

抗肿瘤减毒沙门氏菌 VNP20009 通过 p53 信号通路诱导黑色素瘤细胞凋亡

金天乐¹, 路平², 华子春^{1,2,3,4*}

(1. 中国药科大学生物药物学院, 江苏 南京 211198; 2. 新乡医学院药理学部, 河南 新乡 453003; 3. 南京大学生命科学学院, 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210033; 4. 常州南京大学高新技术研究院/江苏省产业技术研究院医药生物技术研究所, 江苏 常州 213164)

摘要: 减毒鼠伤寒沙门氏菌 VNP20009 是一种具有高肿瘤靶向性的新型溶瘤菌, 其抗肿瘤的机制之一是诱导肿瘤细胞凋亡, 但是具体分子机制尚不明确。黑色素瘤是致死率最高的皮肤癌, 现有治疗手段存在不良反应大、易复发等问题。本研究以小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 为研究模型, 深入探究了 VNP20009 诱导黑色素瘤细胞 B16F10 凋亡的调控机制。结果表明, VNP20009 能够显著诱导 B16F10 细胞凋亡, 且凋亡诱导效应呈现时间和浓度依赖性。通过转录组测序分析发现, p53 信号通路在 VNP20009 处理组中显著富集, 提示该通路可能介导了 VNP20009 的促凋亡效应。进一步研究显示, VNP20009 可以通过激活 p53 通路关键基因 PUMA 及其上下游分子 p53、CytC、CASP9 和 CASP3, 能够形成级联反应, 从而诱导细胞凋亡。本研究阐明了 VNP20009 通过 p53-PUMA 轴激活 B16F10 黑色素瘤细胞内源性凋亡的机制, 为基于减毒沙门氏菌的黑色素瘤治疗提供了新的理论依据。

关键词: 黑色素瘤; 减毒沙门氏菌; p53 信号通路; 细胞凋亡; 基因表达调控

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)05-1208-13

Attenuated *Salmonella typhimurium* VNP20009 induces apoptosis in melanoma cells through the p53 signaling pathway

JIN Tian-le¹, LU Ping², HUA Zi-chun^{1,2,3,4*}

(1. School of Biopharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; 3. The State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, College of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210033, China; 4. High-tech Research Institute of Nanjing University/Pharmaceutical Biotechnology Research Institute of Industrial Technology Research Institutes of Jiangsu Province Institute, Changzhou 213164, China)

Abstract: Attenuated *Salmonella typhimurium* VNP20009 is a novel oncolytic bacterium with high tumor-targeting properties. One of its anti-tumor mechanisms is the induction of tumor cell apoptosis, although the specific molecular mechanisms remain unclear. Melanoma, the deadliest form of skin cancer, is associated with significant challenges, such as severe side effects and high recurrence rates in current treatments. This study used the B16F10 mouse melanoma cell line as a model to explore the regulatory mechanism of VNP20009-induced apoptosis in melanoma cells. The results showed that VNP20009 significantly induced apoptosis in B16F10 cells in a time- and concentration-dependent manner. Transcriptomic analysis revealed that the p53 signaling pathway was

收稿日期: 2025-02-20; 修回日期: 2025-04-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32250016, 82130106, 82404501, 82303774); 江苏省科技厅 (BK20243001, BG2024026, BK20230165, BE2023695); 常州科技局 (CE20246001, CJ20230017, CJ20235009); 江苏靶标生物医药研究所有限公司资助。

*通讯作者 Tel: 13814039758, E-mail: huazc@nju.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0172

significantly enriched in the VNP20009-treated group, suggesting that this pathway might mediate the pro-apoptotic effects of VNP20009. Further investigations demonstrated that VNP20009 induces apoptosis by activating key genes in the p53 pathway, including PUMA, and its upstream and downstream molecules, such as p53, CytC, CASP9, and CASP3, forming a cascade reaction. In conclusion, this study elucidates the molecular mechanism by which VNP20009 induces apoptosis in B16F10 melanoma cells through the p53-PUMA axis, providing new theoretical insights for melanoma treatment based on attenuated *Salmonella* bacteria.

Key words: melanoma; attenuated *Salmonella typhimurium*; p53 signaling pathway; apoptosis; gene expression regulation

近年来, 基于微生物的免疫疗法逐渐成为癌症治疗的研究热点, 其中以 VNP20009 为代表的鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica typhimurium*) 因其独特的抗肿瘤特性而备受关注^[1]。作为一种兼性厌氧菌, 鼠伤寒沙门氏菌能够在低氧的肿瘤微环境中高效富集并侵袭肿瘤细胞^[2,3]。其抗肿瘤活性主要源于其对宿主免疫系统的激活作用, 包括诱导肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs) 的极化、促进细胞毒性 T 细胞 (CTLs) 的浸润以及增强肿瘤微环境的免疫监视能力^[4,5], 进而改善肿瘤免疫微环境^[6]。

此外, 鼠伤寒沙门氏菌还可作为天然的肿瘤靶向载体, 通过主动进入肿瘤组织并以受控方式释放细胞毒性物质, 从而实现了对肿瘤的选择性杀伤^[7,8]。然而, 早期的研究显示, 野生型鼠伤寒沙门氏菌 (如菌株 14028) 在黑色素瘤模型小鼠中虽表现出一定的抗肿瘤效果, 但实验小鼠最终因细菌毒性而死亡^[9]。这一结果促使研究者通过基因工程技术对鼠伤寒沙门氏菌进行改造, 以降低其毒力并增强其肿瘤靶向能力^[10]。

减毒鼠伤寒沙门氏菌 VNP20009 是目前最具潜力的候选菌株之一。该菌株通过删除 *purI* 和 *msbB* 基因, 显著降低了免疫系统的过度激活, 从而在减弱毒性的同时增强了其肿瘤靶向能力^[11,12]。近年来, VNP20009 已被广泛应用于多种癌症的治疗研究, 并与多种抗肿瘤策略联合使用, 包括抗细胞毒性蛋白^[13,14]、干扰素- γ ^[15]、免疫检查点阻断纳米抗体^[16]、免疫调节剂^[17]、肿瘤疫苗^[18], 以及针对促癌基因的 shRNA^[19]等。这些研究不仅验证了 VNP20009 的安全性, 还展示了其在肿瘤治疗中的广阔应用前景。但是, VNP20009 的抗肿瘤作用机制尚未完全阐明, 因此基于 VNP20009 的溶瘤菌改造缺乏理论指导。

在 VNP20009 的抗肿瘤研究中, 黑色素瘤是使用较多的研究模型。黑色素瘤被广泛认为是皮肤癌中最具侵袭性和致命性的一种, 每年在全球范围内导致超过 60 000 人死亡^[20]。尽管在过去几十年中, 研究者投入了大量精力开发多种黑色素瘤治疗方法, 包括手术切除、放射治疗、化学药物治疗、激素治疗和免疫疗法

等, 但这些治疗手段在临床应用中仍存在显著局限性。此外, 黑色素瘤的高复发率和转移倾向进一步限制了现有治疗手段的效果, 导致患者的总生存期 (OS) 较短^[21,22]。因此, 开发高效且不良反应较小的新型治疗策略已成为黑色素瘤研究领域的迫切需求。这也是经常用黑色素瘤模型开展 VNP20009 及其衍生菌株疗效研究的原因之一。

本实验室在 2007 年发现 VNP20009 在体内外模型上能够诱导黑色素瘤细胞凋亡^[23], 但其诱导黑色素瘤细胞凋亡的具体分子机制迄今仍不明确^[24]。本研究旨在揭示 VNP20009 促进黑色素瘤细胞 B16F10 凋亡的作用机制。首先, 通过体外共孵育实验, 本研究证实了 VNP20009 能够显著诱导 B16F10 细胞凋亡, 并呈现时间和浓度依赖性。进一步利用转录组测序技术, 本研究筛选出 p53 信号通路及其下游凋亡相关基因的显著富集, 提示该通路可能介导了 VNP20009 的促凋亡效应。基于此, 本研究进一步聚焦于 p53 信号通路的核心调控节点——p53 上调凋亡因子 (p53 up-regulated modulator of apoptosis, PUMA), 并系统分析了其上下游关键分子: p53、细胞色素 C (cytochrome C, CytC)、半胱天冬酶 9 (caspase 9, CASP9) 及半胱天冬酶 3 (caspase 3, CASP3) 在 mRNA 和蛋白水平的表达变化。通过 qPCR 和 Western blot 验证, 本研究阐明了 VNP20009 通过激活 p53-PUMA 轴级联反应诱导 B16F10 黑色素瘤细胞内源性凋亡的分子机制, 为优化基于减毒沙门氏菌的黑色素瘤治疗策略提供了新的理论依据。

材料与方法

仪器 台式冷冻离心机 (型号: LEGEND MICRO 21R)、细胞培养箱 (型号: IEST-RP-CC001.3), Thermo 公司; 超纯水仪 (型号: IQ 70055, Millipore 公司); 高压灭菌锅 (型号: GR85DA, Zealway 公司); 超声波细胞粉碎机 (型号: 08-III, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 酶标仪 (型号: H1MF, TECAN 公司); 流式细胞仪 (型号: BD Accuri C6 plus, BD 公司); PCR 仪 (型号: TC-E-48D,

杭州博日科技股份有限公司); Real-Time qPCR 仪 (型号: A28567, Applied Biosystems 公司); 电泳系统 (型号: EPS300)、凝胶显影仪 (型号: MINI Space 1000)、化学发光仪 (型号: GloMaxTM20/20 Promega), Tanon 公司。

主要试剂 PBS 磷酸盐缓冲液 (DFQD130024) 购自南京普诺思生物科技有限公司; 蛋白胨 (3581230)、酵母提取物 (4333726-02) 购自英国 Oxoid 公司; 氯化钠 (240915A2) 购自南京化学试剂股份有限公司; 脱脂奶粉 (K807BA0001)、碘化丙啶 (A425259) 购自上海生工生物工程股份有限公司; RPMI1640 完全培养基 (BC20231218)、胰酶-EDTA 溶液 (BC20240903) 购自 Bio-Channel 公司; p53 抑制剂 (A269250220)、Annexin V-APC 结合液 (C1062S) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司; Trizol 溶液 (7F632K2)、cDNA 合成试剂盒 (7F1031I4)、DNA marker (7E750I3)、蛋白 marker (7E0822J4) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; SYBR 染料法 qPCR (15524) 购自北京康为世纪生物科技股份有限公司; 10% PAGE 凝胶试剂盒 (WUKQV) 购自山东思科捷生物技术有限公司思科捷; PVDF 膜 (00003326078) 购自 Millipore 公司; Annexin V-APC 蛋白由本实验前期构建表达菌株并进行发酵表达纯化; p53 抗体、PUMA 抗体购自杭州华安生物技术有限公司; CytC 抗体、CASP9 抗体、CASP3 抗体、Tubulin 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; 其他试剂均为市售分析纯。

细胞培养 小鼠黑色素瘤细胞系 B16F10 购自 ATCC 细胞库并由本实验室保存。B16F10 使用含有 10% 胎牛血清、青霉素 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和链霉素 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 RPMI1640 完全培养基, 置于 95% 湿度和 5% CO_2 的 37 °C 细胞培养箱中培养。

细菌培养 减毒沙门氏菌菌株 VNP20009 由本实验室保存。VNP20009 使用 LB 液体培养基, 置于 37 °C 摇床中进行培养。LB 液体培养基的配置: 称取 5 g 蛋白胨、5 g NaCl 和 2.5 g 酵母粉, 加入 400 mL ddH_2O 中, 充分溶解。将溶液定容至 500 mL, 均匀混合。将溶液分装至 15 mL 玻璃试管和 50 mL 锥形瓶中。对分装的溶液进行灭菌处理后, 保存于室温。

流式细胞术检测 B16F10 细胞凋亡 将细胞培养液吸入适当的离心管中, 使用 PBS 对贴壁细胞进行一次洗涤。加入适量的胰酶消化液 (可含有 EDTA) 对细胞进行消化。随后将消化得到的细胞悬液转移至离心管, $1\ 000 \times g$ 离心 5 min, 弃去上清液。收集细胞, 使用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。取 5 万~10 万计数后的细胞, $1\ 000 \times g$ 离心 5 min, 弃去上清液。将细胞重悬在 195 μL Annexin V-APC 结合液中, 轻轻混匀。加入

5 μL Annexin V-APC, 轻轻混匀。加入 10 μL 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀。室温 (20~25 °C) 避光孵育 10~20 min, 随后将细胞置于冰浴中。孵育完成后, 使用流式细胞仪进行检测。检测完成后根据细胞的 Annexin V 阳性和 PI 阳性比例分析凋亡率。

半数抑制浓度 (IC_{50}) 计算 通过不同浓度 VNP20009 菌株与 B16F10 细胞共同培养后, 使用流式细胞术检测凋亡水平, 使用 GraphPad Prism 9 软件 (9.0.0 版本) 计算 VNP20009 对 B16F10 细胞的 IC_{50} 值。

转录组学测序 收集细胞样品后, 送至上海欧易生物医学科技有限公司完成测序工作。

抑制 B16F10 细胞 p53 基因的表达 在 T25 培养瓶中接种 B16F10 黑色素瘤细胞, 待细胞状态稳定后, 加入终浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p53 抑制剂进行处理, 持续 24 h。随后, 向各组细胞中加入 VNP20009 细菌悬液进行共培养。实验共设 6 个组别: p53 抑制实验组包括 PBS 处理对照组 (control-p53in)、VNP20009 共孵育 8 h 分别以 50 (8 h-50-p53in) 和 100 (8 h-100-p53in) 的 MOI 处理组, 以及 VNP20009 共孵育 16 h 分别以 50 (16 h-50-p53in) 和 100 (16 h-100-p53in) 的 MOI 处理组。同时, 设置 PBS 处理组 (control) 作为无 p53 抑制剂的对照。

B16F10 细胞总 RNA 的提取与 cDNA 合成 向每个含有 B16F10 细胞的 10 cm 培养皿中加入 3 mL Trizol 溶液, 进行细胞裂解。将裂解液收集到 1.5 mL 离心管中, 室温放置 5 min 以确保充分裂解。按照比例 (每 1 mL Trizol 加入 0.2 mL 氯仿), 剧烈震荡 15 s, 形成乳浊液。将乳浊液在 4 °C 下静置 5 min。在 $12\ 000 \times g$ 、4 °C 条件下离心 15 min, 吸取上清液 (含 RNA 的无色水相) 至新的 1.5 mL 离心管中。按照比例 (每 1 mL Trizol 加入 1 mL 75% 乙醇溶液), 轻轻弹离心管底部, 使沉淀悬浮。洗涤后在 4 °C 下静置 5 min。在 $12\ 000 \times g$ 、4 °C 条件下离心 5 min, 弃去上清液。在大于 $5\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 °C 条件下离心 1 s, 离心完成后弃去上清液。待 RNA 稍微干燥后, 按照比例 (每 1 mL Trizol 加入 30 μL DEPC 水) 溶解 RNA, 轻轻混匀后放置在 -80 °C 保存。提取得到的 RNA, 使用逆转录试剂盒合成 cDNA, cDNA 放置于 -20 °C 保存。

qPCR 检测 mRNA 表达水平 采用荧光定量 PCR (qPCR) 检测与 B16F10 黑色素瘤细胞 p53 信号通路相关的基因 (p53、PUMA、CytC、CASP9、CASP3) 的 mRNA 表达水平, 使用 β -actin 作为内参基因。相关引物序列见表 1, 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

B16F10 细胞蛋白样品的提取 用 PBS 溶液润洗

Table 1 Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) primers. PUMA: p53 up-regulated modulator of apoptosis; CytC: Cytochrome C; CASP9: Caspase 9; CASP3: Caspase 3; F: Forward primer; R: Reverse primer

Gene	Sequence (5'-3')
β -Actin-F	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC
β -Actin-R	AGGAGCCAGAGCAGTAATCTC
p53-F	CTCTCCCCGCAAAAGAAAAA
p53-R	CGGAACATCTCGAAGCGTTA
PUMA-F	AGCAGCACTTAGAGTCGCC
PUMA-R	CCTGGTAAGGGGAGGAGT
CytC-F	CCAAATCTCCACGGTCTGTTC
CytC-R	ATCAGGGTATCCTCTCCCCAG
CASP9-F	TCCTGGTACATCGAGACCTTG
CASP9-R	AAGTCCCTTTCGAGAAACAG
CASP3-F	ATGGAGAACAACAAAACCTCAGT
CASP3-R	TTGCTCCCATGTATGGTCTTTAC

含有 B16F10 细胞的 10 cm 培养皿, 之后加入 4 mL PBS, 使用细胞刮刀轻轻刮下细胞并收集至 1.5 mL 离心管中。在 2 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 3 min, 弃去上清液。加入 500 μ L RIPA 裂解液 (含磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂) 重新悬浮细胞, 并在冰上裂解 30 min。使用超声波细胞粉碎机处理细胞样品, 确保细胞完全破碎。裂解完成后, 在 12 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 下离心 15 min, 取上清液。向上清液中加入 5 \times 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 得到样品。样品制备完成后, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

Western blot 检测蛋白表达水平 在 200 V 电压条件下, 使用 10% SDS-PAGE 凝胶分离细胞蛋白样品, 运行时间为 45 min。在 300 mA 电流下, 将分离的蛋白

转膜至 PVDF 膜, 转膜时间为 50 min。使用特异性抗体检测 p53、PUMA、CytC、CASP9 和 CASP3 的蛋白表达水平。Tubulin 作为内参基因用于归一化蛋白表达水平。通过化学发光法检测蛋白条带的强度, 并使用 ImageJ 软件进行分析。

统计学分析 本文使用 GraphPad Prism 9 软件 (版本 9.0.0) 进行数据分析和作图。数据以平均值 \pm 标准误 (SEM) 表示。两组之间的统计学差异通过 *t* 检验进行比较, 而多组之间的差异则采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。*P* 值小于 0.05 被认为具有显著性差异。

结果

1 VNP20009 对 B16F10 细胞的凋亡诱导效果呈时间和剂量依赖性

为探究减毒沙门氏菌 VNP20009 对黑色素瘤细胞 B16F10 的细胞毒性, 本研究建立了体外共培养模型, 通过流式细胞术定量分析细胞凋亡水平。数据显示, 当 MOI 值从 5 提升至 1 000 时, 细胞凋亡率呈现剂量依赖性增长 (图 1A)。另外, 共培养时间延长也会增强细菌浓度与凋亡率之间的相关性 (图 1B~E)。为进一步量化 VNP20009 处理的时间依赖性效应, 本研究对凋亡率数据进行了线性回归分析 (图 1F)。结果显示, 剂量-效应曲线的斜率随共培养时间延长而增加, 4、8、12 和 16 h 处理组的斜率分别为 10.42、26.69、27.68 和 29.46 (表 2)。该趋势进一步表明, 随着共孵育时间的延长, B16F10 细胞对 VNP20009 的敏感性会逐渐增

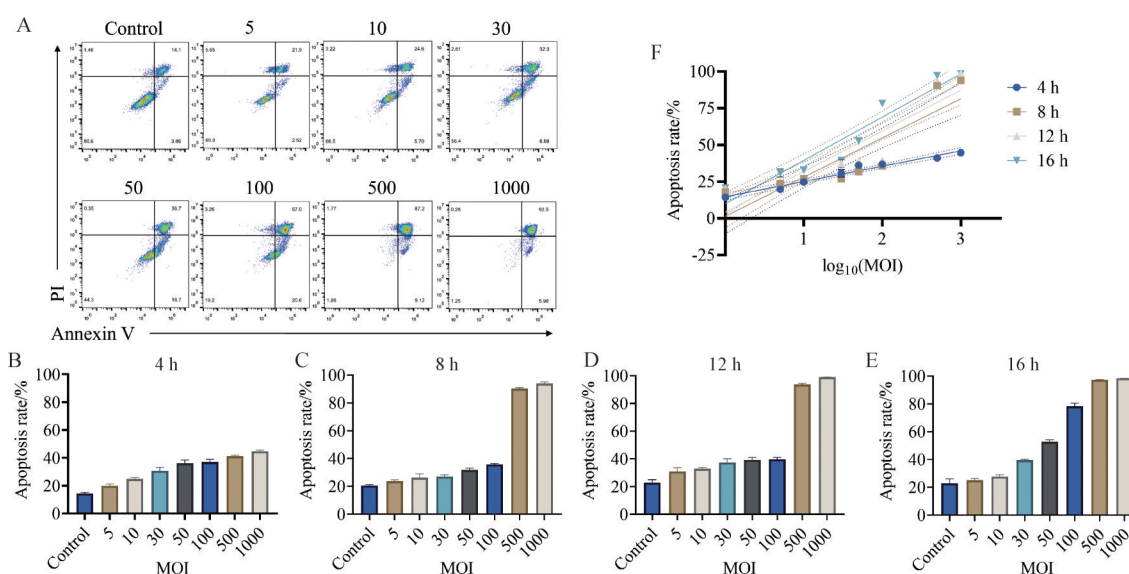


Figure 1 VNP20009 induces apoptosis in B16F10 cells in a time- and concentration-dependent manner. A: Flow cytometric analysis of apoptosis levels in B16F10 cells after co-culturing with different concentrations of VNP20009 for 16 h; B-E: Bar plots showing the analysis of apoptosis rate in B16F10 cells after co-culturing for different durations (4, 8, 12, 16 h); F: Plot of the results obtained from linear regression analysis of apoptosis rate. MOI: Multiplicity of infection

强, 凋亡率随浓度升高的速率加快。上述结果共同表明, VNP20009 对 B16F10 细胞的促凋亡效应具有典型的时间-剂量双重依赖性特征。

Table 2 Results of linear regression analysis of apoptosis rate. *X*: $\log_{10}(\text{MOI})$; *Y*: Apoptosis rate

Time/h	Equation	R^2
4	$Y = 10.42X + 14.72$	0.919 9
8	$Y = 26.69X + 1.403$	0.815 9
12	$Y = 27.68X + 4.253$	0.861 3
16	$Y = 29.46X + 10.05$	0.912 6

基于上述发现, 本研究确定 16 h 为最佳共培养时间, 并建立包含 7 个浓度梯度 (MOI = 5、10、30、50、100、500、1 000) 的实验体系。通过剂量-效应曲线计算得出 VNP20009 的 IC_{50} 为 $(6.874\ 8 \pm 0.121\ 8) \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 这一关键参数为评估菌株的细胞毒性提供了量化依据。

2 沙门氏菌诱导黑色素瘤细胞的转录组学研究

为探究 VNP20009 共孵育处理对 B16F10 细胞信号通路的影响, 本研究设置了 4 个实验组和 1 个对照组。实验组分别为: VNP20009 共孵育 8 h, MOI=50 (vnp-8 h-50); VNP20009 共孵育 8 h, MOI=100 (vnp-8 h-100); VNP20009 共孵育 16 h, MOI=50 (vnp-16 h-50); VNP20009 共孵育 16 h, MOI=100 (vnp-16 h-100)。对照组为 PBS 处理组 (PBS)。

KEGG 富集分析显示, p53 信号通路在多个处理组中呈现显著富集 (图 2A~D)。特别值得关注的是, 与凋亡相关的信号通路 (如 NF- κ B、PI3K-Akt) 虽在部分组别中显现富集, 但 p53 通路的富集分数 (enrichment score) 与显著性水平 (*P* 值) 始终居于首位, 提示其可能作为核心枢纽调控细胞凋亡进程。

GSEA 分析进一步验证了该发现: 在所有处理组中, p53 通路核心基因集均显著上调 (NES=1.74~2.35, $P < 0.001$), 其中高浓度 (MOI=100) 与长时间 (16 h) 处理组的激活程度尤为显著 (图 2E~H)。这些多组学证据共同指向 p53 信号通路在 VNP20009 介导的细胞凋亡中发挥核心作用。

KEGG 和 GSEA 分析的结果共同揭示了 p53 信号通路在 VNP20009 处理中的显著激活, 为后续研究提供了重要的理论依据。

3 PUMA 表达水平的变化与 VNP20009 诱导的 B16F10 细胞凋亡呈强正关联

进一步对 VNP20009 处理组与对照组的转录组数据进行分析, 绘制了差异表达基因火山图 (图 3A~D), 并重点关注了 p53 信号通路中与凋亡相关的基因。结果显示, 大部分凋亡相关基因在 VNP20009 处理后呈

现显著上调趋势, 从而提示: VNP20009 可能通过激活 p53 信号通路来诱导细胞凋亡。

在显著上调的基因中, PUMA (Bbc3) 表现出良好的时间和浓度依赖性。具体而言, 随着处理时间从 8 h 延长至 16 h, PUMA (Bbc3) 的表达量显著增加, 而随着 VNP20009 浓度从 MOI=50 增加至 MOI=100, PUMA (Bbc3) 的表达量也有显著提升。

基于差异基因分析的结果, 本研究进而筛选了 p53 信号通路中与凋亡相关的基因, 并绘制了差异基因表达水平热图 (图 3E)。结果显示, 除 PUMA (Bbc3) 以外, 其相关上下游基因如 p53 (Trp53)、CASP3、CASP9 和 CytC (Cycs) 在实验组中均表现出显著的表达变化。这些基因的表达模式与 p53 信号通路的激活状态一致, 提示它们都参与了 VNP20009 诱导的黑色素瘤 B16F10 细胞凋亡进程。

上述结果表明, PUMA (Bbc3) 作为 p53 信号通路中的关键促凋亡基因, 其显著上调提示其在 VNP20009 诱导的细胞凋亡中可能发挥重要作用。因此, 本研究选择 PUMA (Bbc3) 及其上下游相关基因作为后续研究的重点, 检测其 mRNA 和蛋白表达水平, 以进一步验证转录组测序结果的可靠性, 揭示 VNP20009 诱导 B16F10 细胞凋亡的作用机制。

4 VNP20009 对 PUMA 上下游凋亡相关基因在 mRNA 表达水平的调控

为进一步探讨 VNP20009 对 p53 信号通路中凋亡相关基因的调控作用, 本研究通过 qPCR 分析了 PUMA 及其上下游相关基因 (p53、CASP3、CASP9、CytC) 的 mRNA 表达水平, 并结合不同的处理时间 (8、16 h) 和浓度 (MOI=50、MOI=100) 对其表达变化进行评估。结果表明, p53、PUMA、CASP3 和 CytC 基因的 mRNA 表达均显著上调, 而 CASP9 的 mRNA 表达在各实验组中未显示出明显的差异 (图 4)。

p53 作为 p53 信号通路的核心调控因子, 其 mRNA 表达在 VNP20009 处理后被显著激活, 并且随着处理时间和浓度的延长呈现出明显的时间与剂量依赖性 (图 4A)。PUMA 作为 p53 信号通路中的重要促凋亡基因, 其 mRNA 水平同样在 VNP20009 作用后明显上调, 且随着处理条件的加强进一步提升 (图 4B)。此外, 关键凋亡相关因子 CytC 的 mRNA 表达在 VNP20009 处理后显著增强, 并表现出与作用时长和菌株浓度双重相关的上调趋势 (图 4C)。而 CASP3 和 CASP9 作为凋亡进程中起始因子和执行分子, 其 mRNA 表达水平同样提高, 与 VNP20009 的处理条件呈正相关 (图 4D、E)。

综上所述, VNP20009 显著上调了 p53 信号通路中 p53、PUMA、CytC 和 CASP3 的 mRNA 表达水平, 且其

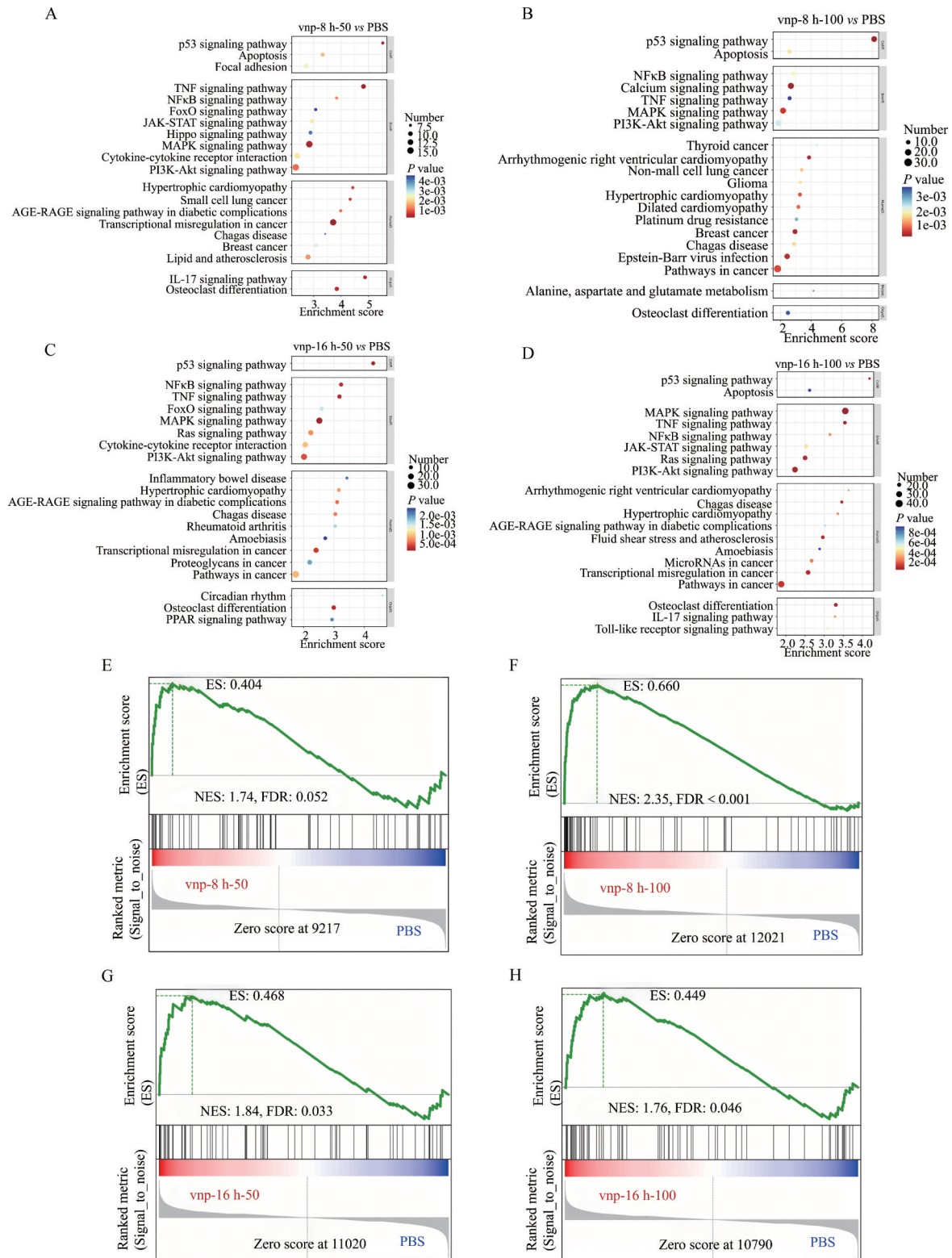


Figure 2 Results of Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis and gene set enrichment analysis (GSEA). A–D: Bubble plots of the top 20 upregulated pathways obtained by KEGG enrichment analysis, comparing the VNP20009 experimental groups with the PBS control group. The X-axis represents the enrichment score, where larger bubbles indicate a greater number of differentially expressed protein-coding genes involved in the pathway. The bubble color gradient ranges from blue to white to yellow to red, with smaller *P*-values indicating higher statistical significance; E–H: GSEA plots of the p53 signaling pathway obtained by comparing the VNP20009 experimental groups with the PBS control group. vnp-8 h-50: VNP20009 co-cultured for 8 h, MOI=50; vnp-8 h-100: VNP20009 co-cultured for 8 h, MOI=100; vnp-16 h-50: VNP20009 co-cultured for 16 h, MOI=50; vnp-16 h-100: VNP20009 co-cultured for 16 h, MOI=100

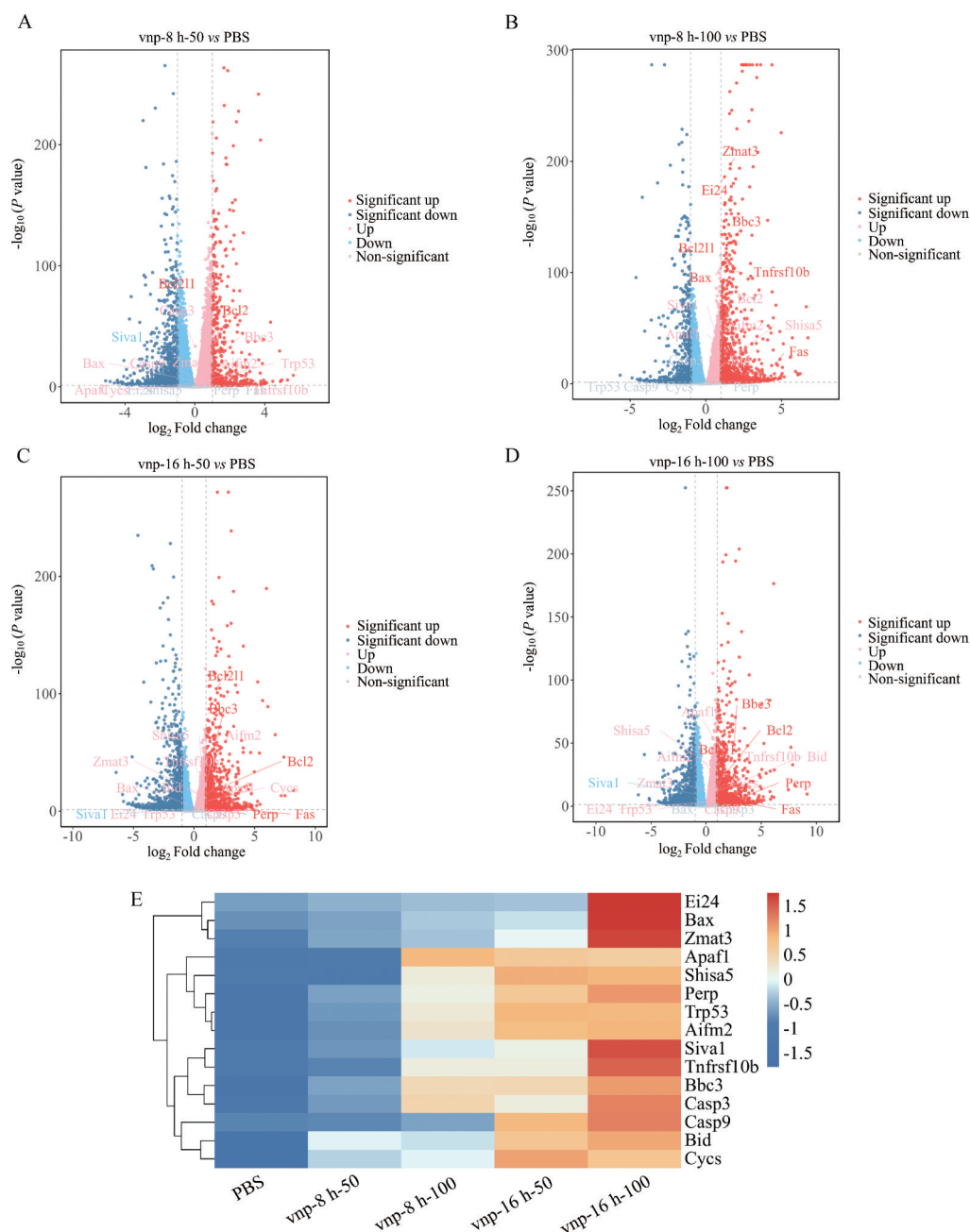


Figure 3 The expression level of PUMA (Bbc3) shows a positive correlation with VNP20009-induced apoptosis in B16F10 cells. A-D: Volcano plots of differentially expressed genes obtained by comparing the VNP20009 experimental groups with the PBS control group, highlighting apoptosis-related genes in the p53 signaling pathway; E: Heatmap of differential gene expression levels showing clustering analysis of apoptosis-related genes in the p53 signaling pathway, PUMA (Bbc3) exhibits a strong time- and concentration-dependent expression pattern. DEGs were identified by $P < 0.05$ and $|\log_2FC| > 1$

调控作用具有明显的时间和浓度依赖性。这些结果证明 PUMA 是 p53 信号通路中的关键促凋亡基因, 其上下游基因在该过程中发挥着重要作用, 为进一步揭示 VNP20009 的作用机制提供了有力的证据。

5 VNP20009 对 PUMA 上下游凋亡相关基因在蛋白表达水平的调控

为验证 VNP20009 通过 PUMA 相关信号通路调控 B16F10 细胞凋亡的分子机制, 本研究进一步通过

Western blot 分析了多个关键蛋白的表达水平。结果显示, VNP20009 处理显著上调了 p53、PUMA、CytC、CASP9 和 CASP3 的蛋白表达水平 (图 5A)。

p53 蛋白的表达量在 VNP20009 处理后显著上调, 且随着处理时间的延长和 MOI 的增加呈现出明显的时间与浓度依赖性 (图 5B)。PUMA 蛋白的表达量同样在 VNP20009 作用下明显升高, 且变化趋势与 p53 保持一致 (图 5C)。CytC 蛋白表达水平在 VNP20009 处

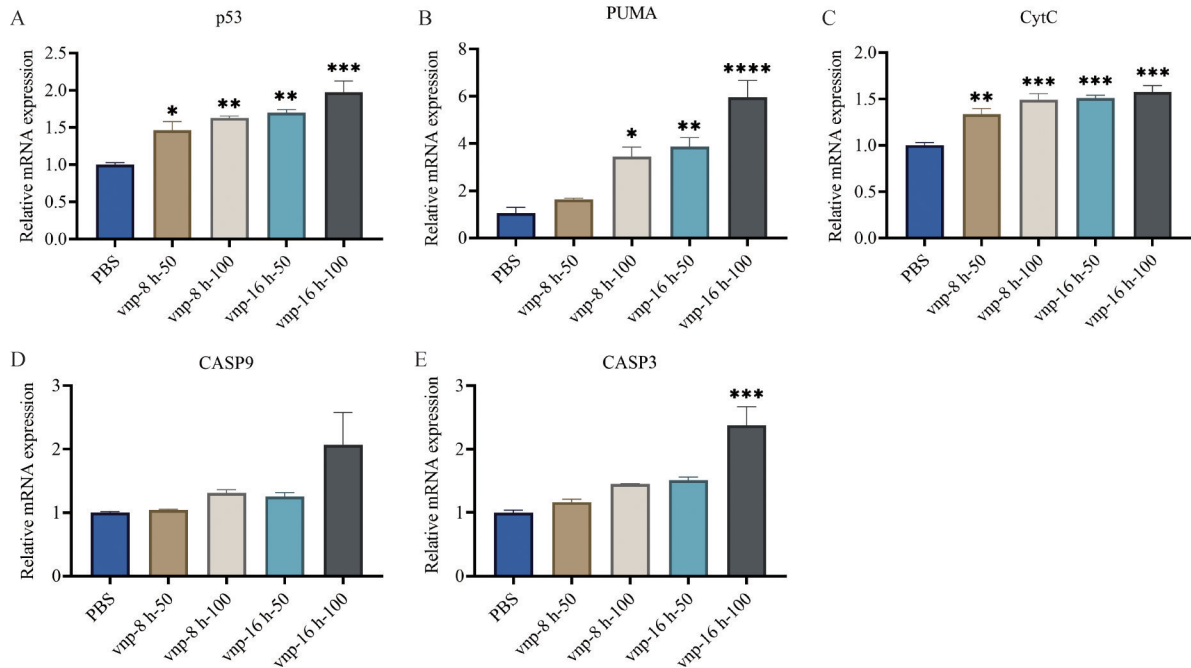


Figure 4 Regulation of PUMA and its upstream and downstream apoptosis-related genes at the mRNA expression level by VNP20009. A–E: Relative mRNA expression levels of p53 (A), PUMA (B), CytC (C), CASP9 (D), and CASP3 (E) gene in B16F10 cells under different experimental conditions. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs PBS (control group)

理后显著增加,且随处理条件的增强而进一步升高,呈现出 VNP20009 处理时间和浓度的依赖性(图 5D)。此外, CASP9 和 CASP3 蛋白的表达量也在 VNP20009 处理后得到显著提升,其变化水平也与处理时间和浓度

呈正相关(图 5E、F)。

这些结果共同表明, VNP20009 能够激活转录因子 p53 的表达、同时激活下游 PUMA、CytC、CASP9 及 CASP3 的蛋白表达,最终导致 B16F10 细胞凋亡。这

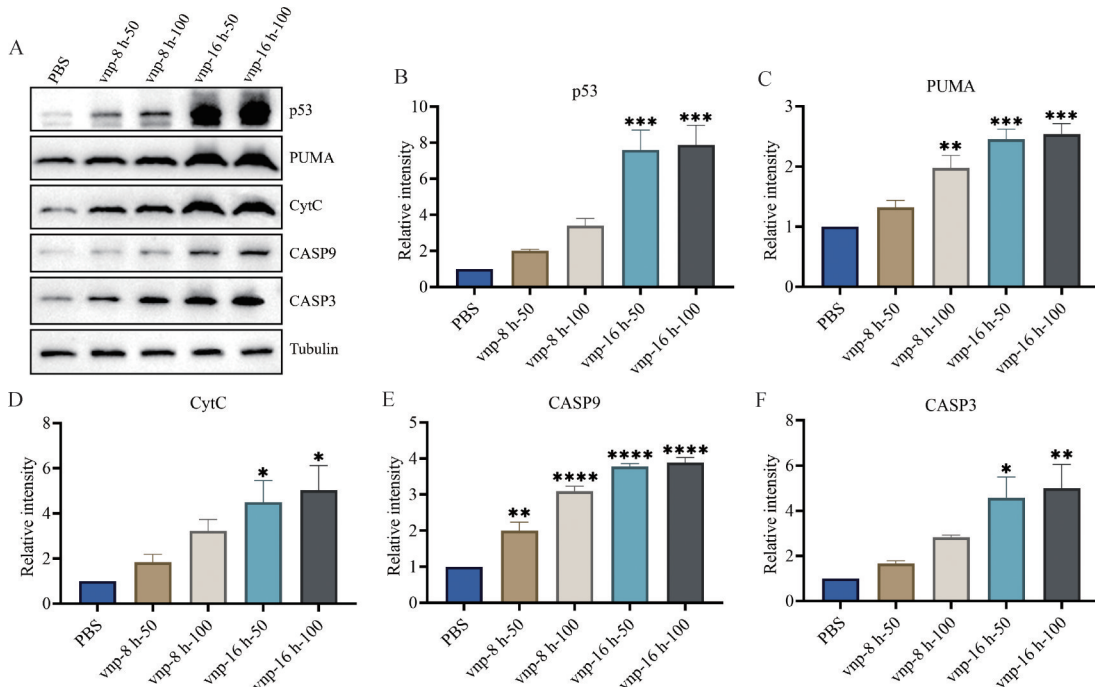


Figure 5 Regulation of PUMA and its upstream and downstream apoptosis-related genes at the protein expression level by VNP20009. A: Western blot analysis showing the protein expression levels of p53, PUMA, CytC, CASP9, and CASP3 in B16F10 cells under different experimental conditions; B–F: Bar plots showing the relative protein expression levels of p53, PUMA, CytC, CASP9, and CASP3 in B16F10 cells under different experimental conditions. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs control group

些发现不仅确认了PUMA及其上下游基因在p53凋亡相关信号通路中的关键作用,也阐明了VNP20009通过激活p53-PUMA轴激活B16F10黑色素瘤细胞内源性凋亡的分子机制。

6 转录与翻译水平解析VNP20009诱导黑色素瘤细胞凋亡的分子机制

为了系统解析VNP20009调控B16F10细胞凋亡的分子机制,本研究进一步对qPCR的检测结果进行综合分析,以解释PUMA上下游凋亡相关基因的协同响应模式。

结果表明,经VNP20009处理后,黑色素瘤细胞B16F10中p53、PUMA、CytC、CASP9和CASP3的mRNA表达量都随着VNP20009浓度的增加和处理时间的延长而逐渐上调(图4)。值得注意的是,PUMA的mRNA表达量呈现出最为显著的上调趋势,表明其mRNA表达水平与VNP20009浓度和处理时间有着高度相关性,进一步证明PUMA在VNP20009诱导黑色素瘤细胞凋亡的过程中可能起到核心作用。

图5清晰地展示了各个基因的蛋白表达水平在不同实验条件下的表达差异与变化趋势。该结果证实,经VNP20009诱导后,位于凋亡信号调控起点的转录因子p53的表达水平呈现出最明显的上调趋势,并且与凋亡信号终端的胱天蛋白酶CASP3的表达趋势几乎完全重叠;CytC的表达趋势与p53的表达趋势也高度相似。其次,CASP9与PUMA之间的表达趋势表现出高度一致,同时CASP9与PUMA的表达趋势同样也与p53的表达趋势关联。

为进一步阐明p53信号通路的调控特征,本研究对转录及蛋白表达数据进行线性拟合分析(图6A、B)。结果显示,p53的mRNA表达量虽然随VNP20009处理呈现上调趋势,但其转录水平的变化响应相对平缓(拟合斜率较低),而p53蛋白表达量则在处理后显著升高,且在16 h-100组达到峰值。另外,PUMA基因的mRNA表达量对VNP20009处理表现出最强烈的响应

(拟合斜率最大),但其蛋白表达量的上调幅度却是最小,提示PUMA的翻译效率可能受到其他机制的调控。相比之下,CytC、CASP9及CASP3在mRNA和蛋白水平的表达趋势高度一致,且均与p53的表达水平呈正相关。这一结果不仅证实p53是该通路的核心调控因子,还表明VNP20009通过激活p53-PUMA轴,驱动黑色素瘤细胞B16F10的内源性凋亡。

综合上述结果,VNP20009通过激活p53信号通路诱导B16F10细胞凋亡,其机制涉及多层次的基因表达调控:p53在蛋白水平的显著上调主导了通路的启动,PUMA作为关键中间分子连接p53与凋亡途径,而CytC、CASP9和CASP3的同步激活则最终执行凋亡程序。未来研究需进一步探索PUMA翻译调控的具体机制,以完善基于p53通路的溶瘤菌治疗策略。

7 p53抑制剂对VNP20009诱导黑色素瘤细胞凋亡的调控作用

为了进一步验证p53对PUMA调控作用及其在凋亡通路中的核心地位,本研究在VNP20009与B16F10细胞共培养前预先加入p53抑制剂,以阻断p53的激活,并评估其对下游靶基因PUMA的调控效应。实验结果显示,在各组处理条件下,相较于未加入抑制剂的样本,p53抑制剂显著降低了p53的mRNA表达水平(图7A),这表明p53抑制剂在VNP20009处理后能够有效抑制p53的转录活性。同时,PUMA的mRNA表达也明显下降,其变化趋势与p53保持一致(图7B)。值得注意的是,即使在p53受抑制的条件下,随着VNP20009处理时间和浓度的增加,p53和PUMA的mRNA表达量仍呈逐步上升趋势,这进一步验证了该信号通路在VNP20009诱导细胞凋亡过程中的关键调控作用。

此外,本研究进一步探讨了p53抑制剂对蛋白表达水平的影响。Western blot结果显示,p53抑制剂显著降低了p53蛋白的表达水平,并导致PUMA蛋白同步下调(图7C),表明p53在调控PUMA翻译过程中的

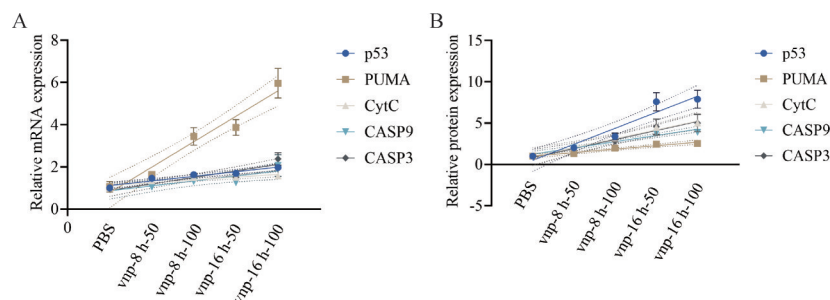


Figure 6 Analysis of the molecular mechanisms underlying VNP20009-induced apoptosis in melanoma cells at the transcriptional levels. A: Plot of the results obtained from linear regression analysis of relative mRNA expression level; B: Plot of the results obtained from linear regression analysis of relative protein expression level

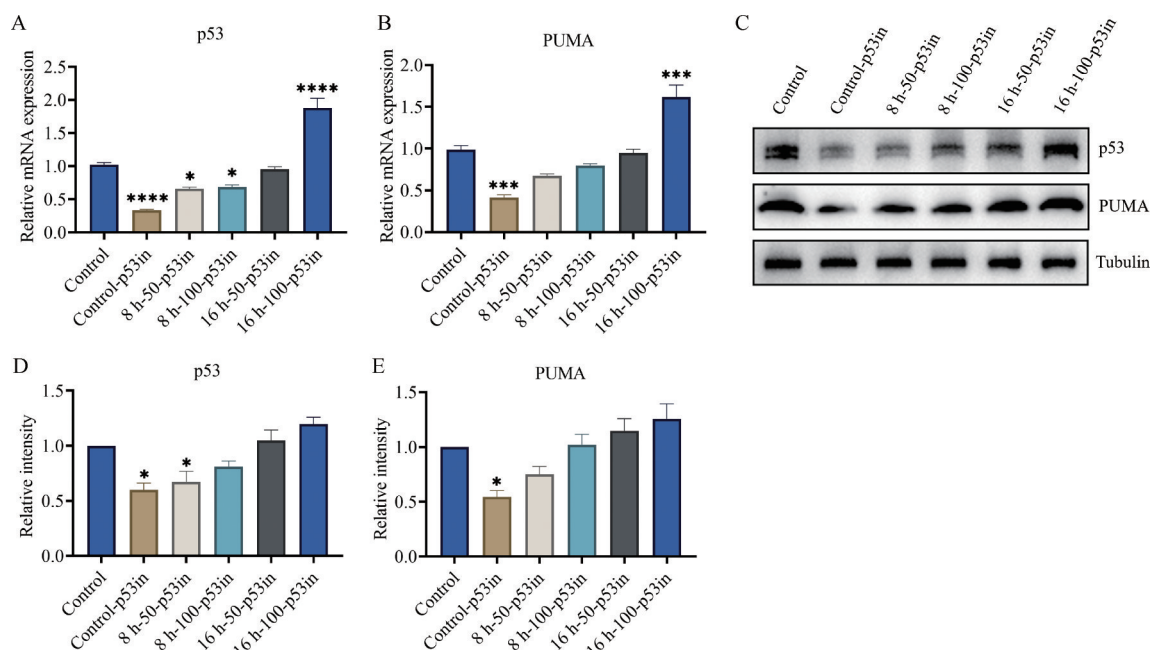


Figure 7 Regulatory effect of p53 inhibitor on VNP20009-induced apoptosis in melanoma cells. A, B: Relative mRNA expression levels of the p53 (A) and PUMA (B) gene in B16F10 cells under different experimental conditions after p53 inhibition; C: Western blot analysis showing the protein expression levels of p53 and PUMA in B16F10 cells under different experimental conditions after p53 inhibition; D, E: Bar plots showing the relative protein expression levels of p53 and PUMA in B16F10 cells under different experimental conditions. Control: PBS-treated group without p53 inhibitor; Control-p53in: PBS-treated group with p53 inhibitor; 8 h-50-p53in: VNP20009 co-cultured for 8 h, MOI=50 under p53 inhibition; 8 h-100-p53in: VNP20009 co-cultured for 8 h, MOI=100 under p53 inhibition; 16 h-50-p53in: VNP20009 co-cultured for 16 h, MOI=50 under p53 inhibition; 16 h-100-p53in: VNP20009 co-cultured for 16 h, MOI=100 under p53 inhibition. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs control group

直接作用。更为重要的是,在不同 VNP20009 处理条件下, p53 与 PUMA 蛋白表达上调的趋势依然高度一致(图 7D、E),说明即使 p53 活性部分受到抑制,其下游凋亡信号通路仍能被部分激活。

上述结果显示,在未使用 p53 抑制剂的情况下, VNP20009 处理显著提升了二者的 mRNA 和蛋白表达水平,且随作用时间的延长和 MOI 的增大而进一步上调,呈现出明显的时间-剂量依赖性。而在加入 p53 抑制剂后, p53 与 PUMA 的上调效应被明显抑制,无论在转录还是翻译水平,其表达量均明显低于未抑制条件。尽管 p53 抑制剂显著抑制了 VNP20009 诱导的 p53 和 PUMA 上调趋势,但在不同处理时间和浓度下, p53 与 PUMA 的表达仍然呈现出微弱的时间与剂量依赖性提升,提示可能存在 p53 非依赖性的残留调控机制。总体而言,这些结果进一步验证了 p53 对 PUMA 表达的正向调控作用,并为针对该信号通路的靶向干预提供了直接的分子依据。

讨论

近年来,基于溶瘤菌的抗癌疗法作为一种前沿的

癌症治疗选择,已引起广泛关注^[25,26]。兼性厌氧菌(如鼠伤寒沙门氏菌)在抗癌研究中备受重视,因为它们具有在不同氧浓度下靶向攻击肿瘤的天然能力,并能通过强大的免疫原性激活免疫系统,进而摧毁动物模型中的肿瘤^[27,28]。然而,鼠伤寒沙门氏菌也同时是引起人类沙门氏菌病的致病菌^[29]。因此,为了确保其在癌症治疗中的安全应用,必须对其毒性进行有效减弱,从而使其成为一种可行的治疗选择^[30]。

VNP20009 是一种经过广泛研究的减毒沙门氏菌株,采用了敲除 *purI* 和 *msbB* 基因的策略,使其毒性显著降低,减少了因脓毒症引起休克的风险,为其在黑色素瘤治疗中的应用提供了更安全的基础^[31,32]。具体而言, *msbB* 突变使得菌株诱导宿主产生的 TNF- α 水平大幅降低,从而减少了宿主因 TNF- α 引起的感染性休克^[33]。为了进一步提升菌株在肿瘤中的特异性定植能力,研究者还敲除了 VNP20009 的 *purI* 基因,使其生长能力依赖于环境中的嘌呤浓度,从而更易在富含嘌呤的区域(肿瘤组织内部)定植和扩增^[34]。前期研究表明,在相同菌株浓度下, VNP20009 对宿主细胞的毒性明显减弱,确保了其作为抗肿瘤载体的安全性^[35]。基

于生物安全性、肿瘤靶向性及明确的全基因组特性, VNP20009已在多种动物肿瘤模型和癌症患者I期临床试验中得到广泛研究,包括黑色素瘤^[36]、乳腺癌^[37]及结肠癌^[38]。目前,已有多项基于动物体内实验的研究探讨了VNP20009治疗肿瘤的机制^[39,40],但关于VNP20009在体外杀伤黑色素瘤细胞的分子机制的研究尚显不足。本研究系统揭示了VNP20009通过激活p53-PUMA轴级联反应,诱导B16F10细胞内源性凋亡的分子机制,为基于溶瘤菌的黑色瘤治疗及其进一步改造提供了新的理论支持。

本研究通过体外实验验证了VNP20009能够显著诱导B16F10黑色素瘤细胞的凋亡,且该效应呈时间和浓度依赖性 [$IC_{50} = (6.8748 \pm 0.1218) \times 10^6$ CFU·mL⁻¹]。转录组测序进一步揭示,p53信号通路在多个实验组中显著富集,其富集分数和标准化富集分数均高于其他凋亡相关通路(如NF- κ B和PI3K-Akt通路)。这一发现与现有研究一致,表明在DNA损伤或细胞应激条件下,p53信号通路通过调控促凋亡基因(如PUMA)来诱导细胞凋亡。特别值得注意的是,本研究揭示了VNP20009通过p53-PUMA轴诱导黑色素瘤细胞凋亡的分子机制,填补了沙门氏菌直接诱导黑色素瘤细胞凋亡发挥抗肿瘤作用机制的研究空白。

此前有研究表明,PUMA作为p53的直接靶基因,可以介导由p53信号通路触发的凋亡效应,如辐射、DNA损伤药物及缺氧等应激条件均通过PUMA依赖的线粒体途径诱导细胞凋亡^[41,42]。本研究进一步发现,VNP20009诱导的黑色瘤细胞凋亡同样依赖于PUMA的调控,PUMA的表达量随p53同步增加,显著增强了B16F10细胞对VNP20009的敏感性。qPCR的结果表明,PUMA的mRNA表达量在高浓度(MOI=100)和长时间(16h)处理组中能达到对照组的5.7倍,证明其在B16F10细胞的p53凋亡信号通路中发挥了重要作用。

另外,本研究通过p53抑制剂干预实验,进一步探究了p53与PUMA之间的相关性,并证明在VNP20009诱导B16F10细胞凋亡的过程中p53对PUMA表达水平的直接调控作用。实验数据表明,p53抑制剂显著抑制了VNP20009诱导的p53和PUMA表达上调(mRNA表达量分别降至32.52%和41.51%),这一结果直接证实了p53对PUMA的正向调控关系。值得注意的是,尽管抑制剂处理大幅削弱了p53活性,但残留的p53和PUMA仍呈现微弱的时间-剂量依赖性上调,提示可能存在p53非依赖的调控机制。这一现象与既往研究报道的凋亡通路代偿性激活机制一致,如NF- κ B或MAPK通路可能通过交叉调控维持部分凋亡信号^[43]。

除此之外,尽管PUMA的mRNA表达量对VNP20009处理响应最为强烈,但其蛋白表达量的上调幅度却相对较小,提示其翻译过程可能受到其他机制调控。本实验室前期研究发现,B16F10细胞在经VNP20009处理后能够激活自噬作为保护性应答^[44]。同时,自噬可通过降解PUMA蛋白来拮抗细胞凋亡进程,而抑制自噬则能够稳定PUMA蛋白并促进细胞凋亡^[44,45]。基于此,本课题组推测B16F10细胞可能通过自噬途径部分降解PUMA蛋白,导致其蛋白表达量的增幅受限,而转录水平的上调则反映了p53对PUMA的直接激活。这一机制或为优化溶瘤菌疗法提供新的干预靶点。

尽管在VNP20009处理后,CASP9的mRNA水平未出现显著性上调,但其蛋白表达量仍呈现上升趋势,与p53信号通路的激活状态及CASP9蛋白水平的增加趋势一致。这一结果可能受到复杂的多层次调控机制影响,包括转录后调控、蛋白降解途径以及翻译后修饰等因素^[46,47]。首先,CASP9在细胞凋亡通路中的激活不仅依赖于转录水平,其翻译效率很可能在凋亡信号的刺激下显著增强。如在凋亡小体中,CASP9通过与Apaf-1和细胞色素c相互作用后发生自剪切活化^[48,49],这一过程伴随翻译后修饰和蛋白稳定性的变化,使得蛋白表达水平显著增加。此外,VNP20009处理可能通过抑制蛋白酶体介导的蛋白降解途径,增强CASP9蛋白的稳定性并促进其在细胞内的积累。研究表明,XIAP等抗凋亡蛋白能够调控CASP9的降解过程及其活性状态^[50]。因此,VNP20009可能通过影响这些调控机制,间接导致CASP9蛋白水平的增加。另一方面,CASP9的翻译后修饰同样可能影响其活化状态,其在凋亡小体内的自剪切可生成D315和D330两个新的表型,因此Western blot检测到的上调可能反映了这种活化过程,而qPCR仅反映总体mRNA水平,无法捕捉翻译后修饰和蛋白活化的动态变化^[51]。结合以上因素,本课题组推测,VNP20009处理后观察到的CASP9蛋白水平上调,可能主要归因于翻译后调控、蛋白稳定性增强及翻译后修饰等机制的共同作用,而非单纯的转录激活。

p53作为被广泛研究的癌症相关基因,其功能已经在多种肿瘤模型中被充分验证^[52]。CytC、CASP9和CASP3作为经典的凋亡相关蛋白,在线粒体依赖性凋亡通路中占据重要地位,其功能机制也已得到广泛研究^[53,54]。而PUMA作为p53的直接靶基因,能够通过促进CytC的释放,进而激活CASP9和CASP3的表达,最终诱导细胞凋亡。这一机制不仅将p53与经典的凋亡执行分子联系起来,还阐明了VNP20009通过p53-

PUMA 轴激活 B16F10 黑色素瘤细胞内源性凋亡的机制。PUMA 的枢纽作用为理解 VNP20009 的抗肿瘤效应提供了关键理论依据,同时也为基于 p53 通路的黑色素瘤治疗策略提供了新的研究方向。本实验室未来将探讨利用合成生物学手段,进一步增加 VNP20009 诱导细胞凋亡的抗肿瘤活性,同时探索与其他治疗方法(如免疫检查点抑制剂等)的联合应用,通过多靶点协同进一步增强溶瘤菌的抗肿瘤效果。

作者贡献: 金天乐负责实验操作、结果分析与统计、文章写作;路平参与了部分实验与结果分析;华子春负责论文的构思、指导和论文修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Pérez Jorge G, Gontijo M, Silva MFE, et al. Attenuated mutants of *Salmonella enterica typhimurium* mediate melanoma regression via an immune response [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2024, 249: 10081.
- [2] Cossart P, Sansonetti PJ. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens [J]. *Science*, 2004, 304: 242-248.
- [3] Li CY, Li Q, Hua ZC. Gene therapy mediated by attenuated *Salmonella* [J]. *Chin Bull Life Sci (生命科学)*, 2023, 35: 252-266.
- [4] Chen J, Qiao Y, Chen G, et al. *Salmonella* flagella confer anti-tumor immunological effect via activating Flagellin/TLR5 signalling within tumor microenvironment [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 3165-3177.
- [5] Tan W, Duong MT, Zuo C, et al. Targeting of pancreatic cancer cells and stromal cells using engineered oncolytic *Salmonella typhimurium* [J]. *Mol Ther*, 2022, 30: 662-671.
- [6] Hua SQ, Hua ZC. Advances and applications of bacteriotherapy in the clinical treatment of tumors [J]. *J Nanjing Med Univ (Nat Sci)* (南京医科大学学报(自然科学版)), 2023, 43: 589-594.
- [7] Zheng DW, Chen Y, Li ZH, et al. Optically-controlled bacterial metabolite for cancer therapy [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 1680.
- [8] Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10: 785-794.
- [9] Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 4537-4544.
- [10] Liang K, Liu Q, Li P, et al. Genetically engineered *Salmonella typhimurium*: recent advances in cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2019, 448: 168-181.
- [11] Li J, Bao FF, Li JH, et al. Effects of temperature, pH, and H₂O₂ on the growth and biofilm formation of attenuated *Salmonella* VNP20009 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1606-1611.
- [12] Jia LJ, Xu HM, Ma DY, et al. Enhanced therapeutic effect by combination of tumor-targeting *Salmonella* and endostatin in murine melanoma model [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4: 840-845.
- [13] Chen J, Yang B, Cheng X, et al. *Salmonella*-mediated tumor-targeting TRAIL gene therapy significantly suppresses melanoma growth in mouse model [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103: 325-333.
- [14] Jiang SN, Park SH, Lee HJ, et al. Engineering of bacteria for the visualization of targeted delivery of a cytolytic anticancer agent [J]. *Mol Ther*, 2013, 21: 1985-1995.
- [15] Yoon W, Park YC, Kim J, et al. Application of genetically engineered *Salmonella typhimurium* for interferon-gamma-induced therapy against melanoma [J]. *Eur J Cancer*, 2017, 70: 48-61.
- [16] Wu L, Li L, Li S, et al. Macrophage-mediated tumor-targeted delivery of engineered *Salmonella typhimurium* VNP20009 in anti-PD1 therapy against melanoma [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 3952-3971.
- [17] Al-Ramadi BK, Fernandez-Cabezudo MJ, El-Hasasna H, et al. Potent anti-tumor activity of systemically-administered IL2-expressing *Salmonella* correlates with decreased angiogenesis and enhanced tumor apoptosis [J]. *Clin Immunol*, 2009, 130: 89-97.
- [18] Ye J, Li L, Zhang Y, et al. Recombinant *Salmonella*-based 4-1BBL vaccine enhances T cell immunity and inhibits the development of colorectal cancer in rats: *in vivo* effects of vaccine containing 4-1BBL [J]. *J Biomed Sci*, 2013, 20: 8.
- [19] Zhang L, Gao L, Zhao L, et al. Intratumoral delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium carrying plasmid-based small interfering RNAs [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 5859-5864.
- [20] Schadendorf D, van Akkooi ACJ, Berking C, et al. Melanoma [J]. *Lancet*, 2018, 392: 971-984.
- [21] Patyar S, Joshi R, Byrav DSP, et al. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy [J]. *J Biomed Sci*, 2010, 17: 21.
- [22] Khan M, Dong Y, Ullah R, et al. Recent advances in bacterium-based therapeutic modalities for melanoma treatment [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13: e2401076.
- [23] Jia LJ, Wei DP, Sun QM, et al. Oral delivery of tumor-targeting *Salmonella* for cancer therapy in murine tumor models [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98: 1107-1112.
- [24] Liu L, Li Q, Chen C, et al. Oncolytic bacteria VNP20009 expressing IFN β inhibits melanoma progression by remodeling the tumor microenvironment [J]. *iScience*, 2024, 27: 109372.
- [25] Pérez Jorge G, Módolo DG, Jaimes-Florez YP, et al. p53 gene delivery via a recombinant *Salmonella enterica typhimurium* leads to human bladder carcinoma cell death *in vitro* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2022, 75: 1010-1020.
- [26] Chen W, Zhu Y, Zhang Z, et al. Advances in *Salmonella typhimurium*-based drug delivery system for cancer therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 185: 114295.
- [27] Zhou S, Gravekamp C, Bermudes D, et al. Tumor-targeting bacteria engineered to fight cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18: 727-743.
- [28] Gao S, Jung JH, Lin SM, et al. Development of oxytolerant

- Salmonella typhimurium* using radiation mutation technology (RMT) for cancer therapy [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 3764.
- [29] Rogers AWL, Tsois RM, Bäumlér AJ. *Salmonella versus the microbiome* [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2021, 85: e00027-19.
- [30] Kolaczowska E, Jenne CN, Surewaard BGJ, et al. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6673.
- [31] Lü ZR, Li DY, Zhu YY, et al. Advances in *Salmonella*-mediated targeted tumor therapy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 17-24.
- [32] Luo X, Li Z, Lin S, et al. Antitumor effect of VNP20009, an attenuated *Salmonella*, in murine tumor models [J]. *Oncol Res*, 2001, 12: 501-508.
- [33] Wang Y, Chen J, Tang B, et al. Systemic administration of attenuated *Salmonella typhimurium* in combination with interleukin-21 for cancer therapy [J]. *Mol Clin Oncol*, 2013, 1: 461-465.
- [34] Zheng JH, Min JJ. Targeted cancer therapy using engineered *Salmonella typhimurium* [J]. *Chonnam Med J*, 2016, 52: 173-184.
- [35] Wu L, Li L, Qiao L, et al. Programmable bacteria with dynamic virulence modulation system for precision antitumor immunity [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11: e2404069.
- [36] Wu L, Qiao L, Zhang S, et al. Dual-engineered macrophage-microbe encapsulation for metastasis immunotherapy [J]. *Adv Mater*, 2024, 36: e2406140.
- [37] Low KB, Ittensohn M, Le T, et al. Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNF α induction retain tumor-targeting *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 37-41.
- [38] Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, et al. *Salmonella typhimurium* engineered to produce CCL21 inhibit tumor growth [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58: 769-775.
- [39] Yin T, Liu LN, Dong SD, et al. Research on anti-tumor mechanism of attenuated *Salmonella typhimurium* VNP20009 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 2700-2706.
- [40] Ahmed SG, Oliva G, Shao M, et al. Intratumoral injection of schwannoma with attenuated *Salmonella typhimurium* induces antitumor immunity and controls tumor growth [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119: e2202719119.
- [41] Niizuma K, Endo H, Nito C, et al. Potential role of PUMA in delayed death of hippocampal CA1 neurons after transient global cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2009, 40: 618-625.
- [42] Avila JL, Grundmann O, Burd R, et al. Radiation-induced salivary gland dysfunction results from p53-dependent apoptosis [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 73: 523-529.
- [43] Yuan J, Ofengeim D. A guide to cell death pathways [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25: 379-395.
- [44] Zhang X, Xu Q, Zhang Z, et al. Chloroquine enhanced the anticancer capacity of VNP20009 by inhibiting autophagy [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29774.
- [45] Xie W, Zhang L, Jiao H, et al. Chaperone-mediated autophagy prevents apoptosis by degrading BBC3/PUMA [J]. *Autophagy*, 2015, 11: 1623-1635.
- [46] Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24: 1380-1389.
- [47] Avrutsky MI, Troy CM. Caspase-9: a multimodal therapeutic target with diverse cellular expression in human disease [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 701301.
- [48] An HK, Chung KM, Park H, et al. CASP9 (caspase 9) is essential for autophagosome maturation through regulation of mitochondrial homeostasis [J]. *Autophagy*, 2020, 16: 1598-1617.
- [49] Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123: 3209-3214.
- [50] Han J, Hou W, Goldstein LA, et al. A complex between Atg7 and caspase-9: a novel mechanism of cross-regulation between autophagy and apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 6485-6497.
- [51] Denault JB, Eckelman BP, Shin H, et al. Caspase 3 attenuates XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)-mediated inhibition of caspase 9 [J]. *Biochem J*, 2007, 405: 11-19.
- [52] Liu Y, Su Z, Tavana O, et al. Understanding the complexity of p53 in a new era of tumor suppression [J]. *Cancer Cell*, 2024, 42: 946-967.
- [53] Matsuyama S, Reed JC. Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation [J]. *Cell Death Differ*, 2000, 7: 1155-1165.
- [54] Czabotar PE, Garcia-Saez AJ. Mechanisms of Bcl-2 family proteins in mitochondrial apoptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24: 732-748.