

# 溶瘤病毒介导碱基编辑靶向杀伤宫颈癌细胞

徐欢欢<sup>1,2</sup>, 李斯微<sup>2</sup>, 罗希<sup>1</sup>, 周祖平<sup>1,3\*</sup>, 毕昌昊<sup>2</sup>

1 广西师范大学 生命科学学院 广西高校干细胞与医药生物技术重点实验室, 广西 桂林 541004

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津 300307

3 广西师范大学 桂林市中西医结合医院联合医学研究中心, 广西 桂林 541004

徐欢欢, 李斯微, 罗希, 周祖平, 毕昌昊. 溶瘤病毒介导碱基编辑靶向杀伤宫颈癌细胞[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1382-1394.

XU Huanhuan, LI Siwei, LUO Xi, ZHOU Zuping, BI Changhao. Oncolytic virus-mediated base editing for targeted killing of cervical cancer cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1382-1394.

**摘要:** 传统肿瘤治疗, 如放疗和化疗, 常损伤正常细胞, 可能引发新肿瘤。与之相比, 溶瘤病毒(oncolytic virus, OV)则能选择性攻击肿瘤细胞, 减少对正常细胞的影响。多数临床试验中的溶瘤病毒经过基因改造, 以增强其靶向肿瘤细胞和激活免疫反应的能力。为了开发特异治疗宫颈癌的溶瘤腺病毒, 本研究构建了特异性治疗宫颈癌的溶瘤腺病毒, 该病毒通过递送靶向原癌基因的碱基编辑器实现肿瘤细胞的高效杀伤, 即通过抑制肿瘤生长和直接裂解肿瘤来高效杀伤癌细胞。本研究利用人端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)启动子启动病毒早期复制蛋白(early region 1A, E1A), 成功构建了 P-hTERT-E1A-GFP 载体, 并验证了其在宫颈癌细胞中的启动活性。鉴于 MYC 原癌基因在肿瘤学研究中的重要作用, 筛选高效 MYC 原癌基因编辑位点是本研究的关键步骤。针对 MYC 基因设计 3 个 gRNA 靶点, 将其与 ABE8e 碱基编辑器质粒共转染至 HEK293T 细胞, 经嘌呤霉素筛选后, Sanger 测序分析显示各靶点编辑效率分别为 43% (MYC-1)、25% (MYC-2)和 35% (MYC-3), 明确 MYC-1 为最优编辑位点。通过构建 P-ABEs-hTERT-E1A-GFP 和 P-MYC gRNA-hTERT-E1A-GFP 载体, 成功进行了病毒包装并验证了其特异性和有效性。实验结果表明, 这种新型溶瘤腺病毒能有效抑制体外培养的 HeLa 宫颈癌细胞的生长。本研究基于 HeLa 细胞模型, 为宫颈癌治疗提供了新的实验依据和潜在策略。

**关键词:** 溶瘤病毒; 碱基编辑器; 原癌基因; 宫颈癌

资助项目: 国家自然科学基金(82203238); 中央引导地方科技发展资金(ZY20230103)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82203238) and the Central and Local Joint Fund for Science and Technology Development (ZY20230103).

\*Corresponding author. E-mail: zhouzuping@mailbox.gxnu.edu.cn

Received: 2024-12-17; Accepted: 2025-02-26; Published online: 2025-02-27

## Oncolytic virus-mediated base editing for targeted killing of cervical cancer cells

XU Huanhuan<sup>1,2</sup>, LI Siwei<sup>2</sup>, LUO Xi<sup>1</sup>, ZHOU Zuping<sup>1,3\*</sup>, BI Changhao<sup>2</sup>

1 Key Laboratory of Stem Cells and Pharmaceutical Biotechnology of Guangxi Universities, College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, Guangxi, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300307, China

3 Joint Medical Research Center of Guangxi Normal University and Guilin Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Guilin 541004, Guangxi, China

**Abstract:** Conventional cancer therapies, such as radiotherapy and chemotherapy, often damage normal cells and may induce new tumors. Oncolytic viruses (OVs) selectively target tumor cells while sparing normal cells. Most OVs used in clinical trials have been genetically engineered to enhance their ability to target tumor cells and activate immune responses. To develop a specific OV-based approach for treating cervical cancer, this study constructed an oncolytic adenovirus that delivered a base editor targeting oncogenes to achieve efficient killing of tumor cells through inhibiting tumor growth and directly lysing tumor cells. We utilized the human telomerase reverse transcriptase (TERT) promoter to drive the expression of adenovirus early region 1A (E1A) and successfully constructed the P-hTERT-E1A-GFP vector, which was validated for its activity in cervical cancer cells. Given the critical role of the *MYC* oncogene in the research of oncology, identifying efficient editing sites for the *MYC* oncogene is a key step in this study. Three *MYC*-targeting gRNAs were engineered and co-delivered with ABE8e base editor plasmids into HEK293T cells. Following puromycin selection, Sanger sequencing demonstrated differential editing efficiencies: *MYC*-1 (43%), *MYC*-2 (25%), and *MYC*-3 (35%), identifying *MYC*-1 as the most efficient editing locus. By constructing the P-ABEs-hTERT-E1A-GFP and P-*MYC* gRNA-hTERT-E1A-GFP vectors, we successfully packaged the virus and confirmed its specificity and efficacy. The experimental results demonstrate that this novel oncolytic adenovirus effectively inhibits the growth of HeLa cells *in vitro*, providing new experimental evidence and potential strategies for treating cervical cancer based on the HeLa cell model.

**Keywords:** oncolytic virus; base editor; oncogene; cervical cancer

宫颈癌(cervical cancer, CC)是全世界常见的女性癌症之一<sup>[1-2]</sup>,也是一种医学研究广泛的肿瘤细胞模型。宫颈癌是20-39岁女性患癌症死亡的第二大原因,宫颈癌的复发、转移可能使女性面临死亡风险<sup>[3-5]</sup>。据报道,宫颈癌最主要的病因是感染高危人瘤病毒株(high-risk human papillomavirus, hrHPV)后可能会激活原

癌基因 *MYC* 的表达<sup>[6]</sup>。由于人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)疫苗的接种和HPV感染筛查不够全面,使得全球宫颈癌发病率仍在逐年增加<sup>[7-8]</sup>。目前治疗宫颈癌的方法主要是放疗、铂类化疗和手术等,但它们在治疗效率和患者生活质量方面均存在一定局限性,亟需开发新的治疗策略<sup>[9-10]</sup>。

溶瘤病毒可以选择性地抑制肿瘤细胞的生长, 它们能够触发免疫原性肿瘤细胞死亡<sup>[11]</sup>。腺病毒(adenoviruses, AdVs)是一种无包膜的线性双链 DNA 病毒, 其基因组大小约为 26–45 kb, 具有较大包装容量<sup>[12]</sup>。人腺病毒分为 7 个亚种、57 种血清型<sup>[13]</sup>。血清型 5 腺病毒基因组包括 4 个早期基因(*E1-E4*)和 5 个晚期基因(*L1-L5*), 分别在病毒 DNA 复制之前和之后转录发挥作用<sup>[14-15]</sup>。早期基因(*E1A*)在野生型腺病毒激活病毒基因转录及病毒 DNA 复制过程中起作用, 是后续病毒基因表达最重要的转录激活因子<sup>[16]</sup>。溶瘤腺病毒利用肿瘤特异性启动子驱动病毒复制早期基因来实现其在肿瘤的特异性复制<sup>[17]</sup>。例如, 将 hTERT、Survivin、AFP 等<sup>[18-19]</sup>肿瘤特异性启动子放置在 *E1A* 序列上游, 可以使得腺病毒仅在肿瘤细胞内进行复制, 并激发特定的溶瘤作用<sup>[20]</sup>。基因工程溶瘤病毒 AdCB016-mp53 是一种在含有 HPV 的细胞中选择性复制的病毒。在细胞培养过程中, AdCB016-mp53 展现出了对 HPV 阳性的宫颈癌细胞的高效杀伤作用, 而对正常的细胞没有影响<sup>[21]</sup>。携带杀伤或抑制细胞生长因子的溶瘤病毒联合使用时对肿瘤治疗效果增强。例如中国科学院上海生命科学研究院<sup>[22]</sup>构建了一个 *E1B* 基因缺失的选择性复制溶瘤病毒(ZD55)并整合了分泌型血管内皮细胞生长抑制因子(VEGI-251)作为治疗性因子。在 HeLa 人宫颈肿瘤模型中, ZD55-VEGI-251 导致 80% 的肿瘤生长抑制并抑制了肿瘤血管生成。插入了早期生长反应基因 *Egr-1* 的启动子和促凋亡蛋白 TNF 相关凋亡诱导配体的基因 *TRAIL* 的溶瘤病毒<sup>[23]</sup>, 已在中国获批用于宫颈癌在内的多种恶性肿瘤的瘤内治疗。此外, 溶瘤病毒进入细胞主要是通过病毒衣壳表面的纤突蛋白来识别细胞表面的柯萨奇腺病毒受体(coxsackievirus and adenovirus receptor, CAR),

并与之结合。然而大多数表皮来源的正常组织表达 CAR, 因此, 使用非靶向 AdV 会导致溶瘤病毒进入非靶细胞。通过在腺病毒载体纤维蛋白 HI-环(HI-loop, HI)中掺入精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD-4C)基序, 可以增加病毒对肿瘤细胞的靶向性, 从而提高治疗效果。使得溶瘤病毒治疗更加安全有效<sup>[24]</sup>。

碱基编辑器是一种有前景的技术, 它能够在不产生双链 DNA 断裂的情况下, 直接在特定的基因位点上实现碱基的转换。例如, 通过使用胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editors, CBEs)可以实现 C 到 T 的突变<sup>[25]</sup>, 而腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editors, ABEs)则可以实现 A 到 G 的突变<sup>[26]</sup>。基于这些工具, 研究者可通过设计特异性 gRNA 靶向关键原癌基因, 如 RAS、MYC 家族基因, 这些基因在多种癌症中经常发生突变<sup>[27]</sup>。通过精确编辑这些基因, 碱基编辑器不仅能够使致癌基因表达失活, 还能够为癌症治疗提供新的策略。目前, 碱基编辑器的细胞内递送载体受到免疫原性、包装容量受限和低耐受性等问题的限制。AdVs 载体的优势在于其大容量的基因递送能力, 允许携带复杂的碱基编辑系统。本研究利用溶瘤病毒作为载体直接递送 ABEs 至肿瘤细胞内, 靶向 MYC 基因, 阻断 MYC 蛋白的正常剪切和拼接过程, 阻止其形成功能性的致癌蛋白, 干扰其致癌功能从而抑制肿瘤的发展。这种方法不仅利用溶瘤病毒作为载体递送 ABEs, 实现对原癌基因的精准编辑, 还充分发挥了溶瘤病毒裂解癌细胞的特性, 增强了对肿瘤细胞的杀伤效果。通过这种双重作用, 以期实现对肿瘤的精准治疗, 同时降低传统治疗方法可能带来的副作用和风险, 为癌症治疗提供一种新的、更为有效的策略。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞、主要试剂和仪器

人胚胎肾 HEK293T 和人宫颈癌 HeLa 为实验室保存,人胚胎肾 HEK293A 细胞购于天津百倍生物科技有限公司。溶瘤病毒骨架质粒 pBHGlox 和目的质粒 PDC316 购于武汉淼灵生物科技有限公司。无缝克隆试剂盒(minerva super fusion cloning kit)购于天津启迪生物有限公司。琼脂糖凝胶(agarose)购于上海博迈生物公司。限制性核酸内切酶 *Eco31I*、10×BSA、T4 DNA ligase、细胞计数板均购于天津凯思博生物科技有限公司。磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)、高糖培养基(dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)、0.25%胰蛋白酶、1%青链霉素溶液(双抗)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、嘌呤霉素(puromycin)均购于华蔚科技有限公司。EP 离心管、细胞培养皿购于天津晟佰昊生命技术有限公司。CCK8 细胞增殖毒性检测试剂盒(cell counting kit-8)购于北京沃格东方科技有限公司。DNA marker 购于北京全式金生物技术股份有限公司。聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)、细胞裂解液由实验室前期配制保存<sup>[28]</sup>。倒置光学显微镜(Ti2-U)和倒置荧光显微镜购于尼康公司。

### 1.2 质粒载体构建

*E1A* 全长基因(GenBank 登录号: MH121101.1)由北京擎科生物科技有限公司合成。hTERT 启动子(GenBank 登录号: NM198253)-203—+56 共 260 bp 的序列为启动子效率较强片段,序列由 HeLa 细胞系中获取。GFP 序列由质粒 pCMV\_BE4max\_P2A\_GFP 中获取,以 PDC316 为载体使用无缝克隆方法构建对照质粒 P-hTERT-*E1A*-GFP。cmv 启动子及编辑器 CRISPR-Cas9-ABE8e (ABEs)序列参考质粒 ABE8e,用 Goldengate 方法将设计好的 gRNA

连接至 gRNA 骨架质粒 sgRNA-ccdb,构建新的质粒以筛选效率高的 gRNA 原癌基因编辑位点。将高效的 gRNA 和 ABEs 用无缝克隆方法克隆至对照质粒中,分别得到 P-MYC gRNA-hTERT-*E1A*-GFP 和 P-ABEs-hTERT-*E1A*-GFP。

### 1.3 HEK293T、HEK293A 和 HeLa 细胞培养

将 10%胎牛血清和 1%青链霉素加入到 DMEM 中配成完全培养基,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。当细胞密度达到约 80%时,移去完全培养基,并使用 PBS 缓冲液进行洗涤 1-2 遍,洗去死细胞。随后,加入 0.25%的胰蛋白酶并放置培养箱中进行消化处理,用 1 mL 完全培养基终止消化。将细胞悬液以 1:5 的比例进行传代,在标准条件下,每 2-3 d 进行一次传代。

### 1.4 hTERT 启动子特异性测试

将状态良好的 HEK293T 细胞、HeLa 细胞按照 5×10<sup>5</sup> 个每孔接种至 6 孔板中,24 h 后当细胞密度达到 60%-70%时用 PEI 转染。将 PDC316-hTERT-GFP 质粒使用 DMEM 稀释,再将 DMEM 稀释的 PEI 静置 5 min 后转移到含有质粒的 DMEM 中孵育 15-20 min,完成上述步骤后,将孵育好待转染样品 60 μL 每孔转染到正常细胞 HEK293T 和癌细胞 HeLa 中,4-6 h 后换成完全培养基,24-48 h 后使用倒置荧光显微镜观察细胞荧光和拍照,并用荧光计数仪统计荧光细胞数量。

### 1.5 引物设计与合成

通过 NCBI 搜索序列 *MYC* (GenBank 登录号: NC\_000008.11),结合引物设计原则和本文构建载体阅读框克隆位点设计引物。*MYC*-1 上游引物为 5'-GTGCTCCCTTTATCCCCA-3';下游引物为 5'-ATTCCTGAGGGGTGGGAGAC-3'。*MYC*-2 上游引物为 5'-CCGGTTTTTCGGGGC TTTATC-3';下游引物为 5'-GATCAGGGCGGG

TTGGAATC-3'。*MYC*-3 上游引物为 5'-GCAGTG GCGCAATCAACCTC-3'; 下游引物为 5'-ACAA GTTCATAGGTGATTGC-3'。PCR 鉴定 P-ABEs-hTERT-*E1A*-GFP 溶瘤病毒上游引物为 5'-GGA GTTTTCCCACGAGTACTGGA-3'; 下游引物为 5'-CCAGCTGGATGAACAGCTTG-3'。PCR 鉴定 *MYC* gRNA 溶瘤病毒上游引物为 5'-GAGGG CCTATTTCCCATGATT-3'; 下游引物为 5'-CTG TGCCCGCGAATCCAC-3'。上述引物均由北京擎科生物科技有限公司负责合成。

## 1.6 筛选 *MYC* 原癌基因高编辑效率靶点

在 NCBI 数据库下载了 *MYC* 基因的全长序列及其 mRNA 区域。基于这些序列信息, 设计了 3 个特定的 gRNA 位点, 分别命名为 *MYC*-1、*MYC*-2 和 *MYC*-3, 用 Goldengate 方法连接到 gRNA 骨架质粒上构建质粒转染到适合进行基因编辑的 HEK293T 细胞中。将状态良好的 HEK293T 细胞按照  $5 \times 10^5$  个/孔接种至 6 孔板中, 24 h 后当细胞密度达到 60%–70% 时进行 PEI 转染。将构建好的 3 个 gRNA 质粒和 ABE8e 质粒共转染到细胞中, 每日使用含有 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  嘌呤霉素的完全培养基给细胞换液, 4–5 d 后将细胞用 1 mL 的 PBS 洗 2 遍, 再用 200  $\mu\text{L}$  的 PBS 将贴壁的细胞吹下, 5 000 r/min 离心 1 min, 去上清 PBS, 根据细胞沉淀量加入 30–50  $\mu\text{L}$  细胞裂解液, 65  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 98  $^{\circ}\text{C}$  2 min 提取细胞基因组并以此为模板, 采用合成的 *MYC*-1、*MYC*-2 及 *MYC*-3 特异性引物进行 PCR 扩增, 并通过琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。若在基因片段长度为 1 000 bp 附近出现条带, 提示其为细胞中被编辑过的 *MYC* 基因片段。送至北京擎科生物科技有限公司测序, 以比较不同 gRNA 位点的编辑效率。通过高通量测序技术, 确定了编辑效率最高的 gRNA 位点。随后, 利用无缝克隆技术, 将该高效 gRNA 位点定向克隆至 P-hTERT-*E1A*-GFP 对

照质粒中。同时, CRISPR-Cas9-ABE8e (ABEs) 编辑器也连接至 P-hTERT-*E1A*-GFP 对照质粒上, 以构建最终的溶瘤病毒载体。这一步骤是为了筛选出能在细胞中高效编辑的 *MYC* gRNA, 从而确保 CRISPR-Cas9 系统能够精确地对 *MYC* 基因进行编辑, 以达到研究或治疗的目的。

## 1.7 溶瘤病毒包装纯化

### 1.7.1 细胞接种与转染

将状态良好的 HEK293A 细胞以每孔  $5 \times 10^5$  个的密度接种至 6 孔板中; 24 h 后, 当细胞密度达到 60%–70% 时, 使用 PEI 将待转染的病毒载体质粒[骨架质粒(pBHGlox):目的质粒=1:1]共转染至 HEK293A 细胞中。

### 1.7.2 培养与病毒收集

每隔 2 d 更换 1 次新鲜培养基; 9–14 d 后, 当出现病毒空斑时, 使用 1 mL 新鲜完全培养基将细胞吹打下来, 收集至 1.5 mL 离心管中; 通过在液氮和 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中反复冻融 3 次, 以释放病毒; 以 12 000 r/min 的速度离心 10 min, 取上清至新的 1.5 mL 离心管中, 并在 -80  $^{\circ}\text{C}$  下保存。

### 1.7.3 病毒空斑纯化

将状态良好的 HEK293A 细胞以每孔  $1 \times 10^6$  个的密度接种至 6 孔板中; 24 h 后, 当细胞密度达到约 90% 时, 取 100  $\mu\text{L}$  种子病毒液, 加入 900  $\mu\text{L}$  DMEM 中, 混匀后再取 100  $\mu\text{L}$  至 900  $\mu\text{L}$  DMEM 中, 进行  $10^3$ – $10^8$  倍的稀释; 将稀释后的病毒液加入 HEK293A 细胞中, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 2 h 后吸去病毒液, 加入含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 等待 5–10 d 直到噬菌斑形成; 显微镜下观察有噬菌斑的六孔板, 标记噬菌斑, 取 6–8 个噬菌斑, 取 10  $\mu\text{L}$  完全培养基单独吹打标记的噬菌斑, 收集吹打的 10  $\mu\text{L}$  完全培养基加到新的 90  $\mu\text{L}$  的完全培养基中混合均匀, 取 20  $\mu\text{L}$  加到前一天铺好的每孔含有  $1 \times 10^6$  细胞的 6 孔板中。

### 1.7.4 PCR 鉴定与病毒扩增

噬菌斑感染 6 孔板 24 h 后, 从感染后的细胞培养液中取出上清液进行 PCR 鉴定, 验证病毒目的条带; 经过 2 轮空斑筛选后, 反复验证有条带的样本, 然后进行大量病毒扩增; 通过以上步骤, 能够纯化并扩增具有碱基编辑能力的溶瘤病毒。

### 1.8 病毒滴度测定

用半数组织细胞感染剂量 (50% tissue culture infective dose, TCID<sub>50</sub>) 方法来测定本实验中成功包装的溶瘤病毒滴度。HEK293A 细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ L 培养基。次日, 将纯化的病毒液按  $10^5$ – $10^{12}$  倍梯度稀释后, 每孔加入 100  $\mu$ L 稀释液, 每个稀释梯度设 10 个重复孔。7 d 后, 根据细胞病变情况计算溶瘤腺病毒滴度。

$$\lg \text{TCID}_{50} = L - d(S - 0.5)$$

式中: L 为最高稀释度的对数; d 为稀释度对数之间的差; S 为病变孔比率之和。

### 1.9 优化溶瘤病毒剂量以特异杀伤宫颈癌细胞的体外研究

使用不同感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 的溶瘤病毒感染宫颈癌细胞, 以确定最适 MOI, 并进一步观察溶瘤病毒对正常细胞和宫颈癌细胞的特异性杀伤效果。

取对数生长期 HeLa 细胞消化, 铺 96 孔板, 每孔接种  $3 \times 10^3$  个细胞, 在培养箱中培养 24 h; 使用含 5% 胎牛血清 DMEM 培养基稀释 P-hTERT-*E1A*-GFP 病毒, MOI 分别为 1、5、10、20、50, 以未感染细胞作为对照, 每条件设 3 个复孔, 在培养箱中培养。感染 4 d 后结束实验, 将 96 孔板中旧的培养基弃去, 每孔加入 90  $\mu$ L 无血清培养基、10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 将 2 种液体混匀 (避光操作); 继续在培养箱中孵育, 持续 0.5 h。在酶标仪 450 nm 波长处检测每孔的光密

度, 计算存活率。存活率 = [(实验孔 - 空白孔) / (对照孔 - 空白孔)]  $\times$  100%。

将 HEK293T 细胞和 HeLa 细胞分别以每孔  $5 \times 10^5$  个细胞的密度进行接种, 铺 6 孔板, 培养箱中培养 24 h; DMEM 稀释病毒, 按 MOI=10 加入病毒, 1–2 h 后换正常完全培养基。24、48、72 h 使用倒置显微镜观察细胞和拍照。通过细胞存活分析实验, 本研究确定了溶瘤病毒的最适 MOI, 并利用显微镜观察溶瘤病毒对宫颈癌细胞的特异性杀伤效果, 以及对正常细胞的影响, 从而评估其治疗潜力和选择性。

### 1.10 CCK8 细胞毒性实验

为评估携带编辑器和 MYC gRNA 的溶瘤病毒 P-ABEs-hTERT-*E1A*-GFP 和 P-MYC gRNA-hTERT-*E1A*-GFP 在 1:1 感染后对 HeLa 细胞的杀伤效果, 以 P-hTERT-*E1A*-GFP 溶瘤病毒为对照。具体步骤如下: 取对数生长期 HeLa 细胞消化, 铺 96 孔板, 每孔接种  $3 \times 10^3$  个细胞, 在培养箱中培养 24 h; 含 5% 胎牛血清 DMEM 培养基稀释病毒, 按每孔 MOI=10 加入病毒, 设 5 个复孔, 在培养箱中培养。在 24、48、72、96 h 后将 96 孔板中旧的培养基弃去, 每孔加入 90  $\mu$ L 无血清培养基、10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 混匀, 操作过程中避光; 继续在培养箱中孵育 0.5 h; 在 450 nm 波长处检测每孔的光密度, 计算存活率。存活率 = [(实验孔 - 空白孔) / (对照孔 - 空白孔)]  $\times$  100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 MYC 基因编辑位点的设计

为了降低 MYC 蛋白表达, 本研究采用 CRISPR-Cas9 系统中的 ABEs 技术, 靶向 mRNA 剪切过程中的关键序列, 针对外显子中保守表达的 AG、TG, 用 ABE 碱基编辑器将 A 突变成 G, 阻止目的外显子的正确拼接 (图 1A、1B), 从而导致 MYC 蛋白表达受阻, 进而下调其蛋

白水平。前期研究发现<sup>[29]</sup>, ABE 碱基编辑器排在第 3–6 位时, 碱基 A 编辑效果最佳, 且能够识别 NG 作为短核苷酸序列(protospacer adjacent motif, PAM)位点。基于 ABEs 的特性设计了 3 个 gRNA (*MYC-1*、*MYC-2* 和 *MYC-3*), 它们靶向 *MYC* 基因的外显子两端。实验结果显示, 这 3 个 gRNA 位点都具有编辑活性, 其中 *MYC-1* 位点编辑效率最高, 达到了 43%, 而 *MYC-2* 和 *MYC-3* 位点的编辑效率分别为 25% 和 35% (图 1C)。

## 2.2 hTERT 启动子在肿瘤细胞中的启动活性

为了评估 hTERT 启动子在不同细胞系中的启动效率, 本研究构建了含有 hTERT 启动子驱动 GFP 表达的载体, 并将该载体转染至 HEK293T 和 HeLa 细胞系中。在转染后的 24–48 h 内, 通过观察 GFP 的荧光强度来评估启动子活性。由于 hTERT 启动子具有肿瘤特异性, 其特点是在多种癌细胞中具有较高的活性, 而在正常细胞

中的活性相对较低。实验结果表明, HeLa 细胞中 GFP 表达量较高, 而作为阴性对照的 HEK293T 细胞则表现出较弱的 GFP 信号(图 2A)。这些结果证实了 hTERT 启动子在肿瘤细胞中具有较高的启动效率, 而在正常细胞中活性较低, 从而验证了其肿瘤特异性启动子的特性。

为了进一步定量分析 hTERT 启动子在 HEK293T 和 HeLa 这 2 种细胞中的启动活性, 本研究增加了荧光计数实验这一关键步骤。将转染 24、48 h 后的细胞消化收集, 进行荧光计数, 通过荧光计数仪计数发出荧光的细胞数量以及总的细胞数量, 从而得到 hTERT 启动效率(图 2B)。在转染 24 h 后, HEK293T 细胞中发出荧光的细胞所占比例为 11.88%, 而 HeLa 细胞达到 11.74%。在转染 48 h 后, 2 种细胞中发出荧光的细胞比例均有所上升, 但 HeLa 细胞的生长更为显著, 其荧光比率攀升至 29.89%, 而 HEK293T 细胞的荧光比率则为 15.10%。

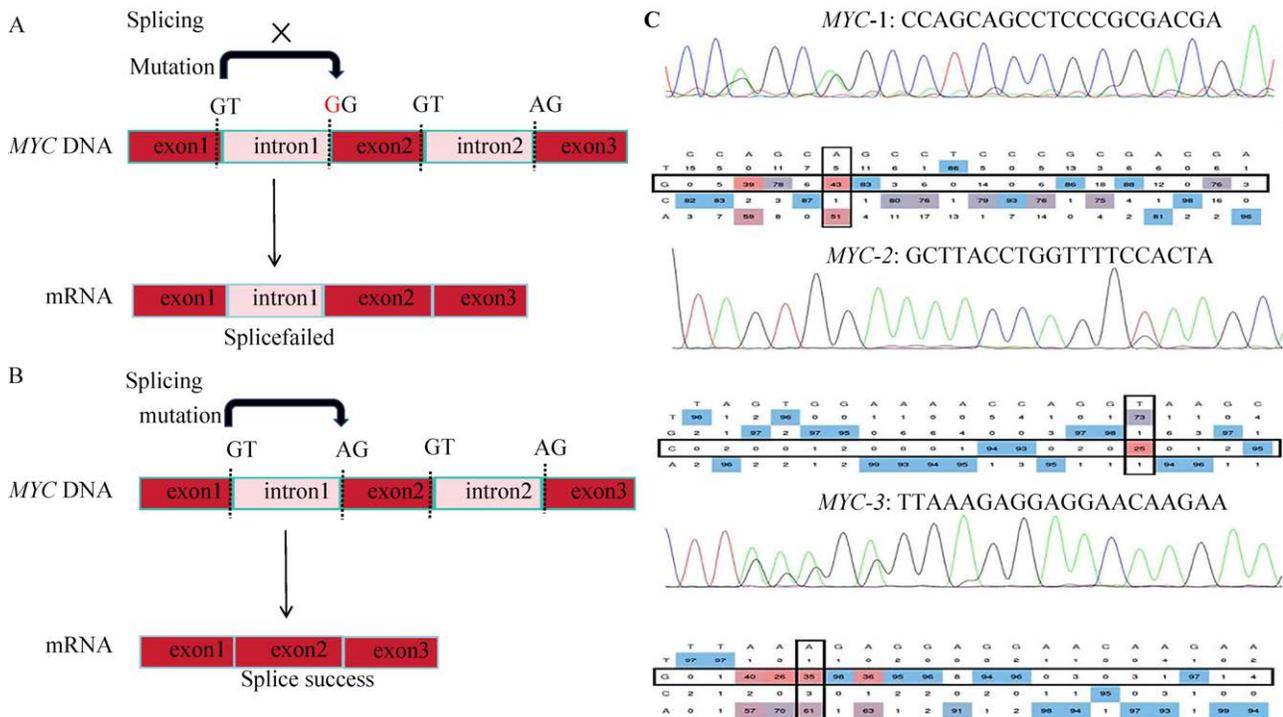


图 1 基因编辑与基因编辑效率分析

Figure 1 Analysis of gene editing and gene editing efficiency. A: mRNA exons splicing process after ABEs base editing; B: Normal mRNA exons splicing process; C: Editing efficiency of different loci of *MYC* proto-oncogene.

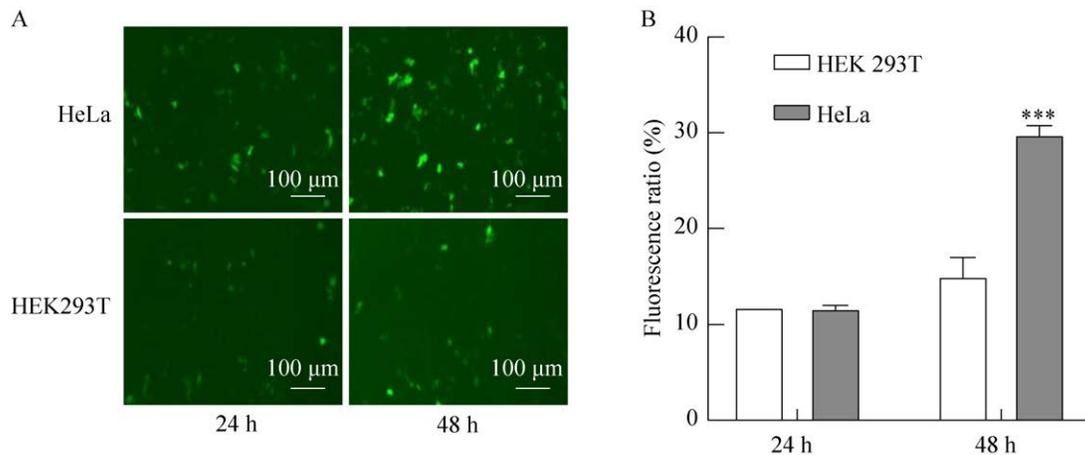


图2 hTERT启动子在HEK293T和HeLa细胞中的启动活性

Figure 2 hTERT promoter activation activity in HEK293T and HeLa cells. A: Fluorescence images of hTERT promoter activity at different time points in HEK293T and HeLa cells; B: Bar chart analysis of fluorescence ratios of hTERT promoter activity at different time points in HEK293T and HeLa cells; Statistical analyses were performed using a two-tailed *t*-test.  $P < 0.001$  (\*\*\*)

### 2.3 病毒滴度检测

经过空斑纯化步骤后,收集的病毒被用于继续感染 HEK293A 细胞。在感染 4–5 d 后,收获细胞和上清液,并通过在液氮和 37 °C 水浴锅中进行 3 次反复冻融来裂解细胞,以释放病毒。随后,采用 TCID<sub>50</sub> 方法来测定病毒滴度,得到以下结果: P-hTERT-*E1A*-GFP 病毒的滴度为  $5 \times 10^{10}$  PFU/mL, P-ABEs-hTERT-*E1A*-GFP 病毒的滴度为  $3.16 \times 10^9$  PFU/mL, P-MYC gRNA-hTERT-*E1A*-GFP 病毒的滴度为  $9.39 \times 10^9$  PFU/mL。这些数据为后续实验提供了参考。

### 2.4 溶瘤病毒最适 MOI 及特异性肿瘤杀伤情况

本研究系统地评估了不同 MOI 对溶瘤病毒疗效的影响,以确定实现最佳抗肿瘤效果的最适 MOI。实验采用梯度 MOI 设计(MOI=0、1、5、10、20 和 50)。通过连续监测病毒感染后的细胞存活情况,在未感染的对照组(MOI=0)中,细胞存活率为 100%。随着 MOI 的增加,细胞存活率显著下降。具体而言,在 MOI=1 时,细胞存活率为 82.75%;在 MOI=5 时,存活率降

至 78.58%;在 MOI=10 时,存活率进一步下降至 57.12%;在 MOI=20 时,存活率为 41.80%;而在 MOI=50 时,存活率最低,仅为 27.19%。此外,在 MOI=10 的条件下,感染 96 h 后细胞存活率在 50% 左右,这一结果表明,MOI=10 时,病毒复制和宿主细胞裂解达到了平衡,确保了病毒的复制和传播,同时避免了宿主细胞过早死亡(图 3A)。

溶瘤病毒的设计基于 hTERT 启动子来驱动病毒早期复制蛋白 E1A 的表达,这一策略使得病毒能够在端粒酶阳性的肿瘤细胞中特异性复制并杀伤这些细胞。为了验证这些溶瘤病毒的特异性,采用了 MOI=10 的病毒滴度来感染 HeLa 细胞以及正常细胞系 HEK293T。显微镜观察发现,随着培养时间的延长,HeLa 细胞表现出不同程度的变圆和脱落现象,这表明病毒对肿瘤细胞具有明显的杀伤效果。相比之下,正常细胞系 HEK293T 的形态基本保持正常,仅有轻微的细胞变圆现象,且大部分细胞形态饱满,正常贴壁生长(图 3B)。这些结果证实了本研究中溶瘤病毒对肿瘤细胞具有特异性杀伤作用,而对正常细胞的影响较小。

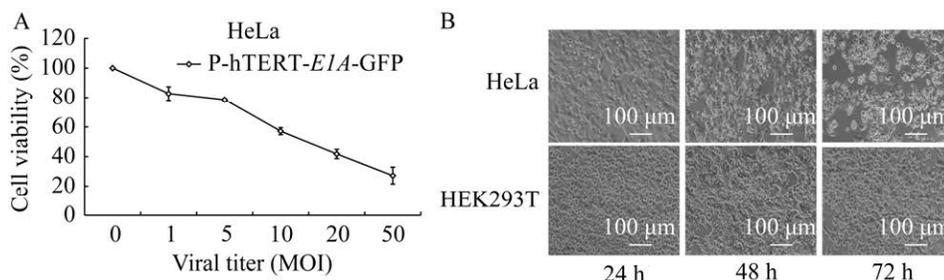


图3 溶瘤病毒的最佳 MOI 及其对肿瘤细胞的选择性杀伤效果

Figure 3 Optimal MOI of oncolytic virus and its selective killing effect on tumor cells. A: Effect of different gradient MOI on the survival rate of HeLa tumor cells after 96 h; B: Oncolytic virus killing effect on HEK293T and HeLa at different times.

## 2.5 CCK8 法检测病毒的杀伤能力

将溶瘤病毒作为载体递送 ABEs 和 gRNA 进行碱基编辑的过程涉及 2 种病毒：一个用于表达碱基编辑器蛋白，另一个用于提供 gRNA，溶瘤病毒感染肿瘤细胞后病毒基因组在宿主细胞内不断产生 ABEs 或 gRNA 目的病毒，在 gRNA 的引导下，ABEs 靶向 MYC 原癌基因，将碱基 A 脱氨变成另一种碱基 I，进而通过 DNA 复制或修复将 I 识别为 G，实现 A/G 的直接替换(图 4A)。

为了深入探究溶瘤病毒 P-ABEs-hTERT-E1A-GFP 和 P-MYC gRNA-hTERT-E1A-GFP 的联合应用对细胞毒性的影响，本研究以 PDC316-hTERT-E1A-GFP 作为对照病毒，通过 CCK-8 实验检测了在病毒感染复数 MOI=10 时对细胞存活率的影响。实验结果表明，随着感染时间的延长，宫颈癌细胞的存活率逐渐降低。联合应用病毒 P-ABEs-hTERT-E1A-GFP 和 P-MYC gRNA-hTERT-E1A-GFP (1:1) 递送碱基编辑器时，对宫颈癌细胞 HeLa 的杀伤性比单独使用 PDC316-hTERT-E1A-GFP 更强。在感染 48 h 后，P-ABEs-hTERT-E1A-GFP 和 P-MYC gRNA-hTERT-E1A-GFP 以 1:1 比例感染的 HeLa

细胞存活率为 76%，相较之下，PDC316-hTERT-E1A-GFP 组的存活率为 85.38%。随着感染时间延长至 72 h，联合病毒组感染的 HeLa 细胞存活率进一步降低至 55.2%，而 PDC316-hTERT-E1A-GFP 组的存活率也降低至 67.48%。96 h 后，联合病毒组感染的 HeLa 细胞存活率降至 38.98%，PDC316-hTERT-E1A-GFP 组的存活率也降低至 51.57%。携带编辑器的联合病毒组的细胞存活率显著低于对照组( $P < 0.05$ )。此外，当病毒感染正常细胞 HEK293T 时，并未观察到明显的细胞死亡现象，这表明 P-ABEs-hTERT-E1A-GFP 和 P-MYC gRNA-hTERT-E1A-GFP 能够选择性地杀伤肿瘤细胞，并抑制其增殖，这不仅证实了这些新型溶瘤病毒对宫颈癌细胞具有更强的杀伤效果，而且还表明它们在杀伤肿瘤细胞的同时，对正常细胞的影响较小，这在癌症治疗中是一个重要的考量因素。

综合上述结果可以得出结论，P-ABEs-hTERT-E1A-GFP 和 P-MYC gRNA-hTERT-E1A-GFP 作为一种新型溶瘤病毒，通过创新性地递送碱基编辑器，展现出了对肿瘤细胞的高效杀伤能力，同时保持了对正常细胞的低毒性，这为肿瘤治疗提供了一个有前景的新策略。

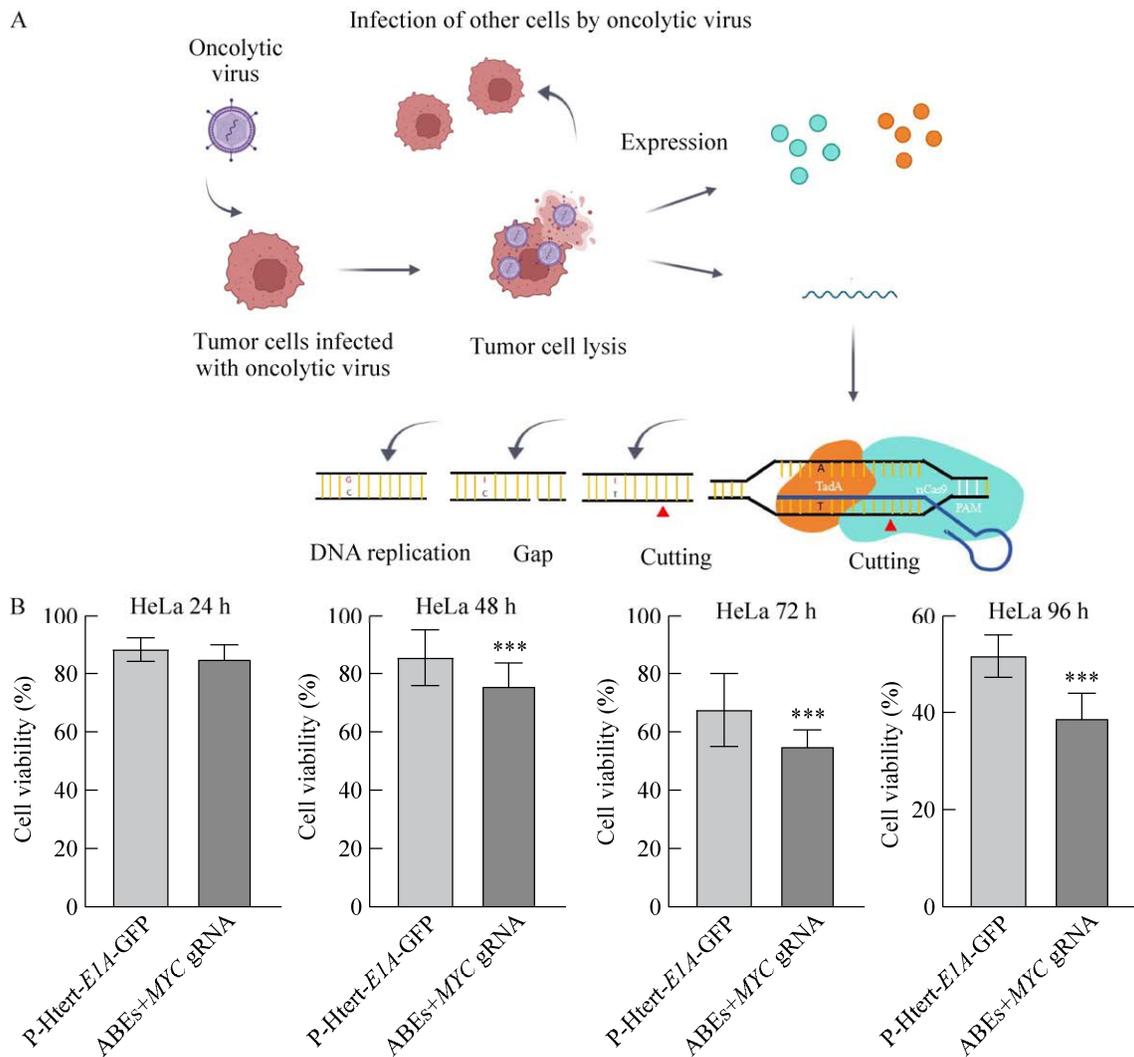


图 4 溶瘤病毒递送碱基编辑器对 HeLa 细胞杀伤作用

Figure 4 Oncolytic virus delivery base editor on HeLa cell killing. A: Oncolytic virus infects and lyses tumor cells to express the editor protein for the base editing process; B: Effect of combined oncolytic viruses on the viability of HeLa cells; Statistical analyses were performed using a two-tailed *t*-test.  $P < 0.001$  (\*\*\*)

### 3 讨论与结论

本研究利用溶瘤病毒递送碱基编辑器 (ABEs) 针对体外培养的 HeLa 细胞进行杀伤实验。通过设计针对 *MYC* 基因的 3 个特异性 gRNA (*MYC*-1、*MYC*-2、*MYC*-3)，成功实现了对 *MYC* 基因的精确编辑。实验结果表明，这些 gRNA 位点均具有编辑活性，其中 *MYC*-1 位点的编辑效率最高，达到了 43%，而 *MYC*-2 和 *MYC*-3

位点的编辑效率分别为 25% 和 35%。

实验中观察到的 HeLa 细胞 GFP 表达明显，而阴性对照 HEK293T 细胞 GFP 信号较弱，实验数据证实了 hTERT 启动子在肿瘤细胞中具有高效的转录激活特性而在正常细胞中其活性则维持在较低水平，验证了其作为肿瘤特异性启动子的特性。此外，通过细胞存活率实验发现 MOI=10 时，第 4 天感染细胞的死亡率适中，表明此时病毒复制与宿主细胞裂解平衡，既促

进了病毒的传播,又避免了宿主细胞过早死亡。进一步显微镜观察发现 HeLa 细胞随着培养时间的延长出现变圆和脱落现象,这表明溶瘤病毒对肿瘤细胞具有明显的杀伤效果。相比之下,正常细胞系 HEK293T 的形态基本保持正常,仅有轻微的细胞变圆现象,且大部分细胞形态饱满,正常贴壁生长。这些结果进一步证实了溶瘤病毒对肿瘤细胞的特异性杀伤作用,而对正常细胞的影响较小。本研究成功利用溶瘤病毒递送碱基编辑器,实现了对 HeLa 细胞(宫颈癌细胞)的高效杀伤,并通过精确设计的 gRNA 对 *MYC* 基因进行了有效编辑。实验结果表明,溶瘤病毒对肿瘤细胞具有特异性杀伤作用,而对正常细胞的影响较小。并且随着溶瘤病毒感染时间的增加,宫颈癌细胞的存活率逐渐下降。联合应用病毒 P-ABEs-hTERT-*EIA*-GFP 和 P-*MYC* gRNA-hTERT-*EIA*-GFP (1:1)对 HeLa 细胞的杀伤性较单独使用 PDC316-hTERT-*EIA*-GFP 更强。这些结果为开发新型溶瘤病毒治疗宫颈癌提供了实验依据,并为未来的癌症基因治疗提供了新的思路和方法。

溶瘤病毒作为一种新型肿瘤治疗手段,具有选择性杀伤肿瘤细胞而不影响正常细胞生长的特点。然而,在实际应用中,溶瘤病毒的疗效受到多种因素的限制。例如,当病毒滴度较低时,其感染肿瘤细胞的能力会显著下降;此外,免疫细胞能够识别并清除溶瘤病毒,从而降低其在肿瘤细胞内的复制能力,影响其裂解肿瘤的效果。为了克服这些困难,本研究开发了一种新型溶瘤病毒,能够在感染肿瘤细胞后持续复制并表达 ABEs 碱基编辑器以及靶向 *MYC* 原癌基因的 gRNA,进而对肿瘤细胞基因组进行编辑,抑制肿瘤细胞的增殖。这种新型溶瘤病毒不仅能够在低病毒滴度的情况下发挥作用,还可以在免疫细胞清除部分病毒后继续

抑制肿瘤细胞的生长,从而显著提高了溶瘤病毒疗法的疗效和稳定性。

尽管本研究在体外实验中取得了一定的成果,但溶瘤病毒递送碱基编辑器在动物体内的递送实验仍面临诸多挑战。首先,体内递送效率受到限制,溶瘤病毒本身会引发免疫反应,导致病毒被快速清除,从而影响碱基编辑器的递送效率。其次,碱基编辑器的长期安全性和潜在脱靶风险尚未完全明确,需通过更全面的实验验证其基因组编辑的精确性和可靠性。

为进一步推动溶瘤病毒递送碱基编辑器的动物体内研究与应用,未来研究可采用细胞递送方法,例如利用间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)运送溶瘤病毒。这种方法能够保护病毒不被快速清除,并更有效地靶向肿瘤部位,从而更特异性地感染肿瘤细胞,提高溶瘤病毒递送碱基编辑器的效率。

## 作者贡献声明

徐欢欢:负责数据的收集工作,确保了数据的准确性和完整性;论文初稿撰写,提供了重要的建议和反馈。李斯微:负责数据的分析工作,使用了先进的统计方法,得出了可靠的研究结果。罗希:数据整理、参与论文的撰写。周祖平:主导了研究的概念设计,确定了研究方向和目标,为整个研究框架提供了基础。毕昌昊:为研究设计提供了关键的建议和反馈,确保了研究的可行性和创新性。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## REFERENCES

- [1] KOUTSKY LA. Epidemiology of Genital Human Papillomavirus Infection[J]. The American Journal of

- Medicine, 1997, 102(5): 3-8.
- [2] MUSA J, ACHENBACH CJ, O'DWYER LC, EVANS CT, JORDAN N. Effect of cervical cancer education and provider recommendation for screening on screening rates: a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS ONE, 2017, 12(9): e0183924.
- [3] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. American Journal of Clinical Pathology, 2020, 70(1): 7-30.
- [4] BONLOKKE S, STOUGAARD M, BLAAKAER J, BERTELSEN J, ANDERSEN K, FUGLSANG K, STEINICHE T. HPV is an essential driver in recurrence of cervical cancer[J]. Pathology Research and Practice, 2024, 264: 155672.
- [5] ZHANG Y, ZOU J, LI LR, HAN MY, DONG JN, WANG X. Comprehensive assessment of postoperative recurrence and survival in patients with cervical cancer[J]. European Journal of Surgical Oncology, 2024, 50(10): 108583.
- [6] GIMENES F, SOUZA RP, DE ABREU ALP, PEREIRA MW, CONSOLARO MEL, Da SILVA VRS. Simultaneous detection of human papillomavirus integration and c-MYC gene amplification in cervical lesions: an emerging marker for the risk to progression[J]. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2016, 293(4): 857-863.
- [7] SASLOW D, SOLOMON D, LAWSON HW, KILLACKEY M, KULASINGAM SL, CAIN J, GARCIA FAR, MORSE AR, WAXMAN AG, WILBUR DC, WENTZENSEN N, DOWNING L, SPITZER M, MAKO AE, HILLEN ME, BURK RD. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer[J]. American Journal of Clinical Pathology, 2012, 137(4): 516-542.
- [8] WHITE MC, WONG FL. Preventing premature deaths from breast and cervical cancer among underserved women in the United States: insights gained from a national cancer screening program[J]. Cancer Causes and Control, 2015, 26(5): 805-809.
- [9] KESIC V. Management of cervical cancer[J]. European Journal of Surgical Oncology, 2006, 32(8): 832-837.
- [10] SINGH U, VERMA ML, RAHMAN Z, QURESHI S, SRIVASTAVA K. Factors affecting quality of life of cervical cancer patients: A multivariate analysis[J]. Journal of Cancer Research and Therapeutics, 2019, 15(6): 1338-1344.
- [11] MA R, LI ZL, CHIOCCA EA, CALIGIURI MA, YU JH. The emerging field of oncolytic virus-based cancer immunotherapy[J]. Trends in Cancer, 2023, 9(2): 122-139.
- [12] DAVISON AJ, BENKŐ M, HARRACH B. Genetic content and evolution of adenoviruses [J]. The Journal of General Virology, 2003, 84(11): 2895-2908.
- [13] BÁNYAI K, MARTELLA V, MELEG E, KISFALI P, PÉTERFI Z, BENKŐ M, MELEGH B, SZUCS G. Searching for HAdV-52, the putative gastroenteritis-associated human adenovirus serotype in Southern Hungary[J]. The New Microbiologica, 2009, 32(2): 185-188.
- [14] YANG ZR, WANG HF, ZHAO J, PENG YY, WANG J, GUINN BA, HUANG LQ. Recent developments in the use of adenoviruses and immunotoxins in cancer gene therapy[J]. Cancer Gene Therapy, 2007, 14(7): 599-615.
- [15] GINGERAS TR, SCIACKY D, GELINAS RE, BING-DONG J, YEN CE, KELLY MM, BULLOCK PA, PARSONS BL, O'NEILL KE, ROBERTS RJ. Nucleotide sequences from the adenovirus-2 genome[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1982, 257(22): 13475-13491.
- [16] ABUDOUREYIMU M, LAI Y, TIAN C, WANG T, WANG R, CHU X. Oncolytic adenovirus-A novel for gene-targeted oncolytic viral therapy in HCC[J]. Frontiers in Oncology, 2019, 9: 1182.
- [17] HORIKAWA Y, WANG Y, NAGANO S, KAMIZONO J, IKEDA M, KOMIYA S, KOSAI K. Assessment of an altered E1B promoter on the specificity and potency of triple-regulated conditionally replicating adenoviruses: implications for the generation of ideal m-CRAs[J]. Cancer Gene Therapy, 2011, 18(10): 724-733.
- [18] WIRTH T, ZENDER L, SCHULTE B, MUNDT B, PLENTZ R, RUDOLPH KL, MANNS M, KUBICKA S, KÜHNHOLD R. A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer[J]. Cancer Research, 2003, 63(12): 3181-3188.
- [19] KUMAR A, DAS SK, EMDAD L, FISHER PB. Applications of tissue-specific and cancer-selective gene promoters for cancer diagnosis and therapy [J]. Advances in Cancer Research, 2023, 160: 253-315.
- [20] 刘昕瑶, 张恺心, 林可, 季陈石, 于彬. 溶瘤腺病毒靶向改造策略研究进展[J]. 生命科学, 2022, 34(4): 459-467.
- LIU XY, ZHANG KX, LIN K, JI CS, YU B. Research progress in targeted modification strategies of oncolytic adenovirus[J]. Life Sciences, 2022, 34(4): 459-467 (in Chinese).
- [21] HEIDEMAN DAM, STEENBERGEN RDM, VAN DER TORRE J, SCHEFFNER M, ALEMANY R, GERRITSEN WR, MEIJER CJLM, SNIJDERS PJF, VAN BEUSECHEM VW. Oncolytic adenovirus expressing a p53 variant resistant to degradation by HPV E6 protein exhibits potent and selective replication in cervical cancer[J]. Molecular Therapy, 2005, 12(6): 1083-1090.
- [22] XIAO T, FAN JK, HUANG HL, GU JF, LI LY, LIU XY. VEGI-armed oncolytic adenovirus inhibits tumor neovascularization and directly induces mitochondria-mediated cancer cell apoptosis[J]. Cell Research, 2010, 20(3): 367-378.
- [23] WANG HB, SONG X, ZHANG H, ZHANG JJ, SHEN XD, ZHOU YX, FAN XQ, DAI LY, QIAN GX, HOFFMAN AR, HU JF, GE SF. Potentiation of tumor

radiotherapy by a radiation-inducible oncolytic and oncoapoptotic adenovirus in cervical cancer xenografts[J]. *International Journal of Cancer*, 2012, 130(2): 443-453.

- [24] BAUERSCHMITZ GJ, KANERVA A, WANG MH, HERRMANN I, SHAW DR, STRONG TV, DESMOND R, REIN DT, DALL P, CURIEL DT, HEMMINKI A. Evaluation of a selectively oncolytic adenovirus for local and systemic treatment of cervical cancer[J]. *International Journal of Cancer*, 2004, 111(2): 303-309.
- [25] KANTOR A, McCLEMENTS ME, MacLAREN RE. CRISPR-Cas9 DNA base-editing and prime-editing[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6240.
- [26] GAUDELLI NM, KOMOR AC, REES HA, PACKER MS, BADRAN AH, BRYSON DI, LIU DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [27] YANG X, WU H. RAS signaling in carcinogenesis, cancer therapy and resistance mechanisms[J]. *Journal of Hematology and Oncology*, 2024, 17(1): 108.
- [28] YANG C, MA Z, WANG K, DONG X, HUANG M, LI Y, ZHU X, LI J, CHENG Z, BI C. HMGNI enhances CRISPR-directed dual-function A-to-G and C-to-G base editing[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2430.
- [29] HUA K, TAO X, HAN P, WANG R, ZHU J. Genome Engineering in Rice Using Cas9 Variants that Recognize NG PAM Sequences[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(7): 1003-1014.