Chinese Journal of Biotechnology CSTR: 32114.14.j.cjb.240690 DOI: 10.13345/j.cjb.240690 王银平 等 | 溶瘤纳米颗粒 CVA21 的制备及其抗肿瘤活性分析 Apr. 25, 2025, 41(4): 1395-1414 http://journals.im.ac.cn/cjbcn ©2025 Chin J Biotech, All rights reserved

• 医药生物技术 •

溶瘤纳米颗粒 CVA21 的制备及其抗肿瘤活性分析

王银平1, 蔡奇应2, 周晶晶3, 郑小迪1, 蔡林康4, 汪洋1, 刘滨磊1*

- 1 湖北工业大学 生命科学与健康工程学院, 湖北 武汉 430068
- 2 南京大学 医学院, 江苏 南京 210093
- 3 湖北科技学院 药学院, 湖北 咸宁 437100
- 4 武汉滨会生物科技股份有限公司, 湖北 武汉 436000

王银平, 蔡奇应, 周晶晶, 郑小迪, 蔡林康, 汪洋, 刘滨磊. 溶瘤纳米颗粒 CVA21 的制备及其抗肿瘤活性分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1395-1414.

WANG Yinping, CAI Qiying, ZHOU Jingjing, ZHENG Xiaodi, CAI Linkang, WANG Yang, LIU Binlei. Preparation and antitumor activity characterization of oncolytic nanoparticles encapsulating CVA21[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1395-1414.

摘要:为了通过包封柯萨奇病毒 A21型(Coxsackievirus A21, CVA21)病毒全基因组 mRNA 制备溶瘤纳米颗粒 CVA21(CVA21@ONP),探究其复活 CVA21 病毒诱导宿主细胞凋亡的能力以及其在免疫正常的 BALB/c 荷瘤小鼠中的抗肿瘤免疫效应,本研究采用脂质体纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)包封 CVA21 病毒全基因组 mRNA 制备 CVA21@ONP,通过空斑实验和细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)确定杀伤效果,通过流式细胞术检测 HT29、CT26-iRFP 细胞凋亡情况。小鼠经瘤内给药 CVA21@ONP,检测近红外荧光蛋白(infra-red fluorescent protein, iRFP)表达的肿瘤生长状况,流式细胞术检测脾脏中免疫细胞的种类与变化。结果表明 CVA21@ONP 能在 HT29与 U87MG 细胞中成功组装 CVA21病毒。空斑实验显示 CVA21@ONP 对人源和鼠源细胞均具有良好的杀伤效果,流式检测结果显示实验组凋亡细胞显著增加,瘤内检测到 CVA21@ONP 组 iRFP 蛋白表达量显著下降。通过流式检测发现 CVA21@ONP治疗有效降低了脾脏中包括髓源性抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)和调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)在内的免疫抑制细胞的水平,同时增强了 T 细胞依赖性的抗肿瘤免疫效应。本研究经瘤内给药验证了 CVA21@ONP 的溶瘤性能,可进一步挖掘其治疗潜力并推动肿瘤治疗领域的发展。

关键词:溶瘤纳米颗粒;柯萨奇病毒 A21型;信使核糖核酸(mRNA);肿瘤

资助项目: 国家自然科学基金(32270969); 湖北省重大科技专项(2022ACA001)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32270969) and the Major Science and Technology Special Project of Hubei Province (2022ACA001).

^{*}Corresponding author. E-mail: liubl@hbut.edu.cn

Preparation and antitumor activity characterization of oncolytic nanoparticles encapsulating CVA21

WANG Yinping¹, CAI Qiying², ZHOU Jingjing³, ZHENG Xiaodi¹, CAI Linkang⁴, WANG Yang¹, LIU Binlei^{1*}

- 1 School of Life and Health Sciences, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, Hubei, China
- 2 Medical School, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China
- 3 Pharmacy School, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, Hubei, China
- 4 Wuhan Binhui Biopharmaceutical Co., Ltd., Wuhan 436000, Hubei, China

Abstract: This study aims to investigate the potential of oncolytic nanoparticles encapsulating Coxsackievirus A21 (CVA21) full-genome mRNA (CVA21@ONP) to resurrect CVA21 and induce apoptosis in host cells, as well as the antitumor immune effects of CVA21@ONP in immunocompetent tumor-bearing BALB/c mice. We used lipid nanoparticles (LNPs) to encapsulate CVA21 full-genome mRNA, thus preparing CVA21@ONP. The killing efficacy of CVA21@ONP was determined by the plaque assay and cell counting kit-8 (CCK-8), and the apoptosis in HT29 and CT26-iRFP cells was evaluated by flow cytometry. Mice were administrated with CVA21@ONP at high and low doses intratumorally, and the growth of tumors expressing infra-red fluorescent protein (iRFP) was monitored. Additionally, the types and changes of immune cells in the spleen were analyzed by flow cytometry. The results demonstrated that CVA21@ONP successfully resurrected CVA21 in both HT29 and U87MG cells. The plaque assay revealed robust killing effects of CVA21@ONP against both human and murine cell lines, and flow cytometry results showed increased early and late apoptotic cells. Notably, intratumoral detection revealed significantly down-regulated expression of iRFP in both high- and low-dose CVA21@ONP groups. Flow cytometry results further indicated that CVA21@ONP treatment effectively reduced the levels of immunosuppressive cells, including myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and regulatory T cells (Tregs), in the spleen, while enhancing T cell-dependent antitumor immune responses. These findings suggest that CVA21@ONP can replicate and survive extensively both in vitro and in vivo, activating the immune system of mice administrated with CVA21@ONP to target cells at the tumor site, thereby remodeling the tumor immune microenvironment and accelerating the suppression or even complete regression of tumors. The oncolytic performance of CVA21@ONP has been verified through intratumoral injection administration in this study, aimed at further exploring its therapeutic potential and promoting the development of the field of tumor treatment.

Keywords: oncolytic nanoparticles; Coxsackievirus A21 (CVA21); messenger ribonucleic acid (mRNA); tumor

目前,癌症已成为全球致死率最高的疾病^[1-2],核酸药物正逐渐成为治疗癌症的新选择。它们设计简单、容易合成,具有良好的生物相容性。核酸药物可编码肿瘤相关抗原,靶向沉默肿瘤

基因^[3],在癌症治疗方面,通过合理的序列设计,信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid, mRNA)可以很容易地控制生成任何类型的蛋白质^[4],这大大促进了治疗癌症替代策略的发展,

包括表达肿瘤免疫治疗中的肿瘤相关抗原和治疗性抗体,通过编码肿瘤抑制蛋白直接进行肿瘤杀伤和调节肿瘤微环境以增强治疗效果^[5-6]。

近年来,随着药物开发步伐的加快,已经有十几种核酸药物获得了美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的批准^[7]。然而,核酸具有生物稳定性差、体内易被核酸酶降解、生物利用度低、靶组织中浓度低等缺点,极大地限制了核酸药物的临床应用^[8],将脂质体纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)作为核酸药物载体是较为常用的方法之一,阳离子脂质作为 LNP 的核心功能成分,通过静电作用中和阴离子核酸,内吞进入细胞中,使 LNP 具有更高的生物相容性、核酸装载能力和转染效率^[9]。而通过 LNP 递送的方式可以有效改善上述缺点,避免核酸在生物体内降解,提高核酸的生物利用度以及靶向性等。

LNP包封 mRNA治疗肿瘤作为一种新兴的治疗技术发挥着至关重要的作用,它开辟了新的治疗途径,使得以往难以治疗的疾病得以应对,开创个性化医疗的新时代,并快速应对新出现的全球健康威胁。如生物技术公司辉瑞(Pfizer)与莫德纳(Moderna)开发的由包封在LNP中的 mRNA链组成的 mRNA新型冠状病毒(corona virus disease 2019, COVID-19)疫苗[10-11],免疫有效性高达 95%;它们是第一批获得 FDA"紧急使用授权"和"有条件批准"的 mRNA疫苗;这些 mRNA COVID-19 疫苗编码 SARS-CoV-2 的病毒刺突(spike, S)糖蛋白,其中包括 2 个脯氨酸替换,以稳定糖蛋白的预融合构象[12],在预防COVID-19 感染方面显示出较优的结果。

溶瘤病毒(oncolytic virus, OV)是很有前景的免疫试剂,OV疗法已经在多种肿瘤中得到了有效验证^[13],然而,它始终存在着一些潜在问题,包括免疫排斥、插入基因突变风险以及靶

向性方面的问题[14]。目前 OV 的给药方式比较 有限[15],分为静脉注射和瘤内注射,静脉注射 存在明显缺点,如人血清中常见的病毒特异性 抗体可迅速杀死病毒。因此,瘤内注射是 OV 治 疗实体肿瘤的主要给药途径。随着 OV 疗法[16] 的加速发展,目前已使用的 OV 载体包括单纯 疱疹病毒、痘病毒、腺病毒及肠道病毒等[17], 其中发展最快的是疱疹病毒,以它为载体的 $G47\Delta^{[18]}$ 、T-VEC $^{[19]}$ 已被批准用于肿瘤治疗。另 外,肠道病毒在其中较为特殊,其属于单股正 链 RNA 病毒,复制周期较短,能够通过细胞间 直接感染等方式发挥迅速而广泛的溶瘤作用[20]。 而柯萨奇病毒 A21型(coxsackievirus A21, CVA21) 是一种天然的未经改造直接应用的 OV^[21-22], 这 类OV疗法可以通过直接杀死肿瘤细胞或增强抗肿 瘤免疫反应来重塑肿瘤微环境破坏肿瘤细胞[23]。

本研究采用 LNP 包封 CVA21 病毒全基因 组 mRNA 制备 CVA21@ONP, 通过空斑实验和 CCK-8 确定杀伤效果以及 CVA21@ONP 对 HT29、 CT26-iRFP 细胞的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC50), 运用流式检测试 剂盒检测细胞凋亡情况。小鼠经瘤内给药的 CVA21@ONP 组,通过检测近红外荧光蛋白 (infra-red fluorescent protein, iRFP)表达评估肿 瘤的生长状况,同时,为深入了解小鼠脾脏中免 疫细胞的种类与数量变化,运用流式细胞术进行 细致分析。此外,还通过间接酶联免疫吸附测定 法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 测 定了小鼠体内 CVA21 病毒的抗体水平, 以全面 评估免疫反应情况。采用 CVA21@ONP 对小鼠肿 瘤部位的靶向给药,不仅提高了生物利用度[24], 发挥了 CVA21 病毒的溶瘤能力,同时通过 CVA21 mRNA 重塑了肿瘤微环境^[25],降低了包 括髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)和调节性 T 细胞(regulatory T

cells, Tregs)在内的免疫抑制细胞的水平,增强了T细胞依赖性的抗肿瘤免疫效应^[26]。

本研究将 OV 疗法与 mRNA 基因疗法相结合,使 mRNA 基因治疗与 OV 的溶瘤作用协同发挥,实现双重治疗效果。这种联合疗法有望通过协同增强免疫反应、促进抗原呈递、克服免疫抑制以及提高安全性等多种途径,实现对肿瘤细胞更有效的杀伤和清除。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒、细胞和实验动物

pUC57-CMV-T7-CVA21-kana 质粒由本实验室构建。eGFP @ONP 由本实验室包封。人结肠癌 HT29细胞、人胶质母细胞瘤 U87MG细胞、表达 iRFP 的小鼠结肠癌 CT26-iRFP 细胞,表达 GFP 的小鼠结肠癌 CT26-GFP 细胞以及小鼠正常肝细胞 AML12 均由本实验室前期构建并保存。42 只雌性无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 BALB/c 小鼠,6-7 周龄,体重(19±1) g,购自湖北省实验动物研究中心。所有动物实验均由湖北工业大学动物伦理委员会批准(批准号: HBUT No. 2020016)。培养温度控制在 25 ℃左右,并保持湿度在 50%,光照设置为 12 h 亮/12 h 暗。

1.1.2 试剂与仪器

本研究中使用的阳离子脂质体转染试剂 Lipid VI由武汉滨会生物科技股份有限公司研 发。0.25%胰酶购自 Grand Island Biological Company 公司;磷酸盐缓冲液(PBS)、DMEM/F12 培养基购自武汉滨会生物科技股份有限公司; 反转录试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有 限公司; Ignite 纳米药物制造系统购自 Precision Nanosystems 公司; Zetasizer Pro 纳米粒度电位 仪购自 Malvern 公司; 分体式注射泵购自苏州 汶颢微流控技术公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术股份有限公司;HRP-Goat Anti-Mouse IgG 购自武汉三鹰生物技术有限公司。二氧化碳培养箱购自松下公司;生物安全柜购自青岛海尔集团公司;Qubit 4 荧光剂和多功能酶标仪及高速冷冻离心机购自赛默飞世尔科技公司;常温冰箱及-80 ℃低温冰箱均购自青岛海尔集团公司;高内涵活细胞工作站购自 PerkinElmer 公司。

1.2 体外实验方法

1.2.1 细胞培养及 CVA21@ONP 的制备

HT29、U87MG、CT26-iRFP、CT26-GFP、AML12 细胞均由本实验室保存,细胞培养基为DMEM/F12 (含 10%胎牛血清),将细胞在含 5% CO₂、37 ℃的二氧化碳培养箱中培养。在显微镜下观察细胞,当细胞汇合度达到 80%–90%时对细胞用 0.25%胰酶消化传代。

CVA21@ONP 的制备:使用引物 CVA-F/CVA-R 对 pUC57-CMV-T7-CVA21-kana 进行 PCR, 获 得线性化的 CVA21 基因片段。对 CVA21 基因片 段进行体外转录(in vitro transcription, IVT),转 录体系: 2 μL 10×transcription buffer、2 μL rNTP (5 mmol/L)、0.1 μL T7 RNA 聚合酶(2.7 kU/μL)、 1 μg DNA 模板(366 ng/μL)、0.2 μL 无机焦磷酸 酶(2 U/ μ L)、0.04 μ L RNase inhibitor (1 kU/ μ L)、 补充 RNase-free ddH₂O 至总体积为 20 μL。将 反应体系混合均匀后于 37 ℃反应 3-4 h, 反应 结束后加入 1 μL DNase I (1 kU/μL)并于 37 ℃ 反应 15 min。去除模板后对产物使用 LiCl 进行 纯化, 获得 CVA21 mRNA。将 CVA21 mRNA 溶 于醋酸钠溶液(25 mmol/L, pH 5.0)中进行稀释, 通过纳米制药包封仪将 Lipid VI和稀释后的 CVA21 mRNA 溶液按照体积比为 1:4 的比例混 合,应用微流控技术完成自组装过程即可得到 CVA21@ONP。Zetasizer Pro 纳米粒度电位仪的

详细参数: 在(25.0±1.0) °C条件下,通过动态光散射(dynamic light scattering, DLS)测定平均粒径和zeta 电位。检测角度为 173°,激光波长为 633 nm。采用了一个功率为 4 mW 的 He/Ne 气体激光源。样品用 0.9% NaCl 稀释 100 倍,摇匀以避免多次散射效应。每个样品平衡(2.0±0.1) min,并平行测量 3 次。折射率和吸收率分别设置为 1.45 和 0.001。收集的 CVA21@ONP 溶液移至 50 kDa 超滤管中,并添加含有 8%蔗糖的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)进行换液浓缩至所需浓度且 pH 值在 7.0–7.5 之间(图 1)。通过 Qubit 4 荧光计、纳米粒度电位仪检测 mRNA-LNP 的包封率、粒径(Z-average)及聚合物分散性指数(polymer dispersity index, PI),其中包封率的计算公式为: $(1-C_f/C_t)\times100\%$ (C_f 为游离样品的 mRNA 量、 C_t 为总 mRNA量)。

CVA21@ONP 的透射电镜:使用移液枪吸取 20 μL CVA21@ONP 溶液,滴加到干净的滤

纸上,形成半球形液滴。用尖头镊子夹住带有 碳支持膜的铜网的边缘,将其正面朝下放在 CVA21@ONP 液滴上,确保铜网与溶液充分接 触。吸附 5 min 后用滤纸从铜网边缘轻轻吸去 多余的溶液, 使铜网上只留下一层薄薄的 CVA21@ONP溶液层。将铜网转移到另一张干 净的滤纸上。将 20 μL 的 2%磷钨酸溶液滴加到 铜网上,确保磷钨酸溶液覆盖整个铜网表面。 负染 2 min, 其间可以轻轻晃动铜网或使用滤纸 在铜网边缘轻轻吸去多余的磷钨酸溶液,以促 进染色剂更好地渗透和染色。负染结束后,用 滤纸从铜网边缘小心吸去多余的磷钨酸溶液。将 铜网转移到蒸馏水滴上,用蒸馏水洗涤 1-2次, 以去除未结合的染色剂。再次用滤纸从铜网边 缘小心吸去水分,将铜网置于干净滤纸上,室 温下风干。待铜网完全干燥后,将其放入透射电 镜的样品室中拍照确定 CVA21@ONP 的形状。

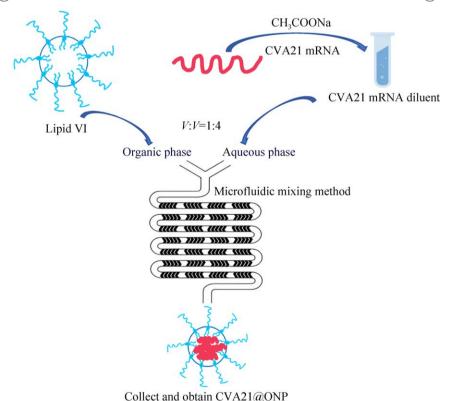


图 1 LNP 包封 CVA21 MRNA 示意图

Figure 1 A schematic diagram of LNP encapsulating CVA21 mRNA.

1.2.2 CVA21@ONP 转染细胞并鉴定 CVA21 病毒

将 HT29、U87MG、CT26-iRFP、CT26-GFP、 AML12 细胞铺 6 孔板,每孔 5×10⁵ 个细胞,在 二氧化碳培养箱中培养过夜。弃去旧培养基, 补充 2 mL 新鲜培养基,将 CVA21@ONP 以 mRNA 质量为 2 μg 转染 6 孔板中细胞, eGFP@ONP 组同样以 mRNA 质量为 2 μg 转染 细胞; 空载组(LNP)组以相同体积的脂质体及缓 冲液处理细胞; 空白组加入等量培养基处理细 胞。待80%细胞产生病变后,将6孔板放入 -80 ℃冰箱反复冻融 3 次,离心后取上清液获 得病毒,将病毒记为 P0-CVA21。将病毒 P0-CVA21 继续感染 HT29、U87MG 细胞,于 -80 ℃反复冻融 3 次, 5 000 r/min 离心 5 min 后 取上清, 收获的上清使用 0.45 µm 滤膜过滤去 除细胞碎片,将收集到的病毒使用 100 kDa 的 超滤管浓缩 20 倍,浓缩后的病毒经磷钨酸负染 后使用透射电镜拍照。CT26-GFP 细胞从转染 CVA21@ONP 开始计为 0 h, 随后用高内涵活细 胞工作站持续拍摄 24 h。

1.2.3 测定浓缩后的病毒滴度

细胞消化并计数后于96孔板中加入HT29、U87MG 细胞悬液 $100 \mu L$,每孔 2×10^4 个细胞,在二氧化碳培养箱中培养过夜。细胞汇合度达70%—100%时,取出待测病毒,以 10 倍浓度梯度做连续稀释,使病毒稀释度为 10^{-1} — 10^{-10} ,96孔板的 1—10 列依次对应 10^{1} — 10^{10} 稀释倍数的待检样本,每个稀释倍数 8 个复孔(即第 1—8 列),加入待检样本稀释液, $100 \mu L$ /孔,将培养板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。48—72 h 后观察噬毒斑个数,以公式 $1gTCID_{50}=L-d(s-0.5)$ (其中 L、d、s 分别表示最高稀释度的对数、稀释度对数之间的差、阳性孔比率总和)计算病毒滴度。

1.2.4 空斑实验-结晶紫染色法检测细胞活力

细胞消化并计数后于 6 孔板中加入 HT29、U87MG、CT26-iRFP 细胞悬液 2 mL,每孔 1×10⁶个细胞,在二氧化碳培养箱中培养过夜。第 2 天弃去旧培养基,补充 2 mL 新鲜培养基,将细胞分为 4 组,CVA21 组将 CVA21@ONP以 mRNA质量为 2 μg 转染细胞;eGFP 组将 eGFP@ONP同样以 mRNA质量为 2 μg 转染细胞;LNP 组以相同体积的脂质体及缓冲液处理细胞;空白组加入等量培养基处理细胞,设置 2 个复孔。细胞培养 72 h 后弃上清,用 PBS 润洗 2 次,4%多聚甲醛固定 15 min,继续用 PBS 润洗 2 次,向每孔中加入 1 mL 结晶紫染色 10–15 min 后,立即用 PBS 润洗 2 次后拍照。

1.2.5 CCK8 检测 CVA21@ONP 细胞毒性

取对数生长期的 HT29、CT26-iRFP 细胞消 化并计数后于 96 孔板中加入悬液 100 μL, 每孔 5×10³个细胞,在二氧化碳培养箱中培养过夜, 待细胞贴壁后进行毒性试验。转染组每孔分别 转染 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4 和 0.8 μg CVA21 mRNA, 对照组(LNP)细胞均加入等量培养基和 转染试剂,空白组(Control)细胞只加入等量培 养基,每组设6个重复。病毒组接种 CVA21 病 毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)分别 为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8,置于 37 ℃ 二氧化碳培养箱中培养 48 h 后,加入 CCK-8 试剂,每孔 10 μL,重新置于 37 ℃的二氧化碳 培养箱中孵育 1 h, 孵育结束后用酶标仪测定 450 nm 波长下光密度 OD 值,按照公式:细胞 存活率(100%)=[(试验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)]×100%, 计 算细胞活率。处理数据时,每组去除最大值和 最小值,减小误差。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期的 HT29、CT26-iRFP 细胞消

化并计数后于 6 孔板中加入悬液 2 mL,每孔 1×10⁶ 个细胞,在二氧化碳培养箱中培养过夜,待细胞贴壁后进行转染。CVA21@ONP 组转染 2 μg CVA21 mRNA,空载组(LNP)均加入等量的转染试剂转染 LNP 空载,阳性对照组(0.5)接种 MOI=0.5 的 CVA21 活病毒,阴性对照组(0.5)接种 MOI=0.5 的 CVA21 活病毒,阴性对照组(0.5)接种 MOI=0.5 的 CVA21 活病毒,阴性对照组(0.5)接种 MOI=0.5 的 CVA21 活病毒,阴性对照组(Control)加入等量培养基,24 h和 48 h时分别检测每组细胞凋亡状态。根据 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书,每组取 1×10⁵ 个细胞,1 000×g 离心 5 min,弃上清,加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀,和 10 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色液,轻轻混匀,孵育 10–20 min 后冰浴,铝箔避光,孵育过程中重悬细胞 2–3 次,上机检测。

1.3 体内实验方法

1.3.1 肿瘤模型构建

取生长状态良好的 CT26-iRFP 细胞,胰酶消化后计数,制备为 1×10⁷/mL 的单细胞悬液,每只 BALB/c 小鼠皮下注射 100 μL 建立 BALB/c-CT26-iRFP 肿瘤模型。每日观察肿瘤生长情况,肿瘤体积(mm³)=0.5×(a×b)² (其中 a、b 分别表示长径、短径),待小鼠肿瘤体积约为 100 mm³ 时将小鼠分笼。将肿瘤体积达到 100 mm³ 左右的 30 只小鼠分为 5 组(表 1)。为各组小鼠瘤内注射 100 μL 不同浓度(10 μg/100 μL、2 μg/100 μL)的 CVA21@ONP 及 1×10⁶ 50%细胞感染量(50% cell culture infectious dose, CCID₅₀)/mL 的 CVA21病毒。LNP 毒性对照组瘤内注射空载脂质体纳

米颗粒 100 μL, 对照组(Control)瘤内注射 PBS 100 μL。将首次给药时间记为 0 d, 于第 0、3、6 天对小鼠进行瘤内给药。

1.3.2 CT26-iRFP 近红外荧光蛋白在肿瘤 部位持续时间的检测

CT26-iRFP 细胞成瘤后表达的近红外荧光 蛋白能在小鼠瘤内检测到。在第 3、6、9、12、 15 天对每组小鼠麻醉后使用小动物活体成像仪 拍照。

1.3.3 流式细胞术检测小鼠脾脏组织免疫细胞比例

制备脾脏单细胞悬液: 脾脏组织直接研磨至能够通过 70 μ m 滤网进行过滤, $400 \times g \times 4 \,^{\circ}$ C 离心 5 \min 后弃上清,加入红细胞裂解液 5 \min 后用 PBS 终止裂解,继续离心弃上清,PBS 重悬后计数,取 2×10^5 个细胞加入 5 μ L Zombie AquaTM染料吹匀染色 30 \min 后离心弃上清。

T细胞的分选:依次加入鼠源CD3、CD4、CD8、CD25、CD44、CD49b 抗体,避光孵育30 min,PBS 洗涤细胞,加入固定液进行细胞固定,固定后用破膜剂进行破膜,加入Foxp3避光孵育30 min后PBS 洗涤细胞2次,进行流式细胞术检测。

树突状细胞(dendritic cells, DCs)、MDSCs的分选:依次加入鼠源CD45、CD11b、CD11c、GR-1 抗体,避光孵育30 min, PBS 洗涤细胞,加入固定液进行细胞固定,固定后用破膜剂进行破膜加入MHC II避光孵育30 min后PBS洗涤细胞2次,使用流式细胞术检测抗体。

表 1 给药分组方案

Table 1 Dose grouping scheme

Group	Type of administration	Dosage (100 µL/piece)	Number of animals	
High-dose group	CVA21@ONP	10 μg/100 μL	6	
Low-dose group	CVA21@ONP	2 μg/100 μL	6	
Virus-group	CVA21	1×10^6 CCID ₅₀ /mL	6	
LNP	ONP	100 μL	6	
Control	PBS	100 μL	6	

1.3.4 小鼠体内 CVA21 病毒抗体水平检测

制备 CVA21 病毒抗原: 1×10^{6.5} CCID₅₀/mL 的病毒样本在常温中化冻,充分混匀后,紫外 照射 30 min 裂解, 超声破碎: 30%功率, 开 2 s, 关 1 s, 超声 6 min。血清样品的制备: 每组 BALB/c 小鼠 3 次瘤内给药后,处死前眼球采 血,置于离心管中。全部血样均于室温或37℃ 静置 1 h 后,4℃过夜,4000 r/min 离心 10 min 获得血清,分装后于-80 ℃冻存,待测。取酶 标板用包被缓冲液将 CVA21 病毒抗原稀释至 1×10^{6.2} CCID₅₀/mL,加入96 孔酶联板中,每孔 100 μL, 4 ℃包被过夜后, 每孔加入 250 μL 明 胶封闭液, 37 ℃孵育 2 h。每孔加入 100 μL 待 测样品,分别测定每组小鼠血清样本,37℃孵 育 1 h。用二抗稀释液按 1:2 000 稀释 HRP 标记 的羊抗鼠 IgG,每孔加入 100 μL,37 ℃避光孵 育 30 min。加入 TMB 显色液, 室温避光放置 10 min。最后加入 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应, 用酶标仪于 450 nm 波长处测定 OD 值。

1.4 统计学分析

数据统计采用 GraphPad Prism 9 软件进行处理,数据以平均值±标准误(mean±SEM)表示。两组组间差异性采用独立样本 t-test 分析,以 P<0.05 表示有显著统计学差异,P<0.01 表示有极显著统计学差异。

2 结果与分析

2.1 CVA21@ONP 的制备

PCR 扩增得到线性化的 CVA21 基因片段,结果如图 2A 所示,条带大小符合预期(7 522 bp); IVT 结果如图 2B 所示,成功转录为 mRNA 产物。包封 mRNA 产物 CVA21@ONP 和 LNP 空载的粒径分布如图 3 所示。多分散指数(polydispersity index, PI)如表 2 所示,粒径小于 100 nm, PI 值在 0.1 附近,分布稳定,说明 CVA21@ONP 和

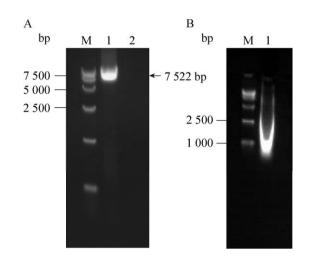


图 2 CVA21 琼脂糖凝胶电泳 A: 线性化 CVA21 基因片段。泳道 1: CVA21; 泳道 2: 空白 对照。B: CVA21 IVT 产物。泳道 1: CVA21-mRNA。 Figure 2 Agarose gel electrophoresis of CVA21. A: Linearizes CVA21 gene fragment. Lane 1: CVA21; Lane 2: Control. B: CVA21 IVT product. Lane 1: CVA21-mRNA.

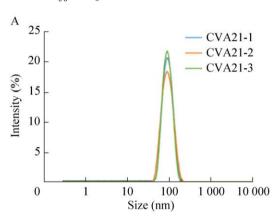
LNP 空载颗粒均一性和稳定性良好,使用透射电镜确定 CVA21@ONP 和 LNP 的形状大小均一(图 4),适用于后续下游实验。

2.2 CVA21@ONP 转染不同细胞及 CVA21 病毒组装结果

如图 5 所示,转染 CVA21@ONP 的 HT29、U87MG 人源细胞大量发生病变并脱落,甚至死亡,转染 CVA21@ONP 的 CT26-iRFP 鼠源细胞也发生了病变、脱落,而转染 LNP、eGFP @ONP的细胞未脱落,与 Control 组生长情况基本一致。转染鼠源 AML12 的正常细胞发现,CVA21@ONP 组与其他对照组生长状态基本一致,基本未发现病变和脱落,表明 CVA21@ONP只靶向肿瘤细胞,对正常细胞的影响较小。如图 6 所示,对转染鼠源 CT26-GFP 细胞持续观察发现,在转染后仅 12 h,红色框内即出现了明显的病毒噬斑,表明 CVA21@ONP 具有较快的转染速度和较短的潜伏时间,潜伏期时间为

12 h。进一步观察至 23 h 时,病毒噬斑显著扩大,形成了较大的空斑,表明大部分肿瘤细胞已经裂解,开始复制至肿瘤细胞裂解需要 23 h。对 HT29、U87MG 这 2 种细胞复活的病毒浓缩液进行透射电镜拍照,结果如图 7 所示,病毒颗粒大小均一,符合 CVA21 形态特征,表明CVA21@ONP 可以使 CVA21 病毒在体外复活成功。

HT29 和 U87MG 细胞复活的 CVA21 病毒浓缩后经测定滴度分别为 1×10^{7.625} CCID₅₀/mL 和 1×10^{7.25} CCID₅₀/mL。



2.3 空斑实验显示 CVA21@ONP 溶瘤效果

如图 8 所示,转染 3 种细胞结晶紫染色 48 h后,与其他对照组相比,CVA21@ONP组产生的空斑最多,空白面积最大。结果显示,CVA21@ONP 能够在体外环境中成功组装CVA21病毒,这一组装过程对人源细胞和鼠源细胞均有效,并展现出显著的溶瘤效果。另外LNP 空载组空斑面积与阴性对照 Control 组基本接近,说明 CVA21@ONP 中脂质体包封试剂对细胞的毒性很小。

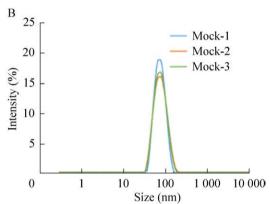


图 3 粒径分布图 A: CVA21@ONP; B: LNP 空载。

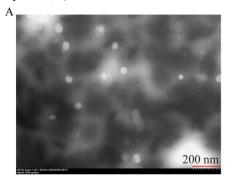
Figure 3 Particle size distribution. A: CVA21@ONP; B: LNP no-load.

表 2 包封产物参数表

Table 2 Detailed parameters of the encapsulated product

	1	1	1		
	Z-average (nm)	PI	C_f	C_t	Encapsulation efficiency
CVA21@ONP	90.58	0.060 38	5.94 ng/μL	246 ng/μL	97.58%
LNP	77.67	0.141 40	N/A	N/A	N/A

PI: Polymer dispersity index; C_f . The amount of free mRNA in the sample; C_f : Total mRNA.



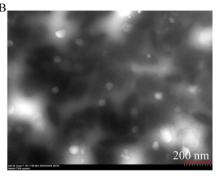


图 4 透射电镜图 A: CVA21@ONP; B: LNP 空载。

Figure 4 Electron microscopy. A: CVA21@ONP; B: LNP no-load. Scale bar=200 nm.

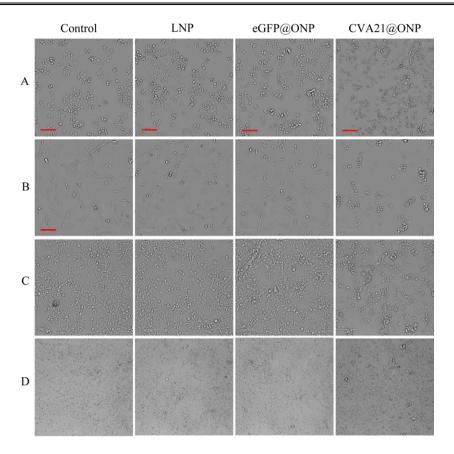


图 5 CVA21@ONP 转染不同细胞 A: HT29 细胞; B: U87MG 细胞; C: CT26-iRFP 细胞; D: AML12 细胞。

Figure 5 CVA21@ONP transfected different cells. A: HT29 cell; B: U87MG cell; C: CT26-iRFP cell; D: AML12 cell. Scale bar (red)=100 μm.

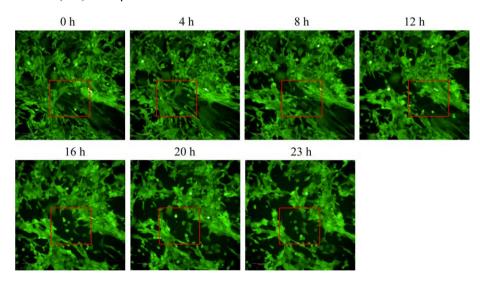


图 6 CVA21@ONP 转染 CT26-GFP 细胞持续拍照

Figure 6 CVA21@ONP transfected CT26-GFP cells were continuously photographed. The square (red) is $(100\times100)~\mu m$.

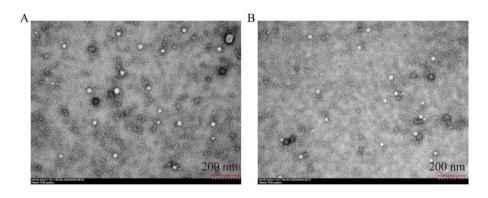


图 7 透射电镜图 A: HT29 细胞复活 CVA21 病毒; B: U87MG 细胞复活 CVA21 病毒。 Figure 7 Electron microscopy. A: Electron microscopy showed that HT29 cells reactivated CVA21 virus; B: Electron microscopy showed that U87MG cells reactivated CVA21 virus. Scale bar=200 nm.

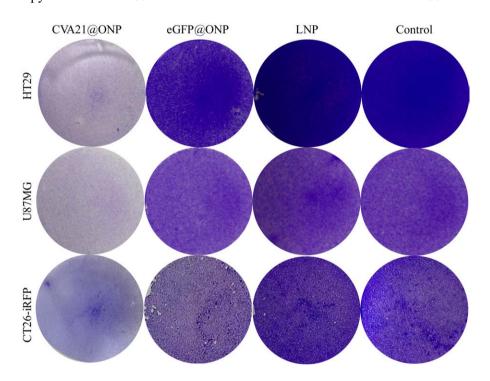


图 8 CVA21@ONP 转染 3 种细胞的空斑效果图

Figure 8 Plaque effect of CVA21@ONP transfection on three cell lines.

2.4 CCK8 检测 HT29、CT26-iRFP 细胞存活率

如图 9 所示,每组样本 *n*=4, CVA21@ONP转染 HT29 细胞 48 h 后,细胞存活率随着剂量的增加显著下降,与 CVA21 活病毒感染 48 h 后结果表现基本一致,呈现剂量依赖性,表明 CVA21@ONP 在体外对 HT29 细胞具有较好杀

伤效果。确定 CVA21@ONP 对 HT29 细胞的 IC₅₀ 为 0.149 1 μg。 CVA21@ONP 转染 CT26-iRFP 细胞 48 h 后,细胞存活率随着剂量的增加显著下降,表明 CVA21@ONP 在体外对 CT26-iRFP 细胞具有较好杀伤效果,确定 CVA21@ONP 对 CT26-iRFP 细胞的 IC₅₀ 为 0.160 7 μg。但 CVA21 活病毒在体外对 CT26-iRFP 细胞的感染不明显。

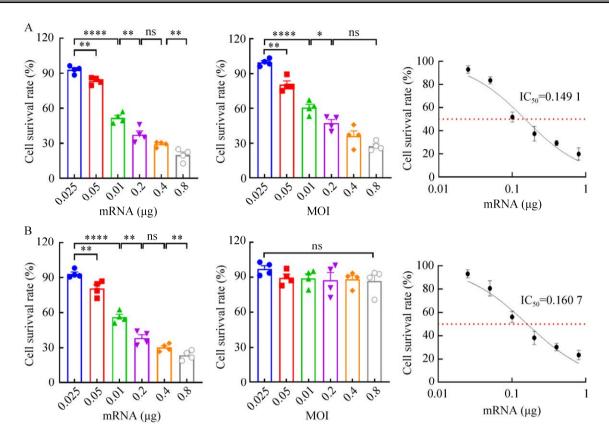


图 9 CVA21@ONP 及 CVA21 病毒处理后细胞存活率 A: HT29 细胞; B: CT26-iRFP 细胞。 Figure 9 Survival rate of cells treated with CVA21@ONP and CVA21 virus. A: HT29 cell; B: CT26-iRFP cell. *: P<0.05; **: P<0.01; ****: P<0.000 1; ns: Not statistically significant.

2.5 流式细胞术检测 CVA21@ONP 诱导 HT29、CT26-iRFP 细胞凋亡

如图 10 所示, 24 h 后转染 CVA21@ONP 组 HT29 人源细胞早期凋亡比例为 31.33%, 感染 CVA21 病毒组比例为 30.08%, 两组细胞凋亡比例分布接近; 48 h 后转染 CVA21@ONP 组早期凋亡比例为 58.91%, 感染 CVA21 病毒组比例为 55.03%, 细胞凋亡比例分布依旧接近,而与 Control 组与 LNP 组相比凋亡细胞明显增多, 表明 CVA21@ONP 组与 CVA21病毒组在体外对 HT29 人源细胞具有相同的凋亡诱导能力。24 h 后转染 CVA21@ONP 组 CT26-iRFP鼠源细胞晚期凋亡比例为 32.96%, 而感染CVA21病毒组比例为 8.62%, 48 h 后转染

CVA21@ONP 组晚期凋亡比例为 54.88%, 感染 CVA21 病毒组比例为 12.37%, 且 CVA21 病毒组与 Control 和 LNP 组凋亡细胞比例相对接近,表明 CVA21@ONP 在体外可以直接使 CT26-iRFP 鼠源细胞发生凋亡甚至死亡,但 CVA21 活病毒的凋亡能力不明显。对照组中部分细胞因为细胞培养过程中的一些非特异性因素,如细胞密度、培养条件、时间、传代次数等,或者实验操作中染色吹打混匀的过程等情况导致的细胞凋亡,造成了少量细胞出现机械性损伤的凋亡现象,占比在 10%左右,在可控的范围内且对照组有可重复性,与实验组30%以上形成鲜明对比,所以认定此实验数据有对照意义。

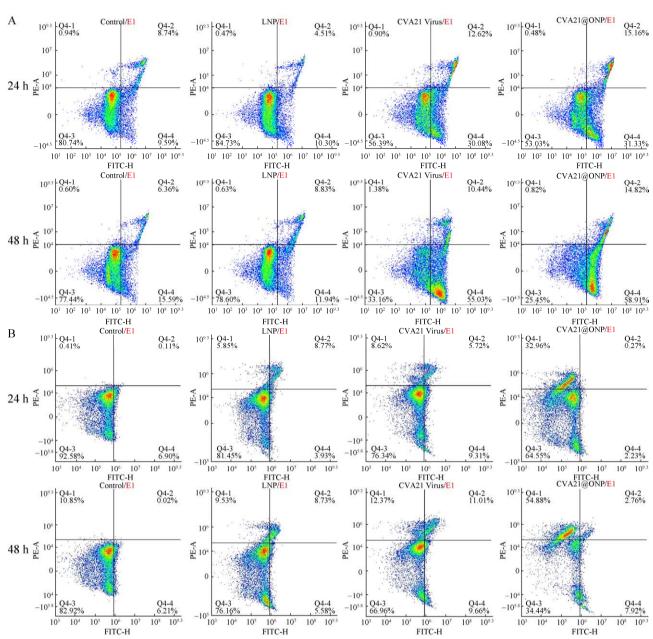


图 10 流式细胞术检测细胞凋亡分布图 A: HT29 细胞; B: CT26-iRFP 细胞。 Figure 10 Cell apoptosis detected by flow cytometry. A: HT29 cell; B: CT26-iRFP cell.

2.6 CVA21@ONP 在荷瘤小鼠模型中的抗肿瘤效果

在首次给药后的第 15 天, CVA21@ONP 高、低剂量这 2 组 BALB/c 小鼠剥出肿瘤体积显著小于 Control 组,且 2 组都出现了无瘤小鼠。如图 11 所示,每组小鼠 6 只, Control 组与 LNP 组的小鼠肿瘤生长曲线基本一致,表明 LNP 在

体内对肿瘤毒性影响较小。第 15 天肿瘤体积 Control 组与 CVA21@ONP 高、低剂量组存在极显著的统计学差异(*P*<0.001)。

2.7 CT26-iRFP 近红外荧光蛋白在肿瘤 部位持续时间的检测

通过动物活体成像仪对不同时间段 BALB/c-CT26-iRFP 肿瘤中携带的 iRFP 表达进行检

测,结果如图 12、13 所示。每组小鼠 6 只,进行 瘤内给药 CVA21@ONP 后的高、低剂量组,检测 到 BALB/c-CT26-iRFP 表达的 iRFP 荧光强度明显

低于 Control 组与 LNP 组,随着时间增长差异更加显著,表明瘤内给药 CVA21@ONP 能显著抑制肿瘤生长甚至使肿瘤完全消退。

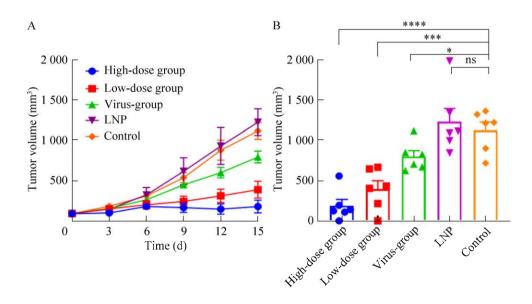


图 11 BALB/c 小鼠肿瘤体积大小 A:肿瘤体积随时间的变化; B:第 15 天肿瘤体积。

Figure 11 Tumor size in BALB/c mice. A: Changes in tumor volume over time; B: Tumor volume on day 15. *: P<0.05; ***: P<0.001; ****: P<0.000 1; ns: Not statistically significant.

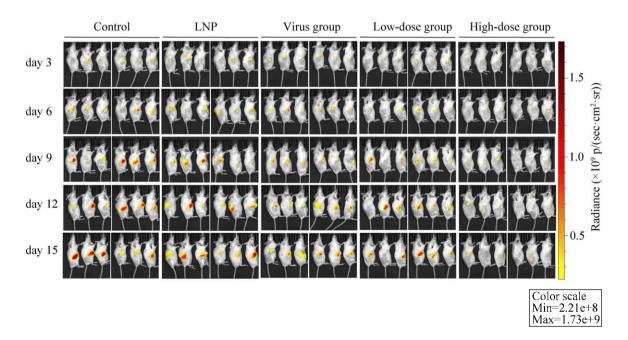


图 12 小鼠瘤内 iRFP 表达近红外荧光信号强度的变化

Figure 12 Changes of near-infrared fluorescence signal intensity of iRFP expression in tumor tissue of mice.

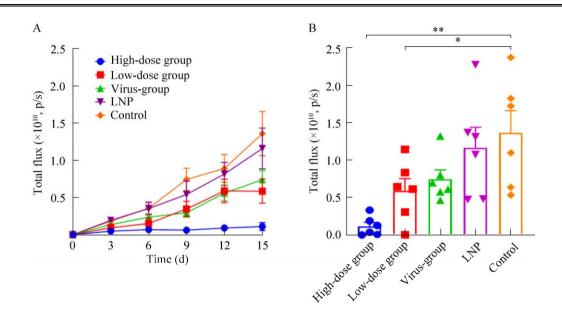


图 13 BALB/c 小鼠瘤内表达 iRFP 信号强度 A: 小鼠瘤内 iRFP 荧光强度随时间的变化; B: 第 15 天小鼠瘤内 iRFP 荧光强度。

Figure 13 Intratumoral expression of iRFP signal intensity in BALB/c mice. A: Changes of intratumor iRFP fluorescence intensity over time; B: Intratumoral iRFP fluorescence intensity in mice on day 15. *: P<0.05; **: P<0.01.

2.8 流式细胞术检测脾脏中免疫细胞的 种类与数量变化

脾脏免疫细胞的表型是描述小鼠外周免疫状况的重要指标,通过流式细胞术分析了脾脏中不同免疫细胞的百分比结果如图 14 所示。每组样本 n=3。Tregs 和 MDSCs 是 2 种类型的免疫抑制细胞,在首次给药后的第 15 天,CVA21@ONP高剂量组脾脏中 Tregs 的比例相对于 Control 组显著下降,其他组也有所下降,但没有显著的统计学差异(图 15A)。CVA21@ONP高、低剂量组和 Virus 组脾脏中 MDSCs 的百分比与Control 组相比,均显著降低(图 15B)。自然杀伤细胞(natural killer cells, NKs)是淋巴细胞的一个亚群,主要参与先天免疫,并在抗肿瘤免疫应答中发挥关键作用。Control 组 NK 细胞百分比显著低于 CVA21@ONP高剂量组,其他组有所上升,但没有显著的统计学差异(图 15C)。

脾脏中 Control 组细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T cells, Tc cells)明显低于 CVA21@ONP 高、低剂 量组和 Virus 组, 具有显著的统计学差异(图 15D)。树突状细胞(dendritic cells, DCs)被认为 是体内最有效的专业抗原呈递细胞, 是连接先 天免疫和适应性免疫的桥梁。Control 组 DCs 显著低于 CVA21@ONP 高、低剂量组,与 Virus 组无明显差异性(图 15E)。记忆 T 细胞的发育通 常被认为是对介导强免疫的外来抗原的成功免 疫反应的特征。检测到与 Control 组相比, CVA21@ONP 高、低剂量组 CD8+记忆 T 细胞显 著增加, 而 Virus 组无明显差异(图 15F)。 CVA21@ONP 高、低剂量组 CD4⁺记忆 T 细胞也 显著增加, 且 Virus 组无明显差异(图 15G)。这 些结果表明, CVA21@ONP 治疗降低了包括 MDSCs 和 Tregs 在内的免疫抑制细胞的水平,同 时增强了T细胞依赖性的抗肿瘤免疫效应。

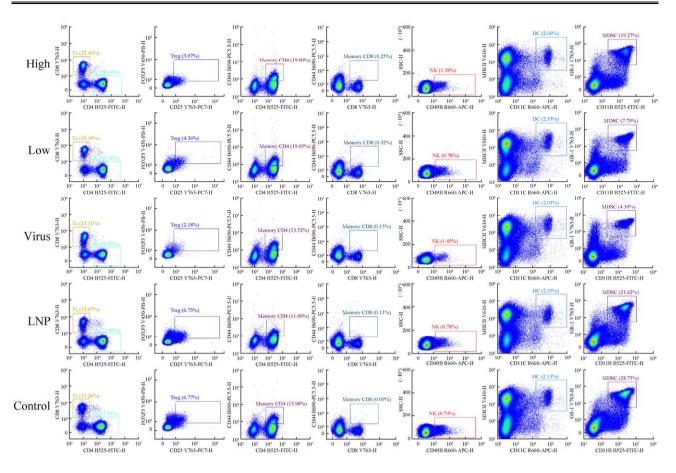


图 14 每组代表性样本的流式细胞术分析

Figure 14 Flow cytometry analysis of a representative sample of each group.

2.9 小鼠体内针对 CVA21 病毒的抗体 含量测定

对第 15 天小鼠血清中 CVA21 抗体水平进行间接 ELISA 检测,如图 16 所示,与 Control组和 LNP 组相比,高、低剂量 CVA21@ONP组 CVA21 抗体水平显著提高,且均存在显著性差异(P<0.01),表明 CVA21@ONP可在小鼠体内大量复制存活,且能够激活机体对 CVA21的抗体中和作用,经验证,免疫系统对机体具有显著的保护作用。

3 讨论与结论

OV 介导的抗肿瘤免疫治疗具有广阔的应用前景,将 OV 免疫疗法与 mRNA 基因疗法相

结合,通过 LNP 载体包封,同时递送 mRNA 发挥肿瘤治疗能力,并且利用 OV 特有的抗原性质有效刺激体内产生免疫反应,激活免疫系统,使其协同发挥更强大而全面的溶瘤效果^[27]。

CVA21 属于小 RNA 病毒,应用核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)完成非帽结构的依赖性翻译,使其在宿主细胞内快速完成复制的过程,继而产生病毒血症激活炎症反应信号通路,上调细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)和衰变加速因子(decayaccelerating factor, DAF)的表达,诱导机体的固有免疫和适应性免疫应答^[28]。与目前研究的大多数 OV 一样,体内自然免疫存在的抗体会对 CVA21 的溶瘤作用产生影响。

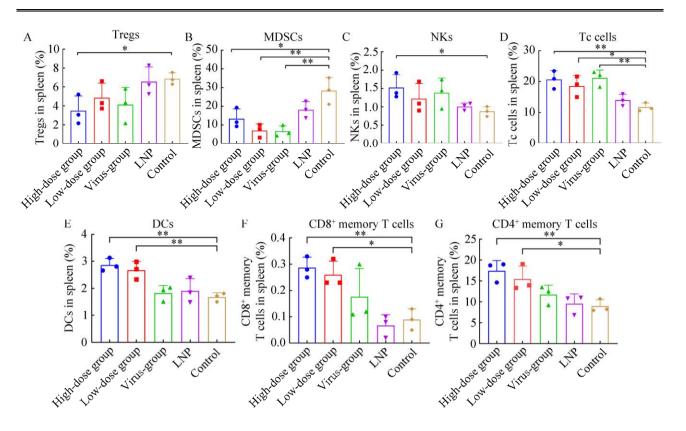


图 15 流式细胞术检测小鼠脾脏组织中不同免疫细胞百分比 A:调节性 T 细胞; B:髓源性抑制细胞; C:自然杀伤细胞; D:细胞毒性 T 细胞; E: 树突状细胞; F: CD8⁺记忆 T 细胞; G: CD4⁺记忆 T 细胞。

Figure 15 The percentage of different immune cells in the spleen tissue of mice was determined by Flow cytometry. A: Tregs; B: MDSCs; C: NKs; D: Tc cells; E: DCs; F: CD8⁺ memory T cells; G: CD4⁺ memory T cells. *: *P*<0.05; **: *P*<0.01.

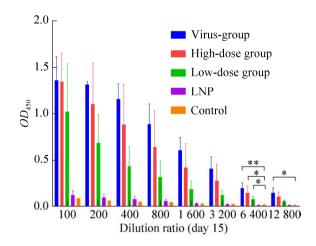


图 16 第 15 天血清中 CVA21 抗体水平 Figure 16 The level of CVA21 antibody in serum on the 15th day. *: P<0.05; **: P<0.01.

2008 年, Kelly 等^[29]利用编码宿主特异性 miRNA 固定 CVA21 在特定组织中进行复制增殖,不仅提高了 CVA21 的溶瘤作用,也为生物 安全性提供了参考。

mRNA编码多种治疗蛋白,已被广泛研究用于癌症免疫治疗^[30]。对于mRNA的包封,通常将LNP和mRNA分别溶解在乙醇和酸性水相中,然后使用微流控装置,将脂质体和mRNA以1:4的体积比混合,完成自组装过程。在形成过程中,可电离的阳离子脂质被质子化带正电,然后通过静电相互作用与带负电的mRNA结合,从而将mRNA包裹在LNP内。同时,

其他物质如辅助脂质,磷脂、胆固醇和 PEG 化脂质等同时完成自组装,形成稳定的 mRNA-LNP。随后,通过缓冲交换将 mRNA-LNP 溶液调整为中性 pH,在此期间,可电离脂质不带电,使其在生理 pH 下稳定且毒性较小^[31]。相比于传统 OV 疗法,LNP 包封 mRNA 具有亲和力高、毒性低、不易产生耐药性等特点。使用 LNP 配方的 mRNA 疫苗会出现短暂的局部炎症,驱动中性粒细胞和抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APCs)募集到注射部位。被招募的 APCs能够摄取 LNP 和蛋白表达,并随后可以迁移到T 细胞启动发生的局部引流淋巴。本研究发现CVA21@ONP 也具有类似的免疫效应。

本研究包封 CVA21 病毒全基因组 mRNA 制备的 CVA21@ONP 在正常的 BALB/c 荷瘤小 鼠中研究其溶瘤效果、安全性以及免疫效应, 结果表明 CVA21@ONP 能在 HT29 与 U87MG 细胞中成功复活 CVA21 病毒且病毒可大量复制 存活。空斑实验显示 CVA21@ONP 对人源和鼠源 细胞均具有良好的杀伤效果, CCK-8 测定 CVA21@ONP对HT29细胞的IC₅₀为0.1491 μg, 对 CT26-iRFP 细胞的 IC50 为 0.160 7 μg, 流式 检测结果显示 CVA21@ONP 可使 HT29、 CT26-iRFP细胞的凋亡比例增多。通过对BALB/c 荷瘤小鼠瘤内给药检测到 CVA21@ONP 高、低 这 2 个剂量组 iRFP 蛋白表达显著下降。通过流 式检测发现脾脏中 CVA21@ONP 治疗组 MDSCs 和 Tregs 在内的免疫抑制细胞的水平显 著低于 Control 组, Tc 细胞、CD4⁺记忆 T 与 CD8⁺ 记忆T在内的T细胞依赖性抗肿瘤免疫细胞显 著增加,间接 ELISA 法测定小鼠体内 CVA21 病毒抗体水平显著增加。这些结果表明 CVA21@ONP 不仅能够在体内外环境中有效复 制并保持其存活能力,而且在小鼠模型中展现 出了显著的免疫激活效应。具体来说,通过调 节免疫细胞的种类和数量变化靶向 CVA21@ONP 给药的肿瘤部位,进而针对肿瘤 组织产生作用。这一过程不仅重塑了肿瘤局部 的免疫微环境,还抑制了肿瘤生长的。目前, 已上市的溶瘤病毒制剂,如 T-VEC,仍仅通过 瘤内注射这一单一途径来实现病毒的给药[17], 病毒直接与机体接触可能会引发不良反应。 CVA21@ONP 能够精确识别并特异性地靶向肿 瘤细胞,这种高度的特异性使得它在裂解肿瘤 细胞时更加精准有效,从而最大限度地减少对周 围正常细胞的非特异性损伤。这一特性不仅提升 了治疗的安全性,也优化了治疗效果。LNP 包 封技术的应用进一步降低了 CVA21@ONP 对机 体本身的潜在毒副作用。LNP 作为一种生物相 容性良好的纳米载体,能够有效地保护病毒颗 粒在体内的传输过程中免受降解,同时促进其 在肿瘤部位的富集,进一步增强了治疗效果, LNP 的包封还减少了病毒颗粒与机体非特异性 免疫反应的接触,从而降低了全身性副作用, 提高了治疗的生物安全性。本研究验证了 CVA21@ONP 的溶瘤性能,下一步将采用尾静 脉注射给药方式,进一步挖掘溶瘤纳米颗粒的 治疗潜力,推动肿瘤治疗领域的发展。

综上,本研究证明 CVA21@ONP 能在正常的 BALB/c 荷瘤小鼠中复制存活并具有显著的溶瘤效果,未来将积极探索 CVA21@ONP 对其他肿瘤的治疗效果^[31],同时探索溶瘤纳米颗粒的给药途径、包封试剂和包封方式等,降低包封试剂毒性^[32]以及增加肿瘤靶向性^[33],如通过增加编码肿瘤相关抗原、靶向沉默肿瘤基因以及与其他药物联合用药^[34]等。

作者贡献声明

王银平:论文的整体构思与设计、实验数据收集与分析,撰写论文初稿;蔡奇应:参与

方案的设计、实验操作、数据处理,审阅论文初稿;周晶晶:文献查阅,提供肿瘤模型构建及实验操作指导;郑小迪:提供纳米颗粒制备技术与包封意见;蔡林康:整理研究领域的背景信息和前人研究成果并对文章进行润色;汪洋与刘滨磊:在实验设计和实施过程中提出意见,帮助修改论文复稿。

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] THANGAVEL P, VISWANATH B, KIM S. Recent developments in the nanostructured materials functionalized with ruthenium complexes for targeted drug delivery to tumors[J]. International Journal of Nanomedicine, 2017, 12: 2749-2758.
- [2] GHORBANI M, HAMISHEHKAR H. Redox and pH-responsive gold nanoparticles as a new platform for simultaneous triple anti-cancer drugs targeting[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2017, 520(1/2): 126-138.
- [3] OPALINSKA JB, GEWIRTZ AM. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2002, 1(7): 503-514.
- [4] KUBIATOWICZ LJ, MOHAPATRA A, KRISHNAN N, FANG RH, ZHANG LF. mRNA nanomedicine: design and recent applications[J]. Exploration, 2022, 2(6): 20210217.
- [5] PARDI N, HOGAN MJ, PORTER FW, WEISSMAN D. mRNA vaccines: a new era in vaccinology[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2018, 17(4): 261-279.
- [6] STADLER CR, BÄHR-MAHMUD H, CELIK L, HEBICH B, ROTH AS, ROTH RP, KARIKÓ K, TÜRECI Ö, SAHIN U. Elimination of large tumors in mice by mRNA-encoded bispecific antibodies[J]. Nature Medicine, 2017, 23(7): 815-817.
- [7] GAGLIARDI M, ASHIZAWA AT. The challenges and strategies of antisense oligonucleotide drug delivery[J]. Biomedicines, 2021, 9(4): 433.
- [8] KULKARNI JA, WITZIGMANN D, THOMSON SB, CHEN S, LEAVITT BR, CULLIS PR, van der MEEL R. The current landscape of nucleic acid therapeutics[J]. Nature Nanotechnology, 2021, 16(6): 630-643.
- [9] FILIPCZAK N, PAN JY, YALAMARTY SSK, TORCHILIN VP. Recent advancements in liposome technology[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2020, 156: 4-22.
- [10] BADEN LR, EL SAHLY HM, ESSINK B, KOTLOFF K, FREY S, NOVAK R, DIEMERT D, SPECTOR SA, ROUPHAEL N, CREECH CB, McGETTIGAN J, KHETAN S, SEGALL N, SOLIS J, BROSZ A,

- FIERRO C, SCHWARTZ H, NEUZIL K, COREY L, GILBERT P, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine[J]. The New England Journal of Medicine, 2021, 384(5): 403-416.
- [11] POLACK FP, THOMAS SJ, KITCHIN N, ABSALON J, GURTMAN A, LOCKHART S, PEREZ JL, PÉREZ MARC G, MOREIRA ED, ZERBINI C, BAILEY R, SWANSON KA, ROYCHOUDHURY S, KOURY K, LI P, KALINA WV, COOPER D, FRENCK RW Jr, HAMMITT LL, TÜRECI Ö, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA covid-19 vaccine[J]. New England Journal of Medicine, 2020, 383(27): 2603-2615.
- [12] WRAPP D, WANG NS, CORBETT KS, GOLDSMITH JA, HSIEH CL, ABIONA O, GRAHAM BS, McLELLAN JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation[J/OL]. bioRxiv, 2020. DOI: 10.1126/science.abb2507.
- [13] HUANG ZJ, GUO HE, LIN L, LI SX, YANG Y, HAN YY, HUANG WW, YANG JL. Application of oncolytic virus in tumor therapy[J]. Journal of Medical Virology, 2023, 95(4): e28729.
- [14] RODRIGUEZ AL, WANG TY, BRUGGEMAN KF, LI R, WILLIAMS RJ, PARISH CL, NISBET DR. Tailoring minimalist self-assembling peptides for localized viral vector gene delivery[J]. Nano Research, 2016, 9(3): 674-684.
- [15] 石璠, 主海强, 郑淑丹, 赵梅, 张杨, 庞雪莹, 郑丽红. 溶瘤病毒在肝细胞癌治疗中应用的研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2023, 43(1): 14-17. SHI F, WANG HQ, ZHENG SD, ZHAO M, PANG XY, ZHENG NH. Progress in the application of oncolytic viruses in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. International Journal of Digestive Diseases, 2023, 43(1): 14-17 (in Chinese).
- [16] EVGIN L, KOTTKE T, TONNE J, THOMPSON J, HUFF AL, van VLOTEN J, MOORE M, MICHAEL J, DRISCOLL C, PULIDO J, SWANSON E, KENNEDY R, COFFEY M, LOGHMANI H, SANCHEZ-PEREZ L, OLIVIER G, HARRINGTON K, PANDHA H, MELCHER A, DIAZ RM, et al. Oncolytic virus-mediated expansion of dual-specific CAR T cells improves efficacy against solid tumors in mice[J]. Science Translational Medicine, 2022, 14(640): eabn2231
- [17] ZONG Y, LIN Y, WEI T, CHENG Q. Lipid nanoparticle (LNP) enables mRNA delivery for cancer therapy[J]. Advanced Materials, 2023, 35(51): e2303261.
- [18] FRAMPTON JE. Teserpaturev/G47Δ: first approval[J]. BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy, 2022, 36(5): 667-672.
- [19] MOHR P, HAFERKAMP S, PINTER A, WEISHAUPT C, HUBER MA, DOWNEY G, ÖHRLING K, LOQUAI C, LOUIE KS. Real-world use of talimogene laherparepvec in German patients with stage IIIB to IVM1a melanoma: a retrospective chart review and physician survey[J]. Advances in Therapy, 2019, 36(1): 101-117.
- [20] 崔博沛. 柯萨奇病毒溶瘤作用和抗原检测试剂研究[D]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2020. CUI BP. Coxsackivirome oncolytic effects and antigen detection agents[D]. Beijing: China National Research Institute for Food and Drug Control, 2021 (in Chinese).
- [21] TILGASE A, PATETKO L, BLĀĶE Ī, RAMATA-STUNDA A, BORODUŠĶIS M, ALBERTS

- P. Effect of the oncolytic ECHO-7 virus Rigvir® on the viability of cell lines of human origin *in vitro*[J]. Journal of Cancer, 2018, 9(6): 1033-1049.
- [22] BRADLEY S, JAKES AD, HARRINGTON K, PANDHA H, MELCHER A, ERRINGTON-MAIS F. Applications of coxsackievirus A21 in oncology[J]. Oncolytic Virotherapy, 2014, 3: 47-55.
- [23] LIU SY, LI F, MA QQ, DU MJ, WANG HR, ZHU YP, DENG L, GAO WR, WANG CL, LIU YQ, ZHAO ZQ, LIU HZ, WANG RK, TIAN YJ, HU ML, WAN YJ, LU WY, ZHANG M, ZHAO MF, CAO YJ, et al. OX40L-armed oncolytic virus boosts T-cell response and remodels tumor microenvironment for pancreatic cancer treatment[J]. Theranostics, 2023, 13(12): 4016-4029.
- [24] 蔡奇应, 张思琪, 刘华鹃, 刘滨磊. 溶瘤II型单纯疱疹病毒在肿瘤中的复制及表达[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2): 585-595.
 CAI QY, ZHANG SQ, LIU HJ, LIU BL. Replication and expression of oncolytic herpes simplex virus in tumors[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(2): 585-595 (in Chinese).
- [25] XIAO YL, CHEN J, ZHOU H, ZENG XD, RUAN ZP, PU ZY, JIANG XY, MATSUI A, ZHU LL, AMOOZGAR Z, CHEN DS, HAN XF, DUDA D, SHI JJ. Combining p53 mRNA nanotherapy with immune checkpoint blockade reprograms the immune microenvironment for effective cancer therapy[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 758.
- [26] ZHANG W, HU X, LIANG J, ZHU YJ, ZENG BB, FENG L, ZHAO CY, LIU SM, LIU BL, ZHANG KT. oHSV2 can target murine colon carcinoma by altering the immune status of the tumor microenvironment and inducing antitumor immunity[J]. Molecular Therapy Oncolytics, 2020, 16: 158-171.
- [27] 陈小华. 基于罗伊氏乳杆菌裂解物的 mRNA 制剂治疗小鼠结肠癌的研究[D]. 成都: 电子科技大学, 2023. CHEN XH. Study on the treatment of colon cancer in mice with mRNA preparation based on lactobacillus reuteri lysate[D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China, 2023 (in Chinese).
- [28] BERGELSON JM, COYNE CB. Picornavirus entry[J].

- Advances in Experimental Medicine and Biology, 2013, 790: 24-41.
- [29] KELLY EJ, HADAC EM, GREINER S, RUSSELL SJ. Engineering microRNA responsiveness to decrease virus pathogenicity[J]. Nature Medicine, 2008, 14(11): 1278-1283.
- [30] van der JEUGHT K, de KOKER S, BIALKOWSKI L, HEIRMAN C, JOE PT, PERCHE F, MAENHOUT S, BEVERS S, BROOS K, DESWARTE K, MALARD V, HAMMAD H, BARIL P, BENVEGNU T, JAFFRÈS PA, KOOIJMANS SAA, SCHIFFELERS R, LIENENKLAUS S, MIDOUX P, PICHON C, et al. Dendritic cell targeting mRNA lipopolyplexes combine strong antitumor T-cell immunity with improved inflammatory safety[J]. ACS Nano, 2018, 12(10): 9815-9829.
- [31] ANNELS NE, ARIF M, SIMPSON GR, DENYER M, MOLLER-LEVET C, MANSFIELD D, BUTLER R, SHAFREN D, AU G, KNOWLES M, HARRINGTON K, VILE R, MELCHER A, PANDHA H. Oncolytic immunotherapy for bladder cancer using Coxsackie A21 virus[J]. Molecular Therapy Oncolytics, 2018, 9: 1-12.
- [32] BILLINGSLEY MM, SINGH N, RAVIKUMAR P, ZHANG R, JUNE CH, MITCHELL MJ. Ionizable lipid nanoparticle-mediated mRNA delivery for human CAR T cell engineering[J]. Nano Letters, 2020, 20(3): 1578-1589.
- [33] CHENG Q, WEI T, FARBIAK L, JOHNSON LT, DILLIARD SA, SIEGWART DJ. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing[J]. Nature Nanotechnology, 2020, 15(4): 313-320.
- [34] BOURGEOIS-DAIGNEAULT MC, ROY DG, AITKEN AS, EL SAYES N, MARTIN NT, VARETTE O, FALLS T, ST-GERMAIN LE, PELIN A, LICHTY BD, STOJDL DF, UNGERECHTS G, DIALLO JS, BELL JC. Neoadjuvant oncolytic virotherapy before surgery sensitizes triple-negative breast cancer to immune checkpoint therapy[J]. Science Translational Medicine, 2018, 10(422): eaao1641.