

基于益生菌裂解物的纳米颗粒递送 siRNA 治疗结直肠癌

朱曼芳¹, 陈小华², 段醒妹^{1*}

¹ 电子科技大学医学院 四川省医学科学院·四川省人民医院个体化药物治疗四川省重点实验室 四川成都

² 四川大学华西医院肿瘤中心四川大学生物治疗国家重点实验室 四川成都

【摘要】通过在基因治疗中引入免疫激活成分的免疫基因治疗已成为治疗癌症的一种新策略。然而，目前仍然需要一个理想的平台来实现免疫激活和高效的基因传递。罗伊氏乳杆菌因其独特的抗原性具有潜在的免疫调节活性，并与癌症进展具有潜在关联。本研究通过将罗伊氏乳杆菌裂解物包封在 DMP 中，设计了一种新型的非病毒 siRNA 载体 DMP-Lac。DMP-Lac 能促进免疫细胞的成熟和活化，并表现出抑制肿瘤的作用。装载靶向 STAT3 的 siRNA 后，DMP-Lac/siSTAT3 复合物可以有效抑制肿瘤的进展。综上所述，我们设计了一种结合免疫激活和 STAT3 沉默的新型中肿瘤治疗策略。

【关键词】 STAT3；siRNA 递送；肠道益生菌；免疫基因治疗

【基金项目】四川省科学技术厅，四川省自然科学基金（23NSFJQ0104）“新型肿瘤靶向 mRNA 纳米疫苗用于肝癌免疫基因治疗实验研究”

【收稿日期】 2024 年 6 月 2 日 **【出刊日期】** 2024 年 7 月 5 日 **【DOI】** 10.12208/j.jmbr.20240005

Nanoparticle delivery of siRNA based on probiotic lysate for colorectal cancer

Manfang Zhu¹, Xiaohua Chen², Xingmei Duan^{1*}

¹Department of Pharmacy, Personalized Drug Therapy Key Laboratory of Sichuan Province Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan

²State Key Laboratory of Biotherapy and Cancer Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan

【Abstract】Immunogene therapy through the introduction of immune-activating components into gene therapy has become a new strategy for treatment of cancer. However, an ideal platform for immune activation and efficient gene delivery is still needed. Lactobacillus reuteri has potential immunomodulatory activity due to its unique antigenicity and potential association with cancer progression. In this study, a novel non-viral siRNA vector DMP-Lac was designed by encapsulating Lactobacillus reuteri lysate into DMP. DMP-Lac can promote the maturation and activation of immune cells, and has been proven to inhibit tumor. Loaded with STAT3-targeting siRNA, the DMP-Lac/siSTAT3 complex can effectively inhibit tumor progression. In summary, we have designed a novel middle tumor treatment strategy that combines immune activation and STAT3 silencing.

【Keywords】 STAT3; siRNA delivery; intestinal probiotics; immune gene therapy

1 前言

虽然结直肠癌已经被研究了很多年，它仍然是世界上第二致命的癌症^[1]。在不受控生长的癌症中，常出现显性癌基因过度激活或抑癌基因的失活，在癌症治疗中，引入抑癌基因或敲低致癌基因具有天

然的优势^[2]。在基因治疗中，siRNA 发挥着重要作用，然而其治疗效果仍然需要进一步提高。

基因治疗可以通过改肿瘤细胞的特征，直接诱导死亡。而肿瘤的免疫治疗是一种激活免疫系统，依靠免疫功能清除肿瘤的手段。免疫治疗可以激活免

*通讯作者：段醒妹

疫细胞, 利用免疫系统识别、攻击, 从而消灭肿瘤^[3]。将免疫治疗引入基因治疗中产生的协同作用对于肿瘤的治疗更有效, 并可能产生长期作用^[4]。然而, 免疫治疗通常需要免疫调节剂来诱导免疫反应。因此, 免疫基因治疗仍然需要寻找理想的免疫刺激物质, 并探索如何将其引入基因治疗。

肠道菌群在许多疾病中起着重要作用, 其中的罗伊氏乳杆菌可以改善宿主微生态平衡, 抑制致病菌生长, 提高宿主免疫力。近期研究发现, 其肽聚糖、多糖等成分具有免疫原性, 可用于抗肿瘤^[5]。研究人员曾尝试将其作为免疫治疗策略, 并证明了其通过 IFN- γ 途径激活 T 细胞的能力^[6]。可见罗伊氏乳杆菌具有作为免疫激活剂的潜力。然而, 虽然罗伊氏乳杆菌具有免疫激活潜力, 但其作为一个整体细菌, 仍然不适合直接在体内使用。因此, 我们使用它的裂解产物在保证安全性的前提下, 最大限度保留免疫原。同时, 裂解物尺寸更小, 更易被引入基因治疗骨架中。由于裂解物的复杂组成, 因此有必要开发合适的策略将其整合到基因制备中。

基因治疗的核心技术是保护 siRNA 不被降解的递送载体, 理想的递送系统是保证治疗效果的前提。现有的研究主要集中在提高递送效率和靶点的活性上, 许多研究对递送载体进行修饰以优化递送效率, 但很少有研究关注载体的治疗潜力^[7]。事实上, 阳离子纳米颗粒由于其特殊理化性质对免疫系统会产生影响。而且载体本身是可修饰的, 具有包裹或偶联修饰分子的潜力。这些特性使载体除了递送 siRNA 外, 还具有表现出治疗效果的潜力。然而, 如何将免疫激活物与基因递送载体骨架结合, 赋予载体自身免疫治疗能力是一个难点。

在之前的研究中, 我们设计了由 DOTAP 和 mPEG-mPCL 自组装的 DMP, 其递送核酸的能力已经得到证实^[8]。我们尝试将裂解液包裹在 DMP 中。同时, 我们选择 STAT3 作为治疗靶标, STAT3 的过激活可以激活 BCL-xL 等基因, 从而在肿瘤增殖中发挥至关重要的作用。利用 DMP-Lac 负载 siSTAT3 得到的 DMP-Lac/siSTAT3 复合物, 我们推测其可以通过 DMP-Lac 激活免疫反应, 并通过 siSTAT3 直接攻击肿瘤细胞, 协同提高肿瘤治疗效果。本研究将研究 DMP-Lac 的免疫激活能力和基因递送能力, 并评估 DMP-Lac/siSTAT3 复合物在结直肠癌腹腔转移模

型中的抗肿瘤能力和安全性。

2 材料与方法

2.1 细胞与动物

CT26、293T 细胞购自 ATCC, 在含有 10%胎牛血清 (FBS, CellBox) 的 DMEM (Thermo Fisher) 中培养。Balb/c 从北京 HFK 生物技术有限公司 (北京) 获得。所有动物实验均在四川大学卫生研究总局动物伦理委员会和《四川大学实验动物指南及标准操作规程》指导下进行。

2.2 革兰氏染色

新鲜培养的罗伊氏乳杆菌及其裂解物可以通过革兰氏染色进行区分。将活菌或裂解物固定在显微镜载玻片上, 然后依次用结晶紫溶液、碘溶液和酚红溶液进行染色。盖上盖玻片后, 用显微镜 (Olympus, Japan) 检测染色结果。

2.3 纳米颗粒的制备与表征

利用高压均质机对罗伊氏乳杆菌进行裂解。将 DOTAP 和 mPEG-PCL2K (1: 9, w/w) 溶解在二氯甲烷中, 旋蒸 45 分钟后, 用罗伊氏乳杆菌裂解物水化薄膜。

我们用 Malvern (Worcestershire, U.K.) 检测了胶束的粒径大小和表面电荷。采用透射电镜 (Tecnai G2F20STWIN, FEI) 观察 DMP-Lac 的形貌。

2.4 体外免疫激活实验

为了制备骨髓来源的 DC, 从 Balb/c 的股骨和胫骨收集骨髓细胞, 用红细胞裂解液裂解红细胞后, 将骨髓细胞重悬在含有 20ng/mL GM-CSF 的培养基中。每 2 天加入含 GM-CSF 的新鲜培养基。第 6 天诱导得到 DC, 种于六孔板后加入 DMP、Lac 或 DMP-Lac。孵育 48 小时后, 使用流式细胞仪检测 DC 的 CD11c、CD80、CD86 表达情况。

为了研究 DMP-Lac 对 T 细胞的激活作用, 我们将 DC 与 T 细胞进行共培养。首先收集小鼠骨髓, 分别用 GM-CSF 诱导分化为 BMDC。成熟后, 收集 BMDC 重新接种到 6 孔板中。然后, 从小鼠淋巴结中提取淋巴细胞并与 DC 共培养, 同时加入 DMP、Lac 或 DMP-Lac。48 小时后, 流式细胞术检测 CD69⁺T 细胞。

2.5 体内免疫激活实验

将 6 周龄的 Balb/c 分为 4 组, 在腹股沟淋巴结附近注射 100 μ L 生理盐水、DMP、Lac 或 DMP-Lac。

48h 后处死小鼠, 收集腹股沟淋巴结和脾脏。加入 CD11C、CD80、CD86、CD3、CD69、CD49b 抗体孵育, 分析免疫细胞。

2.6 安全性试验

将 293T 种于 96 孔板中, 分别加入不同浓度的 DMP、DMP-Lac 或 PEI25K。处理 24h 后, 加入 MTT 溶液。4 后, 加入 DMSO, 使用酶标仪测量吸光度 (波长: 570nm)。

2.7 核糖核酸酶保护试验

使用核糖核酸酶 (0.25mg/mL, Solarbio, 北京) 处理裸露 siNC 和 DMP-Lac/siNC 复合物 15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时和 4 小时后加入十二烷基硫酸钠 (0.24mg/mL, SDS) 处理后进行凝胶电泳, 观察 RNA 条带。

2.8 体外转染

将 CT26 细胞种于 24 孔板, 用 DMP-Lac/siRNA、DMP/siRNA 和 PEI25K/siRNA (1 μ g siRNA) 转染细胞, 用 CY3 标记 siRNA。24h 后, 用荧光显微镜进行拍照, 用流式细胞术检测效率。

2.9 DMP-Lac/siRNA 复合物的细胞摄取机制

将 CT26 细胞种于 24 孔板, 用盐酸氯丙嗪 (CPZ, 1 μ g/mL)、甲基 β -环糊精 (M- β -CD, 8.3 mM)、阿米洛利 (2mM) 或染料木素 (0.3 mM)、菲律宾菌素 III (1mg/mL) 处理 1h。不同抑制剂 (染料木黄酮 30mM、菲律宾菌素 III 1mg/mL、阿米洛利 100mM、甲基 β -环糊精 10 mM 和氯丙嗪 2.5 mg/mL) 处理后, 细胞转染 DMP-Lac/siRNA-CY3。24 h 后用流式细胞术分析转染效率。用 Hoechst 染色细胞核, 用 DiI 染色细胞膜。使用 CLSM (蔡司, 德国) 可以观察转染荧光。

2.10 细胞毒性分析

将 CT26 细胞种于 96 孔板, 加入 DMP-Lac、DMP-Lac/siNC 或 DMP-Lac/siSTAT3 (2 μ g siRNA)。24 h 后, 采用 MTT 法测定细胞活力。

2.11 细胞凋亡检测

连续转染 CT26 细胞 DMP-Lac、DMP-Lac/siNC 和 DMP-Lac/siSTAT3 (2 μ g siRNA) 两次。然后收集各组细胞, 重悬于 AnnexinV-FITC 和 PI 中。采用流式细胞术检测细胞凋亡情况。

2.12 克隆形成试验

将 CT26 细胞种于 6 孔板, 将 DMP-Lac、DMP-

Lac/siNC 或 DMP-Lac/siSTAT3 (4 μ g siRNA) 分别加入到每孔中, 如然后继续培养, 7 天后弃上清用多聚甲醛固定细胞克隆群, 试验结晶紫染色 15 分钟, 拍摄孔板, 计数细胞克隆群。

2.13 动物模型

为了建立腹腔模型, 我们将 2.5×10^5 个 CT26 细胞腹腔注射到雌性 Balb/c 小鼠体内。第 3 天将小鼠分为 4 组, 分别腹腔注射生理盐水、DMP-Lac、DMP-Lac/siNC、DMP-Lac/siSTAT3 (10 μ g siRNA)。共注射 9 次, 每天监测体重。在第 12 天, 对小鼠进行安乐死, 并对其肿瘤进行拍照和称重, 用 4% 多聚甲醛固定肿瘤组织和主要内脏。

2.14 组织学分析

将组织切片脱蜡、水化, 抗原修复后, 肿瘤切片用 STAT3、CD31、TNF- α 兔抗小鼠一抗孵育过夜, 然后使用辣根过氧化物酶偶联二抗, DAB 显色后, 通过病理组织切片扫描系统进行分析。为了分析肿瘤细胞的凋亡, 我们用 Dead End Fluorometric TUNEL System 试剂盒对肿瘤切片进行染色, 使用荧光显微镜 (蔡司, 德国) 获取荧光图像。五脏用于 HE 染色。

2.15 统计分析

数据分析采用 t 检验、单向和双向方差分析。所有数据均以均数 $\pm$ 标准差定义。

3 结果

3.1 DMP-Lac 的制备与表征

根据图 1A, 新培养的罗伊氏乳杆菌可以被染成紫色, 因为革兰氏阳性菌的肽聚糖网络层数多, 交联致密。相比之下, 裂解物会变红, 这意味着罗伊氏乳杆菌的细胞壁已经破裂。我们使用透射电镜观察了 DMP 和 DMP-Lac 的形态 (图 1B)。我们进一步测量了 DMP 和 DMP-Lac 的粒径和 ζ 电位, DMP 和 DMP-Lac 的平均直径分别为 22.2nm 和 34.5nm, DMP 和 DMP-Lac 的平均 ζ -电位分别为 48.1mV 和 13.6mV (图 1C 和图 1D)。然后, 我们将 siNC 和 DMP-Lac 进行孵育, 制备了 DMP-Lac/siNC 复合物, 研究了 DMP-Lac 结合 siRNA 的能力。从图 1E 可以看出, 当 DMP-Lac 与 siNC 的质量比为 60: 1 时, siNC 的条带几乎不可见。我们使用了 MTT 法检测 DMP-Lac 纳米粒的细胞毒性。DMP 和 DMP-Lac 的 IC₅₀ 均 > 800 μ g/mL, 远高于 PEI25K (< 75 μ g/mL) (图 1F),

这表明 DMP-Lac 的毒性远低于 PEI25K, 更适合注射给药。此外, 如图 1G 所示, DMP-Lac 可以保护 siNC 不受 RNA 酶的降解长达 4 小时, 而裸露的 siNC 在 15 分钟内完全不可见, 表明其被完全降解。

以上这些结果表明, DMP-Lac 具有同时递送罗伊氏乳杆菌裂解物和核酸的潜力。

3.2 体外转染研究

如图 2A 所示, 在 CT26 细胞质中可以观察到明显的 CY3-siRNA 信号 (图 2A), 同时, 流式细胞术也表明 DMP-Lac 跟 PEI25K 或 DMP 一样可以高效递送 siRNA (图 2B, 2C)。

我们进一步研究了 DMP-Lac/siRNA 复合物的

摄取机制。目前, 公认的小窝蛋白介导的内吞作用、巨胞吞作用、脂筏介导的内吞作用和网格蛋白介导的内吞作用是常见的内化机制。因此, 我们对 CT26 进行了以下抑制剂的处理: 染料木黄酮、菲律宾菌素 III、阿米洛利、甲基 β -环糊精和氯丙嗪。如图 2D 所示, 经甲基 β -环糊精和氯丙嗪处理后, DMP-Lac/siRNA 转染效率明显降低。图 2E 的流式细胞术结果显示, 这两组的摄取率分别降低了 34% 和 21% ($P < 0.0001$)。这些结果表明脂质筏介导的内吞作用在 DMP-Lac/siRNA 复合物的摄入中起着关键作用。

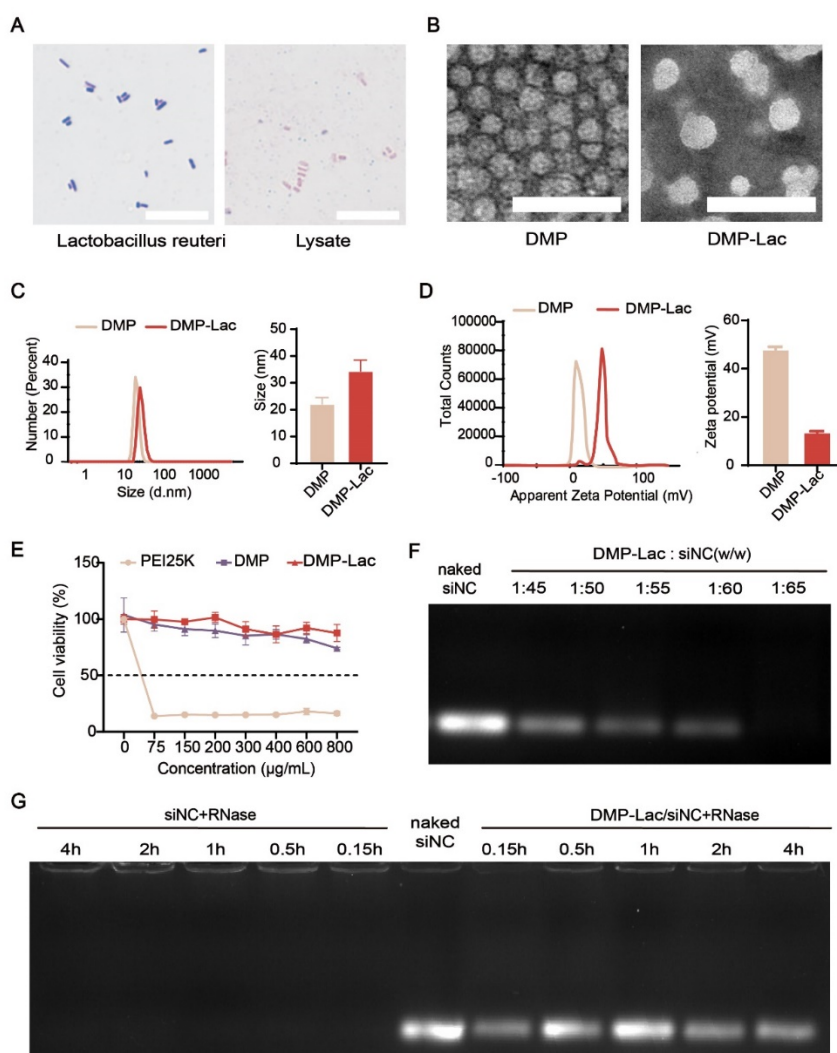


图 1 DMP-Lac 的制备和表征。(A) 罗伊氏乳杆菌及裂解物革兰氏染色图像 (比尺: 10 μm)。 (B) DMP 和 DMP-Lac 的透射电镜 (比尺: 100 nm)。 (C) DMP 和 DMP-Lac 的粒径大小。 (D) DMP 和 DMP-Lac 的 ζ 电位。 (E) DMP-Lac 与 siRNA 的结合比例凝胶电泳分析。 (F) PEI25K、DMP 和 DMP-Lac 对 293T 细胞的细胞毒性。 (G) DMP-Lac 对 siRNA 的保护作用。

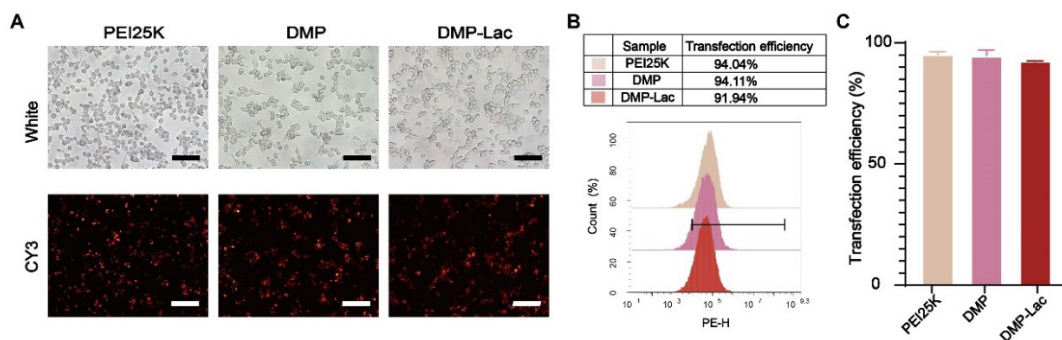


图2 体外转染研究。(A) CT26 细胞转染 PEI25K、DMP 和 DMP-Lac 后的荧光图像分析(比尺: 100 μ m)。(B) CT26 细胞上 DMP-Lac/siRNA 转染率的流式细胞术分析(n=3)。

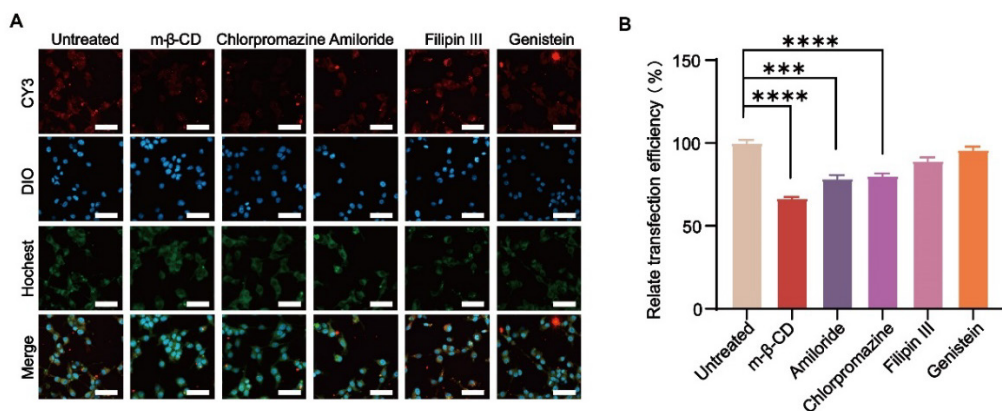


图3 摄取机制研究。(A) DMP-Lac/siRNA 在 CT26 细胞上的转染率分析。(D) 抑制剂处理后 CT26 细胞对 DMP-Lac/siRNA 摄取的荧光图像分析。(比例尺: 50 μ m)。(E) 流式细胞术分析 CT26 对 DMP-Lac/siRNA 的摄取率(***p<0.001, ****p<0.0001)(n=3)。

3.3 DMP-Lac 免疫系统激活作用

DC 在调节先天和适应性免疫反应中起着至关重要的作用, 荧光显微镜结果显示罗丹明标记的 DMP-Lac 可以被 DC 摄取(图 4A)。此外, 我们采用流式细胞术检测 DC 对 DMP-Lac 的反应, 结果表明 DMP-Lac 会激活 DC 高水平表达共激活分子 CD80 和 CD86, Lac 的参与可以导致抗原的成功呈递和 DC 的成熟。我们通过流式细胞术表型进一步证实了 T 细胞的活化(图 4B), Lac 和 DMP-Lac 显著上调 CD69 的表达, 说明它们可以增加 T 细胞的活化。同时, DMP-Lac 在体外也可以有效增加脾淋巴细胞中 NK 细胞的水平。为了验证体内的免疫激活作用, 我们研究了腹股沟肌内注射后淋巴结和脾脏免疫细胞的活性。如图 4C 所示, 在淋巴结中, DMP-Lac 组 DC 表面标志物 CD80+和 CD86+的表达高于对照组。对于 T 细胞, DMP-Lac 可以激活其活化, 促进 CD69 和 CD4 的表达。此外, 我们还评估

了 NK 细胞水平, 并检测到了 NK 细胞的增加, 表明 DMP-Lac 有效诱导 NK 细胞的募集。同时, 在脾淋巴细胞中, Lac 修饰的 DMP-Lac 将 CD69+细胞的比例从 50.87%增加到 70.42%, NK 细胞比例增加到 7.9%, CD3+和 CD4+细胞比例增加到 13%。

综上所述, 我们证明了 Lac 的修饰使 DMP 具有了免疫系统激活能力, DC 可以被 DMP-Lac 有效激活, 然后触发后续的细胞免疫反应。

3.4 DMP-Lac/siSTAT3 体外抑制 CT26 增殖

我们通过克隆形成试验证明 DMP-Lac/siSTAT3 处理组的肿瘤细胞明显生长受到了抑制(图 5A、B)(n=3), 抗增殖实验也证明 DMP-Lac/siSTAT3 可以抑制 CT26 的增殖(图 5C)(n=3), 细胞活力也显著下降。我们进一步通过流式细胞术研究了 DMP-Lac/siSTAT3 的诱导肿瘤凋亡作用, 如图 3D 和 3E, DMP-Lac/siSTAT3 转染后, CT26 细胞凋亡明显增加, 凋亡率高达 23.3%(n=3)。

3.5 DMP-Lac/siSTAT3 体内抑制 CT26 肿瘤生长

我们在 CT26 腹腔转移瘤模型上评估了 DMP-Lac/siSTAT3 的抗肿瘤作用。DMP-Lac 组、DMP-Lac/siNC 组、DMP-Lac/siSTAT3 组的肿瘤结节和血样腹水呈现递减趋势(图 6A) ($n=4$)。含 DMP-Lac 的处理组肿瘤结节数和肿瘤重量小于 NS, 且 DMP-Lac/siSTAT3 组治疗效果最佳(图 6B)。证明了 DMP-Lac 能发挥免疫治疗的效果并且和 STAT3 沉默具有协同作用。免疫组化结果如图 6D 所示, DMP-Lac/siSTAT3 组的 STAT3 和 CD31 信号最弱, TNF- α

信号最强。TUNEL 结果进一步显示, DMP-Lac/siSTAT3 组的肿瘤组织凋亡最为明显, 这些结果表明 DMP-Lac/siSTAT3 可以显著降低微血管密度, 抗血管生成, 并杀伤肿瘤组织。此外, 根据 HE 染色结果(图 6C), 主要器官无病理损伤, 说明 DMP-Lac/siSTAT3 复合物在体内可以安全性地抑制肿瘤的进展。

综上所述, DMP-Lac/siSTAT3 可通过免疫激活和诱导凋亡有效抑制肿瘤进展, 且具有较高的安全性。

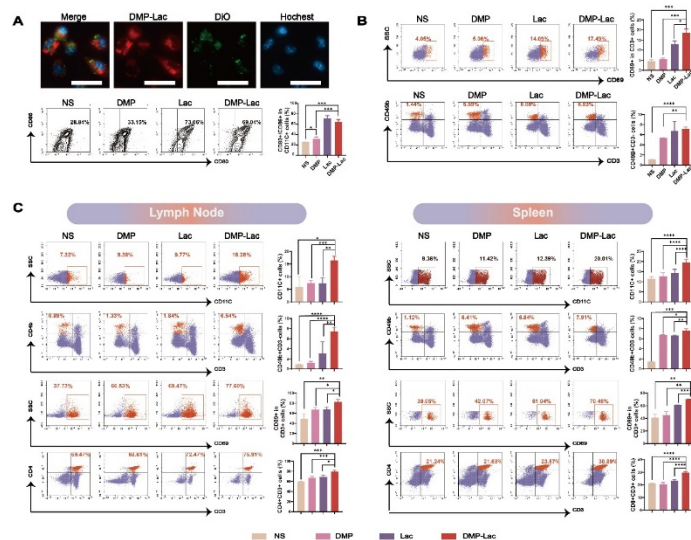


图4 DMP-Lac 在体外和体内激活免疫。(A) DC 摄取 DMP-Lac 图像, 蓝色荧光(细胞核), 绿色荧光(细胞膜), 红色荧光(DMP-Lac-罗丹明; 比例尺: 20 μ m); DC 中 CD11c+, CD80+, CD86+表达的统计数据(* $p<0.05$, *** $p<0.001$) ($n=3$)。(B) CD69+在 T 细胞中的表达; 脾淋巴细胞中 NK 细胞水平(* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$) ($n=3$)。(C) DMP-Lac 在体内免疫激活淋巴结和脾脏免疫细胞的流式分析(* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$) ($n=3$)。

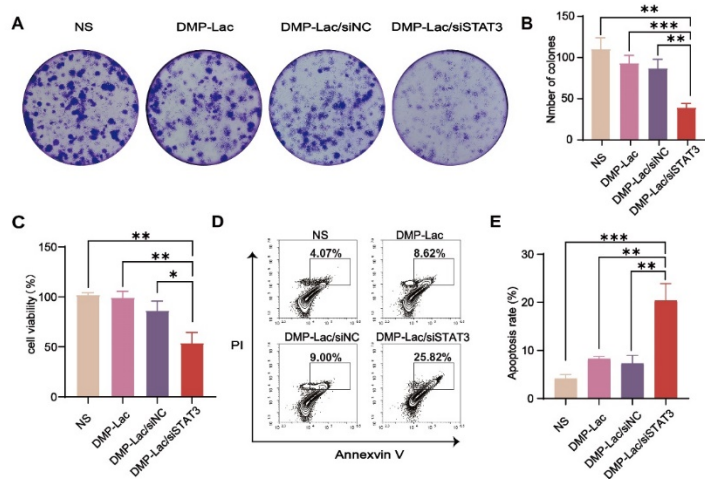


图5 DMP-Lac/siSTAT3 复合物在体外抑制肿瘤细胞生长。(A) 克隆形成试验图像。(B) 克隆形成试验数据分析(** $p<0.01$, *** $p<0.001$)。(C) DMP-Lac/siSTAT3 复合物的抗增殖作用(* $p<0.05$, ** $p<0.001$)。(D) CT26 细胞凋亡流式细胞术分析。(E) 细胞凋亡率直方图分析(** $p<0.001$, *** $p<0.001$)。

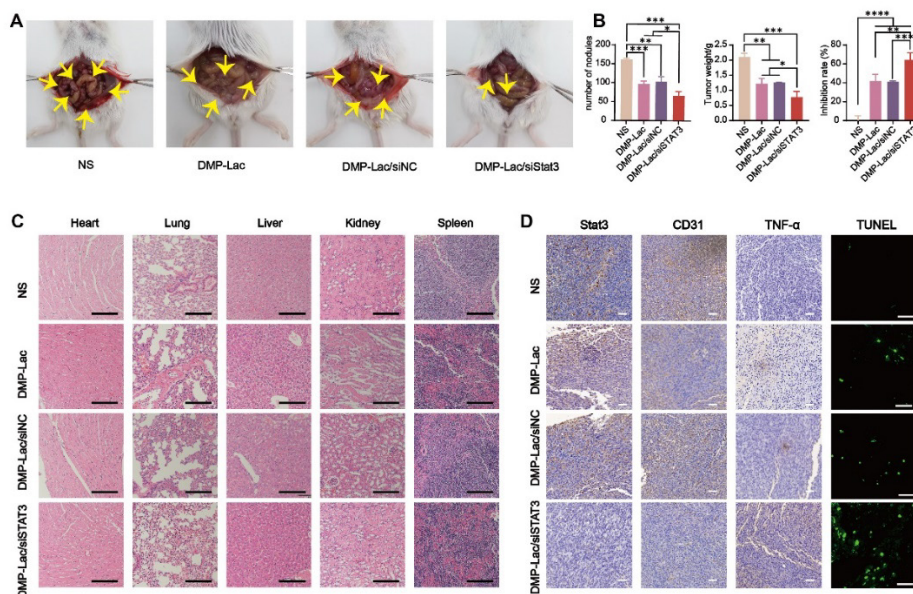


图6 DMP-Lac/siSTAT3 复合物在体内抑制 CT26 腹腔转移瘤的生长。(A) NS、DMP-Lac、DMP-Lac/siNC、DMP-Lac/siSTAT3 代表性小鼠腹腔图像。(B) 每组收集到的肿瘤结节的平均肿瘤数; 每组收集到的平均肿瘤重量; 每组的肿瘤生长抑制率 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) ($n = 4$)。(C) 主要脏器 H&E 分析 (比例尺: $100\mu\text{m}$)。(D) 肿瘤组织免疫组化分析 (比例尺: $50\mu\text{m}$); 肿瘤组织 TUNEL 分析 (比例尺: $50\mu\text{m}$)。

4 讨论

本研究证明了利用免疫原性基因载体递送细胞毒性基因是一种高效的肿瘤治疗策略, 并开发了一种双功能纳米颗粒 DMP-Lac, 可以同时激活免疫反应和递送 siSTAT3。实验表明, DMP-Lac 是一种有效的免疫激活剂, 引起的免疫激活和 siSTAT3 引起的细胞凋亡发挥协同作用, 具有显著的肿瘤治疗作用。

罗伊氏乳杆菌是益生菌的一员, 其各种成分具有免疫原性, 对癌症的免疫治疗具有积极的作用。它被证明可以激活 TNF- α 和 INF- γ 的产生, 抑制黑色素瘤细胞系的迁移和定植^[6]。然而, 虽然罗伊氏乳杆菌在肿瘤治疗中的具体机制正在研究中, 迄今为止仍没有得出确切的结论。同时, 出于安全性考虑, 关于罗伊氏乳杆菌的研究大多集中在口服活菌上致使不能充分利用其能力。为了制备具有更高生物活性的可注射药物, 对其进行灭活至关重要。如恶化灭活罗伊氏乳杆菌, 又能最大限度保持其活性至关重要。常用的热失活可能会导致一些免疫活性物质的损失, 而化学失活则有引入化学试剂残留物的风险。如何在保证安全的前提下, 保证在体内的生物活性, 仍然是一个问题, 基于罗伊氏乳杆菌的有效肿瘤免疫治疗仍有待探索。

免疫治疗旨在激活免疫系统清除肿瘤, 将免疫治疗与基因治疗相结合可以达到最佳的治疗效果。如何找到一种简单有效的方法来实现这一目标成为研究难点。为此, Finocchiaro 等人利用 IL-2 和 GM-CSF 细胞因子作为佐剂, 提高自杀基因对黑色素瘤的治疗效果^[9]。Saito, R 等递送 IFN- β 基因治疗胶质瘤, 联合肿瘤细胞裂解物刺激的 DC 疫苗, 延长了小鼠的生存期^[10]。这些研究都成功激活了免疫系统, 提高了肿瘤治疗效果。然而, 大部分研究常使用免疫佐剂, 单纯地添加免疫佐剂成分不可避免地使药物制备和应用复杂化。本研究制备的 DMP-Lac 着眼于基因载体本身, 利用罗伊氏乳杆菌的裂解物修饰 DMP, 从而激活免疫系统。体外实验表明, DMP-Lac 能显著激活 DC, 激活细胞免疫。体内实验表明, DMP-Lac 在腹腔转移模型中对肿瘤进展的抑制作用为 37.57%。我们认为 DMP-Lac 的成功开发得益于 DMP 的核壳结构, 在自组装过程中, 阳离子脂质体和聚合物形成纳米颗粒, 裂解物得进入空腔结构。对于细菌裂解物, DMP 的包裹可以增强裂解物的穿透能力, 防止裂解物被机体过快清除。综上所述, DMP-Lac 作为一种新型的纳米粒子, 结构设计精巧, 制备简单, 能够通过诱导抗原递呈细胞的成熟, 进而激活后续的免疫反应, 从而实现了对肿瘤的免疫治疗。

STAT3 在肿瘤进展中起重要作用。为了提高治疗效果,HashemiV 等人同时递送了 STAT3 和 p68 的 siRNA^[11]。LuoK 等研制纳米 PPL, 共同递送 PTX 和 siSTAT3, 发挥协同作用, 增强细胞毒性, 抑制肿瘤转移^[12]。Shakeran,Z 等人使用壳聚糖修饰的 MSN 共同递送 MTX 和 siSTAT3, MTX 的加入增加了对乳腺癌的毒性^[13]。虽然这些研究都提高了 siSTAT3 的治疗效果, 但很少有研究能够产生具有抗癌能力的免疫反应。事实上, 如果能同时靶向肿瘤细胞和免疫细胞, 不仅可以诱导细胞凋亡, 还可以在某种程度上重塑肿瘤微环境。我们使用具有免疫治疗作用的 DMP-Lac 负载 siSTAT3, 发挥协同作用, 这种联合使用确实具有更高的抗肿瘤功效。在腹腔转移瘤模型中显著减缓肿瘤进展 66.92%。与单独使用 DMP-Lac 进行免疫治疗相比, 细菌裂解液和 siSTAT3 共递送纳米粒表现出显著的协同治疗优势。一方面, DMP-Lac 满足了 siSTAT3 治疗后对免疫应答的调控需求, 触发持久的抗肿瘤反应。另一方面, STAT3 沉默会诱导肿瘤产生促炎因子, 这些因子可被 DMP-Lac 募集免疫细胞识别, 进一步激活适应性免疫。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040 [J]. *Transl Oncol*, 2021, 14(10): 101174.
- [2] Xu J, Haigis K M, Firestone A J, et al. Dominant role of oncogene dosage and absence of tumor suppressor activity in Nras-driven hematopoietic transformation [J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(9): 993-1001.
- [3] Shields C W t, Wang L L, Evans M A, et al. Materials for Immunotherapy [J]. *Adv Mater*, 2020, 32(13): e1901633.
- [4] Zhang N, Wang J, Foiret J, et al. Synergies between therapeutic ultrasound, gene therapy and immunotherapy in cancer treatment [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 178: 113906.
- [5] Mu Q, Tavella V J, Luo X M. Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 757.
- [6] Luo M, Hu M, Feng X, et al. Preventive effect of *Lactobacillus reuteri* on melanoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 109929.
- [7] D Dhumal W L, L Ding, Y Jiang, Z Lyu, E Laurini, D Marson, A Tintaru, N Duse. An ionizable supramolecular dendrimer nanosystem for effective siRNA delivery with a favorable safety profile [J]. *Nano Research*, 2021, 14: 2247-54.
- [8] Gao Y, Men K, Pan C, et al. Functionalized DMP-039 Hybrid Nanoparticle as a Novel mRNA Vector for Efficient Cancer Suicide Gene Therapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 5211-32.
- [9] Finocchiario L M, Glikin G C. Cytokine-enhanced vaccine and suicide gene therapy as surgery adjuvant treatments for spontaneous canine melanoma [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(4): 267-76.
- [10] Saito R, Mizuno M, Nakahara N, et al. Vaccination with tumor cell lysate-pulsed dendritic cells augments the effect of IFN-beta gene therapy for malignant glioma in an experimental mouse intracranial glioma [J]. *Int J Cancer*, 2004, 111(5): 777-82.
- [11] Hashemi V, Ahmadi A, Malakotikhah F, et al. Silencing of p68 and STAT3 synergistically diminishes cancer progression [J]. *Life Sci*, 2020, 249: 117499.
- [12] Luo K, Gao Y, Yin S, et al. Co-delivery of paclitaxel and STAT3 siRNA by a multifunctional nanocomplex for targeted treatment of metastatic breast cancer [J]. *Acta Biomater*, 2021, 134: 649-63.
- [13] Shakeran Z, Varshosaz J, Keyhanfar M, et al. Co-delivery of STAT3 siRNA and methotrexate in breast cancer cells [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2022, 50(1): 29-39.