

益生菌裂解物修饰的纳米粒用于结肠癌免疫基因治疗

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】在基因治疗中引入免疫系统激活组分成是一种很有前景的癌症免疫治疗策略。然而，目前仍然缺乏能够在具有免疫激活能力的同时保持高效基因递送效率的理想非病毒基因传递系统。作为肠道益生菌的一员，罗伊氏乳杆菌与癌症进展具有潜在的相关性，其独特的抗原也具有潜在的免疫调节活性。我们设计了一种新的非病毒 siRNA 递送系统 DMP-Lac，通过使用基因递送载体 DMP 封装罗伊氏乳杆菌裂解物，增强抗癌免疫刺激特性。我们制备的 DMP-Lac 纳米颗粒的 siRNA 递送效率高达 97.62%。同时，DMP-Lac 在体外和体内均能促进 DC 和 T 细胞等免疫细胞的成熟和活化。吸附靶向免疫检查点 CD47 的 siRNA 后，DMP-Lac/siCD47 复合物可以安全地抑制多种结肠癌模型的生长。总之，我们的研究开发了一种基于肠道益生菌裂解物的新型基因递送系统，为癌症免疫治疗提供了一种潜在的策略。

【关键词】 siRNA；肠道益生菌；免疫治疗；CD47

【基金项目】四川省科学技术厅，四川省自然科学基金（3NSFJQ0104）“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.20240003

Probiotic lysates-modified nanoparticles for immunogene therapy of colon 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】 The introduction of immune system activation in gene therapy is a promising strategy for cancer. However, there is still a lack of ideal non-viral gene delivery system that can maintain high gene delivery efficiency while maintaining immune activation ability. As a member of intestinal probiotics, *Lactobacillus reuteri* has potential relevance to cancer progression, and its unique antigens also have potential immunomodulatory activity. We designed a novel non-viral siRNA delivery system, DMP-Lac, to enhance anti-cancer immunostimulatory properties by encapsulating *Lactobacillus royi* lysate using gene delivery vector DMP. The siRNA delivery efficiency of DMP-Lac nanoparticles prepared is as high as 97.62%. At the same time, DMP-Lac can promote the maturation and activation of immune cells such as DC and T cells in vitro and in vivo. After adsorption of siRNA targeting immune checkpoint CD47, DMP-Lac/siCD47 complex can safely inhibit the growth of multiple colon cancer models. In conclusion, our study developed a novel gene delivery system based on gut probiotic lysate, providing a potential strategy for cancer immunotherapy.

【Keywords】 siRNA; intestinal probiotics; immunotherapy; CD47

*通讯作者：段醒妹

1 前言

癌症是仅次于心血管疾病的全球第二大死因, 根据统计, 结直肠癌是全球第三大常见癌症, 也是全球第二大致命癌症^[1]。传统治疗结直肠癌的方法包括手术切除、化疗等。近年来, 基因治疗应运而生, 成为抗肿瘤治疗领域的研究热点^[2]。基于 siRNA 的基因治疗是结直肠癌治疗的手段之一, 通过沉默抗凋亡或引入促进细胞凋亡的相关基因来发挥作用。虽然 siRNA 在结直肠癌中的治疗备受关注, 但仍需进一步提高治疗效果。

肿瘤免疫治疗是一种通过激活免疫反应来对抗肿瘤的方法。与手术、化疗等治疗方式不同, 它的靶点不是肿瘤组织, 而是免疫系统, 激发其抗肿瘤潜能^[3]。基因疗法是通过替换有缺陷的基因或添加新的基因来治疗疾病。由于基因传递、基因编辑等功能, 基因治疗可以通过传递治疗性核酸来达到治疗效果^[4]。同时, 基于纳米骨架的非病毒基因载体由于其可修饰性和特殊理化性质, 也可以起到免疫刺激作用。因此, 基于非病毒基因治疗可以构建肿瘤免疫基因治疗的新策略。

siRNA 递送载体保护外源遗传物质的完整性, 实现有效传递, 是 siRNA 药物的关键。目前肿瘤 siRNA 基因治疗的研究主要集中在如何进一步提高其传递效率、开发新的载体、修饰载体、提高载体的靶向性等。然而很少有研究聚焦载体本身的治疗效果。事实上, 由于纳米颗粒的带电性质和骨架的可修饰性, 它们具有很高的治疗潜力。另一方面, 对于免疫基因治疗来说, 还需要找到理想的免疫刺激物质和策略, 并探索如何将其引入基因治疗骨架中。

肠道益生菌在最近的研究中对癌症的免疫治疗发挥了有益的影响。罗伊氏乳杆菌是肠道益生菌的一员, 通过促进肠道上皮细胞增殖、产生乳酸等发挥积极作用, 其肽聚糖、胞外多糖等成分具有免疫原性^[5]。最近的研究表明, 它可以刺激抗癌细胞因子的产生, 诱导氧化应激^[6]。然而, 出于安全性考虑, 直接使用细菌进行体内治疗是不理想的。而且目前尚不清楚治疗效果来自细菌的哪一种成分, 治疗机制也尚不清楚。所以我们考虑使用细菌裂解液, 由于细菌裂解液是多种组分的混合物, 必须找到合适的方法将其引入现有的非病毒载体骨架中。

我们之前用阳离子脂质 DOTAP 和 mPEG-mPCL

自组装形成了阳离子胶束 DMP, 已成功应用于一系列涉及不同类型核酸的基因治疗研究。在本研究中, 我们将罗伊氏乳杆菌裂解物包封在 DMP 骨架中, 制备了基于裂解物的基因传递载体 DMP-Lac。装载靶向 siCD47R 后得到 DMP-Lac/siCD47 复合物, 我们推测该复合物可以打破免疫抑制, 增强免疫应答。在本研究中, 我们将进一步研究 DMP-Lac 载体的基因传递能力和免疫刺激能力, 评价该复合物在结肠癌腹腔转移模型上的抗癌能力和安全性。

2 材料与方法

2.1 细胞系和动物

CT26、HEK293T 细胞购自 ATCC。所有细胞均在含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基中培养。Balb/c 小鼠来自北京 HFK 生物技术有限公司有限公司(北京, 中国)。所有小鼠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 纳米颗粒的制备与表征

通过高压破壁制备罗伊氏乳杆菌的裂解物(1000MPa, 60 分钟)。将 DOTAP 和 mPEG-PCL2K 溶解在二氯甲烷中, 然后旋转蒸发 45 分钟以去除二氯甲烷。将溶剂蒸发后形成的脂质膜溶解在 45°C 的罗伊氏乳杆菌裂解液中, 自组装成胶束。

为了表征 DMP-Lac 纳米粒的表面性质, 使用 ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments 有限公司, 英国) 对 DMP 和 DMP-Lac 的尺寸分布和 ζ 电位进行了测量, 在透射显微镜下观察制备颗粒的形貌分析。为了评估 DMP-Lac 结合 siRNA 的能力, 我们进行了凝胶阻滞试验。

2.3 革兰氏染色

将样品固定, 风干, 分别用结晶紫溶液、碘溶液、酚红染液染色 5 分钟。然后用显微镜(Olympus, Japan)观察新鲜培养的罗伊氏乳杆菌或其裂解物的染色情况。

2.4 体外免疫激活能力的研究

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, 将骨髓细胞重新悬浮在含有 20ng GM-CSF/mL 的完全培养基中诱导 DC。6 天后, 将 DC 种于 6 孔板, 然后分别加入 DMP、Lac 或 DMP-Lac。48h 后, 流式细胞术检测 DC 上 CD80 和 CD86 的表达。

为了研究 DMP-Lac 对 T 细胞的刺激作用,我们将 DC 与 T 细胞共培养。按上述方法将 DC 接种到 6 孔板后加入淋巴结细胞,同时分别加入 DMP、Lac 或 DMP-Lac。48h 后用流式细胞术检测 T 细胞的活化和细胞毒性。

2.5 酶保护实验

为了研究 DMP-Lac 保护 siRNA 免受 RNA 酶降解的能力,我们将裸 siNC 或 DMP-Lac/siNC 与 RNA 酶孵育。在 37℃ 孵育不同时间后,加入十二烷基硫酸钠 (0.24mg/mL) 在 70℃ 下孵育 10 分钟。在 1% (w/v) 琼脂糖凝胶上 120V 下电泳 15 分钟,观察条带。

2.6 安全性研究

为了评估制备的 DMP-Lac 的细胞毒性,我们将 293T 细胞预先种于 96 孔板中。24 小时后,细胞用梯度浓度的 DMP-Lac、DMP 或 PEI25K (一种黄金标准转染剂) 处理 24 小时,然后用 MTT 法分析细胞活力。

2.7 体外转染

将 CT26 种于 24 孔板中,将每孔含 10%FBS 的 DMEM 培养基换为不含血清的 DMEM 培养基。然后,将 1 μ g 的 Cyanine3 标记的 siRNA 与 DMP-Lac 孵育得到复合物,将复合物添加到细胞中。4 小时后,将培养基换为含 10%FBS 的培养基,37℃ 孵育 24h 后,在显微镜下检查细胞并拍照,用流式细胞术测定转染效率。

2.8 内吞作用及转运机制分析

CT26 细胞种于 24 孔板中后,使用不同转导途径的抑制剂处理 1h。更换培养基,用 DMP-Lac 转染 1 μ gCY3-siRNA。24h 后使用荧光显微镜观察各组转染效率,流式细胞术检测转染效率。抑制剂包括 M- β -CD、Genistein、CPZ、FilipinIII 和 Amiloride。

2.9 动物模型

将 CT26 细胞 (2.5×10^5) 腹腔注射于雌性 Balb/c 小鼠。第 3 天将小鼠随机分为 4 组,分别腹腔注射生理盐水 (NS)、DMP-Lac、DMP-Lac/siNC (10 μ gsiNC)、DMP-Lac/siCD47 (10 μ gsiCD47)。每天监测小鼠的体重。在第 12 天,对小鼠进行安乐处死,并对其肿瘤进行拍照和称重。

2.10 免疫组织化学分析

将小鼠的肿瘤组织以及主要器官经福尔马林固

定、石蜡包埋、组织切片后,进行脱蜡和复水化处理。用阻断内源性过氧化物酶活性后,用 CD31 (1:50,Abcam)、TNF- α (1:200,Abcam) 和 CD47 (1:50,Abcam) 进行组织化学染色。为了检测肿瘤细胞的凋亡,我们使用了 TUNELkit (Promega) 对石蜡切片进行染色。

2.11 统计分析

数据分析采用 t 检验、单、双向方差分析 (ANOVA)。所有数据定义为均数 $\pm$ 标准差 (SD)。

3 结果

3.1 DMP-Lac/siRNA 复合物的制备与表征

我们将通过一系列高压破壁、超声操作得到罗伊氏乳杆菌裂解物,革兰氏染色结果表明在裂解前,罗伊氏乳杆菌被染成紫色,裂解物被染成红色,证明细菌被有效裂解 (图 1A)。通过透射电镜,我们观察到 DMP 和 DMP-Lac 都是圆形的,并且 DMP-Lac 的直径增加了 (图 1B)。同时,马尔文粒度仪测定纳米颗粒粒径和 Zeta 电位如图 1C 和图 1D 所示,封装裂解物后形成的 DMP-Lac 的尺寸较 DMP 增大,电位降低。接下来,我们研究了 DMP-Lac 结合 siRNA 的能力。如图 1E 所示,当 siRNA/DMP-Lac 比例达到 1:60 时,siRNA 的迁移被完全抑制。因此,我们选择 1:60 的比例进行后续的研究。我们使用 MTT 法检测了 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。根据酶保护实验,如图 1G 所示,裸 siRNA 被 RNA 酶迅速降解。然而, DMP-Lac/siRNA 组在处理 4 小时后仍然可见条带,这表明 DMP-Lac 可以减少 siRNA 的降解。因此,基于上述发现,我们成功制备了能够递送 siRNA 的 DMP-Lac 纳米颗粒。

3.2 DMP-Lac/siRNA 复合物体外转染及细胞摄取机制

为了检测 DMP-Lac 递送 siRNA 的能力,我们在 CT26 上进行了转染实验,在荧光显微镜下观察到 DMP-Lac/CY3-siRNA 复合物与 PEI25K 和 DMP 具有同样高效的转染效率 (图 2A)。进一步流式细胞术分析显示, DMP-Lac/siRNA 转染效率为 97.62% (图 2B 和图 2C)。这些结果表明, DMP-Lac 有潜力成为一种新型的核酸传递载体。

我们进一步研究了 DMP-Lac 纳米颗粒的细胞摄

取机制。用几种内化机制抑制（菲律宾菌素 III 和染料木素抑制小窝蛋白介导的内吞作用，阿米洛利抑制巨胞饮作用，氯丙嗪抑制网格蛋白介导的内吞作用，甲基- β -环糊精抑制脂筏介导的内吞作用）预处理细胞后，如图 3A 所示，荧光显微镜下，甲基- β -环糊精、氯丙嗪和阿米洛利组的红色荧光弱于未处理组。此外，图 3B 的流式细胞术结果显示，甲基 β -环糊精对转染效率的影响最大。因此，我们的研究结果表明，脂筏介导的内吞作用在内化过程中发挥了很大的作用。

3.3 DMP-Lac 的免疫激活能力

我们研究了 DMP-Lac 纳米颗粒是否能有效地刺

激免疫反应。我们首先从小鼠体内分离 BMDC，用罗丹明标记的 DMP-Lac 纳米颗粒处理 BMDC24 小时。如图 4A 所示，在蔡司显微镜下，我们观察到 DMP-Lac（红色信号）与细胞膜（绿色信号）有明显的共定位，表明 DMP-Lac 可以有效结合 DC 受体。接下来，我们使用流式细胞术进行进一步验证 DMP-Lac 对 DC 成熟的影响，由图可以看出，Lac 组和 DMP-Lac 组的 DC 成熟率分别达到 93.91% 和 90.68%，说明裂解物作为抗原可以有效增强 DMP 纳米颗粒的免疫刺激能力。如图 4B 所示，我们评估了对 T 细胞的刺激作用。与对照组和 DMP 组相比，细菌裂解物的参与显著上调了 T 细胞活化标记分子 CD69 的表达。

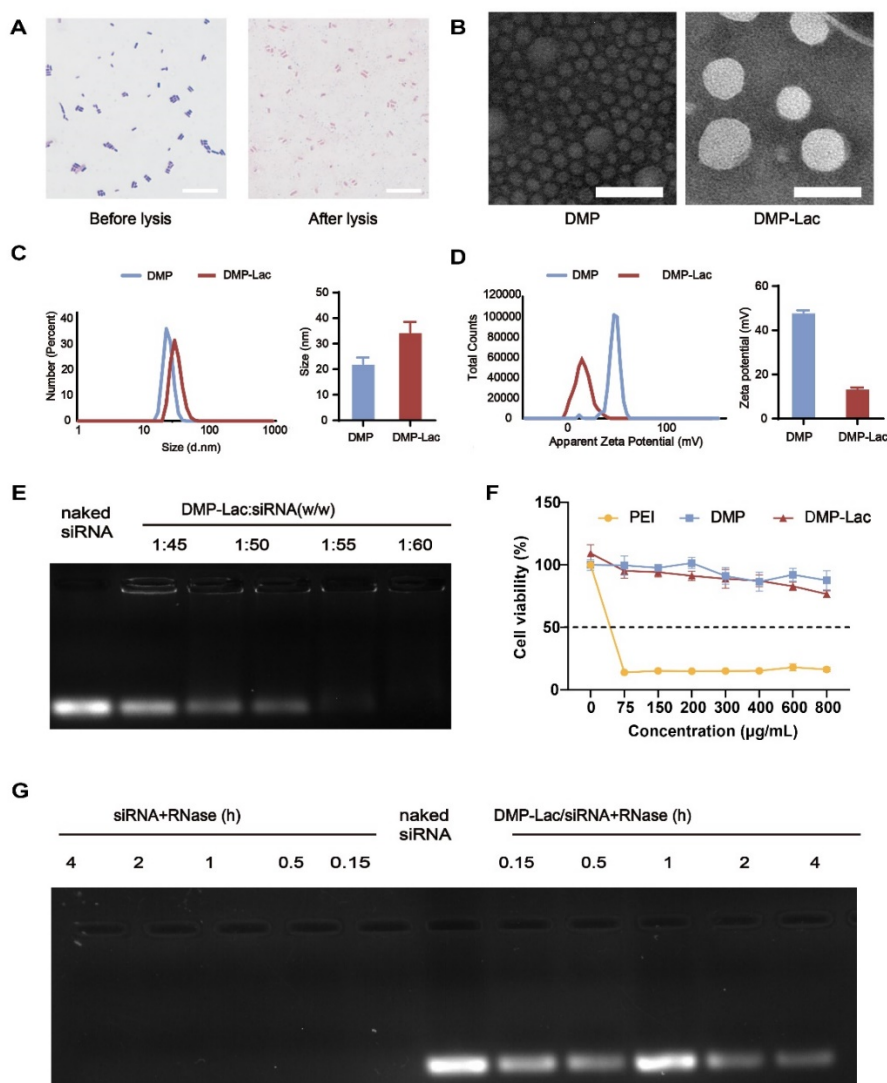


图 1 DMP-Lac 的制备和表征。(A) 罗伊氏乳杆菌及其裂解物的革兰氏染色图像 (标尺:10 μ m)。(B) DMP 和 DMP-Lac 的透射电镜图像 (比尺:100nm)。(C) DMP 和 DMP-Lac 的粒径大小和 Zeta 电位。(D) PEI25K、DMP 和 DMP-Lac 对 293T 细胞的毒性分析。(E) DMP-Lac 结合 siRNA 的凝胶电泳分析。(F) 凝胶电泳分析 DMP-Lac 减少 RNA 酶对 siRNA 的降解。

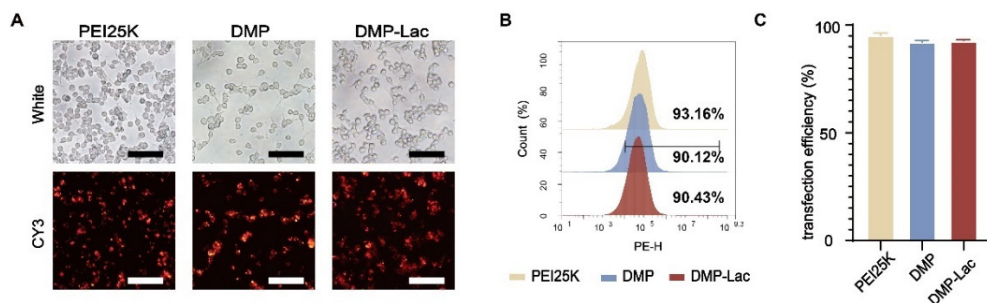


图2 体外转染研究。(A) PEI25K、DMP 和 DMP-Lac 转染 CT26 细胞后的荧光图像 (比尺:100μm)。(B) CT26 细胞上 DMP-Lac/siRNA 转染率的流式细胞术分析。(C) CT26 细胞上 DMP-Lac/siRNA 转染率的流式细胞术分析。

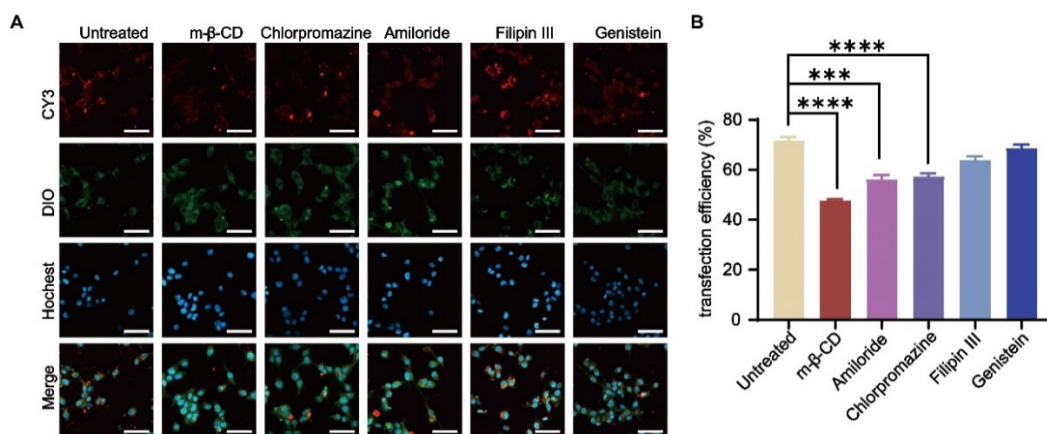


图3 摄取机制研究。(A) 抑制剂处理后 CT26 细胞对 DMP-Lac/siRNA 摄取的荧光图像分析。(比例尺:50μm)。(B) 抑制剂处理后 CT26 细胞对 DMP-Lac/siRNA 摄取率的流式细胞术分析 (***p<0.001, ****p<0.0001)。

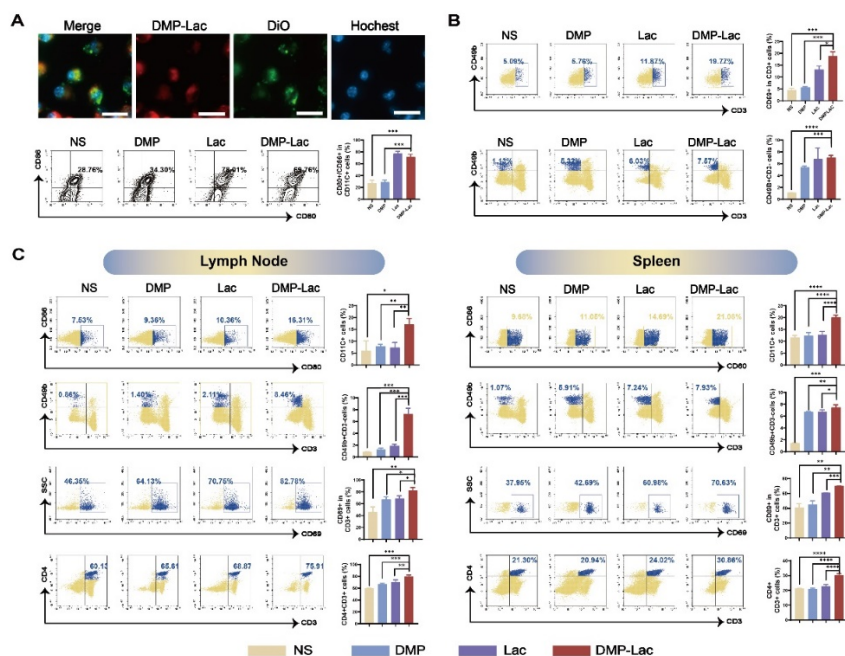


图4 DMP-Lac 激活免疫。(A) BMDC 对 DMP-Lac 的摄取研究;蓝色荧光(细胞核), 绿色荧光(细胞膜), 红色荧光(DMP-Lac-罗丹明) (比例尺:20μm); BMDC 中 CD11C⁺、CD80⁺、CD86⁺表达的统计数据 (***p<0.001)。(B) T 细胞中 CD3、CD69 表达的统计数据;脾淋巴细胞中 NK 细胞的统计数据 (***p<0.001, ****p<0.0001)。(C) 腹股沟注射后淋巴结和脾脏中 DC、T 细胞、NK 细胞的统计数据 (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001)。

为了进一步验证 DMP-Lac 的免疫系统激活作用, 我们对小鼠进行腹腔肌肉注射 DMP-Lac 纳米颗粒进行体内研究。如图 4C 所示, 在淋巴结中, DMP-Lac 组 CD11C、CD80 和 CD86 的增加更为明显, 表明 DMP-Lac 具有诱导 DC 成熟的能力。对于 T 细胞, 结果显示 DMP-Lac 可以刺激其活化, 促进 CD69 的表达。此外, 我们还评估了 NK 细胞的水平, 并检测到 NK 细胞的增加, 表明 DMP-Lac 可以诱导 NK 细胞募集。相应地, 在脾脏中也检测到类似的效果。根据 CD80、CD86 的结果, DMP-Lac 刺激免疫反应的效率最高。CD69+ T 细胞增多表明 T 细胞免疫功能增强, DMP-Lac 组的 NK 细胞水平也表现出升高。

3.4 DMP-Lac/siCD47 复合物在体内有效抑制结肠癌

在腹腔模型中, 我们通过腹腔注射研究了 DMP-Lac/siCD47 复合物的治疗潜力。小鼠腹部放大图像显示 (图 5A), DMP-Lac 和 DMP-Lac/siNC 均能延缓 CT26 肿瘤的进展, DMP-Lac/siCD47 复合物的治疗效果佳, 病理改变最少。此外, 如图 5B 所示, 肿瘤的重量和肿瘤结节数均呈递减趋势, 揭示了 DMP-Lac 与 CD47 基因沉默的协同作用。随后, 我们通过 IHC 和 TUNEL 实验研究了肿瘤组织内部 (图 5D)。结果表明, DMP-Lac 可以有效减少肿瘤血管的形成并促进肿瘤坏死因子的分泌, DMP-Lac/siCD47 复合物在敲低 CD47 表达后, 可进一步增加 TNF- α 的产生, 促进肿瘤组织的凋亡, 抑制肿瘤生长。此外, HE 分析显示主要器官没有明显的病理改变 (图 5C), 证明了 DMP-Lac/siCD47 复合物的体内安全性。

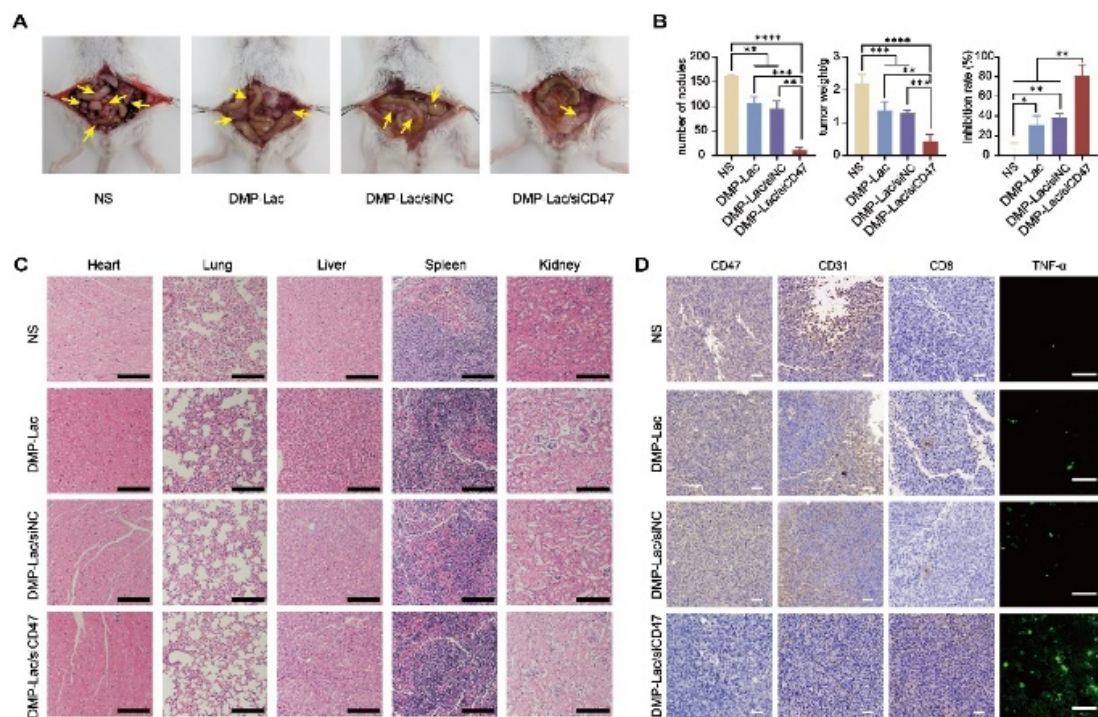


图5 DMP-Lac/siCD47 复合物在体内抑制 CT26 腹腔转移瘤的生长。(A) NS、DMP-Lac、DMP-Lac/siNC 和 DMP-Lac/siCD47 (10 μ g) 组代表性腹腔转移瘤的图像。(B) NS 组、DMP-Lac 组、DMP-Lac/siNC 组和 DMP-Lac/siCD47 组的平均肿瘤重量; 各组采集到的肿瘤结节平均肿瘤数; 各组的肿瘤生长抑制率 (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001)。(C) 主要脏器 HE 分析 (比例尺:100) (D) 肿瘤免疫组化分析; TUNEL 分析 (比例尺:50 μ m)。

4 讨论

本研究开发了一种多功能纳米复合物 DMP-Lac/siCD47, 通过激活免疫应答和减弱免疫抑制治疗结肠癌。实验结果表明, DMP-Lac 是一种有效的免疫刺激剂, 同时还可以将 siRNA 递送到肿瘤细

胞中。本研究证明了免疫应答调控与免疫检查点抑制剂联用的可行性。

免疫治疗可调节清除肿瘤细胞的免疫反应, 在基因治疗的基础上加用免疫治疗可更大程度地提高疗效^[7]。如何找到一种适合基因治疗与免疫治疗相

结合的手段,成为研究热点。为此,Dharmapuri,S 等人采用电穿孔法对 CEA 和 HER2 阳性结肠癌进行基因治疗的同时采用 TLR7 激动剂诱导 IFN α , 提高整体疗效^[8]。Finocchiaro 等选择 IL-2 和 GM-CSF 作为佐剂,增强自杀基因药物治疗黑色素瘤的效果^[9]。然而,目前最常用的手段大多是简单地增加免疫佐剂成分,这使得制备和应用不可避免地变得复杂。一种简单有效的刺激手段亟待开发,本研究主要针对载体本身,用罗伊氏乳杆菌裂解物修饰传递载体 DMP,使其具有免疫刺激功能。细胞实验表明,DMP-Lac 能显著增加 DC 共刺激分子的表达,增加 T 细胞的活化。在动物实验中,DMP-Lac 在腹腔转移模型中抑制肿瘤进展 37.57%。DMP-Lac 的成功制备得益于 DMP 提供的核壳结构,可以将细菌裂解液包裹在其中。纳米颗粒在自组装时,细菌裂解液被成功包装到空腔结构中得到 DMP-Lac。对于细菌裂解物来说,DMP 骨架可以增强其肿瘤组织渗透能力,为裂解物的生物活性提供保护,避免被吞噬细胞快速清除。另一方面,研究表明罗伊氏乳杆菌本身具有抗肿瘤的生物活性,它通过肽聚糖、脂多糖、脂壁酸或其他成分激活多种免疫细胞。采用高压破壁技术对罗伊氏乳杆菌细胞壁进行破壁以提高安全性的同时,还可以暴露更多的异种抗原,更容易被免疫细胞摄取,充分发挥其免疫激活特性。因此,本研究中使用的罗伊氏乳杆菌裂解物和 DMP 基因载体是互惠互利的。

肿瘤的免疫抑制包括癌细胞的免疫原性降低和免疫系统反应敏感性降低,如何打破免疫抑制对肿瘤治疗的桎梏仍是免疫治疗的一大挑战。研究人员为此进行了大量的研究。Hu 等人在使用抗原卵清蛋白和佐剂 CpG 组成的疫苗的同时,递送了表达透明质酸的 Spam1 基因,降解肿瘤细胞外基质,促进免疫细胞浸润,提高抗肿瘤效率^[10]。Chen,S 等开发了一种酸活化的 DOX 前药纳米颗粒并递送 PD-L1 的 siRNA,诱导肿瘤细胞凋亡和逆转免疫抑制^[11]。Wang,T 等设计了一种装载 siANRIL 的聚合物纳米颗粒,以促进细胞凋亡和防止肿瘤增殖^[12]。虽然这些研究都在一定程度上成功地减缓了免疫抑制,但很少有研究注意到阻断免疫抑制和激活免疫应答的协同可以将治疗效果提高到一个新的水平。我们选择了免疫检查点 CD47 作为治疗靶点。siCD47 可以配合 DMP-Lac 的激活作用,使癌细胞更容易被识别

和清除。在腹膜转移模型中,在 DMP-Lac 减缓肿瘤进展的基础上,siCD47 的加入可进一步抑制肿瘤进展,42.87%。我们认为共递送纳米复合物优越的抗肿瘤效果可能与免疫系统激活和逆转免疫抑制的协同作用有关。在 DMP-Lac/siCD47 复合物中,DMP-Lac 发挥着免疫刺激剂的作用,而 siCD47 阻断了 SIRP- α /CD47 通路,提高肿瘤细胞的免疫原性,使其更容易被 DMP-Lac 募集的免疫细胞清除。

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] Bulcha J T, Wang Y, Ma H, et al. Viral vector platforms within the gene therapy landscape [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 53.
- [3] Shields C W t, Wang L L, Evans M A, et al. Materials for Immunotherapy [J]. Adv Mater, 2020, 32(13): e1901633.
- [4] Gutierrez A A, Lemoine N R, Sikora K. Gene therapy for cancer [J]. Lancet, 1992, 339(8795): 715-21.
- [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] Bell H N, Rebernick R J, Goyert J, et al. Reuterin in the healthy gut microbiome suppresses colorectal cancer growth through altering redox balance [J]. Cancer Cell, 2022, 40(2): 185-200 e6.
- [7] 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.
- [8] Dharmapuri S, Aurisicchio L, Neuner P, et al. An oral TLR7 agonist is a potent adjuvant of DNA vaccination in transgenic mouse tumor models [J]. Cancer Gene Ther, 2009, 16(5): 462-72.
- [9] Finocchiaro 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] Hu Y, Lin L, Chen J, et al. Synergistic tumor immunological strategy by combining tumor nanovaccine with gene-mediated extracellular matrix scavenger [J]. *Biomaterials*, 2020, 252: 120114.
- [11] Chen S, Li D, Du X, et al. Carrier-free nanoassembly of doxorubicin prodrug and siRNA for combinationally inducing immunogenic cell death and reversing immunosuppression [J]. *Nano Today*, 2020, 35.
- [12] Wang T, Li P, Wan T, et al. TIGIT/PVR and LncRNA ANRIL dual-targetable PAMAM polymeric nanoparticles efficiently inhibited the hepatoma carcinoma by combination of immunotherapy and gene therapy [J]. *J Drug Target*, 2021, 29(7): 783-91.