

研究报告

微囊泡包裹溶瘤病毒的制备与鉴定及对 Hepa 1-6 细胞体外杀伤作用的探究

吴醒^{1,2}, 郑婷婷³, 梁莹^{1,2}, 陶薇伊^{1,2}, 秦莹^{1,2}, 樊晓晖^{*1,2}

1 广西医科大学基础医学院微生物学教研室, 广西 南宁 530021

2 广西高校区域性疾病基础研究重点实验室, 广西 南宁 530021

3 南昌市洪都中医院检验科, 江西 南昌 330006

吴醒, 郑婷婷, 梁莹, 陶薇伊, 秦莹, 樊晓晖. 微囊泡包裹溶瘤病毒的制备与鉴定及对 Hepa 1-6 细胞体外杀伤作用的探究[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1754-1765.

WU Xing, ZHENG Tingting, LIANG Ying, TAO Weiyi, QIN Ying, FAN Xiaohui. Microvesicle-encapsulated oncolytic virus: preparation, identification, and killing effect on Hepa 1-6 cells *in vitro*[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1754-1765.

摘要:【背景】溶瘤病毒生物治疗是肿瘤治疗发展的新方向, 其中新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)因具有生物安全及靶向性强等优势备受关注。然而, 中和抗体的病毒清除将削弱溶瘤病毒的持续有效发挥的作用。基于肿瘤细胞源性的微囊泡递送体系有望解决上述瓶颈, 因此微囊泡包裹溶瘤病毒的制备具有非常重要的现实意义。【目的】探究建立基于肿瘤细胞源性的新城疫病毒微囊泡递送体系和评估其体外杀瘤效应。【方法】采用差速离心的方法, 提取出微囊泡包裹的新城疫病毒(MV@NDV); 粒度仪检测 MV、NDV、MV@NDV 的粒径大小; 透射电子显微镜观察 MV@NDV 中 MV 和 NDV 的相对位置; 免疫印迹技术(Western blotting, WB)检测 MV@NDV 的 Integrin β -1、Gpc 3 和 Flotillin-1 蛋白表达; 激光共聚焦显微镜观察 MV@NDV 感染 Hepa 1-6 细胞 24 h, 细胞 NDV-HN 蛋白表达; 倒置显微镜和 CCK-8 法分别检测感染 Hepa 1-6 细胞 24、48、72 h 的细胞形态以及活力变化; 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)和免疫印迹技术(WB)分别检测 MV@NDV 感染 Hepa 1-6 细胞 24 h 凋亡相关基因 Caspase-3 和 Caspase-9 表达以及凋亡相关蛋白 Caspase-3 表达。【结果】粒径和透射电子显微镜检测结果表明 MV 粒径范围为 141–342 nm, NDV 粒径范围为 91–825 nm, MV@NDV 粒径范围为 164–712 nm。WB 结果表明 MV@NDV 能够表达 MV 所表达的 Integrin β -1、Gpc 3、Flotillin-1 蛋白。激光共聚焦显微镜观察结果表明 MV@NDV、NDV 感染 Hepa 1-6 细胞, 出现红色荧光, 均表达 NDV-HN 蛋白。CCK-8 结果表明 MV@NDV 组与 NC 组相比, Hepa 1-6 细胞活力下降($P<0.05$)。qPCR 结果表明 MV@NDV

资助项目: 广西壮族自治区自然科学基金(2023GXNSFAA026280, 2018GXNSFDA281043); 国家自然科学基金(81960511)
This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2023GXNSFAA026280, 2018GXNSFDA281043) and the National Natural Science Foundation of China (81960511).

*Corresponding author. E-mail: fanxiaohui63@163.com

Received: 2023-10-13; Accepted: 2023-12-01; Published online: 2024-02-23

与 NC 组相比凋亡相关基因 Caspase-3 和 Caspase-9 均上调($P<0.05$)。WB 结果表明 MV@NDV 与 NC 组相比凋亡相关蛋白 Caspase-3 上调($P<0.05$)。【结论】成功构建 NDV 微囊泡递送体系 MV@NDV, 有望解决治疗型溶瘤新城疫病毒在临床转化上存在的瓶颈, 为临床新城疫病毒抗肿瘤方面提供新的思路及依据。

关键词: 溶瘤病毒; 新城疫病毒; 微囊泡; 抗肿瘤

Microvesicle-encapsulated oncolytic virus: preparation, identification, and killing effect on Hepa 1-6 cells *in vitro*

WU Xing^{1,2}, ZHENG Tingting³, LIANG Ying^{1,2}, TAO Weiyi^{1,2}, QIN Ying^{1,2}, FAN Xiaohui^{*1,2}

1 Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China

2 Key Laboratory of Basic Research on Regional Diseases in Guangxi Universities, Nanning 530021, Guangxi, China

3 Department of Clinical Laboratory, Nanchang Hongdu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi, China

Abstract: [Background] Oncolytic virus therapy is a new direction in the research on tumor treatment, and Newcastle disease virus (NDV) has attracted much attention because of its high biosafety and accurate targeting. However, viral clearance by neutralizing antibodies will weaken the sustained effect of oncolytic virus. The tumor cell-derived microvesicle delivery system is expected to break the above bottleneck. **[Objective]** To establish the tumor cell-derived microvesicle delivery system of oncolytic NDV and evaluate its antitumor effect *in vitro*. **[Methods]** Microvesicle-encapsulated NDV (MV@NDV) was extracted by differential centrifugation. The particle sizes of MV, NDV, and MV@NDV were measured by a particle size meter. The relative positions of MV and NDV in MV@NDV were observed by transmission electron microscopy. Western blotting (WB) was employed to determine the protein levels of Integrin β -1, Gpc 3, and Flotillin-1 of MV@NDV. Laser confocal microscopy was employed to observe MV@NDV 24 h post infection in Hepa 1-6 cells and the expression of NDV-HN protein in cells. An inverted microscope and the cell counting kit-8 (CCK-8) were used to examine the changes the morphology and viability of infected Hepa 1-6 cells 24, 48, and 72 h post infection, respectively. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and WB were employed to determine the mRNA levels of apoptosis-associated genes Caspase-3 and Caspase-9 and the protein level of Caspase-3, respectively, in the MV@NDV-infected Hepa 1-6 cells 24 h post infection. **[Results]** The particle sizes of MV, NDV, and MV@NDV were within the ranges of 141–342 nm, 91–825 nm, and 164–712 nm, respectively. WB results indicated that Integrin β -1, Gpc 3, and Flotillin-1 were expressed in MV@NDV. The Hepa 1-6 cells infected with MV@NDV and NDV showed red fluorescence and expressed NDV-HN protein. In addition, the viability of Hepa 1-6 cells decreased in the MV@NDV group compared with that in the NC group ($P<0.05$). The Hepa 1-6 cells in the MV@NDV group showed up-regulated

mRNA levels of Caspase-3 and Caspase-9 and up-regulated protein level of Caspase-3 compared with the NC group ($P<0.05$). **[Conclusion]** The successful construction of NDV microvesicle delivery system MV@NDV is expected to solve the bottleneck of therapeutic oncolytic Newcastle disease virus (NDV) in the clinical translation, and provide new ideas and rationale for clinical NDV anti-tumor aspects.

Keywords: oncolytic virus; Newcastle disease virus; microvesicles; anti-tumor

免疫疗法已成为当前肿瘤治疗中最受关注的方式,其中包括溶瘤病毒(oncolytic virus, OV)。OV是通过选择性杀伤肿瘤细胞并诱导抗肿瘤免疫的病毒^[1-2]。迄今为止,已有4种溶瘤病毒产品被批准用于全球癌症治疗,包括T-VEC、Delytact、Oncorine H101和Rigvir^[3]。在溶瘤病毒家族中,新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)因具有安全性和溶瘤潜能,已成为用于癌症治疗的潜在病毒^[4]。NDV具有选择性溶瘤作用,对肿瘤细胞具有细胞毒性,但是对正常细胞无伤害^[5]。然而,溶瘤新城疫病毒治疗时会面临癌症患者体内存在针对该病毒的中和抗体,以及癌症患者体内的高度免疫抑制的肿瘤微环境等问题^[6]。这些障碍将削弱溶瘤病毒持续有效地发挥作用。

微囊泡(microvesicle, MV)是细胞外囊泡的一种,在细胞表面以“出芽”的方式释放出来,其直径为100–1 000 nm,它包含蛋白质、RNA(包括mRNA、miRNA、lncRNA和其他非编码RNA)、DNA(mtDNA, ssDNA, dsDNA)和脂质,这些物质可以参与细胞间运输和交换^[7-8]。微囊泡因具有有限的免疫毒性和特异性细胞靶向性的优点,已被广泛当作运载体用于免疫治疗^[9]。研究表明,肿瘤细胞来源的微囊泡能够刺激机体产生抗肿瘤免疫反应,从而达到更好的溶瘤效果^[10-12]。

本研究探讨了肿瘤细胞源性的微囊泡包裹溶瘤病毒对肿瘤细胞的杀伤作用,有望解决治疗型溶瘤新城疫病毒在临床转化上存在的瓶颈,为

临床新城疫病毒抗肿瘤方面提供新的思路及依据。

1 材料与方法

1.1 材料

新城疫病毒 NDV7793 (以下称 NDV)由广西医科大学微生物学教研室 P2 实验室保存,鼠源肝癌细胞 Hepa 1-6 由本实验室保存。DMEM 培养基、胎牛血清均购自 Gibco 公司。Gpc 3 抗体购自 Absin 公司; Integrin β -1 抗体、Flotillin-1 抗体、 β -actin 抗体和 Caspase-3 抗体均购自 CST 公司;NDV-HN 抗体购自 Santa Cruz 公司;荧光二抗羊抗鼠购自 Invitrogen 公司; EDTA 胰蛋白酶消化液、青霉素/链霉素混合液、Tween-20、SDS、甘氨酸、Tris 和脱脂奶粉均购自 Solarbio 公司;一抗二抗稀释液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天公司;PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自雅酶公司;Trizol、反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司。粒度分析仪购自马尔文帕纳克公司;透射电子显微镜购自徕卡仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MV 和 MV@NDV 的提取与鉴定

将 Hepa 1-6 细胞接种于 10 mm 培养皿中,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中,待细胞融合度达到 80%–90%时,弃去培养基,并用 PBS 缓冲液冲洗 3 次。MV 的提取:将培养基更换为不含胎牛血清的 DMEM 培养基,并用紫外照射 1 h, 24 h 后收集细胞上清液;MV@NDV 的提取:将 NDV 原液(效价:5120 HU)稀释 1 000 倍,再

加入到培养皿中, 48 h 后收集细胞上清液。对上述上清液采用差速离心法收集沉淀: 将上清液于 4 °C、400×g 离心 10 min, 取上清, 再在 4 °C、2 500×g 离心 15 min 取上清, 再于 4 °C、14 000×g 离心 1 h, 取沉淀, 得到 MV 和 MV@NDV 于-80 °C 冰箱保存。粒度分析仪检测 NDV、MV、MV@NDV 的粒径。透射电子显微镜观察 NDV、MV、MV@NDV 的形态: 将 NDV、MV、MV@NDV 样本从-80 °C 冰箱取出解冻, 分别吸取 20 μL 滴在碳支持膜铜网静置 3–5 min; 再将 2% 磷钨酸滴在碳支持膜铜网放置 1–2 min; 透射电子显微镜下观察, 采集图像分析。

1.2.2 Western blotting 检测 MV@NDV 的 Integrin β-1、Gpc 3 和 Flotillin-1 蛋白表达

将 NDV、MV、MV@NDV 样本从-80 °C 冰箱拿出解冻, 弃去上清取沉淀, 向各沉淀中加入一定量的蛋白裂解液, 用移液枪反复吹打混匀, 使蛋白充分裂解后离心取上清, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 100 °C、10 min 进行蛋白变性后, 使用 10% PAGE 凝胶快速制备试剂盒制胶, 200 V、30 min 电泳转至 NC 膜, 用 1×TBST 洗涤 3 次, 加入封闭液, 室温封闭 2 h, 用 1×TBST 洗涤 3 次, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜, 再用 1×TBST 洗涤 3 次, 加入二抗, 室温孵育 2 h。使用化学发光法对蛋白条带进行显影并分析。

1.2.3 激光共聚焦检测 MV@NDV 体外作用 Hepa 1-6 细胞表达 HN 蛋白

将 2×10^5 个 Hepa 1-6 细胞接种于共聚焦培养皿, 待细胞贴壁后分别加入 NDV 和 MV@NDV,

于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h; 用 PBS 清洗 3 次, 弃去 PBS, 在共聚焦培养皿中加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定 Hepa 1-6 细胞 15 min, 再弃去 4% 多聚甲醛, 加入 1 mL 0.2% Triton-100 作用 10 min, 再弃去 0.2% Triton-100, 加入 Hoechst 室温孵育 15 min, 再用 0.2% Triton-100 清洗 3 次, 并加入 NDV-HN 抗体, 室温孵育 15 min, 再用 0.2% Triton-100 清洗 3 次, 加入荧光二抗, 室温避光孵育 15 min, 再用 0.2% Triton-100 清洗 3 次。盖好培养皿后于共聚焦显微镜下观察。

1.2.4 CCK-8 检测细胞活力

将 Hepa 1-6 细胞按 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板。实验分组为: NC 组(未处理)、空白组、MV 组(2.5 μg/mL)、NDV 组(1 HU)和 MV@NDV 组(2.5 μg/mL), 将上述各组细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中分别培养 24、48、72 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 放入培养箱中孵育 2 h, 酶标仪 450 nm 测定吸光度并按以下公式计算: 细胞活力 = $[OD(\text{实验组}) - OD(\text{空白组})] / [OD(\text{NC 组}) - OD(\text{空白组})] \times 100\%$ 。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测 MV@NDV 感染 Hepa 1-6 细胞 24 h 凋亡相关基因的 mRNA 水平

Hepa 1-6 细胞按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 同 1.2.4 分组, 处理 24 h。1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清并加入 1 mL RNAiso Plus, 按照说明书提取 RNA, 逆转录为 cDNA, 进行 qPCR (95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环), 引物序列见表 1, 以 ACTB 为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各个基因相对表达量。

表 1 基因的引物序列

Table 1 Primer sequences for genes

Gene	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')
Caspase-3	ATGGAGAACAACAAAACCTCAGT	TTGCTCCCATGTATGGTCTTTAC
Caspase-9	TCCTGGTACATCGAGACCTTG	AAGTCCCTTTTCGCAGAAACA

1.2.6 Western blotting 检测 MV@NDV 感染 Hepa 1-6 细胞 24 h 凋亡相关蛋白表达

Hepa 1-6 细胞按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,同 1.2.4 分组,处理 24 h。1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞,按照比例加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂提取总蛋白,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,100 °C、10 min 进行蛋白变性后,使用 10% PAGE 凝胶快速制备试剂盒制胶,150 V、50 min 电泳转至 NC 膜,用 1×TBST 洗涤 3 次,加入封闭液,室温封闭 2 h,用 1×TBST 洗涤 3 次,加入一抗,4 °C 孵育过夜,再用 1×TBST 洗涤 3 次,加入二抗,室温孵育 2 h。使用化学发光法对蛋白条带进行显影并分析。

1.2.7 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对各组数据进行统计分析。统计学差异为: $P < 0.05$ 。统计学方法为:

两组间的比较用 t 检验(student's t -test),多组间的比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐时两两之间的比较用 LSD- t 检验,方差不齐时用 Turkey 法。

2 结果与分析

2.1 MV、NDV、MV@NDV 粒径检测结果

由粒径结果图(图 1)可知,测得的 MV 粒径大小范围在 141–342 nm 左右,主要集中在 190.1–295.3 nm; NDV 粒径大小范围为 91–825 nm 左右,主要集中在 190.1–295.3 nm; MV@NDV 粒径大小范围为 164–712 nm 左右,主要集中在 255–458.7 nm。MV@NDV 粒径大小大于 MV、NDV 的粒径大小; MV 的粒径大小与 NDV 的粒径大小相近。以上结论可表明, MV 具备包裹 NDV 的潜力。

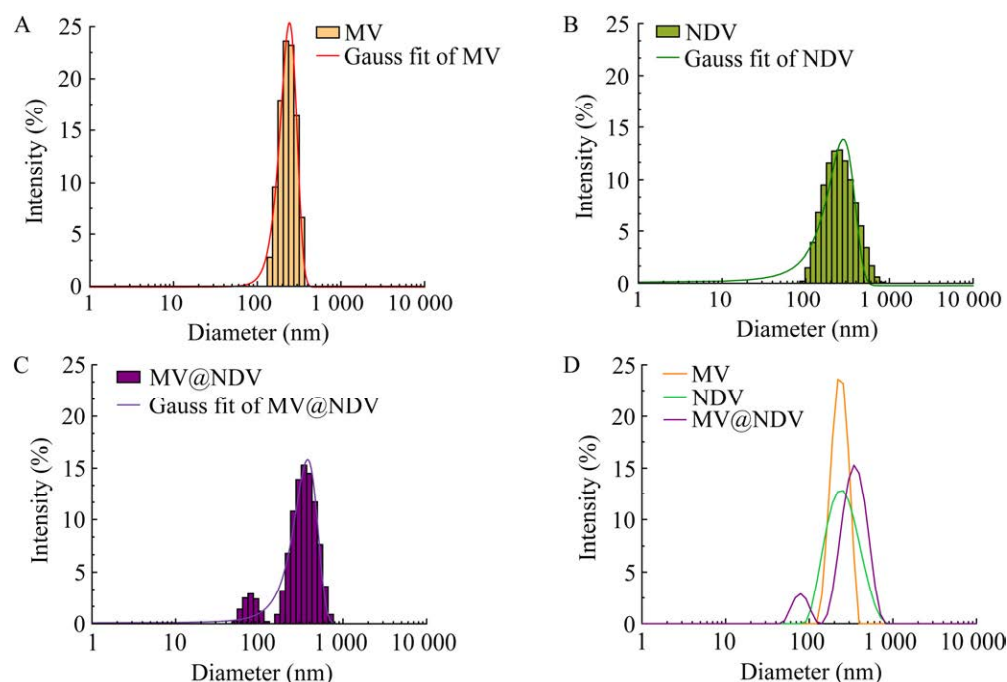


图 1 MV、NDV、MV@NDV 粒径检测结果 A: MV 粒径大小. B: NDV 粒径大小. C: MV@NDV 粒径大小. D: A、B、C 三图重合图

Figure 1 MV, NDV, and MV@NDV particle size detection results. A: MV particle size. B: NDV particle size. C: MV@NDV particle size. D: A, B and C overlap plots.

2.2 MV、NDV 和 MV@NDV 透射电镜检测结果

由图 2 可看出 MV、NDV、MV@NDV 的形态和相对位置, MV@NDV 的大小略大于 MV 和 NDV, MV 能够将 NDV 包裹住。

2.3 MV、NDV 和 MV@NDV 相关蛋白表达结果

由图 3 可看出 MV@NDV 能表达 MV 所表达的 Integrin β -1、Gpc 3 和 Flotillin-1 蛋白。

2.4 MV@NDV 体外作用 Hepa 1-6 细胞表达 HN 蛋白的情况

NDV 和 MV@NDV 作用 Hepa 1-6 细胞 24 h 后, 对样本进行染色处理, 通过激光共聚焦观察 MV@NDV 能否和 NDV 一样感染 Hepa 1-6 细胞并在胞核(图 4 中呈蓝色)周围表达 HN 蛋白(图 4 中呈红色)。图 4 结果表明 NDV 和 MV@NDV 都能感染 Hepa 1-6 细胞, 说明 MV@NDV 能够表达 HN 蛋白并具有和 NDV 一样感染 Hepa 1-6 细胞的活性。

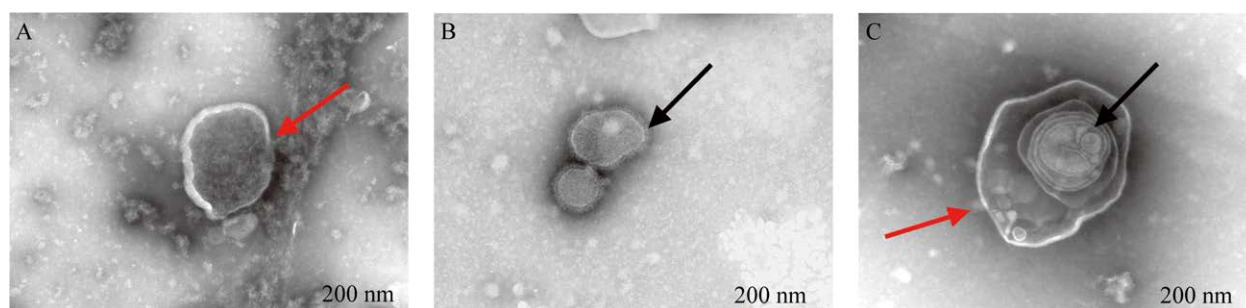


图 2 MV (A)、NDV (B)、MV@NDV (C)电镜检测结果 图中红色箭头所指为 MV, 黑色箭头所指为 NDV

Figure 2 MV (A), NDV (B), and MV@NDV (C) electron microscopy detection results. The red arrow in the figure indicates MV, while the black arrow indicates NDV.

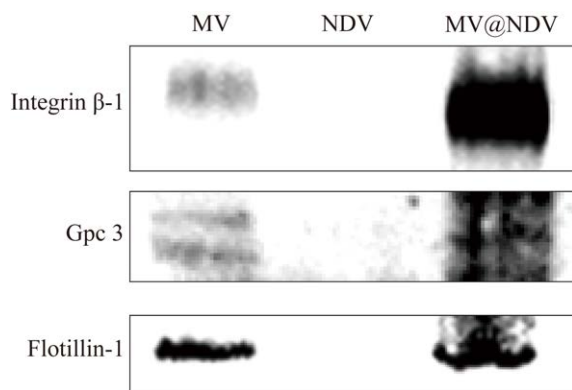


图 3 纯化 MV、NDV、MV@NDV 中 Integrin β -1、Gpc 3、Flotillin-1 蛋白表达情况

Figure 3 Integrin β -1, Gpc 3, and Flotillin-1 protein expression in purified MV, NDV and MV@NDV.

2.5 MV@NDV 体外作用 Hepa 1-6 细胞的形态

MV、NDV、MV@NDV 感染 Hepa 1-6 细胞 24、48、72 h 在倒置显微镜下细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE)情况如图 5 所示。在 24 h 时, NC 组和 MV 组绝大多数 Hepa 1-6 细胞形态正常; NDV 组和 MV@NDV 组 Hepa 1-6 细胞形态有轻微改变。在 48 h 时, NC 组和 MV 组大多数 Hepa 1-6 细胞形态正常; NDV 组和 MV@NDV 组 Hepa 1-6 细胞出现明显 CPE。在 72 h 时, NC 组和 MV 组大多数 Hepa 1-6 细胞形态正常; NDV 组和 MV@NDV 组 Hepa 1-6 细胞出现十分明显的 CPE。

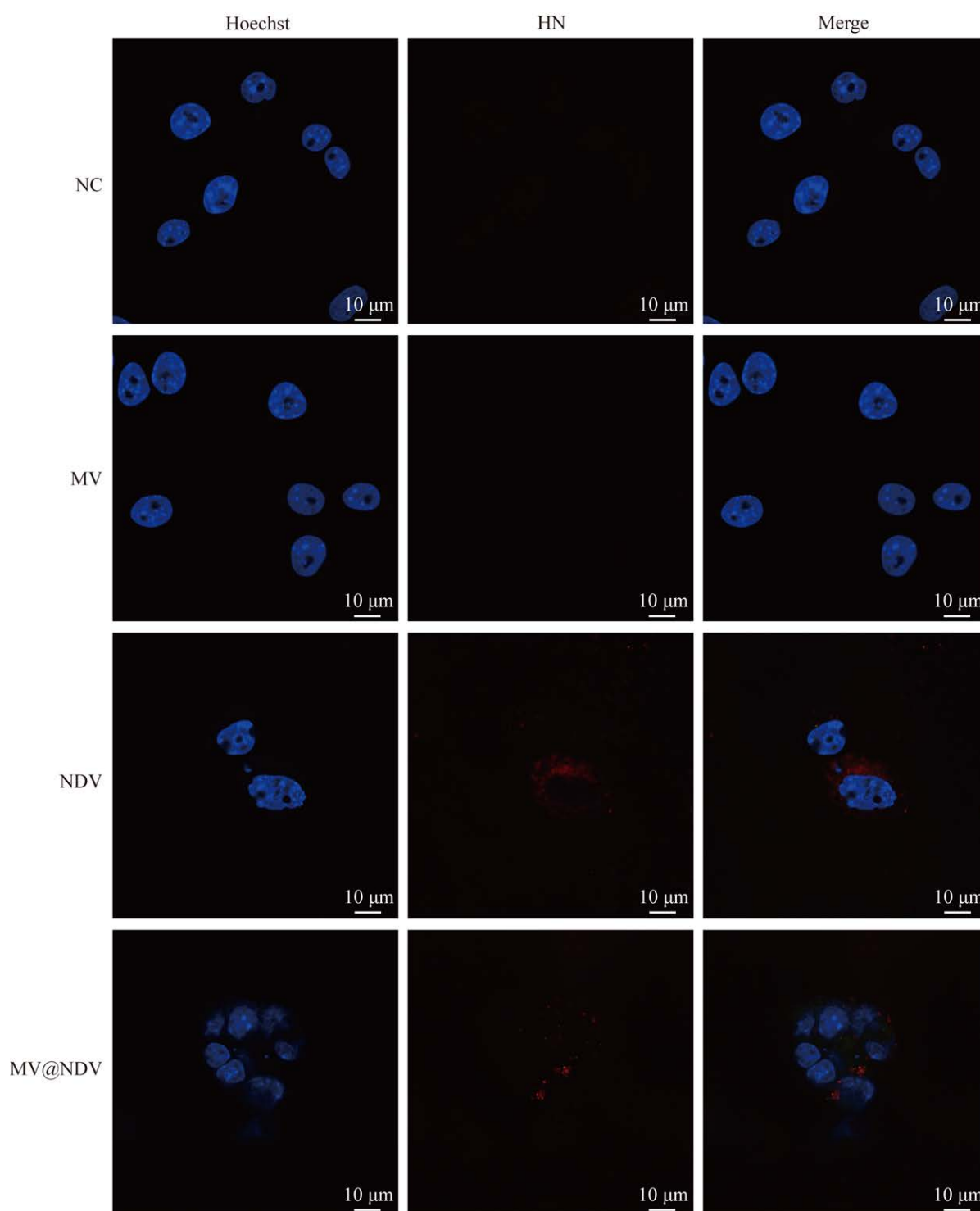


图4 NDV和MV@NDV感染Hepa 1-6细胞24 h后NDV-HN蛋白表达情况 蓝色为Hepa 1-6细胞核, 红色为NDV-HN

Figure 4 NDV-HN protein expression after 24 h of NDV and MV@NDV infection of Hepa 1-6 cells. Blue represents Hepa 1-6 cell nucleus, and red represents NDV-HN.

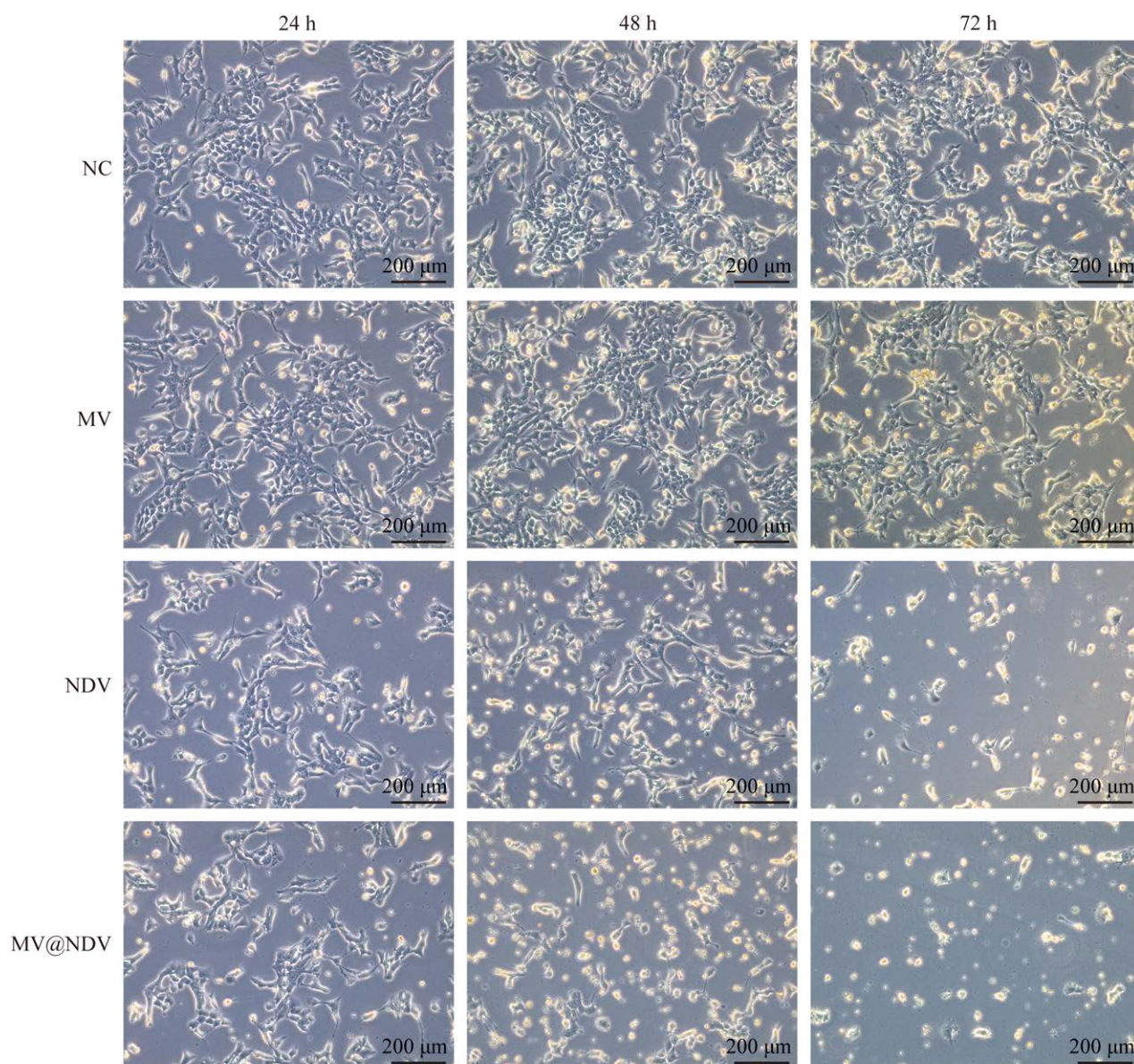


图 5 MV、NDV、MV@NDV 感染 Hepa 1-6 细胞 24、48、72 h (100×)镜下细胞 CPE 情况

Figure 5 Cellular CPE of MV, NDV, and MV@NDV infected Hepa 1-6 cells at 24 h, 48 h and 72 h (100×) microscopy.

2.6 MV@NDV 体外作用 Hepa 1-6 细胞的活力变化

CCK-8 结果(图 6)表明,与 NC 组相比,NDV 组和 MV@NDV 组 Hepa 1-6 细胞在 48 h 和 72 h 时细胞活力均明显下降($P<0.05$)。这表明 MV@NDV 体外作用 Hepa 1-6 细胞,可以使细胞活力下降。

2.7 MV@NDV 体外作用 Hepa 1-6 细胞对凋亡蛋白转录水平的影响

qPCR 结果(图 7)表明,与 NC 组相比, MV@NDV 组凋亡相关基因 Caspase-3 和 Caspase-9 基因均上调;与 NC 组相比,NDV 组凋亡相关基因 Caspase-3 上调。

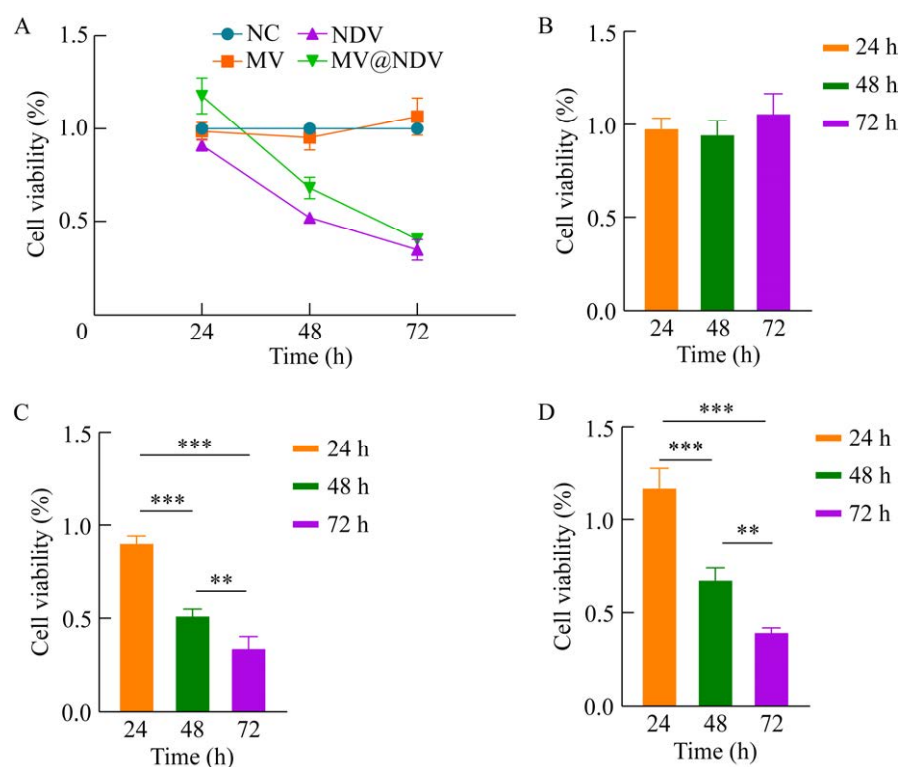


图 6 24、48、72 h Hepa 1-6 细胞活力变化 A: NC 组. B: MV 组. C: NDV 组. D: MV@NDV 组

Figure 6 Changes in Hepa 1-6 cell viability at 24 h, 48 h, and 72 h. A: NC group. B: MV group. C: NDV group. D: MV@NDV group. ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$.

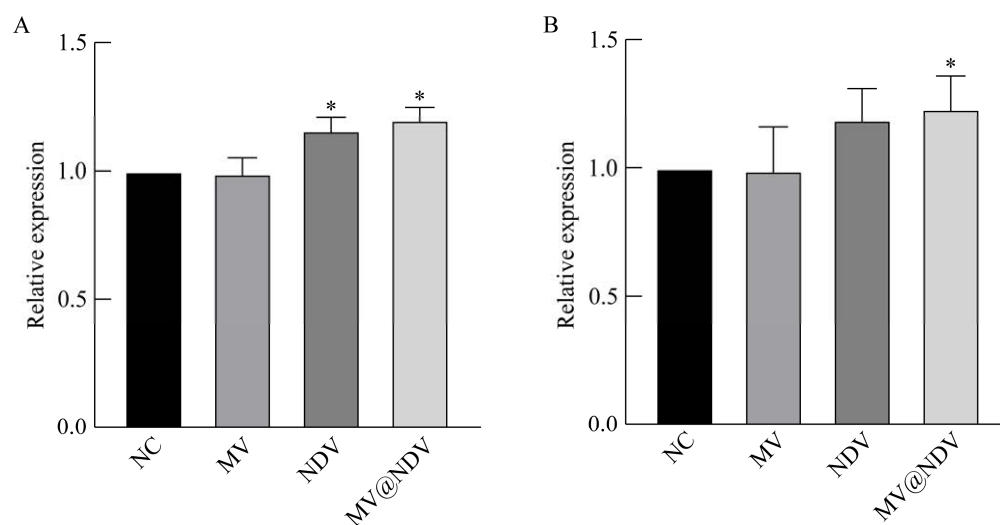


图 7 NC 组、MV 组、NDV 组、MV@NDV 组 Hepa 1-6 细胞 24 h Caspase-3 (A)和 Caspase-9 (B)基因表达情况 *: 与 NC 组比 $P < 0.05$

Figure 7 24 h Caspase-3 (A) and Caspase-9 (B) gene expression in Hepa 1-6 cells of NC group, MV group, NDV group, and MV@NDV group. *: Compared to the NC group, $P < 0.05$.

2.8 MV@NDV 体外作用 Hepa 1-6 细胞对凋亡蛋白表达水平的影响

WB 结果(图 8)表明,与 NC 组相比,MV@NDV 组凋亡相关蛋白 Caspase-3 蛋白表达上调。

3 讨论与结论

近年来,OV 疗法已被用于肿瘤靶向治疗。它能直接裂解肿瘤细胞而几乎不损伤正常细胞,并通过释放抗原和激活肿瘤微环境中的炎

症反应间接增强抗肿瘤免疫。但 OV 在抗肿瘤过程中会遇到宿主的抗病毒免疫反应和持续时间短等问题,它将无法在抗病毒中和抗体的环境下充分复制和裂解^[13-15]。NDV 是一种天然的溶瘤 RNA 病毒,它的溶瘤机制主要为:NDV 选择性感染肿瘤细胞并在胞内复制,最终裂解细胞,达到直接溶瘤的效果。已有研究表明,肿瘤细胞源性的微囊泡携带多种免疫原性分子并抑制肿瘤对免疫疗法的反应,它可以用来递送化疗药物^[16-17]。综上所述,微囊泡包裹 OV 的治疗策略有望解决上述瓶颈。

已有研究表明,巨噬细胞来源的微囊泡通过包裹纳米颗粒,进而靶向性治疗类风湿性关节炎^[18]。此外,肿瘤细胞来源的微囊泡还可以作为一种纳米颗粒物质,通过包裹药物治疗恶性胸腔积液^[19]。目前溶瘤病毒已被用于治疗各种癌症,已有研究发现,肿瘤来源的微囊泡可作为独特的载体系统,通过携带溶瘤腺病毒,从而避免宿主抗体的抗病毒作用,来介导杀伤肿瘤细胞的作用^[20]。NDV 因具有肿瘤杀伤特异性和诱导全身免疫应答等特点,已成为溶瘤家族中极具潜力的候选株^[21]。因此本研究尝试用微囊泡 MV 包裹 NDV,初步探究 MV@NDV 对 Hepa 1-6 细胞的体外杀伤作用,这将为 NDV 的临床肿瘤治疗提供新的思路及实验依据。在本研究中,粒径结果显示 MV 粒径大小为 141-342 nm,NDV 粒径大小为 91-825 nm,表明 MV 具备包裹 NDV 的潜力;透射电子显微镜结果显示 MV 能够包裹 NDV。通过 WB 实验对 MV@NDV 相关表面蛋白的表达进行定性,结果表明 MV@NDV 能够表达 Integrin β -1、Gpc 3 和 Flotillin-1 蛋白,进一步说明 MV 能够包裹 NDV。

在探究 MV@NDV 对 Hepa 1-6 细胞的体外杀伤作用的过程中,激光共聚焦显微镜下可观察到 MV@NDV 和 NDV 一样能表达 NDV-HN

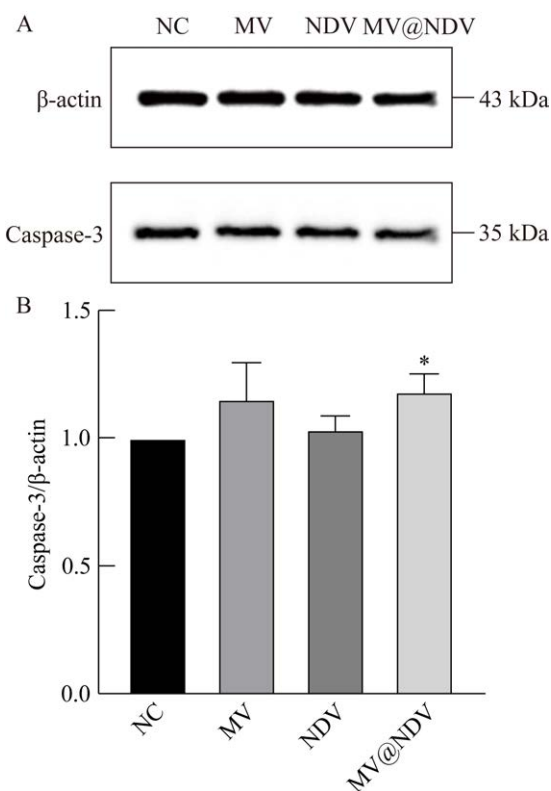


图 8 NC 组、MV 组、NDV 组、MV@NDV 组 Hepa 1-6 细胞 24 h Caspase-3 蛋白表达情况 A: Western blotting 结果图。B: 蛋白表达的柱状图。*: 与 NC 组比 $P<0.05$

Figure 8 24 h Caspase-3 protein expression in Hepa 1-6 cells of NC group, MV group, NDV group, and MV@NDV group. A: The graph of Western blotting results. B: The graph of protein expression. *: Compared to the NC group, $P<0.05$.

蛋白；倒置显微镜下可观察到 MV 组和 NC 组 Hepa 1-6 细胞随着时间的推移无 CPE 发生；而 MV 组和 MV@NDV 组 Hepa 1-6 细胞随着时间的推移发生明显 CPE。CCK-8 结果表明，与 NC 组相比，NDV 组和 MV@NDV 组 Hepa 1-6 细胞在 48 h 和 72 h 时细胞活力明显下降($P<0.05$)，说明 MV@NDV 能使 Hepa 1-6 细胞的细胞活性下降。通过形态学和 CCK-8 结果表明 MV@NDV 和 NDV 对 Hepa 1-6 细胞具有一定的杀伤能力。

程序性细胞死亡主要有细胞凋亡、焦亡和坏死等。细胞凋亡主要有内源性和外源性两种方式，在这两种途径中，都通过激活半胱氨酸蛋白酶，如 Caspase-3、Caspase-9 等，从而导致细胞死亡^[22-24]。已有研究表明，多发性骨髓瘤细胞来源的微囊泡(myeloma-derived microvesicles, MM-MVs)能显著抑制人肾小管上皮细胞(human renal tubular epithelial cells, HK-2)的活力并诱导细胞凋亡，并且该过程中 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白水平显著升高^[25]。此外，NDV 在体外感染肿瘤细胞过程中，如人乳腺癌细胞 MCF-7、骨肉瘤细胞等，其肿瘤细胞中的 BAX、Caspase-9、Caspase-3 基因表达量增加，这些结果表明 NDV 可能是通过激活细胞凋亡的内在途径，从而导致肿瘤细胞死亡^[26-27]。

因此本研究对 MV@NDV 和 NDV 对 Hepa 1-6 细胞的杀伤与凋亡之间的关系进行初步探究。MV、NDV、MV@NDV 分别作用 Hepa 1-6 细胞 24 h，收集样本检测 NC 组、MV 组、NDV 组、MV@NDV 组凋亡相关基因和蛋白的表达。qRT-PCR 结果表明 MV@NDV 组与 NC 组相比凋亡相关基因 Caspase-3 和 Caspase-9 均上调；WB 结果表明 Caspase-3 蛋白表达升高。

综上所述，本研究成功构建了 NDV 微囊泡递送体系 MV@NDV，其能显著杀伤 Hepa 1-6 细胞，并且体外杀瘤效应与凋亡相关基因和蛋

白表达上调有关。本实验已成功构建 NDV 微囊泡递送体系 MV@NDV，并探究了其在体外杀伤作用，但尚未研究该递送体系是否减少机体产生中和抗体，因此后续将通过体内研究来优化这一不足之处。

REFERENCES

- [1] HARRINGTON K, FREEMAN DJ, KELLY B, HARPER J, SORIA JC. Optimizing oncolytic virotherapy in cancer treatment[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2019, 18: 689-706.
- [2] WATANABE N, McKENNA MK, ROSEWELL SHAW A, SUZUKI M. Clinical CAR-T cell and oncolytic virotherapy for cancer treatment[J]. *Molecular Therapy*, 2021, 29(2): 505-520.
- [3] 李雪, 王华. 溶瘤病毒和自然杀伤细胞来源分泌体杀伤肿瘤作用的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2023, 37(9): 711-718.
LI X, WANG H. Research progress in roles of oncolytic virus and natural killer cell-derived exosomes in killing tumors[J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2023, 37(9): 711-718 (in Chinese).
- [4] LAWLER SE, SPERANZA MC, CHO CF, CHIOCCA EA. Oncolytic viruses in cancer treatment: a review[J]. *JAMA Oncology*, 2017, 3(6): 841-849.
- [5] HUANG F, DAI CJ, ZHANG YN, ZHAO YQ, WANG YG, RU GQ. Development of molecular mechanisms and their application on oncolytic Newcastle disease virus in cancer therapy[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022, 9: 889403.
- [6] BOMMAREDDY PK, KAUFMAN HL. Unleashing the therapeutic potential of oncolytic viruses[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2018, 128(4): 1258-1260.
- [7] SCHWAGER SC, REINHART-KING CA. Mechanobiology of microvesicle release, uptake, and microvesicle-mediated activation[J]. *Current Topics in Membranes*, 2020, 86: 255-278.
- [8] HE C, JAFFAR ALI D, XU HT, KUMARAVEL S, SI K, LI YM, SUN B, MA JQ, XIAO ZD. Epithelial cell-derived microvesicles: a safe delivery platform of CRISPR/Cas9 conferring synergistic anti-tumor effect with sorafenib[J]. *Experimental Cell Research*, 2020, 392(2): 112040.
- [9] 谢舟颖, 袁一超, 熊友香, 孙巧仪, 朱新悦, 张纪平, 朱志红. 微囊泡在肿瘤中的研究进展[J]. *中南药*

- 2022, 20(8): 1757-1764.
- XIE ZY, YUAN YC, XIONG YX, SUN QY, ZHU XY, ZHANG JP, ZHU ZH. Research progress of microvesicle in tumor[J]. Central South Pharmacy, 2022, 20(8): 1757-1764 (in Chinese).
- [10] MARKOV OV, SENKOVA AV, MOHAMED IS, SHMENDEL EV, MASLOV MA, OSHCHEPKOVA AL, BRENNER EV, MIRONOVA NL, ZENKOVA MA. Dendritic cell-derived artificial microvesicles inhibit RLS₄₀ lymphosarcoma growth in mice via stimulation of Th1/Th17 immune response[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(11): 2542.
- [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] ZHOU YC, ZHANG YN, YANG X, WANG SB, HU PY. Delivery systems for enhancing oncolytic adenoviruses efficacy[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2020, 591: 119971.
- [13] BERKELEY RA, STEELE LP, MULDER AA, van den WOLLENBERG DJM, KOTTKE TJ, THOMPSON J, COFFEY M, HOEBEN RC, VILE RG, MELCHER A, ILETT EJ. Antibody-neutralized reovirus is effective in oncolytic virotherapy[J]. Cancer Immunology Research, 2018, 6(10): 1161-1173.
- [14] ZHU SL, LI SY, YI M, LI N, WU KM. Roles of microvesicles in tumor progression and clinical applications[J]. International Journal of Nanomedicine, 2021, 16: 7071-7090.
- [15] LIU J, MA JW, TANG K, HUANG B. Therapeutic use of tumor cell-derived extracellular vesicles[J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1660: 433-440.
- [16] LI RX, HE YW, ZHU Y, JIANG LX, ZHANG SY, QIN J, WU Q, DAI WT, SHEN S, PANG ZQ, WANG JX. Route to rheumatoid arthritis by macrophage-derived microvesicle-coated nanoparticles[J]. Nano Letters, 2019, 19(1): 124-134.
- [17] ZHANG SJ, CHEN LC, ZONG Y, LI QW, ZHU KK, LI ZY, MENG R. Research progress of tumor-derived extracellular vesicles in the treatment of malignant pleural effusion[J]. Cancer Medicine, 2023, 12(2): 983-994.
- [18] RAN L, TAN XH, LI YC, ZHANG HF, MA RH, JI TT, DONG WQ, TONG T, LIU YY, CHEN DG, YIN XN, LIANG XY, TANG K, MA JW, ZHANG Y, CAO XT, HU ZW, QIN XF, HUANG B. Delivery of oncolytic adenovirus into the nucleus of tumorigenic cells by tumor microparticles for virotherapy[J]. Biomaterials, 2016, 89: 56-66.
- [19] SCHIRRMACHER V. Molecular mechanisms of anti-neoplastic and immune stimulatory properties of oncolytic Newcastle disease virus[J]. Biomedicines, 2022, 10(3): 562.
- [20] D'ARCY MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. Cell Biology International, 2019, 43(6): 582-592.
- [21] KOWALSKI S, KARSKA J, ŁAPIŃSKA Z, HETNAŁ B, SACZKO J, KULBACKA J. An overview of programmed cell death: apoptosis and pyroptosis-mechanisms, differences, and significance in organism physiology and pathophysiology[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2023, 124(6): 765-784.
- [22] UNNISA A, GREIG NH, KAMAL MA. Inhibition of Caspase 3 and Caspase 9 mediated apoptosis: a multimodal therapeutic target in traumatic brain injury[J]. Current Neuropharmacology, 2023, 21(4): 1001-1012.
- [23] ZHAO AQ, KONG FC, LIU CJ, YAN GX, GAO F, GUO H, GUO AY, CHEN ZC, LI QB. Tumor cell-derived microvesicles induced not epithelial-mesenchymal transition but apoptosis in human proximal tubular (HK-2) cells: implications for renal impairment in multiple myeloma[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(3): 513.
- [24] KALANTARI A, FARASHI BONAB S, KEYVANFAR H, MORTAZAVI P. Evaluation of apoptosis induction by Newcastle disease virus LaSota strain in human breast carcinoma cells[J]. Archives of Razi Institute, 2020, 75(3): 367-376.
- [25] CHEN S, ZHANG QG, XU D, LI YQ, FAN YY, LI WJ, YIN XZ, ZHANG Y, LIU JW, LI X, SUN LL, JIN NY. Antitumor effect of the Newcastle disease viral hemagglutinin-neuraminidase gene is expressed through an oncolytic adenovirus effect in osteosarcoma cells[J]. Anti-Cancer Drugs, 2018, 29(3): 197-207.
- [26] XU R, GREENING DW, ZHU HJ, TAKAHASHI N, SIMPSON RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2016, 126(4): 1152-1162.
- [27] RATAJCZAK MZ, RATAJCZAK J. Extracellular microvesicles/exosomes: discovery, disbelief, acceptance, and the future?[J]. Leukemia, 2020, 34: 3126-3135.