

分类号：Q81

单位代码：10363

密 级：公开

学 号：2210530130

工程化细菌外膜囊泡用于增强肿瘤放射免疫治疗的
研究

Research on engineering bacterial outer membrane
vesicles for enhancing tumor radioimmunotherapy

学生姓名：沈海东

指导教师：杨凯（教授）

专 业：生物与医药（086000）

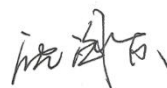
研究方向：生物载体材料

论文答辩日期：2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确和隐含的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：



日期： 2024 年 6 月 3 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在_____年解密后使用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒

学位论文作者签名：



指导教师签名：



日期： 2024 年 6 月 3 日

日期： 2024 年 6 月 3 日

工程化细菌外膜囊泡用于增强肿瘤放射免疫治疗的研究

摘 要

内放射性同位素治疗（RIT）是临床治疗肿瘤的一种手段，它不仅可以直接杀伤肿瘤细胞，还可以通过诱导肿瘤细胞免疫原性死亡（ICD）来增强抗肿瘤免疫应答。为了在肿瘤部位实现放射性核素的靶向输送，目前已经开发了各种纳米载体，包括无机和有机纳米材料，以提高治疗效率并将副作用降至最低。然而，传统放射性标记的纳米载体面临着放射标记效率低，以及肿瘤靶向性差等挑战，这极大地限制了 RIT 的疗效。近年来，细菌外膜囊泡（OMV）在癌症治疗中受到广泛关注。OMV 是由革兰氏阴性菌分泌的天然纳米囊泡，由于其具有良好的肿瘤靶向性，常被用作递送载体以实现药物的靶向递送。此外，OMV 还具有强大的免疫治疗潜力，可以促进免疫细胞分泌干扰素- γ ，从而激活抗肿瘤免疫反应。鉴于 OMV 优异的特性，OMV 有望开发成为一种放射性核素标记的肿瘤靶向纳米载体，从而实现放射性核素在肿瘤部位的精准治疗。

本文构建了一个基于减毒鼠伤寒沙门氏菌外膜囊泡（VNP20009-OMV）的递送平台，以实现放射性碘的高效标记并改善肿瘤放射免疫治疗（ ^{131}I -STATH-OMV-PEG）。主要研究内容及研究结果如下：首先，通过生物工程技术构建表达富酪蛋白（STATH）的细菌外膜囊泡（STATH-OMV）。STATH 含有丰富的酪氨酸，可以提供更多的标记位点，从而提高放射性碘的标记效率。为了提高

STATH-OMV 的生物相容性,我们用聚乙二醇(PEG)对 STATH-OMV 进行了修饰,得到 STATH-OMV-PEG。随后通过 Iodogen 标记法, STATH-OMV-PEG 可实现 $^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$ 标记,与传统的 OMV 相比, STATH-OMV 具有更高的标记率。此外, ^{131}I 标记的 STATH-OMV-PEG 显示出显著的抑制肿瘤生长的作用。更重要的是, ^{131}I -STATH-OMV-PEG 还能诱导树突状细胞(DCs)成熟,以及促进免疫细胞分泌抗肿瘤细胞因子,从而增强 RIT 诱导的全身抗肿瘤免疫应答。另外, ^{131}I -STATH-OMV-PEG 对原位结肠癌也具有显著的抑制作用,并诱导机体产生免疫记忆效应,防止肿瘤再侵袭。

综上所述,本研究提出了一种以 OMV 为中心的 RIT 递送平台,该递送平台实现了 $^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$ 高效标记,并激活了强大的抗肿瘤免疫反应,为肿瘤放射免疫治疗提供了一条全新路径。

关键词: 细菌外膜囊泡, 免疫应答, 富酪蛋白, 放射免疫治疗, 放射性标记

RESEARCH ON ENGINEERING BACTERIAL OUTER MEMBRANE VESICLES FOR ENHANCING TUMOR RADIOIMMUNOTHERAPY

ABSTRACT

Internal radioisotope therapy (RIT) is a method for clinical treatment of tumors. It can not only kill tumor cells directly, but also enhance anti-tumor immune response by inducing tumor cell immunogenic cell death (ICD). In order to achieve targeted delivery of radionuclides in tumor sites, a variety of nano-carriers, including inorganic and organic nanomaterials, have been developed to improve therapeutic efficiency and minimize side effects. However, the traditional radiolabeled nano-carriers face the challenges of low radiolabeling efficiency and poor tumor targeting, which greatly limit the efficacy of RIT. In recent years, bacterial outer membrane vesicles (OMV) have attracted wide attention in the treatment of cancer. OMV is a natural nano-vesicle secreted by Gram-negative bacteria. Because of its good tumor targeting, it is often used as a delivery carrier to achieve targeted drug delivery. In addition, OMV has strong

immunotherapeutic potential, which can promote the secretion of interferon-gamma by immune cells, thus activating the anti-tumor immune response. In view of the excellent characteristics of OMV, OMV is expected to develop into a radionuclide labeled tumor targeting nano-carrier, so as to achieve accurate radionuclide therapy in the tumor site.

In this paper, a delivery platform based on attenuated *Salmonella typhimurium* outer membrane vesicles (VNP20009-OMV) was constructed to achieve efficient labeling of radioactive iodine and improve tumor radioimmunotherapy (^{131}I -STATH-OMV-PEG). The main research contents and results are as follows: Firstly, bacterial outer membrane vesicles (STATH-OMV) expressing statherin (STATH) were constructed by bioengineering technology. Tyrosine rich in STATH can provide more radioactive labeling sites, thus improving the labeling efficiency of radioactive iodine. In order to improve the biocompatibility of STATH-OMV, we modified STATH-OMV with polyethylene glycol (PEG), yielding STATH-OMV-PEG. Then through the Iodogen tagging method, STATH-OMV-PEG can realize $^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$ tagging. Compared with the traditional OMV, STATH-OMV has higher labeling rate. In addition, ^{131}I -labeled STATH-OMV-PEG showed a significant inhibitory effect on

tumor growth. More importantly, ^{131}I -STATH-OMV-PEG can also induce maturation of dendritic cells (DCs) and promote the secretion of anti-tumor cytokines by immune cells, thus enhancing the systemic anti-tumor immune response induced by RIT. In addition, ^{131}I -STATH-OMV-PEG also has a significant inhibitory effect on in situ colon cancer and induces immune memory effect to prevent tumor re-invasion.

To sum up, this study proposes an OMV-centric RIT delivery platform, which realizes the efficient labeling of $^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$ and activates a strong anti-tumor immune response, which opens up a new way for tumor radioimmunotherapy.

KEY WORDS: Bacterial outer membrane vesicles, Immune response, Statherin, Radio-immunotherapy, Radiolabeling

目录

摘要	I
ABSTRACT	III
第一章绪论	1
1.1 引言	1
1.2 当前我国癌症发展状况	2
1.3 肿瘤治疗	3
1.3.1 手术治疗	3
1.3.2 化学治疗	4
1.3.3 靶向治疗	4
1.3.4 放射治疗	5
1.3.5 免疫治疗	7
1.4 放疗对免疫治疗的作用	8
1.5 细菌外膜囊泡	9
1.6 课题设计与研究内容	10
第二章 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的制备及其细胞水平探究	13
2.1 引言	13
2.2 实验材料与仪器	13
2.2.1 实验材料	13
2.2.2 实验仪器	14

2.3 实验方法	14
2.3.1 构建表达富酪蛋白的减毒沙门氏菌	14
2.3.2 超速离心法提取细菌外膜囊泡	14
2.3.3 WB 检测富酪蛋白表达	14
2.3.4 STATH-OMV 的 PEG 修饰	14
2.3.5 STATH-OMN-PEG 形貌表征	15
2.3.6 STATH-OMN-PEG 粒径及 ζ 电位	15
2.3.7 STATH-OMV-PEG 的 ^{131}I 标记率及标记稳定性	15
2.3.8 STATH-OMV-PEG 细胞毒性实验	15
2.3.9 细胞摄取实验	15
2.3.10 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 细胞杀伤实验	16
2.3.11 γ -H2AX 核损伤实验	16
2.4 实验结果与讨论	17
2.4.1 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的制备及表征	17
2.4.2 STATH-OMV-PEG 的细胞毒性及摄取	18
2.4.3 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的细胞杀伤及 DNA 断裂检测 ..	20
2.5 本章小结	22
第三章 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 皮下瘤抑制作用	23
3.1 引言	23
3.2 实验材料与仪器	23
3.2.1 实验材料	23
3.2.2 实验仪器	23

3.3 实验方法	23
3.3.1 SPECT/CT 成像	23
3.3.2 生物分布	24
3.3.3 体内放射免疫治疗	24
3.3.4 体内生物安全性评价	24
3.3.5 数据处理	24
3.4 实验结果与讨论	24
3.4.1 SPECT-CT 成像及生物分布	24
3.4.2 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的体内肿瘤放射治疗	26
3.5 本章小结	29
第四章 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的体内免疫刺激效应及肿瘤放射免疫治疗	30
4.1 引言	30
4.2 实验材料与仪器	30
4.2.1 实验材料	30
4.2.2 实验仪器	30
4.3 实验方法	30
4.3.1 组织切片免疫荧光染色	30
4.3.2 DCs 细胞成熟分析	31
4.3.3 ELISA 法检测血清免疫因子	31
4.3.4 免疫记忆模型治疗实验	31
4.3.5 原位结肠癌模型治疗实验	32

4.3.6 数据分析	32
4.4 结果与讨论	32
4.4.1 放疗导致肿瘤细胞免疫原性死亡相关蛋白表达的验证 ..	32
4.4.2 淋巴结树突状细胞（DCs）成熟	33
4.4.3 血清免疫因子分析	34
4.4.4 免疫记忆模型治疗实验	34
4.4.5 放射性碘标记的细菌外膜囊泡抑制原位肿瘤生长	36
4.5 本章小结	38
第五章 结论及展望	39
5.1 结论	39
5.2 展望	39
参考文献	41
攻读学位期间的研究成果	47
致谢	48

第一章 绪论

1.1 引言

根据国际癌症研究机构的数据显示,2020 年全球癌症病例新增约 1929 万例,死亡病例约 1000 万例(图 1-1)^[1]。癌症的患病率和致死率均呈逐年上升趋势,使其成为全球第二大致死原因。另外,根据国际癌症研究机构的预测,到 2040 年全球新增癌症病例将达到 2840 万例,较 2020 年增长了 47%^[2-4]。尤其是在发展程度较低或中等的国家,癌症病例的增长幅度最为显著^[5]。因此,癌症的防控形势依然十分严峻。

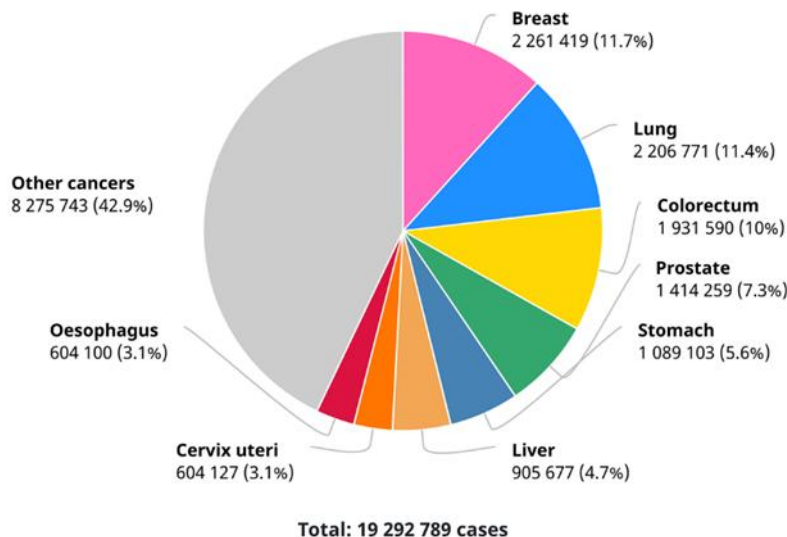


Fig 1-1 Number of new cancer cases worldwide in 2020^[1]

图 1-1 2020 年全球癌症新发病例数^[1]

随着人们对健康意识的增强以及医疗技术的不断进步,癌症的预防和治疗疗效也在不断改善。此外,随着治疗肿瘤的创新药逐渐开发,早期和中期癌症患者的生存率和生存时间得到一定提高^[6,7]。然而对于晚期癌和转移癌来说,患者的生存率改善并不明显,当前医疗技术还无法完全解决所有癌症治疗难题^[8]。在与癌症长期斗争的过程中,人们开发出了许多治疗方法,主要包括手术、化疗、放疗和免疫治疗等^[9-11]。放射治疗(Radiation Therapy, RT)是传统肿瘤治疗策略之一,目前在临床上仍广泛应用。它主要包括体外射线治疗(External irradiation radiotherapy, EBRT)和内放射治疗(Internal radioisotope therapy, RIT)两种方式^[12]。EBRT 利用 X 射线或 γ 射线从外部照射肿瘤部位从而造成肿瘤杀伤,是许多

肿瘤类型的首选治疗方法。RIT 则运用放射性同位素在体内杀伤肿瘤细胞，其特点是治疗区域精确，对周围正常组织影响小^[13, 14]。总体来说，放射治疗作为肿瘤治疗重要手段之一，在临床实践中具有广泛的应用前景。为了在肿瘤部位实现放射性核素的靶向输送，已经开发了各种纳米载体，包括无机和有机纳米材料，以提高治疗效率并将副作用降至最低^[15-17]。然而，用于放射性标记的纳米载体面临着较低的放射标记效率，以及肿瘤靶向性差等挑战，这将限制 RIT 的治疗效果^[18, 19]。此外，RIT 对晚期肿瘤影响不大，也不能预防肿瘤复发。然而，有大量研究表明，放射治疗会导致肿瘤细胞免疫原性死亡（Immunogenic cell death, ICD），继而释放肿瘤相关抗原（Tumor associated antigens, TAAs），并激活了体内的抗肿瘤免疫应答，这极大地增强肿瘤放射治疗的疗效^[20, 21]。

近年来，利用细菌外膜囊泡（Outer membrane vesicles, OMV）进行抗肿瘤治疗引起了广泛的关注。OMV 是由革兰氏阴性菌分泌，其粒径大小在 20-250 nm 之间^[22]。与细菌相比，OMV 缺乏在体内复制的能力，比细菌更具有良好的生物安全性。此外，OMV 具有优异的肿瘤靶向能力。因此，目前 OMV 已成为肿瘤治疗中常用的药物输送载体^[23, 24]。OMV 富含来自亲本细菌的多种成分，包括细菌特有的蛋白质，细菌相关抗原以及病原体相关分子模式（Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs），如脂多糖、核酸和肽聚糖等。OMV 可以激活多种 Toll 样受体通路（Toll-like receptors, TLR）来调节和增强宿主的免疫应答^[24, 25]。研究还表明，OMV 可以调节肿瘤免疫微环境的不同细胞成分，如 CD8⁺T 细胞和肿瘤相关巨噬细胞，刺激抗肿瘤细胞因子的分泌，从而增强抗肿瘤免疫反应的效力^[26]。此外有研究表明，低剂量的 OMV 在机体内可作为良好的抗肿瘤免疫佐剂^[27]。鉴于这些优点，具有肿瘤靶向能力和免疫调节功能的 OMV 显示出作为放射性核素标记载体的巨大潜力。

1.2 当前我国癌症发展状况

癌症是影响广泛的重要公共健康问题，也是我国重要死亡原因之一。根据 2020 年全球癌症观察站（GLOBOCAN）显示，中国新增癌症患者约 457 万例，癌症相关死亡人数约 300 万人，其中，肺癌、结直肠癌、胃癌、肝癌和食道癌在中国年龄标化死亡率中位居前列^[28]。不良的生活方式易导致癌症发生，大约有三

分之一的癌症死亡与吸烟有关。同时,长期饮酒可能导致食道癌和肠胃癌的发生。另外,人体细胞修复能力随着年龄的增长而逐渐减弱,导致患癌风险不断增加^[29, 30]。总体来看,癌症仍然是影响广泛的重大健康问题,其发病率和死亡人数在不斷上升,引起国际社会广泛关注。近些年来,我国的癌症死亡率和生存率已得到明显改善,从2000年至2016年,整体年龄标化死亡率每年下降1.2%,癌症的5年生存率也从2003年至2005年的30.9%增加到2012年至2015年的40.5%^[31, 32]。这些改善可能归因于人们健康意识的不断增强,癌症诊断与治疗能力的提高、多学科团队方法的采用等多个方面。

1.3 肿瘤治疗

目前常见的肿瘤治疗手段包括手术治疗、放射治疗、化疗、靶向治疗、免疫治疗。手术是最常见的治疗方式,通过手术切除肿瘤组织。放射治疗利用高能射线杀死癌细胞或阻止其生长。化疗则通过使用药物杀死癌细胞或阻止其增殖。靶向治疗则是通过药物干扰癌细胞特定的生长信号通路。免疫治疗通过激活患者自身的免疫系统,促使其识别和攻击癌细胞,从而达到抑制肿瘤生长和扩散的效果。此外,还有一些新型的治疗手段,如基因治疗和细胞治疗,也在不断发展和应用中。

1.3.1 手术治疗

虽然治疗肿瘤的手段越来越多,但仍然有60%以上的肿瘤以手术治疗为手段^[33]。手术治疗主要分为以下几种:1.根治性手术。根治性手术彻底切除肿瘤病灶,并对附近可能被癌细胞侵犯的淋巴结进行清扫。主要适用于早期未转移的恶性肿瘤。2.减瘤手术。对于已向远处转移或扩散的肿瘤,如果原发肿瘤可以被手术切除,这将有助于减轻身体症状,增强免疫功能,并且有利于其他治疗方法(比如化疗、放疗等)的有效实施。3.姑息治疗手术。在某些情况下,当部分肿瘤的手术效果有限,但患者出现严重并发症时,可以通过手术治疗解除直接的生命威胁^[34]。4.修复性手术。有些手术对患者的创伤和外貌造成了严重影响,但随着医学科学的发展,现在可以通过手术进行重建,比如乳腺癌切除术后的乳房重建,以及直肠癌切除后进行的原位肛门重建手术等。需要强调的是,手术治疗对患者

的身体状况有一定要求。如果患者存在严重的心脏、肝脏、肾脏、肺部等疾病，或者由于其他原因无法承受手术，就需要寻求其他治疗方案。

1.3.2 化学治疗

化学疗法是肿瘤治疗中常用的方法之一。在治疗过程中，医生通常会根据患者的状况选择适当的药物。这些药物可以通过静脉注射或口服方式进入血液循环，从而全身发挥作用。它们可以扩散到肿瘤细胞聚集的部位，通过不同途径杀灭病变细胞，以达到控制和杀灭肿瘤的目的^[35, 36]。其优点包括：1.可以直接杀死肿瘤细胞，缩小肿瘤大小，延缓疾病进展。2.对于一些无法手术切除的肿瘤，如转移性肿瘤，是有效的治疗方法。3.化疗药物通过机体的血液循环可以到达肿瘤的各个部位，包括原发灶和转移灶，覆盖范围比手术治疗更广，能够有效杀灭分散的癌细胞，从而提高治疗效果。4.可与手术、放疗等其他治疗方式联合使用，提高治疗效果。尽管化疗具有以上众多优点，但同时也有一些副作用：1.化疗药物对正常细胞也有一定毒性，容易引起不适反应如恶心、呕吐等。2.长期使用可能损害重要器官如心脏、肝脏、骨髓等。3.治疗效果依赖于患者的耐受性和肿瘤的敏感性，部分肿瘤对化疗不敏感。4.化疗后会导致人体免疫力下降，使患者更容易受到外界病原体的侵袭。总的来说，化学疗法是一种重要的肿瘤系统性治疗方法，但也存在一定的毒副作用。因此，需要根据病情选择合适的药物和方案进行个性化治疗。

1.3.3 靶向治疗

靶向治疗是一种新兴的肿瘤治疗方法，能够通过干扰肿瘤所需的特定细胞分子来阻止肿瘤细胞的生长^[37, 38]。其主要特点和优势包括：1.针对肿瘤相关基因或蛋白进行靶向治疗。2.使用小分子抑制剂药物有针对性地作用于这些靶点，从而抑制肿瘤的生长和扩散。3.与化疗相比，靶向治疗的毒副作用较小，对正常细胞的影响相对较小。4.适用于多种晚期肿瘤，如乳腺癌、肺癌、结直肠癌等，对化疗无效的患者也可能有益。5.具有较高的个性化程度，能够根据肿瘤的分子特征选择相应的靶向药物。6.在一些肿瘤类型如白血病中效果显著。靶向治疗的缺点是研发周期长，应用范围相对狭窄。总的来说，它代表了肿瘤治疗的新发展趋势^[39, 40]。

1.3.4 放射治疗

肿瘤放射治疗是一种利用高能辐射来破坏癌细胞或阻止其生长的治疗方法^[41]。这种治疗方法可以通过直接破坏癌细胞的 DNA，使其无法继续生长和分裂，从而达到治疗的目的^[42]。放射治疗通常通过放射线治疗机器或其他放射源进行，可以针对特定的肿瘤部位进行定向照射，降低对健康组织的伤害。放射治疗通常作为肿瘤治疗的一部分，可以单独应用或与手术、化疗等其他治疗方法联合使用，以提高治疗效果。放射治疗分为外照射放疗和内照射放疗两种方式^[43]。外照射治疗利用加速器产生的高能射线，如 X 射线、电子束、质子束等，从外部照射肿瘤靶区。内照射放疗则利用放射性同位素内部照射癌细胞，产生 α 、 β 、 γ 等不同类型射线，以实现治疗效果（图 1-2）^[44, 45]。总体来说，外照射和内照射放疗都是肿瘤治疗的重要方式之一。它们通过不同的辐射机制破坏肿瘤细胞核中的 DNA，导致 DNA 的损伤和断裂，最终使肿瘤细胞以自噬、坏死和凋亡等方式死亡^[46]。

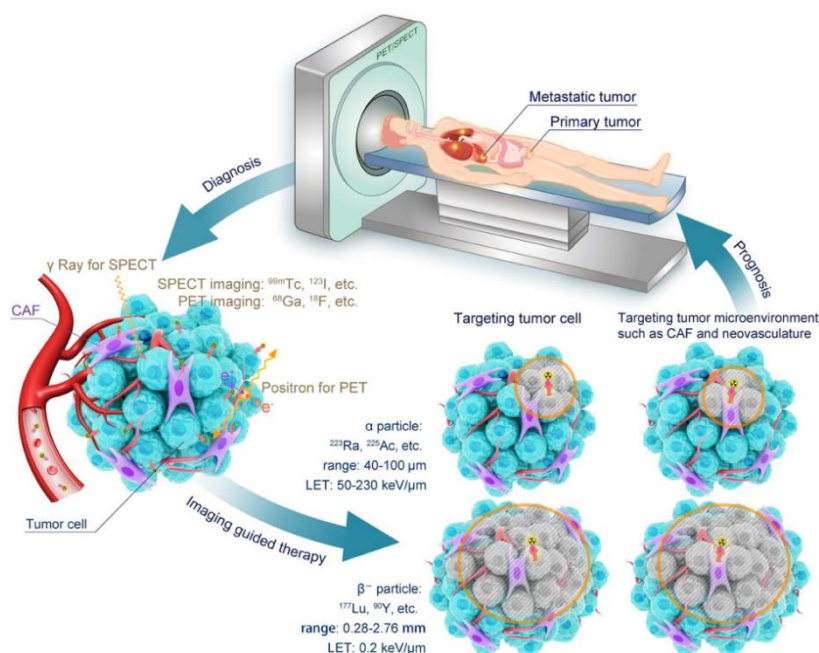


Fig 1-2 Nuclear imaging-guided radionuclide therapy for cancers^[47]

图 1-2 核医学成像引导的放射性核素治疗癌症^[47]

在使用放射性核素进行癌症治疗时，需要满足一定的物理和生物学条件。首先，核素衰变产生的射线类型和能量范围应符合要求，即 β 射线最好低于 1 MeV， α 射线低于 6 MeV， γ 射线尽量少。其次，核素的半衰期一般要求在 1-10 天之间，

以便控制治疗剂量。此外，核素衰变产物应该是稳定核素，对人体生物毒性小。最后，核素的纯度和活度越高越好，有利于提高疗效和减少毒副作用。总体来说，选择合适的放射性核素，结合其物理特性与生物学特性，可以实现肿瘤的精确放射治疗，从而提高疗效并减轻不良反应^[48, 49]。

放射性核素在癌症治疗中被广泛使用。常见 α 衰变型核素有锕-225 (^{225}Ac) 和砹-211 (^{211}At)，其衰变会释放 α 粒子。然而， α 粒子的穿透能力较弱 (28-100 μm)，治疗较大的肿瘤效果有限^[50, 51]。 β 衰变型核素衰变时可以释放 β 粒子，常见的包括碘-131 (^{131}I)、镥-177 (^{177}Lu)、钇-90 (^{90}Y) 等^[52]。体内放射性核素治疗在治疗肿瘤过程中仍然存在一些挑战^[53]。首先，对于一些肿瘤类型，如胰腺癌，它们对放射性同位素治疗的敏感性较低。其次，放射性同位素在体内的分布通常不够特异，影响了其在病灶部位作用效率。最后，体内放射性同位素治疗可能对正常组织造成一定伤害^[54, 55]。

为实现放射性核素在肿瘤部位的靶向输送。目前，已经开发了有许多纳米生物材料用于特异性将放射核素输送至肿瘤部位，以改善治疗效果^[56, 57]。在肿瘤治疗方面，利用生物材料可以将放射性同位素有效聚集于肿瘤组织，同时最大限度降低对正常组织的影响，以减轻治疗毒性（图 1-3）。总的来说，生物材料和纳米技术为放射性核素定向输送提供了新的平台，有望解决当前临床应用中的一些限制^[58]。

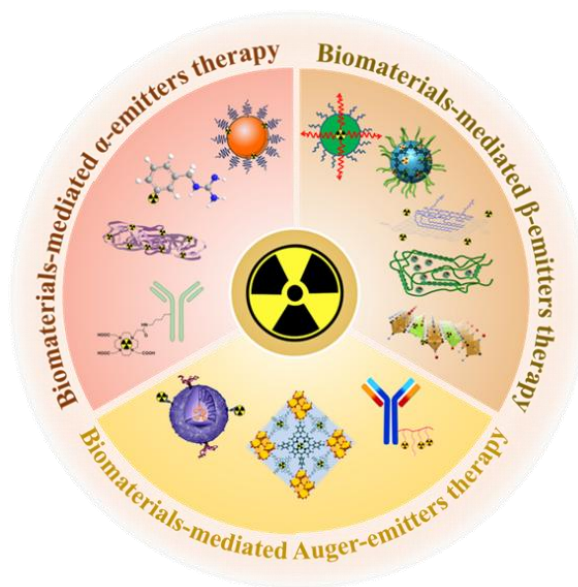


Fig 1-3 Biomaterials-mediated internal radioisotope therapy^[59]

图 1-3 生物材料介导的内放射性同位素治疗^[59]

1.3.5 免疫治疗

肿瘤免疫治疗作为新兴的治疗方式,具有广泛的临床应用前景^[60]。机体的免疫系统具有免疫调节和监视功能,当机体遇到肿瘤细胞侵袭时,免疫系统能够识别肿瘤细胞,并激活特异性免疫应答,从而清除肿瘤细胞^[61-63]。然而,肿瘤细胞能负向调节机体的免疫应答,从而逃避机体免疫监测。肿瘤免疫治疗通过激活和调节抗肿瘤免疫系统,防止肿瘤细胞发生逃逸,增强机体对肿瘤细胞的杀伤能力,从而增强抗肿瘤免疫应答^[64-66]。一般认为肿瘤-免疫循环包括以下几个主要步骤:1.肿瘤细胞释放特异性抗原。2.树突状细胞捕获并处理这些抗原。3.树突状细胞将抗原呈递给T细胞,引起T细胞的激活。4.激活的T细胞迁移到肿瘤部位。5.T细胞浸润入肿瘤组织。6.T细胞识别并杀伤肿瘤细胞。

与传统肿瘤治疗手段相比,肿瘤免疫治疗特异性更强,从而减少对正常组织的伤害。目前,临床上广泛应用的肿瘤免疫治疗方法包括免疫检查点抑制剂治疗、过继性细胞免疫治疗等^[67, 68]。1.免疫检查点抑制剂治疗。免疫系统中,负向调控T淋巴细胞激活的因子称为免疫检查点分子,免疫检查点分子在维持机体免疫稳态过程中具有重要作用^[69-71]。细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)以及程序性细胞死亡受体1(Programmed cell death-ligand 1, PD-1)是最有效的T细胞免疫检查点分子^[72, 73]。通常CD4⁺和CD8⁺T细胞表面会表达CTLA-4分子,CTLA-4与抗原递呈细胞(Antigen-presenting cells, APCs)上的B7配体结合并产生抑制T细胞活化信号。作为免疫检查点抑制剂的CTLA-4单克隆抗体和CTLA-4分子抑制剂可以消除CTLA-4对T细胞活化的抑制作用,提高T细胞应答水平,增强免疫系统的抗肿瘤效应。PD-1在T淋巴细胞激活或扩增期间表达,可以与肿瘤细胞或其他免疫细胞上的PD-L1、巨噬细胞和树突状细胞上的PD-L2结合,抑制细胞内信号传导,降低效应T淋巴细胞活性,诱导T淋巴细胞凋亡,负向调控机体抗肿瘤免疫反应,最终使肿瘤细胞发生免疫逃逸。使用PD-1单克隆抗体,可以阻断PD-1与配体结合,可以恢复机体抗肿瘤免疫效力^[74, 75]。多种免疫检查点抑制剂药物已被批准上市用于临床肿瘤的免疫治疗,包括CTLA-4单克隆抗体Ipilimumab,PD-1单克隆抗体Nivolumab、Pembrolizumab,PD-L1单克隆抗体Atezolizumab、Avelumab等^[76-78]。CTLA-4和PD-1在机体免疫系统中发挥生物学效应的部位和

时间各不相同,两者在功能上相互补充,确保 T 淋巴细胞反应有效保护机体免受肿瘤细胞侵害的同时保持适当水平自我耐受^[79, 80]。

过继性细胞免疫治疗则是通过在癌症患者体内或供体中采集免疫细胞,如 T 细胞或自然杀伤细胞。然后将收集的免疫细胞进行体外改造、激活并扩增这些免疫细胞,使其具有更强的抗肿瘤能力,最后再重新输回患者体内,识别并攻击体内肿瘤细胞^[81, 82]。目前,嵌合型抗原修饰的 T 细胞 (CAR-T)、肿瘤浸润性淋巴细胞 (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TILs) 和 T 细胞受体修饰 (TCR-T) 在抗肿瘤免疫治疗当中具有广阔的应用前景。TILs 和 TCR-T 治疗可以在体内持续发挥作用,但其抗肿瘤效力有限以及较大的不良反应限制了它们在临床中的应用。CAR-T 治疗方法是指使用基因工程的方法把能够识别 TAAs 的特异性位点与患者的 T 淋巴细胞嵌合,使得 T 细胞具有特异性识别肿瘤细胞的能力,最后再将这类 T 细胞输回机体的一种抗肿瘤方法^[83, 84]。CAR-T 细胞同时具有抗原特异性和细胞活化特性,能够特异性杀伤肿瘤细胞,有一定的治疗效果,但是目前临床数据有限,需要更多的临床试验数据的支持。实体肿瘤中缺乏能够被机体免疫细胞识别的 TAAs,较难分离得到有效的供体免疫细胞,因而该方法在临床上多用于浸润性肿瘤的治疗^[85, 86]。过继性细胞免疫治疗的副作用主要表现为细胞因子释放综合征和神经毒性,使用糖皮质激素或者 Tocilizumab 可在一定程度上缓解不良反应;然而,复杂的制备流程和高额的费用是该方法在临床应用上的最主要限制因素。

1.4 放疗对免疫治疗的作用

尽管免疫治疗在治疗恶性肿瘤方面具有很大的吸引力,但在临床实际应用中发现单独的免疫治疗疗效并不理想。此外,由于肿瘤的复杂性,异质性、以及单一疗法的局限性,越来越倾向于采用多种治疗手段联合治疗恶性肿瘤的策略,其中放射治疗和免疫治疗相结合,有着独特的先天优势。具体来说,放射治疗可以导致肿瘤细胞免疫原性死亡,继而释放肿瘤抗原,从而激活体内的抗肿瘤免疫反应^[87, 88]。此外,肿瘤细胞经放射杀伤后会释放损伤相关分子模式 (Damage associated molecular patterns, DAMPs)、高迁移率族蛋白 B1 (High mobility group box 1 protein, HMGB1) 和腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 等因子,这些因子可以激

活 DCs^[89]。随后 DCs 向 naive T 细胞传递肿瘤抗原,促进 naive T 细胞转化为 CTLs,从而识别并对肿瘤细胞进行杀伤(图 1-4)。此外,受到辐射的癌细胞,其表面的主要组织相容性复合体-1 (Major histocompatibility complex-I, MHC-I), 细胞间黏附分子-1 (Intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 表达增加,从而增强 CTLs 的肿瘤杀伤能力^[90, 91]。此外,放射治疗还可以导致相关细胞因子的释放从而在肿瘤病灶部位招募 T 细胞。与此同时,有研究表明,放射治疗可以激活 DCs、减少调节 T 细胞 (Regulatory T cells, Treg) 数量。值得庆幸的是,免疫治疗 (α PD-L1) 联合放射治疗已经在临床治疗非小细胞肺癌上取得了显著的成果,患者的生存期有效的被延长。

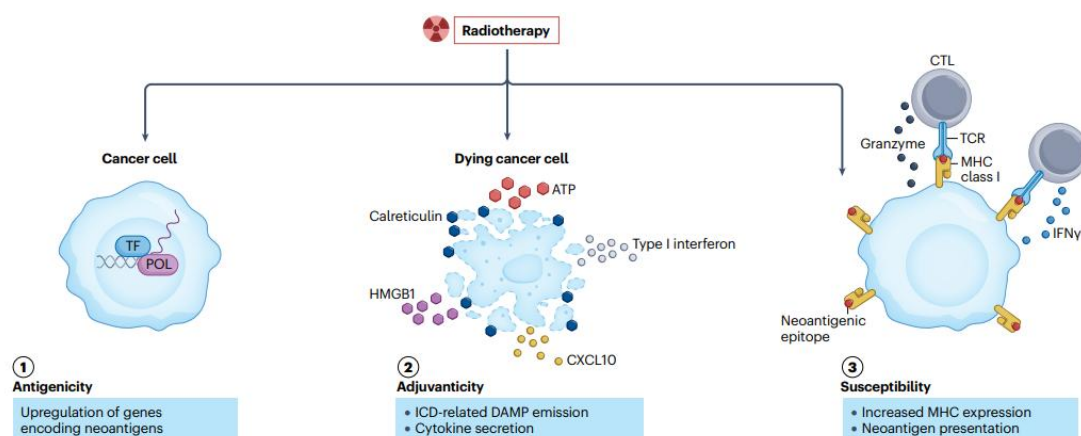


Fig 1-4 Immunostimulatory effects of radiotherapy^[92]

图 1-4 放疗的免疫刺激效应^[92]

总的来说,采取放射治疗和免疫治疗的联合手段,在一定程度上弥补了各自的局限性,从而实现了更有效地肿瘤治疗^[93-95]。

1.5 细菌外膜囊泡

细菌外膜囊泡 (OMV) 是由革兰氏阴性菌分泌的纳米囊泡^[96]。OMV 来源于细菌的外膜,其粒径大小为 20-250 nm。OMV 具有多种细菌来源成分,包括细菌特异性抗原以及各种病原体相关分子模式 (PAMPs),如脂多糖、脂蛋白、肽聚糖、DNA、RNA 等(图 1-5)^[97, 98]。

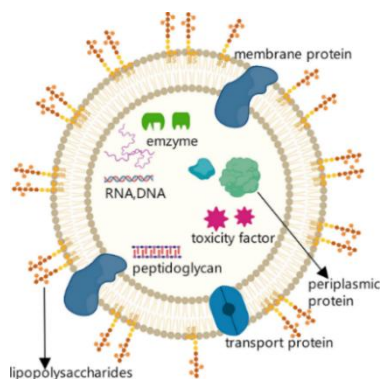


Fig 1-5 Structure and components of OMVs secreted by Gram-negative bacteria^[99]

图 1-5 革兰阴性细菌分泌的 OMV 的结构和组分^[99]

1967 年, Chatterjee 和 Das 在研究霍乱弧菌时偶然发现 OMV 的存在。随后, 越来越多的革兰氏阴性菌也被证实可以分泌 OMV, 并且在某些革兰氏阳性细菌中也观察到了类似囊泡的释放现象。在过去的几年里, OMV 已成为不同生物医学应用的免疫治疗剂。OMV 通常比其亲本细菌小得多, 而且由于其不可复制的性质, OMV 比亲本细菌具有更高的生物安全性。由于 OMV 含有亲本细菌诸多免疫原性成分, 因此它们可以调节和激活宿主的免疫系统。

与亲本细菌相似, OMV 显示出偏好在肿瘤组织中积累, 因此, 它们有希望成为肿瘤靶向递送的载体。此外, 最近的一项研究表明, 静脉注射 OMV 可以促进免疫细胞分泌干扰素- γ , 从而激活强大的抗肿瘤反应。鉴于 OMV 优异的特性, OMV 有望开发成为一种放射性核素标记的肿瘤靶向纳米载体。到目前为止, OMV 和 RIT 的研究尚未被报道, 两者之间的相互机制尚不清楚。本研究论文在基于细菌外膜囊泡的基础上, 探究了内放射核素治疗联合细菌外膜囊泡在肿瘤治疗方面的潜力。

1.6 课题设计与研究内容

在这项研究中, 我们设计了基于减毒鼠伤寒沙门氏菌外膜囊泡 (VNP20009-OMV) 的递送平台, 实现了放射性碘的高效稳定标记和增强肿瘤放射免疫治疗 (图 1-6)。具体地说, 我们设计了表达富酪蛋白的减毒鼠伤寒沙门氏菌外膜囊泡 (STATH-OMV-PEG), 它富含酪氨酸基团, 为 $^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$ 提供了丰富的标记位点, 从而实现了 $^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$ 高效标记。 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 具有直接诱导肿瘤细胞死亡和触发 ICD 的双重作用, 从而促进后续的抗肿瘤免疫应答。

此外, OMV 还可作为免疫佐剂诱导 DCs 成熟, 产生抗肿瘤细胞因子, 增强 RIT 介导的抗肿瘤免疫应答。此外, ^{131}I -STATH-OMV-PEG 介导的 RIT 可以触发免疫记忆效应, 防止肿瘤的再侵袭。更重要的是, 在小鼠原位结肠癌模型上验证了 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 良好的治疗效果。综上所述, 我们建立了基于工程化细菌外膜囊泡从而实现 $^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$ 高效标记和增强放射免疫治疗的递送平台, 并评估了其在肿瘤放射免疫治疗中的疗效, 为肿瘤放射免疫治疗开辟了全新的领域。

基于以上内容, 本课题的实验思路如下: (1) 在本文中首先通过生物工程手段构建表达富酪蛋白的工程化细菌外膜囊泡, 并通过一系列手段对其进行表征。(2) 其次利用 Idogen 邻位取代法, 实现了 STATH-OMV-PEG 的 $^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$ 标记, 获得了 $^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$ -STATH-OMV-PEG, 随后测定其标记率以及标记稳定性。(3) 在细胞层面上验证了 OMV 的生物安全性以及评估 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 对肿瘤细胞的杀伤作用。(4) 将 ^{125}I 标记的细菌外膜囊泡 (^{125}I -STATH-OMV-PEG) 对荷瘤小鼠进行静脉注射, 依靠 ^{125}I 优异的成像能力, 通过 SPECT/CT, 验证 OMV 的肿瘤靶向能力。(5) 建立 CT26 皮下肿瘤模型, 评估静脉注射 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 后的治疗疗效。(6) 对荷瘤小鼠静脉注射 ^{131}I -STATH-OMV-PEG, 3 天后处死小鼠, 取出肿瘤和淋巴结, 将淋巴结制成单细胞悬液并进行染色, 最后通过流式细胞仪分析淋巴结中 DCs 成熟情况。此外, 通过免疫荧光染色探究肿瘤组织中 ICD 相关指标的表达情况。(7) 通过 ELISA 试剂盒检测血清中抗肿瘤相关因子 $\text{TNF-}\alpha$ 及 $\text{IFN-}\gamma$ 水平。(8) 建立免疫记忆模型, 评估 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 对抑制肿瘤复发的疗效。(9) 建立原位结肠癌模型, 评估 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 对原位结肠癌的疗效。

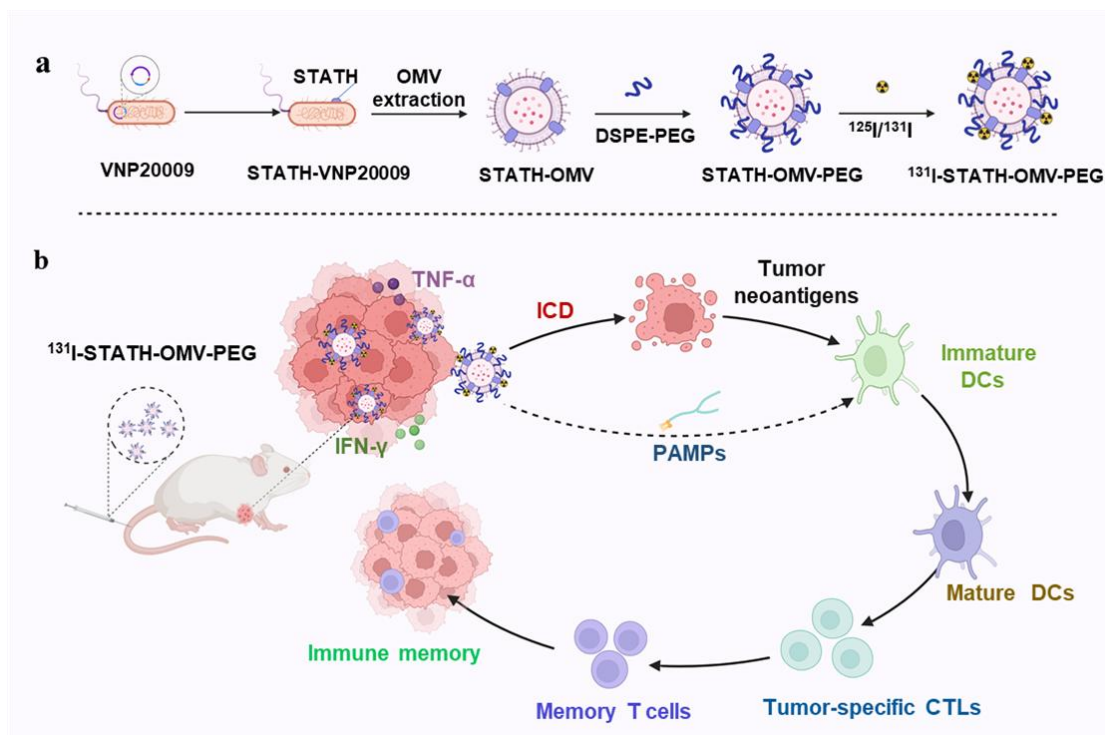


Fig 1-6 Schematic illustration of engineered bacterial outer membrane vesicles (STATH-OMV-PEG) for ^{125}I / ^{131}I labeling (a) and enhanced tumor radioimmunotherapy (b)

图 1-6 用于 ^{125}I / ^{131}I 标记 (a) 和增强肿瘤放射免疫治疗 (b) 的工程化细菌外膜囊泡 (STATH-OMV-PEG) 示意图

第二章 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的制备及其细胞水平探究

2.1 引言

近年来，癌症已成为对人类健康构成严重威胁的首要，对人类健康造成巨大危害。RIT 是临床肿瘤治疗的重要手段，为了实现放射性核素在肿瘤部位的靶向输送，目前已经研发了各种纳米载体，包括无机和有机纳米材料，实现放射性核素在肿瘤病灶部位精准治疗。

然而，如果纳米载体的靶向性差，会降低内放射治疗效率，从而使治疗效果不理想。其次，纳米载体常存在着核素脱靶现象，脱靶的核素会分布到健康组织，造成不必要的辐射损伤。此外传统纳米载体的放射性标记效率低下。因此可采用以下策略从而解决上述难题：（1）选择具有优异肿瘤靶向性的纳米载体以实现放射性核素在肿瘤部位的有效递送；（2）将纳米载体进行工程化修饰以提高纳米载体的放射标记效率。OMV 由于其具有较强的肿瘤靶向性和免疫佐剂的潜力，目前在癌症治疗中受到广泛关注。因此，OMV 有望作为放射性同位素 ^{131}I 实现肿瘤部位靶向递送的良好载体。然而传统 OMV 的放射性碘标记位点少，这使得标记效率大幅度降低。在此基础上，我们通过工程化策略构建了表达富酪蛋白的细菌外膜囊泡，富酪蛋白含有丰富的酪氨酸，这为 ^{131}I 提供了大量的标记位点，从而使得纳米载体的标记效率显著提高。本章主要进行 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的制备及其结构表征，以及 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的放射标记、标记稳定性检测。并在体外细胞水平探究 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的生物学效应。

2.2 实验材料与仪器

2.2.1 实验材料

减毒鼠伤寒沙门氏菌（VNP20009）从 ATCC 获得。Cy5.5-NHS 购自山东星光翡翠生物科技有限公司。酵母提取物，氯化钠，琼脂粉，碳酸钙购自上海国药试剂。氢氧化钠购买于上海阿拉丁公司。无水乙醇购自于上海国药试剂。Iodogen 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。 Na^{125}I 和 Na^{131}I 溶液购自上海 GMS 药业有限公司。三氯甲烷购自上海国药试剂。CT26 细胞以及 HUVECs 细胞购于生化与细胞所。细胞培养基（Hyclone）与胎牛血清（Gibco）购买于苏州亿邦生物科技有限公司。

青霉素链霉素购于苏州新赛美生物科技有限公司。

2.2.2 实验仪器

γ 计数器来源于德国 Berthold 公司。活度计来源于北京恒益德科技公司。双人垂直流超净工作台(ESCO)、粒径仪及 zeta 电位分析仪(Zetasizer Nano ZS90)、透射电子显微镜(Tecnai G2 spirit BioTwin)、纯水系统(Direct Q5)、全功能酶标仪(Synergy NEO)等仪器来自于苏州大学仪器共享平台。

2.3 实验方法

2.3.1 构建表达富酪蛋白的减毒沙门氏菌

将编码 AIDA-I 自身转运蛋白结构域和 STATH 的 DNA 片段插入到可持续表达的 pET28a 载体中,然后将表达载体电转染到减毒的 VNP20009 中。STATH-VNP20009 在含有卡那霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 培养基中在 37°C 和 200 rpm 下培养。

2.3.2 超速离心法提取细菌外膜囊泡

上述工程化 VNP20009 在 37°C、200 rpm 的 LB 液体培养基中培养。当细菌悬浮液的 OD600 达到 0.8 时,向培养基中加入 0.5 mM 异丙基- β -d-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)并在 16°C 下继续培养 14 h,诱导 AIDA-I-STATH 蛋白表达。随后将细菌溶液以 4000 $\times g$ 离心 10 min 以除去细菌,然后通过 0.45 μm 滤膜过滤细菌碎片。接下来使用 100 kDa 超滤膜对滤液进行浓缩。将浓缩液在 4°C, 150000 $\times g$ 条件下离心 2 h,获得 STATH-OMV。随后将这些 OMV 重悬于 500 μL 无菌 PBS 中,并在-80°C 下储存,以进行进一步实验。

2.3.3 WB 检测富酪蛋白表达

通过 BCA 蛋白质试剂盒对所提取的 OMV 进行蛋白定量,随后通过蛋白质印迹法(Western Blot)检测 OMV 中 STATH 的表达。

2.3.4 STATH-OMV 的 PEG 修饰

为了制备 STATH-OMV-PEG,将 2 mg DSPE-PEG2000 与 1 mL STATH-OMV (200 μg)混合。将该混合物超声处理 30 min,然后搅拌过夜。随后通过使用 100

kDa 超滤膜离心除去过量的 DSPE-PEG2000，得到 STATH-OMV-PEG。

2.3.5 STATH-OMV-PEG 形貌表征

将制备好的 STATH-OMV-PEG 原液稀释到适当倍数，随后滴加到铜网上，37℃下自然晾干，最后使用透射电子显微镜（TEM）对 STATH-OMV-PEG 的形态结构进行观察。

2.3.6 STATH-OMV-PEG 粒径及 ζ 电位

将 STATH-OMV-PEG 稀释液转移至样品池中，通过动态光散射粒径仪（DLS）和 Zeta 电位仪对 STATH-OMV-PEG 的粒径和电位分别进行测量。

2.3.7 STATH-OMV-PEG 的 ^{131}I 标记率及标记稳定性

采用 Iodogen 氧化法对 STATH-OMV-PEG 进行放射性 ^{131}I 标记，首先将 20 μL STATH-OMV-PEG 溶液（1 mg/mL）加入含有 1mg Iodogen 的 Eppendorf 管中，然后与 0.3 mCi 的 Na^{131}I 混合。振荡 20 min 后，将反应液通过超滤管（100 kDa）离心从而去除未被标记的 ^{131}I 。随后使用伽马计数器（PerkinElmer）测量放射性标记率。为了研究放射性标记稳定性，将 ^{131}I -STATH-OMV-PEG（20 μg ，100 μCi ）分别用 PBS 和 10%FBS 重新悬浮。在不同的时间点（1、2、6、12 和 24h）使用超滤管（100 kDa）离心（4000 r/min）清洗。随后使用 γ 计数器检测超滤管的总放射性、超滤管下层脱落 ^{131}I 的放射性与超滤管上层放射性，通过比值并计算 STATH-OMV-PEG 的标记稳定性。

2.3.8 STATH-OMV-PEG 细胞毒性实验

将人脐静脉上皮细胞（HUVECs）和结肠癌细胞（CT26）以每孔约 8000 个细胞数传代到 96 孔板中，并在 37℃，5%二氧化碳条件下培养。待细胞完全贴壁后，将含有不同浓度 STATH-OMV-PEG（0、2.5、5、10、20 和 40 $\mu\text{g/mL}$ ）的培养基加到 96 孔板中并与细胞孵育 24 h。待孵育完成，用 PBS 清洗 96 孔板中残留的培养基，每孔加入 10 μL CCK-8 溶液（每组 3 个平行样），37℃条件下孵育 2 h，最后用酶标仪检测 450nm 处的吸收值。细胞存活率为： $100\% \times (\text{处理组吸收值} - \text{空白组吸收值}) / (\text{对照组吸收值} - \text{空白组吸收值})$ 。

2.3.9 细胞摄取实验

将 CT26 结肠癌细胞以每孔 8000 数目加入 24 孔板中，等细胞完全贴壁生长后，将 CT26 结肠癌细胞与 Cy5.5 偶联的 STATH-OMV-PEG (20 $\mu\text{g/mL}$) 分别孵育 0、4、12 和 24 h。随后收集细胞并通过流式细胞仪进行分析。此外，将 CT26 结肠癌细胞以每皿 5×10^4 个细胞数传代到共聚焦培养皿中，等细胞完全贴壁后，将 CT26 结肠癌细胞与 Cy5.5 偶联的 STATH-OMV-PEG (20 $\mu\text{g/mL}$) 孵育 24 h。然后用 PBS 洗涤细胞，用 4% 多聚甲醛固定，并用 DAPI 染色 10 min。最后，通过共聚焦显微镜观察细胞摄取情况。

2.3.10 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 细胞杀伤实验

对于 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的细胞杀伤实验，采用 CCK-8 法进行评估：将 CT26 结肠癌细胞以每孔 8000 的细胞数目加到 96 孔板中，待细胞完全贴壁后，将不同放射剂量 (0、6.25、12.5、25、50 和 100 μCi) 的 ^{131}I -STATH-OMV-PEG (20 $\mu\text{g/mL}$) 加入到 96 孔板中孵育 24 h，接下来用 PBS 清洗残留的培养基，随后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液 (每组 3 个平行样)，37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 2 h，最后用酶标仪检测 450 nm 处的吸收值。细胞存活率为： $100\% \times (\text{处理组吸收值} - \text{空白组吸收值}) / (\text{对照组吸收值} - \text{空白组吸收值})$ 。

2.3.11 γ -H2AX 核损伤实验

为了评估 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 对 CT26 细胞的 DNA 损伤程度，将 CT26 结肠癌细胞以每皿 5×10^4 个细胞数传代到共聚焦培养皿中，待 CT26 结肠癌细胞完全贴壁后，将放射剂量为 20 μCi 的 ^{131}I -STATH-OMV-PEG (20 $\mu\text{g/mL}$) 加入共聚焦皿孵育 12 h，随后对细胞进行 γ -H2AX 和 DAPI 染色。详细染色步骤：将原培养基去除并用 PBS 清洗三遍，通过 4% 多聚甲醛将细胞固定 10 min，随后用 PBS 清洗 3 遍，随后用破膜封闭液 (5% FBS/0.3% Triton-100/PBS) 处理细胞。接下来将共聚焦培养皿中加入 γ -H2AX 抗体稀释液 (1: 200) 并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第二天用 PBS 润洗 3 次，随后在每个共聚焦培养皿中加入二抗稀释液 (1: 200)，在室温条件下孵育 2 h，孵育完毕后用 PBS 清洗，随后将细胞用 DAPI 染料进行染色，染色处理 15 min 后用 PBS 清洗多次以去除多余的染料。最后使用 Olympus 共聚焦显微镜观察 CT26 细胞的 DNA 损伤程度并进行评估。

2.4 实验结果与讨论

2.4.1 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的制备及表征

OMV 有着独特的肿瘤靶向性，以及较强的生物安全性，目前广泛的用于肿瘤的治疗研究。此外 OMV 含有一系列来源于亲本细菌的成分，包括细菌特异性抗原、蛋白质以及 PAMPs。OMV 可以作为免疫佐剂有效地激活宿主的免疫系统，以及促进机体产生抗肿瘤细胞因子。基于以上优点，OMV 可被开发成一种优异的放射性标记纳米载体，将 OMV 与 RIT 相结合，有望突破单一治疗的局限性。OMV 膜蛋白当中的酪氨酸可以实现放射性碘 ($^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$) 标记。为了提高放射标记效率，我们通过生物工程技术将富酪蛋白 (Statherin, STATH) 引入 OMV 表面。STATH 含有丰富的酪氨酸，可以为放射性碘提供更多的标记位点，从而提高标记效率 (图 2-1)。



Fig 2-1 Schematic diagram of the bacterial surface display technique

图 2-1 细菌表面展示技术

具体而言，将编码 AIDA-I 自身转运蛋白结构域和富酪蛋白的 DNA 片段插入到可持续表达的 pET28a 载体中，然后将表达载体电转染到 VNP20009 中。STATH-VNP20009 在含有卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养基中在 37°C 和 200 rpm 下培养。随后，通过超速离心法从 STATH-VNP20009 的培养上清液中收集表 STATH-OMV (图 2-2)。接下来将提取的 STATH-OMV 通过蛋白免疫印迹 (Western Blot) 检测 STATH 在细菌外膜囊泡当中的表达情况。

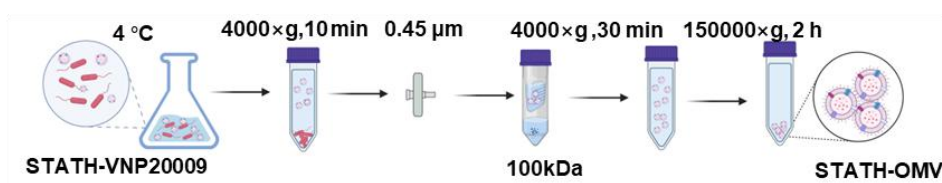


Fig 2-2 Bacterial outer membrane vesicle extraction

图 2-2 细菌外膜囊泡提取

蛋白免疫印迹结果表明，STATH-OMV 成功表达富酪蛋白 (图 2-3a)。为了提高 STATH-OMV 的生物相容性，使用 DSPE-PEG 对 STATH-OMV 进行修饰。

透射电镜结果显示, STATH-OMV-PEG 表现出规则的球形结构 (图 2-3b), 此外 DLS 分析显示, STATH-OMV-PEG 的平均直径约为 30 nm (图 2-3c)。

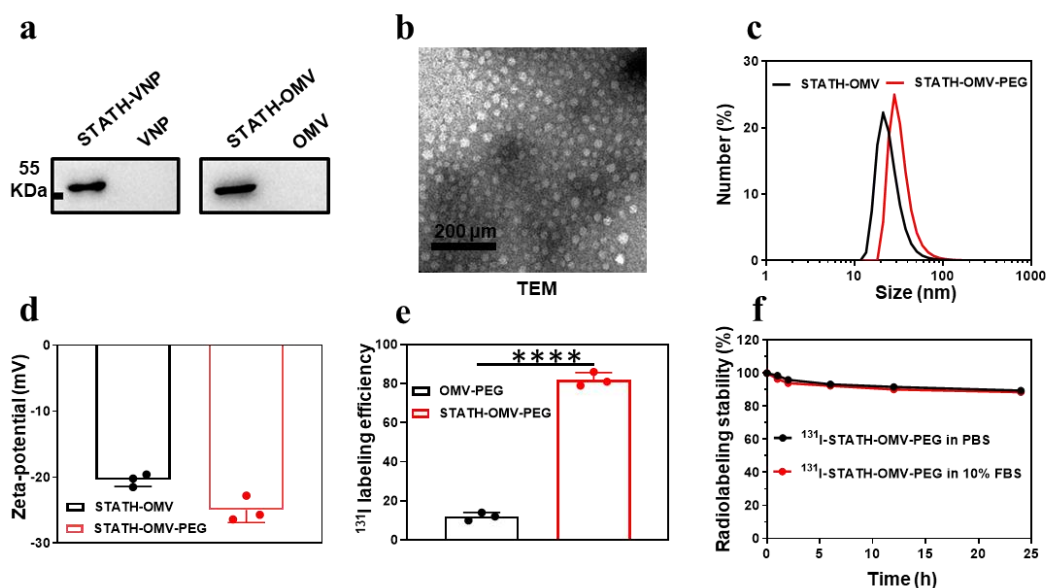


Fig 2-3 (a) The expression of AIDA-I-STATH in STATH-VNP20009 and STATH-OMV was detected by western blot. (b) TEM image of STATH-OMV-PEG. (c) Dynamic light scattering of STATH-OMV-PEG nanoparticles. (d) Zeta potential of STATH-OMV and STATH-OMV-PEG nanoparticles. (e) ^{131}I labeling rate of OMV-PEG and STATH-OMV-PEG nanoparticles. (f) Radiolabeling stability of ^{131}I -STATH-OMV-PEG in PBS and FBS solution. Error bars represent mean $\pm$ SD ($n = 3$). P values were calculated via one-way ANOVA test (**** $P < 0.0001$)

图 2-3 (a) Western blot 检测 STATH-VNP20009 和 STATH-OMV 中 AIDA-I-STATH 的表达。(b) STATH-OMV-PEG 的 TEM 图像。(c) STATH-OMV-PEG 的动态光散射。(d) STATH-OMV 和 STATH-OMV-PEG 的 Zeta 电位。(e) OMV-PEG 和 STATH-OMV-PEG 的 ^{131}I 标记率。(f) ^{131}I -STATH-OMV-PEG 在 PBS 和 FBS 溶液中的放射标记稳定性。误差条代表均值 $\pm$ 标准偏差 ($n = 3$)。P 值通过单因素方差分析 (**** $P < 0.0001$)

经过 PEG 修饰后, STATH-OMV 的 ζ 电位从-20.4 mV 降至-24.5 mV, 证实 PEG 在 STATH-OMV 上成功修饰 (图 2-3d)。放射性核素 ^{131}I 是临床治疗甲状腺癌常用的放射性核素, 在医学领域有着广泛的应用。 ^{131}I 发射的 β 、 γ 射线可诱导肿瘤细胞 DNA 损伤, 引起明显的细胞毒性作用。STATH-OMV-PEG 含有丰富的酪氨酸, 可以为放射性核素 ^{131}I 提供大量的标记位点, 其放射性标记率 (82%) 远高于没有表达 STATH 的 OMV-PEG (12%) (图 2-3e)。接下来, 我们研究了 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 在 PBS 和 10%FBS 溶液中的放射性标记稳定性, 如图 2-3f 所示, ^{131}I -STATH-OMV-PEG 表现出优异的标记稳定性。

2.4.2 STATH-OMV-PEG 的细胞毒性及摄取

接下来，我们评估了 STATH-OMV-PEG 的细胞毒性。将 HUVECs 和 CT26 细胞与不同浓度的 STATH-OMV-PEG 孵育 24 h。图 2-4 所示，即使高浓度下的 STATH-OMV-PEG ($40 \mu\text{g/mL}$)，HUVECs 和 CT26 的细胞存活率也未受到显著影响，说明 STATH-OMV-PEG 对正常细胞的伤害极低，具有良好的生物相容性。

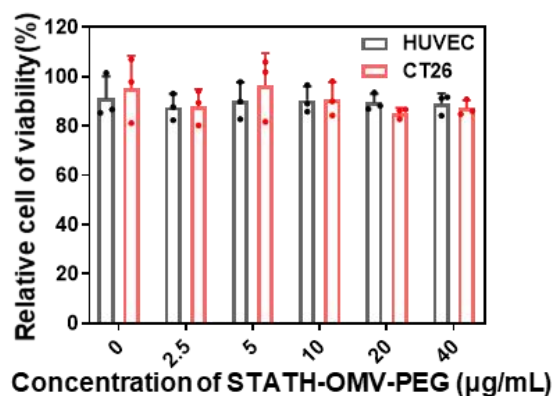


Fig 2-4 Relative cell viability of HUVEC human umbilical vein endothelial and CT26 colon cancer cells after incubation with different concentrations of STATH-OMV-PEG for 24 h

图 2-4 人脐静脉内皮细胞 HUVEC 和 CT26 结肠癌细胞与不同浓度 STATH-OMV-PEG 孵育 24 小时后的相对细胞活力

接下来，进一步探索 CT26 细胞对 STATH-OMV-PEG 的细胞摄取。用 Cy5.5 标记的 STATH-OMV-PEG ($20 \mu\text{g/mL}$) 与 CT26 细胞孵育 4、12 和 24 h。随后，收集细胞并通过流式细胞术分析 Cy5.5-STATH-OMV-PEG 被细胞摄取情况。如图 2-5a, 2-5b 所示，CT26 结肠癌细胞当中的荧光强度随着时间的推移而增强，说明 CT26 细胞可以持续摄取 STATH-OMV-PEG。

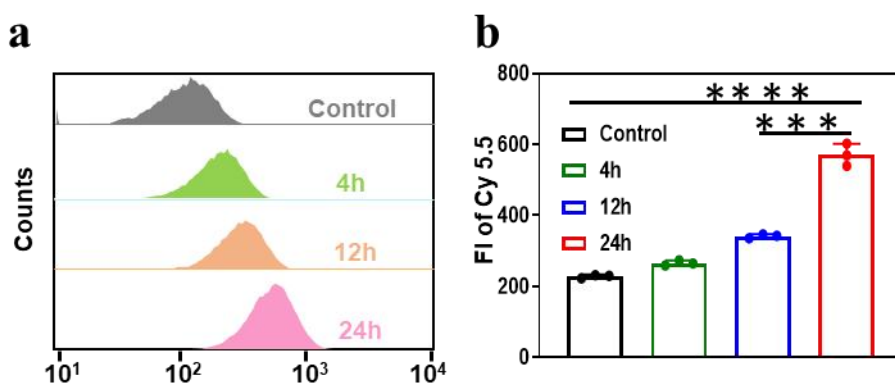


Fig 2-5 Evaluation of CT26 cells treated with Cy5.5-STATH-OMV-PEG (concentration: $20 \mu\text{g/mL}$) using flow cytometry (a) and the Cy5.5 fluorescence intensity of CT26 colon cancer cells at various time points (b)

图 2-5 (a) 用流式细胞术评估经 Cy5.5-STATH-OMV-PEG 处理的 CT26 细胞 (浓度: $20 \mu\text{g/mL}$) 和孵育不同时间点后 CT26 细胞中的 Cy5.5 荧光强度 (b)

同时，将 CT26 细胞加入共聚焦培养皿中，待细胞完全贴壁之后，向共聚焦培养皿分别加入无菌 PBS 和 Cy5.5-STATH-OMV-PEG 共孵育 24 h，随后用 PBS 清洗，用 4%多聚甲醛对细胞固定 10 min，随后用 DAPI 染料染色 10 min，最后通过 Olympus 共聚焦显微镜观察 CT26 细胞摄取 Cy5.5-STATH-OMV-PEG 的情况。从图 2-6 可以看到，共孵育 24 h 后，蓝色的细胞核上有红色材料覆盖，说明 Cy5.5-STATH-OMV-PEG 在体外可以被 CT26 细胞有效摄取（蓝色：DAPI，红色：Cy5.5）。

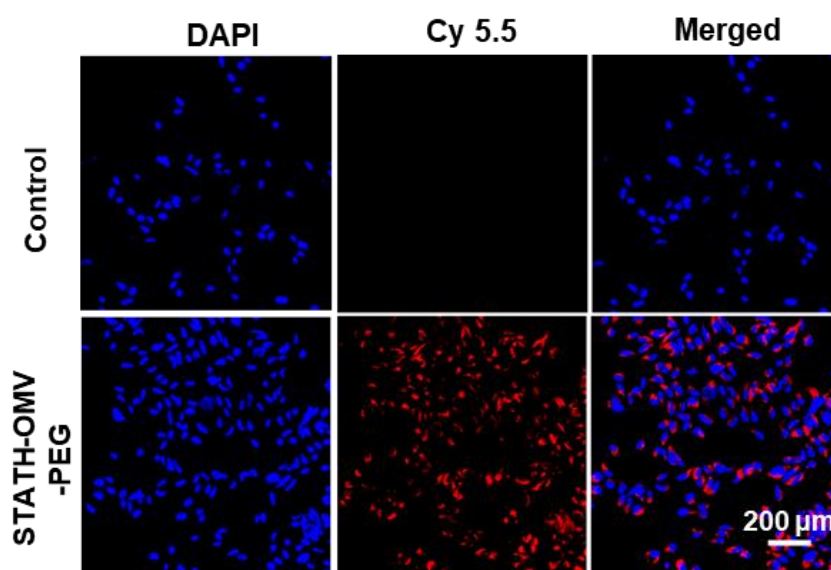


Fig 2-6 Confocal microscopic visualization of CT26 cells after 24 h of incubation with Cy5.5-STATH-OMV-PEG at a concentration of 20 $\mu\text{g/mL}$ of OMV

图 2-6 Cy5.5-STATH-OMV-PEG（浓度：20 $\mu\text{g/mL}$ ）与 CT26 细胞孵育 24 h 共聚焦成像

2.4.3 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的细胞杀伤及 DNA 断裂检测

随后通过 CCK-8 评估了 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 对肿瘤细胞的杀伤性，如图 2-7 所示。 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 可以对 CT26 细胞产生一定的杀伤作用，且杀伤效果随着放射剂量的增加而增强。

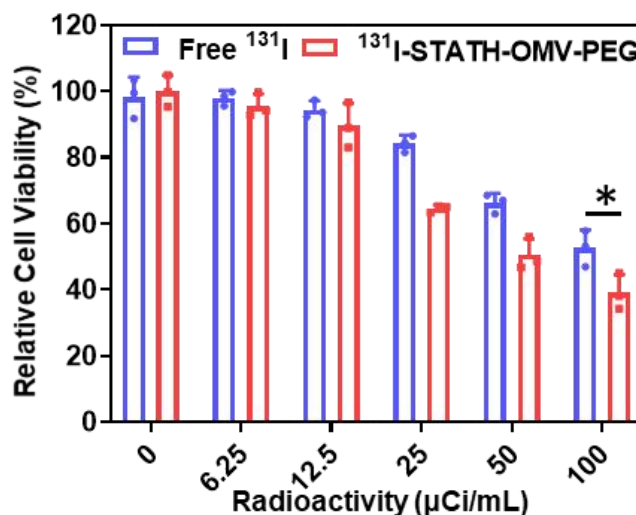


Fig 2-7 Assessment of the relative survival rate of CT26 cells following a 24-hour exposure to varying concentrations of free ¹³¹I and ¹³¹I-STATH-OMV-PEG
图 2-7 CT26 细胞与不同浓度的游离 ¹³¹I 和 ¹³¹I-STATH-OMV-PEG 孵育 24 h 后的细胞相对存活率

此外,我们还评估了 ¹³¹I-STATH-OMV-PEG 处理后 CT26 的 DNA 损伤情况。如图 2-8a 的 γ -H2AX 染色显示, ¹³¹I-STATH-OMV-PEG 处理的 CT26 细胞表现出显著的绿色荧光, 其表明 DNA 损伤。与游离 ¹³¹I 处理组相比, ¹³¹I-STATH-OMV-PEG 处理组的荧光强度更高。这种更强的荧光强度可归因于 ¹³¹I-STATH-OMV-PEG 在 CT26 细胞中的摄取和保留, 导致 DNA 损伤增强 (图 2-8b)。

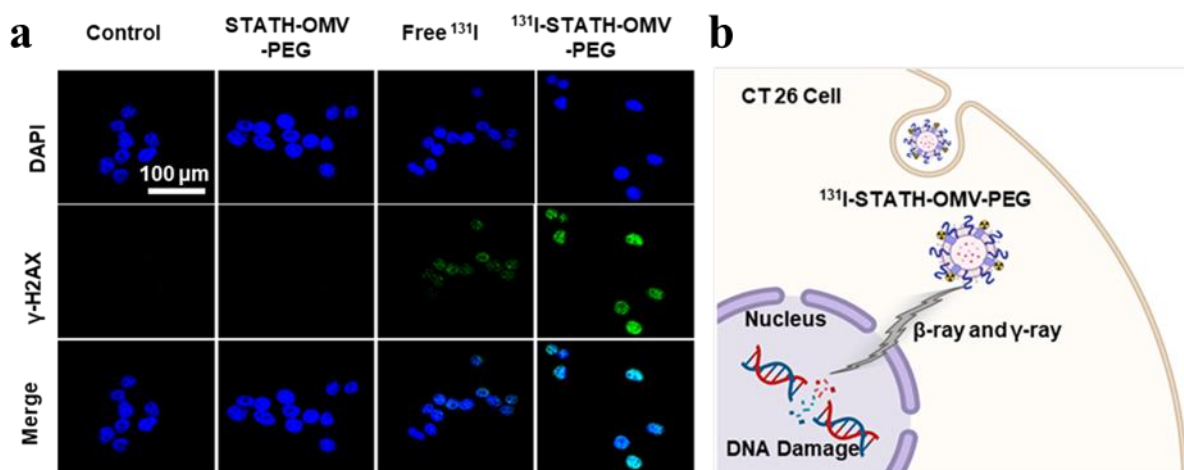


Fig 2-8 (a) Confocal microscopy images showcasing the response of CT26 cells 24 hours post various treatment protocols (blue: DAPI staining for nuclei; green: γ -H2AX indicating DNA damage). Illustrative diagram depicting the DNA damage in CT26 cells induced by ¹³¹I-STATH-OMV-PEG (b)

图 2-8 (a) CT26 细胞与各种处理方案孵育后 24 h 的共聚焦显微镜图像 (蓝色: 细胞核的

DAPI 染色；绿色： γ -H2AX 表示 DNA 损伤）。 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 诱导的 CT26 细胞中的 DNA 损伤的示意图（b）

2.5 本章小结

本章完成了 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的制备和表征并在细胞水平上评估其肿瘤杀伤能力。首先，通过生物工程手段成功构建了 STATH-OMV-PEG，在透射电镜下，可观察到大小均匀的球形。通过粒度分析仪，对 STATH-OMV-PEG 的粒径进行了统计分析，平均尺寸为 30 nm。根据 STATH-OMV-PEG 富含酪氨酸的特性，得到标记稳定的 ^{131}I -STATH-OMV-PEG。通过细胞杀伤实验验证 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 可对 CT26 细胞造成有效的杀伤，且肿瘤细胞的杀伤效果随着放射剂量的增加而增强。此外 γ -H2AX 免疫荧光显示， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 可造成 CT26 细胞显著的 DNA 损伤。综上所述， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 具有良好的体外杀伤肿瘤细胞效果，可作为肿瘤放射免疫治疗研究较为理想的药物。

第三章 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 皮下瘤抑制作用

3.1 引言

^{131}I -STATH-OMV-PEG 能够对结肠癌细胞造成 DNA 损伤从而进行高效杀伤, 同时 STATH-OMV-PEG 具备免疫刺激作用从而增强体内抗肿瘤效果, 因此 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 可用作放射免疫治疗。SPECT 是一种利用单光子发射进行 γ 成像的影像学仪器, 可对含 γ 射线的放射治疗过程实现实时监测, 本章节首先通过 SPECT 成像评估了 STATH-OMV-PEG 在体内的肿瘤靶向能力。随后以 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 为放射免疫治疗剂、以 Balb/c 小鼠为活体实验对象, 对放射性核素标记的工程化细菌外膜囊泡的皮下瘤放射治疗效果进行评估。

3.2 实验材料与仪器

3.2.1 实验材料

PBS (武汉普诺赛公司), 小鼠脱毛膏 (英国利洁时公司), 4%多聚甲醛溶液 (深圳瑞沃德公司)。Balb/c 雌性小鼠 (6~8 周龄), 购自 Viton Lever 实验动物公司。CT26 单侧皮下瘤模型建立: 将 50 μL 含有 2×10^6 个 CT26 细胞的悬浮液接种到小鼠的腋窝皮下。当肿瘤体积大小约 75 mm^3 时进行动物实验。当肿瘤体积大小达到 1000 mm^3 时, 默认荷瘤小鼠死亡, 此时对小鼠实施安乐死。动物实验符合实验动物中心批准的方案。

3.2.2 实验仪器

SPECT-CT (荷兰 MILabs 公司), 放射活度计 (北京恒益德科技公司), 游标卡尺 (宁波得力公司), 分析天平 (上海阿拉丁芯硅谷)。

3.3 实验方法

3.3.1 SPECT/CT 成像

将放射性活度为 200 μCi 的 ^{125}I -STATH-OMV-PEG (^{125}I : 200 μCi ; STATH-OMV-PEG : 20 μg), 通过静脉给药的方式注射到 CT26 荷瘤小鼠体内, 于注射后第 1、6、18、36、50 h 进行 SPECT-CT 成像 (所有图像经 U-SPECT+/CT 显像系统-MILABS 处理)。

3.3.2 生物分布

将放射性活度为 20 μCi 的 ^{125}I -STATH-OMV-PEG (^{125}I : 20 μCi ; STATH-OMV-PEG : 20 μg)，通过静脉给药的方式注射到 CT26 荷瘤小鼠体内，在注射后的第 24 h 处死小鼠，收集小鼠的心，肝，脾，肺，肾和肿瘤组织，使用放射活度计检测各个器官和肿瘤组织的放射活度。

3.3.3 体内放射免疫治疗

在进行体内放射治疗之前，首先构建 CT26 单侧瘤皮下模型，当肿瘤体积大小约 75 mm^3 ，将荷瘤小鼠随机分为 4 组：G1: PBS (*i.v.*)、G2: Free ^{131}I (200 μCi ; *i.v.*)、G3: STATH-OMV-PEG (20 μg ; *i.v.*)、G4: ^{131}I -STATH-OMV-PEG (20 μg , 200 μCi ; *i.v.*) ($n=5$)，肿瘤的体积大小每隔一天进行测量直至小鼠死亡或者当肿瘤体积生长到 1000 mm^3 时。在治疗的第 14 天，在各个治疗组中随机选取小鼠并进行安乐死，收集肿瘤组织并进行 TUNEL (原位末端转移酶标记技术) 和 H&E (苏木精-伊红) 染色处理，最后通过荧光显微镜观察肿瘤组织的损伤情况。

3.3.4 体内生物安全性评价

在体内放射治疗过程中，同时对小鼠体重进行监测。另外，在治疗后的第 14 天，采集 PBS 组、 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 组的小鼠血液进行血常规血生化检测，并在治疗后的第 14 天，收集 PBS 组、 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 组小鼠的主要器官并行 H&E 染色，最后通过荧光显微镜观察主要器官的损伤情况。

3.3.5 数据处理

通过 GraphPad Prism 7 进行数据处理，所有的数据结果均以平均值 $\pm$ 标准差表示 ($n\geq 3$)。数据间显著性差异通过单因素方差分析法 (One way ANOVA) 进行分析。* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ 。

3.4 实验结果与讨论

3.4.1 SPECT-CT 成像及生物分布

在应用放射性核素标记的 STATH-OMV-PEG 增强肿瘤放射免疫治疗之前，我们首先探索了静脉注射 STATH-OMV-PEG 后，其在体内的行为。我们用 ^{125}I 标记的 STATH-OMV-PEG 进行 SPECT/CT 成像。通过静脉给药的方式将 ^{125}I -STATH-OMV-PEG（每只小鼠 $20\text{ }\mu\text{g}$ ， $200\text{ }\mu\text{Ci}$ ）注射到 CT26 荷瘤小鼠体内，并在给药后的不同时间点（1、6、18、36 和 50 h）进行 SPECT/CT 成像。如图 3-1 所示， ^{125}I -STATH-OMV-PEG 在静脉给药后的 18 h 在肿瘤中明显积聚。重要的是，在小鼠中没有观察到甲状腺积聚，表明 ^{125}I -STATH-OMV-PEG 在体内具有良好的放射性标记稳定性。

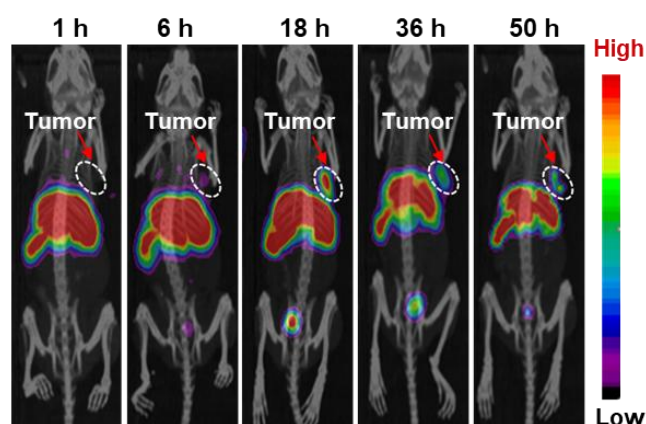


Fig 3-1 SPECT/CT images of the mouse with CT26 tumors at various time points after *i.v.* injection of ^{125}I -STATH-OMV-PEG

图 3-1 CT26 肿瘤小鼠静脉注射 ^{125}I -STATH-OMV-PEG 后不同时间点的 SPECT/CT 图像

随后，对 ^{125}I -STATH-OMV-PEG 在体内的生物分布进行了评估，静脉注射 24 h 后，收集包括心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏和肿瘤在内的主要器官，称重，并使用伽马计数器进行测量。如图中 3-2 所示， ^{125}I -STATH-OMV-PEG 在肿瘤部位积聚，但由于网状内皮（RES）系统的吞噬作用，肝脏中有一些富集。

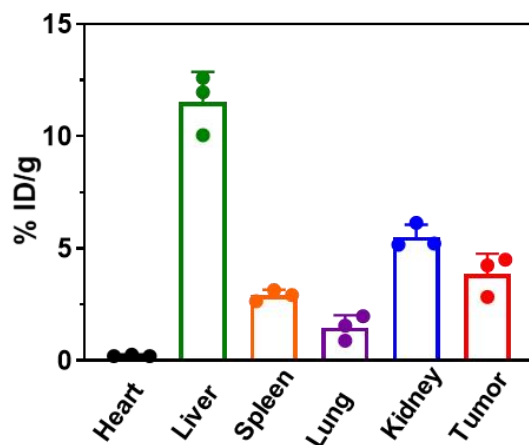


Fig 3-2 Analysis of the biodistribution of ^{125}I -STATH-OMV-PEG in the mice after injection of 24 h

图 3-2 ^{125}I -STATH-OMV-PEG 在注射 24 h 后小鼠体内的生物分布分析

3.4.2 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的体内肿瘤放射治疗

受到 STATH-OMV-PEG 在 SPECT/CT 成像中出色的生物分布的鼓舞，我们继续评估 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 在肿瘤治疗中的治疗效果。将接种 CT26 肿瘤的 Balb/c 小鼠随机分为四组（每组 5 只小鼠）：G1：对照组（PBS），G2：游离 ^{131}I （200 μCi ），G3：STATH-OMV-PEG（20 μg ），G4： ^{131}I -STATH-OMV-PEG（OMV：20 μg ， ^{131}I ：200 μCi ），静脉注射药物后每隔一天测量肿瘤大小。如图 3-3a 所示，与游离 ^{131}I 和 STATH-OMV-PEG 治疗组相比， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 显著抑制了小鼠肿瘤生长。此外， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 还显著延长了荷瘤小鼠的生存时间（图 3-3b）。

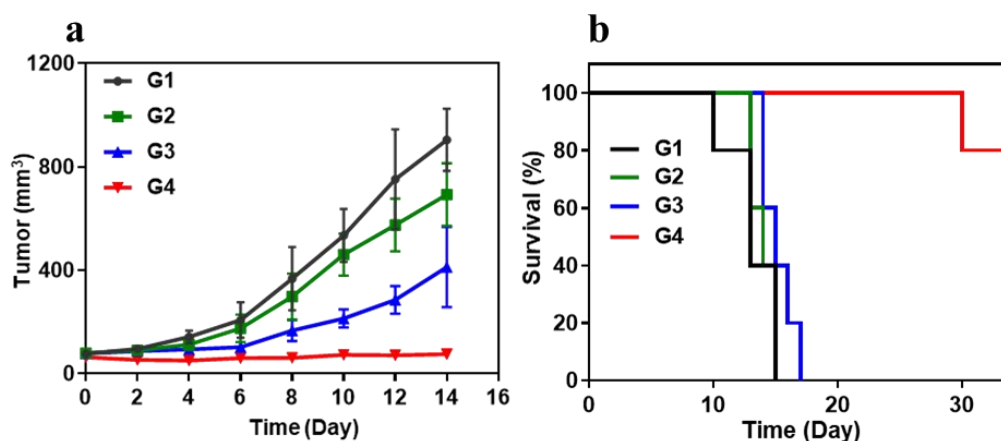


Fig 3-3 The progression of tumor size (a) and survival time (b) of mice with different treatments (n=5)

图 3-3 小鼠在不同治疗下的肿瘤大小 (a) 和存活时间 (b) (n=5)

为了进一步评估内放疗的效果，我们收集了不同治疗组小鼠的肿瘤组织，并使用 H&E 和 TUNEL 染色评估了肿瘤细胞的损伤程度和类型。在治疗的第 14 天，我们随机选择了每个治疗组中的 1 只小鼠进行了肿瘤组织的 H&E 和 TUNEL 染色分析。在图 3-4a， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗组的肿瘤切片当中具有大量 TUNEL 阳性区域，表明肿瘤细胞主要通过凋亡方式死亡。与此同时，在图 3-4b 中， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 组的 H&E 染色显示了肿瘤细胞核的大面积缺失，表明肿瘤细胞大规模坏死，这与 TUNEL 切片染色结果相统一。总的来说， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 作为一种出色的内放疗材料，能够诱导肿瘤细胞凋亡，进而显著地抑制肿瘤细胞的增殖。

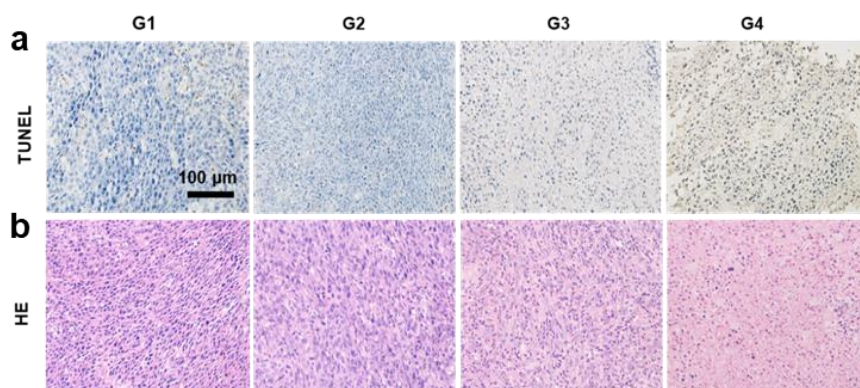


Fig 3-4 Microscopic images of H&E and TUNEL staining of tumor tissues from mice in different treatment cohorts. G1: Control (PBS), G2: Free ^{131}I (200 μCi), G3: STATH-OMV-PEG (20 μg of OMVs), and G4: ^{131}I -STATH-OMV-PEG (20 μg of OMVs corresponding to 200 μCi of ^{131}I)

图 3-4 不同治疗组小鼠肿瘤组织的 H&E 和 TUNEL 染色的显微镜图像。G1: 对照 (PBS)，G2: 游离 ^{131}I (200 μCi)，G3: STATH-OMV-PEG (20 μg)，以及 G4: ^{131}I -STATHOMV-PEG (OMV: 20 μg , ^{131}I : 200 μCi)

此外，在内放射治疗过程中，全程对小鼠的体重进行了监测，如图 3-5 所示，与对照组相比， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗组的小鼠体重没有显著变化，进而也说明了 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 具有优越的生物安全性。

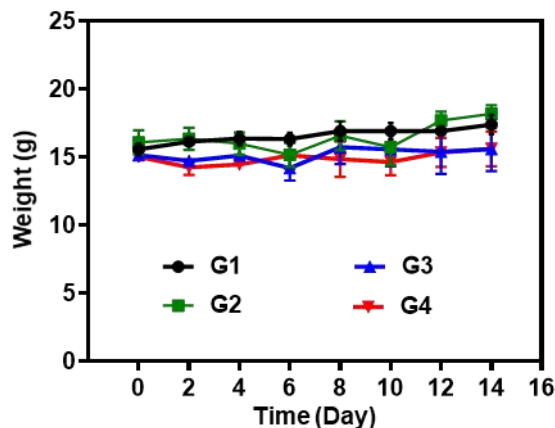


Fig 3-5 Body weight of mice after different treatments. G1: Control (PBS), G2: Free ^{131}I (200 μCi), G3: STATH-OMV-PEG (20 μg), and G4: ^{131}I -STATH-OMV-PEG (20 μg , 200 μCi). Error bars represent mean $\pm$ SD (n = 5)

图 3-5 不同处理后小鼠的体重。G1: 对照 (PBS), G2: 游离 ^{131}I (200 μCi), G3: STATH-OMV-PEG (20 μg), G4: ^{131}I -STATH-OMV-PEG (20 μg , 200 μCi)。误差条表示平均值 $\pm$ SD (n=5)

此外,为了更进一步评价 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的体内生物安全性。在治疗第 14 天,对 PBS 组和 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗组的小鼠取血进行血常规检测与血生化指标的化验,检测结果表明,在 PBS 组与 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗组之间,主要的血常规以及肝肾功能指标 ALT、AST、ALP、UREA 等没有明显的波动 (图 3-6),可证实 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 作为治疗剂的安全性。

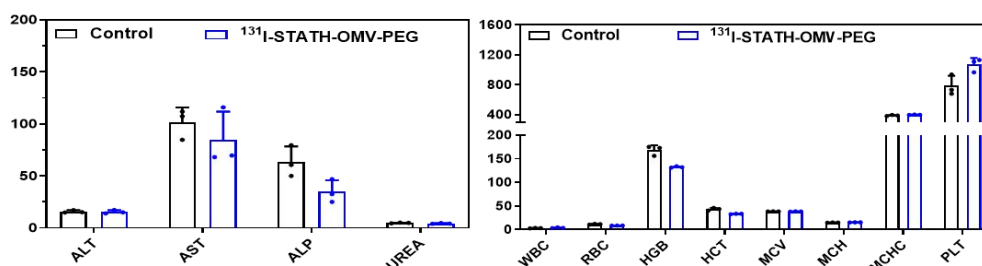


Fig 3-6 Blood parameters of CT26 tumor-bearing mice on day 14 after PBS or ^{131}I -STATH-OMV-PEG treatment. Error bars represent mean $\pm$ SD (n = 3)

图 3-6 PBS 或 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗后第 14 天的 CT26 荷瘤小鼠的血液参数。误差条表示平均值 $\pm$ SD (n=3)

在内放射治疗结束时,我们随机选择了 PBS 组和 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗组中的一只小鼠进行安乐死,并收集其主要脏器进行 H&E 染色。结果显示,与 PBS 组相比, ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗组的心脏、肝脏、脾脏、肺部和肾脏组织结构完整,进一步证实了 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的良好生物安全性。综

上所述, ^{131}I -STATH-OMV-PEG 表现出良好的生物相容性, 可作为一种出色的内放射治疗材料 (图 3-7)。

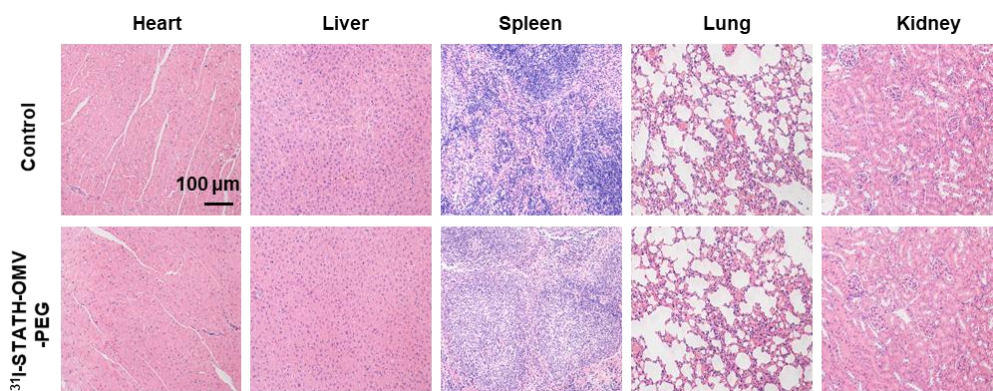


Fig 3-7 H&E stained sections of the heart, liver, spleen, lung, and kidney of mice after 14 days of different treatments

图 3-7 不同处理 14 天小鼠的心、肝、脾、肺和肾的 H&E 染色切片

3.5 本章小结

本章研究旨在评估放射性碘标记的 STATH-OMV-PEG 在内放射治疗中的疗效。首先, 通过 SPECT/CT 成像证实了 ^{125}I -STATH-OMV-PEG 具有良好的肿瘤靶向能力。随后, 建立了 Balb/c 小鼠的单侧 CT26 荷瘤模型, 评估了 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 在体内的放射免疫疗效。结果显示, 静脉给药 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 后, 肿瘤的生长显著被抑制, 免疫组化切片结果表明其主要通过细胞凋亡诱导肿瘤细胞死亡。另外, 小鼠的体重变化、治疗期间的血液指标以及治疗结束时小鼠的主要器官的 H&E 染色切片等数据也说明了 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 作为一种安全的内放射治疗材料的潜力。

第四章 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的体内免疫刺激效应及肿瘤放射免疫治疗

4.1 引言

放射治疗可以诱导 ICD，从而促进机体免疫系统的活化。OMV 作为高效的免疫佐剂，可以增强内放疗介导的抗肿瘤免疫反应。本章将主要评估荷瘤小鼠在静脉给药 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 后体内产生的免疫学效应以及该策略在多种小鼠肿瘤模型中的疗效。研究内容以下：通过肿瘤切片的免疫荧光染色，随后观察 ICD 相关指标的表达情况（CRT 和 HSP-70）、分析荷瘤小鼠治疗后淋巴结中 DCs 的成熟、血液中抗肿瘤细胞因子水平的检测。随后，建立小鼠免疫记忆模型，探究 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 对小鼠肿瘤复发的抑制效果。最后为了探究该策略在临床治疗结肠癌的效率，我们建立了原位结肠癌模型，并评估了其在治疗原位结肠癌中的疗效。

4.2 实验材料与仪器

4.2.1 实验材料

用于免疫染色的荧光抗体 CD3-FITC、CD4-APC、CD8-PE、CD80-APC、CD86-PE、CD11c-FITC 购自于美国 eBioscience 公司。放射性核素 ^{131}I 购自上海欣科医药有限公司。4%多聚甲醛购自于深圳瑞沃德公司。

4.2.2 实验仪器

流式细胞仪（荷兰 MILabs 公司），激光共聚焦显微镜（日本 OLYMPUS 公司），小动物活体成像仪（美国 Perkinelmer 公司）。

4.3 实验方法

4.3.1 组织切片免疫荧光染色

将健康的 Balb/c 小鼠（6-8 周龄）平均分为 4 组，并向每只小鼠腋窝皮下注射 50 μL 包含大约 2×10^6 个 CT26 结肠癌细胞的 PBS，待肿瘤体积大小约 75 mm^3 ，向各组的小鼠通过静脉给药的方式分别注射 50 μL 的 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 溶液（ ^{131}I : 200 μCi ，OMV: 20 μg ）、游离 ^{131}I （200 μCi ）、STATH-OMV-PEG

(20 μg) 及 PBS 溶液。治疗三天后处死小鼠，取小鼠皮下肿瘤组织，并进行包埋冰冻切片处理，随后用 CRT, HSP-70 免疫荧光抗体将肿瘤冰冻切片染色，最后使用激光共聚焦显微镜观察肿瘤组织 ICD 相关蛋白的表达情况。

4.3.2 DCs 成熟分析

具体来说，将健康的 Balb/c 小鼠（6-8 周龄），平均分为 4 组。为了建立皮下肿瘤模型，向每只小鼠腋窝皮下注射 50 μL 包含大约 2×10^6 个 CT26 细胞的 PBS。待肿瘤体积大小约 75 mm^3 ，静脉给药以下药物： ^{131}I -STATH-OMV-PEG (200 μCi , OMV 20 μg)、游离 ^{131}I (200 μCi)、STATH-OMV-PEG (20 μg) 和 PBS。治疗后三天，取荷瘤小鼠腹股沟淋巴结，制成单细胞悬液并用相关抗体进行染色，最后通过流式细胞仪进行 DCs 成熟分析。

具体步骤：（1）准备 FACs 溶液和组织消化酶；（2）将淋巴结置于含有 PBS 溶液的 EP 管中剪碎；（3）将组织匀浆离心（1800 r/min, 5 min），去除上清液，在 EP 管中加入组织消化酶，室温下消化 1 h；（4）使用尼龙滤网过滤，将滤液离心（1800 r/min, 5 min），去除上清液，加入 FACs 重悬，随后离心去除上清，重复 3 次，最后用 FACs 重悬；（5）每个样品加入 CD11c-FITC、CD80-APC、CD86-PE 染色 1 h，每 10 min 震荡一次；（6）染色结束后离心（1800 r/min, 5 min），去除上清液，加入 FACs 洗涤液，重复洗涤 3 次，最后用 FACs 重悬并通过流式细胞仪进行分析。

4.3.3 ELISA 法检测血清免疫因子

取各治疗组小鼠血清，稀释后根据 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 TNF- α 、IFN- γ 水平。

4.3.4 免疫记忆模型治疗实验

为了评估 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 产生的免疫记忆效应，首先建立 CT26 皮下肿瘤模型，当肿瘤体积大小约 75 mm^3 时，将 CT26 荷瘤小鼠随机分组（G1：手术组、G2： ^{131}I -STATH-OMV-PEG (^{131}I :200 μCi , OMV:20 μg)），每组 5 只，通过上述治疗手段消除皮下肿瘤，治疗后第 40 天，在小鼠皮下再次植入 CT26 肿瘤细胞，观察并记录肿瘤的生长情况。此外，在治疗第 40 天，取不同治疗组的

小鼠脾脏组织，并使用特定抗体（包括 anti-CD3-FITC、anti-CD8-PE、anti-CD62L-PE-cyanine7 和 anti-CD44-APC）对脾脏中的免疫细胞进行染色，最后通过流式细胞仪检测脾脏中效应记忆 T 细胞(TEM)和中心记忆 T 细胞(TCM)的比例。

4.3.5 原位结肠癌模型治疗实验

我们建立了 CT26 原位结肠肿瘤模型，该肿瘤模型稳定表达萤火虫荧光素酶，用于验证 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 介导内放疗的有效性。对原位结肠肿瘤模型小鼠静脉注射以下药物：G1: PBS、G2: 游离的 ^{131}I (200 μCi)、G3: STATH-OMV-PEG (OMV:20 μg)、G4: ^{131}I -STATH-OMV-PEG (^{131}I :200 μCi , OMV:20 μg)。最后，使用 IVIS 小动物成像仪监测原位肿瘤生长，并记录小鼠的生存周期和治疗期间的体重变化。

4.3.6 数据分析

通过 GraphPad Prism 7 进行数据处理，所有的数据结果均以平均值 $\pm$ 标准差表示 ($n \geq 3$)。数据间显著性差异通过单因素方差分析法 (One way ANOVA) 进行分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

4.4 结果与讨论

4.4.1 放疗导致肿瘤细胞免疫原性死亡相关蛋白表达的验证

为了评估内放疗之后肿瘤 ICD 相关指标的表达情况 (CRT, HSP-70)，通过静脉给药的方式给 CT26 荷瘤小鼠注射以下药物 G1: PBS、G2: Free ^{131}I (200 μCi)、G3: STATH-OMV-PEG (20 μg)、G4: ^{131}I -STATH-OMV-PEG (^{131}I : 200 μCi , OMV: 20 μg)，治疗三天后处死小鼠并取皮下肿瘤，并进行包埋冰冻切片处理，随后用 CRT, HSP-70 免疫荧光抗体将肿瘤冰冻切片染色，最后使用激光共聚焦显微镜观察肿瘤组织的 CRT 与 HSP-70 的表达情况。如图 4-1 所示，游离 ^{131}I 治疗组显示出较少的 CRT 与 HSP-70 信号（绿色荧光与红色荧光），这是由于游离的 ^{131}I 不能靶向到肿瘤部位从而无法诱导 ICD。值得注意的是，单纯的 OMV 也可以诱导 ICD 从而表现出较强的免疫荧光。最后， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 处理组中的 CRT 与 HSP-70 表达最强，这可能是由于 OMV 与 RIT 相互作用导致

大量的肿瘤细胞免疫性死亡。综上所述，通过肿瘤冰冻切片的免疫荧光分析结果表明， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 可以通过内放疗诱发肿瘤细胞免疫原性死亡，并进一步促进机体产生抗肿瘤免疫应答。

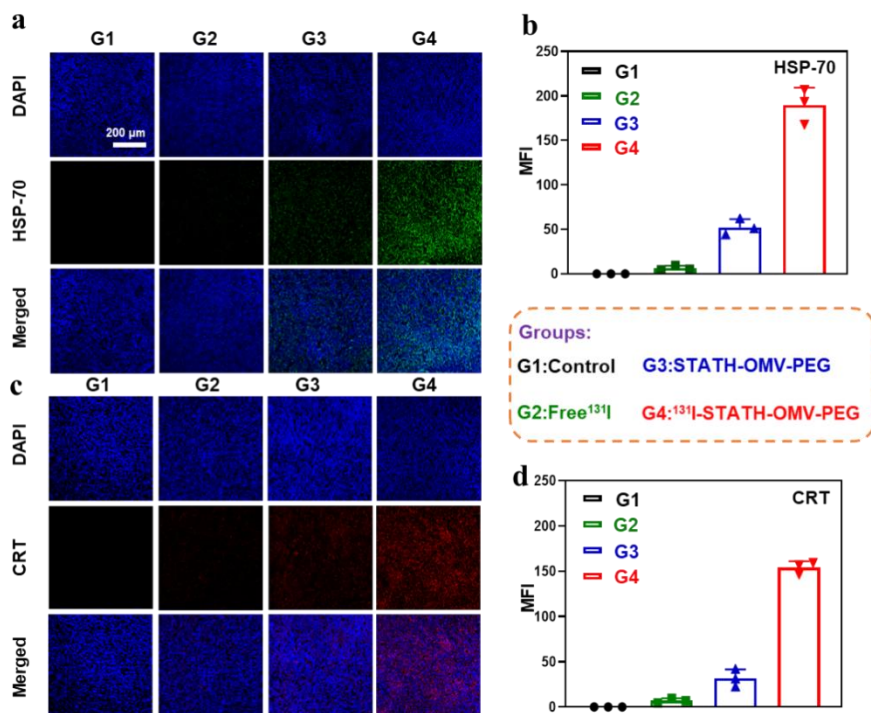


Figure 4-1 Immunofluorescent staining of HSP70 (a) and calreticulin (CRT) (c) in CT26 tumors at 3 day post treatment. Immunofluorescence quantitative statistics of HSP70 (b) and calreticulin (CRT) (d)

图 4-1 CT26 肿瘤在治疗后 3 天的 HSP70 (a) 和钙调蛋白 (CRT) (c) 的免疫荧光染色。HSP70 (b) 和钙调蛋白 (CRT) (d) 的免疫荧光定量统计数据

4.4.2 淋巴结树突状细胞 (DCs) 成熟

树突状细胞 (DCs) 在启动和调节免疫反应中的重要作用取决于它们的成熟状态。随后，我们评估了不同治疗组中小鼠淋巴结中的 DCs 成熟状态。具体而言，在给药三天后，收集荷瘤小鼠的淋巴结，制成单细胞悬液并对其进行荧光染色，最后通过流式细胞术进行分析。如图 4-2 所示，与对照组、单独的 ^{131}I 以及 STATH-OMV-PEG 治疗相比， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗后 DCs 的成熟状态显著提高。 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 的肿瘤靶向能力显著促进了肿瘤的彻底清除并诱导免疫原性细胞死亡。同时，OMV 的免疫刺激特性在激活免疫系统中发挥了关键作用。这种激活有助于 DCs 的成熟并加速抗原呈递，从而加强抗肿瘤免疫应答。

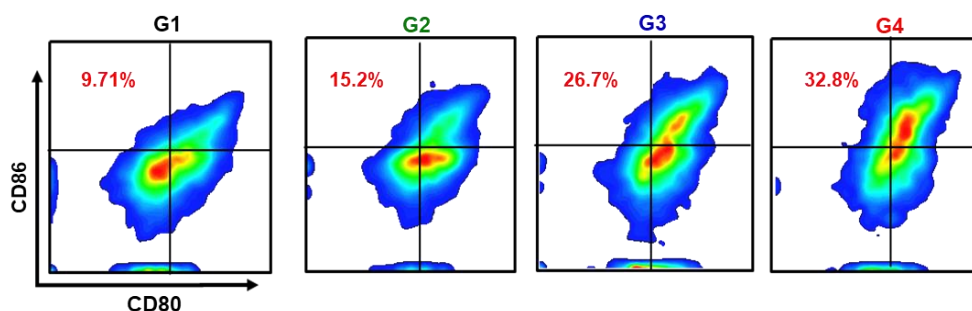


Figure 4-2 Representative flow cytometry plots of DCs maturation in tumor-adjacent lymph nodes after 3 days of varied treatments

图 4-2 不同处理 3 天后肿瘤邻近淋巴结中 DCs 成熟的代表性流式细胞术图

4.4.3 血清免疫因子分析

肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 具有直接杀伤肿瘤细胞和免疫调节活性。干扰素 γ (IFN- γ) 则可以诱导肿瘤细胞凋亡和休眠等方式抑制肿瘤细胞的生长扩散。鉴于 TNF- α 和 IFN- γ 在抗肿瘤免疫反应中的重要作用, 因此对不同治疗组的两种细胞因子水平进行分析。具体而言, 在治疗后七天, 我们使用眼球取血法从小鼠身上获取全血, 并分离出血清, 通过 ELISA 试剂盒来检测血清中 TNF- α 和 IFN- γ 的水平。值得注意的是, TNF- α 和 IFN- γ 两种细胞因子均在 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗组中水平最高 (图 4-3a, 4-3b)。因此, ^{131}I -STATH-OMV-PEG 有望作为一种免疫增强剂, 启动并放大由 RIT 介导的抗肿瘤免疫应答。

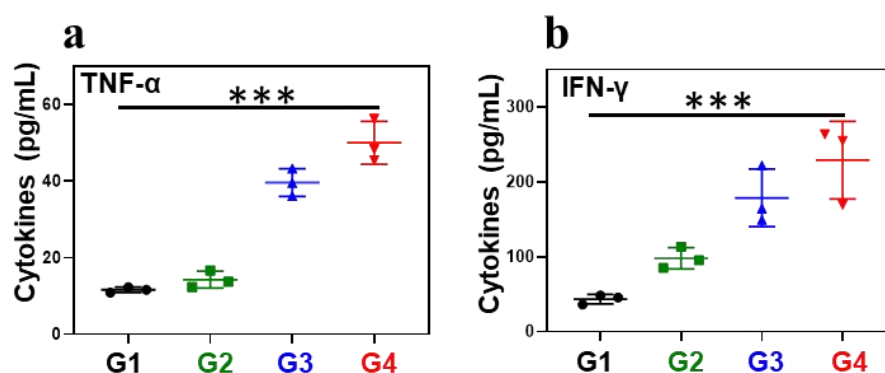


Figure 4-3 The anti-tumor cytokines TNF- α (a) and IFN- γ (b) levels were measured in mice serum on day 7 after different treatments

图 4-3 在不同治疗后 7 天, 测定小鼠血清中抗肿瘤细胞因子 TNF- α (a) 和 IFN- γ (b) 的水平

4.4.4 免疫记忆模型治疗实验

为了研究 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 对抗肿瘤免疫记忆的影响, 我们将小鼠随

机分为手术组和 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗组（图 4-4）。具体而言，将 CT26 荷瘤小鼠随机分为两组（G1：手术组、G2： ^{131}I -STATH-OMV-PEG（ ^{131}I ：200 μCi ，OMV：20 μg ）。然后，我们通过手术治疗或者 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 来消除第一个肿瘤。

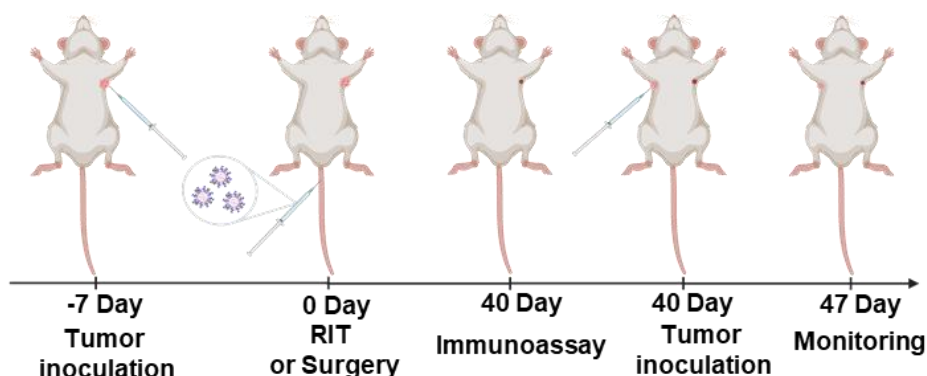


Figure 4-4 Illustrative diagram of immune memory triggered by ^{131}I -STATH-OMV-PEG

图 4-4 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 介导的免疫记忆效应示意图

在经过手术组和 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 消除肿瘤后的第 40 天，将两组治疗组当中的小鼠脾脏取出，用 anti-CD3-FITC、anti-CD8-PE、anti-CD62L-PE-cyanine7 和 anti-CD44-APC 流式抗体对脾脏中的 TCM 和 TEM 进行染色，最后通过流式细胞术对小鼠脾脏当中的 TCM 和 TEM 进行分析。结果显示， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗组中的 TEM 细胞比例显著升高（图 4-5a，图 4-5b）。

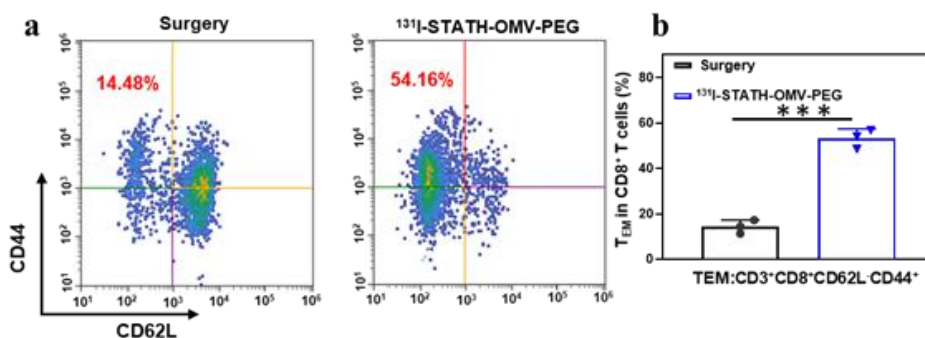


Figure 4-5 (a) Characteristic flow cytometry illustrations and corresponding quantitative data(b) of effector memory T cells (TEM) in the spleen, assessed on day 40, just prior to the secondary tumor challenge in mice ($n = 3$)

图 4-5 在治疗第 40 天，小鼠脾脏中效应记忆 T 细胞（TEM）的特征性流式细胞术图（a）和定量数据（b）（ $n = 3$ ）

同时，我们对治疗痊愈的小鼠再次皮下植入 CT26 肿瘤，并监测了其生长情况。如图 4-6 所示，经过 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗的荷瘤小鼠，再次植瘤后，

肿瘤无法继续生长，这表明经 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗后，小鼠体内产生长期的抗肿瘤免疫记忆效应，阻止肿瘤细胞再次侵袭机体。

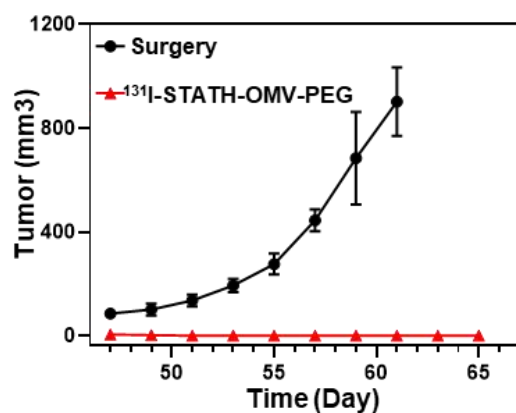


Figure 4-6 Data showing the tumor development in mice during secondary tumor trials, 40 days after initial tumor clearance by ^{131}I -STATH-OMV-PEG

图 4-6 通过 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 消除第一个肿瘤 40 天后，再次植瘤后，小鼠的肿瘤生长数据

4.4.5 放射性碘标记的细菌外膜囊泡抑制原位肿瘤生长

为了评估我们的策略在肿瘤治疗中的临床适用性，我们接下来探究了 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 在治疗原位结肠癌中的有效性。首先，通过将稳定表达荧光素酶的 CT26 肿瘤细胞 (CT26-Luc) 植入小鼠结肠，建立了原位结肠癌小鼠模型。然后，将这些小鼠随机分为两组，包括对照组和 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 组。使用 IVIS 成像系统跟踪两组中 CT26-Luc 肿瘤的进展。如图 4-7 所示，与对照组相比， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗组中显示出明显的肿瘤生长减缓。

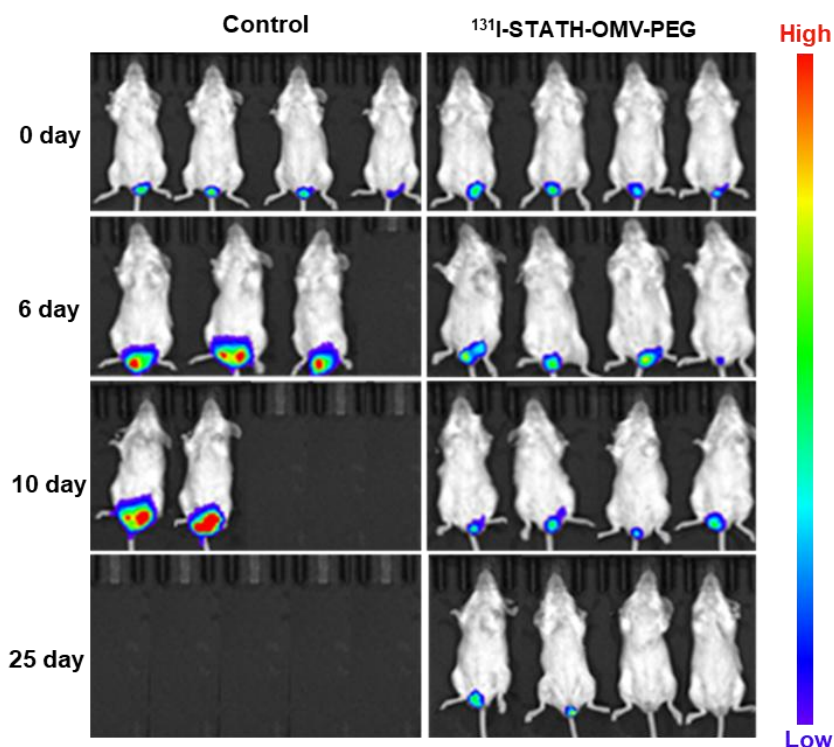


Figure 4-7 Bioluminescence in vivo imaging for monitoring the progression of CT26-Luc colon cancer cells subsequent to ^{131}I -STATH-OMV-PEG treatment

图 4-7 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗后监测 CT26-Luc 结肠癌细胞进展的体内生物发光成像
此外，该方法延长了患原位结肠癌的小鼠的生存期，并且在治疗过程中没有引起明显的体重波动（图 4-8a,图 4-8b）。

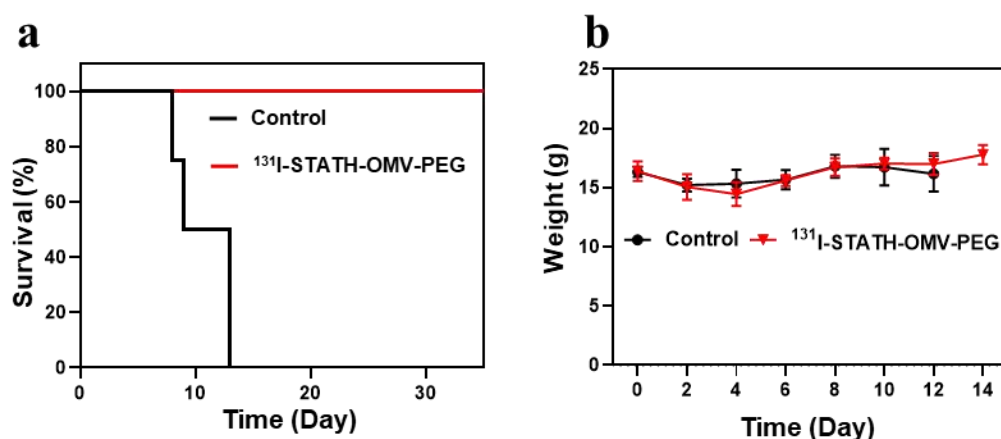


Figure 4-8 (a)Survival rate of in situ colon cancer mice after treatment. (b) Weight changes in mice with in situ colon cancer after treatment

图 4-8 (a) 治疗后原位结肠癌小鼠的存活率 (b) 治疗后原位结肠癌小鼠的体重变化

为了直观地观察各治疗组中原位肿瘤的生长状况，在治疗的第 10 天，将两组小鼠处死并取出原位肿瘤进行比较。如图 4-9，与对照组当中较大的实体肿瘤相比， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗组当中的原位肿瘤可忽略不计，这进一步说

明 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 可以显著抑制原位肿瘤的生长。

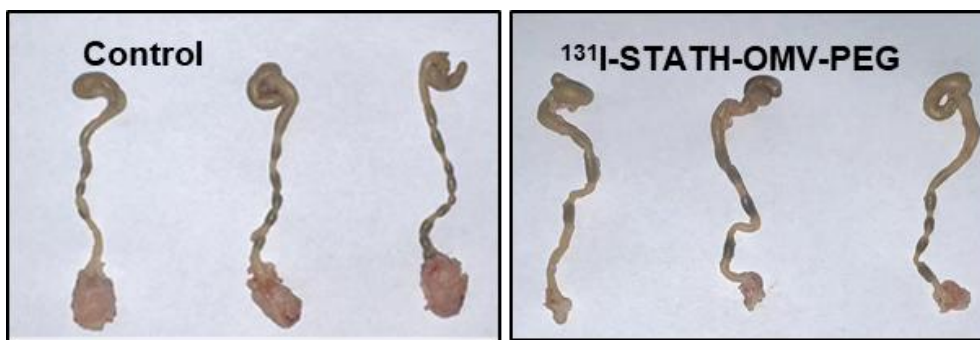


Figure 4-9 Ex vivo images of colons collected at 10 days after treatment

图 4-9 治疗后第 10 天收集的结肠体外图像

4.5 本章小结

在前面一个章节中，我们通过皮下瘤模型验证了 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 优越的肿瘤靶向能力和显著的抑瘤作用。在本章节中，利用 OMV 固有的免疫激活效应，我们希望探究 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 在治疗过程中的潜在免疫机制。通过肿瘤组织的免疫荧光染色显示，我们的治疗策略促进了 ICD 相关蛋白质的释放，例如热休克蛋白 70 (HSP70) 和钙网蛋白 (CRT)，这有助于增强放射免疫治疗。此外，我们评估了不同治疗组小鼠淋巴结中 DCs 的成熟状态。值得注意的是， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 显著促进了 DCs 的成熟。与此同时，我们的策略提高了抗肿瘤细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IFN-}\gamma$ 的水平，显著增强了抗肿瘤免疫反应。最后，在免疫记忆模型和原位结肠肿瘤模型中均验证了 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 具有强大的抗肿瘤疗效。

第五章 结论及展望

5.1 结论

本文设计了基于减毒鼠伤寒沙门氏菌外膜囊泡（VNP20009-OMV）的递送平台，促进了高效稳定的 ^{131}I 标记和免疫调节。首先，通过生物工程技术将富含酪氨酸的 STATH 整合到 OMV 表面（STATH-OMV）。STATH 可以提供丰富的放射标记位点，从而提高放射性标记效率。为了提高 STATH-OMV 的生物相容性，我们用 PEG 对 STATH-OMV 进行了修饰，得到了 STATH-OMV-PEG。利用 Iodogen 标记法，STATH-OMV-PEG 可以实现 $^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$ 的标记，与传统的 OMV 相比，STATH-OMV-PEG 具有更高的标记效率和稳定性。SPECT/CT 显像显示， ^{125}I 标记的 STATH-OMV-PEG 在静脉注射后有较大的肿瘤积聚。此外， ^{131}I 标记的 STATH-OMV-PEG 显示出显著的抑制肿瘤生长的作用，且治疗组小鼠未见明显毒性反应。更重要的是，我们观察到 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 治疗后机体产生了强烈的抗肿瘤免疫应答，包括刺激 DCs 成熟以提高抗原提呈效率，以及产生 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{INF-}\gamma$ ，最终提高了肿瘤放射免疫治疗的效果。此外， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 还可以促进机体产生长期的免疫记忆效应，阻止了肿瘤的复发。最后，在原位肿瘤模型中， ^{131}I -STATH-OMV-PEG 也显著抑制了原位结肠癌的生长，为临床治疗结肠癌提供了一条全新思路。

综上所述，本硕士论文设计了一种基于工程化细菌外膜囊泡的放射性标记载体，实现了 ^{131}I 的高效稳定标记。此外，通过 OMV 优异的肿瘤靶向能力，实现放射性核素在肿瘤部位的精准杀伤。更重要的是，OMV 可以增强 RIT 介导的抗肿瘤免疫应答。总之，我们首次将 RIT 与 OMV 相结合，并在皮下肿瘤模型、免疫记忆以及原位肿瘤模型中均实现了有效治疗，该策略为肿瘤放射免疫治疗提供了全新的研究路径。

5.2 展望

尽管本课题将细菌外膜囊泡与内放疗相结合实现了有效的肿瘤放射免疫治疗，且并具有良好的生物安全性，为肿瘤放射免疫治疗提供了一条全新思路，但本文仍然存在不足：

(1) 本研究中 ^{131}I -STATH-OMV-PEG 可以刺激机体产生强大的抗肿瘤免疫反应, 但是本论文没有深入探究其作用机制, 后面的工作会深度挖掘其具体产生的免疫机制。

(2) 虽然本策略在小鼠模型上验证了良好的生物安全性, 但将该策略应用于临床转化之前, 还需要进一步了解其对人体是否存在潜在的危害。

(3) 针对肿瘤微环境的复杂性, 是否能开发出用于改善和调节肿瘤乏氧和免疫抑制微环境的工程化细菌外膜囊泡。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] RUMGAY H, ARNOLD M, FERLAY J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040 [J]. Journal of Hepatology, 2022, 77(6): 1598-1606.
- [3] MORGAN E, ARNOLD M, GINI A, et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN [J]. Gut, 2023, 72(2): 338-344.
- [4] CHEEMA S, MAISONNEUVE P, LOWENFELS A B, et al. Influence of Age on 2040 Cancer Burden in the Older Population of the Gulf Cooperation Council (GCC) Countries: Public Health Implications [J]. Cancer Control, 2021, 28.
- [5] HEER E, HARPER A, ESCANDOR N, et al. Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study [J]. The Lancet Global Health, 2020, 8(8): 1027-1037.
- [6] ANDERSON C, NICHOLS H B. Trends in Late Mortality Among Adolescent and Young Adult Cancer Survivors [J]. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2020, 112(10): 994-1002.
- [7] WANG Y, WANG M, WU H X, et al. Advancing to the era of cancer immunotherapy [J]. Cancer Communications, 2021, 41(9): 803-829.
- [8] THOMS K M. Advanced melanoma—A curable disease? Implications of systemic treatment on patients' daily life [J]. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2023, 37(5): 853-854.
- [9] CHEN D, HU Y. Approaches for boosting antitumor immunity in prostate cancer therapy: A comprehensive review on drugs, products, and nanoparticles [J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2023, 89.
- [10] PEARSON J R D, CUZZUBBO S, MCARTHUR S, et al. Immune Escape in Glioblastoma Multiforme and the Adaptation of Immunotherapies for Treatment [J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11:582106-582106.
- [11] ZHAO Q, ZONG H, ZHU P, et al. Crosstalk between colorectal CSCs and immune cells in tumorigenesis, and strategies for targeting colorectal CSCs [J]. Experimental Hematology & Oncology, 2024, 13(1):6-6.
- [12] CAO Y, SI J, ZHENG M, et al. X-ray-responsive prodrugs and polymeric nanocarriers for multimodal cancer therapy [J]. Chemical Communications, 2023, 59(54): 8323-8331.
- [13] LIU T, PEI P, SHEN W, et al. Radiation-Induced Immunogenic Cell Death for Cancer Radioimmunotherapy [J]. Small Methods, 2023, 7(5):2201401-2201401.
- [14] TCHELEBI L, ZAORSKY N, MACKLEY H. Stereotactic Body Radiation Therapy in the Management of Upper GI Malignancies [J]. Biomedicines, 2018, 6(1):7-7.
- [15] AN J, HE X, MA H, et al. Radionuclide labeled nanocarrier for imaging guided combined radionuclide, sonodynamic, and photothermal therapy of pancreatic tumours [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2023, 642: 789-799.
- [16] CHANG C-H, CHANG M-C, CHANG Y-J, et al. Translating Research for the Radiotheranostics of Nanotargeted 188Re-Liposome [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(8):3868.

- [17] PELTEK O O, MUSLIMOV A R, ZYUZIN M V, et al. Current outlook on radionuclide delivery systems: from design consideration to translation into clinics [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2019, 17(1),90.
- [18] HOWE A, BHATAVDEKAR O, SALERNO D, et al. Combination of Carriers with Complementary Intratumoral Microdistributions of Delivered α -Particles May Realize the Promise for ^{225}Ac in Large, Solid Tumors [J]. *Journal of Nuclear Medicine*, 2022, 63(8): 1223-1230.
- [19] QIAN Y, LIU Q, LI P, et al. Highly Tumor-Specific and Long-Acting Iodine-131 Microbeads for Enhanced Treatment of Hepatocellular Carcinoma with Low-Dose Radio-Chemoembolization [J]. *ACS Nano*, 2021, 15(2): 2933-2946.
- [20] VAES R D W, HENDRIKS L E L, VOOIJS M, et al. Biomarkers of Radiotherapy-Induced Immunogenic Cell Death [J]. *Cells*, 2021, 10(4):930-930.
- [21] XI Y, CHEN L, TANG J, et al. Amplifying “eat me signal” by immunogenic cell death for potentiating cancer immunotherapy [J]. *Immunological Reviews*, 2023, 321(1): 94-114.
- [22] BAVLOVIC J, PAVKOVA I, BALONOVA L, et al. Intact O-antigen is critical structure for the exceptional tubular shape of outer membrane vesicles in *Francisella tularensis* [J]. *Microbiological Research*, 2023, 269127300-127300.
- [23] PÉREZ JORGE G, GONTIJO M T P, BROCCHI M. Salmonella enterica and outer membrane vesicles are current and future options for cancer treatment [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 131293351-1293351.
- [24] PARK K S, SVENNERHOLM K, CRESCITELLI R, et al. Synthetic bacterial vesicles combined with tumour extracellular vesicles as cancer immunotherapy [J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2021, 10(9):12120-12120.
- [25] GILMORE W J, JOHNSTON E L, BITTO N J, et al. Bacteroides fragilis outer membrane vesicles preferentially activate innate immune receptors compared to their parent bacteria [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13970725-970725.
- [26] KIM O Y, PARK H T, DINH N T H, et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1):626.
- [27] ZHUANG Q, XU J, DENG D, et al. Bacteria-derived membrane vesicles to advance targeted photothermal tumor ablation [J]. *Biomaterials*, 2021, 268120550-120550.
- [28] SINGH D, VIGNAT J, LORENZONI V, et al. Global estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: a baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative [J]. *The Lancet Global Health*, 2023, 11(2): 197-206.
- [29] IRIGARAY P, NEWBY J A, CLAPP R, et al. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2007, 61(10): 640-658.
- [30] JIANG X, PESTONI G, VINCI L, et al. Cancer cases attributable to modifiable lifestyle risk factors in Switzerland between 2015 and 2019 [J]. *International Journal of Cancer*, 2023,154(7):1221-1234.
- [31] QI J, LI M, WANG L, et al. National and subnational trends in cancer burden in China, 2005–20: an analysis of national mortality surveillance data [J]. *The Lancet Public Health*, 2023, 8(12): 943-955.
- [32] MILLER K D, NOGUEIRA L, DEVASIA T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022 [J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2022, 72(5): 409-436.

- [33] GALLE P R, TOVOLI F, FOERSTER F, et al. The treatment of intermediate stage tumours beyond TACE: From surgery to systemic therapy [J]. *Journal of Hepatology*, 2017, 67(1): 173-183.
- [34] LILLEY E J, COOPER Z, SCHWARZE M L, et al. Palliative Care in Surgery [J]. *Annals of Surgery*, 2018, 267(1): 66-72.
- [35] YORDANOVA A, AHRENS H, FELDMANN G, et al. Peptide Receptor Radionuclide Therapy Combined With Chemotherapy in Patients With Neuroendocrine Tumors [J]. *Clinical Nuclear Medicine*, 2019, 44(5): 329-335.
- [36] LIANG P, WANG M, ZHANG S, et al. pH-Triggered Conformational Change of Antp-Based Drug Delivery Platform for Tumor Treatment with Combined Photothermal Therapy and Chemotherapy [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2019, 8(15):1900306.
- [37] JAFARI NIVLOUEI S, SOLTANI M, SHIRANI E, et al. A multiscale cell-based model of tumor growth for chemotherapy assessment and tumor-targeted therapy through a 3D computational approach [J]. *Cell Proliferation*, 2022, 55(3):13187.
- [38] BAI J-W, QIU S-Q, ZHANG G-J. Molecular and functional imaging in cancer-targeted therapy: current applications and future directions [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8(1):89.
- [39] SEEBACHER N A, STACY A E, PORTER G M, et al. Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies [J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2019, 38(1):156.
- [40] RUSAN M, LI K, LI Y, et al. Suppression of Adaptive Responses to Targeted Cancer Therapy by Transcriptional Repression [J]. *Cancer Discovery*, 2018, 8(1): 59-73.
- [41] GOSWAMI N, LUO Z, YUAN X, et al. Engineering gold-based radiosensitizers for cancer radiotherapy [J]. *Materials Horizons*, 2017, 4(5): 817-831.
- [42] GERKEN L R H, GERDES M E, PRUSCHY M, et al. Prospects of nanoparticle-based radioenhancement for radiotherapy [J]. *Materials Horizons*, 2023, 10(10): 4059-4082.
- [43] CHANDRA R A, KEANE F K, VONCKEN F E M, et al. Contemporary radiotherapy: present and future [J]. *The Lancet*, 2021, 398(10295): 171-184.
- [44] SHANG S, LIU J, VERMA V, et al. Combined treatment of non-small cell lung cancer using radiotherapy and immunotherapy: challenges and updates [J]. *Cancer Communications*, 2021, 41(11): 1086-1099.
- [45] DESAI P, RIMAL R, SAHNOUN S E M, et al. Radiolabeled Nanocarriers as Theranostics—Advancement from Peptides to Nanocarriers [J]. *Small*, 2022, 18(25):2200673.
- [46] GILL M R, FALZONE N, DU Y, et al. Targeted radionuclide therapy in combined-modality regimens [J]. *The Lancet Oncology*, 2017, 18(7): 414-423.
- [47] SUN J, HUANGFU Z, YANG J, et al. Imaging-guided targeted radionuclide tumor therapy: From concept to clinical translation [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2022, 190114538-114538.
- [48] NITSCH H. Introduction to Nuclear Chemistry [J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(2): 855-7.
- [49] HANDKIEWICZ-JUNAK D, POEPEL T D, BODEI L, et al. EANM guidelines for radionuclide therapy of bone metastases with beta-emitting radionuclides [J]. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2018, 45(5): 846-859.
- [50] GHARIBKANDI N A, GIERAŁTOWSKA J, WAWROWICZ K, et al. Nanostructures as Radionuclide Carriers in Auger Electron Therapy [J]. *Materials*, 2022, 15(3):1143-1143.

- [51] ZHEN W, WEICHSELBAUM R R, LIN W. Nanoparticle-Mediated Radiotherapy Remodels the Tumor Microenvironment to Enhance Antitumor Efficacy [J]. *Advanced Materials*, 2023, 35(21):2206370.
- [52] SALDARRIAGA VARGAS C, BAUWENS M, POOTERS I N A, et al. An international multi-center investigation on the accuracy of radionuclide calibrators in nuclear medicine theragnostics [J]. *EJNMMI Physics*, 2020, 7(1):69-69.
- [53] BOZKURT M F, SALANCI B V, UĞUR Ö. Intra-Arterial Radionuclide Therapies for Liver Tumors [J]. *Seminars in Nuclear Medicine*, 2016, 46(4): 324-339.
- [54] FAN Y, PAN D, YANG M, et al. Radiolabelling and in vivo radionuclide imaging tracking of emerging pollutants in environmental toxicology: A review [J]. *Science of The Total Environment*, 2023, 866161412-161412.
- [55] SALIH S, ALKATHEERI A, ALOMAIM W, et al. Radiopharmaceutical Treatments for Cancer Therapy, Radionuclides Characteristics, Applications, and Challenges [J]. *Molecules*, 2022, 27(16):5231-5231.
- [56] TAO Y, SUN Y, SHI K, et al. Versatile labeling of multiple radionuclides onto a nanoscale metal-organic framework for tumor imaging and radioisotope therapy [J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(8): 2947-2954.
- [57] CHAKRABORTY K, MONDAL J, AN J M, et al. Advances in Radionuclides and Radiolabelled Peptides for Cancer Therapeutics [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3):971-971.
- [58] KARPOV T E, MUSLIMOV A R, ANTUGANOV D O, et al. Impact of metallic coating on the retention of ²²⁵Ac and its daughters within core-shell nanocarriers [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2022, 608: 2571-2583.
- [59] PEI P, LIU T, SHEN W, et al. Biomaterial-mediated internal radioisotope therapy [J]. *Materials Horizons*, 2021, 8(5): 1348-1366.
- [60] ZHANG H, YANG L, WANG T, et al. NK cell-based tumor immunotherapy [J]. *Bioactive Materials*, 2024, 31: 63-86.
- [61] SAMPSON J H, GUNN M D, FECCI P E, et al. Brain immunology and immunotherapy in brain tumours [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2019, 20(1): 12-25.
- [62] YUE M, HU S, SUN H, et al. Extracellular vesicles remodel tumor environment for cancer immunotherapy [J]. *Molecular Cancer*, 2023, 22(1).
- [63] KANG Y, LI S. Nanomaterials: Breaking through the bottleneck of tumor immunotherapy [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 230123159-123159.
- [64] GERTON T J, GREEN A, CAMPISI M, et al. Development of a Patient-Derived 3D Immuno-Oncology Platform to Potentiate Immunotherapy Responses in Ascites-Derived Circulating Tumor Cells [J]. *Cancers*, 2023, 15(16).
- [65] RAJBHANDARY S, DHAKAL H, SHRESTHA S. Tumor immune microenvironment (TIME) to enhance antitumor immunity [J]. *European Journal of Medical Research*, 2023, 28(1):169-169.
- [66] EICHMÜLLER S B, OSEN W, MANDELBOIM O, et al. Immune Modulatory microRNAs Involved in Tumor Attack and Tumor Immune Escape [J]. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2017, 109(10):.
- [67] SHAMSEDDINE A A, BURMAN B, LEE N Y, et al. Tumor Immunity and Immunotherapy for HPV-Related Cancers [J]. *Cancer Discovery*, 2021, 11(8): 1896-1912.
- [68] DAI E, ZHU Z, WAHED S, et al. Epigenetic modulation of antitumor immunity for improved

- cancer immunotherapy [J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20(1):171-171.
- [69] PARK J, KWON M, SHIN E-C. Immune checkpoint inhibitors for cancer treatment [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2016, 39(11): 1577-1587.
- [70] DONISI C, PUZZONI M, ZIRANU P, et al. Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of HCC [J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 10.
- [71] SHIRAVAND Y, KHODADADI F, KASHANI S M A, et al. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy [J]. *Current Oncology*, 2022, 29(5): 3044-3060.
- [72] HEPPT M V, HEINZERLING L, KÄHLER K C, et al. Prognostic factors and outcomes in metastatic uveal melanoma treated with programmed cell death-1 or combined PD-1/cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 inhibition [J]. *European Journal of Cancer*, 2017, 82: 56-65.
- [73] AN J, KANG H J, SHIM J H, et al. Combined Effect of Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and Programmed Cell Death 1 Ligand 1 (PD-L1) expression in tumor infiltrating lymphocytes on prognostic outcomes after resection of hepatocellular carcinoma [J]. *Journal of Hepatology*, 2017, 66(1):450-450.
- [74] JIANG S, LI X, HUANG L, et al. Prognostic value of PD-1, PD-L1 and PD-L2 deserves attention in head and neck cancer [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13988416-988416.
- [75] LARSEN T V, HUSSMANN D, NIELSEN A L. PD-L1 and PD-L2 expression correlated genes in non-small-cell lung cancer [J]. *Cancer Communications*, 2019, 39(1): 1-14.
- [76] TAN S, ZHANG C W H, GAO G F. Seeing is believing: anti-PD-1/PD-L1 monoclonal antibodies in action for checkpoint blockade tumor immunotherapy [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2016, 1(1):16029.
- [77] CHEN X, CHEN L-J, PENG X-F, et al. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for colorectal cancer: Clinical implications and future considerations [J]. *Translational Oncology*, 2024, 40101851-101851.
- [78] LEE H, LEE S, HEO Y-S. Molecular Interactions of Antibody Drugs Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in Immuno-Oncology [J]. *Molecules*, 2019, 24(6):1190-1190.
- [79] DOVEDI S J, ELDER M J, YANG C, et al. Design and Efficacy of a Monovalent Bispecific PD-1/CTLA4 Antibody That Enhances CTLA4 Blockade on PD-1+ Activated T Cells [J]. *Cancer Discovery*, 2021, 11(5): 1100-1117.
- [80] ZHANG D, XU H, ZHAO C, et al. Detailed characterization of PD-1/PD-L1 and CTLA4 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in yolk sac tumors [J]. *Human Immunology*, 2023, 84(10): 534-542.
- [81] ZHOU X, LIAN H, LI H, et al. Nanotechnology in cervical cancer immunotherapy: Therapeutic vaccines and adoptive cell therapy [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13.
- [82] TIAN Y, WANG K, XU C, et al. Non-invasive T cells adoptive immunotherapy for solid tumor with gel anti-tumor T-cell injections [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 439.
- [83] CHEN R, CHEN L, WANG C, et al. CAR-T treatment for cancer: prospects and challenges [J]. *Frontiers in Oncology*, 2023, 131288383-1288383.
- [84] WEI J, HAN X, BO J, et al. Target selection for CAR-T therapy [J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2019, 12(1):1-9.
- [85] KACZANOWSKA S, MURTY T, ALIMADADI A, et al. Immune determinants of CAR-T cell expansion in solid tumor patients receiving GD2 CAR-T cell therapy [J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(1): 35-51.
- [86] WANG X, XIAO Q, WANG Z, et al. CAR-T therapy for leukemia: progress and challenges [J].

- Translational Research, 2017, 182: 135-144.
- [87] ZHENG Z, SU J, BAO X, et al. Mechanisms and applications of radiation-induced oxidative stress in regulating cancer immunotherapy [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14:1247268-1247268.
- [88] ZHANG Y, ZHAN Y, MAO C, et al. ATP-responsive and functionalized framework nucleic acid for synergistic radio-immunotherapy [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 475.
- [89] VANPOUILLE-BOX C. Immune radiobiology [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2021, 19(1):255-255.
- [90] DING D, JIANG X. Advances in Immunogenic Cell Death for Cancer Immunotherapy [J]. *Small Methods*, 2023, 7(5):2300354.
- [91] MILLER A R. Checkpoint inhibitors are a basic science-based, transformative new treatment for lung cancer [J]. *Respirology*, 2022, 28(2): 101-106.
- [92] GALLUZZI L, ARYANKALAYIL M J, COLEMAN C N, et al. Emerging evidence for adapting radiotherapy to immunotherapy [J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2023, 20(8): 543-557.
- [93] HERRERA F G, RONE C, OCHOA DE OLZA M, et al. Low-Dose Radiotherapy Reverses Tumor Immune Desertification and Resistance to Immunotherapy [J]. *Cancer Discovery*, 2022, 12(1): 108-133.
- [94] RAJEEV-KUMAR G, PITRODA S P. Synergizing radiotherapy and immunotherapy: Current challenges and strategies for optimization [J]. *Neoplasia*, 2023, 36:100867-100867.
- [95] SHI H, HAN L, ZHAO J, et al. Tumor stemness and immune infiltration synergistically predict response of radiotherapy or immunotherapy and relapse in lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Medicine*, 2021, 10(24): 8944-8960.
- [96] MANCINI F, ROSSI O, NECCHI F, et al. OMV Vaccines and the Role of TLR Agonists in Immune Response [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(12).
- [97] GERRITZEN M J H, MARTENS D E, WIJFFELS R H, et al. Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform [J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(5): 565-574.
- [98] CHEN X, LI P, LUO B, et al. Surface Mineralization of Engineered Bacterial Outer Membrane Vesicles to Enhance Tumor Photothermal/Immunotherapy [J]. *ACS Nano*, 2024, 18(2): 1357-1370.
- [99] WANG S, GUO J, BAI Y, et al. Bacterial outer membrane vesicles as a candidate tumor vaccine platform [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13:987419-987419.

攻读学位期间的研究成果

已发表：

1、 **Haidong Shen** , Surui Chen , Chonghai Zhang, Teng Liu , Yugui Tao* , Lin Hu* , Kai Yang*.Engineered delivery platform based on bacterial outer membrane vesicles for efficient labeling of ^{131}I and improved radio-immunotherapy. Chemical Engineering Journal 490 (2024) 151837.

致谢

光阴荏苒，岁月如歌，三年研究生时光转眼即逝，在我完成学业，离开校园之际，我谨向所有曾经在我学习生涯中给予我帮助和鼓励的人们致以最真诚的感谢。

首先，我衷心感谢我的导师杨凯教授，感谢您在我读研期间对我的悉心指导和教诲。您对科研的严谨以及对学术的热情深深地影响了我。在您的教导下，我不仅扩展了自己的科研思维，更懂得了为人处世的人生态度。感谢您对我的支持和栽培，我将永远铭记您的教诲。

其次我还要特别感谢陶玉贵老师以及课题组的各位老师。在我的学习和生活中，你们给予了我很多无私的帮助。在我研一最茫然的阶段，我永远不会忘记各位老师给予我的教诲和帮助。感谢课题组给我提供了优秀的学习平台，让我逐渐走出迷茫，找到新的方向。

在苏大学习的两年里，我非常感谢课题组的胡老师，裴佩哥，豪哥，腾姐对我的帮助。感谢你们，从我一无所知开始，在科研道路上耐心指导我，让我一点一滴的成长。

感谢你们在我研究生生涯中的陪伴和支持：李航航师兄、董婉师姐、桂婷师姐、吴雨佳师姐、梁杰师兄、陈孝露师兄、金伟豪师兄、贾良玉师兄、王善义师兄、王大俊师兄，海琳师姐、香子姐、赛哥、培子姐、顾子姐、睿哥、婷婷、渊哥、峻美、崇海、一凡、越哥、孟姐，董哥，冷哥，张师兄，姗姗，璐璐，崔婷，飞扬，红姐，剑飞，小龙，鸿甫等各位师弟师妹们。我们在一起学习、生活的点滴，将成为我最珍贵的回忆，愿你们前程似锦，归来仍是少年。其次感谢我的室友们：李兴、郜远、汪锡武，郑鹏，感谢这份来之不易的室友缘分，感谢相互羁绊一起走过的那段时光。

最后，感谢一路走来家人的支持，感谢悦悦和父母的陪伴，有你们真好！