



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

博士学位论文

Ph D DISSERTATION

卡介苗与焦亡溶瘤策略的构建及其在宠物肿瘤治疗中的应用初探

THE CONSTRUCTION OF BACILLUS CALMETTE-
GUERIN AND PYROPTOSIS BASED ONCOLYTIC
STRATEGY AND ITS PRELIMINARY APPLICATION IN
PET TUMOR TREATMENT

研究生: 鲁 愿

CANDIDATE: LU YUAN

导 师: 曹 罡 教授

SUPESADISOR: PROF.CAO GANG

专 业: 预防兽医学

MAJOR: PREVENTIVE VETERINARY
MEDICINE

研究方向: 病原分子生物学

SUPESADISOR: PATHOGENIC MOLECULAR
BIOLOGY

中国 武汉

WUHAN, CHINA

二〇二一年六月

JUNE, 2021

华中农业大学博士学位论文

卡介苗与焦亡溶瘤策略的构建及其在宠物肿瘤治疗中的应用初探

**The Construction of Bacillus Calmette-Guerin and Pyroptosis
Based Oncolytic Strategy and its Preliminary Application in
Pet Tumor Treatment**

研 究 生：鲁 愿

学 号：2018302010073

指 导 教 师：曹 昱 教 授

指 导 小 组：傅振芳 教 授

赵 凌 教 授

彭贵青 教 授

崔 旻 教 授

戴金霞 副研究员

何文波 讲 师

专业：预防兽医学

研究方向：病原分子生物学

获得学位名称：农学博士

获得学位时间：2021 年 6 月

华中农业大学大学动物科学技术学院 动物医学院

二〇二一年六月

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文 是否保密	否	如需保密, 解密时间	年 月 日
--------------	---	------------	-------

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知, 除了文中特别加以标注和致谢的地方外, 论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果, 也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料, 指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明, 并表示了谢意。

研究生签名: 鲁愿 时间: 2021 年 6 月 7 日

学位论文使用授权书

本人完全了解华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定, 即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本; 学校有权保存提交论文的印刷版和电子版, 并提供目录检索和阅览服务, 可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容, 为存在馆际合作关系的兄弟高校用户提供文献传递和交换服务, 同时本人保留在其他媒体发表论文的权力。

注: 保密学位论文(即涉及技术秘密、商业秘密或申请专利等潜在需要提交保密的论文)在解密后适用于本授权书。

学位论文作者签名: 鲁愿 导师签名: 

签名日期: 2021 年 6 月 7 日 签名日期: 2021 年 06 月 08 日

目录

摘 要.....	i
Abstract	iv
缩略语表 (Abbreviations)	vii
第一章 文献综述.....	1
1.1 宠物肿瘤.....	1
1.2 肿瘤免疫疗法.....	2
1.3 免疫筛查阻断疗法.....	6
1.3.1 免疫筛查位点阻断疗法的机遇与挑战	8
1.4 肿瘤免疫疗法新靶点——肿瘤微环境.....	9
1.4.1 肿瘤微环境概述.....	9
1.4.2 “加热”肿瘤微环境的方法	10
1.5 卡介苗.....	12
1.5.1 卡介苗概述.....	12
1.5.2 卡介苗的非特异性效应及应用	13
1.5.3 卡介苗在肿瘤免疫治疗中的应用	14
1.6 焦亡.....	16
1.6.1 焦亡概述.....	16
1.6.2 焦亡的分子机制.....	17
1.6.3 焦亡在肿瘤治疗中的应用	21
1.7 重组腺相关病毒载体.....	23
1.7.1 重组腺相关病毒载体概述.....	23
1.7.2 重组腺相关病毒载体的包装及纯化	26
1.7.3 重组腺相关病毒载体在肿瘤治疗中的应用	27
1.7.4 携带细胞毒性基因重组腺相关病毒载体的包装策略	28
1.8 三阴性乳腺癌.....	29
1.9 多形性胶质母细胞瘤.....	29
第二章 目的及意义.....	30
第三章 材料和方法.....	32
3.1 试验材料.....	32
3.1.1 菌株、细胞系、病毒和实验动物.....	32

3.1.2 载体与质粒.....	32
3.1.3 流式抗体及药物.....	33
3.1.4 工具酶及主要试剂.....	33
3.1.5 细胞培养及转染产品.....	34
3.1.6 主要的培养基、抗生素、缓冲液及其配制.....	34
3.1.7 实验设备.....	37
3.1.8 相关软件.....	38
3.2 实验方法.....	38
3.2.1 感受态细胞的制备.....	38
3.2.2 质粒构建.....	39
3.2.3 细胞及 BCG 培养.....	45
3.2.4 4T1-luc 及 C6-luc 细胞系的构建.....	46
3.2.5 三阴性乳腺癌小鼠模型构建.....	47
3.2.6 BCG 治疗对三阴性乳腺癌小鼠模型 TME 的影响.....	47
3.2.7 BCG 治疗三阴性乳腺癌小鼠模型.....	48
3.2.8 BCG 治疗对三阴性乳腺癌小鼠模型肿瘤转录组的影响.....	48
3.2.9 单倍剂量卡介苗和抗 PD-L1 联合治疗 TNBC 小鼠模型.....	56
3.2.10 三质粒包装系统包装 rAAV.....	57
3.2.11 杆状病毒包装系统包装 rAAV.....	58
3.2.12 rAAV 纯化及滴度测定.....	62
3.2.13 哺乳动物启动子的筛选.....	63
3.2.14 利用杆状病毒包装系统包装表达 GSDMD ^{NT} 的 oAAV-P1.....	64
3.2.15 利用三质粒包装系统包装表达 GSDMD ^{NT} 的 oAAV-P2.....	64
3.2.16 oAAV-P1 和 oAAV-P2 细胞实验.....	65
3.2.17 oAAV-P1 和 oAAV-P2 治疗 GBM 大鼠模型.....	66
3.2.18 oAAV-P2 治疗 TNBC 小鼠模型.....	68
3.2.19 oAAV-P2 联合抗 PD-L1 治疗 TNBC 小鼠模型.....	69
3.2.20 oAAV-P2 治疗 TNBC 裸鼠模型.....	70
3.2.21 rAAV 瘤内注射安全性实验.....	70
3.2.22 表达 GSDM ^{NT} 蛋白 oAAV 系统通用性验证.....	70
3.2.23 利用诱导型启动子包装表达 GSDMD ^{NT} 蛋白的 rAAV.....	71
3.2.24 oAAV-P2 在临床宠物肿瘤治疗中的应用.....	71

第四章 利用卡介苗靶向肿瘤微环境增强抗肿瘤免疫	72
4.1 卡介苗治疗增加了 TNBC 小鼠模型 TME 中浸润淋巴细胞数量	72
4.2 卡介苗治疗抑制 TNBC 小鼠模型肿瘤生长	74
4.3 卡介苗治疗上调了 TNBC 小鼠模型肿瘤内 PD-L1 的表达	76
4.4 单倍剂量卡介苗联合 PD-L1 阻滞剂可有效抑制 TNBC 小鼠模型肿瘤生长	78
4.5 本章小结	81
第五章 构建表达焦亡蛋白的重组腺相关病毒载体以增强抗肿瘤免疫	82
5.1 利用哺乳动物启动子包装 rAAV-GSDM ^{NT}	82
5.1.1 哺乳动物启动子 mCBA 的鉴定	82
5.1.2 哺乳动物启动子 mCBA 的分析	84
5.1.3 oAAV-P1 的包装	84
5.2 利用四环素诱导型启动子包装 rAAV-GSDM ^{NT}	86
5.3 利用 Cre/lox 重组酶系统包装 rAAV-GSDM ^{NT} (oAAV-P2)	88
5.4 oAAV-P1 和 oAAV-P2 可以使肿瘤细胞焦亡	89
5.5 oAAV-P1 和 oAAV-P2 诱导细胞焦亡的效率不同	91
5.6 oAAV-P1 治疗原位多形性胶质母细胞瘤大鼠模型	96
5.7 oAAV-P2 治疗原位多形性胶质母细胞瘤大鼠模型	98
5.7.1 oAAV-P2 在 GBM 大鼠模型中有很好的疗效	98
5.7.2 oAAV-P2 在 GBM 大鼠模型中可以暂时性打开血脑屏障	98
5.7.3 oAAV-P2 治疗双侧接种瘤的 GBM 大鼠模型	102
5.8 oAAV-P2 治疗原位三阴性乳腺癌小鼠模型	104
5.9 oAAV-P2 治疗 TNBC 小鼠模型肿瘤浸润淋巴细胞单细胞转录组分析	105
5.10 oAAV-P2 治疗 TNBC 裸鼠模型	105
5.11 oAAV-P2 治疗 TNBC 小鼠模型肿瘤转录组分析	109
5.12 oAAV-P2 治疗 TNBC 小鼠模型肿瘤浸润淋巴细胞流式分析	111
5.13 oAAV-P2 联合 PD-L1 阻断治疗 TNBC 小鼠模型	113
5.14 rAAV 瘤内注射的安全性评价	115
5.15 表达 GSDM ^{NT} 蛋白 oAAV 系统通用性验证	116
5.16 oAAV-P2 在临床宠物肿瘤治疗中的初步应用	118
第六章 讨论	119
6.1 利用卡介苗靶向肿瘤微环境增强抗肿瘤免疫	119
6.2 构建表达焦亡蛋白的重组腺相关病毒载体以增强抗肿瘤免疫	121

6.3 宠物肿瘤治疗前瞻	125
参考文献	127
致谢	141
附录	143

摘 要

肿瘤是威胁宠物生命健康的最主要病因之一，而宠物自发肿瘤与人类肿瘤发生、发展的机制相对保守，所以参照人类肿瘤的研究方法，开发宠物肿瘤治疗方法是非常必要的。以 PD-1/PD-L1 阻断为代表的免疫检查点阻断疗法已在临床肿瘤治疗中取得了喜人的进展，但也存在患者响应率低的应用局限。这可能与肿瘤所处的免疫抑制微环境有关。所以靶向肿瘤微环境 (Tumor Microenvironment, 简称 TME)，可能是突破免疫检查点阻断疗法应用局限的一种有效手段。卡介苗 (Bacille Calmette-Guerin, 简称 BCG) 和细胞焦亡，均已被证明可在肿瘤部位激起强烈的抗肿瘤免疫反应，是很好的重塑 TME 免疫状态的工具。目前 BCG 仅在临床非肌层浸润性膀胱癌的治疗中得到应用，而在其他肿瘤类型，例如三阴性乳腺癌 (Triple Negative Breast Cancer, 简称 TNBC) 中的应用和研究相对较少。此外，诱发焦亡的 gasdermin 蛋白家族 N 端结构域 (the N-terminal gasdermin domain, $GSDM^{NT}$) 具有很强的细胞毒性，常规的基因递送载体包装策略无法避免包装时 $GSDM^{NT}$ 的表达，因此很难获得携带 $GSDM^{NT}$ 的重组载体，所以目前缺乏将 $GSDM^{NT}$ 安全有效递送至肿瘤细胞的方法。本研究以 BCG 及焦亡为手段，构建了利用 BCG 或焦亡激活 TME 内抗肿瘤免疫的溶瘤策略，研究了 BCG 或焦亡对动物肿瘤模型的溶瘤机制，探索了 PD-L1 阻断剂与 BCG 或焦亡联合使用对 TNBC 小鼠模型的疗效，并进一步在宠物肿瘤临床治疗应用中进行了初步探索。

本研究主要取得了以下结果：

1 利用卡介苗靶向肿瘤微环境增强抗肿瘤免疫

1) 在 TNBC 小鼠模型中证实，单倍剂量 BCG 治疗能够上调肿瘤中趋化因子相关基因和抗肿瘤效应基因的表达，下调免疫抑制相关基因的表达，增加肿瘤浸润淋巴细胞数量，重塑 TME 免疫抑制状态；三倍剂量 BCG 治疗可以显著抑制肿瘤生长，但也存在小鼠体重下降的不良反应。

2) 利用 Bulk RNA-seq 和 qRT-PCR 证实，单倍剂量 BCG 治疗可以上调 TNBC 小鼠模型肿瘤中免疫筛查位点 PD-1 和 PD-L1 的表达；在此基础上开发了单倍剂量 BCG 联合 PD-L1 抑制剂的溶瘤方案，并在 TNBC 小鼠模型中证实该联合治疗方案具有显著溶瘤效果且没有体重下降的不良反应。

2 构建表达焦亡蛋白的重组腺相关病毒载体以增强抗肿瘤免疫

1) 筛选出一个在昆虫 Sf9 细胞中不表达的哺乳动物启动子 mCBA, 证实了以 mCBA 启动子驱动 $GSDM^{NT}$ 可以避免昆虫 Sf9 细胞的焦亡; 由此开发了利用哺乳动物启动子 mCBA 和杆状病毒/昆虫 Sf9 细胞包装表达焦亡蛋白重组腺相关病毒载体的策略, 并获得了可以介导肿瘤细胞焦亡的溶瘤腺相关病毒载体 P1 (Oncolytic AAV P1, 简称 oAAV-P1)。

2) 证实将 $GSDM^{NT}$ 基因序列翻转并在两侧加上两对反向 loxP 序列可避免 HEK 293T 细胞的焦亡, 加入 Cre 重组酶则又可恢复 $GSDM^{NT}$ 的表达从而介导焦亡, 由此开发了利用 Cre 重组酶和三质粒/HEK 293T 细胞包装表达焦亡蛋白重组腺相关病毒载体的策略, 并获得了可以介导肿瘤细胞焦亡的溶瘤腺相关病毒载体 P2 (Oncolytic AAV P2, 简称 oAAV-P2)。

3) 在肿瘤细胞及多形性胶质母细胞瘤 (Glioblastoma Multiforme, 简称 GBM) 大鼠模型中证实了 oAAV-P2 相对 oAAV-P1 有更好、更快的溶瘤效果, 并证实此种差异与昆虫 Sf9 细胞包装的 AAV 感染性弱及 mCBA 启动子活性相对弱均有关。

4) 在 GBM 大鼠模型中证实, oAAV-P2 介导的焦亡可以暂时性打开血脑屏障, 破坏 GBM 的 TME, 招募淋巴细胞杀伤肿瘤, 延长 GBM 大鼠模型的生存期; 在 TNBC 小鼠模型中证实, oAAV-P2 治疗可以上调肿瘤中趋化因子相关基因和抗肿瘤效应基因的表达, 下调免疫抑制相关基因的表达, 增加肿瘤内淋巴细胞浸润, 改变 TME 免疫抑制状态。

5) 通过对 TNBC 小鼠模型肿瘤 Bulk RNA-seq 分析, 发现 oAAV-P2 治疗可以增加肿瘤内免疫筛查位点 PD-L1 和 PD-L2 的表达, 由此开发了 oAAV-P2 联合 PD-L1 阻断剂的溶瘤方案, 并在 TNBC 小鼠模型进行了验证, 证实了该联合方案具有很好的肿瘤治疗效果, 可显著抑制 TNBC 小鼠模型肿瘤生长。

本研究以 TME 为靶点, 开发了 BCG 联合 PD-L1 阻断剂的溶瘤方案, 该方案可有效治疗 TNBC, 为宠物临床发病率较高的乳腺癌提供了有效治疗方案; 同时本研究构建了两种表达焦亡蛋白重组腺相关病毒的包装策略, 获得了具有溶瘤效果的 oAAV-P1 和 oAAV-P2; 且这两种包装策略具有良好的扩展性和安全性, 也可用于其他毒性蛋白的重组腺相关病毒载体的包装, 为靶向 TME 的宠物肿瘤治疗提供了更多的备选工具。

关键词：宠物肿瘤；肿瘤免疫治疗；肿瘤微环境；卡介苗；焦亡；重组腺相关病毒；程序性死亡受体-配体 1

Abstract

Tumors have become one of the most important causes that threaten the health of pets, and the mechanisms of the occurrence and development of spontaneous pet tumors and human tumors are relatively conservative. Therefore, it is urged to develop pet tumor treatment methods based on the research of human tumors remedies. Immune checkpoint blocking therapy represented by PD-1/PD-L1 blockade has made surprising progress in clinical tumor treatment. However, some restrictions have limited the application of the therapy, including low patient response rates. This may be related to the state of immunosuppression in the tumor microenvironment (TME). Therefore, tumor microenvironment may be a potential target to overcome the limitations of immune checkpoint blocking therapy. Both Bacille Calmette-Guerin (BCG) and pyroptosis have been proven to provoke a strong anti-tumor immune response at the tumor site, which can reshape the immune status of tumor microenvironment. However, the only widely used clinical application of BCG is in non-muscular invasive bladder cancer, while it has relatively few clinical applications in other tumor types, such as triple negative breast cancer (TNBC). In addition, it is challenging to efficiently produce and deliver *GSDM^{NT}* into cancer cells due to its high intracellular toxicity to different cells and even to bacteria. In this study, BCG or pyroptosis were applied to construct an oncolytic strategy to target TME, the oncolytic mechanism of BCG or pyroptosis to animal tumor models was studied, meanwhile the effect of the combined use of BCG or pyroptosis and PD-L1 inhibitor on TNBC mouse models was estimated. At the same time, preliminary explorations have been made in the clinical application of pet tumors.

The main results of this research are as follows:

1 Targeting tumor microenvironment with BCG vaccine to enhance anti-tumor immunity.

1) It has been confirmed in the TNBC mouse model that single-dose BCG treatment can up-regulate the expression of chemokine-related genes and anti-tumor effect genes, down-regulate the expression of immunosuppressive-related genes, meanwhile increasing

the number of tumors infiltrating lymphocytes, furthermore reshaping TME Immunosuppressive state; triple-dose BCG treatment can significantly inhibit tumor growth, but there are also adverse effects of weight loss in mice.

2) It has been confirmed by Bulk RNA-seq and qRT-PCR that single-dose BCG treatment can up-regulate the expression of PD-1 and PD-L1 in the tumor of TNBC mouse model. On this basis, an oncolysis program single-dose BCG combined with PD-L1 inhibitor was developed, and confirmed to possess a significant oncolytic effect and no adverse effects of weight loss on TNBC mouse model.

2 Construction of recombinant Adeno-associated Virus vector expressing pyroptosis protein to enhance anti-tumor immunity.

1) A mammalian promoter mCBA that is not expressed in insect Sf9 cells was screened out, and it was confirmed that driving *GSDM^{NT}* with mCBA promoter can avoid the pyroptosis of insect Sf9 cells, thus developing a strategy of packaging recombinant adeno-associated virus vector expressing *GSDM^{NT}* using mammalian promoter mCBA and baculovirus/insect Sf9 cells. The oncolytic adeno-associated virus vector P1 (Oncolytic AAV P1, oAAV-P1) was also obtained, which can mediate the pyroptosis of tumor cells.

2) It has been confirmed that reversing the *GSDM^{NT}* sequence and adding two pairs of reverse loxP sequences on both sides can avoid the pyroptosis of HEK 293T cells, and the addition of Cre recombinase can restore the expression of *GSDM^{NT}* and mediate the pyroptosis, thus developing a strategy of packaging recombinant adeno-associated virus vector expressing *GSDM^{NT}* using Cre recombinase and three plasmids/HEK 293T cells. The oncolytic adeno-associated virus vector P2 was obtained (Oncolytic AAV P2, abbreviated as oAAV- P2).

3) In some tumor cells and the rat model of Glioblastoma Multiforme (GBM), it has been confirmed that oAAV-P2 has a better and faster oncolytic effect than oAAV-P1. It has been explored in this study that this phenomenon is related to the weak infectivity of AAV packaged by insect Sf9 cells and the relatively weak activity of mCBA promoter.

4) In the GBM rat model, it has been confirmed that oAAV-P2-mediated pyroptosis can temporarily open the Blood-Brain Barrier and destroy the TME of GBM, recruit

lymphocytes to kill tumors, consequently prolong the survival time of the GBM rat; and in the TNBC mice model, oAAV-P2 therapy result in up-regulation of the chemokine-related genes and anti-tumor effect genes expression, meanwhile downregulates the expression of immunosuppression-related genes, increase lymphocyte infiltration in tumors, and change the TME immunosuppressive state.

5) Through Bulk RNA-seq analysis of TNBC mouse model tumors, it can be observed that oAAV-P2 treatment can increase the expression of PD-L1 and PD-L2 in tumors. Based on the phenomenon we developed an oncolytic program of oAAV-P2 combined with PD-L1 inhibitor. It has been verified in a TNBC mouse model, which proved that the program has a good tumor treatment effect and can significantly inhibit tumor growth in a TNBC mouse model.

This study selected TME as the target and developed an oncolytic program of BCG combined with PD-L1 blocker. This program can effectively treat TNBC and provide an effective remedy for breast cancer with high clinical incidence in pets. Meanwhile, this study constructed two packaging strategies for recombinant adeno-associated viruses expressing GSDM^{NT}, and obtained oAAV-P1 and oAAV-P2 with promising oncolytic effects. Moreover, these two packaging strategies have good scalability and safety, and can also be used for the packaging of recombinant adeno-associated virus vectors of other toxic proteins, providing more alternative tools for the treatment of pet tumors targeting TME.

Key words: Pet tumor; Tumor immunotherapy; Tumor Microenvironment (TME); Bacille Calmette-Guerin (BCG); pyroptosis; recombinant Adeno-associated Viruses (rAAV); Programmed Cell Death-Ligand 1 (PD-L1)

缩略语表 (Abbreviations)

缩略词	英文	中文
Ad5	Adenoviral Vector 5	5 型腺病毒载体
BBB	Blood Brain Barrier	血脑屏障
BCG	Bacille Calmette-Guerin	卡介苗
CAR-T	Chimeric antigen receptor T cells	嵌合抗原受体 T 细胞
CFUs	colony forming units	菌落形成单位
CPIs	Checkpoint Inhibitors	筛查点抑制剂
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4	细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4
ddH ₂ O	double distilled H ₂ O	双蒸水
DEGs	Differentially Expressed Genes	差异表达基因
ER	Estrogen Receptor	雌激素受体
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein	增强绿色荧光蛋白
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
FDA	Food and Drug Administration	美国食品药品监督管理局
GBM	Glioblastoma Multiforme	多形性胶质母细胞瘤
GIVCS	The Global Initiative for Veterinary Cancer Surveillance	全球兽医肿瘤监测倡议
GSDM ^{NT}	The N-terminal gasdermin domain	gasdermin 蛋白家族 N 端结构域, 本文命名为焦亡蛋白
<i>GSDM</i> ^{NT}	The gene of N-terminal domain of the gasdermin protein family	焦亡蛋白基因
HER-2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2	人表皮生长因子受体 2
HSV-1	Herpes simplex virus-1	1 型单纯疱疹病毒
IARC	International Agency for Research on Cancer	国际癌症研究机构
LB	luria-bertani	LB 培养基
MSI-H	Microsatellite instability-high	高度微卫星不稳定性

MDSC	Myeloid-derived suppressor cells	骨髓源性抑制细胞
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death	细胞死亡命名委员会
NMIBC	Non-Muscle Invasive form of Bladder Cancer	非肌肉浸润性膀胱癌
NMPA	National Medical Products Administration	中国国家药品监督管理局
oAAV-P1	Oncolytic AAV P1	溶瘤腺相关病毒 P1
oAAV-P2	Oncolytic AAV P2	溶瘤腺相关病毒 P2
OVs	Oncolytic virus	溶瘤病毒
PD-1	Programmed cell Death protein 1	程序性死亡受体 1
PD-L1	Programmed Cell Death-Ligand 1	程序性死亡配体 1
PD-L2	Programmed Cell Death-Ligand 2	程序性死亡配体 2
PR	Progesterone Receptor	孕激素受体
rAAV	recombinant Adeno-associated Viruses	重组腺相关病毒
rAAV-GSDM ^{NT}	recombinant adeno-associated viruses expressing GSDM ^{NT}	表达焦亡蛋白的重组腺相关病毒
TB	Tuberculosis	结核病
Treg	Regulatory T cells	调节性 T 细胞
TNBC	Triple-Negative Breast Cancer	三阴性乳腺癌
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	血管内皮生长因子

第一章 文献综述

1.1 宠物肿瘤

随着宠物疫苗的普及，兽医水平和动物福利的提升，犬、猫等宠物的“老龄化”问题逐步被重视。“老龄化”的宠物也会像人类一样，患癌的几率会极大提升。据美国兽医协会统计，大约 25%的宠物犬在一生中会罹患肿瘤，而十岁以上的老年犬患肿瘤几率会提升至 50%。澳大利亚伴侣动物肿瘤登记处(Australian Companion Animal Registry of Cancer)的数据表明，超过三分之一的家犬会患上肿瘤。

表 1-1 犬肿瘤流行病学数据

Table 1-1 Epidemiological data of canine tumors

数据来源	统计年份	统计数量	肿瘤类型占比	推测种群发病只数（10 万只/年）
瑞士犬癌登记处(Graf et al 2018)	2008-2013 年	11740 例患癌犬	肥大细胞肿瘤（16.35%）、脂肪瘤（12.47%）、毛囊肿瘤（12.34%）、组织细胞瘤（12.10%）、软组织肉瘤（10.86%）和黑素细胞瘤（8.63%）	肥大细胞肿瘤（60.3）、脂肪瘤（46.0）、毛囊肿瘤（45.5）、组织细胞瘤（44.6）、软组织肉瘤（40.1）和黑素细胞瘤（31.8）
墨西哥首都埃斯塔多斯（Bronden et al 2007）	2002-2016 年	393 例患癌犬	皮肤肿瘤（59.0%）、生殖道（16.3%）、乳腺（12.5%）、消化道（4.6%）、淋巴结（3.6%）、骨骼肌（2.5%）、呼吸道（1.3%）和内分泌肿瘤（0.2%）	-
意大利皮埃蒙特犬癌登记处(Baioni et al 2017)	2001-2008 年	1175 例患癌犬	-	恶性肿瘤（804），良性肿瘤（897 次）

目前，肿瘤已成为犬猫等宠物最常见的致死病因，犬中肿瘤导致的死亡比例在

15-30%，而在猫中达到了 26%(Bronden et al 2007)。鉴于肿瘤已成为威胁宠物健康的主要病因之一，葡萄牙波尔图大学和巴西圣保罗大学的研究人员在 2018 年发起了全球兽医肿瘤监测倡议（The Global Initiative for Veterinary Cancer Surveillance，简称 GIVCS），并于 2020 年召开了第一次会议(Pinello et al 2020)。GIVCS 的成立意味着宠物肿瘤研究已引起兽医研究人员的重视，也表明宠物肿瘤研究进入了全球合作状态。

目前宠物肿瘤临床治疗方法多是采取手术切除和化疗，但这些治疗方法预后效果差，易复发。而肿瘤免疫疗法已在人类肿瘤中取得了很好效果，所以研究肿瘤免疫疗法可以为宠物肿瘤的治疗提供更多的备选方案。

1.2 肿瘤免疫疗法

据国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer，简称 IARC)公布数据显示，2020 年全球共有约 996 万癌症死亡病例，且新发将近两千万例癌症病例，目前癌症已成为人类第二大死亡病因。癌症发生、发展及难以治愈的最主要原因之一是肿瘤细胞存在逃避机体免疫系统识别及杀伤的机制（图 1），因此以恢复及增强机体免疫系统对肿瘤细胞识别及杀伤能力为目的的肿瘤免疫疗法（Cancer Immunotherapy）是肿瘤治疗的一种重要手段(Helmy et al 2013)。

医疗界探索肿瘤与免疫之间的关系由来已久。早在 18 世纪就有记录证明某些癌症患者在感染病原发烧后癌症得到了一定程度的缓解(Wiemann et al 1994)。1808 年，路易十八的私人医生 Alibert 博士通过给自己注射肿瘤细胞来抵抗癌症，这是利用激活免疫系统来治疗肿瘤的首次探索(Ullenhag 2018)。而后，纽约外科医生 William B. Coley 在 1893 年通过观察到一位肿瘤患者在两次感染化脓性链球菌后肿瘤痊愈的现象，开启了利用链球菌(又被称为 Coley's toxin)治疗肉瘤的开拓性工作(Coley 1991)。在随后的 43 年里，Coley 利用 Coley's toxin 对大约 900 例癌症患者进行了治疗，且治愈率达到了 10%，这为后续卡介苗（Bacille Calmette-Guérin，简称 BCG）在膀胱癌中的临床应用奠定了一定基础(Parish 2003)。随着更深入的研究，研究人员对免疫系统有了进一步的了解。

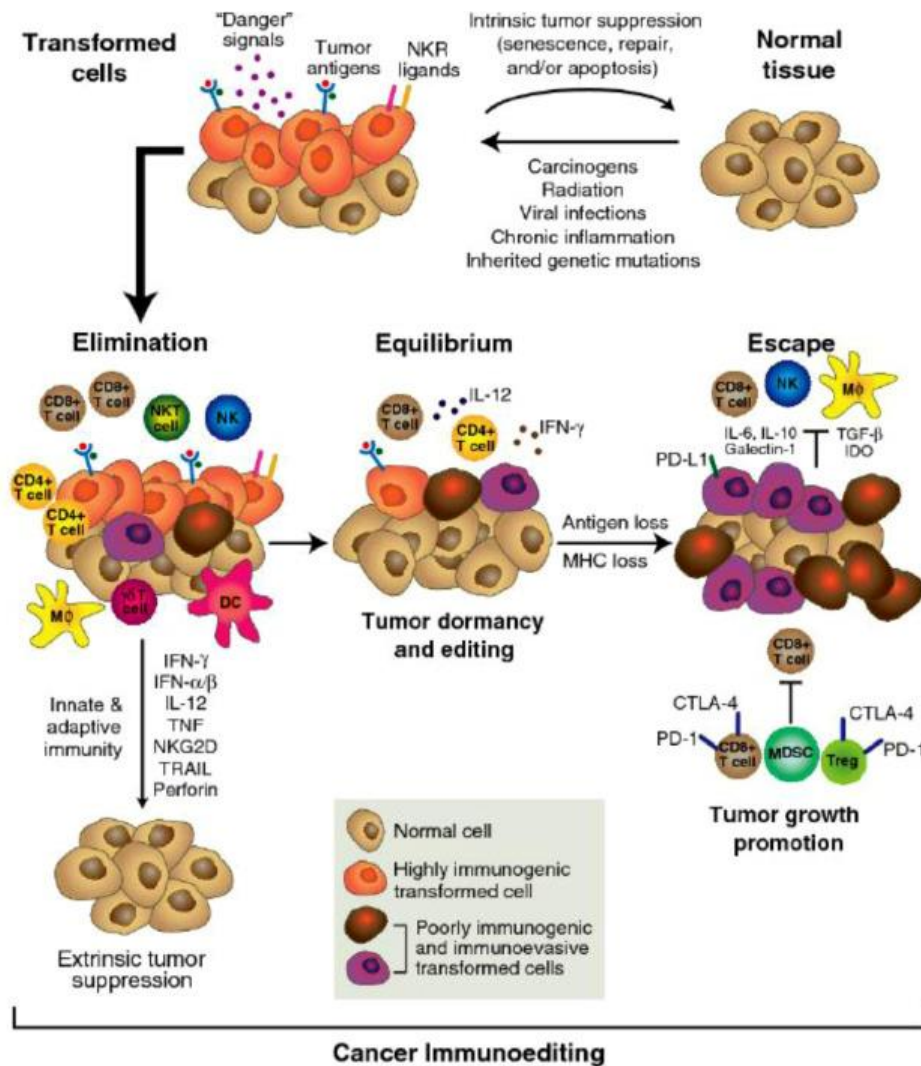


图 1-1. 肿瘤的免疫监测和免疫编辑(Schreiber et al 2011)

Fig. 1-1. Cancer immunosurveillance and immunoediting(Schreiber et al 2011)

在 20 世纪 90 年代,人们发现在正常情况下,机体免疫系统存在着微妙的平衡,既可以在感染时增强免疫杀伤病原,又不至于反应过强而损伤自身组织,所以有研究人员猜想起杀伤病原作用的 T 细胞应该存在“加速(Accelerators)”和“刹车(Brakes)”的机制(Guo 2018),可以在感染病原时启动“加速”机制杀灭病原,但同时在非病原感染部位或病原清除后,启动“刹车”机制避免对正常组织的损伤。随后 T 细胞表面受体——程序性死亡受体 1 (Programmed cell Death protein 1, 简称 PD-1) 和细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4, 简称 CTLA-4) 等免疫筛查位点的相继发现及功能解析证实了上述猜想。

1992 年日本京都大学 Tasuku Honjo 教授在活化的 T 细胞表面发现了 PD-1(Ishida et al 1992), 其在随后的研究中发现, PD-1 就是 T 细胞“刹车”的分子机制之一, 当

PD-1 与其配体程序性死亡配体 1 (PD-L1) 结合后, 可抑制 T 细胞增殖及细胞因子分泌, 从而对免疫系统起到负调控作用(Freeman et al 2000)。而肿瘤细胞表面就存在 PD-L1, 这暗示肿瘤细胞可能通过 PD-1/PD-L1 信号通路对免疫细胞进行负调控, 进而逃避免疫系统的杀伤, 这也提示可以通过阻断 PD-1/PD-L1 通路来恢复免疫系统对肿瘤的清除能力。21 世纪初, 华裔科学家陈列平教授及 Tasuku Honjo 教授分别在动物肿瘤模型中利用 PD-L1 抗体(Strome et al 2003)和 PD-1 抗体(Iwai et al 2005)阻断 PD-1/PD-L1 通路, 并在实验中观察到了动物肿瘤的消除, 这为后续 PD-1/PD-L1 阻断疗法在临床肿瘤免疫治疗的广泛应用奠定了基础。

1996 年, 美国科学家 James P. Allison 证实阻断 T 细胞“刹车”机制的另一种分子 CTLA-4, 也可以解锁 T 细胞的抗肿瘤能力(Kwon et al 1997; Leach et al 1996), 而基于此的 CTLA-4 抗体药物 Ipilimumab, 也在 2011 年获得美国 FDA 批准用于晚期黑色素瘤的治疗, 这也是第一个获得批准上市的免疫筛查位点阻断药物。基于上述研究成果, James P. Allison 和 Tasuku Honjo 在 2018 年获得了诺贝尔医学及生理学奖。

表 1-2 NMPA 批准的免疫疗法总结

Table 1-2 Summary of NMPA-approved immunotherapies

机制	批准药物	研发公司	适应症(批准年月)
溶瘤病毒	H101	上海三维	晚期鼻咽癌(2005)
抗 PD1	特瑞普利单抗	君实生物	黑色素瘤(2018 年 12 月)
	替雷利珠单抗	百济神州	霍奇金淋巴瘤(2019 年 12 月)
	信迪利单抗	信达生物	霍奇金淋巴瘤(2018 年 12 月)
	卡瑞利珠单抗	恒瑞医保	霍奇金淋巴瘤(2019 年 5 月)
	纳武单抗(进口)	百时美施贵宝	非小细胞肺癌(2018 年 6 月)
	派姆单抗(进口)	默沙东	黑色素瘤、非小细胞肺癌(2018 年 7 月)
抗 PD-L1	度伐利尤单抗(进口)	阿斯利康	非小细胞肺癌(2019 年 12 月)
	阿替利珠单抗(进口)	罗氏	小细胞肺癌(2020 年 2 月)

表 1-3 FDA 批准的免疫疗法总结

Table 1-3 Summary of FDA-approved immunotherapies

机制	批准药物	适应症（批准年份）
抗 CTLA-4	Ipilimumab	黑色素瘤（2011）、肾细胞癌（2018）、MSI-H 或 dMMR 结直肠癌（2018）、肝细胞癌（2020）
抗 PD-1	Nivolumab	黑色素瘤（2014）、非小细胞肺癌（2015）、肾细胞癌（2015）、霍奇金淋巴瘤（2016）、头颈部鳞状细胞癌（2016）、泌尿道上皮癌（2017）、MSI-H 或 dMMR 大肠癌（2017）、肝细胞癌（2017）、小细胞肺癌（2018）
	Cemiplimab	鳞状上皮细胞癌（2018）
	Pembrolizumab	黑色素瘤（2014）、非小细胞肺癌（2015）、头颈部鳞状细胞癌（2015）、霍奇金淋巴瘤（2017）、泌尿道上皮癌（2017）、MSI-H 癌（2017）、胃癌（2017）、宫颈癌（2018）、原发性纵隔大 B 细胞淋巴瘤（2018）、默克尔细胞癌（2018）、肾细胞癌（2019）、食道癌（2019）、肝细胞癌（2019 年）、子宫内膜癌（2019 年）
抗 PD-L1	Atezolizumab	泌尿道上皮癌（2016）、非小细胞肺癌（2016）、三阴性乳腺癌（2018）、小细胞肺癌（2019）
	Avelumab	默克尔细胞癌（2017）、尿道上皮细胞癌（2017）、肾癌（2019）
	Durvalumab	上皮细胞癌（2017）、非小细胞肺癌（2018）、小细胞肺癌（2020）
CAR-T 疗法	Axicabtagene ciloleucel	大型 B 细胞淋巴瘤（2017）
	Tisagenlecleucel	B 细胞前体急性淋巴细胞白血病（2017）、大 B 细胞淋巴瘤（2018）
细胞因子调节	Interferon Alfa- 2B	红细胞白血病（1986）、艾滋病相关的卡波济肉瘤（1988）、黑色素瘤（1995）、滤泡性淋巴瘤（1997）
	Interleukin-2	肾细胞癌（1992）、黑色素瘤（1998）
细胞疫苗	Sipuleucel-T	前列腺癌（2010）
溶瘤病毒	T-VEC	黑色素瘤（2015）

基于恢复及增强机体抗肿瘤免疫力的原则，目前临床肿瘤免疫疗法可以总结为以下五个方向：（1）免疫筛查阻断疗法；（2）肿瘤疫苗；（3）过继性 T 细胞疗法嵌合抗原受体 T 细胞（Chimeric antigen receptor T cells，简称 CAR-T）；（4）溶瘤病毒疗法；（5）细胞因子。截至 2020 年 6 月，针对肿瘤免疫治疗药物，中国国家药品监督管理局（National Medical Products Administration，简称 NMPA）共计批准上市了 9 种（表 1-2），美国 FDA 共计批准上市了 13 种（表 1-3）。

细胞因子药物，例如在 20 世纪 70 年代被视为癌症治疗重大进展的肿瘤坏死因子（Tumor Necrosis Factor，简称 TNF）以及 1991 年被美国 FDA 批准用于治疗转移性肾癌的白细胞介素 2（Interleukin 2，简称 IL-2），因为具有明显的毒副作用，如发热、寒战、肺水肿，被逐步淘汰出肿瘤免疫治疗行列(Abbott et al 2019)。肿瘤疫苗主要是通过增加肿瘤抗原的呈递，来增强适应性抗肿瘤反应，然而由于肿瘤细胞的高度特异性、肿瘤抗原的多样性，使得肿瘤疫苗受众面非常小，更适合癌症患者个性化治疗，但这也使得肿瘤疫苗研发投入无法得到有效回报，从而制约了肿瘤疫苗的发展(Velcheti et al 2016)。溶瘤病毒疗法是利用能够在肿瘤细胞中优先复制的天然或者工程化的病毒感染肿瘤细胞，一方面直接发挥溶瘤作用，另一方面增强内源性抗肿瘤免疫反应(Velcheti et al 2016)，然而溶瘤病毒自身免疫原性较强，很容易被机体免疫系统清除，且溶瘤病毒介导的肿瘤细胞死亡主要是凋亡，不能引起很强烈的抗肿瘤免疫力，所以目前也仅有两种溶瘤病毒药物被批准上市。2013 年 CAR-T 细胞疗法的临床试验数据表明，其在急性 B 淋巴细胞白血病（B-cell acute lymphoblastic leukemia）、儿童急性淋巴细胞白血病及侵袭性非霍奇金淋巴瘤（Aggressive non-Hodgkin's lymphoma）患者中，治疗效率高达 90%(Grupp et al 2013; Kochenderfer et al 2015)，但也因存在细胞炎症因子风暴等副作用及对实体瘤效果差等原因，使得 CAR-T 细胞疗法在临床中不如免疫筛查阻断疗法应用广泛。

1.3 免疫筛查阻断疗法

免疫筛查位点阻断疗法主要是利用筛查点抑制剂（Checkpoint Inhibitors，简称 CPIs）对免疫筛查位点进行封锁，从而恢复被抑制的抗肿瘤细胞免疫力。针对不同的免疫筛查位点，有不同的 CPIs。目前已被批准上市的 CPIs 主要集中在 CTLA-4 抗体和 PD-1/PD-L1 抗体上。其中 CTLA-4 抗体仅有一款 CPI，即 2011 年被美国 FDA

批准上市的由百时美施贵宝研发的 CTLA-4 单克隆抗体 Ipilimumab (商品名为 Yervoy), 其可与 CTLA-4 结合, 从而阻断 CTLA-4 与 CD80 和 CD86 的结合, 促进 T 细胞增殖、激活, 增强抗肿瘤免疫能力, 目前 Ipilimumab 主要被美国 FDA 批准用于黑色素瘤、晚期肾癌、MSI-H 或 dMMR 结直肠癌及肝细胞癌的治疗(Murciano-Goroff et al 2020), Ipilimumab 在中国处于三期临床试验中, 尚未被批准上市。

PD-1/PD-L1 抗体是目前获得批准上市 CPIs 最多的免疫筛查位点阻断疗法, 且又可以分为抗 PD-1 和抗 PD-L1 两类。抗 PD-1 获得 NMPA 批准上市的 CPIs 共有 6 种, 其中有 4 种是国产药物, 包含特瑞普利单抗(君实生物)、替雷利珠单抗(百济神州)、信迪利单抗(信达生物)、卡瑞利珠单抗(恒瑞医保), 另有两种进口药物为纳武单抗(阿斯利康)和派姆单抗(罗氏), 批准适应症主要集中在霍奇金淋巴瘤、黑色素瘤和非小细胞肺癌。另外一种适应于鳞状上皮细胞癌的抗 PD-1 药物 Cemiplimab, 虽然没有获得 NMPA 批准上市但被 FDA 准予上市。相较于 NMPA, FDA 对纳武单抗(阿斯利康)、派姆单抗(罗氏)批准用于多种适应症, 这种差异与我国筛查点抑制剂起步较晚有关。抗 PD-L1 的 CPIs, 目前没有国产药物, 但度伐利尤单抗(阿斯利康)和阿替利珠单抗(罗氏)已被 NMPA 批准用于我国非小细胞肺癌和小细胞肺癌患者的治疗, 另有一种药物 Avelumab 被 FDA 批准用于默克尔细胞癌、尿道上皮细胞癌和肾细胞癌。

除了 CTLA-4 和 PD-1/PD-L1 外, TIGIT、LAG-3、VISTA、TIM-3 等免疫筛查位点也相继被开发用于肿瘤免疫治疗(图 1-2)。TIGIT 是 T 细胞免疫球蛋白 ITIM 结构域(T-cell immunoglobulin and ITIM domain)的英文简称, 其表达在 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞和 NK 细胞上, 是 T 细胞共抑制受体, 阻断 TIGIT, 可增加 NK 细胞的杀伤能力、促进 CD4⁺T 细胞活化及树突状细胞细胞因子的分泌(Chan et al 2014)。临床前研究证实, 共阻断 TIGIT 和 PD-1 比只阻断 PD-1 有更好的抗肿瘤免疫力(Johnston et al 2014)。研究表明在癌症发生和进展过程中, 肿瘤细胞利用淋巴细胞激活基因 3 (Lymphocyte activation gene 3, 简称 LAG-3) 信号通路, 抑制 I 型辅助性 T 淋巴细胞的激活, 从而逃避免疫监视(Huard et al 1995)。T 细胞活化的 V 结构域 Ig 抑制因子 (V-domain Ig-containing suppressor of T-cell activation, 简称 VISTA) 是 PD-1 的一种同源物, 在小鼠肿瘤模型中阻断 VISTA 可增加肿瘤微环境内 T 细胞浸润(Le Mercier et al 2014)。T 淋巴细胞免疫球蛋白黏蛋白 3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3, 简称 TIM-3) 在肿瘤内的高表达往往与预后不良相关(Zhang et al 2017),

阻断 TIM-3 可增加抗 PD-1 的治疗效果(Hahn et al 2017)。

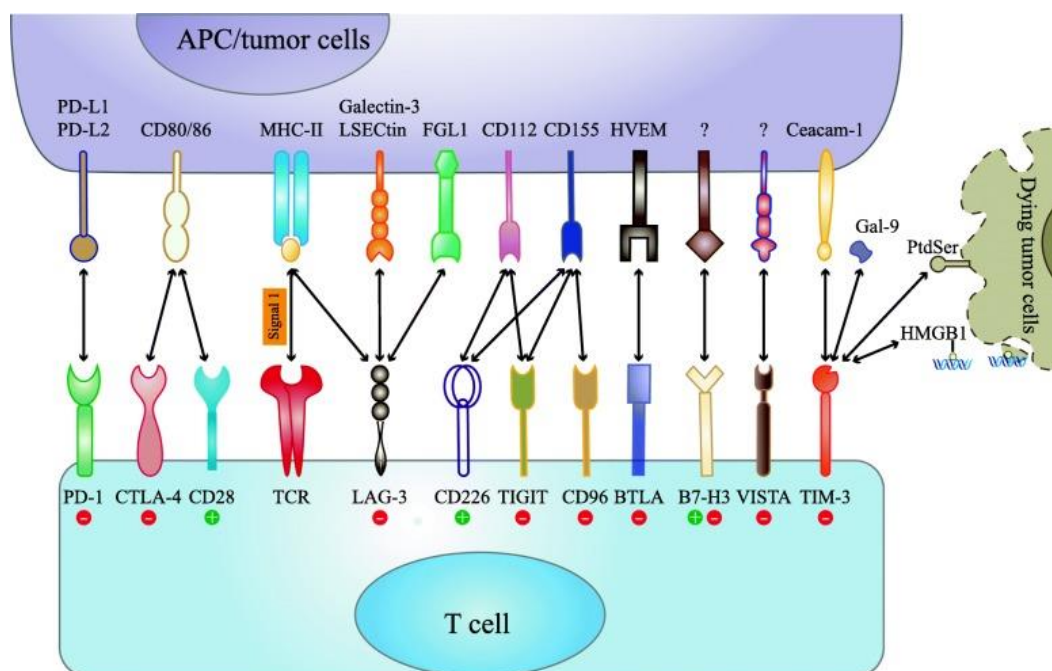


图 1-2. 当前和新兴的免疫检查点受体及其各自的配体(Qin et al 2019)

Fig. 1-2. Current and emerging immune checkpoint receptors and their respective ligands(Qin et al 2019)

1.3.1 免疫筛查位点阻断疗法的机遇与挑战

自 20 世纪末免疫筛查位点 CTLA-4 和 PD-1 被发现以来, 免疫筛查位点阻断疗法吸引了大量科研力量及资本市场的投入, 仅针对抗 PD-1/PD-L1 药物的研发项目就超过 2000 项(Tang et al 2018)。目前, 免疫筛查位点阻断疗法已和外科手术、化疗、放疗、分子靶向一起成为了非小细胞肺癌、晚期黑色素瘤、尿路上皮癌、默克尔细胞癌、难治性霍奇金淋巴瘤、肝细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、三阴性乳腺癌、肾癌、胃癌及高度微卫星不稳定性 (Microsatellite instability-high, 简称 MSI-H) 肿瘤等多个癌种治疗的标准方法(Hahn et al 2017)。然而多个临床试验研究表明, 免疫筛查位点阻断疗法仅对少数肿瘤患者有明显疗效(Lu et al 2015; Yun et al 2016), 后续研究发现, 这种个体差异性不仅与肿瘤内在因素, 例如 PD-L1 表达情况(Aguiar et al 2016)、肿瘤突变负荷(Samstein et al 2019)及肿瘤抗原递呈不足(Kalbasi et al 2018)有关, 更与肿瘤细胞和其他细胞相互作用形成的复杂动态的肿瘤微环境有关, 所以肿瘤微环境, 可能是免疫筛查位点阻断疗法及其他肿瘤免疫疗法获得进一步突破的靶点(Murciano-Goroff et al 2020)。

1.4 肿瘤免疫疗法新靶点——肿瘤微环境

1.4.1 肿瘤微环境概述

肿瘤微环境 (Tumor microenvironment, 简称 TME) 是肿瘤细胞所在的一个高度复杂但有组织的动态组织群 (Dynamic Community)。除肿瘤细胞外, TME 还包含三种成分 (图 1-3), 一种是由与肿瘤相关的间质基质细胞、纤维细胞、周细胞、少量脂肪细胞及血液和淋巴管网络组成的基质细胞群, 一种是与肿瘤相关的免疫细胞群 (主要包含 T 细胞、B 细胞、NK 细胞及巨噬细胞), 还有一种是包裹整个肿瘤的细胞外基质 (Extracellular Matrix, 简称 ECM), 同时其内还包含大量的外泌体 (Exosomes) (Roma-Rodrigues et al 2019)。研究表明, TME 内肿瘤细胞与其他成分的相互串扰和协同作用 (Reciprocal Crosstalk and Cooperative Interactions) 共同决定了肿瘤的发生、发展、增殖及侵袭情况 (Hanahan et al 2011)。

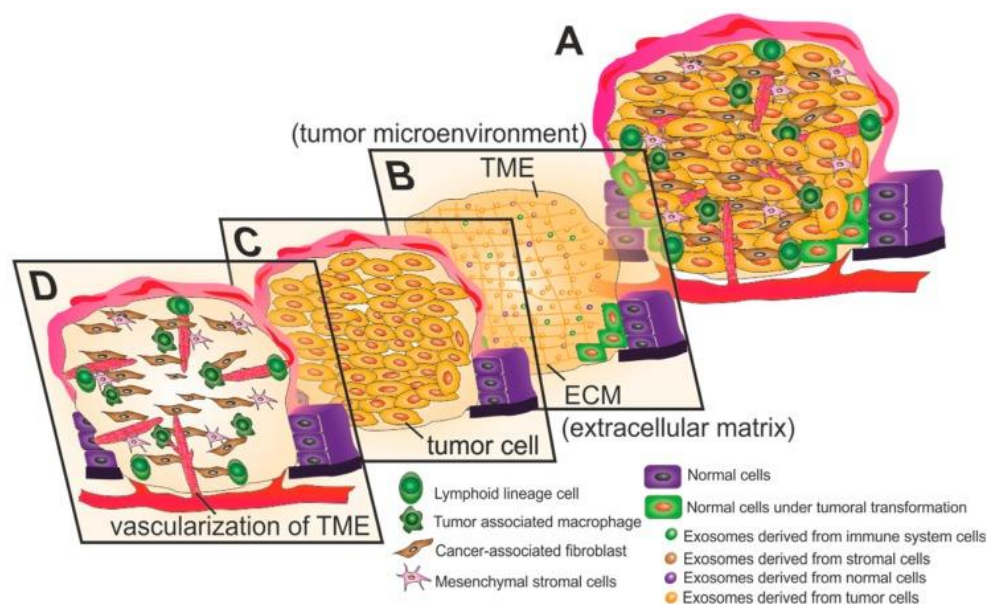


图 1-3. 肿瘤微环境 (TME) 的解剖图 (Hanahan et al 2011)

Fig. 1-3. Anatomy of the tumor microenvironment (TME) (Hanahan et al 2011)

肿瘤微环境的免疫表型 (Immune Phenotypes) 是由其内的免疫细胞群决定, 具体可分为三种类型: 炎症型 (Inflamed)、免疫排除型 (Immune-excluded) 及免疫沙漠型 (Immune desert) (Chen et al 2017)。其中含有炎症型的 TME 的肿瘤, 即“热”肿瘤, 因其内富含分泌细胞因子能力的 $CD4^+$ T 淋巴细胞、细胞杀伤能力的 $CD8^+$ T 淋巴细胞和髓样细胞, 所以对以 PD-1/PD-L1 阻断为代表的肿瘤免疫疗法有更好的

反应(Pardoll 2012)。而含有免疫排除型或免疫沙漠型 TME 的肿瘤,即“冷肿瘤”,前者其内存在的免疫细胞大部分在细胞外基质外,无法发挥应有的抗肿瘤能力(Joyce et al 2015),后者其内大部分免疫细胞为调节性 T 细胞(Regulatory T cells,简称 Treg)、骨髓源性抑制细胞(Myeloid-derived suppressor cells,简称 MDSC)及 M2 巨噬细胞等免疫抑制性细胞亚群,而有肿瘤杀伤能力的 CD8⁺T 淋巴细胞、NK 细胞等数量很少,所以含有这两种类型 TME 的肿瘤均对肿瘤免疫治疗不敏感。因而,采取有效手段,在免疫排除型或免疫沙漠型的 TME 中“放一把火(Lighting a Fire)”,“唤醒(Wakes Up)”具有“免疫昏迷性(Immunological Coma)”的肿瘤,不仅可以增强机体自身抗肿瘤免疫力,也可以在一定程度上促进免疫筛查位点阻断等免疫疗法的治疗效果(Achard et al 2018)。

1.4.2 “加热”肿瘤微环境的方法

“加热”肿瘤微环境,即将免疫排除型或免疫沙漠型 TME 改变为发炎型的 TME,其最终目的是在肿瘤微环境中增加淋巴细胞浸润,增强肿瘤抗原的呈递,激起强烈的抗肿瘤反应。能够在肿瘤细胞中特异复制的溶瘤病毒(Oncolytic virus,简称 OV_s)是实现上述目标的一个很好的策略(Murciano-Goroff et al 2020)。

目前已经被批准上市的 OV_s 只有两种,一种是 2005 年 NMPA 批准用于晚期鼻咽癌的 H101,另一种是 2015 年 FDA 批准用于黑色素瘤的 T-VEC。H101 是一种 E1B-55KD 基因缺失的 5 型人腺病毒(Fukuhara et al 2016)。野生型腺病毒感染正常细胞后,表达的 E1B 可以与抑癌基因蛋白 p53 结合,抑制细胞凋亡通路,使腺病毒得以大量复制,而 H101 则在正常细胞中无法大量增殖,同时大部分癌细胞抑癌基因失活,所以 H101 可以在癌细胞中大量复制而导致癌细胞裂解死亡。

T-VEC 是在 1 型单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus-1,简称 HSV-1)的基础上改造而来,其缺失了两个拷贝的 γ 34.5 基因和 ICP47 基因,同时在缺失的 γ 34.5 位置插入了粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor,简称 GM-CSF)基因(Fukuhara et al 2016)。 γ 34.5 和 ICP47 可以帮助 HSV-1 逃避正常细胞天然免疫,使其可以在正常细胞中大量增殖,而 T-VEC 因为缺失 γ 34.5 和 ICP47,所以无法逃避免疫清除,在正常细胞中不能大量增殖,同时肿瘤细胞不存在天然免疫,所以 T-VEC 可以大量增殖导致其裂解。而且 T-VEC 表达的 GM-CSF

可以招募大量的粒细胞和巨噬细胞,使裂解后的肿瘤抗原得以呈递,从而增强抗肿瘤免疫。

除了腺病毒和 HSV-1 外,也有其他的病毒,例如麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、痘苗病毒等被发现可作为 OV 用于溶瘤治疗(Marchini et al 2019)。溶瘤病毒对于 TME 的改造,主要体现在以下几个方面(图 1-4),首先 OV 特异性在肿瘤细胞内大量增殖,直接导致肿瘤细胞裂解死亡,同时释放出炎症因子,招募免疫细胞浸润 TME,减少抑制性免疫细胞的数量,激活 NK 细胞,“加热”肿瘤微环境;而且 OV 也可以攻击与肿瘤相关的成纤维细胞和基质细胞,破坏 TME 的结构;同时树突状细胞可以携带吞噬的肿瘤抗原进入淋巴结从而呈递给淋巴细胞,使其活化为靶向肿瘤特异抗原的淋巴细胞,而活化后的淋巴细胞可以再次迁移至 TME 内,对肿瘤细胞进行二次杀伤(Achard et al 2018)。

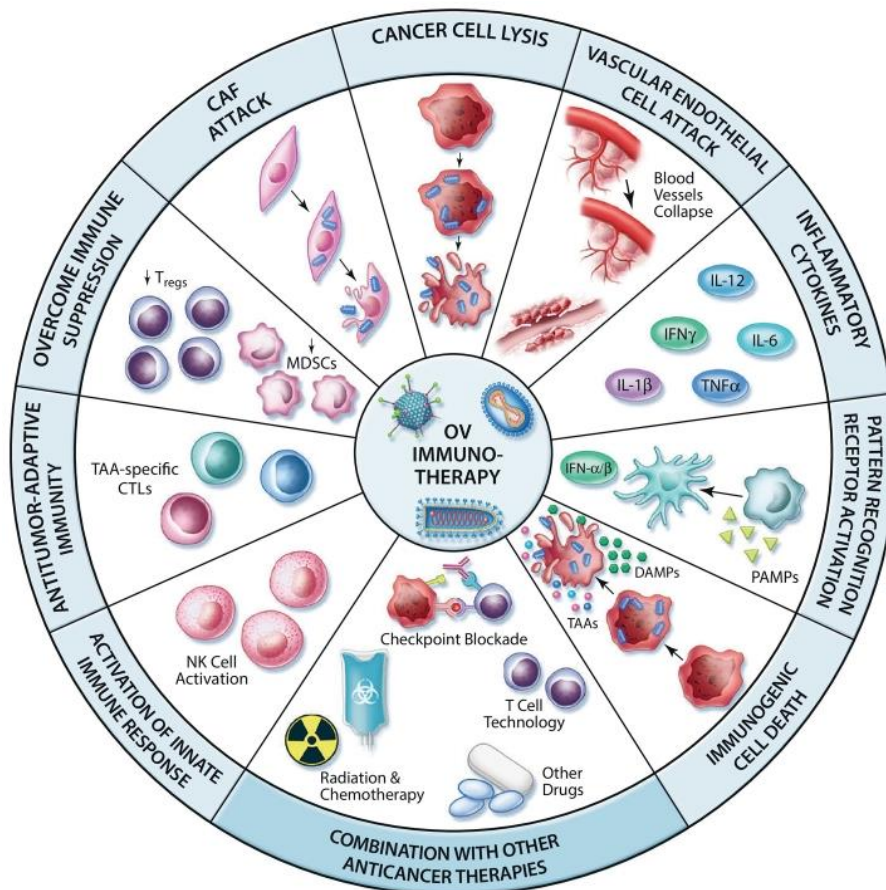


图 1-4. OV 对肿瘤微环境的改造(Achard et al 2018)

Fig. 1-4. OV's oncolytic mechanism (Achard et al 2018)

虽然 OV 在肿瘤治疗中已取得了一定的进展,但也存在易被机体免疫系统清除无法改变 TME 免疫抑制状态的缺点,而被用于膀胱癌临床治疗的卡介苗已被证

明具有很强的免疫原性(Bast et al 1974; Yamazaki-Nakashimada et al 2020), 这可能是另一种“加热”肿瘤微环境的策略。另一方面介导肿瘤细胞发生可引起强烈免疫反应的焦亡, 可能会比 OV_s 复制导致肿瘤细胞的裂解死亡更有利于“加热”TME。

1.5 卡介苗

1.5.1 卡介苗概述

卡介苗, 全称卡介苗芽孢杆菌, *Bacillus Calmette-Guerin* (简称 BCG), 是用于防治结核病 (Tuberculosis, 简称 TB) 的疫苗。BCG 来源于牛结核分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*), 是细菌学家 Albert Calmette 和兽医 Camille Guerin 在巴斯德研究所将其在甘油化的胆汁马铃薯培养基 (Glycerinated Bile Potato Medium) 上连续传代 (231 代), 于 1921 年宣布获得的 TB 减毒疫苗(Luca et al 2013)。BCG 可有效预防婴儿因结核分枝杆菌感染导致的脑结核, 每年有超过 1 亿新生儿接种, 是目前全世界接种最多的疫苗(Moorlag et al 2019), 在我国属于新生儿必须接种的全民免费的第一类疫苗。

目前各国在最初由 Calmette 和 Guerin 获得的初代 BCG 基础上, 驯化形成具有不同复制变异体 (Duplication Variants, 简称 DU-2) 的多个亚菌株, 具体可分为 DU2-I、DU2-II、DU2-III 和 DU2-IV 四类 (图 1-5)。俄罗斯、日本、巴西亚株是 DU2-I、DU2-II 亚菌株, 属于早期 BCG 疫苗株; DU2-III, DU2-IV 属于晚期 BCG 疫苗株, 主要包含丹麦、Connaught、Denmark 亚株(Brosch et al 2007)。不同的 BCG 亚株具有不同的生长特性、毒性及免疫原性(Behr et al 2000)。研究表明早期 BCG 疫苗株可以刺激巨噬细胞分泌更多的 TNF- α 、干扰素- γ 等因子(Korf et al 2005), 可激起更强的免疫反应(Zimmermann et al 2018)。

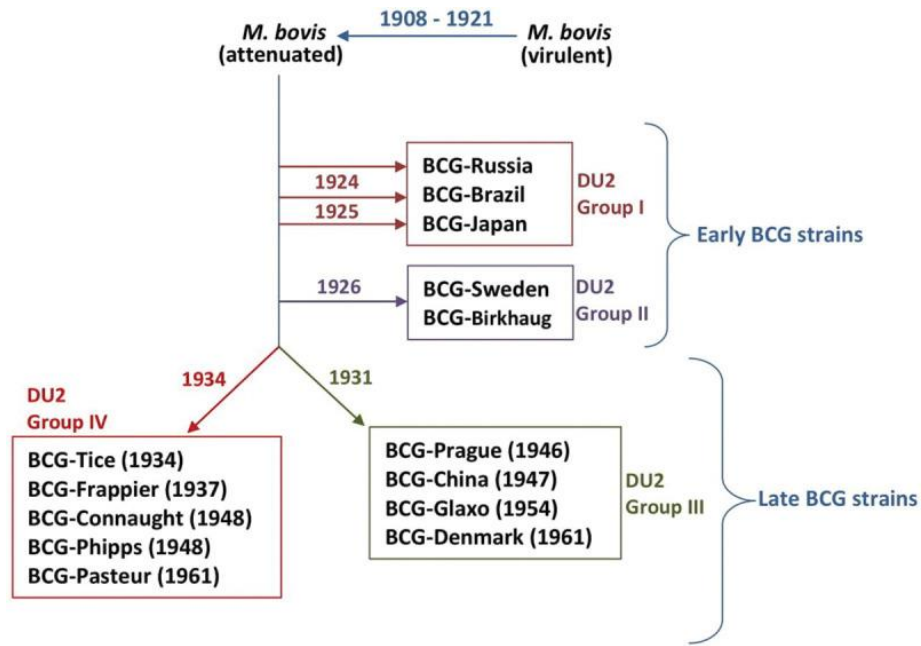


图 1-5. 卡介苗疫苗谱系(Adesanya et al 2020)

Fig. 1-5. Genealogy of the BCG vaccine (Adesanya et al 2020)

1.5.2 卡介苗的非特异性效应及应用

接种 BCG 以预防 TB 的历史已经接近一百年, 研究人员在对其疗效进行评估的过程中惊喜发现, BCG 对死亡率的降低不仅仅体现在预防 TB 上, 还体现在很多被称为异源 (Heterologous), 非特异性 (Non-specific) 或脱靶的效应 (Off-target) (Adesanya et al 2020)。目前, BCG 的非特异性效应已被证明可以用于诊断、预防及治疗多种疾病。

BCG 接种后接种部位的皮肤炎症强度可作为诊断某些疾病的间接方法。川崎病 (Kawasaki disease, 简称 KD) 是一种病因不明的发热型血管炎疾病, 严重时可导致冠状动脉病等后遗症, 是儿童后天心脏病的主要病因之一, 仅在日本每年都有上万婴儿发病, 所以 KD 的早期诊断是非常有必要的。1970 年, 日本学者 Kawasaki 发现, KD 儿童在接种 BCG 后, 接种部位有发热肿胀的现象, 首次提出了 BCG 接种后接种部位的皮炎情况可作为 KD 的诊断标志(Uehara et al 2010)。后续研究人员分别在日本和墨西哥对此现象进行了调查, 其中日本 15524 名 KD 患者中有 7745 名患者接种 BCG 后有发炎现象(Uehara et al 2010), 墨西哥 399 名 KD 患者中有 97 名患者有此现象(Garrido-Garcia et al 2017), 这在一定程度上证明了 BCG 接种部位的反应可以做为 KD 的补充诊断标准。2000 年 Sireci 等人的报道提出其内在机制可能与

BCG 的热休克蛋白 65 和人同源热休克蛋白 63 之间的交叉反应性有关(Sireci et al 2000)。此外也有研究表明 BCG 接种部位反应也可用于 6 型疱疹病毒感染(Kakisaka et al 2012)及麻疹(Muthuvelu et al 2019)的诊断。

BCG 在某些疾病，尤其是某些病毒感染的预防上也有一定的作用。丹麦等国家的研究发现，BCG 可以降低婴幼儿时期感染某些病毒风险，从而降低了婴幼儿的全因死亡率(Biering-Sorensen et al 2012; Nankabirwa et al 2015; Zimmermann et al 2018)。2020 年许多新型冠状病毒流行病学研究表明，BCG 的接种在一定程度上降低了新型冠状病毒的发病率及死亡率。同时也有研究表明 BCG 的接种也可以在一定程度上预防 I 型糖尿病的发生(Klein 2020)。而且针对 BCG 进行改造，例如在构建表达性疟原虫环孢子(Circumsporozoite, 简称 CS)蛋白的重组 BCG-CS，可用于预防疟原虫的感染(Arama et al 2012)。

BCG 也可用于心血管、糖尿病、神经退行性等疾病的治疗。在动物模型上，多次接种 BCG，可以在高脂血症小鼠模型中显著降低血浆中的胆固醇(van Dam et al 2016)，也可以用于治疗非肥胖糖尿病小鼠模型(Shehadeh et al 1997)。同时也有研究表明 BCG 的接种可以缓解阿尔茨海默氏病小鼠模型的认知缺陷和神经炎症(Zuo et al 2017)。

1.5.3 卡介苗在肿瘤免疫治疗中的应用

卡介苗因其热稳定性好、生产成本低、在人类长期使用的安全记录及可激活多种免疫反应的优势，在肿瘤免疫治疗（表 1-4），尤其是非肌肉浸润性膀胱癌（Non-Muscle Invasive form of Bladder Cancer, 简称 NMIBC）临床治疗中得到了广泛应用。1959 年 Zbar 等人首次通过在小鼠肿瘤模型中静脉注射 BCG，证实了 BCG 接种的小鼠可以抵抗肿瘤的生长(Zbar et al 1971)。1976 年 Morales 等人首次报道了膀胱灌注 BCG 可以显著减少膀胱癌患者的复发几率，开创了膀胱灌注 BCG 治疗膀胱癌的先河(Morales et al 1976)。随后的研究证明，相比单独手术切除治疗及手术切除结合术后膀胱内灌注丝裂霉素 C 等化疗药物，手术切除加术后膀胱灌注 BCG 的联合疗法更有利于降低 NMIBC 复发及发展成肌肉浸润性膀胱癌（Muscle Invasive form of Bladder Cancer, 简称 MIBC）的几率(Bohle et al 2003; Jarvinen et al 2009)。目前，膀胱灌注 BCG 已成为 NMIBC 术后预防复发的标准临床治疗方案。

表 1-4 BCG 用于肿瘤免疫治疗的主要应用及发现(Zheng et al 2015)

Table 1-4 Representative examples of BCG applications and key findings in the field of tumor immunotherapy (Zheng et al 2015)

BCG 亚株	发现年份	治疗对象	治疗方法	主要发现
Phipps	1959	小鼠肿瘤模型	静脉注射 BCG	最早证明 BCG 感染小鼠具有抵抗肿瘤生长的能力
Phipps	1971	豚鼠肿瘤模型	瘤内注射 BCG	瘤内注射可导致大部分动物模型肿瘤消退
Tice	1975	膀胱转移的黑色素瘤人类患者	利用膀胱镜，针对膀胱内肿瘤瘤内注射	瘤内 BCG 注射 1 周后，膀胱内 2cm 的肿瘤消失；虽然患者最终因小肠及肝脏转移死亡，但膀胱内没有再复发肿瘤
Tice	1975	犬	膀胱注射	结核菌素试验过敏犬在膀胱注射后没有过敏反应，为后续 BCG 用于膀胱癌治疗奠定基础
Glaxo	1970	36 例黑色素瘤患者	瘤内注射	注射后的黑色素瘤大部分消退，且有 20% 患者未瘤内注射的肿瘤也出现消退，证明 BCG 注射可激发全身抗肿瘤免疫力
Montreal	1976	9 例膀胱癌患者	膀胱灌注	第一项 BCG 灌注膀胱内治疗膀胱癌的临床试验，减少了患者复发几率
Pasteur	1990	小鼠肿瘤模型	膀胱灌注 BCG	证明纤连蛋白介导的 BCG 对膀胱粘膜的附着对于引发抗肿瘤活性至关重要，揭示机理
Connaught	2000	切除肿瘤但有高复发风险的膀胱癌患者	36 个月持续膀胱灌注	最早的大型临床试验，证明 BCG 灌注可显著降低手术切除后膀胱癌复发风险
Connaught and Tice	2014	142 例 NMIBC 患者	6 个月膀胱灌注	研究两种不同菌株的疗效，证明 Connaught 效果更好

NMIBC 术后膀胱灌注的标准方案是在 NMIBC 术后 2-3 周, 连续 6 周进行 BCG 灌注, 每次灌注剂量为 $2-19 \times 10^8$ 个菌落形成单位 (Colony Forming units, 简称 CFUs), 具体剂量根据 BCG 菌株的不同而有所变化 (Zheng et al 2015)。也有研究表明, 为了达到最大治疗效果, 可以将 BCG 膀胱灌注的疗程延长至 1-3 年 (Gan et al 2013)。

BCG 灌注治疗膀胱癌的作用机制可能与 BCG 激发的先天性和适应性免疫有关 (Brandau et al 2007)。BCG 附着于膀胱黏膜是其发挥免疫功效的基础, 而迁移蛋白在这其中起到决定性作用 (Kavoussi et al 1990)。BCG 附着在膀胱黏膜后, 会侵入癌化的尿道上皮细胞内, 而后激活先天性免疫反应, 促进大量细胞因子, 例如 IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- α 及 IFN- γ 的释放 (Zheng et al 2015)。细胞因子的释放又会激活中性粒细胞, T 淋巴细胞及自然杀伤细胞, 从而起到杀伤肿瘤的作用 (Hsu et al 2013)。

除了 NMIBC, BCG 也被研发用于多种肿瘤的治疗。1936 年 Holmgren 等人首次报道了卡介苗可用于胃癌的治疗。随后, 1970 年 Morton 等人在 36 例黑色素瘤患者使用 BCG 瘤内注射的临床试验中发现, 754 个瘤内注射 BCG 的黑色瘤中有 684 个完全消退, 且有部分患者身上与瘤内注射 BCG 的黑色瘤相近的肿瘤也出现了消退 (Morton et al 1970), 这表明 BCG 可用于黑色素瘤的治疗。除此以外, BCG 在结肠癌、胰腺癌、肾细胞癌及前列腺癌等肿瘤的临床治疗试验中也展现出一定的疗效 (Zheng et al 2015)。这都表明 BCG 可以作为“火种”, 用于加热 TME。而目前 BCG 针对三阴性乳腺癌的研究相对较少, 这也为我们的课题研究提供了切入点。

1.6 焦亡

1.6.1 焦亡概述

焦亡是细胞死亡命名委员会 (Nomenclature Committee on Cell Death, 简称 NCCD) 命名的十二种细胞死亡方式 (图 1-6) 之一 (Galluzzi et al 2018)。焦亡, 中文意思为“烧焦的死亡”, 英文名 pyroptosis 是由希腊词根 pyro (发烧) 和 ptosis (跌倒) 组成 (Broz et al 2020), 两者命名均突出此细胞死亡的促炎性质。焦亡最初是由研究人员在 20 世纪末至 21 世纪初期发现的一种由毒素或病原感染导致的 caspase-1 依赖的不同于凋亡的细胞坏死 (Brennan et al 2000; Friedlander 1986; Hilbi et al 1997; Zychlinsky et al 1992)。基于此, Cookson 和 Brennan 于 2001 年创造了焦亡的命名 pyroptosis, 并将其定义为 caspase-1 依赖性细胞坏死 (Cookson et al 2001)。随着炎症

小体复合物(Martinon et al 2002)及非典型炎症小体途径(Kayagaki et al 2011)的发现,焦亡又被重新定义为炎症小体依赖的细胞死亡。直到 2015 年焦亡的分子机制被解析,其才被正式定义为由 gasdermin 家族介导的细胞胀大破裂,伴随大量炎症物质释放的程序化细胞坏死(Kayagaki et al 2015; Shi et al 2015)。

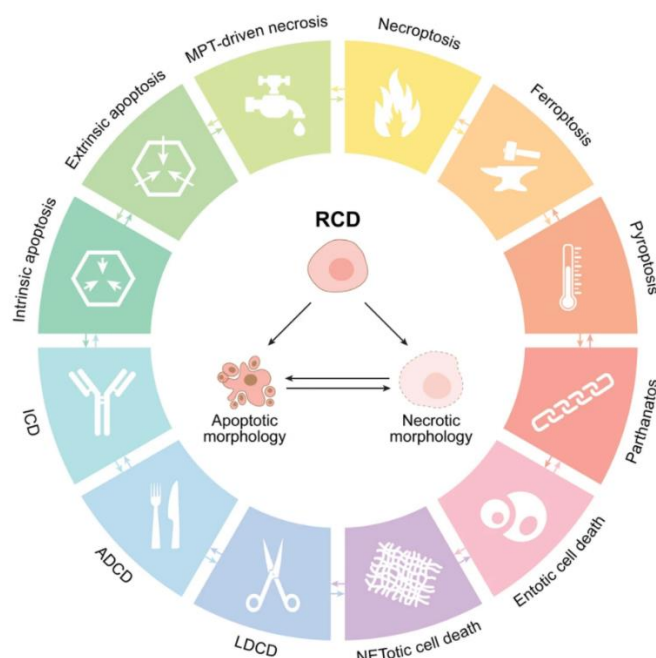


图 1-6. 细胞死亡的主要分类(Galluzzi et al 2018)

Fig. 1-6. Major cell death subroutines (Galluzzi et al 2018)

1.6.2 焦亡的分子机制

焦亡是由 gasdermin 蛋白家族 N 端结构域多聚化后在细胞膜上形成孔洞引起的一种程序性细胞坏死。1998 年研究人员鉴别出了一个突变后可介导小鼠毛发脱落的基因(Sato et al 1998), 随后 Saeki 等人发现该基因仅在小鼠和人上消化道和皮肤的上皮细胞中表达, 故将其命名为 gasdermin(胃泌素)(Saeki et al 2000), 由于这是第一个被发现的 gasdermin, 所以又称成为 gasdermin A, 简称 GSDMA。基于 GSDMAN 端结构域的同源性, 其他的 gasdermin 家族基因相继被鉴定出, 截至目前在人类中共鉴定出 6 个 gasdermin 家族基因, *GSDMA*、*GSDMB*、*GSDMC*、*GSDMD*、*GSDME* (又被称为 *DFNA5*) 及 *PJVK* (也称为 *DFNB59*) (图 1-7)。gasdermin 家族蛋白的详细信息见表 1-5。

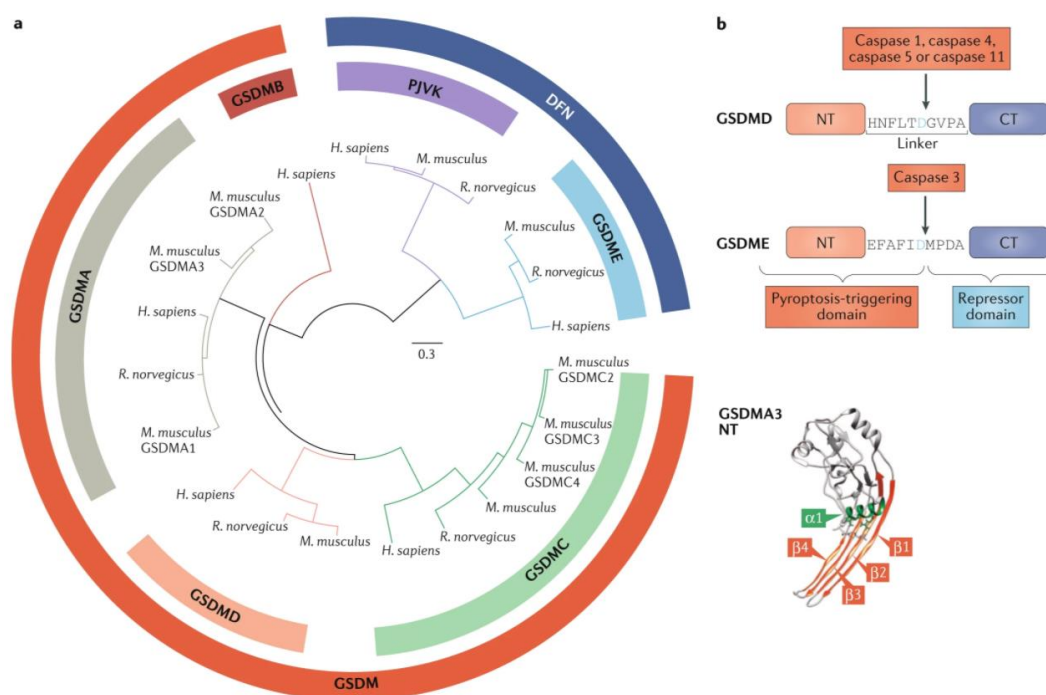


图 1-7. gasdermin 蛋白家族(Broz et al 2020)

Fig. 1-7. The gasdermin protein family (Broz et al 2020)

GSDMA, 也称为 GSDM、GSDM1 或 FKSG9, 其基因最早从小鼠皮肤中克隆获得, 也是第一个被鉴定出来的 gasdermin 家族蛋白, 进化上相对保守, 从鸟类、爬行动物到哺乳动物均有同源序列(Broz et al 2020)。小鼠共有三个同源蛋白, Gsdma1, Gsdma2 和 Gsdma3。GSDMA 主要表达在食道、膀胱、皮肤的上皮细胞中(Saeki et al 2000; Saeki et al 2007)。GSDMA 在原发性胃癌及胃癌细胞株中表达沉默(Saeki et al 2000), 这说明其可能与抑癌机制有关。小鼠中 Gsdma3 的不同突变会导致不同的皮肤异常症状(Broz et al 2020)。GSDMA-NT 的表达会导致细胞焦亡, 但目前 GSDMA 的切割机制尚不清楚。

GSDMB, 又被称为 GSDML、PP4052 或 PRO2521, 是通过 GSDMA 序列同源比对的方法发现的, 但其在小鼠和大鼠中未找到同源序列。GSDMB 在人类中主要在呼吸道上皮、食道、胃、肝、小肠和结肠表达, 存在多个剪接变体, 其中一个变体含有 caspase 1 切割位点(Panganiban et al 2018)。最新研究证明 GSDMB 可以被颗粒酶 A 切割, 从而介导细胞焦亡(Zhou et al 2020)。研究证明 GSDMB 在胃癌、宫颈癌、乳腺癌及肝癌中表达增加(Broz et al 2020), 但具体机制未知。

表 1-5 Gasdermin 蛋白家族相关信息

Table 1-5 The information about the gasdermin protein family

Gasdermin 命名	小鼠同源 蛋白	进化保守性	表达谱	切割分子	相关疾病
GSDMA	Gsdma1, Gsdma2, Gsdma3	鸟类、爬行 动物到哺乳 动物均有同 源序列	食道, 膀胱 和皮肤的上 皮细胞、T 细胞	未知	GSDMA 在人胃癌细胞中不表 达; <i>Gsdma3</i> 突变会导致小鼠 发肤异常, 不同突变表型不 同, 可出现角质化或脱发症 状; 过表达 GSDMA3-NT 会 导致细胞线粒体活性降低
GSDMB	无	仅存在哺乳 动物	呼吸道道上 皮, 食道, 胃, 肝, 小 肠和结肠	caspase 1、 颗粒酶 A	在胃癌、宫颈癌、乳腺癌及肝 癌中表达量增高, 但机制未 知; 其 SNP 突变与哮喘、克罗 恩氏病和溃疡性结肠炎易感相 关
GSDMC	Gsdmc1, Gsdmc2, Gsdmc3, Gsd mc4	仅存在哺乳 动物	食道、皮 肤、脾脏和 阴道	caspase 8	转移性黑色素瘤中表达量增 高; 敲低 GSDMC 表达会抑制 结直肠癌细胞系增殖; 是到鳞 状细胞癌 GSDMC 表达量降低
GSDMD	Gsdmd	仅存在哺乳 动物	各组织广泛 表达	caspase 1、 4、5、11	Gsdmd 缺失可降低 LPS 介导 的小鼠死亡率
GSDME	Gsdme	非常保守, 低等动物也 有同源蛋白	在各组织中 可变表达	caspase 8、 颗粒酶 B	突变会导致听力障碍; 可能是 导致化疗药物副作用的原因; 肿瘤细胞 GSDME 表达降低
PJVK	Pjvk	非常保守, 低等动物也 有同源蛋白	各组织广泛 表达, 睾丸 表达量高	未知	突变导致耳聋

GSDMC 最早被发现在转移性黑色素瘤中表达升高(Watabe et al 2001), 后被鉴定为 gasdermin 家族一员(Tamura et al 2007)。GSDMC 仅在哺乳动物中表达, 小鼠中存在 Gsdmc1-4 四个同源物。GSDMC 仅在食道, 皮肤, 脾脏和阴道中表达。有报道称其可被 caspase 8 切割(Tsuchiya 2021), 但这是否是 GSDMC 介导焦亡的机制还需要进一步研究。在不同的报道中 GSDMC 对肿瘤的作用不同(Broz et al 2020), 具体机理可能需要进一步深入研究。

GSDMD, 也称为 GSDMDC1, DFNA5L 或 FKSG10, 起初是通过在人类基因组数据库中比对 GSDMA 同源物获得(Katoh et al 2004), 是目前研究最多, 也是最初揭开焦亡分子作用机制神秘面纱的 gasdermin 家族蛋白。其与 GSDMB、GSDMC 类似, 目前均只在哺乳动物中找到同源物, 且均与 GSDMA 关系密切, 在进化中可能由 GSDMA 通过复制突变产生(Zerbino et al 2018)。GSDMD 在人体内广泛表达于各组织(Fagerberg et al 2014)。GSDMD 可被 caspase 1、4、5、11 切割介导细胞焦亡, 其具体途径可分为经典炎症小体途径 (Canonical Inflammasome Pathways) 和非经典炎症小体途径 (Non-canonical Inflammasome Pathways) (图 1-8)。在经典炎症小体途径中, 细胞通过感知病原体相关的分子模式 (Pathogen-associated Molecular Patterns, 简称 PAMP)、内源性危险信号或由细胞死亡、伤害或感染引起的细胞稳态变化, 启动 caspase 1 的激活从而切割 GSDMD 介导细胞焦亡。在非经典炎症小体途径中, 细胞通过 LPS 刺激, 启动 caspase 11 的激活从而切割 GSDMD 介导细胞焦亡。研究发现 GSDMD 缺失会使小鼠避免焦亡从而在微生物感染中存活下来(Kayagaki et al 2015), 这说明可通过靶向 GSDMD 来避免败血症性休克的侵害。

GSDME 和 PJVK 均属于耳聋相关蛋白, 在进化上非常保守, 在低等脊椎动物和无脊椎动物中均可找到同源物(Kersey et al 2018)。GSDME 和 PJVK 突变均可导致听力障碍。研究表明 GSDME 的过表达可使细胞在化疗药物作用下, 激活 caspase-3, 切割 GSDME, 由凋亡转变为焦亡, 而 GSDME 在肠道的高表达也说明其可能是导致化疗药物呕吐等副作用的原因之一(Wang et al 2017)。最近的报道证明 GSDME 在大多数肿瘤中沉默表达, 且在肿瘤中恢复 GSDME 表达后, 会增强机体抗肿瘤免疫力(Zhang et al 2020)。

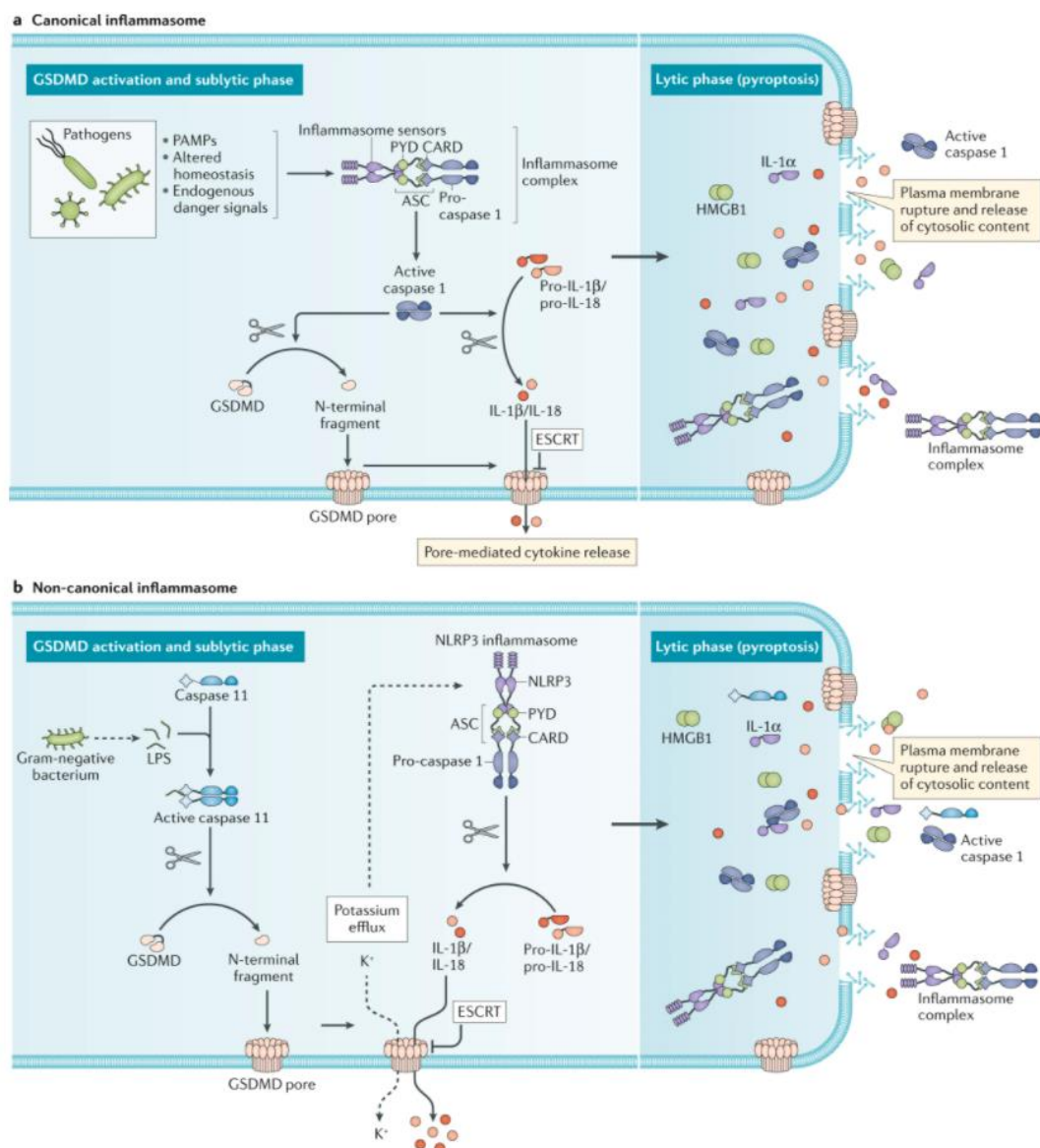


图 1-8. GSDMD 在经典炎症小体途径和非经典炎症小体途径中的作用(Broz et al 2020)

Fig. 1-8. Role of gasdermin D in canonical and non-canonical inflammasome activation 8 (Broz et al 2020)

1.6.3 焦亡在肿瘤治疗中的应用

焦亡不仅会直接导致细胞死亡，同时还会伴随着大量炎症因子，例如 IL-1 β 、IL-8，及损伤相关分子模式（Damage-associated Molecular Patterns，简称 DAMPs）的大量释放，从而会引发强烈的免疫反应，招募大量淋巴细胞，所以焦亡是非常理想的可用于“加热”TME 的“点火器”。Zhang 等人在对癌症基因图谱 TCGA（The Cancer Genome Atlas）数据库进行分析时发现，GSDME 的表达在大部分癌症中受到抑制，

所以推测 GSDME 可能是一种抑癌基因，而后他们通过在鼠乳腺癌中过表达 GSDME 发现，细胞毒性淋巴细胞分泌的颗粒酶 B 可以切割肿瘤细胞内的 GSDME 从而介导肿瘤细胞焦亡，而肿瘤细胞的焦亡会增加 TME 内 NK 细胞和 CD8⁺T 细胞的浸润，从而对肿瘤细胞进行二次杀伤，最终抑制肿瘤的生长(Zhang et al 2020)。Zhou 等人同样证明在鼠肿瘤中过表达 GSDMB 并联合 PD-1 阻断，也会抑制肿瘤生长（图 1-9）(Zhou et al 2020)。这两项研究虽然都证明了焦亡可以用于肿瘤治疗，但均属于基础研究，没有提出最终的应用方案。

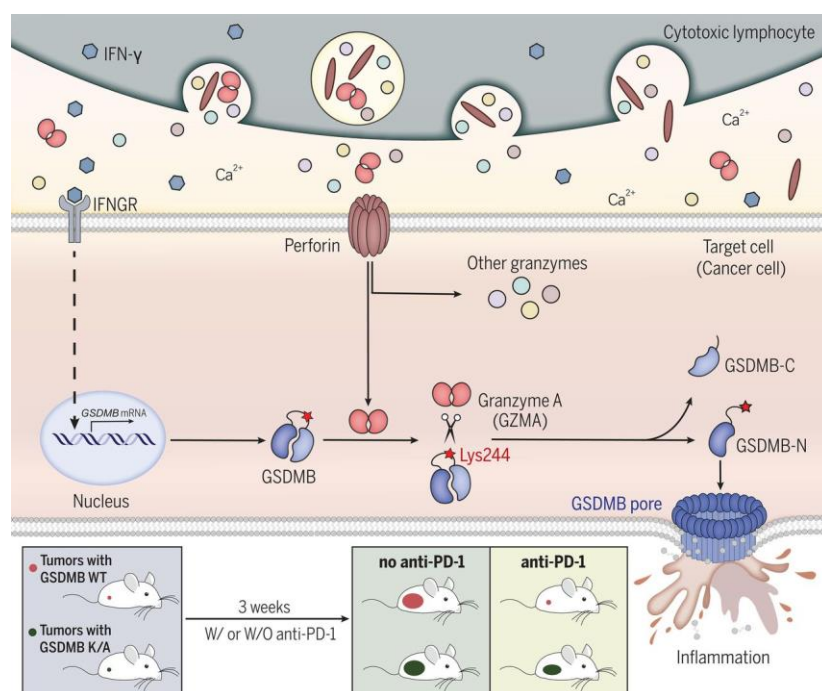


图 1-9. GSDMB 用于肿瘤治疗的机理(Zhou et al 2020)

Fig. 1-9. The mechanism of GSDMB used in tumor treatment (Zhou et al 2020)

Wang 等人提出了一种生物正交系统（图 1-10），利用纳米颗粒（Nanoparticle，简称 NP）和癌症探针三丙氧基苯丙氨酸苯丙氨酸（Phenylalanine Trifluoroborate，简称 Phe-BF3）的肿瘤靶向性，以及 Phe-BF3 的去甲硅烷基化能力，将有活性的 GSDMA3 通过甲硅烷基醚接头与金纳米颗粒偶联形成 NP-GA3 复合物，而后利用 NP-GA3 和 Phe-BF3 进行小鼠肿瘤治疗，证实该疗法可以抑制小鼠肿瘤生长，同时该疗法与 PD-1 抗体联用可以完全消融肿瘤，具有很好的疗效(Wang et al 2020)。该系统有很好的临床应用价值，但也存在有活性的 GSDMA3 生产成本低、纳米材料代谢等问题。

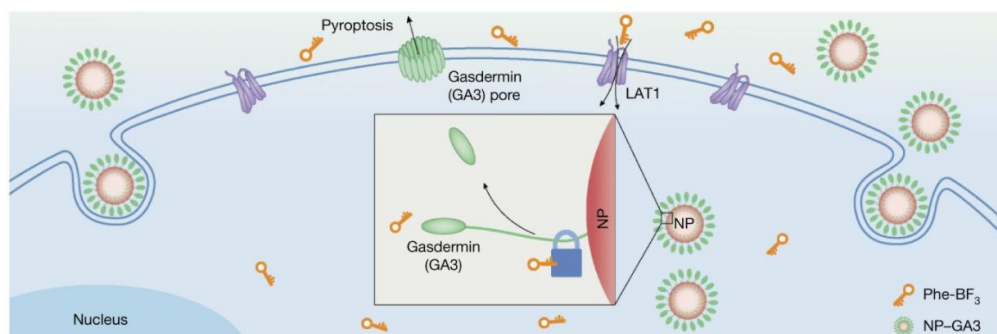


图 1-10. 焦亡治疗肿瘤的生物正交系统(Wang et al 2020)

Fig. 1-10. The bioorthogonal system using pyroptosis to cancer therapy (Wang et al 2020)

GSDM^{NT} 是焦亡的最终介导分子，所以构建表达 GSDM^{NT} 的重组病毒载体来递送 GSDM^{NT} 是一种理想的策略。但由于 GSDM^{NT} 的表达会介导细胞焦亡，所以病毒载体的选择非常重要，既需要在病毒载体包装时避免 GSDM^{NT} 的表达，又需要保证包装成功获得表达 GSDM^{NT} 的重组病毒载体具有很好的安全性。目前用作溶瘤病毒的 HSV-1 和 Ad5 是应用最广泛的肿瘤治疗载体，但一方面这两种病毒的包装策略无法避免包装时 GSDM^{NT} 的毒性，无法成功获得重组病毒，另一方面 T-VEC 和 H101 的肿瘤靶向性仅仅指的是其在肿瘤中特异性复制，但其也能感染正常组织，而且更危险的是，就算可以成功包装获得表达 GSDM^{NT} 的 T-VEC 和 H101，在临床应用时也会出现重组病毒在肿瘤细胞中复制后感染更多正常组织，导致正常组织大量焦亡从而出现严重副作用。而已用于临床基因治疗的重组腺相关病毒载体，既缺失复制能力，安全性很好，又存在两种包装方法，所以可能是一种很好的表达 GSDM^{NT} 的病毒载体。

1.7 重组腺相关病毒载体

1.7.1 重组腺相关病毒载体概述

重组腺相关病毒载体，Recombinant adeno-associated virus vectors，简称 rAAV，是由腺相关病毒（AAV）改造而来。野生型的 AAV 是一种的非致病性细小病毒，其属于依赖性病毒属，需要辅助病毒，例如腺病毒或疱疹病毒的参与才能具有复制能力(Wu et al 2006)。AAV 基因组结构为 4.7 kb 的单链 DNA，具有两个大的开放性阅读框，分别为 *rep* 和 *cap* 基因，两侧各含有一个末端反向重复序列 ITR（图 1-11a）。*rep* 编码四个复制相关蛋白，分别负责位点特异性整合、切割和解旋酶活性以及基因

组内启动子的调控；*cap* 编码组成病毒衣壳的三个结构蛋白，VP1、VP2、VP3；ITR 是 AAV 基因组复制和病毒组装所需的作用元件(Wu et al 2006)。1982 年，Samulski 等人通过将 AAV 基因组构建到 pBR322 质粒并转染到细胞中，并利用 5 型腺病毒作为辅助病毒，成功获得了具有感染能力的 2 型 AAV(Samulski et al 1982)，这标志着 AAV 第一套反向遗传系统的成功构建，此后 rAAV 的研究得到了飞速发展。rAAV 仅含有 ITR 和外源基因表达谱的完美基因组结构（图 1-11b）使其成为非常理想的基因递送载体。

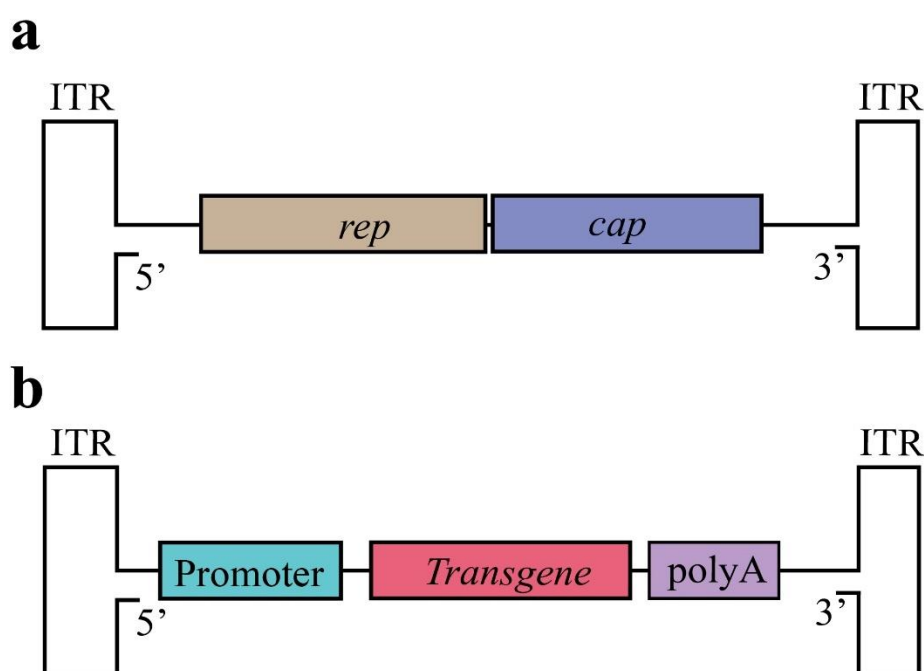


图 1-11. 腺相关病毒及重组腺相关病毒载体的基因组结构

Fig. 1-11. Genome structure of AAV and rAAV

rAAV 载体以其独有的基因递送高效性、低免疫原性、高安全性、基因长时表达能力及在分裂和静止细胞均能递送的优点，被广泛应用于临床基因治疗。目前 rAAV 载体已在多种疾病的临床基因治疗中取得成功(Santiago-Ortiz et al 2016)。利用 AAV2-hRPE65v2 治疗 *RPE65* 基因突变导致的 2 型先天性黑蒙症（Leber Congenital Amaurosis type 2，简称 LCA2）临床试验的三年随访报告显示，rAAV 治疗显著提升了患者视力水平，且在三年时间内均未观察到不良反应(Testa et al 2013)。在血友病 B 及黏多糖综合征 III-B 型（Sanfilippo B）临床基因治疗中，rAAV 同样展现出长期功效且没有任何毒副作用(Nathwani et al 2011; Santiago-Ortiz et al 2016)。上述临床试验均采用 AAV2 型血清型的 rAAV，后续研究发现 AAV 存在可靶向不同组织的多个血

清型，这也使得 rAAV 在临床疾病治疗中得到进一步发展。

研究人员发现从不同物种、组织分离获得的 AAV 具有不同的组织嗜性，后续研究发现这主要取决于衣壳蛋白 cap。根据 cap 蛋白的不同，AAV 刺激机体产生的抗体不同，由此可将其分为不同的血清型，目前已分离及突变获得的 AAV 血清型及突变体可达 100 多种(Wu et al 2006)。而常用的 AAV 血清型共有十四种（表 1-6）。AAV1-5 和 AAV7-9 不与其他血清型形成交叉反应，故也被定义为真正的血清型(Wu et al 2006)。AAV2 是使用最早也是目前应用最广泛的血清型，AAV8 具有很好的肝脏转导能力，AAV1 是最有效的肌肉转导血清型(Grimm et al 2008)，而 DJ 型是由 Grimm 等人使用适应性的 DNA 家族改组技术融合多个血清型获得(Grimm et al 2008)，故其相对其他血清型在体外转导中具有更广谱的组织嗜性。虽然 AAV 的血清型非常多，但所有血清型均可采用同样的包装方法获得。

表 1-6 不同 AAV 血清型的组织嗜性

Table 1-6 Tissue tropism of different AAV serotypes

AAV 血清型	组织嗜性
AAV1	肌肉，心脏，骨骼肌，神经系统
AAV2	神经系统
AAV3	肺，肝，肌肉，眼
AAV4	眼，肌肉，中枢神经
AAV5	肺，眼，神经系统，胰腺
AAV6	肺，心脏，血液细胞，免疫细胞
AAV7	肝，肌肉，眼，神经系统
AAV8	肺，肝，肌肉，心脏，神经系统
AAV9	肺，肝，肌肉，心脏，神经系统
DJ	肝，肺，视网膜，肾脏，体外转导相对泛嗜性
DJ/8	肝，眼，神经系统
Rh10	肺，肝，心脏，肌肉，中枢神经系统
PHP.eB/PHP.B/PHP.S	神经跨血脑屏障
Retro	神经逆行示踪

1.7.2 重组腺相关病毒载体的包装及纯化

最初 rAAV 的包装需要借助腺病毒或疱疹病毒的辅助，这使得重组病毒存在被辅助病毒污染的风险。随着研究的深入，rAAV 的包装系统也得到了进一步发展。目前 rAAV 的包装系统主要分为两种，一种是利用 HEK 293 细胞的三质粒包装系统，另一种是利用昆虫 Sf9 细胞的杆状病毒包装系统。

三质粒包装系统（图 1-12），是目前应用最广泛的 rAAV 包装系统，其通过将 rAAV 包装所需的元件，*rep*、*cap*、腺病毒编码 E2A、E4 及病毒相关 RNA（VARNA）基因、含外源基因表达谱的基因组骨架拆分至 pAAV-Helper、pAAV-Rep/cap、pAAV-transgene 三个质粒上，并在含有腺病毒 E1 基因的 HEK 293 细胞内进行组装，从而避免了辅助病毒的参与，可获得无污染的 rAAV，非常安全。针对不同的外源基因，仅需对 pAAV-transgene 载体进行改造，操作简单，往往在一周内即可得到携带外源表达片段的 rAAV。但三质粒包装系统也存在一定缺陷，例如生产成本较高，不适用于大规模生产 rAAV。

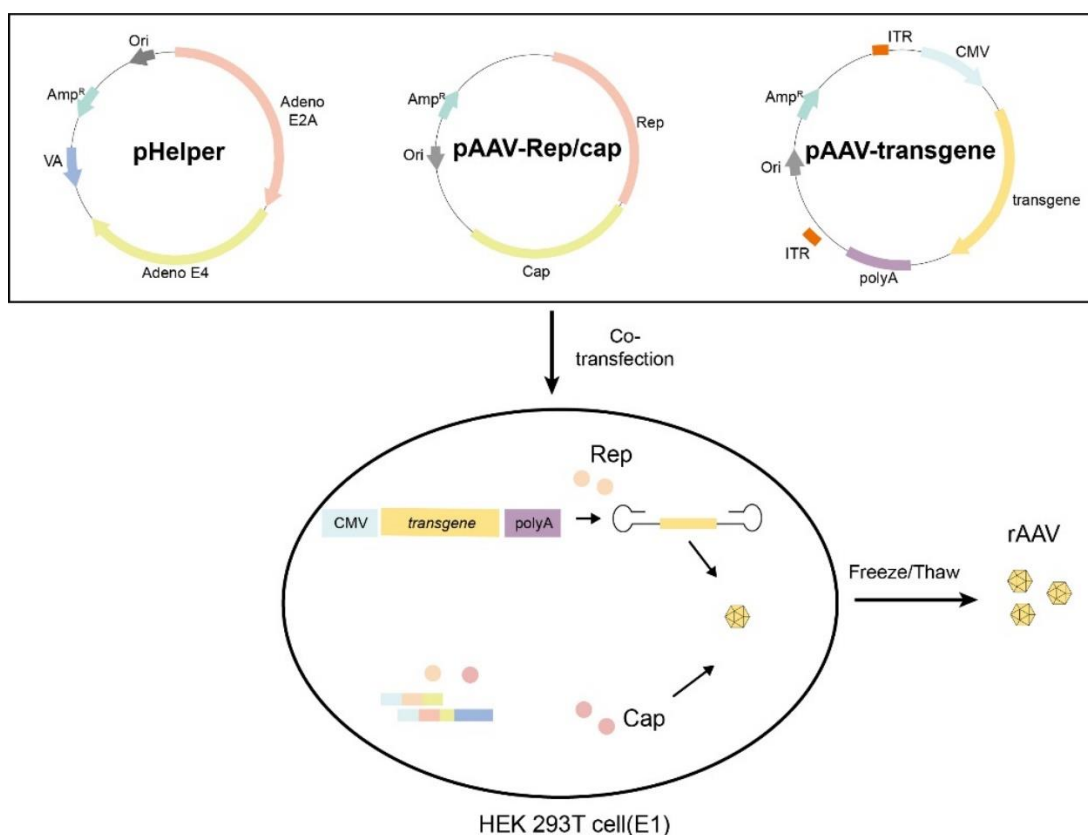


图 1-12. rAAV 三质粒包装系统

Fig. 1-12. The three-plasmid packaging system of rAAV

杆状病毒包装系统的开发解决了 rAAV 大规模生产的问题，最初该包装系统需

要三种杆状病毒的参与，分别提供 *rep*、*cap* 及基因组骨架(Urabe et al 2002)，随着后续研究的深入，两杆毒包装系统和一杆毒包装系统相继被开发出来。一杆毒包装系统有可分为两类，一种是通过将 *rep*、*cap* 整合入 Sf9 细胞的基因组内(Mietzsch et al 2014)，一种是将 *rep*、*cap* 整合到杆状病毒基因组内。二杆毒包装系统（图 1-13）是将 *rep*、*cap* 放至一个杆状病毒内，另一个杆状病毒用于提供携带外源基因的基因组骨架(Smith et al 2009)，是目前应用相对广泛的包装方法。杆状病毒包装系统可以利用发酵工程，在 GMP 车间内大规模生产 rAAV,成本低廉，且其利用昆虫细胞包装的特性，也为后续开发携带毒性基因 rAAV 的包装方法提供了一定的探索方向。

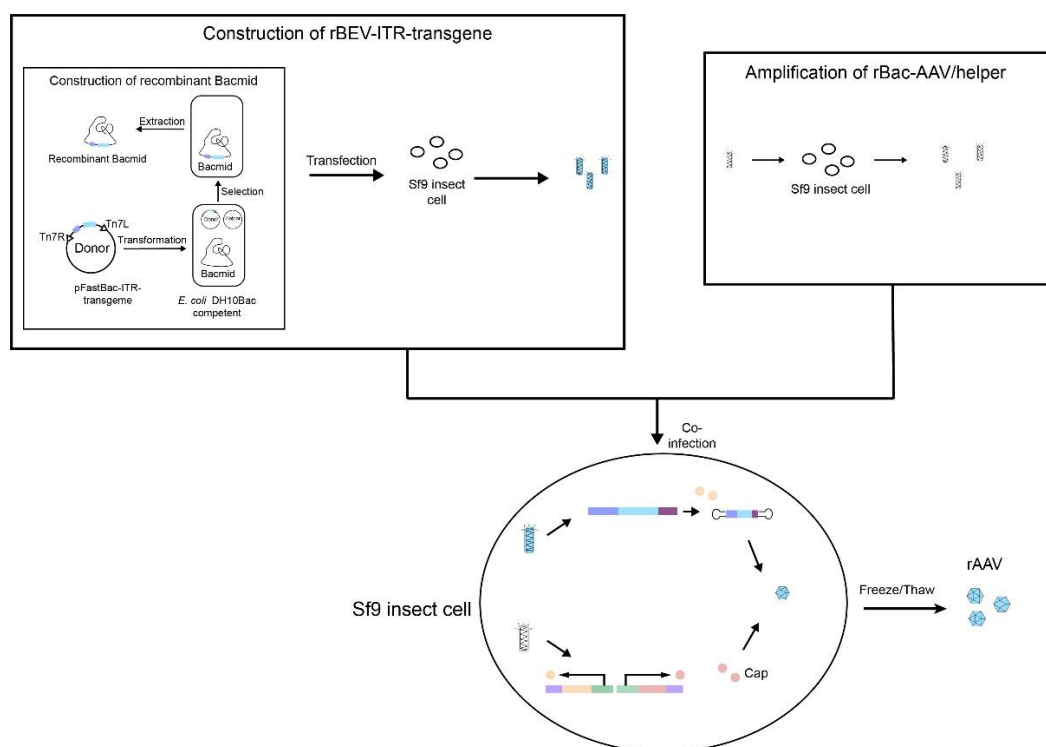


图 1-13. rAAV 二杆状病毒包装系统

Fig. 1-13. The two Baculovirus Packaging System of rAAV

1.7.3 重组腺相关病毒载体在肿瘤治疗中的应用

相比用于肿瘤溶瘤治疗的腺病毒，rAAV 对于实体瘤有着更强的渗透性(Enger et al 2002)，所以 rAAV 也被开发用于肿瘤的基因治疗。目前 rAAV 携带用于肿瘤治疗的基因类型主要分为以下几类：（1）抗血管生成基因，血管内皮生长因子（Vascular Endothelial Growth Factor，简称 VEGF）是肿瘤内一种有效的血管生长因子，抑制

VEGF 可有效抑制肿瘤内血管生成, 阻断肿瘤营养供应, 目前已有研究证实, 携带 VEGF 受体基因的 rAAV 可有效抑制多种小鼠肿瘤模型的肿瘤生长, 例如, 黑色素瘤和肾细胞癌(Lin et al 2005); (2) 免疫调节因子, 利用 rAAV 在肿瘤内过表达例如干扰素、白介素、CD40-配体、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体等免疫因子可以显著增强肿瘤内的抗肿瘤免疫力, 抑制肿瘤生长(Santiago-Ortiz et al 2016); (3) 致肿瘤抗原基因, rAAV 也可用于将致肿瘤病毒抗原直接呈递给抗原递呈细胞的肿瘤疫苗, 从而预防肿瘤的发生, 例如利用携带人乳头瘤病毒 16 结构蛋白 L1 (HPV16-L1) 的 AAV2-HPV16L1 降低宫颈癌的发生率(Liu et al 2005); (4) rAAV 也可用于携带肿瘤抑制基因、靶向肿瘤的小 RNA(Santiago-Ortiz et al 2016)来治疗肿瘤; (5) 细胞毒性或自杀基因, 自杀基因疗法在肿瘤治疗中也被广泛研究(Kroeger et al 2010), 而 rAAV 也可用于递送例如 1 型单纯疱疹病毒胸苷激酶 (HSV-TK)、白喉毒素 A (DTA) 等细胞毒性基因用于肿瘤治疗(Santiago-Ortiz et al 2016), 但细胞毒性基因往往会造成 rAAV 包装细胞的死亡, 因此包装携带此类基因的 rAAV 需要一些特殊的策略。

1.7.4 携带细胞毒性基因重组腺相关病毒载体的包装策略

包装过程中避免细胞毒性基因的表达是包装携带细胞毒性基因 rAAV 的核心策略。目前已有的策略主要有两种。一种是利用细胞特异启动子, 例如利用雪旺氏细胞特异性启动子 P0 控制细胞毒性基因的 rAAV 治疗神经鞘瘤(Ahmed et al 2019), 但细胞特异启动子存在强度不足及不适用非靶定细胞的问题(Kohlschutter et al 2010), 限制了此种策略的应用。另一种是利用 Tet-n 四环素操纵子来限制毒性基因的表达(Kohlschutter et al 2010; Li et al 2006), 但此类策略, 一方面存在包装时四环素操纵子不能完全限制毒性基因, 导致包装细胞死亡, rAAV 滴度不高, 生产成本高的问题, 另一方面存在在临床治疗中需要使用诱导剂的问题, 所以也并不理想。

在肿瘤细胞内表达 $GSDM^{NT}$ 可以使肿瘤细胞发生焦亡, 能够激发强烈的抗肿瘤免疫(Wang et al 2020), 所以 $GSDM^{NT}$ 是非常理想的肿瘤治疗毒性基因。但是 $GSDM^{NT}$ 细胞毒性非常强, 一旦在内部表达, 连大肠杆菌都会死亡(Shi et al 2015), 所以上述两种策略可能并不适合用于包装可广泛用于肿瘤治疗的携带 $GSDM^{NT}$ 的 rAAV。将 $GSDM^{NT}$ 序列翻转, 并在两侧加上两对反向 loxP 序列形成 DIO(Double-floxed Inverse ORF)系统即可完全避免 $GSDM^{NT}$ 的表达, 且在加入 Cre 重组酶后, 即可恢复 $GSDM^{NT}$

的表达,发挥焦亡功效,这可能是包装携带 $GSDM^{NT}$ 的 rAAV 的一种理想策略。选用一种哺乳动物启动子,使用昆虫 Sf9 来包装携带 $GSDM^{NT}$ 的 rAAV,这可能是另一种理想的包装策略。

1.8 三阴性乳腺癌

据 IARC 发布的《2020 年全球最新癌症负担数据》显示,乳腺癌目前已成为全球发病率最高(2020 年新发 226 万例)、女性死亡数最多的癌种。当前乳腺癌临床治疗的分子靶标、预后指标主要是依赖于雌激素受体(Estrogen Receptor,简称 ER),孕激素受体(Progesterone Receptor,简称 PR)和人表皮生长因子受体 2(Human Epidermal Growth Factor Receptor 2,简称 HER-2)基因(Shi et al 2019),尤其是针对 HER-2 阳性患者的曲妥珠单抗等靶向药物在临床中取得了很好的效果。而三阴性乳腺癌(Triple-Negative Breast Cancer,简称 TNBC)本身就具有很强的侵袭性、易于转移,且其又不表达上述三种受体,无法从靶向治疗中受益,所以亟需开发新的治疗方法。4T1 小鼠乳腺癌细胞系具有很高的致瘤性和浸润性,非常适合用于构建小鼠模型用于 TNBC 治疗方法的研究(Shi et al 2019)。

1.9 多形性胶质母细胞瘤

多形性胶质母细胞瘤(Glioblastoma Multiforme,简称 GBM)是最具有侵袭性的脑瘤,其预后很差,平均生存期只有 1-2 年(Louis et al 2016),所以构建 GBM 动物模型以研究其治疗方法是非常必要的。Benda 等人利用 N-亚硝基甲基脲反复刺激成年 Wistar-Furth 大鼠,最终构建获得了 C6 胶质瘤细胞系(Benda et al 1968)。后续研究发现,将 C6 细胞注射至 Wistar 大鼠的纹状体内构建的 GBM 大鼠模型,在形态特征、侵袭能力、血管形成以及 TME 方面与人类 GBM 高度相似,是非常理想的 GBM 动物模型(Giakoumettis et al 2018)。所以选用 C6 大鼠胶质瘤模型进行 GBM 治疗的研究是非常合适的。

第二章 目的及意义

肿瘤目前已成为宠物最大死亡病因之一，但目前宠物肿瘤临床治疗方法主要还是相对落后的手术切除和化疗，因此参考人类肿瘤治疗的研究策略，开发新的宠物肿瘤治疗方法是非常必要的。

肿瘤内癌细胞与相邻的其他细胞及细胞外基质相互作用、相互干扰形成了复杂动态的肿瘤微环境（TME）。TME 内的免疫状态决定着肿瘤的发生、发展及预后。其中免疫排除型或免疫沙漠型的 TME，即“冷”肿瘤，是目前肿瘤治疗，尤其是肿瘤免疫治疗效果不佳的主要原因。因此靶向 TME，在其内“点一把火”，使“冷”肿瘤转变为“热”肿瘤，是改善肿瘤治疗效果的有效手段。而卡介苗和焦亡是很好的“点火器”。

用于预防结核病的卡介苗（BCG）已有一百余年的接种史，经过多年的临床应用，其安全性有很好的保证。而且 BCG 在非肌肉浸润性膀胱癌的临床应用中证实其在肿瘤内引起的炎症反应可以招募淋巴细胞，刺激炎症因子分泌，破坏 TME，增强抗肿瘤免疫力，但目前 BCG 的抗肿瘤应用及研究主要集中在膀胱癌，其他癌种相对较少。本课题拟研究 BCG 对三阴性乳腺癌（TNBC）小鼠模型的作用及对 TME 的影响，探讨 BCG 作为 TME 靶向治疗“点火器”的潜力；并在对 BCG 处理后肿瘤转录组测序分析的基础上，进一步探索 BCG 与免疫筛查位点阻断治疗联用在三阴性乳腺癌治疗中的应用潜力，为扩展 BCG 抗肿瘤应用范围及 TNBC 的治疗方法提供一定的基础研究数据。

焦亡是细胞抵抗病原感染形成的一种程序化坏死，其过程伴随着大量炎症物质的释放，可激起强烈的免疫反应。肿瘤细胞的焦亡可以增加肿瘤内浸润 CD8⁺T 细胞及 NK 细胞的数量，破坏 TME 内免疫抑制的状态，使“冷”肿瘤转变为“热”肿瘤，从而增强机体抗肿瘤免疫力，同时焦亡与免疫筛查位点阻断的联合应用可以起到消融肿瘤的作用。但目前将焦亡蛋白有效递送至肿瘤的方法的研究相对较少，极大制约了焦亡在肿瘤临床治疗中的应用。本课题拟在 Cre 重组酶系统及哺乳动物启动子的基础上，摸索表达焦亡蛋白重组腺相关病毒（rAAV-GSDM^{NT}）的包装策略，为焦亡肿瘤治疗应用提供有力工具；同时利用包装获得的 rAAV-GSDM^{NT} 验证其对多形性胶质母细胞瘤（GBM）大鼠模型及 TNBC 小鼠模型 TME 的靶向治疗效果，并利用肿瘤转录组分析，进一步探索 rAAV-GSDM^{NT} 联合免疫筛查位点阻断在三阴性乳腺

癌治疗中的应用潜力，为焦亡增强抗肿瘤免疫的基础研究增添新的数据，最终为宠物及人类肿瘤治疗方法提供可行方案。

第三章 材料和方法

3.1 试验材料

3.1.1 菌株、细胞系、病毒和实验动物

BCG 菌株(ATCC® 35737™)、大肠杆菌 Stbl3 和 DH10B 菌株由本实验室保存。

小鼠乳腺癌 4T1 细胞系、大鼠脑胶质瘤 C6 细胞系购自中国科学院上海生物科学研究所细胞资源中心。人胚肾细胞系 HEK 293T、宫颈癌细胞系 Hela 由本实验室保存。人肝癌细胞系 Hep3B、昆虫细胞系 Sf9 分别由华中农业大学丰明乾教授和彭贵青教授馈赠。

腺相关病毒包装所需辅助杆状病毒 rBEV-AAV/helper 由中国科学院武汉物理与数学研究所徐富强教授馈赠。其他所用病毒均由本课题包装。病毒制备在生物安全性 2 级 (BSL-2) 实验室中进行。

SPF 级 Wistar 大鼠、Nu/Nu 裸鼠、Balb/c 小鼠均购自湖北省华中农业大学实验动物中心。小鼠和大鼠的使用经华中农业大学研究伦理委员会批准(HZAUMO-2019-041、HZAURA-2020-0002)。所有程序均按照华中农业大学研究伦理委员会实验动物护理和使用指南进行。

3.1.2 载体与质粒

包含人 GSDMD、GSDME 基因的质粒由厦门大学韩家淮教授馈赠。包含 GSDMB 基因的质粒由武汉爱博泰克公司馈赠。包含哺乳动物特异 CBA 启动子 (mammal specific CBA promoter, 简称 mCBA) 的质粒由黑龙江大学葛菁萍教授馈赠。慢病毒包装系统由中国科学院数学物理研究所徐富强教授惠赠, 包括核心质粒 pHKO-GFP 和辅助质粒 pSPAX、pMD2.G。

rAAV 三质粒包装系统 (pAAV-CMV-eGFP, pAAV-DJ and pHelper), 包含四环素操纵子 Tet-On 系统质粒, 质粒 pAAV-DIO、pAAV-Cre、pFastBac-ITR-CMV-eGFP、pCAGGS 由本实验室保存。其他所用质粒均由本课题构建。

3.1.3 流式抗体及药物

抗大鼠抗体 CD3-BV421（克隆号 1F4）购自 BD Biosciences（美国）。用于流式细胞仪分析的抗小鼠抗体，CD3-PE（克隆号 17A2），CD4-FITC（克隆号 RM4.5），CD8a-PacBlue（克隆号 53-6.7），CD49b-APC（克隆号 DX5），CD45-APC-Cy7（克隆号 30-F11）购自 BioLegend（美国）。

抗 PD-L1 阻滞剂 BMS-202（货号 HY-19745）购自 MedChemExpress（美国）。

3.1.4 工具酶及主要试剂

各种限制性内切酶、DNA 聚合酶 Prime STAR® HS、反转录酶（AMV）、T4 DNA 连接酶 DNA 染料和凝胶上样缓冲液等均为大连宝生物（Takara）公司产品。

2×UtaqPCRMaster Mix、DNA Marker 均为庄盟生物有限公司产品。

琼脂、蛋白胨、酵母粉和琼脂糖均为 Amresco 公司产品，NaCl、蔗糖、乙二胺四乙酸（EDTA）、十二烷基磺酸钠（SDS）、PEG200 等化学试剂均为国药集团产品；二甲基亚砜（DMSO）、甲酰胺、碘化丙啶（PI）粉末、伊文思蓝（EB）粉末均购于 sigma 公司。

慢病毒浓缩液购自北京博奥龙公司。

无水乙醇、丙三醇、氯仿、异丙醇均购自上海沪试公司。

体外同源重组试剂盒 ClonExpress®II One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞公司。

质粒小量提取试剂盒、DNA 快速回收试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒和去内毒素质粒大量提取试剂盒（D6915-04）为 Omega 公司产品。

细胞毒性检测试剂盒 LDH-Glo Cytotoxicity Assay、细胞活性检测试剂盒 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay、萤火虫荧光素酶检测试剂盒和活体成像所用底物 D-luciferin 均为 Promega 公司产品。

动物用气麻药异氟烷购自深圳瑞沃德公司。

胶原蛋白酶IV购自 BioFroxx 公司，货号：2091。

小鼠肿瘤浸润组织淋巴细胞分离试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

细胞培养板，15 mL，50 mL 离心管，购自美国 Corning 公司。

rDNase I 购自 TAKARA 公司，货号：D2270A。

荧光二抗 Alexa Fluor488 Goat Anti-Rabbit IgG 为美国 GIBCO 产品。

RNA 提取试剂: TRIzol™ Reagent, 为 Thermo Scientific 公司产品, 货号 15596026。

核酸纯化磁珠购自美国 KAPA Biosystems 公司。

转录组建库试剂盒: Whole RNA-seq Lib Prep Kit for Illumina, 为 ABclonal 公司产品, 货号 RK20303。

焦亡检测试剂盒: eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit APC, 货号: 88-8007-72, 购自 Thermo Scientific 公司。

高内涵成像 96 孔板: CellCarrier-96 ultra plates, 购自 PerkinElmer 公司。

单细胞建库试剂盒: BD Rhapsody™ Cartridge Kit、BD Rhapsody™ Cartridge Reagent Kit、BD Rhapsody™ cDNA Kit、BD Rhapsody™ Targeted mRNA and Abseq Amplification Kit 均购自美国 BD 公司。

3.1.5 细胞培养及转染产品

细胞培养用 DMEM、F12K、1640 基础培养基、Sf-900™ II SFM 培养基、无血清培养基 opti-MEM、胰蛋白酶粉末为 Invitrogen 产品, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、100mM Sodium Pyruvate, 100× GlutaMAX™-1 和 100×MEM NEAA 为 Gibco 产品, 青霉素-链霉素为碧云天生物技术研究产品, 细胞系筛选抗生素 Blasticidin 购自 invitrogen 公司。转染试剂 PEI、Cellfectin® II Reagent 均为 Invitrogen 公司产品。

3.1.6 主要的培养基、抗生素、缓冲液及其配制

LB 液体培养基: 称取胰蛋白胨 (Tryptone) 10 g、酵母浸出物 (Yeast Extract) 5 g、氯化钠 (NaCl) 10 g, 溶解于 800 mL 双蒸水中, 完全溶解后使用 5 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0, 加入双蒸水定容至 1000 mL, 分装后 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 4 °C 保存备用。

LB 固体培养基: 按照每 100 mL LB 液体培养基中加入 1.5 g 琼脂糖粉的比例配制 LB 固体培养基, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 待培养基冷却到 50 °C-60 °C 左右, 在生物超净台中, 按照工作浓度加入相应的抗生素, 铺制平板, 待培养基完全冷却凝固且没有水汽后, 倒置于 4 °C 冰箱中备用。

BCG 培养基: 在 Difco™ Middlebrook 7H9 肉汤中加入 0.5% 甘油, 0.05% Tween-80 和 10% 油酸白蛋白葡萄糖过氧化氢酶, 0.22 μm 细菌滤器过滤后, 4 °C 保存备用。

氨苄青霉素(Amp): 使用灭菌后的双蒸水配置成贮存浓度 50 mg/mL, 使用 0.22 μm 的过滤器过滤并分装于 1.5 mL EP 管, 保存于-20 °C 冰箱中备用。使用的时候按照千分之一的比例加入到 LB 培养基中。

卡那霉素(Kan): 使用灭菌后的 ddH₂O 配置成贮存浓度 100 mg/mL, 使用 0.22 μm 滤器过滤并分装于 1.5 mL EP 管, -20 °C 保存备用。

庆大霉素(Gen): 使用灭菌后的 ddH₂O 配置成贮存浓度 7 mg/mL, 用 0.22 μm 滤器过滤后, 分装于 1.5 mL EP 管, -20 °C 保存备用。

四环素(Tet): 使用灭菌后的 ddH₂O 配置成贮存浓度 10 mg/mL, 用 0.22 μm 滤器过滤后, 分装于 1.5 mL EP 管, -20 °C 避光保存备用。

异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG): 取 2 g 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷粉末加灭菌 ddH₂O 至终体积为 10 mL, 用 0.22 μm 滤器过滤并分装于 1.5 mL EP 管, -20 °C 保存备用。

X-gal: 取 0.2 g X-gal 粉末加 DMSO 至终体积 10 mL, 用 0.22 μm 滤器过滤并分装于 1.5 mL EP 管, -20 °C 避光保存备用。

胰蛋白酶: 依次称取氯化钠(NaCl) 8 g、氯化钾(KCl) 0.2 g、二水合柠檬酸钠 1 g、二水合磷酸二氢钠(NaH₂PO₄·2H₂O) 0.056 g、碳酸氢铵(NaHCO₃) 1 g、葡萄糖 1 g、EDTA·2Na 0.2 g、溶于 800 mL 去离子水中充分溶解, 调节 pH 值至 7.2, 加入粉末状胰蛋白酶 2.5 g、充分溶解, 补充去离子水定容到 1000 mL, 最后使用 0.22 μm 的滤器过滤到无菌的 50 mL 离心管中, 储存于-20 °C 保存。

胶原蛋白酶IV溶液: 将 100 mg 胶原蛋白酶IV粉末溶于 10 mL 1640 基础培养基中, 0.22 μm 的滤器过滤后分装, 储存于-20 °C 保存。

杆粒提取试剂:

溶液 1: 称取 Tris-HCl 0.119 g, EDTA·2Na 0.187 g, 用 ddH₂O 溶解并定容至 50 mL, 调 pH 至 8.0, 使用前加入 RNase(100 $\mu\text{g/mL}$) 0.5 mL, 4 °C 保存备用。

溶液 2: 称取 NaOH 0.24 g 用 ddH₂O 溶解并定容至 30 mL, 称取 SDS 0.3 g, 用 ddH₂O 溶解并定容至 30 mL, 两者分别室温下保存备用, 使用时按照 1: 1 混合, 现用现配。

溶液 3: 称取醋酸钾 14.7 g, 用 ddH₂O 溶解定容至 40 mL, 调 pH 至 5.5, 室温下保存备用。

4%琼脂: 称取 4 g 低熔点琼脂, 加入 ddH₂O 定容至 100 mL, 121 °C 灭菌 20 min,

室温保存备用。

中性红溶液：称取 100 mg 中性红粉末，用 ddH₂O 溶解定容至 100 mL，用 0.22 μm 滤器过滤后，分装 15 mL/管，4 °C 保存备用。

0.8%琼脂糖凝胶：取 0.24 g 琼脂糖加入 30 mL 1×TAE 缓冲液中，加热溶解。待其冷却至 60 °C 时取 0.2 μL GoldViewI 型核酸染色剂加入其中，混匀后倒胶。

PI 溶液配置：称取 2.5 g PI 粉末溶解于 10 mL PBS 溶液中，-20 °C 避光保存备用。

EB 溶液配置：称取 0.4 g EB 粉末溶解于 20 mL PBS 溶液中，4 °C 避光保存备用。

4%多聚甲醛溶液：40 g 多聚甲醛，加入 800 mL PBS 中，调节 pH 值到 7.2 后定容至 1 L。

50×TAE 缓冲液：Tris 242 g、EDTA·2Na 37.2 g 加入 800 mL 去离子水，充分搅拌至溶解，向其中加入 57.1 mL 冰乙酸，充分搅拌，加入去离子水定容至 1 L，室温保存待用。

混合麻醉剂：10 g 氨基甲酸乙酯、2 g 水合氯醛溶于 100 mL 去离子水中配成组分 A，300 mg 甲苯噻嗪盐酸盐溶于 100 mL 去离子水中配成 3 mg/mL 溶液作为组分 B，将组分 A 和组分 B 按照 3:1 的比例混合，制成混合麻醉剂。小鼠活体麻醉使用剂量为 0.9 mL/100 g 小鼠体重。

0.1 mol/L CaCl₂ 溶液配制：27 g CaCl₂·2H₂O 溶于去离子水中，并定容至 1 L，121 °C 高温高压灭菌 30 min，冷却备用。

PBS 缓冲液的：NaCl 8 g、KCl 0.2 g、Na₂HPO₄ 1.42 g 和 KH₂PO₄ 0.27 g 加入 800 mL 去离子水，调节 pH 值到 7.4，定容至 1 L，121 °C 高温高压灭菌 30 min，室温保存待用。

细胞裂解液：0.15 mol/L NaCl，0.05 mol/L Tris-HCl。取 3 mL 5M NaCl，5 mL 1 mol/L Tris-HCl，加入 100 mL 去离子水，pH 为 8.5。

5 mol/L NaCl：29.2 g NaCl 溶于 100 mL 去离子水。

1 mol/L Tris-HCl：12.1 g Tris-base 溶于 80 mL 去离子水，调 pH 为 8.5，定容到 100 mL。

1 mol/L NaCl/PBS-MK 缓冲液

5.84 g NaCl, 26.3 mg MgCl₂ 和 14.91 mg KCl 加入 PBS 溶解, 定容至 100 mL, 0.22 μm 滤器过滤, 4°C 保存。

1×PBS-MK 缓冲液

26.3 mg MgCl₂、14.91 mg KCl 溶于 1×PBS 定容至 100 mL, 0.22 μm 滤器过滤, 4°C 保存。

3.1.7 实验设备

水浴锅: 上海精宏实验设备有限公司产品;

生化培养箱: 上海精宏实验设备有限公司产品;

摇床: 上海精宏实验设备有限公司产品;

PCR 仪: Biometra;

灭菌锅: 日立公司产品;

电泳仪: DNA 琼脂糖凝胶电泳系统电源和电泳槽均为北京六一仪器厂产品;

Nano drop 紫外分光光度计: Thermo Scientific 公司产品, Nanodrop 2000C;

震荡切片机: 为 Leica 公司产品, VT1200S 型号;

超低温冰箱: Hair 公司产品;

细胞培养箱: 为 Sanyo 公司产品;

高速离心机: 为 Thermo Scientific 公司产品;

超高速离心机: 为 Beckman Coulter 公司产品;

普通荧光显微镜: 为 Olympus 公司产品, 为 IX73 机体搭配 DP80 双色 CCD 传感器;

全电动荧光显微镜: 为 Olympus 公司产品, BX63 系统搭配 DP80 双色 CCD 传感器;

激光共聚焦扫描显微镜: 为 Olympus 公司产品, FV1000 型号;

桌面数显鼠脑立体定位仪: 为深圳瑞沃德公司产品, 型号: 68025;

体视显微镜: 为深圳瑞沃德公司产品, 型号: 77001;

大鼠适配器: 为深圳瑞沃德公司产品;

10 μL 微量注射针: 为上海高鸽公司产品;

微量注射泵: 为深圳瑞沃德公司产品, KDS Legato™ 130 micro-pump;

高速颅骨钻: 为深圳瑞沃德公司产品, 型号: 78001, 78002;

拉针仪：PC-10 (DL Naturegene Life Sciences, USA);

流式分析仪：cytoFLEX，为 Beckman Coulter 公司产品；

超高速流式分选细胞仪：MofloXDP，为 Beckman Coulter 公司产品；

小动物活体光学成像系统：IVIS Spectrum，为 PerkinElmer 公司产品；

高内涵成像系统：Opera Phenix™ High Content Screening System，为 PerkinElmer 公司产品；

活细胞成像仪：Invitrogen™ EVOS™ FL Auto 1 显微镜，为 Invitrogen 公司产品；

超景深成像系统：VHX-6000，为日本 Keyence 公司产品；

酶标仪：Victor NIVO 3S，为 PerkinElmer 公司产品；

荧光定量 PCR 仪：QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System，为美国 ABI 产品。

3.1.8 相关软件

Vector NTI 11.5.3 用于质粒载体构建及引物设计；PerkinElmer Living Image® (IVIS Spectrum)用于处理高内涵图像数据；PerkinElmer Harmony 4.9 (Opera Phenix™ High Content Screening System)用于处理分析小动物活体成像数据；nf-core rnaseq(1.4.2)、DEseq2(1.16.1)用于处理转录组数据；Image J 和 Photoshop CS5 用于图像转换；Graphpad prism 6 用于数据统计；Adobe illustrator CC 2018 用于图表绘制。

3.2 实验方法

3.2.1 感受态细胞的制备

3.2.1.1 氯化钙法制备大肠杆菌 Stbl3 感受态

(1) 将大肠杆菌 Stbl3 菌株在 LB 平板上四区划线，放在 37 °C 培养箱中培养 12 h，挑取单菌落于 5 mL 液体 LB 培养基中，在 37 °C，200 rpm/min 水平摇床中培养 12 h。

(2) 将培养后的大肠杆菌菌液按照 1:100 比例接入含有 100 mL 液体 LB 培养基的锥形瓶中，在 37 °C，200 rpm/min 水平摇床中培养 2 h 左右，直至 OD₆₀₀ = 0.5 左右。

(3) 将装有菌液的锥形瓶放到冰上，冰浴 10 min，然后将菌液转移到 50 mL 无

菌离心管中，4 °C，4000 g 离心 10 min 收集菌体。

(4) 弃掉上清，用 10 mL 预冷的 0.1 mol/L 的 CaCl_2 溶液轻轻悬浮菌体，冰上放置 20 min 后，4 °C，4000 g 离心 10 min。

(5) 弃上清，加 4 mL 预冷的含 20%甘油的 0.1 mol/L 的 CaCl_2 溶液，悬浮菌体。

(6) 将菌液分装到 1.5 mL 离心管中，每管 100 μL ，放入液氮中速冻，然后放入 -80 °C 冰箱中保存。

3.2.1.2 氯化钙法制备大肠杆菌 DH10Bac 感受态

(1) 在含有 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan 和 10 $\mu\text{g/mL}$ Tet 抗性的 LB 平板，使用 DH10Bac 菌液划线，37 °C 培养箱培养 12-20 h；

(2) 从平板上挑取一个单菌落，接种到一个含有 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan 和 10 $\mu\text{g/mL}$ Tet 抗性的 10 mL LB 液体培养基中，37 °C，250 rpm 培养 12 h，然后取 2 mL 菌液于 200 mL 含有 50 $\mu\text{g/mL}$ Kan 和 10 $\mu\text{g/mL}$ Tet 抗性的 LB 液体培养基中，2 h 后测定 OD_{600} ，后续隔 30 min 测定一次，每隔直至 OD_{600} 为 0.4 左右。

(3) 将 DH10Bac 细菌培养瓶于冰上孵育至 0 °C，转入无菌的预冷后的 50 mL 离心管中，4 °C，5000 rpm 离心 8 min 收集细胞，直至 200 mL 菌液全部收集结束。

(4) 弃去上清，按照每 50 mL 菌液加入 30 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl_2 溶液的比例加入 CaCl_2 溶液，轻轻吹打使得细胞悬浮，冰上静置 30 min；

(5) 4 °C，5000 rpm 离心 8 min 收集细胞，弃去上清，加入 8 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl_2 溶液，轻轻吹打使得细胞悬浮，加入 2 mL 80%预冷灭菌后的甘油，轻轻吹打混匀。

(6) 将制备好的 DH10Bac 感受态细胞按照 100 μL /管分装，于 -80 °C 保存备用。

3.2.2 质粒构建

使用对应限制性内切酶处理载体，按照表 3-1 在冰上配制酶切体系，37 °C 水浴锅中反应 2 h。根据目的基因及载体序列设计引物 F、R 将目的片段从对应质粒上扩增下来，体系如表 3-2。

表 3-1 酶切反应体系

Table.3-1 Restriction Enzyme Digestion Reaction System

试剂	加入量
载体	6.0 μg
内切酶 I	2.0 μL
内切酶 II	2.0 μL
10 $\times$ Buffer	5.0 μL
ddH ₂ O	Up to 50 μL

表 3-2 PCR 体系

Table.3-2 PCR system

试剂	加入量
含目的基因质粒	1 μL
F	0.5 μL
R	0.5 μL
dNTP	4 μL
5 $\times$ PS Buffer	10 μL
PrimerSTAR TM	0.5 μL
ddH ₂ O	Up to 50 μL

反应体系在冰上配制，98 °C 预变性 3 min，98 °C 变性 30 s，58 °C 退火 15 s，72 °C 延伸 2 min（按照每分钟延伸 1 kb 时间计算），扩增 30 个循环，最后 72 °C 再延伸 10 min，16 °C 30 s。扩增完毕，凝胶电泳后回收目的基因。回收目的片段及线性化载体后进行体外重组，按照表 3-3 配制体外重组体系。

表 3-3 体外重组体系

Table.3-3 In Vitro Reorganization System

试剂	加入量
线性化载体	2 μL
目的片段	4 μL
Exnase 重组酶 TM	1 μL
5 $\times$ CE Buffer	4 μL
ddH ₂ O	Upto 20 μL

体系在冰上配制，在 37 °C 水浴锅中反应 30 min，冰上预冷 5 min，将全部重组反应产物转化到大肠杆菌 Stbl3 感受态细胞中。同时转化线性化载体作为阴性对照。

重组产物的转化：

- （1）取 100 μL 大肠杆菌 Stbl3 感受态于冰上融化。
- （2）将 20 μL 重组产物加入感受态细胞中，轻弹离心管壁混匀。冰上静置 30 min。

(3) 将菌液于 42 °C 水浴锅中热激 90 s, 冰浴 2 min。

(4) 向每管菌液中加入 500 μ L 新鲜的液体 LB 培养基, 37 °C 恒温水平摇床上 200 rpm/min 复苏 45 min。

(5) 取出菌液, 室温, 4000 g 离心 3 min, 弃掉多余的培养液, 留下 100 μ L 左右的培养液, 重悬菌体, 并涂布与含有氨苄青霉素抗性的固体 LB 平板上。

(6) 平板倒置于 37 °C 培养箱中培养过夜。

阳性重组克隆的筛选与鉴定:

取出 37 °C 培养箱中培养过夜的培养板, 挑菌培养 3 h 后进行菌液 PCR 鉴定, 菌液 PCR 体系如表 3-4 所示。

表 3-4 菌液 PCR 体系
Table.3-4 Bacterial Liquid PCR System

试剂	加入量
菌液	1.0 μ L
F	0.5 μ L
R	0.5 μ L
2 $\times$ Utaq Mix	5 μ L
ddH ₂ O	3 μ L

配制好的 PCR 体系放入 PCR 仪里, 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min (按照每分钟延伸 1 kb 时间计算), 扩增 32 个循环, 72 °C 再延伸 5 min, 16 °C 冷却 30 s 停止反应。扩增完毕凝胶电泳鉴定, 紫外光下将出现与目的基因大小一样的条带的样品, 暂定为阳性克隆。将菌液 PCR 鉴定出的阳性克隆的菌液接入带有氨苄青霉素抗性的液体 LB 培养基中培养 12 h 后提取质粒。

质粒提取:

(1) 将菌液转移到 2 mL 离心管中。室温, 10000 g 离心 1 min。弃掉上清。

(2) 重复第一步, 共收集 5 mL 菌液。

(3) 弃上清, 加入 250 μ L Solution I/R NaseA 混合液, 旋涡震荡使菌液完全悬浮。

(4) 向重悬液中加入 250 μ L Solution II, 上下轻轻颠倒 5-7 次裂解细菌, 避免剧烈的混匀, 裂解反应不应超过 5 min。

(5) 再次加入 350 μ L Solution III, 上下轻轻颠倒 7 次, 避免剧烈的混匀。室温, 10000 g 离心 10 min。

(6) 将上清转移到套有 2 mL 收集管的 HiBind DNA 结合柱中。室温, 10000 g

离心 1 min, 弃掉收集管中液体。

(7) 将 HiBind DNA 结合柱重新套到收集管上, 向 HiBind DNA 结合柱中加入 500 μ L HBC Buffer。室温, 10000 g 离心 1 min, 弃掉收集管中液体。

(8) 将 HiBind DNA 结合柱重新套到收集管上, 向 HiBind DNA 结合柱中加入 700 μ L 含无水乙醇的 DNA Wash Buffer。室温, 10000 g 离心 1 min, 弃掉收集管中液体。

(9) 重复第八步。

(10) 将 HiBind DNA 结合柱重新套到收集管上。室温, 10000 g 离心 2 min, 甩掉柱子中残留的 DNA Wash Buffer, 弃掉收集管中液体。

(11) 将 HiBind DNA 结合柱装到新的 1.5 mL 离心管上, 晾干残余的乙醇。加入 50 μ L Elution Buffer 或者无菌水到柱子基膜上, 室温静置 2 min。10000 g 离心 1 min, 洗脱质粒 DNA。

然后将得到的质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, -80 °C 保存测序正确质粒菌种。

按照以上步骤, 通过一次或多次分子克隆, 得到以下质粒:

慢病毒核心质粒 (图 3-1): pHKO-luc;

rAAV 核心质粒 (图 3-2): pAAV-CMV-luc、pAAV-GSDMD^{NT}、pAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT}、pAAV-efl α -DIO-GSDMB^{NT}、pAAV-efl α -DIO-GSDME^{NT}、pAAV-mCBA-DIO-GSDMD^{NT}、pAAV-polyA-rtTA-CMV2-TRE-hDNT-polyA;

杆状病毒供体质粒 (图 3-3): pFastBac-mCBA-eGFP、pFastBac-CAG-eGFP、pFastBac-CBA-eGFP、pFastBac-CMV-GSDMD^{NT}、pFastBac-mCBA-GSDMD^{NT}、pFastBac-CAG-GSDMD^{NT}。

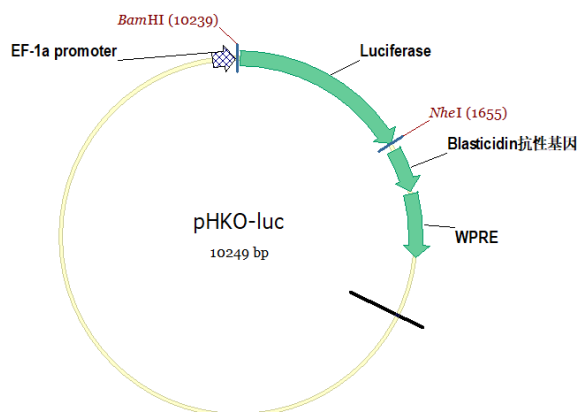


图 3-1. 慢病毒核心质粒图谱

Fig. 3-1. The map of Lentiviral core plasmid

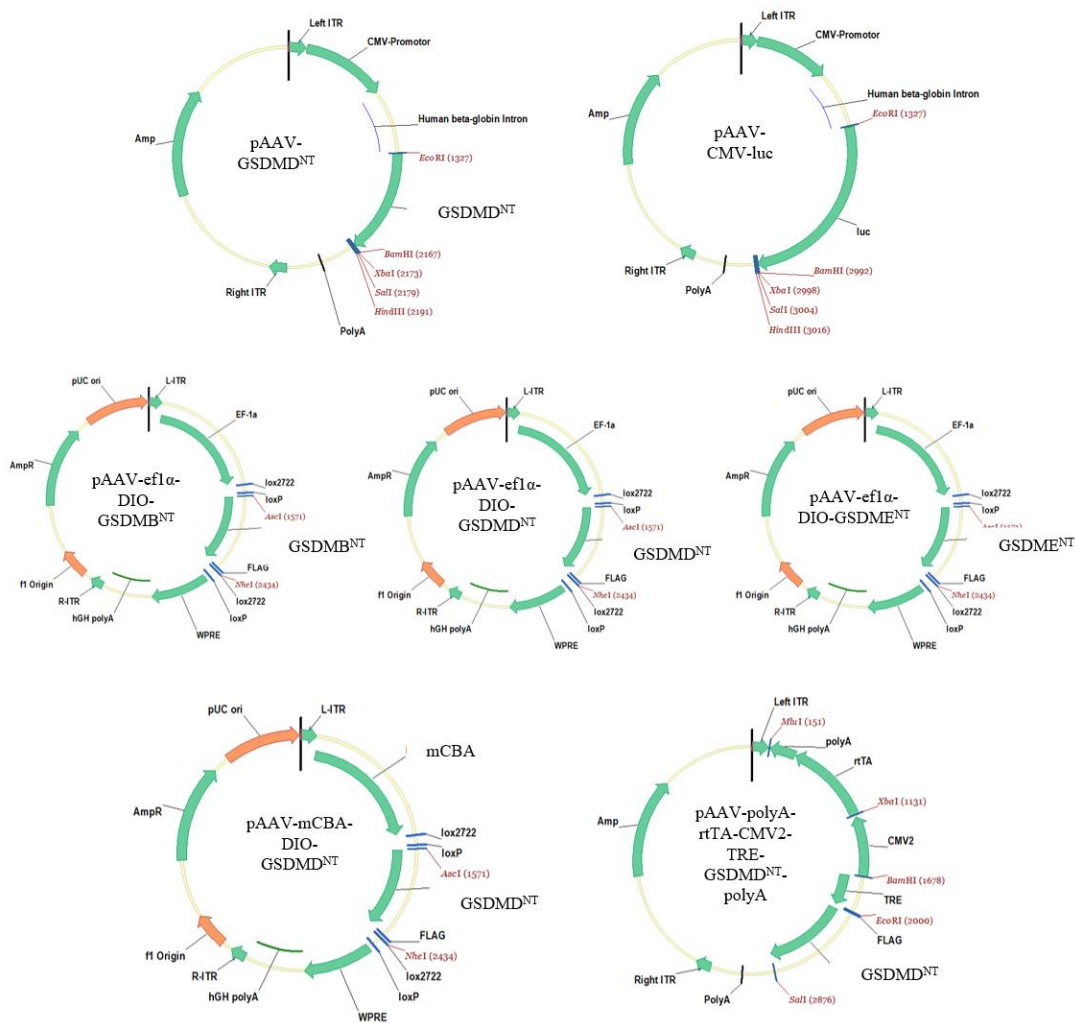


图 3-2. rAAV 核心质粒图谱

Fig. 3-2. The map of rAAV core plasmid

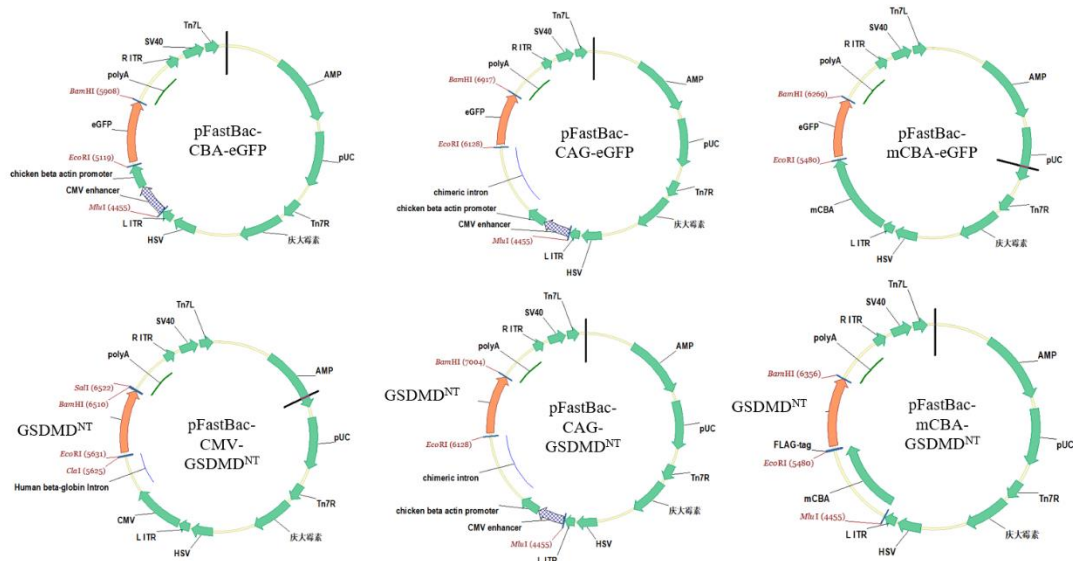


图 3-3. 杆状病毒供体质粒图谱

Fig. 3-3. The map of Baculovirus Donor Plasmid

3.2.2.1 无内毒素提取质粒

用于细胞转染的质粒需进行去内毒素提取，提取步骤如下：

- (1) 保存菌液按 1: 100 比例加入到 50 mL 的 LB 培养基中，并加入相应浓度的抗生素，37℃ 250 rpm 在摇床中振荡培养 12 h。
- (2) 8000 rpm，2 min 离心收集菌体。
- (3) 加入 2.5 mL Solution I 震荡重悬菌液。
- (4) 加入 2.5 mL Solution II 裂解菌体，轻柔颠倒混匀 10 次至溶液清亮，静置 2 min 待菌体充分裂解；
- (5) 加入 1.25 mL 预冷的 Buffer N3 中和 Solution II，出现白色蛋白沉淀，颠倒 10 次混匀，静置 2 min。
- (6) 将上述的混合物通过 8000 rpm，10 min 离心，收集上清过滤，加入 1/10 体积的 ETR，冰浴 10 min，42 °C 水浴 5 min，12000 rpm 离心 3 min，收集上清。
- (7) 向吸附柱中加入 3 mL GPS 溶液，8000 rpm 离心 2 min。
- (8) 将 (6) 收集的上清加入 1/2 体积的无水乙醇，混匀。
- (9) 将上述溶液加入吸附柱中，8000 rpm 离心 2 min，弃去收集管中废液。
- (10) 向吸附柱中加入 3 mL HBC Buffer，8000 rpm 离心 2 min，弃去收集管中废液。

(11) 向吸附柱中加入 3 mL Wash Buffer, 8000 rpm 离心 2 min, 弃去收集管中废液。

(12) 向吸附柱中加入 3 mL Wash Buffer, 8000 rpm 离心 2 min, 弃去收集管中废液。

(13) 空管 8000 rpm/min 离心 2 min, 然后弃去收集管, 将吸附柱转移至新的 15 mL 离心管中, 37°C 温箱中放置 2-3 min。

(14) 悬空向吸附柱滤膜上加 150 μ L EB (洗脱缓冲液), 12000 rpm/min 离心 2 min, 离心结束后弃去吸附柱, 做好标记后放于 -20°C 保存备用。

3.2.3 细胞及 BCG 培养

实验所用细胞系 HEK293T、Hela、Hep3B、4T1、C6、Sf9 及 BCG 菌株传代方法主要依据 ATCC 网站相应的细胞株说明书操作。其中 HEK293T、Hela、Hep3B 细胞系使用 DMEM 完全培养基 (含 10% FBS 和 1% 双抗), 4T1 细胞系使用 1640 完全培养基 (含 10% FBS、1% 双抗、1 mM Sodium Pyruvate, 1 $\times$ GlutaMAXTM-1 和 1 $\times$ MEM NEAA), C6 细胞系使用 F12K 完全培养基 (含 10% FBS 和 1% 双抗), Sf9 使用 Sf-900TM II SFM 培养基, BCG 使用 TB 培养基。

HEK293T、Hela、Hep3B、4T1、C6 细胞系采用以下方法培养传代: T25 细胞瓶细胞长满单层后准备传代, 在超净工作台用 PBS 洗涤细胞两次, 然后加 0.25 % 的胰蛋白酶 1 mL, 放到 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中消化 1-3 min; 当细胞变圆, 间隙变大即消化完成; 在超净台内弃去胰酶, 加 5 mL 完全培养基吹打数次至细胞分散; 然后留 1 mL 的细胞量, 再补加至 5 mL 的生长液, 放于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中培养, 每 2-3 天传代一次。

Sf9 细胞系采用以下方法传代: 125 mL 三角摇瓶细胞悬浮培养细胞, 待细胞密度达到 1.5-2.5 $\times$ 10⁶ 个细胞/mL 时, 在超净工作台将细胞密度调整至 5 $\times$ 10⁵ 个细胞/mL, 放于 27 °C 的生化摇床中培养, 每 2-3 天传代一次。

BCG 培养于 T25 培养瓶, 监测吸光光度值, 待 OD₆₀₀ 达到 1 时, 在超净工作台内将 BCG 吹打均匀后, 按照 1: 3 的比例进行传代, 放于 37 °C 的生化培养箱中培养。

3.2.4 4T1-luc 及 C6-luc 细胞系的构建

3.2.4.1 Lentiviru-luc 的包装

包毒转染前一天下午将 HEK 293T 细胞铺到 150 mm 培养皿中, 体积 30 mL, 第二天早上 (14h 左右) 观察细胞并换 15 mL 新鲜完全培养基 (不含双抗), 若细胞融合度达到 90% 左右则等 1-2h 即可开始转染, 若细胞密度未达到, 可等细胞密度达到再做。

配置转染液:

A 液: 按照 psPAX2(10703 bp): pMD2G(5802 bp): plenti-luc(10249 bp) 分子量等于 1:1:1, 核心质粒 plenti-luc 固定加 20 μg , psPAX2 加 $20 \times 10.703 / 10.249 = 20.88 \mu\text{g}$, pMD2G 加 $20 \times 5.802 / 10.249 = 11.32 \mu\text{g}$, 加入 500 μL opti-MEM 中, 涡旋混匀;

B 液: 按照 PEI (体积, μL) / DNA (质量, μg) = 2, 即加 $(2 + 20.88 + 11.32) \times 2 = 104.4 \mu\text{L}$ PEI 入 500 μL opti-MEM 中, 涡旋混匀;

静置 5 分钟后, 将 B 液加入 A 液中, 涡旋混匀, 静置 15 分钟后加入平皿培养基中, 轻轻晃动平皿, 使转染液均匀分布; 4-6 h 后换维持液 (2% FBS, 1% 双抗 DMEM, 30 mL);

转染 60 h 后, 收集上清, 800 rpm, 离心 5 min, 收上清后用 0.45 μm 滤器过滤后进行浓缩。

慢病毒浓缩液保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。每 30 mL 过滤后的病毒初始液, 加入慢病毒浓缩液 7.5 mL; 每 20-30 min 混合一次, 8 字摇匀, 共进行 3 次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜后, 4 $^{\circ}\text{C}$, 4000 g, 离心 20 min, 吸弃上清。加入 1 mL DMEM 培养基溶解慢病毒 Lentiviru-luc 沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3.2.4.2 Lentiviru-luc 感染细胞及单克隆筛选

提前一天将 4T1 细胞及 C6 细胞铺至 6 孔板。按照每孔 100 μL 的量, 加入浓缩后的 Lentiviru-luc, 培养 12 h 后, 去掉含有病毒的培养基, 换成新鲜完全培养。继续培养 48-72 h 后, 将细胞用胰酶消化下来重新铺至 6 孔板, 同时加入终浓度 2 mg/mL 的 Blasticidin 用于抗性筛选。在筛选 7-14 天后, 调整 Blasticidin 至 1 mg/mL。

将存活下来的细胞消化计数后,使用含有 1 mg/mL Blasticidin 的完全培养基稀释至每 100 μ L 一个细胞,并按照每孔 100 μ L 的量传至 96 孔板继续培养。观察细胞,标记长成单克隆的细胞孔,待细胞长满后将细胞消化后传至 6 孔板继续培养。待 6 孔板长满后,对每个单克隆长成的细胞系使用萤火虫荧光素酶检测试剂盒进行检测,挑选表达萤火虫荧光素酶的细胞系,则获得 4T1-luc 及 C6-luc 细胞系。

3.2.5 三阴性乳腺癌小鼠模型构建

细胞悬浮液准备: 4T1 或 4T1-luc 细胞系培养至 70-80 %融合度时,使用胰酶进行消化,加入完全培养基中和胰酶后,1000 rpm 离心 5 min,吸弃上清后,使用 1640 基础培养基进行重悬,调整密度至 4×10^7 个细胞/mL,放于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅待用。

提前 3-4 天购买 6-8 周龄 SPF 级 Balb/c 雌性小鼠,待其适应新环境后,使用异氟烷进行麻醉。使用刀片将小鼠左腹部毛发剃除,胰岛素针吸取 25 μ L 细胞悬浮液,注射入左侧第四对乳房脂肪垫内,放入饲养笼继续饲养。注射后第 5 天观察成瘤情况,选择成瘤小鼠用于后续实验。

3.2.6 BCG 治疗对三阴性乳腺癌小鼠模型 TME 的影响

为了分析 BCG 治疗对三阴性乳腺癌小鼠模型 TME 的影响,在肿瘤接种后第 5 天将成瘤的三阴性乳腺癌小鼠模型随机分为两组。一组向小鼠肿瘤内注射 10 μ L OD₆₀₀ = 2 的溶解于 PBS 的 BCG 溶液;另一组向小鼠肿瘤内注射 10 μ L PBS 溶液。在 BCG 注射后第 9 天,将小鼠麻醉处死以分离肿瘤块。将肿瘤块放到平皿中,称重。

肿瘤单细胞悬液制备:在超净台内,按照 0.1 g/0.5 mL 的比例向平皿中加入预热的 1640 基础培养基;用手术刀将肿瘤块切至 1 mm³ 左右;用吸管吸 0.5 mL 至 2 mL 离心管中,补 0.4 mL 培养基,加入 100 μ L 胶原酶 IV 溶液,5 μ L rDNaseI;37 $^{\circ}$ C 水浴,每隔 5 分钟混匀一次,共 45 min;用剪刀剪去蓝枪头尖端,吹散细胞,然后通过 70 μ m 的细胞过滤器除去细胞团块,以获得单细胞悬液。

肿瘤浸润淋巴细胞流式分析:用小鼠肿瘤浸润组织淋巴细胞分离试剂盒 (Solarbio) 分离肿瘤浸润淋巴细胞。随后用含 1 %BSA 的 PBS (FACS 溶液) 洗涤两次,并用抗小鼠 CD16/CD32 抗体封闭 30 分钟。然后加入流式抗体 CD49b-APC,

CD3-PE, CD4-FITC 和 CD8a-PacBlue, 孵育 1 小时后, 用含有 0.2%BSA 的 PBS 溶液洗涤一次, 随后通过流式细胞仪 Cytoflex (Beckman Coulter) 进行分析。

肿瘤浸润 CD3⁺淋巴细胞免疫组化: 将肿瘤冰冻切片后, 用抗小鼠 CD3-PE 抗体染色 1 小时, 然后用 Hoechst 染色 1 分钟。通过 Olympus FV1000 显微镜在 40 倍物镜上收集共聚焦图像。

3.2.7 BCG 治疗三阴性乳腺癌小鼠模型

为了验证 BCG 的溶瘤作用, 在肿瘤接种后第 5 天将成瘤的三阴性乳腺癌小鼠模型随机分为三组。在单倍剂量 BCG 治疗组中, 在肿瘤接种后第 5 天, 向小鼠肿瘤内注射 10 μ L OD₆₀₀ = 2 的溶解于 PBS 的 BCG 溶液; 在多剂量 BCG 治疗组中, 在接种肿瘤后的第 5、9 和 13 天, 分别向小鼠肿瘤内注射 10 μ L OD₆₀₀ = 2 的溶解于 PBS 的 BCG 溶液; 同时设置 PBS 对照组, 在接种肿瘤后的第 5、9 和 13 天, 分别向小鼠肿瘤内注射 10 μ L PBS 溶液。随后, 每 2-3 天用游标卡尺测量一次肿瘤块的长径 (L) 和短径 (W)。根据椭球体积计算公式 (即 $1/2 \times L \times W^2$) 计算肿瘤体积。同时每 2-3 天记录一次体重数据。在接种瘤第 30 天, 麻醉杀死小鼠, 使用剪刀和镊子将肿瘤与周围筋膜分开, 取出肿瘤, 称重并拍照。同时分离小鼠的脾、肺和肾脏, 送至武汉博尔夫生物科技有限公司进行石蜡切片及 HE 染色。

3.2.8 BCG 治疗对三阴性乳腺癌小鼠模型肿瘤转录组的影响

为了分析单倍剂量 BCG 处理对 TNBC 小鼠模型肿瘤转录组的影响, 在 BCG 治疗后第 9 天, 将小鼠麻醉处死以分离肿瘤块。提取肿瘤总 RNA 后, 使用 Whole RNA-seq Lib Prep Kit (ABclonal) 构建文库。

3.2.8.1 肿瘤总 RNA 的提取

(1) 将分离的肿瘤块置于 1 mL TRIzol 裂解液中, 用组织匀浆器进行匀浆, 室温静置 10 min。

(2) 每管加入 200 μ L 氯仿, 涡旋 15 s, 室温静置 10 min, 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm/min 离心 10 min。

(3) 取 400 μ L 上清转至新的 1.5 mL 离心管, 加入 400 μ L 异丙醇, 混匀, 冰

上静置 15 min, 12000 rpm/min 离心 10 min。

(4) 弃上清, 每管加入 750 μL 无水乙醇和 250 μL DEPC 水, 轻微颠倒, 10000 rpm/min 离心 10 min, 弃上清, 用枪头吸干残留水份, 风干 15 min, 最后加入 20 μL DEPC 水溶解, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

3.2.8.2 转录组文库构建

3.2.8.2.1 去除 rRNA

Probes 与 rRNA hybridization:

1) 取 10 ng-1 μg total RNA, 加入 Nuclease-free Water 稀释至 12 μL 体积, 冰上放置备用;

2) 取出 Probe Hybridization Buffer 冰上融解, 按照下面体系配制 probe hybridization 预混液:

试剂	加入量
Probe Hybridization Buffer	2 μL
rRNA Probe Mix(H/M/R)	1 μL
总体积	3 μL

3) 将 3 μL probe hybridization 预混液加至提前准备好的 12 μL RNA 溶液中, 移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心;

4) 置于 PCR 仪(热盖 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$)中, 使 probes 与 rRNA 进行杂交:

温度	时间
$95\text{ }^{\circ}\text{C}$	2 min
$95\text{-}22\text{ }^{\circ}\text{C}$	$0.1\text{ }^{\circ}\text{C/s}$, 匀速降温至 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$
$22\text{ }^{\circ}\text{C}$	5 min

5) 杂交结束后, 将样本从 PCR 仪中取出, 置于冰上, 立即进行 RNase H 消化;

RNase H 消化

1) 提前将 $10\times$ RNase H Buffer 取出冰上融解, 按照下面体系配制 RNase H 反应预混液:

试剂	加入量
$10\times$ RNase H Buffer	2 μL
RNase H	2 μL
Nuclease-free Water	1 μL
总体积	5 μL

2) 将 5 μL RNaseH 反应预混液加至上步骤的溶液中, 使 RNase H 反应体系达到 20 μL , 移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心;

3) 将反应体系置于 PCR 仪 (热盖 $\geq 45^\circ\text{C}$) 中, 进行 RNase H 反应:

温度	时间
37 $^\circ\text{C}$	30 min

4) RNase H 反应结束后, 将样本从 PCR 仪中取出置冰上, 立即进行 DNase I 消化;

DNase I 消化:

1) 提前将 10 $\times$ DNase I Buffer 取出冰上融解, 按照下面体系配制 DNase I 反应预混液:

试剂	加入量
10X DNase I Buffer	5 μL
DNase I	2.5 μL
Nuclease-free Water	22.5 μL
总体积	30 μL

2) 将 30 μL DNase I 反应预混液加至 1.2.4 步骤的溶液中, 使 DNase I 反应体系达到 50 μL , 移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心;

3) 将反应体系置于 PCR 仪 (热盖 $\geq 45^\circ\text{C}$) 中, 进行 DNase I 消化:

温度	时间
37 $^\circ\text{C}$	30 min

4) DNase I 反应结束后, 将样本从 PCR 仪中取出置冰上, 立即进行 RNA 纯化;

rRNA-depleted RNA 纯化

1) 提前将 Agencourt RNAClean XP beads 从 2-8 $^\circ\text{C}$ 取出, 静置平衡 30 min 至室温, 使用前涡旋或者振荡混匀;

2) DNase I 反应结束后, 每个反应管中加入 110 μL Agencourt RNAClean XP beads (2.2 $\times$), 吹打混匀;

3) 室温静置 5 min, 然后转移至磁力架上 5 min, 直至溶液变澄清, 小心弃除上清;

4) 将离心管保持在磁力架上, 加入 200 μL 80%乙醇, 静置 30 s, 弃除全部上清;

5) 重复 4) 步骤, 将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次。用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干;

6) 干燥磁珠 2-3 min, 待乙醇挥发完全后, 加入 7 μL Nuclease-free Water, 吹打

混匀;

7) 室温静置 2 min, 磁力架上 1 min, 待溶液变澄清, 小心吸取 5 μL 上清至另一新的离心管中。

8) 上清管中加入 5 μL 2 $\times$ Frag/Elute buffer, 吹打混匀后, 按照下表程序 (热盖 105 $^{\circ}\text{C}$) 进行 RNA 打断:

打断片段大小	打断条件
300-450 nt	94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ hold

9) 当温度降至 4 $^{\circ}\text{C}$ 时, 将离心管取出, 瞬时离心后置于冰上, 立即进行下一步 First strand cDNA 的合成。

3.2.8.2.2 First strand cDNA 合成

1) 取出 RT Strand Specificity Reagent 室温融解, 冰上配制如下体系:

试剂	加入量
打断后 mRNA	10 μL
RT Strand Specificity Reagent	8 μL
First Strand Synthesis Enzyme Mix	2 μL
总体积	20 μL

2) 使用移液器吹打混匀, 瞬时离心, 将体系置于 PCR 仪:

温度	时间
25 $^{\circ}\text{C}$	10 min
42 $^{\circ}\text{C}$	15 min
70 $^{\circ}\text{C}$	15 min
4 $^{\circ}\text{C}$	hold

3.2.8.2.3 Second strand cDNA 合成

1) 将 Second Strand Synthesis Reaction Buffer with dUTP 从冰箱中取出冰上融解, 并按照下表体系加入各试剂:

试剂	加入量
First strand cDNA	20 μL
Second Strand Synthesis Reaction Buffer with dUTP	8 μL
Second Strand Synthesis Enzyme Mix	4 μL
Nuclease-free Water	48 μL
总体积	80 μL

2) 使用移液器吹打混匀, 瞬时离心后, 将样本置于 PCR 仪 (热盖温度关闭):

温度	时间
16 °C	60 min

- 3) 提前将 Agencourt AMPure XP beads 从 2-8 °C 取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者振荡混匀；
- 4) 样本孵育结束后，每个样本加入 144 μL Agencourt AMPure XP beads(1.8 $\times$)，枪头吹打混匀；
- 5) 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上 5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清；
- 6) 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清；
- 7) 重复 6)，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次后，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干；
- 8) 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后，加入 39 μL Low EDTA TE，吹打混匀；
- 9) 室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 37 μL 上清至另一离心管中；
- 10) 双链 cDNA 洗脱产物可在 -20 °C 暂存 24 小时。

3.2.8.2.4 末端修复

- 1) 将 End-prep Buffer 从冰箱中取出，冰上融解后配制如下体系：

试剂	加入量
双链 cDNA	37 μL
End-prep Buffer	10 μL
End-prep Enzyme Mix	3 μL
总体积	50 μL

- 2) 枪头吹打混匀，瞬时离心，PCR 仪上进行如下孵育：

温度	时间
20 °C	30 min
65 °C	30 min
4 °C	hold

3.2.8.2.5 接头连接

- 1) 将 Ligation Buffer，RNA Truncated Adapter 取出冰上融解，在冰上配制接头

连接体系:

试剂	加入量
End-prep DNA	50 μL
Ligation Buffer	16.5 μL
RNA Truncated Adapter	2.5 μL
Ligase Mix	3 μL
总体积	70 μL

2) 吹打混匀, 瞬时离心, PCR 仪上进行连接反应(热盖温度关闭):

温度	时间
22 $^{\circ}\text{C}$	15 min

3) 提前将 Agencourt AMPure XP beads 从 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 取出, 静置平衡至室温, 使用前涡旋或者振荡混匀;

4) 在连接体系中加入 30 μL Nuclease-free Water, 共 100 μL 体系;

5) 再加入 30 μL Agencourt AMPure XP beads (0.30 $\times$), 吹打混匀;

6) 室温静置 5 min, 磁力架上静置 5 min, 直到溶液变澄清(切勿丢弃上清);

7) 将上清转移至另一离心管中, 加入 20 μL Agencourt AMPure XP beads (0.2 $\times$), 吹打混匀;

8) 室温静置 5 min, 磁力架上静置 5 min, 直到溶液变澄清, 小心弃除上清;

9) 将离心管保持在磁力架上, 加入 200 μL 80% 乙醇, 静置 30 s, 弃除全部上清;

10) 重复 9), 将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次后, 用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干;

11) 干燥磁珠 2-3 min, 待酒精挥发完全后, 加入 22 μL Low EDTA TE, 吹打混匀;

12) 室温静置 2 min, 磁力架上 1 min, 直到溶液变澄清, 小心吸取 19.5 μL 上清至另一新的 PCR 管中备用;

3.2.8.2.6 PCR 扩增文库

1) 连接产物纯化结束后选择 Adapter Kit 进行文库富集。

试剂	加入量
连接纯化后产物	19.5 μL
2X PCR Mix	25 μL
UDG Enzyme	0.5 μL
Universal PCR Primer	2.5 μL
PCR Index	2.5 μL
总体积	50 μL

2) 枪头吹打混匀，微离心，PCR 仪中按照如下程序进行 PCR:

温度	时间	Cycles
37 °C	10 min	1
98 °C	1 min	1
98 °C	10 s	
60 °C	15 s	11
72 °C	30 s	
72 °C	1 min	1
4 °C	hold	

3) 提前将 Agencourt AMPure XP beads 从 2-8 °C 取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者振荡混匀；

4) PCR 反应结束后,每个反应管中加入 40 μL Agencourt AMPure XP beads(0.8 $\times$), 吹打混匀；

5) 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上 5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清；

6) 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30s，弃除全部上清；

7) 重复 6)，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次，用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干；

8) 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后，加入 31 μL Low EDTA TE，吹打混匀；

9) 室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 30 μL 文库至另一新的离心管中，留存备用。

3.2.8.3 转录组文库质检

使用 qubit 2.0 测量最终文库的浓度，并通过凝胶电泳初步分析最终文库的片段分布，最后送苏州金唯智生物科技有限公司进行高通量测序。

3.2.8.4 转录组数据分析

使用软件 nf-core rnaseq pipeline 进行上游数据分析, 参数为“--aligner hisat2 --skipBiotypeQC --genome mm10”。使用软件 DESeq2 用于差异基因表达分析并输出归一化计数矩阵。然后利用 Cytoscape/ClueGo 软件, 通过 GO-ImmunesystemProcess-EBI-UniProt-GOA-ACAP-ARAP-08.05.2020 数据库对差异表达基因进行富集, 过滤条件如下 $p \leq 0.05$, Correction Method Used = Bonferroni step down, Min GO Level = 3, Max GO Level = 8, Kappa Score Threshold = 0.4。在软件 Cytoscape / ClueGo 中将“首选布局”调整为“预用力定向布局”以绘制 GO 富集结果图。

3.2.8.5 荧光定量 PCR 验证转录组数据

使用随机引物对肿瘤总 RNA 进行反转录。按照表 3-5 配制 20 μL 的反转录体系。

表 3-5 反转录合成 cDNA 体系

Table 3-5 Reverse transcription system of cDNA

试剂	加入量
RNA	1.0 μg
Random Primer	0.5 μL
RRI	0.5 μL
dNTP	2.0 μL
5 $\times$ AMV buffer	4.0 μL
AMV	2.0 μL
DEPCH2O	Upto 20 μL

冰上配制反应体系, 室温放置 10 min, 再转移到 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴 60 min, 最后冰浴 2 min, 反应结束后可保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

将反转录得到的 cDNA 作为模板分别与各个基因上下游引物进行 qRT-PCR 扩增, 检测 mRNA 的表达, 按照表 3-6 配制 10 μL 的扩增体系。

表 3-6 qRT-PCR 反应体系

Table 3-6 qRT-PCR reaction system

试剂	加入量
cDNA	1.0 μ L
ITR-F	0.5 μ L
ITR-R	0.5 μ L
2 $\times$ SYBRGreen	5.0 μ L
ddH ₂ O	3.0 μ L

冰上配制体系，配制好的 PCR 体系使用小离心机混匀后放入 ABI QuantStudio 3 实时 PCR 系统进行检测，然后通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 *Cxcl10*, *Ifng*, *Pdcd1*, *Cd274* 的相对表达量。mRNA 检测引物如表 3-7:

表 3-7 mRNA 检测引物

Table 3-7 The detection primers of mRNA

引物名称	引物序列
Cxcl10-F	5'-CCAAGTGCTGCCGTCATTTTC-3'
Cxcl10-R	5'-GGCTCGCAGGGATGATTTC-3'
Ifng-F	5'-GCCACGGCACAGTCATTGA-3'
Ifng-R	5'-TGCTGATGGCCTGATTGTCTT-3'
Pdcd1-F	5'-GCTCCAAAGGACTTGTACGTG-3'
Pdcd1-R	5'-TGATCTGAAGGGCAGCATTTC-3'
Cd274-F	5'-GCTCCAAAGGACTTGTACGTG-3'
Cd274-R	5'-TGATCTGAAGGGCAGCATTTC-3'
β -actin-F	5'-CGTTGACATCCGTAAAGACC-3'
β -actin-R	5'-AACAGTCCGCCTAGAAGCAC-3'

3.2.9 单倍剂量卡介苗和抗 PD-L1 联合治疗 TNBC 小鼠模型

为了验证单倍剂量 BCG 和抗 PD-L1 联合疗法对 TNBC 小鼠模型的溶瘤作用，肿瘤接种后第 5 天将小鼠随机分为四组。在单倍剂量卡介苗联合抗 PD-L1 治疗组中，向小鼠肿瘤内注射 10 μ L OD₆₀₀ = 2 的溶解于 PBS 的 BCG 溶液，注射 BCG 后第 9 天，连续 7 天给小鼠腹膜内注射剂量为 20 mg/kg 的 BMS202。在抗 PD-L1 治疗组中，肿瘤接种后第 5 天给小鼠注射 10 μ L PBS 溶液，PBS 注射后第 9 天，连续 7 天向小鼠腹膜内注射 BMS202，剂量为 20 mg/kg。在三剂量 BCG 治疗组和 PBS 组中，按照先前的方法对小鼠进行治疗。每 3-4 天用游标卡尺记录每只小鼠肿瘤的长度(L)和短(W)直径。根据椭球体积计算公式(即 $1/2 \times L \times W^2$)计算每只动物的肿瘤体积。

活体成像：肿瘤接种后 21 天，将 D-luciferin 以 150 mg/kg 的剂量腹膜内注射到

每组的 4 只小鼠中。注射后 15 分钟，使用小型动物活体光学成像仪（PerkinElmer）对小鼠成像。使用成像软件（PerkinElmer）定量分析小鼠肿瘤模型中荧光素酶的表达。肿瘤植入后 30 天，麻醉处死小鼠，分离肿瘤照相并称重。

碘化丙啶（PI）检测小鼠肿瘤细胞死亡：肿瘤植入后 30 天，按照每只小鼠 200 μL 的剂量，静脉注射 PI 溶液，10 min 后，麻醉处死小鼠，分离肿瘤块。对肿瘤块进行冰冻切片，用 Hoechst 染色 1 分钟。通过 Olympus FV1000 显微镜收集共聚焦图像。

3.2.10 三质粒包装系统包装 rAAV

1) 细胞准备

包毒转染前一天下午将 HEK 293T 细胞以密度 7×10^5 个/mL 铺到 150 mm 培养皿中，体积 30 mL，第二天早上（14 h 左右）观察细胞并换 15 mL 新鲜完全培养基（含 10% FBS 的 DMEM，不含双抗），若细胞融合度达到 80% 左右则等 1-2 h 即可开始转染，若细胞密度未达到，可等细胞密度达到再做。

2) 转染包毒

待细胞长好后，以核心质粒 pAAV-CMV-eGFP（5.4 kb）为例，配转染液，以下为一个 150 mm 平皿量：

配 A 液：按照 pAAV-CMV-eGFP(5.4 kb)：pAAV-DJ(7.3 kb)：pHelper（11.6 kb）分子量等于 1:1:1，核心质粒 pAAV-CMV-eGFP 固定加 20 μg ，pAAV-DJ 加 $20 \times 7.3/5.4 = 27.04$ μg ，pHelper 加 $20 \times 11.6/5.4 = 42.96$ μg ，加入 500 μL opti-MEM 中，涡旋混匀；

配 B 液：按照 PEI（体积， μL ）/DNA（质量， μg ）=2，即加 $(20 + 27.04 + 42.96) \times 2 = 180$ μL PEI 入 500 μL opti-MEM 中，涡旋混匀；

静置 5 分钟后，将 B 液加入 A 液中，涡旋混匀，静置 15 分钟后加入平皿培养基中，轻轻晃动平皿，使转染液均匀分布；

6-8h 后换维持液（2% FBS，1% 双抗 DMEM，30 mL）。

3) 收毒

转染 72 小时后，将细胞及上清收集起来，1000 g 离心 5 min，弃上清，加入 1 mL 细胞裂解液，液氮/37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反复冻融四次。10000 g，4 $^{\circ}\text{C}$ ，离心 10 min，收集

上清，加入 50 U DNase I，37 °C 孵育 45 min。10000 g，4 °C，离心 10 min，收集上清，4 °C 保存待下一步纯化。

按照上述方法包装包装 rAAV-Cre、rAAV/293-CMV-eGFP、rAAV-CMV-luc、rAAV-GSDMD^{NT}、rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT}、rAAV-efl α -DIO-GSDMB^{NT}、rAAV-efl α -DIO-GSDME^{NT}、rAAV-mCBA-DIO-GSDME^{NT} 和 rAAV-polyA-rtTA-CMV2-TRE-hDNT-polyA。

3.2.11 杆状病毒包装系统包装 rAAV

1) 重组杆粒的包装

将质粒 pFastBac-ITR-CMV-eGFP 转化 DH10Bac 感受态，转位成为杆粒，并以蓝/白斑筛选来鉴定含有重组杆粒的克隆。

Bac-to-Bac 转化：

- (1) 取 2 管 100 μ L 大肠杆菌 DH10Bac 感受态于冰上融化。
- (2) 将质粒稀释为 5 ng/ μ L，取 1 μ L 加入感受态细胞中，感受态细胞中质粒即为 5 ng，轻轻吹打或轻敲管壁混匀。
- (3) 再将菌液转入一支预冷的 15 mL 离心管中，冰浴 30 min。
- (4) 将菌液放入 42 °C 水浴锅中热激 90 s，再放入冰上冰浴 2 min。
- (5) 向每管菌液中加入 900 μ L 无抗 LB 液体培养基，放入 37 °C 恒温水平摇床上 200 rpm/min 复苏 4 h。
- (6) 取菌液 100 μ L 均匀涂布于含庆大霉素、卡那霉素、四环素、IPTG、X-gal 的 LB 固体培养平板。
- (7) 平板倒置于 37 °C 培养箱中培养至少 48 h。
- (8) 在培养 48 h 后的 LB 固体培养平板中挑取数个白色的克隆，重新划线于新鲜 LB 平板(50 ug/mL Kan, 7 ug/mL Gen, 10 ug/mL Tet, 100 ug/mL X-gal, 40 ug/mL IPTG)，37 °C 过夜培养。
- (9) 在重新划线的平板上选出单克隆证明是白色的显性菌斑，接种至含有 50 ug/mL Kan, 7 ug/mL Gen, 10 ug/mL Tet 的液体中，在 37 °C 摇床中培养 3 h。

重组杆粒的显性验证及杆粒提取：

根据转座重组发生的原理, 利用已有引物按照体系进行阳性鉴定 (如果插入片段较短则可直接用转座子上下游引物 M13-F: 5'-GTTTCCAGTCACGAC-3', M13-R: 5'-AGGAAACAGCTATGAC-3'进行鉴定, 如较长则用转座子上游和片段下游引物或片段上游及转座子下游引物进行鉴定):

表 3-8 菌液 PCR 体系

Table.3-8 Bacterial Liquid PCR System

试剂	加入量
菌液	1.0 μL
M13-F	0.5 μL
M13-R	0.5 μL
2 $\times$ TaqPCRMaster Mix	5 μL
ddH ₂ O	3.0 μL

配制好 PCR 体系后进行扩增。扩增完毕后凝胶电泳, 电泳完毕后, 在紫外光下观察, 将出现与目的基因大小一样的条带的样品, 如大小符合则目的片段转座成功, 定为阳性, 如果大小不对则可能转座不成功。

挑选 PCR 阳性的重组杆粒, 接种至含有 50 ug/mL Kan, 7 ug/mL Gen, 10 ug/mL Tet 的三抗 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中培养 14 h, 按如下体系提取重组杆粒:

- (1) 取 1.5-3 mL 培养物于 EP 管中, 1000 g 室温离心 1 min;
- (2) 弃上清, 向菌体沉淀中加入 300 μL 溶液 1, 重悬菌体, 室温放置 5-10 min, 使 RNase 酶作用充分;
- (3) 加入 300 μL 溶液 2, 轻轻混匀, 室温孵育 5 min, 此时溶液应该由浑浊变澄清;
- (4) 缓慢加入 300 μL 溶液 3, 边加边轻微震荡 (上下颠倒, 直至混匀, 不可剧烈摇晃), 管中形成浓厚的蛋白沉淀时, 将样品放置冰上 5 min;
- (5) 14000 g 室温离心 10 min, 取出上清于新的 2 mL EP 管中, 加入 800 μL 20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的异丙醇;
- (6) 将上清轻轻转移到含异丙醇的离心管中, 轻轻倒转离心管数次, 直至样品和异丙醇混合均匀为止, 冰上放置 5-10 min;
- (7) 样品在室温下 (最好 4 $^{\circ}\text{C}$) 14000 g 离心 15 min;
- (8) 弃去上清, 再在管中加入 70%乙醇 0.5 mL, 翻转离心管数次, 清洗沉淀, 室温 14000 g 离心 5 min (重复两次);

(9) 弃去上清, 尽可能去掉管内液体, 室温下沉降 DNA, 空气干燥 5-10 min, 白色沉淀变干, 除乙醇后会变透明;

(10) 待沉淀变成无色透明后, 加入 38 μL 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 ddH₂O 溶解杆粒;

(11) 测浓度, 并长期保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

2) 重组杆毒的包装

利用处于对数期 ($1.5\text{-}2.5\times 10^6$ 个细胞/mL) 的 Sf9 细胞, 按照 1×10^6 个细胞/孔, 用 2 mL 无抗无血清 Sf-900TM II SFM 培养基稀释细胞后, 铺于六孔板, 放入 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱, 等待细胞贴壁。在 1.5 mL 的灭菌 EP 管中, 将 1 μg 纯化的杆粒 DNA 加入 100 μL 无抗无血清的 Sf-900TM II SFM 培养基进行稀释。混匀 Cellfectin®II 试剂, 吸出 8 μL Cellfectin®II 试剂加入 100 μL 无抗无血清的 Sf-900TM II SFM 培养基进行稀释。将稀释的杆粒 DNA 加入稀释的 Cellfectin®II 试剂 (总体积约 209 μL)。轻轻混合, 室温孵育 20 min。将混合液加入到六孔板中。27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h 后, 弃去转染液, 向细胞中加入 2 mL 含有抗生素的 Sf-900TM II SFM 培养基, 27 $^{\circ}\text{C}$ 潮湿条件下孵育 72 h 后收集 P1 病毒株。500 g 离心 5 min 除去细胞和大的碎片, 将上清转到新的 1.5 mL 离心管, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光储存。

得到 P1 代杆毒后, 由于 P1 代杆毒通常滴度不够且杂质过多, 故利用 P1 代杆毒再次感染 Sf9 细胞, 扩增获得 P2 代杆毒甚至 P3 代杆毒。准备好状态良好且处于对数生长期的 Sf9 细胞, 将 P1 代杆毒按照 1:100 的量加入昆虫细胞瓶培养的 Sf9 细胞中, 感染 72h 后收或 P2 代毒。

按照上述方法包装 rBac-mCBA-eGFP、rBac-CMV-eGFP、rBac-CMV-GSDMD^{NT} 和 rBac-mCBA-GSDMD^{NT}。

3) 重组杆状病毒滴度测定

为了对 P2 代毒进行滴度的测定。利用处于对数期 ($1.5\text{-}2.5\times 10^6$ 个细胞/mL) 的 Sf9 细胞, 按照 1×10^6 个细胞/孔, 用 2 mL 无抗无血清 Sf-900TM II SFM 培养基稀释, 铺于六孔板。1 h 培养之后, 准备 8 个稀释梯度 (10^{-1} 到 10^{-8}) 的病毒液, 将稀释梯度为 $10^{-4}\text{-}10^{-8}$ 的病毒稀释液加入六孔板中, 27 $^{\circ}\text{C}$ 培育 1 h。将 4% 琼脂糖凝胶在微波炉中融化, 与提前预热的 Sf-900TM II SFM 按照 1:3 的比例混合放在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中备用。除去含有病毒液的培养基, 用 2 mL 琼脂培养基代替。室温放置 5 min 待其凝固, 27 $^{\circ}\text{C}$ 潮湿培养箱培养 7 d 直到可见空斑。向每孔加入 1 mg/mL 中性红染料, 进行计数, 根据以下公式计算滴度: 病毒滴度 (pfu/mL) = 蚀斑数 $\times$ 病毒稀释倍数 / 培

养液体积。确保获得的重组杆病毒滴度大于 1×10^8 pfu/mL。

在噬斑法测定完病毒滴度后确定滴度，采用该杆病毒作为标准品，分装后存于 -80°C ，后续其他杆病毒滴度测定可用 qPCR(荧光定量 PCR)测定滴度，具体方法如下：取 $5\ \mu\text{L}$ 杆病毒于 $95\ \mu\text{L}$ PEG200 中（如杆病毒毒价不够高则取 $5\ \mu\text{L}$ 杆病毒到 $45\ \mu\text{L}$ PEG200 中，涡旋后静置 $15\ \text{min}$ ，此时处理后的杆病毒为标准品的最高次方数，例 10^7 ，取 $10\ \mu\text{L}$ 到 $90\ \mu\text{L}$ ddH₂O 中混匀，则稀释了 10 倍，为 10^6 ，依次类推，重复 5 个梯度，涡旋仪涡旋至充分混匀后，室温静置 $15\ \text{min}$ ，加入 $400\ \mu\text{L}$ ddH₂O 混匀，此时假如杆病毒次方数为 10^7 ，则取 $50\ \mu\text{L}$ 稀释后的杆病毒到 $450\ \mu\text{L}$ ddH₂O 中，稀释了 10 倍即为 10^6 ，依次类推，重复 5 个梯度。按照 $10\ \mu\text{L}$ 的体系加入 $1\ \mu\text{L}$ 处理后的杆病毒，重复三个孔，体系如下：

表 3-9 qPCR 反应体系

Table 3-9 qPCR reaction system

试剂	加入量
稀释后的杆病毒	$1.0\ \mu\text{L}$
ITR-F	$0.5\ \mu\text{L}$
ITR-R	$0.5\ \mu\text{L}$
2×SYBR Green Mix™	$5.0\ \mu\text{L}$
ddH ₂ O	$3.0\ \mu\text{L}$

4) 双杆病毒感染 Sf9 包装 rAAV

将辅助杆病毒 rBac-AAV/helper 感染 Sf9 细胞进行扩增，使滴度大于 1×10^8 pfu/mL。

将 Sf9 细胞培养至 $2-3 \times 10^6$ 个 cell/mL，将细胞离心收集，稀释到 2×10^6 个 cell/mL。

将 rBac-AAV/helper 和 rBac-CMV-eGFP 按照每种病毒 MOI = 1 进行接毒。

感染 72h 后收毒，将细胞转移到 $50\ \text{mL}$ 离心管中， $3000\ \text{rpm}$ ，离心 $5\ \text{min}$ 收集细胞，弃去上清，按照每 1×10^7 个 cell/mL 的量加细胞裂解液，吹散重悬细胞，液氮/ 37°C 水浴锅反复冻融 3-4 次， $5000\ \text{rpm}$ ， 4°C 离心 $10\ \text{min}$ ，收集上清。加入全能核酸酶至终浓度 $50\ \text{U/mL}$ ， 37°C 孵育 $60\ \text{min}$ 。 $5000\ \text{rpm}$ ， 4°C 离心 $10\ \text{min}$ ，收集上清。 60°C 水浴 $30\ \text{min}$ 灭活杆病毒。 4°C ， $5000\ \text{rpm}$ 离心 $10\ \text{min}$ ，收集上清。 4°C 保存待下一步纯化。

按照上述方法包装 rAAV/Sf9-CMV-eGFP、rAAV-CMV-GSDMD^{NT}、rAAV-mCBA-eGFP 和 rAAV-mCBA-GSDMD^{NT}。

3.2.12 rAAV 纯化及滴度测定

1) rAAV 纯化

配置不同浓度的碘克沙醇：

15%碘克沙醇：4.5 mL 60%碘克沙醇溶于 13.5 mL 1 mol/L NaCl/PBS-MK；

25%碘克沙醇：5 mL 60%碘克沙醇溶于 7 mL 1×PBS-MK，加入 30 μ L 酚红溶液；

40%碘克沙醇：6.7 mL 60%碘克沙醇溶于 3.3 mL 1×PBS-MK；

60%碘克沙醇：10 mL 60%碘克沙醇加入 45 μ L 酚红溶液；

用 16 ga 的注射针头贴着离心管底部将不同浓度的碘克沙醇按照浓度从低到高的顺序依次加入超速离心管，最后将病毒液缓慢加与离心管顶层。

使用贝克曼库尔特 Optima XPN 超高速离心机的 T70i 转子 200,000 g，18℃离心 2 h；

离心完成后 rAAV 病毒粒子主要分布在浓度为 40%的碘克沙醇，收集 40%的碘克沙醇于 100 KD 的超滤管中，加入 10 mL 过滤后的 PBS，5000 rpm 离心 15 min，弃掉离心管底部的滤液，超滤管中再加入 10 mL PBS 重复以上操作两次后将超滤管中的病毒液浓缩到 250 μ L 后收集病毒液并分装，分装后的病毒液保存于-80℃冰箱。

2) rAAV 滴度测定

rAAV 样品的处理：

分别取 rAAV 病毒液 5 μ L 于 1.5 mL 离心管中，加入 193 μ L 的 DMEM，最后加入 2 μ L rDNaseI，吹吸混匀，放入 37℃ 水浴锅反应 45 min，除去重组腺相关病毒核衣壳外的 DNA，最后煮沸 10 min，灭活 rDNaseI。取 10 μ L 上述混合液，加入到 90 μ L 无菌水中混匀，再取此步稀释液 10 μ L 加入到 90 μ L 无菌水中混匀，此时病毒液已被稀释 4000 倍。

制作标准曲线的质粒的准备：

根据公式：质粒拷贝数 (copies/ μ L) = [质粒浓度 (ng/ μ L) $\times 10^9 \times 6.02 \times 10^{23}$] / [质粒大小(bp) $\times 648$]。

质粒 pAAV-CMV-eGFP 的大小为 5389 bp，将 pAAV-CMV-eGFP 质粒稀释到 58 ng/ μ L，即得到拷贝数为 1×10^{10} 个/ μ L 的标准质粒。取 1.5 mL 离心管，加入 90 μ L 无菌水，再加入稀释好的 pAAV-CMV-eGFP 质粒 10 μ L，重悬混匀，按此方法依次按十倍关系倍比稀释，直至质粒浓度为 1000 个/ μ L。得到 1×10^9 个/ μ L， 1×10^8 个/ μ L， 1×10^7

个/ μL , 1×10^6 个/ μL , 1×10^5 个/ μL , 1×10^4 个/ μL , 1×10^3 个/ μL 这七个浓度的标准质粒稀释液。

按照表 3-10 在 qPCR 管中配制 10 μL qPCR 体系。每个浓度的标准质粒稀释液做三个平行重复。病毒稀释液也按照相同的体系配制，每个病毒稀释液做三个平行重复。同时设置阴性对照。

表 3-10 qPCR 反应体系

Table 3-10 qPCR reaction system	
试剂	加入量
质粒/病毒	1.0 μL
ITR-F	0.5 μL
ITR-R	0.5 μL
2 $\times$ SYBRGreen	5.0 μL
ddH ₂ O	3.0 μL

冰上配制，使用小型离心机混匀后，置于 qPCR 仪中，95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 预变性，95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，循环四十次。

病毒滴度的计算：

以标准质粒的浓度的对数为横坐标，以对应的 CT 值为纵坐标，绘制标准曲线，并显示标准曲线公式与 R^2 。注意 $R^2 \geq 0.98$ ，标准曲线可用。带入 rAAV 病毒液的 CT 值的平均值于公式中，计算出病毒拷贝数，最后乘上最开始的病毒稀释倍数 4000 倍为最终的病毒滴度。rAAV 滴度单位为病毒基因组/毫升，即 vg/mL 。

3.2.13 哺乳动物启动子的筛选

3.2.13.1 启动子序列比对

通过文献查找，找到一个在 Sf9 昆虫细胞中不表达，但在哺乳动物细胞中表达的 mCBA 启动子(Ge et al 2014)。为探索 mCBA 与常用 CBA、CAG 启动子的区别，现对三个启动子进行序列对比。将三个启动子序列均保存为 FASTA 格式，然后上传至 ClustalW 网站 (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)，采用 Clustal 算法进行序列比对。比对完成后，点击 clustalw.aln 下载序列比对文件。然后将 clustalw.aln 文件上传至 ENDscript/ESPrpt 网站 (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>) 对序列比对结果进行作图。

3.2.13.2 启动子活性检测

提前一天分别将 HEK 293T 细胞、Hela 细胞、4T1-luc 细胞铺至 CellCarrier-96 ultra plates。去内毒素提取质粒 pFastBac-mCBA-eGFP(7592 bp)、pFastBac-CAG-eGFP (8240 bp) 和 pFastBac-CBA-eGFP (7231 bp)，使用 PEI 转染试剂，以 pFastBac-CBA-eGFP 每孔转染 0.2 μg 为基准，其他两个质粒转染相同摩尔数的质量，即 pFastBac-mCBA-eGFP 每孔转染 0.21 μg ，pFastBac-CAG-eGFP 每孔转染 0.23 μg ，每个质粒每种细胞各转染三个复孔，转染后 6 个小时吸弃上清换上维持液。转染后 48 h，使用 Opera Phenix™ High Content Screening System，在 20 倍物镜下，每个孔采集 25 个视野。使用 Opera Phenix™ High Content Screening System 自带软件，对图像荧光强度进行统计分析。

3.2.13.3 哺乳动物启动子的鉴定

为进一步确认 mCBA 启动子的哺乳动物特异性，将 pFastBac-ITR-CMV-eGFP，pFastBac-mCBA-eGFP 和 pFastBac-CBA-eGFP 分别转染到预先接种在 6 孔板中的 Sf9 细胞中。每个质粒 DNA 的每孔转染 1 μg 质粒。转染后 48 小时，使用 Invitrogen™ EVOS™ FL Auto 1 显微镜采集图像。

将 rBac-CMV-GSDMD^{NT}，rBac-mCBA-eGFP 和 rBac-mCBA-GSDMD^{NT} 分别按照 MOI = 1 的接种量，感染预先接种在 6 孔板中的 Sf9 细胞。感染 48 h 后，使用 Invitrogen™ EVOS™ FL Auto 1 显微镜采集图像。

3.2.14 利用杆状病毒包装系统包装表达 GSDMD^{NT} 的 oAAV-P1

利用哺乳动物启动子 mCBA 和 Sf9 昆虫细胞，按照步骤 3.2.11 及 3.2.12，包装纯化获得高滴度的表达 GSDMD^{NT} 的 rAAV-mCBA-GSDMD^{NT}。将 rAAV-mCBA-GSDMD^{NT} 滴度调整至 2×10^{12} vg/mL，并将其命名为溶瘤腺相关病毒 P1，英文为 Oncolytic AAV P1，简称 oAAV-P1。

3.2.15 利用三质粒包装系统包装表达 GSDMD^{NT} 的 oAAV-P2

1) Cre/loxP 系统的验证

为进一步验证 Cre/loxP 系统可以成功避免 GSDMD^{NT} 在包装时的表达, 将质粒 pAAV-GSDMD^{NT}, pAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 和 pAAV-Cre 分别以每孔 1 μ g 的量转染到预接种在 6 孔板中的 HEK 293T 细胞。转染 48 小时后, 使用 InvitrogenTM EVOSTM FL Auto 1 显微镜记录图像。

2) 利用三质粒包装系统包装表达 GSDMD^{NT} 的 oAAV-P2

利用 Cre/loxP 系统和三质粒包装系统, 按照步骤 3.2.10 及 3.2.12, 包装纯化获得高滴度的 rAAV-Cre 及 rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT}。rAAV-Cre 和 rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 共感染时会造成细胞焦亡, 将两者滴度均调整至 2×10^{12} vg/mL, 等体积混合后, 将其混合物命名为溶瘤腺相关病毒 P2, 英文为 Oncolytic AAV P2, 简称 oAAV-P2。

3.2.16 oAAV-P1 和 oAAV-P2 细胞实验

1) oAAV-P1 和 oAAV-P2 介导细胞焦亡

为了在 HEK 293T 中进行细胞焦亡检测, 提前一天将预培养的 HEK 293T 细胞接种到 CellCarrier-96 ultra plates 中, 然后分别用 rAAV-efl α -GSDMD^{NT}, oAAV-P1 和 oAAV-P2 按照 MOI = 100000 进行感染, 同时用 PBS 作为对照组。将所有细胞在 37 °C, 5% CO₂ 下孵育 6 小时, 然后放入 Opera PhenixTM High Content Screening System (PerkinElmer), 在 63 倍水镜下每 30 分钟收集一次图像。同时另外转染一块 96 孔板, 并在感染后 48 小时使用具有 40 倍微分干涉对比 (DIC) 物镜的 Olympus IX83 显微镜采集图像。

为了利用 PI 和 annexin V-APC 进行细胞焦亡检测, 提前一天将 HeLa、HEK 293T、Hep3B、4T1-luc 和 C6-luc 细胞分别接种在 CellCarrier-96 ultra plates 中, 然后分别用 rAAV-efl α -GSDMD^{NT}, oAAV-P1 和 oAAV-P2 按照 MOI = 100000 进行感染, 同时用 PBS 作为对照组。感染后 48 小时, 用 PBS 洗涤细胞, 在成像前 15 min 加入 PI 和 annexin V-APC, 然后使用 Olympus FV1000 显微镜在 40 倍物镜上收集共聚焦图像。

2) 检测 oAAV-P1 和 oAAV-P2 介导细胞焦亡效率

为了验证 oAAV-P1 和 oAAV-P2 介导细胞焦亡效率, 在 HeLa、HEK 293T、4T1-luc 和 C6-luc 细胞感染病毒 48 h 后, 参照试剂盒说明书, 使用试剂盒 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay 检测细胞存活率, 使用试剂盒 LDH-Glo Cytotoxicity

Assay 检测 LDH 释放。

3) oAAV-P1 和 oAAV-P2 介导细胞焦亡效率不同的原因

efl α 和 mCBA 启动子介导焦亡效率：

为了研究 efl α 和 mCBA 启动子介导焦亡效率，提前一天将 HeLa、HEK 293T 和 4T1-luc 接种至 96 孔板，然后将质粒 pAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 和 pAAV-mCBA-DIO-GSDMD^{NT} 按照相同的摩尔数分别与质粒 pAAV-Cre 共转染细胞，同时每种细胞均设置单独转染质粒 pAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT}、pAAV-mCBA-DIO-GSDMD^{NT}、pAAV-Cre 的对照组。转染后 48 h，使用奥林巴斯普通荧光显微镜采集图像。同时参照试剂盒说明书，使用试剂盒 LDH-Glo Cytotoxicity Assay 检测 LDH 释放以判断焦亡效率。

不同物种来源衣壳蛋白转导基因效率：

为了研究 HEK 293T 细胞和 Sf9 昆虫细胞包装出的 rAAV 是否会因为衣壳蛋白来源不同导致基因转导效率不同，提前一天分别将 HEK 293T 细胞、HeLa 细胞、4T1-luc 细胞铺至 CellCarrier-96 ultra plates。按照 MOI = 100000 每种细胞分别加入 rAAV/293-CMV-eGFP 和 rAAV/Sf9-CMV-eGFP，感染 48 h 后，使用 Opera Phenix™ High Content Screening System，在 20 倍物镜下，每个孔采集 25 个视野。使用 Opera Phenix™ High Content Screening System 自带软件，对图像荧光强度进行统计分析。

3.2.17 oAAV-P1 和 oAAV-P2 治疗 GBM 大鼠模型

1) GBM 大鼠模型的构建

细胞悬浮液准备：C6-luc 细胞系培养至 70-80 %融合度时，使用胰酶进行消化，加入完全培养基中和胰酶后，1000 rpm 离心 5 min，吸弃上清后，使用 F12K 基础培养基进行重悬，调整密度至 1×10^8 个细胞/mL，放于 37 °C 水浴锅待用。

提前 3-4 天购买体重 160-200 g SPF 级 Wistar 雄性大鼠，待其适应新环境后（体重长至 180-220 g），按照每 100 g 体重 0.9 mL 的剂量腹腔注射混合麻醉剂。待大鼠麻醉后，剃去头部毛发，切开头部皮肤，放至鼠脑立体定位仪上进行校准，然后使用 10 μ L 微量注射针吸取 10 μ L 细胞悬浮液，参照《大鼠脑立体坐标图谱》第六版，以 Bregma 点为原点，在左侧 3 mm、前 1 mm 处使用颅骨钻打孔，然后前缓慢进针至深度 5.5 mm，停针 5 min，退针至 5.0 mm，按照 1 μ L/min 的速度，使用微量注射

泵进行注射，待注射完毕后，停针 10 min，缓慢退针后，撒入适量青霉素粉末，缝合皮肤，放入饲养笼继续饲养。

2) oAAV-P1 治疗 GBM 大鼠模型

为了验证 oAAV-P1 的溶瘤作用，在 C6 细胞植入后第 8 天，将动物随机分为两组，分别使用脑立体定位仪瘤内注射 10 μ L 包含 1×10^{10} vg 的 oAAV-P1 或 rAAV-mCBA-eGFP。将所有大鼠保持在标准环境条件下，每 3-4 天记录一次体重。oAAV-P1 治疗后 23 d，将大鼠麻醉处死，多聚甲醛灌注取脑后，送至武汉博尔夫生物科技有限公司进行石蜡切片及 HE 染色。

3) oAAV-P2 治疗 GBM 大鼠模型

为了验证 oAAV-P2 的抗肿瘤作用，在 C6-luc 细胞植入后 8 天，将动物随机分为三组，分别使用脑立体定位仪瘤内注射 10 μ L 包含 1×10^{10} vg 的 oAAV-P2，rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 或 PBS。每 2 或 3 天称一次体重。在 oAAV-P2 治疗后第 13 天，每组随机取 3 只大鼠，按照 75 mg/kg 剂量腹腔注射 D-luciferin。注射 D-luciferin 15 分钟后，使用小动物活体光学成像仪（PerkinElmer）进行成像，并使用成像软件对荧光素酶的表达进行定量。oAAV-P2 治疗后第 28 及 43 天，每组随机取 3 只大鼠，麻醉处死，多聚甲醛灌注取脑后，送至武汉博尔夫生物科技有限公司进行石蜡切片及 HE 染色。另外，对第 28 天收获的各組大腦切片，用抗大鼠抗体 CD3-BV421（BD Biosciences）进行免疫组化染色。通过 Olympus FV1000 显微镜在 40 倍物镜上收集共聚焦图像。使用 ImageJ 软件定量分析所收集图像的灰度值（每组三只大鼠，每只大鼠三个随机区域），以评估肿瘤中的淋巴细胞浸润情况。

为验证 oAAV-P2 治疗对 GBM 大鼠模型血脑屏障的影响，oAAV-P2 治疗后第 28 及 43 天，每组随机取 3 只大鼠以每只大鼠 1 mL 的剂量尾静脉注射伊文思蓝溶液。注射后 1 小时，给大鼠灌注 PBS 以收获大脑进行拍照。将每组大鼠的脑进行冰冻切片后，用抗大鼠 IgG-488（Invitrogen）染色，通过 Olympus FV1000 显微镜在 40 倍物镜上收集左纹状体（肿瘤区域）的共聚焦图像。将余下脑组织分别转移到预先标记的试管中，然后匀浆。之后，向每个匀浆后的样品中加入甲酰胺溶液（每 100 mg 脑组织 1 mL），并在 60 $^{\circ}$ C 下孵育 24 h，然后以 10,000 $\times$ g 离心 10 分钟以收集上清液，并通过分光光度计记录 620 nm 的吸光度。

为了验证单侧注射 oAAV-P2 对双侧接种肿瘤的 GBM 大鼠模型的治疗效果，在 GBM 大鼠模型构建时，在左右两侧均接种 10 μ L C6-luc 细胞悬浮液。在 C6-luc 细胞

植入后第 8 天，将动物随机分为两组，分别使用脑立体定位仪瘤内注射 10 μL 包含 1×10^{10} vg 的 oAAV-P2, rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT}。在 oAAV-P2 治疗后第 14 天，将大鼠麻醉处死，多聚甲醛灌注取脑后，送至武汉博尔夫生物科技有限公司进行石蜡切片及 HE 染色。

3.2.18 oAAV-P2 治疗 TNBC 小鼠模型

参照 3.2.5 构建 TNBC 小鼠模型。为了验证 oAAV-P2 对 TNBC 小鼠模型的溶瘤作用，在 4T1-luc 细胞接种后第 7 天，将成瘤小鼠随机分为两组，分别瘤内注射 10 μL 包含 1×10^{10} vg 的 oAAV-P2 或 rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT}。每隔 3-4 天用游标卡尺记录每只小鼠肿瘤的长(L)和短(W)直径。根据椭圆体体积计算公式($1/2 \times L \times W^2$)计算每只动物的总肿瘤体积。然后在 AAV 处理后第 24 天麻醉处死小鼠，对肿瘤照相并称重。

1) 肿瘤浸润淋巴细胞分析

为了分析 oAAV-P2 对肿瘤浸润淋巴细胞的作用，在 oAAV-P2 或 rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 治疗后第 14 天，将小鼠麻醉并处死以分离肿瘤块。

肿瘤单细胞悬液制备：在超净台内，按照 0.1 g/0.5 mL 的比例向平皿中加入预热的 1640 基础培养基；用手术刀将肿瘤块切至 1 mm³ 左右；用吸管吸 0.5 mL 至 2 mL 离心管中，补 0.4 mL 培养基，加入 100 μL 胶原酶 IV 溶液，5 μL rDNaseI；37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴，每隔 5 分钟混匀一次，共 45 min；用剪刀剪去蓝枪头尖端，吹散细胞，然后通过 70 μm 的细胞过滤器除去细胞团块，以获得单细胞悬液。

肿瘤浸润淋巴细胞流式分析：用小鼠肿瘤浸润组织淋巴细胞分离试剂盒（Solarbio）分离肿瘤浸润淋巴细胞。随后用含 1% BSA 的 PBS（FACS 溶液）洗涤两次，并用抗小鼠 CD16/CD32 抗体封闭 30 分钟。然后加入流式抗体 CD49b-APC，CD3-PE，CD4-FITC 和 CD8a-PacBlue，孵育 1 小时后，用含有 0.2 %BSA 的 PBS 溶液洗涤一次，随后通过流式细胞仪 Cytoflex（Beckman Coulter）进行分析。

肿瘤浸润 CD3⁺淋巴细胞免疫组化：将肿瘤冰冻切片后，用抗小鼠 CD3-PE 抗体染色 1 小时，然后用 Hoechst 染色 1 分钟。通过 Olympus FV1000 显微镜在 40 倍物镜上收集共聚焦图像。

2) 肿瘤转录组测序

为了分析 oAAV-P2 处理对 TNBC 小鼠模型肿瘤转录组的影响, 在 oAAV-P2 治疗后第 9 天, 将小鼠麻醉处死以分离肿瘤块。提取肿瘤总 RNA 后, 参照 3.2.8.2, 使用 Whole RNA-seq Lib Prep Kit (ABclonal) 构建文库, 文库构建成功后送至苏州金唯智生物科技有限公司进行高通量测序。

3) 肿瘤浸润淋巴细胞单细胞转录组测序

单细胞文库构建: 参照前述方法制备肿瘤单细胞悬液, 并用小鼠肿瘤浸润组织淋巴细胞分离试剂盒 (Solarbio) 分离肿瘤浸润淋巴细胞。利用流式 CD45-APC-Cy7 染色后富集 CD45⁺淋巴细胞, 然后参照 BD 公司 Single cell 3' whole transcriptome amplification (WTA) protocol (Doc ID: 210966 Rev. 1.0) 进行淋巴细胞单细胞文库构建。文库质检合格后送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行高通量测序。

单细胞文库分析: 使用 BD Rhapsody WTA Local 生物信息学管道用于样品解复用、条形码处理、对齐、过滤、UMI 计数和测序运行的聚合。为了对单细胞 RNA 测序程序进行质量控制, 检测到的基因少于 300 个的细胞、线粒体编码基因转录本计数超过总转录本计数 10% 的细胞被从后续分析中移除。在数据集中少于三个细胞中检测到的基因也被排除在外, 产生了 5159 个细胞的初步表达矩阵。在获得数字基因表达数据矩阵后, 使用软件 Seurat (v.3.2.3) 用于降维、聚类 and 差异基因表达分析。

3.2.19 oAAV-P2 联合抗 PD-L1 治疗 TNBC 小鼠模型

为了验证 oAAV-P2 联合抗 PD-L1 拮抗剂 (BMS202) 对 TNBC 小鼠模型的溶瘤作用, 在 4T1-luc 细胞接种后第 7 天, 将成瘤小鼠随机分为两组, 分别瘤内注射组 10 μ L 包含 1×10^{10} vg 的 oAAV-P2 或 PBS。在 oAAV-P2 联合 BMS202 治疗组中, 在 oAAV-P2 注射 8 天后, 连续 7 天腹腔注射剂量为 20mg/kg 的 BMS202。在单独 BMS202 治疗组中, 在 PBS 注射 8 天后, 连续 7 天腹腔注射剂量为 20 mg/kg 的 BMS202。在单独 oAAV-P2 治疗组中, 在 oAAV-P2 注射 8 天后, 连续 7 天腹腔注射相同体积 PBS。在 PBS 对照组中, 在 PBS 注射 8 天后, 连续 7 天腹腔注射相同体积 PBS。使用游标卡尺每 3-4 天测量一次肿瘤块的长径 (L) 和短径 (W)。根据椭圆体体积计算公式 (即 $1/2 \times L \times W^2$) 计算肿瘤体积。在肿瘤接种后第 21 天, 每组随机挑选 4 只小鼠, 按照 150 mg/kg 剂量腹腔注射 D-luciferin。注射 D-luciferin 15 分钟后, 使用小动物活体光学成像仪 (PerkinElmer) 进行成像, 并使用成像软件对荧光素酶的表达进行

定量。肿瘤植入后 30 天，麻醉处死小鼠，对肿瘤照相并称重。

碘化丙啶（PI）检测小鼠肿瘤细胞焦亡：肿瘤植入后 30 天，按照每只小鼠 200 μL 的剂量，静脉注射 PI 溶液，10 min 后，麻醉处死小鼠，分离肿瘤块。对肿瘤块进行冰冻切片，用 Hoechst 染色 1 分钟。通过 Olympus FV1000 显微镜收集共聚焦图像。

3.2.20 oAAV-P2 治疗 TNBC 裸鼠模型

提前 3-4 天购买 6-8 周龄 SPF 级 Nu/Nu 雌性裸鼠，待其适应新环境后，使用异氟烷进行麻醉。参照 3.2.5 构建 TNBC 裸鼠模型。为了研究 oAAV-P2 对 TNBC 裸鼠模型的溶瘤作用，在 4T1-luc 细胞接种后第 6 天，将成瘤裸鼠随机分为三组，分别瘤内注射 10 μL 包含 1×10^{10} vg 的 oAAV-P2、rAAV-ef1 α -DIO-GSDMD^{NT} 或 PBS。每隔 4-6 天用游标卡尺记录每只裸鼠肿瘤的长（ L ）和短（ W ）直径。根据椭圆柱体体积计算公式（ $1/2 \times L \times W^2$ ）计算每只裸鼠的肿瘤体积。在肿瘤接种后第 19 天，每组随机挑选 5 只裸鼠，按照 150 mg/kg 剂量腹腔注射 D-luciferin。注射 D-luciferin 15 分钟后，使用小动物活体光学成像仪（PerkinElmer）进行成像，并使用成像软件对荧光素酶的表达进行定量。然后麻醉处死裸鼠，对肿瘤照相并称重。

3.2.21 rAAV 瘤内注射安全性实验

为了验证瘤内注射 rAAV 的靶向性，使用 4T1 细胞系，参照 3.2.5 构建 TNBC 小鼠模型，在 4T1 细胞接种后第 6 天，瘤内注射 10 μL 包含 1×10^{10} vg 的 rAAV-CMV-luc 的 PBS，同时设置瘤内注射 PBS 对照组。rAAV-CMV-luc 注射后 14 天，按照 150 mg/kg 剂量腹腔注射 D-luciferin。注射 D-luciferin 15 分钟后，使用小动物活体光学成像仪（PerkinElmer）进行成像。然后迅速麻醉处死小鼠，分离肺、心、肝、肾、脾及肿瘤，再次使用小动物活体光学成像仪（PerkinElmer）进行成像。

3.2.22 表达 GSDM^{NT} 蛋白 oAAV 系统通用性验证

为了验证其他 GSDM^{NT} 蛋白在 oAAV 中的适用性，参照 3.2.2 构建质粒 pAAV-ef1 α -DIO-GSDMB^{NT} 和 pAAV-ef1 α -DIO-GSDME^{NT}，然后参照 3.2.10 及 3.2.12，包装纯化 rAAV-ef1 α -DIO-GSDMB^{NT} 和 rAAV-ef1 α -DIO-GSDME^{NT}。将上述两种 rAAV 滴

度均调整至 2×10^{12} vg/mL, 然后分别与滴度为 2×10^{12} vg/mL 的 rAAV-Cre 等体积混合, 组成 oAAV-P2B 和 oAAV-P2E。

提前一天分别将 HEK 293T 细胞、Hela 细胞、4T1-luc 细胞铺至 96 孔板。按照 MOI = 100000 每种细胞分别加入 oAAV-P2、oAAV-P2B 和 oAAV-P2E, 同时设置 rAAV-ef1 α -DIO-GSDMB^{NT}、rAAV-ef1 α -DIO-GSDMD^{NT}、rAAV-ef1 α -DIO-GSDME^{NT} 及 rAAV-Cre 对照组。感染 48 h 后, 使用奥林巴斯普通荧光显微镜采集图像。同时参照试剂盒说明书, 使用试剂盒 LDH-Glo Cytotoxicity Assay 检测 LDH 释放以判断焦亡效率。

3.2.23 利用诱导型启动子包装表达 GSDMD^{NT} 蛋白的 rAAV

为了探索四环素诱导型启动子是否是另一种表达 GSDM^{NT} 蛋白 oAAV 的包装策略, 参照 3.2.2 构建质粒 pAAV-polyA-rtTA-CMV2-TRE-hDNT-polyA, 提取质粒, 计算质粒产量。然后参照 3.2.10 尝试包装病毒。

3.2.24 oAAV-P2 在临床宠物肿瘤治疗中的应用

本课题共收集到两例临床宠物肿瘤病理, 一例为鸟喙上长有肿瘤, 经手术切除后又复发的鸚鵡, 治疗方法为, 将鸚鵡麻醉后, 对复发肿瘤部位进行瘤内注射 20 μ L 包含 2×10^{10} vg 的 oAAV-P2; 另一例为腋下长有肿瘤, 经手术切除后复发的刺猬, 治疗方法为, 将刺猬麻醉后, 切除大部分复发肿瘤, 再对复发部位进行多点状注射 oAAV-P2, 总剂量为 5×10^{10} vg。

第四章 利用卡介苗靶向肿瘤微环境增强抗肿瘤免疫

靶向免疫抑制性肿瘤微环境(TME)是三阴性乳腺癌(TNBC)的重要治疗策略。卡介苗(BCG)在非肌肉浸润性膀胱癌临床治疗中的应用表明,卡介苗是激活免疫的强力诱导剂,可以重塑 TME 的免疫抑制状态。同时,先前的研究表明,在 BCG 免疫治疗过程中会上调肿瘤内 PD-L1 的表达。因此,研究 BCG 对三阴性乳腺癌 TME 的靶向作用,并进一步探索 BCG 联合 PD-L1 阻断疗法对 TNBC 的治疗功效是非常有意义的。

在本章节中,我们研究了 BCG 治疗对原位 TNBC 小鼠模型 TME 中淋巴细胞和转录组的影响,并在此基础上进一步评估了 BCG 和抗 PD-L1 联合疗法在 TNBC 小鼠模型的效果。

4.1 卡介苗治疗增加了 TNBC 小鼠模型 TME 中浸润淋巴细胞数量

为了评估 BCG 对 TNBC 的免疫刺激功效,我们通过将 4T1-luc 细胞接种到 Balb/c 雌性小鼠左侧第四对乳房的脂肪垫中,建立了原位 TNBC 小鼠模型。在肿瘤细胞植入后第 5 天,分别向小鼠肿瘤内注射 BCG 和 PBS。卡介苗处理后第 9 天,麻醉处死小鼠,分离肿瘤浸润淋巴细胞进行流式细胞术分析,具体染色方案见图 4-1。

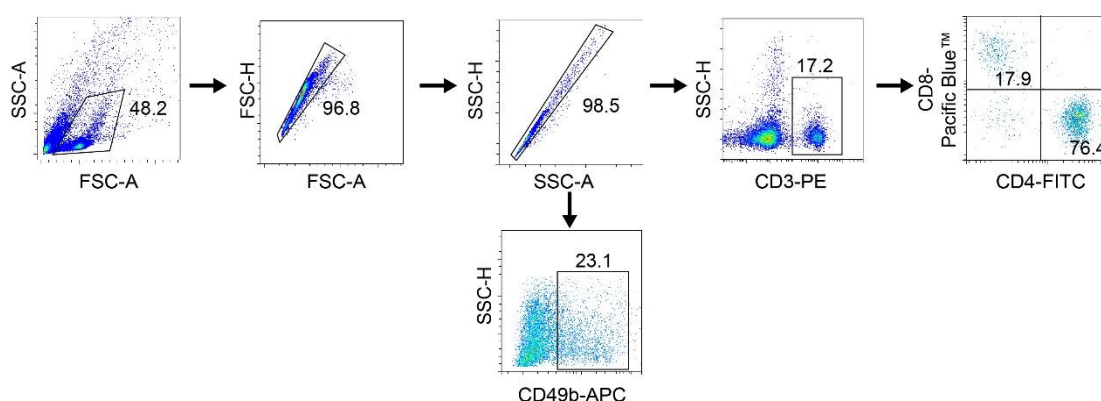


图 4-1. 4T1-luc 肿瘤浸润细胞分析的染色方案

Fig. 4-1. Gating strategy for 4T1-luc tumor infiltrating cells analysis

如图 4-2 b-f 所示,与 PBS 治疗组相比,BCG 治疗组小鼠肿瘤内包含更多的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞和 NK 细胞,表明 BCG 治疗可以增加 TNBC 小鼠 TME 中浸润淋巴细胞数量。同时肿瘤冰冻切片 CD3 染色结果显示,BCG 治疗组的肿瘤

中有更多的 $CD3^+T$ 细胞 (图 4-2 g, h)。这些数据表明, 卡介苗治疗可以通过募集更多淋巴细胞来改变 TME 的免疫抑制状态。这意味着 BCG 可用于重塑 TME 以用于 TNBC 治疗。

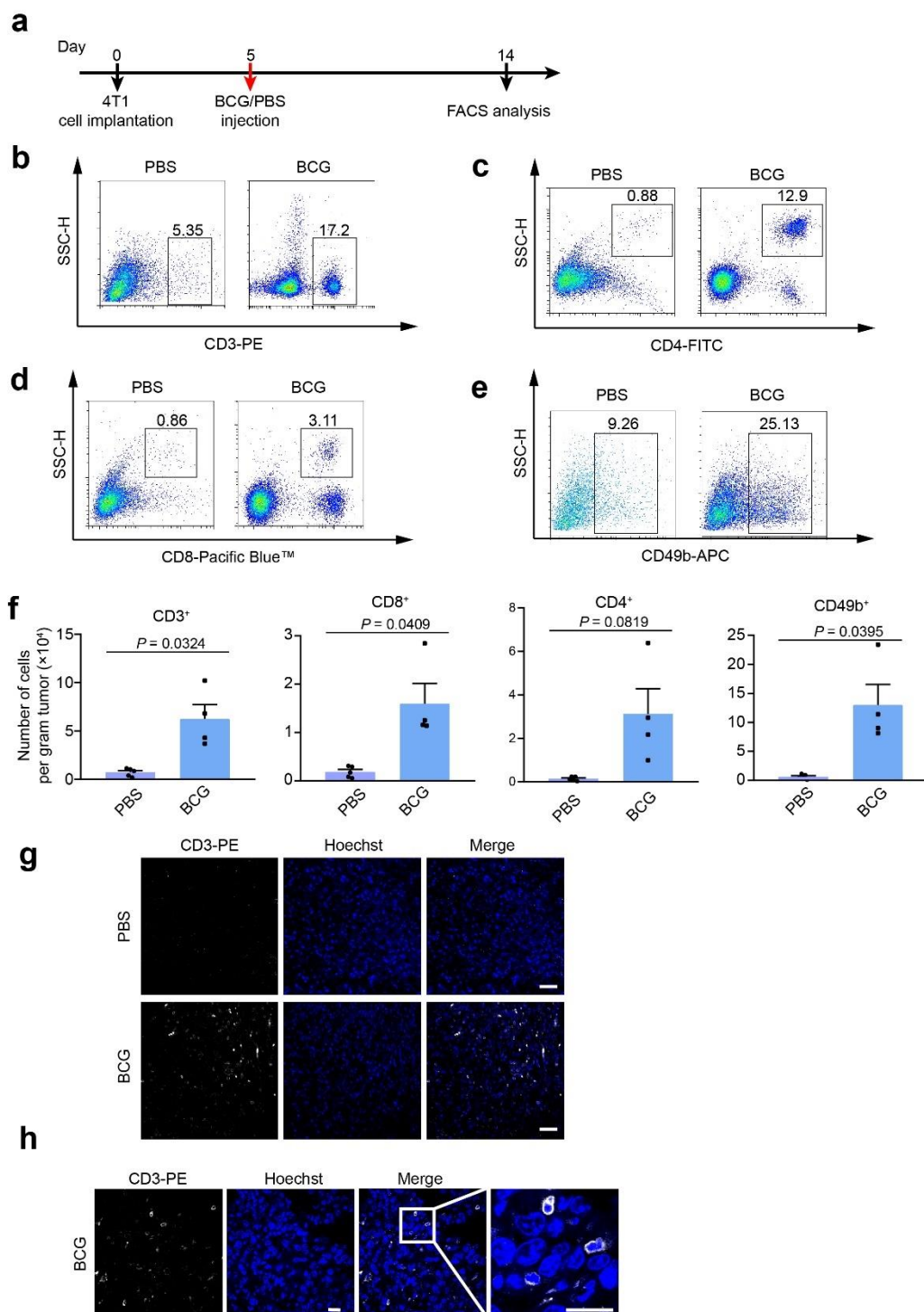


图 4-2. BCG 治疗增加了 TNBC 小鼠模型 TME 中浸润淋巴细胞数量

Fig. 4-2. BCG treatment recruits infiltrating lymphocytes in the TME of TNBC mouse model.

a: TNBC 小鼠模型的 BCG 治疗方案; b-e: 代表 4T1 肿瘤浸润 $CD3^+$ (b), $CD4^+$ (c), $CD8^+$

(d), NK (e) 细胞分析的代表性流式细胞图, 其中 PBS 组 5 只小鼠, BCG 组 4 只小鼠; f: TNBC 小鼠模型的肿瘤浸润淋巴细胞的定量分析结果, 统计方法如下: Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Welch's t-test; g, h, 两组肿瘤的 CD3-PE 染色荧光图像, 标尺代表 20 μ m。

a, Schematic of BCG treatment on TNBC mouse model. n = 5 mice for PBS, 4 mice for BCG. b-e, Representative flow cytometry plots for 4T1 tumor infiltrating CD3⁺ (b), CD4⁺ (c), CD8⁺ (d), NK (e) cells analysis. f, Quantification of the tumor infiltrating lymphocytes from TNBC mouse model. n = 5 mice for PBS, 4 mice for BCG. Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Welch's t-test. g, h, Fluorescence images of CD3-PE-stained 4T1 tumor cells treated with BCG and PBS. Representative images of each group (n = 3 mice) are presented. Scale bar, 20 μ m.

4.2 卡介苗治疗抑制 TNBC 小鼠模型肿瘤生长

为了评估 BCG 对 TNBC 小鼠模型的疗效, 在肿瘤细胞植入后第 5 天, 将成瘤小鼠随机分为三组: 单倍剂量 BCG 组, 三倍剂量 BCG 组和 PBS 组 (图 4-3 a)。我们记录了肿瘤体积数据, 以观察卡介苗治疗对 TNBC 小鼠模型的影响。如图 4-3 b, c 所示, 与 PBS 组相比, 单倍剂量 BCG 组和三倍剂量 BCG 组的肿瘤体积增长均有所延缓, 且三倍剂量 BCG 组的肿瘤体积增长最慢。同时, 在接种后第 25 天, 三倍剂量 BCG 组在三组中, 肿瘤体积和重量也最小 (图 4-3 d, e)。这些数据表明, 单倍剂量 BCG 治疗可适度减慢 TNBC 小鼠模型的病程, 而三倍剂量 BCG 治疗则可抑制 TNBC 小鼠模型肿瘤的生长。

同时为了评估 BCG 剂量的安全性, 我们对三组小鼠进行了体重监测, 同时对三组小鼠的主要器官 (肝, 肾和脾脏) 进行了病理学检测。HE 染色结果表明, 三组小鼠的肝脏、肾脏和脾脏中均未出现病理变化 (图 4-3 f), 这表明单倍剂量 BCG 和三倍剂量 BCG 处理均不会引起小鼠器质性损伤。然而, 与单倍剂量 BCG 组和 PBS 组相比, 三倍剂量 BCG 组小鼠在治疗过程中体重出现了明显下降 (图 4-3 g), 这可能与多次 BCG 治疗诱导了更强的免疫刺激有关。

上述数据证明三倍剂量 BCG 治疗对 TNBC 有很好的治疗效果, 但也存在治疗过程中体重下降的不良反应。同时我们注意到, 单倍剂量 BCG 即可重塑 TNBC 小鼠模型 TME 免疫抑制状态, 而其治疗效果不佳可能与 BCG 处理导致的 PD-L1 表达上调有关 (Wang et al 2018), 但这也暗示 BCG 可以与免疫筛查位点阻断联合以增强

其抗肿瘤效果。所以进一步研究 BCG 治疗对 TNBC 小鼠模型 TME 中基因表达的影响是非常有必要的。

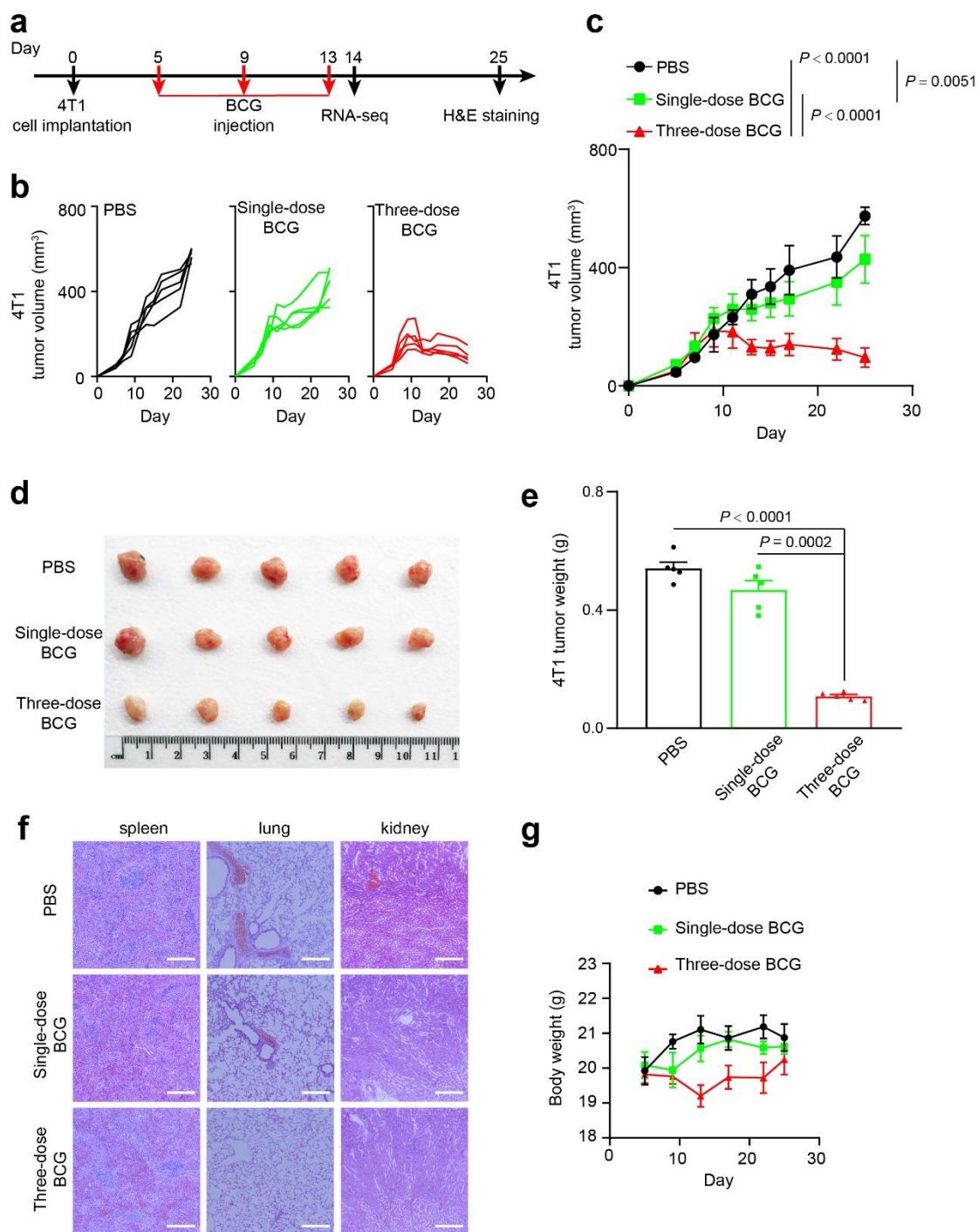


图 4-3. BCG 治疗可以抑制 TNBC 小鼠模型肿瘤生长

Fig. 4-3. BCG treatment inhibits the growth of TNBC mouse models

a: TNBC 小鼠模型的 BCG 治疗方案; b: 各组每只小鼠的肿瘤体积变化, 每组各 5 只小鼠; c: 各组小鼠肿瘤的平均体积, 统计方法为, Mean $\pm$ s.d., two-tailed unpaired Student's t-test; d: 三组小鼠的肿瘤照片; e: 三组小鼠的平均肿瘤重量, 统计方法为, Mean $\pm$ s.e.m.,

two-tailed unpaired Student's t-test; f: 三组小鼠脾、肺和肾组织的 HE 染色图, 标尺代表 200 μm ; g: 三组小鼠的体重监测结果。

a, Schematic of BCG treatment on TNBC mouse model. b, Tumor volume of an individual mouse. n = 5 mice per group. c, Average tumor volume of mice as indicated. Mean $\pm$ s.d., two-tailed unpaired Student's t-test. d, Photographs of the tumors 20 d post treatment with PBS, single-dose BCG and three-dose BCG, respectively. e, Average tumor weight of mice as indicated. Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test. f, H&E-stained spleen, lung and kidney tissues of TNBC mouse model treated as indicated. Representative images of each group (n = 3 mice) are presented. Scale bar, 200 μm . g, Weight monitoring results of mice with different treatments as in indicated.

4.3 卡介苗治疗上调了 TNBC 小鼠模型肿瘤内 PD-L1 的表达

为了研究 BCG 对 TNBC 小鼠模型 TME 内基因表达的影响, 我们对 PBS 和单倍剂量 BCG 治疗后的 4T1 肿瘤进行了 Bulk RNA-seq 分析。从 Bulk RNA-seq 数据中, 我们确定了两组之间共有 6863 个差异表达基因 (DEGs) (图 4-4 a, b)。为了研究这些 DEGs 的功能, 我们对其进行了 Gene Ontology (GO) 富集分析 (图 4-4 c)。结果表明, 这些 DEGs 主要存在于 T 细胞活化信号通路, 如 T 细胞增殖 (GO: 0042098), T 细胞分化 (GO: 0042098)。这表明 BCG 治疗影响了 TNBC 小鼠模型 TME 内 T 细胞的活化。

同时我们发现单倍剂量 BCG 治疗组的编码趋化因子基因 (*Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*) 显著上调 (图 4-4 b, d)。而当 CCL5 和 CXCL9 都存在于肿瘤组织中时, 会增加肿瘤内淋巴细胞的浸润 (Dangaj et al 2019)。这表明 BCG 治疗可能会增加 4T1 肿瘤中的淋巴细胞浸润, 这与之前的肿瘤浸润淋巴细胞流式分析结果相符。

Bulk RNA-seq 结果还显示, BCG 治疗上调了淋巴细胞活化 (*Cd69* 和 *Klrl1*) 和抗肿瘤作用 (*Ifngr1* 和 *Gzma*) 的关键基因, 下调了免疫抑制基因 (*Tigit* 和 *Vegfa*) (图 4-4 b, d)。更重要的是, 我们发现单倍剂量 BCG 治疗后, 免疫筛选位点相关基因 PD-1/PD-L1 (*Cd274* 和 *Pdcd1*) 被上调 (图 4-4 b, d)。这意味着 BCG 和免疫筛选位点阻滞剂 (例如抗 PD-L1 抑制剂) 的组合可能对 TNBC 有更好的疗效。

为了验证 Bulk RNA-seq 数据, 我们利用荧光实时定量 PCR (Q-RT-PCR) 对几个关键基因进行了定量, 如图 4-4 e 所示, BCG 治疗组内 *Cxcl10*、*Ifng*、*Cd274* 和 *Pdcd1*

表达显著上调，这与 Bulk RNA-seq 数据相符。

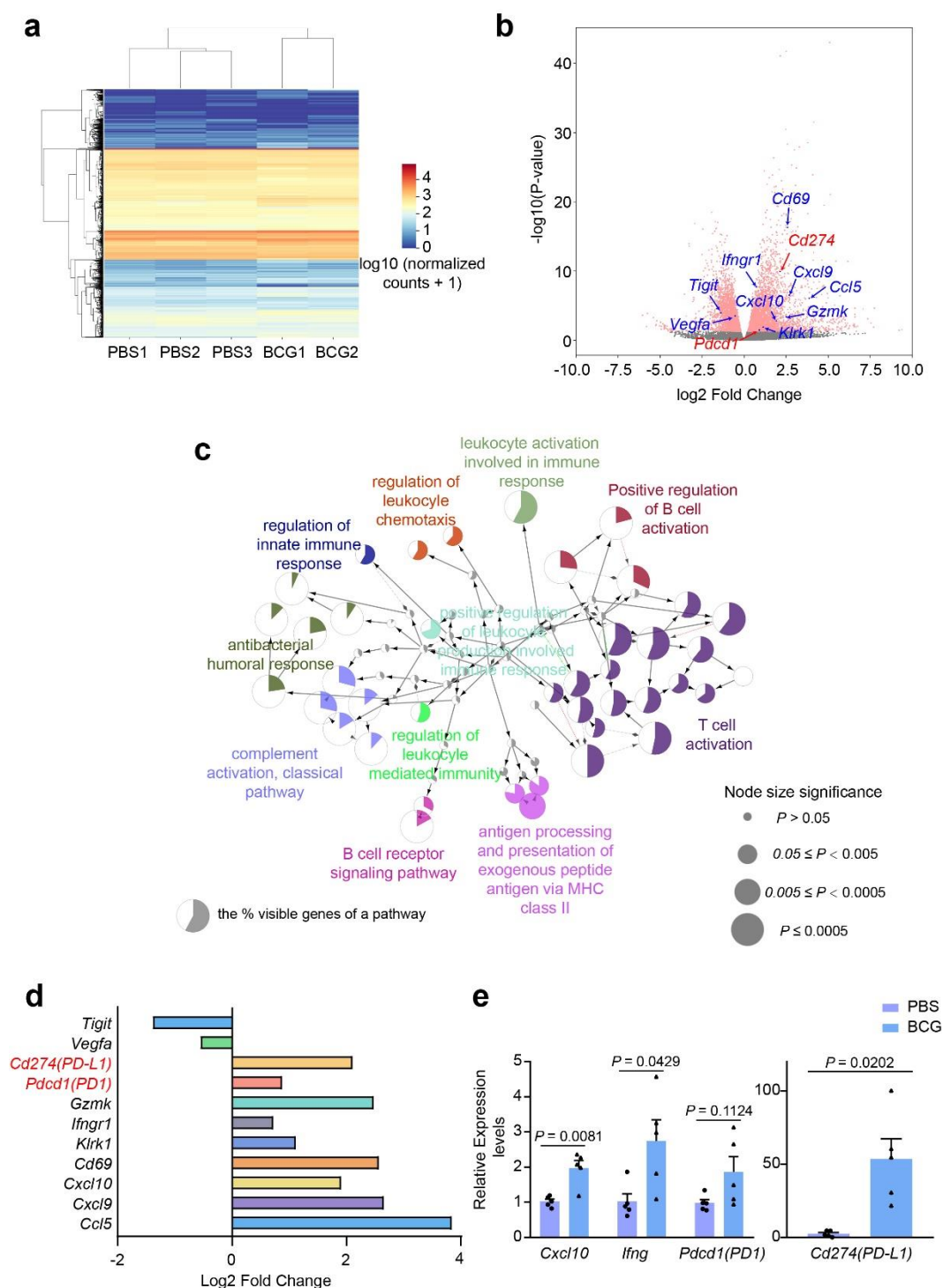


图 4-4. BCG 或 PBS 处理 TNBC 小鼠模型肿瘤转录组分析

Fig. 4-4. Bulk RNA-seq analysis of TNBC treated with BCG or PBS

a: 用 PBS 或 BCG 处理后差异表达基因 (DEGs) 的聚类分析热图; b: DEGs 的火山图;
c: DEGs 富集后的免疫信号通路网络, 筛选条件为, $p \leq 0.05$, Kappa Score = 0.4; d: DEGs 代表基因的表达变化; e: DEG 代表基因的相对表达水平, 每组 5 只小鼠, 统计方法为, Mean $\pm$

s.e.m., two-tailed unpaired Welch's t-test.

a, Cluster analysis heat map of differentially expressed genes in mice treated with PBS or BCG. **b**, Volcano plot of the DEGs. **c**, The immune system process pathways network of GO enriched DEGs from Bulk RNA-seq of tumors in the BCG group and PBS group. $p \leq 0.05$, Kappa Score = 0.4. **d**, The $\log_2(\text{fold change})$ of the DEGs. **e**, Quantification of the relative expression levels of the DEGs. $n = 5$ mice per group. Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Welch's t-test.

4.4 单倍剂量卡介苗联合 PD-L1 阻滞剂可有效抑制 TNBC 小鼠模型肿瘤生长

基于 Bulk RNA-seq 及 Q-RT-PCR 结果，我们对 TNBC 小鼠模型在 BCG 注射后第 9 天进行了 PD-L1 阻断治疗（图 4-5 a）。在 PD-L1 阻断治疗后，我们利用小动物活体光学成像仪，对各组小鼠肿瘤进行萤火虫荧光素酶成像，结果显示，与 PBS 组和抗 PD-L1 组相比，三倍剂量 BCG 治疗和单倍剂量 BCG 联合抗 PD-L1 治疗组小鼠均有较低水平的荧光素信号，且单倍剂量 BCG 联合抗 PD-L1 治疗组所有小鼠均只有很少或没用荧光素信号（图 4-5 b, c）。同时肿瘤体积监测数据表明，单倍剂量卡介苗联合抗 PD-L1 治疗可显著抑制乳腺癌的生长（图 4-6 d, e）。这说明联合治疗组对 TNBC 小鼠模型具有很好的治疗效果。

与 PBS、抗 PD-L1 和三倍剂量 BCG 治疗组相比，单倍剂量 BCG 联合抗 PD-L1 治疗组小鼠的肿瘤内碘化丙啶阳性细胞数量更多（图 4-6 a），这表明卡介苗和抗 PD-L1 的联合治疗具有最好的溶瘤作用。同时小鼠体重监测数据表明，单倍剂量卡介苗联合抗 PD-L1 治疗可有效减少三倍剂量卡介苗治疗引起的小鼠体重减轻的不良反应（图 4-6 b），这表明单倍剂量卡介苗联合应用抗 PD-L1 治疗具有更高的安全性。小鼠麻醉处死后，分离得到的各组肿瘤的大小和重量的结果表明，BCG 和抗 PD-L1 的联合治疗对 TNBC 小鼠模型具有显著的治疗作用，可以消除大部分肿瘤块（图 4-6 c, d）。这都表明单倍剂量卡介苗联合 PD-L1 阻滞剂对 TNBC 有很好的治疗效果。

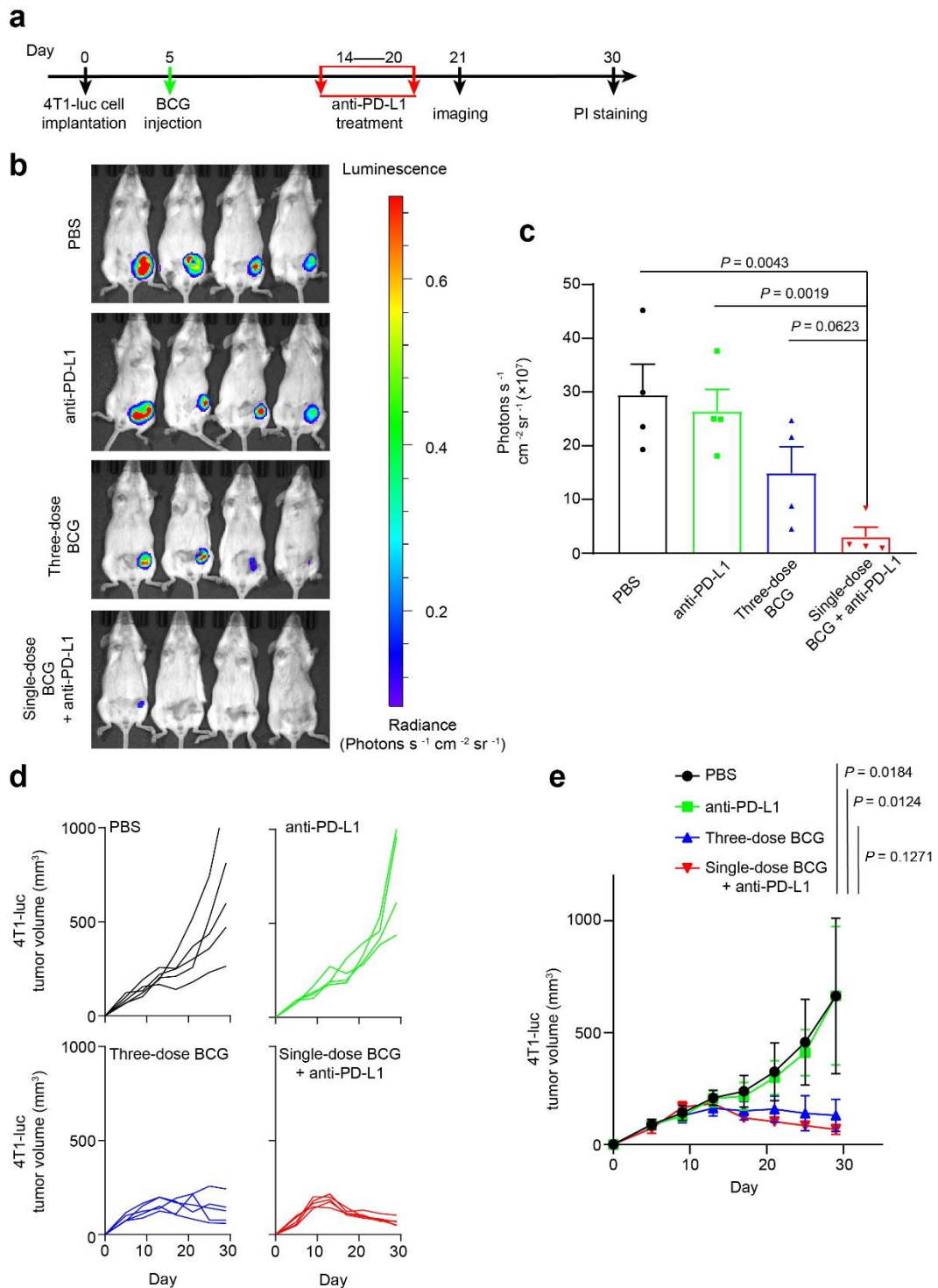


图 4-5. 单倍剂量卡介苗联合 PD-L1 阻滞剂可有效抑制 TNBC 小鼠模型肿瘤生长

Fig. 4-5. Single-dose BCG treatment combined with anti-PD-L1 blocker efficiently inhibites
TNBC

a: 治疗方案示意图; b: 各组 4T1-luc 乳腺肿瘤的荧光素酶成像; c: 各组肿瘤内荧光素酶表达定量分析, 每组四只小鼠, 统计方法如下, Mean ± s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test;
d: 各组每只小鼠的肿瘤体积变化, 每组 5 只小鼠; e: 各组小鼠的平均肿瘤体积, 统计方法如

下，Mean $\pm$ s.d., two-tailed unpaired Welch's t-test.

a, Schematic of single-dose BCG combined with anti-PD-L1 treatment on TNBC mouse model.

b, Luciferase imaging of 4T1-luc breast tumors 21 d after tumor implantation. **c**, Corresponding quantification of luciferase expression in (**b**). Mean $\pm$ s.e.m., from four independent replicates, two-tailed unpaired Student's t-test. **d**, Tumor volume of an individual mouse. n = 5 mice per group. **e**, Average tumor volume of mice as indicated. Mean $\pm$ s.d., two-tailed unpaired Welch's t-test.

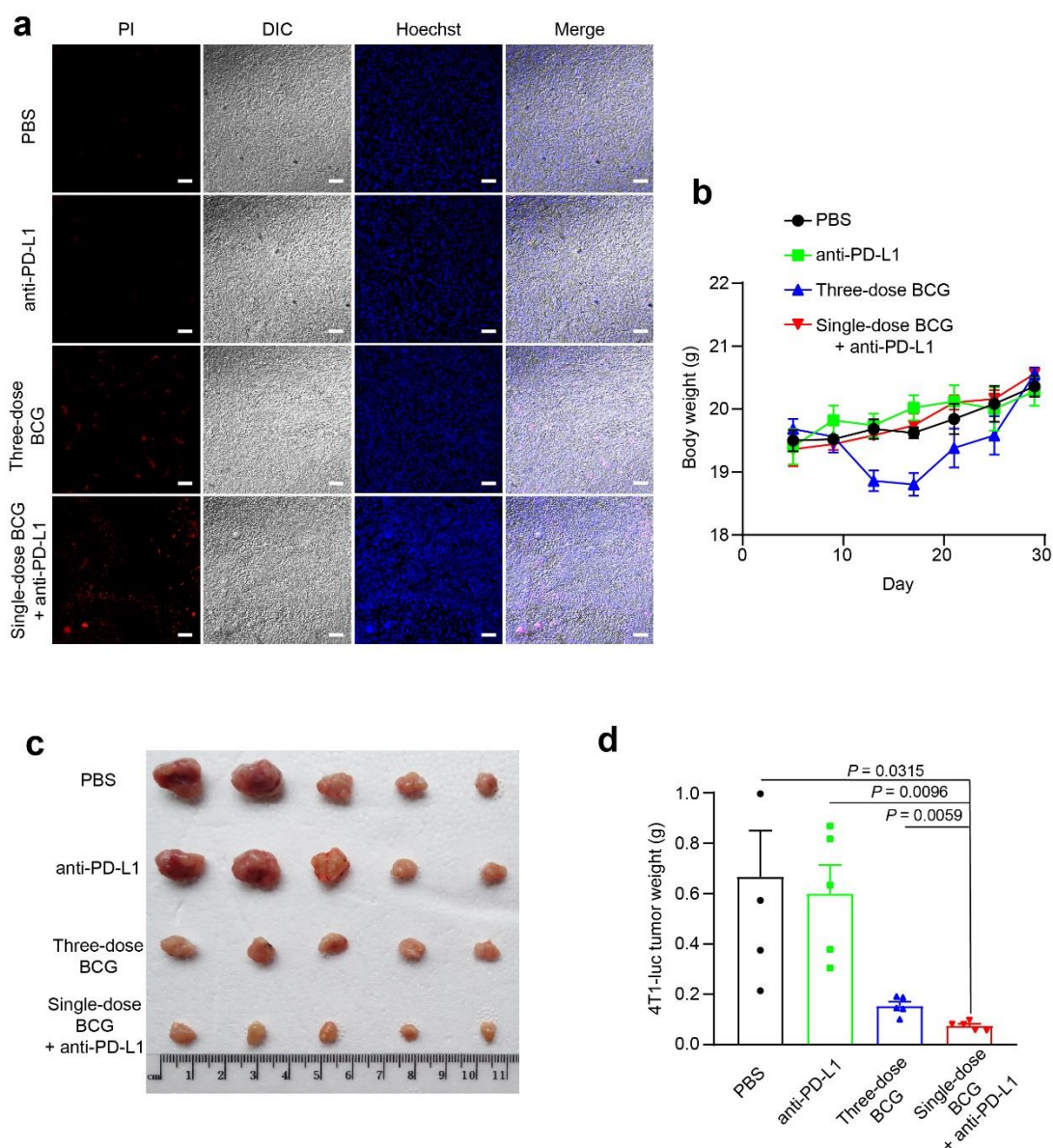


图 4-6. 单倍剂量 BCG 联合抗 PD-L1 治疗对 TNBC 小鼠模型的溶瘤作用。

Fig. 4-6. Oncolytic effect of the Single-dose BCG combined anti-PD-L1 treatment on TNBC

a: 碘化丙锭（PI）染色指示 BCG 治疗诱导的肿瘤细胞死亡，标尺代表 20 μ m；**b**: 各组小鼠的体重监测结果；**c**: 肿瘤接种后第 30 天的肿瘤照片；**d**: 各组小鼠的平均肿瘤重量，统计

方法如下, Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Welch's t-test。

Notes: a, Propidium Iodide staining of tumor cell death induced by treatment as indicated. Scale bar, 20 μ m. b, Weight monitoring results of mice with different treatments as indicated. c, Photographs of the tumors 30 d after tumor cells inoculation. d, Average tumor weight of mice as indicated. Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Welch's t-test.

4.5 本章小结

PD-1/PD-L1 阻断在 TNBC 临床治疗中取得了一定进展,但也存在响应效率较低的问题,这很大程度上归因于其存在免疫抑制性 TME。所以靶向 TME,可能是提高 TNBC 免疫治疗疗效的突破口。用于预防结核病的 BCG 已被证实有很好的安全性,且具有重组免疫抑制性 TME 的能力。

在本章节中,我们利用 BCG 治疗 TNBC 小鼠模型,证实了三倍剂量 BCG 治疗可以显著抑制其肿瘤的生长,但也存在治疗过程中体重下降的不良反应。同时我们的数据表明,单倍剂量 BCG 治疗即可上调趋化因子相关基因和抗肿瘤效应基因,下调免疫抑制相关基因,增加肿瘤浸润淋巴细胞,但同时也存在肿瘤内免疫筛查位点 PD-1 和 PD-L1 表达上调的现象。基于以上两点,我们将单倍剂量 BCG 与 PD-L1 阻断联合应用于 TNBC 小鼠模型,证实了该联合疗法既有很强的溶瘤作用,又没有体重明显下降副作用的出现。

在本章节我们证明了 BCG 治疗可以重塑三阴性乳腺癌 TME 免疫抑制的状态,BCG 和抗 PD-L1 的联合治疗可能是 TNBC 的有效治疗手段。但同时需注意 BCG 瘤内注射后有 6863 个差异基因出现,这表明用 BCG 加热“冷”肿瘤可能存在一定的不确定风险,所以寻找另一种“火种”的研究是非常有必要的。

第五章 构建表达焦亡蛋白的重组腺相关病毒载体以增强抗肿瘤

瘤免疫

焦亡是细胞的一种程序化死亡方式，其过程伴随着强烈免疫反应的发生。最近研究证实肿瘤细胞的焦亡，可增加肿瘤内淋巴细胞浸润，激起强烈的抗肿瘤免疫力。因而焦亡基因（ $GSDM^{NT}$ ）存在作为“火种”——靶向 TME 的价值，但其又具有很强的细胞毒性，所以选择一种安全有效的递送载体是非常必要的。安全性好、基因递送效率高的临床基因治疗载体 rAAV 是递送 $GSDM^{NT}$ 的一个很好的选择。但是目前常用的 rAAV 包装方法无法避免包装时 $GSDM^{NT}$ 的表达，从而使包装细胞焦亡，最终很难得到可用于临床治疗的高滴度重组载体，所以摸索优化表达焦亡蛋白 rAAV（rAAV- $GSDM^{NT}$ ）的包装策略是非常有必要的。

本章节通过尝试利用哺乳动物启动子、诱导性启动子、Cre 重组酶系统来避免 $GSDM^{NT}$ 包装时的表达，摸索表达焦亡蛋白 rAAV 的包装策略，并在 GBM 大鼠模型和 TNBC 小鼠模型上对其抗肿瘤功效加以验证。

5.1 利用哺乳动物启动子包装 rAAV- $GSDM^{NT}$

5.1.1 哺乳动物启动子 mCBA 的鉴定

杆状病毒/昆虫 Sf9 细胞系统可以实现大规模、低成本 rAAV 的包装，且其包装过程仅涉及昆虫 Sf9 细胞的使用，所以我们推测寻找一种在昆虫细胞中不表达在哺乳动物中表达的哺乳动物启动子，应该可以有效避免包装过程中 $GSDM^{NT}$ 的表达。因此，我们筛选了几个启动子，并最终选择了哺乳动物 CBA（mammal CBA，简称 mCBA）启动子来驱动 $GSDM^{NT}$ 表达（图 5-1 a）。首先，我们利用不同启动子驱动 eGFP 以验证其在 Sf9 昆虫细胞中的转录活性，如图 5-1 b 所示，与 CMV 和 CAG 启动子相比，mCBA 启动子驱动的 eGFP 在 Sf9 昆虫细胞中的表达几乎观察不到。为了进一步测试由 mCBA 驱动的 $GSDM^{NT}$ 在 Sf9 细胞中的表达情况，我们构建了两个带有 CMV- $GSDM^{NT}$ 或 mCBA- $GSDM^{NT}$ 的重组杆状病毒质粒（Bacmids），并将其分别转染到 Sf9 细胞中以包装携带 $GSDM^{NT}$ 的杆状病毒。值得注意的是，rBac-CMV- $GSDM^{NT}$ 的滴度显著低于 rBac-mCBA- $GSDM^{NT}$ 的滴度（ 5.56×10^6

VS1.74 $\times 10^8$ pfu/mL), 且利用 rBac-CMV-GSDMD^{NT} 或 rBac-mCBA-GSDMD^{NT} 感染 Sf9 细胞的实验表明, 与 CMV-GSDMD^{NT} 感染组相比, 我们在 mCBA-GSDMD^{NT} 感染组中几乎未观察到任何细胞焦亡现象 (图 5-1 c)。这些数据表明, mCBA 可以避免 GSDMD^{NT} 在昆虫 Sf9 细胞中的表达。

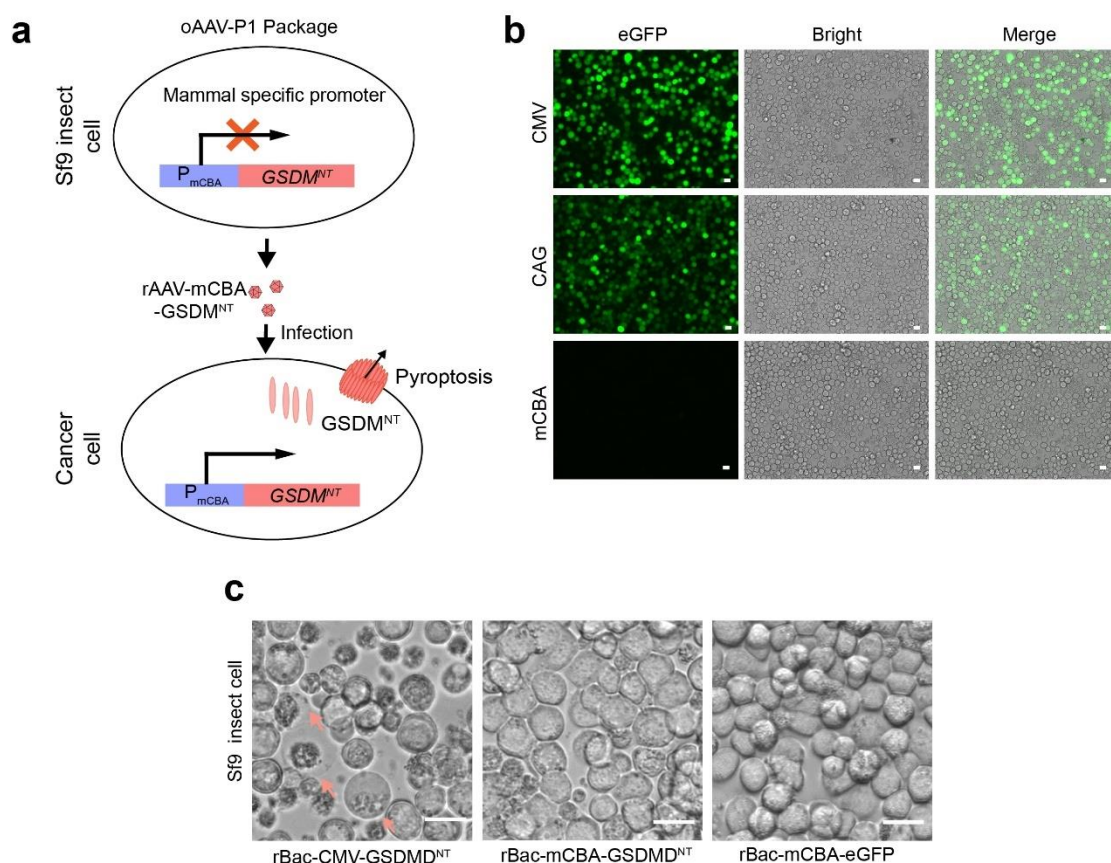


图 5-1. 哺乳动物启动子 mCBA 的鉴定

Fig. 5-1. Identification of Mammalian Promoter mCBA

a: 使用 Sf9/杆状病毒系统和哺乳动物特异性启动子 mCBA 进行 AAV-GSDMD^{NT} (oAAV-P1) 包装的策略示意图; **b:** Sf9 昆虫细胞的荧光显微镜显示转染后 48 小时由不同启动子驱动的 eGFP 的表达, 标尺代表 10 μm ; **c:** 感染了不同杆状病毒的 Sf9 昆虫细胞的图像 (箭头表示焦亡细胞), 标尺代表 20 μm 。

a, Schematic of the strategy for the packaging of AAV-GSDMD^{NT} (oAAV-P1) using the Sf9/rBac system and mammalian specific promoter mCBA. mCBA promoter can hardly drive gene expression in Sf9 insect cells. **b,** Fluorescence microscopy of Sf9 insect cells showing the expression of eGFP driven by different promoters at 48 h post-transfection. Scale bars, 10 μm . **c,** Images of the Sf9 insect cells infected with different baculoviruses (arrows indicate pyroptotic cells). Scale bars, 20 μm .

5.1.2 哺乳动物启动子 mCBA 的分析

为了分析 mCBA 在昆虫 Sf9 细胞中丧失活性的原因，我们将 mCBA（1019 bp）和与其序列相近的两种启动子 CAG（1667 bp）和 CBA（658 bp）进行了序列比对（附图 1）。如附图 1 所示，mCBA 启动子与 CAG 启动子相比，在 CMV enhancer 和 chicken beta actin promoter 序列上存在少数位点突变，而在 chimeric intron 序列上存在很大的不同。这些突变和不同可能就是 mCBA 在昆虫 Sf9 细胞中活性很低的原因。

随后我们又对这三种启动子在哺乳动物细胞中的活性进行了测试，如图 5-2 a 所示，在 HEK 293T 和 Hela 细胞中，mCBA 启动子相对于 CAG 启动子活性较弱，但比没有 chimeric intron 序列的 CBA 启动子活性要强。而在 HEK 293T、Hela 和 4T1-luc 细胞三个启动子驱使 eGFP 表达的荧光强度统计结果（图 5-2 b）也与上述现象相符。以上数据证明 mCBA 在哺乳动物中具有相对强的活性，可用于在肿瘤细胞中驱使 GSDMD^{NT} 的表达。

5.1.3 oAAV-P1 的包装

基于 mCBA 在昆虫 Sf9 细胞中活性极低的特性，我们利用两杆状病毒包装系统，将杆状病毒 rBac-mCBA-GSDMD^{NT} 和 rBac-AAV/helper 共感染昆虫 Sf9 细胞来包装 rAAV-mCBA-GSDMD^{NT}。其中杆状病毒 rBac-AAV/helper 可以为 rAAV 包装提供 Rep 和 Cap 蛋白。我们同时利用该系统包装了 rAAV-CMV-GSDMD^{NT}、rAAV-mCBA-eGFP 作为对照组。如图 5-3 a 所示，利用哺乳动物启动子 mCBA 的策略可以获得高产量的 rAAV-mCBA-GSDMD^{NT}（ 3.2×10^{10} vg/ 10^6 个 Sf9 细胞），远高于利用 CMV 启动子包装获得的 rAAV-CMV-GSDMD^{NT}（ 5.4×10^7 vg/ 10^6 个 Sf9 细胞，该产量无法满足后期动物实验）。上述数据表明，利用哺乳动物启动子 mCBA 的策略可在 rAAV 包装过程中避免 GSDMD^{NT} 的表达，从而最终获得高产量的 rAAV-mCBA-GSDMD^{NT}。接下来，我们用 rAAV-mCBA-GSDMD^{NT} 感染 HEK 293T 细胞，以测试由 mCBA 启动子驱动的 GSDMD^{NT} 在人细胞中的表达。如图 5-3 b 所示，感染 rAAV-mCBA-GSDMD^{NT} 可以使 HEK 293T 细胞发生明显的焦亡。这表明 rAAV-mCBA-GSDMD^{NT} 具有溶解肿瘤的潜力，所以我们将其命名为溶瘤腺相关病毒 P1，英文为 Oncolytic AAV P1，简称 oAAV-P1。

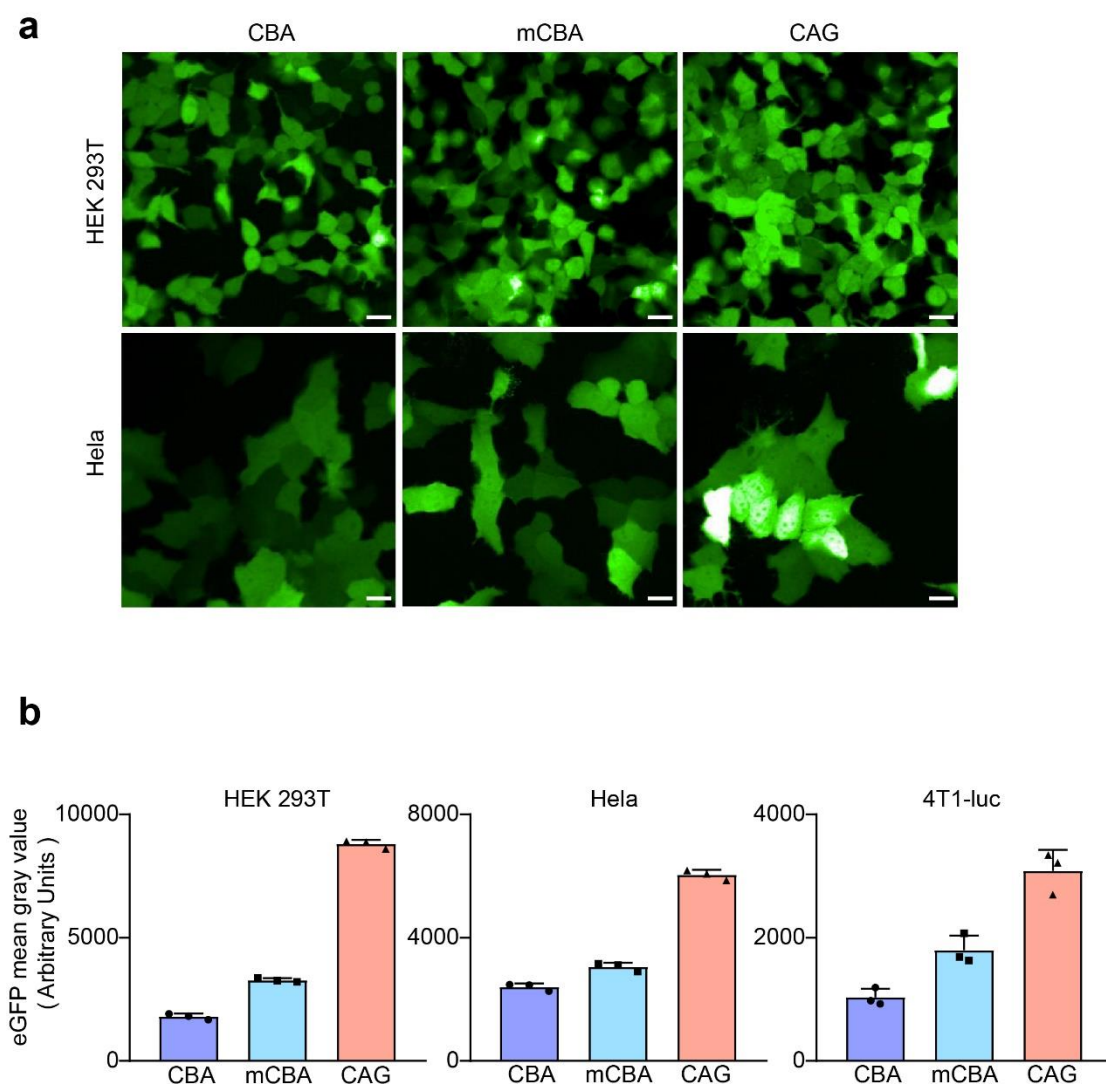


图 5-2. 启动子 mCBA、CBA 和 CAG 在哺乳动物细胞中的活性

Fig. 5-2. The activity of promoter mCBA, CBA and CAG in mammalian cells

a: 三种启动子在 HEK 293T、HeLa 细胞中驱动 eGFP 表达的代表性荧光图，标尺代表 20 μm ；b: 三种启动子在 HEK 293T、HeLa 和 4T1-luc 细胞中驱动 eGFP 表达的平均荧光强度定量结果。

a, Representative fluorescence images of three promoters driving eGFP expression in HEK 293T and HeLa cells. Scale bars, 20 μm . b, Quantitative results of the average fluorescence intensity of three promoters driving eGFP expression in HEK 293T, HeLa and 4T1-luc cells.

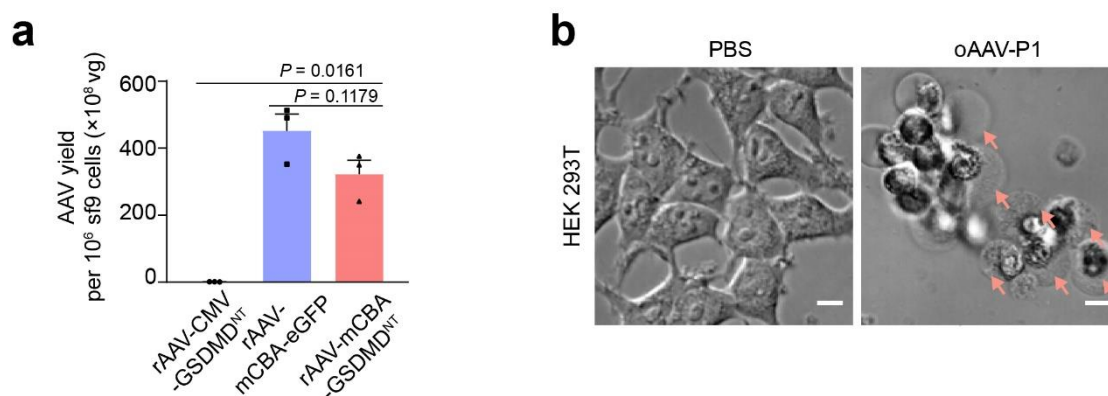


图 5-3. oAAV-P1 的包装

Fig. 5-3. oAAV-P1 packaging

a: 由 Sf9/rBac 系统包装的不同 rAAV 的病毒滴度, 统计方法为, Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Welch's t-test; **b:** 用 oAAV-P1 或 PBS 感染的 HEK 293T 细胞的差分干扰对比 (DIC) 图像 (箭头表示焦亡细胞), 标尺代表 20 μ m。

a, The viral titer of different AAVs packaged by the Sf9/rBac system. Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Welch's t-test. **b,** Differential interference contrast (DIC) images of HEK 293T cells infected with oAAV-P1 or PBS (arrows indicate pyroptotic cells). Scale bars, 20 μ m.

5.2 利用四环素诱导型启动子包装 rAAV-GSDM^{NT}

四环素诱导型启动子也可以在一定程度上避免靶基因表达, 所以我们假设可以利用 Tet-On 系统来避免包装时 GSDM^{NT} 的表达从而包装 rAAV-GSDM^{NT} (图 5-4 a)。然而在构建核心质粒 pAAV-rtTA-CMV-TRE-GSDMD^{NT} 时, 我们发现质粒 pAAV-rtTA-CMV-TRE-GSDMD^{NT} 非常难以提取, 提高菌液量也很难得到高产量的质粒 (图 5-4 b), 我们猜测这可能与四环素诱导型启动子漏表达导致大肠杆菌状态不佳有关, 这表明该质粒在 HEK 293T 细胞中也可能有漏表达现象 (图 5-4 c)。为验证上述猜想, 我们在 HEK 293T 细胞中转染 pAAV-rtTA-CMV-TRE-GSDMD^{NT} 进行测试, 如图 5-4 d 所示, pAAV-rtTA-CMV-TRE-GSDMD^{NT} 转染组在转染后 24 h, 大部分细胞均出现了焦亡现象, 这说明利用四环素诱导型启动子的策略不能用于 rAAV-GSDM^{NT} 的包装。同时我们发现将 GSDMD^{NT} 倒置, 并在两端加入 DIO (两对反向的 Lox) 序列可完全避免 GSDMD^{NT} 的表达 (图 5-4 b, d), 这为包装 rAAV-GSDM^{NT} 的策略提供了新的思路。

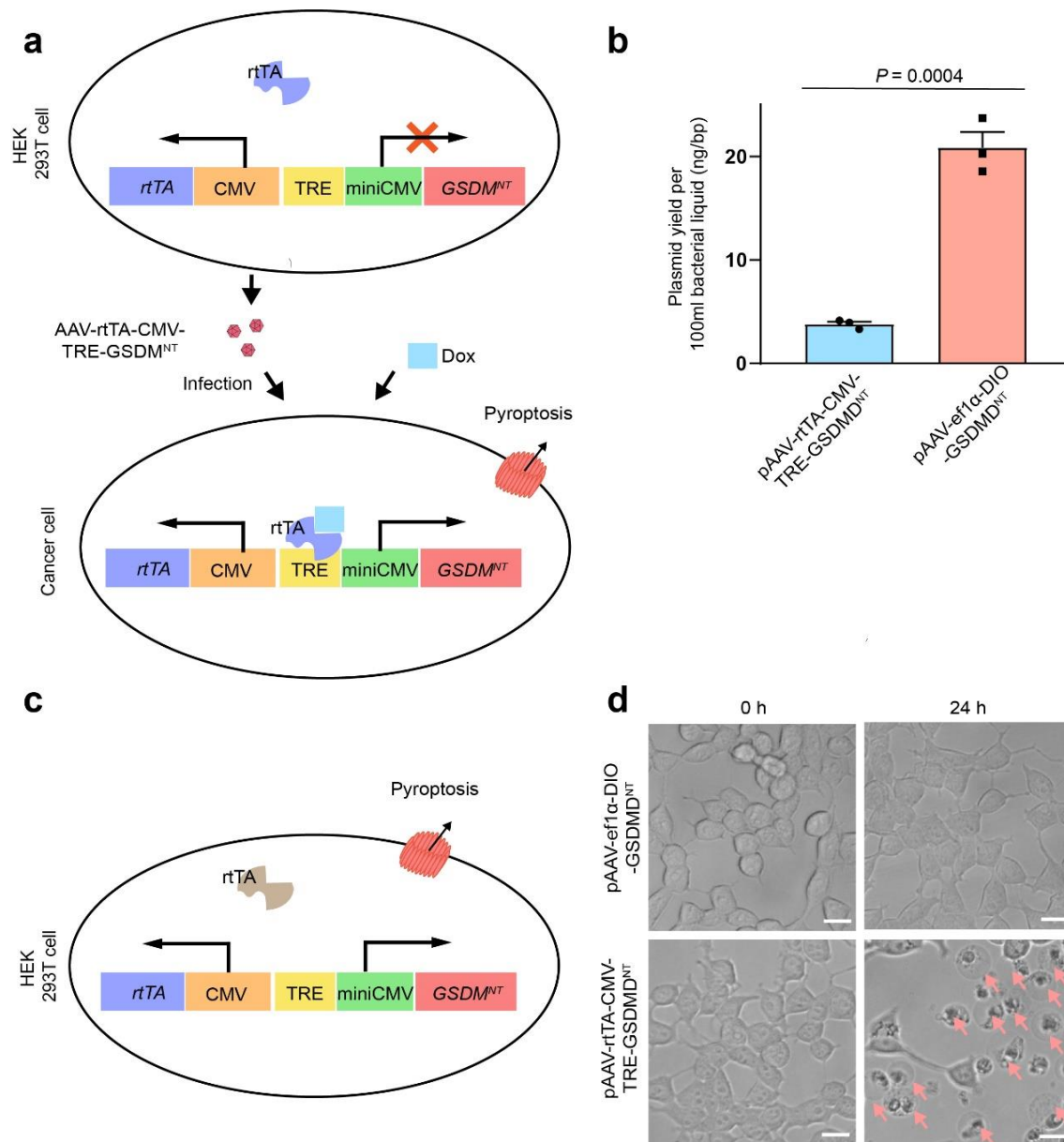


图 5-4. 利用四环素诱导型启动子包装 rAAV-GSDM^{NT}

Fig. 5-4. Packaging rAAV-GSDM^{NT} with a tetracycline inducible promoter

a: 四环素诱导型启动子包装 rAAV-GSDM^{NT} 的策略设计图; **b:** 两种不同质粒的产量, 统计方法如下, Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test; **c:** 质粒 pAAV-rtTA-CMV-TRE-GSDM^{NT} 漏表达导致 HEK 293T 细胞焦亡; **d:** 不同质粒转染 HEK 293T 细胞 0 小时和 24 小时的图像。

a, The strategy of Tetracycline-inducible promoter packaging rAAV-GSDM^{NT}. **b,** The yield of two different plasmids, Mean $\pm$ sem, two-tailed unpaired Student's t-test. **c,** The missed expression of plasmid pAAV-rtTA-CMV-TRE-GSDM^{NT} leads to HEK 293T cell pyroptosis. **d,** The images of HEK 293T cells transfected with different plasmids at 0 h and 24 h.

5.3 利用 Cre/lox 重组酶系统包装 rAAV-GSDM^{NT} (oAAV-P2)

将 *GSDMD*^{NT} 倒置，并在两端加入 DIO（两对反向的 Lox）序列可完全避免 *GSDMD*^{NT} 的表达（图 5-5 a），加入重组酶 Cre，则可使倒置 *GSDMD*^{NT} 恢复，从而发挥焦亡功效。基于此，我们设计了利用 Cre/lox 重组酶系统包装 rAAV-GSDM^{NT} 的策略。如图 5-5 b 所示，分别包装 rAAV-efl α -DIO-GSDM^{NT} 和 rAAV-Cre，然后在使用时将两者共感染，即可造成细胞焦亡，所以我们将这两种病毒的混合物称为溶瘤腺相关病毒 P2，简称 oAAV-P2。如图 5-5 c 所示，oAAV-P2 感染 HEK 293T 可以使其焦亡。

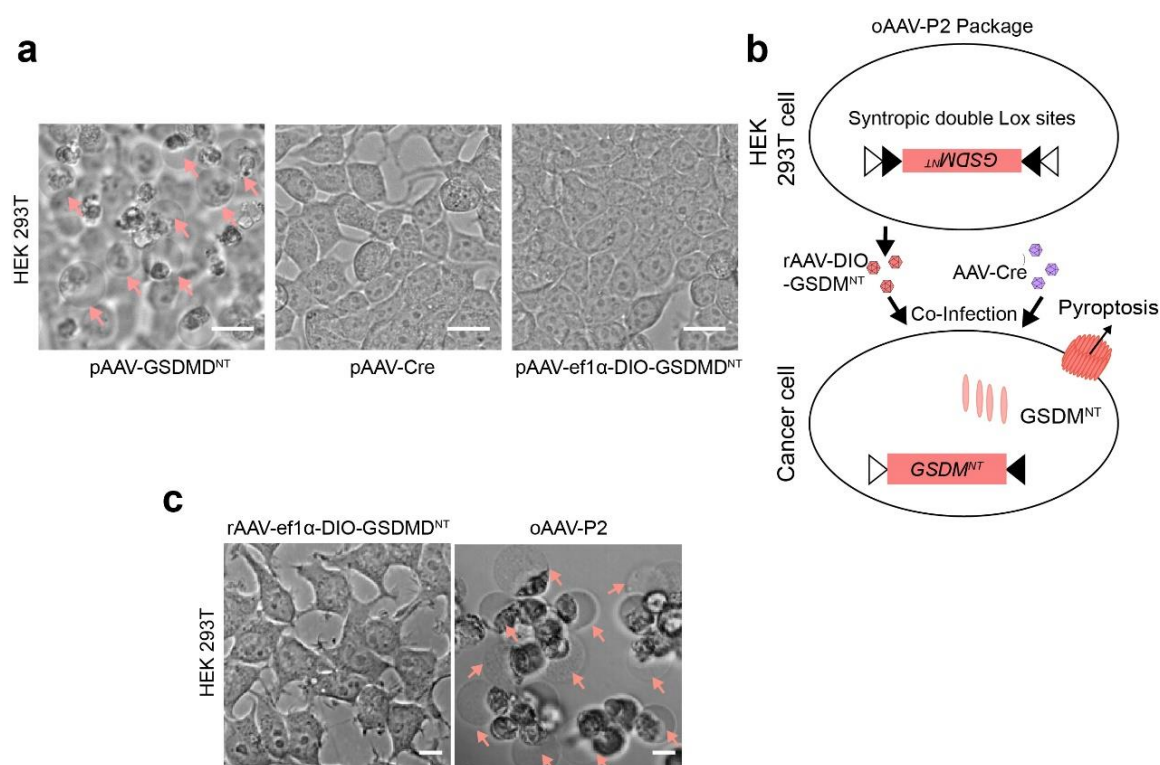


图 5-5. 利用 Cre/lox 重组酶系统包装 rAAV-GSDM^{NT}

Fig. 5-5. Packaging rAAV-GSDM^{NT} with Cre/lox recombinase system

a: 不同质粒转染 HEK 293T 细胞的图像，标尺代表 20 μ m；b: Cre/lox 重组酶系统包装 rAAV-GSDM^{NT} 的策略设计图；c: 用 rAAV-efl α -GSDM^{NT} 或 oAAV-P2 感染的 HEK 293T 细胞的差分干扰对比（DIC）图像（箭头表示焦亡细胞），标尺代表 20 μ m。

a, The images of HEK 293T cells transfected with different plasmids. Scale bars, 20 μ m. b, Schematic of the strategy using Cre/lox system to package RAAV-EF1A-DIO-GSDMD^{NT}. Co-

infection of AAV-Cre can revert the DIO-GSDMD^{NT} (oAAV-P2) to induce pyroptosis. **c**, Differential interference contrast (DIC) images of HEK 293T cells infected with rAAV-efl α -GSDMD^{NT} or oAAV-P2 (arrows indicate pyroptotic cells). Scale bars, 20 μ m.

5.4 oAAV-P1 和 oAAV-P2 可以使肿瘤细胞焦亡

为了验证 oAAV-P1 和 oAAV-P2 在肿瘤细胞中的焦亡作用, 我们分别用 oAAV-P1 或 oAAV-P2 感染了包括 HeLa, hep3B, C6-luc 和 4T1-luc 在内的四种癌细胞系。如图 5-6 a-d 所示, oAAV-P1 和 oAAV-P2 都诱导了所有肿瘤细胞的焦亡, 这表明所有组的 GSDMD^{NT} 都成功得到了表达。为了量化 oAAV-P1 和 oAAV-P2 对肿瘤细胞的致死作用, 我们在这些细胞系中进行了基于 LDH 释放的细胞死亡测定和基于 ATP 检测的细胞活力测定。如图 5-6 e 所示, 对照组 (rAAV-efl α -GSDMD^{NT}) 中 HeLa, C6-luc 和 4T1-luc 的细胞死亡率分别为 2.2%, 8.5% 和 5.0%, 而在 oAAV-P1 或 oAAV-P2 感染组中, 细胞死亡率分别为 23.2%, 20.48%, 19.01% 和 46.92%, 35.5%, 28.6%, 这表明 oAAV-P1 或 oAAV-P2 感染组均造成了更多肿瘤细胞的死亡。基于 ATP 检测的细胞活力测定也支持了上述结果 (图 5-6 f)。同时我们也注意到, 与 oAAV-P1 感染组相比, oAAV-P2 感染可导致更多的细胞死亡, 这说明 oAAV-P2 有更好的溶瘤效率。

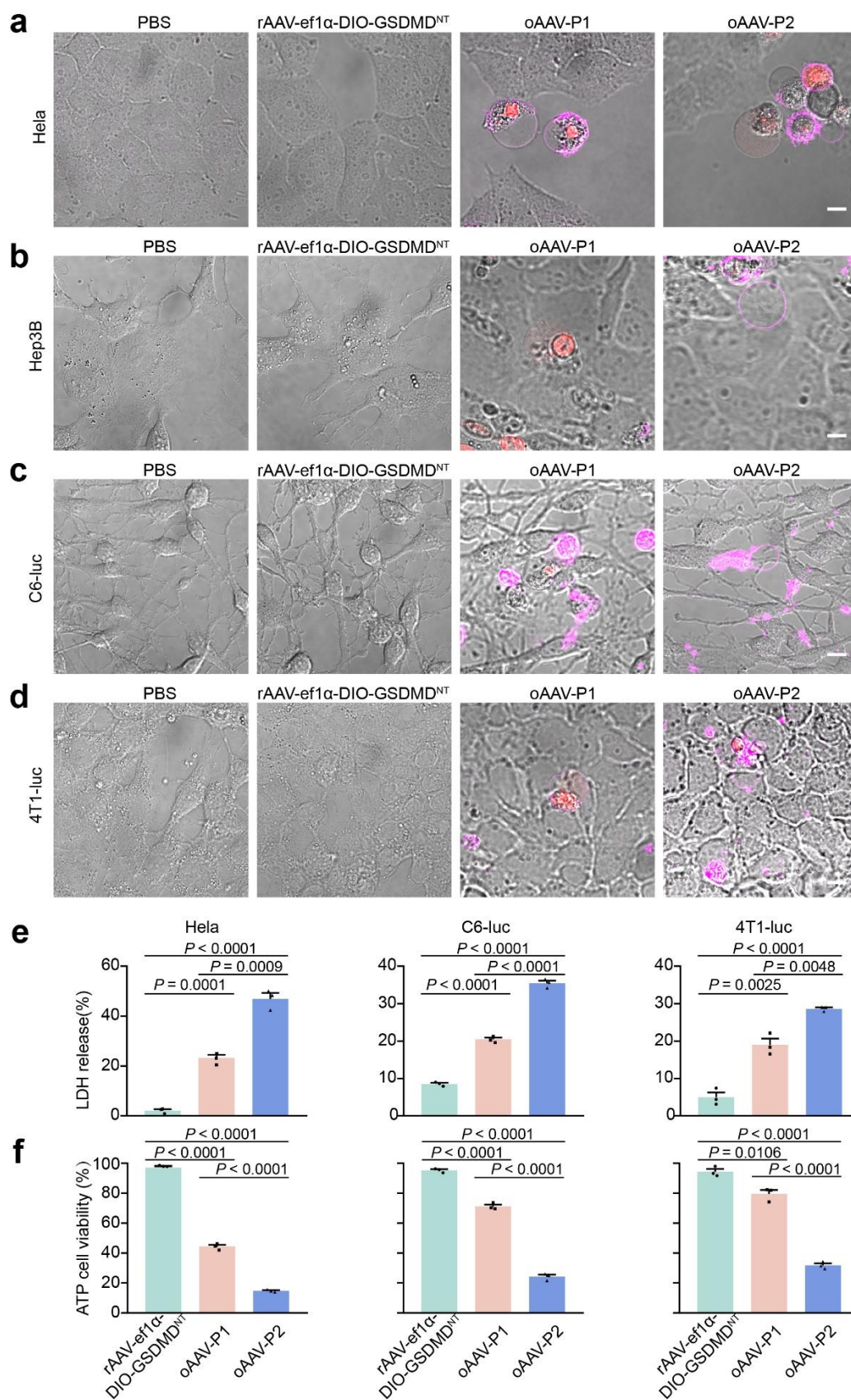


图 5-6. oAAV-P1 和 oAAV-P2 在不同肿瘤细胞系中诱导的焦亡

Fig. 5-6. The pyroptosis induced by oAAV-P1 and oAAV-P2 in different cancer cell lines

a-d: oAAVs 处理的 Hela (a), Hep3B (b), C6-luc (c), 4T1-luc (d) 细胞的共聚焦图像, 标尺代表 20 μm , 成像前 15 分钟, 向细胞添加 PI 和 Annexin V-APC; e, f: 分别用 rAAV-efl α -GSDMD^{NT}, oAAV-P1 和 oAAV-P2 处理后, 在 Hela, C6-luc, 4T1-luc 细胞中基于 LDH 释放的细胞死亡测定和基于 ATP 检测的细胞活力测定的对比结果, 统计条件为, Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test。

a-d, Confocal images of the oAAVs-treated Hela (a), Hep3B (b), C6-luc (c), 4T1-luc (d) cells. Scale bars, 20 μm . All the cells were added with Propidium Iodide and Annexin V-APC 15 min before imaging. **e, f**, Comparison of LDH release-based cell death assay and ATP cell viability assay in Hela, C6-luc, 4T1-luc cells after treatment with RAAV-EF1A-DIO-GSDMD^{NT}, oAAV-P1 and oAAV-P2, respectively. Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test.

5.5 oAAV-P1 和 oAAV-P2 诱导细胞焦亡的效率不同

在肿瘤细胞中, 我们发现在相同剂量下, oAAV-P2 有更好的溶瘤效果, 这说明其诱导焦亡效率高。为了验证上述验证, 我们在 HEK 293T 细胞中也进行了效率测试。如图 5-7 所示, oAAV-P2 感染可以使 HEK 293T 细胞更早发生焦亡, 且最终 oAAV-P2 也可导致更多的 HEK 293T 细胞死亡, 这与之前在肿瘤细胞上的数据相符。oAAV-P2 诱导细胞焦亡, 需要两种病毒 (rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 和 rAAV-Cre) 同时感染, 理论上会比 oAAV-P1 单独一种病毒感染的几率要低, 介导焦亡效率也应该较低, 但实际结果却相反。我们推测可能有两个原因, 一是由于 oAAV-P1 中驱动 GSDMD^{NT} 表达的 mCBA 启动子比 oAAV-P2 中的 efl α 启动子活性低, 另一种原因可能与 oAAV-P1 和 oAAV-P2 的衣壳蛋白来源不同有关。

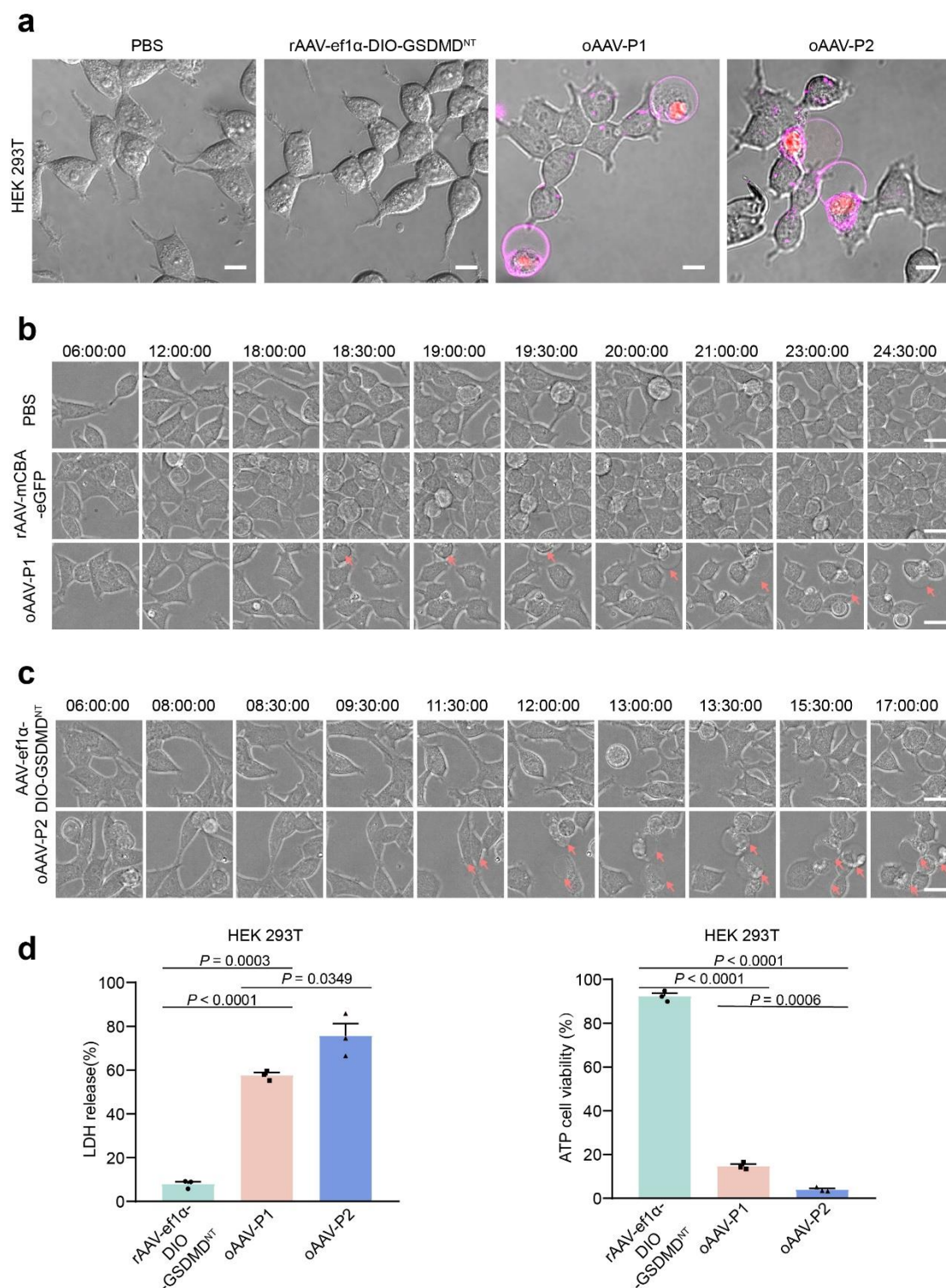


图 5-7. oAAV-P1 和 oAAV-P2 处理诱导的 HEK 293T 细胞焦亡

Fig. 5-7. Pyroptosis of HEK 293T cells induced by oAAV-P1 and oAAV-P2 treatment

a: 用 oAAVs 处理的 HEK 293T 细胞的共聚焦图像，标尺代表 20 μm ，成像前 15 分钟，向细胞添加 PI 和 Annexin V-APC；b, c: 分别用 oAAV-P1 (b) 和 oAAV-P2 (c) 处理的 HEK 293T 细胞的共聚焦高内涵细胞成像图，标尺代表 20 μm ；d: rAAV-ef1α-DIO-GSDMD^{NT}、

oAAV-P1 或 oAAV-P2 处理的 HEK 293T 细胞的基于 LDH 释放的细胞死亡测定和基于 ATP 检测的细胞活力测定, 统计条件为, Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test。

a, Confocal images of the HEK 293T cells treated with oAAVs. Scale bars, 20 μ m. The cells were added with Propidium Iodide and Annexin V-APC 15 min before imaging. **b, c**, Confocal high-content cell imaging of HEK 293T cells treated with oAAV-P1 (**b**) and oAAV-P2 (**c**), respectively. Scale bars, 20 μ m. **d**, Comparison of LDH release-based cell death assay and ATP cell viability assay in HEK 293T cells treated with rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT}, oAAV-P1 and oAAV-P2, respectively.

Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test.

为了验证 mCBA 启动子和 efl α 启动子驱动 GSDMD^{NT} 表达的效率是否存在差异, 我们另外构建了 pAAV-mCBA-DIO-GSDMD^{NT} 质粒, 然后将 pAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 和 pAAV-mCBA-DIO-GSDMD^{NT} 分别与 pAAV-Cre 一起转染细胞, 然后对细胞死亡进行检测。如图 5-8 所示, 相对于 pAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 共转染组, pAAV-mCBA-DIO-GSDMD^{NT} 共转染组细胞死亡数更少, 表明 mCBA 启动子确实比 efl α 启动子驱动 GSDMD^{NT} 表达的效率要低。

为了验证人 HEK 293T 细胞和昆虫 Sf9 细胞包装出的 rAAV 是否会因为衣壳蛋白 Cap 来源不同而影响 rAAV 感染能力, 我们分别用 HEK 293T 细胞和昆虫 Sf9 细胞包装了 rAAV/293-CMV-eGFP 和 rAAV/Sf9-CMV-eGFP, 然后用相同滴度的这两种病毒分别感染 HEK 293T、Hela 和 4T1-luc 细胞后检测 eGFP 的荧光强度。如图 5-9 所示, 相对于 rAAV/Sf9-CMV-eGFP 感染组, rAAV/293-CMV-eGFP 感染后三种细胞的平均荧光强度均较高, 这说明 rAAV/293-CMV-eGFP 有更好的感染能力, 也就是说 HEK 293T 细胞来源的 rAAV 感染性更强。

综合上述结果, oAAV-P2 比 oAAV-P1 诱导焦亡效率高的原因与 mCBA 启动子活性较弱及昆虫 Sf9 来源的 rAAV 感染能力较弱均有关。因此, 在接下来的动物实验中, 我们主要选择 oAAV-P2 用于肿瘤治疗。

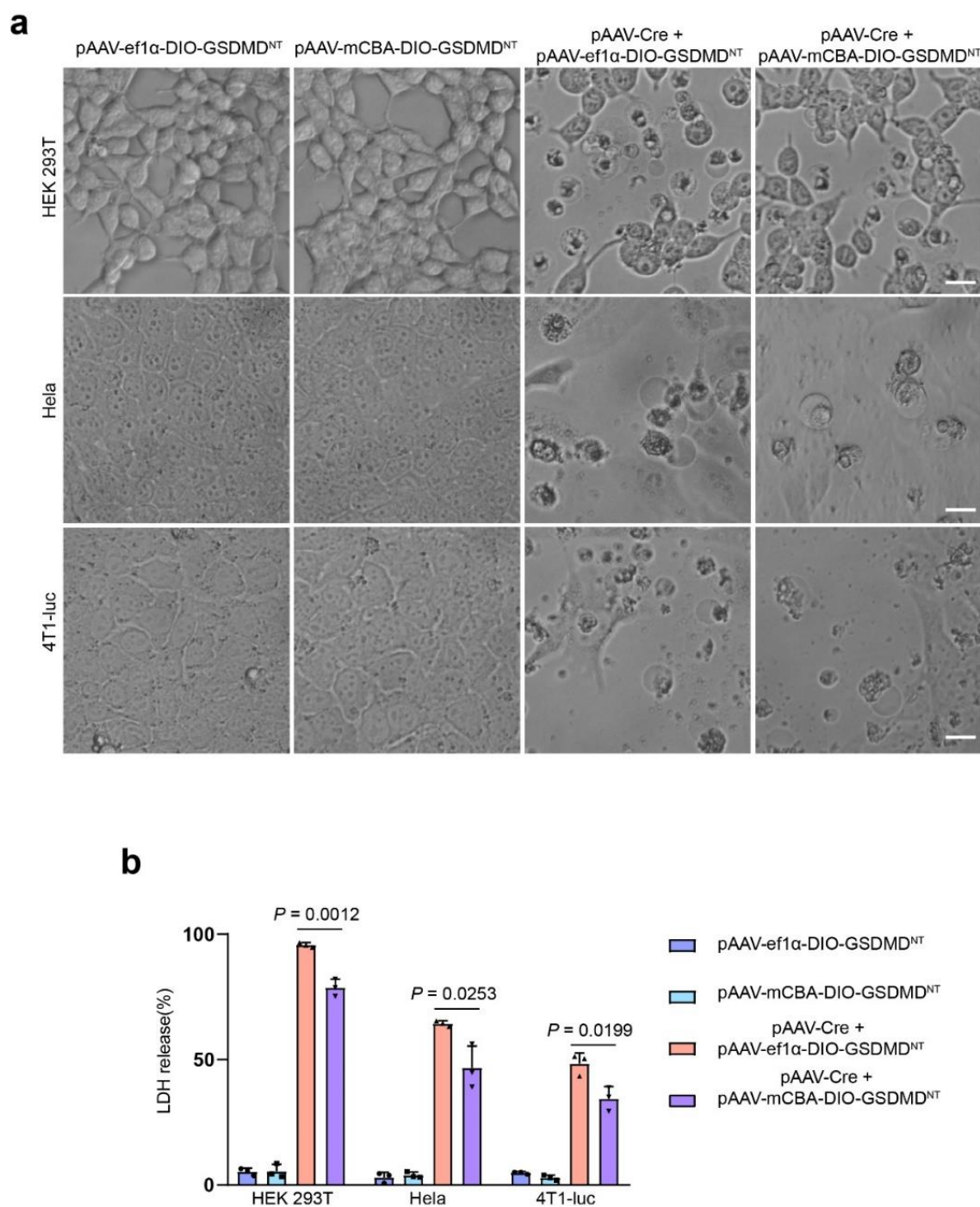


图 5-8. 启动子 mCBA 和 ef1α 启动子驱动 *GSDMD^{NT}* 表达的效率

Fig. 5-8. The efficiency of promoter mCBA and ef1α promoter driving *GSDMD^{NT}* expression

a: 质粒 pAAV-ef1α-DIO-GSDMD^{NT} 和 pAAV-mCBA-DIO-GSDMD^{NT} 单独转染或与 pAAV-Cre 共转染细胞的图像，标尺代表 20 μm; b: 质粒 pAAV-ef1α-DIO-GSDMD^{NT} 和 pAAV-mCBA-DIO-GSDMD^{NT} 单独转染或与 pAAV-Cre 共转染细胞的基于 LDH 释放的细胞死亡测定，统计条件为，Mean ± s.d., two-tailed unpaired Student's t-test。

a, Image of the cells transfected with plasmid pAAV-e β -DIO-GSDMD^{NT} and pAAV-mCBA-DIO-GSDMD^{NT} alone or co-transfected with pAAV-Cre. Scale bars, 20 μ m. **b**, Comparison of LDH release-based cell death assay in the cells transfected with pAAV-e β -DIO-GSDMD^{NT} and pAAV-mCBA-DIO-GSDMD^{NT} alone or co-transfected with pAAV-Cre. Mean $\pm$ s.d., two-tailed unpaired Student's t-test.

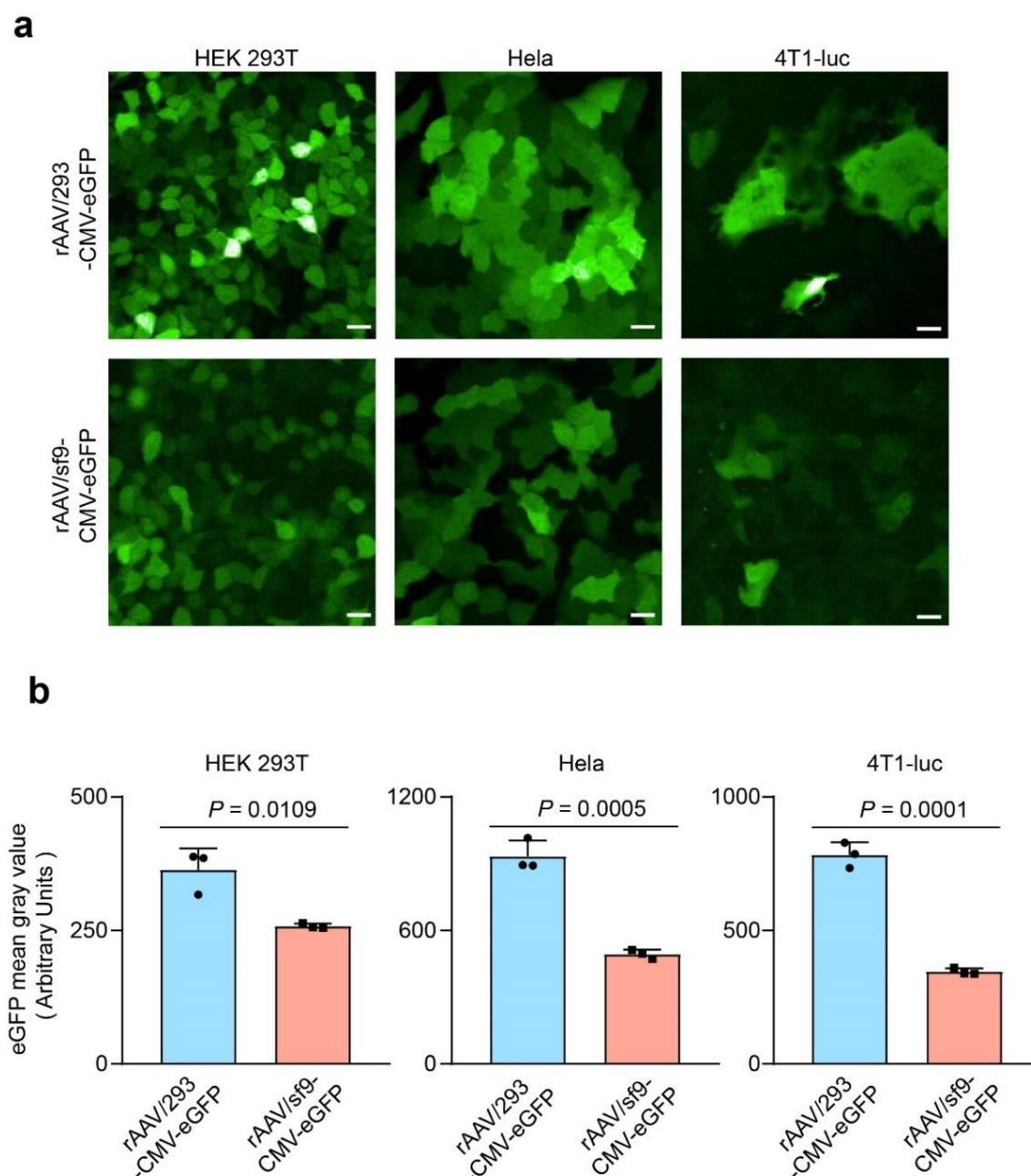


图 5-9. 两种不同细胞来源的 rAAV 的感染性

Fig. 5-9. Infectivity of rAAV from two different cell sources

a: 两种细胞来源不同的 rAAV 在 HEK 293T、HeLa 和 4T1-luc 细胞中驱动 eGFP 表达的代

表性荧光图，标尺代表 20 μm ；b：两种细胞来源不同的 rAAV 在 HEK 293T、Hela 和 4T1-luc 细胞中驱动 eGFP 表达的平均荧光强度定量结果，统计方法为，Mean $\pm$ s.d., two-tailed unpaired Student's t-test。

a, Representative fluorescence images of two rAAVs with different cell sources driving eGFP expression in HEK 293T, Hela and 4T1-luc cells. Scale bars, 20 μm . b, Quantitative results of the average fluorescence intensity of two rAAVs with different cell sources driving eGFP expression in HEK 293T, Hela and 4T1-luc cells. Mean $\pm$ s.d., two-tailed unpaired Student's t-test.

5.6 oAAV-P1 治疗原位多形性胶质母细胞瘤大鼠模型

为了测试 oAAV-P1 对动物肿瘤模型的溶瘤效果，我们利用脑立体定位仪将 C6-luc 细胞注射到 Wistar 大鼠的左侧纹状体中，建立了原位多形性胶质母细胞瘤(GBM)大鼠模型。瘤接种后第七天，将大鼠随机分为两组，一组瘤内接种 oAAV-P1，另一组瘤内接种 rAAV-mCBA-eGFP 作为对照，随后对大鼠体重和生存率进行检测。如图 5-10 所示，虽然 oAAV-P1 治疗对 GBM 大鼠模型肿瘤进程的作用有限，但是 oAAV-P1 处理在脑肿瘤接种部位可引起明显的空洞现象。我们推测这可能是由于来源于 Sf9 细胞的衣壳蛋白和 mCBA 启动子相对较低的活性制约了 oAAV-P1 在肿瘤内 GSDMD^{NT} 的快速表达，从而无法迅速发挥焦亡功效来抑制肿瘤的快速生长。在这种情况下，肿瘤的过度生长会在大脑中占据很大的体积。尽管可以通过 oAAV-P1 治疗最终将其消除，但原有肿瘤的占位效应无法完全消除，所以最终 oAAV-P1 治疗对 GBM 大鼠模型的存活率几乎没有影响。因此，从长远来看，oAAV-P1 治疗可能适合于一些进展缓慢的肿瘤。

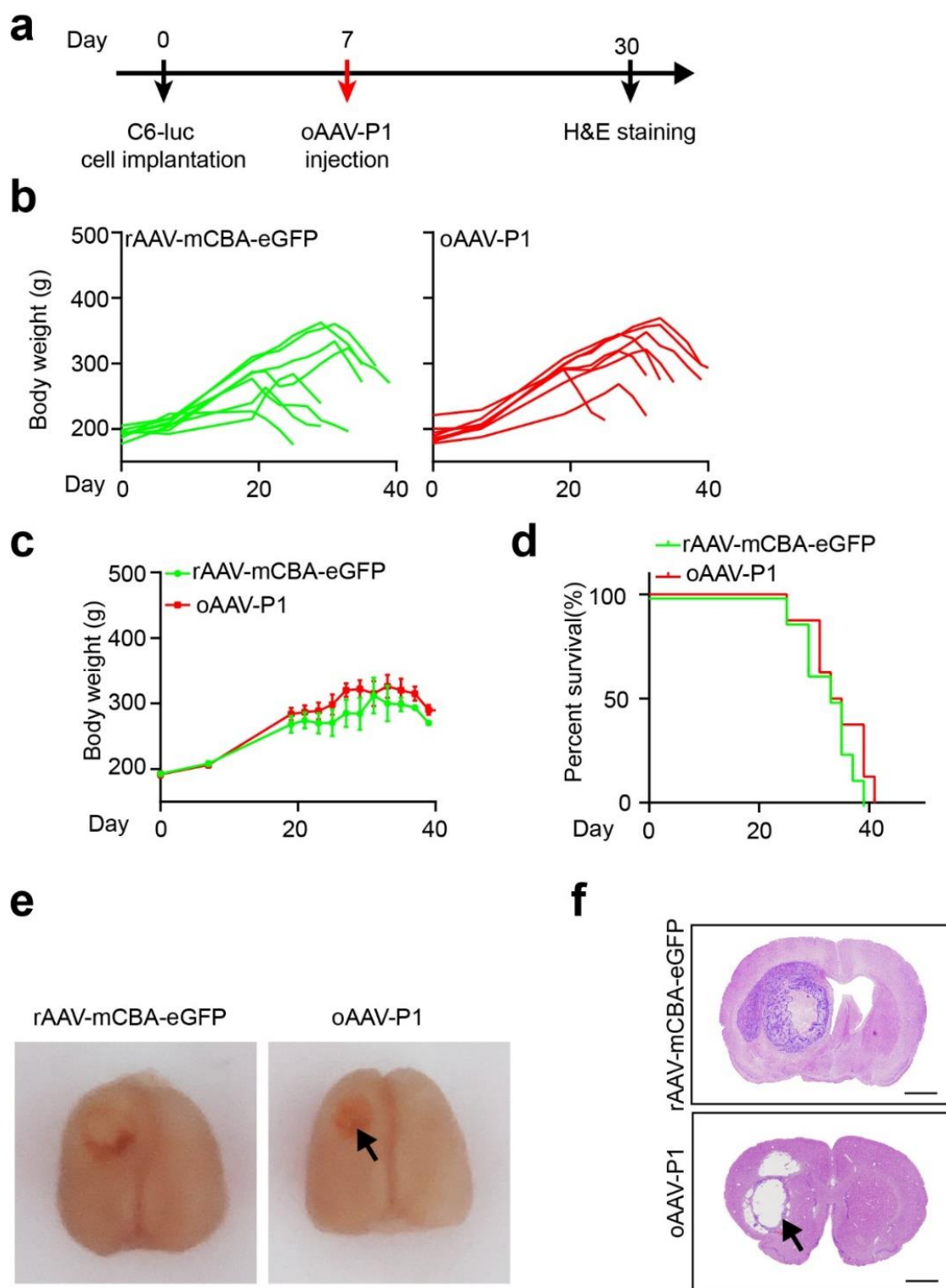


图 5-10. oAAV-P1 治疗多形性胶质母细胞瘤大鼠模型

Fig. 5-10. oAAV-P1 treatment of GBM rat model

a: oAAV-P1 治疗 GBM 大鼠模型的方案; b, c: 所示为大鼠的体重监测结果; d: 用 rAAV-mCBA-eGFP 或 oAAV-P1 处理的 GBM 大鼠的生存曲线; e: 肿瘤细胞植入后 30 天, 两组 GBM 大鼠模型的代表性大脑的照片; f: 肿瘤细胞植入后 30 天, GBM 大鼠模型脑切片的 HE 染色

图，所示图片为每组的代表性图像（每组各 3 只大鼠），标尺代表 2,000 μm 。

a, Treatment scheme of oAAV-P1 treatment of GBM rat model. **b, c**, Weight monitoring results of the rats as indicated. **d**, Survival of C6-luc tumor-bearing rat treated with rAAV-mCBA-eGFP or oAAV-P1 as indicated in **a**. **e**, Photographs of representative brains from GBM model on 30th d. **f**, H&E-stained coronal sections of C6-luc tumor-bearing rat brains 30 d after tumor cell implantation. Representative images of each group ($n = 3$ rats) are presented. Scale bar, 2,000 μm .

5.7 oAAV-P2 治疗原位多形性胶质母细胞瘤大鼠模型

5.7.1 oAAV-P2 在 GBM 大鼠模型中有很好的疗效

细胞实验证明 oAAV-P2 有更高的诱导焦亡效率，为验证其在体内溶瘤效果，我们构建了原位 GBM 大鼠模型。肿瘤植入后第 7 天，分别向大鼠瘤内注射 oAAV-P2，rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 或 PBS，然后在第 20 天时进行荧光素活体成像以评估 GBM 进程（图 5-11 a）。如图 5-11 b, c 所示，与 PBS 和 rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 对照组相比，oAAV-P2 治疗组的大鼠荧光素信号很低，这表明 oAAV-P2 治疗组肿瘤生长受到抑制。同时我们观察到，oAAV-P2 处理可显著减轻 GBM 进展引起的大鼠体重减轻（图 5-11 e, f），并延长 GBM 大鼠模型的平均存活时间（图 5-11 d）。肿瘤植入后第 35 天和第 50 天的脑切片的 HE 染色结果表明，oAAV-P2 能够有效起到溶瘤作用（图 5-11 g）。值得注意的是，oAAV-P2 组中有一半的大鼠存活了 50 天以上，且其脑切片中没有检测到肿瘤组织（图 5-11 g），这说明 oAAV-P2 对 GBM 大鼠模型有很好的治疗效果。

5.7.2 oAAV-P2 在 GBM 大鼠模型中可以暂时性打开血脑屏障

GBM 病程进展迅速的一个关键原因是血脑屏障(Blood Brain Barrier, 简称 BBB)阻碍了淋巴细胞的进入，不能杀死肿瘤细胞(Wang et al 2019)。焦亡发挥抗肿瘤作用主要是靠其引发的强烈免疫反应招募大量的肿瘤浸润淋巴细胞，这意味着 oAAV-P2 可能通过暂时性打开 BBB，使淋巴细胞得以进入肿瘤发挥作用。

为了研究 oAAV-P2 处理对 BBB 完整性的影响，我们将伊文思蓝染料通过静脉注射到 GBM 大鼠模型中，然后对其脑组织进行观察。如图 5-12 a 所示，oAAV-P2

治疗组的大脑显示出较深的伊文思蓝染料染色，而对照组则染色很浅，同时脑组织匀浆提取伊文思蓝染料定量分析的结果也与上述数据相符（图 5-12 b）。此外，我们还对注射伊文思蓝染料的各组大鼠脑切片进行了 IgG 染色试验，证明在 oAAV-P2

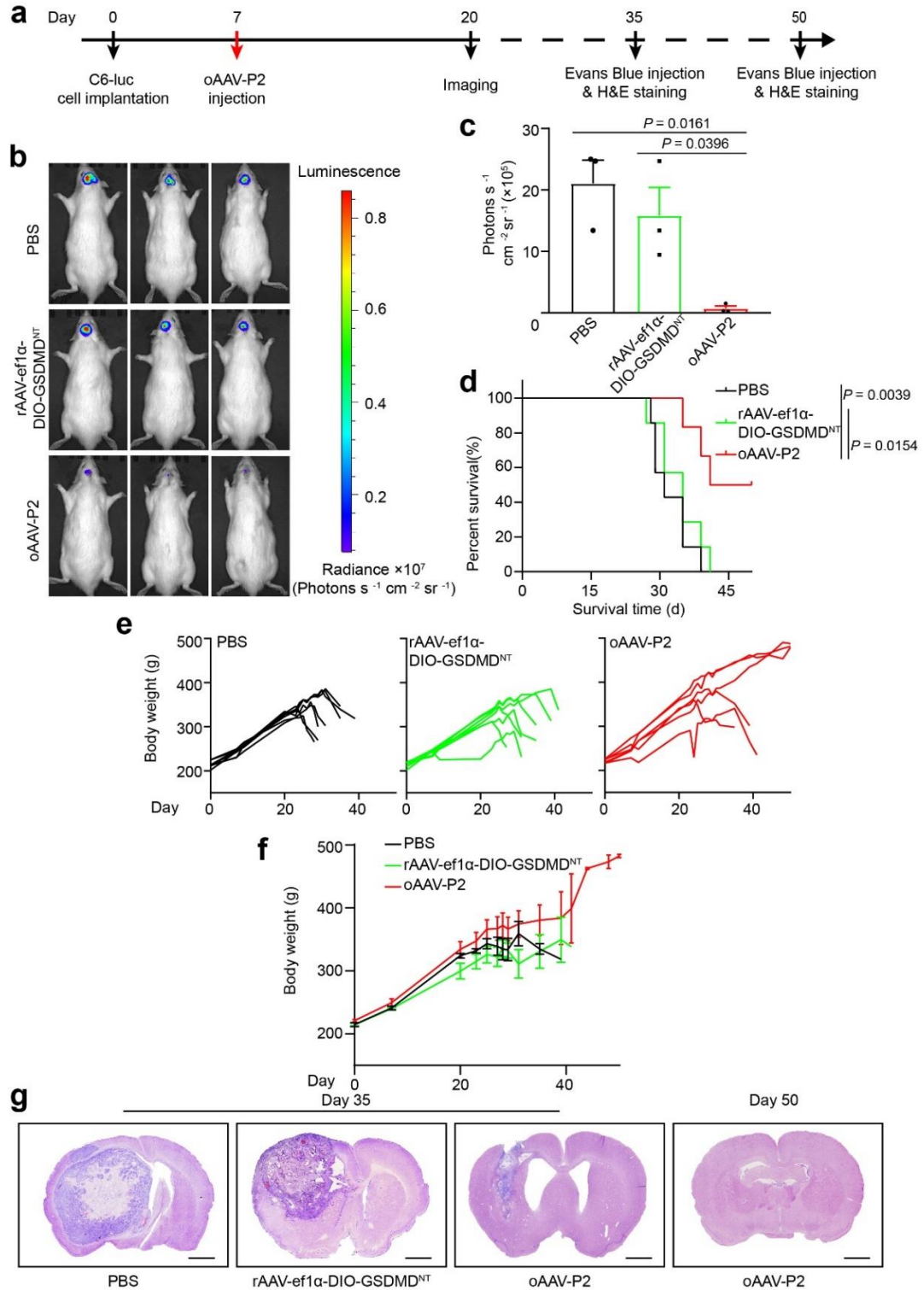


图 5-11. oAAV-P2 治疗多形性胶质母细胞瘤大鼠模型

Fig. 5-11. oAAV-P2 treatment of GBM rat model

a: oAAV-P2 治疗 GBM 大鼠模型的方案; b, c: 各组大鼠的荧光素酶成像结果; d: 用 PBS, rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 或 oAAV-P2 处理的 GBM 大鼠的生存曲线; e, f: 各组大鼠体重监测数据; g: 肿瘤植入后第 35 天各组大鼠脑切片 HE 染色图及第 50 天 oAAV-P2 治疗组脑切片 HE 染色图, 标尺代表 2,000 μ m。

a, Experimental timeline for oAAV-P2 treatment in GBM rat model. **b**, Luciferase imaging of C6 tumors 20 d after implantation (n = 3 rats). **c**, Corresponding quantification of luciferase expression in **b**. Mean $\pm$ s.e.m., from three independent replicates, two-tailed unpaired Welch's t-test. **d**, Survival curves of C6-luc tumor-bearing rats treated with PBS, rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} and oAAV-P2 respectively as indicated in (**a**). n = 7 rats for PBS and rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT}, 6 rats for oAAV-P2. **e, f**, Weight monitoring results of the rats as indicated, n = 7 rats for PBS and rAAV-efl α -mCBA-eGFP, n = 6 rats for oAAV-P2. **g**, H&E-stained coronal sections of C6-luc tumor-bearing rat brains treated as indicated, 35 d (three on the left) or 50 d (right) after tumor cells implantation. Representative images of each group (n = 3 rats) are presented. Scale bar, 2,000 μ m.

处理后 IgG 可以通过 BBB 侵入大脑 (图 5-12 c)。上述数据表明, oAAV-P2 治疗可导致大鼠 GBM 模型中 BBB 的开放。同时, 我们通过对各组大鼠脑切片进行 CD3-BV421 染色, 分析了肿瘤中的 T 细胞浸润, 结果显示, oAAV-P2 组的 CD3⁺T 细胞浸润明显高于对照组 (图 5-12 d, e)。上述数据说明, oAAV-P2 治疗介导的焦亡可以打开 BBB, 使淋巴细胞进入肿瘤, 发挥抗肿瘤作用。

但是 BBB 的长期开放性可能会导致许多脑部疾病, 例如病原感染, 因此我们进一步研究了 oAAV-P2 治疗后 BBB 的完整性。如图 5-12 a, b 所示, 在 oAAV-P2 处理 43 天后大鼠脑中的伊文思蓝染色水平非常低, 此外, 在各组脑切片中也只能观察到很少的 IgG 染色 (5-12 c)。这些结果表明, 由 oAAV-P2 处理引起的血脑屏障开放是暂时性的, 可以恢复。总之, 上述数据表明, oAAV-P2 治疗诱导的焦亡, 可以暂时打开血脑屏障, 使 T 细胞浸润到肿瘤中, 最终杀死肿瘤细胞。

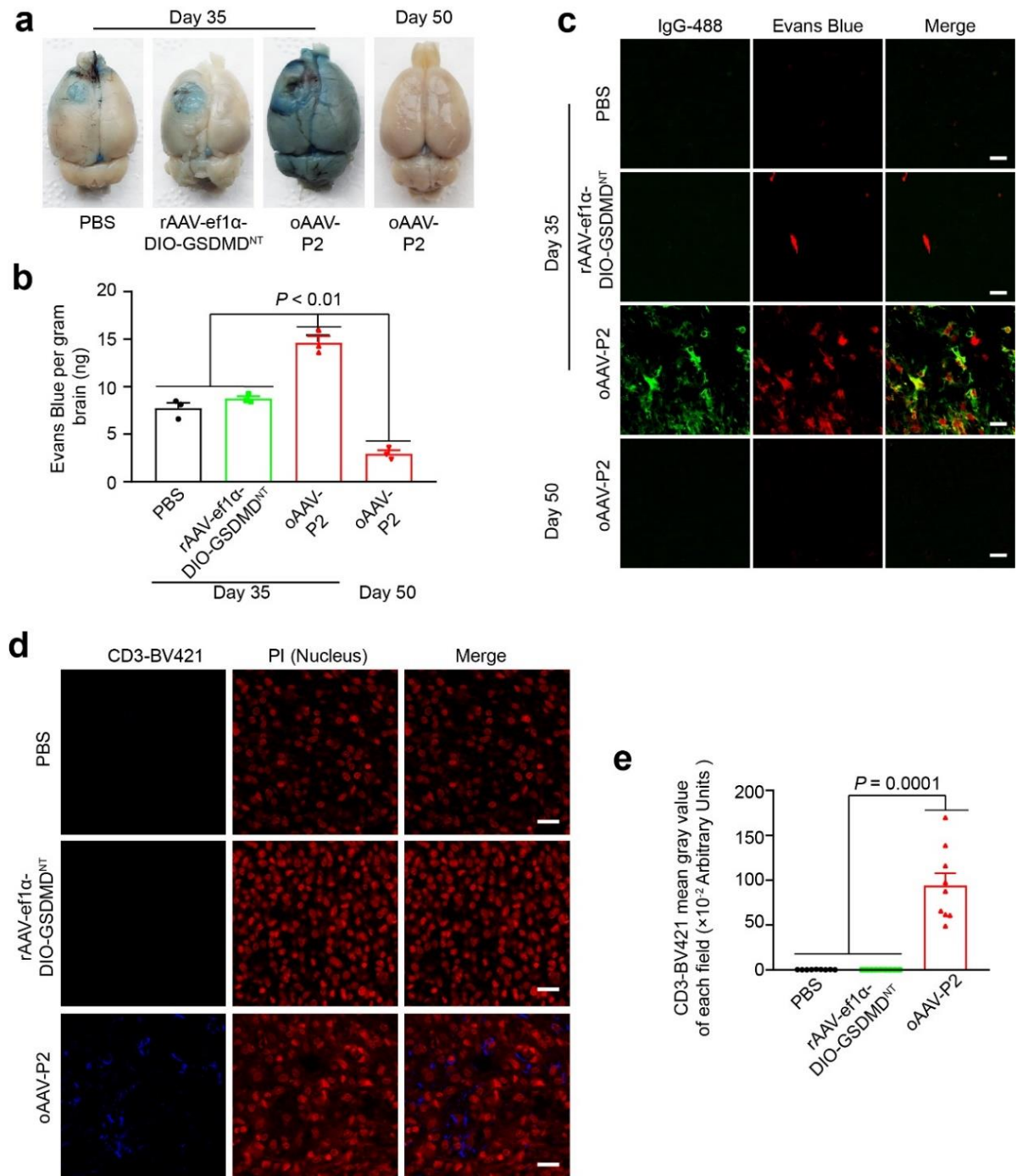


图 5-12. oAAV-P2 可暂时性打开血脑屏障

Fig. 5-12. oAAV-P2 can temporarily open the BBB

a: 在肿瘤细胞植入后第 35 天（左侧三图）或 50 天（右图）图示组别大鼠全脑伊文思蓝染色图；b: 在肿瘤细胞植入后第 35 天（左侧三图）或 50 天（右图）图示组别大鼠脑伊文思蓝的定量结果，统计方法为 Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test; c: 在肿瘤细胞植入后第 35 天（左侧三图）或 50 天（右图）图示组别 IgG-488 和伊文思蓝染色的荧光图像，标尺代表 20 μ m; d: 肿瘤细胞植入后第 35 天各组大鼠脑切片 CD3-BV421 染色的代表性荧光图像，

标尺代表 20 μm ; e, 肿瘤细胞植入后第 35 天各组大鼠脑切片 CD3-BV421 染色的定量分析,

统计方法为 Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test。

a, Evans Blue staining of whole brains treated as indicated, 35 d (three on the left) or 50 d (right) after tumor cells implantation. Representative images of each group ($n = 3$ rats) are presented. **b**, Corresponding quantification of Evans Blue in f. Mean $\pm$ s.e.m., from three independent replicates, two-tailed unpaired Student's t-test. **c**, Fluorescence images of IgG-488 and Evans Blue stained C6-luc tumors following treatment as indicated. Representative images of each group ($n = 3$ rats) are presented. Scale bar, 20 μm . **d**, Representative fluorescence images of CD3-BV421-stained of the C6-luc tumors following treated as indicated. $n = 3$ rats for each group. Scale bar, 20 μm . **e**, Fluorescence images of IgG-488 and Evans Blue stained C6-luc tumors following treatment as indicated. Representative images of each group ($n = 3$ rats) are presented. Scale bar, 20 μm . **f**, Quantification of the tumor infiltrating CD3⁺ cells from GBM rat model by CD3-BV421 gray value measurement. Mean $\pm$ s.e.m., from three independent replicates, two-tailed unpaired Student's t-test.

5.7.3 oAAV-P2 治疗双侧接种瘤的 GBM 大鼠模型

为了研究 oAAV-P2 引起的焦亡是否会激起针对另一侧脑内的抗肿瘤效应, 我们通过在 Wistar 大鼠大脑双侧纹状体内均接种 C6-luc 细胞, 并在接种瘤后第 7 天, 对左侧肿瘤进行 oAAV-P2 或 rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 注射, 两周后麻醉处死大鼠, 取脑做石蜡切片进行 HE 染色。如图 5-13 所示, 相对于 rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 对照组, oAAV-P2 治疗组大鼠脑两侧肿瘤均较小, 且在 oAAV-P2 治疗组左侧和右侧大脑均可观察到明显的坏死灶, 这说明 oAAV-P2 介导焦亡引起的抗肿瘤免疫对对侧脑肿瘤也有杀伤作用。

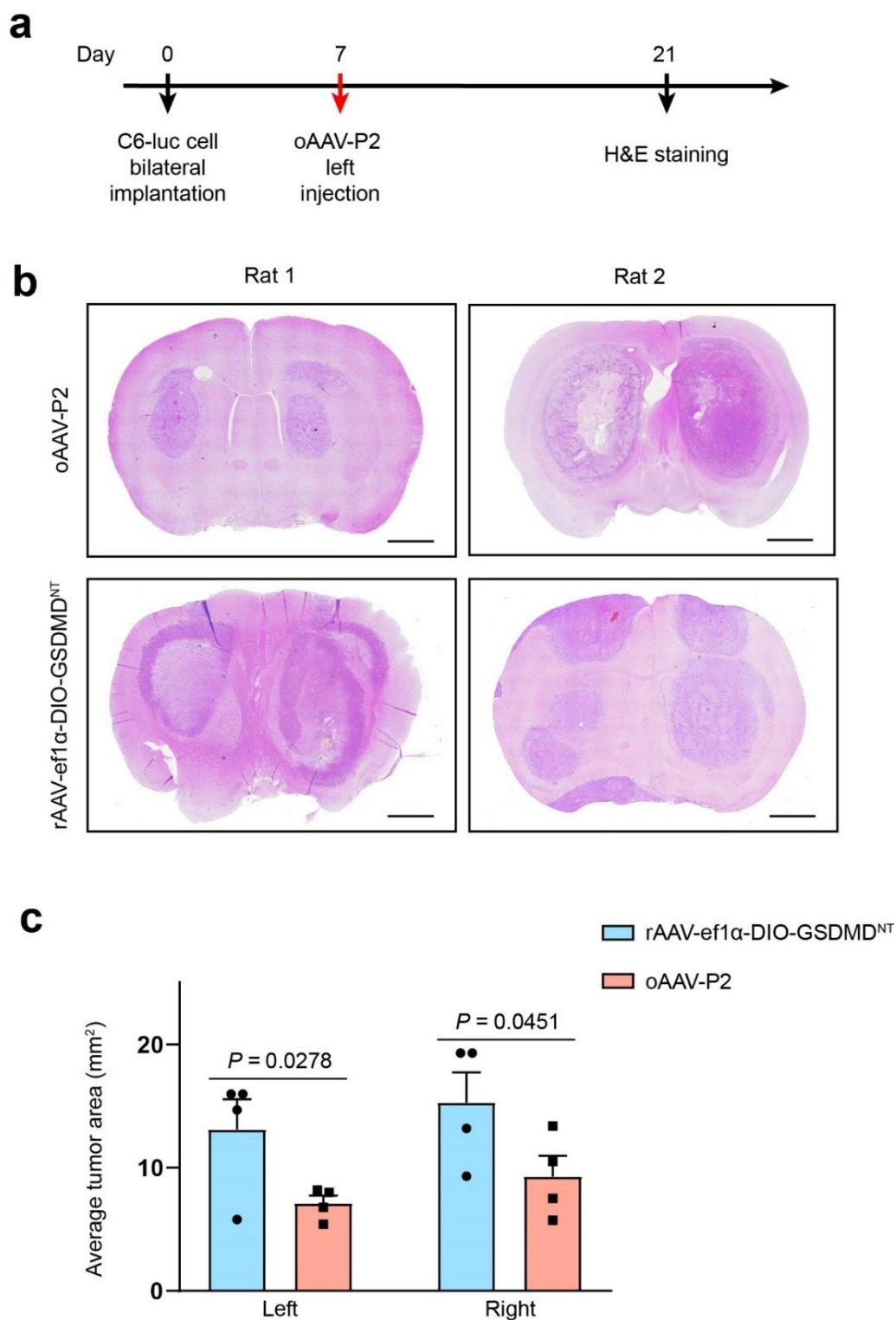


图 5-13. oAAV-P2 治疗双侧接种瘤的 GBM 大鼠模型

Fig. 5-13. oAAV-P2 treatment of GBM rat model with bilateral tumor inoculation

a: oAAV-P2 治疗双侧接种瘤的 GBM 大鼠模型方案; b: 肿瘤植入后第 21 天两组大鼠脑切片 HE 染色图, 标尺代表 2,000 μm ; c: 肿瘤植入后第 21 天两组大鼠脑两侧肿瘤面积, 统计方法为, Mean $\pm$ s.d., one-tailed unpaired Student's t-test。

a, Experimental timeline for oAAV-P2 treatment of GBM rat model with bilateral tumor inoculation. **b**, H&E staining of brain slices of two groups of rats on the 21st day after tumor implantation. Scale bar, 2,000 μm . **c**, The left and right brain tumor areas of the two groups of rats on the 21st day after tumor implantation. Mean $\pm$ s.d., one-tailed unpaired Student's t-test.

5.8 oAAV-P2 治疗原位三阴性乳腺癌小鼠模型

为了评估 oAAV-P2 对三阴性乳腺癌（TNBC）的治疗效果，我们将表达荧光素酶的 4T1-luc 细胞注射到 Balb/c 小鼠左侧第四乳房的脂肪垫中，建立了原位三阴性乳腺癌（TNBC）小鼠模型。肿瘤植入后 6 天，将小鼠随机分为两组，分别瘤内注射 oAAV-P2 或 rAAV-ef1 α -DIO-GSDMD^{NT}。如图 5-14 所示，肿瘤植入后 30 天，rAAV-ef1 α -DIO-GSDMD^{NT} 对照组小鼠的平均肿瘤体积超过 1000 mm³，明显大于 oAAV-P2 治疗组。该结果表明，oAAV-P2 治疗可以抑制 TNBC 小鼠模型的肿瘤进展，而 rAAV-ef1 α -DIO-GSDMD^{NT} 的感染不能启动肿瘤中 GSDMD^{NT} 的表达，因此不能介导焦亡。两组小鼠的实体瘤重量结果也与上述结果相符（图 5-14）。这表明 oAAV-P2 介导的焦亡可以用于治疗三阴性乳腺癌。

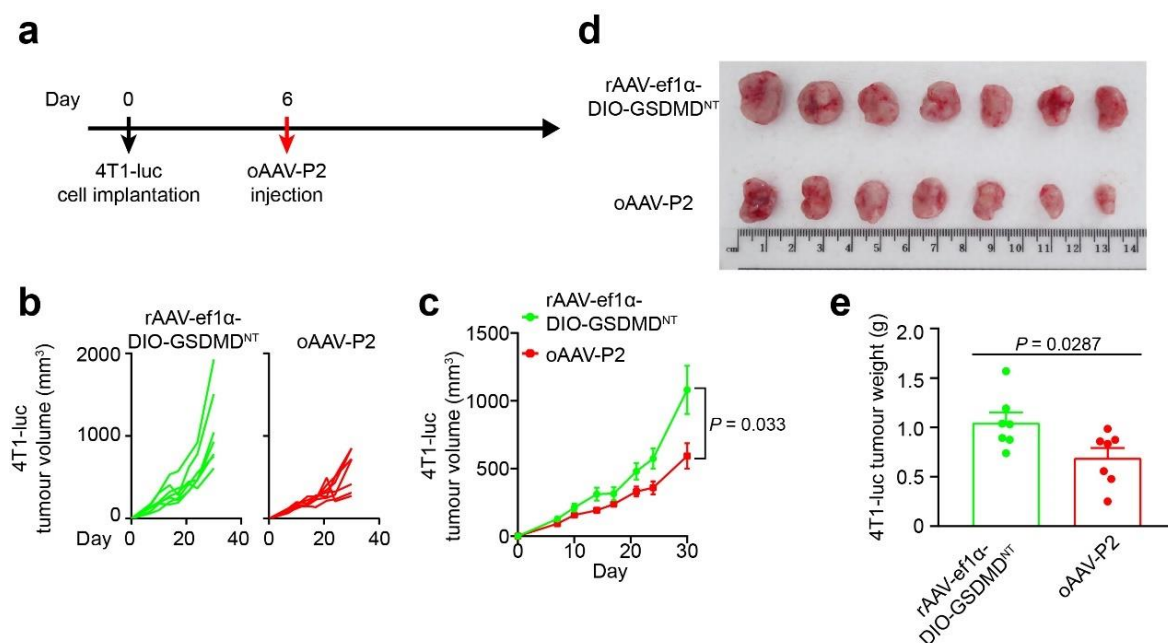


图 5-14. oAAV-P2 治疗三阴性乳腺癌小鼠模型

Fig. 5-14. oAAV-P2 treatment of TNBC mouse model

a: oAAV-P2 治疗 TNBC 小鼠模型方案；**b**: 两组每只小鼠的肿瘤体积增长曲线；**c**: 两组小鼠的平均肿瘤体积，统计方法为，Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test；**d**: 两组肿瘤

接种后 30 天的肿瘤照片；**e**，两组小鼠的平均肿瘤重量，统计方法为，Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test。

a, Schematic of oAAV-P2 treatment on TNBC mouse model. **b**, Tumor volume of an individual mouse. n = 7 mice per group. **c**, Average tumor volume of mice as indicated. Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test. **d**, Photographs of the tumors 30 d post treatment with oAAV-P2 and rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT}, respectively. **e**, Average tumor weight of mice as indicated. Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test.

5.9 oAAV-P2 治疗 TNBC 小鼠模型肿瘤浸润淋巴细胞单细胞转录组分析

为了研究 oAAV-P2 处理对肿瘤微环境(TME)的影响,我们对 oAAV-P2 或 rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 治疗的 4T1 肿瘤浸润淋巴细胞进行了 scRNA-Seq 分析(图 5-15 a-c)。scRNA-Seq 分析的结果表明, oAAV-P2 治疗可以增加肿瘤内 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞的占比(图 5-15 d),表明 oAAV-P2 治疗可以通过招募淋巴细胞破坏免疫抑制性的肿瘤微环境。对 scRNA-Seq 结果中各个细胞集群的差异基因分析的结果表明, oAAV-P2 治疗可以下调肿瘤浸润淋巴细胞内促癌及免疫抑制相关基因(*S100a9*、*S100a8*、*Cxcl2* 和 *Csf1*) 表达水平, 上调趋化因子(*Ccl5*、*Ccl8*、*Ccl9* 和 *Cxcl10*)、T/NK 细胞激活(*Klrk1*、*Havcr2* 和 *Ld2*) 及效应因子基因(*Gzma*、*Gzmb* 和 *Gzmk*) 的表达水平(图 5-16)。这表明 oAAV-P2 治疗可以激起肿瘤内抗肿瘤免疫反应, 从而起到杀伤肿瘤的作用。

5.10 oAAV-P2 治疗 TNBC 裸鼠模型

为了进一步验证 oAAV-P2 的肿瘤治疗效果是由于其介导肿瘤细胞的焦亡激起的抗肿瘤免疫力, 我们将表达荧光素酶的 4T1-luc 细胞注射到 Nu/Nu 裸鼠左侧第四乳房的脂肪垫中, 建立了免疫缺陷的原位三阴性乳腺癌(TNBC)裸鼠模型(图 5-17 a)。各组裸鼠荧光素酶活体成像、肿瘤体积检测及肿瘤拍照和瘤重数据表明(图 5-17 b-f), oAAV-P2 治疗对免疫缺陷的 TNBC 裸鼠模型没有治疗效果, 验证了 oAAV-P2 对肿瘤的治疗效果需要依靠其介导焦亡所引起的后续免疫反应, 而不是焦亡本身。

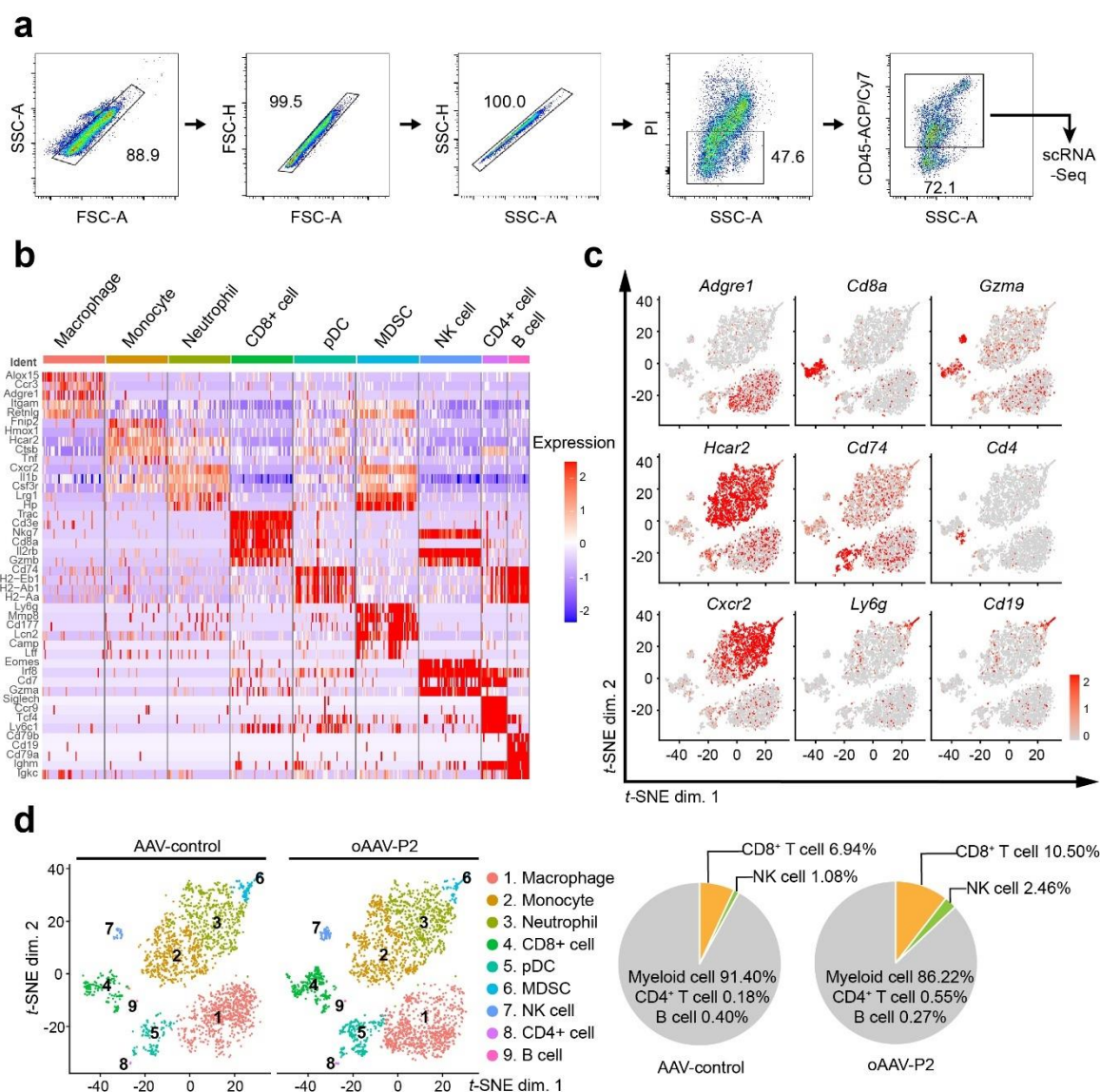


图 5-15. oAAV-P2 治疗 TNBC 小鼠模型的肿瘤浸润淋巴细胞单细胞转录组分析

Fig. 5-15. The single-cell transcriptome analysis of tumor-infiltrating lymphocytes of TNBC mouse model treatment with oAAV-P2

a: 用于富集 4T1 肿瘤浸润单个 CD45⁺免疫细胞的门控策略和代表性流式细胞术图；**b:** 具有独特特征基因的九个免疫细胞群的热图，地图顶部的颜色表示不同的免疫细胞群，用于每个群的四个或五个标记基因列在群旁边；**c:** 每个细胞群特异基因的 t-SNE 图；**d:** 用 AAV-control (rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT}, n = 2 只小鼠, 2,234 个细胞) 或 oAAV-P2 (n = 2 只小鼠, 2,925 个细胞) 治疗 4T1 肿瘤的肿瘤浸润单个 CD45⁺免疫细胞的 t-SNE 图 (左)，以及不同细胞群所占比例 (右)。

a, Gating strategy and representative flowcytometry plots for the enrichment of 4T1 tumor-infiltrating single CD45⁺ immune cells. **b,** Heat map of nine immune-cell clusters with unique signature genes.

Colours on top of the map indicate the immune-cell clusters. The four or five marker genes used for each cluster are listed alongside the cluster. **c**, Signature gene-expression patterns for the corresponding cell clusters on the t-SNE plot (n = 4 mice, 5,159 cells). **d**, t-SNE plots of tumor infiltrating single CD45⁺ immune cells of 4T1 tumors from mice treated with rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} (n = 2 mice, 2,234 cells) or oAAV-P2 (n = 2 mice, 2,925 cells) (left), and the relative frequencies of different clusters (right).

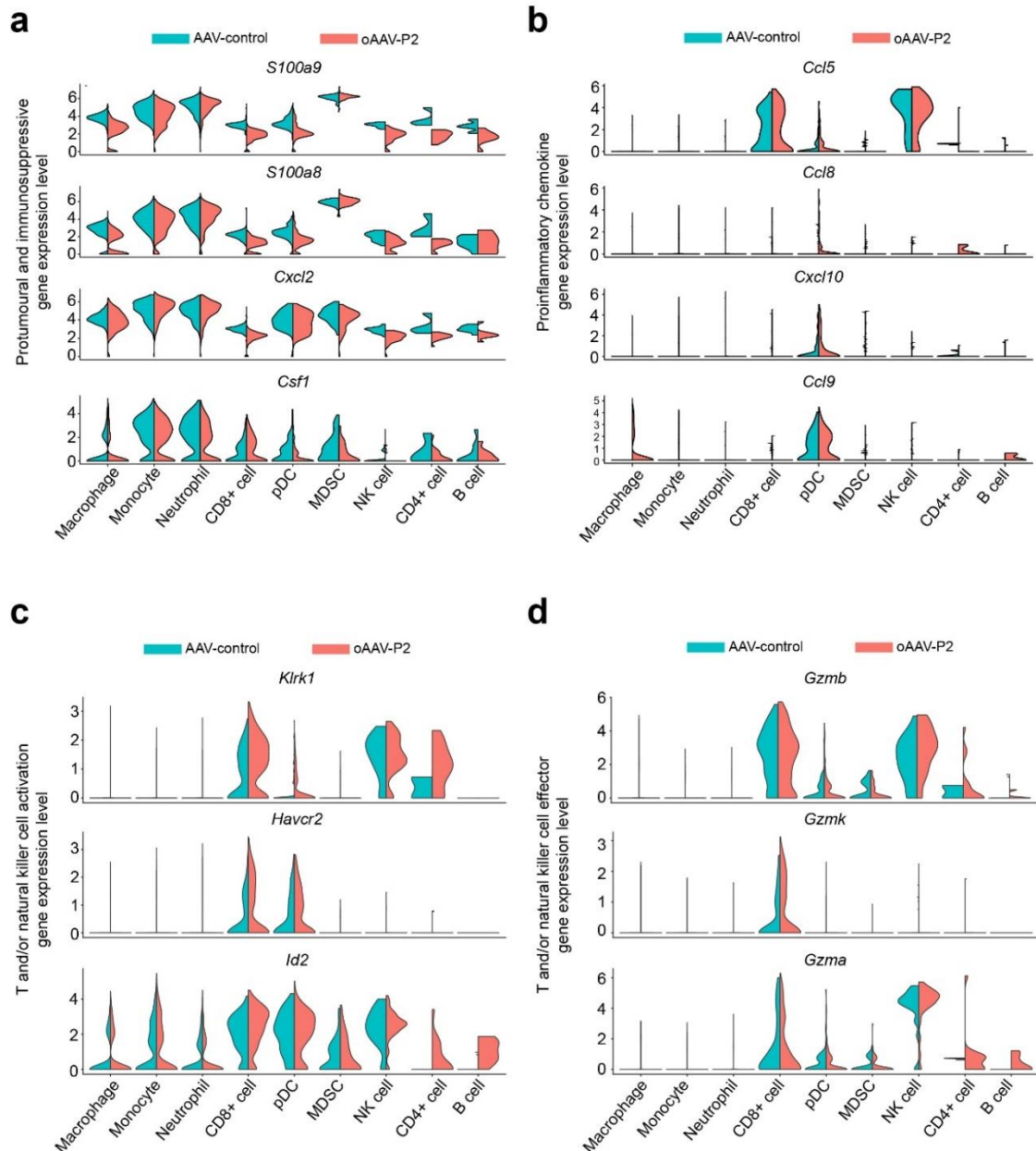


图 5-16. oAAV-P2 治疗 TNBC 小鼠模型的肿瘤浸润淋巴细胞单细胞转录组差异基因分析

Fig. 5-16. The single-cell transcriptome differential genes analysis of tumor infiltrating lymphocytes of TNBC mouse model treatment with oAAV-P2

a-d: 各个免疫细胞簇中促肿瘤和免疫抑制基因 (a)、促炎趋化因子基因 (b) 和 T 细胞及 NK 细胞激活基因 (c) 或效应基因 (d) 的表达水平。

a-d, The expression levels of pro-tumor and immunosuppressive genes (a), pro-inflammatory chemokines (b) and T and/or natural killer cell activation (c) or effector (d) genes in each immune cell cluster.

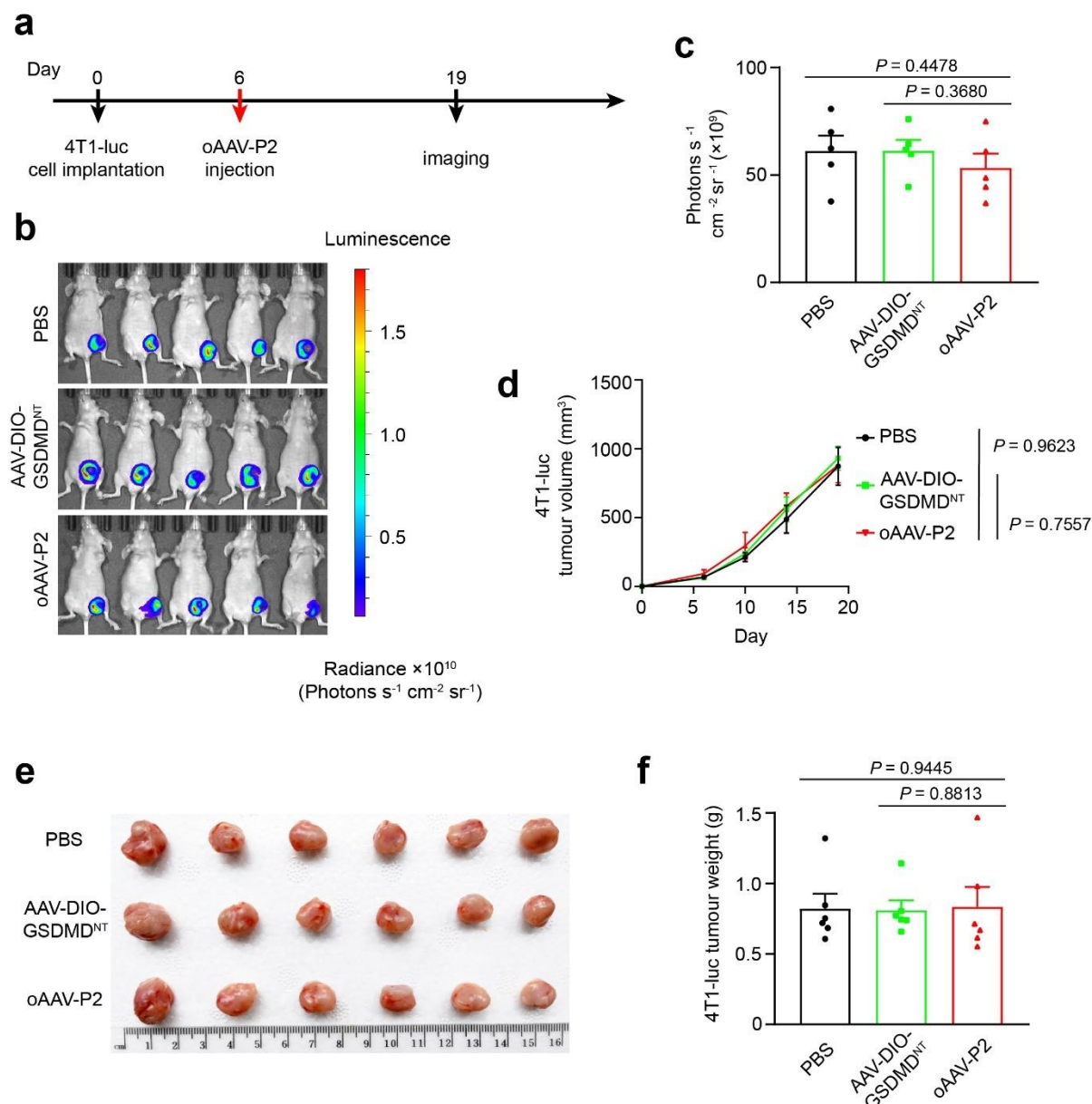


图 5-17. oAAV-P2 治疗 TNBC 裸鼠模型

Fig. 5-17. oAAV-P2 treatment of TNBC Nude mouse model

a: oAAV-P2 治疗 TNBC 裸鼠模型的方案; b: 肿瘤植入后第 19 天各组小鼠的荧光素成像; c: b 中荧光素酶表达量的定量, 统计方法为, Mean $\pm$ s.e.m., from four independent replicates, two-tailed unpaired Student's t-test; d: 各组小鼠的平均肿瘤体积, 统计方法为, Mean $\pm$ s.e.m., two-

tailed unpaired Student's t-test; e: 治疗后第 13 天各组肿瘤的照片; f, 各组小鼠的平均瘤重,

统计方法为, Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test。

a, Schematic of oAAV-P2 treatment on TNBC mouse model. **b**, Luciferase imaging of 4T1-luc breast tumors 19 d after tumor implantation. **c**, Corresponding quantification of luciferase expression in **b**. Mean $\pm$ s.e.m., from five independent replicates, two-tailed unpaired Student's t-test. **d**, Average tumor volume of mice as indicated. Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test. **e**, Photographs of representative tumors 19 d after treatment. **f**, Average tumor weight of mice as indicated. Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Student's t-test.

5.11 oAAV-P2 治疗 TNBC 小鼠模型肿瘤转录组分析

为了进一步优化 oAAV-P2 的肿瘤治疗效果,我们对 oAAV-P2 或 rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 治疗的 4T1 肿瘤进行了 Bulk RNA-seq 分析。通过对 Bulk RNA-seq 数据进行分析,我们在这两组之间鉴定出了 979 个表达差异显著基因 (DEGs) (图 5-18 a)。为了确定这些 DEGs 的生物学功能,我们对其进行了 Gene Ontology (GO) 富集分析。如图 5-18 b 所示,这些 DEGs 的功能主要属于免疫相关信号传导途径,如淋巴细胞增殖途径,先天免疫应答和趋化因子产生途径的正调控。

利用 STRING 数据库(Szklarczyk et al 2019)进一步分析 T 细胞增殖正调控信号通路中的 DEGs,如图 5-18 c 所示,oAAV-P2 治疗组中的趋化因子基因(例如 *Ccl5*, *Cxcl9* 和 *Cxcl10*)显著上调。当 CCL5 和 CXCL9 都存在于肿瘤组织中时,它们可以增加肿瘤淋巴细胞浸润(Dangaj et al 2019),这表明 oAAV-P2 治疗可能会增加 4T1 肿瘤中的淋巴细胞浸润。此外,我们的 Bulk RNA-seq 分析表明,oAAV-P2 处理可以上调 T 细胞活化基因 (*Zap-70*, *Cd28*, *Cd86* 和 *Cd3e*) 和对抗肿瘤作用至关重要的基因 (*Gzmb*, *Gzmk* 和 *Il12rb1*), 下调促进肿瘤进展的 *Il6* 基因。这些基因的表达改变可能会激活抗肿瘤免疫力,从而抑制 TNBC 进展。重要的是,在 oAAV-P2 治疗组中,我们还观察到了免疫检查点基因的上调,例如 *Cd274* (编码 PD-L1), *Pdcd1lg2* (编码 PD-L2) 和 *Pdcd1* (编码 PD-1) (图 5-18 c)。这些结果表明,oAAV-P2 治疗与免疫检查点阻断剂(例如抗 PD-L1 抗体或抑制剂)的组合可能会进一步提高 oAAV-P2 对 TNBC 的治疗效果。

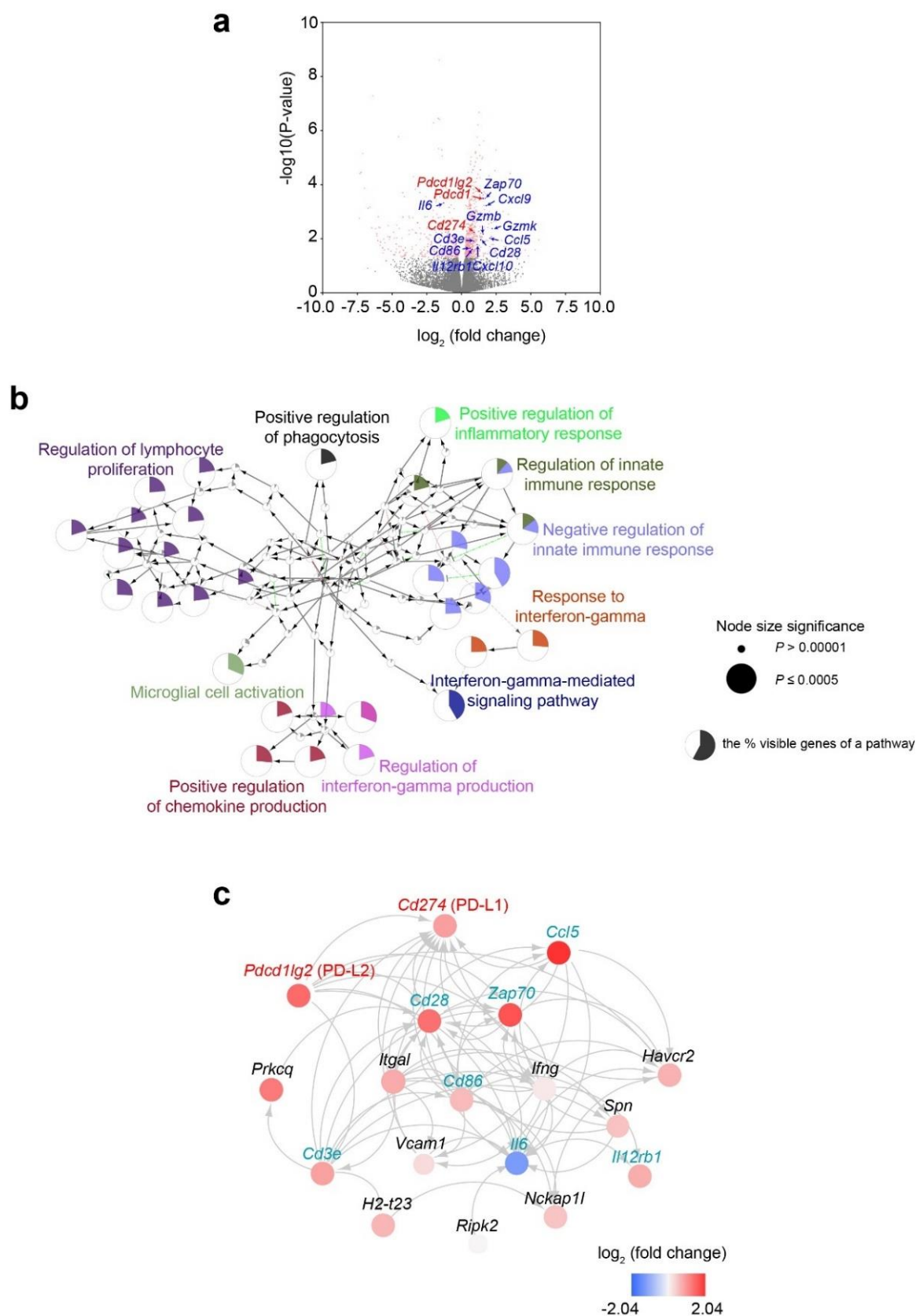


图 5-18 oAAV-P2 治疗 TNBC 小鼠模型的肿瘤转录组分析

Fig. 5-18 The tumor transcriptome Analysis of TNBC mouse model treatment with oAAV-P2

a: 差异表达基因 (DGEs) 的火山图; b: 来自 oAAV-P2 或 rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 治疗组的肿瘤 Bulk RNA-seq 的 DGEs 的 GO 富集结果, 筛选条件如下, $p < 0.00001$, Kappa Score = 0.5; c: 基于 STRING 数据库的“T 细胞增殖的正向调节”信号通路的 DEGs 相互作用网络图。

a, Volcano plot of the differential expressed genes. b, The biological process signal pathways network of GO enriched DEGs from Bulk RNA-seq of tumors in the oAAV-P2 group and AAV-DIO-GSDMD^{NT} group. $p < 0.00001$, Kappa Score = 0.5. c, Diagram of the DEGs interaction network of “the positive regulation of T cell proliferation” signaling pathway based on the STRING database.

5.12 oAAV-P2 治疗 TNBC 小鼠模型肿瘤浸润淋巴细胞流式分析

我们同时对 oAAV-P2 和 rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 治疗组小鼠的肿瘤浸润淋巴细胞进行流式分析。如图 5-19 所示, 相对于 rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} 对照组, oAAV-P2 治疗组小鼠的肿瘤中 CD4⁺、CD8⁺T 细胞和 NK 细胞明显增多。通过在肿瘤组织切片中对 CD3⁺T 细胞进行免疫染色进一步证实了上述结果 (图 5-19 d, e)。oAAV-P2 治疗肿瘤转录组分析、肿瘤浸润淋巴细胞分析及流式分析的结果表明, oAAV-P2 可以通过将淋巴细胞募集到肿瘤中来改变 TME, 这也可能会增加 PD-L1 阻断对 TNBC 的响应效率。

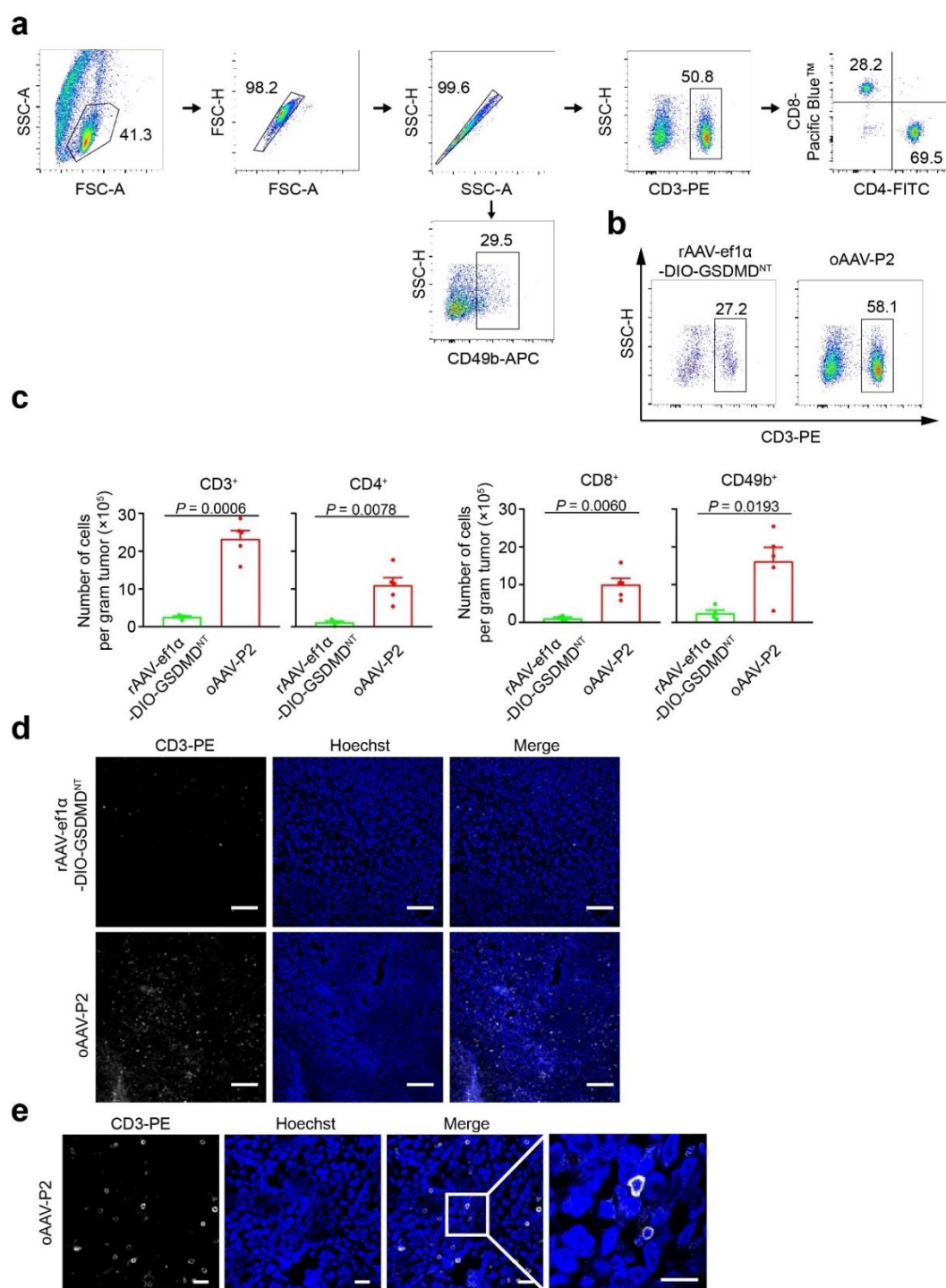


图 5-19. oAAV-P2 治疗 TNBC 小鼠模型的肿瘤浸润淋巴细胞流式分析

Fig. 5-19. Flow cytometric analysis of tumor infiltrating lymphocytes of TNBC mouse model treatment with oAAV-P2

a: 流式染色方案; b: 代表性流式分析图; c-d: 用 rAAV-ef1α-DIO-GSDMD^{NT} 或 oAAV-P2 治疗的 4T1-luc 肿瘤细胞的 CD3-PE 染色荧光图像, 标尺代表 20 μ m; e: 肿瘤浸润淋巴细胞定量结果, 统计方法为, Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Welch's t-test.

a, b, Gating strategy (**a**) and representative flow cytometry plots for 4T1-luc tumor infiltrating CD3⁺ cells analysis (**b**). **c-d**, Fluorescence images of CD3-PE-stained 4T1-luc tumor cells treated with rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT} and oAAV-P2. Representative images of each group (n = 3 mice) are presented. Scale bar, 20 μ m. **e**, Quantification of the tumor infiltrating lymphocytes from TNBC mouse model. n = 4 mice for rAAV-efl α -DIO-GSDMD^{NT}, 5 mice for oAAV-P2. Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Welch's t-test.

5.13 oAAV-P2 联合 PD-L1 阻断治疗 TNBC 小鼠模型

基因 Bulk RNA-seq 分析结果,我们对 TNBC 小鼠模型进行了 oAAV-P2 联合 PD-L1 阻断治疗。因为 AAV 介导的基因表达存在一个时间窗口(Dang et al 2017; Zincarelli et al 2008),所以我们选择在 oAAV-P2 注射后第八天进行 PD-L1 阻断治疗。我们同时设置了 PBS 对照组、单独 PD-L1 阻断治疗组和单独 oAAV-P2 治疗组。PD-L1 阻断治疗后各组荧光素活体成像的结果表明, oAAV-P2 联合 PD-L1 阻断治疗比其他三组的荧光素信号都要弱很多(图 5-20 a-c),这表明 oAAV-P2 联合 PD-L1 阻断治疗在抑制肿瘤生长方面比其他三组的疗效好。同时我们注意到,单独 PD-L1 阻断治疗在抑制肿瘤生长方面的作用非常有限,这可能与 TNBC 小鼠模型 TME 内免疫抑制的状态有关。

静脉注射碘化丙啶 (PI),可以对肿瘤内死亡细胞进行染色,如图 5-20 i 所示,与 PBS 对照组和单独 PD-L1 阻断治疗组相比,单独 oAAV-P2 治疗组及 oAAV-P2 联合 PD-L1 阻断治疗组的肿瘤中 PI 阳性细胞明显增多,这表明后两组可以使更多的肿瘤细胞死亡。此外,在 oAAV-P2 和 PD-L1 阻断联合治疗的小鼠的肿瘤中观察到明显的 PI 阳性细胞簇形成的空洞,这表明 PD-L1 阻断治疗可以进一步提高 oAAV-P2 治疗对肿瘤的杀伤能力。对各组肿瘤体积及肿瘤重量的监测结果也表明 oAAV-P2 治疗与 PD-L1 阻断联合治疗具有很好的溶瘤效果,最终几乎可以消除整个肿瘤组织(图 5-20 d-g)。同时我们也对小鼠的体重进行了监测,如图 5-20 h 所示,各组体重之间并没有明显差异,说明没有明显的副作用发生。

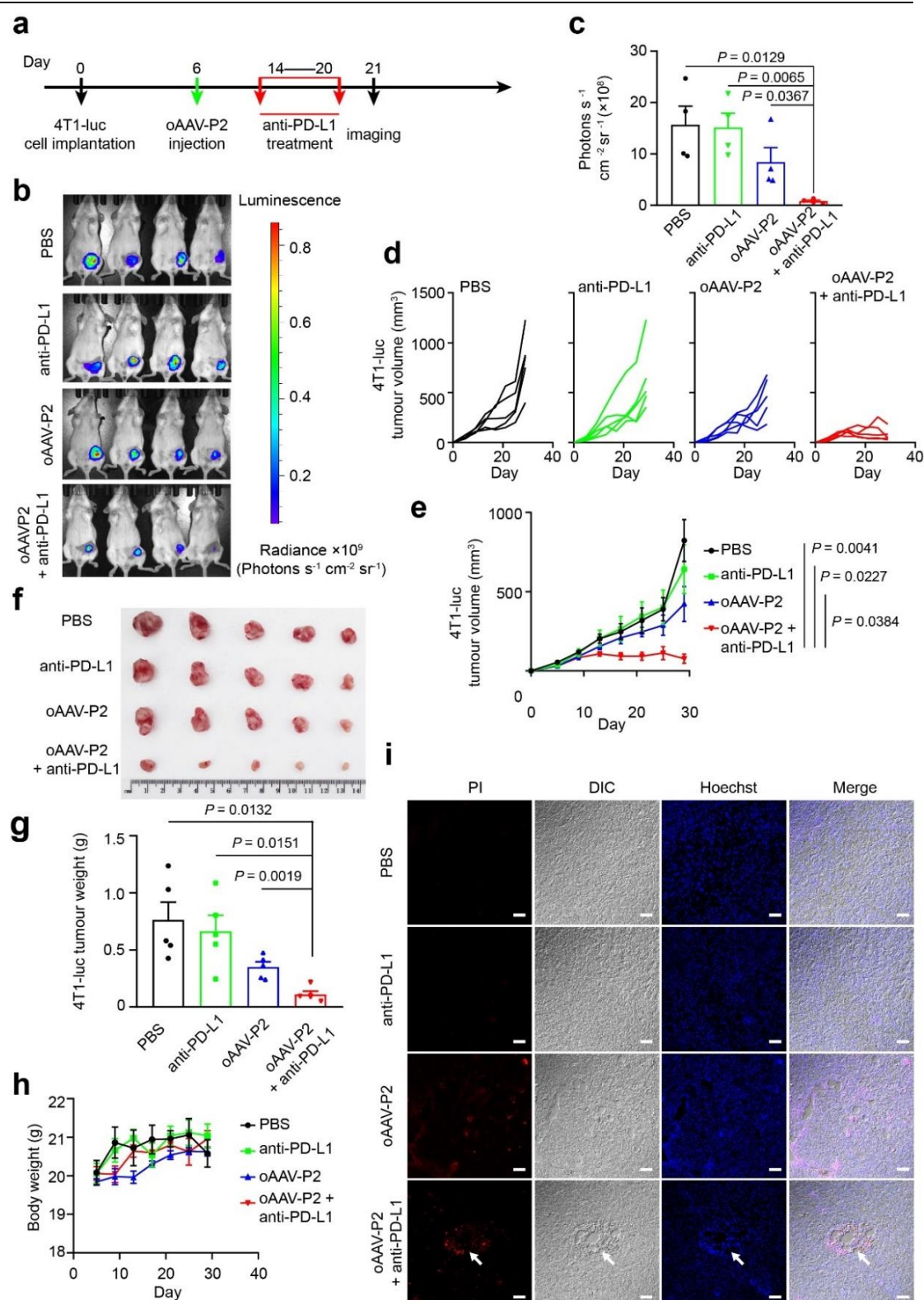


图 5-20. PD-L1 阻断治疗可以增强 oAAV-P2 对 TNBC 小鼠模型的治疗效果

Fig. 5-20. Anti-PD-L1 therapy boosts the effect of oAAV-P2 treatment on TNBC in mouse model

a: oAAV-P2 联合 PD-L1 阻断治疗 TNBC 小鼠模型方案; b: 肿瘤植入后第 21 天各组小鼠的

 荧光素成像; c: b 中荧光素酶表达量的定量, 统计方法为, Mean $\pm$ s.e.m., from four

independent replicates, one-tailed unpaired Welch's t-test; **d**: 各组每只小鼠肿瘤体积变化曲线; **e, g**, 各组小鼠的平均肿瘤体积 (**e**) 和重量 (**g**), 统计方法为, Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Welch's t-test; **f**: 治疗后第 29 天各组肿瘤的照片; **h**, 各组小鼠体重监测结果; **i**: 各组小鼠肿瘤碘化丙锭染色图, 标尺代表 20 μ m。

a, Schematic of oAAV-P2 combined with anti-PD-L1 treatment on TNBC mouse model. **b**, Luciferase imaging of 4T1-luc breast tumors 21 d after tumor implantation. **c**, Corresponding quantification of luciferase expression in **b**. Mean $\pm$ s.e.m., from four independent replicates, one-tailed unpaired Welch's t-test. **d**, Tumor volume of an individual mouse. n = 5 mice per group. **e, g**, Average tumor volume (**e**) and weight (**g**) of mice as indicated. Mean $\pm$ s.e.m., two-tailed unpaired Welch's t-test. **f**, Photographs of representative tumors 29 d after treatment. **h**, Propidium Iodide staining of tumor cell pyroptosis induced by treatment as indicated. Scale bar, 20 μ m. All data are representative of two independent experiments. **i**, Weight monitoring results of mice with different treatments.

5.14 rAAV 瘤内注射的安全性评价

为验证瘤内注射的 rAAV 仅局限于肿瘤内表达, 我们利用不表达荧光素酶的 4T1 细胞构建了原位 TNBC 小鼠模型, 并在瘤内接种表达荧光素酶的 rAAV-CMV-luc。如图 5-21 所示, 无论是在活体水平还是解剖后主要脏器的荧光素酶成像, 均只在肿瘤中检测到信号, 说明通过瘤内注射的 rAAV 仅局限于肿瘤内表达, 而不会扩散到其他部位, 所以在使用 oAAV-P1 或 oAAV-P2 瘤内注射治疗肿瘤时, 不会有 oAAV-P1 或 oAAV-P2 扩散感染, 导致其他组织出现焦亡的风险。

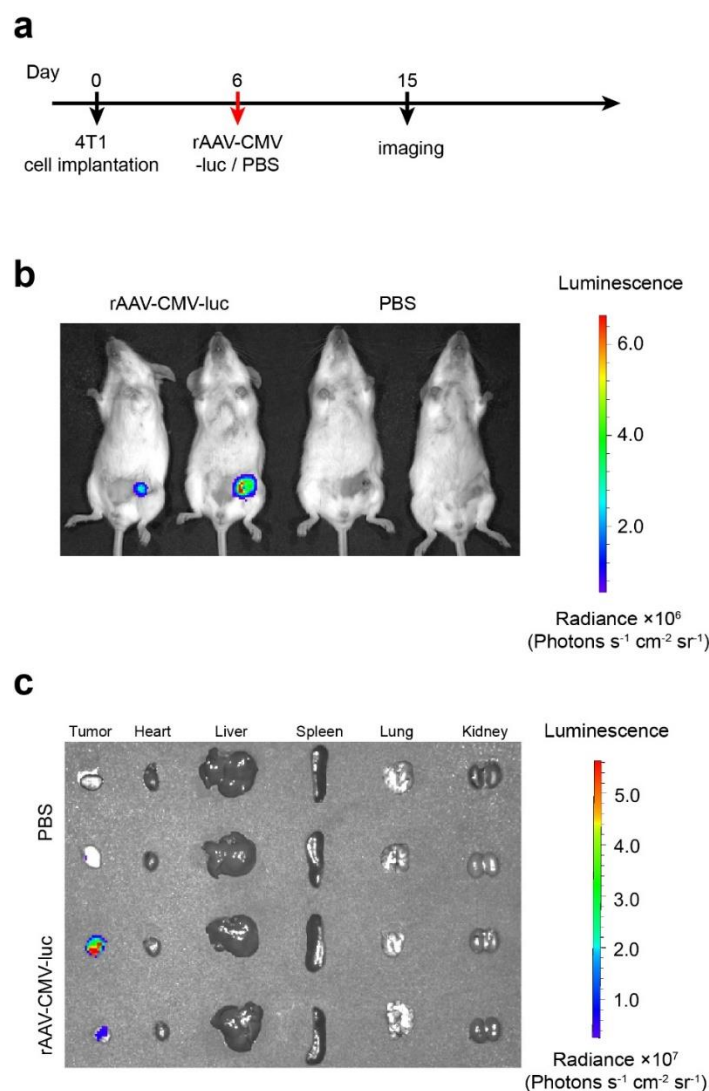


图 5-21. rAAV-CMV-luc 瘤内注射后荧光素成像结果

Fig. 5-21. Luciferase imaging results after intratumoral injection of rAAV-CMV-luc

a: TNBC 小鼠模型瘤内注射 rAAV-CMV-luc 的方案; **b:** rAAV-CMV-luc 注射后第 9 天各组小鼠的荧光素成像; **c:** rAAV-CMV-luc 注射后第 9 天各组小鼠肿瘤及主要脏器的荧光素成像。

a, Schematic of rAAV-CMV-luc treatment on TNBC mouse model. **b,** Luciferase imaging of mouse in each group on the 9th day after rAAV-CMV-luc injection. **c,** Luciferase imaging of mouse tumors and main organs in each group on the 9th day after rAAV-CMV-luc injection.

5.15 表达 GSDM^{NT} 蛋白 oAAV 系统通用性验证

由于 GSDMD 是最早鉴定出的焦亡底物蛋白, 针对其的研究相对较多, 所以我们最初选择了 *GSDMD*^{NT} 作为介导焦亡的基因, 为验证我们包装 rAAV-GSDM^{NT} 策略

的通用性，我们又选择了 $GSDMB^{NT}$ 和 $GSDME^{NT}$ 进行 rAAV-GSDM^{NT} 的包装，并由此获得了 oAAV-P2B 和 oAAV-P2E。如图 5-22 所示，我们的策略可以成功包装获得 oAAV-P2B 和 oAAV-P2E，且在 HEK 293T、Hela 和 4T1-luc 细胞上，oAAV-P2B 和 oAAV-P2E 感染后均出现了焦亡现象。但同时我们也发现，相对于 oAAV-P2，oAAV-P2B 和 oAAV-P2E 介导焦亡的效率相对较低（图 5-22 b），这可能与 $GSDMB^{NT}$ 和 $GSDME^{NT}$ 在细胞膜上成孔效率低有关。上述数据表明，我们包装表达焦亡蛋白 rAAV 的策略具有很好的通用性，可用于其他焦亡基因或细胞毒性基因 rAAV 的包装。

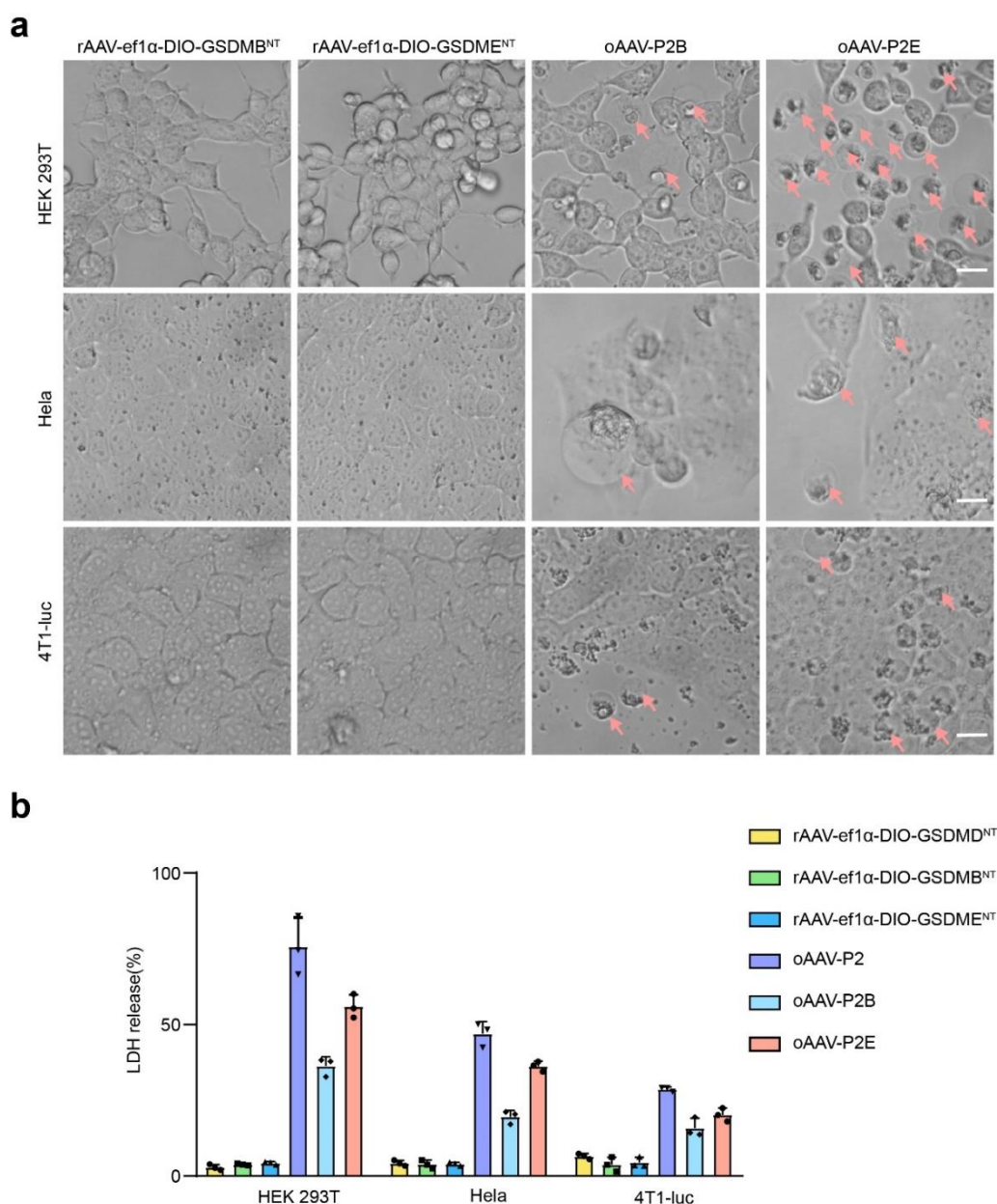


图 5-22. oAAV-P2、oAAV-P2B 及 oAAV-P2E 介导细胞焦亡效率

Fig. 5-22. oAAV-P2, oAAV-P2B and oAAV-P2E mediate the efficiency of pyroptosis

a: rAAV-efl α -DIO-GSDMB^{NT}、rAAV-efl α -DIO-GSDME^{NT}、oAAV-P2B 及 oAAV-P2E 感染细胞的图像，标尺代表 20 μ m；b: 各组基于 LDH 释放的细胞死亡测定比较。

a, Image of the cells infected with rAAV-efl α -DIO-GSDMB^{NT}, rAAV-efl α -DIO-GSDME^{NT}, oAAV-P2B and oAAV-P2E. Scale bars, 20 μ m. **b**, Comparison of LDH release-based cell death assay in the cells infected with different rAAV.

5.16 oAAV-P2 在临床宠物肿瘤治疗中的初步应用

由于宠物主人意愿、新冠疫情等客观原因，本课题仅收集到两例宠物肿瘤病例，且都是术后复发病例。其中，喙上长肿瘤的鹦鹉（图 5-23），由于后期无法联系到主人，所以不清楚 oAAV-P2 的具体疗效。腋下肿瘤的刺猬，后期据主治医生反馈，虽然又出现了肿瘤复发，但未扩散至 oAAV-P2 注射部位。由于临床宠物肿瘤确诊时大多已处于晚期，必须手术切除，且由于目前临床医生及宠物主人客观意愿等问题，很难收集到合适的临床病例及相关数据，所以本课题未能收集到有效的临床数据。



图 5-23. 喙上长肿瘤的鹦鹉

Fig. 5-23. Parrot with tumor on its beak

第六章 讨论

宠物自发肿瘤与人类肿瘤相似，其肿瘤所处的肿瘤微环境（TME）内免疫抑制的状态促进了肿瘤的发生、发展，也极大制约了肿瘤的预后。所以，开发靶向 TME 的方法，在“免疫沙漠”的肿瘤内“点一把火”，激活抗肿瘤免疫力，可以有效的杀伤肿瘤细胞，最终起到治疗肿瘤的作用。卡介苗（BCG）具有很强的免疫刺激作用，其激发的免疫反应不仅可以用于预防结核病的发生，也可对肿瘤产生杀伤作用，且 BCG 长达百年的接种史表明其具有很好的安全性，所以 BCG 是一种很好的靶向 TME 的“点火器”。焦亡是一种炎性细胞坏死，其过程伴随着大量炎症物质的释放，可激起强烈免疫反应，同样具有重塑 TME 内抗肿瘤免疫力的能力。本课题以 BCG 和焦亡蛋白为手段，研究了两者对于肿瘤微环境的影响，并进一步开发了对应的肿瘤治疗方法，为宠物及人类肿瘤的治疗提供了新的思路。

6.1 利用卡介苗靶向肿瘤微环境增强抗肿瘤免疫

卡介苗安全性好，生产成本低及强免疫刺激性使其在除了预防结核病以外的多种疾病中得到应用，其中最成功的就是应用于非肌肉浸润性膀胱癌（NMIBC）的术后免疫治疗，临床数据表明 BCG 膀胱灌注可以显著降低 NMIBC 的复发率(Kamat et al 2017; Tse et al 2019)。但目前 BCG 在其他类型肿瘤，例如乳腺癌中的抗肿瘤功效研究相对较少，而在宠物，尤其是雌性宠物犬、猫中，乳腺癌的发病率非常高，所以研究 BCG 对乳腺癌的影响，开发 BCG 治疗乳腺癌的方法是非常有必要的。

三阴性乳腺癌（TNBC）是乳腺癌中侵袭性特别强的亚型(Kumar et al 2016; Lyons 2019)。由于 TNBC 中雌激素受体（ER），孕激素受体（PR）和人类表皮生长因子受体 2（HER2）不表达，所以无法从内分泌治疗或赫赛汀等靶向治疗中受益(Lyons 2019; Lyons et al 2019; Nedeljkovic et al 2019)。目前 TNBC 临床治疗只能依靠化疗，预后效果非常差。而卡介苗在减少 TME 免疫抑制和激活抗肿瘤免疫方面的能力提示，BCG 可能是 TNBC 的一种有效治疗手段。

在本研究中，我们首先研究了 BCG 对原位 TNBC 小鼠模型 TME 的影响，证实了 BCG 可以增加 TNBC 内浸润淋巴细胞的数量。随后我们利用单倍剂量或三倍剂量的 BCG 来对 TNBC 小鼠模型进行治疗。数据表明 BCG 的三倍剂量瘤内注射虽然

可以显著抑制 TNBC 小鼠模型肿瘤的生长,但因其强烈的免疫刺激作用,使得小鼠出现体重下降的副作用。而单倍剂量 BCG 瘤内注射虽然不能完全抑制 TNBC 的进展,但它可以在 TNBC 小鼠模型的 TME 中招募大量 CD4⁺、CD8⁺T 细胞和 NK 细胞,且没有任何副作用出现。所以以单倍剂量 BCG 瘤内注射为手段,进一步开发 BCG 溶瘤疗法是非常有意义的。

已有研究表明,BCG 治疗可以上调大鼠膀胱癌内程序性死亡配体 1 (PD-L1) 的表达(Wang et al 2018),而 PD-L1 的表达上调会促使肿瘤免疫逃逸的出现。所以我们推测单倍剂量 BCG 瘤内注射溶瘤效果不佳也可能于此有关。基于这种推测,我们对 BCG 治疗的小鼠 TNBC 肿瘤进行了转录组分析, Bulk RNA-seq 和 qRT-PCR 的结果表明单倍剂量 BCG 瘤内注射虽然可以上调抗肿瘤效应、趋化因子等免疫激活相关基因,但同时也引起了 TNBC 内 PD-1 和 PD-L1 的表达上调。这些现象提示我们 BCG 免疫治疗联合免疫筛选位点阻断可能会有更好的溶瘤功效。

以抗 PD-1/PD-L1 为代表的免疫筛选位点阻断在临床肿瘤治疗中取得了令人惊喜的进展,但同时也存在反应效率低的问题(Salmaninejad et al 2019; Zou et al 2016)。同时先前的研究(Wang et al 2020)和我们的数据均表明, TNBC 小鼠模型对抗 PD-L1 治疗响应度低,其原因可能与 TNBC 独特的免疫抑制性 TME 有关。在本研究中,我们证实单倍剂量 BCG 和抗 PD-L1 联合治疗对 TNBC 小鼠模型具有显著的溶瘤功效,这表明 BCG 治疗联合 PD-L1 阻断可以避免两者单独使用时的弊端,一方面缓解 TNBC 小鼠模型 TME 中的免疫抑制状态,另一方面又增强 TNBC 小鼠模型对 PD-L1 阻断治疗的响应。这些数据表明,BCG 治疗可用于预处理对抗 PD-1/PD-L1 治疗不敏感的特定肿瘤,从而使其在联合治疗中产生有益的作用。

本研究证明了 BCG 治疗可以上调 TNBC 肿瘤内趋化因子相关基因和抗肿瘤效应相关基因,下调免疫抑制相关基因,并增加其 TME 中淋巴细胞的浸润,但同时也伴随着免疫筛选位点 PD-1 和 PD-L1 的表达上调。同时我们还证实了 BCG 和抗 PD-L1 的联合治疗可有效缓解 TME 的免疫抑制状态,并对 TNBC 具有显著的溶瘤功效,这表明 BCG 和抗 PD-L1 联合可能是 TNBC 的一种有效治疗手段。我们的研究为卡介苗在宠物和人类临床肿瘤治疗中的广泛应用提供了初步的理论基础和支持,也为提高抗 PD-1/PD-L1 治疗的反应效率提供了有效数据。

同时本研究中三倍剂量 BCG 瘤内注射导致小鼠体重下降的现象及 Bulk RNA-seq 结果中高达 6863 个差异基因的出现表明,BCG 具有激活机体广泛免疫力,对多

种疾病有疗效的同时也伴随着潜在不确定的风险,所以开发更多靶向 TME 的“点火器”是非常有必要的。

6.2 构建表达焦亡蛋白的重组腺相关病毒载体以增强抗肿瘤免疫

细胞焦亡是由成孔蛋白 gasdermin 家族 N 端结构域 ($GSDM^{NT}$) 多聚化并在细胞膜上形成孔洞介导的,其过程伴随着大量炎症物质的释放,可激活强大的抗肿瘤免疫力(Wang et al 2020; Zhang et al 2020; Zhou et al 2020)。然而,由于 $GSDM^{NT}$ 具有很强的细胞毒性,一旦在内部表达连细菌都会发生焦亡,所以有效地产生并输送 $GSDM^{NT}$ 到肿瘤细胞中是非常具有挑战性的。先前的研究提出了一种使用纳米材料的生物正交系统,可以将 $GSDMA3$ (N+C) 递送至肿瘤,刺激抗肿瘤免疫力,从而达到溶瘤作用(Wang et al 2020)。虽然该系统具有诱导细胞焦亡治疗肿瘤的应用潜力,但众所周知,纳米材料在体内存在代谢、副作用等不确定因素(Han et al 2019),且该系统生产成本高,所以会制约其在临床肿瘤治疗中的应用。而选择一种合适的载体,例如病毒载体,将 $GSDM^{NT}$ 递送至肿瘤中表达,可能是有效的策略。

临床中常用的溶瘤病毒,例如经过基因改造的 HSV-1 和 Ad5 具有很好的肿瘤靶向性,但其靶向性主要是指 HSV-1 和 Ad5 可以选择性的在肿瘤细胞中复制,并不代表 HSV-1 和 Ad5 不感染正常细胞,所以如果选择 HSV-1 和 Ad5 作为递送 $GSDM^{NT}$ 的载体,则会出现其在肿瘤细胞中大量复制后感染正常组织,导致正常组织焦亡的现象。另一方面由于 $GSDM^{NT}$ 的超强细胞毒性,目前已有的 HSV-1 和 Ad5 包装策略并不能有效避免 $GSDM^{NT}$ 在包装时的表达,所以也无法成功获得表达 $GSDM^{NT}$ 的重组病毒。所以选择一种复制缺陷,且有一定包装策略的载体是非常重要的。而临床用于基因治疗的重组腺相关病毒 (rAAV) 就是一种很好的选择。rAAV 缺乏复制能力,免疫原性很低,安全性好,基因递送效率高,且其具有两套成熟的包装系统,是非常理想的递送 $GSDM^{NT}$ 载体。在本研究中,我们开发了两种新颖的策略并成功包装了可用于肿瘤治疗的表达焦亡蛋白的重组腺相关病毒。

rAAV 可以通过昆虫 Sf9 细胞包装获得,而我们最终是在哺乳动物上进行肿瘤治疗,所以筛选一种在昆虫 Sf9 细胞中不表达的哺乳动物启动子来驱动 $GSDM^{NT}$ 的表达则可以避免 rAAV- $GSDM^{NT}$ 包装时的毒性问题。基于上述策略,我们成功筛选到一个哺乳动物特异启动子 mCBA,并成功获得了高滴度表达 $GSDM^{NT}$ 的溶瘤腺相

关病毒 oAAV-P1 (图 6-1)。在另一种策略中, 我们将 $GSDMD^{NT}$ 序列翻转, 并在两端插入两对反向 loxP 位点形成 DIO 序列, 则可完全避免 $GSDMD^{NT}$ 的表达, 从而成功包装获得了 rAAV-ef1 α -DIO- $GSDMD^{NT}$, 而 rAAV-ef1 α -DIO- $GSDMD^{NT}$ 和 rAAV-Cre 混合物 (oAAV-P2) 感染细胞后, 则会表达 Cre 重组酶恢复翻转的 $GSDMD^{NT}$, 从而介导肿瘤细胞焦亡。同时我们还测试了四环素诱导型启动子 Tet-On 系统在 rAAV- $GSDMD^{NT}$ 包装中应用的可能性, 结果显示四环素诱导型启动子无法完全避免 $GSDMD^{NT}$ 的表达, 最终并没有得到重组病毒。

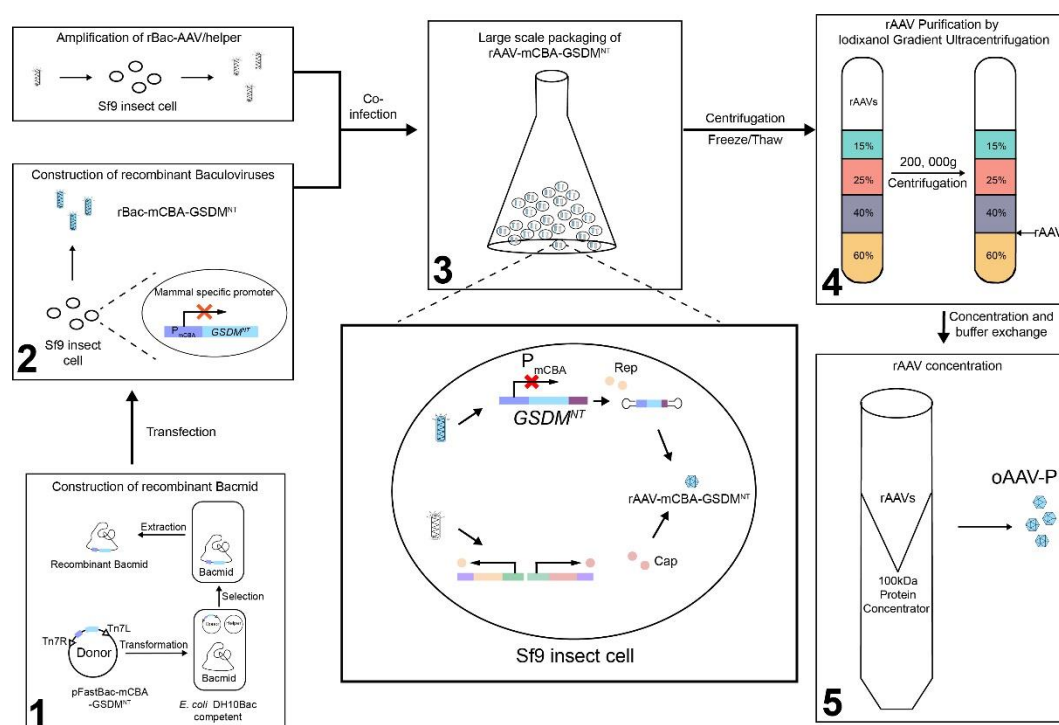


图 6-1. oAAV-P1 包装流程图

Fig. 6-1. The flow diagram of oAAV-P1 packaging

1) 构建携带 ITR-mCBA- $GSDMD^{NT}$ 的重组供体质粒, 并将其转化到大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞中, 筛选抗性和蓝白色后, 获得重组杆状病毒质粒; 2) 将重组杆状病毒质粒转染到 Sf9 昆虫细胞中以获得 rBac-mCBA- $GSDMD^{NT}$ 病毒; 3) 将 Sf9 细胞与 rBac-mCBA- $GSDMD^{NT}$ 和 rBac-AAV/helper 以获得大规模的 rAAV-mCBA- $GSDMD^{NT}$; 4) 用碘克沙醇密度梯度离心 rAAV-mCBA- $GSDMD^{NT}$; 5) 浓缩后获得 oAAV-P1。

1) Construct Recombinant Donor plasmids carrying ITR-mCBA- $GSDMD^{NT}$ and transform it to *E. coli* DH10Bac competent cells. After screening for resistance and blue-white, recombinant Bacmids are obtained. 2) Recombinant Bacmids are transfected into Sf9 insect cells to obtain rBac-mCBA- $GSDMD^{NT}$. 3) Sf9 cells are co-infected with rBac-mCBA- $GSDMD^{NT}$ and rBac-AAV/helper to obtain

AAV-mCBA-GSDM^{NT} on large scale. 4) AAV-mCBA-GSDM^{NT} are centrifuged with iodixanol density gradient. 5) oAAV-P1 are obtained after concentration.

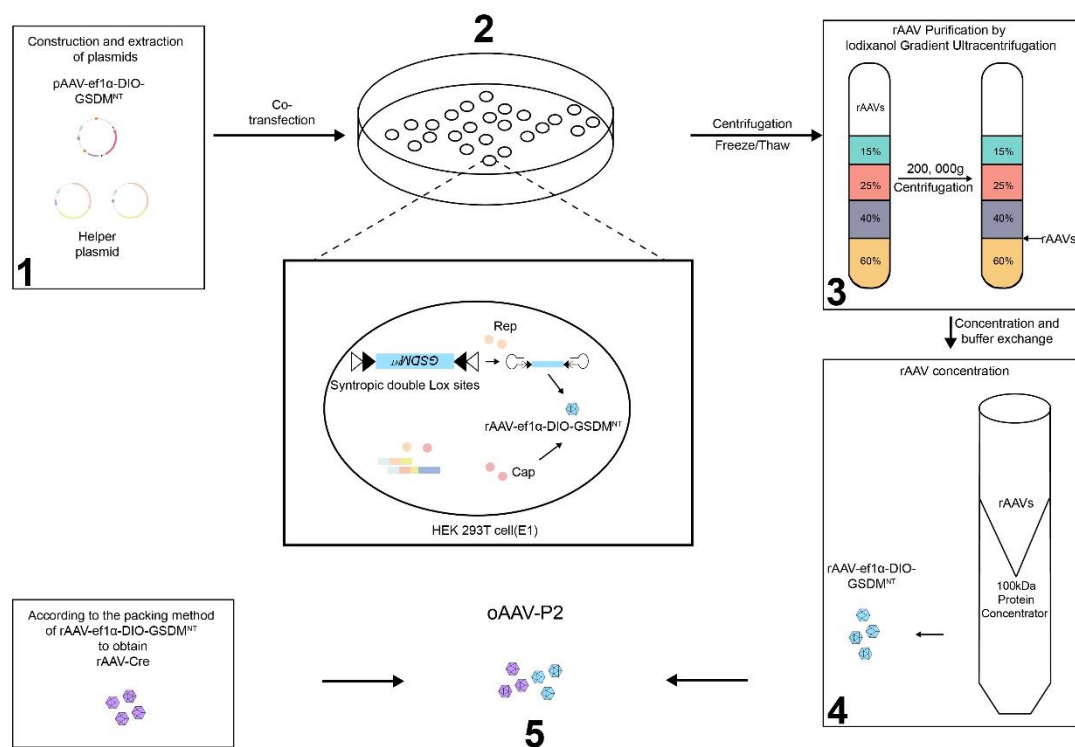


图 6-2. oAAV-P2 包装流程图

Fig. 6-2. The flow diagram of oAAV-P2 packaging

1) 将 GSDM^{NT} 反向克隆到含有同向双 Lox 位点的 AAV 载体中, 获得 pAAV-ef1α-DIO-GSDM^{NT}; 2) 将 pAAV-ef1α-DIO-GSDM^{NT} 与 pAAV-DJ 和 pHelper 共转染到 HEK 293T 细胞中, 包装 rAAV-ef1α-DIO-GSDM^{NT}; 3) 碘克沙醇密度梯度离心; 4) 浓缩后, 获得 rAAV-ef1α-DIO-GSDM^{NT}; 5) 同时包装 rAAV-Cre, rAAV-Cre 和 rAAV-ef1α-DIO-GSDM^{NT} 共感染, 以还原 rAAV-ef1α-DIO-GSDM^{NT} 中翻转的 GSDM^{NT}, 从而构成可以介导焦亡的 oAAV-P2; 此种策略可以完全避免病毒包装过程中 GSDM^{NT} 的表达。

1) GSDM^{NT} is invertedly cloned into AAV vector flanking with syntropic double Lox sites. 2) co-transfect with pAAV-DJ and pHelper into HEK 293T cells to package rAAV-ef1α-DIO-GSDM^{NT}. 3) After iodixanol density gradient centrifugation and 4) concentration, rAAV-ef1α-DIO-GSDM^{NT} was obtained. 5) rAAV-Cre is also packaged to revert rAAV-ef1α-DIO-GSDM^{NT} for GSDM^{NT} expression.

In this way, it can totally avoid the expression of GSDM^{NT} during virus packaging.

随后我们在体外测试了 oAAV-P1 和 oAAV-P2 的溶瘤效果, 证实 oAAV-P1 和 oAAV-P2 均可以介导多种肿瘤细胞的焦亡, 且在同样剂量下 oAAV-P2 有更好的介导

焦亡的能力，后续我们验证这种现象与 mCBA 启动子相对较弱的活性及昆虫 Sf9 细胞包装的 rAAV 相对弱的感染能力均有关。

血脑屏障（BBB）可以保护大脑免受大部分病原的侵害，但其存在也阻碍了常规化疗药物和免疫细胞进入颅内杀伤肿瘤(Samaha et al 2018; Wang et al 2019)，从而制约了常规肿瘤疗法在多形性胶质母细胞瘤（GBM）中的疗效。我们的研究证明，oAAV-P2 介导的细胞焦亡可以暂时打开 BBB，增加 GBM 肿瘤中 T 细胞的浸润，破坏 GBM 的 TME，从而显著延长大鼠 GBM 模型的存活时间。这些数据表明，oAAV-P2 具有很好的溶瘤效果。同时我们的研究也提示，在使用 oAAV-P2 治疗 GBM 的过程中，需要采取额外的抗感染措施，以避免因 BBB 的暂时性开放而引起脑部感染。

免疫检查点阻断，例如抗 PD-1/PD-L1 疗法已成功应用于临床肿瘤治疗(Kalbasi et al 2020; Topalian et al 2016)。但临床数据也表明，PD-1/PD-L1 阻断仅对有限类型的癌症有效，这种现象可能与大部分肿瘤免疫抑制性的 TME 有关(Salmaninejad et al 2019; Zou et al 2016)。我们的 Bulk RNA-seq 和肿瘤浸润淋巴细胞流式分析结果表明，oAAV-P2 处理可以上调肿瘤中趋化因子和细胞因子相关基因的表达，并增加肿瘤中的淋巴细胞浸润，这提示 oAAV-P2 可以重塑 TME 内的抗肿瘤免疫力。这些结果与先前的研究一致(Wang et al 2020; Zhang et al 2020; Zhou et al 2020)，证实了 GSDM^{NT} 诱导的细胞焦亡可以改变免疫抑制性 TME。此外，我们在 Bulk RNA-seq 的数据中也发现了 oAAV-P2 治疗可以上调肿瘤内免疫检查点 PD-1 和 PD-L1 的表达，这也暗示抗 PD-L1 治疗可以增强 oAAV-P2 的溶瘤作用。随后 PD-L1 阻断剂和 oAAV-P2 的联合治疗数据表明该联合疗法确实可以改善 oAAV-P2 的溶瘤作用，几乎可以完全消融 TNBC 小鼠模型的肿瘤。

在本研究中，我们主要是通过瘤内注射来实现 rAAV 的肿瘤靶向性，这会引起肿瘤治疗中 rAAV 感染其他组织器官的担忧，为了验证 rAAV 瘤内注射的安全性，我们包装了表达荧光素酶的 rAAV-CMV-luc 进行瘤内注射，随后进行小鼠荧光素活体成像，结果显示仅在肿瘤内有可观察到的荧光素酶表达，这表明 rAAV 瘤内注射是可行的。同时 rAAV 衣壳蛋白定向改造、靶向性高亲和配体的插入（Her2-AAV 静脉注射靶向 Her2/neu 阳性肿瘤(Munch et al 2015)、肿瘤特异启动子(Chen et al 2018)的研究，也为 rAAV-GSDM^{NT} 的肿瘤靶向提供了充足的替代解决方案。

同时我们还包装了 oAAV-P2B 和 oAAV-P2E，证实了我们 rAAV-GSDM^{NT} 的包装策略具有很好的扩展性，这也暗示我们的策略不止可用于包装表达焦亡蛋白的 rAAV，

也可以用于包装表达其他毒性蛋白的 rAAV, 例如胸苷激酶 1(Barth et al 2008)和天花粉蛋白(Li et al 1991), 从而实现 rAAV 肿瘤治疗的多样性。虽然 oAAV-P1 介导焦亡能力较弱, 但其可以利用发酵工程大规模获得, 生产成本低, 且其在 GBM 大鼠模型中的结果也表明, oAAV-P1 可能适用于治疗一些进展缓慢的肿瘤类型。尽管在本研究中 oAAV-P2 是通过 HEK 293T 细胞包装的, 但其也可以通过杆状病毒系统进行大规模包装, 所以我们开发的这两种包装 rAAV-GSDM^{NT} 都可以实现低成本、大规模包装。

总而言之, 我们的研究开发了两种新颖的策略来规避重组载体包装时 GSDM^{NT} 的细胞毒性, 从而获得可应用于临床肿瘤治疗的高滴度的 rAAV-GSDM^{NT}。同时我们证明了 rAAV-GSDM^{NT} 介导的肿瘤细胞焦亡, 可以暂时性打开血脑屏障, 招募淋巴细胞浸润到脑部肿瘤内, 重塑 TME 内的抗肿瘤免疫力, 从而延长原位 GBM 大鼠模型的生存时间。rAAV-GSDM^{NT} 和抗 PD-L1 的联合治疗可以显著抑制原位 TNBC 小鼠模型肿瘤的生长, 具有很好的溶瘤作用。我们的研究不仅揭示了焦亡新的抗肿瘤效应, 也为焦亡在宠物和人类肿瘤临床治疗中的应用提供了临床前数据。

6.3 宠物肿瘤治疗前瞻

随着动物福利的提升, 宠物的寿命也逐渐提升, 这也使得肿瘤成为目前危害宠物的主要病因之一。相对于构建获得的动物肿瘤模型, 宠物自发肿瘤与人类肿瘤的发生、发展更加接近, 所以研究宠物肿瘤治疗方法, 不仅可以延长患癌宠物寿命, 也可以为人类肿瘤治疗提供借鉴意义, 缩短肿瘤治疗研发临床前研究时限。但同时也注意到, 宠物不同于实验动物, 对于主人来说它们更像亲人, 而目前宠物的临床试验并没有现成的规范和审批管理机制, 所以大多数主人和临床医生在面对临床试验时会心存顾虑, 从而无法得到足够的临床数据。所以成立类似 GIVCS 的组织, 监测宠物肿瘤情况, 规范宠物肿瘤临床试验, 对于宠物肿瘤治疗方法的研究是非常有必要的。

虽然本研究未能得到有效的宠物肿瘤治疗数据, 但我们开发的利用 BCG 和 rAAV-GSDM^{NT} 靶向 TME, 增强抗肿瘤免疫的方法都可以为宠物肿瘤治疗提供很好的借鉴意义。而且针对 BCG 进行改造, 在其内插入宠物免疫筛查位点对应抗体的表达序列, 可以实现 BCG 和免疫筛查位点阻断的低成本结合, 这也可作为后续宠物肿瘤

治疗提供有效方案。同时也可以进一步优化 rAAV-GSDM^{NT}，提升其肿瘤靶向性，从而更加安全有效的治疗宠物肿瘤。

参考文献

1. Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Semin Oncol Nurs*, 2019, 35: 150923.
2. Achard C, Surendran A, Wedge ME, Ungerechts G, Bell J, Ilkow CS. Lighting a Fire in the Tumor Microenvironment Using Oncolytic Immunotherapy. *EBioMedicine*, 2018, 31: 17-24.
3. Adesanya OA, Uche-Orji CI, Adedeji YA, Joshua JI, Adesola AA, Chukwudike CJ. Expanded Scope of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Vaccine Applicability in Disease Prophylaxis, Diagnostics, and Immunotherapeutics. *Infectious Microbes and Diseases*, 2020, 2: 144-150.
4. Aguiar PN, Jr., Santoro IL, Tadokoro H, de Lima Lopes G, Filardi BA, Oliveira P, Mountzios G, de Mello RA. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: a network meta-analysis. *Immunotherapy*, 2016, 8: 479-488.
5. Ahmed SG, Abdelanabi A, Doha M, Brenner GJ. Schwannoma gene therapy by adeno-associated virus delivery of the pore-forming protein Gasdermin-D. *Cancer Gene Ther*, 2019, 26: 259-267.
6. Arama C, Waseem S, Fernandez C, Assefaw-Redda Y, You L, Rodriguez A, Radosevic K, Goudsmit J, Kaufmann SH, Reece ST, Troye-Blomberg M. A recombinant Bacille Calmette-Guerin construct expressing the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein enhances dendritic cell activation and primes for circumsporozoite-specific memory cells in BALB/c mice. *Vaccine*, 2012, 30: 5578-5584.
7. Baioni E, Scanziani E, Vincenti MC, Leschiera M, Bozzetta E, Pezzolato M, Desiato R, Bertolini S, Maurella C, Ru G. Estimating canine cancer incidence: findings from a population-based tumour registry in northwestern Italy. *BMC Vet Res*, 2017, 13: 203.
8. Barth RF, Yang W, Wu G, Swindall M, Byun Y, Narayanasamy S, Tjarks W, Tordoff K, Moeschberger ML, Eriksson S, Binns PJ, Riley KJ. Thymidine kinase 1 as a molecular target for boron neutron capture therapy of brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 17493-17497.
9. Bast RC, Jr., Zbar B, Borsos T, Rapp HJ. BCG and cancer. *N Engl J Med*, 1974, 290: 1458-1469.

10. Behr MA, Schroeder BG, Brinkman JN, Slayden RA, Barry CE, 3rd. A point mutation in the *mma3* gene is responsible for impaired methoxymycolic acid production in *Mycobacterium bovis* BCG strains obtained after 1927. *J Bacteriol*, 2000, 182: 3394-3399.
11. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, 1968, 161: 370-371.
12. Biering-Sorensen S, Aaby P, Napirna BM, Roth A, Ravn H, Rodrigues A, Whittle H, Benn CS. Small randomized trial among low-birth-weight children receiving bacillus Calmette-Guerin vaccination at first health center contact. *Pediatr Infect Dis J*, 2012, 31: 306-308.
13. Bohle A, Jocham D, Bock PR. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol*, 2003, 169: 90-95.
14. Brandau S, Suttman H. Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomed Pharmacother*, 2007, 61: 299-305.
15. Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol*, 2000, 38: 31-40.
16. Bronden LB, Flagstad A, Kristensen AT. Veterinary cancer registries in companion animal cancer: a review. *Vet Comp Oncol*, 2007, 5: 133-144.
17. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 5596-5601.
18. Broz P, Pelegrin P, Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20: 143-157.
19. Chan CJ, Martinet L, Gilfillan S, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Chow MT, Town L, Ritchie DS, Colonna M, Andrews DM, Smyth MJ. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol*, 2014, 15: 431-438.
20. Chen C, Yue D, Lei L, Wang H, Lu J, Zhou Y, Liu S, Ding T, Guo M, Xu L. Promoter-Operating Targeted Expression of Gene Therapy in Cancer: Current Stage

- and Prospect. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 11: 508-514.
21. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 2017, 541: 321-330.
22. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*, 1991: 3-11.
23. Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol*, 2001, 9: 113-114.
24. Dang CH, Aubert M, De Silva Felixge HS, Diem K, Loprieno MA, Roychoudhury P, Stone D, Jerome KR. In vivo dynamics of AAV-mediated gene delivery to sensory neurons of the trigeminal ganglia. *Sci Rep*, 2017, 7: 927.
25. Dangaj D, Bruand M, Grimm AJ, Ronet C, Barras D, Duttagupta PA, Lanitis E, Duraiswamy J, Tanyi JL, Benencia F, Conejo-Garcia J, Ramay HR, Montone KT, Powell DJ, Jr., Gimotty PA, Facciabene A, Jackson DG, Weber JS, Rodig SJ, Hodi SF, *et al.* Cooperation between Constitutive and Inducible Chemokines Enables T Cell Engraftment and Immune Attack in Solid Tumors. *Cancer Cell*, 2019, 35: 885-900 e810.
26. Enger PO, Thorsen F, Lonning PE, Bjerkvig R, Hoover F. Adeno-associated viral vectors penetrate human solid tumor tissue in vivo more effectively than adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*, 2002, 13: 1115-1125.
27. Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpour S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjostedt E, Lundberg E, Szigartyo CA, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13: 397-406.
28. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, 2000, 192: 1027-1034.
29. Friedlander AM. Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. *J Biol Chem*, 1986, 261: 7123-7126.
30. Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment

- at dawn. *Cancer Sci*, 2016, 107: 1373-1379.
31. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 2018, 25: 486-541.
32. Gan C, Mostafid H, Khan MS, Lewis DJ. BCG immunotherapy for bladder cancer-the effects of substrain differences. *Nat Rev Urol*, 2013, 10: 580-588.
33. Garrido-Garcia LM, Castillo-Moguel A, Vazquez-Rivera M, Cravioto P, Fernando G. Reaction of the BCG Scar in the Acute Phase of Kawasaki Disease in Mexican Children. *Pediatr Infect Dis J*, 2017, 36: e237-e241.
34. Ge J, Jin L, Tang X, Gao D, An Q, Ping W. Optimization of eGFP expression using a modified baculovirus expression system. *J Biotechnol*, 2014, 173: 41-46.
35. Giakoumettis D, Kritis A, Foroglou N. C6 cell line: the gold standard in glioma research. *Hippokratia*, 2018, 22: 105-112.
36. Graf R, Pospischil A, Guscetti F, Meier D, Welle M, Dettwiler M. Cutaneous Tumors in Swiss Dogs: Retrospective Data From the Swiss Canine Cancer Registry, 2008-2013. *Vet Pathol*, 2018, 55: 809-820.
37. Grimm D, Lee JS, Wang L, Desai T, Akache B, Storm TA, Kay MA. In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. *J Virol*, 2008, 82: 5887-5911.
38. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 2013, 368: 1509-1518.
39. Guo ZS. The 2018 Nobel Prize in medicine goes to cancer immunotherapy (editorial for BMC cancer). *BMC Cancer*, 2018, 18: 1086.
40. Hahn AW, Gill DM, Pal SK, Agarwal N. The future of immune checkpoint cancer therapy after PD-1 and CTLA-4. *Immunotherapy*, 2017, 9: 681-692.
41. Han X, Shen S, Fan Q, Chen G, Archibong E, Dotti G, Liu Z, Gu Z, Wang C. Red blood cell-derived nanoerythroosome for antigen delivery with enhanced cancer immunotherapy. *Sci Adv*, 2019, 5: eaaw6870.

42. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144: 646-674.
43. Helmy KY, Patel SA, Nahas GR, Rameshwar P. Cancer immunotherapy: accomplishments to date and future promise. *Ther Deliv*, 2013, 4: 1307-1320.
44. Hilbi H, Chen Y, Thirumalai K, Zychlinsky A. The interleukin 1 β -converting enzyme, caspase 1, is activated during *Shigella flexneri*-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun*, 1997, 65: 5165-5170.
45. Hsu JW, Yin PN, Wood R, Messing J, Messing E, Lee YF. 1 α , 25-dihydroxylvitamin D₃ promotes *Bacillus Calmette-Guerin* immunotherapy of bladder cancer. *Oncotarget*, 2013, 4: 2397-2406.
46. Huard B, Prigent P, Tournier M, Bruniquel D, Triebel F. CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur J Immunol*, 1995, 25: 2718-2721.
47. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*, 1992, 11: 3887-3895.
48. Iwai Y, Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol*, 2005, 17: 133-144.
49. Jarvinen R, Kaasinen E, Sankila A, Rintala E, FinnBladder G. Long-term efficacy of maintenance bacillus Calmette-Guerin versus maintenance mitomycin C instillation therapy in frequently recurrent TaT1 tumours without carcinoma in situ: a subgroup analysis of the prospective, randomised FinnBladder I study with a 20-year follow-up. *Eur Urol*, 2009, 56: 260-265.
50. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, Yu X, Huseni M, Yang Y, Park S, Javinal V, Chiu H, Irving B, Eaton DL, Grogan JL. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell*, 2014, 26: 923-937.
51. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*, 2015, 348: 74-80.
52. Kakisaka Y, Ohara T, Katayama S, Suzuki T, Sasai S, Hino-Fukuyo N, Kure S. Human herpes virus type 6 can cause skin lesions at the BCG inoculation site similar to Kawasaki Disease. *Tohoku J Exp Med*, 2012, 228: 351-353.

53. Kalbasi A, Ribas A. Antigen Presentation Keeps Trending in Immunotherapy Resistance. *Clin Cancer Res*, 2018, 24: 3239-3241.
54. Kalbasi A, Ribas A. Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20: 25-39.
55. Kamat AM, Colombel M, Sundi D, Lamm D, Boehle A, Brausi M, Buckley R, Persad R, Palou J, Soloway M, Witjes JA. BCG-unresponsive non-muscle-invasive bladder cancer: recommendations from the IBCG. *Nat Rev Urol*, 2017, 14: 244-255.
56. Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of human DFNA5L, mouse Dfna5l, and rat Dfna5l genes in silico. *Int J Oncol*, 2004, 25: 765-770.
57. Kavoussi LR, Brown EJ, Ritchey JK, Ratliff TL. Fibronectin-mediated Calmette-Guerin bacillus attachment to murine bladder mucosa. Requirement for the expression of an antitumor response. *J Clin Invest*, 1990, 85: 62-67.
58. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Roose-Girma M, Dixit VM. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, 2011, 479: 117-121.
59. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, Cuellar T, Haley B, Roose-Girma M, Phung QT, Liu PS, Lill JR, Li H, Wu J, Kummerfeld S, Zhang J, Lee WP, Snipas SJ, Salvesen GS, Morris LX, *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 2015, 526: 666-671.
60. Kersey PJ, Allen JE, Allot A, Barba M, Boddu S, Bolt BJ, Carvalho-Silva D, Christensen M, Davis P, Grabmueller C, Kumar N, Liu Z, Maurel T, Moore B, McDowall MD, Maheswari U, Naamati G, Newman V, Ong CK, Paulini M, *et al.* Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: D802-D808.
61. Klein BY. Newborn BCG vaccination complemented by boosting correlates better with reduced juvenile diabetes in females, than vaccination alone. *Vaccine*, 2020, 38: 6427-6434.
62. Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, Yang JC, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Raffeld M, Feldman S, Lu L, Li YF, Ngo LT, Goy A, Feldman T, Spaner DE, Wang ML, Chen CC, *et al.* Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol*, 2015, 33: 540-549.

63. Kohlschutter J, Michelfelder S, Trepel M. Novel cytotoxic vectors based on adeno-associated virus. *Toxins (Basel)*, 2010, 2: 2754-2768.
64. Korf J, Stoltz A, Verschoor J, De Baetselier P, Grooten J. The Mycobacterium tuberculosis cell wall component mycolic acid elicits pathogen-associated host innate immune responses. *Eur J Immunol*, 2005, 35: 890-900.
65. Kroeger KM, Muhammad AK, Baker GJ, Assi H, Wibowo MK, Xiong W, Yagiz K, Candolfi M, Lowenstein PR, Castro MG. Gene therapy and virotherapy: novel therapeutic approaches for brain tumors. *Discov Med*, 2010, 10: 293-304.
66. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*, 2016, 293: 247-269.
67. Kwon ED, Hurwitz AA, Foster BA, Madias C, Feldhaus AL, Greenberg NM, Burg MB, Allison JP. Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94: 8099-8103.
68. Le Mercier I, Chen W, Lines JL, Day M, Li J, Sergent P, Noelle RJ, Wang L. VISTA Regulates the Development of Protective Antitumor Immunity. *Cancer Res*, 2014, 74: 1933-1944.
69. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 1996, 271: 1734-1736.
70. Li MX, Yeung HW, Pan LP, Chan SI. Trichosanthin, a potent HIV-1 inhibitor, can cleave supercoiled DNA in vitro. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 6309-6312.
71. Li ZB, Zeng ZJ, Chen Q, Luo SQ, Hu WX. Recombinant AAV-mediated HSVtk gene transfer with direct intratumoral injections and Tet-On regulation for implanted human breast cancer. *BMC Cancer*, 2006, 6: 66.
72. Lin J, Lalani AS, Harding TC, Gonzalez M, Wu WW, Luan B, Tu GH, Koprivnikar K, VanRoey MJ, He Y, Alitalo K, Jooss K. Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor. *Cancer Res*, 2005, 65: 6901-6909.
73. Liu DW, Chang JL, Tsao YP, Huang CW, Kuo SW, Chen SL. Co-vaccination with adeno-associated virus vectors encoding human papillomavirus 16 L1 proteins and adenovirus encoding murine GM-CSF can elicit strong and prolonged neutralizing antibody. *Int J Cancer*, 2005, 113: 93-100.
74. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee

- WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, 2016, 131: 803-820.
75. Lu J, Lee-Gabel L, Nadeau MC, Ferencz TM, Soefje SA. Clinical evaluation of compounds targeting PD-1/PD-L1 pathway for cancer immunotherapy. *J Oncol Pharm Pract*, 2015, 21: 451-467.
76. Luca S, Mihaescu T. History of BCG Vaccine. *Maedica (Bucur)*, 2013, 8: 53-58.
77. Lyons TG. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol*, 2019, 20: 82.
78. Lyons TG, Traina TA. Emerging Novel Therapeutics in Triple-Negative Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1152: 377-399.
79. Marchini A, Daeffler L, Pozdeev VI, Angelova A, Rommelaere J. Immune Conversion of Tumor Microenvironment by Oncolytic Viruses: The Protoparvovirus H-1PV Case Study. *Front Immunol*, 2019, 10: 1848.
80. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, 2002, 10: 417-426.
81. Mietzsch M, Grasse S, Zurawski C, Weger S, Bennett A, Agbandje-McKenna M, Muzyczka N, Zolotukhin S, Heilbronn R. OneBac: platform for scalable and high-titer production of adeno-associated virus serotype 1-12 vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther*, 2014, 25: 212-222.
82. Moorlag S, Arts RJW, van Crevel R, Netea MG. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25: 1473-1478.
83. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*, 1976, 116: 180-183.
84. Morton D, Eilber FR, Malmgren RA, Wood WC. Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. *Surgery*, 1970, 68: 158-163; discussion 163-154.
85. Munch RC, Muth A, Muik A, Friedel T, Schmatz J, Dreier B, Trkola A, Pluckthun A, Buning H, Buchholz CJ. Off-target-free gene delivery by affinity-purified receptor-targeted viral vectors. *Nat Commun*, 2015, 6: 6246.
86. Murciano-Goroff YR, Warner AB, Wolchok JD. The future of cancer

- immunotherapy: microenvironment-targeting combinations. *Cell Res*, 2020, 30: 507-519.
87. Muthuvelu S, Lim KS, Huang LY, Chin ST, Mohan A. Measles infection causing Bacillus Calmette-Guerin reactivation: a case report. *BMC Pediatr*, 2019, 19: 251.
88. Nankabirwa V, Tumwine JK, Mugaba PM, Tylleskar T, Sommerfelt H, Group P-ES. Child survival and BCG vaccination: a community based prospective cohort study in Uganda. *BMC Public Health*, 2015, 15: 175.
89. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P, Riddell A, Pie AJ, Harrington C, O'Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CY, Kay MA, Zhou J, Spence Y, Morton CL, *et al*. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*, 2011, 365: 2357-2365.
90. Nedeljkovic M, Damjanovic A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. *Cells*, 2019, 8.
91. Panganiban RA, Sun M, Dahlin A, Park HR, Kan M, Himes BE, Mitchel JA, Iribarren C, Jorgenson E, Randell SH, Israel E, Tantisira K, Shore S, Park JA, Weiss ST, Wu AC, Lu Q. A functional splice variant associated with decreased asthma risk abolishes the ability of gasdermin B to induce epithelial cell pyroptosis. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142: 1469-1478 e1462.
92. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 252-264.
93. Parish CR. Cancer immunotherapy: the past, the present and the future. *Immunol Cell Biol*, 2003, 81: 106-113.
94. Pinello KC, Queiroga F, de Matos A, Santos A, Ribeiro JN, Guscetti F, Palmieri C, Soberano M, Momanyi K, Torres JR, Killick D, Radford A, Wilson-Robles H, de Carvalho JP, Tedardi MV, Dagli MLZ. The Global Initiative for Veterinary Cancer Surveillance (GIVCS): Report of the first meeting and future perspectives. *Vet Comp Oncol*, 2020, 18: 141-142.
95. Qin S, Xu L, Yi M, Yu S, Wu K, Luo S. Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol Cancer*, 2019, 18: 155.
96. Roma-Rodrigues C, Mendes R, Baptista PV, Fernandes AR. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*, 2019, 20.
97. Saeki N, Kuwahara Y, Sasaki H, Satoh H, Shiroishi T. Gasdermin (Gsdm) localizing

- to mouse Chromosome 11 is predominantly expressed in upper gastrointestinal tract but significantly suppressed in human gastric cancer cells. *Mamm Genome*, 2000, 11: 718-724.
98. Saeki N, Kim DH, Usui T, Aoyagi K, Tatsuta T, Aoki K, Yanagihara K, Tamura M, Mizushima H, Sakamoto H, Ogawa K, Ohki M, Shiroishi T, Yoshida T, Sasaki H. GASDERMIN, suppressed frequently in gastric cancer, is a target of LMO1 in TGF-beta-dependent apoptotic signalling. *Oncogene*, 2007, 26: 6488-6498.
99. Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimardani M, Pashar A, Sahebkar A. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 16824-16837.
100. Samaha H, Pignata A, Fousek K, Ren J, Lam FW, Stossi F, Dubrulle J, Salsman VS, Krishnan S, Hong SH, Baker ML, Shree A, Gad AZ, Shum T, Fukumura D, Byrd TT, Mukherjee M, Marrelli SP, Orange JS, Joseph SK, *et al.* A homing system targets therapeutic T cells to brain cancer. *Nature*, 2018, 561: 331-337.
101. Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY, Barron DA, Zehir A, Jordan EJ, Omuro A, Kaley TJ, Kendall SM, Motzer RJ, Hakimi AA, Voss MH, Russo P, Rosenberg J, Iyer G, Bochner BH, Bajorin DF, *et al.* Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet*, 2019, 51: 202-206.
102. Samulski RJ, Berns KI, Tan M, Muzyczka N. Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982, 79: 2077-2081.
103. Santiago-Ortiz JL, Schaffer DV. Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy. *J Control Release*, 2016, 240: 287-301.
104. Sato H, Koide T, Masuya H, Wakana S, Sagai T, Umezawa A, Ishiguro S, Tamai M, Shiroishi T. A new mutation Rim3 resembling Re(den) is mapped close to retinoic acid receptor alpha (Rara) gene on mouse chromosome 11. *Mamm Genome*, 1998, 9: 20-25.
105. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 2011, 331: 1565-1570.
106. Shehadeh N, Etzioni A, Cahana A, Teninboum G, Gorodetsky B, Barzilai D, Karnieli E. Repeated BCG vaccination is more effective than a single dose in preventing diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Isr J Med Sci*, 1997, 33: 711-715.
107. Shi D, Zhao S, Jiang W, Zhang C, Liang T, Hou G. TLR5: A prognostic and

- monitoring indicator for triple-negative breast cancer. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 954.
108. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 2015, 526: 660-665.
109. Sireci G, Dieli F, Salerno A. T cells recognize an immunodominant epitope of heat shock protein 65 in Kawasaki disease. *Mol Med*, 2000, 6: 581-590.
110. Smith RH, Levy JR, Kotin RM. A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. *Mol Ther*, 2009, 17: 1888-1896.
111. Strome SE, Dong H, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, Salomao D, Cheville J, Hirano F, Lin W, Kasperbauer JL, Ballman KV, Chen L. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 2003, 63: 6501-6505.
112. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering CV. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: D607-D613.
113. Tamura M, Tanaka S, Fujii T, Aoki A, Komiyama H, Ezawa K, Sumiyama K, Sagai T, Shiroishi T. Members of a novel gene family, Gsdm, are expressed exclusively in the epithelium of the skin and gastrointestinal tract in a highly tissue-specific manner. *Genomics*, 2007, 89: 618-629.
114. Tang J, Yu JX, Hubbard-Lucey VM, Neftelinov ST, Hodge JP, Lin Y. Trial watch: The clinical trial landscape for PD1/PDL1 immune checkpoint inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17: 854-855.
115. Testa F, Maguire AM, Rossi S, Pierce EA, Melillo P, Marshall K, Banfi S, Surace EM, Sun J, Acerra C, Wright JF, Wellman J, High KA, Auricchio A, Bennett J, Simonelli F. Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber congenital Amaurosis type 2. *Ophthalmology*, 2013, 120: 1283-1291.
116. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16: 275-287.
117. Tse J, Singla N, Ghandour R, Lotan Y, Margulis V. Current advances in BCG-

- unresponsive non-muscle invasive bladder cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 2019, 28: 757-770.
118. Tsuchiya K. Switching from Apoptosis to Pyroptosis: Gasdermin-Elicited Inflammation and Antitumor Immunity. *Int J Mol Sci*, 2021, 22.
119. Uehara R, Igarashi H, Yashiro M, Nakamura Y, Yanagawa H. Kawasaki disease patients with redness or crust formation at the Bacille Calmette-Guerin inoculation site. *Pediatr Infect Dis J*, 2010, 29: 430-433.
120. Ullenhag G. Cancer treatment of today in view of the Nobel Prize. *Ups J Med Sci*, 2018, 123: 205-206.
121. Urabe M, Ding C, Kotin RM. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther*, 2002, 13: 1935-1943.
122. van Dam AD, Bekkering S, Crasborn M, van Beek L, van den Berg SM, Vrieling F, Joosten SA, van Harmelen V, de Winther MPJ, Lutjohann D, Lutgens E, Boon MR, Riksen NP, Rensen PCN, Berbee JFP. BCG lowers plasma cholesterol levels and delays atherosclerotic lesion progression in mice. *Atherosclerosis*, 2016, 251: 6-14.
123. Velcheti V, Schalper K. Basic Overview of Current Immunotherapy Approaches in Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2016, 35: 298-308.
124. Wang D, Wang C, Wang L, Chen Y. A comprehensive review in improving delivery of small-molecule chemotherapeutic agents overcoming the blood-brain/brain tumor barriers for glioblastoma treatment. *Drug Deliv*, 2019, 26: 551-565.
125. Wang Q, Wang Y, Ding J, Wang C, Zhou X, Gao W, Huang H, Shao F, Liu Z. A bioorthogonal system reveals antitumour immune function of pyroptosis. *Nature*, 2020, 579: 421-426.
126. Wang Y, Gao W, Shi X, Ding J, Liu W, He H, Wang K, Shao F. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*, 2017, 547: 99-103.
127. Wang Y, Liu J, Yang X, Liu Y, Liu Y, Li Y, Sun L, Yang X, Niu H. Bacillus Calmette-Guerin and anti-PD-L1 combination therapy boosts immune response against bladder cancer. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 2891-2899.
128. Watabe K, Ito A, Asada H, Endo Y, Kobayashi T, Nakamoto K, Itami S, Takao S, Shinomura Y, Aikou T, Yoshikawa K, Matsuzawa Y, Kitamura Y, Nojima H. Structure, expression and chromosome mapping of MLZE, a novel gene which is preferentially expressed in metastatic melanoma cells. *Jpn J Cancer Res*, 2001, 92:

- 140-151.
129. Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther*, 1994, 64: 529-564.
130. Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther*, 2006, 14: 316-327.
131. Yamazaki-Nakashimada MA, Unzueta A, Berenise Gamez-Gonzalez L, Gonzalez-Saldana N, Sorensen RU. BCG: a vaccine with multiple faces. *Hum Vaccin Immunother*, 2020, 16: 1841-1850.
132. Yun S, Vincelette ND, Green MR, Wahner Hendrickson AE, Abraham I. Targeting immune checkpoints in unresectable metastatic cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 agents trials. *Cancer Med*, 2016, 5: 1481-1491.
133. Zbar B, Tanaka T. Immunotherapy of cancer: regression of tumors after intralesional injection of living Mycobacterium bovis. *Science*, 1971, 172: 271-273.
134. Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, Billis K, Cummins C, Gall A, Giron CG, Gil L, Gordon L, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, To JK, Laird MR, *et al*. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: D754-D761.
135. Zhang Y, Cai P, Liang T, Wang L, Hu L. TIM-3 is a potential prognostic marker for patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 2017, 8: 31705-31713.
136. Zhang Z, Zhang Y, Xia S, Kong Q, Li S, Liu X, Junqueira C, Meza-Sosa KF, Mok TMY, Ansara J, Sengupta S, Yao Y, Wu H, Lieberman J. Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity. *Nature*, 2020, 579: 415-420.
137. Zheng YQ, Naguib YW, Dong Y, Shi YC, Bou S, Cui Z. Applications of bacillus Calmette-Guerin and recombinant bacillus Calmette-Guerin in vaccine development and tumor immunotherapy. *Expert Rev Vaccines*, 2015, 14: 1255-1275.
138. Zhou Z, He H, Wang K, Shi X, Wang Y, Su Y, Wang Y, Li D, Liu W, Zhang Y, Shen L, Han W, Shen L, Ding J, Shao F. Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells. *Science*, 2020, 368.
139. Zimmermann P, Finn A, Curtis N. Does BCG Vaccination Protect Against Nontuberculous Mycobacterial Infection? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Infect Dis*, 2018, 218: 679-687.

140. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther*, 2008, 16: 1073-1080.
141. Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med*, 2016, 8: 328rv324.
142. Zuo Z, Qi F, Yang J, Wang X, Wu Y, Wen Y, Yuan Q, Zou J, Guo K, Yao ZB. Immunization with Bacillus Calmette-Guerin (BCG) alleviates neuroinflammation and cognitive deficits in APP/PS1 mice via the recruitment of inflammation-resolving monocytes to the brain. *Neurobiol Dis*, 2017, 101: 27-39.
143. Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*, 1992, 358: 167-169.

致谢

完成这篇博士学位论文,为学生生涯划上句号的同时,自己也将步入而立之年。回首二十五载求学路,不胜唏嘘。

大概是四五岁的时候,幼儿园午休醒来看见院子满地的落叶,刚刚学完“夜来风雨声,花落知多少”的我,突然有种说不出来、但至今仍记忆犹新的感觉,后来才明白这就是诗歌的魅力所在一意境,这是我对学涯最初的记忆。小学四年级,母亲被查出乳腺癌,第一次听到肿瘤这个词汇,当时以为这只是一个总会被治愈的母亲生的一个小病,怎么也不会想到,多年以后因为母亲复发转移,自己不得不再次面对这个词汇时会有多么的无助,也不会想到,这个词汇最终会成为自己博士,甚至后续整个科研生涯所要研究的课题。

一路走来,虽有不幸,但在人生的每一次转折点,总有一位“贵人”老师出现。感谢我的小学六年级数学老师,虽然我已记不起她的名字,但她鼓励和关怀塑造了我学习的自信心。使我第一次意识到在学习方面,自己并不比别人差,通过努力,自己也可以名列前茅。感谢高一物理老师魏姐,和她在每次作业后的相互对话,使我第一次体会到了“良师益友”的真正含义。而且也正是魏姐大姐姐般无微不至的关怀,才会让我在父亲病逝,痛失父爱时,虽然在学业上有所懈怠但不至完全堕落。感谢高二生物郝老师,她当着全班同学说的那句“鲁愿上生物课可以学英语,不用听我讲”,至今想来仍感自豪,这也是我最终选择报考生物相关专业的缘由。感谢大一线代龙容老师,和她一起在办公室批改试卷的时光,给我的大学生涯增添了很多自信。感谢本科班主任金卉老师提供实验室实习机会。感谢本科遇到的“良师益友”卢健老师,他的谈吐,修养,为人处事是我一生学习的榜样。

科研路始,最难得的幸运是遇到一位好导师。感谢我的硕博导师曹罡教授,他提供的轻松自由的科研氛围,使我感受到了科研的乐趣。他不落窠臼的科研思维,使我深刻意识到创新对于科研的重要意义。他大方诚恳的处事风格,科研之余的广泛爱好,为我树立积极向上的人生观指引了方向。硕博六年,家事繁多,母亲癌症复发病逝,结婚生子,极其幸运能够得到曹老师的帮助和包容。感谢曹老师在我为母亲治病时帮我联系医生,在我筹钱时大力支持,在我照顾母亲耽误科研时万般包容,使我能够在母亲去世前最后三个月的时间得以尽心尽孝。感谢曹老师在生活上

无微不至的关怀，使我得以组建家庭，弥补缺失的亲情。感谢曹老师在人生选择上的不断指引，使我慢慢坚定了走科研路的决心。东西南北春常在，唯有师恩留心间。

感谢何文波老师在合作完成课题期间对我生活琐事繁多的迁就和包容，没有何老师的帮助我很难如期毕业。同时何老师踏实认真的做事风格，谦逊文雅的为人态度也值得我终生学习。

感谢课题组各位老师：戴金霞副研究员、傅振芳教授、赵凌教授、彭贵青教授、崔旻教授、周明副教授在我完成课题中的帮助和指导，各位老师严谨的科研态度是我科研路上的学习榜样。

感谢我的师妹黄信，何雨，刘小可，张茜，姜雪梨，师弟陶大刚在科研之余对我生活上的帮助。感谢在论文完成期间提供帮助的胡哲师兄，徐伟泽师弟，苟晓娟师妹，曹晓健师弟和张巍嘉师妹。感谢实验室所有同门在我硕博期间给予的科研和生活上的帮助。

感谢我逝去的母亲张爱荣女士，她无私的母爱，朴实的智慧，面对病痛的坚强，将温暖我的一生。感谢我逝去的父亲鲁德良先生，他如山的父爱，是我为人父的榜样。子欲养而亲不待。

感谢我的姐姐鲁聪在我求学路上给予的帮助，在父母逝去后给予我的亲情。

感谢我的妻子骆茹梦一直以来对我的包容、理解和不离不弃，这段陪伴吃苦的日子我会铭记终生，糟糠之妻不下堂。感谢我的儿子鲁一一带来的欢乐，他的出生虽然带给我们很大的压力，但这份难得的亲情，我甘之若饴。

最后衷心感谢参与论文盲评的三位不知名的老师及各位答辩老师！

唯愿出走半生，归来仍是少年。

辛丑年仲夏
南湖畔

chimeric intron

chimeric intron

chimeric intron

chimeric intron

chimeric intron

chimeric intron

chimeric intron

chimeric intron

chimeric intron

chimeric intron

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

chimeric intron

	1270	1280	1290	1300	1310	1320
CAG	CTCGGGCCGGGGCGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGGCCCCGGAGCGCGGGGGCTGTGG					
CBA						
mCBA						

chimeric intron

	1330	1340	1350	1360	1370	1380
CAG	AGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGGCGCAGGGACT					
CBA						
mCBA						

chimeric intron

	1390	1400	1410	1420	1430	1440
CAG	TCCTTTGTCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCGCGCCGCACCCCTCTAGC					
CBA						
mCBA						

chimeric intron

	1450	1460	1470	1480	1490	1500
CAG	GGGCGCGGCGGAAGCGGTGCGGCGCGGCGAGGAAGGAATGGGCGGGGAGGGCCCTTCGTG					
CBA						
mCBA						

chimeric intron

	1510	1520	1530	1540	1550	1560
CAG	CGTCGCGCGCGCGCGCTCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGGGGCTGCCGCGAGGGGGACGG					
CBA						
mCBA						

chimeric intron

	1570	1580	1590	1600	1610	1620
CAG	CTGCCCTTCGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGGCTC					
CBA						
mCBA						

chimeric intron

	1630	1640	1650	1660
CAG	TAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTCTACAG			
CBA				
mCBA				

附录二 个人信息

个人简历:

姓名: 鲁愿

性别: 男

籍贯: 河南省新野县

出生日期: 1991 年 5 月

专业: 预防兽医学

导师: 曹罡教授、何文波讲师、戴金霞副研究员

研究论文: 卡介苗与焦亡溶瘤策略的构建及其在宠物肿瘤治疗中的应用初探

教育经历:

2010 年 9 月-2015 年 6 月

华中农业大学动物医学学士

2011 年 9 月-2015 年 6 月

华中师范大学心理学第二学士

2015 年 9 月至今

华中农业大学硕博连读

在读期间科研成果:

1. **Lu Y**, He W, Huang X, et al. Novel strategies to package oncolytic Adeno-Associated Virus expressing GSDMD^{NT} for tumor treatment. *Nat Commun* 2020 (NCOMMS-20-45979), in revision.
2. **Lu Y**, Huang X, Liu X, et al. Remodels the Immunosuppressive Tumor Microenvironment by Combination of Bacillus Calmette-Guérin and Anti-PD-L1 in an Orthotopic Triple-Negative Breast Cancer Mouse Model. *Onco Targets Ther*. 2021;14:2247-2258.
3. He W, You J, Wan Q, Xiao K, Chen K, **Lu Y**, Li L, Tang Y, Deng Y, Yao Z, Yue J, Cao G. The anatomy and metabolome of the lymphatic system in the brain in health and disease. *Brain Pathol*. 2020 Mar;30(2):392-404.

4. 曹昱, **鲁愿**, 何文波, 黄信, 刘小可, 何雨, 徐伟泽. 中国专利: 用于治疗乳腺癌的组合药剂. 申请号: 202011446702.4.
5. 曹昱, **鲁愿**, 何文波, 黄信, 刘小可, 何雨, 陶大刚, 张茜, 姜雪梨, 徐伟泽. 中国专利: 构建表达焦亡蛋白的溶瘤腺相关病毒 oAAV-SP-GSDM-NT 的包装方法及其应用. 申请号: 202011483576.X.
6. 曹昱, **鲁愿**, 何文波, 黄信, 刘小可, 何雨, 陶大刚, 张茜, 姜雪梨, 徐伟泽. 中国专利: 构建表达焦亡蛋白的溶瘤腺相关病毒 oAAVs 的包装方法及其应用. 申请号: 202011480510.5.