

工程化巨噬细胞外泌体递送*IL-2*-mRNA 用于胶质母细胞瘤治疗研究

温保钰¹ 石英男² 于子婕² 王翠翠² 孙枝红² 孙成铭^{1,2*}

(¹滨州医学院烟台附属医院, 烟台 264000; ²青岛大学附属烟台毓璜顶医院, 烟台 264000)

摘要 胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 是中枢神经系统常见的原发性恶性肿瘤, 而血脑屏障与免疫抑制微环境的双重阻碍, 严重降低了现有疗法的疗效。白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 作为一种新型的治疗分子, 尽管其表现出强大的抗肿瘤治疗效应, 但高剂量使用时附带的严重毒副作用, 极大限制了其临床应用。为解决IL-2在治疗GBM中的难点问题, 该研究构建了一种将高表达CD161的M1型巨噬细胞外泌体修饰于搭载*IL-2*-mRNA的脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticles, LNPs) 骨架外而形成的新型基因递送系统 cExo@LmNPs。采用纳米粒度仪、琼脂糖凝胶电泳、Western blot、细胞荧光成像等, 对 cExo@LmNPs 的基本理化性能进行表征。以小鼠原代T细胞为体外研究对象, 结果表明cExo@LmNPs可显著上调IL-2的表达水平, 促进T细胞的增殖并增强T细胞对GL261肿瘤细胞的特异性杀伤效果。建立小鼠原位GBM模型, 评估cExo@LmNPs靶向肿瘤部位潜能, 结果显示cExo@LmNPs相较于LmNPs呈现出更强的肿瘤靶向性。此外, cExo@LmNPs通过显著促进CD4⁺T和CD8⁺T的增殖与活化, 并上调M1型巨噬细胞比例而呈现较强的肿瘤抑制效果, 且系统毒性可控, 展现出良好的生物安全性。综上, cExo@LmNPs能够穿透血脑屏障并将*IL-2*-mRNA安全、高效递送至肿瘤部位, 全面改善免疫抑制微环境, 从而发挥有效的肿瘤细胞杀伤作用, 为提高GBM治疗效果策略的制定开辟新思路。

关键词 胶质母细胞瘤; 血脑屏障; 脂质纳米颗粒; 免疫抑制; 肿瘤微环境

Engineered Macrophage Exosome-Mediated Delivery of *IL-2*-mRNA for Glioblastoma Treatment

WEN Baoyu¹, SHI Yingnan², YU Zijie², WANG Cuicui², SUN Zhihong², SUN Chengming^{1,2*}

(¹Yantai Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Yantai 264000, China; ²Yantai Yuhuangding Hospital, Qingdao University, Yantai 264000, China)

Abstract GBM (glioblastoma multiforme) is a common primary malignant tumor of the central nervous system, whose treatment efficacy is severely limited by the dual barriers of the blood-brain barrier and the immunosuppressive tumor microenvironment. IL-2 (interleukin-2), as a potent immunotherapeutic agent, demonstrates significant anti-tumor effects; however, its clinical application is greatly restricted by severe side effects associated with high systemic doses. To address these challenges, this study developed a novel gene delivery system, termed cExo@LmNPs, which consists of *IL-2* mRNA-loaded LNPs (lipid nanoparticles) encapsulated within exosomes derived from M1 macrophages overexpressing CD161. The physicochemical properties of cExo@LmNPs were char-

收稿日期: 2025-11-06 接受日期: 2025-12-25

山东省自然科学基金(批准号: ZR2022MH100)资助的课题

*通信作者。Tel: 18953569897, E-mail: chengmingsun012@163.com

Received: November 6, 2025 Accepted: December 25, 2025

This work was supported by Shandong Natural Science Foundation (Grant No.ZR2022MH100)

*Corresponding author. Tel: +86-18953569897, E-mail: chengmingsun012@163.com

acterized using nanoparticle tracking analysis, agarose gel electrophoresis, Western blot, and cellular fluorescence imaging. *In vitro* studies using mouse primary T cells demonstrated that cExo@LmNPs significantly enhanced IL-2 expression, promoted T cell proliferation, and enhanced the specific cytotoxicity against GL261 tumor cells. In an orthotopic GBM mouse model, cExo@LmNPs exhibited superior tumor-targeting capability compared with plain LNPs. Furthermore, cExo@LmNPs treatment markedly promoted the proliferation and activation of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells, increased M1 macrophage polarization, and resulted in significant tumor suppression with controllable systemic toxicity and good biosafety. In conclusion, cExo@LmNPs represent a promising strategy for the safe and efficient delivery of *IL-2*-mRNA across the blood-brain barrier to tumor sites, effectively reshaping the immunosuppressive microenvironment and enhancing anti-tumor immunity, thereby offering a novel therapeutic approach for GBM treatment.

Keywords glioblastoma multiforme; blood-brain barrier; lipid nanoparticles; immunosuppression; tumor microenvironment

胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 是一种具有高度恶性生物学行为及强侵袭性的原发性中枢神经系统肿瘤^[1-2]。尽管在手术、放疗和化疗方面取得了进展^[3],但这些治疗方法往往不能根除肿瘤细胞,最终影响患者的整体健康和生活质量^[4]。此外,血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)与肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME)极大地限制了手术、放化疗等传统治疗手段的有效性^[5-6]。血脑屏障是由脑部毛细血管内皮细胞、星形胶质细胞、周细胞等共同构建的血瘤与大脑之间的天然屏障以维持脑部稳态^[7]。但对于GBM患者, BBB的存在极大地限制了治疗性药物(小分子、蛋白药物等)到达病灶的效率;此外, GBM的TME是由肿瘤细胞、细胞外基质及多种间质细胞(如星形胶质细胞、巨噬细胞和内皮细胞)组成的高度复杂的局部微环境。上述复杂的细胞与分子网络促进免疫抑制性微环境的形成,为胶质瘤创造了生存空间,从而增强了对治疗的抵抗性,以驱动肿瘤的恶性进展。

白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)作为一种高效细胞生长因子,可直接促进细胞毒性T细胞与自然杀伤细胞的增殖与活化,在改善GBM的免疫抑制微环境方面展现出巨大潜力^[8]。但IL-2的系统性给药面临着:(1) IL-2体内半衰期短,且高剂量使用时易引发血管渗漏综合征等严重毒副作用;(2) IL-2作为一种生物大分子,难以自由穿越血脑屏障,致使瘤内无法达到有效治疗浓度等挑战。这也是IL-2疗法若想成功临床应用,必须解决的关键难点。信使RNA(mRNA)技术的快速发展为上述难题提供了新的解决思路^[9]。通过局部特异递送 *IL-2*-mRNA,促

使肿瘤细胞自身表达并分泌功能性IL-2蛋白,从而规避系统毒性并提升局部药物浓度。然而,如何将mRNA安全、高效地递送至颅内肿瘤部位,仍是当前研究的核心瓶颈。脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticles, LNPs)已被证明在药物递送领域具有显著优势,广泛应用于mRNA、siRNA等核酸药物的体内外递送^[10]。另外将LNPs介导的免疫调控疗法与免疫检查点阻断技术联合应用,可进一步激活并重塑肿瘤免疫微环境,增强T细胞对肿瘤的杀伤效果,为肿瘤免疫治疗提供新的组合策略^[11]。

为突破GBM免疫治疗的递送瓶颈,本研究构建了一种将高表达CD161的M1型巨噬细胞外泌体修饰于搭载 *IL-2*-mRNA的LNPs骨架外而形成的新型基因递送系统 cExo@LmNPs。首先,将阳离子脂质分子 (ionizable lipid, IL) ALC-0315、胆固醇、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC) 和DMG-PEG2000等脂质溶解于乙醇中,与溶解于水相中的mRNA溶液混合,形成包封mRNA的脂质纳米颗粒 (lipid nanoparticles for mRNA encapsulation, LmNPs);其次,通过慢病毒转染Raw264.7细胞获得稳定表达CD161的CD161-Raw264.7细胞,并分离提取外泌体(即表达CD161蛋白的外泌体CD161 Exosomes);最后,通过电穿孔技术将LmNPs装载入CD161 Exosomes中,从而制备新型基因递送系统 cExo@LmNPs;见图1。该系统不仅能高效负载治疗性核酸药物 (*IL-2*-mRNA),还借助工程化外泌体的生物学特性实现长效循环与精准的脑瘤靶向,从而有效克服传统递送方式在亲和力与

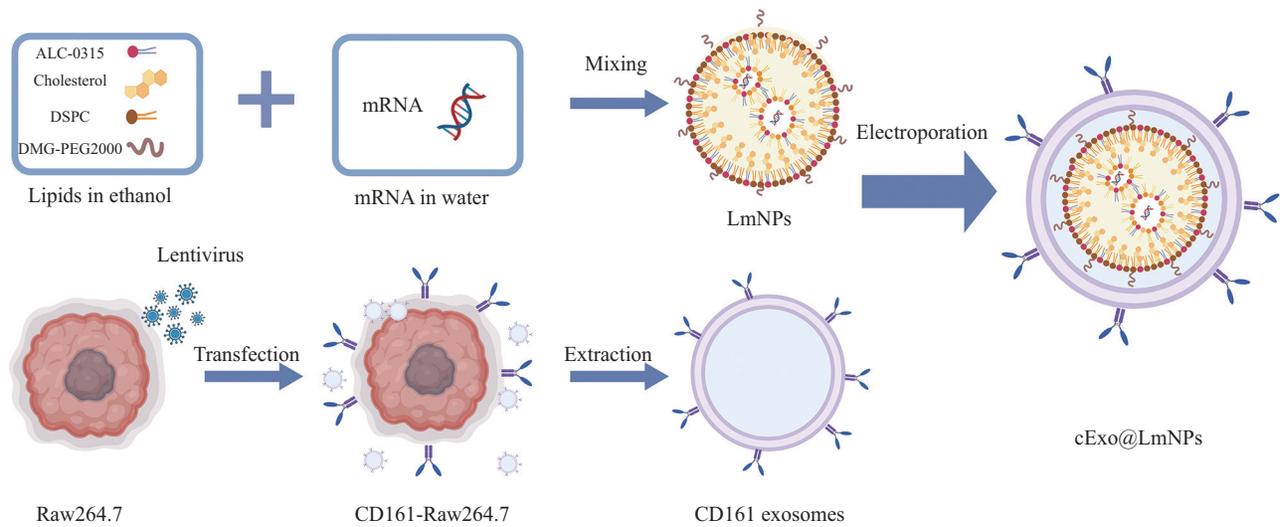


图1 cExo@LmNPs的制备示意图

Fig.1 Schematic illustration of the construction of cExo@LmNPs

选择性方面的局限, 确保IL-2-mRNA高效穿越BBB并富集于肿瘤区域。cExo@LmNPs不仅激活抗肿瘤免疫应答, 还能有效避免全身性给药导致的严重毒副作用, 为GBM的免疫治疗策略的开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 实验材料 小鼠内皮细胞Bend.3、脑胶质瘤细胞GL261、小鼠小胶质细胞系BV2购自中国科学院上海细胞库; DMEM、RPMI 1640培养基购自Life Technologies公司; 胎牛血清购自迈科斯生物科技有限公司; ALC-0315购自上海阿拉丁生化科技有限公司; DSPC、DMG-PEG 2000购自美国Avanti公司; EGPF-mRNA、IL2-mRNA购自上海伟环生物科技有限公司; Lyso-Tracker-Red、细胞增殖染料eFluor™ 670细胞标记液购自美国Invitrogen公司; TNF- α 酶联免疫吸附测定试剂盒和IFN- γ 酶联免疫吸附测定试剂盒购自美国Biolegend公司; LDH检测试剂盒购自英国Abcam公司; 外泌体提取试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。小鼠C57BL/6J(6~8周, 雌性)购自济南明悦实验动物繁育有限公司。本研究经烟台毓璜顶医院伦理委员会批准(伦理号: 2021-414)。

1.1.2 实验仪器 二氧化碳培养箱(ThermoFisher Scientific-HERACeLL240i), 超速离心机、低温高速离心机和台式离心机(ThermoWX100+超速、Ther-

moST16R、ThermoST8), 酶标仪(Thermo Scientific Multiskan GO)均购自美国ThermoFisher Scientific公司; 超净工作台、医用低温冰箱(4 °C、-20 °C)购自中国海尔集团。微量移液器(Research® plus系列)购自德国Eppendorf公司; 纳米粒度电位仪(Zetasizer Nano ZS)购自英国Malvern公司; 超声波细胞破碎仪(UP200St)购自德国Hielscher公司; 紫外可见近红外分光光度计(UV-3600 Plus)购自日本Shimadzu公司; 透射电子显微镜(Tecnaï G2 Spirit)购自美国FEI公司; 流式细胞仪(CytoFLEX)购自上海贝克曼库尔特商贸有限公司; 全自动倒置荧光显微镜(Observer 7)购自德国Carl Zeiss公司; 电泳转膜系统(Mini-PROTEAN Tetra、Trans-blot Turbo)购自美国Bio-Rad公司; 化学发光成像分析系统(Tanon Prime 2000 XDM)购自上海天能生命科技有限公司; 多功能孔板读数仪(SpectraMax iD3)购自美国Molecular Devices公司。

1.2 LmNPs的制备与表征

LmNPs参照课题组前期乙醇相-水相快速混合法^[12]进行制备。即将商业化ALC-0315溶于无水乙醇(2 mg/mL)中; 加入ALC-0315:DSPC:CHO:DMG-PEG 2000(按照物质的量比为46.3:9.4:42.7:1.6的比例)制备乙醇相; 水相则按照可电离阳离子脂质分子(IL)与mRNA质量比分别为2.5:1、5:1、10:1、20:1进行制备。将适量的mRNA加入至pH为3.0的水性柠檬酸钠缓冲液中制备。再将上述制备好的乙醇相快速注入至水相中以合成一系列的LmNPs。采用Zetasizer Nano ZS(马尔文)粒度仪测定水合粒径、多

分散指数 (polydispersity index, PDI) 和 Zeta 电位; 琼脂糖凝胶阻滞实验评估可电离阳离子脂质分子与 mRNA (*EGFP*-mRNA) 在不同质量比下的结合能力, 溶酶体逃逸实验检测 LmNPs 的胞质递送效率, 并通过 Western blot 检测 LmNPs 处理后 IL-2 的蛋白表达情况。

1.3 cExo@LmNPs 制备与理化性质测定

1.3.1 CD161 巨噬细胞外泌体的构建及提取 将表达 CD161 的慢病毒在聚凝胺静电辅助下感染 M1 型巨噬细胞 Raw264.7, 构建稳定表达 CD161 分子的 cRaw264.7 巨噬细胞, 并于 150 mm 培养皿中进行扩大培养。待细胞密度达 80%~95% 时, 收集培养上清液, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\times\text{g}$ 条件下离心 20 min。取上清液与 VEX 外泌体分离试剂按 3:1 体积比混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 垂直静置过夜后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\times\text{g}$ 条件下超速离心 30 min, 收集沉淀, 即为 cRaw264.7 巨噬细胞外泌体 (cExo), 贮存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3.2 cExo@LmNPs 的制备和理化性能测定 将上述外泌体溶于 PBS 溶液, 按照 LmNPs:外泌体质量比为 1:3 的比例加入适量的 LmNPs, 置于 Gene Pulser Xcell 电转系统 (Bio-Rad) 中, 优化电压、脉冲宽度与脉冲次数等参数, 对混合溶液施加电脉冲, 诱导外泌体膜发生可逆性穿孔, 并通过将 LmNPs 与处理后的外泌体共孵育, 以实现 LmNPs 的装载, 从而成功制备 cExo@LmNPs。采用纳米粒度分析仪测定纳米载体的水合粒径和表面电位电势 ($n=3$)。采用荧光显微镜观察 cExo@LmNPs (2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 mRNA 计) 与 GL261 和 BV2 细胞共孵育 0、12、24 h 后的荧光图像, 以评估其细胞摄取及表达效果。将 cExo@LmNPs 分散于 PBS、FBS 和 DMEM 中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 4 天, 通过粒度仪测量其粒径变化 ($n=3$), 评价其在不同溶液环境下的稳定性; 随后将 GL261 细胞接种于 96 孔板中, 当细胞汇合度达到 60%~70% 时加入各组纳米药物, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h, 采用 CCK-8 法检测 LmNPs、Exo@LmNPs 和 cExo@LmNPs 不同浓度条件下的细胞安全性。

1.4 cExo@LmNPs 体外脑胶质母细胞瘤治疗效果测定

1.4.1 体外 cExo@LmNPs 透过血脑屏障性能测定 为评估纳米载体的跨血脑屏障能力, 本研究构建了基于人脑微血管内皮细胞 Bend.3 的体外 BBB 模拟体系。将处于对数生长期的 Bend.3 和 GL261 分别接种

于 Transwell 上室和下室中进行共培养。过夜培养后, 分别将搭载有 *EGFP*-mRNA (2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LmNPs、Exo@LmNPs 和 cExo@LmNPs 加入上室, 通过共聚焦显微镜观察下室 GL261 细胞摄取及表达情况, 并进行统计分析。

1.4.2 体外 cExo@LmNPs 抗肿瘤功能评价 为评估 cExo@LmNPs 等体外抗肿瘤效果, 以小鼠原代 T 细胞、GL261 细胞等为体外研究对象。首先, 将处于对数生长期的 GL261 接种于 24 孔板, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中过夜培养。待细胞汇合度达 50%~60% 时, 分别给予 LmNPs、Exo@LmNPs 和 cExo@LmNPs (2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 mRNA 计) 处理 48 h, 收集细胞上清液, 通过 ELISA 试剂盒检测 IL-2 蛋白表达水平 (各组设置 3 个复孔)。其次, 检测 cExo@LmNPs 等对 T 细胞增殖的促进水平, 即将 T 细胞与活细胞标记探针 eFluorTM 670 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次, 分别给予 LmNPs、Exo@LmNPs 和 cExo@LmNPs (2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 mRNA 计) 处理, 孵育 72 h 后, 收集 T 细胞, 通过流式细胞仪测定 T 细胞中的荧光强度。此外, 将小鼠原代 T 细胞与 GL261 按照 2.5:1、5:1、10:1、20:1 的比例接种至 96 孔板中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中共培养, 分别给予 LmNPs、Exo@LmNPs 以及 cExo@LmNPs (2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 mRNA 计) 处理 48 h, 参照乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒说明书方法, 通过酶标仪测量各孔 450 nm 处的 D 值, 从而测定不同处理组的 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性 (各组设置 3 个复孔)。最后, 进一步评估 cExo@LmNPs 促进 T 细胞激活的潜能, 通过 Transwell 小室建立 T 细胞与 GL261 细胞共培养体系, 将 T 细胞和 GL261 分别接种于小室的上室和下室, 给予含 LmNPs、Exo@LmNPs 和 cExo@LmNPs (2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 以 mRNA 计) 的 DMEM 处理 72 h, 收集培养基上清液, 参照 ELISA MAXTM Deluxe Set Mouse TNF- α 和 ELISA MAXTM Deluxe Set Mouse IFN- γ 试剂盒说明书方法于酶标仪测定各孔 450 nm 处 D 值, 从而测定 TNF- α 和 IFN- γ 水平 (各组设置 3 个复孔)。

1.5 cExo@LmNPs 体内抗肿瘤疗效及安全性评价

1.5.1 cExo@LmNPs 体内生物分布和抗肿瘤效果测定 本研究参照烟台毓璜顶医院伦理委员会的相关制度要求开展体内实验。以 6~8 周 C57BL/6J 雌性小鼠 (济南朋悦实验动物繁育有限公司) 为研究对象, 采用脑立体定位仪建立小鼠原位胶质母细胞瘤

模型,待构建好的小鼠胶质母细胞瘤体积增长至适宜大小开展后续实验。首先,观察cExo@LmNPs等的体内靶向性,以尾静脉注射的方式分别给予等体积的DiR荧光探针标记的LmNPs、Exo@LmNPs、cExo@LmNPs(2.5 mg/kg)处理;随后,通过小动物活体成像系统实时观测cExo@LmNPs等在小鼠体内的生物分布及在肿瘤部位富集情况($n=3$),确定瘤内荧光强度达到峰值的时间点。待观测终点,处死小鼠,分离小鼠心脏、肺、肝、脾、肾及脑组织进行离体成像并进行定量分析,明确cExo@LmNPs等在主要器官及肿瘤组织中的分布特征。

此外,进一步评估cExo@LmNPs等体内治疗效果。以上述小鼠胶质母细胞瘤模型为基础,待肿瘤体积达到实验要求,对小鼠进行随机分组,每组3只,分别给予PBS、LmNPs、Exo@LmNPs、cExo@LmNPs(2.5 mg/kg),每间隔3天处理1次,记录各组小鼠的质量变化等,并通过小动物成像仪,观测小鼠脑部肿瘤体积变化;治疗后,异氟烷麻醉后脱颈处死小鼠,分离小鼠脾脏组织,通过流式细胞术检测并分析各处理组CD4⁺T、CD8⁺T及M1型巨噬细胞比例。

1.5.2 cExo@LmNPs体内的生物安全性评估 为评估cExo@LmNPs等体内生物安全性,首先将小鼠随机分组($n=3$)后,分别给予PBS、LmNPs、Exo@LmNPs、cExo@LmNPs(2.5 mg/kg)处理,分离小鼠血液(眼眶静脉丛采血),测定血常规及肝肾功能关键指标:丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(creatinine, CREA);随后,异氟烷麻醉后脱颈处死小鼠分离主要脏器(心、肝、脾、肺、肾),对不同治疗组取相同部位的组织,经4%多聚甲醛室温固定20 min后进行常规脱水、石蜡包埋,于石蜡切片机上连续切片(厚度约4~5 μm),铺片烤片后按照标准流程进行苏木精-伊红染色,经脱水透明、中性树胶封片,在荧光显微镜下以不同放大倍数观察并比较各组组织形态学改变。通过上述质量、血象、生化及组织病理学结果,对cExo@LmNPs的安全性进行综合评价。

1.6 统计学分析

数据使用GraphPad Prism 8.0软件进行分析。连续变量被表示为均数±标准差,分类变量以百分比

表示。组间比较通过单因素方差分析进行, $P<0.05$ 被设定为具有统计学意义的阈值。

2 结果

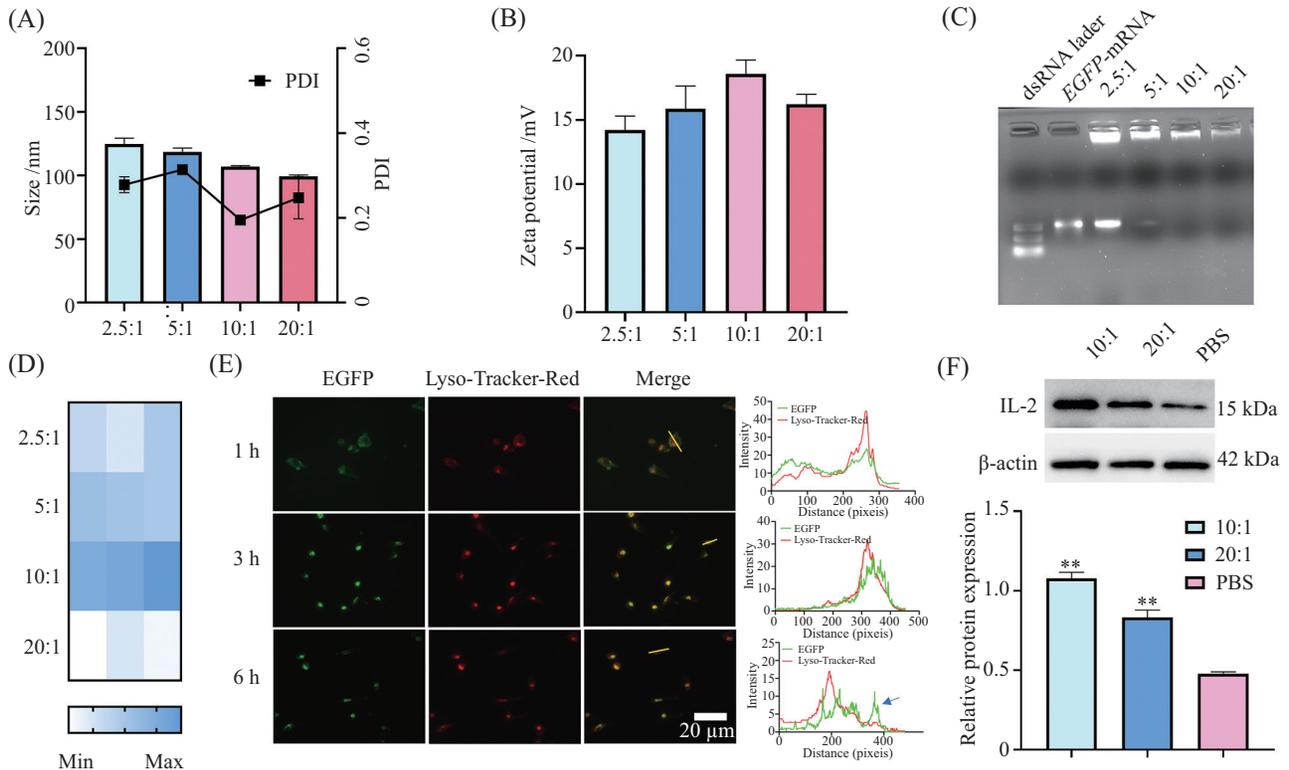
2.1 LmNPs的合成与筛选

本研究通过LmNPs载体来实现IL-2-mRNA的有效递送。首先,通过纳米粒度仪测定不同质量比下LmNPs的水合粒径、PDI及Zeta电位等。结果显示,随着质量比增加,LmNPs的粒径逐渐减小(图2A),电势呈现先升高后降低的趋势(图2B)。为优化基于LmNPs的RNA类药物递送系统,本研究进一步探究了可电离阳离子脂质分子与mRNA的不同质量比(N/P的值)对LmNPs物理特性的影响,核酸电泳结果显示,当质量比为10:1时,EGFP-mRNA已被LmNPs完全封装,未见游离mRNA条带(图2C)。通过萤火虫荧光素酶表达实验测定不同质量比下LmNPs递送mRNA的性能,结果显示,当质量比为10:1时荧光素酶的表达水平显著高于其他组(图2D)。因此,当质量比为10:1时,合成的LmNPs具有最高的mRNA封装效率与递送性能,可作为后续构建仿生递送系统cExo@LmNPs的核心载体,用于后续体内外功能研究。

为深入探讨LmNPs通过细胞内溶酶体屏障的能力,本研究进一步开展了溶酶体共定位实验(图2E)。结果证实,LmNPs表现出优越的溶酶体逃逸能力,能高效地将mRNA货物从降解途径中“解救”并释放至细胞质。随后,通过Western blot测定了IL-2蛋白表达水平,评估了LmNPs将IL-2-mRNA递送至GL261细胞并指导蛋白翻译的能力。实验结果表明,在10:1质量比下制备的LmNPs所介导的蛋白表达水平优于20:1组(图2F),进一步证明该比例在促进mRNA表达方面具有最优性能。综合上述结果,本研究成功构建了具有高效mRNA递送能力的脂质纳米颗粒(LmNPs),并证实了当可电离阳离子脂质分子与mRNA质量比为10:1时,所制备的LmNPs表现出最优的溶酶体逃逸效率与蛋白翻译表达能力,为后续构建功能性递送系统奠定了坚实基础。

2.2 cExo@LmNPs制备与理化性质测定

本研究构建了表达有CD161分子的Raw264.7细胞,通过超速离心法收集其外泌体(cExo)及普通巨噬细胞外泌体(Exo),并通过电穿孔法将预包裹IL-2-mRNA的LmNPs分别与Exo、cExo融合,制



A, B: ALC-0315与mRNA质量比(2.5:1、5:1、10:1、20:1)制备的LNPs的粒径、PDI和Zeta电位; C: ALC-0315与EGFP-mRNA不同质量比合成LmNPs的琼脂糖凝胶电泳; D: 可电离阳离子脂质分子与Luc-mRNA不同质量比合成LmNPs萤火虫荧光素酶的热图分析; E: 不同孵育时间(1、3、6 h)下, LmNPs在GL261细胞中的溶酶体逃逸荧光成像(左)及定位分析(右); GL261细胞核用DAPI荧光标记(蓝色), EGFP信号显示为绿色; F: 通过蛋白质印迹法测定在不同质量比条件下IL-2的表达情况; ** $P < 0.01$, 与PBS组比较。

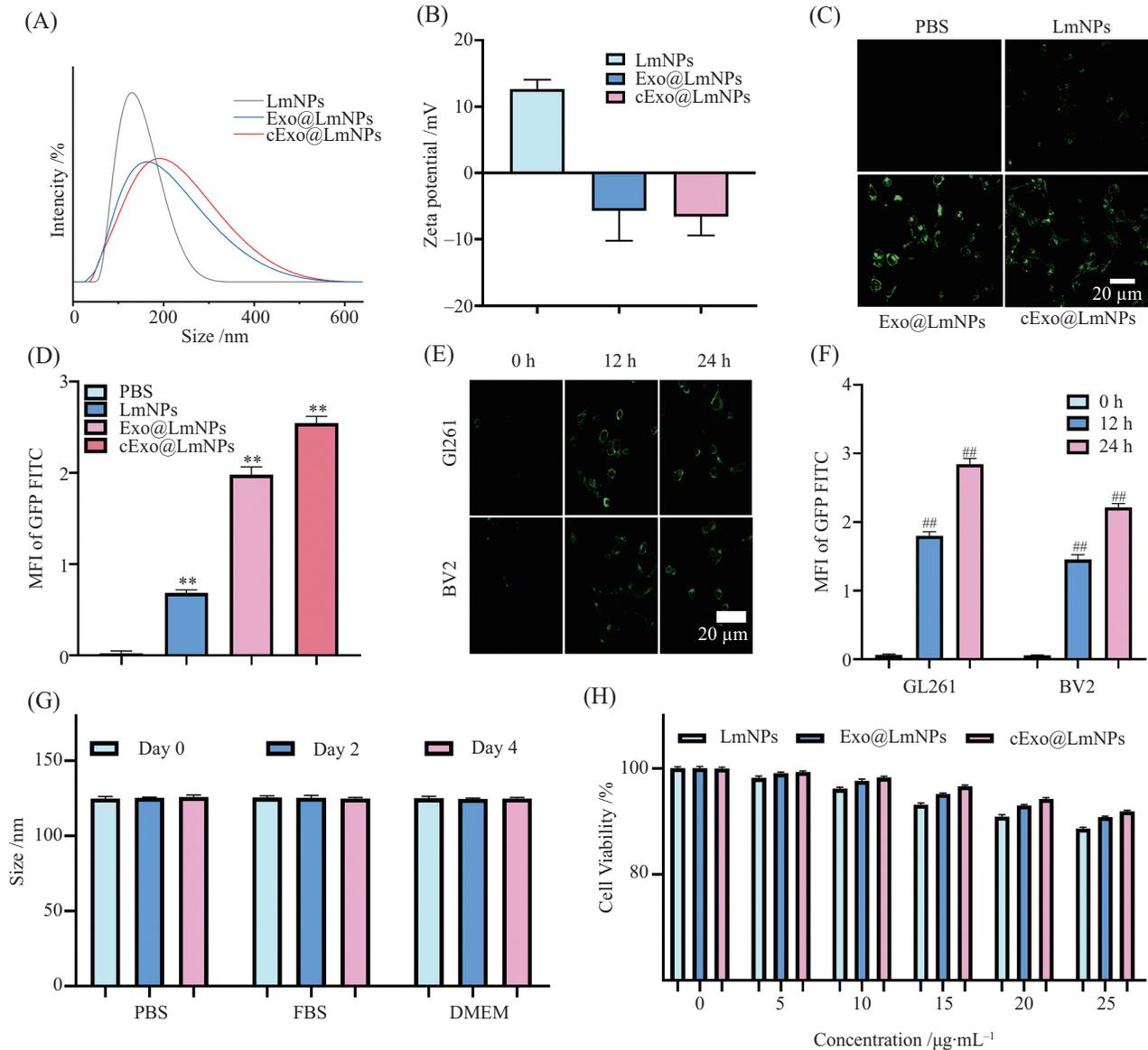
A, B: size, PDI, and zeta potential of LNPs prepared at different mass ratios (2.5:1, 5:1, 10:1, 20:1) of ALC-0315 to mRNA; C: agarose gel electrophoresis of LmNPs synthesized at different mass ratios of ALC-0315 to EGFP-mRNA; D: heatmap analysis of firefly luciferase expression from LmNPs prepared at different mass ratios of ionizable lipid to Luc-mRNA; E: lysosomal escape fluorescence imaging (left) and localization analysis (right) of LmNPs in GL261 cells at different incubation times (1, 3, 6 h); cell nuclei were stained with DAPI (blue), and EGFP signals are shown in green; F: IL-2 expression determined by Western blot at different mass ratios. ** $P < 0.01$ compared with PBS group.

图2 LmNPs的合成与筛选

Fig.2 Synthesis and screening of LmNPs

备了Exo@LmNPs、cExo@LmNPs复合物, 观察并分析到了包裹外泌体后, 纳米颗粒的粒径分别为(145.1±1.4) nm、(157.6±5.3) nm, 略大于未包裹前的粒径(140.3±6.3) nm(图3A)。Zeta电位测量显示LmNPs的表面电荷为(12.6±1.4) mV, 而Exo@LmNPs、cExo@LmNPs的电荷分别为(-5.7±4.5) mV、(-6.6±2.9) mV(图3B), 这种差异可能源于外泌体携带更强的负电荷。为评估cExo@LmNPs穿越内皮屏障并靶向肿瘤细胞的能力, 本研究采用小鼠脑微血管内皮细胞Bend.3与胶质瘤细胞GL261, 通过Transwell小室构建体外血脑屏障模型。结果如图3C和图3D所示, cExo@LmNPs相比对照组表现出更强的跨内皮转运能力, 并能被GL261细胞高效摄取。为深入探究mRNA递送过程, 本研究以EGFP-mRNA为报告基因构建cExo@LmNPs, 并系统分析

其在GL261与BV2细胞中的摄取及表达效率。荧光显微镜观察及定量分析显示, 纳米颗粒的摄取效率呈时间依赖性增强, 胞内荧光强度随孵育时间(0、12、24 h)延长而显著增强, 表明了EGFP-mRNA在细胞内有效蓄积, 初步验证了外泌体修饰对细胞摄取的促进作用(图3E和图3F)。在PBS、FBS及DMEM中孵育0、2与4天后, 纳米颗粒粒径均稳定在约110~120 nm, 随时间及介质变化无显著差异(图3G), 提示其在多种生理相关环境中具有良好的胶体稳定性。CCK-8结果显示, 在0~20 μg/mL浓度范围内, LmNPs、Exo@LmNPs与cExo@LmNPs处理细胞的活力均维持在约90%以上, 未见明显剂量依赖性毒性; 即便在25 μg/mL时细胞活力略有下降, 整体仍处于较高水平(图3H), 表明三种纳米体系具有良好的生物相容性。



A, B: LmNPs、Exo@LmNPs、cExo@LmNPs的水合粒径与Zeta电位; C、D: Transwell小室下腔GL261细胞的荧光图像及定量分析; E、F: 不同孵育时间(0、12、24 h)下, 经cExo@LmNPs处理的GL261细胞和BV2细胞的细胞摄取效率及EGFP-mRNA表达水平; G: cExo@LmNPs在不同溶液中粒径的稳定性; H: CCK-8实验检测LmNPs、Exo@LmNPs和cExo@LmNPs的细胞毒性。^{###} $P < 0.01$, 与0 h组比较; ^{**} $P < 0.01$, 与PBS组比较。A,B: hydrodynamic diameter and zeta potential of LmNPs, Exo@LmNPs, and cExo@LmNPs; C,D: fluorescence images and quantitative analysis of GL261 cells in the lower chamber of the Transwell system; E,F: cellular uptake efficiency and EGFP-mRNA expression levels in GL261 and BV2 cells treated with cExo@LmNPs at different incubation times (0, 12, and 24 h). G: stability of the particle size of cExo@LmNPs in different media; H: cell cytotoxicity of LmNPs, Exo@LmNPs, and cExo@LmNPs determined by the CCK-8 assay. ^{###} $P < 0.01$ compared with 0 h group; ^{**} $P < 0.01$ compared with PBS group.

图3 cExo@LmNPs制备与理化性质测定

Fig.3 Preparation and characterization of cExo@LmNPs

2.3 cExo@LmNPs诱导T细胞功能活化及体外肿瘤细胞杀伤能力评价

白细胞介素-2(IL-2)在免疫调节中起核心作用, 其可促进T细胞增殖与活化^[6]。基于此, 本研究首先评价LmNPs、Exo@LmNPs、cExo@LmNPs体外介导IL-2-mRNA表达的能力。在上述LmNPs、Exo@LmNPs、cExo@LmNPs组中均成功检测到IL-2的表

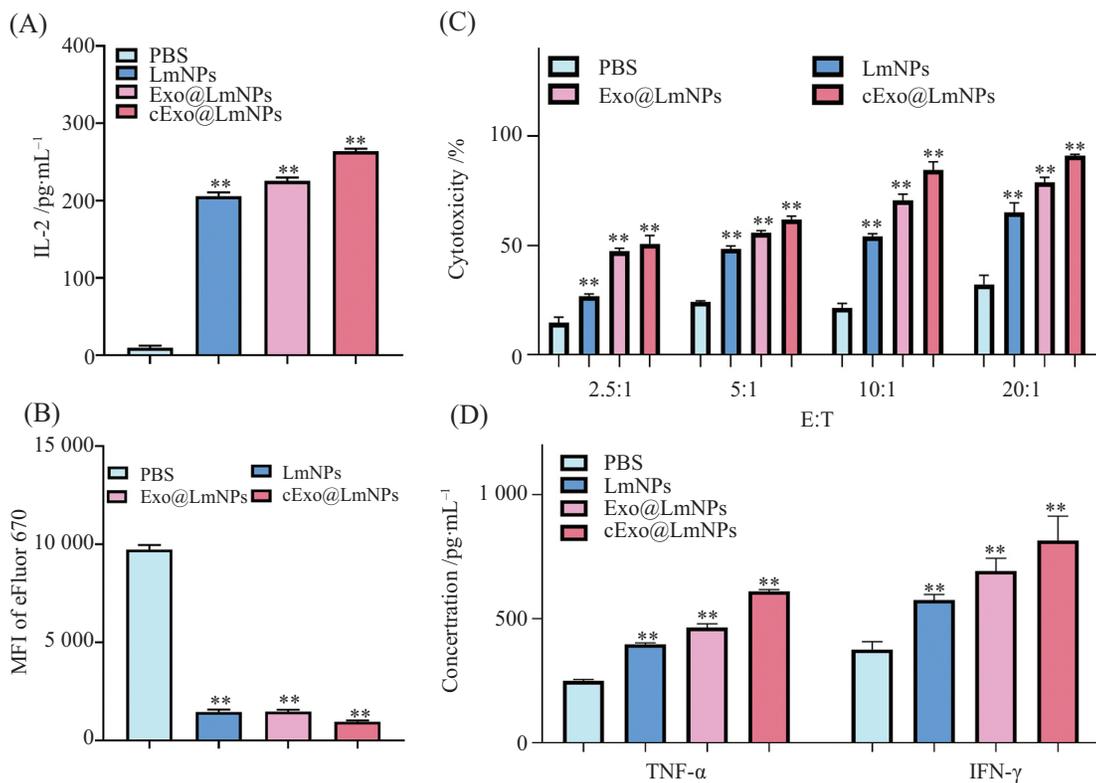
达(图4A), 但cExo@LmNPs组表达水平显著高于其他组; 为验证负载IL-2-mRNA的cExo@LmNPs组表达的功能性IL-2蛋白可有效驱动T细胞增殖, 本研究通过流式细胞术测定各处理组T细胞增殖水平。与对照组相比, cExo@LmNPs处理组T细胞的荧光强度最弱(eFluor670), 表明T细胞增殖数量最多(图4B)。为探究cExo@LmNPs逆转T细胞衰竭和激活

抗原特异性杀伤效应,本研究建立体外共培养体系以模拟肿瘤微环境。通过LDH释放实验评估各处理组T细胞对肿瘤细胞的杀伤效应,在T细胞:GL261的比例为2.5:1时,cExo@LmNPs组呈现出显著的GL261杀伤效果,其杀伤毒性显著高于Exo@LmNPs及LmNPs处理组,并且随着T细胞:GL261值的增加杀伤效果更为明显(图4C)。上述结果表明,cExo@LmNPs表面携带的CD161可能通过阻断免疫抑制性信号,促进T细胞活化而规避耗竭状态。此外,为进一步验证T细胞的免疫功能状态,本研究检测TNF- α 、IFN- γ 关键细胞因子的分泌水平。如图4D所示,cExo@LmNPs处理组的T细胞分泌的TNF- α 与IFN- γ 水平明显高于Exo@LmNPs和LmNPs组。上述结果证实cExo@LmNPs诱导生成的IL-2蛋白和表面CD161蛋白为T细胞提供双重刺激,协同促进T细胞的增殖与活化,从而增强T细胞对肿瘤细胞的杀

伤能力。

2.4 cExo@LmNP体内抗肿瘤效果评价

2.4.1 cExo@LmNP体内生物学分布 基于体外结果表明cExo@LmNP具有跨越内皮屏障并被肿瘤细胞摄取的潜能,本研究进一步利用GL261细胞构建小鼠原位模型,以系统评估cExo@LmNPs在体内的生物分布与肿瘤靶向富集行为。小动物荧光成像及定量分析结果显示(图5A和图5B),Exo@LmNPs组与LmNPs组的荧光强度在6~12 h接近峰值,随后逐渐减弱;其中Exo@LmNPs组的信号强度高于LmNPs组,推测这可能与外泌体所具有的同源靶向特性有关。而cExo@LmNPs组的荧光信号持续增强,并于12~24 h达到最大值,且在肿瘤区域的积累最为显著。注射24 h后处死小鼠,收集心、肝、脾、肺、肾等主要脏器及肿瘤组织,通过离体/体内成像系统进行半定量生物分布分析,进一步验证上述在体观测结果。离



A: ELISA法检测不同纳米药物处理后IL-2浓度; B: 通过流式细胞术检测不同处理对T细胞增殖的影响; C: 通过乳酸脱氢酶(LDH)释放分析法,检测不同处理条件下GL261细胞在不同效应/靶标(E:T)值下的T细胞杀伤活性; D: 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法,分析不同处理后细胞内TNF- α 和IFN- γ 的浓度变化。** $P < 0.01$,与PBS组比较。

A: IL-2 concentrations after treatment with different nanomedicines, as determined by ELISA; B: effects of different treatments on T cell proliferation, measured by flow cytometry; C: cytotoxic T lymphocyte activity against GL261 cells at different effector/target (E:T) ratios under various treatment conditions, assessed by LDH (lactate dehydrogenase) release assay; D: changes in intracellular TNF- α and IFN- γ concentrations after different treatments, analyzed using ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). ** $P < 0.01$ compared with PBS group.

图4 cExo@LmNPs诱导T细胞功能活化及体外肿瘤细胞杀伤能力评价

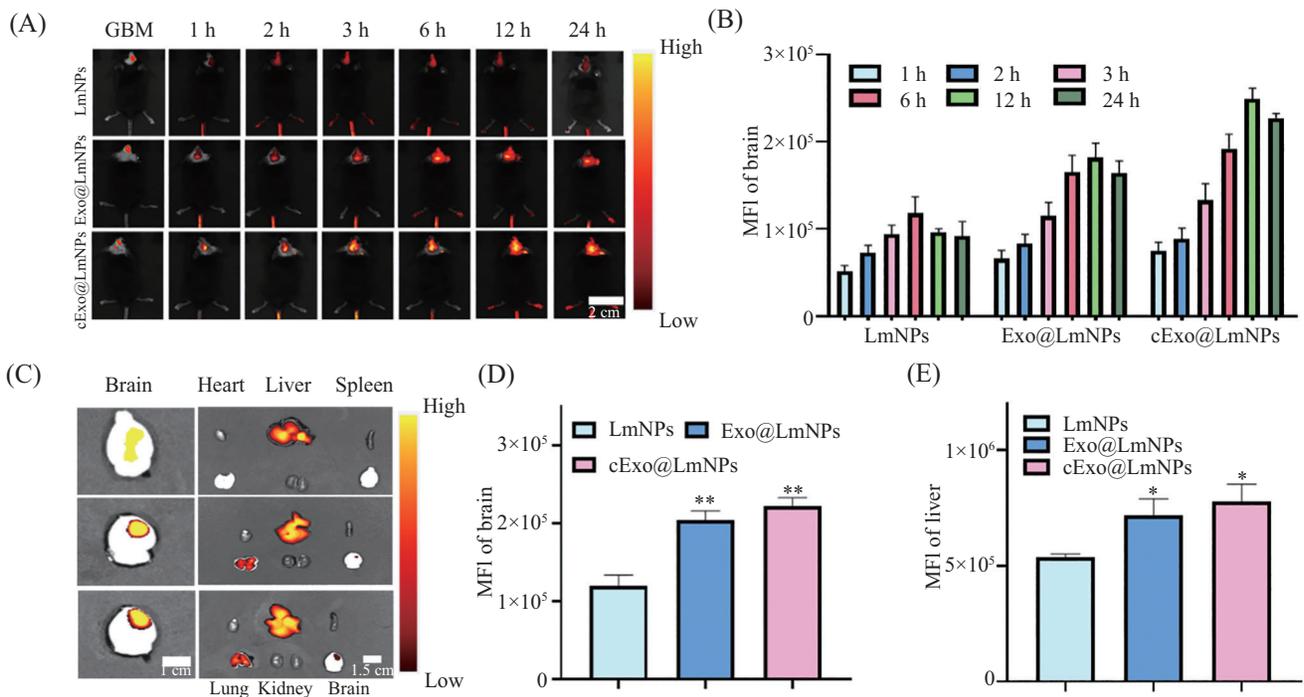
Fig.4 cExo@LmNPs-induced T cell activation and tumor cell killing ability *in vitro*

体成像及荧光定量分析显示cExo@LmNPs组肿瘤组织的NIR-I荧光信号高于其他组(图5C~图5E),这与体内成像结果一致。

2.4.2 cExo@LmNPs体内抗肿瘤效果评价 为评估cExo@LmNPs的体内抗肿瘤疗效,本研究构建了原位胶质母细胞瘤模型(GL261-Luc)。将荷瘤小鼠随机分为4组($n=3$),分别通过尾静脉注射PBS、LmNPs、Exo@LmNPs或cExo@LmNPs进行治疗。通过小动物活体成像仪检测处理组小鼠肿瘤大小(检测肿瘤荧光素酶表达水平)。如图6A所示,与其他对照组相比,cExo@LmNPs组从第7天开始荧光信号逐渐减弱,在第14天时,荧光强度降到最低,且明显低于其他组,表明cExo@LmNPs能有效抑制肿瘤增长。同时,肿瘤组织H&E染色结果(图6B)也证明,与PBS组相比,cExo@LmNPs治疗组肿瘤组织坏死显著,肿瘤细胞表现出明显的病理性变化。随后,探究纳米载体的体内抗肿瘤机制,通过流式细胞术

测定经cExo@LmNPs处理后脾脏组织免疫相关细胞的表达水平。结果(图6C、图6E和图6F)显示,在cExo@LmNPs治疗后,脾脏中CD4⁺T和CD8⁺T表达水平明显高于其他组,且iNOS(M1型巨噬细胞)的表达发生上调,表明该纳米载体不仅可以促进巨噬细胞极化,还可以上调体内调节性和效应性T细胞的表达水平^[13]。

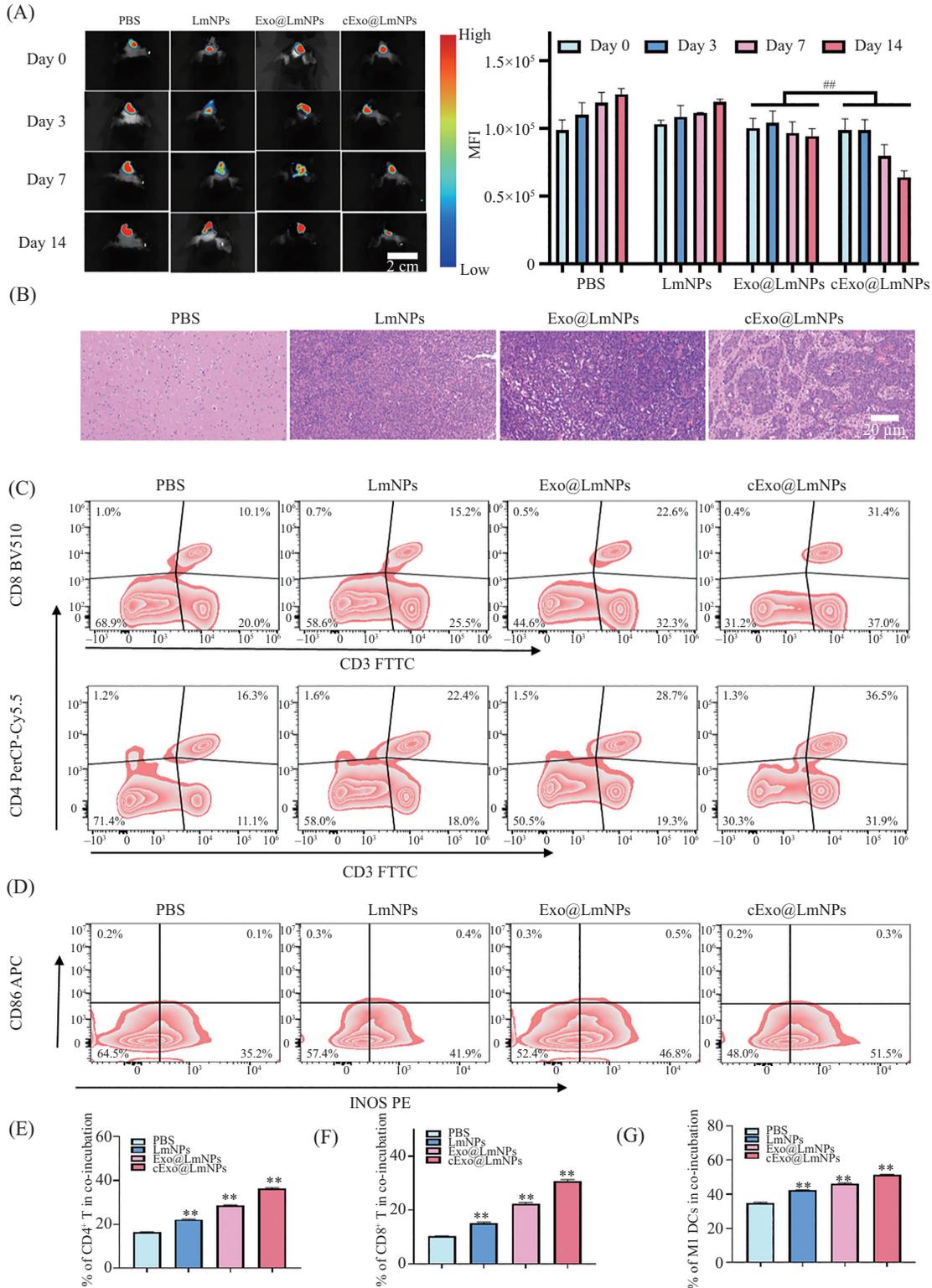
2.4.3 cExo@LmNPs体内安全性评价 纳米药物的生物安全性是其能够在体内应用的决定性因素。如H&E(图7A)结果所示,与对照组相比,cExo@LmNPs组主要脏器(包括心、肝、脾、肺、肾)未见明显形态学改变,证明cExo@LmNPs无明显的毒副作用,具有良好的生物安全性($n=3$)。血常规和生化指标(图7B)也进一步表明,cExo@LmNPs处理后的小鼠与对照组相比无明显的炎症反应,且肝肾功能指标均在正常范围内。上述结果证实,该纳米载体在体内具有良好的生物安全性,为后续的体内应用



A: cExo@LmNP在活体内随时间的生物分布, Exo@LmNPs和LmNPs为对照; B: cExo@LmNP、Exo@LmNPs和LmNPs给药后, GL261荷瘤小鼠肿瘤组织在不同时间点的平均荧光强度; C: 24 h后主要器官及肿瘤离体成像; D: 离体小鼠肿瘤组织的平均荧光强度; E: 离体小鼠肝脏组织的平均荧光强度; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与LmNPs组比较。

A: *in vivo* biodistribution of cExo@LmNPs over time, with Exo@LmNPs and LmNPs as controls; B: mean fluorescence intensity in tumor tissues of GL261 tumor-bearing mice at different time points after administration of cExo@LmNPs, Exo@LmNPs, and LmNPs; C: *ex vivo* imaging of major organs and tumors at 24 hours post-injection; D: mean fluorescence intensity in *ex vivo* tumor tissues; E: mean fluorescence intensity in *ex vivo* liver tissues. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with LmNPs group.

图5 cExo@LmNP纳米药物体内生物学分布
Fig.5 *In vivo* biodistribution of cExo@LmNPs

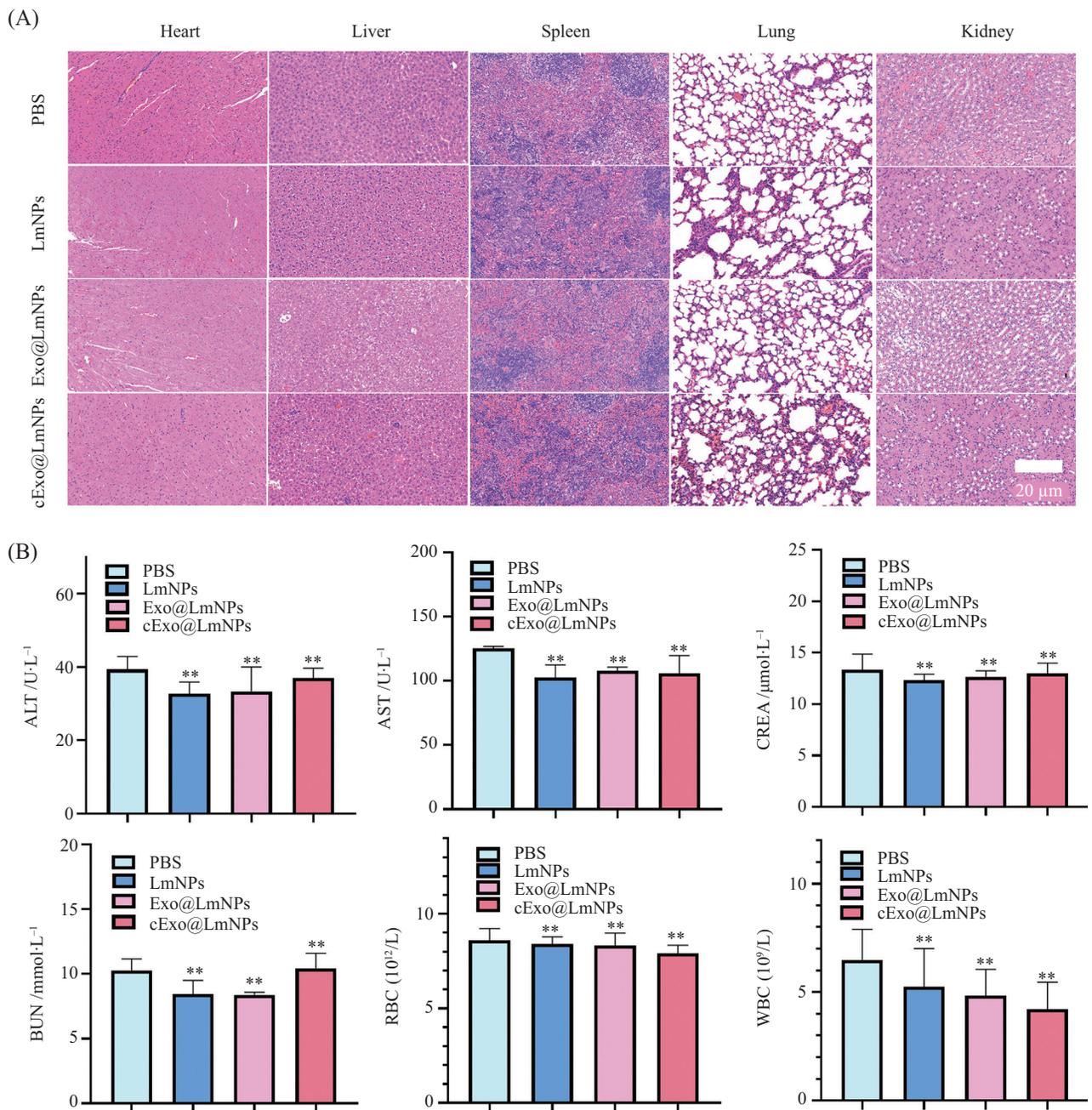


A: 在第0、3、7和14天收集的GL261-Luc GBM小鼠的生物发光图像及定量分析; B: 小鼠肿瘤组织H&E染色; C: 脾组织CD4⁺和CD8⁺ T细胞的流式细胞术分析; D: 脾组织DC细胞的流式细胞术分析; E-G: 脾组织CD4⁺ T、CD8⁺ T和DCs的流式细胞术半定量分析; #*P*<0.01, 与7天组比较; ***P*<0.01, 与PBS组比较。

A: bioluminescence images and quantitative analysis of GL261-Luc glioma-bearing mice on days 0, 3, 7, and 14; B: H&E staining of mouse tumor tissue; C: flow cytometry analysis of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in spleen tissue; D: flow cytometry analysis of DCs (dendritic cells) in spleen tissue; E-G: semi-quantitative analysis of CD4⁺ T cells (E), CD8⁺ T cells (F), and DCs (G) in spleen tissue by flow cytometry. #*P*<0.01 compared with day 7 group. ***P*<0.01 compared with PBS group.

图6 cExo@LmNPs体内抗肿瘤效果评价

Fig.6 *In vivo* antitumor efficacy evaluation of cExo@LmNPs



A: 不同处理组小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏H&E染色图像; B: 通过血常规和血清肝肾功指标评估纳米药物的毒性。ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶; CREA: 肌酐; BUN: 尿素氮; RBC: 红细胞; WBC: 白细胞。** $P < 0.01$, 与PBS组比较。

A: H&E staining images of the heart, liver, spleen, lung, and kidney from different treatment groups; B: toxicity assessment of the nanomedicine via complete blood count and serum liver/kidney function indices. ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; CREA: creatinine; BUN: blood urea nitrogen; RBC: red blood cell; WBC: white blood cell. ** $P < 0.01$ compared with PBS group.

图7 cExo@LmNPs体内生物安全性评价

Fig.7 *In vivo* biocompatibility assessment of cExo@LmNPs

及临床研发奠定了坚实的基础。

3 讨论

胶质母细胞瘤是中枢神经系统常见的原发性恶性肿瘤,其中脑胶质母细胞瘤占比超过50%,患者

5年生存率仅为10%左右。目前GBM的临床标准治疗方案以外科手术切除为主,并辅以替莫唑胺同步化疗及局部放射治疗。然而,这一综合治疗模式仅能为患者提供有限的生存获益,难以实现疾病的根治,绝大多数患者会在治疗后出现肿瘤复发^[4]。若

想突破目前GBM治疗效果不佳的临床困境,则需梳理并攻克制约GBM治疗响应性的关键点。GBM在治疗过程中效果不佳,主要源于血脑屏障的生理性屏障作用及肿瘤微环境的严重免疫抑制状态,二者极大地限制了治疗性药物的治疗效果。因此,若想突破当前GBM的治疗瓶颈,必须从根本上解决“药物如何高效穿透血脑屏障”以及“如何逆转免疫抑制微环境”这两大科学难题。

为了攻克GBM治疗中的难点问题,首先需解决血脑屏障的限制性保护。CUI等^[15]设计了一种由免疫细胞外泌体装载自组装纳米胶束的递送系统,该体系利用外泌体的天然归巢能力,可有效穿越血脑屏障,并在胶质瘤部位实现化疗-免疫协同治疗。SONG等^[16]设计了一种递送雷帕霉素的外泌体载药系统,该体系不仅利用外泌体作为载体有效穿越血脑屏障,更通过其递送的雷帕霉素抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号轴,从而协同提高屏障通透性并抑制胶质瘤进展。上述研究成果为本研究方案的设计奠定了坚实基础,并提供了关键启示。本研究设计合成了一种新型基因递送载体, cExo@LmNPs, 其外层修饰的M1型巨噬细胞外泌体所表达的CD161不仅能够特异性识别脑微血管内皮细胞及胶质瘤细胞上高表达的凝集素样分子-1(lectin-like transcript-1, LLT-1), 利用“钥匙与锁”相互作用以增强载体的精准靶向能力,可穿透血脑屏障后优先富集于肿瘤部位,还能解除对T细胞的免疫抑制,恢复耗竭T细胞的功能。

GBM治疗响应差的另一关键难点是严重抑制性免疫微环境,为肿瘤的恶性增殖提供了“土壤”。GBM局部高度复杂肿瘤微环境中多重因素极大地限制了瘤内T细胞等效应性免疫细胞的数量及功能,导致了多种免疫治疗策略在GBM治疗中效果不佳。为了解决这一难题, WANG等^[17]开发了基于抗体导向的IL-2前体药物系统,实现了IL-2在肿瘤部位的精准递送与活化,有效促进了CD8⁺ T细胞的增殖并逆转其功能耗竭,重塑了肿瘤免疫微环境。SHIMIZU等^[18]利用CD122偏向性IL-2/抗IL-2抗体复合物联合癌症疫苗,该策略通过促进CD8⁺ T细胞增殖并诱导其分化为干细胞样效应细胞,从而显著增强T细胞功能并改善肿瘤免疫微环境。尽管上述IL-2相关策略在激活抗肿瘤免疫方面取得了一定成效,但仍面临一系列瓶颈问题,这限制了其临床转化潜力。一

方面, IL-2全身给药后半衰期极短,难以在肿瘤部位达到有效浓度;另一方面,为追求疗效而增加剂量则会引发血管渗漏综合征等严重全身性毒副作用,且IL-2蛋白难以穿越血脑屏障,使其对胶质母细胞瘤的治疗效果尤为有限。基于此,为克服外源性IL-2蛋白疗法的局限性,本研究提出了一种基于cExo@LmNPs的mRNA递送新策略。该系统以内含优化脂质纳米颗粒(LNP)为核心,借助关键组分ALC-0315实现mRNA的高效包封与保护,并在内涵体酸性环境下通过质子化作用触发溶酶体逃逸,从而确保IL-2-mRNA在胞质内成功翻译为功能性蛋白,实现IL-2在肿瘤部位的“原位生成、按需释放”。该策略不仅有效规避外源性IL-2蛋白的系统性毒性与血脑屏障穿透难题,更通过局部、持续的IL-2表达,成功将免疫抑制性的“冷”肿瘤逆转为T细胞高度浸润的“热”肿瘤,为联合免疫检查点抑制剂治疗创造了有利的微环境条件。

综上所述,本研究结果证实, cExo@LmNPs在治疗胶质母细胞瘤方面具有巨大的潜力,这表明外泌体介导的mRNA递送策略或可应用于中枢神经系统疾病治疗领域。该策略将生物靶向载体的精准性与mRNA技术的灵活性和高效性融为一体,为实现GBM的高效、低毒免疫治疗提供了坚实的理论依据、可靠的实验数据支持和富有创新性的技术路径,为后续的临床转化应用创建了条件。

参考文献 (References)

- [1] APPIDI T, CHINA D, ŞTEFAN G R, et al. Engineered multifunctional nanoparticles for enhanced radiation therapy: three-in-one approach for cancer treatment [J]. *Mol Cancer*, 2025, 24(1): 68.
- [2] LENA R, ALEKSANDRA M, CHARLES A, et al. Crispr/Cas9-induced knockout reveals the role of ABCB1 in the response to temozolomide, carmustine and lomustine in glioblastoma multiforme [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 185: 106510.
- [3] CHEN Y, YANG M Y. Enhancing glioblastoma treatment with molybdenum disulfide (MoS₂) nanomaterials and ultrasound-triggered tumor growth inhibition [J]. *Neuro Oncol*, 2024, 26(Supplement_8): viii126.
- [4] RAHMAN A M, JALOULI M, YADAB K M, et al. Progress in drug delivery systems based on nanoparticles for improved glioblastoma therapy: addressing challenges and investigating opportunities [J]. *Cancers*, 2025, 17(4): 701.
- [5] DAIRAN Z, ZHENYU G, DEJUN W, et al. Harnessing immunotherapy for brain metastases: insights into tumor-brain microenvironment interactions and emerging treatment modalities [J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16(1): 121.

- [6] ROSMELY H, JANIKA P, KATHRYN M L, et al. Engineering IL-2 for immunotherapy of autoimmunity and cancer [J]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(10): 614-28.
- [7] XIE Y, YANG F, HE L Q, et al. Single-cell dissection of the human blood-brain barrier and glioma blood-tumor barrier [J]. *Neuron*, 2024, 112(18): 3089-105, e7.
- [8] LEI D, YINI Z, HAOGUO Z, et al. Open-source throttling of CD8⁺ T cells in brain with low-intensity focused ultrasound-guided sequential delivery of CXCL10, IL-2, and aPD-L1 for glioblastoma immunotherapy [J]. *Adv Mater*, 2024, 36(44): e2407235.
- [9] RONJA M, LUTZ J, RANDI KRISTINA F, et al. 22P Pre-clinical development of CVGBM: a therapeutic mRNA-based multi-epitope vaccine for glioblastoma [J]. *Ann Oncol*, 2024, 35: S221-S22.
- [10] XUE Y, HOU X C, ZHONG Y C, et al. LNP-RNA-mediated antigen presentation leverages SARS-CoV-2-specific immunity for cancer treatment [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 2198.
- [11] CAROLE F, MARION M R, VALENTIN D, et al. Nanostructured lipid carriers based mRNA vaccine leads to a T cell-inflamed tumour microenvironment favourable for improving PD-1/PD-L1 blocking therapy and long-term immunity in a cold tumour model [J]. *EBioMedicine*, 2025, 112: 105543.
- [12] SUN W W, HUANG S Y, SUN Z H, et al. Exosome platform with three-in-one functionality of mRNA therapy, immune checkpoint blockade, and mild photothermal therapy for the treatment of triple-negative breast cancer [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2025, 17(7): 10328-41.
- [13] WANG X J, DING H, LI Z Y, et al. Exploration and functionalization of M1-macrophage extracellular vesicles for effective accumulation in glioblastoma and strong synergistic therapeutic effects [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 74.
- [14] CECILIA M, PINELOPI G, ANDREW H. Procurebazine, lomustine, vincristine for the second line treatment of glioblastoma multiforme [J]. *Neuro Oncol*, 2023, 25(Supplement_3): iii17-iii18.
- [15] CUI J W, WANG X, LI J G, et al. Immune exosomes loading self-assembled nanomicelles traverse the blood-brain barrier for chemo-immunotherapy against glioblastoma [J]. *ACS Nano*, 2023, 17(2): 1464-84.
- [16] SONG L L, TANG Y, QU Y Q, et al. Exosomal delivery of rapamycin modulates blood-brain barrier penetration and VEGF axis in glioblastoma [J]. *J Control Release*, 2025, 381: 113605.
- [17] WANG X, LIU L C, YUE T, et al. Targeting tumor microenvironment with antibody-guided IL-2 pro-cytokine promotes and rejuvenates dysfunctional CD8⁺ T cells [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 268.
- [18] KANAKO S, SHOGO U, MASAMI K, et al. Combination of cancer vaccine with CD122-biased IL-2/anti-IL-2 Ab complex shapes the stem-like effector NK and CD8⁺ T cells against tumor [J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11(7): e006409.