



植物病毒纳米颗粒在医学领域中的应用

杜志游, 周昀茜, 董温昕

(浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018)

摘要: 植物病毒粒子作为纳米级颗粒, 具有在植物细胞内积累水平高、再生成本低、纯化工艺简单及对人体安全等优点, 是一种理想的天然纳米材料。随着生物纳米技术的发展, 植物病毒纳米颗粒在医学领域展现出越来越大的应用潜力, 本文围绕靶向传递药物、分子成像和疫苗制备综述了植物病毒纳米颗粒在医学领域的研究进展和应用。

关键词: 植物病毒; 纳米颗粒; 成像; 疫苗; 药物传递

中图分类号: S432.41

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2022) 01-0109-06

Application of plant virus nanoparticles in tumor therapy

DU Zhiyou, ZHOU Yunqian, DONG Wenxin

(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Plant viruses, as nanoscale particles, are ideal natural nanomaterials with the advantages of high accumulation level in plant cells, low regeneration cost, simple purification process and safety to human body. With the development of biological nanotechnology, plant virus nanoparticles have shown increasing application potential in the medical field. In this paper, we will review the research progress and application of plant virus nanoparticles in the medical field from three aspects: targeted drug delivery, molecular imaging and vaccine preparation.

Key words: plant virus; nanoparticles; imaging; vaccine; drug delivery

0 引言

近年来, 可用于癌症治疗的各种能够输送药物的纳米载体在医学应用中备受关注, 相较于传统的药物递送平台, 纳米载体具有较大比表面积而容纳更多药物或标记物, 并可通过修饰连接特殊配体来增强其靶向性。目前有多种人工合成纳米载体, 如, 合成聚合物、脂类、碳纳米管等^[1-2]在载药量、靶向传递能力、稳定性等方面各有优缺点, 考虑到毒性和对环境的影响, 目前研究者们更多地集中在一些天然的纳米载体材料上, 如, 噬菌体 MS2、小型热休克蛋白、铁蛋白和病毒纳米颗粒 (Viral nanoparticles,

VNPs) 等^[3-5]。自然界中病毒, 具有纳米级大小、高度对称三维蛋白结构、良好生物相容性和水溶性、可进行各种遗传/化学修饰等优点, 在医学领域有着巨大应用潜力。来源于植物的病毒不会感染人畜, 相比较于动物病毒更加安全^[6]。本文将主要从靶向传递药物、分子成像和疫苗制备 3 个方面, 综述植物病毒纳米颗粒在医学领域的研究进展。

1 在靶向传递药物方面的应用

相比较于口服, 利用纳米载体输送药物能提高药物分子的局部浓度, 减少药物吸收时的损失^[6]。植物病毒粒子作为纳米材料, 可以连接或包埋药物,

用于疾病的治疗。Shriver 等^[12]以豇豆花叶病毒(*Cowpea mosaic virus*, CPMV)为载体,成功向受损中枢神经系统递送治疗药物。递送药物时,载体在体内循环时间越长,药物在靶向组织中积累量越高^[13],而载体在体内滞留时间与载体表面所带电荷以及表面是否修饰有关^[14]。运输药物的载体多为小分子纳米材料,但带有负电荷的纳米载体在体内半衰期短^[3, 15]。聚乙二醇修饰,不仅能够增加纳米载体的稳定性和溶解度,还能减少纳米载体与体内蛋白或细胞相互作用,使得其在生物体内的半衰期提高、稳定性增加和免疫原性降低^[16]。基于马铃薯 X 病毒(*Potato virus X*, PVX)和 CPMV 制备的病毒样粒子经聚乙二醇修饰后降低免疫原性;经动物实验证实,修饰后病毒粒子在小鼠的肿瘤部位渗透更强、积累更多,更有利于抗癌药物的递送和成像^[17]。

肿瘤细胞表面蛋白可作为标记物,用于区分肿瘤与正常组织^[8-10]。植物 VNP 连接上肿瘤标记物后再运输药物可直接靶向肿瘤而不影响其他正常组织,如 F56 肽能与血管表皮生长因子受体 1 (Vascular epithelial growth factor receptor, VEGFR-1)特异性结合,在移植有人类结肠癌细胞的小鼠模型中,表达 F56 肽的 CPMV 纳米颗粒能够靶向于高表达 VEGFR-1 的肿瘤细胞^[11],在一定程度上减少了药物的副作用。

植物病毒纳米颗粒外壳蛋白(Coat protein, CP)中有许多裸露氨基酸残基,如,赖氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸和谷氨酸等,可通过化学修饰方法与抗体、寡核苷酸、药物或其他小分子进行连接^[18-19],从而使病毒粒子功能化。Wang 等^[20]通过 N-羧基琥珀酰亚胺酯(N-hydroxysuccinimide ester)将荧光素或生物素结合在 CPMV 表面,使得 CPMV 能用于成像或定位。在各种形态的植物病毒中,二十面体的植物病毒粒子具有较大的内部空间,是目前研究最多的用于装载小分子物质的载体^[21]。通过改变溶液的金属离子浓度和 pH 值,二十面体植物病毒 CP 的间隙逐渐增大^[22],药物通过孔隙扩散到病毒内部,逆转条件,CP 的间隙重新缩小,最终将药物封装在内。Ren 等^[21]以二十面体木槿褪绿斑驳病毒(*Hibiscus chlorotic ringspot virus*, HCRSV)为载体封装抗癌药物阿齐霉素,制备成直径约 30 nm 的蛋白笼,并在病毒粒子的表面连接上叶酸,赋予其靶向肿瘤的能力,改造后的 HCRSV 能将更多的药物输送到肿瘤部位,增强疾病治疗效果。黄瓜花叶病

毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)^[23]、CPMV^[24]、红三叶坏死花叶病毒(*Red clover necrotic mosaic virus*, RCNMV)^[25]等也被证实能够随着 pH 值变化而改变病毒粒子构象,从而将相关药物封装于内部。除了通过改变 pH 值改变植物 VNP 构象外,一些药物还可以与植物 VNP 内表面的带电荷氨基酸残基,或腔内带负电荷的核酸,通过静电相互作用被包封在植物 VNP 的内腔^[7, 26]。病毒 CP 中部分带电荷氨基酸残基对核酸有较强亲和性,能够稳定包裹遗传物质,具有传递基因药物的潜力^[27]。豇豆褪绿斑驳病毒(*Cowpea chlorotic mottle virus*, CCMV)已被证实可高效地自发封装许多长单链 RNA,并将其在相应位置释放^[28]。Azizgolshani 等^[28]研究发现,CCMV 的 CP 与异源 RNA 体外自组装而成的杂合病毒颗粒,能够在哺乳动物细胞的胞质中释放异源 RNA。植物 VNP 的 CP 作为坚固的外部支架,能够保护其封装的基因药物不受核酸酶降解的影响,且具有进一步功能化和细胞靶向的可能,为相关疾病的基因治疗提供了可行的方案。

2 在成像方面的应用

修饰方法的多样性和精确装配的优势使得植物 VNP 能够用于制备成像探针。目前,植物 VNP 已被用于光学成像、磁共振成像(Magnetic resonance imaging, MRI)和正电子发射断层扫描^[29]。在成像过程中,清除携带成像试剂的载体滞留组织所引起的毒性至关重要,与一些需要数月才能清除的合成纳米材料(碳纳米管、金颗粒和二氧化硅)相比,植物病毒纳米颗粒易从体内清除,且半衰期短,大大降低了纳米载体滞留对机体产生的毒性^[13]。荧光成像是目前肿瘤评估的重要方式,荧光剂可以通过生物偶联、基因工程和自组装等方式整合到植物病毒 CP 上^[29]。在使用流式细胞术研究细胞特异性颗粒摄取、通过共聚焦显微镜观察颗粒定位以及通过体内成像确定生物分布的过程中,荧光展现出至关重要的作用^[30]。CPMV 连接荧光分子 Oregon green-488 制备而成的病毒荧光探针可用于检测 CPMV 在活体小鼠体内的循环路径,口服数天后,可在小鼠体内的肾、肺、胃、空肠、回肠和大脑等组织检测到 CPMV,且从小鼠组织中回收的病毒纳米颗粒结构并未受到破坏^[31]。在烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)纳米颗粒 CP 的内表面连接近红外荧光染料和镝(Dy^{3+}),外表面连接天冬氨酸-

甘氨酸-谷氨酸-丙氨酸, 制备的纳米颗粒具有良好生物相容性和较低细胞毒性, 在体内和体外都能够靶向前列腺癌细胞 PC-3^[32], 为植物病毒用于癌细胞的检测提供了可行性。

活体血管成像是一种强大的工具, 可用于无创检测和可视化疾病。常用的成像试剂载体有纳米球^[33]、氧化铁颗粒^[34]和脂质体^[35]等, 但存在稳定性、毒性或生物利用度等缺陷, 且分辨率和穿透深度还有待提升。植物 VNPs 表面有多个化学试剂反应位点, 且具有良好的生物相容性和惰性, 使得植物 VNPs 成为一种优良的荧光染料多价展示平台。植物 VNPs 能与血管内皮细胞表面的蛋白相互作用^[7, 36], 可用于标记血管, 进而用于生物体内部组织的成像。高密度偶联荧光染料的 CPMV 可以在鸡胚和活鼠中显示血管系统和血流, 深度可达 500 μm , 持续时间长达 72 h, 分辨率优于类似大小的荧光纳米球^[31], 荧光标记 CPMV 还能可视化人纤维肉瘤导致的肿瘤血管^[31]。植物 VNPs 直径大多在 5~100 nm 之间, 具有较大的比表面积, 能够承载数以百计的钆离子, 刚性分子结构和较大的扭转系数使得植物 VNPs 能够提供很高的弛豫度, 因此, 植物 VNPs 表面经钆离子修饰后, 可用于制备 MRI 造影剂^[37-38]。

3 在疫苗制备方面的应用

3.1 肿瘤疫苗

肿瘤疫苗是指通过表达特异性的、有免疫原性的肿瘤抗原, 在细胞因子、趋化因子等佐剂的辅助下, 激活或加强患者自身的免疫系统, 进而杀伤、清除肿瘤细胞; 与化疗相比, 肿瘤疫苗具有副作用小、避免耐药性和诱导长期免疫等优点, 是近年的研究热点之一^[37]。2010 年 4 月, 美国食品药品监督管理局 (Food and drug administration, FDA) 批准 Provenge/sipuleucel-T 用于治疗晚期前列腺癌, Provenge/sipuleucel-T 是世界上第一个依靠自体主动免疫的治疗性癌症疫苗, 为其他同类产品的研发铺平了道路^[38]。

3.1.1 多肽疫苗

在过去的二十年中, 植物 VNPs 作为外源多肽和蛋白表达载体的研究正逐渐兴起。植物 VNPs, 尤其是来自 CPMV 或 TMV 的纳米颗粒有望成为多肽疫苗研发的平台^[39-40]。多个抗原分子有序排列可有效调控免疫细胞的活性, 进而诱导机体产生特异性免疫反应, 无包膜植物 VNPs 的 CP 亚单位在

三维空间上排列规则而有序, 能够在纳米尺度上精确的展示和排列功能性结构单元, 使植物 VNPs 成为抗原和/或半抗原的理想表达载体^[40-41]。

植物 VNPs 可通过化学交联剂与多肽或完整的蛋白质抗原相连接, 交联剂与植物 VNPs 表面的反应性基团特异性结合, 从而将连接的抗原展示在病毒颗粒表面^[41], 该方法对抗原表位的大小没有限制, 且可进行多价展示, 将多种不同的抗原表位同时暴露在一个病毒颗粒的表面^[42]。目前已有多种螺旋状的植物病毒通过化学连接的方式在表面展示外源多肽, 如 Shukla 等^[43]将来源于人表皮生长因子受体 2 (Human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 胞外结构域的 P4 肽与 PVX 连接, 制备成 HER2 疫苗, 该疫苗免疫小鼠后能检测到 HER2 特异性抗体, 克服机体对 HER2 的免疫耐受, 有望应用于乳腺癌的预防和治疗。

3.1.2 基因工程疫苗

将编码外源多肽的基因插入植物病毒 CP 的基因中形成融合基因, 使植物病毒在自组装过程中能够将外源多肽暴露于颗粒表面, 制成针对特定抗原的疫苗^[44-45]。抗原与 CP 融合可克服小分子抗原肽单独作为抗原时免疫原性较弱的缺点, 且表达的蛋白质或多肽更易被人体的免疫系统识别, 诱发有效而持久的体液免疫和细胞免疫^[41-42]。由于病毒基因组相对较小, 易于在分子水平上进行操作, 且病毒感染植物比稳定转化的植物再生更加简单和快速, 因此可利用宿主细胞大量地扩增插入病毒基因组和外源多肽基因的载体的序列, 实现目标产物的高表达^[40]。Chatterji 等^[46]将来源于人类免疫缺陷病毒 1 (Human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 抗原决定簇展示在 CPMV 的外表面, 改造后的 CPMV 制剂注入小鼠体内后能够诱导小鼠产生抗体。该疫苗制备方法也存在不足之处, 如插入序列的基因大小具有限制性。

3.2 原位疫苗

近年来, 越来越多的研究证实免疫系统在控制癌症发展过程中的重要性, 直接将药物靶向免疫细胞以减少副作用的可能性^[47]。癌症免疫疗法拥有两种机制, 一是阻断免疫抑制靶点, 二是激活免疫靶点, 目前已开发出针对检查点的抑制剂 (PD-1/CTLA-4) 和免疫刺激细胞因子^[48-49]。由于肿瘤的复杂性, 通常需要联合使用多种治疗方法, 以达到最佳的治疗效果; 给予外源免疫调节剂仅针对癌症免疫周期的特定步骤, 缺乏肿瘤特异性, 可能导致严重

的免疫副作用^[50]。为了寻求更安全的方法,研究者提出了原位疫苗的概念,原位疫苗通常是一种免疫刺激佐剂,直接注射至已确定的肿瘤部位或其转移部位,能够将肿瘤微环境(Tumor microenvironment, TME)从免疫抑制表型重新编程为刺激表型,从而激发机体的抗肿瘤免疫^[50]。原位疫苗不需要携带抗原、药物或者其他免疫刺激物,易于操作,成本较低,相较于其他种类的疫苗更具有优势。

植物病毒对人体安全,与动物病毒相比,更加适合于制备原位疫苗。目前已证实,CPMV^[51]、线状番木瓜花叶病毒(*Papaya mosaic virus*, PapMV)^[52]、TMV^[50]和PVX^[53]作为原位疫苗注入TME后,可诱导机体重新启动或增强抗肿瘤免疫。PapMV的抗肿瘤免疫效果是基于病毒包封的RNA对相关的Toll样受体(Toll-like receptors, TLR)的刺激^[53];PVX和TMV的抗肿瘤免疫刺激则是来源于表面重复的CP亚单位对相应受体的刺激^[50, 53]。研究表明,去除核酸的CPMV与完整的CPMV病毒粒子具有相同的抗肿瘤效果,但PapMV的抗肿瘤效果又依赖于包封的RNA^[51],因此,需要做更多的工作来明确植物病毒的核酸在刺激抗肿瘤免疫中究竟发挥着什么作用。不同植物病毒制备而成的原位疫苗注射入肿瘤后激发机体抗肿瘤反应的机制各不相同,了解其免疫激活的复杂差异和潜在机制将会为原位疫苗的开发奠定基础。

植物病毒外表高度重复的蛋白结构,易被免疫细胞识别^[29];且病毒天然的宿主是植物,在叶片组织中拥有较高的浓度,因此,除了常规的注射疫苗外,受改造病毒侵染的食用植物后有望进一步开发成口服疫苗。已有报道表明,植物病毒经口服给药后能够抵御胃部的酸性环境,易被转移至肠道,吸收进入血液循环系统^[55],通过口服途径接种疫苗可以刺激黏膜和全身免疫,给机体以更高水平的保护^[43]。

4 总 结

植物病毒作为一种天然的纳米材料,可以靶向传递药物,易生物降解,对人体安全,便于修饰和改造,在医学领域有着巨大的应用潜力。植物病毒在植物细胞内高水平积累,再生成本低,纯化工艺简单,对于发展中国家而言,是生产安全廉价疫苗的良好选择^[56]。

植物病毒具有穿透实体肿瘤的能力,在应用于

肿瘤治疗的各种纳米载体中有着巨大的优势。药物可以修饰在植物病毒的表面或包封于内腔,靶向疾病部位后能够提高药物的局部浓度,达到增强疗效和延长半衰期的效果。植物病毒还能通过基因修饰或化学连接的方式在CP上展示肿瘤抗原,通过修饰加上配体,则能制备成靶向性更强的肿瘤疫苗,更好地激发机体抗肿瘤免疫。多种植物VNPs和缺乏遗传物质的病毒样颗粒已被证实能在多种肿瘤模型下诱发强大的局部免疫,不同形态的植物VNPs会引发不同类型的免疫反应,因此,深入研究不同植物VNPs激活免疫的分子机制,明确其作用途径和靶点,挑选出最有效的植物病毒种类,使得该技术从实验室研究到临床应用转化成为可能。此外,植物病毒还能连接荧光物质,用于制备成像试剂。

综上所述,植物VNPs有着诸多优势,在医学领域有着广泛的应用前景,目前,植物VNPs在药物靶向治疗和分子成像领域已有较多研究,但在疫苗领域还处于早期探索阶段,需要进一步研究来推动纳米疫苗的制备。

参考文献:

- [1] Afrooz H, Ahmadi F, Fallahzadeh F, et al. Design and characterization of paclitaxel-verapamil co-encapsulated PLGA nanoparticles; potential system for overcoming P-glycoprotein mediated MDR [J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2017, 41: 174-181.
- [2] Cho K J, Wang X, Nie S M, et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer [J]. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14(5): 1310-1316.
- [3] Kaiser C R, Flenniken M L, Gillitzer E, et al. Biodistribution studies of protein cage nanoparticles demonstrate broad tissue distribution and rapid clearance in vivo [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2007, 2(4): 715-733.
- [4] Le D H T, Lee K L, Shukla S, et al. Potato virus X, a filamentous plant viral nanoparticle for doxorubicin delivery in cancer therapy [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(6): 2348-2357.
- [5] Czapar A E, Zheng Y R, Riddell I A, et al. Tobacco mosaic virus delivery of phenanthriplatin for cancer therapy [J]. *Acs Nano*, 2016, 10(4): 4119-4126.
- [6] 李凯, 张金玲, 王倩, 等. 病毒纳米颗粒在医学领域的潜在应用 [J]. *生物医学工程杂志*, 2014, 31(3): 718-722.
- [7] Alemzadeh E, Dehshahri A, Izadpanah K, et al. Plant virus nanoparticles: novel and robust nanocarriers for

- drug delivery and imaging[J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2018, 167: 20-27.
- [8] Allen T M, Cullis P R. Drug delivery systems: entering the mainstream[J]. *Science*, 2004, 303(5665): 1818-1822.
- [9] Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness[J]. *The American Journal of Pathology*, 2000, 156(4): 1363-1380.
- [10] Maeda H, Wu J, Sawa T, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review [J]. *Journal of Controlled Release*, 2000, 65(1/2): 271-284.
- [11] Steinmetz N F, Ablack A L, Hickey J L, et al. Intravital imaging of human prostate cancer using viral nanoparticles targeted to gastrin-releasing peptide receptors[J]. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 2011, 7(12): 1664-1672.
- [12] Shriver L P, Koudelka K J, Manchester M. Viral nanoparticles associate with regions of inflammation and blood brain barrier disruption during CNS infection [J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2009, 211(1/2): 66-72.
- [13] Steinmetz N F. Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices[J]. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 2010, 6(5): 634-641.
- [14] Li S D, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2008, 5(4): 496-504.
- [15] Singh P, Prasuhn D, Yeh R M, et al. Bio-distribution, toxicity and pathology of cowpea mosaic virus nanoparticles in vivo[J]. *Journal of Controlled Release*, 2007, 120(1/2): 41-50.
- [16] Masarapu H, Patel B K, Chariou P L, et al. Physalis mottle virus-like particles as nanocarriers for imaging reagents and drugs[J]. *Biomacromolecules*, 2017, 18(12): 4141-4153.
- [17] Shukla S, Steinmetz N F. Virus-based nanomaterials as positron emission tomography and magnetic resonance contrast agents: from technology development to translational medicine [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2015, 7(5): 708-721.
- [18] Bruckman M A, Liu J, Koley G, et al. Tobacco mosaic virus based thin film sensor for detection of volatile organic compounds[J]. *Journal Materials Chemistry*, 2010, 20(27): 5715-5719.
- [19] Laga R, Konak E, Subr V, et al. Chemical conjugation of cowpea mosaic viruses with reactive HPMA-based polymers[J]. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 2010, 21(12): 1669-1685.
- [20] Wang Q, Kaltgrad E, Lin T, et al. Natural supramolecular building blocks. Wild-type cowpea mosaic virus[J]. *Chemistry & Biology*, 2002, 9(7): 805-811.
- [21] Ren Y, Wong S M, Lim L Y. Folic acid-conjugated protein cages of a plant virus: a novel delivery platform for doxorubicin[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2007, 18(3): 836-843.
- [22] Fox J M, Wang G, Speir J A. Comparison of the native CCMV virion with in vitro assembled CCMV virions by cryoelectron microscopy and image reconstruction[J]. *Virology*, 1998, 244(1): 212-218.
- [23] Zeng Q B, Wen H B, Wen Q, et al. Cucumber mosaic virus as drug delivery vehicle for doxorubicin [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(19): 4632-4642.
- [24] Yildiz I, Lee K L, Chen K, et al. Infusion of imaging and therapeutic molecules into the plant virus-based carrier cowpea mosaic virus: cargo-loading and delivery [J]. *Journal of Controlled Release*, 2013, 172(2): 568-578.
- [25] Loo L, Guenther R H, Lommel S A, et al. Infusion of dye molecules into Red clover necrotic mosaic virus[J]. *Chemical Communications*, 2008(1): 88-90.
- [26] Alemzadeh E, Izadpanah K, Ahmadi F. Generation of recombinant protein shells of Johnson grass chlorotic stripe mosaic virus in tobacco plants and their use as drug carrier[J]. *Journal of Virological Methods*, 2017, 248: 148-153.
- [27] Chung Y H, Cai H, Steinmetz N F. Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2020, 156: 214-235.
- [28] Azizgolshani O, Garmann R F, Cadena-Nava R, et al. Reconstituted plant viral capsids can release genes to mammalian cells[J]. *Virology*, 2013, 441(1): 12-17.
- [29] Yildiz I, Shukla S, Steinmetz N F. Applications of viral nanoparticles in medicine[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(6): 901-908.
- [30] Robertson K L, Liu J L. Engineered viral nanoparticles for flow cytometry and fluorescence microscopy applications [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2012, 4(5): 511-524.
- [31] Lewis J D, Destito G, Zijlstra A, et al. Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging

- [J]. *Nature Medicine*, 2006, 12(3): 354-360.
- [32] Hu H, Zhang Y, Shukla S, et al. Dysprosium-modified tobacco mosaic virus nanoparticles for ultra-high-field magnetic resonance and near-infrared fluorescence imaging of prostate cancer[J]. *Acs Nano*, 2017, 11(9): 9249-9258.
- [33] Yang C S, Chang C H, Tsai P J, et al. Nanoparticle-based in vivo investigation on blood-brain barrier permeability following ischemia and reperfusion[J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(15): 4465-4471.
- [34] Josephson L, Kircher M F, Mahmood U, et al. Near-infrared fluorescent nanoparticles as combined MR/optical imaging probes[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13(3): 554-560.
- [35] Lee P J, Peyman G A. Visualization of the retinal and choroidal microvasculature by fluorescent liposomes[J]. *Methods in Enzymology*, 2003, 373: 214-233.
- [36] Destito G, Schneemann A, Manchester M. Biomedical nanotechnology using virus-based nanoparticles[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2009, 327: 95-122.
- [37] Koudelka K J, Pitek A S, Manchester M, et al. Virus-based nanoparticles as versatile nanomachines[J]. *Annual Review of Virology*, 2015, 2(1): 379-401.
- [38] 詹阳, 闵涛玲, 胡海峰. 肿瘤疫苗的设计原则和研究进展[J]. *世界临床药物*, 2014, 35(3): 172-177.
- [39] Dent M, Matoba N. Cancer biologics made in plants[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 61: 82-88.
- [40] Canizares M C, Lomonosoff G P, Nicholson L. Development of cowpea mosaic virus-based vectors for the production of vaccines in plants[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2005, 4(5): 687-697.
- [41] Plchova H, Cerovska N, Vaculik P, et al. Plant viruses as scaffolds for the presentation of vaccine epitopes[J]. *Biologia Plantarum*, 2017, 61(1): 1-12.
- [42] Wen A M, Steinmetz N F. Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy[J]. *Chemical Society Reviews*, 2016, 45(15): 4074-4126.
- [43] Shukla S, Wen A M, Commandeur U, et al. Presentation of HER2 epitopes using a filamentous plant virus-based vaccination platform[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(37): 6249-6258.
- [44] McCormick A A, Reddy S, Reinl S J, et al. Plant-produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: safety and immunogenicity in a phase I clinical study[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(29): 10131-10136.
- [45] Fu Y Y, Zhao J, Park J H, et al. Human colorectal cancer antigen GA733-2-Fc fused to endoplasmic reticulum retention motif KDEL enhances its immunotherapeutic effects[J]. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2018, 14: S748-S757.
- [46] Chatterji A, Burns L L, Taylor S S, et al. Cowpea mosaic virus: from the presentation of antigenic peptides to the display of active biomaterials[J]. *Intervirology*, 2002, 45(4/6): 362-370.
- [47] Rini B. Future approaches in immunotherapy[J]. *Seminars in Oncology*, 2014, 41: S30-S40.
- [48] Tumeh P C, Harview C L, Yearley J H, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance[J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 568-571.
- [49] Sharma P, Allison J P. The future of immune checkpoint therapy[J]. *Science*, 2015, 348(6230): 56-61.
- [50] Murray A A, Wang C, Fiering S, et al. In situ vaccination with cowpea vs tobacco mosaic virus against melanoma[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2018, 15(9): 3700-3716.
- [51] Lizotte P H, Wen A M, Sheen M R, et al. In situ vaccination with cowpea mosaic virus nanoparticles suppresses metastatic cancer[J]. *Nature Nanotechnology*, 2016, 11(3): 295-303.
- [52] Lebel M E, Chartrand K, Tarrab E, et al. Potentiating cancer immunotherapy using papaya mosaic virus-derived nanoparticles[J]. *Nano Letters*, 2016, 16(3): 1826-1832.
- [53] Lee K L, Murray A A, Le D H T, et al. Combination of plant virus nanoparticle-based in situ vaccination with chemotherapy potentiates antitumor response[J]. *Nano Letters*, 2017, 17(7): 4019-4028.
- [54] Lico C, Mancini C, Italiani P, et al. Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8⁺ T cells in mice[J]. *Vaccine*, 2009, 27(37): 5069-5076.
- [55] Rae C S, Khor I W, Wang Q, et al. Systemic trafficking of plant virus nanoparticles in mice via the oral route[J]. *Virology*, 2005, 343(2): 224-235.
- [56] Hefferon K. Plant-derived pharmaceuticals for the developing world[J]. *Biotechnology Journal*, 2013, 8(10): 1193-1202.