

小分子药物传输载体综合实验设计

程 度, 陈极峰, 余东升

(中山大学 材料科学与工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 将较为成熟的科研实例小分子药物传输载体聚乙二醇-聚己内酯(PEG-PCL)设计为高年级本科生的综合实验, 探索促进科教融合的新途径和新方法。采用辛酸亚锡催化端羟基聚乙二醇(PEG)引发己内酯开环聚合制备PEG-PCL, 合成方法具有简便易行和成本较低的特点。通过自组装方法负载小分子药物, 并结合聚合物和纳米材料表征手段以及生物医学评价技术, 涵盖开环聚合等高分子化学、自组装等高分子物理、核磁和电镜分析技术以及纳米药物-细胞相互作用评价方法等多学科知识与技能, 使学生全面了解生物材料研发的完整流程, 启发和训练学生系统掌握小分子药物传输载体的研究能力。

关键词: 小分子药物; 传输载体; 两亲性嵌段聚合物; 综合实验

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 1002-4956(2021)12-0043-05

Integrated experiment design of small molecule drug delivery carrier

CHENG Du, CHEN Jifeng, YU Dongsheng

(School of Materials Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Amphiphilic copolymer pegylated-polycaprolactone (PEG-PCL) is synthesized via ring-open polymerization using stannous octoate ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) as catalyst, which is a feasible comprehensive experiment for senior undergraduates. DOX encapsulated nanomedicine is prepared by hydrophobic interaction-based assembly with copolymer PEG-PCL and small molecule drug doxorubicin (DOX). Some characterization approaches and biomedical analysis methods are used to evaluation the performances of polymer and nanomedicine. This experiment uses multidisciplinary research methods including polymeric chemistry (e.g., ring-open polymerization), polymeric physic (e.g., self-assembly), polymer characterization, and biomedical analyses, which is favor of training students' research ability and learning the knowledge and skills about design, fabrication, and functional evaluation of biomaterials.

Key words: small molecule drug; delivery carrier; amphiphilic copolymer; integrated experiment

生物材料对发展医药产业和改善人民生命健康都具有战略地位, 欧美等发达国家及我国都极为重视生物材料领域的研究和人才培养, 已将其列入科学技术发展和人才培养规划^[1-2]。因此, 近年来不少高等院校采取措施加强生物材料课程的建设, 如清华大学材料科学与工程学院在本科和研究生课程中设置了“生物材料学概论”和“生物材料学”等课程^[3]。这些课程的开设不仅促进了生物材料专业人才的培养, 也满足了培养“宽口径、一专多能复合型”创新性材料人才

的需求^[4]。生物材料学科具有多学科交叉和实践性强等特点, 这就要求生物材料人才的培养需要做到理论和实践相结合。如果缺乏实践课程的实操, 抽象的理论教学导致学生难以准确理解和掌握所学内容。科研与教学相融合, 通过科研实例和研究思维的介绍, 联系理论学习, 达到引发学生科研兴趣和培养学生创新思维的目的。因此, 将成熟的科研实例转化为综合实验, 探索科教融合的途径和方法, 利于实施素质教育和提高创新性人才培养水平。

收稿日期: 2021-03-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(21875289); 科技部重点研发计划国际合作交流重点项目(2016YFE0117100)

作者简介: 程 度(1972—), 男, 河南鹤壁, 博士, 教授, 研究方向为生物医用高分子材料, chengdu@mail.sysu.edu.cn。

引文格式: 程 度, 陈极峰, 余东升. 小分子药物传输载体综合实验设计[J]. 实验技术与管理, 2021, 38(12): 43-47.

Cite this article: CHENG D, CHEN J F, YU D S. Integrated experiment design of small molecule drug delivery carrier[J]. Experimental Technology and Management, 2021, 38(12): 43-47. (in Chinese)

小分子药物传输载体可以提高小分子药物(如紫杉醇、阿霉素以及索拉非尼等)的生物利用度,也可降低药物的毒副作用^[5-7]。在小分子药物传输载体材料中,高分子材料具有易于规模化生产、易于功能化和免疫原性低等优点,日益受到研究者和产业界的重视。聚己内酯(PCL)和聚乳酸(PLA)等脂肪族聚酯具有优良的生物相容性和可降解性,在临床中得到广泛使用,是制备药物传输载体的重要材料和研究热点^[8-10]。通过引入聚乙二醇(PEG)等亲水性组分,改变高分子链结构,调节嵌段聚合物的理化性能,可实现对小分子药物的装载和体内输送^[5, 11-13]。本文综合实验选取成熟且常用的PCL,使用简便易行的高分子化学合成方法制备出药物载体聚乙二醇-聚己内酯(PEG-PCL),通过聚合物表征、纳米粒子组装与表征、药物负载效率、细胞毒性评价、细胞吸收的评价,使学生能较为系统地学习生物材料的设计、制备、组装以及评价等方面的知识,训练其掌握生物材料科学的研究思维和方法。

1 实验部分

1.1 实验试剂

聚乙二醇单甲醚(PEG, $M_n=2\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Alfa Aesar公司)反应前置于70℃真空干燥3h。无水反应级 N,N -二甲基甲酰胺(DMF, 99.8%)购自Alfa Aesar。二甲基亚砜(DMSO, 广州化学试剂公司)经加氢化钙后回流24h和减压蒸馏处理。四氢呋喃(THF)使用前以二苯甲酮为指示剂,在氩气保护下加入钠钾合金回流至体系变为深蓝色,然后常压蒸馏。 ϵ -己内酯(ϵ -CL, Sigma-Aldrich公司)经过氢化钙干燥去水并在真空下减压蒸馏所得。氢化钙购于国药集团化学试剂有限公司,经石油醚-丙酮混合溶剂重结晶2次后使用。三氯甲烷、乙酸乙酯用氢化钙干燥除水,蒸馏后使用。盐酸多柔比星(DOX·HCl)从浙江海正药业有限公司购买。实验中所用试剂均为分析纯,除细胞生物学实验外,水均为双蒸水。人类肺腺癌细胞A549细胞在RPMI-1640培养基(含10%胎牛血清)、95%的空气与5%的CO₂混合气体和37℃下培养。

1.2 实验仪器

氢谱¹H-NMR:采用Bruker Avance II 600型核磁共振仪(Bruker Biospin, Germany)进行分析,使用CDCl₃作为溶剂。粒径测定:使用90Plus/BI-MAS动态光散射系统(Brookhaven Instruments, Holtsville, NY)在25℃下检测。旋转蒸发仪采用RV05-ST型(IKA, Germany)。紫外可见分光光度计采用PE/Lambda 750(Perkin Elmer, United States)。倒置荧光显微镜采用徕卡DMi8(Leica Microsystems Inc, Buffalo Grove,

United States)。用于细胞培养的CO₂培养箱采用377型号(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)。

1.3 PEG-PCL 聚合物的制备

根据已发表文献合成PEG-PCL^[5, 12],称取一定量的PEG($M_w=2\ \text{kDa}$)加入50mL反应瓶中,70℃真空环境下干燥2h,加入1滴辛酸亚锡Sn(Oct)₂后继续干燥30min,再加入干燥的己内酯和一定量无水甲苯;在N₂保护下110℃搅拌反应16~18h,产物经过量乙醚沉淀、抽滤及干燥后得白色粉末状产物。

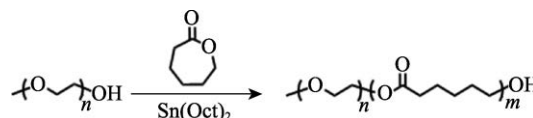


图1 嵌段共聚物聚乙二醇-聚己内酯(PEG-PCL)的合成路线

1.4 阿霉素纳米药物(mPEG-PCL@DOX 胶束)的制备

10mg PEG-PCL聚合物样品和一定量的疏水性阿霉素DOX(将2.0mg DOX·HCl溶解在5mL甲醇中,再向溶液中加入3μL三乙胺,0.5h后用旋转蒸发仪将溶液旋干^[14])溶解于2mL CHCl₃和DMSO(1:1, V/V)混合溶液中。超声下将混合溶液缓慢滴入到20mL超纯水中,旋转蒸发除去氯仿,得到胶束溶液。将胶束溶液置于透析袋(3500Da)中透析48h以除掉游离药物DOX和溶剂,透析期间多次更换透析用超纯水,再用220nm的水相滤膜过滤,最终得到负载DOX的纳米药物。

1.5 纳米药物理化性能评价

动态光散射方法测定纳米药物粒径:用动态光散射系统(温度25℃,入射角45°)测定所制备纳米粒子的粒径,每组样品的测量值均取5次测量的平均值。

透射电镜观察纳米药物形貌:将10μL纳米药物溶液(0.5mg/mL)滴在透射电镜(TEM)铜网上,置于干燥器中静置8h自然风干后,用乙酰双氧铀(wt. 2%)染色1min,用滤纸吸干染色剂。干燥后(60℃过夜)置于透射电镜下观测纳米药物的形貌。

药物包封率和载药量分析:DOX在胶束中的质量百分比为药物负载量(载药量, DLC),胶束中DOX的质量占制备纳米药物时所投入DOX总质量的百分比为药物包封率(DLE)。胶束内DOX质量可通过UV-2000紫外可见光吸收光谱进行测定的。取一定量冻干的PEG-PCL负载有DOX的胶束样品溶于CHCl₃和DMSO(1:1, V/V)共混溶剂中,在波长为482.5nm处测定DOX的紫外吸收并通过DOX标准曲线计算DOX的含量。

$$DLE = \frac{\text{纳米胶束所载药物质量}}{\text{所投入DOX总质量}} \times 100\%$$

$$DLC = \frac{\text{纳米胶束所载药物质量}}{\text{包载药物后纳米胶束的质量}} \times 100\%$$

1.6 纳米药物的细胞吸收性能评价

A549 细胞以 5×10^2 个/孔的密度接种于培养皿中, 在 37°C 培养 24 h 后分别加入纳米药物和空白胶束孵育, 每孔 DOX 终浓度为 $2 \mu\text{mol/L}$ 。孵育 3 h 后, 加入 Hoechst 33342 染料对细胞核染色。弃去培养基, 细胞用 PBS 液洗涤 3 次去除未吸收的纳米药物及核染色剂, 加入 4% 多聚甲醛固定。置于荧光显微镜下观察, 核染色剂 Hoechst 33342 ($1 \mu\text{g/mL}$, 蓝色荧光) 标记细胞核 15 min, 溶酶体用 Lysotracker[®] Green DND-26 ($10 \mu\text{L}$, 绿色荧光) 标记溶酶体 10 min, DOX 发出红色荧光。

1.7 MTT 毒性分析

将 A549 细胞用 0.25% EDTA 胰酶消化下来形成细胞悬液, 按照 1×10^3 个细胞/孔的密度接种到 96 孔板, 在 5% CO_2 和 37°C 环境下培养过夜, 将负载 DOX 的 PEG-PCL@DOX 胶束、未负载 DOX 的空白胶束 (PEG-PCL) 按照不同剂量加入培养基中共培育 48 h, 弃培养基, 向每个孔里加入 $100 \mu\text{L}$ 含 MTT (5 mg/mL) 的培养基。孵育 3 h 后, 弃培养基, 每孔加入 $90 \mu\text{L}$ 的 DMSO 震荡溶解, 再用酶标仪 (美国国腾) 测定每孔在 570 nm 的吸光度值。每组处理设 3 个重复, 细胞存活率表示如下:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组吸光度值}}{\text{对照组吸光度值}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 聚合物材料的制备与表征

PEG-PCL 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图如图 2 所示, 1.40 ppm ($-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 1.65 ppm ($-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 2.31 ppm ($-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.65 ppm ($-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}-$), 4.05 ppm ($-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), $5.15 \sim 5.30 \text{ ppm}$ ($\text{CH}_2-\text{CH}-$), 5.80 ppm ($\text{CH}_2=\text{CH}-$)。所用 PEG 的分子量为 2 kDa , 核磁共振氢谱峰积分计算得到 PCL 聚合物的单元数大约为 31, 计算得出所制备 PEG-PCL 的分子量约为 5.5 kDa ¹⁵。

2.2 纳米药物 (PEG-PCL@DOX 胶束) 的粒径及形貌

通过动态光散射 (DLS) 方法测得纳米药物 (PEG-PCL@DOX) 的水合粒径为 $35 \pm 25 \text{ nm}$ (图 3)。透射电镜下 PEG-PCL@DOX 胶束形貌呈现为大小均匀的球形, 粒径约为 35 nm , 其结果与动态光散射测定值一致。

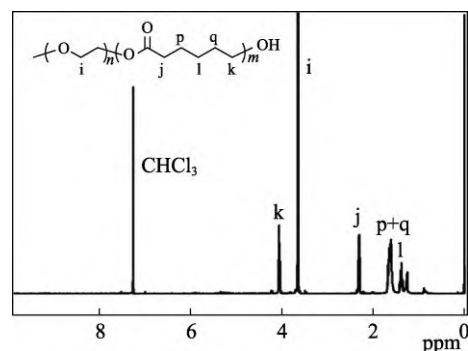


图 2 聚乙二醇-聚己内酯 (PEG-PCL) 的核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$ 谱) (氘代氯仿, 300 MHz)

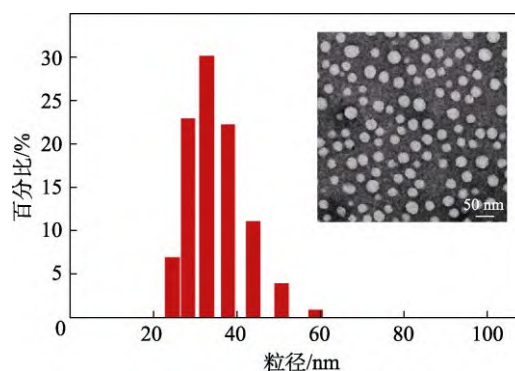


图 3 载药聚乙二醇-聚己内酯胶束 (PEG-PCL@DOX 胶束) 的粒径和透射电镜图

2.3 药物包封率和载药量的测定

通过测定纳米药物中 DOX 的质量, 得到所制备药物载体 PEG-PCL 对 DOX 的包封率为 31.20% , 所制备的纳米药物中 DOX 的载药量为 4.81% 。

2.4 药物细胞吸收

纳米药物与细胞共孵育 3 h 后, 用荧光显微镜观察 A549 细胞内 DOX 的荧光。如图 4 所示, 纳米药物

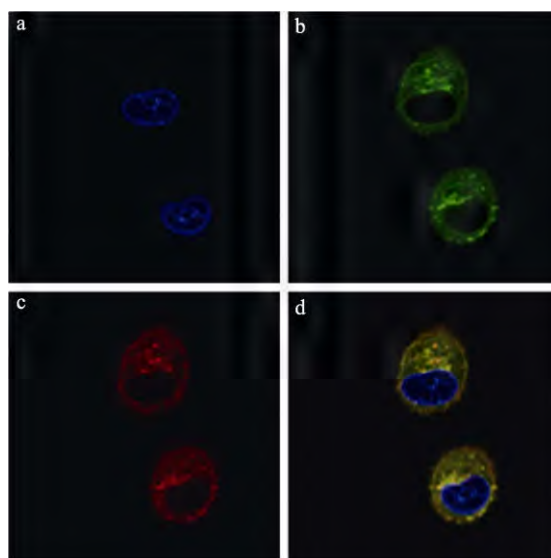


图 4 纳米药物的细胞吸收((a)Hoechst 3324 标记细胞核为蓝色荧光; (b)Lysotracker[®] Green DND-26 标记溶酶体为绿色荧光; (c)阿霉素为红色荧光; (d)荧光重叠图)

(PEG-PCL@DOX 胶束)与 A549 细胞孵育后,用荧光显微镜观察细胞吸收阿霉素的情况,细胞质内有明显 DOX 荧光,而且与溶酶体的绿色荧光相重叠,这表明纳米药物载体通过内吞途径将 DOX 递送进细胞中。

2.5 纳米药物的细胞毒性

A549 细胞分别与不同浓度的空白纳米粒子(PEG-PCL 胶束)、纳米药物(PEG-PCL@DOX 胶束)孵育后,采用 MTT 法分析其细胞毒性,空白纳米粒子(PEG-PCL 胶束)和纳米药物(PEG-PCL@DOX 胶束)对 A549 细胞存活率的影响见图 5。空白纳米粒子处理组的细胞存活率未出现明显变化,即使在 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下细胞存活率仍然达到约 100%,表明未负载 DOX 的空白纳米粒子对 A549 细胞没有明显的毒性,载体材料具有非常好的生物安全性。负载 DOX 的纳米药物则显著降低细胞的存活率,在 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX 的浓度下细胞存活率降至 50%,进一步提高 DOX 浓度至 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$,则细胞存活率降至 30%以下,表明 PEG-PCL 负载 DOX 后,可以显著抑制肿瘤细胞的生长。

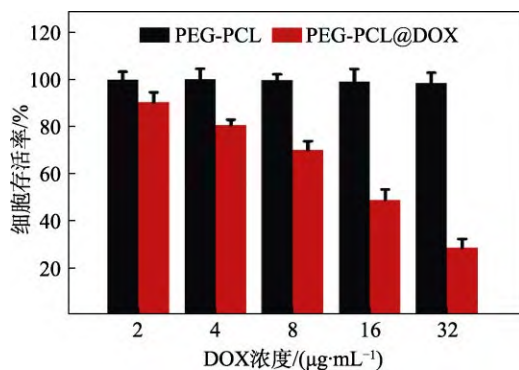


图 5 细胞存活率分析

3 讨论

小分子药物载体材料是生物材料不可或缺的内容,对于提高药物体内利用度和减少毒副作用具有重要作用,因此有必要在本科生物材料综合实验中对其进行讲授,加深学生对药物传输载体材料制备及评价基本技术的理解和掌握,具备初步利用所学专业进行综合性研究的能力。由亲水段和疏水段构成的两亲性嵌段共聚物可通过溶剂挥发法等方法制备纳米药物,其中 PCL 和 PLA 等疏水嵌段可通过疏水作用负载疏水性药物(如阿霉素和紫杉醇等)形成纳米胶束的内核,亲水嵌段(如 PEG、聚 N-羟丙基甲基丙烯酸酯和葡聚糖等)则在胶束内核的外围形成亲水性外壳^[5,8,11-12]。PEG 是最为常用的亲水嵌段,可通过与水分子形成氢键在内核外围构筑出紧密的亲水性外壳,提高纳米粒子在血液中的稳定性,屏蔽血清中蛋白的吸附和网状内皮系统的识别和清除,从而延长药

物血液循环时间和维持有效血药浓度,达到减少给药次数和提高药物疗效的作用。疏水性聚合物 PCL 具有较低临界胶束浓度和较高药物相容性,有利于维持纳米胶束的体内稳定性和提高药物负载量^[5,11]。因此,在小分子药物载体材料综合实验的设计中选用 PEG-PCL 作为传输小分子化疗药物阿霉素的载体材料。

嵌段共聚物 PEG-PCL 的合成方法主要有辛酸亚锡法^[5,11-12]和以双三甲基硅酰胺钾为引发剂的 2 次加料法(氮钾引发剂 2 次加料法)^[15]等。辛酸亚锡法采用端羟基 PEG 引发己内酯开环聚合,所使用的端羟基 PEG 是成熟的商品化产品,价格较低且易获得,通过一步端羟基 PEG 引发反应即可制得嵌段共聚物 PEG-PCL,具有操作简便、易于控制和产物分布较窄的特点。氮钾引发剂 2 次加料法虽然不需要预先合成大分子量的 PEG 引发剂,但在反应过程中需 2 次分别加入环氧乙烷单体和己内酯单体,操作过程复杂,反应过程的控制较为严格,而且所合成聚合物的分布较宽,不利于本科实验的开展。因此,综合考虑对学生研究能力培养和实验可操作性等因素,在小分子药物传输载体中采用大分子 PEG 一步引发己内酯开环聚合的辛酸亚锡法制备 PEG-PCL。

综合材料合成、纳米药物自组装、材料表征技术以及药物传输性能评价等 4 个模块的综合实验,有利于培养引导学生综合应用高分子化学、高分子物理、仪器分析等材料学知识的能力,使其初步掌握生物材料性能评价技术,培养学生全面理解和掌握小分子药物传输载体制备及应用研究能力,满足对高年级本科生进行科研训练的需求,是一个较为适宜的生物材料综合实验。

4 结语

本文综合实验选用涵盖知识面广、合成路线较为成熟且易于实行的实验训练学生综合运用多学科知识解决问题的能力。以辛酸亚锡为催化剂,通过大分子 PEG 引发己内酯开环聚合,一步反应合成两亲性嵌段共聚物 PEG-PCL,并通过自组装负载小分子药物制备出纳米药物,联合应用材料学表征和生物学技术评价其药物传输性能。实验需要使用核磁、动态光散射粒度仪、荧光显微镜和细胞培养箱等仪器,很好地锻炼学生的动手能力,加速了实验技能的积累,为今后工作打下坚实的基础。

参考文献 (Reference)

- [1] 程度,李晓霞,乔立红.基因传输载体综合实验设计[J].实验室研究与探索,2020,39(8):22-26,55.
- [2] 李宇杰,刘双科,王琰,等.“双一流”建设背景下科学构建研究生课程体系的思考:基于麻省理工学院材料学科的对

- 比研究[J]. 高等教育研究学报, 2018, 41(4): 62–70.
- [3] 王建方, 邢欣, 吴文健, 等. 生物材料学课程的设置与改革思考[J]. 高等教育研究学报, 2011, 34(1): 95–97.
- [4] 汪燕芳, 何俊民, 朱云国. 谈“现代生物技术导论”公选课的开设计划[J]. 高教论坛, 2008(1): 37–38.
- [5] CHENG D, HONG G B, WANG W W. Nonclustered magnetite nanoparticle encapsulated biodegradable polymeric micelles with enhanced properties for in vivo tumor imaging[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(13): 4796–4804.
- [6] LI Z R, LI J G, HUANG J S, et al. Synthesis and characterization of pH-responsive copolypeptides vesicles for siRNA and chemotherapeutic drug co-delivery[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2015, 15(11): 1497–1506.
- [7] MAEDA H, BHARATE G Y, DARUWALLA J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-Effect[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 2009, 71(3): 409–419.
- [8] VIEIR A C, VIEIRA J C, GUEDES R M, et al. In degradation and viscoelastic properties of PLA-PCL, PGA-PCL, PDO and PGA fibres[J]. *Materials Science Forum*, 2010, 636–637: 825–832.
- [9] ZOU S Y, CAO N, CHENG D. Enhanced apoptosis of ovarian cancer cells via nanocarrier-mediated codelivery of siRNA and doxorubicin[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, 2012: 3823–3835.
- [10] AHMEDF, DISCHER D E. Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: Hydrolysis-triggered controlled release vesicles[J]. *Control Release*, 2004, 96(1): 37–53.
- [11] CHENG D, CAO N, CHEN J F, et al. Multifunctional nanocarrier mediated co-delivery of doxorubicin and siRNA for synergistic enhancement of glioma apoptosis in rat[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(4): 1170–1179.
- [12] DENG S H, LI X X, LIU S S, et al. Codelivery of CRISPR-Cas9 and chlorin e6 for spatially controlled tumor-specific gene editing with synergistic drug effects[J]. *Science Advances*, 2020, 6(29): eabb4005.
- [13] CHENG J J, TEPLY B A, SHERIFI I, et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(5): 869–876.
- [14] CHEN W C, YUAN Y Y, CHENG D, et al. Co-Delivery of doxorubicin and siRNA with Reduction and pH dually sensitive nanocarrier for synergistic cancer therapy[J]. *Small*, 2014, 10(13): 2678–2687.
- [15] YU G Q, ZHANG Y, SHI X D, et al. Surface property and in vitro biodegradation of microspheres fabricated by poly(ϵ -caprolactone-b-ethylene oxide) diblock copolymers[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008, 84(4): 926–939.
- ~~~~~
- (上接第9页)
- [36] WOLFF G, LIMPENS R, ZEVENHOVEN-DOBBE J C, et al. A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle[J]. *Science*, 2020, 369(6509): 1395–1398.
- [37] MENDONÇA L, HOWE A, GILCHRIST J B, et al. Correlative multi-scale cryo-imaging unveils SARS-CoV-2 assembly and egress[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 4629.
- [38] SIU Y L, TEOH K T, LO J, et al. The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(22): 11318–11330.
- [39] V'KOVSKI P, KRATZEL A, STEINER S, et al. Coronavirus biology and replication: Implications for SARS-CoV-2[J]. *Nature Review Microbiology*, 2021, 19(3): 155–170.
- [40] THOMS M, BUSCHAUER R, AMEISMEIER M, et al. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the nsp1 protein of SARS-CoV-2[J]. *Science*, 2020, 369(6508): 1249–1255.
- [41] GAO Y, YAN L, HUANG Y, et al. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus[J]. *Science*, 2020, 368(6492): 779–782.
- [42] YIN W, MAO C, LUAN X, et al. Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir[J]. *Science*, 2020, 368(6498): 1499–1504.
- [43] WANG Q, WU J, WANG H, et al. Structural basis for RNA replication by the SARS-CoV-2 polymerase[J]. *Cell*, 2020, 182(2): 417–428.
- [44] CHEN J, MALONE B, LLEWELLYN E, et al. Structural basis for helicase-polymerase coupling in the SARS-CoV-2 replication-transcription complex[J]. *Cell*, 2020, 182(6): 1560–1573.
- [45] WOLFF G, BÁRCENA M. Multiscale electron microscopy for the study of viral replication organelles[J]. *Viruses*, 2021, 13(2): 197.
- [46] CORTESE M, LEE J Y, CERIKAN B, et al. Integrative imaging reveals SARS-CoV-2-induced reshaping of subcellular morphologies[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28(6): 853–866.
- [47] SNIJDER E J, LIMPENS R, DE WILDE A H, et al. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis[J]. *PLOS Biology*, 2020, 18(6): e3000715.
- [48] WOLFF G, MELIA C E, SNIJDER E J, et al. Double-membrane vesicles as platforms for viral replication[J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(12): 1022–1033.
- [49] NISHIKIORI M, AHLQUIST P. Transmembrane redox regulation of genome replication functions in positive-strand RNA viruses[J]. *Current Opinion in Virology*, 2021, 47: 25–31.
- [50] UNCHWANIWALA N, ZHAN H, PENNINGTON J, et al. Subdomain Cryo-EM structure of nodaviral replication protein a crown complex provides mechanistic insights into RNA genome replication[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(31): 18680–18691.