

工程化纳米囊泡结合化疗用于增强肿瘤免疫治疗

高克凡, 赵兴中

武汉大学物理科学与技术学院, 湖北 武汉 430072

【摘要】目的:结合免疫治疗与化疗,以改善肿瘤的治疗效果,为安全有效的肿瘤免疫治疗策略的发展提供更多见解。**方法:**使用工程化纳米囊泡,囊泡膜上表达PD-1受体,可以靶向肿瘤细胞表面的PD-L1,通过破坏PD-1/PD-L1免疫抑制通路增强抗肿瘤反应。同时,囊泡包裹的化疗药物阿霉素可以进入肿瘤细胞核,抑制DNA与RNA的合成,诱导肿瘤细胞死亡。**结果:**实验证实,制备的PD1-阿霉素材料具备良好的稳定性、安全性,能准确靶向肿瘤部位,阿霉素在细胞核部位起作用,能有效地进行肿瘤杀伤。**结论:**本研究首次将PD-1免疫检查点抑制与化疗药物阿霉素相结合,利用PD-1囊泡安全性高、长循环的特点作为包裹化疗药物阿霉素的载体,这种方法可以进行肿瘤细胞的有效靶向与治疗,实现肿瘤的有效清除。

【关键词】工程化纳米囊泡;阿霉素;免疫治疗;协同治疗

【中图分类号】R318

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2023)04-0480-07

Engineered nanovesicles combined with chemotherapy for enhancing tumor immunotherapy

GAO Kefan, ZHAO Xingzhong

School of Physics and Technology, Wuhan University, Wuhan 430072, China

Abstract: Objective To combine immunotherapy with chemotherapy for improving the therapeutic effect, and providing more insights for the development of safe and effective tumor immunotherapy strategies. **Methods** The engineered nanovesicles were used in the study. The PD-1 receptors expressed on the vesicle membrane targeted PD-L1 on the surface of tumor cells and enhanced the anti-tumor response by disrupting the PD-1/PD-L1 immunosuppressive pathway. Meanwhile, vesicles-encapsulated chemotherapy drug doxorubicin (DOX) entered the tumor nucleus, inhibited the synthesis of DNA and RNA, and induced tumor cell death. **Results** Experiments confirmed that the prepared PD1-DOX had good stability and high safety, and could accurately target the tumor site. DOX worked at the nucleus to effectively kill tumors. **Conclusion** This is the first time to combine PD-1 immune checkpoint inhibition with DOX. Because of characteristics of high safety and long circulation, the PD-1 vesicles are taken as the carrier for encapsulating DOX. The prepared material can effectively target and treat tumor cells and achieve effective tumor clearance.

Keywords: engineered nanovesicle; doxorubicin; immunotherapy; synergistic treatment

前言

肿瘤以细胞的异常增殖为特征,肿瘤的侵袭转移导致了高致死率^[1-4]。肿瘤的免疫治疗是指利用人类的免疫系统来消除癌细胞^[5-7],其中针对程序性死

亡-1(PD-1)/程序性死亡配体1(PD-L1)通路的免疫检查点封锁在各种类型的癌症中诱导了显著的临床反应^[8-10]。PD-L1是PD-1受体的配体,癌细胞中PD-L1表达量的上调会抑制效应T细胞^[11],通过抗体阻断PD-1与PD-L1通路可以增强机体对癌细胞的免疫应答,但是这种方法存在局限性,并不是所有的癌症都可以通过PD-1通路进行有效治疗^[12-13]。因此,需要开发针对PD-L1免疫检查点抑制的其他替代方法^[14]。

化疗是应用于肿瘤治疗中最有效的方法之一^[15-19],特别是蒽环类药物如阿霉素诱导的免疫原性化疗可以进入肿瘤细胞的细胞核,通过抑制DNA与RNA合成来导致细胞损伤,从而激活肿瘤特异性细胞毒性T淋巴细

【收稿日期】2023-01-28

【基金项目】国家重点研发计划(2022YFA1402503);中央高校基本科研业务费(413000137);湖北珞珈实验室专项基金(20100025)

【作者简介】高克凡,硕士研究生,研究方向:纳米肿瘤免疫治疗,E-mail: 790480886@qq.com

【通信作者】赵兴中,博士研究生,教授,研究方向:纳米功能材料与器件、微流控生物芯片,E-mail: xzzhao@whu.edu.cn

胞,诱导T细胞抗肿瘤免疫,导致肿瘤细胞死亡^[20-22]。但是由于很多癌细胞类型对化疗不敏感,且毒性副作用明显,治疗效果远不及临床预期。而肿瘤的免疫治疗则对于减少肿瘤的免疫抑制、增强治疗效果起到了很好的作用,因此,将肿瘤的免疫治疗与化疗协同使用能在增强机体的免疫应答同时,对肿瘤进行药物靶向治疗,有着独特的治疗优势。

本研究设计一种使用高表达PD-1的细胞膜衍生纳米囊泡(NVs)包裹化疗药物阿霉素对肿瘤进行协同治疗的方法。细胞膜挤压的囊泡作为一种天然细胞膜衍生囊泡可以降低机体的免疫排斥反应,在生物工程化后能有效地增强抗癌免疫^[23-26]。本实验将PD-1蛋白表达基因通过细菌转染到小鼠乳腺癌细胞上并挤推成囊泡,通过囊泡实现PD-L1过表达肿瘤细胞的有效靶向。阿霉素作为一种协同药物,通过超声包裹在囊泡内部,借助功能化囊泡的靶向作用递送到肿瘤部位,对肿瘤细胞进行有效杀伤,囊泡的长循环特点有效节约了阿霉素药物的用量。这种方法首次将肿瘤的PD-1免疫检查点抑制与化疗药物阿霉素相结合,在降低治疗成本的同时,可以有效改善肿瘤的治疗效果,为安全有效的肿瘤免疫治疗策略的发展提供更多见解。

1 材料与方法

1.1 实验材料

4T1细胞、细胞培养基购自武汉普诺赛公司,盐酸阿霉素购自美仑生物,CCK8试剂盒购自碧云天,BCA试剂盒购自凯基生物,所用的荧光染料购自Biolegend公司。实验使用的小鼠为Balb/c雌性小鼠(6~8周),由深圳湾实验室实验动物平台统一购买。动物实验方案由深圳湾实验室实验动物福利伦理委员会批准(伦理号:Shenzhen Bay Laboratory Startup Fund(No. 21310071))。

1.2 实验方法

1.2.1 功能化NVs的制备 通过细菌中表达PD-1的质粒将PD-1表达基因转染至4T1细胞上,转染后的4T1细胞使用流式分选仪分选出PD-1高表达的细胞,用15 cm培养皿扩培培养。扩培后的细胞加入3 mL胰酶消化5 min后加入培养基中止消化,离心清洗后用PBS溶液重悬,在冰浴中使用超声探头超声1 min,使用离心机4℃ 4 000 g离心30 min,去掉沉淀即细胞中的杂质。之后使用超速离心机4℃ 100 000 g离心60 min,去掉上清后,用PBS溶液重悬,获得4T1-PD1细胞膜悬液。使用挤推器,将细胞膜悬液分别通过1 μm、800 nm、400 nm、200 nm、100 nm的滤膜挤推若干次,最后用无菌试管收集备用。

1.2.2 载药囊泡的制备 实验前提前用PBS将盐酸阿霉素配置成1 mg/mL备用。挤推完囊泡后,用BCA试剂盒对囊泡蛋白量进行检测,取100 μg囊泡与150 μg盐酸阿霉素混合充分吹匀,定容到1 mL,在冰浴下超声5 min,之后静置一夜,完成囊泡的载药。

1.2.3 细胞培养 4T1细胞与4T1-PD1细胞均使用DMEM完全培养基培养(DMEM培养基+1%P/S+10%FBS)。培养条件为37℃,5%CO₂的培养箱中。

1.2.4 功能化囊泡载药的表征 将挤推好的囊泡与载药后的囊泡,用动态光散射仪测量粒径的分布与Zeta电位的大小。对于材料中PD-1的表达表征,用蛋白质印迹法进行实验。

包封率计算公式为:

$$\text{药物包封率} = \frac{\text{囊泡内的药物量}}{\text{加入的药物总量}} \quad (1)$$

载药率计算公式为:

$$\text{药物载药率} = \frac{\text{囊泡内的药物量}}{\text{囊泡及其包裹的药物总量}} \quad (2)$$

1.2.5 材料的体内体外细胞毒性实验 为验证囊泡的细胞毒性,在96孔板中培养4T1细胞,每组设置5个平行分组,每孔铺入5 000个细胞,在细胞密度长至70%左右时,分别加入浓度为0、20、40、60、80、100 μg/mL的4T1-PD1囊泡,浓度为0 μg/mL组加入等量培养基。放入培养箱中培养24 h后,洗去上清,加入CCK8试剂反应30 min,用紫外分光光度计测量450 nm处的吸光值,计算获得细胞活性。在验证4T1-PD1材料的细胞毒性时,4T1细胞培养方式如上,在细胞密度长至70%左右分别加入0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、16.0 μg/mL的PD1-阿霉素(以阿霉素浓度为准)、游离阿霉素、对应浓度的PD-1囊泡,培养24 h后用CCK8试剂盒检测细胞活性。

为验证实验材料对小鼠毒性的影响,取3只健康小鼠,通过尾静脉注射,每只小鼠注射浓度为100 μg/mL的PD1-阿霉素材料100 μL(浓度为阿霉素浓度,材料制备方法按照之前比例NVs:阿霉素=2:3制备),另取3只健康小鼠做空白对照,通过尾静脉注射等体积的PBS溶液。注射材料后培养30 d,取出小鼠血液进行血常规检测,取出心、肝、脾、肺、肾等重要器官进行组织切片H&E染色。

1.2.6 材料的摄取实验 为了观察4T1细胞对PD1-阿霉素的摄取情况,验证治疗机制,在共聚焦皿中培养4T1细胞。制备的PD1-阿霉素材料提前用DIO染成绿色备用,染色后清洗3次去掉溶液中的染料。待细胞长至半满时,分别加入0、2、4、8 μg/mL的PD1-阿霉素(浓度均为阿霉素浓度),在37℃培养箱中孵育4 h。之后制备共聚焦显微镜的样本:将样品用4%多

聚甲醛固定,用DAPI染料染色 15 min,放置到共聚焦显微镜下观察。

2 结果与讨论

2.1 工程化NVs的制备与表征

通过细菌将表达PD-1基因的质粒基因转染到小鼠乳腺癌细胞4T1上,使得4T1细胞表面表达PD-1,PD-1蛋白由mCherry红色荧光标记,转染成功后的4T1细胞在共聚焦显微镜下可以观察到细胞膜表面

表达的红色荧光,证明PD-1在4T1细胞上的成功表达(图1a)。将未转染的4T1细胞与转染后的4T1-PD1使用流式细胞仪进行分选,可以看到两个明显的分离峰值,也代表了PD-1的成功转染(图1b)。将转染成功后的4T1-PD1细胞扩培,通过超声、离心后获得细胞膜悬液。最后使用挤推器,分别用1 μm、800 nm、400 nm、200 nm、100 nm的滤膜挤推细胞膜,获得实验使用的功能化囊泡。囊泡用透射电镜拍摄的图像如图1c所示。

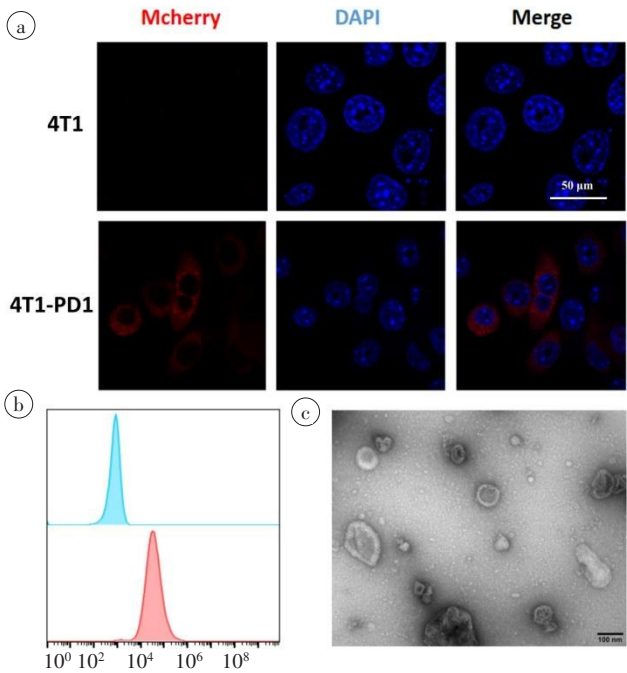


图1 工程化纳米囊泡的制备与表征
Figure 1 Preparation and characterization of engineered nanovesicles
a:4T1细胞与4T1-PD1细胞的共聚焦荧光图(标尺:50 μm);b:4T1细胞与4T1-PD1细胞表面mCherry荧光的流式分析图;c:PD-1表达囊泡的透射电镜图(标尺:100 nm)

2.2 囊泡载药的探究

为了实现使用功能化囊泡对阿霉素进行载药,首先探究载药方法是否会对囊泡的结构产生影响。将挤推好的囊泡与阿霉素混合,通过超声的方式实现载药,利用动态光散射仪可以测得载药前后囊泡的平均粒径分布没有发生太大变化(图2a与b)。通过测定Zeta电位测得囊泡载药前后电位均相对稳定,药物被成功载入囊泡中(图2c)。之后使用蛋白质印迹对载药前后的材料进行进一步分析,在保证蛋白上样量(实验过程中囊泡的蛋白量通过BCA试剂盒检测)一定的条件下对材料进行表征,使用GAPDH作为内参。图2d可以看出,囊泡组没有内参图线,证明膜的提取过程对杂质的清理较为彻底。

之后对囊泡载药进行探究,寻找载药的最优比

例。实验通过将100 μg蛋白量的囊泡与不同量的阿霉素按不同比例混合,探究在哪种情况下阿霉素的载药效率最高。阿霉素的载入量通过测量超离后上清中的阿霉素浓度获得,阿霉素浓度通过代入定标过的标准曲线来确定。可以发现在囊泡量一定的情况下,加入不同浓度的阿霉素,包封率与载药率均在阿霉素浓度为150 μg/mL时存在一个转折点,该点后阿霉素的包封率明显下降,载药率上升变化不明显(图2e、f)。后续实验将该点的囊泡与阿霉素比例作为最佳载药比例,即NVs:阿霉素=2:3。

2.3 材料的细胞毒性实验

为探究材料的细胞毒性,首先验证囊泡对细胞的毒性。在96孔板中每孔铺入5 000个4T1细胞,每组设置5个平行组,分组加入不同浓度囊泡后,经过

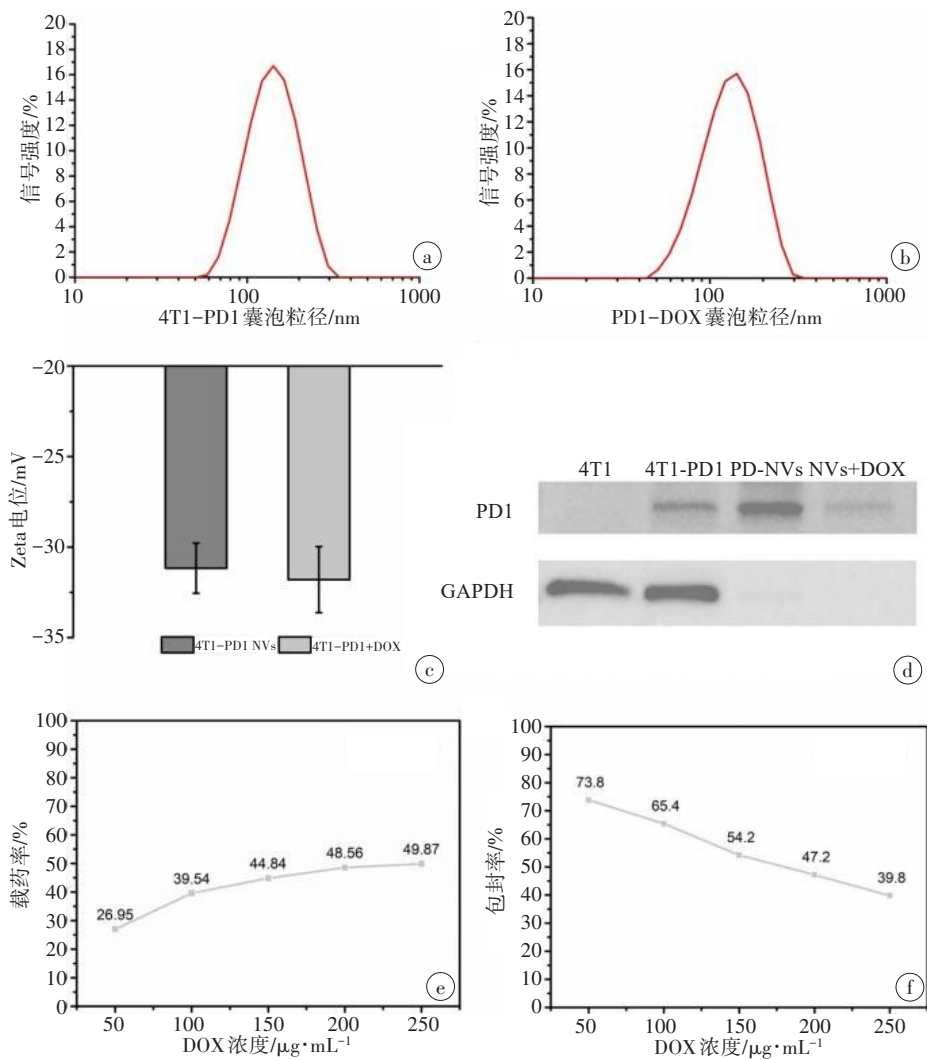


图2 囊泡载药的探究

Figure 2 Exploration of vesicular drug loading

a、b:PD-1 表达囊泡与PD1-阿霉素的动态光散射图;c:PD-1 表达囊泡与PD1-阿霉素的 Zeta 电位图;
d:材料的蛋白质印记法表征;e:PD-1 表达囊泡的载药率;f:PD-1 表达囊泡的封装率

24 h用CCK8试剂检测细胞活性,可以发现在加入材料24 h后,即使是最大浓度100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的囊泡组,细胞的存活率仍然在80%以上,可以证明囊泡的低毒性(图3a)。

之后使用载药囊泡进行实验,同样使用CCK8试剂进行检测,根据阿霉素的药量,设置对应的囊泡载药组与纯囊泡组浓度。由图3b可以看到,随着阿霉素浓度的增加,细胞有着明显死亡趋势,体现了阿霉素对肿瘤细胞有效的杀伤作用。

根据细胞毒性实验结果,使用小鼠对材料的毒性进行进一步评估。实验设置平行组,实验载药量为100 μg 的囊泡对每只小鼠进行尾静脉注射,经过一个月后取主要器官进行H&E染色切片观察,可以看到在注入材料后,小鼠的主要器官没有明显的损伤,证明了材料的安全性(图3c)。将小鼠的血液提

取出来进行血常规分析,可以看到小鼠血液中相关成分的主要指标与对照组(注射PBS溶液)相比无较大差距,进一步证明了材料对小鼠的安全性(表1)。

2.4 乳腺癌细胞对材料的摄取

为了观察乳腺癌细胞对材料的摄取,验证阿霉素的治疗机制,将PD1-阿霉素外部的囊泡用DIO染料染成绿色,内部的阿霉素自带红色荧光,用DAPI将活细胞核染色后,分别向4T1细胞中加入不同浓度的材料(以阿霉素量为准),4 h后用共聚焦显微镜观察细胞对材料的摄取。从图4中可以看出,随着材料浓度的增加,细胞核中的红色越来越明显,这也反映了阿霉素会在细胞核内发挥作用。随着加入的囊泡浓度增大,绿色亮度也随之增加。以上结果表明,在阿霉素与PD-1囊泡的共同作用下,可以实现在对机体不产生损伤的情况下,对肿瘤细胞进行联合治疗。

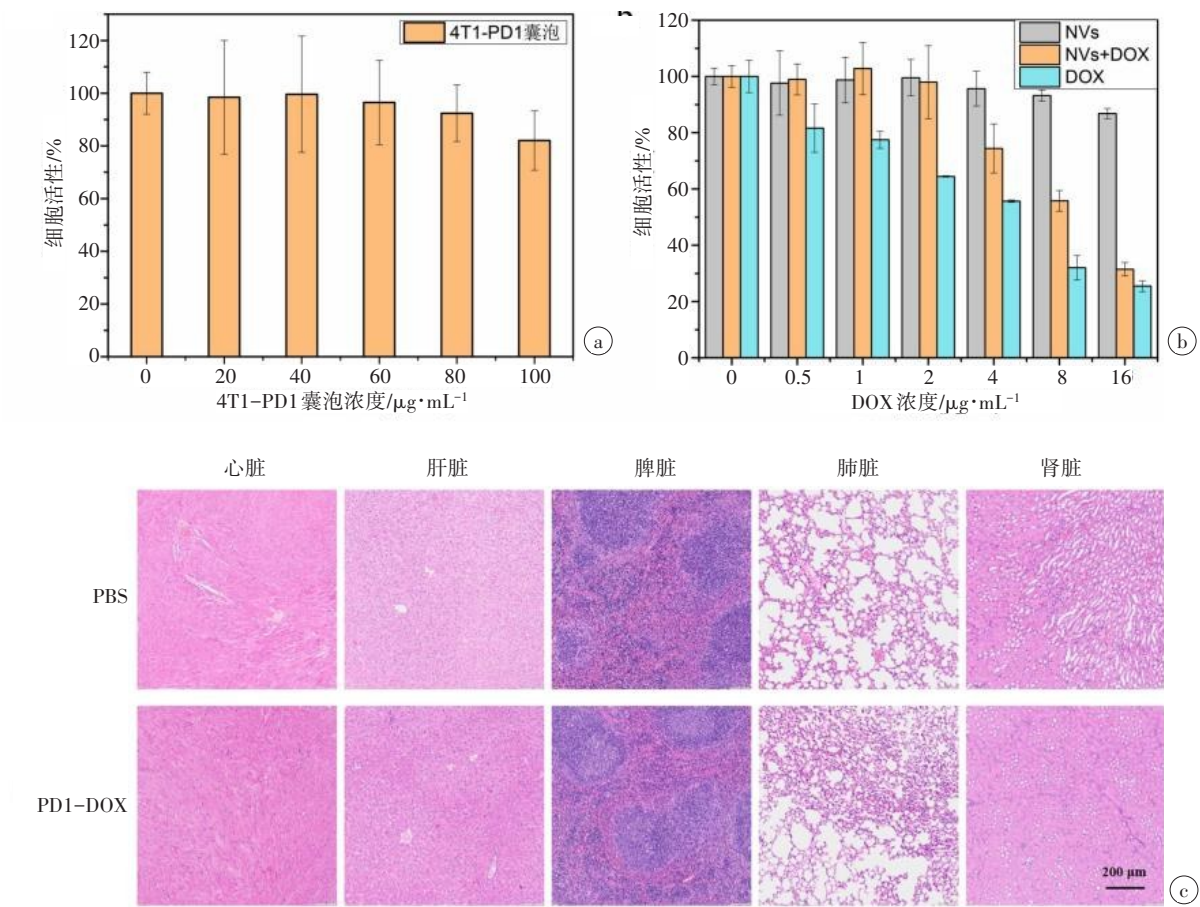


图 3 材料的细胞毒性实验

Figure 3 Cytotoxicity experiments for materials

a:4T1-PD1 囊泡的细胞毒性实验;b:PD1-阿霉素的细胞毒性实验;c:PD1-阿霉素的小鼠体内毒性实验(图中标尺:200 μm)

表 1 小鼠血常规相关参数($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Mouse blood routine parameters ($Mean \pm SD$)

参数	对照组	实验组	P 值
白细胞(WBC)/ $10^9 \cdot L^{-1}$	5.487±0.612	5.480±1.510	0.141 2
中性粒细胞(NEU)/ $10^9 \cdot L^{-1}$	0.863±0.172	0.817±0.188	0.381 5
淋巴细胞(LYM)/ $10^9 \cdot L^{-1}$	4.607±0.726	4.507±1.277	0.658 3
嗜酸性粒细胞(EOS)/ $10^9 \cdot L^{-1}$	0.040±0.017	0.043±0.025	>0.999 9
红细胞(RBC)/ $10^{12} \cdot L^{-1}$	10.357±0.387	11.353±2.543	0.951 3
血红蛋白(HGB)/ $g \cdot L^{-1}$	187.000±26.458	187.333±41.041	0.444 1
红细胞积压(HCT)/%	49.700±2.339	54.700±12.243	0.997 0
红细胞平均体积(MCV)/fL	48.333±0.306	48.167±0.289	0.034 0
红细胞平均血红蛋白量(MCH)/pg	16.433±0.153	16.500±0.100	<0.000 1
红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)/ $g \cdot L^{-1}$	339.333±4.933	342.333±3.215	<0.000 1
红细胞分布宽度变异系数(RDW-CV)/%	18.767±0.666	19.533±0.551	0.044 5
红细胞分布宽度标准差(RDW-SD)/fL	39.133±1.274	41.300±1.000	0.107 4
血小板(PLT)/ $10^9 \cdot L^{-1}$	310.00±7.55	286.00±63.46	0.033 0
血小板平均体积(MPV)/fL	6.167±0.058	6.033±0.153	0.004 3
血小板分布宽度(PDW)/%	15.667±0.209	15.500±0.265	0.013 9
降钙素原(PCT)/%	0.192±0.006	0.173±0.042	0.029 3

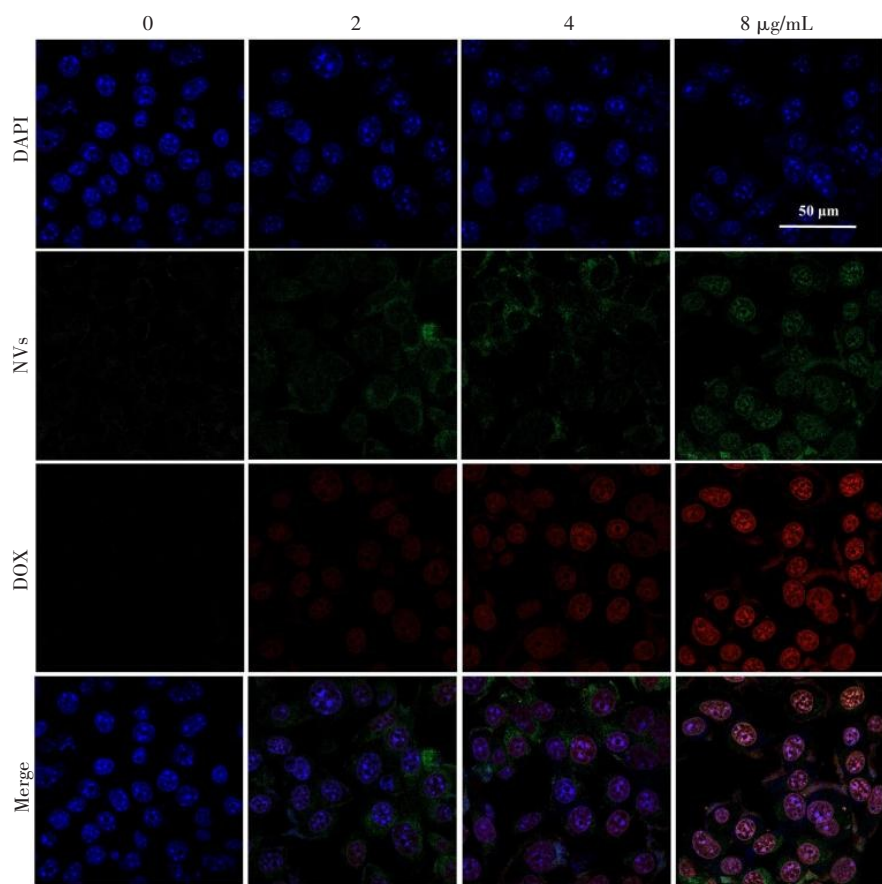


图4 4T1细胞对PD1-阿霉素的摄取图(图中标尺:50 μm)
Figure 4 Uptake of PD1-doxorubicin by 4T1 cells (scale: 50 μm)

3 结 论

本研究制备了一种利用PD-1免疫检查点抑制与化疗药物阿霉素相结合用于肿瘤治疗的材料,PD-1表达的囊泡能有效靶向肿瘤细胞,降低肿瘤细胞对效应T细胞的免疫抑制作用,并结合阿霉素对肿瘤细胞的杀伤作用,诱导肿瘤细胞死亡,增强机体的免疫能力。总的来说,这一材料具有长循环、低毒性等特点,将免疫治疗与化疗相结合,且可以快速重复制备,在降低治疗成本的同时,可以有效改善肿瘤的治疗效果,为安全有效的肿瘤免疫治疗策略的发展提供新型治疗思路。

【参考文献】

[1] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
[2] Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging biological principles of metastasis[J]. Cell, 2017, 168(4): 670-691.
[3] Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(9): 533-548.
[4] Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis[J]. Nat Med, 2013, 19(11): 1423-1437.
[5] Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential[J]. Cell, 2015, 161(2): 205-214.
[6] Palucka AK, Coussens LM. The basis of oncoimmunology[J]. Cell, 2016, 164(6): 1233-1247.

[7] Aasen T, Mesnil M, Naus CC, et al. Gap junctions and cancer: communicating for 50 years [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(12): 775-788.
[8] Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance[J]. Nature, 2014, 515(7528): 568-571.
[9] Zhang X, Wang C, Wang J, et al. Cancer immunotherapy: PD-1 blockade cellular vesicles for cancer immunotherapy[J]. Adv Mater, 2018, 30(22): 1870152.
[10] Robert C, Long GV, Brady B, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation[J]. New Eng J Med, 2015, 372(4): 320-330.
[11] Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: mechanisms, response biomarkers, and combinations[J]. Science Transl Med, 2016, 8(328): 328rv4.
[12] Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, et al. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 561.
[13] Hoos A. Development of immuno-oncology drugs-from CTLA4 to PD1 to the next generations[J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 15(4): 235-247.
[14] Topalian SL, Taube JM, Anders RA, et al. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(5): 275-287.
[15] Dutta R, Mahato RI. Recent advances in hepatocellular carcinoma therapy[J]. Pharmacol Therapeut, 2017, 173: 106-117.
[16] Marsh S, Liu G. Pharmacokinetics and pharmacogenomics in breast cancer chemotherapy[J]. Adv Drug Deliver Rev, 2009, 61(5): 381-387.
[17] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(8): 573-584.
[18] Brenner H, Kloor M, Pox CP. Toward better control of colorectal cancer [J]. Lancet, 2013, 383(9927): 1437.
[19] Giampaolo B, Justin MB, Ingrid AM, et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2016, 13(11): 674-690.

- [20] Apetoh L, Mignot G, Panaretakis T, et al. Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine [J]. Trends Mol Med, 2008, 14(4): 141-151.
- [21] Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, et al. Immunogenic cell death in cancer therapy[J]. Annu Rev Immunol, 2013, 31: 51-72.
- [22] Vacchelli E, Ma Y, Baracco EE, et al. Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1[J]. Science, 2015, 350 (6263): 972-978.
- [23] Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, et al. Extracellular vesicles for drug delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 106: 148-156.
- [24] Wang C, Sun W, Ye Y, et al. *In situ* activation of platelets with checkpoint inhibitors for post-surgical cancer immunotherapy[J]. Nat Biomed Eng, 2017, 1(2): 011.
- [25] Gu L, Mooney DJ. Biomaterials and emerging anticancer therapeutics: engineering the microenvironment[J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(1): 56-66.
- [26] Kuai R, Ochyl LJ, Bahjat KS, et al. Designer vaccine nanodiscs for personalized cancer immunotherapy [J]. Nat Mater, 2017, 16(4): 489-496.

(编辑:谭斯允)