

红细胞/肿瘤细胞膜仿生载体介导高靶向性 光动力抗肿瘤的体外研究

焉绍辉¹ 孙枝红² 刘杰² 孙成铭^{1,2*}

(¹滨州医学院, 烟台 264003; ²青岛大学附属烟台毓璜顶医院, 烟台 264000)

摘要 将红细胞膜和4T1乳腺癌细胞膜形成的杂合细胞膜包覆在mPEG-PLGA搭载Verteporfin形成壳结构表面, 合成新型的仿生纳米递送载体RT@VNPs。采用透射电镜、纳米粒度及Zeta电位分析仪、紫外-可见波谱仪、荧光波谱仪等检测仿生纳米载体的基础性能。在此基础上, 以乳腺癌细胞4T1为研究对象, 评估体外RT@VNPs的细胞摄取、ROS生成和杀伤能力; 此外, 通过测定免疫原性细胞死亡相关指标HMGB1和ATP, 进一步分析RT@VNPs诱导肿瘤细胞产生免疫原性细胞死亡效应的能力。

关键词 细胞膜; 肿瘤靶向性; 免疫原性细胞死亡; 仿生纳米载体

In Vitro Study of Erythrocyte/Tumor Membrane Cloaked Nanoparticle as Biomimetic Nanocarriers for Highly Targeting Photodynamic Cancer Therapy

YAN Shaohui¹, SUN Zhihong², LIU Jie², SUN Chengming^{1,2*}

(¹Binzhou Medical University, Yantai 264003, China; ²Yantai Yuhuangding Hospital Affiliated to Qingdao University, Yantai 264000, China)

Abstract The hybrid cell membrane formed by erythrocyte membrane and 4T1 breast cancer cell membrane was cloaked on the surface of mPEG-PLGA loaded with Verteporfin to form a shell structure, and a novel biomimetic nano-delivery carrier RT@VNPs was synthesized. The basic properties of biomimetic nanocarriers were analyzed by transmission electron microscopy, Zetasizer Nano ZS instrument, ultraviolet-visible spectrometers, and fluorescence spectrometers, etc. On this basis, 4T1 cells were used to evaluate the cellular uptake, ROS generation, and killing abilities of RT@VNPs *in vitro*. In addition, the ability of RT@VNPs induced 4T1 cells to produce immunogenic cell death effects was further analyzed by measuring the immunogenic cell death-related indicators HMGB1 and ATP.

Keywords cell membrane; tumor targeting; immunogenic cell death; biomimetic nanocarriers

随着全球范围内人口老龄化情况加剧, 恶性肿瘤的负担压力将会进一步增加, 其中我国恶性肿瘤的发病率和死亡率增幅最快, 已成为恶性肿瘤发病的重灾区^[1]。据国家最近一期的癌症统计数据显示, 恶性肿瘤已经成为威胁我国人群健康的主要公共卫生问题之一, 并且发病死亡率均呈持续上升态势, 防

控形势异常严峻^[1-2]。光动力治疗是继手术、放疗、化疗之后兴起的新型微创抗癌技术之一, 已成为癌症精准治疗中的新范例。然而传统光动力治疗有诸多不足, 如光敏剂组织穿透力有限导致诱导肿瘤细胞凋亡效率较低、治疗时易产生耐药性等, 因此, 这也一定程度上限制了传统光动力治疗的临床应

收稿日期: 2022-05-16 接受日期: 2022-07-05

烟台市科技计划项目(批准号: 2022MSGY074)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18953569897, E-mail: chengmingsun012@163.com

Received: May 16, 2022 Accepted: July 5, 2022

This work was supported by the Yantai Science and Technology Plan Project (Grant No.2022MSGY074)

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

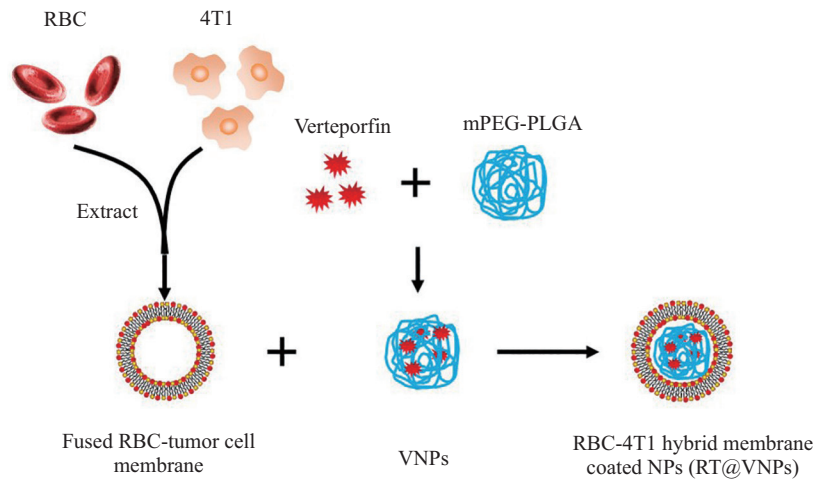


图1 新型仿生载体RT@VNPs的制备流程

Fig.1 Preparation process of novel biomimetic vector RT@VNPs

用。近年来随着纳米技术的不断发展, 纳米材料介导的光动力疗法在肿瘤治疗的基础研究和临床应用领域已取得了巨大的进展, 纳米材料可以优先在肿瘤处富集, 在激光的照射下通过生成活性氧(reactive oxygen species, ROS)诱导肿瘤细胞死亡, 增强肿瘤部位免疫原性细胞死亡(immunogenic cell death, ICD)效应, 改善局部免疫微环境, 促进免疫细胞向肿瘤部位的浸润, 进而进一步增强光动力抗肿瘤治疗效果^[3-7]。

近年来随着纳米技术的发展和科学研究的不断深入, 以纳米载体为主要作用形式的药物递送体系, 因其所特有的减毒增效特性和设计方面的高度灵活性, 已成为新一代生物安全性高、作用位点特异性强且有效的药物递送系统。然而一方面体外合成的纳米载体经注射的方式进入体内, 由于体内极为复杂的血液环境, 纳米载体不可避免的被血液环境视为外来物质给予识别并清除, 体内的内皮系统也阻碍纳米载体到达目标部位, 因此纳米载体的组织渗透性差; 另一方面, 由于纳米载体表面在体内也可发生不可控变化, 这也会导致纳米载体出现非特异性组织分布, 靶向性不足等问题, 并可产生一定的毒副作用。鉴于纳米载体生物表面的重要性, 对其进行工程化的改造和修饰, 可有助于改善纳米载体的体内性能。基于此, 近年来科学家们受天然材料启发, 构建了一系列新型仿生纳米药物递送系统, 其系统内包含具有机体自身细胞特性的药物递送载体, 如红细胞递送载体、外泌体递送载体、免疫细胞递送载体、血小板递送载体、肿瘤细胞递送载体等, 其具有细胞类似的生物膜结构, 具有一定的靶向递送潜能, 可有效地克服传统纳

米药物递送体系的局限性, 不会引入外源物质(如基因组DNA)并易于在生物体内降解进而降低生物安全风险, 目前已成为新一代的智能化药物递送系统^[8-12]。

本研究基于红细胞膜和肿瘤细胞膜的特点, 将两者相融合构建兼具生物相容性、长循环特性和同源靶向性的杂合细胞膜系统, 并通过物理挤压的方式将其包覆在聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]形成的颗粒骨架外; 同时, 通过疏水作用将疏水性小分子光敏剂维替泊芬(verteporfin)包载于其中, 进而形成由红细胞膜和肿瘤细胞膜伪装的仿生药物递送系统RT@VNPs, 并对RT@VNPs的性能进行测定, 验证其体外抗肿瘤活性(图1)。

1 材料和方法

1.1 实验材料

光敏剂 Verteporfin 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; poly (ethylene glycol) methyl ether-block-poly (lactide-co-glycolide)(mPEG-PLGA)、DCFH-DA(2,7-dichlorodi-hydrofluorescein diacetate, 2,7-二氯荧光素二乙酸酯)购自Sigma-Aldrich公司; Annexin V-FITC/PI购自 Thermo Scientific公司; 小鼠乳腺癌细胞株4T1由中国科学院上海细胞库提供。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠红细胞和肿瘤细胞膜的提取 将处于对数生长期的4T1肿瘤细胞接种于175 cm²的培养瓶中, 培养后将其经细胞刮分离收集于15 mL离心管中, 培养后将其经细胞刮分离收集于15 mL离心管, 800 ×g离心5 min, PBS漂洗3次。然后, 将中性细胞裂解缓冲液加入离心管中, 加入蛋白酶抑制剂, 冰浴

条件下超声破碎 10 min。将超声破碎处理的细胞于 4 °C、3 500 ×g 离心 10 min, 收集上清液。将上清液经 4 °C、20 000 ×g 离心 25 min, 去除细胞碎片; 再将上清液 4 °C、100 000 ×g 离心 45 min, 获得肿瘤细胞膜。

通过眼眶取血法从 BALB/c 小鼠眼部取全血置于 15 mL 的含有 3.8% 柠檬酸钠抗凝剂的离心管中。将血液置于离心机中常温下 3 500 ×g 离心 10 min, 弃掉血清层, 留取红细胞层。并将红细胞经 PBS 缓冲液洗涤 3 次。将洗涤好的红细胞加入预冷的低渗 PBS 溶液 (0.2× PBS) 中, 置于冰上放置 1 h 使之在低渗条件下完全溶血。将上述溶液于 4 °C、10 000 ×g 离心 20 min, 使红细胞膜沉淀, 去除其他杂质 (如血红蛋白等)。重复上述操作 3 次后, 再用超声破碎仪处理 30 s, 即可制备红细胞膜。将制备的红细胞膜和肿瘤细胞膜按照总蛋白质 1:1 的比例经超声混匀, 置于 -80 °C 备用。动物实验方案经过滨州医学院实验动物福利与伦理委员会审批 (伦理编号: QUD-AEC-2022-209)。

1.2.2 RT@VNPs 的合成和性能测定 将红细胞膜和 4T1 肿瘤细胞膜按照总蛋白质 1:1 的比例形成的杂合细胞膜直接通过挤压方式包覆于 VNPs 表面而形成 RT@VNPs。首先, 将 4 mg Verteporfin 置于含有 80 mg mPEG-PLGA 的 DMF 溶液 (8 mL) 中, 并将混合溶液滴加至 40 mL 水中, 室温下搅拌 3 h 后即形成 Verteporfin-mPEG-PLGA 纳米颗粒 (VNPs); 透析处理 24 h 后将未包载的 Verteporfin 分离出来。其次, 将前面获得的红细胞/4T1 杂合细胞膜 (总蛋白质 1:1) 通过反复挤压的方式附着于 0.22 μm 的滤器膜上, 再将上述制备的 VNPs 通过挤压的方式通过滤器, 即形成终产物 RT@VNPs。R@VNPs 的制备方式同 RT@VNPs。

RT@VNPs、R@VNPs 和 VNPs 粒径分布和表面电势使用 Zetasizer Nano ZS 仪器 (Malvern) 进行分析, 其基本形貌采用 TEM (FEI Tecnai G2 F20 S-Twin) 进行分析。测定 RT@VNPs、R@VNPs 和 VNPs 的紫外-可见光谱 (Lambda25, PerkinElmer) 曲线和荧光光谱 (F920, Edinburgh Instruments, Ltd.) 曲线, 并测定其在 660 nm 激光处理下的 ROS 水平及溶液稳定性和血液相容性。

1.2.3 RT@VNPs 肿瘤细胞靶向性检测 将 4T1 细胞和 Bend3 细胞分别以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于 8 孔的共聚焦培养板 (Thermo Fisher Scientific) 中, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中。培养

24 h 后, 经 RT@VNPs (10 μg/mL, Verteporfin)、R@VNPs (10 μg/mL, Verteporfin) 和 VNPs (10 μg/mL, Verteporfin) 处理 60 min, PBS 洗涤 3 次后, 4% 多聚甲醛 (200 μL) 4 °C 固定 10 min。将固定好的细胞经预冷的 PBS 洗涤后, 加入细胞核染色液 DAPI (10 μg/mL PBS 溶液) 室温处理 10 min, 经 PBS 洗涤后去除多余染料。利用激光共聚焦显微镜 (CLSM, Leica TCSNT1, 德国) 在激发波长为 408 nm (发射带通: 430~520 nm) 和 633 nm (发射带通: 650~700 nm) 处观察不同处理组细胞的纳米颗粒摄入情况。

1.2.4 RT@VNPs ROS 生成能力测定 将 4T1 细胞按照每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于 8 孔的共聚焦培养板 (Thermo Fisher Scientific) 中培养。培养 24 h 后, 将 RT@VNPs (10 μg/mL, Verteporfin)、R@VNPs (10 μg/mL, Verteporfin) 和 VNPs (10 μg/mL, Verteporfin) 分别加入培养基中共孵育 60 min 后, PBS 洗涤 3 次, 加入 10 μmol/L DCFH-DA (ROS 生成监测探针) 处理 30 min, 随后用 660 nm (60 mW/cm²) 激光器照射 10 min。激光共聚焦显微镜 (CLSM, Leica TCSNT1, 德国) 下测定不同处理组的 ROS 生成情况。

1.2.5 体外细胞凋亡水平测定 为检测细胞凋亡, 将 4T1 肿瘤细胞按照每孔 1×10^6 个细胞的密度接种在 6 孔板中。过夜培养后, 加入 RT@VNPs (10 μg/mL, Verteporfin)、R@VNPs (10 μg/mL, Verteporfin) 和 VNPs (10 μg/mL, Verteporfin) 处理, 经纳米颗粒处理 3 h 后, 用 660 nm 激光器 (0.5 W/cm²) 辐照 10 min。将光照处理后的细胞置于 CO₂ 培养箱中, 37 °C 孵育 6 h, 细胞经胰蛋白酶消化处理, 预冷的 PBS 洗涤 3 次, 将细胞收集在 1.5 mL 的离心管中。将待测的细胞加入 Annexin 结合缓冲液 (100 μL/管) 重悬, 随后加入 Alexa Fluor 488-annexin V (5 μL) 和 PI (1 μL, 100 μg/mL) 染色液, 室温下孵育 30 min。孵育完成后, 加入 400 μL Annexin 结合缓冲液, 置于冰上保存, 采用 BD 流式细胞仪进行分析。

1.2.6 免疫原性细胞死亡标志物检测 采用 ATP 检测试剂盒对处理组处理后的 4T1 细胞外 ATP 水平进行定量测定。将 4T1 肿瘤细胞接种于 6 孔板中, 过夜培养后将其与 RT@VNPs (10 μg/mL, Verteporfin)、R@VNPs (10 μg/mL, Verteporfin) 和 VNPs (10 μg/mL, Verteporfin) 共孵育 3 h 后, 分别给予或未给予 660 nm 激光光照处理。收集培养上清液, 12 000 ×g 离心 10 min, 将上清液转移至 1.5 mL 的离心管中, 采用 ATP 检测试剂

盒利用发光法测定细胞外ATP生成情况。

HMGB1采用ELISA检测试剂盒进行测定。将4T1肿瘤细胞按照每孔 5×10^6 个细胞的密度接种于6孔板中, 过夜培养后将其与RT@VNPs(10 $\mu\text{g/mL}$, Verteporfin)、R@VNPs(10 $\mu\text{g/mL}$, Verteporfin)和VNPs(10 $\mu\text{g/mL}$, Verteporfin)共孵育3 h, 分别给予或未给予660 nm激光光照处理。采用ELISA检测试剂盒(Aviva Systems Biology)测定HMGB1表达水平。

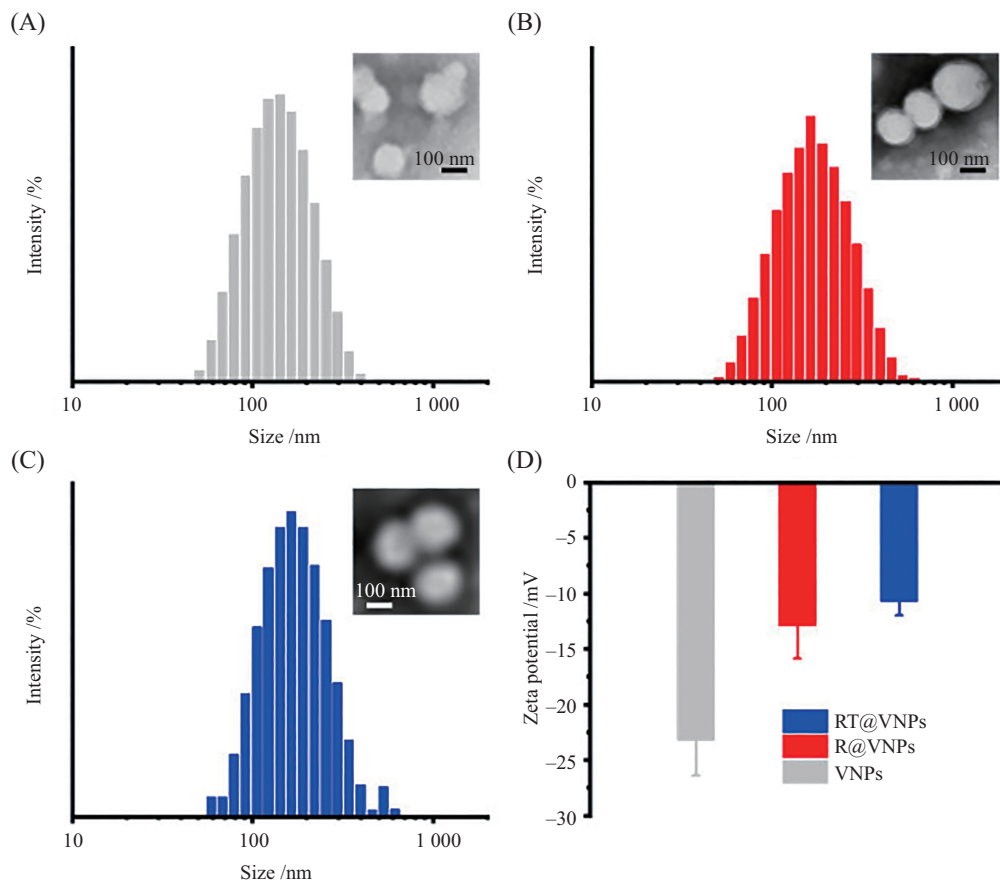
1.2.7 统计分析 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 计数资料数据以N(%)形式表示。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RT@VNPs的制备和形貌测定

基于细胞膜包被的仿生纳米载体是直接细胞膜表面上的蛋白质转移至纳米材料表面, 使合

成的仿生载体兼具来源细胞和纳米粒的功能。合成RT@VNPs, 首先需要将光敏剂Verteporfin装载至mPEG-PLGA形成壳结构中(VNPs), 然后再将制备好的杂合细胞膜(Red-4T1 cell membrane)通过挤压的方式附着于VNPs表面(图1)。透射电镜结果显示, RT@VNPs呈现典型球形的核壳结构(图2), 水合粒径分析表明, RT@VNPs的平均粒径为(163 \pm 4.3) nm, 高于未包覆细胞膜的纳米粒[(148 \pm 3.6) nm, 图2], 相比增加15 nm, 这也与之前报道的天然细胞膜双分子层结构厚度约为5~10 nm相吻合, 进而表明杂合细胞膜成功包覆于纳米粒表面。此外, 透射电镜和水合粒径结果显示, 红细胞膜包载的纳米粒(R@VNPs)与杂合细胞膜包载的纳米粒大小和形貌相类似(图2B), 并无明显差异。随后, 考察VNPs、R@VNP和RT@VNPs的Zeta电位情况, RT@VNPs的表面电荷[(-10.8 \pm 1.2) mV]与R@VNPs表面电荷[(-12.9 \pm 2.9) mV]相类似, 均低于



A: VNPs的DLS测定结果和TEM结果; B: R@VNPs的DLS测定结果和TEM结果; C: RT@VNPs的DLS测定结果和TEM结果; D: VNPs、R@VNPs和RT@VNPs的电势结果。

A: representative DLS measurement result and TEM image of VNPs; B: representative DLS measurement result and TEM image of R@VNPs; C: representative DLS measurement result and TEM image of RT@VNPs; D: the results of zeta potential were measured for VNPs, R@VNPs and RT@VNPs.

图2 VNPs、R@VNP和RT@VNPs形貌和电势变化

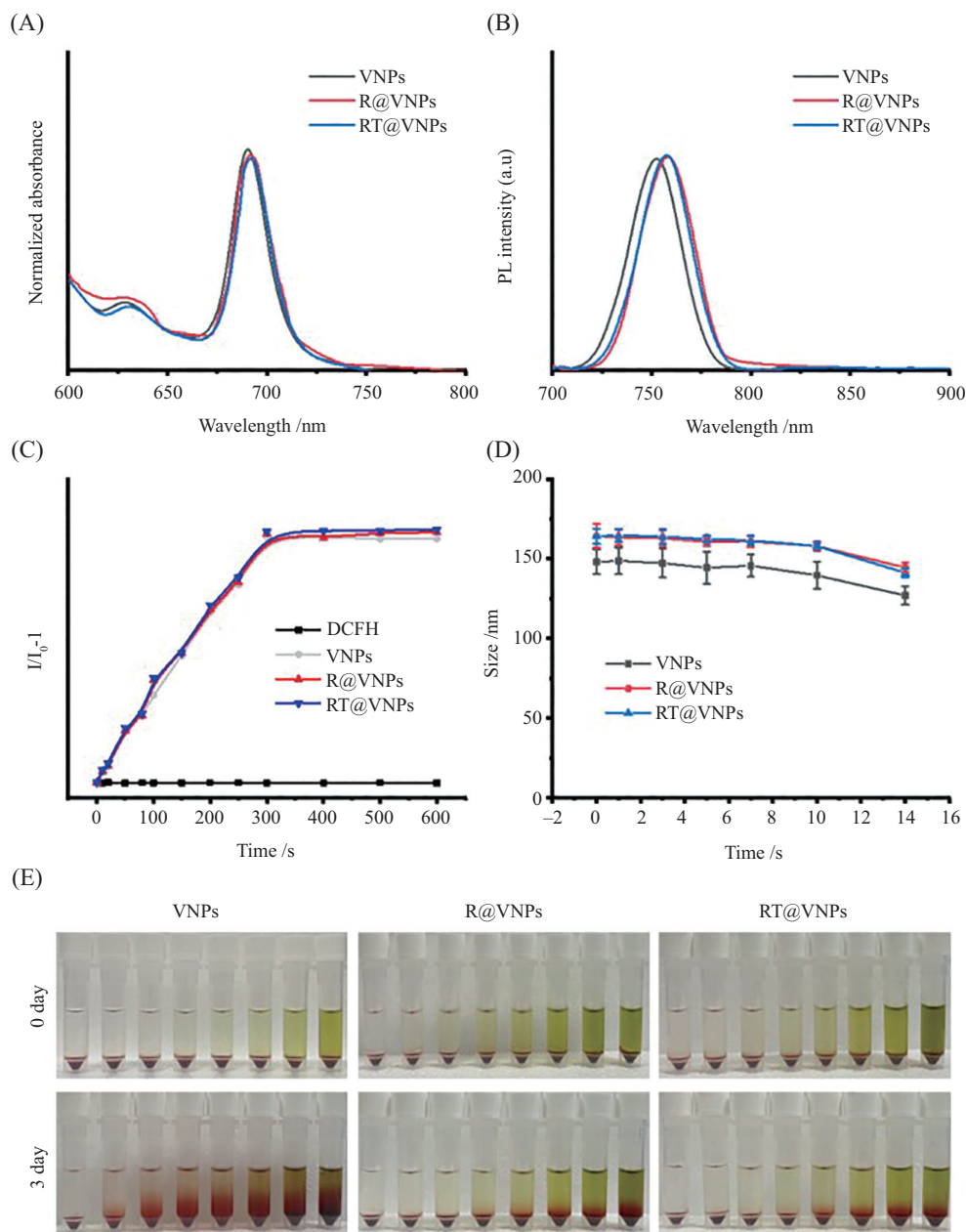
Fig.2 Morphology and Zeta potential changes of VNPs, R@VNPs and RT@VNPs

VNPs (-23.2 ± 3.2) mV]的表面电荷,这也进一步证明杂合细胞膜涂层已成功包覆于纳米粒表面。

2.2 RT@VNPs的紫外-荧光波谱、ROS和体外安全性分析

我们首先研究细胞膜包覆对光敏剂Verteporfin光

学性质的影响,紫外-可见光吸收(UV-vis)结果显示,R@VNPs和RT@VNPs的最大吸收波长在695 nm,这与VNPs的最大吸收波长相一致(图3A);荧光波谱结果分析表明,R@VNP和RT@VNPs的最大荧光发射波长在760 nm,略高于VNP的最大发射波长(755 nm)(图



A: VNPs、R@VNPs和RT@VNPs紫外吸收光谱结果; B: VNPs、R@VNPs和RT@VNPs荧光光谱结果; C: 660 nm激光处理下,不同处理时间VNPs、R@VNPs和RT@VNPs的ROS产生水平,DCFH为监测探针; D: 不同处理时间VNPs、R@VNPs和RT@VNPs在PBS溶液中的粒径稳定性。E: 不同浓度VNPs、R@VNPs和RT@VNPs处理0天和3天后红细胞的溶血百分比(0、1、3、5、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Verteporfin)。

A: UV-vis absorption spectra of VNPs, R@VNPs and RT@VNPs; B: fluorescence spectra of VNPs, R@VNPs and RT@VNPs; C: ROS generation by VNPs, R@VNPs and RT@VNPs after irradiated by white light for different periods of time and monitored by DCFH; D: the size stability of VNPs, R@VNPs and RT@VNPs after treatment for different time in PBS solution; E: hemolytic percentage of red blood cells after treatment with VNPs, R@VNPs and RT@VNPs at various concentrations (0, 1, 3, 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Verteporfin) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 0 day and 3 day incubation.

图3 VNPs、R@VNPs和RT@VNPs紫外-荧光波谱、ROS生成能力和稳定性

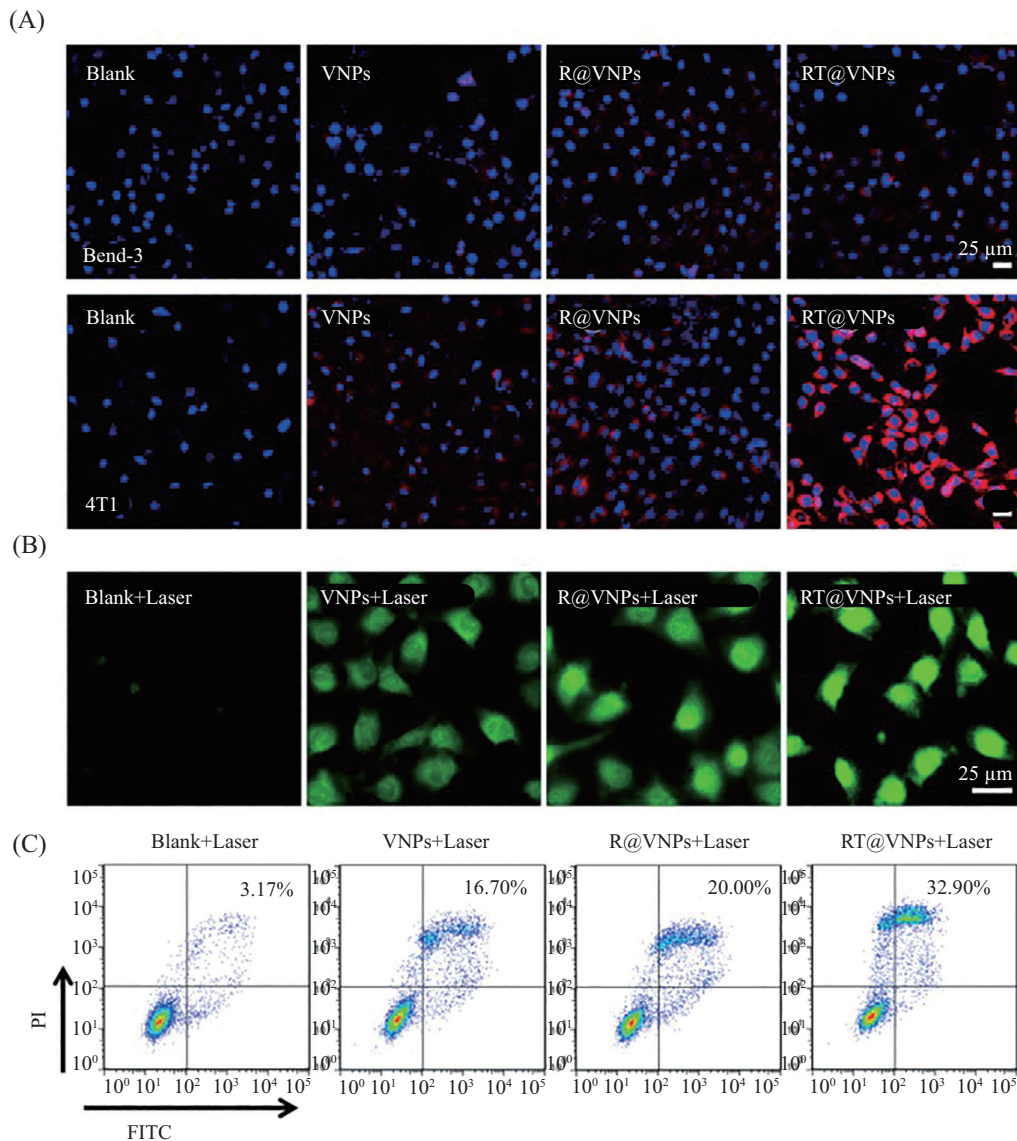
Fig.3 UV-fluorescence spectra, ROS generation ability and stability of VNPs, R@VNPs and RT@VNPs

3B); 接下来, 我们研究包覆了细胞膜的纳米载体光敏剂的ROS产生能力的影响, 结果显示, 细胞膜的包被并没有显著影响光敏剂Verteporfin的ROS产生性能(图3C); 仿生纳米载体的颗粒稳定性也是理想纳米递送载体必须具备的条件之一。各纳米载体在PBS缓冲液中不同时间粒径变化结果(图3D)显示, R@VNP和RT@VNP相较于VNP的粒径在14天内无明显变化, 表明所构建的仿生纳米载体具有良好的溶

液稳定性; 测定不同浓度的各纳米载体在0天和3天的红细胞溶血百分比, 结果(图3E)显示, R@VNP和RT@VNP相较于VNP在3天时无明显溶血现象, 表明所构建的仿生纳米载体具有良好的血液相容性。

2.3 RT@VNP的肿瘤靶向性和体外杀伤效果评价

为了进一步研究RT@VNP的自我识别能力, 我们分别将正常小鼠内皮细胞株Bend-3和乳腺癌细胞株4T1与纳米载体共孵育, 激光共聚焦(图4)

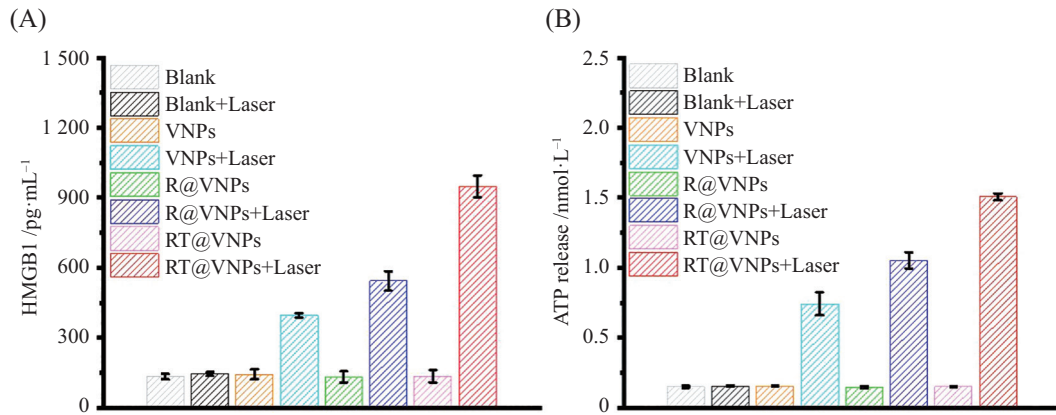


A: 激光共聚焦显微镜测定VNP、R@VNP和RT@VNP处理后小鼠内皮细胞株Bend-3和小鼠乳腺癌细胞株4T1摄取情况, DAPI染细胞核; B: ROS检测探针DCFH-DA监测VNP、R@VNP和RT@VNP经660 nm激光(60 mW/cm²)处理后4T1细胞内的ROS产生水平; C: 660 nm激光处理下, 流式细胞术分析VNP、R@VNP和RT@VNP诱导细胞凋亡水平。

A: after VNP, R@VNP and RT@VNP treatment, the confocal laser microscopy showed the uptake of Bend-3 and 4T1 tumor cell, and the Bend-3 and 4T1 cell nuclei are stained by DAPI; B: the generation of ROS by VNP, R@VNP and RT@VNP based on the fluorescence intensity changes of DCFH-DA in cells upon 660 nm light irradiation (60 mW/cm²); C: flow cytometry analysis showing that VNP, R@VNP and RT@VNP induce apoptosis upon 660 nm irradiation.

图4 VNP、R@VNP和RT@VNP体外肿瘤靶向和杀伤能力

Fig.4 *In vitro* tumor targeting and killing abilities of VNP, R@VNP and RT@VNP



A: VNPs、R@VNPs和RT@VNPs联合660 nm激光或单独处理后, ATP检测试剂盒测定肿瘤细胞的细胞外分泌ATP。B: VNPs、R@VNPs和RT@VNPs联合660 nm激光或单独处理后, ELISA试剂盒测量肿瘤细胞释放的HMGB1水平。

A: extracellular secreted ATP from tumor cells was measured using an ATP detection kit after treating with VNPs, R@VNPs and RT@VNPs with or without 660 nm laser irradiation. B: HMGB1 released from tumor cells was measured by ELISA after treating with VNPs, R@VNPs and RT@VNPs with or without 660 nm laser irradiation.

图5 ICD标志物HMGB1和ATP测定

Fig.5 Determination of ICD markers HMGB1 and ATP

结果显示,相较于VNPs和R@VNPs处理组,RT@VNPs可显著识别肿瘤细胞并被肿瘤细胞摄入(图4A),这表明引入肿瘤细胞膜的杂合细胞膜载体可显著提高其肿瘤靶向能力;接下来,我们通过ROS检测探针DCFH-DA监测660 nm激光处理后细胞水平ROS生成情况,激光共聚焦结果显示,RT@VNPs组细胞内的ROS水平明显高于其他组,说明RT@VNPs更易被肿瘤细胞摄入,这也进一步表明RT@VNPs具有更强的肿瘤靶向性(图4B);以小鼠乳腺癌细胞株4T1为研究对象,评估RT@VNPs的体外杀伤性能,结果显示在660 nm激光处理下,RT@VNPs表现出了更强的肿瘤杀伤性能。上述结果证实,RT@VNPs具有更好的肿瘤靶向能力,并可在660 nm激光诱发下产生更高水平的ROS和更强的肿瘤细胞杀伤效果。

2.4 免疫原性细胞死亡标志物测定

光敏剂Verteporfin产生的ROS不仅可以直接杀伤肿瘤细胞,还可以诱导产生ICD效应。HMGB1和ATP是ICD效应的主要标志。为了评估RT@VNPs体外诱导ICD能力,我们测定HMGB1和ATP生成水平,结果显示,RT@VNPs组在给予660 nm激光处理后, HMGB1和ATP生成水平显著高于其他组,表明660 nm激光处理下的RT@VNPs表现了出更强的ICD诱导效应(图5)。

3 讨论

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤之一,其发

病率呈现逐年上升的趋势。目前乳腺癌的主要治疗策略仍是以手术为主,放化疗为辅,但是其治疗效果不容乐观。手术切除虽然可以将局部“可见”病灶切除,但是对于肉眼不可见的病灶则难以切除,并会对机体正常组织造成一定的损伤。放化疗作为乳腺癌术后的补充治疗,其是一把“双刃剑”,在杀伤肿瘤细胞的同时也会对正常组织造成伤害,且患者易产生耐药性,导致放化疗的临床疗效和患者受益率均不理想。光动力治疗作为一种非侵入式的恶性肿瘤治疗方式,与不断革新的纳米技术相结合,从而产生纳米材料介导的光动力治疗,该疗法成为乳腺癌精准治疗领域的新星^[13-15]。

纳米技术介导的光动力治疗是癌症治疗的新型微创模式,可以优先在肿瘤处富集,在激光的照射下通过生成ROS精确破坏肿瘤组织,而对正常组织无明显伤害,是一种更为个体化、人性化的抗癌技术,近年来备受到各国科学家关注。光动力治疗在实现肿瘤杀伤的同时,可有效触发ICD效应,促进T细胞向肿瘤内部的浸润,实现“冷”肿瘤向“热”肿瘤的转变。本研究结果也证实,光动力疗法可以诱导肿瘤细胞的ICD效应,促进ICD标志物的生成。光动力治疗虽然是一种很有前途的抗肿瘤治疗方式,在临床中得到广泛的应用,但是其也存在一些问题,包括介导光动力治疗的传统纳米载体血液循环时间短、被视为外来物质易被血液清除、靶向性不足等问题^[3-7]。为了解决这些难题,受自然界天然材料特

征启发,科学家基于“模拟自然”理念,使得仿生纳米载体得以广泛应用。尤其是基于细胞来源的仿生纳米载体因其兼具体内循环时间长、肿瘤靶向性强和自身排异率低等特点,已成为肿瘤治疗领域的热点研究和热点话题^[8-12]。本实验也是基于天然细胞的特点,构建一种新型的仿生纳米载体,助力于光动力介导乳腺癌治疗。

目前,以细胞膜和细胞外囊泡为基础的仿生纳米载体研究和应用最为广泛。研究人员将天然细胞膜包覆在有机或无机纳米粒表面而形成纳米仿生载体。细胞膜包覆的仿生载体具有类似于来源细胞的基本功能,这也赋予了纳米仿生载体较好的生物相容性和可变的表面性质。因此,细胞膜包覆的仿生载体既具有所包覆纳米粒的作用,又具有来源细胞的功能。GUO等^[6]构建了一种红细胞伪装的PLGA-NPs的新型抗原肽递送系统,作为抗原递送载体的组分,红细胞膜可以保护所搭载的抗原免于被血液清除,将抗原直接呈递给免疫细胞,进而达到有效治疗黑色素瘤的目的;ZHANG等^[7]报道一种红细胞膜包覆金属有机框架(metal organic framework, MOF)而形成的仿生纳米反应器,通过红细胞膜仿生表面修饰,可以显著延长纳米反应器的血液循环时间和增强免疫逃逸性能,进而实现协同级联效应的结肠癌治疗。虽然红细胞膜伪装的纳米载体可以逃避免疫系统的监控,但其没有明显的肿瘤靶向性,因此,红细胞膜伪装的纳米载体的肿瘤靶向性效果较差。肿瘤细胞膜因其表面具有膜抗原和膜结构蛋白质,其伪装的纳米载体可通过同源靶向作用靶向肿瘤细胞。基于此,CHEN等^[18]合成一负载吲哚菁绿的癌细胞膜包载的纳米粒,其具有特异的同源靶向性,可实现肿瘤靶向成像和有效的光学治疗效果。因此,将红细胞膜和肿瘤细胞膜功能相融合,可进一步提高纳米仿生载体的特异性靶向能力、良好的生物相容性和生物安全性。XIONG等^[19]将小鼠来源的卵巢癌细胞(ID8)和红细胞膜相融合,制备合成混合型细胞膜仿生载体,该载体可以显著延长纳米载体在复杂血液环境中的循环时间和提高肿瘤特异靶向能力,负载吲哚菁绿的磁性纳米颗粒可被用于卵巢癌的联合治疗。上述研究结果也与本研究相类似,本研究体外结果已证明,红细胞膜和肿瘤细胞膜形成的杂合细胞膜结构,可以显著提高纳米载体靶向肿瘤细胞并被肿瘤细胞摄入的能力,且其亦具有良

好的稳定性。此外,本研究的体外结果虽然很好的证实仿生纳米载体的生物安全性、稳定性和肿瘤靶向性,但是并未进行详尽的体内研究,这也是本研究的局限性所在。

综上所述,通过低渗和超声处理获得杂合型细胞膜进而制备的仿生纳米载体,具有良好的生物相容性、稳定性和肿瘤靶向性。体外结果表明,新型仿生纳米载体具有特异性靶向肿瘤细胞的能力,并在激光处理下表现出较强的ROS生成能力和肿瘤细胞杀伤性能。

参考文献 (References)

- [1] 王悠清, SUNG H, FERLAY J, 等. 2020年全球癌症统计报告[J]. 中华预防医学杂志(WANG Y Q, SUNG H, FERLAY J, et al. Global Cancer Statistics 2020 [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine), 2021, 55(3): 398-8.
- [2] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview [J]. Int J Cancer, 2021, 149(4): 778-89.
- [3] RITA L S, BRUNA L M, CÁTIA G A, et al. Combining photothermal-photodynamic therapy mediated by nanomaterials with immune checkpoint blockade for metastatic cancer treatment and creation of immune memory [J]. Adv Funct Mater, 2021, 31(29): 2010777.
- [4] HONG E J, CHOI D G, MIN S S, et al. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials [J]. Acta Pharm Sin B, 2016, 6(4): 297-307.
- [5] LI Y, YANG J, SUN X. Reactive oxygen species-based nanomaterials for cancer therapy [J]. Front Chem, 2021, 9(1): 650587.
- [6] ZHANG Y, WANG C X, HUANG S W. Aggregation-induced emission (AIE) polymeric micelles for imaging-guided photodynamic cancer therapy [J]. Nanomaterials, 2018, 8(11): 921-40.
- [7] ZHANG C, QIN W J, BAI X F, et al. Nanomaterials to relieve tumor hypoxia for enhanced photodynamic therapy [J]. Nano Today, 2020, 35: 100960.
- [8] HONG W, JIE L, ZWA C, et al. Tumor-permeated bioinspired theranostic nanovehicle remodels tumor immunosuppression for cancer therapy [J]. Biomaterials, 2021, 269: 120609.
- [9] XIE J, WANG Y, CHOI W, et al. Overcoming barriers in photodynamic therapy harnessing nano-formulation strategies [J]. Chem Soc Rev, 2021, 50(16): 9152-201.
- [10] ZOU Y, HE W, SHI B, et al. Cell-derived biomimetic drug delivery systems for cancer therapy [J]. Scientia Sinica Chimica, 2019, 49(9): 1203-12.
- [11] GUIDO C, MAIORANO G, CORTESE B, et al. Biomimetic nanocarriers for cancer target therapy [J]. Bioengineering, 2020, 7(3): 111-26.
- [12] LI A, ZHAO Y, LI Y, et al. Cell-derived biomimetic nanocarriers for targeted cancer therapy: cell membranes and extracellular vesicles [J]. Drug Delivery, 2021, 28(1): 1237-55.
- [13] OSTAŃSKA E, AEBISHER D, BARTUSIK-AEBISHER D. The potential of photodynamic therapy in current breast cancer treatment methodologies [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 137(3):

- 111302.
- [14] MONTASERI H, KRUGER C A, ABRAHAMSE H. Review: organic nanoparticle based active targeting for photodynamic therapy treatment of breast cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2020, 11(22): 2120-36.
- [15] MO R. Photodynamic therapy in primary breast cancer [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(2): 483-93.
- [16] GUO Y Y, WANG D, SONG Q S, et al. Erythrocyte membrane-enveloped polymeric nanoparticles as nanovaccine for induction of antitumor immunity against melanoma [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(7): 6918-33.
- [17] ZHANG L, WANG Z, ZHANG Y, et al. Erythrocyte membrane cloaked metal-organic framework nanoparticle as biomimetic nanoreactor for starvation-activated colon cancer therapy [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(10): 10201-11.
- [18] CHEN Z, ZHAO P F, LUO Z Y, et al. Cancer cell membrane-biomimetic nanoparticles for homologous-targeting dual-modal imaging and photothermal therapy [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(11): 10049-57.
- [19] XIONG J, WU M, CHEN J, et al. Cancer-erythrocyte hybrid membrane-camouflaged magnetic nanoparticles with enhanced photothermal-immunotherapy for ovarian cancer [J]. *ACS Nano*, 2021, 15(12): 19756-70.