

肿瘤细胞膜与细菌囊泡膜融合的纳米囊泡及其肿瘤效应

刘清文^{1,2} 胡永茂^{2,3} 马雁冰^{2*}

(¹昆明医科大学, 昆明 650500; ²中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650531;

³云南大学, 昆明 650500)

摘要 该文主要探讨肿瘤细胞膜与大肠杆菌仿生囊泡(BBV)进行膜融合的纳米囊泡是否可激发抗肿瘤免疫反应。通过Avanti挤出机制备具有两种生物膜特性的融合膜囊泡, 采用透射电子显微镜观察囊泡形态, 免疫荧光和免疫印迹检测膜提取的成分, 电泳和共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)观察膜融合。在此基础上, 建立TC-1小鼠肿瘤模型, 监测小鼠的肿瘤生长, 以融合囊泡免疫进行治疗干预, 并以酶联免疫斑点技术(ELISPOT)与流式细胞术分析小鼠免疫应答效果。制备物以纳米膜囊泡形式存在; 融合膜囊泡不仅显示两种膜成分的荧光共定位, 而且具备两种膜的蛋白成分, 免疫抑制剂抑制了小鼠肿瘤的生长, 增强了表达IFN- γ 的肿瘤特异的脾细胞应答水平, 降低了免疫抑制性的髓源性抑制细胞水平。两种生物膜挤压融合形成的纳米融合膜囊泡可激发抗肿瘤免疫, 为基于生物膜系统的肿瘤疫苗研究提供了基础。

关键词 肿瘤细胞膜; 细菌仿生囊泡; 肿瘤免疫治疗; 肿瘤疫苗

Nanovesicles of Tumor Cell Membranes Fused with Bacterial Vesicle Membranes and Their Effects on Tumors

LIU Qingwen^{1,2}, HU Yongmao^{2,3}, MA Yanbing^{2*}

(¹Kunming Medical University, Kunming 650500, China; ²Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650531, China; ³Yunnan University, Kunming 650500, China)

Abstract This study was to investigate whether the nanoscale vesicles prepared by fusing tumor cell membrane and BBV (bacterial biomimetic vesicles) of *Escherichia coli* have the capability of activating anti-tumor immune responses and inhibiting tumor growth. The vesicles with the immunological properties of two different bio-membrane were prepared by Avanti extrusion mechanism. Transmission electron microscopy was used to observe the morphology of the vesicles, immunofluorescence assays and Western blot were performed to analyze the extraction of membranes. SDS-PAGE and CLSM (confocal laser scanning microscopy) were employed to detect the fusion of the two membranes. On this basis, TC-1 mouse tumor model was established; the tumor growth of the mouse was monitored, and the immune response of the mouse was analyzed by ELISPOT (enzyme-linked immunospot assay) and flow cytometry. The preparation existed in the form of nanofilm vesicles. The fusion membrane vesicles not only showed the fluorescence colocalization of the two membrane components, but also possessed the protein components of the two membrane components. After immunization of tumor-bearing mouse, the fusion membrane vesicles inhibited the

收稿日期: 2022-11-04 接受日期: 2022-12-30

国家自然科学基金(批准号: 82073371)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15087096498, E-mail: may@imbcams.com.cn

Received: November 4, 2022 Accepted: December 30, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82073371)

*Corresponding author. Tel: +86-15087096498, E-mail: may@imbcams.com.cn

tumor growth, enhanced the tumor-specific spleen cell response expressing IFN- γ , and reduced the level of immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells. Nanomembrane vesicles formed by the extrusion and fusion of the two biofilms can stimulate anti-tumor immunity provides the basis for tumor vaccines based on biofilm system.

Keywords tumor cell membrane; bacterial bionic vesicles; tumor immunotherapy; tumor vaccine

治疗性疫苗的使用作为肿瘤免疫治疗的主要策略之一,在临床治疗中具有潜在巨大应用前景。其中,基于肿瘤细胞发展的疫苗是传统而吸引人的思路,是因为它可提供广谱的肿瘤抗原,且具有个性化特点^[1-2]。近年来,基于细胞膜工程的肿瘤疫苗及肿瘤靶向递送与干预策略越来越引人注目^[3]。LIU等^[4]将来自DC和肿瘤细胞的细胞膜免疫小鼠,模拟抗原递呈细胞与肿瘤细胞,发现其具有激发抗肿瘤免疫的能力;FANG等^[5]以肿瘤细胞膜包被纳米颗粒,膜上的肿瘤相关抗原与免疫佐剂一起可以被有效递送到抗原呈递细胞,促进抗肿瘤免疫反应;YANG等^[6]将甘露糖修饰于肿瘤细胞膜表面,可通过促进抗原呈递细胞对疫苗的结合和摄取,增强纳米疫苗的抗肿瘤效应。

面对肿瘤的免疫抑制机制,如何增强基于肿瘤细胞膜的疫苗激发抗肿瘤免疫的能力,是一个重要的挑战。细菌含有多种微生物相关分子模式(microbe-associated molecular patterns, MAMPs),具有强的免疫刺激能力,细菌自然分泌的外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)作为疫苗及抗原递送平台已得到越来越多的关注。利用超高压强驱动细菌通过格栅缝隙,可产生自组装的新型细菌仿生囊泡(bacterial biomimetic vesicle, BBV)。BBV是人为驱动细菌制造产生的,释放了细菌自身的胞内蛋白和核酸,相比于细菌OMV,其具有更高的产量和安全性^[7];BBV由磷脂和蛋白质组成并且具有纳米级的囊泡结构,含有细菌抗原和病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)成分,可以促进抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)的高效摄取及成熟^[8-9],研究表明其在体内具有诱导机体细胞及体液免疫应答的能力,显示出了作为天然佐剂与疫苗载体的潜力^[10-12]。考虑到肿瘤细胞膜可提供个性化的广谱肿瘤抗原,而BBV含有丰富的MAMPs及病原体相关分子模式(PAMPs)。本研究提出构建一种融合膜纳米囊泡,一方面发挥了两种膜的抗原及免疫刺激特点,另一方面利用纳米级大小的囊泡膜结构淋巴结定位及APCs高效摄取特点,在小鼠肿瘤模型中激发了抗肿瘤免疫效应,为膜工

程纳米肿瘤疫苗研究提供了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 HPV感染相关肿瘤小鼠TC-1细胞系,是经HPV16 E6、E7和ras基因共转染C57BL/6小鼠肺上皮细胞获得的,由中国医学科学院医学生物学研究所分子免疫实验室保存。培养时用含100 μ g/L链霉素、1% 100 U/mL青霉素和10%胎牛血清的RPMI1640完全培养基培养,置于37 $^{\circ}$ C、5%的CO₂恒温细胞培养箱培养。

1.1.2 实验动物 6~8周龄雌性SPF级C57BL/6J小鼠,体质量为16~18 g,来源于中国医学科学院医学生物学研究所小动物实验部,并饲养于中国医学科学院医学生物学研究所SPF级动物房内。在特定无病原体SPF(specific pathogen free)的情况下,小鼠可以自由获取食物和水,尽一切努力减少动物的痛苦,动物实验严格按照中国医学科学院医学生物学研究所动物护理与福利伦理委员会要求(伦理批准文号:DWSP202004026)。

1.1.3 主要试剂 RPMI1640培养基、胎牛血清(FBS)、含酚红的胰蛋白酶购自美国Gibco公司;BL21(DE3)大肠杆菌菌株购自宝生物工程(大连)有限公司;细胞培养瓶、细胞刮和细胞玻底皿购自NEST无锡耐思生命科技股份有限公司;HBSS缓冲液购自Servicebio公司;4%的多聚甲醛购自Biosharp公司;BCA检测试剂盒、蛋白酶抑制剂PMSF、DID和DIO染料购自碧云天生物技术有限公司;基质胶和70 μ m无菌细胞筛网购自美国Bioscience公司;小鼠淋巴细胞分离液购自北京达科为生物科技有限公司;Collagenase购自Sigma公司;流式抗体、Fixation Buffer和Permeabilization-Wash Buffer购自美国Biolegend公司;ELISPOT试剂盒购自瑞典Mabtech公司;DAPI染液(ab104139)、pan-cadherin(ab51034)、Na⁺/K⁺-ATP酶(ab76020)购自Abcam公司;HRP标记的山羊抗兔IgG(SA00001-2)购自Proteintech公司;多孔聚碳酸酯膜购自英国Whatman公司;多功能检测酶标仪购自美国Biotek公司;Avanti挤出机(LiposoFast-1)购自加拿大Avestin公司;流式细胞

仪购自美国Beckman公司; 转膜液、ECL化学发光底物、转膜仪、凝胶成像仪购自美国Bio-Rad公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 TC-1肿瘤细胞在T225细胞培养瓶大规模培养, 用RPMI1640完全培养基培养(含100 $\mu\text{g/L}$ 链霉素、1% 100 U/mL青霉素和10%胎牛血清)。

1.2.2 肿瘤细胞膜提取 TC-1肿瘤细胞培养于T225的细胞培养瓶, 当细胞密度约90%时, 用细胞刮子刮下细胞, 收集细胞, 800 $\times g$ 离心5 min, 弃上清, PBS洗涤2次, 取少量细胞用于计数, 加适量PMSF至2 000~5 000万细胞中, 混匀后冰浴放置10~15 min, 在液氮和室温依次反复冻融3~4次, 取少量样品在显微镜下检测细胞破碎的程度, 直到细胞破碎的程度为80%左右。4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 $\times g$ 离心15 min, 收集上清液至离心管中, 随后4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 $\times g$ 离心45 min, 以沉淀细胞膜碎片, 存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 后续备用。

1.2.3 BBV(细菌仿生囊泡)的制备 BL21(DE3)大肠杆菌菌株培养于37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min、400 mL LB培养基中, 6 h后收集菌液, 8 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心30 min, 用200 mL的HBSS缓冲液重新悬浮细菌。然后将细菌悬液通过APV均质器(APV-2000)3次, 每次约5 min, 压力为1 200 bar。得到的悬浮液在4 $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 $\times g$ 离心30 min, 将产生的上清液在4 $^{\circ}\text{C}$ 、26 000 r/min离心30 min, 去除上清液后, 用3 mL HBSS缓冲液重悬沉淀。将梯度密度为10%、15%、20%、25%、30%、35%、45%的碘二醇加入超离心管中, 将重悬液置于最上层, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 $\times g$ 超离心4 h后, 分离出10%~45%碘二醇之间的界面, 得到纯化的BBV。

1.2.4 融合囊泡的制备 通过反复冻融和差速离心的组合, 将收集的肿瘤细胞膜和BBV按1:1的蛋白量通过Avanti挤出机共挤出20个循环(首次使用400 nm多孔聚碳酸酯膜)随后通过200 nm多孔聚碳酸酯膜共挤出, 得到融合囊泡进行离心以除去多余的囊泡, 存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 后续备用。

1.2.5 免疫荧光观察肿瘤细胞膜表面蛋白 第1天在6孔板的玻底皿铺 5×10^5 个/mL的TC-1肿瘤细胞, 24 h后取出玻底皿用预温的PBS洗涤, 4%的多聚甲醛固定细胞30 min, 5% BSA室温封闭30 min, 一抗(Na^+/K^+ -ATP稀释比为1:500; pan-cadherin稀释比为1:250)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜(1% BSA稀释抗体), 第2天预温(37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱)的PBS洗涤后加荧光二抗(驴抗兔IgG H&L稀释比为1:800, 山羊抗兔IgG H&L稀释比为1:800), 再次洗

涤后在玻底皿上滴加一滴DAPI进行染核, 盖上盖玻片, 在共聚焦显微镜下观察并记录图像。

1.2.6 免疫印迹检测肿瘤细胞膜表面蛋白 将收集的膜成分用BCA法检测蛋白质的浓度, 20 μg 的蛋白在浓度12%的SDS-PAGE蛋白胶150 V的电压中进行。在转膜仪2.5 A、25 V条件下进行湿转7 min, 5% BSA室温封闭2 h, 加入一抗(Na^+/K^+ -ATP稀释比为1:20 000; pan-cadherin稀释比为1:50 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 第2天用TBST洗涤后加入相应种属二抗(羊抗兔稀释比1:10 000), 室温孵育1 h; TBST洗膜后用ECL化学发光显色液(A液:B液按体积比1:1充分混匀)显色, 用凝胶成像仪成像并拍照。

1.2.7 膜囊泡的形态观察 将制备的肿瘤细胞膜囊泡、细菌仿生囊泡以及膜融合囊泡分别用PBS稀释5倍, 然后将5 μL 样品滴在碳涂层的铜网上, 静置5 min, 滤纸吸去多余的液体, 取5 μL 染液(2%磷钨酸溶液, pH6.5)滴至铜网, 静置5 min, 滤纸吸走多余液体, 干燥30 min, 将铜网置于透射电镜(型号: HITACHI H-7650)上观察(加速电压80 KV)。

1.2.8 融合囊泡共定位观察 将获取的肿瘤细胞膜和BBV各500 $\mu\text{g/mL}$ 在无菌PBS中重悬。将工作浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 的DID(红色)染料和DIO(绿色)染料分别加入两种膜的EP管中, 锡箔纸包裹后固定在摇床后22 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min孵育1 h。然后14 000 $\times g$ 离心10 min, PBS洗涤3次。两种膜成分混合先后通过400 nm、200 nm多孔聚碳酸酯膜的Avanti挤出机, 挤出20个循环后取10 μL 滴在显微镜载玻片上并盖上盖玻片, 通过CLSM共聚焦激光扫描显微镜拍摄并选择了具有代表性的图像。

1.2.9 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测融合囊泡蛋白成分 取肿瘤细胞膜, BBV以及共挤压过的融合膜囊泡15 μg (用BCA法检测蛋白质的浓度), 180 $^{\circ}\text{C}$ 沸水煮10 min, 蛋白变性后在浓度12%的SDS-PAGE蛋白胶150 V的电压中进行。结束后凝胶在考马斯亮蓝溶液中染色过夜, 第2天在脱色液中脱色直至看清蛋白条带, 用凝胶成像仪成像拍照记录结果。

1.3 动物免疫

1.3.1 动物模型的建立 TC-1细胞生长至70%~80%密度时, 收集细胞于C57BL/6J小鼠右侧皮下接种正常的TC-1细胞 1×10^6 个/100 μL , 其间记录肿瘤生长情况。待肿瘤大小有3 mm $\times$ 3 mm左右时, 对照组注

射100 μL /只PBS, 疫苗组左侧皮下免疫50 μg /100 μL 融合囊泡, 之后密切监测肿瘤生长情况。

1.3.2 小鼠脾脏中淋巴细胞的分离 实验终点时颈椎脱臼处死小鼠并分离小鼠脾脏; 在生物安全柜中进行以下实验, 脾脏放于70 μm 无菌细胞筛网中, 用注射器活塞轻轻研磨脾脏, 加入总体积5 mL的小鼠淋巴细胞分离液, 在分离的细胞悬液上缓慢添加700 μL RPMI1640培养基并保持液面分界明显, 室温条件下800 $\times g$ 离心30 min, 升降速3 $\times g$, 离心后吸出白色淋巴细胞层再补加RPMI1640培养基至12 mL刻度处, 室温条件下300 $\times g$ 离心10 min, 升降速3 $\times g$, 弃上清加入5 mL 1 $\times$ 红细胞裂解液, 室温放置5 min后加入5 mL 无菌PBS中和, 室温条件下300 $\times g$ 离心10 min, 弃上清后用RPMI1640完全培养基重悬细胞并进行计数。

1.3.3 酶联免疫斑点技术(enzyme linked immunospot assay, ELISPOT)检测脾脏中表达IFN- γ 的脾细胞水平 首先将所需数量的条带组装在额外的板框中, 并用无菌PBS(200 μL /孔)清洗3次, 用含有与细胞悬液相同的血清的10%的培养液(200 μL /孔)来调节培养板, 在室温下培养30 min, 去掉培养液, 然后加入细胞悬液(5×10^5 个/100 μL)和合成的HPV CTL表位E7⁴⁹⁻⁵⁷肽(终浓度5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。将其放入细胞培养箱中, 培养24 h, 在此期间不要移动平板, 并采取措施避免蒸发(例如用铝箔包裹平板), 倒空培养皿取出细胞, 用200 μL /孔的无菌的PBS清洗5次, 将检测抗体(R4-6A2-生物素)稀释至1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 检测抗体用含0.5%胎牛血清的PBS稀释, 加入检测抗体100 μL /孔, 室温孵育2 h, 倒空培养皿中液体, 用200 μL /孔的PBS清洗5次, 加

入链霉亲和素标记的酶溶液(100 μL /孔), 链霉亲和素将与检测抗体上标记的生物素结合, 链霉亲和素-碱性磷酸酶(1:1 000)用含0.5%胎牛血清的PBS稀释。在室温条件下孵育1 h, 通过0.45 μm 过滤器过滤即可使用的衬底溶液(BCIP/NBT-PLUS), 并添加100 μL /孔, 直到出现明显的斑点, 通过在自来水中大量洗涤来阻止颜色显影, 从塑料托盘上取下板框, 并冲洗薄膜的底面, 直至晾干检查和计数ELISPOT读取器或解剖显微镜中的斑点。

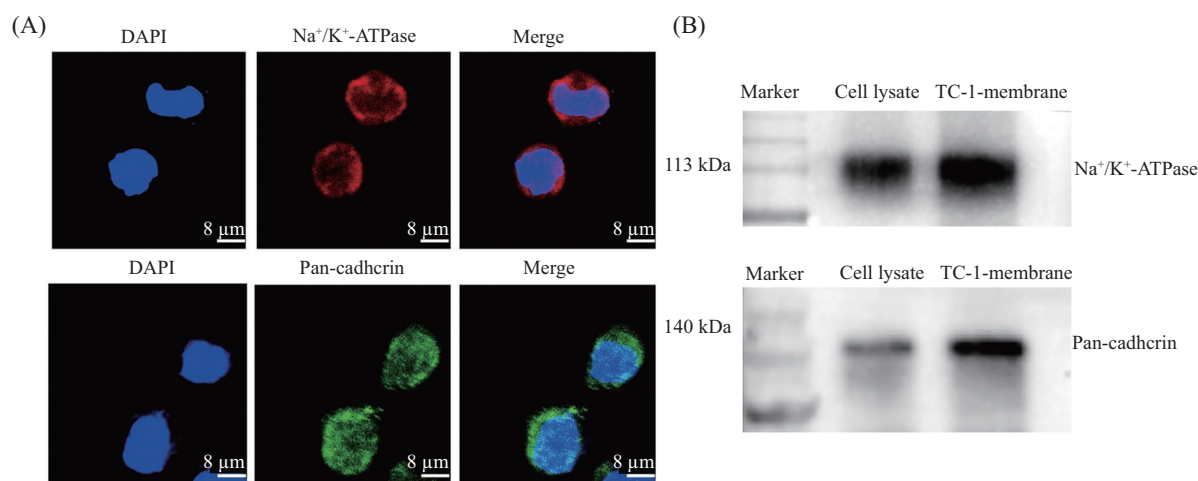
1.3.4 髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC)水平的检测 在96孔细胞培养板中加入(1×10^7 个/100 μL)细胞悬液, 置于细胞培养箱3~6 h后, 用200 μL Cell Staining Buffer洗涤2次, 室温条件下500 $\times g$ 离心5 min弃上清, 加入抗体(Gr-1-PE和CD11b-APC), 总体积为100 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min, 室温条件下500 $\times g$ 离心5 min弃上清, 用Cell Staining Buffer洗涤3次后, 再用100 μL Cell Staining Buffer重悬细胞转移至流式细胞筛管中后, 上机检测。

1.3.5 统计学分析应用 使用Graphpad Prism软件进行数据的整理、分析。两组间比较采用非配对 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤细胞膜提取鉴定

为显示肿瘤细胞膜成分的成功提取, 首先针对TC-1肿瘤细胞的质膜标志物 Na^+/K^+ -ATP酶以及钙黏蛋白(pan-cadherin)进行免疫荧光分析, 结果显示TC-1细胞分别显示红色荧光和绿色荧光(图1A), 提



A: 免疫荧光分析; B: 免疫印记检测。

A: immunofluorescence analysis; B: detection of immunoblotting.

图1 肿瘤细胞膜成分的有效提取

Fig.1 Effective extraction of tumor cell membrane components

示TC-1肿瘤细胞膜表面这两种蛋白质的存在。随后,以蛋白质免疫印迹分析了提取的肿瘤细胞膜中 Na^+/K^+ -ATP酶和pan-cadherin的存在,结果显示,提取的TC-1肿瘤细胞膜和肿瘤全细胞裂解物有着相同大小的特异蛋白质条带(图1B),说明 Na^+/K^+ -ATP酶、pan-cadherin作为质膜特异性标志物指示了膜成分的成功提取。

2.2 膜融合囊泡的形态观察

采用透射电子显微镜(TEM)表征BBV、肿瘤细胞膜囊泡以及膜融合囊泡的形态。通过挤出机挤出而获得的膜囊泡进行负染色,之后用透射电子显微

镜观察。结果显示,膜成分的挤出制备物以囊泡的形式存在(图2)。

2.3 膜融合的分析

本研究进一步分析了获得的膜囊泡是否确实由两种生物膜融合产生。免疫共聚焦显示,红色荧光标记的肿瘤细胞膜成分与绿色荧光标记的BBV成分,在通过挤出机挤出制备的纳米囊泡中显示了共定位产生黄色荧光(图3A),表明两种膜发生了融合。SDS-PAGE结果显示,膜融合囊泡的蛋白条带既有来自肿瘤细胞膜的蛋白质成分,又有BBV的成分(图3B),进一步支撑两种生物膜的融合。图3B中红色边框标记

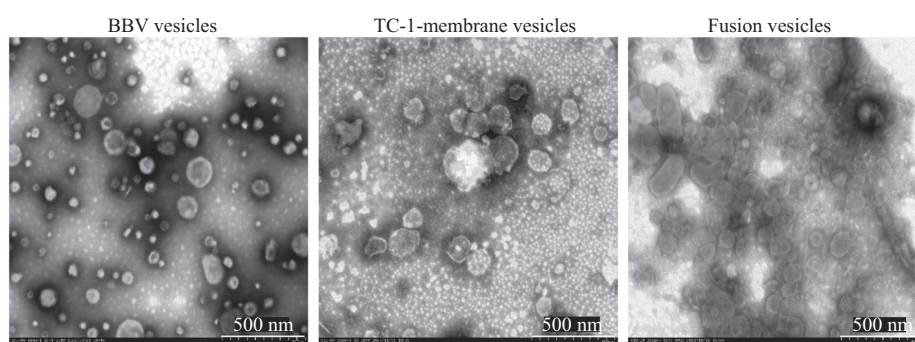
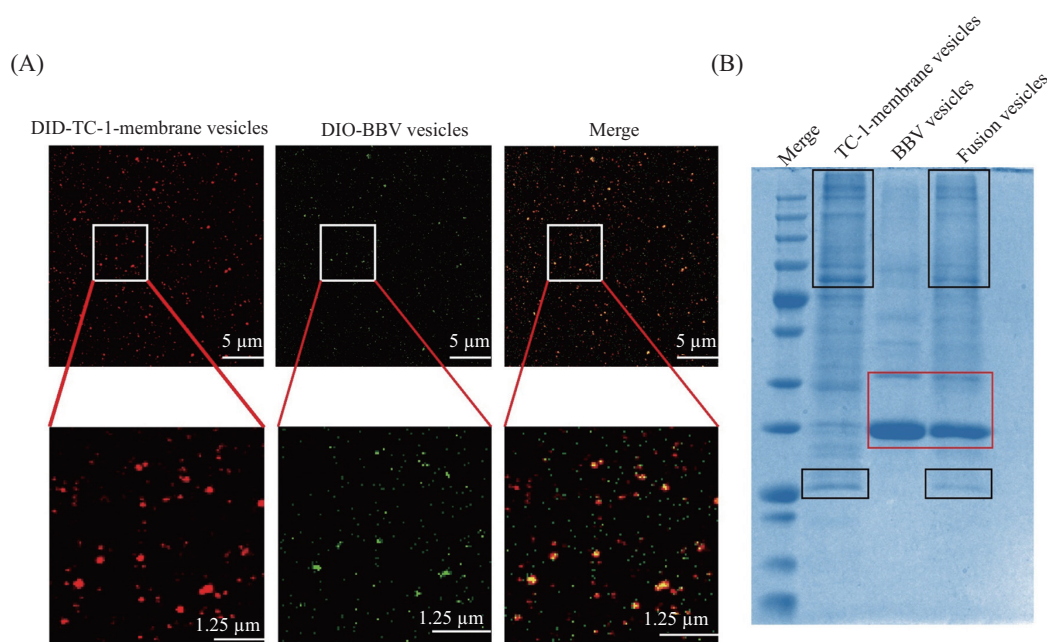


图2 膜囊泡形态的电镜观察

Fig.2 Morphology of the membrane vesicles observed with TEM



A: 囊泡的膜融合荧光信号共定位; B: SDS-PAGE显示融合囊泡继承了来自BBV及肿瘤细胞膜的蛋白成分(黑框代表了部分肿瘤细胞膜的蛋白成分,红框代表了部分BBV的蛋白成分)。

A: the membrane fusion fluorescence signal of vesicles was co-located; B: SDS-PAGE revealed that fusion vesicles inherited protein components from BBV and tumor cell membranes (The black box represents some of the protein components of the tumor cell membrane, and the red box represents some of the protein components of BBV).

图3 囊泡膜融合的分析

Fig.3 The analyses on membrane fusion for the vesicles

的含量较高的细菌膜囊泡蛋白, 经质谱鉴定提示主要包含外膜蛋白F(outer membrane protein F, OmpF)及外膜蛋白A(outer membrane protein A, OmpA)。

2.4 膜融合囊泡免疫抑制肿瘤生长

首先, 以TC-1肿瘤细胞皮下接种小鼠建立肿瘤生长, 然后以融合膜囊泡对荷瘤小鼠进行治疗性免疫干预(图4A); 在此期间, 每3~5天测量肿瘤大小以监测小鼠肿瘤生长情况, 统计结果显示融合膜囊泡组肿瘤显著小于对照组(图4B); 在实验终点牺牲小鼠并分离小鼠的肿瘤和脾脏, 与小鼠肿瘤生长曲线统计结果一致, 融合膜囊泡免疫组小鼠的肿瘤体积较对照组明显减小(图4C), 肿瘤质量显著减轻(图4D), 此外, 脾脏质量也显著减轻(图4E)。

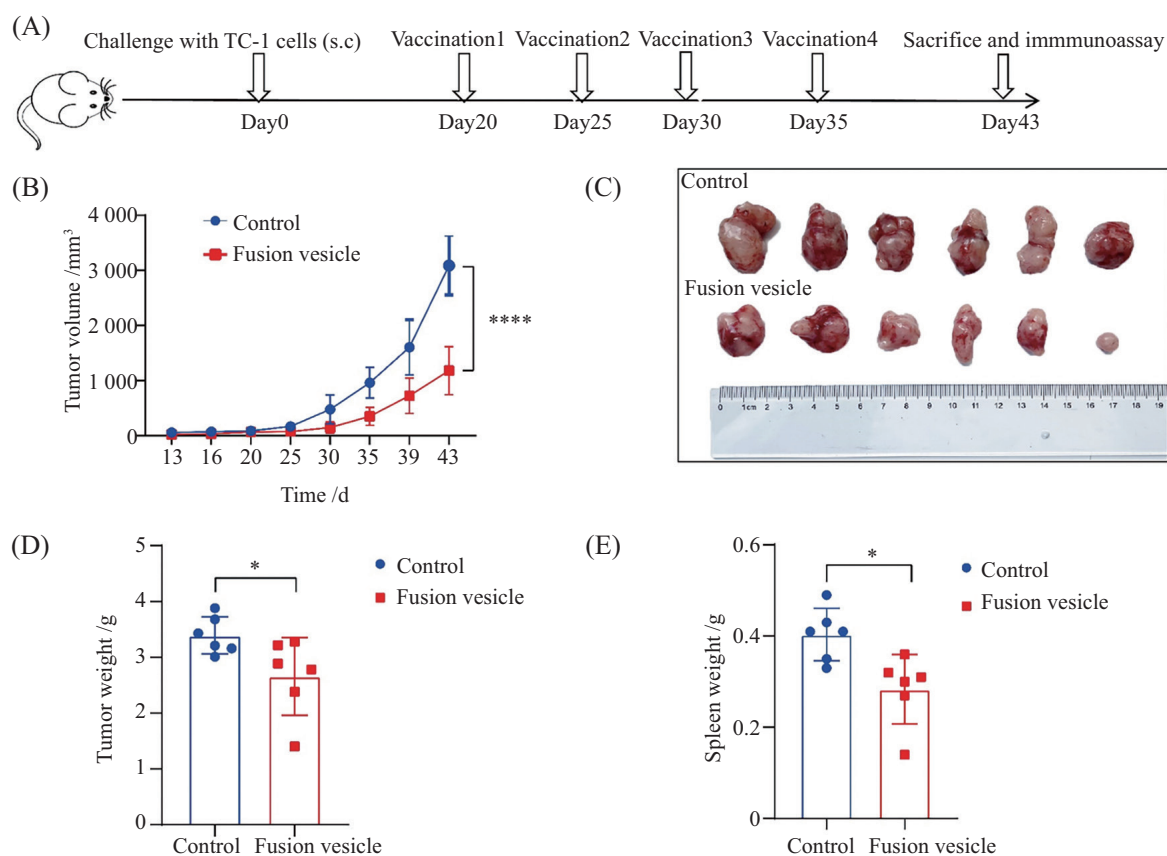
2.5 膜融合囊泡免疫促进小鼠脾脏组织中分泌IFN- γ 的效应细胞水平

细胞因子IFN- γ 被认为是抗肿瘤免疫效应的关

键分子, 表达IFN- γ 的免疫细胞是重要的抗肿瘤效应细胞。小鼠脾脏分离出的淋巴细胞在体外首先经肿瘤特异的E7肽刺激, 然后以ELISPOT进行分析。结果显示, 与对照组荷瘤小鼠相比, 膜融合囊泡免疫的小鼠脾细胞中分泌IFN- γ 的细胞水平显著升高(图5), 提示肿瘤特异的效应细胞免疫应答得到加强。

2.6 膜融合囊泡免疫导致小鼠脾细胞中MDSC水平下降

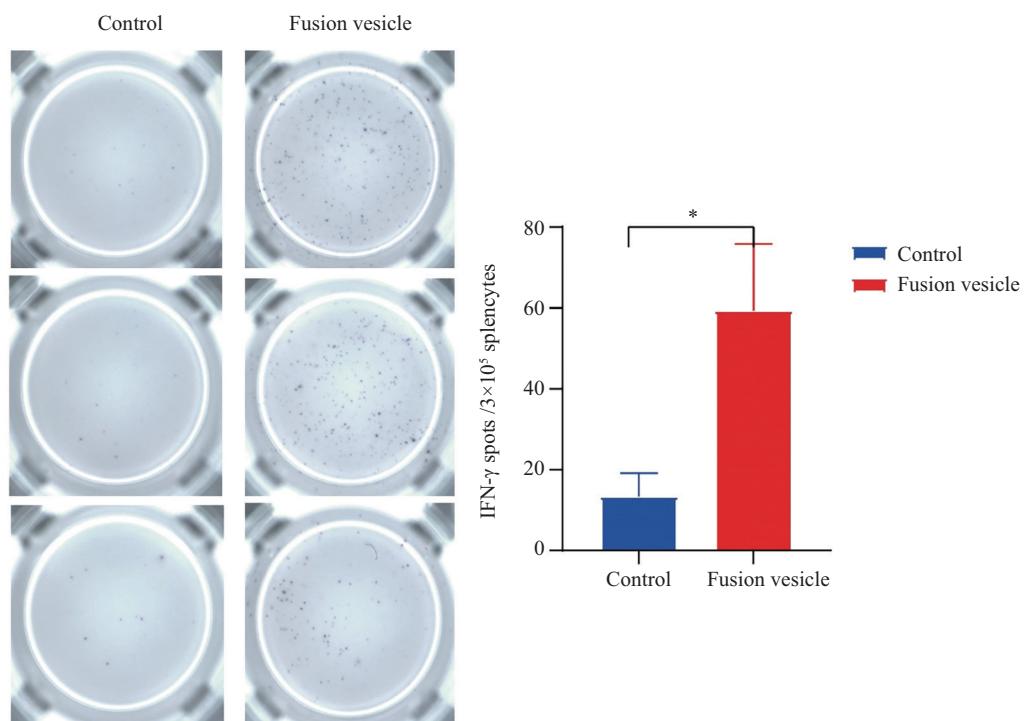
免疫抑制性的细胞对抗肿瘤免疫效应细胞的产生及作用发挥的拮抗是肿瘤免疫抑制的重要机制, 进一步的检测通过流式细胞术分析了分离得到的小鼠脾细胞中MDSC的水平。结果显示, 与对照组荷瘤小鼠相比, 经膜融合囊泡免疫的小鼠脾细胞中的MDSC水平被显著抑制(图6)。这一结果结合ELISPOT检测结果以及小鼠肿瘤生长情况, 提示融合膜囊泡的免疫



A: 小鼠的疫苗免疫程序; B: 小鼠的肿瘤生长曲线图; C: 小鼠体外的肿瘤图; D: 小鼠的肿瘤质量; E: 小鼠的脾脏质量。* $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ 。
A: vaccine immunization program in mouse; B: tumor growth curves in mouse; C: mouse tumor *in vitro*; D: tumor weight of mouse; E: spleen weight of mouse. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

图4 疫苗对小鼠肿瘤生长的抑制作用

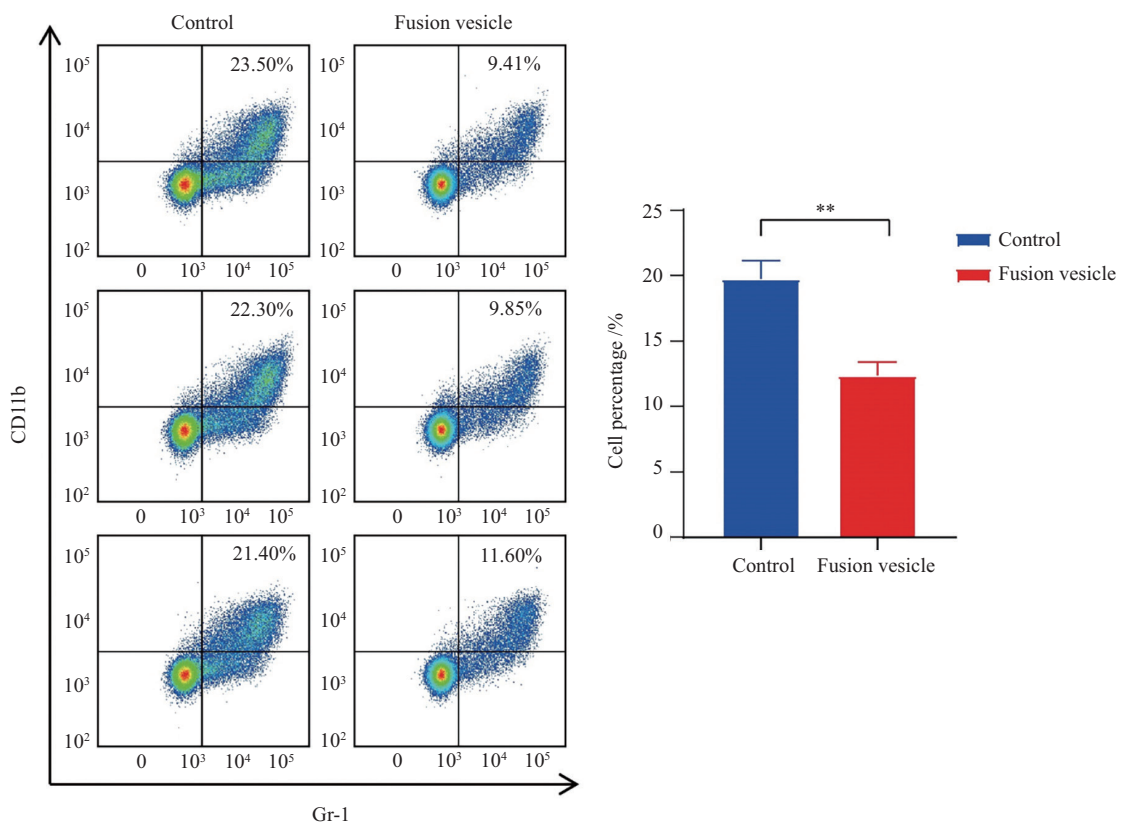
Fig.4 Inhibitory effect of vaccine on tumor growth in mouse



$*P < 0.05$.

图5 ELISPOT分析分泌IFN- γ 的脾细胞水平

Fig.5 ELISPOT analysis on the level of IFN- γ secreting splenocytes



$**P < 0.01$.

图6 流式细胞仪分析小鼠脾脏组织MDSC水平

Fig.6 Flow cytometry analysis on the level of MDSC in mouse spleen

促进了小鼠免疫应答向抗肿瘤效应偏转。

3 讨论

目前, 临床肿瘤的治疗主要依赖手术、放疗和化疗, 而这些治疗方法往往对于早期癌症比较有效, 但对于晚期或复发的癌症治疗往往无效^[13-14]。免疫治疗是新兴的肿瘤治疗的策略, 近年的免疫检查点拮抗疗法, 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)疗法等在临床肿瘤治疗中取得了里程碑式的进展^[15]。肿瘤疫苗同样是极有前景的肿瘤免疫治疗策略, 但到目前为止尚缺乏显著临床疗效, 主要面临的挑战是不能激发足够的有效肿瘤特异免疫应答以及肿瘤免疫抑制、免疫逃逸机制的拮抗^[16]。其中, 肿瘤的遗传不稳定性造成肿瘤抗原的变异及异质性, 给特定有效抗原的筛选鉴定及疫苗应用带来了挑战, 使得目前以不同递送策略递送特定抗原激发抗肿瘤免疫的疫苗策略受到了限制。自体肿瘤细胞理论上具备广谱的肿瘤抗原, 且带有显著的个性化特点, 在应对肿瘤抗原变异及异质性方面具备优势, 因此, 基于其开发疫苗具有重大意义^[17-18]。

本研究通过肿瘤细胞膜与细菌囊泡膜的融合, 充分利用细菌囊泡膜所具备的病原相关分子模式等免疫刺激机制, 以及肿瘤细胞膜抗原谱, 有效激发了抗肿瘤效应细胞的应答, 拮抗了免疫抑制细胞应答, 从而使得荷瘤小鼠免疫向效应方向转变, 显著抑制了已建立的肿瘤的生长, 证实了这一策略潜在的疫苗潜力。此外, 通过膜工程修饰或纳米化, 进一步携带特异肿瘤抗原/新抗原以及免疫刺激物, 将进一步增强这一策略的疫苗效力。近年来, 基于细胞膜工程的免疫治疗策略发展迅速。除了疫苗应用潜力, 还可以作为肿瘤靶向药物递送及免疫干预的平台。焉绍辉等^[19]将红细胞膜和肿瘤细胞膜形成具有良好稳定性的杂合细胞膜结构, 证实其稳定且具备肿瘤靶向性。RAO等^[20]设计采用了血小板来源、巨噬细胞来源和癌细胞来源的混合膜囊泡, 有效激活巨噬细胞抑制了肿瘤的复发转移。FANG等^[5]以肿瘤细胞膜包被纳米颗粒, 肿瘤细胞膜与其源细胞具有相同的细胞黏附分子与受体, 具有源细胞特异靶向性。此外, 细胞膜表面上的蛋白质和糖基化赋予了纳米颗粒更长的血液循环时间, 规避了网状内皮系统(reticulo-endothelial system, RES)摄取和免疫识别, 因此具备了肿瘤靶向药物递送的潜力。同样, ZHU

等^[21]通过用来自多种肿瘤细胞系的特定细胞膜包裹在纳米颗粒表面, 显示了相同肿瘤细胞系的自我识别, 即使在异型肿瘤的竞争中, 体内对同源肿瘤具有高度的自我选择性靶向。这些研究提示, 本研究所获得的肿瘤细胞膜与BBV融合膜具备抗原呈递、同源靶向、免疫刺激等多重能力, 通过进一步包裹纳米颗粒及工程化修饰等手段赋予其更多功能, 在作为疫苗外周免疫的同时, 还可能应用于肿瘤内递送进行局部免疫激活与调控。

综上所述, 本研究证实将肿瘤细胞膜和细菌膜两大生物系统的膜成分通过物理挤压的方式融合形成纳米囊泡, 可发挥各自的膜功能, 激发有效的抗肿瘤免疫, 为进一步深化研究提供了基础, 也为发展膜工程肿瘤免疫治疗策略提供了有益参考。

参考文献 (References)

- [1] XIANG S D, SCALZO-INGUANTI K, MINIGO G, et al. Promising particle-based vaccines in cancer therapy [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2008, 7(7): 1103-19.
- [2] SCHUMACHER T N, SCHREIBER R D. Neoantigens in cancer immunotherapy [J]. *Science*, 2015, 348(6230): 69-74.
- [3] CHEN H Y, DENG J, WANG Y, et al. Hybrid cell membrane-coated nanoparticles: a multifunctional biomimetic platform for cancer diagnosis and therapy [J]. *Acta Biomater*, 2020, 112: 1-13.
- [4] LIU W L, ZOU M Z, LIU T, et al. Cytomembrane nanovaccines show therapeutic effects by mimicking tumor cells and antigen presenting cells [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3199.
- [5] FANG R H, HU C M J, LUK B T, et al. Cancer cell membrane-coated nanoparticles for anticancer vaccination and drug delivery [J]. *Nano Lett*, 2014, 14(4): 2181-8.
- [6] YANG R, XU J, XU L, et al. Cancer cell membrane-coated adjuvant nanoparticles with mannose modification for effective anticancer vaccination [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(6): 5121-9.
- [7] LI W, HU Y, ZHANG Q, et al. Development of drug-resistant klebsiella pneumoniae vaccine via novel vesicle production technology [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(28): 32703-15.
- [8] KRISHNAN N, KUBIATOWICZ L J, HOLAY M, et al. Bacterial membrane vesicles for vaccine applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 185: 114294.
- [9] LONG Q, ZHENG P, ZHENG X, et al. Engineered bacterial membrane vesicles are promising carriers for vaccine design and tumor immunotherapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 186: 114321.
- [10] BRIAUD P, CARROLL R K. Extracellular vesicle biogenesis and functions in gram-positive bacteria [J]. *Infect Immun*, 2020, 88(12): e00433-20.
- [11] PARK K S, LEE J, JANG S C, et al. Pulmonary inflammation induced by bacteria-free outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(4): 637-45.
- [12] SÖDERBLOM T, OXHAMRE C, WAI S N, et al. Effects of the *Escherichia coli* toxin cytolysin A on mucosal immunostimula-

- tion via epithelial Ca^{2+} signalling and Toll-like receptor 4 [J]. *Cell Microbiol*, 2005, 7(6): 779-88.
- [13] ESFAHANI K, ROUDAIA L, BUHLAIGA N, et al. A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future [J]. *Curr Oncol*, 2020, 27(s2): 87-97.
- [14] IGARASHI Y, SASADA T. Cancer vaccines: toward the next breakthrough in cancer immunotherapy [J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: e5825401.
- [15] 王乐. 肿瘤免疫疗法及临床应用的研究进展 [J]. 河北医药 (WANG L. Research progress of tumor immunotherapy and its clinical application [J]. *Hebei Medical Journal*), 2022, 44(16): 2520-5.
- [16] 朱彬毓, 蔡颖, 李亚平, 等. 用于肿瘤免疫治疗的细胞膜包裹纳米药物研究进展 [J]. 药学进展 (ZHU B Y, CAI Y, LI Y P, et al. Research progress of cell membrane-coated nanomedicines for cancer immunotherapy [J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences*), 2022, 46(9): 695-709.
- [17] SADEGHI NAJAFABADI S A, BOLHASSANI A, AGHASA-DEGHI M R. Tumor cell-based vaccine: an effective strategy for eradication of cancer cells [J]. *Immunotherapy*, 2022, 14(8): 639-54.
- [18] CHEN L, QIN H, ZHAO R, et al. Bacterial cytoplasmic membranes synergistically enhance the antitumor activity of autologous cancer vaccines [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(601): eabc2816.
- [19] 焉绍辉, 孙枝红, 刘杰, 等. 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 [J]. 中国细胞生物学学报 (YAN S H, SUN Z H, LIU J, et al. *In vitro* study of erythrocyte/tumor membrane cloaked nanoparticle as biomimetic nanocarriers for highly targeting photodynamic cancer [J]. *Therapy Chinese Journal of Cell Biology*), 2022, 44(8): 1635-43.
- [20] RAO L, WU L, LIU Z, et al. Hybrid cellular membrane nanovesicles amplify macrophage immune responses against cancer recurrence and metastasis [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4909.
- [21] ZHU J Y, ZHENG D W, ZHANG M K, et al. Preferential cancer cell self-recognition and tumor self-targeting by coating nanoparticles with homotypic cancer cell membranes [J]. *Nano Lett*, 2016, 16(9): 5895-901.