

技术与方法

PD-1高表达的肿瘤细胞膜伪装的纳米药物介导 卵巢癌治疗的体外研究

李玮^{1,2} 高潇涵³ 孙枝红² 刘杰² 孙成铭^{1,2,3*}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; ³青岛大学医学部, 青岛 266071)

摘要 该研究探讨了一种新型仿生纳米药物(PDT@DNPs)的制备方式, 并评价了其对于卵巢癌细胞ID8的杀伤及对耗竭T细胞的逆转效果。将高表达PD-1的肿瘤细胞膜修饰于DSPE-PEG-MAL与顺铂(DDP)自组装形成的颗粒骨架外, 进而构建仿生纳米递送载体PDT@DNPs。采用透射电镜、纳米粒度及电位分析仪等对其形貌特征及粒径、电位等性能进行表征和测定。以ID8细胞为研究对象, 通过流式细胞术、激光共聚焦成像、CCK-8(cell counting kit-8)细胞毒性实验、钙黄绿素-AM(Calcein-AM)和碘化丙啶(PI)染色等评价PDT@DNPs的靶向性和杀伤能力; 此外, 检测T细胞和ID8细胞共孵育体系中乳酸脱氢酶(LDH)的释放水平及细胞因子分泌水平, 分析PDT@DNPs对T细胞抗肿瘤免疫的调节能力。上述结果表明, 该研究所构建的新型仿生纳米药物PDT@DNPs具有良好的ID8细胞靶向性及杀伤能力, 可增强共孵育体系中T细胞的肿瘤细胞杀伤能力。

关键词 卵巢癌; 免疫检查点; 细胞膜; 化疗; 仿生纳米载体

In Vitro Study of Tumor Cell Membrane Camouflaged Nanomedicine Mediated Ovarian Cancer Therapy with High PD-1 Expression

LI Wei^{1,2}, GAO Xiaohan³, SUN Zhihong², LIU Jie², SUN Chengming^{1,2,3*}¹Binzhou Medical University, Yantai 264003, China; ²Yantai Yuhuangding Hospital Affiliated to Qingdao University, Yantai 264000, China; ³Department of Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Abstract In this study, a novel biomimetic nanomedicine (PDT@DNPs) was prepared and its killing effect on ID8 cell of ovarian cancer and its reversing effect on exhausted T cells were evaluated. The membrane of tumor cells with high expression of PD-1 was modified on the surface of DSPE-PEG-MAL and DDP (cisplatin) self-assembled particle skeleton to construct a biomimetic nano-delivery vector PDT@DNPs. The morphology, particle size, potential and other properties were characterized and determined by transmission electron microscopy, nanoparticle particle size and potential analyzer. ID8 cells were selected as the study objects. Flow cytometry, laser confocal imaging, CCK-8 (cell counting kit-8) cytotoxicity test, Calcein-AM and PI (propyl iodide) staining were used to evaluate the targeting and killing ability of PDT@DNPs. In addition, the release level of LDH (lactate dehydrogenase) and cytokine secretion levels in the co-incubation system of T cells and ID8 cells were detected, and

收稿日期: 2023-07-12

接受日期: 2023-11-08

山东省自然科学基金(批准号: ZR2022MH100)和烟台市科技计划(批准号: 2022MSGY074)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0535-6691999, E-mail: chengmingsun012@163.com

Received: July 12, 2023

Accepted: November 8, 2023

This work was supported by the Shandong Natural Science Foundation (Grant No.ZR2022MH100), and the Yantai Science and Technology Plan (Grant No.2022MSGY074)

*Corresponding author. Tel: +86-535-6691999, E-mail: chengmingsun012@163.com

the regulatory ability of PDT@DNPs on the anti-tumor immunity of T cells was analyzed. These results indicated that the novel bionic nanomedicine PDT@DNPs constructed in this study had good ID8 cell targeting and killing ability, and could enhance the tumor cell killing ability of T cells in the co-incubation system.

Keywords ovarian cancer; immune checkpoints; cell membrane; chemotherapy; bionic nanocarriers

卵巢癌是女性生殖系统常见的肿瘤之一, 中国人群卵巢癌新发病例为52 100例/年, 死亡病例高达22 500例/年, 5年生存率仅约为40%^[1]。目前卵巢癌的治疗原则仍是以手术切除为主, 铂类、紫杉醇等化疗为辅的综合治疗策略。手术治疗可以最大限度地切除肉眼可见的肿瘤, 但对于已发生转移或者浸润的肿瘤则无法实现有效的手术切除; 而化疗则是一把双刃剑, 其在全身性杀伤肿瘤细胞的同时, 也会杀伤正常组织细胞和免疫细胞, 且极易引起全身性的副作用, 严重影响患者的生活质量^[2]。此外, 卵巢癌还是一种典型的免疫抑制型肿瘤, 即“冷肿瘤”, T细胞、巨噬细胞等免疫细胞浸润量少, 其这一特性导致传统免疫疗法无法高效清除肿瘤细胞及抑制肿瘤复发和转移。因此, 开发一种既能靶向肿瘤部位精准递送化疗药物, 又能提高肿瘤部位免疫细胞功能的新型多功能载体, 从而实现免疫治疗和化疗相联合将为卵巢癌治疗提供新思路。

PD-1(CD 279)即程序性死亡受体1, 主要表达在活性T细胞或B细胞膜上的一种重要的免疫抑制分子, 其能够与肿瘤细胞膜上的PD-L1结合, 从而抑制T细胞的杀伤活性, 引起肿瘤细胞自身免疫耐受和肿瘤细胞逃逸。相较于其他肿瘤, 卵巢癌肿瘤微环境具有更高的PD-L1表达水平。因此, 阻断肿瘤

微环境中卵巢癌细胞表面PD-L1与T细胞表面PD-1的结合, 可以有效地逆转和增强耗竭T细胞的功能, 强化其抗肿瘤效应。近年来, 随着对仿生纳米技术研究的深入, 以肿瘤细胞膜包覆纳米颗粒为代表的仿生纳米技术被认为是降低材料生物免疫原性和提高靶向特异性的一种很有前景的方法^[3]。一方面, 相较于其他类型的细胞, 肿瘤细胞的快速增殖潜力使肿瘤细胞膜的获取更容易; 另一方面, 肿瘤细胞膜独特的膜蛋白组成, 使其修饰的纳米平台兼具良好的同源靶向能力和免疫逃逸潜能^[4-5]。因此, 肿瘤细胞膜修饰的纳米药物, 可更有针对性地进入至肿瘤部位, 提高药物的生物利用度, 进而增强抗肿瘤治疗效果。

综上, 本研究在前期仿生纳米载体研究工作基础上, 基于免疫检查点作用原理, 将仿生纳米技术和基因工程技术相结合, 构建高表达PD-1的肿瘤细胞膜, 并将其修饰于DDP和DSPE-PEG-MAL形成的球形结构表面, 进而形成一种新型的工程化仿生药物递送系统PDT@DNPs。PDT@DNPs可增强肿瘤细胞对化疗药物的摄取, 并通过恢复和增强耗竭T细胞的免疫功能进而提高T细胞对肿瘤细胞的杀伤能力, 为进一步在动物水平研究中提高药物靶向摄取能力和全面提高卵巢癌治疗效果提供研究基础(图1)。

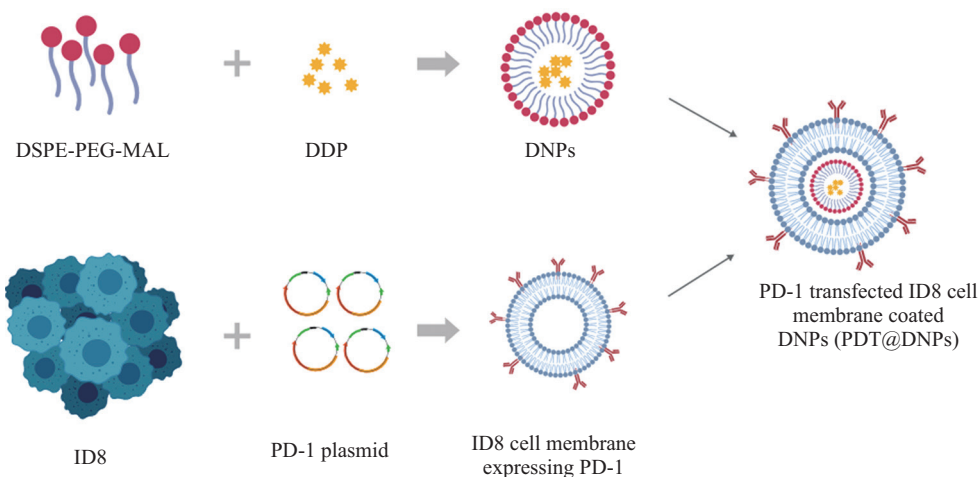


图1 PD-1修饰的肿瘤细胞膜仿生纳米载体PDT@DNPs的制备流程

Fig.1 Preparation process of PD-1 modified tumor cell membrane bionic nanocarriers PDT@DNPs

1 材料和方法

1.1 实验材料

顺铂(DDP)、DSPE PEG Maleimide(DSPE-PEG-MAL)(PEG-5000)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; Calcein-AM/PI Double Stinging试剂盒购自日本同仁(DOJINDO)化学研究所; M5 HiPer Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒、M5 Hiper CCK-8细胞增殖与活性检测试剂盒购自北京聚合美生物科技有限公司; Lipofectamine™ 3000 Reagent试剂盒购自美国Invitrogen公司; LDH Assay Kit购自英国Abcam公司; MojoSort™ Mouse CD3 T Cell Isolation试剂盒购自美国Biolegend公司; PD-L1 Rabbit mAb购自美国CST公司。

小鼠卵巢癌细胞株ID8、小鼠心肌细胞株HL-1由中国科学院上海细胞库提供; 实验中使用的C57BL/6J小鼠购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 本研究经烟台毓璜顶医院伦理委员会审批通过, 批件号为烟毓医伦理审[2023-369]号。

1.2 实验方法

1.2.1 PD-1质粒转染ID8卵巢癌细胞 将ID8细胞接种至培养皿(Φ 100 mm)中, 于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱内培养至细胞汇合度为70%~80%, 转染前2 h更换无血清培养基。将PD-1质粒DNA、P3000™混合于无血清培养基中, 调节DNA终浓度为5 μ g/ μ L, 充分混匀后与稀释的Lipofectamine™ 3000混合, 37 °C孵育15 min。待孵育完毕将混合液滴加入培养皿中, 继续置于培养箱中培养, 6 h后更换新鲜培养基, 培养36 h后于荧光显微镜下观察ID8-PD1细胞转染效果。

1.2.2 工程化肿瘤细胞膜的提取 将预先培养 ID8 细胞或 ID8-PD1 细胞用小刮刀自培养皿中刮下, 用预冷的 PBS 缓冲液重悬, 离心 (4 °C、300 $\times$ g、5 min) 洗涤 2 次。向细胞沉淀中加入含蛋白酶抑制剂 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 的中性细胞裂解液 (RIPA), 置于冰上超声 (功率 30%, 工作 1 s, 间隙 2 s, 超声总时间 5 min) 破碎。待细胞充分裂解后离心 (4 °C、3 500 $\times$ g、10 min) 去沉淀, 收集上清液体再次置于超速离心机内离心 (4 °C、20 000 $\times$ g、20 min)。收集上清液体转移至超速离心管中离心 (4 °C、100 000 $\times$ g、45 min), 沉淀物即为细胞膜成分。

1.2.3 PDT@DNPs 的制备和材料表征 将 1 mg DDP、3 mg DSPE-PEG-MAL 溶于 1 mL 四氢呋喃 (tetrahydrofuran, THF) 中, 充分混合后将 THF 溶液快

速注入 2 mL DEPC 处理的去离子水中, 用探针超声仪连续冰浴超声处理 90 s。将溶液转移至 10 kDa 超滤离心管中离心浓缩。用 DEPC 处理的去离子水离心洗涤 5 次, 最终获得 DNPs 水溶液^[6]。将 ID8 或 ID8-PD1 细胞膜用移液枪反复吹打, 悬于 DEPC 处理的去离子水中, 并将其置于 Cole-Parmer CP100 探针超声仪下进行冰浴超声, 直至细胞膜完全破碎。将细胞膜悬液在 0.22 μ m 的针式滤器上反复过滤 10 次, 使细胞膜充分覆盖在滤网上, 将合成的 DNPs 水溶液在同一滤器上挤压过膜, 反复 2 次, 获得 ID8/ID8-PD1 细胞膜包被的 DT@DNPs/PDT@DNPs^[7]。

采用 Tecnai G2 F20 S-TWIN 透射电子显微镜观测 DNPs、DT@DNPs 及 PDT@DNPs 的基本形貌。使用 Zetasizer Nano ZS (Malvern) 纳米粒度电位仪测定各纳米载体的水合粒径分布及表面电位电势。

对合成纳米颗粒进行真空冷冻干燥处理并称重, 使用电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-OES) 测定 DNPs、DT@DNPs 及 PDT@DNPs 样本中金属铂含量, 并计算纳米颗粒的顺铂载药量。

$$\text{载药量 (\%)} = \frac{\text{药物所含顺铂总重量}}{\text{药物载体总重量}} \times 100\%$$

将 PDT@DNPs 溶解于 H₂O、磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered solution, PBS)、Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 中, 使其浓度为 0.1 μ g/ μ L, 分别于第 0、5、10 天测其水合粒径分布并拍摄数码照片, 观察纳米载体在溶液中的稳定性。

将合成的 PDT@DNPs 分别于第 0、5、10 天以 0.025 μ g/ μ L、0.05 μ g/ μ L、0.1 μ g/ μ L 的浓度与 ID8 肿瘤细胞共孵育, 通过 CCK-8 测定肿瘤细胞的存活率 (各组设 3 个复孔)。

1.2.4 肿瘤细胞摄取 PDT@DNPs 的效果评价 为了直观测定纳米载体的肿瘤细胞靶向性, 我们在合成 DNPs、DT@DNPs、PDT@DNPs 的过程中同时包载 Cy5 荧光染料以便于进行荧光监测。将 ID8 细胞接种到共聚焦皿和 6 孔板中, 在 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱内培养至细胞汇合度为 70%~80%, 分别加入包载 Cy5 的 DNPs、DT@DNPs、PDT@DNPs, 孵育 2 h。将共聚焦皿中培养基吸去, PBS 溶液洗涤 3 次, 加入 DAPI 染液 (10 μ g/mL) 染色 10 min, PBS 溶液洗涤 3 次, 共聚焦显微镜观察、拍照; 将 6 孔板中的细

胞用胰酶消化并收集, PBS溶液洗涤后通过流式细胞仪检测Cy5荧光信号强度。

为了验证纳米材料的靶向性, 以小鼠心肌细胞HL-1为对照, 使用流式细胞仪分别测定ID8细胞和HL-1细胞对包载Cy5的PDT@DNPs的摄取情况。

1.2.5 PDT@DNPs靶向肿瘤细胞的机制研究 向ID8细胞汇合度为70%~80%的共聚焦皿中加入PD-L1 Rabbit mAb并将其继续置于37 °C培养箱中孵育2 h, 制备封闭组。分别向封闭组和未封闭对照组共聚焦皿中加入包载Cy5荧光染料的PDT@DNPs, 以PBS为空白对照, 37 °C孵育2 h后收集细胞进行流式细胞术Cy5荧光强度检测。

1.2.6 PDT@DNPs体外杀伤功能评价 样本制备: 将ID8细胞分别接种于96和12孔板内, 37 °C、5% CO₂的恒温培养箱内培养至细胞汇合度约70%。分别向各孔内加入PBS、DNPs、DT@DNPs及PDT@DNPs(各组设3个复孔), 继续置于培养箱内孵育8 h后进行检测。

CCK-8细胞毒性实验: 将96孔板内各检测孔培养基移除, 加入含有10% CCK-8检测试剂的培养基, 继续置于培养箱内。孵育0.5 h后, 用酶标仪测定450 nm处的吸光度。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{As - Ab}{Ac - Ab} \times 100\%$$

其中, As为加入DNPs、DT@DNPs及PDT@DNPs的实验组吸光值, Ac为加入PBS的对照组吸光值, Ab为不含细胞的培养基空白对照组。

Calcein-AM和PI染色: 将96孔板内各检测孔培养基移除, PBS溶液洗涤2次。向各孔加入Calcein-AM/PI染色液处理15 min后, PBS溶液洗去多余染色液, 清洗完毕置于激光共聚焦显微镜观察。

流式细胞术: 用PBS溶液洗涤12孔板内各检测孔, 收集各孔细胞后用Annexin V/FITC和PI进行标记, 用流式细胞仪进行检测。

1.2.7 PDT@DNPs的免疫调节效果评价 T细胞杀伤功能评价: 颈椎脱臼法处死荷ID8瘤的C57BL/6J小鼠并用75%酒精浸泡消毒。无菌环境下分离小鼠脾脏, 使用眼科剪将脾脏剪成小块并置于研磨器中研磨充分。用70 μm细胞滤网过滤研磨液并离心(4 °C、500 ×g、5 min)去上清, 预冷的PBS洗涤2次。使用MojoSort™ Mouse CD3 T Cell Isolation试剂盒分选出小鼠原代T细胞, 于含20 ng/mL IL-2的1640培养基

中37 °C孵育72 h。

将小鼠原代T细胞按照与ID8细胞5:1、10:1和20:1的细胞数比例接种至96孔板中, 置于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱内培养。在各组中分别加入PBS、DNPs、DT@DNPs及PDT@DNPs, 并设T细胞对照孔及未加处理各比例体系的阴性、阳性对照孔, 继续置于培养箱内继续培养6 h(各组设3个复孔)。将各组阳性对照孔细胞进行充分裂解, 收集阴、阳性对照孔及各实验孔培养基, 离心取细胞上清液, 使用乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)比色法试剂盒和酶标仪测量各孔450 nm处的D值, 换算得各组LDH的水平。

$$\text{Cytotoxicity}(\%) = \frac{D_{\text{实验}} - D_{\text{T}} - D_{\text{阴}}}{D_{\text{阳}} - D_{\text{阴}}} \times 100\%$$

$D_{\text{实验}}$: 各处理组D值; D_{T} : 各处理条件的T细胞对照孔D值; $D_{\text{阳}}$: ID8阳性对照孔D值; $D_{\text{阴}}$: ID8阴性对照孔D值。

T细胞相关细胞因子的释放: 将小鼠原代T细胞按照与ID8细胞20:1的细胞数比例接种至96孔板中, 置于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱内培养, 分别加入PBS、DNPs、DT@DNPs及PDT@DNPs(0.1 μg/μL), 各组设3个复孔, 继续置于培养箱内继续培养48 h, 离心取各孔上清液, 使用ELISA试剂盒检测溶液中TNF-α、INF-γ分泌水平。

1.2.8 统计分析 采用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计分析, 各实验至少重复三次, 连续型数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间的两两比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PDT@DNPs的基本性能测定

水合粒径结果显示, DNPs纳米颗粒粒径为(105.6±6.9) nm, DT@DNPs及PDT@DNPs粒径分别为(123.5±0.7) nm和(123.7±0.9) nm, 较DNPs增加约18 nm, 与天然细胞膜双层厚度一致^[8], 表明表达PD-1的ID8卵巢癌细胞膜已成功包覆于纳米颗粒表面(图2A~图2C); 透射电镜可观察到DNPs、DT@DNPs和PDT@DNPs纳米颗粒呈球形结构, 分散均匀, 粒径大小与水合粒径结果一致, 且可在纳米颗粒表面观测到完整的细胞膜结构, 验证了工程化细胞膜包被的纳米颗粒的成功构建。

DNPs、DT@DNPs和PDT@DNPs表面Zeta电位电势结果显示,DT@DNPs和PDT@DNPs的电位电势分别为 -24.6 mV和 -24.7 mV,低于DNPs的 -5.97 mV,这可能由于细胞膜带有更强的负电荷,将其修饰于纳米颗粒表面后导致电位电势的绝对值增高(图2D),而提高材料表面的电位电势的绝对值可维持纳米颗粒之间的静电排斥,提高其在溶液中的稳定性^[9]。

使用ICP-OES测定1 mg复溶的冻干样本中金属铂含量,DNPs、DT@DNPs及PDT@DNPs样本铂含量分别为 72.6 μg 、 70.9 μg 和 71.3 μg ,验证了顺铂的成功载入,计算可得DNPs、DT@DNPs及PDT@DNPs载药量分别为 7.32% 、 7.19% 、 7.26% 。

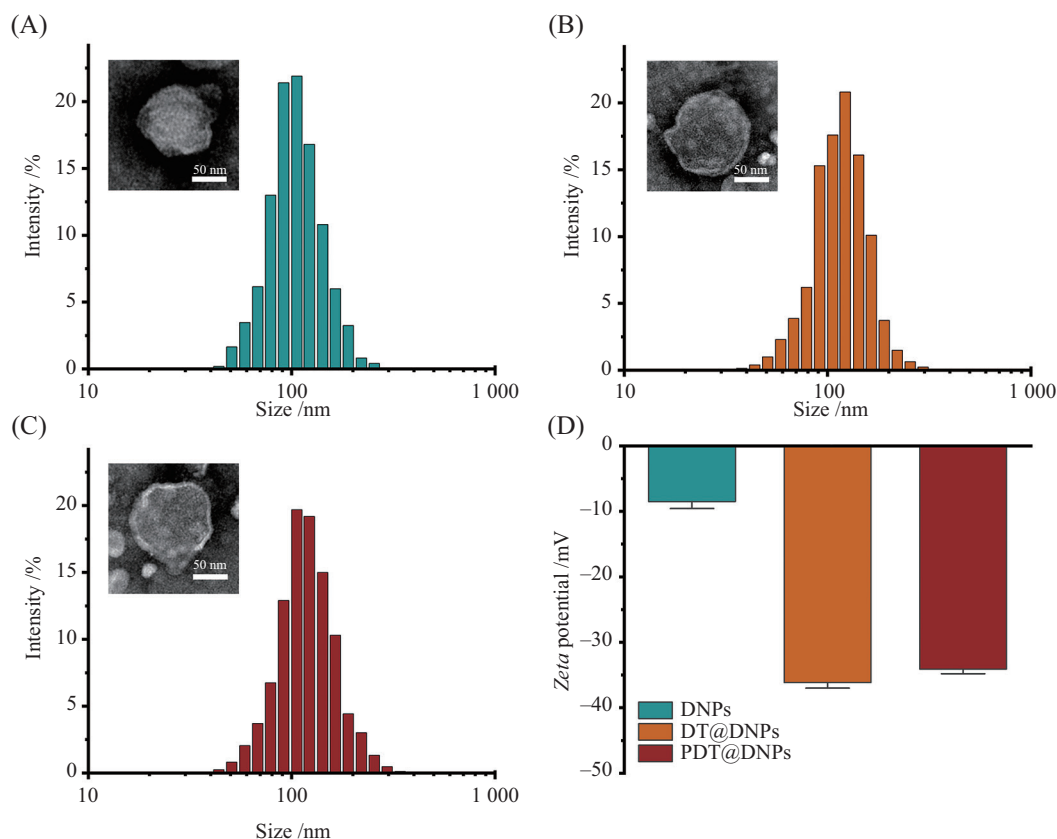
为验证纳米药物的稳定性,将合成的PDT@DNPs纳米颗粒以 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的浓度溶解于不同溶液中,分别检测其第0、5、10天的水合粒径并拍摄数码照片。如图3A可见, H_2O 组、PBS组、DMEM组和FBS组的纳米颗粒粒径略有增加,在第10天时,PDT@DNPs在不同溶液中的粒径大小仍

处于纳米药物理想的粒径范围($100\sim 200$ nm)内^[9]。数码照片图3C显示,至第10天各溶液保持澄清,未见沉淀析出。在纳米药物的杀伤能力方面,如图3B所示,不同浓度的PDT@DNPs储存0、5、10天后对ID8肿瘤细胞的杀伤效率无统计学差异。上述结果表明,本研究所合成的纳米颗粒具有良好的溶液稳定性。

2.2 肿瘤细胞对PDT@DNPs的摄取效果及PDT@DNPs靶向性研究

体外肿瘤细胞药物摄取结果(图4A)显示,PDT@DNPs组和DT@DNPs组细胞内的荧光强度明显高于DNPs组,而PDT@DNPs组的细胞内荧光强度更高,这可能由于除了肿瘤细胞膜修饰纳米颗粒可以提高肿瘤靶向性外,PDT@DNPs组表面修饰的细胞膜上高表达的PD-1也可与肿瘤细胞表面的PD-L1靶向结合,进一步提高了肿瘤细胞摄取PDT@DNPs的能力。

流式分析结果(图4B)显示,DT@DNPs处理组的

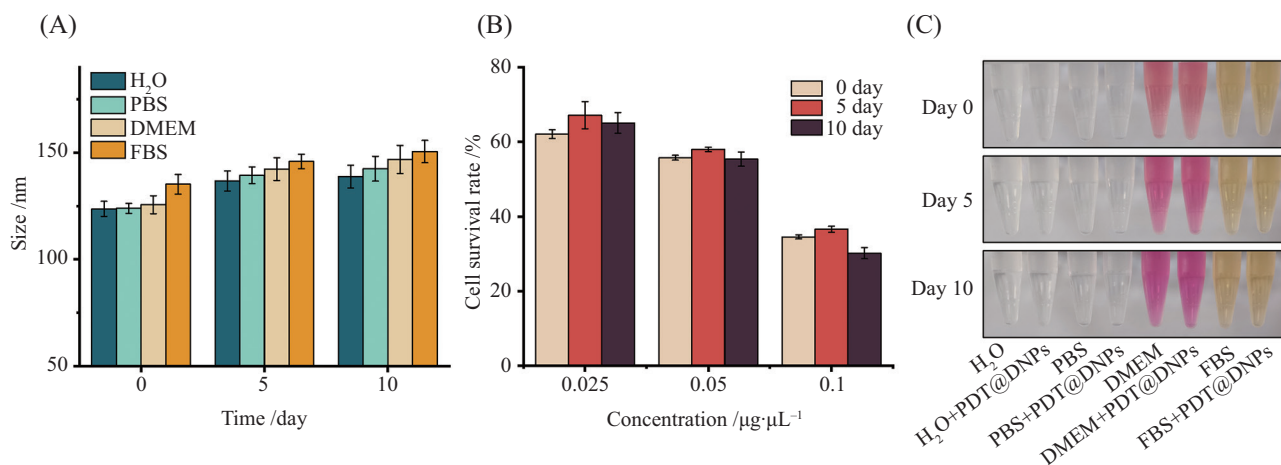


A~C: DNPs、DT@DNPs及PDT@DNPs的水合粒径分布。D: DNPs、DT@DNPs及PDT@DNPs的电位电势。 $\bar{x} \pm s$, $n=3$ 。

A~C: hydrated particle size division of DNPs, DT@DNPs and PDT@DNPs. D: potential of DNPs, DT@DNPs and PDT@DNPs. $\bar{x} \pm s$, $n=3$ 。

图2 DNPs、DT@DNPs及PDT@DNPs形貌、电位电势变化

Fig.2 Changes in morphology and potential of DNPs, DT@DNPs and PDT@DNPs

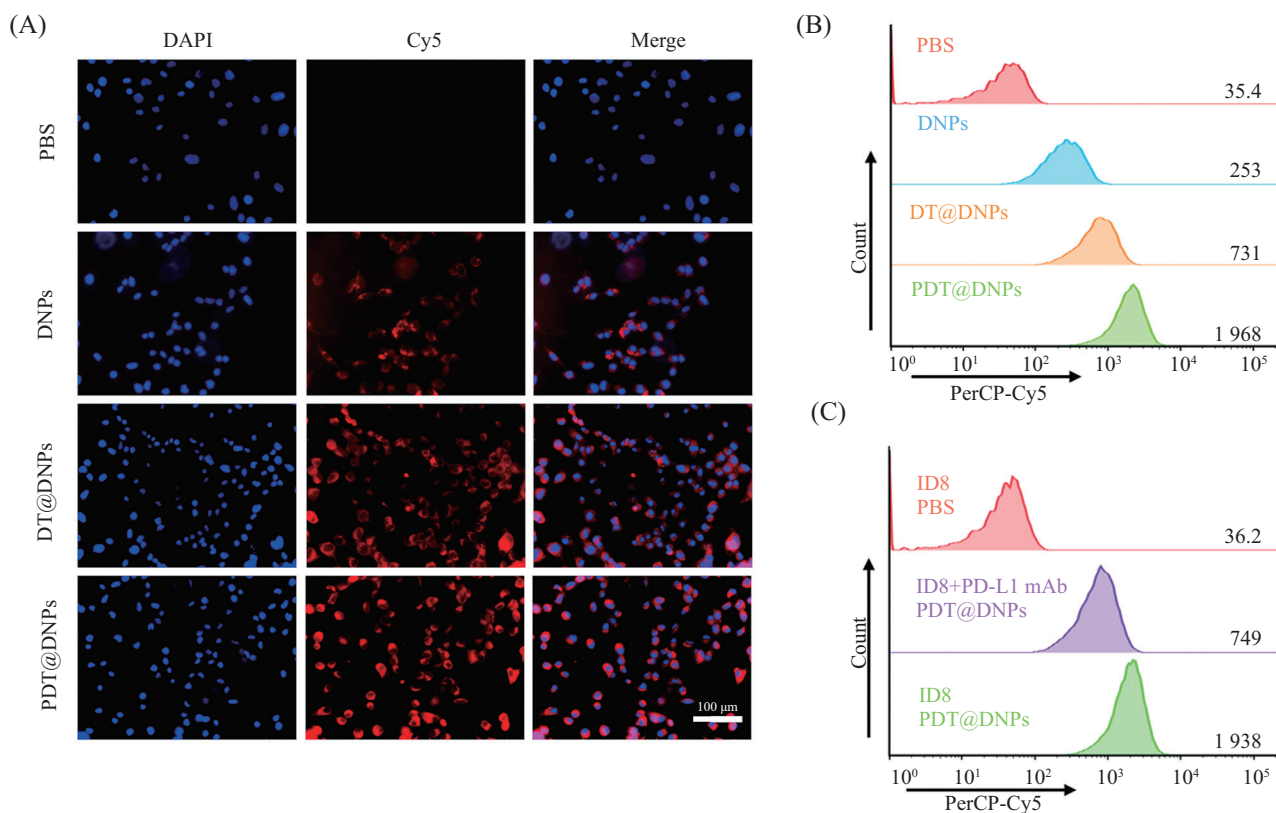


A: PDT@DNPs第0、5、10天不同溶液中纳米颗粒的粒径大小。 $\bar{x} \pm s$, $n=3$ 。 B: 不同浓度PDT@DNPs放置0、5、10天时的ID8细胞杀伤效率。 $\bar{x} \pm s$, $n=3$ 。 C: PDT@DNPs(0.1 µg/µL)溶解在不同溶液中的数码照片。

A: PDT@DNPs particle size of nanoparticles in different solutions on day 0, 5 and 10. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. B: ID8 cell killing efficiency at different concentrations of PDT@DNPs for 0, 5 and 10 days. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. C: PDT@DNPs (0.1 µg/µL) digital photos dissolved in different solutions.

图3 PDT@DNPs的溶液稳定性

Fig.3 Solution stability of PDT@DNPs



A: PBS、DNPs、DT@DNPs、PDT@DNPs的细胞摄取荧光图像。 B: PBS、DNPs、DT@DNPs、PDT@DNPs的细胞摄取流式荧光强度分布。 C: ID8细胞表面PD-L1封闭组与对照组的肿瘤细胞药物摄取荧光强度。

A: fluorescence images of cellular uptake of PBS, DNPs, DT@DNPs and PDT@DNPs. B: flow fluorescence intensity distribution of PBS, DNPs, DT@DNPs and PDT@DNPs. C: the fluorescence intensity of tumor cell drug uptake in the PD-L1 blocking group and the control group on the surface of ID8 cells.

图4 PDT@DNPs的细胞靶向及摄取

Fig.4 Cell targeting and uptake of PDT@DNPs

肿瘤细胞中Cy5平均荧光强度为1 968, 明显高于各对照组, 进一步表明DT@DNPs更易被摄取而蓄积于肿瘤细胞中。

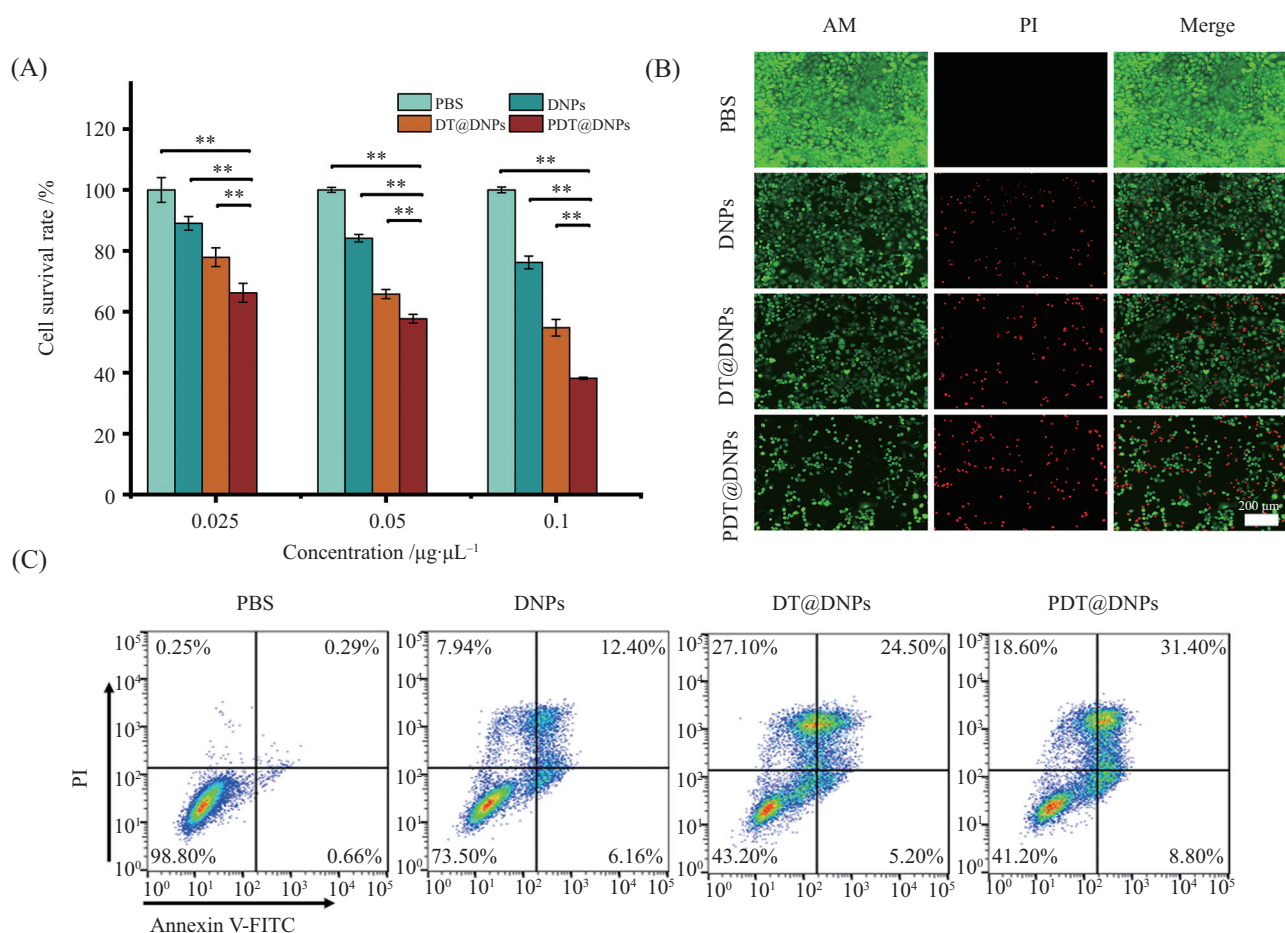
PD-L1主要表达于免疫细胞和肿瘤细胞中, 因此采用小鼠正常心肌细胞HL-1作为PD-L1低表达细胞系进行对照以验证PDT@DNPs对ID8细胞的靶向性, 实验结果显示, 在相同时间条件下, ID8细胞的摄取阳性率为98.13%, 明显高于HL-1细胞的65.67%。为排除细胞膜非同源性的影响, 进一步用抗体封闭ID8表面的PD-L1后进行摄取实验, 如图4C所示, 封闭组的细胞摄取荧光强度749低于未封闭的阳性对照组1 938, 且封闭组的平均荧光强度与图4B中DT@DNPs处理组的平均荧光强度731较一致, 说明

PD-1和PD-L1的特异性结合可明显提高PDT@DNPs与ID8的靶向识别和摄取能力。

2.3 PDT@DNPs体外杀伤效果评价

以小鼠卵巢癌细胞株ID8为体外研究对象, 评估PDT@DNPs细胞水平杀伤性能。CCK-8分析结果(图5A)显示, DNPs、DT@DNPs和PDT@DNPs处理组均可实现肿瘤细胞杀伤, 但相较于其他组, PDT@DNPs组的肿瘤细胞的杀伤效果尤为明显, 细胞存活率仅为47%。

钙黄绿素/碘化丙啶(AM/PI)分析结果(图5B)显示, DNPs、DT@DNPs和PDT@DNPs组细胞均可检测到不同比例的红色荧光信号, 即细胞凋亡; 相较于其他组, PDT@DNPs组的红色荧光阳性比例最高,

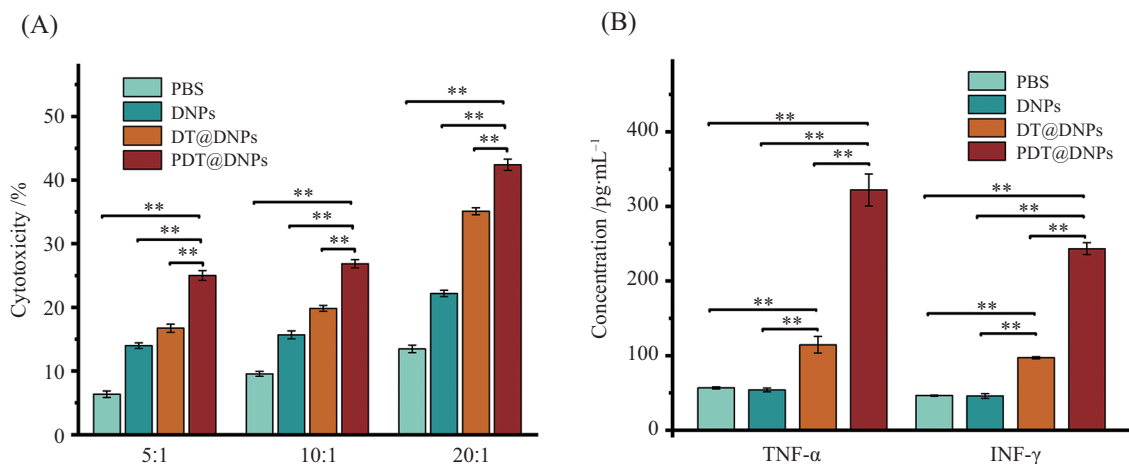


A: CCK-8检测PBS、DNPs、DT@DNPs、PDT@DNPs在药物浓度分别为0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时的细胞存活率。 $\bar{x}\pm s$, $n=3$, $**P<0.01$ 。B: 钙黄绿素/碘化丙啶(AM/PI)染色的PBS、DNPs、DT@DNPs、PDT@DNPs组细胞荧光成像。药物浓度: 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。C: 流式细胞术检测PBS、DNPs、DT@DNPs、PDT@DNPs组细胞凋亡比例。药物浓度: 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

A: CCK-8 was used to detect the cell survival rate of PBS, DNPs, DT@DNPs and PDT@DNPs at the drug concentration of 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. $\bar{x}\pm s$, $n=3$, $**P<0.01$. B: AM/PI staining of PBS, DNPs, DT@DNPs, PDT@DNPs groups of cells fluorescence imaging. Drug concentration: 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. C: flow cytometry was used to detect the proportion of apoptotic cells in PBS, DNPs, DT@DNPs and PDT@DNPs groups. Drug concentration: 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

图5 PDT@DNPs体外杀伤效果评价

Fig.5 PDT@DNPs evaluation of killing effect *in vitro*



A: 不同T细胞与ID8细胞比例下PBS、DNP、DT@DNP及PDT@DNP处理组的T细胞杀伤活性。B: PBS、DNP、DT@DNP及PDT@DNP处理的T细胞与ID8细胞共孵育体系中T细胞TNF-α、INF-γ的释放水平。 $\bar{x} \pm s$, $n=3$, $**P<0.01$ 。

A: cytotoxic activity of T cells treated with PBS, DNP, DT@DNP, and PDT@DNP at different ratios of T cells to ID8 cells. B: amount of TNF-α and INF-γ released by T cells in the co-incubation system of ID8 cells treated with PBS, DNP, DT@DNP and PDT@DNP. $\bar{x} \pm s$, $n=3$, $**P<0.01$.

图6 T细胞杀伤能力及免疫功能评价

Fig.6 Evaluation of T cell killing ability and immune function

表明肿瘤细胞膜的纳米颗粒具有更好的细胞摄取能力,而细胞膜表面PD-1的高表达更进一步促进了肿瘤细胞对纳米颗粒的摄取。

流式细胞术结果(图5C)显示,DT@DNP和PDT@DNP组细胞晚期凋亡比例分别为24.5%和31.4%,明显高于PBS对照组的0.29%和DNP组的12.4%,其中PDT@DNP组细胞凋亡比例最高,显示出较强的促进肿瘤细胞凋亡能力。

2.4 PDT@DNP免疫调节效果评价

为了评估PDT@DNP纳米颗粒封闭免疫检查点从而逆转T细胞耗竭状态的能力,将DNP、DT@DNP及PDT@DNP加入到不同效应细胞与靶细胞数量比的共孵育体系中,并以PBS为对照,在培养6 h后检测LDH的释放量,从而评估T细胞对肿瘤细胞的杀伤活性。如图6A所示,在不同效靶比的孵育体系中,PDT@DNP处理组的ID8肿瘤细胞释放LDH的水平均为同批中最高,证明了PD1/PD-L1免疫检查点的成功封闭使得T细胞的肿瘤杀伤能力得到提高。

为进一步验证T细胞的活化和细胞因子分泌水平,采用ELISA法测定共孵育体系中TNF-α、INF-γ的浓度。如图6B所示,与PBS组、DNP组、DT@DNP组相比,PDT@DNP处理组的T细胞相关细胞因子TNF-α、INF-γ的分泌水平明显升高,这进一步验证了DT@DNP可提高孵育体系中T细胞的活化水平。

3 讨论

卵巢癌是我国女性常见的一种恶性肿瘤,近年来其发病率呈现逐年上升趋势。据统计,预计2029年我国女性卵巢癌的患病率将可能上升至9.73/10万,严重威胁女性健康^[10]。在现有卵巢癌治疗策略中,传统的手术和化疗方案并不能很好地解决复发、耐药性差和对正常组织器官的毒副作用等问题,5年生存率并未得到明显改善^[11]。此外,卵巢癌作为一种免疫抑制性肿瘤,肿瘤局部免疫细胞浸润量少,并且由于复杂肿瘤免疫微环境的存在,导致局部浸润的少量T细胞也处于“静默”状态,严重限制了机体的抗肿瘤免疫功能。这也导致针对于卵巢癌的免疫单药治疗并未明显改善患者的生存期,临床治疗效果不佳,但研究发现同时联合铂类或紫杉醇等化疗药物,患者的临床治疗效果和效应率则明显提高^[12]。受此启发,我们构建一个新型的化疗和免疫相联合的治疗平台,为实现卵巢癌的治疗性药物的安全和精准靶向递送策略的建立提供新的思路。

随着纳米仿生技术的不断发展和应用,仿生纳米药物已成为疾病诊疗领域中的“新星”,备受各国学者关注。其中,以细胞膜或细胞外囊泡修饰纳米颗粒为代表的仿生纳米载体,因取材于天然生物细胞,兼具广泛来源选择性、低免疫原性、特异靶向性、长循环性等诸多优点,在抗肿瘤治疗领域表现出巨大潜能。ZHANG等^[13]首次提出红细胞膜可用

于体内递送抗肿瘤药物的设想,与工业合成的具有“隐身”效果的材料相比,红细胞膜修饰的纳米药物在小鼠体内表现出更长的半衰期,在循环中的保留时间长达72 h; XIE等^[14]开发了一种等离子体成像体系,其团队将肿瘤细胞膜包覆于金纳米颗粒(AuNPs)表面,通过离子体成像技术检测到包膜纳米颗粒(CMC-NPs)较未包膜组同型细胞递送效率增加了7倍,并且细胞内富集过程加快了近两个数量级。细胞膜修饰的纳米载体,不仅具有母源细胞类似的功能,还兼具母细胞所不可比拟的诸多优点,如可进行人工改造和修饰。研究发现,肿瘤细胞膜修饰的仿生纳米颗粒除了具有长循环和靶向性的优势以外,对其膜成分的工程化改造也为纳米颗粒的多功能化提供了方向。YU等^[15]将工程化表达TIGIT的细胞膜和血小板细胞膜融合的纳米囊泡(TPNVs)包裹在化疗药物奥沙利铂(OXA)表面,通过静脉注射的方式抑制乳腺癌术后复发,该体系中细胞膜表面的TIGIT可阻断CD155/TIGIT免疫检查点促进杀伤性T细胞的浸润,激活抗肿瘤免疫,从而有效抑制术后肿瘤复发和转移。由此可见,工程化肿瘤细胞膜修饰的纳米药物递送系统在药物的安全递送、精准靶向和多功能化上发挥着巨大潜能。

本研究在前期研究工作基础上,采用了类似的药物递送体系,所构建的PDT@DNPs纳米平台包含三层结构要素:内层为卵巢癌治疗常用化疗药物顺铂,其能与肿瘤细胞DNA结合,引起交叉联结,从而发挥细胞毒性作用^[16];中层为DSPE-PEG-MAL自组装形成的球形外壳,其包裹微溶于水的顺铂形成DNPs纳米颗粒,提高了顺铂在水溶液中的溶解度,同时作为整个纳米平台的结构支撑,通过对PEG聚合度的选择(PEG-5000)控制了纳米颗粒的粒径大小,使整个纳米药物的粒径稳定在100~200 nm的理想范围内,可以实现纳米颗粒的体内长循环和稳定^[17],同时,PEG在中性及37 °C时保持良好的稳定性,而在酸性的肿瘤微环境中,PEG发生质子化改变并引起DSPE-PEG分子的构象或自组装结构的改变,从而实现顺铂的肿瘤部位精准释放^[18];外层为经过工程化改造高表达PD-1的ID8肿瘤细胞膜,在利用同源靶向理论^[14]提高ID8细胞摄取PDT@DNPs能力的同时,细胞膜上高表达的PD-1可以与肿瘤细胞ID8表面的PD-L1特异性结合,进一步增强肿瘤细胞对PDT@DNPs的摄取能力。为了验证上述构想,我

们采用低表达PD-L1的小鼠心肌细胞HL-1为对照,同时封闭ID8细胞膜表面的PD-L1并进行摄取实验,结果显示, ID8细胞对PDT@DNPs的摄取能力明显高于HL-1细胞,且在封闭实验中ID8细胞摄取能力受到影响,体外杀伤性实验也进一步证实高摄取率下PDT@DNPs实现了更好的肿瘤细胞杀伤效果。在抗肿瘤免疫调节方面, LDH释放实验及T细胞相关细胞因子TNF- α 、INF- γ 的分泌水平显示PDT@DNPs可通过提高ID8细胞培养体系中的PD-1水平实现肿瘤细胞膜表面PD-L1免疫检查点的封闭,改善CTL耗竭状态,激活培养体系中T细胞的抗肿瘤免疫功能。

综上,本研究成功构建了具有较高稳定性和靶向性的新型仿生纳米化疗药PDT@DNPs,体外实验表明PDT@DNPs借助其表面的肿瘤细胞成分及PD-1的高表达显著促进了肿瘤细胞对于药物的摄取,使化疗药物顺铂(DDP)富集于肿瘤细胞内,发挥了化学杀伤作用;同时肿瘤细胞培养体系中的PDT@DNPs提供了大量的PD-1配体,实现了PD-1/PD-L1免疫检查点的封闭,逆转了体系中T细胞的耗竭状态,提高了T细胞的抗肿瘤免疫功能,为卵巢癌的药物研发提供了新思路。

参考文献 (References)

- [1] JIANG X, TANG H, CHEN T. Epidemiology of gynecologic cancers in China [J]. *J Gynecol Oncol*, 2018, 29(1): e7.
- [2] QI G, MA H, LI Y, et al. TTK inhibition increases cisplatin sensitivity in high-grade serous ovarian carcinoma through the mTOR/autophagy pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(12): 1135.
- [3] GUO Y, WANG Z, SHI X, et al. Engineered cancer cell membranes: an emerging agent for efficient cancer theranostics [J]. *Exploration*, 2022, 2(1): 20210171.
- [4] FANG R H, HU C M, LUK B T, et al. Cancer cell membrane-coated nanoparticles for anticancer vaccination and drug delivery [J]. *Nano Lett*, 2014, 14(4): 2181-8.
- [5] JIANG Y, KRISHNAN N, ZHOU J, et al. Engineered cell-membrane-coated nanoparticles directly present tumor antigens to promote anticancer immunity [J]. *Adv Mater*, 2020, 32(30): e2001808.
- [6] YANG H, QIN X, WANG H, et al. An *in vivo* miRNA delivery system for restoring infarcted myocardium [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(9): 9880-94.
- [7] 武洪远, 矫莉萍, 孙枝红, 等. 自然杀伤细胞膜伪装的基因递送载体介导的低温光热治疗乳腺癌的研究[J]. 分析化学(WU H Y, JIAO L P, SUN Z H, et al. Gene delivery vector mediated by nk cell membrane camouflage for low-temperature photothermal therapy of breast cancer [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*), 2022, 50(12): 11.
- [8] LIU S, WU J, FENG Y, et al. CD47KO/CRT dual-bioengineered cell membrane-coated nanovaccine combined with anti-PD-L1

- antibody for boosting tumor immunotherapy [J]. *Bioact Mater*, 2023, 22: 211-24.
- [9] CHEN L, ZHAO T, ZHAO M, et al. Size and charge dual-transformable mesoporous nanoassemblies for enhanced drug delivery and tumor penetration [J]. *Chem Sci*, 2020, 11(10): 2819-27.
- [10] 徐杰茹, 陈磊, 王冕, 等. 1990-2019年中国女性卵巢癌发病趋势分析与预测 [J]. 现代预防医学 (XU J R, CHEN L, WANG M, et al. Analysis and forecast of the incidence trend of ovarian cancer in Chinese women, 1990-2019 [J]. *Modern Preventive Medicine*), 2021, 49(19): 3457-60, 3470.
- [11] 蒋芳, 向阳. 卵巢癌免疫治疗的现状与进展 [J]. 中国实用妇科与产科杂志 (JIANG F, XIANG Y. Current status and progress of immunotherapy for ovarian cancer [J]. *Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics*), 2021, 37(6): 5.
- [12] DISIS M L, TAYLOR M H, KELLY K, et al. Efficacy and safety of avelumab for patients with recurrent or refractory ovarian cancer: phase 1b results from the javelin solid tumor trial [J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(3): 393-401.
- [13] HU C M, ZHANG L, ARYAL S, et al. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(27): 10980-5.
- [14] XIE X, HU X, LI Q, et al. Unraveling cell-type-specific targeted delivery of membrane-camouflaged nanoparticles with plasmonic imaging [J]. *Nano Lett*, 2020, 20(7): 5228-35.
- [15] YU Y, CHENG Q, JI X, et al. Engineered drug-loaded cellular membrane nanovesicles for efficient treatment of postsurgical cancer recurrence and metastasis [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(49): eadd3599.
- [16] DASARI S, TCHOUNWOU P B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 364-78.
- [17] HALD ALBERTSEN C, KULKARNI J A, WITZIGMANN D, et al. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 188: 114416.
- [18] KANAMALA M, WILSON W R, YANG M, et al. Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: a review [J]. *Biomaterials*, 2016, 85: 152-67.