

# 基于 Ce6 和 MMP-2 抑制剂的多级控释脂质纳米复合体用于光动力-免疫协同治疗黑色素瘤

刘慧芳, 雷栋钦, 秦奋, 王斯佳\*, 张镇西\*\*

西安交通大学生命科学与技术学院, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 生物医学光子学与传感研究所, 陕西 西安 710049

**摘要** 光动力疗法(PDT)能诱导肿瘤细胞免疫原性死亡,与免疫治疗联合能够提高对各种癌症的治疗效果。基于自然杀伤(NK)细胞的免疫疗法能够增强 PDT 的抗癌能力。以肿瘤组织中 NK 细胞免疫作用的分子途径为靶点,通过药物调控增强其对肿瘤的免疫作用,并进一步联合 PDT 可以有效提升抗肿瘤疗效。将包封基质金属蛋白酶-2(MMP-2)抑制剂 SB-3CT 的  $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)与负载光敏剂 Ce6 的脂质体通过 MMP-2 响应多肽组装在一起,构建了一种肿瘤微环境/光多重响应的脂质纳米药物控制系统(MRPL-SC),在细胞和裸鼠移植瘤模型中证明了 MRPL-SC 介导的 PDT 和 NK 免疫疗法协同抗肿瘤作用。MRPL-SC 到达肿瘤部位后,连接  $\beta$ -CD 与脂质体核心的 MMP-2 响应性多肽会在肿瘤组织微环境中过表达的 MMP-2 的作用下水解,释放包封在  $\beta$ -CD 中的 SB-3CT,SB-3CT 通过直接对 MMP-2 进行原位抑制来有效提升肿瘤组织中 NKG2DLs 的表达和 NK 细胞免疫响应;封装了 Ce6 的脂质体通过细胞内吞进入肿瘤细胞后,在 660 nm 激光照射下通过 PDT 诱导肿瘤细胞凋亡,同时进一步诱导肿瘤细胞 NKG2DLs 表达,实现对肿瘤组织中 NK 免疫的时空协同增强。MRPL-SC 介导的这种光动力和 NK 免疫增强协同抗肿瘤作用在黑色素瘤细胞和裸鼠移植瘤模型上得到了证明。本研究不仅为开发一种新的纳米药物用于程序化释放抗肿瘤药物以及更好地整合 PDT 和免疫治疗提供了参考,还阐明了一种用 NK 细胞介导的黑色素瘤免疫治疗的新模式。

**关键词** 医用光学; 光动力疗法; 免疫疗法; MMP-2 抑制剂; 自然杀伤细胞

**中图分类号** Q632 **文献标志码** A

**DOI:** 10.3788/CJL221212

## 1 引言

黑色素瘤是免疫原性最强的实体瘤之一,其较强的转移性导致现有疗法难以提高患者的长期生存率<sup>[1]</sup>,因此,开发多种新的有效的抗肿瘤治疗方法至关重要。光动力疗法(PDT)是一种新型的无创治疗恶性肿瘤的技术,已被成功用于治疗非黑色素皮肤癌等。近年来,人们已经进行了多项体外和体内 PDT 研究,以检验 PDT 治疗黑色素瘤的疗效;结果表明,PDT 有可能成为一种颇具潜力的黑色素瘤辅助治疗方法<sup>[2-3]</sup>。研究表明,PDT 能通过诱导氧化应激和肿瘤细胞的免疫原性死亡,在治疗部位增强患者的抗肿瘤免疫反应,从而达到杀死肿瘤细胞的效果<sup>[4-5]</sup>。Chlorin e6(Ce6)是第二代光敏剂,在 660 nm 处有较强的吸收峰,在黑色素瘤<sup>[6]</sup>和鳞状细胞癌<sup>[7]</sup>等皮肤癌的临床试验中有显著疗效。虽然 PDT 策略开启了癌症治疗的新篇章,但单一治疗的反应率仍然很低,临床结果普遍不理想。大量研究证明了光动力-免疫联合疗法在实体瘤治疗

上的优异效果以及对肿瘤转移的抑制作用<sup>[8-11]</sup>。

免疫疗法通过阻断被肿瘤劫持的负向免疫调控通路重新激活肿瘤免疫,进而通过机体免疫清除肿瘤。该疗法对中晚期肿瘤具有显著抑制作用,已逐步成为临床治疗中不可或缺的替代疗法之一,并被广泛用于黑色素瘤治疗。自然杀伤(NK)细胞是人体抵御肿瘤细胞和传染性病原体的第一道免疫防线,可以通过其激活信号和抑制信号之间的平衡识别并杀伤遭受“压力”的细胞,从而在没有抗原呈递或预刺激的情况下快速作用于靶细胞<sup>[12]</sup>。NK 细胞在黑色素瘤肿瘤免疫监视中发挥着关键作用。此外,NK 细胞免疫疗法已被证明可通过诱导全身性抗肿瘤免疫反应来提高 PDT 的肿瘤杀伤效果<sup>[13]</sup>。越来越多的动物实验和临床试验也表明 PDT 可以增加局部肿瘤组织和外周血中 NK 细胞的数量<sup>[14-15]</sup>。因此,PDT 和 NK 细胞免疫治疗的协同作用是一个值得进一步研究的方向。

虽然 NK 细胞免疫重建能够显著改善肿瘤患者的存活率,但自体 NK 细胞的过继转移在进展性 IV 期黑

收稿日期: 2022-09-05; 修回日期: 2022-09-26; 录用日期: 2022-10-05; 网络首发日期: 2022-10-20

基金项目: 国家自然科学基金(61875159, 61727823)、中国博士后科学基金(2018T111036)、广东省生物医学光学影像技术重点实验室开放基金(2020B121201010)

通信作者: \*wang\_sijia@xjtu.edu.cn; \*\*zxzhang@mail.xjtu.edu.cn

色素瘤患者中并没有临床反应<sup>[16]</sup>,患者的NK细胞功能受损,而NK细胞功能受损与疾病进展阶段、不良预后有关。对于NK细胞而言,其治疗抗性主要是由活性NK细胞数量少、寿命短、持久性和运输性差以及缺乏特异性肿瘤靶向性引起的<sup>[17]</sup>。肿瘤细胞除了可以通过改变NK细胞激活受体和抑制受体之间的平衡形成抑制NK细胞活性的微环境之外,还能介导MHC I类分子相关蛋白A(MICA)、MHC I类分子相关蛋白B(MICB)等NKG2D配体(NKG2DLs)脱落,并能招募抑制性免疫细胞。NK细胞相关免疫治疗的疗效在很大程度上取决于NK细胞表面所表达的NKG2D对靶细胞表面NKG2DLs(包括MICA、MICB和ULBP1-6等)的识别。肿瘤细胞通常通过MICA和MICB蛋白水解使细胞表面的NKG2DLs脱落,逃避NK细胞的识别杀伤。当肿瘤细胞表面的MICA和MICB脱落被小分子抑制剂特异性阻断时,NK细胞的抗肿瘤免疫就可以被重新激活<sup>[18]</sup>。基质金属蛋白酶(MMPs),尤其是MMP-2,在多种形式的癌症中过度表达。MMPs不仅与肿瘤的进展和转移有关,还参与NKG2DLs从肿瘤细胞表面脱落的过程<sup>[19]</sup>,因此靶向MMP-2可能会通过调控NKG2DLs的表达促进NK细胞免疫应答。鉴于此,本团队假设MMP-2拮抗剂可以抑制NKG2DLs的脱落,从而增加NKG2DLs在肿瘤细胞表面的暴露,促进NK细胞对癌细胞的识别途径的激活。SB-3CT是一种高选择性明胶酶抑制剂,可特异性抑制MMP-2和MMP-9<sup>[20]</sup>,可能成为NK免疫通路的潜在激动剂,这在以往的研究中很少提及。响应性触发的纳米载体同时负载光敏剂和免疫药物后,可在提升药物稳定性和靶向性的同时,通过时空触发的定向药物释放提升PDT与免疫治疗的协同治疗效果。

基于此,本团队设计了一种对肿瘤微环境和光双重响应的纳米颗粒——MMP-2响应多肽混合脂质体(MRPL-SC),以实现Ce6介导的PDT和SB-3CT增强的基于NKG2D的免疫治疗的协同抗肿瘤作用,并实现负载药物的时空可控释放。MRPL-SC由两部分复合而成,即:负载Ce6的纳米脂质体以及通过MMP-2响应多肽与脂质体连接的包封SB-3CT的 $\beta$ -CD。细胞外肿瘤微环境中过表达的MMP-2会触发 $\beta$ -CDs的分离和SB-3CT的释放。释放的SB-3CT会通过抑制MMP-2表达来抑制可溶性NKG2DLs的脱落,并增加NKG2DLs在肿瘤细胞表面的暴露。负载Ce6的脂质体被黑色素瘤细胞内吞后,采用660 nm激光照射激活其PDT效应,持续的PDT效应会触发脂质体内Ce6的释放和肿瘤细胞的凋亡/坏死。Ce6-PDT诱导的细胞凋亡与SB-3CT对NKG2D/NKG2DL通路的调节相结合,在黑色素瘤细胞和肿瘤异种移植裸鼠模型中显示出了优异的协同抗肿瘤效率和NK免疫应答。

## 2 实验材料与方法

### 2.1 MMP-2 响应肽(MRP)、MRP- $\beta$ -CD、DSPE-PEG(3400)-MRP- $\beta$ -CD的合成

MMP-2响应肽(序列为Ac-CSSSGPLGIAGQSSS-OH)由上海淘普生物科技有限公司通过Fmoc固相肽合成法合成。称取10 mg多肽溶解于1 mL二甲亚砜(DMSO)中,加入100 mg羟基琥珀酰亚胺(NHS)/1-乙基-3-[3-二甲氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)搅拌2 h,然后将17 mg氨基修饰的 $\beta$ -CD( $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD)和1%(体积分数)三乙胺(TEA)添加到上述溶液中并在氮气保护下室温搅拌过夜,通过透析(截留分子量MWCO:2000 Da,1 Da=1 u)去除过量的 $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD。将产物冻干,并采用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术对产物进行分析。

用DSPE-PEG(3400)对MRP- $\beta$ -CD进行进一步修饰:将15 mg MRP- $\beta$ -CD和20 mg DSPE-PEG(3400)-Mal溶解在2 mL DMSO中,将反应混合物在氮气保护下室温搅拌过夜,通过透析(MWCO:3500 Da)去除过量的MRP- $\beta$ -CD。产物冻干后进行MALDI-TOF MS分析。

### 2.2 制备MMP-2响应性纳米脂质体(MRPLs)和载药以形成MRPL-SC

Ce6脂质体通过薄膜水合法制备:将DPPC、DSPE-PEG(3400)-Mal、DSPE-PEG(3400)-MRP- $\beta$ -CD和胆固醇以60:10:5:15的质量比(总质量为12 mg)溶解于氯仿中,然后加入溶于丙酮中的5 mg/mL的Ce6,孵育5 min;在氮气保护下去除 $\text{CHCl}_3$ (以形成薄的磷脂膜),加入1 mL PBS,在48 °C下水合20 min,用小型挤出机系统通过100 nm聚碳酸酯膜挤出11次,获得粒径均匀的MRPL-C脂质体,透析去除未封装的Ce6。将SB-3CT逐滴加入MRPL-C溶液中,超声5 min后室温孵育1 h,以10000g的离心力离心10 min后收集MRPL-SC。使用低温透射电子显微镜(Cryo-TEM)表征脂质体的形态,通过动态光散射仪(DLS)测量粒径分布、Zeta电位和分散指数(PDI)。

MRPL-SC中Ce6的包封率通过Ce6的荧光强度进行评估,SB-3CT的包封率间接通过上清液中SB-3CT的残留量来评估。包封率 $E_e$ 定义为装载药物质量占所加药物总质量的百分比

### 2.3 体外MMP-2响应和光响应药物释放

为了评估MRPLs的MMP-2响应特性,将1 mL MRPL-SC与100  $\mu$ L重组人MMP-2(rhMMP-2, 0.2  $\mu$ g/mL)在37 °C TCNB溶液(50 mmol/L Tris, 10 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 150 mmol/L NaCl, 0.05% Brij 35, pH 7.5)中孵育3 h。采用Cryo-TEM表征脂质体的形态,采用DLS对粒径进行表征。将1 mL MRPL-SC分

别与 1 mL 含有 0、0.05、0.1、0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rhMMP-2 的 TCNB 溶液的混合物放入透析管 (MWCO: 100 kDa) 中, 透析液为 30 mL PBS, 将透析管置于摇床上 ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 200 r/min)。

光触发的 Ce6 释放: 将装有 2 mL MRPL-SC 的透析管 (MWCO: 100 kDa) 放于 30 mL PBS 透析液中进行透析, 温度为  $37\text{ }^\circ\text{C}$ ; 透析 2 h 后, 使用 660 nm 连续激光 ( $50\text{ mW}/\text{cm}^2$ , 5 min) 照射 MRPL-SC。在不同的时间点, 从透析装置的外部介质中取出 1 mL 溶液, 并重新添加相同体积的 PBS。SB-3CT 和 Ce6 的释放量分别通过紫外-可见分光光度计和荧光光谱仪进行测定。

#### 2.4 单线态氧生成

使用荧光  $^1\text{O}_2$  探针 Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) 测量 MRPL 的单线态氧 ( $^1\text{O}_2$ ) 产量。将 SOSG (终浓度,  $10\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 与  $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  Ce6 或 MRPL-SC (含  $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  Ce6) 混合, 并于 660 nm 激光下照射 ( $50\text{ mW}/\text{cm}^2$ ) 5 min。采用荧光光谱法 (发射波长  $\lambda_{\text{ex}}=504\text{ nm}$ , 激发波长  $\lambda_{\text{em}}=525\text{ nm}$ ) 测量荧光强度。

#### 2.5 细胞对 MMP-2 响应脂质体的内吞和 ROS 生成

A375 (人皮肤黑色素瘤细胞系) 肿瘤细胞购自 National Collection of Authenticated Cell Cultures, 将其置于含有 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) 中培养。A375 细胞分别用游离 Ce6 和 MRPL-Ce6 (Ce6 质量浓度为  $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理 0、4、6、8 h, 然后与 4% 甲醛孵育, 孵育结束后再使用  $1.0\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI 染色。采用荧光显微镜观察样品并拍照。

采用荧光显微镜监测 A375 细胞内活性氧 (ROS) 的生成, 将二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 作为荧光探针。将 A375 细胞以  $1\times 10^5\text{ cell}/\text{mL}$  的密度接种在共聚焦培养皿中, 并与  $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  Ce6、MRPL-C (含有  $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$  Ce6) 一起孵育 4 h。未经处理的细胞被视为对照组。孵育结束后, 用 PBS 洗涤细胞, 然后用 660 nm 激光 ( $50\text{ mW}/\text{cm}^2$ ) 照射细胞 5 min。根据检测试剂盒的说明书进行分析, 采用荧光显微镜监测 ROS 信号 ( $\lambda_{\text{ex}}=488\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=520\text{ nm}$ )。

#### 2.6 体外细胞毒性

使用 CCK-8 测定、评估细胞活力: 将  $100\text{ }\mu\text{L}$  A375 细胞以  $1\times 10^5\text{ cell}/\text{mL}$  的密度接种于 96 孔板中培养过夜, 然后加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  用培养基稀释的含有不同浓度 Ce6 和 SB-3CT 的 MRPLs; 6 h 后, 采用 660 nm 激光 ( $50\text{ mW}/\text{cm}^2$ , 5 min) 照射细胞, 对照组置于暗处; 24 h 后每孔加入 1% CCK-8, 采用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值, 计算细胞存活率。细胞存活率  $C_v$  的计算公式为

$$C_v = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{con}} - A_{\text{blank}}) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:  $A_{\text{sample}}$  是指经不同浓度脂质体处理后的细胞在 450 nm 波长下的吸光度 (OD);  $A_{\text{con}}$  是指未经任何处理的细胞在 450 nm 波长下的吸光度;  $A_{\text{blank}}$  是指培养基与

CCK-8 溶液在 450 nm 波长下的吸光度。

采用 Calcein-AM/PI 活死细胞共染色评估 MRPLs 的细胞毒性: 将 A375 细胞接种于 35 mm 直径的共聚焦培养皿中, 与空白 MRPLs、MRPL-S、MRPL-C 和 MRPL-SC 共孵育 6 h; 孵育结束后用 PBS 清洗, 激光照射后 24 h 用 Calcein-AM (活细胞) 和碘化丙啶 (PI, 死细胞) 避光染色 30 min, 然后在荧光显微镜下观察 (Calcein AM 显示绿色荧光,  $\lambda_{\text{ex}}=494\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=517\text{ nm}$ ; PI 显示红色荧光,  $\lambda_{\text{ex}}=535\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=617\text{ nm}$ )。

#### 2.7 NKG2D/NKG2DL 通路分子机制

用 Western Blot 检测 NKG2DLs 蛋白表达: 1) 将 A375 细胞接种于 6 孔板中培养过夜, 然后加入 MRPLs、MRPL-S、MRPL-C 和 MRPL-SC; 2) 24 h 后用 PBS 洗涤细胞两次, 每组细胞用含有  $1\text{ mmol}/\text{L}$  苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的 RAPI 裂解液在冰上裂解 10 min, 接着离心 5 min (离心力为  $10000g$ ), 取上清液用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量; 3) 蛋白定量后, 将  $20\text{ }\mu\text{g}$  蛋白质样品在 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 上进行电泳, 然后将蛋白质转移到硝酸纤维素滤膜 (NC) 上; 4) 室温下, 将 NC 膜于封闭溶液 (5% 脱脂奶粉) 中预孵育 1 h, 接着将 NC 膜与兔抗人单克隆抗体 MICA、MICB、ULBP-1、ULBP-2、MMP-2 和 MMP-9 (1:1 000) 在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  过夜,  $\beta$ -actin 作为内参; 5) 用含有 0.1% Tween-20 的 Tris 缓冲液 (TBST) 洗涤三次, 每次 10 min, 将 NC 膜与山羊抗兔的 HRP-Ig G 于室温下孵育 1 h, 孵育结束后用 TBST 洗涤三次, 将膜与化学发光试剂盒 (Pierce ECL) 的底物一起孵育。用 ClinxChemiScope 捕获图像, 用 Image-Pro Plus 测量灰度带值。

A375 细胞用 MRPLs、MRPL-S、MRPL-C 和 MRPL-SC 处理 24 h 和 48 h 后分别收集细胞培养上清液, 进行酶联免疫吸附实验 (ELISA), 使用 Human MICA ELISA 试剂盒和 Human MICB ELISA 试剂盒检测 MICA 和 MICB 的浓度。简言之, 首先根据试剂盒说明制备标准浓度的 MICA 和 MICB, 将标准液和样品各  $100\text{ }\mu\text{L}$  添加到抗 MICA/B 包被的微孔板中, 然后依次加入生物素化检测抗体和辣根过氧化物酶-链霉素抗生素溶液, 最后加入显色液和终止液, 在 450 nm 处检测吸光度值。以标准液浓度为横坐标、吸光度值为纵坐标绘制标准曲线, 根据样品的吸光度值计算浓度。

#### 2.8 NK 细胞介导的细胞毒性

使用乳酸脱氢酶 (LDH) 释放测定法测量 NK 细胞介导的细胞毒性: 1) 用 MRPLs、MRPL-S、MRPL-C 和 MRPL-SC 处理细胞, 24 h 后收集细胞并计数, 并用完全培养基将收集的 A375 细胞密度调至  $1\times 10^5\text{ cell}/\text{mL}$ ; 2) 采用同样的方法计数 NK 细胞, 并根据不同靶靶比调节 NK 细胞的浓度; 3) 将 A375 细胞和 NK 细胞各  $100\text{ }\mu\text{L}$  加入 96 孔板中, 混合均匀, 每个样品 3 个复孔,

同时设置 A375 最大释放组和 A375 细胞自然释放组作为对照组;4) 孵育 4 h 后离心, 将 100  $\mu\text{L}$  上清液转移到新的 96 孔板中;5) 根据说明书, 用 LDH 检测试剂盒检测上清液中释放的 LDH。NK 细胞杀伤率  $L_{\text{ysis}}$  的计算公式为

$$L_{\text{ysis}} = (A_{\text{exp}} - A_{\text{nat}}) / (A_{\text{max}} - A_{\text{nat}}) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:  $L_{\text{ysis}}$  为 NK 细胞的杀伤率;  $A_{\text{exp}}$  为实验组上清液的吸光度值;  $A_{\text{nat}}$  为 A375 细胞自然释放组上清液的吸光度值;  $A_{\text{max}}$  为 A375 最大释放组上清液的吸光度值。

## 2.9 体内荧光成像

BALB/c 裸鼠(4~6 周龄, 17  $\text{g} \pm 4 \text{g}$ ) 购于西安科奥克生物科技有限公司, 用于构建荷瘤裸鼠模型。所有动物试验均得到了西安交通大学动物伦理委员会的批准。将悬浮于 100  $\mu\text{L}$  PBS 中的共  $1 \times 10^6$  个 A375 细胞皮下注射到小鼠右侧腿部皮下组织中。当肿瘤体积长大到约 200  $\text{mm}^3$  时, 使用 LVIS SPEC 成像系统对小鼠进行体内荧光成像。肿瘤体积的计算公式为:  $V = L \times W^2 / 2$  ( $V$  表示体积,  $L$  表示长,  $W$  表示宽)。将 Ce6 和 MRPL-SC (100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{mol/L}$  Ce6) 静脉注射到荷瘤小鼠体内, 注射后 0、2、8、12、24 h, 采用 IVIS Spectrum 对小鼠进行成像。注射后 24 h 处死小鼠, 对小鼠进行解剖, 并对肿瘤组织和主要器官(心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏) 进行离体成像 ( $\lambda_{\text{em}} = 645 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 680 \sim 720 \text{ nm}$ )。

## 2.10 体内抗肿瘤功效

为了评估 MRPL-SC 的抗肿瘤效率和安全性, 将 A375 细胞(每只裸鼠  $1 \times 10^6$  个细胞) 皮下注射到右侧腿部构建 A375 荷瘤裸鼠模型。当肿瘤体积长大到约 50  $\text{mm}^3$  时, 将裸鼠随机分为 5 组, 分别为生理盐水组(NS 组)、MRPL-S 组、MRPL-C+laser 组、MRPL-SC 组、MRPL-SC+laser 组, 每组 8 只。尾静脉注射 100  $\mu\text{L}$  治疗制剂(SB-3CT 的给药剂量为 50  $\text{mg/kg}$ , Ce6 质量浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$ ), MRPL-C+laser 组和 MRPL-SC+laser 组在注射后 24 h 和 48 h 分别用 660  $\text{nm}$  激光照射肿瘤部位(200  $\text{mW/cm}^2$ , 10 min)。将注射药物的当天定义为第 0 天, 每 3 或 4 天记录一次小鼠体重和肿瘤体积。根据测量的数据计算裸鼠的相对肿瘤体积, 以给药时间为对照。治疗结束后, 以生理盐水组的肿瘤体积为 100%, 计算相对肿瘤增殖率。

为了验证药物的治疗效果, 静脉注射药物并照射后 48 h (即第 4 天), 每组随机选取 2 只小鼠处死, 并收集肿瘤组织。将肿瘤组织在多聚甲醛组织固定液中进行固定, 然后进行石蜡包埋和切片处理, 最后进行苏木精伊红(H&E)染色和末端脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)染色, 以评估治疗效果。

将治疗的第 14 天定义为治疗终点。治疗结束后处死所有小鼠, 取肿瘤组织称重。为了评估脂质体制剂的全身毒性, 收集主要器官(心、肝、脾、肺、肾) 进行固定、石蜡包埋、切片、H&E 染色处理, 以进行组织病

理学分析。

## 2.11 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9 对结果进行统计分析。结果表示为平均值  $\pm$  标准差(SD)。使用单因素方差分析进行多组之间的比较。统计显著性定义为  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) 和  $P < 0.001$  (\*\*\*)。

# 3 实验结果与讨论

## 3.1 MRPL-SC 的制备和表征

MRPL-SC 的合成示意图及作用机制如图 1 所示。为了实现 MMP-2 响应性释药, 首先设计并合成了 MMP-2 多肽, 序列为 Ac-CSSSGPLGIAGQSSS-COOH, 以连接 Ce6 脂质体和包封 SB-3CT 的  $\beta$ -CD, 其中包括 MMP-2 特异性可切割序列“-GPLGIAGQ-”<sup>[21]</sup>。HPLC 分析后可知所合成的多肽纯度高达 98.77% (结果未显示), 可用于后续的合成。随后将此多肽分别与  $\beta$ -CD 和 DSPE-PEG(3400) 反应, 所合成的 MRP- $\beta$ -CD 和 DSPE-PEG(3400)-MRP- $\beta$ -CD 均通过 MALDI-TOF MS 进行检测和确认。如图 2(a) 所示, MRP 的质荷比( $m/z$ ) 为 1379.47, 与计算所得的相对分子质量(1379.49) 基本相同。MRP- $\beta$ -CD 的质荷比为 2778.02, 如图 2(b) 所示。对比图 2(c)、(d) 可以看出 DSPE-PEG(3400)-MRP- $\beta$ -CD 的相对分子质量比 DSPE-PEG(3400)-Mal 增加了约 2800, 这说明 MRP- $\beta$ -CD 成功地与 DSPE-PEG(3400)-Mal 发生了反应。

如图 3(a) 所示, DSPE-PEG(3400)-MRP- $\beta$ -CD 参与 Ce6 脂质体的合成, 同时  $\beta$ -CD 为 SB-3CT 包封提供疏水腔。过量的 DSPE-PEG(3400)-MRP- $\beta$ -CD 会提供更多的  $\beta$ -CD 来封装 SB-3CT, 但  $\beta$ -CD 的大亲水性结构域会导致脂质体的稳定性降低。因此, 合成 MRPLs 时最终选择 DSPE-PEG(3400)-Mal 与 DSPE-PEG(3400)-MRP- $\beta$ -CD 的质量比为 2:1, 以使 MRPLs 在保持结构稳定的同时负载更多的 SB-3CT。随后, 为了确认 MRPL-SC 合成成功, 使用 Cryo-TEM 和 DLS 对其进行成像分析和粒径测定。图 3(b) 所示的 Cryo-TEM 结果显示: MRPL-C (仅包封 Ce6) 和 MRPL-SC (包封 Ce6 和 SB-3CT) 在 PBS 溶液中呈球形, 无聚集, 分散性良好, 均表现出典型的磷脂双层脂质体结构, 且磷脂双层膜结构清晰可见, 可形成具有高药物封装效率的单/双层囊泡, 有利于细胞内递送; MRPL-C (仅包封 Ce6) 和 MRPL-SC (包封 Ce6 和 SB-3CT) 粒径均一, 平均粒径为 160~170  $\text{nm}$ , 而且 SB-3CT 和 Ce6 包封不会对脂质体的粒径产生很大影响。进一步分析了 SB-3CT、Ce6 和 MRPL 的紫外可见光谱, 结果如图 3(c) 所示。SB-3CT 在 265  $\text{nm}$  波长处有强紫外吸收峰, Ce6 在 405  $\text{nm}$  波长处有光吸收峰, 空载脂质体 blank (不包封药物) 在 200~500  $\text{nm}$  处无明显的吸收峰, MRPL-S (仅包封 SB-3CT)、MRPL-C 和

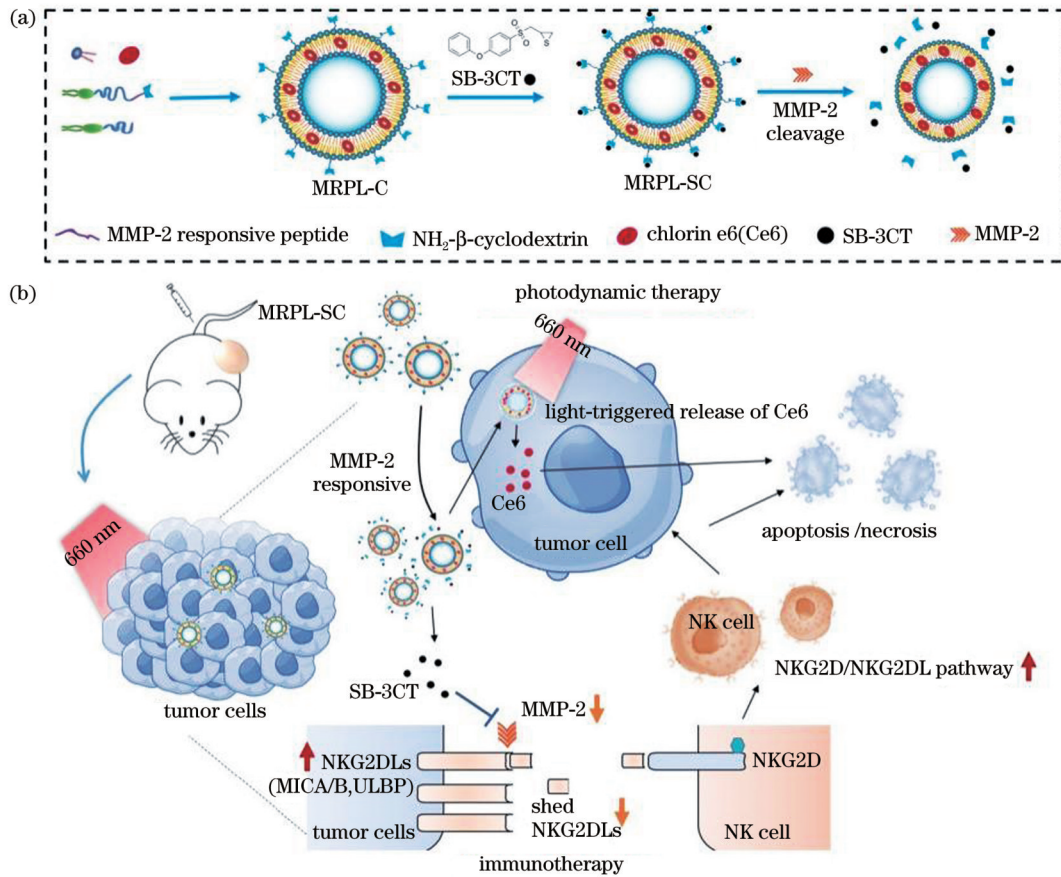


图 1 MRPL-SC 脂质体的作用示意图。(a)MRPL-SC 合成及 MMP-2 响应性释放;(b)MRPL-SC 在肿瘤中的双重反应药物释放及改善光动力免疫治疗的机制

Fig. 1 Schematic diagrams of MRPL-SC liposomes. (a) MRPL-SC synthesis and MMP-2 responsive release; (b) dual-responsive drug release and mechanisms to improve photodynamic immunotherapy of MRPL-SC in tumor

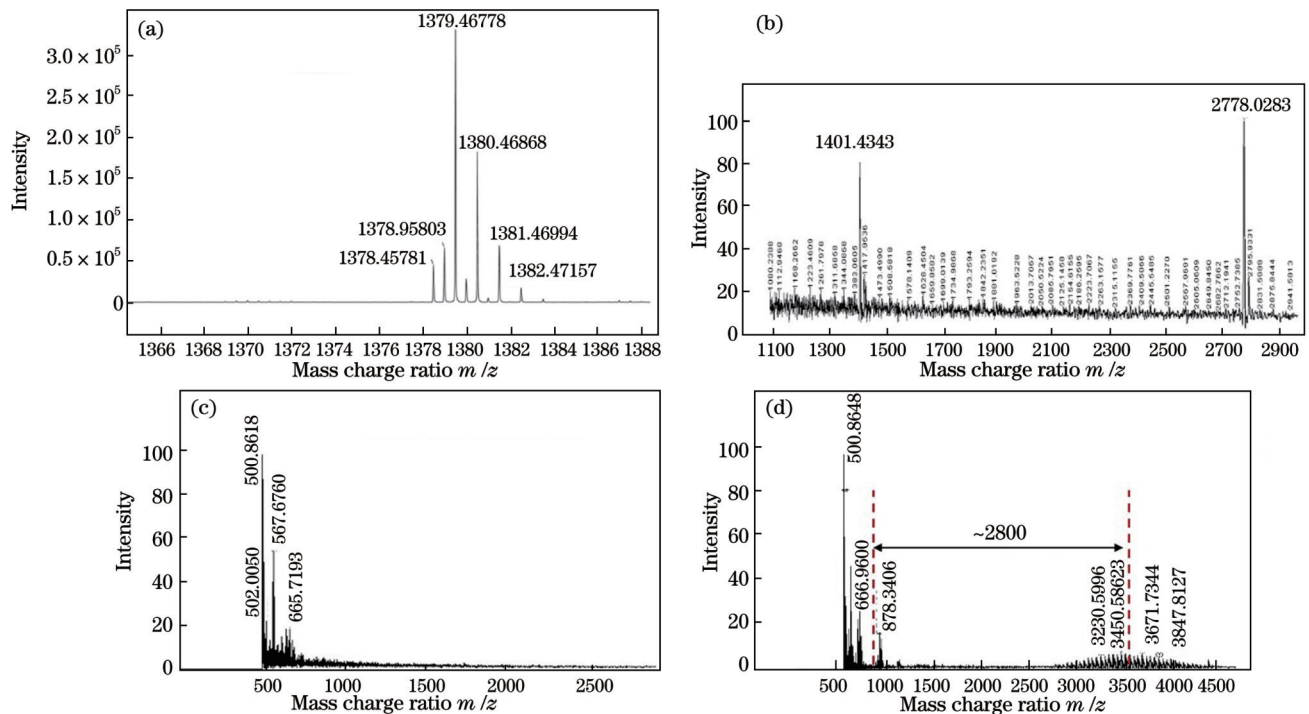


图 2 MALDI-TOF 质谱检测结果。(a)MRP;(b)MRP-β-CD;(c)DSPE-PEG(3400)-Mal;(d)DSPE-PEG(3400)-MRP-β-CD

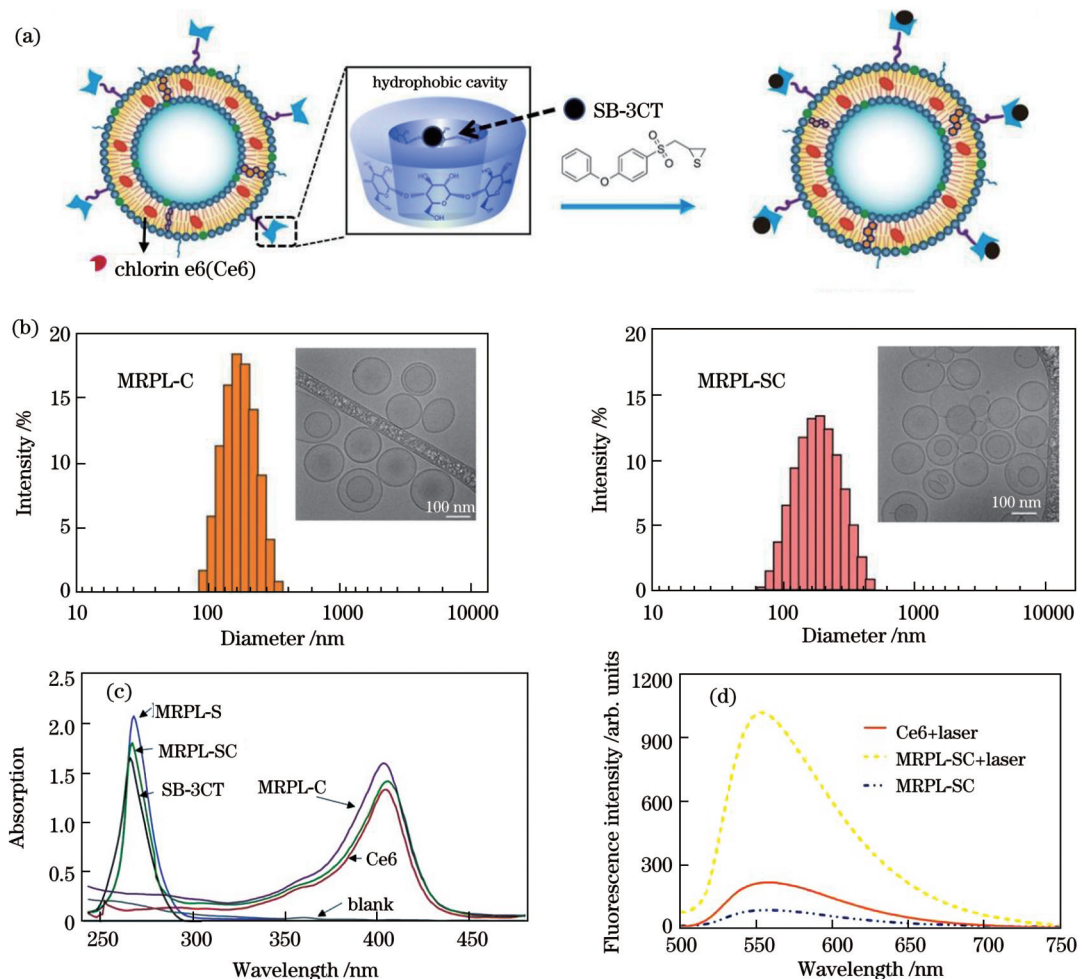


图3 MRPL-SC的表征。(a)MRPL-SC合成示意图;(b)MRPL-C和加载SB-3CT后MRPL-SC的粒径分布及Cryo-TEM形貌表征;(c)游离SB-CT、Ce6及脂质的紫外可见光谱,blank组不包封药物,MRPL-C仅包封Ce6,MRPL-S仅包封SB-3CT,MRPL-SC包封Ce6和SB-3CT;(d)单线态氧产量

Fig. 3 Characterization of MRPL-SC. (a) Synthesis schematic of MRPL-SC; (b) particle size distributions and Cryo-TEM characterization of MRPL-C and MRPL-SC loaded with SB-3CT; (c) UV-vis spectra of free SB-CT, Ce6 and liposomes, where blank loads no drug, MRPL-C loads only Ce6, MRPL-S loads only SB-3CT, and MRPL-SC loads both Ce6 and SB-3CT; (d) singlet oxygen generation

MRPL-SC的特征吸收峰与SB-3CT、Ce6相比略有偏移(证明药物SB-3CT和Ce6已被成功封装)。SB-3CT和Ce6的包封率分别可达81.41%和77.47%,如此高的载药量有利于药物在细胞内递送后发挥相应作用。

Ce6单线态氧的量子产率高,表现出了极其出色的PDT效率,但其水溶性差,生理状态下易聚集,从而影响其细胞杀伤效果。通过SOSG荧光探针对Ce6单线态氧的生成进行评估,结果如图3(d)所示。相同Ce6浓度的MRPL-SC所产生的单线态氧远高于游离Ce6,说明包封可以提高Ce6的稳定性,从而发挥更好的治疗效果。

### 3.2 MRPL-SC双重响应药物释放

图4(a)显示MRPL-SC能够响应MMP-2释放出SB-3CT。为了确定MRPLs的MMP-2响应性释药能力,将MRPL-SC与rhMMP-2孵育3h,通过DLS对脂

质体进行表征。如图4(b)中的Cryo-TEM图像所示,与rhMMP-2一起孵育的MRPL-SC在形态上并没有出现明显的破裂、皱缩等现象,然而DLS结果显示孵育3h后在脂质体中检测到了一个额外的药物聚集小峰,推测此峰是由含有SB-3CT的β-CD从脂质体中分离后聚集形成的。同时,由图4(b)可以发现药物释放后脂质体的粒径发生了轻微变化,从162.2nm增大至168.8nm,PDI也从0.075增加至0.166。这些结果表明MRPL-SC脂质体能在MMP-2存在的情况下响应性释放SB-3CT,使其在细胞外基质发挥相应作用,但β-CD的释放对封装Ce6的脂质体的结构没有影响,脂质体仍保持完整结构,能够进一步被细胞内吞,发挥Ce6的PDT作用。此外,据报道,实现EPR效应(enhanced permeability and retention effect,即实体瘤的高通透性和滞留效应)的纳米材料的最佳直径在100~200nm之间<sup>[22]</sup>,因此释放β-CD后的Ce6脂质体

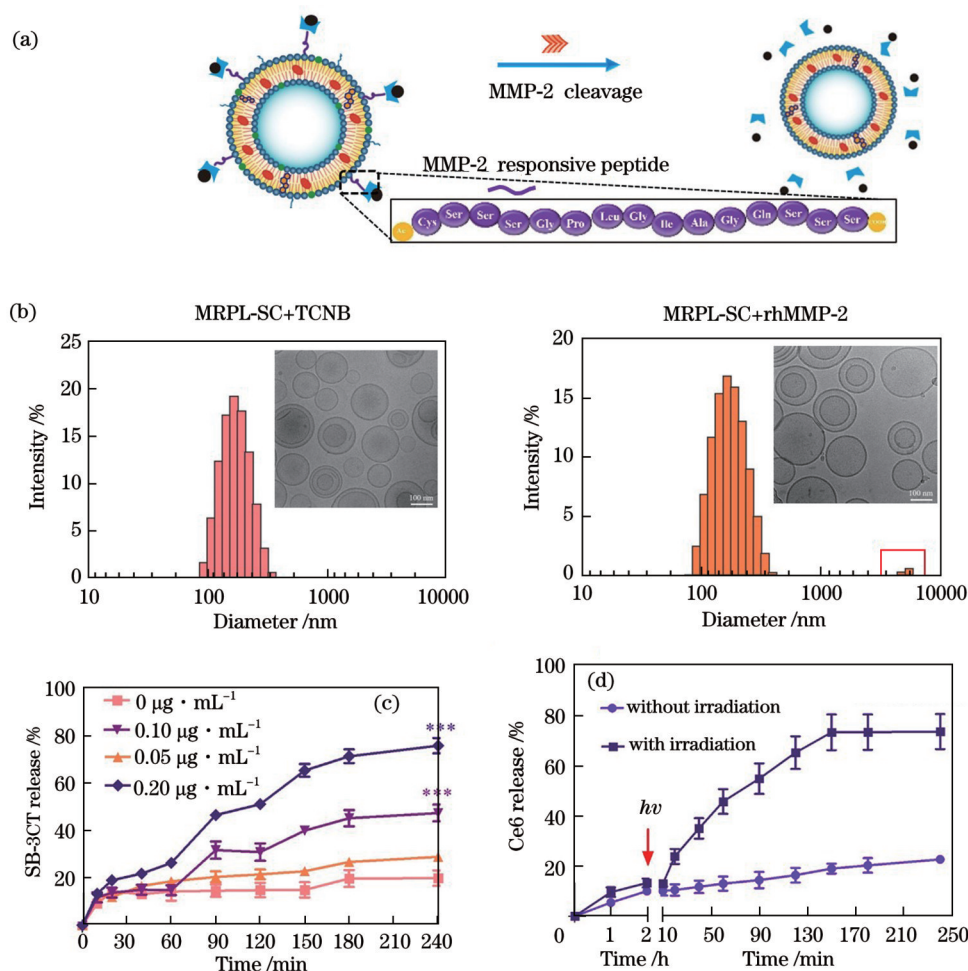


图4 MRPL的MMP-2响应性。(a)MRPL-SC响应MMP-2释放药物示意图;(b)MRPL-SC与rhMMP-2孵育后的粒径分布和Cryo-TEM图像;(c)在不同质量浓度MMP-2下孵育的MRPL-SC的SB-3CT释放曲线;(d)激光触发前后的Ce6释放

Fig. 4 MMP-2 responsiveness of MRPL. (a) Drug release schematic illustration of MRPL-SC with MMP-2 responsive; (b) particle size distributions and Cryo-TEM images of MRPL-SC incubated with rhMMP-2; (c) SB-3CT release curves of MRPL-SC incubated with different mass concentrations of MMP-2; (d) Ce6 release before and after laser triggering

仍能被肿瘤细胞内吞。由图4(c)可以看出:MRPL-SC与 $0.2\ \mu\text{g}/\text{mL}$  rhMMP-2孵育后表现出了快速的SB-3CT响应性释放,90 min内的SB-3CT释放量可达46.60%,240 min内的释放量高至72.26%;然而,在没有rhMMP-2的情况下,仅有不到20%的SB-3CT被释放。需要注意的是,SB-3CT的释放量与MMP-2的质量浓度有关:当MMP-2的质量浓度为 $0.05\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,240 min内的SB-3CT释放量约为28.67%;当MMP-2的质量浓度为 $0.10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,240 min内的SB-3CT释放量约为47.48%。这些结果表明了MRPL-SC对MMP-2的响应性,说明SB-3CT能够在MMP-2过表达的肿瘤微环境中释放。

本文评估了MRPL-SC中Ce6的光触发释放特性,结果如图4(d)所示。660 nm激光未照射时,2 h内的Ce6释放量不足20%;之后对MRPL-SC进行激光照射,60 min内Ce6的释放量达到45.75%,240 min后达到73.62%,而没有进行激光照射组的最终释放量仅为20.07%。这表明MRPL可以抑制正常生理条件

下的药物释放,而光照可以有效触发MRPL-SC药物释放。

### 3.3 细胞MRPL-SC摄取和体外细胞毒性

内吞是纳米颗粒进入细胞的关键途径。众所周知,PDT主要通过相当有限浓度范围内的光敏剂( $<0.1\ \mu\text{mol}/\text{L}$ )产生活性氧来发挥光敏剂的细胞毒性作用<sup>[23]</sup>。因此,Ce6的有效摄取是探索光敏剂作用机制的先决条件。可以用Ce6的荧光强度表征A375细胞对MRPL-SC的摄取能力。由图5(a)、(b)可以看出:孵育4 h后,在细胞内可以检测到少量Ce6的荧光信号;随着孵育时间延长,荧光强度逐渐增加;孵育8 h后,可以检测到明显的荧光信号。这说明MRPL-SC可以被A375细胞有效摄取,从而发挥其细胞毒性作用。相关研究认为,Ce6主要分布于细胞膜、溶酶体、内质网等处,同一种光敏剂定位于不同类型的细胞器中会导致不同的死亡途径<sup>[24]</sup>。

接下来对细胞内ROS的产生进行分析。ROS产生是PDT效应的主要作用机制,ROS可以破坏质膜

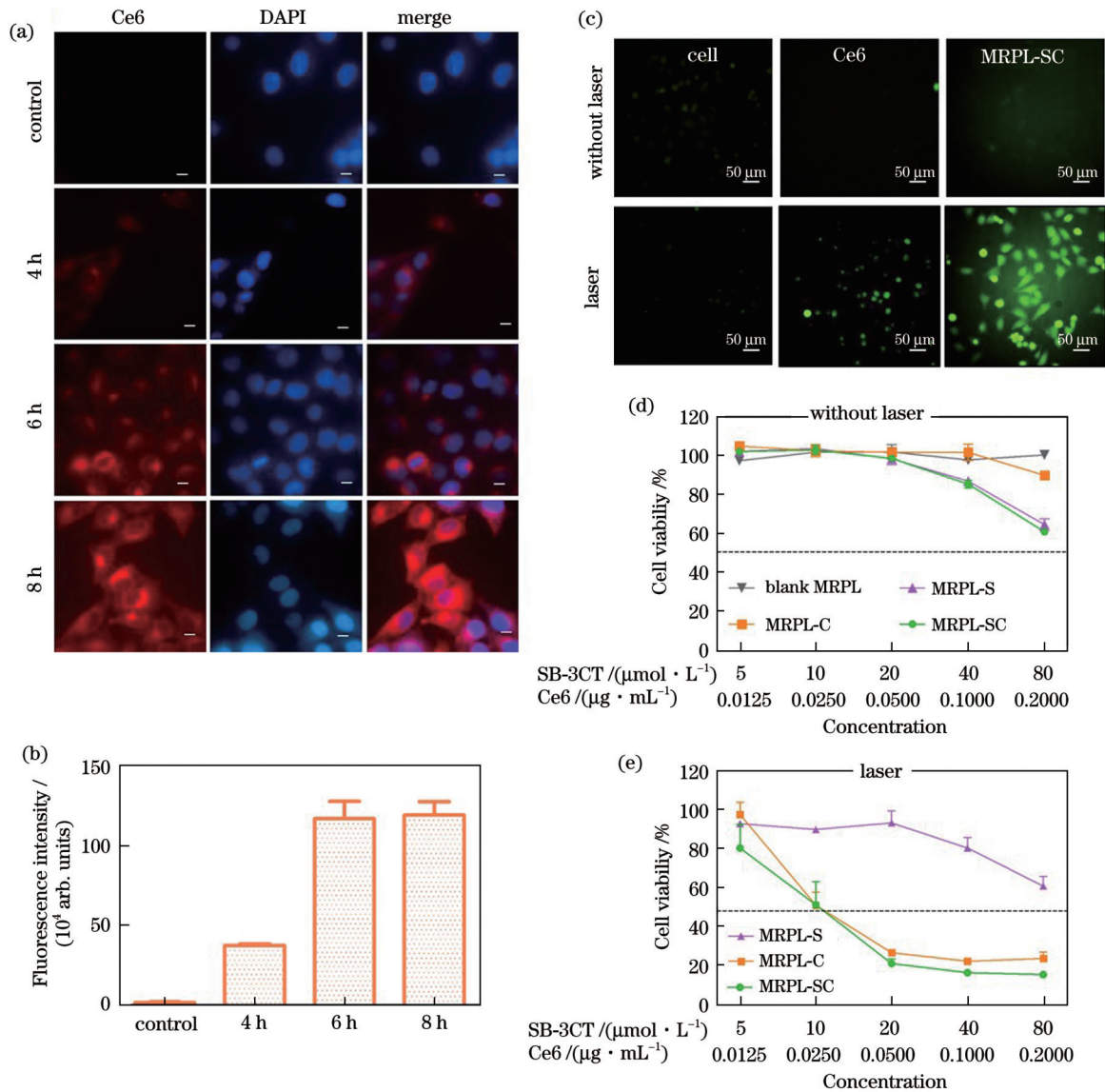


图 5 体外 MRPLs 的细胞摄取和细胞毒性。(a) A375 细胞摄取 Ce6 的荧光图像 (比例尺: 10 μm); (b) A375 细胞摄取 Ce6 的荧光强度的相对定量分析; (c) 不同处理后 A375 细胞产生的 ROS 的荧光图像; (d) A375 经 MRPL 处理后在无光照条件下的细胞活力; (e) A375 经 MRPL 处理后在光照条件下的细胞活力

Fig. 5 Cellular uptake and cytotoxicity of MRPLs *in vitro*. (a) Fluorescent images of Ce6 uptake by A375 cells (scale bar: 10 μm); (b) relative quantitative analysis of fluorescence intensity of Ce6 uptake by A375 cells; (c) fluorescent images of ROS produced by A375 cells after different treatments; (d) cell viability of A375 cells treated by MRPL without laser irradiation; (e) cell viability of A375 cells treated by MRPL with laser irradiation

和细胞器,导致肿瘤细胞自噬、凋亡和坏死。由图 5 (c)可以看出:无光照时,Ce6和MRPL-SC组细胞几乎没有 ROS 生成;用 660 nm 激光器照射 5 min 后,游离 Ce6 处理的细胞发出微弱的荧光信号,MRPL-SC 组细胞发出明显的绿色荧光。包封后的 MRPL-SC 能够更容易地被 A375 细胞摄取,从而在光照刺激下产生更多的 ROS,发挥更强的细胞毒性,促进肿瘤细胞凋亡。因此,MRPL 包封可以有效提高 Ce6 的稳定性、细胞内递送和 PDT 效应。

用于生物医学的纳米脂质体在递送药物的同时应具有有良好的生物相容性和治疗效果。为了评估 MRPLs 的细胞毒性和生物活性,通过 CCK-8 法检测

A375 细胞的活力。采用空载 MRPLs (blank) 处理 A375 细胞没有诱导明显的细胞毒性,如图 5(d) 所示,证明了所合成的脂质体作为药物载体的可行性。当 MRPLs 中包封 SB-3CT 时 (MRPL-S),细胞存活率随着负载 SB-3CT 浓度的增加而逐渐下降,当所负载的 SB-3CT 的浓度达到 80 μmol/L 时,细胞活力降低至 81.25%。同样,MRPL-C 中包封的 Ce6 的质量浓度为 0.2000 μg/mL 时,细胞活力无明显下降。共同包封两种药物 (SB-3CT 的浓度为 80 μmol/L, Ce6 的质量浓度为 0.2000 μg/mL) 后,细胞存活率下降至 80.97%。在后续细胞实验过程中,为了更好地实现 SB-3CT 和 Ce6 的协同作用并避免其对细胞的暗毒性,MRPL-SC



中 SB-3CT 的浓度应低于 80  $\mu\text{mol/L}$ , Ce6 的质量浓度应低于 0.2000  $\mu\text{g/mL}$ 。图 5(e) 显示, 在 660 nm 激光照射下, MRPL-SC 在 SB-3CT 浓度为 40  $\mu\text{mol/L}$ 、Ce6 质量浓度为 0.1000  $\mu\text{g/mL}$  时能够诱导 83.31% 的 A375 细胞死亡, MRPL-C 在 Ce6 质量浓度为 0.1000  $\mu\text{g/mL}$  时能诱导 77.47% 的细胞死亡。可见, 在相同的 Ce6 质量浓度下, MRPL-SC 表现出了更强的抗肿瘤活性。

接下来通过计算 MRPL-SC 中 Ce6 与 SB-3CT 的  $\text{IC}_{50}$  结合指数(CI)来分析药物间的协同作用。由之前的报道可知: 若 CI 等于 1, 说明两种药物为加性作用; 若 CI 值大于 1, 说明两种药物具有拮抗作用; 若 CI 值小于 1, 说明两种药物具有协同作用<sup>[25]</sup>。对于 MRPL-SC 而言, CI 的计算公式为  $\text{CI} = \text{IC}_{50}(\text{SB-3CT in MRPL-SC+laser}) / \text{IC}_{50}(\text{SB-3CT in MRPL-SC}) + \text{IC}_{50}(\text{Ce6 in MRPL-SC+laser}) / \text{IC}_{50}(\text{Ce6 in MRPL-C+laser})$ 。根据 CCK-8 细胞杀伤结果, 上述  $\text{IC}_{50}$  值依次为 13.58  $\mu\text{mol/L}$ 、109.4  $\mu\text{mol/L}$ 、6.789  $\mu\text{g/mL}$  和 8.688  $\mu\text{g/mL}$ 。经计算可得 MRPL-SC 的 CI 值为 0.8916, 这一结果表明 MRPL-SC 介导的光动力疗法 (Ce6-PDT) 和免疫疗法 (SB-3CT) 具有协同作用。

### 3.4 NKG2D/NKG2DL 通路机制研究

Ce6-PDT 能够引发多种急性应激反应, 改变线粒体的功能, 而线粒体是负责诱导细胞凋亡的细胞器<sup>[26]</sup>。因此, 诱导细胞凋亡是 Ce6-PDT 作用于肿瘤细胞的主要机制。SB-3CT 在 MRPL-SC 中的主要机制不是诱导黑色素瘤细胞凋亡, 而是调节 MMP-2 的表达并进一步影响 NKG2D 通路, 进而调控 NK 细胞的杀伤作用。由图 6(a) 所示的 Western Blot 结果可以看出: 无论是否光照, MRPL-S 和 MRPL-SC 都可以抑制 MMP-2/9 的表达; 经 660 nm 激光照射后, MRPL-C 组细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的表达被显著抑制。Ce6-PDT 后, MMP-2 和 MMP-9 的表达降低, 可以进一步辅助 SB-3CT 对 MMP-2 和 MMP-9 的拮抗作用, 说明 MRPL-SC 对 MMP-2 和 MMP-9 的抑制作用比 MRPL-S 强。MMP-2、MMP-9 与 NKG2D 通路密切相关, 影响 NK 细胞对肿瘤细胞的识别。抑制 MMP-2 可以减少 NKG2DLs 从肿瘤中的脱落, 导致 NKG2DLs 上调。Western Blot 结果显示: MRPL-S 能够诱导 ULBP-1 的表达; 光照后, 由于 PDT 对 MMP-2 的抑制作用, MRPL-C 组中 MICB 和 ULBP-1 的表达随之增加; 而在 MRPL-SC 组中, 由于 SB-3CT 与 PDT 的协同作用, A375 细胞中 MICB 和 ULBP-1 的表达显著高于 MRPL-S 组和 MRPL-C 组。MICB 和 ULBP-1 等 NKG2DLs 的高表达使其能够与 NK 细胞的 NKG2D 受体结合, 从而激活 NK 细胞。然而, NK 细胞的有效激活不仅取决于肿瘤表面 NKG2DLs 的表达, 还与产生的可溶性 NKG2DLs 息息相关。如图 6(b) 所示, 未经处理的 A375 细胞分泌的可溶性 MICA (sMICA) 和可溶性 MICB (sMICB) 在孵育 48 h 后显著增加, 表明它们对 NK 细胞的免疫逃逸。在 MRPLs 治疗组中,

MRPL-S 和 MRPL-C (照射后) 均能抑制 sMICA 的产生, 但对 sMICB 的产生没有影响。与未处理的 A375 细胞相比, MRPL-SC 组的 sMICA 水平显著降低, sMICB 的生成也受到抑制。综上所述, 如图 6(c) 所示, MRPL-SC 中 Ce6 介导的 PDT 可以诱导 A375 细胞表面 NKG2DLs 的表达, 与免疫调节剂 SB-3C 协同有效诱导 ULBP-1 表达并抑制产生的 sMICA/sMICB, 进而增加 NK 细胞对 A375 细胞的识别敏感性, 促进 NK 细胞的免疫反应。

NK 细胞对靶细胞的杀伤作用主要取决于 NK 细胞表面抑制性受体与激活性受体之间的平衡, 当靶细胞表面活性受体的配体表达增加时, NK 细胞的激活性受体占据主导地位, 从而识别并杀伤肿瘤细胞。如图 6(d) 所示, 与阴性对照组细胞相比, 即使不经任何处理, NK 细胞也能够杀伤靶细胞, 但杀伤能力较弱, 尤其是当靶细胞与 NK 细胞的数量比为 1:1 时。MRPL-SC+laser 组的靶细胞能够更多地被 NK 细胞识别, 并且随着 NK 细胞增加, 其杀伤能力显著增加, 当靶细胞与 NK 细胞的数量比达到 1:4 时, 几乎所有的 A375 细胞都能被 NK 细胞识别并杀伤。将靶细胞与 NK 细胞的数量比设置为 1:4, 采用 LDH 测定试剂盒定量分析 NK 细胞对 A375 细胞的杀伤作用。如图 6(e) 所示, NK 细胞能够杀伤不经任何处理的 A375 细胞, 细胞死亡率为 38.97%。在未进行光照时, Ce6&SB-3CT@MRPLs 组的细胞有 58.9% 死亡; 光照后, Ce6&SB-3CT@MRPLs 组 NK 细胞的杀伤能力进一步提高, 再加上光动力治疗所诱导的细胞死亡, 细胞几乎全部死亡, 细胞死亡率远高于 Ce6@MRPLs 组。这一结果说明 NK 细胞对靶细胞的杀伤不仅需要足够的 NK 细胞, 还需要 NK 细胞能够识别靶细胞。以上结果进一步证明 Ce6 介导的 PDT 能够增加靶细胞对 NK 细胞的敏感度, Ce6 介导的 PDT 再结合 SB-3CT 的免疫调节作用可以提高 NK 细胞的抗肿瘤免疫应答。

### 3.5 体内生物分布

长血液循环时间是治疗药物在肿瘤部位蓄积的前提条件, 具有适当尺寸 (直径为 100~200 nm) 的纳米颗粒比游离药物具有更长的血液保留时间<sup>[27]</sup>。通过小鼠尾静脉注射 Ce6 和 MRPL-C 纳米颗粒, 使用体内荧光成像系统评估 MRPL-C 在 A375 荷瘤小鼠体内的分布。小鼠成像时间线示意图如图 7(a) 所示。在静脉注射 Ce6 后 2 h 就可以检测到荧光信号, 但随着时间推移, 注射 Ce6 的小鼠体内的荧光强度逐渐降低, 说明游离 Ce6 被迅速代谢, 从血液中清除。然而, MRPL-C 在注射后 8 h 左右时才能检测到在肿瘤中积累, 并表现出时间依赖性的积累方式, 24 h 后依旧可以检测到荧光强度, 如图 7(b) 所示。为了评价主要器官中 Ce6 的含量, 静脉注射 24 h 后处死小鼠, 收集主要器官和肿瘤, 用于离体荧光成像。分析图 7(c) 可知: 注射 Ce6 的小鼠, 只有少量 Ce6 富集在肿瘤部位, 大多数存在于肝

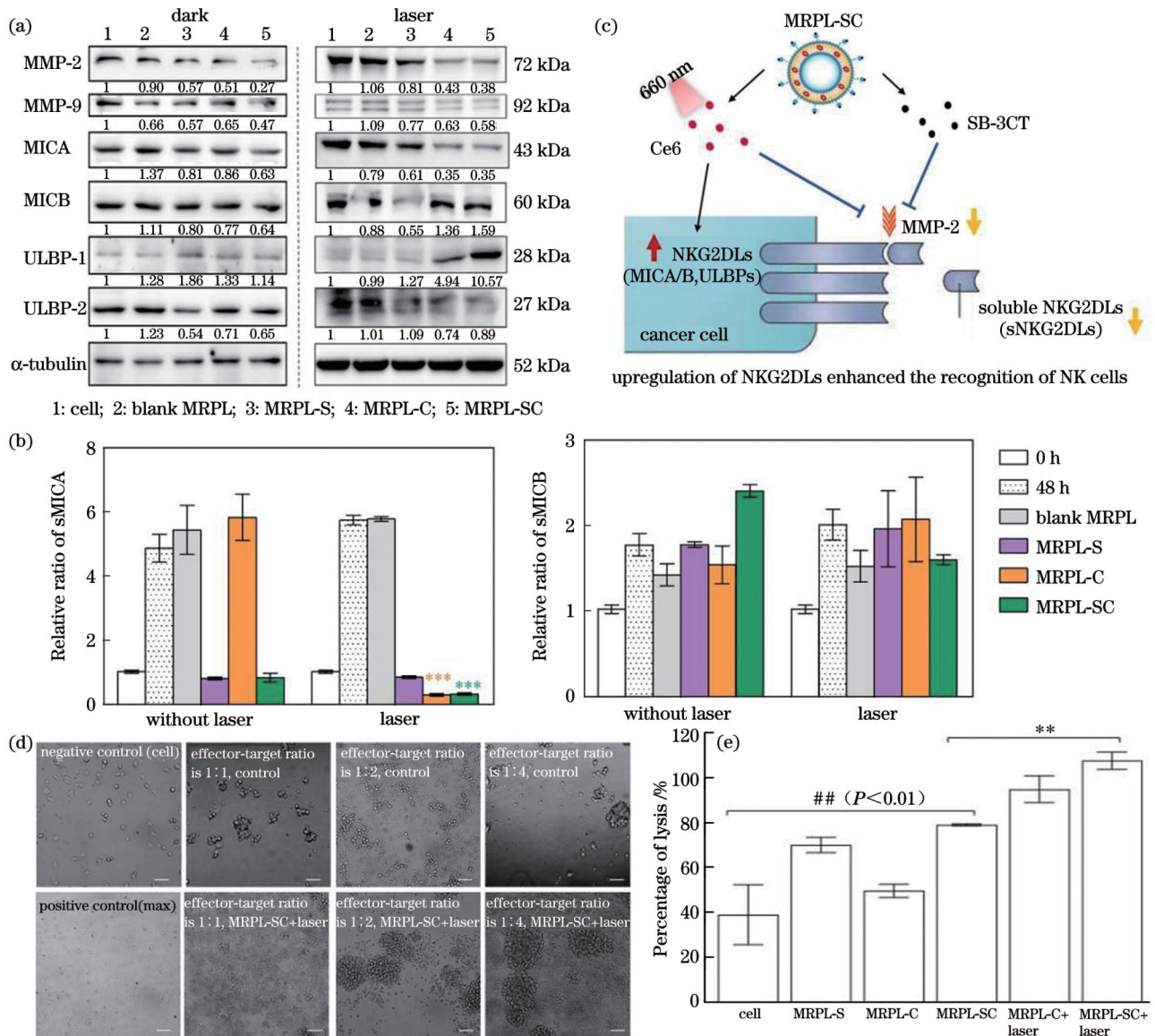


图 6 MRPLs 处理的 A375 细胞中的 NKG2D/NKG2DL 通路机制。(a)MRPLs 处理后有或无激光参与时 NKG2D/NKG2DL 通路的蛋白表达;(b)与 MRPLs 共孵育 48 h 后的 A375 细胞脱落的可溶性 MICA (sMICA) 和 MICB (sMICB);(c)MRPL-SC 上调 A375 细胞表面 NKG2DLs 的表达信号通路;(d)不同效靶比下 NK 细胞的杀伤作用 (比例尺:100  $\mu\text{m}$ );(e)效靶比为 4 : 1 时 NK 细胞介导的对 A375 细胞的细胞毒性

Fig. 6 Mechanism of NKG2D/NKG2DL pathway in A375 cells treated with MRPLs. (a) Protein expression of NKG2D/NKG2DL pathway after MRPLs treatment with or without laser; (b) soluble MICA and MICB shedding from A375 cells treated with MRPLs after 48 h incubation; (c) proposed signaling pathway of MRPL-SC upregulating the expression of NKG2DLs on the surface of A375 cancer cells; (d) killing effect of NK cells at different effector-target ratios (scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ); (e) NK cell-mediated cytotoxicity to A375 cells at effector-target ratio of 4 : 1

脏;而注射 MRPL-C 的小鼠,肿瘤部位显示出较高的 Ce6 荧光强度,但由于药物代谢,肝脏上也能检测到明显的荧光信号。上述实验结果证明封装后药物的血液循环时间增加,并且药物在肿瘤组织中的聚集也高于游离药物,有利于后续治疗。

### 3.6 体内抗肿瘤效果研究

基于 MRPL-SC 的抗肿瘤能力及其在肿瘤部位的良好积累,接下来针对 A375 荷瘤裸鼠评估 MRPL-SC 的体内抗肿瘤效果,以证明 MRPL-SC 的 Ce6-PDT 与 NKG2D 通路介导的免疫疗法的协同治疗作用。如

图 8(a) 所示,在第 0 天向 A375 荷瘤裸鼠尾静脉注射不同的脂质体制剂 (MRPL-S、MRPL-C 和 MRPL-SC)。PDT 治疗组在注射后 24 h 和 48 h 分别对肿瘤部位进行照射 (660 nm, 200  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , 10 min), 以达到治疗所需的光剂量。在治疗期间,记录不同组裸鼠的体重和肿瘤大小。考虑到动物的伦理问题,当任何肿瘤体积超过 1200  $\text{mm}^3$  时或肿瘤任意一侧超过 12 mm 时,即视为动物死亡。图 8(b) 给出了整个实验过程中肿瘤体积的变化。经过 14 d 的治疗,生理盐水治疗组小鼠体内肿瘤在治疗过程中增长最快;单独 MRPL-S 或

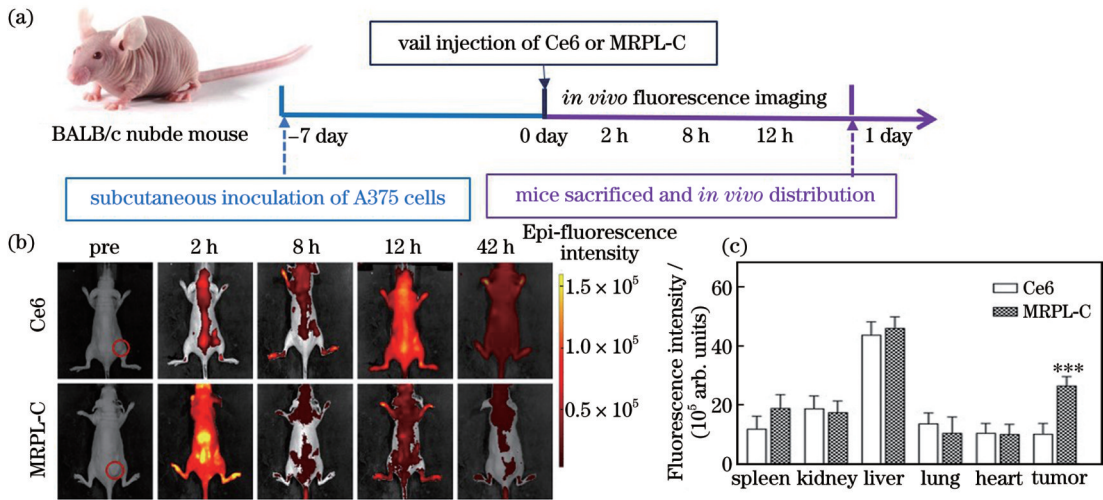


图7 尾静脉注射 Ce6 和 MRPL-C 后荷瘤裸鼠体内荧光成像和生物分布分析。(a) 荷瘤小鼠成像时间线示意图；(b) 静脉注射 Ce6 和 MRPL-C 后不同时间点 A375 荷瘤小鼠的体内荧光成像；(c) 静脉注射 24 h 后主要器官和解剖肿瘤的荧光强度

Fig. 7 *In vivo* fluorescence imaging and biodistribution analysis of nude mice bearing tumors after tail vein injection of Ce6 and MRPL-C. (a) Schematic diagram of tumor-bearing mouse imaging; (b) *in vivo* fluorescence imaging of A375-bearing mice after intravenous injection of Ce6 and MRPL-C nanoparticles at different times; (c) fluorescence intensity of major organs and tumor dissection 24 h after intravenous injection

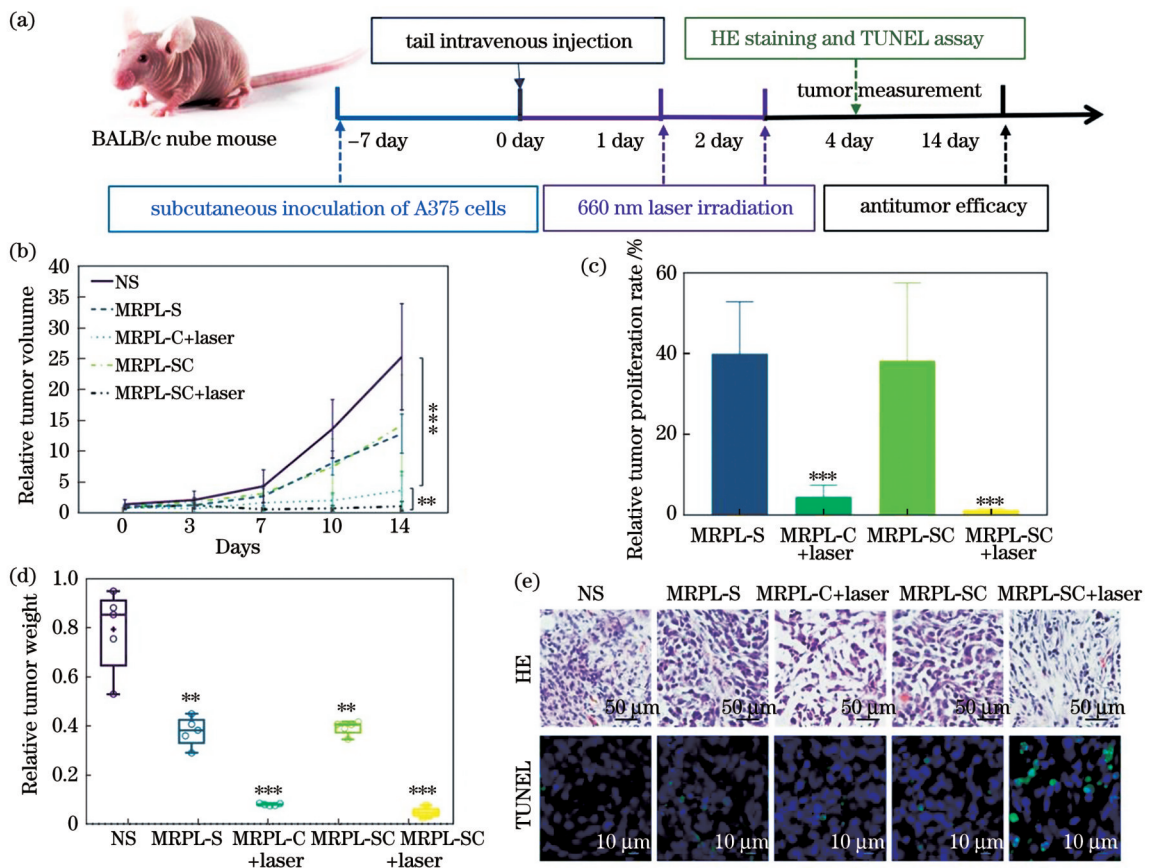


图8 MRPL-SC 体内抗肿瘤效果 (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。 (a) 荷瘤裸鼠治疗时间线示意图；(b) 14 d 治疗期间不同治疗组的肿瘤体积变化；(c) 不同治疗组的荷瘤裸鼠的相对肿瘤增殖率；(d) 不同治疗组解剖肿瘤的质量 ( $n = 5$ )；(e) 照射 2 d 后不同治疗组肿瘤切片的 H&E 染色和 TUNEL 染色结果

Fig. 8 *In vivo* anti-tumor effect of MRPL-SC (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). (a) Schematic illustration of *in vivo* therapeutic time line on tumor-bearing mouse; (b) tumor volume change of mice ( $n = 6$ ) from various treatment groups during 14 d treatment; (c) relative tumor proliferation rate of tumor-bearing mouse in different treatment groups; (d) tumor weight of tumor in different treatment groups; (e) H&E and TUNEL staining of tumor sections of different treatment groups excised two days after irradiation

MRPL-SC 组由于 SB-3CT 的抑制细胞生成作用和免疫调节作用,表现出一定程度的肿瘤抑制现象,但总体而言,肿瘤仍在增长;MRPL-C+laser 介导的 PDT 可以诱导细胞凋亡,导致肿瘤缩小,但是并没有彻底消除肿瘤。在所有治疗组中,MRPL-SC+laser 组的裸鼠在治疗终点时肿瘤体积最小,但与 MRPL-C+laser 组无显著差异。图 8(c)给出了不同 MRPLs 制剂治疗的相对肿瘤增殖率。以生理盐水组为 100% 对照,MRPL-S、MRPL-C+laser、MRPL-SC 和 MRPL-SC+laser 治疗组的相对肿瘤增殖率分别为 40.01%、4.53%、38.26% 和 1.13%。这一结果说明 MRPL-SC+laser 组的治疗效果最佳。

14 d 后处死所有小鼠,取出肿瘤并称重,称量结果如图 8(d)所示。此结果也证明在光照下用 MRPL-SC 治疗,肿瘤的生长得到了显著抑制,进一步验证了其出色的治疗效果。与单独的 MRPL-S 组和 MRPL-C 介导的 PDT 相比,如此高的肿瘤抑制作用取决于两个方面:1)MRPL-SC 中的 Ce6 可以介导 PDT 作用,因此在杀伤肿瘤的同时可以促进肿瘤表面 NKG2DLs 的表达,增强 NK 细胞对靶细胞的靶向识别能力;2)SB-3CT 不仅可以抑制 MMP-2 的表达,还可以通过 NKG2D/NKG2DL 途径激活 NK 细胞的杀伤途径,增强 PDT 诱导的免疫应答,从而达到协同治疗效果。这些结果表明,由于 Ce6-PDT 和 SB-3CT 的协同作用,MRPL-SC 在所有治疗组中具有最佳的抗肿瘤效应。

为了进一步评估 MRPL-SC 的协同治疗效果,治疗结束后,收集并固定不同组的肿瘤组织,通过 H&E 和 TUNEL 染色研究肿瘤的组织学损伤以及肿瘤的凋

亡水平。由图 8(e)所示的 H&E 染色结果可以看出 MRPL-C+laser 和 MRPL-SC+laser 治疗组小鼠肿瘤组织中的癌细胞形态发生了严重变化,能够观察到核收缩和破裂,大量细胞死亡,这意味着这两种治疗方式对细胞凋亡的激活程度更高。此外,TUNEL 染色结果显示 MRPL-SC+laser 治疗组的免疫荧光最强,这表明肿瘤细胞凋亡水平最高。与生理盐水组和 MRPL-SC+laser 联合治疗组相比,其他治疗组表现出低或中等水平的细胞损伤和肿瘤凋亡,这也证明了单独的 SB-3CT 或 PDT 能够在一定程度上杀伤肿瘤或抑制肿瘤的生长。总之,上述这些结果都明确表明所构建的 MMP-2 响应脂质体(MRPL-SC)在荷瘤小鼠体内能够激发协同治疗作用,提高抗肿瘤治疗的整体效果。

### 3.7 体内安全性研究

为了评估 MRPL-SC 的安全性,在治疗结束后取裸鼠的主要器官进行 H&E 染色。如图 9 所示,治疗结束后,在不同 MRPLs 制剂治疗组裸鼠主要器官(如心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏)的 H&E 切片染色结果中没有观察到明显的病变,这表明 MRPL-SC 具有较高的生物相容性。有趣的是,肺组织 H&E 染色结果表明 MRPL-SC 可能抑制了 A375 癌细胞向肺组织迁移,表现为对照组(生理盐水组、MRPL-S 组和 MRPL-SC 组)网状结构增加<sup>[28]</sup>。

此外,还有几点需要考虑:1)不同的 NKG2DLs 是否通过不同的机制调节免疫反应和肿瘤微环境;2)NKG2DLs 是否不仅可以直接杀死肿瘤细胞,还可以通过影响免疫细胞的相互网络来协调免疫反应。例

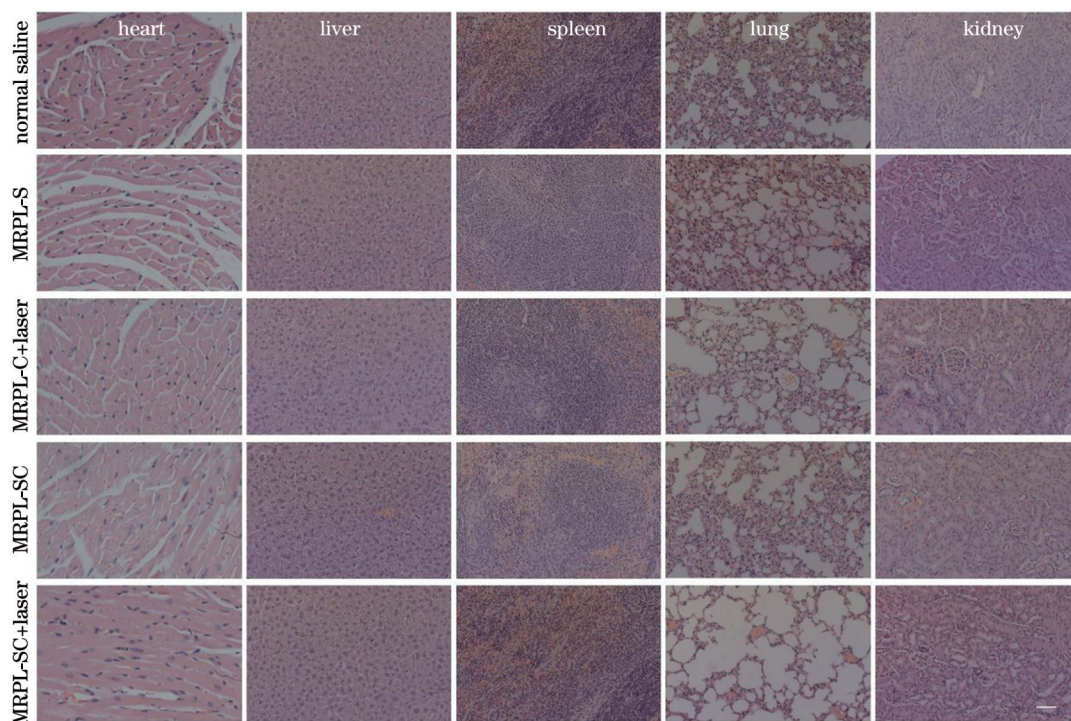


图 9 不同处理的荷瘤小鼠主要器官的 H&E 染色结果(比例尺: 50 μm)

Fig. 9 H&E staining results of major organs of tumor-bearing mice for different treatments (scale bar: 50 μm)

如, NKG2D 是 NK 细胞上的激活受体, 同时它还可以在 CD8<sup>+</sup> T 细胞上作为共刺激受体表达。此外, 新的联合治疗研究表明, SB-3CT 可以提高抗 PD-1 和抗 CTLA-4 在黑色素瘤小鼠模型以及肺转移性黑色素瘤治疗上的效果。值得注意的是, 如今癌症免疫疗法也普遍依赖于细胞毒性淋巴细胞 (CTL 和 NK 细胞) 的功能。检查点抑制剂, 例如针对 PD-1、PD-L1 或 CTLA-4 的抗体, 可以增强 CTL 和 NK 细胞对肿瘤的反应, 临床结果也比较满意<sup>[29]</sup>。MPRL-SC 增强的光动力免疫治疗可以进一步与其他免疫治疗策略相结合, 实现更好的黑色素瘤抗肿瘤效果。

## 4 结 论

本文报道了一种基于 PDT 和 NKG2D 的免疫疗法的程序化组合疗法, 构建了一种封装光敏剂 Ce6 和 MMP-2 抑制剂 SB-3CT 的多响应纳米脂质体 (MRPL-SC), 用于黑色素瘤的有效治疗。全身给药后, MRPL-SC 能在肿瘤部位积累并长期保留, 使 SB-3CT 能在 MMP-2 过表达的肿瘤细胞微环境中特异性释放以抑制 MMP-2 表达, Ce6 脂质体被肿瘤细胞内吞后释放光敏剂并在 660 nm 光照下触发 PDT。采用 A375 细胞和裸鼠异种移植肿瘤模型证明了激光照射后 MRPL-SC 不仅可以有效抑制黑色素瘤的生长和迁移, 还可以显著提高 NK 细胞的抗肿瘤免疫作用。考虑到 PDT 疗法已经被用于黑色素瘤的临床治疗, 并且所设计的纳米脂质体中的主要成分都是美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准或正在临床试验中的药物, 故而认为 MRPL-SC 介导的光动力-免疫联合疗法可能是一种颇具前途的黑色素瘤和其他癌症的治疗方法。

## 参 考 文 献

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68(6): 394-424.
- Dummer R, Hauschild A, Pentheroudakis G, et al. Cutaneous malignant melanoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Annals of Oncology*, 2009, 20: iv129-iv131.
- 李步洪, 陈天龙, 林立, 等. 光动力疗法基础研究与临床应用的新进展[J]. *中国激光*, 2022, 49(5): 0507101.  
Li B H, Chen T L, Lin L, et al. Recent progress in photodynamic therapy: from fundamental research to clinical applications[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(5): 0507101.
- Kousis P C, Henderson B W, Maier P G, et al. Photodynamic therapy enhancement of antitumor immunity is regulated by neutrophils[J]. *Cancer Research*, 2007, 67(21): 10501-10510.
- 刘庄, 冯良珠. 光功能纳米材料与肿瘤光学治疗展望[J]. *发光学报*, 2020, 41(11): 1339-1342.  
Liu Z, Feng L Z. Perspectives on photo-functional nanomaterials and cancer phototherapy[J]. *Chinese Journal of Luminescence*, 2020, 41(11): 1339-1342.
- Kim S, Kim S A, Nam G H, et al. *In situ* immunogenic clearance induced by a combination of photodynamic therapy and Rho-kinase inhibition sensitizes immune checkpoint blockade response to elicit

- systemic antitumor immunity against intraocular melanoma and its metastasis[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2021, 9(1): e001481.
- Nasr S, Rady M, Sebak A, et al. A naturally derived carrier for photodynamic treatment of squamous cell carcinoma: *in vitro* and *in vivo* models[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(6): 494.
- Yang W J, Zhang F W, Deng H Z, et al. Smart nanovesicle mediated immunogenic cell death through tumor microenvironment modulation for effective photodynamic immunotherapy[J]. *ACS Nano*, 2019, 14(1): 620-631.
- Cheng H W, Fan X S, Ye E Y, et al. Dual tumor microenvironment remodeling by glucose-contained radical copolymer for MRI-guided photoimmunotherapy[J]. *Advanced Materials*, 2022, 34(25): e2107674.
- He S S, Li J C, Cheng P H, et al. Charge-reversal polymer nanomodulators for photodynamic immunotherapy of cancer[J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2021, 60(35): 19355-19363.
- Xiao M, Fan J L, Li M, et al. A photosensitizer-inhibitor conjugate for photodynamic therapy with simultaneous inhibition of treatment escape pathways[J]. *Biomaterials*, 2020, 257: 120262.
- Liu H F, Wang S J, Xin J, et al. Role of NKG2D and its ligands in cancer immunotherapy[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2019, 9(10): 2064-2078.
- Korbelik M, Sun J H. Cancer treatment by photodynamic therapy combined with adoptive immunotherapy using genetically altered natural killer cell line[J]. *International Journal of Cancer*, 2001, 93(2): 269-274.
- Theodoraki M N, Lorenz K, Lotfi R, et al. Influence of photodynamic therapy on peripheral immune cell populations and cytokine concentrations in head and neck cancer[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2017, 19: 194-201.
- Deng G J, Sun Z H, Li S P, et al. Cell-membrane immunotherapy based on natural killer cell membrane coated nanoparticles for the effective inhibition of primary and abscopal tumor growth[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(12): 12096-12108.
- Parkhurst M R, Riley J P, Dudley M E, et al. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression[J]. *Clinical Cancer Research*, 2011, 17(19): 6287-6297.
- Barth M J, Chu Y Y, Hanley P J, et al. Immunotherapeutic approaches for the treatment of childhood, adolescent and young adult non-Hodgkin lymphoma[J]. *British Journal of Haematology*, 2016, 173(4): 597-616.
- Luo D, Dong X W, Yan B, et al. MG132 selectively upregulates MICB through the DNA damage response pathway in A549 cells [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 19(1): 213-220.
- Yang F Q, Liu M, Yang F P, et al. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) mediates MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) shedding in renal cell carcinoma[J]. *Actas Urológicas Españolas*, 2014, 38(3): 172-178.
- Tao P, Fisher J F, Mobashery S, et al. DFT studies of the ring-opening mechanism of SB-3CT, a potent inhibitor of matrix metalloproteinase 2[J]. *Organic Letters*, 2009, 11(12): 2559-2562.
- Nagase H, Fields G B. Human matrix metalloproteinase specificity studies using collagen sequence-based synthetic peptides[J]. *Biopolymers*, 1996, 40(4): 399-416.
- Kobayashi H, Watanabe R, Choyke P L. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? [J]. *Theranostics*, 2013, 4(1): 81-89.
- 李西鹏, 张涛. 细胞器靶向光敏剂的研究进展[J]. *激光生物学学报*, 2020, 29(4): 295-301.  
Li X P, Zhang T. Research progress of organelles targeting photosensitizers[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2020, 29(4): 295-301.
- Luo M Y, Li H X, Han D H, et al. Inhibition of autophagy enhances apoptosis induced by Ce6-photodynamic therapy in

- human colon cancer cells[J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2021, 36: 102605.
- [25] Ding L, Lin X, Lin Z G, et al. Cancer cell-targeted photosensitizer and therapeutic protein co-delivery nanoplatfrom based on a metal-organic framework for enhanced synergistic photodynamic and protein therapy[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2020, 12(33): 36906-36916.
- [26] Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal G B, et al. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer[J]. Cancers, 2011, 3(2): 2516-2539.
- [27] 王瑞荣, 崔丹丹, 石玉娇. 光敏感 AgBr@PLGA 纳米探针用于近红外二区肿瘤特异性光声成像[J]. 中国激光, 2022, 49(20): 2007204.
- Wang R R, Cui D D, Shi Y J. Photosensitive AgBr@PLGA nanoprobes for near-infrared second region tumor-specific photoacoustic imaging[J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(20): 2007204.
- [28] Liu C, Lai H Q, Chen T F. Boosting natural killer cell-based cancer immunotherapy with selenocystine/transforming growth factor-beta inhibitor-encapsulated nanoemulsion[J]. ACS Nano, 2020, 14(9): 11067-11082.
- [29] Voskoboinik I, Whisstock J C, Trapani J A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology[J]. Nature Reviews Immunology, 2015, 15(6): 388-400.

## Multi-Responsive Liposomal Nanocomplex Encapsulating Ce6 & MMP-2 Inhibitors for Photodynamic-Immune Synergistic Treatment of Melanoma

Liu Huifang, Lei Dongqin, Qin Fen, Wang Sijia\*, Zhang Zhenxi\*\*

*Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of the Ministry of Education, Institute of Biomedical Photonics and Sensing, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China*

### Abstract

**Objective** Melanoma is one of the most immunogenic solid tumors, with strong metastatic characteristics. Although melanoma is curable when detected in a localized form, the long-term survival rates of patients are difficult to improve by any single therapy. The combination of photodynamic therapy (PDT) and immunotherapy has shown encouraging therapeutic efficacy against various cancers due to PDT-induced immunogenic cell death. Natural killer (NK) cell-based immunotherapy has the ability to enhance the anticancer effects of PDT. The NK cell family 2 member D/ligand (NKG2D/NKG2DL) pathway acts as a “master switch” in the activation of NK cells and mediates the recognition of tumor cells by NK cells. However, tumor cells can produce soluble NKG2DLs via shedding, which mediates the immune escape of tumors. Regulating NKG2D-related molecular pathways can effectively improve the anti-tumor efficacy of NK cells. Further, combined with PDT, NK-related anti-tumor immunity and therapeutic effects could be significantly promoted. In this study, a tumor microenvironment- and light-responsive nanoparticle—MMP-2-responsive polypeptide mixed liposome (MRPL-SC)—was designed to realize synergistic anti-tumor effects of Ce6-mediated PDT and SB-3CT enhanced NKG2D-based immunotherapy, and spatial-temporally controlled release of loaded drugs.

**Methods** To synthesize MRPL-SC, DSPE-PEG(3400)-MRP- $\beta$ -CD with an MMP-2 cleavable sequence was formed via multistep reactions. Then, MRPL-SC, combined with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) containing SB-3CT to suppress the overexpressed MMP-2 that is tightly associated with the tumor NK-related escape mechanism in the tumor microenvironment and photosensitizer Ce6-loaded liposomes, was prepared using the film dispersion and extrusion method. The multi-responsive release ability of SB-3CT triggered by the MMP-2 abundant tumor microenvironment and chlorin e6 (Ce6) by 660 nm laser irradiation was studied *in vitro*. Cellular uptake, ROS generation, and the synergistic anti-tumor effects of MRPL-SC-mediated PDT and enhanced NK immunotherapy were studied in A375 cells, followed by the analysis of NKG2DLs expression. In addition, the anti-tumor efficiency and safety of MRPL-SCs were studied in tumor-bearing nude BALB/c mouse models.

**Results and Discussions** The prepared MRPL-SC exhibited a typical liposome structure with a phospholipid bilayer and formed single/double-layer vesicles for drug encapsulating and intracellular delivering with a particle size about 160–170 nm (Fig. 2). Then, the MMP-2-responsive polypeptide linker was hydrolyzed by MMP-2, and SB-3CT encapsulated in  $\beta$ -CD was rapidly released, with accumulation reaching 72.26% after 240 min, indicating the responsiveness of MRPL-SC to the MMP-2 abundant tumor extracellular microenvironment. The released SB-3CT effectively regulated the expression of NKG2DLs and generation of soluble NKG2DLs in tumor tissues by directly inhibiting MMP-2 *in situ*. Ce6-encapsulated liposomes entered the tumor cells through endocytosis and induced severe cytotoxicity by PDT under 660 nm laser irradiation (Fig. 5). In addition, Ce6-PDT also induced NKG2DLs expression, thereby realizing spatiotemporal synergistic enhancement of NK immunity in tumor tissues (Fig. 6). By employing the A375 tumor-bearing nude mice xenograft model, MRPL-SCs showed higher amounts of aggregation in tumor tissue and efficiently suppressed melanoma growth after laser irradiation (Fig. 8) without significant cytotoxic effects in the major organs.

**Conclusions** In this study, a novel multi-responsive nanoliposome composed of photosensitizer Ce6-liposomes and MMP-2 antagonist SB-3CT linked by MMP-2 responsive peptide was successfully fabricated via film dispersion and extrusion. The synergistic anti-tumor effect of MRPL-SC-mediated PDT and NK cell immune enhancement was observed in both melanoma cells and nude mouse xenograft models. This study not only developed a new multi-responsive nanocomplex for better integration of PDT and immunotherapy but also elucidated a novel paradigm for NK cell-mediated photodynamic immunotherapy for melanoma.

**Key words** medical optics; photodynamic therapy; immunotherapy; MMP-2 inhibitor; natural killer cell