doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.05.001

· 专家论坛 ·

肿瘤囊泡:通向肿瘤免疫生物治疗之路

黄波(中国医学科学院 基础医学研究所 免疫学系暨分子生物医学国家重点实验室,北京 100005)

黄 波 中国医学科学院、北京协和医学院协和学者和特聘教授、博士生导师,中国医学科学院基础医学研究所免疫学系副主任,中国免疫学会副秘书长。先后获得首届"中国免疫学青年学者奖"、"教育部新世纪优秀人才支持计划"资助、"2009 年华中科技大学十佳青年教工"称号、湖北省第 13 届自然科学优秀学术论文特等奖、"湖北省有突出贡献的中青年专家"称号、"国家杰出青年基金"资助、"国家百千万人才和有突出贡献中青年专家"称号,入选教育部"长江学者特聘教授"以及国家万人计划。现任中国免疫学会常务理事以及中国生物化学与分子生物学会理事,中国抗癌协会肿瘤生物治疗专业委员会委员,并担任 *Cancer Let*,*Eur J Immunol* 等杂志的编委。主要从事肿瘤免疫、肿瘤免疫生物治疗,以及围绕肿瘤干细胞、代谢、生物物理机械力信号对肿瘤和免疫的相互作用展开研究,作为通信作者在 *Nat Materials*、*Nat Commun*、*Blood*、*Cancer Res*、*EMBO Rep*、*Cancer Immunol Res*、*J Immunol* 等国际主流杂志发表一系列论文。E-mail: tjhungbo@hotmail.com

[摘 要] 在发生凋亡和受到信号刺激时,细胞会释放直径为 0.1 ~ 1 μm 的膜状囊泡,这样的膜状囊泡称之为微颗粒。其释放受到细胞骨架和生物机械力的影响,在正常细胞和恶性肿瘤细胞中起着传递信息的作用。最近笔者实验室通过肿瘤细胞来源的囊泡研发出一套新型的天然载药系统,其可以有效地将药物输送到肿瘤干细胞的细胞核,进而有效杀伤肿瘤干细胞而不产生副作用。其潜在的机制涉及肿瘤干细胞的柔软特性可以更好地摄取囊泡,载药囊泡进入溶酶体并促进溶酶体向细胞核运动进而将药物输送至细胞核。肿瘤细胞来源的载药囊泡已经进入临床试验,用于治疗梗阻性肿瘤和肿瘤导致的恶性积液。此外,肿瘤细胞来源的囊泡可以有效地被 DC 摄取,通过改变肿瘤细胞溶酶体的 pH 值以及激活 DC 的 cGAS/STING 通路产生 I 型干扰素,进而促进 DC 对肿瘤细胞的抗原提呈,因而肿瘤细胞来源的囊泡可以作为理想的抗肿瘤疫苗。总之,肿瘤细胞来源的囊泡在今后的肿瘤免疫生物治疗和预防中有着广泛的应用前景。

[关键词] 肿瘤囊泡;载药;靶向;肿瘤免疫;生物治疗
[中图分类号] R730.54; R979.1; R730.4 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2015)05-0511-07

Tumor membrane microparticles: potential application in cancer biotherapy

Huang Bo (National Key Laboratory of Medical Molecular Biology & Department of Immunology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China)

[**Abstract**] Mammalian cells may release membrane vesicles of 100 – 1000 nm in diameter, named as microparticles (MPs), in the process of apoptosis and in response to various extracellular stimuli. The release of MPs is regulated by cytoskeletons and mechanical forces. Compiling evidence suggests that MPs may function as veritable vectors for the intercellular exchange of biological signals and information. We have recently developed a natural drug delivery system based on tumour cell-derived MPs, through which drugs can be efficiently delivered to the nucleus of cancer stem cells, mediating cancer stem cell cytotoxicity without significant side effects *in vivo*. Currently, the exact mechanism underlying MP-mediated drug delivery to cancer stem cells remains inconclusive, but the properties of both cancer stem cells and MPs are at-

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划(973 计划)资助项目(No.2014CB542100);国家杰出青年基金资助项目(No.81225021);国家自然科学基金资助项目(No.81472653);中国卫生部公益事业专项基金资助项目(No.201302018)。Project supported by the National Basic Research Program of China (973 Program)(No.2014CB542100), the National Science Fund for Distinguished Young Scholars of China (No.81225021), the National Natural Science Foundation of China (No.81472653), and the Special Fund of Health Public Welfare Profession of China (No.201302018)
[优先发表] http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20151017.1504.002.html

tributable. On one hand, cancer stem cells can efficiently up take MPs. On the other hand, drug-carrying MPs can efficiently enter target cell lysosomes and promote lysosome migration towards the cell nucleus. In addition, tumor cell-derived MPs can also be efficiently taken up by dendritic cells where they induce tumor antigens by regulating the lysosomal pH value and activating the cGAS/STING pathway required for type Ⅰ interferon production, thus conferring tumor MPs as ideal tumor vaccines. At present, this MP-mediated drug delivery system is being evaluated for the treatment of obstructive tumors in clinical trials.

[**Key words**]　tumor microparticle; drug delivery; target; tumor immunology; biotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(5): 551-557]

进入 21 世纪,由于环境污染、饮食改变、精神压力等一系列因素,导致全球肿瘤发生率日益升高,而传统手术、放化疗在近 20 年来对肿瘤患者存活率的提高几乎没有明显帮助, 因此,新型的肿瘤治疗策略和手段极为迫切。2010 年美国 FDA 批准首例治疗性肿瘤疫苗 Sipuleucel-T (Provenge; Dendreon) ,该疫苗属于自体细胞回输免疫治疗;2011 年美国 FDA 批准用于治疗黑素瘤的单克隆抗体,即抗 CTLA-4 的抗体 ipilimumab;2014 年美国 FDA 批准用于治疗晚期黑素瘤的单克隆抗体,即抗 PD-1 的抗体 pembrolizumab。溶瘤病毒作为新型肿瘤免疫治疗制剂,已进入临床试验,有望在不久将来通过美国 FDA 的批准。尽管近来大量的免疫治疗手段被应用于临床,并取得了一定疗效,但必须承认,这与人们所期待的理想状态仍有较大的差距,更有效的免疫生物手段依然为临床迫切需要。本文在此对肿瘤细胞来源的微颗粒(通俗表述为肿瘤囊泡)的形成机制、其作为载体与肿瘤细胞的作用方式,以及作为一种全新的肿瘤免疫生物治疗手段和策略对肿瘤进行干预的潜在应用前景,给予一个较为全面的介绍,一方面体现出中国传统的以毒攻毒的哲理,同时希望这样一种新型肿瘤治疗策略能够给读者带来启迪和思考。

1　抗肿瘤化疗药物的新型载体

化疗是临床肿瘤治疗的最主要手段,但因其毒副作用大和肿瘤细胞的耐药而广受病垢。其实,如果能够让足够量的化疗药物进入肿瘤细胞内,化疗药物的确能够杀灭所有的肿瘤细胞,但这需要非常有效的靶向化疗药物的手段。因此,人们开始寻求靶向化疗药物的相关技术手段。伴随材料科学、合成化学的发展,新型纳米材料技术近年来得到飞速发展。研究人员利用大分子的聚合物制备出纳米载体对化疗药物进行包裹,选择性投递给肿瘤细胞,提高化疗药物对肿瘤细胞的靶向性,并降低化疗药物对正常细胞的杀伤。目前已经有大量的纳米类抗肿瘤药物进入了临床试验阶段,部分药物已经正式应用于临床。目前已进入临床市场的纳米类化疗药物包括脂质体(liposome)类药物和白蛋白载体类药物。脂质体是一种人工膜,其磷脂分子亲水头部插入水中,脂质体疏水尾部伸向空气,搅动后形成双层脂分子的球形脂质体,直径 25 ~ 1 000 nm 不等[1]。临床上应用的脂质体类化疗药物,是利用人工合成的脂质体将化疗药物包裹在脂质体封闭的腔内,一般直径小于 100 nm。虽然脂质体类化疗药物在一定程度上降低了对机体的毒性作用,然而其化疗的毒性作用仍然存在。其主要的毒性作用为由于人工合成的脂质体表面携带的电子活性位点可与氧分子相互作用,产生大量的超氧阴离子,对机体的正常组织产生损伤。白蛋白聚合物载体也同样存在着合成类纳米载体的弊端,诸如合成材料的毒性作用、免疫排斥、体内难以被降解等。近些年来,随着研究的更加深入,处于研究和临床试验阶段的载药纳米材料种类繁多,包括碳纳米、金纳米、银纳米、铁纳米和多聚物纳米等。然而,这些合成类颗粒进入体内后往往会改变机体的正常运转系统,包括酶反应系统、氧化还原系统等[2],使其成为理想的载药系统前景依然困难重重。

那么是否存在天然的低毒的微载体可以作为化疗药物的新载体呢?

2013 年诺贝尔生理医学奖颁发给致力于研究细胞内部囊泡运输体系的来自美国和德国的三位科学家:James E. Rothman, Randy W. Schekman 和 Thomas C. Südhof。他们所研究的介于细胞与分子之间的亚类结构即囊泡在细胞内部的物质运输,引起了全世界科学家的关注。除细胞内囊泡分子运输体系外,其实细胞间同样存在囊泡的运输,并且细胞外囊泡尺寸要远大于细胞内的囊泡。那么这种细胞外囊泡是否可以作为天然的化疗药物载体对肿瘤细胞产生精准的杀伤呢? 其答案是肯定的。

1.1　细胞释放的囊泡

真核细胞通过不同的途径释放大小不一的囊

泡,外排体(exosome)是其中的一种,是当前肿瘤、免疫等研究的热点。细胞通过胞吞胞饮的途径将外源性物质摄取进入胞内,形成早期内吞体(early-endosome),其向晚期内吞体(late-endosome)转变的过程中,内吞体腔内形成多囊泡小体(multivesicular body,MVB)。受细胞骨架运动所介导,内吞体迁移到细胞膜附近时,内吞体质膜与细胞膜融合并将囊状小泡释放到细胞外,这种囊状小泡即为外排体。外排体的直径一般小于 100 nm,其内容物包括各类生物活性分子。

除此之外,细胞还可以释放另外一类囊状小体,其由细胞胞膜起泡(budding)、脱落(shedding)形成,将其称之为微颗粒(microparticle)。一般认为微颗粒是一种直径在 100 ~ 1000 nm 之间的球状结构,其通过母细胞的胞膜向外凸起将胞内的物质包裹后释放出来,其表面为磷脂结构并且表达其母细胞所表达的特殊抗原。微颗粒与外排体在形态大小、形成机制以及包含的内容物成分均有明显的差别,目前也逐渐成为细胞生物学专家密切关注的对象[3]。

1.2 微颗粒囊泡的形成:受细胞骨架和细胞内的机械力调节

1.2.1 囊泡形成的膜重构 微颗粒的外膜由细胞胞膜成分组成,但是其组成与细胞胞膜结构存在很大差别。Triton-X 100 作为生物活性剂对脂筏结构无效。而前期实验[4-6]发现,微颗粒可以对 Triton-X 100 产生抵抗;但经 Triton-X 100 处理后的细胞,其膜的完整性发生破裂。以上的研究表明,细胞在形成微颗粒过程中,细胞膜上面所分布的脂筏结构可能向囊泡形成的部位迁移、聚集,表现为细胞膜结构的一个重构过程。现已知,胞内钙增加会导致磷脂双分子层的不对称重排并且导致磷脂酰丝氨酸从膜内侧翻转到膜外侧。这种膜的重构涉及到钙离子依赖的一种特殊的氨基磷脂转移酶和脂质爬行酶,但微颗粒在形成过程中细胞膜究竟发生了何种重构,具体机制尚有待深入研究。

1.2.2 囊泡形成受骨架-机械力调节 多种化学信号均可导致细胞产生微颗粒囊泡,不仅包括化学刺激信号如炎症信号,也包括凋亡信号以及细胞分化和衰老信号[7-9],但囊泡的形成和释放还是一个物理过程,受到细胞骨架-机械力的调控。近年来,生命科学领域一个重大发现是认识到细胞内存在力,细胞骨架是其承载体。细胞膜下面的骨架形成一种向心的拉力,细胞膜则受到一种向外的反作用力以制衡,这种作用力和反作用力恰好维持了细胞正常的形状。在微颗粒囊泡形成过程中,不仅细胞膜成分发生了重构,细胞骨架也发生了重构,这种重构导致局部的向心力的消失,而相应的反作用力仍然存在,导致细胞膜向外凸出。在细胞凋亡时,凋亡信号通过 caspase 途径激活依赖小 G 蛋白 Rho 相关的激酶 ROCK Ⅰ,活化的 ROCK Ⅰ通过磷酸化肌球蛋白轻链(myosin light chain)激活马达蛋白(myosin protein Ⅱ),从而促进细胞骨架肌动蛋白微丝的重构和凋亡微颗粒的释放[10]。笔者前期研究[11]发现,肿瘤细胞 TLR4 活化后,其信号可传递到细胞骨架,同样影响 myosin Ⅱ,导致肿瘤细胞释放肿瘤微颗粒。因此,细胞内的激活信号和凋亡信号传递,对细胞骨架能够产生影响时,均有可能导致囊泡微颗粒的形成和释放。对于细胞骨架的重构是否与细胞膜重构偶联,以及是否存在相互作用尚不清楚。

1.3 囊泡的信息与传递

虽然微颗粒最初被认为是无生物学功能的细胞碎片,但大量研究[12-13]已经证实微颗粒可以作为真实的赋形体来传递细胞间的生物信息。目前认为微颗粒介导的细胞间信号传递主要有两种机制:第一,微颗粒扮演着循环的信号模块,通过提呈膜相关的生物活性分子来影响细胞的性质以及靶细胞受体激活时的反应;第二,微颗粒可以介导信号通路,直接通过传递其内容物包括蛋白质、具有生物活性的脂类或者 RNA 到受体细胞,潜在地影响细胞的活化、表型的修饰和细胞功能的重构。这种转变在短暂的相互作用时会充分加强,或者需要牢固的接触,如膜的同化或者微颗粒直接与靶细胞整合[14-15]。

微颗粒在其表面表达着大量的范围广泛的生物活性物质、膜嵌合受体以及黏附分子,为其与不同的靶细胞进行特定的相互作用和信息交换提供基础。当微颗粒形成的时候,微颗粒的膜卷入了部分细胞质成分,因而微颗粒中还包含了丰富的细胞因子、趋化因子、酶、生长因子和信号蛋白等[16-17]。最近还发现在某些特定的微颗粒中含有 mRNA 和 miRNA[18-19]。虽然微颗粒表面的抗原以及其包含的内容物与其母体细胞类似,但是其并不仅仅是其母体细胞的缩小版。微颗粒中的包含物与其母体细胞相比往往会被选择性地富集,这个富集过程不仅仅取决于母体细胞的类型也受微颗粒形成时细胞所受的刺激以及细胞的微环境所影响。正因为囊泡包裹的大量生物内容物以及其在母体细胞释放后被受体细胞摄取的特点,囊泡成为了细胞与细胞间信号交换和传递的传递者或载体。这种机体内天然存在的信息携带体或载体的特点为化疗药物的靶向运输提供了独特的条件。

1.4　囊泡可以作为天然的药物载体

囊泡在机体内可以在细胞与细胞间运输各种生物活性物质,包括蛋白质分子、脂类分子、RNA 甚至 DNA 分子。那么是否可以利用囊泡来作为载体将化疗药物传送给肿瘤细胞?

笔者课题组通过肿瘤细胞释放的囊泡将化疗药物进行包裹,包括用小鼠肝癌腹水细胞 H22、人源卵巢癌细胞 A2780 等释放的囊泡对甲氨蝶呤、顺铂、紫杉醇进行包裹,在体内和体外对肿瘤均有良好的杀伤效果。用化疗药物处理肿瘤细胞,在紫外线诱导其凋亡的情况下,肿瘤细胞释放大量的微颗粒,对微颗粒内容物通过高效液相色谱法检测其药物浓度,发现微颗粒包裹了化疗药物;H22 细胞对 H22 细胞来源的微颗粒有着较强的摄取作用,在 8 和 24 h 摄取率达到 45% 和 100%;而 $CD3^+$T 细胞对 H22 细胞来源的微颗粒的摄取率在 8 h 时不到 5%,$CD19^+$B 细胞的摄取率在 8 h 时也不到 20%。是否同源的微颗粒可以更好地被同种细胞所摄取尚需进一步证实。

后续研究还发现,装载化疗药物的囊泡可以明显地杀伤肿瘤部位的巨噬细胞而对 T 细胞和 B 细胞杀伤不明显。之后又将载药囊泡用于小鼠肿瘤模型的治疗。在 BALB/c 小鼠腹水癌模型和裸鼠人卵巢癌模型中,载有化疗药物的囊泡均表现出了明显的抑癌效果,明显地延长了小鼠的生存期。更为重要的是,在囊泡治疗的过程中没有产生明显的不良反应,小鼠的一般活动情况、毛发情况、进食情况和肝肾功能均未发生明显变化。这些实验结果充分说明了载药的囊泡在发挥化疗药物的抗肿瘤作用的同时大大降低了其对正常组织的毒性作用[20]。

装载甲氨蝶呤的肿瘤细胞来源囊泡已经开展了临床试验,临床上采用的囊泡给药方式包括口服、局部给药以及静脉给药三种。其中口服主要用于上消化道肿瘤导致的梗阻患者,局部灌注则针对肺癌导致的胸腔积液,静脉给药则针对各类实体肿瘤。口服和局部灌注的囊泡可以直接与肿瘤组织进行接触,被肿瘤细胞摄取,而静脉给药的途径则利用肿瘤部位毛细血管的特点。由于肿瘤部位炎性刺激和各类细胞因子的释放,最终导致该毛细血管通透性(介于 100 ~ 780 nm 间)远远大于正常组织中毛细血管的通透性(5 ~ 8 nm)。囊泡的大小与肿瘤部位毛细血管的通透性相当,载药囊泡经过静脉给药后穿过肿瘤部位的毛细血管,进入肿瘤组织。当载药囊泡与肿瘤细胞接触后,囊泡可以有两种途径进入肿瘤细胞发挥作用。

1.5　载药微颗粒囊泡进入细胞存在经典和非经典途径

体内的细胞通常通过一种被称为内吞作用的经典途径,摄取细胞外的物质,包括液体、蛋白质和其他分子。在内吞过程中,细胞膜变形向内弯曲,依靠能量将胞外物质包裹转运入细胞。细胞外物质内化入胞形成早期内体,然后通过晚期内体运送至溶酶体,在这一过程中,“小体”内的 pH 值逐渐降低。为了阐明囊泡入胞的途径和方式,可以将肿瘤细胞来源的囊泡染色后和不同类型的细胞(巨噬细胞、DC 和肿瘤细胞)进行共孵育,同时对细胞的早期内体、晚期内体和溶酶体进行标记,在共聚焦显微镜下观察到囊泡和巨噬细胞及 DC 的早期内体、晚期内体和溶酶体都存在明显的共定位现象。而令人意想不到的是,囊泡和肿瘤细胞的早期内体、晚期内体并没有共定位,只和溶酶体有明显的共定位,提示囊泡进入不同类型细胞的途径是不同的:巨噬细胞和 DC 是通过经典内吞途径摄取囊泡的,而肿瘤细胞摄取囊泡却是一种未知的非经典途径,其机制目前还不是十分清楚。尽管如此,微颗粒囊泡对于肿瘤细胞亚群却有不同的喜好。囊泡似乎更喜欢未分化的肿瘤干细胞,对于已分化的肿瘤细胞却不甚喜好。这与肿瘤细胞的物理特征有关。笔者发现,肿瘤干细胞比分化的肿瘤细胞更软,其细胞膜更容易变形,从而有利于其摄取囊泡。增加细胞骨架的量,可使肿瘤干细胞的硬度增加,但其摄取微颗粒的能力却下降;相反,抑制细胞骨架,降低分化了的肿瘤细胞的硬度,却能够增强分化肿瘤细胞摄取微颗粒的能力。微颗粒对肿瘤干细胞的这种选择性,使其作为药物载体更具有优越性。

1.6　载药微颗粒囊泡通过溶酶体途径投递药物进入细胞核

通过在显微镜下对载药囊泡运动轨迹的观察发现,囊泡在胞质内经过至少 30 min 的运动后最终定位于溶酶体。细胞器间的物质传递常常通过膜泡运输的方式进行,如从内质网到高尔基体、高尔基体到溶酶体等细胞器。细胞器依赖于其特殊的膜标志蛋白沿微管或微丝定向运行,动力来自马达蛋白。与膜泡运输有关的马达蛋白有:动力蛋白(dynein),可向微管负极(细胞核)移动;驱动蛋白(kinesin),向微管正极(细胞膜)移动;肌球蛋白(myosin),可向微丝的正极运动[21-22]。在细胞器识别机制中,GTP 结合蛋白是重要的识别元件,其本身是可溶的, 存在于胞质中,结合 GDP 处于失活状态,而结合 GTP 激活后可锚定到细胞器的膜上,并且可募集特异的

效应蛋白到膜上并与之结合;同时 GTP 结合蛋白可募集马达分子到细胞器,再由马达分子驱动相应细胞器的转运。介导溶酶体转运的 GTP 结合蛋白有两种,分别介导溶酶体向正极或负极的运输:一种是在胞质中存在的游离 Rab7 蛋白,其结合 GTP 激活后锚定在溶酶体膜上,并通过它的效应分子 Rab7 相关的溶酶体蛋白(Rab7-interacting lysosomal protein, RILP)将动力蛋白募集到溶酶体,从而使这些细胞器向微管负极运动;另一种是胞质中游离的 Arl8 蛋白,其在结合 GTP 激活后锚定于溶酶体膜上,通过其效应分子 SKIP 募集微管驱动蛋白到溶酶体,介导溶酶体向微管正极运动。溶酶体通过这两种转运系统可将其负载的生物分子沿微管运输到细胞内各处,从而影响细胞的多种生物学功能[23-25]。笔者研究发现,囊泡和肿瘤细胞共孵育后 Rab7 蛋白和溶酶体特异性膜蛋白 LAMP-2 的共定位明显增加,意味着更多的 Rab7 锚定在溶酶体膜上,同时发现动力蛋白和 LAMP-2 及 Rab7 的共定位均明显增加,说明载药囊泡处理后肿瘤细胞的溶酶体沿微管移动并聚集在细胞核周围。另一方面,溶酶体膜上存在多种转运蛋白,能将酸性水解酶的降解产物转运出溶酶体,供细胞重新利用或排出细胞外。前期研究发现,载药囊泡相比于单一化疗药物处理的肿瘤细胞有更多的化疗药物聚集于细胞核,可以推测,当负载化疗药物的溶酶体到达细胞核附近,化疗药物通过溶酶体膜上的转运蛋白排出,穿过核孔进入细胞核,从而发挥杀伤肿瘤细胞的作用。

溶酶体作为真核细胞的细胞器,一直被认为专司分解各种外源和内源的大分子物质。但是随着研究的深入,人们对溶酶体的功能有了许多新的认识,比如其在能量代谢、细胞耐药、自噬和抗原提呈中均发挥重要作用。而在笔者研究中已证实,溶酶体在囊泡介导的化疗药物的核转运中发挥重要作用。溶酶体的 pH 值为 4.5 ~ 5.0,其酸性环境的维持主要依赖于膜上的质子运输泵(V 型 H^+-ATP 酶)将细胞质中的 H^+ 转运入溶酶体从而引起 pH 值下降。另外,溶酶体的合成以及功能受一个基因网路的调控,这些基因间的协调表达受转录因子 TFEB 的调控。TFEB 本身可以在溶酶体功能障碍时被激活,它可调节细胞中溶酶体的丰富程度以及其降解复杂分子的能力。研究发现,囊泡定位于溶酶体内可以上调 TFEB 的表达,引起溶酶体数量增加;另外引起溶酶体的 pH 值升高,溶酶体碱性化。因此推测溶酶体内 pH 值的变化不仅影响了化疗药物的降解,同时还影响了溶酶体在细胞内的运动方向,但是其具体机制还不十分清楚。

2 载药囊泡用于肿瘤的治疗

2.1 恶性胸腔积液的治疗

肺癌导致的恶性胸腔积液是肺癌进展后最为常见的并发症之一,临床最为常用的处置手段为置管引流,并无其他有效的干预手段,往往在引流后会复发。胸腔内灌注装载甲氨蝶呤的囊泡后,可以明显减少胸水的复发,肺癌患者胸痛、气短、咳嗽的症状均得到缓解。研究发现载药囊泡胸腔灌注后,胸腔内肿瘤细胞被快速杀灭,并募集大量的免疫细胞,包括中性粒细胞和单核细胞等,进而抑制肺癌细胞朝胸腔转移,最终修复胸腔内因肿瘤细胞的侵袭导致的炎症,进而抑制胸水的复发。

2.2 肿瘤性梗阻的治疗

在肿瘤进展的晚期,往往会导致严重的并发症,消化系统的肿瘤在进展后往往会导致消化道梗阻。在食道癌梗阻和胃癌贲门部梗阻的肿瘤患者中,口服载药囊泡可以快速缓解上消化道梗阻情况,患者由不能进食到可以进流食,最终恢复正常饮食。胆管癌后期患者,会因肿瘤向管腔侵袭或炎症导致的管腔狭窄导致胆管的完全梗阻,严重影响患者胆汁的排放,导致患者产生黄疸、陶土样便。对这样的患者,通过导管灌注载药囊泡可以快速地杀伤胆管癌细胞并缓解胆管梗阻症状,缓解黄疸和改善患者基础状况。载药囊泡有望在上述的肿瘤治疗中得到广泛的应用。

2.3 装载溶瘤病毒的应用

本课题组也将肿瘤细胞来源的囊泡用于装载溶瘤病毒对肿瘤进行治疗。溶瘤病毒最先由 Martuza 等[26]在 1991 年报道,他发现转基因 HSV 在恶性胶质瘤治疗中有一定的效果。经过 20 余年的大量研究,溶瘤病毒的研究逐渐趋于成熟,然而机体对溶瘤病毒的清除机制、肿瘤细胞下调其表面溶瘤病毒受体的表达等仍然是溶瘤病毒在应用中的瓶颈。研究发现,肿瘤细胞来源的囊泡可以有效地将溶瘤病毒进行包裹,有效地避开了机体产生的抗体对溶瘤病毒的清除,被囊泡装载后的溶瘤病毒也直接通过膜的转运而不依赖于肿瘤细胞表面的病毒受体。利用肿瘤细胞来源的微颗粒装载溶瘤病毒手段有望用于临床上各类肿瘤的治疗。

2.4 与其他手段的联合应用

载药囊泡胸腔灌注后,胸腔内肿瘤细胞被快速杀灭,导致癌性胸水的消退。值得注意的是,部分患者的原发肿瘤如肺癌的生长受到抑制,甚至部分出

现缩小,提示特异性抗肿瘤免疫反应被激发或增强。尽管这种内在的抗肿瘤免疫的力量尚不足以完全对抗原发肿瘤,但如果与目前的肿瘤免疫治疗手段如 PD-1 抗体或肿瘤特异性 T 细胞回输联合,有望取得意想不到的效果。

2.5　抗肿瘤疫苗的应用

除了装载化疗药物的囊泡具有良好的抗肿瘤效果外,课题组还发现,空载的肿瘤细胞来源囊泡可以有效地作为预防性和治疗性抗肿瘤疫苗,在小鼠肿瘤模型中产生良好的抗肿瘤效应。采用肿瘤细胞来源的微颗粒免疫小鼠,发现小鼠肿瘤的成瘤率较瘤细胞裂解物、外排体及对照组明显降低。其效果优于其他组别的原因在于其包裹了细胞的 DNA 并携带了大量的肿瘤抗原,还进一步发现肿瘤细胞来源的微颗粒介导的抗肿瘤免疫应答是 T 细胞依赖的。DC 在 T 细胞的激活中起着抗原提呈的作用,笔者研究显示,肿瘤细胞来源的微颗粒能够通过肿瘤细胞来源中的 DNA 分子激活 cGAS-STING 的信号通路诱导 DC 产生Ⅰ型干扰素,从而诱导 DC 的激活成熟。肿瘤细胞来源的微颗粒中携带着大量的肿瘤抗原,然而肿瘤抗原只有被 DC 通过交叉提呈途径以 MHC-Ⅰ-抗原肽的形式提呈至细胞表面才能激活抗肿瘤 CTL。肿瘤囊泡被 DC 以内吞途径摄取并最终定位在溶酶体,溶酶体的 pH 值影响着肿瘤抗原的降解及交叉提呈的效率。研究[27]发现,DC 摄取肿瘤囊泡后 pH 值升高,溶酶体中酸性酶的活性下降,肿瘤抗原的降解不完全,导致更多抗原肽被提呈至细胞表面激活 CTL,从而特异性杀伤肿瘤细胞。在个体化治疗手段日益凸显的今天,肿瘤细胞来源的囊泡可以用于预防肿瘤的复发,联合 DC 的治疗则有望成为肿瘤免疫治疗的新手段。

2.6　肿瘤患者预后预测的应用

囊泡是机体正常代谢的产物,在生理状态下起着重要的生理作用。当机体发生疾病处于病理状态时,机体内不同种类的微颗粒也会发生异常,介导了重要的病理过程。前期研究较多的血液系统疾病中,血小板来源微颗粒的变化提示凝血功能的改变以及血栓形成的风险。研究[28]也发现,血小板来源的微颗粒介导了肿瘤的转移。大量的研究已经提示微颗粒在机体的生理病理过程中发挥了重要的作用。根据不同的病理状态的发生,微颗粒的表型和数量会发生变化,依照这样的变化可以对疾病的状态进行预测,特别是在肿瘤的进展和转移的过程中,各类囊泡释放的数量,以及囊泡类型的转变都有可能发生明显的变化,因而可以通过囊泡来预测肿瘤的预后情况。

3　结　语

肿瘤免疫生物治疗不仅是近几十年来肿瘤治疗的重大突破,更是今后肿瘤治疗发展的主流和方向。尽管当前国际肿瘤免疫生物治疗主要围绕肿瘤细胞治疗(肿瘤特异性自体 T 细胞、基因重组的嵌合受体 CAR-T 细胞、NK 细胞)、针对免疫负向调节节点(check-point)的抗体治疗(CTLA-4 抗体、PD-1 及 PD-L1 抗体)、溶癌病毒的免疫生物治疗等方面轰轰烈烈地展开,但其他新型免疫生物治疗也在迅速发展,特别是与当前材料科学结合所形成的纳米材料免疫生物治疗已初现雏形。与上述研究领域相平行的细胞释放的囊泡已成为当前医学研究最前沿的大方向,其不但具有重要的生理意义,更是与各种疾病紧密关联,包括肿瘤。如何将这种细胞来源的囊泡作为天然生物材料用于疾病的治疗当前还处于研究的萌芽阶段。本文介绍的肿瘤细胞来源的囊泡则具有典范作用,其不但可以包裹化疗药物,也可以包裹溶癌病毒进行肿瘤的免疫生物治疗,还可以以单独的形式作为预防性和治疗性疫苗对肿瘤进行干预,从而有望开启肿瘤新型免疫生物治疗的一扇大门。

致谢:肿瘤囊泡研究受到国家重点基础研究发展(973 计划)(No. 2014CB542100)、国家杰出青年科学基金(No. 81225021)以及湖北盛齐安生物科技有限公司的资助。

[参 考 文 献]

[1]　van der Meel R, Fens MH, Vader P, et al. Extracellular vesicles as drug delivery systems: lessons from the liposome field [J]. J Control Release, 2014, 195: 72-85.

[2]　Mocan T, Clichici S, Agoşton-Coldea L, et al. Implications of oxidative stress mechanisms in toxicity of nanoparticles (review) [J]. Acta Physiol Hung, 2010, 97(3): 247-255.

[3]　van Wijk MJ, Van Bavel E, Sturk A, et al. Microparticles in cardiovascular diseases [J]. Cardiovasc Res, 2003, 59(3): 277-287.

[4]　Hu YL, Gao JQ. Potential neurotoxicity of nanoparticles [J]. Int J Pharm, 2010, 394(1/2): 115-121.

[5]　Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, et al. Membrane microparticles: two sides of the coin [J]. Physiology, 2005, 20(1): 22-27.

[6]　Mause SF, Weber C. Microparticles: Protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange [J]. Circ Res, 2010, 107(9): 1047-1057.

[7]　Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 1999, 30(2): 111-142.

[8]　Holme PA, Orvim U, Hamers MJ, et al. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis [J]. Arterioscler Thromb

Vasc Biol, 1997, 17(4): 646 - 653.
[9] Vikkula M, Boon LM, Carraway KL III, et al. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2 [J]. Cell, 1996, 87(7): 1181-1190.
[10] Vion AC, Ramkhelawon B, Loyer X, et al. Shear stress regulates endothelial microparticle release [J]. Circ Res, 2013, 112(10): 1323-1333.
[11] Li D, Jia H, Zhang H, et al. TLR4 signaling induces the release of microparticles by tumor cells that regulate inflammatory cytokine IL-6 of macrophages *via* microRNA let-7b [J]. Oncoimmunology, 2012, 1(5): 687-693.
[12] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9: 581-593.
[13] Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, et al. Membrane-derived microvesicles: Important and undera-ppreciated mediators of cell-to-cell communication [J]. Leukemia, 2006, 20(9): 1487-1495.
[14] Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, et al. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation [J]. Blood, 2005, 106(5): 1604-1611.
[15] Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gitahi SK, et al. Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens [J]. Am J Pathol, 2006, 169(6): 2127-2136.
[16] Garcia BA, Smalley DM, Cho H, et al. The platelet microparticle proteome [J]. J Proteome Res, 2005, 4(5): 1516 -1521.
[17] Dean WL, Lee MJ, Cummins TD, et al. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes [J]. Thromb Haemost, 2009, 102(4): 711-718.
[18] Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hemato-poietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery [J]. Leukemia, 2006, 20(9): 847- 856.
[19] Loyer X, Vion AC, Tedgui A, et al. Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases [J]. Circ Res, 2014, 114(2): 345-353.
[20] Tang K, Zhang Y, Zhang H, et al. Delivery of chemotherapeutic drugs in tumour cell-derived microparticles [J]. Nat Commun, 2012, 3: 1282.
[21] Roberts AJ, Kon T, Knight PJ, et al. Functions and mechanics of dynein motor proteins [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(11): 713-726.
[22] Hirokawa N, Noda Y. Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics [J]. Physiol Rev, 2008, 88(3): 1089-1118.
[23] Pu J, Schindler C, Jia R, et al. BORC, a multisubunit complex that regulates lysosome positioning [J]. Dev Cell, 2015, 33(2): 176-188.
[24] Alonso-Curbelo D, Riveiro-Falkenbach E, Pérez-Guijarro E, et al. RAB7 controls melanoma progression by exploiting a lineage-specific wiring of the endolysosomal pathway [J]. Cancer Cell, 2014, 26(1): 61-76.
[25] Jordens I, Fernandez-Borja M, Marsman M, et al. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors [J]. Curr Biol, 2001, 11(21): 1680-1685.
[26] Martuza RL, Malick A, Markert JM, et al. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant [J]. Science, 1991, 252(5007): 854-856.
[27] Zhang H, Tang K, Zhang Y, et al. Cell-free tumor microparticle vaccines stimulate dendritic cells via cGAS/STING signaling [J]. Cancer Immunol Res, 2015, 3(2): 196-205.
[28] Burnouf T, Goubran HA, Chou ML, et al. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine [J]. Blood Rev, 2014, 28(4): 155-166.

[收稿日期] 2015-07-15 [修回日期] 2015-09-10
[本文编辑] 阮芳铭

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对论文中实验动物描述的要求

根据国家科学技术部1988年颁布的《实验动物管理条例》和卫生部1998年颁布的《医学实验动物管理实施细则》,本刊对论文中有关实验动物的描述,要求写清楚以下事项:(1)品种、品系及亚系的确切名称;(2)遗传背景或其来源;(3)微生物检测状况;(4)性别、年龄、体重;(5)质量等级及合格证书编号;(6)饲养环境和实验环境;(7)健康状况;(8)对动物实验的处理方式。

医学实验动物分为四级:一级为普通级;二级为清洁级;三级为无特定病原体(SPF)级;四级为无菌级(包括悉生动物)。省部级课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。

(本刊编辑部)