

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.001

· 专家论坛 ·

肿瘤免疫生物治疗新途径——载药肿瘤囊泡

陆枢桢, 姚睿, 唐科(华中科技大学同济医学院, 湖北 武汉 430030)



唐科 医学博士、副教授、华中科技大学博士生导师。兼任中国免疫学会肿瘤免疫与生物治疗分会委员、湖北省临床肿瘤协会肿瘤微环境专委会常务委员, 2021年中国免疫学会全国学术大会肿瘤生物治疗会场共同主席, 2022年 *Bioengineering* 杂志(IF=5.046)囊泡免疫专辑客座主编。主要从事肿瘤免疫与生物治疗方面研究, 现阶段主要围绕细胞外囊泡载体/肿瘤干细胞代谢/免疫细胞代谢和探寻新的肿瘤生物治疗靶点并推动其临床转化应用。承担国家自然科学基金指南引导原创探索项目、国家自然科学基金面上项目、中国科学技术协会青年人才托举工程等科研项目10余项, 以第一作者和主要参与者身份已在免疫学和肿瘤学领域发表SCI论文十余篇, 其中包括 *Nat Immunol*, *Nat Mater*, *Nat Cell Biol*, *Cancer Cell*, *Nat Commun*, *Cell Res*, *Cancer Res*, *Oncogene*, *Cancer Immunol Res* 等。于2015年获得中国免疫学会青年学者奖, 2021年先后入选首批湖北省“青年拔尖人才”以及湖北省人才工作小组“科技副总”。

[摘要] 正常细胞及肿瘤细胞在发生凋亡或受到某些信号刺激时均可释放出直径为0.1~1 μm的膜状囊泡。肿瘤细胞受到信号刺激后骨架改变, 导致细胞质膜包裹细胞内容物并向膜外侧起泡形成囊状小体, 称为肿瘤囊泡, 其不仅影响肿瘤细胞的生物学特性, 对肿瘤免疫微环境也产生深刻的影响。除生物学效应外肿瘤囊泡还可作为一种天然的药物载体将治疗药物递送到肿瘤细胞, 发挥抗肿瘤作用。研究证实, 载药的肿瘤囊泡在天然免疫和获得性免疫反应中均体现良好的抗肿瘤激活效应, 目前载药肿瘤囊泡已经进入临床应用阶段, 在胆管癌、恶性胸腔积液的治疗中展现了良好的应用前景。

[关键词] 肿瘤囊泡; 载药; 肿瘤免疫; 肿瘤生物治疗

[中图分类号] R730.5; R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)08-0649-07

A new approach to tumor immunobiological therapy: tumor vesicles

LU Shuya, YAO Rui, TANG Ke (Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China)

[Abstract] Mammalian normal cells and tumor cells can release extracellular vesicles with 0.1-1 μm diameter when apoptosis or signal stimulation occurs. These signals stimulate the cytoskeleton changes to cause the plasma membrane to wrap the cellular contents and form extracellular vesicles, which are called tumor vesicles, which not only affect the biological characteristics of tumor cells but also have a profound impact on the tumor immune microenvironment. In addition to the biological effects, tumor vesicles can be used as a natural drug carrier, delivering therapeutic drugs to tumor cells and exerting anti-tumor effects. Follow-up studies have confirmed that drug-delivery tumor vesicles have a good anti-tumor activation effect in both innate and acquired immune responses. At present, drug-delivery tumor vesicles have entered the stage of clinical application. It has shown good application prospects in treating cholangiocarcinoma and malignant pleural effusion.

[Key words] tumor vesicle; drug-delivery; tumor immunity; tumor biotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(9): 649-655. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.001]

药物治疗仍是临床肿瘤治疗的主要手段之一, 如何将治疗药物有选择性地输送至肿瘤部位依然是 一大挑战。虽然某些纳米载体药物已经被批准用于 临床治疗并广泛被使用, 包括脂质体类和白蛋白类 载体药物, 但是这类人工合成的纳米药物并不能满 足临床的需求。其主要体现在两方面: 一方面并未 解决肿瘤细胞导致的药物抵抗; 另一方面其生物相 容性差导致机体长期蓄积毒性的影响仍难以估量。 基于上述背景, 笔者所在课题组于2012年利用肿瘤

囊泡[又称为肿瘤细胞释放的微颗粒(tumor cell- derived microparticle, T-MP)]荷载药物, 创立了

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 82071864, No. 82150103); 华中科技大学学术前沿青年团队计划(No. 2018QYTD01); 湖北省重点研发计划(No. 2020BCA068); 湖北省青年拔尖人才培养计划; 国家级大学生创新创业项目(No. 202210487093)

[作者简介] 陆枢桢(1996—)女, 博士生, 主要从事肿瘤免疫与肿瘤代谢方面的研究, E-mail: lushuya313@163.com

[通信作者] 唐科, E-mail: ketang@hust.edu.cn

一套全新的天然生物源纳米级载药输送体系,其在靶向递送效率、不良反应和抗肿瘤效应中均具有优势。经过十余年基础和临床转化研究,课题组发现,除有直接的药物递送功能外,其在天然免疫和获得性免疫激活过程中也发挥着重要作用,在恶性肿瘤的临床治疗中有着良好的前景。本文将系统综述载药肿瘤囊泡在药物递送和免疫激活中的功能,以及其在抗肿瘤治疗中的转化应用。

1 肿瘤囊泡的基本结构与功能

细胞释放囊泡作为细胞之间信息及物质传递的基础在多年前已有研究,而最近的研究使人们认识到,囊泡在多个不同系统中都发挥非常重要的作用。早先人们认为,细胞之间通过释放分子如神经递质和激素使受体细胞感受到该信号发生功能改变。后来人们用电子显微镜观察发现损伤或坏死的细胞内部及周围存在大量的囊泡,进而发现这种天然结构的小泡在多种细胞事件中都会被释放,此后囊泡作为一种新的亚细胞结构被人们所认识,作为细胞之间信息及物质传递的载体已被广泛研究。根据囊泡的不同来源、结构、大小及生化性质,细胞外囊泡主要被分为两种:外泌体(exosome)和微颗粒(microparticle)。

1.1 细胞外囊泡的基本结构与功能

1981年,“exosome”作为术语第一次被用来描述肿瘤细胞释放的携带有5-核苷酸酶的囊泡状结构^[1]。几年后,研究^[2-3]发现,在网织红细胞中存在这类囊泡的分泌,这些小泡(直径50~100 nm)起源于大型多泡内体,携带有转铁蛋白受体。电子显微镜观察发现,多泡内体与细胞膜融合,导致这些内部囊泡被分泌到细胞外。这些囊泡可通过高速差速离心纯化得到。然而,当时认为晚期内体是内吞过程中的一个过渡阶段,其内容物注定要被溶酶体降解,不能循环回到细胞表面。1989年,PETERS等^[4]发现,细胞毒性T细胞质膜与晚期内体之间存在清晰的融合路径,这可以解释T细胞分泌细胞毒性颗粒的现象。直到1996年,EB病毒转染的B细胞多泡体释放的内部小泡被发现后,外泌体的功能才开始被广泛关注^[5]。

与外泌体不同的是,微颗粒囊泡是由细胞膜表面脱落下来的直径为100~1 000 nm的亚细胞结构。1967年,WOLF等^[6]首次发现血小板能够释放大量的囊泡,当时认为是无生物学功能的细胞碎片,称其为“platelet dust”。近些年的研究^[7-8]证实,体液中,包括血液、尿液以及腹腔积液等,有大量囊泡的存在。几乎所有的真核细胞,包括红细胞和血小板都能够释放囊泡,囊泡的产生释放机制及其生物学功能也被陆续揭示。有核细胞的囊泡释放通常发生在活化或者早期

凋亡过程中,在细胞分化、应激、衰老、外界细胞因子或剪切力刺激、ATP处理、细胞凋亡、微环境改变、缺氧以及恶变时均能释放囊泡。微颗粒不仅含有信使分子、酶、RNA和DNA,还能把这些生物活性分子从供体细胞传递至受体细胞中^[9]。因此,借助微颗粒天然的传递生物信息的能力,笔者所在课题组首次将肿瘤囊泡荷载化疗药物,构建了一套天然的细胞膜结构的抗肿瘤药物递送体系——“载药囊泡”^[10]。

1.2 肿瘤囊泡的载药传输特性

纳米药物由于具有渗透与滞留增强效应、智能响应性、可靶向修饰、不同作用机制药物共输运等优势,在肿瘤精准治疗和诊疗一体化方面受到极大关注^[11-12]。尽管基于纳米技术的药物递送系统可以提高药物对肿瘤细胞的渗透能力,但是依旧存在药物无法充分在肿瘤细胞的富集,无法充分渗透到肿瘤病灶组织中等一系列棘手的问题。LIU等^[13]早于2012年通过三维软纤维凝胶基于生物物理信号筛选获取了干性的肿瘤细胞,将其命名为肿瘤再生细胞(tumour-repopulating cell,TRC),其展现了强大的自我更新能力且具有高致瘤性。TRC往往存在于与实体瘤血管相隔甚远的缺氧隔层中,而传统的纳米药物递送系统很难将药物靶向递送至TCR中。所以,如何进一步提高抗肿瘤纳米药物的靶向输送效率和临床治疗效果仍面临诸多挑战。

基于前期对载药囊泡的研究,LIANG等^[14]构建了基于软三维(3D)纤维蛋白胶,以及筛选、培养TRC的技术,制备了TRC来源的微颗粒囊泡(3D-MP),与普通肿瘤细胞来源微颗粒(2D-MP)相比,3D-MP负载不同抗肿瘤药物及在多种肿瘤模型上均证实其抗肿瘤作用显著增强。进一步发现载药3D-MP在肿瘤部位高度富集,且通过多种肿瘤模型证实3D-MP具有更强的穿透肿瘤血管进入肿瘤深部的能力,且更容易被TRC摄取。利用原子力显微镜测定3D-MP发现,与2D-MP相比,其更加柔软、更易变形。MP蛋白质组学研究发现骨架蛋白cytospin-A等参与了MP的软硬度调节。通过小分子化学药物如cytospin-A siRNA调节MP的软硬度证实,软硬度直接影响载药MP的体内过程及抗肿瘤作用。该研究揭示了纳米药物的力学特性对肿瘤治疗的深刻影响,为发展抗肿瘤药物的高效递送系统提供了新的思路。

2 肿瘤囊泡的载药抗癌作用

2.1 负载化疗药物抗癌

笔者所在课题组^[10]采用化疗药物(氨甲蝶呤、顺铂、紫杉醇)处理肿瘤细胞(小鼠肝癌细胞H22、人源卵巢癌细胞A2780等),通过紫外线照射诱导其凋亡

产生包裹药物的载药囊泡,在体内外实验中均展示了优良的肿瘤细胞杀伤效果。同时,在体内实验中观察小鼠的毛发、体重以及肝、肾功能指标发现,给予载药囊泡治疗后,肿瘤生长受到抑制,小鼠的生存期延长且无明显的不良反应。经过进一步的研究发现,载药囊泡能有效地富集于肿瘤部位,且能将化疗药物递送至细胞内,诱导肿瘤细胞凋亡时能再次释放荷载药物的肿瘤囊泡,产生类似的“多米诺骨牌”效应。与已经临床批准的脂质体药物比较发现,同等药物含量的荷载,载药囊泡能体现出更好的抗肿瘤效果;当产生同样的抗肿瘤效果时,脂质体药物产生了明显的化疗不良反应,而载药囊泡仍然显示出良好的安全性。此外,本课题组将两种荷载不同药物(顺铂和紫杉醇)的载药囊泡联合用于人源卵巢癌的小鼠荷瘤模型,发现与单一的载药囊泡相比,联合的载药囊泡展现出更强大的抗肿瘤效果,几乎完全抑制了小鼠卵巢癌的形成。

2.2 负载溶瘤病毒抗癌

肿瘤囊泡作为一种全新载体,除化疗药物外,也能有效荷载生物大分子乃至溶瘤病毒。溶瘤病毒经肿瘤囊泡包裹后可在肿瘤部位停留更长时间,且肿瘤部位病毒DNA的拷贝数明显高于单独的溶瘤病毒组。此外,因溶瘤病毒经肿瘤囊泡包裹后更容易进入肿瘤细胞的细胞核进行DNA复制,因此病毒复制效率更高,有助于获得更好的溶瘤效果。肿瘤囊泡介导的溶瘤病毒治疗手段与单独溶瘤病毒治疗相比有着多重优势:可以避免宿主的抗病毒抗体的清除;不依赖病毒特异性受体进入肿瘤细胞;进入细胞核是溶瘤病毒达到治疗效果的必要因素,而肿瘤囊泡介导的溶瘤病毒治疗可以有效地将溶瘤病毒输送至肿瘤细胞的细胞核以及肿瘤干细胞的细胞核^[15]。目前,溶瘤病毒已经正式在肿瘤的临床治疗中展开了应用,但是其杀伤肿瘤细胞的持续性有待进一步提高,且其只能进入特异性表达溶瘤病毒受体的肿瘤细胞。经肿瘤囊泡荷载后,溶瘤病毒可通过非受体依赖的模式进入肿瘤细胞。这种新型溶瘤病毒载体系统的发现将会有着广泛的肿瘤临床应用前景。

2.3 逆转TRC的耐药性

在乳房、结肠、肺、肝、脑、胰腺、卵巢和前列腺等部位的肿瘤以及白血病中,肿瘤干细胞对多种类型的化疗药物(如顺铂、紫杉醇、多柔比星、伊马替尼、替莫唑胺和依托泊苷等)具有耐药性。化疗药物的耐药是导致癌症治疗失败的一个主要因素,而肿瘤异质性是介导肿瘤耐药的一大重要特征,一般认为,一类具有自我更新能力的干性肿瘤细胞是导致肿瘤耐药的元凶。尽管化疗能够杀死大部分肿瘤组织中

的细胞,但是TRC却可以避免被杀伤。靶向杀伤TRC以及逆转其耐药是亟待解决的问题^[16-17]。

相比分化完全的细胞,细胞膜柔性较高的TRC能更有效地摄取微囊泡,而微囊泡会下调肿瘤细胞中多耐药蛋白的表达,而经jasplakinolide(一种大环肽,通过诱导肌动蛋白聚合减少细胞的韧度)处理增加TRC硬度后,其药物吞噬效率显著降低,表明机械力这一物理特征在肿瘤细胞对囊泡的吞噬中发挥着同等重要的作用。进一步将具有自发荧光的多柔比星荷载于肿瘤囊泡中,发现其能将具有红色荧光的多柔比星高效递送至细胞核,这些药物的核转运可能依赖于溶酶体的向心运动且依赖于核孔复合体的开放。MA等^[18]开展了前瞻性的临床试验,受试者为顺铂耐药的肺腺癌合并恶性胸腔积液(malignant pleural effusion, MPE)的患者,经荷载顺铂的载药囊泡胸腔灌注治疗后,耐药的肿瘤细胞被明显杀伤,且干性的肿瘤细胞数量也明显减少,再次证明载药囊泡能有效逆转干性肿瘤细胞耐药。

依托肿瘤囊泡促进药物核转运这一理论,JIN等^[19]将其用于膀胱癌的灌注治疗。非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC)通常的治疗方案是手术切除联合膀胱内局部化疗。然而,由于耐药TRC无法被清除,使约一半的患者在治疗后会发生更严重的复发。因此,开发出能增强药物敏感性并清除肿瘤再生细胞的新型治疗方法迫在眉睫。课题组发现,在小鼠模型中,预灌注射载药囊泡可以显著增强膀胱局部化疗对原位膀胱癌和血尿发生的抑制作用。载药囊泡可以将溶酶体的pH值由4.6提高到5.6,从而促进载药溶酶体沿着微管向细胞核转移并将药物释放到可以进入细胞核的位置。基于此,课题组提出了载药囊泡促进药物入核的模型:(1)进入溶酶体的载药囊泡使溶酶体pH值上升并改变其功能;(2)RAS癌基因相关蛋白(member RAS oncogene family, Rab7)被募集到溶酶体膜上;(3)动力蛋白被募集到Rab7复合物上;(4)Rab7动力蛋白复合物作为溶酶体与微管的连接的桥梁;(5)动力蛋白推动溶酶体沿着微管向细胞核运动;(6)溶酶体将药物卸载到细胞核附近;(7)药物分子通过核孔进入细胞核。因此,载药囊泡作为一种化疗增敏剂在增强NMIBC治疗效果方面有望得到广泛应用。

3 肿瘤囊泡对肿瘤微环境中免疫细胞的影响

肿瘤微环境错综复杂,除了异质性的肿瘤细胞外,另外一大群体即为免疫细胞,免疫微环境介导的免疫细胞表型极化和教唆(将抗肿瘤的免疫细胞教唆为肿瘤细胞的帮凶)也是肿瘤进展的重要原因。已经有研究^[20]表明细胞外囊泡最终循环的终点是被

细胞吞噬。本课题组研究显示肿瘤囊泡能被巨噬细胞、DC等吞噬类免疫细胞所吞噬,而T细胞和B细胞则对其吞噬效率较低。那么,肿瘤囊泡被免疫细胞吞噬后对肿瘤细胞会有什么样的影响,产生这种影响的原因又是什么呢?接下来本文重点讨论肿瘤囊泡对免疫细胞表型和功能的影响。

3.1 肿瘤囊泡介导DC的免疫应答

疫苗发挥效应中有一重要环节是DC对肿瘤抗原的提呈^[21]。虽然最终杀伤肿瘤细胞的执行者T细胞并不直接吞噬肿瘤囊泡,但DC能有效摄取肿瘤囊泡。ZHANG等^[22]研究发现,肿瘤囊泡可以通过其荷载的线粒体DNA激活cGAS/STING通路并有效地激活I型干扰素途径,且能激活DC表面的共刺激分子,包括CD80和CD86。更为重要的是,肿瘤囊泡中荷载了大量的肿瘤抗原,因其具有颗粒状的形状和合适的粒径能被DC有效摄取,与可溶性抗原相比,其启动抗肿瘤免疫应答的效率大大提高。

肿瘤细胞来源的外泌体中也含有在亲代肿瘤细胞中表达的肿瘤抗原,但它们似乎不适合体内免疫启动或肿瘤疫苗设计。研究结果^[23]表明,肿瘤细胞来源的外泌体可以通过不同的机制产生免疫抑制。与外泌体或肿瘤裂解物相比,肿瘤囊泡可以诱导保护性免疫,并且负载在DC上的肿瘤囊泡可增强CD8⁺T细胞的浸润和IFN- γ 的产生,从而显著抑制肿瘤的生长。总之,肿瘤囊泡的内容物不仅覆盖肿瘤抗原谱,还携带潜在的固有免疫信号,使其成为开发新型预防和治疗癌症疫苗的理想候选物。在今后的研究中,荷载不同特定抗原的肿瘤囊泡将会更加特异性地展现其预防性和治疗性疫苗的特征。

MA等^[24]发现,在几种不同的小鼠肿瘤模型中,肿瘤囊泡无一例外地诱导了对肿瘤细胞攻击的保护性免疫。然而,这些保护作用在清除了CD8⁺T细胞的小鼠或裸鼠中受到抑制,表明肿瘤囊泡诱导的抗肿瘤免疫是T细胞依赖的。进一步研究^[24]发现,肿瘤囊泡能够被DC摄取并进入溶酶体,导致溶酶体内pH值短暂升高,避免抗原被过度降解,利于肿瘤囊泡携带肿瘤抗原的加工提呈和MHC抗原肽复合物的形成;同时,肿瘤囊泡引起溶酶体内钙离子释放,促进转录因子TFEB去磷酸化入核,调控CD80和CD86的表达,促进DC的活化与成熟。这些发现阐明了DC将肿瘤抗原从肿瘤囊泡递送到CD8⁺T细胞的具体分子途径,为其作为新型高效肿瘤疫苗提供了坚实的理论基础。

尽管皮下或者静脉注射是最常见的方法用来接种肿瘤疫苗,但最近在黏膜免疫方面的进展为探讨预防性和治疗性肿瘤疫苗口服途径提供了一个新的机遇^[25]。口服疫苗已实施了数百年并成功预防了严

重的病毒和细菌感染。然而,它们似乎仅限于黏膜病原体,用口服疫苗的方法控制癌症尚未被人类广泛应用。与全身给药途径相比,口服具有简单、安全、诱导全身黏膜和免疫应答等显著优点。研究^[26]发现,通过联合胃酸抑制剂,口服肿瘤囊泡疫苗能有效抑制小鼠黑色素瘤和结肠癌细胞的增殖;同时这个过程需要T细胞和DC细胞的活化,肿瘤囊泡一旦顺利进入小肠后大部分被回肠上皮细胞吸收,在回肠上皮细胞内激活NOD2及下游的MAPK和NF- κ B,从而导致趋化因子的释放,包括趋化CD103⁺CD11c⁺DC细胞的CCL2。另外,回肠上皮细胞能将肿瘤囊泡转运至基底细胞,同时DC捕获肿瘤囊泡并交叉提呈肿瘤囊泡所负载的肿瘤抗原,并激发全身的抗肿瘤免疫保护效应。本研究阐明了口服肿瘤囊泡疫苗可通过激活回肠上皮细胞NOD2信号通路,引起特异性T细胞免疫应答的细胞和分子机制,突显了肿瘤囊泡作为新型的口服疫苗潜在临床应用价值。

3.2 肿瘤囊泡对巨噬细胞的“教唆”作用

在肿瘤治疗中,肿瘤相关巨噬细胞(TAM)被认为是潜在的目标,但是目前在恶性环境中对TAM的起源和功能仍知之甚少。M2型TAM作为肿瘤特异性标志,不仅仅能促进肿瘤免疫抑制、血管生成和肿瘤转移,同时还介导化疗药物耐受、肿瘤细胞存活以及肿瘤干细胞的形成^[27-28]。考虑到TAM的促肿瘤作用,靶向作用于M2型TAM被认为是抗肿瘤的潜在疗法。研究^[29]发现,肿瘤囊泡通过激活cGAS/STING/TBK1/STAT6途径,诱导巨噬细胞向M2型极化,其通过多个环节的连锁作用促进肿瘤进展:肿瘤释放肿瘤囊泡,肿瘤囊泡穿过血液屏障和循环进入预转移位置,原位巨噬细胞摄取肿瘤囊泡并被教育成M2型巨噬细胞,M2型巨噬细胞通过释放多种因子抑制抗肿瘤免疫反应来改造转移前微环境,从而促进肿瘤的生长和转移,并促进肿瘤干细胞发展。这项研究为肿瘤囊泡在改造肿瘤微环境中的重要作用提供了新的视野。

前期已经证明肿瘤囊泡能够将化疗药物或溶瘤病毒运送至TRC的细胞核并通过溶酶体介导途径破坏它们。此外,TRC类干性肿瘤细胞往往通过抑制抗肿瘤免疫来达到免疫逃逸的目的,载药囊泡是否能通过清除TRC来提高抗肿瘤免疫反应?研究^[29]证明,低剂量辐照(low dose irradiation,LDI)能增强包裹顺铂的载药囊泡对TRC的影响,导致不同的肿瘤模型中肿瘤生长的抑制。这种抗肿瘤效果除了直接杀死肿瘤细胞外,还通过杀伤TRC来减少它们对巨噬细胞的教唆,从而达到逆转和“再教育”TAM的目的^[14]。

肿瘤的生长需要合适的环境,肿瘤的转移也同样如此。较多研究证明原发肿瘤在转移前能够通过

释放多种细胞因子影响远端器官的微环境,使其利于肿瘤细胞的转移定居,这个过程称为转移前微环境(premetastatic niche)的形成^[30-32]。研究^[33]证明,肿瘤细胞在缺氧条件(1% O₂)诱导下会释放大量肿瘤囊泡至外周循环,肿瘤囊泡进入肺组织后被巨噬细胞摄取,诱导巨噬细胞释放趋化因子CCL2,并进一步诱导大量的炎症单核细胞进入肺实质。同时,肿瘤囊泡增加了肺内皮细胞的通透性,导致血液中纤维蛋白原进入肺组织内并形成纤维蛋白沉积,这些物理微环境也有助于TRC的存活与增殖。该研究从免疫细胞极化和趋化的角度系统地分析了肿瘤囊泡在肺肿瘤转移中的作用。

细胞外囊泡中富含大量的RNA,但其生物学功能的相关研究仍处于初步阶段^[34]。研究^[35]发现肿瘤囊泡中富集了大量的非编码RNA,结合囊泡被吞噬后的溶酶体定位特征,发现其介导溶酶体进一步酸化和钙离子的释放,最终介导炎症小体NLRP3的激活和IL-1 β 的成熟剪切与释放,提示肿瘤囊泡对巨噬细胞表型影响并不是单一的朝M2型极化,也可能是复杂的混合性表型,具体的机制还有待后续进一步的探究。

4 载药肿瘤囊泡在肿瘤治疗中的应用

课题组前期的研究工作表明,载药囊泡能够高效富集到肿瘤部位,进而释放荷载药物进入肿瘤细胞内,诱导肿瘤细胞凋亡。此外,动物体内实验也证实了,载药囊泡可以逆转TAM的表型、激活DC等,诱发肿瘤免疫。进一步的临床研究结果显示,载药囊泡在胆管癌、MPE的治疗中也能够达到类似的肿瘤杀伤。

4.1 胆管癌的治疗

胆管癌恶性程度仅次于胰腺癌,对患者影响严重,主要引起梗阻性黄疸从而导致肝功能损害,危及患者生命^[36]。由于胆管位于胆汁引流和肝功能正常运转的关键位置,因解剖位置特殊和胆管癌肿瘤组织的“外壳”坚硬,胆管癌尤其是肝门部胆管癌患者对放化疗均不敏感,一旦失去根治性手术机会,患者基本面临“无药可医”的局面。笔者所在课题组于2014年起与天津市南开医院合作,开展载药囊泡治疗胆管癌的临床试验。结果显示,经PTCD介入灌注载带氨甲蝶呤的肿瘤囊泡一到两个疗程后,每次灌注20 mL含 6×10^7 个载药囊泡(共载药120 μ g氨甲蝶呤),每天1次,7 d为一个疗程(临床试验号:ChiCTR-IIR-16007842),约30%的患者影像学显示胆道梗阻发生好转,约有50%患者首次疗程后黄疸症状减轻、肝功能好转,排便颜色可由陶土色转为黄色,大部分患者饮食状况、生活质量均能够改善。在安

全性方面,患者血常规、肝肾功能均无明显变化,无腹痛、恶心、呕吐等其他不适症状,安全性表现良好。

在机制研究^[37]中发现,载药囊泡能有效趋化和激活中性粒细胞来达到抗肿瘤效果。中性粒细胞是人体内数量最庞大的免疫细胞,其在人体血液中循环流动,寿命仅为7~9 h。正常机体每天死亡的中性粒细胞在10亿数量级以上,但一旦有病原体入侵,成千上万的中性粒细胞聚集到感染部位,将病原体清除,同时又不可避免地对周围的细胞外基质成分进行破坏。课题组^[37]发现,载药囊泡到达胆管癌瘤体上方的胆管腔时,大量的中性粒细胞被募集,进一步研究发现初次的中性粒细胞趋化依赖于载药囊泡中荷载的尿苷二磷酸葡萄糖和补体片段C5a,中性粒细胞到达梗阻的胆管部位后,对胆管癌细胞周围的基质进行破坏,裸露出一个一个的癌细胞,使得它们能够被载药囊泡接触,通过Gasdermin E途径诱导胆管癌细胞焦亡,胆管癌细胞的焦亡,激活了内源巨噬细胞释放促炎因子,进一步趋化中性粒细胞,使得中性粒细胞对肿瘤细胞进行攻击,该项研究揭示了载药囊泡诱发的天然免疫反应,在后续的肿瘤免疫治疗中展现了良好的应用前景。

4.2 MPE的治疗

肿瘤转移是癌症患者死亡的首因。在众多肿瘤转移病灶中,MPE多发且棘手^[38]。当肿瘤转移至胸膜腔时,肿瘤恶性生长损害胸膜表面血管结构,血管内液体大量流出并滞留于胸膜腔,形成MPE,如果肿瘤小结节堵住回流的淋巴管,则积液更为显著。由于血管严重受损,大量红细胞也可穿过毛细血管,进入胸膜腔,形成血性胸腔积液。肺癌,乳腺癌,卵巢癌等众多实体瘤均可转移至胸膜腔,形成MPE。仅以肺癌为例,高达60%晚期肺癌患者会出现MPE。MPE严重危害患者的生存及生活质量,然而临床却缺乏有效治疗手段。在2015至2020年期间,笔者所在课题组将肿瘤囊泡包裹氨甲蝶呤或生理盐水胸腔灌注联合PP(培美曲塞/顺铂)方案治疗非鳞晚期非小细胞肺癌MPE(临床试验注册号:ChiCTR-ICR-15006304),在86例受试者中,氨甲蝶呤荷载囊泡治疗组的MPE控制缓解率为82.50%,明显高于对照组的58.97%,证实载药囊泡技术用于晚期肺癌患者的MPE治疗效果明确、安全可控。

前期研究显示,注射载药囊泡后,患者癌性胸腔积液中大量肿瘤细胞在很短时间内几乎被完全清除。进一步研究^[39]发现,载药囊泡能够迅速将中性粒细胞招募至癌性胸腔积液,活化的中性粒细胞则对肿瘤细胞进行杀伤清除。即便没有了肿瘤细胞,受损的血管也需要一定的时间来修复,那么胸腔积液又是如何快速消退的?

在长期的进化过程中,中性粒细胞在死亡之际,将其细胞核内的DNA和组蛋白释放出来,形成网状结构的复合体。由于DNA具有高度黏滞性,这种网状结构能够将周围的病原菌粘住、网裹,进而杀灭,因此,形象地将其称为“中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular trap, NET)”^[40]。课题组发现,在癌性胸水中同样可释放NET,这种具有高度黏性的NETs作为有效的生物材料,如同膏药般粘贴在受损的血管表面,阻止血管内液体的流出,而胸腔中的液体则通过淋巴管而流出,使得MPE快速消退,从而使得临床上难治的癌性胸腔积液能够得到治愈^[39]。肿瘤免疫治疗是攻克肿瘤的利器,动员机体数量最为庞大的中性粒细胞,达到有效治疗MPE,凸显载药囊泡在肿瘤免疫治疗领域独特的一面。在近期的临床试验过程中发现其在恶性胸腔积液的治疗中也展现了良好的效果,提示载药囊泡在临床恶性胸腔积液的治疗中有其普适性。

5 结 语

近年来,以ICI以及CAR-T、CAR-NK疗法^[41]为代表的肿瘤免疫治疗在临床上已经取得了重大突破,但因免疫治疗受众人群众少、不良反应发生率高弊端,新型免疫疗法的开发仍迫在眉睫。基于载药囊泡的肿瘤治疗手段,其优势不仅在于能靶向杀伤肿瘤细胞,尤其是肿瘤干细胞,更重要的是载药囊泡在固有免疫和获得性免疫的诱发过程中均发挥良好的抗肿瘤作用。现阶段载药囊泡肿瘤治疗技术在中国部分省市已率先通过监管部门批准用于临床晚期恶性肿瘤的治疗,有望有效提升恶性肿瘤患者的生存质量并降低疾病负担。同时,在全球范围内,基于外泌体修饰的肿瘤免疫治疗策略也展开了相关临床试验,主要以Codiak Bioscience开发的exoSTINGTM, exoIL-12TM 泌体药物为代表。总之,在不久的将来,将会有更多的基于细胞外囊泡的肿瘤免疫治疗手段涌现,推动相关学科和产业化进程的发展。

[参 考 文 献]

- [1] TRAMS E G, LAUTER C J, SALEM N Jr, *et al.* Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles[J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1981, 645(1): 63-70. DOI: 10.1016/0005-2736(81)90512-5.
- [2] HARDING C, HEUSER J, STAHL P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes[J]. *J Cell Biol*, 1983, 97(2): 329-339. DOI: 10.1083/jcb.97.2.329.
- [3] PAN B T, TENG K, WU C, *et al.* Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes[J]. *J Cell Biol*, 1985, 101(3): 942-948. DOI: 10.1083/jcb.101.3.942.
- [4] PETERS P J, GEUZE H J, VAN DER DONK H A, *et al.* Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes[J]. *Eur J Immunol*, 1989, 19(8): 1469-1475. DOI: 10.1002/eji.1830190819.
- [5] RAPOSO G, NIJMAN H W, STOORVOGEL W, *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles[J]. *J Exp Med*, 1996, 183(3): 1161-1172. DOI: 10.1084/jem.183.3.1161.
- [6] WOLF P. The nature and significance of platelet products in human plasma[J]. *Br J Haematol*, 1967, 13(3): 269-288. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x.
- [7] HORSTMAN L L, AHN Y S. Platelet microparticles: a wide-angle perspective[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1999, 30(2): 111-142. DOI: 10.1016/s1040-8428(98)00044-4.
- [8] VANWIJK M J, VANBAVEL E, STURK A, *et al.* Microparticles in cardiovascular diseases[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 59(2): 277-287. DOI: 10.1016/s0008-6363(03)00367-5.
- [9] HU Y, SUN Y J, WAN C, *et al.* Microparticles: biogenesis, characteristics and intervention therapy for cancers in preclinical and clinical research[J]. *J Nanobiotechnol*, 2022, 20(1): 189. DOI: 10.1186/s12951-022-01358-0.
- [10] TANG K, ZHANG Y, ZHANG H F, *et al.* Delivery of chemotherapeutic drugs in tumour cell-derived microparticles[J/OL]. *Nat Commun*, 2012, 3: 1282[2022-06-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23250412/>. DOI: 10.1038/ncomms2282.
- [11] SKOTLAND T, IVERSEN T G, LLORENTE A, *et al.* Biodistribution, pharmacokinetics and excretion studies of intravenously injected nanoparticles and extracellular vesicles: possibilities and challenges[J/OL]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 186: 114326[2022-06-13]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2022.114326>. DOI: 10.1016/j.addr.2022.114326.
- [12] NICULESCU A G, GRUMEZESCU A M. Novel tumor-targeting nanoparticles for cancer treatment-a review[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 5253[2022-06-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35563645/>. DOI: 10.3390/ijms23095253.
- [13] LIU J, TAN Y H, ZHANG H F, *et al.* Soft fibrin gels promote selection and growth of tumorigenic cells[J]. *Nat Mater*, 2012, 11(8): 734-741. DOI: 10.1038/nmat3361.
- [14] LIANG Q L, BIE N N, YONG T Y, *et al.* The softness of tumour-cell-derived microparticles regulates their drug-delivery efficiency [J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(9): 729-740. DOI: 10.1038/s41551-019-0405-4.
- [15] RAN L, TAN X H, LI Y C, *et al.* Delivery of oncolytic adenovirus into the nucleus of tumorigenic cells by tumor microparticles for virotherapy[J]. *Biomaterials*, 2016, 89: 56-66. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.02.025.
- [16] OZAWA S, MIURA T, TERASHIMA J, *et al.* Cellular irinotecan resistance in colorectal cancer and overcoming irinotecan refractoriness through various combination trials including DNA methyltransferase inhibitors: a review[J]. *Cancer Drug Resist*, 2021, 4(4): 946-964. DOI: 10.20517/cdr.2021.82.
- [17] REZAYATMAND H, RAZMKHAH M, RAZEGHIAN-JAHROMI I. Drug resistance in cancer therapy: the Pandora's Box of cancer stem cells[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 181 [2022-06-13]. <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-022-02856-6>. DOI: 10.1186/s13287-022-02856-6.

- [18] MA J W, ZHANG Y, TANG K, *et al.* Reversing drug resistance of soft tumor-repopulating cells by tumor cell-derived chemotherapeutic microparticles[J]. *Cell Res*, 2016, 26(6): 713-727. DOI: 10.1038/cr.2016.53.
- [19] JIN X, MA J W, LIANG X Y, *et al.* Pre-instillation of tumor microparticles enhances intravesical chemotherapy of nonmuscle-invasive bladder cancer through a lysosomal pathway[J]. *Biomaterials*, 2017, 113: 93-104. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.036.
- [20] LU Y, YANG Y, LIU S Y, *et al.* Biomaterials constructed for MSC-derived extracellular vesicle loading and delivery—a promising method for tissue regeneration[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 898394[2022-06-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36092710/>. DOI: 10.3389/fcell.2022.898394.
- [21] BARBIER A J, JIANG A Y, ZHANG P, *et al.* The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies[J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(6): 840-854. DOI: 10.1038/s41587-022-01294-2.
- [22] ZHANG H F, 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. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0177.
- [23] THAKUR A, PARRA D C, MOTALLEBNEJAD P, *et al.* Exosomes: Small vesicles with big roles in cancer, vaccine development, and therapeutics[J]. *Bioact Mater*, 2022, 10: 281-294. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.08.029.
- [24] MA J W, WEI K K, ZHANG H F, *et al.* Mechanisms by which dendritic cells present tumor microparticle antigens to CD8⁺ T cells [J]. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6(9): 1057-1068. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0716.
- [25] LOCKHART A, MUCIDA D, PARSAR R. Immunity to enteric viruses[J]. *Immunity*, 2022, 55(5): 800-818. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.04.007.
- [26] DONG W Q, ZHANG H F, YIN X N, *et al.* Oral delivery of tumor microparticle vaccines activates NOD2 signaling pathway in ileac epithelium rendering potent antitumor T cell immunity[J/OL]. *Onco Immunology*, 2017, 6(3): e1282589[2022-06-13]. <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2017.1282589>. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1282589.
- [27] DALLAVALASA S, BEERAKA N M, BASAVARAJU C G, *et al.* The role of tumor associated macrophages (TAMs) in cancer progression, chemoresistance, angiogenesis and metastasis-current status[J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(39): 8203-8236. DOI: 10.2174/0929867328666210720143721.
- [28] MA R H, JI T T, CHEN D G, *et al.* Tumor cell-derived microparticles polarize M2 tumor-associated macrophages for tumor progression[J/OL]. *Onco Immunology*, 2016, 5(4): e1118599 [2022-06-13]. <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1118599>. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1118599.
- [29] SUN Y L, ZHENG Z A, ZHANG H F, *et al.* Chemotherapeutic tumor microparticles combining low-dose irradiation reprogram tumor-promoting macrophages through a tumor-repopulating cell-curtailling pathway[J/OL]. *Onco Immunology*, 2017, 6(6): e1309487 [2022-06-13]. <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2017.1309487>. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1309487.
- [30] BHATIA R, BHAYAVBHATLA N, KISLING A, *et al.* Cytokines chattering in pancreatic ductal adenocarcinoma tumor microenvironment[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86: 499-510. DOI: 10.1016/j.semcancer.2022.03.021.
- [31] NAIRON K G, DEPALMA T J, ZENT J M, *et al.* Tumor cell-conditioned media drives collagen remodeling via fibroblast and pericyte activation in an *in vitro* premetastatic niche model[J/OL]. *iScience*, 2022, 25(7): 104645[2022-06-13]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2022.104645>. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104645.
- [32] MUSTAPHA R, NG K, MONYPENNY J, *et al.* Insights into unveiling a potential role of tertiary lymphoid structures in metastasis[J/OL]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 661516 [2022-06-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34568423/>. DOI: 10.3389/fmolb.2021.661516.
- [33] ZHANG H F, YU Y D, ZHOU L, *et al.* Circulating tumor microparticles promote lung metastasis by reprogramming inflammatory and mechanical niches *via* a macrophage-dependent pathway[J]. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6(9): 1046-1056. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0574.
- [34] XU Z J, CHEN Y, MA L, *et al.* Role of exosomal non-coding RNAs from tumor cells and tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(10): 3133-3154. DOI: 10.1016/j.ymthe.2022.01.046.
- [35] CHEN J, SUN W W, ZHANG H F, *et al.* Macrophages reprogrammed by lung cancer microparticles promote tumor development *via* release of IL-1 β [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(12): 1233-1244. DOI: 10.1038/s41423-019-0313-2.
- [36] RAGGI C, LETIZIA TADDEI M, RAE C, *et al.* Metabolic reprogramming in cholangiocarcinoma[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(3): 849-864. DOI: 10.1016/j.jhep.2022.04.038.
- [37] GAO Y F, ZHANG H, ZHOU N N, *et al.* Methotrexate-loaded tumour-cell-derived microvesicles can relieve biliary obstruction in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(7): 743-753. DOI: 10.1038/s41551-020-0583-0.
- [38] MÉHES G, MOKÁNSZKI A, TÓTH L, *et al.* Malignant pleural effusions for cancer genotyping: a matter of *trans*-pleural traffic of cell-free tumor DNA[J/OL]. *Mol Cell Probes*, 2022, 61: 101793 [2022-06-13]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2022.101793>. DOI: 10.1016/j.mcp.2022.101793.
- [39] XU P W, TANG K, MA J W, *et al.* Chemotherapeutic tumor microparticles elicit a neutrophil response targeting malignant pleural effusions[J]. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8(9): 1193-1205. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0789.
- [40] SHAHZAD M H, FENG L X, SU X, *et al.* Neutrophil extracellular traps in cancer therapy resistance[J/OL]. *Cancers*, 2022, 14(5): 1359 [2022-06-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35267667/>. DOI: 10.3390/cancers14051359.
- [41] PAN K, FARRUKH H, CHITTEPU V C S R, *et al.* CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy [J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 119[2022-06-13]. <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-022-02327-z>. DOI: 10.1186/s13046-022-02327-z.

[收稿日期] 2023-02-28

[修回日期] 2023-08-15

[本文编辑] 沈志超, 黄静怡