

“响应脱壳”介孔硅纳米系统共递送 Tim-3 单抗和索拉非尼 增强肝癌化学免疫联合治疗

慕升君[#], 桑 晓[#], 牟伟伟, 王天琪, 杨 锐, 张自鹏, 刘永军*, 张 娜*

(山东大学药学院, 天然产物化学生物学教育部重点实验室, 山东 济南 250012)

摘要: 化学免疫联合治疗作为癌症治疗的新兴疗法备受关注, 探寻有效的药物联用方案和合理的递送手段仍是目前研究的关键问题。本研究设计了一种“响应脱壳”介孔二氧化硅纳米系统 (ST-MSNs), 共递送 Tim-3 单抗和索拉非尼 (SF) 用于肝癌的化学免疫联合治疗。ST-MSNs 外壳由金属基质蛋白酶 2 (MMP2) 敏感肽修饰的 Tim-3 单抗组成, 在血液循环中作为“门控分子”阻止药物释放, 在肿瘤微环境 MMP2 作用下 Tim-3 单抗响应脱落实现 Tim-3 单抗和 SF 触发释药, 向 T 细胞/肿瘤细胞的异靶细胞递送。体内抑瘤实验表明, 与游离 SF 和 Tim-3 单抗序贯给药相比, ST-MSNs 在荷瘤小鼠中显著提高肿瘤抑制效果。同时, ST-MSNs 显著上调小鼠血清中抗肿瘤细胞因子 IFN- γ 、IL-12 表达及肿瘤中 CD³⁺CD⁴⁺、CD³⁺CD⁸⁺ 细胞比例, 展现了良好的免疫调节能力。此外, 在给药剂量下, 空白载体展现出低细胞毒性和溶血性, 未见明显的组织毒性。动物实验均获得山东大学动物实验伦理委员会批准。综上所述, 本研究为临床肝癌治疗提供了应用前景良好的化学免疫联用药物组合, 为化学免疫联合治疗提供了一种极具潜力的药物载体。

关键词: 化学免疫联合治疗; 肝癌; 索拉非尼; Tim-3 单抗; 介孔二氧化硅纳米粒

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)01-0200-11

Co-delivery of Tim-3 mAb and sorafenib enhanced chemoimmunotherapy for hepatocellular carcinoma using "responsive shell-peeling" mesoporous silica nanoparticles

MU Sheng-jun[#], SANG Xiao[#], MU Wei-wei, WANG Tian-qi, YANG Rui,
ZHANG Zi-peng, LIU Yong-jun*, ZHANG Na*

(Key Laboratory of Chemical Biology (Ministry of Education), School of Pharmaceutical Sciences,
Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: Chemoimmunotherapy has attracted much attention as an emerging therapy pattern for the treatment of cancers. Exploring effective drug combination schemes and reasonable delivery methods remained the key issue in current research. Herein, we designed sorafenib (SF) and anti-Tim-3 monoclonal antibody (Tim-3 mAb) co-loaded MMP2-responsive mesoporous silica nanoparticles (ST-MSNs) for combined chemoimmunotherapy of hepatocellular carcinoma (HCC). The shell of ST-MSNs was fabricated by Tim-3 mAb through matrix metalloproteinase 2 (MMP2) sensitive peptides as "gatekeepers" to prevent drug release during the blood circulation. In tumor microenvironment, the high levels of MMP2 caused the responsive shedding of Tim-3 mAb, leading to the triggered release of SF and Tim-3 mAb. Then, SF could be delivered to tumor cells and Tim-3 mAb could be delivered to T cells,

收稿日期: 2021-08-19; 修回日期: 2021-10-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81974498, 81503008).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-531-88382548, E-mail: zhangnancy9@sdu.edu.cn; liuyongjun@sdu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1190

respectively. *In vivo* tumor inhibition study results demonstrated that ST-MSNs can significantly enhance synergistic antitumor activity compared with sequential administration of free SF solution and Tim-3 mAb solution. Meanwhile, the expression of antitumor cytokines IFN- γ , IL-12 and the percentage of CD3⁺CD4⁺ cells, CD3⁺CD8⁺ cells in tumors were upregulated after the administration of ST-MSNs, demonstrating good immunomodulatory ability. In addition, within the dosage range, the ST-MSNs had low cytotoxicity and hemolysis, and no obvious tissue toxicity was observed. All animal experiments were performed in line with national regulations and approved by the Animal Experiments Ethical Committee of Shandong University. In conclusion, this study provided a promising drug combination of chemoimmunotherapy with good application prospects for clinical HCC treatment, and exhibited a potential drug carrier for clinical chemoimmunotherapy.

Key words: chemoimmunotherapy; hepatocellular carcinoma; sorafenib; anti-Tim-3 antibody; mesoporous silica nanoparticle

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的肝脏恶性肿瘤, 每年造成约 70 万人死亡。临床治疗方法主要包括手术切除、化学治疗、介入治疗和免疫治疗等, 然而临床肝癌的 5 年生存率仍不足 15%, 探寻新的有效的药物联用方案是临床的迫切需求^[1,2]。近年来, 化学免疫联合治疗被高度重视, 并日益成为一种新兴的临床联合治疗方式。例如, 帕博利珠单抗、卡铂和培美曲塞联合治疗已经成为 FDA 批准的非小细胞肺癌一线治疗方案。在化学免疫联合治疗中, 化疗对肿瘤细胞具有快速、直接的杀伤作用; 免疫治疗则通过激活免疫系统发挥长期特异性的杀伤作用, 两者机制协同互补^[3,4]。基于此, 寻找有效的化疗免疫治疗方案提高肝癌的治疗效果是临床治疗的迫切需求^[5,6]。

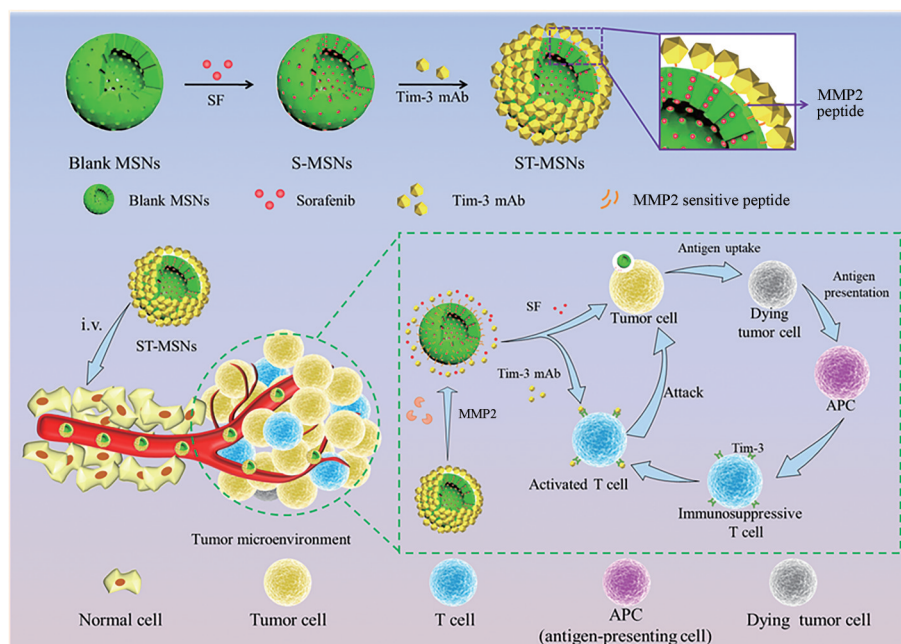
在 HCC 的化学治疗中, 索拉非尼 (sorafenib, SF) 是 FDA 首个批准用于临床的一线抗肝癌化疗药物^[7,8], 其可显著延长患者的中位生存期, 但有限 (3~5 个月)^[9-11]。研究表明, SF 对肿瘤血管的抑制作用能诱导肿瘤区域缺氧加重, 诱导免疫抑制使免疫治疗的效应 T 细胞失活, 从而导致 SF 抗肿瘤效果难以满足预期^[12-14]。目前程序性死亡配体-1 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) 阻断疗法已经用于肝癌的免疫治疗中, 并展现了良好的效果, 但其响应率仍较低。T 细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构域 3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3, Tim-3) 是 PD-L1、细胞毒性 T 细胞相关蛋白-4 (cytotoxic T lymphocyte associate protein-4, CTLA-4) 之外最有前景的免疫检查点之一, 并于 2020 年获批在中国进行临床试验^[15]。研究表明, Tim-3 在 HCC 组织中的异常表达与肿瘤的侵袭、转移密切相关。当 T 细胞表面表达的 Tim-3 与肝癌细胞膜上高表达的半乳糖凝集素-9 (galectin-9) 结合后, 可诱导 T 细胞耗竭抑制抗肿瘤免疫, 是造成肝癌治疗的不良预后的重要因素^[16]。利用 Tim-3 单抗阻断 Tim-3 通路, 可增强 T 细胞免疫, 并促

进 T 细胞产生干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ), 调节 HCC 免疫抑制微环境。因此, 为实现更好的协同抗肝癌效果, SF 与 Tim-3 单抗的联合有望逆转 SF 对 T 细胞的抑制作用, 具有良好的联合应用前景。目前, Tim-3 单抗在肝癌化学免疫联合治疗的研究尚处于早期, 其研究有助于寻找新型化学免疫治疗联用药物组合。

为提高 SF 与 Tim-3 单抗的协同作用, 使用纳米药物递送载体共递送 SF 和 Tim-3 单抗有利于达到最佳的联合治疗效果。目前, 多种纳米载体^[17,18], 如无机纳米载体^[19]、脂质体^[20]和聚合物胶束^[21]等被广泛应用于药物的共递送, 并展现出良好的联合治疗效果。在本研究中, SF 需要被递送至肿瘤细胞, 而 Tim-3 单抗需要被递送至 T 细胞, 因此, 制备能够将共载药物递送到对应作用细胞的纳米载体具有重要的研究价值。基于此, 本课题设计具有金属基质蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) 响应性介孔二氧化硅纳米粒 (mesoporous silica nanoparticles, MSNs) 共装载 SF 和 Tim-3 单抗 (ST-MSNs), Tim-3 单抗通过 MMP2 敏感肽连接于 MSN 表面作为封堵外壳 (示意图 1)。在肿瘤微环境高 MMP2 浓度中 Tim-3 单抗“响应脱壳”, 实现 SF 和 Tim-3 单抗定位分离释放和对肿瘤细胞/T 细胞的药物分别递送。本研究通过细胞共培养实验和肿瘤组织切片, 观察 SF 和 Tim-3 单抗对肿瘤细胞和 T 细胞的递送能力; 通过荷瘤小鼠体内药效实验, 评价 ST-MSNs 的体内药效学性质; 通过测定血清和瘤内的相关细胞因子和效应细胞, 评价 ST-MSNs 调节肿瘤免疫的能力; 通过给药后小鼠体重变化、溶血实验和组织 H&E 染色, 评价 ST-MSNs 的初步安全性。

材料与方法

材料 四乙氧基硅烷 (TEOS, 上海国药化学试剂有限公司); 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB, 天津大茂化学试剂厂); 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES)、香



Scheme 1 Illustration of the preparation of sorafenib (SF) and anti-Tim-3 monoclonal antibody (Tim-3 mAb) co-loaded matrix metalloproteinase 2 (MMP2) responsive mesoporous silica nanoparticles (ST-MSNs) for cancer chemoimmunotherapy. Tim-3 mAb was capped on the surface of ST-MSNs through MMP2 sensitive peptides. When ST-MSNs entered to the tumor microenvironment, the responsively crack of MMP2 sensitive peptide induce the responsively release of Tim-3 mAb and SF, therefore, SF could be delivered to tumor cells and Tim-3 mAb could be delivered to T cells, respectively. The enhanced chemoimmunotherapeutic was achieved

豆素 6 (C6, 上海阿拉丁生物化学技术有限公司); SF (上海 Biochempartner 公司); MMP2 敏感肽、Mal-pep-COOH (南京莱昂生物科技有限公司); 大鼠抗小鼠 Tim-3 单抗、FITC 标记抗小鼠 Tim-3 单抗、Alexa Fluor 647 标记的抗小鼠 Tim-3 单抗 (美国 BioLegend 公司); CD3 抗体 (塞维尔生物科技有限公司); 2-亚氨基硫烷盐酸盐 (Traut's 试剂, 美国 Sigma 公司); 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、牛血清白蛋白 (BSA, 美国 Sigma-Aldrich 公司); DiI 细胞膜红色荧光探针、增强型 BCA 试剂盒 (碧云天生物技术有限公司); 小鼠 IL-12 p70 ELISA 试剂盒 (美国 ABclonal Biotechnology 公司); 所有其他化学品均为分析试剂级。

仪器 TU-1810 型紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); 1200 series 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); 电泳仪、凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 激光共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM, 德国 ZEISS 公司); Multiskan™ GO 全波长酶标仪 (赛默飞世尔科技有限公司); 小动物近红外荧光活体成像系统 (美国 Caliper Life Science 公司); 高分辨透射电镜 (transmission electron microscope, TEM, JEM-1200EX, 日本电子公司); zeta 电位分析仪 (Nano ZS-90, 英国 Malvern 公司); 氮气吸附及比表面

分析仪 (Autosorb-iQ, 美国康塔公司); 傅里叶变换红外光谱法 (Fourier transform infrared, FTIR, 6700 FTIR NXRFT-Raman, 美国赛默飞公司); 热重分析仪 (thermal gravimetric analyzer, TGA, Diamond TG/DTA, 美国 PerkinElmer 公司); 小角度 X 射线散射仪 (X-ray diffraction, XRD, SAXSess mc2, 奥地利安东帕公司); 脱盐柱 (Thermo Scientific-Pierce 公司)。

ST-MSNs 的合成

MSNs 的合成 取 CTAB 0.2 g、H₂O 100 mL 和 2 mol·L⁻¹ NaOH 720 μL 加入 250 mL 烧瓶中, 搅拌并加热至 80 °C, 缓慢滴加 TEOS 1.0 mL (0.05 mL·min⁻¹) 并剧烈搅拌, 滴加结束后继续恒温搅拌 2 h, 离心收集白色固体沉淀物, 用水和乙醇各洗涤 3 次, 真空干燥, 在 550 °C 下煅烧 5 h, 去除 CTAB。

MSNs-NH₂ 的合成 取 MSNs 40 mg 超声分散于蒸馏水中, 加热至 80 °C, 在 MSNs 悬浮液中加入 0.06 mmol APTES, 于 80 °C、N₂ 保护下搅拌反应 1 h, 8 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 收集固体产物, 用乙醇洗涤, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 真空干燥, 得到氨基修饰 MSNs (MSNs-NH₂)。

MSNs-pep 的合成 将 0.02 mmol Mal-pep-COOH 溶解于少量的二甲基甲酰胺中, 加入 0.044 mmol EDC 搅拌 30 min。然后, 向上述 Mal-pep-COOH 溶液中加入 MSNs-NH₂ 40 mg 和 0.044 mmol 三乙胺, 在氮气保护

下反应过夜。反应结束后,用乙醇洗涤,5 000 r·min⁻¹离心10 min,收集沉淀,得MSNs-pep。

S/MSNs-pep的制备 取MSNs-pep 40 mg超声分散于10 mL SF甲醇溶液(1 mg·mL⁻¹)中,室温搅拌24 h,离心分离得到装载SF的MSNs(S/MSNs-pep),甲醇冲洗。采用高效液相色谱法测定离心上清液中SF的浓度。

ST-MSNs的制备 首先使用Traut's试剂对Tim-3单抗进行巯基化。Tim-3单抗与Traut's试剂在磷酸缓冲盐溶液(PBS, pH 7.8~8.0, 含4 mmol·L⁻¹ EDTA)中以摩尔比1:20在室温下反应1 h,用脱盐柱纯化得到巯基化Tim-3单抗。然后,取S/MSNs-pep 40 mg超声分散在含4 mmol·L⁻¹ EDTA的PBS缓冲液(pH 7.8~8.0)中,加入巯基化Tim-3单抗5 mg,4 °C反应过夜,8 000 r·min⁻¹离心去除游离Tim-3单抗,得到ST-MSNs。用增强型BCA试剂盒测定原液和上清液中Tim-3单抗的浓度。同法利用BSA代替Tim-3单抗制备单载SF纳米系统(S-MSNs)。

表征 通过TEM观察纳米粒外观形态及粒径; zeta电位分析仪测定zeta电位;氮气吸附及比表面分析表征孔径及孔体积; FTIR表征载体的构建; TGA测定纳米粒失重百分数; XRD表征MSNs介孔有序性。

酶消化法 用IV型胶原酶酶解MMP2敏感肽,将1 mg·mL⁻¹ MMP2敏感肽与IV型胶原酶在pH 7.4 PBS中37 °C孵育24 h,IV型胶原酶浓度分别设为0、1、10和50 μg·mL⁻¹。采用高效液相色谱法在214 nm波长处测定MMP2敏感肽的含量变化。

SF和Tim-3单抗的体外释放 使用透析法考察SF溶液、S-MSNs和ST-MSNs中SF的释放性质。首先,SF溶液、S-MSNs和ST-MSNs分散于释放介质(含30%异丙醇的PBS溶液,pH 7.4)并置于透析袋中(MWCO 8 000~14 000 Da);然后,将上述透析袋置于10 mL释放介质,于37 °C恒温水浴中震荡(100 r·min⁻¹)。在预定时间点,取出全部透析袋外释放介质,更换新鲜释放介质10 mL。采用高效液相色谱法测定SF的含量。同时各组设置加酶(50 μg·mL⁻¹ IV型胶原酶)对照组,研究MMP2敏感释药性质。

采用离心法考察Tim-3单抗的释放性质。将ST-MSNs分散在1 mL含或不含50 μg·mL⁻¹ IV型胶原酶的PBS(pH 7.4)中,置于37 °C、100 r·min⁻¹的恒温水浴震荡仪。在预定的时间点,2 000 r·min⁻¹离心分离上清液,分别使用增强型BCA试剂盒和聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)方法对Tim-3单抗的释放进行测定。

细胞与细胞培养 人肝癌细胞HepG2和人白血

病T细胞Jurkat使用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基培养。培养条件为37 °C、5% CO₂。小鼠肝癌细胞H22在小鼠腹水中培养。实验中使用的细胞均处于对数生长期。

细胞毒性实验 MSNs、SF、Tim-3单抗、S-MSNs和ST-MSNs的细胞毒作用使用MTT法测定。HepG2细胞以5×10³个/孔细胞数接种于96孔板中,培养12 h使细胞贴壁。H22细胞以1×10⁴个/孔细胞数接种于96孔板中。各孔加入相应浓度的样品,孵育48 h后,每孔加入20 μL MTT溶液(5 mg·mL⁻¹)继续孵育4 h,离心弃除上清液,每孔加入DMSO 150 μL,置摇床上振荡10 min以充分溶解甲臞结晶。使用酶标仪测定570 nm波长下各孔吸光度(A)值,计算各组细胞存活率。

共培养实验 首先制备共载DiI和FITC标记Tim-3单抗的纳米系统(DT-MSNs)用于共培养实验,其中DiI代替SF。HepG2细胞培养过夜,使细胞贴壁后,将Jurkat细胞以2:1的细胞比例加入HepG2细胞中。DT-MSNs与50 μL·mL⁻¹ IV型胶原酶在37 °C孵育4 h后加入共培养的细胞中。培养2 h后,分离Jurkat细胞和HepG2细胞,分别使用CLSM和CytoFLEX流式细胞仪进行定性定量分析。

动物和肿瘤模型 6~8周龄的BALB/c小鼠,雌雄各半,由山东大学医学动物实验中心提供。于小鼠右腋皮下注射含1×10⁶ H22的细胞悬液0.1 mL,建立小鼠荷瘤模型,用于小动物成像及药效实验。所有动物实验均按《中华人民共和国卫生部动物管理办法》和《山东大学动物实验伦理审评》(19030号)执行。通过测量肿瘤的长度(L)和宽度(W),根据公式(1)计算肿瘤体积(V);采用抑瘤率(IR)来评价其抗肿瘤效果,IR按照公式(2)计算。

$$V = (L \times W^2) / 2 \quad (1)$$

$$IR (\%) = (W_c - W_t) / W_c \times 100\% \quad (2)$$

其中,W_t和W_c分别是治疗组和生理盐水对照组的平均肿瘤重量。

小动物活体成像 通过小动物成像实验考察ST-MSNs的体内分布情况。选择具有良好的皮肤穿透性的疏水性染料IR780代替疏水药物SF制备I-MSNs和IT-MSNs,待荷瘤小鼠肿瘤长至200~300 mm³左右时,分别尾静脉注射0.1 mL的IR780溶液、I-MSNs和IT-MSNs(每只30 μg)。在4、8、12和24 h后,将小鼠麻醉放入扫描观察。24 h后将小鼠处死并分离主要脏器及肿瘤,再次扫描观察。结果使用Living Image 3.1处理。

肿瘤切片分析 H22荷瘤小鼠尾静脉注射CT-MSNs(香豆素-6取代SF, FITC标记Tim-3单抗),8 h后

处死小鼠。剥离肿瘤,以 10 μm 厚度进行环切,切片分别用 Alexa Fluor647 标记的 Tim-3 二抗、CD3 抗体和 Cy3 标记的 CD3 二抗进行染色,细胞核用 DAPI 染色。染色后,采用激光共聚焦扫描显微镜成像。

体内抗肿瘤效果 将荷瘤小鼠随机分为 8 组,分别为 NS (每只 0.2 mL)、MSNs (每只 0.2 mL)、SF 溶液、Tim-3 单抗、SF+Tim-3 单抗、T-MSNs (仅装载 Tim-3 单抗的 MSNs)、S-MSNs 和 ST-MSNs 组,每组 6 只。采用尾静脉注射, SF 剂量为 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, Tim-3 单抗剂量为 7.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 每 7 天给药 1 次。每 4 天记录 1 次体重和肿瘤大小。25 天后,所有小鼠眼球采血, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心分离血清。取肿瘤和主要器官,称重。

取肿瘤及主要脏器(心、肝、脾、肺、肾)用 4% 甲醛固定,石蜡包埋。用 H&E 染色检测脏器组织和肿瘤组织的组织学变化。通过 Ki-67 法、H&E 染色法及 TUNEL 染色法对肿瘤细胞增殖及凋亡能力进行评价。

肿瘤中 CD³⁺CD⁴⁺ 细胞和 CD³⁺CD⁸⁺ 细胞的检测 使用流式细胞仪检测肿瘤组织中 CD³⁺CD⁴⁺ 细胞和 CD³⁺CD⁸⁺ 细胞的百分率。取上述肿瘤组织,通过铜网挤压后分散于 pH 7.4 的 PBS 中, 100 $\times\text{g}$ 离心 5 min。取上清液后,于 600 $\times\text{g}$ 离心 5 min,收集沉淀细胞,以 60% Percoll 溶液重新分散, 800 $\times\text{g}$ 离心 25 min 后吸取提纯的 T 细胞层。加入 PBS (pH 7.4) 重新分散, 800 $\times\text{g}$ 离心 5 min,沉淀为提纯的 T 细胞。加入大鼠血清 10 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 30 min,进行相应的抗体标记后,采用流式细胞仪检测。

IFN- γ 和 IL-12 测定 采集血清和新鲜脾脏组织,用于细胞因子浓度的定量测定。采用酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒检测细胞因子 IFN- γ 和白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12) 浓度。取上述小鼠脾脏组织和血清标本。将脾脏组织匀浆后反复冻融破细胞膜。将破细胞膜后的匀浆液于 3 000 $\times\text{g}$ 离心 5 min,取上清检测;血清样品离心后即可检测。

溶血实验 取添加肝素抗凝的新鲜兔血,购自山东大学实验动物中心,通过 1 000 $\times\text{g}$ 离心收集红细胞,并将其重新悬浮在生理盐水中,制成 2% 红细胞悬液。将不同浓度的 ST-MSNs 样品与相同体积的 2% 红细胞悬液混合。设蒸馏水为阳性对照,生理盐水为阴性对照。所有样品在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 3 h, 100 $\times\text{g}$ 离心 5 min,用紫外-可见分光光度计测定上清液中血红蛋白的 A 值。

统计学分析 使用 ANOVA 进行统计分析,定量数据均以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

结果与讨论

1 ST-MSNs 的制备与表征

将 Tim-3 单抗通过 MMP2 敏感肽连接到 S-MSNs 表面制备 ST-MSNs。透射电子显微镜显示空白 MSNs、S-MSNs 和 ST-MSNs 均呈球形,粒径分别为 115、115 和 150 nm (图 1A)。空白 MSNs 显示出良好的介孔结构(图 1A-a)和高度有序的晶格阵列(图 1B)。ST-MSNs (图 1A-c) 与空白 MSNs 相比,孔道结构模糊,表面较粗糙,表明药物的成功装载。与 S-MSNs (图 1A-b) 相比,ST-MSNs 的粒径从 115 nm 增大到 150 nm,而在 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ IV 型胶原酶作用下,ST-MSNs 的粒径又减小到 115 nm (图 1A-d),表明 Tim-3 单抗的成功修饰与响应脱离。

采用 FTIR 技术对 ST-MSNs 的制备过程进行表征(图 1C)。与空白 MSNs 相比,MSNs-NH₂ 在 1 557 cm^{-1} 处有一个新的吸收峰,这归因于酰胺和-NH₂ 弯曲的伸缩振动,证实了 MSNs-NH₂ 表面存在氨基。MSNs-pep 在 1 646 和 1 547 cm^{-1} 处出现新的谱带,分别归因于 MMP2 敏感肽肽键的二级酰胺 C=O 伸缩振动和 N-H 弯曲振动。此外,ST-MSNs 在 2 851 和 2 952 cm^{-1} 处出现了代表 Tim-3 单抗中 C-H 键骨架振动的峰,证实了 Tim-3 单抗的共轭作用,表明 MMP2 敏感肽和 Tim-3 单抗已成功连接到空白 MSNs 的表面。

空白 MSNs 的 N₂ 吸附脱附等温线呈现典型的 IV 型等温线(图 1D)。空白 MSNs 孔径分布较窄,其中孔尺寸为 3.4 nm (图 1E),而 ST-MSNs 中孔尺寸无法检测,说明 SF 装载和 Tim-3 单抗封堵了 ST-MSNs 的介孔。热重分析实验结果也证实 MSNs 系统中有有机物的存在(图 1F),根据失重结果可推测 S-MSNs-pep 中装载了 14.86% SF,ST-MSNs 中装载了 10.5% Tim-3 单抗。

2 SF 和 Tim-3 单抗的响应释放

肿瘤微环境中高表达的 MMP2 触发 SF 和 Tim-3 单抗的定位分离。为评价 MMP2 多肽的敏感性,采用高效液相色谱进行酶解实验(图 2A)。在 HPLC 图谱中观察到两个新的峰 ($t_{\text{R}} = 8.6$ 和 10.8 min),MMP2 敏感肽的峰 ($t_{\text{R}} = 17.4$ min) 随着 IV 型胶原酶浓度的增加而消失,表明 MMP2 敏感肽在 IV 型胶原酶的存在下具有“裂解性”^[22]。

为考察 MMP2 介导的 SF 和 Tim-3 单抗的释放,在有或无 IV 型胶原酶的情况下测定体外释放,酶浓度参考肿瘤微环境中的 MMP2 浓度。在 IV 型胶原酶存在时,ST-MSNs 的 SF 释放在 48 h 内显著高于无酶的 ST-MSNs ($P < 0.01$),表明 IV 型胶原酶触发 SF 的释放(图 2B)。同样,在无 IV 型胶原酶时,6 h 内只有 13.7% 的 Tim-3 单抗被检测到,而在与 IV 型胶原酶孵育前

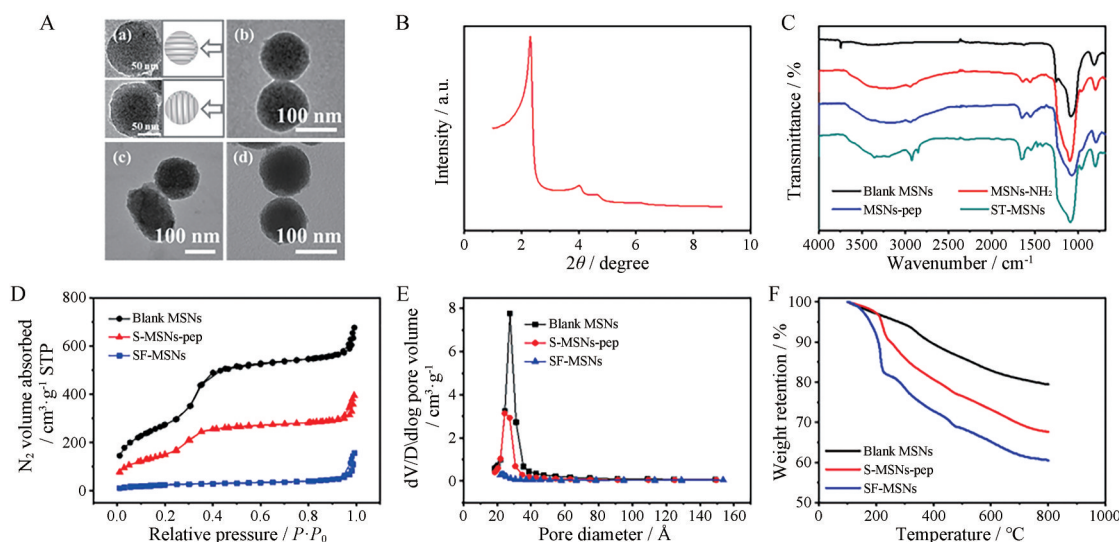


Figure 1 Successful preparation of ST-MSNs. A: Transmission electron microscope (TEM) images of blank MSNs (a), S-MSNs (b), ST-MSNs (c) and ST-MSNs pre-incubated with $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ collagenase type IV for 4 h to cleave SF the peptide linker (d); B: Low angle X-ray diffraction (XRD) patterns; C: Fourier transform infrared (FTIR) spectra; D: Nitrogen adsorption-desorption isotherms (STP, standard temperature and pressure); E: Barrett-Joyner-Halenda pore size distribution; F: Thermal gravimetric analyzer (TGA) curves

15 min, 24.7% Tim-3 单抗从 ST-MSNs 中释放出来, 近 84.3% Tim-3 单抗在 6 h 内被释放 (图 2C)。结果表明, Tim-3 单抗和 MSNs 之间的特异性 MMP2 敏感肽链可以被 IV 型胶原酶有效地切割, 从而致使 Tim-3 单抗的酶敏感“响应脱壳”和快速释放。SDS-PAGE 检测释放的 Tim-3 单抗 (图 2D), 释放的 Tim-3 单抗条带与天然

Tim-3 单抗的条带一致, 说明这种酶催化的多肽降解对 Tim-3 单抗的分子质量没有影响。此外, 使用 Image Lab 软件对条带进行半定量 (图 2E)。 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酶作用 6 h 后 Tim-3 的累积释放量明显高于未加酶组 ($P < 0.01$)。

3 异靶点共递送评价

以人白血病 T 细胞 Jurkat 细胞作为肿瘤浸润 T 细

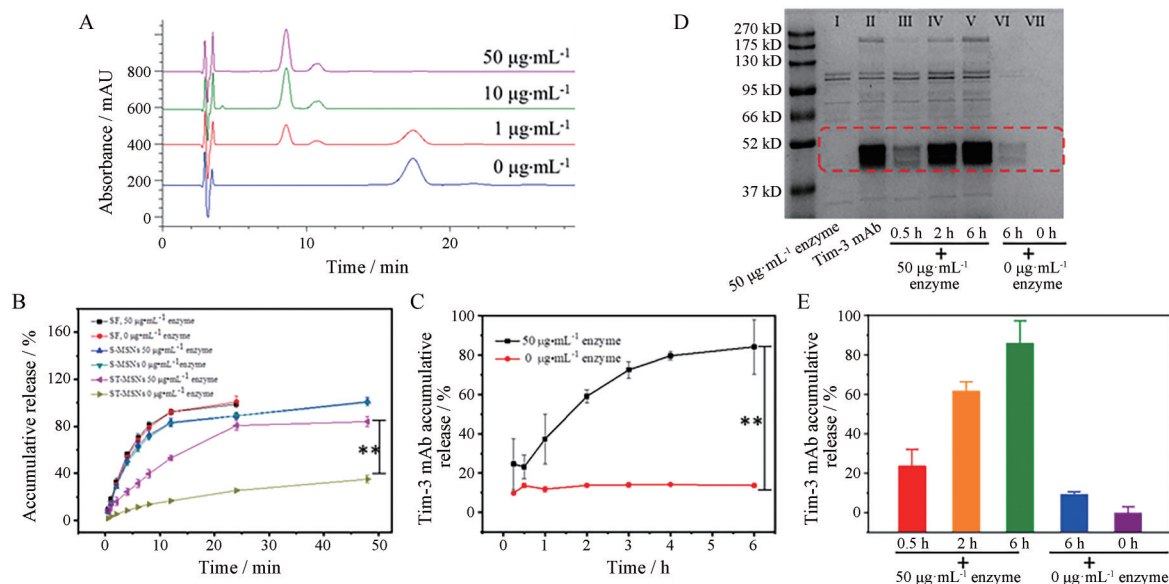


Figure 2 SF and Tim-3 mAb showed enzyme-sensitive *in vitro* release property from ST-MSNs. A: Cleavage assays of the MMP2 sensitive peptide. The HPLC chromatograms of the peptide pre-treated with the collagenase type IV at different concentrations ($0, 1, 10$ and $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in phosphate-buffered saline (PBS) buffer at 37°C for 24 h; B: The release profiles of SF from SF solution, S-MSNs and ST-MSNs in PBS buffer (pH 7.4, containing 30% isopropanol); C: The release profiles of Tim-3 mAb from ST-MSNs in PBS buffer (pH 7.4) with or without the collagenase type IV; D: The representative SDS-PAGE image of Tim-3 mAb released from ST-MSNs in PBS buffer (pH 7.4) with or without the collagenase type IV; E: Semi-quantitative analysis of Tim-3 mAb from SDS-PAGE electrophoresis strip by Image Lab. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$

胞模型, 进行T细胞与肿瘤细胞的共培养实验(图3A)。首先, 通过免疫荧光法测定 Jurkat细胞和HepG2细胞表面Tim-3表达情况(图3B)。结果发现, Jurkat细胞膜上有明显的Tim-3绿色荧光, 而HepG2膜上无明显的Tim-3绿色荧光, 表明Jurkat细胞为Tim-3高表达细胞, 表达量高于HepG2。

Jurkat细胞和HepG2细胞与DT-MSNs共培养2h后, 激光共聚焦显微镜观察到DT-MSNs携带的DiI和Tim-3单抗在HepG2和Jurkat细胞中的分布有明显差异(图3C), 绿色荧光主要出现于Jurkat细胞, 而红色荧光主要出现于HepG2细胞, 这说明DT-MSNs中Tim-3单抗主要靶向于Jurkat细胞, 而DiI主要被HepG2细胞

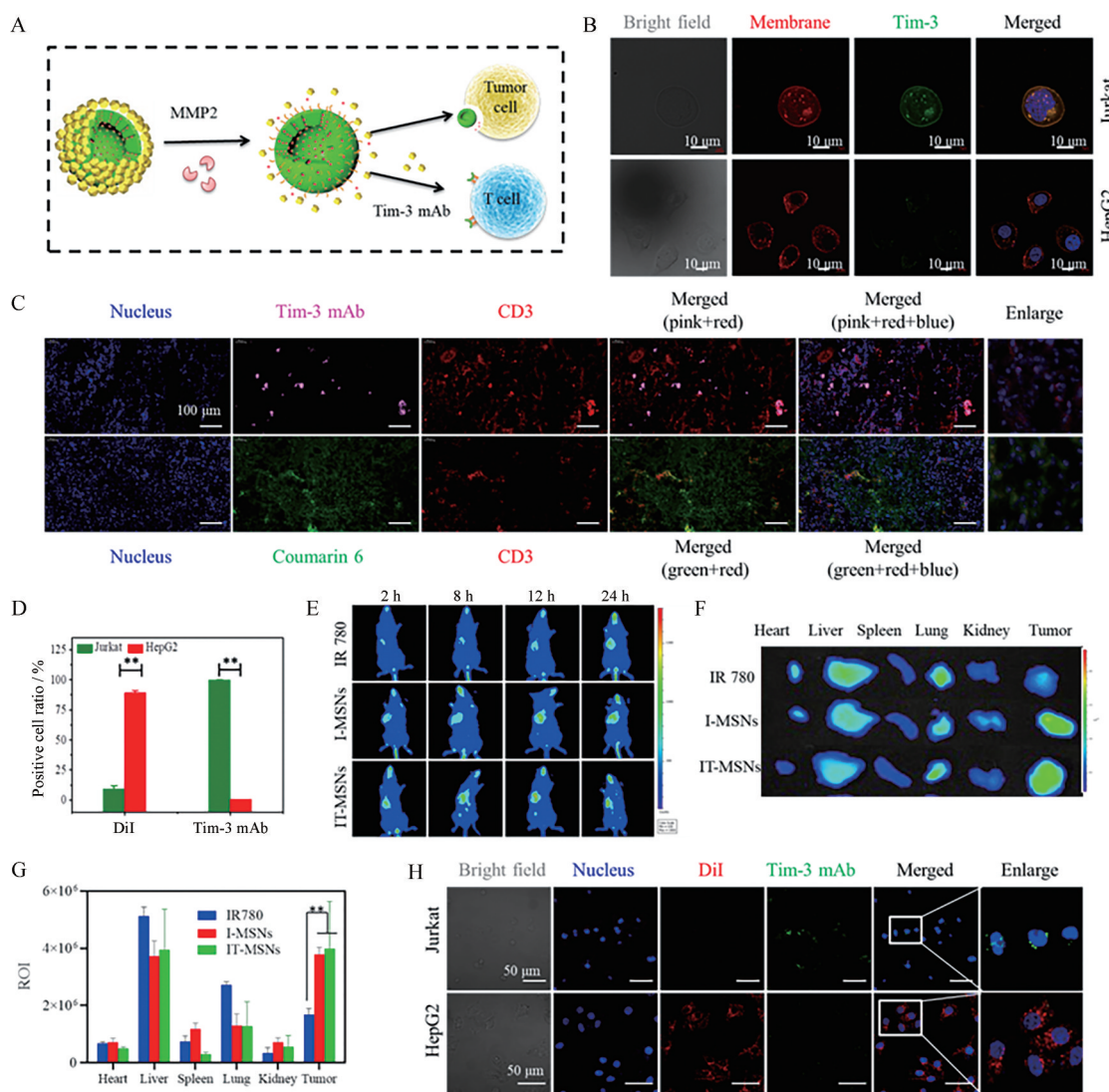


Figure 3 SF and Tim-3 mAb showed xenotype cell delivery to tumor cells and T cells, respectively, by ST-MSNs both *in vitro* and *in vivo*. A: Schematic diagram of ST-MSNs delivery to tumor cells and T cells; B: Tim-3 expression on HepG2 and Jurkat cells. Representative confocal laser scanning microscope (CLSM) images of the Jurkat and HepG2 cells after immunofluorescence staining with the FITC labeled Tim-3 antibody. The cell membranes were stained with DiI, the cell nuclei were stained with Hoechst 33342. Green: Tim-3. Red: Cell membrane. Blue: Cell nucleus. Scale bars indicate 10 μ m; C: CLSM images of tumor cryo-sections. SF was substituted by coumarin 6. Tim-3 mAb was visualized by staining with Alexa Fluor 647 labeled Tim-3 mAb secondary antibody. The T cells were stained with the CD3 antibody and the Cy3 labeled CD3 secondary antibody. Pink: Tim-3 mAb. Green: Coumarin 6. Red: CD3. Blue: Cell nucleus. The magnification was 200 \times . Scale bars indicate 100 μ m; D: The flow cytometry analysis of co-culture assay; E: *In vivo* imaging of mice after administration with free IR780, I-MSNs, and IT-MSNs at different time intervals; F, G: *Ex vivo* imaging (F) and relative fluorescence intensity (ROI, region of interest) (G) of main organs and tumor after mice were sacrificed at 24 h post administration; H: CLSM images of co-culture assay of Jurkat cells and HepG2 cells incubated with DT-MSNs. SF was substituted by DiI. Tim-3 mAb was labeled with FITC. Green: Tim-3. Red: DiI. Blue: Cell nucleus. Scale bars indicate 50 μ m. $n = 3, \bar{x} \pm s. **P < 0.01$

摄取或吸收,表明DT-MSNs具有异靶点药物共递送能力。此外,通过流式细胞仪对DT-MSNs的异靶点递送能力进行定量分析(图3D),Jurkat细胞中FITC阳性细胞比例显著高于HepG2细胞($P < 0.01$),且HepG2细胞中DiI阳性细胞比例显著高于Jurkat细胞($P < 0.01$),与共聚焦定性结果一致。以上结果说明,本课题设计的MMP2酶响应型药物控释系统具有将化疗药物SF递送至肿瘤细胞,而将免疫检验点抑制剂Tim-3单抗递送至T细胞的潜力,可实现药物的异靶点共递送。

采用小动物成像对ST-MSNs的体内分布进行考察(图3E~G)。由图可知,I-MSNs组(包载IR780)和IT-MSNs组(共载IR780和Tim-3单抗)在肿瘤部位的荧光强度显著高于IR780组($P < 0.01$),表明ST-MSNs可以增加SF和Tim-3单抗的肿瘤靶向递送。此外,在小鼠体内考察了ST-MSNs的异靶点递送能力(图3H)。将疏水染料C6装载到MSNs中以代替SF,用AF647标记的Tim-3单抗。小鼠尾静脉注射8 h后,取肿瘤组织进行切片和免疫荧光观察,T细胞使用CD³⁺细胞表示。

如图3H所示,粉色荧光与绿色荧光分布情况不同,表明Tim-3单抗和C6在肿瘤部位实现了分离。粉色荧光与红色荧光具有良好的重合性,表明Tim-3单抗可作用于肿瘤部位的T细胞;绿色荧光与蓝色荧光分布相似,表明C6主要分布于肿瘤细胞,以上结果验证了ST-MSNs的体内异靶点递送能力。

4 ST-MSNs抑瘤效果评价

采用MTT法测定ST-MSNs对HepG2和H22细胞的体外杀伤作用。首先考察Tim-3单抗的体外细胞毒性。游离Tim-3单抗在各实验浓度下,细胞存活率均高于80%,Tim-3单抗对肿瘤细胞增殖无明显影响。然后,分别测定SF、S-MSNs和ST-MSNs对HepG2细胞和H22细胞的体外细胞毒作用(图4A、B)。HepG2细胞和H22细胞存活率均随SF浓度升高而下降,表现为明显的剂量依赖性,与SF组相比,S-MSNs和ST-MSNs在所有浓度下48 h的细胞存活率无显著性差异($P > 0.05$)。ST-MSNs对HepG2细胞的半数抑制浓度($IC_{50} = 10.09 \pm 0.50$)与游离SF的 IC_{50} (9.36 ± 0.16)相似($P > 0.05$),且

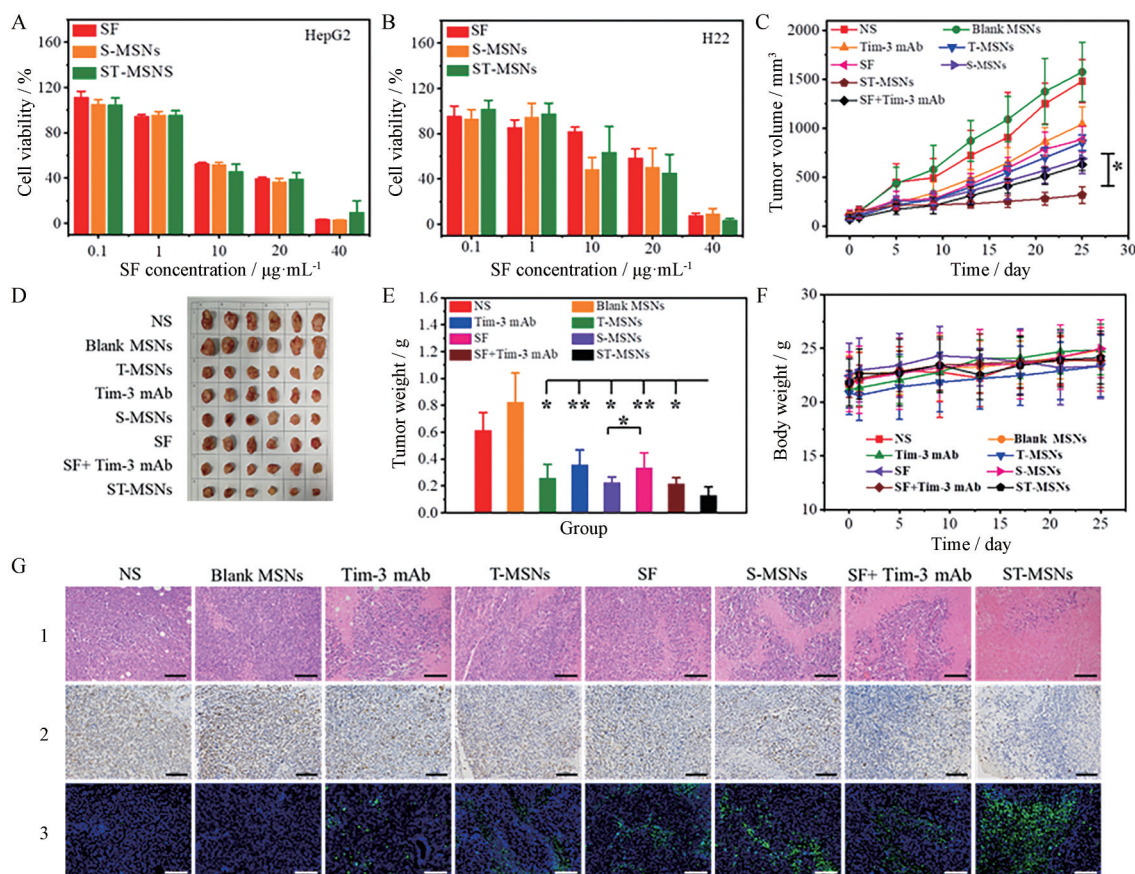


Figure 4 ST-MSNs significantly enhanced *in vitro* and *in vivo* antitumor efficiency. A: Cell viability on the human hepatocarcinoma cell line HepG2; B: Cell viability on the mouse hepatocarcinoma cell line H22; C: The tumor growth curves of tumor-bearing mice; D: Photograph of tumors excised from each treatment group *in vivo* tumor inhibition experiments; E: Variation of tumor weight; F: Mice body weight changes; G: Cell proliferation and apoptosis analyses of tumor tissues. 1: H&E; 2: Ki-67; 3: TUNEL. Scale bars indicate 100 µm. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

与 S-MSNs 组的 IC_{50} (9.23 ± 0.79) 相似, 说明 SF 在 ST-MSNs 中的装载不影响 SF 的细胞毒性。

利用荷 H22 肿瘤 BALB/c 小鼠模型评价 ST-MSNs 的体内抗肿瘤效果 (图 4C)。与 NS 组相比, SF 组、S-MSNs 组、Tim-3 单抗组、T-MSNs 组、SF+Tim-3 单抗溶液组和 ST-MSNs 组均能明显抑制肿瘤生长 ($P < 0.05$)。SF+Tim-3 单抗溶液组的抑瘤率为 65.3%, 明显高于 SF 组 (抑瘤率 45.6%) ($P < 0.05$), 说明 Tim-3 单抗能增强抗肿瘤作用, 同时, ST-MSNs 组 (抑瘤率 79.4%) 与 S-MSNs 组 (抑瘤率 63.7%) 比较也具有明显增强作用 ($P < 0.05$)。与 SF+Tim-3 单抗溶液组相比, ST-MSNs 组的抑瘤率显著提高 ($P < 0.05$), 说明 ST-MSNs 能够增强协同治疗效果。药效结束后, 小鼠肿瘤拍照结果和瘤重结果同样表明 ST-MSNs 具有最佳抗肿瘤效果 (图 4D、E)。同时, 在 ST-MSNs 治疗过程中, 小鼠体重未发生明显变化 (图 4F)。

为进一步评价 ST-MSNs 在动物体内的肿瘤抑制效率, 通过 Ki-67 法、H&E 染色法及 TUNEL 染色法对肿瘤细胞增殖及凋亡能力进行评价 (图 4G)。在 ST-MSNs 治疗后, H&E 染色的肿瘤组织图像 (图 4G-1) 显示, 肿瘤细胞大量消退; Ki-67 图显示 ST-MSNs 组肿瘤细胞增

殖受到明显抑制 (图 4G-2); TUNEL 染色的荧光图像显示 (图 4G-3), FITC 染色的凋亡 DNA 片段化程度最高。

5 ST-MSNs 的免疫治疗评价

为评价肿瘤部位 ST-MSNs 对 T 细胞增殖的影响, 采用流式细胞仪检测肿瘤组织中 $CD^3^+CD^4^+$ T 细胞和 $CD^3^+CD^8^+$ T 细胞的含量 (图 5A、B)。与 NS 组比较, SF 组和 S-MSNs 组肿瘤组织中 $CD^3^+CD^4^+$ T 细胞和 $CD^3^+CD^8^+$ T 细胞明显减少 ($P < 0.05$), 表明 SF 能够明显抑制 T 细胞增殖。Tim-3 单抗组和 T-MSNs 组肿瘤组织中的 $CD^3^+CD^4^+$ T 细胞和 $CD^3^+CD^8^+$ T 细胞百分率明显高于 NS 组 ($P < 0.05$), 表明 Tim-3 单抗对瘤内 T 细胞的增殖有促进作用。SF+Tim-3 单抗组和 ST-MSNs 组 $CD^3^+CD^4^+$ T 细胞百分比与 Tim-3 单抗组和 T-MSNs 组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。SF+Tim-3 单抗组和 ST-MSNs 组肿瘤组织中 $CD^3^+CD^8^+$ T 细胞百分率明显高于 Tim-3 单抗组和 T-MSNs 组 ($P < 0.01$), 表明 SF 与 Tim-3 单抗联合具有逆转 SF 诱导的 T 细胞增殖抑制的能力。与 SF+Tim-3 单抗组相比, ST-MSNs 组 $CD^3^+CD^8^+$ T 细胞比例明显增高, 这可能是由于 ST-MSNs 在体内具有更好的协同递送能力导致。

作为系统性免疫激活的典型标志物, 利用酶联免

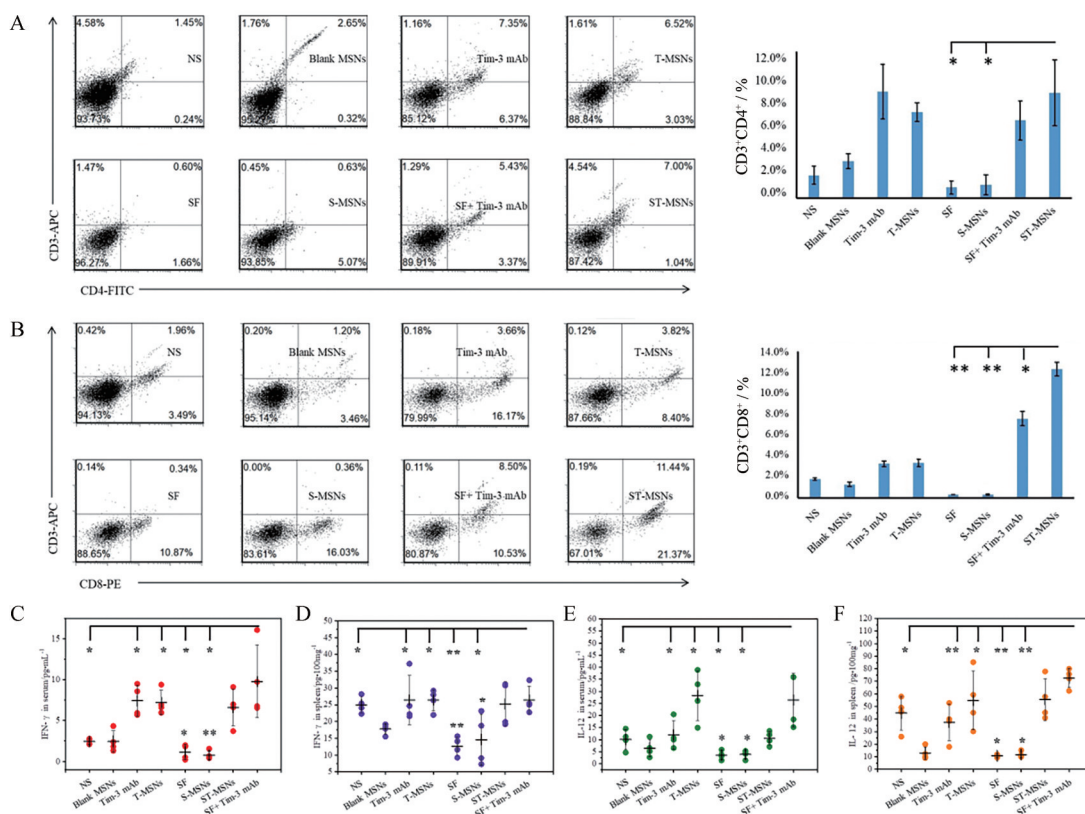


Figure 5 The percentage of $CD^3^+CD^4^+$ cells (A) and $CD^3^+CD^8^+$ cells (B) in tumors after purified by Percoll gradient; C: IFN- γ concentration in serum; D: IFN- γ concentration in spleen tissue; E: IL-12 concentration in serum; F: IL-12 concentration in spleen tissue. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

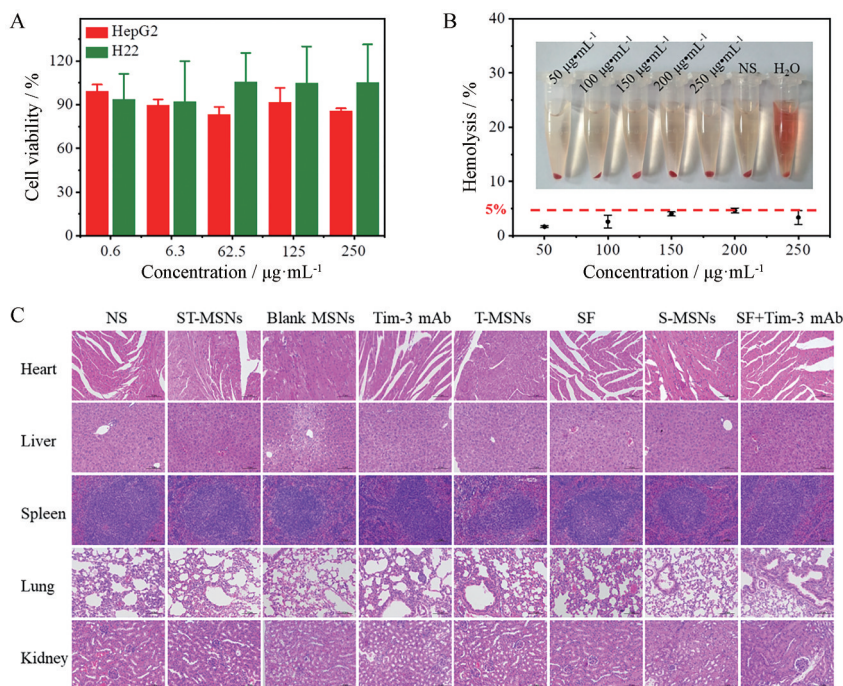


Figure 6 Preliminary safety evaluation. A: *In vitro* cytotoxicity of blank MSNs in the mouse hepatocarcinoma cell line H22 and the human hepatocarcinoma cell line HepG2 for 48 h ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$); B: Hemolysis percentage of red blood cells (RBCs) and the image after RBCs suspension was incubated with ST-MSNs, within an SF range of 50–250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 3 h; C: Representative photomicrographs of H&E stained organs for the mice injected with different groups. The magnification was 200 \times . Scale bars indicate 100 μm

疫吸附实验测定了血清和脾脏中 IFN- γ 和 IL-12 的浓度 (图 5C~F)^[23]。SF 组和 S-MSNs 组小鼠血清和脾脏组织中 IFN- γ 和 IL-12 浓度均显著低于 NS 组 ($P < 0.05$), 表明 SF 治疗后存在明显的免疫抑制作用。联合应用 Tim-3 单抗后, ST-MSNs 组小鼠血清和脾脏中 IFN- γ 和 IL-12 水平明显高于 SF 组和 S-MSNs 组 ($P < 0.05$)。ST-MSNs 组脾脏 IL-12 水平、血清中 IFN- γ 和 IL-12 水平均显著高于 NS 组 ($P < 0.05$)。以上结果表明, ST-MSNs 可提高促炎细胞因子 IFN- γ 和 IL-12 表达水平, 缓解 SF 的系统免疫抑制作用^[24]。

6 ST-MSNs 的初步安全性评价

采用 MTT 法、体外溶血实验和 H&E 染色法评价空白 MSNs 和 ST-MSNs 的初步安全性 (图 6)。在给药浓度下, 空白 MSN 在 HepG2 和 H22 细胞上的存活率均高于 80%, 表明空白 MSNs 在治疗剂量下对 HepG2 和 H22 细胞没有明显的细胞毒作用 (图 6A)。此外, 通过测定释放的血红蛋白在 576 nm 处的 A 值测定红细胞溶血率。SF 质量浓度在 50~250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, ST-MSNs 的溶血率均小于 5%, 且未见明显的红细胞溶血 (图 6B)。此外, 用 ST-MSNs 治疗后的小鼠的主要器官 (心、肝、脾、肺和肾, 图 6C) 的 H&E 染色显示, 与 NS 组相比, 所有器官均未见明显的病理异常。

结论

本研究构建一种“响应脱壳”介孔二氧化硅纳米系统实现 SF 和 Tim-3 单抗的异靶点药物体内共递送, 达到提高肝癌化学免疫联合治疗的目的。本课题研究发现 Tim-3 单抗可以逆转 SF 诱导的免疫抑制, 通过刺激抗肿瘤免疫发挥其协同作用机制, 为临床肝癌治疗提供了具有良好应用前景的化学免疫联用药物组合。ST-MSNs 利用 MMP2 敏感肽修饰的 Tim-3 单抗封堵 MSNs, 制备简单, 可实现 Tim-3 单抗和 SF 在肿瘤部位的响应释放和 T 细胞/肿瘤细胞分别递送, 为临床化学免疫联合治疗药物载体构建提供了一种巧妙的设计思路。

作者贡献: 慕升君负责构思项目、设计实验和完成主要研究; 桑晓负责构思项目和参与抗肿瘤活性实验, 对研究数据进行分析解释和撰写初稿; 牟伟伟参与抗肿瘤活性实验和流式细胞仪检测; 王天琪参与抗肿瘤活性实验; 杨锐对流式细胞术有贡献; 张自鹏对细胞培养有贡献; 刘永军负责构思项目和设计实验; 张娜负责构思项目、设计实验和撰写草稿。

利益冲突: 作者声明本论文没有任何利益冲突。

References

- [1] 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 Cancer J Clin*,

- 2018, 68: 394-424.
- [2] Yan SJ, Liu XY, Wan GH. Review on clinical research progress of immunotherapy in liver cancer [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1749-1754.
- [3] Silva C, Rueda F, Löwik CW, et al. Combinatorial prospects of nano-targeted chemoimmunotherapy [J]. *Biomaterials*, 2016, 83: 308-320.
- [4] Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, et al. Combination therapy in combating cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 38022-38043.
- [5] Meyer T. Treatment of advanced hepatocellular carcinoma: beyond sorafenib [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2018, 3: 218-220.
- [6] Ogasawara S, Chiba T, Ooka Y, et al. Post-progression survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma resistant to sorafenib [J]. *Investig New Drugs*, 2016, 34: 255-260.
- [7] Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16018.
- [8] Galle PR, Forner A, Llovet JM, et al. EASL clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2018, 69: 182-236.
- [9] Schwartz JD. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359: 378-390.
- [10] Sacco R, Granito A, Bargellini I, et al. Clinical outcomes with long-term sorafenib treatment of patients with hepatocellular carcinoma: a multicenter real-life study [J]. *Future Oncol*, 2018, 14: 3049-3058.
- [11] Keating GM. Sorafenib: a review in hepatocellular carcinoma [J]. *Target Oncol*, 2017, 12: 243-253.
- [12] Chen Y, Ramjiawan RR, Reiberger T, et al. CXCR4 inhibition in tumor microenvironment facilitates anti-programmed death receptor-1 immunotherapy in sorafenib-treated hepatocellular carcinoma in mice [J]. *Hepatology*, 2015, 61: 1591-1602.
- [13] Iyer RV, Maguire O, Kim M, et al. Dose-dependent sorafenib-induced immunosuppression is associated with aberrant NFAT activation and expression of PD-1 in T cells [J]. *Cancers*, 2019, 11: 681.
- [14] Lu LC, Lee YH, Chang CJ, et al. Increased expression of programmed death-ligand 1 in infiltrating immune cells in hepatocellular carcinoma tissues after sorafenib treatment [J]. *Liver Cancer*, 2019, 8: 110-120.
- [15] Burugu S, Dancsok AR, Nielsen TO, et al. Emerging targets in cancer immunotherapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 52: 39-52.
- [16] Friedlaender A, Addeo A, Banna G, et al. New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of TIM3 [J]. *ESMO Open*, 2019, 4: e000497.
- [17] Eftekhari RB, Maghsoudnia N, Samimi S, et al. Co-delivery nanosystems for cancer treatment: a review [J]. *Pharm Nanotechnol*, 2019, 7: 90-112.
- [18] Wang Y, Yu H, Zhang D, et al. Co-administration of combrestatin A4 nanoparticles and sorafenib for systemic therapy of hepatocellular carcinoma [J]. *Acta Biomater*, 2019, 9: 229-240.
- [19] Wang Q, Zhang XY, Liao HZ, et al. Multifunctional shell-core nanoparticles for treatment of multidrug resistance hepatocellular carcinoma [J]. *Adv Funct Mater*, 2018, 28: 1706124.
- [20] Mu W, Jiang D, Mu S, et al. Promoting early diagnosis and precise therapy of hepatocellular carcinoma by glypican-3-targeted synergistic chemo-photothermal theranostics [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 23591-23604.
- [21] Wan X, Beaudoin JJ, Vinod N, et al. Co-delivery of paclitaxel and cisplatin in poly(2-oxazoline) polymeric micelles implications for drug loading, release, pharmacokinetics and outcome of ovarian and breast cancer treatments [J]. *Biomaterials*, 2019, 192: 1-14.
- [22] Mu S, Liu Y, Wang T, et al. Unsaturated nitrogen-rich polymer poly(l-histidine) gated reversibly switchable mesoporous silica nanoparticles using "graft to" strategy for drug controlled release [J]. *Acta Biomater*, 2017, 63: 150-162.
- [23] Liang J, Wang H, Ding W, et al. Nanoparticle-enhanced chemoimmunotherapy to trigger robust antitumor immunity [J]. *Sci Adv*, 2020, 6: eabc3646.
- [24] He Q, Zhang Z, Liu H, et al. Relieving immunosuppression during long-term anti-angiogenesis therapy using photodynamic therapy and oxygen delivery [J]. *Nanoscale*, 2020, 12: 14788-14800.