

## pH 敏感穿膜肽修饰的载 $\alpha$ -半乳糖神经酰胺的脂质体 免疫作用机制的初步研究

张梦梦, 杨玉婷, 余倩雯, 何 勤\*

(四川大学华西药学院, 靶向药物与传递系统教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

**摘要:** 通过制备 pH 敏感穿膜肽 TH [AGYLLGHINLHHLAHL (Aib) HHIL-Cys] 修饰的载免疫佐剂  $\alpha$ -半乳糖神经酰胺的脂质体 (TH modified liposome loaded with  $\alpha$ -galactosylceramides,  $\alpha$ GC-TH-Lip), 并研究其对荷瘤小鼠免疫功能的影响及其作用机制。采用薄膜分散-探头超声法制备脂质体, 测定 TH 修饰的脂质体 (TH peptide-modified liposome, TH-Lip) 体外被小鼠树突状细胞 (dendritic cell, DC) 系 DC2.4 细胞的摄取; 给药后荷瘤小鼠体内抗肿瘤相关免疫细胞的激活、促进 DC 细胞成熟的程度以及辅助性 T 细胞 (helper T cell, Th) 的分化情况。结果显示, TH-Lip 在体外被 DC2.4 细胞的摄取量是聚乙二醇修饰的脂质体 (polyethylene glycols modified liposome, PEG-Lip) 的 1.48 倍; 给药后荷瘤小鼠体内自然杀伤性 T 细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞数量分别为  $(0.43 \pm 0.048)\%$ 、 $(12.80 \pm 0.50)\%$  和  $(3.13 \pm 0.26)\%$ , 成熟 DC 细胞达到  $(2.30 \pm 0.22)\%$ , 细胞毒性 T 淋巴细胞的数量达到  $(32.30 \pm 0.80)\%$ , 较游离  $\alpha$ GC 组有显著性差异;  $\alpha$ GC-TH-Lip 对 Th1 细胞分化的诱导效应最强, 对 Th2 细胞的分化无明显促进作用。此结果表明, 该  $\alpha$ GC-TH-Lip 能够提高小鼠的免疫活性, 增强  $\alpha$ -半乳糖神经酰胺的作用效果, 促进淋巴细胞更多地向细胞免疫的方向分化, 从而达到更好的抗癌免疫治疗作用。

**关键词:** 穿膜肽; 免疫佐剂; 脂质体; 作用机制; 肿瘤; 免疫治疗

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 04-0634-07

## Preliminary study on immune mechanisms of pH-sensitive transmembrane peptide modified liposome loaded with $\alpha$ -galactosylceramides

ZHANG Meng-meng, YANG Yu-ting, YU Qian-wen, HE Qin\*

(Key Laboratory of Drug Targeting and Drug Delivery Systems, Ministry of Education, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** In this study, we aim to develop a pH-sensitive transmembrane peptide TH (AGYLLGHINLHHLAHL(Aib)HHIL-Cys) modified liposome loaded with immunoadjuvant  $\alpha$ -galactosylceramides ( $\alpha$ GC-TH-Lip) and then investigate its effect on the immune function in tumor-bearing mice and its immune mechanism of action. The liposomes were prepared by membrane dispersion-probe ultrasound method and the size and zeta potential of  $\alpha$ GC-TH-Lip were also characterized. The uptake of TH modified liposomes (TH-Lip) and polyethylene glycols modified liposomes (PEG-Lip) in DC2.4 cells *in vitro* were analyzed and the activation of natural killer T (NKT), natural killer (NK) and macrophages in tumor-bearing mice were also measured after systemic administrations of samples. Besides, the degree of maturation of dendritic cell (DC), the number of cytotoxic T lymphocyte (CTL) and the differentiation of helper T cell (Th) were determined. The results showed the particle size of  $\alpha$ GC-TH-Lip was about 117.9 nm and the zeta potential was about  $-8.37$  mV under

收稿日期: 2016-12-22; 修回日期: 2017-01-18.

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (81690261).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-28-85502532, E-mail: qinhe@scu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1204

the neutral condition (pH 7.4) and the  $\alpha$ GC-TH-Lip had high serum stability in 50% fetal bovine serum. The uptake of TH-Lip in DC2.4 cells *in vitro* was 1.48 times higher than that of PEG-Lip. After systemic administrations of the samples, the numbers of NKT cells, NK cells and macrophages in tumor-bearing mice were  $(0.43 \pm 0.048) \%$ ,  $(12.80 \pm 0.50) \%$  and  $(3.13 \pm 0.26) \%$ , respectively, and the number of mature DCs and CTLs reached  $(2.30 \pm 0.22) \%$  and  $(32.30 \pm 0.80) \%$  separately, which was significantly different from the control group. Finally, we discovered the  $\alpha$ GC-TH-Lip had the strongest induction effect on the differentiation of Th1 cells, while barely promote the differentiation of Th2 cells. All the above results demonstrated that the  $\alpha$ GC-TH-Lip can improve the immune the activity of mice, enhance the effect of  $\alpha$ -galactosylceramide and promote the differentiation of lymphocytes toward the direction of cellular immunity, which consequently achieve a better anti-cancer immune activity.

**Key words:** cell-penetrating peptide; immunoadjuvant; liposome; mechanism; cancer; immunotherapy

恶性肿瘤是目前人类死亡的主要原因之一, 已经成为危害人类生命健康的一类主要疾病<sup>[1]</sup>。科学家们一直在努力探索各种方式来治疗肿瘤, 但是, 在临床上, 肿瘤的治愈率仍然没有显著的提高。随着肿瘤生物学与肿瘤免疫学基础理论的发展, 肿瘤免疫治疗的研究也突飞猛进。肿瘤免疫治疗是将免疫相关效应分子或免疫细胞输入机体内, 通过提高肿瘤细胞的免疫原性, 增强免疫效应细胞对肿瘤细胞的杀伤作用, 同时刺激和增强机体的抗肿瘤免疫反应, 进而利用机体免疫系统的作用来杀伤肿瘤细胞和抑制肿瘤生长。

手术治疗、放化疗以及靶向治疗等传统的癌症治疗方式均具有不同程度的局限性。手术治疗是常用的癌症治疗手段之一, 是初期肿瘤的首选治疗方法, 但对于敏感部位的肿瘤, 手术危险性大、成功率低, 而且对于已经发生转移的肿瘤, 手术治疗更是无能为力。放疗和化疗是目前癌症治疗最常见的方式, 能够大面积杀伤肿瘤细胞, 但其对机体的正常组织细胞也会产生不同程度杀伤作用, 引起不良反应。靶向治疗效果明显、耐受性好, 但是肿瘤细胞很快就会对其产生耐药性<sup>[2]</sup>。因此, 传统的癌症治疗方式不但有各种不良反应, 而且不能有效防止肿瘤的复发。肿瘤免疫治疗则是通过刺激和增强机体的自身免疫系统来治疗肿瘤, 因此具有反应快、不良反应小等优点<sup>[3]</sup>。此外, 免疫治疗因免疫系统具有良好的记忆能力, 容易形成记忆型免疫, 对防止肿瘤复发有显著优势。因此, 肿瘤免疫治疗与传统癌症治疗方式相比, 具有反应快、不良反应小和疗效持久等优势<sup>[4]</sup>, 是继手术治疗、放化疗及靶向治疗后又一种新的肿瘤治疗方式, 成为战胜恶性肿瘤的新希望。

$\alpha$ -半乳糖神经酰胺 ( $\alpha$ -galactosylceramide,  $\alpha$ GC) 是从海洋生物的海绵体中提取分离出来的鞘糖脂, 是一种免疫调节剂, 目前在临床试验中将其作为一种

抗癌剂, 对多种实体瘤具有显著疗效<sup>[5]</sup>。 $\alpha$ GC 与树突状细胞 (dendritic cells, DC) 上的 CD1d 分子结合后, 能够激活自然杀伤性 T 细胞 (natural killer T cells, NKT)<sup>[6]</sup>。NKT 细胞对肿瘤细胞有直接杀伤作用, 此外, NKT 细胞还能通过分泌白细胞介素-2 和干扰素  $\gamma$  (interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 等细胞因子诱导机体抗肿瘤免疫细胞如自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK)、CD8<sup>+</sup>T 细胞和巨噬细胞的活化。活化后的 CD8<sup>+</sup>T 细胞和 NK 细胞可通过分泌颗粒酶、穿孔素及表达 FasL 来杀伤肿瘤细胞<sup>[7]</sup>。同时,  $\alpha$ GC 诱导 NKT 细胞产生的 IFN- $\gamma$  还可增加对肿瘤具有特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 产生, 其对于肿瘤转移活性具有抵抗作用<sup>[8]</sup>。因此,  $\alpha$ GC 作为一种抗癌剂具有显著疗效。但是, 已有研究表明, 多次注射  $\alpha$ GC 后, GC 对 NKT 细胞的激活能力明显下降, 导致 NKT 细胞的脱敏失活, 严重限制了  $\alpha$ GC 在抗肿瘤治疗方面的应用, 而将其包裹于脂质体后可以避免这一现象的发生<sup>[9]</sup>。

脂质体具有良好的靶向性和生物相容性, 常作为传递各类药物的载体<sup>[10]</sup>。普通脂质体很容易从机体内清除, 利用聚乙二醇 [poly(ethylene glycol), PEG] 对脂质体进行修饰后, 能够显著延长脂质体在体内的循环时间, 从而较多地蓄积在作用部位发挥作用<sup>[11]</sup>。为了进一步将更多的药物递送入细胞内, 可对脂质体表面进行配体修饰<sup>[12]</sup>。TH [AGYLLGHINLHHLAHL (Aib) HHIL-Cys] 是一种具有 pH 敏感性的穿膜肽, 在微酸环境下可以高效地介导脂质体入胞。在本实验室的前期研究中, 曾将 TH 修饰于脂质体的表面而得到能够在肿瘤部位深层穿透的脂质体<sup>[13]</sup>。基于此, 本文将免疫佐剂  $\alpha$ GC 包载于 TH 修饰的脂质体上, 对其提高荷瘤小鼠的免疫功能的能力及具体的免疫作用机制进行了初步的研究。

## 材料与方法

**试剂与药物**  $\alpha$ -半乳糖神经酰胺 ( $\alpha$ GC, 美国 Cayman 公司); 卵磷脂 (SPC, 上海泰威化工公司); 胆固醇 (CHO, 成都科隆化学品有限公司); RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (FBS, 美国 Hyclone 公司); TH (AGYLLGHINLHHLAHL (Aib) HHIL-Cys, 中国肽有限公司); 12-distearoyl-*sn*-glycero-3-phospho-ethano-lamine-*N*-methoxy (polyethylene glycol)-2000 (DSPE-PEG<sub>2000</sub>)、1,2-dis-tearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethalamine *N*-[maleimide (polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal) (上海艾韦特医药科技有限公司); 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine *N*-(car-boxyfluorescein) (CFPE, 美国 Avanti Polar Lipids 公司); Anti-Mouse alpha GalCer: CD1d 复合物抗体、异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的抗小鼠 CD86、藻红蛋白 (PE) 标记的抗小鼠 CD11c、FITC 标记的抗小鼠 CD8 $\alpha$ 、FITC 标记的抗小鼠 NK1.1、FITC 标记的抗小鼠 CD14 (美国 eBioscience 公司); 白细胞介素-2 (IL-2) ELISA 试剂盒、白细胞介素-4 (IL-4) ELISA 试剂盒 (美国 R&D Systems 公司); 其他试剂均为市售分析纯。

**仪器** 旋转蒸发仪 (RE-200B, 上海亚荣生化仪器厂); 恒温空气摇床 (ZHWHY-100B, 上海智城医疗仪器厂); 激光粒度仪/zeta 电位分析仪 (Nano ZS90, 英国 Malvern 公司); 超声波细胞粉碎机 (JY92-II, 宁波新芝科器研究所); 流式细胞仪 (Cytomics<sup>TM</sup> FC500, 美国 Beckman Coulter 公司)。

**DSPE-PEG2000-TH 合成** 将 DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal (3  $\mu$ mol) 和 TH (4.5  $\mu$ mol) 溶解于氯仿和甲醇的混合液 (2 : 1, v/v), 该混合液中含有三乙胺 (6  $\mu$ mol)。室温下, 将上述混合溶液在氩气保护下避光反应 24 h, 采用薄层析色谱法检测 (展开剂: 二氯甲烷/甲醇=10 : 1), 可见原料 DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal 点基本消失。过滤有机溶剂, 并通过旋转蒸发将滤液蒸发。将残余物用氯仿再次溶解, 并再次过滤以纯化产物。所得的产物即为 DSPE-PEG2000-TH<sup>[13]</sup>。

**脂质体的制备** 薄膜分散-探头超声法<sup>[14]</sup>制备脂质体。精密称取处方量的脂质材料 SPC、Chole、DSPE-PEG<sub>2000</sub> (摩尔比 33 : 59 : 8) 溶于氯仿和甲醇的混合溶液 (2 : 1, v/v), 用于制备空白长循环脂质体 (PEG-Lip); 另精密称取处方量的脂质材料 SPC、Chole、DSPE-PEG<sub>2000</sub> 及 DSPE-PEG<sub>2000</sub>-TH (摩尔比 33 : 59 : 2 : 6) 两份, 溶于氯仿和甲醇的混合溶液 (2 : 1, v/v), 其中一份加入适量的  $\alpha$ GC ( $\alpha$ GC 终质量

浓度为 0.05 mg·mL<sup>-1</sup>), 用于制备 TH 修饰的  $\alpha$ GC 脂质体 ( $\alpha$ GC-TH-Lip), 另一份不加药物用于制备 TH 修饰的空白脂质体 (TH-Lip)。进一步将上述脂质材料和药物加至 25 mL 茄形瓶中, 在 37 °C 条件下通过旋转蒸发除去氯仿至形成薄膜, 真空干燥过夜。加入 10 mmol·L<sup>-1</sup> Hepes 缓冲液 (pH 7.4) 1 mL, 放入摇床中, 37 °C 水化 30 min, 在冰浴条件下探头超声 (80 W, 100 s)。制备的脂质体在 4 °C 条件下保存备用。对于 CFPE 标记的脂质体, 将适量 CFPE 氯仿溶液加入至脂质材料中共同旋蒸形成薄膜, 使得所形成的脂质体中 CFPE 终质量浓度为 15  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>。

**脂质体的表征及血清中稳定性的研究** 将制备得到的脂质体在不同 pH 条件 (pH 7.4 及 6.0) 下进行粒径和电位的检测。在 50% 胎牛血清环境中, 通过 48 h 内对其浊度测定 (750 nm 处), 考察脂质体的稳定性。

**$\alpha$ GC 溶液的制备** 将  $\alpha$ GC 溶解在 10 mmol·L<sup>-1</sup> Hepes 溶液 (含 5.6% 蔗糖、0.75% 组氨酸和 0.5% Tween 20) 中, 80 °C 加热 3 min<sup>[15]</sup>即可。

**TH 修饰在脂质体被 DC2.4 细胞摄取过程中的作用** 小鼠树突状细胞系 DC2.4 细胞用含有 10% 胎牛血清、100 u·mL<sup>-1</sup> 链霉素和 100 u·mL<sup>-1</sup> 青霉素的 RPMI-1640 培养基在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养<sup>[16]</sup>。将 DC2.4 细胞接种到 6 孔板中, 每孔的细胞数为 1×10<sup>6</sup> 个, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h 后, 加入 CFPE 标记 TH-Lip 和 PEG-Lip。每孔中 CFPE 的质量浓度为 2  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>, 孵育 6 h 后将培养基吸出, PBS 漂洗 3 次, 然后用胰酶消化, 离心, 用 PBS 0.3 mL 重悬细胞, 流式细胞仪测定细胞的荧光强度。

**给药后荷瘤小鼠体内抗肿瘤相关免疫细胞的激活情况检测** 取 6~8 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠 (成都达硕实验动物有限公司, 生产许可证号 SCXK (川) 2015-030) 12 只, 用 4% 水合氯醛腹腔麻醉, 刮其背部右侧下方毛, 于皮下接种细胞数为每毫升 5×10<sup>7</sup> 个 B16F10 细胞悬液 200  $\mu$ L。待实体瘤体积长到约 50~100 mm<sup>3</sup> 时, 随机分为 3 组: Hepes、Free  $\alpha$ GC 和  $\alpha$ GC-TH-Lip 组, 每组 4 只。各组小鼠分别在 0 天和第 3 天尾静脉注射给予各对应组的药物, 给药量为 200  $\mu$ L。在第 2 次给药 7 天后, 处死小鼠并收集脾脏, 利用小鼠脾脏组织解离试剂盒制备脾细胞悬液。使用荧光标记抗体标记特异性细胞类型如下: PE 标记的抗小鼠 CD3e 和 FITC 标记的抗鼠 NK1.1 抗体标记 NKT 细胞; FITC 标记的抗鼠 NK1.1 标记 NK 细胞; FITC 标记的抗小鼠 CD14 标记巨噬细胞; PE 标记

抗小鼠 CD11c 和 FITC 标记的抗小鼠 CD86 标记成熟的 DC 细胞; FITC 标记的抗小鼠 CD8 $\alpha$  标记 CTL 细胞。分别将标记后的脾细胞悬液用流式细胞仪测定。

**IL-2 和 IL-4 的测定** 动物分组和给药同上, 在第 3 天和第 6 天对小鼠心脏穿刺取血, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取上清液。用 IL-2 和 IL-4 ELISA 试剂盒测量血清中 IL-2 和 IL-4 的含量。

**数据统计分析** 实验数据用均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析, 组间两两比较采用双侧 *t* 检验;  $P<0.05$  说明差异有显著性意义。

## 结果

### 1 脂质体的表征及血清中稳定性

$\alpha$ GC-TH-Lip 在不同 pH 条件下的粒径及电位情况见表 1。从表 1 可知, 在中性条件下 (pH 7.4),  $\alpha$ GC-TH-Lip 的粒径约 117.9 nm, zeta 电位为 -8.37 mV 左右。而在微酸性环境中 (pH 6.3),  $\alpha$ GC-TH-Lip 的粒径没有明显变化, 但 zeta 电位从负电状态翻转成为正电状态, 有利于入胞, 说明 TH 能够在脂质体表面有效地修饰并发挥 pH 敏感的作用。

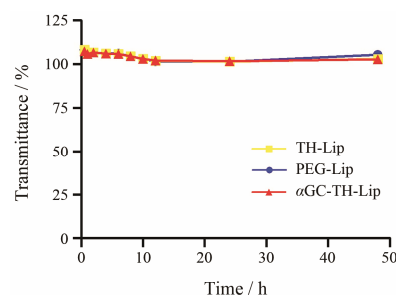
**Table 1** Size and zeta potential of  $\alpha$ GC-TH-Lip under different pH conditions.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ .  $\alpha$ GC:  $\alpha$ -Galactosylceramides; TH: AGYLLGHINLHHLAHL(Aib)HHIL-Cys; Lip: Liposome; PDI: Polydispersity index

Liposome	Size/nm	PDI	Zeta-potential /mV
$\alpha$ GC-TH-Lip (pH 6.3)	118.2 $\pm$ 4.7	0.198 $\pm$ 0.03	3.48 $\pm$ 0.5
$\alpha$ GC-TH-Lip (pH 7.4)	117.9 $\pm$ 3.6	0.236 $\pm$ 0.05	-8.37 $\pm$ 0.4

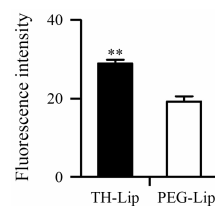
此外, 为了考察脂质体的稳定性, 将  $\alpha$ GC-TH-Lip、TH-Lip 和 PEG-Lip 分别放入 50% 胎牛血清中, 于 750 nm 处检测其在 48 h 内的浊度变化, 如图 1 所示。3 种脂质体, 在 48 h 内浊度的变化不明显, 没有显著性差异, 说明各脂质体在血清环境中较稳定存在, 不会发生明显的聚集或蛋白吸附。

### 2 TH 体外对 DC2.4 细胞摄取脂质体的影响

$\alpha$ GC 能够激活 NKT 细胞, NKT 细胞通过释放大量的 IFN- $\gamma$  来诱导抗肿瘤相关免疫细胞的活化。NKT 细胞的激活需要抗原提呈细胞 (antigen processing cell, APC) 的参与, 而 DC 细胞是动物体内最强的 APC, 也是调节免疫应答的专职 APC<sup>[17]</sup>。将荧光标记的 TH-Lip 或 PEG-Lip 与 DC2.4 细胞共同孵育一段时间, 测定其被摄取后的细胞荧光强度。由 DC2.4 细胞对不同脂质体的摄取结果 (图 2) 可知, DC2.4 细胞对 TH-Lip 的摄取是 PEG-Lip 的 1.48 倍, 表明 TH 修饰



**Figure 1** The variations in turbidity (represented by transmittance) of  $\alpha$ GC-TH-Lip, TH-Lip and PEG-Lip in 50% FBS within 48 h at 37  $^{\circ}$ C.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . PEG: Polyethylene glycol; FBS: Fetal bovine serum



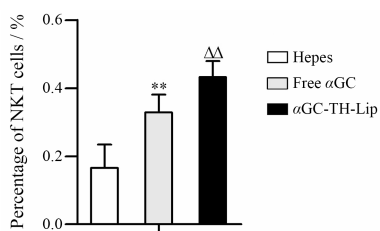
**Figure 2** The quantitative result of the fluorescence intensity in DC2.4 cells incubated with TH-Lip or PEG-Lip.  $n=5$ ,  $\bar{x}\pm s$ . \*\* $P<0.01$  vs PEG-Lip group

脂质体后能够促进脂质体被 DC2.4 细胞摄取, 即促进脂质体被 APC 摄取。

### 3 注射 $\alpha$ GC-TH-Lip 后荷瘤小鼠体内 NKT 细胞、NK 细胞和巨噬细胞的激活

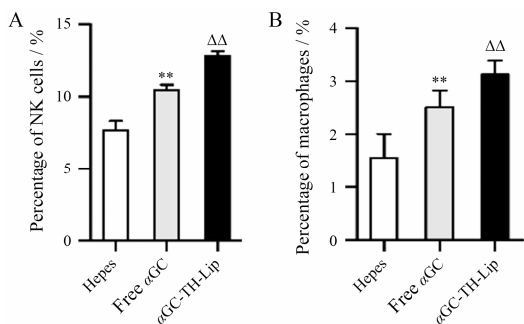
**3.1 NKT 细胞的激活**  $\alpha$ GC 与 DC 细胞上的 CD1d 分子结合后, 能够激活 NKT 细胞, 对肿瘤细胞有直接杀伤作用, 此外, NKT 细胞还能通过分泌 IFN- $\gamma$  细胞因子激活在固有免疫中起重要作用的 NK 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞及 CD8<sup>+</sup>T 细胞等, 进一步发挥抗肿瘤的作用。T 细胞表面既表达 T 细胞表面标志, 如 CD3、TCR $\alpha\beta$ , 又表达 NK 细胞的表面标志, 如 NK1.1、CD16、CD56 等<sup>[18]</sup>。故选择 NKT 细胞上表达的 CD3 和 NK1.1 作为 NKT 细胞的标志, 测定 NKT 细胞的数量, 结果如图 3。由图 3 可知,  $\alpha$ GC-TH-Lip 组和游离  $\alpha$ GC 组的 NKT 细胞数量均高于 Heps 组, 表明  $\alpha$ GC 确实能够激活 NKT 细胞, 而  $\alpha$ GC-TH-Lip 组的 NKT 细胞数量明显高于游离  $\alpha$ GC 组, 说明  $\alpha$ GC 包载于脂质体后激活 NKT 细胞的作用增强, 可发挥更强的抗肿瘤作用。

**3.2 NK 细胞和巨噬细胞的激活** NKT 细胞通过分泌 IFN- $\gamma$  和 IL-2 等细胞因子诱导机体抗肿瘤免疫细胞 NK 细胞和巨噬细胞的活化, 消除循环的肿瘤细胞并抑制原发肿瘤的转移, 因此 NK 细胞和巨噬细胞的激活对肿瘤的免疫治疗具有重要作用且能间接反映 NKT 细胞的激活情况。分别用带有 FITC 标记的抗鼠



**Figure 3** The relative amount of NKT cells at day 7 after twice systemic administrations of samples.  $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs Hepes group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs free  $\alpha$ GC group

NK1.1 抗体和 FITC 标记的 CD14 抗体对 NK 细胞和巨噬细胞进行标记后, 流式细胞仪测定结果如图 4 所示。 $\alpha$ GC-TH-Lip 组的 NK 细胞和巨噬细胞的量均最高, 较游离  $\alpha$ GC 组有显著差异, 这表明将  $\alpha$ GC 包载于 TH 修饰的脂质体后能增强  $\alpha$ GC 免疫方面的作用, 即能激活更多的 NK 细胞和巨噬细胞, 增强机体的免疫功能, 发挥更强抗肿瘤作用。另外,  $\alpha$ GC-TH-Lip 组、游离  $\alpha$ GC 组的 NK 细胞和巨噬细胞的激活结果具有一致性, 均与 NKT 细胞的激活效果一致, 验证了  $\alpha$ GC 对 NKT 细胞的激活作用, 继而 NKT 细胞释放 IFN- $\gamma$  激活 NK 细胞和巨噬细胞, 发挥其肿瘤免疫治疗作用。

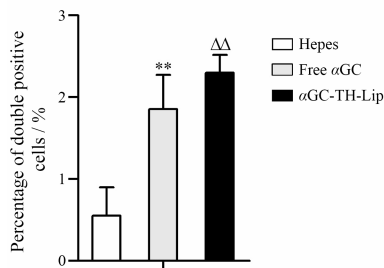


**Figure 4** Relative amount of immune cells (NK cells, macrophages) in spleens at day 7 after twice systemic administrations of samples. A: The relative amount of NK cells in spleens. B: The relative amount of macrophages in spleens.  $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs Hepes group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs free  $\alpha$ GC group

#### 4 $\alpha$ GC-TH-Lip 促进荷瘤小鼠 DC 细胞成熟的程度

DC 细胞是调节免疫应答的专职 APC, 未成熟的 DC 细胞具有较强的迁移能力, 而成熟的 DC 细胞则能有效激活初始型 T 细胞, 是启动、调控和维持免疫应答的关键。成熟的 DC 细胞表达共刺激分子 B7-1 和 B7-2 (CD86), 以及 CD1a、CD11c 等, 同时高表达主要组织相容性复合体和黏附分子<sup>[19]</sup>。因此选择成熟的 DC 细胞上表达的 CD86 和 CD11c 作为 DC 细胞的标志。本文用带有 PE 标记的抗鼠 CD86 和 FITC 标记的 CD11c 抗体来对脾脏的脾细胞进行标记, 并

用流式细胞仪测定。结果如图 5 所示, 双阳性细胞同时表达 CD86 和 CD11c, 代表成熟的 DC 细胞。 $\alpha$ GC-TH-Lip 组和游离  $\alpha$ GC 组双阳性细胞的百分比较 Hepes 组均有显著性差异, 表明注射  $\alpha$ GC 对于促进 DC 细胞的成熟有极强的刺激作用。同时  $\alpha$ GC-TH-Lip 组的双阳性细胞百分比显著高于游离  $\alpha$ GC 组, 即  $\alpha$ GC-TH-Lip 组能促进更多的 DC 细胞成熟, 这是由于将  $\alpha$ GC 包载于 TH 修饰的脂质体后, DC 细胞对其摄取增强, 对 NKT 细胞的激活能力也增强, 激活的 NKT 细胞释放 IFN- $\gamma$ , 进而促进更多的 DC 细胞成熟, 诱发更强大的抗肿瘤免疫作用。

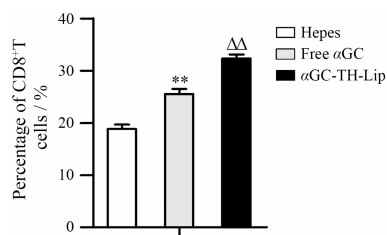


**Figure 5** The relative amount of double positive cells (representing mature DC cells) in spleens at day 7 after twice systemic administrations of samples.  $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs Hepes group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs free  $\alpha$ GC group

#### 5 荷瘤小鼠体内 CTL 的数量

DC 细胞成熟后激活初始型 T 淋巴细胞, T 细胞随血液到达胸腺, 双阴细胞在胸腺内经历阳性选择、阴性选择后发育成熟, 移行至外周淋巴组织, 形成 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞。CD4<sup>+</sup>T 细胞继续发育成为辅助性 T 细胞 (helper T cell, Th), 继而分化为 3 种 Th 细胞: Th1、Th2 和 Th17<sup>[20]</sup>。被活化的 CD8<sup>+</sup>T 细胞自分泌 IL-2, 引起增殖、分化, 成为不同的细胞毒性 T 细胞, CTL 通过多种途径介导细胞毒效应来杀死癌细胞, 如分泌穿孔素、颗粒酶及一些诱导细胞凋亡的途径<sup>[21]</sup>。

CD8 是一条有着两条链的多肽, 由  $\alpha$  链和  $\beta$  链组成 CD8 $\alpha\beta$  或由  $\alpha$  链和  $\alpha$  链组成 CD8 $\alpha\alpha$ 。因此, 用 CD8 $\alpha$  来标记 CD8<sup>+</sup>T 细胞具有代表性, 能标记所有的 CD8<sup>+</sup>T 细胞<sup>[22]</sup>。因此可以将 CD8 $\alpha$  的量作为 CTL 细胞数量的观察指标。图 6 结果显示  $\alpha$ GC-TH-Lip 组的 CTL 数量最多, 与游离  $\alpha$ GC 组相比具有显著性差异, 这一结果直接表明将  $\alpha$ GC 包载于 TH 修饰的脂质体后, 能够促进荷瘤小鼠体内 CTL 的产生, 进而 CTL 可通过细胞毒作用和诱导靶细胞凋亡的方式直接杀伤肿瘤细胞, 发挥更为强大的抗肿瘤作用。此结果与



**Figure 6** The relative amount of CD8<sup>+</sup>T cells (representing CTL) in spleens at day 7 after twice systemic administrations of samples.  $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs Hepes group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs free  $\alpha$ GC group

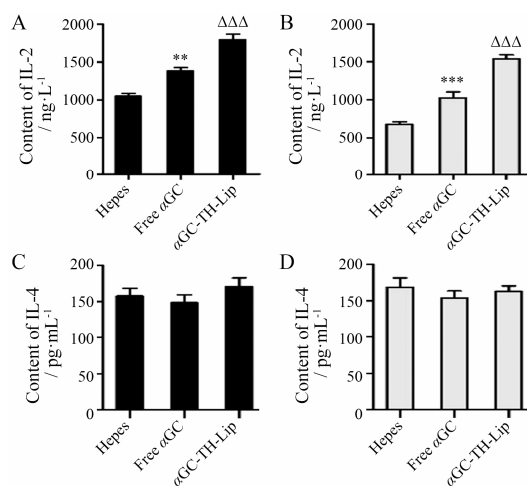
DC 细胞被促进成熟的结果一致, 间接证明了其对 DC 细胞成熟的促进作用。

## 6 $\alpha$ GC-TH-Lip 注射荷瘤小鼠后体内 Th1/Th2 分化趋势

初始 CD4<sup>+</sup>T 被活化后, 首先分化成 Th0 细胞, 它在局部微环境中不同种类的细胞因子调控下进行分化。IL-2、IFN- $\gamma$  等细胞因子可促进 Th0 细胞向 Th1 细胞分化; IL-4、IL-10 等细胞因子可促进 Th0 细胞向 Th2 细胞分化。Th1 细胞主要介导细胞免疫应答, Th2 细胞主要介导体液免疫应答<sup>[23]</sup>。体液免疫主要通过效应 B 细胞分泌抗体, 并与抗原发生特异性结合来清除游离在寄主细胞外的抗原及其产生的有毒物质; 细胞免疫主要通过效应 T 细胞及其分泌的细胞因子使靶细胞溶解死亡, 因此能发挥较强大的抗肿瘤作用。通过间接检测 IL-2、IL-4 细胞因子的含量来判断给药后荷瘤小鼠体内 Th0 细胞分化的方向, 进而确定  $\alpha$ GC-TH-Lip 促进的机体免疫类型, 进一步验证  $\alpha$ GC-TH-Lip 肿瘤靶向递药系统抗肿瘤作用的强弱。由图 7 可知, 第 1 次给药后 3 天时  $\alpha$ GC-TH-Lip 组 IL-2 的含量显著高于游离  $\alpha$ GC 组, 表明可促进 Th0 向 Th1 分化。而各组的 IL-4 水平几乎没有表现出差异, 说明  $\alpha$ GC-TH-Lip 对 Th0 向 Th2 分化没有显著影响。第 2 次给药后 3 天时 (即第 6 天) 时, 各组之间的 IL-2 水平的总体趋势保持不变, 但与第 3 天相比都有所下降, 与游离  $\alpha$ GC 相比,  $\alpha$ GC-TH-Lip 的 IL-2 含量降低较少, 表明其引起了更稳定的 IL-2 分泌, 而此时各组的 IL-4 水平仍基本保持不变。说明  $\alpha$ GC-TH-Lip 对 Th1 细胞分化有最强的诱导效应, 主要促进细胞免疫, 对体液免疫几乎没有促进作用, 这有利于其发挥更强的抗肿瘤免疫治疗的作用。

## 讨论

肿瘤的免疫治疗是一种旨在激活人体免疫系统, 依靠自身免疫功能杀死癌细胞和肿瘤组织的抗癌疗



**Figure 7** The secretion of IL-2 and IL-4 after intravenous administration of samples. A: IL-2 level measured on the 3rd day after administration process. B: IL-2 level measured on the 6th day after administration process. C: IL-4 level measured on the 3rd day after administration process. D: IL-4 level measured on the 6th day after administration process.  $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Hepes group;  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$  vs free  $\alpha$ GC group

法,  $\alpha$ GC 是一种脂质抗原, 其被 DC 细胞摄取后能与 CD1d 分子结合激活 NKT 细胞, 激活的 NKT 细胞分泌大量 IFN- $\gamma$ , 进一步诱导机体抗肿瘤免疫细胞如 NK 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞和巨噬细胞的活化, 能够产生较强的抗肿瘤作用。已有研究表明, 多次注射游离的  $\alpha$ GC 会引起 NKT 细胞的脱敏失活, 严重限制了其在抗肿瘤治疗方面的应用, 而将其包裹于脂质体后可以避免此现象发生。因此, 作者构建了 TH 修饰的载有免疫佐剂  $\alpha$ GC 肿瘤靶向递药系统  $\alpha$ GC-TH-Lip, 并研究其对荷瘤小鼠免疫功能的作用。

首先, 在体外研究了 pH 敏感的穿膜肽 TH 修饰脂质体在 DC 细胞中的摄取情况, 发现 TH 修饰的脂质体在 DC 细胞中的摄取较未修饰的 PEG-Lip 显著增加, 表明 TH 修饰能够促进 DC 细胞对脂质体的摄取, 这种现象的产生很有可能是因为脂质体表面多肽的修饰使其抗原性增强而有助于被抗原提呈细胞摄取。之后, 对给予  $\alpha$ GC-TH-Lip 后荷瘤小鼠体内各种免疫细胞的激活作用和数量进行了研究, 发现荷瘤小鼠体内 NKT 细胞、NK 细胞、巨噬细胞和 CTL 数量较游离  $\alpha$ GC 组均显著增多, 同时, 与游离  $\alpha$ GC 相比,  $\alpha$ GC-TH-Lip 能促进更多的 DC 细胞成熟, 进而激活 T 淋巴细胞发挥免疫效应。该结果不仅验证了  $\alpha$ GC 作为一种免疫佐剂能激活 NKT 细胞, 进一步诱导机体抗肿瘤免疫细胞如 NK 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞和巨噬细胞的活化, 同时也表明将  $\alpha$ GC 包载于脂质体后

较游离的  $\alpha$ GC 能产生更显著的作用。最后, 通过测定给药后荷瘤小鼠体内 IL-2 和 IL-4 分泌情况研究了  $\alpha$ GC-TH-Lip 对 Th0 细胞分化方向的影响进而确定主要促进的免疫类型。结果显示, 两次给药后 IL-4 的含量均无显著变化, 而 IL-2 的含量较对照组显著增加, 表明  $\alpha$ GC-TH-Lip 对 Th1 细胞分化有最强的诱导效应, 主要促进细胞免疫, 从而能够加强 CTL 对于肿瘤细胞的杀伤, 而对体液免疫没有显著促进作用。

总之, 本研究初步证明了所构建的 TH 修饰的载  $\alpha$ GC 脂质体能够提高荷瘤小鼠的免疫功能, 具有潜在的抗肿瘤免疫治疗作用。尚待进一步考察该脂质体在体内的靶向性、抗肿瘤活性和安全性, 以全面验证其抗肿瘤效果。

## References

- [1] Chen XG, Zhang Y. Recent advance in the study of novel anti-tumor targets and drugs-aurora kinase and Pin1 [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 264–269.
- [2] He QY. Tumor heterogeneity and drug resistance of targeted antitumor agents [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 197–201.
- [3] Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy [J]. Cancer cell, 2015, 27: 450–461.
- [4] Miller JFAP, Sadelain M. The journey from discoveries in fundamental immunology to cancer immunotherapy [J]. Cancer Cell, 2015, 27: 439–449.
- [5] Schneiders FL, Scheper RJ, von Blomberg BME, et al. Clinical experience with  $\alpha$ -galactosylceramide (KRN7000) in patients with advanced cancer and chronic hepatitis B/C infection [J]. Clin Immunol, 2011, 140: 130–141.
- [6] Nishimura T, Kitamura H, Iwakabe K, et al. The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes [J]. Int Immunol, 2000, 12: 987–994.
- [7] Richter J, Neparidze N, Zhang L, et al. Clinical regressions and broad immune activation following combination therapy targeting human NKT cells in myeloma [J]. Blood, 2013, 121: 423–430.
- [8] Hong C, Lee H, Park YK, et al. Regulation of secondary antigen-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses by natural killer T cells [J]. Cancer Res, 2009, 69: 4301–4308.
- [9] Thapa P, Zhang G, Xia C, et al. Nanoparticle formulated alpha-galactosylceramide activates NKT cells without inducing anergy [J]. Vaccine, 2009, 27: 3484–3488.
- [10] Lim SB, Banerjee A, Önyüksel H. Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers [J]. J Control Release, 2012, 163: 34–45.
- [11] Tang J, Zhang L, Fu H, et al. A detachable coating of cholesterol-anchored PEG improves tumor targeting of cell-penetrating peptide-modified liposomes [J]. Acta Pharm Sin B, 2014, 4: 67–73.
- [12] Zhang L, Wang Y, Gao HL, et al. The construction of cell-penetrating peptide R8 and pH sensitive cleavable polyethylene glycols co-modified liposomes [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 760–766.
- [13] Zhang W, Song J, Zhang B, et al. Design of acid-activated cell penetrating peptide for delivery of active molecules into cancer cells [J]. Bioconjugate Chem, 2011, 22: 1410–1415.
- [14] Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices [J]. Int J Nanomed, 2015, 10: 975–999.
- [15] Nakamura T, Yamazaki D, Yamauchi J, et al. The nanoparticulation by octaarginine-modified liposome improves  $\alpha$ -galactosylceramide-mediated antitumor therapy via systemic administration [J]. J Control Release, 2013, 171: 216–224.
- [16] Hwang DW, Son S, Jang J, et al. A brain-targeted rabies virus glycoprotein-disulfide linked PEI nanocarrier for delivery of neurogenic microRNA [J]. Biomaterials, 2011, 32: 4968–4975.
- [17] Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, et al. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules [J]. J Immunol, 1997, 158: 2723–2730.
- [18] Wilson SB, Byrne MC. Gene expression in NKT cells: defining a functionally distinct CD1d-restricted T cell subset [J]. Curr Opin Immunol, 2001, 13: 555–561.
- [19] Jeras M, Bergant M, Repnik U. *In vitro* preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells—potential antigen-specific modulators of *in vivo* immune responses [J]. Transplant Immunol, 2005, 14: 231–244.
- [20] Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, et al. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties [J]. Immunity, 2006, 24: 677–688.
- [21] Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs [J]. Nature, 1998, 392: 86–89.
- [22] Saunders KO, Ward-Caviness C, Schutte RJ, et al. Secretion of MIP-1 $\beta$  and MIP-1 $\alpha$  by CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes correlates with HIV-1 inhibition independent of coreceptor usage [J]. Cell Immunol, 2011, 266: 154–164.
- [23] Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity [J]. Nat Med, 2002, 8: 567–573.