

## 内质网靶向递药系统用于抗肿瘤免疫治疗的研究进展

陈李强, 沈欣然, 黄 园\*

(四川大学华西药学院, 靶向药物与释药系统教育部重点实验室, 四川省植物来源药物工程实验室, 四川省小分子药物精准化工程技术研究中心, 四川 成都 610041)

**摘要:** 内质网作为真核细胞内功能多样的细胞器, 不仅是蛋白质合成与修饰的关键场所, 也是胞内信号转导的重要位点, 影响着细胞的功能发挥、存活及凋亡。内质网稳态的失衡会引起内质网应激, 这与肿瘤的发生与发展密不可分。在一些药物 (蒽醌类及奥沙利铂等) 的作用下, 过度的内质网应激则会介导肿瘤细胞的免疫原性细胞死亡并激发抗肿瘤免疫反应, 在治疗后期形成长期免疫记忆。但是, 这些药物往往存在靶向性差等问题, 在肿瘤细胞内质网的蓄积量极低, 限制了其临床疗效。因此, 内质网靶向药物的研究将为更高效更精准的抗肿瘤免疫治疗提供参考。本文就内质网与肿瘤免疫的关系, 以及近年来基于内质网靶向的抗肿瘤免疫治疗的策略进行综述, 并对内质网靶向策略存在的问题及未来发展方向进行总结与展望。

**关键词:** 内质网; 靶向递药; 肿瘤治疗; 免疫疗法; 内质网应激; 免疫原性细胞死亡

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)01-0076-09

## Research progress of endoplasmic reticulum targeting drug delivery system for anti-tumor immunotherapy

CHEN Li-qiang, SHEN Xin-ran, HUANG Yuan\*

(Key Laboratory of Drug-Targeting and Drug Delivery System of the Education Ministry and Sichuan Province, Sichuan Engineering Laboratory for Plant-Sourced Drug and Sichuan Research Center for Drug Precision Industrial Technology, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** Endoplasmic reticulum (ER), a multifunctional organelle in eukaryotic cells, is responsible for protein synthesis and intracellular signal transduction, which dominates cell function, survival, and apoptosis. Disequilibrium of ER homeostasis may induce ER stress, which closely intertwines with tumor occurrence and progress. A few clinical-used drugs (such as anthraquinones and oxaliplatin) can mediate the immunogenic cell death of tumor cells through excessive ER stress, and sequentially stimulate anti-tumor immune responses as well as long-term immune memory. However, these drugs often exhibit poor targeting ability and extremely low ER accumulation in tumor cells, limiting their clinical efficacy. Therefore, the researches of ER-targeted delivery of these drugs will significantly benefit the efficient and precise anti-tumor immunotherapy. In this review, we introduce the relationship between ER and tumor immunity, and summarize the ER targeting strategies for anti-tumor immunotherapy in recent years. Furthermore, we discuss the problems of existing ER targeting strategies and look into its broad prospects of application.

**Key words:** endoplasmic reticulum; targeting drug delivery; oncotherapy; immunotherapy; endoplasmic reticulum stress; immunogenic cell death

收稿日期: 2021-08-22; 修回日期: 2021-09-28.

基金项目: 国家杰出青年基金资助项目 (81625023).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-28-85501617, E-mail: huangyuan0@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1213

近年来,随着肿瘤免疫治疗的不断深入,嵌合抗原受体T细胞疗法和免疫检查点抑制剂等新兴免疫疗法应运而生,这类疗法通过调动自身免疫监视和免疫清除机制对肿瘤进行杀伤,作用时间持久,可限制肿瘤的复发和转移<sup>[1-3]</sup>。但大部分患者的肿瘤处于免疫抑制状态,对于免疫疗法的反应率低下,限制了其临床应用<sup>[4]</sup>。如何改善抗肿瘤免疫疗法疗效和提高反应率,是目前免疫疗法亟待解决的问题。

内质网是细胞内蛋白质合成与信号转导的重要位点,与肿瘤免疫疗法有着密切联系<sup>[5]</sup>。例如,内质网稳态的失衡会引起内质网应激,在一些药物的作用下,过度的内质网应激则会介导肿瘤细胞的免疫原性死亡并激发抗肿瘤免疫反应,在治疗后期形成长期免疫记忆<sup>[6]</sup>。但是,这些药物往往存在靶向性差等问题,内质网靶向递送该类药物可有效改善以免疫原性细胞死亡为基础的抗肿瘤免疫疗法疗效。此外,肿瘤抗原特异性的细胞毒性T淋巴细胞的活化过程需经历抗原呈递细胞的抗原呈递<sup>[7]</sup>。而内质网是主要组织相容性复合体I类分子和抗原肽组装的主要位点,内质网靶向递送肿瘤相关抗原至抗原呈递细胞,将有望改善抗肿瘤免疫疗法疗效<sup>[8]</sup>。本文就内质网与肿瘤免疫的关系,以及近年来基于内质网靶向的抗肿瘤免疫治疗的策略进行综述,并对内质网靶向策略存在的问题及未来发展方向进行总结与展望。

## 1 内质网及其应激

### 1.1 内质网功能

内质网是由封闭的管状或扁平囊状膜系统及其包被的腔形成互相沟通的三维网络结构。一方面,内质网上附着有核糖体,负责蛋白质与脂质的合成与加工;另一方面,内质网作为膜系统的一部分,外与细胞膜相连,内与细胞核膜相通,是细胞内囊泡运输与信号转导的重要联系纽带<sup>[9]</sup>。位于内质网的外源性(药物、纳米载体等)与内源性物质(分泌蛋白、信号分子等)都将通过被膜蛋白II囊泡运输,并以出芽的方式排出至胞外<sup>[10]</sup>。

## 1.2 内质网应激

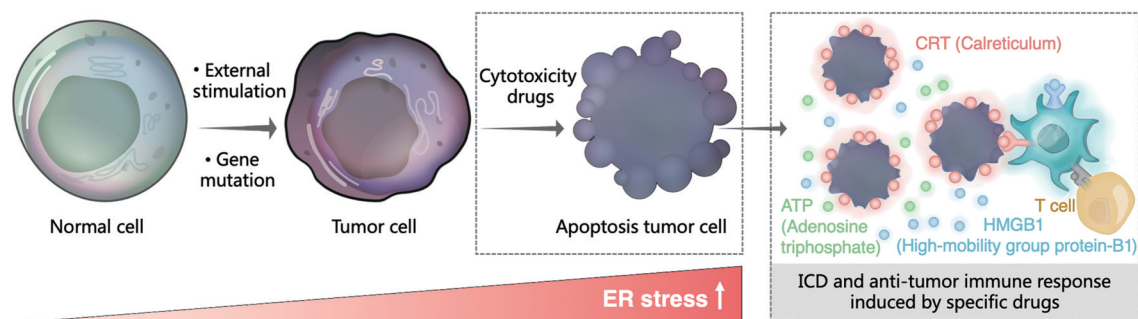
在正常状态下,细胞精确调控着内质网的蛋白合成与信号转导功能,维持着内质网的稳态。而一些外源性或内源性因素(药物刺激或异常代谢产物等)会损伤内质网功能,导致蛋白质不能正常折叠,进而在内质网中蓄积。内质网的这种失衡状态被称为内质网应激<sup>[11]</sup>。在哺乳动物体内,细胞通过内质网腔内分子伴侣结合免疫球蛋白(molecular chaperone binding-immunoglobulin protein, GRP78/BiP)的异位来感知蛋白的错误折叠与累积,随后激活PKR样的内质网蛋白激酶(PKR-like ER protein kinase, PERK)、肌醇酶1 $\alpha$ (inositol requiring enzyme-1 $\alpha$ , IRE-1 $\alpha$ )与活化转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)三条信号通路来缓解内质网应激,这些信号通路的调控被称为未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)<sup>[12,13]</sup>。三条信号通路各自独立,但在缓解内质网应激的过程中又有部分功能的重叠,主要通过两个方面缓解内质网应激:一是通过减少错误折叠蛋白的合成并加速其降解过程,如下调转录翻译水平、降解mRNA和增强内质网相关蛋白降解(ER-associated protein degradation, ERAD)系统功能等;二是加强内质网对蛋白的折叠能力,如上调UPR相关元件表达等<sup>[14,15]</sup>。

## 2 内质网应激与肿瘤

在适度、可逆转的内质网应激状态下,UPR通过启动上述信号通路提高细胞在应激下的生存能力,有利于细胞功能的恢复与胞内稳态的维持。但在长期外界刺激(药物刺激和辐射等)或基因变异(ERAD系统相关基因的缺失)的影响下,持续的内质网应激将引起细胞发生致癌性突变<sup>[16]</sup>。此外,严重和不可逆的内质网应激将启动内质网自噬及后续相关细胞凋亡途径<sup>[17]</sup>。因此,内质网应激的强度与时间跨度决定了细胞生存、癌变与死亡等不同的命运(图1)。

### 2.1 内质网应激与肿瘤的发生发展

近年来,多项研究表明内质网应激在多种肿瘤



**Figure 1** The magnitude of endoplasmic reticulum (ER) stress and its differential outcomes in malignant cells. ICD: Immunogenic cell death

(胃肠道肿瘤、肝癌、乳腺癌等)的发生发展过程均扮演着重要角色。内质网应激的持续发展在激活UPR相关途径的同时,也会激活除UPR以外的转录与代谢途径,并主导了细胞癌化表型的转变<sup>[16]</sup>。Li等<sup>[18]</sup>研究表明,三氧化二砷能引起大鼠皮肤细胞发生内质网应激,通过活化PERK和IRE-1 $\alpha$ 来激活核因子 $\kappa$ B通路,进而通过抗凋亡作用来促进肿瘤细胞的生长。暴露于三氧化二砷的大鼠皮肤细胞将发生癌前病变,并进一步发展为基底细胞癌和鳞状细胞癌。干扰内质网应激、抑制UPR的激活或改变内质网分子伴侣的表达可在初期抑制细胞的癌化和肿瘤的形成<sup>[19,20]</sup>。

## 2.2 内质网应激与肿瘤细胞凋亡

在严重、不可逆的内质网应激状态下,UPR会进一步启动多条细胞凋亡程序,主要包括转录因子C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)、凋亡信号调节激酶1和半胱氨酸蛋白酶-12三条细胞凋亡途径<sup>[17,21]</sup>。其中,CHOP通路是UPR诱导细胞凋亡最主要的途径。正常情况下,CHOP表达极低,在内质网应激状态下,PERK、IRE-1 $\alpha$ 和ATF6的活化均能激活CHOP通路,促进CHOP在细胞核的表达,并基于以下两个可能的机制诱导肿瘤细胞凋亡:一是通过诱导tribbles同源蛋白3的表达,进而抑制抗凋亡信号分子蛋白酶B的活性,促进肿瘤细胞凋亡;二是通过下调抗凋亡基因B细胞淋巴瘤/白血病-2基因(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)的表达,促进肿瘤细胞凋亡<sup>[22]</sup>。

## 2.3 内质网应激与抗肿瘤免疫

近期研究发现,小部分化疗药物(多柔比星和奥沙利铂)引起的致死性内质网应激能诱导肿瘤发生免疫原性细胞死亡(immunogenic cell death, ICD),即肿瘤细胞在死亡的同时产生免疫原性,暴露出肿瘤相关抗原,经抗原提呈后激活细胞毒性T细胞,产生保护性抗肿瘤免疫反应<sup>[23]</sup>。例如,蒽醌类药物治疗会引发肿瘤细胞中活性氧的过度生成,这一过程会导致严重的内质网应激并诱导内质网相关分子伴侣钙网蛋白(calreticulin, CRT)从内质网外翻至肿瘤细胞膜表面<sup>[24]</sup>。CRT作为“吃我信号”,能够与树突状细胞(dendritic cell, DC)表面的低密度脂蛋白受体相关蛋白结合,促进肿瘤细胞被DC细胞吞噬。除“吃我信号”外,经历ICD的肿瘤细胞会释放另一种关键信号——“找我信号”<sup>[25]</sup>。这种信号是由三磷酸腺苷和高迁移率族蛋白B1(high-mobility group protein-B1, HMGB1)等损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs)介导,发生ICD的细胞会将DAMPs释放至胞外,通过与DC细胞上相关受体结合,促进DC细胞的招募和识别,调节肿瘤免疫微环境<sup>[26]</sup>。

除此之外,还有一些通过靶向内质网应激相关信号通路的抗肿瘤免疫治疗策略。如通过靶向UPR通路的GRP78和PERK,可不同程度地调节巨噬细胞极化,促进其溶细胞活性,增强抗肿瘤免疫反应<sup>[27]</sup>;通过靶向IRE-1 $\alpha$ ,增强T细胞对肿瘤抗原的反应,与免疫检查点抑制剂协同促进抗肿瘤免疫疗法<sup>[28]</sup>。

## 2.4 内质网靶向抗肿瘤免疫的必要性与难点

近年来,抗肿瘤免疫治疗不断深入,开发出了免疫检查点抑制剂等新兴免疫疗法,这类疗法通过调动自身免疫监视和免疫清除机制对肿瘤进行杀伤。但是患者对于免疫疗法的反应率较低,仅有20%~40%,这是由于大部分患者的肿瘤处于免疫抑制状态<sup>[4]</sup>。而肿瘤免疫原性细胞死亡能够招募DC及细胞毒性T淋巴细胞等,调节肿瘤免疫微环境,其发现为改善肿瘤免疫疗法的反应率及提高疗效提供了新的契机。但是,目前能够引起ICD的药物较少,仅有蒽醌类药物和奥沙利铂等。即便使用这些药物进行化疗,其在肿瘤细胞的蓄积少之又少,限制了ICD在临床中的应用。

在ICD发生过程中,不难发现,“吃我”与“找我”信号均与内质网息息相关:① CRT和HMGB1等ICD相关信号蛋白在细胞核初步合成后会转移至内质网进行进一步加工和储存;② 定位于内质网的应激反应感受器经活性氧或药物刺激后,促使CRT外翻至胞膜,启动ICD进程;③ 内质网在结构上外与高尔基体顺面相对,内与核膜连接,这种结构使其在胞质内充当信号交流的“十字路口”,ICD进程中多种细胞器间的协调依赖于内质网<sup>[29,30]</sup>。作为这个错综复杂的关系网络中心,内质网在ICD的进程中扮演了不可忽视的角色。因此,如何使药物更多地靶向于内质网是目前以ICD为核心的免疫治疗的重点与难点。

## 3 内质网靶向递药策略

相比于细胞核和线粒体等亚细胞器,内质网靶向递药的相关研究较少,也更为困难,其主要原因在于内质网可被利用并进行靶向的特征较少。目前,内质网的靶向策略多限于配体修饰,主要包括具有内质网靶向特性的小分子和短肽等配体修饰载体或药物(图2)。此外,也有少量通过改变纳米载体亲疏水性以增强内质网亲和性的报道<sup>[31-33]</sup>。这些策略具有各自的优劣势,并以内质网靶向为基础,在抗肿瘤治疗领域取得了一系列进展(表1)。

### 3.1 小分子靶向基因修饰

目前,临床上所用的一些小分子药物可凭借自身结构特点靶向内质网,其作用机制通常包括以下3种:① 通过化学结构中包含的磺酰脲基团可靶向内质网膜的磺酰脲受体,如常见的糖尿病药物格列本脲;② 通过

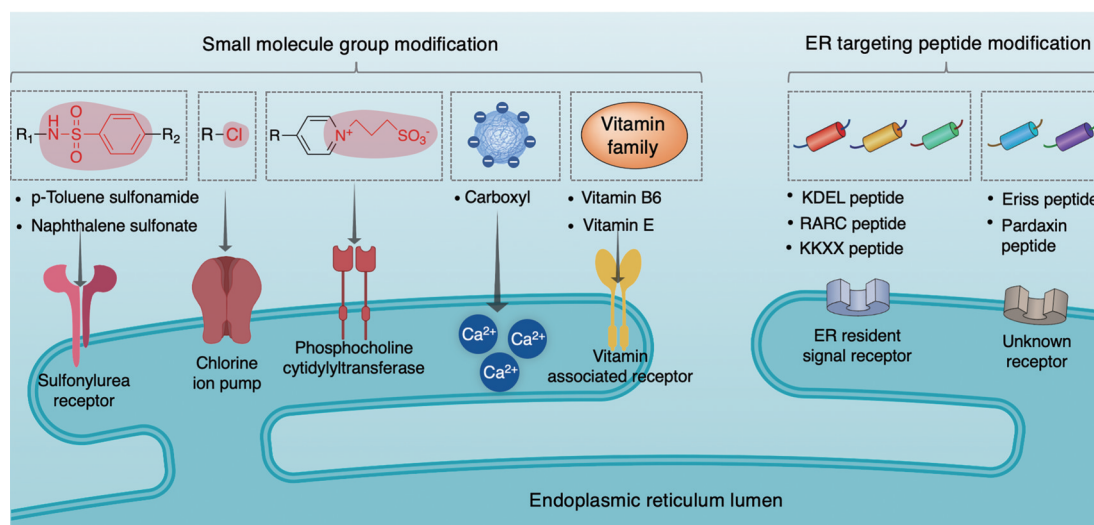


Figure 2 Schematic diagram of endoplasmic reticulum targeted strategies by small molecule group and peptide modification

Table 1 Summary of endoplasmic reticulum targeting strategies

ER-targeting strategy	Mechanism	Advantage	Disadvantage
Small molecule group modification	p-Toluene sulfonamide Sulfonylurea receptors	1. Relatively simple synthesis	1. Suboptimal targeting specificity
	Naphthalene sulfonate Sulfonylurea receptors	2. Definite targeting mechanism	2. Binding with effect receptor induces post-targeting effect
	Vitamin family Vitamin associated receptors in ER		
	Anionic group Coordination with calcium in ER lumen		
ER targeting peptide modification	KDEL peptide ER resident signal peptides	1. Preferable targeting specificity	1. Complicated synthesis
	Eriss peptide ER resident signal peptides analogs	2. Definite targeting mechanism	2. Difficult research and development
	RARC peptide ER resident signal peptides	3. High biocompatibility	
	KKXX peptide ER resident signal peptides	1. Implement multiple approaches	Suboptimal targeting specificity
	Pardaxin peptide Efficient ER membrane pore formation	2. Non-lysosome mediated intracellular trafficking	
Other targeting strategies	Endocytosis pathway alteration Caveolin-mediated endocytosis pathway induces Golgi-ER network trafficking	1. Relatively simple synthesis	Suboptimal targeting specificity
	Liposome with ER membrane fusion property liposome composed of ER-homologous lipids fuses with ER membrane	2. High biocompatibility	
	Cell membrane camouflaging Membrane fusion protein and ER resident signal peptides expression; caveolin-mediated endocytosis	3. Drug release through membrane fusion	
	Intracellular antibody of ER-associated protein Target to ER-associated protein	1. Preferable targeting specificity	Unclear targeting mechanism
	Viral vector-mediated ER targeting May relate to caveolin-mediated endocytosis	2. High biocompatibility	
		Preferable targeting specificity	1. Susceptibly inactivation
		Preferable targeting specificity	2. Complicated synthesis
		Preferable targeting specificity	1. Poor biosafety
		Preferable targeting specificity	2. Unclear targeting mechanism

结构中含有的氯原子靶向内质网的氯离子通道; ③ 通过结构中含有的两性离子基团, 靶向内质网膜表面的磷酸胆碱胞苷转移酶 (一种膜结合酶, 存在于内质网膜, 同样具有两性离子结构, 是合成磷脂酰胆碱的关键)<sup>[34]</sup>。对于递药系统而言, 常采用小分子内质网靶向配体修饰药物或载体, 常用的小分子配体包括对甲苯磺酰胺和萘磺酰胺等。

**3.1.1 对甲苯磺酰胺** 对甲苯磺酰胺能够与内质网膜表面的磺酰脲类受体结合实现内质网靶向<sup>[35]</sup>。Deng等<sup>[36]</sup>设计了对甲苯磺酰胺修饰的氧化还原敏感的内质网靶向纳米粒。该纳米粒能选择性地蓄积于内质网中, 并在近红外光的照射下产生活性氧来诱导内质网应激的发生, 从而介导肿瘤细胞的免疫原性细胞死亡; 在杀伤肿瘤细胞的同时, 调节肿瘤免疫微环境, 发挥抗

肿瘤免疫作用。此外,这种联合光热治疗的内质网靶向策略也能够有效根除远端肿瘤,促进机体整体的抗肿瘤免疫反应。

**3.1.2 萘磺酰胺** 萘磺酰胺与对甲苯磺酰胺具有相似的结构特点,也可通过与磺酰脲类受体特异性结合,从而具有较好的内质网靶向能力<sup>[37]</sup>。Pandey等<sup>[38]</sup>合成了萘磺酰胺基团修饰的长链亲脂分子,可自组装形成球形纳米粒,并加载Bcl-2抑制剂 obatoclax。该递药系统通过靶向内质网抑制Bcl-2,并促进内质网自噬和线粒体损伤,促进人宫颈癌HeLa细胞发生凋亡。

**3.1.3 维生素家族** 研究发现维生素家族可以通过结合并激活内质网相关受体,诱导内质网应激并介导细胞凋亡。Banerjee等<sup>[39]</sup>设计了一种靶向内质网的四价氧化钒-维生素B6复合物,并用于肿瘤的光动力治疗。其中,维生素B6赋予该递药系统一定的内质网靶向能力,这可能与内质网分布的相关维生素家族受体有关。Wang等<sup>[40]</sup>设计并构建了pH敏感的维生素E修饰的脂质体,加载合成生育酚,发现维生素E能显著提高脂质体的内质网分布。

**3.1.4 阴离子基团** 内质网中含较多的钙离子,浓度可达毫摩尔水平,远远高于胞质内的钙离子浓度。因此,富含阴离子基团(如羧基)的聚合物可与内质网的钙离子通过配位键结合,以实现内质网靶向<sup>[41]</sup>。Wan等<sup>[41]</sup>构建了聚天冬氨酸胶束,凭借天冬氨酸上较多的羧基来配位亲和内质网内钙离子,具有较好的内质网靶向性。

## 3.2 多肽靶向配体修饰

内质网与胞内蛋白的合成、加工和运输密不可分。基于对蛋白质在胞内运输的探索,更多具有内质网趋向性的信号肽得以被发现。这些内质网信号肽多修饰于蛋白质的N端,根据其序列的不同执行着不同的功能<sup>[42]</sup>。例如,管腔结合蛋白的KDEL信号肽,能够从高尔基体中回收内质网相关蛋白,有效维持内质网自身蛋白稳态<sup>[43]</sup>。此外,位于内质网膜表面的大多数功能性复合物都包含内质网特异性的双精氨酸(RXR)信号肽<sup>[44]</sup>。通过对药物或递药系统进行内质网信号肽的修饰,能有效提高其在内质网的分布。

**3.2.1 KDEL肽** 由于肿瘤抗原特异性的细胞毒性T淋巴细胞是抗肿瘤免疫反应中的主要效应细胞,其活化过程需经历抗原呈递细胞的抗原呈递。而内质网是主要组织相容性复合体I类分子和抗原肽组装的主要位点,因此更高效地将肿瘤相关抗原递送至抗原呈递细胞中的内质网(涉及主要组织相容性复合体I类分子呈递途径),将极大地改善抗肿瘤免疫疗法的疗效。

有研究发现使用内质网信号肽修饰肿瘤相关抗

原,可靶向抗原提呈细胞内质网,改善肿瘤抗原特异性免疫反应。将内质网保留序列KDEL肽与人乳头瘤病毒16型的E6和E7抗原结合,发现可以增强干扰素 $\gamma$ 的产生,有助于缩短细胞免疫反应时间,诱导更快更强的抗肿瘤免疫反应<sup>[45]</sup>。

**3.2.2 Eriss肽** Matsuo等<sup>[46]</sup>制备了一种内质网插入信号序列(Eriss)修饰的聚谷氨酸纳米疫苗递送系统。Eriss肽是由17个氨基酸组成的内质网定位序列(MRYMILGLLALAAVCSA),来源于腺病毒E3-19K蛋白。该内质网靶向系统能高效递送疫苗至抗原呈递细胞的内质网,促进了肿瘤抗原的交叉呈递,增强了肿瘤疫苗诱导细胞免疫反应的能力。

**3.2.3 RARC肽** RARC肽是一种富含精氨酸的寡肽。研究发现,精氨酸可以和内质网中的蛋白质发生特定的相互作用,由此靶向内质网。Shi等<sup>[47]</sup>用Fmoc保护的RARC肽与喹啉酮衍生物偶联得到Quino-1-Fmoc-RACR,其能形成聚集诱导发射的荧光团,且具有良好的内质网靶向能力,并进行内质网成像。

**3.2.4 KKXX肽** KKXX信号肽常被修饰于内质网跨膜蛋白的C端,与KDEL信号肽具有相似的功能,主要负责识别转运囊泡上的内质网跨膜蛋白并将其定位于内质网<sup>[48]</sup>。Sneh-Edri等<sup>[49]</sup>制备了KKXX修饰的内质网靶向递送系统,发现可提高所载带的抗原肽在小鼠树突状细胞的内质网共定位,并诱导长时间低量级的抗原交叉呈递。

**3.2.5 Pardaxin肽** Pardaxin肽(GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSALSSGGQE)是一种天然抗菌肽,具有内质网定位能力<sup>[50]</sup>。其内质网靶向机制可能与高效的磷脂酰胆碱囊泡成孔能力有关(磷脂酰胆碱是内质网的主要甘油磷脂,占比60%)<sup>[51]</sup>。除了靶向性外,pardaxin肽还具有诱导活性氧产生和内质网应激等生理功能。Shi等<sup>[51]</sup>制备了pardaxin肽修饰的内质网靶向脂质体,联合光动力疗法和光热疗法,分别构建了pardaxin肽修饰的载吡啶菁绿(ICG)金纳米粒和载血红蛋白脂质体<sup>[52]</sup>。在肿瘤细胞中,近红外照射联合内质网靶向策略,可诱导强烈的内质网应激与钙网蛋白外翻,引起肿瘤免疫原性细胞死亡,激活抗肿瘤免疫反应。

## 3.3 其他靶向策略

**3.3.1 改变内吞途径** 纳米递药系统的细胞摄取通过内吞作用实现,不同的内吞途径决定了其胞内转运情况。网格蛋白介导的内吞倾向于将纳米载体运输至内涵体或溶酶体内,随后在酸性多酶的环境中被降解<sup>[53]</sup>。经大胞饮途径入胞的纳米粒首先会进入吞噬体,随后吞噬体与溶酶体融合并降解其内容物。对于经此两种途径入胞的内质网靶向纳米药物而言,从溶酶体或吞

噬体逃逸是较为关键的一步。不同于网格蛋白和大胞饮途径入胞,小窝蛋白是一种特殊的脂筏,其介导的内吞则倾向于转运内容物至高尔基体-内质网网络,是一种可被靶向内质网的途径<sup>[54]</sup>。因此,设计构建可通过小窝蛋白内吞的纳米递药系统对于内质网靶向而言具有重要意义。

Zhang等<sup>[55]</sup>分别设计构建了球形和棒状的仿生纳米粒,发现棒状纳米粒显示出更高的细胞摄取并倾向于经小窝蛋白途径入胞,与内质网具有更高共定位。在体内,棒状纳米粒相对于球形纳米粒表现出更强的免疫逃逸能力及抗肿瘤效果。

**3.3.2 膜融合脂质体** 脂质体与生物膜都含有磷脂双分子层,组成相似的脂质体和生物膜倾向于发生膜融合。由内质网同源脂质制备的脂质体因此也具有一定的内质网靶向能力。Pollock等<sup>[56]</sup>通过优化调节脂质体所含的磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和磷脂酰丝氨酸的比例,构建了内质网膜融合脂质体。可通过清道夫受体和低密度脂蛋白受体介导内吞,经小窝蛋白和微管途径转运,在20 min内与内质网膜融合,并随后释放包载的药物。

**3.3.3 生物膜包裹** Qiu等<sup>[57]</sup>提取了内质网膜并与阳离子载体混合,通过探头超声将两者融合,制备了内质网膜修饰的纳米复合物(EhCv NPs)。与未修饰的阳离子复合物相比,EhCv NPs在人乳腺癌细胞MCF-7具有更高的内质网共定位和药物递送效率。进一步机制研究表明:① 内质网膜上的SNARE蛋白(主要作用是介导囊泡融合以及囊泡与靶膜的融合)促进了纳米粒与靶细胞内质网膜之间的融合;② 内质网膜的修饰改变了阳离子复合物的内吞途径,使之更倾向于经小窝蛋白途径入胞,从而进入内质网-高尔基体网络;③ 纳米粒上的内质网驻留蛋白(如KDEL信号肽)激活了从高尔基体到内质网的逆行转运途径,从而避免了溶酶体的降解。

**3.3.4 内质网相关蛋白抗体** 单克隆抗体能够特异性靶向相应蛋白,在生物医学及递药领域得到了广泛应用。内质网蛋白经单克隆抗体技术处理后得到可靶向内质网的抗体,进一步偶联其他不同功能蛋白(如免疫相关蛋白MHC I),以实现不同的内质网靶向后效应。例如,偶联内质网相关蛋白抗体与KDEL信号肽,可相互增强内质网靶向性,KDEL肽滞留于内质网可有效阻断所偶联的内质网相关蛋白的外排,下调该蛋白的分泌或细胞膜表达<sup>[58]</sup>。该策略对于内质网靶向的免疫治疗具有一定参考价值。

**3.3.5 病毒介导** 猿猴病毒40(simian virus 40, SV40)可以通过小窝蛋白介导的内吞途径进入宿主细胞,通

过结合神经节苷脂,诱导肌动蛋白纤维发生断裂,随后募集肌动蛋白和动力蛋白II形成载SV40的小窝衍生内吞囊泡,囊泡可沿微管移动到内质网,最后脱壳并释放病毒遗传物质<sup>[59]</sup>。因此,SV40有望用于构建靶向内质网的有效载体。

此外,随着对细胞器结构的深入了解,研究者们发现内质网与线粒体间可通过内质网线粒体相关膜(mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane, MAM)进行信号交流,如钙离子的双向流动<sup>[60]</sup>。其中一个细胞器的功能或结构异常可通过MAM影响或调节另一个细胞器。这表明线粒体靶向可作为内质网功能调节的替代策略。Wang等<sup>[61]</sup>设计了可靶向线粒体的近红外染料,能有效诱导内质网应激,可抑制肿瘤生长与复发。该研究成果为线粒体靶向调节内质网功能提供了理论基础。

## 4 结语与展望

由于内质网功能紊乱与诸多疾病尤其是癌症的发生发展紧密相关,内质网靶向药物递释系统的研究也日益成为靶向药物开发的研究热点。通过在药物或载体表面修饰内质网靶向基团,实现内质网功能调节药物或相关抗原的高效靶向递送,成为内质网靶向药物设计的基本策略,在肿瘤免疫治疗和肿瘤疫苗开发等方面具有广泛的应用前景。

但是,目前对于内质网靶向药物的研究尚处于起步阶段,仍有许多科学问题亟待解决:① 有关内质网靶向的研究有限,与临床应用仍存在一定距离。因此,在后续的研究中,需构建更为简单高效的内质网靶向体系,尤其在生物安全性、靶向性优化及给药方式探索等方面需开展深入研究;② 对于内质网靶向的探索多停留在现象观察,缺少深入的靶向机制研究。对内质网靶向机制的探索有助于更深刻地了解递药系统与细胞生物结构的作用规律。但除经典的内质网靶向策略(如磺酰脲基团或内质网信号肽修饰)已具有明确的靶向机制外,多数的内质网靶向相关的研究仍仅停留在现象观察阶段,缺乏相关机制研究;③ 内质网靶向策略多用于增强内质网应激,少有抑制内质网应激的相关研究。内质网应激的强度和时间跨度决定了细胞的存活、癌变和凋亡等不同的命运。目前的研究更多关注通过内质网靶向增强内质网应激,以促使肿瘤细胞发生凋亡,少有内质网靶向(减弱内质网应激水平)在抑制肿瘤形成中的应用;④ 缺乏有关在内质网靶向后如何延长药物在内质网蓄积时间的研究。与细胞核、线粒体等亚细胞器不同,内质网是胞内物质的中转站。尽管内质网靶向体系能在短时间内显著提高其在内质网的蓄积,但滞留时间并不充足,其中很大一部

分仍会被外排至胞外。这一现象是由于内质网主要承担胞内物质运输, 不仅接收相关蛋白转运至此进行进一步加工, 也积极参与多条分泌途径, 进入内质网的药物会以极快的速度被转运至胞外<sup>[62]</sup>。目前, 仅有的少数内质网靶向的相关研究只聚焦于如何增加初始药物的内质网定位, 而忽略了药物因外排而无法长时间滞留于内质网这一问题。

由于肿瘤的发生发展是一个复杂的过程, 联合治疗或将成为当前抗肿瘤治疗的热点<sup>[63]</sup>。内质网靶向联合光动力疗法、免疫检查点疗法已在基础研究方面取得了一定进展。在未来, 期望内质网靶向能联合其他疗法, 在癌症等疾病上进行更深入的研究与应用。随着生物医药领域的不断发展, 也期望更加简单、高效和安全的内质网靶向策略能够应运而生, 与线粒体和细胞核靶向一起, 成为亚细胞器靶向纳米药物研发与应用的重要方向。

**作者贡献:** 陈李强和沈欣然负责文献检索、论文撰写及文章修改; 黄园负责文章选题、指导写作、修改及校对。

**利益冲突:** 本文研究内容无任何利益冲突。

## References

- [1] Brown CE, Mackall CL. CAR T cell therapy: inroads to response and resistance [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19: 73-74.
- [2] Wang QX, Shi LL. Progress in research of switchable chimeric antigen receptor T cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 2209-2213.
- [3] Carlisle JW, Ramalingam SS. A banner year for immunotherapy and targeted therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16: 79-80.
- [4] Xu J, Geng MY, Huang M. Mechanistic advancement in chemotherapeutic agents modulated antitumor immune response [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1741-1748.
- [5] Chen X, Cubillos-Ruiz JR. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21: 71-88.
- [6] Mohamed E, Cao Y, Rodriguez PC. Endoplasmic reticulum stress regulates tumor growth and anti-tumor immunity: a promising opportunity for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66: 1069-1078.
- [7] Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 621-667.
- [8] Cox JH, Yewdell JW, Eisenlohr LC, et al. Antigen presentation requires transport of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum [J]. *Science*, 1990, 247: 715-718.
- [9] Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73: 79-94.
- [10] Bednarek SY, Ravazzola M, Hosobuchi M, et al. COPI and COPII-coated vesicles bud directly from the endoplasmic reticulum in yeast [J]. *Cell*, 1995, 83: 1183-1196.
- [11] Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2656-2664.
- [12] Karna KK, Shin YS, Choi BR, et al. The role of endoplasmic reticulum stress response in male reproductive physiology and pathology: a review [J]. *World J Mens Health*, 2020, 38: 484.
- [13] Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, et al. The unfolded protein response in immunity and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16: 469-484.
- [14] Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the mammalian unfolded protein response [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108: 2777-2793.
- [15] Sayeed A, Ng DTW. Search and destroy: ER quality control and ER-associated protein degradation [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2005, 40: 75-91.
- [16] Chevet E, Hetz C, Samali A. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5: 586-597.
- [17] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 184-190.
- [18] Li C, Xu J, Li F, et al. Unfolded protein response signaling and MAP kinase pathways underlie pathogenesis of arsenic-induced cutaneous inflammation [J]. *Cancer Prev Res*, 2011, 4: 2101-2109.
- [19] Qu LK, Huang S, Baltzis D, et al. Endoplasmic reticulum stress induces p53 cytoplasmic localization and prevents p53-dependent apoptosis by a pathway involving glycogen synthase kinase-3 $\beta$  [J]. *Genes Dev*, 2004, 18: 261-277.
- [20] Koumenis C. ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression [J]. *Curr Mol Med*, 2006, 6: 55-69.
- [21] Yi S, Chen K, Zhang L, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in stress-induced hypothalamic neuronal injury in rats via the PERK-ATF4-CHOP and IRE1-ASK1-JNK pathways [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 190.
- [22] Li Y, Jiang W, Niu Q, et al. eIF2 $\alpha$ -CHOP-BCI-2/JNK and IRE1 $\alpha$ -XBP1/JNK signaling promote apoptosis and inflammation and support the proliferation of Newcastle disease virus [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 1-15.
- [23] Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, et al. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17: 97-111.
- [24] Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 860-875.
- [25] Kepp O, Menger L, Vacchelli E, et al. Crosstalk between ER stress and immunogenic cell death [J]. *Cytokine Growth Factor*

- Rev, 2013, 24: 311-318.
- [26] Barker HE, Paget JTE, Khan AA, et al. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15: 409-425.
- [27] Soto-Pantoja DR, Wilson AS, Clear KY, et al. Unfolded protein response signaling impacts macrophage polarity to modulate breast cancer cell clearance and melanoma immune checkpoint therapy responsiveness [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 80545-80559.
- [28] Lin J, Liu H, Fukumoto T, et al. Targeting the IRE1 $\alpha$ /XBP1s pathway suppresses CARM1-expressing ovarian cancer [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 5321.
- [29] Kimata Y, Kohno K. Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23: 135-142.
- [30] Buondonno I, Gazzano E, Tavanti E, et al. Endoplasmic reticulum-targeting doxorubicin: a new tool effective against doxorubicin-resistant osteosarcoma [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76: 609-625.
- [31] Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 101-124.
- [32] Shi Y, Wang S, Wu J, et al. Pharmaceutical strategies for endoplasmic reticulum-targeting and their prospects of application [J]. *J Control Release*, 2020, 329: 337-352.
- [33] Bilekova S, Sachs S, Lickert H. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, 42: 85-95.
- [34] Huang C, Li T, Liang J, et al. Recent advances in endoplasmic reticulum targeting metal complexes [J]. *Coord Chem Rev*, 2020, 408: 213178.
- [35] Choi JW, Choi SH, Hong ST, et al. Two-photon probes for the endoplasmic reticulum: its detection in a live tissue by two-photon microscopy [J]. *Chem Commun*, 2020, 56: 3657-3660.
- [36] Deng H, Zhou Z, Yang W, et al. Endoplasmic reticulum targeting to amplify immunogenic cell death for cancer immunotherapy [J]. *Nano Lett*, 2020, 20: 1928-1933.
- [37] Ghosh C, Nandi A, Basu S. Supramolecular self-assembly of triazine-based small molecules: targeting the endoplasmic reticulum in cancer cells [J]. *Nanoscale*, 2019, 11: 3326-3335.
- [38] Pandey S, Patil S, Ballav N, et al. Spatial targeting of Bcl-2 on endoplasmic reticulum and mitochondria in cancer cells by lipid nanoparticles [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8: 4259-4266.
- [39] Banerjee S, Dixit A, Shridharan RN, et al. Endoplasmic reticulum targeted chemotherapeutics: the remarkable photo-cytotoxicity of an oxovanadium (IV) vitamin-B6 complex in visible light [J]. *Chem Commun*, 2014, 50: 5590-5592.
- [40] Wang YQ, Ji MY, Wang C. Endoplasmic reticulum-targeted glutathione and pH dual responsive vitamin lipid nanovesicles for tocopheryl DM1 delivery and cancer therapy [J]. *Int J Pharm*, 2020, 582: 119331.
- [41] Wan J, Sun L, Wu P, et al. Synthesis of indocyanine green functionalized comblike poly (aspartic acid) derivatives for enhanced cancer cell ablation by targeting the endoplasmic reticulum [J]. *Polym Chem*, 2018, 9: 1206-1215.
- [42] Walter P, Lingappa VR. Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane [J]. *Annu Rev Cell Biol*, 1986, 2: 499-516.
- [43] Stornaiuolo M, Lotti LV, Borgese N, et al. KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex [J]. *Mol Biol Cell*, 2003, 14: 889-902.
- [44] Gassmann M, Haller C, Stoll Y, et al. The RXR-type endoplasmic reticulum-retention/retrieval signal of GABAB1 requires distant spacing from the membrane to function [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68: 137-144.
- [45] Oosterhuis K, Aleyd E, Vrijland K, et al. Rational design of DNA vaccines for the induction of human papillomavirus type 16 E6-and E7-specific cytotoxic T-cell responses [J]. *Hum Gene Ther*, 2012, 23: 1301-1312.
- [46] Matsuo K, Yoshikawa T, Oda A, et al. Efficient generation of antigen-specific cellular immunity by vaccination with poly ( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles entrapping endoplasmic reticulum-targeted peptides [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362: 1069-1072.
- [47] Shi L, Gao X, Yuan W, et al. Endoplasmic reticulum-targeted fluorescent nanodot with large stokes shift for vesicular transport monitoring and long-term bioimaging [J]. *Small*, 2018, 14: 1800223.
- [48] Henriquez FL, Nickdel MB, McLeod R, et al. Toxoplasma gondii dense granule protein 3 (GRA3) is a type I transmembrane protein that possesses a cytoplasmic dilysine (KKXX) endoplasmic reticulum (ER) retrieval motif [J]. *Parasitology*, 2005, 131: 169-179.
- [49] Sneh-Edri H, Likhtenshtein D, Stepensky D. Intracellular targeting of PLGA nanoparticles encapsulating antigenic peptide to the endoplasmic reticulum of dendritic cells and its effect on antigen cross-presentation *in vitro* [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8: 1266-1275.
- [50] Ting CH, Huang HN, Huang TC, et al. The mechanisms by which pardaxin, a natural cationic antimicrobial peptide, targets the endoplasmic reticulum and induces c-FOS [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 3627-3640.
- [51] Shi Y, Zhu C, Liu Y, et al. A vaccination with boosted cross presentation by ER-targeted antigen delivery for anti-tumor immunotherapy [J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10: e2001934.
- [52] Li W, Yang J, Luo L, et al. Targeting photodynamic and photothermal therapy to the endoplasmic reticulum enhances immunogenic cancer cell death [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 3349.
- [53] Li W, Chen C, Ye C, et al. The translocation of fullerene nanoparticles into lysosome *via* the pathway of clathrin-mediated endocytosis [J]. *Nanotechnol*, 2008, 19: 145102.

- [54] Conrad PA, Smart EJ, Ying YS, et al. Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps [J]. *J Cell Biol*, 1995, 131: 1421-1433.
- [55] Zhang W, Yu M, Xi Z, et al. Cancer cell membrane-camouflaged nanorods with endoplasmic reticulum targeting for improved antitumor therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 46614-46625.
- [56] Pollock S, Antrobus R, Newton L, et al. Uptake and trafficking of liposomes to the endoplasmic reticulum [J]. *FASEB J*, 2010, 24: 1866-1878.
- [57] Qiu C, Han HH, Sun J, et al. Regulating intracellular fate of siRNA by endoplasmic reticulum membrane-decorated hybrid nanoplexes [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 2702.
- [58] Marschall ALJ, Dübel S, Böldicke T. Recent advances with ER targeted intrabodies [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 917: 77-93.
- [59] Pelkmans L, Püntener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae [J]. *Science*, 2002, 296: 535-539.
- [60] Burton GJ, Yung HW, Murray AJ. Mitochondrial-endoplasmic reticulum interactions in the trophoblast: stress and senescence [J]. *Placenta*, 2017, 52: 146-155.
- [61] Wang Y, Luo S, Zhang C, et al. An NIR-fluorophore-based therapeutic endoplasmic reticulum stress inducer [J]. *Adv Mater*, 2018, 30: 1800475.
- [62] Schlegel A, Arvan P, Lisanti MP. Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation: protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 4398-4408.
- [63] Pelster MS, Amaria RN. Combined targeted therapy and immunotherapy in melanoma: a review of the impact on the tumor microenvironment and outcomes of early clinical trials [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2019, 11: 1758835919830826.