

## 共载多柔比星和IDO1 siRNA的高渗透性纳米粒增强肿瘤免疫治疗

史梦浩, 王 瑜, 韩妍妍, 张九龙, 吴诗洋, 陈大为\*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** 肿瘤免疫治疗存在两个严重障碍: ① 免疫抑制肿瘤微环境 (immunosuppressive tumor microenvironment, ITM) 和肿瘤的低免疫原性的存在, 严重降低肿瘤的免疫应答; ② 致密而复杂的病理生理屏障严重限制了实体瘤的深部给药。化疗药物多柔比星 (doxorubicin, DOX) 诱导的肿瘤免疫原性细胞死亡 (immunogenic cell death, ICD) 是增强肿瘤免疫活性的有效方法。但是 ICD 作用后细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 分泌的干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 会增加吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1) 蛋白的表达, 其能够增强 ITM。而 IDO1 siRNA 的协同作用会降低 IDO1 蛋白的表达, 调节肿瘤免疫抑制微环境, 调节 ITM, 从而增强 DOX 的 ICD 作用。本文利用 pH 敏感材料 PLD [poly(ethylene glycol)-poly-L-lysine-2,3-dimethylmaleic anhydride, mPEG-PLL-DMA] 和聚酰胺-胺树状大分子 (PAMAM) 树状聚合物, 一种新型电荷转换、粒径减小的纳米粒, 实现肿瘤组织的深层递送。从而使共载 DOX 药物和 IDO1 siRNA 的载体实现高效的肿瘤免疫治疗。制剂及细胞水平的实验表明 PLD 材料具有显著的 pH 敏感性。体外 3D 肿瘤渗透实验结果表明 pH 敏感材料 PLD 的加入显著提高制剂的渗透性。此外, 建立 BALB/c 小鼠 4T1 药效实验模型, 动物实验操作过程依照沈阳药科大学动物实验伦理委员会的要求执行。体内的药效实验及组织实验表明, IDO1 siRNA 的加入显著提高 DOX 的 ICD 作用, 从而显著抑制肿瘤生长。

**关键词:** 多柔比星; siRNA; 免疫原性细胞死亡; 肿瘤微环境; 吲哚胺 2,3-双加氧酶 1

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)01-0242-09

## Highly penetrable nanoparticles co-loading doxorubicin and IDO1 siRNA enhance tumor immunotherapy

SHI Meng-hao, WANG Yu, HAN Yan-yan, ZHANG Jiu-long, WU Shi-yang, CHEN Da-wei\*

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract:** There are two serious obstacles to tumor immunotherapy. Firstly, the immune response of the tumor is seriously reduced due to immunosuppressive tumor microenvironment (ITM) and low immunogenicity of tumor. The second obstacle is the dense and complex heterogeneous structures, which seriously prevent the nanoparticles (NPs) from penetrating deeper into tumor tissue. Immunogenic cell death (ICD) induced by doxorubicin (DOX) is an effective method to enhance tumor immune activity. However, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) secreted by cytotoxic T lymphocytes (CTL) after ICD induction would increase the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) and enhance ITM. IDO1 siRNA would reduce the expression of IDO1 protein, regulate the tumor immunosuppressive microenvironment and regulate ITM, so as to enhance the ICD effect of DOX. In this paper, a novel charge conversional, particle size reduction and highly penetrable NPs based on a pH sensitive copolymer poly(ethylene glycol)-poly-L-lysine-2,3-dimethylmaleic anhydride (mPEG-PLL-DMA, PLD) and polyamidoamine (PAMAM) dendrimers to achieve deep delivery of tumor tissue. DOX and IDO1 siRNA were encapsulated to achieve efficient tumor immunotherapy. Preparation and cell level experiments showed that PLD material had significant pH

收稿日期: 2021-09-15; 修回日期: 2021-09-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872820).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-24-43520546, E-mail: chendawei@syphu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1352

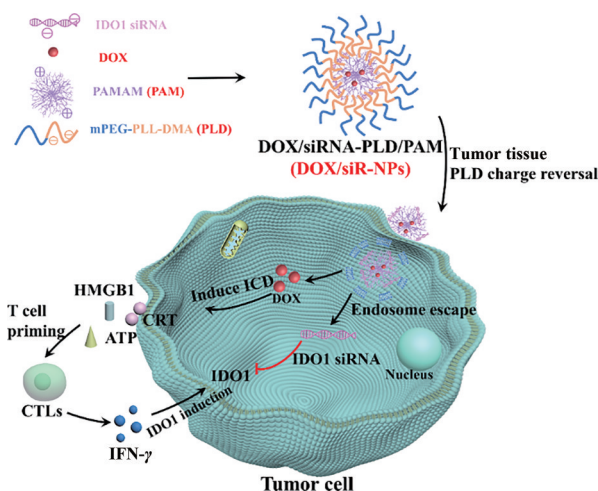
sensitivity. Results of 3D tumor penetrable experiment *in vitro* showed that adding the pH sensitive material PLD significantly improved the permeability of the preparation. In addition, 4T1 tumor model was established for BALB/c mice and all animal experiments were displayed in according with the requirements of the Animal Experiment Ethics Committee of Shenyang Pharmaceutical University. The results of *in vivo* efficacy experiments and tissue experiments evaluated that IDO1 siRNA significantly improved the ICD effect owing to DOX, so as to significantly inhibit tumor growth.

**Key words:** doxorubicin; siRNA; immunogenic cell death; tumor microenvironment; indoleamine 2,3-dioxygenase 1

目前, 肿瘤免疫治疗是一种强有力的肿瘤治疗策略<sup>[1]</sup>, 肿瘤免疫原性死亡 (immunogenic cell death, ICD) 是一种通过激活免疫作用杀伤肿瘤细胞的有效手段<sup>[2]</sup>。肿瘤细胞受到刺激后会产生损伤相关分子信号 (damage-associated molecular patterns, DAMPs), 包括钙网蛋白 (calreticulin, CRT)、高迁移率蛋白 1 (high-mobility group box 1, HMGB1) 和三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP), 激活免疫应答并活化肿瘤免疫反应<sup>[3]</sup>。但是, ICD 诱导作用后产生的细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 分泌的干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 会增加内源性吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1) 的表达, 从而增强了免疫抑制肿瘤微环境 (immunosuppressive tumor microenvironment, ITM), 阻止肿瘤的免疫应答<sup>[4,5]</sup>。IDO1 蛋白在大多数肿瘤细胞中高表达, 其催化色氨酸 (tryptophan, Trp) 的耗竭, 导致犬尿氨酸 (kynurenine, Kyn) 增多。Trp 的耗竭和 Kyn 等代谢物的产生导致肿瘤微环境产生免疫抑制作用, 促进癌细胞的免疫逃逸<sup>[5-8]</sup>, 故降低 IDO1 蛋白的表达不但可以显著地增强肿瘤的免疫应答, 更能提高多柔比星 (doxorubicin, DOX) 的 ICD 作用。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指由与特定基因序列同源的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 诱发的特定基因沉默<sup>[9-11]</sup>。小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 作为潜在的癌症治疗策略具有高度安全性、高效性以及特异性等优势, 利用 siRNA 能够引起同源基因 mRNA 降解并沉默其蛋白表达。因此, 本文引入 IDO1 siRNA, 其与 DOX 的协同作用会显著降低 IDO1 蛋白的表达, 增强 DOX 的 ICD 作用, 显著增强肿瘤的免疫应答<sup>[12-14]</sup>。然而, siRNA 在生理环境下极不稳定, 易被血清中的核糖核酸酶 (ribonuclease, RNase) 迅速降解<sup>[15,16]</sup>。因此, 研究开发具有多功能递药系统并实现有效递送 siRNA 的临床意义重大。另外, 异质结构和独特的肿瘤微环境阻止载药系统深入肿瘤组织, 从而减低药物的治疗效果, 设计构建一种既能包载 siRNA 又能深层递送的载药系统势在必行。

综上所述, 本课题组构建了一种基于 pH 敏感共聚物聚乙二醇-聚赖氨酸-2,3-二甲基马来酸酐 [poly (ethylene glycol)-poly-L-lysine-2,3-dimethylmaleic anhydride, mPEG-PLL-DMA, 简称 PLD]<sup>[17]</sup> 和聚酰胺-胺树状大分子 (polyamidoamine, PAMAM) 的新型电荷转换和高渗透纳米粒, 包载疏水性药物 DOX 和负电荷的 IDO1 siRNA 作为多功能纳米平台 (示意图 1)。利用 DOX 的 ICD 作用将癌细胞变成“肿瘤疫苗”, 刺激释放抗肿瘤免疫相关分子信号, 提升肿瘤免疫原性。另外, IDO1 siRNA 调节肿瘤的免疫抑制微环境。通过两种药物的联合应用, 可获得安全、低毒的肿瘤免疫治疗能力。pH 敏感共聚物 PLD 在中性环境中呈现为负电荷, 当在 pH 6.5 左右的肿瘤微酸性环境中, 由于



**Scheme 1** DOX/siRNA-PLD/PAM was prepared with IDO1 siRNA, DOX and PAMAM dendrimers and then capped with a pH-sensitive copolymer PLD. DOX/siRNA-NPs boasted enhance tumor penetration in the effective treatment of 4T1 cells in tumor bearing mice. DOX: Doxorubicin; PLD: Poly(ethylene glycol)-poly-L-lysine-2,3-dimethylmaleic anhydride (mPEG-PLL-DMA); IDO1: Indoleamine 2,3-dioxygenase 1; PAMAM: Polyamidoamine; HMGB1: High-mobility group box 1; ICD: Immunogenic cell death; ATP: Adenosine triphosphate; CRT: Calreticulin; CTLs: Cytotoxic T lymphocytes; IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$

mPEG-PLL 和 DMA 之间的可切割酰胺键, PLD 共聚物从负电荷转变为正电荷, 从纳米粒上脱离, 暴露出带有正电荷的 PAMAM 纳米粒, 其电荷的反转和粒径的降低会显著提高纳米粒对肿瘤组织的渗透能力。

## 材料与amp;方法

**试剂和仪器** mPEG-PLL-DMA [本实验室自制, mPEG (聚乙二醇) 分子质量为 2 000 Da, PLL (聚赖氨酸) 为 1 500 Da]<sup>[17]</sup>; PAMAM 树状大分子 (G4.0, 含 NH<sub>2</sub> 端基, 乙二胺核); DOX (北京华奉联博科技有限公司); IDO1 siRNA (上海吉玛制药有限公司) 正义链: 5'-GGGCUUCUCCUCGUCUCUTT-3'; 反义链: 5'-AGA GACGAGGAAGAAGCCCTT-3'<sup>[12]</sup>; 胰酶、胎牛血清、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培养基 (Gibco 公司); 甲基噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、4',6-二氨基-2-苯基吲哚 (4',6-diamino-2-phenyl indole, DAPI) (碧云天生物技术研究所); 抗 IDO1-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 抗体、抗 CD8-FITC 抗体和抗 CD4-PE (phycoerythrin) 抗体 (Proteintech 公司); ATP 试剂盒、Ki67 试剂盒、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, H&E) 试剂盒 (联科生物有限公司); 其他试剂均为分析纯。

Tanon 2500R 全自动数码凝胶图像分析系统 (上海天能科技有限公司); Varioskan Flash 多功能酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司); JEM-1200EX 透射电子显微镜 (日本 Electron 株式会社); FV1000-IX81 激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司)。

**细胞培养** 小鼠乳腺癌细胞 4T1 细胞于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养。

**DOX/siR-PLD/PAM 纳米粒的制备** 将 DOX 和 PAMAM 树状大分子以 10:1 的质量比溶解在 30 mL 甲醇中。室温搅拌 24 h, 旋转蒸发完全去除甲醇后, 加入磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer, PBS, pH 7.4) 10 mL, 搅拌以溶解 PAMAM 树状大分子, 0.22 μm 滤膜过滤后, 利用超速离心法对制剂的包封率进行测定。将溶液置于离心管中并离心 (12 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min), 吸取上清液计算包载的 DOX 含量。另外, 精密吸取溶液, 加入甲醇进行破乳, 得到总的 DOX 含量, 从而计算 DOX 的包封率。随后, 按照氮磷比 (N/P, PAMAM 的氨基与 siRNA 的磷酸基团的摩尔比) 为 4 加入 IDO1 siRNA, 负电荷的 IDO1 siRNA 与正电荷的 PAMAM 树状大分子正负电荷吸附, 包载 IDO1 siRNA, 制备成 DOX/siR-PAM 纳米制剂。在 pH 7.4 时, 按照不同的 PLD/PAM 质量比加入 PLD 共聚物, 制备成 DOX/siR-PLD/PAM 纳米制剂 (DOX/siR-NPs)。

利用琼脂糖凝胶阻滞实验来考察 siRNA 的包封率。首先, 称取 1.0 g 琼脂糖于锥形瓶中, 加入 0.5×Tris-硼酸 (TBE) 50 mL 后, 微波炉中火加热 2 min 至全部溶解。待凝胶略微冷却后精密吸取溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 溶液 2.5 μL 加入其中, 轻轻摇晃混匀, 趁热倒入模具中并插入梳齿, 室温冷却后将梳齿取出, 即得凝胶备用。随后, 取上述制备的一系列 N/P 比的 siR-PAM 纳米粒加入至琼脂糖凝胶各泳道中, 等量游离 siRNA 作为阴性对照组, 100 V 恒定电压电泳 30 min 后将凝胶放入凝胶成像系统中, 采用透射光观察成像并拍照。

另外, 采用超滤管分离-荧光分光光度法测定纳米粒中的 siRNA 的包封率 (用带有荧光的 FAM siRNA 替换 siRNA)。将纳米制剂置于 Amicon Ultra-4 超滤管 (截留分子质量为 50 kDa), 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后, 所得滤液即为未包封 FAM siRNA, 测得其荧光强度 ( $F_1$ ;  $E_x$ : 480 nm,  $E_m$ : 520 nm)。取与制剂等量的 FAM siRNA 测定其荧光强度 ( $F_2$ )。最后用公式 (1) 计算 FAM siRNA 的包封率 (encapsulation efficiency, EE):

$$EE (\%) = (1 - F_1 / F_2) \times 100 \quad (1)$$

采用马尔文激光粒度仪测定不同 PLD/PAM 质量比的 DOX/siR-PLD/PAM 纳米粒 (DOX/siR-NPs) 的粒径和 zeta 电位的变化。利用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 进行制剂的形态学的考察。

**pH 敏感性的考察** 采用动态光衍射法 (DLS) 测定纳米粒在 pH 6.5 和 7.4 的 PBS 中的 zeta 电位和粒径。

### 体外细胞毒性考察

利用 MTT 方法考察空白载体 (PLD/PAM 纳米粒) 的细胞毒性 将 4T1 细胞以每孔  $1 \times 10^4$  个接种于 96 孔板中, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 细胞培养箱中培养 24 h。采用 PBS 清洗后向每孔加入含 10、40、80、100 和 200 μg·mL<sup>-1</sup> 的 PLD/PAM 纳米粒 DMEM 培养液 200 μL, 分别培养 24 和 48 h 后每孔加入 MTT 溶液 20 μL, 继续培养 4 h, 弃去培养液每孔加入二甲基亚砷 150 μL, 避光震荡 10 min, 采用酶标仪于 490 nm 处测定吸光度 ( $A$ ) 值。

利用 MTT 方法考察载药制剂的体外细胞毒性 将 4T1 细胞以每孔  $1 \times 10^4$  个接种于 96 孔板中, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 细胞培养箱中培养 24 h。弃去培养液, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 向每孔加入一定量的 DOX 和 DOX/NPs 的 DMEM 培养液 200 μL, 使其终浓度 (以 DOX 计) 分别为 2、4、6、8 和 10 μmol·L<sup>-1</sup>, 并且在不同 pH 条件下培养 (7.4 或 6.5)。后续实验方法同上。

**体外摄取实验** 为考察 pH 敏感材料对细胞摄取的影响, 本研究使用共聚焦激光显微镜 (confocal laser

scanning microscope, CLSM) 观察4T1细胞对不同制剂的摄取情况。将4T1细胞以每孔 $1 \times 10^6$ 个接种于铺有盖玻片的6孔板中,置于5% CO<sub>2</sub>、37 °C细胞培养箱中培养12 h,加入一定量的free FAM siRNA和FAM siR-NPs (FAM siRNA: 100 nmol L<sup>-1</sup>) 在pH 7.4或6.5条件下孵育4 h后,用4%多聚甲醛固定细胞30 min, DAPI染细胞核后,采用CLSM观察细胞摄取情况并拍照。

**体外3D肿瘤细胞的深层递送考察** 为了充分证明pH敏感材料对肿瘤深层递送的影响,建立了4T1细胞的3D肿瘤模型<sup>[18-20]</sup>。用100 μL 无菌琼脂糖溶液(2%, w/v) 覆盖96孔板中,以每孔 $2 \times 10^3$ 个细胞数接种4T1细胞,置于5% CO<sub>2</sub>、37 °C细胞培养箱中培养。待4T1细胞的3D肿瘤球的直径长至300 μm时,加入FAM siR-NPs (FAM siRNA: 100 nmol L<sup>-1</sup>) 分别在pH 7.4和6.5条件下共孵育4 h后,采用CLSM观察并拍照。

**体外诱导ICD作用** 将4T1细胞在12孔板( $2 \times 10^5$ 个/孔)中培养过夜,然后用PBS、DOX、DOX-NPs pH 7.4和DOX-NPs pH 6.5 ( $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DOX) 处理24 h。收集条件培养基,通过ELISA试剂盒检测ATP的水平。为了评估CRT暴露,培养4T1细胞并用PBS、DOX和DOX-NPs制剂分别在pH 7.4和6.5条件下孵育24 h。然后用兔CRT一抗( $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 处理30 min, PBS冲洗后用FITC标记的抗兔IgG二抗( $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 处理20 min,采用流式细胞仪定量检测CRT的表达。采用CLSM定性观察,4%多聚甲醛固定细胞,DAPI染细胞核后,采用CLSM观察CRT暴露情况并拍照。

**体内药效学实验** 将4T1细胞按照细胞条件培养,待细胞处于对数生长期时,将细胞消化制备成每毫升 $5 \times 10^7$ 个的细胞悬液,每只BALB/c雌性小鼠[18~22 g; 质量合格证号: 211002300064979; 许可证号: SCXK(辽) 2020-0001] 右腋下接种0.2 mL细胞悬液,约7天后选取同一批次肿瘤体积约为100 mm<sup>3</sup>的成瘤小鼠进行实验。动物实验操作过程依照沈阳药科大学动物实验伦理委员会的要求执行。

将荷瘤小鼠随机分成6组,分别为生理盐水组、free siRNA组、DOX组、siR-NPs组、DOX-NPs组和DOX/siR-NPs组。每组按照 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  DOX、 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  siRNA的剂量尾静脉注射给药,每2天1次,共给药4次。治疗期间,每4天对小鼠进行体重称量。

在实验结束后,处死BALB/c小鼠并剥离肿瘤,称取瘤重并拍照。另外,在停止给药后,每天检测小鼠的生存数量从而观察小鼠的生存状态,绘制生存曲线并应用GraphPad Prism软件分析中位生存期。

**组织学实验** 将肿瘤剥离后立即用福尔马林固定过夜,经石蜡包埋,制成石蜡切块,切至5 μm厚的石蜡

切片,二甲苯脱蜡,分别经无水乙醇、95%、75%、50%、30%乙醇至水洗涤,用H&E染色后再用梯度乙醇脱水,二甲苯透明,封片液封片,置于倒置荧光显微镜下观察。

Ki67是一种增殖细胞相关的核抗原,其功能与有丝分裂密切相关,在细胞增殖中至关重要。Ki67常作为标记细胞增殖状态的抗原,阳性说明癌细胞增殖活跃。依照Ki67试剂盒进行实验并拍照。

为了验证DOX的ICD作用,以及与IDO1 siRNA的协同作用,肿瘤组织进行一系列的组织学染色。肿瘤组织切片分别用抗IDO1-FITC抗体(IDO1蛋白),抗CD8-FITC抗体(CD8<sup>+</sup> T细胞)和抗CD4-PE抗体(CD4<sup>+</sup> T细胞)染色。CRT蛋白的染色过程依照“体外诱导ICD作用”项中的实验流程操作。最后,切片经DAPI染色后用CLSM拍照。

**统计学方法** 数据以平均值 ± 标准差表示。统计显著性通过单因素方差分析(ANOVA)确定, $P < 0.05$ 代表组间具有显著性差异。所有实验需要重复进行3次。

## 结果与讨论

### 1 制剂的处方优化和特征

PAMAM树状大分子空腔内部具有较强的疏水性,可包裹疏水性药物DOX,形成DOX-PAM纳米粒。而PAMAM表面带有正电荷,可通过静电相互作用吸附带有负电荷的IDO1 siRNA,形成DOX/siR-PAM纳米粒,之后与在pH 7.4条件下带有负电荷的pH敏感聚合物PLD正负电荷吸引,制成DOX/siR-PLD/PAM(DOX/siR-NPs)。

采用琼脂糖凝胶实验考察N/P比对siRNA包封率的影响。如图1A所示,当N/P比为4时,siR-PAM组观察不到siRNA条带,故确定优化处方siR-PAM组的N/P比为4。当在不同质量比条件下,DOX的包封率随DOX与PAMAM的质量比的增加而增加(图1B),当质量比为10时,其包封率达到80%,故确定优化处方的DOX与PAMAM的质量比为10。

制备DOX/siR-PAM纳米粒后,在中性环境下与负电荷的PLD共聚物包裹,形成DOX/siR-PLD/PAM纳米粒(DOX/siR-NPs)。如图1C、D所示,随PLD/PAM质量比增加,DOX和siRNA的包封率逐渐增加,粒径也逐渐增加,但是电位逐渐降低。当PLD/PAM质量比为5时,其粒径为 $140.73 \pm 1.65 \text{ nm}$ , zeta电位为 $-7.73 \pm 1.44 \text{ mV}$ ,为负电荷,可以显著提高其在血液中滞留的时间,故确定PLD/PAM质量比为5。

TEM为观察纳米粒形态大小的一种重要手段。

如图1E所示, DOX/siR-NPs呈球形和类球形, 分布比较均一。其大小与DLS测定的结果较为相近。总之, 此纳米制剂的包封率较高; 粒径小于200 nm, 有利于增强渗透和保留 (enhanced permeation and retention, EPR) 效应; zeta电位为负电荷, 延长制剂的血液循环时间; 外观圆整分布均匀。

## 2 pH敏感性测定

为考察DOX/siR-NPs的pH敏感性, 将DOX/siR-NPs置于pH 6.5 PBS中, 4 h后测定zeta电位和粒径。结果如图1F所示, 当pH从7.4变为6.5时, DOX/siR-NPs的粒径变小且zeta电位从负电荷转变为正电荷, 原因为修饰的PLD共聚物可以迅速从DOX/siR-NPs上面解离, 使zeta电位增加和粒径变小。

## 3 体外细胞毒性考察

利用MTT实验考察空白载体对4T1细胞的毒性。结果如图2A所示, 空白载体在孵育24和48 h后, 其均没有明显细胞毒性, 细胞存活率均在80%以上, 说明空白载体的细胞毒性很低, 生物相容性良好, 是安全无毒的纳米载体材料。

不同制剂组对4T1细胞的细胞毒性和 $IC_{50}$ 值如图2B、C所示。相比pH 7.4条件下的DOX-NPs溶液组, pH 6.5条件下的DOX-NPs组的细胞毒性显著提高。以上结果间接说明, PLD具有良好的pH敏感性, 在pH 6.5时, pH敏感的共聚物PLD从负电荷转变为正电荷, 可以与细胞表面微弱的负电荷相互结合, 更好地发挥作用。

## 4 细胞摄取实验

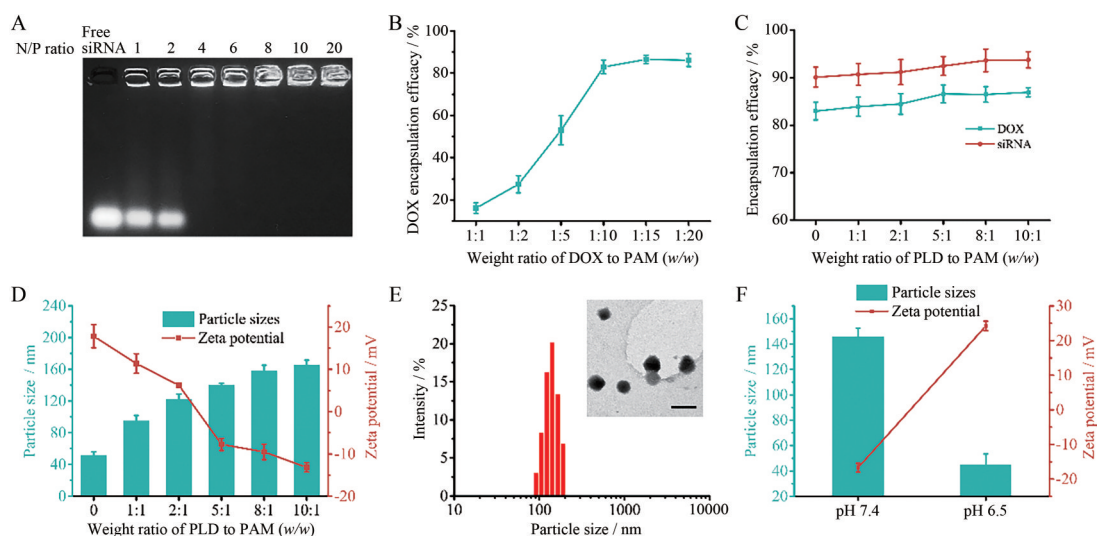
为考察不同条件下的FAM siR-NPs对细胞的摄取情况, 采用CLSM进行定性观察。结果如图2D所示, 在4 h时, free FAM siRNA组的荧光较弱, 说明细胞对游离的siRNA的摄取有限。对于siR-NPs组, 在pH 6.5条件下的摄取明显高于pH 7.4的摄取, 其原因可能为pH 6.5条件下PLD电荷反转, 迅速从纳米粒上面解离, 暴露出带有正电荷的siR-PAM NPs, 从而具有更强的细胞摄取量, 此结果验证了上述MTT实验的结果。以上结果表明, 在pH 6.5条件下, DOX-NPs的细胞毒性明显高于pH 7.4条件下的细胞毒性, 并且pH 6.5的siR-NPs的细胞摄取明显多于pH 7.4条件下的细胞摄取, 验证了制剂的pH敏感性。

## 5 体外肿瘤组织的渗透考察

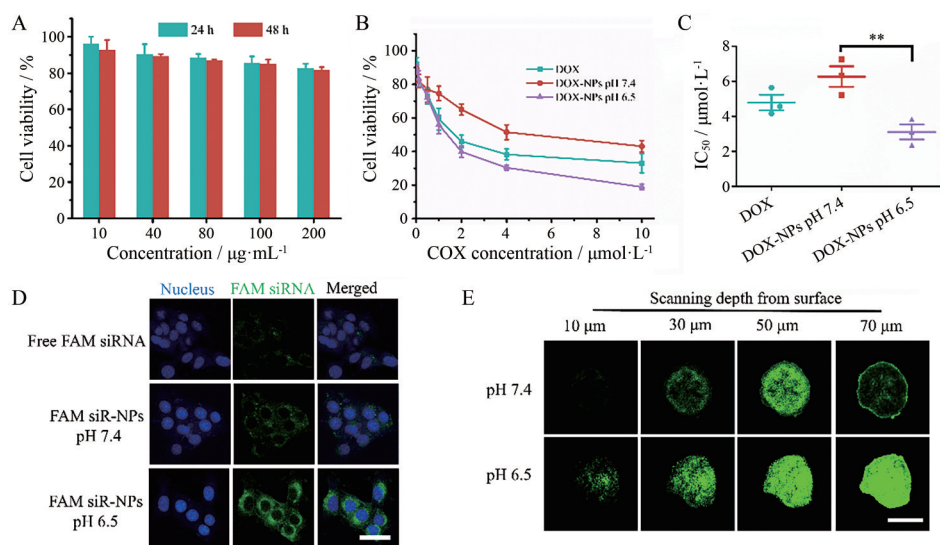
此纳米制剂的设计关键是通过可变大小和电荷反转材料实现肿瘤组织的高肿瘤渗透性, 因此, 研究了不同条件下的体外肿瘤穿透能力。如图2E所示, 在pH 7.4下经过siR-NPs组 (此处均用FAM siRNA) 处理4 h后, 在z轴距离为70  $\mu\text{m}$ 处可以观察到微弱的绿色荧光信号。相比之下, pH 6.5下的siR-NPs组显示了较强的绿色荧光, 结果表明, siR-NPs在微酸性环境下具有较高的肿瘤穿透性, 并且进一步验证了纳米粒pH敏感性的必要性。

## 6 体外诱导ICD

DOX诱导ICD的能力通过检测CRT表达和ATP



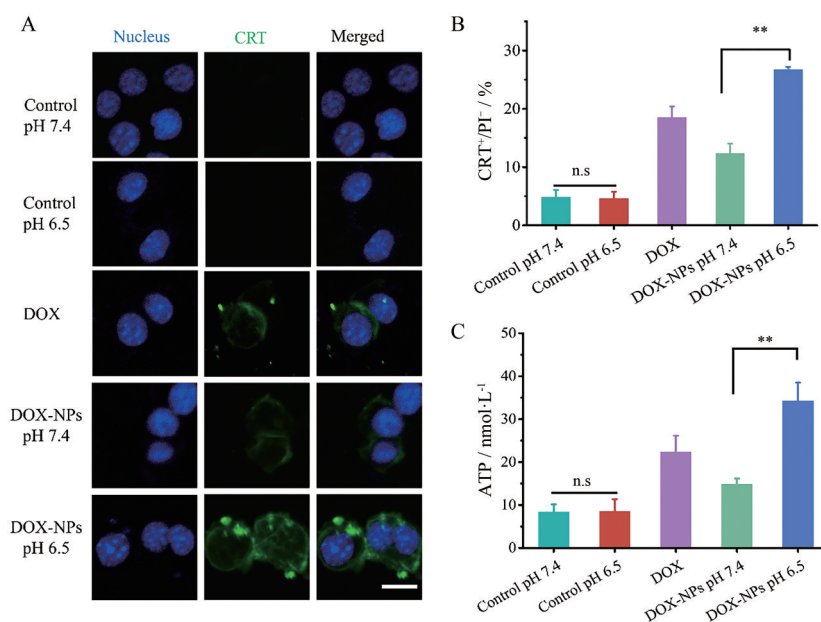
**Figure 1** A: Agarose gel electrophoresis analysis of different formulations with different N/P ratios. B: DOX entrapment efficiency (EE, %) verification with an increase of the weight ratio (DOX/PAM) of DOX-PAM group. C: DOX and siRNA EE% verification with an increase of the weight ratio (PLD/PAM) of DOX/siR-PLD/PAM group. D: Particle size and zeta potential verification with an increase of the weight ratio (PLD/PAM) of DOX/siR-PLD/PAM group. E: Transmission electron microscope (TEM) image and dynamic light scattering (DLS) result of DOX/siR-PLD/PAM group. Scale bar: 200 nm. F: Size distribution and zeta potential of DOX/siR-PLD/PAM group under diverse conditions.  $n = 3, \bar{x} \pm s$



**Figure 2** *In vitro* cell cytotoxicity of blank formulations (A) and different DOX-loaded formulations (B) against the 4T1 cell line under different conditions. C: 50% inhibiting concentration ( $IC_{50}$ ) value of DOX-NPs under different conditions.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ .  $**P < 0.01$ . D: Confocal laser scanning microscope (CLSM) images of 4T1 cells following cellular uptake with different formulations for 4 h. Green and blue represented FAM-siRNA and nuclei, respectively. Scale bar: 50  $\mu m$ . E: CLSM examination of the siR-NPs distribution in 4T1 3D tumor spheroids at pH 7.4 and 6.5, respectively. Green fluorescence represents FAM-siRNA. Scale bar: 200  $\mu m$ . DOX-NPs: DOX-PLD/PAM; FAM siRNA: FAM labeled siRNA; siR-NPs: siRNA-PLD/PAM

的细胞外释放来表征 (图3)。CRT 是一种促凋亡蛋白, 在 ICD 期间充当 APC 的“吃我”信号。为了考察 pH 的变化对 ICD 的作用是否有影响, 空白对照组在不同 pH 条件下的 CRT 的阳性率及 ATP 的分泌量无差别, 结果说明 pH 不影响细胞的 ICD 作用。将 4T1 细胞与

DOX-NPs 孵育 4 h 后, CLSM 实验结果表明 4T1 细胞的 CRT 阳性百分比的不同变化, 图 3A 显示 DOX-NPs 在 pH 6.5 条件下具有较强的绿色荧光, 其表达较多的 CRT 蛋白。流式实验结果如图 3B 所示, 当 pH 从 7.4 转变为 6.5 时, DOX-NPs 组的 CRT 阳性的百分比从 12%



**Figure 3** A: CLSM examination of different DOX-loaded formulations CRT expression on the cell surface of 4T1 cells *in vitro*. Scale bar: 50  $\mu m$ . B: Flow cytometric examination of CRT exposure on the surface of 4T1 cells. C: Quantitative determination of ATP secretion of 4T1 cells after treatment with different DOX-loaded formulations.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ .  $**P < 0.01$ . n.s: No significance; CRT: Calreticulin; PI: Propidium iodide; ATP: Adenosine triphosphate

增至28%, 显示最强的CRT的表达。

此外, 不同环境下的ATP分泌量也有所不同。当pH从7.4转变为6.5时, 4T1细胞的ATP的分泌量明显增多。总之, 这些结果验证了DOX可有效地诱导ICD, 并且进一步验证了纳米粒pH敏感性的必要性。

## 7 体内药效学实验

肿瘤重量及图片如图4A、B所示, 空白对照组及free siRNA溶液组几乎无差别, 其瘤重均高于2 g, 说明free siRNA可能会快速降解, 从而几乎没有抑瘤作用。相对于DOX-NPs组, DOX/siR-NPs组具有明显的抗肿瘤活性, 结果说明IDO1 siRNA的加入能协同DOX的ICD作用, 共同抑制肿瘤的生长。

肿瘤治疗期间, 对体重进行监测。图4C表明各个制剂组的小鼠体重均无明显变化并呈现微弱的上升趋势, 说明制剂对正常组织均没有明显的体内毒性, 载体制剂的安全性良好。

在停止给药后, 每天检测小鼠的生存数量从而观察小鼠的生存状态及中位生存期。由图4D、E可见,

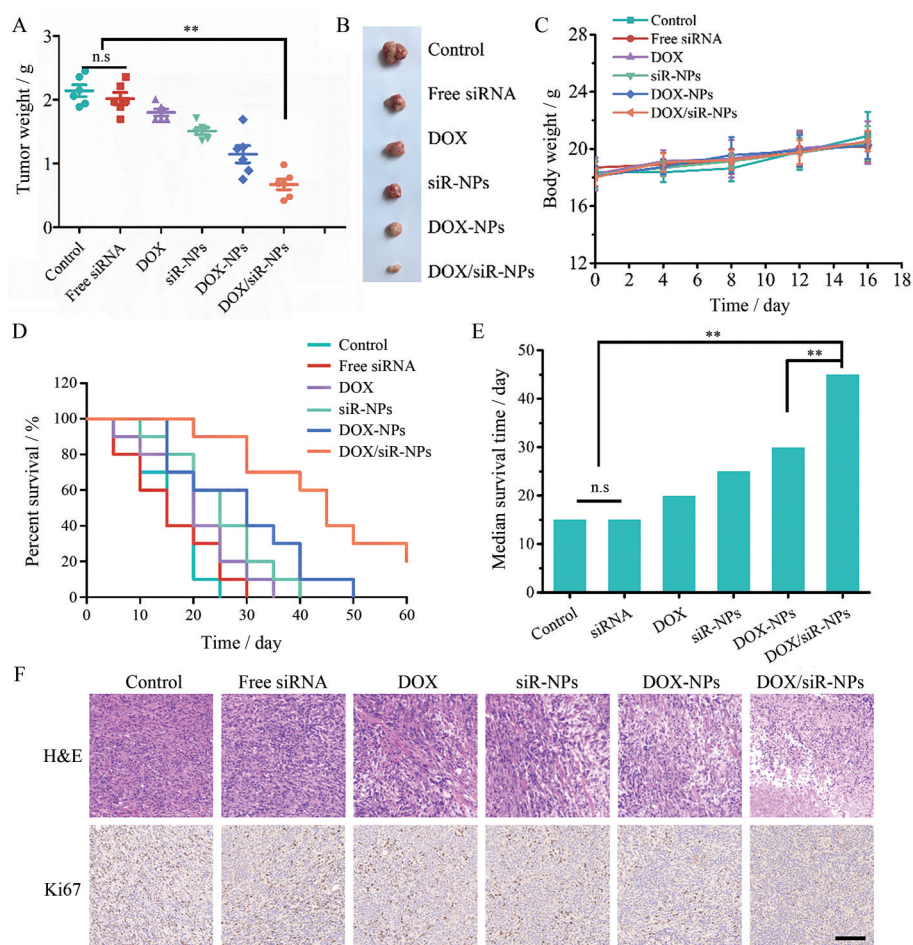
DOX/siR-NPs表现出更长的生存时间且中位生存期较长, 从而表明DOX和IDO1 siRNA的协同治疗作用。

H&E染色显示蓝紫色为细胞核, 粉红色为细胞质。对照组肿瘤细胞的细胞核较大, 并且细胞排列极不规律, 密集成群。在不同制剂组中, 细胞数目均存在不同程度减少, 坏死部分也存在不同程度增多, 其中DOX/siR-NPs组制剂的抑瘤效果最为明显(图4F), 此结果与药效学实验结果一致。

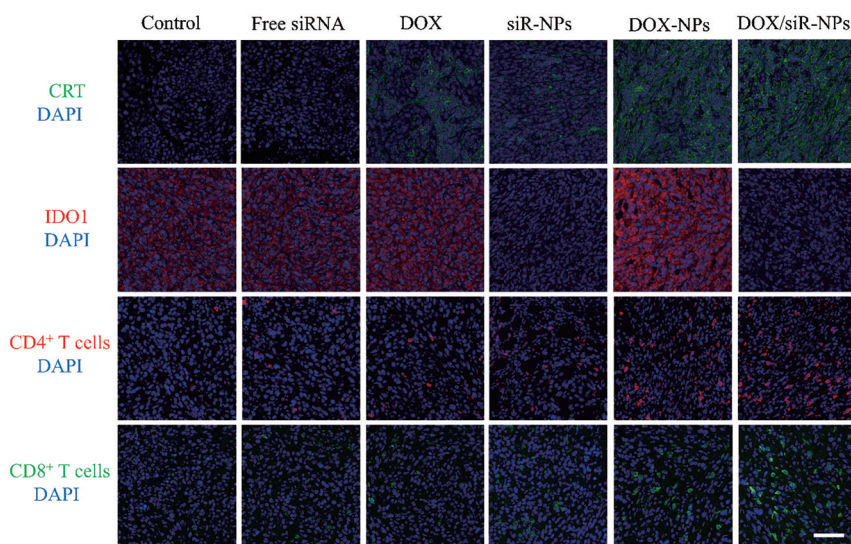
Ki67是一种增殖细胞相关的核抗原, 阳性说明癌细胞增殖活跃。不同制剂对于肿瘤组织的增生情况的影响如图4F所示。对照组Ki67呈现高表达(棕色斑点)。而不同的给药组均呈现了不同程度的肿瘤增生抑制, 其中DOX/siR-NPs组呈现出最为明显的抗增生活性。各实验组抗增生活性趋势与H&E染色相同。

## 8 组织学研究

本研究利用免疫荧光染色进一步研究了DOX的CRT暴露情况及IDO1 siRNA的IDO1抑制结果。除此之外, CLSM实验结果显示CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细



**Figure 4** Tumor weight (A), the image of tumors (B) and body weight (C) in 4T1 cell-bearing BALB/c mice. Survival curves (D) and median survival time (E) of 4T1 tumor-bearing mice after the treatment.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ . F: Tumor tissues were used to prepare paraffin-embedded slides for hematoxylin-eosin staining (H&E) and Ki67 study. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$



**Figure 5** Immunofluorescence examination of CRT exposure, IDO1 expression on the surface of 4T1 tumor, CD4<sup>+</sup> T cells (red: CD4) and CD8<sup>+</sup> T cells (green: CD8) in tumor sections after different treatments. Scale bar: 100  $\mu$ m. PE: Phycoerythrin; FITC: Fluorescein isothiocyanate; DAPI: 4',6-Diamino-2-phenyl indole

胞在肿瘤中的数量。相较于对照组, DOX组 CRT 有微弱的绿色荧光, 而 siRNA 包载的制剂组几乎没有荧光, 说明 DOX 的 ICD 作用。DOX/siR-NPs 表现出更强的绿色荧光, 说明载体可以增强 DOX 的作用。为了观察 IDO1 siRNA 的作用效果, 利用免疫荧光染色考察 IDO1 蛋白的表达。结果如图 5 所示, 对照组和 free siRNA 组无明显不同。然而, DOX 组及 DOX-NPs 组的 IDO1 表达略有增加, 主要原因是 ICD 作用后 CTL 分泌的 IFN- $\gamma$  会增加 IDO1 的表达, 而 IDO1 siRNA 的协同作用会降低 IDO1 蛋白的表达, 调节肿瘤免疫抑制微环境, 增强 DOX 的 ICD 作用, 因此 DOX/siR-NPs 制剂的治疗效果最好。

为了更直观地观察免疫治疗, 利用 CLSM 考察 CD8<sup>+</sup> T 细胞和 CD4<sup>+</sup> T 细胞的数量变化。结果表明, 相对于对照组, DOX/siR-NPs 组的 CD8<sup>+</sup> T 细胞和 CD4<sup>+</sup> T 细胞的数量均明显增多。结果显示, DOX/siR-NPs 的化疗-免疫联合应用可以通过提高肿瘤细胞凋亡效率、提高纳米粒的肿瘤组织的高渗透率、提高 CD8<sup>+</sup> T 细胞及 CD4<sup>+</sup> T 细胞等多种手段, 从而实现最优的免疫治疗。

总之, DOX 作用后会增加 IDO1 的表达, 而 IDO1 siRNA 的引入显著降低 IDO1 蛋白, 增强 DOX 的 ICD 作用。DOX/siR-NPs 组的 CD8<sup>+</sup> T 细胞和 CD4<sup>+</sup> T 细胞明显多于 DOX-NPs 组, 进一步验证了 IDO1 siRNA 的协同作用增强了 DOX 的作用效果。

## 结论

本文成功构建了一种多功能纳米平台, 该平台具

有电荷转换和高渗透性的纳米载体, 包载 DOX 和 IDO1 siRNA, 提高肿瘤的免疫治疗。该纳米载体主要是由 PAMAM 树状大分子内部疏水空腔包载 DOX, IDO1 siRNA 与 PAMAM 表面的正电荷正负电荷吸附。在 pH 7.4 时, 负电荷的 pH 敏感聚合物 PLD 包载在纳米载体的表面, 得到 DOX/siR-NPs 制剂。

当静脉注射给药时, DOX/siR-NPs 由于 PEG 的空间位阻作用通过 EPR 效应积聚在弱酸性肿瘤组织中。肿瘤组织的弱酸性微环境刺激 PLD 共聚物发生电荷反转, 从而暴露出正电荷的 DOX/siR-PAM 纳米粒, 粒径减小, 能够深层地递送到肿瘤组织的深部, 增强肿瘤细胞的摄取, 释放 DOX 和 IDO1 siRNA 药物。DOX 和 IDO1 siRNA 的联合作用会改善肿瘤免疫治疗, 从而显著抑制肿瘤生长。

**作者贡献:** 陈大为和史梦浩提供了研究思路, 所有作者参与了本研究的设计, 史梦浩收集和分析数据并撰写了论文, 王瑜、韩妍妍、张九龙和吴诗洋负责修改文章, 陈大为负责文章选题和指导写作。

**利益冲突:** 所有作者声明本文无任何利益冲突。

## References

- [1] Adams JL, Smothers J, Srinivasan R, et al. Big opportunities for small molecules in immuno-oncology [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14: 603-622.
- [2] Li J, Wang H, Wang Y, et al. Tumor-activated size-enlargeable bioinspired lipoproteins access cancer cells in tumor to elicit anti-tumor immune responses [J]. *Adv Mater*, 2020, 32: 2002380.
- [3] Huang ZY, Chen YY, Zhang JL, et al. Laser/GSH-activatable

- oxaliplatin/phthalocyanine-based coordination polymer nanoparticles combining chemophotodynamic therapy to improve cancer immunotherapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13: 39934-39948.
- [4] Sun JJ, Wan ZY, Xu JN, et al. Tumor size-dependent abscopal effect of polydopamine-coated all-in-one nanoparticles for immunochemo-photothermal therapy of early- and late-stage metastatic cancer [J]. *Biomaterials*, 2021, 269: 120629.
- [5] Huang H, Jiang CT, Shen S, et al. Nanoenabled reversal of IDO1-mediated immunosuppression synergizes with immunogenic chemotherapy for improved cancer therapy [J]. *Nano Lett*, 2019, 19: 5356-5365.
- [6] Röhrig UF, Reynaud A, Majjigapu SR, et al. Inhibition mechanisms of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 8784-8795.
- [7] Dong MJ, Liu ZZ. Advances in research on inhibitors based on targets: IDO1 and TDO [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1265-1278.
- [8] Wang T, Wen H, Cui HQ, et al. Research progress on indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 723-733.
- [9] Chavez-Pena C, Kamen AA. RNA interference technology to improve the baculovirus-insect cell expression system [J]. *Bio-technol Adv*, 2018, 36: 443-451.
- [10] Ratnayake G, Bain AL, Fletcher N, et al. RNA interference to enhance radiation therapy: targeting the DNA damage response [J]. *Cancer Lett*, 2018, 439: 14-23.
- [11] Mali SB. RNA interference in oral cancer [J]. *Oral Oncol*, 2015, 51: e2-e3.
- [12] Li J, Zhao M, Xu YH, et al. Hybrid micelles codelivering shikonin and IDO-1 siRNA enhance immunotherapy by remodeling immunosuppressive tumor microenvironment [J]. *Int J Pharm*, 2021, 597: 120310.
- [13] Zhang YJ, Fu JM, Shi YM, et al. A new cancer immunotherapy via simultaneous DC-mobilization and DC-targeted *IDO* gene silencing using an immune-stimulatory nanosystem [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143: 2039-2052.
- [14] Chen D, Koropatnick J, Jiang N, et al. Targeted siRNA silencing of indoleamine 2,3-dioxygenase in antigen-presenting cells using mannose-conjugated liposomes: a novel strategy for treatment of melanoma [J]. *J Immunother*, 2014, 37: 123-134.
- [15] Zhu J, Qiao MX, Wang Q, et al. Dual-responsive polyplexes with enhanced disassembly and endosomal escape for efficient delivery of siRNA [J]. *Biomaterials*, 2018, 162: 47-59.
- [16] Wang HX, Yang XZ, Sun CY, et al. Matrix metalloproteinase 2-responsive micelle for siRNA delivery [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 7622-7634.
- [17] Shi MH, Wang Y, Zhao XF, et al. Stimuli-responsive and highly penetrable nanoparticles as a multifunctional nanoplatform for boosting nonsmall cell lung cancer siRNA therapy [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2021, 7: 3141-3155.
- [18] Yue EW, Sparks R, Polam P, et al. INCB24360 (epacadostat), a highly potent and selective indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor for immuno-oncology [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2017, 8: 486-491.
- [19] Wu HY, Yu MR, Miao YQ, et al. Cholesterol-tuned liposomal membrane rigidity directs tumor penetration and anti-tumor effect [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9: 858-870.
- [20] Shu M, Tang JJ, Chen LL, et al. Tumor microenvironment triple-responsive nanoparticles enable enhanced tumor penetration and synergetic chemo-photodynamic therapy [J]. *Biomaterials*, 2021, 268: 120574.