

Anti-CXCR4 纳米抗体抑制胰腺癌新生血管的机制探索

李雅贤, 徐舒怡, 郑玥江, 彭利云, 朱建伟, 吴明媛*

(上海交通大学药学院, 上海 200240)

摘要: 肿瘤新生血管为肿瘤的发生发展提供足够氧气和营养物质, 支持肿瘤的生长和转移。胰腺癌微环境中基质细胞衍生因子-1 (stromal cell derived factor 1, SDF-1, 又称 CXCL12) 及其受体 C-X-C 趋化因子受体 4 (C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4) 参与了肿瘤细胞的增殖、迁移和新血管生成等多个生理过程, 可作为胰腺癌治疗的靶点。本研究利用大肠杆菌系统表达了靶向 CXCR4 分子的纳米抗体, 镍柱亲和层析纯化获得 anti-CXCR4 纳米抗体 (CXCR4 Nb) 和 anti-PD-L1 (programmed cell death ligand 1) & CXCR4 双特异性纳米抗体 (PX4 BsNb), 通过体外实验探究 CXCR4 Nb 拮抗肿瘤新生血管的作用及机制, 体内验证 CXCR4 Nb 和 PX4 BsNb 对胰腺癌荷瘤小鼠的抗肿瘤活性。人外周血单个核细胞分离实验获得上海交通大学地方伦理委员会批准, 动物福利和实验过程均遵循上海交通大学动物伦理委员会的规定。体外实验结果表明, 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CXCR4 Nb 能有效抑制 SDF-1 诱导的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 迁移, 拮抗胰腺星状细胞对 HUVEC 增殖和迁移的促进作用。在 NOD/SCID 小鼠皮下胰腺癌移植瘤模型中, 腹腔给予 0.3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ CXCR4 Nb, 抑瘤率为 28.8%, 0.3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PX4 BsNb 抑瘤率为 36.1%, 且免疫荧光显示治疗组肿瘤部位血管生成均减少。CXCR4 Nb 具有良好的安全性和有效性, 为胰腺癌的抗血管生成治疗和纳米抗体的应用提供了理论基础。

关键词: 纳米抗体; 基质细胞衍生因子-1; C-X-C 趋化因子受体 4; 血管新生; 胰腺星状细胞; 胰腺癌

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2022)11-3331-08

Mechanism of anti-CXCR4 nanobody inhibiting angiogenesis in pancreatic cancer

LI Ya-xian, XU Shu-yi, ZHENG Yue-jiang, PENG Li-yun, ZHU Jian-wei, WU Ming-yuan*

(School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Tumor angiogenesis provides adequate oxygen and nutrition for tumor development and supports tumor growth and metastasis. Stromal cell derived factor 1 (SDF-1) and its receptor C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4) in pancreatic cancer microenvironment are involved in tumor growth such as promoting tumor cell proliferation, migration, and angiogenesis. In this study, anti-CXCR4 nanobody (CXCR4 Nb) and anti-programmed cell death ligand 1 (PD-L1) & CXCR4 bispecific nanobody (PX4 BsNb) were expressed in *Escherichia coli* system and purified by nickel column affinity chromatography. We investigated the anti-angiogenesis activity and mechanism of CXCR4 Nb by *in vivo* and *in vitro* experiments. Ethical approval was obtained for collection of human peripheral blood mononuclear cell (hPBMC) samples from the Local Ethics Committee of Shanghai Jiao Tong University. All animal experiments were approved by the Animal Ethic Committee of Shanghai Jiao Tong University. The results showed that CXCR4 Nb at 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ could effectively inhibit the proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) promoted by pancreatic stellate cells *in vitro*. CXCR4 Nb and PX4 BsNb at 0.3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ obviously decreased tumor angiogenesis and inhibited the tumor growth in NOD/SCID mice, the inhibitory

收稿日期: 2022-04-12; 修回日期: 2022-05-17.

基金项目: 转化医学国家重大科技基础设施(上海) 开放课题基金 (TMSK-2020-131).

*通讯作者 Tel: 86-21-34204631, E-mail: wumingyuan@sjtu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0424

rates were 28.8% and 36.1%, respectively. CXCR4 Nb significantly inhibited tumor growth and angiogenesis with great safety, which provides support for application of CXCR4 Nb and anti-angiogenesis therapy of pancreatic cancer.

Key words: nanobody; stromal cell derived factor 1; C-X-C motif chemokine receptor 4; angiogenesis; pancreatic stellate cell; pancreatic neoplasm

胰腺癌是全球范围内恶性程度极高的消化系统肿瘤之一,其显著特点是发现晚、治疗难、预后差,目前5年生存率仍不足8%。传统的治疗方法如手术、化疗和放疗已被广泛使用,但在临床上没有明显改善^[1]。新生血管的形成对于包括胰腺癌在内的多种肿瘤进展具有重要意义,当肿瘤生长直径达到1、2 mm时,会建立适合自己生长的外部组织环境,通过与肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中多种细胞、细胞因子相互作用诱导新血管形成,构建新的营养代谢网络为肿瘤组织提供养分,同时作为转移通道有利于肿瘤细胞的迁移^[2]。TME是一个动态网络,包括多种类型细胞(肿瘤细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞、免疫细胞和周细胞等)和细胞外基质、生长因子及细胞因子等成分^[3]。TME会诱导肿瘤在原有血管基础上生成以毛细血管为主的新生血管系统,因此肿瘤新生血管的形成与TME密切相关^[4]。

胰腺星状细胞(pancreatic stellate cells, PSC)是胰腺癌中含量最丰富的基质细胞,是胰腺癌细胞外基质成分的主要来源,通过协助肿瘤生长、转移和血管生成成为胰腺癌的发展提供有利环境^[5,6]。临床数据表明,与血管生成相关的基因和蛋白,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等的表达异常均与胰腺癌恶性程度呈正相关^[7,8]。PSC除了可分泌直接促进血管生长的细胞因子VEGF,还可分泌基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor 1, SDF-1),通过激活肿瘤细胞表面CXCR4(C-X-C motif chemokine receptor 4)受体,既可刺激肿瘤的生长转移,又可作用于血管内皮细胞参与调控肿瘤的血管新生。SDF-1主要通过两种方式参与肿瘤新血管的生成调控:①促进邻近血管内皮细胞的迁移、增殖和成管;②通过动员和募集远处内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)到肿瘤部位参与新血管的形成^[9,10]。SDF-1还可诱导内皮细胞表达VEGF通过自分泌方式促进血管生成^[11-13]。有研究发现,胶质瘤中SDF-1作用于CXCR4受体后激活PI3K/AKT(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B)信号轴,促进VEGF表达上调进而促进血管生成。使用CXCR4小分子拮抗剂AMD3100或敲除CXCR4基因后,VEGF表达明显降

低,小鼠体内新生血管数量减少,肿瘤生长被抑制^[14]。肿瘤新生血管减少,血管正常化可为效应免疫细胞浸润肿瘤提供有利途径从而增强对肿瘤细胞的杀伤,因此抗血管治疗联合免疫检查点治疗相较于单一疗法可以达到更好的抑瘤效果^[15,16]。

基于已有基础,本研究利用大肠杆菌系统表达靶向CXCR4分子的纳米抗体(nanobody, Nb) anti-CXCR4纳米抗体(CXCR4 Nb)和anti-PD-L1(programmed cell death ligand 1)&CXCR4双特异性纳米抗体(PX4 BsNb)。以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)作为研究对象,利用PSC与HUVEC共培养模型,探究CXCR4 Nb拮抗胰腺癌新血管生成的作用及其机制,比较CXCR4 Nb与联合靶向CXCR4和免疫检查点PD-L1的PX4 BsNb的抑瘤效果,为纳米药物治疗肿瘤提供新的理论依据。

材料与方法

细胞及培养基 HUVEC、内皮细胞培养基(endothelial cell medium, ECM)(美国ScienCell公司);人胰腺癌细胞(AsPC-1,中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心);人胰腺星状细胞(human pancreatic stellate cells, HPSC, 宁波明州生物科技有限公司);DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国Gibco公司);人外周血单个核细胞(human peripheral blood mononuclear cell, hPBMC)由上海长海医院输血科提供,实验获得上海交通大学地方伦理委员会批准。

主要仪器 Cytotflex型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司);正置荧光显微镜(日本Olympus公司);多功能酶标仪Infinite M200 PRO(瑞士Tecan公司);振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司);全自动数码凝胶成像分析系统Tanon-1600(上海天能科技有限公司);His Trap FF层析柱、蛋白分离纯化系统AKTA Start(上海通用电气医疗系统有限公司);超高效液相色谱-离子淌度-四级杆飞行时间质谱仪(Acquity UPLC I-class/VION IMS Q-TOF, 美国Waters公司);蛋白凝胶电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

材料与试剂 胰蛋白胍、酵母提取物(英国Oxoid公司);咪唑、氨苄青霉素(上海麦克林生化科技有限公司);异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG, 上海生工生物

工程有限公司); 人源 SDF-1 重组蛋白 (美国 R&D 公司); 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS, 美国 Gibco 公司); CCK8 试剂盒 (日本 Dojindo 公司); 4% 多聚甲醛固定液 (北京索莱宝科技有限公司); anti-human CXCR4 兔 IgG 单克隆抗体、anti-6× His-tag 小鼠 IgG 单克隆抗体 [FITC (fluorescein isothiocyanate isomer) 标记] (英国 Abcam 公司); anti-human PD-L1 小鼠 IgG 单克隆抗体 [APC (allophycocyanin) 标记] (北京义翘神州科技有限公司); Alexa Fluor 647 标记的羊抗兔 IgG 第二抗体 (上海翊圣生物科技有限公司)。

实验动物 NOD/SCID 雌性小鼠 (浙江维通利华公司, 6~8 周龄), 动物实验方案由上海交通大学动物伦理委员会批准, 饲养于上海交通大学动物实验中心药学院分平台 SPF 级环境, 独立送风无菌笼具系统, 恒温 and 12 h 光照交替。

抗体的表达与纯化 实验室前期已构建 pET22b-CXCR4 重组质粒, CXCR4 Nb 序列从已有文献^[17] 获得, 在其 C 端加入多组氨酸标签 (6× His 标签), 可用于 CXCR4 Nb 的可溶性表达。将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 中, 涂板后挑取单菌落测序, 取测序正确的菌液接种于 5 mL 含 500 μg 氨苄抗生素的 LB 培养基 (每升 LB 培养基含 5 g 酵母提取物、10 g 蛋白胨、10 g 氯化钠, pH 7.0), 在 37 °C、220 r·min⁻¹ 摇床内培养 16 h, 取出转移至 500 mL TB 培养基 (每升 TB 培养基含 11.8 g 胰蛋白胨、23.6 g 酵母提取物、9.4 g 磷酸氢二钾、2.2 g 磷酸二氢钾和 4 mL 甘油) 中继续培养扩增, 待菌液在 600 nm 处的吸光度 (A_{600}) 值达到 0.6~0.8 时, 加入终浓度 0.1 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导表达。次日, 4 500 r·min⁻¹ 离心菌液 20 min 后收集菌体沉淀, 加入 50 mL PBS 重悬菌体沉淀, 混匀, 用高压均质仪破碎菌体, 收集菌液上清, 经过 0.45 μm 滤膜过滤后上机纯化。

纳米抗体序列采用 His 作为筛选标签, 因此选择使用镍柱亲和和层析纯化。样品上机前先用结合缓冲液平衡 His Trap FF 柱, A_{280} 值和电导率都稳定达到平衡状态时, 将结合缓冲液换为待纯化样品。上样结束后再次用结合缓冲液平衡 His Trap FF 柱, 平衡后加入咪唑洗脱液, 按 10%、20%、30%、50%、80% 和 100% 的浓度梯度洗脱, 收集洗脱峰用于 SDS-PAGE 鉴定和质谱分析。

抗原结合能力实验 将培养至 90% 融合的 HUVEC 用 0.5% 胰蛋白酶消化, 终止消化后离心收集细胞, 加入流式染色缓冲液 (fluorescence activated cell sorting buffer, FACS buffer) 重悬, 充分混匀后调整细胞浓度至每毫升 5×10^6 个细胞。每个 EP 管内加 200 μL 细胞悬液, 分别在样品中加入 1 μg CXCR4 Nb 或 PX4 BsNb

作为一抗, FITC 标记的 anti-6× His tag IgG 作为二抗; anti-human CXCR4 mAb 和 Alexa Fluor 647 标记的 anti-rabbit IgG 分别作为 CXCR4 抗原检测的一抗和二抗; Alexa Fluor APC 标记的 anti-human PD-L1 IgG 作为 PD-L1 抗原检测的抗体。将一抗加入 HUVEC 于 4 °C 避光孵育 30 min, 取出加入 FACS buffer 洗涤 2 次; 加入相应二抗, 4 °C 避光孵育 30 min, FACS buffer 洗涤 2 次, 用 100 μL FACS buffer 重悬细胞, 流式细胞仪上进行荧光强度的检测。

细胞增殖抑制实验 用 0.5% 胰蛋白酶消化处于对数生长期的 HUVEC, 加入 ECM 培养基重悬, 以每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板中过夜培养。待细胞贴壁后, 按 ECM 培养基和 HPSC 条件培养基 (HPSC conditioned medium, HPSC-CM) 1:1 比例换液, 加入 CXCR4 Nb 和 PX4 BsNb, 同时设 3 个复孔, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中分别孵育 48 和 72 h。孵育结束后, 按 10:1 比例 (孔内培养基:CCK8 溶液) 加入 CCK8 溶剂, 置于 37 °C 避光孵育 0.5~1 h, 用酶标仪检测各孔 A_{450} 值。根据公式 (1) 计算细胞存活百分比, 利用 GraphPad Prism 进行统计学分析和作图。

$$\text{细胞存活百分比} = [(A - C)/(B - C)] \times 100\% \quad (1)$$

其中, A 为实验组吸光值; B 为对照组吸光值; C 为空白组吸光值 (仅含有培养基和 CCK8 试剂)。

细胞划痕愈合实验 选择处于对数生长期的 HUVEC 用 0.5% 胰蛋白酶消化, 加 ECM 培养基重悬调整细胞密度至每毫升 2.5×10^5 个细胞, 铺至 6 孔细胞培养板过夜培养。次日用 200 μL 无菌枪头在垂直于 6 孔板横轴中心处划一条直线, 吸弃孔内上清液, 加 PBS 轻柔洗涤 2 次。实验组分别加入含 40 ng·mL⁻¹ SDF-1 的 ECM 培养基、HPSC-CM 与 ECM 培养基 (1:1) 的混合物, 对照组分别加入 PBS 和 ECM 培养基。继续在 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 2 h, 分别加入终浓度为 0.1 μmol·L⁻¹ 的 CXCR4 Nb 和 PX4 BsNb。该时间点计为 0 h, 继续培养并在 8 和 24 h 将 6 孔板置于倒置显微镜下拍照。每组取 3 个视野, 用 Image J 和 SPSS 软件进行统计分析, 根据公式 (2) 计算细胞迁移速率。

$$\text{细胞迁移速率} (\%) = (\text{0 h 划痕面积} - \text{观察时间划痕面积}) / \text{0 h 划痕面积} \times 100\% \quad (2)$$

体内移植瘤抑制实验 选择 6~8 周龄雌性 NOD/SCID 小鼠构建皮下胰腺癌移植瘤模型, 小鼠随机分为 4 组, 每组 3 只。空白组每只小鼠注射 1.5×10^6 AsPC-1 细胞, 对照组和实验组将 AsPC-1 与 HPSC 按 1:1 混合均匀, 每只注射 3×10^6 细胞混合悬液。将接种日定为第 0 天, 待肿瘤长至 50~100 mm³, 每只小鼠尾静脉注射 2×10^6 hPBMC 细胞, 为小鼠重构部分免疫系统。次日

腹腔给药, 给药组分别注射 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 CXCR4 Nb 和 PX4 BsNb, 空白组和对照组注射等体积 PBS, 每 3 天给药 1 次, 共 6 次给药。每 3 天测量 1 次小鼠肿瘤的长径 (a) 和短径 (b), 按 $V = 0.5 \times a \times b^2$ 计算肿瘤体积。第 28 天处死所有小鼠, 剥取肿瘤拍照, 用 4% 多聚甲醛溶液固定、切片后进行免疫荧光染色。

统计学分析 采用 GraphPad Prism 8 软件进行分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

结果

1 CXCR4 Nb 的表达、纯化与鉴定

收集大肠杆菌表达的菌液上清, 选用镍柱亲和层析法纯化获取 CXCR4 Nb。用缓冲液平衡上样结束后, 采用咪唑洗脱液进行分部梯度洗脱, 收集洗脱峰, 可见 6 个不同的紫外吸收峰, 说明不同的咪唑浓度均能洗脱 CXCR4 Nb (图 1A)。收集 20%、30%、50%、80% 和 100% 咪唑浓度的洗脱蛋白, 经 SDS-PAGE 鉴定均含有分子质量 29 kDa 的目的蛋白 (图 1B)。其中 20%、30% 和 50% 咪唑浓度洗脱所得样品中含较多杂蛋白, 而 80% 和 100% 咪唑浓度洗脱所得蛋白纯度较高, 收集 100% 咪唑洗脱所得目的蛋白用于质谱分析。

选择 100% 咪唑浓度洗脱所得目的蛋白, 用 PBS 缓冲液透析去除蛋白中的咪唑, 超滤浓缩后得到质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CXCR4 Nb, 通过超高效液相色谱-离子淌度-四级杆飞行时间质谱仪分析, 检测到单一碎片峰分子质量 29 kDa, 与 CXCR4 Nb 的理论分子质量相一致 (图 2), 说明利用大肠杆菌系统表达纯化后

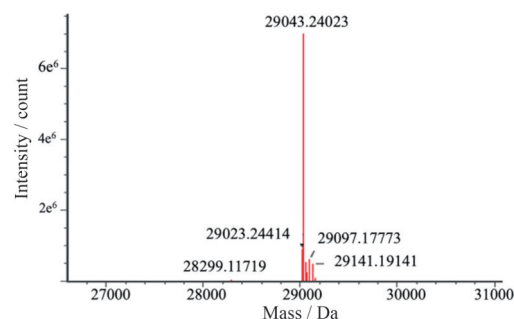


Figure 2 Ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC Q-TOF MS) to identify the molecular weight of CXCR4 Nb

获得的 CXCR4 Nb, 分子质量正确且纯度较高, 可用于后续实验。

2 流式细胞术检测人脐静脉内皮细胞上 CXCR4 的表达

为验证 HUVEC 可作为 CXCR4 Nb 体外抗血管生成研究的实验细胞, 应用流式细胞术检测 HUVEC 细胞膜上 CXCR4 的表达水平及与 CXCR4 Nb 和 PX4 BsNb 的结合能力。结果显示, HUVEC 均表达 CXCR4 和 PD-L1, 而通过大肠杆菌系统表达纯化的 CXCR4 Nb 和 PX4 BsNb 均能与 HUVEC 结合 (图 3)。

3 CXCR4 Nb 在 HUVEC 迁移中的作用

血管内皮细胞迁移是血管形成的关键步骤, 通过细胞划痕实验观察 CXCR4 Nb 和 PX4 BsNb 在 HUVEC 迁移中的作用。实验分为空白组、对照组和纳米抗体实验组, 分别在 0、8 和 24 h 时拍照记录划痕愈合情况。结果显示, 重组蛋白 SDF-1 能诱导 HUVEC 不断向划

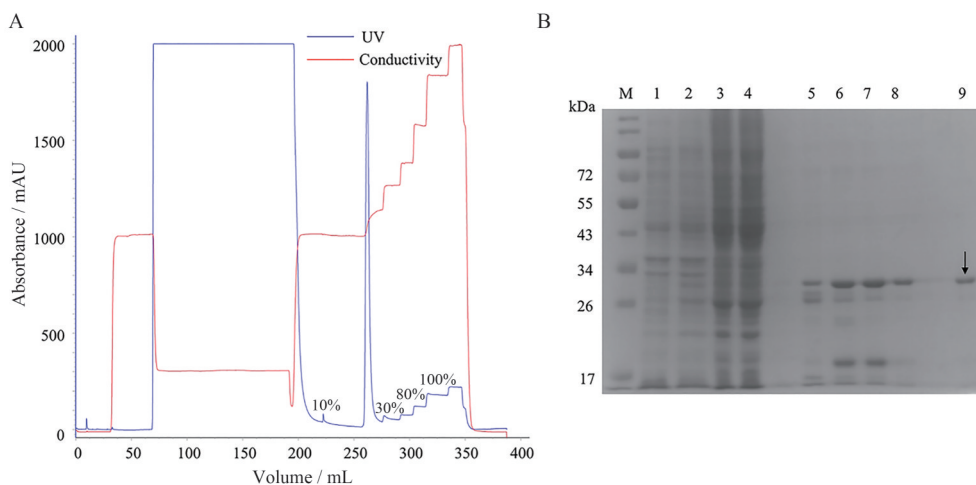


Figure 1 Purification and identification of anti-C-X-C motif chemokine receptor 4 nanobody (CXCR4 Nb). A: Purification process chromatogram of CXCR4 Nb using His-tag affinity chromatography column; B: 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of CXCR4 Nb. M: Protein marker; 1: Bacteria liquid; 2: Phosphate buffered saline (PBS) resuspended bacteria liquid; 3: Bacteria liquid after crushing; 4: Pre-purified supernatant; 5-9: The elution peaks of imidazole concentration at 20% (5), 30% (6), 50% (7), 80% (8) and 100% (9), respectively

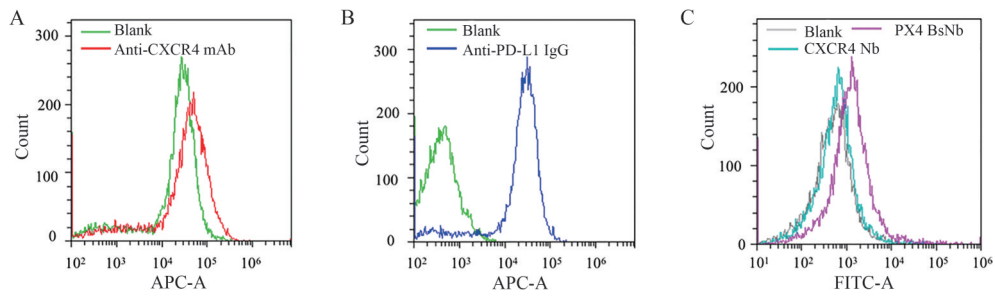


Figure 3 Fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis of nanobody binding to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and the expression of CXCR4 and programmed cell death ligand 1 (PD-L1). A: FACS analysis expression of CXCR4 in HUVEC; B: FACS analysis expression of PD-L1 in HUVEC; C: FACS analysis of nanobody binding to HUVEC. mAb: Monoclonal antibody; PX4 BsNb: Anti PD-L1&CXCR4 bispecific nanobody

痕中心迁移, 培养 24 h 后划痕几乎全部愈合; 而纳米抗体组划痕仍有间隙存在 (图 4A); 划痕面积定量分析结果显示 (图 4B), $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CXCR4 Nb 和 PX4 BsNb 均能抑制 HUVEC 的迁移, 24 h 内皮细胞迁移率明显低于 SDF-1 对照组, 说明 CXCR4 Nb 可拮抗 SDF-1 诱导的 HUVEC 迁移。

4 CXCR4 Nb 在 PSC 介导 HUVEC 迁移中的作用

PSC 是胰腺癌患者体内 SDF-1 的主要来源^[18]。为更好地模拟体内 HUVEC 的迁移情况, 使用 HPSC 条件培养基代替外源 SDF-1 与 HUVEC 共培养, 通过划痕实验观察 CXCR4 Nb 的抑制作用。结果显示, HPSC-CM

组迁移结果类似外源重组蛋白 SDF-1, 能促进 HUVEC 向划痕区域移动, 而纳米抗体均可抑制 HPSC-CM 诱导的 HUVEC 细胞迁移 (图 5A); 定量结果显示, 与 HPSC-CM 对照组相比, $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CXCR4 Nb 和 PX4 BsNb 在 8 和 24 h 的拮抗迁移作用均有显著性差异 (图 5B), 说明 HPSC 可能通过 SDF-1/CXCR4 轴促使 HUVEC 迁移, CXCR4 Nb 能拮抗 HPSC 的促迁移作用。

5 CXCR4 Nb 在 PSC 介导 HUVEC 增殖中的作用

PSC 通过诱导 HUVEC 的增殖和迁移, 促进 HUVEC 到达肿瘤部位形成新生血管, 利用 CCK8 实验可检测 CXCR4 Nb 对 HPSC 促细胞增殖的抑制作用。结果显

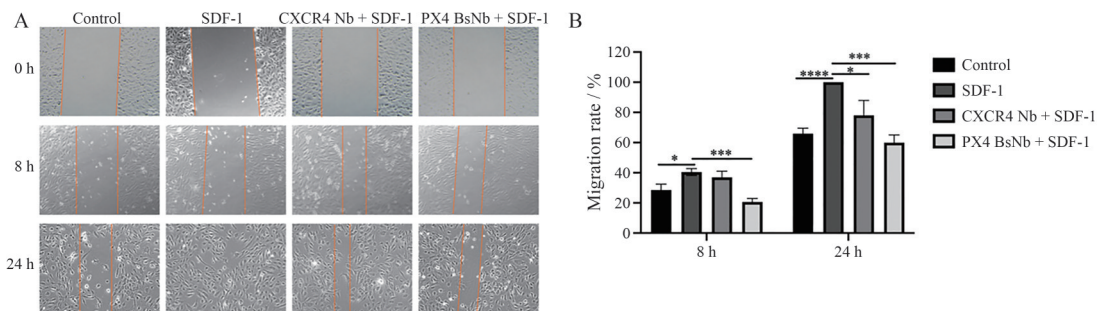


Figure 4 Migration of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), CXCR4 Nb and PX4 BsNb treated HUVEC by scratch assay. A: Representative images of the control, SDF-1, CXCR4 Nb and PX4 BsNb groups of HUVEC at 0, 8 and 24 h. Scale bar: 50 μm ; B: Quantitative analysis of scratch assay. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

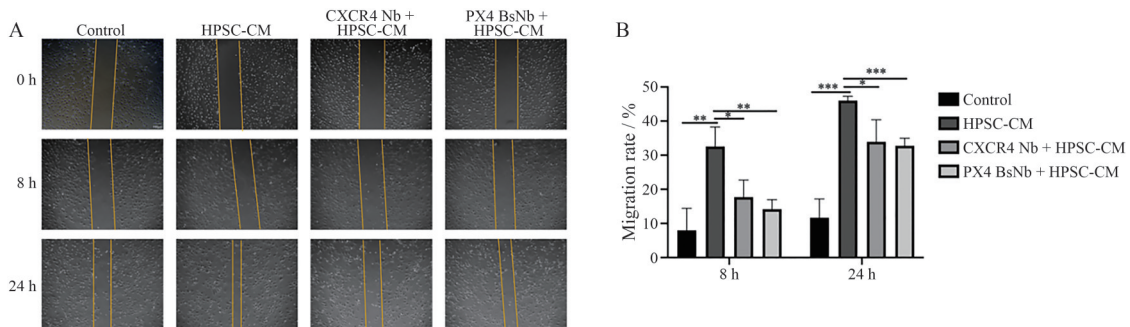


Figure 5 Effects of human pancreatic stellate cells (HPSC) conditioned medium (HPSC-CM), CXCR4 Nb and PX4 BsNb on wound healing of HUVEC. A: The migration of HUVEC after CXCR4 Nb and PX4 BsNb treatment in the presence of HPSC-CM at 0, 8 and 24 h. Scale bar: 100 μm ; B: Quantitative analysis of scratch assay. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

示, HPSC 条件培养基明显促进 HUVEC 的增殖, 与对照组相比有显著性差别; 0.01、0.1 和 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 CXCR4 Nb 和 PX4 BsNb 都可抑制 HPSC 对 HUVEC 的促增殖作用, 且呈现一定的浓度依赖性 (图 6)。由于纳米抗体没有 Fc 结构, 不会对细胞产生直接毒性作用, 因此 CXCR4 Nb 抑制 HPSC 促增殖的效果轻微^[19]。

6 CXCR4 Nb 对体内肿瘤和血管生成的影响

利用胰腺癌皮下移植瘤小鼠模型可直接观察纳米抗体的体内药效学作用。肿瘤生长曲线提示, HPSC 能促进胰腺癌细胞 AsPC-1 体内的快速生长, 说明 HPSC 在胰腺癌的发生发展中发挥重要作用。CXCR4

Nb 和 PX4 BsNb 联合 hPBMC 能明显抑制肿瘤细胞生长, 0.3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 CXCR4 Nb 和 PX4 BsNb 的给药组抑瘤率分别为 28.8% 和 36.1% (图 7A)。给药期间小鼠未出现死亡情况, 且体重平稳增加 (图 7B), 说明 CXCR4 Nb 在体内给药时有较好的安全性。光镜下观察 PX4 BsNb 组的抑瘤效果略优于 CXCR4 Nb (图 7C), 与肿瘤生长曲线结果一致, 说明通过阻断 SDF-1/CXCR4 途径可有效抑制体内肿瘤生长, 联合拮抗负向调控信号 PD-L1 靶点能进一步增加体内抗肿瘤免疫应答。通过 CD31 标记肿瘤组织内新生血管, 免疫荧光结果显示, HPSC 能促进肿瘤内新血管的形成, 给予 CXCR4 Nb 和 PX4

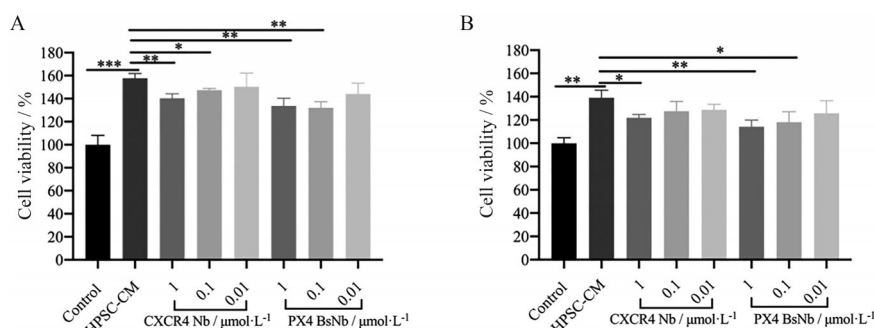


Figure 6 Anti-proliferation effects of CXCR4 Nb and PX4 BsNb on HUVEC for 48 h (A) and 72 h (B). $n = 3, \bar{x} \pm s. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001$

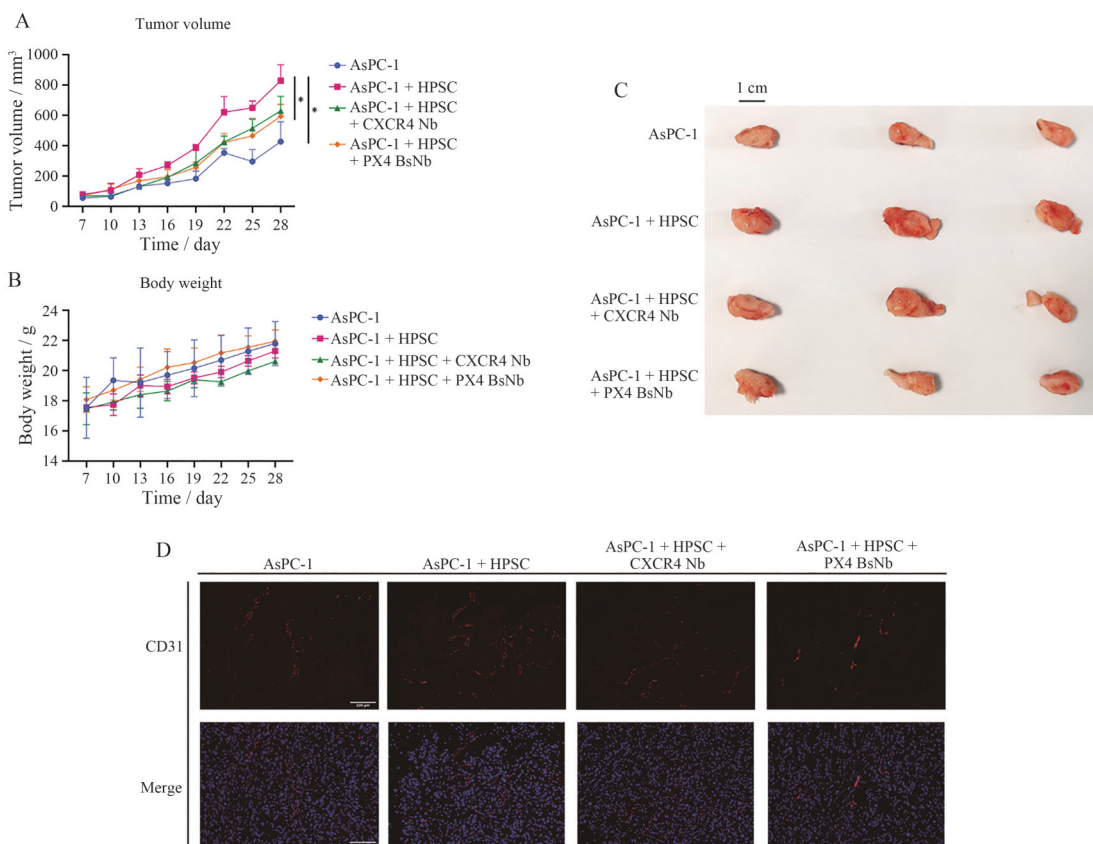


Figure 7 Tumor inhibition efficiency of CXCR4 Nb and PX4 BsNb *in vivo*. A: Relative tumor volume-time curve. $n = 3, \bar{x} \pm s. *P < 0.05;$ B: Body weight changes over time; C: Image of all stripped tumor masses; D: Tumor sections stained with anti-CD31 mAb. Scale bar: 100 μm

BsNb 治疗后, 肿瘤部位血管生成相对减少 (图 7D)。

讨论

新血管生成是肿瘤生长转移的重要因素之一, 针对血管生成的靶向药物已成为临床肿瘤治疗的有效方案, 如靶向 VEGF 分子的贝伐珠单抗可显著延长结直肠癌患者的生存期, 但这些药物在胰腺癌治疗中收效甚微^[20,21]。因此, 本研究选择 TME 中与细胞增殖迁移、血管生成和基质降解等肿瘤生长过程相关的 SDF-1/CXCR4 轴, 构建表达靶向 CXCR4 分子的纳米抗体, 探究其对胰腺癌微环境中新血管生成的作用及其机制, 并使用 PX4 BsNb 探究联合靶向 CXCR4 与免疫检查点和单独靶向 CXCR4 在体内抑瘤效果的区别。

肿瘤血管生成是一个复杂过程, 包括血管内皮基质降解、内皮细胞增殖和迁移、内皮细胞管道化形成血管环和新的基底膜等步骤^[22]。本研究主要观察了纳米抗体对内皮细胞增殖迁移及对新血管生成的抑制作用。体外实验证明趋化因子 SDF-1 可促进 HUVEC 迁移, HPSC 同样能加速 HUVEC 迁移和增殖。HPSC 是胰腺癌中重要的基质细胞, 推测 HPSC 可能分泌 SDF-1, 通过 SDF-1/CXCR4 轴吸引 HUVEC 迁移到肿瘤部位。CXCR4 Nb 和 PX4 BsNb 具有很好靶向性, 且体积小, 能渗透到肿瘤部位, 通过拮抗 SDF-1/CXCR4 信号途径可抑制 HPSC 对 HUVEC 的促增殖和迁移作用。大部分肿瘤细胞高表达负向调控分子 PD-L1, 通过与 T 细胞表面 PD-1 结合, 逃避特异性 T 细胞介导的抗肿瘤效应^[23]。而 PX4 BsNb 通过靶向肿瘤新生血管生成 SDF-1/CXCR4 和负向调控信号 PD-1/PD-L1 信号途径, 联合 T 细胞在体内增加胰腺肿瘤免疫应答, 发挥双效的肿瘤杀伤作用, 与目前已有研究结果一致^[24]。

与正常组织中的血管相比, 肿瘤血管通常呈不规则样, 表现出扭曲回旋和分支过多, 血液比正常血管中的黏稠且阻力变大等特征^[25,26]。同时, TME 中的基质细胞, 如癌相关成纤维细胞 (CAF) 产生趋化因子 SDF-1, 刺激胰腺癌细胞增殖, 募集调节性 T 细胞产生免疫抑制, 通过 SDF-1/CXCR4 轴促使肿瘤周围结缔组织增生性改变, 导致大分子药物难以进入肿瘤内部发挥肿瘤杀伤效应^[27-29]。针对肿瘤新生血管的靶向药物不但使肿瘤内血管结构和血流趋近于正常组织, 同时改善部分营养物质和药物的输送, 有利于化疗药物和免疫细胞对肿瘤的杀伤作用^[30]。PSC 在调控肿瘤细胞的生长周期、增殖转移及血管生成中都发挥重要作用。皮下移植瘤小鼠模型也证实, HPSC 能促进胰腺癌细胞 AsPC-1 在体内的生长, 而 CXCR4 Nb 和 PX4 BsNb 能减少肿瘤内新生血管, 可能对肿瘤基质细胞的类型也

产生影响, 从而抑制肿瘤的生长和进展。

综上, PSC 会促进胰腺癌中新血管的生成和肿瘤进展, 而阻断 SDF-1/CXCR4 通路能够抑制血管内皮细胞的增殖和迁移, 联合阻断免疫检查点能达到更好的抗肿瘤效果。纳米抗体可有效渗透到肿瘤组织内部, 抑制新血管形成, 改善 TME, 在肿瘤治疗中具有巨大的应用潜力。

作者贡献: 李雅贤负责主要实验设计和操作及文章撰写; 徐舒怡、郑玥江和彭利云负责协助实验操作和数据分析; 吴明媛和朱建伟负责提出研究整体思路、指导所有实验和论文修改。

利益冲突: 所有作者声明无利益冲突。

References

- [1] Ansari D, Gustafsson A, Andersson R. Update on the management of pancreatic cancer: surgery is not enough [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21: 3157-3165.
- [2] Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2018, 59: 455-467.
- [3] Bhome R, Bullock MD, Al Saihati HA, et al. A top-down view of the tumor microenvironment: structure, cells and signaling [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2015, 3: 33.
- [4] Zhu C, Chrifi I, Mustafa D, et al. CECR1-mediated cross talk between macrophages and vascular mural cells promotes neovascularization in malignant glioma [J]. *Oncogene*, 2017, 36: 5356-5368.
- [5] Ho WJ, Jaffee EM, Zheng L. The tumour microenvironment in pancreatic cancer-clinical challenges and opportunities [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17: 527-540.
- [6] Habisch H, Zhou S, Siech M, et al. Interaction of stellate cells with pancreatic carcinoma cells [J]. *Cancers (Basel)*, 2010, 2: 1661-1682.
- [7] Sun G, Wei L, Feng J, et al. Inhibitory effects of *Hedyotis diffusa* Willd. on colorectal cancer stem cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11: 3875-3881.
- [8] Arnold SA, Rivera LB, Miller AF, et al. Lack of host sparc enhances vascular function and tumor spread in an orthotopic murine model of pancreatic carcinoma [J]. *Dis Model Mech*, 2010, 3: 57-72.
- [9] Li JH, Li Y, Huang D, et al. Role of stromal cell-derived factor-1 in endothelial progenitor cell-mediated vascular repair and regeneration [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2021, 18: 747-758.
- [10] Jiang C, Li R, Ma X, et al. AMD3100 and SDF-1 regulate cellular functions of endothelial progenitor cells and accelerate endothelial regeneration in a rat carotid artery injury model [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22: 3201-3212.
- [11] Han Y, Zhang Y, Jia T, et al. Molecular mechanism underlying the tumor-promoting functions of carcinoma-associated fibroblasts [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36: 1385-1394.

- [12] Tang D, Gao J, Wang S, et al. Cancer-associated fibroblasts promote angiogenesis in gastric cancer through galectin-1 expression [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37: 1889-1899.
- [13] Homey B, Müller A, Zlotnik A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2: 175-184.
- [14] Ping YF, Yao XH, Jiang JY, et al. The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 promote glioma stem cell-mediated VEGF production and tumour angiogenesis *via* PI3k/Akt signalling [J]. *J Pathol*, 2011, 224: 344-354.
- [15] Finn RS, Qin S, Ikeda M, et al. Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382: 1894-1905.
- [16] Zhou J, Su CX. Optimization of combined tumor immunotherapy with non-small cell lung cancer as an example [J]. *Her Med (医药导报)*, 2022, 41: 318-322.
- [17] Xu SY, Li YX, Hu H, et al. Purification and activity of anti-PD-L1&CXCR4 bispecific nanobody [J]. *China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2021, 52: 622-629.
- [18] Wei L, Ye H, Li G, et al. Cancer-associated fibroblasts promote progression and Gemcitabine resistance *via* the SDF-1/SATB-1 pathway in pancreatic cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 1065.
- [19] Liu M, Li L, Jin D, et al. Nanobody-a versatile tool for cancer diagnosis and therapeutics [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2021, 13: e1697.
- [20] Bennouna J, Sastre J, Arnold D, et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (M118147): a randomised phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14: 29-37.
- [21] Quintanilha JCF, Liu Y, Etheridge AS, et al. Plasma levels of angiopoietin-2, VEGF-A, and VCAM-1 as markers of bevacizumab-induced hypertension: CALGB 80303 and 90401 (Alliance) [J]. *Angiogenesis*, 2022, 25: 47-55.
- [22] Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets [J]. *Angiogenesis*, 2017, 20: 409-426.
- [23] Yan SJ, Sun L, Wan GH. The mechanism and research progress of drug resistance of PD-1/PD-L1 immunotherapy in tumors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1728-1734.
- [24] Wang RD, Peng YW, Yang ZZ, et al. Tumor microenvironment responsive liposomes blocking CXCL12/CXCR4 pathway and synergistically enhancing immune efficacy of anti-PD-L1 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 178-187.
- [25] Une N, Takano-Kasuya M, Kitamura N, et al. The anti-angiogenic agent lenvatinib induces tumor vessel normalization and enhances radiosensitivity in hepatocellular tumors [J]. *Med Oncol*, 2021, 38: 60.
- [26] Eelen G, Treps L, Li X, et al. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis updated [J]. *Circ Res*, 2020, 127: 310-329.
- [27] Feig C, Jones JO, Kraman M, et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 20212-20217.
- [28] Fearon DT. The carcinoma-associated fibroblast expressing fibroblast activation protein and escape from immune surveillance [J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2: 187-193.
- [29] Righi E, Kashiwagi S, Yuan J, et al. CXCL12/CXCR4 blockade induces multimodal antitumor effects that prolong survival in an immunocompetent mouse model of ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 5522-5534.
- [30] Guha P, Heatherton KR, O'Connell KP, et al. Assessing the future of solid tumor immunotherapy [J]. *Biomedicines*, 2022, 10: 655.