

钙纳米粒在肿瘤免疫治疗应用中的研究进展

直炜炜¹, 祝侠丽¹, 贾永艳¹, 胥芷灵¹, 李一菁¹, 黄胜楠^{2,3}

(1 河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 2 河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046;

3 郑州大学药学院, 河南省肿瘤重大疾病靶向治疗和诊断重点实验室, 郑州 450001)

[摘要] 肿瘤免疫治疗因其可以利用患者的免疫系统根除肿瘤并防止复发, 而成为一种极具潜力的肿瘤治疗方法。纳米粒因其独特的优势, 有望成为实现肿瘤免疫治疗的最佳载体。钙离子($\text{calcium ion}, \text{Ca}^{2+}$)作为细胞内的第二信使, 在调节体内免疫反应中发挥着重要作用。近些年的研究表明, 钙纳米粒如过氧化钙($\text{calcium peroxide}, \text{CaO}_2$)纳米粒、磷酸钙($\text{calcium phosphate}, \text{CaP}$)纳米粒、氢化钙($\text{calcium hydride}, \text{CaH}_2$)纳米粒和碳酸钙($\text{calcium carbonate}, \text{CaCO}_3$)纳米粒等, 可以通过多种机制激活抗肿瘤免疫反应。此外, 钙纳米粒还可以通过与其他疗法如光热疗法($\text{phototherapy}, \text{PTT}$)、声动力疗法($\text{sonodynamic therapy}, \text{SDT}$)、化学治疗和放射疗法等的联合使用, 协同对抗肿瘤, 发挥出“免疫+”的抗肿瘤效果。本文总结了近几年钙纳米粒在肿瘤免疫治疗中取得的研究进展, 并对其面临的挑战进行了展望。

[关键词] 钙纳米粒; 肿瘤免疫治疗; 联合疗法; 免疫+

[中图分类号] R944 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)12-1220-08

Research progress of calcium nanoparticles in tumor immunotherapy

ZHI Wei-wei¹, ZHU Xia-li¹, JIA Yong-yan¹, XU Zhi-ling¹, LI Yi-jing¹, HUANG Sheng-nan^{2,3}

(1 *Pharmacy College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China*; 2 *Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China*; 3 *School of Pharmaceutical Sciences, Key Laboratory of Targeting Therapy and Diagnosis for Critical Diseases of Henan Province, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China*)

[Abstract] Tumor immunotherapy holds immense potential for tumor treatment because it can utilize the patient's immune system to eradicate tumors and prevent tumor recurrence. Nanoparticles are expected to be the optimal carrier for tumor immunotherapy due to their unique advantages. Ca^{2+} , as the second messenger in cells, plays an important role in regulating the immune response *in vivo*. Recent studies have shown that calcium nanoparticles, such as calcium peroxide (CaO_2) nanoparticles, calcium phosphate (CaP) nanoparticles, calcium hydride (CaH_2) nanoparticles and calcium carbonate (CaCO_3) nanoparticles, can activate anti-tumor immune responses through a variety of mechanisms. In addition, calcium nanoparticles can also be used in combination with other therapies such as photothermal therapy (PTT), sonodynamic therapy (SDT), chemotherapy and radiotherapy to synergistically fight tumors to exert the “immune+” anti-tumor effect. In this article, we reviewed the recent research progress of calcium nanoparticles in tumor immunotherapy, and looked forward to the challenges of this field.

[Key words] calcium nanoparticles; tumor immunotherapy; combined therapy; immune+

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82003298); 河南省博士后科研项目(201901025); 河南省肿瘤重大疾病靶向治疗和诊断重点实验室开放基金项目(NMZL2020102); 河南省科技攻关项目(232102310392); 河南中医药大学科研创新项目(2022KYCX031)

[作者简介] 直炜炜, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药新剂型与新技术研究。E-mail: 1363792531@qq.com。

[通讯作者] 黄胜楠, 女, 博士, 研究方向: 中药新剂型与新技术研究。E-mail: huangsn2019@hactcm.edu.cn。

细胞癌变是细胞的一种异常状态,癌变的细胞往往会经历不受控制的增殖并产生侵袭性恶性肿瘤,每年导致数百万患者死亡^[1]。在过去的一个世纪中,放疗、化疗、手术和免疫治疗已经被用于肿瘤治疗,其中免疫疗法因其可以利用患者的免疫系统,根除肿瘤并防止复发而成为一种有潜力的肿瘤治疗方法。在过去10年中,该领域在肿瘤治疗中的影响也呈指数级上升^[2]。然而,肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)的免疫抑制作用严重限制了免疫疗法在临床上的进一步应用^[3]。纳米粒具有许多独特的优势,如比表面积大^[4]、可以在不伤害正常体细胞的情况下靶向肿瘤细胞^[5]和实现药物的高效递送^[6]等,有望成为肿瘤免疫治疗的最佳载体。金属离子,如 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 等是大多数酶发挥功能所必需的成分,除了参与基本的生物过程,在免疫调节中也发挥着至关重要的作用^[7]。最近的研究表明, Ca^{2+} 可以通过多种途径诱导抗肿瘤免疫反应,多种钙纳米粒如 CaO_2 纳米粒、 CaP 纳米粒、 CaH_2 纳米粒和 CaCO_3 纳米粒等已被用于抗肿瘤免疫治疗及与其他疗法的联合使用。基于此,本文回顾了近几年钙纳米粒在抗肿瘤免疫治疗中的研究进展,也对该领域面临的挑战进行了展望。

1 钙纳米粒发挥肿瘤免疫治疗的作用机制

1.1 诱导免疫原性细胞死亡

在使用某些化疗药物、物理化学疗法和放射疗法等治疗肿瘤时,肿瘤细胞可发生免疫原性细胞死亡^[8](immunogenic cell death, ICD),即肿瘤细胞在发生凋亡的同时,由非免疫原性的细胞转变为具有免疫原性的细胞,并在机体内激发抗肿瘤免疫反应。该过程同时伴随着损伤相关分子模式(damage-associated molecular pattern, DAMPs)的产生,在已发现的DAMPs中,研究最多的为高迁移率组蛋白B1(high mobility group protein, HMGB1)、钙网蛋白(calreticulin, CRT)、热休克蛋白(heat shock protein, HSP)和三磷酸腺苷(adenosine-triphosphate, ATP)等^[9-10]。释放的DAMPs可作为一种信号参与抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC)和其他先天性免疫细胞上的Toll样受体、RIG-I样受体或NOD样受体等模式识别受体,促进树突状细胞(dendritic cells, DCs)的成熟并激活启动有效的 CD_8^+ T细胞免疫反应^[11-12]。研究表明,线粒体 Ca^{2+} 超载可以导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成增加,进而引起氧化应激,而线粒体的氧化应激是引起大

规模ICD的高效策略^[13]。利用姜黄素(curcumin, Cur)可以增加线粒体内 Ca^{2+} 浓度的特点,Zheng等^[14]将Cur成功包载于聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰的 CaCO_3 纳米颗粒中,设计合成了钙纳米调节器 PEG-CaCUR ,同时利用超声进一步增加线粒体内的 Ca^{2+} 浓度。体外实验中CRT的表露以及HMGB1和ATP分泌证实了线粒体内的 Ca^{2+} 超载可以有效地诱导ICD,体内实验中DCs的成熟和 CD_8^+ T细胞的活化证实了体内免疫效应的激活。此外,该研究还进一步证实了 Ca^{2+} 超载诱导ICD的机制为线粒体 Ca^{2+} 超载诱导ROS生成,ROS积累导致ICD,这与之前的研究结果一致。

1.2 诱导肿瘤相关巨噬细胞表型极化

肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)作为固有免疫应答细胞之一,是免疫治疗关注的靶标之一^[15]。在TME中可以分化为2种不同的表型,即M1型TAMs和M2型TAMs。其中,M1型TAMs可以通过呈递抗体和吞噬癌细胞发挥免疫激活作用,而M2型TAMs可以通过产生免疫抑制细胞因子如白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)和精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)阻断抗肿瘤免疫反应^[16]。因此,将TME中的M2型TAMs极化为M1型TAMs,更有利于抗肿瘤免疫应答^[17]。Kang等^[18]用介孔二氧化硅(mesoporous silica, mSiO₂)包覆近红外光响应性的多功能镧系掺杂上转换纳米颗粒(up-conversion nanoparticles, UCNPs),形成 Ca^{2+} 调节剂 UCNP@mSiO_2 ,通过近红外光改变细胞内 Ca^{2+} 浓度调节TAMs的极化。结果表明,细胞内 Ca^{2+} 含量增加可以诱导TAMs极化为M1型。此外,An等^[19]对 CaO_2 纳米粒进行了研究,结果显示 Ca^{2+} 诱导TAMs极化为M1型的潜在机制为调控丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路中p38的磷酸化和核因子 κB (nuclear factor kappa-B, NF- κB) p65的核易位,并通过转录组分析进一步研究了 CaO_2 纳米粒诱导TAMs极化的分子机制。结果表明, Ca^{2+} 超载后与炎症抑制表型相关的多个基因(*Arg1*, *CD163*, *Il4ra*, *Il13ra2*)表达显著下调,而与炎症相关的基因(*Tnfsf15*, *Tlr12*, *Pik3cb*)表达上调。同时,KEGG通路分析揭示了炎症相关通路如NF- κB 信号通路、趋化因子信号通路和细胞因子受体相互作用在 Ca^{2+} 发挥免疫治疗中的重要作用。

1.3 破坏DCs自噬抑制条件

在正常情况下,细胞自噬是细胞的一种自我保

护机制,有助于维持细胞的稳态。研究表明,DCs的自噬还可以增强T细胞的抗癌活性^[20]。然而,TME中的免疫抑制细胞和因子可能会破坏DCs的自噬^[21]。因此,改善TME中的DCs自噬抑制对抗肿瘤免疫反应有一定的积极意义。 Ca^{2+} 作为一种无处不在的细胞信使,也是细胞自噬的一个重要调节因子^[22],An等^[23]借助卵清蛋白(ovalbumin,OVA)和 CaCO_3 ,成功设计合成蜂窝状 Ca^{2+} 纳米发生器 $\text{OVA}@\text{CaCO}_3$ (HOCN),并通过自噬标记物(LC3-II)检测了HOCN对DCs的自噬增强作用,证实了 Ca^{2+} 可以通过破坏TME中DCs的自噬抑制条件,诱导肿瘤细胞内的免疫反应。该研究也进一步表明DCs自噬可以通过自噬小体将抗原包埋在细胞质中,进而导致组织相容性复合体II(major histocompatibility complex-II,MHC-II)介导的抗原呈递。

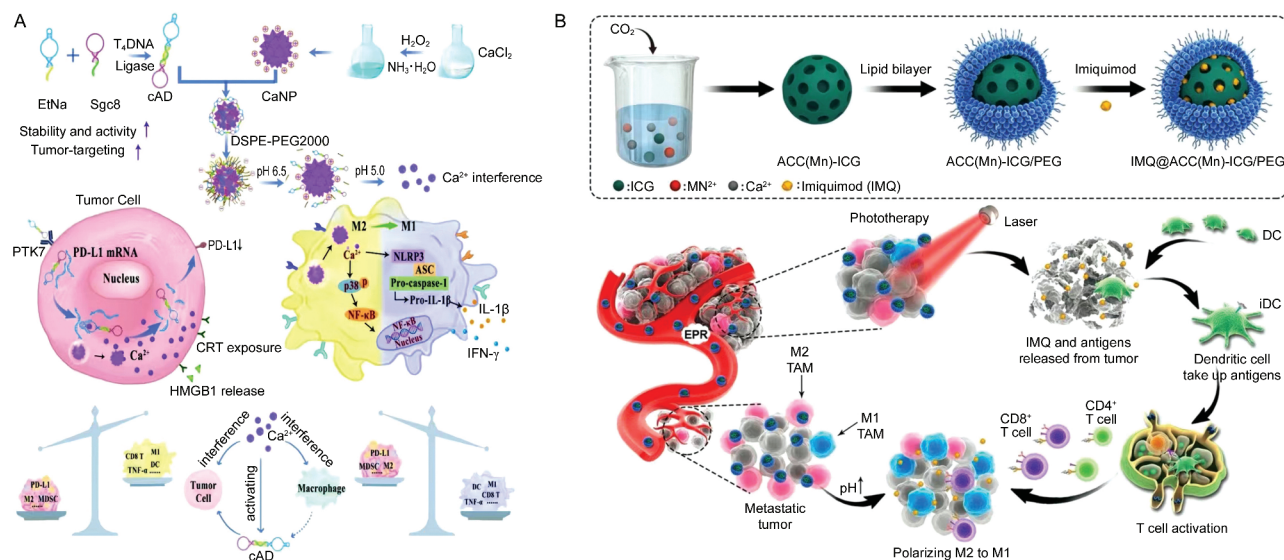
2 用于癌症免疫治疗的钙纳米粒

2.1 CaO_2 纳米粒

CaO_2 是一种安全的无机过氧化物,在水中可以同时释放 H_2O_2 和 O_2 ,被广泛用于消毒和污染物降解^[24]。目前,研究者们已经报道出多种制备 CaO_2 纳米粒的方法,Liu等^[25]在搅拌的状态下,逐滴将 H_2O_2 加入到 CaCl_2 , $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 和PEG 400的混合溶液中,反应2h后,通过调节pH析出沉淀后,通过离心分离沉淀,经洗涤、干燥后得到平均粒径20 nm、电位+16.1 mV的 CaO_2 纳米粒。Shen等^[26]采用湿

化学法,以乙醇为溶剂,通过调节 CaCl_2 与聚乙烯吡咯烷酮的比例,成功合成了平均粒径在15~100 nm之间的 CaO_2 纳米粒。与前一种方法相比,此种方法不用调节反应体系的pH值,操作更加简便。

此外,最近的研究表明, CaO_2 纳米粒还可以通过产生 O_2 或引起钙超载而用于抗肿瘤免疫治疗。Su等^[27]通过调节反应体系中纳米疫苗(nanovaccines,NVs)与 CaCl_2 的比例,将 CaO_2 原位生长在模型抗原卵清蛋白自组装的NVs上,成功设计合成了尺寸约80 nm的均匀矿化纳米疫苗 NVs^{op} 。在这里, CaO_2 可以通过对内体/溶酶体的酸性环境作出反应,触发ROS的释放,导致内体/溶酶体脂质过氧化。从而引起 NVs^{op} 的内体/溶酶体逃逸,实现胞质递送和APC的交叉提呈。An等^[19]通过简单的湿化学法合成了平均粒径150 nm、电位+16.3 mV的 CaO_2 纳米粒,利用 CaO_2 释放的 Ca^{2+} ,产生“ Ca^{2+} 干扰”效应,通过激活多种炎症相关信号通路和NLRP3炎症小体,并促进原位肿瘤相关抗原释放,将TAM重置为M1表型。同时利用 Ca^{2+} 可以特异性激活具有肿瘤靶向性的环状适体-DNA酶结合物(cAD)的催化剪切活性的特点,来减少PD-L1抗体潜在的自身免疫样疾病。该课题组通过将pH敏感的 CaO_2 纳米颗粒与cAD整合到一个纳米系统中($\text{CaNP}@\text{cAD-PEG}$),不仅可以阻止原发性肿瘤扩散和肺转移,而且还可以提供长期免疫记忆,防止肿瘤再发(见图1A)。



A: $\text{CaNP}@\text{cAD-PEG}$ 通过“ Ca^{2+} ”干扰介导的 TME 重编程和特异性 PD-L1 缺失促进肿瘤免疫治疗示意图^[19];

B: $\text{IMQ}@\text{ACC}(\text{Mn})\text{-ICG/PEG}$ 纳米粒的制备方案及其抗肿瘤的光免疫治疗机制^[33]

图 1 用于肿瘤免疫治疗的 CaO_2 纳米粒和 CaCO_3 纳米粒

2.2 CaCO₃ 纳米粒

CaCO₃ 是一种天然的生物矿物,由于其良好的生物相容性和可降解性,在纳米医学领域中备受关注。同时, CaCO₃ 纳米粒的制备方法也较为成熟。Hussein 等^[28]以 CaCl₂ 和 K₂CO₃ 为原料,通过研究水体积、溶剂类型、K₂CO₃ 加料速率和干燥方法等对 CaCO₃ 形貌的影响,最终合成了平均粒径为 39 nm 的球形 CaCO₃ 纳米粒。Persano 等^[29]通过考察 CaCl₂ 和 Na₂CO₃ 的浓度、反应时间、搅拌速度和温度等不同合成参数对粒径的影响,发现 CaCl₂ 和 Na₂CO₃ 的浓度和反应温度对 CaCO₃ 纳米粒尺寸影响显著,最终通过共沉淀法制备出粒径在 200 nm 以下、分散良好的球形 CaCO₃ 纳米粒。

越来越多的研究表明, CaCO₃ 纳米粒在抗肿瘤免疫治疗中能够发挥多重作用^[30-31]。利用 CaCO₃ 纳米粒优越的载药性能, Dai 等^[32]采用薄膜分散法设计合成了脂质 (lipid, Li) 包被的 CaCO₃ 纳米粒用来负载 Ce6 (Li/CC-Ce6), 可作为一种用于结直肠癌免疫治疗的原位疫苗。CaCO₃ 纳米粒的 pH 敏感性已经被广泛用于 pH 响应性药物的递送, 此外, CaCO₃ 纳米粒在酸性环境下可分解为 Ca²⁺ 和 CO₂, 可以降低 TME 中的酸性, 从而抑制 TAMs 向 M2 样表型极化, 激活 TME 中的免疫反应。利用上述 2 个特性, Wang 等^[33]选用 CaCO₃ 纳米粒作为免疫佐剂, 通过溶剂扩散法, 将吖啶菁绿 (indocyanine green, ICG) 嵌入 Mn²⁺ 掺杂的非晶 CaCO₃ 纳米粒中, 然后荷载 Toll 样受体-7 激动剂咪喹莫特 (imiquimod, IMQ), 合成 IMQ@ACC (Mn)-ICG/PEG, 成功增强了抗肿瘤免疫应答 (见图 1B)。Wang 等^[34]设计合成了抗原 OVA 掺杂 CaCO₃ 的纳米颗粒 (OVA@NP)。CaCO₃ 分解产生的 CO₂ 不仅可以破坏溶酶体膜, 还可以引发自噬, 进一步促进抗原交叉提呈效率, 为开发安全有效的疫苗提供了新的途径。

2.3 CaP 纳米粒

CaP 与人体骨骼和牙齿中无机成分的相似性, 使其具有很高的生物相容性和可降解性。其中, 以纳米粒形式存在的 CaP 在体内和体外都有广泛的应用^[35]。CaP 纳米粒除了可以通过提供 Ca²⁺ 参与抗肿瘤免疫治疗, 还是世界卫生组织批准使用的疫苗佐剂, 用于抗癌小分子、生长因子和核酸药物等的递送^[36-37]。HeBe 等^[38]设计制备了 CpG 和肿瘤模型抗原功能化的 CaP 纳米粒, 该纳米粒不仅可以通 I 型干扰素依赖性方式增加肿瘤中细胞毒性

CD₈⁺ T 细胞的频率, 还可以通过与免疫检查点阻断剂 PD-L1 联合使用, 进一步增强细胞毒性 CD₈⁺ T 细胞反应, 从而根除肿瘤。

2.4 CaH₂ 纳米粒

H₂ 作为一种内源性气体, 具有重要的生理调节功能。结合 Ca²⁺ 在抗肿瘤治疗中的重要作用, Gong 等^[39]采用液相剥离技术, 成功合成了 (7.9 ± 1.7) nm 的 CaH₂ 纳米粒, 通过将 CaH₂ 纳米粒分散在 PEG 中, 注入肿瘤后与水反应生成丰富的 H₂, Ca²⁺ 和 OH⁻, 分别实现氢治疗、肿瘤钙化、中和 TME 的酸性环境。此外, CaH₂ 纳米粒诱导的肿瘤细胞凋亡和有效的 TME 调节可以激活免疫反应, 与细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen, CTLA-4) 共同作用, 引发强大的免疫反应, 有效地抑制远处肿瘤的生长。

2.5 表面功能化修饰的钙纳米粒

除了上述一般的钙纳米粒, 研究者们通过对一般的钙纳米粒进行修饰, 得到表面功能化修饰的钙纳米粒, 将钙纳米粒的研究推向了一个新的阶段。

2.5.1 丰富钙纳米粒的功能性 Zhang 等^[40]在甲醇-水体系中, 采用简单、快速的湿化学法, 一步合成了 pH 敏感的透明质酸钠 (sodium hyaluronate, SH) 修饰的 CaO₂ 纳米粒 SH-CaO₂, 其可以在 TME 的酸性环境中快速释放出 Ca²⁺ 和 H₂O₂, 有效地增强了 CaO₂ 纳米粒的靶向性。Wang 等^[41]采用一锅水扩散法制备了磷脂非晶态 CaCO₃ 杂化纳米粒, 这种混合纳米粒可以特异性响应肿瘤细胞内的特定环境而爆裂释放其载荷药物, 增强药物对肿瘤深部组织的渗透, 可用于晚期癌症的治疗。Kong 等^[42]合成了表面带有二茂铁铜分子的 CaO₂ 纳米粒, 在肿瘤的酸性条件下, 纳米粒能快速释放 Ca²⁺ 和 H₂O₂, 而在中性条件下则能保持稳定。

2.5.2 提高钙纳米粒的稳定性 Sun 等^[43]利用 CaP 纳米粒高 DNA 载量的优点, 并通过 ATP 修饰提高其稳定性, 得到了稳定且高 DNA 载量的 CaP 纳米粒。将 ATP 修饰的 CaP 纳米粒用于制备 DNA 疫苗后, 增强了细胞摄取且提高了 DNA 疫苗的转染效率, 进而促进了抗肿瘤免疫作用。Qiu 等^[44]开发了一种透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 功能化的 CaP 纳米粒, 通过在 CaP-siRNA 共沉淀表面包覆阿胶醛酸-HA 接枝聚合物 AHA, 制备了 pH 响应性递送的 siRNA 递送系统, 促进了肿瘤的靶向蓄积。同时, 通

过亲水性 HA 的包覆,纳米粒的物理稳定性提高了 1 个月以上。

2.5.3 提高钙纳米粒的负载效率 Bakan 等^[45] 采用溶胶-凝胶技术对 CaP 纳米粒进行精氨酸修饰,显著提高了 CaP 纳米粒的 siRNA 负载效率,且具有良好的生物相容性。因此,精氨酸修饰的 CaP 纳米粒可能成为 siRNA 递送中一个良好的转染试剂。

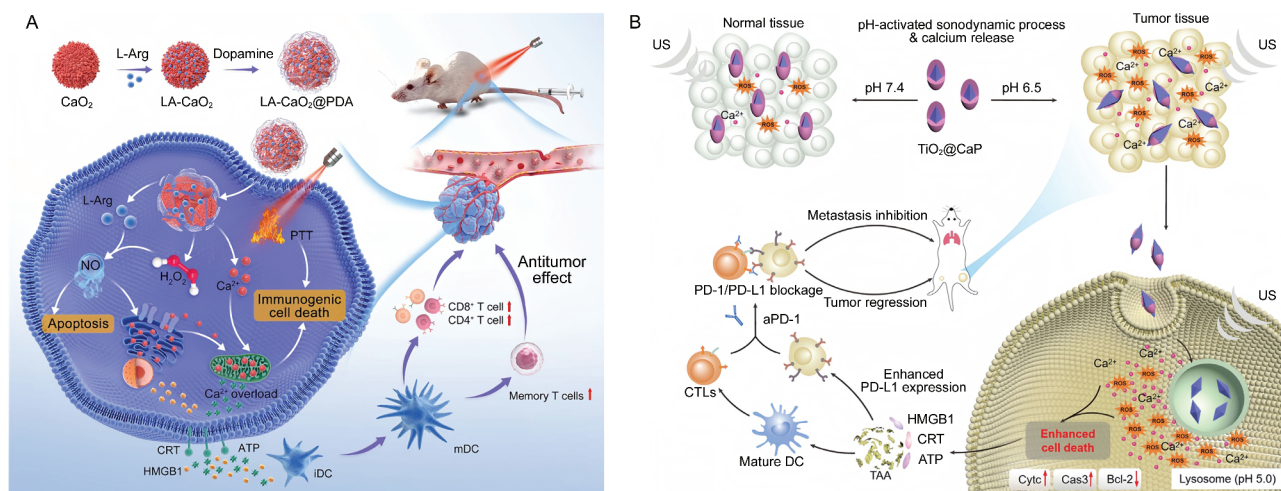
3 钙纳米粒在免疫疗法与其他疗法联合使用中的作用

抗肿瘤免疫疗法虽然在临床应用中取得了重大进展,成为最有希望的肿瘤治疗手段,但由于其客观应答率低、存在个体差异和部分肿瘤的低免疫原性,单独使用免疫疗法对肿瘤治疗的疗效仍不理想^[46]。因此,研究者们开始将免疫疗法与其他疗法,如 PTT、SDT、化学治疗和放射疗法等联合使用^[47],达到“免疫+”的效果,从而使抗肿瘤免疫治疗在临床上具有更广阔的应用前景。在免疫疗法与其他疗法

联合使用的研究中,钙纳米粒也起到了重要作用。

3.1 免疫疗法与 PTT

PTT 的治疗作用来源于光热在肿瘤部位引起的细胞膜破坏、蛋白质变性和 DNA 损伤,是一种很有前景的肿瘤治疗方法^[48]。此外,PTT 还可引起针对肿瘤的免疫反应,与免疫疗法具有良好的相容性^[49-50]。因此,PTT 和免疫疗法的联合使用可以加强肿瘤治疗的效果。Hao 等^[51] 制备了具有提供 O₂/H₂O₂ 能力的介孔 CaO₂,以封装和氧化精氨酸(L-arginine, LA),从而在酸性 TME 中实现可控制的一氧化氮(nitric oxide, NO)局部释放。产生的 NO 同时会加剧细胞内 Ca²⁺ 的异常滞留,从而导致氧化应激加剧和 ICD。通过在 LA-CaO₂ 表面进一步引入具有光热转换特性聚多巴胺(polydopamine, PDA)后,结合 PTT,进一步增强了肿瘤细胞的 ICD,在抑制原发和远处肿瘤生长以及抑制肿瘤肺转移方面均表现出具有疗效(见图 2A)。



A: LA-CaO₂@PDA 的合成及抗癌机制^[51]; B: TiO₂@CaP 增强肿瘤声免疫治疗疗效的机制示意图^[56]

图 2 免疫疗法分别与 PTT 和 SDT 联合

3.2 免疫疗法与 SDT

SDT 是从 PDT 中开发出来的一种新兴的非侵入性肿瘤治疗手段,具有更强的组织穿透能力^[52]。它是在超声作用下,利用声敏剂和 O₂ 产生 ROS 杀死肿瘤细胞,在治疗深部肿瘤方面具有很大的优势^[53-54]。与 PDT 类似,SDT 对免疫应答也有重要的影响,因此,SDT 可以与免疫佐剂或免疫检查点抑制剂相结合,用于肿瘤免疫治疗^[55]。Tan 等^[56] 报道了一种智能的核-壳纳米声敏剂 TiO₂@CaP,在超声激活的酸性 TME 下,可激活 ROS 的生成并溶解其

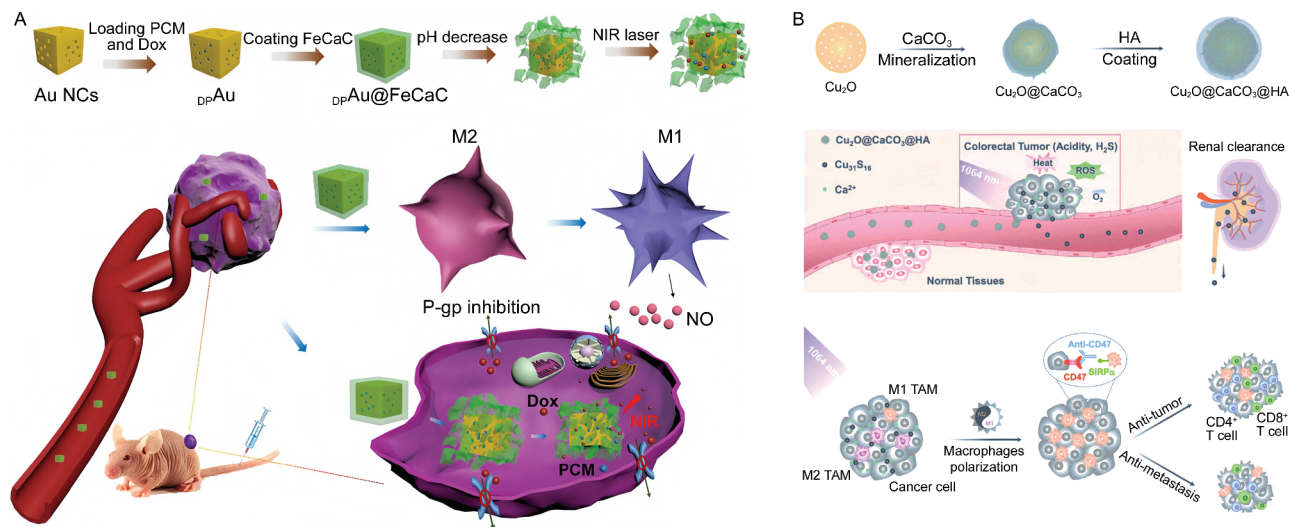
CaP 壳释放 Ca²⁺。通过细胞内 Ca²⁺ 超载,特异性地诱导线粒体功能障碍,与 TME 中的声动力过程协同作用后,TiO₂@CaP 大大增强了 ICD,导致 T 细胞聚集和浸润免疫原性“冷”肿瘤。此外,与免疫检查点抑制剂联合治疗后,TiO₂@CaP 介导的 SDT 可引起全身抗肿瘤免疫,导致未治疗的远处肿瘤的消退和抑制肺转移(见图 2B)。

3.3 免疫疗法与化学治疗

化学治疗简称化疗,是肿瘤治疗的传统手段,而免疫疗法是近年来前沿的治疗方法,两者的结合被

认为是治疗多种肿瘤类型的有效方法之一^[57-58]。Wu 等^[59]为了改善化疗的多药耐药性(multiple drug resistance,MDR),将免疫治疗纳入 MDR 的调控中,采用相变材料将阿霉素(doxorubicin,Dox)包裹在由钙和碳酸铁组成的金纳米笼外层,得到 DP Au@FeCaC 纳米粒。在酸性条件下,DP Au@FeCaC 纳米粒的 FeCaC 外壳被降解,近红外激光照射可以进一步促进 Dox 释放。FeCaC 壳层的内在特性将 TAMs 从

免疫抑制型 M2 重编程为免疫刺激型 M1。体外和体内评估证实 DP Au@FeCaC 纳米粒可实现免疫治疗介导的肿瘤高效化疗(见图 3A)。除此之外,有研究表明,肿瘤细胞内的 Ca^{2+} 过多释放可以引起呼吸抑制,阻断 ATP 产生,进一步导致 P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)功能不全,从而逆转 MDR 的产生^[60]。因此, Ca^{2+} 的使用可以为临床上因化疗药物导致的 MDR 提供一种新的解决方案。



A: DP Au@FeCaC 纳米颗粒实现免疫治疗介导肿瘤高效化疗示意图^[59]; B: Cu₂O@CaCO₃@HA 协同实现光热/光动力/化学动力/钙超载治疗 CRC 示意图^[65]

图 3 免疫疗法分别与化学治疗和多种方法治疗联合

3.4 免疫疗法与放射疗法

放射疗法,长期以来一直被认为可以与免疫检查点阻断疗法相辅相成。越来越多的证据表明,肿瘤免疫疗法能以增加肿瘤放射敏感性的方式重新编程 TME^[61]。此外,肿瘤免疫疗法激活 T 细胞也有利于进行放射治疗^[62]。因此,放射疗法和免疫疗法之间的互惠性使二者可以协同对抗肿瘤^[63]。Wang 等^[64]将吲哚胺 2,3-双加氧酶 1(indoleamine 2,3-dioxygenase 1,IDO-1)抑制剂 4-苯基咪唑(4-phenylimidazole,4PI)与 Zn^{2+} 通过配位反应包覆在 CaCO_3 纳米颗粒表面,制备成 pH 响应型纳米药物 AIM 纳米粒,以增强放疗的疗效。在这里, CaCO_3 可以有效地中和肿瘤的酸性环境,并实现 pH 响应性释放。用 AIM 纳米粒分别治疗 CT26 和 4T1 肿瘤模型小鼠后,均能引起较强的抗肿瘤免疫反应,从而显著提高放疗对 CT26 和 4T1 肿瘤模型小鼠的疗效。此外,这种联合治疗还可以导致免疫记忆反应,有效抑制

肿瘤复发。

3.5 免疫疗法与多种方法联合使用

此外,有研究者也进行了免疫与多方法联合使用的相关研究。Chang 等^[65]利用结肠直肠癌(colorectal cancer,CRC)内源性 H_2S 过表达和酸性 TME 的生理特征,并通过具有肿瘤靶向性的 HA 修饰后,合成了核壳结构的纳米颗粒 $\text{Cu}_2\text{O}@ \text{CaCO}_3 @ \text{HA}$ 。当 CaCO_3 壳层在 TME 中分解并释放出 Ca^{2+} 时,使 Cu_2O 暴露在 H_2S 下,形成可代谢的 $\text{Cu}_3\text{1S}_{16}$ 纳米晶体,获得显著的近红外吸收,可实现协同 CRC 靶向和 TME 触发的光热/光动力/化学动力/钙超载治疗。此外, $\text{Cu}_2\text{O}@ \text{CaCO}_3 @ \text{HA}$ 还可以有效地将 TAMs 从 M2 表型重编程到 M1 表型,并在原发肿瘤切除后启动疫苗样免疫效应,通过免疫治疗同时抑制 CRC 远处转移和复发(见图 3B)。

4 结语和展望

本文通过归纳总结钙纳米粒在免疫疗法中的作

用机制、常用的钙纳米粒及其在肿瘤免疫疗法和其他疗法联合使用中的作用,为钙纳米粒在抗肿瘤免疫治疗中的进一步应用提供了参考。此外,除了发挥免疫作用,钙纳米粒还可以通过其他方式治疗肿瘤:一方面,使肿瘤细胞矿化,阻断营养供应,从而抑制肿瘤细胞的迁移、侵袭和增殖^[66];另一方面通过钙过载使线粒体结构和功能被破坏,使细胞骨架崩溃和氧化应激,进而导致肿瘤细胞凋亡^[67]。钙纳米粒的多重作用机制进一步表明了钙纳米粒在肿瘤治疗中的巨大应用潜力。

然而,尽管钙纳米粒在免疫疗法中有诸多优势,也取得了一定的进展,但仍存在一些问题需要我们去解决。① 现有的钙纳米粒大多数利用渗透与滞留增强(enhanced permeability and retention,EPR)效应,通过被动靶向的方式定位肿瘤细胞。然而,EPR效应很大程度上取决于肿瘤类型和位置,针对复杂的肿瘤并不能发挥很好的作用^[68],因此,开发主动靶向的钙纳米粒或许能够对抗更复杂的肿瘤类型。② 虽然多项研究已经表明 Ca^{2+} 在抗肿瘤免疫治疗中有巨大的潜力,但整体来说,相关研究偏少,尤其是在免疫疗法与其他新兴疗法如 SDT 和 PTT 等联合使用方面。③ Ca^{2+} 作为细胞内关键的第二信使,钙稳态是影响细胞生长和功能的关键性因素^[69],所以,如何精确控制 Ca^{2+} 在肿瘤部位的特异性释放,将其对正常组织和细胞的损伤降至最低是一个亟须考虑的问题。

[参 考 文 献]

[1] ANAND U, DEY A, CHANDEL AKS, *et al.* Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics [J]. *Genes Dis (in press)*, 2022.

[2] SEZTO GL, FINLEY SD. Integrative approaches to cancer Immunotherapy [J]. *Trends Cancer*, 2019, 5(7): 400-410.

[3] LAN H, ZHANG W, JIN K, *et al.* Modulating barriers of tumor microenvironment through nanocarrier systems for improved cancer immunotherapy: a review of current status and future perspective [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 1248-1262.

[4] BUKHARI B, NAVEED M, MAKHDOOM SI, *et al.* A comparison between organic and inorganic nanoparticles: prime nanoparticles for tumor curation [J]. *Nano*, 2021, 16(13): 213011.

[5] DUAN C, TOWNLEY HE. Nanoparticles as vectors to tackle cancer [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(11): 1729.

[6] MBA IE, NWEZE EI. Nanoparticles as therapeutic options for treating multidrug-resistant bacteria: research progress, challenges, and prospects [J]. *World J Microb Biot*, 2021, 37(6): 108.

[7] WANG CG, ZHANG R, WEI XM, *et al.* Metalloimmunology: The metal ion-controlled immunity [J]. *Adv Immunol*, 2019, 145: 187-241.

[8] AHMED A, TAIT SWG. Targeting immunogenic cell death in cancer [J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(12): 2994-3006.

[9] JIN MZ, WANG XP. Immunogenic cell death-based cancer vaccines [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 697964.

[10] ROH JS, SOHN DH. Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases [J]. *Immune Netw*, 2018, 18(4): e27.

[11] CHEN J, ZHANG XC, LI LP, *et al.* Farnesyl pyrophosphate is a new danger signal inducing acute cell death [J]. *PLoS Biol*, 2021, 19(4): e3001134.

[12] HAYASHI K, NIKOLOS F, LEE YC, *et al.* Tipping the immunostimulatory and inhibitory DAMP balance to harness immunogenic cell death [J]. *Nat Commun*, 2020; 11(1): 6299.

[13] CHEN C, NI X, JIA S, *et al.* Massively evoking immunogenic cell death by focused mitochondrial oxidative stress using an AIE luminogen with a twisted molecular structure [J]. *Adv Mater*, 2019, 31(52): e1904914.

[14] ZHENG P, DING B, JIANG ZY, *et al.* Ultrasound-augmented mitochondrial calcium ion overload by calcium nanomodulator to induce immunogenic cell death [J]. *Nano Lett*, 2021, 21(5): 2088-2093.

[15] FUNES SC, RIOS M, VERA JE, *et al.* Implications of macrophage polarization in autoimmunity [J]. *Immunology*, 2018, 154(2): 186-195.

[16] PANG X, WANG SS, ZHANG M, *et al.* OSCC cell-secreted exosomal CMTM6 induced M2-like macrophages polarization via ERK1/2 signaling pathway [J]. *Cancer Immunol Immun*, 2020, 70(4): 1015-1029.

[17] CHEN MS, MIAO YQ, QIAN K, *et al.* Detachable liposomes combined immunochemotherapy for enhanced triple-negative breast cancer treatment through reprogramming of tumor-associated macrophages [J]. *Nano Lett*, 2021, 21(14): 6031-6041.

[18] KANG H, ZHANG KY, WONG DSH, *et al.* Near-infrared light-controlled regulation of intracellular calcium to modulate macrophage polarization [J]. *Biomaterials*, 2018, 178: 681-696.

[19] AN JY, LIU MY, ZHAO L, *et al.* Boosting tumor immunotherapy by bioactive nanoparticles via Ca^{2+} interference mediated TME reprogramming and specific PD-L1 depletion [J]. *Adv Funct Mater*, 2022, 32(24): 22701275.

[20] OH DS, LEE HK. Autophagy protein ATG5 regulates CD36 expression and anti-tumor MHC class II antigen presentation in dendritic cells [J]. *Autophagy*, 2019, 15(12): 2091-2106.

[21] GUAN YH, WANG N, DENG ZW, *et al.* Exploiting autophagy-regulative nanomaterials for activation of dendritic cells enables reinforced cancer immunotherapy [J]. *Biomaterials*, 2022, 282: 121434.

[22] KONDRATSKYI A, KONDRATSKA K, SKRYMA R, *et al.* Ion channels in the regulation of autophagy [J]. *Autophagy*, 2018, 14(1): 3-21.

[23] AGHDA NH, ABDULSAHIB SM, SEVERSON C, *et al.* Induction of immunogenic cell death of cancer cells through nanoparticle-mediated dual chemotherapy and photothermal therapy [J]. *Int J Pharmaceut*, 2020, 589: 119787.

[24] WU D, ZHU ZQ, TANG HX, *et al.* Efficacy-shaping nanomedicine by loading calcium peroxide into tumor microenvironment-responsive nanoparticles for the antitumor therapy of prostate cancer [J]. *Theranostics*, 2020, 10(21): 9808-9829.

[25] LIU CH, CAO Y, CHENG YR, *et al.* An open source and reduce expenditure ROS generation strategy for chemodynamic/photodynamic synergistic therapy [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1735.

[26] SHEN S, MAMAT M, ZHANG SC, *et al.* Synthesis of CaO_2 nanocrystals and their spherical aggregates with uniform sizes for use as a biodegradable bacteriostatic agent [J]. *Small*, 2019, 15(36): e1902118.

[27] SU RP, CHONG GW, DONG HQ, *et al.* Nanovaccine biomimetalization for cancer immunotherapy: a NADPH oxidase - inspired strategy for improving antigen cross-presentation via lipid peroxidation [J]. *Biomaterials*, 2021, 277: 121089.

[28] HUSSEIN AL, GHANI ZA, MAT ANC, *et al.* Synthesis and characterization of spherical calcium carbonate nanoparticles derived from cockle shells [J]. *Appl Sci*, 2020, 10(20): 7170.

[29] PERSANO F, NOBILE C, PICCIRILLO C, *et al.* Monodisperse and nanometric-sized calcium carbonate particles synthesis optimization [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2022, 12(9): 1494.

[30] ZHANG Y, CAI LL, LI D, *et al.* Tumor microenvironment-responsive hyaluronate-calcium carbonate hybrid nanoparticle enables effective chemotherapy for primary and advanced osteosarcoma

- mas[J]. *Nano Res*, 2018, 11(9): 4806–4822.
- [31] ZHAO XR, WAN XY, HUANG T, *et al.* Acidity-responsive nanocages as robust reactive oxygen species generators with butterfly effects for maximizing oxidative damage and enhancing cancer therapy[J]. *J Colloid Interf Sci*, 2022, 618(15): 270–282.
- [32] DAI WX, LU SQ, ZENG WY, *et al.* Lipid coated and chlorin e6 loaded calcium carbonate for effective in situ immunotherapy of colorectal cancer[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2021, 16(8): 1196–1204.
- [33] WANG M, ZHOU BQ, WANG L, *et al.* Biodegradable pH-responsive amorphous calcium carbonate nanoparticles as immunoadjuvants for multimodal imaging and enhanced photoimmunotherapy[J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(36): 8261–8270.
- [34] WANG S, NI DZ, YUE H, *et al.* Exploration of antigen induced CaCO₃ nanoparticles for therapeutic vaccine[J]. *Small*, 2018, 14(14): e1704272.
- [35] SOKOLOVA V, EPPLE M. Biological and medical applications of calcium phosphate nanoparticles[J]. *Chem-Eur J*, 2021, 27(27): 7471–7488.
- [36] MASSON JD, THIBAUDON M, BELEC L, *et al.* Calcium phosphate: a substitute for aluminum adjuvants? [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2016, 16(3): 289–299.
- [37] ZHAO J, CHEN GC, PANG XJ, *et al.* Calcium phosphate nanoneedle based gene delivery system for cancer genetic immunotherapy[J]. *Biomaterials*, 2020, 250: 120072.
- [38] HEBE C, KOLLENDAS S, ROTAN O, *et al.* A tumor-peptide based nanoparticle vaccine elicits efficient tumor growth control in anti-tumor immunotherapy[J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(6): 1069–1080.
- [39] GONG F, XU JC, LIU B, *et al.* Nanoscale CaH₂ materials for synergistic hydrogen-immune cancer therapy [J]. *Chem-US*, 2022, 8(1): 268–286.
- [40] ZHANG M, SONG RS, LIU YY, *et al.* Calcium-overload-mediated tumor therapy by calcium peroxide nanoparticles[J]. *Chem*, 2019, 5(8): 2171–2182.
- [41] WANG C, LIU X, CHEN S, *et al.* Correction: facile preparation of phospholipid-amorphous calcium carbonate hybrid nanoparticles: toward controllable burst drug release and enhanced tumor penetration [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2020, 56(73): 10768–10769.
- [42] KONG H, CHU Q, FANG C, *et al.* Cu-ferrocene-functionalized CaO₂ nanoparticles to enable tumor-specific synergistic therapy with GSH depletion and calcium overload[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(14): e2100241.
- [43] SUN B, ZHAO XH, GU WX, *et al.* ATP stabilised and sensitized calcium phosphate nanoparticles as effective adjuvants for a DNA vaccine against cancer[J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(36): 7435–7446.
- [44] QIU C, WEI W, SUN J, *et al.* Systemic delivery of siRNA by hyaluronan-functionalized calcium phosphate nanoparticles for tumor-targeted therapy[J]. *Nanoscale*, 2016, 8(26): 13033–13044.
- [45] BAKAN F, KARA G, CAKMAK MC, *et al.* Synthesis and characterization of amino acid-functionalized calcium phosphate nanoparticles for siRNA delivery[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 158(1): 175–181.
- [46] LI AN, WANG N, SONG YX, *et al.* Bimetallic metal-organic frameworks for tumor inhibition via combined photothermal-immunotherapy[J]. *Chem Commun*, 2022, 58(14): 2315–2318.
- [47] ZHOU BQ, WU Q, WANG M, *et al.* Immunologically modified MnFe₂O₄ nanoparticles to synergize photothermal therapy and immunotherapy for cancer treatment[J]. *Chem Eng J*, 2020, 396(15): 125239.
- [48] YUN WS, PARK JH, LIM DK, *et al.* How did conventional nanoparticle-mediated photothermal therapy become “Hot” in combination with cancer immunotherapy? [J]. *Cancers*, 2022, 14(8): 2044.
- [49] LI RY, ZHENG QH, DENG QP, *et al.* A dual functional drug delivery system that combines photothermal therapy and immunotherapy to treat tumors[J]. *Mol Pharmaceut*, 2022, 19(5): 1449–1457.
- [50] LIU KY, LIAO YX, ZHOU ZF, *et al.* Photothermal-triggered immunogenic nanotherapeutics for optimizing osteosarcoma therapy by synergizing innate and adaptive immunity[J]. *Biomaterials*, 2022, 282: 121383.
- [51] HAO HS, YU M, YI YF, *et al.* Mesoporous calcium peroxide-ignited NO generation for amplifying photothermal immunotherapy of breast cancer[J]. *Chem Eng J*, 2022, 437(1): 135371.
- [52] GENG C, ZHANG YL, HIDRU TH, *et al.* Sonodynamic therapy: A potential treatment for atherosclerosis[J]. *Life Sci*, 2018, 207: 304–313.
- [53] 陈星妍, 崔韶晖, 杜桑, 等. 细胞膜修饰纳米粒药物递送系统的研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(22): 3024–3029.
- [54] ZHANG Y, ZHANG XQ, YANG HC, *et al.* Advanced biotechnology-assisted precise sonodynamic therapy[J]. *Chem Soc Rev*, 2021, 50(20): 11227–11248.
- [55] ZHANG QY, BAO CX, CAI XJ, *et al.* Sonodynamic therapy-assisted immunotherapy: A novel modality for cancer treatment [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(5): 1330–1345.
- [56] TAN X, HUANG JZ, WANG YQ, *et al.* Transformable nanosensitizer with tumor microenvironment-activated sonodynamic process and calcium release for enhanced cancer immunotherapy [J]. *Angew Chem Int Edit*, 2021, 60(25): 14051–14059.
- [57] YONG SB, RAMISHETTI S, GOLDSMITH M, *et al.* Dual-targeted lipid nanotherapeutic boost for chemo-immunotherapy of cancer[J]. *Adv Mater*, 2022, 34(13): e2106350.
- [58] DAVERN M, LYSAGHT J. Cooperation between chemotherapy and immunotherapy in gastroesophageal cancers[J]. *Cancer Lett*, 2020, 495(28): 89–99.
- [59] WU XQ, YAN J, HAN XQ, *et al.* Core-shell nanomaterials engineered to reverse cancer multidrug resistance by immunotherapy and promote photo-responsive chemotherapy[J]. *Chem Eng J*, 2021, 429(1): 6800–6811.
- [60] LIU JJ, ZHU CY, XU LH, *et al.* Nanoenabled intracellular calcium bursting for safe and efficient reversal of drug resistance in tumor cells[J]. *Nano Lett*, 2020, 20(11): 8102–8111.
- [61] WANG YF, LIU ZG, YUAN HF, *et al.* The reciprocity between radiotherapy and cancer immunotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 25(6): 1709–1717.
- [62] WALKER JM, ROLIG AS, CHARYCH DH, *et al.* NKTR-214 immunotherapy synergizes with radiotherapy to stimulate systemic CD8⁺ T cell responses capable of curing multi-focal cancer[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000464.
- [63] ASHRAFIZADEH M, FARHOOD B, MUSA AE, *et al.* Abscopal effect in radioimmunotherapy [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 85: 106663.
- [64] WANG CJ, DONG ZL, HAO Y, *et al.* Coordination polymer-coated CaCO₃ reinforces radiotherapy by reprogramming the immunosuppressive metabolic microenvironment [J]. *Adv Mater*, 2021, 34(3): e2106520.
- [65] CHANG MY, HOU ZY, JIN DY, *et al.* Colorectal tumor microenvironment-activated bio-decomposable and metabolizable Cu₂O @ CaCO₃ nanocomposites for synergistic oncotherapy [J]. *Adv Mater*, 2020, 32(43): e2004647.
- [66] LI YH, ZHANG X, LIU XH, *et al.* A mineralization strategy based on T-cell membrane coated CaCO₃ nanoparticles against breast cancer and metastasis[J]. *Mater Chem Front*, 2021, 5(15): 5738–5745.
- [67] LI YL, ZHOU S, SONG HZ, *et al.* CaCO₃ nanoparticles incorporated with KAE to enable amplified calcium overload cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2021, 277: 121080.
- [68] CARO C, AVASTHI A, MUNOZ JMP, *et al.* Passive targeting of high-grade gliomas via the EPR effect: a closed path for metallic nanoparticles? [J]. *Biomater Sci-UK*, 2021, 9(23): 7984–7995.
- [69] HUANG T, ZHOU JY, WANG JL. Calcium and calcium-related proteins in endometrial cancer: opportunities for pharmacological intervention[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(3): 1065–1078.

编辑:蒋欣欣/接受日期:2022-08-08