

分 类 号: R979.1

单位代码: 10183

研究生学号: 2019771021

密 级: 公 开



吉林大学 博士学位论文

环糊精纳米粒共递送人参皂苷 Rg3 和槲皮素

抗结直肠癌免疫治疗研究

A study on cyclodextrin-based nanoparticle for co-delivery of
ginsenoside Rg3 and quercetin to achieve immunotherapy
against colorectal cancer

作者姓名: 孙丹丹

专 业: 生物药学

研究方向: 基于纳米制剂的肿瘤免疫治疗研究

指导教师: 郭建锋 教授

培养单位: 吉林大学药学院

2022 年 6 月

环糊精纳米粒共递送人参皂苷 Rg3 和槲皮素
抗结直肠癌免疫治疗研究

A study on cyclodextrin-based nanoparticle for co-delivery of ginsenoside Rg3 and quercetin to achieve immunotherapy against colorectal cancer

作者姓名： 孙丹丹
专业名称： 生物药学
指导教师： 郭建锋 教授
学位类别： 医学博士
论文答辩日期： 2022 年 5 月 21 日
授予学位日期： 年 月 日

答辩委员会组成：

	姓名	职称	工作单位
主席	吴伟	教授	复旦大学
委员	李清	教授	沈阳药科大学
	管清香	教授	吉林大学
	王广树	教授	吉林大学
	项金宝	教授	吉林大学

吉林大学博士学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交学位论文，是本人在指导教师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其它个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名: 孙丹丹

日期: 2022 年 5 月 21 日

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解吉林大学有关保留、使用学位论文的规定，同意吉林大学保留或向国家有关部门或机构递交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权吉林大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

（保密论文在解密后应遵守此规定）

论文级别： 硕士 博士

学科专业：

论文题目：环糊精纳米粒共递送人参皂苷 Rg3 和槲皮素
抗结直肠癌免疫治疗研究

作者签名： 孙丹丹

指导教师签名： 郭建峰

2022 年 5 月 21 日

指导教师对博士论文的评阅意见

论文题目：环糊精纳米粒共递送人参皂苷Rg3和槲皮素抗结直肠癌免疫治疗研究

作者姓名：孙丹丹 专业：药学（生物药学）

导师姓名：郭建锋 职称：教授 所在单位：药学院

对论文的工作过程介绍和学术评语：

该论文证实了人参皂苷 Rg3 诱导免疫原性死亡的能力，将其与能在肿瘤细胞内产生 ROS 的槲皮素联用，并构建了共递送 Rg3 和槲皮素的环糊精纳米递送系统，该纳米制剂改善了两种药物在小鼠原位 CRC 模型中的药动学性质和体内分布，促进肿瘤细胞发生 ICD，从而打破免疫耐受肿瘤微环境。

选题具有一定的理论价值，研究结果具有创新性。论文总体结构合理，撰写语言流畅、逻辑清晰、格式较为规整。推荐进行学位论文答辩。

对论文是否达到学位标准的意见：论文达到学位标准

签名：

2022 年 3 月 16 日

评阅小组对博士论文的评阅意见

论文题目：环糊精纳米粒共递送人参皂苷Rg3和槲皮素抗结直肠癌免疫治疗研究

作者姓名：孙丹丹

专业：药学（生物药学）

评阅小组成员	职 称	所 在 单 位
项金宝	教授	吉林大学药学院
管清香	教授	吉林大学药学院
王广树	教授	吉林大学药学院
周小平	副教授	吉林大学药学院
张伟东	副教授	吉林大学药学院

学科学位评定分委员会对评阅小组组成的意见：

同意

学科学位评定分委员会主席签名：

2021年12月16日

对论文的工作过程介绍和学术评语：

该论文证实了人参皂苷 Rg3 诱导免疫原性死亡的能力，将其与能在肿瘤细胞内产生 ROS 的槲皮素联用，并构建了共递送 Rg3 和槲皮素的环糊精纳米递送系统，该纳米制剂改善了两种药物在小鼠原位 CRC 模型中的药动学性质和体内分布，促进肿瘤细胞发生 ICD，从而打破免疫耐受肿瘤微环境。

该论文立论依据充分，研究结果具有较好的创新性，研究设计合理，方法先进，技术路线清晰，数据详实，论文撰写规范。达到博士研究生毕业要求。

对论文是否达到学位标准的意见

已达到学位标准

签名：

2021年12月16日

2019771021 孙丹丹

- 4 -

答辩决议书

论文题目：环糊精纳米粒共递送人参皂苷Rg3和槲皮素抗结直肠癌免疫治疗研究

作者姓名：孙丹丹 专业：药学（生物药学） 学院：药学院

答辩委员会	姓名	职称	工作单位	是否博导
主席	吴伟	教授	复旦大学	是
委员	李清	教授	沈阳药科大学	是
	管清香	教授	吉林大学药学院	是
	项金宝	教授	吉林大学药学院	是
	王广树	教授	吉林大学药学院	是

答辩委员会对论文及答辩情况的评语：

该论文证实了人参皂苷 Rg3 诱导免疫原性死亡的能力，将其与能在肿瘤细胞内产生 ROS 的槲皮素联用，并构建了共递送 Rg3 和槲皮素的环糊精纳米递送系统，该纳米制剂改善了两种药物在小鼠原位 CRC 模型中的药动学性质和体内分布，促进肿瘤细胞发生 ICD，从而打破免疫耐受肿瘤微环境。

该论文立论依据充分，研究结果具有较好的创新性，研究设计合理，方法先进，技术路线清晰，数据详实，论文撰写规范。答辩过程语言流畅，条理清楚，回答问题切题。

经答辩委员会讨论并无记名投票，一致同意孙丹丹同学通过论文答辩，建议授予医学博士学位。

环糊精纳米粒共递送人参皂苷 Rg3 和槲皮素抗结直肠癌免疫治疗研究

摘要

结直肠癌（Colorectal Cancer, CRC）是常见的消化道恶性肿瘤。常规疗法存在疗效低、毒性高、易复发等缺点，亟需发展新型治疗手段。近年来，激活机体免疫系统进行预防、控制和杀死癌细胞的免疫疗法已成为一种新的抗癌策略。研究表明，某些化疗药物可以通过诱导癌细胞凋亡激活抗肿瘤适应性免疫应答，而这一过程被称为免疫原性细胞死亡（Immunogenic Cell Death, ICD）。因此，通过促进 CRC 细胞发生 ICD 是诱导适应性免疫应答抗 CRC 的有效手段。

目前已经明确的 ICD 诱导药物匮乏，因此亟需发展新型诱导药物以丰富基于 ICD 的免疫疗法。本文首先通过研究人参皂苷 Rg3（Ginsenoside Rg3, Rg3）诱导 ICD 的发生过程及其生物标记物的表达，证明 Rg3 诱导 ICD 的潜力。通过激光共聚焦和流式细胞术等方法证明 Rg3 可有效的刺激 CRC 细胞（CT26 和 HCT116）发生内质网应激。在内质网应激发生时，Rg3 诱导钙网蛋白（Calreticulin, CRT）从内质网转运至细胞膜表面；在细胞自噬发生时，Rg3 诱导三磷酸腺苷（Adenosine Triphosphate, ATP）的分泌；在凋亡后期，Rg3 促使高迁移率族蛋白 B1(High Mobility Group Protein B1, HMGB1) 释放到细胞外。因此，上述结果证明了 Rg3 具有诱导 ICD 的作用。

文献报道，肿瘤细胞内产生活性氧（Reactive Oxygen Species, ROS）能够诱发内质网应激，被认为是促进 ICD 的一大原因。因此，本文接下来对槲皮素（Quercetin, QTN）诱导 ROS 的产生进行探究。通过流式细胞术方法发现，QTN 能够提高 CRC 细胞的凋亡率并增加胞内 ROS 含量，从而抑制了 CT26 和 HCT116 细胞生长；这一结果，为 Rg3 和 QTN 的联合应用提供了理论基础。本文进一步探究 Rg3 和 QTN 的组方策略，通过 MTT 实验确定两者联合的最佳比例，由细胞凋亡、ICD 发生过程的标记物以及诱导树突状细胞（Dendritic Cell, DC）活化情况可知，当 Rg3 和 QTN 摩尔比为 1:1 时，具有最佳的体外抗癌效果，并能够促进“1+1>2”的 ICD 功效。

然而，Rg3 和 QTN 不同的物理化学性质，限制了二者在体内的协同抗肿瘤作用。目前，纳米给药系统的最新发展极大地解决了癌症治疗中化疗药物的体内给药障碍。

查阅文献可知，现在还没有研究报道 Rg3 和 QTN 在 CRC 纳米制剂中的共递送。在本文中，以环糊精（Cyclodextrin, CD）为基础，开发了一种以叶酸（Folate, FA）为靶点的聚乙二醇化两亲性环糊精纳米粒（Nanoparticles, NPs），以最佳摩尔比（1:1）共包封 Rg3 和 QTN，使其具有良好的物理化学性质。载双药纳米制剂（CD-PEG-FA.Rg3.QTN）在体外抗癌作用中实现了协同效应。

最后，研究了 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 的体内抗肿瘤疗效。实验结果显示，该纳米制剂改善了双药在小鼠原位 CRC 模型中的药动学性质和体内分布。此外，CD-PEG-FA.Rg3.QTN 促进肿瘤细胞发生 ICD，从而打破免疫耐受肿瘤微环境，增强 PD-L1 抗体的抗肿瘤疗效，可显著延长荷瘤小鼠小鼠的存活时间。本文的“载双药纳米粒+PD-L1 抗体”联合策略有望为 CRC 患者提供新的治疗方案。

关键词：结直肠癌，纳米给药系统，免疫治疗，联合治疗，肿瘤微环境

A study on cyclodextrin-based nanoparticle for co-delivery of ginsenoside Rg3 and quercetin to achieve immunotherapy against colorectal cancer

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is a common gastrointestinal malignant tumor occurring in the colorectal region. Conventional therapy has the disadvantages of low curative effect, high toxicity and easy recurrence. It is urgent to develop new treatment methods. In recent years, immunotherapy, which activates the immune system to prevent, control and kill cancer cells, has become a new anti-cancer strategy. Studies have shown that some chemotherapeutic drugs can activate the anti-tumor adaptive immune response by inducing cancer cell apoptosis, which is called immunogenic cell death (ICD). Therefore, ICD by promoting the occurrence of CRC cells is an effective means to induce adaptive immune response against CRC.

At present, there is a clear lack of ICD inducing drugs, so there is an urgent need to develop new inducing drugs to enrich ICD based immunotherapy. In this study, the potential of Rg3 to induce ICD was proved by studying the occurrence process of Ginsenoside Rg3 (Rg3) induced ICD and the expression of biomarkers. It was proved by laser confocal and flow cytometry that Rg3 can effectively stimulate endoplasmic reticulum stress in CRC cells (CT26 and HCT116). When endoplasmic reticulum stress occurs, Rg3 induces the transport of calreticulin (CRT) from endoplasmic reticulum to cell membrane surface; When autophagy occurs, Rg3 induces the secretion of adenosine triphosphate (ATP); In the late stage of apoptosis, Rg3 promotes the release of high mobility group protein B1 (HMGB1) to the outside of cells. Therefore, the above results prove that Rg3 can induce ICD.

It is reported that reactive oxygen species (ROS) produced by tumor cells can induce endoplasmic reticulum stress, which is considered to be a major reason to promote ICD. Therefore, this paper next explores the production of ROS induced by quercetin (QTN). Flow cytometry showed that QTN could increase the apoptosis rate of CRC cells and increase the content of intracellular ROS, thus inhibiting the growth of CT26 and HCT116 cells; This result

provides a theoretical basis for the joint application of Rg3 and QTN. This paper further explores the formulation strategy of Rg3 and QTN, and determines the optimal proportion of the combination of Rg3 and QTN through MTT experiment. From the markers of apoptosis, ICD and the activation of induced dendritic cells (DCs), it can be seen that when the molar ratio of Rg3 and QTN is 1:1, it has the best anticancer effect *in vitro* and can promote the ICD effect of "1 + 1 > 2".

However, the different physicochemical properties of Rg3 and QTN limit their synergistic antitumor effect *in vivo*. At present, the latest development of nano drug delivery system has greatly promoted the *in vivo* administration of chemotherapeutic drugs in cancer treatment. According to the literature, there is no study on the co delivery of Rg3 and QTN in CRC nano preparations. In this paper, based on cyclodextrin (CD), a PEGylated amphiphilic cyclodextrin nanoparticles (NPs) targeting folate (FA) was developed, which co encapsulated Rg3 and QTN with the best molar ratio (1:1). Double drug loaded nano preparation (CD-PEG-FA.Rg3.QTN) achieved synergistic effect in anticancer effect *in vitro*.

Finally, CD-PEG-FA was studied Rg3. *In vivo* antitumor effect of QTN. The experimental results showed that the nano preparation improved the pharmacokinetics and *in vivo* distribution of the two drugs in the mouse *in situ* CRC model. In addition, CD-PEG-FA.Rg3.QTN can promote the occurrence of ICD in tumor cells, break the immune tolerance tumor microenvironment, enhance the antitumor effect of PD-L1 antibody, and significantly prolong the survival time of tumor bearing mice. The combined strategy of "dual drug loaded nanoparticles + PD-L1 antibody" in this paper is expected to provide a new treatment for CRC patients.

Key Words: Colorectal cancer, Nano drug delivery systems, Immunotherapy, Combination therapy, Tumor microenvironment

目 录

摘要	I
ABSTRACT	III
目录	V
英文缩略词表	XIII
第1章 绪论	1
1.1 结直肠癌治疗现状	1
1.2 免疫原性细胞死亡	1
1.2.1 ICD 介导的抗癌机制	1
1.2.2 ICD 诱导药物	4
1.3 载 ICD 诱导药物纳米递送系统	7
1.3.1 设计纳米粒克服体内递送障碍	8
1.3.2 递送 ICD 诱导药物的纳米制剂研究现状	12
1.4 立题依据及研究策略	18
1.4.1 立题依据	18
1.4.2 研究策略	19
第2章 人参皂甙 Rg3 诱导结直肠癌细胞免疫原性细胞死亡的研究	23
2.1 实验材料	24
2.1.1 实验仪器	24
2.1.2 实验药品与试剂	24

2.2 实验方法	25
2.2.1 细胞培养	25
2.2.2 体外抗癌活性检测	25
2.2.3 细胞凋亡检测	26
2.2.4 蛋白印迹技术	26
2.2.5 Rg3 激活 CRC 细胞的 ICD 生物标记物	29
2.2.6 DC2.4 细胞成熟实验	30
2.2.7 体内疫苗	30
2.3 实验结果和讨论	30
2.3.1 Rg3 的体外抑瘤疗效	30
2.3.2 Rg3 诱导细胞凋亡情况	31
2.3.3 Rg3 诱导内质网应激的作用	32
2.3.4 Rg3 诱导 CRT 暴露到细胞表面	35
2.3.5 Rg3 诱导 ATP 的分泌	35
2.3.6 Rg3 诱导 HMGB1 的释放	36
2.3.7 Rg3 诱导 DC 细胞成熟	37
2.3.8 Rg3 作为体内疫苗	38
2.4 本章小结	39
第 3 章 榆皮素诱导结直肠癌细胞产生活性氧的研究	40
3.1 实验材料	40
3.1.1 实验仪器	40

3.1.2 实验药品与试剂	41
3.2 实验方法	41
3.2.1 QTN 的体外抑瘤疗效	41
3.2.2 QTN 的细胞凋亡	42
3.2.3 蛋白印迹技术	42
3.2.4 ROS 产生	42
3.3 实验结果和讨论	42
3.3.1 QTN 的体外抑瘤疗效	42
3.3.2 QTN 诱导细胞凋亡	43
3.3.3 免疫印迹分析	44
3.3.4 QTN 诱导 ROS 产生	46
3.3.5 ROS 抑制剂对细胞存活率的影响	47
3.3.6 ROS 抑制剂对细胞凋亡的影响	48
3.4 本章小结	49
第 4 章 榆皮素和人参皂甙 Rg3 体外对结直肠癌细胞协同作用研究	51
4.1 实验材料	51
4.1.1 实验仪器	51
4.1.2 实验药品与试剂	52
4.2 实验方法	52
4.2.1 体外 QTN 和 Rg3 联合 IC ₅₀	52
4.2.2 细胞凋亡	52

4.2.3 ICD 标志物检测	52
4.2.4 ROS 抑制剂对 DC 活化的影响	53
4.3 实验结果和讨论	53
4.3.1 体外联合细胞毒性检测	53
4.3.2 细胞凋亡	54
4.3.3 CRT 标志物检测	55
4.3.4 ATP 标志物检测	55
4.3.5 HMGB1 标志物检测	56
4.3.6 NAC 对 DC 细胞活化的影响	57
4.4 本章小结	58
第 5 章 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 的制备与表征及体外抗癌研究	59
5.1 实验材料	60
5.1.1 实验仪器	60
5.1.2 实验试剂与药品	61
5.2 实验方法	62
5.2.1 载药量包封率	62
5.2.2 粒径和形貌测定	62
5.2.3 体外释放	63
5.2.4 稳定性考察	63
5.2.5 细胞定性摄入	63
5.2.6 细胞定量摄入	63

5.2.7 体外抗癌效果	64
5.2.8 细胞划痕	64
5.2.9 克隆形成实验	64
5.3 实验结果和讨论	64
5.3.1 载药量包封率	64
5.3.2 纳米粒形态	65
5.3.3 释放行为	66
5.3.4 稳定考察	67
5.3.5 纳米粒的细胞毒性	68
5.3.6 体外抗癌活性	69
5.3.7 细胞定性摄入	69
5.3.8 细胞定量摄入	70
5.3.9 细胞划痕实验	71
5.3.10 克隆形成实验	72
5.4 本章小结	73
第 6 章 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 的体内毒性、药动学和组织分布研究	75
6.1 实验材料	75
6.1.1 实验仪器	75
6.1.2 实验试剂与药品	75
6.2 实验方法	76
6.2.1 体内急毒	76

6.2.2 HE 染色.....	76
6.2.3 肝/肾功检测.....	76
6.2.4 全血检测	76
6.2.5 组织分布和药代.....	76
6.3 实验结果和讨论	77
6.3.1 小鼠急毒	77
6.3.2 HE 染色.....	78
6.3.3 全血分析	79
6.3.4 肝功分析	80
6.3.5 药代和组织分布	81
6.4 本章小结	84
第 7 章 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 与抗 PD-L1 抗体联合治疗结直肠癌研究 .	85
7.1 实验材料.....	86
7.1.1 实验仪器	86
7.1.2 实验试剂与药品	86
7.2 实验方法	87
7.2.1 抗肿瘤效果	87
7.2.2 体内细胞凋亡检测	87
7.2.3 免疫细胞检测	87
7.2.4 qPCR	87
7.2.5 T 细胞耗竭研究.....	88

7.3 实验结果和讨论	88
7.3.1 体内抗肿瘤	88
7.3.2 体内细胞凋亡	91
7.3.3 体内免疫细胞分析	92
7.3.4 qPCR	95
7.3.5 T 细胞耗竭	95
7.4 本章小结	96
第 8 章 全文总结与研究展望	99
8.1 全文结论	99
8.2 本文创新点	100
参考文献	101
作者简介及科研成果	123

英文缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
CRC	Colorectal Cancer	结直肠癌
TME	Tumor Microenvironment	肿瘤微环境
NP	Nanoparticle;	纳米粒
FA	Folate	叶酸
QTN	Quercetin	槲皮素
Rg3	Ginsenoside Rg3	人参皂苷 Rg3
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1	程序性死亡受体 1
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4	细胞毒性 T 淋巴细胞-4
ICD	Immunogenic Cell Death	免疫原性细胞死亡
PDT	Photodynamic Therapy	光动力疗法
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns	损伤相关分子模式
CRT	Calreticulin	钙网蛋白
HMBG1	High Mobility Group Protein B1	高迁移率族蛋白 B1
ATP	Adenosine Triphosphate	三磷酸腺苷
TLR	Toll-like Receptor	Toll 样受体
UPR	Unfolded Protein Response	未折叠蛋白信号转导通路
CD	Cluster of Differentiation	分化抗原
DC	Dendritic Cell	树突状细胞
IFN- γ	Interferon-gamma	干扰素 γ

IL-12	Interleukin-12	白细胞介素 12
CXCL9	C-X-C Motif Chemokine 9	趋化因子 9
CXCL10	C-X-C Motif Chemokine 10	趋化因子 10
IL-4	Interleukin-4	干扰素 4
IL-6	Interleukin-6	干扰素 6
IL-10	Interleukin-10	干扰素 10
ROS	Reactive Oxygen Species	活性氧簇
MDR	Multiple Drug Resistance	多药耐药
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砜
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride	苯甲基磺酰氟
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基硫酸钠
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane	氨基丁三醇
TBS	Tris Buffered Saline	三乙醇胺缓冲盐水溶液
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
PERK	PKR-like ER Kinase	蛋白激酶样内质网激酶
IRE1	Inositol-requiring Enzyme 1	肌醇需求酶 1
ATF6	Activating Transcription Factor 6	转录激活因子 6
MR	Molar Ratio	摩尔比
LC3	Microtubule-associated Protein Light Chain 3	微管相关蛋白轻链 3

caspase	cysteinyl aspartate specific proteinase	天冬氨酸蛋白水解酶
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide	3- (4, 5-二甲基噻唑-2) -2, 5-二苯基四氮唑溴盐
FITC	Fluorescein Isothiocyanate Isomer	异硫氰酸荧光素
PI	Propidiumiodide	碘化丙啶

第1章 绪论

1.1 结直肠癌治疗现状

结直肠癌（Colorectal Cancer, CRC）是全球常见的癌症死亡原因，每年 CRC 患者超过 185 万例。在被诊断为转移性结直肠癌的患者中，约 70% 至 75% 的患者存活 1 年以上，30% 至 35% 的患者存活 3 年以上，不到 20% 的患者存活 5 年以上。无法切除的转移性结直肠癌的主要治疗方法是全身治疗（细胞毒性化疗、生物治疗，如细胞生长因子抗体、免疫治疗及其组合），对于 50% 患有 KRAS/NRAS/BRAF 型肿瘤的转移性结直肠癌患者，与单纯化疗相比，西妥昔单抗和帕尼妥单抗（针对上皮生长因子受体（EGFR）的单克隆抗体）联合可将生存期延长 2 至 4 个月。然而，对于 35% 到 40% 的 KRAS 或 NRAS 序列突变患者，尚未有有效的靶向治疗。对于 5% 到 10% 的 BRAF V600E 序列变异患者，使用 BRAF 和 EGFR 抑制剂的靶向联合治疗将总生存期延长至 9.3 个月，而接受标准化疗的患者的总生存期为 5.9 个月。对于 5% 的微卫星不稳定性（MMR）（重复 DNA 单元存在大量插入或缺失）或错配修复缺陷患者，免疫治疗可用于第一行或后续行，并改善了治疗结果，先前治疗的患者的总生存期为 31.4 个月^[1]。因此免疫治疗给结直肠癌患者治疗带来了希望。

1.2 免疫原性细胞死亡

1.2.1 ICD 介导的抗癌机制

越来越多的研究表明细胞程序性细胞死亡被认为是一种免疫原性较差的细胞死亡过程^[2]。然而，越来越多的研究表明，损伤相关分子模式（Damage-associated Molecular Patterns, DAMPs）可以由凋亡细胞响应某些刺激而诱导产生，这些 DAMPs 充当危险信号并可以触发免疫刺激作用^[3]。这种免疫原性细胞凋亡被称为 ICD（Immunogenic Cell Death）（图 1.1）。最近，某些化疗药物（例如阿霉素（Doxorubicin, DOX）、米托蒽醌（Mitoxantrone, MTX）、奥沙利铂（Oxaliplatin, OXP）和硼替佐米）、物理疗法（例如光动力疗法（Photodynamic Therapy, PDT）、辐射、热疗和高静水压）和病毒（例如麻疹病毒和溶瘤病毒）等已证明有可能在肿瘤细胞中诱导 ICD^{[4],[5]}。这些化疗药物能

够引起垂死细胞内内质网(Endoplasmic Reticulum, ER)应激、活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)的产生和自噬的发生，这是ICD产生的三个基本先决条件^[6]。目前，研究作者普遍将ICD分类为两种类型：I型ICD和II型ICD。其中，间接引起ER应激的策略被归类为I型ICD触发因素，例如DOX和MTX与DNA相互作用，诱导内质网应激作为下游效应。而直接诱导ER应激的方法被归类为II型ICD触发因素，例如PDT和溶瘤病毒^[7]。

最近，有新的研究更详细地描述了ICD诱导剂的分类^{[8],[9]}。当垂死或死亡的肿瘤细胞发生ICD时，会依次产生三类DAMP，包括：

(i) ICD早期钙网蛋白(Calreticulin, CRT)在细胞表面暴露。ER在蛋白质合成、加工和运输中起着关键作用。当ER稳态被破坏时，未折叠和错误折叠的蛋白质在内质网内积累，进而破坏ER调节能力，导致ER应激^[10]。ER应激影响还原氧化稳态，导致内质网和线粒体内产生ROS^[11]。由于ER应激和ROS形成，某些ER蛋白易位到细胞膜上会激活肿瘤内树突状细胞(Dendritic Cell, DC)的活性^[12]。例如CRT(一种Ca²⁺结合蛋白)作为吞噬或“吃掉我”信号激活DC中的吞噬途径，以摄取肿瘤相关抗原(Tumor Associated Antigen, TAA)或垂死的肿瘤细胞^[13]。CRT还可以与DC上的CD91(低密度脂蛋白受体相关蛋白1, LRP1)结合，从而诱导DC的核因子(NF)-κB信号通路产生细胞因子，例如肿瘤坏死因子α(TNF-α)和白细胞介素6(IL-6)^{[14],[15]}。这些细胞因子促进辅助T1(Th1)细胞的极化，随后Th1细胞产生干扰素-γ(IFN-γ)和IL-2以促进细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL)的分化^[16]。此外，其他ER蛋白，如热休克蛋白(HSP70和HSP90)已显示出有助于DC活性、细胞因子产生和T细胞极化的潜力^[14]。值得注意的是，Giampazolias及其同事近期发现了一种通过线粒体外膜透化(Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP)进行ICD的独特途径。MOMP可以诱导ICD而不会引起caspase活性(内质网应激的下游效应之一)，表明MOMP可绕过内质网应激进行诱导ICD^[17]。

(ii) ICD中期肿瘤细胞分泌ATP(Adenosine Triphosphate)。从垂死肿瘤细胞的细胞质分泌到细胞外环境的ATP可以作为“找到我”信号，将DC募集到肿瘤中^[6]，这一过程依赖于细胞内自噬的发生。自噬是ATP分泌所必需的一种去除和回收不必要或功能失调细胞成分的自然过程^[18]。研究发现，抑制自噬过程会使肿瘤细胞对ICD诱导剂的响应减弱，导致ATP分泌减少，从而显著减少DC的募集^[19]。此外，分泌的ATP

可以与 DC 的嘌呤 P2X7 受体相互作用，诱导 NALP3 炎症小体的激活和 IL-1 β 的释放 [20]，促进 TAA 向 DC 呈递和 CTL 的分化[21]。

(iii) 在 ICD 晚期释放高迁移率族蛋白 1(High Mobility Group Protein B1, HMGB1)。HMGB1 释放的潜在机制仍有待研究。当它从凋亡肿瘤细胞的细胞核转运到细胞质中时，HMGB1 可通过两种方式增强自噬，一方面抑制细胞质内 p53 的自噬活性[22]，另一方面通过保护 Beclin 1 和 ATG5 (自噬相关蛋白) 免受降解来增强自噬[23]。HMGB1 一旦释放到细胞外环境，可以与 Toll-样受体 (例如 DC 细胞表面 TLR4 和 TLR2) 结合，促进 DC 将 TAA 交叉呈递至 CTL。例如 HMGB1 和 TLR4 的相互作用触发 MyD88 (一种关键的骨髓分化基因)，它抑制吞噬体和溶酶体的融合并避免 TAA 的溶酶体降解，从而促进有效的交叉呈递[24],[25]。

尽管关于 ICD 抗肿瘤免疫相关机制尚不完全清楚，但现在很清楚的是 DAMP 和 DC 之间的相互作用会刺激 DC 中 TAA 的吞噬、加工和呈递，触发 TAA 向 T 细胞交叉呈递，并引发抗原特异性抗肿瘤免疫反应和记忆[26]。因此，ICD 诱导策略可能将肿瘤细胞转化为它们自己的疫苗，显示出重新激活和维持癌症免疫循环的重要作用，具有广阔的应用前景[27]。进一步研究 ICD 诱导剂和与其他治疗方案的组合可能会彻底改变癌症治疗[9]。

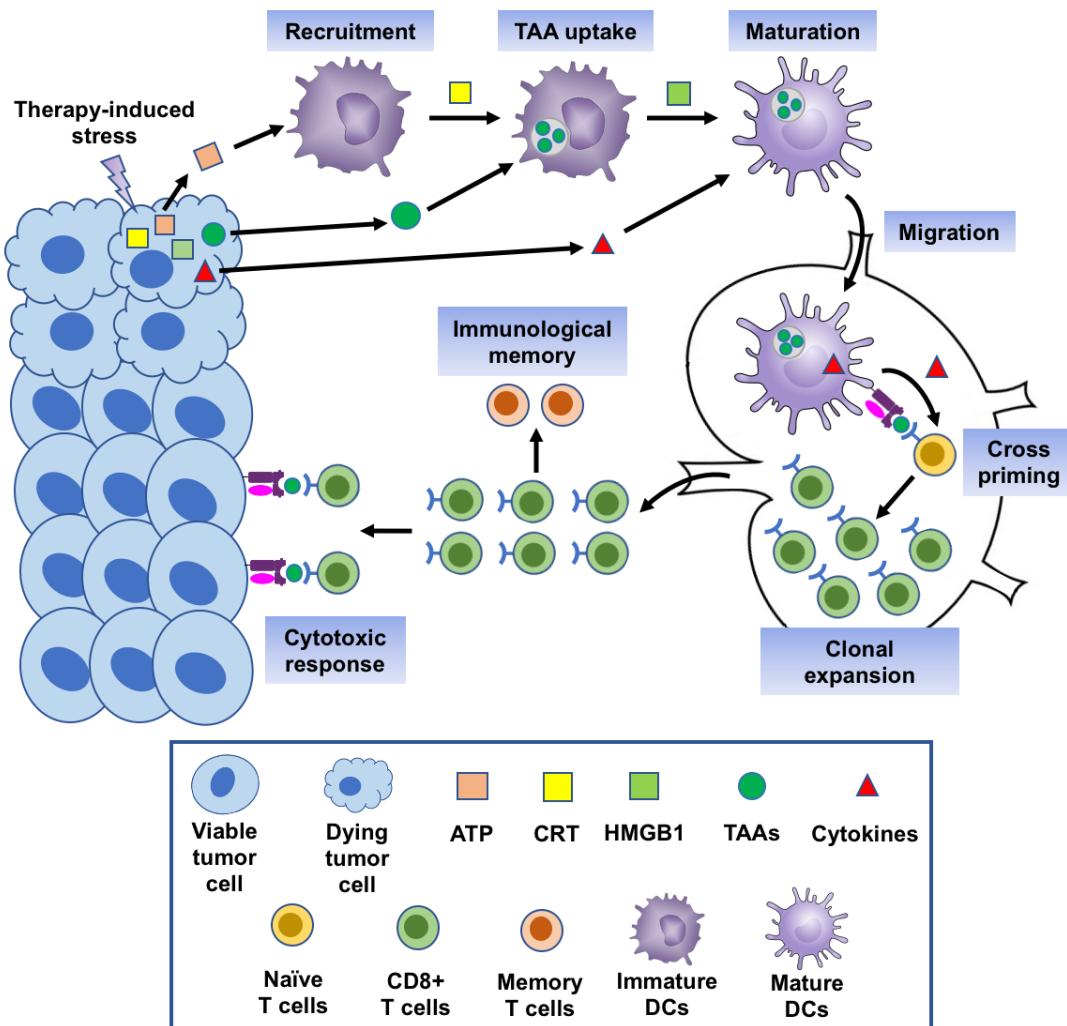


图 1.1 诱导 ICD 用于肿瘤免疫治疗。当肿瘤细胞在药物刺激下产生 ICD 时，依次产生三种 DAMP 分子，包括 CRT 暴露、ATP 分泌和 HMGB1 释放。它们负责将未成熟的 DC 招募到肿瘤部位，并进行 TAA 的摄取、加工和呈递，以及 DC 的成熟。除了释放 TAA 外，死亡或垂死的肿瘤细胞还可以产生细胞因子（例如 1 型干扰素）来激活 DC。在淋巴结中迁移后，成熟的 DC 激活原始 T 淋巴细胞并释放细胞因子（如 IL-1 β ），以克隆性扩增细胞毒性 CD8 $^{+}$ T 淋巴细胞（CTL）。随后，CTL 迁移到肿瘤中，用相同的 TAA 诱导针对肿瘤细胞的抗原特异性细胞毒性反应，并转化为记忆性 T 细胞以防止肿瘤复发。

1.2.2 ICD 诱导药物

在过去的研究中，化疗药物的抗肿瘤活性往往是由于其本身的细胞毒性或抑制细胞生长的作用引起的，因此，近几十年，某些具有 ICD 功效的药物一直被人们忽视^[28]。

迄今为止，只有少数化疗药物被证实是真正的 ICD 诱导剂，包括蒽环类药物（例如阿霉素、米托蒽醌、伊达比星和表柔比星）^[29]、强心苷（如地高辛、洋地黄毒苷和哇巴因）^[30]、GADD34/PP1 抑制剂（例如 tautomycin、calyculin A 和 salubrinal）^[31]、OxP^[32]、硼替佐米^[33]、环磷酰胺^[34]和紫草素^[35]。最近，ICD 介导的抗肿瘤免疫治疗得到广泛关注，科研人员尝试在临床现有的或者新合成的药物中鉴定真正的 ICD 诱导剂。目前，已经开发了几种实验方法来验证真正的 ICD 诱导剂^[36]。其中，具体方法如图 1.2 所示：

(i) 肿瘤细胞中 DAMP 的体外评估。ICD 的三大标志物，包括 CRT 暴露、ATP 分泌和 HMBG1 释放，可用于预测药物的 ICD 潜力（图 1.2A）。可以使用流式细胞术^[30]、免疫荧光（IF）染色^[37]、生物发光分析^[38]和 ELISA^[39]检测这些特性。

(ii) DC 成熟和激活的体外评估。在 ICD 之后，DAMP 会引起 DC 的成熟和激活。在这种情况下，使用药物对肿瘤细胞进行预处理，然后将垂死的肿瘤细胞或从垂死的肿瘤细胞收集的培养基与 DC 共培养（图 1.2B）。通过检测 DC 细胞表面共刺激分子（例如 CD80 和 CD86）的表达，以及免疫刺激细胞因子（例如 IL-1β 和 IL-12）的分泌情况，可以判断 DC 的成熟与活性^{[40],[41]}。此外，将预处理的 DC 和同源 T 细胞共培养，可以评估 DC 响应 DAMP 的交叉呈递能力（图 1.2B）。通过 T 细胞表面 CD69 和 PD-1 的上调以及 IFN-γ、穿孔素 1 和颗粒酶的产生情况，可以评价 T 细胞的成熟和功能^[36]。

(iii) 体内疫苗接种实验。根据上述体外研究基础，使用免疫活性小鼠和同源肿瘤细胞进行疫苗接种实验，以正式确认药物的 ICD 能力（图 1.2C）。在这种情况下，小鼠肿瘤细胞在体外经药物处理后，去除药物或其他外源性刺激物，并保证在没有任何免疫佐剂的情况下，皮下注射（s.c.）到小鼠侧腹。注射一到两周后，将相同种类的正常状态的肿瘤细胞皮下注射到另一侧（即再激发）。当药物能够诱导 ICD，肿瘤发生率和生长在再激发时将显著抑制。相反，当该药物不能诱导 ICD 时，再激发会导致肿瘤发生率和生长显著增加^[21,25,29,42]。作为验证性实验，免疫缺陷小鼠用于疫苗接种实验（图 1.2C）。无论药物是否为 ICD 诱导剂，由于小鼠处于免疫缺陷状态，再激发部位的肿瘤发生率和生长都不会受到显著抑制。

最近，已经开发了一种结合流式细胞术、免疫荧光染色和生物发光测定的高通量平台，用于分析肿瘤细胞中的 ICD 标志（即 CRT 暴露、ATP 释放和 HMBG1 分泌）^[43]。它提供了一个完全自动化的工作流程，包括样品处理和数据分析。候选药物可以

通过使用该体外平台筛选大型文库来确定，并且候选药物的 ICD 诱导能力可以使用体内疫苗接种实验进行确认。通过这种联合方法，强心昔^[30]和 septacidin^[43]已被成功验证为真正的 ICD 诱导剂。

此外，计算机模拟已被用于开发算法，该算法可以将推断的 ICD 药物的物理化学特征与此类药物相关的细胞反应相关联。基于理化和生物学信息，希望这些算法能够预测现有药物的 ICD 潜力并指导新型 ICD 诱导剂的设计^[44]。然而，药物的物理化学性质与生物之间关系并不能完全依靠计算机进行精准的预测。例如顺铂^[45]和苯丙氨酸氮芥（美法仑）^[42]、OxP 和环磷酰胺具有相似的化学结构和抗癌特性，其中 OxP 和环磷酰胺是 ICD 诱导剂，而顺铂和美法仑则不是。导致这一问题的原因，可能是因为目前可用的数据量太少，无法根据现有数据进行精确预测。因此，需要使用上述实验方法进一步验证，以识别真正的 ICD 诱导剂，这将为计算机学习模型提供更多数据，提高算法的准确性。

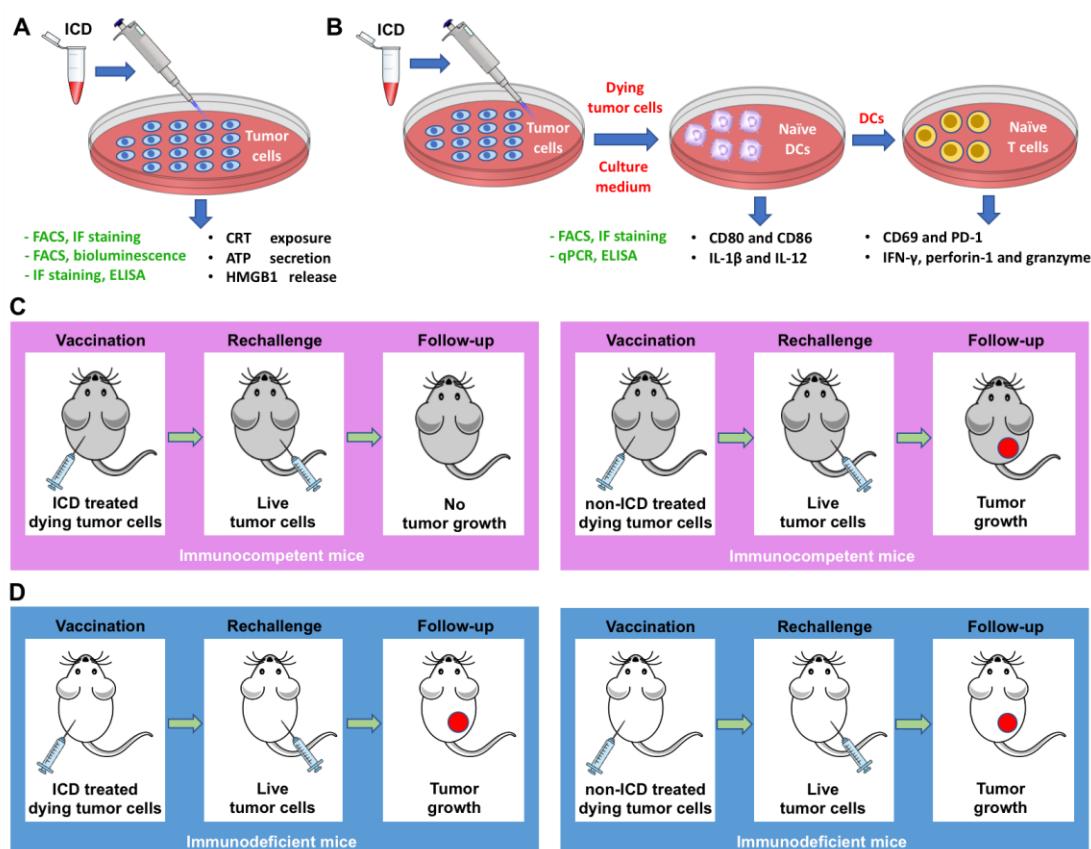


图 1.2 使用体外和体内实验方法鉴定真正的 ICD 诱导剂。（A）：药物治疗后，可使用荧光激活细胞分选（FACS）、免疫荧光（IF）染色和酶联免疫吸附实验（ELISA）评估肿瘤细胞中的 DAMP（即 CRT 暴露、ATP 分泌和 HMGB1 释放）。（B）：药物治疗

后，死亡的肿瘤细胞或从死亡的肿瘤细胞收集的培养基与未成熟的树突状细胞共培养。通过 FACS、IF 染色、qPCR 和 ELISA 等实验技术，评价共刺激抗原（如 CD80 和 CD86）的刺激和炎性细胞因子（如 IL-1 β 和 IL-12）的上调情况，以判断 DC 的成熟。成熟 DC 可进一步与未成熟 T 淋巴细胞共培养，T 淋巴细胞的活化（例如 CD69 和 PD-1 的表达以及 IFN- γ 、穿孔素 1 和颗粒酶的产生）通过 FACS、IF 染色、qPCR 和 ELISA 进行评估。（C）：在体外用药物治疗小鼠肿瘤细胞，并将其皮下注射（s.c.）到小鼠侧腹。注射 1 至 2 周后，将同种活肿瘤细胞皮下注射到对侧（即再次激发）。鉴于该药物能够诱导 ICD，实验肿瘤发生率和再激发部位的生长将受到显著抑制。相反，当药物不能诱导 ICD 时，用活肿瘤细胞再次激发将诱导肿瘤发生和生长。（D）：此外，免疫缺陷小鼠用于疫苗接种，在这种实验条件下，再激发部位的肿瘤发生率和肿瘤大小都不会受到明显抑制。

1.3 载 ICD 诱导药物纳米递送系统

大部分 ICD 化疗药物的半衰期短、稳定性差、肿瘤靶向递送效率低，且受肿瘤微环境（Tumor Microenvironment, TME）的影响，严重阻碍了 ICD 诱导剂的临床应用潜力。因此，设计用于改善药代动力学、增强肿瘤分布和肿瘤细胞特异性递送的纳米药物递送系统（Nano Drug Delivery System, NDDS）是迫切需要的^[46]，其旨在改变 ICD 化疗诱导剂的全身给药特性，实现药物靶向到肿瘤细胞的有效和安全递送（图 1.3）。使用多功能 NDDS 共同递送 ICD 化疗诱导剂和具有不同作用机制的药物以重塑肿瘤微环境。针对 TME，多功能 NDDS 可以基于脂质纳米颗粒（Nanoparticles, NPs）、聚合物 NPs 和无机 NPs 使用隐形基团、响应部分和靶向配体的修饰来实现靶向递送。多功能 NDDS 能够改善药物的药代动力学、增强肿瘤分布以及靶向递送药物。系统给药后，多功能 NDDS(100~200 nm)通过高通透性和滞留效应(Enhanced Permeability and Retention Effect, EPR)或转胞吞作用在肿瘤内积累，通过配体受体介导的途径（主动肿瘤靶向）识别肿瘤细胞，逃逸内体或溶酶体，并以响应方式释放治疗性药物。因此，含有 ICD 诱导剂的 NDDS 可以增加免疫刺激细胞（例如 CD8 $^{+}$ T 细胞、CD4 $^{+}$ T 细胞、DC 和 M1 巨噬细胞）、细胞因子（例如 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-12）和 TME 内的趋化因子（例如 CXCL9 和 CXCL10）。此外，例如癌症相关成纤维细胞（Cancer Associated Fibroblasts, CAF）这类的细胞外基质（Extracellular Matrix, ECM），其致密性和杂乱无章的肿瘤血管可

以通过含有 TME 调节药物的 NDDS 进行重塑^{[39],[69]}。TME 中的髓源抑制细胞 (Myeloid Derived Suppressor Cells, MDSC) , M2 巨噬细胞, 调节性 T 细胞 (Treg 细胞), 细胞因子 (例如 IL-4, IL-6, 和 IL-10) 和生长因子 (例如转化生长因子-β (TGF-β)) 等, 会诱导肿瘤内部产生免疫抑制的微环境, 这时本章可以采用含有抗免疫抑制通路药物的 NDDS 来调节 TME^{[22],[86]}, 从而, 使免疫抑制性“冷”肿瘤转化为免疫刺激性“热”肿瘤。

1.3.1 设计纳米粒克服体内递送障碍

1.3.1.1 体内稳定性

血液循环方面, 静脉注射后, 大于 5.5 nm 的纳米颗粒 (NPs) 通过肾脏过滤从血液循环中排出^[47], 而粒径大于 10 nm 的纳米颗粒则倾向于避免肾小球清除^[48], 10-100 nm 范围内的 NPs 易在肝脏中发生非特异性积聚^[49]。此外, 大于 200 nm 的纳米制剂可通过内皮细胞间缝隙滞留在脾脏内^[50]。综上所述, 尺寸在 100 至 200 nm 范围内的 NPs 适合延长血液循环 (图 1.3)。

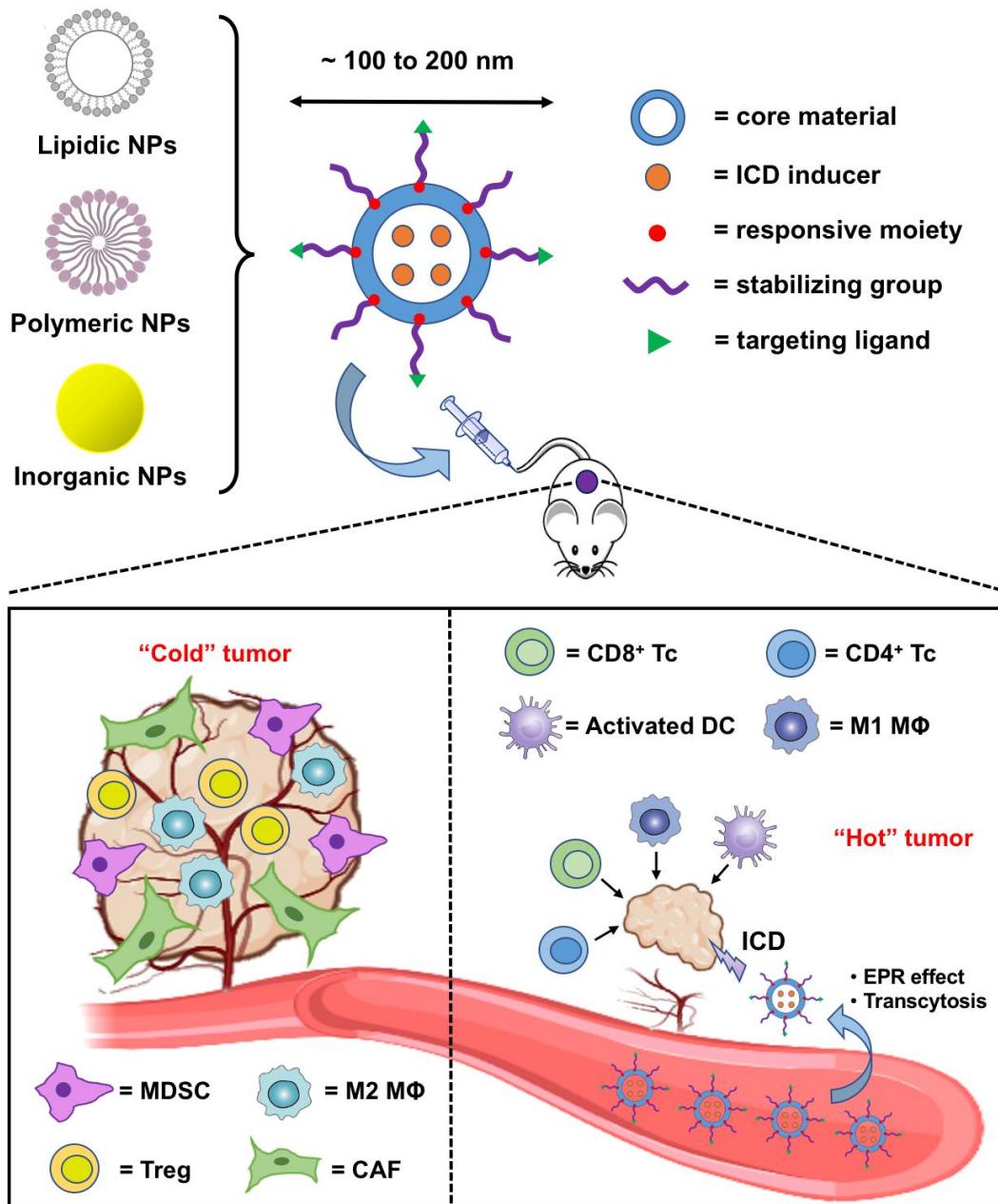


图 1.3 使用多功能 NDDS 提供化疗 ICD 诱导药物，以重塑 TME 用于癌症免疫治疗。通过对基团、响应性基团和靶向配体的修饰，可以基于脂质体 NPs、聚合物 NPs 和无机 NPs 实现多功能 NDDS。多功能 NDDS 可改善药代动力学，增强肿瘤分布，并有针对性地提供 ICD 化疗诱导剂。系统给药后，多功能 NDDS（约 100~200 nm）通过胞饮作用积聚在肿瘤内，通过配体受体介导的途径识别肿瘤细胞，进而释放 ICD 诱导药物。因此，ICD 介导的免疫治疗可显著抑制细胞外基质 (ECM，如癌相关成纤维细胞 (CAF)) 的致密性和紊乱的肿瘤血管。此外，TME 中的 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、DC 和 M1 巨噬细胞被激活，促使免疫抑制性“冷”肿瘤（由 MDSC、M2 巨噬细胞和 Treg 组成）

被转化为免疫刺激性“热”肿瘤。

此外，纳米制剂的改性和修饰已被证实可改善 NPs 的体循环（图 1.3）。纳米制剂的改性和修饰可通过多种方式来实现纳米制剂的靶向作用：1) 使用长循环部分（例如聚乙二醇）对 NPs 进行表面改性；2) 使用生物膜对 NPs 进行表面涂层来实现纳米制剂的靶向作用。值得注意的是，与聚乙二醇化对应物相比，有红细胞膜包被的 NPs 显著提高了半衰期，这意味着生物膜涂层可能是 PEG 更好的替代物，用于改善药代动力学特征^[51-53]。

1.3.1.2 肿瘤靶向

由于血管渗漏，小于 500nm 的 NPs 在肿瘤中被动积累^[54]。这种现象被称为 EPR 效应^[55]。1986 年首次描述^[56]，EPR 效应被认为是 NPs 肿瘤分布的主要机制。然而，NPs 肿瘤递送中 EPR 效应的可变性和程度仍备受争议。例如 EPR 效应在小动物肿瘤模型（通常用于临床前研究的小鼠）中比在患者体内发展的肿瘤更重要^[57]。此外，尽管 EPR 介导的 NPs 肿瘤积累在患者中很明显^[58]，但 EPR 效应的程度在同一肿瘤的不同阶段和同一患者的不同部位的肿瘤内是异质性的^{[59],[60]}。因此，在 EPR 效应方面确定适合纳米药物的患者亚群至关重要^[61]。最近，非侵入性成像技术的应用成为评估肿瘤中 EPR 的更好手段^{[62],[63]}。例如可追溯的纳米粒子（例如超顺磁性氧化铁纳米粒子（SPION））已被开发为成像指南，它可以根据 EPR 效应将从纳米药物中受益的患者进行分类^[64]。

此外，转胞吞作用，即分子从细胞一侧主动跨细胞转运到另一侧^[65]，也参与了 NPs 进入肿瘤^[66]。最近，Chan 及其同事报道了一项关于 NPs 在肿瘤部位外渗的机制研究。在这项研究中，在对荷瘤小鼠全身给予金纳米粒子（AuNPs，15、50 和 100nm）后，动物被处死并使用多聚甲醛（PFA）进行固定。随后，使用电感耦合等离子体质谱法、透射电子显微镜（Transmission Electron Microscope, TEM）和 3D 成像分析了肿瘤血管系统。结果表明，具有三种粒径（15、50 和 100nm）在细胞质内或内皮细胞表面积累，表明转胞吞作用是 AuNPs 进入肿瘤的主要转运机制。在单独的实验中，荷瘤小鼠被处死并使用 PFA 进行固定，以检测抑制与转胞吞作用相关的结构变化。使用经心灌注将 NPs 全身给药于 PFA 固定的小鼠，发现三种粒径的 AuNPs 在肿瘤中的积累显著减少。这些结果证实转胞吞作用在 NPs 在肿瘤部位的转运中起关键作用^[67]。

1.3.1.3 肿瘤微环境

TME 对 NDDS 的递送存在结构和生理障碍（图 1.3）。例如 ECM 细胞外成分（胶原蛋白、酶和糖蛋白等）3D 网络的致密性质和杂乱无章的肿瘤血管显著阻碍了 NPs 在整个肿瘤中的运输^[68]。因此，迫切需要开发新的策略来提高 NDDS 的肿瘤渗透率。

胰腺导管腺癌（Pancreatic ductal adenocarcinoma，PDAC）是高密度 ECM。活化的胰腺星状细胞（Pancreatic stellate cells，aPSCs）作为关键的基质细胞，在 ECM 的形成中具有重要作用；因此，通过靶向 aPSCs 进行 ECM 调制对 PDAC 治疗有很大的希望^[69]。最近，开发了一种基于聚乙二醇化阳离子 AuNPs 的 pH 响应 NDDS，装载全反式维甲酸（ATRA，一种诱导 aPSC 静止的药物）和 HSP47 siRNA（siHSP47；HSP47 是一种胶原特异性伴侣蛋白），用于治疗 PDAC^[70]。所得纳米制剂同时诱导 aPSCs 静止并抑制 ECM 增生。这种方法显著增强了吉西他滨联合治疗 PDAC 小鼠的疗效^[69]。此外，在脂质体 NDDS 中，搭配肼苯哒嗪（HDZ，一种用于治疗高血压的药物）在静脉给药后可调节肿瘤的血管通透性。脂质体 HDZ 增强了脂质体 DOX 抗晚期结缔组织增生性黑色素瘤小鼠的抗癌效果^[39]。

此外，TME 的特点是新抗原减少、免疫检查点表达以及免疫抑制细胞因子、趋化因子和生长因子的产生^[16]。这种免疫抑制环境对当前的免疫疗法有抵抗力。NDDS 配方的最新发展证明了通过促进免疫刺激作用和克服免疫抑制障碍（即“为发动机加油，释放制动器”）（图 1.3）来调节 TME 的潜力。

使用 NDDS 递送 ICD 诱导剂已表现出促进 TME 内免疫刺激作用的潜力，这通常伴随着免疫刺激细胞（例如 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、M1 巨噬细胞和 DC）、细胞因子（例如 IFN-γ、TNF-α 和 IL-12）和趋化因子（例如 CXCL9 和 CXCL10）。此外，据报道，干扰素基因（STING）的刺激控制 DNA 刺激的 IFN 依赖性免疫反应^[71-74]。使用 NDDS 递送 STING 诱导剂也显示出抗肿瘤免疫方面的重要前景^[75]。例如 2'3'-环状鸟苷单磷酸-腺苷单磷酸（cGAMP）被称为 STING 途径的内源性介质。最近设计了一种聚合 NDDS 用于递送 cGAMP。由此产生的纳米制剂成功地增强了 cGAMP 的细胞内摄取，诱导了 STING 途径，并将免疫抑制性环境转化为免疫刺激性^[76]。

免疫抑制细胞（例如 Tregs、MDSCs 和肿瘤相关巨噬细胞（TAMs，主要是 M2 表型））、细胞因子（例如 IL-4、IL-6 和 IL-10）和生长因子（例如 TGF-β）支持肿瘤生长或转移并赋予治疗抗性。因此，使用 NDDS 对这些成分的调制有望克服 TME 内的免

疫抑制障碍^{[16],[77]}。最近，使用蛋黄磷脂酰甘油（EPG）、唾液酸（SA）-十八烷酸偶联物依鲁替尼（IBR，一种布鲁顿酪氨酸激酶（BTK）抑制剂；BTK 在 TAM 中的过表达维持了 M2 表型）显著增加了肿瘤微环境的正向免疫调节作用^[78]。鉴于 SA 和 Siglec-1（一种表达在 TAM 上的内吞受体）之间的高亲和力，所得纳米制剂将 IBR 特异性递送到 TAM 中，从而抑制免疫抑制细胞因子的产生，延长荷瘤小鼠的存活时间^[78]。

1.3.1.4 肿瘤细胞特异性递送

如前所述，NPs 可改善体循环；然而，它们通常无法实现细胞特异性靶向。NPs 可以在颗粒表面进一步功能化修饰，例如在表面增加使用肿瘤中独特或高度发现的受体/抗原的靶向配体^[59]，通过配体-受体途径增强抗癌药物（例如化疗 ICD 诱导剂）向肿瘤细胞的递送（图 1.3）。近年来，已有许多科学研究围绕肿瘤细胞上过度表达的受体/抗原和这些物质的靶向配体开展工作^{[79],[80]}。在配体-受体介导的细胞内化之后，NPs 通常被包裹在内体中，随后被转运到溶酶体，其中酸性生态位（pH≈4.5）和降解酶可以破坏制剂并使治疗性药物释放^[81]。为了促进药物从溶酶体逃逸，可以使用生物响应性和生物活性基团（例如 pH 敏感、酶敏感、光敏感和温度敏感的接头、融合肽和膜破坏材料）修饰 NPs（图 1.3），目前有大量的文献报道^[82-84]。一旦从溶酶体释放，化疗诱导 ICD 药物从纳米粒释放，从而增加癌症免疫疗法（图 1.3）。

1.3.2 递送 ICD 诱导药物的纳米制剂研究现状

以 NDDS 为设计基础，将化疗药物 ICD 诱导剂转运至肿瘤细胞中，旨在促进 TME 内的免疫刺激作用，在本文中进行了讨论并总结在表 1.1 中。

1.3.2.1 脂质体

脂质纳米粒，包括脂质体^[85]、固体脂质纳米粒（SLN）^[86]和脂质复合物^[87]，使用阳离子、中性、阴离子脂质、PEG 修饰的脂质和脂质聚合物配制而成。脂质 NDDS 已被用于提高化学治疗剂的溶解度和生物利用度，控制药物输送，并减少毒性作用^[88]。

组合 OXP，亚叶酸（FnA）和 5-氟尿嘧啶（5-FU），即 FOLFOX，是目前用作 CRC 患者的标准化疗方式。然而，FOLFOX 存在疗效低和严重毒副作用的问题，限制了其临床应用。最近，使用 $[\text{Pt}(\text{DACH})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 和 FnA，与 $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}$ 形成了纳米级沉淀物（分子式= $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{OPt}$ ），将 Pt 封装在脂质 NDDS 中，该 NDDS 包含 1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷（DOTAP）、胆固醇和聚乙二醇化氨基乙基茴香胺（AEAA，靶向在肿

瘤上过度表达的 sigma-1 受体的配体）。静脉注射后，所得纳米制剂（Nano-Folox）显著改善了血流中的半衰期并增强了肿瘤积累。实验结果表明，Nano-Folox 能够实现 OxP 介导的 ICD，从而增加了免疫刺激细胞（CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞和 DC）、细胞因子（IFN-γ、TNF-α 和 IL-12）和趋化因子（CXCL9 和 CXCL10）的表达，并且还伴随着免疫抑制细胞（Tregs、MDSC 和 M2 细胞）和细胞因子（IL-4、IL-6 和 IL-10）的抑制。因此，“Nano-Folox 和 5-Fu”的组合策略在原位移植 CRC 小鼠中产生了抗肿瘤功效^[37]。此外，免疫检查点阻断疗法（抗 PD-L1 抗体）提高了 Nano-Folox 和 5-Fu 的疗效，可显著抑制肝转移，促进小鼠长期存活，为 CRC 提供了一种有前景的治疗方式。

如前所述，ROS 具有增强 ICD 的效果，因此，假设刺激肿瘤细胞内 ROS 产生，能够与 ICD 诱导剂产生协同作用。最近，一种基于脂质的 NDDS 被设计用于联合递送双氢青蒿素（DHA，一种 ROS 诱导药物）和 OxP 治疗 CRC。在这项研究中，含有 OxP 的纳米配位聚合物（NCP）核心被封装在 1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱（DOPC）、胆固醇、胆固醇结合的 DHA 和 PEG 的脂质制剂中。在腹腔内（i.p.）给药后，这种纳米制剂实现了 DHA 介导的 ROS 产生和 OxP 介导的 ICD 效应，从而在皮下 CRC 小鼠模型中实现协同肿瘤免疫治疗。同时，伴随着 CD8⁺T 细胞、DC 和 M1 细胞的浸润以及肿瘤内 IFN-γ 的增加。加入抗 PD-L1 抗体进一步增强了这种纳米制剂的功效，抑制了 CRC 生长并防止了肿瘤复发，为 CRC 的临床测试提供了一种新的免疫治疗方法^[89]。

1.3.2.2 聚合物

经过多年研究，以聚合技术为基础，已发展出多种纳米材料，例如聚乳酸-乙醇酸共聚物（PLGA）^[90]、聚 β-氨基酯（PBAE）^[91]、多肽^[92]和多糖^[93]等。这些两亲性聚合物可以采用触发敏感配体、稳定基团和靶向部分进行表面修饰，以实现多功能 NDDS，最终克服体内递送障碍^[94-97]。

最近，使用溶剂置换工艺开发了一种 NDDS，即 PLGA-PEG-AEAA，以共同递送 DOX 和淫羊藿昔，应用于肝细胞癌（HCC）的治疗。结果表明，纳米制剂以 pH 敏感的方式释放药物，促进 DOX 和淫羊藿昔的全身递送和肿瘤分布。这种纳米制剂的静脉注射能够介导有效的免疫反应（CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞和 DC 的刺激，以及 IFN-γ、TNF-α 和 IL-12 的上调），重塑免疫抑制性 TME（抑制 Treg、MDSC 和 M2 细胞，以及下调 IL-4、IL-6 和 IL-10），并在原位移植 HCC 的小鼠中产生抗肿瘤作用^[38]。这一治疗结果主要是由于淫羊藿昔能够诱导 HCC 细胞自噬并改善 DOX 介导的 ICD 效应。

当与乐伐替尼（一种多激酶抑制剂）结合使用时，纳米制剂显著提高了患病小鼠的存活率，证明该化学免疫治疗策略有望用于 HCC 的临床应用。

此外，有研究人员开发了一种基于 PLGA 的 NDDS，采用水包油乳液方法，包装过氧化氢酶（Cat，一种用于将 H_2O_2 分解为氧气的水溶性酶）和咪喹莫特（R837，一种水不溶性 TLR-7 激动剂）。在瘤内(i.t.)注射后，所得纳米制剂（称为 PLGA-Cat/R837）显著减少了缺氧生态位并重新编程了 TME（例如 $CD8^+T$ 细胞和 DC，以及 Treg 和 M2 细胞的减少），从而增强了乳腺肿瘤转移模型中放疗介导的 ICD 效应。在阻断细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4（CTLA-4）的同时，“PLGA-Cat/R837+放疗”策略实现了长期免疫记忆，防止了肿瘤复发，并为无反应的患者提供了一种新的有前景的治疗方法 [98]。

1.3.2.3 无机物

无机纳米粒子，如金纳米粒子、氧化铁纳米粒子、二氧化硅纳米粒子、碳纳米粒子和量子点，在药物递送方面受到了关注。无机材料可以使用不同的官能团进行修饰，从而增强了用于运输化疗药物的多功能 NDDS 的设计^[99]。

最近，有研究者设计了一种基于介孔二氧化硅 NP (MSNP) 的 NDDS，用于 PDAC 的治疗，共同递送 OXP 和吲哚昔莫德 (IND，阻断吲哚胺 2,3-双加氧酶 (IDO，一种免疫抑制介质))。在这项研究中，OXP 被包载到 MSNP 的内芯形成 MSNP/OXP，在其表面涂有脂质双层包含 IND。静脉注射后，所得纳米制剂显著改善了两种药物的体循环和肿瘤分布，从而上调了 ICD 效应并下调了 IDO 通路。因此，这种组合策略显著招募了 CTL 并减少了 Treg，在原位 PDAC 小鼠中实现了协同肿瘤抑制^[100]。

此外，还有人设计了一种基于聚乙二醇化空心 MnO_2 NP 的 NDDS，用于氯 e6(Ce6，一种光动力化合物) 和 DOX 的共包封，以实现 PDT 和免疫治疗。静脉给药后，所得纳米制剂 (PEG- MnO_2 -Ce6/DOX) 主要存在于肿瘤区域，Ce6 和 DOX 在酸性环境中从 PEG- MnO_2 -DOX/Ce6 中释放出来。同时，PEG- MnO_2 诱导 H_2O_2 分解，产生氧气以缓解肿瘤缺氧。当肿瘤受到光照射刺激时，PEG- MnO_2 -DOX/Ce6 将免疫抑制性 TME 重编程为免疫刺激性，伴随着免疫刺激成分 ($CD8^+T$ 细胞、IFN- γ 和 IL-12) 的上调和免疫抑制成分 (M2 细胞和 IL-10) 的下调，显著在原位乳腺癌小鼠模型中抑制肿瘤生长^[101]。表 1.1 是关于 ICD 介导的肿瘤免疫治疗中 NDDS 的最新体内研究，包括制剂、治疗药物、荷瘤小鼠模型、给药途径和终点评价。

表 1.1 在 ICD 介导的肿瘤免疫治疗中对 NDDS 的体内研究汇总。

剂型	包载治疗药物	肿瘤模型和给药方式	注释
Lipids			
Lipid-based NPs (Nano-Folox)	Oxaliplatin (OxP); Folinic acid	CT26-FL3 orthotopic (O.T.) and metastatic (M.T.) colorectal cancer (CRC) & Intravenous (I.V.) injection	The combination of Nano-Folox (OxP and folinic acid) and 5-Fu significantly generated chemo-immunotherapy effects in CRC mice.
Liposomal NPs (LNPs)	OxP; Dihydroartemisinin (DHA, a ROS- inducing drug)	CT26 subcutaneous (S.C.) CRC & Intraperitoneal (I.P.) injection	LNPs containing OxP derivative and DHA synergistically suppressed tumor growth in CRC mice.
Cationic lipid-assisted NPs (CLANs)	OxP; siRNA against indoleamine 2,3- dioxygenase-1 (IDO-1)	CT26 S.C. CRC and Panc02 O.T. pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) & I.V. injection	The combination of OxP and CLANs-siIDO1 could achieve synergistic antitumor immunity in PDAC mice by improving DC maturation, increasing CTL infiltration, and suppressing Treg activity.
Synthetic high-density lipoprotein (sHDL)- like NPs	Doxorubicin (DOX)	CT26-FL3 O.T. CRC & I.V. injection	sHDL-DOX could induce ICD and synergize with anti-PD- L1 antibody for CRC therapy.
Polymeric NPs			
PLGA NPs	Catalase (Cat); Imiquimod (R837)	4T1 O.T. and M.T. breast cancer & I.V. injection	PLGA-Cat/R837 reduced the hypoxia and reprogrammed the immunosuppressive TME, resulting in enhancement of

			radiotherapy-mediated ICD effects in breast tumor metastasis model.
PLGA NPs	OxP	Panc02 S.C. PDAC & I.V. injection	PLGA-OxP led to ICD for improved antitumor effects than free OxP in mice with PDAC.
AEAA-targeted PEGylated PLGA NPs (PLGA-PEG-AEAA)	DOX; Icaritin (ICT)	Hepa1-6 O.T. hepatocellular carcinoma (HCC) & I.V. injection	PLGA-PEG-AEAA containing DOX and ICT was able to remodel the immunosuppressive TME and trigger robust immune responses, achieving satisfactory antitumor effect in orthotopic HCC mice.
Folate-targeted PEGylated PLGA NPs (PLGA-PEG-FA)	DOX; miRNA-200c (tumor suppressor gene)	MC38 S.C. CRC & I.V. injection	PLGA-PEG-FA achieved co-delivery of DOX and miRNA-200c into tumor-bearing mice, and facilitated ICD-mediated immunotherapy for tumor suppression.
Binary cooperative prodrug NP (BCPN)	OxP; NLG919 (IDO-1 inhibitor)	4T1 M.T. breast cancer & I.V. injection	BCPN containing OxP and NLG919 could reprogram the immunosuppressive TME, achieving effective antitumor effect in mice with metastatic breast cancer.
Polydopamine (PDA) NPs conjugated with an up-conversion layer of NaGdF4:Yb/Er	Chlorin e6 (Ce6)	4T1 M.T. breast cancer & Intratumoral (I.T.) injection	The PDA-Ce6 nanoformulation induced PDT and PTT for the TME modulation, generating therapeutic effect against breast cancer metastasis in mice.
PEG-s-s-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(PEG)-2000]	TCPP-T ^{ER}	4T1 S.C. breast cancer & I.T. injection	Ds-sP NPs containing TCPP-T ^{ER} could target the ER and induce ROS under 670 nm laser irradiation, leading to

(Ds-sP) NPs			ICD for immunotherapy against primary and distal tumor growth in mice with breast cancer.
Poly-lysine (PLL) and hyaluronic acid (HA) nanocomplex	Ce6; Dextro-1-methyl tryptophan (1-mt); Anti-PD-L1 antibody	4T1 S.C. breast cancer and B16F10 S.C. melanoma & I.V. injection	Ce6-conjugated HA, 1-mt-conjugated PLL and anti- PD-L1 antibody were self-assembled into nanocomplex via electrostatic interaction. This three-in-one nanocomplex induced ICD and immune checkpoint blockade for effective immunotherapy against breast cancer.
Inorganic NPs			
ER-targeting pardaxin (FAL) peptides modified hollow gold nanospheres (HAuNS)	Indocyanine green (ICG)	CT26 S.C. CRC & I.V. injection	The combination of FAL-ICG-HAuNS and FAL-hemoglobin-liposomal NP achieved PDT and PTT for improved ICD-mediated antitumor efficacy.
Red blood cell membrane-coated HA-complexed gold nanoclusters (RBC-HA-AuNC)	Pheophorbide A (PheoA); Paclitaxel (PTX); Anti-PD-L1 peptide	4T1 O.T. breast cancer & I.V. injection	Co-delivery of PheoA, PTX and anti-PD-L1 peptide was achieved using RBC-HA-AuNC for generation of ICD and ROS against breast cancer in mice.
α -enolase targeting peptide modified Fe ₃ O ₄ NPs	OxP	4T1 O.T. breast cancer & I.V. injection	The resulting nanoformulation induced OxP-mediated ICD and ferric ion-mediated ROS, leading to synergistic antitumor immunotherapy.
Mesoporous silica NPs (MSNPs)	OxP; IND (an inhibitor for IDO-1)	KPC O.T. PDAC & I.V. injection	The resultant nanoformulation simultaneously upregulated ICD effects and downregulated IDO

			pathway. This combination strategy significantly recruited CTLs and reduced Tregs, achieving tumor inhibition in PDAC mice.
PEGylated hollow MnO ₂ NPs	DOX; Ce6	4T1 O.T. breast cancer & I.V. injection	The PEG-MnO ₂ -DOX/Ce6 significantly reshaped the immunosuppressive TME, exerting the abscopal effect for tumor inhibition at the distant site.

1.4 立题依据及研究策略

1.4.1 立题依据

在全世界，每年大约有 100 万人确诊为结直肠癌（Colorectal Cancer, CRC），因此，结直肠癌成为最为常见的恶性肿瘤之一，尤其是在北美、西欧等发达国家多发，且其死亡率居第 3 位。因此寻找新的治疗策略是 CRC 治疗的迫切要求^[102]。手术、放疗和化疗等常规治疗仅在癌症早期有望治愈癌症，尤其是与常规治疗相结合时，晚期和转移性癌症靶向治疗（主要是小分子抑制剂）已显示出治疗益处。然而，尽管取得了重大进展，但这些疗法仍存在耐药性、靶向效应和毒性等局限性，远不能令人满意。越来越多的癌症免疫学知识揭示了免疫系统在肿瘤形成、发展和转移中的作用，并开启了免疫治疗作为新兴治疗策略的开端^[103-107]。

最近，Chen 和 Mellman 描述了癌症免疫周期的一系列事件，即免疫系统消除肿瘤细胞的过程^[108]。肿瘤免疫周期包括：1) 肿瘤细胞中肿瘤相关抗原（TAA）的释放；2) TAA 向抗原呈递细胞呈递；3) T 细胞的激活（主要是细胞毒性 CD8⁺T 淋巴细胞（CTLs））；4) T 细胞的运输；5) 浸润肿瘤；6) T 细胞对肿瘤细胞的识别，以及 7) 肿瘤细胞的破坏（详见癌症免疫周期的讨论^[108]）。越来越清楚的是，肿瘤细胞能够不断进化，形成负反馈机制（例如新抗原的减少、免疫检查点的表达和免疫抑制因子的产生），从而抑制肿瘤免疫周期^{[109],[110]}。作为一种恢复癌症免疫周期的策略，癌症疫苗可以促进 TAA 向 DC 的呈递，从而激活针对肿瘤细胞的肿瘤特异性 CTL^[111]。然而，诸如工程抗原的

低免疫原性、识别个性化新抗原的困难以及缺乏适当的递送方法等限制，已经严重阻碍了癌症疫苗的临床应用^[112]。

免疫原性细胞死亡（ICD）作为免疫原性凋亡的一种形式，可以将垂死或死亡的肿瘤细胞转化为疫苗，进而介导 CTL 针对具有相同 TAA 的残余肿瘤细胞的免疫应答。在肿瘤细胞中诱导 ICD 的方法可能重新激活和维持肿瘤免疫周期，潜在地发挥肿瘤根除作用并提供持久的保护性免疫。纳米技术和生物医学工程的最新进展促进了 NDDS 的发展，以解决 ICD 诱导剂应用的体内问题。

在过去的十年中，研究者们在肿瘤免疫治疗方面已经做出了重大努力。针对癌症免疫循环中的刺激和抑制途径而设计的策略，已经提供了协同抗肿瘤免疫治疗策略^[16]。对体内递送障碍和纳米工程最新进展的深入了解将有助于设计多功能 NDDS，以改善药代动力学、增强肿瘤生物分布、靶向肿瘤细胞和 TME 的重塑。如前所述，用于化学治疗 ICD 诱导剂的 NDDS 的发展，促进了在癌症免疫循环中的免疫刺激作用（表 1）。然而，仅靠促进免疫刺激作用不足以重塑 TME。针对 TME 内的结构、生理障碍和免疫抑制途径，NDDS 能够提供治疗抑制剂，以在癌症免疫循环中“释放刹车”^[16,39,69]。因此，使用 NDDS 实现的 ICD 诱导剂和其他治疗剂（具有不同作用机制）的组合策略，可以实现正向调控肿瘤微环境，以治疗肿瘤和形成长期保护性免疫的潜力。

鉴于以上研究，本文前期筛选 20 种中药单体，筛出对 CRC 细胞敏感的人参皂苷 Rg3（Ginsenoside Rg3, Rg3）和槲皮素（Quercetin, QTN）两种中药单体。Rg3 在诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞侵袭和转移、逆转耐药，与化疗联合协同增效、提高机体免疫力等方面具有显著的作用。但是其抗肿瘤作用机制尚不是很明确。由于人参皂苷 Rg3 诱导损伤相关分子模式（Damage related molecular model, DAMPs）的产生，因此本文验证其是否能够诱导 ICD。抗肿瘤药诱导 ICD 的同时，也伴随着活性氧（Reactive oxygen specie, ROS）的产生。那么本文进一步验证 QTN 能否诱导 ROS 的产生进而诱导肿瘤 ICD。

1.4.2 研究策略

1.4.2.1 人参皂苷 Rg3 诱导免疫原性细胞死亡作用研究

越来越多的研究结果表明，某些化疗药物可以诱导 ICD，从而更好调节免疫抑制性 TME，将“冷”（非 T 细胞炎症）肿瘤重塑为“热”（T 细胞炎症）肿瘤^[113]。ICD

诱导化学疗法与其他免疫疗法的结合已显示出改善癌症患者生存率的巨大前景^[114]。因此，研究化疗药物（被认为是细胞毒性和低免疫原性的）作为潜在的 ICD 药物，受到越来越多的关注。在本研究中，首次使用体外和体内实验方法证实了 Rg3(20(S)-Rg3) 作为 ICD 诱导剂对抗 CRC 细胞的潜力，该方法已被接受并用于 ICD 诱导剂的鉴定。

1.4.2.2 槲皮素 (QTN) 产生活性氧的研究

通过 MTT 法测定 QTN 的 IC₅₀ 且发现 QTN 能诱导 CRC 细胞凋亡。通过流式测定 QTN 能诱导结直肠癌细胞产生 ROS，采用 ROS 抑制剂，流式结果可知，QTN 产生 ROS 量明显下降。由此可以得出 QTN 通过诱导结直肠癌细胞产生 ROS，促进肿瘤细胞凋亡。

1.4.2.3 人参皂苷 Rg3 和槲皮素联合的体外作用研究

采用 MTT 法测 Rg3 和 QTN 联合效果，并确定两药的最优组合。利用流式细胞术、激光共聚焦法和 ELISA 法测定 Rg3、QTN 和 Rg3.QTN 的体外诱导结直肠癌 ICD 的效果。

1.4.2.4 改性环糊精共载人参皂苷 Rg3 和槲皮素的理化性质研究

纳米给药系统的最新发展极大地促进了癌症治疗中化疗药物的体内给药^[115-120]。然而，目前没有研究报道 Rg3 和 QTN 在 CRC 纳米制剂中的共包封。在本研究中，开发了一种以叶酸 (FA) 为靶点的聚乙二醇化两亲性环糊精 NPs，用于以最佳摩尔比 (1:1) 共包封 Rg3 和 QTN，使其具有良好的物理化学性质。

1.4.2.5 体外生物学研究

采用细胞划痕、流式和克隆形成实验测定 QTN.Rg3、CD-PEG-Rg3.QTN 和 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 的体外抗 CRC 效果。由以上结果可知 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 纳米制剂 (CD-PEG-FA.Rg3.QTN) 在体外具有更好的抗癌作用。

1.4.2.6 体内毒性、药代动力学和生物分布

药物通过静脉注射进入体内后，经血液循环将迅速分布到全身的各个组织器官中，如何使药物顺利靶向到肿瘤部位并产生蓄积，对其充分发挥药效具有重要意义。肿瘤血管具有结构不完整且间隙宽的特点，这种血管的高通透性使得大分子颗粒更容易穿过血管渗入到肿瘤组织当中，并长时间滞留在肿瘤部位。组织分布实验可以帮助确定

药物是否能够靶向到肿瘤部位，药物何时在肿瘤部位聚集达到峰值，这决定了联合治疗的最佳时间点。因此，本文采用 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 纳米制剂改善了原位 CRC 小鼠模型中的药代动力学和生物分布。

1.4.2.7 与抗 PD-L1 联合治疗结直肠癌

CD-PEG-FA.Rg3.QTN 改变了 TME 的免疫抑制性质，当与 PD-L1 抗体结合时，可显著延长原位 CRC 小鼠的存活时间。众所周知，只有 MMR 缺陷型结直肠癌患者作为单一疗法对抗 PD-L1 抗体有反应^[121]，而 MMR 型结直肠癌的反应率很低^[122]。因此，本文的联合策略可能为更广泛的 CRC 患者提供治疗益处。

第2章 人参皂甙 Rg3 诱导结直肠癌细胞免疫原性细胞死亡的研究

人参皂甙是人参提取物（一种具有悠久人类使用历史的传统药物）中的一组天然存在的化学物质^[123]。人参皂苷 Rg3 是人参的主要成分之一，具有不同的药理作用^[124-127]。不同之处在于 Rg3 的 C₂₀ 上的立体中心产生两个差向异构体，即 20(S)-和 20(R)-Rg3。它们都具有心脏保护功能，促进抗肿瘤作用，并介导不同程度免疫反应^[128]，但人参皂甙 Rg3 生物利用度比较低。有研究人参皂甙 Rg3 的药代动力学，发现人参皂甙 Rg3 有口服吸收快、代谢快和血药浓度低的缺点，从而限制了人参皂甙 Rg3 的临床应用^[129-135]。

免疫原性细胞死亡 (ICD) 的特征是免疫原性凋亡，它激活凋亡或死亡肿瘤细胞中的损伤相关分子模式 (DAMP)，以刺激响应某些蛋白分子发生变化^[113]。内源性 DAMP 在 ICD 期间响应于 ER 应激和自噬而在癌细胞中被激活。钙网蛋白 (CRT，一种主要存在于内质网中的蛋白质)，三磷酸腺苷 (ATP) 的分泌和高迁移率族蛋白 1 (HMGB1，一种核蛋白) 的释放是三个基本标志，可用于准确预测候选药物的 ICD 潜力^[136]。响应 ER 应激，位于 ER 腔内的蛋白质 CRT 易位到凋亡前癌细胞的质膜上^[137]。在细胞凋亡过程中，自噬是从垂死细胞分泌到细胞外环境中所必需的^[138]。在细胞凋亡的晚期，HMGB1 是一种非组蛋白染色质蛋白，从细胞核释放到细胞外环境中^[139]。DAMP 作为危险信号激活树突状细胞 (DC) 表达肿瘤相关抗原 (TAA)，随后诱导 T 细胞介导的针对同种肿瘤细胞的免疫反应。ICD 的概念彻底改变了被认为具有细胞毒性和低免疫原性的化疗药物的传统观点。例如化疗药物如蒽环类^[140]、奥沙利铂^[141]、硼替佐米^[142]和强心苷^[143]已被确定为 ICD 诱导剂。近年来，化疗药物作为潜在 ICD 诱导剂的评价越来越受到人们的关注。因此本章验证 Rg3 诱导体外诱导结直肠癌细胞的 ICD 情况，并进一步考察 Rg3 作为 CRC 疫苗的潜力。

2.1 实验材料

2.1.1 实验仪器

数显恒温水浴锅	常州国华电器有限公司
全自动雪花制冰机	常熟雪科电器有限公司
高速冷冻离心机	Eppendorf 有限公司
低温离心机	湖南湘仪离心机仪器有限公司
电子分析天平	美国丹佛仪器公司
移液器	Thermo (美国) 公司
超净工作台	北京东联哈尔仪器制造有限公司
倒置显微镜	Olympus (日本) 公司
CO ₂ 培养箱	SANYO (日本) 公司
化学发光凝胶成像仪	北京东胜创新科技有限公司
电热鼓风干燥箱	北京科伟永兴仪器有限公司
立式蒸汽压力灭菌锅	上海博讯实业有限公司
垂直电泳槽	上海天能科技有限公司
电泳仪	北京六一生物科技有限公司
迷你转印仪	杭州诺扬生物技术有限公司

2.1.2 实验药品与试剂

娃哈哈纯净水	杭州娃哈哈集团有限公司
PBS	美国 Corning 公司
RPMI 1640 细胞培养基	美国 Corning 公司
0.25% 胰酶-EDTA	美国 Corning 公司
FBS	以色列 Biological Industries 公司
青-链霉素双抗	以色列 Biological Industries 公司
台盼蓝	北京索莱宝科技有限公司
DMSO	天津百伦斯生物技术有限公司
PMSF	上海碧云天生物技术有限公司

RIPA 细胞裂解液	上海碧云天生物技术有限公司
BCA 工作液	北京全式金生物技术有限公司
5×Protein Loading Buffer	上海碧云天生物技术有限公司
牛血清白蛋白	北京亚米生物科技有限公司
SDS-PAGE 预制胶	上海碧云天生物技术有限公司
SDS	北京博奥拓达科技有限公司
甘氨酸	美国 VWR 生命科技公司
Tris	北京博奥拓达科技有限公司
吐温-20	北京博奥拓达科技有限公司
氯化钠	北京化工厂
甲醇	北京化工厂
抗体	北京 Affinity 生物科技有限公司
ECL 发光液	上海翊圣生物科技有限公司
人参皂苷 Rg3	成都德斯生物技术有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 细胞培养

CT26 (小鼠结直肠癌细胞系) 和 HCT116 (人结直肠癌细胞系) 孵育在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 和 1% 青霉素链霉素中。CT26-Luc (稳定表达荧光素酶的小鼠 CRC 细胞系) 在 RPMI-1640 中培养, 含有 10% 的 FBS、1% 的青霉素-链霉素和 1% $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘧啶霉素。DC2.4 细胞 (小鼠树突状细胞系) 孵育在 RPMI-1640 内, 含有 10% 的 FBS、1×非必需氨基酸、1×HEPES 缓冲液和 5.4 mmol/L β -巯基乙醇。所有细胞均培养在 37°C、5% CO₂ 和 95% 相对湿度的培养箱里面。

2.2.2 体外抗癌活性检测

采用 MTT 法测定 Rg3 的体外细胞毒性。将 CT26 和 HCT116 细胞分别接种于 96 孔板内, 每孔的细胞初始密度约为 1×10^4 个/空, 在 37°C, 5% CO₂ 条件下培养 24 h。弃去上清, 将 Rg3 ([c]=1、5、10、20、40、80、100、120 和 150 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 添加到细胞中培养 24 h。在 37°C, 5%CO₂ 条件下, 孵育 48 h, 每孔加 20 μL MTT 溶液 (终浓度为 0.5

mg/mL) 继续在 5%CO₂, 37°C 培养 4 h, 小心缓慢吸去上清, 每空加入 150 μL DMSO 溶解蓝紫色的甲瓒, 振荡 10 min 待结晶充分溶解后, 用酶标仪测定 570 nm 的 OD 值, 分别设正常对照和空白对照(以不加药物组为正常对照组, 只加培养基组为空白对照组), 平行测定三次。使用 GraphPad Prism 软件计算 IC₅₀。

2.2.3 细胞凋亡检测

使用流式细胞术评估 Rg3 的体外凋亡。将 CT26 和 HCT116 细胞(每孔 2×10⁵) 分别接种于 6 孔板中一天。在 6、12 和 24 h 后, 向细胞中添加 Rg3 ([c]=30 μmol/L)。加入 500 μL 的 1× binding buffer 重悬细胞, 向每组细胞悬液中各加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 继续加入 10 μL Propidium Iodide (PI) 进行混匀, 同时设置 Annexin V-FITC 单阳性管、PI 单阳性管。室温避光孵育 15 min, 随后, 通过 BD FACSCalibur 使用 Annexin V-FITC 和碘化丙啶分析法检测凋亡细胞(%)。

2.2.4 蛋白印迹技术

使用 western blotting 分析评估 UPR 信号通路的相关蛋白活性。将 CT26 和 HCT116 细胞(每孔 2×10⁵) 分别接种于 6 孔板中一天。在 6、12 和 24 h 后, 将 Rg3 ([c]=30 μmol/L) 添加到细胞中。随后, 使用 ProteinXT® 哺乳动物总蛋白提取试剂盒从细胞中提取蛋白质, 并使用 BCA 分析进行含量测定。将蛋白质(每个样品 40 μg) 上样到 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上, 并在 100 V 下运行 90 min。然后将蛋白质在 200 mA 下转移 1 h, 将目标蛋白转到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。将膜与抗体(表 2.1)在 4°C 下孵育过夜。将二级抗体(表 2.1)添加到膜中 1.5 h。使用增强化学发光(ECL)溶液检测蛋白质。使用密度测定法(ImageJ)对蛋白质条带进行定量, 所有结果均以标准化 β-肌动蛋白为参考。

表2.1 研究中使用的抗体

抗体	公司	目录号	实验	稀释比例
Anti-IRE1 (MW of IRE1 = 110 kDa)	Affinity	DF7709	WB	1:2000
Anti-p-IRE1 (MW of p-IRE1 = 110 kDa)	Affinity	AF3318	WB	1:2000
Anti-Bcl-2 (MW of Bcl-2 = 26 kDa)	Affinity	AF6139	WB	1:2000
Anti-BAX (MW of BAX = 21 kDa)	Affinity	AF0120	WB	1:2000
Anti-PERK (MW of PERK = 125 kDa)	Affinity	AF5304	WB	1:2000
Anti-p-PERK (MW of p-PERK = 125 kDa)	Affinity	DF7576	WB	1:2000
Anti-Caspase 9 (MW of Caspase 9 = 46 kDa)	Affinity	AF6348	WB	1:2000
Anti-c-Caspase 9 (MW of c-Caspase 9 = 45 kDa)	Affinity	AF5240	WB	1:2000
Anti-Caspase 3 (MW of Caspase 3 = 37 kDa)	Affinity	AF6311	WB	1:2000
Anti-c-Caspase 3 (MW of c-Caspase 3 = 17 kDa)	Affinity	AF7022	WB	1:2000

Anti-ATF6 (MW of ATF6 = 75 kDa)	Affinity	DF6009	WB	1:2000
Anti-Caspase 4 (MW of Caspase 4 = 43 kDa)	Affinity	AF5130	WB	1:2000
Anti-c-Caspase 4 (MW of c-Caspase 4 = 43 kDa)	Affinity	AF5373	WB	1:2000
Anti-LC3 (MW of LC3 = 19 kDa)	Affinity	DF7421	WB	1:2000
Anti- β -actin (MW of β -actin = 43 kDa)	Affinity	AF7018	WB	1:2000
Goat anti-rabbit IgG (H+L) HRP	TransGen Bi otech	HS101-01	WB	1:5000
Anti-CRT	Affinity	DF6211	IF	1:500
Goat anti-rabbit IgG (H+L) FITC-conjugated CRT	Affinity	S0008	IF	1:500
PE anti-CD11c	BioLegend	117307	Flow	1:500
FITC anti-CD86	BioLegend	105005	Flow	1:500
Alexa Fluor® 700 anti-CD8	BioLegend	100729	Flow	1:500
Alexa Fluor®647 anti-CD3	BioLegend	100209	IF/Flow	1:500
PE anti-CD3	BioLegend	100219	Flow	1:500
APC anti-CD4	BioLegend	100411	Flow	1:500
Alexa Fluor®647 anti-MHC II	BioLegend	107617	Flow	1:500

Alexa Fluor®488 CD11b	BioLegend	101217	Flow	1:500
APC anti-Gr1	BioLegend	108412	Flow	1:500
PE anti-CD206	BioLegend	141705	Flow	1:500
Alexa Fluor®647 anti-F4/80	BioLegend	123121	Flow	1:500
Alexa Fluor®488 FoxP3	BioLegend	126406	Flow	1:500

2.2.5 Rg3激活CRC细胞的ICD生物标记物

2.2.5.1 ATP分泌情况

首先，将细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中。接下来，将细胞设置成PBS组和给药组(IC_{50})，观察细胞生长到约70%时给药；分别在12 h和24 h时收集上清及细胞，并且使用ATP检测试剂盒测定其ATP分泌量。然后，使用移液枪向每孔中加入200 μ L细胞裂解液以裂解细胞，在4°C，12000 g条件下，将其离心5min，取上清，待后续测定。

标准曲线测定准备：在冰水浴的条件下将待用试剂溶解，同时，将ATP标准溶液用ATP检测裂解液稀释成所需的浓度梯度；ATP工作液的配制：按照说明书要求将ATP工作液进行稀释；ATP浓度的测定：A. 向检测管内加入100 μ L的ATP检测工作液，室温下将其放置5 min，使本底性的ATP全部消耗掉；B. 向检测管内加入20 μ L标准品，迅速用移液枪混匀，然后，使用荧光酶标仪测定其RLU值。

2.2.5.2 HMGB1释放情况

使用适宜浓度的Rg3孵育CT26细胞，24 h后，取其上清，设置标准品孔和样品孔，标准品用于制作标准曲线，依次向每个样品孔中加入10 μ L样品和40 μ L样品稀释液。然后按照试剂盒说明书进行后续操作。

2.2.5.3 CRT暴露的测定

将提前处理好的盖玻片放在24孔板中，以 1×10^5 个/孔的密度接种细胞，然后，将细胞分为PBS组和给药组(IC_{50})，观察细胞生长到约70%时给药。给药2 h、4 h、8 h后，用PBS缓慢冲洗细胞2次，并使用0.25%的多聚甲醛固定细胞，时间为5 min；PBS冲洗细胞2次，然后向其中加入1%的牛血清白蛋白，孵育30 min；PBS冲洗细胞

2 次，加入钙网蛋白一抗孵育 1 h；PBS 冲洗细胞 2 次，并加入 FTIC 耦合的二抗，避光孵育 30 min；PBS 冲洗细胞 2 次，并用 4% 的多聚甲醛固定细胞，时间为 20 min；PBS 冲洗细胞 2 次，使用 DAPI 染核；PBS 冲洗细胞 2 次，将盖玻片取出放置在载玻片上，封片，避光保存，使用荧光显微镜检测 CRT 的表达。

2.2.6 DC2.4 细胞成熟实验

采用适宜浓度的 Rg3 孵育 CT26 细胞，24 h 后，取其上清；将 DC2.4 细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种在 6 孔板中，培养过夜，然后取上述细胞上清液继续培养 48 h；孵育完成后，弃去孔内液体，用 PBS 冲洗一次，然后用胰酶消化，收集细胞，在 4°C 条件下，使用 1 mL FITC-labeled anti-mouse CD86 和 PE labeled anti-mouse CD11c，避光孵育，时间为 20 min；在 4°C，500 g 的条件下离心 5 min，使用 PBS 冲洗一次后，加入 200 μ L PBS 重悬细胞；使用流式细胞术分别对 CD86 和 CD11c 成熟标记物进行评价。

2.2.7 体内疫苗

简单地说，将 3×10^6 CT26 细胞经二甲基亚砜处理、在干冰上冻融三次或 30 μ mol/L Rg3 处理 12 h 后，将上述三组细胞皮下植入 BALB/c 小鼠或裸鼠的右侧。一周后，将 3×10^5 的 CT26 细胞皮下移植到左侧腹壁，监测左侧肿瘤的发展。

2.3 实验结果和讨论

2.3.1 Rg3 的体外抑瘤疗效

通过 MTT 验证 Rg3 对 CT26 和 HCT116 细胞毒性，进而评估 Rg3 对 CRC 体外抑制作用。由实验结果可知，Rg3 对两种 CRC 细胞均有明显抑制作用，随着给药浓度增加，细胞存活率下降（如图 2.1）。采用 Graphpad Prism 8.0 软件对实验结果进行分析，计算各 CRC 细胞的半数抑制浓度（median inhibition concentration, IC₅₀），结果所得 Rg3 的抗增殖作用在两种细胞系中相似，CT26（培养 24 h 后）的 IC₅₀ 为 32 μ mol/L 和 HCT116（培养 24 h 后）的 IC₅₀ 为 30 μ mol/L（如表 2.2）。

表 2.2 孵育 24 h 后 CT26 和 HCT116 细胞 Rg3 的 IC₅₀ (n=3)。

IC ₅₀ of Rg3	CT26	HCT116
μ mol/L	32	30

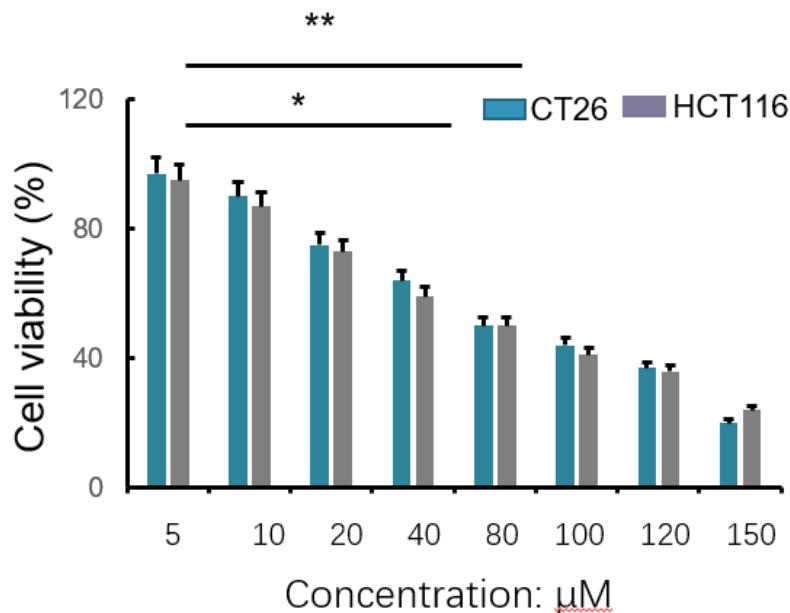
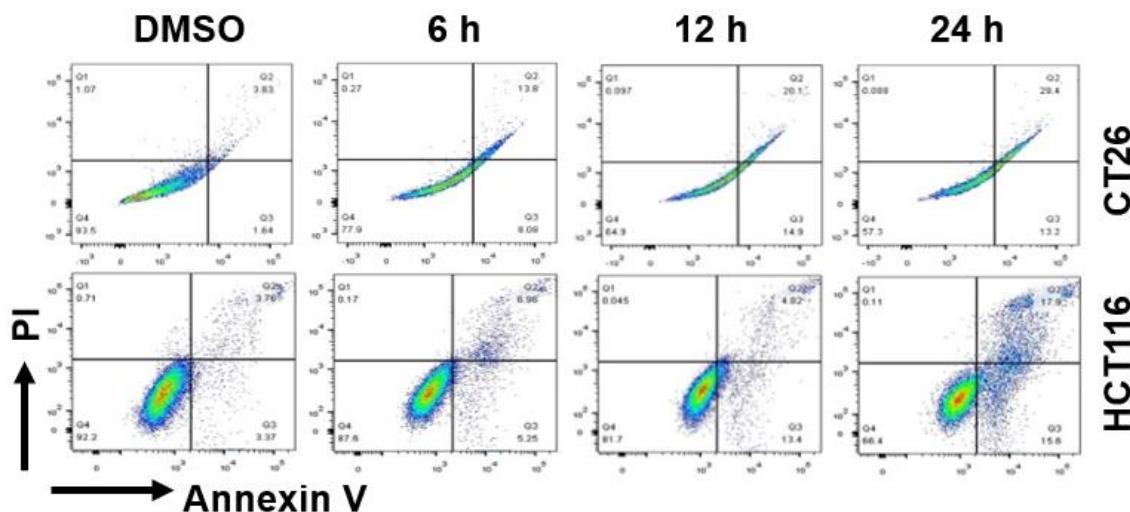


图 2.1 Rg3 对 CT26 和 HCT116 细胞存活率影响（相比于 DMSO，n=3，*P<0.05 和 **P<0.01）。

2.3.2 Rg3 诱导细胞凋亡情况

流式细胞术结果显示，Rg3 以时间依赖性方式诱导细胞凋亡，在 CT26 和 HCT116 细胞系中凋亡分别约 40% 和约 35%（培养 24 h 后）（图 2.2）。这些结果表明，Rg3 诱导的细胞凋亡是抑制 CRC 细胞生长的机制。



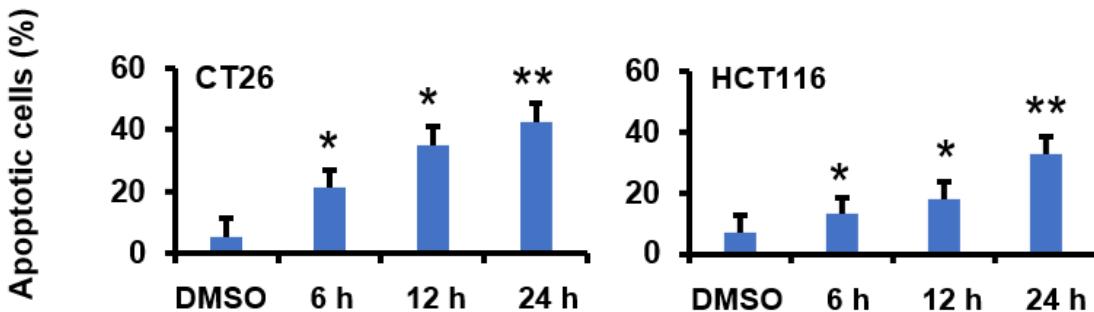


图 2.2 Rg3 ($[c]=30\mu\text{mol}/\text{L}$) 处理 6、12 和 24 h 后 CT26 和 HCT116 细胞凋亡 (%)
(相比于 DMSO, $n=3$, * $P<0.05$ 和 ** $P<0.01$)。

2.3.3 Rg3 诱导内质网应激的作用

使用 CT26 和 HCT116 细胞系评估 Rg3 作为 ICD 诱导剂的潜力。ICD 的诱导能力与内质网 (ER) 应激和自噬密切相关^{[143],[144]}。当恶性肿瘤细胞经历 ER 应激时，包括肌醇需要酶 1 (IRE1)，PKR 样 ER 激酶 (PERK) 和激活转录因子 6 (ATF6) 在内的未折叠蛋白反应 (UPR) 信号通路被激活^[145]。本节通过 WB 法分析内质网应激相关通路蛋白的表达情况。分析结果发现内质网应激主要有三条通路，分别为：(1) IRE1 通路: IRE1→BAX/Bcl-2→caspase9/3；(2) PERK 通路: PERK→Bcl-2/BAX→caspase9/3；(3) ATF6 通路。通过比较给药后各通路蛋白活化情况可以推断出 Rg3 是否能够激活结直肠癌细胞内质网应激。

2.3.3.1 IRE1 信号通路

内质网应激 UPR 信号传导起始于 IRE1 (110 kDa) 磷酸化，抑制抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) (26 kDa) 的表达，上调促凋亡因子 BAX (21 kDa) 的表达^[146]。由图 2.3 和 2.4 可以得出，给药 24 h 后 Rg3 均能诱导 CT26 和 HCT116 细胞中 IRE1 蛋白的磷酸化 ($P<0.001$)，且随时间的推移表达量持续增加；IRE1 通路激活后，能够诱导其下游的促凋亡因子 BAX 构象改变而活化，并抑制 Bcl-2 抗凋亡能力，如图 2.3 和 2.4 所示，BAX 在两个 CRC 细胞系中表达显著增加 ($P<0.01$, $P<0.05$)，而 Bcl-2 呈现完全相反的趋势 ($P<0.01$)，这与实验前预测的结果保持一致。这也说明 Rg3 能够激活内质网应激，同时进一步促进 CRC 细胞凋亡。

2.3.3.2 PERK 信号通路

PERK 是参与 ER 应激信号通路的主要蛋白之一，其 N 端能够感受内质网的刺激

信号，进而活化成为二聚体和磷酸化形式发挥作用。由图 2.3 和 2.4 可以看出，在两种 CRC 细胞中，Rg3 给药后，P-PERK (125 kDa) 表达增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。此外，观察到未磷酸化的 PERK (125 kDa) 蛋白的表达水平呈现轻度下降趋势，这可能是由于大部分 PERK 蛋白转变为活化形态，最终导致这些前体蛋白质含量减少。

2.3.3.3 ATF6 信号通路

ATF6 是 ER 应激信号通路的重要调节因子，内质网接收到刺激信号后，能够迅速解离转变为活化形式，同时转运到高尔基体中发挥相应作用^[147]。从图 2.3 和 2.4 可以观察到，给药 24 h 后，Rg3 能够增加 CRC 细胞中 ATF6 (75 kDa) 的表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)，由此表明 Rg3 能够诱导 ATF6 活化，诱导 ER 应激。

2.3.3.4 Rg3 诱导细胞自噬的作用

药物诱导 ICD 时会伴随着自噬的发生，当癌细胞中进行自噬（自噬作用，去除细胞质成分的自然过程^[148]）时，自噬体的双膜囊泡，将不必要或功能失调的成分转运到溶酶体中进行降解^[149]。微管相关蛋白轻链 3 (Microtubule-associated Protein Light Chain 3, LC3) 是与自噬体生物发生过程中相关的必需蛋白，已被证实是自噬途径中使用最广泛的标志物^[150]。随着 LC3 I (LC3 的胞质形式) 转化为 LC3 II (LC3 的膜结合形式)，形成是明显的自噬体^{[151],[152]}。采用 WB 实验方法检测 Rg3 给药后，观察细胞内 LC3II 和 LC3 I (14+16 kDa) 比例的变化，结果发现 Rg3 能够促进两种 CRC 细胞内自噬的发生。如图 2.3、2.4 的数据所示，给药 6 h 后，CT26 和 HCT116 细胞中的 LC3II 和 LC3I 的蛋白表达比值均有所增加 ($P<0.05$)，且在 HCT116 细胞中，LC3II/I 的蛋白比值呈现时间依赖性。这一结果表明，Rg3 能够有效诱导 CRC 细胞发生细胞自噬。

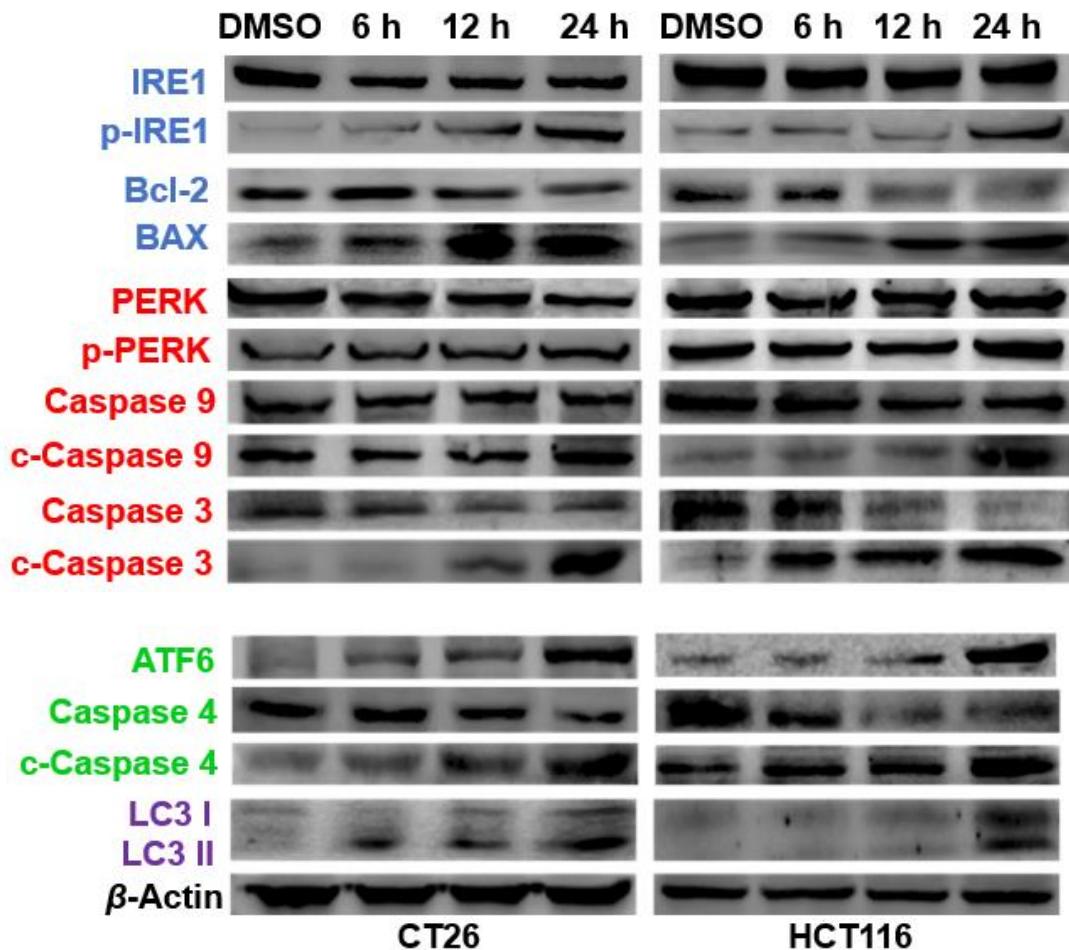


图 2.3 Rg3 ([c]=30 μ mol/L) 处理 6、12 和 24 小时后 UPR 信号通路的激活情况。

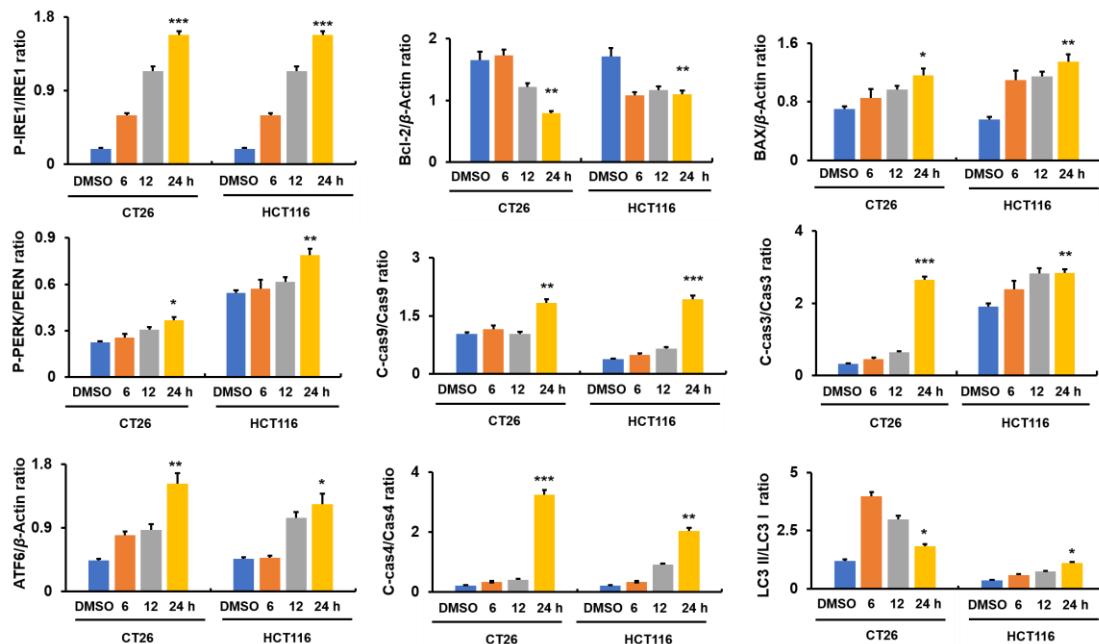


图 2.4 图 2.3 的蛋白质条带定量图（相对于 DMSO, n=3, *P<0.05, **P<0.01 和 ***P<0.001）。

2.3.4 Rg3 诱导 CRT 暴露到细胞表面

CRT 作为 ICD 的代表性 DAMP 分子之一，主要存在于内质网中。当肿瘤细胞经过 ICD 诱导后，内质网内的 CRT 分子会转运出来，最后分布在细胞膜表面，可以被 TME 中的 DC 细胞识别，促进未成熟 DC 对相关抗原进行摄入和处理。实验结果如图 2.5 所示，通过免疫荧光方法检测 CRT 在细胞内的迁移情况，细胞核使用 DAPI 进行处理，表现为图中的蓝色荧光；CRT 经 FITC 标记，在图中显示为绿色荧光。通过荧光显微镜观察 Rg3 给药后绿色荧光的位置变化，评价 CRT 在细胞内的迁移情况。未经药物处理的 DMSO 组，CRT 主要包裹于内质网内，因此未见绿色荧光；而 Rg3 给药 6 h 后，CRC 细胞内出现大量绿色荧光，说明 CRT 开始从内质网转运出来。因此，我们推断 Rg3 在诱导内质网应激后，成功刺激 CRT 从内质网迁移出来并暴露至细胞表面。

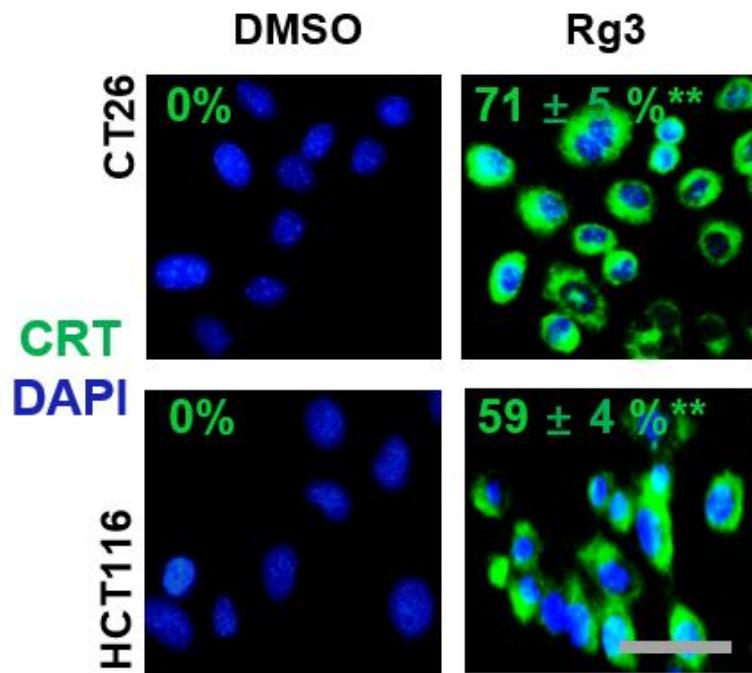


图 2.5 Rg3 ([c]=30 μmol/L) 处理后 CRC 细胞 CRT 暴露 (6 h) (相对于 DMSO, n=3, **P<0.01; bar=20 μm)。

2.3.5 Rg3 诱导 ATP 的分泌

本节实验通过检测 ATP 含量，研究给药后肿瘤细胞 ATP 释放情况。ATP 作为诱导 ICD 的主要 DAMP 分子之一，是细胞内的主要代谢产物之一，参与体内多种代谢活动。ATP 可以与细胞内的代谢型 (P2Y) 或离子型 (P2X 嘌呤) 相结合，进而发挥信使作用

[¹⁵³]。当细胞受物理或化学刺激后，细胞内的 ATP 通过多种途径释放到肿瘤组织内，作为“发现我”信号，招募更多的单核细胞、未成熟 DC 细胞及 M1 巨噬细胞到达肿瘤病灶处。如图 2.6 所示，30 μmol/L 的 Rg3 对 CT26 细胞内 ATP 含量的具有显著影响，当给药浓度为 30 μmol/L 时，细胞内 ATP 含量与对照组相似 ($P<0.05$)，说明大量的 ATP 被分泌到细胞外。

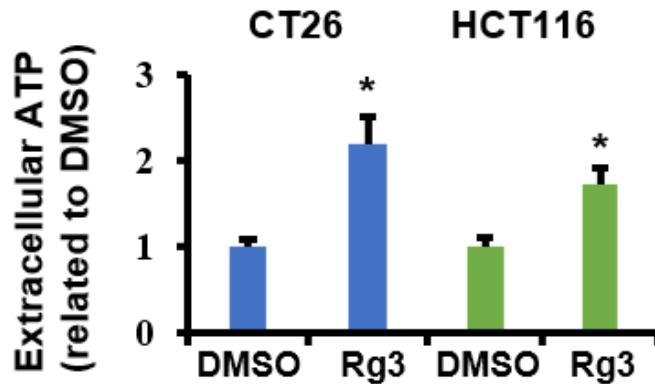


图 2.6 Rg3 ([c]=30 μmol/L) 处理后 CRC 细胞中 ATP 分泌 (12 h) (相对于 DMSO, n=3, *P<0.05; bar=20 μm)。

2.3.6 Rg3 诱导 HMGB1 的释放

正常情况下，HMGB1 分子主要存在于细胞核内，与染色质相结合，状态稳定。但当细胞经受刺激后，处于凋亡后期、垂死或死亡的肿瘤细胞内，细胞核膜破裂，HMGB1 易从细胞核迁移至细胞外部，进而作为 DAMP 分子诱导 DC 细胞趋向成熟。因此，本节采用免疫荧光的方法，研究 Rg3 诱导 CRC 细胞释放 HMGB1 的情况，结果如图 2.7 所示，ELISA 结果可知对照组几乎不释放 HMGB1，Rg3 处理的 CT26 和 HCT116 细胞释放的 HMGB1 明显增加，两者具有显著差别 ($P<0.05$)，Rg3 具有诱导 CRC 细胞释放 HMGB1 的能力。

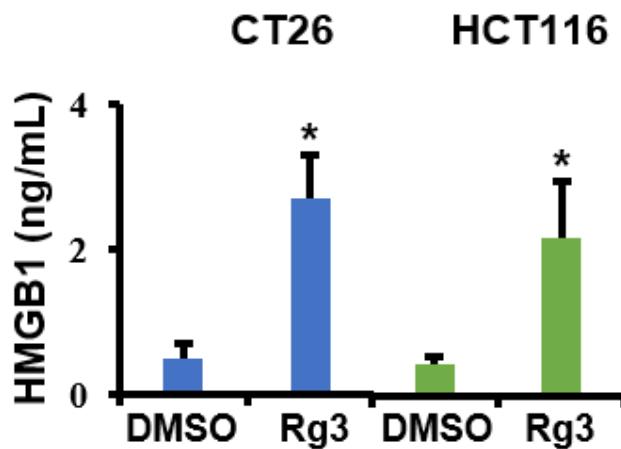


图 2.7 Rg3 ([c]=30 $\mu\text{mol/L}$) 处理后 CRC 细胞 HMGB1 释放 (12 h) (相对于 DMSO, n=3, *P<0.05)。

2.3.7 Rg3 诱导 DC 细胞成熟

DAMP 可以激活未成熟 DC 向成熟 DC 转变^[154]。使用小鼠髓源未成熟 DC 细胞系 DC2.4 细胞进行实验，观察 Rg3 诱导 DC2.4 细胞成熟的能力。将 CT26 细胞经 DMSO 或是 Rg3 进行预处理后，取上清液与 DC2.4 细胞共孵育，使用流式细胞术检测 CD11c⁺ 和 CD86⁺ 群体（定义为成熟 DC^[155-157]）的数量，进而评价 Rg3 引起 ICD 促进 DC2.4 成熟的能力。如图 2.8 所示，与 DMSO 组对比，Rg3 组的 DC2.4 细胞表面具有更多的 CD11c 和 CD86 表达 (P<0.01)，其中 DC2.4 上 CD11c⁺ 约占 20%，CD86⁺ 约占 30%，因此，本文认为 Rg3 能刺激 CRC 细胞释放 DAMPs 等免疫原性物质到细胞培养液中，进而促使未成熟 DC2.4 细胞转化为成熟 DC 细胞。

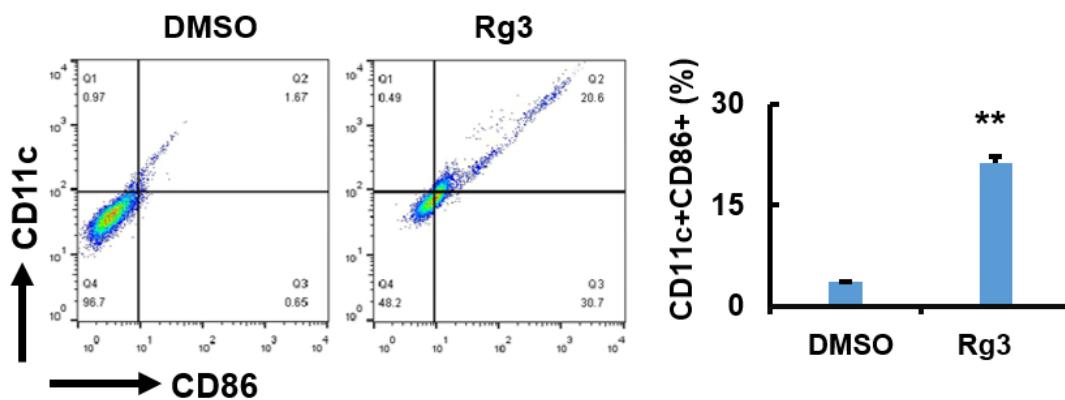


图 2.8 用 Rg3 ([c]=30 $\mu\text{mol/L}$) 处理的细胞上清液刺激 DC 中 CD11c 和 CD86 的表达 (24 h) (相对于 DMSO, n=3, **P<0.01)。

2.3.8 Rg3 作为体内疫苗

体外经过 ICD 诱导的肿瘤细胞可作为疫苗，在活体内，诱导 T 细胞介导的针对同类活肿瘤细胞的抗肿瘤免疫^[158]。因此，进行体内接种实验以进一步确定 Rg3 的 ICD 潜能（图 2.9）。CT26 细胞用 DMSO、冻融或 Rg3 预处理，随后，这些细胞被皮下注射到免疫活性小鼠的右侧。一周后，同样的动物在左侧皮下注射活的 CT26 细胞。结果所示，注射 DMSO 处理或正常 CT26 细胞的小鼠，可以被 CT26 细胞的再激发，并且在 15 天内发现所有动物的肿瘤继续生长。相反，接种经 Rg3 预处理的 CT26 细胞的小鼠，可显著抑制 CT26 细胞的后续生长（P<0.001）。作为验证性研究，以缺乏功能性 T 细胞为特征的裸鼠（免疫缺陷）用于疫苗接种实验。与上述实验结果相反，Rg3 处理的 CT26 细胞在裸鼠体内产生的抗肿瘤作用明显下降。这些结果表明，Rg3 能够将 CRC 细胞转化为内源性疫苗，这可能是由于其介导树突状细胞的成熟，从而激活 T 细胞杀伤相同类型的活细胞。综上所述，图 2.9 中的结果证实了 Rg3 作为 ICD 诱导剂对抗 CRC 的应用潜力。

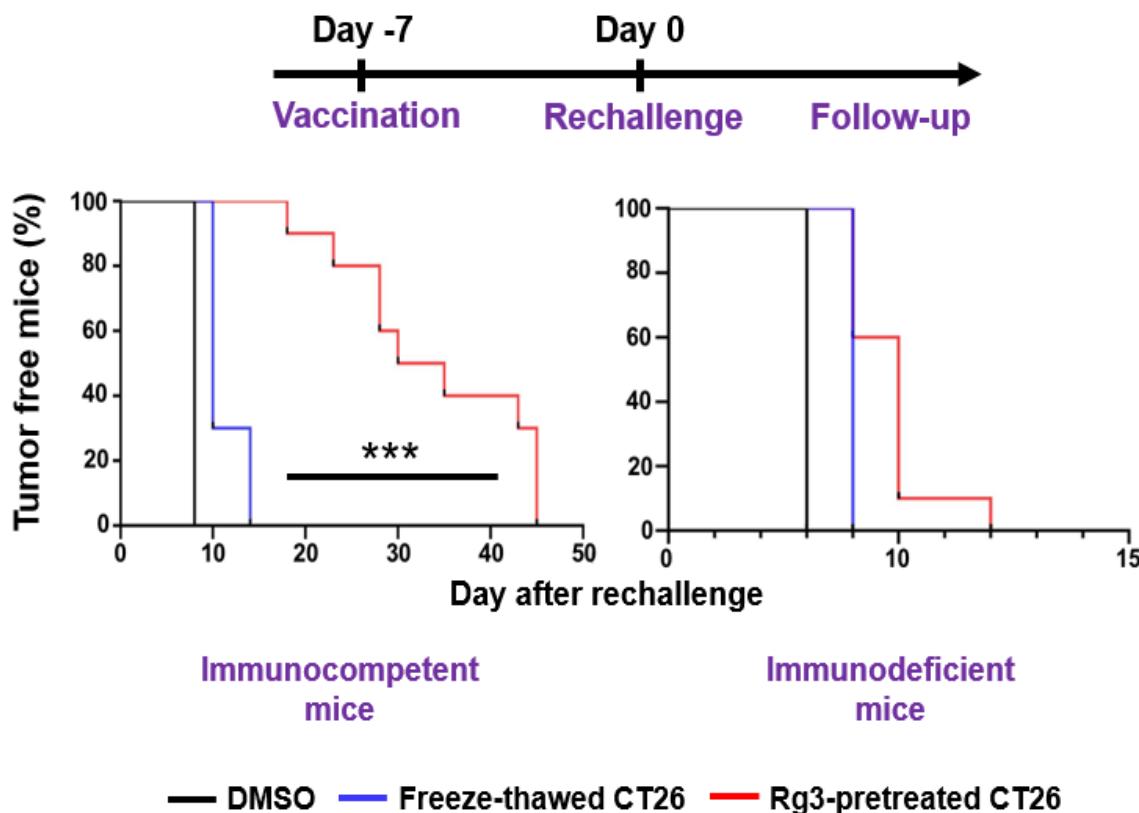


图 2.9 使用 BALB/C 和裸鼠的体内接种实验（n=4， ***P<0.001）。

2.4 本章小结

越来越多的证据表明，某些化疗药物可以诱导 ICD，从而更好的调节免疫抑制性 TME，将“冷”（非 T 细胞炎症）肿瘤重塑为“热”（T 细胞炎症）肿瘤^[113]。ICD 诱导化疗与其他免疫疗法的结合已显示出改善癌症患者生存率的巨大前景^[159]。因此，研究化疗药物作为潜在的 ICD 药物受到越来越多的关注。尽管关于 ICD 抗肿瘤免疫相关机制尚不完全清楚，但现在很清楚的是 DAMP 和 DC 之间的相互作用会刺激 DC 中 TAA 的吞噬、加工和呈递，触发 TAA 向 T 细胞交叉呈递，并引发抗原特异性抗肿瘤免疫反应和记忆。因此，ICD 诱导策略可能将肿瘤细胞转化为它们自己的疫苗，显示出重新激活和维持癌症免疫循环的重要作用，具有广阔的应用前景。

在本章研究中，首先通过 MTT 法验证 Rg3 对 CT26 和 HCT116 细胞毒性，可知 Rg3 对两种 CRC 细胞均有明显抑制作用，进而采用流式细胞术检测 Rg3 诱导 CRC 细胞凋亡情况，结果显示 Rg3 对 CRC 细胞的抑制作用是通过诱导细胞凋亡的方式。进一步采用 ELISA、ATP 试剂盒和免疫荧光的方法检测 Rg3 诱导 ICD 情况，结果可知 Rg3 可诱导 ATP 和 HMGB1 的释放，CRT 的暴露，且能促进 DC 细胞的成熟。综上，使用体外和体内实验方法首次证实了 Rg3[20(S)-Rg3]作为 ICD 诱导剂抗 CRC 细胞的潜力，该方法已被证明并用于识别 ICD 诱导剂^[158]。

第3章 榆皮素诱导结直肠癌细胞产生活性氧的研究

活性氧物质（Reactive Oxygen Species, ROS）是由分子氧衍生而来的一类高活性化学物质，包括超氧自由基（ $O_2^{-\cdot}$ ）、羟基自由基（ HO^{\cdot} ）、过氧化氢（ H_2O_2 ）和单态氧（ 1O_2 ）^[160]。虽然中等浓度的 ROS 对细胞信号通路调控等重要生理功能至关重要，但 ROS 水平异常表达与多种疾病相关，如癌症、心血管和神经退行性疾病。研究表明，许多其他类型纳米粒或者增敏剂可以通过影响 DNA 的损伤修复、促进细胞凋亡、改变肿瘤周围的免疫环境、抑制肿瘤血管生成、靶向参与细胞信号传递的蛋白质和生长因子或促进 ROS 生成等方式实现增强抗肿瘤效果。已知 ICD 通常伴随着 ROS 的产生^[113]，而活性氧诱导策略可增强 ICD 的功效^[161-163]。

槲皮素是植物体内的天然药物成分之一，具有抗炎和抗肿瘤等药理活性^{[164],[165]}。ROS 是细胞内主要的氧自由基，它的水平能反映细胞内氧化系统的情况，同时 ROS 具有很高的生物学活性，可作为第二信使参与到 JNK 通路中。ROS 是 JNK 上游信号分子，ROS 可促进 JNK 活化，而活化 JNK 反过来刺激产生更多的 ROS，最终 JNK 被持续活化，活化的 JNK 可启动 Caspase 级联反应，促进细胞凋亡。诸多研究证明槲皮素与白藜芦醇联合用于多种肿瘤具明显的协同抑制作用，并且可降低化疗药物引起的心脏毒性^[166-168]。然而槲皮素为多羟基黄酮类成分，水溶性小、稳定性差且体内代谢迅速^[169]，限制了其体内应用，常规给药途径不利于其药效的发挥^[170-172]。

假设 ICD 诱导剂和 ROS 产生剂联合的策略将介导免疫抑制性 TME 的重塑。因此，本章主要讨论 QTN 体外诱导 ROS 的产生效果，进而为后续通过诱导 ROS 的产生增强免疫治疗效果做基础。

3.1 实验材料

3.1.1 实验仪器

数显恒温水浴锅	常州国华电器有限公司
全自动雪花制冰机	常熟雪科电器有限公司
高速冷冻离心机	Eppendorf 有限公司
低温离心机	湖南湘仪离心机仪器有限公司

电子分析天平	美国丹佛仪器公司
移液器	Eppendorf(美国)公司
超净工作台	北京东联哈尔仪器制造有限公司
倒置显微镜	Olympus(日本)公司
CO ₂ 培养箱	SANYO(日本)公司
化学发光凝胶成像仪	北京东胜创新科技有限公司
电热鼓风干燥箱	北京科伟永兴仪器有限公司
立式蒸汽压力灭菌锅	上海博讯实业有限公司
多功能荧光酶标仪	Bio Tek(美国)公司
微孔板恒温振荡器	杭州奥盛仪器有限公司
流式细胞仪	美国BD公司

3.1.2 实验药品与试剂

抗体	Affinity(北京)生物科技有限公司
Triton-X 100	北京索莱宝科技有限公司
DMSO	天津百伦斯生物技术有限公司
ROS 检测试剂盒	上海翊圣生物科技有限公司
细胞凋亡检测试剂盒	上海翊圣生物科技有限公司
MTT	长春天佳生物技术有限公司
牛血清白蛋白	上海碧云天生物技术有限公司
DAPI	上海碧云天生物技术有限公司
槲皮素	成都德斯生物技术有限公司

3.2 实验方法

3.2.1 QTN 的体外抑瘤疗效

MTT 法检测 QTN 的体外细胞毒性。将 CT26 和 HCT116 细胞（每孔 1×10^4 ）分别接种于 96 孔板内培养过夜。随后，将 QTN ([c]=5、10、20、40、80、100、120 和 150 $\mu\text{mol/L}$) 添加到细胞中，继续培养 24 h。然后向细胞中加入 MTT 试剂在 37°C 下培养 4 h，用 150 μL 二甲基亚砜溶解紫色沉淀物，在 570 nm 处测量吸光度值。使用 GraphPad

Prism 软件计算 IC_{50} 。在另一项实验研究中，在接种细胞 $1 \times 10^4/\text{孔}$ 后，分别用和不用 N-乙酰半胱氨酸（NAC，5 mmol/L）处理细胞 4 h。随后，将 QTN ($[c]=80 \mu\text{mol}/\text{L}$) 加入细胞中培养 24 h，并如上所述测定细胞毒性。

3.2.2 QTN 的细胞凋亡

采用流式细胞术检测 QTN 的体外凋亡。将 CT26 和 HCT116 细胞（每孔 2×10^5 ）分别接种于 6 孔板中培养过夜。在此之后，分别用和不用 NAC (5 mmol/L) 处理细胞 4 h。随后，向细胞中加入 QTN ($[c]=80 \mu\text{mol}/\text{L}$) 24 h 后，如上所述检测凋亡细胞（%）。

3.2.3 蛋白印迹技术

用 western blotting 法检测 BCL-2/BAX/caspase9/caspase3 信号通路的活性。将 CT26 和 HCT116 细胞(每孔 2×10^5)分别接种于 6 孔板中培养过夜。在此之后，将 QTN($[c]=80 \mu\text{mol}/\text{L}$)添加到细胞中孵育 6、12 和 24 h 后。如上 2.2.4 所述，进行蛋白质印迹分析。使用密度测定法 (ImageJ) 对蛋白质条带进行定量，所有结果均参考标准化 β -肌动蛋白定量。

3.2.4 ROS 产生

为了测量 ROS 的形成，将 CT26 和 HCT116 细胞（每孔 2×10^5 ）分别接种在 6 孔板中过夜。在此之后，向细胞中添加 QTN ($[c]=80 \mu\text{mol}/\text{L}$) 孵育 6、12 和 24 h 后。使用基于 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯的活性氧物种分析试剂盒，通过 BD FACSCalib (488 nm/525 nm) 检测细胞中的 ROS 水平。

3.3 实验结果和讨论

3.3.1 QTN 的体外抑瘤疗效

使用 MTT 法在 CT26 和 HCT116 细胞系中评估 QTN 的细胞毒性(IC_{50}) (表 3.1)。QTN 在两种细胞系中具有相似的抗增殖作用，且都有浓度依赖性(如图 3.1)。与 HCT116 和 CT26 共孵育 24 h 后，QTN 的 IC_{50} 分别为 $80 \mu\text{mol}/\text{L}$ 和 $81 \mu\text{mol}/\text{L}$ (表 3.1)。

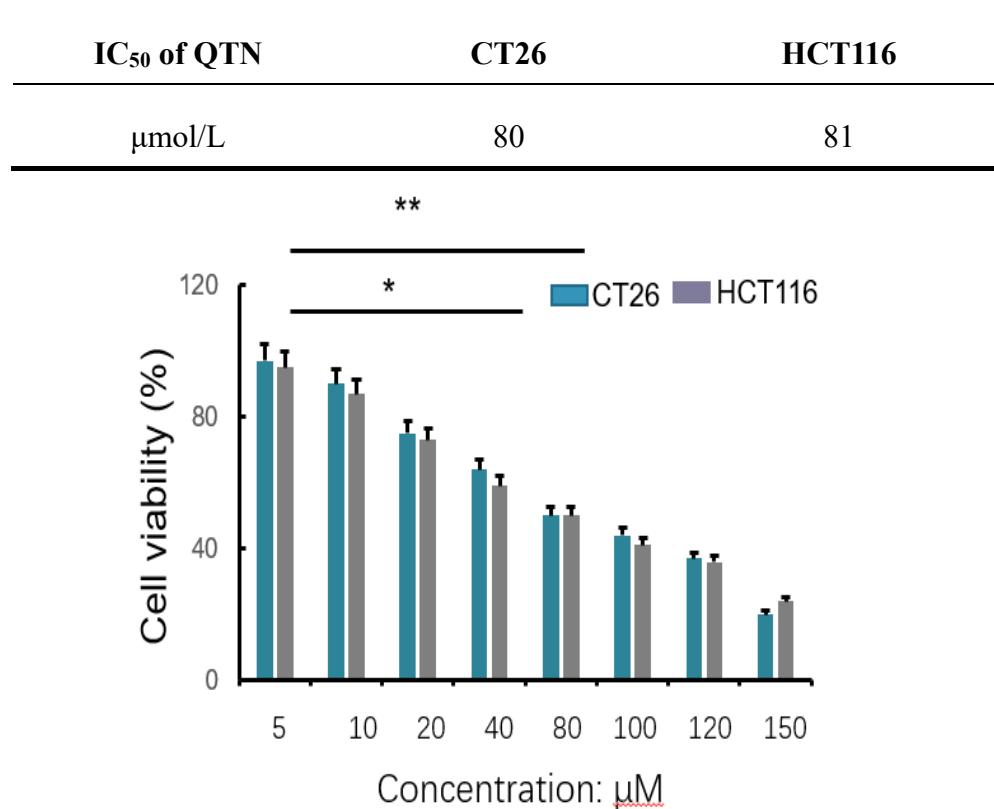
表 3.1 孵育 24 h CT26 和 HCT116 细胞 QTN 的 IC₅₀ (n=3)。

图 3.1 QTN 对 CT26 和 HCT116 细胞存活率影响（相比于 DMSO, n=3, *P<0.05 和 **P<0.01）。

3.3.2 QTN 诱导细胞凋亡

QTN 在两种细胞系中具有相似的抗凋亡作用，CT26 (培养 24 h 后) 的凋亡百分率为 71.3%，HCT116 (24 h 培养) 的凋亡百分率为 43.3% (图 3.2)，与对照组有明显差异 (P<0.01)，与上述体外抗增殖效果一致。

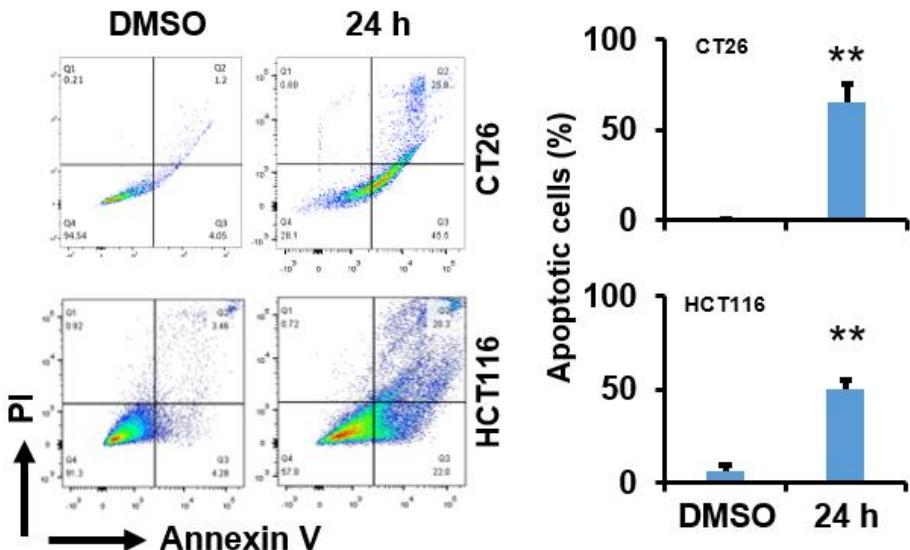


图 3.2 QTN ([c]=80 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后 CT26 和 HCT116 细胞凋亡 (%)

(n=3, **相对于 DMSO P <0.01)。

3.3.3 免疫印迹分析

ROS 与细胞凋亡密切相关,因此本章首先考察的 QTN 诱导 CRC 细胞凋亡的能力。QTN 的凋亡效应通过 BCL-2 (一种凋亡抑制蛋白) 的下调和 BAX (一种凋亡调节蛋白)、caspase 9 和 caspase 3 的上调得到证实 (图 3.3 和 3.4)。因此, QTN 诱导的细胞凋亡是抑制 CRC 细胞生长的主要机制。

BCL-2/BAX/caspase 9/caspase 3 信号通路与 ROS (凋亡刺激物之一) 的形成密切相关^[173]。由图 3.3 和 3.4 可知, QTN 诱导细胞凋亡蛋白具有时间依赖性, 随着时间延长细胞凋亡蛋白表达增加。且和对照组相比 24 h 后, BAX/Bcl-2 的表达量有显著区别 (** P < 0.01 和 *** P < 0.001), c-Caspase9 和 c-Caspase3 与对照组也有相似的显著性差异 (* P < 0.05, ** P < 0.01 和 *** P < 0.001)。

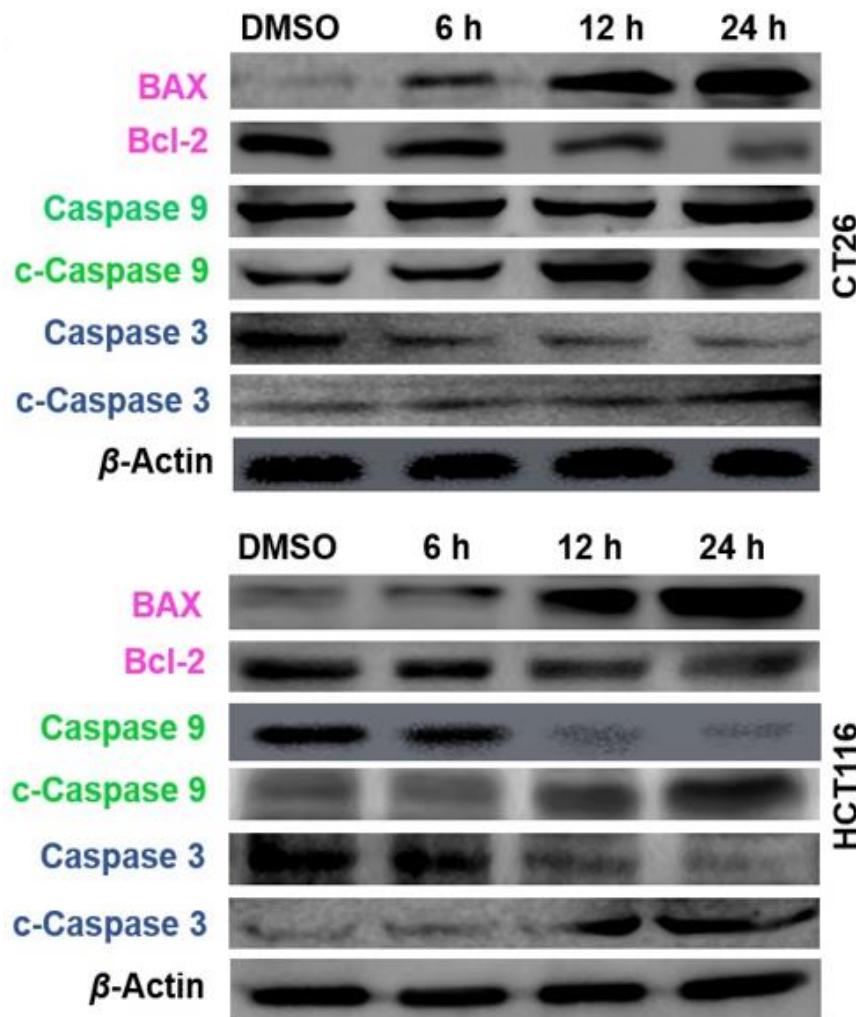


图 3.3 QTN ($[c]=80 \mu\text{mol}/\text{L}$) 处理后 6、12 和 24 h, Bcl-2/BAX/caspase9/caspase3 信号通路的活性。

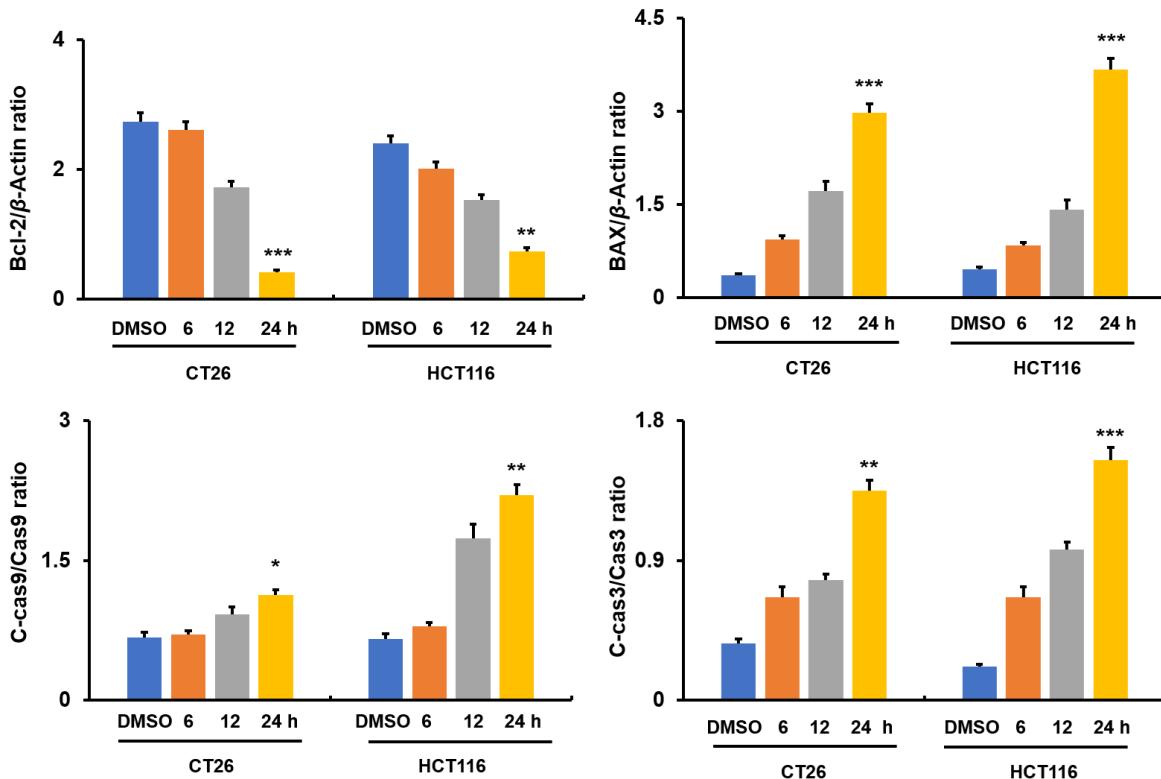


图 3.4 图 3.3 的蛋白质条带鉴定（相对于 DMSO, n=3, *P<0.05, **P<0.01 和 ***P<0.001）。

3.3.4 QTN 诱导 ROS 产生

已知 ICD 通常伴随着活性氧 ROS 的产生^[113], 而活性氧诱导策略可增强 ICD 的功效。为了研究 QTN 介导的 ROS 在抗肿瘤中的作用, 使用生物发光分析法测量两个 CRC 细胞系中的 ROS 水平, 显示 QTN 以时间依赖性方式产生更多 ROS (图 3.5)。当 QTN 与 CT26 和 HCT116 孵育 6 h 后, ROS 产生开始增加, 且随着时间延长, ROS 的产生不断增多, 与对照组有显著性差异 (**P<0.01 和 ***P<0.001)。

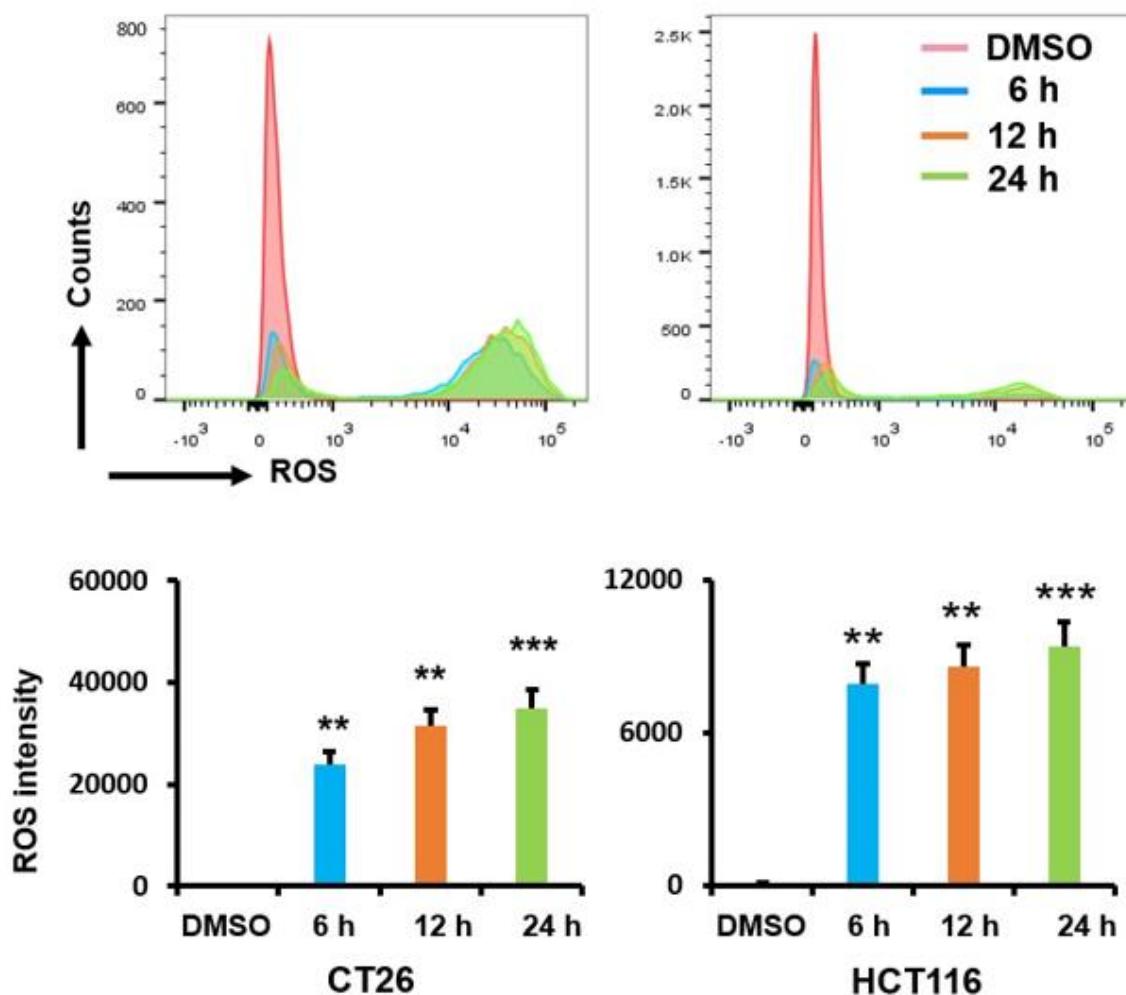


图 3.5 QTN ([c]= $80\mu\text{mol/L}$) 处理 6、12 和 24 h 后 CT26 和 HCT116 细胞中的 ROS 水平（相对于 DMSO，n=3，**P<0.01 和 ***P<0.001）。

3.3.5 ROS 抑制剂对细胞存活率的影响

在 QTN 治疗之前，用 N-乙酰-L-半胱氨酸（NAC，一种用于中和 ROS 的化学物质）孵育 CRC 细胞^{[174],[175]}（图 3.6）。结果表明，NAC 预处理显著阻碍了 QTN 介导的细胞毒性（P<0.05 和 P<0.01），进而证明 QTN 可诱导 ROS 的形成，从而在 CRC 细胞中发挥抗增殖作用。

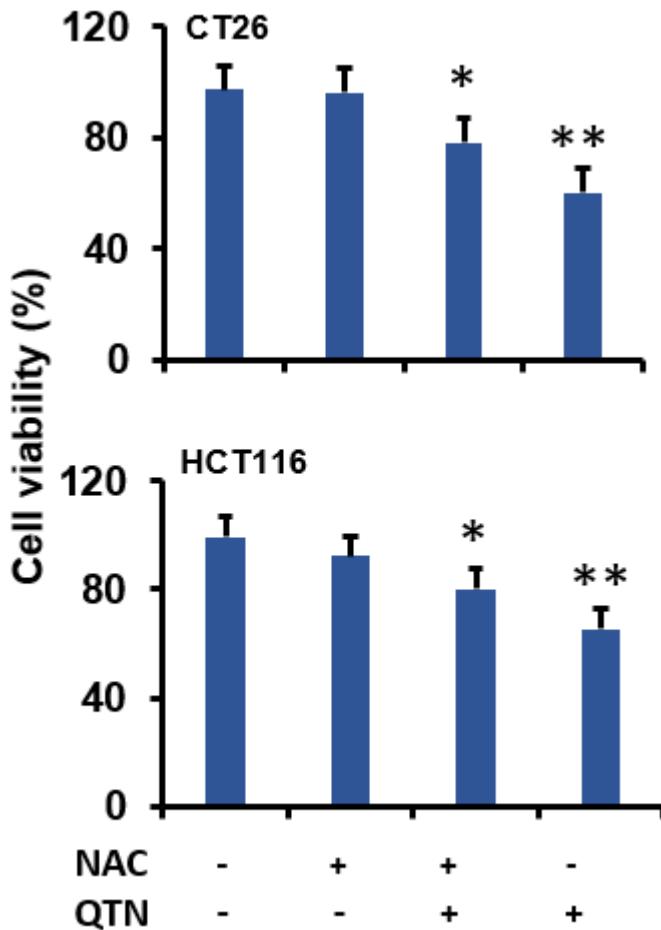


图 3.6 在 QTN 治疗前（24 h）（与未治疗对照组相比，n=3，*P<0.05 和 **P<0.01），有或没有 NAC 的 CT26 和 HCT116 细胞的细胞活力（%）
([c]=80μmol/L）。

3.3.6 ROS 抑制剂对细胞凋亡的影响

由上结果可知，QTN 促进结直肠癌细胞产生 ROS 进而诱导结直肠癌细胞凋亡，那么本章采用反向验证的方法进一步确定上述结果。由实验结果表明，NAC 预处理显著阻碍了 QTN 介导的细胞凋亡（P<0.05 和 P<0.01）（图 3.7），进而证明 QTN 可诱导 ROS 的形成，从而在 CRC 细胞中发挥抗凋亡作用。

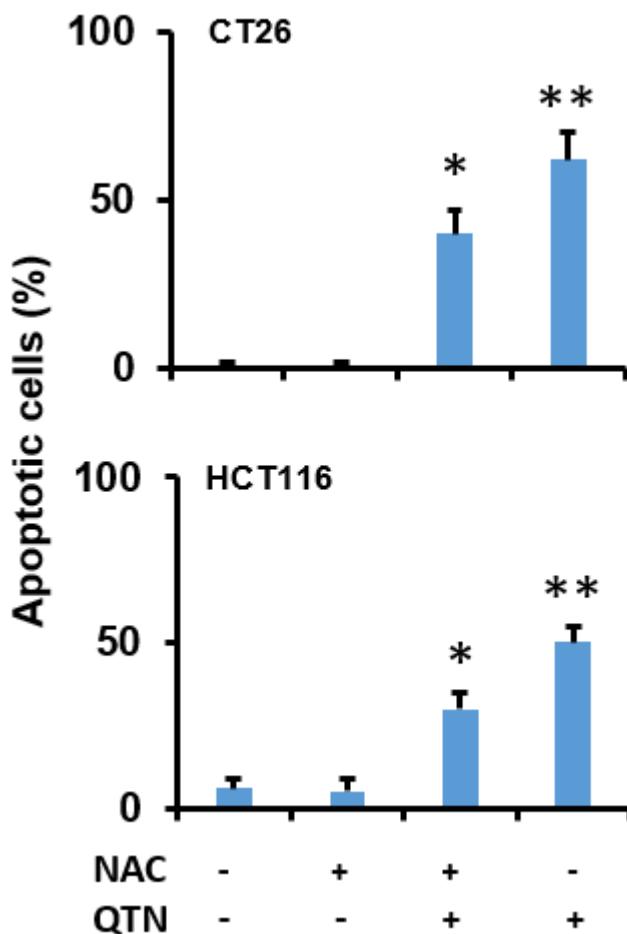


图 3.7 QTN 治疗前 (24 h) (与未治疗对照组相比, n=3, *P<0.05 和 **P<0.01), 有或没有 NAC 的 CT26 和 HCT116 细胞凋亡 (%) ([c]=80 μmol/L)。

3.4 本章小结

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是外源性氧化剂或细胞内有氧代谢过程中产生的具有很高生物活性的含氧化合物的总称, 包括超氧阴离子 (O_2^-)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟自由基 ($HO \cdot$)、一氧化氮 (NO) 等。目前认为 ROS 不仅是一种毒性分子而且具有很高的生物学活性, 参与多种因子细胞生物学效应。可被细胞因子、生长因子、应激 (如电离辐射、渗透压、热休克和氧化损伤) 等多种因素激活, 近年来, 大量实验提示 ROS/凋亡信号通路在细胞分化、细胞凋亡、应激反应以及多种人类疾病的发生与发展中起着至关重要的作用。

本章研究中, 首先使用 MTT 法在 CT26 和 HCT116 细胞系中评估 QTN 的细胞毒性, QTN 在两种细胞系中具有相似的抗增殖作用。然后采用流式细胞术检测 QTN 可

诱导 CT26 和 HCT116 细胞凋亡。已知 ROS 与细胞凋亡密切相关，那么进一步采用免疫印迹的方法检测 BCL-2/BAX/caspase 9/caspase 3 信号通路的蛋白表达，由结果可知，QTN 可诱导 BCL-2/BAX/caspase 9/caspase 3 相关凋亡蛋白的表达。接下来采用流式细胞术检测 QTN 诱导 CT26 和 HCT116 细胞产生 ROS 情况，结果表明 QTN 能诱导两种 CRC 细胞产生 ROS，且能有效诱导肿瘤细胞的凋亡，当加入 NAC 后，ROS 的产生明显降低且细胞存活率也相应增加，证明 QTN 能有效地产生 ROS 从而诱导 CRC 的凋亡。

第4章 榆皮素和人参皂甙Rg3体外对结直肠癌细胞协同作用研究

联合用药 (Concomitant drugs) 是为了达到更好的治疗效果而采用的两种或两种以上药物同时应用，其结果主要是为了增加药物的疗效或为了减轻某一种药物的毒副作用。合理的联合用药，应以提高疗效和（或）降低不良反应为基本原则。联合用药时，药物的相互作用，应包括影响药动学的相互作用，应包括影响药效学的相互作用。此外，用药品种偏多，使药物相互作用的发生率增加，影响药物疗效或毒性增加。

内质网应激和活性氧产生的同时对 DAMPs 的活性至关重要，活性氧诱导策略可有效提高 ICD 的疗效^[161-163,176]，因此本章将两药体外联合，验证 ROS 对 ICD 的体外协同治疗效果。

4.1 实验材料

4.1.1 实验仪器

数显恒温水浴锅	常州国华电器有限公司
全自动雪花制冰机	常熟雪科电器有限公司
高速冷冻离心机	Eppendorf 有限公司
低温离心机	湖南湘仪离心机仪器有限公司
电子分析天平	美国丹佛仪器公司
移液器	Thermo (美国) 公司
超净工作台	北京东联哈尔仪器制造有限公司
倒置显微镜	Olympus (日本) 公司
CO ₂ 培养箱	SANYO (日本) 公司
电热鼓风干燥箱	北京科伟永兴仪器有限公司
立式蒸汽压力灭菌锅	上海博讯实业有限公司

4.1.2 实验药品与试剂

娃哈哈纯净水	杭州娃哈哈集团有限公司
PBS	美国 Corning 公司
RPMI 1640 细胞培养基	美国 Corning 公司
0.25%胰酶-EDTA	美国 Corning 公司
FBS	以色列 Biological Industries 公司
青-链霉素双抗	以色列 Biological Industries 公司
台盼蓝	北京索莱宝科技有限公司
DMSO	天津百伦斯生物技术有限公司
牛血清白蛋白	上海碧云天生物技术有限公司
人参皂苷 Rg3	成都德斯生物技术有限公司
槲皮素	成都德斯生物技术有限公司

4.2 实验方法

4.2.1 体外 QTN 和 Rg3 联合 IC₅₀

采用 MTT 法测定“Rg3+QTN”的体外细胞毒性。将 CT26 细胞（每孔 1×10^4 ）分别接种于 96 孔板内培养过夜。随后，将不同摩尔比（MR=1:5、1:2、1:1、2:1 和 5:1）的“Rg3+QTN”添加到细胞中孵育 24 h 后，使用 GraphPad Prism 软件计算 IC₅₀。

4.2.2 细胞凋亡

用流式细胞术检测“Rg3+QTN”的体外凋亡。CT26（每孔 2×10^5 ）分别在 6 孔板中孵育过夜。在此之后，用单一药物或“Rg3+QTN”（[c]=12 和 12 μmol/L）分别添加到细胞上清液中，孵育 24 h，检测凋亡细胞（%）。

4.2.3 ICD 标志物检测

用免疫荧光染色法检测 CRT 暴露情况。将 CT26（每孔 1×10^5 ）分别接种在 24 个玻璃底孔板中孵育过夜。然后分别用和不用 NAC（5 mmol/L）处理细胞 4 h。随后，用单一药物和“Rg3+QTN”（[c]=12 和 12 μmol/L）分别孵育细胞 6 h。使用激光共聚焦检测 CRT 的暴露情况。

采用生物发光法和 ELISA 法评估 ATP 的分泌和 HMGB1 的释放。将 CT26 细胞 ($5 \times 10^5/\text{孔}$) 接种于 6 孔板中孵育过夜。然后分别用和不用 NAC (5 mmol/L) 处理细胞 4 h。随后，用单一药物和“Rg3+QTN” ($[c]=12$ 和 $12 \mu\text{mol}/\text{L}$) 分别孵育细胞 12 h。如上所述，测量上清液中 ATP 和 HMGB1 的水平。

4.2.4 ROS 抑制剂对 DC 活化的影响

使用流式细胞仪 (Becton Dickinson) 测定 DC2.4 细胞的成熟度。CT26 ($5 \times 10^5/\text{孔}$) 在 6 孔板中孵育过夜。在此之后，分别用和不用 NAC (5 mmol/L) 处理细胞 4 h。随后，将“Rg3+QTN” ($[c]=12$ 和 $12 \mu\text{mol}/\text{L}$) 分别添加到细胞培养基中，24 h 后，从经 Rg3 处理的 CT26 细胞收集上清液，并转移至 DC2.4 细胞再持续孵育 24 h。如 2.2.6 所述，采用流式细胞术评估 CD11c 和 CD86 的表达 (%)。

4.3 实验结果和讨论

4.3.1 体外联合细胞毒性检测

MTT 结果表明，联合使用这两种药物可达到协同抗增殖作用（图 4.1）。当两种药物的摩尔比 (MR) 优化为 1:1 时，QTN 和 Rg3 联合方案的 IC_{50} 分别降低至为 $12 \mu\text{mol}/\text{L}$ 和 $12 \mu\text{mol}/\text{L}$ ，与单独药物处理后的结果相比，其细胞毒性显著降低 ($P<0.05$) (QTN 的 IC_{50} 为 $80 \mu\text{mol}/\text{L}$ 和 Rg3 的 IC_{50} 为 $32 \mu\text{mol}/\text{L}$)。如前所述测定组合指数 (CI) [40]，当 $\text{CI}<1$ 时表明两药具有协同效应^[177]。且当 QTN 和 Rg3 联合时，其协同指数 (CI) 最小，证明两药协同效果最好（图 4.2）。

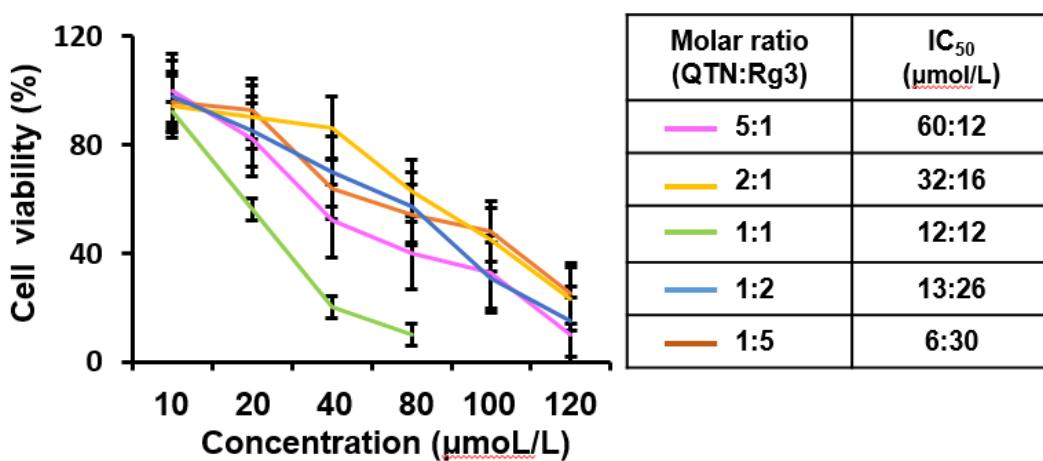


图 4.1 孵育 24 h 后药物组合的 IC_{50} ($n=3$)。

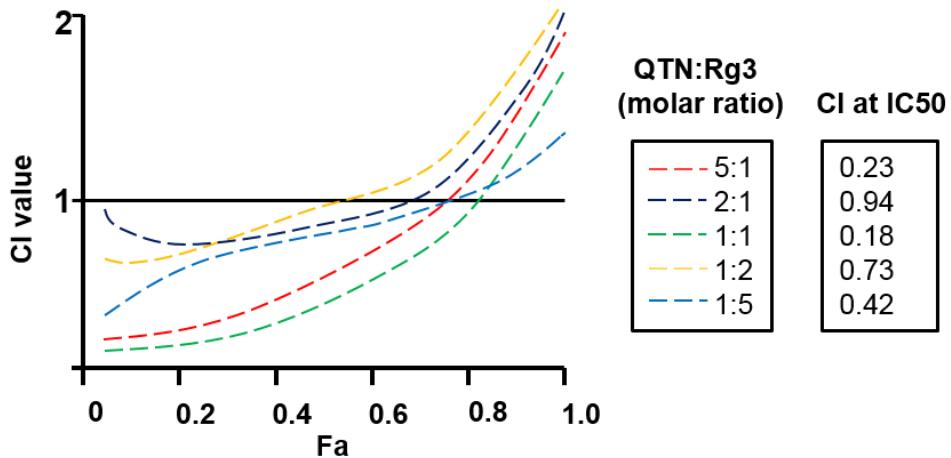


图 4.2 在不同浓度摩尔比 ($n=3$) 下用 Rg3、QTN 和组合处理的相应 CI 图。

4.3.2 细胞凋亡

由凋亡实验结果可知，与单独应用 QTN (凋亡约 20%) 和 Rg3 (凋亡约 30%) 与 CT26 细胞共孵育相比，将 Rg3. QTN 联合方案显著 ($P<0.01$) 增强了 CT26 细胞的凋亡效应 (凋亡约 80%，24 h 孵育后) (图 4.3)。这些结果表明，QTN 和 Rg3 联合使用可实现协同抗肿瘤作用。

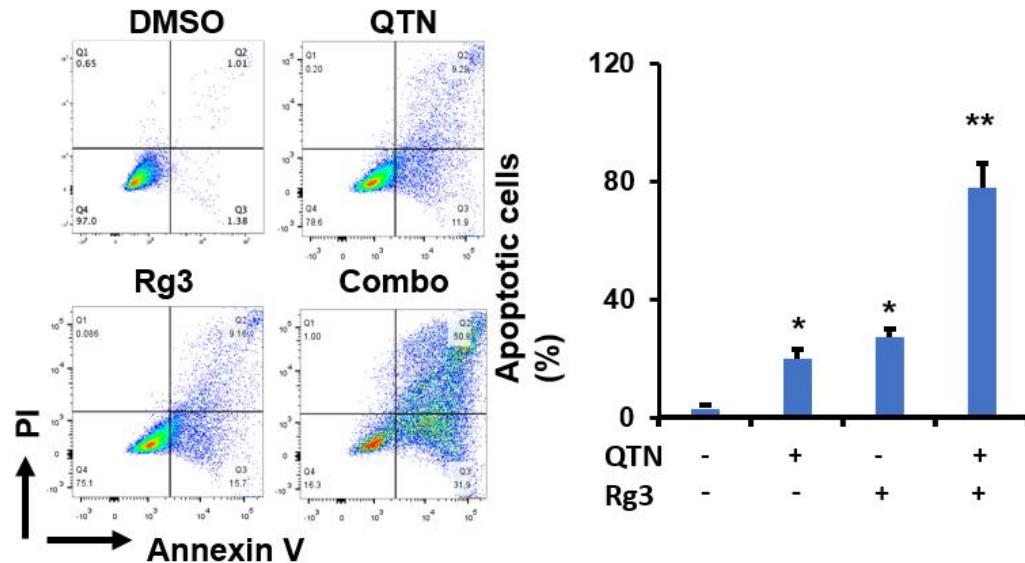


图 4.3 24 h 时联合用药引起的细胞凋亡 (%) (相对于 DMSO, $n=3$, * $P<0.05$ 和 ** $P<0.01$)。

4.3.3 CRT 标志物检测

在 CT26 细胞中评估 QTN 和 Rg3 的协同 ICD 效应。如图 4.4 所示，用 DMSO 或 QTN 处理都不能使 CRT 暴露在细胞膜上，相反，Rg3 显著触发 CRT 暴露 ($P<0.05$)。值得注意的是，Rg3.QTN 进一步 ($P<0.01$) 激活了 CRT 暴露，当使用 NAC 处理后，QTN 和 QTN.Rg3 处理都不能使 CRT 暴露在细胞膜上，因此，ROS 是促进 CRT 暴露的原因之一。

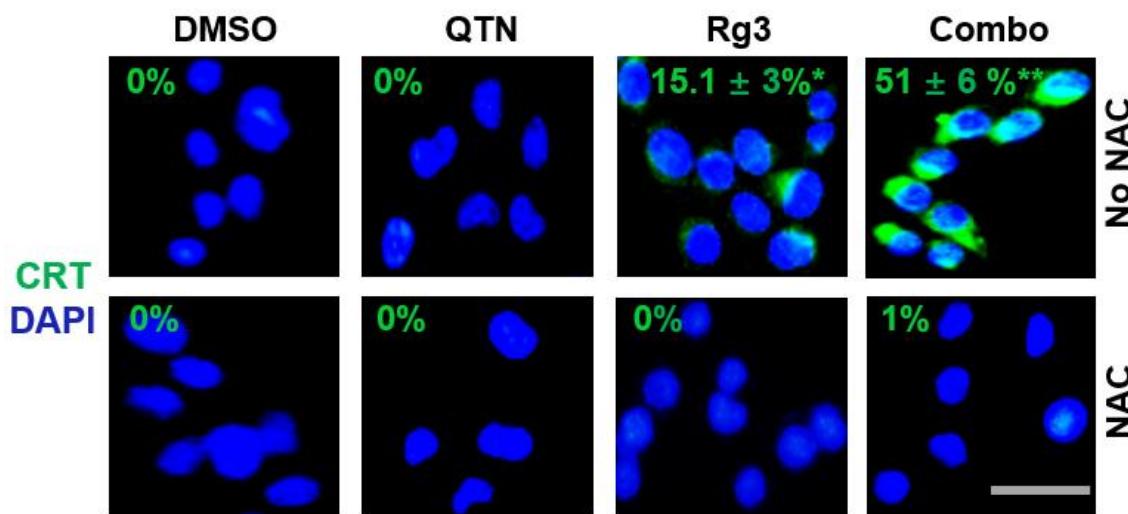


图 4.4 联合用药治疗前 (6 h) 有或没有 NAC 的 CRT 暴露（相对于 DMSO, n=3,
* $P<0.05$ 和 ** $P<0.01$; bar=20 μ m）。

4.3.4 ATP 标志物检测

在 CT26 细胞中评估 QTN 和 Rg3 的协同 ICD 效应。如图 4.5 所示，用 DMSO 或 QTN 处理都不能诱导 CT26 细胞分泌 ATP，相反，Rg3 增加诱导 CT26 细胞分泌 ATP ($P<0.05$)。同时，Rg3.QTN 进一步增加分泌 ATP ($P<0.01$)，相反，NAC 处理 CT26 细胞后，Rg3.QTN 增加 ATP 分泌作用消失，再一次证明 QTN 处理能增强 Rg3 诱导 CT26 细胞分泌 ATP。

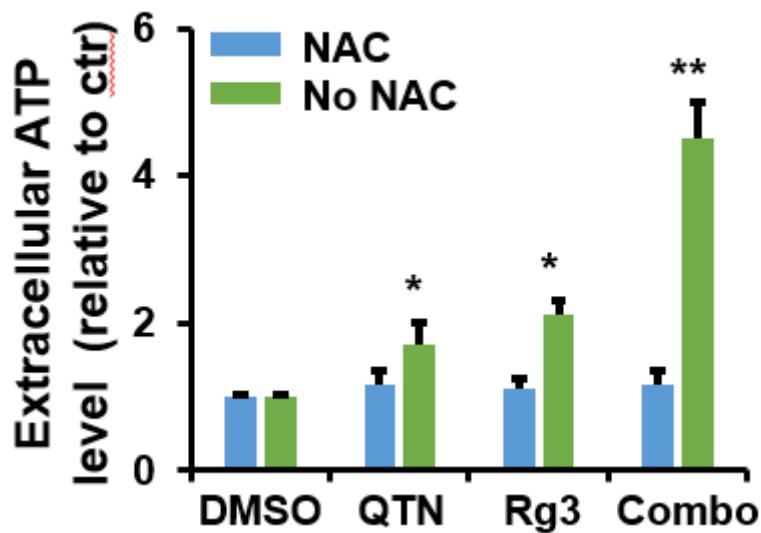


图 4.5 有或没有 NAC 的 ATP 分泌 ($n=3$, * $P<0.05$ 和 ** $P<0.01$, NAC 和无 NAC 之间)。

4.3.5 HMGB1 标志物检测

在 CT26 细胞中评估 QTN 和 Rg3 的协同 ICD 效应。如图 4.6 所示, 用 DMSO 或 QTN 处理都不能使 CT26 细胞释放 HMGB1, 相反, Rg3 显著增加 CT26 细胞释放 HMGB1 ($P<0.05$)。值得注意的是, Rg3.QTN 进一步促进 CT26 细胞释放 HMGB1 ($P<0.01$)。相反, NAC 处理 CT26 细胞后, Rg3.QTN 促进释放 HMGB1 效果消失。

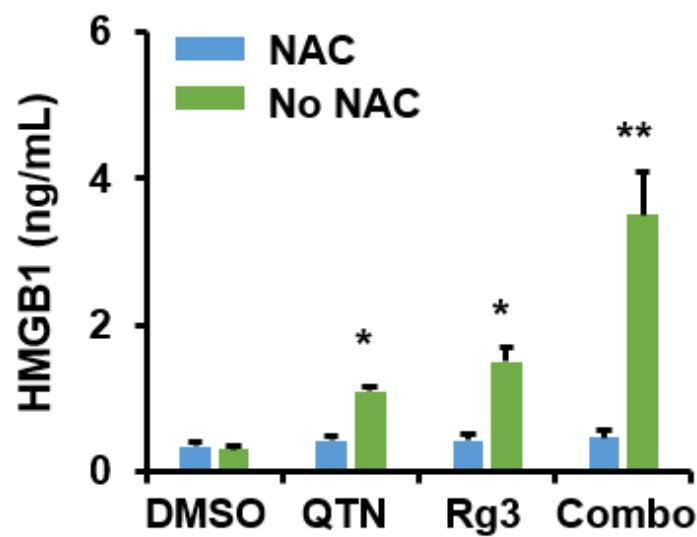


图 4.6 HMGB1 在有或无 NAC 的情况下释放 ($n=3$, * $P<0.05$ 和 ** $P<0.01$, NAC 和无 NAC 之间)。

4.3.6 NAC 对 DC 细胞活化的影响

DC 细胞活化和共刺激分子表达是专业抗原提呈细胞呈递抗原、诱导 T 细胞和 B 细胞活化及激活体液和细胞免疫反应的重要步骤^{[178],[179]}。Rg3 处理 DC 细胞可以触发 DC 的成熟 (CD11c⁺ 和 CD86⁺) (图 4.7)。值得注意的是, NAC 的预处理后, QTN、Rg3 以及 “QTN+Rg3” 均显著抑制了 ICD 标志的活性和 DC 的成熟 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 和 $P<0.001$)，这表明 Rg3 在 CRC 细胞中的 ICD 诱导功效被 QTN 显著增强，并且这种协同作用部分归因于 ROS 的产生。

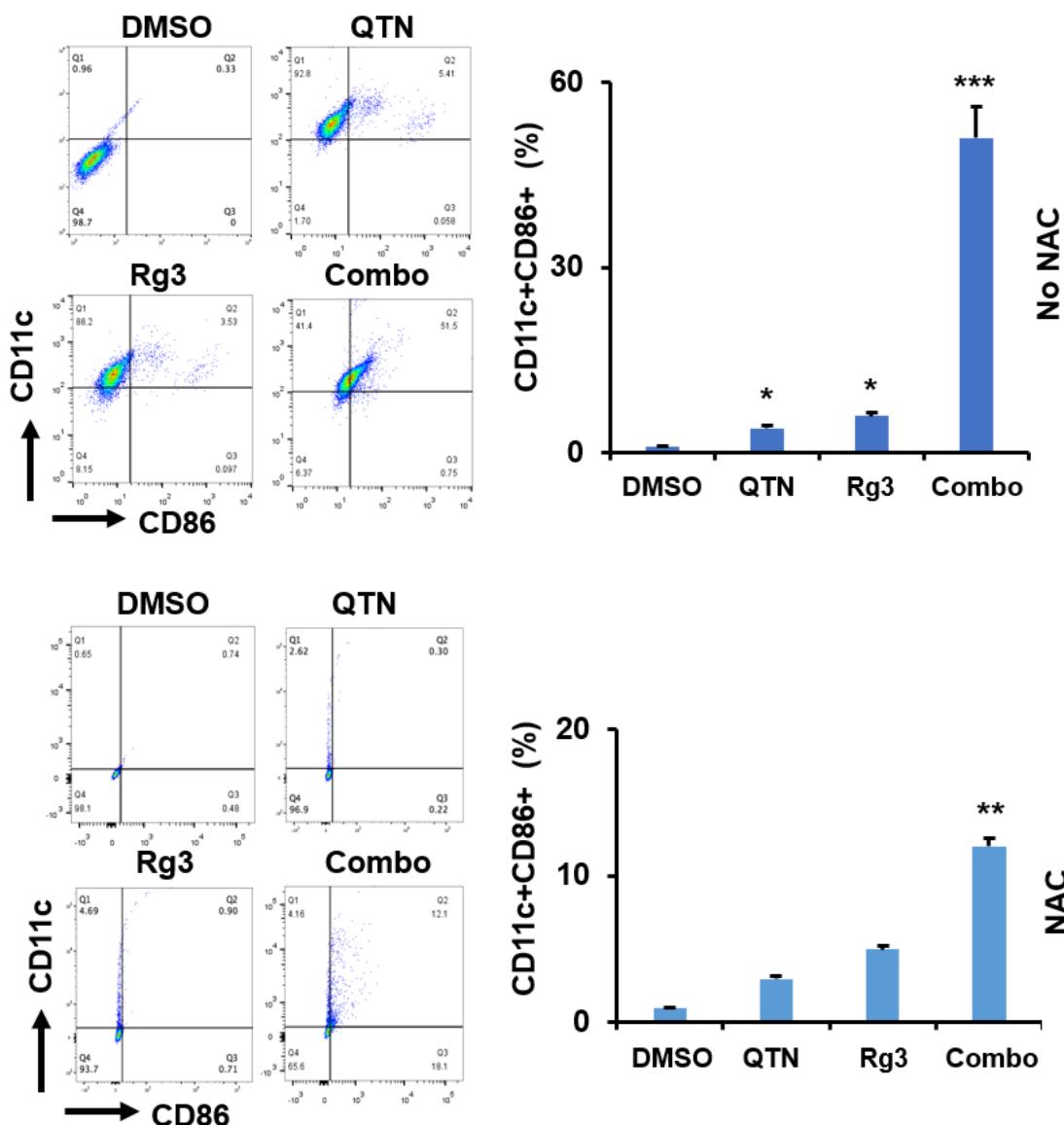


图 4.7 经 Rg3 处理的细胞经 NAC 预处理或未经 NAC 预处理 ($n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 和 *** $P<0.001$, 相对于 DMSO) 的上清液刺激 (24 h) DC 中 CD11c 和 CD86 的表达。

4.4 本章小结

利用两种化疗药物用于肿瘤治疗，这一协同作用机制其效应往往大于各药物单用的总和，其不仅能够发挥单个药物的作用，显著发挥药物的抗肿瘤活性，并能够减少单个药物的使用剂量，降低药物毒副作用。进一步研究 ICD 诱导剂和与其他治疗方案的组合可能会彻底改变癌症治疗。

MTT 法表明联合使用这两种药物可达到协同抗增殖作用。当两种药物的摩尔比 (MR) 优化为 1:1 时协同效果最好，且当两种药物联合增强了 CT26 细胞的凋亡效果。当两者联合作用 CT26 细胞时，ICD 的三大标志 ATP 和 HMGB1 的释放明显增加，CRT 的暴露也显著增加。当加入 ROS 抑制剂时，DC 的活化明显降低。因此，QTN 能增加 Rg3 的 ICD 效果，两者联合具有更优的促 CRC 细胞凋亡效果。

第5章 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 的制备与表征及体外抗癌研究

鉴于大部分的化疗药物的水溶性较差，治疗肿瘤时不能采用注射给药，而通常采用口服给药，这会使化疗药物的生物利用度显著下降。此外，服用化疗药物时常会伴随毒副作用的发生，这可能会对人体正常组织产生损坏，并且也会使患者的生理功能下降。在长期化疗中，肿瘤细胞可能会对化疗药物产生耐药性，从而会减少药物的摄入，明显减弱化疗效果，并且联合用药需要借助载体才可以共同递送到病灶部位。总之，目前的肿瘤治疗存在着上述难题，这些难题为药物递送系统的研究提供动力和出发点^[181-184]。

纳米递送系统的最新发展显著促进了用于癌症治疗化学治疗剂的体内递送^[183-187]。本章研究将 Rg3 和 QTN 共载在改性环糊精（CD）载体中（如图 5.1），同时测定其电位、粒径和稳定性等理化性质，为之后的体内外抗癌做研究基础，本研究采用激光共聚焦和流式两种方法考察复方制剂（CD-PEG.FA.Rg3.QTN）纳米粒细胞摄入情况，进而对 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 纳米粒体外抑制细胞迁移等进行考察。

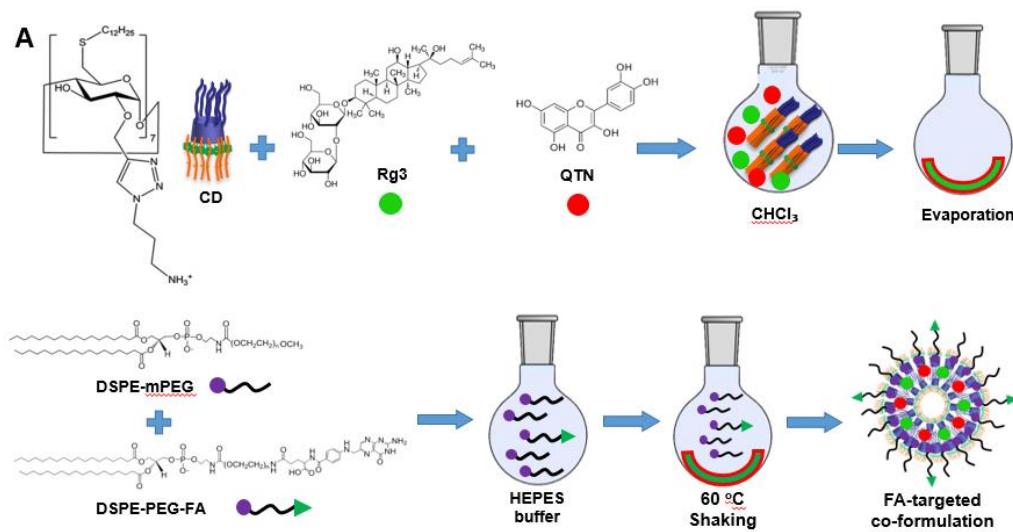


图 5.1 配方示意图。

5.1 实验材料

5.1.1 实验仪器

透析袋 (Mw 8-14 kDa)	Sigma Aldrich
300 目碳网	北京中科镜仪有限公司
HS-4 型搅拌器	德国 IKA 公司
Zetasizer Nano ZS 型动态光散射仪	英国 Malvern 公司
HC-1 型透射电镜	日本日立公司
小型高速离心机	长沙湘仪
HS-4 型磁力搅拌器	德国 IKA
精密天平	梅特勒托利多
Zetasizer Nano ZS 型动态光散射仪	英国 Malvern 公司
数显恒温水浴锅	常州国华电器有限公司
全自动雪花制冰机	常熟雪科电器有限公司
高速冷冻离心机	Eppendorf 有限公司
低温离心机	湖南湘仪离心机仪器有限公司
电子分析天平	美国丹佛仪器公司
移液器	Thermo (美国) 公司
超净工作台	北京东联哈尔仪器制造有限公司
倒置显微镜	Olympus (日本) 公司
CO ₂ 培养箱	SANYO (日本) 公司
化学发光凝胶成像仪	北京东胜创新科技有限公司
电热鼓风干燥箱	北京科伟永兴仪器有限公司
立式蒸汽压力灭菌锅	上海博讯实业有限公司
多功能荧光酶标仪	Bio Tek (美国) 公司
微孔板恒温振荡器	杭州奥盛仪器有限公司
流式细胞仪	美国 BD 公司

5.1.2 实验试剂与药品

氯仿	国药化学试剂有限公司
乙醇	天津光复化学有限公司
甲醇（色谱级）	Thermo Fisher Scientific
乙腈（色谱级）	Thermo Fisher Scientific
磷钨酸（纯度 99%）	国药集团化学试剂有限公司
甲醇	天津光复化学试剂有限公司
二甲基亚砜（DMSO）	天津光复化学有限公司
娃哈哈纯净水	杭州娃哈哈集团有限公司
PBS	美国 Corning 公司
RPMI 1640 细胞培养基	美国 Corning 公司
0.25%胰酶-EDTA	美国 Corning 公司
FBS	以色列 Biological Industries 公司
青-链霉素双抗	以色列 Biological Industries 公司
台盼蓝	北京索莱宝科技有限公司
DMSO	天津百伦斯生物技术有限公司
MTT	长春天佳生物技术有限公司
牛血清白蛋白	上海碧云天生物技术有限公司
DAPI	上海碧云天生物技术有限公司
ROS 检测试剂盒	上海翊圣生物科技有限公司
细胞凋亡检测试剂盒	上海翊圣生物科技有限公司
Z-VAD-FMK	美国 Selleck 生物科技有限公司
N-acetylcysteine	美国 Selleck 生物科技有限公司
FITC-labeled anti-mouse CD86	Biolegend(北京)生物科技有限公司
PE-label labeled anti-mouse CD11c	Biolegend(北京)生物科技有限公司
人参皂苷 Rg3	成都德斯生物技术有限公司
槲皮素	成都德斯生物技术有限公司

5.2 实验方法

5.2.1 载药量包封率

5.2.1.1 色谱条件

仪器：高效液相色谱仪（LC-20AT）；

色谱柱：迪马 C18 色谱柱（4.6 mm*250 mm）；

Rg3 流动相：乙腈：2%冰醋酸=22:78 (V/V)；

QTN 流动相：甲醇：0.2%磷酸水溶液=70:30 (V/V)；

柱温: 30°C;

Rg3 检测波长: 233 nm; QTN: 检测波长: 370nm;

流速：1.0 mL/min；

进样量：20 μL。

5.2.1.2 载药量和包封率

该 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 在包封率 (EE%) 和载药量 (LC%) 方面进行了优化 (计算方法如式 5.1 和 5.2 所示)，称取 2.0 mg CD、0.5 mg Rg3 和 0.2 mg QTN，量取 5 mL 氯仿 (CHCl_3) 将上述所称粉末溶解在圆底烧瓶中，并使用旋转蒸发仪干燥形成薄膜。随后，使用 5 mL 超纯水对薄膜进行再水化，在 0°C 下超声处理 30 min，并在 37°C 下轻微摇动培养 2 h，以获得 CD.Rg3.QTN 复合物。此外，将 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 和 DSPE-mPEG₂₀₀₀-FA (MR, 约为 4:1, 0.5 mg/mL) 溶解在 20 mmol/L HEPES 缓冲液 (pH=7.4) 中于 60°C 下振动 15 min。如前所述^[188-190]，将 DSPE-mPEG₂₀₀₀/DSPE-mPEG₂₀₀₀-FA 采用“后插入”镶嵌到 CD 中。Rg3.QTN 复合物在 60°C 下摇动 1 h。每种配方的外表面 FA 含量约为 1.5% (mol/mol)。如上所述，仅使用 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 可制备非靶向 CD-PEG.Rg3.QTN。此外，如上所述制备罗丹明标记的制剂，其含有约 0.02% (w/w) 的罗丹明。如前[190]所述，使用 Malvern 测量粒径和 zeta 电位。

$$EE (\%) = (\text{纳米粒药物重量}/\text{添加药物重量}) \times 100 \dots\dots\dots (5.1)$$

$$LC\ (\%) = (\text{纳米粒药物重量}/\text{纳米粒重量}) \times 100 \dots\dots\dots (5.2)$$

5.2.2 粒径和形貌测定

采用马尔文动态光散色粒度仪测量纳米粒子的平均粒径、电位和多分散性指数

(PDI)。首先，将制备的纳米粒用超纯水稀释至透明状态，然后将稀释好的纳米粒置于粒径杯中，上机检测粒径、电位和多分散性指数，每个样品系统自动测定三次，取平均值。

如前所述，使用 TEM 观察 NPs 的形态^[191]。简言之，在 TEM 分析之前，将 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 分别滴加在碳涂层 400 目铜网上，然后等其自然挥干。用 0.1% 磷钨酸溶液染色 (PAS) 20 min，用滤纸除去多余的 PAS 后，于透射电镜上拍照。

5.2.3 体外释放

将含有 250 μg Rg3 和 100 μg QTN (MR=1: 1) 的 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 置于透析袋内 (MWCO=2 kDa; Solarbio®, 北京)，然后将其放置于 0.01 mol/L PBS (pH=5.5 和 7.4) 的缓冲液中。透析袋在 (37±0.5) °C 的释放介质 (0.5% 吐温-80 0.01 mol/L PBS 溶液) 中恒温避光条件下振荡 (100 rpm/min)^[192]。分别在 1、2、3、5、7、8、9、24 及 48 h 时吸取 5 mL 透析液，同时立即加入等温等体积释放介质，取出透析液立即离心 3 min (3000 rpm/min)，精密取 20 μL 进样测定，计算载体中 Rg3 和槲皮素在不同时间内的体外累积释放度，并如上所述使用 HPLC 测定游离药物的浓度。

5.2.4 稳定性考察

采用动态光散射粒度仪监测 PBS 中仿生纳米粒 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 纳米制剂的稳定性，初步考察纳米粒的储存条件和时间。纳米粒稳定性测定过程如下：将纳米粒悬浮于 PBS 中，置于 4°C 冰箱中，在 0、7、14、21 和 28 天测定纳米粒的粒径和电位，观察纳米粒粒径和电位变化，评估纳米粒在 4°C 条件下的稳定性，与上述时间点一样，分别于 0、7、14、21 和 28 天采用粒度分析仪检测纳米粒的粒径及电位。

5.2.5 细胞定性摄入

使用共焦显微镜评估 CD-PEG.FA.Rg3.QTN (含 0.05% 罗丹明, w/w) 的细胞摄取。将 CT26 和 HCT116 细胞 (每孔 1×10^5) 分别接种于 24 孔玻璃底培养皿中一天。将含有罗丹明的 CD-PEG.FA.Rg3.QTN (12 μmol/L Rg3 和 12 μmol/L QTN) 添加到细胞中共孵育 6 h。在此之后，用 4% PFA 处理细胞 20 min，并使用 DAPI 进行共聚焦成像染色。

5.2.6 细胞定量摄入

首先，采用流式细胞术检测细胞定量摄入情况。将 CT26 和 HCT116 细胞 (每孔

1×10^5 ）分别接种在 24 孔板中，孵育过夜。将含有罗丹明的 CD-PEG.FA.Rg3.QTN（ $12 \mu\text{mol/L}$ Rg3 和 $12 \mu\text{mol/L}$ QTN）添加到细胞中共孵育 4 h。随后，使用 BD FACSCalibur 检测罗丹明阳性细胞（%）。

5.2.7 体外抗癌效果

采用 MTT 法测定 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 的体外细胞毒性、抗增殖和抗转移活性。将 CT26 和 HCT116 细胞（每孔 1×10^4 ）分别接种于 96 孔板内，孵育过夜。随后，将 CD-PEG.FA.Rg3.QTN（ $12 \mu\text{mol/L}$ Rg3 和 $12 \mu\text{mol/L}$ QTN）添加到细胞中 24 h，并如上所述测量 IC_{50} 。

5.2.8 细胞划痕

如前所述进行体外划痕实验^[193]。简单地说，当 CT26 和 HCT116 细胞汇合时，用 PBS 彻底清洗细胞单层，用 p200 移液管尖刮擦以产生“划痕”，然后用 PBS 再次清洗。用无血清生长培养基替换细胞，并添加 CD-PEG.FA.Rg3.QTN（ $12 \mu\text{mol/L}$ Rg3 和 $12 \mu\text{mol/L}$ QTN）12 h 后。在显微镜下对 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 培养前后的无细胞区域进行成像，并使用 ImageJ 进行测量。

5.2.9 克隆形成实验

将 CT26 和 HCT116 细胞以每孔 1000 个细胞的密度接种于 6 孔板中，贴壁培养 24 h。弃去原有培养基，CD-PEG-FA-Rg3.QTN（ $12 \mu\text{mol/L}$ Rg3 和 $12 \mu\text{mol/L}$ QTN）处理 4 周。每个药物组均设置三组实验。在培养箱中培养 7 天后，可在皿底观察到均匀散落分布的细胞克隆团。小心吸走培养基，并缓慢加入无水乙醇配制的 0.25% 结晶紫染色工作液对细胞团进行固定与染色。0.5 h 后弃去染色液，并用清水小心清洗多余的染色液直至细胞克隆团清晰可见，晾干后在显微镜下对细胞克隆团计数）。

5.3 实验结果和讨论

5.3.1 载药量包封率

Rg3 和 QTN 具有独特的物理化学特性。例如 Rg3 和 QTN 的 $\log P$ 约为 2.63 和 1.81，同时 Rg3 和 QTN 都具有水不溶性。因此，纳米给药系统对于两种药物的联合给药是可行的，能够实现协同效应。然而，据我们所知，还没有关于 Rg3 和 QTN 在 CRC 纳米

制剂中共包封的研究报告。

在此之前，以环糊精 NPs 为基础，已建立了多种体外和体内模型并对其物化性质进行表征^[188,194-198]。在这些功能化环糊精中，两亲性阳离子 β -环糊精（后称为 CD）显示出高基因传递效率^[188,196-198]和低水平的细胞毒性和免疫毒性^[199]。在本研究中，开发了一种 FA 靶向 PEG 修饰 CD 纳米制剂，用于 Rg3 和 QTN 的共包封。FA 靶向共制剂（CD-PEG-FA.Rg3.QTN）显示了 Rg3 和 QTN 很好的负载能力（LC%、为 12% (w/w) 和 QTN 为 6% (w/w)，Rg3 和 QTN 的 MR 约为 1:1），具有较低的特定尺寸（约 110 nm）和接近中性的 zeta 电位（表 5.1），这与非靶向制剂（CD-PEG.Rg3.QTN）实现的负载能力相似。图 5.2 可知 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 制剂粒径电位分布均匀，粒度分布均一。

表 5.1 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 制剂的 EE%、LC%、粒径和表面电荷 (n=3)。

NP	EE%	LC%	Particle size (PDI)	Surface charge
CD-PEG- FA.Rg3.QTN	Rg3=96±4 QTN=90±2	Rg3=12±2 QTN=6±1	108±6nm(0.3)	6±1mV

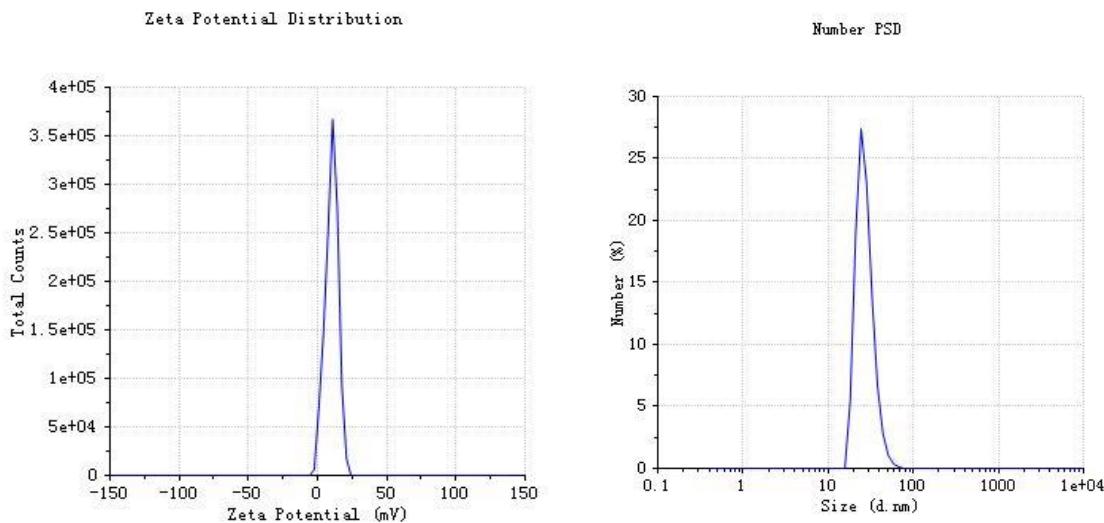


图 5.2 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 制剂电位粒径分布图。

5.3.2 纳米粒形态

图 5.3 是所有制剂制备完成后的直观图，1 是 Rg3 和 QTN 的游离混合液；2 是 CD-PEG-Rg3.QTN；3 是 CD-PEG-FA.Rg3.QTN。此外，CD-PEG-FA.Rg3.QTN 纳米粒显示

球形结构（图 5.4），其与 CD-PEG-Rg3.QTN 所观察到的类似。



图 5.3 三种制剂的制备液体直观图。

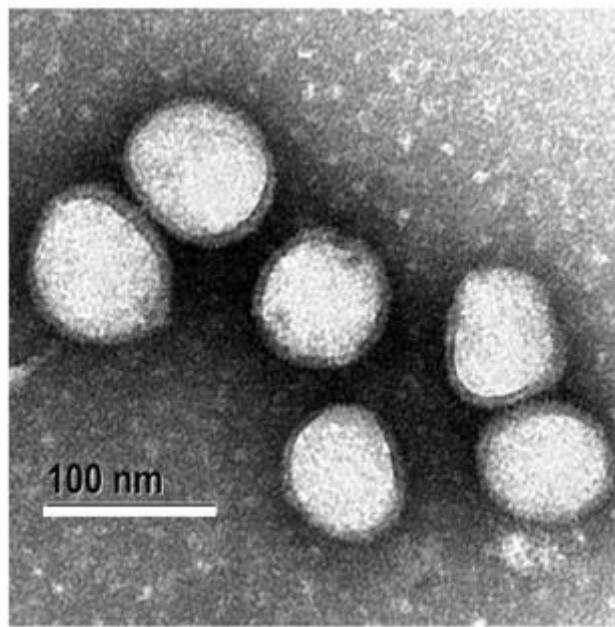


图 5.4 靶向 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 制剂的 TEM 图像 (bar=100 nm)。

5.3.3 释放行为

如图 5.5 所示，两种药物在中性 PBS (pH 7.4) 中 8 h 时从 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 制剂中释放约 30%，而在酸性 PBS (pH 5.5) 中 8 h 时药物释放显著增加 (约 70%)。在 48 h 内，在中性和酸性 PBS 下，CD-PEG-FA.Rg3.QTN 制剂中分别观察到约 70% 和

约90%的药物释放。该数据表明，CD制剂可在酸性pH环境下实现更高的药物释放，这是由于NPs功能化胺基可促进pH敏感药物释放^{[200],[201]}。这种现象背后的机制可能是由于胺基在外部酸性条件下的质子化。值得注意的是，靶向CD-PEG.FA.Rg3.QTN中Rg3和QTN的释放在两种pH值下都是相似的，这表明两种药物可能同时在血流中传递并在肿瘤部位释放。

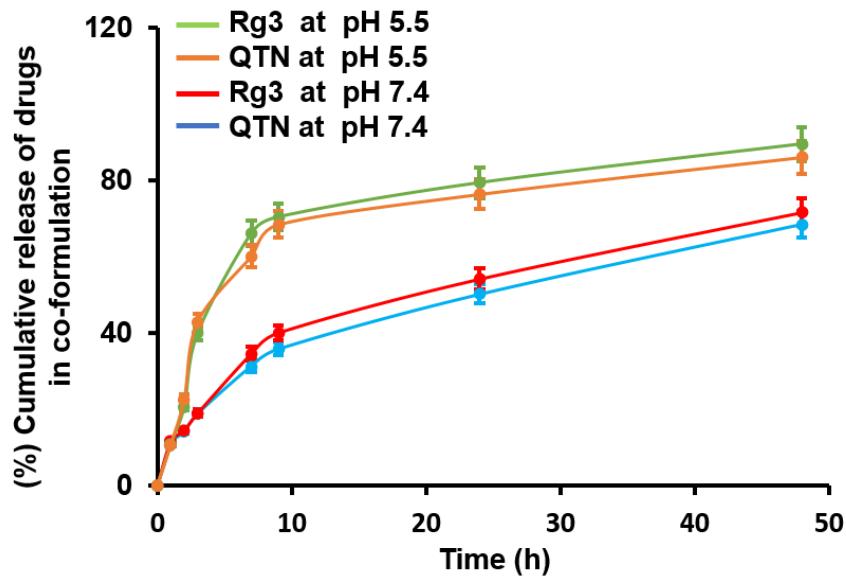


图5.5 在0.01 M PBS (pH=5.5和7.4) (n=4) 中靶向CD-PEG-FA.Rg3.QTN的药物体外释放情况。

5.3.4 稳定考察

在4°C下储存后，当未看到明显的药物聚集时，CD-PEG-FA.Rg3.QTN纳米粒在长达一周的时间内保持稳定，粒径没有明显变化（图5.6）。此外，CD-Rg3.QTN纳米粒显示出与CD-PEG-FA.Rg3.QTN纳米粒相似的药物释放和稳定性。

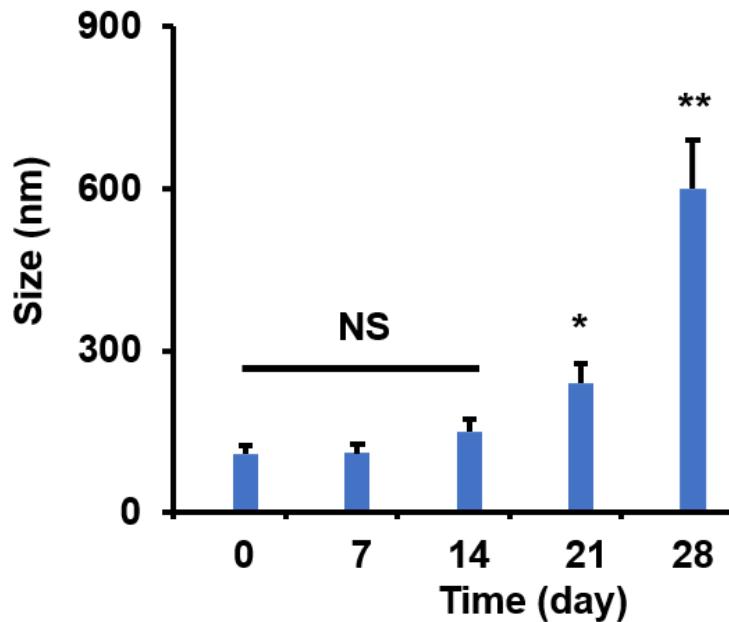


图 5.6 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 制剂在水溶液中 4°C 储存后的粒径变化（相对于第 0 天，n=4、*P<0.05 和 **P<0.01；NS=无显著性）。

5.3.5 纳米粒的细胞毒性

由图 5.7 可知，由于空白的 CD-PEG-FA 没有表现出明显的毒性，因此 CD-PEG-FA 制剂不能抑制细胞生长，进而得出 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 实现的抗增殖作用不是由于纳米毒性，而是由 Rg3 和 QTN 发挥的毒性作用。

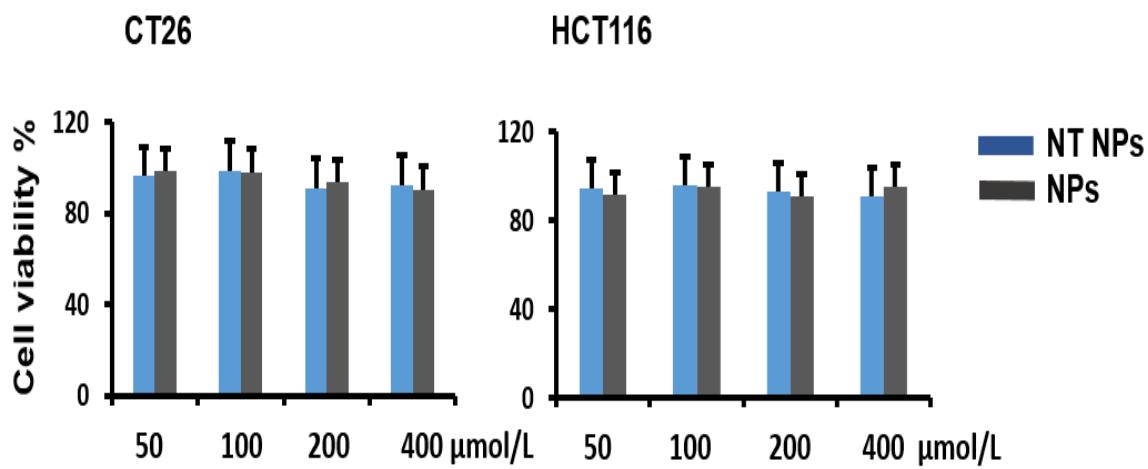


图 5.7 不同浓度空白 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 的细胞活力（%）。

5.3.6 体外抗癌活性

如图 5.8 所示，在 CT26 和 HCT116 细胞系中，CD-PEG-Rg3.QTN 制剂（24 h 孵育时细胞存活率约 40%）和 Rg3.QTN（24 h 孵育时细胞存活率约 55%）抗肿瘤效果相比，CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂显著降低了细胞活力（24 h 孵育时细胞存活率约 25%）。值得注意的是，由于空白的 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 不能抑制细胞生长，因此，CD-PEG.FA.Rg3.QTN 实现的抗增殖作用不是由于纳米粒毒性，而是包载的 Rg3 和 QTN 所致。

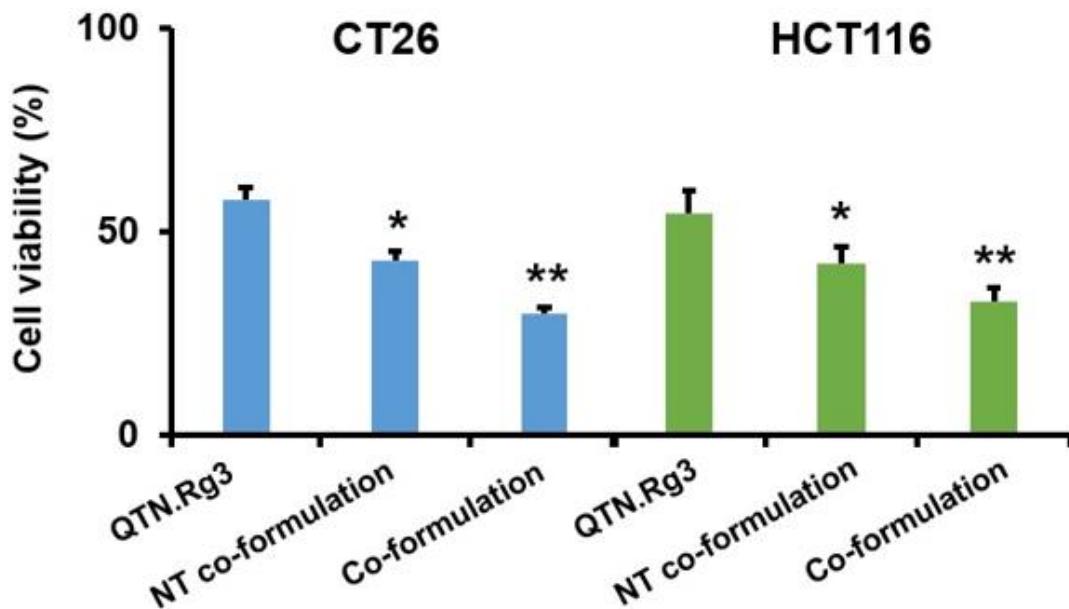


图 5.8 24 h 后 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 的细胞存活率（%）（相对于游离药物，n=3，
*P<0.05 和 **P<0.01）。

5.3.7 细胞定性摄入

为了确认主动靶向给药，使用激光共焦显微镜评估含有罗丹明的 CD-PEG-FA-Rh.B.Rg3.QTN 和 CD-PEG-Rh.B.Rg3.QTN 制剂的细胞摄取（图 5.9 和 5.10）。由结果可知，CD-PEG-FA-Rh.B.Rg3.QTN 制剂的红色荧光强度明显强于 CD-PEG-Rh.B.Rg3.QTN 制剂的荧光强度，因此，CD-PEG-FA-Rh.B.Rg3.QTN 靶向制剂的细胞摄入优于 CD-PEG-Rh.B.Rg3.QTN 非靶向制剂。

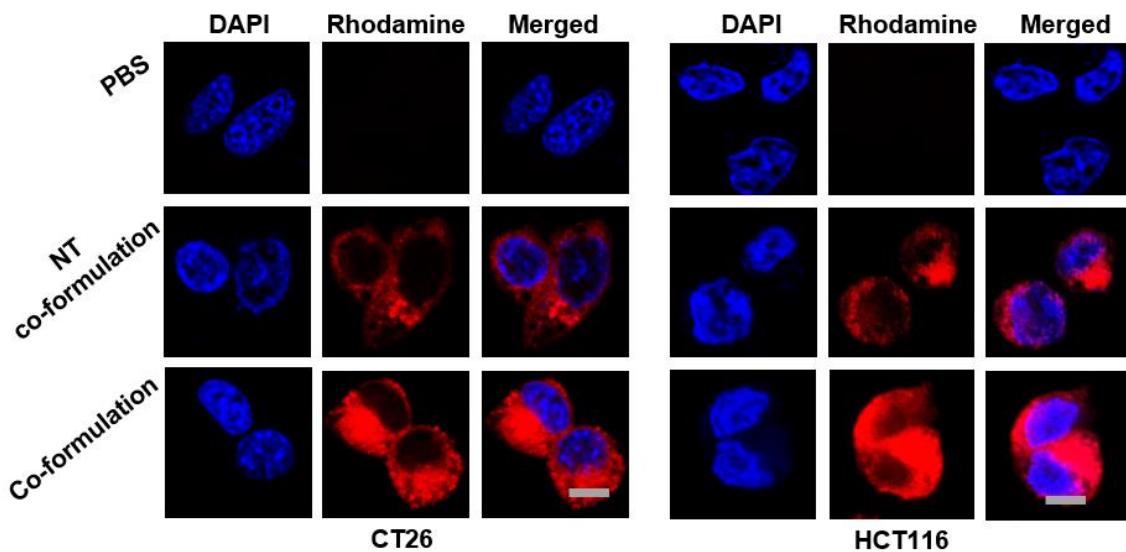


图 5.9 使用共焦显微镜 (bar=5 μm) 评估含有罗丹明的 CD-PEG.FA.Rg3.QTN (NT co-formulation: 非靶向 CD-PEG.FA.Rg3.QTN; co-formulation: 靶向 CD-PEG.FA.Rg3.QTN) 的细胞摄取。

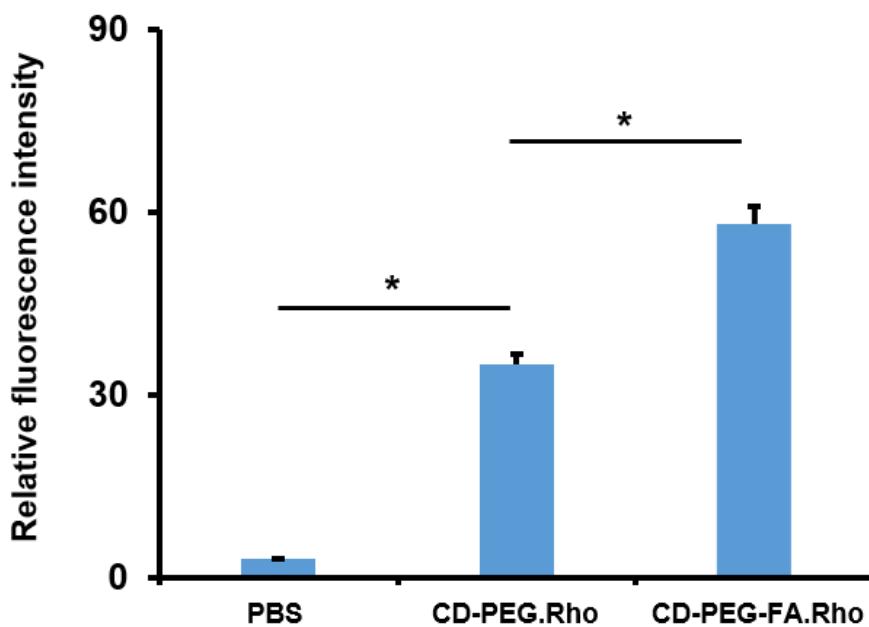


图 5.10 图 5.9 的定量图 ($n=3$, * $P<0.05$)。

5.3.8 细胞定量摄入

CT26 和 HCT116 细胞的流式细胞术检测细胞定量摄入情况 (图 5.11) (它们都表达叶酸受体^{[202],[203]})。结果表明, 在两种细胞系中, 与非靶向组相比, CD-PEG-FA-Rh.B.Rg3.QTN 靶向制剂获得了更高的罗丹明摄取量 ($P<0.05$ 和 $P<0.01$), 与上述定性结果一致。证实了 FA 介导的递送效应。

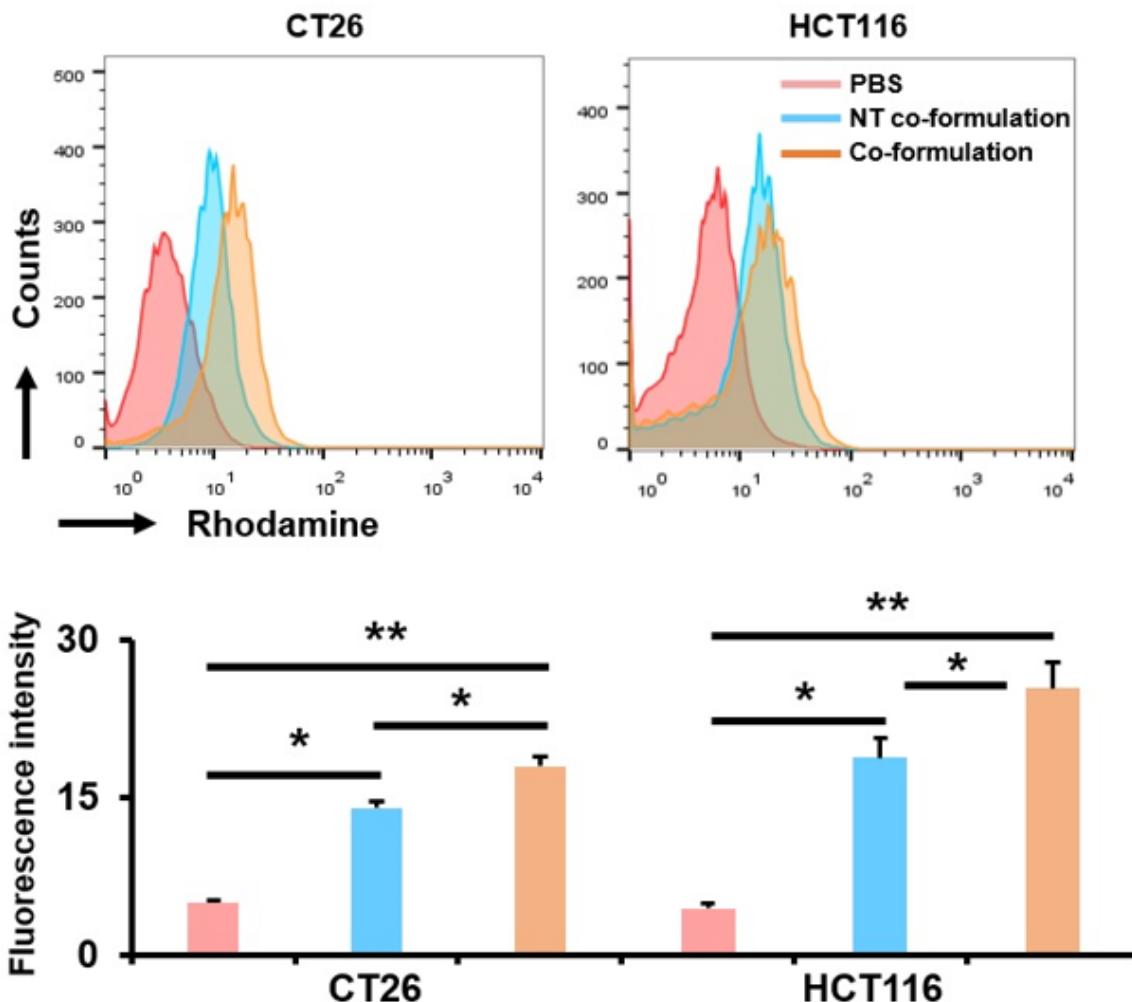


图 5.11 使用流式细胞术（相对于 PBS, n=3, *P<0.05 和 **P<0.01）评估含有罗丹明的 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 的细胞摄取。

5.3.9 细胞划痕实验

使用划痕实验（图 5.12）评估靶向 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 的抗转移活性。结果表明，靶向 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 显著减缓了 CT26 和 HCT116 细胞的迁移 ($P<0.01$)。

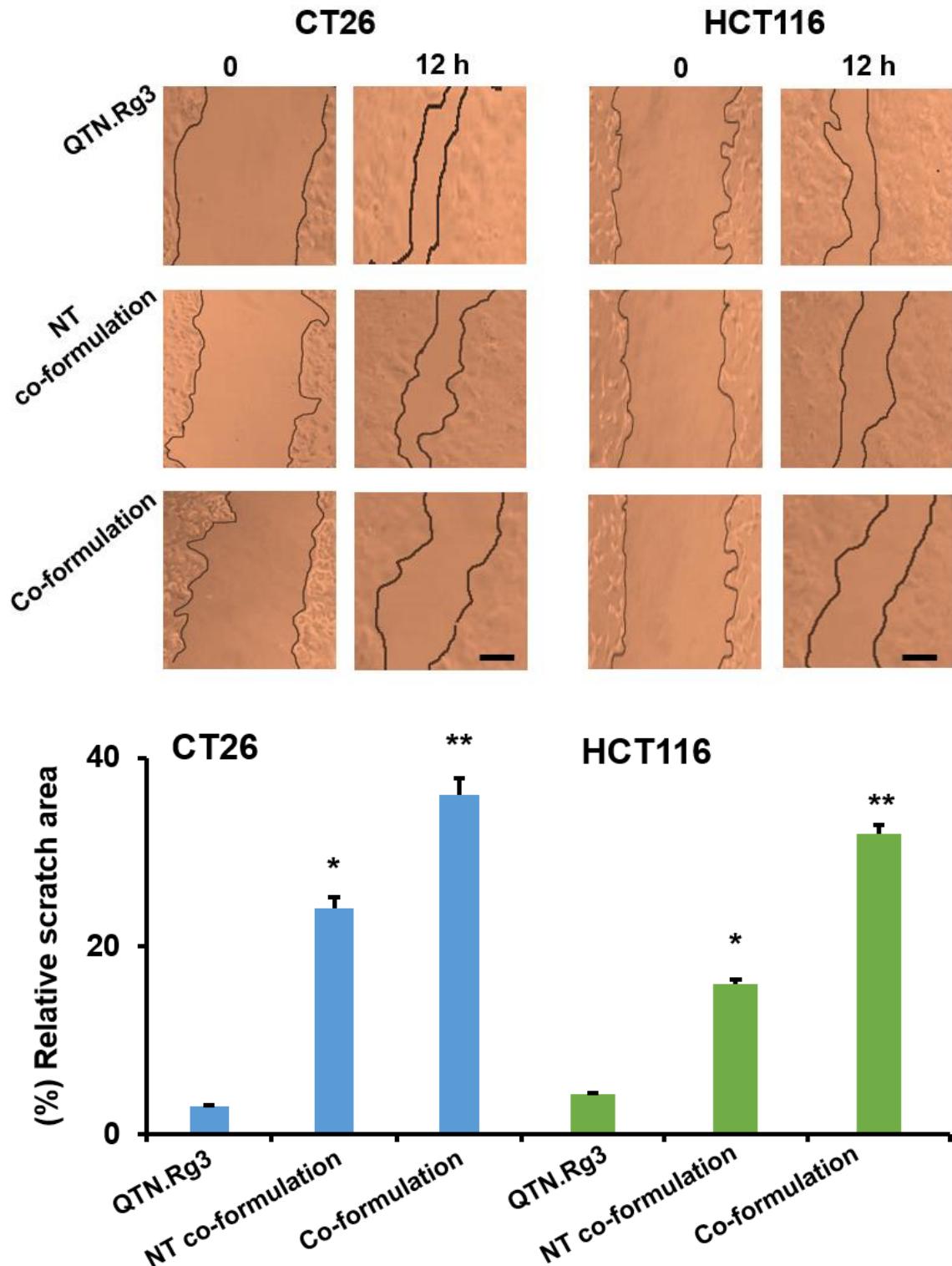


图 5.12 对 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 治疗前后（12 h）的无细胞区域进行成像和测量的相对划痕面积（%）（相对于游离药物，n=3， *P<0.05 和 **P<0.01）。

5.3.10 克隆形成实验

与 CD-PEG-Rg3.QTN (克隆集落约为 12) 和 Rg3.QTN 组合 (克隆集落约为 19)

相比，CD-PEG-FA-Rg3.QTN减少了克隆集落量（图5.13，克隆集落约为5）。图5.13中的结果表明，CD-PEG-FA-Rg3.QTN在CRC细胞中实现了FA介导的抗增殖和抗转移作用。

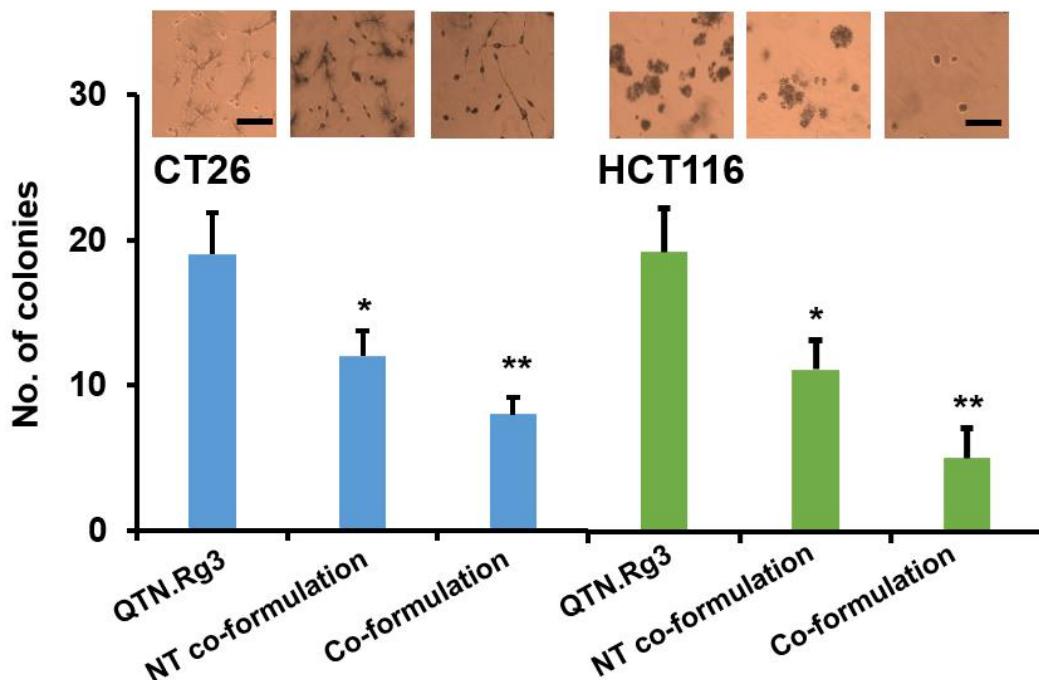


图5.13 CD-PEG-FA.Rg3.QTN治疗后的菌落形成（4周）情况（相对于游离药物， $n=3$ ，* $P<0.05$ 和 ** $P<0.01$ ）。

5.4 本章小结

大部分ICD化疗药物的半衰期短、稳定性差、肿瘤靶向递送效率低，且受肿瘤微环境（Tumor Microenvironment, TME）的影响，严重阻碍了ICD诱导剂的临床应用潜力。因此，设计用于改善药代动力学、增强肿瘤分布和肿瘤细胞特异性递送的纳米药物递送系统（Nano Drug Delivery System, NDDS）是迫切需要的，其旨在改变ICD化疗诱导剂的全身给药特性，实现药物靶向到肿瘤细胞的有效和安全递送。使用多功能NDDS共同递送ICD化疗诱导剂和具有不同作用机制的药物以重塑肿瘤微环境。针对TME，多功能NDDS可以基于脂质纳米颗粒（Nanoparticles, NPs）、聚合物NPs和无机NPs使用隐形基团、响应部分和靶向配体的修饰来实现靶向递送。多功能NDDS能够改善药物的药代动力学、增强肿瘤分布以及靶向递送药物。系统给药后，多功能NDDS（100~200 nm）通过高通透性和滞留效应（Enhanced Permeability and Retention Effect, EPR）或转胞吞作用在肿瘤内积累，通过配体受体介导的途径（主动肿瘤靶向）

识别肿瘤细胞，逃逸内体或溶酶体，并以响应方式释放治疗性药物。

为了改善与化疗药物相关的体内递送障碍，本章开发了一种叶酸（FA）靶向聚乙二醇（PEG）修饰的两亲性环糊精纳米颗粒（NPs），用于 Rg3 和 QTN 的共包封。释放结果表明，CD-PEG-FA.Rg3.QTN 纳米粒在 pH 为 5.5 表现出更好的释放效果；且在 4°C 情况下具有很好的稳定性。其次 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 纳米粒能很好地进入细胞，从而发挥抗肿瘤作用。最后通过集落实验证明靶向 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 在 CRC 细胞中实现了 FA 介导的抗增殖和抗转移作用，这些实验结果为后续体内外抗肿瘤研究奠定了基础。

第6章 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 的体内毒性、药动学和组织分布研究

目前临幊上主要采用聚乙二醇长循环修饰的 PLGA 纳米制剂^[204], PEG 可以延长药物在体內循环时间, 同时减轻 Rg3 和 QTN 毒副作用, 从而改善患者的顺应性。纳米粒作为研究最广泛的载体之一, 能够在水系环境中自发形成内部疏水, 外部亲水, 粒径在 20-200 nm 的球状结构。纳米粒可以将疏水药物包裹于疏水核心能够使药物缓慢从疏水核心中释放出来从而降低代谢^[205], 维持血药浓度, 同时也可避免被肝脏消除^[206]。

本章研究 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 纳米粒体内的药代动力学, 同时建立结直肠肿瘤的 BALB/c 鼠模型, 采用荧光物质 DiD 来模拟 Rg3 和 QTN 在体内的药物生物学分布。

6.1 实验材料

6.1.1 实验仪器

KQ-2 型超声波清洗器	昆山超声设备有限公司
GL-8813 涡旋混合器	瑞金仪器有限公司
小动物活体成像系统	Maestro EX
LC-20AT	SHIMADZU
HS-4 型搅拌器	德国 IKA 公司

6.1.2 实验试剂与药品

DiR	大连美伦生物制品有限公司
Luciferin	Maokangbio
肝素钠 (纯度 BR)	国药集团化学试剂有限公司
甲醇 (AR)	天津光复化学试剂有限公司
氯仿 (AR)	天津光复化学试剂有限公司

6.2 实验方法

6.2.1 体内急毒

选取 4~6 周龄且生长状态良好的 BALB/c 雌性白鼠作为实验模型动物，将小鼠随机分成四组，每组六只小鼠。通过尾静脉注射的方式给药，给药的四个实验组分别为 PBS，CD-PEG-FA-Rg3.QTN 低剂量组、CD-PEG-FA-Rg3.QTN 中剂量组和 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 高剂量组。在给药 30 天内，定期记录体重。

6.2.2 HE 染色

选取 4~6 周龄且生长状态良好的 BALB/c 雌性白鼠作为实验模型动物，将小鼠随机分成三组，每组六只小鼠。通过尾静脉注射的方式给药，给药的三个实验组分别为 PBS，CD-PEG-FA-Rg3.QTN 高剂量组和低剂量组。第 30 天获得主要器官，HE 染色，以分析组织病理学。

6.2.3 肝/肾功检测

选取 4~6 周龄且生长状态良好的 BALB/c 雌性白鼠作为实验模型动物，将小鼠随机分成三组，每组六只小鼠。通过尾静脉注射的方式给药，给药的三个实验组分别为 PBS，CD-PEG-FA-Rg3.QTN 高剂量组和低剂量组。在第 30 天获得血清，以分析肝/肾功能。

6.2.4 全血检测

选取 4~6 周龄且生长状态良好的 BALB/c 雌性白鼠作为实验模型动物，将小鼠随机分成三组，每组六只小鼠。通过尾静脉注射的方式给药，给药的三个实验组分别为 PBS，CD-PEG-FA-Rg3.QTN 高剂量组和低剂量组。在第 30 天获得全血，以分析其血液指标。

6.2.5 组织分布和药代

按照前面描述的步骤^[192]，向 BALB/c 小鼠的盲肠壁注射 5×10^5 个 CT26-Luc 细胞建立原位 CRC 小鼠模型。接种后（第 0 天）， $100\mu\text{L}$ 荧光素（ 10 mg/mL ；Pierce）腹腔注射给动物，并使用 IVIS®活体光学系统监测肿瘤的生长情况。当肿瘤生长到约 5 至 $10 \times 10^8 \text{ p/s/cm}^2/\text{sr}$ 时，使用小鼠进行药代动力学和组织分布检测：静脉注射含有 10 mg/kg

Rg3 和 4 mg/kg QTN 的 CD-PEG-FA.Rg3.QTN (Rg3: QTN, MR 约 1: 1) , 并在不同时间点采集血液 (约 50 μ L)。用乙酸乙酯提取血浆中的药物, 用氮气干燥, 并在 HPLC (岛津) 流动相中重悬, 测得的数据使用 DAS2.0 软件计算半衰期等。向动物静脉注射含有约 0.05% (w/w) DiR、10 mg/kg Rg3 和 4 mg/kg QTN 的 CD-PEG.FA.Rg3.QTN, 并使用 IVIS®活体光学系统 ($n=4$) 检测生物分布 (640 nm/670 nm)。

6.3 实验结果和讨论

6.3.1 小鼠急毒

肿瘤鼠的体重变化能够在药效学实验中一定程度上反应药物的毒性, 在健康小鼠中评估游离药物和 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 的体内毒性 (图 6.1 和 6.2)。如图 6.2A 所示, 静脉注射 (i.v.) 50 mg/kg 的游离 Rg3 或 25mg/kg 的游离 QTN 的动物体重没有明显减轻 (图 6.2B), 与 PBS 相比, 静脉注射含有两种不同剂量药物 (Rg3 高达 50 mg/kg, QTN 高达 20 mg/kg, MR 约为 1:1) 的靶向 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 的动物体重没有显著降低 (图 6.1)。

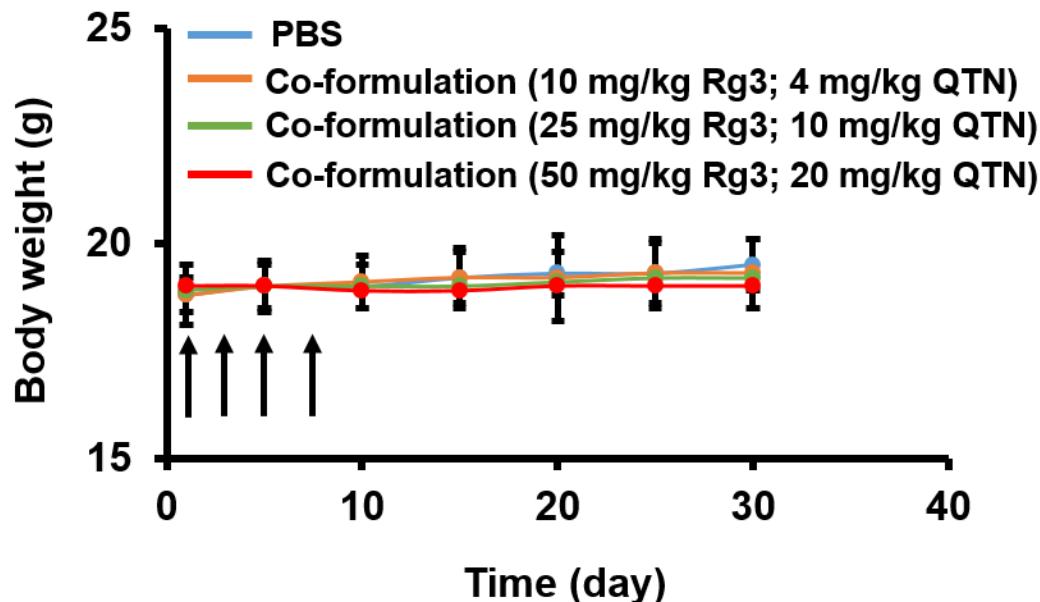


图 6.1 静脉注射 PBS 和靶向 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 后 30 天内的体重变化 ($n=5$)。

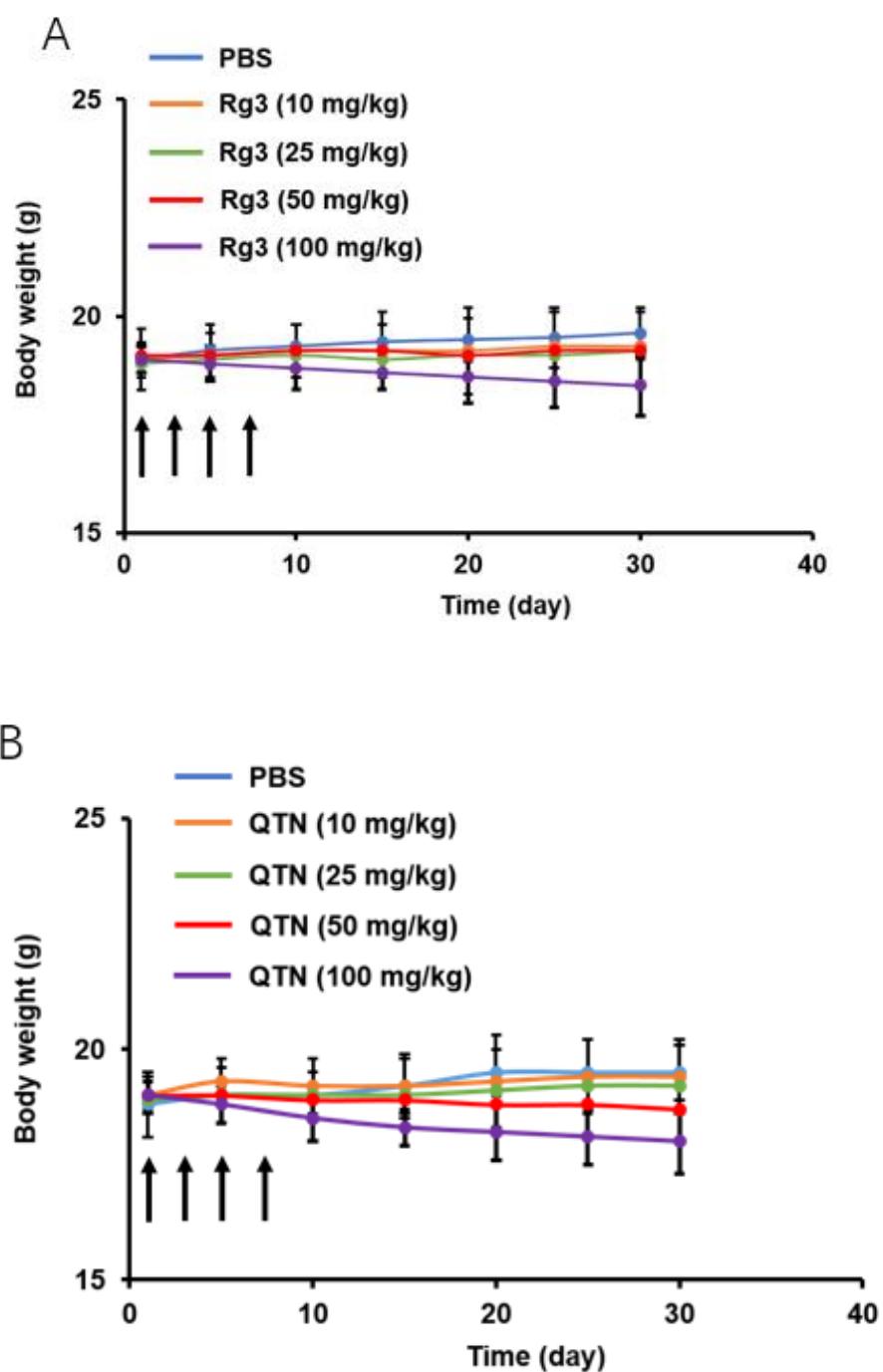


图 6.2 Rg3 和 QTN 不同剂量治疗后 30 天内的体重变化 (n=5)。

6.3.2 HE 染色

H&E 染色结果表明，与 PBS 相比，静脉注射靶向 CD-PEG-FA.Rg3.QTN (Rg3=50 mg/kg 和 QTN=20 mg/kg) 后，小鼠主要器官中未发现明显的组织学变化（图 6.3）。

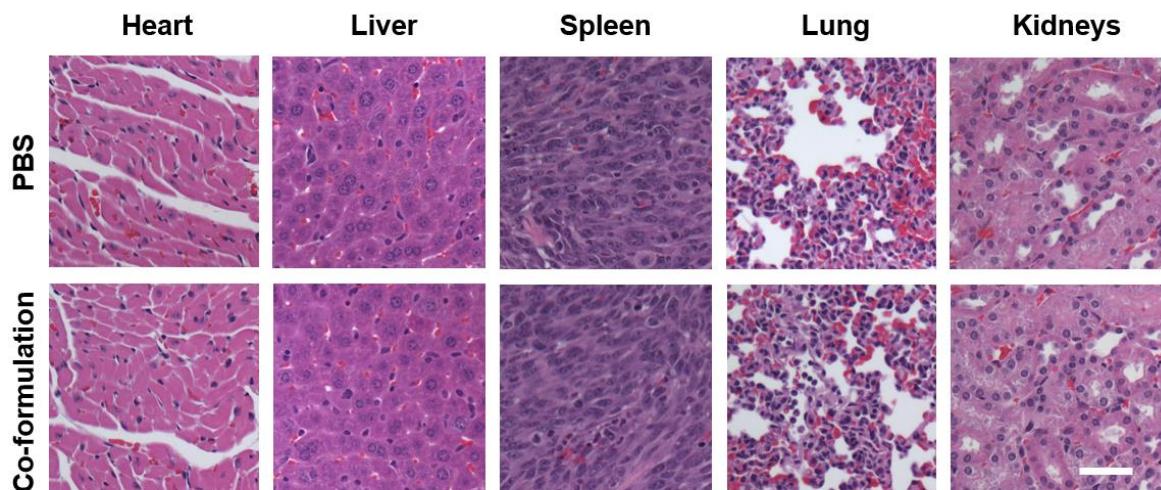


图 6.3 H&E 染色法进行评估主要器官的毒性 (bar = 50 μm)。

6.3.3 全血分析

在体内实验开始之前需要首先在活体水平上评价药物载体的生物安全性，血常规检测可作为一项重要的安全性指标。血常规主要监测的是血液中血细胞的变化，其指标包括血细胞的数量占比、平均体积占比和细胞大小的均一程度。这些血细胞根据功能又可分为三大类：红细胞系统，主要依靠血红蛋白来向身体各处输送 O₂ 并运走 CO₂；白细胞系统，负责吞噬外来抗原及内源坏死组织碎片，是机体防御系统的重要组成部分；血小板系统，主要作用是凝血、止血，对机体损伤修复有着重要意义。血常规指标的失衡与机体内各种炎症、疾病及贫血等密切相关，因此是评价生物体健康水平的重要手段。小鼠在尾静脉注射载药纳米粒 30 天后，本章对其血常规指标进行了检测分析，如图 6.4 所示，主要包括 WBC（白细胞）、RBC（红细胞）、HGB（血红蛋白）、PLT（血小板）。实验结果表明，与对照组 PBS 相比，载药纳米制剂这四项血常规指标均在正常范围内浮动，该载药纳米载体未引起机体的炎症反应，小鼠的造血、凝血功能正常，证明了所制备载药纳米粒在小鼠体内的低毒性。

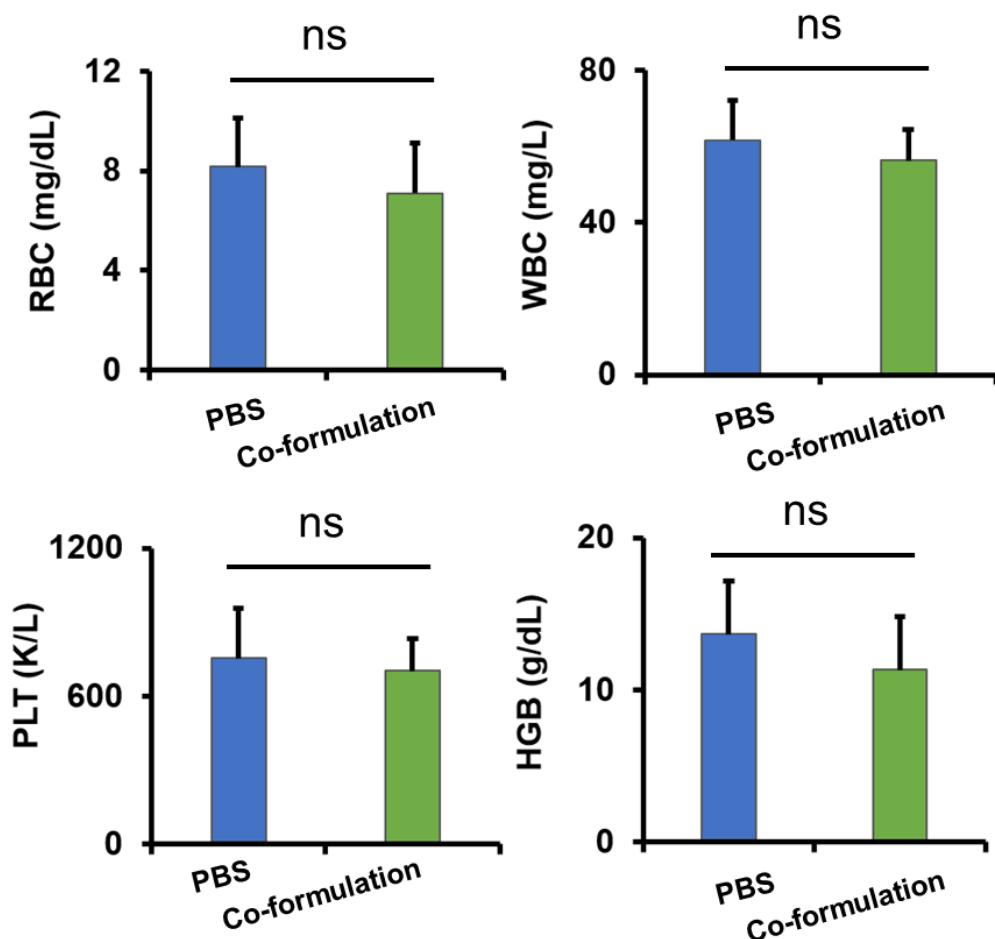


图 6.4 第 30 天 ($n=4$) 血液学分析 (红细胞 (RBC)、白细胞 (WBC)、血小板 (PLT) 和血红蛋白 (HGB))。

6.3.4 肝功分析

血生化指数是判断机体健康水平的另一项重要指标。血生化检测的是静脉血中含有的各种化学物质，包括各类离子、激素、脂类、糖类、蛋白质、酶或尿酸等代谢产物等等。在此项实验中本章主要检查了给药后小鼠的肝功能二项，包括谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)；肾功能二项，包括尿素氮(BUN)，肌酐(CRE)。检查结果如图 6.5 所示，小鼠各项指标正常，靶向 CD-PEG-FA.Rg3.QTN ($Rg3=50 \text{ mg/kg}$ 和 $QTN=20 \text{ mg/kg}$) 未导致肝/肾损伤。这表明在实验剂量下，靶向 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 不会引起全身毒性。

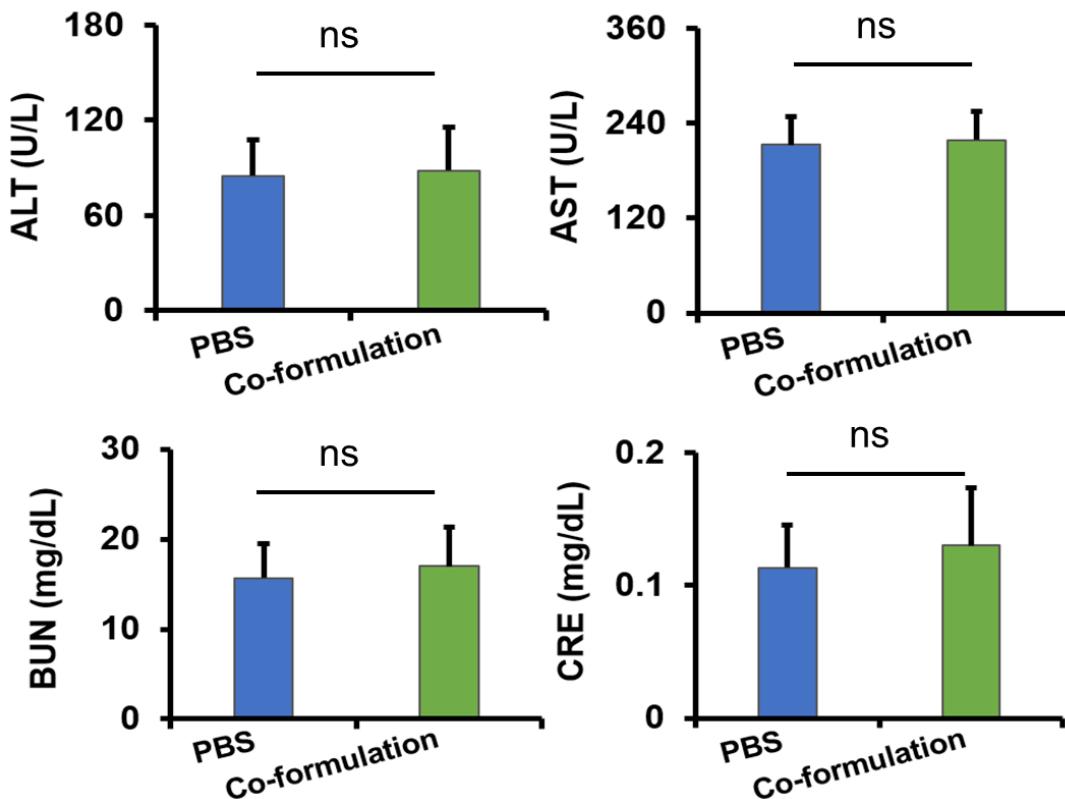


图 6.5 检测第 30 天 ($n=4$) 的肝/肾功能 (包括丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 、血尿素氮 (BUN) 和肌酐 (CRE)) 。

6.3.5 药代和组织分布

一般来说，全身给药后，化疗药物的半衰期短，从体内迅速清除，这将显著降低治疗效果。众所周知，PEG 的空间修饰可以防止血清蛋白的非特异性结合 NPs，从而改善 NPs 的血液循环^[207]。在本研究中，使用原位 CT26-Luc 建立的 CRC 小鼠模型评估游离药物和封装在靶向 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 中的药物的半衰期（图 6.6）。结果表明，两种药物在血浆中的浓度迅速下降，在注射后 8 h 检测到最低水平（QTN 的 $t_{1/2}$ 为 20 min，Rg3 为 10 min）。相比之下，靶向复方中的两种药物从血浆中的清除速度明显较慢（QTN 的 $t_{1/2}$ 为 1.4 h，Rg3 为 1.3 h），表明药物的血液循环延长。值得注意的是，游离药物表现出明显的半衰期；相比之下，当通过靶向 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 进行共递送时，它们呈现出相似的半衰期。数据表明这两种药物可能同时进入血液。此外，CD-PEG-Rg3.QTN 制剂的半衰期与 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂相似。

使用原位 CRC 小鼠模型测定了 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂的组织分布。静脉注射 DiD 标记的 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 12 h 后，使用 IVIS®活体成像系统对肿瘤和主要器官

进行体外成像（图 6.7）。结果表明，与 CD-PEG-Rg3.QTN 制剂相比，CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂的肿瘤蓄积显著增加（约为 3.5 倍， $P<0.05$ ），但肝脏蓄积显著减少（约为 1.5 倍， $P<0.05$ ），因此，CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂显著提高肿瘤保留率，减少非特异性组织分布。

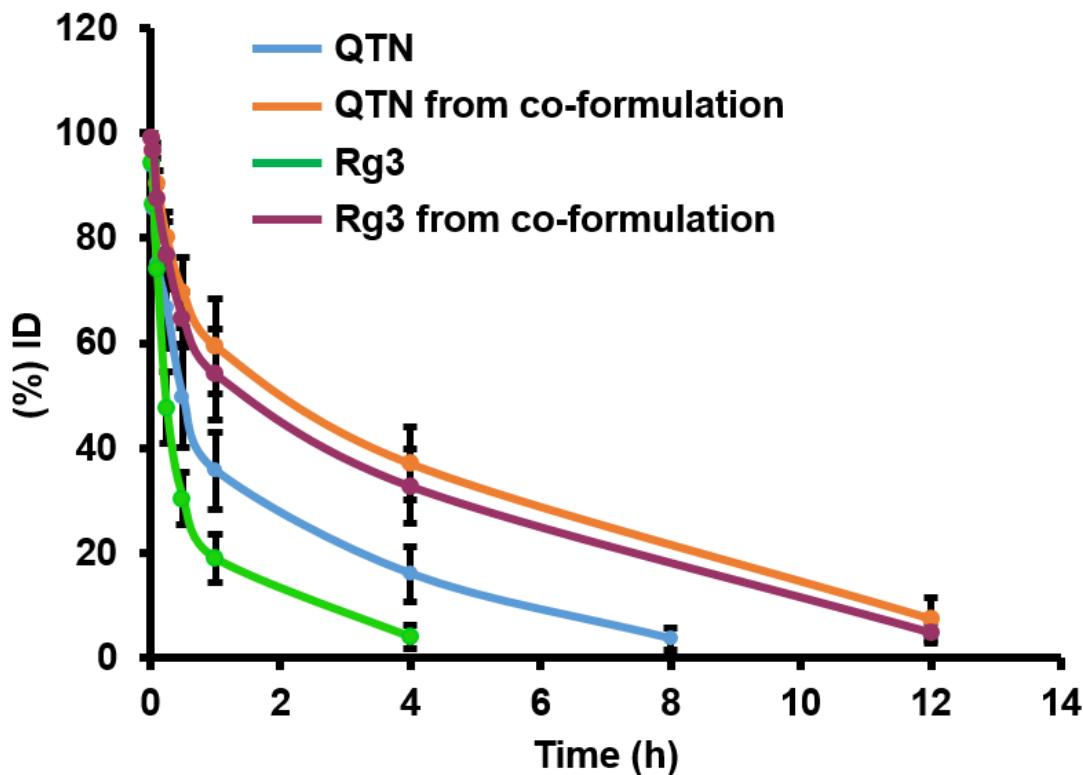


图 6.6 不同时间点 ($n=4$) 的血浆药物浓度图。

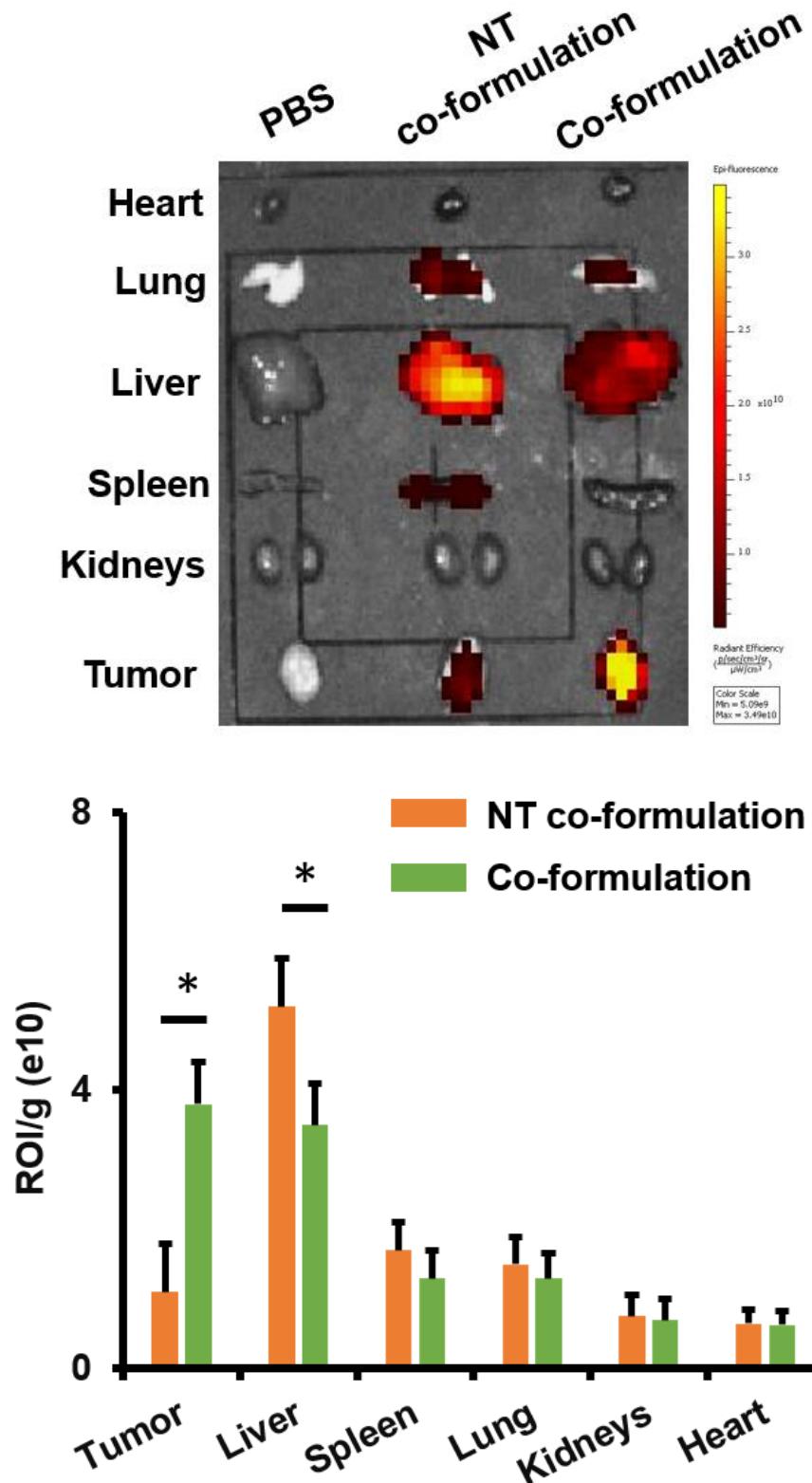


图 6.7 IVIS®活体光学系统 (n=4, *p<0.05) 检测 DiD 标记的 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂的生物分布 (640 nm/670 nm)。

6.4 本章小结

使用 NDDS 递送 ICD 诱导剂已表现出促进 TME 内免疫刺激作用的潜力，这通常伴随着免疫刺激细胞（例如 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、M1 巨噬细胞和 DC）、细胞因子（例如 IFN-γ、TNF-α 和 IL-12）和趋化因子（例如 CXCL9 和 CXCL10）。此外，据报道，干扰素基因 (STING) 的刺激控制 DNA 刺激的 IFN 依赖性免疫反应。使用 NDDS 递送 STING 诱导剂也显示出抗肿瘤免疫方面的重要前景。如前所述，NPs 可改善体循环；然而，它们通常无法实现细胞特异性靶向。NPs 可以在颗粒表面进一步功能化修饰，例如在表面增加使用肿瘤中独特或高度发现的受体/抗原的靶向配体。

目前，由于不良的药代动力学和非特异性肿瘤递送，化疗药物必须大剂量使用才能获得治疗效果，但这种过度治疗将导致严重的副作用。由于溶解度低、药代动力学差和非特异性组织分布，化疗药物的体内应用受到严重阻碍。最近，纳米给药系统的发展已经实现了高生物利用度、药物控制释放、延长系统循环和改善化疗药物的肿瘤分布 [192,208-210]。在本章研究中，CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂显著延长了循环时间并增强了对肿瘤病灶部位的递送，这表明 CD-PEG.FA-Rg3.QTN 制剂可能提供一种低剂量治疗策略，与 CD-PEG-Rg3.QTN 制剂相比，有更好的治疗 CRC 的效果。

第7章 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 与抗 PD-L1 抗体联合治疗结直肠癌研究

目前，有关专家已经对肿瘤发生发展与免疫系统的关系及相互作用研究了数十年。肿瘤的发生常与遗传基因突变有关，从而导致产生新的抗原，因此，肿瘤具有高度免疫原性，从而激发强烈的免疫反应。此外，肿瘤细胞能够逃脱免疫监视，罗伯特温伯格（Robert-Weinberg）认为，“避免免疫监视”是癌症最初六个特征之一^[208]。艾拉梅尔曼（IraMellman）提出了“癌症—免疫周期”这一正反馈反应的概念，累积免疫刺激因子能够放大适应性免疫反应从而打破了肿瘤细胞周期。抗肿瘤免疫治疗主要通过增强机体对抗肿瘤的免疫力，重新建立“癌症—免疫周期”来发挥作用。基于免疫学、分子生物学等的理论知识，肿瘤疫苗如 CAR-T 细胞治疗及免疫检查点抑制剂的治疗得到了迅速的发展并在临床应用中使用更加广泛。人体中所占表面积最大的系统是肠道系统，近期研究认为，因肠道接触抗原和免疫细胞，其也属于人体的免疫器官^[209]，其主要功能是维持菌群平衡和清除病原体，同时也是人体免疫系统的第一道防线，主要负责局部的免疫功能和参与全身免疫功能的调节。目前调查发现，CRC 的发病率和致死率逐年升高，与其他肿瘤相似，CRC 的发生发展也是一个多步骤、多因素参与的复杂过程，然而通过一系列的研究，未能清晰的发现对具体发展过程中产生的微观分子物质以及与肿瘤进展之间的相互作用^[213-218]。通过对免疫学和分子生物学的研究发现，肿瘤的恶化、转移、复发均与肿瘤细胞周期、凋亡有关，其中涉及多条信号通路和侵袭转移机制。随着对肿瘤免疫学研究的进一步加深，逐步发现肿瘤免疫逃逸与肿瘤的复发转移之间的关系，在 CRC 患者中，特别是晚期转移性 CRC 患者中，PD-1 / PD-L1 抑制剂能够延长患者生存期^[219-221]。然而，只有少部分的患者对 PD-1 / PD-L1 治疗敏感。因此，开发新的 T 细胞免疫治疗策略以及探索 PD-1 / PD-L1 在抗肿瘤治疗中可能的免疫机制可成为一种新的结直肠癌的治疗方法，与此同时，PD-1 / PD-L1 与抗肿瘤药联合应用也提供了一种新的治疗结直肠癌的方法。

CRC 是一种全球癌症相关死亡的第三大病因，同时也会带来严重的疾病负担。因此，需一种安全、可靠和有效适用的治疗手段。最近的癌症免疫学研究促进了不同免疫治疗策略的发展^[222-225]。其中，阻断免疫检查点途径的策略（例如细胞毒性 T 淋巴细胞

抗原 4 (CTLA-4) 和程序性死亡配体 1 (PD-L1)) 在一系列实体瘤中取得了良好的结果^{[223],[224]}。然而，有关研究发现，只有少数被确定为错配修复 (MMR) 缺陷型 CRC 的患者（高达 CRC 人群的 15%）对免疫检查点阻断疗法有积极反应，而 MMR 的 CRC 患者的反应率仍然很低^[228-233]。这种失败主要归因于肿瘤微环境 (TME) 的免疫抑制特性^{[231],[232]}。因此，设计用于重塑 TME 的方法可能会提高免疫检查点抑制剂的治疗效果，有可能为广泛的 CRC 患者提供治疗益处^[233]。

7.1 实验材料

7.1.1 实验仪器

全自动雪花制冰机	常熟雪科电器有限公司
高速冷冻离心机	Eppendorf 有限公司
移液器	Thermo (美国) 公司
超净工作台	北京东联哈尔仪器制造有限公司
倒置显微镜	Olympus (日本) 公司
CO ₂ 培养箱	SANYO (日本) 公司

7.1.2 实验试剂与药品

娃哈哈纯净水	杭州娃哈哈集团有限公司
PBS	美国 Corning 公司
RPMI 1640 细胞培养基	美国 Corning 公司
0.25%胰酶-EDTA	美国 Corning 公司
FBS	以色列 Biological Industries 公司
青-链霉素双抗	以色列 Biological Industries 公司
台盼蓝	北京索莱宝科技有限公司
人参皂苷 Rg3	成都德斯生物技术有限公司
槲皮素	成都德斯生物技术有限公司

7.2 实验方法

7.2.1 抗肿瘤效果

采用 BALB/小鼠作为研究对象。当肿瘤生长约为 5 至 1×10^9 p/s/cm²/sr 时, 用抗 PD-L1 (Bioxcell, 100 μg/只小鼠, i.p.)、CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂 (10 mg/kg Rg3 和 4 mg/kg QTN/只小鼠, i.v.) 或抗 PD-L1+CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂组合治疗小鼠 (n=5)。使用 IVIS®活体光学系统监测肿瘤生长。健康 BALB/c 小鼠使用图 7 (n=5) 所述的 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂进行治疗。定期记录体重。

7.2.2 体内细胞凋亡检测

分别在两次注射后 2 天^[115-119], 收集肿瘤进行以下研究: 细胞凋亡。肿瘤 (n=3) 用 4%PFA 固定, 在石蜡包埋的玻片上进行, 并渗透^{[192],[208]}。使用 TransDetect®荧光素 TUNEL 细胞凋亡试剂盒检测 DNA 片段, 并使用 DAPI 对细胞核进行染色, 以进行共聚焦显微镜分析。

7.2.3 免疫细胞检测

检测免疫细胞的测量。使用胶原酶 A (1 mg/mL; Sigma) 和 DNase (200 μg/mL; Invitrogen) 裂解组织^{[192],[208]}, 使肿瘤 (n=4) 组织产生单个细胞。使用 ACK 缓冲液去除红细胞后, 用荧光标记抗体 (孵育细胞, 使用 4%PFA 固定, 并使用 BD FACSCalibur 分析)。

7.2.4 qPCR

细胞因子和趋化因子的测定。肿瘤 (n=4) 在 TriZol-Up 试剂内使用组织研磨机 (中国镇江市科学兹) 均质化。匀浆收集上清液进行 RT-PCR。使用 TransScript®第一链 cDNA 合成 SuperMix 试剂盒生成第一链 cDNA。通过 StepOnePlusTM 实时 PCR 系统使用 TransStart®Top Green qPCR SuperMix 试剂盒(TransGen Biotech)进行定量实时 RT-PCR。进行反应: 94°C 下 30 s, 94°C 下 5 s 的 45 个循环, 60°C 下 30 s。下表 7.1 中列出了引物。

表 7.1 本研究中用于 RT-PCR 的引物。

引物	目录号
IFN- γ	Mm01168134_m1
IL-12	Mm00434169_m1
CXCL9	Mm00434946_m1
CXCL10	Mm00445235_m1
IL-4	Mm00445259_m1
IL-6	Mm00446190_m1
IL-10	Mm01288386_m1
GAPDH	Mm99999915_g1

7.2.5 T 细胞耗竭研究

T 细胞耗竭研究如先前报告所述^{[192],[208]}。简而言之，在治疗 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂（10 mg/kg Rg3 和 4 mg/kg QTN）之前，每只小鼠腹腔注射 100 μ g 抗 CD4（克隆 GK1.5）、抗 CD8（克隆 53-6.72）或 IgG（多克隆）抗体（图 8H）。使用 IVIS® 活体光学系统（n=4）监测肿瘤生长情况。

7.3 实验结果和讨论

7.3.1 体内抗肿瘤

为了研究低剂量 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂的治疗潜力（制剂含有 Rg3(10 mg/kg) 和 QTN (4 mg/kg)，MR 在本研究中选择了 1:1），使用原位 CT26-Luc 的 CRC 小鼠模型评估化疗免疫治疗效果。图 7.1 的结果显示，与 PBS 相比，在较高剂量（25 mg/kg Rg3 和 10 mg/kg QTN）下，自由药物组合未实现显著的肿瘤生长；当分别使用 50 mg/kg 和 20 mg/kg 剂量的 Rg3 和 QTN 时，观察到毒性体征。相反，CD-PEG-Rg3.QTN 制剂治疗后，肿瘤生长显著抑制 ($p<0.05$)。与游离药物组合相比，CD-PEG-Rg3.QTN 制剂减慢了治疗速度，而 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂进一步提高了治疗效果 ($p<0.05$)（图 7.1）。这些结果证实，CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂实现了 FA 介导的递送效果，并且与较高剂量的游离药物相比，在较低剂量下可显著提高治疗效果。基于这些结果，含有 Rg3 (10 mg/kg) 和 QTN (4 mg/kg) 的 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂被选择与抗 PD-L1

联合治疗。

在诊断为 MMR 阳性的 CRC 患者中，免疫检查点阻断的应答率仍然较低^[122]。事实上，在原位 CRC 小鼠模型中，与 PBS 相比，抗 PD-L1 不能产生抗肿瘤效果（用 CT26 肿瘤模型建立，其特征为 MSS-CRC 细胞系^{[114],[120]}（图 7.2 和 7.3），这与之前观察到的结果相似^[234]）。相比之下，CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂的抗肿瘤效果显著（ $p<0.01$ ）优于单独抗 PD-L1。值得注意的是，“CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂+抗 PD-L1”的组合进一步（ $p<0.05$ ）提高了相对于单独靶向 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 的治疗效果。因此，CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂+抗 PD-L1 联合策略显著延长了模型小鼠的生存期（PBS 约为 38 天、抗 PD-L1 约为 40 天、靶向 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 约为 62 天）（图 7.4）。

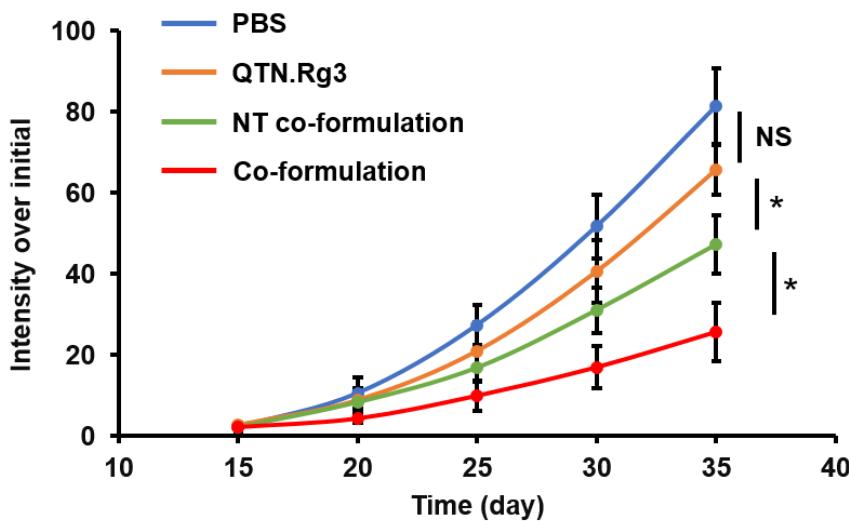


图 7.1 原位结直肠癌小鼠模型中 Rg3.QTN、CD-PEG.Rg3.QTN 制剂和 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 制剂的治疗效果。* $P<0.05$ ，NS=无显著性。

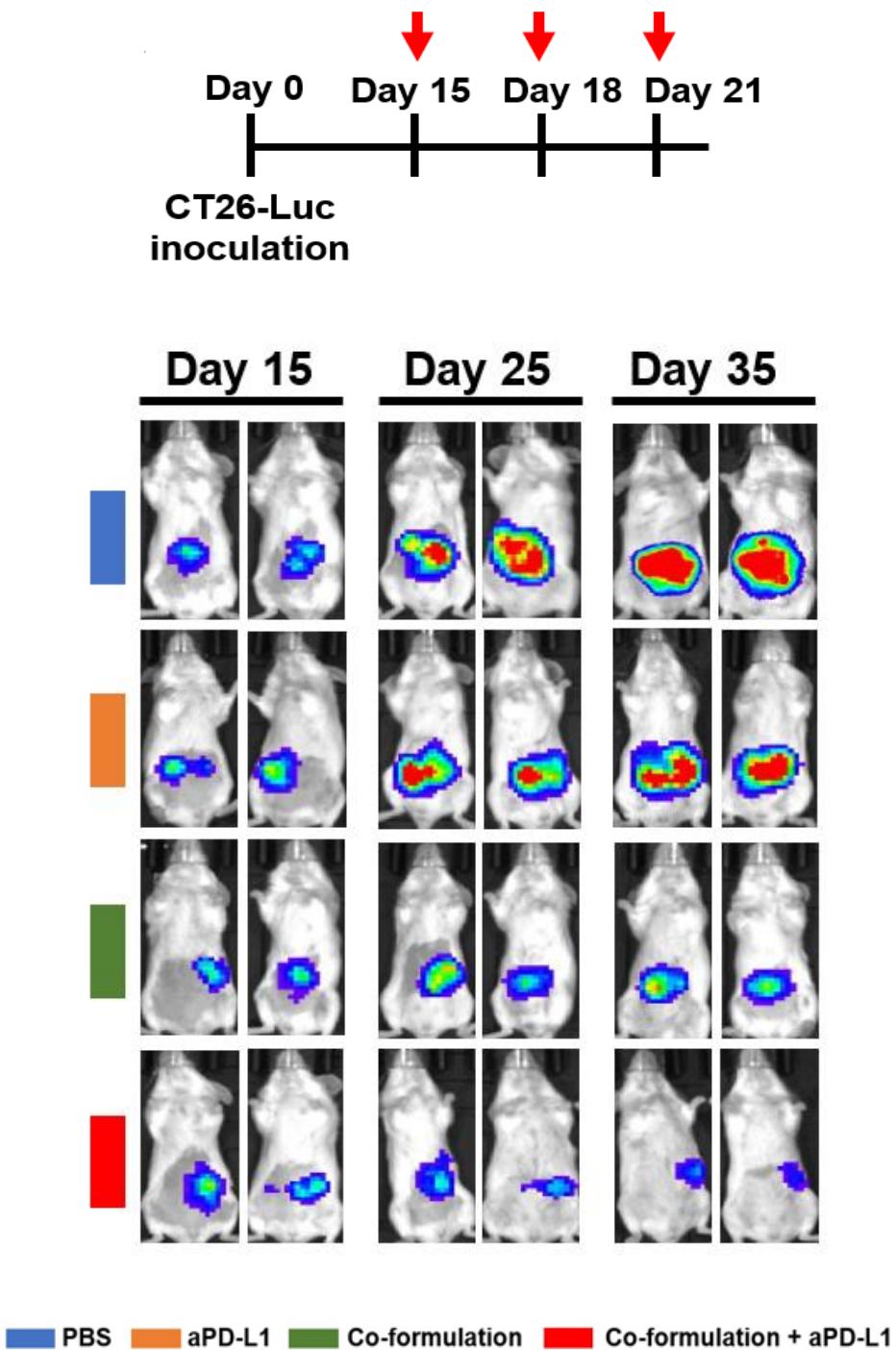


图 7.2 治疗后 IVIS 图像。

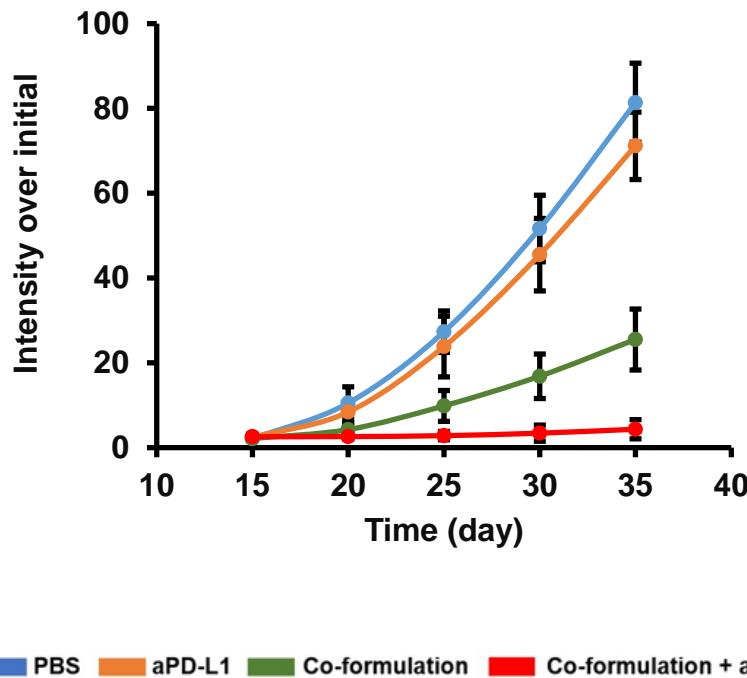


图 7.3 结直肠癌在 35 天内的生长情况 ($n=5$, * $P<0.05$ 和 ** $P<0.01$; ns=无显著性)。

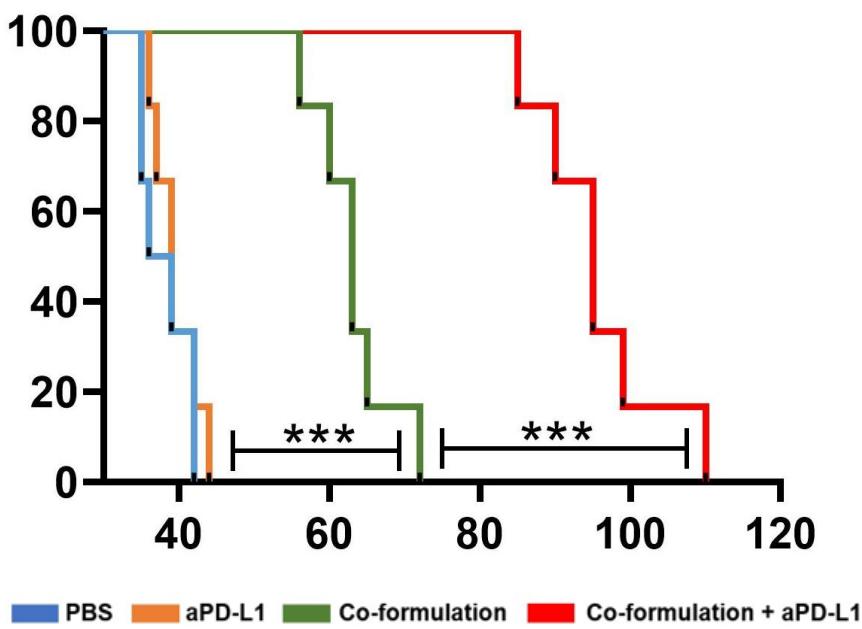


图 7.4 动物存活率 (中位存活率: PBS≈38 天, 抗 PD-L1≈40 天, 目标共同配方≈62 天, 和组合≈96 天) ($n=5$, ** $P<0.01$ 和 *** $P<0.001$)。

7.3.2 体内细胞凋亡

如图 7.5 免疫荧光染色结果所示, 抗 PD-L1 和 PBS 在凋亡肿瘤细胞中未检测到差

异，而 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂显著诱导肿瘤细胞凋亡 ($P<0.05$ ；凋亡约 11%)。PD-L1 和 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂联合策略进一步 ($P<0.05$) 增强了肿瘤细胞的凋亡 (凋亡约 27%)。

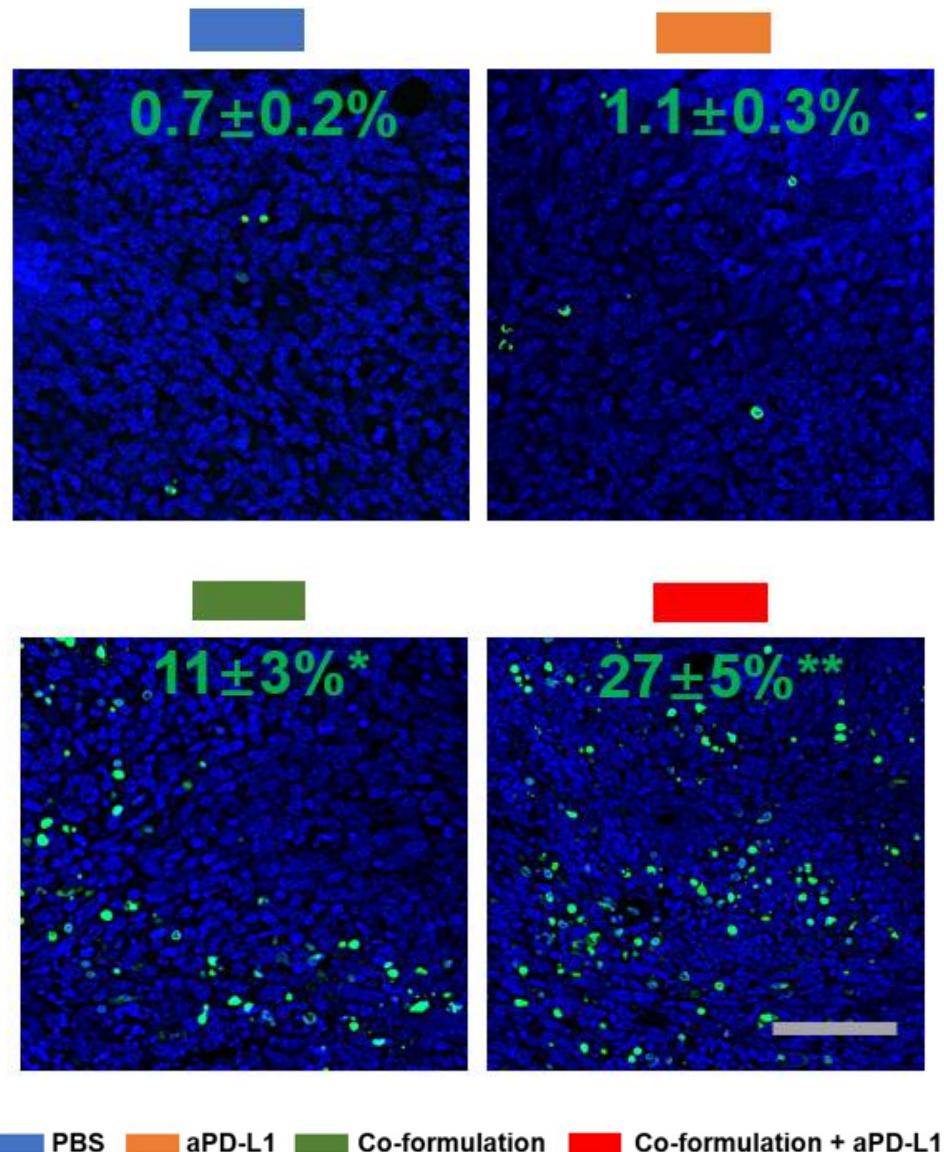
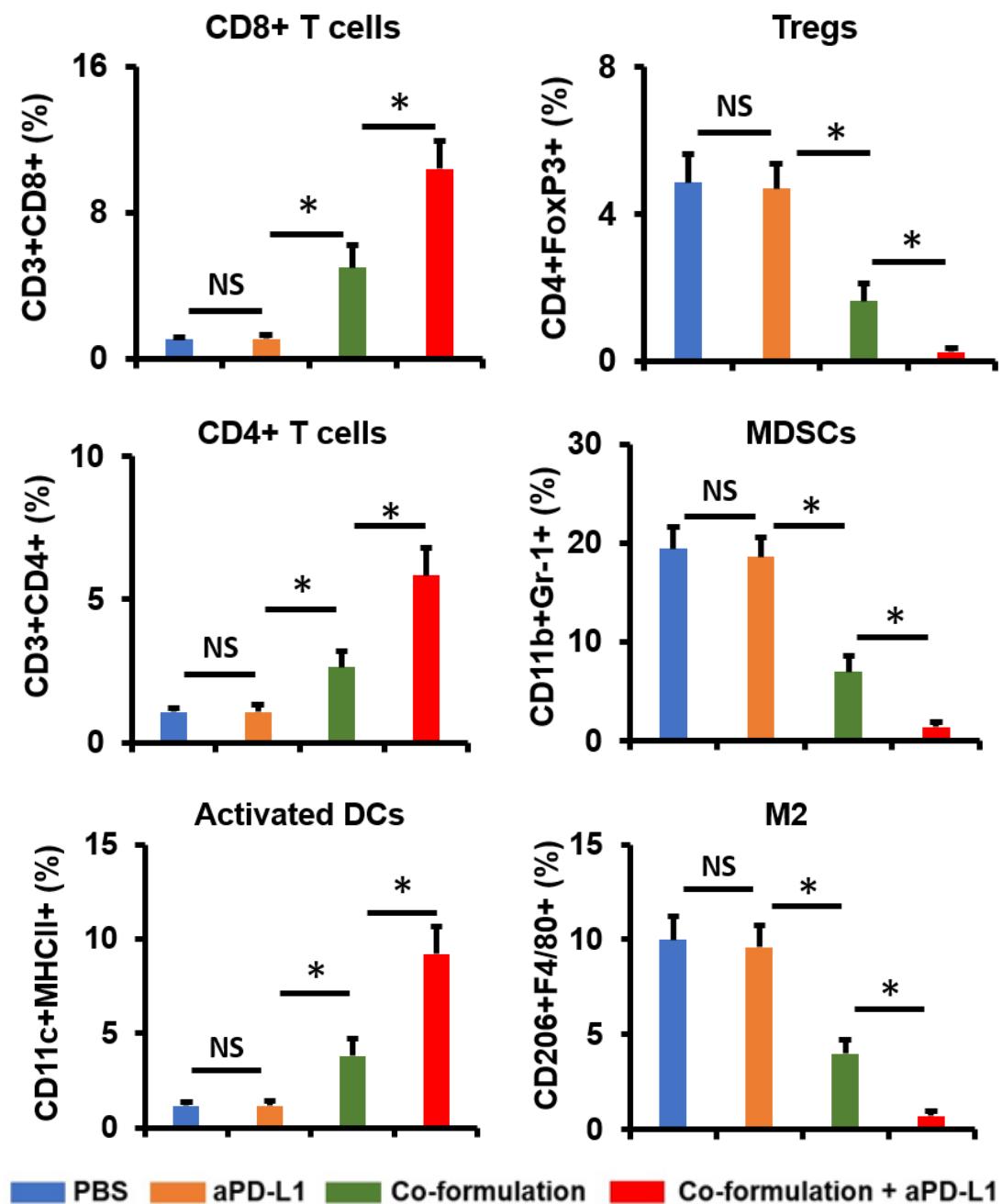


图 7.5 检测肿瘤中的细胞凋亡情况（第 20 天）（绿色=DNA 片段，蓝色=细胞核），
(bar=50 μ m)（相对于 PBS, n=3, * $P<0.05$ 和 ** $P<0.01$ ）。

7.3.3 体内免疫细胞分析

如图 7.6 所示，与 PBS、抗 PD-L1 或单独的 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂相比，TME 通过抗 PD-L1 和 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂组合策略显著地重塑。通过 PD-L1 + CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂联合治疗策略，免疫刺激细胞如 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞

和活化的 DC 在肿瘤内显著上调 ($p<0.05$)。



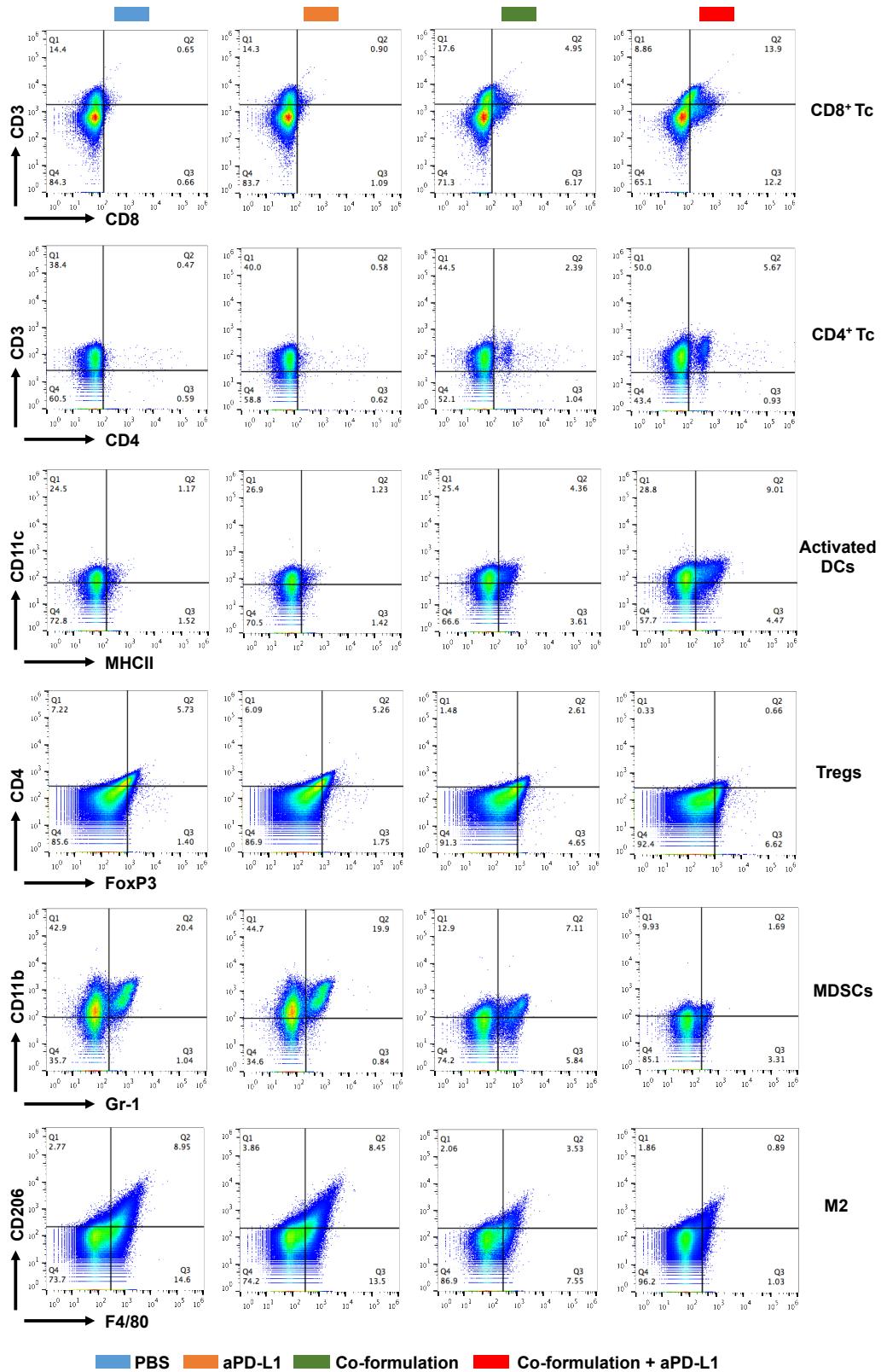


图 7.6 使用流式细胞术分析第 20 天肿瘤中的免疫细胞情况 ($n=4$, * $P<0.05$ 和 ** $P<0.01$; NS=0.05)。

7.3.4 qPCR

伴随着 IFN- γ 、IL-12、CXCL9 和 CXCL10 的增加 (IFN- γ 和 IL-12 负责激活抗肿瘤免疫^[235])，CXCL9 和 CXCL10 对肿瘤部位的 T 细胞浸润起积极作用^[236] (图 7.7)。此外，免疫抑制细胞如调节性 T 细胞 (Tregs)、髓源性抑制细胞 (MDSCs) 和肿瘤相关巨噬细胞 (M2) 通过抗 PD-L1 和 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂联合治疗后在肿瘤内显著下调，并伴有 IL-4、IL-6 和 IL-10 的降低 (它们促进免疫抑制细胞的激活^[159])。

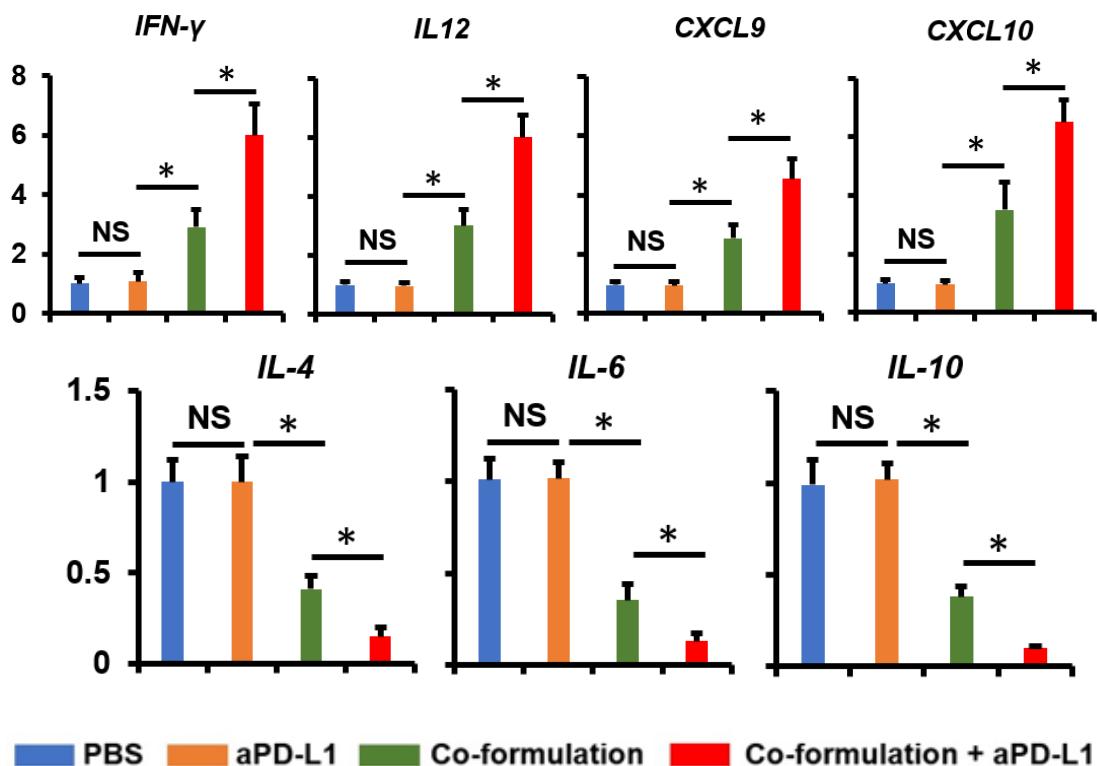


图 7.7 采用实时荧光定量 RT-PCR ($n=4$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; NS=0.05) 分析肿瘤细胞因子和趋化因子的 mRNA 表达。

7.3.5 T 细胞耗竭

ICD 介导的抗肿瘤免疫依赖于效应 T 细胞的激活^[113]。当原位 CRC 小鼠在使用抗 CD4⁺或 CD8⁺T 细胞抗体后注射 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂时，抗癌效果显著消失 (图 7.8)。相反，CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂的治疗效果不受同种型 IgG 抗体预处理的影响，证实了靶向 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 在诱导 T 细胞介导的抗结直肠癌免疫反应中的作用。

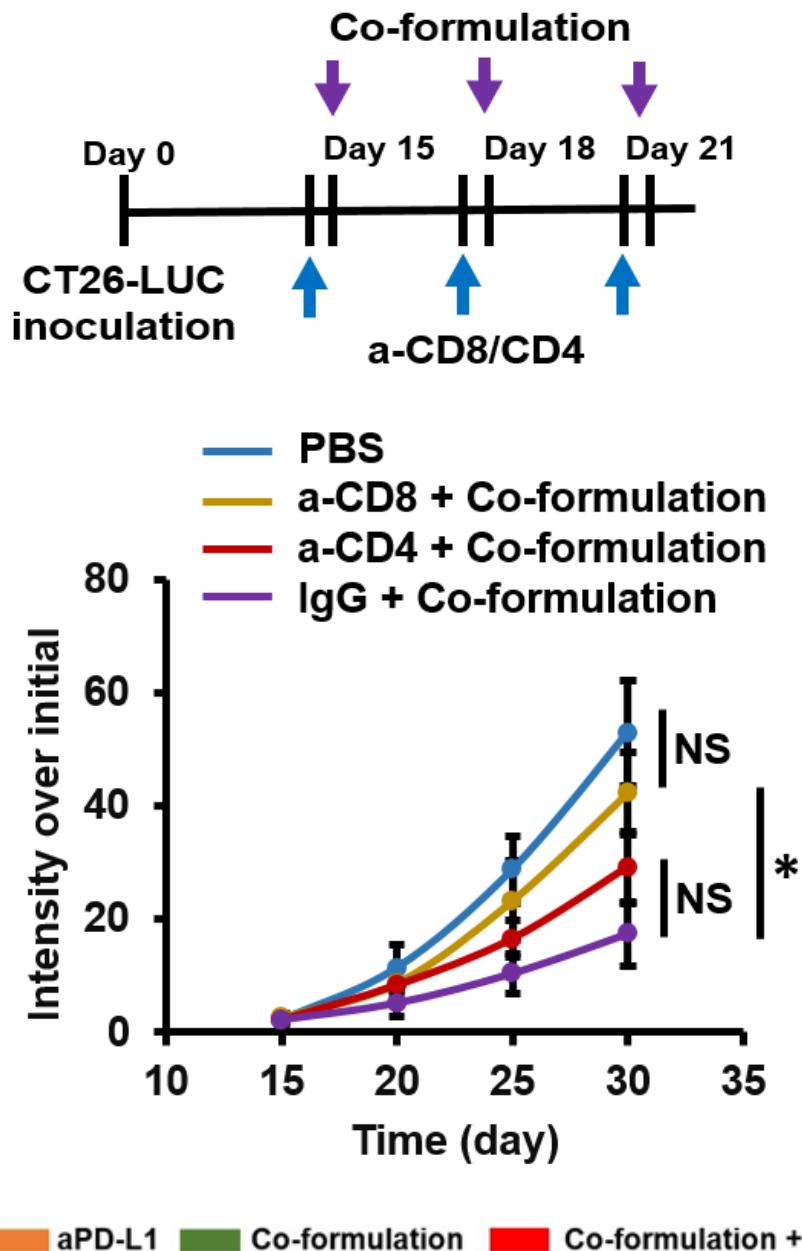


图 7.8 使用抗 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞抗体后给予 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 治疗情况 (n=4, *P<0.05 和 **P<0.01; NS=无显著性)。

7.4 本章小结

在 CRC 患者中，特别是晚期转移性 CRC 患者中，PD-1 / PD-L1 抑制剂能够延长患者生存期，然而，只有少部分的患者对 PD-1 / PD-L1 治疗敏感。因此，开发新的 T 细胞免疫治疗策略以及探索 PD-1 / PD-L1 在抗肿瘤治疗中可能的免疫机制可成为一种新的结直肠癌的治疗方法，与此同时，PD-1 / PD-L1 与抗肿瘤药联合应用也提供了一

种新的治疗结直肠癌的方法。

本章使用原位 CT26-Luc 的 CRC 小鼠模型评估化疗免疫治疗效果。结果显示，与 PBS 相比，在较高剂量（25 mg/kg Rg3 和 10 mg/kg QTN）下，自由药物组合未实现显著的肿瘤生长，而 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂进一步提高了治疗效果，且“CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂 + 抗 PD-L1”的组合进一步提高了相对于单独靶向 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 的治疗效果；PD-L1 和 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂联合策略也进一步增强了体内肿瘤细胞的凋亡；抗 PD-L1 和 CD-PEG-FA-Rg3.QTN 制剂组合策略使正向调控免疫细胞增加，负向调控免疫细胞减少。

综上所述，靶向 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 制剂能够诱导 ICD（T 细胞介导的免疫原性反应）对免疫抑制性 TME 进行重塑，同时，与 PD-L1 联合使用时显著提高了治疗效果，为结直肠癌患者提供了一种有希望的治疗策略。

第8章 全文总结与研究展望

8.1 全文结论

本文证明 Rg3 是 ICD 的诱导剂，QTN 通过增加 ROS 产生增强原位 CRC 小鼠模型的化学免疫治疗效果。因此，识别新出现的 ICD 诱导药物越来越受到重视，这将促进基于 ICD 的癌症免疫治疗，并与免疫检查点阻断疗法产生协同抗体内结直肠癌效果。

1、通过研究 ICD 发生过程及生物标记物，证明 Rg3 诱导 ICD 的潜力。结果表明，Rg3 可有效的刺激 CRC 细胞（CT26 和 HCT116）发生内质网应激和细胞凋亡。在内质网应激发生时，Rg3 诱导钙网蛋白（calreticulin, CRT）从内质网转运至细胞膜表面；在细胞发生 ICD 时，Rg3 诱导三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）的分泌；在凋亡后期，Rg3 促使高迁移率族蛋白 B1（high mobility group protein B1, HMGB1）释放到细胞外。因此，上述结果证明了 Rg3 具有诱导 ICD 的作用。

2、槲皮素（QTN）可以引发活性氧（ROS）的产生，ROS 可以诱导细胞死亡，且通过反向验证，加入 ROS 抑制剂后，细胞死亡明显减少，证明 QTN 诱导肿瘤细胞死亡是通过产生 ROS 介导。

3、本文利用两种化疗药物用于肿瘤治疗，这一协同作用机制其效应往往大于各药物单用的总和，其不仅能够发挥单个药物的作用，显著发挥药物的抗肿瘤活性，并能够减少单个药物的使用剂量，降低药物毒副作用。因此，体外筛选 Rg3 和 QTN 联合的最佳比例可以为后续体内治疗提供最佳条件。通过 MTT 实验结果可知 Rg3 和 QTN 摩尔比为 1: 1 时协同效果最佳。

4、本文采用改性环糊精作为递送载体，通过电位粒径和稳定性等考察，可知本文制备的 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 制剂粒径小且均一、分散性良好，并具有很好的稳定性。

5、通过激光共聚焦和流式共同确定 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 制剂可以被细胞摄取，且效果比 Rg3.QTN 和 CD-PEG-Rg3.QTN 更好。进一步采用划痕实验和细胞克隆形成实验判断细胞迁移和修复能力，结果可知 CD-PEG-FA.Rg3.QTN 制剂抑制细胞迁移能力更强。

6、目前，由于不良的药代动力学和非特异性肿瘤递送，化疗药物必须大剂量使用才能获得治疗效果，但这种过度治疗将导致严重的副作用。在这项研究中，靶向

CD-PEG.FA.Rg3.QTN 显著延长了循环时间并增强了对肿瘤的递送，表明靶向 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 可能提供一种低剂量策略，与游离的非处方药物相比，有更好的治疗结直肠癌效果。在以下体内研究中，探究了靶向 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 与抗 PD-L1 联合的化学免疫治疗效果。

7、靶向 CD-PEG.FA.Rg3.QTN 能够诱导 ICD（T 细胞介导的免疫原性反应）对免疫抑制性 TME 进行重新编程，这在与 PD-L1 联合使用时显著提高了治疗效果，为结直肠癌患者提供了一种有希望的治疗策略。

8.2 本文创新点

1. 揭示人参皂苷 Rg3 (Rg3) 是免疫原性细胞死亡 (ICD) 的诱导剂，证实 Rg3 通过诱导结直肠癌 (CRC) 细胞发生 ICD 激活适应性免疫应答。
2. 提出“Rg3+QTN”组方策略，采用槲皮素 (QTN) 刺激 CRC 细胞产生活性氧 (ROS)，以促进 Rg3 的 ICD 功效。
3. 构建基于环糊精的载双药纳米粒提高药物半衰期靶向递送药物至 CRC 细胞，改善免疫耐受肿瘤微环境，增强 PD-L1 抗体的抗 CRC 疗效。

参考文献

- [1] Biller L H, Schrag D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review[J]. *Jama*, 2021, 325(7): 669-685.
- [2] Nagata S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells[J]. *Annual review of immunology*, 2018, 36: 489-517.
- [3] Nagata S, Tanaka M. Programmed cell death and the immune system[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2017, 17(5): 333-340.
- [4] Montico B, Nigro A, Casolaro V, et al. Immunogenic apoptosis as a novel tool for anticancer vaccine development[J]. *International journal of molecular sciences*, 2018, 19(2): 594.
- [5] Gao J, Wang W, Pei Q, et al. Engineering nanomedicines through boosting immunogenic cell death for improved cancer immunotherapy[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2020, 41(7): 986-994.
- [6] Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, et al. Immunogenic cell death in cancer therapy[J]. *Annual review of immunology*, 2013, 31: 51-72.
- [7] Zhou J, Wang G, Chen Y, et al. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers[J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2019, 23(8): 4854-4865.
- [8] Endoplasmic Reticulum Stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications[J]. *Febs Journal*, 2018, 286(2): 241-278.
- [9] Hafiz Z, Geum L, Hyung-Ryong K, et al. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(3): 327.
- [10] Panaretakis, Theocharis, Kepp, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death[J]. *The EMBO journal*, 2009, 28(5): 578-590.
- [11] Chao M P, Jaiswal S, Weissman-Tskamoto R, et al. Calreticulin Is the Dominant Pro-Phagocytic Signal on Multiple Human Cancers and Is Counterbalanced by CD47[J]. *Science Translational Medicine*, 2010, 2(63): 63ra94.

- [12] Pawaria S, Binder R J. CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization[J]. *Nature Communications*, 2011, 2: 521.
- [13] Garg A D, Dudek A M, Ferreira G B, et al. ROS-induced autophagy in cancer cells assists in evasion from determinants of immunogenic cell death[J]. *Autophagy*, 2013, 9(9): 1292-1307.
- [14] Liu Y, Guo J, Huang L. Modulation of tumor microenvironment for immunotherapy: focus on nanomaterial-based strategies[J]. *Theranostics*, 2020, 10(7): 3099-3117.
- [15] Giampazolias E, Zunino B, Dhayade S, et al. Mitochondrial permeabilization engages NF- κ B-dependent anti-tumour activity under caspasedeficiency[J]. *Nature Cell Biology*, 2017, 19(9): 1116-1129.
- [16] Kroemer G, Mario G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response[J]. *Molecular Cell*, 2010, 40(2): 280-293.
- [17] Michaud M, Martins I, Sukkurwala A Q, et al. Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice[J]. *Autophagy*, 2012, 334(3): 1573-1577.
- [18] F Ghiringhelli, Apetoh L, Tesniere A, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors[J]. *Nature Medicine*, 2009, 15(10): 1170-1178.
- [19] Garg A D, Krysko D V, Verfaillie T, et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death[J]. *Embo Journal*, 2014, 31(5): 1062-1079.
- [20] Livesey K M, Kang R, Vernon P, et al. p53/HMGB1 Complexes Regulate Autophagy and Apoptosis[J]. *Autophagy*, 2012, 72(8): 1996-2005.
- [21] Zhu X, Messer J S, Wang Y, et al. Cytosolic HMGB1 controls the cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2015, 125(3): 1098-1110.
- [22] Shiratsuchi A, Watanabe I, Takeuchi O, et al. Inhibitory Effect of Toll-Like Receptor 4 on Fusion between Phagosomes and Endosomes/Lysosomes in Macrophages[J]. *Journal of Immunology*, 2004, 172(4): 2039-2047.

- [23] Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy[J]. *Nature Medicine*, 2007, 13(9): 1050-1059.
- [24] Galluzzi L, A Buqué, Kepp O, et al. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2017, 17(2), 97-111.
- [25] Qiang W, X Ju, J Wang, et al. Immunogenic cell death in anticancer chemotherapy and its impact on clinical studies[J]. *Cancer Letters*, 2018, 438: 17-23.
- [26] Asadzadeh Z, Safarzadeh E, Safaei S, et al. Current Approaches for Combination Therapy of Cancer: The Role of Immunogenic Cell Death[J]. *Cancers*, 12(4): 1047.
- [27] Tala S, Sandrine V W, Christophe C, et al. Paradigm shift in oncology: targeting the immune system rather than cancer cells[J]. *Mutagenesis*, 2015(2): 205-211.
- [28] Casares N, Pequignot M O, Tesniere A, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death[J]. *The Journal of experimental medicine*, 2005, 202(12): 1691-1701.
- [29] Menger L, Vacchelli E, Adjemian S, et al. Cardiac Glycosides Exert Anticancer Effects by Inducing Immunogenic Cell Death[J]. *Science Translational Medicine*, 2012, 4 (143): 1-10.
- [30] Obeid M, Tesniere A, F Ghiringhelli, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death[J]. *Nature Medicine*, 2007, 13(1): 54-61.
- [31] Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin[J]. *Oncogene*, 2009, 29(4): 482-491.
- [32] Spisek R, Charalambous A, Mazumder A, et al. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications[J]. *Blood*, 2007, 109(11): 4839-4845.
- [33] Schiavoni G, Sistigu A, Valentini M, et al. Cyclophosphamide Synergizes with Type I Interferons through Systemic Dendritic Cell Reactivation and Induction of Immunogenic Tumor Apoptosis[J]. *Cancer Research*, 2011, 71(3): 768-778.
- [34] Chen H M, Wang P H, Chen S S, et al. Shikonin induces immunogenic cell death in

- tumor cells and enhances dendritic cell-based cancer vaccine[J]. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2012, 61(11): 1989-2002.
- [35] Galluzzi L, Vitale I, Warren S, et al. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death[J]. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2020, 8(1): e000337.
- [36] Guo J, Yu Z, Das M, et al. Nano Codelivery of Oxaliplatin and Folinic Acid Achieves Synergistic Chemo-Immunotherapy with 5-Fluorouracil for Colorectal Cancer and Liver Metastasis[J]. *ACS Nano*, 2020, 14 (4), 5075-5089.
- [37] Yu Z, Guo J, Hu M, et al. Icaritin exacerbates mitophagy and synergizes with doxorubicin to induce immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma[J]. *ACS nano*, 2020, 14(4): 4816-4828.
- [38] Chen Y, Song W, Shen L, et al. Vasodilator hydralazine promotes nanoparticle penetration in advanced desmoplastic tumors[J]. *ACS nano*, 2019, 13(2): 1751-1763.
- [39] Pozzi C, Cuomo A, Spadoni I, et al. The EGFR-specific antibody cetuximab combined with chemotherapy triggers immunogenic cell death[J]. *Nature medicine*, 2016, 22(6): 624-631.
- [40] Hossain D M S, Javaid S, Cai M, et al. Dinaciclib induces immunogenic cell death and enhances anti-PD1-mediated tumor suppression[J]. *The Journal of clinical investigation*, 2018, 128(2): 644-654.
- [41] Dudek-Perić A M, Ferreira G B, Muchowicz A, et al. Antitumor immunity triggered by melphalan is potentiated by melanoma cell surface-associated calreticulin[J]. *Cancer research*, 2015, 75(8): 1603-1614.
- [42] Sukkurwala A Q, Adjemian S, Senovilla L, et al. Screening of novel immunogenic cell death inducers within the NCI Mechanistic Diversity Set[J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3(4): e28473.
- [43] Bezu L, Sauvat A, Humeau J, et al. eIF2 α phosphorylation is pathognomonic for immunogenic cell death[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2018, 25(8): 1375-1393.
- [44] Martins I, Kepp O, Schlemmer F, et al. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress[J]. *Oncogene*, 2011, 30(10):

1147-1158.

- [45]Guo J, Huang L. Membrane-core nanoparticles for cancer nanomedicine[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2020, 156: 23-39.
- [46]Choi H S, Liu W, Misra P, et al. Renal clearance of quantum dots[J]. Nature biotechnology, 2007, 25(10): 1165-1170.
- [47]Longmire M, Choyke P L, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats[J]. 2008.
- [48]Braet F, Wisse E, Bomans P, et al. Contribution of high-resolution correlative imaging techniques in the study of the liver sieve in three-dimensions[J]. Microscopy research and technique, 2007, 70(3): 230-242.
- [49]Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery[J]. Nature biotechnology, 2015, 33(9): 941-951.
- [50]Suk J S, Xu Q, Kim N, et al. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery[J]. Advanced drug delivery reviews, 2016, 99: 28-51.
- [51]Tan S, Wu T, Zhang D, et al. Cell or cell membrane-based drug delivery systems[J]. Theranostics, 2015, 5(8): 863-881.
- [52]Piao J G, Wang L, Gao F, et al. Erythrocyte membrane is an alternative coating to polyethylene glycol for prolonging the circulation lifetime of gold nanocages for photothermal therapy[J]. ACS nano, 2014, 8(10): 10414-10425.
- [53]Kobayashi H, Watanabe R, Choyke P L. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target?[J]. Theranostics, 2014, 4(1): 81-89.
- [54]Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect[J]. Advanced drug delivery reviews, 2011, 63(3): 136-151.
- [55]Park J, Choi Y, Chang H, et al. Alliance with EPR effect: Combined strategies to improve the EPR effect in the tumor microenvironment[J]. Theranostics, 2019, 9(26): 8073-8090.
- [56]Majumder J, Taratula O, Minko T. Nanocarrier-based systems for targeted and site

- specific therapeutic delivery[J]. Advanced drug delivery reviews, 2019, 144: 57-77.
- [57] Natfji A A, Ravishankar D, Osborn H M I, et al. Parameters affecting the enhanced permeability and retention effect: the need for patient selection[J]. Journal of pharmaceutical sciences, 2017, 106(11): 3179-3187.
- [58] Prabhakar U, Mae Da H, Jain R K, et al. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology[J]. Cancer Research, 2013, 73(8): 2412-2417.
- [59] Miller M A, Arlauckas S, Weissleder R. Prediction of anti-cancer nanotherapy efficacy by imaging[J]. Nanotheranostics, 2017, 1(3): 296-312.
- [60] Moghimi S M, Simberg D. Nanoparticle transport pathways into tumors[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2018, 20(6): 1-4.
- [61] Nel A, Ruoslahti E, Meng H. New Insights into "Permeability" as in the Enhanced Permeability and Retention Effect of Cancer Nanotherapeutics[J]. Acs Nano, 2017, 11(10): 9567-9569.
- [62] Sindhwani S, Syed A M, Ngai J, et al. The entry of nanoparticles into solid tumours[J]. Nature materials, 2020, 19(5): 566-575.
- [63] Dewhirst M W, Secomb T W. Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue[J]. Nature Reviews Cancer, 2017, 17(12): 738-750.
- [64] Neesse A, Algül H, Tuveson D A, et al. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm[J]. Gut, 2015, 64(9): 1476-1484.
- [65] Han X, Li Y, Xu Y, et al. Reversal of pancreatic desmoplasia by re-educating stellate cells with a tumour microenvironment-activated nanosystem[J]. Nature communications, 2018, 9(1): 1-18.
- [66] Ishikawa H, Ma Z, Barber G N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity[J]. Nature, 2009, 461(7265): 788-792.
- [67] Su T, Zhang Y, Valerie K, et al. STING activation in cancer immunotherapy[J]. Theranostics, 2019, 9(25): 7759-7771.
- [68] Zhao X, Yang K, Zhao R, et al. Inducing enhanced immunogenic cell death with nanocarrier-based drug delivery systems for pancreatic cancer therapy[J]. Biomaterials,

2016, 102: 187-197.

- [69] Dai Phung C, Nguyen H T, Choi J Y, et al. Reprogramming the T cell response to cancer by simultaneous, nanoparticle-mediated PD-L1 inhibition and immunogenic cell death[J]. Journal of Controlled Release, 2019, 315: 126-138.
- [70] Feng B, Zhou F, Hou B, et al. Binary cooperative prodrug nanoparticles improve immunotherapy by synergistically modulating immune tumor microenvironment[J]. Advanced Materials, 2018, 30(38): 1803001-1803010.
- [71] Yan S, Zeng X, Tang Y, et al. Activating antitumor immunity and antimetastatic effect through polydopamine-encapsulated core-shell upconversion nanoparticles[J]. Advanced Materials, 2019, 31(46): 1905825.
- [72] 庞晓燕, 谭星, 郝秀静, 等. STING 信号通路的研究进展[J/OL]. 微生物学杂志: 1-8[2021-12-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1186.Q.20210802.1757.002.html>.
- [73] 陈洪博, 李凤, 赖文琰, 等. cGAS/STING 信号通路参与猪圆环病毒 2 型诱导猪肺泡巨噬细胞产生 I型干扰素[J]. 生物工程学报, 2021, 37(09): 3201-3210.
- [74] 张倩, 章越凡, 李铁军. cGAS-cGAMP-STING 通路在抗病毒中的作用[J]. 药学实践杂志, 2021, 39(06): 487-490+498.
- [75] Deng H, Zhou Z, Yang W, et al. Endoplasmic reticulum targeting to amplify immunogenic cell death for cancer immunotherapy[J]. Nano letters, 2020, 20(3): 1928-1933.
- [76] Li Q, Zhang D, Zhang J, et al. A three-in-one immunotherapy nanoweapon via cascade-amplifying cancer-immunity cycle against tumor metastasis, relapse, and postsurgical regrowth[J]. Nano letters, 2019, 19(9): 6647-6657.
- [77] Li W, Yang J, Luo L, et al. Targeting photodynamic and photothermal therapy to the endoplasmic reticulum enhances immunogenic cancer cell death[J]. Nature communications, 2019, 10(1): 1-16.
- [78] Yu W, He X, Yang Z, et al. Sequentially responsive biomimetic nanoparticles with optimal size in combination with checkpoint blockade for cascade synergetic treatment of breast cancer and lung metastasis[J]. Biomaterials, 2019, 217: 1193091-1193010.
- [79] Shae D, Becker K W, Christov P, et al. Endosomolytic polymersomes increase the

- activity of cyclic dinucleotide STING agonists to enhance cancer immunotherapy[J]. Nature nanotechnology, 2019, 14(3): 269-278.
- [80] Qiu Q, Li C, Song Y, et al. Targeted delivery of ibrutinib to tumor-associated macrophages by sialic acid-stearic acid conjugate modified nanocomplexes for cancer immunotherapy[J]. Acta biomaterialia, 2019, 92: 184-195.
- [81] Duan X, Chan C, Han W, et al. Immunostimulatory nanomedicines synergize with checkpoint blockade immunotherapy to eradicate colorectal tumors[J]. Nature communications, 2019, 10(1): 1-15.
- [82] Huang H, Jiang C T, Shen S, et al. Nanoenabled reversal of IDO1-mediated immunosuppression synergizes with immunogenic chemotherapy for improved cancer therapy[J]. Nano letters, 2019, 19(8): 5356-5365.
- [83] Kuai R, Yuan W, Son S, et al. Elimination of established tumors with nanodisc-based combination chemoimmunotherapy[J]. Science advances, 2018, 4(4): eaao1736.
- [84] Chen Q, Chen J, Yang Z, et al. Nanoparticle-enhanced radiotherapy to trigger robust cancer immunotherapy[J]. Advanced materials, 2019, 31(10): 1802228-18022212.
- [85] Chen Q, Liu L, Lu Y, et al. Tumor Microenvironment-Triggered Aggregated Magnetic Nanoparticles for Reinforced Image-Guided Immunogenic Chemotherapy[J]. Advanced Science, 2019, 6(6): 1802134.
- [86] Lu J, Liu X, Liao Y P, et al. Nano-enabled pancreas cancer immunotherapy using immunogenic cell death and reversing immunosuppression[J]. Nature communications, 2017, 8(1): 1-14.
- [87] Yang G, Xu L, Chao Y, et al. Hollow MnO₂ as a tumor-microenvironment-responsive biodegradable nano-platform for combination therapy favoring antitumor immune responses[J]. Nature communications, 2017, 8(1): 1-13.
- [88] Allen T M, Cullis P R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications[J]. Advanced drug delivery reviews, 2013, 65(1): 36-48.
- [89] Mishra V, Bansal K K, Verma A, et al. Solid lipid nanoparticles: Emerging colloidal nano drug delivery systems[J]. Pharmaceutics, 2018, 10(4): 191.
- [90] Wang Y, Miao L, Satterlee A, et al. Delivery of oligonucleotides with lipid

- nanoparticles[J]. Advanced drug delivery reviews, 2015, 87: 68-80.
- [91] Wong H L, Bendayan R, Rauth A M, et al. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles[J]. Advanced drug delivery reviews, 2007, 59(6): 491-504.
- [92] Li X, Jiang X. Microfluidics for producing poly (lactic-co-glycolic acid)-based pharmaceutical nanoparticles[J]. Advanced drug delivery reviews, 2018, 128: 101-114.
- [93] Cordeiro R A, Serra A, Coelho J F J, et al. Poly (β -amino ester)-based gene delivery systems: From discovery to therapeutic applications[J]. Journal of Controlled Release, 2019, 310: 155-187.
- [94] 张申武,单新竹,孙新新,等.基于纳米递送技术诱导肿瘤铁死亡的研究进展[J/OL].药学学报:1-19[2021-12-18]. <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2021-1152>.
- [95] 贤凤,程婉婷,高静.壳聚糖纳米粒子的制备方法及其作为药物递送载体的应用[J].化学试剂,2021,43(12):1615-1622.
- [96] 江文心,张华清,丁杨,等.抗肿瘤多药联用型纳米递送系统的研究进展[J/OL].药学学报:1-23[2021-12-18]. <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2021-0787>.
- [97] Bae Y, Kataoka K. Intelligent polymeric micelles from functional poly (ethylene glycol)-poly (amino acid) block copolymers[J]. Advanced drug delivery reviews, 2009, 61(10): 768-784.
- [98] Swierczewska M, Han H S, Kim K, et al. Polysaccharide-based nanoparticles for theranostic nanomedicine[J]. Advanced drug delivery reviews, 2016, 99: 70-84.
- [99] Cabral H, Miyata K, Osada K, et al. Block copolymer micelles in nanomedicine applications[J]. Chemical reviews, 2018, 118(14): 6844-6892.
- [100] Kim C S, Tonga G Y, Solfield D, et al. Inorganic nanosystems for therapeutic delivery: Status and prospects[J]. Advanced drug delivery reviews, 2013, 65(1): 93-99.
- [101] Prasad M, Lambe U P, Brar B, et al. Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 97: 1521-1537.
- [102] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA:

- a cancer journal for clinicians, 2018, 68(6): 394-424.
- [103] Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression[J]. Genes & development, 2018, 32(19-20): 1267-1284.
- [104] Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies[J]. Nature reviews Drug discovery, 2019, 18(3): 197-218.
- [105] 张申武,单新竹,孙新新,等.基于纳米递送技术诱导肿瘤铁死亡的研究进展[J/OL].药学学报:1-19[2021-12-18]. <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2021-1152>.
- [106] 刘博宁.免疫疗法是癌症的最终克星吗? [J].北京纪事,2021(11):104-105.
- [107] 张思汗,许斌.肿瘤免疫治疗药物的开发现状及展望[J].临床与病理杂志,2021,41(10):2447-2460.
- [108] Chen D S, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle[J]. immunity, 2013, 39(1): 1-10.
- [109] Dunn G P, Old L J, Schreiber R D. The three Es of cancer immunoediting[J]. Annu. Rev. Immunol., 2004, 22: 329-360.
- [110] 毛艳艳,刘丽丽,黄瑶庆.肿瘤免疫治疗新兴靶点[J].生命科学,2021,33(10):1225-1230.
- [111] Melero I, Gaudernack G, Gerritsen W, et al. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials[J]. Nature reviews Clinical oncology, 2014, 11(9): 509-524.
- [112] Hu Z, Ott P A, Wu C J. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer[J]. Nature Reviews Immunology, 2018, 18(3): 168-182.
- [113] Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, et al. Immunogenic cell death in cancer therapy[J]. Annual review of immunology, 2013, 31: 51-72.
- [114] Germano G, Lamba S, Rospo G, et al. Inactivation of DNA repair triggers neoantigen generation and impairs tumour growth[J]. Nature, 2017, 552(7683): 116-120.
- [115] Zhao X, Yang K, Zhao R, et al. Inducing enhanced immunogenic cell death with nanocarrier-based drug delivery systems for pancreatic cancer therapy[J]. Biomaterials, 2016, 102: 187-197.

- [116] Feng B, Zhou F, Hou B, et al. Binary cooperative prodrug nanoparticles improve immunotherapy by synergistically modulating immune tumor microenvironment[J]. Advanced Materials, 2018, 30(38): 1803001-1803010
- [117] Chen Q, Liu L, Lu Y, et al. Tumor Microenvironment-Triggered Aggregated Magnetic Nanoparticles for Reinforced Image-Guided Immunogenic Chemotherapy[J]. Advanced Science, 2019, 6(6): 1802134.
- [118] Li Q, Zhang D, Zhang J, et al. A three-in-one immunotherapy nanoweapon via cascade-amplifying cancer-immunity cycle against tumor metastasis, relapse, and postsurgical regrowth[J]. Nano letters, 2019, 19(9): 6647-6657.
- [119] Huang H, Jiang C T, Shen S, et al. Nanoenabled reversal of IDO1-mediated immunosuppression synergizes with immunogenic chemotherapy for improved cancer therapy[J]. Nano letters, 2019, 19(8): 5356-5365.
- [120] Song W, Shen L, Wang Y, et al. Synergistic and low adverse effect cancer immunotherapy by immunogenic chemotherapy and locally expressed PD-L1 trap[J]. Nature communications, 2018, 9(1): 1-11.
- [121] Ruiz-Bañobre J, Goel A. DNA mismatch repair deficiency and immune checkpoint inhibitors in gastrointestinal cancers[J]. Gastroenterology, 2019, 156(4): 890-903.
- [122] Sinicrope F A, Sargent D J. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications[J]. Clinical cancer research, 2012, 18(6): 1506-1512.
- [123] Park H J, Kim D H, Park S J, et al. Ginseng in traditional herbal prescriptions[J]. Journal of ginseng research, 2012, 36(3): 225.
- [124] Wei X, Chen J, Su F, et al. Stereospecificity of ginsenoside Rg3 in promotion of the immune response to ovalbumin in mice[J]. International immunology, 2012, 24(7): 465-471.
- [125] Wu K, Li N, Sun H, et al. Endoplasmic reticulum stress activation mediates Ginseng Rg3-induced anti-gallbladder cancer cell activity[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2015, 466(3): 369-375.
- [126] Xie Q, Wen H, Zhang Q, et al. Inhibiting PI3K-AKt signaling pathway is involved in

- antitumor effects of ginsenoside Rg3 in lung cancer cell[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 85: 16-21.
- [127] Pan X Y, Guo H, Han J, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates cell migration via inhibition of aquaporin 1 expression in PC-3M prostate cancer cells[J]. European journal of pharmacology, 2012, 683(1-3): 27-34.
- [128] Mohanan P, Subramaniyam S, Mathiyalagan R, et al. Molecular signaling of ginsenosides Rb1, Rg1, and Rg3 and their mode of actions[J]. Journal of Ginseng Research, 2018, 42(2): 123-132.
- [129] 庞煥, 文允镒. 质谱联用技术研究进展及其在药物分析中的最新应用[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(7): 433-435.
- [130] Freitas M N, Marchetti J M. Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases[J]. International journal of pharmaceutics, 2005, 295(1-2): 201-211.
- [131] Yeh M K, Chen J L, Chiang C H, et al. The preparation of sustained release erythropoietin microparticle[J]. Journal of microencapsulation, 2007, 24(1): 82-93.
- [132] 别黎, 毕春华, 王新, 等. 人参皂苷 Rg3-聚乳酸纳米粒诱导 U87-MG 凋亡和 Caspase-3 的表达[J]. 中风与神经疾病杂志, 2010, 27(11): 1002-1004.
- [133] 郭琪, 袁明慧, 郭宇飞. 人参皂苷 Rg3 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖和侵袭的影响[J]. 实用妇科内分泌杂志(电子版), 2018, 5(12): 8+10.
- [134] 王洪羽, 金宏, 刘威, 等. 人参皂苷 Rg3 抗肿瘤作用的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(68): 50-51.
- [135] 周儒兵, 周双容, 向永佳, 等. 人参皂苷 Rg3 通过调控 ROS 途径诱导人肺癌细胞 A549 凋亡[J]. 中国药师, 2018, 21(07): 1145-1150.
- [136] Zhou J, Wang G, Chen Y, et al. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers[J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2019, 23(8): 4854-4865.
- [137] Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death[J]. The EMBO journal, 2009, 28(5): 578-590.
- [138] Michaud M, Martins I, Sukkurwala A Q, et al. Autophagy-dependent anticancer

- immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice[J]. Science, 2011, 334(6062): 1573-1577.
- [139] Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, et al. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease[J]. Nature Reviews Immunology, 2017, 17(2): 97-111.
- [140] Casares N, Pequignot M O, Tesniere A, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death[J]. The Journal of experimental medicine, 2005, 202(12): 1691-1701.
- [141] Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin[J]. Oncogene, 2010, 29(4): 482-491.
- [142] Spisek R, Charalambous A, Mazumder A, et al. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications[J]. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2007, 109(11): 4839-4845.
- [143] Menger L, Vacchelli E, Adjemian S, et al. Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death[J]. Science translational medicine, 2012, 4(143): 143ra99-143ra99.
- [144] Garg A D, Krysko D V, Verfaillie T, et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death[J]. The EMBO journal, 2012, 31(5): 1062-1079.
- [145] Michaud M, Martins I, Sukkurwala A Q, et al. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice[J]. Science, 2011, 334(6062): 1573-1577.
- [146] Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond[J]. Nature reviews Molecular cell biology, 2012, 13(2): 89-102.
- [147] Martucciello S, Masullo M, Cerulli A, et al. Natural Products Targeting ER Stress, and the Functional Link to Mitochondria[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 1-16.
- [148] 李欲轲, 熊孟连, 徐德, et al. 内质网应激与凋亡研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(23): 7856-7862.
- [149] Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response[J].

- Molecular cell, 2010, 40(2): 280-293.
- [150] Yoshii S R, Mizushima N. Monitoring and measuring autophagy[J]. International journal of molecular sciences, 2017, 18(9): 1865.
- [151] Klionsky D J, Boyer-Guittaut M, Marie-Agnès Bringier, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)[J]. Autophagy, 2016, 12: 1-222.
- [152] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy[M]//Autophagosome and phagosome. Humana press, 2008: 77-88.
- [153] Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission[J]. Physiol Rev, 2007, 87(2): 659-797.
- [154] Garg A D, Martin S, Golab J, et al. Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation[J]. Cell Death & Differentiation, 2014, 21(1): 26-38.
- [155] e Sousa C R. Dendritic cells in a mature age[J]. Nature Reviews Immunology, 2006, 6(6): 476-483.
- [156] Schlecht G, Mouriès J, Poitrasson-Rivière M, et al. Purification of splenic dendritic cells induces maturation and capacity to stimulate Th1 response in vivo[J]. International immunology, 2006, 18(3): 445-452.
- [157] Kim M K, Kim J. Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration[J]. RSC advances, 2019, 9(20): 11230-11238.
- [158] Humeau J, Lévesque S, Kroemer G, et al. Gold standard assessment of immunogenic cell death in oncological mouse models[M]//Cancer Immunosurveillance. Humana Press, New York, NY, 2019: 297-315.
- [159] Wang Y J, Fletcher R, Yu J, et al. Immunogenic effects of chemotherapy-induced tumor cell death[J]. Genes & diseases, 2018, 5(3): 194-203.
- [160] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?[J]. Nature reviews Drug discovery, 2009, 8(7): 579-591.
- [161] Duan X, Chan C, Han W, et al. Immunostimulatory nanomedicines synergize with

- checkpoint blockade immunotherapy to eradicate colorectal tumors[J]. Nature communications, 2019, 10(1): 1-15.
- [162] Chen Q, Chen J, Yang Z, et al. Nanoparticle-enhanced radiotherapy to trigger robust cancer immunotherapy[J]. Advanced materials, 2019, 31(10): 1802228.
- [163] Wang D, Wang T, Yu H, et al. Engineering nanoparticles to locally activate T cells in the tumor microenvironment[J]. Science immunology, 2019, 4(37): eaau6584.
- [164] Xia N, Daiber A, Förstermann U, et al. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system[J]. British journal of pharmacology, 2017, 174(12): 1633-1646.
- [165] Nam J S, Sharma A R, Nguyen L T, et al. Application of bioactive quercetin in oncotherapy: from nutrition to nanomedicine[J]. Molecules, 2016, 21(1): 108.
- [166] Boydens C, Pauwels B, Vandendaele L, et al. Resveratrol and quercetin protect isolated mouse corpora cavernosa from *in vitro*-induced diabetic erectile dysfunction[J]. Atherosclerosis, 2016, 252: e140.
- [167] Cote B, Carlson L J, Rao D A, et al. Combinatorial resveratrol and quercetin polymeric micelles mitigate doxorubicin induced cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo*[J]. Journal of Controlled Release, 2015, 213: 128-133.
- [168] Arias N, Macarulla M T, Aguirre L, et al. The combination of resveratrol and quercetin enhances the individual effects of these molecules on triacylglycerol metabolism in white adipose tissue[J]. European Journal of Nutrition, 2016, 55(1): 341-348.
- [169] Wang M, Chen L, Liu D, et al. Metabolomics highlights pharmacological bioactivity and biochemical mechanism of traditional Chinese medicine[J]. Chemico-Biological Interactions, 2017, 273: 133-141.
- [170] 杜倩, 汤洋, 陈剑秋, 等. 槲皮素和白藜芦醇共载磁性固体脂质纳米粒的制备及其抑瘤作用评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(10): 109-114.
- [171] 徐浩, 高艺璇, 王向涛. 槲皮素纳米混悬剂的制备、表征及抗乳腺癌研究[J]. 中草药, 2019, 50(01): 42-51.
- [172] 戴卓睿, 姜凯. 槲皮素通过 SIRT1/ROS/DR5 途径提高 TRAIL 抗前列腺癌活性的研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2018, 28(10): 830-833+837.

- [173] Zhang Z, Singh R, Aschner M. Methods for the detection of autophagy in mammalian cells[J]. Curr Protoc Toxicol, 2016, 69:1-26.
- [174] Chytil M, Peka M. Effect of new hydrophobic modification of hyaluronan on its solution properties: evaluation of self-aggregation[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 76(3): 443-448.
- [175] Zafarullah M, Li W Q, Sylvester J, et al. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions[J]. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2003, 60(1): 6-20.
- [176] Garg A D, Krysko D V, Vandenebeele P, et al. The emergence of phox-ER stress induced immunogenic apoptosis[J]. Oncoimmunology, 2012, 1(5): 786-788.
- [177] Chou T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. Cancer research, 2010, 70(2): 440-446.
- [178] Chen X, Liu Y, Wang L, et al. Enhanced humoral and cell-mediated immune responses generated by cationic polymer-coated PLA microspheres with adsorbed HBsAg[J]. Molecular pharmaceutics, 2014, 11(6): 1772-1784.
- [179] Wilson N S, Yang B, Morelli A B, et al. ISCOMATRIX vaccines mediate CD8⁺ T-cell cross-priming by a MyD88-dependent signaling pathway[J]. Immunology and cell biology, 2012, 90(5): 540-552.
- [180] Li J, Guo Y. Basic evaluation of typical nanoporous silica nanoparticles in being drug carrier: structure, wettability and hemolysis[J]. Materials Science and Engineering C, 2017, 73: 670-673.
- [181] Chen X, Liu Y, Wang L, et al. Enhanced humoral and cell-mediated immune responses generated by cationic polymer-coated PLA microspheres with adsorbed HBsAg[J]. Molecular pharmaceutics, 2014, 11(6): 1772-1784.
- [182] Aderem A, Underhill D M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages[J]. Annual Review of Immunology, 1999, 17: 593-623.
- [183] Guo J, Huang L. Membrane-core nanoparticles for cancer nanomedicine[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2020, 156: 23-39.
- [184] Sun D, Zhang J, Wang L, et al. Nanodelivery of immunogenic cell death-inducers for cancer immunotherapy[J]. Drug Discovery Today, 2021, 26(3): 651-662.

- [185] Gao J, Wang W, Pei Q, et al. Engineering nanomedicines through boosting immunogenic cell death for improved cancer immunotherapy[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2020, 41(7): 986-994.
- [186] Gao A, Chen B, Gao J, et al. Sheddable prodrug vesicles combating adaptive immune resistance for improved photodynamic immunotherapy of cancer[J]. *Nano letters*, 2019, 20(1): 353-362.
- [187] Hu X, Hou B, Xu Z, et al. Supramolecular prodrug nanovectors for active tumor targeting and combination immunotherapy of colorectal cancer[J]. *Advanced Science*, 2020, 7(8): 1903332.
- [188] Guo J, Russell E G, Darcy R, et al. Antibody-targeted cyclodextrin-based nanoparticles for siRNA delivery in the treatment of acute myeloid leukemia: physicochemical characteristics, *in vitro* mechanistic studies, and ex vivo patient derived therapeutic efficacy[J]. *Molecular pharmaceutics*, 2017, 14(3): 940-952.
- [189] Evans J C, Malhotra M, Guo J, et al. Folate-targeted amphiphilic cyclodextrin. siRNA nanoparticles for prostate cancer therapy exhibit PSMA mediated uptake, therapeutic gene silencing *in vitro* and prolonged circulation *in vivo*[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2016, 12(8): 2341-2351.
- [190] Luan X, Rahme K, Cong Z, et al. Anisamide-targeted PEGylated gold nanoparticles designed to target prostate cancer mediate: Enhanced systemic exposure of siRNA, tumour growth suppression and a synergistic therapeutic response in combination with paclitaxel in mice[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2019, 137: 56-67.
- [191] Guo J, O'Driscoll C M, Holmes J D, et al. Bioconjugated gold nanoparticles enhance cellular uptake: A proof of concept study for siRNA delivery in prostate cancer cells[J]. *International journal of pharmaceutics*, 2016, 509(1-2): 16-27.
- [192] Guo J, Yu Z, Das M, et al. Nano codelivery of oxaliplatin and folinic acid achieves synergistic chemo-immunotherapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer and liver metastasis[J]. *ACS nano*, 2020, 14(4): 5075-5089.
- [193] Liang C C, Park A Y, Guan J L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive

- method for analysis of cell migration *in vitro*[J]. Nature protocols, 2007, 2(2): 329-333.
- [194] Guo J, Ogier J R, Desgranges S, et al. Anisamide-targeted cyclodextrin nanoparticles for siRNA delivery to prostate tumours in mice[J]. Biomaterials, 2012, 33(31): 7775-7784.
- [195] McMahon A, O'Neill M J, Gomez E, et al. Targeted gene delivery to hepatocytes with galactosylated amphiphilic cyclodextrins[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2012, 64(8): 1063-1073.
- [196] McCarthy J, O'Neill M J, Bourre L, et al. Gene silencing of TNF-alpha in a murine model of acute colitis using a modified cyclodextrin delivery system[J]. Journal of controlled release, 2013, 168(1): 28-34.
- [197] Godinho B M D C, Ogier J R, Darcy R, et al. Self-assembling modified β -cyclodextrin nanoparticles as neuronal siRNA delivery vectors: Focus on Huntington's disease[J]. Molecular pharmaceutics, 2013, 10(2): 640-649.
- [198] Fitzgerald K A, Guo J, Tierney E G, et al. The use of collagen-based scaffolds to simulate prostate cancer bone metastases with potential for evaluating delivery of nanoparticulate gene therapeutics[J]. Biomaterials, 2015, 66: 53-66.
- [199] Godinho B M D C, McCarthy D J, Torres-Fuentes C, et al. Differential nanotoxicological and neuroinflammatory liabilities of non-viral vectors for RNA interference in the central nervous system[J]. Biomaterials, 2014, 35(1): 489-499.
- [200] Gao W, Chan J M, Farokhzad O C. pH-responsive nanoparticles for drug delivery[J]. Molecular pharmaceutics, 2010, 7(6): 1913-1920.
- [201] He Y, Luo L, Liang S, et al. Amino-functionalized mesoporous silica nanoparticles as efficient carriers for anticancer drug delivery[J]. Journal of biomaterials applications, 2017, 32(4): 524-532.
- [202] Fani M, Tamma M L, Nicolas G P, et al. *In vivo* imaging of folate receptor positive tumor xenografts using novel ^{68}Ga -NODAGA-folate conjugates[J]. Molecular pharmaceutics, 2012, 9(5): 1136-1145.
- [203] Soe Z C, Poudel B K, Nguyen H T, et al. Folate-targeted nanostructured chitosan/chondroitin sulfate complex carriers for enhanced delivery of bortezomib to

- colorectal cancer cells[J]. Asian journal of pharmaceutical sciences, 2019, 14(1): 40-51.
- [204] Schütz C A, Jeanneret L J, Mueller H, et al. Therapeutic nanoparticles in clinics and under clinical evaluation[J]. Nanomedicine, 2013, 8: 449-467.
- [205] Wang X, Gu X, Wang H, et al. Enhanced delivery of doxorubicin to the liver through self-assembled nanoparticles formed via conjugation of glycyrrhetic acid to the hydroxyl group of hyaluronic acid[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 195: 170-179.
- [206] Dar S, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles[J]. Molecular Pharmaceutics, 2008, 5: 496-504.
- [207] Suk J S, Xu Q, Kim N, et al. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery[J]. Advanced drug delivery reviews, 2016, 99: 28-51.
- [208] Yu Z, Guo J, Hu M, et al. Icaritin exacerbates mitophagy and synergizes with doxorubicin to induce immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma[J]. ACS nano, 2020, 14(4): 4816-4828.
- [209] Han X, Li Y, Xu Y, et al. Reversal of pancreatic desmoplasia by re-educating stellate cells with a tumour microenvironment-activated nanosystem[J]. Nature communications, 2018, 9(1): 1-18.
- [210] Zhou F, Feng B, Yu H, et al. Tumor microenvironment-activatable prodrug vesicles for nanoenabled cancer chemoimmunotherapy combining immunogenic cell death induction and CD47 blockade[J]. Advanced Materials, 2019, 31(14): 1805888.
- [211] Xiao X, Lao X M, Chen M M, et al. PD-1hi Identifies a Novel Regulatory B-cell Population in Human Hepatoma That Promotes Disease Progression[J]. Cancer Discovery, 2016, 6(5): 546.
- [212] 谢璐鸿, 张文玲. 免疫检查点 PD-1 及其抗体在肿瘤中的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(9): 1353-1355.
- [213] Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age[J]. Nature, 2011, 480(7378): 480-489.
- [214] 江东, 程海波, 沈卫星, 等. 参白解毒方抑制 HCT116 细胞增殖的药效及机制[J/OL]. 中 国 实 验 方 剂 学 杂 志 :1-11[2021-12-18].

[https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20220423.](https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20220423)

- [215] 张小燕,侯晓春.参芪扶正注射液联合 XELOX 化疗对老年结直肠癌患者 T 淋巴细胞亚群、CEA、CA125 和 CA724 及生存质量的影响[J].中国老年学杂志,2021,41(23):5201-5203.
- [216] 王余娜,黄平,王春华.结直肠癌患者 EBV 感染与癌组织 COX-2、P-gp、p53 蛋白表达相关性 [J/OL]. 中华医院感染学杂志 ,2021(24):3767-3771[2021-12-18].
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3456.R.20211213.0955.036.html>.
- [217] 刘琼,徐蓉,王琼,等.术后腹腔感染对结直肠癌患者 HIPPO 通路基因和肠屏障及免疫功能的影响[J/OL].中华医院感染学杂志,2021(24):3772-3776[2021-12-18].
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3456.R.20211213.0955.040.html>.
- [218] 李庚鹏,张国伟,张双龙.血清 MACC-1、Ang-2 水平预测直肠癌患者腹腔镜术后复发研究[J].国际检验医学杂志,2021,42(23):2866-2870.
- [219] Le D T, Uram J N, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency[J]. New England Journal of Medicine, 2015, 372(26): 2509-2520.
- [220] 章海斌,丁晓娇,王练,等.PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂治疗不同 BRAF 基因型晚期结直肠癌的临床效果与安全性[J].临床合理用药杂志,2021,14(31):31-34.
- [221] 王如东,彭祎玮,仰浈臻,等.肿瘤微环境响应脂质体阻断 CXCL12/CXCR4 通路协同增加抗 PD-L1 的免疫疗效 [J/OL]. 药学学报 :1-14[2021-12-18].
<https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2021-0967>.
- [222] Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors[J]. Przeglad gastroenterologiczny, 2019, 14(2): 89-103.
- [223] Sahin U, Türeci Ö. Personalized vaccines for cancer immunotherapy[J]. Science, 2018, 359(6382): 1355-1360.
- [224] Weiner L M, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy[J]. Nature Reviews Immunology, 2010, 10(5): 317-327.
- [225] Xu X, Li T, Shen S, et al. Advances in engineering cells for cancer immunotherapy[J]. Theranostics, 2019, 9(25): 7889-7908.
- [226] Wei S C, Duffy C R, Allison J P. Fundamental mechanisms of immune checkpoint

- blockade therapy[J]. Cancer discovery, 2018, 8(9): 1069-1086.
- [227] 高嫦娥. PD-1 基因敲除 T 细胞治疗结直肠癌的有效性及其体内安全性评价的临床前研究[D]. 昆明医科大学, 2021.
- [228] 沈奥林, 胡世莲, 沈国栋. PD-1/PD-L1 抗体治疗胃肠道癌症的研究进展[J]. 中国临床保健杂志, 2020, 23(06): 855-859.
- [229] 智佳俊. 错配修复缺陷型散发结直肠癌临床病理与预后[D]. 上海交通大学, 2014.
- [230] 冯振宁. 关于错配修复和结直肠癌发病机制的研究进展[D]. 河北医科大学, 2016.
- [231] Gevorkian J, Verspaget H W, Hommes D W, et al. Mo1872 Corticotropin-Releasing Hormone Receptor 2 (CRHR2) Inhibits Colorectal Cancer Immunoescape Through Regulation of Fas/FasL Signaling[J]. Gastroenterology, 2015, 148(4): S-732.
- [232] Mazzolini G, Murillo O, Atorrasagasti C, et al. Immunotherapy and immunoescape in colorectal cancer[J]. World journal of gastroenterology: WJG, 2007, 13(44): 5822-5831.
- [233] Koido S, Ohkusa T, Homma S, et al. Immunotherapy for colorectal cancer[J]. World journal of gastroenterology: WJG, 2013, 19(46): 8531-8542.
- [234] Showalter A, Limaye A, Oyer J L, et al. Cytokines in immunogenic cell death: applications for cancer immunotherapy[J]. Cytokine, 2017, 97: 123-132.
- [235] Bronger H, Singer J, Windmüller C, et al. CXCL9 and CXCL10 predict survival and are regulated by cyclooxygenase inhibition in advanced serous ovarian cancer[J]. British journal of cancer, 2016, 115(5): 553-563.
- [236] Liu Y, Guo J, Huang L. Modulation of tumor microenvironment for immunotherapy: focus on nanomaterial-based strategies[J]. Theranostics, 2020, 10(7): 3099-3117.

作者简介及科研成果

作者简介：

姓名：孙丹丹

性别：女

民族：汉

出生年月：1991 年 4 月

发表的学术论文：

- [1] Sun D, Zou Y, Song L, Han S, Yang H, Chu D, Dai Y, Ma J, O'Driscoll CM, Yu Z*, Guo J*. A cyclodextrin-based nanoformulation achieves co-delivery of ginsenoside Rg3 and quercetin for chemo-immunotherapy in colorectal cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2022;12(1):378-393. SCI (IF: 11.413)
- [2] Sun D#, Zhang J#, Wang L, Yu Z, O'Driscoll CM, Guo J*. Nanodelivery of immunogenic cell death-inducers for cancer immunotherapy. *Drug Discovery Today* 2021, 26: 651-662. SCI (IF: 7.851)
- [3] Guo J, Yu Z, Sun D, Zou Y, Yun Liu, Huang L*. Two nanoformulations induce reactive oxygen species and immunogenetic cell death for synergistic chemo-immunotherapy eradicating colorectal cancer and hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer*, 2021, 20(1): 10. SCI (IF: 27.401)
- [4] Yang, H. Song, L, Zou, Y, Sun, D, &Guo, J. Role of hyaluronic acids and potential as regenerative biomaterials in wound healing. *ACS Applied Bio Materials*, 2021, 4(1), 311-324. ESCI (IF:未出影响因子)
- [5] Zou Y#, Xiao F#, Song L, Sun B, Sun D, Chu D, Wang L, Han S, Yu Z, O'Driscoll CM*, Guo J*. A folate-targeted PEGylated cyclodextrin-based nanoformulation achieves co-delivery of docetaxel and siRNA for colorectal cancer. *International Journal of Pharmaceutics* 2021, 606: 120888. SCI (IF: 5.875)

参加的科研项目：

1. 新型人参皂苷 Rg3 和槲皮素复方纳米制剂抗胃肠道癌机制研究
2. 环糊精纳米药物载体制备技术开发

致 谢

写到这里，脑子里出现了太多的画面，感觉自己要感恩的人太多太多，很多画面像过山车一样浮现在眼前，有欢笑有泪水。

朝气蓬勃的迈入博士研究生的大门，迈着对知识渴求的步伐，告诉自己要踏踏实实地虚心多学习，多动手。在导师郭建锋教授身上我学习到什么是坚忍不拔；什么是踏踏实实；什么是爱岗敬业。您的亲历亲为激励着我继续前行；您的科研能力教会我弥补不足；您的踏实肯干鼓励我稳扎稳打；总之是您让我博士三年期间知道自己的不足，弥补自己的短板。感谢您无私的帮助。还要感谢美貌与智慧并存的余卓老师，您的每一句话都是那么温暖而真切，你看待问题的态度和思维是我应该好好学习的。

在我生活上提供最大帮助的秦鹏华和耿智慧老师，衷心的感谢你们在我迷茫时的安慰，在科研路上的大力指导。

感谢聪明与美貌并存的邹宜芳、宋柳和初迪师妹，还有帅气与智慧兼顾的杨浩师弟，因为你们的天真无邪，才给师姐平淡枯燥的生活带来无限乐趣。更是因为你们的大力帮助，我的实验才可以进展的那么顺利。在这个大家庭里面，因为你们一切变得那么温暖。还要感谢新进科的小兰姐、玲芝妹妹、安琪妹妹和晓焕师弟，你们的善良一直感染着我。

感谢我的姐妹许志萍，是你把寝室打扫的干干净净，让我有一个舒适的空间，在我实验遇到困境时的鼓励和帮助，生活中对我百般包容，你们一路的鼓励和包容让我不断成长，多幸运有你们。我的生活因遇到你们而丰富多彩。

最后要感谢我最挚爱的爸爸妈妈还有弟弟和弟妹，没有你们背后的鼓励和支持，我不会那么坚强，因为有你们的爱，我不断坚持着，不断努力着，不断前进着。

感谢这一路上帮助过我的可爱可敬的人们，有你们我会更有动力继续努力前行，谢谢你们。