

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.08.005

· 基础研究 ·

靶向性 CPI-444 载药纳米微粒的制备及其对 T 细胞活性和抗肿瘤效应的影响

陈明水, 李洁羽, 王玲, 周智锋, 张麟腾(福建医科大学 肿瘤临床医学院, 福建省肿瘤医院, 福建 福州 350014)

[摘要] **目的:** 制备并表征包载 CPI-444 并偶联 CD8 抗体的纳米微粒(CNP/ α CD8), 探讨其对 CD8⁺ T 细胞活化、增殖和抗肿瘤作用的影响。**方法:** 采用复乳溶剂蒸发法和 EDC/NHS 法制备包载腺苷受体 A2A (A2AR) 特异性拮抗剂 CPI-444 (C) 或香豆素 6 (C6) 荧光素的纳米微粒并分别在其表面偶联 CD8 抗体, 制得 CNP/ α CD8 和 C6NP/ α CD8。扫描电镜和 NanoPlus 粒度测定仪表征纳米微粒形态和粒径, 液相色谱与串联质谱联用 (LC-MS/MS) 法和离心法测定纳米微粒的载药量和药物释放情况, 荧光显微镜和流式细胞仪检测 CD8⁺ T 细胞内化 C6NP/ α CD8 的情况, 流式细胞仪、ELISA 和 LDH 法检测 CNP/ α CD8 对 CD8⁺ T 细胞增殖、活化、细胞毒活性和杀瘤能力的影响。**结果:** CNP/ α CD8 纳米微粒为圆形、粒径约 150 nm, 能有效包载 CPI-444 和偶联 CD8 抗体, 药物包封率和 CD8 抗体偶联效率分别约为 60% 和 53.4%; CNP/ α CD8 纳米微粒具有良好稳定性, 能被 CD8⁺ T 细胞内化, 抑制 A2AR 分子表达。生物学功能实验显示, CNP/ α CD8 增强 CD8⁺ T 细胞的增殖能力、促进 T 细胞活化、分泌细胞因子及产生颗粒酶 B 和穿孔素, 并增强 CD8⁺ T 细胞杀伤肿瘤细胞的能力。**结论:** CNP/ α CD8 纳米微粒能显著增强 CD8⁺ T 细胞免疫效应功能, 其增强 CD8⁺ T 细胞功能可能是通过抑制 A2AR 分子的表达起作用。

[关键词] 纳米微粒; 腺苷受体 A2A; 过继细胞疗法

[中图分类号] R730.3; R979.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385x(2024)08-0777-09

Preparation of targeting CPI-444-loaded nanoparticles and investigation of its effects on T cell activity and anti-tumor response

CHEN Mingshui, LI Jieyu, WANG Ling, ZHOU Zhifeng, ZHANG Linteng (Clinical Oncology School of Fujian Medical University, Fujian Cancer Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare and characterize CD8 antibody-conjugated CPI-444 (C)-loaded nanoparticles (CNP/ α CD8) and investigate their effects on CD8⁺ T cell activation, proliferation, and anti-tumor activity. **Methods:** Nanoparticles encapsulating the adenosine A2A receptor (A2AR) antagonist CPI-444 (C) or the fluorescent dye Coumarin-6 (C6) were prepared using the double emulsion solvent evaporation method and EDC/NHS chemistry for antibody conjugation, resulting in CNP/ α CD8 and C6NP/ α CD8. The morphology and size of the nanoparticles were characterized by scanning electron microscopy and NanoPlus particle size analyzer. Drug loading and release profiles were determined using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and centrifugation. The internalization of C6NP/ α CD8 by CD8⁺ T cells were examined by flow cytometry and fluorescence microscopy. The effects of CNP/ α CD8 on the proliferation, activation, cytotoxicity, and tumor killing ability of CD8⁺ T cells were examined by flow cytometry, ELISA, and lactate dehydrogenase (LDH) assay. **Results:** The CNP/ α CD8 nanoparticles were spherical with an average diameter of about 150 nm, effectively encapsulating CPI-444 and conjugating CD8 antibodies, with a drug encapsulation efficiency and a CD8 antibody conjugation efficiency of approximately 60% and 53.4%, respectively. The nanoparticles exhibited good stability and were efficiently internalized by CD8⁺ T cells, inhibiting A2AR expression. Biological function assays showed that CNP/ α CD8 enhanced CD8⁺ T cell proliferation, promoted T cell activation, cytokine secretion, granzyme B, and perforin production, and improved the tumor-killing ability of CD8⁺ T cells. **Conclusion:** CNP/ α CD8 nanoparticles can significantly enhance the immune functions of CD8⁺ T cells, likely by inhibiting A2AR expression.

[Key words] nanoparticle; adenosine A2A receptor (A2AR); adoptive cell transfer therapy

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(8): 777-785. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.08.005]

[基金项目] 福建省医学创新课题 (No.2020CX012); 福建省自然科学基金联合资金 (No.2023J011272); 福建省肿瘤医院院内基金 (No.2023YN10)

[作者简介] 陈明水 (1967—), 男, 硕士, 主任技师, 主要从事肿瘤免疫及纳米肿瘤免疫治疗的研究。E-mail: 838195033@qq.com

[通信作者] 陈明水, E-mail: 838195033@qq.com

过继细胞疗法是肿瘤免疫治疗重要手段之一, CD8⁺ T细胞是抗肿瘤免疫的主要效应细胞^[1], 但只有少部分患者从这种治疗中受益, 大多数患者对这种治疗仍然没有反应或不能产生持久的反应^[2], 主要原因是T细胞表达多种抑制性受体从而抑制T细胞的激活和效应功能^[3-5]。腺苷受体是免疫细胞表面表达的重要抑制性受体之一, 其通过与腺苷分子结合抑制免疫细胞的活化、增殖和免疫效应功能, 从而引起肿瘤的免疫逃逸^[6]。目前已鉴定的腺苷受体有四种, 分别为A1、A2A、A2B和A3, 其中腺苷受体A2A (adenosine A2A receptor, A2AR) 主要表达在T细胞上, 与腺苷的亲和力最高, 在T细胞抗肿瘤中起主要作用。A2AR激活能抑制T细胞增殖和活化^[7], 而抑制A2AR能增强T细胞活性和抗肿瘤效应, 抑制肿瘤生长^[8-9]。因此, A2AR作为一种新发现的代谢检查点, 已成为肿瘤免疫治疗的重要靶点。目前, 已有多种A2AR拮抗剂单独使用或与其他疗法如免疫检查点抑制剂、化疗和过继细胞疗法联合使用, 在多种肿瘤治疗中取得较好效果^[10-11]。但A2AR在多种细胞上都有表达, 因此A2AR拮抗剂全身给药未能达到理想效果^[12], 研究新的方法对于提高A2AR介导的抗肿瘤免疫治疗效果具有重要意义。已有研究^[13]发现用脂质体递送siRNA沉默A2AR能增强T细胞的迁移能力, 促进T细胞浸润, 但A2AR抑制剂与纳米微粒结合对CD8⁺ T功能影响的研究较少。本研究用PLGA聚合物制备包载CPI-444(一种特异性A2AR拮抗剂)的纳米微粒(CPI-444 nanoparticle, CNP), 将其与CD8抗体偶联, 制备CNP/ α CD8, 探讨CNP/ α CD8对T细胞活性和抗肿瘤免疫效应功能的影响, 为进一步研究腺苷受体抑制剂在肿瘤免疫治疗中的作用及机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及细胞

端羧基聚乳酸-羧基乙酸[poly(D, L-lactide-co-glycolide), PLGA] (MW 23 000 50:50)、聚乙烯醇 (polyvinyl acetate, PVA)、二氯甲烷(dichloromethane, DCM)、香豆素-6(coumarin-6, C6)、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC)均购自Sigma公司; Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 购自Invitrogen公司。APC-CD8、PE-Cy7-CD25、FITC-CD69、PE-Cy7-GraB、PE-Perforin抗体均购自Biolegend公司, PE-A2AR抗体购自R&D公司, 人CD8抗体购自北京义翘神州公司, CPI-444购自Med

ChemExpress (MCE) 公司, 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒购自Promega公司, 人IL-2和IFN- γ ELISA试剂盒购自Abcam公司, HepG2细胞株购自中国科学院细胞库。CD8磁珠、 α CD3/CD28磁珠均购自ThermoFisher公司。

1.2 主要仪器

JY92-IIDN超声波细胞粉碎机和LGJ-18冷冻干燥机购自宁波新艺超声设备有限公司产品, himac高速冷冻离心机购自贝克曼公司, NanoPlus Zeta电位与纳米粒度仪购自美国麦克仪器公司, Nova Nano SEM 230高分辨场发射扫描电子显微镜购自美国FEI公司, 液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱仪(LC-MS/MS)购自美国Agilent公司, 流式细胞仪购自美国BD公司。

1.3 包载CPI-444纳米微粒的制备与表征

将CPI-444用DMSO溶解, 配制为1 mg/mL溶液。称取50 mg PLGA置于10 mL瓶内, 加入3 mL DCM将其溶解, 再加入100 μ L 1 mg/mL的CPI-444, 振荡2 min, 用功率为35% \times 900 W的超声仪处理, 每间隔3 s超声9 s, 共5 min, 形成初乳; 将初乳加至4 mL的1.5%PVA溶液中, 振荡2 min, 再用功率为35% \times 900 W的超声仪超声9 s、间隔3 s, 共5 min, 形成复乳, 将复乳液放通风橱中搅拌3~4 h, 挥发去除有机溶剂, 然后用16 000 \times g离心10 min, 收集上清液用于检测CPI-444的含量。沉淀物用蒸馏水洗涤2次, 收集洗涤液, 与上清液合在一起用LC-MS/MS测定CPI-444的含量。最后将沉淀物用双蒸水溶解并重悬, 即制得包载CPI-444的纳米微粒, 用CNP表示, 用同样方法制备包载C6荧光素的纳米微粒C6NP, 用于T细胞内化纳米微粒实验。将制得的CNP和C6NP悬液用LGJ-18冷冻干燥机进行冷冻干燥, 于-20 $^{\circ}$ C冰箱保存。

用离心法检测纳米微粒释放CPI-444: 称取10 mg CNP冻干粉末, 加入10 mL PBS溶解超声制成悬液, 将悬液分装到1.5 mL离心管, 每管1 mL, 将离心管放入摇床, 在37 $^{\circ}$ C下持续振摇, 每间隔一天取出一个离心管, 用离心机9 500 \times g离心10 min, 吸上清液用LC-MS/MS检测CPI-444含量, 以此检测纳米微粒释放CPI-444的情况。

1.4 CNP偶联 α CD8抗体

称取5 mg上述CNP冻干粉末, 加入1 mL PBS溶解分散, 再用PBS洗涤两次, 加入600 μ L PBS, 超声分散均匀, 称取10 mg EDC和5 mg NHS, 分别使用200 μ L PBS溶解, 将其迅速加入到CNP纳米微粒中, 置于摇床上常温下振摇0.5 h, 将纳米微粒表面的羧基活化, 将羧基活化后的纳米微粒用1 mL 10 mmol/L

pH7.2 的 PBS 洗涤两次, 然后分散于 1 mL 10 mmol/L pH7.2 的 PBS 中, 加入 10 μg CD8 抗体, 放置冰上温育 15 min, 再放 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱温育 15 min, 反应完成后, 将纳米微粒用 PBS 洗涤 3 次, 除去未反应的抗体分子, 收集每次洗涤的上清液, 用 BCA 法测定上清液中蛋白含量, 沉淀物用 200 μL 10 mmol/L pH 7.2 的 PBS 溶解, 即制得表面偶联 CD8 抗体的包载 CPI-444 的纳米微粒, 用 CNP/ αCD8 表示。

1.5 CD8⁺ T 细胞分选

本实验经福建省肿瘤医院伦理委员会批准, 审批号: K2020-323-01。抽取健康人供者外周血 20 mL 加入 EDTA 抗凝管中, 用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞 (PBMC), PBS 洗涤、计数, 每 1×10^7 个活细胞加入 80 μL MACS 分选缓冲液和 20 μL CD8 磁珠, 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min, 温育完毕后, 加入细胞分选缓冲液, 300 \times g 离心 8 min, 弃去上清液, 加入 1 mL MACS 缓冲液, 重悬细胞, 加到分选柱上, 将分选柱放在 MiniMACS 分选仪磁力架上, 细胞流经过磁场分选柱后, 将分选柱移出磁场, 用注射器针芯将分选柱细胞冲出, 收集冲出的细胞即为 CD8⁺ T 细胞。

1.6 细胞培养

取以上分选获得的 CD8⁺ T 细胞接种至 24 孔细胞培养板, 2×10^5 /孔, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液 1 mL 和密度为 4×10^7 个/mL 的 $\alpha\text{CD3}/\text{CD28}$ 磁珠 2 μL 和 10^6 U/L 的 IL-2 10 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱温育 24 h 后收集细胞。HepG2 细胞接种在 96 孔细胞培养板中, 加入含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养液, 常规培养。

1.7 CD8⁺ T 细胞内化 C6NP/ αCD8 纳米微粒的检测

将分选 CD8⁺ T 细胞加入 2 μL $\alpha\text{CD3}/\text{CD28}$ 磁珠刺激 24 h, 收集 CD8⁺ T 细胞接种在 24 孔细胞培养板, 每孔接种 1 mL (含 2×10^5 个细胞), 再加入 10 μL 含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C6NP/ αCD8 纳米微粒的培养液, 放 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱温育 4 h, 收集细胞, 离心、洗涤, 用流式细胞仪检测 CD8⁺ T 细胞内化 C6NP/ αCD8 纳米微粒。另取分选细胞 $\alpha\text{CD3}/\text{CD28}$ 磁珠刺激 24 h 后, 收集 CD8⁺ T 细胞接种在 24 孔细胞培养板, 5×10^3 /孔, 加入 10 μL 含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 C6NP/ αCD8 纳米微粒的培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4 h, 收集细胞, PBS 洗涤 3 次后, 用 100 μL PBS 重悬细胞, 将细胞滴加在载玻片上, 用荧光显微镜观察 T 细胞内化纳米微粒的情况。

1.8 LC-MS/MS 测定 CD8⁺ T 细胞内化 CNP/ αCD8 及胞内 CPI-444 情况

将分选所得细胞用 $\alpha\text{CD3}/\text{CD28}$ 磁珠刺激 24 h 后, 收集 CD8⁺ T 细胞接种在 24 孔细胞培养板, 2×10^5 /孔, 加入 1 mL RPMI 1640 培养液和 150 μL CNP/ αCD8 配

制 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CPI-444 悬液, 温育 24 h, 收集细胞用 RIPA 将细胞裂解, 将细胞裂解液收集到 1.5 mL 离心管, 用 9 500 \times g 离心 10 min, 收集上清液, 用 LC-MS/MS 测定细胞裂解上清液中的 CPI-444 含量。

1.9 流式细胞术检测 A2AR 的表达

将分选所得细胞用 $\alpha\text{CD3}/\text{CD28}$ 磁珠刺激 24 h 后, 收集 CD8⁺ T 细胞接种在 24 孔细胞培养板, 2×10^5 /孔, 分别加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CPI-444 以及不同纳米微粒共同温育 24 h, 收集细胞, 加入 5 μL PE-A2AR 抗体, 常温暗处反应 10 min, 用 PBS 洗涤细胞后再用 100 μL PBS 重悬, 用流式细胞仪检测各组细胞 A2AR 的表达。实验分为未刺激组、单纯细胞空白对照组、CPI-444 组 (C)、CNP 组和 CNP/ αCD8 组。

1.10 CNP/ αCD8 对 CD8⁺ T 细胞特性的影响

1.10.1 CFSE 法检测 CD8⁺ T 细胞增殖情况

分选 PBMC 中 CD8⁺ T 细胞, 接种在 24 孔细胞培养板, 2×10^5 个/孔, 加入含 2 μL $\alpha\text{CD3}/\text{CD28}$ 磁珠及 10 μL 含 1×10^6 U/L IL-2 的细胞培养液, 24 h 后, 收集细胞, 用 CFSE 染色。染色后的细胞接种在 24 孔细胞培养板, 2×10^5 /孔, 加入含纳米微粒的培养液 CPI-444 为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱温育 24 h, 收集细胞, 用 PBS 洗涤, 再重悬细胞, 用流式细胞仪检测不同组细胞增殖情况。实验分为单纯细胞空白对照组、CPI-444 组 (C)、CNP 组和 CNP/ αCD8 组。

1.10.2 检测 CD8⁺ T 细胞活化水平

CD8⁺ T 细胞接种在 24 孔细胞培养板, 2×10^5 个/孔, 加入含 2 μL $\alpha\text{CD3}/\text{CD28}$ 磁珠及 10 μL 的 IL-2 (1×10^6 U/L) 的细胞培养液, 24 h 后, 收集细胞, 接种在 24 孔细胞培养板, 分别加入 CPI-444、CNP 以及 CNP/ αCD8 的培养液, 各组 CPI-444 终质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 放 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中温育 24 h, 收集细胞上清液用人 IL-2 和 IFN- γ ELISA 试剂盒检测上清液中细胞因子含量; 将细胞用 PBS 洗涤并重悬细胞, 每组细胞分成两管, 其中一管按每 1×10^6 个细胞分别加入 5 μL FITC-CD25 和 APC-CD8 抗体, 另一管加 PE-CD69 和 APC-CD8 抗体, 室温温育 10 min 后, 离心, 加入 200 μL PBS 重悬细胞, FACS 测定不同药物和纳米微粒处理后 CD8⁺ T 细胞 CD25 和 CD69 的表达。实验分为单纯细胞空白对照组、CPI-444 组 (C)、CNP 组和 CNP/ αCD8 组, 空白组不含 CPI-444, 其余各组 CPI-444 终质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.10.3 检测细胞毒活性

分选 PBMC 中 CD8⁺ T 细胞接种在 24 孔细胞培养板, 2×10^5 个/孔, 加入含 2 μL $\alpha\text{CD3}/\text{CD28}$ 磁珠及 10 μL 浓度为 10^6 U/L 的 IL-2 的细胞培养液, 24 h 后, 收集细胞。接种在 24 孔细胞培养板, 分别加入含

CPI-444、CNP 以及 CNP/ α CD8 的培养液, 37 °C 培养箱温育 24 h, 收集细胞, 用 PBS 洗涤, 再重悬细胞, 用 APC-CD8 抗体染色、然后分别用固定和穿孔液进行固定和穿孔, 随后用 PE-PRF 和 PE-Cy7-GrB 标记 20 min, 用 PBS 洗涤 2 次, 每次 3 min, 加入 100 μ L PBS 重悬细胞, 用流式细胞仪检测。实验分为单纯细胞空白对照组、CPI-444 组(C)、CNP 组和 CNP/ α CD8 组, 空白组不含 CPI-444, 其余各组 CPI-444 终浓度为 10 μ g/mL。

1.10.4 乳酸脱氢酶(LDH)释放法检测 CNP/ α CD8 对 CD8⁺ T 细胞杀伤 HepG2 细胞能力的影响

从外周血分选 CD8⁺ T 细胞接种在 24 孔细胞培养板, 4 \times 10⁵ 个/孔, 加入含 2 μ L α CD3/CD28 磁珠及 10 μ L 10⁶ U/L 的 IL-2 及终质量浓度为 10 μ g/mL 的 CPI-444、CNP 和 CNP/ α CD8 的培养液, 放 37 °C、5% CO₂ 培养箱 24 h 后收集 CD8⁺ T 细胞。将 HepG2 细胞接种在 96 孔细胞培养板, 37 °C、5% CO₂ 培养箱温育过夜。次日将以上 CD8⁺ T 细胞与 HepG2 细胞按 5:1、10:1 和 20:1 的效:靶比混合, 放 37 °C、5% CO₂ 培养箱温育 12 h。设靶细胞最大释放孔、靶细胞自发释放孔、效应细胞自发释放孔。每个检测样本设 3 个复孔, 每孔总体积为 100 μ L, 在最大释放孔加入 10 μ L 细胞裂解液, 然后再把细胞培养板放 37 °C、5% CO₂ 培养箱温育 45 min。离心, 每孔吸出 50 μ L 上清液转移到新 96 孔平底培养板, 每孔加入 50 μ L 底物, 放室温暗处静置 30 min, 每孔加入 50 μ L 终止液, 用酶标仪测量 490 nm 波长处各空的光密度(D)值。杀伤率=[(实验组 D 值-效应细胞自然释放组 D 值-靶细胞自然释放组 D 值)/(靶细胞最大释放组 D 值-靶细胞自然释放组 D 值)] \times 100%。实验分为单纯细胞空白对照组、CPI-444 组(C)、CNP 组和 CNP/ α CD8 组, 空白组不含 CPI-444, 其余各组 CPI-444 终质量浓度为 10 μ g/mL。

1.11 统计学处理

主要实验均独立重复 3 次。所有数据用 GraphPad Prism6.0 软件进行统计分析, 符合正态分布的计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用双侧卡方检验, 组内比较采用单侧卡方检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CNP/ α CD8 纳米微粒表征

扫描电镜观察结果(图 1A)显示, CNP/ α CD8 纳米微粒较均匀、呈球形、大小约为 150 nm; 动态光散射检测结果(图 1B)显示, 纳米微粒具有较好分散性, PDI 为 0.01~0.1。LC-MS-MS 检测 CPI-444 特异吸收

峰(图 1C)及峰面积(图 1D), 根据标准曲线计算 CPI-444 含量, 得出本实验封装率约为 60%。BCA 法检测结果显示 CD8 抗体偶联效率约为 48.7%。体外释放实验结果(图 1E)显示, 在 37 °C、PBS 溶液中, 在最初 24 h 内 CNP/ α CD8 中 CPI-444 呈现快速释放过程, 这可能是部分吸附在纳米微粒表面的 CPI-444 释放, 接着在 24~48 h CPI-444 释放较为缓慢, 大约 48 h 后 CPI-444 释放逐渐达到平台期。稳定性实验结果(图 1F)显示, 纳米微粒在 pH7.0 的 PBS 中具有良好稳定性, 在 7 d 内, 粒径和电位没有明显变化。

2.2 CD8⁺ T 细胞内化 CNP/ α CD8 及胞内 CPI-444 检测

荧光显微镜观察发现, CD8⁺ T 细胞与 C6NP/ α CD8 纳米微粒共培养 4 h, 细胞内观察到荧光信号, 而与其他纳米微粒共培养同样时间, 细胞内未观察到明显的荧光信号(图 2A)。流式细胞术检测结果也显示, CD8⁺ T 细胞与 C6NP/ α CD8 纳米微粒共温育 4 h, CD8⁺ T 细胞内化 C6NP/ α CD8, 而其他组 CD8⁺ T 细胞未检测到明显荧光信号(图 2B、2C, $P<0.01$)。胞内 CPI-444 检测结果显示, CNP/ α CD8 组较其他组明显升高, 这些说明 CNP/ α CD8 纳米微粒能更有效地进入 CD8⁺ T 细胞, 释放 CPI-444(图 2D, $P<0.01$)。

2.3 CNP/ α CD8 抑制 CD8⁺ T 细胞 A2AR 分子表达

流式细胞仪检测未刺激 CD8⁺ T 细胞及 α CD3/CD28 刺激后经 CPI-444 与不同纳米微粒处理后 CD8⁺ T 细胞 A2AR 分子的表达情况。结果显示, 未经刺激 CD8⁺ T 细胞 A2AR 表达为 6.1%, α CD3/CD28 刺激下 CD8⁺ T 细胞 A2AR 表达升高为 12.3%。与 CNP/ α CD8 共培养后 A2AR 表达显著减少, 在终质量浓度为 10 μ g/mL 时, 与空白对照组相比, 单纯 CPI-444 和 CNP 对 A2AR 表达具有一定抑制作用, 而 CNP/ α CD8 显著抑制 A2AR 表达(图 3, $P<0.01$), 这可能是细胞内 CPI-444 含量差异导致的不同效果, 这些结果说明靶向纳米微粒比非靶向纳米微粒能更有效进入 CD8⁺ T 细胞, 释放 CPI-444 抑制 A2AR。

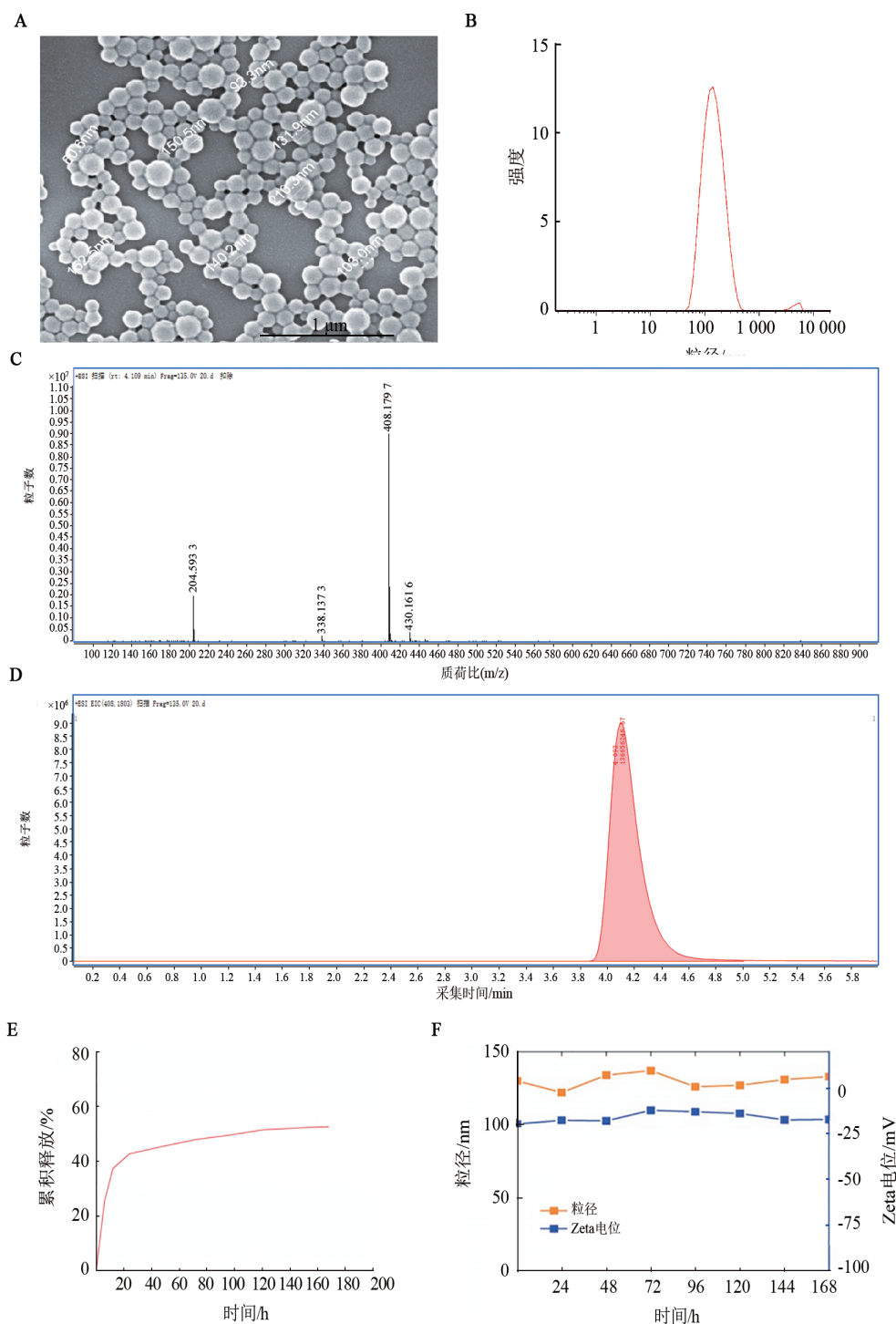
2.4 CNP/ α CD8 促进 CD8⁺ T 细胞的增殖和活化

CFSE 法检测结果显示, 在 CNP/ α CD8 纳米微粒处理组中, CD8⁺ T 细胞增殖比空白组显著增加(图 4A, $P<0.01$)。活化指标检测结果显示, CNP/ α CD8 处理后 CD8⁺ T 细胞 CD25、CD69 分别为 61.1% 和 64.3%, 显著高于空白对照组 42.1% 和 36.9%(图 4B、C, $P<0.01$)。ELISA 检测结果显示, CD8⁺ T 细胞与 CNP/ α CD8 共培养 24 h 后, 上清液中 IFN- γ 和 IL-2 分别为 350 pg/mL(图 4D)和 230 pg/mL(图 4E), 均显著高于其他组细胞所产生的 IFN- γ 和 IL-2(均 $P<0.01$)。这些结果表明, CNP/ α CD8 纳米微粒能有效刺激 CD8⁺ T 细胞增殖、活化。

2.5 CNP/ α CD8增强CD8⁺T细胞的细胞毒活性和杀伤HepG2细胞的能力

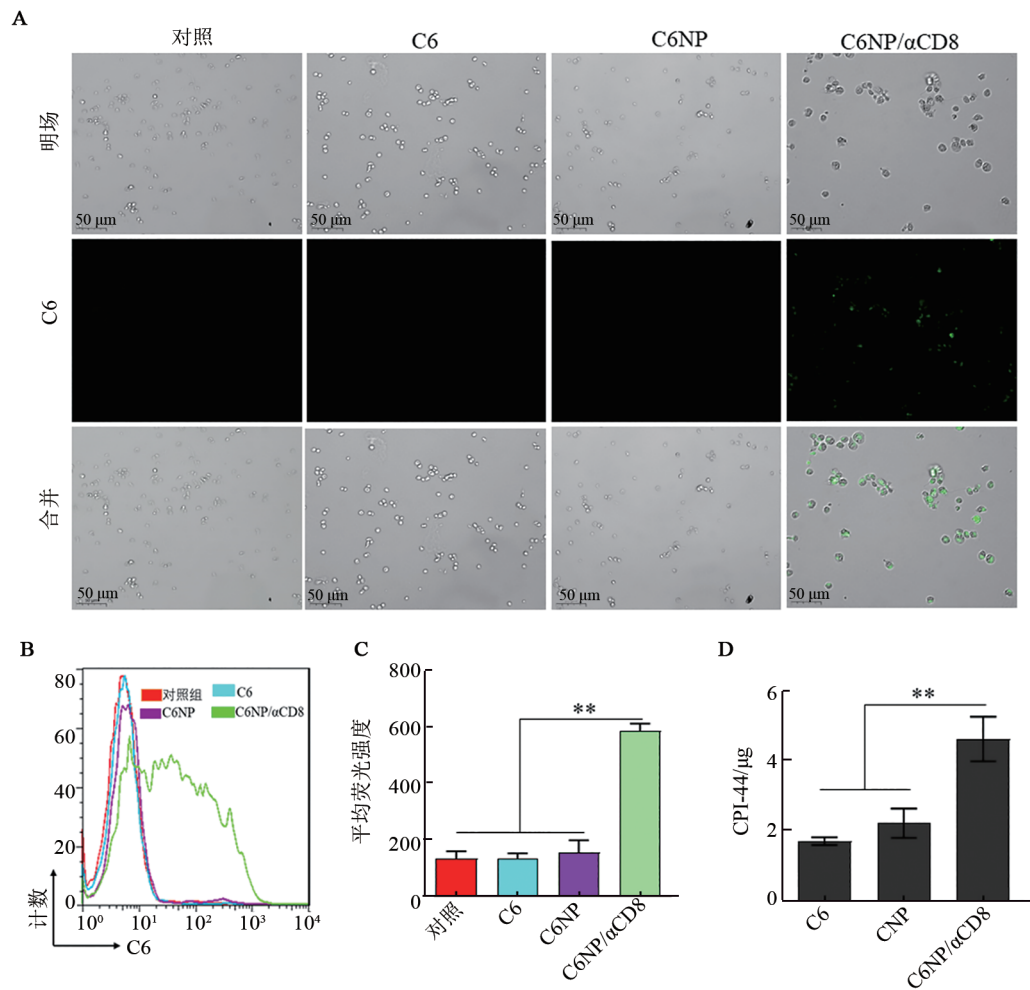
颗粒酶B和穿孔素检测作为CD8⁺T细胞毒活性的指标,流式细胞仪检测结果显示,与其他组相比,CD8⁺T细胞与CNP/ α CD8纳米微粒共培养24h,颗粒酶B(图5A, $P < 0.01$)和穿孔素(图5B, $P < 0.01$)分别为26.5%和40.4%,明显高于空白对照组15.7%和

26.2%。LDH法检测结果显示,在效:靶比分别为5:1、10:1和20:1时,CNP/ α CD8组CD8⁺T细胞对HepG2细胞的杀伤率分别为6.29%、11.32%和24.63%,显著高于对照组(图5C, $P < 0.01$)。这些结果表明,CNP/ α CD8能够增强T细胞的细胞毒活性和对肿瘤细胞的杀伤能力。



A: CNP/ α CD8 纳米微粒扫描电镜图; B: CNP/ α CD8 纳米微粒动态光散射图; C: LC-MS-MS 检测显示 CNP/ α CD8 纳米微粒 CPI-444 特异性峰; D: CNP/ α CD8 纳米微粒 CPI-444 峰面积; E: CNP/ α CD8 纳米微粒释放 CPI-444 情况; F: CNP/ α CD8 纳米微粒稳定性。

图1 CNP/ α CD8 纳米微粒表征



A: CD8⁺ T细胞内化C6NP/αCD8(×200, 标尺: 50 μm); B: CD8⁺ T细胞内化C6NP/αCD8流式细胞仪图; C: 为图B的量化统计结果(n=3, **P<0.01); D: CD8⁺ T细胞内CPI-444含量(n=3, **P<0.01)。

图2 CD8⁺ T细胞内化CNP/αCD8及胞内CPI-444测定

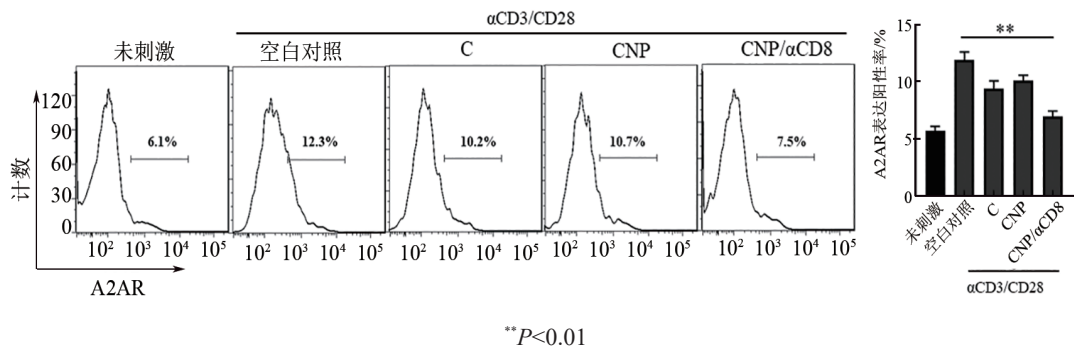
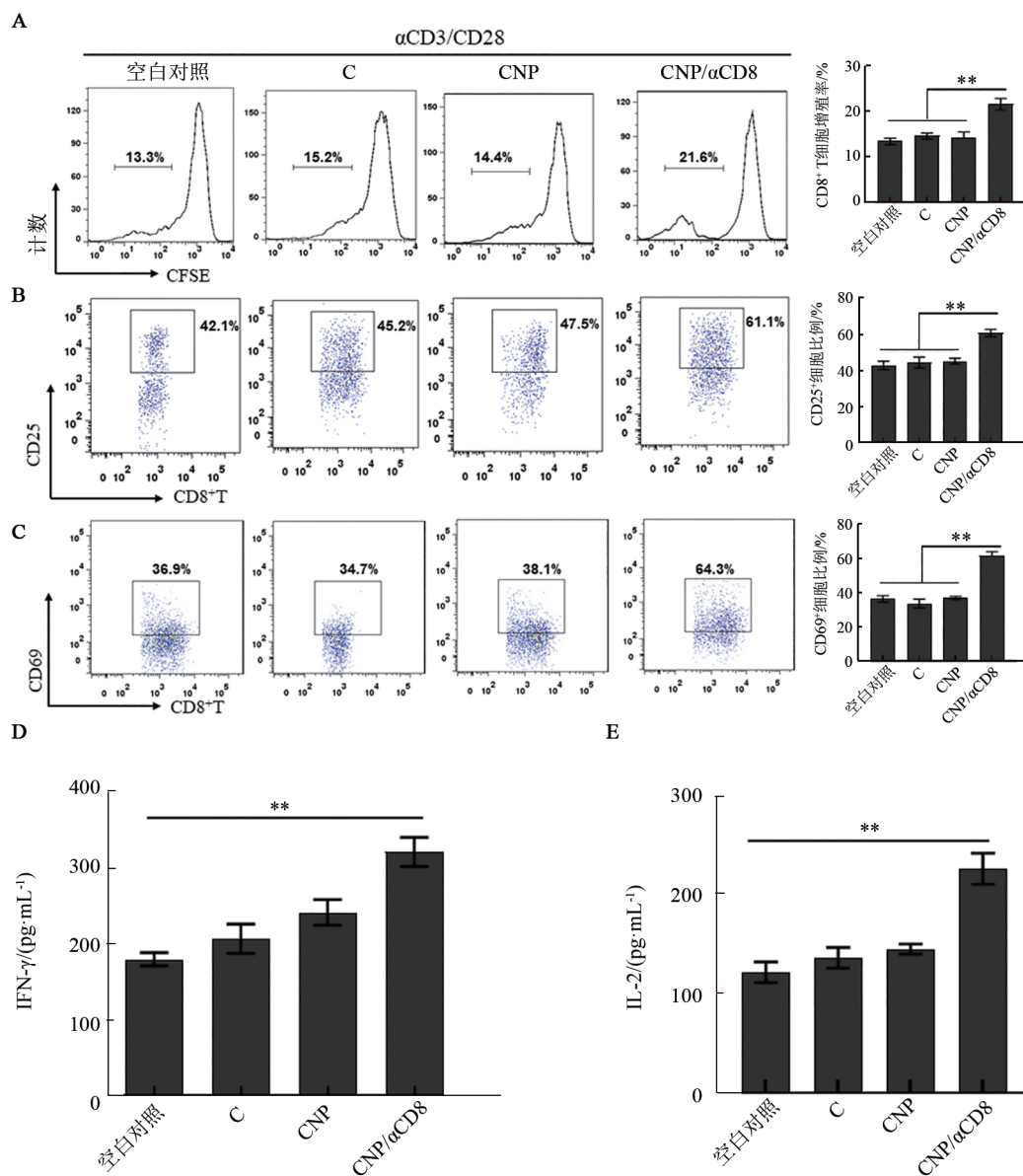


图3 流式细胞仪检测CD8⁺ T细胞A2AR分子的表达

3 讨论

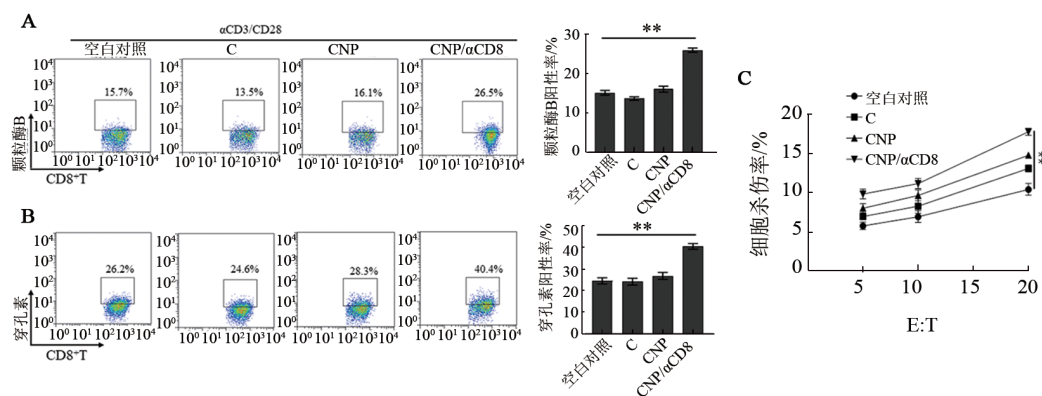
增强T细胞活性和免疫效应功能是提高肿瘤免疫治疗疗效的重要策略^[14],腺苷受体特别是A2AR在这一过程中起重要作用^[15]。激活A2AR能抑制T细胞激活、增殖和细胞因子分泌等从而促进肿瘤生长^[16],而抑制A2AR则使活性T细胞的杀瘤能力得到恢复和增强^[17]。A2AR在肿瘤免疫治疗中起重要作用

用,阻断A2AR能减少Treg细胞数,增强CD8⁺ T细胞的抗肿瘤免疫反应,抑制肿瘤生长^[18];抑制A2AR能增强DC细胞的抗原提呈能力,激活并提高CTL细胞免疫效应功能^[19]。上述研究表明,A2AR可通过多种机制影响免疫细胞功能,介导机体的免疫抑制,抑制A2AR分子能阻断腺苷-腺苷受体通路对免疫效应细胞功能的抑制作用,如小分子抑制剂AB928抑制A2AR活性能提高CAR-T细胞的增殖、细胞因子分泌



A: 流式细胞仪检测 CNP/αCD8 对 CD8⁺ T 细胞增殖; B、C: 流式细胞仪检测 CNP/αCD8 对 CD25(B)和 CD69(C)表达的影响; D、E: 酶联免疫吸附试验检测上清液中 IFN-γ(D)和 IL-2(E)含量。 **P<0.01。

图4 CNP/αCD8 纳米微粒促进 CD8⁺ T 细胞增殖和活化



A、B: 流式细胞仪检测不同处理 CD8⁺ T 细胞颗粒酶 B 的表达(A)和穿孔素(B)的表达; C: 乳酸脱氢酶法测定在不同效靶比 CD8⁺ T 细胞对 HepG2 细胞的杀伤率。 **P<0.01。

图5 CNP/αCD8 纳米微粒增强 CD8⁺ T 细胞的细胞毒活性和杀伤能力

和杀伤肿瘤细胞的能力^[20]。纳米微粒是大小约为100 nm的颗粒,它能保护其中包被的内容物免受降解、缓慢释放被包裹的物质,作为小分子药物、核酸、蛋白质等递送系统用于疾病诊断和治疗^[21-22]。纳米材料在肿瘤治疗中作为药物载体能够将化疗药物、核酸和免疫调节剂靶向递送到肿瘤部位,增强抗癌药物的药代动力学、生物分布和治疗效果,同时减少全身毒性^[23]。纳米微粒在T细胞抗肿瘤免疫中起重要作用,用纳米微粒将基因、细胞因子、抗体、小分子等递送到T细胞可以促进T细胞活化增殖和免疫效应功能^[24]。近年来发现,纳米材料与核酸或小分子抑制剂制成的纳米微粒显示出较强抗肿瘤活性,研究^[25]显示,与单纯A2AR-siRNA相比,载A2AR-siRNA纳米微粒能显著抑制T细胞A2AR和PKA/CREB表达,促进NF- κ B表达,促进T细胞增殖和IFN- γ 分泌,抑制T细胞凋亡和分泌IL-10,同时抑制Treg细胞的活性,增强机体抗肿瘤免疫功能。另有研究^[26]将腺苷受体抑制剂与聚多巴胺(polydopamine, PDA)结合制成纳米微粒,释放腺苷受体抑制剂抑制A2AR表达,增强光热疗法诱导肿瘤免疫原性死亡产生的免疫反应,即促进DC细胞激活和CD8⁺T浸润,减少抑制性细胞MDSC。这些研究表明,用纳米微粒能显著减少A2AR分子对免疫功能的抑制作用,对肿瘤免疫治疗具有重要意义。CPI-444是一种小分子抑制剂,具有抗肿瘤活性,其机制是通过抑制A2AR的信号转导,恢复并增强T细胞活性,提高机体免疫功能,抑制肿瘤生长^[27]。但CPI-444与纳米微粒结合对T细胞功能的影响还未见报道。本研究用PLGA聚合物制备载CPI-444纳米微粒,观察纳米微粒对CD8⁺T细胞功能的影响。首先,荧光显微镜和流式细胞仪结果显示,与其他组相比,荧光素纳米微粒C6NP/ α CD8能更有效地进入CD8⁺T细胞,说明该纳米系统可用于递送CPI-444;其次,与游离CPI-444和非靶向NP(CNP)相比,CNP/ α CD8能显著促进CPI-444进入CD8⁺T细胞,抑制A2AR的表达,显著促进CD8⁺T细胞增殖和活化,增强CD8⁺T细胞杀瘤能力,这些结果说明CNP/ α CD8具有载药量高、胞内药物浓度高,作用时间长,作用效果好等特点。

综上,本研究初步探讨了聚乳酸-羟基乙酸聚合物载腺苷受体抑制剂的纳米微粒对T细胞生物学功能的影响,表明腺苷受体抑制剂与纳米微粒结合可显著提高T细胞的免疫效应功能,这种效应功能可能是通过抑制A2AR分子起作用。后续进一步研究CNP/ α CD8纳米微粒是否能在体内靶向识别T细胞、抑制A2AR分子表达,达到增强T细胞活性和抑制肿瘤生长的效果,进一步探讨CNP/ α CD8体内抗肿瘤作

用的机制,为腺苷受体抑制剂用于临床治疗提供新思路。临床应用方面,由于纳米微粒成分复杂,可能影响其在体内的生物学行为;其次,由于肿瘤的异质性,肿瘤微环境成分复杂,使得有效药物和药物递送系统在肿瘤部位积聚存在不确定性^[28];第三,需要考虑体内使用安全性,将纳米微粒产生的毒副作用降低到最小程度。需要进一步加强基础研究和临床转化,综合了解纳米药物的物化性质,以及对细胞、组织和器官方面的影响,进而合理设计出理想的纳米药物,安全、有效地用于临床治疗。

[参考文献]

- [1] CHEN Y X, YU D N, QIAN H, *et al.* CD8⁺ T cell-based cancer immunotherapy[J/OL]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 394[2024-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38685033/>. DOI: 10.1186/s12967-024-05134-6.
- [2] ONCOLOGY T L. CAR T-cell therapy for solid tumours[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(7): 893[2024-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34197740/>. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00353-3.
- [3] VESELY MD, ZHANG T, CHEN L. Resistance mechanisms to anti-pd cancer immunotherapy[J]. *Annu Rev Immunol*, 2022, 40: 45-74. DOI: 10.1146/annurev-immunol-070621-030155.
- [4] BAESSLER A, VIGNALI D A A. T cell exhaustion[J]. *Annu Rev Immunol*, 2024, 42(1): 179-206. DOI: 10.1146/annurev-immunol-090222-110914.
- [5] THOMPSON E A, POWELL J D. Inhibition of the adenosine pathway to potentiate cancer immunotherapy: potential for combinatorial approaches[J]. *Annu Rev Med*, 2021, 72: 331-348. DOI: 10.1146/annurev-med-060619-023155.
- [6] REMLEY V A, LINDEN J, BAUER T W, *et al.* Unlocking antitumor immunity with adenosine receptor blockers[J]. *Cancer Drug Resist*, 2023, 6(4): 748-767. DOI: 10.20517/cdr.2023.63.
- [7] SUN C F, WANG B C, HAO S L. Adenosine-A2A receptor pathway in cancer immunotherapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 837230 [2024-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35386701/>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.837230.
- [8] AUGUSTIN R C, LEONE R D, NAING A, *et al.* Next steps for clinical translation of adenosine pathway inhibition in cancer immunotherapy[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(2): e004089 [2024-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35135866/>. DOI: 10.1136/jitc-2021-004089.
- [9] KIANI F K, IZADI S, DEZFOULI E A, *et al.* Retraction notice to "Simultaneous silencing of the A2aR and PD-1 immune checkpoints by siRNA-loaded nanoparticles enhances the immunotherapeutic potential of dendritic cell vaccine in tumor experimental models" [Life Sci. 288 (2022) 120166[J/OL]. *Life Sci*, 2024, 350: 122775[2024-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38851943/>DOI: 10.1016/j.lfs.2024.122775.
- [10] BAI Y, ZHANG X, ZHENG J, *et al.* Overcoming high level adenosine-mediated immunosuppression by DZD2269, a potent and selective A2aR antagonist[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 302 [2024-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36229853/>.

- DOI: 10.1186/s13046-022-02511-1.
- [11] FALCHOOK G S, REEVES J, GANDHI S, *et al.* A phase 2 study of AZD4635 in combination with durvalumab or oleclumab in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer[J/OL]. *Cancer Immunol Immunother*, 2024, 73(4): 72[2024-06-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10908633/>. DOI: 10.1007/s00262-024-03640-6.
- [12] SEITZ L, JIN L X, LELETI M, *et al.* Safety, tolerability, and pharmacology of AB928, a novel dual adenosine receptor antagonist, in a randomized, phase 1 study in healthy volunteers[J]. *Invest New Drugs*, 2019, 37(4): 711-721. DOI: 10.1007/s10637-018-0706-6.
- [13] NEWTON H S, CHIMOTE A A, ARNOLD M J, *et al.* Targeted knockdown of the adenosine A_{2A} receptor by lipid NPs rescues the chemotaxis of head and neck cancer memory T cells[J/OL]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 21: 133-143[2024-06-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8005736/>. DOI: 10.1016/j.omtm.2021.03.001.
- [14] KAPTEIN P, SLINGERLAND N, METOIKIDOU C, *et al.* CD8-targeted IL2 unleashes tumor-specific immunity in human cancer tissue by reviving the dysfunctional T-cell pool[J/OL]. *Cancer Discov*, 2024, 14(7): 1226-1251[2024-06-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11215409/>. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-23-1263.
- [15] CHEN S Q, FAN J, XIE P, *et al.* CD8⁺ T cells sustain antitumor response by mediating crosstalk between adenosine A2A receptor and glutathione/GPX4[J/OL]. *J Clin Invest*, 2024, 134(8): e170071 [2024-06-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11014673/>. DOI: 10.1172/JCI170071.
- [16] LI N, TANG N, CHENG C, *et al.* Improving the anti-solid tumor efficacy of CAR-T cells by inhibiting adenosine signaling pathway[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2020, 9(1): 1824643[2024-06-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7781731/>. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1824643.
- [17] SLAATS J, WAGENA E, SMITS D, *et al.* Adenosine A2a receptor antagonism restores additive cytotoxicity by cytotoxic T cells in metabolically perturbed tumors[J]. *Cancer Immunol Res*, 2022, 10(12): 1462-1474. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-22-0113.
- [18] MA S R, DENG W W, LIU J F, *et al.* Blockade of adenosine A2A receptor enhances CD8⁺ T cells response and decreases regulatory T cells in head and neck squamous cell carcinoma[J/OL]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 99[2024-06-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5461710/>. DOI: 10.1186/s12943-017-0665-0.
- [19] BORODOVSKY A, BARBON C M, WANG Y J, *et al.* Small molecule AZD4635 inhibitor of A2AR signaling rescues immune cell function including CD103⁺ dendritic cells enhancing anti-tumor immunity[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e000417 [2024-06-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7394305/>. DOI: 10.1136/jitc-2019-000417.
- [20] SEIFERT M, BENMEBAREK M R, BRIUKHOVETSKA D, *et al.* Impact of the selective A2AR and A2BR dual antagonist AB928/etrumadenant on CAR T cell function[J]. *Br J Cancer*, 2022, 127(12): 2175-2185. DOI: 10.1038/s41416-022-02013-z.
- [21] LI X T, PENG X J, ZOULIKHA M, *et al.* Multifunctional nanoparticle-mediated combining therapy for human diseases[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 1[2024-06-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10758001/>. DOI: 10.1038/s41392-023-01668-1.
- [22] HE C X, GUO Y H, ZHOU N N, *et al.* Construction and application of a PD-L1-targeted multimodal diagnostic and dual-functional theranostics nanoprobe[J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 5479-5492. DOI: 10.2147/IJN.S461701.
- [23] RAMZY A, SOLIMAN A H, HASSANEIN S I, *et al.* Multitarget, multiagent PLGA nanoparticles for simultaneous tumor eradication and TME remodeling in a melanoma mouse model[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2024, 14(2): 491-509. DOI: 10.1007/s13346-023-01413-9.
- [24] LI F Z, OUYANG J, CHEN Z Q, *et al.* Nanomedicine for T-cell mediated immunotherapy[J/OL]. *Adv Mater*, 2024, 36(22): e2301770[2024-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36964936/>. DOI: 10.1002/adma.202301770.
- [25] MASJEDI A, HASSANNIA H, ATYABI F, *et al.* Downregulation of A2AR by siRNA loaded PEG-chitosan-lactate nanoparticles restores the T cell mediated anti-tumor responses through blockage of PKA/CREB signaling pathway[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 133: 436-445. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.223.
- [26] LIU Y Q, LIU Y, XU D L, *et al.* Targeting the negative feedback of adenosine-A2AR metabolic pathway by a tailored nanoinhibitor for photothermal immunotherapy[J/OL]. *Adv Sci*, 2022, 9(14): e2104182 [2024-06-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9108638/>. DOI: 10.1002/advs.202104182.
- [27] WILLINGHAM S B, HO P Y, HOTSON A, *et al.* A2AR antagonism with CPI-444 induces antitumor responses and augments efficacy to anti-PD-(L)1 and anti-CTLA-4 in preclinical models[J]. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6(10): 1136-1149. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0056.
- [28] LAMMERS T. Nanomedicine tumor targeting[J/OL]. *Adv Mater*, 2024, 36(26): e2312169 [2024-06-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38361435/>. DOI: 10.1002/adma.202312169.

[收稿日期] 2024-04-05

[修回日期] 2024-06-18

[本文编辑] 黄静怡