

携双抗体纳米微泡对卵巢癌细胞增殖活性的影响

吴天, 赵越, 胡蓉

<https://doi.org/10.12307/2023.974>

投稿日期: 2022-11-30

采用日期: 2023-01-10

修回日期: 2023-03-19

在线日期: 2023-04-20

中图分类号:

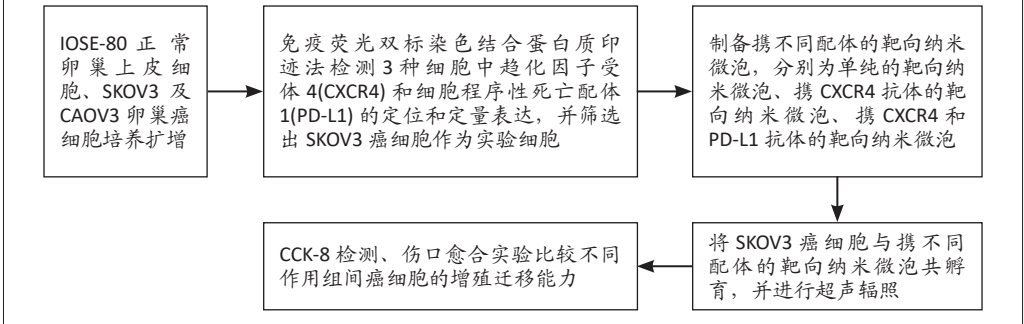
R459.9; R318.08; R73-36

文章编号:

2095-4344(2024)03-00341-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 携 CXCR4 抗体和 PD-L1 抗体双靶向纳米微泡的体外细胞实验



文题释义:

趋化因子受体4: 是一种具有7次跨膜结构的G蛋白偶联受体, 与癌症微环境的纤维化和免疫抑制等方面有关。肿瘤微环境内的基质细胞衍生因子1与其结合后, 通常促进肿瘤细胞的生存增殖以及肿瘤血管的生成, 它们还招募免疫细胞并引导它们做出特定的免疫抑制反应。

程序性细胞死亡受体: 是位于T细胞表面的抑制性受体, 与其配体1结合后可以抑制T细胞的活化, 减少抗肿瘤细胞因子的产生, 降低杀伤活性, 从而使免疫系统沉默。

摘要

背景: 免疫治疗可通过多种途径增强抗肿瘤免疫反应, 联合免疫治疗是一个更好的选择。超声靶向微泡破坏技术可将药物、基因、抗体和细胞因子直接输送到免疫细胞的细胞质中, 进一步增强免疫应答。然而, 通过超声靶向微泡破坏技术将携趋化因子受体4抗体和细胞程序性死亡配体1抗体双靶向纳米微泡应用于卵巢癌的治疗尚未见报道。

目的: 探讨超声辐照携趋化因子受体4抗体和程序性死亡配体1抗体双靶向纳米微泡对卵巢癌细胞增殖、迁移的影响。

方法: 对IOSE-80正常卵巢上皮细胞及SKOV3、CAOV3卵巢癌细胞进行培养及扩增, 采用双标记荧光免疫法对3种细胞中的趋化因子受体4和细胞程序性死亡配体1蛋白进行共定位, 蛋白质印迹法检测3种细胞中趋化因子受体4和程序性死亡配体1蛋白相对表达量, 并筛选出实验细胞。制备携不同配体的靶向纳米微泡后, 即单纯的纳米微泡、携趋化因子受体4抗体的纳米微泡、携趋化因子受体4和程序性死亡配体1抗体的纳米微泡。取对数生长期的SKOV3卵巢癌细胞, 分6组处理: A组加入McCoy's 5A培养基, B组加入含基质细胞衍生因子1的McCoy's 5A培养基, C组加入单纯的纳米微泡溶液与含基质细胞衍生因子1的McCoy's 5A培养基, D组加入携趋化因子受体4抗体的纳米微泡溶液与含基质细胞衍生因子1的McCoy's 5A培养基, E组加入携趋化因子受体4和程序性死亡配体1抗体的纳米微泡溶液与含基质细胞衍生因子1的McCoy's 5A培养基, F组加入单纯的纳米微泡溶液, 超声辐照120 s, 孵育48 h后, 采用CCK-8法检测细胞存活率, 通过伤口愈合实验检测B-E组细胞的愈合迁移能力。

结果与结论: ①免疫荧光染色显示, 3种细胞均可表达趋化因子受体4和程序性死亡配体1蛋白; 蛋白质印迹法检测显示, SKOV3、CAOV3卵巢癌细胞中的趋化因子受体4和程序性死亡配体1蛋白表达量均高于IOSE-80正常卵巢上皮细胞($P < 0.05$); ②CCK-8检测结果显示, B组细胞存活率高于A组($P < 0.05$), F组细胞存活率低于A组($P < 0.05$), B-E组细胞存活率逐渐降低, 组间两两比较差异有显著性意义($P < 0.05$); ③伤口愈合实验显示, B-E组细胞愈合率逐渐降低, 组间两两比较差异有显著性意义($P < 0.05$); ④结果表明, 超声靶向微泡破坏技术联合携趋化因子受体4抗体和程序性死亡配体1抗体双靶向纳米微泡可显著抑制卵巢癌细胞的增殖迁移。

关键词: 卵巢肿瘤; 增殖; 靶向纳米微泡; 超声靶向微泡破坏; 趋化因子受体4(CXCR4); 程序性死亡配体1(PD-L1)

缩略语: 趋化因子受体4: CXC chemokine receptor 4, CXCR4; 程序性死亡配体1: programmed Death-Ligand 1, PD-L1

Effect of nanobubbles carrying double antibodies on the proliferation of ovarian cancer cells

Wu Tian, Zhao Yue, Hu Rong

Xinjiang Key Laboratory of Ultrasound Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology Ultrasound, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Wu Tian, Master candidate, Xinjiang Key Laboratory of Ultrasound Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology Ultrasound, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Hu Rong, MD, Associate chief physician, Master's supervisor, Xinjiang Key Laboratory of Ultrasound Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology Ultrasound, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

新疆医科大学第一附属医院妇产超声诊断科, 新疆超声医学重点实验室, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

第一作者: 吴天, 女, 1996年生, 河南省商丘市人, 汉族, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事妇产超声诊断研究。

通讯作者: 胡蓉, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 新疆医科大学第一附属医院妇产超声诊断科, 新疆超声医学重点实验室, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

<https://orcid.org/0000-0002-6916-8966> (吴天)

基金资助: 国家自然科学基金(81660288), 项目负责人: 胡蓉; 新疆医科大学研究生创新创业项目(CXC2022008), 项目负责人: 吴天

吴天

引用本文: 吴天, 赵越, 胡蓉. 携双抗体纳米微泡对卵巢癌细胞增殖活性的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(3):341-346.



Abstract

BACKGROUND: Immunotherapy enhances the anti-cancer immune response in many ways, so combined immunotherapy is a better choice. Ultrasound-targeted microbubble destruction technique delivers drugs, genes, antibodies and cytokines directly to the cytoplasm of immune cells and enhances the immune response. However, the application of ultrasound-targeted microbubble destruction technique in the treatment of ovarian cancer with both CXC chemokine receptor 4 antibody and programmed death-ligand 1 antibody has not been reported.

OBJECTIVE: To investigate the effect of ultrasound irradiation on the proliferation and migration of ovarian cancer cells with CXC chemokine receptor 4 antibody and programmed death-ligand 1 antibody double targeted nanobubbles.

METHODS: IOSE-80 normal ovarian epithelial cells, SKOV3 and CAO3 ovarian cancer cells were cultured and expanded. Double labeling fluorescence immunoassay was used to co-locate CXC chemokine receptor 4 and programmed death-ligand 1 protein. Western blot assay was used to detect the relative expression of CXC chemokine receptor 4 and programmed death-ligand 1 protein in three kinds of cells and screen out the experimental cells, i.e., pure nanobubbles, nanobubbles carrying CXC chemokine receptor 4 antibody, nanobubbles carrying CXC chemokine receptor 4 and programmed death-ligand 1 antibody. SKOV3 ovarian cancer cells in the logarithmic growth phase were taken and divided into six groups for treatment. Group A was added with McCoy's 5A medium. Group B was added with McCoy's 5A medium containing stromal cell-derived factor-1. Group C was added with pure nanobubble solution and McCoy's 5A medium containing stromal cell-derived factor-1. Group D was added with nanobubble solution containing CXC chemokine receptor 4 antibody and McCoy's 5A medium containing stromal cell-derived factor-1. Group E was added with nanobubble solution containing CXC chemokine receptor 4 and programmed death-ligand 1 antibody and McCoy's 5A medium containing stromal cell-derived factor-1. Pure nanobubble solution was added in group F. After ultrasonic irradiation for 120 seconds and incubation for 48 hours, the survival rate of cells was measured by CCK-8 assay, and the healing and migration ability of cells in groups B-E were measured by wound healing test.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Immunofluorescence staining showed that CXC chemokine receptor 4 and programmed death-ligand 1 protein could be expressed in all three kinds of cells. Western blot assay showed that the expression levels of CXC chemokine receptor 4 and programmed death-ligand 1 in SKOV3 and CAO3 ovarian cancer cells were significantly higher than those in IOSE-80 normal ovarian epithelial cells ($P < 0.05$). (2) CCK-8 assay results exhibited that the cell survival rate of group B was higher than that of group A ($P < 0.05$). The cell survival rate of group F was lower than that of group A ($P < 0.05$). The cell survival rate of groups B-E decreased gradually, and there were significant differences between the two groups ($P < 0.05$). (3) Wound healing test demonstrated that the cell healing rate of groups B-E decreased gradually, and there were significant differences between the two groups ($P < 0.05$). (4) The results show that the use of CXC chemokine receptor 4 antibody and programmed death-ligand 1 antibody double targeted nanobubbles under ultrasound-targeted microbubble destruction can significantly inhibit the proliferation and migration of ovarian cancer cells.

Key words: ovarian tumor; proliferation; targeted nanobubble; ultrasound-targeted microbubble destruction; CXC chemokine receptor 4; programmed death-ligand 1

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 81660288 (to HR); Innovation and Entrepreneurship Project for Postgraduates of Xinjiang Medical University, No. CXC2022008 (to WT)

How to cite this article: WU T, ZHAO Y, HU R. Effect of nanobubbles carrying double antibodies on the proliferation of ovarian cancer cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(3):341-346.

0 引言 Introduction

卵巢癌是一种具有隐匿性生长、转移频繁、耐药快等特点的恶性肿瘤，具有较高死亡率^[1]。患者在接受传统化疗后的几年内往往出现耐药现象，因此免疫疗法成为卵巢癌治疗的新革命^[2]。为了优化激活肿瘤免疫循环，除了T细胞和抗原提呈细胞之间的共刺激信号传递外，还可通过靶向T细胞的受体或配体来抵抗肿瘤微环境的免疫抑制作用^[3]。抗程序性细胞死亡受体及程序性死亡配体1(programmed Death-Ligand 1, PD-L1)的免疫疗法，可使由于程序性细胞死亡受体1及其配体信号抑制而失活的T细胞重新活跃起来，有效阻断肿瘤活性^[4]。然而有证据显示，阻断程序性死亡受体1及其配体虽可显著提高不同癌症的抗肿瘤效果^[5]，但只有一部分患者表现出临床反应^[6]。因此，理想的治疗方法是在激活特异性靶向肿瘤细胞T细胞的同时，减少肿瘤微环境中的免疫抑制细胞^[7]。孙敏捷教授团队证实了趋化因子受体4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)拮抗剂可减少抗PD-L1耐药肿瘤中的肿瘤纤维化，增加细胞毒性T淋巴细胞的渗透，减轻免疫抑制，从而调节免疫过程，提高抗PD-L1免疫治疗的客观应答率^[8]。然而将抗CXCR4与PD-L1的联合免疫治疗应用于卵巢癌的相关研究少见报道。

超声靶向微泡破坏是一种靶向性、非侵入性、高效、新颖的基因/药物递送系统，其中微泡是基因/药物递送载体^[9]。在精准医疗和靶向治疗流行的背景下，超声靶向微泡破坏因其独特的优势而备受瞩目，该技术在打开血脑屏障方面是可重复的，而且微泡在体内循环系统中运动时保持良好的稳定性^[10]。超声靶向微泡破坏具有高度的特异性和针对性，通过

修饰微泡来赋予它们定位能力^[11]。超声靶向微泡破坏通过将化疗药物包裹在微泡中，在药物和器官或组织之间形成一道屏障，从而降低了化疗药物的毒性作用。并且，该技术可以调节药物或分子的释放速度，精确杀死肿瘤区域的细胞，不干扰整个身体的免疫细胞水平，从而缓解化疗引起的免疫缺陷^[12]。此外，提高肿瘤免疫治疗效果是超声靶向微泡破坏最具临床价值的方面之一。Li等^[13]、ILOVITSH等^[14]的研究发现，超声靶向微泡破坏可通过扩张血管、促进热休克蛋白表达、增加肿瘤抗原暴露和促进细胞因子分泌，增强CD8⁺T细胞浸润和T细胞介导的适应性免疫应答。TAN等^[15]的研究证实了超声靶向微泡破坏可减轻CD71⁺红系祖细胞对Lewis肺癌模型的免疫抑制并促进抗PD-L1的免疫治疗，增强抗肿瘤效果。对于妇科肿瘤，超声靶向微泡破坏联合贝伐珠单抗或抗PD-L1抗体，可通过增加CD8⁺T细胞的迁移和浸润提高宫颈癌、子宫内膜癌和卵巢癌的疗效^[16-17]。

因此，超声靶向微泡破坏与联合免疫治疗结合将是一种有前途的肿瘤治疗策略。为追求最大的抗肿瘤效果，此次实验通过制备的携CXCR4抗体和PD-L1抗体双靶向纳米微泡联合超声靶向微泡破坏技术，在体外实验中探索其对卵巢癌细胞增殖活性的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学观察实验，多组间比较使用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD法。

1.2 时间及地点 实验于2022年1-7月在新疆医科大学第一附属医院科技楼完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞 IOSE-80 人正常卵巢上皮细胞 (STR 鉴定正确) 购自赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司, SKOV3 及 CAO3 卵巢癌细胞 (STR 鉴定正确) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3.2 实验试剂及仪器 无血清 McCoy's 5A 培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司); 二棕榈酰磷脂酰胆碱 (瑞士 Adamas); 生物素化二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000、链霉亲和素 (西安瑞禧生物科技有限公司); 氮气 (新疆金红山气体检测有限责任公司); 全氟丙烷 (武汉纽瑞德特种气体有限公司); PD-L1/CD274 Polyclonal antibody、CXCR4 Monoclonal antibody (武汉三鹰生物技术有限公司); 山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor® 488)、山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor® 594)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (英国 Abcam); 基质细胞衍生因子 1 重组蛋白 (美国 MedChemExpress); SuperSignal West Pico PLUS 化学发光底物 (美国 Thermo Fisher); beta-Actin 抗体 (北京义翘神州); CCK-8 试剂盒 (日本同仁化学); 激光共聚焦显微镜 (上海卡尔蔡司); 化学发光成像仪系统 (上海勤翔科学仪器有限公司); Vivid 7 超声诊断仪、高频探头 i13L 14 MHz (美国 GE)。

1.4 实验方法

1.4.1 双标记荧光免疫法对 CXCR4 与 PD-L1 蛋白共定位 取对数生长期的 IOSE-80 细胞及 SKOV3、CAOV3 卵巢癌细胞, 分别以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种到含盖玻片的 24 孔培养板中, 每孔 200 μL , 孵育过夜; 40 g/L 多聚甲醛固定细胞, 以 PBS 洗涤; 0.5% Triton X-100 处理, 以 PBS 洗涤; 37 $^{\circ}\text{C}$ 下用 1% 牛血清白蛋白封闭 40 min, 清除残余封闭液; 滴加 1 : 500 比例稀释的一抗 (CXCR4、PD-L1), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 以 PBS 洗涤; 滴加 1 : 500 比例稀释的 Alexa Fluor 488 或 Alexa Fluor 594 标记的二抗, 室温下避光 2 h, 以 PBS 洗涤; 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚染色, 避光孵育 5 min, 充分冲洗, 激光共聚焦显微镜下观察。

1.4.2 蛋白质印迹法检测 CXCR4 与 PD-L1 蛋白表达量 收集铺满 T25 培养瓶的 IOSE-80 细胞及 SKOV3、CAOV3 卵巢癌细胞, 数量约 5×10^6 个, 1 000 r/min 离心 5 min, 去除上清液; 以 PBS 洗涤后收集在 EP 管中, 加入裂解液, 冰上裂解; 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 使用二喹啉甲酸法检测蛋白质浓度; 将蛋白样品与上样缓冲液混匀, 加热使蛋白变性, 冷却; 用 10% 分离胶和 5% 浓缩胶电泳分离蛋白质并转膜; 室温下用 5% 脱脂奶粉封闭膜 1 h, 以 PBS 洗涤; 4 $^{\circ}\text{C}$ 下加入 CXCR4 抗体 (1 : 400)、PD-L1 抗体 (1 : 400)、 β -肌动蛋白 (1 : 1 000) 孵育过夜, 以 PBS 洗涤; 室温下与稀释比例分别为 1 : 5 000、1 : 5 000、1 : 10 000 的二抗孵育 1 h, 以 PBS 洗涤; 通过增强化学发光法及化学发光成像仪显像, 以 β -肌动蛋白为内参。利用 Image J 软件量化条带强度。

1.4.3 靶向纳米微泡的制备 采用薄膜水化法制备空纳米微泡^[18], 生物素-亲和素桥接法制备靶向纳米微泡^[19]。按一定比例将二棕榈酰磷脂酰胆碱与生物素化二硬脂酰基磷脂酰

乙醇胺-聚乙二醇 2000 溶于氯仿, 置于旋转蒸发仪, 吹入氮气使其充分挥发, 抽真空; 加入三羟甲基氨基甲烷缓冲液水化薄膜, 形成均匀的脂质体膜混悬液; 装入西林瓶, 抽真空并注入全氟丙烷; 置于银汞调合器振荡 30 s, 得到生物素化空纳米微泡, 于冰上保存; 向空纳米微泡中加入链霉亲和素, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 分层后弃下清液; 每 1×10^7 个微泡加入生物素化 CXCR4 抗体或 (和) PD-L1 抗体 1.5 μg , 分别制备携载 CXCR4 抗体的纳米微泡、携 CXCR4 抗体与 PD-L1 抗体的纳米微泡, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 分层后收集上层乳白色微泡, 得到靶向纳米微泡, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。以上操作避光下进行。

抗体携载验证: 取约 5×10^6 个携 CXCR4 抗体与 PD-L1 抗体的纳米微泡, 加入 10 μL 稀释比例为 1 : 500 的 Alexa Fluor® 488 或 Alexa Fluor® 594 标记的二抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 置于倒置荧光显微镜下观察。

1.4.4 CCK-8 实验检测细胞存活率 取对数期生长的 SKOV3 卵巢癌细胞, 以 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL , 分 6 组处理: A 组加入无血清的 McCoy's 5A 培养基 200 μL ; B 组加入 PBS 100 μL 与含 100 ng/mL 基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基 100 μL ; C 组加入单纯的纳米微泡溶液 100 μL 与含 100 ng/mL 基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基 100 μL ; D 组加入携 CXCR4 抗体的纳米微泡溶液 100 μL 与含 100 ng/mL 基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基 100 μL ; E 组加入携 CXCR4 抗体与 PD-L1 抗体的纳米微泡溶液 100 μL 与含 100 ng/mL 基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基 100 μL ; F 组加入单纯的纳米微泡溶液 100 μL 与 McCoy's 5A 培养基 100 μL 。然后采用 GE Vivid 7 超声诊断仪进行超声处理, i13L 14 MHz 高频探头, 机械指数 0.6, 辐照 120 s^[20]。孵育 48 h 后, 加 CCK-8 溶液, 用酶标仪于 450 nm 处测定吸光度值, 计算存活率。实验重复 3 次。

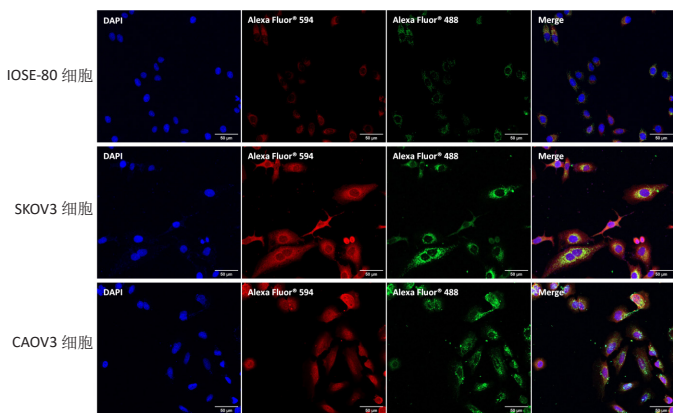
1.4.5 伤口愈合实验检测细胞愈合迁移能力 取对数期生长的 SKOV3 卵巢癌细胞, 以 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度铺于 6 孔板中, 每孔加入 1 mL; 细胞生长达到 90% 融合后, 用 200 μL 的枪头尖端进行划痕, 按照 1.4.4 中 B-E 组方法处理, 仅干预液与培养基的体积改为 500 μL 。48 h 后, 显微镜下观察和拍摄伤口愈合情况。使用 Image J 软件, 将图片设置 “Type” 为 “8-bit”, 多次进行 “smooth” 处理, 以便识别划痕边界; 视情况调整图像阈值, 适当舍弃个别散在的细胞, 以便勾勒出面积进行测量。愈合率 = (0 h 划痕面积 - 48 h 后的划痕面积) / 0 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.5 主要观察指标 各组 SKOV3 卵巢癌细胞存活率与愈合迁移能力。

1.6 统计学分析 所有实验平均重复 3 次, 采用统计软件 SPSS 26.0 分析实验数据, Shapiro-Wilk 法对数据进行正态性检验, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述, 多组间比较使用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD 法; 当 $P < 0.05$ 时差异有显著性意义。文章统计学方法已通过新疆医科大学公共卫生学院统计学专家审核。

2 结果 Results

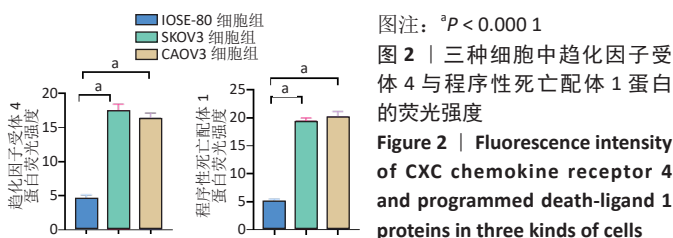
2.1 CXCR4 与 PD-L1 蛋白在 3 种细胞中的共定位 激光共聚焦显微镜下观察可见, CXCR4 与 PD-L1 蛋白均可共定位于 3 种细胞, 其中 SKOV3、CAOV3 卵巢癌细胞中 CXCR4 蛋白与 PD-L1 蛋白荧光强度均明显高于 IOSE-80 细胞 ($P < 0.0001$), SKOV3 与 CAOV3 卵巢癌细胞的两种蛋白荧光强度比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 1, 2。



图注: SKOV3、CAOV3 卵巢癌细胞的红绿荧光信号强度相似, IOSE-80 细胞的荧光信号弱于 SKOV3、CAOV3 卵巢癌细胞。蓝色荧光为细胞核, 红色荧光为程序性死亡配体 1 所在位置, 绿色荧光为趋化因子受体 4 所在位置, 标尺 = 50 μm

图 1 | 趋化因子受体 4、程序性死亡配体 1 在 3 种细胞中的定位 (免疫荧光染色)

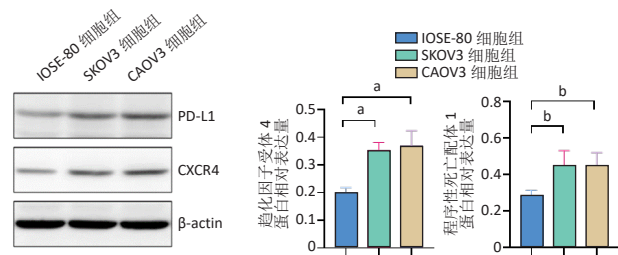
Figure 1 | Localization of CXCR4 chemokine receptor 4 and programmed death-ligand 1 in three kinds of cells (immunofluorescence staining)



图注: $^a P < 0.0001$
图 2 | 三种细胞中趋化因子受体 4 与程序性死亡配体 1 蛋白的荧光强度

Figure 2 | Fluorescence intensity of CXCR4 chemokine receptor 4 and programmed death-ligand 1 proteins in three kinds of cells

2.2 CXCR4 与 PD-L1 蛋白在 3 种细胞中的表达量 蛋白质印迹法检测结果显示, SKOV3、CAOV3 卵巢癌细胞中 CXCR4 的蛋白表达量均明显高于 IOSE-80 细胞 ($P < 0.01$), 两种癌细胞中 PD-L1 的蛋白表达量均明显高于 IOSE-80 细胞 ($P < 0.05$)。而 SKOV3 与 CAOV3 卵巢癌细胞的两种蛋白表达量比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 3。

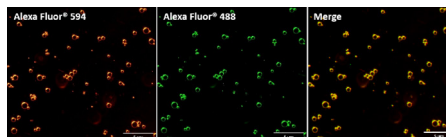


图注: $^a P < 0.01$, $^b P < 0.05$

图 3 | 三种细胞中程序性死亡配体 1(PD-L1) 和趋化因子受体 4(CXCR4) 蛋白表达

Figure 3 | Protein expression of CXCR4 chemokine receptor 4 and programmed death-ligand 1 in three kinds of cells

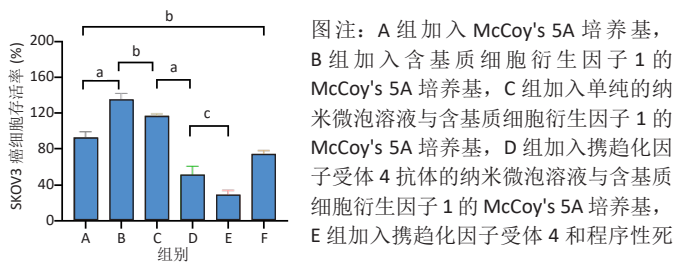
2.3 靶向纳米微泡连接抗体的鉴定结果 与 Alexa Fluor®488 或 Alexa Fluor®594 标记的二抗孵育后, 荧光显微镜下纳米微泡形态表现为大小均匀的球体, 分散良好。单靶向纳米微泡在荧光显微镜下呈现绿色荧光, 而双靶向纳米微泡同时呈现红、绿色荧光, 红色荧光与绿色荧光重合发出橙黄色荧光, 说明生物素化的微泡以链霉亲和素为桥梁成功偶联生物素化的 CXCR4 及 PD-L1 抗体, 见图 4。



图注: 纳米微泡形态表现为大小均匀的球体, 分散良好, 红色荧光为程序性死亡配体 1 所在位置, 绿色荧光为趋化因子受体 4 所在位置, 标尺 = 5 μm

图 4 | 生物素化双靶向纳米微泡连接抗体鉴定 (免疫荧光染色)
Figure 4 | Identification of biotinylated double-targeted nanobubble conjugated antibody (immunofluorescence staining)

2.4 各组 SKOV3 卵巢癌细胞的增殖活性比较 选择 SKOV3 卵巢癌细胞为实验细胞, 将细胞与干预液共孵育 48 h 后, A-F 组细胞存活率分别为 (92.5±3.9)%、(135.1±4.0)%、(116.7±1.6)%、(51.3±5.5)%、(28.6±3.1)%、(74.7±2.1)%。B 组细胞存活率显著高于 A 组 ($P < 0.0001$), C 组细胞存活率显著低于 B 组 ($P < 0.05$), F 组细胞存活率显著低于 A 组 ($P < 0.05$), D 组细胞存活率较 C 组下降更加显著 ($P < 0.0001$), E 组细胞存活率低于 D 组 ($P < 0.01$), 见图 5。



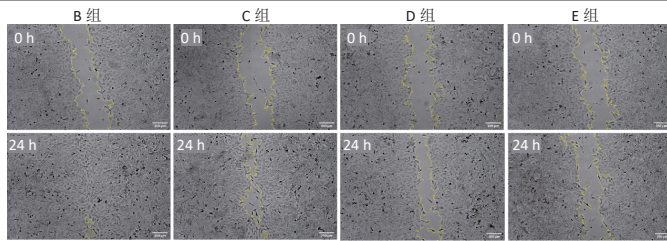
图注: A 组加入 McCoy's 5A 培养基, B 组加入含基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基, C 组加入单纯的纳米微泡溶液与含基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基, D 组加入携趋化因子受体 4 抗体的纳米微泡溶液与含基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基, E 组加入携趋化因子受体 4 和程序性死亡配体 1 抗体的纳米微泡溶液与含基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基, F 组加入单纯的纳米微泡溶液。 $^a P < 0.0001$, $^b P < 0.05$, $^c P < 0.01$

图 5 | 各组 SKOV3 卵巢癌细胞增殖活性情况
Figure 5 | Proliferative activity of SKOV3 ovarian cancer cells in each group

2.5 各组 SKOV3 卵巢癌细胞的愈合迁移能力比较 划痕后, SKOV3 卵巢癌细胞与干预液共孵育 48 h, B-E 组细胞愈合率分别为 (97.7±1.1)%、(72.1±3.9)%、(37.7±3.1)%、(16.5±3.4)%; C 组细胞愈合率显著低于 B 组 ($P < 0.01$), D 组细胞愈合率较 C 组下降更加显著 ($P < 0.0001$), E 组细胞愈合率低于 D 组 ($P < 0.01$), 见图 6, 7。

3 讨论 Discussion

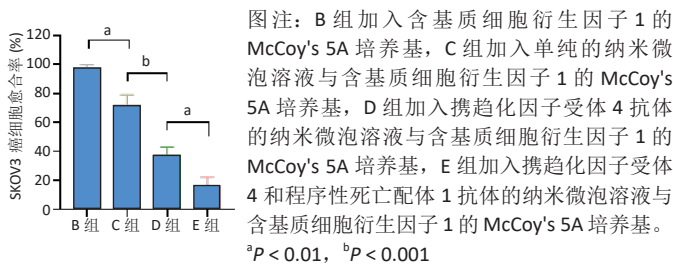
卵巢癌是最致命的妇科恶性肿瘤, 临床表现隐匿, 前哨症状少, 缺乏有效的筛查策略。卵巢癌的 5 年生存率较低, 主要是由于复发和对化疗药耐药^[21]。免疫治疗在各种癌症类型中取得了令人鼓舞的进展, 但由于肿瘤微环境的特殊性, 如缺氧、肿瘤血管畸形和免疫逃逸, 以及目前免疫治疗的局限性, 如脱靶毒性、药物渗透和积累不足以及免疫细胞功能



图注：B 组加入含基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基，C 组加入单纯的纳米微泡溶液与含基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基，D 组加入携趋化因子受体 4 抗体的纳米微泡溶液与含基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基，E 组加入携趋化因子受体 4 和程序性死亡配体 1 抗体的纳米微泡溶液与含基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基。标尺 = 200 μm

图 6 | 各组 SKOV3 卵巢癌细胞迁移愈合情况

Figure 6 | Migration and healing of SKOV3 ovarian cancer cells in each group

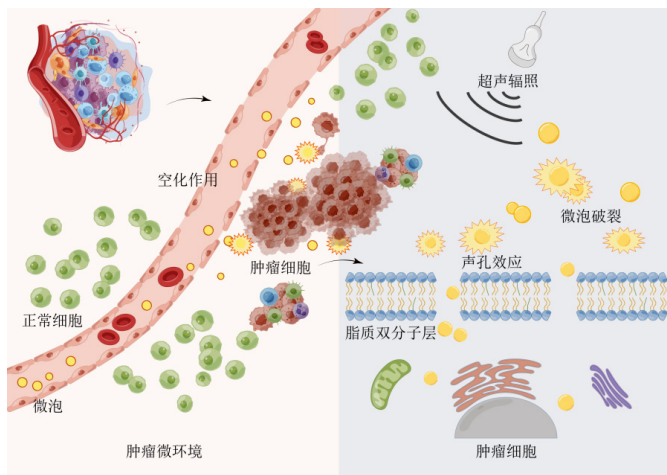


图注：B 组加入含基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基，C 组加入单纯的纳米微泡溶液与含基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基，D 组加入携趋化因子受体 4 抗体的纳米微泡溶液与含基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基，E 组加入携趋化因子受体 4 和程序性死亡配体 1 抗体的纳米微泡溶液与含基质细胞衍生因子 1 的 McCoy's 5A 培养基。
^aP < 0.01, ^bP < 0.001

图 7 | 各组 SKOV3 卵巢癌细胞愈合迁移情况比较

Figure 7 | Comparison of healing and migration of SKOV3 ovarian cancer cells in each group

障碍，大部分患者受益有限^[22]。而超声靶向微泡破坏治疗有助于减少免疫治疗相关的不良事件。超声靶向微泡破坏的生物物理机制主要是空化作用(或称为声孔效应)(图 8)，诱导血管内皮细胞之间的间隙增加，细胞膜的渗透性增加^[23]。曾宏兴等^[24]在探讨超声靶向爆破载藤黄酸微泡对人结肠癌细胞增殖和凋亡的影响时发现，超声辐照组的细胞凋亡率(16.33±0.45)%显著高于对照组(3.33±0.09)%。SHI 等^[25]的细胞侵袭实验结果也显示，单独超声辐照组与对照组相比癌细胞迁移数目显著减少，而超声与微泡联合比单独的超声处理产生的抑癌作用更明显，这为开发新的超声介导的癌症治疗提供了可能。



图注：超声靶向微泡破坏可通过空化或声孔效应增大对肿瘤血管和细胞膜的通透性，提高治疗基因/药物的递送效率

图 8 | 超声靶向微泡破坏技术

Figure 8 | Ultrasonic targeted microbubble destruction technique

超声靶向微泡破坏突破了血管的限制，与血管外组织或肿瘤的标记物结合，从而有利于早期诊断、临床分期和疾病治疗。通过双标记荧光免疫法，此次实验发现 3 种细胞均可表达 CXCR4 和 PD-L1 蛋白。SKOV3、CAOV3 卵巢癌细胞中出现了较强的绿色及红色荧光信号，且两种癌细胞的荧光强度相似，而 IOSE-80 细胞的荧光强度则弱于两种癌细胞。此外，这也验证了 CXCR4、PD-L1 与其抗体的结合通路，从而可在体内免疫循环中使失活的 T 细胞重新活跃起来，增强抗肿瘤作用。DAASSI 等^[26]、SHI 等^[27]研究认为 CXCR4 主要位于细胞膜上，PD-L1 主要位于细胞膜和细胞质中，此次实验双重染色结果与之相似。蛋白质印迹法检测结果显示，SKOV3、CAOV3 卵巢癌细胞中 CXCR4、PD-L1 蛋白的表达量均显著高于 IOSE-80 细胞，而两种癌细胞之间无显著差异，这为 CXCR4、PD-L1 成为卵巢癌治疗的靶点提供了可能。此外，HAO 等^[28]证明了抗 PD-L1/CXCR4 双功能纳米体对肿瘤细胞的抑制作用与 CXCR4 的表达有关，因此筛选 SKOV3 癌细胞作为实验细胞。此次实验也发现，卵巢癌细胞过表达的 CXCR4 和 PD-L1 蛋白在正常卵巢上皮细胞表面也存在，因此在以其为靶点的治疗策略中，为避免对正常组织的影响以保证特异性，可利用超声靶向微泡破坏技术精确定位到肿瘤组织，仅局部释放药物以减少对正常组织的损害，实现更高的治疗效率。

目前市售的微泡仅用于增强成像，而与药物、基因和疫苗整合的“下一代”微泡需要在未来进行优化并适应临床应用。此外，超声靶向微泡破坏的最佳参数还在不断研究中，治疗效果不仅与频率、机械指数、占空比和照射时间等超声参数相关，还与微泡剂量、环境温度、空气湿度和组织类型等非超声要素相关。关丽娜等^[20]的研究显示，以机械指数 0.6、靶向微泡浓度 10⁹ L⁻¹、辐照时间 120 s 为微泡爆破条件的较优组合，高机械指数可使纳米泡爆破，而适宜的辐照时间可保护细胞及细胞微环境。因此，此次实验参考该微泡爆破条件，通过薄膜水化法及生物素-亲和素桥接法制备双靶向纳米微泡进行干预，比较 SKOV3 卵巢癌细胞增殖受抑制的程度。细胞体外实验显示，单纯基质细胞衍生因子 1 组的细胞存活率明显高于细胞对照组，同时单靶向纳米微泡组的细胞增殖活性明显低于纳米微泡 + 基质细胞衍生因子 1 组。BIASCI 等^[29]的研究也同样说明了在无血清培养体外细胞条件下，基质细胞衍生因子 1 可刺激 CXCR4 阳性表达的癌细胞增殖，并被 CXCR4 抗体所抑制。空泡且无基质细胞衍生因子 1 组与细胞对照组相比、空泡组与基质细胞衍生因子 1 组相比，细胞活性明显降低，这可能与超声靶向微泡破坏可刺激细胞内产生具有肿瘤杀伤作用的活性氧有关^[25]。PD-L1 抗体既作为靶向分子也具有一定的免疫作用。体外免疫荧光结果验证了 PD-L1 与其抗体的结合通路，这将会抑制肿瘤免疫逃逸，从而发挥一定的治疗效果。联合免疫疗法可在不同的免疫调节途径之间产生协同和相加的效应^[30]。SAXENA 等^[7]的研究发现，CXCR4 拮抗剂具有显著的单药抗肿瘤活性，也可与抗 PD-L1 免疫治疗产生疗效叠加效应，为 CXCR4 拮抗剂既可作

为单一疗法又可作为免疫检查点抑制剂的有效辅助治疗提供了证据。此次实验与 SAXENA 等^[7]、LU 等^[31]的研究结果一致,辐照后双靶向纳米微泡组与单靶向纳米微泡组相比,卵巢癌细胞的增殖能力显著降低,说明 CXCR4 抗体与 PD-L1 抗体联合治疗可协助提高反应效果,这可能对卵巢癌有更好的治疗作用,这也证明了双靶向的优越性,有利于靶向材料到达靶区,从而提高治疗效果。LU 等^[31]研发了 CXCR4 靶向脂质体制剂(脂质体-普乐沙福),与游离普乐沙福相比,前者能更有效地重塑肿瘤免疫微环境,提高治疗效果。此次实验的这些纳米微泡外层包裹脂质体,同样增加了生物相容性,从而可提高细胞吞噬效率和药物传递效率。微泡不仅可以保护生物活性分子在运输过程中不被内源性清除,还可以通过惯性空化作用在病灶区释放,实现靶向治疗,减少全身性毒副作用^[32]。与声动力疗法类似,微泡通过引起微血管破裂和肿瘤细胞凋亡、阻碍肿瘤血管生成和增强免疫治疗效果来调节肿瘤免疫抑制微环境^[33]。目前,大多数超声靶向微泡破坏实验仍在体外或动物身上进行,考虑到人类环境的复杂性和异质性,超声靶向微泡破坏结合肿瘤免疫治疗的应用有必要进行进一步的临床试验。

综上所述,此次实验发现该双靶向纳米微泡可更大程度抑制卵巢癌细胞的生长,为超声靶向微泡破坏技术下 CXCR4 抗体与 PD-L1 抗体联合能加大抗肿瘤的免疫疗效作了铺垫。鉴于 CXCR4 抗体不但可以通过直接靶向基质细胞衍生因子 1/CXCR4 生物轴来控制癌细胞的增殖与转移,还能作为一种有效的免疫调节剂来防止多方面免疫抑制性肿瘤微环境的发展,在今后的工作中将进一步验证该方案可用于其他 CXCR4 或基质细胞衍生因子 1 表达水平高或低的癌症提高抗 PD-L1 免疫治疗的效果,为未来的临床试验奠定基础。

实验的局限性:①需进一步评估超声靶向微泡破坏和纳米微泡联合应用的安全性;②需深入体内研究,以阐明携该双抗体的靶向纳米微泡特异性结合肿瘤细胞、通过抑制免疫检查点 PD-L1 及阻断基质细胞衍生因子 1/CXCR4 生物轴抑制肿瘤生长和转移的分子机制。

致谢:感谢新疆超声医学重点实验室以及 Figdraw 绘图软件给予的大力支持。
作者贡献:所有作者均参与了实验过程,第一作者完成初稿,通讯作者审核。
利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权声明:文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。
出版规范:该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊投稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] ARMSTRONG D, ALVAREZ R, BAKKUM-GAMEZ J, et al. Ovarian Cancer, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2021;19(2):191-226.

[2] SUN Q, BAI X, SOFIAS A, et al. Cancer nanomedicine meets immunotherapy: opportunities and challenges. Acta Pharmacol Sin. 2020;41(7):954-958.

[3] YANG C, XIA B, ZHANG Z, et al. Immunotherapy for Ovarian Cancer: Adjuvant, Combination, and Neoadjuvant. Front Immunol. 2020;11:577869.

[4] BANTA K, XU X, CHITRE A, et al. Mechanistic convergence of the TIGIT and PD-1 inhibitory pathways necessitates co-blockade to optimize anti-tumor CD8 T cell responses. Immunity. 2022;55(3):512-526.e519.

[5] WEISS S, DJUREINOVIC D, JESSEL S, et al. A Phase I Study of APX005M and Cabiralizumab with or without Nivolumab in Patients with Melanoma, Kidney Cancer, or Non-Small Cell Lung Cancer Resistant to Anti-PD-1/PD-L1. Clin Cancer Res. 2021;27(17):4757-4767.

[6] WU M, HUANG Q, XIE Y, et al. Improvement of the anticancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade via combination therapy and PD-L1 regulation. J Hematol Oncol. 2022;15(1):24.

[7] SAXENA R, WANG Y, MIER J. CXCR4 inhibition modulates the tumor microenvironment and retards the growth of B16-OVA melanoma and Renca tumors. Melanoma Res. 2020;30(1):14-25.

[8] LI Z, WANG Y, SHEN Y, et al. Targeting pulmonary tumor microenvironment with CXCR4-inhibiting nanocomplex to enhance anti-PD-L1 immunotherapy. Sci Adv. 2020;6(20):eaaz9240.

[9] 徐桂兰, 宋建生, 杨世疆. 超声微泡沉默 S100A4 基因对胃癌干细胞干性和上皮间质转化的调控 [J]. 中国组织工程研究, 2021,25(25):4025-4031.

[10] BARZEGAR-FALLAH A, GANDHI K, RIZWAN S, et al. Harnessing Ultrasound for Targeting Drug Delivery to the Brain and Breaching the Blood-Brain Tumour Barrier. Pharmaceutics. 2022;14(10):2231.

[11] OMATA D, UNGA J, SUZUKI R, et al. Lipid-based microbubbles and ultrasound for therapeutic application. Adv Drug Deliv Rev. 2020;154-155:236-244.

[12] XUE Y, CHUNG J, TANG P, et al. USMB-shMincle: a virus-free gene therapy for blocking M1/M2 polarization of tumor-associated macrophages. Mol Ther Oncolytics. 2021;23:26-37.

[13] LI N, TANG J, YANG J, et al. Tumor perfusion enhancement by ultrasound stimulated microbubbles potentiates PD-L1 blockade of MC38 colon cancer in mice. Cancer Lett. 2021;498:121-129.

[14] ILOVITSH T, FENG Y, FOIRET J, et al. Low-frequency ultrasound-mediated cytokine transfection enhances T cell recruitment at local and distant tumor sites. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(23):12674-12685.

[15] TAN X, YI C, ZHANG Y, et al. Ultrasound-Targeted Microbubble Destruction Alleviates Immunosuppression Induced by CD71 Erythroid Progenitor Cells and Promotes PDL-1 Blockade Immunotherapy in the Lewis Lung Cancer Model. Front Oncol. 2021;11:768222.

[16] MA Y, HAN J, JIANG J, et al. Ultrasound targeting of microbubble-bound anti PD-L1 mAb to enhance anti-tumor effect of cisplatin in cervical cancer xenografts treatment. Life Sci. 2020;262:118565.

[17] YAMAGUCHI K, MATSUMOTO Y, SUZUKI R, et al. Enhanced antitumor activity of combined lipid bubble ultrasound and anticancer drugs in gynecological cervical cancers. Cancer Sci. 2021;112(6):2493-2503.

[18] DONG L, LI N, WEI X, et al. A Gambogic Acid-Loaded Delivery System Mediated by Ultrasound-Targeted Microbubble Destruction: A Promising Therapy Method for Malignant Cerebral Glioma. Int J Nanomedicine. 2022;17:2001-2017.

[19] 李翠仙, 黄基建, 陆清, 等. 靶向血管内皮生长因子受体 2/整合素 $\alpha_v\beta_3$ 微泡体内评价肾细胞癌血管生成的实验研究 [J]. 中华超声影像学杂志, 2022,31(4):338-344.

[20] 关丽娜, 魏圆圆, 窦静, 等. 优化靶向载基因超声纳米泡效能: 实验研究 [J]. 中国医学影像技术, 2022,38(9):1281-1285.

[21] BONIFÁCIO V. Ovarian Cancer Biomarkers: Moving Forward in Early Detection. Adv Exp Med Biol. 2020;1219:355-363.

[22] HAN Y, SUN J, WEI H, et al. Ultrasound-Targeted Microbubble Destruction: Modulation in the Tumor Microenvironment and Application in Tumor Immunotherapy. Front Immunol. 2022;13:937344.

[23] YANG Y, LI Q, GUO X, et al. Mechanisms underlying sonoporation: Interaction between microbubbles and cells. Ultrason Sonochem. 2020;67:105096.

[24] 曾宏兴, 郑德俊, 苑伟, 等. 超声靶向爆破载藤黄酸微泡对人结肠癌 HCT116 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2021,38(11):2163-2166.

[25] SHI D, GUO L, SUN X, et al. UTMD inhibit EMT of breast cancer through the ROS/miR-200c/ZEB1 axis. Sci Rep. 2020;10(1):6657.

[26] DAASSI D, MAHONEY KM, FREEMAN GJ. The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion. Nat Rev Immunol. 2020;20:209-215.

[27] SHI Y, RIESE DJ, SHEN J. The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis in Cancer. Front Pharmacol. 2020;11:574667.

[28] HAO S, XU S, LI L, et al. Tumour inhibitory activity on pancreatic cancer by bispecific nanobody targeting PD-L1 and CXCR4. BMC Cancer. 2022;22(1):1092.

[29] BIASCI D, SMORAGIEWICZ M, CONNELL C, et al. CXCR4 inhibition in human pancreatic and colorectal cancers induces an integrated immune response. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(46):28960-28970.

[30] 邓海怡, 李力强, 杨伊霖, 等. 双免疫联合治疗在晚期非小细胞肺癌中的一线应用 [J]. 中国肺癌杂志, 2022,25(2):102-110.

[31] LU G, QIU Y, SU X. Targeting CXCL12-CXCR4 Signaling Enhances Immune Checkpoint Blockade Therapy Against Triple Negative Breast Cancer. Eur J Pharm Sci. 2021;157:105606.

[32] SCHOEN S, KILINC M, LEE H, et al. Towards controlled drug delivery in brain tumors with microbubble-enhanced focused ultrasound. Adv Drug Deliv Rev. 2022;180:114043.

[33] YOO S, MITTELSTEIN D, HURT R, et al. Focused ultrasound excites cortical neurons via mechanosensitive calcium accumulation and ion channel amplification. Nat Commun. 2022;13(1):493.

(责任编辑: GW, ZN, QY, YJ)