doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.23.002

# 羧基化介孔二氧化硅纳米颗粒递送 PD-L1 抑制剂治疗膀胱癌 的作用研究 \*

杨锦涛 吴江涛 王 琦 邢添瑛 欧彤文<sup>△</sup> (首都医科大学宣武医院泌尿外科北京100053)

摘要目的:构建羧基化介孔二氧化硅纳米颗粒(COOH-MSN)递送 PD-L1 抑制剂治疗膀胱癌。方法:构建负载 PD-L1 抑制剂的 COOH-MSNs,透射电镜检测纳米颗粒的特征,zeta 电位分析仪检测纳米颗粒的电位变化;流式细胞术检测血液中T细胞和 CD8T细胞的比例;MTT实验检测细胞增殖;构建小鼠荷瘤模型,HE染色检测基本的病理学变化,免疫组化检测 ki-67 的表达。 结果:透射电镜结果显示纳米颗粒呈圆形,直径约为 100 nm;COOH-MSNs 表面带负电荷,BSA 呈强负电性,BSA 包封后纳米材 料整体负电荷增强;纳米材料可显著提高T细胞和CD8T细胞的比例,并进一步抑制膀胱癌细胞的增殖;动物实验结果显示纳米 材料可抑制移植瘤的生长,且移植瘤内淋巴细胞的数量显著升高;免疫组化结果显示相对于 PD-L1 抑制剂组,纳米材料组 ki-67 增殖指数显著减低;HE 染色结果显示 PD-L1 抑制剂组肾组织内可观察到血管充血、扩张和较多炎细胞浸润,而纳米材料组肾组 织损伤程度显著降低。结论:我们构建了一种负载有 PD-L1 抑制剂的 COOH-MSNs,可有效激活抗肿瘤免疫反应,并降低对正常 器官的损伤。

关键词:膀胱癌;介孔二氧化硅;PD-L1抑制剂;免疫治疗;肿瘤免疫 中图分类号:R-33;R737.14 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)23-4407-05

## Constructing Carboxylated Mesoporous Silica Nanoparticles to Deliver PD-L1 Inhibitors for the Treatment of Bladder Cancer\*

YANG Jin-tao, WU Jiang-tao, WANG Qi, XING Tian-ying, OU Tong-wen

(Department of Urology, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100053, China)

**ABSTRACT Objective:** To construct carboxylated mesoporous silica nanoparticles (COOH-MSN) to deliver PD-L1 inhibitors for the treatment of bladder cancer. **Methods:** COOH-MSNs loaded with PD-L1 inhibitor were constructed, the characteristics of nanoparticles were detected by transmission electron microscopy, and the potential changes of nanoparticles were detected by zeta potential analyzer. Flow cytometry was used to measure the proportion of T cells and CD8'T cells in the blood. Cell proliferation was detected by MTT assay. The mouse tumor-bearing model was constructed, the basic pathological changes were detected by HE staining, and the expression of ki-67 was detected by immunohistochemistry. **Results:** The results of transmission electron microscopy showed that the nanoparticles were round and the diameter was about 100 nm. The surface of COOH-MSNs was negatively charged, the BSA was strongly electronegative, and the overall negative charge of the nanomaterial was enhanced after the BSA encapsulation. The nanomaterials significantly increased the ratio of T cells and CD8'T cells, and further inhibited the proliferation of bladder cancer cells. The results of animal experiments showed that the nanomaterials inhibited the growth of transplanted tumors and the number of lymphocytes in transplanted tumors increased significantly. The results of immunohistochemistry showed that the ki-67 proliferation index decreased significantly in the nanomaterial group compared with the PD-L1 inhibitor group. HE staining showed that vascular congestion, dilatation, and more inflammatory cell infiltration were observed in the renal tissue of the PD-L1 inhibitor group, while the degree of renal tissue injury was significantly reduced in the nanomaterial group. **Conclusion:** We constructed a COOH-MSN loaded with PD-L1 inhibitors, which can effectively activate anti-tumor immune response and reduce damage to normal organs.

Key words: Bladder cancer; Mesoporous silica; PD-L1 inhibitor; Immunotherapy; Tumor immunity

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R737.14 Document code: A Article ID:1673-6273(2023)23-4407-05

## 前言

膀胱癌是最常见的泌尿系统恶性肿瘤之一,近几年其发 病率呈持续上升趋势<sup>(1)</sup>。系统性化疗是目前大部分膀胱癌患者

\*基金项目:首都卫生发展科研专项(2020-2-2015);首都医科大学宣武医院国自然青年培育项目(QNPY2022019)

作者简介:杨锦涛(1987-),男,博士后,主要研究方向:膀胱癌靶向治疗

<sup>△</sup> 通讯作者:欧彤文(1967-),男,博士,主任医师,博士研究生导师,主要研究方向:泌尿系统疾病的临床和基础,

E-mail: outongwen1967@126.com

<sup>(</sup>收稿日期:2023-07-10 接受日期:2023-07-31)

的一线治疗选择。然而膀胱癌的复发率非常高,非浸润性膀胱 癌的复发率约为60%。很多膀胱癌在治疗和复发过程中产生了 耐药,化疗效果显著降低<sup>[2,4]</sup>。免疫治疗是近几年肿瘤靶向治疗 的研究热点,目前已经有数种免疫检查点抑制剂进入临床应 用,最常见的是 PD-1/PD-L1 抑制剂<sup>[5]</sup>。PD-1/PD-L1 抑制剂可诱 导患者的免疫细胞快速活化和增殖,并释放大量的细胞因子, 在杀伤肿瘤细胞的同时,还可能引起细胞因子释放综合征(Cytokine release syndrome,CRS)等副作用<sup>[68]</sup>。CRS 以发热和多器 官功能障碍为特征,严重者可引起患者死亡<sup>[9]</sup>。因此,控制免疫 检查点抑制剂缓慢释放具有重要的临床意义。许多研究均显示 二氧化硅具有良好的物理、化学稳定性和生物相容性,在药物 控释、生物传感和催化等领域表现出广泛的应用前景<sup>[10-12]</sup>。本文 拟构建羧基化介孔二氧化硅纳米颗粒(Carboxyl-functionalized mesoporous silica nanoparticle,COOH-MSN),控制 PD-L1 抑制 剂的缓慢释放,为膀胱癌的免疫治疗提供新的工具。

### 1 材料和方法

## 1.1 试剂和材料

羧基化介孔二氧化硅购于江苏先丰纳米材料科技有限公司;抗小鼠 PD-L1 抑制剂购于美国 MedChemExpress 生物科技公司;膀胱癌细胞株 T24 细胞购于美国 ATCC 公司;胎牛血清、DMEM-F12 基础培养基和胰酶均购于美国 Hyclone 公司;淋巴细胞分离液购于天津 TBD 生物科技公司;CD3-PE 和CD8-APC 抗体购于美国 BD 公司;ki-67 抗体和免疫组化试剂 盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

#### 1.2 纳米材料的合成

40 mg 的 COOH-MSNs 缓慢的加入 PD-L1 抑制剂溶液中, 在超声震荡下充分溶解。在室温下反应 6 h 后,超速离心,收集 沉淀物,PBS 清洗三次。之后将沉淀物充分溶于牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin,BSA)溶液中,加入 EDC/NHS,室温下 反应 6 h。超速离心后,收集沉淀物,PBS 清洗三次。最后冷冻干 燥得到了纳米颗粒。透射电镜检测纳米颗粒的特征,zeta 电位 分析仪检测纳米颗粒的电位变化。

#### 1.3 流式细胞术

收集小鼠的心脏血,并使用 PBS 进行同体积的稀释。之后 轻柔的加到淋巴细胞分离液上层,1500×g 离心 20 min。用巴氏 管小心吸取中间的白膜层,加入到 5 mL 的 PBS 中。充分混勾 后,1500×g 离心 5 min,弃上清。使用 PBS 清洗三次后,细胞分 为三组:对照组(加入同体积的 PBS)、PD-L1 抑制剂组(加入 PD-L1 抑制剂) 和纳米材料组(加入负载有 PD-L1 抑制剂的 COOH-MSNs)。孵育 48 h 后,收集各组细胞,加入 CD3-PE 和 CD8-APC,室温条件避光孵育 15 min。使用 PBS 清洗三次后, 在流式细胞仪上检测 T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例。

### 1.4 增殖实验

膀胱癌细胞株 T24 细胞置于含有 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 中培养。实验分为四组:对照组(加入同体积的 PBS)、淋巴细胞组(加入未处理的淋巴细胞)、PD-L1 抑制剂组 (加入 PD-L1 抑制剂刺激的淋巴细胞)和纳米材料组(加入负载 有 PD-L1 抑制剂 COOH-MSNs 刺激的淋巴细胞)。共培养 48 小时后,去除淋巴细胞,之后将各组膀胱癌细胞以 4×10<sup>3</sup>/ 孔的 密度种植到 96 孔板中。继续培养 48 h,弃上清。PBS 清洗三次 后,加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液,继续培养 4 h。弃上清,加入 150 μL 二甲基亚砜, 震荡 15 min, 之后在酶联免疫检测仪 (OD:490 nm)处测量吸光度。

#### 1.5 动物实验

2×10<sup>6</sup>个 T24 细胞重悬于 30 μL 的 PBS 中,注射到小鼠的 左侧腋窝处皮下组织中,之后在适宜的环境中进行饲养。动物 实验分为三组:对照组(通过尾静脉注射 PBS)、PD-L1 抑制剂 组(尾静脉注射 PD-L1 抑制剂)和纳米材料组(尾静脉注射负载 有 PD-L1 抑制剂的 COOH-MSNs)。2 周后,使用 0.1%戊巴比妥 钠麻醉小鼠。断颈处死小鼠,获取移植瘤、以及正常肾脏,之后 置于 4%多聚甲醛中固定。24 h 后,进行石蜡切片,HE 染色检测 基本的病理学变化,免疫组化检测 ki-67 的表达。

#### 1.6 统计学方法

分析数据采用 GraphPad 5 软件进行,多组之间的比较采 用单因素方差分析,事后检测采用 Bonferroni 法,P<0.05 认为 组之间的差异具有统计学意义。

#### 2 结果

#### 2.1 纳米材料的特征

透射电镜结果显示纳米颗粒呈圆形,直径约为100 nm。我 们进一步检查了 Zeta 电位,COOH-MSNs 表面带负电荷,BSA 呈强负电性,BSA 包封后纳米材料整体负电荷增强。见图1。 2.2 纳米材料激活抗肿瘤免疫反应

相对于对照组,纳米材料组 T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例 分别升高了 16.71%和 90.65%。纳米材料组和 PD-L1 抑制剂组 T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例均没有统计学差异。这些结果说明 纳米材料可激活抗肿瘤免疫反应,且对 PD-L1 抑制剂的生物学 功能没有显著的影响。见图 2。

#### 2.3 纳米材料刺激的淋巴细胞抑制膀胱癌细胞的增殖

相对于对照组,淋巴细胞组膀胱癌细胞的增殖率降低了 26.50%。相对于淋巴细胞组,纳米材料组膀胱癌细胞的增殖率 进一步降低了 60.88%。纳米材料组和 PD-L1 抑制剂组膀胱癌 细胞的增殖率没有统计学差异。见图 3。

## 2.4 纳米材料在体抑制移植瘤的生长

相对于对照组,PD-L1抑制剂组移植瘤的体积减少了 45.19%。相对于PD-L1抑制剂组,纳米材料组移植瘤的体积进 一步减少了 29.44%。HE 染色结果显示相对于对照组,纳米材 料组和 PD-L1抑制剂组移植瘤内淋巴细胞的数量均显著升高。 免疫组化的结果显示相对于对照组,PD-L1抑制剂组 ki-67 增 殖指数减少了 32.61%。相对于 PD-L1抑制剂组,纳米材料组 ki-67 增殖指数进一步减少了 27.58%。见图 4。

#### 2.5 纳米材料在体降低免疫治疗的副作用

对照组基本观察不到肾组织的损伤。相对于对照组,PD-L1 抑制剂组肾组织的损伤程度显著升高,可观察到血管充血、扩 张和较多炎细胞浸润。相对于 PD-L1 抑制剂组,纳米材料组肾 组织损伤程度显著降低。见图 5。





Fig. 1 Characteristics of nanomaterials

(A) Transmission electron microscopy; (B) Zeta potential before BSA encapsulation; (C) Zeta potential after BSA encapsulation.



图 2 流式细胞术检测 T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例 Fig. 2 The ratio of T cells to CD8<sup>+</sup>T cells was detected by flow cytometry

## 3 讨论

膀胱癌是最常见的泌尿系统恶性肿瘤之一,近几年其发病率呈持续上升趋势。非浸润性膀胱癌采用电切术治疗,术后行灌注化疗。浸润性膀胱癌则首选手术切除和术后化疗<sup>[13]</sup>。然而膀胱癌的复发率非常高,非浸润性膀胱癌的复发率约为60%。很多膀胱癌在治疗和复发过程中产生了耐药,化疗效果显著降低。此外晚期膀胱癌患者大多身体素质较差,很难耐受化疗药

物的毒副作用<sup>[1+16]</sup>。免疫治疗可显著抑制肿瘤的生长,且副作用 相对更小<sup>[17]</sup>。然而,CRS 依旧是限制免疫检查点抑制剂广泛临 床应用的重要因素。在这篇文章中,我们采用 COOH-MSNs 控 制 PD-L1 抑制剂的缓慢释放,可在体显著减少对正常肾组织的 损伤。我们的研究为免疫治疗的广泛应用提供了新的思路。

经典的药物载体在制备、储存和应用过程中,容易在体内 和体外理化因素的影响下,稳定性和载药能力逐渐降低。二氧 化硅等无机药物载体的物理稳定性好,且基本不与化学物质发



生相互作用,具有良好的生物相容性<sup>[18-20]</sup>。二氧化硅纳米颗粒 因其独特的孔道结构还易于表面化修饰,实现药物的靶向递 送<sup>[21-23]</sup>。我们采用 COOH-MSNs 控制 PD-L1 抑制剂的释放,细胞实验结果显示其对药物的生物学功能没有显著的影响。动物实验结果则没有观察 COOH-MSNs 明确的副作用。这些结果进一步证明了二氧化硅在生物学领域广阔的应用前景。

为了降低免疫治疗的副作用,在这篇文章中,我们构建了 一种负载有 PD-L1 抑制剂的 COOH-MSNs。其具有以下优势: (1)良好的生物相容性和化学稳定性,二氧化硅属于无机物,物 理稳定性好,且几乎不与化学物质发生相互作用;(2)降低 CRS,通过缓慢释放 PD-L1 抑制剂,在保证免疫治疗效果的同 时,能够避免抗肿瘤免疫反应的过度激活;(3)巨大的载药量, 介孔二氧化硅表面具有大量的载药通道,可一次性负载大量的 药物;(4)延长作用时间,通过物理吸附和 BSA 包封,纳米材料 可缓慢控制 PD-L1 抑制剂,持续的激活抗肿瘤免疫反应,避免 重复给药;(5)个性化治疗,根据肿瘤类型和治疗药物,纳米材 料可更换为相应的药物,以实现精准治疗和个性化治疗。

综上,我们构建了一种负载有 PD-L1 抑制剂的 COOH-MSNs,可有效激活抗肿瘤免疫反应,并降低对正常器官 的损伤。我们的研究为膀胱癌的免疫治疗提供了新的思路。



图 4 纳米材料在体抑制移植瘤的生长,HE 染色检测移植瘤的基本病理变化,免疫组化检测 ki-67 增殖指数 Fig. 4 Nanomaterials inhibited the growth of transplanted tumors in vivo. The basic pathological changes of transplanted tumors were detected by HE staining, and the ki-67 proliferation index was detected by immunohistochemistry



图 5 纳米材料在体降低免疫治疗的副作用 Fig. 5 Nanomaterials reduce the side effects of immunotherapy in vivo

#### 参考文献(References)

- [1] 王守磊,吉振帅,谢程,等.非肌层浸润性膀胱癌患者 TURBT 术后 吉西他滨与表柔比星膀胱灌注化疗的疗效比较及复发的危险因 素分析[J].现代生物医学进展,2022,22(18):3499-3503
- [2] Lenis AT, Lec PM, Chamie K, et al. Bladder Cancer: A Review[J]. JAMA, 2020, 324(19): 1980-1991
- [3] Dobruch J, Oszczudłowski M. Bladder Cancer: Current Challenges and Future Directions[J]. Medicina (Kaunas), 2021, 57(8): 749
- [4] Song Q, Zhou R, Shu F, et al. Cuproptosis scoring system to predict the clinical outcome and immune response in bladder cancer[J]. Front Immunol, 2022, 13: 958368
- [5] Nair SS, Weil R, Dovey Z, et al. The Tumor Microenvironment and Immunotherapy in Prostate and Bladder Cancer [J]. Urol Clin North Am, 2020, 47(4S): e17-e54
- [6] Peyrottes A, Ouzaid I, Califano G, et al. Neoadjuvant Immunotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer[J]. Medicina (Kaunas), 2021, 57 (8): 769
- [7] Zhang S, Yu S, Duan H, et al. Revealing prognostic and tumor microenvironment characteristics of cuproptosis in bladder cancer by genomic analysis[J]. Front Genet, 2022, 13: 997573
- [8] Pfail JL, Katims AB, Alerasool P, et al. Immunotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer: current status and future directions[J]. World J Urol, 2021, 39(5): 1319-1329
- [9] Morris EC, Neelapu SS, Giavridis T, et al. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy [J]. Nat Rev Immunol, 2022, 22(2): 85-96
- [10] Shah S, Famta P, Bagasariya D, et al. Tuning Mesoporous Silica Nanoparticles in Novel Avenues of Cancer Therapy [J]. Mol Pharm, 2022, 19(12): 4428-4452
- [11] Escriche-Navarro B, Escudero A, Lucena-Sánchez E, et al. Mesoporous Silica Materials as an Emerging Tool for Cancer Immunotherapy[J]. Adv Sci (Weinh), 2022, 9(26): e2200756
- [12] Lin M, Yao W, Xiao Y, et al. Resveratrol-modified mesoporous silica nanoparticle for tumor-targeted therapy of gastric cancer [J].

Bioengineered, 2021, 12(1): 6343-6353

- [13] Compé rat E, Amin MB, Cathomas R, et al. Current best practice for bladder cancer: a narrative review of diagnostics and treatments [J]. Lancet, 2022, 400(10364): 1712-1721
- [14] Richters A, Aben KKH, Kiemeney LALM. The global burden of urinary bladder cancer: an update [J]. World J Urol, 2020, 38 (8): 1895-1904
- [15] Ahmadi H, Duddalwar V, Daneshmand S. Diagnosis and Staging of Bladder Cancer [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2021, 35 (3): 531-541
- [16] Ng K, Stenzl A, Sharma A, et al. Urinary biomarkers in bladder cancer: A review of the current landscape and future directions [J]. Urol Oncol, 2021, 39(1): 41-51
- [17] Konala VM, Adapa S, Aronow WS. Immunotherapy in Bladder Cancer[J]. Am J Ther, 2022, 29(3): e334-e337
- [18] He X, Chen F, Chang Z, et al. Silver Mesoporous Silica Nanoparticles: Fabrication to Combination Therapies for Cancer and Infection[J]. Chem Rec, 2022, 22(4): e202100287
- [19] Nguyen TL, Choi Y, Kim J. Mesoporous Silica as a Versatile Platform for Cancer Immunotherapy [J]. Adv Mater, 2019, 31 (34): e1803953
- [20] Cheng YJ, Hu JJ, Qin SY, et al. Recent advances in functional mesoporous silica-based nanoplatforms for combinational photo-chemotherapy of cancer[J]. Biomaterials, 2020, 232: 119738
- [21] Li Y, Deng G, Hu X, et al. Recent advances in mesoporous silica nanoparticle-based targeted drug-delivery systems for cancer therapy [J]. Nanomedicine (Lond), 2022, 17(18): 1253-1279
- [22] Ahmadi F, Sodagar-Taleghani A, Ebrahimnejad P, et al. A review on the latest developments of mesoporous silica nanoparticles as a promising platform for diagnosis and treatment of cancer [J]. Int J Pharm, 2022, 625: 122099
- [23] Igaz N, Bélteky P, Kovács D, et al. Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug-Delivery to Multidrug-Resistant Cancer Cells [J]. Int J Nanomedicine, 2022, 17: 3079-3096