

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.03.002

· 基础研究 ·

PD-1 高表达细菌质膜囊泡的构建及对小鼠肺癌移植瘤组织的靶向性评估

徐秀杰^{1,2}, 张静云², 范峻晨², 蒋灵馨², 张娜², 郑猛超¹, 龙雨飞¹, 高贵花³, 颜涛玲³, 兰天舒^{2,4} (1. 广西大学 医学院, 广西 南宁 530000; 2. 厦门医学院 基础医学院, 福建 厦门 361000; 3. 厦门医学院附属第二医院 产科, 福建 厦门 361000; 4. 厦门医学院 呼吸疾病研究所, 福建 厦门 361000)

[摘要] **目的:** 构建程序性死亡受体 1 (PD-1) 高表达的细菌质膜纳米囊泡 (BMV) BMV-PD-1, 评估其对小鼠肺癌移植瘤组织的靶向性。 **方法:** 通过质粒转化将 PD-1 与膜孔蛋白细胞溶素 A (ClyA) 融合质粒 ClyA-PD-1-EGFP 转入大肠杆菌 BL21-Codonplus, 使用激光共聚焦显微镜、SDS-PAGE 和 WB 法检测融合蛋白 ClyA-PD-1-EGFP 的表达。提取质膜并采用挤出法, 利用挤出器制备 BMV-PD-1。采用透射电子显微镜 (TEM)、纳米粒子跟踪分析 (NTA) 技术分别对 BMV-PD-1 的形态、粒径和膜电位进行检测, 用 WB 鉴定 PD-1 蛋白的携带情况。采用激光共聚焦成像检测 Lewis 肺癌 LLC 细胞对 BMV-PD-1 的摄取。建立肺癌 LLC 细胞 C57BL/6J 小鼠皮下移植瘤模型, 采用小动物活体成像系统评估 BMV-PD-1 的肿瘤靶向性。 **结果:** 激光共聚焦显微成像结果显示, 质粒 ClyA-PD-1-EGFP 被转入 BL21-Codonplus 并成功表达蛋白。SDS-PAGE 结果表明, ClyA-PD-1-EGFP 在 BL21-Codonplus 中过表达。WB 分析表明, PD-1 在细菌中表达且在 BMV-PD-1 上呈高表达 ($P < 0.001$) 状态。NTA 和 TEM 分析表明, BMV-PD-1 是一种粒径为 (145 ± 14) nm、表面呈负电性的球状囊泡。激光共聚焦成像显示, PD-1 高表达能显著提升肺癌细胞对 BMV-PD-1 的摄取 ($P < 0.01$), 小动物活体成像也进一步证实 PD-1 高表达能有效提升 BMV-PD-1 的肿瘤靶向性 ($P < 0.01$)。 **结论:** 本研究成功构建了 PD-1 高表达的细菌纳米囊泡 BMV-PD-1, 发现 PD-1 高表达可显著提高 BMV-PD-1 的肺癌 LLC 细胞移植瘤组织的靶向性, 为进一步开发以 BMV-PD-1 为载体的肿瘤靶向药物递送系统奠定基础。

[关键词] PD-1; 细菌囊泡; 细胞摄取; 肺癌靶向

[中图分类号] R730.5; R318.08 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)03-0239-08

Construction of PD-1 overexpressing bacterial cytoplasmic membrane vesicles and evaluation of its targeting efficacy of mouse lung cancer xenograft tissue

XU Xiujie^{1,2}, ZHANG Jingyun², FAN Junchen², JIANG Lingxin², ZHANG Na², ZHENG Mengchao¹, LONG Yufei¹, GAO Guihua³, YAN Taoling³, LAN Tianshu^{2,4} (1. School of Medicine, Guangxi University, Nanning 530000, Guangxi, China; 2. School of Basic Medical Science, Xiamen Medical College, Xiamen 361000, Fujian, China; 3. Department of Obstetrics, the Second Affiliated Hospital of Xiamen Medical College, Xiamen 361000, Fujian, China; 4. Institute of Respiratory Diseases, Xiamen Medical College, Xiamen 361000, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To construct bacterial cytoplasmic membrane nanovesicles (BMV) with overexpressing programmed death 1 (PD-1), denoted as BMV-PD-1 and evaluate the targeting efficacy of BMV-PD-1 towards transplanted lung tumor tissues in mice. **Methods:** The fusion plasmid ClyA-PD-1-EGFP fused by PD-1 and Cytolysin A (ClyA) was transferred into *Escherichia coli* BL21-Codonplus through plasmid transformation. Laser confocal microscopy, SDS-PAGE, and WB were used to detect the expression of the fusion protein ClyA-PD-1-EGFP. Bacterial membranes were extracted and processed with an extruder to generate BMV-PD-1. TEM and NTA were utilized to assess the morphology, size distribution, and zeta potential of BMV-PD-1, while WB was used to verify the presence of PD-1 protein. Laser confocal imaging was conducted to monitor the uptake of BMV-PD-1 by Lewis lung cancer cells. A C57BL/6J mouse subcutaneous transplant tumor model of LLC lung cancer cells was constructed, and the tumor targeting of BMV-PD-1 was evaluated by small animal imaging system. **Results:** Laser confocal microscopy images demonstrated that the plasmid ClyA-PD-1-EGFP was transferred into BL21-Codonplus and successfully expressed into protein. SDS-PAGE results suggested that ClyA-PD-1-EGFP was overexpressed in BL21-Codonplus. WB analysis indicated that PD-1 was expressed in bacteria and highly expressed in BMV-PD-1 ($P < 0.001$). NTA and TEM analyses revealed that BMV-PD-1 were spherical vesicles with a diameter of (145 ± 14) nm and

[基金项目] 厦门医学院科技计划项目学校-医院联合资助项目 (No. K2023-04); 厦门医学院大学生创新创业训练计划资助项目 (No. 202412631001)

[作者简介] 徐秀杰 (1996—), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫相关研究。E-mail: 13526596559@163.com

[通信作者] 兰天舒, E-mail: tianshu.lan@xmmc.edu.cn

a negative surface charge. Laser confocal imaging showed that the high expression of PD-1 significantly increased the uptake of BMV-PD-1 by lung cancer cells ($P < 0.01$). *In vivo* imaging of small animals further confirmed that the high expression of PD-1 can effectively improve cancer targeting of BMV-PD-1 ($P < 0.01$). **Conclusion:** In this study, bacterial plasma membrane nanovesicles BMV-PD-1 with high PD-1 expression are successfully constructed, and it is found that PD-1 overexpression markedly improve the mouse lung cancer xenograft tissue targeting specificity of BMV-PD-1, laying the groundwork for further development of BMV-PD-1 as a carrier for targeted drug delivery systems in tumors.

[Key words] PD-1; bacterial vesicle; cell uptake; lung cancer targeting

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(3): 239-246. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.03.002]

通过纳米载体进行肿瘤药物靶向递送有望实现对肿瘤精准杀伤。然而在实际应用中,纳米材料对于肿瘤的实际靶向效果限制了其临床转化^[1]。研究^[2]发现,由革兰氏阴性细菌分泌的细菌外膜囊泡(outer membrane vesicle, OMV)以其纳米级尺寸可利用肿瘤的增强渗透和滞留(the enhanced permeability and retention, EPR)效应实现被动靶向。同时,还可利用工程菌基因编辑的便利性,通过过表达靶向性分子实现OMV的主动靶向^[3]。此外,OMV携带的细菌抗原是强烈的免疫佐剂,不仅能活化免疫细胞避免肿瘤细胞的免疫逃逸^[4],还可以利用中性粒细胞等炎症细胞通过免疫趋化作用实现对肿瘤的靶向递送^[5]。但是,OMV携带的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可诱发高热、脓毒血症等严重的不良反应^[6-9]。为了避免LPS的毒副作用,提高细菌囊泡的肿瘤靶向性,本研究拟利用溶菌酶去除细胞壁上的LPS,采用挤出法制备融合表达溶细胞素A(cytolysin A, ClyA)和PD-1的细菌质膜纳米囊泡(bacterial cytoplasmic membrane nanovesicle, BMV),并全面评估所制备的BMV-PD-1对PD-L1高表达的肺癌细胞及其小鼠移植瘤的靶向作用。这种全新的材料开发将为优化工程化细菌囊泡的肿瘤靶向性能提供有效的途径。

1 材料与方法

1.1 肿瘤样本的基因表达数据来源

采用GEPIA 2(<http://gepia2.cancer-pku.cn>)在线分析平台,对10种高发肿瘤组织中PD-L1的表达进行分析。采用Human Protein Atlas数据库(<https://www.proteinatlas.org/>)中正常肺组织及肺癌组织的免疫组织化学图片,分析两者中PD-L1的表达情况。

1.2 主要材料与试剂

本试验使用的C57BL/6J小鼠均为中国科学院上海斯莱克实验动物有限责任公司提供的雄性鼠(6~8周,体质量20~25 g),动物实验方案由伦理委员会审批,审批号为2023084。实验中使用的大肠杆菌BL21-Codonplus、Lewis肺癌LLC细胞株和AEC2细胞株由厦门医学院基础医学部保存。DMEM培养液(MA0212)、DMEM/F-12培养液(MA0214)、胎牛血清(J0108D)、100

×的青霉素和链霉素双抗溶液(MA0110)等细胞培养必需品,以及氯化钠(MB2471)、氨苄青霉素(MB1507-1)、BCA试剂盒(MA0082-2)、SDS-PAGE快速配制试剂盒(MA0159)、氯化镁(MB0404)、抗荧光衰减封固剂(含DAPI)(MA0222-1)和DIR细胞膜荧光探针(MB12482)均购自大连美仑生物科技有限公司,PD-L1(PE)流式抗体(2555823)购自Invitrogen公司,胰蛋白胨(LP0042B)和酵母提取物(LP0021B)购自Thermo Fisher公司,用于细菌转化的质粒ClyA-PD-1-EGFP及其对照质粒购自云舟生物公司,考马斯亮蓝染色液(P0017F)购自上海碧云天生物技术股份有限公司,PD-1一抗(ab214421)、GAPDH一抗(AB0037)、二抗(SA00001-2)和Isotype抗体(ab37359)分别购自Abcam公司、Abways公司和Proteintech公司,DNA酶I(S1D21204A)购自Worthington biochemical公司,1 mol/L Tris-HCl(pH7.4)(T1090)和溶菌酶(L8120)购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 细胞培养

接种LLC细胞至细胞培养皿,使用DMEM培养液(含10%胎牛血清)在细胞培养箱中培养LLC细胞,参数为37℃、5%CO₂,培养至细胞密度为90%左右时传代。

接种AEC2细胞至细胞培养皿,使用DMEM/F-12培养液(含10%胎牛血清)在细胞培养箱中培养AEC2细胞,参数为37℃、5%CO₂,培养至细胞密度为90%左右时传代。

1.4 流式细胞术分析LLC细胞表面PD-L1表达情况

按照1.3的培养方法培养LLC及AEC2细胞生长至80%~90%汇合时,收集细胞,PBS洗涤2次后,使用PBS将细胞密度调整为 5×10^6 个/mL,分别将1 μL PD-L1(PE)流式抗体和Isotype抗体(IgG-PE)加入200 μL LLC细胞悬液中,并将1 μL PD-L1(PE)流式抗体加入200 μL AEC2细胞悬液中,4℃下避光温育反应30 min。然后使用离心机在4℃下、 $200 \times g$ 离心5 min,收集细胞,1 mL PBS洗涤2次,用500 μL PBS重悬,流式细胞仪析细胞表面PD-L1的表达水平。

1.5 大肠杆菌培养与蛋白诱导表达

利用热激转化法分别将质粒ClyA-PD-1-EGFP和ClyA-EGFP转入大肠杆菌BL21-Codonplus后,得到工

程菌 *E.Coli*-PD-1 和作为阴性对照的 *E.Coli*-Ctrl。分别涂布挑取单菌落培养。然后分别用 200 mL LB 培养液(含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素)在摇床上扩大培养,参数为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min,培养至 D_{600} 为 0.8,加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)(终浓度为 0.1 mmol/L),将摇床参数调整为 16 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养 16 h 诱导蛋白表达。

1.6 共聚焦显微镜分析大肠杆菌表达融合蛋白表达和 LLC 细胞对 BMV-PD-1 的摄取情况

取诱导蛋白表达后的菌液 1 mL,离心,收集菌体,参数为 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\times g$ 离心 5 min,后用 1 mL PBS 洗涤 2 次。用 4% 多聚甲醛室温固定 5 min,用 PBS 清洗 2 次,稀释 40 倍后涂于玻片上,37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥。使用共聚焦显微镜观察。

将 6×10^5 个 LLC 细胞接种于共聚焦培养皿中,待 LLC 细胞生长至 70%~80% 汇合后,与 BMV-PD-1 (2×10^{11} 个/mL)温育 3 h。用 PBS 清洗 3 次,在室温下加入 500 μL 的 4% 多聚甲醛,5 min 后用 PBS 清洗 3 遍,再用抗荧光衰减封固剂(含 DAPI)封闭,共聚焦显微镜下观察荧光状态。

1.7 SDS-PAGE 法检测大肠杆菌中蛋白表达情况

收集诱导蛋白表达后的细菌细胞,PBS 清洗 2 遍,制蛋白样。在 10% 的 Tris-Glycine 凝胶中进行电泳。结束后,使用考马斯亮蓝染液染色 30 min,纯水脱色 30 min,后观察分析。

1.8 脂质体挤出法制备 PD-1 高表达质膜的 BMV-PD-1

取诱导蛋白表达后的菌液 200 mL,离心。收集菌体,离心参数为 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\times g$ 、20 min,然后用 200 mL PBS 洗涤 2 次,用溶菌酶(2 mg/mL)溶液 80 mL 重悬,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 摇床温育 2 h。80 mL PBS 洗涤 2 次,沉淀用 10 mL 提取缓冲液(每 100 mL 纯水加入 1 mg DNA 酶 I、95 mg 氯化镁、5 mL pH 7.4 的 Tris-HCl)重悬,置于冰上、裂解 30 min 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 下、3 000 $\times g$ 离心 5 min。取上清,4 $^{\circ}\text{C}$ 下、20 000 $\times g$ 离心 30 min,弃上清液,大肠杆菌质膜沉淀用 200 μL PBS 重悬,存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

取大肠杆菌质膜 200 μL 加入 800 μL PBS,混匀后冰水浴超声(超声波频率 20 kHz,振幅 35%)2 min,使用脂质体挤出器续挤出 21 次,获得 BMV-PD-1。

1.9 离心法/浓缩离心法制备 OMV-PD-1

离心法提取 OMV-PD-1:取诱导蛋白表达后的细菌悬液 200 mL,离心收集上清液,离心参数为 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 $\times g$ 、20 min。使用 0.45 μm 的过滤器过滤上清液,将过滤后的上清液离心,离心参数为 4 $^{\circ}\text{C}$ 、110 000 $\times g$ 、70 min。尽可能吸出全部上清液,加入 1 mL 的 PBS 重悬,持续吹打 100 次。将重悬液转移至离心管中,再次用 1 mL PBS 重悬,重悬液转移至离心管中

后,用 PBS 定容至 11 mL 使用 0.22 μm 孔径的过滤器过滤后再次离心,离心参数为 4 $^{\circ}\text{C}$ 、150 000 $\times g$ 、70 min。然后用 200 μL 的 PBS 重悬,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

浓缩离心法提取 OMV-PD-1:取诱导蛋白表达后的细菌悬液 1 000 mL,离心收集上清液,离心参数为 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 $\times g$ 、20 min。使用切向流系统浓缩上清液至 140 mL,使用 0.22 μm 孔径的过滤器过滤浓缩液。将过滤后的浓缩液离心,离心参数为 4 $^{\circ}\text{C}$ 、110 000 $\times g$ 、70 min。尽可能吸出全部上清,加入 1 mL 的 PBS 重悬,持续吹打 100 次。将重悬液转移至离心管中,再次用 1 mL PBS 重悬,重悬液转移至离心管中后,用 PBS 定容至离心要求体积。再次离心,离心参数为 4 $^{\circ}\text{C}$ 、150 000 $\times g$ 、70 min。然后用 200 μL 的 PBS 重悬,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.10 透射电子显微镜(TEM)观察细菌囊泡的形态

取细菌囊泡悬液 5 μL ,用 PBS 稀释 10 倍,然后取 5 μL 样品滴在碳涂层的铜网上,静置 2 min,用滤纸吸走多余液体,用 5 μL 染液(1%醋酸双氧铀)染色 1 min,用滤纸吸走多余液体,干燥后用透射电镜察其形态。

1.11 纳米粒子跟踪分析(NTA)技术分析细菌囊泡 OMV-PD-1、BMV-Ctrl 和 BMV-PD-1 的粒径和膜电位

分别将 OMV-PD-1、BMV-Ctrl 和 BMV-PD-1 用纯水稀释 1 000、10 000、10 000 倍左右,取 2.5 mL 注射入纳米粒子示踪分析仪样品池,进行粒径和膜电位分析。

1.12 WB 法检测融合蛋白表达情况

分别取待测样本 *E.Coli*-PD-1、*E.Coli*-Ctrl、OMV-PD-1、BMV-Ctrl 和 BMV-PD-1 各 100 μL ,分别加入 100 μL RIPA 裂解液和 1 μL PMSF,冰上裂解 30 min,按照 BCA 说明书进行蛋白定量,加入 Loading Buffer,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮样 10 min。

取蛋白样品 10 μg 在 10% 的 Tris-Glycine 凝胶中进行电泳,电转后 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, TBST 洗涤 3 次,加入重组 Anti-PD-1 抗体(稀释比例为 1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜温育。用 TBST 洗涤 3 次,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(稀释比例为 1:10 000),室温温育反应 1 h。TBST 洗涤 3 次后,表面覆盖 ECL 化学发光显色液,用凝胶成像仪成像并利用 Image J 分析蛋白条带灰度值。

1.13 小动物活体成像法检测 BMV-PD-1 的肿瘤靶向性

当细胞生长达到 80%~90% 汇合时,收集 LLC 细胞,PBS 洗涤 2 次,然后用 PBS 将细胞密度调整为 2×10^7 个/mL,并以 2×10^6 个/只的剂量将这些细胞经皮下注射植入小鼠右后肢。记录移植瘤生长情况,待瘤体生长至 600~800 mm^3 时,进行下一步实验。本研究首先采用近红外荧光染料 DIR 进行标记处理,随后将荷载 LLC 肿瘤的 C57 小鼠随机分为 3 组,分别通

过尾静脉注射 DIR 的 PBS 溶液、DIR 标记的对照组 BMV-Ctrl(2×10^{12} 个/Kg)以及 DIR 标记的 PD-1 修饰组 BMV-PD-1(2×10^{12} 个/Kg)。在注射后 2 h, 使用小动物活体成像系统观察并分析肿瘤部位的荧光强度, 计算平均辐射亮度值。

1.14 统计学处理

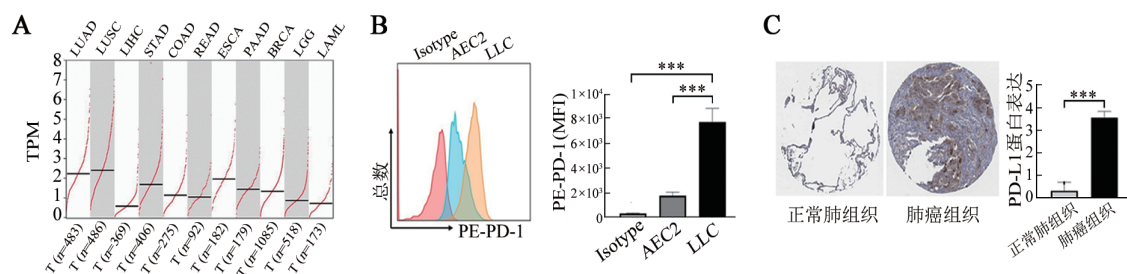
所有实验至少独立重复 3 次。计量数据以平均值 \pm 标准误(SEM)来表示, 采用 GraphPad Prism8 软件进行数据分析与作图。组间数据比较采用 *t* 检验和 Ordinary one-way ANOVA 进行分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PD-L1 在肺癌组织中呈高表达

使用生物信息学方法及 GEPIA 2 在线分析平台,

对包括肺腺癌和肺鳞状细胞癌在内的发病率较高的几种肿瘤类型的 PD-L1 基因表达水平进行分析。结果揭示, 对比其他常见肿瘤类型时, PD-L1 基因在肺腺癌和肺鳞状细胞癌样本中表达量较高(图 1A)。进而运用流式细胞术对 AEC2 和 LLC 细胞中的 PD-L1 蛋白表达进行检测。实验结果(图 1B)证实, 相较于 AEC2 细胞, LLC 细胞中的 PD-L1 蛋白表达量表现出显著高表达特征, 且该结果具有统计学上的显著差异($P < 0.001$)。并分析了 Human Protein Atlas 数据库中正常肺组织及肺癌组织的代表性免疫组织化学图片中 PD-L1 的表达情况, 结果(图 1C)说明, 肺癌组织中 PD-L1 蛋白表达量较高($P < 0.001$)。数据库生信分析结果及实验室研究结果, 均证明 PD-L1 在肺癌组织中存在高表达现象。



A: PD-L1 在发病率较高的 10 种肿瘤样本的基因表达图谱点图; 肿瘤样本分别为肺腺癌(LUAD, 样本数: 483 个)、肺鳞状细胞癌(LUSC, 样本数: 486 个)、肝细胞癌(LIHC, 样本数: 369 个)、胃癌(STAD, 样本数: 406 个)、结直肠癌(COAD, 样本数: 275 个)、直肠癌(READ, 样本数: 92 个)、食管癌(ESCA, 样本数: 182 个)、胰腺癌(PAAD, 样本数: 179 个)、乳腺癌(BRCA, 样本数: 1 085 个)、脑低级别胶质瘤(LGG, 样本数: 518 个)、急性髓系白血病(LAML, 样本数: 173 个); B: PD-L1 在 AEC2 和 LLC 细胞的表达情况及其统计分析; C: 正常肺组织及肺癌组织中 PD-L1 表达的免疫组织化学图片。*** $P < 0.001$ 。

图 1 PD-L1 的表达情况分析

2.2 获得 PD-1 高表达的 BL21-Codonplus 菌株

基因重组质粒 ClyA-PD-1-EGFP 和 ClyA-EGFP 被分别转染到大肠杆菌 BL21-Codonplus 菌株中, 从而成功构建出表达目标融合蛋白的工程菌 *E. Coli*-PD-1 和作为阴性对照的 *E. Coli*-Ctrl(图 2A)。

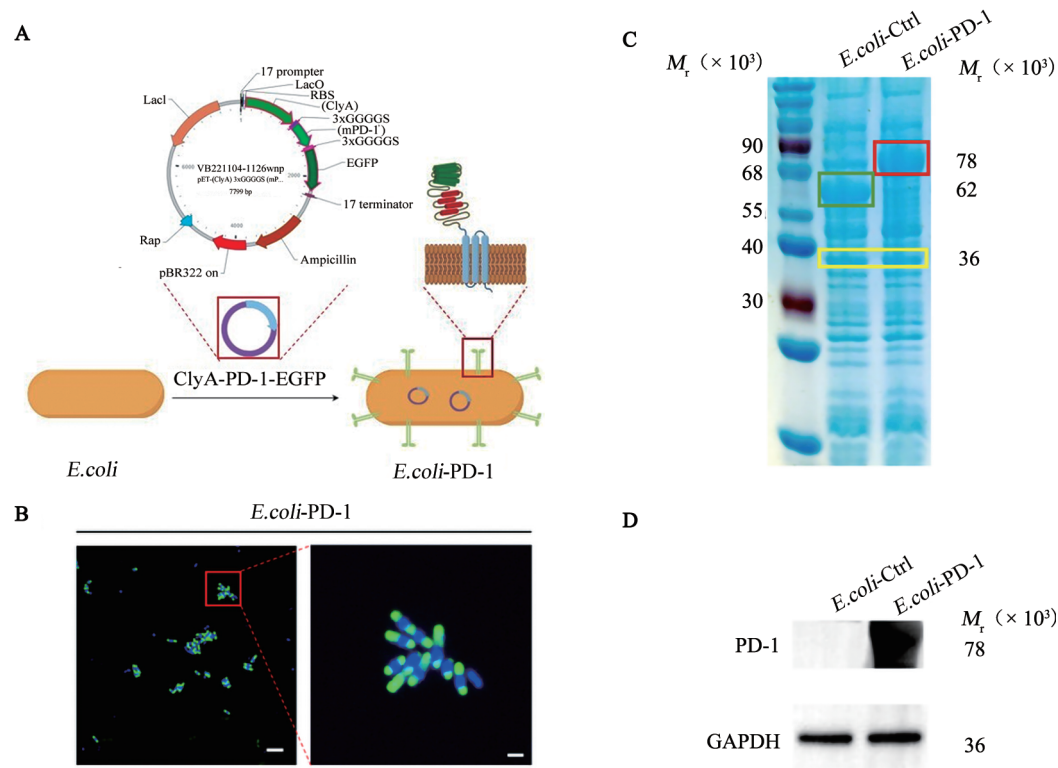
激光共聚焦显微镜的成像结果(图 2B)显示, 转染质粒的大肠杆菌菌体发出绿色荧光, 表明融合蛋白 ClyA-PD-1-EGFP 已成功表达。随后的 SDS-PAGE 全蛋白质分析结果(图 2C), 可以观察到 *E. Coli*-PD-1 在分子量 78 000 位置(ClyA-PD-1-EGFP 分子量为 78 000)有过表达条带, 而 *E. Coli*-Ctrl 在 62 000 位置(ClyA-EGFP 分子量为 62 000)有过表达条带, 且在其他位置表达基本一致, 例如在 36 000(GAPDH 分子量为 36 000)位置无明显差异。该结果提示 PD-1 在 *E. Coli*-PD-1 中成功表达。后续的 WB 结果(图 2D)进一步证实了这一猜测, *E. Coli*-PD-1 组中 PD-1 呈高表达。

2.3 成功制备 PD-1 高表达的 BMV-PD-1

在成功构建了 PD-1 高表达的 *E. Coli*-PD-1 之后, 本研究旨在制备含有 PD-1 蛋白的细菌质膜纳米囊泡 BMV-PD-1。为此, 首先运用化学方法分别从 200 mL 的 *E. Coli*-PD-1 和 *E. Coli*-Ctrl 菌液中提取质膜, 随后通过挤压的方式制备囊泡, 从而获得含有 PD-1 的 BMV-PD-1 及其相应的 BMV-Ctrl(图 3A)。本研究还通过常规离心法和浓缩离心法制备了 OMV-PD-1。TEM 和 NTA 检测结果显示, BMV-Ctrl、BMV-PD-1 和 OMV-PD-1 都展现出典型的球形囊泡结构(图 3B), 粒径符合细菌囊泡大小(图 3C), 说明成功制备了 BMV-Ctrl、BMV-PD-1 和 OMV-PD-1。对比从 200 mL 菌液中提取出的 OMV-PD-1 与 BMV-PD-1 在颗粒数和蛋白量方面的差异, NTA 和 BCA 结果(图 3D、E)显示, 从 200 mL 菌液中制备的 BMV-PD-1 的颗粒数为 $(2.9 \times 10^{12} \pm 6.68 \times 10^{10})$ 个, 提取相应颗粒数的 OMV-PD-1 需要 9 026 mL 细菌培养液, 不利于后续转化。从 200 mL 菌液中提取出的 OMV-PD-1 的颗粒数过少, 蛋白量过低, 无法检测其是否携带

PD-1,更无法支撑后续实验进行。此外,通过NTA对BMV-Ctrl和BMV-PD-1的粒径分布和膜电位进行定量分析,发现BMV-PD-1与BMV-Ctrl在粒径的中位数和膜电位上并无显著差异,粒径为(145±14) nm、膜电位

为-(35±2.7) mV(图3F)。为了验证BMV-PD-1中PD-1的表达情况,运用WB技术进行检测,实验结果(图3G)显示,BMV-PD-1成功携带了PD-1蛋白,而对照组BMV-Ctrl则没有检测到PD-1蛋白表达($P<0.001$)。



A: 大肠杆菌转化载入融合蛋白ClyA-PD-1-EGFP基因并表达蛋白的示意图(ClyA:蓝色,PD-1:红色,EGFP:绿色);B:激光共聚焦显微镜分析大肠杆菌的融合蛋白表达情况(绿色:EGFP,蓝色:DAPI,标尺:左5 μm ,右1 μm);C:SDS-PAGE法检测*E. coli*-PD-1中蛋白表达情况;D:WB法检测*E. coli*-PD-1中PD-1蛋白表达情况。

图2 *E. coli*-PD-1蛋白表达情况

2.4 BMV-PD-1 在肿瘤细胞水平的靶向性

利用激光共聚焦显微镜技术对BMV-PD-1与LLC细胞间的交互作用进行了详细观察。实验结果(图4A)显示,与未修饰的BMV-Ctrl相比,BMV-PD-1在LLC细胞的细胞核周边区域的绿色荧光标志物分布更为密集。结合定量分析(图4B)结果,证实了PD-1修饰显著提升了BMV在LLC细胞内的摄取效率($P<0.01$)。

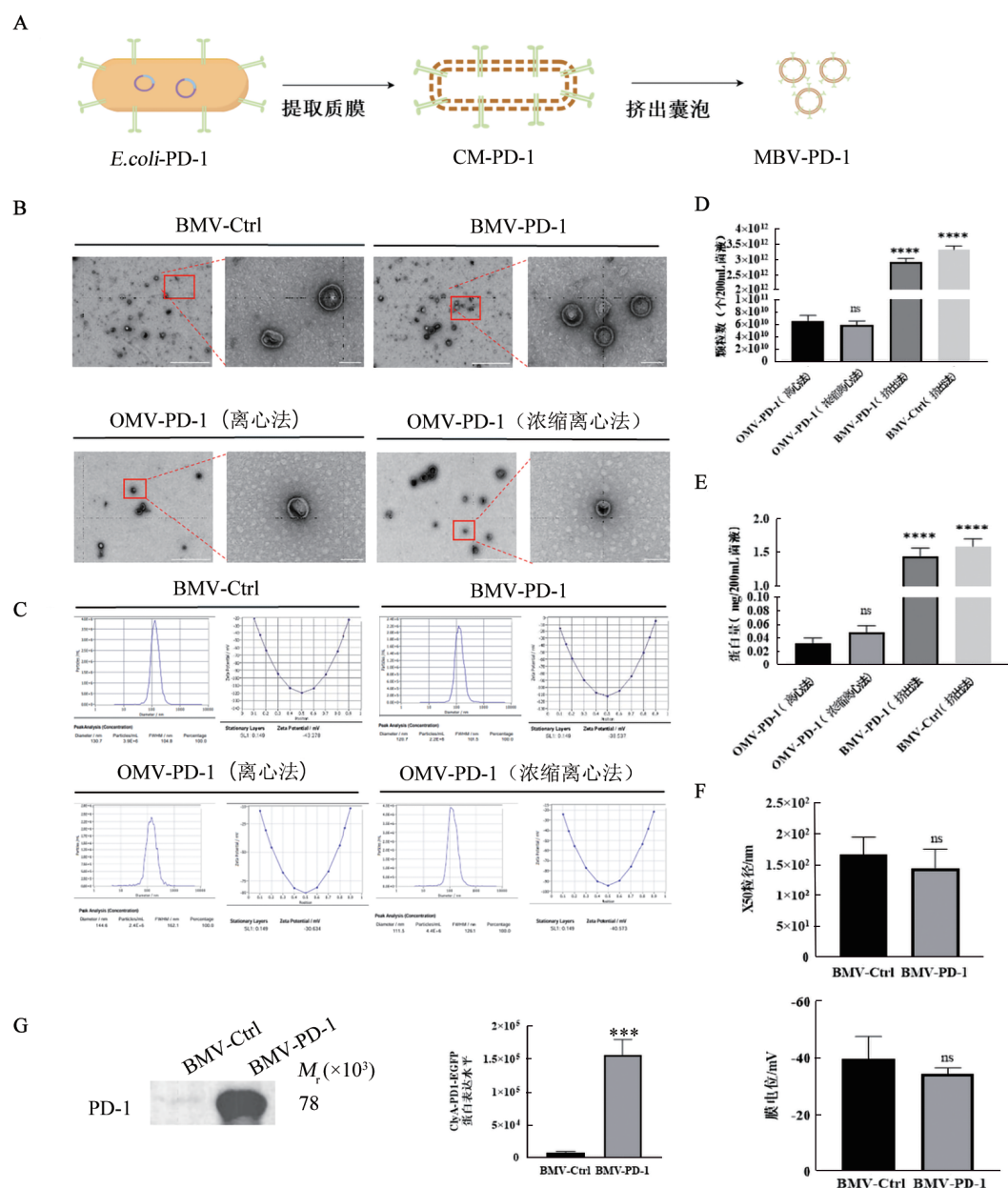
2.5 BMV-PD-1 在肿瘤组织水平的靶向性

小动物活体成像观察结果(图5A)显示,BMV-PD-1组肿瘤部位的荧光强度明显高于BMV-Ctrl组。平均辐射亮度值(图5B)统计分析结果显示,与BMV-Ctrl组相比,BMV-PD-1组在肿瘤组织的累积量显著增加($P<0.01$),这一发现证实了PD-1修饰显著提升了BMV-PD-1在体内对肿瘤组织的靶向性。

3 讨论

长期以来,肿瘤治疗面临的挑战在于难以精确地将药物输送达肿瘤细胞所在部位,导致药物在肿

瘤局部浓度不足,同时给健康组织带来严重的不良反应^[10]。胶束、核壳纳米粒子、脂质体等纳米材料,能够利用EPR效应,实现肿瘤组织的被动靶向^[11]。随着纳米生物膜材料制备和提取的技术突破,开发出外泌体、细胞膜、OMV等一系列纳米生物膜材料并被证明具有肿瘤靶向的能力^[1,6,12]。本研究中,采用离心法和浓缩离心法制备OMV-PD-1时发现,其制备效率过低,不足以支撑研究,故本研究利用较新的膜挤出技术制备细菌质膜囊泡BMV-PD-1,经体外肺癌细胞摄取实验和体内肿瘤靶向性实验证明其同样具备靶向肿瘤的能力。TEM和NTA结果显示,与OMV相似,BMV-PD-1为均一的带负电荷的纳米颗粒,粒径(167±14)nm。这种纳米级尺寸有利于BMV-PD-1利用EPR效应进行肿瘤被动靶向。但是,基于EPR效应的被动靶向效果还受到血管的通透性、血流特性以及组织构造等多种因素的影响^[13],导致这些纳米材料的靶向能力在临床实际中大多没有达到预期,药物在肿瘤部位的实际获取率仍然偏低^[1]。

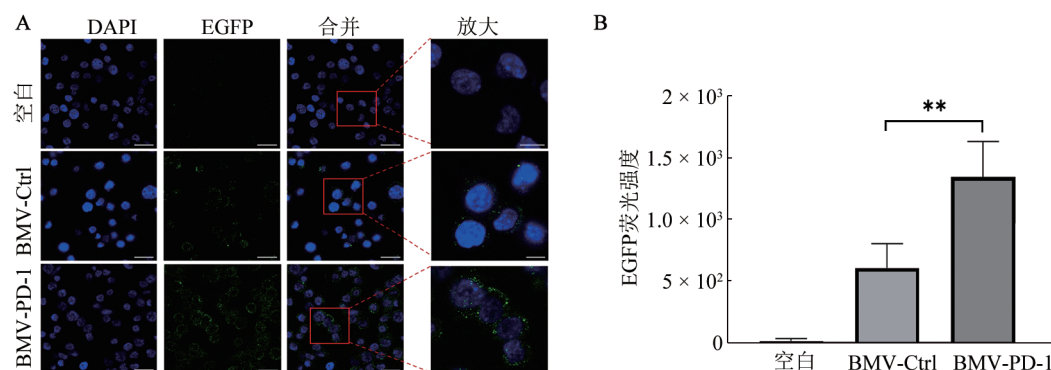


A: BMV-PD-1 挤出机制示意图; B: BMV-Ctrl、BMV-PD-1 和 OMV-PD-1 形态的电镜观察 (标尺: 1 μm , 放大图片标尺: 100 nm); C: BMV-Ctrl、BMV-PD-1 和 OMV-PD-1 粒径和膜电位的纳米粒子示踪分析; D: BMV-Ctrl、BMV-PD-1 和 OMV-PD-1 颗粒数 (200 mL 菌液提取) 统计分析 ($n=3$); E: BMV-Ctrl、BMV-PD-1 和 OMV-PD-1 蛋白量 (200 mL 菌液提取) 统计分析 ($n=3$); F: BMV-Ctrl、BMV-PD-1 的 X50 粒径和膜电位的统计图 ($n=9$); G: BMV-Ctrl、BMV-PD-1 的 WB 结果及其统计图 ($n=3$)。与 BMV-Ctrl 比较, ns 差异无统计学意义, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图3 细菌质膜纳米 BMV-PD-1 的构建和鉴定

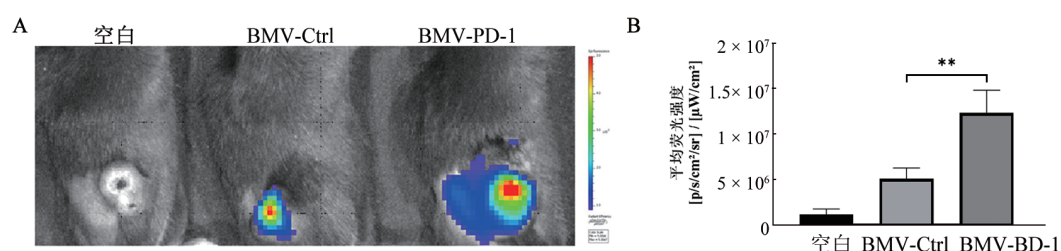
事实上, BMV-PD-1 靶向肿瘤的机制除了 EPR 效应, 其携带的抗原也可能发挥了一定的正向作用, 有研究^[6]发现, OMV 表面的抗原性成分使其能够被宿主的固有免疫细胞识别和摄取, 这些免疫细胞在免疫趋化作用下将 OMV 输送到肿瘤组织。此外, 这些抗原还可作为佐剂, 激活抗肿瘤免疫应答。但是, OMV 中存在的 LPS 可能导致致死性免疫不良反应^[6-9, 14], 限制其临床转化。CHEN 等^[15]发现, 利用溶菌

酶可以去除大肠杆菌含有 LPS 的细胞壁, 提取的 BMV-PD-1 与 OMV 类似, 带有细菌特定的, 如 ClyA、丝状温度敏感蛋白 Z 等抗原成分。它们能在不引发显著毒性反应的同时, 激活宿主的免疫应答^[15]。在本研究中发现的 BMV-PD-1 的肿瘤靶向作用的机制是否与免疫细胞吞噬导致的靶向递送有关, 有待进一步探究。



A:共聚焦显微镜观察代表性图片(标尺:30 μm 、放大图片标尺:10 μm)绿色:EGFP,蓝色:DAPI;B:单个随机视野EGFP 荧光强度统计分析($n=3$)。 ** $P<0.01$ 。

图4 肿瘤细胞对BMV-PD-1的摄取



A:小动物活体成像观察代表性图片(荧光强度从紫色至红色依次增强);B:BMV-PD-1 注射小鼠 2 h 后相对肿瘤累计效率($n=3$)。 ** $P<0.01$ 。

图5 体内评估BMV-PD-1的肿瘤靶向性

除了这些被动靶向机制,还可通过纳米材料修饰,对肿瘤细胞表面高度表达的特定肿瘤标志物进行识别,实现对肿瘤细胞的高效主动识别和靶向性^[16]。在表面蛋白靶向性修饰方面,大肠杆菌作为工程菌具有极大的优势^[17]。肿瘤细胞高表达PD-L1,能够通过活化的T细胞上PD-1结合,诱导T细胞程序性死亡^[18]。该信号在肿瘤免疫逃逸过程中发挥重要的作用。目前,阻断PD-L1/PD-1通路已成为肿瘤免疫治疗的重要方法^[19]。有趣的是,LI等^[20]发现,OMV携带PD-1可以增加OMV在黑色素瘤和结肠癌皮下肿瘤模型肿瘤部位的聚集,提高OMV对黑色素瘤和结肠癌的靶向能力^[20]。在本研究中,首先使用生物信息学方法确定了PD-L1在肺腺癌及肺鳞状细胞癌中均有高水平表达。流式细胞术检测结果也显示,LLC细胞具有高水平的PD-L1蛋白表达。王世杰等^[21]发现,ClyA可将其C-端融合的外源蛋白呈现于细菌的膜表面^[21]。因此,本研究利用ClyA膜定位及自组装特性^[22],通过与ClyA融合实现PD-1在菌膜上的过表达,借助挤出技术制备了BMV-PD-1,WB法检测结果显示BMV-PD-1上负载有PD-1蛋白。体外肺癌细胞摄取和小鼠模型体内肺癌移植瘤靶向性实验结果说明,相较于对照组BMV-Ctrl,BMV-PD-1的肺癌靶向性显著提高($P<0.01$)。TEM、NTA检测结

果显示BMV-PD-1与BMV-Ctrl的粒径与膜电位无显著差异。因此,靶向性大幅提高的原因应该源于囊泡携带的PD-1针对肺癌细胞上高表达的PD-L1的主动靶向作用。

综上,本研究开发的BMV-PD-1可以显著提高BMV的肺癌靶向性。这种靶向性提高的机制可能包括纳米材料所具有的肿瘤EPR效应,以及BMV携带的抗原刺激机体免疫活化带来的免疫趋化靶向作用。特别是PD-1高表达可进一步提升对PD-L1阳性肺癌的靶向和滞留作用。该作用的机制可能依赖于PD-1与PD-L1的特异性结合以及信号阻断对肿瘤微环境中免疫逃逸作用的调控。BMV-PD-1的成功开发,有望为化疗、光热治疗等药物搭载提供良好的载体。材料是否能进一步提高相关药物的抗肿瘤治疗作用以及相关机制值得进一步深入研究。此外,鉴于细菌质膜的抗原性和PD-1与PD-L1的特异性结合作用,通过加载肿瘤抗原,BMV-PD-1有望同时发挥佐剂的作用,激活抗肿瘤免疫,从而为抗肿瘤疫苗开发提供优良的抗原载体。BMV-PD-1靶向性载体具有十分广阔的应用前景,通过进一步的优化和改造,以及机制上的深入探究,将为增强抗肿瘤药物及肿瘤疫苗的治疗效果,减少药物不良反应,延长癌症患者生存期带来新的希望。

[参考文献]

- [1] ROSENBLUM D, JOSHI N, TAO W, et al. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics[J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1410[2024-09-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29650952/>. DOI:10.1038/s41467-018-03705-y.
- [2] QING S, LYU C L, ZHU L, et al. Biom mineralized bacterial outer membrane vesicles potentiate safe and efficient tumor microenvironment reprogramming for anticancer therapy[J/OL]. *Adv Mater*, 2020, 32(47): e2002085[2024-09-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33015871/>. DOI:10.1002/adma.202002085.
- [3] LIU H, ZHANG Q, WANG S C, et al. Bacterial extracellular vesicles as bioactive nanocarriers for drug delivery: Advances and perspectives[J]. *Bioact Mater*, 2021, 14: 169-181. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.12.006.
- [4] LONG Q, ZHENG P, ZHENG X, et al. Engineered bacterial membrane vesicles are promising carriers for vaccine design and tumor immunotherapy[J/OL]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 186: 114321[2024-09-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35533789/>. DOI:10.1016/j.addr.2022.114321.
- [5] LIU X Z, WEN Z J, LI Y M, et al. Bioengineered bacterial membrane vesicles with multifunctional nanoparticles as a versatile platform for cancer immunotherapy[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15(3): 3744-3759. DOI:10.1021/acsami.2c18244.
- [6] LI D M, ZHU L S, WANG Y X, et al. Bacterial outer membrane vesicles in cancer: biogenesis, pathogenesis, and clinical application [J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115120[2024-09-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37442066/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115120.
- [7] CHRONOPOULOS A, KALLURI R. Emerging role of bacterial extracellular vesicles in cancer[J]. *Oncogene*, 2020, 39(46): 6951-6960. DOI:10.1038/s41388-020-01509-3.
- [8] GUO Q, LI X W, ZHOU W X, et al. Sequentially triggered bacterial outer membrane vesicles for macrophage metabolism modulation and tumor metastasis suppression[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(8): 13826-13838. DOI:10.1021/acsnano.1c05613.
- [9] LI Y, ZHANG K Y, WU Y, et al. Antigen capture and immune modulation by bacterial outer membrane vesicles as in situ vaccine for cancer immunotherapy post-photothermal therapy[J/OL]. *Small*, 2022, 18(14): e2107461[2024-09-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35152555/>. DOI:10.1002/sml.202107461.
- [10] LI Y T, YAN B S, HE S M. Advances and challenges in the treatment of lung cancer[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 169: 115891[2024-09-17]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115891>. DOI:10.1016/j.biopha.2023.115891.
- [11] DUAN Y J, SHEN C, ZHANG Y N, et al. Advanced diagnostic and therapeutic strategies in nanotechnology for lung cancer[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1031000[2024-09-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36568152/>. DOI:10.3389/fonc.2022.1031000.
- [12] SADEGHI L, MOHIT E, MOALLEMI S, et al. Recent advances in various bio-applications of bacteria-derived outer membrane vesicles[J/OL]. *Microb Pathog*, 2023, 185: 106440[2024-09-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37931826/>. DOI: 10.1016/j.micpath.2023.106440.
- [13] SHEN X D, PAN D Y, GONG Q Y, et al. Enhancing drug penetration in solid tumors via nanomedicine: evaluation models, strategies and perspectives[J]. *Bioact Mater*, 2023, 32: 445-472. DOI:10.1016/j.bioactmat.2023.10.017.
- [14] MICOLI F, ADAMO R, NAKAKANA U. Outer membrane vesicle vaccine platforms[J]. *BioDrugs*, 2024, 38(1): 47-59. DOI:10.1007/s40259-023-00627-0.
- [15] CHEN L, QIN H, ZHAO R F, et al. Bacterial cytoplasmic membranes synergistically enhance the antitumor activity of autologous cancer vaccines[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(601): eabc2816[2024-09-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34233949/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.abc2816.
- [16] PETRILLI R, PINHEIRO D P, DE CÁSSIA EVANGELISTA DE OLIVEIRA F, et al. Immunoconjugates for cancer targeting: a review of antibody-drug conjugates and antibody-functionalized nanoparticles[J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(13): 2485-2520. DOI: 10.2174/0929867327666200525161359.
- [17] JIA B L, JEON C O. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives [J/OL]. *Open Biol*, 2016, 6(8): 160196[2024-09-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27581654/>. DOI:10.1098/rsob.160196.
- [18] 马晓钰, 孙晓革. PD-1/PD-L1 抑制剂的困境与 sPD-1/sPD-L1 的标志物潜能[J]. *肿瘤学杂志*, 2023, 29(1): 54-60. DOI:10.11735/j.issn.1671-170X.2023.01.B010.
- [19] MU C Y, HUANG J N, CHEN Y, et al. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation[J]. *Med Oncol*, 2011, 28(3): 682-688. DOI: 10.1007/s12032-010-9515-2.
- [20] LI Y, ZHAO R F, CHENG K M, et al. Bacterial outer membrane vesicles presenting programmed death 1 for improved cancer immunotherapy via immune activation and checkpoint inhibition[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(12): 16698-16711. DOI:10.1021/acsnano.0c03776.
- [21] 王世杰, 黄惟巍, 舒聪妍, 等. 新型抗原递送载体: 细胞溶素 A 融合目的蛋白整合的重组外膜囊泡的构建与鉴定[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32(11): 1272-1278. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2016.11.14.
- [22] MURASE K. Cytolysin A (ClyA): a bacterial virulence factor with potential applications in nanopore technology, vaccine development, and tumor therapy[J/OL]. *Toxins*, 2022, 14(2): 78[2024-09-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35202106/>. DOI: 10.3390/toxins14020078.

[收稿日期] 2024-09-20

[修回日期] 2025-01-14

[本文编辑] 黄静怡