

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.02.0167

论著

# 声动力联合双重免疫激活作用治疗口腔鳞状细胞癌的研究

周楠<sup>1</sup>, 曹鸣芯<sup>2</sup>, 杨晓英<sup>1</sup>

(1.天津医科大学药学院药剂学系, 天津 300070; 2.天津医科大学口腔医院正畸科, 天津 300070)

**摘要** 目的:探讨声敏剂维替泊芬(Vp)与 EZH2 抑制剂他泽司他(Taz)构建的纳米药物介导声动力疗法(SDT)与免疫激活协同治疗口腔鳞状细胞癌(OSCC)的作用。方法:通过将 Vp 与 Taz 共沉淀制备无载体纳米药物 VpTaz,随后通过粒径电位分析仪和透射电镜检测其粒径、粒径分布和形貌特征,并采用活性氧簇(ROS)探针检测其体外 SDT 性能。进一步采用 SCC-7 细胞为 OSCC 细胞的研究对象,观察 VpTaz 被 SCC-7 细胞摄取的情况,检测其对胞内 ROS 生成和细胞毒性的作用,评估其对 SCC-7 细胞的杀伤性能,通过免疫荧光技术检测 SCC-7 细胞中高迁移率族蛋白 1(HMGB1)的释放情况,考察由 VpTaz 的 SDT 作用引发的免疫原性细胞死亡(ICD);同时,通过蛋白印迹实验考察 VpTaz 对 H3K27me3、EZH2、Histone3 蛋白表达的影响。结果:VpTaz 在透射电子显微镜下呈现完整的实心球形纳米结构,水合粒径大小为(113.03±1.42) nm,分散性良好,多分散系数为 0.069±0.016,且具有良好的体外 SDT 性能( $F=1\ 020, P<0.001$ ;  $F=27.11, P<0.01$ );其可被 SCC-7 细胞摄取,并在 2 h 达到饱和( $F=802.1, P<0.001$ )。在超声激发下,VpTaz 处理的 SCC-7 细胞内产生了大量 ROS( $F=2\ 550, P<0.001$ ),不同浓度下,非超声 Vp、VpTaz 组 SCC-7 细胞其生存率无显著性变化,Vp+US、VpTaz+US 组 SCC-7 细胞的生存率均显著降低( $F=5.463, 38.53, 76.74, 398.7, 666.7$ , 均  $P<0.05$ ),且 VpTaz 可以成功促进 HMGB1 的释放,促进 ICD 的发生( $F=53.1, P<0.001$ );在基因层面,对照和单纯 Vp 相比,Taz 和 VpTaz 均可显著抑制主要组织相容性复合物 I 类分子(MHC-I)上游调控相关蛋白的甲基化( $F=1\ 006, P<0.01$ ),并且提高 MHC-I 的表达( $F=3\ 932, P<0.001$ ),增强 SCC-7 细胞免疫原性。结论:VpTaz 可通过 SDT 杀伤和双重抗肿瘤免疫激活协同治疗 OSCC。

**关键词** 口腔鳞状细胞癌;声动力疗法;表观遗传调控

中图分类号 R739.8

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)02-0167-07

## Sonodynamic therapy combined with dual immune activation effect in the treatment of oral squamous cell carcinoma

ZHOU Nan<sup>1</sup>, CAO Mingxin<sup>2</sup>, YANG Xiaoying<sup>1</sup>

(1.Department of Pharmacy, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Department of Orthodontics, Stomatology Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To investigate the synergic effects of nanomedicine mediated sonodynamic therapy (SDT) and antitumor immune activation constructed by Verteporfin (Vp) as a sonosensitizer and Tazemetostat (Taz) as an EZH2 inhibitor on the treatment of oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods:** Carrier-free nanomedicine VpTaz was obtained by co-precipitation of Vp with Taz, followed by detecting its particle size and size distribution via a particle size potential analyser, and observation the morphological characteristics via transmission electron microscopy. The SDT performance *in vitro* was detected by reactive oxygen species (ROS) probes. SCC-7 cells were employed as the research object of OSCC cells. The uptake of VpTaz by SCC-7 cells was observed, its effect on intracellular ROS generation and cytotoxicity was detected. Then, the release of high mobility group protein 1 (HMGB1) in SCC-7 cells was detected by immunofluorescence technique, the immunogenic death (ICD) triggered by SDT effect of VpTaz was assessed. Meanwhile, the effect of VpTaz on the expression of H3K27me3, EZH2 and Histone3 proteins was examined by Western blotting. **Results:** VpTaz showed an intact solid spherical nanostructure under transmission electron microscopy, with an average hydrated particle size of (113.03±1.42) nm and well dispersed, a polydispersity coefficient of 0.069±0.016. It exhibited good SDT performance *in vitro* ( $F=1\ 020, P<0.001$ ;  $F=27.11, P<0.01$ ). VpTaz could be uptaken by SCC-7 cells and saturated at 2 h ( $F=802.1, P<0.001$ ). Under ultrasound irradiation, SCC-7 cells treated with VpTaz exhibited higher ROS levels when compared with OSCC cells without ultrasound irradiation ( $F=2\ 550, P<0.001$ ). At different concentrations, there was no significant difference in the survival rate of SCC-7 cells in the non ultrasound Vp and VpTaz groups. However, the survival rate of SCC-7 cells in the Vp+US and VpTaz+US groups was significantly reduced ( $F=5.463, 38.53, 76.74,$

基金项目 国家自然科学基金面上项目(12074284)

作者简介 周楠(2000-),女,硕士在读,研究方向:药剂学;通信作者:杨晓英, E-mail: yangxiaoying@tmu.edu.cn。

398.7, 666.7,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ). Moreover, VpTaz could facilitate the release of HMGB1 and induced ICD effect ( $F = 53.1$ ,  $P < 0.001$ ). On the genetic level, compared with control and Vp control, Taz and VpTaz significantly inhibited the methylation of upstream regulatory proteins related to major histocompatibility complex I (MHC-I) ( $F = 1\ 006$ ,  $P < 0.01$ ), elevated the expression of MHC-I ( $F = 3\ 932$ ,  $P < 0.001$ ), and enhanced the immunogenicity of SCC-7 cells. **Conclusion:** VpTaz can synergistically treat OSCC through SDT killing and dual anti-tumor immune activation.

**Key words** oral squamous cell carcinoma; sonodynamic therapy; epigenetic regulation

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是指发生于口腔黏膜上皮的恶性肿瘤,其侵袭性强、恶性程度高、易复发与转移、预后差<sup>[1]</sup>。临床上主要采取手术切除为主,放化疗为辅的综合治疗方法,这对控制 OSCC 的进展具有一定作用,但晚期或复发患者的总生存率仍然较低<sup>[2]</sup>。研究表明,OSCC 突变负荷高,且处于抗肿瘤免疫失能的微环境中,免疫治疗表现出一定的有限性。

声动力疗法(sonodynamic therapy, SDT)作为一种基于超声波(US)的非侵袭性新型物理治疗方法,具有组织穿透性强<sup>[3]</sup>、时空选择性高<sup>[4]</sup>、损伤小、不易耐药等优势<sup>[5]</sup>,特别适合治疗 OSCC<sup>[6]</sup>。SDT 主要通过超声激发声敏剂,生成细胞毒性活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),发挥直接的肿瘤杀伤作用。研究表明,SDT 还可诱发肿瘤细胞免疫原性死亡(immunogenic cell death, ICD),释放肿瘤相关抗原,发挥疫苗样效应<sup>[7]</sup>;同时凋亡的肿瘤细胞会产生大量的损伤相关分子模式,招募并激活抗原呈递细胞,最终启动 T 细胞介导的抗肿瘤免疫<sup>[8]</sup>。近期研究表明,维替泊芬(Vp)作为一种经典的抑制 YAP-TEAD 相互作用的小分子化合物,具有优越的声敏性,且其介导的 SDT 对 OSCC 具有良好的治疗效果,不仅可以消融原位肿瘤,还能发挥免疫激活作用<sup>[9]</sup>。然而,恶性肿瘤可通过免疫耐受的导入<sup>[10]</sup>、局部免疫逃逸<sup>[11]</sup>、T 细胞信号破坏<sup>[12]</sup>等多种途径逃脱免疫清除,SDT 介导的免疫激活效应仍不足以抑制肿瘤的复发或远端转移<sup>[13]</sup>。因此,联合的免疫治疗策略很有必要。

肿瘤缺失主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC) I 类分子表达,导致 CD8<sup>+</sup>T 细胞无法特异性识别和杀伤带有相应 MHC-I 类分子抗原肽的肿瘤细胞是肿瘤免疫逃逸和免疫治疗失败的关键因素<sup>[14]</sup>。据报道,多种实体瘤均出现 MHC-I 类分子表达缺失,而这一现象在头颈鳞癌中更为普遍<sup>[15]</sup>。OSCC 细胞中, MHC-I 类分子的基因启动子区域受到组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化(H3K27me3)修饰而转录抑制。研究显示, Zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2)抑制剂能够下调 H3K27me3 表达,削弱其对 MHC-I 类分子的转录

抑制,进而增强肿瘤抗原提呈和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的杀伤作用<sup>[16]</sup>。2020 年, FDA 批准首个 EZH2 特异性小分子抑制剂——他泽司他(Taz)用于局部晚期或转移性实体瘤的临床治疗<sup>[17]</sup>。有研究证实, Taz 能够有效抑制 EZH2 对 H3K27me3 的修饰,进而增强 OSCC 的免疫原性<sup>[18]</sup>。因此,本研究采用纳米沉淀法将 Vp 与 Taz 自组装制备无载体纳米药物 VpTaz,旨在探究该纳米药物介导的 SDT 对 OSCC 细胞的杀伤作用以及增强 OSCC 免疫原性激活抗肿瘤免疫的潜能,从而为综合治疗 OSCC 提供新的方法和策略。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂和仪器** 小鼠 OSCC 细胞系 SCC-7 细胞(深圳豪地华拓生物科技有限公司), Vp(天津希思恩奥普德科技有限公司), Taz(山东思科捷生物技术有限公司), DCFH-DA 荧光探针、DPBF 探针(美国 Sigma 公司), CCK-8 试剂盒(大连美仑生物), 兔源 HMGB1 单克隆抗体(中国, 武汉爱博泰克生物科技有限公司), 兔源 EZH2 单克隆抗体、兔源 His-tone 3 单克隆抗体、兔源 H3K27me3 单克隆抗体(美国 CST 公司), 兔源  $\beta$ -actin 多克隆抗体(中国, 北京博奥森生物技术有限公司), 鼠源 MHC-I 单克隆抗体(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

恒温磁力搅拌器(德国 IKA 公司), ZS90 粒径-Zeta 电位分析仪(英国 Malvern 仪器有限公司), HT7700 场发射透射电子显微镜(TEM)、荧光分光光度计(F-7000, 日本 Hitachi 公司), 紫外-可见分光光度计(UV-vis)光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 激光扫描共聚焦显微镜 LSM-800 (CLSM)(德国卡尔蔡司公司), 分析型流式细胞仪 Verse(美国 BD 公司), 荧光发光成像仪(英国 Syngene 公司)。

**1.2 药品制备与表征** 将 Vp 和 Taz 分别溶解于二甲基亚砜(DMSO)中, 得到浓度为 20 mg/mL 的溶液。随后, 将 Vp 和 Taz 按照 1:1 的比例混合, 在 1 000 r/min 搅拌 10 min 后, 在搅拌下按照 DMSO 与水为 1:10 的比例缓慢滴加至超纯水中, 再以 1 000 r/min 搅拌 10 min, 得到 VpTaz 纳米粒子。将 VpTaz 稀释一倍分散于水中制备样品溶液, 取 20  $\mu$ L 样品液滴于碳膜铜网表面, 滤纸吸掉多余液体, 自然晾

干后置于透射电子显微镜下观测并拍照记录。利用粒径-Zeta 电位分析仪检测 VpTaz 的粒径、粒径分布。

**1.3 VpTaz 的体外 SDT 性能** 采用荧光探针 DCFH-DA 检测在超声作用下 VpTaz 产生的 ROS 水平。检测前先将 DCFH-DA 进行预处理:避光条件下,在 DCFH-DA 溶液中加入 DMSO 和氢氧化钠溶液,搅拌反应 30 min 后,加入 PBS 溶液终止反应,置于冰上待用。实验分为 4 组:包括非超声组 Vp、VpTaz;超声(US)组 Vp+US、VpTaz+US。各组中 ROS 探针、各组药物的终浓度分别为 20  $\mu\text{mol/L}$  和 25  $\mu\text{g/mL}$ 。在超声组中,将各组药物与探针混合,超声参数设置为 1 W/cm<sup>2</sup>,5 min,1 MHz,50% 占空比;非超声组不予超声,其他条件与超声组一致。超声完毕后,于 37℃ 摇床孵育 2 h。采用荧光分光光度计检测各样品溶液的荧光强度,激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm。同时,采用紫外探针 DPBF 检测在超声作用下 VpTaz 产生的 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 水平。在 1 mL 浓度为 25  $\mu\text{g/mL}$  的对照组、Vp、VpTaz 溶液中分别加入 40  $\mu\text{L}$  浓度为 1 mg/mL DPBF 的 DMSO 溶液和 10  $\mu\text{L}$  的 DMF,随后对各样品超声处理 5 min,超声参数设置为 1 W/cm<sup>2</sup>,1 MHz,50% 占空比,并孵育 2 h,采用 UV-vis 分光光度计检测其在 425 nm 的吸光度。

**1.4 SCC-7 细胞摄取 VpTaz 的能力** 为检测 Vp-Taz 被 OSCC 细胞的摄取情况,本研究采用 SCC-7 细胞为研究对象,利用 Vp 自发荧光,通过共聚焦荧光显微镜观察 Vp 或 VpTaz 处理后,药物在 SCC-7 细胞内的数量和分布情况。采用 OSCC 的 SCC-7 细胞为研究对象,实验分为 2 组:Vp、VpTaz 分别给药处理,体系中 Vp 的浓度均为 2.5  $\mu\text{g/mL}$ ,避光培养 0.5、2、4 h 后,加入 4% 的多聚甲醛溶液室温固定 10 min,采用 DAPI 染细胞核后,通过共聚焦显微镜观察细胞摄取效率。

**1.5 流式细胞术检测细胞内 ROS 水平** 采用 DCFH-DA 荧光探针检测 VpTaz 作用下 SCC-7 细胞中的 ROS 生成水平,在 SCC-7 细胞中分别加入 PBS 缓冲溶液治疗组、Vp 或 VpTaz,体系中 Vp 的浓度均为 2.5  $\mu\text{g/mL}$ ,培养 2 h 后超声组细胞采用 1 W/cm<sup>2</sup> 的功率超声 5 min(1 MHz,50% 占空比),随后转移至细胞培养箱内继续培养 24 h,弃去原有的培养基,PBS 洗 2 遍,加入 DCFH-DA 荧光探针(20  $\mu\text{mol/L}$ ),并于细胞培养箱内避光孵育 30 min,而后消化细胞并过膜,上机检测 DCF 信号。

**1.6 VpTaz 对 SCC-7 细胞的杀伤性能** VpTaz 介导的 SDT 可以在 SCC-7 细胞中产生大量的 ROS,可以检测其在超声激发下对 SCC-7 细胞的杀伤性能。在 SCC-7 细胞内加入 0.25、0.5、1、2.5、5  $\mu\text{g/mL}$

的 Vp 或 VpTaz,实验分为 4 组,包括非超声组:Vp、VpTaz 与超声(US)组:Vp+US、VpTaz+US。同时,设置不做处理的 SCC-7 细胞作为对照组。培养 2 h 后,超声组采用 1 W/cm<sup>2</sup> 的功率超声 5 min(1 MHz,50% 占空比),随后转移至细胞培养箱内继续培养 12 h,弃去原有的培养基,PBS 洗 2 遍后,每孔加入 CCK-8 试剂孵育 1.5 h,通过酶标仪检测其在 450 nm 处的吸光度。以对照孔细胞存活率为 100%,通过计算各组吸光度值与对照组吸光度值的比率得到各组的存活率。

**1.7 免疫荧光染色观察 HMGB1 定位及表达情况** 在 SCC-7 细胞内加入 2.5  $\mu\text{g/mL}$  的 Vp、Taz、VpTaz,培养 2 h。同时,设置不做处理的 SCC-7 细胞作为对照组(Control)。实验分为 8 组:包括非超声组:Control、Vp、Taz、VpTaz 与超声组:Control、Vp、Taz、VpTaz。超声组采用 1 W/cm<sup>2</sup> 的功率持续照射 5 min(1 MHz,50% 占空比),随后转移至细胞培养箱内继续培养 12 h,弃去培养液,加入 4% 多聚甲醛溶液固定 10 min,采用 PBS 洗 3 遍后加入 0.2% TritonX-100,室温静置 10 min 打孔处理后,PBS 清洗 3 遍,随后滴加 1:400 稀释后的 HMGB1 一抗,并于 4℃ 冰箱静置孵育过夜。次日,采用 PBS 清洗 2 遍,滴加稀释后的 FITC 标记的羊抗兔二抗于湿盒中室温静置孵育 1 h,孵育结束后用 DAPI 染色并于 CLSM 下观察。

**1.8 Western 印迹检测 Taz 的表观遗传调控作用** H3-K27me3 是核心组蛋白 H3 的第 27 个氨基酸赖氨酸的氨基(N)末端尾部发生的组蛋白甲基化,是最为常见的组蛋白甲基化修饰之一。检测 Vp、Taz、VpTaz 在 SCC-7 细胞中作用 24 h 后对 Zeste 基因增强子同源物 2(EZH2)、组蛋白 3(Histone 3)及 H3K27me3 表达的影响。细胞裂解提取蛋白样品,依次进行电泳、转膜、封闭后,将于 4℃ 摇床孵育一抗过夜(一抗稀释比例:EZH2:1:1 000、Histone3:1:2 000、H3K27me3:1:1 000)。次日,清洗后进行二抗孵育 1 h(二抗稀释比例:1:6 000),最后将发光液 A 和 B 按 1:1 比例配置,滴加于条带上进行暗室曝光,于 Image J 软件分析条带灰度值做半定量分析。

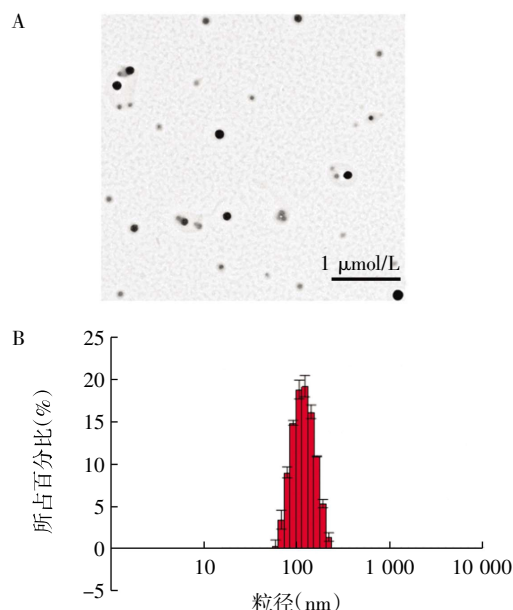
**1.9 流式细胞术检测 MHC-I 表达情况** 在 SCC-7 细胞中加入 Vp、Taz 或 VpTaz,体系中 Vp 的浓度均为 2.5  $\mu\text{g/mL}$ ,继续培养 48 h 后,弃去原有的培养基,使用 PBS 洗 2 遍,收集细胞后用 3% BSA 稀释后的 PE 标记的 MHC-I 抗体溶液于冰上孵育 40 min,最后用 1 mL PBS 终止并离心,上机检测荧光强度。

**1.10 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,每个实验均平行重

复操作 3 次,多组间比较采用单因素 ANOVA 方差分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 VpTaz 的表征** 采用 TEM 观察 VpTaz 纳米粒子,如图 1A 所示,VpTaz 呈圆形或类圆形的纳米级粒子特征。利用粒径电位分析仪检测 VpTaz 粒径和 Zeta 电位,结果显示粒子水合粒径大小为  $(113.03 \pm 1.42)$  nm,多分散系数为  $0.069 \pm 0.016$ ,分散性良好(图 1B)。



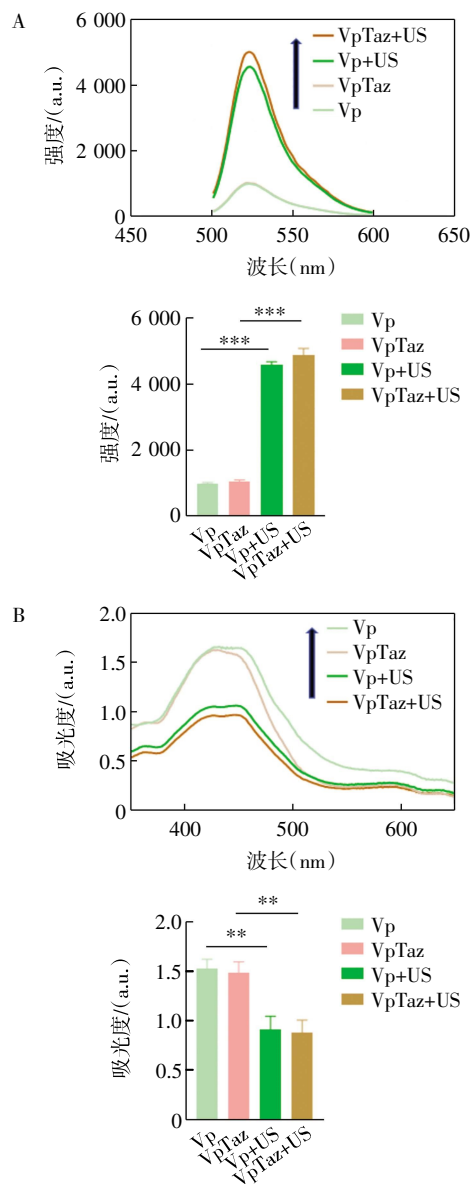
注:A:TEM 观察 VpTaz 形态;B:VpTaz 的粒径分布图

图 1 VpTaz 的表征

Fig.1 Characterization of VpTaz

**2.2 VpTaz 的体外 SDT 性能考察** 采用 DCFH-DA 荧光探针检测在超声作用下 VpTaz 产生 ROS 的能力,DCFH-DA 在碱性条件下被水解成 DCFH,然后被 ROS 氧化成具有荧光的 DCF,如图 2A 所示,非超声组 Vp 和 VpTaz 均显示出较弱的荧光强度。Vp+US 组和 VpTaz+US 组( $1 \text{ W/cm}^2$ , 5 min, 1 MHz, 50% 占空比)荧光强度均有显著增高( $F=1\,020$ ,  $P<0.001$ )。由于 SDT 引发的 ROS 生成主要是  $^1\text{O}_2$ ,因此进一步研究了 VpTaz 介导的 SDT 效应过程中  $^1\text{O}_2$  的生成情况(图 2B)。DPBF 紫外探针可以结合  $^1\text{O}_2$ ,从而导致 DPBF 的紫外特征吸收峰降低,因此可以通过测定 DPBF 在 425 nm 处吸收峰的变化情况,评价 VpTaz 体外产生  $^1\text{O}_2$  的效率。结果如图 2B 所示,与非超声组相比,Vp+US 组和 VpTaz+US 组的 UV-vis 吸收峰显著降低,表明 Vp 作为声敏剂能够使 VpTaz 介导的 SDT 产生大量的  $^1\text{O}_2$ ( $F=27.11$ ,  $P<0.01$ )。

**2.3 SCC-7 细胞摄取 VpTaz 的能力** 结果显示,Vp 和 VpTaz 主要分布在细胞质中,进入细胞的数



注:Vp: 维替泊芬;Taz: 他泽司他;A:DCFH-DA 检测非超声组 Vp、VpTaz 与超声(US)组 Vp+US、VpTaz+US 产生 ROS 水平的荧光光谱及 525 nm 处的荧光峰值图(\*\*\* $P<0.001$ );B:DPBF 检测非超声组 Vp、VpTaz 与超声(US)组 Vp+US、VpTaz+US 产生  $^1\text{O}_2$  水平的紫外扫描及 425 nm 处紫外吸收值;\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$

图 2 VpTaz 的体外 SDT 性能考察

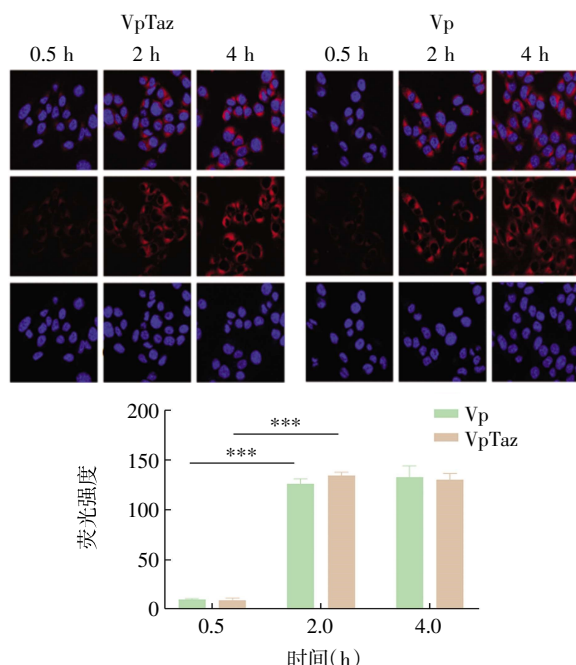
Fig.2 Examination of SDT performance of VpTaz in vitro

量在 2 h 基本达到饱和,其荧光强度与 4 h 时基本一致,且 Vp 和 VpTaz 被 SCC-7 细胞摄取的能力无显著差异(图 3)。半定量荧光分析结果显示,2 h 的 Vp、VpTaz 组比 0.5 h 时均显示出更强的荧光强度( $F=802.1$ ,均  $P<0.001$ )。

**2.4 流式细胞术检测细胞内 ROS 生成水平** 结果如图 4 所示,与非超声组相比,超声组 DCF 荧光峰有明显右移,DCF 的水平明显升高( $F=2550$ ,均  $P<0.001$ )。

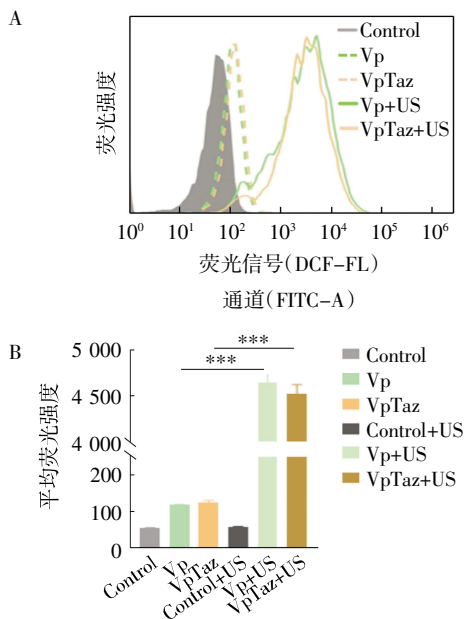
**2.5 VpTaz 的 SDT 杀伤性能** 结果如图 5 所示,不同浓度下,非超声 Vp、VpTaz 组 SCC-7 细胞其生存

率无显著性变化,Vp+US、VpTaz+US组 SCC-7 细胞的生存率均显著降低 ( $F=5.463, 38.53, 76.74, 398.7, 666.7$ , 均  $P<0.05$ ), 且呈现出浓度依赖性, 表明 SCC-7 细胞的杀伤主要是由 Vp 介导的 SDT 所导致。



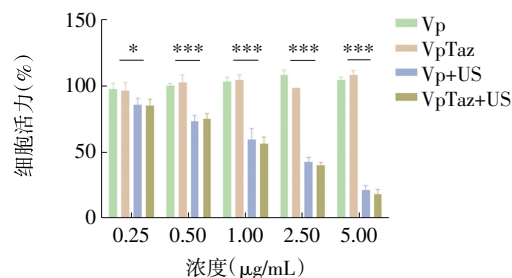
注: VpTaz 与 Vp 在不同时间入胞的荧光强度; \*\*\* $P<0.001$

图3 SCC-7 对 VpTaz 与 Vp 在不同时间时的摄取情况  
Fig.3 Cell uptake capacity of SCC-7 for VpTaz and Vp in different time points



注: A: DCFH-DA 检测非超声组 Vp、VpTaz 与超声 (US) 组 Vp+US、VpTaz+US 的 ROS 水平的流式分析图; Vp 与 VpTaz 的给药浓度均为  $2.5 \mu\text{g/mL}$ ; B: 超声 (US) 条件下各组中 SCC-7 细胞处理后的平均荧光强度; \*\*\* $P<0.001$

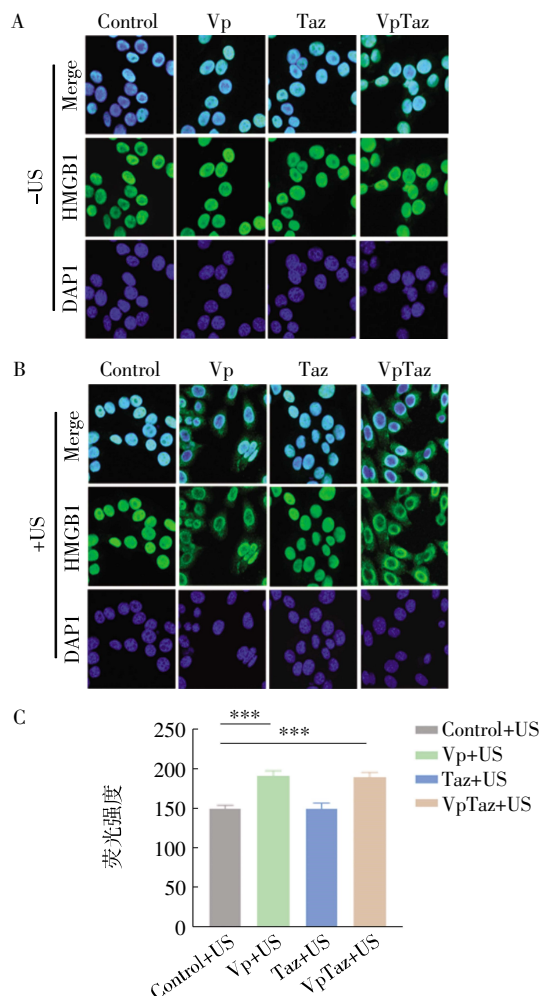
图4 DCFH 探针检测 SCC-7 细胞中的 ROS 生成水平  
Fig.4 ROS production in SCC-7 cells detected by DCFH probe



注: \* $P<0.05$ ; \*\*\* $P<0.001$

图5 VpTaz 的 SDT 杀伤性能  
Fig.5 SDT killing of VpTaz

2.6 肿瘤细胞发生 ICD 的标志物考察 HMGB1 核转位是细胞发生 ICD 的重要标志之一, 由图 6 可观察到, 非超声 Control、Vp、Taz、VpTaz 组细胞中, HMGB1 均位于细胞核中, 核内有明显的绿色荧光; 超声 Vp 组、VpTaz 组 HMGB1 从细胞核释放到细胞



注: A: 非超声组 SCC-7 细胞的 HMGB1 的免疫荧光图; B: 超声组 SCC-7 细胞的 HMGB1 的免疫荧光图; C: 超声 (US) 条件下各组中 SCC-7 细胞处理后的荧光强度; 各组给药浓度均为  $2.5 \mu\text{g/mL}$ ; \*\*\* $P<0.001$

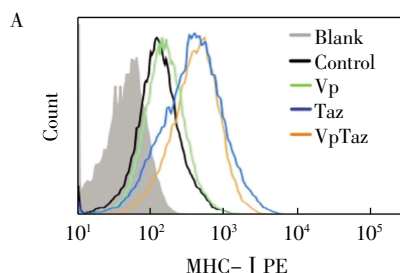
图6 超声激发下 VpTaz 对 SCC-7 的 HMGB1 的释放影响  
Fig.6 Effect of VpTaz on HMGB1 release from SCC-7 under ultrasound exposure



质中。表明 VpTaz 介导的 SDT 引发了肿瘤细胞发生 ICD, 有助于激活抗肿瘤免疫应答, 从而抑制肿瘤的复发与转移。半定量荧光分析结果显示超声 Vp 组、VpTaz 组相对于 Control 组在细胞质中显示出更明显的荧光强度 ( $F=53.1$ , 均  $P<0.001$ )。

**2.7 VpTaz 的表观遗传调控作用** 如图 7 所示, 与 Control 组相比, Taz 组及 VpTaz 组明显下调了 H3K27me3 的表达, 且其他蛋白表达量与 Control 组一致, 表明 Taz 可以有效抑制 SCC-7 细胞中 H3K27me3 的表达, 对解除 MHC-I 表达的甲基化抑制有明显作用, 证明 VpTaz 可以增强 OSCC 细胞的免疫原性, 有利于肿瘤抗原呈递, 从而进一步增强抗肿瘤免疫应答 ( $F=1\ 006$ , 均  $P<0.001$ )。

**2.8 VpTaz 促进 OSCC 细胞表面 MHC-I 类分子的表达情况** 本实验考察了 SCC-7 给予不同药物处理后 MHC-I 类分子的表达情况, 结果显示, 与



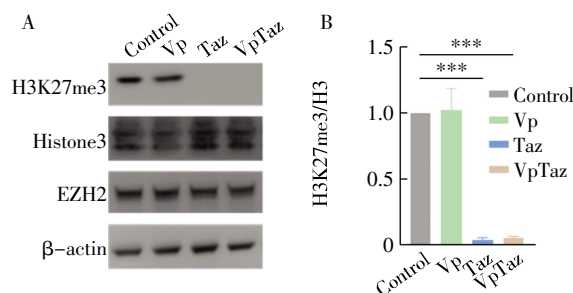
注: A: 流式检测 Control、Vp、Taz、VpTaz 对 SCC-7 细胞处理后的荧光峰值图; 各给药组给药浓度均为  $2.5\ \mu\text{g/mL}$ ; B: 各组中 SCC-7 细胞处理后的 MHC-I 的细胞占比; \*\*\* $P<0.001$

图 8 MHC-I 的流式分析曲线

Fig.8 Flow cytometry analysis curves for MHC-I

### 3 讨论

OSCC 是一种常见的头颈部恶性肿瘤, 常规治疗方法包括手术、放疗和化疗。SDT 作为一种新兴的物理治疗方法, 因其穿透性强、不良反应小、不易耐受等优势近年来备受关注。有报道指出, 通过靶向运输声敏剂至肿瘤部位, 响应超声刺激产生 ROS, 是使肿瘤细胞凋亡和坏死, 同时减少对邻近正常组织损伤的有效方法<sup>[19]</sup>。Sun 等<sup>[9]</sup>开发了一种纳米工程化的间充质干细胞(MSCs) M/LPV/O2, 将 Vp 作为一种声敏剂用于改善针对 OSCC 的非破坏性 SDT, 并使其具有良好的治疗依从性。近年来, 多项与 SDT 相关的研究表明, 其在消融原位肿瘤的同时, 可以作为一种激活机体对肿瘤免疫应答的“原位疫苗”, 可诱导肿瘤细胞的免疫原性死亡。通过释放损伤相关分子模式(DAMPs), 刺激树突状细胞成熟, 并启动效应 T 细胞<sup>[20]</sup>, 从而杀伤肿瘤细胞。有研究使用替莫唑胺作为声敏剂在神经胶质瘤中触发

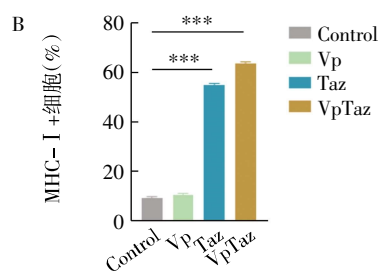


注: Western 印迹检测 Zeste 基因增强子同源物 2(EZH2)、组蛋白 3(Histone 3)及组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸上三甲基化(H3K27me3)表达, 内参为  $\beta$ -actin; 分组包括 Control (对照组)、Vp、Taz 和 VpTaz, 各给药组给药浓度均为  $2.5\ \mu\text{g/mL}$ ; \*\*\* $P<0.001$

图 7 Vp、Taz、VpTaz 对 H3K27me3 调控的 WB 曝光图

Fig.7 WB of H3K27me3 regulation by Vp, Taz, and VpTaz

Control 组相比, Taz 组和 VpTaz 组 MHC-I 的荧光峰有明显右移, 说明 MHC-I 类分子的表达明显升高 ( $F=3\ 932$ ,  $P<0.001$ ), 见图 8。



ICD, 对 DAMPs 相关信号的检测结果表明 ICD 的有效激活, 可促进免疫杀伤作用<sup>[21]</sup>。本研究同样发现, 声敏剂 Vp 可介导 SDT 杀死 OSCC 细胞, 并释放 DAMPs 的经典标志物 HMGB1, 具有激活抗肿瘤免疫的潜能。尽管 SDT 有许多优势, 但恶性肿瘤会通过 T 细胞信号失活, 低免疫原性等方式进行免疫逃逸。超过 50% 的头颈鳞癌表现出 MHC-I 的低表达<sup>[22]</sup>, 造成免疫原性的降低。根据肿瘤的免疫逃逸特点, 通过提升其免疫原性协同 SDT 可增强对肿瘤的杀伤作用。

MHC-I 类分子在抗原呈递中起重要作用, 通过提高肿瘤细胞 MHC-I 的表达水平, 可以增强 T 细胞对肿瘤抗原的识别, 恢复特异性 T 细胞介导的细胞毒性作用, 从而提高免疫治疗的抗肿瘤效应<sup>[22]</sup>。研究表明, MHC-I 类分子稳定性与其表观遗传改变和转录功能相关, 当其在肿瘤细胞内的表达量下降时, 可通过失调的内在可逆性恢复 MHC-I 类分子表达。Vijayan 等<sup>[23]</sup>研究发现, NLRC5(NOD 样受体

家族的一种蛋白质)作为 MHC-I 类反式激活因子,可调控其表达。Zhao 等<sup>[24]</sup>通过干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )促进 MHC-I 类分子缺陷型乳腺癌细胞中 NLRC5 的表达,使 MHC-I 类分子的表达量增加,结果表明,该方法可明显提高免疫治疗的效果,并可抵抗肿瘤发生免疫逃逸。EZH2 作为甲基化转移酶,促进了甲基化转移的修饰过程。研究表明对组蛋白的修饰能够抑制 OSCC 细胞中与抗原呈递相关的 MHC-I 分子的表达,导致肿瘤抗原识别减少<sup>[25]</sup>。2020 年,美国食品与药品监督管理局批准的 EZH2 抑制剂 Taz 可针对 OSCC 的 MHC-I 低表达特点进行调控。在本研究中,Taz 通过对 H3K27 特殊位点的竞争结合,抑制其甲基化作用,有效提升了 MHC-I 类分子的表达,促进肿瘤抗原提呈,以提高肿瘤的免疫原性。

综上所述,本研究使用纳米共沉淀法自组装制备了无载体纳米药物 VpTaz,通过考察其在超声下,在溶液水平和在 SCC-7 细胞内生成 ROS 的能力及对 SCC-7 细胞的杀伤情况,评价其体外 SDT 性能。通过检测细胞内 HMGB1 的释放情况,证明 VpTaz 在超声下对 SCC-7 细胞产生的 ICD 效应。同时,表观遗传调控相关的表征证明了肿瘤抗原提呈基因的表达,以此实现抑制肿瘤发展及转移的目的。本研究在细胞水平对 VpTaz 在口腔鳞癌的治疗进行了考察,但还缺乏其在体内效果的验证,从而深入探究表观遗传调控的具体通路。接下来的研究将深入考察 VpTaz 在动物水平对口腔鳞癌的治疗效果,并完善相关机制的考察,为临床的治疗策略提供新思路。

#### 参考文献:

- [1] 郑家伟,李金忠,钟来平.口腔鳞状细胞癌临床流行病学研究现状[J].中国口腔颌面外科杂志,2007,5:83.
- [2] 陈皓卓,郑纪伟.口腔鳞状细胞癌治疗现状分析[J].徐州医科大学学报,2018,38(11):755-757.
- [3] PAN X, WANG H, WANG S, et al. Sonodynamic therapy (SDT): a novel strategy for cancer nanotheranostics[J]. Sci China Life Sci, 2018, 61(4):415-426.
- [4] YAN P, LIU L H, WANG P. Sonodynamic therapy (SDT) for cancer treatment: advanced sensitizers by ultrasound activation to injury tumor[J]. ACS Appl Bio Mater, 2020, 3(6):3456-3475.
- [5] QIAN X, ZHENG Y, CHEN Y. Micro/nanoparticle-augmented sonodynamic therapy (SDT): breaking the depth shallow of photoactivation[J]. Adv Mater, 2016, 28(37):8097-8129.
- [6] 许斌,毕良佳.声动力疗法在口腔医学领域的研究进展[J].口腔疾病防治,2020,28(8):535-539.
- [7] LIANG S, YAO J, LIU D, et al. Harnessing nanomaterials for cancer sonodynamic immunotherapy[J]. Adv Mater, 2023, 35(33):e221130.
- [8] ZHANG C, PU K. Organic sonodynamic materials for combination cancer immunotherapy[J]. Adv Mater, 2023, 35(51):e2303059.
- [9] SUN L, XU Y, ZHANG X, et al. Mesenchymal stem cells functionalized sonodynamic treatment for improving therapeutic efficacy and compliance of orthotopic oral cancer[J]. Adv Mater, 2020, 32(48):e2005295.
- [10] PENTER L, LIU Y, WOLFF J O, et al. Mechanisms of response and resistance to combined decitabine and ipilimumab for advanced myeloid disease[J]. Blood, 2023, 141(15):1817-1830.
- [11] RUI R, ZHOU L, HE S. Cancer immunotherapies: advances and bottlenecks[J]. Front Immunol, 2023, 14:1212476.
- [12] VANDER LEUN A M, THOMMEN D S, SCHUMACHER T N. CD8<sup>+</sup> T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis[J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(4):218-232.
- [13] NICHOLAS D, NESBITT H, FARRELL S, et al. Exploiting a rose bengal-bearing, oxygen-producing nanoparticle for SDT and associated immune-mediated therapeutic effects in the treatment of pancreatic cancer[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2021, 163:49-59.
- [14] HU Z, ZHANG Q, HE Z, et al. MHC1/LILRB1 axis as an innate immune checkpoint for cancer therapy[J]. Front Immunol, 2024, 15:1421092.
- [15] ZHOU L, MUDIANTO T, MA X, et al. Targeting EZH2 enhances antigen presentation, antitumor immunity, and circumvents anti-PD-1 resistance in head and neck cancer[J]. Clin Cancer Res, 2020, 26:290-300.
- [16] 李倩,王艳林. EZH2 作为抗肿瘤免疫治疗靶点研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31:29-32.
- [17] 王钧,王铁楠,肖建波,等. EZH2 抑制剂对恶性淋巴瘤细胞放疗抵抗、Th 细胞分化及 PD1/PD-L1 表达的作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(4):888-892.
- [18] 朱永霞,施丽红,陈欣怡,等. 甲基转移酶 EZH2 在恶性肿瘤发生发展及治疗中的新进展[J]. 肿瘤预防与治疗, 2021, 34(10):895-903.
- [19] ZHAO L, RAO X, HUANG C, et al. Epigenetic reprogramming of carrier free photodynamic modulator to activate tumor immunotherapy by EZH2 inhibition[J]. Biomaterials, 2023, 293:121952.
- [20] 李健伦,黄思剑,牟漫,等. 免疫原性细胞死亡在肺癌治疗中的研究进展[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2024, 53(4):552-557.
- [21] ZHOU Y, JIAO J, YANG R, et al. Temozolomide-based sonodynamic therapy induces immunogenic cell death in glioma[J]. Clin Immunol, 2023, 256:109772.
- [22] DHATCHINAMOORTHY K, COLBERT J D, ROCK K L. Cancer immune evasion through loss of MHC class I antigen presentation[J]. Front Immunol, 2021, 12:636568.
- [23] VIJAYAN S, SIDIQ T, YOUSUF S, et al. Class I transactivator, NLRC5: a central player in the MHC class I pathway and cancer immune surveillance[J]. Immunogenetics, 2019, 71:273-282.
- [24] ZHAO M Z, SUN Y, JIANG X F, et al. Promotion on NLRC5 upregulating MHC-I expression by IFN- $\gamma$  in MHC-I deficient breast cancer cells[J]. Immunol Res, 2019, 67:497-504.
- [25] 刘华联,蒋敬庭.头颈部鳞状细胞癌的肿瘤微环境及免疫治疗研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2022, 29(7):671-680.

(2024-09-13 收稿)