

# 基于乙二胺四乙酸插层锌铝双金属氢氧化物的 晚期肿瘤抗转移免疫治疗研究

李世奇<sup>1,2</sup>, 鲍群群<sup>3</sup>, 胡萍<sup>1,2</sup>, 施剑林<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院 上海硅酸盐研究所, 高性能陶瓷和超微结构国家重点实验室, 上海 200050; 2. 中国科学院大学 材料科学与光电工程中心, 北京 100049; 3. 同济大学附属第十人民医院, 上海 200435)

**摘要:** 癌细胞的全身性转移是目前癌症晚期患者的主要死亡原因。由于肿瘤细胞的快速增殖和细胞外基质的异常沉积, 晚期癌症大体积瘤体组织致密且刚度较高, 这为晚期实体肿瘤的治疗带来了极大的困难。一方面, 由于大体积肿瘤的结构特性, 使得常规药物难以渗透至其内部, 免疫细胞难以浸润; 另一方面, 硬基质上的肿瘤细胞具有更强的侵袭能力, 这容易引起肿瘤的全身性转移。为了解决这一问题, 本研究制备了乙二胺四乙酸(EDTA)插层锌铝双金属氢氧化物纳米材料(EDTA/LDH), 基于两个平行的  $\text{Ca}^{2+}$  剥夺机制, 开展了 EDTA/LDH 材料体系对晚期大体积实体瘤的抗转移免疫治疗研究。该材料在肿瘤微酸环境中, 通过静电力作用贴附在肿瘤细胞膜上, 并释放 EDTA 以螯合细胞连接蛋白中的  $\text{Ca}^{2+}$ , 切断部分细胞连接, 从而降低大体积瘤体的致密程度, 促进免疫细胞向瘤体内浸润。此外, 该材料在机体内被巨噬细胞作为“异物”吞噬, 引起钙库操纵性钙内流, 激活巨噬细胞抗肿瘤免疫效应, 抑制多形核髓系抑制性细胞(PMN-MDSCs)和调节性 T 细胞(Tregs)的促肿瘤侵袭作用。本研究将为晚期恶性实体瘤的抗转移治疗提供借鉴性思路和方法。

**关键词:** 晚期癌症; 免疫治疗; 无机纳米材料; 离子调控

中图分类号: R318; R730 文献标志码: A 文章编号: 1000-324X(2024)09-1044-09

## Anti-metastatic Immunotherapy of Advanced Tumors Based on EDTA Intercalated Zinc-aluminum Layered Double Hydroxide

LI Shiqi<sup>1,2</sup>, BAO Qunqun<sup>3</sup>, HU Ping<sup>1,2</sup>, SHI Jianlin<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of High Performance Ceramics and Superfine Microstructures, Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China; 2. Center of Materials Science and Optoelectronics Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Shanghai Tenth People's Hospital, Medical School of Tongji University, Shanghai 200435, China)

收稿日期: 2024-03-28; 收到修改稿日期: 2024-05-24; 网络出版日期: 2024-05-31

**基金项目:** 国家重点研发计划(2022YFB3804500); 国家自然科学基金(22322509, 52072394, 22335006); 上海市优秀学科带头人计划(23XD1424200); 上海市科委基础研究项目(23DX1900200); 中国科学院前沿科学重点计划(ZDBS-LYSLH029); 上海市青年科技英才扬帆计划(22YF1433400)  
National Key R&D Program of China (2022YFB3804500); National Natural Science Foundation of China (22322509, 52072394, 22335006); Program of Shanghai Academic/Technology Research Leader (23XD1424200); The Basic-Research-Program of Shanghai Municipal Government (23DX1900200); Key Research Program of Frontier Sciences, Chinese Academy of Sciences (ZDBS-LYSLH029); Shanghai Yangfan Program (22YF1433400)

**作者简介:** 李世奇(1999-), 男, 硕士研究生. E-mail: lishiqiucas@163.com

LI Shiqi (1999-), male, Master candidate. E-mail: lishiqiucas@163.com

**通信作者:** 鲍群群, 助理研究员. E-mail: bqqshnu@163.com; 胡萍, 研究员. E-mail: huping@mail.sic.ac.cn;

施剑林, 研究员. E-mail: jlshi@mail.sic.ac.cn

BAO Qunqun, assistant professor. E-mail: bqqshnu@163.com; HU Ping, professor. E-mail: huping@mail.sic.ac.cn;  
SHI Jianlin, professor. E-mail: jlshi@mail.sic.ac.cn

**Abstract:** Systemic metastasis of cancer cells is currently the main cause of death for patients with advanced cancer. Due to the rapid proliferation of tumor cells and abnormal deposition of extracellular matrix, the large-volume tumor tissue in advanced cancer is dense and stiff, which brings great difficulties to the treatment of advanced solid tumors: conventional drugs having difficulty in penetrating and immune cells facing challenges to infiltrate into their interior. Meanwhile, tumor cells on hard matrices have stronger invasive ability, which is prone to cause systemic metastasis of tumors. To solve this problem, this study prepared ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) intercalated zinc-aluminum layered double hydroxide nanomaterials (EDTA/LDH). Based on two parallel  $\text{Ca}^{2+}$  deprivation mechanism, the anti-metastasis immunotherapy of EDTA/LDH material system for advanced large-volume solid tumors was studied. In the slightly acidic tumor microenvironment, the material system adheres to the tumor cell membrane through electrostatic force, releases EDTA to chelate  $\text{Ca}^{2+}$  in cell adhesion proteins, cuts off part of the cell connections, reduces the stiffness of large tumors, and promotes the infiltration of immune cells into the tumor tissue. In addition, the material system is phagocytosed by macrophages as a "foreign body", causing calcium store-operated calcium influx, activating the anti-tumor immune effect of macrophages, and inhibiting the tumor-promoting invasion of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSCs) and regulatory T cells (Tregs). This study will provide reference ideas and methods for the anti-metastasis treatment of advanced malignant solid tumors.

**Key words:** advanced cancer; immunotherapy; inorganic nanomaterial; ion regulation

恶性肿瘤迅速地发生发展使得许多癌症患者在临床确诊时病情已经进入中晚期。肿瘤的全身性转移是导致癌症中晚期患者死亡的主要原因<sup>[1-2]</sup>。由于晚期肿瘤细胞呈对数性繁殖,同时伴随着细胞外基质(ECM)的异常沉积,使得肿瘤体积显著增大,其内部压力和刚度远超正常组织水平<sup>[3-4]</sup>。这些特性为晚期癌症的抗转移治疗带来了极大的困难<sup>[5]</sup>。一方面,大体积实体瘤往往已经失去了手术治疗的最佳时期,而致密的肿瘤和硬化的基质所形成的坚实的物理屏障又会阻碍药物、氧气与免疫细胞的渗透,导致化疗、放疗和免疫治疗方法失效<sup>[6-9]</sup>,进而导致失控性生长的肿瘤细胞易于在机体内扩散。另一方面,肿瘤和周围基质刚度增大,会改变细胞骨架,促进肿瘤细胞的增殖和迁移<sup>[10-11]</sup>。而刚性肿瘤更加复杂的内部微环境降低了肿瘤的免疫原性、促进了肿瘤细胞的免疫逃逸<sup>[12-13]</sup>,又进一步通过髓系抑制性细胞(MDSCs)<sup>[14-15]</sup>和调节性T细胞(Tregs)<sup>[16-17]</sup>等诱导肿瘤的扩散,从而引起肿瘤的全身性转移。

为解决大体积实体瘤难以治疗和容易扩散的问题,本研究基于两个平行的钙离子剥夺机制,构建了层间负载乙二胺四乙酸(EDTA)的锌铝层状双金属氢氧化物(EDTA/LDH),提出了一种既能降低肿瘤的刚度,又能逆转促转移的免疫抑制型微环境,从而有效抵抗晚期肿瘤失控性生长和全身性转移的治疗策略<sup>[18]</sup>。一方面,当该材料体系循环至肿瘤组织周围时,正电性的EDTA/LDH易于贴附在肿瘤细

胞膜表面,并在微酸响应下释放EDTA。EDTA剥夺肿瘤和基质间钙依赖性连接蛋白中的钙离子,破坏黏着带和黏着斑的连接,致使坚实瘤体变得松软,从而增加了实体瘤的通透性并降低了肿瘤的刚度<sup>[19-20]</sup>。另一方面,当该材料体系进入机体循环时,作为大颗粒的外源物质易被内皮网状系统中的固有免疫细胞吞噬,经过内涵体和溶酶体(pH 4.5~5.5)转运至内质网并酸响应性释放大量的EDTA。EDTA快速剥夺内质网中的钙离子,引起钙库操纵性钙内流<sup>[21]</sup>,从而激活固有免疫细胞并促使其向抗肿瘤型细胞极化<sup>[22]</sup>。激活的固有免疫细胞进一步通过抗原呈递促使适应性免疫中的T细胞活化,在增强对肿瘤杀伤性的同时改善了肿瘤免疫抑制型,从而抵挡抑制性免疫细胞促肿瘤转移的作用。

为了研究该双重钙剥夺策略针对大体积高度恶性实体瘤的抗转移免疫治疗效果,本工作构建了原位晚期恶性乳腺癌模型,如图1所示,BALB/c小鼠的乳腺接种了高浓度小鼠乳腺癌细胞(4T1,  $6 \times 10^6$  cells/100  $\mu\text{L}$ ),并在肿瘤体积增长到约100  $\text{mm}^3$ 时通过尾静脉注射EDTA/LDH进行干预治疗。EDTA/LDH通过剥夺基质间和肿瘤间黏着带中E-cadherin(E-cad)的钙离子,促使大体积实体瘤的刚度降低,从而降低了肿瘤细胞的转移风险,并增加了毒性T细胞和其他免疫细胞的浸润。此外,EDTA/LDH通过钙内流通道增加了免疫活性,可有效抵抗肿瘤细胞的无限繁殖。最后,EDTA/LDH逆转了免疫抑制型肿瘤微环境,阻碍了促肿瘤转移的

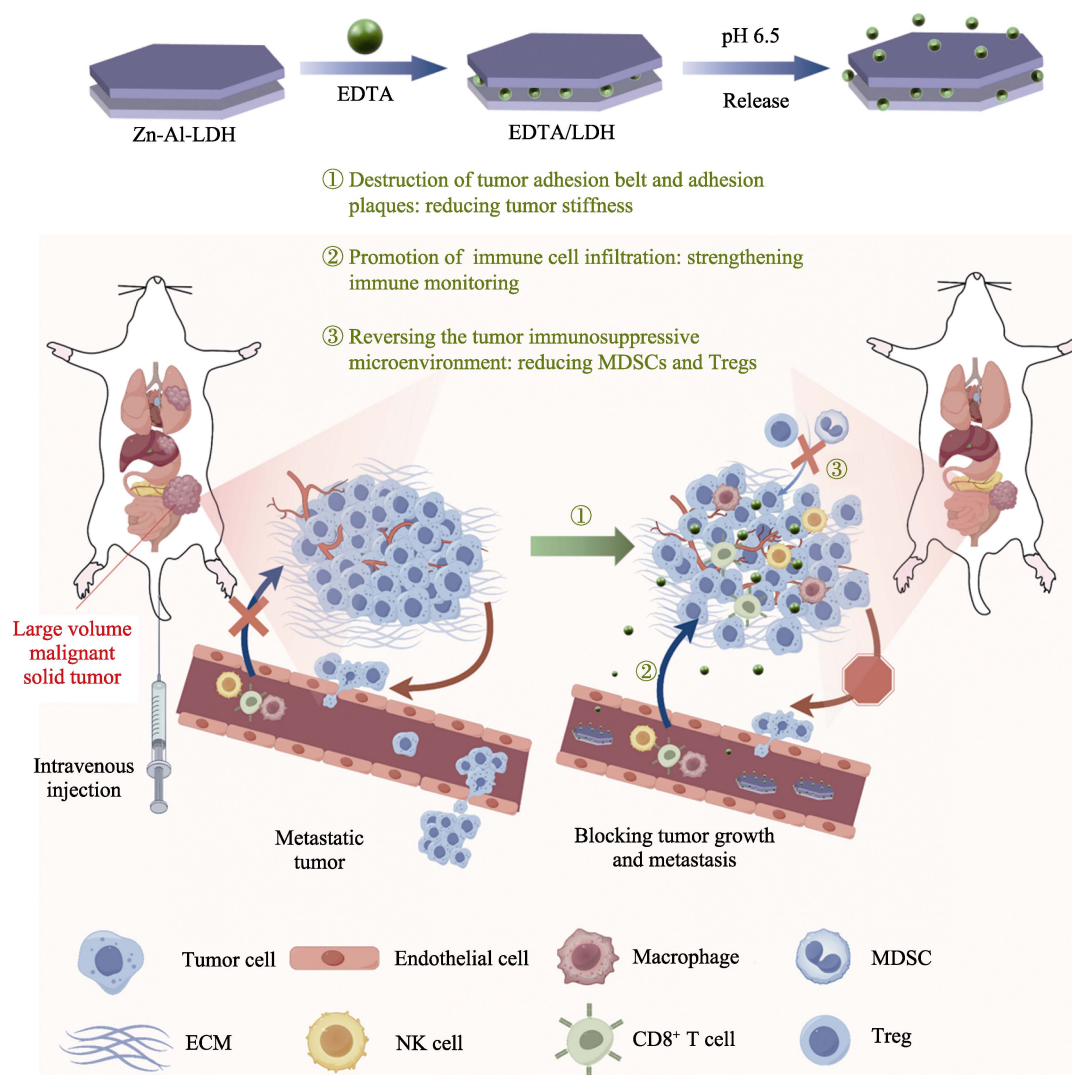


图 1 EDTA/LDH 材料体系针对大体恶性实体瘤的抗转移免疫治疗示意图

Fig. 1 Schematic diagram of EDTA/LDH material system for anti-metastatic immunotherapy of large-volume malignant solid tumors

MDSCs 和 Tregs 的表达, 进一步阻止了恶性肿瘤的全身性转移。本工作更贴近临床应用需求, 为无机纳米材料在晚期恶性肿瘤抗转移中的转化应用提供了实验基础和理论指导。

## 1 实验方法

### 1.1 实验药品

所有化学试剂均为分析级, 未经纯化直接使用。硝酸铝( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )、硝酸锌( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、硝酸钠( $\text{NaNO}_3$ )和六亚甲基四胺(HMT)均购自中国上海中试化学试剂有限公司。乙二胺四乙酸二钠购自 Sigma-Aldrich。

### 1.2 材料表征

使用冷场发射扫描电子显微镜(SU9000, Hitachi)拍摄透射电子显微(TEM)图像。采用 Magellan 场发

射扫描透射电子显微镜(FEI)获得能量色散 X 射线谱(EDS), 工作电压为 30 kV。X 射线衍射(XRD)图谱由 Ultima IV X 射线衍射分析仪获得。傅里叶变换红外光谱(FT-IR)由 Nicolet iS 10 红外光谱仪(Thermo Scientific)获得。通过纳米粒度电位仪(Malvern Zetasizer Nanoseries Nano ZS90)分别测定了材料的水合粒径 DLS(Dynamic light scattering)和表面 Zeta 电位。

### 1.3 材料合成

通过改善的均相碱化工艺合成了锌铝层状双金属氢氧化物( $\text{Zn-Al-LDHs}$ ): 将  $\text{NaNO}_3$ (0.085 g)、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.594 g)、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0.375 g)和 HMT(0.702 g)溶于 150 mL 去离子水中。在氩气保护气氛下, 将得到的透明混合溶液在 80 °C 下回流。0.5 h 后, 在氩气保护气氛中于 80 °C 下向 LDH 前体中加入乙二胺四乙酸二钠溶液(0.6 g), 4 h 后形成 EDTA/LDH 沉淀。经过三次洗涤和过滤, 得到

EDTA/LDH的最终产物。

### 1.4 小鼠原位乳腺癌模型构建

BALB/c 小鼠(6周)购自上海实验动物中心。每只小鼠右腹部皮下注射 100  $\mu\text{L}$  癌细胞悬液( $6 \times 10^6$  cells),建立皮下 4T1 肿瘤荷瘤小鼠。肿瘤生长到较大尺寸( $\sim 100 \text{ mm}^3$ )后进行后续体内实验。

### 1.5 小鼠尾静脉注射给药

EDTA/LDH 经紫外线消毒后分散于生理盐水中,以 10 mg/kg 的剂量经尾静脉注射到 4T1 荷瘤 BALB/c 小鼠体内,每四天进行一次尾静脉注射治疗,治疗过程中记录小鼠的肿瘤大小和体重。

### 1.6 组织学分析

在治疗开始后的第 16 天脱颈处死小鼠,取出肿瘤、肝、脾、肺、肾等组织、器官进行拍照,并将组织固定在 4%(wt/v)的多聚甲醛中。为了确定小鼠器官中是否有肿瘤转移灶,将组织进行石蜡包埋切片,并进行苏木精和伊红(H&E)染色,以作组织学评估。

为验证引起肿瘤刚度下降的生物机制,对肿瘤组织切片进行免疫组织化学(IHC)染色分析:将组织切片与 E-cad 抗体(三鹰, 20874-1-ap)在 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,然后在室温下将切片与偶联荧光素的二抗孵育 1 h,并用苏木精复染 5 min,最后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤组织切片三次,封片晾干。

为了探究材料在体内抗转移的免疫机制,对各组小鼠的原位肿瘤组织切片进行免疫荧光染色分析,首先对切片进行抗原修复,之后用牛血清蛋白(BSA)室温封闭 30 min,接下来将组织切片与下列一抗孵育: CD11b(Abcam, ab133357)、Ly-6G(Thermo Fisher, 14-5931-81)、CD16(Abcam, ab21151)、Foxp3(Abcam, ab215206)、F4/80(Abcam, ab300421)、CD86(三鹰, 13395-1-ap)、CD8(Abcam, ab217344)。在 4  $^{\circ}\text{C}$  下过夜,随后肿瘤组织切片在室温下与偶联荧光素的二抗孵育 1 h,并用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)复染 5 min,最后用 PBS 洗涤组织切片三次,封片晾干后用共聚焦激光扫描显微镜(CLSM, NIKON ECLIPSE TI-SR)观察。

## 2 结果与讨论

### 2.1 EDTA/LDH 材料体系的制备与表征

采用改善的均相碱液法,以锌铝的硝酸盐和 HMT 水溶液为前驱体,在高温下, HMT 水解过程中释放出的氨气使溶液呈碱性,提供反应中所需的  $\text{OH}^-$  促使材料均匀成核和生长。同时该反应在高纯

氩气的保护下进行,避免了溶液体系中的  $\text{CO}_2$  气体形成碳酸根离子,合成了具有二维片层形貌的硝酸根盐锌铝层状双金属氢氧化物( $\text{Zn-Al-LDHs}$ );同时,在通入氩气的环境下,向 LDH 前体溶液中加入 EDTA 溶液,在 80  $^{\circ}\text{C}$  下,提高 EDTA 的电离和自由扩散能力,使 EDTA 取代硝酸根离子插入 LDH 层间。

对制备得到的 EDTA/LDH 材料体系进行表征。如图 2(a)中 TEM 照片所示,所制备的二维纳米片尺寸在 500 nm 左右。元素分布图(图 2(b))检测表明其片层主要组成元素为 Zn、Al 和 O。利用 EDS(图 2(c))分析得到该材料体系中还含有 N 元素,这可能与负载 EDTA 有关。FT-IR 谱图(图 2(d))进一步证实了 EDTA 的负载, EDTA/LDH 在 1400 和 1594  $\text{cm}^{-1}$  处的特征吸收峰是由 EDTA 上  $-\text{COO}^-$  的对称振动( $\nu_s$ )和反对称振动( $\nu_{as}$ )引起的( $\Delta\nu \geq 200 \text{ cm}^{-1}$ ),这表明  $-\text{COO}^-$  基团与 LDH 层上的金属离子有较强的单齿配位,说明在纳米药物中 EDTA 的  $-\text{COO}^-$  基团仍以离子形式存在。从 XRD 图谱中(图 2(e))得知负载 EDTA 后的 LDH 特征峰均向小角度偏移,这是由片层的层间距增大导致的,证明了 EDTA 负载于 LDH 层间。DLS 测试得到材料的水合粒径仍然保持在 480 nm 左右(图 2(f)),证明了该材料体系在水中具有较高的稳定性和单分散性, Zeta 电位显示该材料体系表面具有强的正电性,从而有利于贴附在负电性的肿瘤细胞膜表面<sup>[23-24]</sup>。

### 2.2 EDTA/LDH 对大体积恶性实体瘤的疗效评估

首先,为了验证 EDTA/LDH 对晚期恶性肿瘤的治疗效果,采用高浓度的 4T1 肿瘤细胞( $6 \times 10^6$  cells/100  $\mu\text{L}$ )接种于 BALB/c 小鼠,并在肿瘤体积生长到约 100  $\text{mm}^3$  时进行给药治疗,治疗过程如图 3(a)所示。对照组小鼠不做处理,而 EDTA/LDH 组小鼠每四天进行一次 EDTA/LDH 尾静脉注射。结果表明, EDTA/LDH 治疗组小鼠具有更高的生存率,均存活到第 16 天,而对照组小鼠于第 5 天出现死亡(图 3(b))。通过图 3(c)可知, EDTA/LDH 组小鼠的肿瘤受到了较为显著的抑制,在治疗终点处观察到部分小鼠肿瘤减小甚至消失,平均肿瘤体积几乎没有变化,而对照组小鼠的平均肿瘤体积则较第 0 天提高了近 7 倍,这表明 EDTA/LDH 对较大的恶性肿瘤也具有明显的抑制作用。整个治疗过程中, EDTA/LDH 组小鼠的体重略有升高,而对照组小鼠的体重持续降低,说明 EDTA/LDH 具有一定的生物安全性并且治疗后小鼠的健康状况有所恢复(图 3(d))。



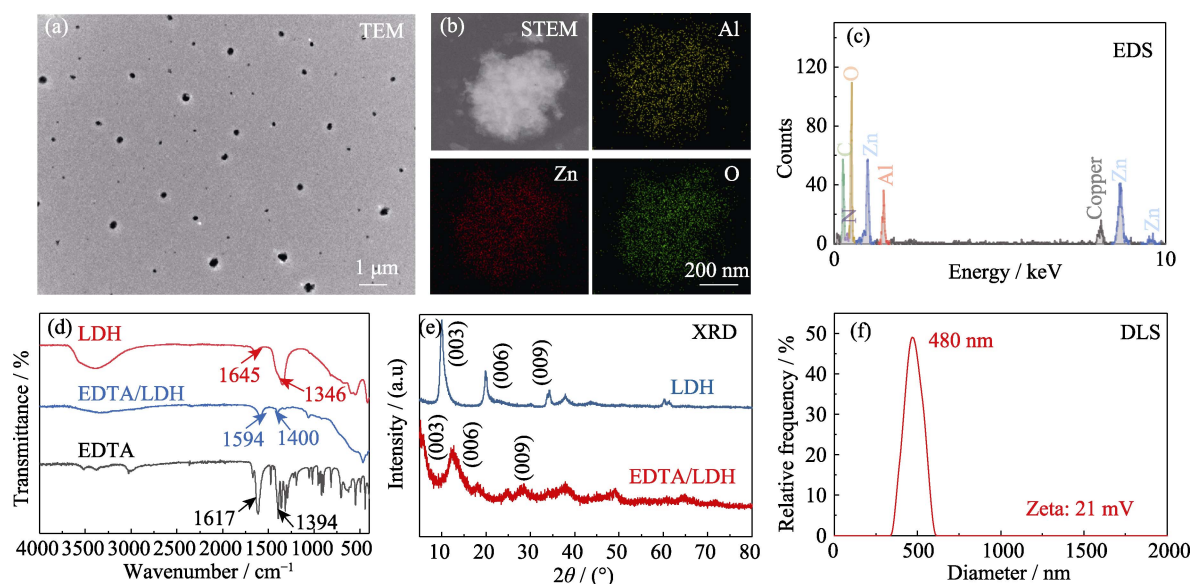


图 2 EDTA/LDH 材料体系的表征

Fig. 2 Characterization of EDTA/LDH material system

(a) TEM image; (b) Element mappings; (c) EDS pattern; (d) FT-IR spectra; (e) XRD patterns; (f) DLS/Zeta potential

在治疗终点, 采用非侵入性剪切波弹性成像技术 (SWE) 检测两组小鼠肿瘤的机械力和面积 (图 3(e)), 结果表明 EDTA/LDH 组小鼠具有更小的肿瘤面积 (图 3(f)), 进一步证明了 EDTA/LDH 对晚期恶性肿瘤的抑制作用。此外, 治疗后空白对照组肿瘤出现弹性模量大于 20 kPa 的高硬度区域, 而 EDTA/LDH 组的肿瘤硬度在 10 kPa 左右, 这说明 EDTA/LDH 导致了肿瘤组织松动, 降低了肿瘤的刚度并增强了实体瘤的通透性 (图 3(g))。

### 2.3 EDTA/LDH 抑制恶性肿瘤转移的效果评估

为了验证 EDTA/LDH 抑制晚期恶性肿瘤转移的治疗效果, 治疗结束后将小鼠处死并将两组小鼠的肿瘤、肝、脾、肺、肾等组织切片, 作 H&E 染色后拍照 (图 4(a)), 小鼠各器官中的转移灶用黄色箭头标出。从图中可以看出, 对照组小鼠有很高的肺转移率, 高达 75%, 肝转移率和肾转移率也分别达到了 50% 和 25%, 而 EDTA/LDH 组小鼠各器官中均没有发现转移灶, 这说明 EDTA/LDH 对小鼠晚期恶性肿瘤的转移有明显的抑制作用。之后本实验通过 H&E 组织学分析观察了两组小鼠的器官转移灶 (图 4(b)), 各器官转移灶用虚线框标出。结果表明对照组小鼠的肺、肝、肾中形成了明显的肿瘤转移结节, 其中肝脏上出现了较大的转移肿瘤侵占区域, 而 EDTA/LDH 组小鼠中各器官仍具有正常的组织学特征, 未见肿瘤转移结节, 这进一步证实了 EDTA/LDH 对晚期恶性肿瘤转移的抑制作用。由于脾脏是重要的免疫器官, 脾脏大小可以在一定程度上反映小鼠免疫功能的活性。通过统计两组小鼠的

脾脏直径得知, EDTA/LDH 组小鼠的脾脏尺寸明显小于对照组小鼠 (图 S1), 这说明 EDTA/LDH 的治疗有效维持了小鼠正常的免疫系统功能。

### 2.4 EDTA/LDH 抗恶性肿瘤转移的免疫机制研究

以上实验已证明 EDTA/LDH 材料体系可有效抑制大体积实体瘤的生长和转移, 为了探讨该材料体系的抗转移机制, 本研究将从降低肿瘤刚度、加强免疫监控和逆转肿瘤免疫抑制型微环境三个方面展开研究和讨论。

#### 2.4.1 降低肿瘤刚度的抗转移作用

癌症转移与肿瘤刚度有着密切的关系, 当刚度提高时, 肿瘤细胞产生一系列适应性行为。已有研究表明, 当采用刚度较高的培养基培养乳腺癌 MCF-7 细胞时, 细胞肌动蛋白和微管蛋白的表达量增加, 导致细胞增殖率和迁移率升高<sup>[10]</sup>。在本工作中已证明经 EDTA/LDH 材料体系干预的小鼠原位乳腺癌体刚度明显下降, 从而进一步抑制了肿瘤的迁移速率。本研究后续验证了引起肿瘤刚度下降的生物机制。

将对照组和 EDTA/LDH 组小鼠的肿瘤 H&E 切片图像放大之后可以看到, 对照组小鼠肿瘤中的细胞紧密程度明显大于 EDTA/LDH 组小鼠, 这表明 EDTA/LDH 提高了小鼠肿瘤的通透性 (图 5(a))。此后, 对两组小鼠肿瘤和基质中的细胞连接关键蛋白 E-cadherin 进行了免疫组化分析, 结果表明 EDTA/LDH 治疗后肿瘤中的 E-cadherin 表达受到了很大程度的抑制, 这是由于释放出的 EDTA 剥夺了钙离子, 破坏了肿瘤组织和基质中黏着带和黏着斑

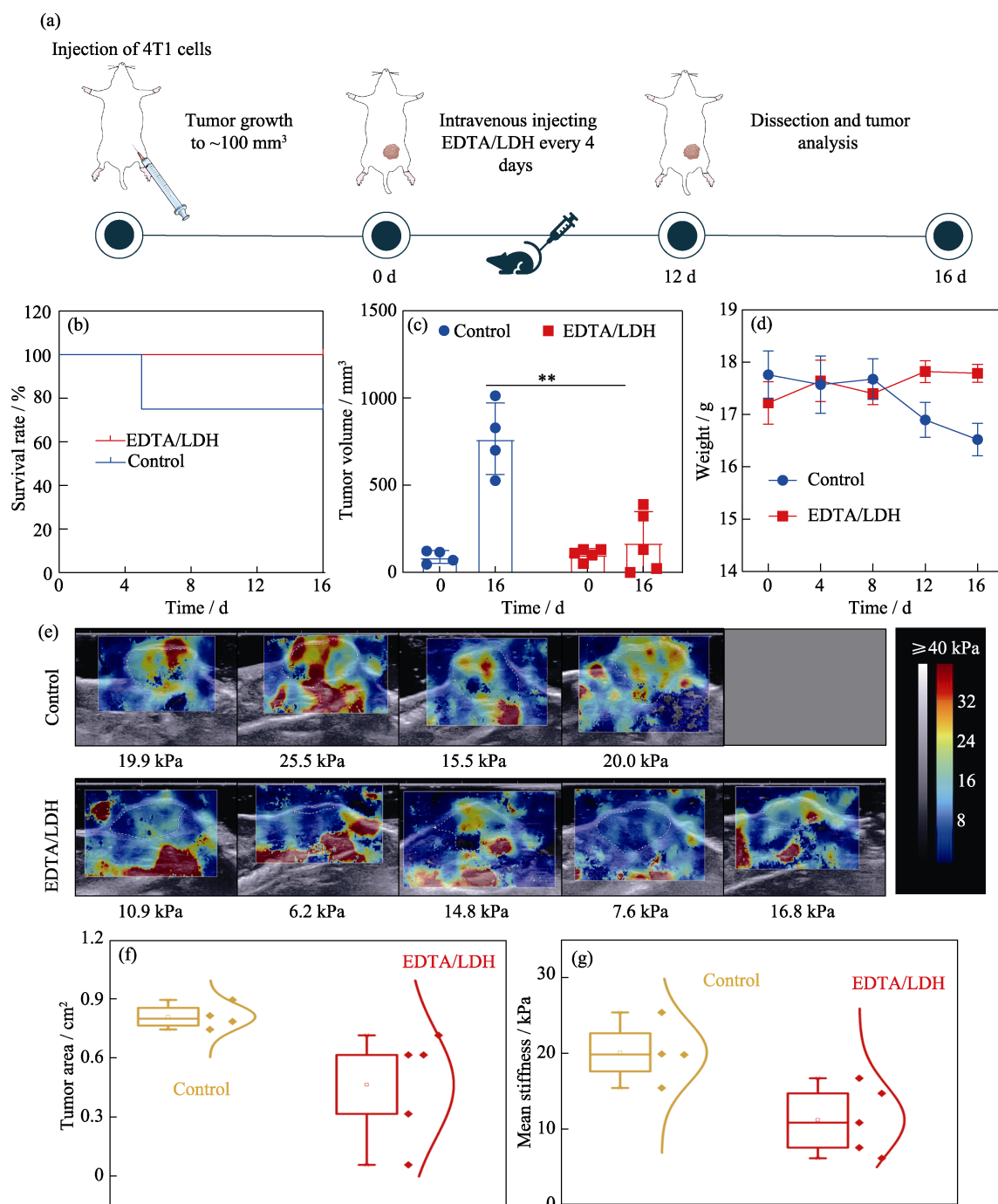


图3 EDTA/LDH 对大体积恶性实体瘤的疗效评估

Fig. 3 Evaluation of the efficacy of EDTA/LDH in large-volume malignant solid tumors

(a) Schematic diagram of mouse 4T1 tumor model construction and treatment process; (b) Survival curves; (c) Tumor volume on day 0 and day 16; (d) Body weight curves; (e) Images and quantification of tumor mechanical forces measured by SWE; (f) Tumor areas; (g) Tumor mean stiffnesses. Statistical significances (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ ) were calculated by one-way ANOVA.

的钙依赖性连接蛋白, 从而导致组织框架松解、肿瘤刚度下降。肿瘤组织刚度上升可不同程度地引起肿瘤上皮间质细胞转移, EDTA/LDH 材料通过减小实体瘤的刚度进而降低了肿瘤的转移概率。

#### 2.4.2 加强免疫监控的抗转移作用

宿主免疫系统与肿瘤的发生发展和转移都有着密切的关系, 例如自然杀伤(NK)细胞和毒性 T 细胞

的免疫监视, 控制了肿瘤细胞的全身扩散。然而, 大体积实体瘤表现出比正常组织高得多的内部压力和刚度, 这形成了一道坚实的物理屏障, 阻碍了免疫细胞浸润至肿瘤病灶区, 致使肿瘤细胞发生免疫逃逸并失去控制。

以上实验已表明 EDTA/LDH 通过破坏细胞连接促使肿瘤细胞间隙增大, 这减弱了物理屏障作用,



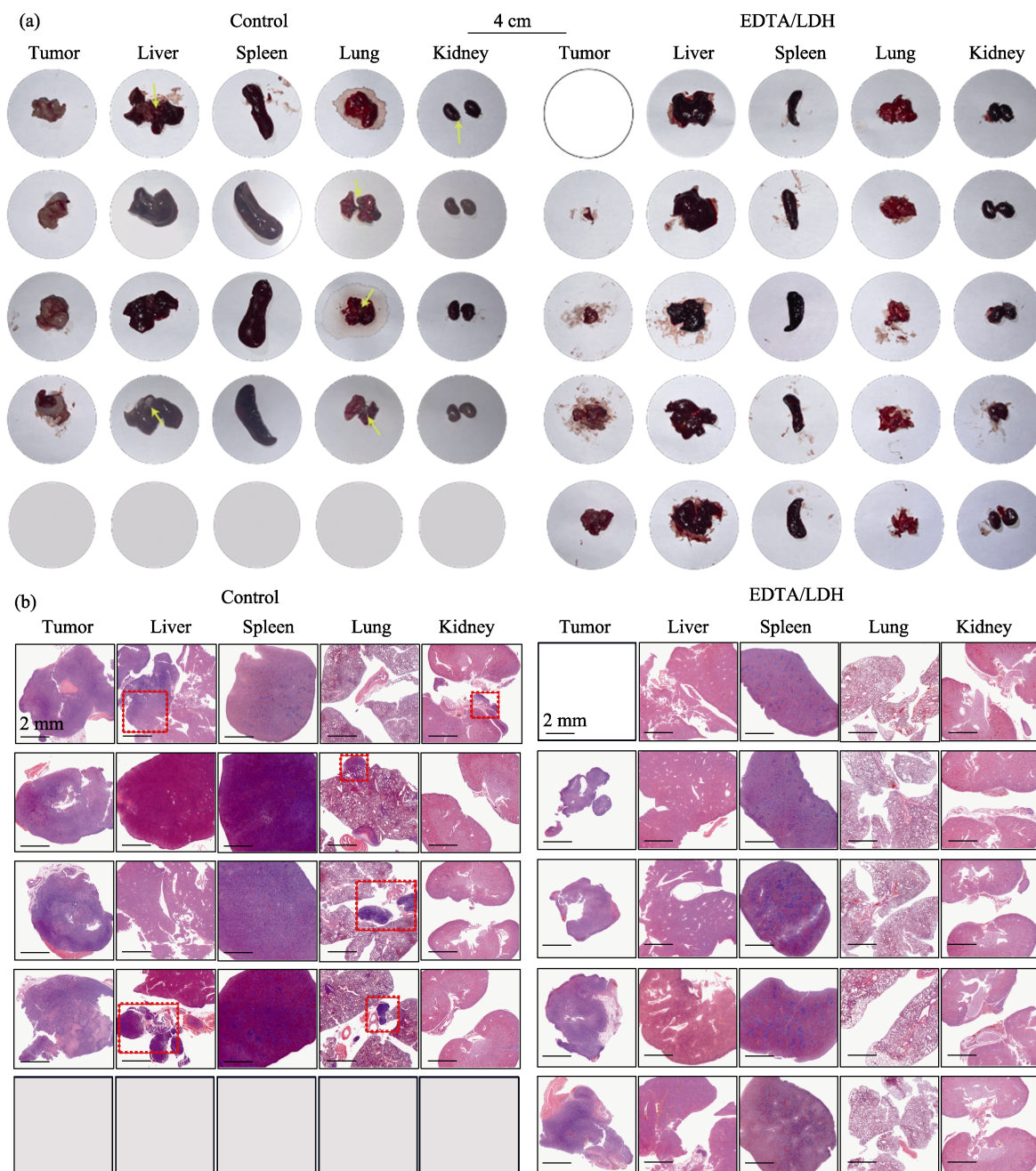


图 4 EDTA/LDH 抑制恶性肿瘤转移的效果评估( $n=5$ )

Fig. 4 Evaluation of the efficacy of EDTA/LDH in inhibiting the metastasis of malignant tumors ( $n=5$ )

(a) Photos of tumors and organs of mice in the control group and the treatment group; (b) H&E slices of tumors and organs of mice in the control group and the treatment group

进一步促进肿瘤组织中的免疫细胞浸润量增加,从而加强了对肿瘤细胞的免疫监控。因此为了探究 EDTA/LDH 抗肿瘤转移的免疫机制,本实验对治疗结束后的小鼠肿瘤进行了免疫荧光分析,以探究肿瘤浸润免疫细胞的表型(图 5(b))。可以观察到 EDTA/LDH 组小鼠肿瘤中的 M1 型巨噬细胞的浸润量相较于对照组有明显提高,这说明 EDTA/LDH 可以有效逆转肿瘤中巨噬细胞的 M2 表型。过往研究表明,肿瘤组织中  $CD8^+$  T 细胞的浸润量与肿瘤转

移风险有着密切的关系<sup>[25]</sup>。从图 5(b)中可以看到治疗组小鼠中  $CD8^+$  T 细胞浸润量有显著提高,这表明 EDTA/LDH 进一步激活了肿瘤部位的适应性抗肿瘤免疫,从而抑制了肿瘤的转移。此外,实验发现 EDTA/LDH 组小鼠肿瘤中的 NK 细胞浸润量也有所提高, NK 细胞也是抑制肿瘤生长的重要先天性免疫细胞亚群,其不仅维持 T 细胞介导的抗肿瘤免疫反应,还高度参与肿瘤转移的免疫监视<sup>[26]</sup>,而 NK 细胞的增多也表明 EDTA/LDH 可以增强免疫系统



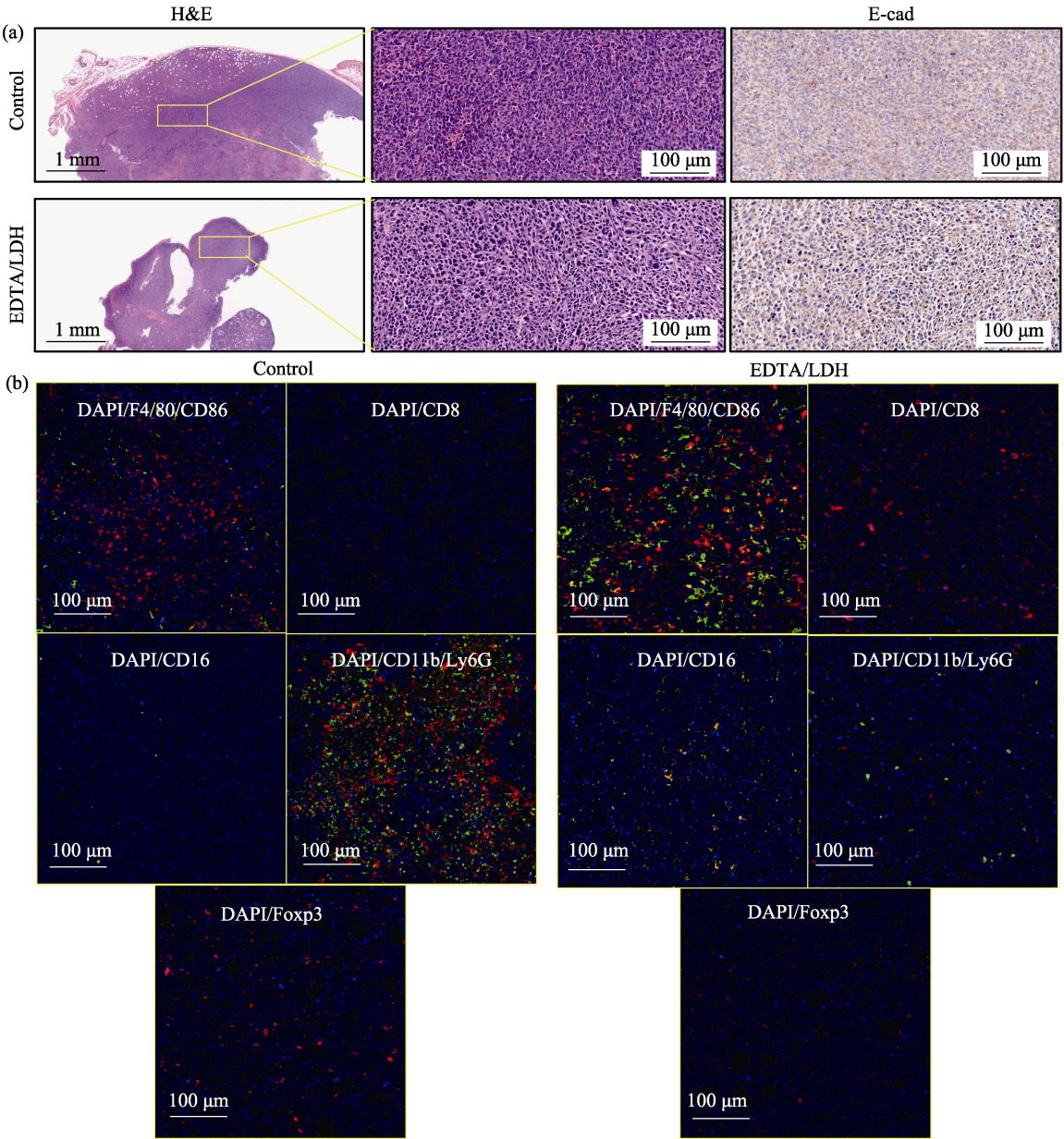


图 5 EDTA/LDH 抗恶性肿瘤转移的免疫机制

Fig. 5 Immune mechanism of EDTA/LDH against malignant tumor metastasis

(a) Tumor H&E sections and E-cadherin immunohistochemical analysis;

(b) Immunofluorescence analysis, CD8<sup>+</sup>T (CD8<sup>+</sup>), Treg (Foxp3<sup>+</sup>), PMN-MDSC (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>), M1 macrophages (F4/80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup>) and NK (CD16<sup>+</sup>) being labeled

对肿瘤转移的监视,以抑制其发生。

2.4.3 逆转肿瘤微环境的抗转移作用

肿瘤细胞调控宿主免疫细胞,为其生长和转移创造了有利的微环境<sup>[27]</sup>。例如,在实体瘤中,免疫抑制型的肿瘤微环境促使MDSCs和Tregs的含量大幅度增加。肿瘤细胞会招募免疫抑制性的骨髓细胞,多形核髓系抑制性细胞(PMN-MDSCs)是荷瘤小鼠中最大的 MDSCs 种群,占有 MDSCs 的 80%以上。许多研究表明 PMN-MDSCs 对肿瘤转移中的所有过程均有促进作用,例如通过产生 HGF(肝细胞生长因子)和 TGF-β(转化生长因子 β)来促进上皮-间

质转化(EMT)的形成<sup>[14]</sup>。除了 PMN-MDSCs, Tregs 也可形成免疫抑制环境,对 NK 形成免疫抑制,从而促进肿瘤转移<sup>[28]</sup>。这些细胞为肿瘤转移提供了有利的条件。

通过以上实验已证明, EDTA/LDH 材料体系可增加抗肿瘤型免疫细胞的浸润,从而逆转肿瘤抑制型微环境。例如, M1 型巨噬细胞可以分泌 IL-12 来抑制 Tregs 的增殖,而 CD8<sup>+</sup> T 细胞分泌的 IFN-γ 可以直接导致 Tregs 周期停滞,同时这些抗肿瘤型免疫细胞分泌的一些促炎因子将会进一步抑制 PMN-MDSCs 的表达。通过免疫荧光分析(图 5(b)),

观察到 EDTA/LDH 组小鼠肿瘤中 Tregs 和 PMN-MDSCs 的浸润量相比于对照组有明显减少, 这表明 EDTA/LDH 有效改变了肿瘤中利于肿瘤转移的免疫抑制型微环境, 从而逆转了肿瘤的转移前生态位。

### 3 结论

本研究采用均相碱液工艺合成了锌铝层状双金属氢氧化物(Zn-Al-LDHs), 并通过离子交换法将 EDTA 插入层间, 获得了 EDTA/LDH 复合材料。通过构建晚期恶性乳腺癌小鼠, 验证得出该复合材料在体内对晚期较大瘤体( $\sim 100 \text{ mm}^3$ )具有明显的治疗效果, 并且相对于空白对照组, 表现出对晚期恶性肿瘤转移的显著抑制作用。本研究进一步通过 SWE 监测了肿瘤的硬度, 证明了 EDTA/LDH 的干预可大幅度降低肿瘤组织的刚度, 从而有效抵抗因组织刚性带来的物理屏障与细胞转移。组织学分析表明, 在大体积实体瘤中, EDTA/LDH 可通过破坏肿瘤中的钙离子依赖性连接蛋白来增加肿瘤组织的通透性, 进而增强肿瘤内部的免疫细胞浸润。一方面, EDTA/LDH 通过免疫细胞激活和浸润来抑制肿瘤生长和转移。另一方面, EDTA/LDH 有效逆转肿瘤部位的免疫抑制型微环境, 减少了促肿瘤转移的免疫细胞浸润量, 从而更高效地抵抗恶性肿瘤的全身性转移。

本研究通过深入探讨 EDTA/LDH 的作用机制, 为晚期恶性实体瘤的抗转移免疫治疗提供了新的视角, 然而目前的研究仍具有一定限制性。首先, 为了达到治疗效果最大化以及副作用最小化的目的, 需要确定 EDTA/LDH 的最佳用药方案(如单次剂量、用药频率等)。另外, 本研究主要探讨了材料对原位肿瘤组织中免疫微环境的作用, 而未对远端器官组织的免疫微环境进行研究, 后者有助于更好地了解复合材料的抗转移机制。此外, 本研究主要集中在特定类型的肿瘤上, 但 EDTA/LDH 的作用机制可能具有更广泛的应用, 未来可以研究其在其他类型肿瘤中的治疗效果, 以验证其广泛适用性。

### 补充材料:

本文相关补充材料请登录 <https://doi.org/10.15541/jim20240154> 查阅。

### 参考文献:

- [1] VIGANÓ A, BRUERA E, JHANGRI G S, *et al.* Clinical survival predictors in patients with advanced cancer. *Archives of Internal Medicine*, 2000, **160**(6): 861.
- [2] KODACK D P, ASKOXYLAKIS V, FERRARO G B, *et al.* Emerging strategies for treating brain metastases from breast cancer. *Cancer Cell*, 2015, **27**(2): 163.
- [3] MUNOZ A, ELDRIDGE W J, JAKOBSEN N M, *et al.* Cellular shear stiffness reflects progression of arsenic-induced transformation during G<sub>1</sub>. *Carcinogenesis*, 2019, **40**(10): 1298.
- [4] PENG Y, CHEN Z, CHEN Y, *et al.* ROCK isoforms differentially modulate cancer cell motility by mechanosensing the substrate stiffness. *Acta Biomaterialia*, 2019, **88**: 86.
- [5] WANG W, LOLLIS E M, BORDELEAU F, *et al.* Matrix stiffness regulates vascular integrity through focal adhesion kinase activity. *Faseb Journal*, 2019, **33**(1): 1199.
- [6] YAMADA K M, SIXT M. Mechanisms of 3D cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, **20**(12): 738.
- [7] JOYCE M H, LU C, JAMES E R, *et al.* Phenotypic basis for matrix stiffness-dependent chemoresistance of breast cancer cells to doxorubicin. *Front Oncol*, 2018, **8**: 337.
- [8] TODOROVSKI V, FOX A H, CHOI Y S. Matrix stiffness-sensitive long noncoding RNA NEAT1 seeded paraspeckles in cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, 2020, **31**(16): 1654.
- [9] DENG B, ZHAO Z, KONG W, *et al.* Biological role of matrix stiffness in tumor growth and treatment. *Journal of Translational Medicine*, 2022, **20**(1): 540.
- [10] FENG J, TANG Y, XU Y, *et al.* Substrate stiffness influences the outcome of antitumor drug screening *in vitro*. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2013, **55**(1): 121.
- [11] LADOUX B, MEGE R M. Mechanobiology of collective cell behaviours. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, **18**(12): 743.
- [12] NOLTE M, MARGADANT C. Controlling immunity and inflammation through integrin-dependent regulation of TGF- $\beta$ . *Trends in Cell Biology*, 2020, **30**(1): 49.
- [13] KUCZEK D E, LARSEN A M H, THORSETH M L, *et al.* Collagen density regulates the activity of tumor-infiltrating T cells. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2019, **7**(1): 68.
- [14] CONDAMINE T, RAMACHANDRAN I, YOUN JI, *et al.* Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells. *Annual Review of Medicine*. 2015, **66**: 97.
- [15] SCENEAY J, CHOW M T, CHEN A, *et al.* Primary tumor hypoxia recruits CD11b<sup>+</sup>/Ly6C<sup>med</sup>/Ly6G<sup>+</sup> immune suppressor cells and compromises NK cell cytotoxicity in the premetastatic niche. *Cancer Research*, 2012, **72**(16): 3906.
- [16] HALVORSEN E C, MAHMOUD S M, BENNEWITH K L. Emerging roles of regulatory T cells in tumour progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2014, **33**(4): 1025.
- [17] TAN W, ZHANG W, STRASNER A, *et al.* Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature*, 2011, **470**(7335): 548.
- [18] BAO Q, FU H, GUO Y, *et al.* Calcium-deprivation-activated immune responses for solid tumor regression. *Chem*, 2024, **10**(4): 1175.
- [19] BAO Q, HU P, REN W, *et al.* Tumor cell dissociation removes malignant bladder tumors. *Chem*, 2020, **6**(9): 22839.
- [20] GARCIA M A, NELSON W J, CHAVEZ N. Cell-cell junctions organize structural and signaling networks. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2018, **10**(4): a029181.
- [21] WHITE C, FRESQUEZ A. Store-Operated calcium entry regulates macrophage chemotaxis. *Faseb Journal*, 2020, **34**(S1): 1.
- [22] CHEN Y F, LIN P C, YEY Y M, *et al.* Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in tumor progression: from molecular mechanisms to clinical implications. *Cancers*, 2019, **11**(7): 1332.
- [23] GASPAR D, VEIGA A S, CASTANHO M A. From antimicrobial to anticancer peptides. a review. *Frontiers in Microbiology*, 2013, **4**: 63880.
- [24] TAN J, TAY J, HEDRICK J, *et al.* Synthetic macromolecules as therapeutics that overcome resistance in cancer and microbial infection. *Biomaterials*, 2020, **252**: 120078.
- [25] KITAKAZE M, FUJINO S, MIYOSHI N, *et al.* Tumor-infiltrating T cells as a risk factor for lymph node metastasis in patients with submucosal colorectal cancer. *Scientific Reports*, 2023, **13**: 2077.
- [26] DENG X W, TERUNUMA H. Harnessing NK cells to control metastasis. *Vaccines*, 2022, **10**(12): 2018.
- [27] OBENAUF A C, MASSAGUÉ J. Surviving at a distance: organ-specific metastasis. *Trends in Cancer*, 2015, **1**(1): 761.
- [28] GAO Y, ROSEN J M, ZHAN X H F. The tumor-immune ecosystem in shaping metastasis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2023, **324**(3): C707.

补充材料

基于乙二胺四乙酸插层锌铝双金属氢氧化物的  
晚期肿瘤抗转移免疫治疗研究

李世奇<sup>1,2</sup>, 鲍群群<sup>3</sup>, 胡 萍<sup>1,2</sup>, 施剑林<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院 上海硅酸盐研究所, 高性能陶瓷和超微结构国家重点实验室, 上海 200050; 2. 中国科学院大学 材料科学与光电工程中心, 北京 100049; 3. 同济大学附属第十人民医院, 上海 200435)

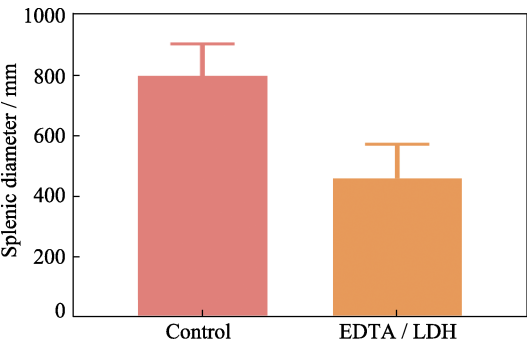


图 S1 小鼠脾脏尺寸统计数据  
Fig. S1 Mouse spleen diameter statistics