

哌唑嗪仿生纳米囊泡抑制肿瘤细胞自噬的免疫治疗机制与靶向策略

周洁洁 郭 允 高艳丽

郑州卫生健康职业学院, 河南 郑州 450000

摘要: 本文围绕哌唑嗪仿生纳米囊泡的制备工艺、理化特性及其在抑制肿瘤细胞自噬和增强免疫治疗中的作用机制展开系统研究。通过细胞膜仿生技术成功制备了具有良好稳定性和较高包载率的哌唑嗪仿生纳米囊泡, 体外实验结果表明, 该囊泡能够有效抑制肿瘤细胞自噬活性, 主要通过激活 mTOR 和 PI3K/Akt 信号通路实现。此外, 哌唑嗪仿生纳米囊泡显著增强了免疫细胞的活化和肿瘤杀伤作用, 免疫共培养体系显示 T 细胞活化标志物表达显著上调, 细胞因子分泌增加。体内活体成像实验进一步证实了其良好的肿瘤靶向能力。这些研究结果表明, 哌唑嗪仿生纳米囊泡在“自噬抑制-免疫激活-精准递送”多维度协同作用下, 展现出优异的肿瘤免疫治疗潜力。

关键词: 哌唑嗪; 仿生纳米囊泡; 自噬抑制; 免疫治疗; 肿瘤靶向

近年来, 肿瘤免疫治疗成为癌症治疗领域的前沿方向, 而肿瘤细胞自噬的活跃性被认为是影响免疫治疗疗效的重要因素。自噬是一种细胞自我降解过程, 肿瘤细胞常通过增强自噬以适应微环境压力, 进而削弱免疫细胞的杀伤力。哌唑嗪作为一种 α_1 -受体拮抗剂, 近年来被发现具有多种抗肿瘤活性。然而, 游离哌唑嗪的靶向性差和体内代谢不稳定等问题限制了其临床应用。仿生纳米囊泡作为一种新型递药载体, 具备良好的生物相容性和免疫激活潜力, 能够有效提高药物在肿瘤部位的累积和免疫微环境重塑能力。本研究拟基于仿生纳米囊泡技术, 负载哌唑嗪形成新型药物递送体系, 系统探究其抑制肿瘤细胞自噬的机制以及免疫治疗潜能, 期望为肿瘤精准免疫治疗提供新的策略和技术支持。

1 哌唑嗪仿生纳米囊泡的制备及理化特性

1.1 哌唑嗪仿生纳米囊泡的制备策略与原理

仿生纳米囊泡是一种模拟天然细胞膜结构的纳米递送体系, 能够高效包载活性药物并实现靶向递送。其制备通常以细胞膜衍生材料或脂质体为基础, 利用膜蛋白和磷脂的自组装特性形成稳定的囊泡结构。为制备哌唑嗪仿生纳米囊泡, 本研究选用肿瘤细胞膜材料, 通过超声破碎和离心纯化方法提取细胞膜片段, 随后采用超声共振与物理挤压结合的方式, 将哌唑嗪包裹于纳米囊泡内部, 形成稳定的仿生纳米囊泡。整个制备过程中, 充分保持了膜蛋白的功能活性和完整性, 从而赋予囊泡良好的靶向性和免疫微环境适配能力。

1.2 仿生纳米囊泡的理化性质与表征

制备完成后, 利用多种表征手段验证哌唑嗪仿生纳米囊泡的物理化学性质。动态光散射 (DLS) 测定结果显示, 囊泡的平均粒径约在 120nm 左右, 分布较为均匀, PDI 值低于 0.2, 表明制备工艺较为稳定。透射电镜 (TEM) 观察显示囊泡形貌规整, 呈球形或椭圆形, 边缘清晰可见。Zeta 电位测试结果表明囊泡表面电荷为负值, 有助于其在体液中的稳定性和分散性。此外, 通过紫外分光光度法检测哌唑嗪的包载率, 结果表明该囊泡体系对哌唑嗪的包载率可达 85% 以上, 且在模拟体液环境中的药物释放速率平稳, 符合可控释放的需求。

1.3 安全性与生物相容性初步评估

为了评估哌唑嗪仿生纳米囊泡的生物相容性, 采用体外 CCK-8 实验测定其对肿瘤细胞及正常细胞的毒性, 结果显示在合理浓度范围内, 仿生纳米囊泡并未引起明显的细胞毒性。此外, 溶血实验结果表明, 囊泡对红细胞的溶血率低于 5%, 符合纳米药物生物相容性要求。为了进一步验证其生物学功能, 利用荧光标记追踪技术观察仿生纳米囊泡在体外的细胞摄取能力。结果表明, 哌唑嗪仿生纳米囊泡能迅速被肿瘤细胞摄取, 并在胞质内均匀分布, 体现出良好的细胞靶向摄取特性。这为后续研究其在体内的靶向分布及免疫治疗应用奠定了基础, 也彰显了哌唑嗪仿生纳米囊泡在抑制肿瘤细胞自噬及免疫调节中的潜在优势。

2 肿瘤细胞自噬过程的抑制效应与机制探析

2.1 哌唑嗪仿生纳米囊泡对肿瘤细胞自噬活性的抑制作用

自噬在肿瘤细胞中的双重作用已被广泛报道,一方面有助于细胞稳态维持,另一方面则为肿瘤生长和耐药提供保护机制。为探究哌唑嗪仿生纳米囊泡对肿瘤细胞自噬活性的影响,本研究选取了典型的肝癌细胞系 HepG2 和肺癌细胞系 A549 进行体外实验。实验将细胞随机分为空白对照组、游离哌唑嗪处理组和哌唑嗪仿生纳米囊泡处理组,通过免疫荧光染色检测 LC3 和 p62 等自噬标志物的表达。结果显示,与对照组相比,游离哌唑嗪组细胞自噬水平略有下降,而哌唑嗪仿生纳米囊泡组自噬抑制更为显著,LC3-II 表达显著减少, p62 积累明显增加。这表明,仿生纳米囊泡能够更高效地递送哌唑嗪进入肿瘤细胞内部,充分发挥其对自噬活性的抑制作用。

2.2 关键自噬信号通路的影响分析

深入探讨哌唑嗪仿生纳米囊泡抑制自噬的分子机制,本研究进一步分析了细胞内 mTOR、PI3K/Akt 等关键信号通路的变化情况。采用 Western blot 检测蛋白表达,结果发现,哌唑嗪仿生纳米囊泡处理后, mTOR 磷酸化水平显著升高, PI3K/Akt 信号通路活性也有所增强,而 Beclin-1 等自噬相关蛋白表达量下降。这一结果提示,哌唑嗪仿生纳米囊泡主要通过激活 mTOR 通路,抑制下游自噬信号转导,从而阻断自噬体形成和自噬流。qPCR 结果亦显示, mTOR、Akt 等基因转录水平显著上调,进一步佐证了其在转录水平上的影响。这些机制数据表明,哌唑嗪仿生纳米囊泡不仅是物理递送的“载体”,其仿生特性还可能通过膜蛋白介导的信号调控,进一步促进抗自噬效应。

2.3 免疫治疗背景下自噬抑制的潜在意义

自噬不仅影响肿瘤细胞自身的生存适应,还与免疫细胞的功能状态密切相关。文献报道,肿瘤细胞自噬活跃会削弱免疫细胞对其的清除能力,减弱抗肿瘤免疫反应。在本研究中,哌唑嗪仿生纳米囊泡介导的自噬抑制,有助于增强肿瘤抗原的释放和呈递,从而激发更强烈的免疫应答。体外免疫共培养实验结果显示,经过囊泡处理的肿瘤细胞与 T 细胞共培养后, T 细胞表面活化标志物(CD69、CD25) 表达水平显著升高,细胞因子(如 IFN- γ 、TNF- α) 分泌增加。这一现象提示,自噬抑制在一定程度上促进了免疫效应细胞的活化与功能发挥。进一步分析认为,仿生纳米囊泡不仅作为哌唑嗪的递送载体,还可能通过其表面膜蛋白与免疫细胞的相互作用,协同增强免疫细胞的激活能力。

此外,仿生纳米囊泡携带的哌唑嗪通过精准靶向递送,显著提高药物在肿瘤局部的浓度,克服游离药物在体内分布不均和代谢快的短板。这种靶向特性降低了药物的系统性毒副作用,同时最大限度地激发了肿瘤微环境中的免疫应答。整体而言,哌唑嗪仿生纳米囊泡的自噬抑制效应不仅在细胞信号层面上得以体现,更在免疫调节层面展现了其多维协同作用。这一研究结果为后续深入挖掘其免疫治疗潜力提供了有力依据,并奠定了理论和实验基础,凸显了仿生纳米递送系统在抗肿瘤免疫治疗中的应用前景。

3 哌唑嗪仿生纳米囊泡的免疫治疗机制与靶向策略

3.1 纳米囊泡递送体系的免疫调节功能

近年来,仿生纳米囊泡因其源于细胞膜的自然成分和复杂的膜蛋白构成,显示出良好的免疫适配性和生物相容性。在本研究中,制备的哌唑嗪仿生纳米囊泡不仅能够高效负载哌唑嗪,更通过细胞膜蛋白与宿主免疫系统之间的相互作用,协同增强抗肿瘤免疫效应。实验中,仿生纳米囊泡表面携带的膜蛋白(例如 MHC 分子和整合素等)与免疫细胞表面受体发生特异性结合,促进了抗原递呈与免疫识别的过程。这一作用使得囊泡在到达肿瘤微环境后,能够更有效地被树突状细胞(DCs)等抗原递呈细胞摄取,并激活其成熟,进一步诱导 T 细胞的激活与增殖。

值得一提的是,肿瘤免疫耐受是当前免疫治疗面临的主要障碍之一。自噬的持续激活会导致肿瘤细胞对外源性免疫刺激的耐受,而哌唑嗪仿生纳米囊泡通过抑制自噬水平,在一定程度上破除了这种耐受状态。实验结果表明,处理后的肿瘤细胞更易于被免疫系统识别,并激活巨噬细胞和 T 细胞的吞噬与杀伤功能。免疫共培养体系中, T 细胞表面免疫检查点分子的下调与激活标志物的上调,进一步证实了仿生纳米囊泡对免疫微环境的有益影响。这种协同效应不仅依赖于哌唑嗪的药理作用,更是囊泡仿生特性与免疫细胞之间复杂网络相互作用的体现。

3.2 免疫治疗协同效应评价

为了系统评价哌唑嗪仿生纳米囊泡在免疫治疗中的潜力,本研究设计了多组体外免疫共培养实验,将仿生纳米囊泡处理过的肿瘤细胞与原代 T 细胞和 DC 细胞共培养,通过检测免疫细胞活化水平、细胞因子分泌及细胞毒性效应,评估其免疫激活潜能。ELISA 检测结果显示,仿生纳米囊泡组 IFN- γ 和 TNF- α 的分泌量明显高于空白组及游离哌唑嗪组。流式细胞术检测进一步证实,仿生纳米囊泡处理组 T 细胞表面 CD69 和 CD25 等活化标志物表达上调,表明 T 细胞处于活化状态。

与此同时, 哌唑嗪仿生纳米囊泡对免疫细胞杀伤功能的增强作用同样得到证实。采用乳酸脱氢酶 (LDH) 释放实验评价免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤力, 结果表明, 在相同效应靶细胞比下, 仿生纳米囊泡处理组的细胞裂解率远高于其他组。结合免疫荧光染色可见, CD8⁺ T 细胞的浸润数量明显增加, 提示其在免疫微环境中的效应性得到进一步加强。这些结果说明, 哌唑嗪仿生纳米囊泡不仅在自噬抑制方面发挥作用, 更在免疫激活与效应细胞功能增强方面具有显著协同优势。

3.3 靶向性及体内分布特性探究

除免疫激活功能外, 哌唑嗪仿生纳米囊泡的另一大亮点在于其优异的靶向性与体内分布优势。传统的化疗药物往往因缺乏靶向递送能力而在全身分布, 导致严重的系统毒性。为此, 本研究通过小动物体内活体荧光成像技术, 模拟并评估仿生纳米囊泡的体内分布与肿瘤靶向累积能力。将荧光探针 DiR 标记的囊泡注射入荷瘤小鼠体内, 观察其体内荧光分布, 结果显示, 仿生纳米囊泡在 24 小时内主要富集于肿瘤部位, 而在肝、脾等网状内皮系统组织中的分布明显低于游离探针组。组织冷冻切片荧光显微镜结果进一步证实, 囊泡在肿瘤组织的累积显著, 边缘及中央均可见明显的荧光信号, 说明其具备良好的肿瘤靶向能力。

囊泡靶向性的提升与其仿生化特性密切相关。细胞膜来源的外壳不仅赋予了囊泡与肿瘤细胞膜表面受体的“同源相吸”能力, 同时, 纳米级粒径和负电荷表面电位也有助于其在肿瘤血管渗漏的“EPR 效应”基础上实现更深层的组织渗透。此外, 研究中尝试在囊泡表面进行简单的糖基化修饰, 模拟天然糖蛋白修饰, 提高其与肿瘤细胞表面糖基受体 (如 CD44 等) 的亲合力。初步结果显示, 修饰后的仿生纳米囊泡在体外靶向结合能力进一步提升, 提示该策略可能是未来优化囊泡递送性能的重要手段。

在免疫治疗协同方面, 仿生纳米囊泡的靶向递送不仅能够有效抑制自噬, 还可实现“定向免疫激活”。通过将哌唑嗪集中递送至肿瘤微环境, 增强局部免疫细胞的功能活性, 既避免了全身免疫过度激活引发的副作用, 也最大程度地激发了抗肿瘤免疫的区域优势。这种空间分布的

“精准性”体现了仿生纳米囊泡免疫治疗策略的核心价值。

4 结论

本研究围绕哌唑嗪仿生纳米囊泡在抑制肿瘤细胞自噬以及免疫治疗过程中的协同机制与靶向优势进行了系统探究。首先, 通过采用细胞膜仿生技术制备了高效稳定的哌唑嗪仿生纳米囊泡, 囊泡具备均一的粒径分布、良好的生物相容性及较高的药物包载率, 保证了其在体内的药物递送稳定性与安全性。其次, 在体外实验中, 哌唑嗪仿生纳米囊泡能够显著抑制肿瘤细胞自噬活性, 主要通过激活 mTOR 及 PI3K/Akt 信号通路, 抑制自噬相关蛋白表达, 打破肿瘤细胞对免疫刺激的耐受屏障。更为重要的是, 囊泡仿生特性增强了与免疫细胞的相互作用, 显著提高了免疫效应细胞的活化程度和杀伤活性, 实现了自噬抑制与免疫治疗的协同增效。体内荧光成像实验也证实了囊泡的良好肿瘤靶向能力, 进一步降低了药物在体内的系统毒副作用, 强化了治疗的精准性和安全性。

参考文献:

- [1]杨书翰.MAO-A 抑制剂的虚拟筛选及哌唑嗪抗胃癌作用和机制初探[D].西南交通大学,2023.
- [2]哌唑嗪[J].上海医药,2020,41(S2):18-19.
- [3]曾凯,张焱,李强,等.细胞自噬和肾癌的研究进展[J].华中科技大学学报(医学版),2024,53(06):833-838+844.
- [4]方田.PARP 抑制剂通过抑制成纤维细胞自噬诱导 B7-H3 累积介导卵巢癌免疫逃逸[D].华中科技大学,2023.
- [5]龚婷.山楂酸对胃癌 SGC-7901 细胞自噬及增殖的影响[D].南华大学,2021.
- [6]彭珂.激酶 MEKK3 介导的肿瘤细胞自噬及其功能的研究[D].江苏大学,2021.
- [7]李双辉.盐霉素诱导胃癌细胞内质网应激和细胞自噬[D].南华大学,2021.
- [8]詹升华.负性共刺激分子 B7-H3 对结直肠癌细胞自噬的调控作用及机制[D].苏州大学,2020.

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 25B350003。课题题目: 抑制细胞自噬的哌唑嗪仿生杂化纳米囊泡抗肿瘤免疫作用研究。