

硕 士 学 位 论 文

功能化姜黄细胞外囊泡克服治疗诱导的衰老 及 SASP 提高化疗作用研究

Functionalised turmeric-derived extracellular vesicles
overcome treatment-induced senescence and SASP to enhance
chemotherapeutic effects

作 者 姓 名: 张毅

学 号: 32130012

指 导 教 师: 郭兆明/秦超

学 科、 专 业: 生物与医药

答 辩 日 期: 2024.05.30

大连理工大学

Dalian University of Technology

摘 要

在对癌症传统治疗的过程中,会对肿瘤细胞造成持续的 DNA 损伤反应(DNA-damage response,DDR),肿瘤细胞响应这种治疗方法表现为:激活凋亡程序或者应激于衰老相关信号通路, p16-RB 和 p53-p21,从而进入一种永久的细胞周期阻滞状态,称为治疗诱导的衰老(Therapy-Induced Senescence,TIS)。治疗诱导的衰老肿瘤细胞一方面会抵抗凋亡刺激,另一方面会产生大量衰老相关分泌表型(SASP),长期影响近旁肿瘤细胞及微环境,促进肿瘤上皮间质转化(EMT)、血管生成,并创建肿瘤免疫抑制环境。因此,在癌症的治疗过程中,清除产生的衰老肿瘤细胞及 SASP 对于癌症的治疗有积极的帮助。

在本项研究中,提出一种克服衰老肿瘤细胞及其 SASP 的不利影响来提高化疗效果的新思路,采用姜黄细胞外囊泡(CNV)负载抗肿瘤化疗药物阿霉素,表面修饰靶向衰老肿瘤细胞表面高表达死亡受体 5 (DR5)的抗体,形成纳米粒子 DR5-CNV/DOX。纳米粒子 DR5-CNV/DOX 在进入体内后, DR5 抗体可以通过靶向肿瘤细胞,从而实现纳米粒子 DR5-CNV/DOX 在肿瘤组织的聚集。其中负载的 DOX 发挥化疗作用,一部分癌细胞被直接杀死,一部分受到持续的 DNA 损伤,进而转化成衰老肿瘤细胞,并持续分泌 SASP。此时,纳米粒子 DR5-CNV/DOX 会主动靶向衰老肿瘤细胞, DR5 抗体协同 CNV 中的姜黄素共同促进衰老肿瘤细胞凋亡,且 CNV 中的姜黄素还会抑制衰老肿瘤细胞产生的 SASP,从而克服 SASP 造成的各种不利影响,包括抑制了 EMT、血管生成及重塑肿瘤免疫微环境,达到一石二鸟的效果,提高了抗肿瘤疗效。此外,体内毒性研究证实 DR5-CNV/DOX 具有良好的生物相容性和安全性。

总之,本研究,通过基于植物来源 EVs 进行功能化修饰构建新型药物递送系统,探讨其克服衰老肿瘤细胞及其 SASP 的作用,为相应给药系统的设计和发展打下基础。

关键词: 治疗诱导的衰老; 姜黄细胞外囊泡; SASP; 新型药物递送系统

ABSTRACT

During conventional cancer treatment, tumour cells experience sustained DNA damage, which triggers the apoptotic program or activates the senescence-related signalling pathways p16-RB and p53-p21. This leads to therapy-induced senescence (TIS), a state of permanent cell-cycle arrest. Therapy-induced senescent tumour cells resist apoptotic stimuli and produce senescence-associated secretory phenotypes (SASP). These SASP have a long-term impact on near-parietal tumour cells and the microenvironment, promoting tumour epithelial-mesenchymal transition (EMT), angiogenesis, and creating an environment of tumour immunosuppression. Therefore, removing senescent tumour cells and SASP can be beneficial in treating cancer.

In this study, a new idea to overcome the detrimental effects of senescent tumour cells and their SASPs to enhance the chemotherapeutic effect is proposed by using turmeric extracellular vesicles (CNV) loaded with the anti-tumour chemotherapeutic drug Adriamycin, surface modified with an antibody targeting the high expression of death receptor 5 on the surface of senescent tumour cells (DR5) to form DR5-CNV/DOX nanoparticles. The DR5-CNV/DOX nanoparticles, after entering the body, the DR5 antibody can achieve the aggregation of DR5-CNV/DOX nanoparticles in the tumour tissue by targeting the tumour cells. As the loaded DOX exerts its chemotherapeutic effect, some of the cancer cells are killed directly and some are subjected to sustained DNA damage and then transformed into senescent tumour cells that continue to secrete SASP. At this time, the DR5-CNV/DOX nanoparticle will actively target the senescent tumour cells, and the DR5 antibody will cooperate with the curcumin in the CNV to jointly promote the apoptosis of the senescent tumour cells, and the curcumin in the CNV also inhibits the apoptosis of the senescent tumour cells, curcumin in CNV also inhibits SASP produced by senescent tumour cells, thereby overcoming various adverse effects caused by SASP, including inhibition of EMT, angiogenesis and remodelling of the tumour immune microenvironment, thus killing two birds with one stone and improving anti-tumour therapeutic efficacy. In addition, *in vivo* toxicity studies confirmed the good biocompatibility and safety of DR5-CNV/DOX.

In conclusion, by constructing a novel drug delivery system based on functionalised modification of plant-derived EVs, this study explores its role in overcoming senescent tumour cells and their SASPs, and lays the foundation for the design and development of the corresponding drug delivery system.

Key Words: Therapeutically induced senescence; Turmeric extracellular vesicles; SASP; Novel drug delivery systems

目 录

1 文献综述.....	1
1.1 引言.....	1
1.2 癌症治疗研究现状.....	2
1.3 细胞衰老.....	2
1.3.1 诱导细胞衰老的因素.....	3
1.3.2 衰老细胞的特征.....	5
1.4 衰老与肿瘤的发展.....	7
1.4.1 癌症干预和衰老诱导.....	8
1.4.2 衰老肿瘤细胞的双重作用.....	8
1.4.3 SASP 的双重作用.....	9
1.4.4 衰老疗法作为抗癌策略.....	11
1.5 关于细胞外囊泡.....	11
1.6 关于植物细胞外囊泡.....	12
1.7 姜黄素.....	13
1.8 本课题的立题依据.....	14
1.9 本课题的研究内容.....	15
2 DR5-CNV/DOX 的合成与表征	17
2.1 概述.....	17
2.2 实验仪器与试剂.....	17
2.2.1 实验仪器.....	17
2.2.2 实验试剂与耗材.....	18
2.3 实验方法.....	18
2.3.1 姜黄细胞外囊泡(CNV)的提取	18
2.3.2 纳米粒子 CNV/DOX 的制备	19
2.3.3 纳米粒子 DR5-CNV/DOX 的制备	19
2.3.4 姜黄素标准曲线的绘制.....	19
2.3.5 阿霉素标准曲线的绘制.....	19
2.3.6 阿霉素载药率和包封率的测定.....	20
2.3.7 DR5-CNV/DOX 纳米粒子理化性质的表征	20
2.3.8 DR5-CNV/DOX 纳米粒子表面抗体的检测	20
2.3.9 DR5-CNV/DOX 纳米粒子体外药物释放实验	20
2.4 实验结果与讨论.....	21
2.4.1 CNV 纳米粒子的表征	21
2.4.2 DR5-CNV/DOX 纳米粒子的表征	23

2.4.3 DR5-CNV/DOX 的体外药物释放	26
2.5 本章小结.....	27
3 衰老肿瘤细胞模型的建立与验证	28
3.1 概述.....	28
3.2 实验仪器与试剂.....	28
3.2.1 实验仪器	28
3.2.2 实验试剂与耗材	29
3.3 实验方法.....	29
3.3.1 细胞培养	29
3.3.2 细胞传代.....	30
3.3.3 细胞冻存	30
3.3.4 细胞复苏	30
3.3.5 建立衰老 MCF-7 细胞模型	30
3.3.6 SA- β -Gal 染色	30
3.3.7 蛋白免疫印迹实验	31
3.3.8 统计学分析	31
3.4 实验结果与讨论.....	31
3.4.1 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色分析	31
3.4.2 衰老相关蛋白的表达分析	32
3.5 本章小结.....	34
4 DR5-CNV/DOX 的体外抗肿瘤作用研究	35
4.1 概述.....	35
4.2 实验仪器与试剂.....	35
4.2.1 实验仪器	35
4.2.2 实验试剂与耗材	36
4.3 实验方法.....	37
4.3.1 细胞培养相关实验	37
4.3.2 细胞摄取实验.....	37
4.3.3 体外细胞毒性实验	37
4.3.4 蛋白免疫印迹实验	38
4.3.5 酶联免疫吸附实验	38
4.3.6 溶血实验.....	38
4.3.7 统计学分析	39
4.4 实验结果与讨论.....	39
4.4.1 DR5-CNV/DOX 体外细胞摄取评价	39
4.4.2 DR5-CNV/DOX 体外抗肿瘤效果评价	40
4.4.3 CNV 对抗凋亡蛋白家族作用评价	43
4.4.4 DR5-CNV/DOX 体外对 SASP 抑制作用评价	44

4.4.5 DR5-CNV/DOX 生物相容性评价	45
4.5 本章小结.....	45
5 DR5-CNV/DOX 的体内抗肿瘤作用研究	47
5.1 概述.....	47
5.2 实验仪器与试剂.....	47
5.2.1 实验仪器	47
5.2.2 实验试剂与耗材	47
5.3 实验方法.....	48
5.3.1 动物模型的建立.....	48
5.3.2 动物体内给药治疗	49
5.3.3 血清生化分析和组织病理学检查.....	49
5.3.4 小鼠肿瘤切片免疫荧光实验.....	49
5.3.5 酶联免疫吸附实验.....	49
5.3.6 统计学分析.....	49
5.4 实验结果与讨论.....	49
5.4.1 DR5-CNV/DOX 体内抗肿瘤效果评价	49
5.4.2 DR5-CNV/DOX 体内对 SASP 抑制作用评价	51
5.4.3 DR5-CNV/DOX 体内克服 SASP 产生的不利影响	51
5.4.4 DR5-CNV/DOX 体内安全性评价	53
5.5 本章小结.....	55
6 结论与展望.....	57
6.1 结论.....	57
6.2 创新点.....	57
6.3 展望.....	57
参考文献.....	59

图目录

图 1.1 诱导细胞衰老的主要因素	4
图 1.2 衰老细胞形态及结构的变化	5
图 1.3 衰老细胞的特征	7
图 1.4 衰老肿瘤细胞产生的 SASP 的双重作用	11
图 1.5 植物来源的 PELNV 的生物学功能及其转化为治疗应用	13
图 1.6 (A) DR5-CNV/DOX 制备示意图 (B) DR5-CNV/DOX 体内发挥抗肿瘤作用示意图	15
图 2.1 (A) CNV 的 SEM 图(比例尺: 500 nm) (B) CNV 的 TEM 图(比例尺: 50 nm) (C) CNV 和 CUR 的 UV-vis 吸收光谱 (D) CNV 悬浮液图 (E) CNV 的 DLS 粒径分布图 (F) CNV 和 CUR 的 FT-IR 图	22
图 2.2 CNV 的质谱分析图	22
图 2.3 (A) 蛋白标准曲线图 (B) 不同浓度 CUR UV-vis 吸收光谱图 (C) CUR 标准曲线图	23
图 2.4 (A) DR5-CNV/DOX 的 SEM 图(比例尺: 500 nm) (B) DR5-CNV/DOX 的 TEM 图(比例尺: 200 nm) (C) CNV、CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 的 DLS 粒径分布图 (D) CNV、DOX、Anti-DR5、CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 的 Zeta 电位分布图	24
图 2.5 (A) 不同浓度 DOX UV-vis 吸收光谱图 (B) DOX 标准曲线图	24
(C) 不同比例 CNV: DOX 的载药率和包封率图	24
图 2.6 (A) CUR、DOX、CUR 和 DR5-CNV/DOX 的 UV-vis 吸收光谱图 (B) CUR、DOX、CUR 和 DR5-CNV/DOX 的 FT-IR 图 (C) CNV、Anti-DR5 和 DR5-CNV/DOX 的 SDS-PAGE 蛋白分析图	25
图 2.7 DR5-CNV/DOX 在一周之内的 Size 和 Zeta 变化	26
图 2.8 DR5-CNV/DOX 在 pH =7.4、pH=6.5 和 pH=5.3 PBS 中的 DOX 体外释放曲线 ..	26
图 3.1 不同浓度 DOX 诱导的衰老 MCF-7 细胞 SA- β -Gal 染色图 (比例尺: 100 μ m)	32
图 3.2 (A) 不同浓度 DOX 诱导 MCF-7 的衰老标志蛋白(p16、p21 和 p53)表达情况 (B) 不同浓度 DOX 诱导 MCF-7 的衰老标志蛋白(p16、p21 和 p53)表达情况的量化分析 ..	32
图 3.3 (A) MCF-7 和衰老 MCF-7 细胞中抗凋亡 BCL-2 蛋白家族表达情况 (B) MCF-7 和衰老 MCF-7 细胞中抗凋亡 BCL-2 蛋白家族表达情况的量化分析 (C) MCF-7 和衰老 MCF-7 细胞中 DR5 蛋白表达情况 (D) MCF-7 和衰老 MCF-7 细胞中 DR5 蛋白表达情况的量化分析	33

图 4.1 (A)激光共聚焦分析 MCF-7 细胞对不同实验组的摄取情况(比例尺: 50 μm)(蓝色: 细胞核, 红色: DOX) (B) 激光共聚焦分析衰老 MCF-7 细胞对不同实验组的摄取情况(比例尺: 50 μm) (蓝色: 细胞核, 红色: DOX) (C) 流式细胞术分析 MCF-7 和衰老 MCF-7 细胞对不同实验组摄取情况的量化分析	40
图 4.2 CCK-8 评价各实验组(DOX、CNV、CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX)在体外对 MCF-7 细胞的毒性作用结果	41
图 4.3 (A) CCK-8 评价 DR5-CNV/DOX 对 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞的毒性作用结果 (B) CCK-8 评价 CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 对衰老 MCF-7 细胞的毒性作用结果	42
图 4.4 (A) 不同浓度 CNV 处理衰老 MCF-7 细胞对抗凋亡 BCL-2 蛋白家族表达的影响 (B) 不同浓度 CNV 处理衰老 MCF-7 细胞对抗凋亡 BCL-2 蛋白家族表达影响的量化分析	43
图 4.5 (A) 使用 ELISA 试剂盒测定衰老 MCF-7 细胞水平 IL-6 细胞因子含量表达 (B) 使用 ELISA 试剂盒测定衰老 MCF-7 细胞水平 CCL-2 细胞因子含量表达 (C) 使用 ELISA 试剂盒测定衰老 MCF-7 细胞水平 MMP-3 细胞因子含量表达	44
图 4.6 (A) H ₂ O、PBS 和不同浓度 CNV 和 DR5-CNV/DOX 与红细胞共孵育后的溶血结果 (B) 不同浓度 CNV 和 DR5-CNV/DOX 与红细胞共孵育后的溶血率	45
图 5.1 (A) 用不同制剂治疗的 MCF-7 荷瘤小鼠的治疗方案 (B) 整个治疗期间小鼠肿瘤体积的变化(C) 治疗后的小鼠肿瘤质量	50
图 5.2 (A) 使用 ELISA 试剂盒测定肿瘤组织水平 IL-6 细胞因子含量表达 (B) 使用 ELISA 试剂盒测定肿瘤组织水平 CCL-2 细胞因子含量表达 (C) 使用 ELISA 试剂盒测定肿瘤组织水平 MMP-3 细胞因子含量表达	51
图 5.3 小鼠肿瘤切片免疫荧光实验探究不同实验组(PBS、DOX、CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX)处理的肿瘤中 p16、CD31、N-cadherin、CD49 和 IFN- γ 的表达情况(比例尺: 50 μm)	52
图 5.4 整个治疗期间小鼠体重的变化	53
图 5.5 静脉注射各实验组的体内生物安全性评价 (A-B) 血液常规检查包括: 红细胞(RBC)、白细胞(WBC)、血红蛋白(HGB)和血小板(PLT)分析; (C-D) 血液生化检查包括: 谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、尿素(UREA)和肌酐(CREA);	54
图 5.6 各实验组主要器官(包括心脏、肝脏、脾脏、肺和肾)的 H&E 染色图像(比例尺: 200 μm)	55

表目录

表 2.1 实验仪器	17
表 2.2 实验试剂与耗材	18
表 3.1 实验仪器	28
表 3.2 实验试剂与耗材	29
表 4.1 实验仪器	35
表 4.2 实验试剂与耗材	36
表 5.1 实验仪器	47
表 5.2 实验试剂与耗材	47

1 文献综述

1.1 引言

癌症是世界上威胁人类健康的主要疾病之一。在过去的几十年里，一些传统的肿瘤治疗方法，如手术治疗、放射治疗、化疗等在临床上已经得到了广泛的应用，帮助人们有效的抑制癌症的发展。但传统治疗也表现出明显的弊端，如对身体的副作用较大，不能很好的遏制肿瘤的生长，且最近的研究表明在传统癌症的治疗过程中，肿瘤细胞会转化成衰老肿瘤细胞，进而对传统的癌症治疗产生抗性，包括自身抗凋亡 BCL-2 蛋白家族表达的增加和促凋亡蛋白 BAX 表达的降低，并且自身会持续的分泌衰老相关分泌表型 (Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP)，其中包括 IL-6、IL-8、CXCL-1、CCL-2、CCL-5、VEGF 和基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)等。这些分泌的 SASP 会持续影响更多肿瘤细胞转变成衰老肿瘤细胞，从而使更多肿瘤细胞对传统的癌症治疗产生抗性，同时随着癌症的发展，衰老肿瘤细胞分泌的 SASP 会促进肿瘤上皮间质转化、肿瘤血管的生成和形成免疫抑制的微环境，从而造成肿瘤的生长和侵袭。因此，清除肿瘤治疗过程中产生的衰老肿瘤细胞及其产生的 SASP 对癌症的治疗有积极作用，这也是本课题旨在达到的目的。

细胞外囊泡(Extracellular Vesicles, EVs)是一种 40-150 nm 的生物纳米结构，其结构由脂质双分子层组成的球形囊泡，在其囊泡内含有蛋白质、糖类、RNA 和其他药理活性分子，作为天然纳米载体具有独特的形态和组成特征。与传统的合成纳米载体相比，EVs 具有制备工艺要求简单，细胞毒性低，生物安全性高，且具有良好的生物相容性和可生物降解性。植物来源 EVs 由于其天然来源和成分，有着不被免疫系统检测的优势，因此可以延长循环周期和提高生物利用度。此外，与哺乳动物 EVs 不同，植物 EVs 不存在人畜共患病或感染人类病原体的风险，存在的潜在风险低，可以实现低成本大规模生产，并在靶组织部位显示出高效的摄取。因此，植物 EVs 是一种理想的纳米药物递送载体。

姜黄素(Curcumin)最早是从姜科植物姜黄的根茎中发现的一种多酚类的化合物。姜黄素已被证明在各种癌细胞中发挥抗肿瘤活性，例如乳腺癌、肺癌和软巢癌等。此外，姜黄素在抗氧化、抗炎等方面同样具有重要活性。但其难溶于水，生物利用度较低，限制了其临床应用。因此，姜黄来源 EVs 用作化疗药物递送载体，不仅能够解决游离姜黄素不溶于水且生物利用度低的弊端，还有望利用其内姜黄素发挥抗炎功能，抑制衰老肿瘤细胞产生的 SASP。

综上所述，我们将纳米靶向递送平台与传统癌症治疗策略结合在一起，研究提出—

种克服衰老肿瘤细胞及其 SASP 产生的不利影响来提高化疗效果的新思路。采用姜黄来源 EVs (Turmeric-Derived Extracellular Vesicles, CNV) 负载抗肿瘤化疗药物阿霉素 (Doxorubicin, DOX), 表面修饰靶向衰老肿瘤细胞表面高表达死亡受体 5 (Death Receptor 5, DR5) 的抗体, 形成 DR5-CNV/DOX 纳米粒子。由于其对衰老肿瘤细胞和 SASP 的独特作用, DR5-CNV/DOX 可以发挥“一石二鸟”的抗肿瘤作用, 可作为未来癌症治疗有前景的新型药物递送系统。

1.2 癌症治疗研究现状

癌症又名恶性肿瘤, 是指机体在各种促肿瘤因素影响下, 局部组织的细胞不受控制的持续增殖进而形成局部的肿块, 是一类体内出现异常细胞无限增殖并可能入侵身体其他部位的疾病。相较良性肿瘤容易通过手术清除干净, 一般不存在转移、复发的风险, 并且对体内器官和组织只有阻塞和挤压作用。恶性肿瘤会持续破坏组织和器官的结构和功能, 引起其坏死、出血进而造成感染, 患者最终可能由于器官功能衰竭而死亡。

如今癌症已成为世界范围内的一个主要公共卫生问题, 现阶段对于癌症的治疗主要还是传统的治疗方法分别为: 手术切除、放射治疗以及化学药物治疗。但它们无一例外都有较大的负面作用: 手术切除可能无法彻底的将肿块切除, 且因为癌细胞易在淋巴系统和血液系统中转移, 手术后易于复发, 并且像白血病等的恶性肿瘤根本无法手术切除, 因此有很大的局限性。放射性治疗对正常组织或是肿瘤细胞均具有杀伤作用, 放射后对人体的伤害很大。并且有些癌细胞对射线不敏感, 因此放射性治疗也有很大的局限性。化学药物治疗的作用范围则是以全身为主, 对机体正常的细胞也具有杀伤作用, 现有的抗癌药物主要有阿霉素、紫杉醇、多西紫杉醇、顺铂、卡铂和 5-氟尿嘧啶等, 效果不是很理想, 用药后肿瘤转移复发率高, 不能从根本上解决癌症, 而且存在不同程度的毒副作用。

因此, 在癌症的治疗过程中, 对于生物靶向治疗的需求就大大增加, 研发出可以发挥高效靶向作用、低毒性且有药物高负载率的纳米药物递送系统, 似乎是 21 世纪对抗癌症的曙光。

1.3 细胞衰老

1881 年, 德国动物学家 August Weismann 在《生命的长度》论文中指出: 所有的有机生命都是短暂的, 生命在个体间传递, 看似不朽, 但个体本身却会消亡。这是因为细胞通过分裂方式产生的增殖能力是有限的而非永恒的, 机体无法产生新一代细胞来代替在生命周期中损坏的细胞, 从而造成死亡的发生^[1]。1961 年, 美国生物学家 Leonard Hayflick 和 Paul S. Moorhead 在对人成纤维细胞的连续传代培养过程中发现, 哺乳动物

细胞确实存在有限的细胞分裂增殖,因此首次提出了“Hayflick 极限”的概念,为正常细胞通过分裂方式产生的增殖能力是有限的而非永恒的提供了实验依据^[2]。这些不断的分裂的细胞到达极限后,会表现出一种特殊的形式,也就是我们所说的衰老。

细胞衰老是一种与各种生理过程和多种与年龄相关的疾病有关的细胞状态。其显著的特征是永久性细胞周期停滞,是响应内源性和外源性应激而发生的,包括端粒功能障碍、细胞器应激、癌基因激活和持续性 DNA 损伤。细胞衰老会发生在包括胚胎发育、器官形成在内的多种生物过程中的受控程序^[3],为防止肿瘤的发生提供保障^[4],且衰老细胞还可以通过细胞和非细胞自主机制在发育和成年过程中作为组织重塑和修复的积极调节器^[5]。不过衰老细胞在组织中的过度和异常积累会对机体产生负面影响,为包括癌症在内的各种与衰老相关的疾病包括动脉粥样硬化、器官纤维化、糖尿病及其并发症和神经退行性疾病等^[6]的发生和发展创造有利的促炎环境^[7,8],并导致组织再生受损、慢性年龄相关疾病和机体衰老^[9]。

1.3.1 诱导细胞衰老的因素

由于细胞会受到内源性和外源性的压力影响,因此造成细胞衰老的原因很多。现在人们普遍认为造成机体细胞衰老的原因是端粒的缩短,因此在细胞衰老的生物标志物中,端粒缩短是第一个也是最明确的衰老细胞生物标志^[10]。端粒是由真核染色体末端的蛋白质和核苷酸所组成。由于复制机制,端粒随着每次细胞分裂而缩短,就像细胞的“分子钟”一样滴答作响,直至细胞停止分裂,进入细胞周期停滞状态,从而成为衰老细胞^[11]。端粒理论具体表现为:第一个是衰老是有程序的;第二个是不可逆的细胞周期停滞;最后,在没有端粒酶活性的情况下,细胞分裂的总数不能超过 Hayflick 极限^[12]。所以人们思考或许衰老的最好标志就是衰老产生的原因,因此基于端粒的缩短机制^[13,14],端粒理论成为主流的衰老理论^[10]。除了端粒缩短引起的细胞衰老外,DNA 损伤反应也能引起细胞衰老。核 DNA 损伤经常被报道为衰老的常见根本原因,主要以 DNA 双链断裂^[15]的形式激活 DNA 损伤反应(DNA Damage Response, DDR)途径。DDR 发挥检查点功能来阻止细胞周期进程并防止损坏的遗传信息传播到子细胞。一些 DDR 因子在 DNA 损伤位点积累,形成细胞学可检测的核灶,这些核灶由延长的染色质修饰组成,例如组蛋白 H2AX 的磷酸化,以及与之相关的蛋白质,包括 MDC1、53BP1 和共济失调毛细血管扩张激酶的激活形式突变(ATM)^[16]。这些焦点标记 DNA 损伤的各个位点,并有助于检查点执行和细胞周期停滞,直到损伤得到修复。如果 DNA 损伤持续存在,则会导致 DDR 信号传导延长,并以细胞衰老的形式延长增殖停滞^[17]。在 DDR 级联的底部,肿瘤抑制因子 p53(ATM 及其旁系同源物 ATR 的靶标)被激活并刺激细胞周期蛋白依赖性激酶抑

制剂 p21 的表达, p21 是衰老相关细胞周期停滞的重要介质^[18]。p16 是 CDK4 和 CDK6 的抑制剂,也是多种类型衰老的关键^[19]; p21 在衰老进入早期被激活, p16 被激活较晚,可能是为了维持衰老表型^[20]。除了激活 DDR 级联外,肿瘤抑制因子 ARF 还能稳定 p53,从而有助于诱导衰老^[21]。人们一直致力于评估这两条主要途径(DDR 和 ARF 途径)对 p53 依赖性衰老建立的贡献,特别是在应对致癌挑战时。此外,癌基因的激活也是细胞衰老的强大诱导剂。癌基因的表达触发了与 DNA 复制改变有内在联系的初始高增殖期,最终参与 DDR 通路并导致衰老^[22-24]。这一过程被称为癌基因诱导衰老(Oncogene-Induced Senescence, OIS),肿瘤抑制基因表达的缺失也可以导致细胞增殖停滞,例如 PTEN 缺失诱导的细胞衰老。虽然最初 PTEN 缺失诱导的细胞衰老与 DDR 激活无关^[25],但后来发现它与在体内中的过度增殖、DDR 参与和细胞衰老有关^[26]。活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)除了作为 DNA 损伤剂可以在肿瘤中积累,它们还可以作为信号分子介导原癌基因功能。ROS 可以促进细胞增殖和衰老相关 DNA 损伤,这是由 NADPH 氧化酶产生的癌基因诱导的 ROS 可以通过促进与 DNA 复制和 DNA 损伤积累相关的初始过度增殖阶段来诱导细胞衰老^[27](图 1.1)。

以上是造成细胞衰老的主要途径,此外能造成细胞衰老的因素有很多,例如氧化应激诱导的衰老,细胞代谢的氧化产物或已知的氧化剂(如过氧化氢)都可能导致衰老^[28]。化疗诱导的衰老,多种化疗药物均可以诱导衰老(如博来霉素或阿霉素等)^[29]。线粒体功能障碍诱导的相关衰老:最近有报道称,诱导线粒体功能障碍也会导致衰老^[30]。旁分泌诱导的衰老:由初级衰老细胞产生的 SASP 引起的衰老^[31]。

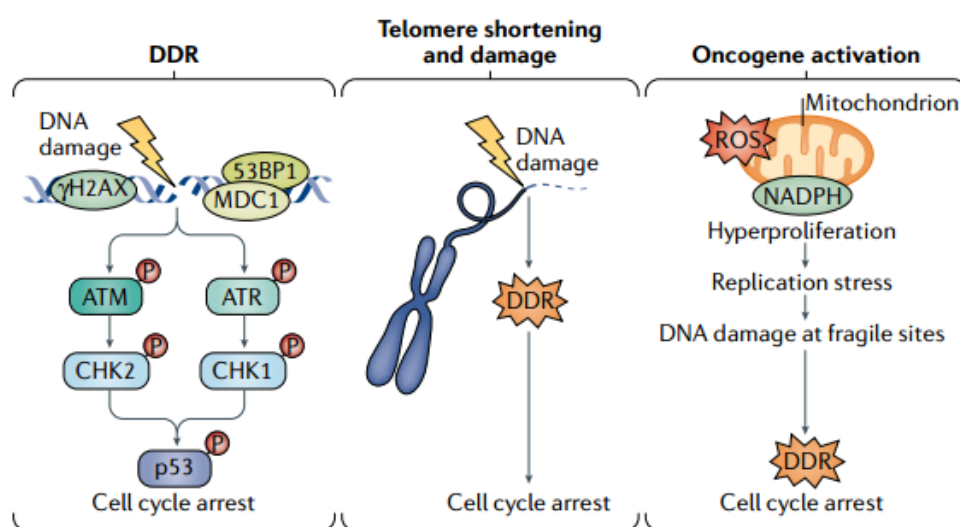


图 1.1 诱导细胞衰老的主要因素^[32]。

Fig. 1.1 Major factors inducing cellular senescence.

1.3.2 衰老细胞的特征

细胞衰老的特点除了涉及细胞不可逆的增殖障碍这一事实。衰老细胞还会经历一些形态、生化和功能变化，这是细胞衰老的表型。所有组织的衰老细胞(包括复制性衰老和应激诱导的过早衰老)看起来都很相似。它们具有代谢活性，并具有一系列体外和体内特征，被称为衰老和细胞衰老的生物标志物。

(1).衰老细胞的特点是形态异常增大、形状无规则且扁平，细胞质与细胞核的比例不成比例地增加，相关研究表明衰老细胞体积的增大与 mTOR 通路的激活相关^[33]。细胞质膜在与邻近细胞和细胞外空间的沟通中发挥着核心作用，而在衰老细胞中质膜成分改变，表现为 Caveolin-1 蛋白显著上调^[34]。在衰老细胞中许多溶酶体蛋白上调和溶酶体含量增加^[35]。在衰老细胞中线粒体数量增加且体积增大^[36]，线粒体的膜电位降低，导致线粒体酶的释放，并增强 ROS 的产生^[37]。衰老细胞核膜完整性被破坏，表现为核纤层结构蛋白 LaminB1 的丢失^[38]，核膜的被破坏也会导致包浆中染色质的出现，例如 DNA 损伤相关的表观遗传标记的染色质片段的出现，这些染色质片段还可以通过外泌体分泌到细胞外环境，并激活其他细胞中的 DDR^[39] (图 1.2)。

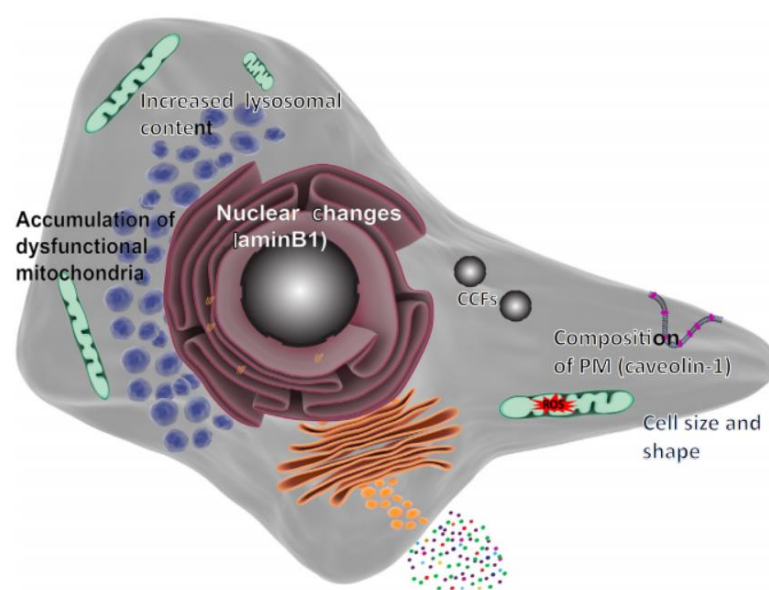


图 1.2 衰老细胞形态及结构的变化^[40]。

Fig. 1.2 Changes in the morphology and structure of senescent cells.

(2).衰老细胞中溶酶体含量的增加，会导致 β -半乳糖苷酶含量的增加，SA- β -gal 是一种衰老相关 β -半乳糖苷酶活性，可作为溶酶体活性最常见的标志物，该标记物可通过

大多数衰老细胞的组织化学染色检测到, 并且通常在衰老前、静止或永生和转化细胞中检测不到。因为其检测方法简单且对衰老细胞具有明显的特异性, 也成为最广泛评估衰老生物标志物方法之一^[41]。脂褐素积累是衰老细胞的另一个特征。最近开发的一种基于生物素连接的苏丹黑 B 类似物的方法正在成为一种可靠的检测手段, 可追踪各种细胞和组织类型中的衰老细胞^[42]。

(3).衰老细胞相关信号通路中衰老标志蛋白 p16、p21 和 p53 表达的增加。衰老细胞的一个显著特征是细胞周期抑制蛋白的表达增加, 统称为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂。在衰老过程中, 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂在衰老细胞的积累中发挥最重要的作用的是 p16INK4A, 以下简称 p16, 因为它对于持久维持增殖停滞状态至关重要^[43]。除此之外, p21 也是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂, 两者分别是构成 p53-p21 和 p16-RB 控制的衰老信号通路的组成部分, 也是形成多种类型衰老的关键^[44, 45]。p21 在衰老进入早期被激活, p16 被激活较晚, 这是为了维持衰老表型^[46]。对于肿瘤细胞, 在受到持续的 DDR 刺激后可以激活 p53 蛋白, 阻断细胞周期进程, 从而使其进入衰老状态, 达到遏制肿瘤发展的作用^[45]。由于 p16、p21 和 p53 表达水平足以建立和维持衰老相关的生长停滞, 因此它们可用于识别组织和培养细胞中的衰老细胞。

(4).衰老细胞抗凋亡 BCL-2 蛋白家族表达增加, 以此增强衰老细胞的抗凋亡特性。衰老细胞对外在和内在的促凋亡刺激具有抵抗力, 主要是通过提高抗凋亡蛋白 BCL-2、BCL-XL、BCL-W 和下调促凋亡蛋白 BAX 来抵抗凋亡刺激^[47]。BCL-2 蛋白家族的存在是增加衰老细胞抗凋亡的基础^[48], 在依托泊苷和电离辐射引起的 DNA 损伤诱导的衰老中, BCL-2、BCL-XL、BCL-W 的表达水平增加。它们的联合抑制衰老细胞的死亡, 当使用针对其的小分子抑制剂 ABT-737 时, 在体内体外均会导致衰老细胞的优先死亡, 并将这些细胞从组织中消除^[49]。在癌症和衰老过程中, BCL-2 蛋白家族的过度表达会抵消促凋亡基因 Puma 和 Noxa, 从而限制细胞凋亡, 这也是 BCL-2 蛋白家族是某些癌细胞对化疗药物产生耐药性的关键^[50]。

(5).衰老肿瘤细胞的另一个特征是可以分泌一系列细胞因子, 统称为衰老相关分泌表型(SASP)^[51]。SASP 复含多种促炎因子、趋化因子、生长调节因子、血管生成因子和基质金属蛋白酶等^[52], 这其中主要包括 IL-6、IL-8、CXCL-1、CCL-2、CCL-5、VEGF、和 MMPs 等等。SASP 在很大程度上是由促炎转录因子 NF- κ B 介导的转录程序, 且 NF- κ B 激活的主要触发因素是 DDR^[53]。SASP 的组成和强度差异很大, 具体取决于衰老的持续时间、促衰老刺激的来源和细胞类型^[54]。SASP 是不光是衰老细胞的一个标志, 其造成的炎症环境, 还介导许多病理生理效应, 例如 SASP 以自分泌和旁分泌的方式增强和传播衰老, 可以改变邻近细胞的行为, 发挥细胞非自主功能在非衰老细胞中进行重编

程,使更多细胞转化成衰老细胞,甚至影响整个生物体的组织微环境^[55];并还可以激活消除衰老细胞的免疫反应^[56];促进胚胎结构的重组,参与组织重塑和修复^[57];将未成熟的免疫抑制性骨髓细胞募集到前列腺和肝脏肿瘤,并通过驱动血管生成来刺激肿瘤发生和转移,增加复发的风险^[58, 59]。此外,一些 SASP 成员通过小的细胞外囊泡分泌,一旦被衰老细胞释放,可以发挥更远端的功能,例如增强癌细胞的增殖^[60](图 1.3)。

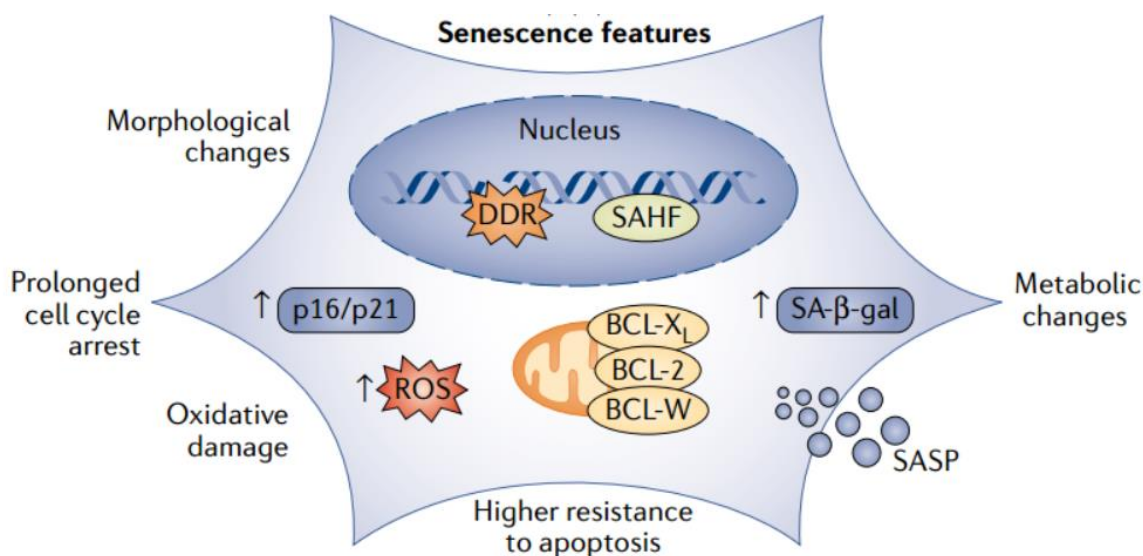


图 1.3 衰老细胞的特征,包括细胞周期停滞(通过 p21 和 p16 细胞周期抑制剂的上调)、氧化损伤(通过 ROS 水平升高检测到)、抗凋亡蛋白 BCL-2 家族的上调,从而诱导细胞凋亡抵抗、代谢变化(衰老相关的 β -半乳糖苷酶积累)和衰老相关的分泌表型(SASP)^[32]。

Fig. 1.3 Senescent cells are characterised by cell cycle arrest (through upregulation of p21 and p16 cell cycle inhibitors), oxidative damage (detected by elevated ROS levels), upregulation of the BCL-2 family of anti-apoptotic proteins which induces apoptosis resistance, metabolic changes (senescence-associated accumulation of β -galactosidase) and senescence-associated secretory phenotypes (SASP).

1.4 衰老与肿瘤的发展

虽然大多数关于衰老的研究都是在非癌细胞上进行的,但显然癌细胞也可以产生衰老反应。在对癌症治疗的过程中,依赖于细胞毒性治疗策略,通过彻底破坏肿瘤细胞而优化肿瘤患者生存潜力,这会对肿瘤细胞产生持续的 DNA 损伤反应(DDR),肿瘤细胞响应这种治疗方法表现为:激活凋亡程序造成肿瘤细胞的凋亡或者应激于衰老相关信号通路, p16-RB 和 p53-p21,进入一种永久的细胞周期阻滞状态,我们称后者为治疗诱导的衰老(Therapy-Induced Senescence, TIS)^[61]。治疗诱导的衰老是部分肿瘤细胞在面对外部压力刺激下,主动性避免压倒性压力可能造成的细胞凋亡途径,而选择可以造成不太严

重的损伤的细胞衰老结果^[62]。例如，阿霉素低剂量会导致 MCF-7 乳腺癌细胞衰老，高剂量会导致 MCF-7 乳腺癌细胞凋亡^[63]。除了肿瘤细胞外，在新生大鼠心肌细胞中也发现了类似的阿霉素剂量依赖性反应^[64, 65]。高剂量的 H_2O_2 会导致细胞凋亡，而较低剂量的 H_2O_2 会诱导 F65 和 IMR90 人类二倍体成纤维细胞衰老^[66, 67]。

1.4.1 癌症干预和衰老诱导

在现如今癌症的治疗上可以引起治疗诱导的衰老的干预措施可分为五个部分：化疗、放疗、CDK4/6 抑制剂、表观遗传调节剂和免疫疗法。

1.化学疗法。化疗被定义为使用细胞毒性化合物造成不可修复的 DNA 损伤并损害癌细胞的有丝分裂。大量研究表明，化疗药物可诱导多种肿瘤衰老。例如，阿霉素可以诱导乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、卵巢癌、神经胶质瘤、白血病和黑素瘤等肿瘤细胞衰老^[68-70]。依托泊苷、喜树碱、顺铂和紫杉醇也都可以诱导纤维肉瘤、结肠癌、肺癌、鼻咽癌和乳腺癌等多种肿瘤细胞衰老^[71-74]。

2.放射疗法。放射治疗需要使用高能带电离子对癌细胞造成不可修复的 DNA 损伤，目的是诱导细胞死亡，由于缺乏特异性，放射治疗可用于治疗多种癌症。实验表明，放射疗法可以诱导纤维肉瘤、乳腺癌和恶性胶质瘤等多种肿瘤细胞衰老^[75-77]。

3.CDK4/6 抑制剂。CDK4 和 CDK6 是细胞周期从 G1 期过渡到 S 期的关键因素。许多临床前研究都观察到癌细胞中细胞周期蛋白 CDK4/6 的过度激活，特别是在乳腺癌中^[78]，使其靶向抑制成为一种有吸引力的抗癌策略。最近，FDA 开发并批准了三种 CDK4/6 抑制剂药物抑制剂(Palbociclib、Ribociclib 和 Abemaciclib)。Palbociclib 可诱导乳腺癌和胃癌、黑色素瘤、脂肪肉瘤和肝细胞癌的细胞衰老^[79-83]，Ribociclib 可诱导神经母细胞瘤细胞^[84]，Abemaciclib 可诱导各种乳腺癌细胞^[85]。

4. 表观遗传调节剂。5-Aza-2'-脱氧胞苷(5-aza)是 DNA 甲基转移酶(DNMT)的抑制剂，可导致富含 CpG 的启动子或增强子整体去甲基化。由于 p16 启动子含有富含 CpG 的区域，因此推测用 5-aza 处理可以通过激活 p16 来诱导衰老。辛二酰苯胺异羟肟酸(SHA)，也称为伏立诺他，是一种表观遗传调节剂。可以在结肠癌细胞(HCT116)^[86]，人白血病细胞系(MOLM-7、HL-60 和 JURL-MK1)^[87]和尿路上皮癌^[88]中诱导多种衰老表型。

5.免疫疗法。免疫疗法是由免疫治疗药物介导的，使机体产生免疫反应进而使肿瘤细胞发生凋亡，SASP 可能是该过程的调节剂。利妥昔单抗是一种 CD20 靶向抗体，用于治疗白血病和淋巴瘤，该药物已被证明可诱导 B 细胞淋巴瘤衰老^[89]。

1.4.2 衰老肿瘤细胞的双重作用

在癌症背景下，需要全面了解衰老肿瘤细胞的分子、生理特性、特异表型以及它们

与癌症的复杂关联，这可能是有益的，也可能是有害的。

在肿瘤发展的前期，衰老的肿瘤细胞对癌症的治疗是有益的。治疗诱导的衰老作为一种肿瘤抑制机制，可以抑制肿瘤细胞不受控制的增殖使其进入衰老程序，从而建立持久的细胞周期停滞，以进一步的防止基因组不稳定，从而抑制癌症的发展^[90]。衰老的肿瘤细胞还会通过分泌 SASP，来强化自身衰老，并影响邻近肿瘤细胞，来刺激其进入细胞周期停滞状态，改善药物输送的脉管系统并招募免疫细胞，以消除肿瘤细胞，从而进一步抑制肿瘤^[91-93]。

随着肿瘤的发展，衰老的肿瘤细胞对癌症的治疗是有害的。衰老肿瘤细胞会通过抵抗细胞凋亡刺激或上调促生存途径来抵抗细胞死亡。通过这种方式，衰老肿瘤细胞保持持续存活状态。细胞凋亡抵抗是通过抗细胞凋亡蛋白(BCL-2 蛋白家族)的持续激活以及促细胞凋亡蛋白(BAX)来对化疗产生抗性^[94, 95]，并且持续分泌的 SASP 可以保护邻近的肿瘤细胞不被造成诱导衰老的化疗药物杀死^[96]。由衰老肿瘤细胞分泌的细胞外囊泡可以促进肿瘤细胞的增殖^[97]。化疗诱导后的衰老肿瘤细胞可能会获得类似干细胞的特性，在小鼠实验中，阿霉素治疗会导致 B 细胞淋巴瘤衰老，但也会导致各种干性基因的上调，其中一些衰老淋巴瘤细胞能够重新进入细胞周期并表现出更强的侵袭性，这主要依赖于经典的 WNT 信号传导^[98]。且衰老肿瘤细胞分泌的炎症性 SASP 因子可以非自主方式促进肿瘤发生的各个方面，包括癌细胞增殖、迁移、侵袭、血管生成、上皮间质转化(EMT)以及免疫抑制(下面部分会详细阐述)。由于大多数抗癌治疗是通过全身途径进行的，因此许多衰老细胞是在非肿瘤区域产生的^[99]，这种过度积累会产生严重的副作用，并加速心血管、纤维化和神经退行性疾病等慢性疾病的发作和进展^[100]。另外小鼠研究表明，癌症治疗后去除衰老细胞可以减轻其有害影响，包括减少骨髓抑制、心脏功能障碍、癌症复发以及改善身体活动和力量^[101]。

总之，在肿瘤治疗的前期，衰老肿瘤细胞会对肿瘤的发展产生抑制作用，而随着肿瘤的发展，衰老肿瘤细胞和其产生的 SASP 会产生一系列促进肿瘤发展的不利影响。

1.4.3 SASP 的双重作用

与衰老肿瘤相关的表型变化最大的一种是 SASP，它是编码分泌蛋白的基因的转录程序，是持续 DDR 的结果，并由 NF- κ B^[102]、p38 MAPK^[103]和 C/EBP- β ^[104]途径介导产生。SASP 富含各种细胞因子，如 IL-6、IL-8、CXCL-1、CCL-2、CCL-5 和 MMPs 等等。

在肿瘤组织中，衰老的肿瘤细胞产生的 SASP 具有双重作用。一方面，SASP 因子部分通过增强衰老生长抑制和促进免疫监视来抑制癌症^[105]。癌基因诱导和治疗诱导的衰老细胞会分泌炎症细胞因子 IL-1 α ，它是重要的 SASP 引发剂和调节器^[106]。IL-1 α 通过激活 NF- κ B 触发自分泌炎症反应，从而导致 IL-6 和 IL-8 的转录。随后，这些炎症细

胞因子通过增加活性氧的产生和持续的 DNA 损伤反应来加强衰老增殖抑制，特别是在癌基因诱导的衰老细胞中^[106, 107]。此外，IL-1 α 还介导邻近细胞的旁分泌衰老，以抑制肿瘤进展^[91]。此外，IL-1 α 、IL-6 和 IL-8 介导 M1 样巨噬细胞、辅助 T1 细胞和自然杀伤 (Natural Killer, NK) 细胞向肿瘤微环境的募集。这些浸润的免疫细胞驱动衰老癌细胞的消除，也可能通过旁观者效应消除非衰老癌细胞^[108, 109]。此外，免疫细胞例如辅助 T1 细胞，也可以通过分泌炎症细胞因子引发癌细胞衰老^[110] (图 1.4A)。

另一方面，从长远来看，SASP 被认为是有害的。二十年前的一项体内研究发现了这一概念的早期证据，该研究表明，当与人类衰老成纤维细胞共同注射到小鼠体内时，癌前和恶性上皮细胞的增殖和肿瘤发生都会增加^[111]，SASP 是这一效应的重要贡献者。另一项研究观察到，衰老的人类成纤维细胞分泌的 MMPS 对于促进肿瘤发生至关重要^[112]。这些重要的 SASP 因子参与细胞外基质的加工和降解，从而促进癌细胞生长和侵袭。此外，MMPS 还促进许多其他支持肿瘤发生的细胞因子和生长因子的释放，例如血管内皮生长因子(VEGF)，它可促进肿瘤驱动的血管生成^[113]。SASP 因子 IL-6 和 IL-8 也是衰老细胞促肿瘤作用的重要介质，因为它们创造了支持癌症生长的慢性炎症微环境^[114]。此外，它们驱动 MMP 编码基因的转录并驱动上皮细胞向间质细胞的转变，从而促进肿瘤侵袭性^[115-117]。IL-6 介导的衰老细胞的另一个促肿瘤作用是将骨髓源性抑制细胞 (Myeloid-Derived Suppressor Cells, MDSC) 募集到肿瘤微环境中^[118]。这些 MDSC 阻断 IL-1 α 信号传导，从而拮抗癌细胞衰老的建立^[119]。此外，MDSC 通过抑制 CD8+T 细胞(由 IL-6 介导)^[118]和 NK 细胞(由趋化因子 CCL-2 介导)^[120]来阻断免疫监视。通过这种方式，SASP 创建了一个免疫抑制环境，促进肿瘤生长^[121]。然而，衰老癌细胞的促肿瘤和抗肿瘤作用可能是由多种 SASP 因子和免疫微环境之间复杂的相互作用介导的。最近几项研究表明，衰老诱导疗法与复杂的重编程相关，最终可能驱动肿瘤和正常细胞的干性^[122]。此外，未被免疫系统清除的剩余衰老癌细胞在某些情况下可以自发地逃避增殖抑制并重新进入细胞周期^[71, 98, 123]。另一项研究观察到，癌基因诱导的衰老细胞也可以重新进入细胞周期，特别是通过端粒酶逆转录酶基因的去抑制来恢复端粒酶活性^[124]。重要的是，恢复生长的衰老细胞具有 WNT 依赖性的增强生长和肿瘤启动潜力，这种与衰老相关的干性导致高度侵袭性的肿瘤，由 WNT 通路激活驱动，通过 SASP 独立于 WNT 配体，并且被发现在复发肿瘤中富集^[125]。此外，衰老的癌细胞可能会长期处于休眠状态，从而逃避治疗并带来肿瘤复发的风险，加剧化疗副作用^[126] (图 1.4B)。

总之，SASP 在肿瘤发展的早期，可以起到抑制肿瘤细胞增殖，招募免疫细胞来杀伤肿瘤的作用。随着肿瘤的发展和 SASP 的积累，SASP 会促进肿瘤生长、治疗耐药、免疫抑制、肿瘤转移和血管生成等等一系列不利影响。

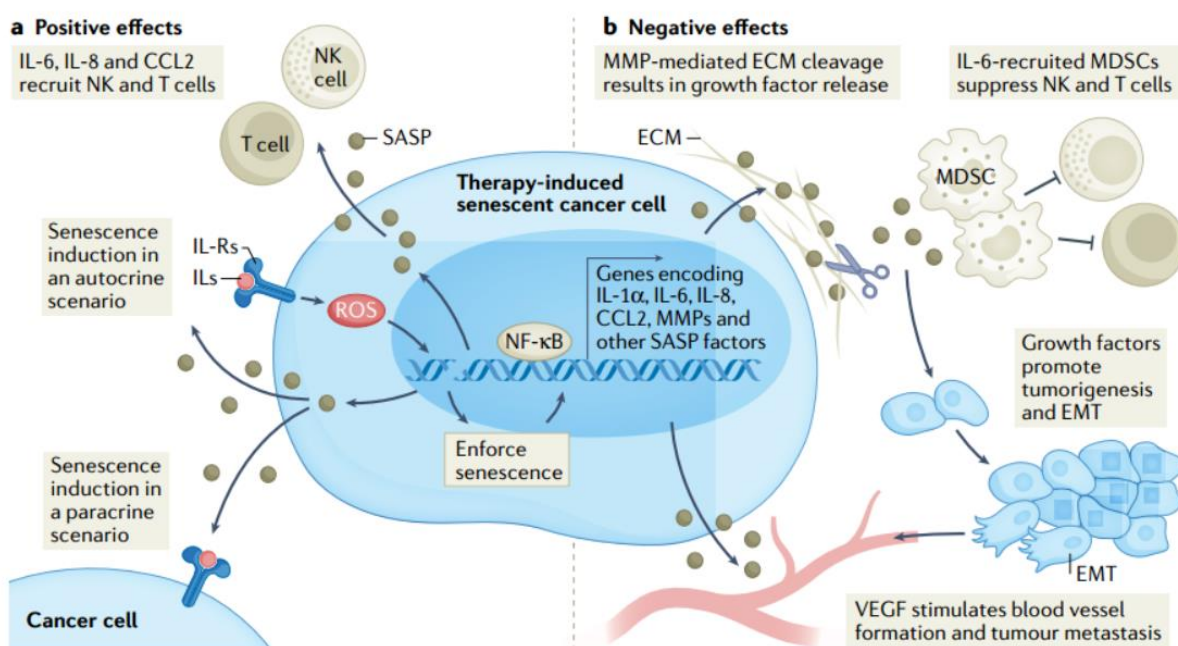


图 1.4 衰老肿瘤细胞产生的 SASP 的双重作用^[127]。

Fig. 1.4 Dual role of SASP produced by senescent tumour cells.

1.4.4 衰老疗法作为抗癌策略

癌症联合疗法的概念自 1958 年以来一直应用于临床，人们普遍认为联合疗法可以预防耐药性的发展。然而，一方面毒性是限制药物组合在肿瘤学中疗效的主要因素。另一方面虽然联合治疗可以诱导肿瘤细胞衰老或细胞死亡来防止癌细胞增殖，但治疗后诱导的衰老肿瘤细胞的持续存在是有害的。

顺序药物治疗方案则完美解决这个问题，其首先采用促衰老疗法，诱导肿瘤细胞衰老，随后进行衰老疗法去除衰老肿瘤细胞和其产生的 SASP。由于顺序疗法在原则上允许组合更多药物和较低的药物浓度，因此避免了直接组合毒性。且由于衰老是一种稳定的细胞状态，在衰老诱导剂撤除后仍持续存在，所以促衰老疗法非常适合用于顺序治疗。在衰老疗法上可考虑三个主要类别：永久去除衰老细胞(衰老溶解)、免疫介导的衰老细胞清除和 SASP 中和。现如今，促衰老和衰老疗法在癌症治疗方面分别取得的成功，证明顺序疗法在原则上似乎是可行的。

1.5 关于细胞外囊泡

细胞外囊泡(EVs)于 20 世纪 80 年代初在网织红细胞中首次被发现。细胞外囊泡来

源于细胞膜，既可由原核细胞分泌，也可由真核细胞分泌，是由细胞主动释放到细胞外基质的多样化、纳米级的膜囊泡，参与细胞间通讯、细胞迁移、血管新生和肿瘤细胞生长，转移等过程^[128-131]，是细胞间交流的重要载体，现在也被作为疾病诊断 ADDIN 和预后的循环生物标志物^[132]。广泛地存在于不同的复杂生物体液中并稳定携带了一些重要的信号分子，作为介导不同细胞间信息传递的重要信使，在各种疾病的发生过程中具有重要的功能^[133]。

细胞外囊泡被分为三类：外泌体、微囊泡和凋亡小体。外泌体是由细胞内的内体隔间产生的，胞外体的直径为 30-100 nm。微囊是通过细胞质膜的向外萌发和分裂直接产生的，其大小在 50 到 200 nm 之间。当细胞死亡时，细胞膜被破坏，形成大小为 50-500 nm 的凋亡小体^[134, 135]。细胞外囊泡有三种外排方式：①囊泡萌发成离散的内体，成熟后成为多泡体，在质膜融合时向外释放外泌体；②微囊泡直接从质膜萌发，出芽而立即释放；③通过在细胞内质膜连接(IPMCs)萌发，出芽后延迟释放^[136]。

细胞外囊泡可以将各种分子从母体细胞运送到其他细胞，其中包括蛋白质、糖类、脂质、mRNA 和 DNA 等多种生物活性分子，细胞外囊泡能够克服自然障碍，利用内源性机制进行吸收、细胞内贩运，并随后在母体细胞中传递其内容，并且具有良好的生物相容性和可生物降解性^[137]。因此，利用外泌体等细胞外囊泡作为药物载体，将各种治疗药物有针对性地传递到高度特定的细胞中，从而达到靶向治疗的作用^[138]。

虽然许多人源外泌体或一些哺乳动物来源外泌体已经被广泛的研究，但其存在提取量少的缺点，可能的免疫原性，又限制了其临床的应用。

1.6 关于植物细胞外囊泡

植物外泌体样纳米囊泡 PELNVs 由于其天然来源和成分，有着不被免疫系统检测的优势，因此可以延长循环周期和提高生物利用度。此外，与哺乳动物外泌体样纳米囊泡不同，植物外泌体样纳米囊泡不存在人畜共患病或感染人类病原体的风险，可以实现低成本大规模生产，在靶组织部位显示出高效的摄取，存在潜在的不利环境影响低。因此，植物外泌体样纳米囊泡是一种理想的纳米医学载体^[139]。最近，有大量文章从可食用植物中分离出来植物外泌体样纳米囊泡，如葡萄柚^[140]、生姜^[141]、柠檬^[142]和西蓝花^[143]等。从植物中提取的植物外泌体样纳米囊泡保证了其天然的结构完整性，具有完整的生物活性，在抗炎，抗菌，抗肿瘤，促进组织修复等方面都有巨大的优势^[144]。植物细胞外囊泡不仅可以对药物进行负载还可以表面功能化的修饰，以进一步加强对病变部位的靶向作用。大量研究显示，一些植物细胞外囊泡在发挥化疗药物的递送载体作用的同时，本身也可以发挥其固有抗肿瘤治疗作用，且其治疗作用取决于植物细胞外囊泡 PELNVs 植物

来源的选择^[139, 144]。

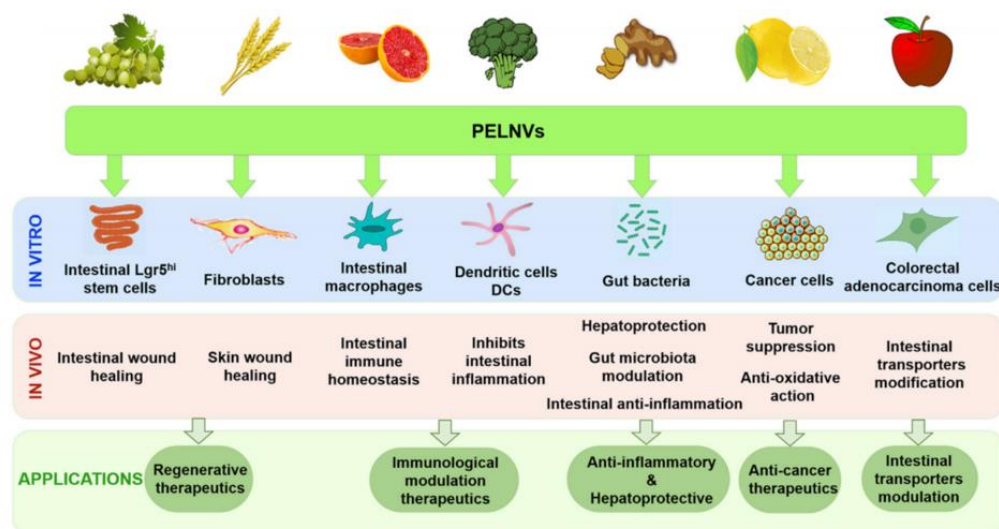


图 1.5 植物来源的 PELNV 的生物学功能及其转化为治疗应用^[144]。

Fig. 1.5 Biological functions of plant-derived PELNV and its translation to therapeutic applications.

1.7 姜黄素

姜黄素(Curcumin)是最早从姜科植物姜黄的根茎中发现的一种多酚类的化合物。姜黄素是一种天然衍生试剂,可在多种不同的肿瘤细胞系中诱导凋亡,其可以通过激活细胞内的氧化还原反应,诱导活性氧(ROS)产生,导致肿瘤细胞膜上凋亡受体的上调。姜黄素还可以上调 p53 的表达和活性从而抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡。此外,姜黄素可以通过抑制 NF- κ B 和 COX-2 的活性,以降低抗凋亡蛋白家族 BCL-2 的过度表达,从而促进肿瘤细胞凋亡。此外,姜黄素还可以减弱抗细胞凋亡 PI3K 信号的调节,增加 MAPKs 的表达,诱导 ROS 的内源性产生,从而导致肿瘤细胞的凋亡^[145-149]。姜黄素已被证明在各种癌细胞系中发挥抗肿瘤活性,例如乳腺癌^[149, 150],肺癌^[151, 152],软巢癌^[153, 154],前列腺癌^[155, 156]和皮肤癌^[157, 158]等等。

姜黄素除了被证明在抗肿瘤方面发挥着重要作用,在抗氧化^[159],抗炎^[160, 161],抗菌^[162, 163],抗类风湿关节炎^[164, 165],抗糖尿病^[166, 167]等同样具有重要活性。其中在抗炎症作用中,大多数炎症介质受 NF- κ B 调节,包括炎症细胞因子、趋化因子、粘附分子、酶和激酶,下调 NF- κ B 和 NF- κ B 调节基因产物的药物对炎症的发展有着抑制作用^[168]。姜黄素已被证明是不同炎症刺激诱导的 NF- κ B 激活的有效阻断剂^[169],并且姜黄素还是 STAT3 的有效抑制剂,STAT3 是另一种转录因子,促炎细胞因子 IL-6 通过其介导发挥

作用^[170]。因此,姜黄素可以通过多种途径来抑制炎症。基于上述对姜黄素的研究,本课题决定采用从姜黄中提取姜黄细胞外囊泡,姜黄细胞外囊泡中的姜黄素不仅可以使衰老的肿瘤细胞凋亡,还可以发挥抗炎功能,清除衰老肿瘤细胞产生的 SASP,而且克服了姜黄素不溶于水且生物利用度低的弊端。因此,姜黄细胞外囊泡有望成为一种新型纳米医学载体。

1.8 本课题的立题依据

基于以上背景,提出一种克服衰老肿瘤细胞及其 SASP 产生的不利影响来提高化疗效果的新思路。在本研究中,我们构建了一种新型纳米药物递送系统 DR5-CNV/DOX,采用姜黄来源细胞外囊泡(CNV)负载抗肿瘤化疗药物阿霉素(DOX),表面修饰靶向衰老肿瘤细胞表面高表达死亡受体 5 (DR5)的抗体,实现靶向治疗的同时协同其内姜黄素促进衰老肿瘤细胞凋亡,抑制 SASP,从而克服 SASP 产生的各种不利影响。在构建纳米药物递送系统过程中,采用超高速离心方式,从新鲜的姜黄根茎中获得姜黄来源细胞外囊泡(CNV)。采用共孵育的方式将化疗药物阿霉素(DOX)包载进入姜黄来源细胞外囊泡(CNV)中,获得 CNV/DOX。然后,将 DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ 自组装为胶束,表面修饰 DR5 抗体,获得 DSPE-PEG₂₀₀₀-DR5。最后,将 CNV/DOX 与 DSPE-PEG₂₀₀₀-DR5 共孵育获得 DR5-CNV/DOX 纳米粒子(图 1.6A)。我们设想最终的纳米粒子 DR5-CNV/DOX 可通过静脉注射的方式进入体内,DR5 抗体发挥靶向肿瘤细胞和衰老肿瘤细胞作用实现主动靶向药物递送,并且在肿瘤部位高浓度累积,其中负载的 DOX 发挥化疗作用,一部分癌细胞被直接杀死,一部分受到持续的 DNA 损伤,进而转化成衰老肿瘤细胞,此时 CNV 中的姜黄素和 DR5 抗体会介导衰老肿瘤细胞发生凋亡(包括下调抗凋亡蛋白 BCL-2、BCL-XL 的表达,上调促凋亡蛋白 BAX 表达),抑制衰老肿瘤细胞产生的 SASP,从而克服其产生的 SASP 的不利影响,包括抑制肿瘤的 EMT、血管的新生和重塑肿瘤免疫微环境,达到提高抗肿瘤效果的目的(图 1.6B)。

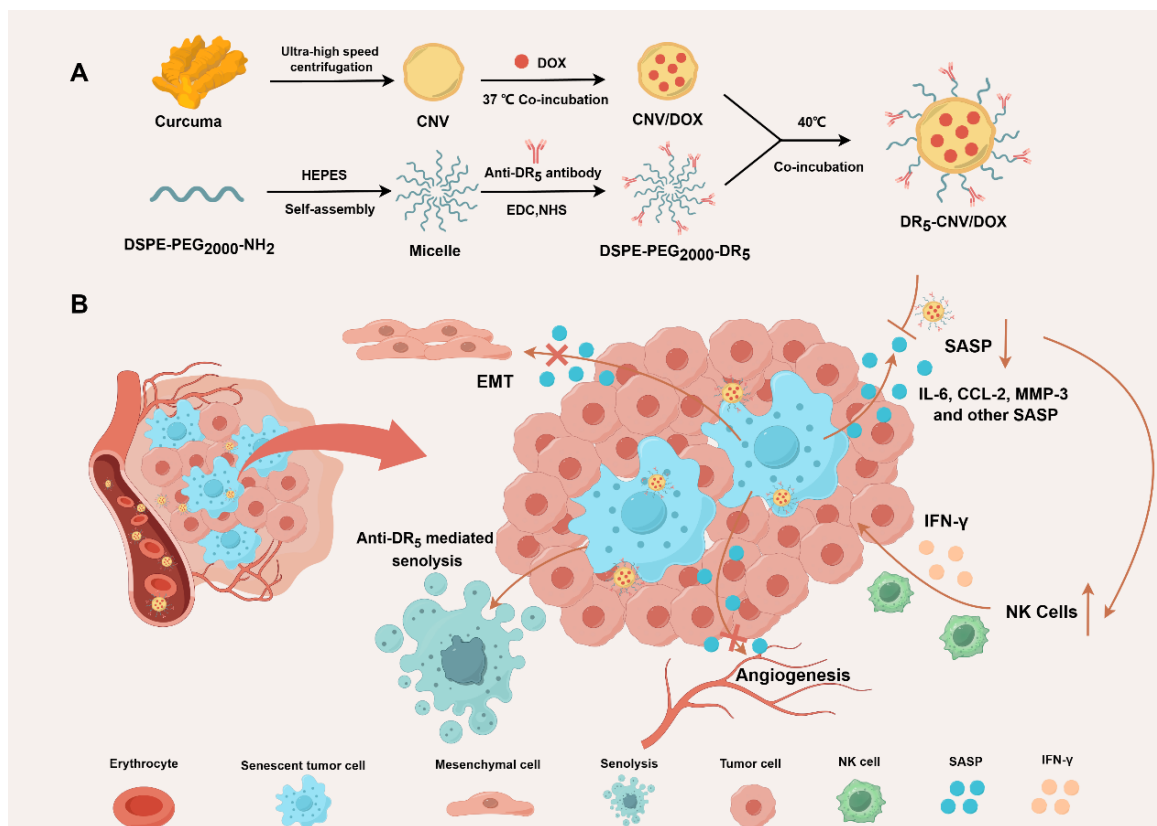


图 1.6 (A) DR5-CNV/DOX 制备示意图。(B) DR5-CNV/DOX 体内发挥抗肿瘤作用示意图。

Fig. 1.6 (A) Schematic diagram of DR5-CNV/DOX preparation. (B) Schematic representation of the anti-tumour effects exerted by DR5-CNV/DOX in vivo.

1.9 本课题的研究内容

新型纳米药物递送系统 DR5-CNV/DOX 的构建及抗肿瘤作用研究内容如下：

1. DR5-CNV/DOX 纳米粒子的构建与表征：通过超高速离心法、共孵育载药和后插入法修饰表面抗体，成功构建 DR5-CNV/DOX 纳米粒子。对 DR5-CNV/DOX 纳米粒子的形貌、粒径和电位进行表征，对姜黄细胞外囊泡(CNV)内含有姜黄素、DR5-CNV/DOX 纳米粒子成功负载化疗药物 DOX 和表面修饰抗体进行紫外、红外和 SDS-PAGE 表征。最后，对 DR5-CNV/DOX 纳米粒子的药物释放和稳定性进行表征。

2. 衰老 MCF-7 细胞模型的构建与表征：通过探究诱导衰老的给药浓度与给药时间等因素成功构建衰老 MCF-7 细胞模型。通过对 SA-β-Gal 染色、衰老标志蛋白 p16、p21 和 p53 的表达、抗凋亡 BCL-2 蛋白家族的表达和衰老细胞 DR5 的表达来对衰老 MCF-7 细胞进行表征。

3. DR5-CNV/DOX 纳米粒子体外抗肿瘤研究：通过溶血实验来评价 DR5-CNV/DOX

纳米粒子的生物安全性。通过激光共聚焦实验和流式细胞术研究来评价 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞对 DR5-CNV/DOX 纳米粒子的摄取能力。通过 CCK-8 细胞毒性实验评价不同实验组对 MCF-7 细胞的细胞毒性作用。通过 CCK-8 细胞毒性实验验证 DR5-CNV/DOX 和 DR5 抗体对衰老 MCF-7 细胞的细胞毒性作用。通过蛋白免疫印迹实验评价姜黄细胞外囊泡(CNV)对抗凋亡 BCL-2 蛋白家族的影响。通过 ELISA 实验测定各实验组细胞水平的 IL-6、CCL-2 和 MMP-3 细胞因子的含量，来评价 DR5-CNV/DOX 纳米粒子抑制 SASP 的能力。

4. DR5-CNV/DOX 纳米粒子体内抗肿瘤研究：建立小鼠肿瘤模型，通过眼丛静脉给药，实验过程中测量各组小鼠体重、肿瘤质量和肿瘤体积，以评价各实验组对肿瘤生长的抑制作用。并进行血液生化检测实验和组织病理学染色实验，以评价各实验组在体内的生物安全性。通过 ELISA 实验测定各实验组肿瘤水平的 IL-6、CCL-2 和 MMP-3 细胞因子的含量，来评价 DR5-CNV/DOX 纳米粒子抑制 SASP 的能力。肿瘤组织免疫荧光实验来评价 DR5-CNV/DOX 纳米粒子体内克服 SASP 产生的不利影响进而提高抗肿瘤效果。

2 DR5-CNV/DOX 的合成与表征

2.1 概述

传统的癌症治疗包括化疗和放疗等,治疗效果不佳,且对自身造成较大的毒副作用。并且在传统的癌症治疗过程中,肿瘤细胞会持续的受到刺激,进而转化进入衰老状态,衰老的肿瘤细胞自身会对凋亡产生抗性,也会持续的分泌 SASP,容易造成肿瘤的转移和侵袭,不利于癌症的治疗。而现阶段肿瘤靶向药物递送的研究中多是针对原发肿瘤细胞靶向递送化疗药物,往往忽视衰老肿瘤细胞及其产生的 SASP。

基于此,在本研究中,我们设计了一种在靶向并杀死肿瘤细胞的同时,又可以清除衰老肿瘤细胞、抑制其产生的 SASP 及克服 SASP 产生的不利影响,达到“一石二鸟”的治疗手段。该纳米粒子采用超高速离心的方法,从新鲜姜黄根茎中提取姜黄细胞外囊泡(CNV),通过共孵育的方式包载抗肿瘤化疗药物阿霉素(DOX),形成 CNV/DOX。采用后插入法 CNV/DOX 在表面修饰衰老肿瘤细胞表面高表达死亡受体 5 的抗体,最终获得 DR5-CNV/DOX 纳米粒子。

2.2 实验仪器与试剂

2.2.1 实验仪器

表 2.1 实验仪器

Tab. 2.1 Experimental instruments

实验仪器	厂家
超声清洗器(KUDOS)	上海科导超声仪器有限公司
超高速离心机	日本日立公司
真空干燥机	日本岛津公司
IR-960 傅里叶红外光谱仪	日本岛津公司
Malvern Zetasizer Nano ZS	英国 Malvern 公司
SZCL-2 磁力搅拌器	予华仪器有限责任公司
智能恒温培养振荡器	天津欧诺仪器股份有限公司
DYCZ-25E 蛋白质电泳仪	北京六一生物科技有限公司
QL-910 型涡旋振荡器	海林市其林贝尔仪器制造有限公司
BSA124S 电子天平	德国 Sartorius 公司
场发射透射电镜(TEM)	美国 FEI 公司
场发射扫描电子显微镜	美国 FEI 公司
Evolution 300 紫外可见分光光度计	赛默飞世尔科技(中国)有限公司

表 2.1 续
Tab. 2.1 Cont

实验仪器	厂家
Aquelix5 超纯水机	美国 Millipor 公司
化学发光凝胶成像仪	美国 BIO-RAD 公司

2.2.2 实验试剂与耗材

表 2.2 实验试剂与耗材
Tab. 2.2 Experimental reagents and consumables

实验试剂	厂家
盐酸阿霉素	北京酷尔化学科技有限公司
无水乙醇	天津大茂化学试剂厂
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -NH ₂	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
姜黄素	北京索莱宝生物科技有限公司
铜网	北京新兴百瑞技术有限公司
溴化钾(KBr)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
磷酸盐缓冲液(PBS)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
透析袋	北京索莱宝生物科技有限公司
苯甲磺酰氟(PMSF)	上海麦克林生化科技有限公司
0.25%胰酶-EDTA	赛默飞世尔科技(中国)有限公司
2%磷钨酸负染液	北京索莱宝生物科技有限公司
EDS,NHS	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
HEPES 缓冲溶液	上海碧云天生物技术公司
PAGE 凝胶快速制备试剂盒	上海雅酶生物医药科技有限公司
RAPI 强裂解液	上海碧云天生物技术公司
甲醇	天津大茂化学试剂厂
考马斯亮蓝 R-250 染色液	上海碧云天生物技术公司
Anti-DR5-antibody	美国圣克鲁斯生物技术公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	上海碧云天生物技术公司

2.3 实验方法

2.3.1 姜黄细胞外囊泡(CNV)的提取

从附近的农贸市场选取新鲜的姜黄根茎用清水清洗干净,进行搅碎榨汁。采取在 4℃ 下低转速 3000×g 离心 30 min 以去除细胞,采取在 4℃ 下低转速 10000×g 离心 60 min 以

去除细胞碎片，随后使用超高速离心机(Hitachi CP-NX, Japanese)在 4℃下超高速 150000×g 离心 90 min 以得到姜黄细胞外囊泡(CNV)。随后将其离心得到的 CNV 进行重悬，再次以超高速进行离心，以达到纯化 CNV 的目的。最后，将纯化的 CNV 重悬于 PBS 中，使用 BCA 试剂盒测定其蛋白浓度，采取冻干或者-80℃进行保存。

2.3.2 纳米粒子 CNV/DOX 的制备

为了制备 CNV/DOX，采取共孵育法进行载药，将 CNV 与 DOX 按照蛋白浓度与药物浓度比例 1:1 配置，取相同体积混合于圆底烧瓶中，将圆底烧瓶放置于智能恒温培养振荡器(Honour HNY-200B, China)。设置反应 37℃，转速 200 rpm，反应持续 2 h 后完成载药。将得到的 CNV/DOX、CNV 和 DOX 混合物在 4℃下超高速 130000×g 离心 90 min 以得到 CNV/DOX，并用 PBS 洗涤 3 次。

2.3.3 纳米粒子 DR5-CNV/DOX 的制备

为了制备 DR5-CNV/DOX，采取后插入法进行 CNV/DOX 的表面修饰。取 DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ (10.0 mg)溶解于稀释 100 倍的 HEPES 缓冲液中(10 mM HEPES, 135 mM NaCl, PH 7.3 Cell Culture Tested),在 60℃下溶解 15 min 形成胶束，将胶束以 10 μM 的振幅超声处理 2×5 s，以减小胶束尺寸，方便与 CNV/DOX 的反应结合。在 4℃下，加入摩尔比为 1:1 的 EDC 和 NHC 活化胶束中的氨基。然后，在 4℃下，将 Anti-DR5-antibody 与胶束以摩尔比 8.6:1000 结合过夜。接下来，在 40℃下，将 CNV/DOX 与胶束以 1:1 的比例(μg protein:μg protein)混合孵育 2 h，将其混合物放置于 4℃冷却后，进行超高速离心处理，得到离心产物即是 DR5-CNV/DOX。最后，收集纳米颗粒 DR5-CNV/DOX 并用 PBS 洗涤三次。

2.3.4 姜黄素标准曲线的绘制

配置 CUR 溶液 1 mg/mL 备用，分别稀释成一系列梯度浓度(0、1、2、3、5、10 μg/mL)，各梯度浓度分别取 1 mL 的溶液放入石英比色皿中，使用紫外可见分光光度计检测 425 nm 处的吸光值，根据对应浓度和吸光值，绘制标准曲线， $R^2 \geq 0.999$ 。

2.3.5 阿霉素标准曲线的绘制

配置 DOX 溶液 1 mg/mL 备用，分别稀释成一系列梯度浓度(0、0.01、0.03、0.05、0.07、0.1、0.15、0.2 mg/mL)，各梯度浓度分别取 1 mL 的溶液放入石英比色皿中，使用紫外可见分光光度计检测 488 nm 处的吸光值，根据对应浓度和吸光值，绘制标准曲线， $R^2 \geq 0.999$ 。

2.3.6 阿霉素载药率和包封率的测定

为了得到最佳的载药率和包封率，我们将 CNV:DOX（蛋白浓度：药物浓度）设定了 5:1、2:1、1:1、1:2、1:5 几个载药比例。按照上述步骤进行 DR5-CNV/DOX 纳米粒子的制备，收集所有载药上清，取 1 mL 注入石英比色皿中，使用紫外-可见分光光度计检测 488 nm 处的吸光值，根据 DOX 的标准曲线，可以计算出上清液的 DOX 浓度，根据上清液的总体积，可以计算出未负载到 CNV 中的 DOX 的质量，进而能够计算出负载到 CNV 上的 DOX 的质量。

$$\text{载药率(Drug Loading, DL)} = \frac{W_e}{W_m} \times 100\% \quad (2.1)$$

$$\text{包封率(Entrapment efficiency, EE)} = \frac{W_t - W_f}{W_t} \times 100\% \quad (2.2)$$

其中 W_e -为包封于载体内的药物质量， W_m -为含药载体的总质量， W_t -为加入药物的总质量， W_f -为游离药物的质量。

2.3.7 DR5-CNV/DOX 纳米粒子理化性质的表征

动态光散射 Malvern Zetasizer Nano ZS(Malvern,UK)分析测量纳米颗粒的水合粒径和表面 zeta 电位。透射电子显微镜(FEI Tecnai G2 F30)和扫描电子显微镜(Nova Nano SEM 450)表征纳米颗粒的形貌与尺寸。傅立叶变换红外光谱仪(FT-IR,Nicolet iN10 MX & iS10,ThermoFish)评估 DOX 的成功负载和表面 DR5 抗体的成功修饰。紫外-可见分光光度计(Theromo Scientific Instrument Co,Ltd)评估药物负载能力和药物释放能力。

2.3.8 DR5-CNV/DOX 纳米粒子表面抗体的检测

聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测 DR5-CNV/DOX 纳米颗粒膜蛋白保留情况。用 RAPI 强裂解液提取 DR5 抗体蛋白和 DR5-CNV/DOX 纳米颗粒的抗体蛋白。通过 BCA 试剂盒测定提取蛋白质的浓度，以此保证上样蛋白量一致。

蛋白样品和 5×loading buffer 按照 4:1 混合，100℃水浴煮沸 5 min，待样品冷却至室温加样。按照凝胶试剂盒步骤配置浓缩胶和分离胶，将 10 μL 样品加到 10%浓缩胶孔中，电泳设定恒定电压 110 V，当观测到溴酚蓝指示剂移动至凝胶底部时停止电泳。然后，使用考马斯亮蓝 R250 溶液染色 30 min，最后，脱色液脱色过夜后进行拍摄。

2.3.9 DR5-CNV/DOX 纳米粒子体外药物释放实验

为了研究 DR5-CNV/DOX 的释放行为，在 pH=7.4，pH=6.5，pH=5.3(分别模拟人体正常生理环境，肿瘤微环境，肿瘤溶酶体环境)条件下，采用透析法测定了 DR5-CNV/DOX 的释放量。简而言之，将 2 mL DR5-CNV/DOX 放置于透析袋(MW=14,000)中，两端扎紧，然后，将透析袋放入不同 pH 值含 0.1% (W/V) Tween 80 的 50 mL PBS 体系中，置于 37℃

的智能恒温振荡器上缓慢摇晃(100 r/min), 分别在 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 和 72 h, 取出 100 μ L 溶液, 同时加入同体积同温度的新鲜释放介质, 用紫外-可见分光光度计测量累积释放药物的量。

2.4 实验结果与讨论

2.4.1 CNV 纳米粒子的表征

通过超高速离心方法, 从新鲜姜黄根茎中提取 CNV。如图 2.1D 所示, CNV 悬浮液颜色呈现深棕色。使用扫描电子显微镜和透射电子显微镜对其形貌进行表征发现, CNV 呈现为茶托状, 有明显的磷脂双分子层, 粒径为 97 nm 左右(图 2.1A B)。通过马尔文激光粒度分析仪分析 CNV 水合粒径, 结果显示其水合粒径大约为 122 nm(图 2.1E)。这些结果表明我们成功从姜黄根茎中提取了 CNV。接下来, 将姜黄素标准品 CUR 和 CNV 进行紫外分析, 其紫外可见吸收光谱(图 2.1 C)结果表明, CNV 在 425 nm 处出现与 CUR 相同的紫外特征峰。将姜黄素标准品 CUR 和 CNV 进行红外分析, 傅里叶红外光谱(FT-IR)结果表明(图 2.1F), CNV 在 3504 cm^{-1} 处出现 Ph-OH 吸收波数, 在 1602 cm^{-1} 处出现 C=C 吸收波数, 这与姜黄素特征官能团的红外特征峰相同。图 2.2 对 CNV 进行质谱分析, 结果表明 CNV 的质荷比在 369.2 处有较强的吸收峰, 而姜黄素相对分子质量为 369。紫外、红外和质谱结果表明, 我们提取的 CNV 中含有姜黄素。

接下来, 我们对 CNV 内的姜黄素含量进行定量分析。通过 BCA 试剂盒绘制出蛋白标准曲线(图 2.3A), 随后测试出 CNV 中的蛋白含量。通过紫外分光光度计对不同浓度的姜黄素标准品进行光谱分析, 得到不同浓度的姜黄素标准品的紫外光谱图(图 2.3B), 并由此得到姜黄素标准品的标准曲线(图 2.3C)。通过紫外分光光度计测定 CNV 在 425 nm 下的 OD 值, 结合姜黄素标准品的标准曲线, 得到 CNV 中的姜黄素含量。最终, 我们得出 CNV 中的姜黄素含量为每 1mg 蛋白中含有 $13.55 \pm 1.624 \mu\text{g}$ 的姜黄素。

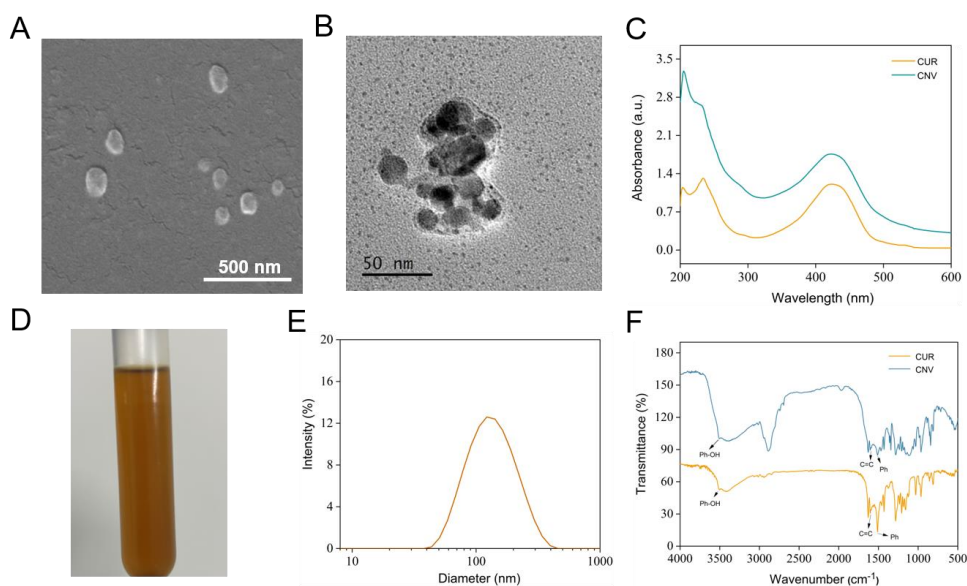


图 2.1 (A) CNV 的 SEM 图 (比例尺: 500nm)。 (B) CNV 的 TEM 图 (比例尺: 50nm)。 (C) CNV 和 CUR 的 UV-vis 吸收光谱。 (D) CNV 悬浮液图。 (E) CNV 的 DLS 粒径分布图。 (F) CNV 和 CUR 的 FT-IR 图。

Fig. 2.1 (A) SEM image of CNV (Scale: 500 nm). (B) TEM image of CNV (Scale: 50 nm). (C) UV-vis absorption spectra of CNV and CUR. (D) CNV suspension diagram. (E) DLS particle size distribution map plot of CNV. (F) FT-IR plots of CNV and CUR.

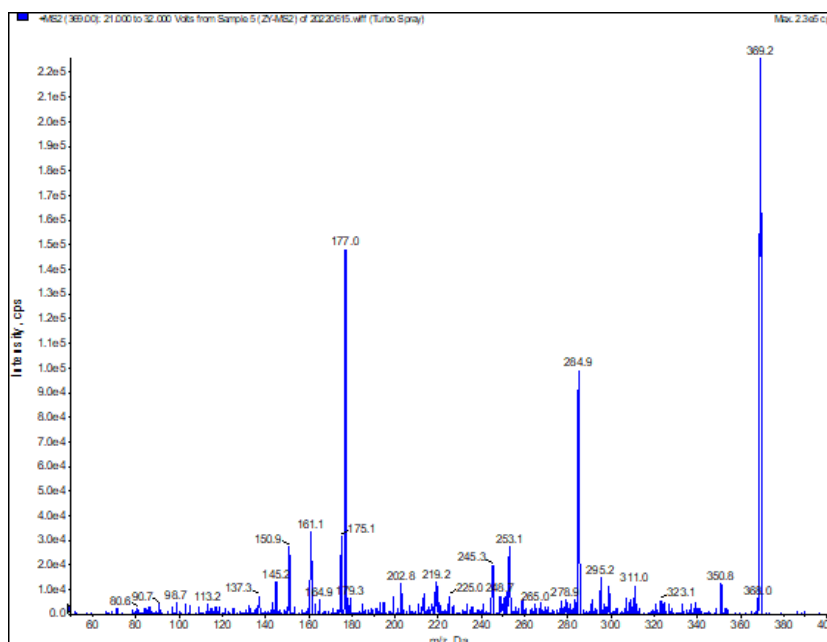


图 2.2 CNV 的质谱分析图。

Fig. 2.2 Plot of mass spectrometry analysis of CNV.

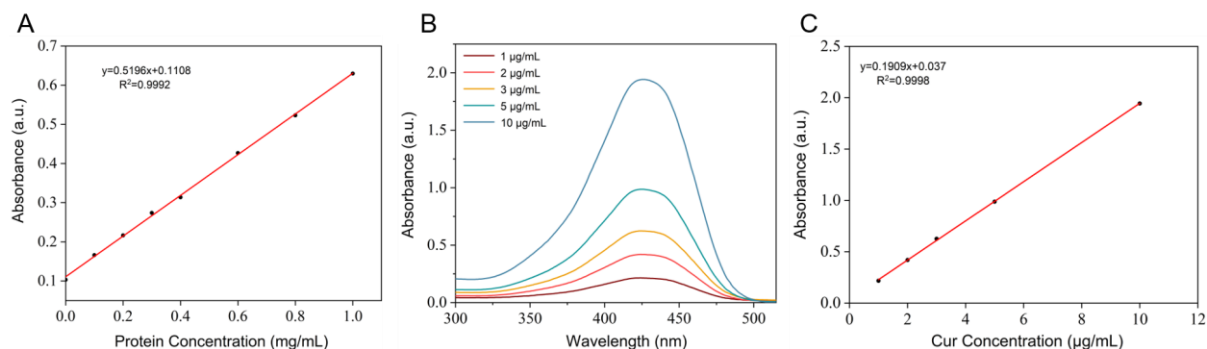


图 2.3 (A) 蛋白标准曲线图。(B) 不同浓度 CUR UV-vis 吸收光谱图。(C) CUR 标准曲线图。

Fig. 2.3 (A) Protein standard curve graph. (B) UV-vis absorption spectra of different concentrations of CUR. (C) CUR standard curve.

2.4.2 DR5-CNV/DOX 纳米粒子的表征

在对 CNV 表征之后，我们采用共孵育的方法，将 DOX 包载进入 CNV 中，得到 CNV/DOX。随后，将 DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ 在 60℃ 下溶解自组装形成胶束，表面氨基与 DR5 抗体上的羧基，形成稳定的酰胺键，形成 DSPE-PEG₂₀₀₀-DR5。最后，采用后插入法将 DSPE-PEG₂₀₀₀-DR5 与 CNV/DOX 反应，获得最终的纳米粒子 DR5-CNV/DOX。如图 2.4A,B 所示，SEM 和 TEM 图像显示 DR5-CNV/DOX 呈现成球状，平均粒径大约为 180 nm。DLS 测量结果表明流体动力学直径从 CNV 的 122 nm 增加到 DR5-CNV/DOX 的 190 nm (图 2.4C)。表面电位测量结果显示从 CNV 的 -12.15 mV 增加到 DR5-CNV/DOX 的 -9.39 mV (图 2.4D)。

在载药过程中，我们通过紫外分光光度计对不同浓度的阿霉素标准品进行光谱分析，得到不同浓度的阿霉素标准品的紫外光谱图(图 2.5A)，并由此得到阿霉素标准品的标准曲线(图 2.5B)。并且为了得到最佳的载药率(公式 2.1)和包封率(公式 2.2)，我们将 CNV:DOX (µg:µg) 设定了 5:1、2:1、1:1、1:2、1:5 不同的载药比例，实验结果显示当 CNV:DOX (µg:µg) 为 1:1 时 CNV 有较高的载药率和包封率，其中载药率为 $38.39 \pm 1.626\%$ ，包封率为 $62.43 \pm 4.2937\%$ (图 2.5C)。

随后，我们探索了 DR5-CNV/DOX 在体内的稳定性，将 DR5-CNV/DOX 置于 PBS 缓冲溶液中，室温放置一周，测量其粒径和电位变化。如图 2.7 所示，DR5-CNV/DOX 粒径和电位基本没有发生变化，表明 DR5-CNV/DOX 有良好的体外稳定性。

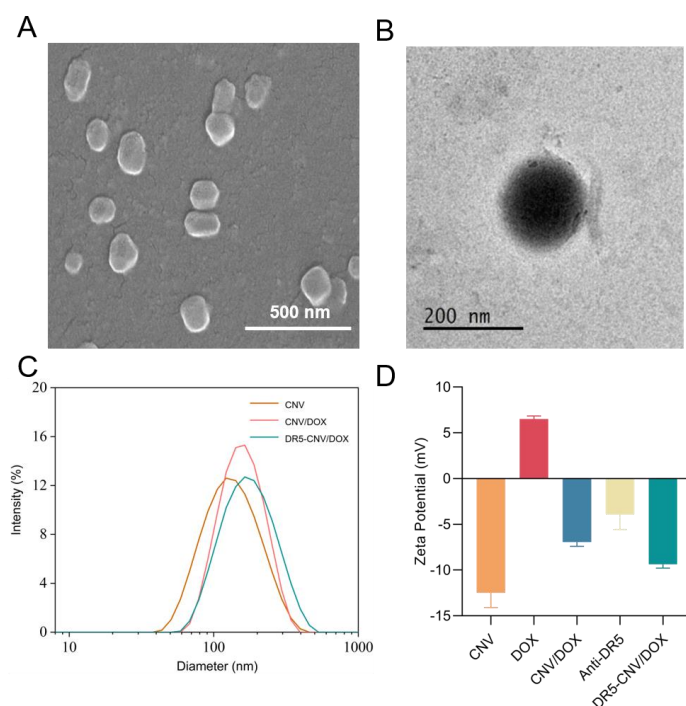


图 2.4 (A) DR5-CNV/DOX 的 SEM 图 (比例尺: 500 nm)。 (B) DR5-CNV/DOX 的 TEM 图 (比例尺: 200 nm)。 (C) CNV、CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 的 DLS 粒径分布图。 (D) CNV、DOX、Anti-DR5、CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 的 Zeta 电位分布图。数据表示为平均值 $\pm$ SD ($n = 3$)。

Fig. 2.4 (A) SEM image of DR5-CNV/DOX (Scale: 500 nm). (B) TEM image of DR5-CNV/DOX (Scale: 200 nm). (C) DLS particle size distribution maps of CNV, CNV/DOX and DR5-CNV/DOX. (D) Zeta potential distribution maps of CNV, DOX, Anti-DR5, CNV/DOX and DR5-CNV/DOX. Data are represented as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

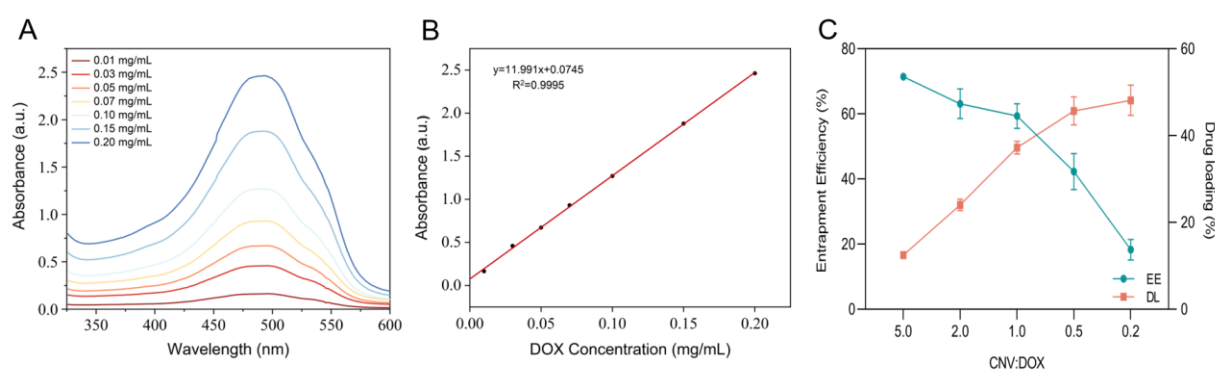


图 2.5 (A) 不同浓度 DOX UV-vis 吸收光谱图。 (B) DOX 标准曲线图。

(C) 不同比例 CNV: DOX 的载药率和包封率图。数据表示为平均值 $\pm$ SD ($n = 3$)。

Fig. 2.5 (A) UV-vis absorption spectra of different concentrations of DOX. (B) DOX standard curve graph. (C) Plot of loading and encapsulation rates of different ratios of CNV:DOX. Data are represented as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

为了证明 DOX 的负载和表面 DR5 抗体修饰成功,我们对 DR5-CNV/DOX 进行了紫外光谱、红外光谱和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)实验分析。如图 2.6A 紫外光谱分析结果显示,姜黄素在 425 nm 左右出现特征峰,阿霉素在 488 nm 左右出现特征峰,而 DR5-CNV/DOX 在 450 nm 附近出现最大吸收波长,我们推测这是姜黄素与阿霉素特征的重叠,造成最大吸收波长的迁移。红外光谱分析结果显示,DR5-CNV/DOX 出现酚羟基(3506 cm^{-1})、氨基(3531 cm^{-1})、羟基(3323 cm^{-1})、羰基(1730 cm^{-1})等特征峰,这与姜黄素和阿霉素特征官能团的 FT-IR 光谱特征峰类似,这些结果表明,DOX 成功负载到 CNV 中。同时,DR5-CNV/DOX 出现酰胺键(1760 cm^{-1})特征峰可以表明 DR5 抗体成功修饰到纳米粒子表面(图 2.6B)。SDS-PAGE 结果显示,DR5-CNV/DOX 出现与 DR5 抗体相似的特征蛋白条带印迹,这也佐证了 DR5 抗体表面修饰成功(图 2.6C)。

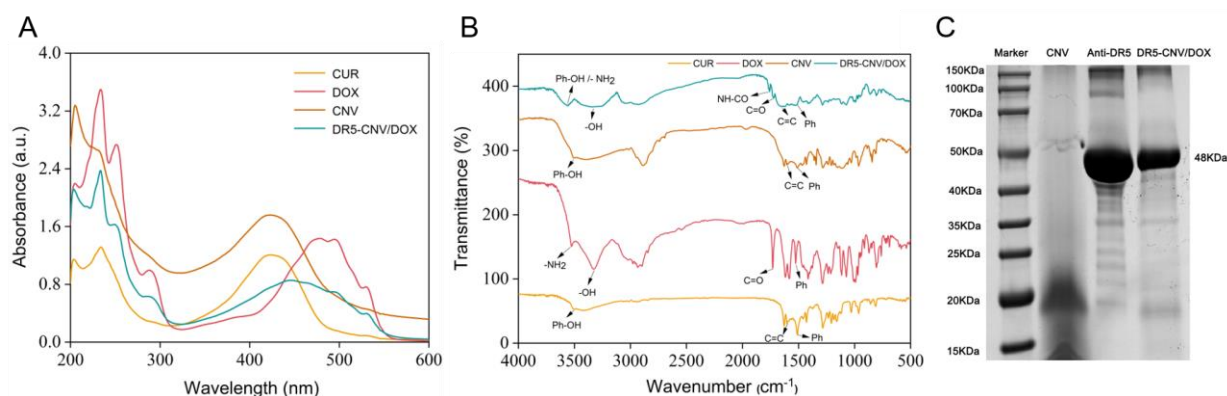


图 2.6(A)CUR、DOX、CUR 和 DR5-CNV/DOX 的 UV-vis 吸收光谱图。(B)CUR、DOX、CUR 和 DR5-CNV/DOX 的 FT-IR 图。(C)CNV、Anti-DR5 和 DR5-CNV/DOX 的 SDS-PAGE 蛋白分析图。

Fig. 2.6 (A) UV-vis absorption spectra of CUR, DOX, CUR and DR5-CNV/DOX. (B) FT-IR plots of CUR, DOX, CUR and DR5-CNV/DOX. (C) SDS-PAGE protein analysis plots of CNV, Anti-DR5 and DR5-CNV/DOX.

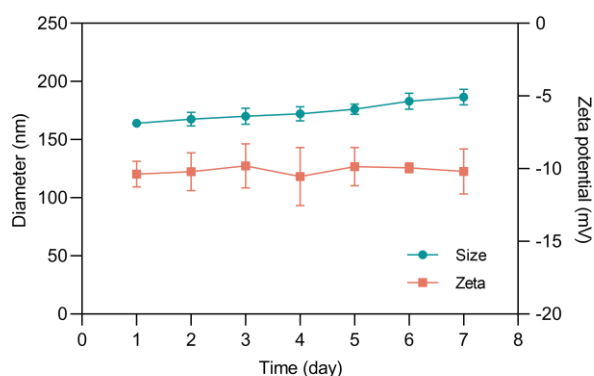


图 2.7 DR5-CNV/DOX 在一周之内的 Size 和 Zeta 变化。数据表示为平均值 $\pm$ SD ($n = 3$)。

Fig. 2.7 Size and Zeta changes of DR5-CNV/DOX over the course of a week. Data are represented as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

2.4.3 DR5-CNV/DOX 的体外药物释放

为了确定 DR5-CNV/DOX 中的 DOX 释放量,在 pH=7.4, pH=6.5, pH=5.3 的条件下,将 DR5-CNV/DOX 溶液置于透析袋(MW=14,000)中,模拟探究其在体内 72 h 内的释药行为。药物释放曲线显示,随着 pH 值的降低 DOX 释放率不断加,当 pH=5.3 时, DOX 释放率为 80.31%, 当 pH=6.5 时, DOX 释放率为 58.67%, 当 pH=7.4 时, DOX 释放率为 45.95%, 并都在 48 h 时趋于稳定(图 2.8)。药物释放结果说明, DR5-CNV/DOX 有良好的药物释放率,并且在肿瘤微环境,溶酶体环境中比正常生理环境有更高的药物释放率。

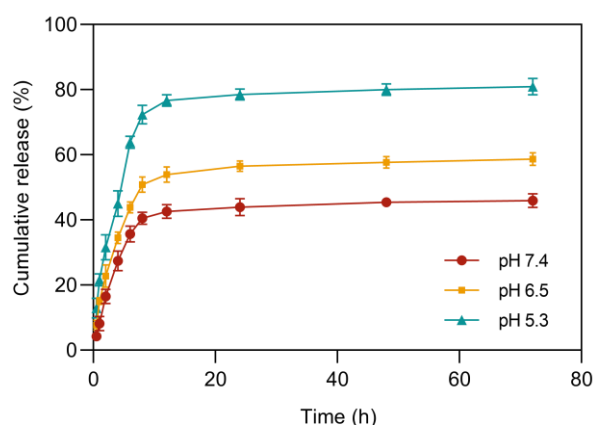


图 2.8 DR5-CNV/DOX 在 pH =7.4, pH=6.5 和 pH=5.3 PBS 中的 DOX 体外释放曲线。数据表示为平均值 $\pm$ SD ($n = 3$)。

Fig. 2.8 In vitro DOX release profiles of DR5-CNV/DOX in pH = 7.4, pH = 6.5 and pH = 5.3 PBS. Data are represented as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

2.5 本章小结

在传统癌症的治疗中,人们往往忽视治疗诱导的衰老所形成衰老肿瘤细胞和 SASP。针对治疗诱导的衰老所产生的衰老肿瘤细胞和 SASP,在本章中,我们成功制备了 CNV 包载 DOX,表面修饰 DR5 抗体的 DR5-CNV/DOX 纳米粒子。首先,采用超高速离心从姜黄根茎中提取 CNV,采用共孵育的方式,将 DOX 包载进入 CNV 中,获得 CNV/DOX。随后,采用后插入法将 DR5 抗体修饰到 CNV/DOX 表面,获得 DR5-CNV/DOX。采用 SEM、TEM、DLS、UV-vis、FT-IR 和 SDS-PAGE 等表征手段对其形貌、粒径、表面电位、载药率与包封率、稳定性和释药率等进行了表征。

通过 SEM 和 TEM 表征可知, CNV 呈现为具有明显磷脂双分子层的茶托状, DR5-CNV/DOX 呈现为球状。由于负载药物和表面修饰的原因,流体动力学直径从 CNV 的 122 nm 增加到 DR5-CNV/DOX 的 190 nm,表面电位从 CNV 的 -12.15 mV 增加到 DR5-CNV/DOX 的 -9.39 mV。紫外和红外表征证明了 CNV 中含有姜黄素,且表明 CNV 成功负载了 DOX。DR5-CNV/DOX 的红外光谱分析出现酰胺键特征峰且 SDS-PAGE 蛋白分析显示 DR5-CNV/DOX 出现有 DR5 抗体相似的条带,说明了 DR5 抗体表面修饰成功,为 DR5-CNV/DOX 具有靶向肿瘤细胞和衰老肿瘤细胞能力提供了理论依据。对其载药率和包封率探索发现,当 CNV:DOX 为 1:1 时有较高的载药率和包封率。DR5-CNV/DOX 一周内的粒径和表面电位没有明显变化,证明其具有良好的稳定性。此外, DR5-CNV/DOX 的释药结果说明其具有良好的药物释放率,尤其当 pH 值降低时其释药率增加。

综上所述,我们成功合成并表征了 DR5-CNV/DOX,其具有良好的流体动力学直径、载药率、包封率、稳定性和释药率。下一步对其体外和体内的抗肿瘤作用效果进行探究。

3 衰老肿瘤细胞模型的建立与验证

3.1 概述

在传统的癌症治疗过程中,大多采用化疗等方式对肿瘤细胞进行杀伤。其中一部分肿瘤细胞被直接杀死,另一部分肿瘤细胞会表现为:激活凋亡程序或者进入一种永久的细胞周期阻滞状态,称为治疗诱导的衰老(TIS)。衰老肿瘤细胞自身衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)表达增加,衰老标志蛋白 p16、p21、p53 表达增加,持续激活抗凋亡蛋白如 BCL-2 家族或抑制促凋亡蛋白如 BAX 来对凋亡刺激产生抵抗并持续分泌 SASP。

为了探索 DR5-CNV/DOX 对衰老肿瘤细胞的影响,我们在体外构建了衰老 MCF-7 模型。本章通过探究不同的给药浓度和给药时间来确定诱导最佳的衰老 MCF-7 细胞条件。将 MCF-7 细胞给药孵育一定时间后,采用衰老 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色,Western blotting 实验验证衰老标志蛋白 p16、p21、p53 等蛋白的表达情况,以确定诱导衰老 MCF-7 细胞模型的成功。

3.2 实验仪器与试剂

3.2.1 实验仪器

表 3.1 实验仪器

Tab. 3.1 Experimental instruments

实验仪器	厂家
CO ₂ 细胞培养箱	美国 Thermo Electron 公司
超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
台式离心机	美国 ThermoFisher 公司
BS202 生物显微镜	重庆光电仪器有限公司
倒置荧光显微镜	德国 Lecica 公司
热电偶温度传感器	中国乐清朗本电气有限公司
化学发光成像分析仪	北京百晶生物技术公司
SX-500 全自动灭菌锅	日本 TOMY 公司
各种规格移液器	Eppendorf
DYCZ-25E 蛋白质电泳仪	北京六一生物科技有限公司
智能恒温培养振荡器	天津欧诺仪器股份有限公司

3.2.2 实验试剂与耗材

表 3.2 实验试剂与耗材

Tab. 3.2 Experimental reagents and consumables

实验材料	厂家
双抗(青霉素、链霉素)	上海碧云天生物技术有限公司
RAPI 强裂解液	上海碧云天生物技术有限公司
0.25%胰酶-EDTA	上海碧云天生物技术有限公司
胎牛血清(FPS)	美国 HyClone 公司
RPMI 1640 细胞培养基	赛默飞世尔科技(中国)有限公司
DMEM 细胞培养基	赛默飞世尔科技(中国)有限公司
MCF-7 细胞系	中国医学科学院基础医学研究所
细胞培养瓶与离心管	美国 Coning 公司
6 孔板、12 孔板、24 孔板, 96 孔板	美国 Coning 公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
p16 兔源单克隆抗体	上海碧云天生物技术有限公司
p21 兔源单克隆抗体	上海碧云天生物技术有限公司
p53 兔源单克隆抗体	上海碧云天生物技术有限公司
BCL-2 兔源单克隆抗体	杭州华安生物技术有限公司
BCL-XL 兔源单克隆抗体	杭州华安生物技术有限公司
BAX 兔源单克隆抗体	杭州华安生物技术有限公司
DR5 兔源单克隆抗体	美国 Santa Cruz 生物技术有限公司
β -actin 兔源单克隆抗体	上海碧云天生物技术有限公司
山羊抗兔 IgG 二抗	北京博奥龙免疫技术有限公司
甲醇	天津大茂化学试剂厂
脱脂奶粉	北京索莱宝生物科技有限公司
PAGE 凝胶快速制备试剂盒	上海雅酶生物医药科技有限公司
细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
盐酸阿霉素	北京酷尔化学科技有限公司
二甲基亚砜	北京索莱宝生命与技术有限公司

3.3 实验方法

3.3.1 细胞培养

本研究中使用的人乳腺癌(MCF-7)细胞系购自中国科学院基本医学研究所(中国北京)。将 MCF-7 细胞培养在含有 10%胎牛血清, 1%青霉素和链霉素(100 U/mL)的 DMEM

培养基中培养，培养在含有 5% CO₂，恒定温度 37°C 的细胞培养箱中。

3.3.2 细胞传代

通过显微镜观察 MCF-7 细胞密度情况，当 MCF-7 细胞密度达到 70%-80% 左右，对其进行细胞传代。吸取细胞上清，用预热的 PBS 缓冲溶液清洗 1 次，加入 1 mL 胰酶，将 MCF-7 细胞放入细胞培养箱中消化 1 min，从培养箱中取出 MCF-7 细胞，轻轻敲打培养瓶外壁并使用移液枪吹打，将 MCF-7 细胞完全消化下来。将消化下来的 MCF-7 细胞加入到 3 mL 培养基中终止消化，1000×g 离心 5 min，离心后的 MCF-7 细胞沉淀用 1 mL 培养基重悬，取适量 MCF-7 细胞重新加入到培养瓶中继续培养。

3.3.3 细胞冻存

取形态良好，处于对数生长期的 MCF-7 细胞，对其消化、离心、计数。采用 90% 胎牛血清和 10% DMSO(细胞级)比例配置细胞冻存液，根据 MCF-7 细胞数量加入对应比例的冻存液，使细胞密度维持在 300-500 w/mL。将每管分装 1-1.5 mL 含 MCF-7 细胞的冻存液，拧紧盖管，做好标记。分装好的冻存管转入冻存盒中放入 -80°C 过夜。第二天，从 -80°C 冰箱取出冻存管迅速转移到液氮长期保存。

3.3.4 细胞复苏

提前准备好 10 mL DMEM 完全培养基，从液氮中快速取出相应细胞的冻存管。在提前预热的水浴锅中快速振动，使其迅速解冻。将消融的 MCF-7 细胞悬液加入 10 mL DMEM 完全培养基中，1000×g 离心 5 min，离心后的 MCF-7 细胞沉淀用 1 mL 培养基重悬，将重悬的 MCF-7 细胞重新加入到培养瓶中培养。

3.3.5 建立衰老 MCF-7 细胞模型

用不同浓度的 DOX (0.5 μM, 1 μM, 3 μM) 来探索诱导 MCF-7 细胞衰老最佳的药物浓度和给药时间。实验探究发现，当 MCF-7 细胞密度在 60-70% 时，采用浓度为 1 μM DOX 刺激 MCF-7 细胞 2 h，接着培育细胞 5-7 天，诱导的 MCF-7 细胞可以获得较好衰老效果。

3.3.6 SA-β-Gal 染色

通过使用细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色试剂盒对诱导的衰老 MCF-7 细胞进行染色表征。吸除采用上述方法诱导的衰老 MCF-7 细胞上清液，用 PBS 洗涤 2 次，每孔加入 1 mL β-半乳糖苷酶染色固定液，室温固定 15 min。吸除细胞固定液，用 PBS 洗涤 3 次，每次 3 分钟，每孔加入 1 mL 染色工作液。细胞在 37°C 下，避光孵育过夜。普通显微镜

下观察细胞染色情况。

3.3.7 蛋白免疫印迹实验

通过 Western blotting 实验验证衰老标志蛋白的表达情况。将不同浓度 DOX (0 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 3 μ M) 诱导的 MCF-7 细胞置于冰上用 RAPI 强裂解液进行裂解, 用细胞刮刀将其从 6 孔板中刮下来, 在 4°C 下 12000 $\times$ g 离心 10 min, 取上清。通过 BCA 试剂盒测定提取的蛋白浓度, 将蛋白样品和 5 $\times$ loading buffer 按照 4:1 混合, 100°C 水浴煮沸 5 min, 待样品冷却至室温后加样。在恒压 110 V 下, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳将蛋白分离, 将使用甲醇活化的 PVDF 膜覆盖于胶上, 在恒流 200 mA 下, 进行转膜。转膜完成后, 将 PVDF 膜用 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 用 TBST 溶液洗涤 3 次后, 每次 10 min, 4°C 孵育 p16、p21、p53、BCL-2、BCL-XL、BAX 和 β -actin 的一抗中过夜。接下来, 用 TBST 溶液洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 15 min, 用 HRP 二抗室温孵育 1 h, 再用 TBST 溶液洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入 ECL 发光液, 在化学发光成像分析仪下曝光, 使目标蛋白带可视化。

3.3.8 统计学分析

实验数据处理中, 采用学生 t 检验以评估统计学显著性(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$), 并且实验数据以平均值 $\pm$ 标准偏差的方式表示。

3.4 实验结果与讨论

3.4.1 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色分析

为了建立衰老肿瘤细胞模型, 我们通过探究给药浓度与给药时间等因素来确定最佳的诱导衰老条件。我们使用不同浓度的 DOX(0.5 μ M, 1 μ M, 3 μ M) 对正常 MCF-7 细胞进行刺激, 采取 DOX 刺激 MCF-7 细胞不同时间。我们通过探索发现, 采用浓度为 1 μ M DOX 刺激 MCF-7 细胞 2 h, 接着培育细胞 5-7 天, 诱导的 MCF-7 细胞可以获得较好衰老效果。使用 SA- β -Gal 染色试剂盒可以将衰老特异性的 β -半乳糖苷酶催化产生深蓝色产物。SA- β -Gal 染色实验结果表明, 当 DOX 浓度 1 μ M 时, 有更多的深蓝色产物生成, 细胞核变大, 肿瘤细胞形态呈现更加明显的扁平状(图 3.1)。

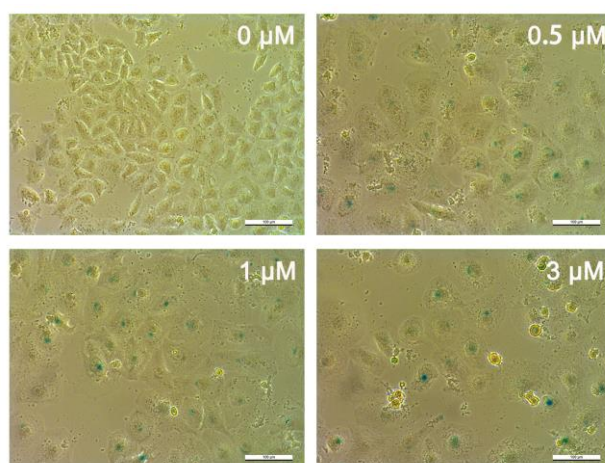


图 3.1 不同浓度 DOX 诱导的衰老 MCF-7 细胞 SA-β-Gal 染色图 (比例尺: 100 μm)。

Fig. 3.1 SA-β-Gal staining of senescent MCF-7 cells induced by different concentrations of DOX (Scale: 100 μm).

3.4.2 衰老相关蛋白的表达分析

接下来, 我们通过 Western blot 来验证衰老标志蛋白 p16、p21 和 p52 的表达情况, 我们发现当 DOX 浓度 1 μM 时, 衰老标志蛋白 p16、p21 和 p52 表达量最高, 右图是蛋白量化图(图 3.2A B)。

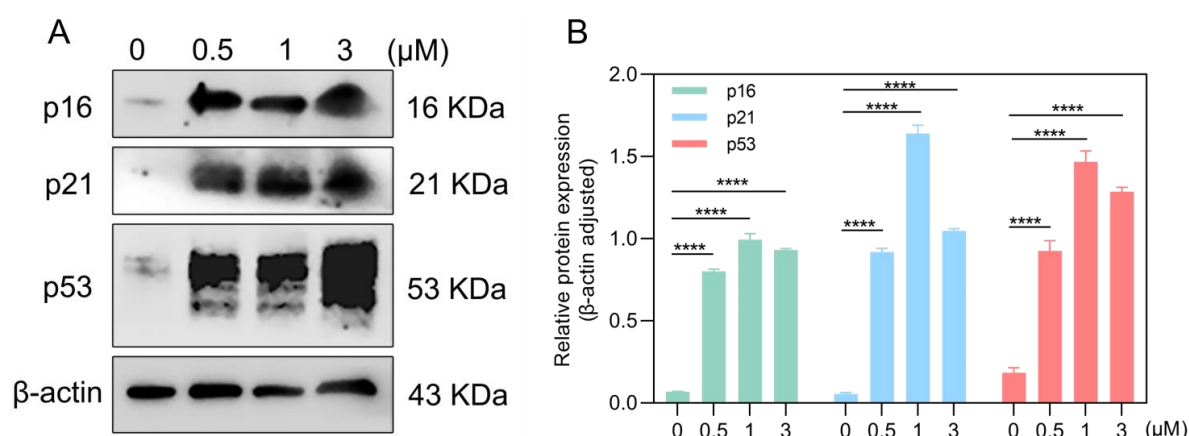


图3.2 (A) 不同浓度DOX诱导MCF-7的衰老标志蛋白(p16、p21和p53)表达情况。(B) 不同浓度DOX诱导MCF-7的衰老标志蛋白(p16、p21和p53)表达情况的量化分析。数据表示为平均值±SD (n = 3)。(*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001, ****, P < 0.0001)。

Fig. 3.2 (A) Expression of senescence marker proteins (p16, p21 and p53) induced by different concentrations of DOX. (B) Quantitative analysis of the expression of senescence marker proteins (p16, p21 and p53) induced by different concentrations of DOX. Data are represented as mean ± SD (n = 3). (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001, ****, P < 0.0001).

衰老肿瘤细胞相较于正常肿瘤细胞对于化疗药物刺激变得不敏感,这是由于衰老肿瘤细胞中 BCL-2 和 BCL-XL 等抗凋亡蛋白的表达增加,而促凋亡蛋白 BAX 表达下降导致的。随后,我们通过 Western blot 来验证衰老肿瘤细胞蛋白抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白的表达情况,实验结果表明,在衰老肿瘤细胞中抗凋亡蛋白 BCL-2 和 BCL-XL 表达明显上升,促凋亡蛋白 BAX 表达明显下降(图 3.3A B)。DR5 在衰老肿瘤细胞中高表达,而在正常肿瘤细胞中表达量低。因此, Anti-DR5 可以发挥靶向衰老肿瘤细胞的作用,并且有着介导衰老肿瘤细胞凋亡的作用。随后,我们通过 Western blot 来验证衰老肿瘤细胞 DR5 蛋白的表达情况,实验结果表明,相较于正常肿瘤细胞,衰老肿瘤细胞中 DR5 表达量增加(图 3.3C D)。这些结果代表我们成功建立了衰老肿瘤细胞模型。

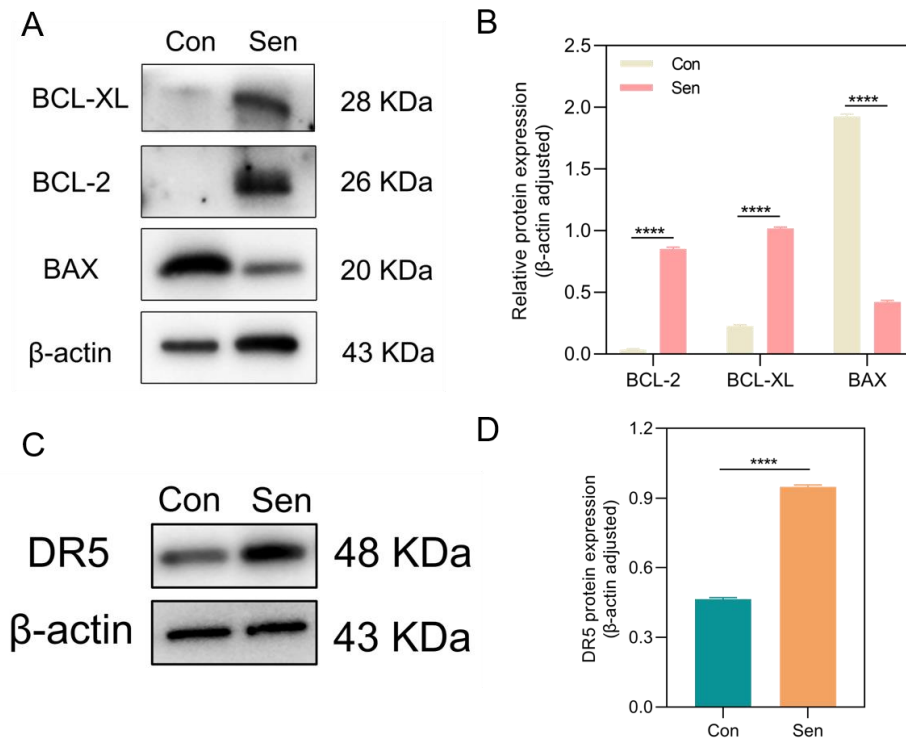


图 3.3 (A) MCF-7 和衰老 MCF-7 细胞中抗凋亡 BCL-2 蛋白家族表达情况。(B) MCF-7 和衰老 MCF-7 细胞中抗凋亡 BCL-2 蛋白家族表达情况的量化分析。(C) MCF-7 和衰老 MCF-7 细胞中 DR5 蛋白表达情况。(D) MCF-7 和衰老 MCF-7 细胞中 DR5 蛋白表达情况的量化分析。数据表示为平均值 $\pm$ SD ($n = 3$)。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$)。

Fig. 3.3 (A) Expression of anti-apoptotic BCL-2 protein family in MCF-7 and senescent MCF-7 cells. (B) Quantitative analysis of anti-apoptotic BCL-2 protein family expression in MCF-7 and senescent MCF-7 cells. (C) DR5 protein expression in MCF-7 and senescent MCF-7 cells. (D) Quantitative analysis of DR5 protein expression in MCF-7 and senescent MCF-7 cells. Data are represented as mean $\pm$ SD ($n = 3$). (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$).

3.5 本章小结

在传统的癌症治疗中，肿瘤细胞容易受到持续的刺激，转变成衰老肿瘤细胞，研究表明衰老肿瘤细胞会对传统治疗产生抗性，不易发生凋亡，持续分泌 SASP，造成促炎的肿瘤微环境，加速肿瘤的转移与侵袭。为了验证我们制备的 DR5-CNV/DOX 对清除衰老肿瘤细胞和克服其产生的 SASP，我们在体外构建了衰老 MCF-7 细胞模型。经过不断对给药浓度和给药时间的探索，我们诱导出了最佳的衰老 MCF-7 细胞。我们采用了 SA- β -Gal 染色对衰老 MCF-7 细胞进行验证，我们发现 1 μ M DOX 诱导的衰老 MCF-7 细胞体积变大，有更多的深蓝色产色生成。我们采用 Western blot 来验证不同浓度 DOX 诱导的衰老 MCF-7 细胞中衰老标志蛋白 p16、p21 和 p52 的表达情况，结果发现 1 μ M DOX 诱导的衰老 MCF-7 细胞 p16、p21 和 p52 有更高的蛋白表达。接下来，我们验证了衰老肿瘤细胞的抗凋亡 BCL-2 蛋白家族的表达，结果表明相较于 MCF-7 细胞，衰老 MCF-7 细胞抗凋亡蛋白 BCL-2 和 BCL-XL 表达增加，而促凋亡蛋白 BAX 表达减少，正是因为此原因，所以衰老肿瘤细胞变得对刺激不敏感，产生凋亡抗性。随后，我们验证了 DR5 在衰老肿瘤细胞上的表达，结果表明相较于 MCF-7 细胞，衰老 MCF-7 细胞中 DR5 有更高的表达，这表明我们制备的 DR5-CNV/DOX 可以更好的实现对衰老肿瘤细胞的靶向。

以上结果表明我们成功诱导出了衰老 MCF-7 细胞模型，并且确定在 1 μ M DOX 刺激时，MCF-7 细胞有最佳衰老状态。为接下来探究 DR5-CNV/DOX 对衰老肿瘤细胞的作用创造了条件。

4 DR5-CNV/DOX 的体外抗肿瘤作用研究

4.1 概述

在成功制备 DR5-CNV/DOX 和构建衰老 MCF-7 细胞模型后,本章通过一系列体外实验来探究 DR5-CNV/DOX 的抗肿瘤效果。其中体外实验选用 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞作为研究对象,采取细胞摄取实验来探究 DR5-CNV/DOX 对 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞的靶向能力,采用 CCK-8 法评估 DR5-CNV/DOX 对 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞的细胞毒性作用,采用 Western blot 来探究 CNV 对衰老 MCF-7 细胞抗凋亡的抑制作用,进一步采用 ELISA 实验来探究 DR5-CNV/DOX 对衰老 MCF-7 细胞产生的 SASP 的抑制作用,最后通过溶血实验来评估 DR5-CNV/DOX 的生物相容性。

4.2 实验仪器与试剂

4.2.1 实验仪器

表 4.1 实验仪器

Tab. 4.1 Experimental instruments

实验仪器	厂家
CO ₂ 细胞培养箱	美国 Thermo Electron 公司
超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
台式离心机	美国 ThermoFisher 公司
BS202 生物显微镜	重庆光电仪器有限公司
TCS SP8 激光共聚焦荧光显微镜	德国 Lecica 公司
FACS Calibur 流式细胞仪	美国 BD 公司
化学发光成像分析仪	北京百晶生物技术公司
SX-500 全自动灭菌锅	日本 TOMY 公司
各种规格移液器	Eppendorf
DYCZ-25E 蛋白质电泳仪	北京六一生物科技有限公司
智能恒温培养振荡器	天津欧诺仪器股份有限公司
Synergy H1 酶标仪	美国伯腾仪器有限公司(BioTek)

4.2.2 实验试剂与耗材

表 4.2 实验试剂与耗材

Tab. 4.2 Experimental reagents and consumables

实验材料	厂家
双抗(青霉素、链霉素)	上海碧云天生物技术有限公司
RAPI 强裂解液	上海碧云天生物技术有限公司
0.25%胰酶-EDTA	上海碧云天生物技术有限公司
胎牛血清(FPS)	美国 HyClone 公司
Cell Counting Kit-8(CCK-8 试剂盒)	美国 ApexBio 生物公司
RPMI 1640 细胞培养基	赛默飞世尔科技(中国)有限公司
DMEM 细胞培养基	赛默飞世尔科技(中国)有限公司
MCF-7 细胞系	中国医学科学院基础医学研究所
细胞培养瓶与离心管	美国 Coning 公司
6 孔板、12 孔板、24 孔板、96 孔板	美国 Coning 公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
BCL-2 兔源单克隆抗体	杭州华安生物技术有限公司
BCL-XL 兔源单克隆抗体	杭州华安生物技术有限公司
BAX 兔源单克隆抗体	杭州华安生物技术有限公司
β -actin 兔源单克隆抗体	上海碧云天生物技术有限公司
山羊抗兔 IgG 二抗	北京博奥龙免疫技术有限公司
4%多聚甲醛	上海碧云天生物技术有限公司
甲醇	天津大茂化学试剂厂
脱脂奶粉	北京索莱宝生物科技有限公司
PAGE 凝胶快速制备试剂盒	上海雅酶生物医药科技有限公司
盐酸阿霉素	北京酷尔化学科技有限公司
二甲基亚砷	北京索莱宝生命与技术有限公司
DAPI(4, 6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐)	北京索莱宝生命与技术有限公司
抗荧光淬灭封片剂	上海碧云天生物技术有限公司
IL-6 酶联免疫吸附试剂盒	武汉 Elabscience 生物科技有限公司
CCL-2 酶联免疫吸附试剂盒	武汉 Elabscience 生物科技有限公司
MMP-3 酶联免疫吸附试剂盒	武汉 Elabscience 生物科技有限公司
抗凝血常规管分离采集器	河北康卫仕医疗科技有限公司

4.3 实验方法

4.3.1 细胞培养相关实验

关于细胞培养、细胞传代、细胞冻存和细胞复苏与上述一致，本段不再过多叙述。

4.3.2 细胞摄取实验

为了检测细胞对不同实验组的摄取能力，采用流式细胞术测定和激光共聚焦显微镜(CLSM)观察。由于 DOX 本身激发红色荧光，所以我们采用 DOX 来标记 DR5-CNV/DOX，以研究不同实验组(PBA、DOX、CNV/DOX、DR5+DR5-CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX)对 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞的靶向能力。对于定量分析，将 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞培育于 6 孔板中(600,000 细胞/孔)，用培养基中含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX 的不同实验组来在 37°C 下孵育 3 h (DR5+DR5CNV/DOX 组提前加入 DR5 抗体以达到封闭 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞上的 DR5 受体效果)，用 PBS 洗涤细胞 3 次，用胰蛋白酶消化并离心得到各实验组细胞。通过流式细胞术分析各实验组细胞中荧光强度以反映 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞对不同实验组的摄取情况。对于定性分析，将 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞培育于 24 孔板中的爬片上(100,000 细胞/孔)，用培养基中含有 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX 的不同实验组来在 37°C 下孵育 3 h (DR5+DR5CNV/DOX 组提前加入 DR5 抗体以达到封闭 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞上的 DR5 受体效果)，用 PBS 洗涤细胞 3 次，用 4%多聚甲醛固定细胞，细胞核用 DAPI (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 染色，将爬片取出放到滴加抗荧光猝灭剂的载玻片上。最后，通过 CLSM 分析各实验组细胞中荧光强度以反映 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞对不同实验组的摄取情况。

4.3.3 体外细胞毒性实验

为了评估不同实验组对 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞的杀伤作用，我们采用了 CCK-8 实验。在探究不同实验组对 MCF-7 细胞的作用时，将 MCF-7 细胞培育于 96 孔板中(10,000 细胞/孔)，每孔加入 100 μL 含有不同浓度 DOX (0、0.1、0.3、0.5、0.7、1、3 和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的各实验组(DOX、CNV、CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX)，加药孵育 48 h 后，去除含药培养基，用 PBS 清洗 3 次，每孔加入 100 μL 的 CCK-8 配制工作液(90 μL 基本培养基+10 μL CCK-8)后在培育 1 h，然后将 96 孔板放入酶标仪中，在 450 nm 处测量吸光度。

在探究 DR5-CNV/DOX 对 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞的作用时，我们将 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞培育于 96 孔板中(10,000 细胞/孔)，每孔加入 100 μL 含有不同浓度 DOX (0、0.1、0.3、0.5、0.7、1 和 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 DR5-CNV/DOX，加药孵育 48 h

后, 去除含药培养基, 用 PBS 清洗 3 次, 每孔加入 100 μ L 的 CCK-8 配制工作液(90 μ L 基本培养基+10 μ L CCK-8)后在培育 1 h, 然后将 96 孔板放入酶标仪中, 在 450 nm 处测量吸光度。

在探究 CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 对衰老 MCF-7 细胞的作用时, 我们将衰老 MCF-7 细胞培育于 96 孔板中(10,000 细胞/孔), 每孔加入 100 μ L 含有不同浓度 DOX (0、0.05、0.1、0.3、0.5、0.7、1、3 和 5 μ g/mL)的 DR5-CNV/DOX, 加药孵育 24 h 后, 去除含药培养基, 用 PBS 清洗 3 次, 每孔加入 100 μ L 的 CCK-8 配制工作液(90 μ L 基本培养基+10 μ L CCK-8)后在培育 1 h, 然后将 96 孔板放入酶标仪中, 在 450 nm 处测量吸光度。

4.3.4 蛋白免疫印迹实验

通过 Western blotting 实验验证 CNV 对衰老肿瘤细胞中抗凋亡蛋白的影响。将不同蛋白浓度的 CNV (10、30、50 和 100 μ g/mL)与衰老 MCF-7 细胞共孵育 24 h, 后将细胞置于冰上用 RAPI 强裂解液进行裂解, 用细胞刮刀将其从 6 孔板中刮下来, 在 4 $^{\circ}$ C 下 12000 $\times$ g 离心 10 min, 取上清。通过 BCA 试剂盒测定提取的蛋白浓度, 将蛋白样品和 5 $\times$ loading buffer 按照 4:1 混合, 100 $^{\circ}$ C 水浴煮沸 5 min, 待样品冷却至室温后加样。在恒压 110 V 下, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳将蛋白分离, 将使用甲醇活化的 PVDF 膜覆盖于胶上, 在恒流 200 mA 下, 进行转膜。转膜完成后, 将 PVDF 膜用 5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 用 TBST 溶液洗涤 3 次后, 4 $^{\circ}$ C 孵育 BCL-2、BCL-XL、BAX 和 β -actin 的一抗中过夜。接下来, 用 TBST 溶液洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 15 min, 用 HRP 二抗室温孵育 1 h, 再用 TBST 溶液洗涤 3 次, 加入 ECL 发光液, 在化学发光成像分析仪下曝光, 使目标蛋白带可视化。

4.3.5 酶联免疫吸附实验

将 MCF-7 细胞培育于 6 孔板中, 加入不同实验(PBS、DOX、DOX+DR5、CNV/DOX、DR5-CNV/DOX 1 μ M DOX)共孵育, 取细胞上清, 4 $^{\circ}$ C 1000 $\times$ g 离心 10 min, 取离心后上清, 使用 BCA 试剂盒测定其蛋白浓度, 接下来使用 ELISA 试剂盒分析不同实验组孵育的衰老 MCF-7 细胞上清中 IL-6、CCL-2、MMP-3 的含量。

4.3.6 溶血实验

使用 BALB/c-nu 小鼠血液用于分析 CNV 和 DR5-CNV/DOX 的生物相容性。小鼠眼眶采取全血, 将其引流到 EDTA 抗凝管中并均匀摇动。将小鼠血液 1500 rpm $\times$ 5 min 离心, 沉淀即是红细胞。然后, 将红细胞悬液添加到各种浓度的 CNV 和 DR5-CNV/DOX

悬液中(0.1、0.5、1 和 3 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 mL)。在 37°C 下, 置于恒温孵育仪中以 100 rpm 的速度孵育 4 h 后, 拍摄照片, 以观察溶血情况。最后, 取每个实验组的 100 μL 上清液, 并使用酶标仪在 540 nm 处测量其吸收值。去离子水和 PBS (pH 7.4) 分别用作阳性和阴性对照。溶血率使用以下公式进行计算:

$$\text{溶血率}(\%) = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性对照组}}}{A_{\text{阳性对照组}} - A_{\text{阴性对照组}}} \times 100 \quad (4.1)$$

A 样品是指样品在 540 nm 处的吸光度。A 阳性对照组和 A 阴性对照组分别代表阳性对照和阴性对照在 540 nm 处的吸光度。

4.3.7 统计学分析

实验数据处理中, 采用学生 t 检验以评估统计学显著性(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$), 并且实验数据以平均值 $\pm$ 标准偏差的方式表示。

4.4 实验结果与讨论

4.4.1 DR5-CNV/DOX 体外细胞摄取评价

由于 DOX 可以自发荧光, 我们通过检测 DOX 的荧光强度来代表 MCF-7 细胞对纳米粒子的摄取能力。我们使用了 CLSM 和流式细胞术来评估 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞对各实验组(DOX、CNV/DOX、DR5+DR5-CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX)的摄取能力。如图 4.1A 所示, 在 MCF-7 细胞中, DR5-CNV/DOX 有较强的红色荧光, 这代表 MCF-7 细胞对其的摄取能力最强。CNV/DOX 和 DR5+DR5-CNV/DOX 的红色荧光强度相似, 这是由于 DR5+DR5-CNV/DOX 提前封闭正常 MCF-7 细胞上的 DR5 导致的。如图 4.1B 所示, 相较于 MCF-7 细胞, DR5-CNV/DOX 在衰老 MCF-7 细胞中有更强的红色荧光, 再次证明了 DR5 在衰老 MCF-7 细胞上表达量更高。且由于提前对 DR5 的封闭, 在衰老 MCF-7 细胞中, CNV/DOX 和 DR5+DR5-CNV/DOX 的红色荧光强度也相似。图 4.1C, MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞对不同实验组的流式细胞术摄取结果与 CLSM 摄取结果相同。这些结果表明, 相较于正常肿瘤细胞, DR5-CNV/DOX 对衰老肿瘤细胞的靶向能力更强。

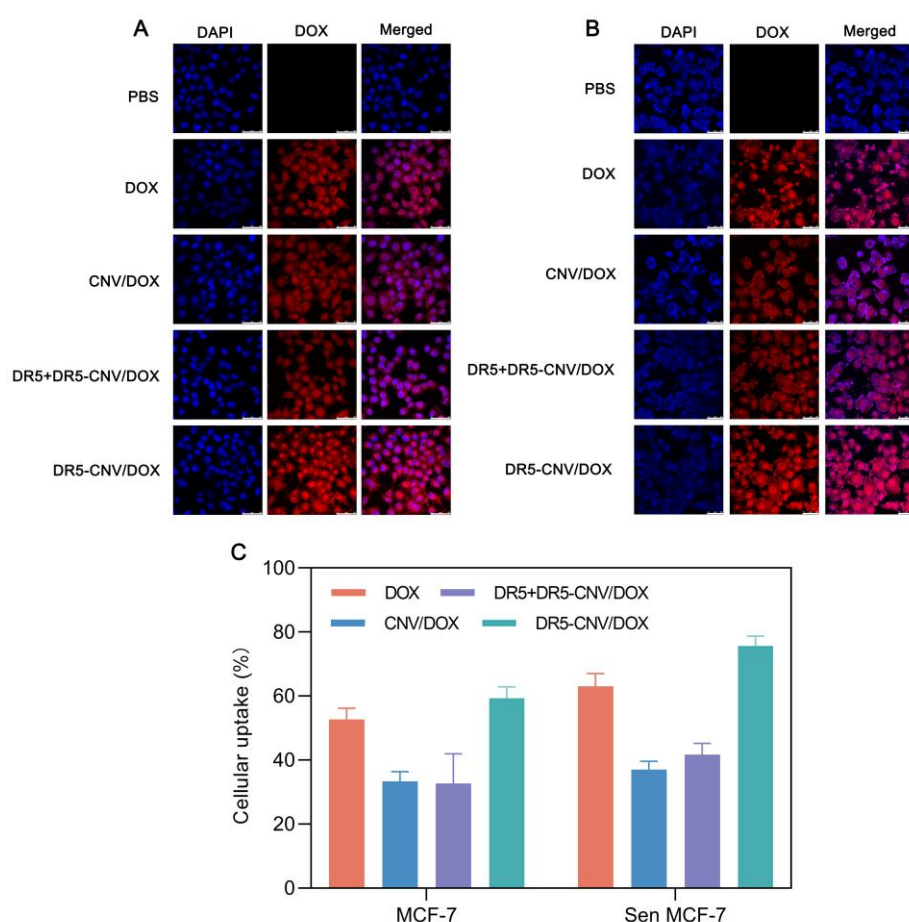


图 4.1 (A)激光共聚焦分析 MCF-7 细胞对不同实验组的摄取情况(比例尺: 50 μm)(蓝色: 细胞核, 红色: DOX)。 (B) 激光共聚焦分析衰老 MCF-7 细胞对不同实验组的摄取情况(比例尺: 50 μm) (蓝色: 细胞核, 红色: DOX)。 (C) 流式细胞术分析 MCF-7 和衰老 MCF-7 细胞对不同实验组摄取情况的量化分析。数据表示为平均值 $\pm$ SD ($n = 3$)。

Fig. 4.1 (A) Laser confocal analysis of the uptake of MCF-7 cells to different experimental groups (Scale: 50 μm) (Blue: nucleus, Red: DOX) . (B) Laser confocal analysis of the uptake of senescent MCF-7 cells to different experimental groups (Scale: 50 μm) (Blue: nucleus, Red: DOX). (C) Quantitative analysis of uptake of MCF-7 and senescent MCF-7 cells to different experimental groups by flow cytometry. Data are represented as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

4.4.2 DR5-CNV/DOX 体外抗肿瘤效果评价

接下来, 我们采用 CCK-8 法来评价各实验组(DOX、CNV、CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX)在体外对 MCF-7 细胞的毒性作用。将 MCF-7 细胞与不同浓度的各实验组(0、0.1、0.3、0.5、0.7、1、3 和 5 $\mu\text{g/mL}$ DOX, 其中 CNV 组与 CNV/DOX, DR5-CNV/DOX

组蛋白浓度一致)共同孵育 48 h, 如图 4.2 所示, 各实验组 MCF-7 细胞活力逐渐下降, CNV 可以轻微抑制 MCF-7 细胞的活性。随着 DOX 浓度的增加, CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 抗肿瘤作用明显。当 DOX 浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时, CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 组的 MCF-7 细胞活性分别为 5.77%和 4.01%。

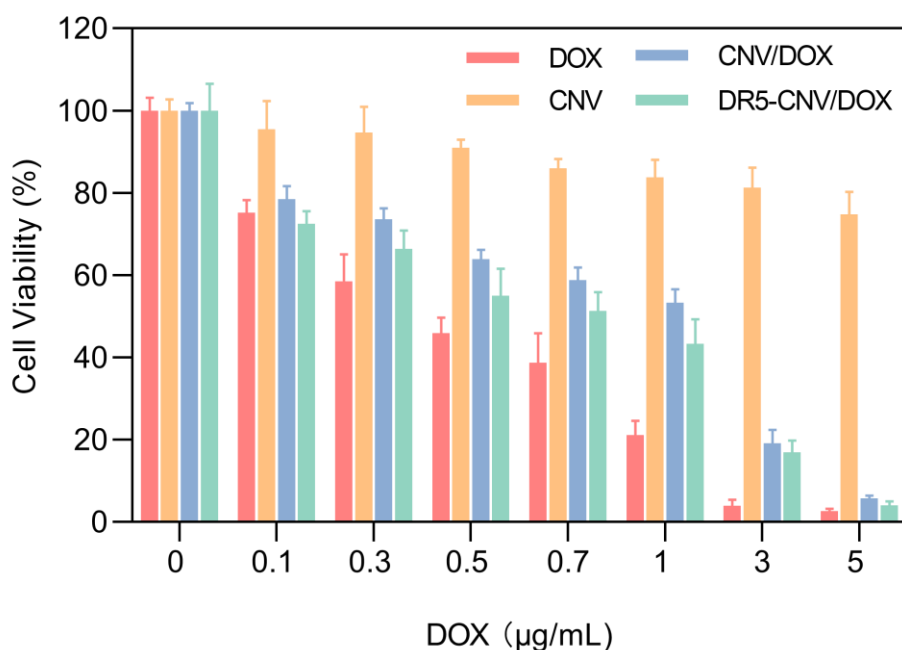


图 4.2 CCK-8 评价各实验组(DOX、CNV、CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX)在体外对 MCF-7 细胞的毒性作用结果。数据表示为平均值 $\pm$ SD ($n = 3$)。

Fig. 4.2 Results of CCK-8 evaluation of the toxic effects of each experimental group (DOX, CNV, CNV/DOX and DR5-CNV/DOX) on MCF-7 cells in vitro. Data are represented as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

随后, 为了比较 DR5-CMV/DOX 对 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞的作用效果。我们将不同浓度的 DR5-CNV/DOX (0、0.1、0.3、0.5、0.7、1 和 3 $\mu\text{g/mL}$ DOX)分为与 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞共同孵育 48 h, 结果显示随着药物浓度的增加, 两者活力都呈现下降趋势, MCF-7 细胞组的 IC_{50} 值为 1.760 $\mu\text{g/mL}$, 衰老 MCF-7 细胞的 IC_{50} 值为 0.4013 $\mu\text{g/mL}$, 其中衰老指数(衰老指数=正常细胞组的 IC_{50} 值/衰老细胞的 IC_{50} 值)为 4.4。图 4.3A 实验结果说明, 相较于 MCF-7 细胞, DR5-CNV/DOX 对衰老 MCF-7 细胞的作用效果更加明显, 可以有效的降低衰老肿瘤细胞的抗凋亡作用, 从而清除衰老的肿瘤细胞。由于 DR5 抗体有介导衰老肿瘤细胞凋亡的作用。为了验证其功能, 我们将不同浓度的 CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX (0、0.05、0.1、0.3、0.5、0.7、1、3 和 5 $\mu\text{g/mL}$ DOX)

与衰老 MCF-7 细胞共同孵育 24 h，结果显示随着药物浓度的增加，两组衰老 MCF-7 细胞都呈现下降趋势，CNV/DOX 组的 IC_{50} 值为 $1.921 \mu\text{g/mL}$ ，DR5-CNV/DOX 组的 IC_{50} 值为 $1.532 \mu\text{g/mL}$ ，衰老指数为 1.3。图 4.3B 实验结果说明，DR5 抗体的确有促进衰老肿瘤细胞凋亡的作用。

以上结果表明，DR5-CNV/DOX 在体外对于 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞有优秀的杀伤能力，并且对于化疗产生抗性的衰老 MCF-7 细胞有更加明显的作用效果。

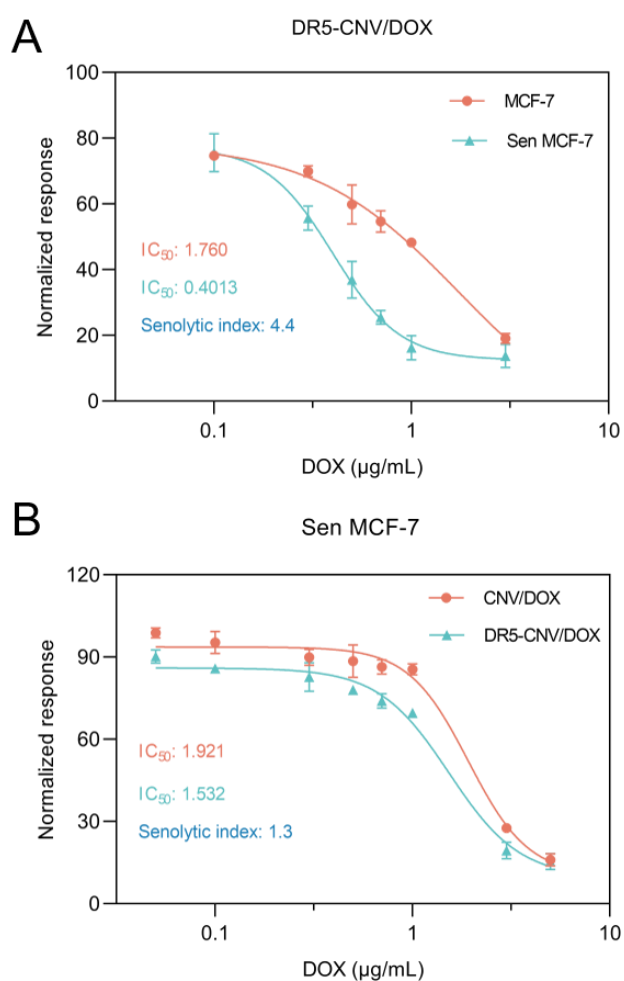


图 4.3 (A) CCK-8 评价 DR5-CNV/DOX 对 MCF-7 细胞和衰老 MCF-7 细胞的毒性作用结果。(B) CCK-8 评价 CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 对衰老 MCF-7 细胞的毒性作用结果。数据表示为平均值 $\pm$ SD ($n = 3$)。

Fig. 4.3 (A) Results of CCK-8 evaluation of the toxic effects of DR5-CNV/DOX on MCF-7 cells and senescent MCF-7 cells. (B) CCK-8 evaluation of the results of toxic effects of CNV/DOX and DR5-CNV/DOX on senescent MCF-7 cells. Data are represented as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

4.4.3 CNV 对抗凋亡蛋白家族作用评价

衰老肿瘤细胞对凋亡产生抗性是由于其 BCL-2 和 BCL-XL 等抗凋亡蛋白的表达增加和促凋亡蛋白 BAX 表达的下降。为了探究 CNV 中含有的姜黄素是否能够逆转衰老肿瘤细胞中 BCL-2 蛋白家族的表达, 我们将不同蛋白浓度的 CNV (10、30、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与衰老 MCF-7 细胞进行共孵育 24 h, Western blot 结果表明(图 4.4A B), 随着 CNV 蛋白浓度的增加, 抗凋亡蛋白 BCL-2 和 BCL-XL 的表达逐渐下降, 促凋亡蛋白 BAX 的表达逐渐增加。这说明 CNV 通过降低抗凋亡蛋白表达和增加促凋亡蛋白表达来促使衰老肿瘤细胞发生凋亡。

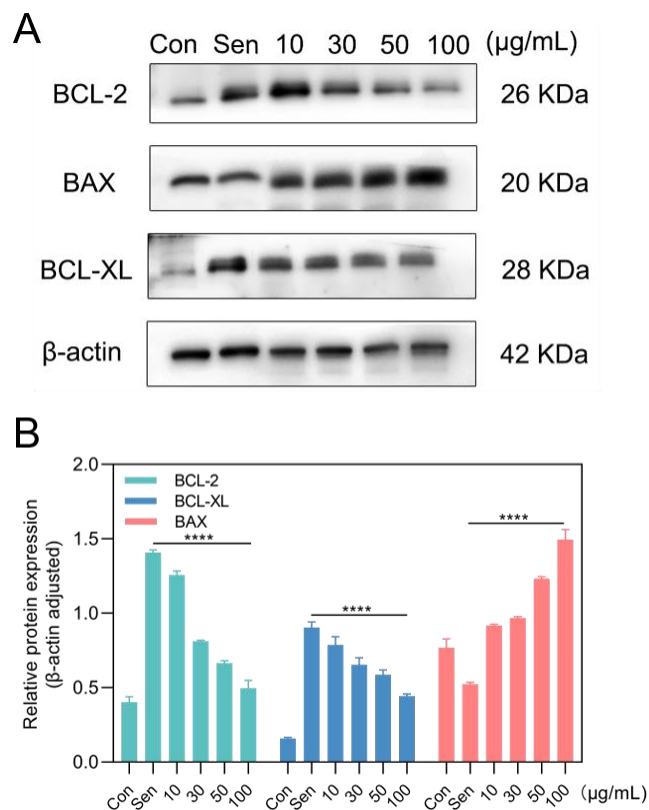


图 4.4 (A) 不同浓度 CNV 处理衰老 MCF-7 细胞对抗凋亡 BCL-2 蛋白家族表达的影响。(B) 不同浓度 CNV 处理衰老 MCF-7 细胞对抗凋亡 BCL-2 蛋白家族表达影响的量化分析。数据表示为平均值 $\pm$ SD ($n=3$)。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$)。

Fig. 4.4 (A) Effects of treating senescent MCF-7 cells with different concentrations of CNV on the expression of anti-apoptotic BCL-2 protein family. (B) Quantitative analysis of the effect of treatment of senescent MCF-7 cells with different concentrations of CNV on the expression of anti-apoptotic BCL-2 protein family. Data are represented as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$).

4.4.4 DR5-CNV/DOX 体外对 SASP 抑制作用评价

衰老肿瘤细胞会持续分泌 SASP，这些 SASP 会造成肿瘤促炎微环境，进一步促进癌症的转移与侵袭，不利于癌症的治疗，所以抑制衰老肿瘤细胞产生的 SASP 对于癌症的治疗是十分有利的。因此，我们在细胞水平进行 IL-6、CCL-2 和 MMP-3 细胞因子含量的测定。我们将不同实验组(PBS、DOX、DOX+DR5、CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 1 μ M DOX)与 MCF-7 细胞共培养，其中 DOX 可以诱导正常 MCF-7 细胞转变成衰老 MCF-7 细胞。细胞水平结果显示，相较于 PBS 组 DOX 组 IL-6、CCL-2 和 MMP-3 细胞因子含量明显增加，DOX+DR5 组对其降低效果不理想，而 CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 组都可以明显的降低 IL-6、CCL-2 和 MMP-3 细胞因子含量，这是由于 CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 组中 CNV 含有姜黄素可以中和 SASP (图 4.5A B C)。以上结果说明，DR5-CNV/DOX 在体外具有优秀的诱导肿瘤细胞、衰老肿瘤细胞死亡和抑制 SASP 的能力。

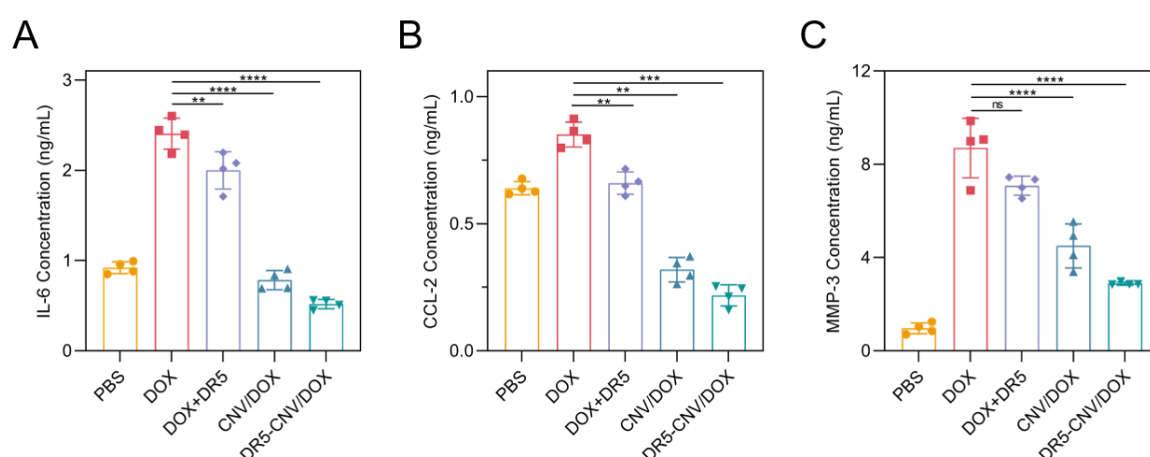


图 4.5 (A) 使用 ELISA 试剂盒测定衰老 MCF-7 细胞水平 IL-6 细胞因子含量表达。(B) 使用 ELISA 试剂盒测定衰老 MCF-7 细胞水平 CCL-2 细胞因子含量表达。(C) 使用 ELISA 试剂盒测定衰老 MCF-7 细胞水平 MMP-3 细胞因子含量表达。数据表示为平均值 $\pm$ SD ($n = 4$)。

(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$)。

Fig. 4.5 (A) Expression of IL-6 cytokine content in senescent MCF-7 cells was determined using an ELISA kit. (B) Expression of CCL-2 cytokine content in senescent MCF-7 cells was determined using an ELISA kit. (C) Determination of MMP-3 cytokine expression in senescent MCF-7 cells using ELISA kits.

Data are represented as mean $\pm$ SD ($n = 4$).

(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$).

4.4.5 DR5-CNV/DOX 生物相容性评价

在癌症的治疗过程中,药物的生物相容性是至关重要的。因此,我们测试了 H_2O 、PBS 和不同浓度 CNV 和 DR5-CNV/DOX (0.1、0.5、1 和 3 $\mu\text{g/mL}$ DOX)与红细胞共孵育后的溶血行为,结果显示 CNV 和 DR5-CNV/DOX 的溶血行为几乎可以忽略不计(图 4.5A B)。

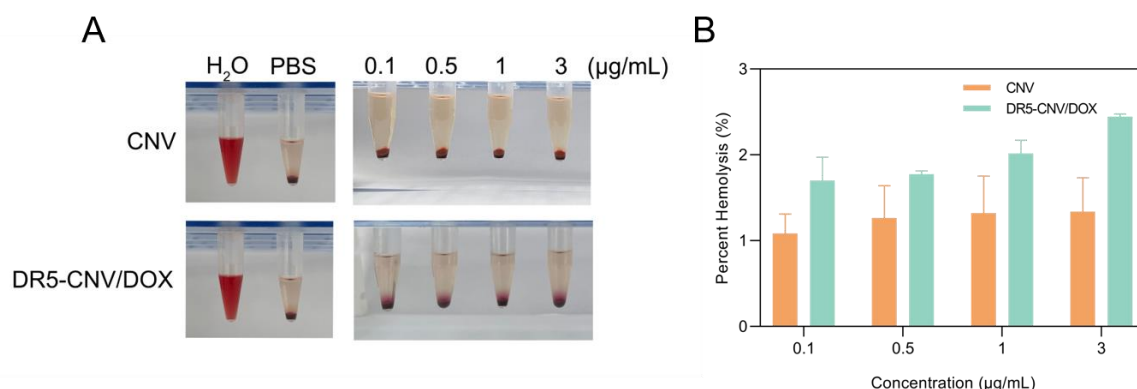


图 4.6 (A) H_2O 、PBS 和不同浓度 CNV 和 DR5-CNV/DOX 与红细胞共孵育后的溶血结果。(B) 不同浓度 CNV 和 DR5-CNV/DOX 与红细胞共孵育后的溶血率。数据表示为平均值 $\pm$ SD (n=3)。

Fig. 4.6 (A) Haemolysis results after co-incubation of H_2O , PBS and different concentrations of CNV and DR5-CNV/DOX with erythrocytes. (B) Haemolysis rates after co-incubation of different concentrations of CNV and DR5-CNV/DOX with erythrocytes. Data are represented as mean $\pm$ SD (n = 3).

4.5 本章小结

本章主要从体外细胞水平对 DR5-CNV/DOX 的抗肿瘤作用进行研究。首先,我们利用 CLSM 和流式细胞分析术分析了 MCF-7 和衰老 MCF-7 细胞对 DR5-CNV/DOX 的摄取情况,实验结果表明,DR5-CNV/DOX 能主动靶向到肿瘤细胞,并且由于 DR5 在衰老肿瘤细胞中表达增加,所以相较于 MCF-7 细胞,DR5-CNV/DOX 在衰老 MCF-7 细胞中表现出一个更高浓度的聚集。其次,我们利用 CCK-8 分析了 DR5-CNV/DOX 在体外对 MCF-7 细胞的细胞毒性作用,实验结果表明,DR5-CNV/DOX 对于 MCF-7 细胞的细胞杀伤作用明显,当 DOX 浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,DR5-CNV/DOX 组的 MCF-7 细胞活性仅为 4.01%。将 DR5-CNV/DOX 与 MCF-7 和衰老 MCF-7 细胞共培养后,实验结果表明,MCF-7 细胞组的 IC_{50} 值为 1.760 $\mu\text{g/mL}$,衰老 MCF-7 细胞的 IC_{50} 值为 0.4013 $\mu\text{g/mL}$,这说明 DR5-CNV/DOX 对衰老 MCF-7 细胞的作用效果更加明显,可以改善衰老肿瘤细胞的抗凋亡作用,从而清除衰老的肿瘤细胞。将 CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 与衰老 MCF-

7 细胞共培养后,实验结果表明,CNV/DOX 组的 IC_{50} 值为 $1.921\ \mu\text{g/mL}$, DR5-CNV/DOX 组的 IC_{50} 值为 $1.532\ \mu\text{g/mL}$, 这说明 DR5 抗体的确有促进衰老肿瘤细胞凋亡的作用。

随后,我们评价了 CNV 对衰老肿瘤细胞中抗凋亡蛋白家族表达的影响。不同浓度 CNV 与衰老 MCF-7 细胞共培养后,Western blot 实验结果表明,CNV 能降低抗凋亡蛋白的表达和增加促凋亡蛋白的表达,以来逆转衰老肿瘤细胞抗凋亡特性。

接下来,我们评价了 DR5-CNV/DOX 对衰老肿瘤细胞产生的 SASP 的抑制效果。在细胞水平测定共培养细胞上清中 IL-6、CCL-2 和 MMP-3 的含量水平,ELISA 实验结果表明,CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 组中 IL-6、CCL-2 和 MMP-3 的含量较低,这都归功于 CNV 中的姜黄素可以抑制 SASP。

最后,我们评价了 DR5-CNV/DOX 在体外的生物相容性。溶血实验结果显示,其具有优秀的生物相容性。

综上所述,由于 DR5-CNV/DOX 具有在杀伤肿瘤和衰老肿瘤细胞以及抑制 SASP 方面的多功能作用,因此,其在体外显示出优秀的抗肿瘤效果,具有潜在的应用前景。

5 DR5-CNV/DOX 的体内抗肿瘤作用研究

5.1 概述

在对 DR5-CNV/DOX 体外抗肿瘤效果评价后,本章我们通过一系列体内实验来探究其在体内的抗肿瘤效果。选用人源的乳腺癌 MCF-7 细胞构建小鼠肿瘤模型,经过不同组给药处理后,监测了 14 天内小鼠的肿瘤生长情况和小鼠的体重变化。给药治疗结束后,收集主要脏器和肿瘤组织,并采集小鼠新鲜血液用于常规血液分析和生化检查,以进一步评估 DR5-CNV/DOX 在体内的抗肿瘤效果和体内纳米材料的生物安全性。

5.2 实验仪器与试剂

5.2.1 实验仪器

表 5.1 实验仪器

Tab. 5.1 Experimental instruments

实验仪器	厂家
游标卡尺	标康科技(深圳)有限公司
制冰机	Scotsman
细胞计数器	上海沪宇生物公司
台式离心机	美国 ThermoFisher 公司
Synergy H1 酶标仪	美国伯腾仪器有限公司(BioTek)
TCS SP8 激光共聚焦荧光显微镜	德国 Lecica 公司
BS202 生物显微镜	重庆光电仪器有限公司
超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
电子天平	上海力辰仪器有限科技公司
BSA124S 电子天平	德国 Sartorius 公司
CO ₂ 细胞培养箱	美国 Thermo Electron 公司
SX-500 全自动灭菌	日本 TOMY 公司

5.2.2 实验试剂与耗材

表 5.2 实验试剂与耗材

Tab. 5.2 Experimental reagents and consumables

实验材料	厂家
乙醚	美国 Millipor 公司
细胞筛网	无锡耐思倍生命科技有限公司

表 5.2 续
Tab. 5.2 Cont

实验材料	厂家
水合氯醛	德国 Sigma 公司
中性福尔马林	德国 Sigma 公司
无菌手术刀	上海浦东金环医疗用品股份有限公司
细胞刮刀	无锡耐思生命科技有限公司
双抗(青霉素、链霉素)	碧云天生物技术公司
0.25%胰酶-EDTA	中科迈晨(北京)科技有限公司
胎牛血清	赛默飞世尔科技(中国)有限公司
DAPI(4, 6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐)	北京索莱宝生命与技术有限公司
p16 兔源单克隆抗体	上海碧云天生物技术有限公司
CD31 兔源单克隆抗体	杭州华安生物技术有限公司
N-cadherin 兔源单克隆抗体	杭州华安生物技术有限公司
CD49 兔源单克隆抗体	杭州华安生物技术有限公司
IFN- γ 兔源单克隆抗体	杭州华安生物技术有限公司
二甲苯	国药集团
无水乙醇	国药集团
浓缩型正常山羊血清(封闭)	武汉博士德生物工程有限公司
荧光(FITC)标记羊抗兔 IgG	武汉博士德生物工程有限公司
IL-6 酶联免疫吸附试剂盒	武汉 Elabscience 生物科技有限公司
CCL-2 酶联免疫吸附试剂盒	武汉 Elabscience 生物科技有限公司
MMP-3 酶联免疫吸附试剂盒	武汉 Elabscience 生物科技有限公司

5.3 实验方法

5.3.1 动物模型的建立

使用 6 周龄 BALB/c-nu 雌性小鼠(辽宁长盛生物技术有限公司)建立肿瘤模型。将 MCF-7 细胞(6×10^5 , 100 μ L)皮下注射接种到小鼠腋下, 建立小鼠右腋窝肿瘤模型, 并在之后测量肿瘤体积。当肿瘤体积达到 50 mm³时, 开始进行体内实验。

$$\text{肿瘤体积 (mm}^3\text{)} = W^2 \times L / 2 \quad (5.1)$$

W 指的是肿瘤的最短直径, L 指的是肿瘤的最长直径。

5.3.2 动物体内给药治疗

将所有小鼠随机分为 4 组(n=3): (a) PBS; (b) DOX; (c) CNV/DOX; (d) DR5-CNV/DOX; 每只小鼠每次眼丛静脉注射注射 150 μ L PBS、DOX、CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX (2 mg/kg 50 μ g/mL DOX)。在整个实验过程中, 每两天给药一次, 一共给药 4 次, 每两天用电子天平称量小鼠体重, 并用数字卡尺测量小鼠肿瘤大小。

5.3.3 血清生化分析和组织病理学检查

取小鼠的血液用于常规血液分析和生化分析。小鼠眼球采血, 将小鼠新鲜血液放入抗凝管中, 反复摇晃, 防止血液凝固。然后, 引颈处死小鼠, 收集主要器官(心、肝、脾、肺、肾)和肿瘤组织浸泡在中性 10%福尔马林溶液中。用石蜡包裹、冷冻, 使用冷冻切片机制备石蜡切片。随后将组织切片在二甲苯中脱蜡并在梯度醇中脱水后, 将玻片用苏木精和伊红(H&E)染色, 并用光学显微镜进行观察和拍摄。

5.3.4 小鼠肿瘤切片免疫荧光实验

对于免疫荧光切片的制作与处理, 首先用不同梯度酒精对组织进行脱水处理, 使用透明剂(二甲苯)进行组织透明, 透明后的组织块依次经 3 缸石蜡(60 $^{\circ}$ C)进行浸蜡, 将浸透蜡的组织块包裹在石蜡块中, 随后包埋好的蜡块进行切片, 60 $^{\circ}$ C烤箱烤片 3 个小时, 将切片放入二甲苯和酒精中进行脱蜡, 接下来进行抗原修复, 血清封闭, 在 4 $^{\circ}$ C下加入 p16、CD31、N-cadherin、CD49 和 IFN- γ 的一抗孵育过夜, 在 37 $^{\circ}$ C下加入荧光二抗孵育 1 h, 滴加 DAPI 避光孵育 5 min, 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 最后在荧光显微镜下观察采集图像。

5.3.5 酶联免疫吸附实验

将小鼠肿瘤组织用液氮进行研磨, 加入 PBS, 继续冰上研磨。取上清, 4 $^{\circ}$ C 1000 $\times$ g 离心 10 min, 取离心后上清, 使用 BCA 试剂盒测定其蛋白浓度, 接下来使用 ELISA 试剂盒分析不同给药组小鼠肿瘤中 IL-6、CCL-2、MMP-3 的含量。

5.3.6 统计学分析

实验数据处理中, 采用学生 t 检验以评估统计学显著性(* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001), 并且实验数据以平均值 $\pm$ 标准偏差的方式表示。

5.4 实验结果与讨论

5.4.1 DR5-CNV/DOX 体内抗肿瘤效果评价

为了探究 DR5-CNV/DOX 在体内的抗肿瘤作用, 如图 5.1A 所示过程, 是小鼠肿瘤

接种和治疗的整个过程示意图。如图 5.1B 结果显示整个实验期间小鼠肿瘤体积的变化情况。由于缺乏药物的控制，PBS 组小鼠肿瘤呈现自然生长趋势。DOX 组小鼠肿瘤生长相较于 PBS 组得到一定的抑制，但肿瘤仍就有较大增长。CNV/DOX 组有效的抑制了小鼠的肿瘤生长，这是由于 CNV/DOX 中的姜黄素和 DOX 可以有效的杀伤肿瘤细胞。DR5-CNV/DOX 组小鼠肿瘤生长相较于 CNV/DOX 组表现出更加优秀的抗肿瘤效果，这是因为 DR5 抗体可以起到靶向作用，使 DR5-CNV/DOX 更多的聚集到肿瘤部位，在杀死肿瘤细胞的同时，也会清除衰老肿瘤细胞，抑制衰老肿瘤细胞产生的 SASP。图 5.1C 显示了治疗后的的小鼠肿瘤重量，DR5-CNV/DOX 组的小鼠肿瘤重量最小。这些结果表明 DR5-CNV/DOX 在体内有良好的抑制肿瘤生长的作用。

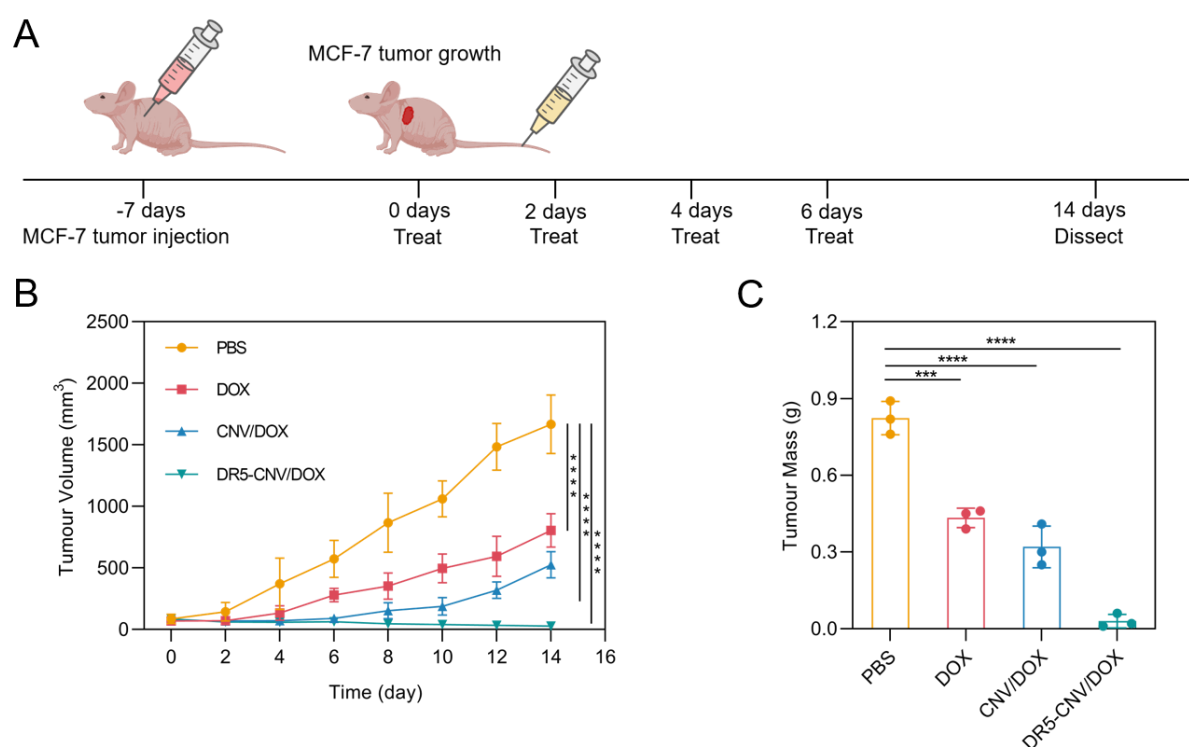


图 5.1 (A) 用不同制剂治疗的 MCF-7 荷瘤小鼠的治疗方案。(B) 整个治疗期间小鼠肿瘤体积的变化。(C) 治疗后的小鼠肿瘤质量。数据表示为平均值 $\pm$ SD (n = 3)。

(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$).

Fig. 5.1 (A) Treatment regimen of MCF-7 rhabdomyosarcoma mice treated with different agents. (B) Changes in tumour volume of mice throughout the treatment period. (C) Tumour mass of mice after treatment. Data are represented as mean $\pm$ SD (n = 3). (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$).

5.4.2 DR5-CNV/DOX 体内对 SASP 抑制作用评价

接下来，我们测定了肿瘤组织中的 SASP 含量情况。将小鼠肿瘤组织进行研磨，离心取上清，使用 ELISA 试剂盒测定 IL-6、CCL-2 和 MMP-3 细胞因子含量，结果与细胞水平一致，CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 组可以有效抑制 SASP (图 5.2A B C)，主要是由于 CNV 中含有的姜黄素具有抗炎作用，可以中和衰老肿瘤细胞产生的 SASP，这表明 DR5-CNV/DOX 可以在体内发挥抑制衰老肿瘤细胞产生的 SASP 作用。

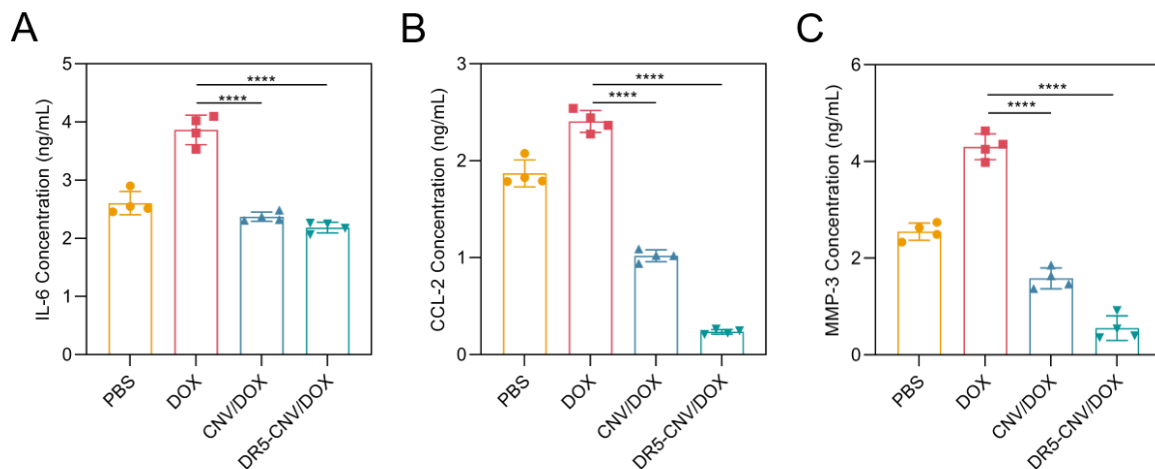


图 5.2 (A) 使用 ELISA 试剂盒测定肿瘤组织水平 IL-6 细胞因子含量表达。(B) 使用 ELISA 试剂盒测定肿瘤组织水平 CCL-2 细胞因子含量表达。(C) 使用 ELISA 试剂盒测定肿瘤组织水平 MMP-3 细胞因子含量表达。数据表示为平均值 $\pm$ SD (n = 4)。

(* , $P < 0.05$; ** , $P < 0.01$; *** , $P < 0.001$, **** , $P < 0.0001$)。

Fig. 5.2 (A) Expression of IL-6 cytokine content at the tumour tissue level was determined using an ELISA kit. (B) Determination of CCL-2 cytokine expression at tumour tissue level using ELISA kit. (C) Determination of MMP-3 cytokine expression in tumour tissues using ELISA kits. Data are represented as mean $\pm$ SD (n = 4). (* , $P < 0.05$; ** , $P < 0.01$; *** , $P < 0.001$, **** , $P < 0.0001$).

5.4.3 DR5-CNV/DOX 体内克服 SASP 产生的不利影响

衰老肿瘤细胞分泌的 SASP 会促进肿瘤 EMT 的发生、血管新生和形成肿瘤免疫抑制微环境，不利于癌症的治疗。接下来，我们进一步验证 DR5-CNV/DOX 克服 SASP 产生的不利影响。将小鼠肿瘤组织进行免疫荧光染色处理，结果显示，DOX 组相较于 PBS 组衰老标志物 p16 蛋白、肿瘤 EMT 标志物 N-cadherin 蛋白和血管新生标志物 CD31 蛋白绿色荧光强度增加，而 CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 组绿色荧光强度降低，且 DR5-CNV/DOX 组有最低的绿色荧光强度。这说明 DR5-CNV/DOX 可以很好的清除肿瘤组织

中的衰老细胞，克服 SASP 引起的肿瘤组织 EMT 和血管新生。CD49 是小鼠 NK 细胞的表面标志物，对 CD49 和 IFN- γ 进行免疫荧光染色，结果显示，DOX 组相较于 PBS 组红色荧光强度下降，说明 SASP 造成了免疫抑制的肿瘤微环境，而 CNV/DOX 和 DR5-CNV/DOX 组红色荧光强度逐渐增强，这表明 DR5-CNV/DOX 逆转了免疫抑制的肿瘤微环境，从而可以吸引更多的免疫细胞进入肿瘤微环境(图 5.3)，联合化疗协同抗肿瘤免疫作用，大大提高抗肿瘤疗效。这些结果表明，DR5-CNV/DOX 可以显著克服 SASP 造成的各种不利影响。

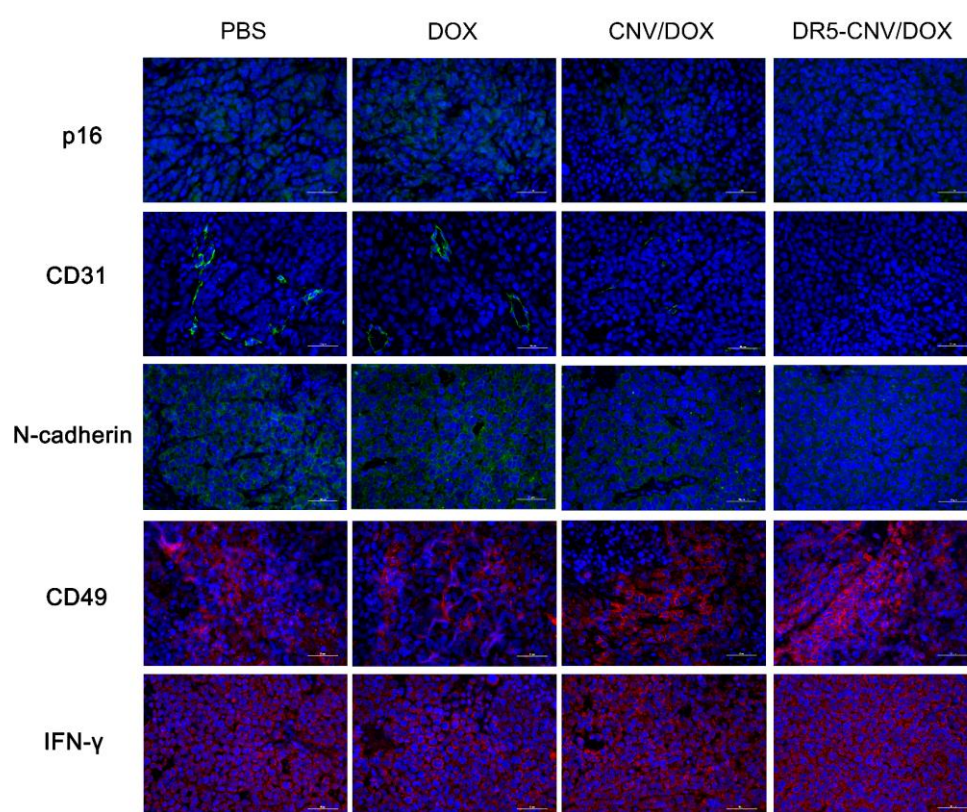


图5.3 小鼠肿瘤切片免疫荧光实验探究不同实验组(PBS、DOX、CNV/DOX和DR5-CNV/DOX)处理的肿瘤中p16、CD31、N-cadherin、CD49和IFN- γ 的表达情况(比例尺: 50 μ m)(蓝色: 细胞核, 绿色: p16 , CD31 , N-cadherin, 红色: CD49 , IFN- γ)。

Fig. 5.3 Immunofluorescence experiments on mouse tumour sections exploring the expression of p16, CD31, N-cadherin, CD49 and IFN- γ in tumours treated with different experimental groups (PBS, DOX, CNV/DOX and DR5-CNV/DOX) (Scale : 50 μ m) (blue: nucleus, green: p16 , CD31 , N-cadherin, red: CD49 , IFN- γ).

5.4.4 DR5-CNV/DOX 体内安全性评价

紧接着评估了在静脉给药后, DR5-CNV/DOX 在体内的潜在毒性。实验期间未观察到小鼠存在明显进食、梳洗、活动、排泄异常的行为。在治疗 14 天内, 各组小鼠体重均无明显变化(图 5.4)。在治疗结束后, 小鼠的血常规分析、血液生化检验以及组织切片染色检查也显示出 DR5-CNV/DOX 在体内有良好的生物安全性。血常规检查结果显示(图 5.5A B), 各组小鼠的主要血液参数如 RBC、HGB 和 PLT 与正常小鼠对比无明显差异(仅是 DOX 组对白细胞数量有些一定的影响), 表明各组小鼠均未出现贫血等不良症状。生物化学测试结果表明, 与正常组小鼠相比, 各个实验组小鼠的肝损伤标记物(AST 和 ALT)和肾损伤标记物(CREA 和 UREA)均在正常范围内波动, 表明各组小鼠没有发生明显的肾或肝功能的损伤(图 5.5C D)。采集小鼠主要脏器(心、肝、脾、肺、肾)进行 H&E 染色进行组织学分析显示除 DOX 组对心肌细胞有一定的毒性, 发生心肌细胞损伤, 心肌细胞出现轻微水肿和空泡变形外, 其余各组小鼠主要器官保持正常生理形态, 未观察到炎症反应(图 5.6)。这些结果表明, 在测试剂量下, DR5-CNV/DOX 在体内几乎没有毒性, 具有优秀的生物安全性。

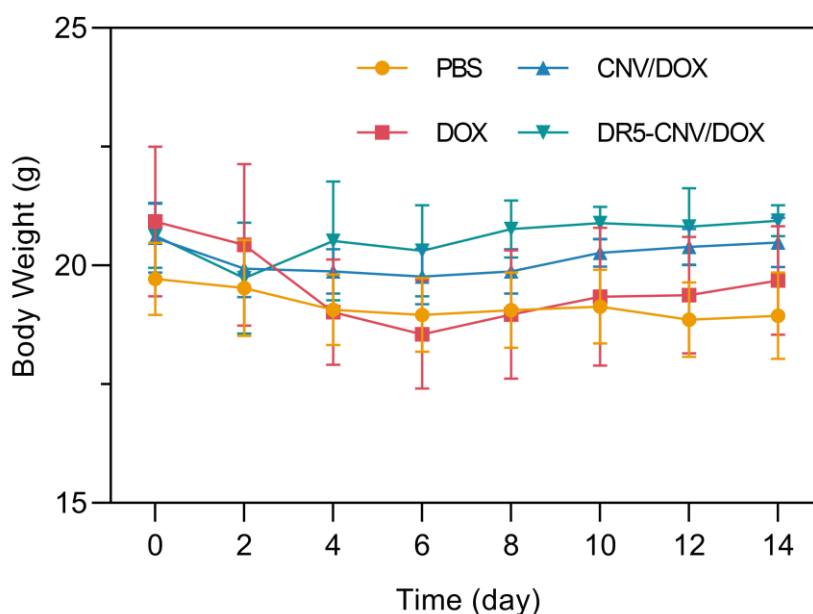


图5.4 整个治疗期间小鼠体重的变化。数据表示为平均值 $\pm$ SD (n = 3)。

Fig. 5.4 Changes in body weight of mice throughout the treatment period. Data are represented as mean $\pm$ SD (n = 3).

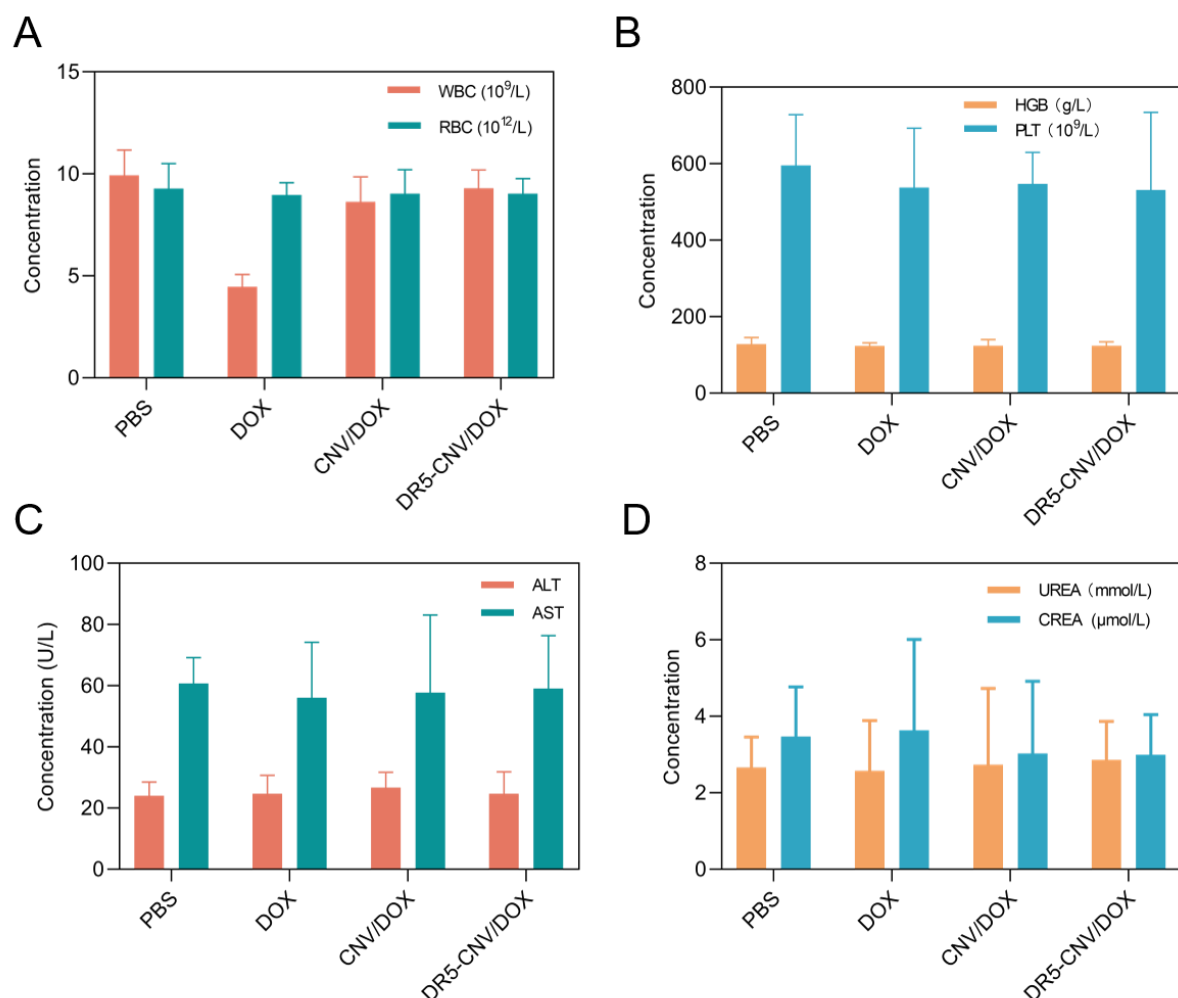


图5.5 静脉注射各实验组的体内生物安全性评价。(A-B) 血液常规检查包括：红细胞(RBC)、白细胞(WBC)、血红蛋白(HGB)和血小板(PLT)分析；(C-D) 血液生化检查包括：谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、尿素(UREA)和肌酐(CREA)；数据表示为平均值 $\pm$ SD (n = 3)。

Fig. 5.5 In vivo biosafety evaluation of each experimental group by intravenous injection. (A-B) Routine blood tests including: red blood cell (RBC), white blood cell (WBC), haemoglobin (HGB) and platelet (PLT) analysis; (C-D) blood biochemical tests including: alanine aminotransferase (ALT), alanine oxal transaminase (AST), urea (UREA) and creatinine (CREA); Data are represented as mean $\pm$ SD (n = 3).

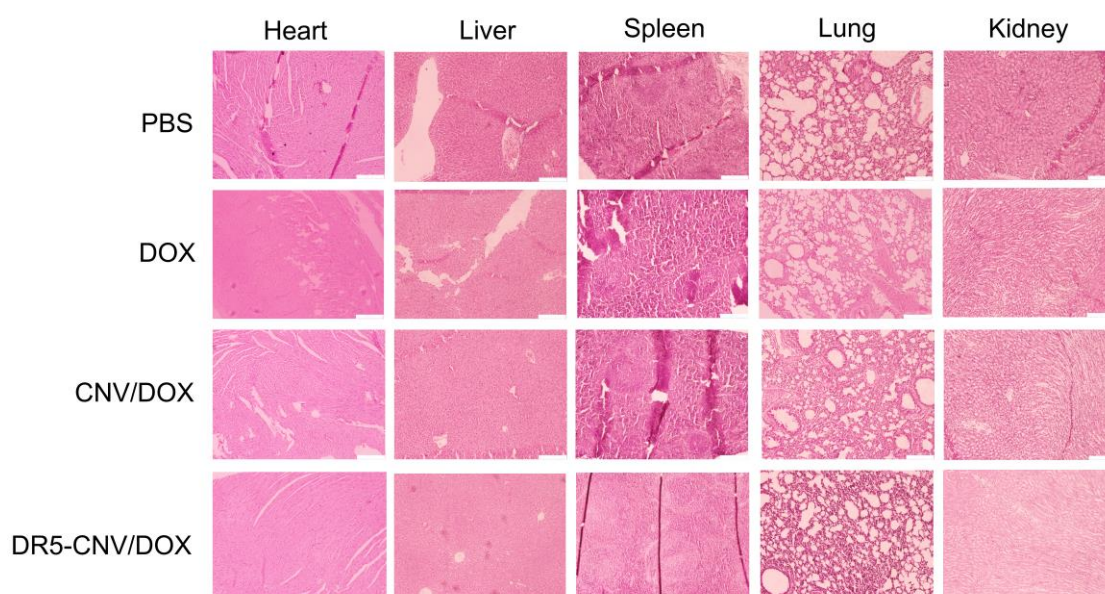


图 5.6 各实验组主要器官(包括心脏、肝脏、脾脏、肺和肾)的 H&E 染色图像 (比例尺: 200 μm)。

Fig. 5.6 H&E stained images of major organs (including heart, liver, spleen, lungs and kidneys) of each experimental group (Scale: 200 μm).

5.5 本章小结

本章在小鼠体内水平上评价了 DR5-CNV/DOX 的抗肿瘤效果、对 SASP 的抑制以及克服其产生的各种不利影响和体内生物安全性。

体内抗肿瘤实验结果表明 DR5-CNV/DOX 有着优秀的体内抗肿瘤作用，基本抑制了小鼠肿瘤的生长。解剖后，该组有最小的肿瘤质量。肿瘤组织的 ELISA 实验结果显示，DR5-CNV/DOX 组基本抑制了由于 DOX 刺激造成衰老肿瘤细胞分泌的 SASP，改善了肿瘤的促炎微环境。接下来，我们采用对小鼠肿瘤组织切片进行免疫荧光染色分析，实验结果表明，DR5-CNV/DOX 一方面明显降低了由于 SASP 造成的 p16、N-cadherin 和 CD31 蛋白表达的增加，这表明 DR5-CNV/DOX 可以在体内清除衰老肿瘤细胞，并克服由于 SASP 引起的肿瘤 EMT 和血管新生；DR5-CNV/DOX 另一方面明显增加了由于 SASP 造成的 CD49 和 IFN- γ 蛋白表达的减少，这表明 DR5-CNV/DOX 可以重塑肿瘤免疫微环境，吸引更多免疫细胞来抗肿瘤。最后，我们对小鼠体重、常规血液分析、生化检查和主要器官的 H&E 染色进行分析，实验结果表明，DR5-CNV/DOX 在体内有优秀的生物安全性。

综上所述，由于 DR5-CNV/DOX 在体内表现出优秀的肿瘤和 SASP 抑制，以及克服 SASP 产生的各种不利影响，因此，其在体内显示出优秀的抗肿瘤效果，具有巨大的应用潜力和广阔的应用前景。

6 结论与展望

6.1 结论

简而言之,我们成功开发了基于植物来源 EVs 进行功能化修饰构建的新型药物递送系统。我们设计的 DR5-CNV/DOX 纳米粒子可以促进衰老肿瘤细胞凋亡,抑制 SASP,克服 SASP 产生的各种不利影响,从而提高化疗作用研究。

表征实验结果表明,DR5-CNV/DOX 纳米粒子具有良好的粒径大小、载药率与包封率、稳定性和药物释放性。在细胞水平上,相较于肿瘤细胞,衰老肿瘤细胞表现出对 DR5-CNV/DOX 更高的摄取,DR5-CNV/DOX 在杀死肿瘤细胞的同时,DR5 抗体与 CNV 中的姜黄素也可以介导产生抗性的衰老肿瘤细胞凋亡,且 CNV 中的姜黄素也可以抑制衰老肿瘤细胞产生的 SASP,从而达到更好的抗肿瘤效果。小鼠实验结果表明,DR5-CNV/DOX 可以主动靶向到肿瘤部位和衰老肿瘤细胞,杀死肿瘤细胞,促进衰老肿瘤细胞的凋亡,抑制其产生的 SASP,并克服由于 SASP 引起的肿瘤 EMT、血管新生和免疫抑制微环境,提高体内化疗作用效果,从而达到了有效的控制肿瘤的生长,并且具有良好的生物相容性与安全性。

综上所述,由于 DR5-CNV/DOX 对衰老肿瘤细胞和 SASP 的独特作用,其可以发挥“一石二鸟”的抗肿瘤作用,提高化疗作用效果。因此,可作为未来癌症治疗的有前景的治疗平台新型药物递送系统。

6.2 创新点

- (1) 首次从姜黄中提取细胞外囊泡并将其作为药物载体。
- (2) 提取的姜黄细胞外囊泡内含姜黄素,可以发挥抗炎和抗肿瘤功效,并且改善了姜黄素溶解性差的缺点,提高了其生物利用度。
- (3) 纳米粒子在抑制肿瘤增殖的同时,可以清除抗肿瘤产生的衰老肿瘤细胞和其产生的 SASP,达到“一石二鸟”的抗肿瘤效果。

6.3 展望

本项目基于植物来源 EVs 进行功能化修饰构建新型药物递送系统,并探讨了其克服衰老肿瘤细胞及其 SASP 的作用,为相应给药系统的设计和发展打下基础,为以后的抗肿瘤疗法提供了新思路。

参 考 文 献

- [1] Weismann A. The Duration of Life[J]. *Nature*, 1881(37):541-542.
- [2] Leonard Hayflick P S M. The serial cultivation of human diploid cell strains[J]. *Experimental Cell Research*, 1961,25(3):585-621.
- [3] Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development[J]. *Cell*, 2013,155(5):1104-1118.
- [4] Sharpless N E, Sherr C J. Forging a signature of in vivo senescence[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2015,15(7):397-408.
- [5] Demaria M E A. An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA[J]. *Cell*, 2014,31:722-733.
- [6] Shenghui He A N E S. Senescence in Health and Disease[J]. *Cell*, 2017,6(169):1000-1011.
- [7] Lecot P, Alimirah F, Desprez P, et al. Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development[J]. *British Journal of Cancer*, 2016,114(11):1180-1184.
- [8] Adams P D. Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence[J]. *Mol Cell*, 2009,36(1):2-14.
- [9] Gorgoulis V, Adams P D, Alimonti A, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward[J]. *Cell*, 2019,179(4):813-827.
- [10] Bernadotte A, Mikhelson V M, Spivak I M. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence[J]. *Aging (Albany, NY.)*, 2016,8(1):3-11.
- [11] Bojovic B, Crowe D L. Dysfunctional telomeres promote genomic instability and metastasis in the absence of telomerase activity in oncogene induced mammary cancer[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2013,52(2):103-117.
- [12] Hao L Y, Armanios M, Strong M A, et al. Short telomeres, even in the presence of telomerase, limit tissue renewal capacity[J]. *Cell*, 2005,123(6):1121-1131.
- [13] Greider C W, Blackburn E H. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity[J]. *Cell*, 1987,51(6):887-898.
- [14] Olovnikov A M. Telomeres, telomerase, and aging: Origin of the theory[J]. *Exp Gerontol* 1996;31:443-448.
- [15] Ovadya Y, Landsberger T, Leins H, et al. Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging[J]. *Nature Communications*, 2018,9(1):5435.
- [16] Jackson S P, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease[J]. *Nature*, 2009,461(7267):1071-1078.
- [17] Fumagalli M, Rossiello F, Mondello C, et al. Stable cellular senescence is associated with persistent DDR activation[J]. *PLoS One*, 2014,9(10):e110969.
- [18] Mallette F A, Ferbeyre G. The DNA Damage Signaling Pathway Connects Oncogenic Stress to Cellular Senescence[J]. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2007,6(15):1831-1836.
- [19] Beausejour C M, Krtolica A, Galimi F, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways[J]. *EMBO J*, 2003,22(16):4212-4222.
- [20] Dulić V, Beney G, Frebourg G, et al. Uncoupling between Phenotypic Senescence and Cell Cycle Arrest in Aging p21-Deficient Fibroblasts[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000,20(18):6741-6754.

- [21] Kamijo T, Zindy F, Roussel M F, et al. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF[J]. *Cell*, 1997,91(5):649-659.
- [22] Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication[J]. *Nature*, 2006,444(7119):638-642.
- [23] Halazonetis T D, Gorgoulis V G, Bartek J. Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development[J]. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 2008,319(5868):1352-1355.
- [24] Bartkova J, Rezaei N, Lontos M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints[J]. *Nature*, 2006,444(7119):633-637.
- [25] Alimonti A, Nardella C, Chen Z, et al. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2010,120(3):681-693.
- [26] Parisotto M, Grelet E, El Bizri R, et al. PTEN deletion in luminal cells of mature prostate induces replication stress and senescence in vivo[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2018,215(6):1749-1763.
- [27] Ogrunc M, Di Micco R, Lontos M, et al. Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation[J]. *Cell death and differentiation*, 2014,21(6):998-1012.
- [28] Hernandez-Segura A, de Jong T V, Melov S, et al. Unmasking transcriptional heterogeneity in senescent cells[J]. *Current Biology*, 2017,27(17):2652-2660.
- [29] Petrova N V, Velichko A K, Razin S V, et al. Small molecule compounds that induce cellular senescence[J]. *Aging Cell*, 2016,15(6):999-1017.
- [30] Wiley C D, Velarde M C, Lecot P, et al. Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype[J]. *Cell Metabolism*, 2016,23(2):303-314.
- [31] Acosta J C, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence[J]. *Nature Cell Biology*, 2013,15(8):978-990.
- [32] Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities[J]. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2021,22(2):75-95.
- [33] Bent E H, Gilbert L A, Hemann M T. A senescence secretory switch mediated by PI3K/AKT/mTOR activation controls chemoprotective endothelial secretory responses[J]. *Genes & Development*, 2016,30(16):1811-1821.
- [34] Chrétien A, Piront N, Delaive E, et al. Increased abundance of cytoplasmic and nuclear caveolin 1 in human diploid fibroblasts in H₂O₂-induced premature senescence and interplay with p38 α MAPK[J]. *FEBS Letters*, 2008,582(12):1685-1692.
- [35] Cho S, Hwang E S. Status of mTOR activity may phenotypically differentiate senescence and quiescence[J]. *Molecules and Cells*, 2012,33(6):597-604.
- [36] Tai H, Wang Z, Gong H, et al. Autophagy impairment with lysosomal and mitochondrial dysfunction is an important characteristic of oxidative stress-induced senescence[J]. *Autophagy*, 2017,13(1):99-113.
- [37] Korolchuk V I, Miwa S, Carroll B, et al. Mitochondria in cell senescence: is mitophagy the weakest link?[J]. *EBioMedicine*, 2017,21:7-13.

- [38] Sadaie M, Salama R, Carroll T, et al. Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence[J]. *Genes & Development*, 2013,27(16):1800-1808.
- [39] Ivanov A, Pawlikowski J, Manoharan I, et al. Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence[J]. *Journal of Cell Biology*, 2013,202(1):129-143.
- [40] Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence[J]. *Trends in Cell Biology*, 2018,28(6):436-453.
- [41] Lee B Y, Han J A, Im J S, et al. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase[J]. *Aging Cell*, 2006,5(2):187-195.
- [42] Evangelou K, Lougiakis N, Rizou S V, et al. Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens[J]. *Aging Cell*, 2017,16(1):192-197.
- [43] Baker D J, Wijshake T, Tchkonja T, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders[J]. *Nature*, 2011,479(7372):232-236.
- [44] Beausejour C M, Krtolica A, Galimi F, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways[J]. *EMBO J*, 2003,22(16):4212-4222.
- [45] Sherr C J. Divorcing ARF and p53: an unsettled case[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2006,6(9):663-673.
- [46] Dulic V, Beney G E, Frebourg G, et al. Uncoupling between phenotypic senescence and cell cycle arrest in aging p21-deficient fibroblasts[J]. *Mol Cell Biol*, 2000,20(18):6741-6754.
- [47] Barriuso D, Alvarez-Frutos L, Gonzalez-Gutierrez L, et al. Involvement of Bcl-2 Family Proteins in Tetraploidization-Related Senescence[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023,24(7):6374.
- [48] Ryu S J, Oh Y S, Park S C. Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts[J]. *Cell Death Differ*, 2007,14(5):1020-1028.
- [49] Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL[J]. *Nature Communications*, 2016,7(1):11190.
- [50] Hafezi S, Rahmani M. Targeting BCL-2 in Cancer: Advances, Challenges, and Perspectives[J]. *Cancers*, 2021,13(6):1292.
- [51] Rodier F, Coppé J, Patil C K, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion[J]. *Nature Cell Biology*, 2009,11(8):973-979.
- [52] Coppé J, Desprez P, Krtolica A, et al. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression[J]. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2010,5(1):99-118.
- [53] Ohanna M, Giuliano S, Bonet C, et al. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS)[J]. *Genes & Development*, 2011,25(12):1245-1261.
- [54] Childs B G, Durik M, Baker D J, et al. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy[J]. *Nature Medicine*, 2015,21(12):1424-1435.
- [55] Acosta J C, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence[J]. *Nature Cell Biology*, 2013,15(8):978-990.
- [56] Krizhanovsky V, Xue W, Zender L, et al. Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008,73:513-522.
- [57] Demaria M, Ohtani N, Youssef S A, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA[J]. *Dev Cell*, 2014,31(6):722-733.

- [58] Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases[J]. The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences, 2014,69(Suppl 1):S4-S9.
- [59] Eggert T, Wolter K, Ji J, et al. Distinct functions of senescence-associated immune responses in liver tumor surveillance and tumor progression[J]. Cancer Cell, 2016,30(4):533-547.
- [60] Takasugi M, Okada R, Takahashi A, et al. Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2[J]. Nature Communications, 2017,8(1):15729.
- [61] Prasanna P G, Citrin D E, Hildesheim J, et al. Therapy-induced senescence: opportunities to improve anticancer therapy[J]. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2021,113(10):1285-1298.
- [62] Prasanna P G, Citrin D E, Hildesheim J, et al. Therapy-induced senescence: opportunities to improve anticancer therapy[J]. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2021,113(10):1285-1298.
- [63] Song Y S, Lee B Y, Hwang E S. Distinct ROS and biochemical profiles in cells undergoing DNA damage-induced senescence and apoptosis[J]. Mechanisms of Ageing and Development, 2005,126(5):580-590.
- [64] Spallarossa P, Altieri P, Aloï C, et al. Doxorubicin induces senescence or apoptosis in rat neonatal cardiomyocytes by regulating the expression levels of the telomere binding factors 1 and 2[J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2009,297(6):H2169-H2181.
- [65] Altieri P, Barisione C, Lazzarini E, et al. Testosterone antagonizes doxorubicin-induced senescence of cardiomyocytes[J]. Journal of the American Heart Association, 2016,5(1):e002383.
- [66] Chen Q, Ames B N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS, 1994,91(10):4130-4134.
- [67] CHEN Q M, Juping L A J B. Apoptosis or senescence-like growth arrest : influence of cell-cycle position, p53, p21 and BAX in H₂O₂ response of normal human fibroblasts[J]. Biochem. J. (2000) 347, 543-551.
- [68] Bey-Dih Chang E V. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents1[J]. Cancer Research,1999,59,3761-3767.
- [69] Yang M Y, Lin P M, Liu Y C, et al. Induction of cellular senescence by doxorubicin is associated with upregulated miR-375 and induction of autophagy in K562 cells[J]. PLoS One, 2012,7(5):e37205.
- [70] Muñoz Espín D, Rovira M, Galiana I, et al. A versatile drug delivery system targeting senescent cells[J]. EMBO molecular medicine, 2018,10(9):e9355.
- [71] Roberson R S, Kussick S J, Vallieres E, et al. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers[J]. Cancer Res, 2005,65(7):2795-2803.
- [72] Hu W, Sung T, Jessen B A, et al. Mechanistic investigation of bone marrow suppression associated with palbociclib and its differentiation from cytotoxic chemotherapies[J]. Clinical Cancer Research, 2016,22(8):2000-2008.
- [73] Han Z, Wei W, Dunaway S, et al. Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002,277(19):17154-17160.
- [74] Roberson R S. Evidence of Cisplatin-induced Senescent-like Growth Arrest in Nasopharyngeal Carcinoma Cells1[J]. Cancer Res 65(7): 2795-803, 2005.

- [75] DeMasters G A, Gupta M S, Jones K R, et al. Potentiation of cell killing by fractionated radiation and suppression of proliferative recovery in MCF-7 breast tumor cells by the Vitamin D3 analog EB 1089[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2004,92(5):365-374.
- [76] Quick Q A, Gewirtz D A. An accelerated senescence response to radiation in wild-type p53 glioblastoma multiforme cells[J]. Journal of neurosurgery, 2006,105(1):111.
- [77] Jones K R, Elmore L W, Jackson-Cook C, et al. p53-dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells[J]. International Journal of Radiation Biology, 2009,81(6):445-458.
- [78] Yu Q, Sicinska E, Geng Y, et al. Requirement for CDK4 kinase function in breast cancer[J]. Cancer Cell, 2006,9(1):23-32.
- [79] Valenzuela C A, Vargas L, Martinez V, et al. Palbociclib-induced autophagy and senescence in gastric cancer cells[J]. Experimental Cell Research, 2017,360(2):390-396.
- [80] Bollard J, Miguela V, Ruiz De Galarreta M, et al. Palbociclib (PD-0332991), a selective CDK4/6 inhibitor, restricts tumour growth in preclinical models of hepatocellular carcinoma[J]. Gut, 2017,66(7):1286-1296.
- [81] Vijayaraghavan S, Karakas C, Doostan I, et al. CDK4/6 and autophagy inhibitors synergistically induce senescence in Rb positive cytoplasmic cyclin E negative cancers[J]. Nature Communications, 2017,8(1):15916.
- [82] Leontieva O V, Blagosklonny M V. CDK4/6-inhibiting drug substitutes for p21 and p16 in senescence: duration of cell cycle arrest and MTOR activity determine geroconversion[J]. Cell Cycle, 2013,12(18):3063-3069.
- [83] Kovatcheva M, Liu D D, Dickson M A, et al. MDM2 turnover and expression of ATRX determine the choice between quiescence and senescence in response to CDK4 inhibition[J]. Oncotarget, 2015,6(10):8226-8243.
- [84] Rader J, Russell M R, Hart L S, et al. Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma[J]. Clinical Cancer Research, 2013,19(22):6173-6182.
- [85] Gong X, Litchfield L M, Webster Y, et al. Genomic aberrations that activate d-type cyclins are associated with enhanced sensitivity to the CDK4 and CDK6 inhibitor abemaciclib[J]. Cancer Cell, 2017,32(6):761-776.
- [86] Xu W, Perez G, Ngo L, et al. Induction of polyploidy by histone deacetylase inhibitor: a pathway for antitumor effects[J]. Cancer Research, 2005,65(17):7832-7839.
- [87] Elknerova K, Myslivcova D, Lacinova Z, et al. Epigenetic modulation of gene expression of human leukemia cell lines-induction of cell death and senescence[J]. Neoplasma, 2011,58(1):35-44.
- [88] Kaletsch A, Pinkerneil M, Hoffmann M J, et al. Effects of novel HDAC inhibitors on urothelial carcinoma cells[J]. Clinical Epigenetics, 2018,10(1):100.
- [89] Däbritz J H M, Yu Y, Milanovic M, et al. CD20-targeting immunotherapy promotes cellular senescence in B-cell lymphoma[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2016,15(5):1074-1081.
- [90] Caterina Nardella J G C. Pro-senescence therapy for cancer treatment[J]. Nature Reviews Cancer, 2011,11(7):503-11.
- [91] Acosta J C, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence[J]. Nature Cell Biology, 2013,15(8):978-990.

- [92] Ruscetti M, Leibold J, Bott M J, et al. NK cell-mediated cytotoxicity contributes to tumor control by a cytostatic drug combination[J]. *Science*, 2018,362(6421):1416-1422.
- [93] Iannello A, Thompson T W, Ardolino M, et al. P53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2013,210(10):2057-2069.
- [94] Sanders Y Y, Liu H, Zhang X, et al. Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress[J]. *Redox Biology*, 2013,1(1):8-16.
- [95] Zhu Y, Tchkonina T, Fuhrmann Stroissnigg H, et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors[J]. *Aging Cell*, 2016,15(3):428-435.
- [96] Sun Y, Campisi J, Higano C, et al. Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B[J]. *Nature Medicine*, 2012,18(9):1359-1368.
- [97] Takasugi M, Okada R, Takahashi A, et al. Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2[J]. *Nature Communications*, 2017,8(1):15729.
- [98] Milanovic M, Fan D N Y, Belenki D, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness[J]. *Nature*, 2018,553(7686):96-100.
- [99] Ewald J A, Desotelle J A, Wilding G, et al. Therapy-induced senescence in cancer[J]. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2010,102(20):1536-1546.
- [100] Campisi J, Andersen J K, Kapahi P, et al. Cellular senescence: A link between cancer and age-related degenerative disease?[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2011,21:354-359.
- [101] Demaria M M N J. Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse[J]. *Cancer discovery*, 2017,7(2):165-176.
- [102] Chien Y, Scuoppo C, Wang X, et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity[J]. *Genes & Development*, 2011,25(20):2125-2136.
- [103] Freund A, Patil C K, Campisi J. P38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype[J]. *EMBO J*, 2011,30(8):1536-1548.
- [104] Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld L C, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network[J]. *Cell*, 2008,133(6):1019-1031.
- [105] Faget D V, Ren Q, Stewart S A. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2019,19(8):439-453.
- [106] Orjalo A V, Bhaumik D, Gengler B K, et al. Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009,106(40):17031-17036.
- [107] Acosta J C. Chemokine Signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence[J]. *Cell*, 2008(133(6)):1006-1018.
- [108] Kang T, Yevsa T, Woller N, et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development[J]. *Nature*, 2011,479(7374):547-551.
- [109] Eggert T, Wolter K, Ji J, et al. Distinct functions of senescence-associated immune responses in liver tumor surveillance and tumor progression[J]. *Cancer Cell*, 2016,30(4):533-547.
- [110] Braumüller H, Wieder T, Brenner E, et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence[J].

- Nature, 2013,494(7437):361-365.
- [111] Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, et al. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001,98(21):12072-12077.
 - [112] Liu D, Hornsby P J. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion[J]. Cancer Research, 2007,67(7):3117-3126.
 - [113] Donnini S, Monti M, Castagnini C, et al. Pyrazolo-pyrimidine-derived c-Src inhibitor reduces angiogenesis and survival of squamous carcinoma cells by suppressing vascular endothelial growth factor production and signaling[J]. International Journal of Cancer, 2007,120(5):995-1004.
 - [114] Lasry A, Ben-Neriah Y. Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives[J]. Trends in Immunology, 2015,36(4):217-228.
 - [115] Goulet C R, Champagne A, Bernard G, et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through paracrine IL-6 signalling[J]. BMC Cancer, 2019,19(1):137.
 - [116] Wang L, Tang C, Cao H, et al. Activation of IL-8 via PI3K/Akt-dependent pathway is involved in leptin-mediated epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2015,16(8):1220-1230.
 - [117] Waugh D J J, Wilson C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2008,14(21):6735-6741.
 - [118] Ruhland M K, Loza A J, Capietto A, et al. Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis[J]. Nature Communications, 2016,7(1):11762.
 - [119] Di Mitri D, Toso A, Chen J J, et al. Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer[J]. Nature, 2014,515(7525):134-137.
 - [120] Eggert T, Wolter K, Ji J, et al. Distinct functions of senescence-associated immune responses in liver tumor surveillance and tumor progression[J]. Cancer Cell, 2016,30(4):533-547.
 - [121] Lian J, Yue Y, Yu W, et al. Immunosenescence: a key player in cancer development[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2020,13(1):151.
 - [122] Triana-Martínez F, Loza M I, Domínguez E. Beyond Tumor Suppression: Senescence in Cancer Stemness and Tumor Dormancy[J]. Cells, 2020,9(2):346.
 - [123] Lee S, Schmitt C A. The dynamic nature of senescence in cancer[J]. Nature Cell Biology, 2019,21(1):94-101.
 - [124] Patel P L, Suram A, Mirani N, et al. Derepression of hTERT gene expression promotes escape from oncogene-induced cellular senescence[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016,113(34):E5024-33.
 - [125] Milanovic M, Fan D N Y, Belenki D, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness[J]. Nature, 2018,553(7686):96-100.
 - [126] Demaria M M N. Cellular Senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse[J]. Cancer discovery, 2017:2159-8274.
 - [127] Wang L, Lankhorst L, Bernards R. Exploiting senescence for the treatment of cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2022,22(6):340-355.
 - [128] Raposo G, Nijman H W, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles[J]. J

- Exp Med, 1996,183(3):1161-1172.
- [129] Meckes D G, Shair K H Y, Marquitz A R, et al. Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010,107(47):20370-20375.
 - [130] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. Nature Cell Biology, 2007,9(6):654-659.
 - [131] Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers[J]. Nature Cell Biology, 2008,10(12):1470-1476.
 - [132] Gao J, Chu D, Wang Z. Cell membrane-formed nanovesicles for disease-targeted delivery[J]. Journal of Controlled Release, 2016,224:208-216.
 - [133] Fei X, Li Z, Yang D, et al. Neddylation of Coro1a determines the fate of multivesicular bodies and biogenesis of extracellular vesicles[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2021,10(12):e12153.
 - [134] Akers J C, Gonda D, Kim R, et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies[J]. Journal of Neuro-Oncology, 2013,113(1):1-11.
 - [135] Juan T, Fürthauer M. Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2018,74:66-77.
 - [136] An Y, Lin S, Tan X, et al. Exosomes from adipose - derived stem cells and application to skin wound healing[J]. Cell Proliferation, 2021,54(3):e12993.
 - [137] Gao J, Dong X, Wang Z. Generation, purification and engineering of extracellular vesicles and their biomedical applications[J]. Methods, 2020,177:114-125.
 - [138] Gao J, Wang S, Wang Z. High yield, scalable and remotely drug-loaded neutrophil-derived extracellular vesicles (EVs) for anti-inflammation therapy[J]. Biomaterials, 2017,135:62-73.
 - [139] Ha D, Yang N, Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2016,6(4):287-296.
 - [140] Wang Q, Zhuang X, Mu J, et al. Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids[J]. Nature Communications, 2013,4(1):1867.
 - [141] Zhang M, Xiao B, Wang H, et al. Edible ginger-derived bano-lipids loaded with doxorubicin as a novel drug-delivery approach for colon cancer therapy[J]. Mol Ther, 2016,24(10):1783-1796.
 - [142] Raimondo S, Naselli F, Fontana S, et al. Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death[J]. Oncotarget, 2015,6(23):19514-19527.
 - [143] Del Pozo-Acebo L, López De Las Hazas M, Tomé-Carneiro J, et al. Therapeutic potential of broccoli-derived extracellular vesicles as nanocarriers of exogenous miRNAs[J]. Pharmacological Research, 2022,185:106472.
 - [144] Dad H A, Gu T, Zhu A, et al. Plant Exosome-like Nanovesicles: Emerging Therapeutics and Drug Delivery Nanoplatforms[J]. Molecular Therapy, 2021,29(1):13-31.
 - [145] Mortezaee K, Salehi E, Mirtavoos Mahyari H, et al. Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for cancer therapy[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019,234(8):12537-12550.
 - [146] Calibasi-Kocal G, Pakdemirli A, Bayrak S, et al. Curcumin effects on cell proliferation, angiogenesis and metastasis in colorectal cancer[J]. Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of

- Oncology, 2019,24(4):1482.
- [147] Hassanilou T, Ghavamzadeh S, Khalili L. Curcumin and gastric cancer: a review on mechanisms of action[J]. Journal of Gastrointestinal Cancer, 2019,50(2):185-192.
- [148] Wang Y, Yu J, Cui R, et al. Curcumin in treating breast cancer: A Review[J]. SLAS Technology, 2016,21(6):723-731.
- [149] Wan Mohd Tajuddin W N B, Lajis N H, Abas F, et al. Mechanistic understanding of curcumin's therapeutic effects in lung cancer[J]. Nutrients, 2019,11(12):2989.
- [150] Bimonte S, Barbieri A, Palma G, et al. Dissecting the role of curcumin in tumour growth and angiogenesis in mouse model of human breast cancer[J]. BioMed Research International, 2015,2015:1-7.
- [151] Ye M, Zhang J, Zhang J, et al. Curcumin promotes apoptosis by activating the p53-miR-192-5p/215-XIAP pathway in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Letters, 2015,357(1):196-205.
- [152] Wang P, Zhang L, Peng H, et al. The formulation and delivery of curcumin with solid lipid nanoparticles for the treatment of on non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo[J]. Materials Science and Engineering: C, 2013,33(8):4802-4808.
- [153] Saxena V, Hussain M D. Polymeric Mixed Micelles for Delivery of Curcumin to Multidrug Resistant Ovarian Cancer[J]. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2013,9(7):1146-1154.
- [154] Gou Q, Liu L, Wang C, et al. Polymeric nanoassemblies entrapping curcumin overcome multidrug resistance in ovarian cancer[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2015,126:26-34.
- [155] Jordan B C, Mock C D, Thilagavathi R, et al. Molecular mechanisms of curcumin and its semisynthetic analogues in prostate cancer prevention and treatment[J]. Life Sciences, 2016,152:135-144.
- [156] Yallapu M M, Khan S, Maher D M, et al. Anti-cancer activity of curcumin loaded nanoparticles in prostate cancer[J]. Biomaterials, 2014,35(30):8635-8648.
- [157] Phillips J M, Clark C, Herman Fernandez L, et al. Curcumin inhibits skin squamous cell carcinoma tumor growth in vivo[J]. Otolaryngology – Head and Neck Surgery, 2011,145(1):58-63.
- [158] Phillips J, Moore Medlin T, Sonavane K, et al. Curcumin inhibits UV radiation-induced skin cancer in SKH-1 mice[J]. Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2013,148(5):797-803.
- [159] Trujillo J, Chirino Y I, Molina-Jijón E, et al. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings[J]. Redox Biology, 2013,1(1):448-456.
- [160] Selvam C, Jachak S M, Thilagavathi R, et al. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking of curcumin analogues as antioxidant, cyclooxygenase inhibitory and anti-inflammatory agents[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005,15(7):1793-1797.
- [161] Mun S, Joung D, Kim Y, et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. Phytomedicine, 2013,20(8-9):714-718.
- [162] Shehzad A, Rehman G, Lee Y S. Curcumin in inflammatory diseases[J]. BioFactors, 2013,39(1):69-77.
- [163] Zorofchian Moghadamtousi S, Abdul Kadir H, Hassandarvish P, et al. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin[J]. BioMed Research International, 2014,2014:1-12.
- [164] Yang Y, Wu X, Wei Z, et al. Oral curcumin has anti-arthritic efficacy through somatostatin generation via cAMP/PKA and Ca²⁺/CaMKII signaling pathways in the small intestine[J]. Pharmacological Research, 2015,95-96:71-81.

- [165] Huang G, Xu Z, Huang Y, et al. Curcumin protects against collagen-induced arthritis via suppression of BAFF production[J]. *Journal of Clinical Immunology*, 2013,33(3):550-557.
- [166] Rashid K, Sil P C. Curcumin enhances recovery of pancreatic islets from cellular stress induced inflammation and apoptosis in diabetic rats[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2015,282(3):297-310.
- [167] Castro C N, Barcala Tabarrozzi A E, Winnewisser J, et al. Curcumin ameliorates autoimmune diabetes. Evidence in accelerated murine models of type 1 diabetes[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2014,177(1):149-160.
- [168] Aggarwal B B, Harikumar K B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2009,41(1):40-59.
- [169] Aggarwal B B, Shishodia S, Takada Y, et al. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor- κ B pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice[J]. *Clinical Cancer Research*, 2005,11(20):7490-7498.
- [170] Ashrafizadeh M, Rafiei H, Mohammadinejad R, et al. Potential therapeutic effects of curcumin mediated by JAK/STAT signaling pathway: A review[J]. *Phytotherapy Research*, 2020,34(8):1745-1760.