

超分子纳米疫苗用于黑色素瘤免疫治疗

崔彦琪, 封文洁, 刘 轶

(吉林大学化学学院, 超分子结构与材料国家重点实验室, 长春 130012)

摘要 纳米疫苗是肿瘤免疫治疗的重要组成部分, 主要通过激活机体免疫系统抑制并清除肿瘤; 但是肿瘤组织普遍存在的免疫抑制微环境会大大降低纳米疫苗的治疗效果. 因此, 设计制备既可以逆转肿瘤组织免疫抑制微环境, 又可以激活机体抗肿瘤免疫响应的纳米疫苗, 对肿瘤免疫治疗的发展具有重要意义. 本文利用铁离子(Fe^{3+})和紫草素(Shik)之间的配位相互作用构筑了Fe/Shik超分子纳米结构, 并通过负载鸡卵白蛋白(OVA, B16-OVA肿瘤抗原)和R837(TLR7激动剂, 佐剂)制备了OVA/R837@Fe/Shik纳米疫苗. 该纳米疫苗具有良好的胶体稳定性及抗肿瘤活性, 可以在肿瘤微环境中特异性拆解并释放 Fe^{2+} , Shik, OVA和R837, 通过诱导肿瘤细胞铁死亡和程序性坏死引发免疫原性细胞死亡并释放细胞裂解物, 细胞裂解物协同OVA以及R837共同诱导树突细胞成熟, 促进细胞毒性T淋巴细胞的激活与浸润以及巨噬细胞向M1表型极化, 从而在逆转肿瘤组织免疫抑制微环境的同时激活机体的抗肿瘤免疫反应.

关键词 纳米疫苗; 铁死亡; 程序性坏死; 免疫疗法; 免疫原性细胞死亡

中图分类号 O625.31

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240245

Supramolecular Nanovaccines for Melanoma Immunotherapy

CUI Yanqi, FENG Wenjie, LIU Yi*

(State Key Laboratory of Supramolecular Structure and Materials, College of Chemistry,
Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract As an important part of tumor immunotherapy, nanovaccines eradicate tumor mainly through activating the body's immune system. However, the immunosuppressive microenvironment can largely reduce the therapeutic effect of nanovaccines in tumor tissues. Therefore, the preparation of nanovaccines that can both reverse the immunosuppressive microenvironment of tumor tissues and activate the antitumor immune response is of great significance for the development of tumor immunotherapy. In this study, the Fe/Shik supramolecular nanostructures were constructed by utilizing the coordination interaction between Fe^{3+} and Shikonin(Shik). Furthermore, OVA/R837@Fe/Shik nanovaccines were prepared by loading ovalbumin(OVA, B16-OVA tumor antigen) and R837 (TLR7 agonist, adjuvant) on the basis of Fe/Shik nanostructures. Thanks to the good colloidal stability and antitumor activity, the nanovaccines can specifically disassemble and release Fe^{2+} , Shik, OVA, R837 in the tumor microenvironment, eliciting immunogenic cell death by ferroptosis and necroptosis of tumor cells. The released cell lysates cooperate with OVA and adjuvants to stimulate dendritic cells maturation, promoting the activation and infiltration of cytotoxic T-lymphocytes, repolarization of macrophage, thereby activating the antitumor immune response. The study effectively overcomes the inhibitory effect of the immunosuppressive microenvironment of tumor tissues on the nanovaccines, and provide a new strategy for tumor immunotherapy.

Keywords Nanovaccines; Ferroptosis; Necroptosis; Immunotherapy; Immunogenic cell death

收稿日期: 2024-05-20. 网络首发日期: 2024-08-13.

联系人简介: 刘 轶, 男, 博士, 教授, 主要从事聚合物纳米复合材料诊疗方面的研究. E-mail: yiliu@chem@jlu.edu.cn

基金项目: 长春市科技发展计划项目(批准号: 23***13)资助.

Supported by the Science and Technology Development Program of Changchun City, China(No.23***13).

癌症又称为恶性肿瘤,是威胁人类健康、国民经济以及社会发展的主要疾病。目前,治疗肿瘤的常规方法主要有手术、化疗和放疗。但这些常规治疗方法很难彻底根除肿瘤,且患者面临肿瘤转移以及复发的风险^[1]。近年来,随着免疫学、临床医学的快速发展,免疫治疗逐步成为治疗肿瘤的重要手段^[2,3]。免疫治疗通过激活或增强机体免疫反应来识别和杀伤肿瘤细胞。与手术、化疗和放疗不同,免疫治疗主要作用于免疫系统而非肿瘤细胞本身,具有复发率低、特异性高等优点^[4]。同时,免疫治疗具有长效性,当机体再次出现肿瘤细胞时,免疫系统会特异性识别并攻击肿瘤细胞,对其它正常细胞及组织的毒副作用较小。因此,免疫治疗已成为当今肿瘤治疗领域的研究热点^[5-7]。

随着纳米技术的发展,纳米疫苗成为肿瘤免疫治疗的重要分支^[8]。纳米疫苗主要由抗原和佐剂组成^[9,10]。其中,抗原是指能诱导机体发生免疫应答,产生抗体和/或致敏淋巴细胞的物质,主要包括肿瘤相关抗原(TAAs)、肿瘤特异性抗原(TSAs)和肿瘤裂解物^[11,12]。佐剂是能够非特异性改变或增强机体对抗原的特异性免疫应答、发挥辅助作用的一类物质。Toll样受体(TLRs)激动剂可利用内源性免疫信号通路增强和调节免疫反应,对肿瘤疫苗具有重要意义^[13,14]。纳米疫苗在被树突细胞(DCs)摄取后,会诱导DCs成熟,加速抗原的交叉呈递,进而促进细胞毒性T淋巴细胞(CD8⁺ T细胞)的激活与浸润,实现对肿瘤组织的识别和清除^[15-17]。另外,记忆T淋巴细胞的大量产生也可有效抑制肿瘤复发^[18]。然而,肿瘤组织普遍存在的免疫抑制微环境会大大降低免疫治疗的效果。因此,开发更高效的纳米疫苗,在激活免疫系统的同时,逆转肿瘤组织的免疫抑制微环境,是提高肿瘤免疫治疗的新策略^[19]。

免疫原性细胞死亡(ICD)是一种调节性细胞死亡方式。肿瘤细胞在ICD过程中释放的损伤相关分子模式可以被当作特异性的肿瘤抗原用于激活机体的抗肿瘤免疫响应^[20-22]。ICD也可以有效逆转肿瘤组织的免疫抑制微环境。程序性坏死是一种由内源性或外源性途径激活的程序性细胞死亡模式。发生程序性坏死的肿瘤细胞会释放具有免疫原性的损伤相关分子模式,诱导肿瘤细胞ICD^[23,24]。紫草素(Shik)作为一种天然药物,能够促进受体相互作用蛋白激酶1(RIPK1)和受体相互作用蛋白激酶3(RIPK3)的表达,从而高效诱导细胞程序性坏死^[25,26]。铁死亡是一种铁依赖性细胞死亡模式,主要表现在胞内亚铁粒子(Fe²⁺)和活性氧自由基(ROS)浓度升高,谷胱甘肽过氧化物酶(GPX4)表达水平下调,进而造成脂质过氧化物(LPO)累积,诱导细胞死亡并释放损伤相关分子模式^[27-30]。Shik具有酚羟基结构,可以与金属离子配位构筑金属/多酚网络。如果利用Shik与铁离子配位制备Fe/Shik超分子纳米结构,就可以充分利用Shik和铁离子的生物活性,诱导肿瘤细胞发生程序性坏死和铁死亡,进而促进肿瘤细胞ICD,在逆转肿瘤组织免疫抑制微环境的同时激活机体抗肿瘤免疫响应。

本文利用Fe³⁺和Shik之间的配位作用构筑了Fe/Shik超分子纳米结构,并通过负载鸡卵白蛋白(OVA, B16-OVA肿瘤抗原)和R837(TLR7激动剂,佐剂)制备了OVA/R837@Fe/Shik纳米疫苗。OVA/R837@Fe/Shik纳米疫苗在被B16-OVA肿瘤细胞摄取之后,会在高浓度谷胱甘肽(GSH)作用下发生响应性拆解,释放Fe²⁺, Shik, OVA和R837。其中Fe²⁺和Shik可以诱导肿瘤细胞铁死亡和程序性坏死,进而发生ICD并释放一系列损伤相关分子模式,包括钙网蛋白(CRT)的暴露、高迁移率组蛋白B1(HMGB1)的迁移,以及三磷酸腺苷(ATP)的分泌。这些损伤相关分子模式和OVA、R837一同被DCs摄取,促进DCs成熟和抗原交叉呈递,激活CD8⁺ T细胞,实现针对B16-OVA肿瘤的免疫治疗。由于OVA/R837@Fe/Shik纳米疫苗具有良好的生物安全性,本研究为肿瘤免疫治疗提供了新策略。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

卵清蛋白(OVA)购自Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司;紫草素、咪喹莫特(R837)、二甲基亚砜(DMSO)、六水合氯化铁(FeCl₃·6H₂O)、谷胱甘肽(GSH)、硫氰酸钾、铁氰化钾、亚甲基蓝(MB)和对苯二甲酸二钠(TPA)均购自阿拉丁试剂公司;过氧化氢(H₂O₂)购自国药集团化学试剂有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS)、1640培养基购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;胎牛血清(FBS)购自四季青公司;Cell Counting Kit-8试剂(CCK-8)购自GlpBio公司;BODIPY^{581/591}-C11和2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸钠酯

(DCFH-DA)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Ferro Orange 购自日本同仁化学; BCA 蛋白检测试剂盒和高迁移率组蛋白 B1 (HMGB1) 试剂盒购自赛培生物公司; 还原型谷胱甘肽测定试剂盒、Hoechst33342 和 ATP 检测试剂盒均购自碧云天公司; 钙网蛋白抗体 (Anti-CRT) 和高迁移率族蛋白 B1 抗体 (Anti-HMGB1) 均购自 Abcam 试剂公司; CD11c-FITC 抗体、CD80-PE 抗体、CD86-PE-Cyanine5 抗体、CD3-FITC 抗体、CD4-PE 抗体、CD8a-PE-Cyanine5 抗体、F4/80-FITC 抗体、Foxp3-PE-Cyanine5 抗体和 CD206-PE 抗体均购于 eBioscience 公司。

JEM-2100F 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司); Bruker VERTEX 80V 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Bruker 公司); RF-6000 型荧光光谱仪(日本岛津公司); Zetasizer Nano ZS 型纳米粒度电位仪(中国马尔文帕纳科仪器公司); 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); Infinite 200 PRO 型酶标仪(中国 Tecan 上海贸易有限公司); OLYMPUS FV1000 型激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司); BD FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司)。

1.2 实验过程

1.2.1 OVA/R837@Fe/Shik 的制备 在 60 °C 超声条件下, 将 R837 溶于 DMSO 中得到 R837 溶液 (2 mg/mL), 备用。在室温条件下, 将 30 mg OVA 溶解在 15 mL 水中得到 OVA 水溶液。随后向 OVA 水溶液中加入三氯化铁水溶液 (10 mg/mL)、R837 溶液以及 Shik 溶液 (5 mg/mL)。搅拌 90 min 后, 经多次超滤离心洗涤, 收集得到的离心产物即为 OVA/R837@Fe/Shik。

1.2.2 OVA/R837@Fe/Shik 的 GSH 响应性及自由基生成测试 将 OVA/R837@Fe/Shik (50 $\mu\text{g/mL}$) 与 GSH (10 mmol/L) 进行共孵育, 反应 1 h 后, 对反应液进行离心并收集上层清液, 依次向 1 mL 上层清液中加入 H_2O 、硫氰酸钾 (1 mg/mL) 以及铁氰化钾 (1 mg/mL), 静置一段时间后, 观察溶液颜色的变化。此外, 向收集好的上层清液中依次加入 MB 溶液和 H_2O_2 , 于 37 °C 水浴条件下反应 30 min 后, 使用紫外-可见吸收 (UV-Vis) 光谱仪测试 MB 的特征吸收峰。此外, 对苯二甲酸二钠 (TPA) 用于 $\cdot\text{OH}$ 的检测, 与 MB 过程相同, 使用荧光光谱仪对溶液进行测试。

1.2.3 细胞毒性测试 首先, 将 B16-OVA 细胞接种在 96 孔板中, 并使用含有 10% FBS 的 1640 培养基对 B16-OVA 细胞进行培养。孵育 24 h 后, 再分别与不同浓度的 OVA, Fe/Shik, OVA@Fe/Shik 和 OVA/R837@Fe/Shik 进行共培养。24 h 后, 向每孔内加入 10 μL Cell Counting Kit-8, 并在培养箱内继续孵育 30 min。最后, 使用酶标仪对细胞的相对存活率进行测试。

1.2.4 细胞内 ROS 水平、 Fe^{2+} 水平、LPO 含量以及 GSH 含量测试 一方面, 通过激光扫描共聚焦显微镜 (CLSM) 图像分析细胞内的 ROS 水平。首先, 将 B16-OVA 细胞接种在含有 1 mL 培养基的共聚焦皿中。孵育 24 h 后分别加入 OVA, R837, Fe/Shik, OVA@Fe/Shik 和 OVA/R837@Fe/Shik (40 $\mu\text{g/mL}$ 的 OVA/R837@Fe/Shik 中的等效剂量) 对细胞进行处理。最后, 加入 DCFH-DA 荧光探针并进行测试, 得到 CLSM 图像。另一方面, 通过流式细胞术定量检测细胞内的 ROS 水平。将 B16-OVA 细胞以细胞密度为每孔 5.0×10^5 个细胞接种在 6 孔板中。加入不同材料处理细胞后, 使用流式细胞仪进行测试。

细胞内 Fe^{2+} 水平、LPO 含量、GSH 含量与细胞内 ROS 水平测试的过程相同。最后使用亚铁离子荧光探针 Ferro Orange 测试 Fe^{2+} 水平。使用 BODIPY^{581/591}-C11 测试细胞内的 LPO 含量。依据 GSH 检测试剂盒说明书对细胞内 GSH 的含量进行测试。

1.2.5 RIPK1 和 RIPK3 表达测试 使用 ELISA 试剂盒对各组细胞中 RIPK1 和 RIPK3 的表达情况进行测试。将细胞在 6 孔细胞培养板中进行培养, 孵育与处理过程与测试 ROS 水平的过程相同。随后收集全部细胞, 使用超声波细胞破碎仪处理细胞, 对细胞进行离心并收集上层清液, 最后依据 ELISA 试剂盒说明书对各组细胞的 RIPK1 和 RIPK3 表达情况进行检测。

1.2.6 CRT 表达、HMGB1 表达和三磷酸腺苷 (ATP) 水平测试 将细胞接种在共聚焦皿中, 加入不同材料处理细胞后, 对细胞进行固定、透化以及封闭处理。随后, 用 CRT (或 HMGB1) 一抗、二抗稀释液孵育细胞。最后, 使用 Hoechst33342 处理细胞, 使用 CLSM 对细胞内 CRT 和 HMGB1 的表达情况进行分析。此外, 通过 ELISA 试剂盒定量分析 B16-OVA 细胞内 HMGB1 的表达水平。将细胞接种在 6 孔细胞培

养皿中,与不同材料进行共孵育.收集细胞上层清液,并依据 HMGB1 试剂盒说明书分析细胞内 HMGB1 的表达水平.

将 B16-OVA 细胞接种在 6 孔细胞培养板中,并对细胞进行上述相同处理.24 h 后收集上层清液,最后使用 ATP 检测试剂盒对细胞 ATP 水平进行测试.

1.2.7 体外骨髓来源树突状细胞成熟测试 雌性 C57BL/6 小鼠(小鼠体重 19~21 g, 周龄 6~8 周)购自北京维通利华实验动物技术有限公司.所有动物实验均按照吉林大学第一医院实验动物中心的要求进行及展开.

从健康 C57BL/6 小鼠的后腿中提取骨髓来源树突状细胞(BMDCs).首先,取下 C57BL/6 小鼠的两只后腿,并在 70% 乙醇中杀菌消毒,浸泡一段时间后,使用消毒过的剪刀和镊子将小鼠后腿的肌肉剔除干净.然后将小鼠小腿的一端剪掉,用装有 1 mL HBSS (含有 5% FBS) 的胰岛素注射器对小腿骨进行冲洗,直至骨头由红色变为白色.将冲洗过小腿骨的 HBSS 进行收集并离心,在 800 r/min 条件下离心 10 min 后,收集离心后的细胞,并向细胞中加入适量的红细胞裂解液,静置裂解 5 min 后再次离心并收集细胞.最后,用预先配制好的培养基培养细胞.在细胞培养的第三天,向细胞培养瓶内加入 10 mL 上述 1640 培养基.在细胞培养的第六天,更换部分培养基并继续培养.在培养的第八天,将 B16-OVA 细胞接种在 6 孔板内,用含有 10% FBS 的 1640 培养基对细胞进行培养,24 h 后加入 OVA, R837, Fe/Shik, OVA@Fe/Shik 和 OVA/R837@Fe/Shik (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 OVA/R837@Fe/Shik 中的等效剂量)处理细胞.24 h 后,将 B16-OVA 细胞与小鼠骨髓来源树突状细胞(BMDCs)进行共孵育.孵育 24 h 后对细胞进行离心和收集,然后使用 anti-CD11c-FITC, anti-CD80-PE 以及 anti-CD86-PE-Cyanine5 对细胞进行染色,通过流式细胞术定量分析不同方式处理后细胞内成熟的 BMDCs.

1.2.8 体内抗肿瘤效果 首先,用小鼠剃毛器剔除 C57BL/6 小鼠背部右下方毛发,然后皮下接种 B16-OVA 细胞,构建 B16-OVA 肿瘤模型.每 2 天观测并记录肿瘤大小,当瘤体生长至约 50 mm^3 时,将荷瘤小鼠随机分为 6 组,每组 5 只荷瘤小鼠.随后,对每组小鼠进行尾静脉注射给药,分别注射 PBS, OVA, R837, Fe/Shik, OVA@Fe/Shik 以及 OVA/R837@Fe/Shik (分别对应 I 组、II 组、III 组、IV 组、V 组以及 VI 组).每 2 天测量并记录小鼠肿瘤体积以及小鼠体重.连续记录 14 d 后结束实验,将各组小鼠的肿瘤组织进行收集,并记录肿瘤体积和肿瘤质量.通过对比各组小鼠的肿瘤大小,比较药物抗肿瘤效果.

1.2.9 体内抗肿瘤免疫作用机制 收集小鼠的肿瘤组织以及脾脏,通过苏木精-伊红(H&E)、免疫荧光以及流式细胞术对体内抗肿瘤免疫机制进行研究.

(1) 肿瘤组织的免疫荧光染色和 H&E 染色.使用谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4), RIPK1, RIPK3, CRT 以及 HMGB1 的一抗和二抗处理 B16-OVA 的肿瘤切片,通过免疫荧光照片分析蛋白的表达.通过 H&E 染色照片对肿瘤组织中的病理损伤进行分析.

(2) 小鼠脾脏 DCs 成熟情况的检测.首先,将收集的各组小鼠脾脏碾碎并用筛网过滤,得到相应的细胞悬液,然后将细胞悬液在 800 r/min 的条件下离心 5 min.使用 CD11c-FITC 抗体、CD80-PE 抗体、CD86-PE-Cyanine5 抗体处理细胞,在细胞培养箱内孵育 30 min 后,离心洗涤并收集细胞.最后,通过流式细胞术分析 DCs 的成熟情况.

(3) 肿瘤组织中 T 淋巴细胞的检测.制备肿瘤组织的单细胞悬液并使用 CD3-FITC 抗体、CD4-PE 抗体和 CD8a-PE-Cyanine5 抗体处理细胞,然后通过流式细胞术定量检测肿瘤组织中的 T 细胞.

(4) 肿瘤组织中调节性 T 细胞的检测.制备肿瘤单细胞悬液(制备过程与 T 淋巴细胞检测相同),并使用相应抗体(anti-CD3-FITC, anti-CD4-PE 和 anti-Foxp3-PE-Cyanine5)处理细胞,在细胞培养箱内孵育 30 min 后,离心洗涤并收集细胞.使用流式细胞术对肿瘤组织中的调节性 T 细胞进行定量检测.

(5) 肿瘤组织中巨噬细胞表型的检测.制备肿瘤单细胞悬液(制备过程与 T 淋巴细胞检测相同),并使用 F4/80-FITC 抗体、CD206-PE 抗体和 PE-CD86-Cyanine5 抗体处理细胞,在细胞培养箱内孵育 30 min 后,离心洗涤并收集细胞.最后,通过流式细胞术检测肿瘤组织中巨噬细胞表型.

1.2.10 体内抗肿瘤肺转移 首先,用小鼠剃毛器剔除 C57BL/6 小鼠背部右下方毛发,然后皮下接种

B16-OVA 细胞, 构建 B16-OVA 肿瘤模型. 每 2 天观测并记录肿瘤大小, 当瘤体生长至约 50 mm^3 时, 将荷瘤小鼠随机分为 6 组, 每组 3 只小鼠. 分别为 I 组、II 组、III 组、IV 组、V 组以及 VI 组(与上述分组情况相同). 在给药治疗的第四天, 将 B16-OVA 细胞注射到荷瘤小鼠体内. 21 d 后, 将小鼠实行安乐死, 立即取出小鼠肺并固定. 观察各组小鼠全肺变化以及肺上结节的数量并拍照片. 此外, 通过 H&E 染色对小鼠全肺进行病理学分析.

1.2.11 生物安全性测试 将健康 C57BL/6 小鼠随机分为 6 组, 每组 3 只小鼠. 随后, 向小鼠体内分别注射 PBS, OVA, R837, Fe/Shik, OVA@Fe/Shik 以及 OVA/R837@Fe/Shik (即对应 I 组、II 组、III 组、IV 组、V 组以及 VI 组). 在第七天, 对各组小鼠实行安乐死, 并收集各组小鼠的新鲜血液和心、肝、脾、肺和肾脏等主要器官, 并将小鼠主要器官浸泡在多聚甲醛(4%)中进行固定以便后续 H&E 染色实验的开展来验证材料的生物安全性. 一方面, 对小鼠血液进行离心, 收集小鼠血清并通过生化试验检测肝功能和肾功能指标. 另一方面, 对主要器官的切片进行 H&E 染色.

2 结果与讨论

2.1 OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗的表征

对 OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗进行了表征. 由图 1(A) 可见, 纳米疫苗直径为 44.8 nm , 水合粒径为 86.7 nm [图 1(B)]. 图 1(C) 为 OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗的紫外-可见吸收光谱图. 与 Fe/Shik 相比, OVA/R837@Fe/Shik 在 270 nm 和 317 nm 处出现紫外吸收峰, 表明 OVA 和 R837 已成功负载. 另外, 还对纳米疫苗进行了傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 表征 [图 1(D)]. 与 Shik 分子相比, Fe/Shik 中 Shik 的 O—H 伸缩振动峰从 3250 cm^{-1} 移动到了 3450 cm^{-1} , 说明 Shik 和 Fe^{3+} 之间存在配位作用. OVA@Fe/Shik 的 FTIR 光谱在 1120 和 980 cm^{-1} 处出现特征吸收峰, 说明存在 Fe/Shik, 并在 1650 cm^{-1} 处出现了 C=O 的伸缩振动峰, 证明了 OVA 的负载. 以上结果表明, OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗由 OVA, R837 以及 Fe/Shik 组成. 最后, 根据标准曲线方法计算得到 OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗中 R837 的包封率为 4.6% [图 1(E) 和 (F)].

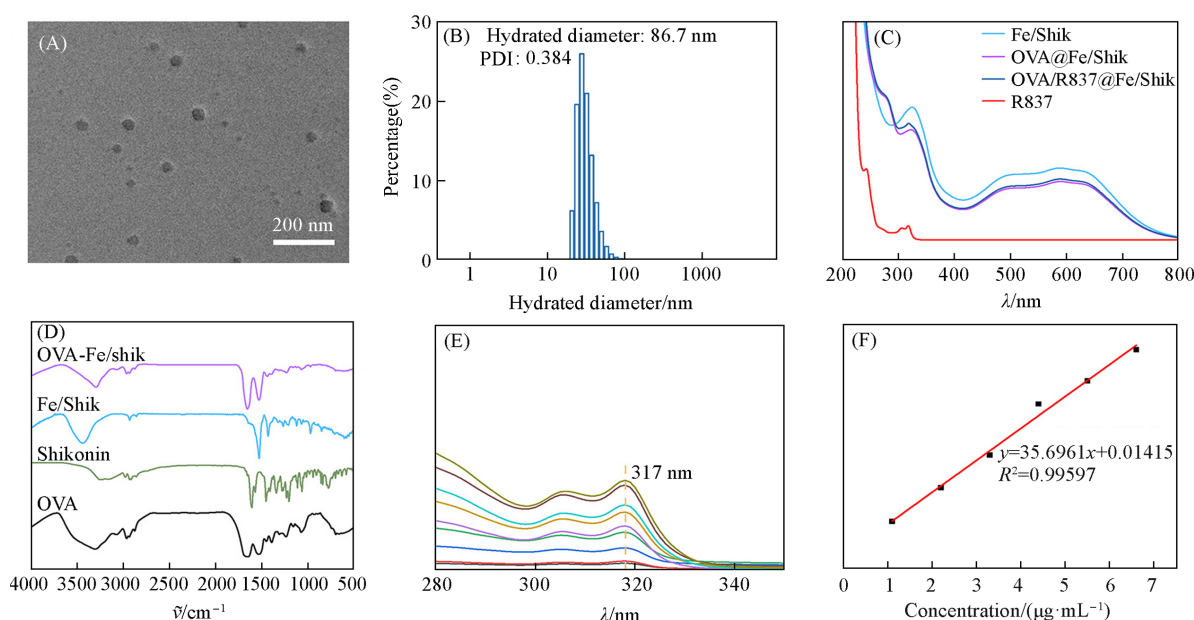


Fig. 1 TEM image of OVA/R837@Fe/Shik(A), DLS hydrodynamic diameter of OVA/R837@Fe/Shik(B), UV-Vis absorption spectra of R837, Fe/Shik, OVA@Fe/Shik and OVA/R837@Fe/Shik(C), FTIR spectra of OVA, Shik, Fe/Shik and OVA/R837@Fe/Shik(D), UV-Vis absorption spectra of R837 (E) and the standard absorption curve of R837(F)

2.2 OVA/R837@Fe/Shik 的 GSH 响应性拆解及 ROS 生成性能

纳米疫苗的响应性拆解是其发挥抗肿瘤作用的前提. 因此, 测试了 OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗

的GSH响应性拆解以及ROS生成性能. 如图2(A)所示, OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗经GSH处理后, 溶液颜色发生改变. 加入铁氰化钾后, 溶液颜色由粉红色变为蓝绿色. 而加入硫氰酸钾的上层清液, 溶液颜色没有发生明显改变[图2(A)]. 以上结果说明, OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗在GSH条件下 Fe^{3+} 被还原为 Fe^{2+} 而发生拆解. 释放的 Fe^{2+} 会催化芬顿反应生产大量 $\cdot\text{OH}$. OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗经GSH及 H_2O_2 处理后, MB的紫外特征吸收峰变弱, 说明MB被芬顿反应生成的 $\cdot\text{OH}$ 氧化[图2(B)].

另外, TPA也可以与 $\cdot\text{OH}$ 反应生产具有荧光性质的物质, 因此使用TPA作为探针检测 $\cdot\text{OH}$ 的生成. 在荧光光谱中, 只有当OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗与GSH以及 H_2O_2 同时存在时才能产生荧光信号, 说明TPA与 $\cdot\text{OH}$ 发生了反应[图2(C)]. 以上结果说明, OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗在肿瘤微环境中会消耗GSH, 释放 Fe^{2+} , 并通过芬顿反应产生 $\cdot\text{OH}$. 另外, OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗在多种生理环境中都具有良好的胶体稳定性, 其水合粒径不随时间的延长而发生明显的改变[图2(D)~(F)].

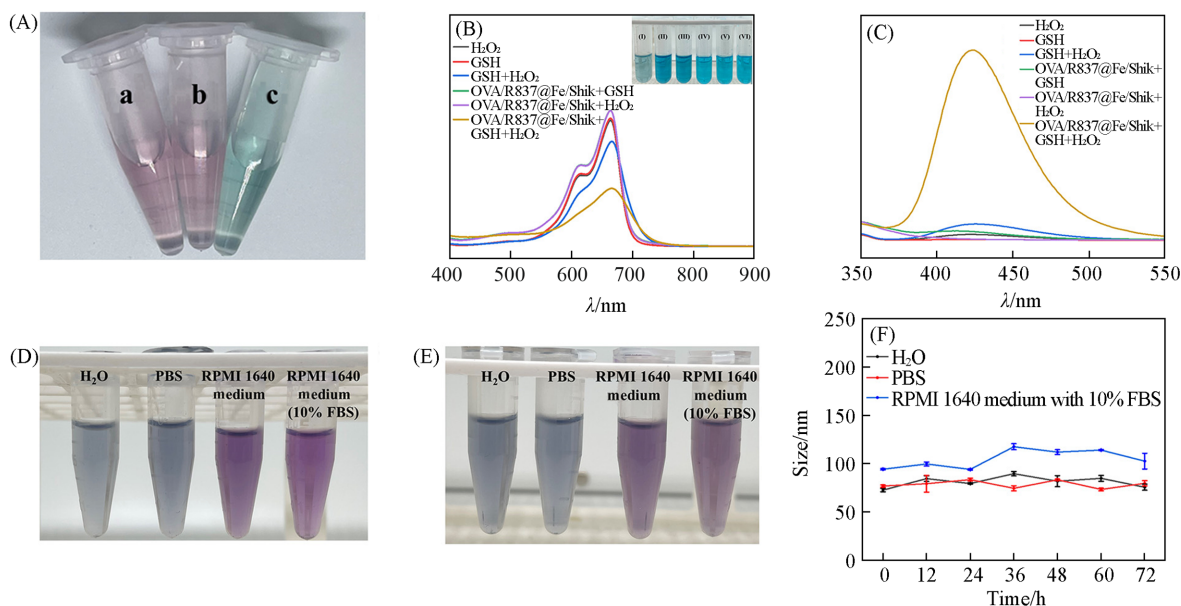


Fig. 2 Color changes of the supernatant(A), UV-Vis absorption spectra of MB solution under different treatments(B), fluorescence spectra of disodium terephthalate under different treatments(C), physiological stability of OVA/R837@Fe/Shik in H_2O , PBS, and RPMI 1640 medium with or without 10% FBS before(D) and after(E) 72 h, time-dependent hydrated diameter of OVA/R837@Fe/Shik in H_2O , PBS and RPMI 1640 medium with 10% FBS(F)

Inset of (A): color changes of the supernatant with the addition of water(a), potassium thiocyanate(b), and potassium ferricyanide(c). Inset of (B): photographs of MB solution under different treatments, I—VI: OVA/R837@Fe/Shik+GSH+ H_2O_2 , OVA/R837@Fe/Shik+ H_2O_2 , OVA/R837@Fe/Shik+GSH, GSH+ H_2O_2 , GSH, H_2O_2 .

2.3 OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗的作用机制

为了探究纳米疫苗的作用机制, 首先考察了OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗对B16-OVA细胞的细胞毒性. 如图3(A)所示, OVA对B16-OVA细胞没有明显的细胞毒性. 由图3(B)~(D)可以看出, OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗对B16-OVA的细胞毒性主要来自于Fe/Shik. OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗在正常细胞中毒性很低^[31], 当暴露在GSH过表达的肿瘤微环境中时, 会释放 Fe^{2+} 和Shik, 诱导B16-OVA细胞死亡.

在随后的细胞实验中, 通过CLSM、流式细胞术以及ELISA试剂盒探究了OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗的作用机制. 图4给出了不同实验组B16-OVA细胞的CLSM图像. 由图5(A)~(D)可以看到, OVA/R837@Fe/Shik 中的 Fe^{3+} 会被GSH还原为 Fe^{2+} , 在消耗细胞内GSH的同时提高 Fe^{2+} 的水平. 高浓度的 Fe^{2+} 会通过芬顿反应产生大量 $\cdot\text{OH}$, 促进细胞内LPO的累积, 从而诱导肿瘤细胞铁死亡. 除此之外, 经OVA/R837@Fe/Shik 处理之后, B16-OVA细胞内RIPK1和RIPK3的表达水平分别是Control组的2.9倍和7.3倍, 说明OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗可以诱导肿瘤细胞发生程序性坏死[图5(E)和(F)].

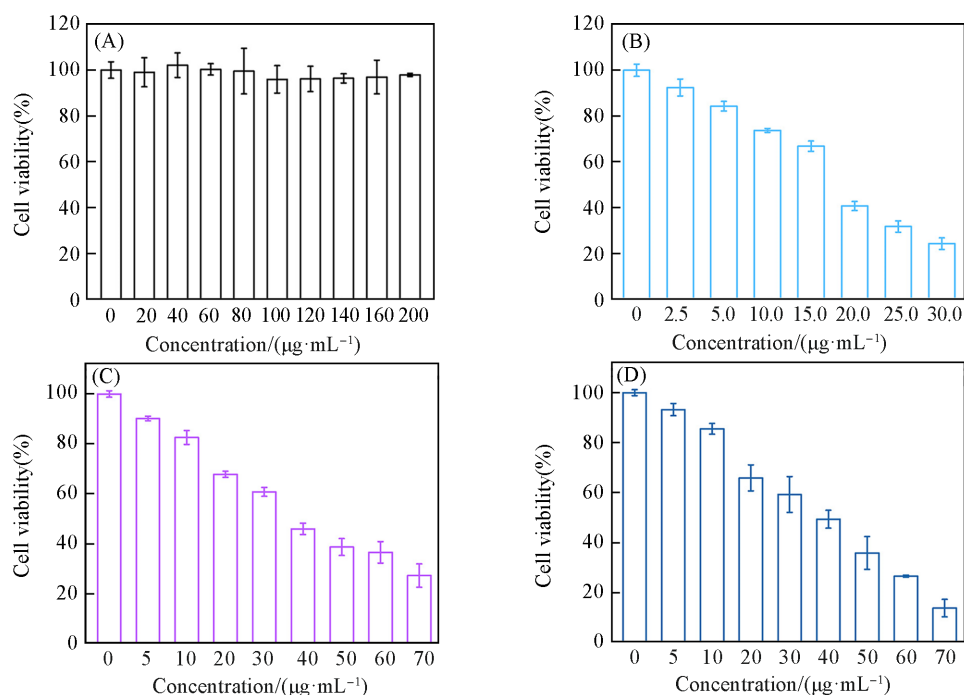


Fig. 3 Relative cell viability of B16-OVA cells after 24 h incubation with different concentrations of OVA(A), Fe/Shik(B), OVA@Fe/Shik(C) and OVA/R837@Fe/Shik(D)

Data are shown as mean \pm SD. *n* represents the number of biologically independent samples. Statistical significance was calculated by Student's *t*-test and designated as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

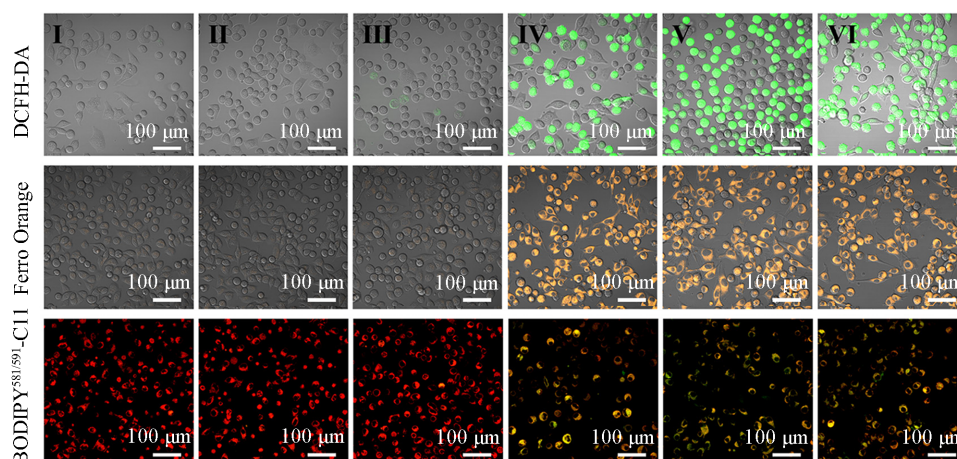


Fig. 4 CLSM images of ROS, Fe²⁺ and LPO levels in B16-OVA cells after different treatments

Group: I(control), II(OVA), III(Shik), IV(Fe/Shik), V(OVA@Fe/Shik), VI(OVA/R837@Fe/Shik).

铁死亡和程序性坏死可以引发ICD，主要表现为CRT的暴露、HMGB1的释放以及ATP的分泌。图6(A)给出了不同实验组B16-OVA细胞的CLSM图像。结果表明，OVA/R837@Fe/Shik可以促进CRT的暴露以及HMGB1的释放[图6(B)]。同时，经过OVA/R837@Fe/Shik处理后，B16-OVA细胞的ATP分泌量是Control组的7.3倍，说明OVA/R837@Fe/Shik纳米疫苗可以明显提高ATP的分泌水平[图6(C)]。以上结果表明，OVA/R837@Fe/Shik纳米疫苗可以通过铁死亡和程序性坏死引发ICD。当肿瘤细胞受到刺激发生ICD时，释放的细胞裂解物可以促进DCs成熟。图6(D)给出了不同实验组DCs的成熟(CD11c⁺CD80⁺CD86⁺)情况。经OVA/R837@Fe/Shik处理后DCs的成熟率最高，达到(38.9 \pm 0.8)%。说明OVA、细胞裂解物以及R837的存在可以高效促进DCs的成熟和抗原的交叉呈递，激活机体的免疫响应。

2.4 OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗体内抗肿瘤效果及免疫作用机制

利用C57BL/6小鼠建立了小鼠原位黑色素瘤模型，探究了OVA/R837@Fe/Shik纳米疫苗的体内治

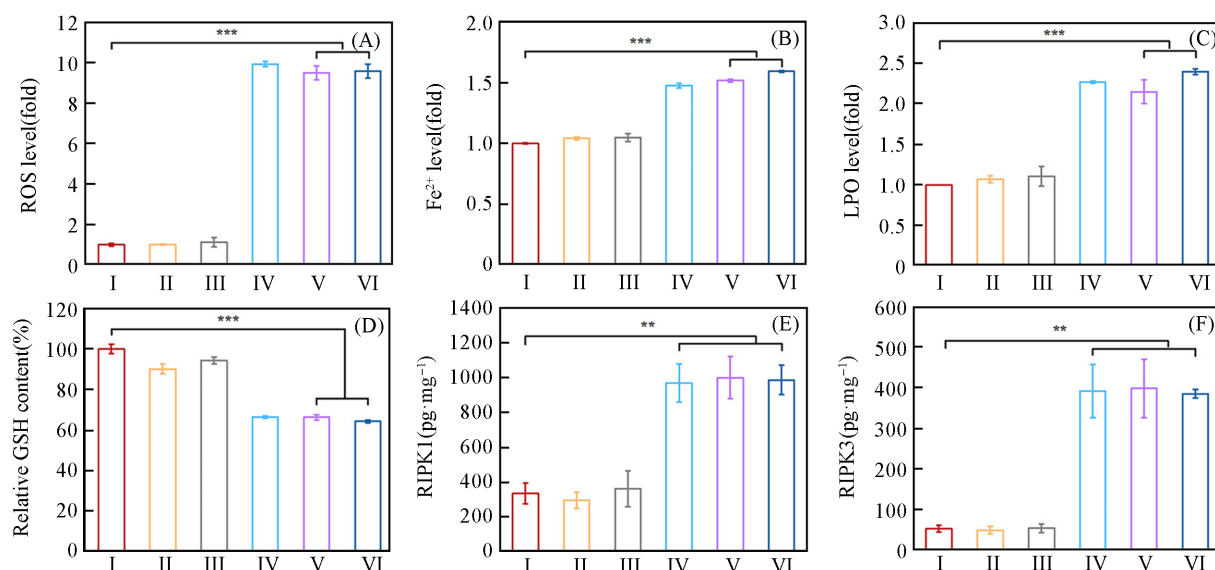


Fig. 5 Quantification of ROS(A), Fe²⁺(B) and LPO(C) levels by flow cytometry in B16-OVA cells after different treatments, GSH content of B16-OVA cells after different treatments by GSH assay kit(D), the expression of RIPK1(E) and RIPK3(F) analyzed by ELISA assay kit after different treatments

Group: I(OVA), II(OVA), III(Shik), IV(Fe/Shik), V(OVA@Fe/Shik), VI(OVA/R837@Fe/Shik). Data are shown as mean±SD. *n* represents the number of biologically independent samples. Statistical significance was calculated by Student's *t*-test and designated as **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001.

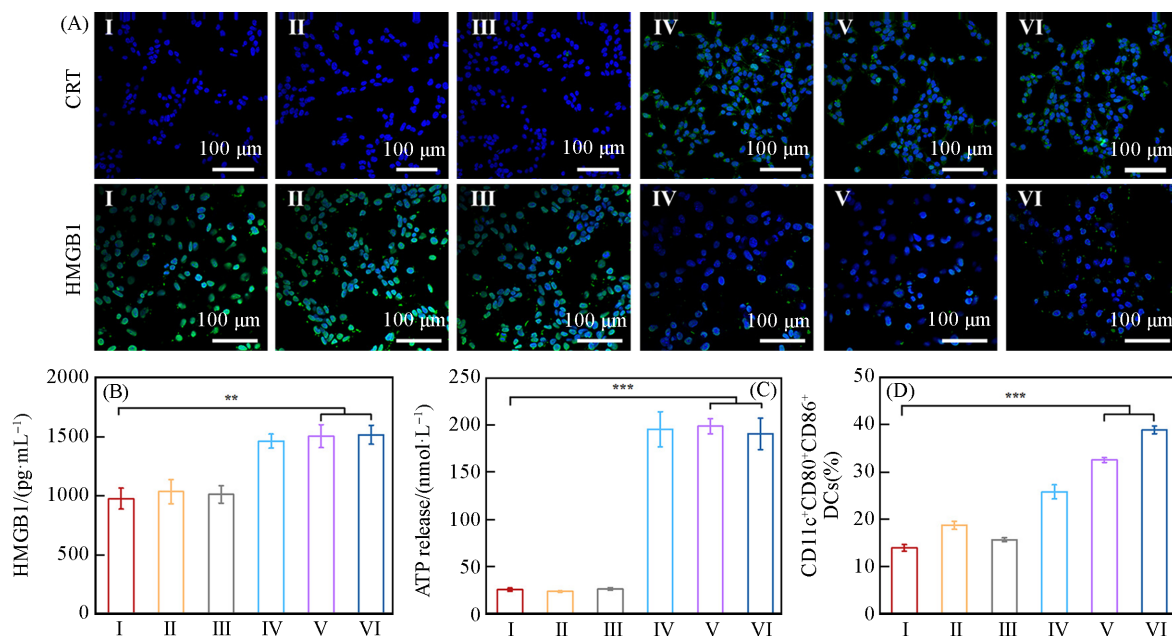


Fig. 6 CLSM images of CRT and HMGB1 expression in B16-OVA cells after different treatments(A), the expression of HMGB1(B) and ATP(C) analyzed by ELISA assay kit after different treatments, corresponding quantification DCs maturation(CD11c⁺CD80⁺CD86⁺) by flow cytometry(D)

Group: I(control), II(OVA), III(Shik), IV(Fe/Shik), V(OVA@Fe/Shik), VI(OVA/R837@Fe/Shik). Data are shown as mean±SD. *n* represents the number of biologically independent samples. Statistical significance was calculated by Student's *t*-test and designated as **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001.

疗效果。结果表明，OVA/R837@Fe/Shik可以有效抑制肿瘤的生长[图7(A)~(C)]。实验结束后，将肿瘤组织切片进行H&E染色以及免疫荧光染色。通过H&E染色照片可知，肿瘤坏死趋势为VI>V>IV>III>II>I，表明OVA/R837@Fe/Shik具有优异的抗肿瘤效果[图7(D)]。此外，免疫荧光染色进一步证

明了 OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗可以引发 ICD, 具备用于肿瘤免疫治疗的潜质。

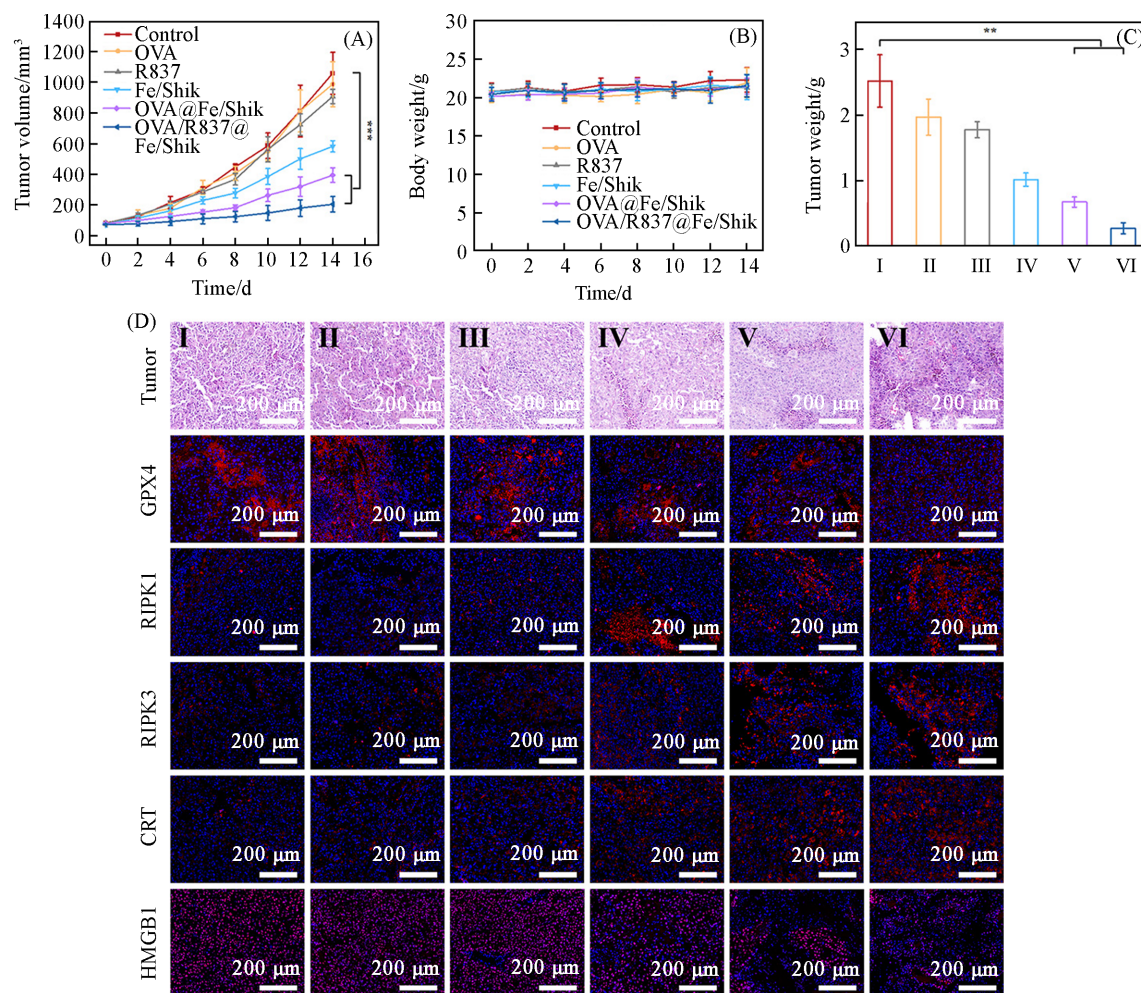


Fig. 7 Average tumor growth curves(A), average body weight of mice(B) and average tumor weight(C) with various treatments, H&E-stained images of tumor and immunofluorescence staining images (GPX4, RIPK1, RIPK3, CRT and HMGB1) of tumor tissue slices after different treatments(D)

Group: I(control), II(OVA), III(Shik), IV(Fe/Shik), V(OVA@Fe/Shik), VI(OVA/R837@Fe/Shik). Data are shown as mean \pm SD. *n* represents the number of biologically independent samples. Statistical significance was calculated by Student's *t*-test and designated as **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001.

随后, 对 OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗的体内免疫作用机制进行了分析. 收集小鼠新鲜脾脏以及肿瘤组织制备单细胞悬液, 通过流式细胞术探究 OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗激活机体免疫反应的过程. 图 8(A) 给出了脾脏单细胞悬液的流式细胞术测试结果, OVA/R837@Fe/Shik 治疗组中成熟 DCs 比例最高, 达到 (24.1 \pm 0.4)%. 这主要因为 ICD 释放的细胞裂解物与 OVA 以及 R837 佐剂之间的协同作用, 高效诱导 DCs 成熟. 成熟 DCs 可以进一步激活 CD8⁺ T 细胞, 增强免疫响应. 同时, 与其它实验组相比, OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗能够促进 CD8⁺ T 细胞的浸润[图 8(B), (C), (G)~(I)].

在肿瘤微环境中, 肿瘤相关巨噬细胞能够分化为具有肿瘤抑制作用的 M1 表型和能够促进肿瘤细胞发生免疫逃逸的 M2 表型. 因此, 肿瘤相关巨噬细胞发生 M2 表型到 M1 表型的极化, 是逆转肿瘤免疫抑制微环境、提高机体免疫响应的关键. 通过流式细胞术分析各组肿瘤细胞中巨噬细胞的表型[图 8(D)和(E)]. 一方面, 由于 Fe/Shik 可以通过铁死亡和程序性坏死引发 ICD, 逆转肿瘤组织免疫抑制微环境. 另一方面, 肿瘤细胞碎片、OVA 及 R837 之间的协同效应可以促进 DCs 成熟, 使得肿瘤免疫抑制微环境得到进一步改善. 因此, 经 OVA/R837@Fe/Shik 处理的肿瘤, M1 表型占比进一步增加至 (5.7 \pm 0.2)%, M2 表型占比则下降至 (7.1 \pm 0.2)%. 此外, 调节性 T 细胞(Tregs)具有免疫抑制作用, 能

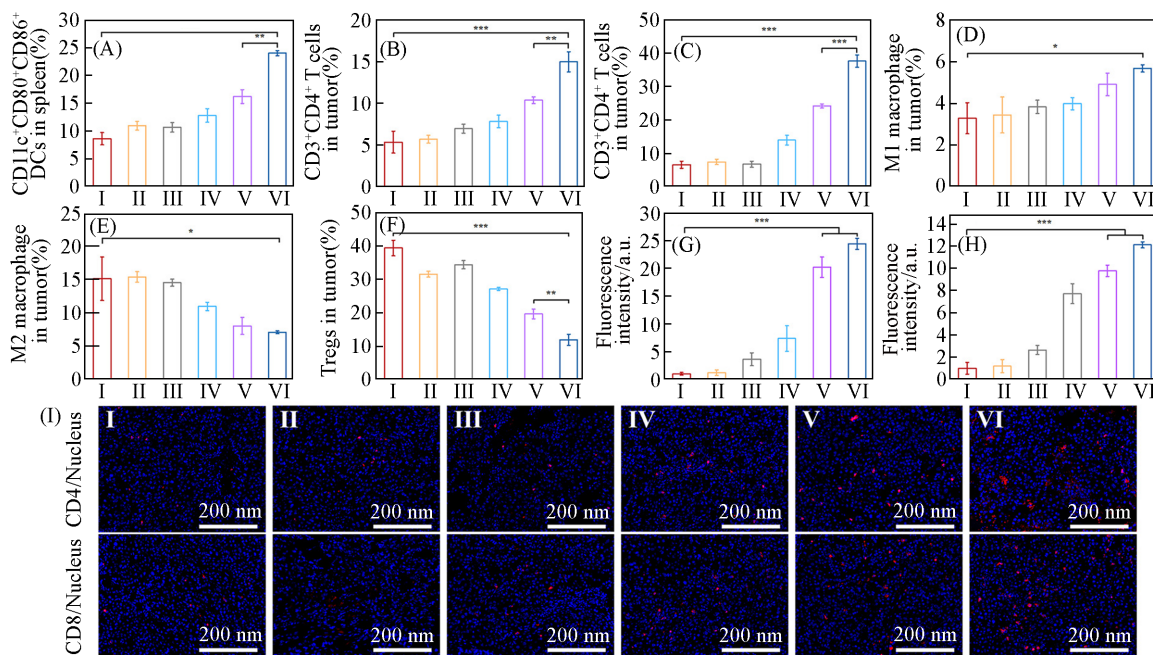


Fig. 8 Corresponding quantification DCs maturation($CD11c^+CD80^+CD86^+$) by flow cytometry in spleen(A), flow cytometric statistical analysis of the percentages of T helper cells($CD3^+CD4^+$)(B), cytotoxic T lymphocytes($CD3^+CD8^+$)(C), M1 macrophage(D), M2 macrophage(E) and Tregs(F) in tumors after different treatments, fluorescence intensity measured by Image J(G, H) and corresponding immunofluorescence staining images(I) of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in tumor tissue slices after different treatments

Group: I(control), II(OVA), III(Shik), IV(Fe/Shik), V(OVA@Fe/Shik), VI(OVA/R837@Fe/Shik). Data are shown as mean \pm SD. *n* represents the number of biologically independent samples. Statistical significance was calculated by Student's *t*-test and designated as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

够降低机体的免疫应答能力。因此，抑制或下调Tregs是改善肿瘤免疫抑制微环境的关键。图8(F)给出了肿瘤组织中Tregs的定量统计图。在OVA/R837@Fe/Shik组中，Tregs发生了明显下调，下降至(11.9 \pm 1.7)%。以上结果表明，OVA/R837@Fe/Shik纳米疫苗具有逆转肿瘤免疫抑制微环境的作用。

2.5 OVA/R837@Fe/Shik 纳米疫苗抗肿瘤肺转移

为了探究OVA/R837@Fe/Shik纳米疫苗抗肿瘤转移能力，构建了小鼠B16-OVA肺转移模型。图9给出了各组小鼠肺部的光学照片[图9(A)]和H&E染色照片[图9(B)]。如图9(A)所示，Control组中小鼠肺部出现肿瘤的转移，主要表现为肺叶上存在不同大小的黑色结节，肺部肿大和肺叶粗糙。在Fe/Shik和OVA@Fe/Shik治疗组中，小鼠肺叶上黑色结节数目逐渐减少，且相较于Control组肺叶较平整、光滑。经OVA/R837@Fe/Shik纳米疫苗治疗的小鼠的肺部黑色结节最少，肺部形态也最为正常。结合肺组织H&E染色照片表明，OVA/R837@Fe/Shik纳米疫苗具有优异的抗肿瘤肺转移效果。

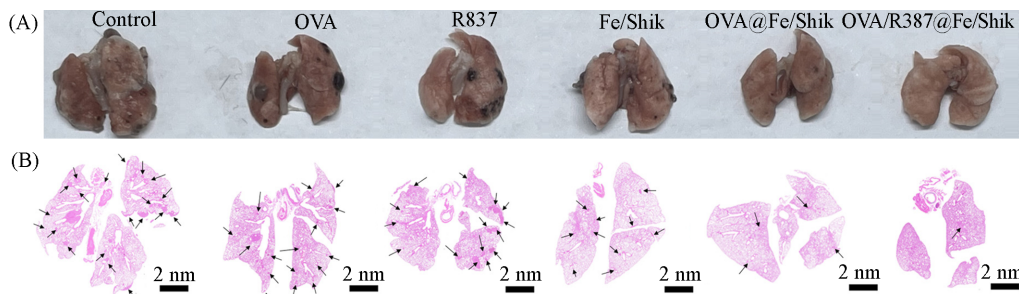


Fig. 9 Representative images(A) and H&E-stained images(B) of lungs of mice after different treatments

2.6 生物安全性

生物安全性是纳米疫苗的重要指标，因此收集了各组小鼠的肝、肾功能指标，以及小鼠主要器官

切片的H&E染色照片. 由图10可见, 其中总胆汁酸(TBA)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、丙氨酸氨基转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、血清碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)和白蛋白(ALB)等肝功能指标和肌酐(CREA)、血尿酸(UA)、血尿素(UREA)等肾功能指标均在正常范围之内, 未出现异常. H&E染色照片中也没有发现明显的组织损伤(图11). 以上结果说明, OVA/R837@Fe/Shik纳米疫苗具有良好的生物安全性.

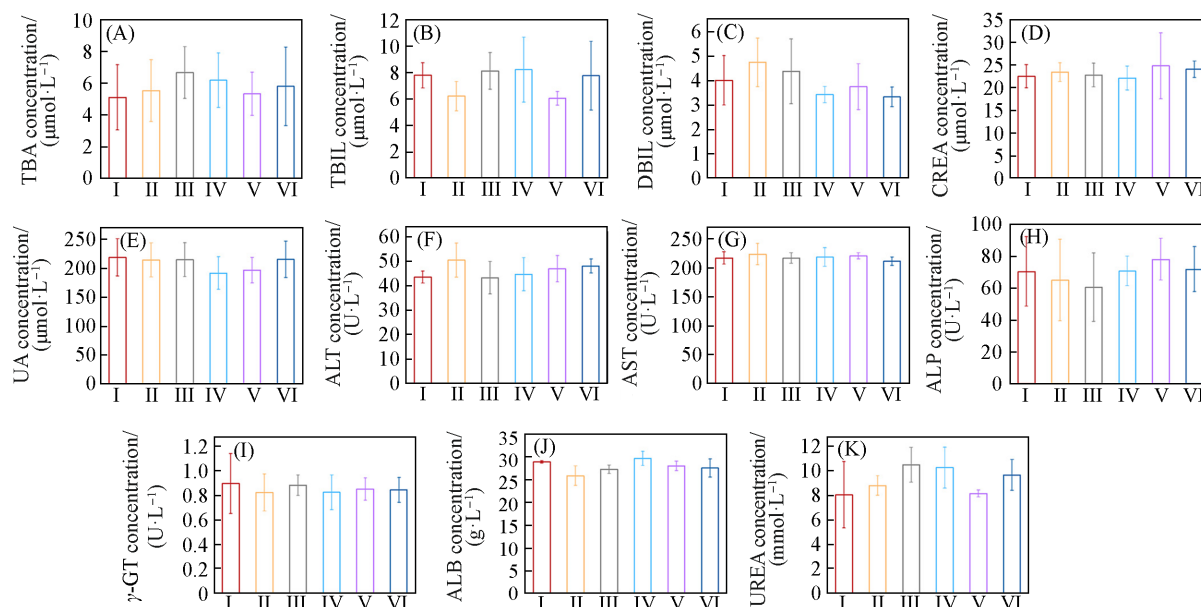


Fig. 10 Main indexes of liver and renal functions tests of mice in each group

(A) Total bile acid(TBA); (B) total bilirubin(TBIL); (C) direct bilirubin(DBIL); (D) creatinine(CREA); (E) uric acid(UA); (F) alanine aminotransferase(ALT); (G) aspartate transaminase(AST); (H) alkaline phosphatase(ALP); (I) γ -glutamyl transpeptidase; (J) albumin(ALB); (K) urea. Group: I(OVA), II(OVA), III(Shik), IV(Fe/Shik), V(OVA@Fe/Shik), VI(OVA/R837@Fe/Shik). Data are shown as mean \pm SD. n represents the number of biologically independent samples. Statistical significance was calculated by Student's t -test and designated as * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001.

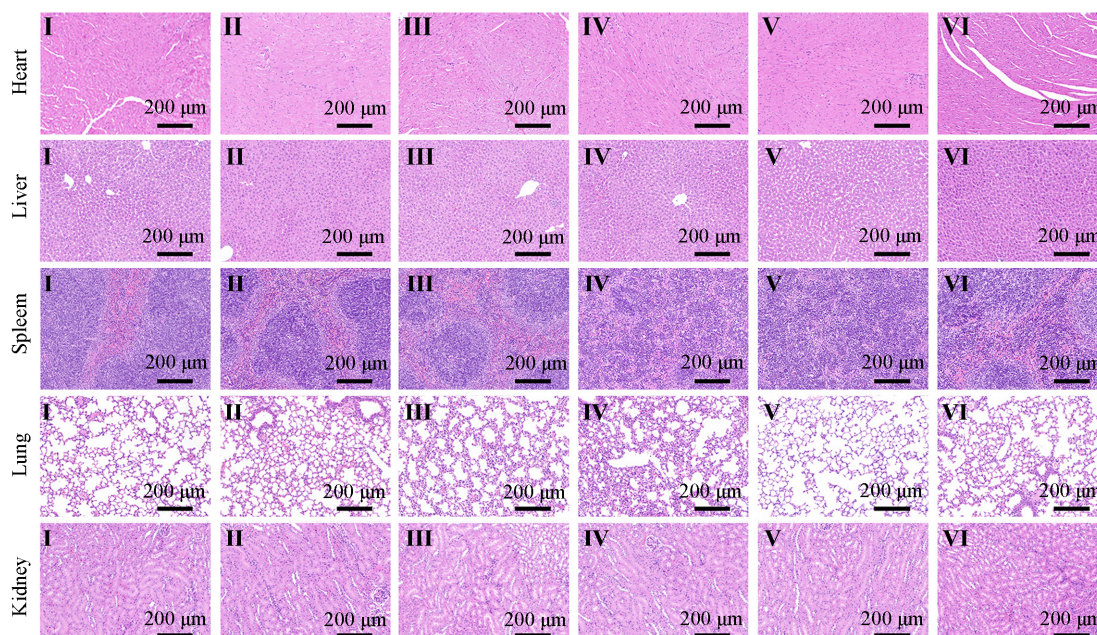


Fig. 11 H&E-stained splanchnic slices of heart, liver, spleen, lungs and kidneys of mice after different treatments

Group: I(OVA), II(OVA), III(Shik), IV(Fe/Shik), V(OVA@Fe/Shik), VI(OVA/R837@Fe/Shik).

综上所述, 本文通过 Fe^{3+} 和Shik之间的配位相互作用构筑了Fe/Shik超分子纳米结构, 并通过负载OVA和R837制备了OVA/R837@Fe/Shik纳米疫苗. 该纳米疫苗具有良好的胶体稳定性和选择性细胞毒

性,可以在特异性肿瘤微环境中发生拆解并释放 Fe^{2+} , Shik, OVA和R837,通过诱导肿瘤细胞铁死亡和程序性坏死引发ICD,进而抑制肿瘤的生长和转移.结果表明,OVA/R837@Fe/Shik具有高效诱导DCs成熟、增强细胞毒性T细胞的浸润以及促进巨噬细胞M2表型向M1表型极化等作用.因此,OVA/R837@Fe/Shik纳米疫苗在逆转肿瘤组织免疫抑制微环境的同时可以激活机体的抗肿瘤免疫响应,从而实现针对肿瘤的免疫治疗.本研究有效克服了肿瘤组织免疫抑制微环境对纳米疫苗治疗效果的抑制作用,为肿瘤免疫治疗提供了新策略.

参 考 文 献

- [1] Miyata Y., Murakami N., Honma Y., Mori T., Yoshimoto S., Kashihara T., Takemori M., Nakayama Y., Itami J., Ogo E., Igaki H., *J. Radiat. Res.*, **2022**, 63(6), 879—883
- [2] Guo Y. Y., Gao F. Y., Ahmed A., Rafiq M., Yu B., Cong H. L., Shen Y. Q., *J. Mater. Chem. B*, **2023**, 11(36), 8586—8604
- [3] Kubecek O., Trojanova P., Molnarova V., Kipecky J., *Med. Hypotheses*, **2016**, 93, 74—76
- [4] Huang W., Xu R., Zhou B., Lin C., Guo Y. K., Xu H. Y., Guo X., *Front. Cardiovasc. Med.*, **2022**, 9, 912329
- [5] Nagaraju G. P., Malla R. R., Basha R., Motofei I. G., *Semin. Cancer Biol.*, **2022**, 86, 616—621
- [6] Hu Y., Li Y., Yao Z. C., Huang F. L., Cai H. Z., Liu H. Y., Zhang X. Y., Zhang J. Y., *Cancers*, **2023**, 15(3), 563
- [7] Tan S. Z., Li D. P., Zhu X., *Biomed. Pharmacother.*, **2020**, 124, 109821
- [8] Zhao H., Xu J., Li Y., Guan X. X., Han X., Xu Y. Y., Zhou H. T., Peng R., Wang J., Liu Z., *ACS Nano*, **2019**, 13(11), 13127—13135
- [9] Li F., Ding X. H., Lv Z. Y., Li J., Yang D. Y., *Nano Today*, **2024**, 54, 102061
- [10] Lu Z. X., Zhang Y. W., Wang Y., Tan G. H., Huang F. Y., Cao R., He N. Y., Zhang L. M., *J. Controlled Release*, **2021**, 332, 245—259
- [11] Choi I. K., Wang Z., Ke Q., Hong M., Paul Jr D. W., Fernandes S. M., Hu Z., Stenvens J., Guleria I., Kim H. J., Cantor H., Wucherpfennig K. W., Brown J. R., Ritz J., Zhang B. C., *Nature*, **2021**, 590(7844), 157—162
- [12] de Gruijl T. D., van den Eertwegh A. J. M., Pinedo H. M., Scheper R. J., *Cancer Immunol. Immun.*, **2008**, 57(10), 1569—1577
- [13] Tan J., Ding B. B., Teng B., Ma P. A., Lin J., *Adv. Funct. Mater.*, **2022**, 32(16), 2111670
- [14] Zhou B. Q., Liu J. X., Lin M. A., Zhu J. Y., Chen W. R., *Coord. Chem. Rev.*, **2021**, 442, 214009
- [15] Chen D. S., Mellman I., *Immunity*, **2013**, 39(1), 1—10
- [16] Hubbell J. A., Thomas S. N., Swartz M. A., *Nature*, **2009**, 462(7272), 449—460
- [17] Kuai R., Ochyl L. J., Bahjat K. S., Schwendeman A., Moon J. J., *Nat. Mater.*, **2017**, 16(4), 489—496
- [18] Zheng Y. R., Zhong Z. Y., *J. Controlled Release*, **2022**, 347, 308—313
- [19] Aikins M. E., Xu C., Moon J. J., *Acc. Chem. Res.*, **2020**, 53(10), 2094—2105
- [20] Yu L., Yu M., Chen W., Sun S. J., Huang W. X., Wang T. Q., Peng Z. W., Luo Z. W., Fang Y. X., Li Y. J., Deng Y., Wu M. Y., Tao W., *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, 145, 8375—8388
- [21] Oh J. M., Venters C. C., Di C., Pinto A. M., Wan L. L., Younis I., Cai Z. Q., Arai C., So B. R., Duan J. Q., Dreyfuss G., *Nat. Commun.*, **2020**, 11(1), 6299
- [22] Kroemer G., Galluzzi L., Kepp O., Zitvogel L., *Annu. Rev. Immunol.*, **2013**, 31, 51—72
- [23] Hu H., Wu G. X., Shu Z. Q., Yu D. D., Nan N., Yuan F. Y., Liu X. Y., Wang H. Y., *Front. Cell Dev. Biol.*, **2020**, 8, 595253
- [24] Lee S. Y., Ju M. K., Jeon H. M., Jeong E. K., Lee Y. J., Kim C. H., Park H. G., Han S. I., Kang H. S., *Oxid. Med. Cell. Longevity*, **2018**, 2018, 3537471
- [25] Hou S. Q., Zhang J., Jiang X., Yang Y. X., Shan B., Zhang M. M., Liu C., Yuan J. Y., Xu D. C., *Mol. Cell*, **2024**, 84(5), 938—954
- [26] Wang R. S., Liu C. Z., Lyu C. G., Sun J. H., Kang C. Z., Ma Y., Wan X. F., Guo J., Shi L. Y., Wang J. Y., Huang L. Q., Wang S., Guo L. P., *Front. Plant Sci.*, **2023**, 14, 1160571
- [27] Wen Q. R., Liu J., Kang R., Zhou B. R., Tang D. L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2019**, 510(2), 278—283
- [28] Liao P., Wang W. M., Wang W. C., Kryczek I., Li X., Bian Y. J., Sell A., Wei S., Grove S., Johnson J. K., Kennedy P. D., Gijón M., Shan Y. M., Zou W. P., *Cancer Cell*, **2022**, 40(4), 365—378
- [29] Dixon S. J., Lemberg K. M., Lamprecht M. R., Skouta R., Zaitsev E. M., Gleason C. E., Patel D. N., Bauer A. J., Cantley A. M., Yang W. S., Morrison B., Stockwell B. R., *Cell*, **2012**, 149(5), 1060—1072
- [30] Stockwell B. R., Angeli J. P. F., Bayir H., Bush A. I., Conrad M., Dixon S. J., Fulda S., Gascón S., Hatzios S. K., Kagan V. E., Noel K., Jiang X. J., Linkermann A., Murphy M. E., Overholtzer M., Oyagi A., Pagnussat G. C., Park J., Ran Q. T., Rosenfeld C. S., Zhang D. D., *Cell*, **2017**, 171(2), 273—285
- [31] Feng W. J., Shi W. R., Cui Y. Q., Xu J. J., Liu S. W., Gao H., Zhu S. J., Liu Y., Zhang H., *Theranostics*, **2023**, 13(15), 5266—5289

(Ed.: V, K, S)