

## 新型水凝胶的制备及其发挥免疫化疗协同作用的研究

闫文文<sup>1,2#</sup>, 张彦龙<sup>2#</sup>, 曹明慧<sup>2</sup>, 刘政翰<sup>2</sup>, 雷虹<sup>1\*</sup>, 贾向前<sup>2\*</sup>

(1. 黑龙江大学生命科学学院, 农业微生物技术教育部工程研究中心, 黑龙江省寒地生态修复与资源利用重点实验室, 黑龙江省普通高校分子生物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080; 2. 黑龙江大学生命科学学院, 农业微生物技术教育部工程研究中心, 黑龙江省寒地生态修复与资源利用重点实验室, 黑龙江省普通高校微生物重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080)

**摘要:** 近年来癌症的治疗方法和手段越来越多样化, 单一的治疗方法往往疗效有限, 而免疫联合化疗的协同作用可以更有效地抑制肿瘤生长。基于此, 作者构建了一种负载化疗药和肿瘤疫苗的海藻酸钠 (sodium alginate, SA) 水凝胶复合体系 (命名为 SA-DOX-NA), 以期实现化疗药物和肿瘤疫苗的联合使用。首先, 以鸡卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 为模型抗原, 选择丙烯酰胺、甲基丙烯酸二甲氨乙酯单体, 通过原位聚合法构建了一种酸性条件下可降解的肿瘤疫苗 (命名为 NA), 然后以海藻酸钠为基质制备了一种共负载化疗药多柔比星 (doxorubicin, DOX) 和 NA 的水凝胶复合体系 SA-DOX-NA。电镜结果显示, SA-DOX-NA 具有良好的原位成胶能力, 内部连通性良好, 形成的三维立体网状结构能够实现 DOX 与 NA 的共负载及药物缓慢释放。抗肿瘤及其免疫调节结果显示, SA-DOX-NA 既能有效抑制肿瘤细胞的生长, 又可以实现无外加佐剂的情况下高效促进 DC2.4 树突状细胞的增殖及活化。综上所述, SA-DOX-NA 发挥了化疗及免疫治疗肿瘤的双重功效, 在肿瘤局部治疗中具有良好的应用前景。

**关键词:** 水凝胶复合体系; 肿瘤疫苗; DC2.4 树突状细胞; 肿瘤细胞; 免疫联合化疗

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)02-0479-09

## Preparation of new hydrogels and their synergistic effects of immunochemotherapy

YAN Wen-wen<sup>1,2#</sup>, ZHANG Yan-long<sup>2#</sup>, CAO Ming-hui<sup>2</sup>, LIU Zheng-han<sup>2</sup>, LEI Hong<sup>1\*</sup>, JIA Xiang-qian<sup>2\*</sup>

(1. Ministry of Education & Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Ecological Restoration and Resource Utilization for Cold Region & Key Laboratory of Molecular Biology, Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, College of Heilongjiang Province & School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China; 2. Ministry of Education & Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Ecological Restoration and Resource Utilization for Cold Region & Key Laboratory of Microbiology, Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, College of Heilongjiang Province & School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

**Abstract:** In recent years, cancer treatment methods and means are becoming more and more diversified, and single treatment methods often have limited efficacy, while the synergistic effect of immunity combined with chemotherapy can inhibit tumor growth more effectively. Based on this, we constructed a sodium alginate hydrogel composite system loaded with chemotherapeutic agents and tumor vaccines (named SA-DOX-NA) with a view to the combined use of chemotherapeutic agents and tumor vaccines. Firstly, the tumor vaccine (named NA)

收稿日期: 2024-07-12; 修回日期: 2024-11-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82303743).

#共同第一作者

\*通讯作者 Tel: 13074511033, E-mail: 1999012@hlju.edu.cn;

Tel: 15201032327, E-mail: 2021108@hlju.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0658

degradable under acidic conditions was constructed by *in situ* polymerization using chicken ovalbumin (OVA), acrylamide (AAM) and 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate (DMAEMA) monomer. Then a hydrogel composite system SA-DOX-NA co-loaded with chemotherapeutic drug doxorubicin (DOX) and NA was prepared using sodium alginate as a matrix. The results showed that SA-DOX-NA had good *in situ* gel-forming ability and formed a mesh structure that could realize the co-loading of DOX and NA as well as the slow drug release. The electron microscopy results showed that SA-DOX-NA had good *in situ* gel-forming ability with good internal connectivity, and the three-dimensional mesh structure could realize the co-loading of DOX and NA as well as the slow drug release. The antitumor and immunomodulatory results showed that SA-DOX-NA both effectively inhibited the growth of tumor cells and efficiently promoted the proliferation and activation of DC2.4 dendritic cells without additional adjuvant. In summary, SA-DOX-NA exerts the dual efficacy of chemotherapy and immunotherapy for tumor treatment, and has a good application prospect in local tumor treatment.

**Key words:** hydrogel composite system; tumor vaccine; DC2.4 dendritic cell; tumor cell; immuno-combination chemotherapy

癌症是世界上主要的死亡原因之一<sup>[1]</sup>。尽管手术、化疗及放疗等治疗手段在临床上的应用日趋成熟,但这些手段仍存在治疗效果不完全,肿瘤易转移复发及不良反应大等问题<sup>[2]</sup>。如何有效治疗或控制肿瘤,仍然是面临的巨大挑战。研究发现联合治疗成为重要的癌症治疗手段,其中,免疫联合化疗取得了许多创新性进展,为治疗提供了新的可能性和方向<sup>[3]</sup>。免疫联合化疗治疗癌症能够综合利用免疫系统和化学药物的优势,提高治疗效果并减少机体不良反应<sup>[4,5]</sup>。然而,免疫和化疗药物的药代动力学性质和体内分布差异,可能导致药物在肿瘤组织中的靶向特异性不足,肿瘤组织中药物比例不确定,以及严重的全身不良反应等问题会影响到协同抗肿瘤效果<sup>[6]</sup>。

盐酸多柔比星 (doxorubicin, DOX) 是一种常用于治疗多种癌症的化疗药物,游离的 DOX 易于代谢并具有系统毒性。水凝胶是一类可响应环境刺激原位成胶的生物性材料,可以作为药物的储存库,能够在注射部位停留相当长的时间,从而实现药物的可控释放<sup>[7-9]</sup>。海藻酸钠 (sodium alginate, SA) 作为一种天然高分子材料,能够响应肿瘤微环境内一定浓度的钙离子发生交联反应,形成原位水凝胶,从而减少药物不良反应并实现抗癌药物的缓慢释放<sup>[10]</sup>。单纯的肿瘤抗原往往存在着免疫原性低、靶向性差及稳定性差等缺点,使其在应用中存在着局限性<sup>[11]</sup>,往往需要合适的载体将免疫佐剂和抗原共同递送。随着纳米技术的快速发展,纳米药物递送系统具有靶向递送、生物相容性、稳定性及响应性释药等特性,为免疫联合化疗带来了广阔的应用前景<sup>[12,13]</sup>。目前,大量的研究证明纳米递送系统能够控制抗原的释放来提高稳定性,提供良好的佐剂特性,并协助将抗原有针对性地传递至抗原呈递细胞<sup>[14-17]</sup>。

本实验在课题组前期研究基础上<sup>[18]</sup>,以鸡卵清蛋

白 (ovalbumin, OVA) 为模型抗原,选择具有佐剂作用效果的中性单体丙烯酰胺 (acrylamide, AAM)、阳性单体甲基丙烯酸二甲氨乙酯 [2-(dimethylamino) ethyl methacrylate, DMAEMA]、可在酸性条件下降解的二甲基丙烯酸甘油酯 (glycerol 1, 3-dimethacrylate, GDMA)、*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺 [*N,N'*-methylenebis (acrylamide), BIS] 作为交联剂,通过原位聚合法制备生物相容性良好的肿瘤疫苗 (NA),可在细胞溶酶体酸性条件下响应性降解,并无需额外添加佐剂即可活化树突状细胞。利用海藻酸钠水凝胶能够响应钙离子浓度形成原位水凝胶的特性,将其作为缓释载体,形成的网状三维结构成功负载化疗药物和肿瘤疫苗,为化疗药物与肿瘤疫苗提供了理想的药物储库。本实验结合了水凝胶和纳米递送系统的优势,为多功能水凝胶/纳米胶囊复合体系的研究和实施提供新的方向,也为智能纳米药物递送系统的开发提供新的思路。

## 材料与方法

**试剂** 卵清蛋白、丙烯酰胺 (上海麦克林生化科技股份有限公司); DMAEMA、BIS、过硫酸铵 (ammonium persulfate, APS)、四甲基乙二胺 (*N,N,N,N*-tetramethylethylenediamine, TEMED) (美国 Sigma 公司); GDMA、DOX、低黏度海藻酸钠 (上海阿拉丁生化科技有限公司); 细胞增殖及毒性检测试剂盒 (CCK-8, 大连博格林生物科技有限公司); RPMI 1640 Medium 培养基 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); DC2.4 树突状细胞 (浙江诺博生物制品有限公司); 人胚肾 293T 细胞、B16-F10 黑色素瘤细胞、HCT-116 结肠癌细胞、4T1 乳腺癌细胞 (北京协和细胞资源中心); 其他试剂均为市售分析纯。

**仪器** 离心机 (中国湘仪公司); 显微镜 (日本

Olympus 公司); iMark 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); Mastersizer3000 纳米粒度分析仪 (英国 Malvern 公司); 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司); T600 紫外可见分光光度计 (北京普析公司); Sigma500 扫描电镜 (德国 Carl Zeiss 公司)。

**NA 的制备** NA 在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中进行合成反应, 反应体系如表 1 所示, 其中 AAM 为中性单体, 表面不带电荷, DMAEMA 为阳离子单体, 表面带正电荷。OVA 与单体和交联剂加入到 PBS 溶液中后, 在 4 °C 下轻轻搅拌, 加入 10% 的 20.28 μL APS 和 5.23 μL 的 TEMED 作为催化剂开始聚合反应。聚合反应在 4 °C 避光条件下进行 120 min。将制备好的溶液转移至透析袋 (MWCO 3.5 kDa) 中, 在 4 °C 条件下使用 PBS 缓冲液进行透析处理, 持续处理 24 h, 以去除残留的单体和引发剂, 所得的 NA 于 4 °C 储存, 待用。

**Table 1** Reaction amount of monomers and crosslinkers in the tumor vaccine (NA). OVA: Ovalbumin; AAM: Acrylamide; DMAEMA: 2-(Dimethylamino)-ethyl methacrylate; BIS: *N,N*-Methylenebis(acrylamide); GDMA: Glycerol-1,3-dimethacrylate

| Unit  | Protein             |       | Monomer |       | Crosslinker |  |
|-------|---------------------|-------|---------|-------|-------------|--|
|       | OVA                 | AAM   | DMAEMA  | BIS   | GDMA        |  |
| Conc. | 6.00                | 20.0% | 20.0%   | 10.0% | 10.0%       |  |
|       | mg·mL <sup>-1</sup> | w/v   | w/v     | w/v   | w/v         |  |
| V/μL  | 166.67              | 23.67 | 17.47   | 10.28 | 5.07        |  |

**NA 粒径与电位的表征** 利用动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 粒度仪测定 NA 的粒径和电位。

**NA 的紫外全波长扫描** 将制备好的 NA 样品加入到 15 mL 的超滤管 (MWCO 50 kDa) 中, 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min 后, 取出内管中的样品, 加入去离子水进行稀释, 用紫外可见分光光度计对样品进行全波长扫描。

**NA 包封率 (encapsulation efficiency, EE) 的测定** 根据 BCA 测出蛋白的标准曲线, 其线性回归方程为  $y = 1.349x + 0.1538$  ( $R^2 = 0.9981$ ), 利用 BCA 蛋白检测试剂盒测量 NA 包封率, 将 NA (6 mg·mL<sup>-1</sup>) 分散在透析袋 (MWCO 50 kDa) 中, 并在 37 °C 条件下振荡。取透析液中 20 μL 液体于 96 孔板中, 利用 BCA 蛋白质试剂盒检测 562 nm 处的吸光值, 根据公式 (1) 计算包封率:

$$EE\% = [1 - (C_1V_1)/(C_0V_0)] \times 100\% \quad (1)$$

其中:  $C_1$  是游离 OVA 的浓度,  $V_1$  是烧杯中溶液的体积,  $C_0$  是透析袋中 OVA 的浓度,  $V_0$  是透析袋中溶液的体积。

**NA 在不同条件下的体外药物释放研究** NA 在不同条件下的释放效率的测定参考文献<sup>[19]</sup>方法。将制备得到的肿瘤疫苗液体样品加入到透析袋 (MWCO 50 kDa) 中, 将透析袋分别置于装有 30 mL 的 PBS 缓冲

溶液 (pH = 7.4 与 6.0) 的烧杯中, 避光后放到摇床上振荡进行药物释放实验。分别于 0、1、3、5、7、12、20、30、36、48、52、54 h 利用 BCA 试剂盒检测 562 nm 处 OVA 的吸光度值, 最终使 NA 全部释放 OVA 于 PBS 缓冲液中, 测定其 562 nm 处时的吸光度值。根据公式 (2) 计算 NA 中 OVA 的释放率:

$$\text{释放率}(\%) = (A_b - A_a)/(A_c - A_a) \times 100\% \quad (2)$$

其中:  $A_a$  和  $A_b$  分别表示 NA 释放 OVA 的初始和不同时间点的吸光度值,  $A_c$  是 OVA 全部释放后的最终吸光度值。

**SA-DOX-NA 的制备** 将 0.15 mg DOX 溶解到 0.5 mL 去离子水中, 与 1 mL NA 一起加到 30 mg 海藻酸钠粉末中, 经振荡溶解后形成负载 DOX 和 NA 的海藻酸钠水凝胶复合体系 (SA-DOX-NA, 海藻酸钠、DOX 与 NA 的质量浓度分别为 20、0.1、1 mg·mL<sup>-1</sup>)。利用去离子水代替 DOX 溶液加入到海藻酸钠粉末中, 振荡溶解后加入 NA 溶液, 混合均匀, 制备成负载 NA 的海藻酸钠水凝胶体系 (SA-NA), 将 DOX 溶液加入到海藻酸钠粉末中, 经振荡溶解后形成负载 DOX 的海藻酸钠水凝胶体系 (SA-DOX)。

**SA-DOX-NA 的形貌观察** 取一定量的 CaCl<sub>2</sub>, 制备出浓度为 1.8 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Ca<sup>2+</sup> 溶液。将制备好的 SA-DOX-NA 溶胶样品注射到 1.8 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Ca<sup>2+</sup> 溶液中使其形成海藻酸钠水凝胶。将形成的海藻酸钠水凝胶用液氮淬冷并淬断, 随后放入冻干机中进行冷冻干燥, 将冻干后的水凝胶固定于样品台, 喷金, 用扫描电子显微镜观察并分析其表面的微观形貌。

**SA-DOX-NA 的包封率** 将制备好的 SA-DOX-NA 溶胶样品加入到透析袋 (MWCO 8~14 kDa) 中, 然后将透析袋放入含有 1.8 mmol·L<sup>-1</sup> 的 40 mL Ca<sup>2+</sup> 溶液的烧杯中, 在室温下观察, 当其形成稳定水凝胶时, 取 200 μL 的透析液于 96 孔板中, 检测 480 nm 处的吸光值, 根据公式 (1) 计算包封率。将制备好的 SA-DOX-NA 加入到透析袋中 (MWCO 100 kDa), 并在 37 °C 条件下振荡。取透析液中 20 μL 液体于 96 孔板中, 利用 BCA 蛋白质试剂盒检测 562 nm 处的吸光度值, 根据公式 (1) 计算包封率, 其中:  $C_1$  是游离 DOX/NA 的浓度,  $V_1$  是烧杯中溶液的体积,  $C_0$  是透析袋中 DOX/NA 的浓度,  $V_0$  是透析袋中溶液的体积。

**模拟肿瘤微环境 pH 条件下 SA-DOX-NA 的体外药物释放研究** 将制备好的 SA-DOX-NA 溶胶样品加入到透析袋 (MWCO 8~14 kDa) 中, 然后将透析袋放入含有 1.8 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Ca<sup>2+</sup> 溶液中, 在室温下静置过夜, 形成稳定的水凝胶。第二天将其移至含 50 mL PBS 缓冲液 (pH 值为 6.5) 的烧杯中, 置于摇床上振荡进行药

物释放实验。分别在不同的时间点测定 480 nm 处的吸光度值,在第 6 天测定药物全部释放时的吸光度值。为便于对比,制备同 SA-DOX-NA 中的 DOX 含量相同的 DOX 溶液,将其置于相同条件下进行药物释放实验。根据公式 (2) 计算药物释放率,其中:  $A_a$  和  $A_b$  分别表示 SA-DOX-NA 释放 DOX 的初始和不同时间点的吸光度值,  $A_c$  是 DOX 全部释放后的最终吸光度值。

**SA-DOX-NA 的安全性评价** 利用 RPMI1640 培养基培养 293T 人胚胎肾细胞,将处于对数生长期的细胞调整成细胞浓度为每毫升  $1 \times 10^5$  个,接种于 96 孔培养板中,每孔接种 100  $\mu\text{L}$ ,于培养箱中孵育 24 h 细胞贴壁后,吸去培养基。先加入 100  $\mu\text{L}$  含钙离子的培养基,然后再加入 10  $\mu\text{L}$  不同质量浓度的 SA、SA-NA、SA-DOX、SA-DOX-NA (SA: 0.125、0.25、0.5、1、2  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,当 SA 质量浓度为 2  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , DOX 为 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , NA 为 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,且当 SA 质量浓度变化时,DOX 与 NA 进行等比稀释) 进行处理,在给药过程中,设立未加药物处理的细胞对照组和仅含有培养基的空白对照组,每组 5 个重复,上药后继续培养 24 h,取出 96 孔板,每孔加 10  $\mu\text{L}$  的 CCK-8 溶液,37  $^\circ\text{C}$  培养 30 min,酶标仪 450 nm 检测吸光度值。根据公式 (3) 计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = [(A_1 - A_3) / (A_2 - A_3)] \times 100\% \quad (3)$$

其中:  $A_1$  是药物处理组的吸光度值,  $A_2$  是未被药物处理的阴性对照组的吸光度值,  $A_3$  是在空白培养基的吸光度值。

**SA-DOX-NA 对肿瘤细胞的杀伤效果** 利用 DMEM 培养基培养 B16-F10 黑色素瘤细胞和 4T1 乳腺癌细胞,利用 5A 培养基培养 HCT-116 结肠癌细胞分别检测不同样品对不同肿瘤细胞的杀伤效果。实验设计不同样品处理组,包括游离 DOX、空白水凝胶 SA 与 SA-NA-DOX。对肿瘤细胞的培养及不同样品处理细胞的方法同上。最后根据公式 (3) 计算不同样品孵育后肿瘤细胞的存活率。

**SA-DOX-NA 对 DC2.4 树突状细胞的增殖影响** 利用 RPMI1640 培养基培养 DC2.4 树突状细胞,检测

不同药品对 DC2.4 树突状细胞的增殖效果,实验设计不同样品处理组,包括游离 OVA (质量浓度为 6.25、12.5、25、50、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、NA 与 SA-DOX-NA。另外配置质量浓度为 1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 为阳性对照组,上样时,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  不同浓度的上述样品,同上述方法计算细胞存活率。

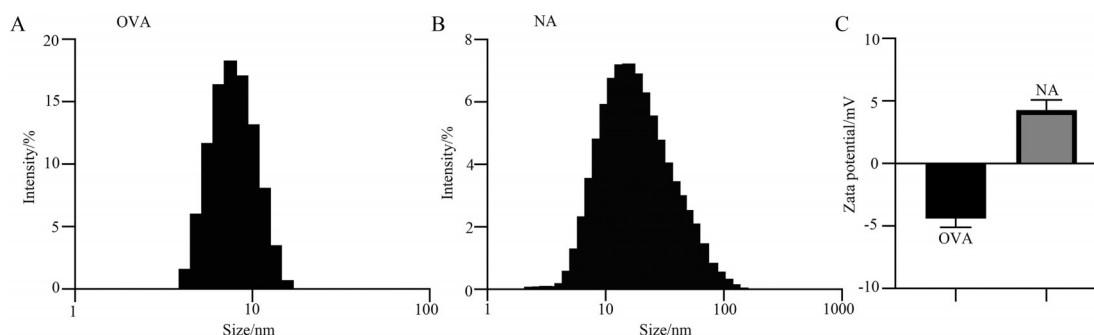
**SA-DOX-NA 对 DC2.4 树突状细胞分泌 IL-6、TNF- $\alpha$  和 IL-12 的影响** 在 6 孔板中接种 DC2.4 树突状细胞,待其细胞密度到 90% 以上时,每孔分别加入含 OVA、NA、SA-DOX-NA、LPS 的 RPMI1640 培养基进行刺激,同时设置阴性对照组。细胞培养 24 h 后,收集上清液保存备用。取 96 孔聚苯乙烯板,铺一抗 (每孔 100  $\mu\text{L}$ ,用 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH = 9.5 的碳酸盐缓冲液以 1:1 000 比例进行稀释)。将 96 孔聚苯乙烯板在 4  $^\circ\text{C}$  下孵育过夜,吸出一抗。将收集的上清液 (每孔 200  $\mu\text{L}$ ) 加入到 96 孔板中,于 37  $^\circ\text{C}$  孵育 2 h。吸出细胞因子,然后用 PBST 洗涤缓冲液 (PBS 含 0.05% Tween 20) 洗涤 3 次,并轻轻拍干。接着,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 在 37  $^\circ\text{C}$  下封闭 2 h。随后,吸出封闭液,加入 HRP 标记的抗小鼠 IgG (每孔 100  $\mu\text{L}$ ,用 5% BSA 以 1:2 000 比例进行稀释),在 37  $^\circ\text{C}$  下孵育 1 h。经过再一次洗板步骤后,向每个孔中加入 TMB 显色液 (每孔 100  $\mu\text{L}$ ),室温孵育 10 min,观察颜色变化。最后,加入 2  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  (每孔 30  $\mu\text{L}$ ) 终止反应,并在 450 nm 波长处测量吸光度值。

**数据分析** 所有结果均表示为平均值  $\pm$  SD,两组间比较采用非配对双尾  $t$  检验。ns 没有统计学意义 ( $P > 0.05$ ),  $P < 0.05$  被认为具有统计学意义,统计分析用 GraphPad Prism 9.5.0 软件。

## 结果

### 1 NA 粒径与电位的表征

DLS 结果 (图 1) 显示游离 OVA 的平均粒径是 (7.80  $\pm$  0.01) nm, NA 的平均粒径是 (18.44  $\pm$  0.14) nm,通过粒径的变化可以看出成功制备了肿瘤疫苗。同



**Figure 1** Characterization of NA. A: OVA particle size; B: NA particle size; C: The zeta potential of OVA and NA

样, 从电位的变化上也显示了相似的结果。由于制备肿瘤疫苗所用的单体 (DMAEMA) 带有正电荷, 所以 NA 相较于 OVA 的电位也由  $(-4.4 \pm 0.7)$  mV 变为  $(4.27 \pm 0.82)$  mV。

## 2 NA 的紫外全波长扫描图谱

紫外全波长扫描是一种常用的分析技术, 利用紫外全波长扫描检测了 NA 对 OVA 的负载情况。结果如图 2 所示, 在位于 280 nm 波长处 NA 有明显的吸收峰, NA 中的 OVA 在 280 nm 波长处具有最大吸收峰, 这表明, 通过原位聚合法制备的 NA 成功负载 OVA。

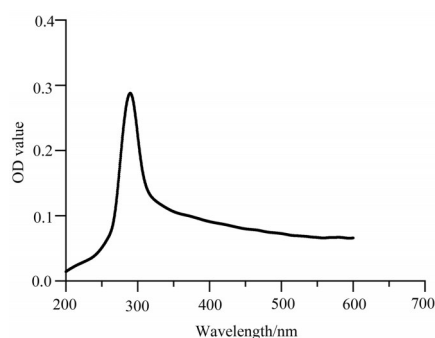


Figure 2 UV full wavelength profile of NA

## 3 NA 的包封率检测与在不同条件下的体外药物释放测定

将测定的吸光值代入  $y = 1.349x + 0.1538$  计算药物浓度 (图 3A), 根据公式 (1) 计算出 NA 平均包封率为  $(89.3 \pm 0.28)\%$ , 说明 NA 对 OVA 有较高的负载量。二甲基丙烯酸甘油酯具有酸敏感性, 在酸性条件下, 二甲基丙烯酸甘油酯会发生酯键水解反应<sup>[20]</sup>。在本试验中, 使用二甲基丙烯酸甘油酯作为交联剂制备 NA, 赋予其 pH 敏感性, 可响应细胞内溶酶体酸性 (pH = 4.5~6) 条件下更快释放抗原, 体外评价了 NA 在不同 pH 条件下 (pH = 6.0 和 7.4) 的释放速率。如图 3B 所示, 在不同时间点下, 样品在 pH 为 6.0 的环境中表现出较高的药物释放率, 这表明 NA 更易于响应酸性条件下释放药物。

## 4 SA-DOX-NA 的形貌观察

通过 SEM 分析研究 SA-DOX-NA 冻干材料的断裂表面。如图 4 所示, SA-DOX-NA 形成的原位水凝胶形貌良好、有清晰的三维立体网状结构、内部连通性良好, 有利于实现化疗药物与肿瘤疫苗的缓慢释放。

## 5 SA-DOX-NA 的包封率检测

将测定的吸光值分别代入  $y = 0.004525x + 0.04606$  和  $y = 1.349x + 0.1538$  计算药物浓度 (图 5, 图 3A), 根据公式计算出 SA-DOX-NA 对 DOX 的平均包封率为  $(87.38 \pm 0.43)\%$ , 对 NA 的平均包封率为  $(82.8 \pm 0.37)\%$ 。

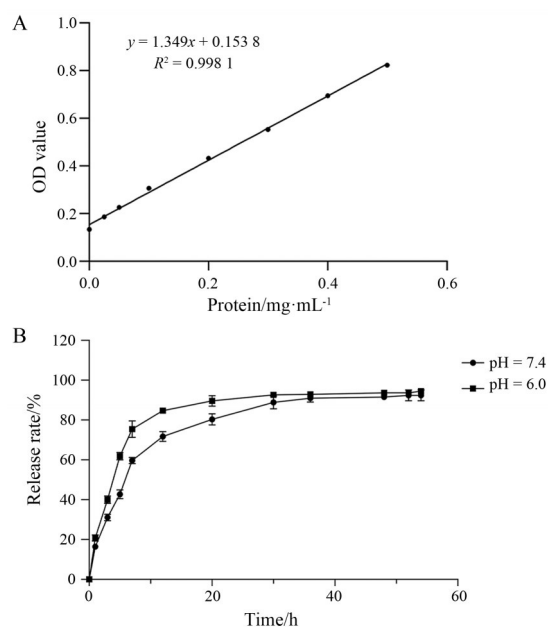


Figure 3 A: Standard curve of protein; B: NA releases ovalbumin (OVA) curves under different pH conditions

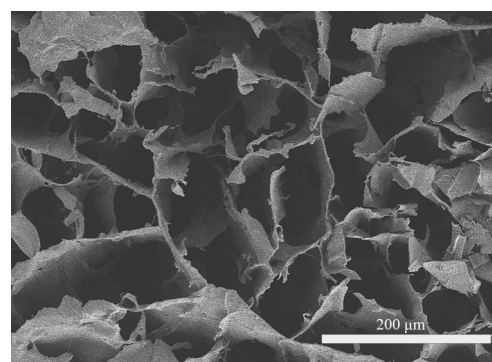


Figure 4 Scanning electron microscopy of SA-DOX-NA. SA: Sodium alginate; DOX: Doxorubicin hydrochloride

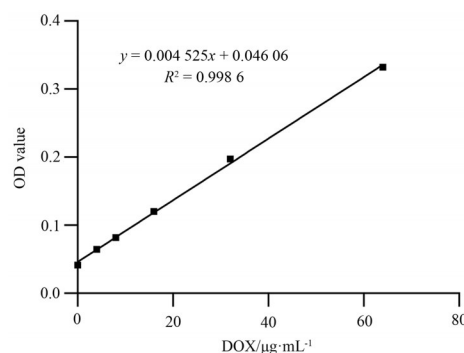


Figure 5 Standard curve of DOX

## 6 SA-DOX-NA 的体外药物释放测定

水凝胶因其具有高吸水性和网状结构特性, 可以实现对药物的缓慢释放。为了验证海藻酸钠水凝胶对药物的储存及缓释作用, 通过检测 DOX 不同时间段的

释放量,对SA-DOX-NA体外药物释放能力进行了评估。如图6所示,游离的DOX在6 h内完全释放,相比于游离DOX,SA-DOX-NA缓慢释放药物,100 h基本释放完全,由此可以看出水凝胶延缓了DOX的释放,实现对药物的储存及缓慢释放作用。

### 7 SA-DOX-NA的安全性评价

为评价SA-DOX-NA的生物安全性,检测空载的SA水凝胶、SA-NA、SA-DOX和SA-DOX-NA对239T的细胞毒性。如图7所示,当SA-DOX-NA质量浓度达到 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,与空白对照相比,对细胞的存活率影响无明显变化。说明SA-DOX-NA质量浓度在 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以下时,对293T人胚肾细胞没有毒性。

### 8 SA-DOX-NA对肿瘤细胞的杀伤效果

药物对细胞的作用效果最直接的反映是细胞存活率。通过检测不同制剂对肿瘤细胞存活率的影响来评估各组制剂的抗肿瘤效果。如图8所示,SA对肿瘤细胞(B16-F10、HCT-116、4T1)无明显杀伤效果,SA-DOX-NA对B16-F10黑色素瘤细胞的半数抑制质量浓度( $\text{IC}_{50}$ )为 $177.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对HCT-116结直肠癌细胞的 $\text{IC}_{50}$ 为 $296.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对4T1乳腺癌细胞的 $\text{IC}_{50}$ 为 $855.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。相比于对照组,SA-DOX-NA对肿瘤细胞(B16-F10、

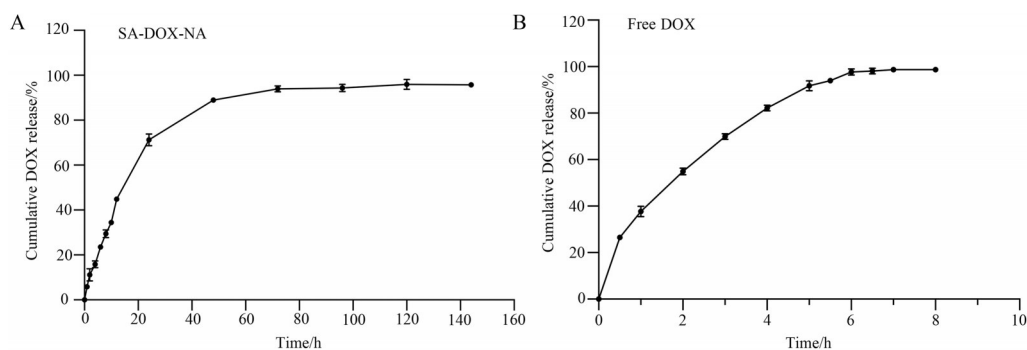
HCT-116、4T1)具有显著的杀伤效果,且相比于游离DOX组,SA-DOX-NA杀伤效果显著增强,这表明SA-DOX-NA具有较好的杀伤肿瘤能力。

### 9 SA-DOX-NA对DC2.4树突状细胞的作用

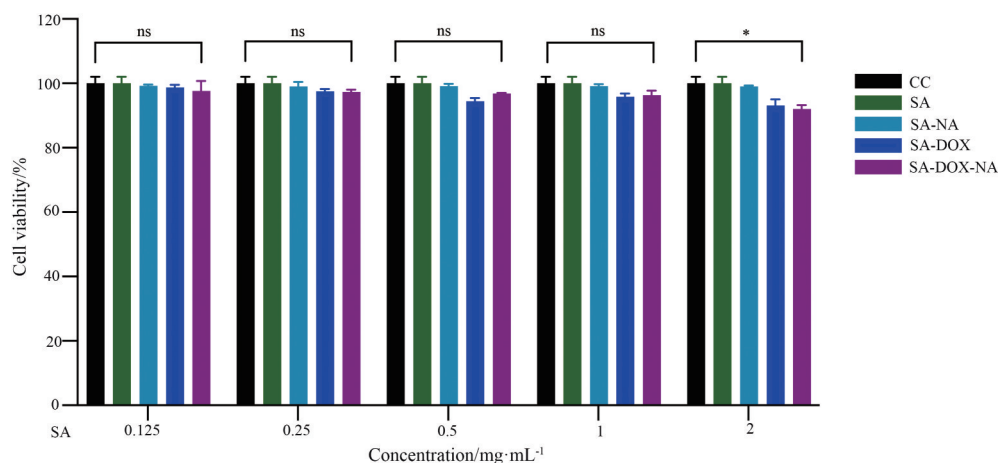
利用CCK-8法检测NA对DC2.4树突状细胞的增殖影响,如图9所示,在不同浓度NA与SA-DOX-NA的作用下,DC2.4树突状细胞具有明显的增殖现象,且随着浓度的改变增殖效果发生变化。当NA质量浓度为 $25$ 、 $50$ 、 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (SA质量浓度为 $0.5$ 、 $1$ 、 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )时,NA与SA-DOX-NA对DC2.4细胞的增殖效果无显著性差异,且NA与SA-DOX-NA对DC2.4树突状细胞增殖效果是单独使用OVA的1.5倍,这说明当NA质量浓度达到 $25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、SA质量浓度达到 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时NA与SA-DOX-NA可以显著促进DC2.4树突状细胞的增殖。

### 10 SA-DOX-NA对DC2.4树突状细胞分泌IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-12表达的影响

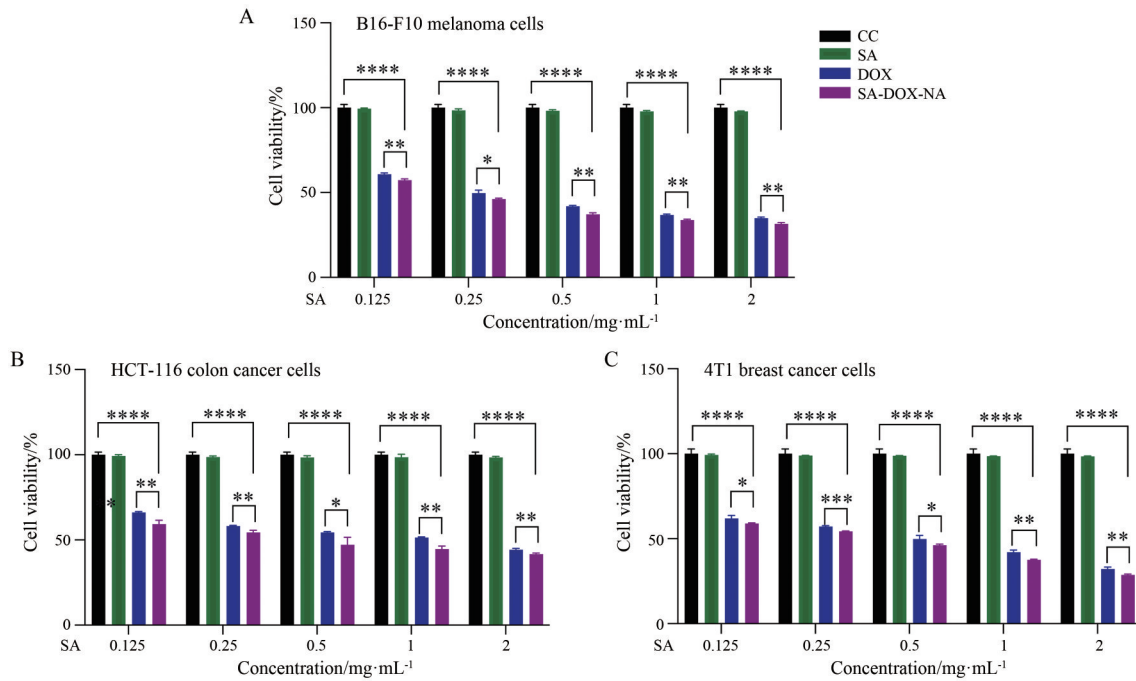
IL-12主要由成熟的树突状细胞分泌,在免疫应答中起着重要的调节和促进作用<sup>[21,22]</sup>。IL-6作为一种多效性的细胞因子,在炎症调控、免疫反应激发及造血过程等多个生物过程中,都展现出了显著的影响力和



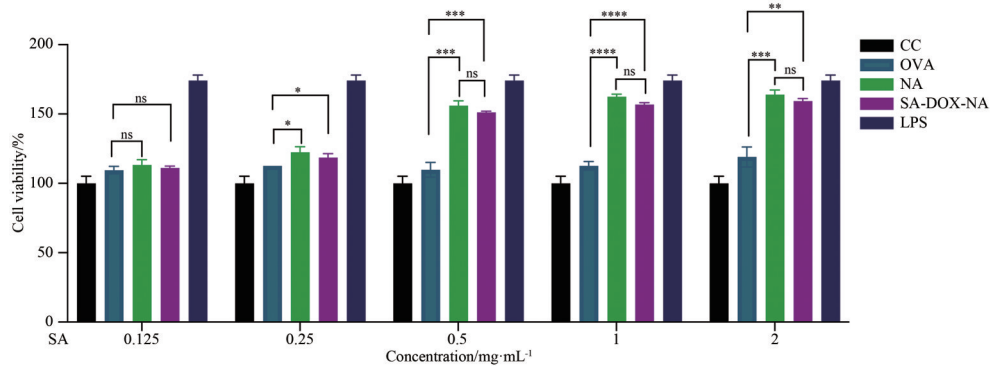
**Figure 6** DOX release curve. A: Release DOX curve of SA-DOX-NA in acidic tumor microenvironment; B: Release curve of free DOX in acidic tumor microenvironment



**Figure 7** Safety evaluation of different concentrations of SA-DOX-NA. CC: Control check.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ , \* $P < 0.05$



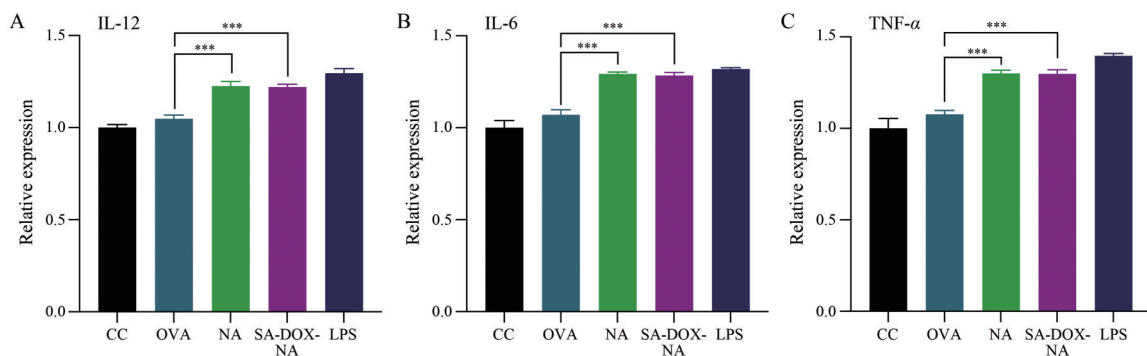
**Figure 8** Cell viability of different tumor cells. A: B16-F10 melanoma cells; B: HCT-116 colon cancer cells; C: 4T1 breast cancer cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001$



**Figure 9** Cell viability of DC2.4 dendritic cells (LPS concentration was  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).  $n = 3, \bar{x} \pm s, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001$

作用<sup>[23-25]</sup>。TNF- $\alpha$ 是一种重要的细胞因子,当DC2.4树突状细胞受到适当的刺激时,它可以分泌TNF- $\alpha$ ,增强其对抗原的处理和呈递能力,从而促进T细胞的激活

和免疫应答的启动。探究NA对DC2.4树突状细胞表达细胞因子蛋白分泌水平的影响,如图10所示,NA与SA-DOX-NA组在结果中检测到的IL-12细胞因子表



**Figure 10** The relative expression levels of IL-12 (A), IL-6 (B) and TNF- $\alpha$  (C) in DC2.4 dendritic cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s, ***P < 0.001$

达量约是游离的OVA组的1.2倍; IL-6细胞因子表达量约是游离的OVA组的1.2倍; TNF- $\alpha$ 细胞因子表达量约是游离的OVA组的1.2倍, 这表明SA-DOX-NA具有较好的免疫活化效果。可实现无需额外佐剂的条件下促进DC2.4树突状细胞的成熟和活化, 激活免疫途径。

## 讨论

本研究以水凝胶为载体, 将化疗药物与肿瘤疫苗联合, 构建了一种复合水凝胶体系SA-DOX-NA。该体系可以缓慢释放化疗药DOX及肿瘤疫苗NA, 其中NA因带有正电荷易被免疫细胞吞噬, 而且构成NA的单体材料在前期研究的基础上发现具有免疫佐剂的效果, 并能够响应细胞溶酶体内酸性环境降解, 能在无额外佐剂添加的情况下高效活化免疫细胞, 激发机体免疫抗肿瘤的作用。而从SA-DOX-NA中释放的化疗药物不但可以直接发挥抗肿瘤的作用, 同时被杀伤的肿瘤细胞的裂解物也可以作为肿瘤抗原进一步辅助NA的免疫活化效果。因此, 本研究构建的复合水凝胶体系SA-DOX-NA可以发挥免疫联合化疗的协同作用, 可以为抗肿瘤研究及新型药物递送系统的开发提供新的思路。

**作者贡献:** 闫文文和张彦龙负责进行实验设计、实验操作、数据分析和论文撰写; 曹明慧和刘政翰负责实验样品的制备、文献查阅和实验数据分析; 雷虹负责实验的指导和论文的润色; 贾向前负责指导实验设计、指导完善实验的进行和论文的修改。

**利益冲突:** 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

## References

- [1] Dizon DS, Kamal AH. Cancer statistics 2024: all hands on deck [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74: 8-9.
- [2] Abedizadeh R, Majidi F, Khorasani HR, et al. Colorectal cancer: a comprehensive review of carcinogenesis, diagnosis, and novel strategies for classified treatments [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2023, 43: 729-753.
- [3] Shi YG, Li D, He CL, et al. Design of an injectable polypeptide hydrogel depot containing the immune checkpoint blocker anti-PD-L1 and doxorubicin to enhance antitumor combination therapy [J]. *Macromol Biosci*, 2021, 21: e2100049.
- [4] Poustchi F, Amani H, Ahmadian Z, et al. Combination therapy of killing diseases by injectable hydrogels: from concept to medical applications [J]. *Adv Health Mater*, 2020, 10: e2001571.
- [5] Fang ZZ, Yang EL, Du Y, et al. Biomimetic smart nanoplatform for dual imaging-guided synergistic cancer therapy [J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10: 966-976.
- [6] Cheng ZH, Zhao DY, Wu M, et al. Intracellular co-delivery of proteins and chemotherapeutics using calcium carbonate mineralized nanoparticles for osteosarcoma therapy [J]. *Mater Des*, 2022, 222: 111040.
- [7] Marques AC, Costa PC, Velho S, et al. Injectable poloxamer hydrogels for local cancer therapy [J]. *Gels*, 2023, 9: 593.
- [8] Liu YL, Ma WQ, Zhou P, et al. *In situ* administration of temperature-sensitive hydrogel composite loading paclitaxel microspheres and cisplatin for the treatment of melanoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 160: 114380.
- [9] Xiao CC, Liu CF, Feng J, et al. Research progress of anti-tumor *in situ* gel delivery system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 3004-3015.
- [10] Xiao TT, Zhu JZ, Jia L, et al. Injectable alginate hydrogels for synergistic tumor combination therapy through repolarization of tumor-associated macrophages [J]. *J Control Release*, 2022, 348: 239-249.
- [11] Negahdaripour M, Golkar N, Hajighahramani N, et al. Harnessing self-assembled peptide nanoparticles in epitope vaccine design [J]. *Biotechnol Adv*, 2017, 35: 575-596.
- [12] Guo JY, Liu CH, Qi ZY, et al. Engineering customized nanovaccines for enhanced cancer immunotherapy [J]. *Bioact Mater*, 2024, 36: 330-357.
- [13] Chen Q, Sun MJ, Li YN, et al. Nano-vaccines combining customized *in situ* anti-PD-L1 depot for enhanced tumor immunotherapy [J]. *Nanomedicine*, 2023, 53: 102693.
- [14] Pan C, Wu J, Qing S, et al. Biosynthesis of self-assembled proteinaceous nanoparticles for vaccination [J]. *Adv Mater*, 2020, 32: e2002940.
- [15] Li X, Pan C, Li CX, et al. Self-assembled proteinaceous nanoparticles for co-delivery of antigens and cytosine phosphoguanine (CpG) adjuvants: implications for nanovaccines [J]. *ACS Appl Nano Mater*, 2023, 6: 7637-7648.
- [16] Côté -Cyr M, Zottig X, Gauthier L, et al. Self-assembly of flagellin into immunostimulatory ring-like nanostructures as an antigen delivery system [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2022, 8: 694-707.
- [17] Zhu DJ, Tian M, Liu YY. Loaded CA4P and rapamycin acid-sensitive liposomes target blood vessels for the treatment of triple-negative breast cancer [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 2143-2152.
- [18] Jia XQ, Chen H, Wu ML, et al. A biodegradable antigen nanocapsule promotes anti-tumor immunity *via* the cGAS-STING pathway [J]. *Adv Funct Mater*, 2023, 33: 2212085.
- [19] Yuba E, Osaki T, Ono M, et al. Bleomycin-loaded pH-sensitive polymer (-) pipid-incorporated liposomes for cancer chemotherapy [J]. *Polymers (Basel)*, 2018, 10: 74.
- [20] Yan M, Du JJ, Gu Z, et al. A novel intracellular protein delivery platform based on single-protein nanocapsules [J]. *Nat Nanotechnol*, 2010, 5: 48-53.
- [21] Liu MR, Hu SQ, Yan N, et al. Inhalable extracellular vesicle

- delivery of IL-12 mRNA to treat lung cancer and promote systemic immunity [J]. *Nat Nanotechnol*, 2024, 19: 565-575.
- [22] Landoni E, Woodcock MG, Barragan G, et al. IL-12 reprograms CAR-expressing natural killer T cells to long-lived Th1-polarized cells with potent antitumor activity [J]. *Nat Commun*, 2024, 15: 89.
- [23] Soler MF, Abaurrea A, Azcoaga P, et al. New perspectives in cancer immunotherapy: targeting IL-6 cytokine family [J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11: e007530.
- [24] Naseem S, Hussain T, Manzoor S. Interleukin-6: a promising cytokine to support liver regeneration and adaptive immunity in liver pathologies [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2017, 39: 36-45.
- [25] Jenkins BJ, Roberts AW, Najdovska M, et al. The threshold of gp130-dependent STAT3 signaling is critical for normal regulation of hematopoiesis [J]. *Blood*, 2005, 105: 3512-3520.