DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0433
文章编号 1671-8852(2025)09-1146-09

携带锰离子和白细胞介素15的蜂毒肽水凝胶在宫颈癌治疗中的应用

师 媛[1] 韩继荣[1] 陈 璐[2] 武琳琳[1] 李思曼[1] 韩 华[1] 周满红[3]
西北妇女儿童医院 [1]妇女保健科，[2]妇科内分泌科，[3]产二科 陕西 西安 710003

摘要 目的：通过构建包含锰离子和白细胞介素15(IL-15)等细胞因子的微环境响应性蜂毒肽水凝胶(IL-15@MRMn)探索其用于治疗晚期宫颈癌，促进机体免疫记忆特性的效果。方法：采用扫描电镜观察IL-15@MRMn成胶的微观特性；采用流式细胞术和溶血实验验证IL-15@MRMn对宫颈癌细胞U14的特异性杀伤。采用流式细胞术结合C57小鼠在体原位治疗实验验证IL-15@MRMn对抗原呈递细胞、巨噬细胞、NK细胞、效应T细胞以及免疫记忆T细胞形成的调控作用；采用免疫荧光、U14原位肿瘤接种实验以及肿瘤细胞再接种实验证实IL-15@MRMn对宫颈癌细胞的在体治疗效果与免疫记忆特性的鉴定。结果：IL-15@MRMn中包含的蜂毒肽可穿透肿瘤细胞壁，实现内容物的释放；释放的内容物可被锰离子活化的抗原呈递细胞摄取，并转运到淋巴结，实现机体对该肿瘤细胞的免疫记忆。同时，IL-15可促进NK细胞和效应T细胞的活化以及记忆T细胞的形成，最终实现对宫颈癌的有效治疗和预防。结论：具有肿瘤微环境响应特性的蜂毒肽水凝胶结合IL-15等细胞因子可有效治疗晚期宫颈癌模型，实现机体的长期免疫记忆特性。

关键词 蜂毒肽；水凝胶；锰离子；白细胞介素15；宫颈癌
中图分类号 R737.3
文献标识码 A
开放科学(资源服务)标识码(OSID)：

Melittin peptide-based hydrogel carrying manganese ions and interleukin-15 for the treatment of cervical cancer

SHI Yuan[1], HAN Jirong[1], CHEN Lu[2], WU Linlin[1], LI Siman[1], HAN Hua[1], ZHOU Manhong[3]
[1]Dept. of Women's Health, [2]Dept. of Gynecological Endocrinology, [3]Dept. of Obstetrics Ⅱ, Northwest Women's and Children's Hospital, Xi'an 710003, Shaanxi, China

Abstract

Objective: To explore the therapeutic efficacy of microenvironment responsive melittin peptide-based hydrogel containing manganese ions and interleukin (IL)-15 (IL-15@MRMn) in a cervical cancer tumor model. **Methods:** The physical and chemical properties of IL-15@MRMn were observed by scanning electron microscopy. Flow cytometry and hemolysis experiments were used to verify the specific killing of cervical cancer cell U14 by IL-15@MRMn. Flow cytometry combined with *in situ* treatment experiments in C57 mice were used to verify the regulatory effects of IL-15@MRMn on the formation of antigen-presenting cells, macrophages, NK cells, effector T cells, and immune-memory T cells. Immunofluorescence, *in situ* tumor inoculation experiments on U14, and tumor cells were re-implanted to confirm the *in vivo* therapeutic effects of IL-15@MRMn on cervical cancer cells and the ability to induce

作者简介：师媛，女，1988—，医学硕士，主治医师，主要从事妇产科各种常见病、多发病的临床研究，E-mail：15592991550@163.com
通信作者：周满红，女，1987—，医学硕士，主治医师，主要从事围产医学及妊娠期糖尿病研究，E-mail：570451468@qq.com

immune memory properties. **Results:** Melittin peptides in IL-15@MRMn can penetrate the tumour cell membrane and release its contents. The released contents can be taken up by manganese ion-activated antigen-presenting cells and transported to lymph nodes to achieve the body's immune memory for this tumour cell. At the same time, IL-15 can promote the activation of NK cells and effector T cells and the formation of memory T cells, ultimately achieving effective treatment and prevention of cervical cancer. **Conclusion:** Melittin peptide-based hydrogel with tumor microenvironment response properties combined with cytokines such as IL-15 can effectively treat advanced cervical cancer and achieve long-term immune memory properties of the organism.

Key Words　Melittin Peptide; Hydrogel; Manganese Ion; Interleukin-15; Cervical Cancer

宫颈癌是一种常见的女性恶性肿瘤，在发展中国家的发病率和死亡率尤为突出[1]。宫颈癌在早期阶段缺乏明显症状，难以诊断，而晚期患者面临的治疗选择有限，常规的放化疗和靶向治疗效果也并不理想[2]。近年来，免疫治疗，特别是抗程序性死亡受体/配体1(PD-1/PD-L1)抗体和抗细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)抗体，通过激活宿主免疫系统以识别和清除癌细胞，为晚期宫颈癌患者带来了新的希望[3-4]。然而，免疫治疗的响应率并不高，且难以预防疾病的复发，这促使研究者们需要探索更加有效的治疗策略。

晚期宫颈癌的治疗挑战主要包括肿瘤的异质性、免疫抑制微环境以及疾病的频繁复发[5]。肿瘤的异质性增加了放化疗的耐受性，也使得靶向药物的效果受限；而免疫抑制微环境则抑制了免疫细胞的功能，导致肿瘤快速进展[6-7]。因此，克服肿瘤异质性带来的耐药性问题和逆转免疫抑制微环境是提高治疗效果和预防复发的关键。水凝胶作为一种新型的化疗和免疫治疗载体，因其载药量大、控释能力强和生物相容性高而受到关注[8-9]。例如，含有塞来昔布和PD-1抗体的藻酸盐水凝胶，通过改善肿瘤免疫微环境，展现出显著的抗肿瘤效果[10]。然而，现有的水凝胶主要作为药物释放平台，缺乏直接的抗肿瘤功能或免疫刺激能力。

为了有效治疗晚期宫颈癌并预防复发，一种新型的可生物降解、$RADA_{32}$多肽水凝胶体系被引入[11-12]。该体系通过整合不同功能分子，实现对肿瘤细胞和微环境的时空精确调控。特别是，$RADA_{32}$多肽与蜂毒肽的结合，利用蜂毒肽的抗肿瘤特性和MMP2/9酶的选择性释放机制，实现了对肿瘤细胞的定点杀伤，且可有效规避蜂毒肽的溶血效应[13]。进一步地，为改善肿瘤抑制性免疫微环境并激活抗肿瘤免疫细胞，本研究在蜂毒肽水凝胶中引入了锰离子和白细胞介素15(IL-15@MRMn)。锰离子通过激活cGAS-STING信号通路，促进抗原呈递细胞的活化，增强T细胞的免疫反应[14-15]；而IL-15则增强了效应T细胞和NK细胞的活性，促进记忆T细胞的形成[16-17]。本研究通过体外溶血实验、细胞凋亡分析、抗原呈递细胞活化分析以及小鼠宫颈癌模型的治疗实验和肿瘤微环境的流式分析与多因子检测等实验验证IL-15@MRMn可通过活化抗原呈递细胞、控释性杀伤肿瘤细胞以及逆转免疫抑制性微环境有效治疗晚期宫颈癌模型，以期为晚期宫颈癌免疫治疗提供新的思路和方法。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　*实验动物和饲养*　实验所用C57BL/6J小鼠均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，生产许可证[SCXK(湘)2019-0004]，使用许可证[SYXK(鄂)2023-0102]。小鼠均饲养于武汉华联科生物技术有限公司。小鼠饲养环境温度保持在22～24 ℃、湿度保持在40%～70%之间；明暗交替各12 h，自由摄食、摄水。所有动物实验均是双盲进行。

1.1.2　*细胞*　小鼠来源宫颈癌细胞系U14购买于中国典藏中心。

1.1.3　*主要试剂和仪器*　RADARADARADA-RADARADARADARADARADA-GGGPQGIW-GQGK-GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ ($RADA_{32}$-MMP2/9-melittin)、RADARADA-RADARADARADARADARADARADA-GIGAV-LKVLTTGLPALISWIKRKRQQ ($RADA_{32}$-melittin)、RADARADARADARADARADARADARADARA-DA-GGGPQGIWGQGK ($RADA_{32}$-MMP2/9)、RADARADARADARADARADARADAR ($RADA_{32}$)和GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (melittin)等多肽购自上海楚肽生物科技有限公司；

荧光染料PKH26、胶原酶Ⅳ、透明质酸酶、琥珀酰亚胺酯(CSFE)细胞增殖染料、鼠源性白细胞介素2(IL-2)、鼠源性粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)以及鼠源性IL-15细胞因子购自上海翌圣生物科技有限公司;BCA蛋白浓度检测试剂盒、CCK-8检测试剂盒、蛋白上样缓冲液、化学底物发光试剂盒、蛋白酶抑制剂以及磷酸酶抑制剂购自碧云天生物科技有限公司;兔源一抗STING、p-STING、NF-κB、p-NF-κB、GAPDH和Laminin B1抗体均购自于爱博泰客生物科技有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗购自武汉三鹰生物科技有限公司;1640培养基购自美国Gibco公司;电泳仪和ChemiDoc MP成像系统购自美国Bio-Rad公司;流式细胞仪购自贝克曼生物科技;CD45(clone S18009F)、CD3(clone 17A2),CD8(clone SK1),CD69(clone H1.2F3),CD4(clone GK1.5),PD1(clone 29F.1A12),CD11c(clone N418),CD11b(clone M1/70),CD86(clone GL-1),MHCⅡ(clone M5/114.15.2),CD44(clone IM7)和CD62L(clone MEL-14)等流式抗体、IL-15相关ELISA检测试剂盒、$CD8^+$ T细胞磁珠分选试剂盒以及死活染料Zombie NIR™均购自达科为生物科技有限公司;0.22 μm PVDF膜购自默克密理博。

1.2 实验方法

1.2.1 IL-15@MRMn合成 IL-15(0.1 mg•mL^{-1})在室温下溶解于0.9%的氯化锰水溶液中。将10 mg $RADA_{32}$多肽溶解于1 mL上述配制的溶液中,在4 ℃条件下孵育过夜,即可获得实验所用水凝胶体系,其他组别的水凝胶体系只需要替换等摩尔浓度的多肽即可;所有操作步骤都在无菌条件下进行。

1.2.2 IL-15@MRMn形貌检测 不同组别水凝胶的形貌通过扫描电镜(ZEISS Sigma 300型号)设备获得。将水凝胶溶液(50 μL)装入标准样品支架的样品孔中,在室温下孵育2 min以形成稳定的水凝胶。然后将标准样品支架固定在样品杆上,并迅速转移到过冷恒温器中,防止水形成结晶并损坏样品。用刮刀削去水凝胶表面,露出水凝胶的内部结构。升华法去除样品表面的水分,并通过喷涂铂金获得高质量的扫描电子显微镜图像。成像在3.0 kV的加速电压下进行。

1.2.3 IL-15@MRMn缓释性检测 在1.5 mL EP管中添加0.5 mL IL-15@MRMn,然后添加1 mL包含或者不包含5个单位蛋白酶K的生理盐水溶液,置于37 ℃中孵育;在指定时间置换并收集对应的生理盐水溶液,用于检测IL-15和锰离子的含量。同时检测每天水凝胶剩余的质量;IL-15使用ELISA试剂盒检测,锰离子使用质谱检测。本实验独立重复3次。

1.2.4 IL-15@MRMn体外溶血实验鉴定 收集新鲜小鼠血液中分离的红细胞,并稀释至细胞密度为5×10^7•mL^{-1},然后将100 μL的红细胞与不同浓度的不同体系水凝胶在37 ℃下孵育4 h。未添加水凝胶且悬浮在PBS中的为对照组,悬浮在1% Triton X-100的PBS中的为阳性对照组。本实验独立重复3次。

1.2.5 肿瘤细胞杀伤性检测 将U14细胞(5 000个细胞/孔)接种于96孔板,在处理前培养24 h。然后用90 μL新鲜培养基和10 μL的0.9%氯化钠替代培养基。在每个培养孔中加入80 μmol•L^{-1} $RADA_{32}$、80 μmol•L^{-1} $RADA_{32}$-MMP2/9、80 μmol•L^{-1} $RADA_{32}$-melittin RD、80 μmol•L^{-1} $RADA_{32}$-MMP2/9-melittin以及80 μmol•L^{-1} IL-15@MRMn水凝胶。各组培养基每天更换。在37 ℃下孵育1、3、5和7 d后,CCK-8法评估细胞活力。本实验独立重复3次。

1.2.6 IL-15@MRMn体外DC细胞活化检测 提取C57小鼠骨髓来源细胞,使用1 640培养基进行培养,使用20 ng•mL^{-1}的GM-CSF诱导DC细胞的形成,在DC培养第6天,加入0.9%氯化钠诱导形成的80 μmol•L^{-1} $RADA_{32}(Na^{2+})$水凝胶、0.9%氯化钠诱导形成的80 μmol•L^{-1} $RADA_{32}$-melittin(Na^{2+})水凝胶、氯化锰诱导形成的80 μmol•L^{-1} $RADA_{32}(Mn^{2+})$水凝胶、氯化锰诱导形成的80 μmol•L^{-1} $RADA_{32}$-melittin(Mn^{2+})水凝胶以及80 μmol•L^{-1} IL-15@MRMn水凝胶,于24 h后使用CD86与MHC-Ⅱ等流式抗体检测DC的成熟状态。本实验独立重复3次。

1.2.7 IL-15@MRMn体外效应T细胞增殖检测 提取C57小鼠脾脏来源$CD8^+$ T细胞,用CFSE对T细胞染色,1640培养基培养,同时添加鼠源性IL-2细胞因子(10 ng•mL^{-1})。在培养的$CD8^+$ T细胞培养基中加入CD3/CD28抗体非特异性刺激T细胞增殖,同时添加IL-15细胞因子(10 ng•mL^{-1})、80 μmol•L^{-1} $RADA_{32}(Na^{2+})$水凝胶、80 μmol•L^{-1} $RADA_{32}$-melittin(Na^{2+})水凝胶、80 μmol•L^{-1} $RADA_{32}(Mn^{2+})$水凝胶、80 μmol•L^{-1} $RADA_{32}$-melittin(Mn^{2+})水凝胶及80 μmol•L^{-1} IL-15@MRMn水凝胶,于3 d后使用流式细胞仪观察$CD8^+$ T细胞增殖情况并使用CD69等流式抗体观察T细胞活化情况。本实验独立重复3次。

1.2.8 免疫印记检测 使用含有蛋白酶和磷酸酶

抑制剂的RIPA裂解液裂解DC细胞样本，在4 ℃裂解 30 min，然后 4 ℃ 12 000 *g* 离心 30 min。根据BCA蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度，将样品的上样浓度调整到相同。样品煮沸 5 min后，使用SDS-PAGE胶分离，然后转移到PVDF膜上。PVDF膜在室温下用5%脱脂牛奶阻断1 h，并与相关一抗在4 ℃孵育过夜。用含0.05% Tween-20的生理盐水洗涤，二抗与膜在室温下孵育1 h时。使用化学曝光仪检测条带强度。本实验独立重复3次。

1.2.9　U14宫颈癌皮瘤模型构建与治疗　皮下肿瘤模型中，小鼠右侧大腿根部皮下注射5×10^5个细胞。接种U14细胞后，当肿瘤体积达到50 mm^3时，将小鼠随机分为不同的处理组（每组小鼠均为6只），接受多肽总摩尔剂量均为10 nmol的$RADA_{32}(Na^{2+})$水凝胶、$RADA_{32}$-melittin(Na^{2+})水凝胶、$RADA_{32}(Mn^{2+})$水凝胶、$RADA_{32}$-melittin(Mn^{2+})水凝胶以及IL-15@MRMn水凝胶的瘤内给药，共注射一次。用游标卡尺测量肿瘤的长度（L）和宽度（W），肿瘤体积（V）的计算公式为$V=(L\times W^2)/2$。

1.2.10　免疫荧光检测　不同指定处理组获取的小鼠U14肿瘤采用4%多聚甲醛固定24 h，之后采用30%蔗糖溶液固定48 h，使用冰冻切片机获取小鼠肿瘤切片；使用对应的荧光抗体对小鼠肿瘤切片进行染色，并使用共聚焦显微镜拍照并获取图像。

1.2.11　肿瘤浸润免疫细胞分析　在治疗模型中设置每组6只小鼠，在接种肿瘤模型中设置每组10只小鼠。使用手术器械剥离不同治疗组别的U14肿瘤肿块，并切成小块，在含有0.32 mg•mL^{-1}胶原酶Ⅳ和0.5 mg•mL^{-1}透明质酸酶的PBS溶液中消化降解1 h。裂红后，使用70 μm孔径的纱布过滤肿瘤细胞悬液；所有样品先使用Fc受体阻断，然后与包含CD45、CD3、CD8、CD69、PD1、CD11c、CD86、MHCⅡ、CD44、CD62L以及Zombie NIR™的PBS溶液在4 ℃下孵育30 min后行流式检测与分析。

1.3　统计学分析　使用GraphPad Prism软件进行统计分析。数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，使用单因素方差分析比较多组数据间的差异；采用对数秩检验比较组间生存率。以$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　IL-15@MRMn水凝胶体系合成与特性表征　多药联合策略是有效同时逆转肿瘤抑制性微环境以及杀伤肿瘤的最有效方式，而水凝胶的高载药率促进了其在肿瘤治疗中的应用，本研究选择可细胞膜打孔以及释放胞质的蜂毒肽、可活化cGAS-STING信号通路的锰离子以及可促进免疫细胞活化和记忆T细胞形成的IL-15为功能性成分，通过对温度响应的$RADA_{32}$多肽水凝胶实现对这三者的有效装载与缓释。IL-15@MRMn合成原材料以及抗肿瘤免疫学机制如图1A所示，其中蜂毒肽与$RADA_{32}$水凝胶通过MMP2/9酶可切割的多肽序列GGGPQGIWGQGK进行共价连接，实现对蜂毒肽的毒性功能的屏蔽以及在肿瘤微环境中的可控释放。蜂毒肽的装载以及锰离子和IL-15细胞因子的装载并不会影响RADA32多肽水凝胶的成胶能力（图1B），RADA32多肽水凝胶在低温时以液态形式存在，达到体表温度时可迅速转变为半固体状态。扫描电镜的结果显示IL-15@MRMn与常规的水凝胶结构相似，呈现蜂窝状结构（图1C）；将不同蜂毒肽浓度的IL-15@MRMn与U14肿瘤细胞孵育，可发现肿瘤细胞的死亡比例与IL-15@MRMn中的蜂毒肽浓度成正比例关系（图1D），这证明了U14肿瘤细胞释放的MMP2/9可有效释放IL-15@MRMn中的蜂毒肽成分。为验证IL-15@MRMn屏蔽蜂毒肽的功效，将小鼠来源的红细胞与含有不同浓度的蜂毒肽的IL-15@MRMn共孵育，以单纯蜂毒肽为阳性对照组；图1E的结果显示，含有较高浓度蜂毒肽的IL-15@MRMn并不会有效裂解红细胞，而单纯蜂毒肽在极低浓度即可裂解红细胞；这些结果证明了IL-15@MRMn可特异性响应肿瘤细胞释放的MMP2/9酶的活性，实现对肿瘤细胞的特异杀伤。

2.2　IL-15@MRMn水凝胶体系体外免疫细胞活化能力评定　为验证IL-15@MRMn对肿瘤相关免疫细胞功能活性的影响，本研究评估了其对抗原呈递细胞、吞噬类细胞、效应T细胞增殖的影响。本实验将骨髓来源的DC细胞与含有10 μmol•L^{-1}蜂毒肽浓度的IL-15@MRMn共孵育24 h，通过流式细胞术检测树突状细胞表面CD80和CD86的表达量，图2A的结果显示，含有钠离子的蜂毒肽纳米颗粒不会产生对树突状细胞的活化能力，证明了蜂毒肽和RADA32水凝胶本身的弱免疫激活能力，而含有锰离子的水凝胶可诱导树突状细胞高效表达CD80和CD86，证明了锰离子本身诱导抗原呈递细胞活化的能力，而加入IL-15细胞因子的IL-15@MRMn并不会更加高效诱导树突状细胞的活化。

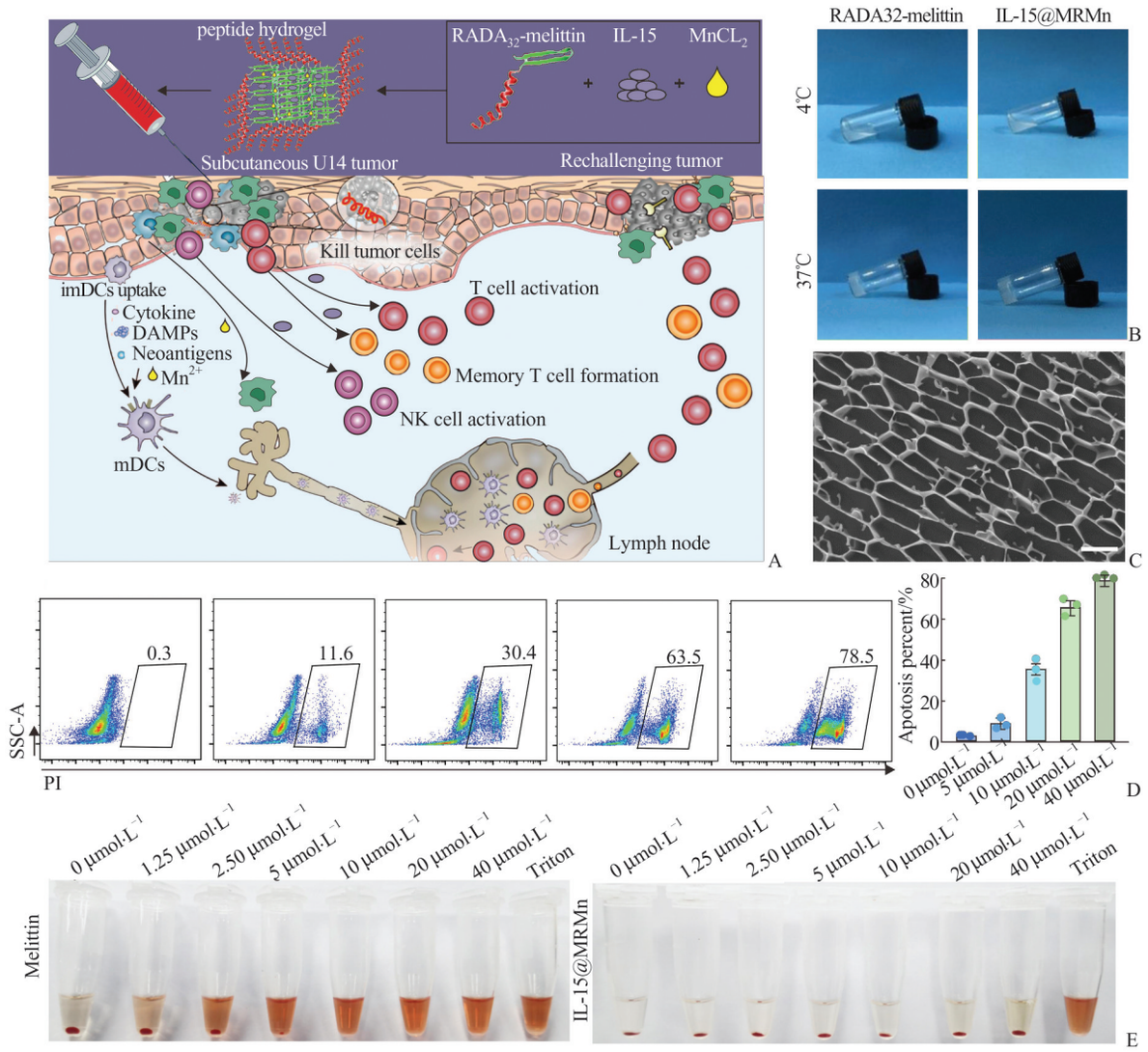


图 1 IL-15@MRMn 水凝胶体系成胶特性、肿瘤杀伤能力以及溶血性检测

A. IL-15@MRMn 水凝胶体系合成与作用机制示意图；B. IL-15@MRMn 成胶能力检测；C. IL-15@MRMn 扫描电镜检测结构；D. IL-15@MRMn 在不同浓度杀伤肿瘤细胞的特性；E. IL-15@MRMn 溶血能力检测，以单独 Melittin 为对照组

此外，本研究将同等浓度的 IL-15@MRMn 与骨髓来源的 M2 型巨噬细胞共孵育后发现，含有锰离子的蜂毒肽水凝胶可高效抑制 CD206 的表达并促进 CD86 的表达，证明了 IL-15@MRMn 和 MRMn 在重编程 M2 型巨噬细胞中的巨大潜力（图 2B～2E）。免疫印记结果表明锰离子可有效活化巨噬细胞中 cGAS-STING 信号通路（图 2F）。为确定 IL-15@MRMn 中 IL-15 在调控 T 细胞活性方面的影响，本研究将具有同等浓度 RADA32 的不同组别与 C57 小鼠脾脏来源的 $CD8^+$ T 细胞共孵育，并添加抗 CD3/CD28 抗体促进 $CD8^+$ T 细胞非特异性增殖，结果显示蜂毒肽本身、锰离子和 IL-15 都具有促进 $CD8^+$ T 细胞增殖的潜力，而 IL-15@MRMn 的组合能更高效地促进效应 T 细胞的有效快速增殖（图 2G～2H）。

2.3 IL-15@MRMn 水凝胶体系治疗 U14 宫颈癌疗效与作用机制 为验证 IL-15@MRMn 在体治疗 U14 宫颈癌细胞的能力及相关治疗机制，本研究使用 U14 细胞系构建了皮下肿瘤模型，在肿瘤生长的第 7 天将小鼠无差别分群，并按组别进行了不同的治疗（肿瘤原位注射一针水凝胶）；在 C57 小鼠肿瘤模型生长到第 20 天后，解剖不同组别的小鼠，统计肿瘤生长情况。图 3A 的结果显示，仅含有蜂毒肽的水凝胶或者仅含有锰离子的水凝胶都可以在一定程度上抑制肿瘤生长，同时含有蜂毒肽和锰离子的水凝胶可高效抑制 U14 宫颈癌细胞系的生长，与

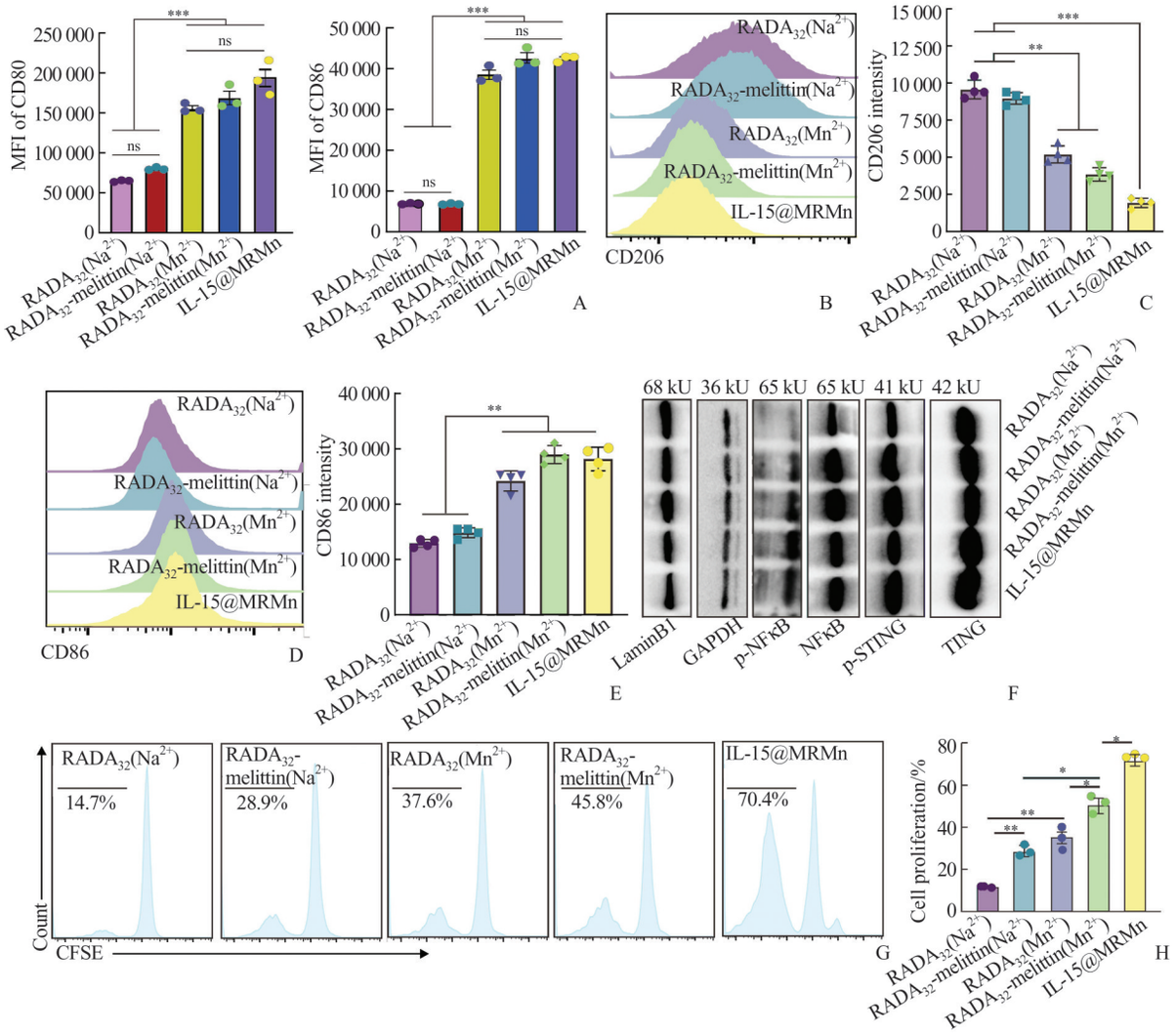


图 2　IL-15@MRMn 诱导 DC 细胞活化、巨噬细胞极化以及效应 T 细胞增殖特性鉴定

A. 流式细胞术统计树突状细胞经不同指定处理后的活化相关 CD80 与 CD86 的表达量；B、C. IL-15@MRMn 诱导 M2 巨噬细胞表达 CD206 的情况；D、E. IL-15@MRMn 诱导 M2 巨噬细胞表达 CD86 的情况；F. 免疫印记验证 IL-15@MRMn 活化 cGAS-STING 信号通路；G. IL-15@MRMn 诱导效应 T 细胞增殖的特性；H. 流式细胞术统计效应 T 细胞经不同指定处理后的增殖比例。每组实验独立重复 3 次，ns：无显著差异，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

单独蜂毒肽和锰离子治疗组具有显著差异；而含有 IL-15 细胞因子的 IL-15@MRMn 可实现对宫颈癌肿瘤的治愈，不同组别小鼠肿瘤不同天数的生长情况如图 3B 所示。此外，检测不同治疗组别小鼠的体质量后发现，注射不同组别的水凝胶对小鼠的体质量影响变化不大，证明了 IL-15@MRMn 的高生物相容性（图 3C）。

为阐明 IL-15@MRMn 对肿瘤微环境的影响，本研究获取了不同治疗组别小鼠的肿瘤单细胞悬液并进行流式细胞术验证与统计。我们同时统计了肿瘤浸润中性粒细胞（图 3D）、M2 型巨噬细胞（图 3E）、成熟树突状细胞（图 3F）、活化 $CD69^{+}$ $CD8^{+}$ T 细胞（图 3G）、IFN-γ 阳性 $CD8^{+}$ T 细胞（图 3H）以及活化 NK 细胞（图 3I）的浸润比例，发现单次注射水凝胶会诱发一定程度的炎症，导致炎性中性粒细胞的大量浸润，而含有锰离子的水凝胶可高效促进肿瘤微环境中 TAMs 的重编程以及 DC 的活化；此外，IL-15 的添加可有效增加效应 T 细胞的浸润以及分泌 IFN-γ 的效应 T 细胞的浸润，还可以促进浸润肿瘤细胞的 NK 的活化，最终导致对 U14 宫颈癌肿瘤的有效抑制。

2.4　IL-15@MRMn 水凝胶体系预防 U14 宫颈癌复发效果评价　宫颈癌术后复发和全身扩散是导致临床治疗效果差的原因。为验证 IL-15@MRMn 治

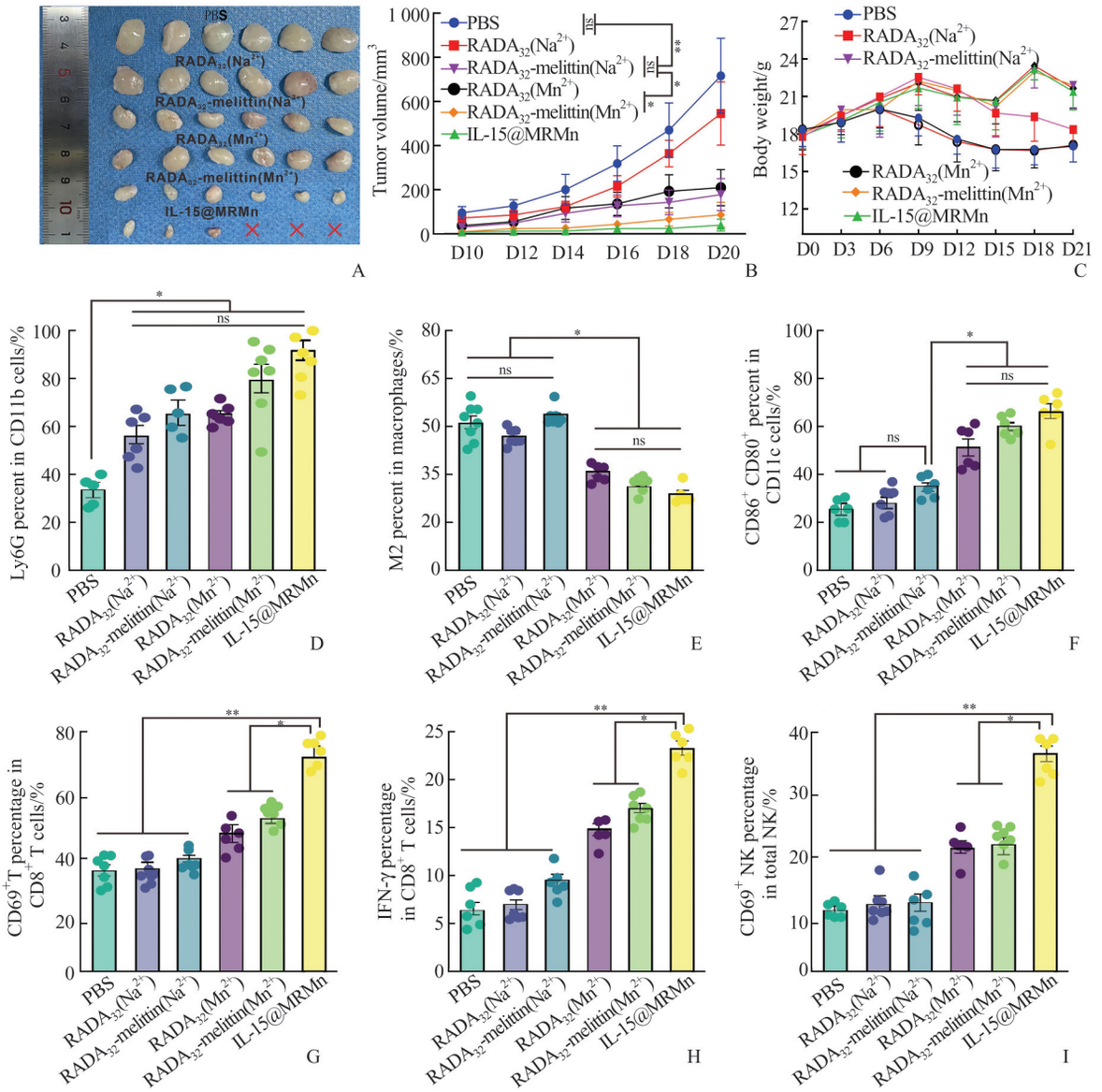


图 3 IL-15@MRMn 原位注射治疗宫颈癌的功能特性与机制评估

A. 肿瘤体外剥离成像实物图；B. 统计 U14 宫颈癌原位肿瘤经过不同指定治疗后的不同天数的肿瘤生长情况；C. 统计 U14 宫颈癌原位肿瘤经过不同指定治疗后的不同天数的小鼠体质量变化情况；D～I. 流式统计经过不同指定治疗后的不同组别的中性粒细胞占据 CD11b 阳性细胞比例(D)、不同组别的 M2 型巨噬细胞占据总巨噬细胞的比例(E)、不同组别的成熟树突状细胞占据总树突状细胞的比例(F)、不同组别的活化 $CD69^+CD8^+$ T 细胞占据总 $CD8^+$ T 细胞的比例(G)、不同组别的 IFN-γ 阳性 T 细胞占据总 $CD8^+$ T 细胞的比例(H)以及不同组别的 CD69 活化阳性 NK 细胞占据总 NK 细胞的比例(I)。每组 $n=6$，ns：无显著差异，$^*P<0.05$，$^{**}P<0.01$

疗 U14 原位宫颈癌后能否够抵制肿瘤的再复发，本研究使用 IL-15@MRMn 原位治疗宫颈癌消退的 C57 小鼠再次接种 U14 细胞，观察其肿瘤生长情况，对照组为正常 C57 小鼠。对肿瘤不同时间点的生长体积统计后发现，IL-15@MRMn 可显著性抑制再次接种 U14 细胞小鼠的肿瘤生长(图 4A)，并且其抑制肿瘤复发的概率可达到 30%(图 4B、4C)。为验证 IL-15@MRMn 抵制肿瘤再复发的机制，实验后统计不同治疗组小鼠的脾脏记忆性 T 细胞发现，IL-15@MRMn 可诱导中央记忆性 T 细胞($CD44^+CD62L^+$)大量产生，与其他治疗组相比具有显著差异(图 4D)。此外，检测再次接种 U14 细胞的不同组别的小鼠肿瘤中 $CD8^+$ T 细胞浸润效率发现，IL-15@MRMn 治疗组的小鼠肿瘤具有较多数量 $CD8^+$ T 细胞的浸润，而 PBS 组的 $CD8^+$ T 细胞浸润则较少(图 4E、4F)；上述结果证明 IL-15@MRMn 可诱导肿瘤记忆性 T 细胞大量产生，并有效抵制宫颈癌肿瘤的再复发。

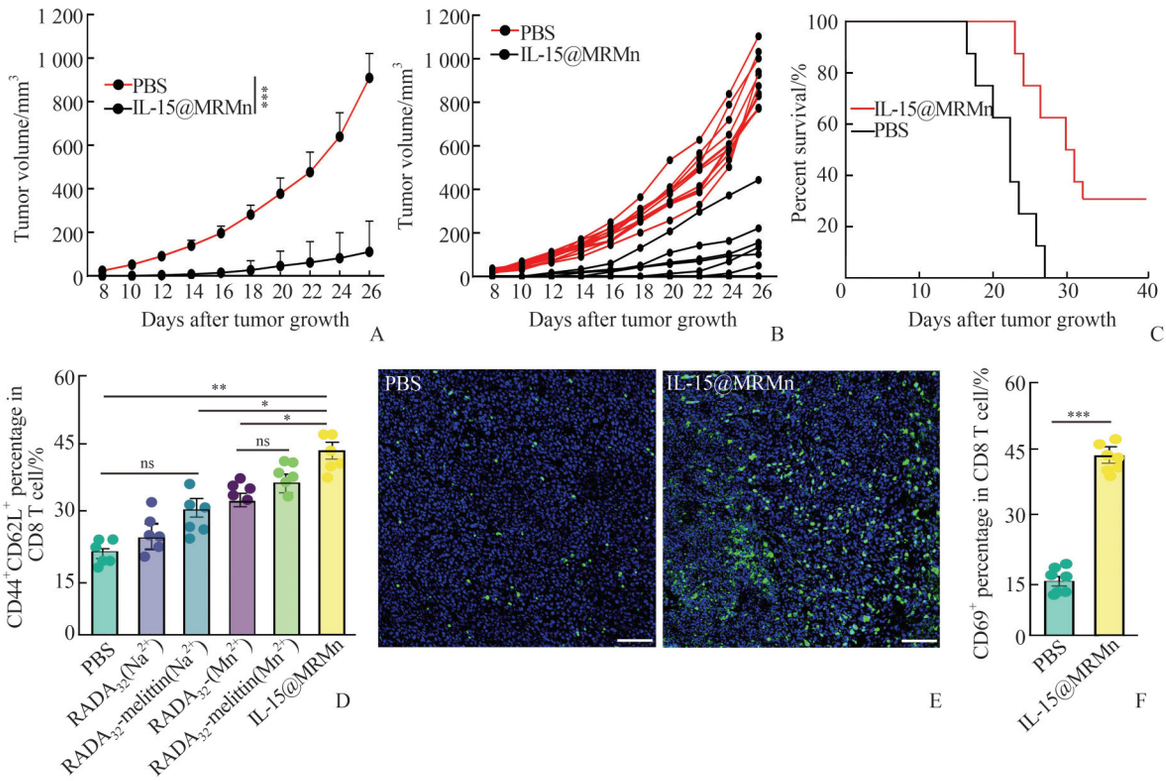


图 4　IL-15@MRMn 预防 U14 宫颈癌复发的功能特性与机制评估

A. IL-15@MRMn 治疗消融后的小鼠再次接种 U14 细胞系的肿瘤生长情况（n=10）；B. 不同组别小鼠中单个小鼠肿瘤的生长情况（n=10）；C. 不同组别小鼠生存率，小鼠肿瘤长到 1 000 mm^3 大小即视为终点（n=10）；D. 流式统计经过不同指定治疗后的不同组别的记忆性 T 细胞占据 $CD8^+$ T 细胞比例（n=6）；E. 免疫荧光鉴定再次小鼠接种 U14 细胞后，肿瘤微环境中 $CD8^+$ T 细胞浸润情况，其中蓝色为 DAPI 染色细胞核，绿色为 $CD8^+$ T 细胞流式抗体染色 $CD8^+$ T 细胞；标尺：100 μm；F. 流式检测统计 U14 肿瘤细胞后的不同组别的活化 $CD8^+$ T 细胞占总 $CD8^+$ T 细胞比例（n=6）。ns：无显著差异，$^*P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.01$

3　讨论

免疫抑制性肿瘤组织主要由淋巴管、肿瘤细胞、成纤维细胞和各种免疫细胞构成，而各种免疫细胞往往给癌症的有效治疗带来巨大障碍，其中基于免疫细胞形成的肿瘤抑制性微环境难以通过传统疗法逆转。由于肿瘤组织具有异质性和复杂的细胞-细胞通信网络，通常很难通过单一的治疗方式重塑肿瘤组织的免疫特性以提高抗癌效果[18]，因此，往往需要进行多角度的治疗规划。

本研究研发了包含锰离子和 IL-15 细胞因子的蜂毒肽多肽水凝胶，该水凝胶体系可通过逆转肿瘤抑制性微环境并促进效应记忆 T 细胞形成抑制原位和复发转移性宫颈癌。IL-15@MRMn 的核心成分包括含有 26 个多肽的蜂毒肽、锰离子和 IL-15 等细胞因子。其中，蜂毒肽由于毒性问题，一直未被用于临床转化，有部分研究[19-20]通过将蜂毒肽整合到生物材料中减少其对机体的毒副作用；而本研究利用 MMP2/9 酶可切割序列连接蜂毒肽与多肽水凝胶，既有效屏蔽了蜂毒肽的毒性问题，又能够在肿瘤微环境中定点释放蜂毒肽，促进了对肿瘤细胞和 M2 型巨噬细胞的特异性杀伤。本项目中选择的 IL-15 还可以促进 NK 细胞的活化以及记忆 T 细胞的形成，通过结合锰离子对抗原呈递细胞的活化以及巨噬细胞的再极化，可加强机体抗肿瘤免疫记忆 T 细胞的形成，最终促进蜂毒肽水凝胶体系的临床转化。

这种基于蜂毒肽的自组装多肽水凝胶，尽管在晚期卵巢癌模型治疗上显示出了积极的疗效，但其临床应用仍面临一系列挑战。首先，生物相容性和安全性需要通过长期临床试验进一步验证，以确保不会引发不良反应或免疫排斥。其次，水凝胶的稳定性和降解性对于药物在体内的持续释放至关重要，需要确保其降解速率与药物释放速率相匹配，同时避免产生有害降解产物。此外，免疫调节作用的平衡也是关键，需要仔细调整二价锰离子和 IL-15 细胞因子的浓度和比例，以避免过度激活导致的炎症反应或其他免疫相关副作用。最后，患者

个体差异的存在意味着多肽水凝胶的疗效可能在不同患者中表现出显著差异,这要求在临床应用中进行个性化的治疗方案设计。综上所述,这些局限性需要通过持续的研究和技术创新来克服,以实现这一新型治疗手段的广泛应用。

参考文献

[1] SINGH D, VIGNAT J, LORENZONI V, et al. Global estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: A baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative[J]. Lancet Glob Health, 2023, 11(2): e197-e206.

[2] SUNDSTRÖM K, ELFSTRÖM K M. Advances in cervical cancer prevention: Efficacy, effectiveness, elimination?[J]. PLoS Med, 2020, 17(1): e1003035.

[3] GAO X Y, XU N, LI Z Y, et al. Safety and antitumour activity of cadonilimab, an anti-PD-1/CTLA-4 bispecific antibody, for patients with advanced solid tumours (COMPASSION-03): A multicentre, open-label, phase 1b/2 trial[J]. Lancet Oncol, 2023, 24(10): 1134-1146.

[4] FERRALL L, LIN K Y, RODEN R B S, et al. Cervical cancer immunotherapy: Facts and hopes[J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(18): 4953-4973.

[5] CAO G X, YUE J L, RUAN Y T, et al. Single-cell dissection of cervical cancer reveals key subsets of the tumor immune microenvironment[J]. EMBO J, 2023, 42(16): e110757.

[6] DUAN Q Q, ZHANG H L, ZHENG J N, et al. Turning cold into hot: Firing up the tumor microenvironment [J]. Trends Cancer, 2020, 6(7): 605-618.

[7] TIETSCHER S, WAGNER J, ANZENEDER T, et al. A comprehensive single-cell map of T cell exhaustion-associated immune environments in human breast cancer[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 98.

[8] LI Y K, FANG M, ZHANG J, et al. Hydrogel dual delivered celecoxib and anti-PD-1 synergistically improve antitumor immunity[J]. Oncoimmunology, 2015, 5(2): e1074374.

[9] NISHIKAWA M, MIZUNO Y, MOHRI K, et al. Biodegradable CpG DNA hydrogels for sustained delivery of doxorubicin and immunostimulatory signals in tumor-bearing mice[J]. Biomaterials, 2011, 32(2): 488-494.

[10] Wu X L, Wu Y D, Ye H B, et al. Interleukin-15 and cisplatin co-encapsulated thermosensitive polypeptide hydrogels for combined immuno-chemotherapy[J]. J Control Release, 2017, 255: 81-93.

[11] JIN H L, WAN C, ZOU Z W, et al. Tumor ablation and therapeutic immunity induction by an injectable peptide hydrogel[J]. ACS Nano, 2018, 12(4): 3295-3310.

[12] WAN C, SUN Y J, HU Y, et al. Peptide hydrogels loaded with irradiated tumor cell secretions enhance cancer immunotherapy[J]. Nano Today, 2021, 41: 101323.

[13] ZHOU J, WAN C, CHENG J, et al. Delivery strategies for melittin-based cancer therapy[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13(15): 17158-17173.

[14] LÜ M Z, CHEN M X, ZHANG R, et al. Manganese is critical for antitumor immune responses via cGAS-STING and improves the efficacy of clinical immunotherapy[J]. Cell Res, 2020, 30(11): 966-979.

[15] WANG X, LIU Y Q, XUE C C, et al. A protein-based cGAS-STING nanoagonist enhances T cell-mediated anti-tumor immune responses[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 5685.

[16] MA S B, CALIGIURI M A, YU J H. Harnessing IL-15 signaling to potentiate NK cell-mediated cancer immunotherapy[J]. Trends Immunol, 2022, 43(10): 833-847.

[17] SHEN J, ZOU Z Z, GUO J Y, et al. An engineered concealed IL-15-R elicits tumor-specific $CD8^{+}$ T cell responses through PD-1-cis delivery[J]. J Exp Med, 2022, 219(12): e20220745.

[18] GOENKA A, KHAN F, VERMA B, et al. Tumor microenvironment signaling and therapeutics in cancer progression[J]. Cancer Commun, 2023, 43(5): 525-561.

[19] LV S X, SYLVESTRE M, SONG K F, et al. Development of D-melittin polymeric nanoparticles for anticancer treatment[J]. Biomaterials, 2021, 277: 121076.

[20] YU X, DAI Y F, ZHAO Y F, et al. Melittin-lipid nanoparticles target to lymph nodes and elicit a systemic anti-tumor immune response[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1110.

(2024-06-05收稿)
编辑 袁 靓