

分类号：Q81

单位代码：10363

密 级：公开

学 号：2210530120

CCR2-MCP-1 介导巨噬细胞自发结合普朗尼克纳米颗粒
靶向递送阿霉素用于肿瘤治疗

CCR2-MCP-1-mediated macrophage spontaneously
binding pluronic nanoparticle for targeting delivery of
doxorubicin for tumor therapy

学生姓名： 胡 成 锐

指导教师： 朱 龙 宝（教授）

专 业： 生物与医药

研究方向： 生物制药工程

论文答辩日期： 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确和引用的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学术论文作者签名：胡成钢

日期：2024年6月3日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密☐，在_____年解密后使用本版权书

本学位论文属于

不保密☒

学位论文作者签名：胡成毅

指导教师签名：朱本宝

日期：2024 年 6 月 3 日

日期：2024 年 6 月 3 日

CCR2-MCP-1 介导巨噬细胞自发结合普朗尼克纳米颗粒靶向递送阿霉素用于肿瘤治疗

摘 要

肿瘤严重威胁人类身体健康,传统的化疗是目前治疗肿瘤的主要手段之一,但存在毒副作用强,易复发等问题。基于纳米颗粒(NP)的载药系统可有效提高药物在肿瘤部位的蓄积以减轻毒副作用,已成为提高癌症治疗效果的一种有效策略。然而,目前已报道的纳米颗粒在临床试验中并不能转化为更好的疗效,因其在血液循环中会迅速被免疫清除,缺乏特异性的靶向肿瘤,而且在肿瘤组织中的扩散也受到限制。因此,需开发高效的主动靶向纳米药物递送系统。利用巨噬细胞(MA)等内源性细胞的肿瘤归巢特性和生物相容性开发的主动靶向给药系统,成为解决肿瘤治疗中传统载药输送系统存在问题的新策略。本文利用巨噬细胞表面 CCR2/MCP-1 信号轴的相互作用,设计了一种载阿霉素的纳米颗粒(DOX@MPF127-MCP-1, DMPM)负载在巨噬细胞(RAW264.7)表面,制备的主动的肿瘤靶向药物递送系统用于肿瘤的靶向治疗,主要研究内容和结果如下:

(1) DMPM 纳米颗粒的合成与表征。

首先,利用固相合成制备 MCP-1 多肽(CYNFTNRKISVQRLASYRRITSSK),然后利用酯化反应将两亲性嵌段共聚物普朗尼克 F127

(PF127) 末端羟基进行羧基化修饰, 以 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 将 MCP-1 肽与 MPF127 以酰胺键偶联, 成功制备出 MPF127-MCP-1 (MPM), MPM 可以在 20 mg/mL 的浓度条件下进行自组装, 将 DOX 自组装在 MPM 中, 制备出粒径约为 100 nm 的 DMPM 纳米胶束。紫外-可见分光光度计、傅里叶红外光谱和 EDS 等表征结果表明纳米粒子 DMPM 的成功合成。体外稳定性及药物释放实验结果表明 DMPM 具有较高的稳定性, 且能在微酸环境 (pH 5.5) 中进行药物释放。体外溶血实验及 CCK-8 实验进一步证明了 DMPM 对于正常小鼠成纤维细胞 (MEF) 及巨噬细胞 (RAW264.7) 的伤害较小, 具有良好的生物安全性。

(2) DMPM 纳米颗粒的靶向及抗肿瘤活性研究。

细胞靶向及迁移实验结果表明: DMPM 可与巨噬细胞 (RAW264.7) 表面 CCR2 受体结合形成 MA-DMPM 输送载体, 同时表明 MCP-1 能吸引巨噬细胞并表现出归巢作用, 与对照组相比, MA-DMPM 体外归巢率达到 220%, 表明 MA-DMPM 具有良好的肿瘤靶向递送能力。体外细胞实验表明: DMPM 具有明显的肿瘤抑制效果, 与 DOX 相比, DMPM 对 NCI-H1299 细胞的抑制率从 55% 提高至 60%, 体外细胞摄取也表明 NCI-H1299 细胞能够对 DMPM 进行有效摄取。荷瘤小鼠实验结果表明, 经过 14 天的治疗, DMPM 组的小鼠肿瘤相对体积及肿瘤重量明显低于对照组, 说明 MA-DMPM 能显著抑制肿瘤细胞生长, 表明其在肿瘤治疗中有一定的应用前景。荧光成

像 (IVIS) 结果表明, MA-DMPM 在体内表现出良好的肿瘤靶向性。H&E 切片及肝肾功能分析表明 DMPM 对小鼠主要脏器(心、肝、脾、肺和肾)损伤较小, 具有良好的生物安全性。TUNEL 肿瘤组织切片显示出 DMPM 处理组的肿瘤细胞凋亡率约为 63.33%, 高于纯 DOX 处理组的 51.29%, 相比较体外细胞实验, MA 具有较好的药物转送能力且能够到达肿瘤部位, 提升了 DMPM 的肿瘤抑制效果。ELISA 炎症因子的分析进一步验证了 DMPM 的体内生物安全性较好且可以在一定程度上促进机体免疫。

综上所述, 本研究设计了一种能够靶向巨噬细胞及肿瘤的纳米材料 (DMPM), 通过液相、质谱、紫外、红外、粒径、XPS、EDS 等表征方法证明了纳米材料及其前体物的成功合成。细胞毒性及细胞摄取实验表明纳米材料可被肿瘤细胞摄取并对肿瘤细胞造成一定的毒性。细胞迁移实验证明了 DMPM 可与巨噬细胞进行靶向偶联并且 MA-DMPM 可通过归巢作用向肿瘤细胞迁移。体内荧光成像实验进一步证明了 MA-DMPM 可在肿瘤部位聚集。小鼠实验表明 MA-DMPM 可以抑制小鼠肿瘤的生长且不会对小鼠正常生理活动造成影响。本文所构建的利用巨噬细胞进行靶向药物递送系统对于肿瘤治疗具有一定的参考意义。

关键词: 靶向运输, 肿瘤治疗, 普朗尼克, CCR2/MCP-1, 巨噬细胞

CCR2-MCP-1-MEDIATED MACROPHAGE SPONTANEOUSLY BINDING PLURONIC NANOPARTICLE FOR TARGETING DELIVERY OF DOXORUBICIN FOR TUMOR THERAPY

ABSTRACT

Tumor poses a significant health risk, and while traditional chemotherapy is a primary method of tumor therapy, it often comes with strong side effects and the risk of recurrence. Nanoparticle (NP)-based drug delivery systems have shown promise in improving drug accumulation at tumor sites and reducing side effects, making them an effective strategy for enhancing tumor therapy. However, challenges such as rapid immune clearance, lack of tumor-specific targeting, and limited spread in tumor tissues have hindered the translation of NPs efficacy in clinical trials. To address these issues, the development of an efficient actively targeted nanomedicine delivery system is necessary. Utilizing the tumor-homing properties and biocompatibility of endogenous cells like macrophages (MA), an actively targeted drug delivery system has emerged as a new approach to improving traditional drug delivery systems in tumor therapy.

By leveraging the interaction of the CCR2/MCP-1 signaling axis on macrophages, a doxorubicin-loaded nanoparticle (DMPM) was designed, which could be loaded on the surface of macrophages (RAW264.7) for targeted tumor therapy. The main research and results are as follows:

(1) The synthesis and characterization of DMPM. Initially, the MCP-1 peptide (CYNFTNRKISVQRLASYRRITSSK) was prepared through solid-phase synthesis. Subsequently, the hydroxyl group at the terminus of the amphiphilic block copolymer Pluronic F127 (PF127) was carboxylated via an esterification reaction. The MCP-1 peptide was then coupled with MPF127 through an amide bond using 1-ethyl- (3-dimethylaminopropyl) carboimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) to prepare MPF127-MCP-1 (MPM). MPM demonstrated self-assembly capabilities at a concentration of 20 mg/mL. The DMPM micelles, with a particle size of approximately 100 nm, were prepared through the self-assembly of DOX within MPM. The successful synthesis of DMPM was confirmed through various analytical techniques such as ultraviolet-visible spectrophotometry, fourier infrared spectroscopy and EDS. External stability and drug release experiments indicated that DMPM exhibited high stability and could release drugs in a slightly acidic environment (pH 5.5). *In vitro* hemolysis and CCK-8 assay further proved that DMPM displayed good biosafety and caused minimal damage to normal mouse embryo fibroblasts (MEF) and macrophages (RAW264.7).

(2) Study on the targeting and anti-tumor activity of DMPM. The results of cell targeting and migration experiments revealed that DMPM can bind to the CCR2 receptor on the surface of macrophages (RAW264.7), forming the MA-DMPM transport vector. Additionally, it was observed that MCP-1 can attract macrophages, exhibiting a homing effect. In comparison to the control group, the homing rate of MA-DMPM reached 220% *in vitro*, indicating its strong tumor-targeted delivery capability. *In vitro* cell experiments demonstrated a significant tumor inhibition effect of DMPM, with the inhibition rate on NCI-H1299 cells increasing from 55% to 60% compared to free DOX. Moreover, NCI-H1299 cells showed effective uptake of DMPM. The tumor-bearing mice experiments after 14 days of treatment showed that the relative tumor volume and weight in the DMPM group were notably lower than those in the control group, indicating a substantial inhibition of tumor cell growth by MA-DMPM. *In vivo* imaging systems (IVIS) results confirmed the effective tumor targeting of MA-DMPM *in vivo*. H&E sections and analysis of liver and kidney function indicated good biosafety of DMPM with minimal damage to major organs. TUNEL tumor tissue sections revealed a higher apoptosis rate of tumor cells in the DMPM treatment group (63.33%) compared to the free DOX group (51.29%). Compared with *in vitro* cell experiments, MA had better drug delivery ability and could reach the tumor site, which improved the tumor inhibition effect of DMPM. ELISA analysis of

inflammatory factors further verified that DMPM has good biosafety *in vivo* and can promote immunity.

This study focused on designing a nanomaterial (DMPM) with the ability to target both macrophages and tumors. The successful synthesis of the nanomaterial and its precursors was demonstrated using various characterization methods such as liquid phase, mass spectrometry, ultraviolet, infrared, particle size, XPS, and EDS. Cytotoxicity and cell uptake experiments revealed that the nanomaterials could be internalized by tumor cells and exhibit toxicity towards them. Cell migration experiments indicated that DMPM could effectively target macrophages, and MA-DMPM showed homing capabilities towards tumor cells. IVIS confirmed the accumulation of MA-DMPM at the tumor site. Tumor-bearing mice experiments demonstrated that MA-DMPM could inhibit tumor growth without adverse effects on the normal physiological activities of the mice. The targeted drug delivery system utilizing macrophages presented in this study holds significant implications for tumor therapy.

KEY WORDS: Active targeting delivery, Tumor therapy, Pluronic micelles, CCR2/MCP-1, Macrophage

目录

摘 要	I
ABSTRACT	IV
第 1 章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 传统肿瘤治疗手段及其局限性	2
1.3 新型纳米载体抗肿瘤应用进展	3
1.3.1 纳米载体的种类及应用	4
1.3.2 纳米载体的治疗手段	7
1.3.3 纳米载体的递送方式及其局限性	8
1.3.4 主动靶向药物输送载体的研究进展	10
1.4 巨噬细胞载体的研究进展	11
1.4.1 巨噬细胞的肿瘤趋向性	11
1.4.2 巨噬细胞作为载体的种类及应用	12
1.4.3 巨噬细胞载体的局限性	14
1.5 本论文的研究内容及意义	15
1.5.1 研究内容	15
1.5.2 研究意义	16
第 2 章 DOX@MPF127-MCP-1 靶向载体的制备	18
2.1 实验材料	18
2.1.1 实验试剂	18
2.1.2 实验仪器	18
2.2 DOX@MPF127-MCP-1 的合成与表征	19
2.2.1 MCP-1 多肽的合成	19
2.2.2 PF127 的羧基化	19
2.2.3 MPF127-MCP-1 的合成	19
2.2.4 临界胶束浓度的测定	20

2.2.5 DOX@MPF127-MCP-1 的制备	20
2.2.6 DOX@MPF127-MCP-1 纳米材料的表征	20
2.3 DOX@MPF127-MCP-1 的载药及体外药物释放研究	21
2.4 结果与讨论.....	21
2.4.1 MCP-1 多肽的鉴定	21
2.4.2 MPF127 的表征.....	23
2.4.3 MPF127-MCP-1 的表征.....	24
2.4.4 临界胶束浓度评估	26
2.4.5 DOX@MPF127-MCP-1 的表征	27
2.4.6 DOX@MPF127-MCP-1 的体外药物释放	30
2.5 本章小结.....	30
第 3 章 DOX@MPF127-MCP-1 载体用于肿瘤靶向治疗的体外研究.....	31
3.1 引言.....	31
3.2 细胞系.....	31
3.3 DOX@MPF127-MCP-1 的体外生物相容性研究	32
3.3.1 体外溶血实验.....	32
3.3.2 体外对 RAW264.7 和 MEF 的相容性研究.....	32
3.4 DOX@MPF127-MCP-1 的体外靶向特性研究	32
3.4.1 体外巨噬细胞迁移实验	32
3.4.2 体外与巨噬细胞结合及在肿瘤部位释放 DOX 研究	33
3.4.3 体外与巨噬细胞结合量的研究.....	33
3.5 DOX@MPF127-MCP-1 的体外细胞实验	34
3.5.1 体外对 NCI-H1299 细胞的毒性研究.....	34
3.5.2 体外细胞活死染色	34
3.5.3 体外细胞摄取实验	34
3.6 结果与讨论.....	35
3.6.1 溶血实验.....	35
3.6.2 体外对 RAW264.7 和 MEF 的生物相容性研究.....	35
3.6.3 体外巨噬细胞迁移分析	36
3.6.4 体外 DOX@MPF127-MCP-1 与巨噬细胞结合及在肿瘤部位释药研究.....	38

3.6.5 体外巨噬细胞与 DOX@MPF127-MCP-1 结合量评估.....	39
3.6.6 体外 DOX@MPF127-MCP-1 对 NCI-H1299 细胞的毒性研究.....	40
3.6.7 体外细胞活死染色.....	41
3.6.8 体外细胞摄取实验.....	41
3.7 本章小结.....	42
第 4 章 DOX@MPF127-MCP-1 载体用于肿瘤靶向治疗的体内研究.....	44
4.1 引言.....	44
4.2 DOX@MPF127-MCP-1 的体内抗肿瘤效果研究	44
4.2.1 动物模型的建立.....	44
4.2.2 体内抗肿瘤效果的研究.....	44
4.2.3 肿瘤 H&E 及 TUNEL 染色	44
4.3 DOX@MPF127-MCP-1 的体内肿瘤靶向性研究	45
4.4 DOX@MPF127-MCP-1 的体内生物安全性研究	45
4.4.1 小鼠主要器官 H&E 染色	45
4.4.2 小鼠血生化及炎症因子水平分析.....	45
4.5 结果与讨论.....	46
4.5.1 DOX@MPF127-MCP-1 的体内抗肿瘤效果评价.....	46
4.5.2 肿瘤 H&E 和 TUNEL 染色	47
4.5.3 DOX@MPF127-MCP-1 的体内肿瘤靶向性评价.....	48
4.5.4 小鼠主要器官 H&E 染色	49
4.5.5 小鼠血生化分析.....	50
4.5.6 小鼠体内炎症因子水平评估	50
4.6 本章小结.....	51
结论与展望.....	53
参考文献.....	54
攻读硕士学位期间研究成果.....	65
致谢	66

中英文缩略词对照表

缩略词	英文全称	中文名称
NP	Nanoparticle	纳米颗粒
MA	Macrophage	巨噬细胞
CCR2	C-C chemokine receptor-2	C-C 趋化因子受体-2
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1	单核细胞趋化蛋白-1
PF127	Pluronic F127	普朗尼克 F127
EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide	1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳酰二亚胺
NHS	N-Hydroxysuccinimide	N-羟基琥珀酰亚胺
RAW264.7	Mouse leukemia cells of monocyte macrophage	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast	小鼠胚胎成纤维细胞
NCI-H1299	Non-small cell lung cancer cell	人非小细胞肺癌细胞
IVIS	In Vivo Imaging Systems	体内成像系统
H&E	Hematoxylin-Eosin staining	苏木精/伊红染色实验
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling	原位末端转移酶标记技术
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay	酶联免疫吸附法
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy	X 射线光电子能谱
EDS	Energy Dispersive Spectroscopy	能量色散 X 射线光谱
RES	Reticulo-Endothelial System	网状内皮系统
TME	Tumor microenvironment	肿瘤微环境
DOX	Doxorubicin	阿霉素
CMC	Critical Micelle Concentration	临界胶束浓度
EPR	Enhanced permeability and retention effect	高通透性和滞留效应

第 1 章 绪论

1.1 引言

肿瘤是由于细胞异常增殖而形成的,其中的恶性肿瘤具有较强的侵袭及转移性,生长速度快,严重威胁人类健康,是导致人类死亡的主要原因,也是提高各国人口预期寿命的重要障碍^[1,2]。近年来,中国癌症患者的病例数正在逐年增加,给社会经济发展带来了沉重的负担,也给人类生命健康造成了巨大威胁^[3,4]。自 2005 年以来,癌症一直是中国城乡男性居民的首要死因和女性居民的前三大死因,分别占男性和女性死亡总人数的 1/4 和 1/5^[5]。由于庞大的人口规模,中国的癌症负担可能会强烈影响中国政府和个人的医疗保健负担能力^[6]。为减轻癌症所能带来的负担,我国出台了《健康中国行动—癌症防治行动实施方案》等政策文件指导癌症防治^[7],并在后续的癌症防治工作中取得了初步进展。但当前仍然亟需更加有效的治疗方法及手段来治疗癌症,发展新的抗癌技术以推进癌症的预防和治疗,是控制我国甚至全球癌症、提高癌症患者生存率和治愈率的有效措施。

随着现代纳米技术的发展及对于癌症的认识越来越广泛,癌症的治疗方式及手段也在不断与时俱进^[8-11]。癌症传统治疗手段包括手术治疗、放疗、化疗等,但随着对癌症的认识越来越广泛,传统疗法都显示出了弊端和局限性,比如手术治疗对于晚期癌症转移不够理想^[12,13];化疗对于机体没有特异性,易造成机体副作用^[14];放疗会使患者产生恶心呕吐等不良反应,严重者会影响患者的正常生活等^[15]。基于此,各种新的治疗手段,如免疫治疗^[16]、化动力治疗^[17]、光热^[18]、光动力治疗^[19]等不断出现,并研究出了把抗癌药物运输到肿瘤部位而设计的纳米药物载体。纳米药物载体现如今被认为是一种比较有效安全的能够递送抗癌药物的材料,由于其微小的粒径,足以渗透到肿瘤部位,且不易在到达肿瘤部位前发生裂解^[20],从而不易对身体造成副作用。现如今倚靠于纳米载体而进行的药物递送研究屡见不鲜,已成为抗癌药物研究的热点方向。

1.2 传统肿瘤治疗手段及其局限性

(1) 化疗

化疗是目前肿瘤治疗常用的一种方式，由于肿瘤转移的频繁发生，联合化疗已成为一种重要的治疗策略^[21]。常规化疗药物多种多样，根据其主要或表面的作用机制分为烷化剂、抗代谢药物和抗肿瘤抗生素等多个种类^[22]。烷化剂和铂类似物会诱导 DNA 链间或链内交联，从而使 DNA 不稳定并导致 DNA 断裂；抗代谢药可以抑制 DNA、RNA 或其成分合成；拓扑异构酶抑制剂可阻断 DNA 解旋酶等，其相关作用机制如图 1-1 所示^[23]。

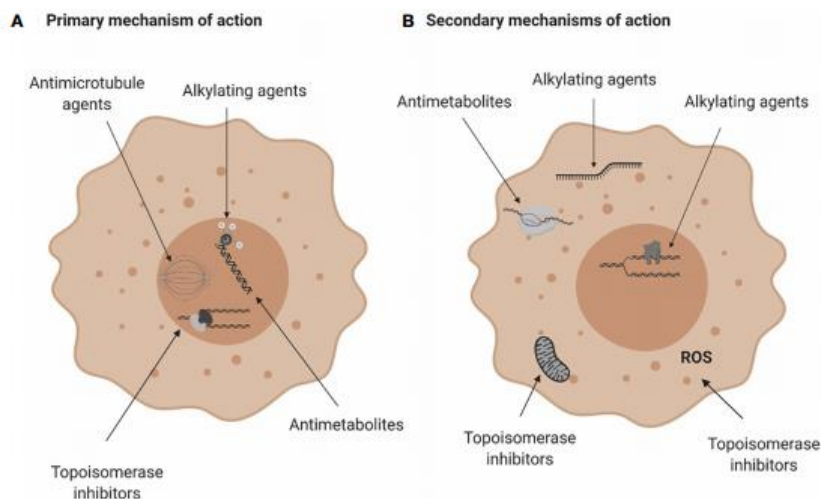


图 1-1 常规化疗的作用机制^[23]

Figure 1-1 Mechanism of the conventional chemotherapy^[23].

虽然化疗药物对肿瘤患者全身的肿瘤细胞有治疗作用，但由于其低选择性和药物扩散不可控性^[24]，同时也会对患者体内的正常细胞有一定副作用，且化疗药物由于溶解度低^[25]、缺乏肿瘤靶向性^[26]和多种药物耐药性^[27]等原因导致疗效不佳并常常伴随着不良反应，如脱发、贫血、神经毒性和肾毒性等^[28]，这些不良反应进一步限制了化疗药物的使用^[29]。所以单一使用化疗药物的局限性越来越显著，需要寻找联合治疗方案以平衡化疗药物的副作用。

(2) 手术治疗

手术治疗是目前实体瘤的主要治疗方法之一，因为它能够最大限度地消除肿瘤组织并降低肿瘤细胞的恶性增殖率，手术治疗是通过直接切除癌症患者的肿瘤组织来实现治疗效果^[30]。但是由于体内器官及个体的差异性，手术治疗想要达到

良好的疗效就需要在肿瘤早期进行手术切除,这样才能使得术后恢复最佳。虽然一些患者可能会从手术治疗中受益,但相当多的患者容易出现并发症,例如术后炎症毒性、畸形组织修复、肿瘤复发和转移^[31]。此外手术治疗也有局限性,一是对于实体瘤的治疗,手术会有相应的抑制作用,但对于白血病、淋巴瘤等血液系统瘤的治疗,手术就没有抑制效果。第二就是手术所切除的实体瘤部分往往也会携带一部分机体器官正常组织,正常机体组织被切除后,在很大程度上也会影响手术患者术后的行动能力。

(3) 放疗

随着医疗技术的发展,放射治疗(RT)已广泛应用于癌症的治疗^[32]。肿瘤放射治疗是肿瘤的一种局部治疗方法,利用放射线如 α 、 β 、 γ 射线和各类X射线及其它粒子束等来治疗恶性肿瘤。RT的目的是阻止肿瘤细胞增殖并诱导肿瘤细胞死亡,但不会立即杀死细胞,肿瘤细胞死亡可能会在放疗后的一段时间内^[33,34]。传统的X射线放疗中,由于肿瘤组织被正常组织包围,电子密度较低,很难将足够的剂量转移到肿瘤部位,这表明X射线治疗需要较高的剂量^[35]。而想要达到较好的治疗效果,就需要较高的放射剂量,从而可能会增加放射损伤的概率,使得正常组织细胞受到损伤,导致机体出现不良反应^[36]。此外辐射会诱导髓源性抑制细胞(MDSC)、M2型肿瘤相关巨噬细胞和免疫抑制细胞因子(TGF- β 、IL)的释放从而促进免疫抑制微环境,影响肿瘤的治疗^[37]。

1.3 新型纳米载体抗肿瘤应用进展

在实体瘤的治疗中,手术和化疗/放疗被认为是最重要的治疗措施。但是由于效果不佳,机体出现不良反应,频繁发生肿瘤的转移与复发,于是逐渐将化疗与其他方式相结合已成为一种重要的治疗策略。手术中辅助化疗,使用特定的化学物质抑制癌细胞的增殖,可以在一定程度上减少肿瘤的复发和扩散^[38]。近年来,纳米医学技术发展迅速,例如基于mRNA脂质体纳米颗粒(NPs)的COVID-19疫苗已获得美国食品药品监督管理局的批准^[39,40]。开发有效的药物递送系统为抗肿瘤药物的应用提供了广阔的前景,纳米载体递送化疗药物已日益成为肿瘤治疗的常用方法^[21]。

1.3.1 纳米载体的种类及应用

(1) 聚合物纳米载体

聚合物纳米载体包括合成聚合物和天然聚合物,是较受欢迎的一种纳米颗粒传递系统^[41]。线性聚合物和两亲性嵌段共聚物是最常见的类型,主要形成胶束、囊泡、树枝状大分子和纳米凝胶。聚合物纳米粒子因具有良好的生物相容性、无毒、循环时间长、无免疫原性等特点,能够应用到肿瘤纳米载体的研究及治疗。由于不同药物分子的性质不同,需要根据具体药物的性质选择合适的纳米材料,其中具有 pH 响应性的聚合物纳米材料具有广阔前景^[42]。聚合物纳米载体目前应用较为广泛,是一种治疗癌症的理想候选载体。

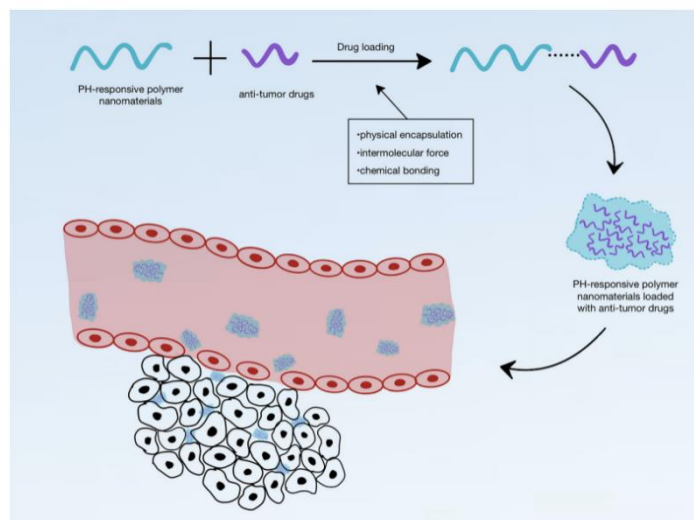


图 1-2 pH 响应性高分子纳米材料负载抗肿瘤药物进入肿瘤环境示意图^[42]

Figure 1-2 Diagram of PH-responsive polymer nanomaterials carrying antitumor drugs into the tumor environment^[42].

(2) 细胞类纳米载体

人体是由具有不同生理功能的多种细胞组成的,某些类型的活细胞可以用来吞噬或装载纳米颗粒进行药物的靶向传递,例如红细胞(Red blood cells, RBCs),干细胞(Stem cells, SCs)和一些免疫细胞^[43]。相关研究中,间充质干细胞(MSCs)和神经干细胞(NSCs)能够向肿瘤微环境进行迁移^[44, 45]。以红细胞纳米载体为例,作为天然的血液成分,红细胞是用作药物递送系统的良好候选者,以改善不同药物的药代动力学、生物相容性等。红细胞载体适用于各种抗癌药物,特别是纳米粒子等,可以辅助药物逃避网状内皮系统(RES)的吞噬作用^[46]。Zhao^[47]等

人设计了一种免疫调节性锌明矾/卵清蛋白纳米疫苗通过红细胞辅助级联免疫激活促进癌症金属免疫治疗,该研究针对癌症疫苗的局限性利用红细胞来促进免疫调节性锌明矾/卵清蛋白纳米疫苗在脾脏和肿瘤部位的积累,通过预先注射衰老红细胞使肝脏巨噬细胞瞬时饱和,然后全身施用锌明矾/卵清蛋白纳米疫苗,在脾脏中,纳米疫苗诱导有效的自噬依赖性抗原交叉呈递,促进特异性 T 细胞激活。同时,在 TME 中,纳米疫苗激活特异性 T 细胞并增强 T 细胞浸润,这种红细胞辅助级联免疫激活方法为稳健的癌症金属免疫治疗提供了一种简单而有效的策略。

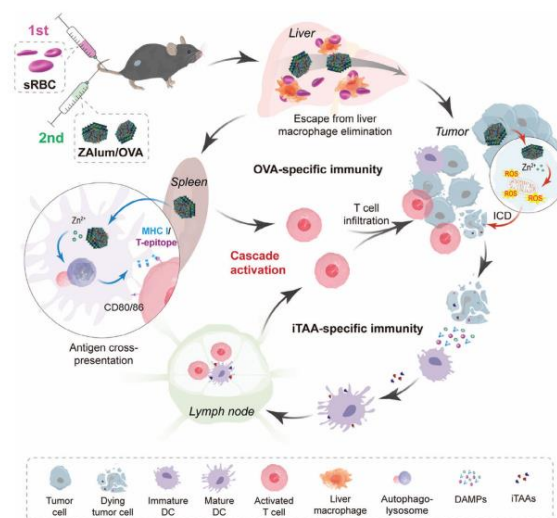


图 1-3 免疫调节性锌明矾/卵清蛋白纳米疫苗通过红细胞辅助级联免疫激活促进癌症金属免疫治疗^[47]

Figure 1-3 Immune-regulated zinc alum/ovalbumin nanovaccines promote metal immunotherapy in cancer through erythrocyte assisted cascade immune activation^[47].

(3) 无机纳米载体

无机纳米载体具有制备简单、稳定性较好、有较强的生物相容性等性质,是药物输送载体构建的理想材料^[48]。近些年来,基于无机纳米结构材料的药物载体如二氧化锰^[49]、金纳米颗粒^[50]等已被制备。在纳米医学领域开发的各种纳米材料中,金纳米颗粒(AuNPs)在生物条件下相对无毒^[51],因此它们比其他类型的纳米材料更适合体内测试^[52]。AuNPs 表面可以进行简单的功能化,且其形状和尺寸可以精确控制以及稳定的物理/化学性质而受到了极大的关注^[53]。由于 Au 的生物相容性和靶向肿瘤细胞的能力,可以用于载药从而治疗肿瘤。相关文献表明,AuNPs 可作为米托蒽醌(MTX)^[54]、酞菁-4(Pc4)^[55]和光敏剂^[56]的载体,靶向肿瘤细胞并增强化疗效果影响。图 1-4 显示了 AuNPs 作为药物载体在体内的应用及其在近红外辐射下产生 ROS 促进肿瘤细胞凋亡的能力^[53]。

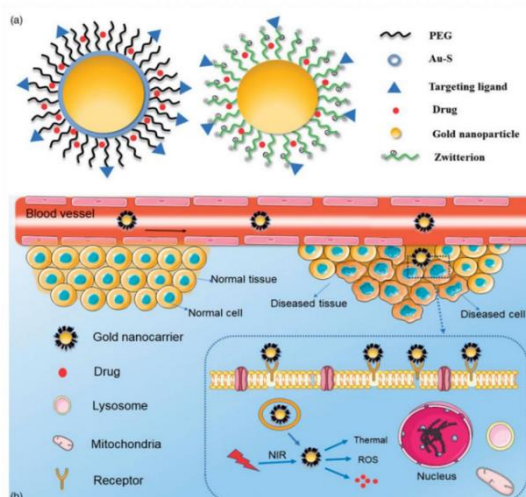


图 1-4 AuNPs 作为药物载体在体内的应用及其在近红外辐射下产生 ROS 促进肿瘤细胞凋亡的能力^[53]

Figure 1-4 Application of AuNPs as a drug carrier *in vivo* and its ability to induce tumor cell apoptosis by producing ROS under near-infrared radiation^[53].

(4) 脂质体纳米载体

脂质体是最早的纳米药物，主要由磷脂分子双层构成，可以组成纳米到微米级的脂泡，可用于将抗肿瘤药物封装在疏水性磷脂双层或中央亲水性空腔中，脂质体的药物搭载是通过物理封装途径实现的^[42]。脂质体表面可以与靶向分子结合，如靶向性多肽的修饰等。脂质体可以通过特异性靶向癌细胞或血管生成标记物而进行主动富集，是一种目前应用较为广泛的一类纳米载体^[57]。

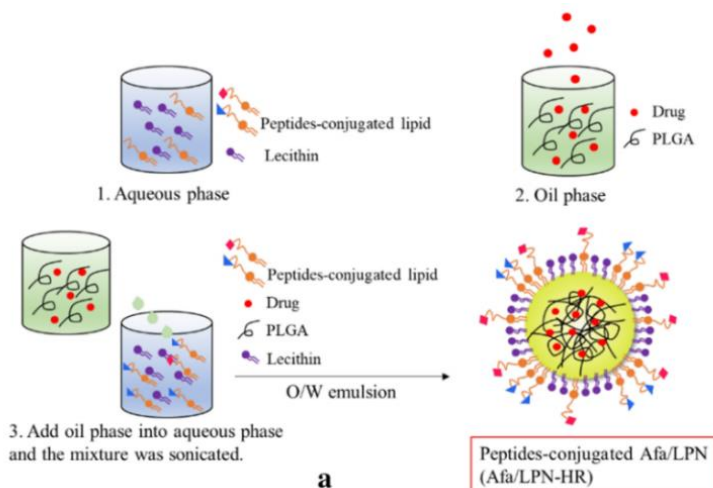


图 1-5 pH 响应和靶向肽缀合的脂质聚合物纳米颗粒提高阿法替尼和 microRNA 的抗癌效果示意图^[58]

Figure 1-5 Diagram of pH-responsive and peptide-targeted conjugated lipid polymer nanoparticles enhancing the anticancer effects of afatinib and microRNA^[58].

如图 1-5 所示, Hong^[58]等人设计了以聚乳酸-乙醇酸共聚物为疏水核心的脂质-聚合物杂化纳米粒子, 将阿法替尼或 miR-139 封装在内部, 并进一步用配体精氨酸和 pH 敏感的细胞穿透肽组氨酸修饰壳层, 以增强这些多功能纳米粒子在结直肠癌细胞酸性微环境中的靶向和渗透。

1.3.2 纳米载体的治疗手段

1.3.2.1 化学动力学治疗

在纳米载体的发展过程中, 化学动力学疗法 (CDT) 被认为是一种具有低副作用的肿瘤特异性治疗方法^[59]。一般来说, 在 CDT 中具有代表性的是由肿瘤微环境 (TME) 引发的芬顿/类芬顿反应, 采用过渡金属离子 (铁、铜等) 催化分解活性较低的过氧化氢 (H_2O_2), 产生高毒性的羟基自由基 ($\cdot OH$)。由于肿瘤细胞中的生物分子物质被破坏 (蛋白质、脂质和核酸等), 导致氧化应激, 从而诱导肿瘤细胞死亡^[60]。因此, CDT 疗法比化疗、放疗和手术治疗等更加具有肿瘤特异性、选择性较高、且副作用低。

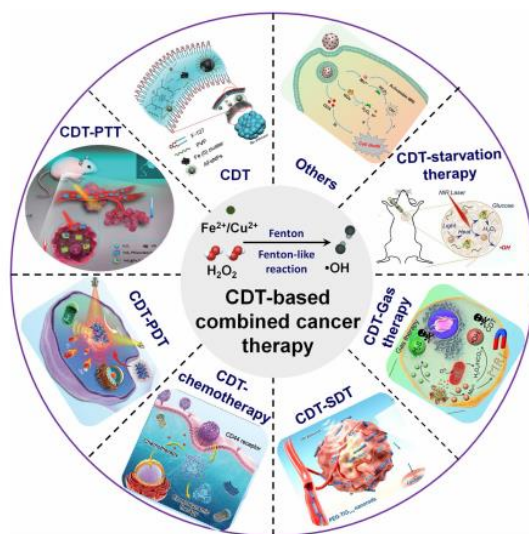


图 1-6 芬顿/类芬顿特性的纳米材料用于 CDT 或基于 CDT 的联合癌症治疗方法^[61]

Figure 1-6 Nanomaterials with Fenton/Fenton-like properties for CDT or CDT-based combination cancer therapies^[61].

然而, 在进行肿瘤的临床治疗中, CDT 的治疗效果也会受到一定的限制。首先是肿瘤内源性 H_2O_2 含量低和药物催化效率低, 导致催化效果较高的铁基催化剂 (如 Fe_3O_4 和 FeS_2) 和铜基纳米材料 (如 Cu_2Se 和 CuO_2) 也无法达到令人满意的治疗效果^[62,63]。其次是由于 TME 中的谷胱甘肽 (GSH) 的过度表达会抵消

•OH 的产生, 从而降低 CDT 的治疗效果^[64]。基于以上问题限制, 现如今开发出了具有芬顿/类芬顿特性的纳米材料联合其他疗法对癌症进行治疗的研究^[61]如图 1-6 所示。

1.3.2.2 光动力治疗

光动力疗法 (PDT) 因其光控选择性、非侵入性、耐药性可忽略、副作用低等优异特性, 已在临床上用于治疗浅表肿瘤^[65]。当光敏剂 (PS) 被光激发时, PS 可以与 H_2O 或 O_2 反应, 通过电子转移机制产生活性氧 (ROS), 例如羟自由基 (•OH) 和超氧自由基 (O_2^-)^[66]。另一方面, PS 还可以通过能量转移产生剧毒的单线态氧 ($^1\text{O}_2$)^[67]。因此在 PDT 中, 当有足够的 O_2 和光量时, PS 分子可以持续产生 $^1\text{O}_2$, 使用少量的 PS 就可以达到良好的治疗效果^[68, 69]。

然而, PDT 的治疗仍然存在一定的局限性, 肿瘤细胞的恶性增殖和肿瘤血管的异常生长导致肿瘤组织 O_2 供应不足^[70, 71], 从而间接削弱 PDT 的疗效。此外, PDT 过程消耗大量 O_2 , 破坏肿瘤血管, 进一步阻断 O_2 供应, 造成严重的 TME 缺氧^[72]。此外, 肿瘤新生血管和缺氧诱导因子 (HIF-1 α) 的形成可诱导癌细胞的复发和侵袭^[73, 74]。因此, 开发新型的缺氧肿瘤 PDT 材料具有重要的科学意义^[75]。

1.3.3 纳米载体的递送方式及其局限性

根据靶向类型, 目前已有三种纳米载体递送系统。第一种纳米载体递送系统是指缺乏肿瘤特异性的被动靶向^[76]; 第二种纳米载体递送系统基于主动靶向^[77]; 第三代纳米载体递送系统遵循多阶段策略^[78]。递送的纳米载体制剂不仅应改善药效学和药代动力学, 而且生产过程也应非常简单, 以最大限度地提高药物的临床转化率^[79]。

(1) 被动递送

用于药物递送系统的纳米颗粒或纳米载体被称为纳米医学, 是一种新的递送技术。纳米载体可以通过控制药物释放和改变药物的生物分布来防止对正常组织的副作用^[80, 81]。利用增强渗透性和滞留 (EPR) 效应, 纳米颗粒从循环系统外渗透到肿瘤区域并在肿瘤中累积, 这种效应被称为被动靶向^[82-84]。然而, Sindhvani 等人^[85]的研究结果显示, 仅有 3% 至 25% 的纳米粒子可以通过内皮细胞 (例如跨细胞通道和胞吞作用/转胞吞作用) 进入肿瘤。所以纳米载体的低肿瘤渗透性在很

大程度上影响了肿瘤的治疗，而且由于纳米载体和药物不能深入进入肿瘤内部，对肿瘤中心区域的细胞影响较小，会导致肿瘤再生和转移。

(2) 主动递送

将载药纳米粒子选择性靶向肿瘤细胞仍然是开发纳米载体的挑战。虽然 EPR 效应可以将纳米颗粒以非特异性方式在肿瘤中蓄积，但主动靶向可以最大限度地减少药物毒性并确保治疗药物输送的剂量，基于纳米技术的方法已用于选择性靶向肿瘤并改善化疗结果^[86]。肿瘤靶向策略包括利用肿瘤组织独特的病理生理学特征来装饰纳米载体（纳米颗粒、胶束、树枝状聚合物等）用于主动靶向的目标特异性配体连接；除了靶向肿瘤细胞之外，纳米粒子还可用于将有效负载传递至其他细胞类型，例如用于刺激抗肿瘤免疫反应的抗原呈递细胞（APC）；靶向肿瘤细胞的另一种方法是使用细胞药物载体^[87]，T 细胞、红细胞、巨噬细胞和间充质干细胞（MSC）都有一定的靶向肿瘤的能力^[88]。Wan 等^[89]开发了一种基于两亲性凋亡肽（KLA）的自递送纳米平台（HKI），用于精准线粒体靶向光热治疗。自递送纳米平台合成后通过 CD44 受体介导的识别被肿瘤细胞内化，然后在酸性环境中被分解，导致凋亡肽 KLA 和具有线粒体锚定能力的光热剂 IR780 的释放，实现了线粒体的精确引导和破坏。这种靶向肿瘤线粒体的自递送纳米平台能够有效地将光热剂和凋亡肽递送至肿瘤细胞线粒体，从而精确破坏线粒体并增强亚细胞器水平上的肿瘤细胞抑制。

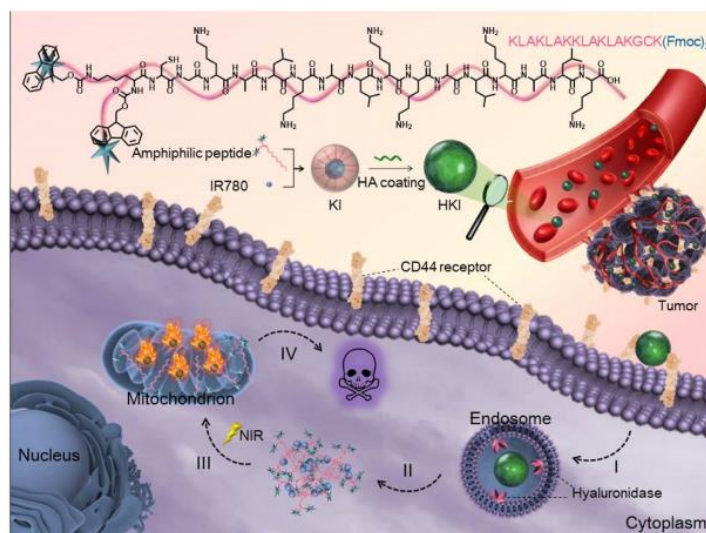


图 1-7 基于两亲性凋亡肽的自递送纳米平台用于精准线粒体靶向光热治疗示意图^[89]

Figure 1-7 Schematic diagram of a self-delivered nanoplatform based on amphiphilic apoptotic peptides for precise mitochondria-targeted photothermal therapy^[89].

基于受体配体的靶向可以使纳米载体在靶位点更大程度地积累,从而改善药物输送并减少副作用。然而,主动靶向的纳米载体必须首先在肿瘤中被动积累,以便从与靶位点增加的亲和力中受益。虽然被动靶向纳米载体已被批准用于临床,但主动靶向纳米载体均未通过临床试验^[90]。主动靶向的主要障碍是靶标肿瘤表达的异质性^[91]。肿瘤细胞中受体的这种不均匀分布限制了传统单分子靶向系统的靶向能力,包括基于适体、葡萄糖、抗体或肽的策略。因此,肿瘤特异性靶向在这些条件下要么效率低下,要么难以在没有明显副作用的情况下实现^[87]。

(3) 纳米载体递送方式的局限性

基于纳米粒子的载药系统可有效提高药物的蓄积,减轻药物的不良反应,已成为提高肿瘤治疗效果的一种有前景的策略。然而,由于循环中的快速免疫清除、缺乏特异性肿瘤靶向性和肿瘤组织扩散受限,许多已获批准的纳米颗粒在临床试验中并不能改善疗效^[92, 93]。一般情况下,基于 EPR 效应,纳米材料可以通过被动靶向的方式在实体肿瘤中聚集。另一种方式是基于靶向配体(如叶酸、透明质酸、大分子多肽等)与纳米粒子的高亲和力的主动靶向递送,这些配体可以结合肿瘤细胞表面的受体^[94, 95]。与被动靶向相比,肿瘤细胞可能摄入更多的药物,从而提高基于纳米载体的药物递送系统治疗癌症的效率。

然而,过去十年的研究表明,纳米粒子在肿瘤中的靶向递送效率仍然低于 1%^[96, 97]。最近的一项研究报道,即使纳米颗粒被识别配体包裹,也只有 0.0014% 的注射剂量可以递送到靶向癌细胞^[98]。肿瘤异质性、异常的肿瘤微环境(包括密集的细胞外基质)、缺氧、供血不足和组织间液体压力增加等因素严重阻碍了纳米粒子对肿瘤的高效渗透^[99, 100]。此外,人工合成的有机、无机或有机/无机杂化纳米载体通常具有“非自我”性质,容易被 RES 捕获,传统的被动或主动靶向策略无法使纳米载体深入渗透实体瘤,导致药物在肿瘤区域的蓄积不足^[101]。肿瘤穿透性差严重限制了治疗效果。因此,利用主动输送系统进一步提高肿瘤深层转运效率的高效和低不良反应是肿瘤治疗的迫切需要。

1.3.4 主动靶向药物输送载体的研究进展

肿瘤由于其微环境的复杂多变性,成为最难治愈的疾病之一。越来越多的研究表明,肿瘤微环境(TME)在肿瘤的发生、转移与防治发挥着重要作用,不仅

参与肿瘤生长、侵袭、转移，而且还参与免疫抵抗。TME 是肿瘤细胞、免疫细胞（T 淋巴细胞和巨噬细胞）、成纤维细胞、血管和淋巴管、神经纤维、信号分子和细胞外基质成分的高度动态和异质的组合^[102, 103]。基于肿瘤微环境的特殊性，随着对于纳米药物的进一步研究，为了进一步降低纳米药物的副作用，同时提升纳米药物的转送效率，各种新型的主动纳米药物载体获得了越来越多的关注。现如今主动靶向药物输送载体的研究进展基于 NPs 连接的靶向配体与肿瘤细胞表面的受体高亲和性而进行的递送，其中包括肿瘤细胞因子^[95]、肿瘤微环境以及配体受体介导^[104]的靶向递送。

1.4 巨噬细胞载体的研究进展

近年来，内源性类细胞巨噬细胞介导的主动给药系统作为一种新型的肿瘤治疗策略已被广泛研究。巨噬细胞是免疫系统的重要细胞，广泛参与多种疾病的病理过程。巨噬细胞或其细胞膜因与体细胞相似的膜结构而不会被机体特异性识别从而造成免疫清除，因此巨噬细胞成为递送药物的良好候选细胞^[105, 106]。巨噬细胞在肿瘤的发展和转移中起着重要作用，根据其作用机制可以分为 M1 及 M2 两种，M1 型巨噬细胞（促炎）可以抑制肿瘤细胞的增殖^[107]，M2 型巨噬细胞（抗炎）如肿瘤相关巨噬细胞（TAMs）则促进肿瘤的生长和侵袭。大多数纳米粒子的血液半衰期不够长，无法在肿瘤组织中实现深度渗透。巨噬细胞作为天然免疫细胞和抗原呈递细胞，具有较长的血液半衰期，在肿瘤穿透性^[108]、循环时间长、生物相容性和跨越生物屏障^[109, 110]的能力等方面显示出了其优于其他肿瘤靶向给药系统的优势，并能与肿瘤组织特异性结合。因此，活的巨噬细胞可以作为药物载体，将巨噬细胞应用于药物输送将显著增加药物在肿瘤中的蓄积。为了进一步提高巨噬细胞的肿瘤靶向能力，可以对其进行靶向配体的改造。此外，借鉴红细胞（RBC）膜包衣技术，巨噬细胞膜包衣被开发出来，从而增强了肿瘤对药物的摄取^[111]。

1.4.1 巨噬细胞的肿瘤趋向性

巨噬细胞可通过趋化行为渗透到实体瘤中，巨噬细胞可被一些趋化因子（如 CCL2）募集到肿瘤微环境^[112]，并有效地进入通常难以到达的区域进行常规递送

[113], 这一现象也被称为肿瘤固有归巢特性[108]。巨噬细胞携带纳米颗粒的深度是 EPR 被动扩散的 2-5 倍[114, 115]。同样, 来源于巨噬细胞的载体也可以递送到肿瘤细胞, 这正是由于巨噬细胞细胞膜表面继承了大量趋化因子 CCR2[116]。因此, 巨噬细胞的特性表明, 巨噬细胞有很大的潜力有效地携带纳米粒子进入实体肿瘤。与此同时, 由于巨噬细胞能够容纳外部药物并协助其逃避血液清除[117], 因此巨噬细胞已被开发为药物载体, 如原代骨髓巨噬细胞和 RAW264.7 细胞(小鼠巨噬细胞), 已被证明可迁移到肿瘤的乏氧区域, 并可作为“特洛伊木马”递送载体, 转运纳米颗粒, 以提高治疗效果[118]。因此, 将巨噬细胞优异的肿瘤归巢特性应用于药物载体的靶向运输, 会使药物在肿瘤中的蓄积显著增加。

相关研究表明, CCL2/CCR2 信号轴参与了多种肿瘤的增值与转移。在胃癌、肺癌等恶性肿瘤中均观察到 CCL2 的过表达, 且与肿瘤的预后呈负相关[119]。多项研究表明, CCL2/CCR2 信号轴能够促进原发肿瘤部位的细胞增殖和转移。肿瘤细胞分泌的 CCL2 能募集血液中的单核细胞到肿瘤微环境中, 继而分化成巨噬细胞, 从而发挥免疫抑制活性[120]。肿瘤相关巨噬细胞通常被认为是 M2 型巨噬细胞, 通过分泌转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 等, 从而加速肿瘤的进展和转移[100]。

1.4.2 巨噬细胞作为载体的种类及应用

在肿瘤治疗中, 可以通过抑制巨噬细胞募集和清除 TAMs 来缓解免疫抑制的 TME, 而将 TAMs 重新编程为 M1 型巨噬细胞并阻断 CD47/Sirp α 通路可以将免疫抑制的肿瘤微环境改变为炎症性肿瘤微环境, 使巨噬细胞吞噬肿瘤细胞。在巨噬细胞给药中, 不仅巨噬细胞, 而且巨噬细胞衍生的仿生体和巨噬细胞膜包被的纳米粒都显示出肿瘤靶向性, 在药物传递中得到了广泛的应用[113]。

据报道, 有几种方法可以作为纳米颗粒主动靶向载体, 例如分离巨噬细胞细胞膜用于载纳米颗粒药物的涂层[121], 纳米颗粒通过与活巨噬细胞进行孵育包载[105]。在自然界中吞噬外来纳米颗粒与被巨噬细胞膜包裹的 NPs 相比, 通过负载 NPs 的活巨噬细胞在靶点表现出更高的蓄积, 这可能是由于肿瘤更加趋向于招募活细胞载体到肿瘤部位。

(1) 活细胞作为载体进行药物输送

在免疫细胞的分类中，单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等在伤口、炎症和肿瘤部位均具有一定的趋向性并进行迁移和聚集^[122]。所以利用该类型细胞可以将携带的纳米药物靶向运输到病灶部位并且可以减少药物的免疫原性及药物毒性等。其中的炎性单核细胞可以优先招募到转移生态位，然后分化为成熟的巨噬细胞促进转移性肿瘤的形成^[123-125]。此外，单核细胞也是一种吞噬细胞，可以对多种纳米粒子进行摄取^[126]。He 等人^[127]报告了一种负载豆酶激活纳米颗粒的炎性单核细胞可以主动靶向肺转移并启动转移特异性智能药物释放以用于抗转移治疗。将纳米颗粒加载到炎性单核细胞中，制备负载 NPs 的单核细胞递送系统。该输送系统在循环中将处于活细胞状态，以确保其主动靶向肺转移瘤，并在单核细胞分化为巨噬细胞时在转移部位发生响应性损伤。抗癌药物以游离药物分子和载药微泡的形式从纳米载体中智能释放，对转移性 4T1 乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭活性产生显著抑制。这种方式提供了一种智能仿生药物递送策略，用于有效的肿瘤抗转移治疗。

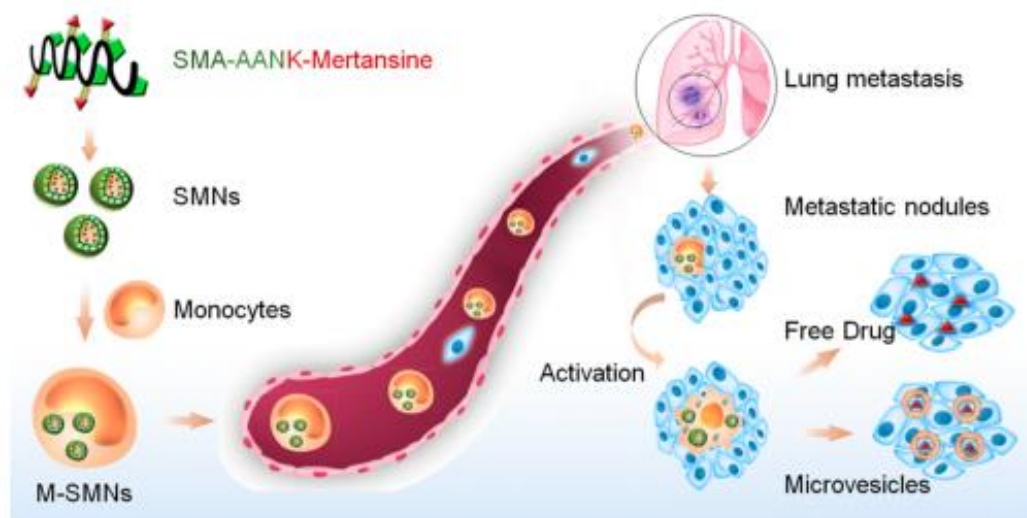


图 1-8 炎性单核细胞负载纳米颗粒以靶向乳腺癌肺转移并启动转移特异性药物释放以实现抗转移功效的示意图^[127]

Figure 1-8 Schematic illustration of inflammatory monocytes loading nanoparticles to target lung metastasis in breast cancer and initiating metastasis-specific drug release to achieve anti-metastatic efficacy^[127].

(2) 利用仿生巨噬细胞膜作为载体进行药物输送

细胞膜作为一种天然的药物递送载体已经用于纳米颗粒的装载。纳米药物载

体在体内总是会被 RES 系统捕获而从快速清除^[128]，而细胞膜包覆的纳米载体可以免于被各种免疫细胞捕获，从而能够准确高效的被募集到肿瘤部位并实现药物递送。目前对于巨噬细胞膜作为载体进行药物输送的研究较为广泛，如 Li 等人^[129]设计了一种巨噬细胞膜包被的纳米吉西他滨系统（MNG）来促进淋巴细胞浸润，然后协同抗程序性死亡配体 1（抗 PD-L1）来重新激活耗尽的淋巴细胞。MNGs 表现出有效的肿瘤内渗透和响应性药物释放能力，显著消除多功能免疫抑制细胞，并促进淋巴细胞浸润到肿瘤的癌细胞区域。为巨噬细胞膜作为药物输送载体提供了新策略。

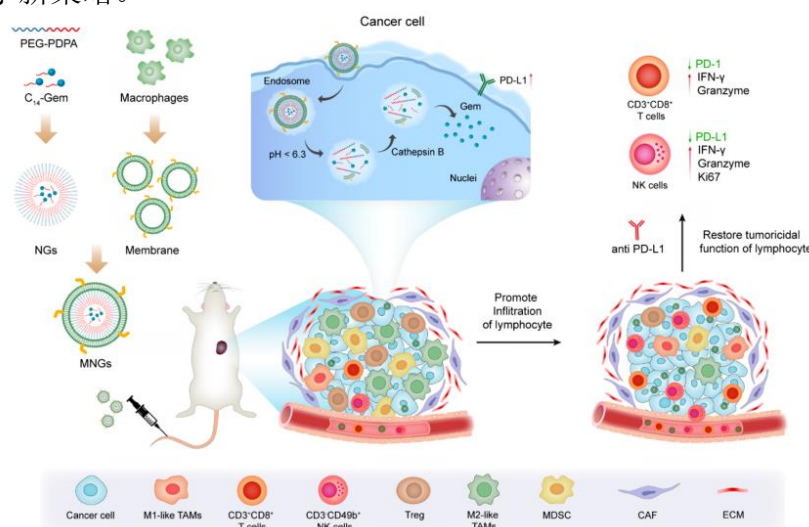


图 1-9 巨噬细胞膜包被的纳米吉西他滨系统（MNG）促进肿瘤内渗透和淋巴细胞浸润以协同抗 PD-L1 进行癌症治疗的示意图^[129]

Figure 1-9 Schematic illustration of the macrophage membrane-coated nanogemcitabine system (MNG) promoting intra tumor infiltration and lymphocyte infiltration to synergistically anti-PD-L1 for cancer therapy^[129].

1.4.3 巨噬细胞载体的局限性

当巨噬细胞作为纳米粒子/药物递送载体时，其应用仍存在一些局限性：首先，纳米粒子或药物被隔离在吞噬体中，降低了药物的释放速率；其次，巨噬细胞可能会降解所载药物。第三，负载的纳米粒子或药物可能影响巨噬细胞的活性。随后，减少向实体瘤的趋化性迁移。因此，通过巨噬细胞摄取靶向递送药物仍然是一个重大挑战，因为平衡高载药量和实体瘤中的高蓄积非常复杂^[130]。根据之前的报道，这意味着巨噬细胞吞噬后的载药量低于 $1.0 \mu\text{g} / 100$ 万个细胞。考虑到

在正常的细胞治疗过程中的注药量，大约需要注射 1-1000 万个细胞，所以使用这种方法治疗肿瘤的药物量是非常不足的^[114]。

为了克服这些局限性，可以将巨噬细胞作为背包，将载药纳米粒子驻留或附着在巨噬细胞表面，负载 NPs 的药物被巨噬细胞递送^[131]。这样，负载纳米粒子的巨噬细胞仍然具有肿瘤靶向性，并且负载纳米粒子的性质不会受到影响。虽然该策略在药物递送应用方面很有前景，但目前的方法仍依赖于过继性细胞转移。在此治疗过程中，将从内脏提取的巨噬细胞进行扩增，并在专门的培养基中用 NPs 进行标记，随后被标记的巨噬细胞被重新输入癌症患者体内进行相应治疗^[132]。然而，细胞提取、扩增和体外标记耗时且难以复制，阻碍了实际的临床转化^[133, 134]。为了解决这一问题，我们需要可直接注入血液循环，并在体内与巨噬细胞载体结合的载药 NPs 以实现体内纳米粒子向肿瘤区域的高效递送能力。由于趋化因子（C-C 基序）配体 MCP-1 与趋化因子受体 CCR2 相互作用^[135]，介导 TME 中肿瘤相关巨噬细胞（TAMs）的趋化，趋化因子配体通过与其受体上的 G 蛋白偶联趋化因子受体（GPCR）结合来发挥其功能，因此 CCR2 与其配体 CCL2（单核细胞趋化蛋白-1）之间的信号轴可介导巨噬细胞在体内粘附载 NPs 药物^[119, 136-138]。多种细胞都能产生 MCP-1，包括肿瘤细胞、内皮细胞、成纤维细胞、上皮细胞、平滑肌细胞和骨髓细胞^[139]，而具有 CCR2 受体的细胞仅为单核细胞、巨噬细胞和其他免疫细胞^[140]。因此，NPs 被 MCP-1 功能化，并可在体内被巨噬细胞表面的 CCR2 识别和结合。NPs 可通过 MCP-1/CCR2 相互作用于巨噬细胞表面，并在体内自发组装 MCP-1/CCR2-巨噬细胞^[141]，然后将载药的 NPs-MCP-1/CCR2 巨噬细胞募集到肿瘤内部，实现药物在肿瘤区域的精准释放。

1.5 本论文的研究内容及意义

1.5.1 研究内容

本文将一种两亲性嵌段共聚物用于自组装纳米粒子来负载阿霉素（DOX），DOX 是治疗不同类型癌症的常用药物之一，包括肺癌、胃癌和乳腺癌等^[142]。通过静脉注射给药的阿霉素有一定的副作用，比如恶心、呕吐、脱发等。将 DOX 封装在纳米粒子中可降低与给药相关的全身毒性^[143]。这种两亲性嵌段共聚物是

聚(环氧乙烷)(PEO)-聚(环氧丙烷)(PPO)-PEO, 即普朗尼克, 是美国食品药品监督管理局批准用于生物医学应用的三嵌段共聚物^[144, 145]。PEO-PPO-PEO 三嵌段共聚物在高于临界胶束浓度(CMC)时容易自组装形成核-壳胶束, 疏水的内核提供了容纳不溶水药物的空间, 核心中的药物在生物介质中免受降解^[146, 147]。它们可增加溶解度, 延长循环时间, 并在靶点释放药物^[148]。此外, 在 PF127 的 PEO 末端可以进行羟基的修饰从而变成羧基, 通过温和的酯化反应制备羧基化的 F127-COOH 三嵌段^[149]。然后, 将改性后 PF127 的羧基与 MCP-1 的氨基通过酰胺键进行连接, 将 F127-COOH-MCP-1 (MPM) 与 DOX 共组装形成 DMPM。在体内, DMPM 可以通过 MCP-1/CCR2 相互作用主动结合在巨噬细胞表面, 产生巨噬细胞-DMPM (MA-DMPM) 递送系统。然后, DOX 在肿瘤微环境的酸性条件下通过裂解释放。本研究选择肺癌细胞作为肿瘤模型实验, 相关研究表明在肺癌细胞中 MCP-1/CCR2 通路明显表达^[150-152], 而肺癌是最常见的肿瘤之一^[153], 约占癌症相关死亡的四分之一, 其中非小细胞肺癌细胞占 85%^[154]。目前非小细胞肺癌的治疗仍然面临困境, 因此有必要开发新的治疗策略来治疗非小细胞肺癌。本文成功合成了 DMPM 纳米材料并研究了其体内及体外抗肿瘤活性, 实验原理图如图 1-10 所示。

1.5.2 研究意义

本研究设计了一种基于巨噬细胞的功能型智能纳米平台, 将其与肿瘤靶向治疗、化疗等药物递送策略相结合, 成功开发了一种新型治疗肿瘤的方式。利用广泛存在的 CCR2/CCL2 轴和巨噬细胞的肿瘤归巢作用将载药纳米粒子靶向递送到肿瘤位置, 并通过 TME 的微酸性响应性释放 DOX, 从而对肿瘤进行抑制以达到治疗的目的。该方法具有一定的可行性, 为肿瘤的治疗提供了一种新思路。

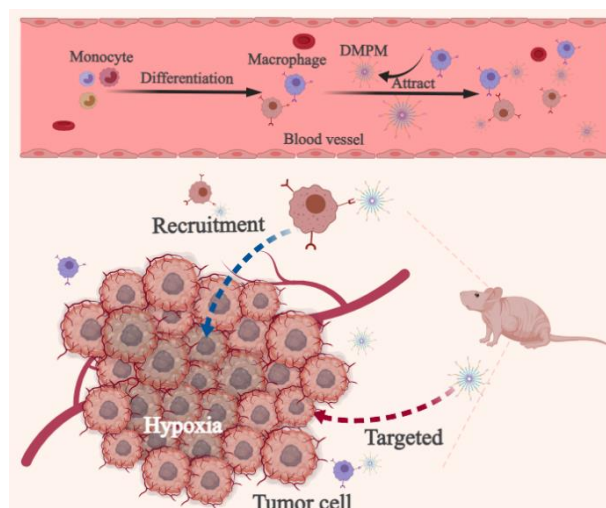


图 1-10 巨噬细胞自发结合功能性普朗尼克纳米颗粒靶向递送 DOX 用于抗肿瘤示意图

Figure 1-10 Schematic of macrophage spontaneously binding functional pluronic nanoparticle for targeted delivery of DOX for anti-tumor.

第 2 章 DOX@MPF127-MCP-1 靶向载体的制备

2.1 实验材料

2.1.1 实验试剂

表 2-1 实验试剂

Table 2-1 The main reagents of the experiment

药品名称	化学式或缩写	公司
普朗尼克 F127	PF127	麦克林有限公司
4-二甲氨基吡啶	DMAP	上海阿拉丁有限公司
三氟乙酸	TFA	上海阿拉丁有限公司
N,N-二甲基甲酰胺	DMF	上海阿拉丁有限公司
1-乙基- (3-二甲氨基丙基) 碳酰二亚胺	EDC	上海麦克林有限公司
N-羟基琥珀酰亚胺	NHS	麦克林有限公司
盐酸阿霉素	DOX	麦克林有限公司
异硫氰酸荧光素	FITC	上海阿拉丁有限公司
三乙胺	TEA	上海麦克林有限公司

2.1.2 实验仪器

表 2-2 实验仪器与设备

Table 2-2 Experimental instrunlents and equipments

设备	型号	公司
傅里叶红外光谱仪	IR Prestige-21	日本岛津公司
恒温磁力搅拌器	SZCL-2	上海岐耀设备有限公司
冷冻干燥机	FD8-3	美国 SIM 公司
流式细胞仪	CytoFLEX	贝克曼公司
高速离心机	TGC-10B	上海安亭仪器设备有限公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州净化设备有限公司
倒置荧光显微镜	IX73-DP80	日本奥林巴斯公司
CO ₂ 培养箱	371	德国艾本德股份公司

2.2 DOX@MPF127-MCP-1 的合成与表征

2.2.1 MCP-1 多肽的合成

以 Fmoc 保护的 L 型氨基酸作为原料, 通过标准固相合成法, 从 C 端到 N 端合成 MCP-1 多肽 (CYNFTNRKISVQRLASYRRITSSK) [155]。将多肽合成所需的高分子载体王树脂用 DCM 溶液浸泡 10 min, 抽干后加入 DMF, 在第一个氨基酸进行反应结束后, 用乙酸酐和 DIEA 对未进行反应的基团封头处理 60 min。洗涤三次后用含哌啶的 DMF 溶液浸泡树脂, 然后用含有 6% 茚三酮的乙醇溶液检测反应是否完全, 之后按顺序添加氨基酸完成 MCP-1 肽的合成。最后, 甲醇洗涤树脂三次, 抽干后加入到 TFA: H₂O: EDT: TMSBr=95:2:2:1 的切割液中反应 4 h 以分离多肽并除去侧链保护基团 [156], 然后离心沉淀以获得 MCP-1 粗肽。使用反相 HPLC 纯化粗肽, 通过液相色谱质谱法进行检测 [157, 158] 从而获得纯 MCP-1 肽。

2.2.2 PF127 的羧基化

将普朗尼克、丁二酸酐、4-二甲氨基吡啶和三乙胺按 100:1:1:1 的质量比例溶于 400 mL 1,4-二氧六环中, 在室温下搅拌 24 h, 减压蒸发除去 1,4-二氧六环得到剩余物, 将所得剩余物加入冰乙醚缓慢搅拌, 有沉淀生成, 过滤收集产生的沉淀并重复洗涤三到五次, 得到的白色固体进行干燥, 得到羧基化的普朗尼克 (MPF127) [159]。

2.2.3 MPF127-MCP-1 的合成

利用 EDC/NHS [160] 对 MPF127 与 MCP-1 进行偶联, 将 EDC:NHS:MPF127:MCP-1 以 3: 1: 1: 0.1 将各反应物加入到足量超纯水中, 室温条件下旋转搅拌 4-6 h, 后将反应后的溶液置入透析袋 (MWCO=2000 Da) 中进行透析 24 h, 期间定期换水, 以去除多余的反应试剂, 然后通过对溶液进行 BCA、紫外等检测多肽是否已接合在 MPF127 上, 而后将其冻干以进行红外表征。对冻干后的 MPM 进行称重, 低温保存。

2.2.4 临界胶束浓度的测定

首先,在试管中加入少量芘的丙酮溶液(6×10^{-6} mol/L),避光条件下使丙酮完全挥发,再分别在试管中配制 10 mL 浓度为 0.625 mg/L 至 40 mg/L 的 PF127、MPF127、MPM 的水溶液,而后在振荡培养箱中避光振荡 24 h (37 °C, 100 rpm),使 PF127、MPF127、MPM 包载芘形成胶束,而后以激发波长 335 nm 测定不同浓度溶液在 350-500 nm 之间的荧光激发光谱,狭缝宽度均为 5 nm^[161]。临界胶束浓度(CMC)的值,以高浓度与低浓度下 I_{373}/I_{384} 的值与 PF127 浓度对数拟合的两条直线交点计算而得出。

2.2.5 DOX@MPF127-MCP-1 的制备

将 DOX 及 MPM 混合溶解在超纯水中(20 mg/mL),在室温条件下进行旋转搅拌 24 h,后使用透析袋(MWCO=2000 Da)对反应溶液进行透析 24-48 h,期间定时换水,以去除多余的 DOX。

2.2.6 DOX@MPF127-MCP-1 纳米材料的表征

(1)用扫描电镜和透射电镜观察 DMPM 的形貌。将 DMPM 溶液进行稀释,取一滴样品溶液在硅片上进行风干,利用导电胶将含样品的硅片放在电镜铜片上,而后使用 SEM 进行观察。同样的,将溶液进行一遍铜网过滤,进行 TEM 观察。

(2)使用傅里叶变换红外光谱仪(IR Prestige-21,日本岛津)进行红外分析。将溴化钾与干燥后的粉末状 PF127、MPF127、MCP-1、MPM、DOX 和 DMPM 一起按照 200: 1 的比例充分研磨,压片后使用仪器进行测定。

(3)用液相色谱法(LC-20AR,日本岛津)和液相色谱质谱联用(LCMS-8030,日本岛津)对 MCP-1 肽进行鉴定。将合成好的 MCP-1 多肽溶液进行稀释,而后使用液相色谱仪和液相色谱质谱联用仪对 MCP-1 进行鉴定和制备纯化。

(4)用 BI-200SM 多角度动态激光散射仪进行动态光散射(DLS)及马尔文 Zeta sizer Nano 90 仪器(英国马尔文)测定样品粒径和 Zeta 电位。将 PF127、MPF127、MCP-1、MPM、DOX 和 DMPM 溶液进行稀释,取 1mL 稀释后的样品溶液置于样品池中,进行粒径及 Zeta 电位检测。

(5) 用荧光分光光度计 (FL) 测量材料的临界胶束浓度 (CMC)。将芘与不同浓度梯度 PF127、MPF127 和 MPM 进行共孵育 24 h, 然后将各组溶液置于比色皿中进行荧光检测。

(6) 用紫外-可见分光光度计 (UV2700, 日本岛津) 记录紫外可见吸收光谱。将 PF127、MPF127、MCP-1、MPM、DOX 和 DMPM 溶解在超纯水中并超声至完全溶解。用超纯水建立基线, 将各组溶液置于比色皿中进行紫外光谱检测。

(7) 用双辛酸蛋白测定法 (BCA 蛋白测定法) 测定 DMPM 中的 MCP-1 含量。将 MCP-1 与 MPM 分别溶解稀释, 将不同浓度的蛋白标准品、MCP-1、MPM 置入 96 孔板中进行显色反应, 后用酶标仪进行测定分析。

2.3 DOX@MPF127-MCP-1 的载药及体外药物释放研究

采用透析法评价 DMPM 胶束在不同 pH 条件下的体外药物释放的能力^[162]。首先制备 0.5 mg/mL 的 DMPM 胶束溶液, 然后将溶液转移到透析袋 (MWCO=1000 Da) 中并放入含有 50 mL 的 pH 缓冲液的烧杯中进行透析, 并在振荡培养箱中避光搅拌 60 小时 (37 °C, 100 rpm), 在不同时间段分别取 2 mL 缓冲液, 并立即用新的 2 mL 缓冲液代替。然后, 使用紫外可见分光光度计检测溶液在 480 nm 处的吸光度。使用 DOX 标准曲线公式 1 和公式 2 计算 DOX 载药率 (DLE, Rt, %)。

$$Y = 0.0219X - 0.0313 \quad R^2 = 0.9997 \quad \text{公式 1}$$

$$DLE = \frac{\text{Weight of loaded DOX}}{\text{Weight of micelle}} \times 100 \% \quad \text{公式 2}$$

2.4 结果与讨论

2.4.1 MCP-1 多肽的鉴定

(1) MCP-1 肽的结构式

MCP-1 肽由 24 个氨基酸组成，由其结构式可以计算出该多肽的分子量为 2892.36 道尔顿 (Da) (图 2-1)。

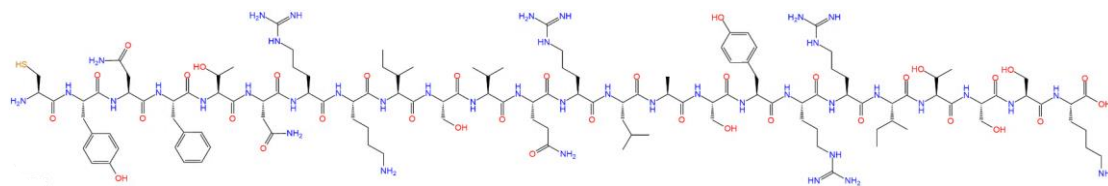


图 2-1 MCP-1 肽的结构式

Figure 2-1 Structural formula of MCP-1 peptide.

(2) MCP-1 肽的液相色谱分析

使用液相色谱对 MCP-1 肽进行表征分析，分析得出 MCP-1 肽在 HPLC 上呈单峰，保留时间为 13.175 min，纯度约为 84.51% (图 2-2)。

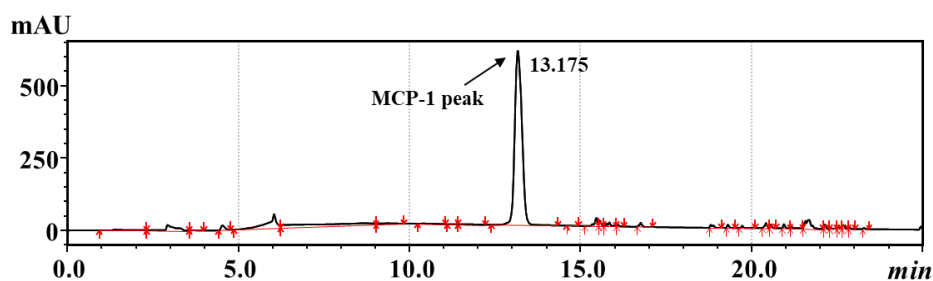


图 2-2 MCP-1 肽的液相色谱分析

Figure 2-2 Liquid chromatography analysis of MCP-1 peptide.

(3) MCP-1 肽的质谱分析

对该多肽进行质谱分析，分析其质荷比和强度显示出 $[M+2H]^{2+}=1447.18$, $[M+3H]^{3+}=965.12$, $[M+4H]^{4+}=724.09$, $[M+5H]^{5+}=579.472$, $[M+6H]^{6+}=483.06$ (图 2-3)，对应多肽的分子量可以验证成功合成 MCP-1。

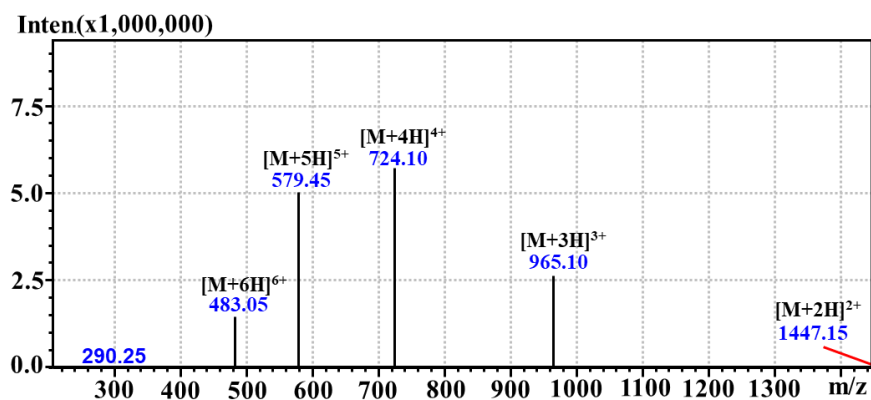


图 2-3 MCP-1 肽的质谱分析

Figure 2-3 Mass spectrogram of MCP-1 peptide.

2.4.2 MPF127 的表征

(1) MPF127 的合成流程图

MPF127 是 PF127 的羟基末端进行羧基化所合成的，合成所需条件及流程如图所示（图 2-4）。

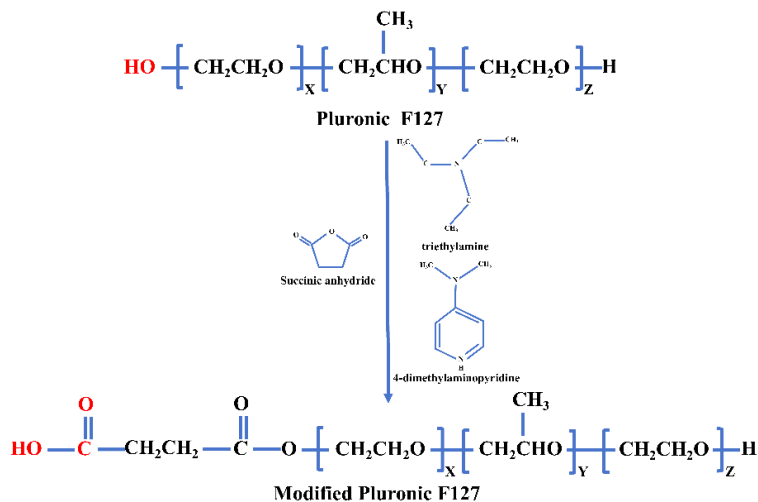


图 2-4 MPF127 的合成流程图

Figure 2-4 Flow chart of MPF127 synthesis.

(2) MPF127 的红外图谱

红外光谱（图 2-5）显示，与 PF127 相比，MPF127 丁二酸酐在 1734.2 cm^{-1} 处出现了羰基特征峰，成功验证了 PF127 的羟基改性为羧基^[163, 164]。

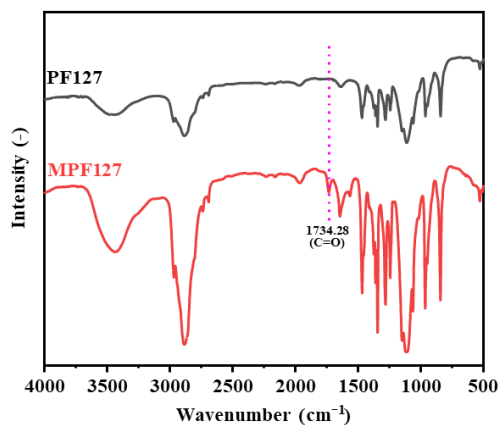


图 2-5 PF127、MPF127 的红外图谱

Figure 2-5 FT-IR spectra of PF127 and MPF127.

(3) MPF127 的紫外图谱

通过分析紫外光谱可以得出, MPF127 在 212 nm 和 280 nm 处出现了吸收峰(图 2-6)。以上结果验证了 PF127 成功修饰为 MPF127。

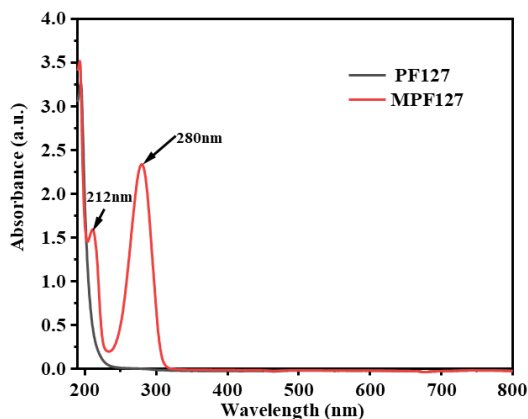


图 2-6 PF127、MPF127 的紫外图谱

Figure 2-6 UV-vis spectra of PF127 and MPF127.

2.4.3 MPF127-MCP-1 的表征.

(1) MPF127-MCP-1 的红外光谱

利用红外光谱分析了 MPM 的表面化学性质。如图 2-7 所示, 在 MPM 中检测出了属于 MCP-1 的酰胺 I ($\text{C}=\text{O}$) 的 1673 cm^{-1} 以及酰胺 II ($\text{N}-\text{H}$) 和 ($\text{C}-\text{N}$) 的 1532 cm^{-1} , 1204 cm^{-1} 和 1139 cm^{-1} 峰值^[136], 同时显示出了来源于 MPF127 的 ($\text{C}-\text{H}$) 和 ($\text{C}=\text{O}$) 的 2887 cm^{-1} 和 1734 cm^{-1} 峰值。

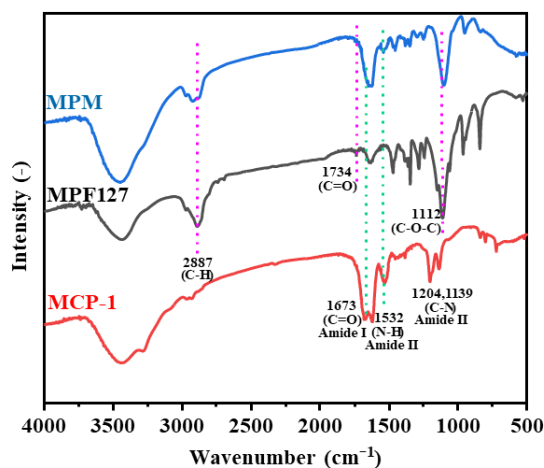


图 2-7 MPF127、MCP-1 及 MPM 的红外图谱

Figure 2-7 FT-IR spectra of MPF127, MCP-1 and MPM.

(2) MPF127-MCP-1 的 XPS 图谱

XPS 全扫描显示 MPM 的所有元素 (C/N/O/S) 如图 2-8 a 所示。对 C 1s (286.04 eV, 288.94 eV) 和 O 1s (532.44 eV, 531.44 eV) 的 XPS 谱进行分析得出了 C-O-C 和 O-C=O 的特征峰 (图 2-8 b-c)。通过 N 1s 谱和 S 2p 谱 (图 2-8 d-e) 成功验证了有酰胺键 N-(C=O)- 的存在 (399.94 eV), 并且含有多肽中的 S 元素 C-S (163.54 eV), 从而成功验证了 MPM 的成功合成^[165]。

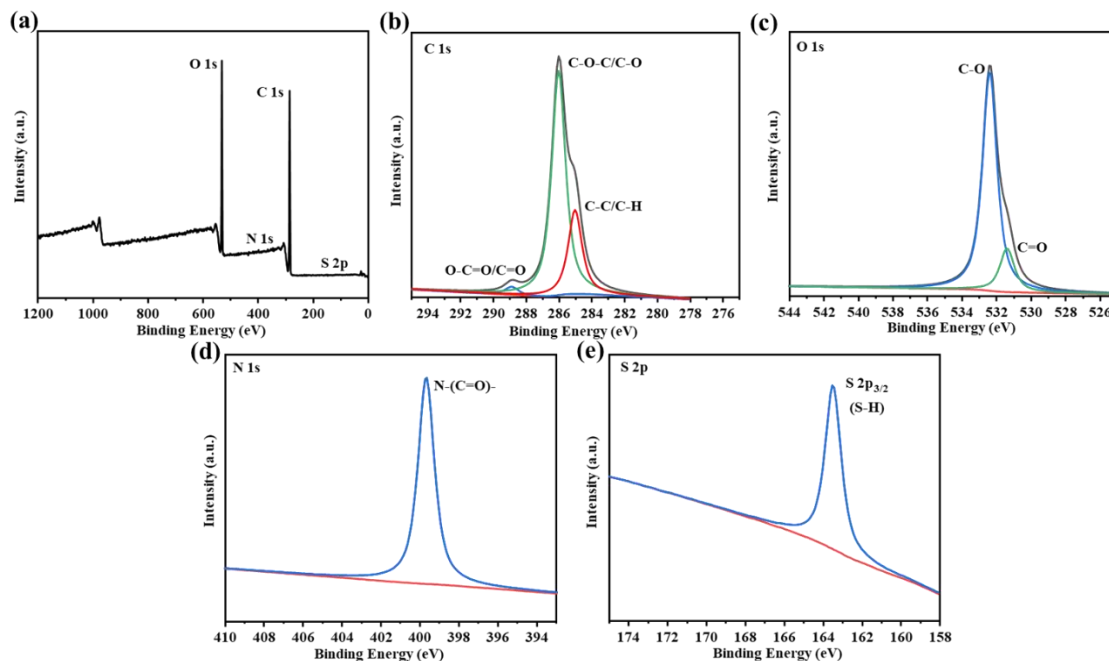


图 2-8 MPM 的 XPS 总图 (a) 及 C 1s (b), O 1s (c), N 1s (d) 和 S 2p (e) 分析。

Figure 2-8 XPS diagram of MPM (a) and analysis of C 1s (b), O 1s (c), N 1s (d) and S 2p (e).

(3) MPF127-MCP-1 的 EDS 元素分析

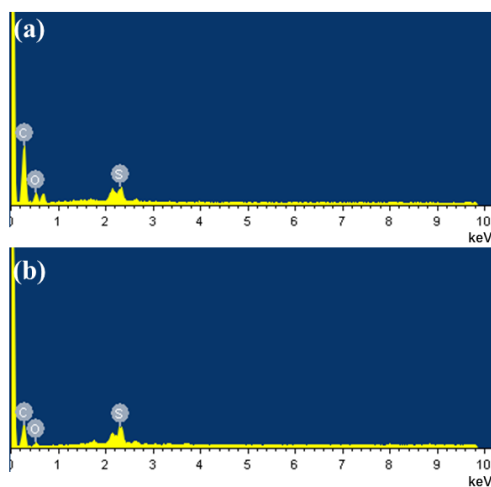


图 2-9 MCP-1 (a) 及 MPM (b) 的 EDS 分析

Figure 2-9 EDS analysis of MCP-1 (a) and MPM (b).

EDS 显示出 MPM 所具有的元素为 C、O、N、S 等（图 2-9 a-b），在 MPM 中的 C 和 O 的占比分别为 81.69% 和 12.98%，在 MCP-1 中仅有的 S 元素在 MPM 中的占比约为 5.33%，EDS 中的元素组成与 MCP-1 和 PF127 中的元素一致，并与 XPS 图谱相对应，验证了 MPM 的成功合成。

（4）MPF127-MCP-1 中的 MCP-1 含量测定

使用 BCA 试剂盒绘制标准曲线（图 2-10 b）并检测 MPM 中 MCP-1 多肽的含量，相关检测结果如图 2-10 a 所示，计算结果得出 MPM 中 MCP-1 肽的占比达到 8.53%。

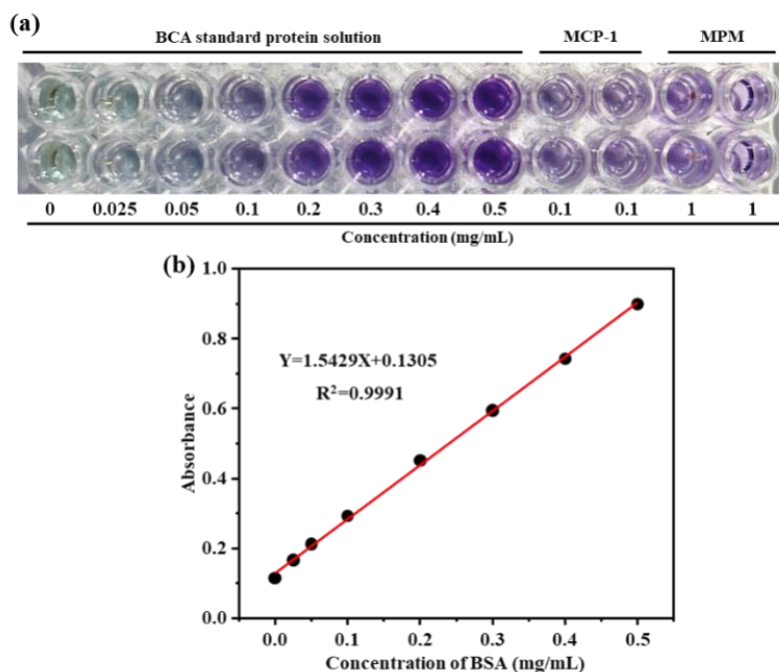


图 2-10 MCP-1 及 MPM 的 BCA 检测结果示意图 (a) 和 BCA 标准曲线 (b)

Figure 2-10 BCA detection diagram of MCP-1 and MPM (a), BCA standard curve (b).

2.4.4 临界胶束浓度评估

临界胶束浓度 (CMC) 是 MPM 形成胶束负载 DOX 的重要参数。当溶液浓度超过 CMC 时，MPM 可自组装成外亲内疏的包绕 DOX 的胶束。随着溶剂中 PF127、MPF127 和 MPM 浓度的增加，芘的荧光强度增加。峰的红移（从 375 nm 到 376.2 nm）表明 PF127、MPF127 和 MPM 自组装成胶束，芘聚集在疏水胶束核心中（图 2-11 a-c）。如图 2-11 d-f 所示，用 I_{373}/I_{384} 的比值来测定 PF127、MPF127 和 MPM 的 CMC 值^[161]，分别约为 12.53 mg/mL、15.56 mg/mL 和 14.11 mg/mL。

同时, 结果表明改性后 PF127 的 CMC 没有明显变化, 表明其具有很好的组装包载能力, 可用作药物靶向递送材料。

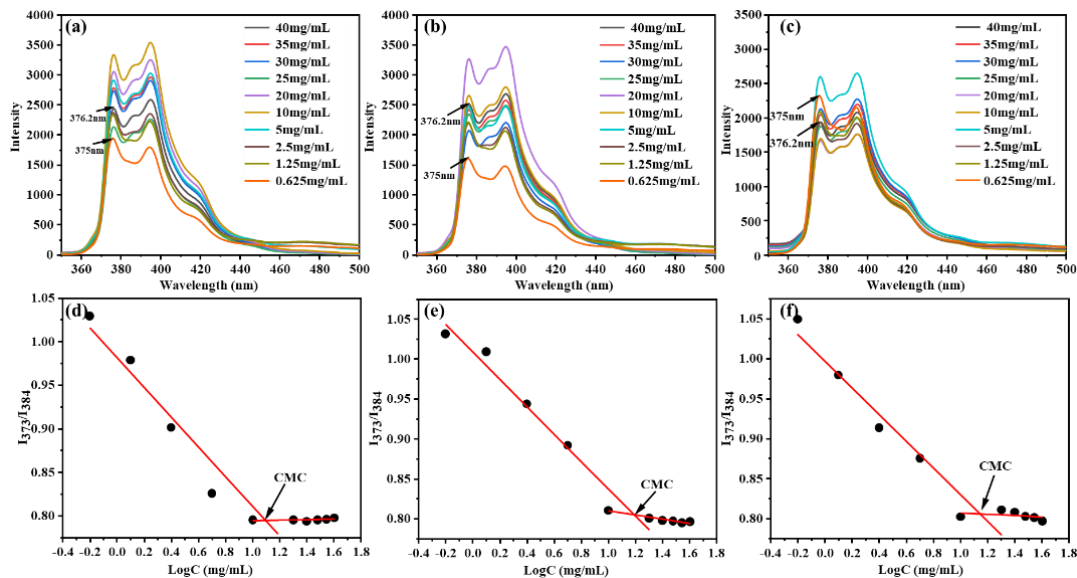


图 2-11 荧光光谱分析: PF127 (a)、MPF127 (b) 和 MPM (c); I_{373}/I_{384} 比值: PF127 (d)、MPF127 (e) 和 MPM (f)

Figure 2-11 Fluorescence spectral analysis of PF127 (a), MPF127(b) and MPM (c); The ratio of I_{373}/I_{384} : PF127 (d), MPF127(e) and MPM (f).

2.4.5 DOX@MPF127-MCP-1 的表征

(1) DOX@MPF127-MCP-1 的合成

在完成 MPM 的合成后, 将 DOX 与 MPM 进行混合, 加入超纯水进行搅拌, MPM 浓度控制在 20 mg/mL 以上, 此时 MPF127 即可自组装将 DOX 包裹在疏水核心内部, 其合成流程图如图 2-12 所示。



图 2-12 DMPM 的合成流程图

Figure 2-12 Synthesis flowchart of DMPM.

(2) DOX@MPF127-MCP-1 的 SEM 及 TEM 电镜图

使用扫描电镜及透射电镜对所得到的 DMPM 进行表征, 从 SEM 图可以看出 DMPM 为均一的球形, 平均直径约为 150 nm 左右 (图 2-13 a), 随后进行了

透射电镜的表征,从 TEM 图可以得出与 SEM 相似的结论,但粒径稍有变化,大约为 100 nm 左右(图 2-13 b)。

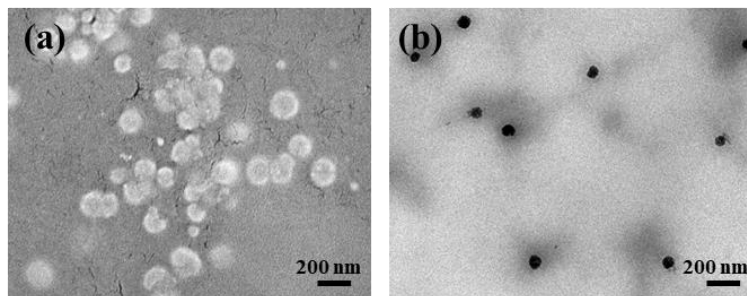


图 2-13 DMPM 的扫描电镜 (a) 和透射电镜 (b)

Figure 2-13 SEM (a) and TEM (b) of DMPM.

(3) DOX@MPF127-MCP-1 的粒径

使用动态光散射 DLS 粒径检测对 DMPM 的平均粒径进行了分析,结果显示 DMPM 的平均流体动力学直径约为 110 nm 左右(图 2-14),结果与 SEM 及 TEM 相一致。

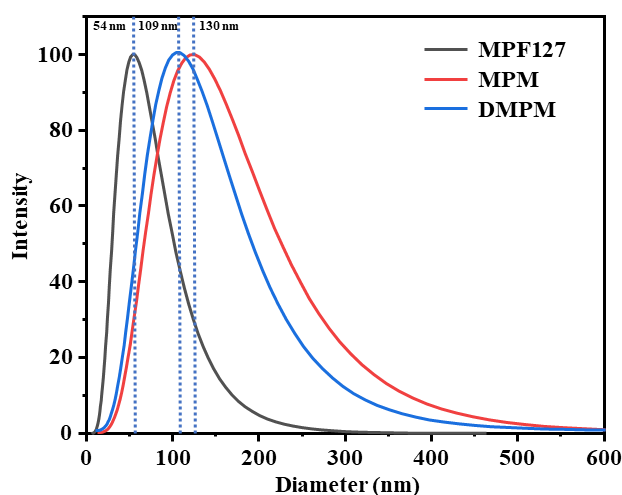


图 2-14 MPF127, MPM 和 DMPM 的粒径分布图

Figure 2-14 Particle size distribution of MPF127, MPM and DMPM.

(4) DOX@MPF127-MCP-1 的稳定性分析

为了对 DMPM 的稳定性进行测定,将 MPM 以及 DMPM 均匀分散在 PBS 中 7 天,如图 2-15 所示,在经过 7 天的分散之后,DMPM 的平均直径并未发生较大变化,表明 DMPM 在溶液中较为稳定。

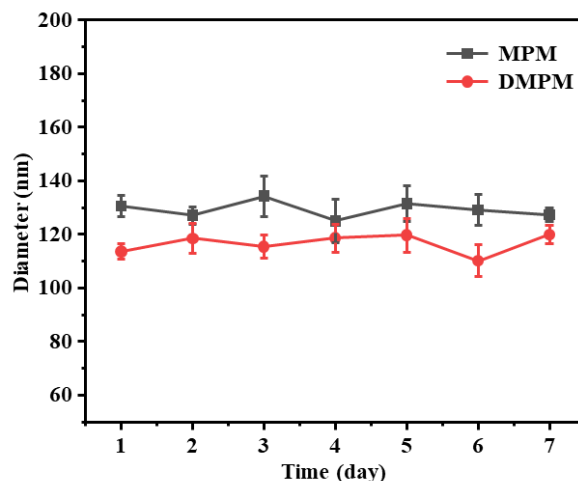


图 2-15 DMPM 的七天稳定性分析

Figure 2-15 Seven-day stability analysis of DMPM.

(5) DOX@MPF127-MCP-1 的紫外光谱、红外光谱及 Zeta 电位分析

紫外-可见吸收光谱测试可以分析 DMPM 在制备过程的合成情况。通过紫外图谱我们可以看出（图 2-16 a）DMPM 在 MCP-1 的 275 nm 峰和 MPF127 的 280 nm 峰有一定的蓝移。同时，负载 DOX 的 DMPM 在 480 nm 处的峰出现了明显的红移，证明成功制备了 DMPM。

傅里叶红外光谱进一步解释了我们设计的 DMPM 的合成，通过图 2-16 b 可以看出在 DMPM 的 IR 光谱中观察到 3526 cm^{-1} 、 3330 cm^{-1} （O-H）、 1617 cm^{-1} （C=O）、 1617 cm^{-1} （C=O）和 991 cm^{-1} （N-H）处的 DOX 特征峰，表明 MPM 已成功包裹 DOX 形成 DMPM 纳米颗粒。

使用 Zeta 电位检测对 DMPM 的电位进行了测量，得出 DMPM 的平均电位大约为 15.31 mV（图 2-16 c），与前体材料 MPF127、MCP-1、MPM 的电位测定结果有较高的一致性。

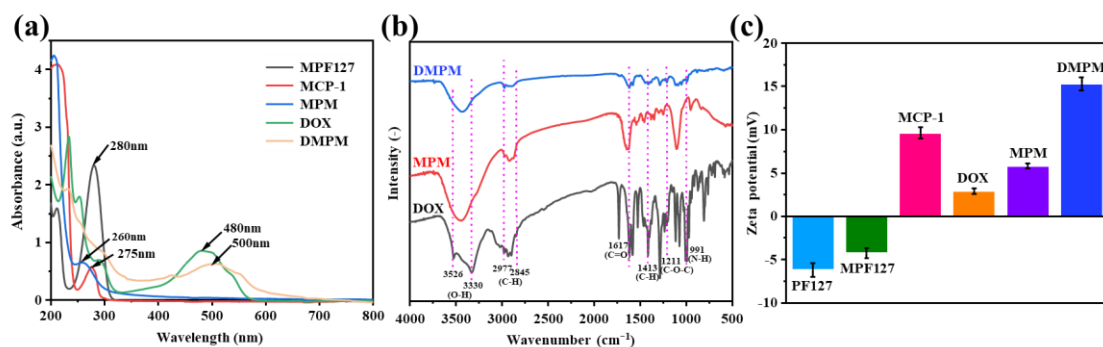


图 2-16 DMPM 的紫外图谱 (a)，红外图谱 (b) 和电位分析 (c)

Figure 2-16 The UV-vis spectra (a), FT-IR spectra (b) and Zeta potential (c).

2.4.6 DOX@MPF127-MCP-1 的药物装载及体外药物释放

为了了解 DMPM 中 DOX 的装载量,我们绘制了 DOX 的标准曲线(图 2-17 a),通过测量 DMPM 溶液在 480 nm 下的吸光度,根据公式 1 计算得出 DOX 的装载量约为 1.5%。同时为了研究 DMPM 在酸性 TME 下的阿霉素释放^[166],我们采用透析法分别在正常组织 pH 7.4、肿瘤微环境 pH 6.5^[167]和肿瘤溶酶体 pH 5.5^[168]下研究了 DMPM 中 DOX 的释放。结果表明,释放出的 DOX 能够在 10 小时左右达到平衡,这与之前报道的参考文献一致^[169](图 2-17 b)。根据药物释放数据显示,在 37°C 条件下,10 h 内释放率分别为 49.5% (pH 7.4)、68.75% (pH 6.5) 和 75.42% (pH 5.5)。DMPM 内的 DOX 的释放具有 pH 响应性,表明 DMPM 能够在肿瘤区域酸敏释放 DOX,这可能会减少 DOX 对正常机体的副作用。

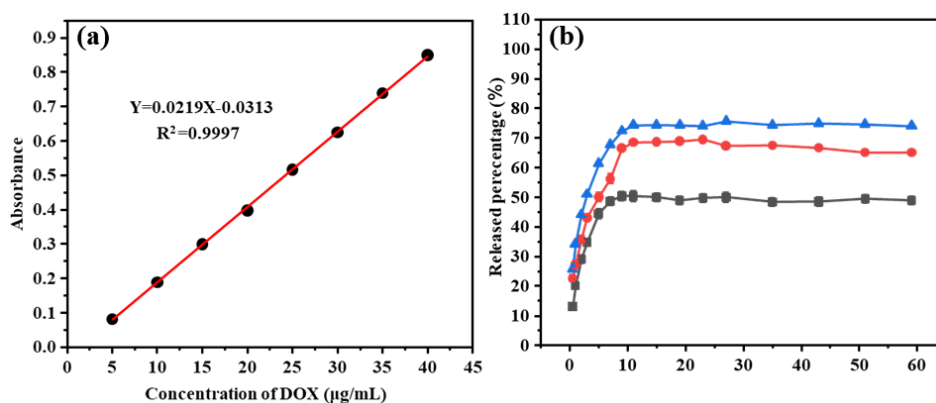


图 2-17 DOX 标准曲线 (a) 及 DMPM 的药物释放曲线 (b)

Figure 2-17 DOX standard curve (a) and drug release of DMPM (b).

2.5 本章小结

本章利用固相合成法成功合成了 MCP-1 多肽,液相及质谱均显示其成功合成,同时将普朗尼克 F127 末端的羟基成功进行羧基化,而后将 MCP-1 与改性后的普朗尼克 F127 以 EDC/NHS 法连接到一起,最终包裹 DOX 合成了 DMPM,合成后的 DMPM 具有较为均一的球形且分散性较好,粒径大小约为 100 nm 左右,适宜于在体内进行循环。电位、红外、紫外等均显示出了 MPM 及 DMPM 纳米材料的合成成功。将 DMPM 在 PBS 中溶解并放置 7 天,表现出较高的稳定性。药物释放结果表明,合成的 DMPM 纳米材料具有一定的酸响应性释放,为该纳米材料在生物体内的应用提供了进一步的可能性。

第 3 章 DOX@MPF127-MCP-1 载体用于肿瘤靶向治疗的体外研究

3.1 引言

肿瘤组织微环境的复杂性导致对肿瘤细胞的治疗有很大难度, 基于纳米材料的给药体系虽可以增加药物效果, 减少药物副作用, 但是其仍然是依靠 EPR 效应的被动转运, 运输效率较低。而巨噬细胞作为一种内源性细胞, 与其他肿瘤靶向给药系统相比有很大的优势。以巨噬细胞作为转运载体, 把巨噬细胞作为背包携带纳米材料从而进入肿瘤细胞内部, 从而释放纳米药物, 可以更加准确高效的对肿瘤进行防治。巨噬细胞可被 CCL2 募集到肿瘤微环境中, 并可通过趋化行为渗透到实体瘤内部, 有效地进入通常难以到达的区域进行常规递送, 极大地增强了纳米材料的肿瘤渗透性。CCR2 及其配体 CCL2 (MCP-1) 之间的信号轴可在体内介导巨噬细胞负载纳米药物, 而巨噬细胞表面就具有该趋化因子受体, 所以巨噬细胞适宜于作为纳米载体运输载药纳米材料从而进入到肿瘤内部。相关研究表明, 肺癌细胞中的 CCL2/CCR2 通路明显。本章以此为基础在体外对 DMPM 复合材料使用非小细胞肺癌细胞 (NCI-H1299) 进行机理研究。对 DMPM 的体外生物安全性, 体外靶向结合巨噬细胞, 体外细胞毒性等实验验证了 DMPM 纳米材料的抗肿瘤效果及靶向巨噬细胞的应用效果。

3.2 细胞系

将 MEF、RAW264.7 和 NCI-H1299 三种细胞在含 5%CO₂ 的环境 (37℃) 中进行传代培养, 以用于后续细胞实验及荷瘤小鼠模型的建立。实验中所使用的培养基均由 DMEM、10%胎牛血清 (FBS) 和 1%青霉素/链霉素配制而成。

3.3 DOX@MPF127-MCP-1 的体外生物相容性研究

3.3.1 体外溶血实验

对无菌大鼠血血液样本加入乙二胺四乙酸（EDTA）抗凝，而后加入 PBS 缓冲液（pH=7.4）进行离心（1500 rpm/min, 15min）分离血清中的红细胞（RBC），去除上清之后继续使用 PBS 洗涤三次，后用 PBS 配制成为 2% 的混悬液。取七支试管，其中两支分别设置为阴性（加入 PBS）和阳性（加入纯水）对照，将浓度范围为 0.156 mg/mL-2.5 mg/mL 的 DMPM 依次加入编号试管中，混匀后，置于 37°C，100 rpm 的条件下孵育 3-4 小时，期间每隔 1 小时观察一次。最后，将试管以 1000 rpm 离心 10 分钟，并通过酶标仪读取在 570 nm 处上清液的吸光度，样品设置三个平行试验，相对溶血率计算如公式 3 所示^[170]。

$$\text{Hemolysis \%} = \frac{\text{OD sample} - \text{OD negative}}{\text{OD positive} - \text{OD negative}} \times 100 \% \quad \text{公式 3}$$

其中 OD sample、OD negative 和 OD positive 分别是测试样品、阴性对照（PBS）和阳性对照（H₂O）的吸光度值。

3.3.2 体外对 RAW264.7 和 MEF 的相容性研究

使用细胞计数试剂盒（CCK-8）法检测 DMPM 在体外对小鼠正常细胞 MEF 以及巨噬细胞 RAW264.7 的细胞相容性。使用培养基 DMEM 制备不同浓度（0~800 µg/mL）的 PF127、MPF127、MCP-1、MPM 和 DMPM 胶束样品。将 MEF 以及 RAW264.7 两种细胞分别接种于 96 孔板（1×10⁶ 细胞/孔）培养 24 h 后，加入含不同浓度样品的培养基 100 µL，以纯 DMEM 作为对照。孵育 24 h 后，移去培养液，用 PBS 洗涤 2 次，而后与 100 µL 含 10% CCK-8 的培养液混合孵育 1 h，最后使用酶标仪测定孔板在 450 nm 处吸光度并计算细胞活力（%）。

3.4 DOX@MPF127-MCP-1 的体外靶向特性研究

3.4.1 体外巨噬细胞迁移实验

（1）将经过培养的 RAW264.7 细胞均匀接种在细胞迁移 24 孔板的上室迁移

膜表面 (200 μL , 2×10^5 细胞/孔), 在 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 的条件下培养 24 h, 而后下室培养液中添加 MPF127、MCP-1、MPM 和 DMPM。培养 24 h 后, 移去 24 孔板中的培养基, 将迁移膜用 PBS 轻洗, 5% 多聚甲醛固定 20 min, 轻轻洗三次, 而后使用 0.1% 结晶紫染色 15 分钟, 使用荧光显微镜观察迁移膜下层的迁移细胞^[94, 136]。

(2) 将经过培养的 NCI-H1299 细胞均匀接种在细胞迁移 24 孔板的下室中 (2×10^5 细胞/孔), 培养 24 h, 而后将 RAW264.7 细胞均匀接种在细胞迁移 24 孔板的上室迁移膜表面 (200 μL , 2×10^5 细胞/孔), 培养 24 h 后, 参照 1) 所示步骤进行染色观察。

(3) 将经过培养的 NCI-H1299 细胞均匀接种在细胞迁移 24 孔板的下室中 (200 μL , 2×10^5 细胞/孔), 培养 24 h, 同时将 RAW264.7 细胞与 DMPM 在 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 的条件下共孵育 24 h, 而后将 MA-RAW264.7 进行消化, 均匀接种在细胞迁移 24 孔板的上室迁移膜表面 (200 μL , 2×10^5 细胞/孔), 培养 24 h 后, 参照 1) 所示步骤进行染色观察。

3.4.2 体外与巨噬细胞结合及在肿瘤部位释放 DOX 研究

(1) 将经过培养的 RAW264.7 细胞均匀接种在 6 孔板 (2×10^5 细胞/孔) 中, 孵育 24 h, 而后分别加入游离 DOX (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 DMPM (1 mg/mL), 孵育 12 h。清洗后使用 5% 多聚甲醛固定 20 min, 然后使用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 对细胞核进行染色, 清洗后使用荧光显微镜下观察巨噬细胞捕获 DMPM 的情况。

(2) 将经过培养的 NCI-H1299 细胞均匀接种在 6 孔板 (2×10^5 细胞/孔) 中, 孵育 24 h, 而后将 RAW264.7 与 DMPM 共孵育后的 RAW264.7-DMPM 进行消化, 并均匀接种在 NCI-H1299 的 6 孔板中, 共孵育 24 h, 孵育完成后参照 1) 所示步骤进行染色, 荧光显微镜下观察 DMPM 的荧光分布情况。

3.4.3 体外与巨噬细胞结合量的研究

将经过培养的 RAW264.7 细胞均匀接种在两个 6 孔板中 (2×10^5 细胞/孔) 孵育过夜, 用 PBS 轻轻洗涤 3 次。在一个 6 孔板中加入 2 mg/mL DMPM, 孵育不同时间 (0、1、2、4、6、8 h), 分析时间对吞噬功能的影响。同时, 在另一个 6

孔板中加入 0、0.33、0.66、1、1.33、2 mg/mL DMPM 孵育 RAW264.7 细胞 8 h。两个六孔板孵育完成后，离心收集细胞，并反复冻融 3~5 次，直至细胞完全溶解并释放被吞噬的 DMPM。用紫外-可见分光光度法测定释放的 DMPM 的吸光度值，用标准曲线（以 DOX 浓度表示）计算每个细胞中 DMPM 的量。

3.5 DOX@MPF127-MCP-1 的体外细胞实验

3.5.1 体外对 NCI-H1299 细胞的毒性研究

使用细胞计数试剂盒（CCK-8）法检测 DMPM 在体外对 NCI-H1299 的细胞毒性。使用培养基 DMEM 制备不同浓度（0 ~ 800 $\mu\text{g/mL}$ ）的 PF127、MPF127、MCP-1、MPM、DOX 和 DMPM 胶束样品。将 NCI-H1299 细胞接种于 96 孔板（ 1×10^6 细胞/孔）培养 24 h 后，加入含不同浓度样品的培养基 100 μL ，以纯 DMEM 作为对照。孵育 24 h 后，移去培养液，用 PBS 洗涤三次，而后与 100 μL 含 10% CCK-8 的培养液混合孵育 1 h，使用酶标仪测定孔板在 450 nm 处吸光度并计算细胞活力（%）。

3.5.2 体外细胞活死染色

采用活死细胞试剂盒（AM/PI 试剂盒）检测 DMPM 对细胞活力的影响。将 NCI-H1299 细胞接种于 6 孔板（ 2×10^5 细胞/孔），在 37°C、5% CO_2 条件下培养过夜，然后在孔中加入 1 mL 含不同浓度 DOX（10 $\mu\text{g/mL}$ ）、MPM（10 $\mu\text{g/mL}$ ）和 DMPM（5-30 $\mu\text{g/mL}$ ）的 DMEM 培养基，以纯 DMEM 作为对照。培养 24 h 后，AM/PI 染色 15-20 min，PBS 洗涤三次，用 AM/PI 试剂盒检测细胞活力，荧光显微镜观察细胞形态。

3.5.3 体外细胞摄取实验

（1）将 NCI-H1299 细胞样本（ 2×10^5 细胞/孔）接种于 6 孔板并培养过夜，然后在不同时间间隔（0.5、2、6 和 12 h）加入 DMPM（浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$ ），以纯 DMEM 作为对照。孵育结束后，用 5% 多聚甲醛固定 NCI-H1299 细胞 20 min，DAPI 染色，荧光显微镜下观察细胞核形态。

(2) 将 DMPM (DOX 浓度为 $15 \mu\text{g/mL}$) 接种于 NCI-H1299 细胞孵育不同时间 (0.5、2、6、12 h) 后, 用无 EDTA 胰蛋白酶消化并离心, 而后使用流式细胞术检测 DMPM 的荧光强度。

3.6 结果与讨论

3.6.1 溶血实验

溶血试验是评价纳米粒子生物相容性的常用方法。材料的高血液毒性会引起红细胞破裂, 使得血红蛋白从红细胞的细胞质膜释放到血流中。根据 ISO/TR7406 标准, 纳米粒子的溶血率不能超过 5%^[171]。通过比较阳性对照 (H_2O) 和阴性对照 (PBS) 来分析 DMPM 的溶血效果 (图 3-1 a), 分析溶血实验数据, 可以得出 DMPM 在 2.5 mg/mL 和 0.625 mg/mL 浓度下的溶血率分别达到 23.83% 和 2.65% (图 3-1 b)。在正常实验条件下, DMPM 的浓度仅为 0.8 mg/mL , 溶血率远低于 5%, 表明 DMPM 具有良好的生物相容性。

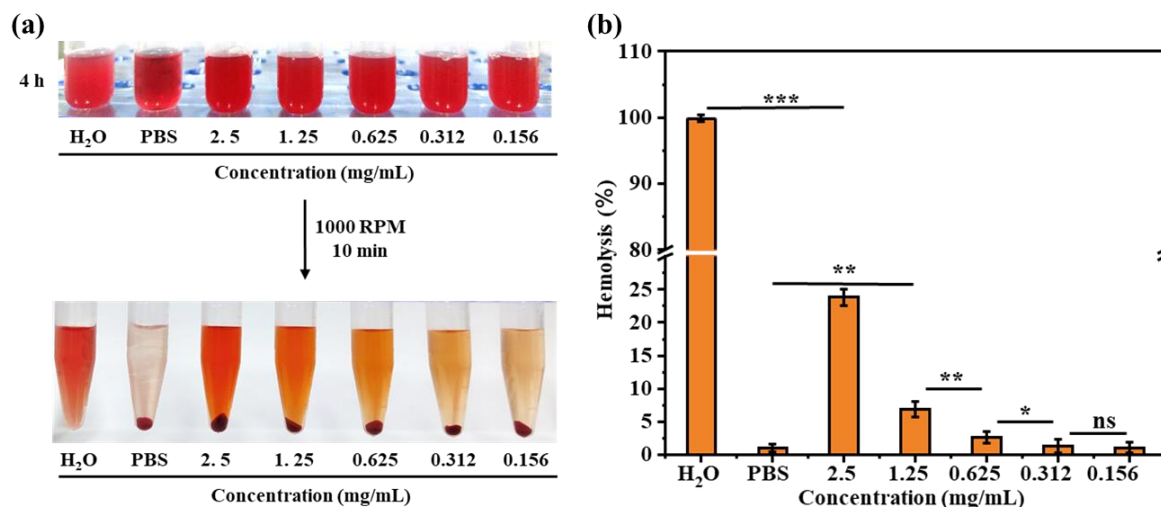


图 3-1 DMPM 溶血效果示意图 (a) 和溶血率测定 (b) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns, 无显著差异, $P > 0.05$)

Figure 3-1 Schematic diagram of hemolytic effect of DMPM (a) and the determination of hemolysis rate (b). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns, not significant, $P > 0.05$)

3.6.2 体外对 RAW264.7 和 MEF 的生物相容性研究

通过 CCK-8 法检测小鼠成纤维细胞 (MEF) 和小鼠单核巨噬细胞白血病细

胞(RAW264.7)的细胞活力。结果表明当 DMPM 中 DOX 浓度为 0.75~12 $\mu\text{g/mL}$ 时, RAW264.7 和 MEF 细胞活力从 90%逐渐下降至约 80%。在 DOX 浓度为 12 $\mu\text{g/mL}$ 时, RAW264.7 和 MEF 的细胞活力仍可达到 80% (图 3-2 a-b)。此外, 在正常组织 pH 下, DMPM 中的 DOX 释放水平较低, 与药物释放结果相匹配。

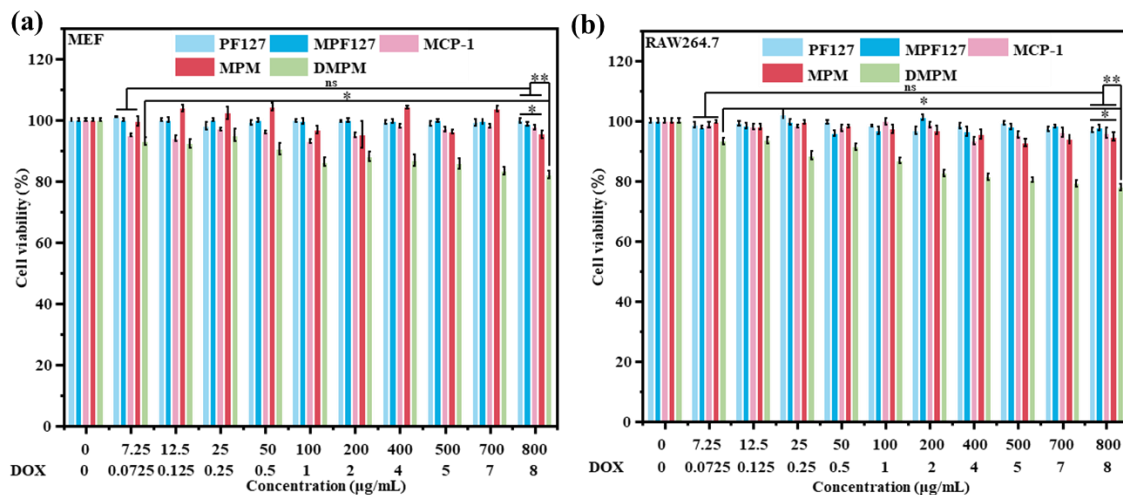


图 3-2 MEF (a) 和 RAW264.7 (b) 的细胞活力检测 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns, 无显著差异, $P > 0.05$)

Figure 3-2 Cell viability of MEF(a) and RAW264.7 (b). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns, not significant, $P > 0.05$)

3.6.3 体外巨噬细胞迁移分析

本研究通过跨膜迁移实验^[136, 172]检测了在 CCR2/MCP-1 轴的介导下, DMPM 自发结合在巨噬细胞(RAW264.7)表面组装一个背包(MA-DMPM), MA-DMPM 具有主动靶向性渗透到肿瘤区域。简言之, 巨噬细胞被培养在迁移膜的上层, 被 DMPM 和肿瘤募集, 从上层迁移到迁移膜的下层。对膜下迁移的 RAW264.7 进行结晶紫染色并拍照。如图 3-3 a-b 所示, 对照组和 MPF127 组几乎没有迁移细胞(紫点), 而 MCP-1、MPM、DMPM 组细胞迁移明显(图 3-3c-e)。与对照组相比, MCP-1、MPM、DMPM 的相对迁移率分别达到 170%、220%、210%(图 3-3 f), 结果表明 MCP-1 可以介导 DMPM 与 MA 结合组装背包(MA-DMPM), 其在 PF127 表面的 MCP-1 修饰具有相同的效果。此外, 该结果进一步证明了 CCR2/MCP-1 轴的相互作用可以广泛用于靶向递送系统。

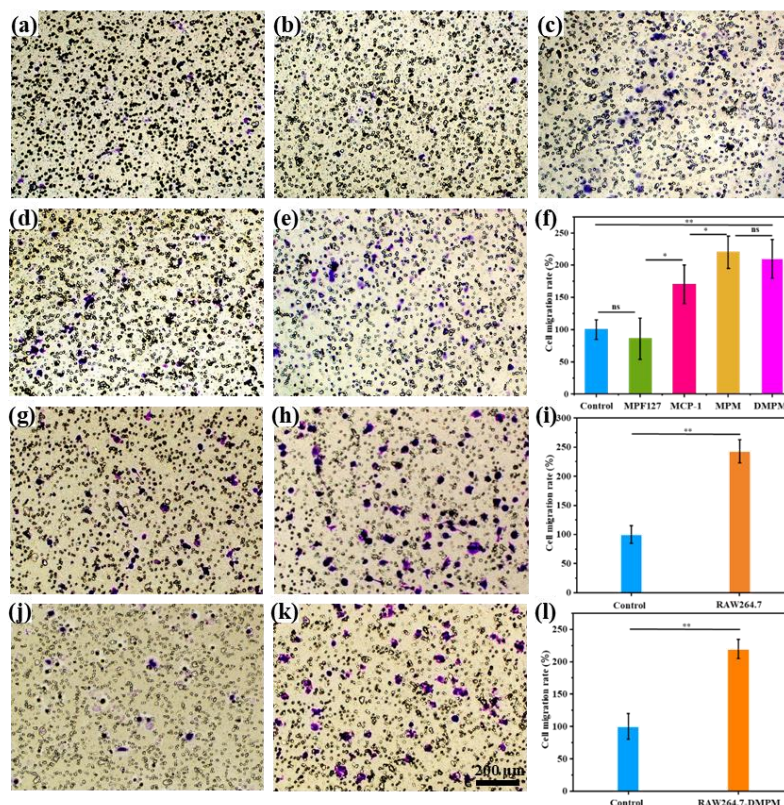


图 3-3 巨噬细胞迁移: 上室接种 RAW264.7, 下室空白 (a), 接种 MPF127 (b), MCP-1 (c), MPM (d) 和 DMPM (e), 细胞迁移率 (f)。单独 RAW264.7 (g, h) 和 RAW264.7-DMPM (j, k) 接种于上室, NCI-H1299 细胞接种于下室 (h, k) 或下室空白 (g, j), 细胞迁移率 (i, l) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns, 无显著差异, $P > 0.05$)

Figure 3-3 Macrophage migration: RAW264.7 was inoculated in the upper chamber and the down chamber were inoculated with control (a), MPF127 (b), MCP-1 (c), MPM (d) and DMPM (e), cell mobility (f). RAW264.7 alone (g, h) and RAW264.7-DMPM (j, k) were inoculated in the upper chamber, NCI-H1299 cells were inoculated in the down chamber (h, k) and blank of down chamber (g, j), cell mobility (i, l). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns, not significant, $P > 0.05$)

迁移实验进一步验证了 RAW264.7 和 RAW264.7-DMPM (MA-DMPM) 对 NCI-H1299 细胞的靶向归巢能力。首先, 上室仅接种 RAW264.7 细胞, 下室接种 DMEM 对照组 (图 3-3 g) 和 NCI-H1299 细胞组 (图 3-3 h)。NCI-H1299 细胞组的迁移细胞较对照组明显, 相对迁移率达到了 243% (图 3-3 i), 这可能是由于肿瘤细胞可以释放趋化因子并吸引 MA 到肿瘤区域^[173-176]。接下来, 我们进一步研究了 MA-DMPM 在体外趋化作用下可以募集到肿瘤区域。下室接种对照组 (图 3-3 j) 和 NCI-H1299 细胞组 (图 3-3 k), 上室接种 RAW264.7-DMPM, 仍然观察

到 MA-DMPM 的归巢靶向作用，相对迁移率约为 220%（图 3-3 1）。RAW264.7 与 RAW264.7-DMPM 相比，虽然相对迁移率有所下降，但可能与 RAW264.7 的蛋白受体被 DMPM 占据，RAW264.7 的 CCR2/MCP-1 轴相互作用减弱有关。结果表明，MA 可能通过归巢效应将 NPs DMPM 递送到肿瘤细胞中。与 MA 的仿生膜相比，活体 MA 作为背包可以更有效地将药物递送到肿瘤区域，且几乎不会引起机体的免疫排斥反应。

3.6.4 体外 DOX@MPF127-MCP-1 与巨噬细胞结合及在肿瘤部位释药研究

进一步验证巨噬细胞 RAW264.7 体外高效捕获 DMPM 组装 MA-DMPM 并在肿瘤区域释放 DOX。使用 Hoechst 33258 对 RAW264.7 进行染色（蓝色荧光），DOX 标记的 DMPM 发出红色荧光。如图 3-4 a 所示，RAW264.7 细胞表面的点状红色荧光表明 RAW264.7 细胞在体外能够成功捕获 DMPM^[136]。同时，将 RAW264.7-DMPM 与 NCI-H1299 细胞共培养，观察肿瘤区域 MA-DMPM 释放 DOX 的情况。在 RAW264.7 和 NCI-H1299 细胞中可以看到 DMPM 中 DOX 的红色荧光，这证实了 DOX 可以从 MA-DMPM 中释放并引起肿瘤摄取（图 3-4 b）从而影响肿瘤增殖。

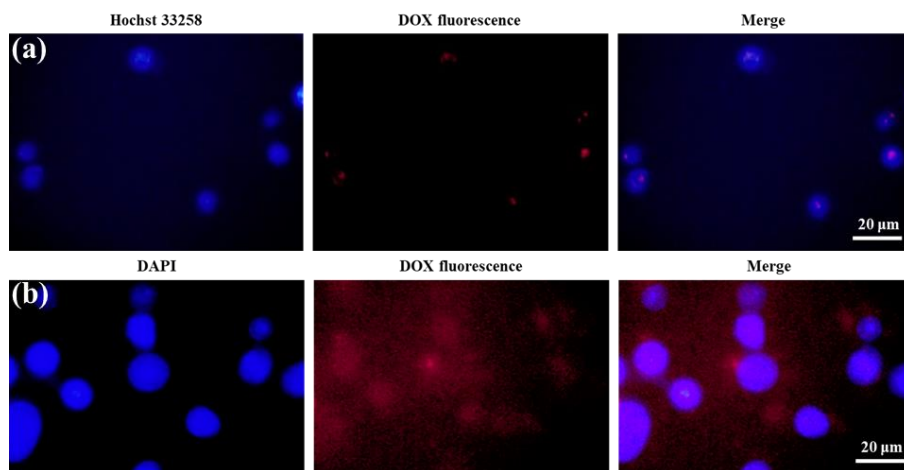


图 3-4 DMPM 靶向巨噬细胞结果 (a)，RAW264.7-DMPM 与 NCI-H1299 共孵育结果 (b)

Figure 3-4 The image of DMPM targeting macrophage (a), the image of RAW264.7-DMPM and NCI-H1299 co-incubation (b).

3.6.5 体外巨噬细胞与 DOX@MPF127-MCP-1 结合量评估

将 2 mg/mL DMPM 与 RAW264.7 孵育，分别在 0、1、2、4、6、8 h 用 DOX 浓度表达捕获的 DMPM 量，以量化巨噬细胞对 DMPM 的捕获量。如图 3-5 b 所示，RAW264.7 对 DMPM 的捕获量在 6 h 达到最大值（28 pg/cell），因此 DMPM 与 RAW264.7 孵育的最佳时间为 6 h。随后，检测不同浓度 DMPM（0、0.33、0.66、1、1.33、2 mg/mL）分别与 RAW264.7 孵育 6 h，离心后，沉淀呈红色。结果显示，当 DMPM 浓度为 2 mg/mL 时，RAW264.7 捕获的 DMPM 量达到 31 pg/cell，是 DMPM 浓度为 0.33 mg/mL 时捕获量的 4 倍（图 3-5 c）。结果表明，RAW264.7 在体外可有效捕获 DMPM，可作为 DMPM 的药物递送载体^[177, 178]。

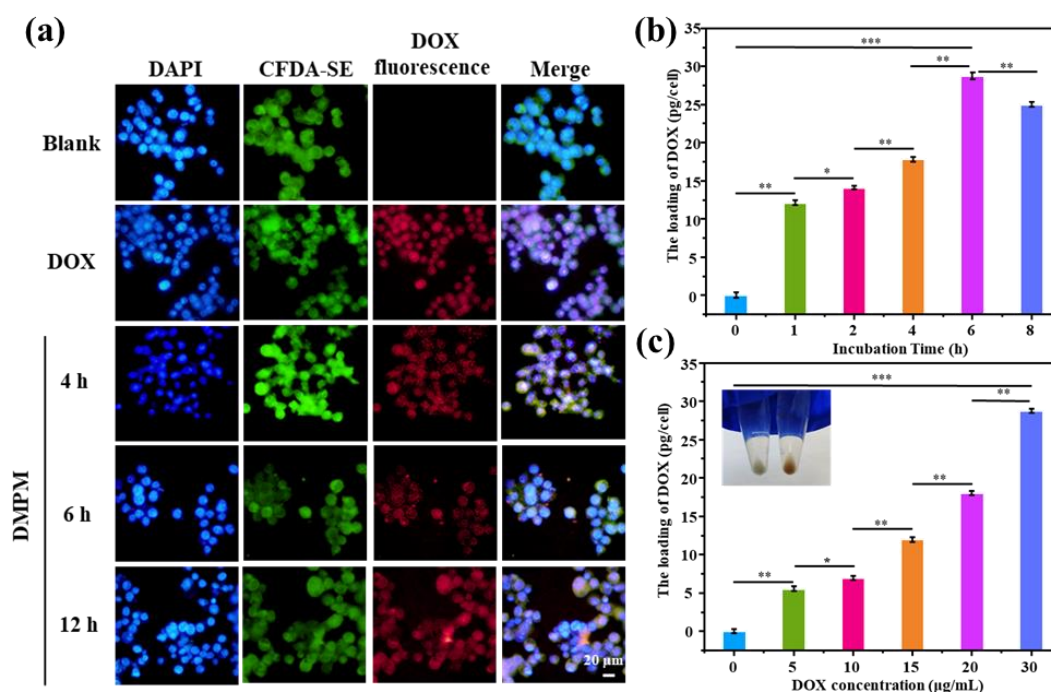


图 3-5 同浓度不同时间的 DMPM 与 RAW264.7 的荧光图 (a)，同浓度不同时间内的捕获量分析 (b)，不同浓度同时间的捕获量分析 (c) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Figure 3-5 The fluorescence image of RAW264.7 incubation with DMPM at different time (a), analysis of the amount of the DMPM captured by macrophage with the same concentration at different time (b), analysis of different concentrations at the same time of the DMPM captured by macrophage (c). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

采用半定量荧光分析法确定巨噬细胞捕获 DMPM 的最佳时间。将游离 DOX（5 $\mu\text{g/mL}$ ）和 DMPM 中 DOX（330 $\mu\text{g/mL}$ ）与 RAW264.7 共孵育，采用 CFDA-SE（绿色荧光）和 DAPI（蓝色荧光）对 RAW264.7 细胞和细胞核分别进行染色，

以区分 DOX（红色荧光）出现在细胞质中还是出现在细胞核中。游离 DOX 孵育的 RAW264.7 在 4 h 内细胞核内呈现红色荧光，而 DMPM 围绕在细胞核周围（图 3-5 c），呈淡红色点状分布，与细胞质重叠，几乎没有进入细胞核。随着培养时间的延长，DMPM 主要分布在 DOX 荧光表达的细胞质中。孵育 12 h 后，RAW264.7 捕获的 DMPM 量增加，同时伴随着 RAW264.7 细胞核内 DOX 荧光的增加，这可能是由于 RAW264.7 内化和吞噬 DMPM，开始裂解和释放 DOX^[179, 180]。结果表明，巨噬细胞捕获 DMPM 的最佳时间应控制在 12 h 内，以发挥巨噬细胞最大的转运 DMPM 效率。研究表明，纳米材料在体内循环一周约 4 小时^[94]，12 小时的孵育时间完全足以将 MA-DMPM 募集到 NCI-H1299 细胞附近。

3.6.6 体外 DOX@MPF127-MCP-1 对 NCI-H1299 细胞的毒性研究

采用 CCK-8 试剂盒验证 DMPM 的抗肿瘤能力，评价 DMPM 的抗肿瘤作用。如图 3-6 a 所示，PF127、MPF127、MCP-1 和 MPM 组即使在 800 $\mu\text{g/mL}$ 的高浓度下，NCI-H1299 细胞仍保持较高的细胞活力。而 DMPM 和 DOX 在低浓度下均表现出明显的抗肿瘤能力，当 DMPM 浓度为 800 $\mu\text{g/mL}$ 时，细胞存活率仅为 40%左右，此时的 DOX 浓度为 12 $\mu\text{g/mL}$ ，比等浓度游离 DOX 表现出更高的抗肿瘤能力（细胞存活率约 45%），这可能是由于普朗尼克能够抑制 P-糖蛋白降低了肿瘤细胞的耐药性^[181]。根据图 3-6 a 的结果，计算出 DMPM 的 IC_{50} 约为 9.15 $\mu\text{g/mL}$ （图 3-6 b），以 DOX 浓度表示。

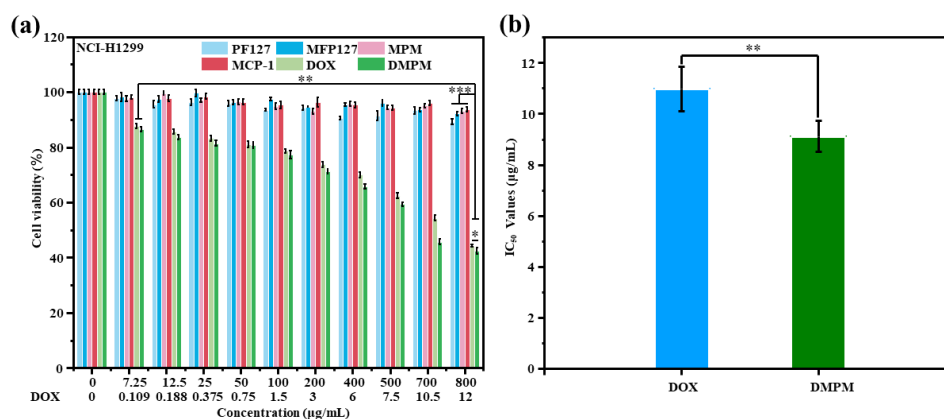


图 3-6 NCI-H1299 细胞活力测定 (a) 及 IC_{50} 值 (b) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Figure 3-6 The cell viability of NCI-H1299 (a) and the IC_{50} values (b). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,

*** $P < 0.001$)

3.6.7 体外细胞活死染色

对空白组、MPM 对照组、DOX 组和 DMPM 组进行活死细胞染色。如图 3-7 所示，在空白和 MPM 组的 NCI-H1299 细胞未见凋亡，说明其细胞活力较高（绿色荧光）。而随着 DMPM 中 DOX 浓度的增加，活细胞数减少，死亡细胞数增加（红色荧光），在 10 $\mu\text{g/mL}$ DOX 和 DMPM 时细胞凋亡数与存活数大致达到平衡，与细胞毒性结果相对应。

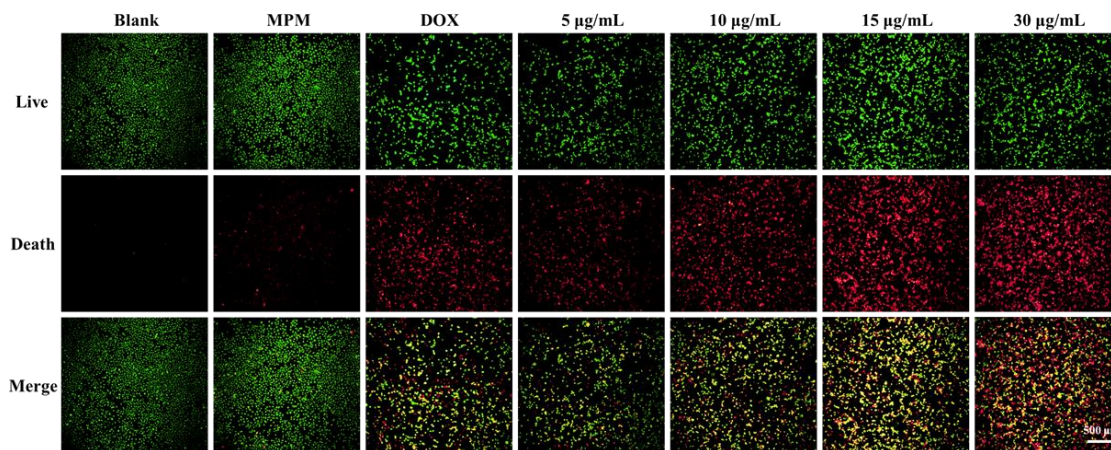


图 3-7 NCI-H1299 的细胞活死染色结果

Figure 3-7 Schematic diagram of cell Live/Death staining for NCI-H1299.

3.6.8 体外细胞摄取实验

肿瘤治疗的有效性取决于肿瘤细胞内吞的纳米载体的量^[182]。将 DMPM 与 NCI-H1299 细胞共孵育，定时观察荧光分布情况，进行流式荧光分析及荧光半定量分析细胞对 DMPM 的摄取情况。如图 3-8 a 所示，NCI-H1299 细胞在 0 h 时未观察到荧光，随后 DOX 的荧光强度随着孵育时间的延长逐渐增加，在 12 h 时达到较高水平，流式细胞术结果也显示出了相同的趋势，细胞内 DMPM 的荧光强度随着孵育时间的延长而增加（图 3-8 b）。荧光半定量分析结果表示（图 3-8 c），在 12 h 时细胞的平均荧光强度达到 37.58 AU，显示出 NCI-H1299 细胞核已被 DOX 完全侵入，这表明 DMPM 可在 12 h 内被 NCI-H1299 细胞吞噬并导致细胞死亡。上述结果进一步验证了 DMPM 中的 DOX 能够成功释放，DMPM 可被 NCI-H1299 细胞摄取以抑制肿瘤细胞增殖。

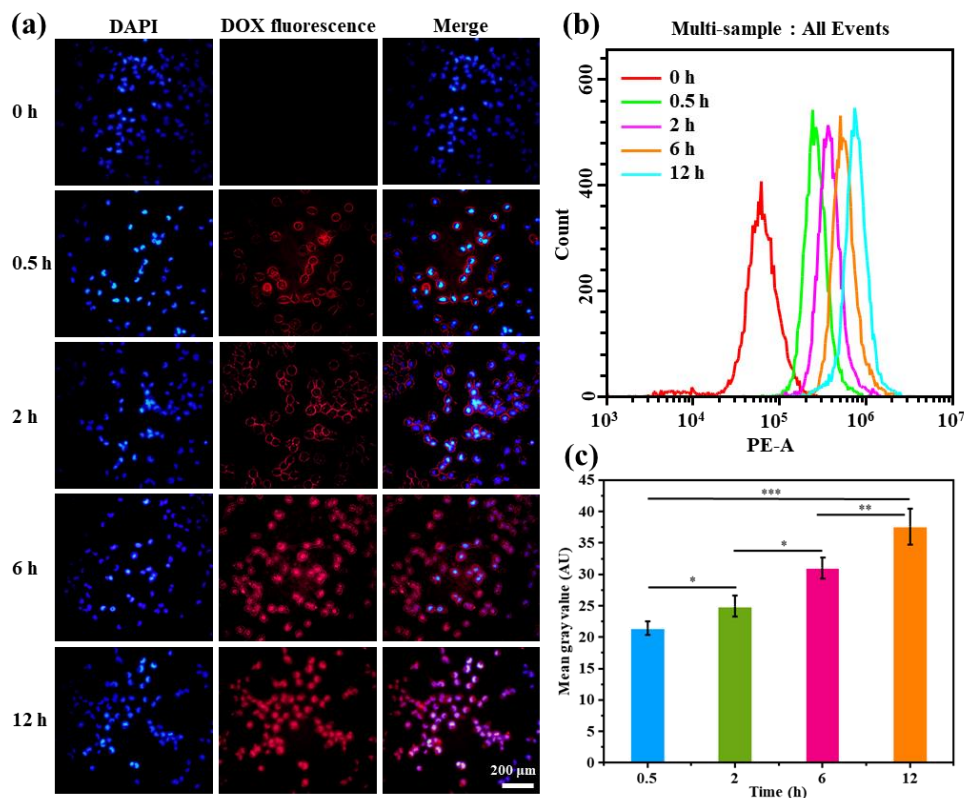


图 3-8 DMPM 与 NCI-H1299 细胞共孵育荧光图 (a)，流式细胞术分析 (b) 和荧光半定量分析 (c) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Figure 3-8 Fluorescence image of DMPM incubated with NCI-H1299 cells (a), flow cytometry analysis (b) and semi-quantitative fluorescence analysis (c). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

3.7 本章小结

本章延续上一章节对合成的 DMPM 纳米材料进行体外细胞毒性及靶向机理的验证。第一步是对材料的靶向性进行了验证，完成了细胞迁移实验，首先验证的是 MCP-1 是否具有靶向 RAW264.7 的能力，与 DMEM、MPF127 对照组相比，MCP-1 及 DMPM 都显示出了一定的靶向性；其次验证了单独 RAW264.7 与装载了 DMPM 的 RAW264.7 的靶向肿瘤的能力，与空白组进行比较，装载了 DMPM 的 RAW264.7 仍可以被肿瘤所募集并进行迁移，说明巨噬细胞可以作为背包，携带 DMPM 纳米材料，向肿瘤进行药物运输，显示出此主动运输方法的可行性。在进行细胞迁移试验后，研究了 NCI-H1299 细胞对 DMPM 的摄取能力以及 MPF127、DOX、MPM 以及 DMPM 对 NCI-H1299 的抑制作用，通过流式细胞仪的测定，可以看出，随着时间的延长，细胞内荧光强度越强，说明 DMPM 纳米

材料可以成功被肿瘤细胞所摄取。随后的 CCK-8 实验同样可以得出 DMPM 对 NCI-H1299 有一定的抑制作用，其抑制作用比单独使用 DOX 要强，说明普朗尼克可以有一定的化疗增敏的作用。为了验证 DMPM 对于肿瘤细胞抑制的同时，对于正常细胞是否也有伤害，使用了 RAW264.7 以及 MEF 细胞进行了生物安全性评估，结果表明，即使 DMPM 的浓度达到了 800 $\mu\text{g/mL}$ 时，也没有对 MEF 及 RAW264.7 有很高的伤害，其生物安全性较好，且溶血实验进一步证明了其在溶血浓度 5% 范围内可达 1 mg/mL 以上，其适于应用在生物体内实验，且不会对生物健康造成危害。

第 4 章 DOX@MPF127-MCP-1 载体用于肿瘤靶向治疗的体内研究

4.1 引言

在体外，本课题对 DMPM 进行相关表征以及药物释放效果进行了测定，结果表明 DMPM 纳米材料具有一定的稳定性且形貌均一，随后进行了体外细胞实验进一步证明了 DMPM 纳米材料的生物安全性，并通过迁移实验验证了 DMPM 与巨噬细胞的可结合性以及肿瘤募集趋向性，最后对 DMPM 的肿瘤抑制效果进行了体外细胞层面的评估，结果都表明该纳米材料可对肿瘤有一定的抑制效果，然而在体内该材料是否具有同样的靶向抑制效果还尚待验证。本章即研究验证 DMPM 纳米材料在小鼠体内的应用效果及生物安全性。

4.2 DOX@MPF127-MCP-1 的体内抗肿瘤效果研究

4.2.1 动物模型的建立

将 20 只 BALB/c 雌性裸鼠饲养于恒温 22℃，相对湿度 50% 的小鼠房内，使用 NCI-H1299 细胞对该裸鼠进行腋下肿瘤接种（ 1×10^7 细胞/mL, 100 μ L），以建立 NCI-H1299 细胞肿瘤模型，而后定期对裸鼠肿瘤的生长状态进行观察。

4.2.2 体内抗肿瘤效果的研究

当肿瘤生长至 100 mm³ 左右时，将 20 只裸鼠分为 4 组（每组 5 只），分别给予 PBS、MPM、DOX 和 DMPM 治疗。将这些溶液注射到小鼠体内，各组隔日按 2 mg/kg 剂量注射给药并测量记录小鼠肿瘤体积和体重。

4.2.3 肿瘤 H&E 及 TUNEL 染色

在进行体内抗肿瘤效果评估后，将小鼠进行处死并取其肿瘤组织分别做好标记，使用 4% 的多聚甲醛固定组织切片，之后进行反复冲洗，再按照脱水、脱蜡

等步骤进行 H&E 染色，最后统计拍照。同样的，将切好的肿瘤组织片按照相同的处理进行 TUNEL 染色并进行拍照。

4.3 DOX@MPF127-MCP-1 的体内肿瘤靶向性研究

为了进一步证明 MA-DMPM 在体内的肿瘤靶向作用，我们使用了 NCI-H1299 细胞模型，通过监测 Cy5 标记的 DMPM (Cy5-DMPM) 的荧光分布来研究 MA-DMPM 的肿瘤靶向性。当肿瘤生长至 100 mm^3 时，尾静脉注射 Cy5-DMPM，并在不同时间点 (0.5、1、2、4、6、8、12 和 24 h) 进行 IVIS 成像^[183]。此外，为了探索 DMPM 在肿瘤中的体内富集情况，将裸鼠尾静脉注射 Cy5-DMPM 24 h 后处死，利用 IVIS 对心、肝、脾、肺、肾等主要器官和肿瘤组织进行成像。采用 IVIS 和 Image-J 软件对荧光成像数据进行分析。

4.4 DOX@MPF127-MCP-1 的体内生物安全性研究

4.4.1 小鼠主要器官 H&E 染色

在进行体内抗肿瘤效果评估后，处死小鼠取其主要器官 (心、肝、脾、肺、肾) 并做好标记，参照 4.2.3 的步骤对小鼠主要器官进行 H&E 染色。

4.4.2 小鼠血生化及炎症因子水平分析

在进行体内抗肿瘤效果评估后，取一半裸鼠全血，分离血清，分析其生理生化及炎症因子指标。将全血标本 3000 rpm/min 离心 15 min ，取上清使用全自动生化仪自动测定小鼠肝肾功能指标 (谷丙转氨酶 ALT、门冬氨酸氨基转移酶 AST、肌酐 CREA 和尿素 UREA)。同样的，离心后将血清标本放于 -20°C 或 -80°C 保存，而后按照包被、封闭、洗涤、加样等步骤进行 ELISA 测定。

4.5 结果与讨论

4.5.1 DOX@MPF127-MCP-1 的体内抗肿瘤效果评价

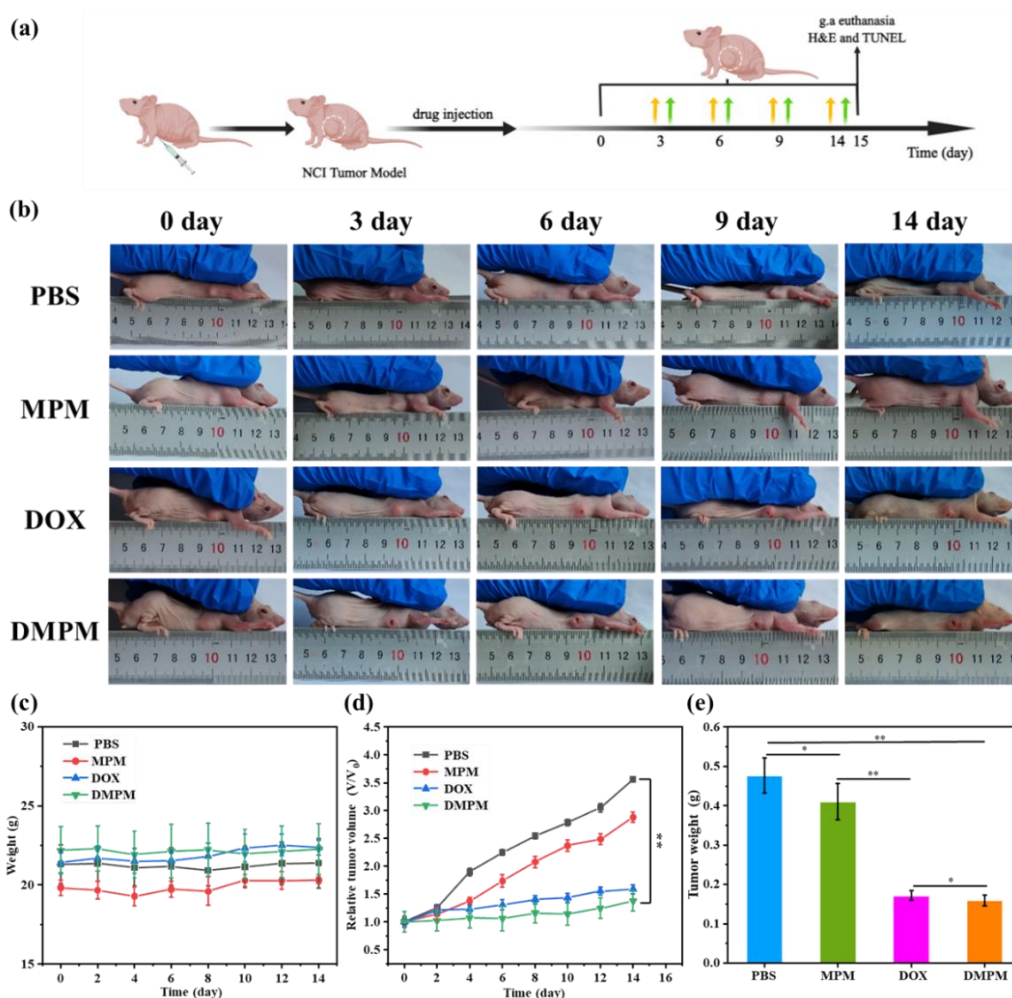


图 4-1 小鼠实验流程图 (a), 分阶段给药代表性图像 (b), 小鼠体重变化 (c), 肿瘤相对体积变化 (d) 和肿瘤质量 (e) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Figure 4-1 Flow chart of mice experiment (a), representative images of phased administration (b), body weight change in mice (c), the relative volume change of tumor (d) and the tumor weight (e).

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

为了进一步评估 MA-DMPM 在荷瘤小鼠中的抗肿瘤作用, 在接种 NCI-H1299 细胞后, 当肿瘤体积接近 100 mm^3 时^[94], 将小鼠按照肿瘤大小随机分为 PBS 组、MPM 组、游离 DOX 组和 DMPM 组, 每隔 2 天静脉注射 $100 \mu\text{L}$ 不同药物, 实验流程如图所示 (图 4-1 a)。如图 4-1 b 所示, 注射 DMPM 后, 肿瘤被明显抑制。游离 DOX 组的治疗效果较 DMPM 组弱, 这可能是由于普朗尼克

使得肿瘤细胞内的 P-糖蛋白的含量降低导致肿瘤细胞耐药性降低，并且 DMPM 可以结合 MA 组装 MA-DMPM 背包，靶向肿瘤区域，提高 DOX 的疗效。对肿瘤体积（图 4-1 d）和肿瘤重量（图 4-1 e）的记录并分析，结果显示 DMPM 显著抑制肿瘤生长，而小鼠体重无明显变化（图 4-1 c），说明 DMPM 具有良好的抗肿瘤能力和生物安全性。

4.5.2 肿瘤 H&E 和 TUNEL 染色

通过 H&E 和 TUNEL 染色分析肿瘤组织细胞凋亡情况，与对照组相比，DMPM 组肿瘤细胞凋亡明显（图 4-2 a-b），荧光半定量分析得出凋亡率达到 63.33%（图 4-2 c），而游离 DOX 组细胞凋亡率仅为 51.29%。结果表明，DMPM 能够有效到达小鼠体内肿瘤部位并释放 DOX 从而引起肿瘤细胞凋亡。

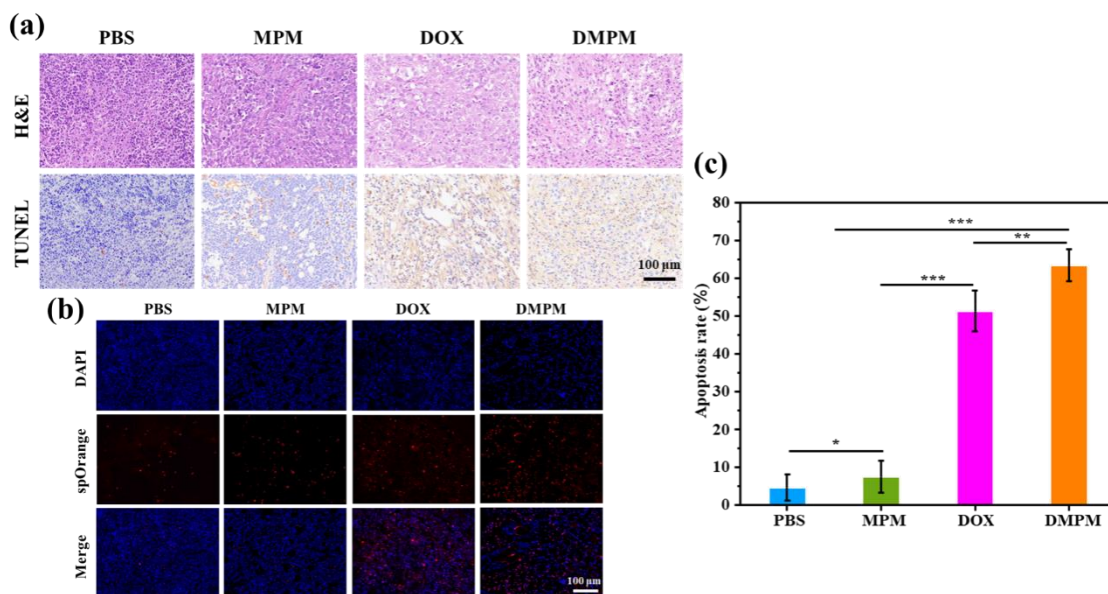


图 4-2 各处理组的小鼠肿瘤 H&E 及白光 TUNEL 染色 (a)，荧光 TUNEL 染色 (b) 和凋亡率分析 (c) (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)

Figure 4-2 The tumor H&E and white light TUNEL staining of mouse in each treatment group (a), fluorescent TUNEL staining (b) and the apoptosis rate (c). (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)

4.5.3 DOX@MPF127-MCP-1 的体内肿瘤靶向性评价

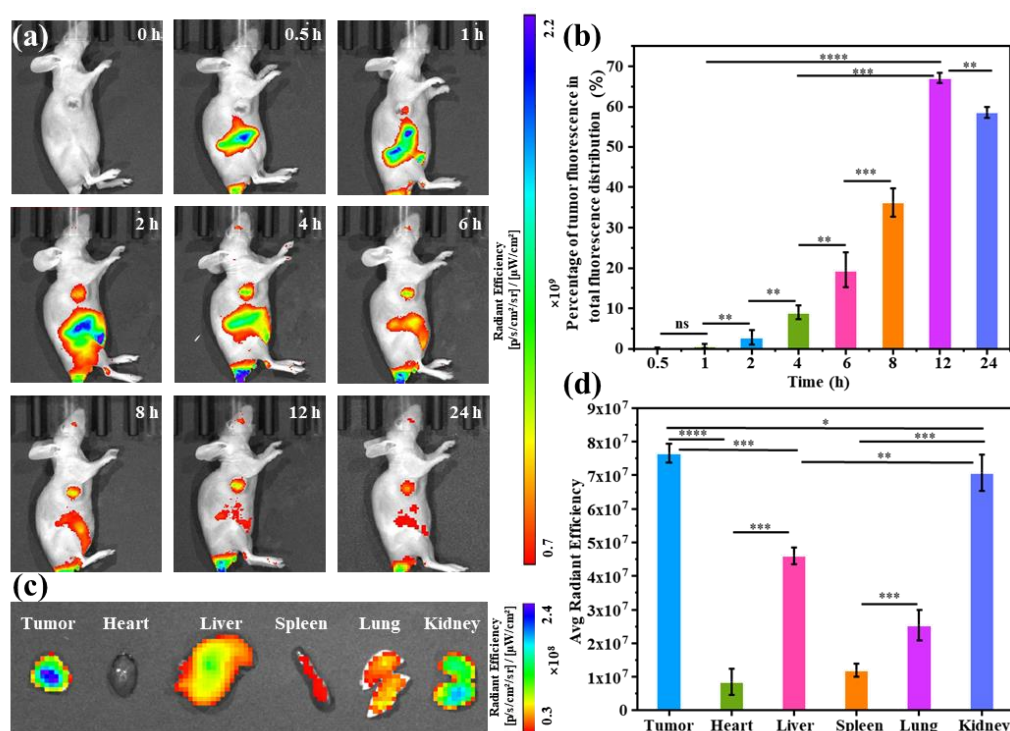


图 4-3 不同时间段小鼠体内 IVIS 成像图 (a), 体内荧光半定量分析 (b), 不同器官体外 IVIS 成像图 (c) 和体外器官荧光半定量分析 (d) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Figure 4-3 IVIS imaging of mice in different time periods (a), semi-quantitative fluorescence analysis *in vivo* (b), IVIS images of different organs *in vitro* (c) and semi-quantitative fluorescence analysis of organs *in vitro* (d). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

体外迁移实验结果初步证实了 MA-DMPM 作为主动靶向药物通过募集作用可以渗透到肿瘤区域, 但仍需进一步证明其在体内的靶向作用。通过 IVIS 监测 Cy5 标记的 DMPM (Cy5-DMPM) 在体内的荧光分布, 研究 Cy5-DMPM 在 NCI-H1299 细胞肿瘤模型小鼠体内的募集、组装和靶向性。结果显示, DMPM 首先在肝和肾中富集, 然后逐渐到达肿瘤区域并聚集 (图 4-3 a)。Cy5-DMPM 注射后 1 h 内在肿瘤区域可见少量荧光, 定量分析显示荧光占比为 0.62% (图 4-3 b)。随着时间的推移, 肝、肾部位荧光逐渐减弱, 而肿瘤部位荧光开始增强。肿瘤部位的荧光强度占比从 2 h 的 2.76% 增加到 12 h 的 67.16%, 在 24 h 仍保持在 58.58%, 而肝、肾的荧光强度在 24 h 时较低。24 h 后使用气体麻醉处死裸鼠, 收集小鼠主要器官和肿瘤组织进行组织荧光成像, 结果显示肿瘤组织具有最强的荧光强度, 其次是肝和肾组织 (图 4-3 c)。定量分析肿瘤中 Cy5-DMPM 的平均荧光强度约

为 7.66×10^7 (图 4-3 d), 其次是肾组织 (7.07×10^7), 最低的是心脏 (8.53×10^6), 说明该材料对心脏毒性较小, 可以有效减少 DOX 的心脏毒性。这些结果进一步表明, 在 CCR2/MCP-1 轴的介导下, DMPM 可以主动结合 MA 组装 MA-DMPM 背包, 从而实现体内主动靶向递送药物。MA 介导的载药纳米系统可在肿瘤内聚集并维持一定时间, 对肿瘤治疗有显著效果。

4.5.4 小鼠主要器官 H&E 染色

另外, 观察各组小鼠主要脏器(心、肝、脾、肺、肾)的组织形态学。与对照组相比, 不同治疗组的主要器官均未出现显著的组织学异常(图 4-4), 进一步表明 DMPM 具有出色的生物安全性。

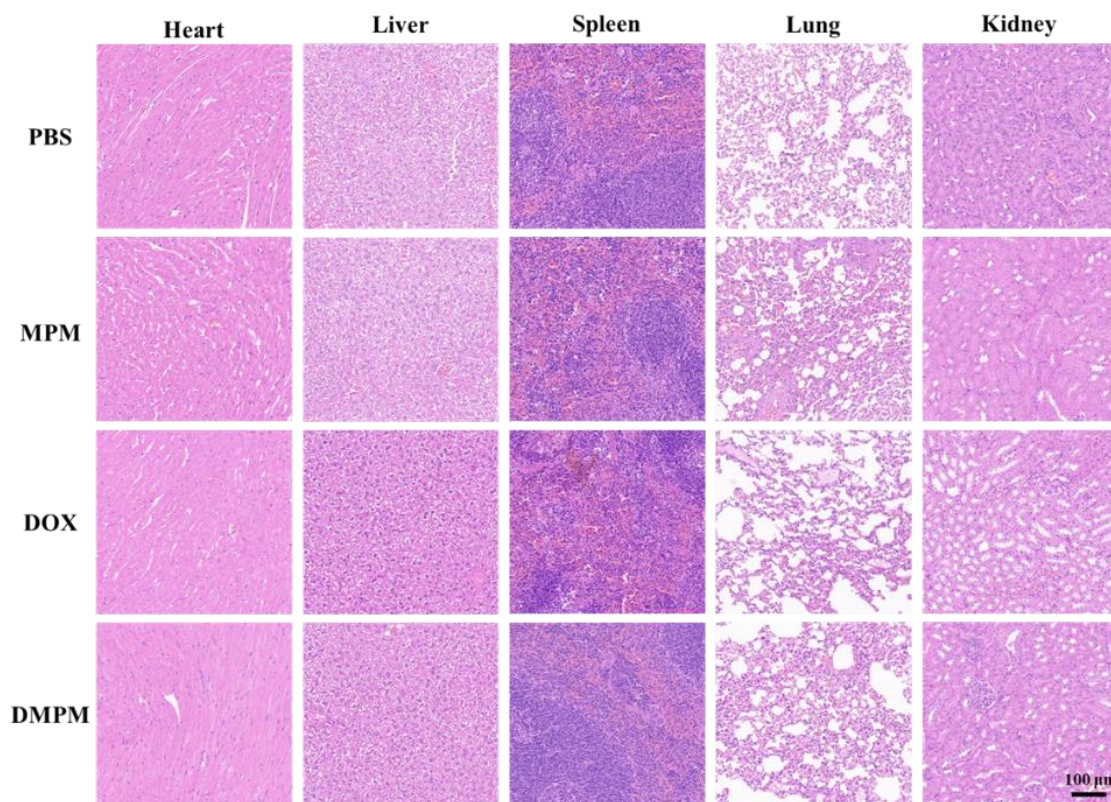


图 4-4 各处理组的小鼠主要器官 H&E 染色

Figure 4-4 H&E staining of major organs of mice in each treatment group.

4.5.5 小鼠血生化分析

提取小鼠血清，检测肝功能指标 ALT、AST、CREA 和 UREA。与对照组相比，DMPM 组小鼠的肝肾功能无明显变化，表明 DMPM 在体内具有良好的生物安全性（图 4-5 a-d）。

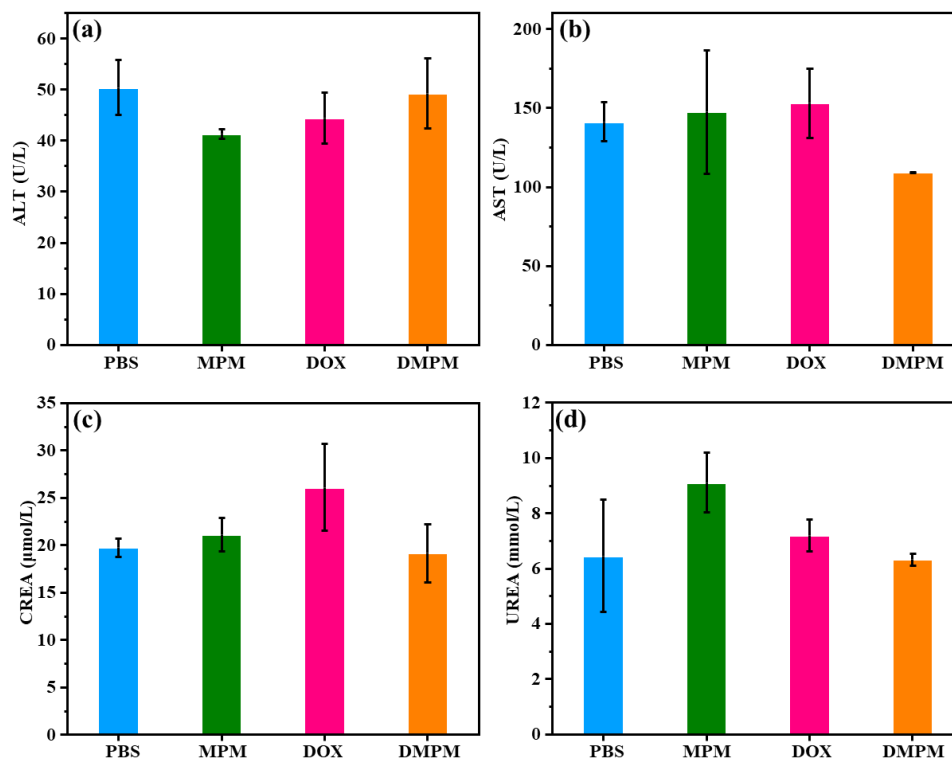


图 4-5 小鼠肝功能指标：ALT (a) 和 AST (b)；肾功能指标：CREA (c) 和 UREA (d)

Figure 4-5 The liver function indexes of mice in each treatment group: ALT (a) and AST (b).

Renal function indicators: CREA (c) and UREA (d)

4.5.6 小鼠体内炎症因子水平评估

为了检测小鼠的不良免疫反应，使用 Elisa 试剂盒检测血液中炎症因子的分泌水平，包括白细胞介素-6 (IL-6)、IL-12、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和干扰素- γ (IFN- γ)。通过检测结果可以看出，血清中的 IL-6 水平无显著变化，表明进入外源性 DMPM 未引起体内的全身性免疫毒性^[184]（图 4-6 a）。同时，IL-12、TNF- α 和 IFN- γ 轻度升高，表明 DMPM 可以促进免疫应答，从而进一步在免疫层面可能会抑制肿瘤的生长繁殖（图 4-6 b-d）。

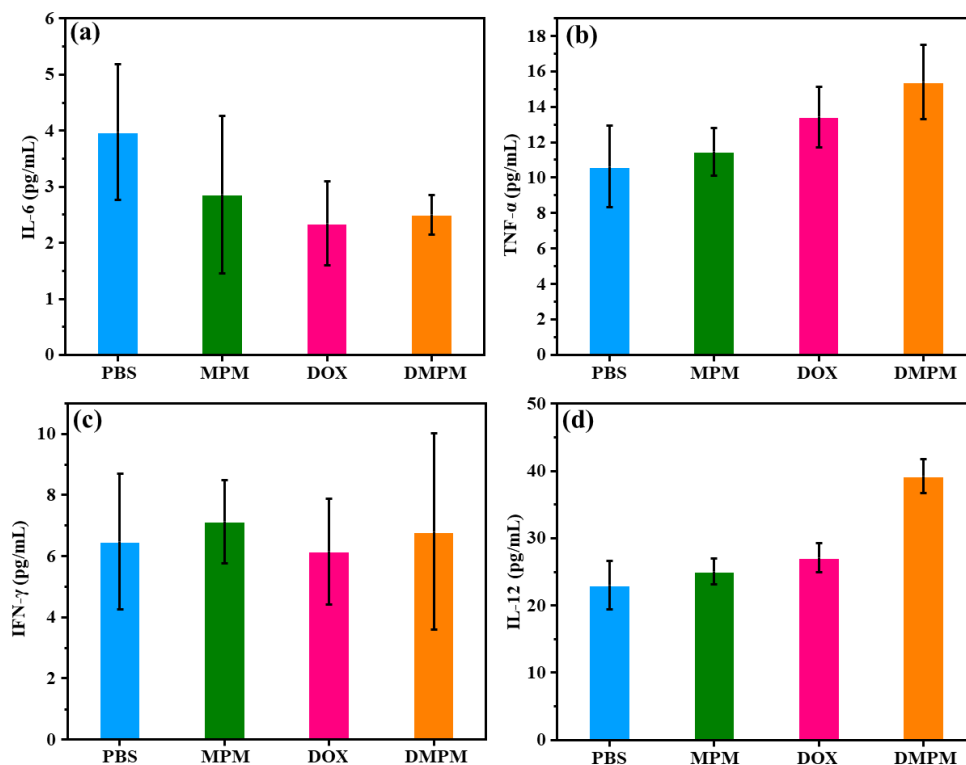


图 4-6 小鼠炎症因子 ELISA 分析：IL-6 (a)，IL-12 (b)，TNF- α (c) 和 IFN- γ (d)

Figure 4-6 ELISA analysis of inflammatory factors in mice of each treatment group: IL-6 (a), IL-12 (b), TNF- α (c) and IFN- γ (d).

4.6 本章小结

本章延续了第三章的思路进行后续的体内实验，更加深入探究了 DMPM 纳米材料在体内的作用效果及机理。通过建立 NCI-H1299 肿瘤小鼠模型，探究了 DMPM 在体内的作用效果，结果显示 DMPM 在体内仍然有很强的肿瘤抑制性，且比单独使用 DOX 要强，这与毒性试验对应。小鼠体重变化与心、肝、脾、肺、肾切片 H&E 染色以及肝肾功能指标分析进一步表明在体内的治疗过程中，DMPM 并不会对小鼠机体产生副作用，从而影响小鼠正常的生理活动，生物安全性较高。在对小鼠进行体内荧光成像时，可以清晰的看出 DMPM 聚集在肿瘤部位且随着肝肾代谢完成，肿瘤部位的荧光仍然较为强烈，说明 DMPM 在体内可以靶向巨噬细胞并被肿瘤细胞募集转运到肿瘤部位，DMPM 的靶向输送能力得到了验证。

肿瘤的 H&E 切片染色及 TUNEL 染色可以看出在体内肿瘤模型经过 DMPM 治疗之后，肿瘤的凋亡率随之升高，与单独 DOX 治疗结果相对比，DMPM 治疗

后的肿瘤凋亡率达到 63.33%，而 DOX 仅有 51.29%，相比较体外细胞毒性实验，显示出巨噬细胞作为载体能够有效输送 DMPM 到达肿瘤部位附近，提高单一 DMPM 的作用效果。ELISA 实验结果表明 DMPM 实验组的小鼠体内的白细胞介素-6 并没有发生太大的变化，表明 DMPM 纳米材料不会对小鼠造成免疫应激反应，同时体内的炎症因子水平略微上升，表明 DMPM 可以上调小鼠体内的免疫应答，促进小鼠机体本身对肿瘤的抑制作用。简而言之，合成的 DMPM 纳米材料对于抗肿瘤的应用具有一定的潜力。

结论与展望

纳米材料靶向输送是当前肿瘤治疗的研究热点，本文通过将 MCP-1 连接在普朗尼克表面，再将 DOX 负载在普朗尼克疏水内核中，联合化疗与靶向治疗，克服了 DOX 的药物副作用的同时将药物递送到肿瘤部位。构建的 DMPM 的纳米颗粒通过扫描电镜、透射电镜、电位、粒径、红外、紫外等表征，验证了其成功合成并具有良好的尺寸和分散性。通过溶血与正常细胞活力分析证明了纳米材料的安全性，通过迁移实验验证了 MCP-1 的巨噬细胞靶向性及巨噬细胞的肿瘤趋向性，为体内实验提供了良好的基础。

以 NCI-H1299 为研究对象，评估了 DMPM 的体外抗肿瘤效果，结果显示 DMPM 可以被 NCI-H1299 细胞摄取，并具有一定的杀伤作用。在建立的动物实验模型中，DMPM 与巨噬细胞相联合，显示出了良好的靶向肿瘤效果，体内 IVIS 实验结果表明 MA-DMPM 在体内能够聚集在肿瘤部位，靶向肿瘤表现良好的实验结果。综上所述，本文构建的 CCR2/MCP-1 轴介导的巨噬细胞主动靶向药物输送系统可以用于药物的输送及治疗，为抗肿瘤的研究提供了新的思路与方式，具有良好的研究前景。

通过本次研究，我们了解了巨噬细胞的靶向机理及作用在肿瘤的方式，构建了以巨噬细胞为载体的药物输送方式，提高了化疗药物在体内的治疗效果，但本文还存在很多问题值得深入思考。首先是在体外的细胞毒性测研究时，我们发现 DMPM 单独作用于肿瘤时具有比单一 DOX 所展现的效果强，查阅相关文献发现这可能是由于普朗尼克的存在导致肿瘤细胞表面的 P-蛋白的含量降低，从而降低了肿瘤细胞的耐药性，但对于普朗尼克的肿瘤抗性我们并没有做太多的验证，因此，本文可以基于这一点进一步研究普朗尼克的肿瘤抑制效果。其次就是在进行体内实验时，对于体内巨噬细胞装载 DMPM 的量我们未能进行测定，一方面是由于 DMPM 的不仅作用于巨噬细胞，而且也作用于肿瘤，经代谢产出的 DMPM 的量不能代表巨噬细胞在体内与巨噬细胞结合的量，所以这也是下一步重点研究的对象。总而言之，本文在提供了一种新的肿瘤靶向治疗方式的同时，也存在一些待解决的问题，在后续的研究中，这些问题将被深入探讨，以为更加科学的肿瘤治疗及临床提供思路。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Wagle N S, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] Wu Y, Pan X, Xie H, et al. Research progress of biomineralization for the diagnosis and treatment of malignant tumors [J]. Frontiers in Pharmacology, 2023, 14: 1335109.
- [3] 胡志强, 游伟程, 潘凯枫等. 中、美两国癌症流行特征分析——《2023 美国癌症统计报告》解读[J]. 科技导报, 2023, 41(18): 18-28.
- [4] Cao W, Chen H D, Yu Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chinese Medical Journal, 2021, 134(7): 783-791.
- [5] He S Y, Xia C F, Li H, et al. Cancer profiles in China and comparisons with the USA: a comprehensive analysis in the incidence, mortality, survival, staging, and attribution to risk factors [J]. Science China-Life Sciences, 2024, 67(1): 122-131.
- [6] Cai Y, Chen W, Wang X, et al. Contemporary trends on expenditure of hospital care on total cancer and its subtypes in China during 2008–2017 [J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2021, 33(5): 627-636.
- [7] 健康中国行动——癌症防治行动实施方案（2023—2030 年）[J]. 中国肿瘤, 2023, 32(12): 887-890.
- [8] Li J, Tong D, Lin J. Current status of cancer starvation therapy [J]. Zhejiang da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Zhejiang University Medical sciences, 2022, 51(2): 241-250.
- [9] Tynga I M, Abrahamse H. Nano-Mediated Photodynamic Therapy for Cancer: Enhancement of Cancer Specificity and Therapeutic Effects [J]. Nanomaterials, 2018, 8(11): 923.
- [10] Chakraborty C, Sharma A R, Sharma G, et al. The novel strategies for next-generation cancer treatment: miRNA combined with chemotherapeutic agents for the treatment of cancer [J]. Oncotarget, 2018, 9(11): 10164-10174.
- [11] Xu H, Zhao L, Bai Y F, et al. Research Progress in Cancer Treatment of Aptamer Functionalized Gold Nanorods [J]. Chinese Journal of Inorganic Chemistry, 2022, 38(7): 1226-1240.
- [12] Carretta A, Muriana P, Ciriaco P, et al. Current and Future Issues in the Surgical Treatment of Thymic Epithelial Tumors: a Review [J]. Indian Journal of Surgery, 2023, 85(S2): 570-583.
- [13] 郑茂胜, 巫志华, 邱耿锋. 新辅助化疗联合手术治疗食管癌的效果 [J]. 中国卫生标准管理, 2023, 14(22): 137-140.
- [14] Zhou H R, Zhang M X, Cao H H, et al. Research Progress on the Synergistic Anti-Tumor Effect of Natural Anti-Tumor Components of Chinese Herbal Medicine Combined with Chemotherapy Drugs [J]. Pharmaceuticals, 2023, 16(12): 1734.
- [15] Mei L, Liu Y Y, Rao J D, et al. Enhanced Tumor Retention Effect by Click Chemistry for Improved Cancer Immunotherapy [J]. Acs Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(21): 17582-17593.
- [16] Bergman P J. Cancer Immunotherapy [J]. The Veterinary clinics of North America Small animal practice, 2023, 54(3): 441-468.
- [17] Zhang L, Li C X, Wan S S, et al. Nanocatalyst-Mediated Chemodynamic Tumor Therapy [J]. Advanced Healthcare Materials, 2022, 11(2): 2101971.
- [18] Duan S F, Hu Y L, Zhao Y, et al. Nanomaterials for photothermal cancer therapy [J]. Rsc

- Advances, 2023, 13(21): 14443-14460.
- [19] Ulfo L, Costantini P E, Di Giosia M, et al. EGFR-Targeted Photodynamic Therapy [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(2): 241.
- [20] Ding Y, Wang C W, Ma Y X, et al. Tumor microenvironment responsive polypeptide-based supramolecular nanoprodrugs for combination therapy [J]. *Acta Biomaterialia*, 2022, 146: 396-405.
- [21] Peng S, Yuan X, Li H, et al. Recent progress in nanocarrier-based drug delivery systems for antitumour metastasis [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, 252: 1152590.
- [22] Mihlon F, Ray C, Messersmith W. Chemotherapy Agents: A Primer for the Interventional Radiologist [J]. *Seminars in Interventional Radiology*, 2010, 27(04): 384-390.
- [23] Tilsed C M, Fisher S A, Nowak A K, et al. Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action [J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 960317.
- [24] Akhtar N, Mohammed H A, Yusuf M, et al. SPIONs Conjugate Supported Anticancer Drug Doxorubicin's Delivery: Current Status, Challenges, and Prospects [J]. *Nanomaterials*, 2022, 12(20): 3686.
- [25] Dragojevic S, Turner L, Raucher D. Circumventing Doxorubicin Resistance Using Elastin-like Polypeptide Biopolymer-Mediated Drug Delivery [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(4): 2301.
- [26] Zhang L, Guo Q L, Zheng R X, et al. Zwitterionic Targeting Doxorubicin-Loaded Micelles Assembled by Amphiphilic Dendrimers with Enhanced Antitumor Performance [J]. *Langmuir*, 2023, 39(13): 4766-4776.
- [27] Williams J B, Buchanan C M, Pitt W G. Codelivery of Doxorubicin and Verapamil for Treating Multidrug Resistant Cancer Cells [J]. *Pharmaceutical nanotechnology*, 2018, 6(2): 116-123.
- [28] Hossain M B, Halder Neer A H. Chemotherapy [J]. *Cancer treatment and research*, 2023, 185: 49-58.
- [29] Burns C V, Edwin S B, Szpunar S, et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity in an outpatient setting [J]. *Pharmacotherapy*, 2021, 41(2): 184-190.
- [30] 李国强, 席孝忠, 陈洋. 吉西他滨和顺铂新辅助化疗联合手术治疗非小细胞肺癌的临床观察 [J]. *实用癌症杂志*, 2023, 38(09): 1533-1559.
- [31] Cai J, Wang J, Liu M B, et al. Advances of multifunctional hydrogel-based therapy system for postoperative treatment of tumor [J]. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2023: 2255721.
- [32] Chen H, Han Z, Luo Q, et al. Radiotherapy modulates tumor cell fate decisions: a review [J]. *Radiation Oncology*, 2022, 17(1): 196.
- [33] Hayes J D, Dinkova-Kostova A T, Tew K D. Oxidative Stress in Cancer [J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(2): 167-197.
- [34] Baskar R. Emerging role of radiation induced bystander effects: Cell communications and carcinogenesis [J]. *Genome integrity*, 2010, 1(1): 13.
- [35] Durante M, Loeffler J S. Charged particles in radiation oncology [J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2010, 7(1): 37-43.
- [36] Liang S, Zhou G, Hu W. Research Progress of Heavy Ion Radiotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(4): 2316.
- [37] Yu S, Wang Y, He P, et al. Effective Combinations of Immunotherapy and Radiotherapy for Cancer Treatment [J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 809304.

- [38] Wu F, Xue H, Li X, et al. Enhanced targeted delivery of adenine to hepatocellular carcinoma using glycyrrhetic acid-functionalized nanoparticles in vivo and in vitro [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 131: 110682.
- [39] Younis M A, Tawfeek H M, Abdellatif A A H, et al. Clinical translation of nanomedicines: Challenges, opportunities, and keys [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2022, 181: 114083.
- [40] Rauf A, Abu-Izneid T, Khalil A A, et al. Nanoparticles in clinical trials of COVID-19: An update [J]. *International Journal of Surgery*, 2022, 104: 106818.
- [41] Caraway C A, Gaitsch H, Wicks E E, et al. Polymeric Nanoparticles in Brain Cancer Therapy: A Review of Current Approaches [J]. *Polymers*, 2022, 14(14): 2963.
- [42] Chu S, Shi X, Tian Y, et al. pH-Responsive Polymer Nanomaterials for Tumor Therapy [J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 855019.
- [43] 肖婷婷. 多功能智能型凝胶药物递送系统的构建及其抗肿瘤联合治疗应用 [D]; 东华大学, 2023.
- [44] Porada C D, Almeida-Porada G. Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010, 62(12): 1156-1166.
- [45] Zhang B B, Yan W, Zhu Y J, et al. Nanomaterials in Neural-Stem-Cell-Mediated Regenerative Medicine: Imaging and Treatment of Neurological Diseases [J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(17): 1705694.
- [46] Mao Y, Zou C, Jiang Y, et al. Erythrocyte-derived drug delivery systems in cancer therapy [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2021, 32(3): 990-998.
- [47] Zhao J, Zhang L, Li P, et al. An Immunomodulatory Zinc - Alum/Ovalbumin Nanovaccine Boosts Cancer Metalloimmunotherapy Through Erythrocyte - Assisted Cascade Immune Activation [J]. *Advanced Science*, 2023, 11(6): 2307389.
- [48] Pei Z F, Lei H L, Cheng L. Bioactive inorganic nanomaterials for cancer theranostics [J]. *Chemical Society Reviews*, 2023, 52(6): 2031-2081.
- [49] Zhao L, Ge X Q, Zhao H J, et al. Double-Sensitive Drug Release System Based on MnO₂ Assembled Upconversion Nanoconstruct for Double-Model Guided Chemotherapy [J]. *Acs Applied Nano Materials*, 2018, 1(4): 1648.
- [50] Zhu L B, Kuang Z, Song P, et al. Gold nanorod-loaded thermosensitive liposomes facilitate the targeted release of ruthenium(II) polypyridyl complexes with anti-tumor activity [J]. *Nanotechnology*, 2021, 32(45): 455103.
- [51] Connor E E, Mwamuka J, Gole A, et al. Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity [J]. *Small*, 2005, 1(3): 325-327.
- [52] Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles [J]. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 2008, 4(1): 26-49.
- [53] Dhakshinamoorthy A, Navalón S, Asiri A M, et al. Gold - Nanoparticle - Decorated Metal - Organic Frameworks for Anticancer Therapy [J]. *ChemMedChem*, 2020, 15(23): 2236-2256.
- [54] Tian F, Conde J, Bao C, et al. Gold nanostars for efficient in vitro and in vivo real-time SERS detection and drug delivery via plasmonic-tunable Raman/FTIR imaging [J]. *Biomaterials*, 2016, 106: 87-97.
- [55] Cheng Y, C Samia A, Meyers J D, et al. Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(32): 10643-10647.
- [56] Jang B, Park J Y, Tung C H, et al. Gold Nanorod-Photosensitizer Complex for Near-Infrared

- Fluorescence Imaging and Photodynamic/Photothermal Therapy *In Vivo* [J]. *Acs Nano*, 2011, 5(2): 1086-1094.
- [57] Ren L L, Chen S Z, Li H D, et al. MRI-visible liposome nanovehicles for potential tumor-targeted delivery of multimodal therapies [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(30): 12843-12850.
- [58] Hong S-T, Lin H, Wang C-S, et al. Improving the anticancer effect of afatinib and microRNA by using lipid polymeric nanoparticles conjugated with dual pH-responsive and targeting peptides [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2019, 17(1): 89.
- [59] Tang Z M, Liu Y Y, He M Y, et al. Chemodynamic Therapy: Tumour Microenvironment-Mediated Fenton and Fenton-like Reactions [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2019, 58(4): 946-956.
- [60] Zhang C, Bu W B, Ni D L, et al. Synthesis of Iron Nanometallic Glasses and Their Application in Cancer Therapy by a Localized Fenton Reaction [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2016, 55(6): 2101-2106.
- [61] Wang X, Zhong X, Liu Z, et al. Recent progress of chemodynamic therapy-induced combination cancer therapy [J]. *Nano Today*, 2020, 35: 100946.
- [62] Wang X, Zhong X, Lei H, et al. Hollow Cu₂Se Nanozymes for Tumor Photothermal-Catalytic Therapy [J]. *Chemistry of Materials*, 2019, 31(16): 6174-6186.
- [63] Lin L-S, Huang T, Song J, et al. Synthesis of Copper Peroxide Nanodots for H₂O₂ Self-Supplying Chemodynamic Therapy [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(25): 9937-9945.
- [64] Gong F, Yang N L, Wang X W, et al. Tumor microenvironment-responsive intelligent nanoplatforms for cancer theranostics [J]. *Nano Today*, 2020, 32: 100851.
- [65] Monro S, Colón K L, Yin H M, et al. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433 [J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(2): 797-828.
- [66] Huang L, Zhao S, Wu J, et al. Photodynamic therapy for hypoxic tumors: Advances and perspectives [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2021, 438: 213888.
- [67] Feng G X, Zhang G Q, Ding D. Design of superior phototheranostic agents guided by Jablonski diagrams [J]. *Chemical Society Reviews*, 2020, 49(22): 8179-8234.
- [68] Li X Y, Wang W, Huang W B, et al. Difference of uveal parameters between the acute primary angle closure eyes and the fellow eyes [J]. *Eye*, 2018, 32(7): 1174-1182.
- [69] Lo P C, Rodríguez-Morgade M S, Pandey R K, et al. The unique features and promises of phthalocyanines as advanced photosensitisers for photodynamic therapy of cancer [J]. *Chemical Society Reviews*, 2020, 49(4): 1041-1056.
- [70] Lohse I, Lourenco C, Ibrahimov E, et al. Assessment of Hypoxia in the Stroma of Patient-Derived Pancreatic Tumor Xenografts [J]. *Cancers*, 2014, 6(1): 459-471.
- [71] Zeng W, Liu P Y, Pan W M, et al. Hypoxia and hypoxia inducible factors in tumor metabolism [J]. *Cancer Letters*, 2015, 356(2): 263-267.
- [72] Zhang Y, Chen Y N, Liu Y L, et al. Research on band-edge emission properties and mechanism of high-quality single-crystal diamond [J]. *Carbon*, 2018, 132: 651-655.
- [73] Dewhirst M W, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response [J]. *Nature reviews Cancer*, 2008, 8(6): 425-437.
- [74] Jain R K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy [J]. *Science (New York, NY)*, 2005, 307(5706): 58-62.

- [75] Zhu W W, Dong Z L, Fu T T, et al. Modulation of Hypoxia in Solid Tumor Microenvironment with MnO₂ Nanoparticles to Enhance Photodynamic Therapy [J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(30): 5490-5498.
- [76] Cheng Z L, Al Zaki A, Hui J Z, et al. Multifunctional Nanoparticles: Cost Versus Benefit of Adding Targeting and Imaging Capabilities [J]. *Science*, 2012, 338(6109): 903-910.
- [77] Mukherjee A, Kumar B, Hatano K, et al. Development and Application of a Novel Model System to Study "Active" and "Passive" Tumor Targeting [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2016, 15(10): 2541-2550.
- [78] Miele E, Spinelli G P, Miele E, et al. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer [J]. *International journal of nanomedicine*, 2009, 4: 99-105.
- [79] Kalaydina R V, Bajwa K, Qorri B, et al. Recent advances in "smart" delivery systems for extended drug release in cancer therapy [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2018, 13: 4727-4745.
- [80] Wolfram J, Ferrari M. Clinical Cancer Nanomedicine [J]. *Nano Today*, 2019, 25: 85-98.
- [81] Saw W S, Anasamy T, Foo Y Y, et al. Delivery of Nanoconstructs in Cancer Therapy: Challenges and Therapeutic Opportunities [J]. *Advanced Therapeutics*, 2021, 4(3): 2000206.
- [82] Wilhelm S, Tavares A J, Dai Q, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours [J]. *Nature Reviews Materials*, 2016, 1(5): 14.
- [83] Kashkooli F M, Soltani M, Souri M. Controlled anti-cancer drug release through advanced nano-drug delivery systems: Static and dynamic targeting strategies [J]. *Journal of Controlled Release*, 2020, 327: 316-349.
- [84] Raj S, Khurana S, Choudhari R, et al. Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2021, 69: 166-177.
- [85] Sindhwani S, Syed A M, Ngai J, et al. The entry of nanoparticles into solid tumours [J]. *Nature Materials*, 2020, 19(5): 566.
- [86] Jabir N R, Tabrez S, Ashraf G M, et al. Nanotechnology-based approaches in anticancer research [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 4391-4408.
- [87] Nethi S K, Bhatnagar S, Prabha S. Synthetic Receptor-Based Targeting Strategies to Improve Tumor Drug Delivery [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2021, 22(3): 93.
- [88] Singh N, Orlando E, Xu J, et al. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapies [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2020, 65: 91-98.
- [89] Wan X, Wang W, Zhou Y, et al. Self-Delivery Nanoplatform Based on Amphiphilic Apoptosis Peptide for Precise Mitochondria-Targeting Photothermal Therapy [J]. *Mol Pharm*, 2024, 21(3): 1537-1547.
- [90] Rosenblum D, Joshi N, Tao W, et al. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1410.
- [91] Lim Z F, Ma P C. Emerging insights of tumor heterogeneity and drug resistance mechanisms in lung cancer targeted therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 134.
- [92] Sun P P, Deng Q Q, Kang L H, et al. A Smart Nanoparticle-Laden and Remote-Controlled Self-Destructive Macrophage for Enhanced Chemo/Chemodynamic Synergistic Therapy [J]. *Acs Nano*, 2020, 14(10): 13894-13904.
- [93] Wang Y Z, Xie Y, Li J, et al. Tumor-Penetrating Nanoparticles for Enhanced Anticancer Activity of Combined Photodynamic and Hypoxia-Activated Therapy [J]. *Acs Nano*, 2017, 11(2): 2227-

- 2238.
- [94] Xiao T T, Hu W, Fan Y, et al. Macrophage-mediated tumor homing of hyaluronic acid nanogels loaded with polypyrrole and anticancer drug for targeted combinational photothermo-chemotherapy [J]. *Theranostics*, 2021, 11(14): 7057-7071.
- [95] Zhou Q, Hou Y L, Zhang L, et al. Dual-pH Sensitive Charge-reversal Nanocomplex for Tumor-targeted Drug Delivery with Enhanced Anticancer Activity [J]. *Theranostics*, 2017, 7(7): 1806-1819.
- [96] Dai Q, Wilhelm S, Ding D, et al. Quantifying the Ligand-Coated Nanoparticle Delivery to Cancer Cells in Solid Tumors [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(8): 8423-8435.
- [97] Xuan M, Shao J, Dai L, et al. Macrophage Cell Membrane Camouflaged Au Nanoshells for in Vivo Prolonged Circulation Life and Enhanced Cancer Photothermal Therapy [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(15): 9610-9618.
- [98] Xu X, Kwong C H T, Li J, et al. “Zombie” Macrophages for Targeted Drug Delivery to Treat Acute Pneumonia [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15(24): 29012-29022.
- [99] Anderson N R, Minutolo N G, Gill S, et al. Macrophage-Based Approaches for Cancer Immunotherapy [J]. *Cancer Research*, 2021, 81(5): 1201-1208.
- [100] Chanmee T, Ontong P, Konno K, et al. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment [J]. *Cancers*, 2014, 6(3): 1670-1690.
- [101] Zhang M, Gao S, Yang D, et al. Influencing factors and strategies of enhancing nanoparticles into tumors in vivo [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2021, 11(8): 2265-2285.
- [102] Jiang J, Mei J, Yi S, et al. Tumor associated macrophage and microbe: The potential targets of tumor vaccine delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 180: 114046.
- [103] Lim B, Woodward W A, Wang X, et al. Inflammatory breast cancer biology: the tumour microenvironment is key [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(8): 485-499.
- [104] Ahn J, Miura Y, Yamada N, et al. Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer [J]. *Biomaterials*, 2015, 39: 23-30.
- [105] Yang L, Zhang Y, Zhang Y, et al. Live Macrophage-Delivered Doxorubicin-Loaded Liposomes Effectively Treat Triple-Negative Breast Cancer [J]. *ACS Nano*, 2022, 16(6): 9799-9809.
- [106] Huang X, Wang L T, Guo H Y, et al. Macrophage membrane-coated nanovesicles for dual-targeted drug delivery to inhibit tumor and induce macrophage polarization [J]. *Bioactive Materials*, 2023, 23: 69-79.
- [107] Murray P J, Wynn T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11): 723-737.
- [108] Fu J, Wang D, Mei D, et al. Macrophage mediated biomimetic delivery system for the treatment of lung metastasis of breast cancer [J]. *Journal of Controlled Release*, 2015, 204: 11-19.
- [109] Lv Y, Jun Y, Tang Z, et al. Enhanced Antitumor Efficacy of Macrophage-Mediated Egg Yolk Lipid-Derived Delivery System Against Breast Cancer [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, Volume 15: 10075-10084.
- [110] Zheng Y, Han Y, Sun Q, et al. Harnessing anti - tumor and tumor - tropism functions of macrophages via nanotechnology for tumor immunotherapy [J]. *Exploration*, 2022, 2(3): 20210166.
- [111] Lopes J, Lopes D, Pereira-Silva M, et al. Macrophage Cell Membrane-Cloaked Nanoplatforms for Biomedical Applications [J]. *Small Methods*, 2022, 6(8): e2200289.

- [112] Zhao H, Li L, Zhang J, et al. C–C Chemokine Ligand 2 (CCL2) Recruits Macrophage-Membrane-Camouflaged Hollow Bismuth Selenide Nanoparticles To Facilitate Photothermal Sensitivity and Inhibit Lung Metastasis of Breast Cancer [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(37): 31124-31135.
- [113] Xia Y Q, Rao L, Yao H M, et al. Engineering Macrophages for Cancer Immunotherapy and Drug Delivery [J]. Advanced Materials, 2020, 32(40): 2002054.
- [114] Zhang W Z, Wang M Z, Tang W, et al. Nanoparticle-Laden Macrophages for Tumor-Tropic Drug Delivery, 2018, 30 [J]. Advanced Materials, 2022, 34(6): 1805557.
- [115] Lin Z P, Nguyen L N M, Ouyang B, et al. Macrophages Actively Transport Nanoparticles in Tumors After Extravasation [J]. ACS Nano, 2022, 16(4): 6080-6092.
- [116] Guo L, Zhang Y, Wei R, et al. Proinflammatory macrophage-derived microvesicles exhibit tumor tropism dependent on CCL2/CCR2 signaling axis and promote drug delivery via SNARE-mediated membrane fusion [J]. Theranostics, 2020, 10(15): 6581-6598.
- [117] Pang L, Zhu Y, Qin J, et al. Primary M1 macrophages as multifunctional carrier combined with PLGA nanoparticle delivering anticancer drug for efficient glioma therapy [J]. Drug Delivery, 2018, 25(1): 1922-1931.
- [118] An L, Wang Y Y, Lin J M, et al. Macrophages-Mediated Delivery of Small Gold Nanorods for Tumor Hypoxia Photoacoustic Imaging and Enhanced Photothermal Therapy [J]. Acs Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(17): 15251-15261.
- [119] Trac N, Chen L Y, Zhang A, et al. CCR2-targeted micelles for anti-cancer peptide delivery and immune stimulation [J]. J Control Release, 2021, 329: 614-623.
- [120] Hao Q, Vadgama J V, Wang P. CCL2/CCR2 signaling in cancer pathogenesis [J]. Cell Commun Signal, 2020, 18(1): 82.
- [121] Cao H, Wang H, He X, et al. Bioengineered Macrophages Can Responsively Transform into Nanovesicles To Target Lung Metastasis [J]. Nano Letters, 2018, 18(8): 4762-4770.
- [122] Lv B, Wang Y, Ma D, et al. Immunotherapy: Reshape the Tumor Immune Microenvironment [J]. Front Immunol, 2022, 13: 844142.
- [123] Chen Q, Zhang X H, Massague J. Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs [J]. Cancer Cell, 2011, 20(4): 538-549.
- [124] Bonapace L, Coissieux M M, Wyckoff J, et al. Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis [J]. Nature, 2014, 515(7525): 130-133.
- [125] Franklin R A, Liao W, Sarkar A, et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages [J]. Science, 2014, 344(6186): 921-925.
- [126] Geissmann F, Manz M G, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells [J]. Science, 2010, 327(5966): 656-661.
- [127] He X, Cao H, Wang H, et al. Inflammatory Monocytes Loading Protease-Sensitive Nanoparticles Enable Lung Metastasis Targeting and Intelligent Drug Release for Anti-Metastasis Therapy [J]. Nano Lett, 2017, 17(9): 5546-5554.
- [128] Hayashi Y, Takamiya M, Jensen P B, et al. Differential Nanoparticle Sequestration by Macrophages and Scavenger Endothelial Cells Visualized *in Vivo* in Real-Time and at Ultrastructural Resolution [J]. Acs Nano, 2020, 14(2): 1665-1681.
- [129] Li J, Wu Y, Wang J, et al. Macrophage Membrane-Coated Nano-Gemcitabine Promotes Lymphocyte Infiltration and Synergizes AntiPD-L1 to Restore the Tumoricidal Function [J]. ACS Nano, 2023, 17(1): 322-336.

- [130] Gao C, Liu C, Chen Q, et al. Cyclodextrin-mediated conjugation of macrophage and liposomes for treatment of atherosclerosis [J]. *Journal of Controlled Release*, 2022, 349: 2-15.
- [131] Liao X, Gong G D, Dai M Y, et al. Systemic Tumor Suppression via Macrophage-Driven Automated Homing of Metal-Phenolic-Gated Nanosponges for Metastatic Melanoma [J]. *Advanced Science*, 2023, 10(18): 202207488.
- [132] Rosenberg S A, Restifo N P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer [J]. *Science*, 2015, 348(6230): 62-68.
- [133] Lee S H, Park O K, Kim J, et al. Deep Tumor Penetration of Drug-Loaded Nanoparticles by Click Reaction-Assisted Immune Cell Targeting Strategy [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(35): 13829-13840.
- [134] Marrache S, Tundup S, Harn D A, et al. *Ex Vivo* Programming of Dendritic Cells by Mitochondria-Targeted Nanoparticles to Produce Interferon-Gamma for Cancer Immunotherapy [J]. *Acs Nano*, 2013, 7(8): 7392-7402.
- [135] Zhang X, Detering L, Sultan D, et al. CC Chemokine Receptor 2-Targeting Copper Nanoparticles for Positron Emission Tomography-Guided Delivery of Gemcitabine for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma [J]. *ACS Nano*, 2021, 15(1): 1186-1198.
- [136] Chien W C, Cheng P H, Cheng X J, et al. MCP-1-Functionalized, Core-Shell Gold Nanorod@Iron-Based Metal-Organic Framework (MCP-1/GNR@MIL-100(Fe)) for Photothermal Therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(44): 52092-52105.
- [137] Mittal P, Wang L Q, Akimova T, et al. The CCR2/MCP-1 Chemokine Pathway and Lung Adenocarcinoma [J]. *Cancers*, 2020, 12(12): 3723.
- [138] Lim S Y, Yuzhalin A E, Gordon-Weeks A N, et al. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 28697-28710.
- [139] Singh S, Anshita D, Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101(Pt B): 107598.
- [140] She S, Ren L, Chen P, et al. Functional Roles of Chemokine Receptor CCR2 and Its Ligands in Liver Disease [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 812431.
- [141] Argyle D, Kitamura T. Targeting Macrophage-Recruiting Chemokines as a Novel Therapeutic Strategy to Prevent the Progression of Solid Tumors [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 2629.
- [142] Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy [J]. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2014, 10(4): 853-858.
- [143] Behera S K, Mohanty M E, Mohapatra M. A Fluorescence Study of the Interaction of Anticancer Drug Molecule Doxorubicin Hydrochloride in Pluronic P123 and F127 Micelles [J]. *Journal of Fluorescence*, 2020, 31(1): 17-27.
- [144] Sawada T, Takizawa M, Serizawa T. Affinity-Based Functionalization of Biomedically Utilized Micelles Composed of Triblock Copolymers through Polymer-Binding Peptides [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019, 5(11): 5714-5720.
- [145] Khalin I, Heimburger D, Melnychuk N, et al. Ultrabright Fluorescent Polymeric Nanoparticles with a Stealth Pluronic Shell for Live Tracking in the Mouse Brain [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(8): 9755-9770.
- [146] Das R P, Singh B G, Kunwar A. Preparation of a size selective nanocomposite through temperature assisted co-assembly of gelatin and pluronic F127 for passive targeting of doxorubicin [J]. *Biomaterials Science*, 2020, 8(15): 4251-4265.
- [147] Xu W, Cui Y, Ling P, et al. Preparation and evaluation of folate-modified cationic Pluronic

- micelles for poorly soluble anticancer drug [J]. *Drug Delivery*, 2012, 19(4): 208-219.
- [148] Anirudhan T S, Varghese S, Manjusha V. Hyaluronic acid coated Pluronic F127/Pluronic P123 mixed micelle for targeted delivery of Paclitaxel and Curcumin [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 192: 950-957.
- [149] Wang H, Williams G R, Wu J, et al. Pluronic F127-based micelles for tumor-targeted bufalin delivery [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 559: 289-298.
- [150] Schmall A, Al-Tamari H M, Herold S, et al. Macrophage and Cancer Cell Cross-talk via CCR2 and CX3CR1 Is a Fundamental Mechanism Driving Lung Cancer [J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2015, 191(4): 437-447.
- [151] An J, Xue Y, Long M J, et al. Targeting CCR2 with its antagonist suppresses viability, motility and invasion by downregulating MMP-9 expression in non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24): 39230-39240.
- [152] Yan C H, Song X M, Yu W W, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells delivering sTRAIL home to lung cancer mediated by MCP-1/CCR2 axis and exhibit antitumor effects [J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(6): 8425-8435.
- [153] Kong L-Y, Chen X-Y, Lu X, et al. Association of lung-intestinal microecology and lung cancer therapy [J]. *Chinese Medicine*, 2023, 18(1): 37.
- [154] Srivastava S, Mohanty A, Nam A, et al. Chemokines and NSCLC: Emerging role in prognosis, heterogeneity, and therapeutics [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2022, 86: 233-246.
- [155] Trac N, Chen L Y, Zhang A L, et al. CCR2-targeted micelles for anti-cancer peptide delivery and immune stimulation [J]. *Journal of Controlled Release*, 2021, 329: 614-623.
- [156] Al Musaimi O, de la Torre B G, Albericio F. Greening Fmoc/t Bu solid-phase peptide synthesis [J]. *Green Chemistry*, 2020, 22(4): 996-1018.
- [157] Mant C T, Chen Y, Yan Z, et al. HPLC analysis and purification of peptides [J]. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ), 2007, 386: 3-55.
- [158] Wei C, Cantone J L, Leet J E, et al. Improving the LC-MS bioanalysis of hydrophilic peptides utilizing vacuum-based sample preparation [J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(13): 4885-4888.
- [159] Park K M, Bae J W, Joung Y K, et al. Nanoaggregate of thermosensitive chitosan-Pluronic for sustained release of hydrophobic drug [J]. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, 2008, 63(1): 1-6.
- [160] Nakajima N, Ikada Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media [J]. *Bioconjugate chemistry*, 1995, 6(1): 123-130.
- [161] Xie Y J, Wang Q L, Adu-Frimpong M, et al. Preparation and evaluation of isoliquiritigenin-loaded F127/P123 polymeric micelles [J]. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2019, 45(8): 1224-1232.
- [162] Yu M Z, Yuan W M, Li D, et al. Predicting drug release kinetics from nanocarriers inside dialysis bags [J]. *Journal of Controlled Release*, 2019, 315: 23-30.
- [163] Zhao Y Z, Sun C Z, Lu C T, et al. Characterization and anti-tumor activity of chemical conjugation of doxorubicin in polymeric micelles (DOX-P) *in vitro* [J]. *Cancer Letters*, 2011, 311(2): 187-194.
- [164] Tian J L, Zhao Y Z, Jin Z, et al. Synthesis and characterization of Poloxamer 188-grafted heparin copolymer [J]. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2010, 36(7): 832-838.
- [165] Cho Y, Ivanisevic A. TAT peptide immobilization on gold surfaces: a comparison study with a thiolated peptide and alkylthiols using AFM, XPS, and FT-IRRAS [J]. *The journal of physical*

- chemistry B, 2005, 109(13): 6225-6232.
- [166] Vander Heiden M G, Cantley L C, Thompson C B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. Science (New York, NY), 2009, 324(5930): 1029-1033.
- [167] Gatenby R A, Gillies R J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? [J]. Nature reviews Cancer, 2004, 4(11): 891-899.
- [168] Volk T, Jahde E, Fortmeyer H P, et al. pH in human tumour xenografts: effect of intravenous administration of glucose [J]. British journal of cancer, 1993, 68(3): 492-500.
- [169] Liao J H, Zheng H R, Fei Z M, et al. Tumor-targeting and pH-responsive nanoparticles from hyaluronic acid for the enhanced delivery of doxorubicin [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 113: 737-747.
- [170] Li C, Yang X Q, Zhang M Z, et al. *In vivo* Imaging-Guided Nanoplatform for Tumor Targeting Delivery and Combined Chemo-, Gene- and Photothermal Therapy [J]. Theranostics, 2018, 8(20): 5662-5675.
- [171] Vijayakumar S, Chen J D, Sánchez Z I G, et al. *Moringa oleifera* gum capped MgO nanoparticles: Synthesis, characterization, cyto- and ecotoxicity assessment [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 233: 123514.
- [172] Pijuan J, Barceló C, Moreno D F, et al. *In vitro* Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis [J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2019, 7: 107.
- [173] Wu T T, Yang W N, Sun A Q, et al. The Role of CXC Chemokines in Cancer Progression [J]. Cancers, 2023, 15(1): 167.
- [174] Zhao H Q, Jiang J. Chemokines and receptors in the development and progression of malignant tumors [J]. Cytokine, 2023, 170: 156335.
- [175] Vilgelm A E, Richmond A. Chemokines Modulate Immune Surveillance in Tumorigenesis, Metastasis, and Response to Immunotherapy [J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 333.
- [176] Unver N. Macrophage chemoattractants secreted by cancer cells: Sculptors of the tumor microenvironment and another crucial piece of the cancer secretome as a therapeutic target [J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2019, 50: 13-18.
- [177] Nguyen V D, Min H K, Kim D H, et al. Macrophage-Mediated Delivery of Multifunctional Nanotherapeutics for Synergistic Chemo-Photothermal Therapy of Solid Tumors [J]. Acs Applied Materials & Interfaces, 2020, 12(9): 10130-10141.
- [178] Dong Z, Gong H, Gao M, et al. Polydopamine Nanoparticles as a Versatile Molecular Loading Platform to Enable Imaging-guided Cancer Combination Therapy [J]. Theranostics, 2016, 6(7): 1031-1042.
- [179] Takenaka S, Möller W, Semmler-Behnke M, et al. Efficient internalization and intracellular translocation of inhaled gold nanoparticles in rat alveolar macrophages [J]. Nanomedicine, 2012, 7(6): 855-865.
- [180] Van De Ven H, Vermeersch M, Vandenbroucke R E, et al. Intracellular drug delivery in *Leishmania*-infected macrophages: Evaluation of saponin-loaded PLGA nanoparticles [J]. Journal of Drug Targeting, 2012, 20(2): 142-154.
- [181] Batrakova E V, Miller D W, Li S, et al. Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: in vitro and in vivo studies [J]. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2001, 296(2): 551-557.

- [182] Wei X, Wei R, Jiang G Y, et al. Mechanical cues modulate cellular uptake of nanoparticles in cancer via clathrin-mediated and caveolae-mediated endocytosis pathways [J]. *Nanomedicine*, 2019, 14(5): 613-626.
- [183] Tayama M, Inose T, Yamauchi N, et al. Fabrication and fluorescence imaging properties of indocyanine green-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles [J]. *Colloid and Polymer Science*, 2021, 299(8): 1271-1283.
- [184] Elsabahy M, Wooley K L. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity [J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(12): 5552-5576.

攻读硕士学位期间研究成果

(1) **Chengrui Hu**, Jun Wang, Xinxing Gao, et al. Pluronic-Based Nanoparticles for Delivery of Doxorubicin to the Tumor Microenvironment by Binding to Macrophages [J]. ACS nano, 2024. DOI: 10.1021/acsnano.4c01120

致谢

时光荏苒，转眼间我即将毕业，这意味着三年的研究生生涯即将结束，心中充满着不舍和感慨。毕业季总会让人情绪波动，仿佛时间在不经意间从指尖溜走，让人不禁感叹岁月如梭。作为一名即将离开校园的毕业生，我想借此机会表达我的感激之情。

首先，我要衷心感谢我的导师朱龙宝教授，正是您给予的指导与陪伴，才让我能够顺利完成实验及完成小论文的撰写、修改与投稿。朱老师不仅在学术上对我谆谆教导，也教会了我许多为人处世的道理，对我以后的生活及工作影响深远。其次，非常感谢王军老师对论文整体数据分析、绘图、小论文撰写等方面进行悉心指导，让我对实验的方式、思路、数据处理的方法等方面都有了长足的进步，使我在数据处理及论文撰写方面更加专业。感谢葛飞教授为课题组提供的良好实验室平台，让我们能够物尽其用，做出更好更多的实验数据。感谢张伟伟老师、宋平老师及李婉珍老师在平时的组会上为我出谋划策，完善我的实验方案与实验体系并为我排忧解难。正是在您们的悉心指导和教诲下，我才能够顺利完成学业并取得今天的成绩。您们不仅传授了我专业知识，更是在学术和人生道路上给予了我无私的指引和帮助，感谢您们对我的耐心教导和无私付出。

其次，我也要感谢我的同学、师兄师姐和师弟师妹们。感谢桂婷师姐和陈孝露师兄带我熟悉实验方案及学习实验技能，感谢金伟豪师兄、梁杰师兄、董婉师姐在实验方法、课题把关等方面的指导。在你们的陪伴和支持下，我收获了许多珍贵的友谊和美好的回忆。你们的友谊和支持是我大学生活中最美好的陪伴，让我在求知路上永远不感孤单。

最后，我要感谢我的家人和挚爱的朋友们。没有你们的支持和关爱，我无法坚持走到今天。在我迷茫犹豫的时候，是你们给予我鼓励和帮助，让我勇敢面对困难，勇往直前。无论是生活上的陪伴还是学业上的支持，你们始终给予我最无私的关怀和帮助。时光匆匆，研究生生活即将谢幕，我将永远怀念这段充满温馨和回忆的日子。感谢所有给予我帮助和关爱的人们，是你们让我的研究生生涯如此难忘而珍贵。愿我们在人生的舞台上继续奋力向前，收获更多的欢笑与泪水。再次感谢您们，愿友谊长存，祝福常伴！