

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.11.001

• 基础研究 •

巨噬细胞装载纳米颗粒用于药物递送*

朱茂华 朱欣迪 高宇豪 隆梅 张钟 陆琴 方超[△]

(上海交通大学基础医学院药理学与化学生物学系 上海 200025)

摘要 目的:活细胞药物递送系统具有主动靶向至肿瘤部位,防止被免疫系统清除等诸多优势。本文提供了一种巨噬细胞负载纳米颗粒的递送方法,并探讨不同载药量对巨噬细胞的活性以及运动性的影响。**方法:**通过超声乳化法制备包载阿霉素的 DOX@PLGA 纳米颗粒。纳米粒度分析仪测量粒径和表面电位,透射电镜观察纳米颗粒形态。将 DOX@PLGA 纳米颗粒与巨噬细胞共同孵育,即得到负载 DOX@PLGA 纳米颗粒的巨噬细胞用以药物递送。然后通过 CCK-8 法、LDH 法以及细胞迁移实验检测不同载药量情况下细胞活力水平、细胞损伤程度以及细胞运动性。**结果:**制备的 DOX@PLGA 纳米颗粒呈圆形或椭圆形,粒径为 109.2 ± 2.3 nm;表面电位为 -45.0 ± 2.0 mV;载药量为 4.61%。当单个巨噬细胞负载 0.15 pg DOX 时细胞存活率为 71.5 ± 4.4 (%);细胞损伤率为 26.3 ± 1.8 (%);迁移率为 61.6 ± 5.7 (%)。**结论:**成功制备巨噬细胞负载 DOX@PLGA 纳米颗粒的递药系统,载药量适当的情况下载体细胞依然具有良好的活性和运动性。

关键词:巨噬细胞;纳米颗粒;阿霉素;药物递送

中图分类号:R-33;R943 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)11-2001-05

Macrophages Loaded with Nanoparticles for Drug Delivery*

ZHU Mao-hua, ZHU Xin-di, GAO Yu-hao, LONG Mei, ZHANG Zhong, LU Qin, FANG Chao[△]

(Department of pharmacology and chemical biology, College of Basic Medical Sciences, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: The live cell drug delivery system has many advantages, such as actively targeting to the tumor site, preventing it from being cleared by the immune system and so on. This study provides a method for delivering macrophage-loaded nanoparticles and explores the effects of different drug loadings on the activity and motility of macrophages. **Methods:** DOX@PLGA nanoparticles containing adriamycin were prepared by phacoemulsification. The particle size and zeta potential were measured by nanoparticle size analyzer, and the morphology of nanoparticles was observed by a transmission electron microscopy. Incubate the nanoparticles with macrophages to obtain macrophages loaded with DOX@PLGA nanoparticles for drug delivery. Then CCK-8 method, LDH method and cell migration experiments were used to detect the level of cell viability, cell damage degree and cell motility under different drug loading conditions. **Results:** The prepared DOX @ PLGA nanoparticles were round or elliptical; the size was 109.2 ± 2.3 nm; the zeta potential was -45.0 ± 2.0 mV. When a single macrophage was loaded with 0.15 pg DOX, the cell survival rate was 71.5 ± 4.4 (%); the cell damage rate was 26.3 ± 1.8 (%); and the migration rate was 61.6 ± 5.7 (%). **Conclusions:** The delivery system of DOX@PLGA nanoparticles loaded with macrophages was successfully prepared. Carrier cells with appropriate drug loading still have favorable activity and mobility.

Key words: Macrophages; Nanoparticles; Adriamycin; Drug delivery

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R943 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)11-2001-05

前言

中美在 2019 年分别发布了最新的癌症统计数据,癌症已经成为威胁人类健康的主要原因之一^[1,2]。随着人口老龄化的加速,癌症的防治任务将更为艰巨。中国每年花费超过 2200 亿人民币用于癌症的治疗^[3],美国 2019 年癌症诊断病例新增 170 万例^[2],中美两国都在公共卫生领域投入巨额资金^[3]。因此迫切地

需要开发一种有效的癌症治疗方法,减轻患者痛苦和国家财政负担。

化疗作为一种常规的癌症治疗手段,在肿瘤的治疗中发挥了重要作用。但由于小分子化疗药物缺乏靶向性,常常导致严重的毒副作用,大大影响了患者的生存质量。随着纳米技术的发展,纳米靶向制剂越来越多地用于癌症治疗,并显示出巨大的优势^[4-6]。纳米靶向制剂主要分为被动靶向制剂和主动靶向制剂

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81773274;81572998)

作者简介:朱茂华(1991-),男,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤靶向递药系统,E-mail: manfredzhu@foxmail.com

[△] 通讯作者:方超,男,博士生导师,教授,主要研究方向:肿瘤靶向递药系统,E-mail: fangchao32@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2020-01-28 接受日期:2020-02-23)

剂两大类。肿瘤由于生长速度快,新生血管间隙较大,小于 200 nm 尺寸的纳米制剂很容易穿过血管间隙滞留于肿瘤部位^[7,8]。目前很多的纳米被动靶向制剂都是基于此进行设计^[9]。但是肿瘤的某些部位缺乏血管并且静水压很高,被动靶向制剂实际到达肿瘤部位的量较少^[10,11]。研究人员通过对纳米颗粒修饰靶向多肽,包裹仿生细胞膜等方法增强制剂的主动靶向能力^[12-14]。

巨噬细胞作为一种免疫细胞,可以感知肿瘤相关细胞因子,并穿透生物屏障到达肿瘤中心部位^[15]。巨噬细胞的这种特性,使其成为药物递送的良好载体。包载小分子药物的纳米颗粒利用巨噬细胞搭便车,从而避免免疫系统地清除,实现更好的肿瘤主动靶向,更多的肿瘤部位药物集聚^[16]。因此,本研究利用巨噬细胞作为“特洛伊木马”运载纳米颗粒,提供了一种新的药物递送方法。当巨噬细胞运载适当浓度的药物时,载体细胞本身依旧保持了很好的活性和运动性,为后续研究者提供了一个很好的递药模型。并且该方法的操作过程极其简单,有利于大规模地推广,在抗肿瘤治疗领域具有广泛地应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

巨噬细胞(RAW 264.7)购自 ATCC;DMEM 和胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司;DPBS 和青霉素-链霉素(双抗)购自上海源培生物科技股份有限公司;聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid),PLGA)、Hoechst 33342 和台式离心机购自美国 Thermo fisher 公司;盐酸阿霉素(DOX·HCl)购自北京华奉联博化学材料有限公司;三乙胺(TEA)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)购自东仁化学科技(上海)有限公司;乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(LDH Cytotoxicity Assay Kit)购自上海碧云天生物技术有限公司;培养皿、孔板及 Transwell 小室购自美国 Corning 公司;超声波细胞粉碎机购自宁波新芝生物科技股份有限公司;纳米粒度分析仪购自英国 Malvern 公司;生物型透射电子显微镜购自美国 FEI 公司;激光共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司;光学显微镜购自德国 Zeiss 公司。

1.2 方法

1.2.1 巨噬细胞 RAW 264.7 培养 配制 50 mL 含 10% FBS 的巨噬细胞培养基,配方如下:44.5 mL DMEM 培养基+5 mL FBS+0.5 mL 双抗。从 -80 °C 冰箱中取出 RAW 264.7 细胞冻存管,于 37 °C 水浴箱中迅速解冻,将含有细胞的冻存液吸入装有 DPBS 的离心管,离心(1000 rpm, 3 min)弃上清,加入 10 mL 预热的巨噬细胞培养基重悬,移入 100 mm 培养皿进行常规培养。每天使用移液枪将细胞从培养皿底部吹打下来,取其中 1/4 进行传代培养。

1.2.2 DOX@PLGA 纳米颗粒制备与表征 盐酸阿霉素脱盐酸:5 mg 盐酸阿霉素(DOX·HCl)和 4 μL 三乙胺(TEA)加入 1 mL 二氯甲烷中,搅拌过夜脱去盐酸制得 5 mg/mL 阿霉素(DOX)溶液。配制 0.5%和 1%的胆酸钠溶液。精密称取 19 mg PLGA 粉末溶于 1 mL 二氯甲烷中,加入 200 μL DOX 溶液混匀。再加入 3 mL 1%胆酸钠溶液,于超声波细胞粉碎机 200 W 超声 25 s。然后将乳化液倒入 40 mL 0.5%胆酸钠溶液避光搅拌 1 h 挥发二氯甲烷。最后离心(11000×g, 30 min)弃上清,1 mL 三蒸水复溶制得 DOX@PLGA 纳米颗粒溶液。将 20 μL DOX@PLGA 溶

液稀释至 1 mL,使用纳米粒度分析仪测量粒径与表面电位。DOX@PLGA 纳米颗粒使用生物型透射电子显微镜(Transmission electron micrograph, TEM)进行拍照。对空 PLGA 纳米颗粒(NP)水溶液、DOX@PLGA 纳米颗粒(DOX-NP)水溶液进行拍照。盐酸阿霉素水溶液在 480 nm 处存在紫外吸收,使用紫外分光光度计分别测量空 PLGA 纳米颗粒(NP)水溶液、DOX@PLGA 纳米颗粒(DOX-NP)水溶液和阿霉素水溶液(DOX·HCl),以表征 DOX 载入 PLGA 纳米颗粒中。采用倍比稀释法得到一系列不同浓度的阿霉素 DMSO 溶液并测量相应紫外吸收以制备标准曲线。将测量的紫外吸收值带入标曲方程,得到纳米颗粒内 DOX 的含量,载药量(%)=(包封于纳米颗粒中的阿霉素质量/纳米颗粒总质量)×100%。

1.2.3 巨噬细胞 RAW 264.7 负载 DOX@PLGA 纳米颗粒 RAW 264.7 细胞于 100 mm 培养皿进行常规培养。待其生长至 1×10^7 个细胞时,将 DOX@PLGA 溶液离心并置换相同体积的巨噬细胞培养基,之后加入 100 μL DOX@PLGA 溶液于培养皿内。RAW 264.7 细胞摄取 DOX@PLGA 纳米颗粒 2 h 后加入 2 μL Hoechst 33342 对细胞核染色 10 min,弃去培养基,DPBS 清洗三遍,然后将细胞吹打下来重悬于 1 mL DPBS 溶液。激光共聚焦显微镜对细胞进行拍照。

1.2.4 Cell Counting Kit-8(CCK-8)测定细胞生长活力 取不同量的 DOX@PLGA 纳米颗粒与 RAW 264.7 细胞进行孵育,得到单个细胞携带 0、0.15、0.3、0.6、1.2 pg DOX 的细胞悬液。96 孔板每孔接种 1 万个细胞,加入 100 μL 巨噬细胞培养基进行培养,24 h 后按照 Cell Counting Kit-8 试剂盒说明书操作,测量细胞生长活力。

1.2.5 LDH Cytotoxicity Assay Kit 测定细胞损伤 按照 1.2.3 类同的方法分别使单个细胞携带 0、0.15、0.3、0.6、1.2 pg DOX。96 孔板每孔接种 2 万个细胞,加入 200 μL 无血清细胞培养基进行培养,24 h 后按照 LDH Cytotoxicity Assay Kit 说明书操作,测量细胞损伤程度。

1.2.6 细胞迁移试验测定细胞运动性 按照 1.2.3 类同的方法得到单个细胞携带 0、0.15、0.3、0.6、1.2 pg DOX 的细胞悬液。将准备好的 RAW 264.7 细胞接种于 Transwell 上室,每孔 15 万个细胞,100 μL 无血清细胞培养基;下室加入 600 μL 巨噬细胞培养基。24 h 后将上室细胞固定,结晶紫染色后进行拍照。

1.3 统计学分析

本文采用 GraphPad Prism 7.00 软件进行作图;穿过 Transwell 小室的巨噬细胞利用 ImageJ 软件进行细胞计数;所有结果采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。设定 $P < 0.05$ 时,具有显著性差异。

2 结果

2.1 DOX@PLGA 纳米颗粒表征

通过超声乳化法制得的 DOX@PLGA 纳米颗粒粒径为 109.2 ± 2.3 nm;粒径分散系数为 0.1 ± 0.01 ,一般认为 $PDI < 0.2$ 即具有较好的均一性;表面电位为 -45.0 ± 2.0 mV;载药量为 4.61%。透射电镜图显示 DOX@PLGA 纳米颗粒呈圆形或者椭圆形,直径约 100 nm 左右。DOX@PLGA 纳米颗粒水溶液呈粉红色,并在 480 nm 处有吸收峰(图 1)。

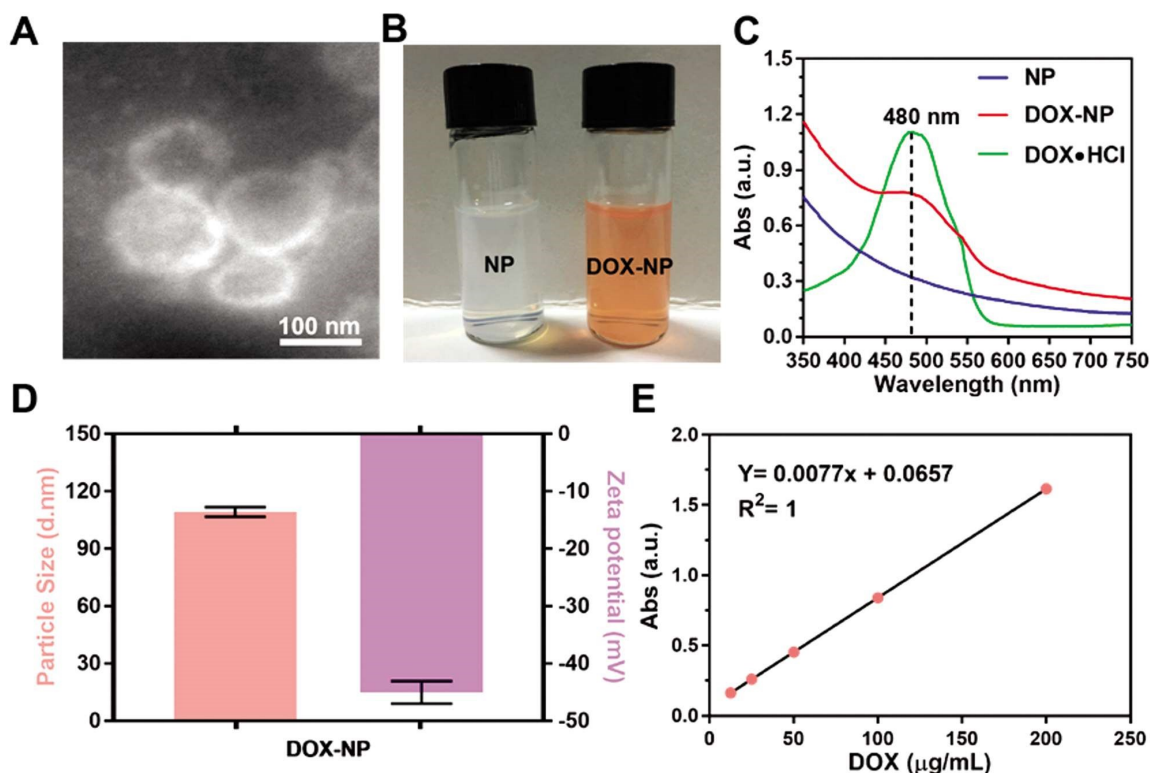


图 1 DOX@PLGA 纳米颗粒的理化表征

Fig.1 Physical and Chemical Characterization of DOX @ PLGA Nanoparticles

Note: (A)TEM of DOX @ PLGA nanoparticles. (B) aqueous solution of hollow nanoparticles and DOX @ PLGA nanoparticles.(C) UV absorption spectrum of DOX @ PLGA nanoparticles.(D) particle size and surface potential of nanoparticles.(E) standard curve of DOX concentration. Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=3$.

2.2 巨噬细胞 RAW 264.7 负载 DOX@PLGA 纳米颗粒

巨噬细胞摄取 DOX@PLGA 纳米颗粒 2 h 后,大量纳米颗粒被摄取进细胞浆。将负载 DOX@PLGA 纳米颗粒的巨噬细胞置于激光共聚焦专用玻璃底培养皿里。Hoechst 染细胞核,通过

Ex: 405 nm 波长激发,Em: 461 nm 波长接受发射荧光;纳米颗粒内的 DOX 通过 Ex: 488 nm 波长激发,Em: 585 nm 波长接受发射荧光。得到巨噬细胞负载 DOX@PLGA 纳米颗粒的图片(图 2)。

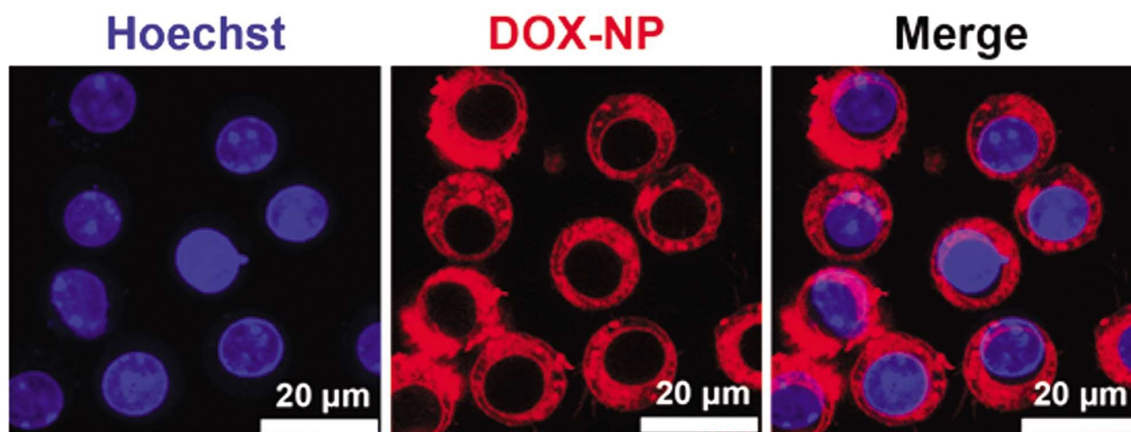


图 2 巨噬细胞 RAW 264.7 负载 DOX@PLGA 纳米颗粒

Fig.2 Macrophage RAW 264.7 loaded with DOX@PLGA nanoparticles

2.3 不同载药量情况下巨噬细胞生长活力

阿霉素(DOX)作为一种小分子化疗药物对细胞有杀伤作用。巨噬细胞 RAW 264.7 负载 DOX@PLGA 后,对自身的活力有一定的影响。将负载纳米颗粒的巨噬细胞培养 24 h 后,采用 CCK-8 法检测不同载药量巨噬细胞的存活率。巨噬细胞负载空纳米颗粒的细胞存活率为:100.0 $\pm$ 2.9(%);单个巨噬细胞负载

0.15 pg DOX 的细胞存活率为:71.5 $\pm$ 4.4(%);单个巨噬细胞负载 0.30 pg DOX 的细胞存活率为:48.6 $\pm$ 2.6(%);单个巨噬细胞负载 0.60 pg DOX 的细胞存活率为:32.0 $\pm$ 1.2(%);单个巨噬细胞负载 1.20 pg DOX 的细胞存活率为:27.9 $\pm$ 2.6(%)。单个细胞负载 0.15 pg DOX 时细胞活力相对较好(图 3)。

2.4 不同载药量情况下巨噬细胞损伤水平

细胞受到损伤时,细胞膜破坏导致胞浆内的乳酸脱氢酶释放到培养基内,通过测定培养基内的乳酸脱氢酶活性,间接实现对细胞损伤水平的定量分析。将负载纳米颗粒的巨噬细胞培养 24 h 后,采用 LDH 法检测不同载药量巨噬细胞的损伤水平。巨噬细胞负载空纳米颗粒的细胞损伤率为:16.9± 1.0(%);单个巨噬细胞负载 0.15 pg DOX 的细胞损伤率为:26.3± 1.8 (%);单个巨噬细胞负载 0.30 pg DOX 的细胞损伤率为:27.7± 1.1 (%);单个巨噬细胞负载 0.60 pg DOX 的细胞损伤率为:47.7± 2.4(%);单个巨噬细胞负载 1.20 pg DOX 的细胞损伤率为:80.3± 2.1(%)。单个细胞负载 0.15 pg DOX 时细胞受损相

对较小(图 4)。

2.5 不同载药量情况下巨噬细胞运动性

巨噬细胞可以通过 Transwell 小室的膜孔。细胞运动性越好,越多的细胞可以穿过膜孔。通过统计穿过膜孔的细胞数间接实现对细胞运动性的分析。巨噬细胞负载空纳米颗粒的细胞迁移率为:100.4± 2.0(%);单个巨噬细胞负载 0.15 pg DOX 的细胞迁移率为:61.6± 5.7(%);单个巨噬细胞负载 0.30 pg DOX 的细胞迁移率为:27.0± 5.6 (%);单个巨噬细胞负载 0.60 pg DOX 的细胞迁移率为:16.5± 3.5(%);单个巨噬细胞负载 1.20 pg DOX 的细胞迁移率为:5.3± 2.1 (%)。单个细胞负载 0.15 pg DOX 时约有 67%的细胞能穿过膜孔,保持了一定的运动性(图5)。

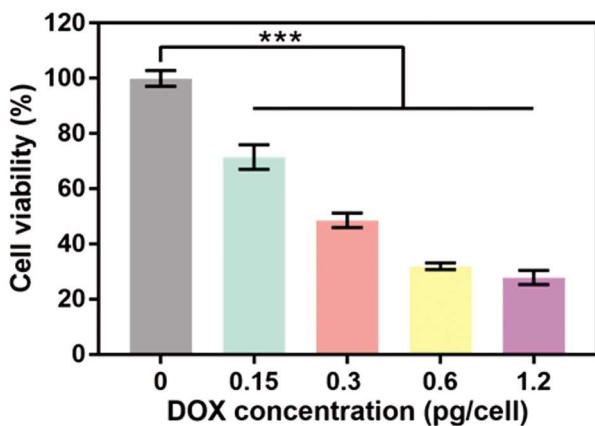


图 3 不同载药量情况下巨噬细胞生长活力比较

Fig.3 Comparison of macrophages growth activity under different drug loading

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=9. ***: P<0.001.

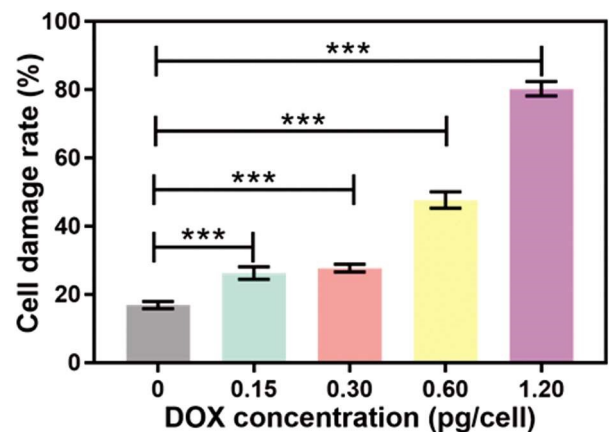


图 4 不同载药量情况下巨噬细胞损伤比较

Fig.4 Comparison of macrophages damage under different drug loading

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=5. ***: P<0.001.

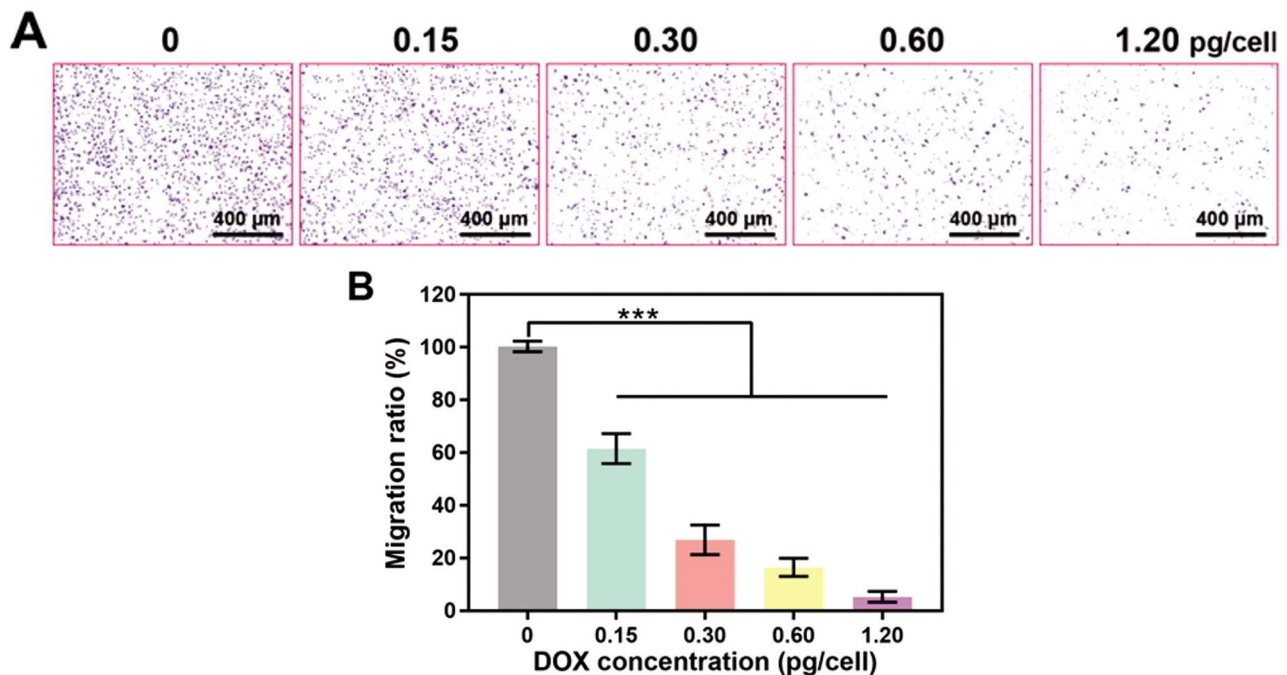


图 5 不同载药量情况下巨噬细胞运动性比较

Fig.5 Comparison of Macrophages motility under different drug loading

Note: Crystal violet chromatogram(A) and cell count(B) of macrophages passing through Transwell chamber under different drug loading. Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=3. ***: P<0.001.

3 讨论

细胞治疗的历史悠久,早在十七世纪就有研究人员利用全血进行输血,这是对细胞治疗的早期探索^[17,18]。随着科技的发展,人们对细胞的认识也更加深入^[19,21]。由于巨噬细胞能感知肿瘤相关因子并向肿瘤部位趋化,具有主动靶向的特性,相比起被动靶向能有效降低毒副作用。并且巨噬细胞作为“特洛伊木马”进行伪装能逃脱免疫系统的清除,防止药物过早地被清除^[22]。因此利用巨噬细胞进行药物递送具有巨大的优势。本文利用巨噬细胞运载 DOX@PLGA 纳米颗粒,开创了一种新的药物递送方法。该递药系统的制备方法非常简单,可以大批量制备,材料便宜易得,不需要特殊的仪器,重现性优异,有利于临床转化。相比与巨噬细胞直接装载游离阿霉素,可以降低阿霉素对载体细胞本身的杀伤作用。当巨噬细胞运载适当浓度的药物时,细胞依然具有很好的活性和运动性,为后续研究者提供了一个很好的递药模型。

首先,我们采用超声乳化法制备了 DOX@PLGA 纳米颗粒^[23,24]。脱去盐酸的阿霉素(DOX)易溶于有机溶剂,与 PLGA 共同溶于二氯甲烷中作为油相;1%胆酸钠溶液作为水相,同时具有乳化剂的作用。油相和水相在超声的作用下形成乳液,内含大量包载 DOX 的 PLGA 乳滴。通过搅拌液体,乳滴中的二氯甲烷得以挥发,PLGA 固缩成纳米颗粒,并将 DOX 包载于其中。通过此方法制备的纳米颗粒呈圆形或者椭圆形,粒径均一,分散性和稳定性优异。

然后,我们将 DOX@PLGA 与巨噬细胞共同孵育,让巨噬细胞对纳米颗粒进行摄取,从而实现巨噬细胞负载纳米颗粒的目的。巨噬细胞摄取 2 h 后,大量纳米颗粒出现在细胞浆。游离阿霉素作为一种小分子药物能嵌入 DNA 碱基对中,从而抑制 DNA 的复制和 RNA 的转录。若直接将游离阿霉素与巨噬细胞进行孵育,会对巨噬细胞造成很大的毒性。本研究将 DOX 包载进 PLGA 纳米颗粒中,能一定程度上减轻药物对载体的伤害。

最后,我们通过 CCK-8 法,LDH 法和细胞迁移试验分别评价了不同载药量情况下巨噬细胞的活力,损伤程度以及运动性。为了在细胞活力与载药量之间寻找到一个相对平衡的点,我们制备了一系列载药量不等的巨噬细胞,使得单个细胞具有一定载药量的同时也具有相对较好的细胞活性。当单个巨噬细胞负载 0.15 pg DOX 时细胞存活率为:71.5±4.4(%);细胞损伤率为:26.3±1.8(%);迁移率为:61.6±5.7(%)。该浓度下细胞的损伤率相对较低,部分细胞保持了较好的活力。采用 CCK-8 法测量细胞活性时,细胞孵育 24 h 时,孵育时间较长,所以存活率相对较低;而实际用于体内药物递送时,往往几小时巨噬细胞便能到达肿瘤部位,DOX 对载体本身的伤害可能会大大降低。当细胞负载药物后,细胞迁移率低于细胞活力,结果提示药物对细胞功能的影响可能大于对细胞活性的影响。

综上所述,本文提供了一种新的药物递送方法,具有一定的开创性。对活细胞药物递送进行了有益的探索,也为其他研究人员提供了一种利用巨噬细胞的新思路^[25,26]。巨噬细胞作为一种具有很强吞噬性的细胞,很容易将纳米颗粒负载于细胞内,但依然存在毒性较大的缺点,有待后续改进以降低药物对载体本身的毒性。一种思路是制备在胞浆内不容易释放药物的

纳米颗粒,待载体细胞到达肿瘤部位后再响应性释放^[27];另一种思路是将纳米颗粒负载于细胞表面,减轻药物对细胞的毒性^[28,29]。通过改进纳米颗粒的负载方式,活细胞药物递送在肿瘤治疗领域具有广泛的应用前景^[30]。

参考文献(References)

- [1] 郑荣寿,孙可欣,张思维. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34
- [3] Zhou M, Wang H, Zeng X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. Lancet, 2019, 394(10204): 1145-1158
- [4] Meel R, Sulheim E, Shi Y, et al. Smart cancer nanomedicine [J]. Nat Nanotech, 2019, 14(11): 1007-1017
- [5] Faria M, Björnmalin M, Thurecht KJ, et al. Minimum information reporting in bio-nano experimental literature [J]. Nat Nanotech, 2018, 13(9): 777-785
- [6] Goldberg MS. Improving cancer immunotherapy through nanotechnology[J]. Nat Rev Cancer, 2019, 19(10): 587-602
- [7] Tee JK, Yip LX, Tan ES, et al. Nanoparticles' interactions with vasculature in diseases[J]. Chem Soc Rev, 2019, 48(21): 5381-5407
- [8] Kwon S, Ko H, You DG, et al. Nanomedicines for Reactive Oxygen Species Mediated Approach: An Emerging Paradigm for Cancer Treatment[J]. Acc Chem Res, 2019, 52(7): 1771-1782
- [9] Sasaki K, Ishihara J, Ishihara A, et al. Engineered collagen-binding serum albumin as a drug conjugate carrier for cancer therapy [J]. Sci Adv, 2019, 5(8): eaaw6081
- [10] Nakamura Y, Mochida A, Choyke PL, et al. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer?[J]. Bioconjug Chem, 2016, 27(10): 2225-2238
- [11] Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? [J]. J Control Release, 2016, 244: 108-121
- [12] Kim B, Sun S, Varner JA, et al. Securing the Payload, Finding the Cell, and Avoiding the Endosome: Peptide-Targeted, Fusogenic Porous Silicon Nanoparticles for Delivery of siRNA [J]. Adv Mater, 2019, 31(35): e1902952
- [13] Chen Z, Wang Z, Gu Z. Bioinspired and Biomimetic Nanomedicines [J]. Acc Chem Res, 2019, 52(5): 1255-1264
- [14] Hu CM, Fang RH, Luk BT, et al. Nanoparticle-detained toxins for safe and effective vaccination[J]. Nat Nanotech, 2013, 8(12): 933-938
- [15] Tiet P, Berlin JM. Exploiting homing abilities of cell carriers: Targeted delivery of nanoparticles for cancer therapy [J]. Biochem Pharmacol, 2017, 145: 18-26
- [16] Chen Z, Hu Q, Gu Z. Leveraging Engineering of Cells for Drug Delivery[J]. Acc Chem Res, 2018, 51(3): 668-677
- [17] Myhre BA. The first recorded blood transfusions: 1656 to 1668 [J]. Transfusion, 1990, 30(4): 358-362
- [18] Anthes E. Evidence-based medicine: Save blood, save lives [J]. Nature, 2015, 520(7545): 24-26
- [19] Xue J, Zhao Z, Zhang L, et al. Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence [J]. Nat Nanotech, 2017, 12(7): 692-700

- Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis[J]. *Tissue Engineering Part B Reviews*, 2015, 21(4): 354-364
- [14] Bryan N. Brown. Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials[J]. *Acta biomaterialia*, 2012, 8(3): 978-987
- [15] Wang J, Qian S, Liu X, et al. M2 macrophages contribute to osteogenesis and angiogenesis on nanotubular TiO₂ surfaces[J]. *J. mater. chem. b*, 2017, 5(18): 3364-3376
- [16] Roh J D, R Sawh-Martinez, M P Brennan, et al. Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(10): 4669-4674
- [17] Li Y, W Yang, X Li, et al. Improving Osteointegration and Osteogenesis of Three-Dimensional Porous Ti6Al4V Scaffolds by Polydopamine-Assisted Biomimetic Hydroxyapatite Coating [J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(10): 5715-5724
- [18] Siddiqui N, Asawa S, Birru B, et al. PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications [J]. *Molecular Biotechnology*, 2018, 60(7): 506-532
- [19] Pina S, Rebelo R, Correlo V M, et al. Bioceramics for Osteochondral Tissue Engineering and Regeneration [J]. *Advances in experimental medicine & biology*, 2018, 1058: 53-75
- [20] Ng J, Spiller K, Bernhard J, et al. Biomimetic Approaches for Bone Tissue Engineering [J]. *Tissue Engineering Part B Reviews*, 2017, 23(5): 480-493
- [21] Doyle H, Lohfeld S, McDonnell P, et al. Evaluation of a Multiscale Modelling Methodology to Predict the Mechanical Properties of PCL/ β -TCP Sintered Scaffold Materials[J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2015, 43(8): 1989-1998
- [22] Lee S, Choi D, Shim JH, Nam W. Efficacy of three-dimensionally printed polycaprolactone/beta tricalcium phosphate scaffold on mandibular reconstruction[J]. *Scientific Report*, 2020, 10(1): 4979
- [23] Lai Y, Li Y, Cao H, et al. Osteogenic magnesium incorporated into PLGA/TCP porous scaffold by 3D printing for repairing challenging bone defect[J]. *Biomaterials*, 2019, 197: 207-219
- [24] Chen, Zetao, Wu, Chengtie, Gu, Wenyi, et al. Osteogenic differentiation of bone marrow MSCs by β -tricalcium phosphate stimulating macrophages via BMP2 signalling pathway[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(5): 1507-1518
- [25] Chen Z, Mao X, Tan L, et al. Osteoimmunomodulatory properties of magnesium scaffolds coated with β -tricalcium Phosphate [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(30): 8553-8565
- [26] Xie H, Z Cui, L Wang, et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis [J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(11): 1270-1278
- [27] Jetten N, Verbruggen S, Gijbels M J, et al. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo[J]. *Angiogenesis*, 2014, 17(1): 109-118
- [28] Xiaoshi J, Hudi X, Miron R J, et al. EZH1 Is Associated with TCP-Induced Bone Regeneration through Macrophage Polarization [J]. *Stem Cells International*, 2018, 2018: 1-10
- [29] Spiller K L, Anfang R R, Spiller K J, et al. The Role of Macrophage Phenotype in Vascularization of Tissue Engineering Scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(15): 4477-4488
- [30] Suen J L, Y Chang, Y S Shiu, et al. IL-10 from plasmacytoid dendritic cells promotes angiogenesis in the early stage of endometriosis[J]. *Journal of Pathology*, 2019, 249(4): 485-497

(上接第 2005 页)

- [20] Chu D, Gao J, Wang Z. Neutrophil-Mediated Delivery of Therapeutic Nanoparticles across Blood Vessel Barrier for Treatment of Inflammation and Infection[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(12): 11800-11811
- [21] Hu Q, Sun W, Wang J, et al. Conjugation of haematopoietic stem cells and platelets decorated with anti-PD-1 antibodies augments anti-leukaemia efficacy[J]. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2(11): 831-840
- [22] Zhang W, Wang M, Tang W, et al. Nanoparticle-Laden Macrophages for Tumor-Tropic Drug Delivery [J]. *Adv Mater*, 2018, 30(50): e1805557
- [23] Bai F, Wang C, Lu Q, et al. Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor neovasculature to combat P-gp expressing multidrug resistant cancer[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(26): 6163-6174
- [24] Zhong Q-Z, Li S, Chen J, et al. Oxidation-Mediated Kinetic Strategies for Engineering Metal-Phenolic Networks [J]. *Angew Chem*, 2019, 58(36): 12563-12568
- [25] Tang L, Zheng Y, Melo MB, et al. Enhancing T cell therapy through TCR-signaling-responsive nanoparticle drug delivery[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(8): 707-716
- [26] Kim H, Shin K, Park OK, et al. General and Facile Coating of Single Cells via Mild Reduction [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(4): 1199-1202
- [27] Shao J, Xuan M, Zhang H, et al. Chemotaxis-Guided Hybrid Neutrophil Micromotors for Targeted Drug Transport [J]. *Angew Chem*, 2017, 56(42): 12935-12939
- [28] Park J, Andrade B, Seo Y, et al. Engineering the Surface of Therapeutic "Living" Cells[J]. *Chem Rev*, 2018, 118(4): 1664-1690
- [29] Stephan MT, Moon JJ, Um SH, et al. Therapeutic cell engineering with surface-conjugated synthetic nanoparticles[J]. *Nat Med*, 2010, 16(9): 1035-1041
- [30] Ayer M, Klok H-A. Cell-mediated delivery of synthetic nano- and microparticles[J]. *J Control Release*, 2017, 259: 92-104