

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.14.001

巨噬细胞膜伪装纳米颗粒的制备和功能表征 *

隆梅 张钟 张攀 陆琴 方超[△]

(上海交通大学医学院药理学与化学生物学系 上海 200025)

摘要 目的:巨噬细胞具有炎症趋化能力,近年来巨噬细胞膜伪装的纳米递送载体引起研究者的广泛关注。本文提供了一种巨噬细胞膜伪装纳米颗粒的方法,即摄取-挤出法,并对该法制得的纳米颗粒进行表征,考察纳米颗粒在不同细胞中的摄取。**方法:**利用溶胶-凝胶法制备装载阿霉素的介孔硅(DMSN)纳米颗粒,再利用 RAW 264.7 巨噬细胞吞噬 DMSN,最后将巨噬细胞连续挤出制得巨噬细胞膜伪装的载有阿霉素的介孔硅(DMSN@CM)纳米颗粒。动态光散射激光粒度仪(DLS)测定 DMSN@CM 颗粒的粒径和表面电位,透射电子显微镜(TEM)观察纳米颗粒形态,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)验证细胞膜的成功伪装。然后通过激光共聚焦显微镜与流式细胞术共同考察了 DMSN@CM 在不同细胞中的摄取情况。**结果:**成功制备了 DMSN 和 DMSN@CM 纳米颗粒。DMSN 粒径为 116.7 ± 3.2 nm, zeta 表面电势为 -29.5 ± 1.3 mV; MSN@CM 粒径为 128.0 ± 9.3 nm, zeta 表面电势为 -26.7 ± 1.2 mV。TEM 与 SDS-PAGE 共同验证了 DMSN@CM 表面细胞膜的成功包覆。细胞摄取试验表明巨噬细胞膜的伪装可以抑制 RAW 264.7 细胞对 DMSN@CM 的摄取;促进 MDA-MB-231 细胞对 DMSN@CM 的摄取。**结论:**利用摄取-挤出法成功构建了 DMSN@CM 纳米颗粒,该法简便高效,为纳米颗粒的细胞膜伪装提供了一种新的手段。

关键词:巨噬细胞;细胞膜;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(2021)14-2601-06

Preparation and Functional Characterization of Macrophage Membrane Camouflaged Nanoparticles *

LONG Mei, ZHANG Zhong, ZHANG Pan, LU Qin, FANG Chao[△]

(Department of pharmacology and chemical biology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: Macrophage is a kind of immune cells with the ability of inflammatory chemotaxis. In recent years, macrophage membrane-camouflaged nanoparticle delivery system has attracted wide attention of researchers. Herein, a new method for macrophage membrane to camouflage nanoparticle-uptake-extrusion method is developed, and then we characterize the nanoparticles prepared by this method, and investigate the uptake of nanoparticles in different cells. **Method (s):** DMSN nanoparticles loaded with doxorubicin were prepared by sol-gel method, and then DMSN was phagocytized by RAW 264.7 macrophages. Finally, macrophages were continuously extruded to prepare DMSN@CM nanoparticles. The particle size and zeta potential of DMSN@CM were measured by nanoparticle size analyzer. The morphology of nanoparticles was observed by transmission electron microscope. Polyacrylamide gel electrophoresis was used to verify the successful camouflage of cell membrane. Then the uptake of DMSN@CM in different cells was investigated by laser confocal microscope and flow cytometry. **Result (s):** DMSN and DMSN@CM nanoparticles were successfully prepared. The size of DMSN was 116.7 ± 3.2 nm, and its zeta potential was -29.5 ± 1.3 mV; The size of MSN@CM was 128.0 ± 9.3 nm, and its zeta potential was -26.7 ± 1.2 mV. TEM and SDS-PAGE jointly verified the successful coating of cell membrane. Cell uptake assay showed that the camouflage of macrophage membrane could inhibit the uptake of DMSN@CM in RAW 264.7 cells, and promote the uptake of DMSN@CM in MDA-MB-231 cells. **Conclusion (s):** Thus, we provide a simple and efficient method for macrophage membrane to camouflage nanoparticles-uptake-extrusion method, and successful constructed DMSN@CM nanoparticles based on this method.

Key words: Macrophages; Cell membrane; Nanoparticles; Doxorubicin; Drug delivery

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

Article ID: 1673-6273(2021)14-2601-06

前言

一直以来,尽管许多癌症治疗手段已取得良好效果,癌症仍然是世界第一死亡原因^[1],给社会带来了沉重负担。目前,乳

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81773274;81572998)

作者简介:隆梅(1994-),女,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤靶向递药系统, E-mail: maysitu@163.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:2020-12-06 接受日期:2020-12-28)

腺癌已成为我国女性发病率最高的恶性肿瘤,发病年龄也呈逐渐年轻化趋势^[2]。如何解决癌症这一世界难题,已成为生命科学领域关注的热点。

近年来,纳米颗粒作为药物递送的载体受到了广泛的关注^[3,4]。由于其在肿瘤部位具有良好的高通透性和滞留效应(Enhanced permeability and retention effect, EPR),使得纳米颗粒能大量蓄积在肿瘤部位^[5],发挥最大的治疗作用。但许多纳米颗粒存在毒性和生物相容性差的问题,并且纳米颗粒进入体内会大量的被内皮网架系统清除^[5,6]。细胞膜作为生物内源性物质,具有先天免疫识别功能以及良好的生物相容性^[7]。许多研究已将细胞膜应用于纳米颗粒的表面伪装,相比起未伪装纳米递送系统,膜伪装纳米递送系统显示出较好的治疗效果^[8-11]。

因此,本文利用巨噬细胞天然的炎症趋化能力,通过摄取-挤出法将巨噬细胞膜成功包覆到介孔硅纳米颗粒表面,赋予纳米颗粒长循环与主动靶向的能力。该法简便易操作,可以大规模生产,并且可以通过吞噬不同的“核”纳米颗粒对多种纳米粒子进行膜伪装,根据疾病模型选择不同药物和纳米载体,为癌症的治疗提供了一种膜伪装的通用技术,在肿瘤的治疗领域具有广阔的应用前景。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

正硅酸乙酯 (TEOS, 98%)、十六烷基溴化铵 (CTAB, 98%)、购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 甲醇、无水乙醇、氢氧化钠 (NaOH)、氯化钠 (NaCl)、氯化铵 (NH₄Cl) 购自国药化学试剂公司; Hoechst 33342 购自美国 Thermo fisher 公司; 盐酸阿霉素 (DOX·HCl) 购自北京华联博化学材料有限公司; 巨噬细胞 (RAW 264.7)、乳腺癌细胞 (MDA-MB-231) 购自 ATCC; DMEM 培养基和胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公司; 磷酸盐缓冲液 (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; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、考马斯亮蓝快速染色液、蛋白质分子量标准 (Marker) 购于碧云天公司。

1.2 实验仪器

XS205 型电子天平购自 Mettler Tole 公司; MS2 型涡旋振荡器、IKA-Rtc basic 温控加热搅拌器购自德国 IKA 公司; 脂质体挤出器购自美国 Avanti 公司; 多功能酶标仪、Sorvall ST16 冷冻离心机购自美国 Thermo Fisher 公司; 动态光散射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。

1.3 方法

1.3.1 巨噬细胞 RAW 264.7 培养 按照如下配方配制巨噬细胞培养液: 44.5 mL DMEM 培养基 + 5 mL FBS + 0.5 mL 双抗。将 RAW 264.7 巨噬细胞冻存管从 -80 °C 冰箱中取出, 置于 37 °C 恒温水浴箱中迅速复温解冻, 将解冻后的冻存液吸入装有预热 DPBS 的离心管中, 800 rpm, 4 °C 条件下离心 5 min, 弃去上清后重悬于 10 mL 预热的巨噬细胞培养液中, 移入 100 mm 培养皿, 于 5% CO₂ 培养箱中常规培养。

1.3.2 DMSN 的制备 根据文献^[12] 采用溶胶-凝胶法合成 MSN, 具体如下: 精密称取 0.5 g CTAB 溶于 240 mL 三蒸水中, 向其中加入 1.75 mL 2 M NaOH 溶液, 混合物置于 75 °C 油浴条

件下剧烈搅拌 15 min。然后逐滴加入 2 mL TEOS, 60 s 后快速加入 3 mL 乙酸乙酯, 60 s 后停止搅拌, 室温下静置陈化 2 h。通过离心 (12000 rpm, 10 min) 收集 MSN 沉淀, 并用甲醇洗涤 3 次除去未反应的试剂, 真空干燥过夜。

采用离子交换法, 将 MSN 溶解在硝酸铵的甲醇溶液 (10 mg/mL, 100 mL) 中, 水浴超声 3 h, 离心 (12000 rpm, 10 min) 收集沉淀, 重复上述过程三遍除去模板剂。

将 MSN (1 mg/mL) 和阿霉素 (DOX, 0.5 mg/mL) 溶解在 PBS 中, 水浴超声 5 min, 剧烈搅拌 24 h。离心 (12000 rpm, 10 min), 用 HEPES 缓冲液 (pH 8.5) 洗至上清液无色, 完成对 DOX 的装载。

1.3.3 DMSN@CM 的制备 ① 从 CO₂ 细胞培养箱中取出 RAW 264.7 巨噬细胞培养皿, 吸弃原有培养基溶液, DPBS 洗 2 次, 加入 5 mL 含有 DMSN (DOX 400 μg/mL) 的完全培养基溶液, 置于 CO₂ 细胞培养箱中培养 2 h; ② 取出细胞培养皿, 使用 1 mL 移液枪将细胞吹打下来, 移取至离心管中, 800 rpm 离心 5 min, DPBS 洗 2 次后获得吞噬了 DMSN 的 RAW 264.7 巨噬细胞, 将细胞重悬于 DPBS 中; ③ 将步骤②中的细胞悬液分别通过 10 μm、5 μm、1 μm 的聚碳酸酯膜挤出, 每一步分别挤 10 次, 再用 800 nm 滤器过滤; ④ 过滤后的溶液离心 (12000 rpm, 10 min) 弃去上清, 重悬于 DPBS 中, 超声 5 min 即得到 DMSN@CM 的 DPBS 溶液, 保存于 4 °C 备用。

1.3.4 纳米粒的表征方法 DLS 粒度分析仪检测纳米粒的粒径和 zeta 表面电势; 将纳米粒溶液适当稀释后滴加于铜网上, 自然干燥后 TEM 观察不同纳米粒的形态与尺寸。

1.3.5 验证纳米粒表面细胞膜的成功伪装 采用 SDS-PAGE 方法验证 MSN@CM 表面细胞膜的成功伪装, 具体步骤如下: ① 制备不同样品: 按照前述方法分别制备 MSN、MSN@CM、CMtreated (巨噬细胞经聚碳酸酯膜挤出并超声) 的 DPBS 溶液备用; ② 提取蛋白: 取适量 MSN、MSN@CM、CMtreated 的 DPBS 溶液, RAW 264.7 细胞 (CM), 向其中加入 RIPA 细胞裂解液, 冰上裂解 20 min, 冷冻离心机离心 (12000 rpm, 4 °C, 20 min) 收集上清; ③ BCA 定量: 按照说明书的步骤制作蛋白浓度标准曲线并测定各组样品的总蛋白浓度, 用细胞裂解液将浓度调整一致; ④ 样品处理: 向各组样品中加入一定量 6 倍的 SDS, 使其终浓度为 1 倍, 100 °C 加热 10 min, 冷却至室温后保存于 -20 °C 冰箱中备用; ⑤ 配胶: 先配制 15 mL 10% 的分离胶, 具体为: 7.45 mL ddH₂O + 3.75 mL 40% Arc-Bis + 3.8 mL Tris-HCl + 150 μL APS + 7.5 μL TEMED; 再配制 6 mL 浓缩胶, 具体为: 3.75 mL ddH₂O + 0.75 mL 40% Arc-Bis + 1.5 mL Tris-HCl + 60 μL APS + 12 μL TEMED; ⑥ 上样与电泳: 将样品从冰箱中取出, 恢复室温后直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内, 60 V 电泳 1 h 后调整电压至 90 V, 电泳 1.5 h; ⑦ 考马斯亮蓝染色: 洗涤凝胶后按照染色液说明书的步骤对凝胶进行染色。

1.3.6 RAW 264.7 细胞对 MSN@CM 的摄取情况考察 ① 将 RAW 264.7 细胞以 2 × 10⁵ 个 / mL 的密度接种在预先加有爬片的 24 孔板上, 培养 24 h; ② 吸去原有培养基溶液, 向孔中分别加入 1 mL 含有 iFluor 647 标记的 MSN、iFluor 647 标记的 MSN@CM 的培养基溶液 (iFluor 647 的浓度为 10 ng/mL); ③ 继续培养 3 h 后, 吸去孔板中培养基溶液, 并用 DPBS 洗去残余

纳米粒及培养基;⑦用 Hoechst 与 DPBS(1:1000)配制工作液,染色 5 min 后 DPBS 洗 2 次,4%多聚甲醛固定 10 min 后,激光共聚焦显微镜观察细胞内荧光;收集细胞,4%多聚甲醛固定后流式细胞仪检测细胞内荧光。

1.3.7 MDA-MB-231 细胞对 MSN@CM 的摄取情况考察

将 MDA-MB-231 细胞以 2×10^5 个/mL 的密度接种在预先加有爬片的 24 孔板上,培养 24 h;⑧吸去原有培养基溶液,向孔中分别加入 1 mL 含有 iFluor 647 标记的 MSN、iFluor 647 标记的 MSN@CM 的培养基溶液(iFluor 647 的浓度为 10 ng/mL);⑨继续培养 3 h 后,吸去孔板中培养基溶液,并用 DPBS 洗去残余纳米粒及培养基;⑩用 Hoechst 与 DPBS(1:1000)配制工作液,染色 5 min 后 DPBS 洗 2 次,4%多聚甲醛固定 10 min 后,激光共聚焦显微镜观察细胞内荧光;收集细胞,4%多聚甲醛固定后流式细胞仪检测细胞内荧光。

1.4 统计学分析

所有原始数据导入 GraphPad Prism 7.00 软件进行统计学分析。以纳米粒大小作为横坐标,颗粒数量百分比为纵坐标绘

制 size 曲线;以纳米粒 zeta 表面电势为横坐标,分布强度为纵坐标绘制 zeta 曲线;以波长为横坐标,荧光强度为纵坐标拟合蛋白浓度标准曲线。Flowjo 统计流式细胞术结果。结果以 mean $\pm$ SD 表示。

2 结果

2.1 DMSN 的制备与表征

溶胶-凝胶法制备好纳米粒后,DLS 检测纳米粒的粒径和 zeta 表面电势,DLS 结果表明,MSN 粒径为 116.7 ± 3.2 nm,zeta 表面电势为 -29.5 ± 1.3 mV,历经分散系数 PDI 为 0.18 ± 0.01 。一般认为 $PDI < 0.2$ 即具有较好的均一性。将制备好的 DMSN 滴加至铜网上,室温下干燥后 TEM 观察纳米粒的形貌结构及尺寸大小,TEM 结果显示纳米颗粒呈圆形或椭圆形,形状规则,边界明显,孔道清晰,直径约 100 nm 左右。装载了 DOX 的 MSN 纳米粒水溶液呈红色,多功能酶标仪检测其在 480 nm 处有吸收峰(图 1)。

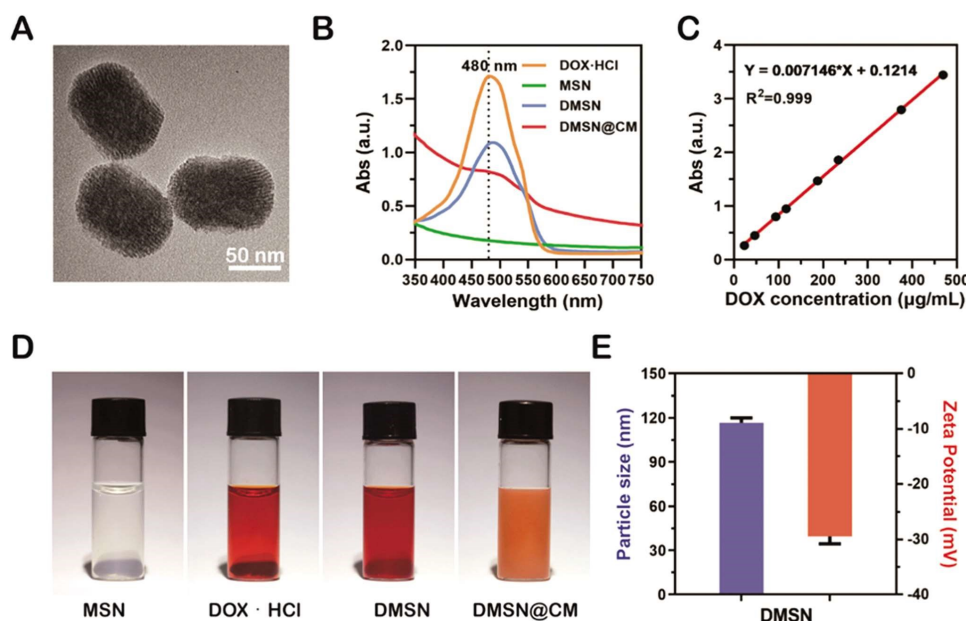


图 1 DMSN 的表征

Fig.1 Characterization of DMSN nanoparticles

Note: A) TEM of DMSN; B) UV absorption spectra of different nanoparticles; C) Standard curve of DOX concentration; D) Aqueous solution of different nanoparticles; E) Size and zeta potential of DMSN determined by DLS. Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n = 3$.

2.2 DMSN@CM 的制备与表征

RAW 264.7 细胞利用自身的吞噬功能将 DMSN"吃下去",再通过聚碳酸酯膜反复挤出与超声的方式得到了理想粒径的 DMSN@CM。DLS 测量结果表明,DMSN@CM 粒径为 128.0 ± 9.3 nm(图 2B),zeta 表面电势为 -26.7 ± 1.2 mV(图 2C),粒径分散系数为 0.13 ± 0.02 ,尺寸分布与 PDI 结果均表明纳米结构具有良好的均一性;且 DMSN@CM 与 DMSN 相比,粒径增大了 10 nm 左右。TEM 下显示圆形或椭圆形结构(图 2A),与 MSN(图 1A)相比,可以明显看到孔道变模糊,介孔之间有膜粘连,边界不清,介孔周围明显有一圈膜存在。DLS 与 TEM 的结果初步证明细胞膜的成功包覆(图 2)。DMSN@CM 的水溶液呈粉红色,在 480 nm 处有吸收峰,证明 DOX 的成功装载

(图 1)。

综上所述,DLS 所测得的各纳米粒粒径、zeta 电位与 PDI 如下表(表 1)所示:

2.3 SDS-PAGE 验证纳米粒表面细胞膜的成功伪装

按照 BCA 定量试剂盒的说明配置了不同浓度的蛋白标准溶液,并用多功能酶标仪于 560 nm 波长处定量检测其浓度,得到 BCA 定量的标准曲线(图 3A)。各组纳米粒样品蛋白浓度稀释 4 倍后,多功能酶标仪 560 nm 处测出的吸光度值分别为:CM 组为 1.16,CMtreated 组为 1.05,MSN@CM 组为 0.49,MSN 组 0.15。将各组值带入标准曲线计算后得到各组蛋白浓度为:CM 组为 $1.31 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,CMtreated 组为 $1.17 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,MSN@CM 组为 $0.46 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,MSN 组 $0.03 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,以最小浓度

即 MSN@CM 组浓度为准调整浓度一致后,最终蛋白上样量为 30 μL (约 14 μg)。考马斯亮蓝染色后的蛋白条带(图 3B)结果表明,MSN 组无蛋白条带,CM、CM_{treated} 和 MSN@CM 三组

蛋白条带相似,证明膜的成分相似,MSN@CM 与 CM 组蛋白条带重合度更高,表明 MSN@CM 表面 RAW 264.7 细胞膜的成功伪装。

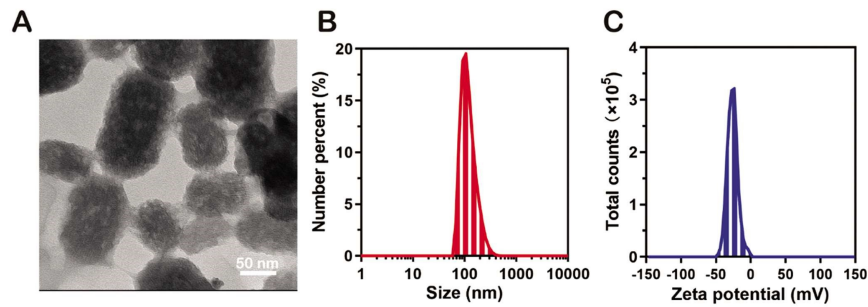


图 2 DMSN@CM 的表征

Fig.2 Characterization of DMSN@CM nanoparticles

Note: A) TEM of DMSN@CM; B) Size and C) Zeta potential of DMSN@CM determined by DLS.

表 1 各组纳米粒 DLS 测量的粒径与 zeta 电势

Table 1 The DLS size and zeta potential data of nanoparticles

Nanoparticles	Particle size (nm)	(PDI)	Zeta potential (mV)
DMSN	116.7 $\pm$ 3.2	0.18 $\pm$ 0.01	-29.5 $\pm$ 1.3
DMSN@CM	128.0 $\pm$ 9.3	0.13 $\pm$ 0.02	-26.7 $\pm$ 1.2

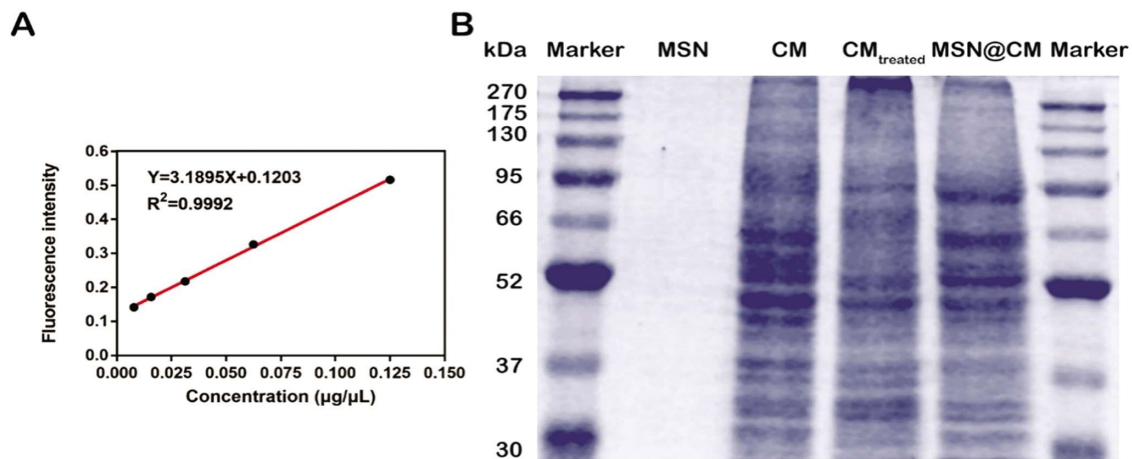


图 3 验证 MSN@CM 表面细胞膜的成功伪装

Fig.3 Verify the successful camouflage of cell membrane on the surface of MSN@CM

Note: A) Quantitative standard curve of BCA protein; B) SDS-PAGE of the CM with equivalent protein contents from the nanoparticles followed by Coomassie Blue staining.

2.4 MSN@CM 抑制 RAW 264.7 细胞的摄取

纳米颗粒进入血液循环后,容易被体内的内皮网装系统 (RES)清除,从而大大降低其靶向能力;而细胞膜作为体内天然存在的物质,能够将纳米颗粒伪装成 "自身" 成分,抵抗 RES 的清除,增强纳米颗粒在肿瘤部位的积蓄。当用 iFluor 647 标记的 MSN 和 MSN@CM (iFluor 647 的浓度为 10 ng/mL)与 RAW 264.7 孵育 3 h 后,共聚焦激光显微镜与流式细胞术的结果均表明纳米颗粒表面巨噬细胞膜的伪装能够抵抗巨噬细胞的摄取,从而在体内赋予纳米颗粒长循环的作用(图 4)。

2.5 MSN@CM 促进 MDA-MB-231 细胞的摄取

巨噬细胞是一种固有免疫细胞,具有炎症趋化能力^[13],能够靶向肿瘤细胞,促进肿瘤细胞对纳米颗粒的摄取。当用 iFluor 647 标记的 MSN 和 MSN@CM (iFluor 647 的浓度为 10

ng/mL)与MDA-MB-231 孵育 3 h 后,共聚焦激光显微镜与流式细胞术的结果表明,MDA-MB-231 对 MSN@CM 的摄取强于 MSN,表明巨噬细胞膜的成功包覆有利于纳米颗粒在肿瘤部位的积蓄,增强肿瘤杀伤作用(图 5)。

3 讨论

随着纳米技术的发展,有关纳米递药系统的研究越来越普遍^[14,15]。然而纳米粒子一旦进入人体,便会遇到一个高度复杂的环境,面临血浆稀释、调理作用和网状内皮系统的清除^[16-18],从而大大降低其治疗作用。传统解决方法是将合成聚合物聚乙二醇(PEG)引入纳米颗粒表面,产生水化层,同时还提供空间稳定作用,赋予纳米颗粒 "隐身" 的性能^[19]。然而近年来有关聚合物免疫反应的报导^[20,21]以及 "加速血液清除" 现象^[22]使得该法

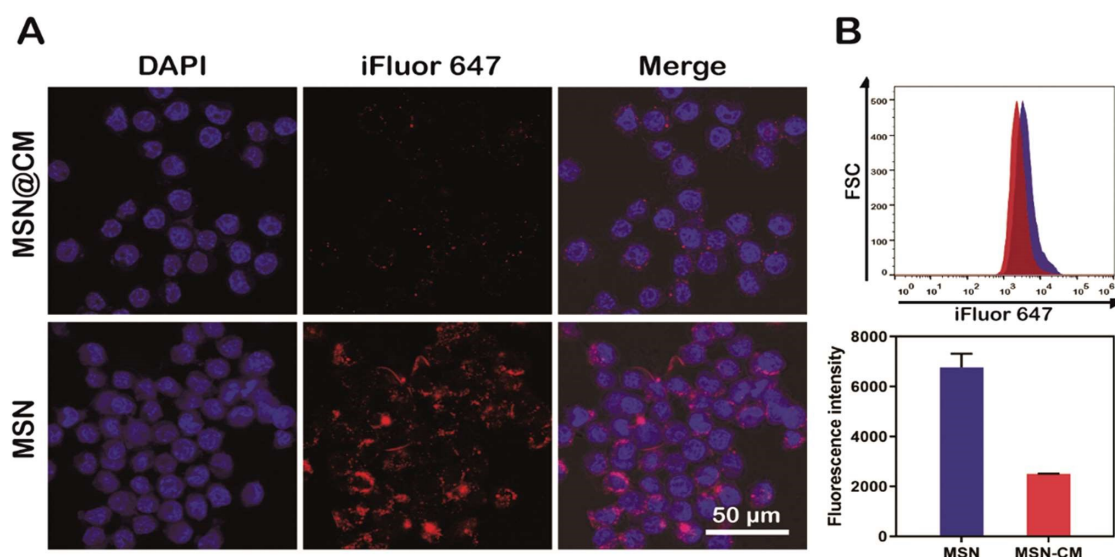


图 4 MSN@CM 抑制 RAW 264.7 细胞的摄取

Fig.4 MSN@CM can inhibit the uptake of RAW 264.7

Note: A) CLSM image of RAW 264.7 cellular uptake of MSN@CM after 3 h incubation at 37 °C. MSN treated cells were set as control; B) Flow cytometry showed the quantitative assay of MSN and MSN@CM uptake by RAW264.7. Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, n = 3.

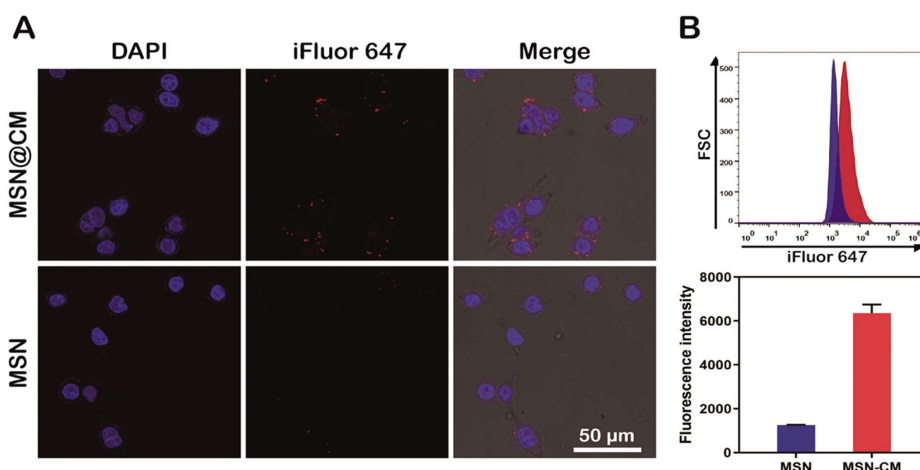


图 5 MSN@CM 促进 MDA-MB-231 细胞的摄取

Fig.5 MSN@CM can promote the uptake of MDA-MB-231

Note: A) CLSM image of MDA-MB-231 cellular uptake of MSN@CM after 3 h incubation at 37 °C. MSN treated cells were set as control; B) Flow cytometry showed the quantitative assay of MSN and MSN@CM uptake by MDA-MB-231. Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, n = 3.

的效果受到质疑。

生物细胞膜由于其天然的抗原特性，能够逃离免疫检测，避免网状内皮系统的吞噬，延长血液循环时间，是很好的纳米粒表面伪装材料^[23,24]。之前的研究发现，包括金纳米颗粒、上转换纳米粒子和介孔二氧化硅纳米粒子在内的各种递送载体已被整合到巨噬细胞膜系统中，在血液循环中具有良好的稳定性^[25,26]。传统的细胞膜伪装是一种“自上而下”的策略，通过低渗处理、反复冻融或超声破坏^[27,28]获得合适的细胞膜后，与“核”纳米颗粒通过多孔聚碳酸酯膜共挤出，从而获得膜伪装纳米颗粒^[29]。该法涉及的步骤繁多，操作复杂，花费时间长。有文献报道通过巨噬细胞先摄取 DOX 再将其挤出获得载 DOX 的囊泡，但其对 DOX 的装载效率低下^[30]。

因此，基于以上背景，我们设计了一种新的纳米颗粒表面膜伪装的方法—摄取—挤出法。该法简单易操作，不需要低渗处理、梯度离心和反复冻融等复杂的操作，也不需要特殊的仪器，

能够批量生产，材料便宜易得，重现性优异，有利于临床转化。与巨噬细胞直接装载游离阿霉素相比，摄取—挤出法可以大大增强阿霉素的装载效率，同时减少游离阿霉素对巨噬细胞的杀伤作用。细胞膜的成功伪装能够赋予纳米颗粒长循环的特性，体内增强肿瘤部位的积蓄，增强抗肿瘤作用。

首先，我们采用溶胶凝胶法，以 CTAB 为模板剂，TEOS 为硅源，在碱性条件下反应制备了生物相容性良好、表面易于修饰的 MSN 纳米颗粒，并将其用于 DOX 的装载。然后，将 DMSN 与 RAW 264.7 细胞共孵育，让 DMSN 被 RAW 264.7“吃进去”，再通过聚碳酸酯膜的反复挤出获得 DMSN@CM。通过 DLS 与 TEM 考察了纳米粒的尺寸大小与形态结构，结果表明通过溶胶凝胶法制备的纳米粒大小均匀，形态规则，具有明显的孔道结构；细胞膜伪装后，纳米粒粒径增加，TEM 下明显观察到孔道模糊，表面膜状物质的存在。SDS-PAGE 结果也表明 MSN 表面细胞膜的成功伪装。至此，我们运用多种手段证明了

MSN@CM 纳米递送系统的成功构建。紫外 - 可见光谱考察了 MSN@CM 纳米递送系统可用于装载 DOX, 证明了该纳米递送系统的实用性。MSN 与 MSN@CM 在不同细胞中的摄取情况表明, MSN@CM 能够抵抗 RAW 264.7 的清除, 促进 MDA-MB-231 的摄取, 从而促进肿瘤的杀伤毒性。一方面, 纳米颗粒表面伪装的生物膜继承了源细胞固有的自我识别功能, 能够逃避内皮网状系统的清除和免疫学检测, 在体内具有长循环作用^[31], 故来源于 RAW 264.7 的细胞膜能够将 MSN 伪装为自身 "RAW 264.7", 从而抵御 RAW 264.7 的摄取。另一方面, 巨噬细胞可以通过其表面的 $\alpha 4$ 整合素与癌细胞表面的血管细胞粘附分子 1 (VCAM-1) 的相互作用, 与癌细胞主动结合^[32], 故巨噬细胞膜伪装的 MSN, 能够促进 MDA-MB-231 的摄取。但该药物递送系统在动物体内的治疗效果还需进一步考察。RAW 264.7 作为一种巨噬细胞, 对吞噬的物质没有选择性, 理论上各种纳米颗粒都能被吞噬进入细胞, 再通过摄取 - 挤出法制得膜伪装的多种 "核" 纳米颗粒。

综上所述, 巨噬细胞还可用于其他不同性质纳米粒的表面伪装, 具有广阔的应用前景, 为多种临床药物的递送提供了方向。

参 考 文 献 (References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1)[Epub ahead of print]
- [2] Miller KD, Fidler-Benaoudia M, Keegan TH, et al. Cancer statistics for adolescents and young adults, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020 [Epub ahead of print]
- [3] Chu D, Dong X, Shi X, et al. Neutrophil-Based Drug Delivery Systems [J]. Adv Mater, 2018, 30(22): e1706245
- [4] Riley RS, June CH, Langer R, et al. Delivery technologies for cancer immunotherapy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(3): 175-196
- [5] Golombek SK, May J-N, Theek B, et al. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018, 130: 17-38
- [6] Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours[J]. Nature Reviews Materials, 2016, 1(5): 16014
- [7] Narain A, Asawa S, Chhabria V, Patil-Sen Y. Cell membrane coated nanoparticles: next-generation therapeutics[J]. Nanomedicine (Lond), 2017, 12(21): 2677-2692
- [8] Xia Y, Rao L, Yao H, et al. Engineering Macrophages for Cancer Immunotherapy and Drug Delivery[J]. Adv Mater, 2020, 32(40): e2002054
- [9] Dehaini D, Wei X, Fang RH, et al. Erythrocyte-Platelet Hybrid Membrane Coating for Enhanced Nanoparticle Functionalization[J]. Adv Mater, 2017, 29(16): doi: 10.1002
- [10] Zhang Y, Cai K, Li C, et al. Macrophage-Membrane-Coated Nanoparticles for Tumor-Targeted Chemotherapy[J]. Nano Lett, 2018, 18(3): 1908-1915
- [11] Wei X, Zhang G, Ran D, et al. T-Cell-Mimicking Nanoparticles Can Neutralize HIV Infectivity[J]. Adv Mater, 2018, 30(45): e1802233
- [12] Lee JE, Lee N, Kim H, et al. Uniform mesoporous dye-doped silica nanoparticles decorated with multiple magnetite nanocrystals for simultaneous enhanced magnetic resonance imaging, fluorescence imaging, and drug delivery[J]. J Am Chem Soc, 2010, 132(2): 552-557
- [13] Gordon S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process [J]. Immunity, 2016, 44(3): 463-475
- [14] Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities [J]. Nature Reviews Cancer, 2017, 17(1): 20-37
- [15] Wang AZ, Langer R, Farokhzad OC. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs[J]. Annual Review of Medicine, 2012, 63(1): 185-198
- [16] Nie S. Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine[J]. Nanomedicine (Lond), 2010, 5(4): 523-528
- [17] Moghimi SM, Simberg D, Skotland T, et al. The Interplay Between Blood Proteins, Complement, and Macrophages on Nanomedicine Performance and Responses [J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2019, 370(3): 581-592
- [18] Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, et al. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems [J]. Biomaterials, 2006, 27(24): 4356-4373
- [19] Suk JS, Xu Q, Kim N, et al. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 99(Pt A): 28-51
- [20] Yang Q, Lai SK. Anti-PEG immunity: emergence, characteristics, and unaddressed questions [J]. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2015, 7(5): 655-677
- [21] Verhoef JFF, Carpenter JF, Anchordoquy TJ, et al. Potential induction of anti-PEG antibodies and complement activation toward PEGylated therapeutics[J]. Drug Discovery Today, 2014, 19(12): 1945-1952
- [22] Abu Lila AS, Kiwada H, Ishida T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: Clinical challenge and approaches to manage [J]. Journal of Controlled Release, 2013, 172(1): 38-47
- [23] Zhang Y, Cai K, Li C, et al. Macrophage-Membrane-Coated Nanoparticles for Tumor-Targeted Chemotherapy [J]. Nano Lett, 2018, 18(3): 1908-1915
- [24] Hu CM, Fang RH, Wang KC, et al. Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking[J]. Nature, 2015, 526(7571): 118-121
- [25] Rao L, He Z, Meng QF, et al. Effective cancer targeting and imaging using macrophage membrane-camouflaged upconversion nanoparticles[J]. J Biomed Mater Res A, 2017, 105(2): 521-530
- [26] Xuan M, Shao J, Dai L, et al. Macrophage Cell Membrane Camouflaged Mesoporous Silica Nanocapsules for In Vivo Cancer Therapy[J]. Adv Healthc Mater, 2015, 4(11): 1645-1652
- [27] Fang RH, Hu C-MJ, Luk BT, et al. Cancer cell membrane-coated nanoparticles for anticancer vaccination and drug delivery [J]. Nano Lett, 2014, 14(4): 2181-2188
- [28] Hu C-MJ, Fang RH, Wang K-C, et al. Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking[J]. Nature, 2015, 526(7571): 118-121
- [29] Fang RH, Jiang Y, Fang JC, Zhang L. Cell membrane-derived nanomaterials for biomedical applications [J]. Biomaterials, 2017, 128: 69-83
- [30] Jang SC, Kim OY, Yoon CM, et al. Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors[J]. ACS Nano, 2013, 7(9): 7698-7710
- [31] Luk BT, Zhang L. Cell membrane-camouflaged nanoparticles for drug delivery[J]. Journal of Controlled Release, 2015, 220: 600-607
- [32] Chen Q, Zhang XHF, Massagué 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