

特约专栏

基于活细胞及其衍生物的药物递送系统研究进展

张 蒙, 黄容琴

(复旦大学药学院, 上海 201203)

摘 要: 目前, 对病变组织或细胞的靶向性不足是药物递送研究领域存在的一个重大挑战。大量研究表明, 基于纳米颗粒的靶向药物递送系统已经给癌症治疗带来新希望, 但仍存在生物相容性差、不可控降解、细胞毒性高和具有免疫原性等问题。相比之下, 活细胞及其衍生物通常具有固有的靶向能力、高载药能力和生物屏障穿透能力, 可作为药物载体控制药物释放, 从而提高药物在病灶组织或细胞的累积和治疗效率。首先综述了免疫细胞、无核细胞、干细胞、细菌等活细胞及其衍生物作为药物递送载体的主要研究进展; 同时, 对不同载药系统的靶向递送机制及优缺点进行了阐述; 最后, 对活细胞及其衍生物作为递药载体的临床转化潜力进行了展望。

关键词: 活细胞及其衍生物; 药物载体; 药物释放; 靶向递送; 肿瘤治疗

中图分类号: R730.59 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2022)09-0697-09

引用格式: 张蒙, 黄容琴. 基于活细胞及其衍生物的药物递送系统研究进展[J]. 中国材料进展, 2022, 41(9): 697-705.

ZHANG M, HUANG R Q. Research Progress of Drug Delivery Systems Based on Living Cells and Their Derivatives[J]. Materials China, 2022, 41(9): 697-705.

Research Progress of Drug Delivery Systems Based on Living Cells and Their Derivatives

ZHANG Meng, HUANG Rongqin

(School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

Abstract: Currently, one of the significant challenges remaining in the field of drug delivery research is insufficient targeting to diseased tissues or cells. The massive research indicated that, targeted drug delivery systems based on nanoparticles have shown a new hope in cancer treatment, but there still exist some problems including poor biocompatibility, uncontrollable degradation, high cytotoxicity and immunogenicity. In contrast, living cells usually have innate targeting ability, high drug loading capability and biological barrier penetration ability, and can be used as drug delivery vehicles to control drug release, so as to improve the accumulation and treatment efficiency of drugs on the focal tissues or cells. This review dwelled on the researches of immune cells, anucleated cells, stem cells, bacteria and their derivatives as drug delivery carriers. Meanwhile, the mechanism, advantages and disadvantages of different drug delivery systems were also discussed. Finally, the potential for clinical transformation and the prospect of live cells and their derivatives as drug delivery carriers were proposed.

Key words: living cells and their derivatives; drug carrier; drug release; targeted delivery; tumor therapy

1 前 言

纳米颗粒已被广泛用于提高药物的治疗效果, 然而大量研究证明, 纳米颗粒对生物体具有毒性作用^[1, 2]。此外, 药物递送过程中的生物屏障阻止了纳米药物载体在病灶部位的累积, 从而限制了药物治疗的效果。据报道^[3], 到达肿瘤的纳米药物通常是静脉注射剂量的 1%, 大多数纳米药物通过非特异性摄入而沉积在肝脏和脾脏中, 从而引起副作用。因此, 纳米颗粒在临床转化中面

收稿日期: 2022-08-11 修回日期: 2022-08-31

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年科学基金项目(31922044);
国家自然科学基金面上项目(82172746); 上海市优秀
学术带头人项目(20XD1420500)

第一作者: 张 蒙, 女, 1996 年生, 博士研究生

通讯作者: 黄容琴, 女, 1981 年生, 教授, 博士生导师,

Email: rqhuang@fudan.edu.cn

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.202208008

临许多挑战,这些挑战激发了研究者对新型药物递送载体的探索。

细胞具有感知、整合和响应体内动态环境的自然能力,可以作为治疗药物的载体。最近的相关研究主要集中在利用天然细胞或细胞来源的衍生物作为药物载体,包括整个细胞、细胞外囊泡和外泌体等。在体内注射游离蛋白质和治疗药物之后通常会引起免疫系统的反应,从而使之在血液中被迅速清除^[4]。而使用活细胞作为药物载体,药物被包裹在细胞内或附着在细胞表面,随后通过体液运输到病灶部位。细胞的内包封可以改善药物的药代动力学特征,或显著增加药物对病理条件区域的靶向性^[5]。同时,细胞及其衍生物能够逃离机体免疫系统的监视,使其负载的药物能够在体内持续存在,从而达到比天然或合成药物更好的预期效果^[6,7]。综上,由于活细胞及其衍生物具有较好的生物相容性、天然的靶向组织能力、固有的生物降解性、较高的载药能力和天然的跨越生物屏障能力,利用活细胞及其衍生物进行药物递送系统的设计已经成为药物递送领域的热点研究方向。

2 基于活细胞的药物递送系统

人体含有多种具有不同生理功能的细胞,在保留细胞结构和功能的基础上实现药物在体内的高效递送,是研究人员不断探索的方向。近年来,细胞药物载体如免疫细胞、无核细胞(红细胞和血小板)、干细胞和细菌等已成为研究的热点。本节总结了不同活细胞作为药物分子和生物活性蛋白递送载体的研究进展,并讨论了它们的优缺点。

2.1 免疫细胞

免疫细胞作为参与免疫应答或与免疫应答相关的细胞群,在人体免疫中担任着重要的角色。免疫细胞在接收到来自损伤组织的信号后迁移到感染组织处,可以有效抵御病原体。此外,免疫细胞自身不会引起不良的免疫反应,具有优越的生物相容性,与正常细胞的相互作用小,可以主动靶向特定细胞和位点^[8,9]。因此,免疫细胞是有潜力的药物递送载体。

2.1.1 巨噬细胞

巨噬细胞是人体吞噬细胞的一种,主要由白细胞产生,主要作用是清除损伤部位的外来碎片和细胞。由于巨噬细胞具有穿过血脑屏障和自然归巢的能力^[10],因而在靶向和治疗神经退行性疾病、炎症和癌症等疾病方面具有显著优势^[11]。尽管如此,巨噬细胞作为递药载体仍然存在不足,比如巨噬细胞是活细胞,大量的药物或纳米颗粒中的药物可能会干扰细胞的存活、迁移和功能,

从而限制了药物的负荷量。此外,巨噬细胞具有吞噬作用,该过程会释放酶和酸来杀死和消化病原体^[9]。在负载药物之后,巨噬细胞会快速消化大多数药物载体,降解药物,从而降低药物的释放和疗效。Dai 等以巨噬细胞为模板,设计出功能化的“细胞机器人”,利用巨噬细胞的内吞作用,将磁性纳米粒子、阿霉素(DOX)和吲哚菁绿等组成的颗粒富集到细胞内部,组成细胞机器人,以提高载药效率,并且可以被外界磁场驱动。在外磁场和近红外光(NIR)的作用下,该细胞机器人可以被精准控制到达靶向位置,释放 DOX,并在靶向位置对肿瘤进行杀伤^[9]。

快速的精准靶向和多手段辅助的精准释药可以提高巨噬细胞载药体系的治疗效果。2021 年,Nguyen 等^[12]开发了一种基于巨噬细胞的双靶向的微型机器人,该微型机器人的构建方法是将柠檬酸包被的超顺磁性纳米颗粒(CA-MNPs)和含 DOX 的热敏纳米脂质体(DOX-TSLPs)共同负载到巨噬细胞中。将巨噬细胞本身的趋化性和外部磁场调节的磁靶向相结合,可以使之快速靶向到肿瘤部位。同时,磁性纳米颗粒响应 NIR 照射,触发热敏纳米脂质体释放 DOX,该系统实现了在肿瘤部位精确的时空控制药物的释放(图 1)。因此,以上基于巨噬细胞的多手段辅助的精准递药系统可以转化成优良的临床药物输送平台,并在肿瘤靶向治疗中发挥巨大的作用。

2.1.2 T 细胞

T 细胞作为适应性免疫系统的一部分,可以特异性识别抗原和介导免疫应答。同时,由于其较高的特异性,T 细胞也是具有较高靶向性的一类细胞。当细胞毒性 T 细胞遇到其各自的抗原时,T 细胞受体会使细胞表面还原电位增加,该信号使细胞分泌蛋白质,从而诱导抗原提呈细胞凋亡^[13]。与抗原特异性结合后诱导细胞凋亡的这个过程,使 T 细胞在携带靶向药物和消除肿瘤方面具有优势。例如,T 细胞作为一种免疫细胞,具有直接杀伤靶细胞的生物学功能,因此 T 细胞能够穿过血脑屏障并利用自身的细胞毒性杀死颅内肿瘤^[14]。此外,T 细胞还能够不受限制地接触其他全身性疾病细胞,包括人类免疫缺陷病毒(HIV)和癌症(如黑色素瘤),这使得 T 细胞作为生物载体具有独特的优势^[14-16]。

近年来,使用嵌合抗原受体(CAR)T 细胞(CAR-T)的过继性细胞疗法显示出强大的抗肿瘤免疫能力,首先将编码这种 CAR 的基因导入毒性 T 细胞,然后经过基因编辑的 T 细胞利用它们表达的 CAR 受体结合到靶细胞表面的分子,此种结合可触发免疫系统的分子(如白细胞介素-15 超激动剂(IL-15Sa)、B 细胞)激活,产生促进组织损伤的抗体,从而实现靶细胞的快速摧毁。Tang 等^[17]

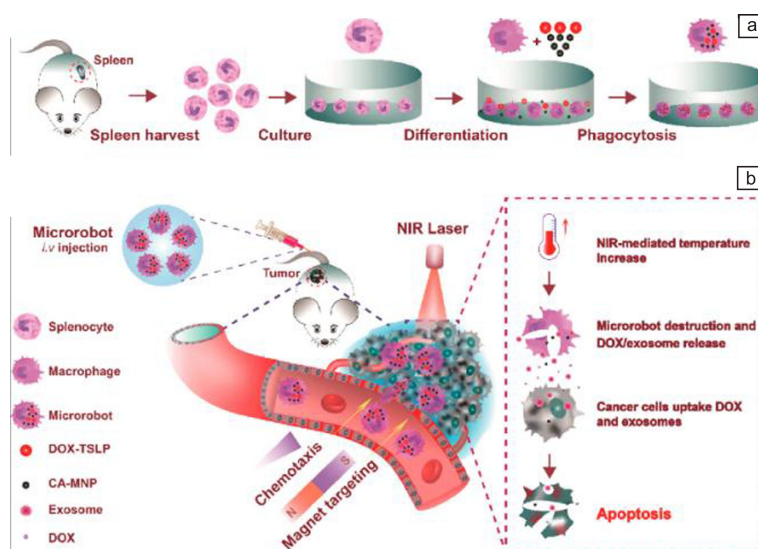


图1 基于巨噬细胞的微型机器人抗癌治疗原理示意图^[12]: (a)由脾细胞衍生的巨噬细胞负载到柠檬酸包被的超顺磁性纳米粒子(CA-MNP)和含DOX的热敏纳米脂质体(DOX-TSLP)组成的微型机器人制备过程示意图,(b)肿瘤细胞释放的电磁场和化学梯度将微型机器人吸引到肿瘤部位,然后通过近红外介导的药物释放破坏靶向的肿瘤细胞

Fig. 1 Schematic representation of the macrophages-based microrobot working principles as an anticancer therapy^[12]: (a) schematic diagrams of microrobots composed of splenocyte-derived macrophages loaded with superparamagnetic nanoparticles coated with citric acid (CA-MNPs) and DOX-containing thermosensitive nanoliposomes (DOX-TSLPs), (b) microrobots are attracted to the tumor site by an electromagnetic field and chemical gradients released by tumor cells, then the targeted tumor cells are destroyed by the NIR-mediated drug release

设计了“背包”纳米凝胶,在肿瘤靶向T细胞膜上偶联蛋白质药物,只有当CAR-T细胞与癌细胞结合并启动T细胞表面氧化还原活性时,才会释放蛋白质药物(图2a)。研究发现,从纳米凝胶中释放的IL-15 α 蛋白质药物促进了T细胞的扩增(数量增加16倍),从而加速脑胶质瘤的抑制和清除。

作为临床上的新型细胞疗法,尽管CAR-T疗法在癌症的免疫治疗中取得了成功,但一些挑战仍然限制了CAR-T细胞治疗癌症的疗效,包括脱靶毒性、抗原丢失和异质性、肿瘤微环境免疫抑制、T细胞浸润和渗透不足等^[16]。CAR-T细胞介导的肿瘤细胞杀伤主要是通过诱导靶细胞的凋亡来实现。以黑色素瘤为例,黑色素瘤细胞中具有高水平的抗凋亡蛋白,因此诱导细胞凋亡是极其困难的。已经有研究表明,黑色素瘤细胞的凋亡失败(即凋亡失败后存活的黑色素瘤细胞)会导致细胞粘附、趋化性增强,增加了黑色素瘤的迁移和侵袭^[18]。因此,在递药系统设计时,使用CAR-T细胞和靶向抗凋亡信号通路的药物联合治疗也可能是一个有用的解决方案。

2.1.3 中性粒细胞

中性粒细胞是人体含量最丰富的白细胞(占外周血循环中总白细胞的50%~70%),是感染和肿瘤发生期间炎症部位招募的主要细胞类型,这也说明了中性粒细胞可

能可以用于炎症和癌症的纳米治疗^[19,20]。以中性粒细胞为基础的给药系统有望克服纳米治疗诸如生物相容性低、循环时间短和纳米材料的免疫原性等局限性,在癌症治疗方面显示出巨大的潜力。

肿瘤的发生过程总是伴随着炎症,药物搭载中性粒细胞的“便车”可以自然地实现在肿瘤处的蓄积。Chu等发现,白蛋白纳米粒可以在中性粒细胞原位(即血液循环期间)搭“便车”,将治疗药物带到肿瘤病灶区^[21]。黑色素瘤gp75抗原的单克隆抗体TA99可以启动肿瘤中性粒细胞的募集,因此中性粒细胞可以介导与TA99抗体共注射的白蛋白纳米粒在肿瘤处的累积。他们进一步制备了光敏剂(焦脱镁叶绿酸-a)负载白蛋白纳米粒和TA99(TA99/Ppa BSA NPs),与使用白蛋白纳米粒或TA99治疗相比,同样在660 nm激光照射下,TA99/Ppa BSA NPs显著抑制了肿瘤的生长并提高了小鼠存活率。这项研究提出了一种治疗癌症的新途径,即通过纳米粒“搭车”免疫系统来增强治疗药物向肿瘤部位的输送。

此外,中性粒细胞具有穿越血脑屏障并穿透胶质瘤部位的天然能力^[22]。Zhang等将携带含有紫杉醇(paclitaxel, PTX)的脂质体(PTX-CL)装载到中性粒细胞(neutrophils, NEs)中(PTX-CL/NEs)^[23],在小鼠脑胶质瘤的复发试验中,肿瘤切除后释放的炎症因子引导载药的中性

粒细胞进入发炎的大脑(图 2b)。大脑中高度集中的炎症信号触发 PTX-CL 从中性粒细胞中释放,从而将 PTX 输送到侵袭细胞中。这种中性粒细胞介导的药物递送有效

减缓了肿瘤的复发生长,显著提高了小鼠的生存率。在中性粒细胞中引入功能性纳米药物可能是改善复杂条件下纳米治疗的一种有前景的策略。

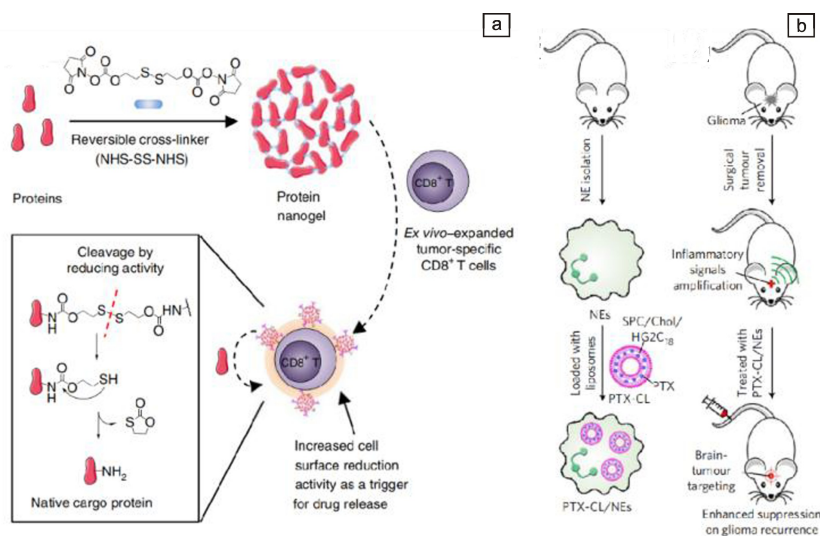


图 2 蛋白质纳米凝胶合成以及 CAR-T 细胞响应局部微环境释放蛋白质的示意图 (a)^[17]; 中性粒细胞介导的抗癌药物递送抑制胶质瘤术后复发的方案设计, PTX-CL/NEs 制备示意图和 PTX-CL/NEs 抑制小鼠术后胶质瘤复发的示意图 (b)^[23]

Fig. 2 Scheme for protein nanogels synthesis and for release of protein in response to reduce activity in the local microenvironment (a)^[17]; schematic design of neutrophil-mediated anticancer drug delivery for the suppression of postoperative glioma recurrence, the preparation of PTX-CL/NEs and the schematic shows how PTX-CL/NEs suppress postoperative glioma recurrence in mice (b)^[23]

2.2 无核细胞

红细胞和血小板由造血干细胞产生,是血液循环系统的独特组成部分,因为它们没有细胞核和遗传信息,因此没有异常生长或致癌转化的固有风险。相较于向体内注射游离蛋白质会引起快速的免疫反应,导致蛋白质从血液中被快速清除,红细胞和血小板可以在血液不受阻碍地循环几天,在药物递送方面具有显著优势。可以通过将治疗分子装在细胞内(细胞内包裹)或附着到细胞表面(表面修饰)来实现药物递送。

2.2.1 红细胞

红细胞也被称为红血球,是人体内数量最多的血细胞类型,具有良好的生物相容性、可调的负荷能力和较长的血液循环半衰期(人类红细胞的半衰期约为 120 d)。红细胞具有完全的生物降解性,没有任何毒性副产物,在使用红细胞负载药物时,在循环递送过程中可以使生物体免受毒副作用。红细胞除了具有双凹形状和较高的表面积之外,还不具有细胞核和许多细胞器,这些独特的性质为细胞的药物装载和表面改性提供了足够的空间。一些纳米颗粒在肝脏、脾脏的积蓄,可能会对机体产生长期毒性,这限制了其临床转化进程。近期有研究表明,将纳米药物颗粒负载在红细胞中,可以减少许多单核吞噬系统器官(如肝和脾)对纳米颗粒的摄取^[24]。并且,表

达于红细胞表面的 CD47 蛋白质可以向免疫系统发出信号,以避免红细胞被巨噬细胞摄取^[25],便于药物装载到红细胞表面或其内部。此外,CD47 还具有延长药物在血液中循环时间的作用^[26]。

细胞内的药物负载可以为药物的封装提供一个免疫特权环境,从而增加其循环时间。实现细胞内包封的一种方法是将红细胞置于低渗溶液中,诱导细胞膜上的孔洞(尺寸 15~100 nm)暂时性地打开,这样药物分子就可以进入细胞,当切换到等渗环境,这些孔洞就会关闭,从而将药物分子包裹在细胞内^[27]。利用该方法, Dumont 等成功地将抗炎和免疫抑制的前药分子(地塞米松的前药地塞米松磷酸钠)包裹在红细胞内,实现了炎症性肠病囊性纤维化和共济失调性毛细血管扩张症的临床治疗^[27]。

此外,药物也可以搭载红细胞的“便车”到达靶部位,即在红细胞外部连接大分子药物。为了将“红细胞便车”靶向特定的器官, Brenner 等将纳米载体(脂质体或白蛋白)在体外吸附到红细胞(red blood cell, RBC)上(RBC-NPs)^[28],向小鼠的动脉(intra-arterially, IA)内注射 RBC-NPs,使药物在下游器官中积累,以治疗心脏病发作和中风(图 3a)。通过 IA 注射,这种新型药物运输方式使得药物在大脑、肾脏和外周组织中有较高的累积。

2.2.2 血小板

血小板是一种体积较小的无核循环细胞, 直径约 $1\sim 3\ \mu\text{m}$ ^[29], 单个血小板的寿命约为 $8\sim 10\ \text{d}$, 因此, 骨髓造血组织中的巨核细胞持续产生大量新的血小板以维持正常的血小板数目。血小板的快速补充特性和适当的循环时间, 避免了体内长时间的蓄积, 因而成为可再生和高安全性的用于细胞治疗的理想药物载体。近年来相关研究表明, 血小板的数量和活性增加与肿瘤转移相关, 其主要通过促进肿瘤细胞的免疫逃避、黏附作用以及血管生成参与肿瘤转移进程。在肿瘤微环境中, 肿瘤细胞分泌的前列腺素 E_2 (PGE_2) 可激活血小板进而释放转化生长因子- β ($\text{TGF-}\beta$), 促进肿瘤细胞的上皮-间充质转化 (EMT), 从而促进肿瘤细胞的存活和转移^[30]。此外, 血小板进入血液循环后的聚集还可以保护循环肿瘤细胞 (CTCs) 免受自然杀伤细胞的免疫监视, 并通过增强与内皮细胞的粘附, 使 CTCs 渗出血管。因此, 利用血小板靶向系统进行抗肿瘤治疗, 可能具有更好的治疗效果^[31]。

近期, King 等开发了一种血小板介导的肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 相关凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL, 一种选择性诱导肿瘤细胞凋亡的蛋白) 的递送系统^[32]。他们将 TRAIL 和血管性血友病因子 A1 结构域 (vWF-A1) 同时修饰到纳米脂质体表面, 因为 vWF-A1 可以与血小板受体复合物 GPIb-IX-V 结合, 从而使该药物修饰的纳米脂质体搭载血小板的“便车”实现 CTCs 的靶向, 抑制肿瘤的转移。在各种原发性和转移性癌症临床样本中, 血小板介导的 TRAIL 递送系统杀死了血液中超过 60% 的 CTCs。血小板-脂质体治疗是一种很有前景的方法, 可与手术联合使用来预防癌症的复发和转移。

血小板活化会引起自身剧烈的形态变化, 并导致细胞内容物的释放。新型药物递送系统的设计主要是基于血小板粘附于肿瘤细胞和将药物递送到靶向的恶性细胞的能力。例如, Xu 等^[33]将 DOX 装载进入天然血小板中用于治疗淋巴瘤。将 DOX 包载于血小板中, 此过程并未显著诱导血小板形态学和功能的改变。DOX-血小板通过“肿瘤细胞诱导的血小板聚集”促进细胞内药物积累, 并以 pH 响应的方式将 DOX 释放到培养基中。同时, 将 DOX 放入血小板中可以消除 DOX 游离在机体内环境中所产生的有害影响 (循环时间差和心脏毒性作用等), 并且增强对淋巴瘤细胞的生长抑制作用 (图 3b)。DOX-血小板通过调节细胞凋亡相关基因的表达来提高 DOX 的抗肿瘤活性, 因此血小板可以作为淋巴瘤临床治疗的潜在药物载体。

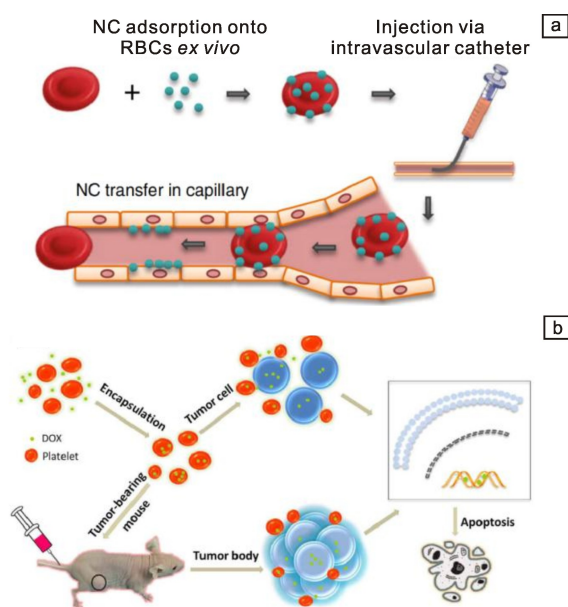


图3 纳米载体在体外吸附到红细胞上, 血管内导管注射后转移到下游毛细血管(a)^[28]; DOX-血小板在体外和体内增强抗肿瘤活性的机制示意图(b)^[33]

Fig. 3 Nanocarriers are adsorbed onto the RBCs *ex vivo*, and then transfer to downstream capillaries after intravascular catheter injection (a)^[28]; schematic illustration of the possible mechanism of enhanced anti-tumor activity of DOX-platelet *in vitro* and *in vivo* (b)^[33]

2.3 干细胞

干细胞是一种未分化的细胞, 具有产生不同类型细胞的潜力, 由于具有在癌组织中生存和耐受的能力, 将其作为化疗药物载体的相关研究受到研究人员的关注。因为是活细胞, 干细胞具有生物可降解性和生物相容性^[34], 同时还具有再生、免疫调节和抗炎的特性^[34,35]。此外, 干细胞能够基于趋化信号靶向特定的细胞, 并浸润特定的肿瘤类型。

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一种多能干细胞, 具有干细胞的所有共性, 即自我更新和多向分化能力, 在特定的体外刺激下具有克隆性扩增能力, 能够分化为骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞。常用的骨髓间充质干细胞类型为骨髓来源的骨髓间充质干细胞和脂肪来源的骨髓间充质干细胞。MSCs 易于从各种组织中分离并且易于在体外扩增, 因而成为提供特异性并靶向癌症治疗的有竞争力的候选者。

MSCs 具有肿瘤归巢能力, 在全身注射后可聚集在肿瘤病灶区内, 可以作为肿瘤靶向治疗的药物载体。近期, Takayama 等利用亲和素-生物素复合的方法^[36], 将负载 DOX 的脂质体 (DOX-Lips) 成功修饰到了 MSCs 的表面,

此过程没有改变 MSCs 的细胞特性。动物实验结果也显示,尾静脉注射 DOX-Lips 修饰的 MSCs 1 h 后,药物在小鼠肿瘤处的蓄积明显高于其他组织,同时,该递药系统可以显著抑制皮下荷瘤小鼠和肺转移小鼠模型中的肿瘤生长。

影响细胞给药有效性的一个关键参数是有效载荷能力,除了采用细胞表面共价连接的方式进行药物的负载, MSCs 同样也可以进行内部载药。但是,当依赖于干细胞的非特异性内吞作用时^[37],细胞的快速循环和胞吐作用会导致较低的纳米颗粒负载能力。同样,细胞不断地内化和循环其外膜,可能导致膜偶联纳米颗粒的溶酶体降解。Moku 等在纳米颗粒表面修饰穿膜肽,以增强骨髓间充质干细胞的药物有效载荷能力^[38]。穿膜肽通常为 5~30 个氨基酸组成,其特征是赋予纳米颗粒通过大胞吞^[39]进入细胞质并绕过溶酶体的能力。在迄今为止发现的各种穿膜肽中,转录反激活因子(transactivator, TAT)肽已被广泛研究,用以改善细胞内各种装载物的递送。研究人员通过将 TAT 肽共价偶联到封装紫杉醇的纳米颗粒表面,改善了 MSCs 对纳米颗粒的内化和保留,从而增强了有效载药量。

2.4 细菌

细菌是由单个细胞构成的,细菌的细胞内具有细胞壁、细胞膜、细胞质等结构,但都没有成形的细胞核,属于原核细胞。人体内居住着许多不同的微生物群,这些微生物分布于人体各处,包括肠道、口腔、皮肤、呼吸道等部位。某些细菌栖息在身体特定部位的生态位中,可以优先靶向该部位并在肿瘤微环境中生存。因此,以细菌为基础的递送系统是目前有吸引力的选择。血液循环和其他正常组织中的细菌分别可以在数小时和数天内被清除,而肿瘤中的细菌往往会持续增殖,数量往往远远超过最初使用的集落形成单位^[40]。这种选择性的定植很可能是与实体肿瘤相关的病理改变引起的免疫抑制和肿瘤部位独特的生化微环境共同作用的结果。

血管结构的缺陷、间质压力的升高和肿瘤微环境中渗透距离的增加是将治疗药物引入肿瘤的主要障碍。近年来,以细菌为递药载体的研究不断发展。将载药脂质体通过化学偶联附着在海洋趋磁细菌(MC-1)表面,将修饰后的 MC-1 注射到小鼠肿瘤附近,通过使用外部磁场,利用改造过的细菌的趋磁性将载药细菌引导到肿瘤部位,然后关闭磁场,修饰后的 MC-1 优先迁移到肿瘤深处,随后向低氧区域移动。注射的 MC-1(高达 55%)能够进入肿瘤的缺氧区域,表明这些改造后的趋磁细菌具有穿透实体肿瘤的能力^[41]。此外,细菌也被用于将功能性核酸递送到人类的实体肿瘤中。2007 年, Akin 等研究发现,

绿色荧光蛋白(green fluorescent protei, GFP)报告基因、萤火虫荧光素酶和分泌碱性磷酸酶均可以通过附着在细菌表面的纳米颗粒中进行递送^[42]。肿瘤细胞吞噬细菌后,这些细菌将携带的 DNA 释放到肿瘤细胞中,实现了基因在肿瘤细胞中的表达。利用细菌作为非病毒载体将基因递送到肿瘤细胞中,为重新编程肿瘤细胞提供了可行性方案。

此外,以细菌为载体,联合其它多种策略进行肿瘤治疗的方案不断被挖掘。聚多巴胺(pDA)是一种仿生光热材料,具备良好的生物相容性与生物可降解性,光热转化效率较高。Chen 等利用多巴胺在碱性溶液中的氧化自聚合反应,使 pDA 成功地包裹于减毒沙门氏菌 VNP20009(VNP)的表面(pDA-VNP),构建了细菌与光热疗法联合的抗肿瘤治疗方案^[43]。如图 4 所示, pDA-VNP 经尾静脉注射到荷瘤小鼠体内后,可以靶向实体肿瘤的缺氧区域,在近红外激光照射下诱导肿瘤处的温度升高。更重要的是,该研究发现 VNP 和 pDA 相互增强了治疗能力,具有优越的抗肿瘤效果。

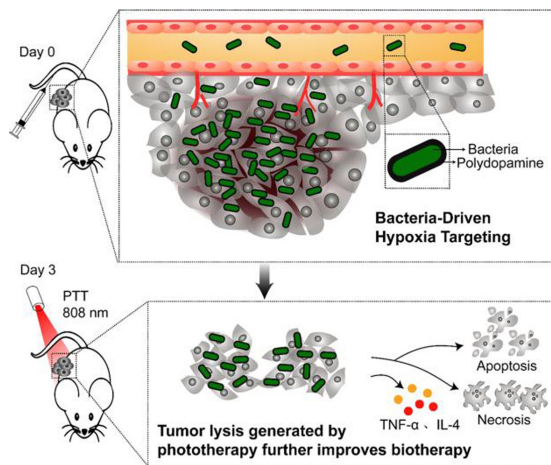


图 4 pDA-VNP 光热疗法产生的肿瘤细胞裂解进一步改善了细菌介导的生物治疗^[43]

Fig. 4 Tumor cell lysis generated by pDA-VNP-based photothermal therapy further improves bacteria-mediated biotherapy^[43]

3 基于囊泡的药物递送系统

除了前文描述的基于细胞的药物递送策略外,囊泡作为细胞衍生的膜颗粒,能继承源细胞的功能,如免疫逃逸、长循环和识别能力等。本节总结了细胞外囊泡和细菌外膜囊泡作为药物分子和生物活性蛋白递送载体的进展,并讨论了其优缺点。这种细胞衍生的囊泡被广泛使用,有望成为新兴的药物递送工具。

3.1 细胞外囊泡

细胞外囊泡是一种天然的纳米载体,能携带蛋白质、

脂质、核酸和糖等生物活性分子,有助于细胞和组织之间信息的传递,从而在细胞通信中发挥重要作用。细胞外囊泡根据大小和形态可大致分为3种类型:凋亡小体(1000~5000 nm)、大囊泡或微粒(100~1000 nm)和外泌体(50~100 nm)^[44]。其中,外泌体是研究最全面的囊泡。细胞外囊泡已被证明可以携带包括蛋白质、mRNA和miRNA在内的功能活性生物分子,可以通过血液和淋巴管将信号传递到周围环境中的目标细胞以及远处的器官。

外泌体来源于晚期核内体,是由细胞内多泡体与细胞膜融合后释放到细胞外基质中的膜性囊泡,是细胞外囊泡的最小形式。由于尺寸较小,单核吞噬细胞系统无法对其进行清除^[45],因此,外泌体可以作为药物的“隐形外衣”。使用外泌体载药克服了2种主要的干细胞并发症,即致瘤性和移植物抗宿主病,同时保留了所有的靶向性和亲本细胞类型的优势^[46]。大多数类型的细胞,如树突状细胞(dendritic cells, DCs)、上皮细胞、巨噬细胞、网织红细胞、肥大细胞、血小板、神经元、B细胞、T细胞、少突胶质细胞、肿瘤细胞和雪旺细胞等均能释放外泌体。外泌体的成分很大程度上取决于细胞的来源,例如,来自B淋巴细胞的外泌体具有功能性的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)I、II和T细胞共刺激分子,可以刺激T细胞增殖;癌细胞来源的外泌体含有明胶溶解酶和其他与细胞粘附相关的分子,可以促进肿瘤的发展和转移^[47]。外泌体作为一种内源性多功能载体,具有独特的“归巢”效应,即靶向产生外泌体的源细胞的能力。因此,外泌体在各种治疗药物的递送方面具有巨大潜力。其中,对MSCs来源的外泌体、肿瘤细胞来源的外泌体和免疫细胞来源的外泌体的研究较为广泛。

药物分子可以通过主动或被动的方式加载/封装到外泌体中。被动载药法可以通过药物与外泌体孵育或药物与供体细胞孵育来实现,相对简单和直接。主动载药法可以通过超声处理、挤压、电穿孔或药物偶联等技术实现,载药效率高,有利于大分子药物的负载。DOX是一种广泛使用的抗癌药物,但将细胞长期暴露于DOX中会导致显著的细胞毒性,限制了DOX的持续使用。Schindler等在研究中发现,与游离DOX和市售DOX脂质体(Myocet®和Doxil®)相比,将DOX负载到外泌体中更容易被细胞摄取,DOX可以从核内体分布到细胞核^[48]。此外,Li等开发了一种用于靶向给药的抗体功能化的外泌体,并对其体内疗效进行了评估。通过超离心法从A33阳性的结直肠癌(LIM1215)细胞中分离出外泌体,并进行了DOX的装载。带有A33抗体的超磁性氧化铁纳

米颗粒(US)与A33阳性外泌体结合,形成了外泌体复合物(A33Ab-US-Exo/Dox)。小鼠体内实验表明,该复合物具有良好的肿瘤靶向能力和肿瘤抑制能力,可以延长小鼠存活时间和降低心脏毒性^[49]。通过修饰抗体可提高外泌体复合物的肿瘤靶向能力,高密度抗体功能化的外泌体是一种有效的癌症治疗方法。

其他使用外泌体为递送载体的药物有用于治疗胰腺癌的吉西他滨(Gem)和用于治疗帕金森病的多巴胺。外泌体除了提高用药效率外,还被用来携带小分子穿过血脑屏障。帕金森病是常见的神经退行性疾病,受血脑屏障的阻碍,其治疗具有挑战性。有研究报道,负载有多巴胺的外泌体(0.2 mL,相当于左旋多巴4.95 mg/kg)通过血液传递时,小鼠大脑中的多巴胺浓度为(1.02±0.15) nmol/g,而接受游离多巴胺的小鼠大脑中未检测到多巴胺(串联质谱检测限为0.065 nmol/g)。该研究表明,通过将多巴胺装入外泌体,可以使其在脑中的分布增加15倍以上,而游离多巴胺倾向于在肝脏、肺和肾脏中积累。体外和体内研究显示,与单独使用游离多巴胺相比,外泌体对帕金森病小鼠模型具有更好的治疗效果,并具有更低的全身毒性^[50]。

尽管外泌体展示出可跨越血脑屏障的能力,但许多研究表明,静脉注射的外泌体主要分布在肝脏或脾脏,只有很小一部分保留在大脑或肿瘤部位^[51]。MicroRNA-21(miR-21)是包括胶质母细胞瘤在内的实体肿瘤中上调最高的miRNA之一,下调miR-21可作为一种干预肿瘤细胞增殖和增加凋亡的方法。转铁蛋白受体在胶质母细胞瘤表面过表达,而转铁蛋白靶向肽T7是转铁蛋白受体结合肽,因此,可以通过T7肽靶向胶质母细胞瘤。Kim等通过将T7作为T7和溶酶体相关膜蛋白2b(Lamp2b)的融合蛋白掺入到外泌体膜中,产生了装饰有T7肽的外泌体(T7-exo),并通过电穿孔将miR-21反义寡核苷酸装载到外泌体中。研究表明,与未修饰的外泌体相比,通过尾静脉注射,T7-exo可更有效地将miR-21反义寡核苷酸递送至大脑,有效降低胶质母细胞瘤中的miR-21水平^[52]。因此,可以通过肿瘤靶向配体对外泌体进行修饰,提高其靶向递送到大脑的效率^[51]。

3.2 细菌外膜囊泡

细菌外膜囊泡(outermembrane vesicles, OMVs)是由微生物细胞表面产生的球形膜性囊泡,直径在20~500 nm之间。不同细菌产生的囊泡不仅在大小、形态、组成和形成方式上不同,名称也有所不同。由于OMVs来源于细菌的外表面,其保留了细菌外膜的基本特征,并包含蛋白质、DNA、RNA、代谢物和毒素等^[53]。细菌OMVs具有较大的载药空间,可以像传统的纳米颗粒一样作为纳

米载体,主要成分是脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、甘油磷脂和包括周质蛋白在内的蛋白质。其中, LPS 赋予细菌 OMVs 佐剂功能,可作为疫苗开发的抗原成分。例如,细菌 OMVs 可以通过电穿孔的方式装载 siRNA^[54],通过基因工程可实现卵清蛋白片段^[55]和碱性成纤维细胞生长因子^[56]在细菌 OMVs 表面的抗原呈递。对于相对疏水和容易与亲脂膜相互作用的小分子药物,可以直接被动扩散到细菌 OMVs 内部,实现药物的装载^[57]。另一种装载方法是在亲代细菌菌株生长过程中将药物装载进 OMVs。Allan 等研究发现,在铜绿假单胞菌 PAO1 菌株的生长过程中掺入庆大霉素后,可以产生含有庆大霉素的 OMVs,从而将药物装载到目标细菌的 OMVs 中^[57]。

作为一种药物递送工具,OMVs 具有体积小、稳定、耐受性良好和特异性高的优点。与普通脂质体容易循环降解导致药物泄漏不同,OMVs 具有热力学稳定性,在悬浮液中不会分解,可以在特定的生理条件下缓慢释放药物,减少药物泄漏到机体循环系统中引起的非特异性毒性。此外,这种慢释放特性可以为 siRNA 在血供异常的区域提供足够的时间到达靶细胞^[54]。

4 结 语

基于活细胞及其衍生物的药物递送系统展示出了许多优势,特别是在生物相容性和靶向性等方面。目前,包括无机和聚合物纳米颗粒在内的大多数给药系统,其本质是外来材料,尽管其中一些已获得临床批准,但仍可能具有潜在的毒性和免疫原性。相较于纳米载体,细胞及其衍生物是内源性的,生物相容性好。然而,这些载体从实验室向临床应用的过程,仍面临一定的局限。

(1)细胞直接封装游离药物时,药物毒性可能会影响细胞的活性,而且这些药物较难以空间或时间上可控的方式释放。

(2)有些细胞适合作为药物载体,但存在数量少、寿命短等局限,不能满足疾病治疗对细胞的大量要求。细胞模拟物具有类似于细胞的人造结构,它们能够自主地摄取、处理和排出物质,实现活细胞的基本功能。目前还没有非常有效的方法产生活细胞或其相关的细胞模拟物,限制了这些细胞载体在临床上的大规模使用。

(3)除了研究引入的细胞对机体的影响外,还需要保证细胞免受机体环境的影响,特别是免受免疫活性分子和免疫细胞的影响。针对这一问题,目前一种很有前景的方法是细胞微封装技术,将工程细胞封闭在半透膜胶囊中。胶囊可以防止免疫细胞以及大分子抗体通过半透膜,同时允许氧气、营养物质和一些具有生物活性的小分子物质自由出入。除了保护工程细胞免受宿主的影

响外,微胶囊化已经成为一种很有前途的策略,可以实现数周或数月的长期给药。

(4)活细胞在体内的代谢、安全性、细胞内的稳定性、是否会诱导肿瘤的发生以及保证工程治疗细胞不干扰机体其它基本过程等方面都有待进一步探究。

参考文献 References

- [1] ABDELSATTAR A S, DAWOUD A, HELAL M A. *Nanotoxicology* [J], 2021, 15(1): 66–95.
- [2] de la HARPE K M, KONDIAH P P D, CHOONARA Y E, *et al.* *Cells*[J], 2019, 8(10): 1209–1234.
- [3] DAI Q, WILHELM S, DING D, *et al.* *ACS Nano*[J], 2018, 12(8): 8423–8435.
- [4] FLIERVOET L A L, MASTROBATTISTA E. *Advanced Drug Delivery Reviews*[J], 2016, 106: 63–72.
- [5] GLASSMAN P M, HOOD E D, FERGUSON L T, *et al.* *Advanced Drug Delivery Reviews*[J], 2021, 178: 113992.
- [6] TUO Z, HE Q, ZHANG Z, *et al.* *Chemical Engineering Journal*[J], 2022, 433: 134437.
- [7] LEE H, PARK H, YU H S, *et al.* *Pharmaceutics*[J], 2019, 11(2): 54.
- [8] HAAS L, ELEWAUT A, GERARD C L, *et al.* *Nature Cancer*[J], 2021, 2(7): 693–708.
- [9] DAI Y, BAI X, JIA L, *et al.* *Small*[J], 2021, 17(41): 2103986.
- [10] SHARMA R, LIAW K, SHARMA A, *et al.* *Journal of Controlled Release*[J], 2021, 337: 179–192.
- [11] HE W, KAPATE N, SHIELDS I V C W, *et al.* *Advanced Drug Delivery Reviews*[J], 2020, 165: 15–40.
- [12] NGUYEN V D, MIN H K, KIM H Y, *et al.* *ACS Nano*[J], 2021, 15(5): 8492–8506.
- [13] SCHAIBLE U E, WINAU F, SIELING P A, *et al.* *Nature Medicine* [J], 2003, 9(8): 1039–1046.
- [14] POHL-GUIMARÃES F, YANG C, DYSON K A, *et al.* *Molecular Therapy*[J], 2019, 27(4): 837–849.
- [15] JONES R B, MUELLER S, KUMARI S, *et al.* *Biomaterials* [J], 2017, 117: 44–53.
- [16] SOLTANTOYEH T, AKBARI B, KARIMI A, *et al.* *Cells*[J], 2021, 10(6): 1450.
- [17] TANG L, ZHENG Y, MELO M B, *et al.* *Nature Biotechnology*[J], 2018, 36(8): 707–716.
- [18] BERTHENET K, FERRER C C, FANFONE D, *et al.* *Cell Reports* [J], 2020, 31(10): 107731.
- [19] KHOYRATTY T E, AI Z, BALLESTEROS I, *et al.* *Nature Immunology*[J], 2021, 22(9): 1093–1106.
- [20] ANSARI J, SENCHENKOVA E Y, VITAL S A, *et al.* *Blood*[J], 2021, 137(11): 1538–1549.
- [21] CHU D, ZHAO Q, YU J, *et al.* *Advanced Healthcare Materials*[J], 2016, 5(9): 1088–1093.

- [22] HAN Y, ZHAO R, XU F. *Small*[J], 2018, 14(42): 1801674.
- [23] XUE J, ZHAO Z, ZHANG L, *et al.* *Nature Nanotechnology* [J], 2017, 12(7): 692–700.
- [24] ANSELMO A C, GUPTA V, ZERN B J, *et al.* *ACS Nano*[J], 2013, 7(12): 11129–11137.
- [25] WAN X, ZHANG S, WANG F, *et al.* *Biomaterials Science* [J], 2019, 7(1): 187–195.
- [26] CHENG L, ZHANG X, TANG J, *et al.* *Biomaterials*[J], 2021, 275: 120964.
- [27] COKER S A, SZCZEPKOWSKI Z M, SIEGEL A H, *et al.* *Transfusion Medicine Reviews*[J], 2018, 32(2): 102–110.
- [28] BRENNER J S, PAN D C, MYERSON J W, *et al.* *Nature Communications*[J], 2018, 9(1): 1–14.
- [29] ROWETH H G, BATTINELLI E M. *Blood* [J], 2021, 137(23): 3174–3180.
- [30] HAEMMERLE M, STONE R L, MENTER D G, *et al.* *Cancer Cell* [J], 2018, 33(6): 965–983.
- [31] CHEN X, WANG Q, LIU L, *et al.* *Biomaterials*[J], 2018, 183: 258–267.
- [32] ORTIZ-OTERO N, MARSHALL J R, LASH B W, *et al.* *Nanoscale Advances*[J], 2020, 2(9): 3942–3953.
- [33] XU P, ZUO H, CHEN B, *et al.* *Scientific Reports*[J], 2017, 7(1): 1–16.
- [34] SALEHI H, AL-ARAG S, MIDDENDORP E, *et al.* *Stem Cell Research & Therapy*[J], 2018, 9(1): 1–10.
- [35] HUANG K, LI Z, SU T, *et al.* *Advanced Therapeutics*[J], 2019, 2(10): 190009.
- [36] TAKAYAMA Y, KUSAMORI K, TSUKIMORI C, *et al.* *Journal of Controlled Release*[J], 2021, 329: 1090–1101.
- [37] OH N, PARK J H. *International Journal of Nanomedicine*[J], 2014, 9(S1): 51–63.
- [38] MOKU G, LAYEK B, TRAUTMAN L, *et al.* *Cancers*[J], 2019, 11(4): 491–506.
- [39] GUIDOTTI G, BRAMBILLA L, ROSSI D. *Trends in Pharmacological Sciences*[J], 2017, 38(4): 406–424.
- [40] CAO Z, LIU J. *Journal of Controlled Release* [J], 2020, 326: 396–407.
- [41] FELFOUL O, MOHAMMADI M, TAHERKHANI S, *et al.* *Nature Nanotechnology*[J], 2016, 11(11): 941–947.
- [42] AKIN D, STURGIS J, RAGHEB K, *et al.* *Nature Nanotechnology* [J], 2007, 2(7): 441–449.
- [43] CHEN W, WANG Y, QIN M, *et al.* *ACS Nano*[J], 2018, 12(6): 5995–6005.
- [44] ARMSTRONG J P K, STEVENS M M. *Advanced Drug Delivery Reviews*[J], 2018, 130: 12–16.
- [45] SHAHABIPOUR F, BARATI N, JOHNSTON T P, *et al.* *Journal of Cellular Physiology*[J], 2017, 232(7): 1660–1668.
- [46] KIM M S, HANEY M J, ZHAO Y, *et al.* *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*[J], 2016, 12(3): 655–664.
- [47] MORRISSEY S M, ZHANG F, DING C, *et al.* *Cell Metabolism*[J], 2021, 33(10): 2040–2058.
- [48] SCHINDLER C, COLLINSON A, MATTHEWS C, *et al.* *PLoS One* [J], 2019, 14(3): e0214545.
- [49] LI Y, GAO Y, GONG C, *et al.* *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*[J], 2018, 14(7): 1973–1985.
- [50] QU M, LIN Q, HUANG L, *et al.* *Journal of Controlled Release*[J], 2018, 287: 156–166.
- [51] WANG J, TU C, ZHANG H, *et al.* *Biomaterials* [J], 2020, 255: 120152.
- [52] CHOI H, CHOI K, KIM D H, *et al.* *Pharmaceutics*[J], 2022, 14(3): 672.
- [53] BITTO N J, CHAPMAN R, PIDOT S, *et al.* *Scientific Reports*[J], 2017, 7(1): 1–11.
- [54] GUJRATI V, KIM S, KIM S H, *et al.* *ACS Nano*[J], 2014, 8(2): 1525–1537.
- [55] CARLETON H A, LARA-TEJERO M, LIU X, *et al.* *Nature Communications*[J], 2013, 4(1): 1–8.
- [56] HUANG W, SHU C, HUA L, *et al.* *Acta Biomaterialia*[J], 2020, 108: 300–312.
- [57] ALLAN N D, BEVERIDGE T J. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*[J], 2003, 47(9): 2962–2965.

(编辑 张雨明)