

克服肿瘤生理病理屏障的纳米药物递送系统的研究进展

苏志桂, 莫 然, 张 灿*

(中国药科大学江苏省代谢性疾病药物重点实验室, 南京 210009)

摘 要 纳米药物递送系统在肿瘤的靶向治疗中发挥着越来越重要的作用。由于机体的生理特征以及肿瘤的异质性, 递送系统从给药到靶点发挥作用需要克服多重生理及病理屏障, 包括血液、肿瘤组织、细胞和胞内转运等屏障。本文综述了近年来为克服药物递送屏障提出的新思路与新方法, 为设计克服肿瘤生理病理屏障的递送系统、实现对药物的有效递送和肿瘤的高效安全治疗提供理论参考。

关键词 纳米药物递送系统; 生理病理屏障; 肿瘤微环境; 在体响应; 靶向治疗

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)01-0028-12

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150103

Advances in nano-drug delivery systems overcoming the physiological and pathological barriers of tumor

SU Zhigui, MO Ran, ZHANG Can*

Jiangsu Key Laboratory of Drug Discovery for Metabolic Diseases, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Nano-drug delivery systems (nano-DDSs) play an important role in targeted cancer therapy. Due to the physiological characteristics of the body and the heterogeneity of tumor, intravenous delivery of anticancer agents carried by nano-DDSs from the injection site to their targeted sites is required to overcome multiple physiological and pathological barriers, including blood, tumor tissue, tumor cell and intracellular transportation. This review surveys emerging strategies for the development of novel nano-DDSs that can conquer the physiological and pathological barriers of tumor, which provides a great potential platform for safe and efficient cancer treatment.

Key words nano-drug delivery systems; physiological and pathological barriers; tumor microenvironment; *in situ* response; targeted therapy

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81473153, 81273468)

纳米药物递送系统(nano-drug delivery systems)由于具有增效减毒的作用在肿瘤治疗中发挥着重要作用。但随着研究的深入,通过静脉注射给药的纳米药物递送系统要实现有效地向靶组织、靶细胞和靶分子递送药物需要克服血液屏障、组织屏障、细胞屏障以及胞内转运屏障等多重生理病理屏障(physiological and pathological barriers)。每一道生理病理屏障都会直接影响到最终肿瘤治疗的效果。为了克服这些生理病理屏障的影响,一方面,

需要对肿瘤疾病病理特征进行更深入的研究;另一方面,需要进一步开发具有多功能的智能响应体内生理病理特征的纳米药物递送系统。目前,该方面的研究已形成结合药剂学、医学、化学、材料学等多学科交叉的重要研究领域。本文综述了近年来针对克服药物递送屏障而设计的药物递送系统所提出的新策略与新方法,为实现纳米药物递送系统向靶点的有效传递,实现肿瘤的安全高效治疗提供理论参考。

* 收稿日期 2014-12-30 * 通信作者 Tel:025-83271117 E-mail:zhangcan@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81473153, 81273468)

1 克服血液屏障影响的纳米药物递送系统

纳米药物递送系统通过静脉给药进入血液循环后,首先面临血液屏障,包括:①血浆中各种酶对纳米粒或药物的降解^[1];②调理素对纳米粒的调理作用以及网状内皮系统(reticuloendothelial system, RES)对纳米粒的吞噬和清除^[2-3];③血浆蛋白对纳米粒的吸附所造成的纳米粒聚集,从而产生血液毒性,或被肺部毛细血管截留,或者进一步被RES吞噬^[4];④粒径小于5 nm的纳米粒会经肾小球的滤过作用从体内清除^[5]。为了克服血液屏障的影响,大量的研究基于对纳米粒的表面特征进行改性,另外,设计具有仿生特征的药物递送系统以实现纳米粒从血液循环向肿瘤组织的有效递送。

1.1 聚乙二醇化(PEGylation)递送系统

由于聚乙二醇(PEG)链具有电中性、亲水性和较大的空间位阻,纳米粒经PEG修饰后,PEG链的水化层可有效阻止调理素蛋白的识别和与血浆蛋白的结合,从而减少体内RES的吞噬。静脉注射PEG修饰量为20%的脂质纳米粒可完全避免RES的吞噬^[6]。而PEG的空间位阻和长循环功能与PEG的链长以及修饰量有关,链越长以及修饰量越多则长循环作用越强,并且长短链的PEG按一定比例混合修饰要比单一修饰的效果要好^[7]。但对于特定的递送系统如脂质体,其表面的PEG修饰量存在一定的上限(小于6%),超过上限则会引起脂质体膜稳定性降低从而带来药物泄漏等问题^[8]。此外,由于基因药物的负电性,常用阳离子载体通过静电作用包载基因,但阳离子载体的强正电性所引起的血液毒性极大限制了其体内应用^[9]。最常见的策略是采用PEG对载体进行修饰,以掩盖阳离子载体表面的正电性。但PEG链较强的亲水性以及空间位阻作用妨碍了纳米粒的肿瘤细胞摄取,从而降低了基因的转染效率^[8,10]。并且近年来研究报道,PEG化的纳米粒在连续注射后,会诱发体内的免疫反应,产生血浆快速清除效应(ABC效应)^[11]。尽管研究人员试图解决PEG的ABC效应或以其他材料来替代PEG,但迄今为止仍然没有获得满意的结果^[12]。

1.2 仿生递送系统

纳米粒由于不具有机体内源性物质的特征,当其进入体内后,易被机体识别而被RES系统清除。

近年来,采用仿生技术设计的药物递送系统受到越来越多的关注^[13]。该技术是以内源性物质作为载体材料或者作为载体的包覆层,通过模拟体内的一些内源性蛋白、哺乳动物细胞以及病原体等的结构及功能,从而降低纳米粒免疫原性,延长药物在血液中的滞留时间,提高靶向性。

1.2.1 白蛋白 人血清白蛋白(HSA)由于具有无免疫原性、生物安全性、生物可降解性和生物相容性良好等特点,被视为构建药物递送载体的优良材料。目前,白蛋白结合紫杉醇(PTX)纳米粒注射混悬液(Abraxane[®])已在临床上使用,用于治疗转移性乳腺癌联合化疗失败后或辅助化疗6个月内复发的乳腺癌。以HSA构建的纳米粒,因为其具有内源性HSA的生物学特征,不易被机体当做外源性物质识别而被RES系统清除,具有一定的长循环作用。南京大学张俊峰课题组以负电性的HSA作为阳离子明胶-DNA/阿霉素(DOX)复合物纳米粒的表面包覆层,屏蔽了阳离子载体的正电性,降低了免疫原性,具有较好的体内长循环功能。相较于游离DOX,该纳米复合物显著提高了DOX对异位鼠源肉瘤S180和原位鼠源肝肿瘤Heps的抑瘤作用^[14]。为了进一步提高HSA纳米粒的肿瘤特异性靶向作用,南京大学胡一桥课题组将靶向肿瘤细胞表面受体核仁素(nucleolin)的核酸适体(aptamer)AS1411修饰在荷载PTX的白蛋白纳米粒表面,修饰后的纳米粒能显著提高PTX对人源乳腺癌细胞MCF-7的杀伤作用,而对正常人源乳腺癌细胞MCF-10A几乎无毒性^[15]。

1.2.2 脂蛋白 脂蛋白(lipoprotein)是人体天然的脂质运送载体。天然脂蛋白作为药物载体也能够达到克服血液屏障的目的。基于高密度脂蛋白(HDL)的内源性、生物安全性、对肿瘤细胞表面清道夫受体的天然靶向性以及借助脂筏(lipid raft)/小窝蛋白(caveolin)内吞途径转运至细胞质等功能。美国纽约西奈山医学院的研究人员研究发现,金纳米粒(AuNP)、氧化铁纳米粒(FeONP)和量子点(QD)进行HDL化修饰得到的Au-HDL、FeO-HDL和QD-HDL的药代动力学行为与PEG化修饰的纳米粒相似,但HDL化修饰的纳米粒的体内组织成像效果更具有选择性^[16]。

此外,在多种肿瘤细胞表面都高表达低密度脂蛋白受体(LDLR)^[17],因此以低密度脂蛋白(LDL)

作为肿瘤药物递送系统或人工模拟 LDL 能够进一步提高纳米粒的肿瘤靶向性。美国德州大学西南医学中心 Corbin 课题组以 LDL 为载体, 荷载了二十二碳六烯酸(DHA)能选择性地杀死鼠源肝癌细胞^[18]。人工模拟 LDL 主要是将构成天然 LDL 的成分经体外组装形成类天然 LDL 结构的纳米颗粒, 如 Allijn 等^[19]以载脂蛋白 B100(ApoB100)、磷脂、甘油三酯及胆固醇酯等材料构建了负载金纳米粒的人工模拟 LDL, 该纳米粒具有多模式肿瘤成像功能, 为肿瘤的诊断提供了技术平台。另外, Lee 等^[20]模拟 LDL 构建了多功能脂质纳米粒并负载 PTX 和 FeO 纳米晶体, 该纳米粒具有良好的肿瘤成像和治疗功能, 可应用于多种药物的共递送和肿瘤的诊疗。

尽管天然脂蛋白作为药物载体具有很多优势, 但是由于 HDL 和 LDL 来源少、分离纯化较困难, 样品重现性差等问题, 限制了其临床应用, 大多研究仍局限于实验室研究阶段。另外, 天然脂蛋白的成分复杂且其粒径小(小于 30 nm), 现有的纳米载体组装技术难以实现完全人工模拟^[21]。

1.2.3 内源性细胞组分 人体血液中的细胞以红细胞、白细胞和血小板为主。基于这些细胞的内源性特征, 研究者们致力于构建具有天然细胞生物学特征的仿生型载体, 通过伪装(camouflage)手段逃避体内的清除。然而, 构建具有天然细胞生物学特征的仿生型载体的关键技术是在载体表面进行复杂的功能化修饰。目前使用的方法主要有两种。一种是通过化学手段将内源性细胞的膜蛋白组分连接在载体表面。如 Tsai 等^[22]在聚苯乙烯纳米粒表面修饰了具有免疫抑制效应的红细胞膜蛋白 CD47, 该纳米粒进入血液循环后, 能够有效地减少巨噬细胞的吞噬, 延长纳米粒在体内的循环时间。但这种方式不可避免地使所修饰的蛋白发生一定程度的变性, 并且由于细胞表面蛋白的复杂性, 很难实现对红细胞的完全模拟。另一种是以完整的细胞膜包覆在纳米粒的表面。美国穆尔斯癌症中心张良方课题组利用红细胞膜对聚乙交酯-丙交酯(PLGA)聚合物纳米粒进行包覆。包覆后的 PLGA 纳米粒能够有效躲避生物体免疫系统的攻击, 降低了机体对纳米粒的清除^[23], 并且将红细胞膜包覆的 PLGA 纳米粒用于吸附体循环中的 α -毒素^[24-25]和病源性抗体如抗红细胞-多克隆免疫球蛋白等^[26], 有效阻止 α -毒素和病原体对机体的破

坏作用, 显著延长实验动物的生存期。该课题组还利用红细胞膜对 AuNP 进行包覆, 修饰后的 AuNP 可以显著降低巨噬细胞对 AuNP 的摄取^[27]。此外, 利用白细胞的免疫豁免及天然靶向性, Parodi 等^[28]在介孔硅纳米粒表面包覆白细胞细胞膜, 经静脉给药后有效延长了介孔硅纳米粒的循环时间, 同时通过白细胞细胞膜表面受体与炎症血管内皮之间的相互作用实现肿瘤局部富集。以这种方式实现纳米粒仿生化的优势在于, 一方面保留了细胞表面分子特征, 维持了内核的完整性, 可以对内核进行多功能化的改造, 从而构建智能化给药系统; 另一方面, 细胞可来源于病人自身, 为实现个性化治疗提供基础。

1.3 活细胞作为药物载体

目前作为药物载体的活细胞主要有红细胞、单核/巨噬细胞和骨髓源间充质干细胞(MSC)等。细胞载体中药物的存在形式有两种, 一种是将药物或者载体介导入到活细胞内, 到达靶组织后再从活细胞中释放出来而发挥作用, 这种方式可称为“特洛伊木马”(Trojan horse)效应。如利用红细胞的长循环作用, Banz 等^[29]通过低渗溶胀处理将肿瘤相关抗原如卵清蛋白和酪氨酸酶相关蛋白-2 包封于红细胞中实现了肿瘤免疫治疗的目的。此外, 研究表明, 血液中单核/巨噬细胞可受到肿瘤组织的趋化因子诱导而具有向肿瘤组织游走的功能, 并且单核/巨噬细胞对病毒具有强大的吞噬作用。美国谢菲尔德大学医学院 Lewis 课题组将具有乏氧环境诱导复制功能的溶瘤细胞腺病毒导入到巨噬细胞中。当巨噬细胞处于肿瘤乏氧环境下, 溶瘤细胞腺病毒会大量复制并从巨噬细胞中释放出来, 从而杀伤肿瘤细胞^[30]。利用 Fe_3O_4 -NP 可诱导 MSC 表达肿瘤趋向因子 CXCR4 的作用。Huang 等^[31]将含锌的 $\text{Zn}_{0.4}\text{Fe}_{2.6}\text{O}_4$ -NP 导入到 MSC 中, 静脉回输到动物体后, 可增加 MSC 在脑外伤和脑胶质瘤部位的富集。值得注意的是, 以“特洛伊木马”式载药的细胞载体, 能获得较大的载药量, 但是需考虑药物或载体在细胞内的稳定性, 同时也要考虑药物或载体细胞本身生物学功能的影响, 并且当细胞载体到达靶部位后, 药物或者载体从细胞载体中的释放也是影响药效发挥的重要因素。

另一种以活细胞为载体的载药方式是将药物或载体通过物理或者化学作用修饰到活细胞的表面。

当到达靶部位后,药物或载体再从活细胞表面脱离下来,这种方式可称为“细胞贴”(cell paster)效应。Anselmo等^[32]研究表明,通过静电作用和疏水作用吸附在红细胞表面的纳米粒可逃避RES的清除。当红细胞经过肺小血管时,附在红细胞表面的纳米粒可转移到肺小血管内皮细胞中,具有较好的肺部靶向性。利用MSC的天然肿瘤趋向性,美国麻省理工学院Anderson课题组将亲和素修饰的纳米粒黏附在生物素修饰的MSC表面以构建细胞载体,修饰纳米粒后的MSC仍具有较强的肿瘤靶向功能^[33]。但是,以“细胞贴”式载药的细胞载体存在以下局限:为了不影响活细胞的细胞膜生物功能,载药量相对较低;药物或载体在黏附过程中不可避免地会被细胞吞噬,减少了药物或载体在细胞表面的修饰量;修饰在细胞表面的药物或载体在体循环过程中可能会发生脱落,降低了其在肿瘤部位的蓄积量^[34]。

2 克服肿瘤组织屏障的纳米药物递送系统

恶性肿瘤的低治愈率很大程度上取决于肿瘤的病理特征。这些病理特征包括大量无规则、高渗透的脉管系统,缺少淋巴回流(lymphatic drainage)、致密的细胞外间质(extracellular matrix)、高的肿瘤间质压(interstitial fluid pressure, IFP)以及由于肿瘤中心部位血流供应不足,代谢物无法顺利排出而产生的酸性和缺氧环境。肿瘤血管的高渗透性和淋巴回流的缺失为大分子物质以及纳米粒提供了对肿瘤组织的被动靶向(passive targeting)作用,使其具有增强渗透滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR效应),能够提高其在肿瘤组织的蓄积量。但是,致密的肿瘤细胞外基质以及高的肿瘤间质压极大地阻碍了药物进入肿瘤深层,大量的药物分布于肿瘤周围血管附近,这种肿瘤内药物的不均匀分布是造成肿瘤复发及转移的重要原因之一,为肿瘤的治愈增加了难度。因而开发具有肿瘤穿透作用的药物载体显得尤为重要。

2.1 利用尺寸效应克服肿瘤组织屏障的纳米药物递送系统

纳米粒通过EPR效应到达肿瘤组织的蓄积量和瘤内分布与纳米粒子的尺寸大小密切相关。一般来说,粒径在100 nm左右的纳米粒(如临床上应用的粒径为100 nm的荷载DOX的长循环脂质体注射剂Doxil®和粒径为130 nm的荷载PTX的

白蛋白纳米粒注射剂Abraxane®)都能够相对提高药物在肿瘤组织的蓄积。近年来,随着对肿瘤微环境的深入研究,越来越多的研究表明,不同类型肿瘤的局部血管分布和血管的缺陷特征存在着较大的差异,从而造成了纳米粒在不同种类实体瘤的瘤内分布差异甚大。如粒径为100 nm左右的纳米粒,在血管分布丰富、血流量较大的实体瘤(如肉瘤和乳腺癌)中具有良好的被动靶向和肿瘤组织穿透能力,而在低血流供应的实体肿瘤(如胰腺癌)中因纳米粒的肿瘤穿透性差,导致药物在瘤内的有效治疗浓度低,治疗效果较差。日本东京大学Kataoka课题组考察了不同粒径大小的长循环载药聚合物胶束(30、50、70、100 nm)在高低两种渗透特性肿瘤模型中的靶向能力和抑瘤活性^[35]。各种粒径的聚合物胶束均能进入到高渗透性肿瘤模型内部,而仅有粒径最小的聚合物胶束(30 nm)才能够穿透到低渗透性肿瘤模型的深层并发挥治疗作用。美国伊利诺斯大学香槟分校Tang等^[36]考察了粒径分别为20、50和200 nm的3种表面偶联喜树碱的二氧化硅纳米粒的生物学特性。结果表明,粒径为50 nm的复合物具有最优的肿瘤组织渗透作用,最高效的肿瘤细胞摄取能力和较低的肿瘤清除率。这些研究表明,应用于抗肿瘤治疗的纳米粒存在一个最优的尺寸范围,为今后新型纳米药物递送系统的设计提供了重要参考依据。

2.2 具有破坏肿瘤组织屏障功能的纳米药物递送系统

肿瘤组织中的肿瘤相关成纤维细胞(tumor-associated fibroblasts, TAFs)与实体瘤的IFP升高有关,因此靶向TAFs可以作为增强纳米粒肿瘤渗透的手段之一^[37]。通过抑制TAFs的生长,能够有效降低实体瘤内的IFP,增加药物在瘤内的分布,提高药物治疗效果^[38]。美国北卡罗来纳大学教堂山分校黄立夫课题组的研究表明,通过诱导TAFs的凋亡可提高纳米粒在肿瘤中的渗透。由于TAFs分布于肿瘤血管附近,当载药纳米粒透过肿瘤血管后,释放的药物先作用于TAFs,从而破坏肿瘤间质的完整性,为更多的纳米粒子穿过肿瘤间质并转运至距离血管更远的肿瘤细胞创造了条件^[39]。该课题组还发现荷载顺铂(CDDP)的纳米粒在动物体内实验中,除了对给药的肿瘤细胞具有促进凋亡作用,还会诱导邻近的没有给药的肿瘤细胞发生凋

亡,这种“邻近效应”(neighboring effect)可反复循环直到药物完全耗竭为止^[40]。本课题组设计了具备“多细胞传递”功能的纳米凝胶。该纳米凝胶能够对肿瘤微环境 pH 做出响应性“可逆”胀大缩小,如“病毒”一般,以连续“进入、逃出、再进入”的模式,实现了在肿瘤细胞内与多个肿瘤细胞间的有效传递(intra-intercellular delivery)。当纳米凝胶富集于肿瘤组织后,首先进入位于实体瘤外层的肿瘤细胞的酸性内涵体中,发生酸响应性的胀大,快速释放抗肿瘤药物 DOX,药物触发细胞凋亡,同时纳米凝胶从内涵体逃逸至细胞质,在胞质中性 pH 下收缩恢复原样,阻止 DOX 的释放。之后,纳米凝胶从 DOX 作用后的死细胞中逃出并继续“感染”附近细胞,向实体瘤内部递进。这种“剥洋葱”式的从肿瘤表层向中心杀死细胞的策略显著提高了 DOX 的肿瘤组织渗透性,具有良好的抑瘤活性^[41]。

2.3 利用特殊功能蛋白克服肿瘤组织屏障的纳米药物递送系统

日本东京大学 Kataoka 课题组的研究表明,转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)的抑制剂可以增加低渗透性肿瘤的渗透性,从而显著提高大粒径胶束的肿瘤组织渗透性和治疗效果^[35]。南京大学蒋锡群课题组将血管缓激肽增强肽和顺铂(CDDP)共价连接在壳聚糖纳米粒上。血管缓激肽增强肽具有增加肿瘤微血管通透性和降低肿瘤间质压的功能,可以有效提高壳聚糖纳米粒的肿瘤穿透性,并显示出更强的抑制鼠源肝肿瘤 H22 的生长和肺转移作用^[42]。

3 克服肿瘤细胞屏障的纳米药物递送系统

纳米药物递送系统从肿瘤组织进入细胞内的过程存在着跨细胞膜屏障。纳米粒须具有较为适宜的表面特性及尺寸才能顺利的透过两亲性和负电性的细胞膜进入到细胞内部。研究表明,粒径较小且表面为正电性的药物载体在细胞水平上具有较高的胞内递送效率。同时,纳米粒表面修饰具有肿瘤细胞主动靶向功能的基团如 RGD 肽、适配体、透明质酸和抗 HER2 的单克隆抗体等,可以通过配体与受体或抗原与抗体的相互作用,提高肿瘤细胞对纳米粒的摄取。此外,在载体表面修饰细胞穿膜肽(cell penetrating peptide, CPP)也可促进载体进入肿瘤细胞。

3.1 基于正电性克服细胞屏障的纳米药物递送系统

阳离子载体由于自身的正电性有助于其通过静电作用吸附在负电性的细胞膜上,从而加快肿瘤细胞对阳离子载体的摄取。但阳离子载体进入体内后会吸附大量的血浆蛋白导致阳离子载体的快速清除,该载体不能克服血液屏障将药物递送至肿瘤组织,体内应用受到了极大的限制^[43]。研究表明,PEG 化仍然是掩盖载体正电性和克服血液屏障的有效手段之一^[44],但是载体表面 PEG 化后,由于亲水性太强并不利于载体透过生物膜^[9]。因此,开发一种在血液中能够保持稳定并通过 EPR 效应靶向肿瘤组织,又能在肿瘤组织微环境中重新转变为正电性的药物递送系统将更有利于药物在细胞内的递送。

基于肿瘤细胞的“瓦博格效应”(Warburg effect)以及缺少淋巴回流系统,实体瘤细胞外基质的 pH 范围在 pH 6.5~7.2 之间^[45]。大量研究利用肿瘤微环境的弱酸性,设计了各种酸触发断裂的化学键,构建了多种响应实体瘤微环境 pH 实现纳米粒表面 PEG 脱落的药物递送系统。例如,亚胺键是一类在偏酸性微环境可断裂的化学键,通过改变与亚胺键连接的基团而得到 pH 敏感范围在 pH 5.0~7.4 的不同类型的亚胺键^[46-47]。Wang 等^[48]在氧化铁硅纳米粒表面修饰了聚苯基天冬氨酸(PBLA),然后通过苯甲酰亚胺键将 mPEG 与 PBLA 相连,当药物载体到达肿瘤外偏酸性微环境时,表面可发生 PEG 断裂而重新恢复载体的正电性,促进肿瘤细胞的摄取。

另一种研究较多的是响应实体瘤弱酸微环境的电荷翻转型药物递送系统。如中国科技大学王均课题组设计了一种具有 pH 敏感电荷翻转功能的材料 PPC-DA。在中性环境下,通过静电作用将负电性的 PPC-DA 包覆于正电性的聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)与小干扰 RNA(siRNA)形成的纳米复合物表面。当在弱酸环境下(pH < 6.8),PPC-DA 中的羧基发生水解,使其电性由负电性逆转为正电性,与正电性的复合物发生电性相斥而脱落,脱去包覆层的复合物表现出更快的肿瘤细胞摄取^[49]。

3.2 基于受体介导的内吞克服细胞屏障的纳米药物递送系统

纳米药物递送系统表面修饰具有肿瘤细胞主

动靶向功能的配体可以通过配体与受体或抗原与抗体作用介导的内吞,提高肿瘤细胞对纳米粒的摄取。目前大多数的研究都是将主动靶向功能的配体或抗原修饰在纳米药物递送系统的表面。但是通过这种修饰方式构建的靶向载体在体内的长循环效应及肿瘤靶向作用并没有得到提高,原因在于体循环过程中靶基团会被吸附在载体表面的血浆蛋白所掩盖,同时特定的靶向基团还会诱导免疫反应的产生,从而加快机体对纳米药物递送系统的清除。因此,保护靶向基团在体循环中不受影响,而当到达肿瘤部位又可发挥作用也是目前肿瘤主动靶向的一个研究重点。Song等^[50]将mPEG通过苯甲酰亚胺键连接聚氨酯上合成一种具有pH敏感的胶束材料。当到达肿瘤偏酸性环境,苯亚胺键发生断裂,使mPEG链从胶束表面脱落,暴露出修饰在聚氨酯链上的靶向配体叶酸,从而有效增加了肿瘤细胞对胶束的摄取。

除了利用肿瘤组织的弱酸环境以外,也可以利用肿瘤组织间隙中表达的特异性酶,设计出酶响应的PEG脱落和靶基团暴露的药物递送系统,以促进肿瘤细胞的摄取。例如,肿瘤在侵袭与转移过程中会大量表达基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP),用以破坏抑制肿瘤细胞侵袭的组织学屏障。目前的研究旨在开发具有MMP敏感的寡肽链,设计具有MMP敏感的药物载体,达到肿瘤组织中释药或暴露靶向功能基团的目的。Zhang等^[51]将RGD修饰在介孔硅纳米粒(mesoporous silica nanoparticle, MSN)表面,并以能够被MMP特异性降解的寡肽链PLGVR作为连接臂键将PEG和RGD相连,该载体在体内具有较好的长循环功能,当到达肿瘤组织后,过表达的MMP可将寡肽链PLGVR降解,裸露出RGD,从而促进肿瘤细胞对MSN的摄取。

3.3 基于细胞穿膜肽克服细胞屏障的递送系统

基于小分子细胞穿膜肽的正电性及穿膜作用,在载体表面修饰细胞穿膜肽后可快速介导载体进入肿瘤细胞。然而,细胞穿膜肽的这种穿膜作用并没有细胞选择性。因此,构建具有选择性穿膜能力的细胞穿膜肽修饰的纳米药物递送系统也是目前克服肿瘤细胞屏障的研究方向之一。Zhu等^[52]以MMP-2敏感的寡肽链GPLGIAGQ作为连接臂合成了PEG₂₀₀₀-GPLGIAGQ-PTX前药,并与细胞穿膜肽

TAT修饰的PEG₁₀₀₀-DSPE自组装构建了肿瘤靶向胶束。该递送系统在生理条件下,利用相对分子质量为2 000的PEG(PEG₂₀₀₀)来掩盖TAT的穿膜能力。当胶束进入到肿瘤组织后,其中的寡肽链段在肿瘤组织高表达的MMP-2作用下降解,暴露出胶束表面的TAT,从而有效的选择性的促进肿瘤细胞对PTX的摄取。此外,对于侵袭期的肿瘤,在肿瘤基质周围透明质酸酶(hyaluronidase, HAase)的表达量会发生上调,从而加快肿瘤相关基质的降解而促进肿瘤细胞转移^[53]。利用HAase对透明质酸(hyaluronic acid, HA)的降解作用,中国药科大学周建平课题组以负电性HA来掩盖细胞穿膜肽修饰的脂质体,当载体进入肿瘤微环境后,在HAase的作用下HA发生降解而裸露出正电性的细胞穿膜肽,从而实现了脂质体的高效入胞和有效抑制肿瘤生长的作用^[54]。美国北卡罗来纳州大学Gu课题组采用类似的机制设计了一种用于肿瘤细胞膜相关蛋白和胞内作用的小分子化疗药物癌症联合治疗的共递送系统(TRAIL/DOX-Gelipo)。该体系把多靶点协同作用、肿瘤微环境敏感、主动靶向和促进摄取等策略结合在同一个纳米递送系统上,更有利于克服肿瘤治疗的复杂性问题^[55]。

4 克服肿瘤细胞内传递屏障的纳米药物递送系统

纳米载体大部分是以内吞途径进入肿瘤细胞。在进入肿瘤细胞后,首先进入的是内涵体,继而进入溶酶体。内涵体/溶酶体是载体在细胞内传递的最主要的屏障,内涵体/溶酶体中的酸(pH 4.0 ~ 6.0)和酶易使载体及其荷载的药物降解。大量的研究针对内涵体/溶酶体的酸性环境设计出功能化的载体,以实现载体和药物的内涵体/溶酶体逃逸。目前研究较多的具有内涵体/溶酶体逃逸功能的递送系统的作用机制主要有以下3种:膜破坏、膜去稳定化和膜融合。

4.1 膜破坏

4.1.1 质子海绵作用 阳离子聚合物(polycation),如PEI^[56]、聚酰胺-胺(polyamidoamine dendrimer, PAMAM)^[57]、聚组氨酸(polyhistidine, PHis)^[58]和聚4-乙烯基咪唑(P4V)^[59]等,都含有大量的可在内涵体/溶酶体的酸性环境下继续质子化的胺基。在内涵体/溶酶体中,这些胺基能够大量吸收氢质子,并引起氯离子的内流,导致内涵体/溶

酶体中渗透压的升高,从而使内涵体/溶酶体涨破,将药物或载体释放到细胞质中,该现象被称为“质子海绵作用”(proton sponge effect)。具有质子海绵作用的阳离子聚合物目前广泛应用于基因药物递送,其不仅可以与负电性的基因药物通过静电相互作用形成聚电解质复合物,还能够帮助进入内涵体/溶酶体的基因药物,实现内涵体/溶酶体逃逸,避免被其中的核酸酶降解。但由于聚阳离子复合物正电性较强,对细胞毒性大,静脉给药安全性差,因此,如何利用阳离子聚合物,开发安全有效的静脉给药基因载体受到关注。例如, Kim 等^[60]将端基巯基化的 PEG-PLL 通过静电作用复合 siRNA 后,利用硫金(S-Au)键偶联在 AuNP 表面,制得纳米复合物(uPIC-AuNP)。该复合物一方面可以利用 PLL 逃离内涵体/溶酶体,而另一方面释放到细胞质中的 uPIC-AuNP 在细胞质中高浓度的谷胱甘肽(glutathione, GSH)的作用下, S-Au 键发生断裂而快速释放出 siRNA,有效的发挥 siRNA 的基因沉默功能。

无机材料磷酸钙(calcium phosphate)也能够在内涵体/溶酶体的酸性环境下吸收氢质子,发挥“质子海绵作用”,实现药物或载体的内涵体/溶酶体逃逸。研究报道,同时荷载针对 HDM2, c-myc 和 VEGF 的 3 种 siRNA 的靶向磷酸钙(lipid-calcium-phosphate, LCP)纳米粒进入内涵体/溶酶体后, LCP 纳米粒的磷酸钙内核吸收氢质子,从磷酸钙降解成磷酸氢钙,使内涵体/溶酶体中离子浓度增加,促使大量的水分内流,使内涵体发生破裂,并释放 siRNA 至细胞质。体内外实验结果表明, LCP 纳米粒有效降低了 HDM2, c-myc 和 VEGF 的表达,并通过抑制肿瘤增殖、新生血管的形成以及促进肿瘤细胞凋亡等多种机制,达到了更好的肿瘤治疗效果^[61]。而基于磷酸钙纳米粒与磷酸化分子的高亲和作用, Xu 等^[62]将磷酸化的肿瘤抗原 Trp2 多肽和疫苗佐剂 CpG ODN 共同担载于甘露糖修饰的磷酸钙纳米粒中。该纳米粒通过下调 TGF- β 的表达和增加肿瘤浸润性 CD8⁺ T 细胞的水平,显著提高了疫苗的抑瘤效果。

4.1.2 气体膨胀作用 碳酸氢根在内涵体/溶酶体的酸性环境下可以产生大量的 CO₂ 气体,撑破内涵体/溶酶体膜,实现药物或者载体的内涵体逃逸。Ke 等^[63]以 PLGA 为载体共载药物阿霉素(DOX)和碳酸氢钠(NaHCO₃),构建一种具有响应酸环境的递

药系统。该载体进入内涵体/溶酶体后,随着 pH 的降低,内核中的 NaHCO₃ 可与 H⁺ 发生反应而产生大量的 CO₂,使 PLGA 载体以及内涵体/溶酶体膜发生破裂,将大量的药物释放至细胞质中。

4.1.3 载体膨胀作用 美国犹他大学 Bae 课题组构建了一种由聚乙二醇-组氨酸-苯丙氨酸共聚物[PEG-poly(His₃₂-co-Phe₆)]构建的药物递送系统,并在载体表面共价偶联了叶酸修饰的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA),不仅赋予了载体主动靶向于高表达叶酸受体肿瘤的功能,还增加了载体在膨胀和收缩时的稳定性。该载体在内涵体酸性环境(pH 6.4)下,组氨酸发生质子化带正电,在正电斥力下,载体通过体积膨胀逃离出内涵体/溶酶体,并同时释放出包载的 DOX,发挥细胞毒作用,杀死肿瘤细胞^[64]。除此之外,材料疏水性/亲水性的转化也会诱导载体体积的膨胀。美国波士顿大学 Grinstaff 课题组将 2,4,6-三甲氧基苯甲醛与三羟甲基乙烷的反应产物修饰在丙烯酸上,由于三甲氧基苯甲醛在内涵体/溶酶体的酸性环境下可离去,因此以该材料经微乳法聚合反应制备的纳米粒,其内核在 pH 5.0 下可由疏水性转变为亲水性,这种转变促发了纳米粒的体积膨胀,实现了纳米粒的内涵体/溶酶体逃逸,荷载 PTX 的纳米粒对 Lewis 肺癌、人类恶性胸膜间皮瘤腹膜转移和乳腺癌淋巴转移等均取得良好的抑瘤效果^[65]。

4.2 膜去稳定化功能

具有膜去稳定化功能材料通常为带有强正电性和负电性的聚合物。阳离子通过与负电性的质膜形成离子对,聚集的离子对使质膜表面发生脱水从而使内涵体/溶酶体的质膜破裂或者融合^[66]。中国药科大学平其能课题组设计并合成了一种具有 pH 敏感的膜破坏作用的精氨酸衍生物 L-精氨酸月桂醇酯(AL),通过考察 AL 在不同 pH 下的溶血能力评价了 AL 的 pH 选择性的膜破坏作用。结果表明,AL 在中性环境(pH 7.4)中几乎没有溶血作用,而随着 pH 的下降溶血能力增强,当 pH 5.4 下,AL 处理后的红细胞几乎全部破裂。可能原因为:AL 结构中的精氨酸的伯胺和仲胺在内涵体/溶酶体中发生质子化,与质膜形成离子对,使内涵体/溶酶体的质膜融合。另外,随着 pH 的下降,使插入到质膜中 AL 的质子化程度增加,相互排斥,最终扰乱双分子层而导致质膜发生破裂^[67]。

具有 pH 敏感而发生膜去稳定功能的阴离子聚合物,如聚甲基丙烯酸(PMAA),在中性环境下其构型主要表现为无规线团,而在内涵体的弱酸性环境下其构型可由无规线团转变为球形,与内涵体膜相互作用时可导致膜去稳定^[68]。Mebarek 等^[69]以脂质体膜模型及溶血实验来研究不同相对分子质量的聚甲基丙烯酸-聚氧乙烯共聚物(PMAA-PEO)的 pH 敏感膜去稳定功能。不同相对分子质量的共聚物在不同 pH 下的溶解性与脂质体膜的破坏能力相关。当 PMAA 相对分子质量为 3 500, PEO 相对分子质量为 5 000(PMAA₃₅₀₀-b-PEO₅₀₀₀)时,可在 pH < 5.5 下发生最强的膜去稳定化作用。同时,溶血实验表明,随着 pH 的降低,PMAA₃₅₀₀-b-PEO₅₀₀₀的羧基发生质子化,引发聚合物构型的变化,并增加了聚合物的疏水性从而诱导强烈的膜去稳定性,当 pH 为 4.5 时溶血率达到 100%,提示可用于实现内涵体/溶酶体逃逸。

4.3 膜融合作用

膜融合作用也是纳米载体逃出内涵体/溶酶体或者向细胞质释放药物的重要手段之一。常用的膜融合材料可分为脂质类和多肽类两种。二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)是最常用的膜融合脂质。在脂质组分中加入 DOPE 后所制得的脂质体在中性条件下稳定,而在酸性下可以与质膜发生膜融合作用^[70]。Lin 等^[71]以 DOPE 和胆固醇-(甲基丙烯酸羟乙酯-co-赖氨酸共聚物)制备了荷载 siRNA 的脂质复合物,并在表面修饰叶酸-聚乙二醇-(甲基丙烯酸羟乙酯-组氨酸-甲基丙烯酸共聚物)(FA-PEG-P(HEMA-His-co-MAAc))。被肿瘤细胞摄取后,该载体通过酸敏感膜融合作用将 siRNA 释放到胞质中,发挥靶基因沉默效应。

流感病毒通过自身血凝素 2 蛋白(HA2)与质膜融合后向宿主细胞质内释放病毒基因而实现病毒感染。研究表明,位于 HA2 N 端的 20 个氨基酸短肽被证明是一种 pH 敏感多肽,在酸性环境下能与类脂膜发生膜融合作用^[72]。日本北海道大学 Harashima 课题组将模拟 HA2 功能的 GALA 多肽连接到胆固醇(Chol)上得到具有酸敏感膜融合的胆固醇多肽偶联物 Chol-GALA,与具有核定位功能材料麦芽三糖衍生物 Malto-PEG6-C11 和鱼精蛋白/DNA 复合物组装成具有多层包膜结构的纳米载体。当进入细胞后,该载体可循序发挥 Chol-

GALA 逃离内涵体/溶酶体功能和 Malto-PEG6-C11 的核靶向功能,从而将 DNA 递送到细胞核内^[73]。美国东北大学 Torchilin 课题组则从噬菌体中得到一种具有内涵体/溶酶体酸性敏感的膜融合噬菌体蛋白。修饰了这种蛋白的脂质体具有良好的肿瘤细胞靶向和内涵体/溶酶体逃逸作用^[74]。

5 胞内释药机制

只有从载体中释放出来的药物才能发挥药效。因此,以完整的纳米粒形式逃逸出内涵体/溶酶体转运至细胞质的药物递送系统还存在药物释放的屏障。目前响应肿瘤细胞内细胞质中的信号实现药物在细胞质中释放的纳米药物递送系统的释药机制主要有还原敏感型和三磷酸腺苷(ATP)敏感型。

5.1 响应细胞质还原环境的纳米药物释放系统

巯基与二硫键交换反应对于维持体内细胞蛋白质结构稳定性、酶活性及氧化还原平衡具有重要作用^[75]。研究表明,细胞外 GSH 的浓度约为 2 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$,而在细胞内由于大量的还原型辅酶 II(NADPH)以及谷胱甘肽还原酶的存在,通常情况下表现为还原性环境,细胞内的 GSH 浓度要远远高于细胞外水平,约为 0.5 ~ 10 mmol/L ^[76]。肿瘤组织 GSH 表达水平是正常组织的 4 倍以上^[77]。因此,基于肿瘤细胞内外 GSH 表达水平的差异,设计具有 GSH 敏感实现肿瘤细胞内响应性释药的递药系统,有利于提高化疗药物的药效并降低不良反应。

目前设计 GSH 敏感的常用方法是以二硫键作为 GSH 敏感键。当载体进入细胞后可与细胞中的 GSH 发生二硫键的断裂,载体发生解组装而快速释放出药物。例如,Li 等^[78]通过二硫键将 PTX 和 HA 连接后构建肿瘤靶向胶束,当胶束进入肿瘤细胞后,在 GSH 的作用下二硫键断裂使胶束迅速解组装,从而促进了 PTX 的胞内释放。

此外,AuNP 能够与具有巯基的药物形成稳定的 Au-S 键,而在富含 GSH 的环境下,Au-S 键又可被游离巯基所取代而释放出药物或成像分子。Wang 等^[79]合成了一种包载 AuNP 的树状聚合物分子(DEGNPs),并通过 Au-S 键在 AuNP 表面偶联了含巯基抗肿瘤药物如甲硫丙脯酸、6-巯基嘌呤以及巯基化 DOX 和巯基化顺铂。该载体能够在细胞质中高浓度 GSH 的作用中快速释放偶联在 AuNP 表面的抗肿瘤药物。

5.2 响应细胞质能量环境的纳米药物释放系统

ATP 是体内组织细胞一切生命活动所需能量的直接来源,其在细胞内外的含量具有显著差异,在细胞内的含量($1 \sim 10 \text{ mmol/L}$)远高于细胞外含量($5 \text{ } \mu\text{mol/L}$)^[80],基于这种差异,可以设计具有细胞内 ATP 响应释放特征的载体用于肿瘤的治疗。美国北卡罗来纳州大学 Gu 课题组基于 ATP 适体(ATP aptamer)与 ATP 的高亲和性,将 DOX 负载于具有 ATP 敏感的 DNA 双螺旋支架中,再与鱼精蛋白混合得到正电性的纳米复合物(DOX/Complex),之后加入到甲基丙烯酸修饰的 HA 溶液中,经紫外诱导反应交联 HA 外壳,制得纳米胶(DOX/NG)。静脉注射的 DOX/NG 经 EPR 效应和 HA 的主动靶向作用富集于肿瘤组织后内吞进入细胞,在内涵体/溶酶体中 HA 外壳发生降解暴露出 DOX/Complex,并基于鱼精蛋白的强正电性实现了内涵体/溶酶体的逃逸,在细胞质中高浓度 ATP 的作用下,ATP 适体与 ATP 形成复合物,导致 DNA 双螺旋结构的解离,从而释放出嵌入的 DOX^[81]。由于肿瘤细胞内微环境处于动态变化过程,为了获得稳定的信号响应功能,他们又设计了一种基于 DOPE 膜融合功能的且具有肿瘤细胞内 ATP 信号敏感及 ATP 信号放大的脂质体共递给药系统。将 ATP 敏感的 DOX/Complex 载入到 DOPE 修饰的脂质体中得到 ATP 信号响应模块(DOX-FL),再以负载 ATP 的脂质体(ATP-L)作为 ATP 信号放大模块。共输送的 DOX-FL 与 ATP-L 在肿瘤细胞的内涵体的酸性环境中,DOX-FL 分别与 ATP-L 和内涵体发生膜融合,更迅速的将 DOX 释放到细胞质中,发挥抗肿瘤活性^[82]。此外,日本东京大学 Kataoka 课题组对 PEG-PLL 的氨基修饰后获得一种苯硼酸衍生物 $\text{PEG}_n\text{-P}(\text{Lys}/\text{FPBA})_{42}$,利用复合物中的苯硼酸可以与 siRNA 上的核糖邻二羟基结合的特性,构建了荷载 siRNA 的聚电解质复合物胶束。该胶束遇到游离的 ATP 后,由于 ATP 与苯硼酸的结合能力要强于与 siRNA 上核糖的结合能力,可与 siRNA 发生置换作用,从而实现在细胞质中 siRNA 从胶束中有效释放^[83]。

6 克服多重生理屏障的纳米药物递送系统

纳米给药系统从给药到达肿瘤治疗的最终靶点需经过血液屏障、组织屏障、跨膜屏障及胞内传

递屏障等过程,因此设计一种药物递送系统可同时克服以上的递送屏障,是目前研究者们面临的挑战。为此,本课题组设计了能够突破静脉注射药物的体内转运全过程(体循环至肿瘤组织,至肿瘤细胞,至肿瘤细胞内的作用靶点或特定细胞器)中各种生理屏障,更有效输送抗肿瘤药物至肿瘤细胞内线粒体的功能脂质体。该功能脂质体的关键构筑基元是一种精密设计的同时含有 pH 敏感离子键和共价键的小分子寡肽($\text{HHG}_2\text{C}_{18}$)。该寡肽赋予了脂质体根据所经机体(血液、肿瘤组织及细胞)环境的 pH,灵敏地变化自身电性(负电、正电、强正电)的功能,逐步实现了对肿瘤组织、肿瘤细胞和细胞器三重靶向,大大增强了由线粒体凋亡途径介导的肿瘤细胞程序性死亡,为线粒体靶点抗肿瘤药物提供了安全、高效的载体平台^[84]。这种具有克服多重生理病理屏障的设计思路为细胞内及细胞亚器官靶向的研究设计提供了新的策略。为了使递送系统更好地具有长循环作用,该课题组又设计了 PEG 化的寡肽两性离子脂质体。研究显示:该递药系统除了仍然具有各种生理环境的 pH 响应外,还具有良好的长循环作用,具有更强的抑制肿瘤生长的作用,不良反应更低,并可显著延长荷瘤小鼠的生存期^[85]。

Du 等^[86]通过点击反应将半胱胺(Cya)修饰在 mPEG-聚磷酸烯丙基乙烯(PAEP)上制备聚合物 mPEG-b-PAEP-Cya(PPC),然后在 Cya 的氨基上分别引入具有肿瘤组织 pH 敏感断裂的 2,3-二甲基马来酸酐(DA)和内涵体/溶酶体 pH 敏感断裂的 DOX 衍生物,得到最终产物 PPC-Hyd-DOX-DA 聚合物。该聚合物在生理条件(pH 7.4)下可自组装形成纳米粒。在 pH 6.8 下,与氨基相连的 DA 离去而实现电荷翻转,促进肿瘤细胞对纳米粒的摄取。当进入细胞后,在 pH 5.0 下,连接 DOX 的胺键可发生水解断裂,偶联的 DOX 从纳米粒中释放,扩散进入细胞核内。该纳米粒能够有效抑制 SK-3rd 多细胞肿瘤球的生长。

7 结语与展望

在过去的 10 年中,纳米药物递送系统在肿瘤靶向治疗中取得了十分显著的进展,目前已有多种纳米药物递送系统在国内上市。但是目前纳米药物递送系统的开发上还存在着许多研究难题以

及工业化生产的瓶颈:① 不同肿瘤的类型以及肿瘤发生发展的不同阶段,导致肿瘤组织微环境存在较大的差异,为肿瘤靶向纳米药物递送系统的设计以及应用带来了最直接的困难;② 纳米药物递送系统在肿瘤治疗上的应用仍然难以有效克服生理病理屏障,非特异性分布而造成的不良反应问题依旧没有得到很好的解决;③ 多功能及智能型肿瘤靶向纳米给药系统的制备过程往往较为复杂,难以从实验室研究阶段向工业化生产转化;④ 用于纳米递药系统的实验室荷瘤鼠模型试验与肿瘤病人临床治疗的相关性及可预测性尚未见研究;⑤ 对于制剂质量标准的制定也需要更高的要求。尽管如此,随着国内外肿瘤靶向纳米给药系统研究的不断深入,加之肿瘤病理学和肿瘤分子细胞生物学等领域研究不断深入,智能型且更具普适性的靶向纳米制剂将会在肿瘤的预防、诊断及治疗中发挥更加广泛和重要的作用。

参考文献

- [1] Kim JK, Howard MD, Dziubla TD, *et al.* Uniformity of drug payload and its effect on stability of solid lipid nanoparticles containing an ester prodrug[J]. *ACS Nano*, 2011, **5**(1): 209 – 216.
- [2] Sun C, Du K, Fang C, *et al.* PEG-mediated synthesis of highly dispersive multifunctional superparamagnetic nanoparticles: their physicochemical properties and function *in vivo* [J]. *ACS Nano*, 2010, **4**(4): 2402 – 2410.
- [3] Sandiford L, Phinikaridou A, Protti A, *et al.* Bisphosphonate-anchored PEGylation and radiolabeling of superparamagnetic iron oxide: long-circulating nanoparticles for *in vivo* multimodal (T1 MRI-SPECT) imaging[J]. *ACS Nano*, 2013, **7**(1): 500 – 512.
- [4] Han J, Wang Q, Zhang Z, *et al.* Cationic bovine serum albumin based self-assembled nanoparticles as siRNA delivery vector for treating lung metastatic cancer [J]. *Small*, 2014, **10**(3): 524 – 535.
- [5] Dolman ME, Harmsen S, Storm G, *et al.* Drug targeting to the kidney: advances in the active targeting of therapeutics to proximal tubular cells [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, **62**(14): 1344 – 1357.
- [6] Liu Y, Hu Y, Huang L. Influence of polyethylene glycol density and surface lipid on pharmacokinetics and biodistribution of lipid-calcium-phosphate nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2014, **35**(9): 3027 – 3034.
- [7] Sadzuka Y, Nakade A, Tsuruda T, *et al.* Study on the characterization of mixed polyethyleneglycol modified liposomes containing doxorubicin[J]. *J Control Release*, 2003, **91**(3): 271 – 280.
- [8] Li SD, Huang L. Stealth nanoparticles: high density but sheddable PEG is a key for tumor targeting[J]. *J Control Release*, 2010, **145**(3): 178 – 181.
- [9] Zhang J, Li X, Huang L. Non-viral nanocarriers for siRNA delivery in breast cancer [J]. *J Control Release*, 2014, **190**: 440 – 450.
- [10] Mishra S, Webster P, Davis ME. PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles[J]. *Eur J Cell Biol*, 2004, **83**(3): 97 – 111.
- [11] Shiraiishi K, Hamano M, Ma H, *et al.* Hydrophobic blocks of PEG-conjugates play a significant role in the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon [J]. *J Control Release*, 2013, **165**(3): 183 – 190.
- [12] Abu Lila AS, Kiwada H, Ishida T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage[J]. *J Control Release*, 2013, **172**(1): 38 – 47.
- [13] Wang YZ, Zhou JP, Ding Y, *et al.* Advances in research of biomimetic drug delivery systems[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2014, **45**(3): 267 – 273.
- [14] Zhu Q, Jia L, Gao Z, *et al.* A tumor environment responsive doxorubicin-loaded nanoparticle for targeted cancer therapy[J]. *Mol Pharm*, 2014, **11**(10): 3269 – 3278.
- [15] Wu J, Song C, Jiang C, *et al.* Nucleolin targeting AS1411 modified protein nanoparticle for antitumor drugs delivery [J]. *Mol Pharm*, 2013, **10**(10): 3555 – 3563.
- [16] Cormode DP, Skajaa T, van Schooneveld MM, *et al.* Nanocrystal core high-density lipoproteins: a multimodality contrast agent platform[J]. *Nano Lett*, 2008, **8**(11): 3715 – 3723.
- [17] Kim HR, Gil S, Andrieux K, *et al.* Low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis of PEGylated nanoparticles in rat brain endothelial cells[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, **64**(3): 356 – 364.
- [18] Reynolds L, Mulik RS, Wen X, *et al.* Low-density lipoprotein-mediated delivery of docosahexaenoic acid selectively kills murine liver cancer cells[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2014, **9**(14): 2123 – 2141.
- [19] Allijn IE, Leong W, Tang J, *et al.* Gold nanocrystal labeling allows low-density lipoprotein imaging from the subcellular to macroscopic level[J]. *ACS Nano*, 2013, **7**(11): 9761 – 9770.
- [20] Lee JY, Kim JH, Bae KH, *et al.* Low-density lipoprotein-mimicking nanoparticles for tumor-targeted theranostic applications [J]. *Small*, 2014. doi: 10.1002/smll.201303277.
- [21] Glickson JD, Lund-Katz S, Zhou R, *et al.* Lipoprotein nanoplat-form for targeted delivery of diagnostic and therapeutic agents [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2009, **645**: 227 – 239.
- [22] Tsai RK, Rodríguez PL, Discher DE. Self inhibition of phagocytosis; the affinity of ‘marker of self’ CD47 for SIRPalpha dictates potency of inhibition but only at low expression levels[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2010, **45**(1): 67 – 74.
- [23] Hu CM, Zhang L, Aryal S, *et al.* Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, **108**(27): 10980 – 10985.
- [24] Hu CM, Fang RH, Luk BT, *et al.* Nanoparticle-detained toxins for safe and effective vaccination [J]. *Nat Nanotechnol*, 2013, **8**(12): 933 – 938.

- [25] Hu CM, Fang RH, Copp J, *et al.* A biomimetic nanosponge that absorbs pore-forming toxins[J]. *Nat Nanotechnol*, 2013, **8**(5): 336–340.
- [26] Copp JA, Fang RH, Luk BT, *et al.* Clearance of pathological antibodies using biomimetic nanoparticles[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, **111**(37): 13481–13486.
- [27] Gao W, Hu CM, Fang RH, *et al.* Surface functionalization of gold nanoparticles with red blood cell membranes[J]. *Adv Mater*, 2013, **25**(26): 3549–3553.
- [28] Parodi A, Quattrocchi N, van de Ven AL, *et al.* Synthetic nanoparticles functionalized with biomimetic leukocyte membranes possess cell-like functions[J]. *Nat Nanotechnol*, 2013, **8**(1): 61–68.
- [29] Banz A, Cremel M, Mouvant A, *et al.* Tumor growth control using red blood cells as the antigen delivery system and poly(I; C)[J]. *J Immunother*, 2012, **35**(5): 409–417.
- [30] Muthana M, Giannoudis A, Scott SD, *et al.* Use of macrophages to target therapeutic adenovirus to human prostate tumors[J]. *Cancer Res*, 2011, **71**(5): 1805–1815.
- [31] Huang X, Zhang F, Wang Y, *et al.* Design considerations of iron-based nanoclusters for noninvasive tracking of mesenchymal stem cell homing[J]. *ACS Nano*, 2014, **8**(5): 4403–4414.
- [32] Anselmo AC, Gupta V, Zern BJ, *et al.* Delivering nanoparticles to lungs while avoiding liver and spleen through adsorption on red blood cells[J]. *ACS Nano*, 2013, **7**(12): 11129–11137.
- [33] Cheng H, Kastrup CJ, Ramanathan R, *et al.* Nanoparticulate cellular patches for cell-mediated tumorotropic delivery[J]. *ACS Nano*, 2010, **4**(2): 625–631.
- [34] Doshi N, Swiston AJ, Gilbert JB, *et al.* Cell-based drug delivery devices using phagocytosis-resistant backpacks[J]. *Adv Mater*, 2011, **23**(12): H105–H109.
- [35] Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, *et al.* Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size[J]. *Nat Nanotechnol*, 2011, **6**(12): 815–823.
- [36] Tang L, Yang X, Yin Q, *et al.* Investigating the optimal size of anticancer nanomedicine[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, **111**(43): 15344–15349.
- [37] Guo S, Lin CM, Xu Z, *et al.* Co-delivery of cisplatin and rapamycin for enhanced anticancer therapy through synergistic effects and microenvironment modulation[J]. *ACS Nano*, 2014, **8**(5): 4996–5009.
- [38] Pietras K, Rubin K, Sjoblom T, *et al.* Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy[J]. *Cancer Res*, 2002, **62**(19): 5476–5484.
- [39] Zhang J, Miao L, Guo S, *et al.* Synergistic anti-tumor effects of combined gemcitabine and cisplatin nanoparticles in a stroma-rich bladder carcinoma model[J]. *J Control Release*, 2014, **182**: 90–96.
- [40] Guo S, Wang Y, Miao L, *et al.* Lipid-coated cisplatin nanoparticles induce neighboring effect and exhibit enhanced anticancer efficacy[J]. *ACS Nano*, 2013, **7**(11): 9896–9904.
- [41] Ju C, Mo R, Xue J, *et al.* Sequential intra-intercellular nanoparticle delivery system for deep tumor penetration[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, **53**(24): 6253–6258.
- [42] Wang X, Yang C, Zhang Y, *et al.* Delivery of platinum(IV) drug to subcutaneous tumor and lung metastasis using bradykinin-potentiating peptide-decorated chitosan nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2014, **35**(24): 6439–6453.
- [43] Nomoto T, Matsumoto Y, Miyata K, *et al.* *In situ* quantitative monitoring of polyplexes and polyplex micelles in the blood circulation using intravital real-time confocal laser scanning microscopy[J]. *J Control Release*, 2011, **151**(2): 104–109.
- [44] Abu Lila AS, Doi Y, Nakamura K, *et al.* Sequential administration with oxaliplatin-containing PEG-coated cationic liposomes promotes a significant delivery of subsequent dose into murine solid tumor[J]. *J Control Release*, 2010, **142**(2): 167–173.
- [45] Tian L, Bae YH. Cancer nanomedicines targeting tumor extracellular pH[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, **99**: 116–126.
- [46] Ding C, Gu J, Qu X, *et al.* Preparation of multifunctional drug carrier for tumor-specific uptake and enhanced intracellular delivery through the conjugation of weak acid labile linker[J]. *Bioconjug Chem*, 2009, **20**(6): 1163–1170.
- [47] Gao Y, Ma R, An Y, *et al.* Nanogated vessel based on polypseudorotaxane-capped mesoporous silica via a highly acid-labile benzoic-imine linker[J]. *J Control Release*, 2011, **152**(Suppl 1): e81–82.
- [48] Wang J, Gong C, Wang Y, *et al.* Magnetic nanoparticles with a pH-sheddable layer for antitumor drug delivery[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, **118**: 218–225.
- [49] Yang XZ, Du JZ, Dou S, *et al.* Sheddable ternary nanoparticles for tumor acidity-targeted siRNA delivery[J]. *ACS Nano*, 2012, **6**(1): 771–781.
- [50] Song N, Ding M, Pan Z, *et al.* Construction of targeting-clickable and tumor-cleavable polyurethane nanomicelles for multifunctional intracellular drug delivery[J]. *Biomacromolecules*, 2013, **14**(12): 4407–4419.
- [51] Zhang J, Yuan ZF, Wang Y, *et al.* Multifunctional envelope-type mesoporous silica nanoparticles for tumor-triggered targeting drug delivery[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(13): 5068–5073.
- [52] Zhu L, Wang T, Perche F, *et al.* Enhanced anticancer activity of nanopreparation containing an MMP2-sensitive PEG-drug conjugate and cell-penetrating moiety[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**(42): 17047–17052.
- [53] Stern R. Hyaluronidases in cancer biology[J]. *Semin Cancer Biol*, 2008, **18**(4): 275–280.
- [54] Jiang T, Zhang Z, Zhang Y, *et al.* Dual-functional liposomes based on pH-responsive cell-penetrating peptide and hyaluronic acid for tumor-targeted anticancer drug delivery[J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(36): 9246–9258.
- [55] Jiang T, Mo R, Bellotti A, *et al.* Gel-liposome-mediated co-delivery of anticancer membrane-associated proteins and small-molecule drugs for enhanced therapeutic efficacy[J]. *Adv Funct Mater*, 2013, **24**(16): 2295–2304.
- [56] Neuberg P, Kichler A. Recent developments in nucleic acid

- delivery with polyethylenimines [J]. *Adv Genet*, 2014, **88**: 263 – 288.
- [57] Ouyang D, Zhang H, Parekh HS, *et al.* The effect of pH on PAM-AM dendrimer-siRNA complexation; endosomal considerations as determined by molecular dynamics simulation [J]. *Biophys Chem*, 2011, **158**(2/3): 126 – 133.
- [58] Lachelt U, Kos P, Mickler FM, *et al.* Fine-tuning of proton sponges by precise diaminoethanes and histidines in pDNA polyplexes [J]. *Nanomedicine*, 2014, **10**(1): 35 – 44.
- [59] Ihm JE, Han KO, Han IK, *et al.* High transfection efficiency of poly(4-vinylimidazole) as a new gene carrier [J]. *Bioconjug Chem*, 2003, **14**(4): 707 – 708.
- [60] Kim HJ, Takemoto H, Yi Y, *et al.* Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles [J]. *ACS Nano*, 2014, **8**(9): 8979 – 8991.
- [61] Yang Y, Hu Y, Wang Y, *et al.* Nanoparticle delivery of pooled siRNA for effective treatment of non-small cell lung cancer [J]. *Mol Pharm*, 2012, **9**(8): 2280 – 2289.
- [62] Xu Z, Wang Y, Zhang L, *et al.* Nanoparticle-delivered transforming growth factor-beta siRNA enhances vaccination against advanced melanoma by modifying tumor microenvironment [J]. *ACS Nano*, 2014, **8**(4): 3636 – 3645.
- [63] Ke CJ, Su TY, Chen HL, *et al.* Smart multifunctional hollow microspheres for the quick release of drugs in intracellular lysosomal compartments [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, **50**(35): 8086 – 8089.
- [64] Lee ES, Kim D, Youn YS, *et al.* A virus-mimetic nanogel vehicle [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, **47**(13): 2418 – 2421.
- [65] Griset AP, Walpole J, Liu R, *et al.* Expansile nanoparticles: synthesis, characterization, and *in vivo* efficacy of an acid-responsive polymeric drug delivery system [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, **131**(7): 2469 – 2471.
- [66] Hafez IM, Maurer N, Cullis PR. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids [J]. *Gene Ther*, 2001, **8**(15): 1188 – 1196.
- [67] Li S, Su Z, Sun M, *et al.* An arginine derivative contained nanostructure lipid carriers with pH-sensitive membranolytic capability for lysosomolytic anti-cancer drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2012, **436**(1/2): 248 – 257.
- [68] Yessine MA, Leroux JC. Membrane-destabilizing polyanions: interaction with lipid bilayers and endosomal escape of biomacromolecules [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, **56**(7): 999 – 1021.
- [69] Mebarek N, Aubert-Pouessel A, Gerardin C, *et al.* Polymeric micelles based on poly(methacrylic acid) block-containing copolymers with different membrane destabilizing properties for cellular drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2013, **454**(2): 611 – 620.
- [70] Mochizuki S, Kanegae N, Nishina K, *et al.* The role of the helper lipid dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) for DNA transfection cooperating with a cationic lipid bearing ethylenediamine [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1828**(2): 412 – 418.
- [71] Lin SY, Zhao WY, Tsai HC, *et al.* Sterically polymer-based liposomal complexes with dual-shell structure for enhancing the siRNA delivery [J]. *Biomacromolecules*, 2012, **13**(3): 664 – 675.
- [72] Jardeztzy TS, Lamb RA. Virology: a class act [J]. *Nature*, 2004, **427**(6972): 307 – 308.
- [73] Akita H, Masuda T, Nishio T, *et al.* Improving *in vivo* hepatic transfection activity by controlling intracellular trafficking: the function of GALA and maltotriose [J]. *Mol Pharm*, 2011, **8**(4): 1436 – 1442.
- [74] Wang T, Yang S, Petrenko VA, *et al.* Cytoplasmic delivery of liposomes into MCF-7 breast cancer cells mediated by cell-specific phage fusion coat protein [J]. *Mol Pharm*, 2010, **7**(4): 1149 – 1158.
- [75] Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase [J]. *Eur J Biochem*, 2000, **267**(20): 6102 – 6109.
- [76] Li YL, Zhu L, Liu Z, *et al.* Reversibly stabilized multifunctional dextran nanoparticles efficiently deliver doxorubicin into the nuclei of cancer cells [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, **48**(52): 9914 – 9918.
- [77] Kuppusamy P, Li H, Ilangoan G, *et al.* Noninvasive imaging of tumor redox status and its modification by tissue glutathione levels [J]. *Cancer Res*, 2002, **62**(1): 307 – 312.
- [78] Li J, Huo M, Wang J, *et al.* Redox-sensitive micelles self-assembled from amphiphilic hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for targeted intracellular delivery of paclitaxel [J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(7): 2310 – 2320.
- [79] Wang X, Cai X, Hu J, *et al.* Glutathione-triggered “off-on” release of anticancer drugs from dendrimer-encapsulated gold nanoparticles [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(26): 9805 – 9810.
- [80] Gribble FM, Loussouarn G, Tucker SJ, *et al.* A novel method for measurement of submembrane ATP concentration [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275**(39): 30046 – 30049.
- [81] Mo R, Jiang T, DiSanto R, *et al.* ATP-triggered anticancer drug delivery [J]. *Nat Commun*, 2014, **5**: 3364.
- [82] Mo R, Jiang T, Gu Z. Enhanced anticancer efficacy by ATP-mediated liposomal drug delivery [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, **53**(23): 5815 – 5820.
- [83] Naito M, Ishii T, Matsumoto A, *et al.* A phenylboronate-functionalized polyion complex micelle for ATP-triggered release of siRNA [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, **51**(43): 10751 – 10755.
- [84] Mo R, Sun Q, Xue J, *et al.* Multistage pH-responsive liposomes for mitochondrial-targeted anticancer drug delivery [J]. *Adv Mater*, 2012, **24**(27): 3659 – 3665.
- [85] Mo R, Sun Q, Li N, *et al.* Intracellular delivery and antitumor effects of pH-sensitive liposomes based on zwitterionic oligopeptide lipids [J]. *Biomaterials*, 2013, **34**(11): 2773 – 2786.
- [86] Du JZ, Du XJ, Mao CQ, *et al.* Tailor-made dual pH-sensitive polymer-doxorubicin nanoparticles for efficient anticancer drug delivery [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(44): 17560 – 17563.