

· 综述 ·

基于红细胞的载药系统研究进展

孙雅楠¹, 马琳², 张彪¹, 苏靖^{1*}, 邱明丰^{1**}(¹ 上海交通大学药学院, 上海 200240; ² 上海交通大学医学院附属第九人民医院老年科, 上海 200011)

摘要 基于红细胞(RBC)的新型药物输送系统近年来倍受关注,天然红细胞是机体固有成分,与传统药物载体相比,具有生物相容性高、体内半衰期长等优势。本文综述了红细胞药物载体的特点、制备方法及其载药的最新研究进展;同时,介绍了近年来出现的新型红细胞膜药物输送系统即红细胞膜包裹纳米粒(RBC-NP)和红细胞膜纳米海绵技术。

关键词 红细胞; 细胞膜; 药物载体; 红细胞膜包裹纳米粒; 红细胞膜纳米海绵

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)04-0481-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150416

Advances of erythrocyte-inspired delivery systems

SUN Yanan¹, MA Lin², ZHANG Biao¹, SU Jing^{1*}, QIU Mingfeng^{1**}

¹ School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240; ² Department of Geriatrics, Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

Abstract In recent years, erythrocyte-inspired delivery systems have gained much attention. Erythrocytes (red blood cells, RBCs) are natural components of our bodies. Compared to the conventional drug delivery systems, RBCs have such advantages, as higher degree of biocompatibility and longer half-life. Herein, characteristics for drug delivery, preparation methods and recent research of RBC carriers are reviewed. Besides the latest development on RBC membrane-camouflaged nanoparticle systems (RBC-NP) and RBC membrane nanosplices, which have emerged as new trends of erythrocyte-inspired delivery systems are introduced.

Key words red blood cells(RBC); cell membranes; drug carrier; RBC membrane-camouflaged nanoparticles; RBC membrane nanosplice

This work was supported by Shanghai Science and Technology Funding Program (No. 13401900801) and the Morning Star Award Scheme of Shanghai Jiao Tong University (No. 14X100010061)

大多数药物存在不良反应、血药浓度波动大等现象,基因药物(特别是小干扰 RNA)还存在快速降解的风险。为解决这类问题,研究者们选择各种各样的化学类或生物类载体去运载药物^[1]。

在众多的药物载体中,红细胞因其自身的独特性质备受关注。红细胞是血液中数量最多且寿命最长的细胞。正常的成熟红细胞无核、无细胞器,呈双凹圆碟形,直径 7~8 μm,中央最薄处仅约 1 μm,这种特殊的结构有利于增大其表面积以便

进行物质交换^[2]。红细胞具有可塑变形性,在全身血管中循环运行时,经过变形才能通过口径比它小的毛细血管和血窦孔隙。红细胞膜存在渗透脆性,在低渗溶液中红细胞可发生溶血,利于物质的交换^[3],红细胞膜本身适合在血管内运输。

红细胞直接作为载体,用于运载小分子药物和蛋白质、核酸等大分子药物的研究已广泛展开。此外,制备保持完整功能的红细胞膜包封纳米粒作为药物载体的研究也取得了一定进展。本文综述了

红细胞作为运载工具输送药物的研究情况,另外,着重介绍两种新型的红细胞膜载药系统——红细胞膜包裹纳米粒(RBC-NP)和红细胞膜纳米海绵的最新研究进展。

1 红细胞作为药物载体的发展历程

早在1953年,已有科学家尝试用红细胞运载化学物质。随后有人成功将相对分子质量10~250 kD的右旋糖酐类载入红细胞。而直到1973年,科学家们才开始采用红细胞做为药物载体,并于1979年首次以红细胞载体(carrier erythrocytes)来描述运载药物的红细胞^[4]。最先应用红细胞转运的是各种酶类,如乙醛脱氢酶^[5]、谷氨酸脱氢酶^[6]等。经过30多年发展,红细胞已应用于输送不同性质的药物,用于治疗肿瘤、心脑血管疾病、各类炎症等。

2 红细胞作为药物载体的特点

红细胞作为药物载体主要有以下优势:降解不会产生有毒或有害物质,红细胞的粒径及形状相同,提供相对稳定的内环境,各种化学物质和酶都可包裹在红细胞膜内,防止内源物质降解运载的药物,可调整药物的药代动力学和药效学,保持血浆内药物浓度的稳定,延长药物的全身作用时间,减少药物的不良反应等^[7]。

2.1 延长药物在体内的半衰期

正常红细胞的寿命为120 d左右,其体内循环时间远高于普通药物载体。将药物用红细胞负载后可显著延长其体内半衰期,提高药物疗效。将抗肿瘤药物长春新碱(MTX)、甲氨蝶呤(VCR)采用红细胞单一负载或复合负载后,可显著提高药物抗肿瘤活性,延长药物作用时间。其中MTX+VCR的双载红细胞对K562细胞48 h的抑制率为(68.63±2.76)%,显著高于MTX或VCR单载红细胞($P<0.05$)^[8-10]。连燕舒^[11]以红细胞运载吗啡(M-RBC)用于手术后镇痛,实验组术后无痛时间为(15.7±5.6)h,远高于对照组(3.2±2.3)h,明显延长了吗啡的镇痛时效,且M-RBC半衰期为(6.48±1.56)h,与文献报道吗啡体内半衰期2.5~3 h相比显著增加。核磁共振检查一般采用超顺磁氧化铁颗粒(SPIO)和超小型超顺磁氧化铁颗粒(USPIO)作为对比剂。Antonelli

等^[12]用红细胞运载SPIO作对比剂,注射后24 h血液内铁离子浓度仍接近检测限,该对比剂血液中寿命可被延长至12 d。

2.2 良好的生物相容性和可降解性,减少不良反应

天然红细胞为机体固有成分,可通过代谢完全降解为无毒产物,作为运载体在体内不会引起其他不良反应。聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor)常添加于紫杉醇注射液中作增溶剂,但易引起感染、过敏等不良反应。Harisa等^[13]尝试以红细胞作为药物载体运载紫衫醇,替代Cremophor的使用。载药的红细胞各种生理特性并无显著差异,可作为紫衫醇的药物靶向输送载体。

2.3 增加药物在体内的稳定性,降低免疫原性

红细胞可形成一个隔离空间以保护运载的物质,使药物不受内源性因素的影响而过早失活和降解,提高药物在体内的稳定性。此外,亦可减少外源性大分子(如基因物质、蛋白等)引起的免疫反应,是运载大分子药物的理想工具^[14]。

2.4 增加药物的靶向性

红细胞因衰老或其他原因造成膜表面性质变化,经过脾和肝时可被网状内皮系统(RES)的巨噬细胞识别、吞噬,因此红细胞可作为天然的RES靶向给药载体。已有研究将干扰素α-2b用红细胞担载后用于RES靶向给药^[15]。为增加红细胞被识别能力,Chiarantini等^[16]将反义肽核酸载入红细胞后,诱导红细胞表面的带三蛋白凝集并固定化,使之成为自体免疫球蛋白G(IgG)的识别、结合位点,从而被巨噬细胞内吞,最终抑制了巨噬细胞内一氧化氮合酶(iNOS)和环氧化酶2(COX-2)的表达。

除RES靶向外,红细胞载体还可实现其他部位靶向。化疗药物在正常组织器官的分布积累是导致其不良反应的重要原因,磁化红细胞载体是解决这一问题的新手段。有报道将氧化铁纳米粒通过生物素-亲和素方法偶联到红细胞表面,或将四氧化三铁纳米粒载入红细胞内,制成红细胞磁化载体来运载多柔比星^[17-18]。磁化红细胞本身生理特性并无明显改变,但在外磁场的控制下可将药物准确输送到肿瘤部位。Cinti等^[19]将超顺磁纳米粒载入红细胞内,并以病毒血凝素糖蛋白对红细胞膜表面进行修饰,构建一种新型红细胞磁化载体。该磁化载体到达靶部位后能高效地与肿瘤细胞融合

并释放药物,用其运载地西他滨,给药剂量仅为常规化疗剂量的 10%。

2.5 延长药物释放时间,保持血药浓度稳定

红细胞膜是具有生物活性的半透膜,药物被载入红细胞后可实现缓慢持续释放,与传统给药方式相比,能明显减少血药浓度的波动。Alanazi 等^[20]用红细胞负载伯氨喹用于疟疾的治疗,载药后的红细胞可实现 48 h 的药物持续释放,但膜上谷胱甘肽(GSH)的含量显著降低,使载药后的红细胞更易被氧化。Bossa 等^[21]将地塞米松的前药地塞米松-21-磷酸盐(DEX 21-P)载入红细胞内,DEX 21-P 先在酶的作用下去磷酸化生成地塞米松,再通过自由扩散作用释放到红细胞外,如此给药一次便可维持 3~4 周的治疗浓度。

2.6 负载各类物质进行递送

红细胞载体适用范围广,无论是大分子药物还是小分子药物,大多可被红细胞运载,在适当的载药条件下可较大幅度地保持红细胞的活性和功能。Harisa 等^[22]用红细胞负载降血脂药物普伐他汀,探究不同包封条件对红细胞载药率及其生理特性的影响,结果显示在 0.6% NaCl、普伐他汀质量浓度为 10 mg/mL 下孵育 60 min 可得到最大载药率,且红细胞的生理特性基本无变化。Favretto 等^[23]则研究了用 3 种方法将不同相对分子质量的酶载入红细胞的情况,结果显示,氯丙嗪浸泡法和脂质体融合法,相较于低渗透析法,可提高载药率减少不良反应。Shi 等^[24]利用二硬脂酸磷脂酰乙酰胺将 IgG 连接于红细胞膜上,这种方法可显著提高整个红细胞载体的稳定性,且有利于药物的靶向运输。

3 红细胞载体的制备

3.1 红细胞载体的来源

红细胞及红细胞膜的来源与提取相对简单,一般通过离心方法得到血液中的红细胞,采用低渗溶血的方式取得红细胞膜,也有化学合成仿生的红细胞膜^[25]。

3.2 红细胞载体的载药方式

3.2.1 将药物包载入红细胞内 目前,人们运用一系列技术将治疗成分包裹入红细胞内,常用的有低渗法、化学法、电穿孔、胞吞法和脂质融合法等^[26~28]。对于可自由扩散的小分子药物,常将其

前药或其药物结合蛋白包载入红细胞内,通过前药的代谢或结合蛋白对小分子药物的亲和力实现药物的缓慢释放。大分子蛋白例如一些酶类(其作用底物可穿过红细胞膜进入胞内的)可直接包载入红细胞内,如此既可保持药物本身的稳定性,亦可实现缓慢催化作用^[29]。

3.2.2 将药物连接在红细胞膜上 若药物(酶或其他药物)必须同红细胞膜外不能穿膜的底物直接作用才能产生治疗效果,则常用不同的连接方法将药物连接于红细胞膜上。其中亲和素-生物素方法是膜与药物(特别是生物药物)结合的最常用技术^[30]。哺乳动物红细胞膜生物素酰化可通过生物素 N-溴代琥珀酰亚胺酯(NHS-biotin)引入氨基,也可生物氧化红细胞膜的醛基。Magnani 等^[31]比较了这些方法,发现通过 NHS-biotin 生物素酰化的细胞活性最好,每 1 个红细胞膜连接约 1 000 个生物素,在体内 24 h 的活性不受影响。

4 基于红细胞载药系统的最新进展

红细胞载药的优势主要依靠红细胞膜的结构及功能实现,且红细胞膜提取分离较简单,因此许多研究者提取单纯红细胞膜来考察其药物输送作用。例如 Gupta 等^[32]提取纯净红细胞膜经挤压制成直径为 100~200 nm 的纳米红细胞小体,运载法舒地尔治疗肺动脉高血压。红细胞膜包裹纳米粒(RBC-NP)以及红细胞膜纳米海绵这两种新型红细胞膜载体的研究进展介绍如下。

4.1 红细胞膜包裹纳米粒(RBC-NP)

RBC-NP 药物载体是将纳米粒内核和红细胞膜结合,既能弥补纳米粒体内清除速度快及红细胞载体释药缺乏可控性的缺点,又能发挥这两类药物载体的各自优势,是一种十分具有发展前景的新型药物载体。

4.1.1 RBC-NP 的制备、载药和释药方式 制备 RBC-NP 一般采用低渗透析挤压法。制备基本原理如图 1 所示,在低渗环境下红细胞膜孔打开将内容物释出,得到的红细胞膜经纳米膜挤压形成纳米红细胞小体,再将纳米红细胞小体和纳米粒经反复挤压形成 RBC-NP(直径约 80 nm)。通过透射电镜(TEM)观察以及蛋白酶消化等试验证明,合成的 RBC-NP 能够稳定存在,且膜包裹的方向为红细胞膜的外侧朝外,膜内侧邻纳米粒内核。Luk 等^[33]

探究了纳米粒内核的表面电性、曲率半径等因素对红细胞膜包裹纳米粒的影响。结果显示,红细胞膜可包封粒径为 65~340 nm 纳米粒,负电性内核与

负电性红细胞膜间的静电作用是能包裹并保持稳定的主要原因。

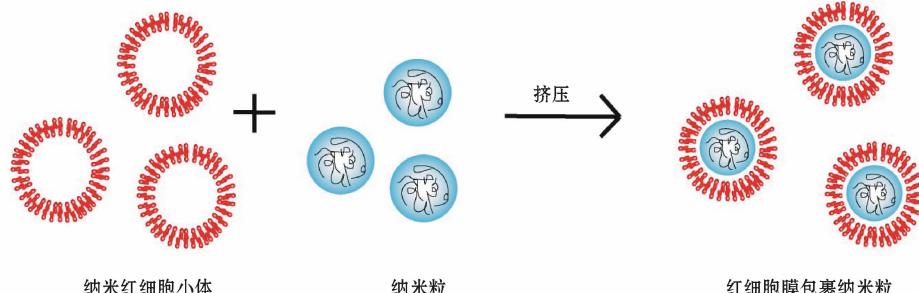


图 1 红细胞包裹纳米粒(RBC-NP)的制备过程

RBC-NP 主要是通过纳米粒内核载药,目前常使用 PLGA,载药方式分为物理包封和化学键接。有研究通过这两种方式将多柔比星载入 RBC-NP,得到的 RBC-NP 在 PBS 缓冲液中具有近似的高稳定性,且药效均高于单纯多柔比星给药,但化学键接载药的 RBC-NP 药物释放更加持久^[34]。

RBC-NP 的释药方式主要有被细胞吞噬后膜破裂释药和通过细胞膜扩散或特殊的转运体系释药^[35]。Gao 等^[36]研究发现,将脂质体中装载 NH_4HCO_3 ,温度上升至 42 ℃时产生二氧化碳气泡破坏脂质体膜,可释放出药物。如此实现温度敏感性释药,且无有害化学成分残留。除了内部作用,也可通过外界触发释药。Delcea 等^[37]发现,金纳米粒附于红细胞膜上,用激光照射后金纳米粒聚集处的膜性质改变,可形成孔道释放膜内的药物,这些成果为日后进一步发展 RBC-NP 释药技术提供了新思路。

4.1.2 RBC-NP 作为药物载体的特点及应用

RBC-NP 与普通药物载体相比,可显著延长药物的体内循环时间。Hu 等^[38]将 RBC-NP(PLGA 为内核)、PEG 修饰的 PLGA 纳米粒(PEG-PLGA NP)以及 PLGA 纳米粒(PLGA NP)3 种药物载体进行荧光染色后,尾静脉注射入小鼠体内,按一定时间眼眶取血进行检测。结果显示,在 24 和 48 h 后,RBC-NP 在血液中的残留量分别为 29% 和 16%,显著高于 PEG-PLGA NP 组(11% 和 2%)和 PLGA NP 组(2 min 后基本不存在)。

RBC-NP 可稳定持续释放药物,增加给药靶向性。Aryal 等^[34]将多柔比星载入 RBC-NP 进行体

外药物释放研究,发现 72 h 内药物释放率仅为 20%,约为对照组(PEG 修饰的 PLGA 纳米粒)释放速率的二分之一。为使 RBC-NP 具有更好的功能性和靶向性,Fang 等^[39]将两种配体即叶酸(相对分子质量约 441)和核仁素配体 AS1411(M_r 约 9 000)以磷脂分子为连接剂对红细胞膜进行修饰。结果显示叶酸修饰的 RBC-NP 在 KB 细胞中摄取量提高了 8 倍,AS1411 修饰的 RBC-NP 在 MCF-7 细胞中摄取量提高了 2 倍。此外,采用这种脂质植入的修饰方式避免了普通化学修饰造成的膜蛋白变性、功能损害等问题。受到 RBC-NP 启发,Fang 等^[40]采用肿瘤细胞膜包裹纳米粒制成新型肿瘤靶向载体(CC-NP),通过细胞-细胞之间的相互作用,CC-NP 在肿瘤细胞的摄取量可达 PLGA 纳米粒的 20 倍。

本课题组目前基于 RBC-NP 展开小干扰 RNA(siRNA)的主动靶向输送研究。siRNA 类药物存在快速降解的风险^[41],在前期筛选获得高效、低毒氨基类聚乙烯亚胺衍生物(PEI-Et)材料的工作基础上,将 PEI-Et 复合 siRNA,得到稳定的载体核心纳米粒(PEP)^[42~43];将半乳糖修饰的红细胞膜包裹 PEP 作为新型输送系统(Gal-RBC-PEP NPs),实现 siRNA 的稳定包封。本课题组将考察该系统输送 siRNA 的长效、靶向、安全性,以此探索构建具有长效、主动靶向功能的新型红细胞膜类 siRNA 输送载体。

4.2 红细胞膜纳米海绵

RBC-NP 的红细胞膜可捕获体内毒素并使其被清除掉,从而对抗细菌感染,这种本身可吸收细

菌毒素的特性 RBC-NP 被称作红细胞膜纳米海绵。4.2.1 作为解毒剂 Hu 等^[44]通过研究发现,PLGA 为内核的纳米海绵,可特定吸收成孔毒素类(PFTs),显著降低其毒性。在注射纳米海绵的情况下再给予小鼠致死剂量的 α -毒素,小鼠存活率可达 80% (存活时间超过 360 h)。通过与 PEG-PLGA NP、PEG-Lipid NP、纳米红细胞小体的试验对比,证实 PLGA 纳米粒内核与红细胞膜对于吸收 PFTs 缺一不可。PFTs 普遍具有细胞膜穿孔能力,纳米海绵的红细胞膜结构可作为该毒素作用底物吸引 PFTs 嵌入膜内,但在纳米粒的稳定作用下不发生溶血,且能在体内长时间循环继续吸收毒素,如此纳米海绵可将绝大部分毒素带离其靶细胞。当被巨噬细胞吞噬后,纳米海绵也可增强溶酶体对毒素蛋白的消化作用,最终可通过肝脏安全代谢。研究者紧接着进行了链球菌及蜂毒肽等其他 PFTs 解毒试验,结果均可显著减轻毒素对动物的伤害,说明红细胞膜纳米海绵的抗菌解毒作用具有普适性,可应用于各种 PFTs 的解毒治疗,克服了普通解毒治疗中不同的病毒必须采用不同解毒药物的缺点。

4.2.2 作为抗毒疫苗 除了用纳米海绵直接进行解毒治疗外,也可将抗原蛋白嵌入纳米海绵的红细胞膜中制成抗毒素疫苗。Hu 等^[45]将 PFTs 嵌入纳米海绵的膜上,PFTs 在纳米海绵的限制下不会对细胞产生毒性,且仍能保持原有结构形态,通过皮下注射后随淋巴循环可被有效运输到免疫系统。被浆细胞吞噬后,能产生大量与毒素特异性结合的 IgG。与通过加热或化学手段灭活的疫苗相比,这种疫苗产生的抗体数量更多,亲和力更强,且不会引发其他针对输药载体的免疫并发症。在体内循环过程中,对正常细胞亦没有危害。

4.2.3 治疗免疫系统疾病 纳米海绵在治疗Ⅱ型超敏反应类疾病方面也有了新的研究进展。抗体诱导型贫血症的致病机制是患者体内产生了可与自体红细胞膜表面抗原结合的病理性抗体,正常的红细胞与之结合后被吞噬细胞吞噬而导致贫血。Copp 等^[46]的最新研究发现,纳米海绵膜上的相应抗原能够保持裸露并与该病理性抗体特异性结合,可作为诱饵大量中和病理性抗体,然后经吞噬细胞作用将其清除,最终使病理性抗体不能与正常红细胞结合,从而大大缓解自身免疫性溶血反应或药物

诱导的贫血症。纳米海绵可吸收各型病理性抗体,这为解决免疫疾病治疗中药物不能普遍适用的问题^[47]提供了思路。

5 展望

红细胞载药体系具有极高的生物相容性和可降解性,在延长体内循环时间、提高靶向性和稳定性、提高药物效果等方面也具有其他传统药物载体不可比拟的优势^[48-49]。相比于单纯的红细胞载药,复合型红细胞膜载药体系可实现更多的功能(靶向性等)^[39]。目前,已有红细胞载体进入临床试验阶段^[29]。其中,地塞米松红细胞载体治疗溃疡性结肠炎已完成临床Ⅱ期试验;L-天门冬酰胺酶红细胞载体治疗急性淋巴细胞白血病复发正在进行临床Ⅲ期试验。

但对于大规模生产和使用,红细胞药物载体的来源和储存仍是阻碍其应用的主要问题。与其他药物载体相比,红细胞源于生物体,不同来源的载体本身就具有较大的差异性,且制备过程缺少统一控制标准。在红细胞的提取和载药过程中如何减少污染、降低对膜功能的损害,如何储存红细胞载体并保持其生物活性等,都是亟待解决的问题。对于新型 RBC-NP 的研究才刚起步,接下来应进一步探明红细胞膜与不同纳米粒内核的作用机制和原理,研究如何将较大粒径的纳米粒包裹入红细胞膜内且尽量减少对红细胞膜的损害。红细胞膜纳米海绵在抗菌解毒治疗上将有着极为广阔的发展前景,在其他临床应用方面也存在一定潜力,值得深入研究。最后,基于红细胞的载药体系还需通过各种科学优化,进一步提高药物的包封率、靶向性和控释性。随着相关研究不断深入,相信在不远的将来就会掀起一场临床药物载体的新变革。

参考文献

- [1] Alabi CA, Love KT, Sahay G, et al. Multiparametric approach for the evaluation of lipid nanoparticles for siRNA delivery [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**(32):12881-12886.
- [2] Bhateria M, Rachumallu R, Singh R, et al. Erythrocytes-based synthetic delivery systems: transition from conventional to novel engineering strategies [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2014, **11**(8):1219-1236.
- [3] Yoo JW, Irvine DJ, Discher DE, et al. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers [J]. *Nat Rev Drug Discov*,

- 2011,710(7):521-535.
- [4] Hamidi M, Tajerzadeh H. Carrier erythrocytes: an overview [J]. *Drug Deliv*, 2003, 10(1):9-20.
- [5] Carmen L, Teresa P, Pinilla M, et al. Mouse erythrocytes as carriers for coencapsulated alcohol and aldehyde dehydrogenase obtained by electroporation *in vivo* survival rate in circulation, organ distribution and ethanol degradation [J]. *Life Sci*, 2001, 68:2001-2016.
- [6] Lizano C, Luque J, Pinilla M, et al. *In vitro* and *in vivo* study of glutamate dehydrogenase encapsulated into mouse erythrocytes by hypotonic dialysis procedure [J]. *Life Sci*, 1999, 65(26):2781-2789.
- [7] Hu CMJ, Fang RH, Zhang L. Erythrocyte-inspired delivery systems [J]. *Adv Health Mater*, 2012, 1(5):537-547.
- [8] Wang X. Preparation of the methotrexate mono-encapsulated erythrocytes and methotrexate-vincristine co-encapsulated erythrocytes and their biological character *in vitro* (甲氨蝶呤单载和甲氨蝶呤与长春新碱双载红细胞的制备及体外活性研究) [D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2005.
- [9] Yuan SH, Wang H, Ge WH, et al. Protection of hepatic and renal function by methotrexate loading erythrocytes in hepatocarcinoma rats [J]. *Pharm Clin Res* (药学与临床研究), 2010, 18(2):164-167.
- [10] Peng LH. Observation of the effects of hepatic and renal function by methotrexate loading erythrocytes in hepatocarcinoma rats [J]. *Chin Med Mod Dis Edu China* (中国中医药现代远程教育), 2012(1):149.
- [11] Lian YS. Methods for determination of morphine using high-performance liquid chromatography and studies on carrier erythrocyte encapsulated morphine (吗啡高效液相色谱测定及吗啡红细胞载体性能的研究) [D]. Nanjing: Southeast University, 2004.
- [12] Antonelli A, Sfara C, Battistelli S, et al. New strategies to prolong the *in vivo* life span of iron-based contrast agents for MRI [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):e78542.
- [13] Harisa GI, Ibrahim MF, Alanazi F, et al. Engineering erythrocytes as a novel carrier for the targeted delivery of the anticancer drug paclitaxel [J]. *Saudi Pharm J*, 2013, 35(8):1431-1439.
- [14] Wang YQ, Wang F, Deng XQ, et al. Delivery of therapeutic AGT shRNA by PEG-Bu for hypertension therapy [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e68651.
- [15] Hamidi M, Zarrin AH, Foroozesh M, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of carrier erythrocytes for RES-targeted delivery of interferon-alpha 2b [J]. *Int J Pharm*, 2007, 341(1):125-133.
- [16] Chiarantini L, Cerasi A, Fraternale A, et al. Comparison of novel delivery systems for antisense peptide nucleic acids [J]. *J Control Release*, 2005, 109(1):24-36.
- [17] Xu JL. Experimental study on magnetized technique of doxorubicin-load erythrocytes (多柔比星载体红细胞磁化技术的实验研究) [D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2009.
- [18] Wang C, Sun X, Cheng L, et al. Multifunctional theranostic red blood cells for magnetic-field-enhanced *in vivo* combination therapy of cancer [J]. *Adv Mater*, 2014, 26(28):4794-4802.
- [19] Cinti G, Taranta M, Naldi I, et al. Newly engineered magnetic erythrocytes for sustained and targeted delivery of anti-cancer therapeutic compounds [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2):e17132.
- [20] Alanazi FK, Harisa GEDI, Maqboul A, et al. Biochemically altered human erythrocytes as a carrier for targeted delivery of primaquine: an *in vitro* study [J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34(4):563-571.
- [21] Bossa F, Annese V, Valvano MR, et al. Erythrocytes-mediated delivery of dexamethasone 21-phosphate in steroid-dependent ulcerative colitis: a randomized, double-blind Sham-controlled study [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(9):1872-1879.
- [22] Harisa GI, Ibrahim MF, Alanazi FK. Erythrocyte-mediated delivery of pravastatin: *in vitro* study of effect of hypotonic lysis on biochemical parameters and loading efficiency [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(8):1431-1439.
- [23] Favretto ME, Cluitmans JCA, Bosman G, et al. Human erythrocytes as drug carriers: loading efficiency and side effects of hypotonic dialysis, chlorpromazine treatment and fusion with liposomes [J]. *J Control Release*, 2013, 170(3):343-351.
- [24] Shi G, Mukthavaram R, Kesari S, et al. Distearoyl anchor-painted erythrocytes with prolonged ligand retention and circulation properties *in vivo* [J]. *Adv Health Mater*, 2014, 3(1):142-148.
- [25] Doshi N, Zahr AS, Bhaskar S, et al. Red blood cell-mimicking synthetic biomaterial particles [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(51):21495-21499.
- [26] Deuticke, Kim M, Zolinel C. The influence of amphotericin-B on the permeability of mammalian erythrocytes to nonelectrolytes, anions and cations [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1973, 318:345-359.
- [27] Tsong TY, Kinoshita K. Use of voltage pulses for the pore opening and drug loading, and the subsequent resealing of red blood cells [J]. *Biol Haematol*, 1985, 51:108-114.
- [28] Hirlekar RS, Patel PD, Dand N, et al. Drug loaded erythrocytes: as novel drug delivery system [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(1):63-70.
- [29] Magnani M, Rossi L. Approaches to erythrocyte-mediated drug delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2014, 11(5):677-687.
- [30] Kong LQ, Li Y, Gao H, et al. Avidin-biotin technique [J]. *Prog Veter Med* (动物医学进展), 2008, 29(4):100-102.
- [31] Magnani ML, Chiarantini U, Mancini U. Preparation and characterization of biotinylated red blood cells [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1994, 20(3):335-345.
- [32] Gupta N, Patel B, Ahsan F. Nano-engineered erythrocyte ghosts as inhalational carriers for delivery of fasudil: preparation and characterization [J]. *Pharm Res*, 2014, 31(6):1553-1565.
- [33] Luk BT, Hu CMJ, Fang RH, et al. Interfacial interactions between natural RBC membranes and synthetic polymeric nanoparticles

- [J]. *Nanoscale*, 2014, **6**(5): 2730–2737.
- [34] Aryal S, Hu CMJ, Fang RH, et al. Erythrocyte membrane-cloaked polymeric nanoparticles for controlled drug loading and release [J]. *Nanomedicine*, 2013, **8**(8): 1271–1280.
- [35] Tang HF, Li X, Gong LB. Recent development on the RBC delivery system [J]. *Eval Anal Drug Use Hosp China* (中国医院用药评价与分析), 2011, **11**(10): 959–960.
- [36] Gao W, Zhang L. Anticancer agents: unleash the forces within [J]. *Nat Chem*, 2012, **4**(12): 971–972.
- [37] Delcea M, Sternberg N, Yashchenok AM, et al. Nanoplasmonics for dual-molecule release through nanopores in the membrane of red blood cells [J]. *ACS Nano*, 2012, **6**(5): 4169–4180.
- [38] Hu CMJ, 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.
- [39] Fang RH, Hu CMJ, Kevin NH, et al. Lipid-insertion enables targeting functionalization of erythrocyte membrane-cloaked nanoparticles [J]. *Nanoscale*, 2013, **5**(19): 8884–8888.
- [40] Fang RH, Hu CMJ, Luk BT, et al. Cancer cell membrane-coated nanoparticles for anticancer vaccination and drug delivery [J]. *Nano Lett*, 2014, **14**(4): 2181–2188.
- [41] Han J, Cai J, Borjihan W, et al. Preparation of novel curdlan nanoparticles for intracellular siRNA delivery [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, **117**: 324–330.
- [42] Xiang S, Su J, Tong H, et al. Biscarbamate cross-linked low molecular weight PEI for delivering IL-1 receptor antagonist gene to synoviocytes for arthritis therapy [J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(27): 6520–6532.
- [43] Wang YQ, Su J, Wu F, et al. Biscarbamate cross-linked polyethyleneimine derivative with low molecular weight, low cytotoxicity, and high efficiency for gene delivery [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, **7**: 693.
- [44] Hu CMJ, Fang RH, Luk BT, et al. Nanoparticle-detained toxins for safe and effective vaccination [J]. *Nat Nanotechnol*, 2013, **8**(12): 933–938.
- [45] Hu CMJ, Fang RH, Copp J, et al. A biomimetic nanosponge that absorbs pore-forming toxins [J]. *Nat Nanotechnol*, 2013, **8**(5): 336–340.
- [46] 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.
- [47] Getts DR, Martin AJ, McCarthy DP, et al. Microparticles bearing encephalitogenic peptides induce T-cell tolerance and ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, **30**(12): 1217–1224.
- [48] Ge W, Lian Y, Kang X, et al. Pharmacokinetics of morphine loaded into erythrocyte in rabbits [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2006, **37**(2): 150–152.
- [49] Fan W, Yan W, Xu Z, et al. Erythrocytes load of low molecular weight chitosan nanoparticles as a potential vascular drug delivery system [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, **95**: 258–265.