

红细胞伪装纳米颗粒：一个具有潜力的药物及疫苗递送系统

彭培培^{1,2,3}, 胡娇^{1,2,3*}

- 1 扬州大学兽医学院 动物传染病实验室, 江苏 扬州 225009
- 2 扬州大学 教育部农业与农产品安全国际联合实验室, 江苏 扬州 225009
- 3 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

彭培培, 胡娇. 红细胞伪装纳米颗粒: 一个具有潜力的药物及疫苗递送系统[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 159-176.
PENG Peipei, HU Jiao. Erythrocytes-camouflaged nanoparticles: a promising delivery system for drugs and vaccines[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 159-176.

摘 要: 红细胞伪装纳米颗粒是一种以红细胞或红细胞膜纳米囊泡为载体在体内递送药物、酶、多肽和抗原等物质的系统, 具有生物相容性好、循环周期长、靶向性强等优势。本文从红细胞载体的种类、发展历程、递送策略应用以及其局限性和未来的挑战等方面进行了详细阐述, 并展望了其未来的发展方向。

关键词: 红细胞; 红细胞膜; 递送策略; 药物; 疫苗

资助项目: 江苏省农业科技自主创新项目(CX(21)3141); 江苏省研究生科研创新计划(KYCX21_3277); 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-40); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

This work was supported by the Jiangsu Province Agricultural Science Technology Independent Innovation Funds (CX(21)3141), the Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (KYCX21_3277), the Earmarked Fund For China Agriculture Research System (CARS-40), and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD).

*Corresponding author. Tel: +86-514-87972247, E-mail: hujiaohot@163.com

Received: 2022-03-04; Accepted: 2022-06-22; Published online: 2022-06-30

Erythrocytes-camouflaged nanoparticles: a promising delivery system for drugs and vaccines

PENG Peipei^{1,2,3}, HU Jiao^{1,2,3*}

1 Laboratory of Animal Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

2 Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-Product Safety, The Ministry of Education of China, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

3 Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonosis, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: Erythrocytes-camouflaged nanoparticles is an *in vivo* delivery system that uses erythrocytes or erythrocyte membrane nano vesicles as carriers for drugs, enzymes, peptides and antigens. This system has the advantages of good biocompatibility, long circulation cycle and efficient targeting. This review summarizes the type of carriers, their development history, the application of delivery strategies as well as their limitations and future challenges. Lastly, future directions and key issues in the development of this system are discussed.

Keywords: red blood cell; red blood cell membrane; delivery strategy; drug; vaccine

红细胞伪装纳米颗粒是一种以红细胞(red blood cells, RBCs)或红细胞膜纳米囊泡(erythrocyte membranes nano vesicles, EMNVs)为载体递送药物、酶、多肽和抗原等物质的系统。红细胞是血液的固有成分,在血液中的循环周期可达 120 d。另外,红细胞膜表面含有糖蛋白 CD47,该蛋白可躲避巨噬细胞的吞噬作用。因此,红细胞载体具有良好的生物相容性和较长的循环周期。此外,红细胞载体还可通过表面修饰来增强靶向性。例如 Fang 等^[1]将修饰性叶酸插入红细胞膜以增强纳米颗粒(nanoparticles, NP)的靶向性,结果显示,与未靶向修饰的 RBC-NP 相比,叶酸修饰的 RBC-NP 在人口腔表皮样癌 KB 细胞(human oral epidermoid carcinoma KB cells, 口腔癌体外实验使用的细胞)中的摄取量提高了 8 倍,有效提高了 RBC-NP 对 KB 细胞的靶向性。

红细胞伪装纳米颗粒需要特定的策略。

例如,红细胞装载主要利用细胞的渗透压或通过物理(电穿孔)/化学的方法使红细胞膜表面形成“孔洞”,有利于物质的包载;而 EMNVs 主要通过超声法和挤出法来实现物质的包载。然而,基于红细胞为载体的红细胞装载具有活性易于丧失等弊端,应用范围较为局限。而 EMNVs 载体是应用的最为广泛的一种,其制备方法简单且来源丰富,被广泛地用于包载药物来减轻药物的副作用和提高治疗效果。EMNVs 载体具有递送疏水性药物和延长药物在体内释放时间等特性,这种特性能显著减少药物的使用剂量和提高药物的治疗效率。基于以上优势,EMNVs 载体在药物的靶向递送^[2]、酶治疗^[3]、镉中毒、光热治疗^[4]以及肿瘤相关诊断和治疗^[5]等领域发展迅速。然而,EMNVs 载体在疫苗领域应用较少,仅见于人的癌症和肿瘤治疗方面的研究,而在兽用疫苗方面的应用尚未见报道,具有广阔的发展空间。

1 红细胞载体的种类及发展历程

1.1 红细胞装载

红细胞装载(engineered RBCs)是一种基于红细胞膜表面形成的瞬时孔或膜表面的吸附,包载药物、抗原和激素等物质。红细胞是许多动物和人最为丰富的血液成分(约 4×10^{13} – 5×10^{13} 个细胞),寿命比其他血细胞要长得多(约4个月)^[6-7]。因此,红细胞装载可增加物质在体内的循环周期。此外,红细胞还具有许多理想的特性,如良好的相容性、高通量负载、靶向性和降解性等,能够克服许多药物和治疗剂的局限性,被认为是理想的天然载体。

2005年,Saulis^[8]通过电穿孔技术将抗坏血酸(vitamin C, VC)和甘露醇分子(mannitol)装入红细胞内,开辟了人红细胞负载小分子物质的新领域。2010年后,红细胞装载技术在各个领域广泛发展。例如,在2010年,Sinauridze等^[9]利用逐步层析法将凝血因子 IX (coagulation factor IX, CF IX)装载入志愿者的红细胞,此策略解决了临床血友病 B (hemophilia B, 严重的遗传性出血疾病)的治疗。红细胞装载的实现需考虑负载的策略、给药模型、红细胞的活性丧失以及靶向性等问题。

红细胞装载的负载策略主要有红细胞内负载和红细胞表面吸附。红细胞内负载应用较为广泛。如 Hamidi 等^[10]通过“低渗透析”法将丙戊酸盐(valproate)负载的纳米凝胶封装在人的红细胞中,获得了静脉内持续给药的新型给药模型,为临床红细胞装载的应用开辟了新视野。Biagiotti 等^[11]开发了一种通过低渗透析和等渗再密封程序法成功地将免疫抑制剂——他克莫司(tacrolimus, FK506)和环孢菌素 A (cyclosporin A, CsA)成功地载入红细胞内。此外,红细胞表面吸附也是一种可行的负载策略。如 Fan 等^[12]

通过凝胶技术制备了单分散的低分子量 (low molecular weight, LMW)壳聚糖纳米颗粒,这些颗粒可吸附于红细胞的膜上,这种特性使 LMW 壳聚糖纳米颗粒的红细胞负载可作为潜在的血管药物递送系统。

靶向性是增强给药效果和减少剂量的关键,也是研究的热点。例如, Favretto 等^[13]基于前人研究的基础上探索不同方法将酶装载入红细胞的加载效率,结果表明通过用氯丙嗪(chlorpromazine, CPZ)预处理和脂质体融合加载技术使细胞保留了高变形能力,这使它们能够通过靶向脾脏并避免从血液中被清除。此外, Mukthavaram 等^[14]利用亲脂配体涂覆策略赋予红细胞靶向性,可靶向红细胞/白细胞/癌细胞,用于免疫学和药物的递送应用。此后,红细胞装载因其良好的靶向性在癌症/肿瘤等重要领域得到了发展迅速。例如, Harisa 等^[15]通过低渗预膨胀技术将普伐他汀-壳聚糖纳米凝胶(pravastatin-chitosan nanogel, PR-CNG)加载到红细胞中,形成红细胞负载的普伐他汀-壳聚糖纳米凝胶(PR-CNG-ER),被用作靶向肝癌的新型药物载体。此外, Wan 等^[16]将可辅助光动力疗法的氧合血红蛋白(oxyhemoglobin, oxyHb)与气体发生剂碳酸氢铵(ammonium bicarbonate, ABC)共修饰纳米级的 RBCs,用于吲哚菁绿(indocyanine green, CG)和化疗药物阿霉素(doxorubicin, DOX)的共载和控释,实现了光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)/光热疗法(photothermic therapy, PTT)和化疗对乳腺癌的协同治疗。

红细胞装载实现的基础是红细胞的天然仿生功能。红细胞的装载过程可能发生结构的改变和活性的丧失,从而失去仿生功能。尽管 Harisa 等^[17]通过研究张力、孵育时间和药物浓度对红细胞载药量的影响,证明了普伐他汀

(pravastatin, PR)加载入红细胞后对红细胞的结构没有有害影响。然而,与 EMNVs 相比,红细胞装载在工艺的操作性和包载效率等方面缺乏优势。

1.2 红细胞膜纳米囊泡

由于红细胞对环境要求较高,装载过程容易造成红细胞的结构改变,从而影响了运载效率,应用较为局限,因此在此技术上又开发了红细胞膜纳米囊泡(erythrocyte membranes nano vesicular, EMNVs)技术。EMNVs 是一种基于红细胞在低渗溶液中涨破,释放其内容物,反复洗涤后获得的膜状结构,经超声或聚碳酸酯反复挤出若干次的囊泡状结构。EMNVs 凭借其制备的简易性和良好的生物相容性,成为红细胞装载的优化方式。

2004 年,Skorokhod 等^[18]将红细胞膜包载 DOX 用于白血病患者静脉注射治疗,发现红细胞膜的包载可有效减轻 DOX 的副作用,开辟了毒性药物临床治疗的新领域。此后,EMNVs 的缓释作用、生物相容性和靶向性均得到了证实。例如,Aryal 等^[19]利用物理封装和化学缀合两种策略将 DOX 包裹于红细胞膜内,确定了红细胞膜的包载可使药物持续地在体内释放,并且红细胞膜可有效为药物分子提供屏障。此外,Ding 等^[20]以上转换纳米颗粒(upconversion nanoparticles, UCNPs)和光敏剂(photosensitizer, PI)作为内核,以红细胞膜为外饰,开发了一种新型 PDT 剂,证实了红细胞膜修饰具有双向靶向(靶向性地识别癌细胞和线粒体)作用。

因此,EMNVs 凭借以上的优良特性,在临床各类危重疾病(癌症、肿瘤及阿尔茨海默病等领域)应用广泛。肿瘤多药耐药(multidrug resistance, MDR)是临床肿瘤/癌症治疗主要障碍之一。EMNVs 不仅可以减轻化疗药物的副作用,还可逆转 MDR 效应。例如,Que 等^[21]利

用 PLGA 包载粉防己碱(tetrandrine, TET)制备 PTNs,然后将 EMNVs 包载在 PTNs 表面,得到壳核双层结构的 RPTNs。经过一系列实验,RPTNs 表现出高包封率、均匀分布、缓释、长循环时间和显著逆转 MDR 效应,且毒性较低的特点。此外,EMNVs 的包载化疗药物还具有癌细胞杀伤毒性。例如,Zhai 等^[22]通过超声法将肺癌治疗药物紫杉醇(paclitaxel, PTX)包裹到红细胞膜(EM)中,制备了 PTX-NP-EM (PNM)体系。研究表明,PNM 具有较强的癌细胞杀伤毒性和抗肿瘤疗效,可作为肿瘤部位高剂量化疗的高效给药系统。

近年来,为实现更好的化疗效果,研究学者们将光热剂与化疗药物协同治疗癌症。例如,Chen 等^[23]通过挤出法将化疗药物(DOX)和光热剂(indocyanine green, ICG)包载于红细胞膜中,制备了 DOX 和 ICG-PLGA@RBC 纳米颗粒(DIRNPs)。研究表明靶向配体-叶酸(folic acid, FA)修饰的纳米红细胞药物载体系统 DIRNPs,可共传递 DOX 和 ICG 用于化疗-光热协同癌症治疗。此外,EMNVs 还可递送神经保护剂塞来昔布(celecoxib, CB),为阿尔茨海默病的治疗提供了一种新思路^[24]。

2 红细胞伪装纳米颗粒的装载策略

近 20 年来,红细胞载体在载药、光学成像、癌症等领域均得到了广泛的关注。红细胞载体的最初目的是用来递送药物或功能性物质(如 ATP 等)。因临床治疗的需求,逐渐转变为递送疏水性/毒性药物或解决一些临床难以实现治疗和诊断的难题。红细胞载体应用的领域较为丰富,其装载策略也较为丰富。下面将分类阐述红细胞伪装纳米颗粒的装载策略。

红细胞伪装纳米颗粒递送策略分为两个部

分：载体(RBCs 和 EMNVs)的制备和红细胞伪装纳米颗粒(nanoparticles)的制备。载体制备的方法较为简单。从生物体(如小鼠)通过静脉获得全血，离心去除上层白细胞等杂质后，用等渗的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)反复洗涤获得纯净的 RBCs。该纯净的 RBCs 通过电穿孔/低渗法形成表面具有孔洞的 engineered RBCs；也可将纯净的 RBCs 低渗处理后获得红细胞膜，并将获得红细胞膜经超声和聚碳酸酯膜挤压处理后获得粒径均一的 EMNVs (图 1)。制备的载体再与所递送的颗粒通过渗透法(图 2A)、挤出法(图 2B)和电穿孔(图 2C)等方法组装成纳米颗粒，实现药物和单抗等物质的靶向递送。

渗透法(infiltration method)早期被用于药物的装载，目前已成为制备红细胞膜最为常用的方法。红细胞低渗法装载的原理是为红细胞创造低渗环境，使红细胞吸水肿胀，打开细胞膜表面的孔，被递送的物质通过红细胞膜表面

的孔进入红细胞内，再将红细胞置于高渗溶液中，使红细胞表面的孔关闭，实现物质的包载(图 2A)。低渗法较为常用的两种方法分别为低渗透析法和低渗预溶胀法。低渗透析法原理是利用透析袋中的低渗溶液降低红细胞渗透压^[25-26]或在流动透析的情况下在特殊透析器中增加红细胞与缓冲溶液的接触面积^[27]，从而提高红细胞的包载效率。例如，Hamidi 等^[10]和 Biagiotti 等^[11]均于 2011 年通过“低渗透析”法将药物包载入红细胞中，实现药物的递送。

低渗预溶胀法基于初始受控细胞(红细胞等)在低渗溶液中溶胀，然后通过添加小部分药物水溶液进行封装^[28-30]。如 Harisa 等^[15]等通过低渗预溶胀法将 PR-CNG 加载到红细胞(ER)中构建了 PR-CNG-ER，为肝癌的治疗提供了新思路。此外，低渗介质稀释法(将红细胞悬液进行简单的可逆细胞裂解)是最为常用的红细胞膜制备方法^[31-32]。此方法应用的领域较为广泛，是比较常见的药物、酶和蛋白质等物质的包载方法。

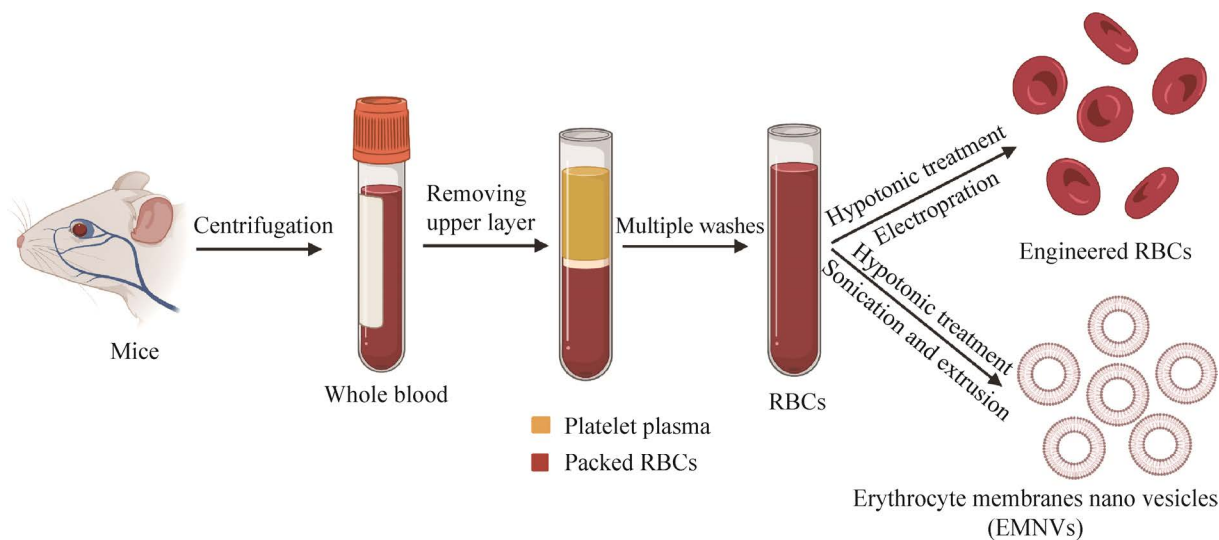


图 1 Engineered RBCs/EMNVs 的制备流程示意图

Figure 1 Schematic diagram of the preparation process of engineered RBCs/EMNVs. Fresh whole blood is centrifuged and repeatedly washed to obtain clean RBCs. The final RBCs used for delivery of the targeted material is dispensed by hypotonic and electroporation treatment. The EMNVs are obtained through further hypotonic, sonication and extrusion treatment.

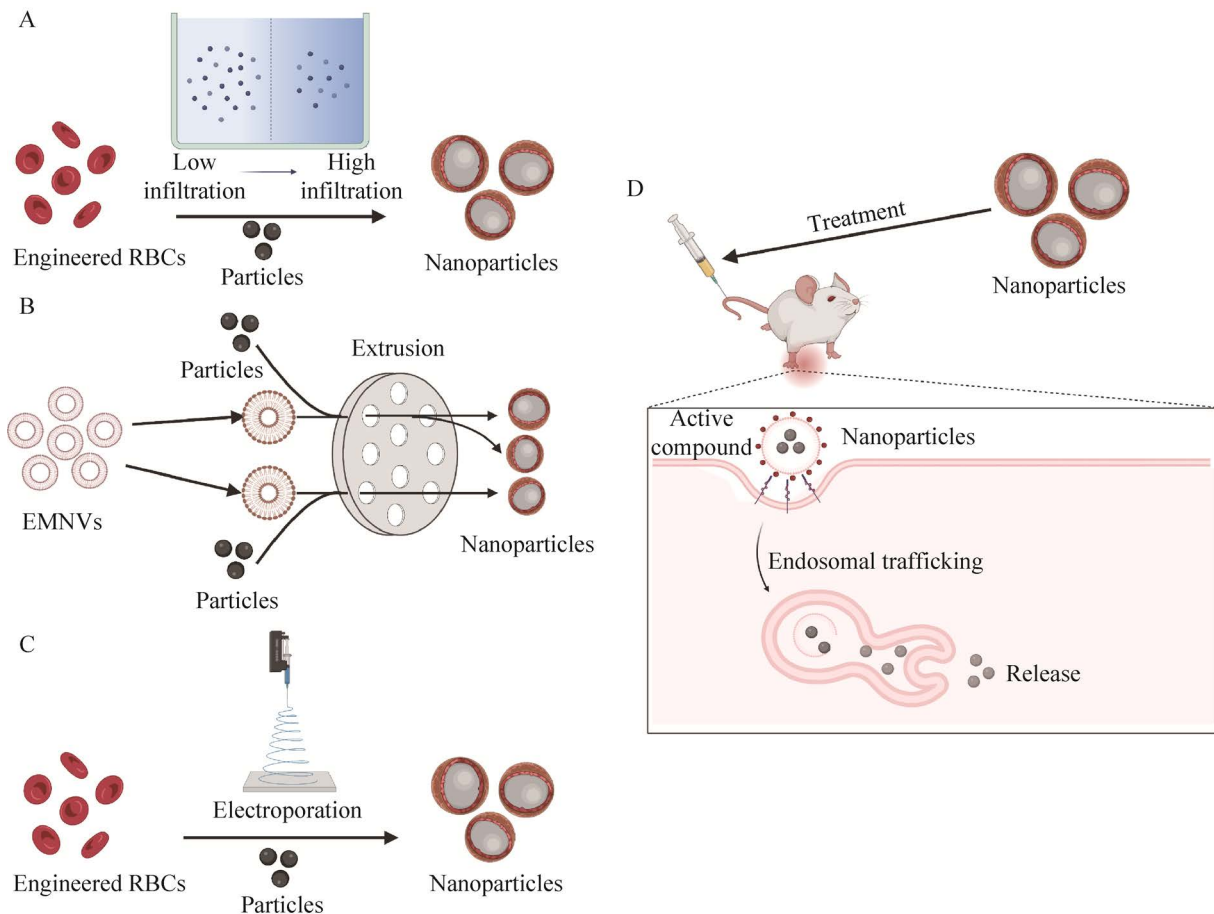


图 2 红细胞/红细胞膜纳米囊泡载体装载策略示意图

Figure 2 Engineered RBCs/EMNVs carrier delivery strategy. Schematic of nanoparticles preparation by three different methods. A: Infiltration method. Engineered RBCs are co-incubated with particles in a hypotonic environment and then encapsulated in a hypertonic solution to form nanoparticles. B: Co-extrusion method. EMNVs are co-extruded with particles through polycarbonate film to form nanoparticles. C: Electroporation method. Engineered RBCs and particles are loaded into nanoparticles by electroporation. D: Nanoparticles release pathways *in vivo*. The prepared nanoparticles are injected into the vein of the mouse tail to facilitate the release of the particles.

挤出法(extrusion method)是目前制备 EMNVs 较为常用的方法,同时也常用于仿生纳米颗粒的制备。挤出法是将红细胞膜与所递送物质的混合物经聚碳酸酯膜挤出若干次,获得大小一致的纳米颗粒。如上文所述获得的 EMNVs,将 EMNVs 与需递送的物质共挤出,获得均质的纳米颗粒(图 2B)。常用的聚碳酸酯膜规格为 400 nm、200 nm 和 100 nm。例如, Gao 等^[33]通过挤出法将等电沉淀法制备的人类

端粒酶逆转录酶单克隆抗体纳米粒子(human telomerase reverse transcriptase, hTERT mAb NPs)包载于红细胞膜内,得到的纳米颗粒可靶向肿瘤细胞。同时, Sun 等^[34]通过挤出法将普鲁士蓝(prussian blue, PB)包载于光敏剂(Ce6)嵌入的红细胞膜内,用于 PDT/PTT 联合治疗根除肿瘤。此外, Lian 等^[35]和 Su 等^[36]通过挤出法将超声后获得的 EMNVs 包载于所递送物质的表面,从而实现靶向递送、缓释和免于巨噬细胞

的吞噬等作用,开辟了肿瘤仿生治疗的新领域。

电穿孔(electroporation, EP)也是一种安全有效的装载技术,被广泛用于将药物和 DNA 的递送^[37]。电穿孔应用的原理是在红细胞膜上形成瞬水孔(电击诱导红细胞发生渗透性的改变,跨膜电位差导致红细胞上形成孔隙)^[38]。其操作简便,不需要特殊处理即可保留其功能^[39](图 2C)。

如 Saulis^[8]将通过 EP 法抗坏血酸和甘露醇分子装载入红细胞内。为实现靶向递送,也可将靶向分子嵌入红细胞膜的表面进行修饰。例如, Fang 等^[1]以配体-接头-脂质偶联物理插入红细胞膜中,这种模式既可使红细胞膜功能化又不破坏红细胞膜的表面蛋白。该研究团队将两种不同大小的配体(小分子叶酸和核素)靶向受体 AS11411,并将制备的功能化红细胞膜在体外癌细胞系模型中验证了受体特异性的靶向能力。比较常用的修饰方法有脂质插入、生物素-亲和素桥、EDC/NHS 偶联和抗体/配体-受体偶联等^[40]。上述递送策略制备的纳米颗粒,可作为治疗性的药物和抗体以及疫苗,通过静脉注射或皮内注射等方式进入机体。纳米颗粒表面覆盖的跨膜蛋白 CD47,可与免疫细胞的信号调节蛋白相互作用,以抑制吞噬作用。但红细胞膜包裹的纳米颗粒被其靶细胞吸收的机制仍不清楚^[41]。

此外,工程纳米颗粒-红细胞搭便车(engineering nanoparticle-erythrocyte hitchhiking)也是一种极为巧妙的递送策略。它与上述的方法截然不同,通过纳米颗粒在红细胞表面的吸附以启动接触,以及膜在纳米颗粒周围的扩散以增强粘附强度来实现递送。Ukidve 等^[42]将化学制备的 OVA-NPs 利用搭便车的方法与 RBCs 结合,形成 hitchhiked OVA-NPs (EDIT)。研究结果表明,EDIT 可以作为一种通用的策略,将纳米颗粒靶向到脾脏,且无需进行特定的修饰。

目前已知 EMNVs 进入途径包括受体介导的内吞作用、脂筏相互作用、网格蛋白相互作用、吞噬作用、巨胞吞作用以及有可能直接融合^[43]。其体内的分布与注射方式和粒径密切相关,例如郭源源^[44]通过皮内注射粒径为 20–200 nm Cy5 标记的红细胞膜包被的纳米粒于小鼠体内,活体成像仪显示,荧光主要呈现在淋巴结,脾脏未检测到荧光。而纳米粒的静脉注射与皮内注射的体内分布截然不同,例如杨雨婷^[45]通过静脉注射 IR783 标记的细胞膜包被的纳米粒于小鼠体内,活体成像仪显示,体内组织的分布量为肝>肾>肺>脾>心。

3 红细胞载体的应用

3.1 红细胞载体的应用

红细胞装载技术凭借其发展的成熟性、负载策略的丰富性、生物相容性及靶向性,在药物和蛋白质等领域应用广泛。

3.1.1 红细胞装载技术在药物领域的应用

在药物应用方面,红细胞装载可用于泼尼松龙(prednisolone, PRD)和普伐他汀等药物的递送。例如, Shavi 等^[46]通过预溶胀稀释和两种不同交联剂(戊二醛 F2 和二甲基亚砷 DMSO)的稀释技术将 PRD 包载入人的红细胞膜内,发现具有较好的包载率和药释效果。并且药物在体内分布为肝>肺>肾>脾,为 EMNVs 载体系统的应用研究提供了战略性指导意义。此外, Harisa 等^[15]开发了基于载有壳聚糖纳米凝胶(chitosan nanogels, CNG)的红细胞(ER)作为多功能载体,克服了网状内皮系统(reticulo-endothelial system, RES)对纳米载体的免疫激活特性,以及巨噬细胞大量清除纳米载体。红细胞负载普伐他汀-壳聚糖纳米凝胶(PR-CNG-ER)被用作靶向肝癌的新型药物载体。研究表明,与未加载的红细胞相比,PR-CNG-ER 表现更明显的磷脂酰丝氨酸

(phosphatidylserine, PS)暴露(PS 被认为是巨噬细胞快速清除脾脏和肝细胞的潜在标记物)以及对 HepG2 (来源于肝母细胞瘤)更高的细胞毒性等特点。

3.1.2 红细胞装载技术在蛋白领域的应用

红细胞装载除了可递送药物外,还可有效递送蛋白质等物质。例如,Hamidi 等^[47]将牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)作为模型抗原/蛋白质包载入人红细胞,发现负载 BSA 的红细胞是一种有前景的网状内皮(reticulo-endothelial system, RES)靶向抗原递送系统。此外,武汉大学人民医院的研究人员基于癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)-红细胞生成素(erythropoietin, EPO)构建了 CEA-EPO 重组质粒并通过重组腺病毒法体外转染至造血干细胞,制备了红细胞疫苗^[48]。实验结果表明,携带 CEA-EPO 基因肿瘤抗原的红细胞疫苗对结肠癌有明显的抗肿瘤作用,既可诱导造血干细胞定向分化成红细胞疫苗,又可合成携带肿瘤抗原的红细胞疫苗。

3.2 红细胞膜纳米囊泡的应用

EMNVs 凭借其循环周期长、靶向性以及应用的多样性,在药物、疫苗和其他领域应用较为丰富。

3.2.1 红细胞膜纳米囊泡在药物领域的应用

药物治疗是临床治疗最为常用的一种手段。部分药物的滥用以及药物副作用的出现,使得细菌耐药性增强以及治疗效率低等弊端逐渐显现出来。这就迫切需要研发新型安全有效的药物,来克服药物的不良反应,达到良好的治疗效果。EMNVs 仿生递送系统凭借可实现药物的缓释、靶向性递送且可减少部分药物的毒性作用等优点,已成为研究热点。EMNVs 递送系统可有效延长药物在体内的循环周期。红细胞膜含有免疫抑制性红细胞膜蛋白 CD47,其与

药物、酶和抗原等物质结合后,可显著减少巨噬细胞的吞噬^[49],实现长效循环^[50-51]。EMNVs 递送系统原理是保留 CD47 糖蛋白前提下,将红细胞内的物质替换为药物,实现药物的长效循环和缓释效果。例如,Gupta 等^[52]利用 EMNVs 递送法舒地儿(fasudil, 治疗肺动脉高压),发现与普通 fasudil 相比,包载在 EMNVs 的 fasudil 半衰期增加了约 6-8 倍。

EMNVs 具有药物靶向递送作用。例如,Alqahtani 等^[53]将 EMNVs 包载到 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)负载的脂质体(liposomes, LP)上以生产 NEM-5-FU LP,显著增强了囊泡的可控性及其对肝癌细胞的靶向性。在靶向递送的基础上,还可通过靶向性修饰来增强药物递送的靶向性。例如,Zhu 等^[54]将抗肿瘤药物 PTX 封装于金纳米笼(Au nanocageas, AuNs),并将该复合物包裹于抗 EpCam 抗体修饰的红细胞膜中,形成纳米粒子 EpCam-RPAuNs。该纳米粒子可靶向癌细胞,用于癌症的诊断和治疗。同时,Liu 等^[55]为解决抗癌药物伽马布福他林(gamabufotalin, CS-6)的非靶向释放的副作用,构建了 HA@RBC@PB@CS-6NPs (HRPC)纳米颗粒。该策略有利于靶向分子透明质酸(hyaluronic acid, HA)在肿瘤部位 HRPCs 的积累并提高光热治疗效率,可用于乳腺癌的辅助治疗。此外,Long 等^[56]以 FA 修饰的红细胞膜包载 DOX 和 ICG,制备了新的仿生系统(WID@M-FANPs),WID@M-FANPs 可靶向肿瘤并可双重成像,具有良好的应用前景。EMNVs 的靶向递送在减轻药物毒性作用的同时,还可增强对癌细胞的毒性作用。Su 等^[36]通过 EMNVs 包载盐酸小檗碱(berberine hydrochloride, BH)克服了 BH 静脉给药的血管舒张压、低血压、心脏抑制等多种副作用^[57]。同时,Malhotra 等^[58]利用 EMNVs 包载疏水性药物喜树碱(camptothecin, CPT),形成纳米

颗粒(nanovesicles, NVEs), 并发现 NVEs 可被 A549 细胞内化来增强 NVEs 对肺癌细胞的毒性。以上研究表明, EMNVs 可有效减轻药物的毒性作用, 也可通过靶向修饰增强纳米颗粒对癌细胞的毒性。

EMNVs 递送的药物种类繁多, 主要包括抗生素类药物和用于癌症治疗的药物(表 1)。EMNVs 递送系统在抗癌/抗肿瘤的化疗药物(DOX、PTX 和 BH 等)应用得最为丰富。例如, Wang 等^[59]基于红细胞膜(RBC)和黑色素瘤细胞(B16-F10)制备的混合仿生涂层(RBC-B16)包载 DOX, 具有良好的抗癌作用。Sun 等^[60]和 Ren 等^[61]也通过 EMNVs 递送 DOX, 实现 DOX 的可控释放。此外, PTX 也是非小细胞肺癌、卵巢癌和乳腺癌等临床化疗常用的药物之一, 但 PTX 口服利用度差且频繁的静注可产生严重的副作用。然而, EMNVs 的包载可有效解决这一问题。例如, Jiang 等^[62]通过 EMNVs 包载 PTX, 并通过建立胃肠道模型, 证实了 EMNVs 可有效改善 PTX 的口服生物利用度差的缺点。Chen 等^[63]将 PTX 包载于 anti-EGFR-iRGD 修饰的 EMNVs 中, 该系统可使 PTX 损害胃癌细胞并可在肿瘤部位缓释。

为实现 PTX 在酸性肿瘤环境的释放, Gao 等^[33]利用 pH 敏感聚合物(L- γ -谷氨酰甲司坦)修饰的 EMNVs 包载 PTX, 可有效提高 PTX 抗肿瘤作用。

为实现更好的化疗效果, 研究者们将化疗药物与光热疗法联合应用于临床治疗。PTT 是利用光热转化剂(photothermic conversion agents, PTCAs), 可将吸收的光转化为热, 局部加热并消融肿瘤^[63]。而决定 PTT 疗效的关键因素包括组织能否被激发光完全穿透、光热转换效率以及肿瘤部位的靶向性^[64]。EMNVs 可有效递送光-热剂, 为临床的肿瘤治疗提供了新思

路。例如, Piao 等^[65]为克服 AuNCs 循环周期短对肿瘤吸收的限制, 用红细胞膜(BC)包载于 AuNCs 的表面(BC-AuNCs)。BC-AuNCs 具有良好的胶体稳定性且保留了 AuNCs 独特的多孔和中空结构, 可有效递送 PTT 的光热转换剂。进一步地, Chen 等^[66]将(锌酞菁)ZNPC-(萘花青)ICG 包载于红细胞膜(RBCM)内, 制备了 ZNPC-ICG@RBC 纳米探针。研究表明, 该纳米探针可同时产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)和热疗并放大治疗效果, 在荧光成像的基础上提高抗肿瘤效果。EMNVs 还可用于递送抗生素类物质, 如将庆大霉素(gentamicin, G)装载于 AuNCs 中, 形成了 AuNCs-G, 并将该物质封装于 EMNVs 包载的纳米蠕虫(nano worm, NW)中, 在光热效应、银、铁和抗生素的协同作用下, 具有高效的生物膜抗菌性能^[67]。

目前, 药物的递送系统种类繁多, 如仿生的细胞膜结构(红细胞膜^[68]、免疫细胞膜^[69]、细菌膜^[70]和癌细胞膜^[67,71]等)、病毒纳米颗粒(virus-based nanoparticle, VNP)^[72]及有机材料[poly(actic-co-glycolic acid), PLGA]^[73]和[poly(lactic acid), PLA]^[19]等。在仿生的细胞膜结构中, 红细胞膜凭借其数量多和可再生性, 被广泛用于药物的递送研究。VNP 主要通过基因工程功能化递送活性肽和电荷间的相互作用递送小分子药物; 有机材料 PLGA 等可通过形成 W1/O/W2 (水包油包水)实现药物的递送。而 EMNVs 相比 VNP 和有机材料的突出优点是可延长药物的循环周期、应用范围较为广泛、装载策略较为简易且丰富、安全性高。综上所述, EMNVs 靶向递送是一个较为成熟的药物递送系统。能够增强药物靶向递送、延长药物半衰期和减轻药物毒性等特点。基于以上的优势, EMNVs 在其他领域也得到了进一步的发展, 如疫苗、抗体和酶等物质的靶向递送。

表 1 EMNVs 在药物递送方面应用的进展

Table 1 Advances in the application of EMNVs in drug delivery

Drugs	Diameter (nm)	Delivery strategy	Advantages	References
Fasudil	~154.1	Sonication	Favorable entrapment, <i>in-vitro</i> release, and stability profiles	[52]
PTX	~69.7	Sonication	Promotes the recognition of cancer cells and facilitates the mitochondrial guiding	[54]
CS-6	~140.0	Co-incubation	Extends the circulation time and the ability to escape from immune surveillance	[55]
DOX, ICG	~132.0	Sonication; extrusion	Prolongs the half-life time and avoids unnecessary drug leakage	[56]
LP-5-FU	~191.4	Sonication; high osmosis	Has a good advantage in enhancing <i>in vivo</i> liver cancer targeting	[53]
BH	~256.1	Extrusion	Avoids recognition by macrophage cells and no obvious toxicity to HEK 293T cells and LO2 cells, and does not cause hemolysis or aggregation of RBCs	[57]
CPT	~150.0	Co-incubation; sonication	Prolongs circulation time	[58]
DOX	~150.0	Sonication	Exhibits infusive specific self-recognition to B16-F10 cells <i>in vitro</i> , markedly prolongs circulation life and enhances homogenous targeting abilities <i>in vivo</i>	[59]
	~150.0	Sonication; extrusion	Exhibits a good photothermal conversion effect and NIR-responsive drug release	[60]
PTX	~150.0	Sonication	Extends the circulation time, and improves the efficacy of drugs on tumors	[61]
	~150.0	Sonication	Improves relative bioavailability	[62]
	~49.0	Extrusion	Enhances accumulation of the drug in tumors, and improves tumor suppression in GC	[63]
AuNCs	~130.0	Extrusion	Exhibits a raised therapeutic effect on lung cancer, in view of their characteristics of pH sensitivity and long circulation	[33]
	~89.1	Extrusion	Exhibits superior blood retention and circulation lifetime to their biopolymer-stealth coated counterparts	[65]
ZNPC-ICG	~120.0	Sonication; extrusion	Prolongs the blood half-life and improves the tumor-targeting ability	[66]
AuAg-G	~170.0	Sonication	Shows good biocompatibility and in aggregating at the infected site	[67]

Data were taken from the literature on the application of EMNVs in vaccines/other fields.

3.2.2 红细胞膜纳米囊泡在疫苗领域的应用

疫苗仍是许多疾病的预防和治疗方法。传统的疫苗引起免疫应答的抗原是由抗原和佐剂共同制备而成。铝是第一个使用的佐剂，与弗氏完全和不完全佐剂均可引起局部或全身的毒性。而 EMNVs 可通过延长抗原递呈和树突细胞(dendritic cells, DC)介导的抗原摄取时间，从

而直接刺激树突状细胞，并促进抗原的交叉递呈作用^[74-75]。同时，也可作为佐剂增强机体的免疫应答，完全有潜力替代具有毒副作用的传统疫苗佐剂。此外，EMNVs 载体递送系统还可实现抗原的靶向递送和长效缓释。已有的研究发现，EMNVs 可有效递送的类毒素、抗原肽和其他靶向配体等物质(表 2)。

表 2 EMNVs 在疫苗/其他领域应用的研究进展

Table 2 Advances in the application of EMNVs in vaccines/other fields

Name	Diameter (nm)	Delivery strategy	Advantages	References
PFTs	~80.0	Extrusion	Effective in virulence neutralization via spontaneous particle entrapment	[76]
Hgp100 ₂₅₋₃₃ , MPLA, mannose	149.2	Extrusion	Combines the antigen entrapment and stimuli-responsive property from polymeric NPs	[77]
hTERT mAb NPs	~197.3	Sonication; extrusion	Has long circulation and an intracellular delivery of intrabody	[78]
PFTs	~113.5	Sonication	Loses toxicity to not only cells but also live animals	[79]
BPQDs	~100.0	Sonication; extrusion	Leads to apoptosis and macrophage recruitment as well as stimulates a strong tumour-specific CD8 ⁺ T cell response in cancer cells	[80]
PLGA GOx, MCO	~148.0	Sonication; extrusion	Reduces the cellular uptake in macrophages and prolongs their blood circulation time	[81]
Cur, PLGA	~162.0	Sonication; extrusion	Suitable for uptake by cancer cells and retention in the tumor by means of the enhanced permeation and retention effect	[82]
ATO	~163.2	Sonication; extrusion	Prolongs the duration of ATO <i>in vivo</i> , thus reduces administration times and enhances patient compliance	[35]
TiO ₂ , AuNRs	~198.5	Extrusion	Has good stability, and reduces the cytotoxicity of the Au/TiO ₂ nanoparticles	[83]

Data were taken from the literature on the application of EMNVs in vaccines/other fields.

类毒素传统灭活疫苗免疫保护率较低且具有较强的副作用，难以满足临床需求。Hu 等^[76]通过纳米颗粒的毒素递送策略——该策略可以安全地传递不受破坏的成孔毒素(non-disrupted pore-forming toxins)。以葡萄球菌 α -溶血素(alpha-hemolysin, Hla)作为模型毒素，并以此模型病毒制备了热变性的 Hla 为热变性类毒素。同时将红细胞膜包被 Hla，并将细菌性穿孔素(perforatins, PFTs)镶嵌在表面，制备了纳米类毒素。

实验结果表明，与接种热变性类毒素相比，接种纳米颗粒毒素(Hla)的小鼠的存活率提高了 5 倍。此外，Guo 等^[77]构建了由抗原肽(人类黑色素瘤抗原的 25–33 个氨基酸片段，hgp100₂₅₋₃₃)、佐剂 MPLA 和甘露糖组成的新型的纳米疫苗。该纳米疫苗可高效靶向抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APC)，尤其是 DC；

诱导抗原特异性 T 细胞反应；并可增强 IFN- γ 分泌和 CD8⁺ T 细胞反应。

以上研究表明，EMNVs 可有效实现抗原等物质的递送，为临床肿瘤疫苗的研发提供了新的途径。然而，EMNVs 的靶向递送仅在人用疫苗领域进行了部分研究，在兽用疫苗领域的研究仍为空白。

3.2.3 红细胞膜纳米囊泡在其他领域的应用

EMNVs 载体递送系统除了在以上两个领域发展迅速外，在递送单克隆抗体、抗菌和其他抗肿瘤手段等领域也得到了发展(表 2)。

EMNVs 可递送单克隆抗体，靶向并杀伤肿瘤细胞。例如，Gao 等^[78]通过等电沉淀法制备 hTERT mAb NPs，并包载于红细胞膜内，得到红细胞膜包载的 Anti-hTERT mAb NPs 输送系统。此递送系统可有效延长 mAb NPs 在体内的循环时间，并靶向递送至肿瘤细胞中。EMNVs

还可递送抗菌性(类毒素)等物质,减轻机体耐药性。例如,Chen 等^[79]还通过纳米沉淀法制备了 PLGA,并将 EMNVs 涂覆到 PLGA 核上。并将穿孔毒素(pore-forming toxins, PFTs)镶嵌于 EMNVs 的表面,形成红细胞膜纳米海绵,从而抑制毒素诱导的溶血。

此外,还可通过激光靶向药物释放^[80]、CO 气体治疗和能量饥饿^[81]以及其他抗肿瘤方式^[82],治疗临床肿瘤病例。EMNVs 递送激光靶向药物,诱导癌细胞凋亡。例如,Liang 等^[80]通过超声法制备了红细胞膜纳米囊泡(RMNVs),并将 RMNVs 与仿生黑磷量子点(black phosphorus quantum dots, BPQDs)制剂混合挤出制备了 BPQD-RMNVs。研究表明,该仿生纳米颗粒在 NIR 激光照射下可使癌细胞凋亡(apoptosis in cancer cells),募集巨噬细胞并诱导强烈的肿瘤特异性 CD8⁺T 细胞反应。EMNVs 递送用于 CO 气体治疗和能量饥饿的酶和化合物,抑制肿瘤的生长。例如,Wang 等^[81]还将葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOx)和 Mn₂(CO)₁₀封装成生物相容性聚合物(聚乳酸共乙醇酸),得到 MGP 纳米颗粒,并用红细胞膜包载纳米颗粒,制备了 MGP@RBC 纳米颗粒。研究发现该纳米颗粒可用于 CO 气体治疗和能量饥饿(energy starvation)抑制肿瘤的生长。EMNVs 递送抗癌和抗肿瘤的化合物,用于癌症/肿瘤的治疗。例如,Xie 等^[82]通过超声和挤出技术,利用红细胞膜(RBCM)包载已制备的姜黄素(curcumin, Cur) PLGA NPs,得到 RBCM-PLGA@CurNPs。研究表明,该仿生制剂具有强大的抗肿瘤活性。同时,Lian 等^[35]基于三氧化二砷(arsenic trioxide, ATO)在急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)和晚期原发性肝癌的显著治疗作用,开发 RBCM 包载的海藻酸钠(sodium alginate, SA)纳米颗粒(RBCM-SA-A-ATO-NPs, RSANs)。

研究表明,RSANs 具有缓释作用且可显著降低 ATO 的毒性,对于 APL 的治疗和抗肿瘤具有巨大的潜力。此外,EMNVs 还可同时递送激光靶向物和光催化剂,实现可控释放的同时,杀死肿瘤细胞。例如,Li 等^[83]还将光催化剂二氧化钛胶体(TiO₂)和 AuNRs 包裹于 EMNVs 中,制备了 Au/TiO₂@RBC 纳米胶囊。研究表明,该纳米胶囊可以在光催化降解(photocatalytic degradation)时实现 AuNRs 的可控释放,释放的 AuNRs 被 NIR 激光照射后产生治疗信号。同时,光催化产生的 ROS 有助于光动力学杀死肿瘤细胞。

以上研究显示 EMNVs 可有效靶向递送药物、疫苗和单克隆抗体等物质,为 EMNVs 载体递送系统在兽用领域的应用提供了理论支持。

4 红细胞载体面临的挑战

EMNVs 虽在众多领域发展迅速,但仍具有局限性和挑战性。下面将从 EMNVs 的制备和 EMNVs 的包载两个方面具体阐述该系统面临的挑战。

首先,EMNVs 的制备过程复杂。目前研究所用的红细胞主要的动物来源是小鼠、大鼠和人类的血液。动物的选择基于哺乳动物的红细胞无核,便于获得膜性结构。然而,小鼠和大鼠的血容量较少,难以一次性大批量获得红细胞。其他大型哺乳动物罕有无特定病原体(specific pathogen free, SPF)种类,非 SPF 类型动物红细胞可能携带其他病原物质,造成实验的干扰。同时,部分研究会针对病患进行个体化治疗,需考虑血型差异性,多采用个体自身的血液或与病患血液配型的血液样本,这些局限性是 EMNVs 临床应用的巨大挑战。此外,EMNVs 的制备需要将获取的血细胞进行低渗处理,然后经超声和挤出处理后,获得 EMNVs。

在这个制备过程，可能会导致膜表面蛋白的移位或缺失。而 EMNVs 载体系统的递送策略关键在于它的表面糖蛋白 CD47 的存在。研究表明，CD47 表面糖蛋白可被巨噬细胞识别，释放“不要吃我”的信号，可躲避巨噬细胞的吞噬。若 CD47 蛋白的缺失，巨噬细胞可能会将该纳米颗粒清除。

其次，EMNVs 的包载技术也是一个巨大挑战。目前所用的包载技术主要有超声、挤出和化学键的交联等。这些包载过程可能会造成 EMNVs 和所递送物质活性的削弱。最后，目前研究的融合的纳米颗粒大多都进行 PBS 或血清稳定性检测，但纳米颗粒进入体内的稳定性研究尚未完善。例如，在移植、注射或输注后，纳米修饰的细胞将暴露于由血流动力学引起的剪切应力^[84-85]，并可能在通过组织迁移时发生广泛的转变^[86]。此外，生物制剂的存储也是一件需解决的困难。EMNVs 不可反复冻融，冷冻干燥技术较为复杂；EMNVs 包载后，样品的储存条件也较为局限。此外，自身的病理条件也可能干扰 EMNVs 的递送效果。如局部组织的通透性的改变，造成非预期的脱靶，引起毒性作用等问题。如何改善包载手段、改善保存条件和提高载体系统的靶向性，避免造成不良反应，是目前研究的重点。

5 展望

红细胞载体是研究人员汲取大自然的灵感，使人工制备品在体内发生生物作用，是一个神奇的想法。利用 EMNVs/engineered RBCs 作为新型药物、酶、单抗和抗原等物质的生物递送载体，是一个有趣的策略。研究人员最初用 engineered RBCs 包载功能性物质，发现其良好的递送特性。随后，EMNVs 因制备的简易性，成为应用最为广泛的“仿生”载体。EMNVs 来源

于天然的红细胞，其表面含有许多膜蛋白、脂质和多糖，赋予其良好的递送特性。因此，EMNVs 可递送治疗性的药物和杀伤性的化合物(如肿瘤杀伤性)的同时，而不被机体清除，实现多功能递送。此外，为实现更好的靶向递送，还可通过特异性的靶向物质修饰。除了这种 EMNVs 直接包载递送治疗剂的方式，还可将 EMNVs 包载的纳米颗粒(抗原等)作为纳米疫苗，实现持续刺激体内免疫系统的目的。目前还可将光热反应剂与治疗剂共同包载于 EMNVs 内，实现可调控的释放模式。

红细胞的生物相容性和循环周期长的特点，显示了其在药物、疫苗和其他物质等递送方面的优势，激发了其他细胞膜的包载递送的研究。如肿瘤细胞膜、细菌膜和病毒的膜等，也可通过融合膜的方式进行药物/蛋白质的包载。EMNVs 来源于天然组织，它可以绕过蛋白质鉴定、纯化和偶联的复杂过程。而融合膜的验证和认证方法较为复杂，需要精确的设计。

目前，EMNVs 的制备技术相对成熟，具有较高的灵活性。因此，实现大规模生产是完全有可能的。然而，最大的挑战是包载效率的优化、EMNVs 来源的安全性及其制备过程损伤性，以避免不必要的内源性污染。EMNVs 载体递送系统在人用疫苗的研究较为丰富，在兽用疫苗领域罕有应用。相信科研工作者可克服面临的挑战，在兽用疫苗的研发得到良好的应用。

REFERENCES

- [1] FANG RH, HU CM J, CHEN KNH, LUK BT, CARPENTER CW, GAO WW, LI SL, ZHANG DE, LU WY, ZHANG LF. Lipid-insertion enables targeting functionalization of erythrocyte membrane-cloaked nanoparticles[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(19): 8884-8888.
- [2] ZHANG Y, ZHANG JH, CHEN WS, ANGSANTIKUL P, SPIEKERMANN KA, FANG RH, GAO WW, ZHANG LF. Erythrocyte membrane-coated nanogel for

- combinatorial antivirulence and responsive antimicrobial delivery against *Staphylococcus aureus* infection[J]. *Journal of Controlled Release*, 2017, 263: 185-191.
- [3] BAX BE. Erythrocytes as carriers of therapeutic enzymes[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(5): 435.
- [4] BURNS JM, SAAGER R, MAJARON B, JIA WC, ANVARI B. Optical properties of biomimetic probes engineered from erythrocytes[J]. *Nanotechnology*, 2017, 28(3): 035101.
- [5] SHAW TK, MANDAL D, DEY G, PAL MM, PAUL P, CHAKRABORTY S, ALI KA, MUKHERJEE B, BANDYOPADHYAY AK, MANDAL M. Successful delivery of docetaxel to rat brain using experimentally developed nanoliposome: a treatment strategy for brain tumor[J]. *Drug Delivery*, 2017, 24(1): 346-357.
- [6] HAMIDI M, TAJERZADEH H. Carrier erythrocytes: an overview[J]. *Drug Delivery*, 2003, 10(1): 9-20.
- [7] XU PP, WANG RJ, WANG XH, OUYANG J. Recent advancements in erythrocytes, platelets, and albumin as delivery systems[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2016, 9: 2873-2884.
- [8] SAULIS G. The loading of human erythrocytes with small molecules by electroporation[J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2005, 10(1): 23-35.
- [9] SINAURIDZE EI, VUIMO TA, KULIKOVA EV, SHMYREV II, ATAULLAKHANOV FI. A new drug form of blood coagulation factor IX: red blood cell-entrapped factor IX[J]. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2010, 16(10): PI19-PI26.
- [10] HAMIDI M, RAFIEI P, AZADI A, MOHAMMADI-SAMANI S. Encapsulation of valproate-loaded hydrogel nanoparticles in intact human erythrocytes: a novel nano-cell composite for drug delivery[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 100(5): 1702-1711.
- [11] BIAGIOTTI S, ROSSI L, BIANCHI M, GIACOMINI E, PIERIGÈ F, SERAFINI G, CONALDI PG, MAGNANI M. Immunophilin-loaded erythrocytes as a new delivery strategy for immunosuppressive drugs[J]. *Journal of Controlled Release*, 2011, 154(3): 306-313.
- [12] FAN W, YAN W, XU ZS, NI H. Erythrocytes load of low molecular weight chitosan nanoparticles as a potential vascular drug delivery system[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, 95: 258-265.
- [13] FAVRETTO ME, CLUITMANS JCA, BOSMAN GJCGM, BROCK R. Human erythrocytes as drug carriers: loading efficiency and side effects of hypotonic dialysis, chlorpromazine treatment and fusion with liposomes[J]. *Journal of Controlled Release*, 2013, 170(3): 343-351.
- [14] MUKTHAVARAM R, SHI GX, KESARI S, SIMBERG D. Targeting and depletion of circulating leukocytes and cancer cells by lipophilic antibody-modified erythrocytes[J]. *Journal of Controlled Release*, 2014, 183: 146-153.
- [15] HARISA GI, BADRAN MM, ALQAHTANI SA, ALANAZI FK, ATTIA SM. Pravastatin chitosan nanogels-loaded erythrocytes as a new delivery strategy for targeting liver cancer[J]. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2016, 24(1): 74-81.
- [16] WAN GY, CHEN BW, LI L, WANG D, SHI SR, ZHANG T, WANG Y, ZHANG LY, WANG YS. Nanoscaled red blood cells facilitate breast cancer treatment by combining photothermal/photodynamic therapy and chemotherapy[J]. *Biomaterials*, 2018, 155: 25-40.
- [17] 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]. *Archives of Pharmacal Research*, 2012, 35(8): 1431-1439.
- [18] SKOROKHOD OA, GARMAEVA TT, VITVITSKY VM, ISAEV VG, PAROVICHNIKOVA EN, SAVCHENKO VG, ATAULLAKHANOV FI. Pharmacokinetics of erythrocyte-bound daunorubicin in patients with acute leukemia[J]. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2004, 10(4): PI55-PI64.
- [19] ARYAL S, HU CM J, FANG RH, DEHAINI D, CARPENTER C, ZHANG DE, ZHANG LF. Erythrocyte membrane-cloaked polymeric nanoparticles for controlled drug loading and release[J]. *Nanomedicine: London, England*, 2013, 8(8): 1271-1280.
- [20] DING H, LV YL, NI DZ, WANG J, TIAN ZY, WEI W, MA GH. Erythrocyte membrane-coated NIR-triggered biomimetic nanovectors with programmed delivery for photodynamic therapy of cancer[J]. *Nanoscale*, 2015, 7(21): 9806-9815.
- [21] QUE X, SU J, GUO PC, KAMAL Z, XU EG, LIU SY, CHEN JY, QIU MF. Study on preparation, characterization and multidrug resistance reversal of red blood cell membrane-camouflaged tetradrine-loaded PLGA nanoparticles[J]. *Drug Delivery*, 2019,

- 26(1): 199-207.
- [22] ZHAI Z, XU PC, YAO J, LI RD, GONG LD, YIN YX, LIN ZQ. Erythrocyte-mimicking paclitaxel nanoparticles for improving biodistributions of hydrophobic drugs to enhance antitumor efficacy[J]. *Drug Delivery*, 2020, 27(1): 387-399.
- [23] CHEN ZH, WANG WT, LI YS, WEI C, ZHONG P, HE DH, LIU H, WANG PF, HUANG ZP, ZHU WY, ZHOU Y, QIN LH. Folic acid-modified erythrocyte membrane loading dual drug for targeted and chemo-photothermal synergistic cancer therapy[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2021, 18(1): 386-402.
- [24] GUO JW, GUAN PP, DING WY, WANG SL, HUANG XS, WANG ZY, WANG P. Erythrocyte membrane-encapsulated celecoxib improves the cognitive decline of Alzheimer's disease by concurrently inducing neurogenesis and reducing apoptosis in APP/PS1 transgenic mice[J]. *Biomaterials*, 2017, 145: 106-127.
- [25] DELOACH J, IHLER G. A dialysis procedure for loading erythrocytes with enzymes and lipids[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA-General Subjects*, 1977, 496(1): 136-145.
- [26] BAX BE, BAIN MD, FAIRBANKS LD, WEBSTER AD, CHALMERS RA. *In vitro* and *in vivo* studies with human carrier erythrocytes loaded with polyethylene glycol-conjugated and native adenosine deaminase[J]. *British Journal of Haematology*, 2000, 109(3): 549-554.
- [27] ROPARS C, NICOLAU C, CHASSAIGNE M. Process and device for the encapsulation in erythrocytes of at least one biologically active substance, in particular hemoglobin allosteric effectors, and erythrocytes so obtained FR: EP0101341B1[P]. 1986-11-05.
- [28] RECHSTEINER MC. Uptake of proteins by red blood cells[J]. *Experimental Cell Research*, 1975, 93(2): 487-492.
- [29] MAGNANI M, ROSSI L, PANZANI I, BIGI L, ZANELLA A. Erythrocyte engineering for drug delivery and targeting[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1998, 28(1): 1-6.
- [30] ALPAR HO, LEWIS da. Therapeutic efficacy of asparaginase encapsulated in intact erythrocytes[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1985, 34(2): 257-261.
- [31] USMAN WM, PHAM TC, KWOK YY, VU LT, MA V, PENG BY, CHAN YS, WEI LK, CHIN SM, AZAD A, HE ABL, LEUNG AYH, YANG MS, SHYH-CHANG N, CHO WC, SHI JH, LE MTN. Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 2359.
- [32] UPDIKE SJ, WAKAMIYA RT. Infusion of red blood cell-loaded asparaginase in monkey. Immunologic, metabolic, and toxicologic consequences[J]. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1983, 101(5):679-91.
- [33] GAO LP, WANG H, NAN LJ, PENG T, SUN L, ZHOU JG, XIAO Y, WANG J, SUN JH, LU WY, ZHANG L, YAN ZQ, YU L, WANG YT. Erythrocyte membrane-wrapped pH sensitive polymeric nanoparticles for non-small cell lung cancer therapy[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2017, 28(10): 2591-2598.
- [34] SUN LH, LI Q, HOU MM, GAO Y, YANG RH, ZHANG L, XU ZG, KANG YJ, XUE P. Light-activatable Chlorin e6 (Ce₆)-imbedded erythrocyte membrane vesicles camouflaged Prussian blue nanoparticles for synergistic photothermal and photodynamic therapies of cancer[J]. *Biomaterials Science*, 2018, 6(11): 2881-2895.
- [35] LIAN YM, WANG XR, GUO PC, LI YC, RAZA F, SU J, QIU MF. Erythrocyte membrane-coated arsenic trioxide-loaded sodium alginate nanoparticles for tumor therapy[J]. *Pharmaceutics*, 2019, 12(1): 21.
- [36] SU J, ZHANG R, LIAN YM, KAMAL Z, CHENG ZY, QIU YJ, QIU MF. Preparation and characterization of erythrocyte membrane-camouflaged berberine hydrochloride-loaded gelatin nanoparticles[J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(2): 93.
- [37] SPUGNINI EP, ARANCIA G, PORRELLO A, COLONE M, FORMISANO G, STRINGARO A, CITRO G, MOLINARI A. Ultrastructural modifications of cell membranes induced by electroporation on melanoma xenografts[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2007, 70(12): 1041-1050.
- [38] ZIMMERMANN U, RIEMANN F, PILWAT G. Enzyme loading of electrically homogeneous human red blood cell ghosts prepared by dielectric breakdown[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Biomembranes*, 1976, 436(2): 460-474.
- [39] HARITOU M, YOVA D, KOUTSOURIS D, LOUKAS S. Loading of intact rabbit erythrocytes with fluorophores and the enzyme pronase by means of electroporation[J]. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 1998, 19(3): 205-217.
- [40] SUN D, CHEN J, WANG Y, JI H, PENG RY, JIN LB, WU W. Advances in refunctionalization of erythrocyte-based nanomedicine for enhancing cancer-targeted drug delivery[J]. *Theranostics*, 2019,

- 9(23): 6885-6900.
- [41] MATHIEU M, MARTIN-JAULAR L, LAVIEU G, THÉRY C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication[J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(1): 9-17.
- [42] UKIDVE A, ZHAO ZM, FEHNEL A, KRISHNAN V, PAN DC, GAO YS, MANDAL A, MUZYKANTOV V, MITRAGOTRI S. Erythrocyte-driven immunization via biomimicry of their natural antigen-presenting function[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(30): 17727-17736.
- [43] KALLURI R, LEBLEU VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [44] 郭源源. 红细胞膜包被聚合物纳米疫苗的制备及其对黑色素瘤的免疫治疗研究[D]. 武汉: 华中科技大学博士学位论文, 2015.
GUO YY. Erythrocyte membrane-enveloped polymeric nanoparticles as nano-vaccine for induction of antitumor immunity against melanoma[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong University of Science and Technology, 2015 (in Chinese).
- [45] 杨雨婷. 红细胞膜仿生纳米载体的硬度影响其体循环和细胞摄取的研究[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2020.
YANG YT. Study on stiffness of cell membrane camouflaged nanocarriers influences their systemic circulation and cellular uptake[D]. Nanchang: Master's Thesis of Nanchang University, 2020 (in Chinese).
- [46] SHAVI GV, DOIJAD RC, DESHPANDE PB, MANVI FV, MEKA SR, UDUPA N, OMPRAKASH R, DHIRENDRA K. Erythrocytes as carrier for prednisolone: *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 23(2): 194-200.
- [47] HAMIDI M, ZAREI N, ZARRIN AH, MOHAMMADI-SAMANI S. Preparation and *in vitro* characterization of carrier erythrocytes for vaccine delivery[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 338(1/2): 70-78.
- [48] 孙华文, 杨厚涑, 王秋爽. CEA-EPO质粒的构建及其诱导造血干细胞定向生成的红细胞疫苗治疗结肠癌的研究[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2018, 25(7): 792-799.
SUN HW, YANG HL, WANG QS. Effects of recombinant adenovirus-mediated co-transfection of *CEA* gene and *EPO* gene on promoting hematopoietic stem cells directly producing erythrocyte vaccine against colon cancer[J]. *Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery*, 2018, 25(7): 792-799 (in Chinese).
- [49] DOSHI N, ZAHR AS, BHASKAR S, LAHANN J, MITRAGOTRI S. Red blood cell-mimicking synthetic biomaterial particles[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(51): 21495-21499.
- [50] RAO L, BU LL, XU JH, CAI B, YU GT, YU XL, HE ZB, HUANG QQ, LI A, GUO SS, ZHANG WF, LIU W, SUN ZJ, WANG H, WANG TH, ZHAO XZ. Red blood cell membrane as a biomimetic nanocoating for prolonged circulation time and reduced accelerated blood clearance[J]. *Small: Weinheim an Der Bergstrasse, Germany*, 2015, 11(46): 6225-6236.
- [51] HU CM J, FANG RH, LUK BT, CHEN KNH, CARPENTER C, GAO WW, ZHANG K, ZHANG LF. 'Marker-of-self' functionalization of nanoscale particles through a top-down cellular membrane coating approach[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(7): 2664-2668.
- [52] GUPTA N, PATEL B, AHSAN F. Nano-engineered erythrocyte ghosts as inhalational carriers for delivery of fasudil: preparation and characterization[J]. *Pharmaceutical Research*, 2014, 31(6): 1553-1565.
- [53] ALQAHTANI SA, HARISA GI, BADRAN MM, ALGHAMDI KM, KUMAR A, SALEM-BEKHIT MM, AHMAD SF, ALANAZI FK. Nano-erythrocyte membrane-chaperoned 5-fluorouracil liposomes as biomimetic delivery platforms to target hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47(1): 989-996.
- [54] ZHU DM, XIE W, XIAO YS, SUO M, ZAN MH, LIAO QQ, HU XJ, CHEN LB, CHEN B, WU WT, JI LW, HUANG HM, GUO SS, ZHAO XZ, LIU QY, LIU W. Erythrocyte membrane-coated gold nanocages for targeted photothermal and chemical cancer therapy[J]. *Nanotechnology*, 2018, 29(8): 084002.
- [55] LIU B, WANG WM, FAN JL, LONG Y, XIAO F, DANIYAL M, TONG CY, XIE Q, JIAN YQ, LI B, MA XC, WANG W. RBC membrane camouflaged Prussian blue nanoparticles for gamabutin loading and combined chemo/photothermal therapy of breast cancer[J]. *Biomaterials*, 2019, 217: 119301.
- [56] LONG Y, WU XJ, LI Z, FAN JL, HU X, LIU B. PEGylated WS₂ nanodrug system with erythrocyte membrane coating for chemo/photothermal therapy of

- cervical cancer[J]. *Biomaterials Science*, 2020, 8(18): 5088-5105.
- [57] WANG XH, WANG Q, LIU ZH, ZHENG X. Preparation, pharmacokinetics and tumour-suppressive activity of berberine liposomes[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2017, 69(6): 625-632.
- [58] Malhotra S, Dumoga S, Sirohi P, Singh N. Red blood cells-derived vesicles for delivery of lipophilic drug camptothecin[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(25): 22141-22151.
- [59] WANG DD, DONG HF, LI M, CAO Y, YANG F, ZHANG K, DAI WH, WANG CT, ZHANG XJ. Erythrocyte-cancer hybrid membrane camouflaged hollow copper sulfide nanoparticles for prolonged circulation life and homotypic-targeting photothermal/chemotherapy of melanoma[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(6): 5241-5252.
- [60] SUN MQ, DUAN YC, MA YM, ZHANG QY. Cancer cell-erythrocyte hybrid membrane coated gold nanocages for near infrared light-activated photothermal/radio/chemotherapy of breast cancer[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 6749-6760.
- [61] REN LL, QIU LR, HUANG BB, YIN J, LI YN, YANG XL, CHEN GG. Preparation and characterization of anti-cancer crystal drugs based on erythrocyte membrane nanoplatfrom[J]. *Nanomaterials: Basel, Switzerland*, 2021, 11(10): 2513.
- [62] JIANG X, Wang KK, Zhou ZG, Zhang YF, Sha HZ, Xu QP, Wu J, Wang J, Wu JH, Hu YQ, Liu BR. Erythrocyte membrane nanoparticles improve the intestinal absorption of paclitaxel[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 488(2): 322-328.
- [63] CHEN H, SHA HZ, ZHANG LR, QIAN HQ, CHEN FJ, DING NQ, JI LL, ZHU AQ, XU QP, MENG FY, YU LX, ZHOU Y, LIU BR. Lipid insertion enables targeted functionalization of paclitaxel-loaded erythrocyte membrane nanosystem by tumor-penetrating bispecific recombinant protein[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2018, 13: 5347-5359.
- [64] JOHNSON DT, ZHOU JR, KROLL AV, FANG RH, YAN M, XIAO C, CHEN XF, KLINE J, ZHANG LF, ZHANG DE. Acute myeloid leukemia cell membrane-coated nanoparticles for cancer vaccination immunotherapy[J]. *Leukemia*, 2022, 36(4): 994-1005.
- [65] PIAO JG, WANG LM, GAO F, YOU YZ, XIONG YJ, YANG LH. Erythrocyte membrane is an alternative coating to polyethylene glycol for prolonging the circulation lifetime of gold nanocages for photothermal therapy[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(10): 10414-10425.
- [66] CHEN YL, LI Y, LIU JX, ZHU QX, MA JY, ZHU X. Erythrocyte membrane bioengineered nanoprobe via indocyanine green-directed assembly for single NIR laser-induced efficient photodynamic/photothermal theranostics[J]. *Journal of Controlled Release*, 2021, 335: 345-358.
- [67] RAN LX, LU BT, QIU HY, ZHOU GF, JIANG J, HU EL, DAI FY, LAN GQ. Erythrocyte membrane-camouflaged nanoworms with on-demand antibiotic release for eradicating biofilms using near-infrared irradiation[J]. *Bioactive Materials*, 2021, 6(9): 2956-2968.
- [68] YE SF, WANG FF, FAN ZX, ZHU QX, TIAN HN, ZHANG YB, JIANG BL, HOU ZQ, LI Y, SU GH. Light/pH-triggered biomimetic red blood cell membranes camouflaged small molecular drug assemblies for imaging-guided combinational chemophotothermal therapy[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(17): 15262-15275.
- [69] XUE JW, ZHAO ZK, ZHANG L, XUE LJ, SHEN SY, WEN YJ, WEI ZY, WANG L, KONG LY, SUN HB, PING QN, MO R, ZHANG C. Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence[J]. *Nature Nanotechnology*, 2017, 12(7): 692-700.
- [70] 冯晴晴, 张天蛟, 赵潇, 聂广军. 合成纳米生物学: 合成生物学与纳米生物学的交叉前沿[J]. *合成生物学*, 2022, 3(2): 260-278.
- FENG QQ, ZHANG TJ, ZHAO X, NIE GJ. Synthetic nanobiology—Fusion of synthetic biology and nanobiology[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022, 3(2): 260-278 (in Chinese).
- [71] SUN HP, SU JH, MENG QS, YIN Q, CHEN LL, GU WW, ZHANG ZW, YU HJ, ZHANG PC, WANG SL, LI YP. Cancer cell membrane-coated gold nanocages with hyperthermia-triggered drug release and homotypic target inhibit growth and metastasis of breast cancer[J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 30(15): 1910230.
- [72] 张文静, 李明, 周维, 张先恩, 李峰. 基于病毒组件的纳米材料的自组装合成、功能化及应用[J]. *合成生物学*, 2020, 1(3): 298-318.
- ZHANG WJ, LI M, ZHOU W, ZHANG XE, LI F. Self-assembly, biosynthesis, functionalization and applications of virus-based nanomaterials[J]. *Synthetic*

- Biology Journal, 2020, 1(3): 298-318 (in Chinese).
- [73] 刘喜阳, 罗玉莹, 邓盛齐, 郑林, 沈雪. 人血清白蛋白修饰的盐酸伊立替康 PLGA 纳米粒的制备与评价[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(21): 1740-1748.
- LIU XY, LUO YY, DENG SQ, ZHENG L, SHEN X. Preparation and evaluation of human serum albumin modified irinotecan hydrochloride PLGA nanoparticles[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2021, 56(21): 1740-1748 (in Chinese).
- [74] KRISHNAMACHARI Y, GEARY SM, LEMKE CD, SALEM AK. Nanoparticle delivery systems in cancer vaccines[J]. Pharmaceutical Research, 2011, 28(2): 215-236.
- [75] ZHANG XQ, DAHLE CE, BAMAN NK, RICH N, WEINER GJ, SALEM AK. Potent antigen-specific immune responses stimulated by codelivery of CpG ODN and antigens in degradable microparticles[J]. Journal of Immunotherapy: Hagerstown, Md: 1997, 2007, 30(5): 469-478.
- [76] HU CM J, FANG RH, LUK BT, ZHANG LF. Nanoparticle-detained toxins for safe and effective vaccination[J]. Nature Nanotechnology, 2013, 8(12): 933-938.
- [77] GUO YY, WANG D, SONG QL, WU TT, ZHUANG XT, BAO YL, KONG M, QI Y, TAN SW, ZHANG ZP. Erythrocyte membrane-enveloped polymeric nanoparticles as nanovaccine for induction of antitumor immunity against melanoma[J]. ACS Nano, 2015, 9(7): 6918-6933.
- [78] GAO LP, HAN L, DING XL, XU JJ, WANG J, ZHU JZ, LU WY, SUN JH, YU L, YAN ZQ, WANG YT. An effective intracellular delivery system of monoclonal antibody for treatment of tumors: erythrocyte membrane-coated self-associated antibody nanoparticles[J]. Nanotechnology, 2017, 28(33): 335101.
- [79] CHEN YJ, CHEN MC, ZHANG Y, LEE JH, ESCAJADILLO T, GONG H, FANG RH, GAO WW, NIZET V, ZHANG LF. Broad-spectrum neutralization of pore-forming toxins with human erythrocyte membrane-coated nanosponges[J]. Advanced Healthcare Materials, 2018, 7(13): e1701366.
- [80] LIANG X, YE XY, WANG C, XING CY, MIAO QW, XIE ZJ, CHEN XL, ZHANG XD, ZHANG H, MEI L. Photothermal cancer immunotherapy by erythrocyte membrane-coated black phosphorus formulation[J]. Journal of Controlled Release, 2019, 296: 150-161.
- [81] WANG YQ, LIU ZY, WANG H, MENG ZJ, WANG YL, MIAO WJ, LI XM, REN H. Starvation-amplified CO generation for enhanced cancer therapy via an erythrocyte membrane-biomimetic gas nanofactory[J]. Acta Biomaterialia, 2019, 92: 241-253.
- [82] XIE XT, WANG HJ, WILLIAMS GR, YANG YB, ZHENG YL, WU JZ, ZHU LM. Erythrocyte membrane cloaked curcumin-loaded nanoparticles for enhanced chemotherapy[J]. Pharmaceutics, 2019, 11(9): 429.
- [83] LI SH, ZHANG L. Erythrocyte membrane nanocapsules: biomimetic delivery and controlled release of photothermal-photochemical coupling agents for cancer cell therapy[J]. Dalton Transactions, 2020, 49(8): 2645-2651.
- [84] KATRITSIS D, KAIKTSIS L, CHANIOTIS A, PANTOS J, EFSTATHOPOULOS EP, MARMARELIS V. Wall shear stress: Theoretical considerations and methods of measurement[J]. Progress in Cardiovascular Diseases, 2007, 49(5): 307-329.
- [85] DAVIES PF, DEWEY CF JR, BUSSOLARI SR, GORDON EJ, GIMBRONE MA JR. Influence of hemodynamic forces on vascular endothelial function. *In vitro* studies of shear stress and pinocytosis in bovine aortic cells[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1984, 73(4): 1121-1129.
- [86] FRIEDL P. Prespecification and plasticity: Shifting mechanisms of cell migration[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2004, 16(1): 14-23.

(本文责编 郝丽芳)