

靶向 M2 巨噬细胞的纳米药物体内抗肿瘤效应的初步研究

李逸娴¹, 黄燕¹, 蒋鸥^{1,2}

(1. 西南医科大学附属肿瘤医院肿瘤科, 四川 泸州 646000; 2. 内江市第二人民医院肿瘤中心, 四川 内江 641000)

【摘要】目的: 探索靶向 M2 巨噬细胞的纳米复合物(MICE-NPs)在 BALB/c 小鼠肿瘤模型中的抑瘤效应及其相关机制。**方法:** 建立 BALB/c 小鼠肿瘤模型, 通过免疫组化法观察癌巢周围肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)的聚集情况; 采用不同浓度纳米药物在小鼠体内进行急性毒性实验, 从而获得后续实验纳米药物的合适浓度; 利用荧光显微镜观察纳米药物在小鼠不同组织中的分布情况; 通过肿瘤控制率的计算, 评估 MICE-NPs 对小鼠肿瘤生长的抑制作用; 采用流式细胞技术观察 MICE-NPs 对荷瘤小鼠病灶内免疫细胞组成的影响。**结果:** 免疫组化结果表明, 模型小鼠肿瘤微环境(TME)中存在大量 TAMs 及 M2 型巨噬细胞。急性毒性实验表明, MICE-NPs 急性期毒性不明显, MICE-NPs 具较好的安全性。荧光显微镜观察到在给药后 24 h 仍可用于肿瘤组织中观察到较高水平的荧光显示, 证明 MICE-NPs 可在肿瘤组织中蓄积。MICE-NPs 的抑瘤实验证明高浓度 MICE-NPs 抑瘤效果良好。流式细胞仪结果显示, 与对照组相比, 纳米药物组小鼠的肿瘤组织中 M2、Treg 的比例下降, M1、CTL 比例升高。**结论:** MICE-NPs 体内实验未见明显毒副作用, 抑瘤效应良好, 有望能为肿瘤治疗提供一种新的思路与方法。

【关键词】 纳米颗粒; 甘露糖受体; M2 型巨噬细胞; 肿瘤相关巨噬细胞; 体内实验

【中图分类号】 R979.1 **【文献标志码】** A

Preliminary study on the anti-tumor effect of nanoparticles targeting M2 macrophages in vivo

LI Yi-xian¹, HUANG Yan¹, JIANG Ou^{1,2}

(1. Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000; 2. Cancer Center, the Second People's Hospital of Neijiang, Neijiang 641000, Sichuan, China)

【Abstract】 Objective: To explore the antitumor effect of nanocomplex (MICE-NPs) targeting M2 macrophages in BALB/c mouse tumor models and explore its related mechanisms. **Methods:** BALB/c mouse tumor models were established to observe the accumulation of tumor-associated macrophages (TAMs) around the cancer nests by immunohistochemistry, acute toxicity experiments were performed in mice using different concentrations of nanomedicines to obtain the appropriate concentration of nanomedicines for subsequent experiments. The distribution of nanomedicines in different tissues of mice was observed using fluorescence microscopy, the inhibitory effect of MICE-NPs on tumor growth in mice was assessed by the calculation of tumor control rate, flow cytometry was used to observe the effect of MICE-NPs on the composition of immune cells in the lesions of tumor-bearing mice. **Results:** The immunohistochemical results showed that there were a large number of TAMs and M2 macrophages in the tumor microenvironment (TME) of the model mice. The acute toxicity test showed that MICE-NPs had no obvious acute toxicity, and MICE-NPs had good safety. Fluorescence microscopy showed that a high level of fluorescence was still observed in tumor tissue 24 hours after administration, indicating that MICE-NPs could accumulate in tumor tissue. The tumor inhibitory experiment of MICE-NPs demonstrated that high concentrations of MICE-NPs had good tumor inhibitory effect. Flow cytometry results showed that the proportion of M2 and Treg decreased, while the proportion of M1 and CTL increased in the tumor tissues of mice in the nanomedicine group compared with the control group. **Conclusion:** MICE-NPs showed no significant toxicity and good antitumor effect in vivo, which is expected to provide a new idea and method for tumor treatment.

【Key words】 Nanoparticles; Mannose receptor; M2 macrophage; Tumor-associated macrophages; In vivo

肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 是肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 中的主要成分,与肿瘤的发生、生长及侵袭有关。TAMs 有两种相反的表型,抑制肿瘤生长的 M1 型巨噬细胞和支持肿瘤生长的 M2 型巨噬细胞^[1]。M1 型巨噬细胞可产生促炎因子,对入侵机体的病原体具有较强的杀伤作用,在人体免疫中发挥重要作用。M2 型巨噬细胞则在寄生虫感染、组织重塑、变态反应性疾病和血管生成的过程中发挥重要作用。在肿瘤微环境中,外周血单核细胞主要分化为倾向于 M2 表型的 TAMs^[2]。M2 可分泌多种生长因子以帮助肿瘤发生发展^[3]并协助产生多种蛋白水解酶和运动相关蛋白,有助于肿瘤的侵袭和转移^[4],还可编码多种基因产物以促进肿瘤血管生成^[5-6]。因此靶向调控 M2 有可能成为治疗恶性肿瘤新的方法^[7]。

本实验制备了甘露糖化咪唑化羧甲基壳聚糖与依替膦酸的复合物纳米粒 (MICE-NPs, 专利号: 201610878839.4)。MICE-NPs 含有咪唑基团及依替膦酸,咪唑基团具有细胞毒性和诱导细胞凋亡的作用,是很多药物 (包括抗肿瘤药物) 分子结构中的重要组成部分^[8]。依替膦酸为第一代双膦酸盐,具有抑制肿瘤细胞增殖、粘附、迁移、抗肿瘤血管生成、促进肿瘤细胞的凋亡等功能^[9]。通过相关实验观察 MICE-NPs 在 BALB/c 小鼠肿瘤模型中的抑瘤效应及其相关机制,为纳米药物治疗恶性肿瘤的临床研究提供了新的可能。

1 材料与方法

1.1 材料

BALB/c 雄性小鼠 100 只,约 6 周龄,体重约 30 g,购自成都达硕实验动物有限公司,根据实验动物护理指南维护并照顾所有动物。细胞株: H22 细胞株,制备于西南医科大学附属医院肿瘤中心实验室。甘露糖化咪唑化羧甲基壳聚糖与依替膦酸复合物纳米粒 (MICE-NPs)、异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的甘露糖化咪唑化羧甲基壳聚糖与依替膦酸复合物纳米粒 (F-MICE-NPs)、羧甲基壳聚糖与三聚磷酸复合物纳米粒 (CST),制备于内江市第二人民医院肿瘤中心实验室。

1.2 方法

1.2.1 模型小鼠的建立及免疫组化 模型小鼠的建立参照《抗肿瘤药物药理学实验指南》^[10]和《实验动物学》^[11],并经西南医科大学机构动物护理和使用委员会批准。采用 H22 肝癌细胞及 BALB/c 小鼠用于模型小鼠的建立。将复苏后的 H22 肝癌细

胞配制 20 mL 生理盐水混合后置于离心机离心 3 次 (每次去除离心后上层液体),生理盐水调整浓度为 1×10^7 个/mL,接种于小鼠腹腔,饲养至形成大量腹水。采用脊椎脱臼法处死小鼠,抽取腹水,稀释、离心,将细胞沉淀重悬于 PBS 中,于小鼠大腿皮下接种,每只 0.2 mL (2×10^6 个),耐受良好且肿瘤成功接种的即为模型小鼠。于取材室取出模型小鼠的肿瘤组织,固定、脱水、包埋、切片、制片、烘干。采用水浴高温修复抗原, PBS 缓冲液冲洗后滴加正常山羊血清封闭液,放置于 37 °C 恒温箱 1 h。取出玻片, PBS 缓冲液冲洗,滴加 I 抗, 37 °C 孵育 1 ~ 2 h, PBS 缓冲液冲洗,滴加 II 抗 (CD68、CD163), 放置于 37 °C 恒温箱 30 min。取出玻片, DAB 显色剂显色, 10 min 后置于流动自来水下充分冲洗,复染、冲洗、脱水、封片,显微镜下观察细胞染色情况。本实验以 PBS 缓冲液代替 I 抗作为阴性对照;选取肝癌患者的肿瘤组织行相同免疫组化作为阳性对照。

1.2.2 MICE-NPs 的动物急性毒性实验 动物急性毒性试验按照固定剂量法,分别以 250 mg/kg、500 mg/kg、1 000 mg/kg 进行纳米药物剂量爬坡实验,每组各 6 只小鼠,对照组小鼠予以 0.6 mL 的生理盐水。在急性毒性实验的 1 周内观察各组小鼠的基本情况及存活小鼠数量,记录各组小鼠 1 周内的体重变化并绘制曲线图。实验结束后,剖出各组小鼠的重要脏器,比较各组小鼠的重要脏器的变化情况。

1.2.3 MICE-NPs 在小鼠中的组织分布实验 模型小鼠制备成功后,待肿瘤生长至约 250 mm³ 时,随机选取其中 12 只小鼠分为两组。第 1 组 8 只小鼠,予以 F-MICE-NPs 15 mg/只,为尾静脉给药,分别在给药后 3 h、24 h 各处死 4 只小鼠;第 2 组予以 CST (空白纳米粒) 15 mg/kg 作为对照组,直接处死。两组均取出小鼠的心、肝、脾、肺、双肾和肿瘤组织。快速冰冻切片后固定,采用荧光显微镜对比两组的荧光成像结果。荧光显微镜的 FITC 的激发波长在 495 nm,接收波长 519 nm,通过采集荧光图片后可计算出每组的平均荧光值。

1.2.4 MICE-NPs 的抑瘤实验 随机选取 30 只肿瘤体积约 250 mm³ 的模型小鼠并分为 3 组,每组各 10 只,均为尾静脉给药,隔天 1 次。处理方式分别为:第 1 组:干扰素 (阳性对照) 0.2 μg/只;第 2 组: MICE-NPs 500 mg/kg (根据《实验动物学》选取急性毒性实验中的中间剂量);第 3 组: CST (空白纳米粒) 500 mg/kg。皮下有肿瘤出现时即可测量,隔天测量 1 次,通过称重以及肿瘤的长度、宽度的测量,计算出肿瘤体积,计算公式为: $V(\text{mm}^3) = AB^2/2$ (A 为肿瘤的长度, B 为肿瘤的宽度)^[12]。实验观察期为

3 周,3 周后,取出所有小鼠的肿瘤组织,称重并测量肿瘤的长度及宽度,计算出肿瘤控制率计算公式为:肿瘤控制率 $V\% = (V_{\text{治疗前}} - V_{\text{治疗后}}) / V_{\text{治疗前}} \times 100\%$ 。

1.2.5 MICE-NPs 抑瘤作用的机理 随机选取 30 只模型小鼠并分为 3 组,每组各 10 只,分别为:干扰素组;干扰素(阳性对照)0.2 $\mu\text{g}/\text{只}$;纳米药物组:MICE-NPs 500 mg/kg ;空白纳米组:CST 500 mg/kg 。均为尾静脉给药,隔天 1 次。总观察期为两周。两周后,取出各组小鼠肿瘤组织,加入红细胞裂解液,充分裂解肿瘤组织后加入 PBS 并离心,用 MACS 缓冲液重悬,调整浓度为 5×10^6 个/mL。加入荧光抗体冰上封闭染色 15 min,通过流式细胞仪检测 F4/80、CD206、iNOS、CD4、CD25、Foxp3、CD28、CD8 等标志物表达情况。细胞毒性 T 细胞(CTL)标记物:CD28、CD8;调节性 T 细胞(Treg)标记物:Foxp3、CD28、CD4;M2 型巨噬细胞标记物:CD206、F4/80;M1 型巨噬细胞标记物:iNOS、F4/80。CD8⁺ + CD28⁺ 表示为 CTL 细胞;CD4⁺ + CD25⁺ + Foxp3⁺ 表示为 Treg 细胞;F4/80⁺ + CD206⁺ 表示为 M2 型巨噬细胞;F4/80⁺ + iNOS⁺ 表示为 M1 型巨噬细胞。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析与处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)形式描述,组间比较采用独

立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较行 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型小鼠建立及免疫组化评价

小鼠皮下接种肿瘤细胞后耐受良好,进食、活动正常,第七天肿瘤开始出现,长度 6~9 mm,宽度 5~8 mm,体积 100~300 mm^3 。

免疫组化评价:CD68、CD163 为巨噬细胞共同的标志抗原,其中 CD163 是 M2 型巨噬细胞的标志抗原。故 CD68⁺ 细胞可判定为 TAMs,CD163⁺ 细胞则判定为 M2 型巨噬细胞。CD68 及 CD163 阳性染色细胞均表示为胞膜或胞质着黄褐色颗粒或着色深于背景的背景细胞。肿瘤癌巢周围 CD68⁺ 表达情况如图所示,视野中可见较多浅褐色弱阳性 CD68⁺ 细胞,部分细胞胞质中可见空泡,阳性染色细胞多为类圆形或者不规则纺锤形。阳性细胞密度较高,染色略高于背景。见图 1。肿瘤癌巢周围 CD163⁺ 表达情况如图所示,细胞染色明显强于背景,呈强阳性,相较于图 1 细胞密度有所减少。见图 2。研究表明模型小鼠肿瘤微环境中具有 TAMs 及 M2 型巨噬细胞,适用免疫相关的药物实验。

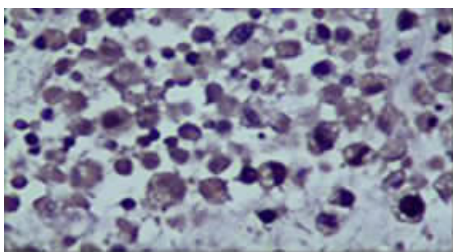


图 1 癌巢周围的 CD68⁺染色(400 \times)

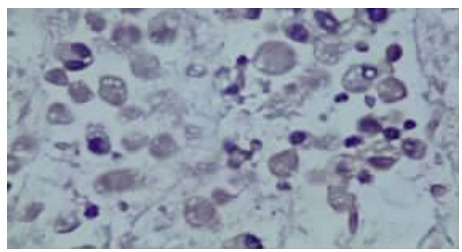


图 2 癌巢周围的 CD163⁺染色(400 \times)

2.2 MICE-NPs 的动物急性毒性实验结果

密切观察各组小鼠。给药后 1 周内,各组小鼠未见明显的进食、活动等异常,未观察到明显毒副反应。1 周后,各组小鼠均无死亡。采用脱脊椎法处死各组小鼠,分别剖检各组小鼠重要脏器,肉眼观察其颜色、形态均无明显差别。见图 3。



图 3 各剂量小鼠重要脏器对比图

1 周观察期内每日称重,纳米药物组小鼠的体重每日均增加,与生理盐水组无差异($P < 0.05$),表明 MICE-NPs 急性期毒性不明显,MICE-NPs 具较好的安全性。参考《实验动物学》^[11],以 500 mg/kg 作为后续 MICE-NPs 的实验剂量。见图 4。

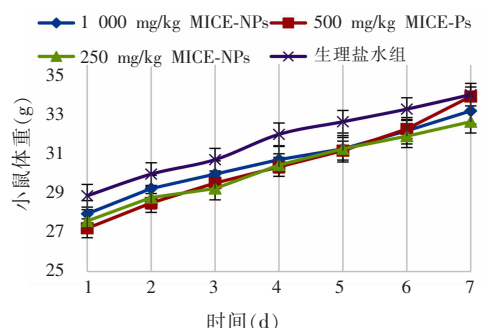


图 4 各组小鼠体重变化曲线

2.3 MICE-NPs 在模型小鼠体内的组织分布结果

空白纳米组荷瘤小鼠的重要脏器及肿瘤组织的荧光成像仅有微量荧光显示。实验组小鼠用药后 3 h,肺、肝、脾、双肾及肿瘤组织均可见荧光显示;用药后 24 h,各脏器的荧光强度呈现出逐渐减弱的趋

势,其中肺组织、脾脏的荧光强度减低,而肝、双肾、肿瘤组织仍可见较强荧光信号。24 h 内,心脏的荧光成像仅见微弱荧光且强度变化不明显。肿瘤组织在用药后 3 h 荧光强度增强,24 h 仍维持在较高水平。见图 5。

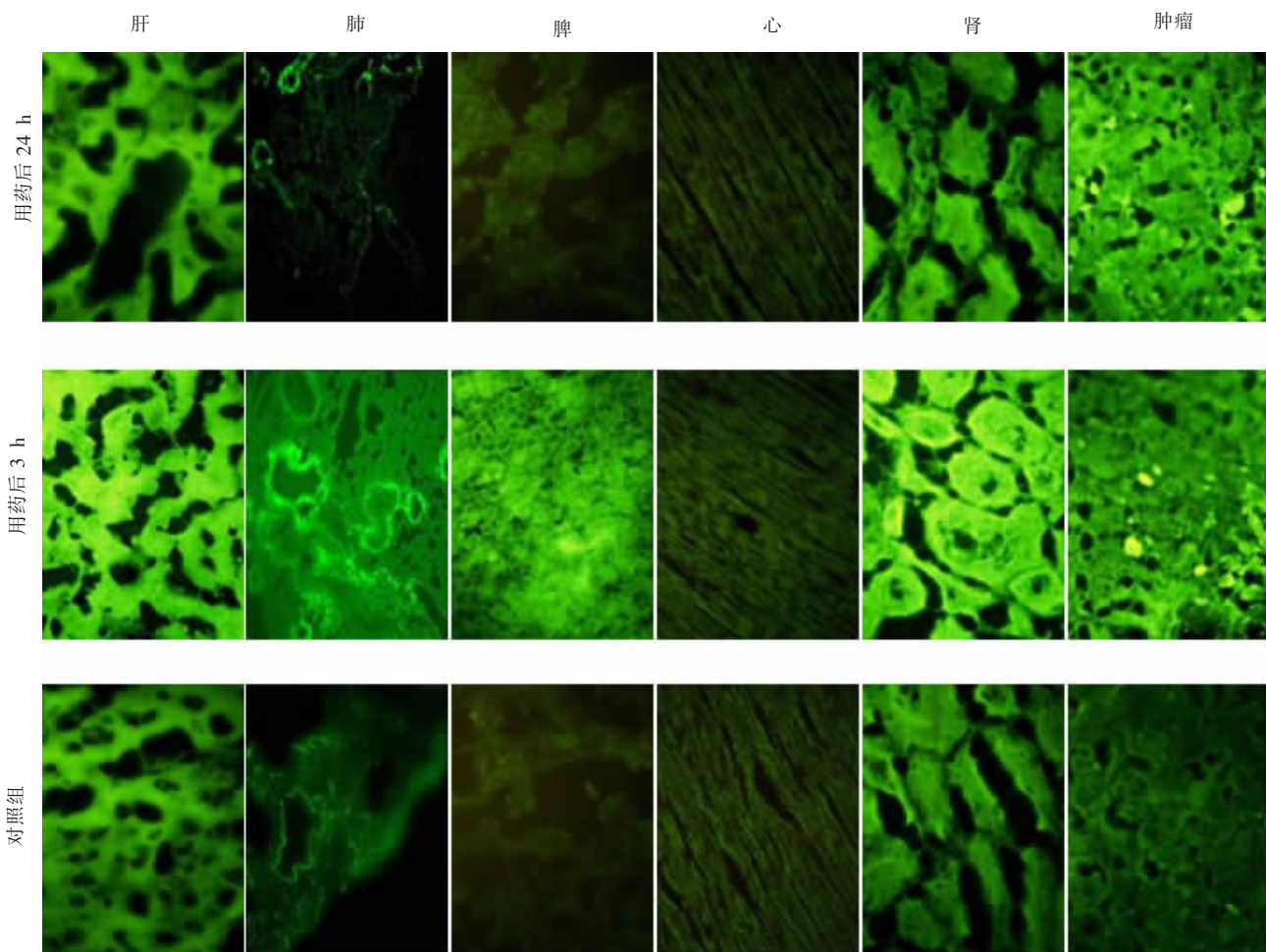


图 5 重要脏器及肿瘤的荧光图像(1 000×)

记录小鼠各个重要脏器及肿瘤组织的平均荧光值,对照组和实验组小鼠重要脏器及肿瘤组织的荧光值表示为($\bar{x} \pm s$)。用药后 3 h,实验组荧光值均高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。仅肿瘤组织在用药后 24 h,荧光强度仍较强,荧光值较高,其他实验组均与对照组相近($P < 0.05$)。见图 6。实验可知,MICE-NPs 在模型小鼠中实现了肿瘤的靶向性,可以较长时间聚集于肿瘤组织。

2.4 MICE-NPs 抑瘤实验结果

3 周观察期内,肿瘤体积比较:纳米药物组 < 干扰素组 < 空白纳米组。纳米药物组小鼠肿瘤生长缓慢,剩余两组肿瘤增长较快。实验结束时,其他两组小鼠肿瘤体积大于纳米药物组($P < 0.01$)。见图 7。

统计各组小鼠瘤体的体积并计算出肿瘤控制率。从中可知,除纳米药物组外,其余两组小鼠的肿

瘤控制率相近,均 < 30%。纳米药物组的肿瘤抑制率较高,抑瘤效果较好。见图 8。

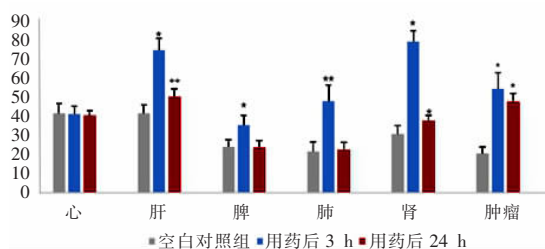


图 6 小鼠在用药后不同时间重要脏器的平均荧光值
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,与对照组相比。

2.5 流式细胞仪检测结果

根据流式细胞仪检测可知,干扰素组、纳米药物组、空白纳米组的 M1/M2 比例分别为 4.86%/30.5%、38.5%/3.74%、5.24%/12.8%;Treg 细胞

比例分别为:0.55%、0.089%、0.32%;CTL 比例分别为:3.84%、3.67%、0.66%。见图 9。

检测结果表明,对比空白纳米组,纳米药物组:M2、Treg 减少,M1、CTL 增多;干扰素组:M1 减少,

Treg、M2、CTL 增多。见图 10。表明 MICE-NPS 可能是通过下调 M2 和 Treg 的数量,上调 M1 和 CTL 的数量来发挥抑瘤作用。

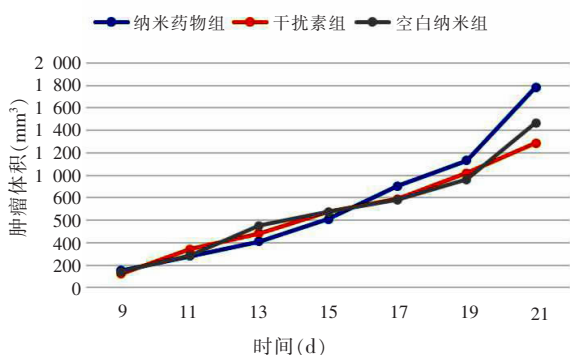


图 7 各组小鼠肿瘤体积变化

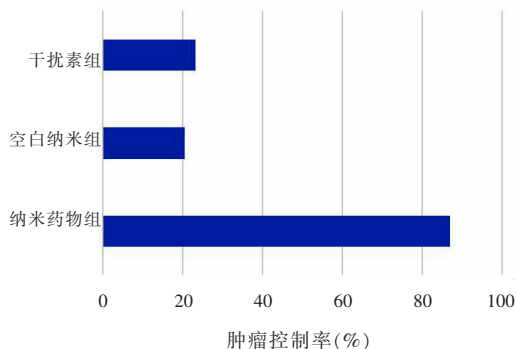


图 8 各组小鼠肿瘤控制率

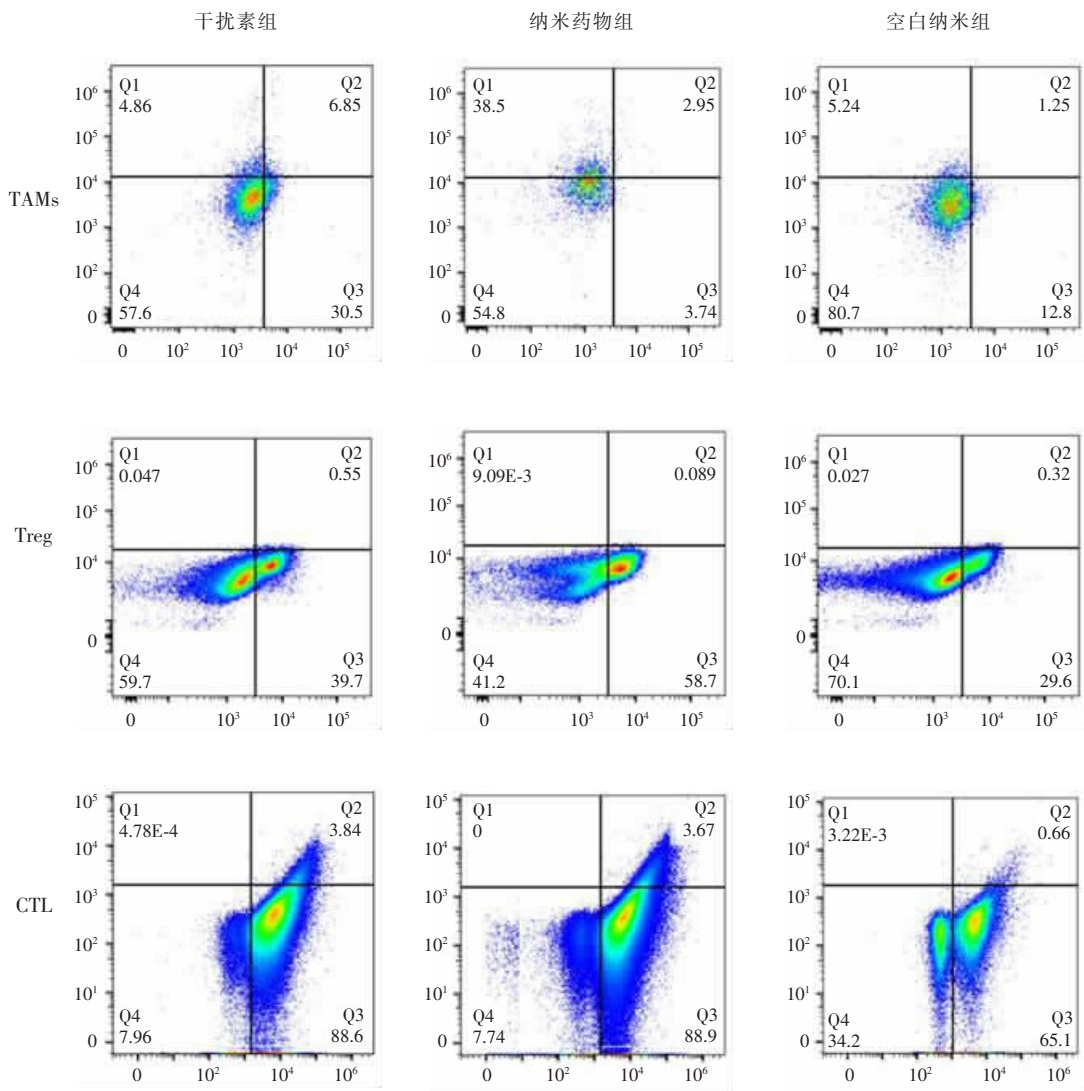


图 9 肿瘤组织中各种免疫细胞比例

TAMS:Q1 象限代表 M1 细胞比例,Q3 象限代表 M2 细胞比例;Treg:Q2 象限代表 Treg 细胞比例;CTL:Q2 象限代表 CTL 细胞比例。

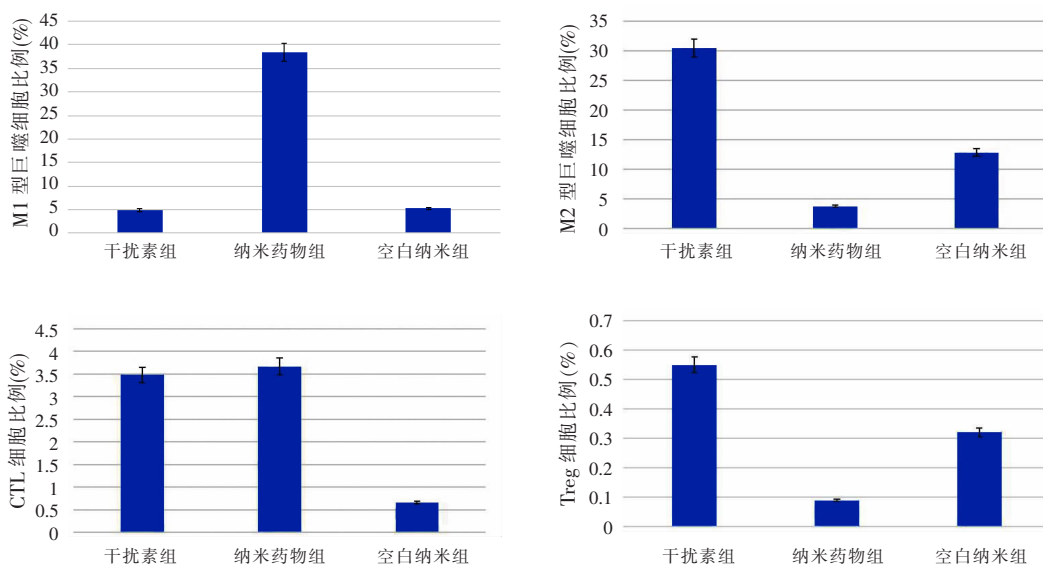


图 10 肿瘤组织中各种免疫细胞的比例

3 讨论

M2 型巨噬细胞大量表达甘露糖受体 (MR/CD206)^[13]。MR 是一种高度保守的钙依赖性多凝集素和模式识别受体 (PRR), 可介导多种微生物的非调理性吞噬作用, 并且还充当聚糖的内吞受体^[14-15]。Wei 等^[16] 构建了甘露糖修饰的巨噬细胞来源微颗粒并负载二甲双胍, 并证明其能有效靶向 M2 型巨噬细胞, 有效抑制肿瘤生长。Zhan 等^[17] 研发了一种双磷酸葡甘聚糖结合物 ALN-BSP (其中葡甘聚糖可靶向结合巨噬细胞表面高表达的甘露糖受体), 并构建了荷瘤小鼠, ALN-BSP 治疗最终抑制了肿瘤生长。故靶向 M2 型巨噬细胞是有依据且可行的。

传统的化疗药物, 经血液循环后, 到达肿瘤组织中的药物有限, 且毒副作用较大, 疗效欠佳。而纳米载体系统依靠 EPR 效应 (增强的通透性和滞留效应) 可被动地靶向肿瘤部位^[18], 这适用于大多数实体瘤。由于肿瘤组织中的血管损伤和淋巴系统损伤, 纳米颗粒会通过间质性血管屏障, 并借助不良的淋巴引流引起的压差滞留于肿瘤组织中, 故借助纳米载体系统靶向 TAM 治疗是可行的^[19]。羧甲基壳聚糖具有良好水溶性、无毒性、增稠性、成膜性良好等优点, 从而成为了癌细胞内药物输送的合适载体。双磷酸盐分子上具有带负电的磷酸根 ($O = P^O^-$) 基团, 可与壳聚糖分子内大量的 $-NH_2$ 基团形成分子间的交联, 从而形成不同粒径的纳米粒。前期实验中团队选择唑来膦酸作为纳米粒壳核, 但制作出来的纳米粒存在较大问题, 如纳米粒形状不规则, 产出率低等问题, 考虑为唑来膦酸中的咪唑环占用了壳聚糖上的 $-NH_2$ 基团。故本研究设计选用依替膦酸作为纳米粒核, 将咪唑枝接在羧甲基壳聚糖上。本研

究团队前期实验^[20-21] 发现甘露糖化壳聚糖纳米粒可特异性结合 M2 型巨噬细胞, 从而间接发挥抗肿瘤作用。因此, 课题组以离子交联法为基础制备出了甘露糖化咪唑化羧甲基壳聚糖与依替膦酸复合物纳米粒, 该纳米粒具有更高的生物利用率, 并且可以与肿瘤组织更加紧密的结合在一起, 靶向肿瘤组织的能力更强。

为进一步验证 MICE-NPs 体内抗肿瘤效应, 课题组选择建立肝癌模型小鼠, 通过急性毒性实验判断 MICE-NPs 的急性毒性情况, 最终选用最合适后续实验剂量, 应用免疫荧光技术, 观察 MICE-NPs 在小鼠重要组织及肿瘤组织中的蓄积时间, 通过设立空白对照组及阳性对照组, 对比小鼠注射不同药物前后体积变化, 计算出各组肿瘤控制率, 从而验证 MICE-NPs 的抑瘤效应, 最终应用流式细胞仪检测各组小鼠的肿瘤组织中免疫细胞类型, 从细胞水平进一步探讨 MICE-NPs 的抑瘤机制。

本实验中, 模型小鼠建模成功后, 免疫组化结果提示癌巢内有大量 CD163 表达, CD163 为 M2 型巨噬细胞的标志抗体, 表明模型小鼠肿瘤微环境中具有 M2 型巨噬细胞, 适合用于免疫相关的药物实验。急性毒性实验中, 在观察期内, 各个浓度梯度小鼠一般情况良好, 且并未出现明显的毒副作用, 表明该纳米粒急性期毒副作用不明显、安全性较好。参考《实验动物学》, 课题组以 500 mg/kg 作为后续 MICE-NPs 的实验剂量。F-MICE-NPs 尾静脉注射后 24 h, 仍能观察到肿瘤组织中较高水平的免疫荧光, 而其他组织几乎观察不到荧光显示, 进一步在体内验证了纳米粒能长时间聚集于肿瘤组织中, 这一点成为了后续研究的理论基石。抑瘤实验结果显示 MICE-NPs 组的肿瘤控制率高于空白对照及阳性对

对照组,表明 MICE-NPs 具有抗肿瘤活性。流式细胞仪观察发现,对比空白纳米组,纳米药物组小鼠的肿瘤组织中 M2、Treg 的比例下降,而 M1、CTL 比例升高,这为后期寻找纳米药物抗肿瘤机制的研究指明了一种可能的方向。考虑到实验动物为 BALB/c 小鼠,为防止小鼠接种肿瘤细胞后出现严重的移植排斥反应,本研究中我们选择鼠源的 H22 肝癌细胞建立肿瘤模型。近年研究^[22]发现,干扰素能通过调控肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤转移及血管新生、激活抗肿瘤免疫反应发挥抗肿瘤作用。在 MICE-NPs 的抑瘤实验中,因为实验测试的药物 MIC-NPs 抗肿瘤作用可能是免疫调节方面的机制,因此采用干扰素作为阳性对照药物。

但是,本实验仍有许多不足:(1) 纳米药物安全剂量实验中我们选取的三个浓度仅仅是大致的安全浓度,并非最适浓度;(2) 通过荧光显微镜观察 MICE-NPs 在小鼠体内的分布情况时,选取的切片为随机的,不一定意味着整体的情况,并且由于总的组织体积不详,平均荧光值的计算结果也有一定偏差;(3) 尽管观察到了 MICE-NPs 对小鼠肿瘤生长的抑制作用,后续还需选用不同类型肿瘤细胞建模来加以验证 MICE-NPs 的抑瘤效应。

本实验结合了肿瘤微环境及纳米技术的特点,制作了靶向 M2 型巨噬细胞的甘露糖化、咪唑化羧甲基壳聚糖纳米颗粒,并以离子交联术为基础制作了依替膦酸为壳核的纳米颗粒,改变了肿瘤免疫微环境内的免疫细胞组成结构,在动物实验中观察到明显的抗肿瘤活性,证明其潜在的治疗应用前景,值得后续进一步研究。

参考文献

[1] Rodell CB, Arlauckas SP, Cuccarese MF, et al. TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy [J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2018, 2(8): 578 - 588.

[2] Yang QY, Guo NN, Zhou Y, et al. The role of tumor-associated macrophages (TAMs) in tumor progression and relevant advance in targeted therapy [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2020, 10(11): 2156 - 2170.

[3] Yunna C, Mengru H, Lei W, et al. Macrophage M1/M2 polarization [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2020, 877: 173090.

[4] Schulz M, Salamero-boix A, Niesel K, et al. Microenvironmental regulation of tumor progression and therapeutic response in brain metastasis [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1713.

[5] Wang FR, Li B, Wei YC, et al. Tumor-derived exosomes induce PD1 + macrophage population in human gastric cancer that promotes disease progression [J]. *Oncogenesis*, 2018, 7(5): 41.

[6] Prenen H, Mazzone M. Tumor-associated macrophages: a short compendium [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76(8): 1447 - 1458.

[7] Pathria P, Louis TL, Varner JA. Targeting tumor-associated macrophages in cancer [J]. *Trends in Immunology*, 2019, 40(4): 310 - 327.

[8] Sharma P, Larosa C, Antwi J, et al. Imidazoles as potential anticancer agents: an update on recent studies [J]. *Molecules*, 2021, 26(14): 4213.

[9] Zheng Y, Wang PP, Fu Y, et al. Zoledronic acid enhances the efficacy of immunotherapy in non-small cell lung cancer [J]. *International Immunopharmacology*, 2022, 110: 109030.

[10] 徐寒梅. 抗肿瘤药物药理学实验指南 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 79 - 118.

[11] 秦川, 魏泓. 实验动物学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社出版, 2015: 242 - 244.

[12] Murugesan K, Srinivasan P, Mahadeva R, et al. Tuftsin-bearing liposomes co-encapsulated with doxorubicin and curcumin efficiently inhibit EAC tumor growth in mice [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 10547 - 10559.

[13] Jaynes JM, Sable R, Ronzetti M, et al. Mannose receptor (CD206) activation in tumor-associated macrophages enhances adaptive and innate antitumor immune responses [J]. *Science Translational Medicine*, 2020, 12(530): 6337.

[14] Van Der Zande HJP, Nitsche D, Schlaumann L, et al. The Mannose receptor: from endocytic receptor and biomarker to regulator of (Meta) inflammation [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 765034.

[15] Hossain MK, Wall KA. Use of dendritic cell receptors as targets for enhancing anti-cancer immune responses [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(3): 418.

[16] Wei ZH, Zhang XQ, Yong TY, et al. Boosting anti-PD-1 therapy with metformin-loaded macrophage-derived microparticles [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 440.

[17] Zhan X, Jia L, Niu Y, et al. Targeted depletion of tumour-associated macrophages by an alendronate-glucomannan conjugate for cancer immunotherapy [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(38): 10046 - 10057.

[18] Yang Y, Guo J, Huang L. Tackling TAMs for cancer immunotherapy: it's nano time [J]. *Trends in Pharmacological Sciences (Regular ed)*, 2020, 41(10): 701 - 714.

[19] Ovais M, Guo M, Chen C. Tailoring nanomaterials for targeting tumor-associated macrophages [J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(19): e1808303.

[20] 刘宇. 甘露糖化壳聚糖纳米粒与肿瘤组织结合能力的研究 [D]. 泸州: 泸州医学院, 2015.

[21] 马成. 甘露糖化壳聚糖咪唑膦酸纳米颗粒体外抗肿瘤效应的初步研究 [D]. 泸州: 西南医科大学, 2017.

[22] Gocher AM, Workman CJ, Vignali DAA. Interferon- γ : teammate or opponent in the tumour microenvironment? [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2022, 22(3): 158 - 172.

(收稿日期: 2022 - 06 - 08

修回日期: 2022 - 12 - 13)