

搭载咪唑-沸石骨架的减毒沙门氏菌的制备及抗肿瘤作用研究

钟小芳^{1*}, 邓小瑜¹, 刘 帅²

(1. 广东医科大学药学院, 广东 东莞 523109; 2. 黄江医院, 广东 东莞 523750)

摘要: 本研究利用仿生矿化将咪唑-沸石骨架 (ZIF-8) 巧妙地搭载在减毒沙门氏菌 VNP20009 表面, 同时包载化疗药物盐酸多柔比星 (doxorubicin, DOX) 得到 ZD@VNP; 采用透射电镜、激光共聚焦显微镜对 ZD@VNP 的形貌及 ZIF-8 与 VNP20009 的结合情况进行表征。采用荧光分光光度法考察 DOX 的包封率及体外释放率; 通过 CCK-8 和细胞活/死染色 FDA/PI 评估 ZD@VNP 抑制黑色素瘤细胞 (B16F10) 增殖的能力, 并建立黑色素瘤小鼠模型考察 ZD@VNP 抑瘤效果。实验结果表明 ZIF-8 均匀地结合在 VNP20009 表面, 共聚焦结果也证实了 ZD@VNP 中 ZIF-8 与 VNP 的结合; ZD@VNP 对 DOX 的包封率为 $85.7\% \pm 3.7\%$, 在 pH 6.0 的缓冲液中 DOX 的释放显著高于 pH 7.4; 细胞实验结果表明 ZD@VNP 能增强 DOX 对 B16F10 细胞增殖的抑制作用; 药效实验结果表明与 VNP+DOX 相比, ZD@VNP 治疗在 C57BL/6 小鼠 (实验得到广东医科大学动物保护和伦理委员会批准, 编号: GDMU-2023-002518) 上可显著抑制 B16F10 肿瘤生长, 并延长小鼠生存期。综上, 本研究借助仿生矿化通过一步法制备的 ZD@VNP 可显著增强 DOX 和 VNP 抑制肿瘤细胞生长的作用, 在药物递送领域具有较大的应用前景。

关键词: 咪唑-沸石骨架; 沙门氏菌 VNP20009; 仿生矿化; 细胞增殖; B16F10 细胞

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)06-1841-06

Preparation of *Salmonella typhimurium* VNP20009 conjugated with imidazole-zeolite framework and its anti-tumor effect

ZHONG Xiao-fang^{1*}, DENG Xiao-yu¹, LIU Shuai²

(1. School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523109, China; 2. Huangjiang Hospital, Dongguan 523750, China)

Abstract: In this study, inspired by biomimetic mineralization process, we have developed imidazole-zeolite framework (ZIF-8) conjugated VNP20009, and chemotherapy drug doxorubicin hydrochloride (DOX) was encapsulated to obtain ZD@VNP. The morphology and the combination of ZIF-8 and VNP was characterized by transmission electron microscopy and laser confocal microscopy. Fluorescence spectrophotometry was used to examine the encapsulation rate and *in vitro* release rate of DOX. CCK-8 and FDA/PI cell viability staining experiments were used to evaluate the ability of ZD@VNP to inhibit cell proliferation. Melanoma mouse model was established to investigate the effect of ZD@VNP to inhibit tumor growth. It was shown that ZIF-8 was evenly bounded to the surface of VNP20009, and laser confocal microscopy results also confirm the combination of ZIF-8 with VNP in ZD@VNP. The encapsulation rate of DOX in ZD@VNP was calculated to be $85.7\% \pm 3.7\%$, and the release of DOX under the buffer at pH 6.0 was significantly higher than that of pH 7.4. ZD@VNP treatment resulted in a greater inhibitory effect on B16F10 cell proliferation compared to DOX treatment. Animal experiment results showed that compared with VNP+DOX, ZD@VNP treatment can significantly inhibit the growth of B16F10 tumors in C57BL/6 mice and prolonged survival (all animal experiments were approved by the Institutional Animal

收稿日期: 2024-01-16; 修回日期: 2024-05-09.

基金项目: 广东医科大学博士科研启动经费 (1026/4SG23195G); 国家自然科学基金资助项目 (82302537).

*通讯作者 Tel: 13689055712, E-mail: xfzhong3640@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0045

Care and Ethics Committee Guangdong Medical University, No. GDMU-2023-2518). In summary, ZD@VNP was prepared through a facile, one-step method, which can significantly enhance the proliferation inhibitory effect of DOX to inhibit tumor growth and prolong survival. Our results demonstrate that ZD@VNP has great application prospects in the field of drug delivery.

Key words: imidazole-zeolite framework; *Salmonella* VNP20009; biomimetic mineralization; proliferation; B16F10 cell

实体瘤具有血管异常增生及局部组织缺氧坏死特征,大多数药物难以到达肿瘤深部,导致其在肿瘤部位的蓄积不足,削弱药效^[1,2]。沙门氏菌是一类兼性厌氧的革兰氏阴性菌,能特异性地靶向实体瘤组织的乏氧区域,并通过竞争营养、分泌毒素及激活机体免疫应答等多种途径发挥抗肿瘤效应^[3-5]。VNP20009是将鼠伤寒沙门氏菌 YS14028 的 *purI* 和 *msbB* 两种基因敲除后得到的减毒菌株^[6]。因其安全性高、可主动靶向乏氧肿瘤而广泛应用于抗肿瘤研究^[7]。然而,单独使用 VNP 的临床效果并不理想,患者肿瘤并未出现明显消退^[8]。这可能是由于肿瘤微环境的复杂性,导致单一的细菌治疗难以达到期望的抗肿瘤效果^[9]。将细菌治疗与其他临床治疗手段结合或许能改善疗效。

多柔比星 (doxorubicin, DOX) 是小分子广谱化疗药,对乳腺癌、肝癌等多种肿瘤都有很好的效果^[10-12]。但其体内非特异性分布及心脏毒性等不良反应使患者生存期缩短,严重限制了其应用^[13]。因此需要增加 DOX 在肿瘤组织内分布,达到减毒增效的目的。将 DOX 与细菌有机结合,利用细菌的肿瘤靶向性提高 DOX 在肿瘤部位的蓄积是一个可行的方法。但这种方式对搭载药物的结构有较高要求,且复杂的反应过程可能会降低细菌存活率^[14]。

纳米技术为癌症治疗提供了新的方法,研究者们开发了多种纳米载体,包括脂质体、胶束、无机、有机纳米粒等用于药物递送^[15-17]。金属有机骨架化合物是由金属离子和有机配体通过自组装连接而成的一类具有网络结构的多孔材料。其具有较大的比表面积,可以调节的孔径和较高的负载能力而受到研究者的广泛关注^[18,19]。沸石咪唑骨架材料由锌离子与 2-甲基咪唑配位形成,具有高载药量和 pH 敏感降解等特性,是优良的药物载体^[20]。

基于此,本研究借助仿生矿化的原理,采用一步法巧妙连接 ZIF-8 与 VNP,并有效包载 DOX 得到 ZD@VNP,期望利用 VNP 的肿瘤靶向性,将 DOX 有效递送至肿瘤组织,提高其在肿瘤部位的蓄积。ZIF-8 的 pH 降解特性使其在肿瘤环境中释放 DOX,被肿瘤细胞摄取后与 VNP 协同实现抗肿瘤作用。作者对

ZD@VNP 的形貌、ZIF-8 与 VNP 的结合状态进行了表征。在 B16F10 细胞上通过 CCK-8 及细胞活/死染色 FDA/PI 评估了 ZD@VNP 对细胞增殖能力的影响,发现 ZD@VNP 能显著抑制细胞增殖。在黑色素瘤小鼠模型上的结果也表明 ZD@VNP 治疗可显著抑制肿瘤生长并延长小鼠生存期。本研究结果表明,借助仿生矿化通过一步法制备的 ZD@VNP 可显著增强 DOX 和 VNP 抑制肿瘤细胞生长的作用,在药物递送领域具有较大的应用前景。

材料与方法

材料与动物 黑色素瘤细胞 B16F10 和减毒沙门氏菌 VNP20009 由四川大学惠赠;盐酸多柔比星 (125745-1) 购自北京华奉联博化学材料有限公司;蛋白胨 (3684237) 和酵母提取物 (6752383-3) 购自英国 Oxoid 公司;NaCl (2305125) 购自西陇科学股份有限公司;硫酸卡那霉素 (3673809) 和透析袋购自北京兰杰柯科技有限公司;DMEM 高糖培养基、青链霉素混合液 (1735702) 和细胞活/死染色 FDA/PI 染色试剂盒 (6535376) 购自北京索莱宝科技有限公司;Tween 80 (62573-26) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司;胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司。雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 (17~19 g, 6~8 周龄) 购自广东省医学实验动物中心,合格证号: 0372543632,动物实验批准编号: GDMU-2023-002518。

仪器 酶标仪 (H1MF, 美国 Thermo Fisher 公司);超纯水仪 (Milli-Q, 北京优普超纯科技有限公司);CO₂ 恒温培养箱 (BB150-2tcs, 美国 Thermo Fisher 公司);共聚焦显微镜 (ZEISS Smart proof 5, 德国 ZEISS 公司)。

细菌培养 将复苏后的 VNP 划线涂布至含有 50 μg mL⁻¹ 卡那霉素的 LB 固体培养基中,挑取单菌落隔夜培养。细菌数量通过测量 600 nm 处吸光值确定。将对数生长期的 VNP 调整至所需数量并在无菌 PBS 中洗涤 3 次。

细胞培养 使用含 10% Gibco 血清和 1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基在 5% CO₂ 恒温培养箱中培养。

ZD@VNP 制备与表征 取 VNP (4×10⁸ CFU) 分取

于 5 mL 无菌 PBS 中, 加入 0.5 mL 2-甲基咪唑 (10 mg) 混合均匀, 搅拌下滴加 0.5 mL 硝酸锌和 DOX (0.5 mg) 的混合溶液, 继续搅拌 1 h。硝酸锌用量分别为 1、5、10 mg, 将上述反应液经 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后弃去上清液, 并用 PBS 离心洗涤 3 遍得到 ZD@VNP。将 ZD@VNP 稀释后经磷钨酸染色, 置于透射电镜下观察。将 ZD@VNP 置于激光共聚焦显微镜下观察 DOX 的荧光与 VNP 的明场重叠情况。

DOX 包封率测定 取 1 mL ZD@VNP 加入葡聚糖凝胶柱中并连接紫外检测器, 收集后段滤过液用于荧光强度检测, 并根据公式 (1) 计算包封率:

$$\text{包封率} = [1 - \text{后段滤过液中 DOX 的量} / \text{DOX 总量}] \times 100\% \quad (1)$$

DOX 体外释放 取 1 mL ZD@VNP 置于透析袋中 (5 000 kD), 将袋口束紧, 分别置于装有 30 mL 含 $200\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Tween 80 的 PBS (pH 6.0、7.4) 的 EP 管中, 将其置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $80\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床中。分别于 0、2、4、8、12、24、36、48 h 时取 1 mL 释放液, 同时补加等体积新鲜释放介质。取释放液进行荧光强度检测, 计算释放液中 DOX 的浓度。

CCK-8 法考察 B16F10 细胞增殖抑制作用 取对数生长期的 B16F10 细胞离心得到细胞悬液, 调整细胞浓度约为每孔 1×10^4 个, 接种于 96 孔板中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养过夜。将培养基替换成 100 μL 含 DOX、ZD@VNP 的培养基, 同时设置 VNP 组、空白组和阴性对照组, 每组 6 个复孔。DOX 质量浓度分别为 0.5、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在培养箱中孵育 24 h 后弃培养基, 每孔用 100 μL PBS 洗涤, 并加入含 10 μL CCK-8 的新鲜培养基, 于培养箱中继续孵育 2 h, 用酶标仪在 450 nm 处检测各组吸光度, 计算细胞存活率。

细胞活/死染色 FDA/PI 双染色法考察 B16F10 细胞增殖抑制作用 取对数生长期的 B16F10 细胞离心得到细胞悬液, 调整细胞浓度约为每孔 2×10^5 个, 接种于 12 孔板中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养过夜。将培养基分别替换成 500 μL 含 DOX、VNP、ZD@VNP 的培养基, 同时设置空白对照组。在培养箱中孵育 4 h 后弃培养基, 每孔用 100 μL PBS 洗涤, 分别加入 50 μL PI 溶液和 50 μL FDA 溶液, 轻轻混匀, 通过激光共聚焦显微镜观察细胞。

ZD@VNP 在 B16F10 肿瘤模型上的抑瘤效果 对 C57BL/6 小鼠背部右侧进行剃毛处理, 以每只小鼠 5.0×10^5 个 B16F10 细胞皮下接种。待肿瘤生长至 $50 \sim 80\text{ mm}^3$ 时, 随机分为 5 组: PBS、VNP、DOX、VNP+DOX、ZD@VNP, 每组设置 8 只小鼠。每只小鼠尾静脉注射

100 μL 以上制剂 (DOX $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, VNP $10^5\text{ CFU}/\text{只}$) 记为第 0 天; 于第 2、4、6 天分别再次注射上述制剂, 记录小鼠体重和肿瘤大小。

统计学方法 实验结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 one-way ANOVA 进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 形态学考察

本文拟利用仿生矿化构建 ZIF-8 包覆的 VNP, 其机制为 VNP 表面蛋白上的羧基与锌离子具有较高的亲和力, 能形成配位键从而促进 ZIF-8 在 VNP 表面的矿化^[21]。作者对所制得的 ZD@VNP 进行透射电镜观察, 并与单独的 VNP 进行对比。如图 1A 所示, VNP 长约 2 μm ; 表面形态清晰可见; 当硝酸锌用量为 1 mg 时, VNP 表面包覆很多细小的纳米粒, 但纳米粒呈聚集状态, 且细菌与细菌之间黏附 (图 1B); 当硝酸锌用量为 5 mg 时, 观察到视野下 ZIF-8 的粒径约为 60 nm, 均匀地包裹在 VNP 表面, 且未完全遮挡细菌表面结构, 有利于细菌固有性质的发挥 (图 1C); 而当硝酸锌用量为 10 mg 时, VNP 表面结合的纳米粒略有增大, 但纳米粒依然是聚集的 (图 1D)。因此后续制备 ZD@VNP 采用 10 mg 2-甲基咪唑与 5 mg 硝酸锌混合的处方。

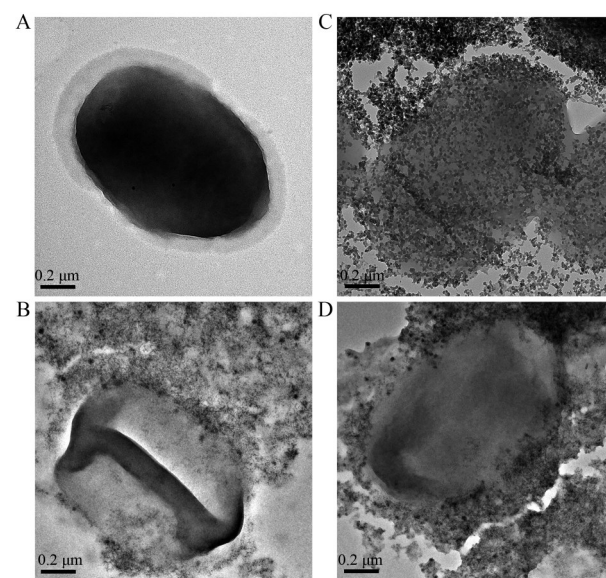


Figure 1 Transmission electron microscopy images of VNP (A) and ZD@VNP with zinc nitrate amount of 1 mg (B), 5 mg (C) and 10 mg (D). Scale bar, 0.2 μm

将 ZD@VNP 置于激光共聚焦显微镜下, 作者观察到多柔比星的荧光 (橙色) 几乎与 VNP 的明场重叠, 证明 ZIF-8 与 VNP 的有效结合 (图 2)。

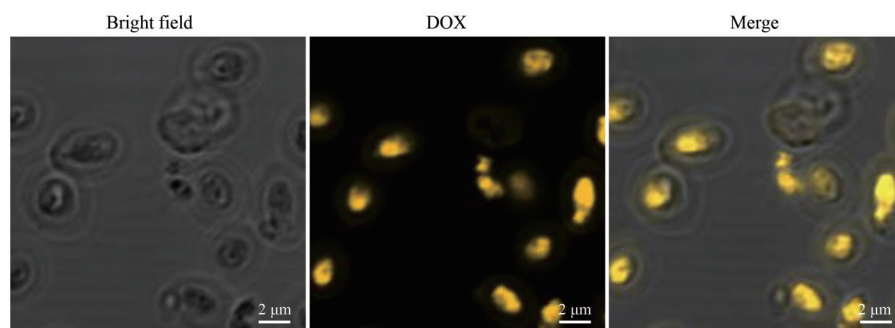


Figure 2 Representative confocal laser scanning images of ZD@VNP. Scale bar, 2 μm

2 包封率检测结果

利用 DOX 在激发波长 (E_x) = 497 nm、发射波长 (E_m) = 555 nm 的条件下具有最佳吸收, 以荧光强度对浓度绘制标准曲线, 并得到回归直线方程。测得包封率为 85%。

3 ZD@VNP 的体外释放行为

由图 3 可知: pH 7.4 的缓冲液中, DOX 的释放相对平缓, 48 h 内释放率约为 40%, 而在模拟肿瘤微环境的 pH 6.0 的缓冲液下 DOX 释放明显加快, 24 h 释放率达到 55%。这可能是由于 ZIF-8 的 pH 降解特性使装载的 DOX 在酸性条件下释放加速导致。

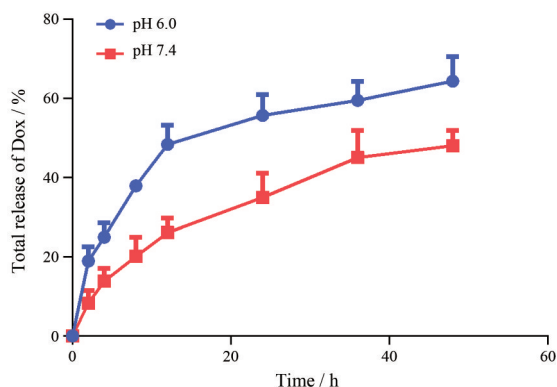


Figure 3 *In vitro* release profiles of DOX. $n = 3$

4 ZD@VNP 对 B16F10 细胞增殖抑制作用

CCK-8 结果如图 4 所示, DOX 和 ZD@VNP 对 B16F10 细胞增殖的抑制作用都表现出剂量依赖性, 且 ZD@VNP 的细胞抑制作用显著强于 DOX。当质量浓度为 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, DOX 和 ZD@VNP 组细胞存活率分别约为 60% 和 45%, 当质量浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, ZD@VNP 组细胞存活率约为 8%, 而 VNP (10^5 CFU) 的细胞存活率约为 80%。在各个浓度梯度下, ZD@VNP 的细胞存活率皆显著低于 DOX 组, 说明 ZD@VNP 增强了 DOX 的细胞增殖抑制作用。

细胞活/死染色结果如图 5 所示, 空白组的细胞呈现大面积的绿色, VNP 组有 30% 细胞呈红色, 证明细

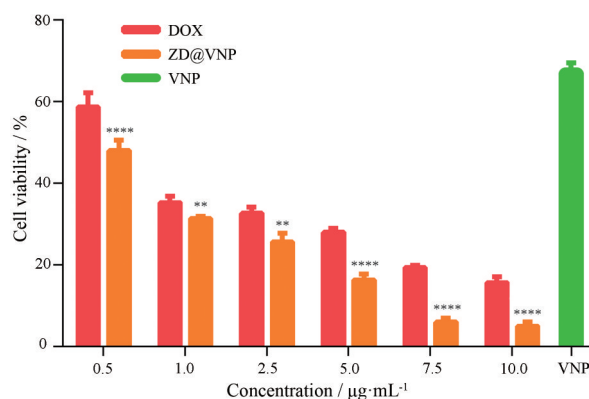


Figure 4 Cell viability of B16F10 cells treated for DOX and ZD@VNP with a series of concentrations, VNP was set as control. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. Asterisk signs indicate P values associated with comparisons between DOX and ZD@VNP: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

菌本身对于 B16F10 细胞具有一定的侵袭杀伤能力。DOX 组有 60% 细胞呈红色, 而 ZD@VNP 组呈现大面积的红色, 说明大部分为死细胞。再次证明 ZD@VNP 具有较好的抑制 B16F10 增殖的作用。

5 ZD@VNP 在 B16F10 肿瘤模型上的抑瘤效果

由图 6 可知, PBS、VNP、DOX、VNP+DOX、ZD@VNP 的中位生存期分别为 16、20、20、24、37 天, VNP 有一定的抑制肿瘤生长的能力但弱于 DOX, ZD@VNP 抑瘤的能力在各组之间是最强的, 并显著强于 VNP+DOX 组, 说明 ZD@VNP 制剂中的 DOX 和 VNP 有协同抗肿瘤作用。从小鼠体重变化来看, VNP 组小鼠体重无明显变化, 而 DOX 组则有缓慢下降趋势, 说明 VNP 的安全性高于 DOX。ZD@VNP 组小鼠体重在治疗期间无明显变化, 说明 ZD@VNP 具有较好的生物安全性。

讨论

VNP20009 因其安全性高、可主动靶向乏氧肿瘤而广泛应用于抗肿瘤研究。然而, 在 I 期临床试验中患者肿瘤并未明显消退^[4]。可见, 细菌治疗须联合其他抗肿

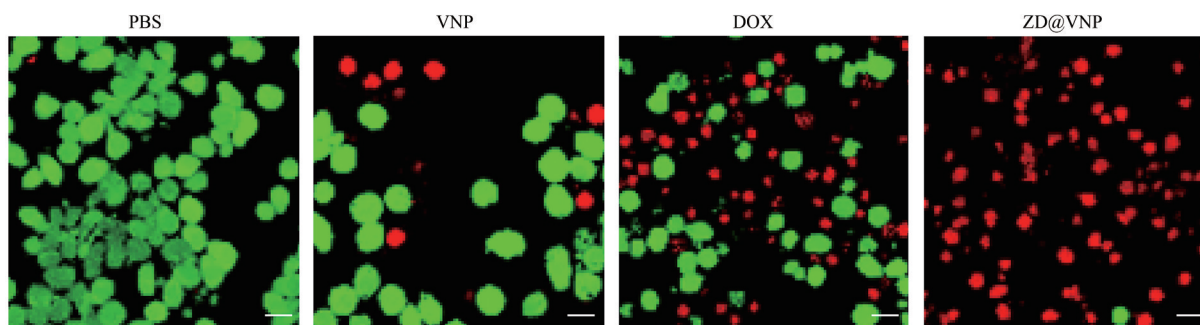


Figure 5 B16F10 cells were treated with VNP, DOX and ZD@VNP, and then stained with fluorescein diacetate and propidium iodide and examined by confocal fluorescence microscopy. Scare bar, 20 μm

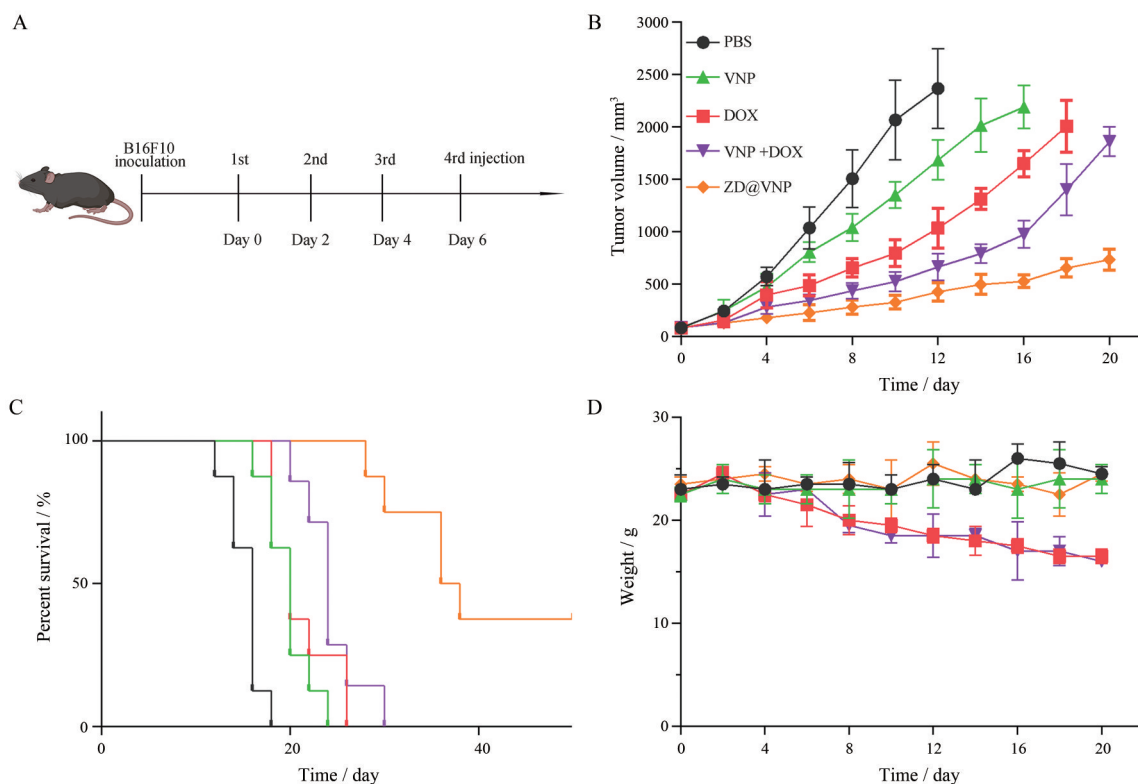


Figure 6 ZD@VNP treatment suppressed tumor growth *in vivo*. A: Therapeutic schedule; B: Tumor volume of mice treated with PBS, VNP, DOX, VNP+DOX and ZD@VNP; C, D: Survival and weight of B16F10 bearing mice. $n = 8$

瘤策略,才能有效治疗肿瘤。DOX是常用的化疗药物,但其心脏毒性和体内非特异性分布严重限制了其应用^[22]。利用VNP搭载DOX将提高DOX在肿瘤部位的蓄积,与VNP协同治疗肿瘤,在药物递送方面有着广阔的发展前景。

本研究利用仿生矿化法,通过一步法制备了搭载ZIF-8的VNP,并有效包载化药多柔比星得到ZD@VNP,该制备方法快速简单、无需使用有机溶剂、安全无毒。在处方筛选过程中,作者发现2-甲基咪唑与硝酸锌2:1时,ZIF-8能均匀地包裹在VNP表面,且ZIF-8粒径约为60 nm。共聚焦结果显示DOX的荧光与VNP的明场重叠,证实了ZIF-8与VNP的结合作用。文中制

备的ZD@VNP对DOX包封率达85%,且在pH 6.0的条件下能有效释放DOX,为其在ZD@VNP到达肿瘤组织后释放DOX被肿瘤细胞摄取提供了可能。

细胞实验结果证明ZD@VNP具有较好的抑制B16F10细胞增殖的作用,进一步的动物实验也表明ZD@VNP具有优异的抑制肿瘤生长并延长小鼠生存期的效果,且具有较好的生物安全性。

综上所述,本研究采用一步法制备了搭载ZIF-8的VNP,同时包载DOX得到ZD@VNP,其对DOX具有较高的包封率,且制备过程中未使用有机溶剂,具有较高的安全性。ZD@VNP增强了对肿瘤细胞增殖抑制作用,并在动物肿瘤模型上表现出较好的肿瘤抑制效果。

文中只进行了肿瘤药效学研究,在后续的研究中将进一步进行体内抑瘤机制的研究。

作者贡献: 钟小芳负责论文构思、实验指导、文章撰写与修改; 邓小瑜负责主要实验操作与设计; 刘帅负责资料收集、结果分析与统计。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 437-447.
- [2] Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14: 430-439.
- [3] Gurbatri CR, Arpaia N, Danino T. Engineering bacteria as interactive cancer therapies [J]. *Science*, 2022, 378: 858-864.
- [4] Zhou SB, Gravekamp C, Bermudes D, et al. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18: 727-743.
- [5] Yin T, Liu LN, Dong SD, et al. Research on anti-tumor mechanism of attenuated *Salmonella typhimurium* VNP20009 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 2700-2706.
- [6] Clairmont C, Lee KC, Pike J, et al. Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of *Salmonella typhimurium* [J]. *J Infect Dis*, 2000, 181: 1996-2002.
- [7] Wu LY, Li L, Li SF, et al. Macrophage-mediated tumor-targeted delivery of engineered *Salmonella typhimurium* VNP20009 in anti-PD1 therapy against melanoma [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 3952-3971.
- [8] Cunningham C, Nemunaitis J. A phase I trial of genetically modified *Salmonella typhimurium* expressing cytosine deaminase (TAPET-CD, VNP20029) administered by intratumoral injection in combination with 5-fluorocytosine for patients with advanced or metastatic cancer. protocol no: CL-017. version: april 9, 2001 [J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12: 1594-1596.
- [9] Zhou DX, Wang XH, Xu X, et al. Anti-tumor effects of engineered VNP20009-Abvec-Ig κ -mPD-1 strain in melanoma mice *via* combining the oncolytic therapy and immunotherapy [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14: 2789.
- [10] Cai S, Thati S, Bagby TR, et al. Localized doxorubicin chemotherapy with a biopolymeric nanocarrier improves survival and reduces toxicity in xenografts of human breast cancer [J]. *J Control Release*, 2010, 146: 212-218.
- [11] Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16: 3267-3285.
- [12] Xu XL, Huang Y. Synergistic anti-tumor effects of axitinib and doxorubicin [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1250-1256.
- [13] Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 1789-1792.
- [14] Luo CH, Huang CT, Su CH, et al. Bacteria-mediated hypoxia-specific delivery of nanoparticles for tumors imaging and therapy [J]. *Nano Lett*, 2016, 16: 3493-3499.
- [15] Irvine DJ, Dane EL. Enhancing cancer immunotherapy with nanomedicine [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20: 321-334.
- [16] Riley RS, June CH, Langer R, et al. Delivery technologies for cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 175-196.
- [17] Jiang WX, Zhang HQ, Ding Y, et al. Research progress in nano-drug delivery systems for antitumor multi-drug combinational application [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1-12.
- [18] Cai W, Wang JQ, Chu CC, et al. Metal-organic framework-based stimuli-responsive systems for drug delivery [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2018, 6: 1801526.
- [19] Sun YJ, Zheng LW, Yang Y, et al. Metal-organic framework nanocarriers for drug delivery in biomedical applications [J]. *Nanomicro Lett*, 2020, 12: 103.
- [20] Xie HX, Liu XY, Huang ZR, et al. Nanoscale zeolitic imidazolate framework (ZIF)-8 in cancer theranostics: current challenges and prospects [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14: 3935.
- [21] Liang K, Ricco R, Doherty CM, et al. Biomimetic mineralization of metal-organic frameworks as protective coatings for biomacromolecules [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7240.
- [22] Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: an update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111708.