

铜负载葡萄糖氧化酶纳米药物用于肝癌的化学动力学治疗

吴婷婷, 郝希伟*

青岛大学附属医院小儿外科, 山东 青岛

收稿日期: 2024年3月17日; 录用日期: 2024年4月11日; 发布日期: 2024年4月16日

摘要

目的: 为了达到靶向肿瘤部位实现肝癌的精准治疗, 设计合成一种负载葡萄糖氧化酶(GOx)和铜离子(Cu^{2+})的纳米药物(Cu@GoxNM), 通过化学动力学治疗达到对肿瘤细胞的杀伤作用。方法: 通过“一锅法”合成铜负载葡萄糖氧化酶的纳米药物, 通过扫描电镜和元素映射检测相关元素来验证纳米药物的合成。验证该纳米药物的级联催化产生活性氧作用。通过MTT细胞毒活实验, 细胞活性氧的检测和活死细胞染色实验来验证其对细胞的影响, 由此来证明化学动力学治疗的效果。结果: 成功合成了铜负载葡萄糖氧化酶的纳米药物 Cu@GoxNM ; Cu@GoxNM 对HUH7细胞的促凋亡作用与其浓度呈正相关; 与对照细胞相比 Cu@GoxNM 致HUH7细胞产生更多的活性氧并发生细胞凋亡。结论: Cu@GoxNM 纳米药物能明显促进肝癌细胞的凋亡, 其是通过产生过量的活性氧达到化学动力学疗法作用。

关键词

葡萄糖氧化酶, 纳米药物, 化学动力学疗法, 肝癌

The Copper-Loaded Glucose Oxidase Nanomedicines for Chemodynamic Therapy of Hepatocellular Carcinoma

Tingting Wu, Xiwei Hao*

Department of Pediatric Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Mar. 17th, 2024; accepted: Apr. 11th, 2024; published: Apr. 16th, 2024

Abstract

Objective: In order to achieve precise treatment of liver cancer by targeting the tumour site, to

*通讯作者。

design and synthesize a nanomedicine (Cu@GoxNM) loaded with glucose oxidase (GOx) and copper ions (Cu²⁺), which can kill the tumour cells through chemodynamic therapy. Methods: Synthesis of copper-loaded glucose oxidase nanomedicine by “one-pot method” was demonstrated by scanning electron microscopy (SEM) and elemental mapping for the detection of relevant elements. The cascade-catalyzed generation of reactive oxygen species by the nanomedicine was experimentally verified. The effects of the nanomedicine on cells were verified by MTT cytotoxicity assay, cellular reactive oxygen species assay, and staining assay of live and dead cells to demonstrate the effectiveness of chemodynamic therapy. Results: The copper-loaded glucose oxidase nanomedicine Cu@GoxNM was successfully synthesised; the pro-apoptotic effect of Cu@GoxNM on HUH7 cells was positively correlated with its concentration; Cu@GoxNM resulted in the production of more reactive oxygen species and apoptosis in HUH7 cells compared to control cells. Conclusion: Cu@GoxNM nanomedicine significantly promotes the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells, and it might be the effect of chemodynamic therapy by generating excessive reactive oxygen species.

Keywords

Glucose Oxidase, Nanomedicines, Chemodynamic Therapy, Hepatocellular Carcinoma

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肝细胞癌(HCC)是全球第六大最常见癌症[1]。据世界卫生组织称,到2030年,肝癌将导致超过100万人死亡。对于早期HCC患者,根治性切除联合靶向治疗等全身治疗是目前的标准治疗方法;而大多数HCC患者往往诊断时已属晚期,不适合手术治疗,预后和标准治疗效果均较差[2]。近年来,受到广泛关注的靶向药物制剂可最大限度地运送药物至靶区,使药物在靶区的浓度显著高于传统制剂[3],这既能明显改善治疗效果,又能减少药物使用剂量,大大降低毒副作用,同时还便于控制给药的速度和方式,达到高效低毒精准治疗的作用[4]。

而纳米粒子有实现靶向肿瘤的优势,纳米尺寸的粒子可在血液中长期循环,并经由“高渗透长滞留(Enhanced permeability and retention, EPR)效应富集于肿瘤组织[5]。纳米靶向药物制剂是一种纳米尺寸的靶向制剂,在其上修饰特定的靶向基团可以有效地通过EPR效应靶向肿瘤部位,实现药物在肿瘤部位的富集[6]。基于EPR效应的纳米药物制剂尺寸取决于肿瘤血管壁孔径,因此设计的纳米药物制剂的粒径通常在1 μm以下,尺寸越小越有利于在肿瘤组织中渗透扩散。但如果尺寸太小易被肝脏和肾脏清除,而粒径较大则易被网状内皮系统清除[7]。

铜作为参与能量转换、氧运输和细胞氧化代谢调节的必需酶的催化辅助因子,在细胞中发挥着重要作用[8]。细胞中铜的浓度受代谢需求和细胞环境变化的调节,太少或太多都会对细胞造成严重损害[9]。迄今为止,已提出许多策略来提高抗肿瘤疗效,例如光热疗法[10]、光动力疗法[11]、化学动力疗法(CDT)[12]、和放射疗法[13]。特别是,CDT利用了肿瘤微环境(TME)产生剧毒活性氧(ROS),无需外部能量即可诱导细胞死亡,由于癌细胞中过氧化氢(H₂O₂)水平较高,因此合成了各种纳米材料通过芬顿反应或类芬顿反应在弱酸性TME中产生高水平的·OH,这样大量活性氧在肿瘤细胞内堆积即诱导了细胞的死亡达到治疗效果[11]。

因此, 本研究拟合成一种 Cu 负载 GOx 纳米药物 Cu@GoxNM, 其粒径小的尺寸特点可 EPR 效应可达到肿瘤细胞产生滞留, 通过合成的表征, 细胞外实验验证和细胞内实验检测, 验证了 Cu@GoxNM 利用芬顿反应将细胞内的 H_2O_2 转化为羟基自由基(-OH)来杀死癌细胞。

2. 实验部分

2.1. 仪器和材料

1) 主要仪器: 基因扩增仪(Mini 1620, 杭州朗基科学仪器有限公司, 中国); 扫描探针显微镜(CSPM 5500, 广州本原纳米仪器公司, 中国); 紫外可见分光光度计(UV-2600, 岛津仪器有限公司, 日本); 荧光光谱仪(F-7000, 日立高新技术公司, 日本); 多功能微孔板酶标仪(Synergy HTX, 伯腾仪器有限公司, 美国); X 射线衍射仪(Ultima IV, 株式会社理学公司, 日本); 台式低速冷冻离心机(TDL5M, 湖南赫西仪器装备有限公司, 中国); 二氧化碳细胞培养箱(HF-151, 上海力康仪器有限公司, 中国); 细胞计数仪(LUNA-IITM, Logos Biosystems 公司, 韩国); 激光共聚焦扫描显微镜(LSM 900 & Axio Imager M2, 卡尔蔡司光学有限公司, 德国); 生物显微镜(LEICA DM3000, 徕卡仪器有限公司, 德国)。

2) 主要试剂: GOx 剂购自 BBI 生命科学有限公司(上海, 中国); $CuCl_2$ 购自麦克林生化科技股份有限公司(上海, 中国); 盐酸(HCl)、三水合乙酸钠(CH_3COONa)和氯化钠(NaCl)购于国药集团化学试剂有限公司(上海, 中国)。本实验中使用的的人肝癌细胞(HUH7 细胞)购自普诺赛生命科技有限公司(武汉, 中国); DMEM 培养基、胰蛋白酶-EDTA (0.25%)和青霉素/链霉素(Penicillin/streptomycin, P/S)购自普诺赛生命科技有限公司(武汉, 中国); 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)购自普诺赛生命科技有限公司(武汉, 中国); 二甲基亚砜(DMSO)购于国药集团化学试剂有限公司(上海, 中国); Calcein AM/PI 活/死细胞双染试剂盒购自翌圣生物科技有限公司(上海, 中国); $1 \times$ PBS 缓冲液(0.01 M, pH 7.2~7.4)、活性氧检测试剂盒检测试剂盒购自索莱宝科技有限公司(北京, 中国); 实验所用试剂纯度均为分析纯, 无需进一步纯化即可使用。

2.2. 实验方法

1) 组装 Cu@GoxNM 将磷酸化线性模板 5 μ L (100 μ M)和引物 10 μ L (100 μ M)在 $1 \times$ T4 DNA 连接酶缓冲液中充分混合, 在 95 $^{\circ}$ C 下加热 5 分钟, 然后在 3 小时内逐渐冷却至 25 $^{\circ}$ C, 后进行滚环扩增反应, 包含环状模板 3 μ L (10 μ M)、dNTPs 5 μ L (10 mM)、GOx 2.5 μ L (16 mg/mL)和 2 μ L ϕ 29 DNA 聚合酶(10 U/ μ L)。后向反应体系中加入 2 μ L $CuCl_2$ 。在 25 $^{\circ}$ C 下进行 12 小时。孵育后, 将混合物在 65 $^{\circ}$ C 下处理 10 分钟(使 ϕ 29DP 失活)。通过离心收集后用双蒸馏 H_2O 冲洗三次, 离心沉淀, 然后保存在 4 $^{\circ}$ C 下备用。

2) 催化反应验证羟基自由基(-OH)的生成是通过 652 纳米波长处 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)吸光度的增加来测定的。在 96 孔板中, 将谷胱甘肽(GSH)与不同浓度的 Cu@GoxNM 与 $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ 缓冲溶液混合, 体系总体积为 100 μ L。然后将混合溶液在 37 $^{\circ}$ C 黑暗中振荡 30 分钟后测吸光度。

3) 细胞毒活实验利用 MTT 细胞增殖检测试剂盒检测 HUH7 细胞的存活率。将 HUH7 细胞以每孔 2×10^4 个的细胞密度接种在 96 孔板中, 置于含 5% CO_2 的细胞培养箱中 37 $^{\circ}$ C 孵育 12 h。向各处理孔中分别加入含有 PBS、和不同浓度的 Cu@GoxNM 细胞培养基, 并孵育 24 h。处理完毕后, 向各孔中加入 10 μ L MTT, 置于含 5% CO_2 的细胞培养箱中 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。随后, 弃去培养基, 加入 100 μ L DMSO 并振荡 15 min, 以溶解生成的甲瓏。在多功能微孔板酶标仪中测量各孔在 570 nm 波长处的吸光度, 以加药浓度为 0 的 PBS 处理孔为对照, 计算细胞存活率。

4) 细胞活性氧和活死双染实验

以 2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)作为活性氧(Reactive oxygen species, ROS)指示剂, 利用活性

氧检测试剂盒中检测 HUH7 细胞内 ROS 的生成效率。利用 Calcein-AM/PI 活细胞/死细胞双染试剂盒分析不同处理组的细胞存活情况。将 HUH7 细胞以每孔 3×10^5 个的细胞密度接种在共聚焦培养皿中, 药物处理后收集各个共聚焦培养皿中的所有细胞, 并用 Calcein AM/PI 工作液(含 2 mM Calcein-AM 和 1.5 mM PI 的 $1 \times$ Assay Buffer)加到细胞中, 对细胞进行染色 15 min 后, 用 PBS 洗涤细胞, 通过 CLSM 进行成像分析。

3. 结果

3.1. Cu@GoxNM 的合成与表征

采用扫描电子显微镜(SEM)对 Cu@GoxNM 的形貌进行表征, 如图 1 所示。可以观察到 Cu@GoxNM 平均直径约为 400 nm, DNA 纳米药物均表现出三维花瓣状结构, 且大小和分布都均匀, 表明将 GOx 和 Cu 的封装, 均不会引起 NFs 有太大的尺寸和形貌的变化。且模拟肿瘤微环境下的 pH 值, 通过不同的时间纳米药物开始裂解, 方便后续释放 Cu 和 GOx 来发挥化学动力学治疗作用。

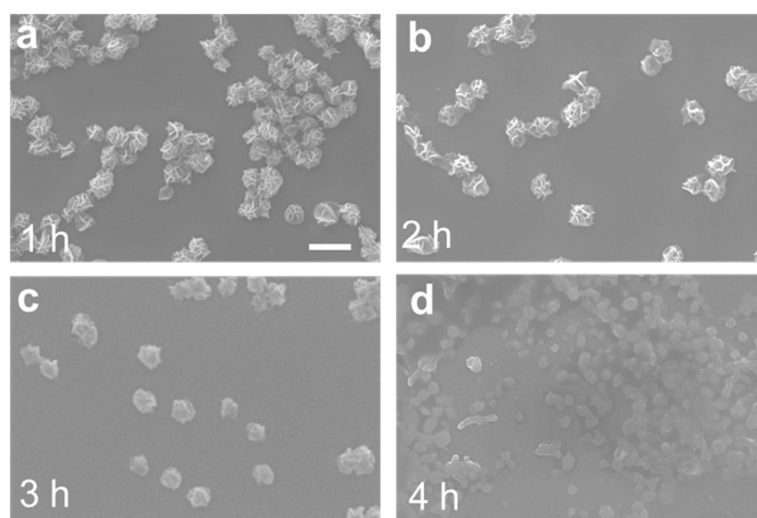


Figure 1. SEM images of Cu@GoxNM at pH 5.5 at different times (scale bar 1 μ m)
图 1. 不同时间在 pH 5.5 条件下的 Cu@GoxNM 的 SEM 图像(比例尺 1 μ m)

3.2. Cu@GoxNM 细胞外产生 \cdot OH 与其浓度成正比

通过测定 Cu@GoxNM 存在的条件下, 催化葡萄糖氧化 TMB 的动力学曲线探究 Cu@GoxNM 的催化活性。如图 2 所示, 葡萄糖模拟肿瘤细胞内高糖环境, 当纳米药物浓度较低时, 游离 GOx 和 Cu^{2+} 催化 TMB 氧化的速率较低, 将浓度逐渐升高则表现出越来越强的催化活性, 表明药物通过物理吸附和配位作用与 GOx、 Cu^{2+} 结合后, 在一定程度上增强了二者间的级联催化活性。基于铜离子类辣根过氧化物酶的性质, 在同时加入葡萄糖, TMB 和不同浓度 Cu@GoxNM 后, 铜离子可以在葡萄糖与 GOx 反应产生的过氧化氢的存在下有效催化 TMB 的氧化, 且产生的葡萄糖酸进一步加重肿瘤微环境中的酸性。 Cu^{2+} 也会与过氧化氢反应生成 \cdot OH 和 Cu^+ 同时也促进催化 TMB 的氧化。

3.3. Cu@GoxNM 对肝癌细胞的促凋亡作用

如图 3, 不同浓度纳米花处理的肿瘤细胞的存活率随着浓度增加逐渐降低, 这可能是由于消耗葡萄糖和 Cu^+ 生成可以形成级联反应能够促进 Cu@GoxNM 诱导芬顿反应生成活性氧, 为了证实内化的

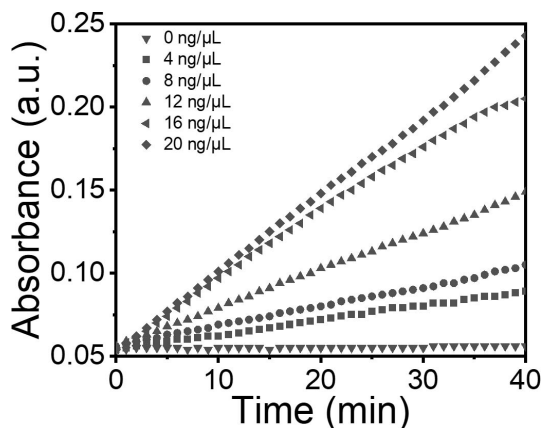


Figure 2. TMB dynamics curves after glucose reaction with different concentrations of Cu@GoxNM

图 2. 不同浓度 Cu@GoxNM 的葡萄糖反应后的 TMB 动力学曲线

Cu@GoxNM 可以通过类 Fenton 反应增加细胞内的 ROS, 使用氧化应激传感探针 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)研究了细胞内的活性氧水平(图 4)。将 Cu@GoxNM 与 HUH7 共培养 12 小时, 然后用 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)染色处理后的细胞, 用 CLSM 观察 ROS 信号。与对照组相比, Cu@GoxNM 的荧光信号更亮, 证实了·OH 生成。结果表明, 内化的 Cu@GoxNM 可催化细胞内葡萄糖和 H₂O₂ 转化为羟自由基, 从而降解纳米药物裂解并促进药物释放, 这充分证明了化学动力学疗法的效果。如图 5, 观察活细胞和死细胞的分布情况, 我们用 Cu@GoxNM 处理 HUH7 细胞 12 小时, 然后用钙黄绿素乙酰氧甲基酯(Calcein-AM)和碘化丙啶(PI)染色。将对照组和处理组细胞进行荧光标记, Calcein-AM 发绿色荧光(Ex = 490 nm, Em = 515 nm), 其能够轻易穿透活细胞膜, 一旦进入细胞后, Calcein-AM (本身不发荧光)被细胞内的酯酶剪切形成膜非渗透性的极性分子 Calcein, 从而被滞留在细胞内并发出强绿色荧光。碘化丙啶(Propidium iodide, PI)不能穿过活细胞的细胞膜, 仅能穿过死细胞膜的无序区域而到达细胞核, 并嵌入细胞的 DNA 双螺旋从而产生红色荧光(Ex = 535 nm, Em = 617 nm), 因此 PI 仅对死细胞染色。但 Calcein 和 PI-DNA 都可被 490 nm 激发, 因此可用荧光显微镜同时观察活细胞和死细胞。活细胞和死细胞分别被绿色和红色荧光染色, 该结果证明了用 PBS 处理的细胞生长良好, 而用活细胞和死细胞分别被绿色和红色荧光染色处理的细胞近 80% 的细胞死亡, 这是由葡萄糖消耗、·OH 生成的化学动力学疗法诱发的。

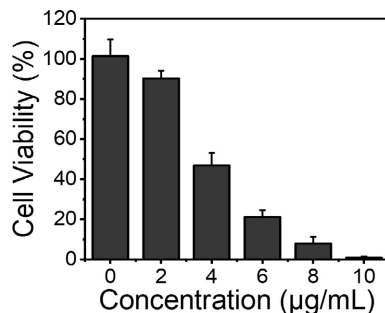


Figure 3. Viability of HUH7 cells after treatment with different concentrations of Cu@GoxNM

图 3. 经不同浓度的 Cu@GoxNM 处理后 HUH7 细胞的存活率

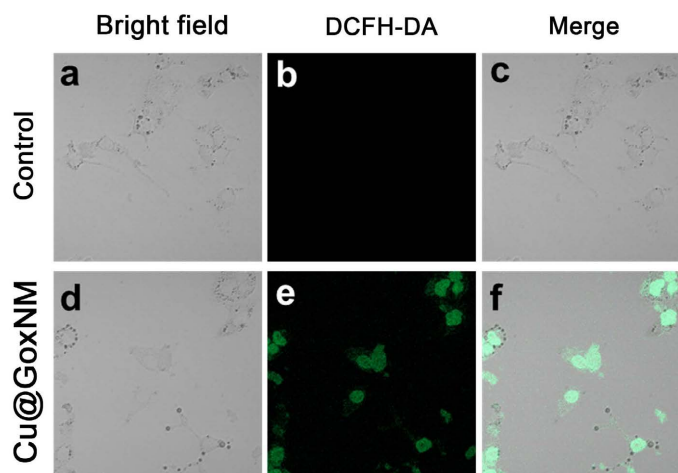


Figure 4. CLSM images of ROS production in HUH7 cells after different treatments by using DCFH-DA as a probe

图 4. 采用 DCFH-DA 作为探针检测经不同处理后 HUH7 细胞中生成 ROS 的 CLSM 图像

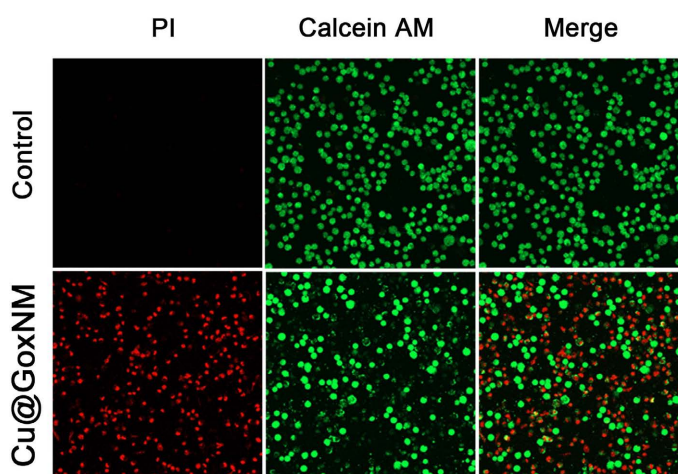


Figure 5. CLSM images of differently treated HUH7 cells subjected to Calcein-AM/PI colouring

图 5. 不同处理的 HUH7 细胞进行 Calcein-AM/PI 染色的 CLSM 图像

4. 讨论

肝癌是全球最常见的癌症死因,也是五大致命癌症中唯一一种发病率逐年上升的癌症[14]。肝癌的预后很差。只有 5%~15%的患者符合手术切除的条件,手术切除仅适用于早期患者,由于肝脏再生能力减弱,通常不伴有肝硬化;与左肝切除术相比,右肝切除术术后并发症的风险更高[15]。无论是目前的消融疗法还是化疗,都无法显著改善疾病的治疗效果,所以必须落脚于精准治疗,解决耐药和副作用一系列问题来辅助手术切除。

现阶段纳米药物(NM)广泛用于生物医学应用,它们具有独特的物理化学特征,包括较大的表面积与体积比、多种表面功能化可能性以及承载大量药物的能力,在此基础上可以与各种化疗药物结合以发挥作用。NM 利用病理生理学特性,尤其是长效渗透性和保留(EPR)效应,定位于目标部位。对癌症来说,由于血管通透性增加后加上淋巴引流受损,EPR 能够在静脉注射后在肿瘤中被动积聚[16] [17]。这种在病

理部位的优先积聚除了经典的 EPR 特征之外, 近几年被证明还依赖于跨血管内皮的主动转胞吞作用和作为储库的肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的保留[18], 在过去几十年中已被广泛用于诊断、治疗纳米药物的开发。且相关药物的开发也不拘泥于化疗药物的使用, 很多研究人员都研发出新型治疗方式, Wang 等人探索了一种基于酸性/光敏树突状细胞(DC)的新抗原纳米疫苗, 可将肿瘤免疫“冷”状态转变为“热”状态, 他们提到肝细胞癌(HCC)通常以免疫“冷”状态出现, 此后保护其免受肿瘤浸润淋巴细胞的溶细胞攻击, 导致对免疫治疗的反应不佳。所以用抗原纳米疫苗来重塑肿瘤相关中性粒细胞以增强抗癌免疫反应, 从而提高免疫治疗效率[19]。也有很多研究人员考虑治疗的想法是从改善化疗药物的耐药性, 通过逆转耐药反应来增强抗肿瘤的效果。Tian 的团队就考虑到索拉非尼介导的化疗是目前无法手术切除的 HCC 的首选, 可显著提高患者的生存率。然而, 其较差的水溶性限制了其生物利用度, 长期单次使用并不能达到令人满意的 HCC 治疗效果。于是他们利用新型级联铜基金属有机框架(MOF)治疗性纳米催化剂, 通过整合环氧合酶-2 (COX-2)抑制剂美洛昔康(Mel)和化疗药物索拉非尼(Sol)来扩增 HCC 治疗。这种纳米催化剂可以被 GSH 降解为类似芬顿的试剂, 从而触发 CDT。CDT 介导的细胞毒性活性氧(ROS)可通过积累脂质过氧化物(LPO)来激活铁死亡, 还会导致氧化应激扩增。属于联合了化疗和化学动力学疗法来进行治疗[20]。

本研究通过实验证明了 CDT 纳米药物的疗效优异, 由此可以引发很多创新, 比如与标志物结合观察药物在体内分布状况的同时可以用作诊断, 比如于疗效不佳的化疗药物结合, 通过相佐的作用来得到疗效互增的效果。

5. 结论

本研究成功制备了 Cu@GoxNM 纳米药物, 且 Cu@GoxNM 能明显促进肝癌细胞 HUH7 的凋亡, 通过实验验证是通过产生过量的活性氧达到了化学动力学疗法作用。

参考文献

- [1] Vogel, A., Meyer, T., Sapisochin, G., *et al.* (2022) Hepatocellular Carcinoma. *The Lancet*, **400**, 1345-1362. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01200-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01200-4)
- [2] Forner, A., Gilibert, M., Bruix, J., *et al.* (2014) Treatment of Intermediate-Stage Hepatocellular Carcinoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **11**, 525-535. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.122>
- [3] Wang, C., Zhang, Y.B. and Dong, Y.Z. (2021) Lipid Nanoparticle-mRNA Formulations for Therapeutic Applications. *Accounts of Chemical Research*, **54**, 4283-4293. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00550>
- [4] Chen, M.-L., John, M., Lee, S.L., *et al.* (2017) Development Considerations for Nanocrystal Drug Products. *The AAPS Journal*, **19**, 642-651. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0064-x>
- [5] Maeda, H. (2001) The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumor Vasculature: The Key Role of Tumor-Selective Macromolecular Drug Targeting. *Advances in Enzyme Regulation*, **41**, 189-207. [https://doi.org/10.1016/S0065-2571\(00\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2571(00)00013-3)
- [6] Maeda, H. (2017) Polymer Therapeutics and the EPR Effect. *Journal of Drug Targeting*, **25**, 781-785. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1365878>
- [7] Zhou, Q., Dong, C.Y., Fan, W.F., *et al.* (2020) Tumor Extravasation and Infiltration as Barriers of Nanomedicine for High Efficacy: The Current Status and Transcytosis Strategy. *Biomaterials*, **240**, Article ID: 119902. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119902>
- [8] Kim, B.-E., Nevitt, T. and Thiele, D.J. (2008) Mechanisms for Copper Acquisition, Distribution and Regulation. *Nature Chemical Biology*, **4**, 176-185. <https://doi.org/10.1038/nchembio.72>
- [9] Lutsenko, S. (2010) Human Copper Homeostasis: A Network of Interconnected Pathways. *Current Opinion in Chemical Biology*, **14**, 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.01.003>
- [10] Liang, S., Deng, X.R., Chang, Y., *et al.* (2019) Intelligent Hollow Pt-CuS Janus Architecture for Synergistic Catalysis-Enhanced Sonodynamic and Photothermal Cancer Therapy. *Nano Letters*, **19**, 4134-4145. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b01595>
- [11] Min, H., Wang, J., Qi, Y.Q., *et al.* (2019) Biomimetic Metal-Organic Framework Nanoparticles for Cooperative Com-

- bination of Antiangiogenesis and Photodynamic Therapy for Enhanced Efficacy. *Advanced Materials*, **31**, E1808200. <https://doi.org/10.1002/adma.201808200>
- [12] Lin, L.-S., Huang, T., Song, J.B., *et al.* (2019) Synthesis of Copper Peroxide Nanodots for H₂O₂ Self-Supplying Chemodynamic Therapy. *Journal of the American Chemical Society*, **141**, 9937-9945. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b03457>
- [13] Chen, Q., Chen, J.W., Yang, Z.J., *et al.* (2019) Nanoparticle-Enhanced Radiotherapy to Trigger Robust Cancer Immunotherapy. *Advanced Materials*, **31**, E1802228. <https://doi.org/10.1002/adma.201802228>
- [14] Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2019) Cancer Statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **69**, 7-34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- [15] Soerjomataram, I., Oomen, D., Lemmens, V., *et al.* (2010) Increased Consumption of Fruit and Vegetables and Future Cancer Incidence in Selected European Countries. *European Journal of Cancer*, **46**, 2563-2580. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.07.026>
- [16] Matsumura, Y. and Maeda, H. (1986) A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Research*, **46**, 6387-6392.
- [17] Fang, J., Sawa, T. and Maeda, H. (2003) Factors and Mechanism of “EPR” Effect and the Enhanced Antitumor Effects of Macromolecular Drugs Including SMANCS. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **519**, 29-49. https://doi.org/10.1007/0-306-47932-X_2
- [18] Miller, M.A., Zheng, Y.-R., Gadde, S., *et al.* (2015) Tumour-Associated Macrophages Act as a Slow-Release Reservoir of Nano-Therapeutic Pt(IV) Pro-Drug. *Nature Communications*, **6**, Article No. 8692. <https://doi.org/10.1038/ncomms9692>
- [19] Wang, Y.H., Zhao, Q.F., Zhao, B.Y., *et al.* (2022) Remodeling Tumor-Associated Neutrophils to Enhance Dendritic Cell-Based HCC Neoantigen Nano-Vaccine Efficiency. *Advanced Science (Weinh)*, **9**, E2105631. <https://doi.org/10.1002/adv.202105631>
- [20] Tian, H.L., Zhao, S., Nice, E.C., *et al.* (2022) A Cascaded Copper-Based Nanocatalyst by Modulating Glutathione and Cyclooxygenase-2 for Hepatocellular Carcinoma Therapy. *Journal of Colloid and Interface Science*, **607**, 1516-1526. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.09.049>