



# 细胞表面工程的策略及应用

黄裕乔<sup>1,2</sup>, 王本<sup>1,2,3\*</sup>

1. 浙江大学医学院附属第二医院, 杭州 310009;

2. 浙江大学转化医学研究院, 杭州 310029;

3. 浙江大学癌症研究院, 杭州 310058

\* 联系人, E-mail: benwang@zju.edu.cn

收稿日期: 2022-04-13; 接受日期: 2022-08-25; 网络版发表日期: 2022-12-05

**摘要** 操纵细胞一直以来都是科研人员梦寐以求的事, 细胞表面工程的崛起为细胞操纵提供了许多简单且高效的表面修饰策略. 细胞膜是一个极其复杂的分子环境, 膜上丰富的化学成分调节着细胞内外发生的各种生化过程. 通过各种策略引入外源型物质来修饰细胞膜, 改变细胞膜的组成成分, 就可以影响细胞的行为和命运. 然而这些策略或多或少存在着一定限制, 需要根据特定的应用场景选择合适的策略. 本文介绍了哺乳动物细胞膜修饰的几种策略, 并展示了这些策略的医学应用.

**关键词** 细胞表面工程, 输血, 移植医学, 肿瘤钙化

细胞膜是细胞内在的细胞器与外界环境的屏障, 它最基本的作用就是保持内环境的稳态, 确保胞内的各种生化反应有序进行. 除此之外, 细胞膜还具有物质运输、能量传递、细胞识别、信息传递、酶促反应等功能, 与细胞黏附、分裂、分化、凋亡、坏死等细胞行为息息相关. 这些功能的实现都依赖于细胞膜的结构和各种功能分子. 科研工作者利用化学、生物学手段在细胞膜表面引入外源性小分子或材料大分子来改变细胞膜的结构, 产生具有新功能的基团, 从而调控细胞的行为和命运, 这就是细胞表面工程.

众所周知, 细胞膜的基本骨架是由磷脂、胆固醇、糖脂构成的可流动脂质双分子层, 蛋白质呈不对称性镶嵌分布在脂双层中, 细胞膜的表面还有丰富的聚糖链. 如此丰富的体系带来了许多可操作的空间: 膜上存在着广泛的反应性官能团, 包括胺、硫醇和羰

基, 为外源分子的共价修饰提供了巨大的机会; 磷脂双分子层的结构允许外源型分子通过疏水作用插入细胞膜上, 或者通过静电相互作用沉积在细胞表面; 特定构象的蛋白和多肽形成的受体和配体也赋予了外源型物质特异结合的能力. 目前, 细胞膜修饰策略主要有化学共价交联<sup>[1]</sup>、疏水插膜修饰<sup>[2]</sup>、静电吸附沉积<sup>[3]</sup>、受体配体结合<sup>[4]</sup>、基因工程<sup>[5]</sup>、代谢糖工程<sup>[6,7]</sup>等. 这些策略在不同的应用中各有优势, 展现出了广阔的发展前景, 并且还产生了多种策略的组合应用以达到更强大的细胞修饰功能.

细胞表面工程带来的潜在进展包括输血、干细胞移植、肿瘤治疗、细胞膜成像、胰岛移植、药物的靶向递送、细胞外环境的监测等, 生物医学的各个角落都能找到细胞表面工程方法的影子, 本文着重介绍了领域进展、医学应用和本团队的研究成果.

引用格式: 黄裕乔, 王本. 细胞表面工程的策略及应用. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 1749–1762

Huang Y, Wang B. Strategies and applications of cell surface engineering (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 1749–1762, doi: 10.1360/SSV-2022-0067

# 1 细胞表面修饰的策略

## 1.1 静电吸附沉积

在生理条件下, 细胞膜表面往往带负电荷, Zeta电位为19~32 mV, 这是由于细胞膜成分中富含一些能够提供净负电荷的基团, 如膜磷脂(磷脂酰丝氨酸)的带负电头部基团、膜糖胺聚糖中的唾液酸等<sup>[8]</sup>. 在相对高浓度的带正电基质中培养时, 细胞膜表面会吸附带正电基质, 膜表面电荷中和甚至反转, 在离心和洗涤后产生稳定的纳米涂层, 并允许这层新的带正电的分子层吸引负电荷基质来形成第二层分子层. 通过在聚阳离子和聚阴离子溶液中连续培养, 表面电荷不断交替, 形成了纳米涂层的层层自组装(layer-by-layer assembly, LbL)沉积, 其组成、层数和厚度可以根据需要来调整. 此外, 还可以在纳米层的最外层引入各种功能基团以达到功能修饰的目标. 常用的聚电解质有聚赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)、聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)和聚二甲基二烯丙基氯化铵(poly dimethyl diallyl ammonium chloride, PDDA)等. 通过静电逐层自组装在细胞表面沉积聚电解质和矿物质是细胞纳米封装最广泛使用的方法之一. 例如, Zhi等人<sup>[9]</sup>将胰岛素瘤MIN6 $\beta$ 细胞自聚集形成假胰岛样细胞团, 然后在带阳离子的壳聚糖和带阴离子的海藻酸盐溶液中交替自组装形成多层纳米膜, 最后在最外层沉积磷酸胆碱(phosphorylcholine, PC)修饰的硫酸化糖胺聚糖以增加生物相容性. 这种包封方法不会损伤细胞结构, 能够有效排斥免疫抗体大分子, 并且允许被包封细胞释放胰岛素而不受影响. Yang等人<sup>[10]</sup>将带有弱正电荷的A型明胶(gelatin-A, GL-A)与乙二胺偶联制备了阳离子明胶, 与带有负电荷的B型阴离子明胶(gelatin-B, GL-B)通过静电自组装在细胞表面形成了GL-A/GL-B双层纳米膜, 然后在最外层引入GL-B-4臂-PEG-硫醇(polyethylene glycol, PEG), 通过巯基马来酰亚胺点击反应与8臂-PEG-马来酰亚胺交联. 这种方法能够实现包封细胞的长期保存, 有效防止外部实体渗透和抵抗高物理应力, 还可以通过使用谷胱甘肽还原二硫键-硫醚键, 脱下PEG外壳, 使明胶纳米层逐渐降解, 实现纳米壳的按需降解.

## 1.2 疏水插膜修饰

组成细胞膜的磷脂分子是两亲性的, 它们以疏水

性尾部相对, 极性头部朝向水相, 形成磷脂双分子层. 利用疏水相互作用, 一些亲脂分子或两亲性分子如磷脂、胆固醇、烷基链可以很容易地插入到细胞膜内, 将外源性功能基团(荧光分子、抗体、核酸适体、酶、糖链、纳米颗粒等)与疏水端相连, 就可以在细胞膜上实现各种功能性修饰, 具有低毒、锚定迅速、适用范围广等优点. 其不足之处在于插入目标的稳定性较差, 可能被细胞内吞或者从膜上脱落. Ma等人<sup>[11]</sup>设计了一种两亲性嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)配体分子: 疏水性的双烷基链与亲水性的PEG以及功能配体分子组成三组分体系. 该分子能够通过疏水作用搭载白蛋白进入淋巴结, 随后插入到淋巴结常驻抗原呈递细胞的膜上, 与天然的细胞因子共刺激分子一起作用于CAR-T细胞, 从而在天然的淋巴结微环境中促进T细胞的活化和扩增. 在多种免疫活性小鼠肿瘤模型中, 两亲性配体增强触发了大量CAR-T细胞扩增, 增加了供体细胞的多功能性, 增强了抗肿瘤效果. 这里展示了两亲性配体的双重性质: 淋巴结靶向性和膜插入修饰(图1).

## 1.3 化学共价交联修饰

将外源型物质经过化学共价交联的方式与细胞膜上固有的官能团相连也是一种重要的细胞表面工程策略. 相对于物理相互作用, 共价修饰可提供更稳定和持久的结合能力; 与基因工程相比, 其是一种简单直接的细胞膜工程解决方案. 其缺点是一般缺乏特异性, 可能会影响细胞的形态和功能并诱导细胞凋亡. 细胞表面是一个非均质性和动态的环境, 呈现出可用于大分子共轭的不同官能团, 其中最常见的官能团是氨基. 氨基主要存在于赖氨酸残基中, 可以与三聚氯氰基团或者N-羟基琥珀酰亚胺酯(N-hydroxy succinimide, NHS)反应, 从而与外源性的大分子连接. 例如, Lou等人<sup>[12]</sup>开发了一种含肝素的PEG纳米膜来包裹胰岛, 将肝素与NHS偶联后再与八臂PEG-NH<sub>2</sub>共价连接形成PEG纳米膜, 再通过NHS与胰岛表面膜的氨基共价结合. 该涂层对培养的胰岛体积影响最小, 不影响胰岛的活力和分泌功能, 减弱了血液介导的炎症反应, 同时促进胰岛在促炎环境下存活. 此外, 巯基也是一个常用于共价修饰的官能团, 主要存在于半胱氨酸的残基中. 巯基最常见的反应是与马来酰亚胺基反应生成硫醚键. 例如, Li等人<sup>[13]</sup>用温和还原剂三(2-羧乙基)膦(Tris(2-

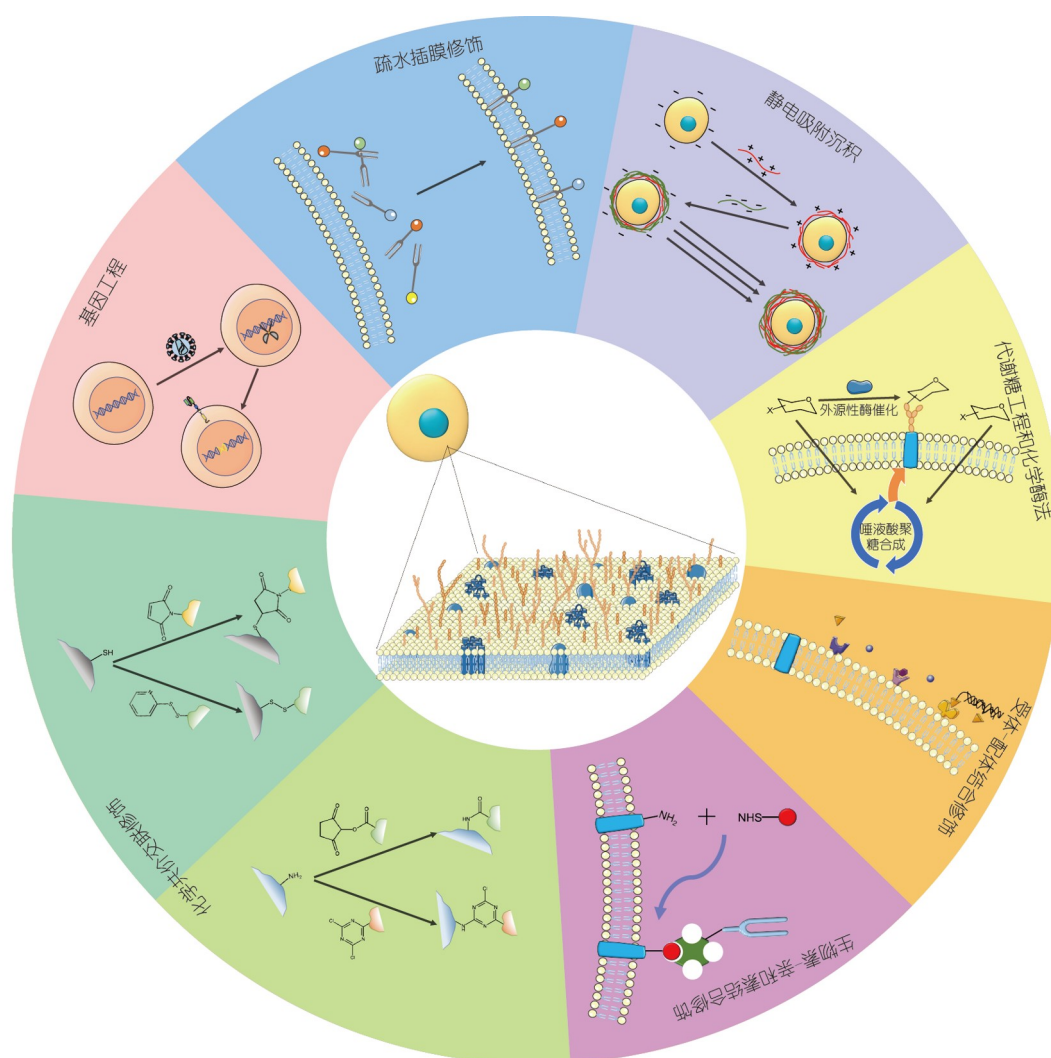


图 1 细胞表面工程的常见策略示意图

Figure 1 Schematic diagram of common strategies for cell surface engineering

carboxyethyl)phosphine, TCEP)将膜蛋白的二硫化物还原为活性硫醇,使细胞膜上暴露出更多的巯基反应位点.然后通过巯基-马来酰亚胺结合引入DNA桥复合模板银纳米簇(DNA bridge complex-templated silver nanoclusters, DNA bridge-AgNCs)进行信号标记,通过追踪标记的AgNCs的电化学响应,可以反映靶细胞的定性和定量信息.

#### 1.4 基因工程

用编码新蛋白的基因转染细胞是一种直接的细胞表面工程策略,也可以通过基因敲除的方式消除细胞

膜表面特定分子的表达来达到操控细胞行为的目的.相对于其他几种膜表面修饰策略,经过基因工程修饰的细胞膜是最为稳定持久的.其不足之处在于基因转染的复杂性、效率问题及临床安全问题.在真核细胞中,可以通过将编码感兴趣的蛋白质表位的基因附加到编码适当的先导序列和跨膜结构域的基因上来完成.例如, Rieder等人<sup>[14]</sup>在早期首先利用这种技术在真核细胞表面表达由病毒结合抗体和膜相关分子ICAM-1组成的融合蛋白.该表位作为一种新的细胞表面受体,赋予宿主细胞选择性感感染口蹄疫病毒的能力.近年来不断发展的CAR-T细胞过继疗法也是一种典型的

利用基因操纵来修饰细胞表面的策略。来自患者血液的T细胞在体外被工程化,以表达针对特定肿瘤抗原的人工受体。利用基因转染使T细胞膜表面表达类似T细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)的分子,即嵌合抗原受体,能够特异地识别肿瘤相关抗原如CD19,经体外扩增后回输到患者体内,达到靶向杀伤CD19高表达肿瘤细胞的目的。随着基因编辑技术的不断发展和对CAR分子的不完善,近年来CAR分子的结构也不断发展。CAR分子由胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域组成。胞外结构域由抗体重链可变区和轻链可变区连接而成的单链抗体(single chain antibody fragment, scFv)组成;胞内结构域由可介导TCR活化信号转导的CD3 $\zeta$ 结构域组成,并含有1个或2个共刺激结构域如CD28, 4-1BB, CD27等,可增强细胞的增殖、持久性和有效性。在这基础之上,也有将编码免疫调节的细胞因子如白介素12的基因融合到CAR-T细胞之上的第四代CAR。表达CAR的T细胞的优势在于可以特异性识别抗原分子,不涉及MHC限制性,胞内域连接有共刺激分子,介导T细胞的活化,促进T细胞的增殖和细胞因子的释放,能够在宿主体内长期存活并不断发挥作用。目前,越来越多的CAR构建方案涌现,如双特异性CAR、串联CAR、抑制性CAR、通用型CAR、CRISPR编辑CAR等,为肿瘤患者提供了进一步治疗的希望,有着广阔的发展空间<sup>[15-17]</sup>。

### 1.5 代谢糖工程和化学酶法

在细胞膜表面引入非天然的化学反应基团能够达到选择性修饰细胞膜的目的,是对细胞膜直接共价修饰的极大补充。利用基因工程可以引入肽和蛋白质表位,而低聚糖表位的引入则依赖于代谢糖工程和化学酶法。细胞表面有丰富多样的聚糖链,唾液酸通常位于聚糖链的最末端,是代谢糖工程的理想位点。参与唾液酸聚糖生物合成的酶对于底物具有混杂性,无法准确区分一些经过细微化学修饰的非天然唾液酸类似物<sup>[18]</sup>。利用这种特性,可以将外源性的功能基团通过糖代谢途径引入细胞表面唾液酸,该技术被称为代谢低聚糖工程,并常常与生物正交标记方法联合使用。生物正交化学报告基团是一种生物惰性的官能团,通过代谢糖工程表达在聚糖链末端后,可以在生物系统中与互补官能团发生选择性反应,具有效率高和低细胞毒性的特点,使各种功能(如成像探针和亲和标签

的安装)成为可能。此外,还可以通过靶向运输非天然糖,实现对特定细胞的选择性糖代谢工程修饰。例如,Xie等人<sup>[19]</sup>利用包封在配体靶向脂质体中的叠氮多糖开发了一种细胞特异性代谢聚糖标记策略。配体设计用于结合表达特定受体的靶细胞,介导叠氮多糖的细胞内递送。靶向递送的叠氮多糖代谢并入细胞表面聚糖链,然后通过生物正交反应成像。

除了通过代谢糖工程的方法标记细胞表面聚糖外,还可以利用外源性的糖基转移酶,将带有功能基团的非天然糖标记到细胞表面的糖链上,这就是化学酶法标记。化学酶法可以结合生物正交反应实现多种功能分子的修饰;也有可能直接引入大分子功能基团。例如,Li等人<sup>[20]</sup>发现一种岩藻糖基转移酶具有很强的底物兼容性,能够将与IgG抗体相连的底物GDP-岩藻糖转移到细胞膜表面的糖链上。这种方法不需要基因修饰、速度快、生物相容性好、对细胞内源性功能干扰小,应用这种方法构建的抗体-细胞结合物表现出特异性肿瘤细胞靶向性和更强的杀伤能力。

### 1.6 其他非共价连接修饰策略

除了以上几种细胞表面修饰策略,还有一些常见的非共价连接作用被应用于细胞表面工程。常见的有生物素-亲合素系统、受体-配体作用、抗原-抗体作用等。生物素是一种水溶性B族维生素,与四聚体蛋白亲和素紧密结合,是目前已知的强度最高的非共价作用,以生物素和亲合素为末端的连接体被设计用于提供多种可用于功能化的小分子、聚合物或蛋白质。生物素活化后可与细胞膜上的生物大分子偶联,随后亲合素偶联物便能引入到细胞膜上<sup>[21]</sup>。

受体-配体相互作用被广泛用于外源型大分子材料的靶向递送<sup>[22]</sup>。例如,肿瘤细胞上高表达的叶酸受体、转铁蛋白受体、表皮生长因子受体等。受体靶向递送的分子可能被细胞摄取而内化,也有可能停留在细胞表面,这取决于外源性分子的结构性质。

抗原-抗体作用通过抗体分子对特定抗原的特异性亲和力,可以将抗体-材料复合物定向迁移至靶细胞。例如,Sakai等人<sup>[23]</sup>使用抗人CD326抗体结合辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP),可以将HRP选择性地结合到人肝癌细胞系HepG2细胞膜上,在HepG2细胞和10T1/2细胞的混合物中选择性地将HepG2细胞包裹在海藻酸钠基水凝胶鞘中;也可以通

过与细胞上的靶点特异性结合来阻断细胞信号通路<sup>[24]</sup>, 干扰信号转导途径, 调节参与癌细胞增殖的原癌基因, 如临床上广泛使用的曲妥珠单抗(抗ERBB2, 赫赛汀)、贝伐单抗(抗VEGF, 阿瓦斯丁), 在这种情况下, 活性分子同时起着靶向配体和药物的作用; 还可以介导免疫细胞与肿瘤细胞的结合, 如2014年获美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市的博纳吐, 是一种针对CD19/CD3的双特异性抗体, 两条抗原结合臂分别与T细胞上的CD3分子和肿瘤细胞的CD19分子特异性结合, 激活T细胞定向杀伤肿瘤细胞<sup>[25]</sup>。

## 2 细胞表面工程的主要应用领域

### 2.1 细胞表面工程应用于输血医学

红细胞血型指红细胞表面由遗传所决定的个体抗原差异, 是由红细胞表面某些可遗传的糖蛋白及糖链构成的抗原决定的, 包括ABO, Rh, MN, P, Kell, Lewis, Duffy, Kidd等血型。血型不匹配是输血中的一个关键问题, 易引发严重的溶血反应而危及患者的生命安全。构建通用型红细胞有利于解决稀有血型资源短缺, 实现血液资源的合理分配, 对于国家医疗卫生建设具有战略意义。

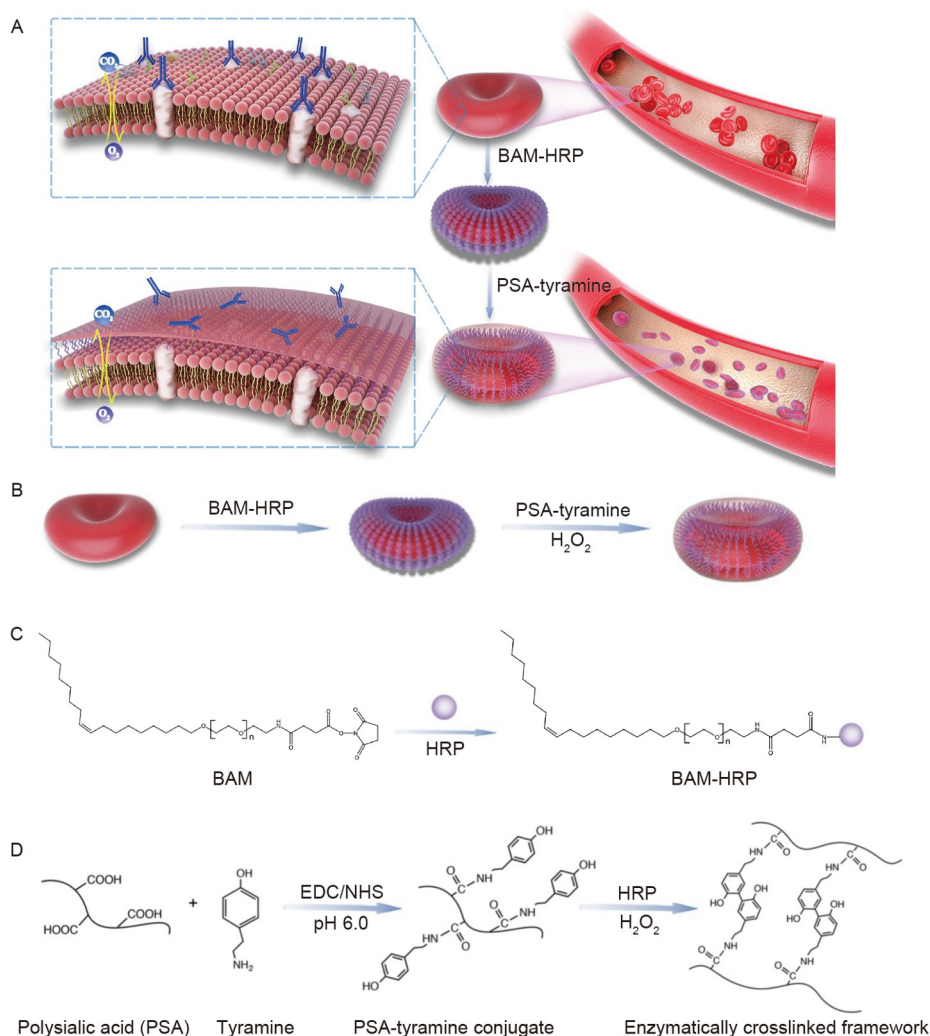
已经有多种方法用于通用型红细胞的构建。最先提出的是酶法切割血型ABO抗原以制备通用型红细胞。例如, Liu等人<sup>[26]</sup>在细菌中发现两种糖苷酶家族, 含有 $\alpha$ -N-乙酰半乳糖苷酶和 $\alpha$ -半乳糖苷酶, 具有中性pH最优活性和对底物的高转化效率, 可以分别切割红细胞A型抗原和B型抗原以产生人工制备的“O”型万能血。

高分子化学材料也被用于红细胞膜的修饰以遮蔽抗原, 如聚乙二醇、海藻酸钠、壳聚糖、多聚赖氨酸等<sup>[27-30]</sup>。几种甲氧基聚乙二醇(methoxy polyethylene glycol, mPEG)的反应性衍生物已被用于将mPEG共价修饰到红细胞表面。用三聚氯氰活化后的PEG可以与细胞膜蛋白的赖氨酸残基相连, 形成的PEG涂层可以在红细胞表面形成一个保护性的亲水性外壳。三聚氯氰作为偶联剂的优势包括其化学性质的延展性、膜蛋白修饰的有效性以及修饰蛋白的化学稳定性。形成的PEG外壳可以排斥大分子, 如抗体, 但似乎不抑制小分子的通过, 如葡萄糖和氧气。由PEG衍生物修饰在红细胞上的“分子刷”能够大幅度减弱抗原识别<sup>[31]</sup>。

Scott和Chen<sup>[32]</sup>报道了利用聚合物进行细胞工程的首批实例之一, 其中红细胞被甲氧基聚乙二醇(mPEG)包裹。该策略用于通过减少抗体与细胞表面受体的结合, 屏蔽免疫系统识别。红细胞周围PEG链的存在所提供的免疫伪装不仅在体外有效, 在体内也有效。将经mPEG修饰的绵羊红细胞输注于小鼠体内, 证明其体内存活率正常, 且无免疫原性。该策略有助于在自身免疫性溶血病患者或严重创伤患者中预防输血免疫反应。

尽管如此, 这些方案或多或少还存在着进步的空间。比如酶法切除抗原对于ABO血型转化很有效, 但对于RhD抗原却无能为力, 过多的RhD抗原切除会导致细胞膜的解体<sup>[33]</sup>。使用PEG衍生物的伪装修饰可以减弱抗原识别但效果并不完全, 仍能引起一定程度的免疫反应, 并且PEG本身可能具有免疫原性<sup>[34]</sup>。

本研究团队开发了一种细胞膜锚定的三维交联凝胶框架, 在屏蔽红细胞表面RhD抗原的同时能够维持细胞膜较好的流动性和稳定性<sup>[35]</sup>(图2A, B)。首先使用类磷脂的生物相容性的锚定分子(biocompatible anchor molecule, BAM)和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)的结合物将HRP锚定在细胞表面。如图2C所示, BAM是一种高生物相容性的与聚乙二醇偶联的单油基链衍生物, 能够插入到细胞膜的磷脂双分子层中。然后通过固定在细胞表面的辣根过氧化物酶催化 $H_2O_2$ 反应, 将聚唾液酸(polysialic acid, PSA)-酪胺共轭物构建成为凝胶网络框架来包绕整个细胞(图2D)。这种策略利用了细胞膜中磷脂分子的亲疏水组装特性, 将外源性酶分子引入到细胞膜上, 从而在细胞膜上直接催化合成反应, 形成包裹细胞的凝胶框架。整个反应过程简单方便、反应条件温和、对细胞毒性小。由于反应形成的3D凝胶层漂浮在细胞膜表面, 所以不会像PEG衍生物修饰那样造成细胞膜的固化而影响红细胞的膜流动性和功能。除此之外, 有报道细胞能够通过细胞膜上唾液酸糖聚物介导免疫逃避, 表明含有唾液酸成分的凝胶网络具有抑制免疫识别, 保持红细胞体内长循环特性的作用<sup>[36-38]</sup>。实验结果显示, 经过凝胶包裹的工程化红细胞在循环系统中具有较长的循环时间, 呈现出与天然红细胞相似的理化性质, 具有优异的RhD抗原屏蔽效果, 并且在小鼠和兔子动物模型中获得成功。这一工作为构建通用血型红细胞, 应对稀有血型输血难题提供了新方法。



**图 2** 三维锚定凝胶框架屏蔽红细胞表面RhD抗原。A: 表面锚定凝胶框架的红细胞实现抗原屏蔽效果示意图。B: 红细胞表面三维锚定凝胶合成示意图。C: 锚定分子共轭物(BAM-HRP)的合成方案。D: PSA-酪胺络合物和酶促交联骨架的形成机理

**Figure 2** Three-dimensional anchored gel framework shelters the epitopes on RhD-positive RBCs. A: RBC-surface anchoring gel framework to shield antigen. B: Schematic illustration of the procedure for RBC surface engineering. C: Synthetic scheme for the anchor molecule (BAM-HRP). D: Mechanism of the formation of PSA-tyramine conjugation and enzymatically crosslinked framework

## 2.2 细胞表面工程用于干细胞移植治疗心肌梗死

干细胞移植是心肌梗死<sup>[39]</sup>、脊髓损伤<sup>[40]</sup>、糖尿病<sup>[41]</sup>等疾病的一种新兴治疗方式。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)来源广泛、易增殖,可用于自体移植,是干细胞治疗的主要细胞类型。临床试验结果表明,骨髓间充质干细胞移植治疗是安全可行的,可以修复损伤,减少心肌梗死的面积<sup>[42]</sup>。然而,由于移植部位恶劣的细胞环境的影响,大多数细胞在移植一周后死亡,大大限制了干细胞移植的有效性<sup>[43]</sup>。因此,迫切需要开发新的细胞处理方式提高干细胞对

恶劣环境的适应能力。

已经开发的干细胞处理手段包括药物预处理<sup>[44,45]</sup>、联合用药<sup>[46,47]</sup>、基因修饰<sup>[48,49]</sup>、改善衰老MSC<sup>[50,51]</sup>、生物材料封装<sup>[52,53]</sup>等,通过多种机制影响干细胞移植后的存活率,显著改善了心肌梗死的治疗效果。在这里着重介绍生物材料封装干细胞这一新型策略的进展情况。

组织工程学为干细胞移植治疗组织损伤提供了很多可能性。利用纤维蛋白、胶原蛋白、海藻酸盐和明胶等天然高分子材料包裹干细胞能够改善干细胞的移

植疗效。因为可注射水凝胶具有多孔的三维空间结构, 以及天然高分子材料对细胞的黏附作用, 有利于干细胞的黏附、生长、分化、迁移。它可以作为细胞载体模拟细胞外基质环境, 连接伤口损伤区域; 还能保护细胞免受恶劣的炎症环境的影响, 抑制细胞凋亡, 提高移植细胞存活率。然而可注射水凝胶也存在着问题: 充满细胞的可注射水凝胶通过注射器和喷嘴系统时, 由于凝胶的黏度和注射的速度而产生的剪切应力会影响封装细胞的功能和生存能力<sup>[54]</sup>。

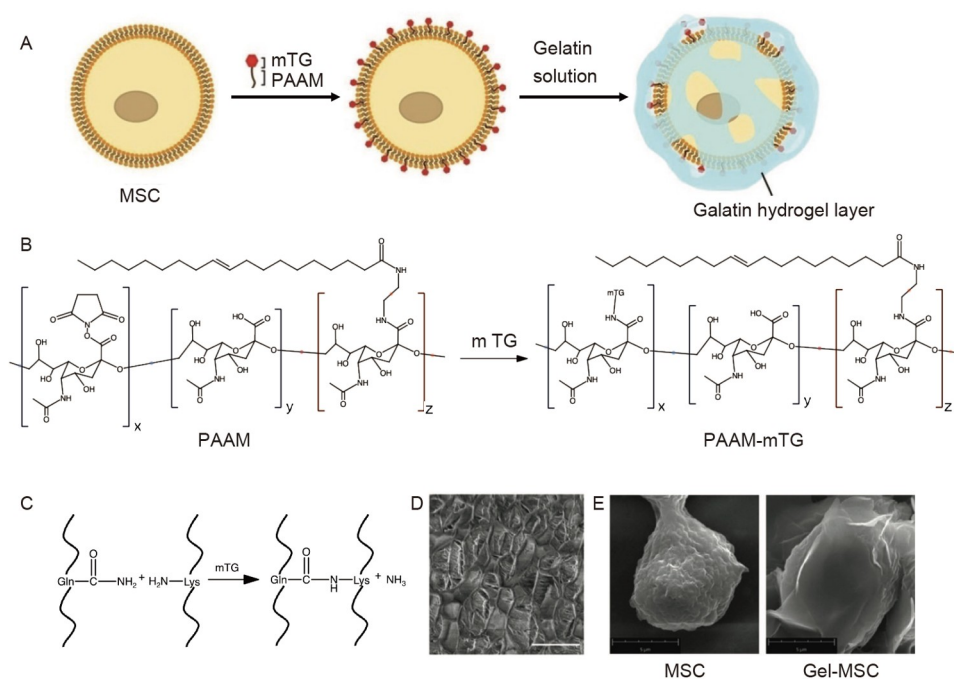
将干细胞封装在生物相容性保护壳内与外界环境隔离开来, 也能够保护细胞免受恶劣环境的影响。单细胞封装领域在过去数十年发展迅速。封装对象从死细胞发展到活细菌、酵母, 直至应用于干细胞、红细胞等; 封装材料涵盖了聚电解质、矿物壳和超分子金属有机复合物等; 封装方式包括微囊化和纳米涂层。对于干细胞来说, 封装的材料种类和保护壳的厚度非常重要。黏附的哺乳动物细胞需要来自其细胞外基质的结构支持和生化信号才能生存和发挥功能。细胞黏附序列如整合素, 启动细胞内信号级联, 调节黏附细胞的形态、存活、迁移、增殖和分化。因此, 黏附的哺乳动物细胞(尤其是MSC)在悬浮状态下经历的首要压力是缺乏基质支持, 最终导致称为失巢凋亡的细胞凋亡<sup>[55,56]</sup>。在组织工程和再生医学应用(如3D生物打印和细胞移植治疗)中, 失巢凋亡导致的细胞存活率降低是目前一个关键的限制因素。单个哺乳动物细胞的封装被认为是为悬浮细胞提供基质支持的有效方法。将细胞封装在天然细胞外基质成分(如纤维黏连蛋白、层黏连蛋白、胶原蛋白/明胶和透明质酸)中, 可提供固有的细胞识别信号, 提高涂层细胞的存活率。保护壳的厚度对干细胞移植后的分化增殖至关重要。微囊化提供了大量体积允许细胞增殖和细胞簇的形成, 但由于氧和营养物质穿透微囊有限导致中心细胞的供应不足, 最终导致整个细胞簇的饥饿和营养不良<sup>[57]</sup>。采用纳米涂层的方法可以避免营养物质供应的问题, 并且在维持细胞活力和临床应用功能方面更为有利。

Guerzoni等人<sup>[58]</sup>将LbL纳米沉积与微流体技术结合起来, 制备了含有纳米膜沉积细胞的可注射水凝胶。纤维黏连蛋白和明胶连续沉积在诱导多能干细胞分化的心肌细胞膜上, 形成细胞外基质样包裹, 增强了细胞抗机械力性能, 通过细胞膜上的整合素受体以及细胞外基质的相互作用加强了细胞-细胞相互作用, 提高了

细胞的存活率。随后将纳米膜沉积的细胞通过微流体技术封装到PEG水凝胶中, 形成可注射水凝胶。PEG水凝胶以星形PEG乙烯基砒作为聚合物主链, 含有基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)敏感序列的双半胱氨酸肽用作交联剂, 能够实现按需生物降解。在14天的时间过程中, 当细胞被ECM纳米膜包裹时, 可以观察到心脏小组织更强的搏动, 在第10天达到60搏/分钟的自然搏动频率, 比无包裹细胞增加两倍。

然而, 在细胞表面静电沉积纳米薄膜的合成过程会损伤细胞本身, 天然聚阳离子的对细胞具有一定毒性, 这些方面都对静电沉积纳米薄膜的应用造成了限制。在聚阳离子沉积过程中, 正电荷的不断累积对带负电的细胞膜造成破坏, 细胞膜的脆弱性增加, 进一步增加了细胞对离心力的敏感性, 显著降低了细胞的生存能力。因此, 在细胞纳米封装过程中, 需要开发出具有温和反应条件的方法来保护哺乳动物细胞极薄和脆弱的膜。

本研究团队<sup>[59]</sup>成功开发出一种细胞表面锚定纳米凝胶层, 这种生物相容性凝胶层赋予了移植干细胞抗炎应激能力, 提高干细胞活性和存活率, 避免干细胞失巢凋亡, 并且不影响干细胞的增殖(图3A)。首先将一条油基链接枝到唾液酸分子上, 生成用于细胞膜表面锚定的聚唾液酸膜锚定分子(polysialic acid anchor for cell membranes, PAAM); 然后在N-羟基琥珀酰亚胺存在下, 将PAAM与微生物谷氨酰胺转氨酶(microbial transglutaminase, mTG)连接以形成PAAM-mTG分子(图3B); 将PAAM插入细胞膜脂双层后, mTG部分暴露在外表面, 催化相邻明胶分子的交联, 形成明胶纳米层(图3C)。扫描电子显微镜和透射电子显微镜显示, 聚合纳米凝胶在单个MSC上以块状和涂层形式形成(图3D)。干细胞表面的纳米水凝胶层能阻断细胞凋亡因子比如肿瘤坏死因子(TNF $\alpha$ )与其受体的结合, 维持线粒体的结构完整性, 还能够模仿细胞外基质, 提供细胞黏附识别信号, 发挥抗“失巢凋亡”的作用; 同时, 细胞表面锚定凝胶并不改变干细胞的旁分泌功能。用细胞表面锚定凝胶修饰的MSCs移植治疗心肌梗死模型大鼠可以显著提高移植细胞的存活率、改善心脏功能、降低心肌梗死面积。该工作解决了移植细胞在病灶部位活性降低这一困扰干细胞移植的瓶颈问题, 不仅适用于干细胞, 也可用于其他类型细胞以挖掘和改善细胞治疗的临床应用潜力。



**图 3** PAAM-mTG方法在单个MSC表面有效生成纳米凝胶涂层. A: PAAM结构域插入细胞膜, 使mTG部分暴露在表面, 在那里它催化纳米凝胶分子的聚合. B: 聚唾液酸连接到一个油基链, 然后与mTG反应生成PAAM-mTG分子. C: 相邻明胶分子在mTG催化作用下交联. D: 聚合纳米凝胶在单个MSC上以块状形式形成. E: 聚合纳米凝胶在单个MSC上以涂层形式形成

**Figure 3** The PAAM-mTG method efficiently generates a nanogel coating over the surface of individual MSCs. A: The PAAM domain inserts into the cell membrane, leaving the mTG moiety exposed on the surface, where it catalyzes the polymerization of nanogel molecules. B: Polysialic acid was linked to an oily chain and then reacted with mTG to generate a PAAM-mTG molecule. C: Crosslinking of adjacent gelatin molecules catalyzed by mTG (D) formed in bulk or (E) coating on the individual MSCs.

### 2.3 细胞表面工程用于肿瘤杀伤

在肿瘤杀伤方面, 近年来CAR分子的构建是一种比较热门的细胞表面工程技术. 然而比较流行的细胞表面工程策略都是应用在T细胞、NK细胞、巨噬细胞等肿瘤杀伤细胞上, 直接对肿瘤细胞进行表面修饰来达到杀伤效果的报道比较少, 而本研究团队在这一方面进行了深入的探索.

上文提到将细胞封装在生物相容性保护壳内能够隔绝外界环境而保护细胞, 但保护壳过厚会导致氧气和营养物质扩散障碍, 细胞营养不良; 保护层材料可能会对细胞产生毒性作用. 本研究团队在这一概念上进一步拓展, 采用细胞表面工程手段在肿瘤细胞表面构建钙化外壳, 影响肿瘤细胞的膜流动性和营养摄取, 造成肿瘤细胞代谢紊乱, 进而达到杀伤肿瘤的效果.

2008年, Wang等人<sup>[60]</sup>在单细胞生物钙化封装方面迈出了重要的一步. 采用层层自组装的策略将钙化相关功能聚电解质引入酵母细胞表面, 然后在生理条件

下原位钙化: 使用两种电荷相反的聚电解质, 即PDDA和聚丙烯酸钠(poly(acrylic sodium), PAA)在细胞膜上逐层组装, 形成多组分薄膜. 外层的PAA具有高密度的羧酸基团, 为钙化物提供了活性成核位点, 在富含钙离子的溶液中, 羧酸基团向水-聚合物界面迁移并结合钙离子, 并在修饰后的细胞表面诱导钙矿物的异相成核. 2013年, Wei等人<sup>[61]</sup>提出了癌细胞外的钙化层会干扰和抑制内细胞和外组织之间的联系假设. 由于癌细胞高度依赖宿主组织的营养和信息交换, 细胞的生存能力和转移运动可能会受到严重抑制. 2016年, Zhao等人<sup>[62]</sup>通过瘤内注射钙离子和叶酸, 在富含叶酸受体的肿瘤细胞上成功实现了钙化包裹. 瘤内注射的叶酸分子通过受体-配体作用靶向结合到叶酸受体高表达的HeLa细胞表面, 叶酸分子上的羧酸基团能够富集钙离子, 提供钙化成核位点. 瘤内注射的钙离子提高了肿瘤细胞外环境的钙离子浓度, 大大促进了钙化层的形成. 实验表明, 钙化的肿瘤细胞膜完整性破坏, 核凝集, 并最终导致细胞死亡. 肿瘤的钙化病灶变黄并溃烂, 生

长和转移能力明显受到抑制, 荷瘤小鼠的存活率也显著提高. 2021年, 本研究团队<sup>[63]</sup>成功开发出一种不依赖外源性钙离子的肿瘤靶向钙化策略, 能够避免因外源性钙离子注射而产生高钙血症的潜在风险, 并且具有较好的抗肿瘤效果以及较低的全身注射毒性. 如图4A所示, 肿瘤钙化由一种大分子药物介导, 即叶酸-聚唾液酸分子(folate-polySia, FA-PSA), 叶酸分子与聚唾液酸分子相连, 由叶酸分子介导对高表达叶酸受体的肿瘤细胞的靶向, 大分子药物通过受体-配体作用结合到肿瘤细胞膜上, 由聚唾液酸分子上的多羧基基团在正常生理环境中富集钙离子并诱导肿瘤细胞表面钙化. 用 $1.7 \text{ mmol L}^{-1}$  FA-PSA处理2天后, 缺乏叶酸受体的Ect1/E6E7细胞表面保持光滑, 而富含叶酸受体的HeLa细胞的细胞形态发生显著变化. 如图4B所示, 可以观察到HeLa细胞周围形成粗糙的固体层, 并且细胞体积减小. 细胞实验表明, 钙化细胞能量代谢、膜流动性、侵袭迁移能力显著降低; 动物实验表明, 相对于传统的化疗药物阿霉素治疗, 钙化疗法具有更高的肿瘤生长抑制率, 延长了荷瘤小鼠的生存期, 并且其副作用可以忽略. 这一工作巧妙借助内源性钙离子, 安全实现了肿瘤细胞/组织的病理性钙化干预, 打开了肿瘤钙化治疗临床应用的可能性, 为抗肿瘤药物开发提供了新思路, 为恶性肿瘤尤其是妇科肿瘤如乳腺癌、宫颈癌和卵巢癌的精准治疗提供了创新性的手段和方法.

钙化组织在电子计算机断层(computed tomography, CT)成像和超声成像中具有容易辨认的特殊信号, 具有高灵敏度和特异性. 受此启发, 本研究团队<sup>[64]</sup>探索了钙化治疗策略在肺部微小肿瘤病灶的早期诊疗作用. 首先设计了一种新的多肽分子(calcification-inducing polypeptide, CiP)来模仿蛋白质大分子, 由两个功能域组成(图4C): 可特异性结合到肺癌细胞膜的靶向识别域和由24个谷氨酸单体相连提供钙化所需羧基的钙化诱导域. 在细胞层面验证了CiP的靶向能力和钙化能力后, 将CiP静脉注射到肺癌模型小鼠体内, 经超声和CT检测, CiP治疗4周以上的肿瘤有明显钙化, 而对照组小鼠的肿瘤病灶在4周时未被检测到, 直至6~8周时在CT图像上才检测到无钙化信号的散在肿块, 并且CiP诱导的肿瘤钙化还能够区分良恶性肺结节(图4D). 此外, CiP疗法还在荷瘤小鼠模型上显示出明显的抑制肿瘤生长和转移的作用, 并且对小鼠没有明显的毒性.

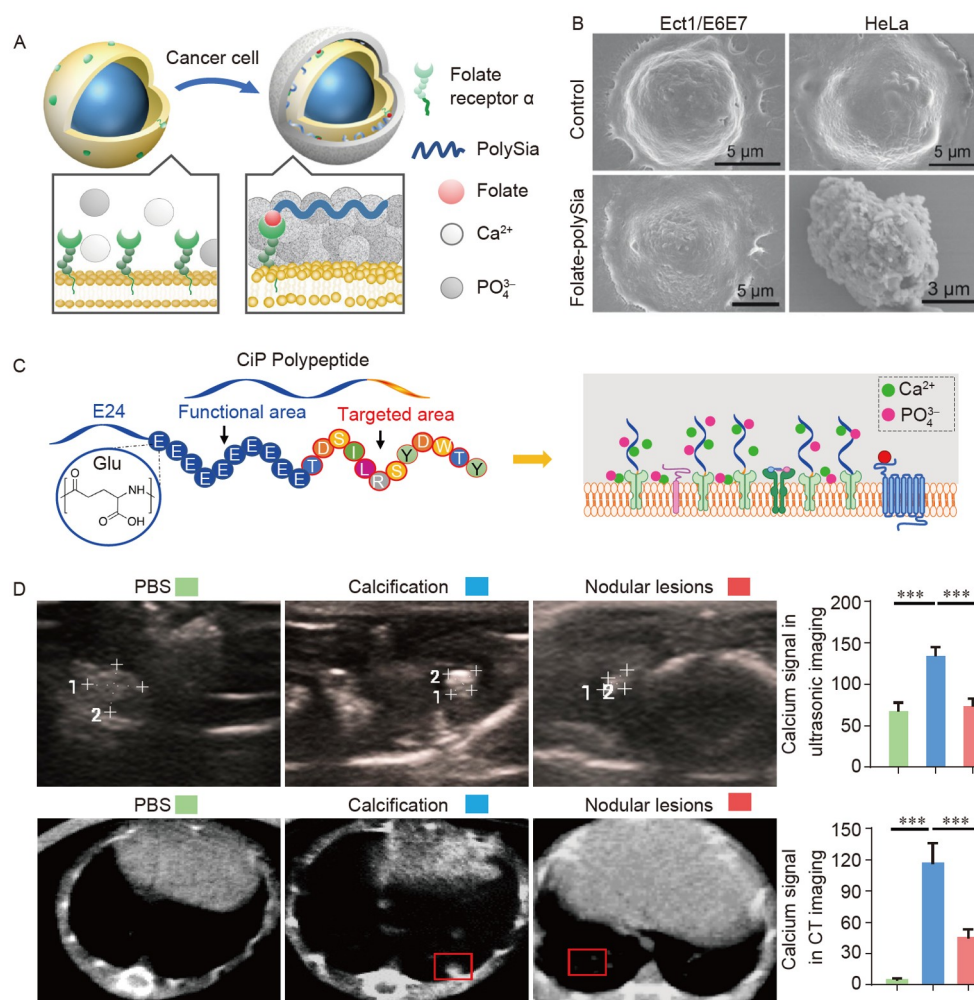
这种非细胞毒性的多肽能够有效解决目前临床存在的肿瘤早期微小病灶诊断和良恶性肺结节鉴别的难题, 显示出巨大的临床转化潜力.

### 3 总结与展望

合理而精确地操纵哺乳动物细胞膜能够克服传统细胞疗法面临的许多挑战, 在生物技术领域有广阔的创新前景. 在此介绍了细胞膜修饰的策略, 强调了每种策略的优缺点, 并介绍了细胞表面工程的转化医学应用.

目前细胞表面工程的应用可以分为体内和体外, 由于体内应用对于细胞的选择性要求较高, 一些策略方法通常在体外应用, 包括静电吸附、共价修饰、疏水插膜和基因工程. 在体外对细胞进行修饰的目的通常是将移植细胞更好地包封, 赋予其逃避宿主免疫攻击的能力, 如输血、胰腺移植、干细胞移植等. 因此, 在材料方面采用生物相容性好且免疫原性低的聚合物、合成树枝状大分子、蛋白质、聚糖、肽、脂质、骨架核酸等, 能够在体内降解并清除. 不仅如此, 有些修饰材料还能为细胞提供抗机械力性能和细胞识别信号, 如在干细胞封装领域采用的天然细胞外基质成分, 如胶原蛋白、层黏连蛋白、透明质酸, 可提供固有的细胞识别信号, 调节细胞的存活、迁移、增殖、分化, 避免干细胞的失巢凋亡<sup>[65-67]</sup>.

除了免疫逃避, 维持细胞原有的活力和功能对于包封修饰至关重要, 这一点与体外修饰过程中的合成方式和反应条件息息相关. 例如, 在层层自组装过程中, 正电荷的不断积累会对细胞膜上天然带负电的基团产生影响, 增加细胞膜的脆性<sup>[68]</sup>; 化学共轭反应中的pH、温度和反应时间都会对细胞的状态产生影响, 而细胞状态的改变又会反过来影响细胞表面胺或硫醇的密度从而影响反应的稳定性<sup>[69]</sup>. 另外, 包封的厚度也是影响细胞功能的关键, 制备薄厚适宜, 既不影响细胞又能有效遮蔽抗原的纳米膜, 要求实验者必须在实验过程中不断摸索反应条件、时间、投料比等参数. 除了合成过程中的条件控制, 在实际应用中也常常采用多策略的组合应用来扬长避短. 例如, 在修饰红细胞的时候, 先在细胞膜上利用疏水插膜引入一端输水的材料, 材料的另一端的酶能够催化交联反应, 高效而温和地在细胞膜上形成凝胶框架. 在这个过程



**图 4** 钙化疗法在肿瘤治疗和诊断中发挥作用. A: FA-PSA诱导的细胞表面钙化示意图. B: 钙化处理后的Ect1/E6E7和HeLa细胞的SEM图像. C: 靶向多肽诱导的细胞表面钙化示意图. D: 肺肿瘤、钙化肺肿瘤和良性肺结节的超声和CT成像以及小鼠肺部钙化信号的量化

**Figure 4** Application of calcification therapy in tumor diagnosis and treatment. A: Schematic diagram of cell surface calcification induced by FA-polySia. B: SEM images of Ect1/E6E7 and HeLa cells after calcification treatment. C: Schematic diagram of cell surface calcification induced by CiP. D: Ultrasound and CT imaging of lung tumors, calcified lung tumors and lung nodules and quantification of the calcification signals in the lungs of mice

中, 疏水插入的材料作为反应过程中的催化剂而不作为长期修饰的结果, 充分利用了疏水插膜的简便易行、对细胞影响小的特点, 避免了其长期不稳定性. 酶促交联反应能够在较温和的反应条件下形成较稳固的凝胶框架. 形成的凝胶框架悬浮在细胞膜表面而不直接与细胞膜接触, 避免了直接修饰导致的细胞膜固化问题, 维持了细胞膜的流动性<sup>[35]</sup>. 因此, 多策略的组合应用能够带来更大的收益, 为细胞表面工程策略带来了巨大的潜力和无限的可能性, 等待着人们去发掘.

细胞表面工程的另一个体外应用是生产CAR-T细胞. 体外基因工程作为一种调节细胞表面蛋白质的强大技术, 可以产生长期的细胞表面修饰. 然而, 由于转染困难, 基因工程方法不适用于所有类型的细胞, 并且永久性基因修饰可能具有长期副作用. 尽管病毒载体在当前的基因转染中得到了广泛应用, 但在CAR-T的生产过程中仍然存在潜在的问题, 如不可控的基因表达和与病毒载体相关的免疫风险<sup>[70]</sup>. 基于功能性生物材料的非病毒基因载体, 包括脂质、阳离子聚合物、适体和无机载体, 值得被探索. 目前这些生物材料的

问题主要是对T细胞的转染效率较低, 应致力于开发更适合T细胞和其他免疫细胞转染的功能性生物材料。此外, 基于体外基因操纵的复杂性和高成本, 近年来在体内生产CAR-T细胞已经被多次尝试<sup>[71~73]</sup>, 有效解决了体外操作的复杂性, 但是体内基因工程的特异性和安全性仍然是其走向转化需要改进的方面。期待着未来CAR-T疗法能够发展成为一种高效、安全且实惠的治疗手段。

利用细胞表面工程对生物体内的细胞进行在体操纵代表着未来前进的方向。基于生物体内的复杂性、操纵难度和安全保证, 在体的细胞表面工程对于修饰手段有更高的要求。各种策略能否在体应用取决于材料能否靶向细胞递送和智能修饰。主动靶向递送的主流方法是依赖于材料和细胞间的配体识别。将识别特定细胞类型的配体分子或抗体引入至功能材料上以提高体内稳定性、延长血液循环时间、改善靶点积聚。相关衍生的递送方式包括脂质体递送<sup>[74]</sup>、血浆白蛋白运输<sup>[2]</sup>、细胞膜包裹<sup>[75]</sup>等方法的发展为细胞表面工程的在体应用开拓了新的道路。例如, 通过与脂质体或

细胞膜靶向递送相结合, 代谢聚糖标记与生物正交反应的联合应用可以显著弥补其缺乏细胞类型选择性的局限<sup>[76]</sup>。材料的智能修饰包括智能响应、识别和组装等。可将刺激响应性连接物引入功能材料中, 以控制由特定刺激如活性氧、pH、辐射、超声、光控、磁控等触发的释放、识别、组装行为。值得一提的是, 体内自组装纳米材料技术, 作为化学自组装和生物医学的结合, 可实现对纳米材料的分子编程并在体实现预先设计的组装, 大大提升了功能材料的智能性<sup>[77,78]</sup>。例如, 一种由疏水核心和人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)配体结合的超分子肽, 可以在水中自组装成纳米颗粒, 而一旦与HER2受体结合就会自动转化为细胞表面的纳米纤维结构<sup>[79]</sup>。

总的来说, 细胞表面工程能够发挥多学科交叉优势, 包含丰富的手段和策略, 在多个领域已经有了成熟的应用。由于智能多功能材料的不断开发进展和不同策略组合应用带来的可能性, 该领域存在着广阔的发展空间和巨大的机遇。

## 参考文献

- 1 Luo Z, Luo L, Lu Y, et al. Dual-binding nanoparticles improve the killing effect of T cells on solid tumor. *J Nanobiotechnol*, 2022, 20: 261
- 2 Liu H, Moynihan K D, Zheng Y, et al. Structure-based programming of lymph-node targeting in molecular vaccines. *Nature*, 2014, 507: 519–522
- 3 Chen P, Miao Y, Zhang F, et al. Nanoscale microenvironment engineering based on layer-by-layer self-assembly to regulate hair follicle stem cell fate for regenerative medicine. *Theranostics*, 2020, 10: 11673–11689
- 4 Choi K Y, Han H S, Lee E S, et al. Hyaluronic acid-based activatable nanomaterials for stimuli-responsive imaging and therapeutics: beyond CD44-mediated drug delivery. *Adv Mater*, 2019, 31: 1803549
- 5 Greenbaum U, Yalniz F F, Srour S A, et al. Chimeric antigen receptor therapy: how are we driving in solid tumors? *Biol Blood Marrow Transplant*, 2020, 26: 1759–1769
- 6 Tomás R M F, Gibson M I. 100th anniversary of macromolecular science viewpoint: re-engineering cellular Interfaces with synthetic macromolecules using metabolic glycan labeling. *ACS Macro Lett*, 2020, 9: 991–1003
- 7 Mahal L K, Yarema K J, Bertozzi C R. Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis. *Science*, 1997, 276: 1125–1128
- 8 Bondar O V, Saifullina D V, Shakhmaeva I I, et al. Monitoring of the zeta potential of human cells upon reduction in their viability and interaction with polymers. *Acta Naturae*, 2012, 4: 78–81
- 9 Zhi Z, Liu B, Jones P M, et al. Polysaccharide multilayer nanoencapsulation of insulin-producing  $\beta$ -cells grown as pseudoislets for potential cellular delivery of insulin. *Biomacromolecules*, 2010, 11: 610–616
- 10 Yang J, Li J, Li X, et al. Nanoencapsulation of individual mammalian cells with cytoprotective polymer shell. *Biomaterials*, 2017, 133: 253–262
- 11 Ma L, Dichwalkar T, Chang J Y H, et al. Enhanced CAR-T cell activity against solid tumors by vaccine boosting through the chimeric receptor. *Science*, 2019, 365: 162–168
- 12 Lou S, Zhang X, Zhang J, et al. Pancreatic islet surface bioengineering with a heparin-incorporated starPEG nanofilm. *Mater Sci Eng-C*, 2017, 78: 24–31
- 13 Li L, Han B, Wang Y, et al. Simple and universal signal labeling of cell surface for amplified detection of cancer cells via mild reduction. *Biosens*

- [Bioelectron](#), 2019, 145: 111714
- 14 Rieder E, Berinstein A, Baxt B, et al. Propagation of an attenuated virus by design: engineering a novel receptor for a noninfectious foot-and-mouth disease virus.. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 1996, 93: 10428–10433
- 15 Fesnak A D, June C H, Levine B L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. [Nat Rev Cancer](#), 2016, 16: 566–581
- 16 Hong M, Clubb J D, Chen Y Y. Engineering CAR-T cells for next-generation cancer therapy. [Cancer Cell](#), 2020, 38: 473–488
- 17 Zhang C, Liu J, Zhong J F, et al. Engineering CAR-T cells. [Biomark Res](#), 2017, 5: 22
- 18 Cheng B, Xie R, Dong L, et al. Metabolic remodeling of cell-surface sialic acids: principles, applications, and recent advances. [ChemBioChem](#), 2016, 17: 11–27
- 19 Xie R, Hong S, Feng L, et al. Cell-selective metabolic glycan labeling based on ligand-targeted liposomes. [J Am Chem Soc](#), 2012, 134: 9914–9917
- 20 Li J, Chen M, Liu Z, et al. A single-step chemoenzymatic reaction for the construction of antibody-cell conjugates. [ACS Cent Sci](#), 2018, 4: 1633–1641
- 21 Cabric S, Sanchez J, Lundgren T , et al. Islet surface heparinization prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet transplantation. [Diabetes](#), 2007, 56: 2008–2015
- 22 Mattheolabakis G, Milane L, Singh A, et al. Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: from receptor biology to nanomedicine. [J Drug Targeting](#), 2015, 23: 605–618
- 23 Sakai S, Liu Y, Sengoku M, et al. Cell-selective encapsulation in hydrogel sheaths via biospecific identification and biochemical cross-linking. [Biomaterials](#), 2015, 53: 494–501
- 24 Danhier F, Feron O, Pr  at V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. [J Control Release](#), 2010, 148: 135–146
- 25 Blanco B, Ramírez-Fernández   , Alvarez-Vallina L. Engineering immune cells for *in vivo* secretion of tumor-specific T cell-redirecting bispecific antibodies. [Front Immunol](#), 2020, 11: 1792
- 26 Liu Q P, Sulzenbacher G, Yuan H, et al. Bacterial glycosidases for the production of universal red blood cells. [Nat Biotechnol](#), 2007, 25: 454–464
- 27 Mansouri S, Merhi Y, Winnik F M, et al. Investigation of layer-by-layer assembly of polyelectrolytes on fully functional human red blood cells in suspension for attenuated immune response. [Biomacromolecules](#), 2011, 12: 585–592
- 28 Rossi N A A, Constantinescu I, Kainthan R K, et al. Red blood cell membrane grafting of multi-functional hyperbranched polyglycerols. [Biomaterials](#), 2010, 31: 4167–4178
- 29 Wang D, Toyofuku W M, Scott M D. The potential utility of methoxypoly(ethylene glycol)-mediated prevention of rhesus blood group antigen RhD recognition in transfusion medicine. [Biomaterials](#), 2012, 33: 3002–3012
- 30 Scott M D, Murad K L, Koumpouras F, et al. Chemical camouflage of antigenic determinants: stealth erythrocytes. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 1997, 94: 7566–7571
- 31 Hashemi-Najafabadi S, Vasheghani-Farahani E, Shojaosadati S A, et al. A method to optimize PEG-coating of red blood cells. [Bioconjugate Chem](#), 2006, 17: 1288–1293
- 32 Scott M D, Chen A M. Beyond the red cell: pegylation of other blood cells and tissues. [Transf Clin Biol](#), 2004, 11: 40–46
- 33 Salomao M, Zhang X, Yang Y, et al. Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2008, 105: 8026–8031
- 34 Yang Q, Lai S K. Anti-PEG immunity: emergence, characteristics, and unaddressed questions. [WIREs Nanomed Nanobiotechnol](#), 2015, 7: 655–677
- 35 Zhao Y, Fan M, Chen Y, et al. Surface-anchored framework for generating RhD-epitope stealth red blood cells. [Sci Adv](#), 2020, 6: eaaw9679
- 36 Adams O J, Stanczak M A, von Gunten S, et al. Targeting sialic acid-Siglec interactions to reverse immune suppression in cancer. [Glycobiology](#), 2018, 28: 640–647
- 37 B  ll C, Boltje T J, Balneger N, et al. Sialic acid blockade suppresses tumor growth by enhancing T-cell-mediated tumor immunity. [Cancer Res](#), 2018, 78: 3574–3588
- 38 Fuster M M, Esko J D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. [Nat Rev Cancer](#), 2005, 5: 526–542
- 39 Guo R, Morimatsu M, Feng T, et al. Stem cell-derived cell sheet transplantation for heart tissue repair in myocardial infarction. [Stem Cell Res Ther](#), 2020, 11: 19

- 40 Cofano F, Boido M, Monticelli M, et al. Mesenchymal stem cells for spinal cord injury: current options, limitations, and future of cell therapy. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 2698
- 41 Memon B, Abdelalim E M. Stem cell therapy for diabetes: beta cells versus pancreatic progenitors. *Cells*, 2020, 9: 283
- 42 Cruz-Samperio R, Jordan M, Perriman A. Cell augmentation strategies for cardiac stem cell therapies. *Stem Cells Transl Med*, 2021, 10: 855–866
- 43 Afzal M R, Samanta A, Shah Z I, et al. Adult bone marrow cell therapy for ischemic heart disease. *Circ Res*, 2015, 117: 558–575
- 44 Deng R, Liu Y, He H, et al. Haemin pre-treatment augments the cardiac protection of mesenchymal stem cells by inhibiting mitochondrial fission and improving survival. *J Cell Mol Med*, 2020, 24: 431–440
- 45 Deng J, Zhang N, Wang Y, et al. FNDC5/irisin improves the therapeutic efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for myocardial infarction. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11: 228
- 46 Xu J Y, Qian H Y, Huang P S, et al. Transplantation efficacy of autologous bone marrow mesenchymal stem cells combined with atorvastatin for acute myocardial infarction (TEAM-AMI): rationale and design of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-center, Phase II TEAM-AMI trial. *Regenerat Med*, 2019, 14: 1077–1087
- 47 Xu J, Xiong Y Y, Li Q, et al. Optimization of timing and times for administration of atorvastatin-pretreated mesenchymal stem cells in a preclinical model of acute myocardial infarction. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8: 1068–1083
- 48 Cho H M, Lee K H, Shen Y M, et al. Transplantation of hMSCs genome edited with LEF1 improves cardio-protective effects in myocardial infarction. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2020, 19: 1186–1197
- 49 Alijani-Ghazyani Z, Sabzevari R, Roushandedeh A M, et al. Transplantation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells overexpressing lipocalin 2 ameliorates ischemia-induced injury and reduces apoptotic death in a rat acute myocardial infarction model. *Stem Cell Rev Rep*, 2020, 16: 968–978
- 50 Liang X, Ding Y, Lin F, et al. Overexpression of ERBB4 rejuvenates aged mesenchymal stem cells and enhances angiogenesis via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. *FASEB J*, 2019, 33: 4559–4570
- 51 Zhang Y, Zhu W, He H, et al. Macrophage migration inhibitory factor rejuvenates aged human mesenchymal stem cells and improves myocardial repair. *Aging*, 2019, 11: 12641–12660
- 52 Kim C W, Kim C J, Park E H, et al. MSC-encapsulating *in situ* cross-linkable gelatin hydrogels to promote myocardial repair. *ACS Appl Bio Mater*, 2020, 3: 1646–1655
- 53 Park B W, Jung S H, Das S, et al. *In vivo* priming of human mesenchymal stem cells with hepatocyte growth factor-engineered mesenchymal stem cells promotes therapeutic potential for cardiac repair. *Sci Adv*, 2020, 6: eaay6994
- 54 Del Giudice F, Sathish S, D’Avino G, et al. “From the edge to the center”: viscoelastic migration of particles and cells in a strongly shear-thinning liquid flowing in a microchannel. *Anal Chem*, 2017, 89: 13146–13159
- 55 Mayfield A E, Tilokee E L, Latham N, et al. The effect of encapsulation of cardiac stem cells within matrix-enriched hydrogel capsules on cell survival, post-ischemic cell retention and cardiac function. *Biomaterials*, 2014, 35: 133–142
- 56 Choi D, Park J, Heo J, et al. Multifunctional collagen and hyaluronic acid multilayer films on live mesenchymal stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 12264–12271
- 57 Lopez-Mendez T B, Santos-Vizcaino E, Pedraz J L, et al. Cell microencapsulation technologies for sustained drug delivery: latest advances in efficacy and biosafety. *J Control Release*, 2021, 335: 619–636
- 58 Guerzoni L P B, Tsukamoto Y, Gehlen D B, et al. A layer-by-layer single-cell coating technique to produce injectable beating mini heart tissues via microfluidics. *Biomacromolecules*, 2019, 20: 3746–3754
- 59 Zhang L, Liu G, Lv K, et al. Surface-anchored nanogel coating endows stem cells with stress resistance and reparative potency via turning down the cytokine-receptor binding pathways. *Adv Sci*, 2021, 8: 2003348
- 60 Wang B, Liu P, Jiang W, et al. Yeast cells with an artificial mineral shell: protection and modification of living cells by biomimetic mineralization. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47: 3560–3564
- 61 Wei Y, Yin G, Ma C, et al. Inhibiting the motility and invasion of cancer cells by biomineralization. *Med Hypotheses*, 2013, 81: 169–171
- 62 Zhao R, Wang B, Yang X, et al. A drug-free tumor therapy strategy: cancer-cell-targeting calcification. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 5225–5229
- 63 Tang N, Li H, Zhang L, et al. A macromolecular drug for cancer therapy via extracellular calcification. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 6509–6517
- 64 Wu J, Chen Y, Xin J, et al. Bioinspired tumor calcification enables early detection and elimination of lung cancer. *Adv Funct Mater*, 2021, 31:

2101284

- 65 Barros D, Amaral I F, Pêgo A P. Laminin-inspired cell-instructive microenvironments for neural stem cells. *Biomacromolecules*, 2020, 21: 276–293
- 66 Barros D, Conde-Sousa E, Gonçalves A M, et al. Engineering hydrogels with affinity-bound laminin as 3D neural stem cell culture systems. *Biomater Sci*, 2019, 7: 5338–5349
- 67 Hamilton M, Harrington S, Dhar P, et al. Hyaluronic acid hydrogel microspheres for slow release stem cell delivery. *ACS Biomater Sci Eng*, 2021, 7: 3754–3763
- 68 Li W, Lei X, Feng H, et al. Layer-by-layer cell encapsulation for drug delivery: the history, technique basis, and applications. *Pharmaceutics*, 2022, 14: 297
- 69 Sahaf B, Heydari K, Herzenberg L A, et al. Lymphocyte surface thiol levels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 4001–4005
- 70 Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature*, 1999, 401: 517–518
- 71 Rurik J G, Tombácz I, Yadegari A, et al. CAR T cells produced *in vivo* to treat cardiac injury. *Science*, 2022, 375: 91–96
- 72 Agarwal S, Weidner T, Thalheimer F B, et al. *In vivo* generated human CAR T cells eradicate tumor cells. *Oncoimmunology*, 2019, 8: e1671761
- 73 Agarwal S, Hanauer J D S, Frank A M, et al. *In vivo* generation of CAR T cells selectively in human CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *Mol Ther*, 2020, 28: 1783–1794
- 74 Almeida B, Nag O K, Rogers K E, et al. Recent progress in bioconjugation strategies for liposome-mediated drug delivery. *Molecules*, 2020, 25: 5672
- 75 Yan H, Shao D, Lao Y H, et al. Engineering cell membrane-based nanotherapeutics to target inflammation. *Adv Sci*, 2019, 6: 1900605
- 76 Du Y, Xie R, Sun Y, et al. Liposome-assisted metabolic glycan labeling with cell and tissue selectivity. *Methods Enzymol*, 2018, 598: 321–353
- 77 Li L L, Qiao Z Y, Wang L, et al. Programmable construction of peptide-based materials in living subjects: from modular design and morphological control to theranostics. *Adv Mater*, 2019, 31: 1804971
- 78 Li S, Jiang Q, Liu S, et al. A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger in vivo. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 258–264
- 79 Zhang L, Jing D, Jiang N, et al. Transformable peptide nanoparticles arrest HER2 signalling and cause cancer cell death in vivo. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15: 145–153

## Strategies and applications of cell surface engineering

HUANG Yuqiao<sup>1,2</sup> & WANG Ben<sup>1,2,3</sup>

*1 The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China;*

*2 Institute of Translational Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;*

*3 Cancer Center, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China*

Manipulating cells has always been the dream of researchers. The development of cell surface engineering provides many simple and efficient surface modification strategies for cell manipulation. Cell membrane is an extremely complex environment. A variety of components on the membrane regulate biochemical processes inside and outside the cell. Through multiple strategies, the introduction of exogenous substances to modify the cell membrane can change the components of the cell membrane, and even affect the behavior and fate of cells. However, these strategies have more or less certain limitations, and appropriate strategies need to be selected according to specific application scenarios. Here we introduce various strategies of mammalian cell membrane modification and show some classical applications of these strategies.

**cell surface engineering, blood transfusion, transplantation medicine, tumor calcification**

**doi:** 10.1360/SSV-2022-0067