

靶向Endoglin的CL-PEG-MnFe₂O₄探针构建及体外实验

杨华¹, 龚明福², 邹利光², 张松², 舒通胜², 周培华¹

1. 重庆市中医院放射科, 重庆 400021; 2. 第三军医大学新桥医院放射科, 重庆 400037

【摘要】目的:合成靶向细胞内皮糖蛋白(Endoglin)的CL-PEG-MnFe₂O₄分子探针,并探讨其在肿瘤新生血管及新生淋巴管双重靶向显像中的可行性。**方法:**将与Endoglin特异性结合的多肽CL-1555与超敏感的聚乙二醇两亲片段修饰的MnFe₂O₄(PEG-PCL-MnFe₂O₄)纳米胶束耦联制备靶向Endoglin的CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束。用CL-PEG-MnFe₂O₄标记肿瘤源性血管内皮细胞(VECs)及淋巴管内皮细胞(LECs)。通过普鲁士蓝染色、透射电子显微镜及核磁共振成像了解纳米粒内皮细胞的结合情况及MRI信号改变。**结果:**在相同铁浓度下,CL-PEG-MnFe₂O₄标记的肿瘤源性内皮细胞的标记率较PEG-PCL-MnFe₂O₄高。在铁浓度为0、0.5、1.0、2.0、5.0及10.0 μg/mL时,靶向CL-PEG-MnFe₂O₄和非靶向PEG-PCL-MnFe₂O₄标记诱导后 VECs 的标记率分别为0%、(27.75±3.84)%、(61.63±3.12)%、(83.43±3.76)%、100.00%、100.00%和0%、(14.56±3.24)%、(37.53±2.62)%、(51.62±3.32)%、(88.36±4.26)%、100.00%。在T₁WI,信号强度呈缓慢升高;在T₂WI,信号强度逐渐下降,T₂*WI下降更明显。相对于非靶向PEG-PCL-MnFe₂O₄纳米胶束标记肿瘤源性内皮细胞和靶向CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束标记未诱导内皮细胞,靶向CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束标记的肿瘤源性内皮细胞信号改变更明显,但随着标记铁浓度的增加,该差异逐渐减小。**结论:**CL-PEG-MnFe₂O₄纳米粒在体外能与肿瘤源性 VECs 和 LECs 特异性结合,并可通过核磁共振成像进行检测,这为肿瘤新生血管及新生淋巴管的双重靶向显像提供了实验基础。

【关键词】细胞内皮糖蛋白;探针;内皮细胞;纳米胶束;铁浓度

【中图分类号】R318;R445.2

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2016)07-0751-06

Synthesis and *in vitro* experiment of Endoglin targeted CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelle

YANG Hua¹, GONG Ming-fu², ZOU Li-guang², ZHANG Song², SHU Tong-sheng², ZHOU Pei-hua¹

1. Department of Radiology, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China; 2. Department of Radiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

Abstract: Objective To synthesize Endoglin targeted CL-PEG-MnFe₂O₄ probe and discuss on its feasibility in dual target imaging for tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. **Methods** Endoglin targeted polypeptide CL-1555 was synthesized and bound to the surface of PEG-PCL-MnFe₂O₄ nanomicelle to construct Endoglin targeted CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelle. The tumor-derived vascular endothelial cells (VECs) and lymphatic endothelial cells (LECs) were co-cultured with CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelle. The intracytoplasmic nanoparticles and MR signals were confirmed by Prussian blue iron staining, transmission electron microscopy and MRI. **Results** With the same iron concentration, the tumor-derived endothelial cell labeling ratio with CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelle was significantly higher than that with PEG-PCL-MnFe₂O₄ nanomicelle. At iron concentrations of 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 ug/mL, the labeling ratios of targeted CL-PEG-MnFe₂O₄ and off-targeted PEG-PCL-MnFe₂O₄ for induced VECs were respectively 0%, (27.75±3.84)%, (61.63±3.12)%, (83.43±3.76)%, 100.00% and 100.00%; 0%, (14.56±3.24)%, (37.53±2.62)%, (51.62±3.32)%, (88.36±4.26)% and 100.00%. Signal intensity gradually increased in T₁WI, and decreased in T₂WI and T₂*WI, especially in T₂*WI. Compared with the tumor-derived endothelial cells with off-targeted PEG-PCL-MnFe₂O₄ nanomicelle and non-induced endothelial cells with targeted CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelle, the tumor-derived endothelial cells with targeted CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelle showed more significant signal changes, and the significant differences were gradually decreased with the increasing of iron concentration. **Conclusion** The CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelle can specifically bind to tumor-derived VECs and LECs, and be detected by MRI, providing potential experimental basis for dual target MRI for tumor angiogenesis and lymphangiogenesis.

Key words: Endoglin; probe; endothelial cell; nanomicelle; iron concentration

【收稿日期】2016-01-20

【基金项目】国家自然科学基金(81071197,81501521);重庆市前沿与应用基础研究一般项目(cstc2015jcyjA1338)

【作者简介】杨华(1978-),博士,副主任医师,研究方向:磁共振分子影像,Tel:13527547568,E-mail:yanghua780819@163.com

【通信作者】周培华(1969-),本科,主任医师,研究方向:体部影像及介入放射学,Tel:023-67063923,E-mail:zphcqszyy@sina.com

前言

肿瘤血管及淋巴管生成对肿瘤生长及转移起着重要作用,因此准确地定量肿瘤新生血管及新生淋巴管对预测肿瘤转移风险及评价靶向治疗疗效有着重要意义^[1-3]。细胞内皮糖蛋白(Endoglin)在肿瘤新生血管及新生淋巴管的内皮细胞高表达,以Endoglin为靶标将有可能实现肿瘤新生血管和新生淋巴管的双重靶向成像^[4-6]。结合肽分子量小、穿透性好、合成方便、价格便宜、在体内免疫应答轻、靶向性好,是目前分子靶向成像研究中重要的靶向载体^[7]。聚乙二醇两亲片段修饰的 MnFe_2O_4 (PEG-PCL- MnFe_2O_4)纳米胶束具有良好的水溶性、生物相容性和非常高的饱和磁化强度^[8]。本研究将靶向Endoglin的短肽CL-1555(氨基酸序列为AHKHVHHVPVRL)链接到超敏感的PEG-PCL- MnFe_2O_4 纳米胶束,构建靶向Endoglin的CL-PEG- MnFe_2O_4 分子探针。通过体外标记淋巴管内皮细胞(LECs)及血管内皮细胞(VECs),了解该探针对Endoglin的靶向性能及其在肿瘤新生血管及新生淋巴管双重靶向显像的可行性。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器

MDA-MB-231乳腺癌细胞由第三军医大学生物化学及分子生物学教研室惠赠;人脐静脉内皮细胞由新生婴儿脐带消化分离;LECs株购自美国ATCC细胞库;内皮细胞所有细胞培养液及染色试剂均购自美国Sigma公司和Abcam公司;M199细胞培养液购自美国Hyclone公司;内皮细胞培养支持物购自美国Sciencecell公司;CCK-8细胞增殖试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Millicell小室购自美国Millipore公司;透射电子显微镜为日本日立公司Hitachi-7500;倒置显微镜和TCSP5激光共聚焦显微镜购自德国徕卡公司;磁共振成像(MRI)仪器购自美国GE公司。

1.2 CL-PEG- MnFe_2O_4 纳米胶束的构建

PEG-PCL两亲性嵌段聚合物及PEG-PCL- MnFe_2O_4 纳米胶束的合成委托四川大学生物医学材料研究中心完成^[9];Endoglin结合肽CL-1555由上海强耀生物科技有限公司合成。将PEG-PCL- MnFe_2O_4 胶束溶解于硼酸缓冲液中,再将N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC.HCl)分别溶解在硼酸缓冲液中。分别取EDC.HCl和NHS依次加入PEG-PCL- MnFe_2O_4 胶束体系中,室温下磁力搅拌器搅拌20 min、离心、浓缩,再加入硼酸缓冲液调节pH值到8,加入2 mL浓度为1

mg/mL的CL-1555,室温下反应3 h,超滤管离心、浓缩后用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释待用。

1.3 乳腺癌MDA-MB-231细胞与内皮细胞共培养

第4代人脐静脉内皮细胞按 5×10^4 /孔的细胞密度接种于六孔板,在孵箱内孵育12 h,使细胞贴壁。将接种有细胞密度为 5×10^4 /孔的乳腺癌MDA-MB-231细胞的Millicell小室置入六孔板中,共培养3 d后,在六孔板内收获诱导后的肿瘤源性VECs。采用相同的共培养方法诱导LECs。

1.4 细胞标记及检测

1.4.1 细胞标记及显微镜观察 把经乳腺癌MDA-MB-231细胞诱导后和未经诱导处于对数生长期的VECs及LECs以 1×10^5 /孔的细胞密度接种于铺有盖玻片的六孔板中,置于5% CO_2 细胞培养箱中培养24 h,待细胞爬片。铁浓度分别为0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,将靶向CL-PEG- MnFe_2O_4 纳米胶束加入经诱导后的VECs和LECs内,在孵箱中继续培养24 h。以非靶向的PEG-PCL- MnFe_2O_4 胶束标记诱导后的VECs和LECs及靶向CL-PEG- MnFe_2O_4 胶束标记未诱导的VECs和LECs为对照,全程在避光条件下操作。采用常规普鲁士蓝染色,倒置显微镜下摄片、观察,随机选取20个视野进行标记阳性细胞计数,并计算细胞标记阳性率(标记阳性率=阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$)。通过电子显微镜观察纳米粒在细胞内的分布情况,用CCK8检测纳米粒对内皮细胞活性的影响。

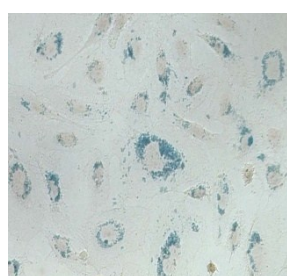
1.4.2 标记细胞的MRI 标记细胞离心、洗涤后,采用PBS重悬于1 mL离心管中,细胞浓度 2×10^6 /mL,容积0.8 mL,以单纯的PBS为对照。于3.0 T MRI扫描仪上进行轴位多层成像,分别行自旋回波(SE) T_1 WI,脉冲重复间隔时间/回波时间(TR/TE) = 400.0 ms/7.5 ms;快速自旋回波(FSE) T_2 WI, TR/TE = 3 800.0 ms/85.0 ms;梯度回波(GRE) T_2^* WI, TR/TE = 270.0 ms/6.9 ms, FA=20°;16回波 T_2 mapping, TR/TE = 2400.0 ms/13.7 ms-109.7 ms。在同一层面进行信号强度(SI)测量,感兴趣区大小为15 mm²,计算信号强度变化率(ΔSI), $\Delta \text{SI} = (\text{SI}_{\text{cell}} - \text{SI}_{\text{PBS}}) / \text{SI}_{\text{PBS}} \times 100\%$,其中, SI_{cell} 为细胞悬液SI, SI_{PBS} 为PBS的SI,并绘制铁浓度- ΔSI 曲线。采用GE公司ADW 4.4工作站自带的 T_2 软件在 T_2 mapping图像中测量纳米胶束溶液的 T_2 值,以非靶向PEG-PCL- MnFe_2O_4 纳米胶束标记未诱导的VECs和LECs为对照。

2 结果

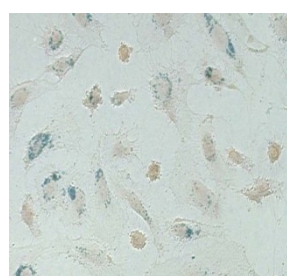
2.1 CL-PEG- MnFe_2O_4 纳米胶束标记内皮细胞

普鲁士蓝染色后的细胞胞浆内可见大量蓝染颗粒,随着铁浓度的增加,细胞标记阳性率逐渐增加。在相同条件下,靶向CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束对VECs及LECs的标记率较非靶向PEG-PCL-MnFe₂O₄纳米胶束高,如图1所示。在铁浓度分别为0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,靶向CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束标记诱导后 VECs 的标记率为 0%、(27.75 \pm 3.84)%、(61.63 \pm 3.12)%、(83.43 \pm 3.76)%、100.00%、100.00%;非靶向PEG-PCL-MnFe₂O₄纳米胶束标记诱

导后 VECs 的标记率为 0%、(14.56 \pm 3.24)%、(37.53 \pm 2.62)%、(51.62 \pm 3.32)%、(88.36 \pm 4.26)%、100.00%。在相同条件下,靶向CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束标记诱导后 LECs 的标记率也高于未诱导的 LECs,这说明 CL-PEG-MnFe₂O₄对肿瘤源性 VECs 和 LECs 具有良好的靶向性。电镜下,内皮细胞胞浆及溶酶体内可见高电子密度的内吞囊泡和细小颗粒;核周部分次级溶酶体破裂,周围可见细小颗粒,如图2所示。

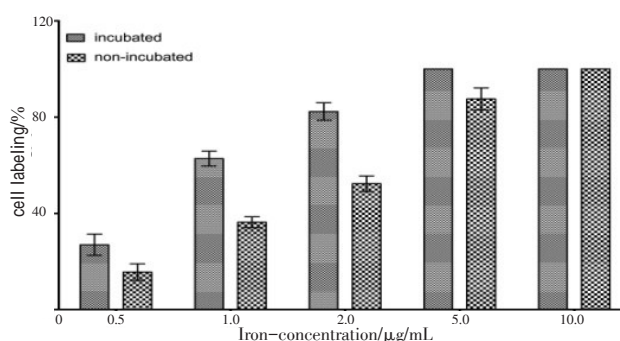


a: VECs labeled with CL-PEG-MnFe₂O₄ at iron concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$



b: VECs labeled with PEG-PCL-MnFe₂O₄ at iron concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$

VECs: Vascular endothelial cells



c: Labeling ratio of VECs

图1 标记内皮细胞的普鲁士蓝染色($\times 200$)

Fig.1 Prussian blue staining of labeled endothelial cells ($\times 200$)

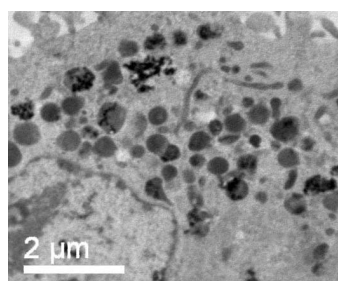


图2 标记细胞的透射电镜图

Fig.2 Transmission electron microscopy photograph of labeled endothelial cells

2.2 CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束对细胞增殖活性的影响

CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束与 VECs 共孵育 48 h 后,在铁浓度分别为 0、1、2、5、10、20、50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,CCK-8 培养基的吸光值如图3所示。铁浓度小于 20 $\mu\text{g/mL}$ 时,纳米胶束对 VECs 细胞增殖活性没有明显影响;铁浓度增加到 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,VECs 活性受轻度影响;铁浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞吸光值和 VECs 的增殖活性明显降低。

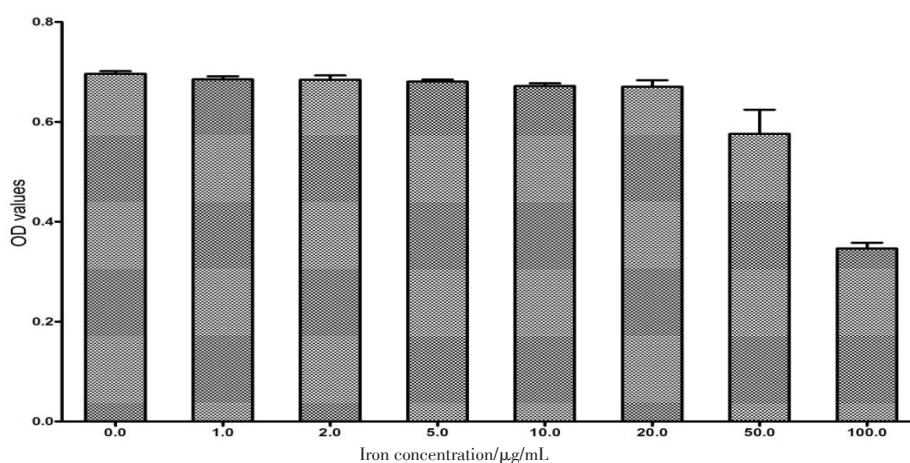


图3 不同铁浓度下 CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束标记 VECs 48 h 后细胞的吸光值

Fig.3 Optical density (OD) of VECs labeled with CL-PEG-MnFe₂O₄ at different iron concentrations

2.3 标记细胞的MRI

细胞悬液的MRI信号改变如图4所示。随着铁浓度的增加,在SE-T₁WI,SI呈缓慢升高;在T₂WI,SI逐渐下降;较FSE-T₂WI,GRE-T₂*WI的SI随浓度变化更明显。当铁浓度为0.5、1.0、2.0、5.0及10.0 μg/mL时,CL-PEG-MnFe₂O₄和PEG-PCL-MnFe₂O₄标记细胞悬液的T₂值分别为(192.84±12.13) ms、(65.26±11.16) ms、(46.26±3.25) ms、(38.28±2.47) ms、(35.24±2.65) ms

和(195.14±13.63) ms、(123.57±9.47) ms、(81.55±5.60) ms、(51.37±2.14) ms、(41.52±2.24) ms。随着铁浓度增加,T₂值逐渐降低,与非靶向PEG-PCL-MnFe₂O₄胶束标记肿瘤源性内皮细胞和靶向CL-PEG-MnFe₂O₄标记未诱导内皮细胞比较,靶向CL-PEG-MnFe₂O₄标记的肿瘤源性内皮细胞的T₂值降低更明显,但随着铁浓度的进一步增加,该差异越来越小。

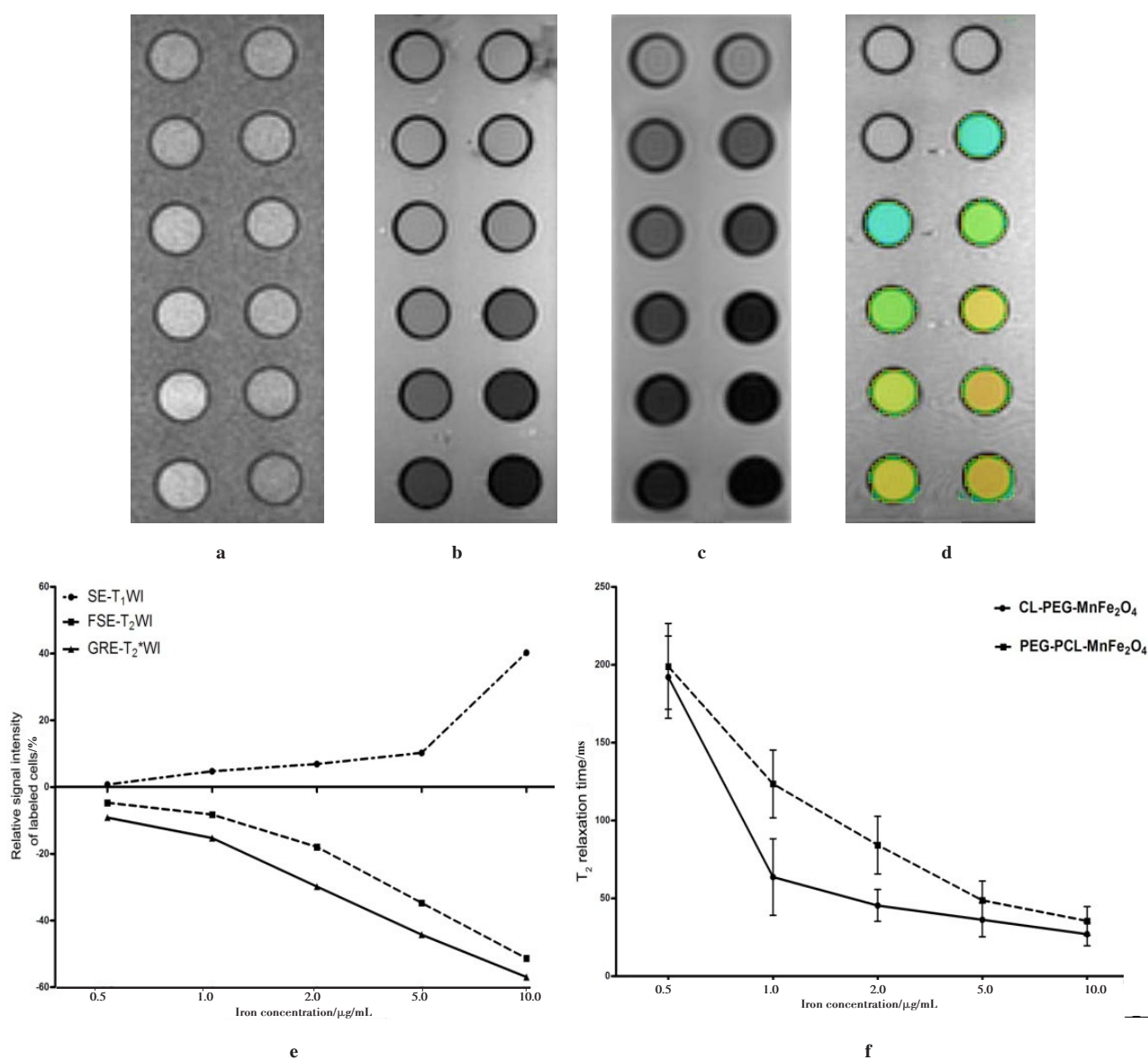


图4 标记细胞悬液的MRI

Fig.4 MR images of labeled endothelial cell suspensions

Fig.4a to 4d were axial MR images of labeled cell suspensions in SE-T₁WI, FSE-T₂WI, GRE-T₂*WI and T₂ mapping respectively; The left images in Fig.4a to d was non-induced cells, while the right images was induced cells. From top to bottom, the iron concentrations were 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0 μg/mL respectively. The color in T₂ mapping changed from blue (high T₂) to green and yellow (low T₂). Fig.4e showed the correlation between iron concentration and signal intensity. Fig.4f showed the T₂ relaxation time of labeled cell suspensions with CL-PEG-MnFe₂O₄ or PEG-PCL-MnFe₂O₄ changed with the iron concentration. SE: Spin echo; FSE: Fast spin echo; GRE: Gradient recalled echo

3 讨论

运用分子影像无创评估肿瘤新生血管及新生淋巴管对肿瘤诊断、分级和疗效评估具有重要意义。Endoglin在肿瘤新生血管及淋巴管的内皮细胞高表达,基于Endoglin的MRI分子影像有可能实现肿瘤新生血管及新生淋巴管的双重靶向显像^[4-6]。目前,分子影像主要采用抗原-抗体和配体-受体识别系统。靶向结合的短肽分子量小、结构简单、在体内穿透性好,一般不会引起严重的免疫反应,是良好的靶向成像载体。运用噬菌体随机肽技术可以在不了解配体或受体构象及功能的前提下,筛选出可与靶分子特异结合的模拟短肽^[7]。毕仙民等^[10-11]应用此技术成功筛选出可与Endoglin特异性结合的多肽CL-1555,竞争抑制实验证明其能够模拟Endoglin抗体在Endoglin表位特异结合。PEG-PCL-MnFe₂O₄纳米胶束较其它铁酸盐纳米粒具有更高的饱和磁化强度,可以作为潜在的超敏感MRI对比剂^[12]。本研究合成了能与Endoglin结合的短肽CL-1555,并将其与超敏感的PEG-PCL-MnFe₂O₄纳米胶束通过交链反应偶联形成能与Endoglin靶向结合的CL-PEG-MnFe₂O₄纳米粒。靶向纳米胶束标记细胞的普鲁士蓝染色、MRI及电镜结果显示探针针对肿瘤内皮细胞有很好的靶向性;肿瘤诱导后内皮细胞及非诱导内皮细胞的比较显示靶向探针在一定程度上能够反映细胞Endoglin表达的量。

GRE序列采用去相位梯度而没有使用180°脉冲,不能消除失相位效应,但是能够检测纳米粒周围不均匀磁场引起的横向弛豫变化,较SE更能反映纳米粒的磁敏感效应^[13]。细胞吞噬纳米粒的能力与纳米粒的理化特性、包被材料及靶向介质、标记细胞、标记条件等有关^[14]。在达到饱和浓度以前,随着纳米粒浓度增加,细胞内吞纳米粒会成倍增加,但当浓度达到饱和阈值后,随着纳米粒浓度的增加,细胞吞噬纳米粒的能力会逐渐降低。实验观察到不同类型标记细胞的T₂值在铁浓度增加达到一定程度以后,T₂值的改变将趋于平缓^[15]。

纳米粒首先黏附在细胞表面,然后通过流体相胞吞、吸附胞吞以及受体介导胞吞这3种方式胞吞入细胞内部,其中,受体介导的内吞是对纳米粒最有效的胞吞方式^[16]。通过粒子表面链接的配体与细胞膜表面相应的受体结合,然后通过受体介导的胞吞作用使膜内陷形成包涵体,并进入胞浆中^[14]。电镜下除了胞膜上、胞浆内及溶酶体内可见高电子密度的内吞囊泡和细小颗粒外,在核周可见部分次级溶酶

体破裂,周围胞质内也可见散在细小颗粒。这是由于纳米粒进入胞浆后,细胞核周围溶酶体酶的活性会升高,包涵体最终进入核周的终极溶酶体发生降解,又将纳米粒释放入胞浆,在这个过程中细胞内氧自由基短暂而明显的升高也从机制上解释了这个现象^[17]。

除了敏感性外,生物纳米材料要应用于人体还必须考虑生物相容性和细胞毒性。PEG广泛应用于生物材料的合成与修饰,具有极好的生物相容性以及极低的免疫源性和毒性^[18]。所以CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束的细胞毒性主要关注MnFe₂O₄的毒性,细胞降解、代谢纳米粒的确切路径及机制目前尚不清楚。MnFe₂O₄纳米粒进入细胞以后,在溶酶体内低pH值环境下发生降解,铁与转铁蛋白解离形成低分子量的铁离子复合物和高分子量的中间体,最终铁可能参与细胞代谢,或以铁蛋白的形式储存,或在红细胞内参与血红素的合成^[19]。目前认为锰是引起Mn-Fe₂O₄纳米粒毒性的主要因素,锰的细胞毒性主要是因为锰离子能与线粒体单向钙离子通道相互作用,扰乱肌肉膜的钙离子平衡;锰离子也能够竞争抑制质子泵的功能,引起线粒体膜电位降低,最终导致细胞损伤^[20-21]。而本研究发现用于细胞标记和MRI剂量的MnFe₂O₄纳米粒是安全的,对内皮细胞的活性没有明显影响。

本研究通过体外实验验证CL-PEG-MnFe₂O₄探针针对Endoglin的靶向性能,该探针也能在体外与肿瘤源性VECs和LECs特异性结合,并可以通过MRI进行检测,这为肿瘤新生血管及新生淋巴管的双重靶向显像提供了实验基础。

致谢:感谢四川大学生物医学材料中心艾华教授、王丹博士在材料合成过程中的精心指导。

【参考文献】

- [1] YANG H, ZOU L G, ZHANG S, et al. Feasibility of MR imaging in evaluating breast cancer lymphangiogenesis using polyethylene glycol-GoldMag nanoparticles[J]. Clin Radiol, 2013, 68(12): 1233-1240.
- [2] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [3] PRICE S J, GILLARD J H. Imaging biomarkers of brain tumour margin and tumour invasion[J]. Br J Radiol, 2011, 84(12): 159-167.
- [4] 杨华, 邹利光. Endoglin (CD105) 在肿瘤新生血管靶向诊断及治疗中的应用[J]. 临床肿瘤学杂志, 2011, 16(12): 1130-1132.
YANG H, ZOU L G. The application of endoglin (CD105) in targeted diagnosis and treatment of malignant tumors[J]. Chinese Clinical Oncology, 2011, 16(12): 1130-1133.
- [5] SEON B K, HABA A, MATSUNO F, et al. Endoglin-targeted cancer therapy[J]. Curr Drug Deliv, 2011, 8(1): 135-143.

- [6] YOSHITOMI H, KOBAYASHI S, OHTSUKA M, et al. Specific expression of endoglin (CD105) in endothelial cells of intratumoral blood and lymphatic vessels in pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2008, 37(3): 275-281.
- [7] 毕仙民, 梁志清, 侍立峰. Endoglin 结合肽功能性亲和常数的测定[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(8): 685-687.
- BI X M, LIANG Z Q, SHI L F. Determination of functional affinity of Endoglin conjugated peptide [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2007, 29(8): 685-687.
- [8] HU Y, JIANG X, DING Y, et al. Preparation and drug release behaviors of nimodipine-loaded poly (caprolactone)-poly (ethylene oxide)-polylactide amphiphilic copolymer nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(13): 2395-2404.
- [9] LU J, MA S, SUN J, et al. Manganese ferrite nanoparticle micellar nanocomposites as MRI contrast agent for liver imaging [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(15): 2919-2928.
- [10] 毕仙民, 梁志清, 侍立峰. Endoglin 特异性结合短肽筛选及功能分析[J]. *重庆医科大学学报*, 2007, 32(3): 232-235.
- BI X M, LIANG Z Q, SHI L F. Screening and function analysis of targeted short binding peptides of Endoglin [J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2007, 32(3): 232-235.
- [11] 毕仙民, 梁志清, 侍立峰. 应用噬菌体肽库筛选 Endoglin 的结合肽[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(7): 582-584.
- BI X M, LIANG Z Q, SHI L F. Screening of conjugated peptides of Endoglin from phage display peptide library [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2007, 29(7): 582-584.
- [12] LEE J H, HUH Y M, JUN Y W, et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging [J]. *Nat Med*, 2006, 13(1): 95-99.
- [13] CHAVHAN G B, BABYN P S, THOMAS B, et al. Principles, techniques, and applications of T2*-based MR imaging and its special applications[J]. *Radiographics*, 2009, 29(5): 1433-1449.
- [14] 胡玲, 张裕英, 高长有. 聚合物纳米粒子的结构和性能对胞吞和细胞功能的影响[J]. *化学进展*, 2009, 21(6): 1254-1267.
- HU L, ZHANG Y Y, GAO C Y. Affect of the structure and properties of polymeric nanoparticles to endocytosis and cell function[J]. *Progress in Chemistry*, 2009, 21(6): 1254-1267.
- [15] MENG W, PARKER T, KALLINTERI P, et al. Uptake and metabolism of novel biodegradable poly (glycerol-adipate) nanoparticles in DAOY monolayer[J]. *J Control Release*, 2006, 116(3): 314-321.
- [16] 邵阳, 杨华, 罗治彬, 等. 磁共振对超顺磁性氧化铁标记的大鼠间充质干细胞成像的研究[J]. *中国医学物理学杂志*, 2009, 26(1): 1011-1014.
- SHAO Y, YANG H, LUO Z B, et al. MR study on superparamagnetic iron oxide labeling mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Medical Physics*, 2009, 26(1): 1011-1014.
- [17] ARBAB A S, WILSON L B, ASHARI P, et al. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging[J]. *NMR Biomed*, 2005, 18(6): 383-389.
- [18] SELIM K K, XING Z C, CHOI M J, et al. Reduced cytotoxicity of insulin-immobilized CdS quantum dots using PEG as a spacer[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2011, 6(1): 1-9.
- [19] RICHARDSON D R, PONKA P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells[J]. *BBA-Biomembranes*, 1997, 1331(1): 1-40.
- [20] GAVIN C, GUNTER K, GUNTER T. Manganese and calcium transport in mitochondria: implications for manganese toxicity[J]. *Neurotoxicology*, 1998, 20(2-3): 445-453.
- [21] YANG H, SUN Y, ZHENG X. Manganese-induced apoptosis in rat myocytes[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2007, 21(3): 94-100.

(编辑:陈丽霞)

(上接750页)

- [3] CAMERON I L, MARKOV M S, HARDMAN W E. Optimization of a therapeutic electromagnetic field (EMF) to retard breast cancer tumor growth and vascularity[J]. *Cancer Cell Int*, 2014, 14(1): 125.
- [4] WANG J, AN Y, LI F, et al. The effects of pulsed electromagnetic field on the functions of osteoblasts on implant surfaces with different topographies[J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(2): 975-985.
- [5] KUBAT N J, MOFFETT J, FRAY L M. Effect of pulsed electromagnetic field treatment on programmed resolution of inflammation pathway markers in human cells in culture [J]. *J Inflamm Res*, 2015, 8: 59-69.
- [6] DETLAVALS I, DOMBROVSKA L, TURAUSKAA, et al. Experimental study of the effects of radiofrequency electromagnetic fields on animals with soft tissue wounds[J]. *Sci Total Environ*, 1996, 180(1): 35-42.
- [7] PYE C, ELSHERBINY N M, IBRAHIM A S, et al. Adenosine kinase inhibition protects the kidney against streptozotocin-induced diabetes through anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms[J]. *Pharmacol Res*, 2014, 85: 45-54.
- [8] DYGA I A M, SKURIKHIN E G, PERSHINA O V, et al. Role of hematopoietic stem cells in inflammation of the pancreas during diabetes mellitus[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2016, 160(4): 474-479.
- [9] AL-ONAZI A S, AL-RASHEED N M, ATTIA H A, et al. Ruboxistaurin attenuates diabetic nephropathy via modulation of TGF-beta1/Smad and GRAP pathways[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2016, 68(2): 219-232.
- [10] DA C J, DAMASCENO R S, MACHADO U F, et al. High glucose concentration stimulates NHE-1 activity in distal nephron cells: the role of the Mek/Erk1/2/p90RSK and p38MAPK signaling pathways [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(2): 333-343.
- [11] STENBERG L, KANJE M, MARTENSSON L, et al. Injury-induced activation of ERK 1/2 in the sciatic nerve of healthy and diabetic rats [J]. *Neuroreport*, 2011, 22(2): 73-77.

(编辑:陈丽霞)