

CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束介导的肿瘤微血管和微淋巴管双重靶向MR成像

杨华¹, 龚明福², 邹利光², 曾国飞¹, 方玉¹, 刘翠芳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:评价靶向Endoglin的CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束在肿瘤微血管和微淋巴管MR成像中的价值。**方法:**乳腺癌裸鼠移植瘤模型5只,经球后静脉注入铁浓度为50 μg/mL靶向Endoglin的CL-PEG-MnFe₂O₄纳米微粒,总量0.15 mL。分别于对比剂注射后0、5、15、30、60和120 min进行SE T₁WI、FSE T₂WI、GRE T₂*WI及T₂ mapping扫描。在各时间点测量肿瘤信号强度,绘制时间-信号强度变化曲线,分析曲线的变化规律。测量并计算肿瘤的T₂值、R₂值,评价CL-PEG-MnFe₂O₄探针的靶向增强效能,以非靶向的PEG-PCL-MnFe₂O₄纳米胶束为对照。**结果:**纳米粒注射后早期,肿瘤呈负性增强,肿瘤周边区明显;60 min后,注射非靶向PEG-PCL-MnFe₂O₄纳米胶束的肿瘤信号强度恢复到基线水平,而注射靶向CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束的肿瘤周边区仍呈斑点状强化。CL-PEG-MnFe₂O₄和PEG-PCL-MnFe₂O₄注射前,注射后0、5、15、30、60、120 min肿瘤的T₂值分别为(77.98±10.29)、(44.66±5.25)、(50.80±3.85)、(54.25±5.08)、(57.20±4.04)、(59.20±7.11)、(60.15±7.43) ms和(78.66±5.71)、(44.85±5.67)、(50.06±8.62)、(63.10±8.36)、(70.19±7.71)、(74.76±10.60)、(76.63±12.13) ms。CL-PEG-MnFe₂O₄的时间-信号强度变化率曲线呈下降-上升-平台型;PEG-PCL-MnFe₂O₄的时间-信号强度变化率曲线呈下降-上升型。**结论:**靶向Endoglin的CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束能与肿瘤新生血管及新生淋巴管结合,并能通过MRI检测,为肿瘤新生血管和新生淋巴管的MR靶向显像提供了实验基础。

【关键词】肿瘤; 内皮细胞; CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束; 分子成像; 磁共振

【中图分类号】R318.08; R814

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2019)09-1034-05

Magnetic resonance imaging of angiogenesis and lymphangiogenesis in tumor using dual-targeted CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelles

YANG Hua¹, GONG Mingfu², ZOU Liguang², ZENG Guofei¹, FANG Yu¹, LIU Cuifang¹

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 evaluate the value of Endoglin targeted CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelles in magnetic resonance (MR) imaging of tumor microvessels and lymphatic microvessels. **Methods** In 5 nude-mice breast cancer xenografts models, a total of 0.15 mL CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelles with a concentration of 50 μg/mL was intravenously administrated by retrobulbar vein. MR imaging was performed at 0, 5, 15, 30, 60, 120 min after contrast injection. The MR imaging sequences included spin echo T₁-weighted imaging (SE T₁WI), fast spin echo T₂-weighted imaging (FSE T₂WI), gradient echo T₂*-weighted imaging (GRE T₂*WI) and T₂ mapping. The tumor signal intensity was measured at each time point, and time-intensity curve was plotted to analyze the change rule of the curve. The T₂ and R₂ values of the tumor were measured and calculated, so as to evaluate the target enhancement performance of CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelles. Non-targeted PEG-PCL-MnFe₂O₄ was served as a control. **Results** In the early period after the intravenous administration of nanomicelles, the tumor was negatively enhanced and the peripheral area of the tumor had obvious enhancement. At 60 min after the intravenous administration of targeted CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelles, the tumor displayed patchy or spot-like enhancement, which was mainly limited to the peripheral areas of the tumor. However, the tumor signal intensity returned to the baseline at 60 min after the administration of non-targeted PEG-PCL-MnFe₂O₄ nanomicelles. The T₂ values of the tumor before and at 0, 5, 15, 30, 60 and 120 min after the administration of CL-PEG-MnFe₂O₄

【收稿日期】2019-04-20

【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(cstc2015jcyjA10083)

【作者简介】杨华, 博士, 副主任医师, 主要从事磁共振分子影像研究, E-mail: yanghua780819@163.com

【通信作者】刘翠芳, E-mail: lcfhappy@163.com

nanomicelles were (77.98±10.29), (44.66±5.25), (50.80±3.85), (54.25±5.08), (57.20±4.04), (59.20±7.11) and (60.15±7.43) ms, respectively; and those values before and after the administration of PEG-PCL-MnFe₂O₄ nanomicelles were (78.66±5.71), (44.85±5.67), (50.06±8.62), (63.10±8.36), (70.19±7.71), (74.76±10.60) and (76.63±12.13) ms, respectively. After the intravenous administration of CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelles, the time-intensity curve was decreased firstly and then increased and finally reached a plateau, while the time-intensity curve after the intravenous administration of PEG-PCL-MnFe₂O₄ was decrease firstly and then increased. **Conclusion** Endoglin targeted CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelles can bind to tumor microvessels and lymphatic microvessels, which can be detected by MR imaging, thereby providing an experimental basis for targeted MR imaging of tumor microvessels and lymphatic microvessels.

Keywords: tumor; endothelial cell; CL-PEG-MnFe₂O₄ nanomicelles; molecular imaging; magnetic resonance

前言

近年来,随着靶向治疗、生物治疗及化疗等各种治疗手段的不断进步,恶性肿瘤的五年生存率不断提高,但肿瘤一旦发生了转移,其远期治疗效果将大大减低,因此,准确的发现或预测肿瘤转移风险对肿瘤治疗手段的选择及预后的判断具有重要意义^[1-2]。部分恶性肿瘤的转移同时存在血行和淋巴道两个转移途径,显然,此类肿瘤如果只针对一种转移途径进行干预将会大大影响患者的预后^[3-4]。研究发现^[5]:恶性肿瘤内血管的新生或淋巴管的新生与肿瘤的恶性程度及转移风险具有明显的相关性,如能通过影像手段在活体内同时检测肿瘤的新生血管和新生淋巴管将会给肿瘤的治疗带来重大意义。磁共振分子影像的出现为靶向肿瘤血管及淋巴管显像提供了一种分辨率高、无创且较敏感的影像检查方法。在过去的20年中,靶向肿瘤血管显像的研究取得了长足的进展,然而,针对肿瘤血管及淋巴管双重靶向显像的研究却罕见报道。前期,笔者合成了靶向Endoglin的CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束,体外实验表明CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束能与肿瘤源性血管内皮细胞和淋巴管内皮细胞特异性结合^[6]。本研究中笔者拟将CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束应用于裸鼠乳腺癌移植瘤模型并进行MR成像,探索基于磁共振纳米探针显示肿瘤新生血管及新生淋巴管的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂及仪器

4~5周龄健康雌性BALB/C裸鼠12只(购自第三军医大学新桥医院实验动物中心),MDA-MB-231乳腺癌细胞由第三军医大学生物化学与分子生物学教研室惠赠。CL-PEG-MnFe₂O₄和PEG-PCL-MnFe₂O₄纳米胶束为自制^[6-7]。胰酶、胎牛血清、青霉素、链霉素双抗购自美国Hyclone公司,小鼠抗人CD34单克隆抗体、山羊抗小鼠IgG-HRP、兔抗人CD105抗体、山羊抗兔IgG-HRP、鼠抗人Podoplanin单克隆抗体及山羊抗鼠IgG-HRP等

免疫组化试剂均购自美国Abcam公司,DAB显色液购自上海碧云天公司。光学显微镜为日本奥林巴斯公司产品,TCSP5激光共聚焦显微镜为德国莱卡公司产品,3.0 T磁共振成像仪(Signa HDx)及正交小动物线圈来自美国GE公司。

1.2 裸鼠移植瘤模型的建立

收集处于对数生长期乳腺癌MDA-MB-231细胞,PBS重悬配制成细胞浓度为 $5 \times 10^7/\text{mL}$ 的细胞悬液。选取裸鼠大腿根部皮下为种植部位,以1 mL注射器缓慢注射0.2 mL的细胞悬液,注射过程中防止细胞悬液渗漏。裸鼠细胞接种后置于SPF级动物房内饲养,定期观察、记录移植瘤生长情况,待肿瘤直径长到1.0 cm进行下一步实验。

1.3 移植瘤的MR成像

10只裸鼠移植瘤模型随机分为实验组和对照组,每组5只。2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。俯卧位固定在小动物专用正交线圈内,3.0 T磁共振进行轴位平扫及靶向增强扫描。扫描参数:平扫SE-T₁WI(TR/TE=380 ms/14 ms);FSE-T₂WI(TR/TE=3 000 ms/65 ms);GRE T₂*WI(TR/TE=540 ms/10 ms, FA=20°);八回波T₂ mapping(TR/TE=2 400 ms/13.7、27.4、41.1、54.8、68.6、82.3、96.0、109.7 ms)。平扫结束后行靶向增强扫描,经球后静脉注射铁浓度为50 μg/mL纳米粒,方法参考笔者前述报道^[8]。实验组为靶向Endoglin的CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束,对照组为非靶向的PEG-PCL-MnFe₂O₄纳米胶束,总量均为0.15 mL。整个穿刺和注药过程尽量保证裸鼠移植瘤位置不动,除T₁WI序列外,增强扫描的其余序列、位置及参数与平扫相同。分别于对比剂注射后0、5、15、30、60及120 min扫描。选取不同时间点相同层面肿瘤图像同一位置进行信号强度(Signal Intensity, SI)测量,感兴趣区(Region Of Interest, ROI)大小为10 mm²,并计算信号强度变化率(ΔSI): $\Delta SI = (SI_{\text{增}} - SI_{\text{平}})/SI_{\text{平}} \times 100\%$,其中SI_平和SI_增分别为肿瘤平扫和增强后的信号强度。绘制时间- ΔSI 曲线(Time-Intensity Curve, TIC),观察曲线的特征,分析信号变化

规律。 T_2 mapping 获取图像导入 ADW 4.5 工作站进行后处理,在 T_2 mapping 伪彩图测量肿瘤的 T_2 值和 R_2 值,评价靶向 CL-PEG-MnFe₂O₄ 纳米胶束增强效能。MRI 扫描结束后,摘取肿瘤,尽可能在 MRI 扫描层面切开标本,分别行 HE 染色、普鲁士蓝染色、CD34、CD105 及 Podoplanin 免疫组化染色,倒置显微镜下观察摄片。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差表示,先进行正态分布检验及方差齐性检验,根据方差齐性检验结果采用配对资料 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

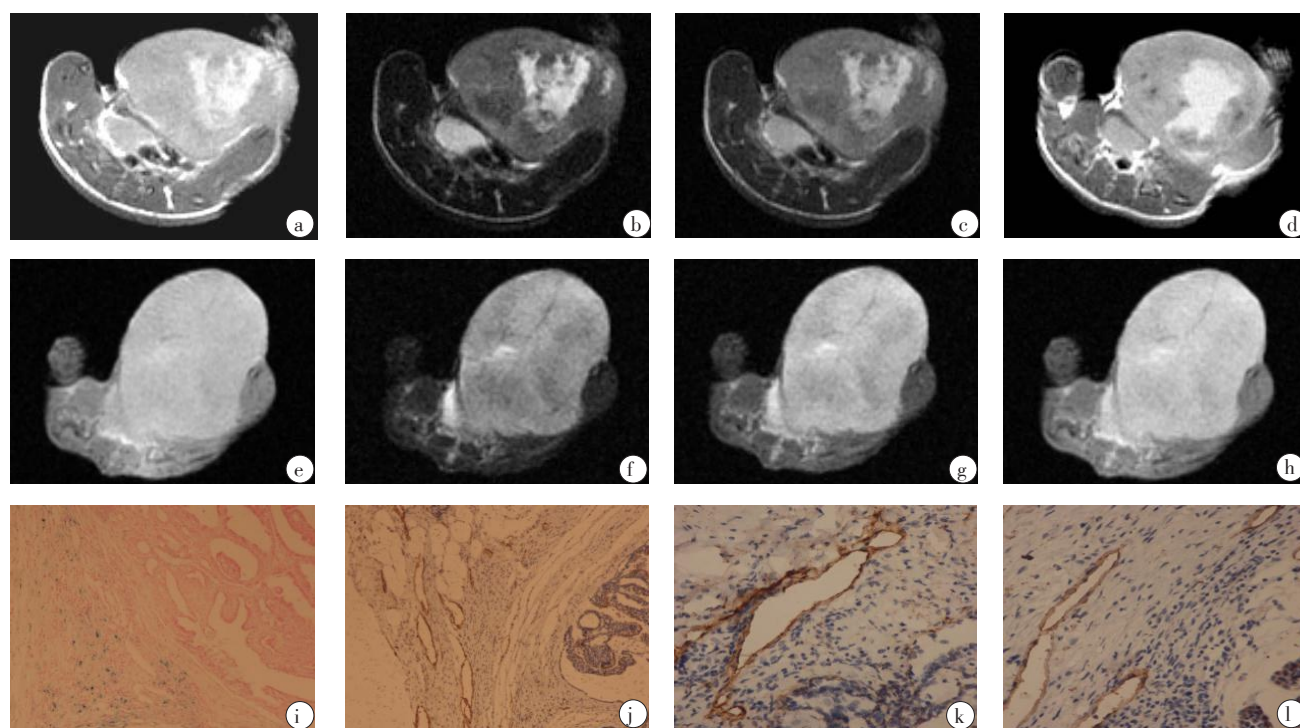


图1 裸鼠乳腺癌移植瘤靶向增强 T_2 WI 图像

Fig.1 Targeted and enhanced T_2 -weighted images of breast cancer xenografts in nude mice

a~d 分别为静脉注射 CL-PEG-MnFe₂O₄ 后 0、5、30 和 60 min 图像; e~h 分别为注射 PEG-PCL-MnFe₂O₄ 后 0、5、30 和 60 min 图像; i~l 分别为移植瘤注射 CL-PEG-MnFe₂O₄ 后的普鲁士蓝染色($\times 100$)、CD105 染色($\times 100$)、CD34 染色($\times 400$)和 Podoplanin 染色($\times 400$)图像

2.2 裸鼠乳腺癌移植瘤靶向增强后 T_2 值和 R_2 值变化

两组肿瘤实质对比剂注射前、后的 T_2 值及 R_2 值见表 1, 可见 CL-PEG-MnFe₂O₄ 组在注射后 0 min T_2 值明显缩短, R_2 值明显增高, T_2 值变化幅度约 42.3%, 此后逐渐恢复。60 min 后 T_2 值和 R_2 值趋于恒定。2 h 后 T_2 仍维持在 22.9% 左右, 而 PEG-PCL-MnFe₂O₄ 在 15 min 内迅速回升, 60 min 后 T_2 值和 R_2 值恢复到纳米粒注射前水平(图 2b)。

2.1 裸鼠乳腺癌移植瘤 Endoglin 靶向 MR 成像

靶向 Endoglin 的 CL-PEG-MnFe₂O₄ 探针注射后 0 及 5 min, 在 FSE T_2 WI 序列肿瘤实质呈明显的负性增强, 肿瘤周边区增强明显, 此后强化逐渐减弱, 强化范围逐渐减小, 1 h 的时候, 肿瘤呈周边区斑点状强化(图 1a~d), TIC 呈下降-上升-平台型(图 2a); 而注射非靶向的 PEG-PCL-MnFe₂O₄ 纳米胶束后早期实质强化特点与 CL-PEG-MnFe₂O₄ 相似, 但消退更快, 在 1 h 时肿瘤信号强度几乎恢复到平扫状态(图 1e~h), TIC 呈下降-上升型(图 2a)。肿瘤增强区域病理组织普鲁士蓝染色见大量蓝染颗粒, 相应区域 CD105、CD34 及 Podoplanin 免疫组化染色显示局部血管及淋巴管丰富(图 1i~l)。

3 讨论

分子影像的出现为疾病(尤其是肿瘤)的精确诊断和精准治疗提供更为可靠的辅助工具, 磁共振分子影像由于具有无创、信噪比及软组织分辨率高和可重复的优点被认为是未来分子影像发展的主要方向^[9-11]。但敏感性一直是制约磁共振分子影像发展的难点, 探寻更加敏感的磁共振显像对比剂是学术界研究的热点。金属纳米粒子的出现为磁共振分子影

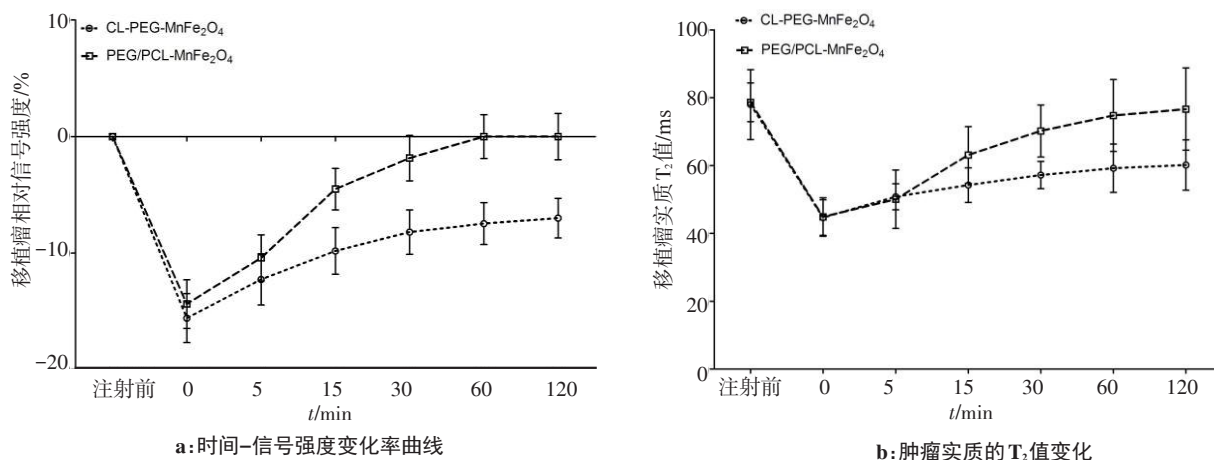


图2 静脉注射PEG-PCL-MnFe₂O₄和CL-PEG-MnFe₂O₄后乳腺癌移植瘤的MR信号变化规律

Fig.2 Changes in magnetic resonance signals of breast cancer xenografts after the intravenous administration of PEG-PCL-MnFe₂O₄ and CL-PEG-MnFe₂O₄

表1 注射两种对比剂后肿瘤实质的T₂值及R₂值($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 T₂ and R₂ values of tumor parenchyma after the intravenous administration of PEG-PCL-MnFe₂O₄ and CL-PEG-MnFe₂O₄ (Mean±SD)

扫描时间	CL-PEG-MnFe ₂ O ₄		PEG-PCL-MnFe ₂ O ₄	
	T ₂ 值/ms	R ₂ 值/Hz	T ₂ 值/ms	R ₂ 值/Hz
注射前	77.98±10.29	13.04±1.47	78.66±5.71	12.76±0.98
0 min	44.66±5.25	23.83±2.66	44.85±5.67	24.39±5.98
5 min	50.80±3.85	19.83±1.62	50.06±8.62	20.55±3.32
15 min	54.25±5.08	18.59±1.76	63.10±8.36	16.15±2.14
30 min	57.20±4.04	17.56±1.27	70.19±7.71	14.36±1.49
60 min	59.20±7.11*	17.11±2.07*	74.76±10.60*	13.61±1.75*
2 h	60.15±7.43*	16.85±2.11*	76.63±12.13*	13.33±1.89*

*差异有统计学意义

像的突破带来新的希望,近年来,伴随着纳米粒合成技术不断进步,更多超敏感金属氧化物被优选出来,同时,包被材料及表面修饰材料的不断更新,纳米粒的水溶性、生物相容性及靶向性能逐渐提升,为磁共振分子影像的临床应用打下了坚实的基础^[12-13]。MnFe₂O₄纳米粒由于具有易于反磁化的特性,相对于其他铁酸盐纳米粒具有更高的饱和磁化强度^[14]。笔者在前期的研究中,证实了MnFe₂O₄纳米粒的稳定性、高敏感性及其安全性,通过聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)和聚己内酯(Polycaprolactone, PCL)两亲性嵌段聚合物包被、自组装形成PEG-PCL-MnFe₂O₄纳米胶束能再进一步提升纳米粒的磁化率,体外细胞实验证实了其连接靶向Endoglin的多肽后形成的

CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束能与肿瘤源性血管内皮细胞和淋巴管内皮细胞特异性结合^[6-7]。本研究中,笔者通过球后静脉注射的方式将CL-PEG-MnFe₂O₄纳米胶束引入到裸鼠乳腺癌移植瘤模型,MRI及病理结果证实了PEG-PCL-MnFe₂O₄纳米胶束在结合了靶向Endoglin的短肽后能与肿瘤血管及淋巴管结合。

尽管通过包被、修饰以后纳米粒具备了良好的水溶性及生物相容性,链接靶向介质后能与血管内皮主动结合,但由于要事先穿过血管壁、组织间隙和淋巴管壁,因而通过静脉的途径引入纳米粒实现活体淋巴管显像仍然面临诸多困难^[15]。研究表明:正常毛细血管壁难以透过粒径超过50 nm的纳米粒^[16]。然而,由于肿瘤新生血管内皮细胞增殖速度快,细胞不成熟,基底膜不完整,细胞间间隙大(约280~380 nm),周细胞和平滑肌细胞缺失,从而使新生血管壁的通透性明显增大,增加了纳米粒到达组织间隙的概率^[17]。进入间质的纳米粒均会被淋巴管重吸收,这是因为淋巴管通透性非常高,淋巴管内皮细胞间的间隙能达到500 nm,且新生淋巴管由于内皮不成熟,缺少紧密连接,无锚定纤维蛋白及周细胞环绕,通透性进一步增加,加上淋巴管特有的虹吸功能,能将进入间质的纳米粒吸收进淋巴管^[18]。纳米粒进入淋巴管后在特异性靶向介质的趋化下与淋巴管内皮细胞结合。

笔者前期的研究表明:纳米粒在活体血浆内的清除时间大致为30 min,而靶向纳米粒从血浆进入组织间隙,再由组织间隙内重吸收进入淋巴管的时间大致为60 min,这与文献的报道相一致^[14]。本研究中,由于考虑到实验动物麻醉的效果及安全,笔者把最大观察时间窗设定在120 min。结果显示:无论是

靶向组还是非靶向组,纳米粒注射后信号迅速降低,代表着肿瘤组织的血流灌注,而周边区信号改变强于中心区,这与肿瘤血管生成主要集中在肿瘤周边区有关。非靶向组的TIC呈下降-上升型,且增强持续时间短,在纳米粒注射后15 min内信号就急剧回升,后回升减慢,在30 min左右回到基线水平,呈指数样衰减,这与纳米粒在血浆中的廓清规律一致^[19-20]。而靶向组纳米粒注射后信号不能迅速回升,在60 min后信号仍维持在一定水平,TIC呈下降-上升-平台型,这可能源于纳米粒与血管内皮及淋巴管内皮的结合,术后标本的病理及免疫组化染色也印证了纳米粒的存在。

在本研究中,尽管笔者证实了靶向Endoglin的CL-PEG-MnFe₂O₄胶束能在活体显示肿瘤新生血管及新生淋巴管,但仍然有以下几点问题尚需进一步研究和完善。首先,经管短肽与纳米胶束的结合在体外证实是稳定的,且短肽的活性也得以足够的保留,但活体内复杂的生理、生化环境,尤其纳米粒在穿过这么多障碍的过程中是否会破坏靶向纳米粒的稳定性和靶向介质的活性尚不完全清楚,影像及病理结果可能会出现假阳性。其次,本研究中,由于病理及免疫组化的局限性,笔者仍然难以准确的区分显像的新生血管、新生淋巴管以及正常微淋巴管。然而,免疫组化确实证实局部新生血管及新生淋巴管丰富,结合笔者前期体外实验,笔者有理由相信基于CL-PEG-MnFe₂O₄胶束实现肿瘤新生血管及淋巴管的显像可能性,为肿瘤新生血管和新生淋巴管的活体MR靶向显像提供了实验基础。

【参考文献】

- [1] SOUHO T, LAMBONI L, XIAO L, et al. Cancer hallmarks and malignancy features: gateway for improved targeted drug delivery[J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(7): 1928-1945.
- [2] CHAKRAVARTY R, CHAKRABORTY S, DASH A, et al. Molecular imaging of breast cancer: role of RGD peptides[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2015, 15(13): 1073-1094.
- [3] WAKAYAMA A, KUDAKA W, MATSUMOTO H, et al. Lymphatic vessel involvement is predictive for lymph node metastasis and an important prognostic factor in endometrial cancer[J]. *Int J Clin Oncol*, 2018, 23(3): 532-538.
- [4] ONIMARU M, YONEMITSU Y. Angiogenic and lymphangiogenic cascades in the tumor microenvironment[J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2011, 3: 216-225.
- [5] LEE E, KOSKIMAKI J E, PANDEY N B, et al. Inhibition of lymphangiogenesis and angiogenesis in breast tumor xenografts and lymph nodes by a peptide derived from transmembrane protein 45A[J]. *Neoplasia*, 2013, 15(2): 112-124.
- [6] 杨华, 龚明福, 邹利光, 等. 靶向Endoglin的CL-PEG-MnFe₂O₄探针构建及体外实验[J]. *中国医学物理学杂志*, 2016, 33(7): 751-756.
- [7] 杨华, 龚明福, 邹利光, 等. MnFe₂O₄纳米胶束合成及其应用于磁共振分子影像的可行性[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(47): 7090-7096.
- [8] 杨柳, 杨华, 刘云, 等. 球后静脉注射在裸小鼠纳米粒静脉给药中的可行性探讨[J]. *实验动物与比较医学*, 2016, 36(2): 117-120.
- [9] HELLER S L, HEACOCK L, MOY L. Developments in breast imaging: update on new and evolving MR imaging and molecular imaging techniques[J]. *Magn Reson Imaging Clin N Am*, 2018, 26(2): 247-258.
- [10] LEE L, ITO T, JENSEN R T. Imaging of pancreatic neuroendocrine tumors: recent advances, current status and controversies[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018, 18(9): 837-860.
- [11] ROSSI S H, PREZZI D, KELLY-MORLAND C, et al. Imaging for the diagnosis and response assessment of renal tumours[J]. *World J Urol*, 2018, 36(12): 1927-1942.
- [12] HASAN A, MORSHED M, MEMIC A, et al. Nanoparticles in tissue engineering: applications, challenges and prospects [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 5637-5655.
- [13] NITTA S K, NUMATA K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(1): 1629-1654.
- [14] LEE J H, HUH Y M, JUN Y W, et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging [J]. *Nat Med*, 2007, 13(1): 95-99.
- [15] 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.
- [16] ESTELRICH J, SÁNCHEZ- MARTÍN M J, BUSQUETS M A. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents[J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 1727-1741.
- [17] ZHANG Y, SUN T, JIANG C. Biomacromolecules as carriers in drug delivery and tissue engineering[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8(1): 34-50.
- [18] BALUK P, FUXE J, HASHIZUME H, et al. Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(10): 2349-2362.
- [19] POTHAYEE N, BALASUBRAMANIAM S, POTHAYEE N, et al. Magnetic nanoclusters with hydrophilic spacing for dual drug delivery and sensitive magnetic resonance imaging[J]. *J Mater Chem B*, 2013, 1(8): 1142-1149.
- [20] NICULAES D, LAK A, ANYFANTIS G C, et al. Asymmetric assembling of iron oxide nanocubes for improving magnetic hyperthermia performance[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(12): 12121-12133.

(编辑:薛泽玲)