

特约专栏

氧化铁纳米颗粒示踪干细胞的临床转化研究进展

谢园园, 刘 硕, 王 斌

(南京大学医学院附属鼓楼医院 临床干细胞研究室, 江苏 南京 210008)

摘 要: 氧化铁纳米颗粒由纳米结构的氧化铁分子和表面包被的有机或无机涂层组成, 具有独特的磁性和优异的生物相容性, 在医学领域中应用非常广泛。当氧化铁纳米颗粒核心的氧化铁直径小于 10~15 nm 时, 在一定温度范围内表现出超顺磁性, 常用于磁共振成像, 并且已经有多种基于超顺磁性氧化铁纳米颗粒的相关产品批准用于临床。在人体, 移植干细胞在体内的迁移、分布和归巢仍然没有有效的示踪方法, 严重制约着研究人员了解干细胞治疗机理及评价治疗效果, 而超顺磁性氧化铁纳米颗粒与磁共振成像技术的结合为干细胞示踪的临床转化带来了希望, 并将有望成为干细胞示踪的“金标准”, 但是目前还未有任何纳米铁剂批准用于临床干细胞标记和体内示踪。综述了纳米铁颗粒在干细胞示踪方面的临床转化研究现状, 以及面临的机遇和挑战, 并展望了今后的发展方向与前景。

关键词: 氧化铁纳米颗粒; 超顺磁性; 磁共振成像; 干细胞; 示踪技术; 临床转化

中图分类号: R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2019)06-0567-10

Research Progresses on Clinical Translation of Iron Oxide Nanoparticles in Stem Cell Tracing

XIE Yuanyuan, LIU Shuo, WANG Bin

(Clinical Stem Cell Center, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

Abstract: The iron oxide nanoparticles are composed of nanostructured iron oxide molecules and organic (or inorganic) surface coatings, which have unique magnetic properties and excellent biocompatibility, and are widely used in medical field. As long as the diameter of iron oxide core is less than 10~15 nm, they exhibits superparamagnetism in a certain temperature range, which is often used for magnetic resonance imaging. Up to now, a variety of products based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles have been approved for various clinical uses. So far, there is no effective method for tracing migration, distribution, and homing of the transplanted stem cells in human, heavily hampering the mechanism and efficacy researches of stem cell-based products. The combination of superparamagnetic iron oxide nanoparticles and magnetic resonance imaging technology brings a hope for clinical translation of stem cell tracing, which is expected to become “the gold standard” for stem cell tracing in future. However, there is no relevant nano-iron approved as clinical stem cell tracing markers in clinic setting so far. This article reviews research progresses of nano-iron particles in stem cell tracing clinical translation, the facing opportunities and challenges, also gives a prospects for the development in the future.

Key words: iron oxide nanoparticles; superparamagnetic; magnetic resonance imaging; stem cells; tracing; clinical translation

1 前 言

近年来, 涉及纳米技术的研究成果呈现指数级增长, 纳米材料在电子学、光学、自动化技术、纺织、石油、天然气和生物医学等领域得到广泛应用^[1-4]。在所有类型的纳米颗粒中, 磁性纳米颗粒(magnetic nanoparticles, MNPs, 直径 10~100 nm), 因其尺寸和形状可调节、合成方法简单、具有相对较大的比表面积以及可携带多种生物配体的特性等, 在医学研究中关注度较高^[5]。MNPs 由铁、钴、镍和锌等磁性材料组成^[6], 包含多种金属化

收稿日期: 2018-10-15 修回日期: 2018-11-14

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFA0104304); 国家自然科学基金资助项目(81800583, 81571213); 江苏省第十三批“六大人才高峰”项目(WSN-155); 南京市“十三五”规划重点项目(ZDX16002)

第一作者: 谢园园, 女, 1993 年生, 检验技师

通讯作者: 王 斌, 男, 1973 年生, 教授, 博士生导师,

Email: wangbin022800@126.com

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.201810009

合物,例如 Fe_3O_4 、 Fe_2O_3 、 NiFe_2O_4 和 FeCo ,从而具有不同的磁性^[7]。

众所周知,铁是所有生物体必须的矿物质,是人体中天然存在的金属元素,具有多种重要功能,比如:是血红蛋白的关键组成部分,可为组织携带氧气,促进维生素 B 族代谢以及促进婴幼儿智力发育等。MNPs 中的氧化铁纳米颗粒(iron oxide nanoparticles, IONPs),具有独特的磁性和优异的生物相容性^[8],在医学领域应用非常广泛,包括贫血患者的补铁剂^[9]、磁性细胞或分子分离技术^[10]、磁性靶向药物和基因传递载体^[11]、磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)造影剂^[12]、磁流体热疗(magnetic fluid hyperthermia, MFH)^[13]和干细胞生物学应用^[14]等等。

IONPs 的功能核心是纳米结构的氧化铁分子,最常用的氧化铁是磁铁矿(Fe_3O_4)、磁赤铁矿($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)和赤铁矿($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)^[15]。裸的 IONPs 颗粒易于发生化学反应而聚集成团,而且可能有毒,因此 IONPs 一般会被有机或无机涂层包裹,并且可以用第二层或更多层改性第一涂层以提供特定的功能,从而减少氧化铁氧化、防止纳米粒子聚集及提高生物相容性^[16]。医学生物学领域中最常用的是有机涂层,包括柠檬酸盐、葡聚糖、聚乙二醇、壳聚糖、聚乙烯亚胺、磷脂和共聚物等等^[17],并且涂层外表还可以通过物理或化学的方法缀合与特异性受体结合的靶向分子(即配体或抗体),也可以加载特定的药物化学分子,如蛋白质和遗传物质的治疗剂,用于某些医学目的^[18]。

当核心 IONPs 颗粒尺寸小于临界尺寸(通常为 10~15 nm)时,在一定温度范围内颗粒将表现出超顺磁性^[19],称之为超顺磁性氧化铁纳米颗粒(superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs)。超顺磁性是指整个粒子表现为顺磁原子的状态,例如,该单畴粒子的磁矩与外部磁场对齐^[20],通常 MRI 是观察 SPIONs 的首选技术。MRI 是一种功能强大且应用广泛的医学成像方法,具有极高的成像灵活性、优异的空间分辨率,可避免电离辐射,患者接受度高,并且能够评估解剖学和生理学参数,获得独特的临床信息,是医学领域中最有效的诊断工具之一^[21]。此外,用于 MRI 成像的 SPIONs,一般具有可生物降解的碳水化合物表层和氧化铁纳米颗粒核心,可以提供强烈的对比度区分移植体内的 SPIONs 标记的干细胞和周围宿主组织^[22],也成为近年来科学家们提出的一种新兴的干细胞示踪检测技术——将 MRI 和 SPIONs 应用结合评估干细胞在体内的命运,目前已被提出作为监测植入体内的干细胞生物分布和迁移的金标准^[23]。

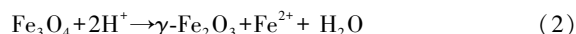
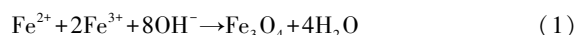
2 SPIONs 在 MRI 的临床应用中的发展过程

目前 SPIONs 用于临床成像已经超过 20 年,本文将详细介绍以往和当前被批准临床应用的 SPIONs 的发展过程及各自特点。1995 年,第一个用以 MRI 成像的 SPION 被开发出来,其流体动力学半径是 100~150 nm,是由 5~10 nm 的氧化铁核心和葡聚糖分子包被的表面组成^[24]。但是在不断的研究与应用中,发现其安全性、生物相容性、MRI 的灵敏度以及与成像装置的兼容性都需要进一步改进。随后,不断有研究报道逐渐优化的 SPIONs 的合成方法和工艺,基于其制备了多种质量较高、成本较低的纳米颗粒材料。

2.1 SPIONs 的合成方法

2.1.1 碱性溶液共沉淀法

在碱性溶液中共沉淀 Fe^{2+} (亚铁离子)和 Fe^{3+} (铁离子)是公认的、常规的 SPIONs 合成方法^[10, 25],通过在非氧化环境中添加碱性溶液(如反应方程式(1)),在稳定剂存在下,使用定比例的 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 盐溶液,通过沉淀法形成 Fe_3O_4 纳米颗粒。根据用于共沉淀的悬浮液的 pH 值和氧含量, Fe_3O_4 可以通过各种电子或离子转移转变成 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (如反应方程式(2)),同时可以在溶液中加入不同的化合物涂覆在 SPIONs 表面^[26]。通过改变前驱体盐浓度、稳定剂、反应时间和 pH,可以实现对粒度、磁性和胶体稳定性的高度控制。



这些类型的 SPIONs 目前已得到了广泛的研究,并成功转化到临床^[25, 27]。该方法可用于 SPIONs 的大规模生产,但缺陷是较难获得尺寸均一和磁性稳定的纳米铁颗粒核心^[28]。Chen 等^[29]提出了一种称为“水冷却和磁性内部加热共沉淀”的物理辅助策略优化合成 SPIONs 的方法。共沉淀制备过程按顺序分为成核、生长和成熟 3 个部分,而加热是为纳米晶体生长和成熟阶段提供足够的能量,用优化工艺制备的 SPIONs 的晶体结构得到了极大的改善,粒度分布更均匀,磁性能显著提高。

2.1.2 热分解法

在封端剂(例如油酸和油胺)存在下,将铁的有机化合物(例如五羰基铁 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ 、油酸铁 $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 或 FeOOH)热分解可获得 SPIONs,通过改变反应中试剂的比例可以控制 SPION 的尺寸、形状和分散性以及磁性等^[30-33]。但主要缺点是合成的 SPIONs 是疏水性的,需经多步骤、繁琐的表面修饰才可以将它们改变成亲水性颗粒,从而改善其生物学功能^[28, 34]。目前多篇文献报道了在 IONP 的化学修饰中,聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)是具有高电荷密度的阳离子聚合物,其氨基基团片

段可以产生具有正电荷和聚集稳定性的纳米颗粒, 常被用作多功能封端剂和活性稳定剂, 对纳米颗粒的流体动力学具有显著影响, 并且可提高其在 MRI 中的弛豫率和灵敏度^[35]。但是缺点是 PEI 能够与带负电荷的细胞膜相互作用, 并通过胞吞作用进入细胞中, 对细胞具有高毒性^[36]。而将水溶性聚合物聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 与 PEI 结合产生的 PEI-PEG 共聚物, 不仅可以增强 IONPs 的水溶性, 还可降低 PEI 的毒性^[37]。

2.1.3 微乳液法

聚(L-丙交酯) (poly(L-lactide), PLLA) 是一种在医疗应用中长期使用并且安全的聚合物, 是完全可生物降解的^[38]。近年来有文献报道通过微乳液法合成氧化铁-PLLA 纳米粒子^[39], 这种合成方法的优点是可以将不同浓度和类型的氧化铁引入纳米颗粒中进一步优化 MRI 性质, 并可将荧光染料嵌入聚合物中。此种方法合成的纳米颗粒具有负 Zeta 电位 (-29 和 -44 mV 之间), 直径为 110~135 nm^[40]。

2.1.4 其他合成方法

很多文献报道了合成具备所需形状、尺寸和磁性的氧化铁纳米颗粒的其他方法。其他不太常用的合成方法包括水热反应和溶胶-凝胶合成法^[27]。

对于在生物医学中的应用, SPIONs 在水中的稳定性、对人体的无毒性以及体内可生物降解性至关重要。一般来说, Fe₃O₄ 核的 SPIONs 因更易合成而被广泛研究, 但是有报道认为 Fe₃O₄ 会分解成 γ -Fe₂O₃, 可能会在标记干细胞过程中引起毒性问题^[41], 因此研究人员一般会在标记干细胞前预氧化微粒^[42]。一般认为 γ -Fe₂O₃ 在化学性质上更稳定并且对干细胞的毒性较小, 但对两种成分尚未进行详细研究与比较, 可能由于大多数合成的 SPIONs 是两者的混合物^[33]。

2.2 曾经或正在批准用于临床成像的 SPIONs

作者查阅大量文献后, 总结了曾经或正在批准用于临床成像的 SPIONs, 列于表 1。第一个上市的 SPIONs 是

表 1 已被批准用于临床或正处于临床试验的 SPIONs
Table 1 SPIONs approved for clinical application and in clinical trails

General name	Trade name	Surface coating	Hydrodynamic diameter	Iron concentration	Clinical dose	Half-life	Indication	R&D company	Marketing years or research status	Ref.
Ferumoxides AMI-24	Feridex®	Dextran	SPIO, 50~100 nm	11.2 mg/mL	0.56 mg/kg	10 min	MRI of liver injury and some tumors	AMAG Pharmaceuticals	Approved in 1996 by FDA, withdrew in 2008	[43]
Ferucarbotran SHU 555A	Resovist®	Polyglucosyl sorbitol carboxymethyl ether	SPIO, 60~80 nm	28 mg/mL	<60 kg = 25.2 mg, >60 kg = 29.2 mg	12 min	Liver MRI	Bayer Schering Pharma AG	Approved in 2001 by FDA, withdrew in 2009	[45]
Ferumoxtran-10 AMI-227	Combidex®/Sinerem®	Low molecular weight dextran	USPIO, 20~50 nm	Not mentioned	2.6 mg/kg	>24 h	MRI of liver, spleen and lymph node metastasis	AMAG Pharmaceuticals	Approved in 2005 by EMA, withdrew in 2007	[44]
Ferumoxytol AMI-7228	Feraheme®	Polyglucosyl sorbitol carboxymethyl ether	USPIO, 20~30 nm	30 mg/kg	Anemia treatment: 510 mg, each time	10~14 h	Supplement of iron for iron deficiency anemia	AMAG Pharmaceuticals	Approved in 2009 by FDA	[47]
Ruicun	Ferumoxytol	Polyglucosyl sorbitol carboxymethyl ether	USPIO, 19~31 nm	29.2 mg/kg	Anemia treatment: 510 mg each time	15 h	Supplement of iron for iron deficiency anemia	Chia Tai Tianqing Pharmaceutical Group Limited by Share Ltd.	Approved in 2016 by CFDA	Not mentioned
Feruglose NC100150	Clariscan®	Oxidized oligosaccharide starch	USPIO, 11~15 nm	28 mg/mL	5.6 mg/kg	2 h	Blood pool and hepatic angiography	Nycomed Imaging	Approved in 2017 in Korea	[53]
Ferucarbotran SHU 555C	Supravist™	Dextran	USPIO, 20~25 nm	28 mg/mL	< 4.48 mg/kg	6~8 h	MRI	Bayer Schering Pharma AG	Phase III clinical trial in Germany	[54]

AMAG Pharmaceuticals 公司研发的右旋糖酐包被的流体动力学直径为 50~100 nm 的 Endorem[®], 通用名称为 Ferumoxides AMI-24, 其 1996 年在美国上市, 曾被美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于肝部损伤及某些肿瘤的 MRI 造影剂, 最终于 2008 年撤市^[43]。同一个公司研发的 Combidx[®]/Sinerem[®] (低分子量右旋糖酐包被, 20~50 nm), 2005 年在欧洲上市, 但仅仅两年后就被撤市^[44]。此外还有, Resovist[®] (聚葡萄糖山梨醇羧甲基醚包被, 60~80 nm) 和 Clariscan[®] (氧化低聚淀粉包被, 直径为 11~15 nm), 由于安全问题, 现已被停产^[45, 46]。详细内容见表 1。

目前, 可临床应用的 SPIONs 颗粒有 FDA 批准的 Ferumoxytol (Feraheme[®], AMAG Pharmaceuticals)、中国 FDA (China FDA, CFDA) 批准的瑞存以及在欧洲国家撤市而在日本仍用于肝脏成像的 SPIONs 颗粒 Resovist[®]^[47, 48]。Ferumoxytol 是 FDA 批准的唯一静脉注射的超小 SPION (ultra SPION, USPIO) 颗粒, 直径为 17~31 nm, 由氧化铁晶体核心 (直径 (6.76 ± 0.41) nm) 和亲水性羧基葡聚糖涂层组成, 最初被 FDA 批准用于静脉治疗慢性肾病患者缺铁性贫血的铁补充剂^[49]。由于其在血管内半衰期长达 14~15 h^[50], 近些年作为 MRI 的静脉造影剂得到广泛的研究, 同时也用于细胞标记。Ferumoxytol 对 T_1 和 T_2 加权的 MRI 图像具有强烈的信号效应, 反映的纵向 r_1 和横向 r_2 松弛度分别为 15 和 $89 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[51], 与其他 USPIO 相比, Ferumoxytol 较少发生过敏反应和特异性反应。

3 SPIONs 标记干细胞的方法、临床前安全性评价和临床研究

干细胞因具有刺激病变宿主组织再生的能力而被广泛地用于治疗各种疾病和病症。在再生疗法中, 对移植到体内的干细胞成像并追踪其在体内的迁移和分布至关重要, 可为评价干细胞的安全性和治疗效果提供关键信息^[55]。目前, 临床前成像技术如光学、光声和 MRI, 通常涉及用探针或造影剂标记细胞, 使其与宿主细胞区分开来^[56]。在临床上, MRI 穿透深度和空间分辨率等优势使其成为干细胞成像的首选方法, 其避免了有创性检查, 并且是可重复的。一般将患者或组织样本放置在临床上常用的 1.5 T、3 T 以及临床前高达 21 T 的设备的强外部磁场位置, 通过 MRI 扫描仪来可视化活体组织或细胞。

SPIONs 作为干细胞标记示踪剂与器官成像有着根本性的差异, 后者是直接静脉内施用 SPIONs 溶液, 而前者是体外标记细胞后将其移植入患者和/或动物模型体内^[33]。在两种情况下铁的使用剂量不能统一论, 评价

体系也是不同的, 并且要考虑 SPIONs 标记干细胞的方法以及不用种类细胞的差异性。

3.1 SPIONs 标记干细胞的方法

SPIONs 能否成功标记细胞, 受粒子从细胞外环境穿梭到细胞内这一过程中各种因素的影响, 标记效率取决于细胞膜特性以及标记细胞的大小。有些细胞类型允许对纳米颗粒的有效摄取, 并且仅通过简单地将纳米颗粒悬浮在培养基中孵育一定的时间即可成功标记。但是由于干细胞缺乏吞噬能力, 内化的 SPIONs 量可能不足以用于细胞成像, 所以通常使用物理方法或转染剂 (transfection agents, TA) 涂覆带负电的 SPIONs 颗粒, 促进颗粒与阴离子细胞膜的结合, 从而促进细胞对纳米铁颗粒的摄取^[57]。常用的 TA 试剂包括脂质体 (lipofectamine, SuperFect)、多聚赖氨酸 (poly-L-lysine, PLL) 和硫酸鱼精蛋白 (protamine sulfate) 等^[58]。

3.1.1 物理学方法标记

基于电穿孔、显微注射或超声脉冲^[56, 59, 60]的物理学方法标记干细胞的原理是暂时破坏细胞膜稳定性, 细胞膜渗透性的瞬时变化允许纳米颗粒穿过膜并进入细胞质。磁电/声波穿孔的主要优点是标记是瞬时的、不需要延长细胞的孵育时间, 常用于标记一些敏感的原代细胞。然而, 这种标记方式最大的缺陷是细胞死亡较多, 并且需要针对每种细胞类型优化参数^[55]。Lei 等使用聚焦超声波的磁光子穿孔术 (magnetosonoporation, MSP) 标记神经干细胞^[61], 并且验证了 MSP 标记干细胞的安全性。但是这些标记程序对干细胞生物学的长期影响需要更全面和彻底的评估。

此外, 还有大量文献报道, 由于 SPIONs 的独特磁性, SPIONs 和细胞膜之间的相互作用可以通过各种类型的磁场来控制。这种技术包括在细胞培养液中孵育 SPIONs, 并在培养瓶下面放置一个磁铁, 从而产生一个静磁场 (static magnetic field, SMF), 一方面力的作用将纳米铁颗粒“拉”进细胞内, 同时 SMF 会导致内吞相关蛋白表达增加^[62, 63], 从而有更多的 SPIONs 进入细胞内, 并且该过程不损害细胞活力。除 SMF 外^[64], 研究表明脉冲磁场 (pulsed magnetic fields, PMF)^[65] 和交变磁场 (alternating magnetic field, AMF)^[66] 产生的磁力也可增加细胞的 SPIONs 摄取量。此外, 有研究人员合成具有不同磁铁矿载荷的磁性纳米颗粒, 评估磁力对纳米颗粒吸收的影响, 结果表明, 内化速率取决于颗粒内的磁铁矿水平^[67]。

3.1.2 PLL 复合 SPIONs 颗粒标记干细胞

PLL (分子量为 350~400 Da) 是一种带正电荷的合成氨基酸链, 广泛用作生物涂层, 并且是第一种认定的聚合 DNA 转染试剂, 可将 DNA 浓缩成带正电的颗粒。有

文献报道, PLL 与氧化铁纳米颗粒复合后标记干细胞的效率高达 80%^[68]。作者课题组曾将 Fe 浓度为 5 mg/mL 的 Ferumoxytol 与浓度为 100 μ g/mL 的 PLL 复合后超声, 用 Fe 终浓度为 200 μ g/mL 的复合物转染人脐带和人骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs), 效率均可达到 100%, 见图 1。但是也有文献报道, SPIONs-PLL 复合物进入细胞后可能会增加细胞内活性氧和羟基自由基的形成, 从而增加细胞凋亡率, 并且 PLL 的终浓度达到 10 mg/mL 时, 可引起明显的细胞死亡^[69], 还有报告指出用 SPIONs-PLL 复合物标记 MSCs 抑制其软骨分化能力^[70, 71]。因此针对不同的干细胞必须优化出最佳的 PLL 和 SPIONs 的比率以及转染浓度, 转染效率和细胞本身产生的毒性根据所应用的条件而变化。

3.1.3 硫酸鱼精蛋白复合 SPIONs 颗粒标记干细胞

目前, 大部分的干细胞示踪研究中使用硫酸鱼精蛋白(protamine sulfate, Ps)与 Ferumoxytol 复合来标记干细胞, 结果表明单独的 Ferumoxytol 与 Ps 直接复合不能有效地标记细胞^[49, 72]。将 Ps 先和肝素(heparin sodium, Hs)

按比例混合, 迅速通过静电作用形成复合物^[73], 然后再加入 Ferumoxytol, 三者即可形成稳定的 HsPsF 纳米复合物, 可以高效率地标记干细胞。Ps 是一种低分子量(~ 4000 Da)天然聚阳离子肽; Hs 为 FDA 批准的抗凝血药物^[58], 细胞耐受性好, 治疗窗口宽(大于 50 mg/mL)。HsPsF 标记干细胞的主要优点是这些药物都是具有临床资质的, 因此不需要对复合物各种药物成份进行广泛的安全性检测, 缩短了临床转化时间。文献中报道的高效的标记方法^[74]是将 HsPsF 按照 Hs(1~5 IU/mL)、Ps(30~60 μ g/mL)、Ferumoxytol(50~100 μ g/mL)的顺序依次加入无血清培养基中混合, 配置成复合物后加入细胞中培养 4 h, 再加入血清至完全培养基培养 20 h。作者课题组前期也采用 HsPsF(浓度分别为 5 IU/mL、60 μ g/mL、100 μ g/mL)的方法标记人脐带 MSCs, 标记效率也达到 100%, 见图 1。HPF 的标记方法中使用的 Hs、Ps 和 Ferumoxytol 的浓度均低于临床推荐剂量。而且有文献报道, HsPsF 纳米复合物具有与 SPIONs 相似的生物化学特性, 可在标记细胞中通过铁代谢途径生物降解^[75]。

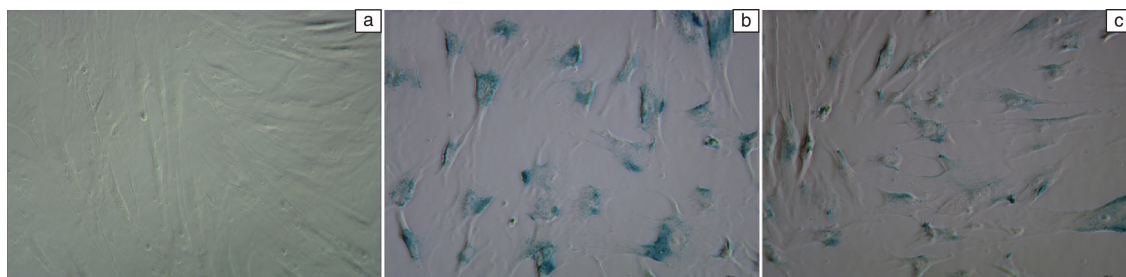


图1 Ferumoxytol 标记人脐带 MSCs 的普鲁士蓝染色图: (a) 对照组, (b) Ferumoxytol-PLL 标记法, (c) HsPsF 标记法

Fig. 1 Prussian blue staining images of Ferumoxytol labeled human umbilical cord MSCs: (a) control cell, (b) Ferumoxytol-PLL labeling method, (c) HsPsF labeling method

3.1.4 蛋白质电晕介导的 SPIONs 颗粒标记干细胞

Nejadnik 等^[76]将 Ferumoxytol 与含有人血清(Human serum, HS)的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基在温育后通过离心除去过量和未结合的蛋白质后, 用磷酸盐缓冲盐水(phosphate-buffered saline, PBS)洗涤。将沉淀重悬于 PBS 后, 以 Fe 终浓度 100 μ g/mL 加入细胞中, 标记人 MSCs, 细胞内平均铁含量为(4.01 \pm 0.02) pg, 在动物模型体内 MRI T2 弛豫时间相比于 HPF 标记方法明显缩短。

无论使用何种标记方法, 都需要检测细胞的标记效率, 一般采用普鲁士蓝呈色法定性观察; 用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察 SPIONs 在细胞内分布; 采用电感耦合等离子体原子发射光谱法(inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy, ICP-AES)检测细胞内平均铁含量。在 ICP-AES 检测前需彻底清洗细胞以去除细胞表面所有过量的纳米颗粒, 因

为残留在细胞外的造影剂可能导致检测结果偏高, 而通过流式细胞术^[77]分选后定量细胞内铁含量的方法可以排除细胞外聚集体。最为精确的定量方法是用磁电泳检测法^[78, 79]测量磁性纳米颗粒的摄取, 这种技术最初是由 Zborowski 等研究学者提出的, 细胞磁电泳取决于高度规则的自旋铁物质的存在并且产生细胞磁泳过程, 通过测量细胞磁泳迁移率的平均值和分布的变化来计算细胞内铁含量, 此方法优势是既可排除细胞外聚集体, 又能测量活细胞单个细胞中的磁性含量而非细胞群体的平均值。

3.2 SPIONs 标记干细胞的临床前研究——安全性评价检测

SPIONs 标记干细胞为干细胞体内示踪提供了一种有望临床转化的工具, 但是目前全世界并没有批准用于临床的干细胞标记造影剂, 因此完善标记后的干细胞的安全性评价体系对于干细胞示踪的临床转化至关重要。理

想的临床用细胞造影剂必须满足以下标准^[40]：① 标记的细胞移植体内后可观察到的 MRI 信号强度与细胞量呈现对应趋势关系；② 不影响细胞在体内的生存、扩增和迁移；③ 国际细胞治疗协会 (International Society for Cellular Therapy, ISCT) 定义的干细胞标准没有变化；④ 干细胞未发生明显影响疗效的功能改变。而干细胞的来源、转染试剂、标记技术、标记时间以及细胞内的铁含量都有可能对标记后的细胞产生影响。

作者研究团队结合国内外干细胞法规与质量标准，查阅相关的文献，总结出 SPIONs 标记的干细胞需检测的项目应包括：① 标记效率检测；② 毒性检测：形态、活率、凋亡、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、增殖、生长曲线和细胞周期等；③ 功能学检测：表面标志物、分化潜能、集落形成能力、迁徙能力、免疫调节和基因芯片检测等；④ 动物体内安全性检测：致瘤性、炎症反应和致死性等；⑤ MRI 可视化：细胞水平以及动物体内可成像性。

目前不同的研究小组^[40]已经证实了不同的 SPIONs 标记的干细胞在体外和体内的 MRI 特性，然而，铁标记对细胞的毒性和生物学功能影响存在争议，一些研究小组报告了变化，而有些文献则没有观察到任何统计学差异，强调了每种标记方法综合评估的重要性。例如，有文献报道 Ferucarbotran 标记干细胞促进细胞迁移能力^[55]，而有的数据^[74]却显示不影响；对于成脂和成骨分化潜能，有文献表明没有影响^[70]，有的则报道对成骨分化潜能呈现剂量依赖性抑制，高浓度下成骨分化能力消失^[80]。Gu 研究组^[81]用合成的 SPIONs 标记人骨髓 MSCs 细胞，研究表明其通过激活经典 MAPK 通路调控的分子机制促进人骨髓 MSCs 成骨分化。在大多数研究中，SPIONs 不会影响脂肪和神经原性分化^[70, 82]；表型也不发生改变^[74]。详细内容总结于表 2。

目前为止，还没有一份特定 MRI 造影剂标记干细胞后的系统而全面的安全评价报告或指导性的文件。但是纵观文献，SPIONs 标记的干细胞在一定的浓度范围和孵育时间内基本是安全的，具有临床应用可行性。因此，前期有些研究小组虽未经过系统的安全评价体系，也已经应用在临床病人体内。

3.3 SPIONs 标记干细胞的临床研究和体内示踪

2006 年，第一篇报道 SPIONs 标记干细胞的文章发表在 *New England Journal of Medicine* 杂志上^[96]。研究人员从一名 34 岁患者暴露的神经组织 (脑损伤区域) 分离出自体神经干细胞 (neural stem cells, NSCs)，后利用 Feridex IV4 (FDA 批准的造影剂，2008 年撤市) 和

Effectene (脂质转染试剂) 复合物标记，再将这些标记后的细胞再次植入患者脑损伤区域周围。术后第 24 h 及每周进行 MRI，共十周。植入后第一天，细胞移植的部位见圆形的暗组织区域；植入后第一周，信号的变化与细胞积聚和病变周围细胞的增殖一致，第二和第三周病变周围信号增强。第四周，NSCs 已经从注射的主要部位逐渐迁移到损伤组织边界，7 周后无信号。作者推测无信号的原因是细胞增殖及移植细胞向受损组织的边缘迁移引起的信号稀释。这项涉及两名患者的初步临床研究，证明了 SPIONs 标记干细胞移植的安全性以及 MRI 非侵入性检测干细胞的移植和迁移的可行性，与动物模型中的临床前数据一致。

2010 年 Karussis 等进行了一项临床研究^[97]，项目注册号是 NCT00781872，目的是评估自体骨髓 MSCs 在多发硬化症 (multiple sclerosis, MS) 和肌萎缩性侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 患者中的可行性、安全性和免疫学作用。研究中涉及 MS 与 ALS (脊髓) 患者 9 例，将自体骨髓来源 MSCs 与 Ferumoxide 共孵育后，采用壳内注射与静脉注射量为 2 : 1 的方式移植标记干细胞。移植后第 4~48 h、1 个月、3 个月和 6 个月分别进行 MRI 成像，患者随访至 25 个月。T2 加权图像结果表明，MSCs 从腰椎 (移植部位) 向髓膜、脊神经根和脊髓组织迁移。随访期间没有发生不良反应。

2010 年 Jozwiak 等在 *Cell Medicine* 杂志发表论文^[98]，研究中采用 PLL 修饰的 Ferumoxide 复合物，标记自体脐带血来源神经祖细胞，48 h 后移植到发生缺血性脑损伤后 7 个月的 16 个月大的婴儿脑室内，每个月连续注射 3 次细胞至大脑的侧脑室中。移植后第 1 天、1 周、1 月、2 月和 4 月后进行 MRI 成像，结果显示移植后 4 个月内细胞沿着侧脑室壁排列，没有进入脑组织，随访到第 6 个月，神经状况略有改善，证明脑室内移植细胞是可行的，并且是耐受和安全的。

2014 年，Janowski 等在 *PLoS One* 杂志发表文章^[99]，他们同样采用 PLL 修饰的 Ferumoxide 复合物，标记自体脐带血来源神经祖细胞，48 h 后移植到严重脑缺血的 18 个月大的婴儿侧脑室前额角，脑室内注射约 10^7 个细胞。移植后第 1 天、1 周、1 月、2 月、4 月和 33 个月进行 MRI 成像，并在体外开发重力驱动的沉降测定和吸引细胞的磁场驱动。移植后 24 h，MRI 检测到侧脑室枕角中低信号的细胞，并且观察到标记细胞可随着外加磁场方向迁移，在整个成像周期内信号降低，第 33 个月时检测不到信号。临床数据表明，MRI 成像可以检测到侧脑室内 SPIONs 标记的干细胞。

表2 临床前研究中显示的 SPIONs 标记对干细胞的影响

Table 2 The effects of SPIONs labeling on stem cells in preclinical studies

Ref.	Cell type	Labeling method	Evaluation items												
			Efficiency	Viability	Apoptosis	Proliferation	Cell cycle	ROS	Migration	Colony forming	Surface markers	Differentiation	Immunomodulatory	Genetic analysis	Other items
[44]	H-Schwann cell	SPIONs-PLL	100%	NM	1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ \uparrow	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
[83]	HMSCs	Fe-Pro	NM	No change	NM	NM	NM	NM	No change	No change	No change	Cho; No change	NM	NM	NM
[81]	HBM-MSC	SPION in lab	NM	Dosage \downarrow	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ost; \uparrow	NM	2092 genes \uparrow , 1631 genes \downarrow	NM
[84]	Pig BM-MSC	PLL-Ferumoxytol	100%	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6d \downarrow	No change	No change	NM	NM	No change	NM	NM	NM	NM	NM	NM
[85]	HMSCs	PLL-Ferumoxides	100%	No change	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	Adi; No change	NM	NM	NM
[86]	HBM-MSCs	PLL-Ferumoxides	71%~78%	NM	No change	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
[87]	Rat BM-MSCs	HEDP-SPIONs	NM	No change	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
[74]	HBM-MSCs HNSCs	HPF	100%	No change	\uparrow	No change	NM	\uparrow	No change	NM	No change	Ost, Adi; No change	NM	NM	NM
[88]	HBM-MSCs	PLLA-SPIONs	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	No change	No change	Ost, Adi, Cho; No change	No change	NM	NM
[89]	HAECs	PEG-SPIONs	NM	Dosage \downarrow	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
[47]	Rat ADSCs	Pro-Ferumoxytol	NM	No change	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	Cho; No change	NM	NM	NM
[22]	HNPCs	Ferumoxytol	NM	No change	NM	NM	NM	NM	NM	NM	No change	High dose to astrocyte	NM	NM	NM
[90]	Rat BM-MSCs	PLL-SPIONs	100%	No change	NM	NM	NM	NM	NM	NM	No change	NM	NM	NM	NM
[91]	HUCB-MSCs	HPF	NM	Pro \uparrow , then \downarrow	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	Ost, Adi, Cho; No change	NM	NM	NM
[92]	HCDCs	HPF	NM	No change	No change	No change	No change	No change	No change	NM	NM	Cardiac, endothelial; No change	NM	35 genes	NM
[58]	HMSCs	Pro-Ferumoxides	100%	No change	No change	No change	NM	No change	NM	NM	No change	Ost, Adi; No change	NM	NM	NM
[93]	HBM-MSCs	HPF	NM	No change	NM	No change	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM
[94]	HBM-MSCs	SPIONs	(99.8 \pm 0.1)%	No change	No change	No change	KI67+ \downarrow	NM	NM	NM	NM	NM	NM	NM	Chondrogenesis; No change
[95]	HMSCs	Magnetic	NM	No change	NM	No change	NM	NM	No change	\downarrow	NM	Adi; \uparrow , Ost; \downarrow	NM	Extracellular CD93, Cadherin7 \uparrow ; Zincfinger FYVE domain \downarrow	CD93 and cadherin7 protein; No change

Notes: H, human, 人类; NM, not mentioned, 未检测; HUCB-MSCs, 人脐带血造血干细胞; Fe-Pro: Ferumoxytol-Protamin complex, Ferumoxytol-硫酸鱼精蛋白复合物; Cho: chondrogenic differentiation, 成软骨分化潜能; BM-MSC: bone marrow MSC 骨髓间充质干细胞; Adi: adipogenesis differentiation, 成脂分化潜能; HPF: 肝素-鱼精蛋白-Ferumoxytol 复合物; Ost: osteogenic differentiation, 成骨分化潜能; AEC: amniotic epithelial cells, 羊膜干细胞; NPC: neural progenitor cells, 神经祖细胞; ADSC: adipose-derived stem cells, 脂肪干细胞; CDCs: cardiosphere-derived stem cells, 心脏球衍生的干细胞; PLL: poly-L-lysine, 多聚赖氨酸; HEDP: 1-Hydroxyethylidene-1, 1-diphosphonic acid 羟基乙叉二膦酸; HNSCs: human neural stem cells, 人神经干细胞; PLLA: poly(L-lactic acid), 聚(L-丙交酯)。

4 结 语

本文介绍了基于 SPIONs 标记的干细胞示踪的临床转化相关研究进展,包括 SPIONs 的合成方法、批准用于临床的 SPIONs 的发展历程、SPIONs 标记干细胞的方法、标记后干细胞的安全评价以及目前已报道的干细胞示踪的临床试验。SPIONs 标记干细胞进行临床转化的流程见图 2。MRI 示踪成像 SPIONs 标记的干细胞具有坚实的临床前研究基础,临床前细胞学评价、动物水平示踪以及目前已开展的临床试验的初步结果显示,SPIONs 示踪干细胞是一项非常有前途的技术并且值得临床转化,将极大推动移植干细胞在体内生物分布和归巢不明这一难题的解决。

然而,在临床转化的过程中依旧有很多问题需要科学家们进一步地探索 and 解决:(1)MRI 信号强度与标记细胞中的 SPIONs 量直接相关,移植到体内的标记干细

胞可能会在体内增殖以及被宿主巨噬细胞吞噬,细胞内氧化铁纳米颗粒可能会逐渐稀释并在体内生物降解,使得 MRI 检测信号强度随着时间的推移而降低,这可能会限制 MRI 检测干细胞的时间,并且出现假阳性。未来的研究中,需要开发新的 SPIONs,进一步建立符合良好生产规范(good manufacturing practices, GMP)、安全有效的干细胞标记方案来克服这些问题。(2)SPIONs 标记的干细胞检测阈值受多种因素的影响,包括磁场强度、信噪比、脉冲序列、粒子类型和大小等。目前的 MRI 设备和成像序列,对 SPIONs 标记细胞的定量是间接技术,信号变化反映的是磁性纳米粒子的总体浓度,而不是实际的细胞总数。某些内源性病症导致的低 MR 信号可能与磁性造影剂的存在相混淆。例如:在梗死的心肌中通常有含铁黄素的巨噬细胞,其低信号与标记细胞没有区别^[100]。因此,开发灵敏度更高的成像设备以及成像序列至关重要。

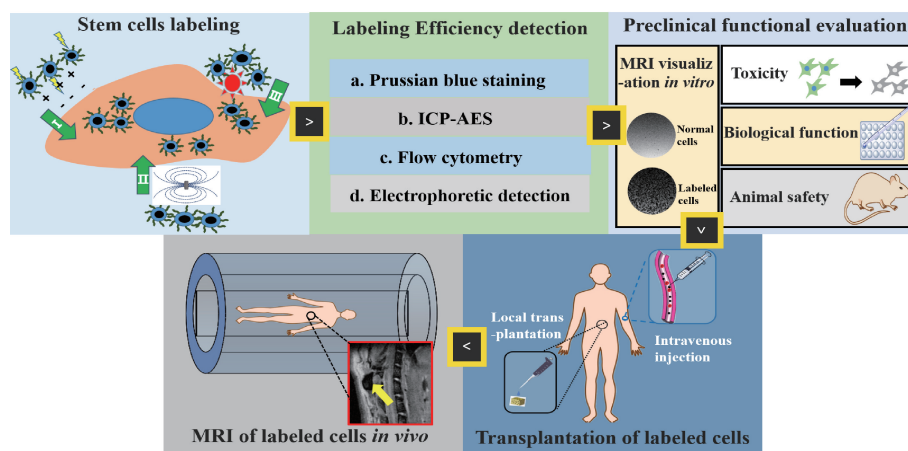


图 2 SPIONs 标记干细胞进行临床转化的流程示意图 (I: TA 标记法; II: 物理学标记法; III: 蛋白质电晕介导标记法)

Fig. 2 Schematic diagram of clinical transformation of SPIONs labeling stem cells (I: SPIONs/ transfection agents complex method; II: Physical labeling method; III: Protein corona mediated labeling method)

用于标记干细胞的理想 MR 对比剂最好符合以下条件:低毒性、生物相容性、稳定对比度、高灵敏度(单细胞检测)、不随着细胞增殖而稀释,并且最小程度地向内源宿主细胞转移^[55]。虽然目前可用的磁性纳米颗粒不能同时满足这些标准,但可以通过 MR 的引导实时将干细胞递送到患者体内,确保干细胞的初始移植和分布在解剖学上是准确的。干细胞的长期示踪,有待于开发出 SPIONs 与 MR 特异性成像物质相结合的材料,不仅可以观察到移植细胞是否存活,而且信号不会随着细胞分裂而稀释。

参考文献 References

[1] CALERO M, GUTIÉRREZ L, SALAS G, *et al.* Nanomedicine: Nano-

technology Biology & Medicine[J], 2014, 10(4): 733-743.

[2] KAUR H, SINGH J, RANDHAWA B S. Ceramics International[J], 2014, 40(8): 12235-12243.

[3] PRASAD B D, NAGABHUSHANA H, THYAGARAJAN K, *et al.* Journal of Magnetism & Magnetic Materials[J], 2014, 358-359(5): 132-141.

[4] TURCU R, CRACIUNESCU I, GARAMUS V M, *et al.* Journal of Magnetism & Magnetic Materials[J], 2015, 380: 307-314.

[5] XU C, SUN S. Advanced Drug Delivery Reviews[J], 2013, 65(5): 732-743.

[6] LU A H, SALABAS E L, SCHÜTH F. Angewandte Chemie International Edition[J], 2007, 46(8): 1222-1244.

[7] REDDY L H, ARIAS J L, NICOLAS J, *et al.* Chemical Reviews[J], 2012, 112(11): 5818-5878.

- [8] CHEN O, RIEDEMANN L, ETOC F, *et al.* Nature Communication[J], 2014, 5: 5093–5101.
- [9] LU M, COHEN M H, RIEVES D, *et al.* American Journal of Hematology[J], 2010, 85(5): 315–319.
- [10] XU H, AGUILAR Z P, YANG L, *et al.* Biomaterials[J], 2011, 32(36): 9758–9765.
- [11] PHANAPAVUDHIKUL P, SHEN S, NG W K, *et al.* Drug Delivery[J], 2008, 15(3): 177–183.
- [12] JING X H, YANG L, DUAN X J, *et al.* Joint Bone Spine[J], 2008, 75(4): 432–438.
- [13] LATORRE M, RINALDI C. Puerto Rico Health Sciences Journal[J], 2009, 28(3): 227–238.
- [14] LI Q, TANG G, XUE S, *et al.* Biomaterials[J], 2013, 34(21): 4982–4992.
- [15] SALAZAR J S, PEREZ L, ABRIL O D, *et al.* Chemistry of Materials[J], 2011, 23(6): 1379–1386.
- [16] LI Y, YE D, LI M, *et al.* Chemphyschem[J], 2018, 19(16): 1965–1979.
- [17] IYER S R, XU S, STAINS J P, *et al.* Tissue Engineering B: Reviews[J], 2017, 23(4): 373–385.
- [18] LI Y, CHEN Z W, GU N. Science Bulletin[J], 2012, 57(31): 3972–3978.
- [19] LINDEMANN A, LÜDTKEBUZUG K, FRÄDERICH B M, *et al.* International Journal of Nanomedicine[J], 2014, 2014(1): 5025–5040.
- [20] PREETZ H, ROLF C, IGEL J. Journal of Soils & Sediments[J], 2013, 13(3): 585–605.
- [21] JUN Y W, SEO J W, CHEON J. Cheminform[J], 2008, 39(22): 179–189.
- [22] LAMANNA J J, GUTIERREZ J, URQUIA L N, *et al.* Stem Cells Translational Medicine[J], 2017, 6(1): 139–150.
- [23] QI Y, FENG G, HUANG Z, *et al.* Molecular Biology Reports[J], 2013, 40(3): 2733–2740.
- [24] BULTE J W, KRAITCHMAN D L. Current Pharmaceutical Biotechnology[J], 2004, 5(6): 567–584.
- [25] LAURENT S, BRIDOT J L, ELST L V, *et al.* Future Medicinal Chemistry[J], 2010, 2(3): 427–449.
- [26] NEOH K G, KANG E T. Soft Matter[J], 2012, 8(7): 2057–2069.
- [27] ARAMI H, KHANDHAR A, LIGGITT D, *et al.* Chemical Society Reviews[J], 2015, 44(23): 8576–8607.
- [28] ARAMI H, STEPHEN Z, VEISEH O, *et al.* Advances in Polymerence[J], 2011, 243(1): 163–184.
- [29] CHEN B, SUN J, FAN F, *et al.* Nanoscale[J], 2018, 10(16): 7369–7376.
- [30] ARAMI H, FERGUSON R M, KHANDHAR A P, *et al.* Medical Physics[J], 2013, 40(7): 071904.
- [31] KHANDHAR A P, FERGUSON R M, ARAMI H, *et al.* Biomaterials[J], 2013, 34(15): 3837–3845.
- [32] GOULD M, BARBOUR R J, THOMAS N, *et al.* Applied Physics Letters[J], 2014, 105(7): 6948–6951.
- [33] BARROW M, TAYLOR A, MURRAY P, *et al.* Chemical Society Reviews[J], 2015, 44(19): 6733–6748.
- [34] SAPSFORD K E, ALGAR W R, BERTI L, *et al.* Chemical Reviews[J], 2013, 113(3): 1904–2074.
- [35] CAI H, AN X, CUI J, *et al.* Applied Materials & Interfaces[J], 2013, 5(5): 1722–1731.
- [36] OTA S, TAKAHASHI Y, TOMITAKA A, *et al.* Journal of Nanoparticle Research[J], 2013, 15(5): 1–12.
- [37] KIEVIT F M, VEISEH O, BHATTARAI N, *et al.* Advanced Functional Materials[J], 2010, 19(14): 2244–2251.
- [38] BLACKWOOD K A, MCKEAN R, CANTON I, *et al.* Biomaterials[J], 2008, 29(21): 3091–3104.
- [39] LANDFESTER K. Angewandte Chemie International Edition[J], 2010, 48(25): 4488–4507.
- [40] SCHMIDTKE-SCHREZENMEIER G, URBAN M, MUSYANOVYCH A, *et al.* Cytotherapy[J], 2011, 13(8): 962–975.
- [41] SINGH N, JENKINS G J S, ASADI R, *et al.* Nano Reviews[J], 2010, 1(7): 5358–5372.
- [42] BABIC M, HORÁK D, JENDELOVÁ P, *et al.* Bioconjugate Chemistry[J], 2009, 20(2): 283–294.
- [43] VARALLYAY P, NESBIT G, MULDOON L L, *et al.* American Journal of Neuroradiology[J], 2002, 23(4): 510–519.
- [44] XU Q, ZHANG H T, LIU K, *et al.* Cellular & Molecular Neurobiology[J], 2011, 31(3): 365–375.
- [45] WANG Y, XU C, OW H. Theranostics[J], 2013, 3(8): 544–560.
- [46] WANG Y X. Quantitative Imaging in Medicine & Surgery[J], 2011, 1(1): 35.
- [47] KHURANA A, NEJADNIK H, CHAPELIN F, *et al.* Nanomedicine[J], 2013, 8(12): 1969–1983.
- [48] DALDRUPLINK H E. Radiology[J], 2017, 284(3): 616–629.
- [49] NEUWELT E A, HAMILTON B E, VARALLYAY C G, *et al.* Kidney International[J], 2009, 75(5): 465–474.
- [50] MCCULLOUGH B J, KOLOKYTHAS O, MAKI J H, *et al.* Journal of Magnetic Resonance Imaging[J], 2013, 37(6): 1476–1479.
- [51] HAMILTON B E, NESBIT G M, DOSA E, *et al.* American Journal of Neuroradiology[J], 2011, 197(4): 981–988.
- [52] HARISINGHANI M G, SAINI S, SLATER G J, *et al.* Journal of Magnetic Resonance Imaging[J], 2010, 7(1): 161–163.
- [53] GOINS B, PHILLIPS W T, KLIPPER R. Journal of Nuclear Medicine: Official Publication Society of Nuclear Medicine[J], 1996, 37(8): 1374–1379.
- [54] TAUPITZ M, SCHMITZ S, HAMM B. Rofo[J], 2003, 175(6): 752–765.
- [55] CROMER BERMAN S M, WALCZAK P, BULTE J W M. Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine & Nanobiotechnology[J], 2011, 3(4): 343–355.
- [56] TAYLOR A, WILSON K M, MURRAY P, *et al.* Chemical Society Reviews[J], 2012, 43(27): 2707–2717.

- [57] WEISSLEDER R, STARK D D, ENGELSTAD B L, *et al.* American Journal of Neuroradiology[J], 1989, 152(1): 167-173.
- [58] ARBAB A S, YOCUM G T, KALISH H, *et al.* Blood[J], 2004, 104(4): 1217-1223.
- [59] PICKARD M, CHARI D. Nanomedicine[J], 2010, 5(2): 217-232.
- [60] QIU B, XIE D, WALCZAK P, *et al.* Magnetic Resonance in Medicine[J], 2010, 63(6): 1437-1441.
- [61] LEI H, NAN X, WANG Z, *et al.* Journal of Nanoscience & Nanotechnology[J], 2016, 15(4): 2605-2612.
- [62] LAURENT N, SAPET C, LE GOURRIERE G L, *et al.* Therapeutic Delivery[J], 2011, 2(4): 471-482.
- [63] JENKINS S I, PICKARD M R, GRANGER N, *et al.* ACS Nano[J], 2011, 5(8): 6527-6538.
- [64] LU Y C, CHANG F Y, TU S J, *et al.* Journal of Magnetism & Magnetic Materials[J], 2017, 427: 71-80.
- [65] HSIAO T H, LIN C J, CHUNG Y S, *et al.* Molecular & Cellular Biology[J], 2014, 34(3): 498-509.
- [66] MIN K A, SHIN M C, YU F, *et al.* ACS Nano[J], 2013, 7(3): 2161-2171.
- [67] MACDONALD C, BARBEE K, POLYAK B. Pharmaceutical Research[J], 2012, 29(5): 1270-1281.
- [68] BABIC M, HORÁK D, TRCHOVÁ M, *et al.* Bioconjugate Chemistry[J], 2008, 19(3): 740-750.
- [69] JR A L, DAGAN A, GUTHEIL J, *et al.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America[J], 1979, 76(7): 3246-3250.
- [70] KOSTURA L, KRAITCHMAN D L, MACKAY A M, *et al.* NMR in Biomedicine[J], 2004, 17(7): 513-517.
- [71] BULTE J W, KRAITCHMAN D L, MACKAY A M, *et al.* Blood[J], 2004, 104(10): 3410-3412.
- [72] PROVENZANO R, SCHILLER B, RAO M, *et al.* Clinical Journal of the American Society of Nephrology Cjasn [J], 2009, 4(2): 386-393.
- [73] LIANG J F, SONG H, LI Y T, *et al.* Journal of Pharmaceutical Sciences[J], 2000, 89(5): 664-673.
- [74] THU M S, HENRY B L, TIZIANA C, *et al.* Nature Medicine[J], 2012, 18(3): 463-467.
- [75] ARUN B, EDYTA P, REN J, *et al.* PLoS One [J], 2010, 5(7): e11462.
- [76] NEJADNIK H, TAGHAVI-GARMESTANI S M, MADSEN S J, *et al.* Radiology[J], 2018, 286(3): 938-947.
- [77] GE Y Q, ZHANG Y, XIA J G, *et al.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces[J], 2009, 73(2): 294-301.
- [78] JING Y, MAL N, WILLIAMS P S, *et al.* FASEB Journal[J], 2008, 22(12): 4239-4237.
- [79] TAYLOR A, WILSON K M, MURRAY P, *et al.* Chemical Society Reviews[J], 2012, 41(7): 2707-2717.
- [80] CHEN Y C, HSIAO J K, LIU H M, *et al.* Toxicology & Applied Pharmacology[J], 2010, 245(2): 272-279.
- [81] WANG Q, CHEN B, CAO M, *et al.* Biomaterials[J], 2016, 86: 11-20.
- [82] ZENG G, WANG G, GUAN F, *et al.* Molecular & Cellular Biochemistry[J], 2011, 357(1-2): 331-341.
- [83] ARBAB A S, YOCUM G T, RAD A M, *et al.* NMR in Biomedicine[J], 2010, 18(8): 553-559.
- [84] MU D, ZHANG X L, XIE J, *et al.* Scientific Reports [J], 2016, 6: 19155.
- [85] ARBAB A S, BASHAW L A, MILLER B R, *et al.* Transplantation[J], 2003, 76(7): 1123-1130.
- [86] OMIDKHODA A, MOZDARANI H, MOVASAGHPPOOR A, *et al.* Toxicology in Vitro[J], 2007, 21(6): 1191-1196.
- [87] DELCROIX G J-R, JACQUART M, LEMAIRE L, *et al.* Brain Research[J], 2009, 1255(2009): 18-31.
- [88] SCHMIDTKE-SCHREZENMEIER G, URBAN M, MUSYANOVYCH A, *et al.* Cytotherapy[J], 2011, 13(8): 962-975.
- [89] NASEROLESLAMI M, PARIVAR K, KHOEI S, *et al.* Cell Journal[J], 2016, 18(3): 332-339.
- [90] ZHOU B, SHAN H, LI D, *et al.* Magnetic Resonance Imaging[J], 2010, 28(3): 394-399.
- [91] LEE N K, KIM H S, YOO D, *et al.* Stem Cell Reviews[J], 2017, 13(1): 127-138.
- [92] VANDERGRIF A C, HENSLEY T M, HENRY E T, *et al.* Biomaterials[J], 2014, 35(30): 8528-8539.
- [93] JR L H B, KIM S J, HOBSON M, *et al.* Nanomedicine: Nanotechnology Biology & Medicine[J], 2016, 13(2): 503-513.
- [94] KILIAN T, FIDLER F, KASTEN A, *et al.* Nanomedicine[J], 2016, 11(15): 1957-1970.
- [95] SCHÄFER R, BANTLEON R, KEHLBACH R, *et al.* BMC Cell Biology[J], 2010, 11(1): 22.
- [96] ZHU J, ZHOU L, XINGWU F. New England Journal of Medicine[J], 2006, 355(22): 2376-2378.
- [97] KARUSSIS D, KARAGEORGIOU C, VAKNINDEMBINSKY A, *et al.* Archives of Neurology[J], 2010, 67(10): 1187-1194.
- [98] JOZWIAK S, HABICH A, KOTULSKA K, *et al.* Cell Medicine[J], 2010, 1(2): 71-80.
- [99] JANOWSKI M, WALCZAK P, KROPIWNICKI T, *et al.* PLoS One [J], 2014, 9(2): e97631.
- [100] AMSALEM Y, MARDOR Y, FEINBERG M S, *et al.* Circulation[J], 2007, 116(11 Suppl): 138-145.