

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000148

SPIO-PLL-pshRNA 分子探针转染卵巢癌 SKOV3 细胞及 MR 成像研究

文曦琳, 李 易, 葛晓东, 李妹玲, 邓小林, 吴晓凤, 文 明

(重庆医科大学附属第一医院放射科, 重庆 400016)

【摘要】目的:利用多聚赖氨酸修饰的超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide modified with Poly-L-lysine, SPIO-PLL)及质粒 pGenesil1-shRNA 构建 SPIO-PLL-pshRNA 分子探针,并初步评价其体外转染卵巢癌细胞 SKOV3 及 MR 成像的可行性。**方法:**利用静电吸附法连接 SPIO-PLL 和质粒 pGenesil1-shRNA,微量分光光度计检测复合物离心后上清液中质粒 DNA 浓度,评测 SPIO-PLL 与质粒的结合能力;凝胶阻滞实验及 zeta 电位测定验证两者结合;通过普鲁士蓝染色法观察铁的人胞情况及荧光显微镜观察绿色荧光蛋白在细胞中的表达来检测复合物的细胞转染能力;MR 扫描观察细胞转染后信号改变。**结果:**DNA 结合实验、凝胶阻滞实验结果显示当 SPIO-PLL 和质粒质量比达 6:1 时,二者可有效结合;激光粒度仪测定 SPIO、SPIO-PLL、SPIO-PLL-pshRNA 3 组样品的 zeta 电位分别为 (-14.8 ± 0.35) 、 (15.2 ± 0.55) 、 (3.6 ± 0.35) mV,3 组结果差异有统计学意义($F=6323.782$, $P=0.000$; LSD- t :均 $P=0.000$);所制备的 SPIO-PLL-pshRNA 分子探针体外转染细胞后,用普鲁士蓝染色法可检测到细胞内有铁颗粒分布,荧光显微镜观察到绿色荧光蛋白表达,MR 扫描结果示无探针转染组及 10、20、40 $\mu\text{g/ml}$ 3 种浓度探针转染组的 T_2^* 信号强度值分别为 (558 ± 19) 、 (427 ± 16) 、 (283 ± 19) 、 (191 ± 8) ,琼脂糖组及蒸馏水组分别为 (600 ± 36) 、 (670 ± 16) ,随着探针浓度升高,信号强度降低,各组结果差异有统计学意义($F=279.667$, $P=0.000$; SNK- q :均 $P<0.05$)。**结论:**SPIO-PLL 纳米

作者介绍:文曦琳,Email:xilin.wen@163.com,

研究方向:肿瘤分子影像学。

通信作者:文 明,Email:13883669699@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81171366);国家发明专利申请(编号:2004100642179);国家临床重点专科建设资助项目。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000148.html

次调查发现农村居民各种慢性病防治知识水平低,防控意识薄弱,健康行为形成率很低,而农村地区医疗卫生资源远落后于城市地区^[3],其慢性病防控工作难度更为艰巨和复杂,因此,应加大农村地区慢性病防控投入力度,通过探索各种适宜健康教育技术帮助农村居民树立健康意识,促其养成正确的生活方式和行为习惯。

参 考 文 献

- [1] Sun Z, Zheng L, Detrano R, et al. Incidence and predictors of hypertension among rural Chinese adults: results from Liaoning province[J]. Ann Fam Med, 2010, 8(1): 19-24.
- [2] 李立明. 中国居民营养与健康状况调查报告之四: 2002 高血压[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 44-46.
- [3] 中国疾病预防控制中心. 中国慢性病及其危险因素监测报告[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 64-65.
- [4] World Health Organization International Society of Hypertension. Guidelines of management of hypertension[J]. Hypertensions, 1999, 17: 151-183.
- [5] 钱巧慧, 李 栩, 冯 波, 等. 上海市社区居民糖尿病知识知晓情况分析[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(12): 1514-1515.
- [6] 武阳丰, 谢高强, 李 莹, 等. 中国部分中年人群糖尿病患病率、知晓率、治疗率及控制率现况调查[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(8): 564-568.
- [7] 李 慧, 马吉祥, 夏 慧, 等. 农村居民高血压、糖尿病相关知识及行为调查[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(12): 1458-1460.
- [8] 黄建春, 杨俊莹, 尤晓寅, 等. 无锡市城区居民糖尿病知识知晓率调查分析[J]. 江苏预防医学, 2011, 22(3): 5-8.
- [9] 程 婧, 何 非, 陈爱华, 等. 广州市珠海区 50~80 岁居民慢性病相关生活方式的现状[J]. 中国慢性病预防与控制, 2010, 18(3): 318.
- [10] 潘 榕, 秦景新, 韦献飞, 等. 柳州市柳北区社区居民慢性病及主要生活方式现况研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2012, 16(10): 910-912.
- [11] 张 磊, 史中锋, 迟阿鲁, 等. 居民高血压、糖尿病及知行信社区干预效果评价[J]. 中国公共卫生, 2013, 29(4): 608-611.
- [12] 范 杉, 蒋汝刚. 农村居民高血压患病及相关知识、行为调查[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(4): 386.
- [13] 中华人民共和国卫生部. 2011 年中国卫生统计年鉴[M]. 北京: 中国协和医科大学, 2011.

(责任编辑: 关蕴良)

粒可有效结合质粒 pGenesil1-shRNA, 制得 SPIO-PLL-pshRNA 分子探针, 该探针于体外成功转染卵巢癌 SKOV3 细胞, 并于 MR 扫描下 T2*WI 信号强度降低。

【关键词】超顺磁性氧化铁; 多聚赖氨酸; 分子探针; 绿色荧光蛋白

【中图分类号】R318

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-10-13

Tansfection of ovarian cancer SKOV3 cells with SPIO-PLL-pshRNA molecular probes and MR imaging

Wen Xilin, Li Yi, Ge Xiaodong, Li Meiling, Deng Xiaolin, Wu Xiaofeng, Wen Ming

(Department of Radiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】**Objective:** To prepare SPIO-PLL-pshRNA molecular probes and to preliminarily evaluate the feasibility of transfecting SKOV3 cells and MR imaging in vitro. **Methods:** Superparamagnetic iron oxide modified with Poly-L-lysine (SPIO-PLL) was bound with plasmid pGenesil1-shRNA through electrostatic absorption. Concentration of plasmid DNA in the supernatant was detected by micro-ultraviolet spectrophotometer after the centrifugation of the complexes. By this way, the ability of plasmid DNA binding to SPIO-PLL could be evaluated. Conjunction between SPIO-PLL and plasmid DNA was confirmed via gel retardation experiments and zeta potential methods. Cell transfection was evaluated with Prussia blue staining for iron assessment and fluorescence microscope for green fluorescent protein (GFP) expression detection. Changes of cells in MR signal intensities were observed after the transfection. **Results:** DNA binding tests, gel retardation experiments and zeta potential methods demonstrated that SPIO-PLL could effectively bind plasmid DNA when the w/w ratio of SPIO-PLL and plasmid DNA was more than 6:1. zeta electric potentials of SPIO, SPIO-PLL and SPIO-PLL-pshRNA were (-14.8 ± 0.35) , (15.2 ± 0.55) mV and (3.6 ± 0.35) mV, with statistical differences among groups ($F=6323.782, P=0.000$; LSD: all $P=0.000$). After transfection with the SPIO-PLL-pshRNA complexes, iron particles could be detected in cells with Prussia blue staining; green fluorescence could be observed by fluorescent microscope; MR imaging showed T2*WI signal intensities reduction ($558 \pm 19, 427 \pm 16, 283 \pm 19$ and 191 ± 8 in non transfection group, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ and 40 $\mu\text{g/ml}$ groups respectively; 600 ± 36 and 670 ± 16 in agarose group and distilled water group). The signal intensity was decreased with the increase of complex concentration and statistical differences were observed among groups ($F=279.667, P=0.000$; SNK- q : all $P<0.05$). **Conclusions:** SPIO-PLL nanoparticles can effectively bind with plasmid pGenesil1-shRNA as SPIO-PLL-pshRNA molecular probe. This probe can successfully transfect SKOV3 cells and T2*WI signal intensity reduction can be observed by MR scanning.

【Key words】superparamagnetic iron oxide; Poly-L-Lysine; molecular probe; green fluorescence protein

恶性肿瘤已经成为严重威胁人类健康的常见疾病, 如何对其进行早期诊断及有效治疗, 仍是现代医学面临的重大挑战。近年来, 分子影像学的飞速发展恶性肿瘤的早期诊治开辟了新的方向, 特别是将肿瘤的早期成像与靶向治疗进行一体化研究, 具有精确病变定位动态实时监测疗效的优点, 成为当前的研究热点^[1-4]。

本课题组前期已经成功制备出多聚赖氨酸修饰的超顺磁性氧化铁 (superparamagnetic iron oxide modified with Poly-L-lysine, SPIO-PLL) (另文报道), 本研究拟在此基础上将其与质粒 pGenesil1-shRNA 连接, 构建 SPIO-PLL-pshRNA 分子探针, 并体外转染卵巢癌 SKOV3 细胞, 通过检测编码增强型绿色荧光蛋白 (enhance green fluorescent protein, EGFP) 基因的表达及转染后 MR 成像等, 初步确定

该探针可否转染肿瘤细胞并被 MR 检测, 为后续研究奠定基础。

1 材料及方法

1.1 材料和仪器

SPIO-PLL 由课题组自制, 重组质粒 pGenesil1-shRNA (含 EGFP 报告基因) 委托上海生物工程公司合成, 卵巢癌 SKOV3 细胞株 (中科院上海细胞库), RPMI1640 培养基、胎牛血清 (美国 Hyclone 公司), 琼脂糖 (美国 Hydragene 公司), 多聚甲醛、亚铁氰化钾 (上海生物工程有限公司), 核固红 (武汉博士德公司)。

ND-2000 微量分光光度计 (美国 Thermo 公司), 凝胶成像系统 (美国 BIO-RAD 公司), Zetasizer Nano ZS 激光粒度分析仪 (英国 Malvern 公司), KDC-160HR 高速冷冻离心机 (中佳公司), TE2000 倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司), 3.0 T 超导型 MR 成像仪 (美国 GE 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 SPIO-PLL-pshRNA 分子探针的制备及结合率检测

在 pH=7 时,将 SPIO-PLL 与质粒 pGenesil1-shRNA (10 μ g/ml) 分别按 0.1:1、0.5:1、1:1、2:1、4:1、6:1、8:1、10:1 质量比混合并分别编号,室温下放置 30 min 以便两者充分吸附。将所制备的复合物以 12 000 r/min 离心 20 min,微量分光光度计测定上清液中的质粒浓度,以单纯质粒为对照组,计算各组游离质粒百分比并换算成相应的结合率,取最适质量比用于后续实验。

1.2.2 凝胶阻滞实验 新鲜制备适量 SPIO-PLL-pshRNA 分子探针作为实验组,并按相同方法及比例制备的 SPIO/pshRNA 复合物作为阴性对照组,单纯质粒作为空白对照组,进行琼脂糖凝胶电泳;称取适量琼脂糖,加入约 20 ml 1 $\times$ TAE 液,加热溶解,配制 1% 琼脂糖凝胶溶液,待冷却至 60 $^{\circ}$ C 左右,加入核酸染料,混匀、灌胶。移液器取 2 μ l 上样缓冲液及 10 μ l 样品混匀加入孔道,在 1 $\times$ TAE 缓冲液中以 100 V 电压泳动 50 min 后,取出胶板于紫外透射仪下观察并凝胶照相。

1.2.3 Zeta 电位检测 取适量 SPIO、SPIO-PLL、SPIO-PLL-pshRNA 3 组样品,去离子水稀释至 2 ml,调整 pH 为 7,加入样品池,采用 Zetasizer Nano ZS 激光粒度分析仪进行电位检测。

1.2.4 细胞培养及准备 将卵巢癌 SKOV3 置于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中常规培养,待细胞至对数生长期时,用 0.25% 胰酶消化并加入适量培养液制成细胞悬液用于细胞转染。

1.2.5 普鲁士蓝染色 调整卵巢癌 SKOV3 细胞悬液浓度为 1×10^5 个/ml,接种于预先放有爬片的 24 孔板,常规培养 24 h 后,将分子探针加入其中混匀(探针中铁的终浓度为 20 μ g/ml),继续培养 24 h 后取出,吸弃培养液,PBS 洗 3 遍,4% 多聚甲醛固定 30 min,蒸馏水洗涤 3 次,再加入 2% 亚铁氰化钾和等体积 2% 盐酸的混合液,反应 30 min 后再用蒸馏水洗涤 3 次,核固红复染 10 min,蒸馏水洗涤后晾干,中性树脂封片,光学显微镜下观察。设置未加探针的 SKOV3 细胞为对照组。

1.2.6 荧光显微镜观察体外细胞转染 将卵巢癌细胞接种于 6 孔板,置于孵箱中培养,至次日细胞贴壁率达 70%~80%,吸弃原培养基,将 SPIO-PLL-pshRNA 分子探针、SPIO/pshRNA 复合物、质粒 pGenesil1-shRNA 分别用无血清培养基稀释后加入各培养孔(每孔质粒约 4 μ g),5 h 后加入含 15% 胎牛血清的完全培养基,继续培养 24 h 后荧光显微镜下观察结果。

1.2.7 探针转染细胞 MR 成像 将细胞接种于培养瓶中,常规培养 24 h,加入不同浓度 SPIO-PLL-pshRNA 分子探针,24 h 后用胰酶消化贴壁细胞,500 r/min 离心 5 min,弃上清,无铁培养基重悬,注入 1.5 ml EP 管,并加入 1% 琼脂糖凝胶混匀。另设置蒸馏水、琼脂糖、未转染的 SKOV3 细胞作为对照组,行 MR 扫描。扫描参数:腕关节线圈,横断位 GRE T2*WI,TR 240 ms,TE 8.2 ms,FOV 8 cm,层厚 3 mm,矩阵 320 $\times$ 224,激励次数 4,翻转角 20 $^{\circ}$ 。每组设 3 个平行管,在 GE AW 4.0 工作站,沿管内径勾画感兴趣区,测量各管信号强度。

1.3 统计分析

应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,数据结果采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 法或 SNK-*q* 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 SPIO-PLL 与质粒 pGenesil1-shRNA 的结合率检测

结果见图 1,从图中可以发现,随着 SPIO-PLL 浓度的增加,上清液中游离质粒含量逐渐减少,即 SPIO-PLL 与质粒的结合率逐渐升高,当两者比例达 6:1 时,进入平台期,提示二者的结合已接近饱和。因此,在后续的研究中,均选取此比例进行实验。

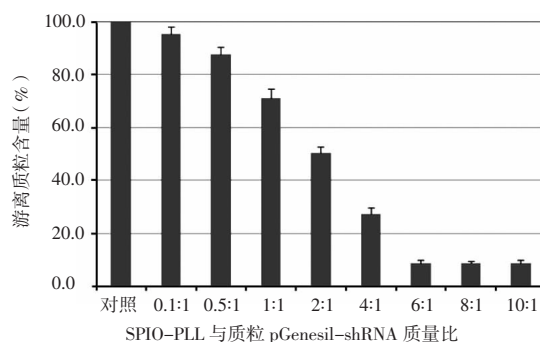
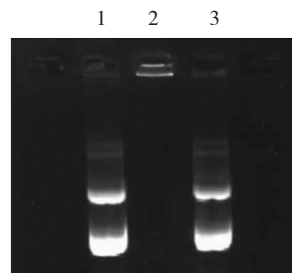


图 1 SPIO-PLL 与质粒在不同质量比时的结合情况
($n=5, \bar{x} \pm s, \%$)

Fig.1 Binding status of SPIO-PLL and plasmid at different w/w ratios ($n=5, \bar{x} \pm s, \%$)

2.2 凝胶阻滞实验

琼脂糖凝胶电泳结果见图 2,如图中显示,在中性条件下,对照组(泳道 1 为裸质粒 pGenesil1-shRNA,泳道 3 为 SPIO/pshRNA 复合物)均可见到白色亮条带泳出,实验组(泳道 2 为 SPIO-PLL-pshRNA 分子探针)仅于点样孔处有光亮,未见 DNA 条带泳出。



1. 裸质粒;2. SPIO-PLL-pshRNA;3. SPIO/pshRNA 复合物

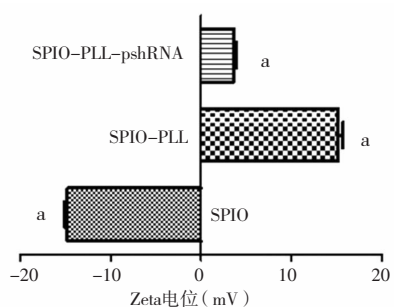
图 2 凝胶阻滞实验

Fig.2 Gel retardation experiments

2.3 Zeta 电位检测

在 pH=7 时,SPIO 的 zeta 电位为 (-14.8 ± 0.35) mV,SPIO-PLL 的 zeta 电位为 (15.2 ± 0.55) mV,SPIO-PLL-pshRNA 分子探针的 zeta 电位为 (3.6 ± 0.35) mV,3 组结果差异有统计

学意义 ($F=6\ 323.782, P=0.000; \text{LSD}-t$; 均 $P=0.000$)。



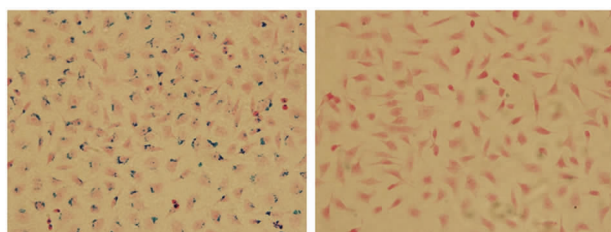
a, 该组与各组比较差异有统计学意义

图3 SPIO 经 PLL 修饰及结合质粒后 zeta 电位变化
($n=5, \bar{x} \pm s, \text{mV}$)

Fig.3 Zeta potential changes after SPIO modifying with PLL and binding with plasmid ($n=5, \bar{x} \pm s, \text{mV}$)

2.4 普鲁士蓝染色实验

普鲁士蓝染色结果显示,实验组大部分细胞内均可见到蓝染的铁颗粒,且大部分分布于胞浆,少部分位于胞核,表明分子探针可顺利进入细胞,而未加探针组的细胞中未见蓝色颗粒。



A. 探针转染组

B. 未加探针组

图4 SKOV3 细胞普鲁士蓝染色结果图 (200 ×)

Fig.4 Prussia blue staining images of SKOV3 cells (200 ×)

2.5 荧光显微镜观察体外细胞转染

质粒载体 pGenesil-1 含编码增强型绿色荧光蛋白 EGFP 的序列作为报告基因,在质粒进入细胞内并瞬时表达后,即可在荧光显微镜下发出绿色荧光。图 5 为探针转染细胞后的镜下观察结果,可见散在绿色荧光,而 SPIO/pshRNA 复合物、质粒 pGenesil1-shRNA 组于镜下均未见到发绿色荧光的细胞。

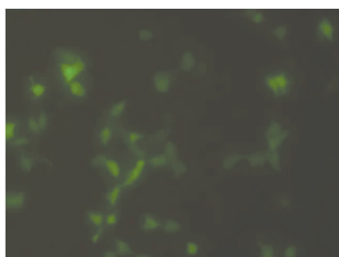
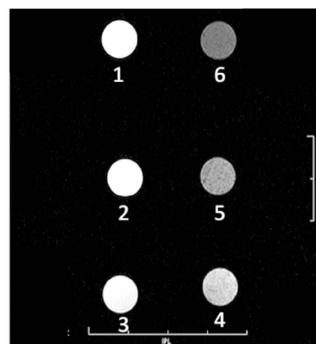


图5 SPIO-PLL-pshRNA 转染 SKOV3 细胞,荧光显微镜下结果

Fig.5 Cells transfected with SPIO-PLL-pshRNA observed by fluorescence microscope

2.6 探针转染细胞 MR 成像

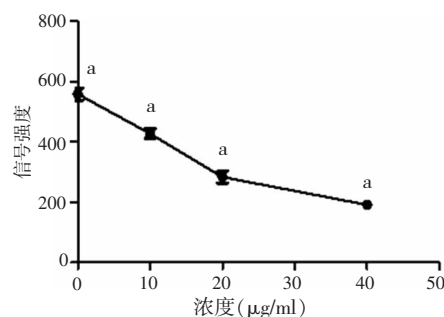
MR 成像结果示,4~6 号实验组(探针浓度分别为 10、20、40 $\mu\text{g/ml}$)的 T_2^* 信号强度值分别为 (427 ± 16)、(283 ± 19)、(191 ± 8),未转染 SKOV3 细胞组为 (558 ± 19),琼脂糖组及蒸馏水组分别为 (600 ± 36)、(670 ± 16),实验组的 T_2^* 信号强度均比对照组低且随着探针浓度的增加,信号强度逐渐逐渐减低。各浓度组信号强度差异有统计学意义 ($F=279.667, P=0.000; \text{SNK}-q$; 均 $P<0.05$)。



1. 蒸馏水;2. 琼脂糖;3. 未转染 SKOV3 细胞;4~6. 不同浓度组探针转染结果,其中 Fe 的终浓度分别为 10、20、40 $\mu\text{g/ml}$

图6 PLL-SPIO-pshRNA 转染细胞 MR 成像结果

Fig.6 MR imaging results of cells transfected with PLL-SPIO-pshRNA



a, 该组与各组比较差异有统计学意义

图7 不同浓度组探针转染细胞后 MR 信号强度变化 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig.7 MR signal intensity changes of cells transfected with probes at different concentrations ($n=3, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

在分子影像学研究中,分子探针的构建是最重要的环节。本研究构建的 SPIO-PLL-pshRNA 分子探针,是基于这样的考虑:选择卵巢癌表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)作为研究靶点,构建针对 EGFR 的 shRNA 质粒表达载体,再将 SPIO 与该重组质粒连接制成分子探针。从理论上分析,探针进入细胞后,shRNA 转录出来,

通过 RNA 干扰作用沉默靶基因,诱导细胞凋亡,达到治疗肿瘤的目地;此外,探针上的 SPIO 在 MR 扫描时可造成肿瘤的信号降低。这样,不仅能达到对肿瘤的特异性早期诊断,还能观察基因治疗效果,从而实现肿瘤诊治的一体化。

由于单纯的 SPIO 一般呈非正电性,而质粒 DNA 表面带有大量的磷酸根基团而呈负电,两者难以直接结合,所以必须对 SPIO 进行正电化修饰^[5]。多聚赖氨酸(poly-L-Lysine, PLL)作为一种低毒、生物相容性好的阳离子多肽,常被用于纳米材料的表面修饰,多篇文献显示^[6-8],经 PLL 修饰后,纳米载体获得较好的基因递送能力。本实验通过 DNA 结合实验来检测 SPIO-PLL 与质粒 DNA 的结合能力, SPIO-PLL 与 DNA 结合后比重增大,通过一定时间的离心后沉淀,可与未结合的游离 DNA 分离,因此通过比较离心后上清液中 DNA 的浓度可反映 SPIO-PLL 与 DNA 的结合情况,本实验测得两者质量比到 6:1 时可达到较佳结合率。为了进一步验证 SPIO-PLL 与质粒 DNA 的结合,笔者又进行了 zeta 电位的测定以及凝胶阻滞实验。zeta 电位可衡量纳米微粒的表面带电情况,实验测得在中性条件下,经 PLL 修饰后的 SPIO 表面电位为 (15.2 ± 0.55) mV,结合质粒 DNA 后表面电位变为 (3.6 ± 0.35) mV,表明 SPIO-PLL 结合 DNA 后纳米粒表面电位发生了重排,由于 DNA 带负电,因此该复合纳米微粒的表面电位降低。凝胶阻滞实验可检测复合物的组装情况,当 DNA 与 SPIO-PLL 结合后,其迁移受到阻碍,因此点样孔中可见到 DNA 滞留,而带负电的 SPIO 与 DNA 不能结合,因此可见到与对照组相同的 DNA 条带泳出。

SPIO-PLL 与质粒 DNA 连接后能否进入细胞是后续应用的基础,本实验通过普鲁士蓝染色观察铁的入胞情况及荧光镜下观察质粒 DNA 中绿色荧光蛋白基因在细胞中的表达来检测其体外转染情况。结果证实,PLL-SPIO-pshRNA 分子探针可进入卵巢癌细胞,且 EGFP 作为报告基因转入细胞后成功表达。但本实验中质粒 DNA 的转染率还欠佳,可能与质粒的纯度、PLL 的分子量、探针的浓度及作用时间等有关,且有研究表明^[9]磁性纳米粒子还可通过外加磁场的应用来提高转染率,具体的优化条件尚需进一步探讨。SPIO 作为 MR 负性对比剂,在外加磁场下,能有效缩短 T1 和(或)T2 弛豫时间,引起信

号的降低。有研究显示^[10],T2*WI 序列对检测细胞内 SPIO 更敏感,本实验将不同浓度探针转染细胞进行体外磁共振 T2*WI 序列扫描,结果示,在探针浓度较低情况下,即可引起 T2* 信号的降低,且随着浓度的升高,信号降低越明显,这与先前的研究结果一致,说明 PLL-SPIO-pshRNA 分子探针体外转染卵巢癌细胞后能于 MR 扫描仪下敏感检测。

综上所述,本实验将 SPIO-PLL 可与质粒 pGenesil1-shRNA 结合,构建出 PLL-SPIO-pshRNA 分子探针,该探针于体外成功转染卵巢癌细胞,并有效降低磁共振 T2* 信号强度,为后续卵巢癌的 MR 可视化诊断与基因治疗研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Rosen JE, Chan L, Shieh DB, et al. Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics[J]. *Nanomedicine*, 2012, 8(3): 275-290.
- [2] Li F, Sun J, Zhu H, et al. Preparation and characterization novel polymer-coated magnetic nanoparticles as carriers for doxorubicin[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 88(1): 58-62.
- [3] Tassa C, Shaw SY, Weissleder R. Dextran-coated iron oxide nanoparticles: a versatile platform for targeted molecular imaging, molecular diagnostics, and therapy[J]. *Acc Chem Res*, 2011, 44(10): 842-852.
- [4] Rosenblum LT, Kosaka N, Mitsunaga M, et al. In vivo molecular imaging using nanomaterials: general in vivo characteristics of nano-sized reagents and applications for cancer diagnosis[J]. *Mol Membr Biol*, 2010, 27(7): 274-285.
- [5] Kievit FM, Zhang M. Surface engineering of iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy[J]. *Acc Chem Res*, 2011, 44(10): 853-862.
- [6] Albukhaty S, Naderi-Manesh H, Tiraihi T. In vitro labeling of neural stem cells with poly-L-lysine coated super paramagnetic nanoparticles for green fluorescent protein transfection[J]. *Iran Biomed J*, 2013, 17(2): 71-76.
- [7] Hartono SB, Gu W, Kleitz F, et al. Poly-L-lysine functionalized large pore cubic mesostructured silica nanoparticles as biocompatible carriers for gene delivery[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(3): 2104-2017.
- [8] Minigo G, Scholzen A, Tang CK, et al. Poly-L-lysine-coated nanoparticles: a potent delivery system to enhance DNA vaccine efficacy[J]. *Vaccine*, 2007, 25(7): 1316-1327.
- [9] Priej S, Sersa G. Magnetic nanoparticles as targeted delivery systems in oncology[J]. *Radiol Oncol*, 2011, 45(1): 1-16.
- [10] Tanimoto A, Oshio K, Suematsu M, et al. Relaxation effects of clustered particles[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2001, 14(1): 72-77.

(责任编辑:冉明会)