

转铁蛋白标记磁性脂质体的制备及体外成像

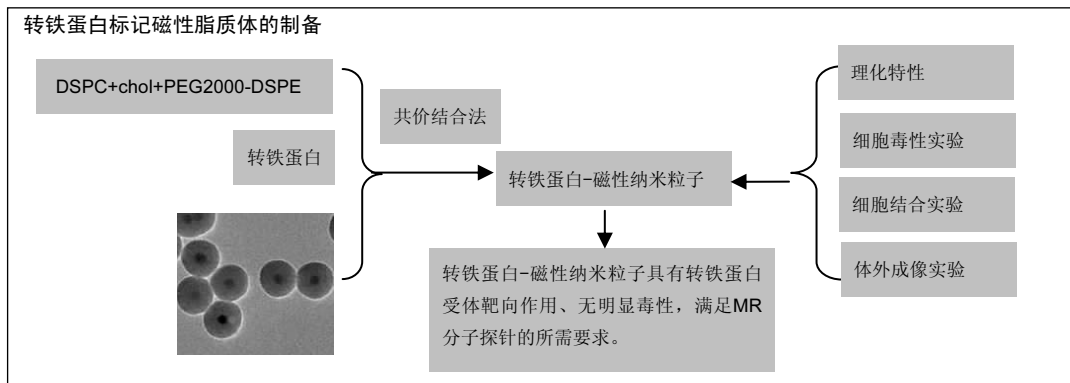
陈维翠¹, 刘淑仪¹, 林爱华², 刘 峴¹ (广州中医药大学第二附属医院, ¹影像科, ²药学部, 广东省广州市 510120)

引用本文: 陈维翠, 刘淑仪, 林爱华, 刘峴. 转铁蛋白标记磁性脂质体的制备及体外成像[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(6):923-927.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.06.018

ORCID: 0000-0002-1814-8295(陈维翠)

文章快速阅读:



陈维翠, 女, 1986年生, 广西壮族自治区贺州市人, 汉族, 硕士, 主要从事影像诊断、分子影像学相关研究。

通讯作者: 刘峴, 博士, 硕士生导师, 副主任医师, 广州中医药大学第二附属医院影像科, 广东省广州市 510120

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2017)06-0923-05

稿件接受: 2016-12-13

文题释义:

转铁蛋白受体: 为跨膜糖蛋白, 介导细胞内铁的摄取、参与细胞生长调节, 且能在肿瘤细胞表面高度表达, 是一种有效的肿瘤标志物, 广泛应用于各类恶性肿瘤的靶向治疗。

磁性纳米粒子: 以磁性材料为中心, 包被生物高分子的核壳结构。磁性纳米粒具有良好的磁导向性和生物组织相容性, 可与多种功能分子结合, 如蛋白质、核酸、生物素等。

摘要

背景: 利用转铁蛋白受体表达的特异性和转铁蛋白-转铁蛋白受体结合的亲和性, 转铁蛋白修饰药物载体可以明显提高药物的特异结合能力和疗效。转铁蛋白也可修饰影像对比剂, 针对肿瘤组织的转铁蛋白受体, 实现肿瘤的特异性靶向成像。

目的: 评价转铁蛋白-磁性纳米粒的理化特性, 并对其细胞结合特性进行体外实验研究。

方法: 采用旋转蒸发法制备磁性脂质体, 共价结合法制备转铁蛋白-磁性纳米粒。对转铁蛋白-磁性纳米粒的粒径、电位、形态、转铁蛋白结合效率、r2弛豫率、细胞结合特性及细胞毒性等指标进行分析评价。转铁蛋白-磁性纳米粒与转铁蛋白受体高表达 HepG2 肝癌细胞特异性结合后进行体外 MR 成像。

结果与结论: ①转铁蛋白-磁性纳米粒平均粒径为 95.1 nm, 多分散系数为 0.21, Zeta 电位为-1.25 mV, r2弛豫率为 94.62 mmol⁻¹·s⁻¹, 每个磁性脂质体约结合 27 个转铁蛋白分子; ②荧光共聚焦电镜显示转铁蛋白-磁性纳米粒与转铁蛋白受体高表达 HepG2 肝癌细胞发生特异结合, 荧光胞浆出现罗丹明红染; 普鲁士蓝铁染色显示 HepG2 细胞内和细胞表面有铁染色颗粒; ③体外细胞 MR T2WI 成像显示, 转铁蛋白-磁性纳米粒与 HepG2 细胞标记后, 离心管信号强度下降; 而空白磁性纳米粒与细胞不发生结合, 故无明显信号强度下降; ④细胞毒性实验显示细胞生长曲线良好; ⑤以上结果表明, 转铁蛋白-磁性纳米粒满足 MR 分子探针的所要求, 可用于 MR 分子成像。

关键词:

生物材料; 纳米材料; 磁性脂质体; 转铁蛋白受体; 纳米粒子; 磁共振成像; 国家自然科学基金

主题词:

脂质体; 受体; 转铁蛋白; 纳米粒; 磁共振成像; 组织工程

基金资助:

广东省科技计划项目(2013B021800247); 国家自然科学基金青年项目(30700184)

Transferrin-labeled magnetoliposomes: preparation and magnetic resonance imaging *in vitro*

Chen Wei-cui¹, Liu Shu-yi¹, Lin Ai-hua², Liu Xian¹ (¹Department of Radiology, ²Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Transferrin (Tf) is one suitable ligand to be conjugated to drug delivery systems to achieve site-specific targeting and desired therapeutic effect, due to its specific binding to transferrin receptors (TfR), and high

Chen Wei-cui, Master, Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Corresponding author: Liu Xian, M.D., Master's supervisor, Associate chief physician, Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

expression on the surface of tumor cells. Contrast agents are also modified with Tf to achieve specific tumor imaging.

OBJECTIVE: To prepare Tf-labeled magnetoliposomes (MLs), and characterize their utility as TfR targeted MR specific contrast agent *in vitro*.

METHODS: MLs and Tf-MLs were prepared by lipid film hydration method and covalent coupling method, respectively. Tf-MLs were characterized by their mean size, zeta potential, polyindex, r_2 relaxivity, Tf-binding efficacy and cytotoxicity. *In vitro* MRI contrasting properties of the suspended nanoparticles incubated with HepG2 cells were determined.

RESULTS AND CONCLUSION: The mean diameter, polydispersity index, zeta potential and r_2 relaxivity of Tf-ML were 95.1 nm, 0.21, -1.25 mv and 94.62 $\text{mmol}^{-1}/\text{s}$, respectively. The coupling efficiency was calculated and the values obtained were 59.4 μg Tf/ μmol phospholipid corresponding to about 27 molecules of Tf-MLs. After a 2-hour incubation with rhodamine-labeled Tf-MLs, rhodamine fluorescence was detected intensively in the plasma membrane and the cytoplasm of the TfR-overexpressing HepG2 cells. In contrast, Tf-ML showed little binding in MCF-7 cells that had low TfR level. HepG2 cells incubated with Tf-ML showed much higher intracellular iron density than incubated with non-targeted MLs. *In vitro* MR T2WI of cells demonstrated the centrifuge tube containing HepG2 cells incubated with Tf-MLs produced a lower visible signal intensity than that treated with non-targeted MLs. Tf-MLs showed their potentials such as high r_2 relaxivity, specific binding ability characteristics. These results suggest the availability of Tf-MLs to serve as a targeted contrast agent.

Subject headings: Liposomes; Receptors, Transferrin; Nanoparticles; Magnetic Resonance Imaging; Tissue Engineering

Funding: the Science and Technology Program of Guangdong Province, No. 2013B021800247; the National Natural Science Foundation of China, No. 30700184

Cite this article: Chen WC, Liu SY, Lin AH, Liu X. Transferrin-labeled magnetoliposomes: preparation and magnetic resonance imaging *in vitro*. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(6):923-927.

0 引言 Introduction

利用肿瘤表面的抗原或受体与靶向对比剂的特异性结合, 可实现对肿瘤特异性显像的目的。转铁蛋白(transferrin, Tf)为单链糖基化球蛋白, 可协助血浆糖蛋白运载铁离子至正常细胞。转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)是一种跨膜糖蛋白, 与转铁蛋白相互作用介导对铁的吸收^[1]。研究表明, 转铁蛋白受体在肿瘤细胞中表达显著增加, 而在正常组织表达少, 可作为肿瘤抗原标记物和诊断治疗的靶向部位; 转铁蛋白受体不易发生脱落凋衰, 且增高程度与肿瘤的分期、分级有密切关系; 转铁蛋白-转铁蛋白受体结合具有高亲和性, 这些特点使其在肿瘤靶向诊断和治疗中越来越受到重视^[1-2]。利用转铁蛋白受体的有效靶向作用, 转铁蛋白修饰抗肿瘤药物可明显提高药物的特异结合能力和疗效。而磁性脂质体为药物传递系统中的新型载体, 可包裹药物和 Fe_3O_4 分子, 既具有磁流体性能, 又具有脂质体组织相容性好的特点^[3]。基于以上, 实验设想利用转铁蛋白标记磁性脂质体作为MR影像示踪剂, 针对肿瘤组织的转铁蛋白受体, 实现特异性靶向成像的目的。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 观察学实验。

1.2 时间及地点 于2015年12月至2016年4月在广东省中医科学研究院实验室完成。

1.3 材料 二硬脂酰磷脂酰胆碱 (distearoyl phosphatidylcholine, DSPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱 (dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC)购自于德国Lipoid公司; 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇[1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(poly(ethylene glycol))-2000, PEG2000-DSPE]、罗丹明-磷脂酰乙醇胺 (rhodamine-PE)购自美国Avanti Polar Lipids公司; 双铁人转

铁蛋白[H-Tf(Fe)₂]、磁性氧化铁纳米粒子、3-(2-吡啶二巯基)丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯[dithiothreitol and 3-(2-pyridylthio) propionic acid N-hydroxysuccinimide ester, SPDP]、胆固醇 (cholesterol, Chol)购自美国Sigma公司。

1.4 实验方法

1.4.1 磁性脂质体的制备 5 mg 磁性氧化铁纳米粒子与脂质(DSPC : chol : PEG2000-DSPE为6 : 3 : 0.6摩尔比)混合, 溶于氯仿/乙醚混合液(体积比1 : 1), 脂质总量为120 μmol , 在40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下旋转蒸干; 然后脂质混合物加入2.5 mL硫酸铵溶液进行水化(pH 7.4), 并使用探针型声纳仪(Sonics VCX-130-PB, Newtown, CT)进行超声波处理15 min。制备的脂质体使用0.45, 0.22, 0.10 μm 多聚碳酸酯滤器分别过滤5次统一粒径。此外, 加入0.001 mol rhodamine-PE用于荧光成像。

1.4.2 转铁蛋白受体靶向磁性脂质体的制备 采用共价结合合法制备。室温条件下10 mg H-Tf (Fe)₂与20 mmol/L SPDP在甲醇内孵育30 min, 使用Sephadex G-25凝胶柱, 0.1 mol/L乙酸缓冲液(pH 4.5)去除过量的SPDP; 然后加入二硫苏糖醇, 在室温下孵育30 min对SPDP进行还原(终浓度为50 mmol/L)。终产物使用Sephadex G-25凝胶柱, MES缓冲盐溶液进行纯化(25 mmol/L MES, 140 mmol/L NaCl, pH 6.5)。还原后的转铁蛋白加入事先制备的磁性脂质体(转铁蛋白 : 脂质比例为0.2 : 1), 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜。游离的转铁蛋白采用Sepharose CL-4B层析柱去除(HEPES缓冲液)。

1.4.3 转铁蛋白-磁性纳米粒的粒径、电位及形态检测 取纯化体脂质体混悬液, 加适量双蒸水稀释后, 用Nicomp380粒度仪(Particle Sizing Systems)测定其粒径及zeta电位。按1 : 4比例稀释转铁蛋白靶向磁性脂质体, 取1滴放在镀膜铜网上, 滤纸吸去多余液体, 加入2%磷酸染色30 s, 干燥后透射电镜下观察其形态。

1.4.4 转铁蛋白-磁性纳米粒结合效率检测 采用氨基黑BSA蛋白分析法^[4], 转铁蛋白结合效率以g/mol方式表示, 计算每个脂质体分子所结合转铁蛋白数量。

1.4.5 转铁蛋白-磁性纳米粒 r_2 弛豫率测定 将浓度为0.10, 0.12, 0.14, 0.16和0.18 mmol/L的转铁蛋白-磁性纳米粒装入试管内, 另取10 mL纯净水及空白载体作对照。使用GE Signa HDX 3.0T超导型磁共振扫描仪, T2 map序列对各管进行横断成像。扫描参数为TR/TE 2 000 ms/20 ms、40 ms、60 ms、80 ms、100 ms、120 ms、140 ms、160 ms, NEX为4, FOV为75 mm×75 mm, 层厚2 mm, 层间隔2 mm。将原始数据导入T2mapping分析软件, 计算 r_2 弛豫率。

1.4.6 细胞结合实验 选择肝癌细胞HepG2(转铁蛋白受体高表达)、人乳腺癌细胞MCF-7(转铁蛋白受体低表达)与罗丹明标记的免疫脂质体在37 °C下孵育2 h, 采用共聚焦荧光显微镜观察细胞悬液。罗丹明-PE的激发、发射波长分别选择560 nm、590 nm。

转铁蛋白-磁性纳米粒、非靶向磁性纳米粒与HepG2细胞反应16 h后进行普鲁士蓝染色, 吸去培养基, PBS洗涤2次, 1 mL体积分数为4%甲醛固定液固定30 min, PBS洗涤2次, 加入1 mL普鲁士蓝染液染色10 min, PBS洗涤2次, 加入伊红溶液染色5 min; 再用PBS洗涤2次, 光学显微镜观察实验结果。

1.4.7 细胞毒性试验 采用MTT法检测。取生长对数期的HepG2、MCF-7细胞, 用RPMI1640培养液调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 。实验前1 d接种到96孔细胞培养板中, 每孔加入200 μL 细胞悬液, 在 CO_2 培养箱内(37 °C, 体积分数为5% CO_2 、饱和湿度)培养24 h, 弃去上清液, 分别加入不同浓度(50, 100, 200, 400, 600, 800, 1 000 $\mu\text{mol/L}$)脂质体溶液培养24 h, 每孔加入20 μL MTT溶液, 在细胞培养箱内继续孵育4 h, 待结晶充分形成后, 去除上清液, 每孔加入100 μL 二甲基亚砷溶解液, 在37 °C细胞培养箱内继续孵育, 直至在镜下观察二甲基亚砷全部溶解。使用酶标仪在570 nm波长处测定吸光度, 计算细胞存活率, 通过细胞存活率评价脂质体的细胞毒性。

细胞存活率(%)=实验组吸光度值/空白对照组吸光度值×100%。

1.4.8 体外细胞MR成像 选择转铁蛋白受体高表达HepG2肝癌细胞, 在DMEM培养基内进行培养, 待细胞生长程度至80%时, 加入胰蛋白酶进行消化处理, 然后分别加入转铁蛋白-磁性纳米粒、空白磁性纳米粒孵育3 h, 使用PBS进行洗脱, 并在1 mL的PBS内进行离心(1 500 r/min, 5 min), 去除上清液, 剩余的细胞成分移入0.5 mL离心管内进行MR T2WI成像, 成像参数为TR/TE 2 500/100 ms, NEX 4, 层厚2 mm。

1.5 主要观察指标 转铁蛋白-磁性纳米粒的理化特性(粒径、电位、电镜形态、转铁蛋白结合效率、 r_2 弛豫率、细胞毒性等指标)、体外细胞结合情况及MR成像效果。

2 结果 Results

2.1 转铁蛋白-磁性纳米粒的理化特性 转铁蛋白-磁性纳米粒平均粒径为95.1 nm, 电位为 (-1.25 ± 0.23) mV, 多分散系数(PI)为0.21(图1)。透射电镜显示转铁蛋白-磁性纳米粒为大小均一、边缘光滑的囊泡状球体, 内部为磁性氧化铁核心(图1)。经计算, 转铁蛋白偶合效率为59.4 g/mol, 相当于每个磁性脂质体结合27个转铁蛋白分子。 r_2 弛豫率为 $94.62 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

2.2 细胞毒实验结果 随着转铁蛋白-磁性纳米粒浓度增大, 细胞毒性略有增加。HepG2细胞在转铁蛋白-磁性纳米粒浓度为400 $\mu\text{mol/L}$ 时生长曲线良好, 与非靶向细胞MCF-7生长曲线无明显差异; 随着标记浓度增加, 细胞生长曲线变为低平, 提示细胞用400 $\mu\text{mol/L}$ 以上浓度标记后, 其生长增殖受到影响(图2)。

2.3 体外细胞结合实验及MR成像实验 激光共聚焦荧光显微镜显示转铁蛋白-磁性纳米粒在细胞内的分布情况。在转铁蛋白受体高表达的HepG2肝癌细胞内, 罗丹明标记的转铁蛋白-磁性纳米粒发生内化, 胞浆出现罗丹明红染; 而在转铁蛋白受体低表达的MCF-7乳腺癌细胞内, 由于不发生特异性结合, 不表现内化作用, 细胞浆内无明显染色(图3)。普鲁士蓝铁染色显示转铁蛋白-磁性纳米粒与转铁蛋白受体高表达HepG2细胞孵育后, 免疫脂质体发生内化, 细胞内、细胞表面可见普鲁士蓝铁染色颗粒; 非靶向对比剂与HepG2细胞孵育后, 不表现内化作用, 细胞浆内无明显铁颗粒染色(图4)。体外MR成像实验表明, 转铁蛋白-磁性纳米粒与HepG2细胞标记后, 大体可观察到T2WI离心管信号强度下降; 而空白磁性纳米粒与细胞不发生结合, 故无明显信号强度下降(图5)。

3 讨论 Discussion

通过抗体或配体与靶细胞表面的抗原/受体特异性结合, 经吞噬、吞饮等多种方式, 药物载体可释放出包封的药物或对比剂, 实现靶向治疗或成像的目的。转铁蛋白-转铁蛋白受体可做为配体-受体介导的药物传递系统。多个研究表明, 利用转铁蛋白摄取旁路, 在动物模型和人体肿瘤治疗中有非常好的效果^[5-11]。转铁蛋白与抗癌药物(如阿霉素)偶联, 可改善药物的心血管毒性和肿瘤组织的抗药性。转铁蛋白-转铁蛋白受体系统也可用于肿瘤靶向成像。研究发现, 利用转铁蛋白受体介导的受体-配体结合特点, 转铁蛋白-氧化铁纳米粒子螯合物分子探针能够特异性进入肝癌等恶性肿瘤细胞, 而对细胞内的转铁蛋白受体表达调控无影响, 可实现对肝癌的MR特异性显像^[12-14]。

理想的靶向对比剂系统应具有简单快速稳定的连接方式、能在血液循环中保持长时间的空间稳定性和良好的抗原识别能力^[15-17]。实验将转铁蛋白与磁性脂质体相连, 制备针对转铁蛋白受体的MR靶向对比剂, 其特点是既利用了转铁蛋白-转铁蛋白受体的高亲和、高特异性的结合特点, 又

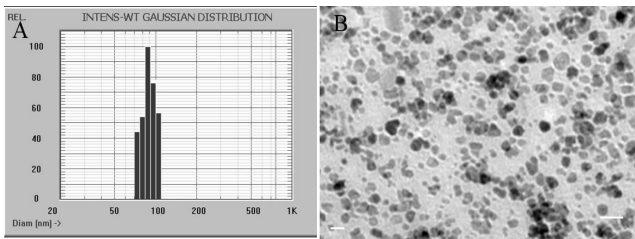


图1 转铁蛋白-磁性纳米粒的粒径分布图及透射电镜图

Figure 1 Particle size distribution and transmission electron microscope of transferrin-labeled magnetoliposomes

图注: 图A为转铁蛋白-磁性纳米粒的粒径分布; B为透射电镜图像, 显示转铁蛋白-磁性纳米粒为大小均匀的囊状球体, 内部为高密度氧化铁核心(标尺为100 nm)。

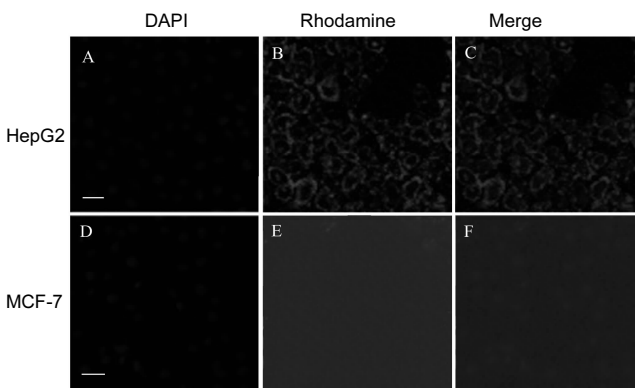
图3 激光共聚焦荧光显微镜图($\times 200$)

Figure 3 Laser confocal fluorescence microscope observation of HepG2 and MCF-7 cells incubated with rhodamine labeled magnetoliposomes ($\times 200$)

图注: 图中A-C为转铁蛋白受体高表达HepG2肝癌细胞与罗丹明标记转铁蛋白-磁性纳米粒孵育后的DAPI染色图、荧光图及Merge图像, 显示转铁蛋白-磁性纳米粒发生内化, 胞浆出现罗丹明红染; D-F为转铁蛋白受体低表达MCF-7乳腺癌细胞与罗丹明标记转铁蛋白-磁性纳米粒孵育后的DAPI染色图、荧光图及Merge图像, 无罗丹明红染。

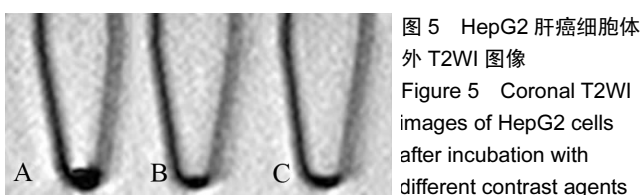


图5 HepG2肝癌细胞体外T2WI图像

Figure 5 Coronal T2WI images of HepG2 cells after incubation with different contrast agents

图注: HepG2肝癌细胞与不同对比剂孵育后的MR T2WI图像, 可见转铁蛋白-磁性纳米粒组(A)导致MR信号明显下降; 而非靶向磁性纳米粒(B)、空白组(C)无明显信号下降。

利用了脂质体的良好组织相容性。实验所使用的转铁蛋白为双铁转铁蛋白, 生理条件下与转铁蛋白受体的亲和力最大。转铁蛋白与磁性脂质体的连接为共价结合方式。所使用的SPDP为异型多功能偶联剂, 可与细胞表面含氨基的蛋白或者多肽发生酰胺化反应, 封闭B链的结合位点, 为抗体蛋白质引入巯基, 形成硫化抗体^[16]。转铁蛋白成分与二硫苏糖醇在pH 4.5条件下反应, 产生自由巯基, 后者再经二硫交换反应与脂质体内的磷脂酰乙醇胺交联, 形成蛋白-蛋白偶联。通过这种共价交联技术将转铁蛋白与脂质体连接起来, 能在脂质体表面结合大量的转铁蛋白(约27个转铁蛋白/

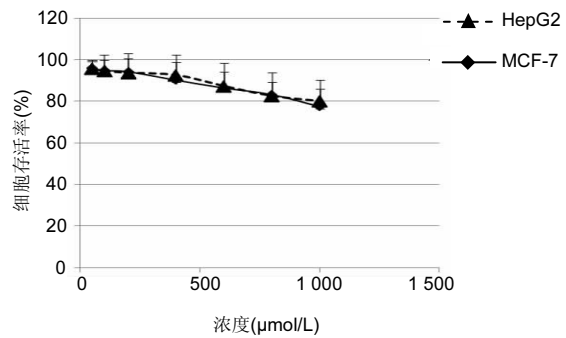


图2 不同浓度转铁蛋白-磁性纳米粒条件下, HepG2细胞及MCF-7细胞生长曲线

Figure 2 Cytotoxicity assay of transferrin-labeled magnetoliposomes in HepG2 and MCF-7 cells

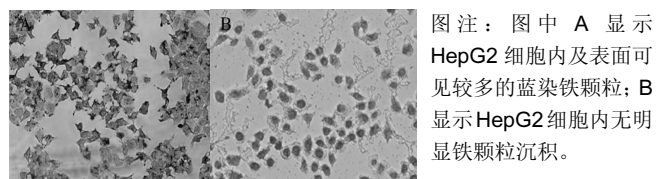
图4 HepG2细胞与转铁蛋白-磁性纳米粒、非靶向磁性纳米粒孵育2 h后的普鲁士蓝铁染色光镜照片($\times 200$)

Figure 4 The light microscopy images of Prussian blue staining of HepG2 cells incubated with transferrin-labeled magnetoliposomes and non-targeted magnetoliposomes ($\times 200$)

磁性脂质体分子), 方法简单可靠, 且包裹的水溶性内容物丢失少。但需注意的是, 磷脂与抗体之间的同型交联易造成分子聚集, 可能会影响抗原-抗体、配体-受体的结合。此时, 在蛋白质和脂质之间使用空间长臂可解决这一问题。实验中制备的转铁蛋白-磁性纳米粒加入了聚乙二醇, 可在脂质体表面形成亲水性空间立体屏障, 可延长血浆半衰期并能减小免疫原性, 提高其生物利用度^[17-19]。

转铁蛋白-磁性纳米粒经受体介导的吞噬作用, 实现对肿瘤细胞的靶向作用。转铁蛋白-转铁蛋白受体复合物被内化后, 运输到吞噬体内; ATP依赖性质子泵将 H^+ 泵入吞噬体内使pH降低, 促进包封物的释放。体外细胞结合实验表明, 转铁蛋白-磁性纳米粒与转铁蛋白受体高表达HepG2肝癌细胞发生特异性结合, 经受体介导的吞噬作用进入胞浆, 细胞内出现荧光红染和普鲁士蓝染铁颗粒^[1]。体外MR成像显示这种转铁蛋白-转铁蛋白受体特异性结合, 缩短了细胞的T2弛豫时间, 引起MR T2加权信号下降。

以转铁蛋白-磁性纳米粒作为恶性肿瘤的特异性靶向分子探针, 在基因治疗、药物传递方面也有广泛的应用前景^[20-22]。此次实验制备的磁性纳米粒子, 为脂质体包裹的氧化铁粒子, 能提高细胞标记效率, 增加细胞对脂质体包裹的氧化铁粒子的摄取量。研究表明, 经脂质体包裹后的氧化铁粒子对猪肌母细胞的标记效率可提高至100%, 并可消除高浓度铁对细胞的潜在毒性^[12]。磁性纳米粒子也可用于靶向治疗^[23-25], 利用转铁蛋白-转铁蛋白受体的靶向作用, 通过静脉注射、动脉插管或直接注射等方式引入肿瘤内, 磁性纳米粒在外源性交变磁场的作用下, 达到靶区的磁性离子能迅

速升温到有效治疗温度, 可导致肿瘤组织的坏死, 而无磁性纳米粒的正常组织则不受到损伤。

总之, 实验所制备的转铁蛋白标记靶向磁性脂质体具有高 r_2 弛豫率、特异性靶向作用。转铁蛋白与脂质体为二硫键共价结合方式, 形成的免疫脂质体更加有效。此研究为下一步的活体实验研究奠定了实验基础, 具有重要的指导意义。但由于脂质体的制备受多种因素如材料、粒径大小、电位等影响, 体内应用与循环时间、药物动力学等因素有关, 这些都需在进一步的研究中加以注意。

作者贡献: 通讯作者构思并设计实验, 并与第一、二、三作者共同分析文献资料; 第一、二作者负责实验操作。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 通讯作者对于研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- Gomme PT, McCann KB, Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today*. 2005;10(4):267-273.
- Daniels TR, Bernabeu E, Rodríguez JA, et al. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(3):291-317.
- Soenen SJ, Vande Velde G, Ketkar-Atre A, et al. Magnetoliposomes as magnetic resonance imaging contrast agents. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2011;3(2):197-211.
- 陈鸿琪. 蛋白质定量分析的进展[J]. 理化检验: 化学分册. 2000, 36(7):33-36.
- Kobayashi T, Ishida T, Okada Y, et al. Effect of transferrin receptor-targeted liposomal doxorubicin in P-glycoprotein-mediated drug resistant tumor cells. *Int J Pharm*. 2007;329(1-2):94-102.
- Guo Y, Wang L, Lv P, et al. Transferrin-conjugated doxorubicin-loaded lipid-coated nanoparticles for the targeting and therapy of lung cancer. *Oncol Lett*. 2015;9(3):1065-1072.
- Szwed M, Wrona D, Kania KD, et al. Doxorubicin-transferrin conjugate triggers pro-oxidative disorders in solid tumor cells. *Toxicol In Vitro*. 2016;31:60-71.
- Salvatore A, Montis C, Berti D, et al. Multifunctional Magnetoliposomes for Sequential Controlled Release. *ACS Nano*. 2016;10(8):7749-7760.
- Hodenus M, Würth C, Jayapaul J, et al. Fluorescent magnetoliposomes as a platform technology for functional and molecular MR and optical imaging. *Contrast Media Mol Imaging*. 2012;7(1):59-67.
- Rodrigues AR, Gomes IT, Almeida BG, et al. Magnetic liposomes based on nickel ferrite nanoparticles for biomedical applications. *Phys Chem Chem Phys*. 2015;17(27):18011-18021.
- Martins MB, Corvo ML, Marcelino P, et al. New long circulating magnetoliposomes as contrast agents for detection of ischemia-reperfusion injuries by MRI. *Nanomedicine*. 2014;10(1):207-214.
- Moore A, Josephson L, Bhorade RM, et al. Human transferrin receptor gene as a marker gene for MR imaging. *Radiology*. 2001;221(1):244-250.
- Yang R, Tang Q, Miao F, et al. Inhibition of heat-shock protein 90 sensitizes liver cancer stem-like cells to magnetic hyperthermia and enhances anti-tumor effect on hepatocellular carcinoma-burdened nude mice. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:7345-7358.
- Ketkar-Atre A, Struys T, Dresselaers T, et al. In vivo hepatocyte MR imaging using lactose functionalized magnetoliposomes. *Biomaterials*. 2014;35(3):1015-1024.
- Kozłowska D, Foran P, MacMahon P, et al. Molecular and magnetic resonance imaging: The value of immunoliposomes. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(15):1402-1411.
- Manjappa AS, Chaudhari KR, Venkataraju MP, et al. Antibody derivatization and conjugation strategies: application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor. *J Control Release*. 2011;150(1):2-22.
- Koshkaryev A, Sawant R, Deshpande M, et al. Immunoconjugates and long circulating systems: origins, current state of the art and future directions. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(1):24-35.
- Miller AD. Lipid-based nanoparticles in cancer diagnosis and therapy. *J Drug Deliv*. 2013;2013:165981.
- Vithanarachchi SM, Allen MJ. Strategies for Target-Specific Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Curr Mol Imaging*. 2012;1(1):12-25.
- Lei Y, Hamada Y, Li J, et al. Targeted tumor delivery and controlled release of neuronal drugs with ferritin nanoparticles to regulate pancreatic cancer progression. *J Control Release*. 2016;232:131-142.
- Szwed M, Kania KD, Jozwiak Z. Assessment of pro-apoptotic activity of doxorubicin-transferrin conjugate in cells derived from human solid tumors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;70:57-67.
- Zhang R, Li J, Li J, et al. Efficient In vitro labeling rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells with SPIO and differentiating into neural-like cells. *Mol Cells*. 2014;37(9):650-655.
- Gharib A, Faezizadeh Z, Mesbah-Namin SA, et al. Preparation, characterization and in vitro efficacy of magnetic nanoliposomes containing the artemisinin and transferrin. *Daru*. 2014;22:44.
- Hauser AK, Wydra RJ, Stocke NA, et al. Magnetic nanoparticles and nanocomposites for remote controlled therapies. *J Control Release*. 2015;219:76-94.
- Ferreira RV, Martins TM, Goes AM, et al. Thermosensitive gemcitabine-magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy. *Nanotechnology*. 2016;27(8):085105.