

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.10.001

• 基础研究 •

PVCL-MnO₂ 纳米探针用于多形性胶质母细胞瘤的放疗增敏
及 MRI 成像的实验研究 *贺美娟 王毅晖 余宏微 范旭辉 王 悍^Δ

(上海交通大学附属第一人民医院放射科 上海 200080)

摘要 目的:探讨 PVCL-MnO₂ 对多形性胶质母细胞瘤的放疗增敏作用,并进行体内 MRI 成像研究。**方法:**制备 PVCL-MnO₂ 纳米探针,利用透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope, TEM)对其形态进行表征,并使用 Image J 分析其尺寸分布。采用细胞增殖-毒性实验(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT),测定 PVCL-MnO₂ 协同放疗处理肿瘤细胞 48 h 后的细胞活性。将多形性胶质母细胞瘤细胞进行 PVCL-MnO₂ 共孵育后,协同放疗处理,分别使用免疫荧光,蛋白质印迹法等实验技术检测 H2AX 组蛋白异型的磷酸化形式(phosphorylated form of the histone protein H2AX, γ -H2AX),活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的产生及 Bax, Bcl-2 凋亡相关蛋白的表达。PVCL-MnO₂ 尾静脉注射至原位多形性胶质母细胞瘤小鼠中,在不同的时间点进行 MRI 扫描,观察成像效果。**结果:**PVCL-MnO₂ 颗粒粒径分布均匀,结构规整,表现出良好的单分散性。PVCL-MnO₂ 联合放疗可有效增强 DNA 双链的断裂,ROS 及促凋亡蛋白 Bax 的产生,同时下调了抗凋亡蛋白 Bcl-2。MRI 成像显示, PVCL-MnO₂ 具有较好的 T₁-加权 MRI 成像效果,在尾静脉注射 PVCL-MnO₂ 后 4 h,肿瘤部位的信号增强最明显,随后信号开始下降。**结论:** PVCL-MnO₂ 可实现多形性胶质母细胞瘤的放疗增敏及 MRI 成像。

关键词:放疗增敏; MRI 成像; 多形性胶质母细胞瘤

中图分类号:R-33;R445;R730.55 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)10-1801-05

Experimental Study of PVCL-MnO₂ Nanoprobe for Radiosensitization
and MRI Imaging of Glioblastoma Multiforme*HE Mei-juan, WANG Yi-hui, YU Hong-wei, FAN Xu-hui, WANG Han^Δ

(Department of Radiology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the radiosensitization and MR Imaging of PVCL-MnO₂ nanoprobes on orthotopic glioblastoma multiforme. **Methods:** PVCL-MnO₂ nanoprobes were prepared and characterized by transmission electron microscope (TEM). Meanwhile, the size distribution was analyzed by Image J. Then the cell viability of tumor cells treated by PVCL-MnO₂ and radiotherapy for 48 h were determined by cell proliferation-toxicity test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT). Moreover, C6 cells treated with PVCL-MnO₂ nanoprobes and radiotherapy, immunofluorescence, western blot and other techniques were utilized to evaluate the production of γ -H2AX, reactive oxygen species (ROS) and apoptosis-related proteins (Bax, Bcl-2). Finally, glioblastoma-bearing mice were injected with PVCL-MnO₂ nanoprobes via tail vein and scanned by MRI at different time points. **Results:** PVCL-MnO₂ nanoprobes possessed a uniform size distribution, well-defined structure and excellent monodispersity. The combination of PVCL-MnO₂ nanoprobes and radiotherapy could effectively enhance DNA double-strand breaks and the production of ROS and pro-apoptotic protein Bax. The expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 was downregulated. MR imaging showed that PVCL-MnO₂ performed excellent in T₁-weighted MRI imaging. The increasing signal at the tumor site was the most distinct at 4h post-injection of PVCL-MnO₂. Then the signal began to decrease. **Conclusions:** The PVCL-MnO₂ nanoprobe has potential for radiosensitization and MRI imaging of glioblastoma multiforme.

Key words: Radiosensitization; MRI imaging; Glioblastoma multiforme

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R445; R730.55 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2022)10-1801-05

前言

多形性胶质母细胞瘤(Glioblastoma multiforme, GBM)是最具侵袭性的恶性肿瘤,其发病率为 3/10 万,5 年生存率低于

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81871400);上海市教委重大项目(202101070002E00085);上海市科委重点项目(18441905000)

作者简介:贺美娟(1995-),女,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤分子影像学, E-mail: lilyhmj@163.com, 电话: 15996962788

^Δ 通讯作者:王悍, E-mail: han.wang@shsmu.edu.cn, 电话: 021-63071422

(收稿日期:2022-01-04 接受日期:2022-01-26)

10%^[1]。放疗是改善 GBM 临床症状和提高其生存率的不可或缺的方式^[2]。然而,放疗依旧存在一定的局限性,不可避免的副作用,放疗抵抗的肿瘤微环境以及免疫抑制细胞的存在,使得放疗并不能取得较好的成效,实现 GBM 的完全根治。目前针对胶质瘤的综合治疗方法主要包括手术切除肿瘤联合放疗或替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 化疗,但患者的总生存时间并未得到明显改善,仍少于 15 个月^[3]。因此,亟需找到能够提升基于放疗的抗 GBM 治疗效果的方法。

在过去的几十年里,新兴的纳米技术使得多种纳米材料被设计并开发出来,用于放疗增敏,弥补放疗所存在的不足。比如,金-、铋(bismuth, Bi)-、银(silver, Ag)-、铂(platinum, Pt)等高原子序数纳米粒子^[4-7],由于它们产生的光电子、康普顿电子和俄歇电子可以将辐射能量沉积在肿瘤部位,促进 ROS 的产生,杀死肿瘤细胞,现已被用来增强放疗的抗肿瘤效果。此外,还有些纳米材料通过改善肿瘤微环境的缺氧,消耗内部高表达的谷胱甘肽 (glutathione, GSH),将肿瘤细胞细胞周期停滞在 G2/M 期,从而使肿瘤细胞对射线更加敏感。其中,一些纳米酶比如磁性四氧化三铁纳米粒子, MnO_2 和 CaO_2 , 铜基纳米粒子等可以催化肿瘤微环境中的 H_2O_2 产生氧气,改善肿瘤的缺氧微环境^[8-10]。 MnO_2 还可以在高 GSH 的肿瘤微环境分离出 Mn^{2+} , 实现 T_1 - 加权 MRI 成像,对脑肿瘤的研究具有极大的价值。因此,我们设想用聚(N- 乙基己内酰胺) (poly(N-vinyl caprolactam), PVCL) 纳米水凝胶构建 PVCL- MnO_2 , 进而研究其放疗增敏作用及 MRI 成像效果。

1 材料和方法

1.1 材料

乙二胺 (Ethylenediamine, EDA, 百灵威科技有限公司), 1-(3-二甲氨基丙基)-3 乙基碳二亚胺盐酸盐 (1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC, 吉尔生化有限公司), N- 羟基琥珀酰亚胺 (N-Hydroxysuccinic NHS, 吉尔生化有限公司), MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (碧云天公司), 胎牛血清 (Fatal Bovine Serum, FBS, Gibco 公司), DMEM 细胞培养液 (Hyclone 公司), RPMI-1640 细胞培养基 (Hyclone 公司); 青霉素-链霉素 (杭州吉诺生物科技有限公司); 胰酶 (Gibco 公司); 活性氧检测试剂盒 (碧云天公司); γ -H2AX 抗体 (CST 公司); Bax, Bcl-2 抗体 (Affinity 公司); JEOL 2010F 透射电子显微镜 (日本电子株式会社); 激光扫描共聚焦显微镜 (Leica 公司)。

1.2 材料的合成

将含 EDC (287.55 mg) 和 NHS (172.635 mg) 的混合溶液加入到 30 mL PVCL NGs (210 mg) 水溶液中, 搅拌两小时以活化羧基。上述溶液与过量的 EDA (200.4 μL) 反应 3 天, PVCL NGs 表面的羧基通过 EDC / NHS 偶联反应转化为氨基, 得到 PVCL-NH₂ NG, 随后透析 3 天以去除杂质。使用注射泵以 0.1 mL/min 的速度将 KMnO_4 (5 mg/mL) 水溶液滴加到 PVCL NG (7 mg/mL), PVCL NGs 与 KMnO_4 比例为 1 : 0.5, 连续搅拌过夜。上述溶液去离子水透析 3 天后, 获得 PVCL- MnO_2 NGs。

1.3 材料的表征

TEM 电镜下观察 PVCL- MnO_2 NGs 的形貌, 并用 Image J

统计粒径分布。

1.4 细胞培养及 MTT 法检测细胞毒性

将胶质母细胞瘤细胞 C6 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 脑微血管内皮细胞 (brain-derived Endothelial cells, bEnd.3) 细胞培养于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基, 培养箱的温度为 37 °C, 二氧化碳浓度为 5%。为了防止高浓度锰离子对正常细胞的损伤作用, 使用 MTT 检测不同纳米水凝胶浓度的 PVCL- MnO_2 纳米探针对于 bEnd.3 的毒性作用, 明确锰离子合适的剂量。将 100 μL 含 1×10^4 的 bEnd.3 接种于 96 孔板中, 贴壁后加入不同浓度的 PVCL- MnO_2 。24 小时后每孔加入 10 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续孵育 4 h, 然后小心吸取孔内上清液, 每孔加入 100 μL DMSO, 震荡 10 min 后, 使用酶标仪测定 490 nm 波长下的吸光度。根据 $(\text{OD}_{\text{PVCL-MnO}_2} - \text{OD}_{\text{blank}}) / (\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}}) \times 100\%$ 计算出各组细胞存活率。

1.5 实验分组

为了探究 PVCL- MnO_2 的放疗增敏, 将 C6 细胞分为 3 组: 未给予刺激的一组为阴性对照组 - Control 组; 单独给予 X 线照射 (6 Gy) 的为放疗 (radiotherapy, RT) 组 - RT 组; 同时给予 X 线照射 (6 Gy) 和 PVCL- MnO_2 处理的为实验组, RT+PVCL- MnO_2 组。

1.6 免疫荧光检测 γ -H2AX 的表达

将 2×10^5 个 C6 细胞预先接种在共聚焦培养皿中。细胞贴壁后, 分别加入或不加入 PVCL- MnO_2 , 6 小时后进行 X 线照射 (4 Gy, 180 KV, 10 mA)。2 小时后终止培养, 用 4 % 多聚甲醛固定, 然后分别进行破膜和封闭处理, 加入 200 μL γ -H2AX 抗体 (1 : 400), 4 °C 下孵育过夜。第二天用 PBS 洗涤后, 加入抗兔 IgG Fab2 Alexa Fluor® 488 分子探针 (1 : 500), 暗盒中孵育 1 小时。最后用 DAPI 染色并通过激光扫描共聚焦显微镜进行评估。

1.7 ROS 检测

将 2×10^5 个 C6 细胞预先接种在共聚焦培养皿中。细胞贴壁后, 分别加入或不加入 PVCL- MnO_2 , 6 小时后进行 X 线照射。24 小时后, 去除细胞培养液, 每个皿中加入 1 mL 按照 1 : 1000 用无血清培养液稀释的活性氧荧光探针, 37 °C 细胞培养箱内孵育 30 分钟。用无血清细胞培养液洗涤细胞三次, 加入 PBS 后用激光扫描共聚焦显微镜直接观察。

1.8 Western Blot 检测 Bax, Bcl-2 凋亡相关蛋白的表达

收集不同处理的 C6 细胞, PBS 洗涤 3 次之后, 每孔加入 100 μL 蛋白裂解液 (含有蛋白酶抑制剂), 冰上裂解 20 min 后, 13000 rpm, 4 °C 离心 15 分钟, 吸取 80 μL 上清于新的 1.5 mL Ep 管中, 每管再加入 20 μL 的 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 混匀后置于 100 °C 水中煮 10 分钟。BCA 蛋白定量后, 进行电泳、转膜及封闭, 4 °C 孵育 Bax, Bcl-2 (1 : 1000) 一抗过夜。TBST 洗涤条带 3 次, 每次 15 分钟, 室温下孵育二抗一小时, 再次 TBST 洗涤条带 3 次, 每次 15 分钟, 最后滴加 ECL 发光液显影。

1.9 原位多形性胶质母细胞瘤的构建

使用 ICR 小鼠 (25~30 g, 雄性, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司) 建立小鼠多形性胶质母细胞瘤原位动物模型, 用于 PVCL- MnO_2 的 MRI 成像。C6 细胞培养于 37 °C、5% CO_2

的培养箱中,选取对数生长期的细胞,弃去培养液,PBS 冲洗 3 遍,离心获得细胞沉淀,加入适量 PBS。小鼠头部剃毛处理,酒精棉球擦拭小鼠头部,沿头的矢状缝切开头皮,约 1 cm,然后用微型钻孔器在矢状缝右 2 mm,前囟后 2 mm 处钻孔,微量注射器抽取 5 μ L 细胞 (1×10^5 个细胞),在该钻孔处下 3 mm 以 1 μ L/min 的速度注入细胞,注射结束后留针 15 min,最后缝合头皮,碘伏消毒,待小鼠醒来后放至小鼠笼。

1.10 PVCL-MnO₂ 的体内 MRI 成像

将 PVCL-MnO₂ (Mn:91.8 μ g)尾静脉注射至原位多形性胶质母细胞瘤小鼠,分别在注射后的 0、1、2、4、10 和 24 小时,用 3.0 T MRI 系统进行磁共振扫描,其扫描参数为:自旋回波 T₁ 加权相(T₁WI),重复时间(TR)为 500 ms,回波时间(TE)为 15 ms,扫描野(FOV)为 60 mm $\times$ 60 mm,层厚 2 mm,同时测量不同时间点的信噪比(Signal to noise ratio, SNR)^[11,12]。

1.11 统计学分析

所有数据使用 GraphPad Prism 8.4.0 进行分析,多组组间差异使用 one-way analysis of variance(ANOVA)检验, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 PVCL-MnO₂ 的表征

TEM 电镜可见 PVCL-MnO₂ 纳米颗粒表现出良好的单分散性,类似于球形结构,经 Image J 检测该纳米颗粒的尺寸分布为 116 ± 10 nm(图 1)。

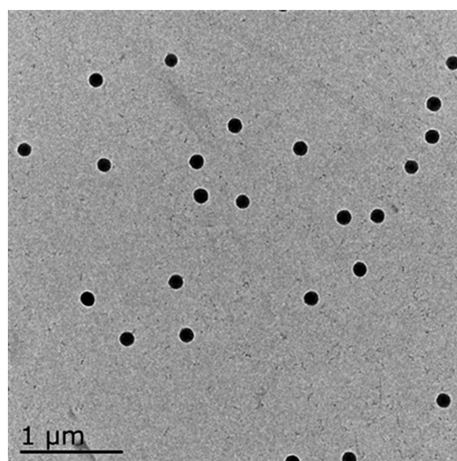


图 1 PVCL-MnO₂ 的 TEM 图

Fig. 1 TEM images of PVCL-MnO₂ nanoparticles

2.2 不同浓度 PVCL-MnO₂ 作用后对细胞活性的影响

用不同浓度(0、20、40、60、80、100 μ g/mL) PVCL-MnO₂ 纳米颗粒处理 bEnd.3 细胞 24 小时后,用 MTT 法检测细胞活性。结果显示,正常细胞 bEnd.3 细胞与 60 μ g/mL PVCL-MnO₂ 纳米颗粒共培养 24 小时后,其细胞活性不到 50%,与 40 μ g/mL PVCL-MnO₂ 纳米颗粒共培养其细胞活性可达到 50%以上,见图 2。因此选用 40 μ g/mL 的纳米材料浓度用于后续的体外细胞实验。

2.3 PVCL-MnO₂ 的放疗增敏

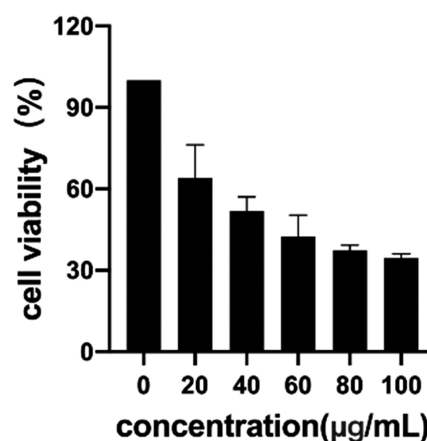


图 2 不同浓度的 PVCL-MnO₂ 对 bEnd.3 细胞增殖的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of PVCL-MnO₂ on proliferation of bEnd.3 cells

2.3.1 MTT 法检测 PVCL-MnO₂ 联合放疗对肿瘤细胞增殖的影响

在被 PVCL-MnO₂ 与 6 Gy 的放疗剂量干预 48 小时后,MTT 法检测到 C6 细胞的活性仅为 46%,与对照组及 RT 组相比,C6 细胞的细胞活性分布下降了 54%($P < 0.0001$) 和 32%($P < 0.0001$),见图 3,说明 PVCL-MnO₂ 可以增强放疗对细胞的杀伤作用。

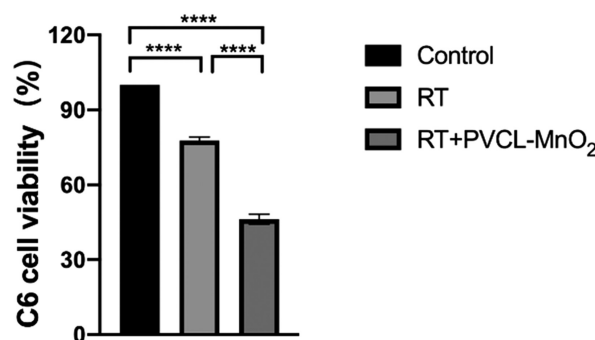


图 3 PVCL-MnO₂ 联合放疗对 C6 细胞增殖的影响

Fig. 3 Effects of PVCL-MnO₂ on proliferation of C6 cells

2.3.2 免疫荧光检测 γ -H2AX 的表达 γ -H2AX 的产生与肿瘤细胞被电离辐射后产生的 DNA 双链断裂 (DNA double-strand breaks, DSBs) 密切相关,形成的 γ -H2AX 焦点数量与 DNA 双链断裂数量一一对应。为确定 PVCL-MnO₂ 能否增强放疗对肿瘤细胞的 DNA 损伤,我们通过免疫荧光成像检测 γ -H2AX 的表达。结果如图 4 所示,对照组中可见少许几个 γ -H2AX 焦点,RT 组的 γ -H2AX 焦点稍有增多,RT+ PVCL-MnO₂ 组的 γ -H2AX 焦点表达的最明显,说明 RT+ PVCL-MnO₂ 处理后肿瘤细胞的 DNA 损伤程度最高。

2.3.3 免疫荧光检测 ROS 的产生 在放疗过程中,还会产生活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)攻击肿瘤细胞,促进肿瘤细胞的凋亡^[13,14]。因此,我们使用活性氧探针 (2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 检测各组处理后肿瘤微环境中 ROS 的产生,见图 5。与对照组和 RT 组相比,RT+ PVCL-MnO₂ 组可见到更明显的 ROS 表达,因此可以产生更强的抗肿瘤作用,与之前的实验结果相一致。

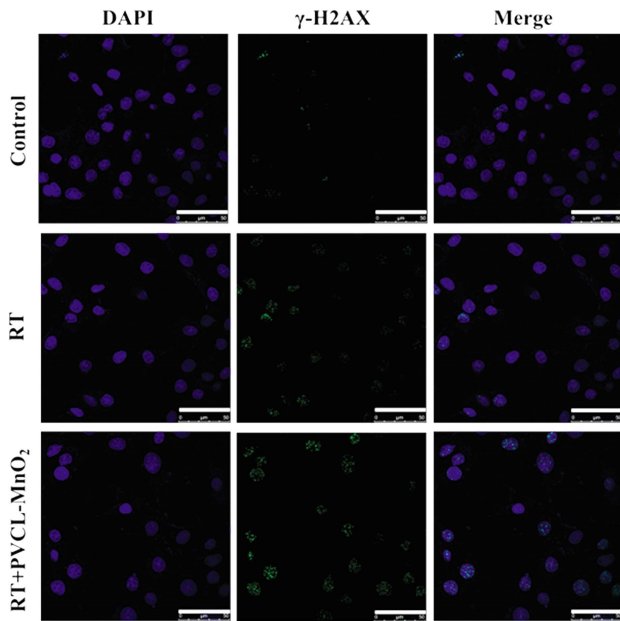


图4 经不同处理后 C6 细胞产生 γ -H2AX 的免疫荧光, 图中标尺代 50 μ m

Fig. 4 Immunofluorescence imaging of γ -H2AX when C6 cells were treated with PBS, RT, RT+PVCL-MnO₂. Scale bar, 50 μ m

2.3.4 Western Blot 检测 Bax, Bcl-2 凋亡相关蛋白的表达 Bax 和 Bcl-2 是 Bcl-2 家族的主要成员, 在肿瘤进展及线粒体功能障碍引发的凋亡通路的抑制方面发挥着重要作用^[15]。Bcl-2 蛋白可以抑制细胞凋亡, 延长肿瘤细胞的存活时间^[16]。相比之下, Bax 蛋白是细胞凋亡的启动子, 可以促进肿瘤细胞的凋亡^[17]。为了探究放疗联合 PVCL-MnO₂ 对凋亡通路的影响, 我们用 Western Blot 检测了 Bax、Bcl-2 凋亡相关蛋白的表达, 见图 6。与 Control 组相比, RT+ PVCL-MnO₂ 组 Bax 蛋白表达增高, Bcl-2 蛋白明显下降, 说明 RT+ PVCL-MnO₂ 组可以通过上调 Bax 蛋白的表达和下调 Bcl-2 蛋白的表达, 从而介导 C6 细胞的凋亡。

2.4 体内 MRI 成像分析

构建的原位多形性胶质母细胞瘤小鼠尾静脉注射 PVCL-MnO₂, 后不同时间点进行 MRI 扫描。T₁WI 图像和 SNR 结果如图 7A、B 所示, 随着时间的增加, T₁ 信号在逐渐增加, 在

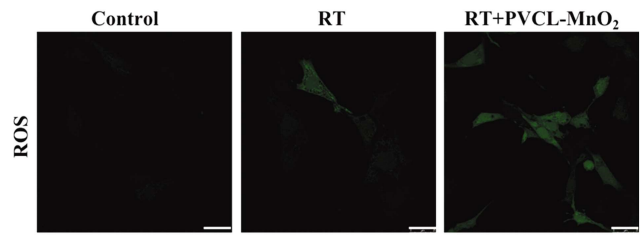


图5 经不同处理后 C6 细胞产生 ROS 的免疫荧光, 图中标尺代 25 μ m

Fig. 5 Immunofluorescence imaging of generated ROS when C6 cells were treated with PBS, RT, RT+PVCL-MnO₂. Scale bar, 25 μ m

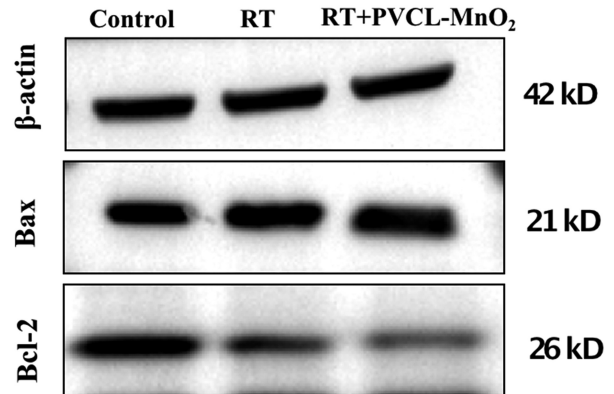


图6 不同处理组的 C6 中 Bax, Bcl-2 的表达情况

Fig. 6 Expression of Bax and Bcl-2 in C6 cells treated with PBS, RT and RT+PVCL-MnO₂

4 小时达到信号的高峰, 然后信号开始下降。

3 讨论

研究表明, 二氧化锰具有类 Fenton 效应, 可以在酸性的肿瘤微环境中催化 H₂O₂ 产生氧气和活性氧自由基·OH, 同时也可以被 GSH 还原, 分解出大量 Mn²⁺^[18,19]。一方面, 氧气的产生缓解了肿瘤微环境的缺氧, ROS 的聚积和 GSH 的消耗可以促进肿瘤细胞的凋亡, 增强放疗的抗肿瘤效果。另一方面, Mn²⁺ 可以作为 T₁- 加权 MRI 成像的对比剂, 应用于肿瘤的诊断与监测^[20-22]。因此, 二氧化锰既是成像的手段, 又是治疗的利器。在众多的纳米载体中, 纳米水凝胶由于良好的生物相容性、易表面功能化、出色的流动性及可变形性而凸显出来^[23-25], 被广泛的应

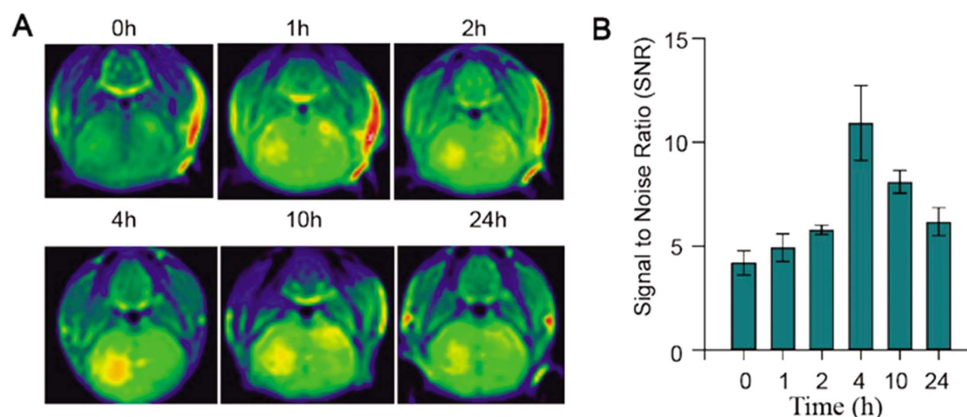


图7 不同时间点的 MRI 体内成像图片及对应的 SNR 值

Fig.7 T₁-weighted MRI images of glioblastoma-bearing mice and T₁ SNR at different time post-injection of PVCL-MnO₂

用于药物的刺激响应性输送和生物成像。在我们之前的工作中,我们已经合成了尺寸均匀、分散性及胶体稳定性较好的PVCL水凝胶^[26]。并且,我们的研究发现,纳米粒子的粒径对细胞的摄取效率具有很大影响,粒径越大的纳米粒子被细胞吞噬的就越少。因此,尺寸小于200 nm的纳米凝胶更适合作为纳米载体,用于诊疗一体化纳米探针的构建。因此,本研究构建的PVCL-MnO₂有望实现MRI引导下的放疗增敏。

肿瘤微环境中高水平的GSH可以通过减少ROS的产生和抑制有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路,抑制电离辐射诱导的细胞凋亡^[27]。我们通过免疫荧光技术证明放疗协同PVCL-MnO₂可以促进肿瘤内ROS的表达,增强肿瘤细胞 γ -H2AX焦点的表达。同时,Western Blot的结果表明,肿瘤细胞的抗凋亡蛋白Bcl-2被下调,促凋亡蛋白Bax的表达被上调,可以进一步诱导肿瘤细胞的凋亡。因此,PVCL-MnO₂可以通过消耗肿瘤内的GSH并促进ROS的产生,增强肿瘤细胞对电离辐射的敏感性,实现更强的抗肿瘤效果。此外,PVCL-MnO₂的体内成像结果显示,随着时间的增加,MRI的信号强度及SNR也同步增加,在达到信号高峰后又开始下降,表明了PVCL-MnO₂应用于脑肿瘤成像的可行性。

综上所述,本研究成功合成了PVCL-MnO₂纳米探针并对其进行了表征,在细胞水平上可实现放疗增敏,体内MRI也取得了较好的成效。近年来,Mn²⁺被研究发现还具有促免疫激活的作用,通过增强肿瘤细胞DNA损伤所产生的环GMP-AMP合酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)和干扰素基因刺激剂(stimulator of interferon genes, STING)信号,进一步促进树突状细胞(dendritic cells, DCs)的成熟和毒性T淋巴细胞的增殖^[28,29]。此外,放疗产生的DNA也可以激活cGAS-STING信号通路,促进I型干扰素(type-I interferons, IFN-I)的产生^[30]。因此,PVCL-MnO₂有望通过增强该信号通路,提升电离辐射后肿瘤细胞诱导的抗肿瘤免疫反应。我们下一步将对放疗协同PVCL-MnO₂产生的免疫系统激活进行验证。

参考文献(References)

- [1] Easaw JC, Mason WP, Perry J, et al. Canadian recommendations for the treatment of recurrent or progressive glioblastoma multiforme[J]. *Curr Oncol*, 2011, 18(3): e126-136
- [2] Tan AC, Ashley DM, Lopez GY, et al. Management of glioblastoma: State of the art and future directions [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(4): 299-312
- [3] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(5): 459-466
- [4] Her S, Jaffray DA, Allen C. Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 109: 84-101
- [5] Zhang FM, Liu SK, Zhang N, et al. X-ray-triggered NO-released Bi-SNO nanoparticles: all-in-one nano-radiosensitizer with photothermal/gas therapy for enhanced radiotherapy [J]. *Nanoscale*, 2020, 12(37): 19293-19307
- [6] Fong CW. Platinum based radiochemotherapies: Free radical mechanisms and radiotherapy sensitizers [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 99: 99-109
- [7] Lu R, Yang D, Cui D, et al. Egg white-mediated green synthesis of silver nanoparticles with excellent biocompatibility and enhanced radiation effects on cancer cells [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 2101-2107
- [8] Zhu D, Lyu M, Jiang W, et al. A biomimetic nanozyme/camptothecin hybrid system for synergistically enhanced radiotherapy [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(24): 5312-5319
- [9] Suo M, Liu Z, Tang W, et al. Development of a novel oxidative stress-amplifying nanocomposite capable of supplying intratumoral H₂O₂ and O₂ for enhanced chemodynamic therapy and radiotherapy in patient-derived xenograft (PDX) models[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(45): 23259-23265
- [10] Liu Y, Nie N, Tang H, et al. Effective Antibacterial Activity of Degradable Copper-Doped Phosphate-Based Glass Nanozymes [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(10): 11631-11645
- [11] Wang Z, Xue X, Lu H, et al. Two-way magnetic resonance tuning and enhanced subtraction imaging for non-invasive and quantitative biological imaging[J]. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15(6): 482-490
- [12] Wang Z, Qiao R, Tang N, et al. Active targeting theranostic iron oxide nanoparticles for MRI and magnetic resonance-guided focused ultrasound ablation of lung cancer[J]. *Biomaterials*, 2017, 127: 25-35
- [13] Brenneisen P, Reichert AS. Nanotherapy and Reactive Oxygen Species (ROS) in Cancer: A Novel Perspective [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2018, 7(2): 31
- [14] Perillo B, Di Donato M, Pezone A, et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon[J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(2): 192-203
- [15] Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer [J]. *Oncogene*, 2008, 27(50): 6398-6406
- [16] Merino D, Lok SW, Visvader JE, et al. Targeting BCL-2 to enhance vulnerability to therapy in estrogen receptor-positive breast cancer [J]. *Oncogene*, 2016, 35(15): 1877-1887
- [17] Gibson LF, Fortney J, Magro G, et al. Regulation of BAX and BCL-2 expression in breast cancer cells by chemotherapy [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1999, 55(2): 107-117
- [18] Lin LS, Song JB, Song L, et al. Simultaneous Fenton-like Ion Delivery and Glutathione Depletion by MnO₂-Based Nanoagent to Enhance Chemodynamic Therapy[J]. *Angew Chem Int Edit*, 2018, 57(18): 4902-4906
- [19] Liu JJ, Chen Q, Zhu WW, et al. Nanoscale-Coordination-Polymer-Shelled Manganese Dioxide Composite Nanoparticles: A Multistage Redox/pH/H₂O₂-Responsive Cancer Theranostic Nanoplatfrom [J]. *Adv Funct Mater*, 2017, 27(10)
- [20] Xiao T, He M, Xu F, et al. Macrophage Membrane-Camouflaged Responsive Polymer Nanogels Enable Magnetic Resonance Imaging-Guided Chemotherapy/Chemodynamic Therapy of Orthotopic Glioma[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(12): 20377-20390
- [21] Liang K, Li Z, Luo Y, et al. Intelligent Nanocomposites with Intrinsic Blood-Brain-Barrier Crossing Ability Designed for Highly Specific MR Imaging and Sonodynamic Therapy of Glioblastoma [J]. *Small*, 2020, 16(8): e1906985

- lipopolysaccharide-stimulated microglia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 520(1): 171-178
- [11] Wang Z, Wei D, Xiao H. Methods of cellular senescence induction using oxidative stress[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1048: 135-144
- [12] Li R L, Lu Z Y, Huang J J, et al. SIRT1720, a SIRT1 specific activator, protected H₂O₂-induced senescent endothelium [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(7): 2876-2888
- [13] Li J, Chen X, Xiao W, et al. Mitochondria-targeted antioxidant peptide SS31 attenuates high glucose-induced injury on human retinal endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 404(1): 349-356
- [14] Yang D Q, Zuo Q N, Wang T, et al. Mitochondrial-Targeting Antioxidant SS-31 Suppresses Airway Inflammation and Oxidative Stress Induced by Cigarette Smoke [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6644238
- [15] Kulkarni A S, Gubbi S, Barzilai N. Benefits of Metformin in Attenuating the Hallmarks of Aging[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(1): 15-30
- [16] Zhang R, Krigman J, Luo H, et al. Mitophagy in cardiovascular homeostasis[J]. *Mech Ageing Dev*, 2020, 188: 111245
- [17] Jiang L, Zhou S, Zhang X, et al. Mitochondrion-specific dendritic lipopeptide liposomes for targeted sub-cellular delivery [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2390
- [18] Chavez J D, Tang X, Campbell M D, et al. Mitochondrial protein interaction landscape of SS-31 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(26): 15363-15373
- [19] Szeto H H, Birk A V. Serendipity and the discovery of novel compounds that restore mitochondrial plasticity [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2014, 96(6): 672-683
- [20] Szeto H H. First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(8): 2029-2050
- [21] Ding X W, Robinson M, Li R, et al. Mitochondrial dysfunction and beneficial effects of mitochondria-targeted small peptide SS-31 in Diabetes Mellitus and Alzheimer's disease [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 171: 105783
- [22] Escribano-Lopez I, Diaz-Morales N, Iannantuoni F, et al. The mitochondrial antioxidant SS-31 increases SIRT1 levels and ameliorates inflammation, oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in type 2 diabetes[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 15862
- [23] Lee B Y, Han J A, Im J S, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase [J]. *Aging Cell*, 2006, 5(2): 187-195
- [24] Lin X, Dai Y, Tong X, et al. Excessive oxidative stress in cumulus granulosa cells induced cell senescence contributes to endometriosis-associated infertility[J]. *Redox Biol*, 2020, 30: 101431
- [25] Brooks C L, Gu W. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer?[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(2): 123-128
- [26] Kida Y, Goligorsky M S. Sirtuins, Cell Senescence, and Vascular Aging[J]. *Can J Cardiol*, 2016, 32(5): 634-641
- [27] Chang H C, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(3): 138-145
- [28] Tominaga K, Suzuki H I. TGF- β Signaling in Cellular Senescence and Aging-Related Pathology[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5002
- [29] Hafner A, Bulyk M L, Jambhekar A, et al. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(4): 199-210
- [30] Mijit M, Caracciolo V, Melillo A, et al. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(3): 420
- [31] Fujita K. p53 Isoforms in Cellular Senescence-and Ageing-Associated Biological and Physiological Functions [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 6023

(上接第 1805 页)

- [22] He Z, Yan H, Zeng W, et al. Tumor microenvironment-responsive multifunctional nanoplatfrom based on MnFe₂O₄-PEG for enhanced magnetic resonance imaging-guided hypoxic cancer radiotherapy [J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(6): 1625-1637
- [23] Xie J, Shen Z, Anraku Y, et al. Nanomaterial-based blood-brain-barrier (BBB) crossing strategies [J]. *Biomaterials*, 2019, 224: 119491
- [24] Cuggino JC, Blanco ERO, Gugliotta LM, et al. Crossing biological barriers with nanogels to improve drug delivery performance [J]. *J Control Release*, 2019, 307: 221-246
- [25] Sun WJ, Zhang JL, Zhang CC, et al. Construction of Hybrid Alginate Nanogels Loaded with Manganese Oxide Nanoparticles for Enhanced Tumor Magnetic Resonance Imaging [J]. *Acs Macro Lett*, 2018, 7(2): 137-142
- [26] Zhang C, Gau E, Sun W, et al. Influence of size, crosslinking degree and surface structure of poly(N-vinylcaprolactam)-based microgels on their penetration into multicellular tumor spheroids [J]. *Biomater Sci*, 2019, 7(11): 4738-4747
- [27] Meng DF, Guo LL, Peng LX, et al. Antioxidants suppress radiation-induced apoptosis via inhibiting MAPK pathway in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527(3): 770-777
- [28] Hou L, Tian C, Yan Y, et al. Manganese-Based Nanoactivator Optimizes Cancer Immunotherapy via Enhancing Innate Immunity [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4): 3927-3940
- [29] Liu Q, Chen F, Hou L, et al. Nanocarrier-Mediated Chemo-Immunotherapy Arrested Cancer Progression and Induced Tumor Dormancy in Desmoplastic Melanoma [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(8): 7812-7825
- [30] Deng L, Liang H, Xu M, et al. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors [J]. *Immunity*, 2014, 41(5): 843-852