

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.10.007

聚乙二醇连接荧光 Cy5.5 构建超小超顺磁性氧化铁成像探针的制备与表征*

刘 强¹ 李忠原^{1Δ} 陈 颂¹ 郝利国¹ 李春香¹ 韩 康² 田洪达¹ 谷弘谦¹ 李忠涛¹

(1 齐齐哈尔医学院 黑龙江 齐齐哈尔 161041; 2 解放军第九六〇医院骨科 山东 济南 250000)

摘要 目的: 以超小超顺磁性氧化铁颗粒为载体通过聚乙二醇连接荧光 Cy5.5 构建核磁 / 荧光分子探针并表征。**方法:** 取 Cy5.5-NHS 荧光粉末溶于二甲基甲砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶液, 将 PEG 四氧化三铁颗粒离心超滤之后用磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline, PBS) 重悬纳米颗粒改变 PEG 化四氧化三铁纳米颗粒溶液 pH。将配置好的 Cy5.5 荧光加入到四氧化三铁颗粒中, 恒温摇床孵育, 通过离心过滤器去除较大铁离子与未结合的荧光, 静置后检测水合粒径及 Zeta 电位, 纽麦小核磁检测其弛豫率, CCK-8 实验检测其细胞毒性, 激光共聚焦显微镜观察探针被细胞摄取情况。**结果:** 合成 Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 探针, 透射电镜 (Transmission electron microscope, TEM) 显示探针粒径为 16.8±2.4nm, 纳米颗粒的水合径为 43.4±17.6 nm, Zeta 电位为 -18.0 mV。弛豫率为 39.5 mM⁻¹·s⁻¹, R² 为 0.98。细胞毒性实验结果显示对细胞有轻微毒性, 且毒性随浓度呈依赖性。激光共聚焦结果显示此款探针可顺利被细胞摄取。**结论:** 成功合成 Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 探针。

关键词: 超小超顺磁性氧化铁颗粒; 分子探针; 细胞成像; 荧光

中图分类号: R730.4; R318.08; Q6-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2022)10-1829-05

Preparation and Characterization of Ultra Small Superparamagnetic Iron Oxide Imaging Probe Constructed by Fluorescent Cy5.5 Linked with Polyethylene Glycol*

LIU Qiang¹, LI Zhong-yuan^{1Δ}, CHEN Song¹, HAO Li-guo¹,LI Chun-xiang¹, HAN Kang², TIAN Hong-da¹, GU Hong-qian¹, LI Zhong-tao¹

(1 School of medical technology, Qiqihar Medical College, Qiqihar, Heilongjiang, 161041, China;

2 Deptment of orthopedic, The 960th Hospital of the PLA Joint Logistics Support Force, Jinan, Shandong, 250000, China)

ABSTRACT Objective: The ultra-small superparamagnetic iron oxide particles were used as the carrier to construct and characterize nuclear magnetic/fluorescent molecular probes through polyethylene glycol-linked fluorescent Cy5.5. **Methods:** A small amount of Cy5.5-nhs fluorescent powder and dissolve it in dimethyl sulfoxide (DMSO) solution. After centrifugation and ultrafiltration of PEG ferric oxide particles, resuspend the nanoparticles with phosphate buffered saline (PBS) to change the pH of PEG ferric oxide nanoparticle solution. The configured cy5.5 fluorescence was added to Fe₃O₄ particles, incubated in a constant temperature shaking table, and the larger iron ions and unbound fluorescence were removed through a centrifugal filter. After standing, the hydrated particle size and zeta potential were detected, the relaxation rate was detected by newwheat nuclear magnetic resonance, the cytotoxicity was detected by CCK-8 experiment, and the uptake of the probe by cells was observed by laser confocal microscope. **Results:** The Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ probe was successfully synthesized. Transmission electron microscope (TEM) showed that the diameter of the probe was 16.8±2.4nm, the water and diameter of the nanoparticles were 43.4±17.6 nm, and the Zeta potential was -18.0 mV. The relaxation rate is 39.5 mM⁻¹·s⁻¹ and the slope is 0.98. The results of cytotoxicity experiments show that it is slightly toxic to cells, and the toxicity is dependent on the concentration. Laser confocal results show that this probe can be taken up by cells smoothly. **Conclusion:** This experiment successfully synthesized Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ probe.

Key words: Ultra small superparamagnetic iron oxide particles; Molecular probe; Cell imaging; Fluorescence

Chinese Library Classification(CLC): R730.4; R318.08; Q6-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)10-1829-05

前言

近年来,在针对恶性肿瘤早期诊断、转移前预警以及疗效检测等阶段尚缺少有效方案,在临床诊疗方面需要建立微小肿

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81702935)

作者简介:刘强(1996-),硕士研究生,电话:15689082404, E-mail: 244715621@qq.com

Δ 通讯作者:李忠原,电话:13945235177, E-mail: m15946506063@163.com

(收稿日期:2021-09-23 接受日期:2021-10-19)

瘤早期诊断、获取分子层面及个体化信息技术等。分子影像技术逐步受到人们的重视,可达到在病变无解剖变化之前,从分子层面对病灶进行检测,从而提供微小肿瘤准确空间定位信息。由于精准化和个体化的诊疗要求的提出,单纯磁共振检查无法精准区分正常组织与患癌组织两者间弛豫时间相差较小,核磁对比剂被越来越广泛应用^[1-3]。对比剂的应用可以提高图像对比度,且可以改变弛豫时间。 T_2 对比剂是超顺磁性对比剂,可以缩短 T_2 的弛豫时间,降低 T_2 加权图像信号,增强对比度,具有负性增强的效果。含有氧化铁的纳米颗粒是 T_2 对比剂^[4]。钆剂是临床上最早使用的磁共振对比剂,磁共振分子探针多以钆剂作为材料,但其缺点也十分明显,钆剂以游离形式进入体内毒性较大、且弛豫率低、循环时间短等。本实验所用的超小超顺磁性氧化铁颗粒尺寸均一、磁学性质优良、可进行功能性表面修饰等优点具有更好的应用前景。传统的超小超顺磁性氧化铁颗粒溶于氯仿后与荧光相结合,其在氯仿中需要加热,氯仿随温度升高会散发毒性,危害试验人员的安全,二甲基亚砜被称为“万能溶剂”其毒性较小操作步骤更为简单,传统探针合成时步骤较繁琐且容易出现问题,如通过静电吸附将超小超顺磁性氧化铁与荧光相结合可能出现较多未结合及易分散的情况,本实验通过共价键将超小超顺磁性氧化铁颗粒与荧光材料相连接更为坚实可靠。纳米材料的迅速发展同时带来了其在医学领域更加广泛的应用,这可能为肿瘤早期诊断提供更加准确、可靠的成像。与传统对比剂相比,体外及动物实验表明纳米级对比剂展现除更高的成像能力、更长的循环时间、以及更好的靶向能力。核磁加近红外荧光的双模态探针技术可将核磁的空间分辨率高、较好的软组织对比度与荧光安全无创、成像速度快的优点相结合^[5-7],对癌症早期的诊断以及预测转移提供可观的形态学、功能学、分子生物学信息^[8]。本研究拟将核磁特异性对比剂超小超顺磁性氧化铁颗粒(Ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticles,USPIO)通过 PEG 与荧光 Cy5.5 连接,设计并制备双模态分子探针并验证其理化性质,验证细胞毒性,细胞对制备成功的探针的摄取情况,分子探针的设计与构建尚处于发展阶段,许多步骤需要完善,希望通过本实验能充实分子探针构建方面的内容,后续将搭载靶向基团,以期在恶性肿瘤早期阶段即提供定性诊断的可能。

1 材料与方法

1.1 材料

激光共聚焦显微镜(ZEISS 公司,德国);荧光分光光度计(RF-5301PC,日本岛津);紫外分光光度计(UV-2550,日本岛津);傅里叶变换显微红外光谱仪(Nicolet-IN10,美国赛默飞世尔);透射电镜(HT-7700,日本日立);万分之一电子天平(GT-104,上海精科);集热式恒温加热磁力搅拌器(DF-101S,巩义予华);数显智能控温磁力搅拌器(HJ-3A,江苏正基);超声清洗仪(XM-3200UVF,昆山禾创);粒度分析仪(NICOMP-380ZLS,美国 PSS);NM120 核磁共振造影剂弛豫率分析与成像系统(苏州纽迈分析仪器股份有限公司);多功能酶标仪(SAFIRE2,瑞士 Tecan);超纯水系统(CascadeIII. I, PALL,美国)。Amicon® Ultra-15 100K 离心过滤器。甲状腺癌细胞系 FRO 细胞购自中国科学院上海细胞库。超小超顺磁性

氧化铁颗粒购自中科雷鸣有限公司。荧光 Cy5.5 购自索莱宝生物科技有限公司。聚乙二醇购自西安瑞禧生物科技有限公司。胎牛血清购自美国 Clark 公司。PBS 缓冲液、DMEM 细胞培养基购自美国 Hyclone 公司。CCK-8 试剂购自碧云天生物。

1.2 方法

1.2.1 Cy5.5-PEG- Fe_3O_4 的制备 取 Cy5.5 荧光粉末,万分之一天平称量。将 Cy5.5-NHS 荧光粉末溶于无水二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide,DMSO)溶液中,配制成 10 mg/mL 浓度。取 3 mg PEG 化四氧化三铁纳米颗粒(氨基末端)置于 100 KD 离心过滤器中 15000 rpm/min,10 min 离心超滤,结束后用 pH8.0 的磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline,PBS)重悬纳米颗粒,此步骤主要目的为改变 PEG 化四氧化三铁纳米颗粒溶液 pH 值。吸取 DMSO 溶液中配制好的 30 μ L Cy5.5 荧光(总量为 0.3 mg),在涡旋条件下加入到改变 pH 值的 PEG 化四氧化三铁纳米颗粒中,然后置于 37℃ 恒温摇床中孵育 2 小时。孵育结束后,利用 100 KD 离心过滤器去除未结合的 Cy5.5 荧光分子,以及较大铁离子,最后用超纯水重悬 PEG- Fe_3O_4 -Cy5.5 荧光磁性纳米颗粒。

1.2.2 Cy5.5-PEG- Fe_3O_4 表征检测 透射电镜尺寸的测定:移液器吸取少量 USPIO - Cy5.5 溶液与等量的 2 %的磷酸酸钠水溶液混合染色,制成混合染色液备用;吸取少量 USPIO - Cy5.5 溶液与 2 %的磷酸酸钠的混合染色液、 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒溶液,滴于超薄碳膜,样本干燥后电子显微镜下观察,通过 NanoMeasure 软件对相片中的纳米颗粒进行直径测量,统计 600 个纳米颗粒直径并计算平均粒径。水合尺寸及 Zeta 电位的测定:分别吸取 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒溶液、USPIO - cy5.5 溶液各 50 μ L 与 1.5 mL 去离子水混匀后转移入绿色塑料比色皿,排尽空气后使用激光粒度仪通过动态光散射测量水动力尺寸与 Zeta 电位。探针光学性质表征:取重悬后的探针 2 μ L,加入 998 μ L PBS 混匀,转移至石英比色皿;紫外分光光度计检测 200-800 nm 波段的吸收;荧光检测仪测定探针在 685 nm (EX=685 nm)激发下的荧光发射情况,发射波长取 680-800 nm 区间扫描。

1.2.3 弛豫率检测 弛豫率的作用主要是评价磁共振特异性造影剂对比增强的重要参数,代表每摩尔(mole)的一种造影剂减低周围介质的弛豫时间的能力。用移液器吸取 Cy5.5-PEG- Fe_3O_4 加入去离子水调配成铁含量分别为 100.0、75.0、50.0、20.0 μ g/mL 共 4 个不同浓度,分别装入 1.5 mL Ependoff 管,每管量液 1 mL,浓度从低到高标记为 1-4 号,每次取一管放入纽麦小核磁分析仪中,磁体-探头选择 EDUMR20-015V-1,序列为 CPMG,参数:SF (MHz):21,O1 (Hz):569335.95,P1 (us):14.00,TD:29994,PRG:1,TW (ms):300.000,P2 (us):29.00,TE(ms):0.300,NECH:1000,NS:8。

1.2.4 细胞培养 将甲状腺癌 FRO 细胞复苏,接种于含青霉素/链霉素以及 10 %胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,37℃、5% CO_2 培养箱中培养,取对数生长期状态良好的细胞进行相关实验。

1.2.5 细胞成像研究 按取对数期生长状态良好的甲状腺癌 FRO 细胞,以 1×10^4 个/孔接种于激光共聚焦专用 96 孔板中。

37℃, 5 %CO₂ 培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后,加入含不同浓度 Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 纳米颗粒的 DMEM 培养基,继续培养 2-4 h。吸弃培养基 PBS 清洗后每孔加入 100 μL PBS,激光共聚焦选择激发波长 652 nm,散发波长 672 nm,镜下观察并拍照。

1.2.6 细胞毒性试验 为了解制备探针在细胞中的毒性,采用 CCK-8 法检测细胞活力。取对数生长期状态良好的 FRO 细胞,胰酶消化,计数后,以 5000/孔接种于 96 孔板中,体积为 100 μL,每组设置 3 个复孔,96 孔板周围用 PBS 填满,避免出现边缘效应,影响读数。37℃, 5 %CO₂ 培养箱孵育过夜。向 96 孔板细胞中分别加入浓度为(0 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.5 mg/mL)的含有 USPIO 的培养基 100 μL,继续培养 24 小时。向每个待测样品孔内加入 10 μL CCK-8 溶液,孵育 2-4 h。酶标仪 450 nm 吸光度下检测数值,实验设置对照组及空白组。计算公式为:细胞活力(%)=[A(加药)-A(空白)]/[A(不加药)-A(空白)]×100%。

1.3 统计分析

使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,所有实验至少重复 3 次,所有数据均表示为平均数±标准差。两两比较采用 t 检验

分析,多组间均数比较运用单因素方差分析(one-way ANOVA)。P<0.05 认为具有统计学意义。探针纳米粒径使用 Nano Measure1.2 软件分析,弛豫率使用 Origipro 8.0 分析绘制,所有统计分析使用 Graphpad prism 7.0 统计软件完成。

2 结果

2.1 探针表征

Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 纳米颗粒静置后为黑色透明悬液,颜色较为透亮,无沉淀浑浊以及分层现象。透射电镜(Transmission electron microscope, TEM) 显示合成的纳米颗粒尺寸为 16.8±2.4 nm,大致规则球形,粒径分布一致性良好,无聚集性现象,分散性较好(图 A)。近红外荧光 Cy5.5 的激发波长为 650 nm 左右,有文献表明 Cy5.5 为材料的分子探针在 650-670 nm 处有发射光^[9],通过荧光光谱检测,结果如(图 B)所示采用 600 nm 激发光激发 Cy5.5-PEG-Fe₃O₄, 扫描 620 nm-800 nm 范围检测到 670 nm 处有发射光,可进行荧光成像。水和粒径为 3.4±17.6 nm,尺寸分布区间小,粒径分布较统一(图 C)。测得其表面电位为 -18.0 mV(图 D)。见图 1。

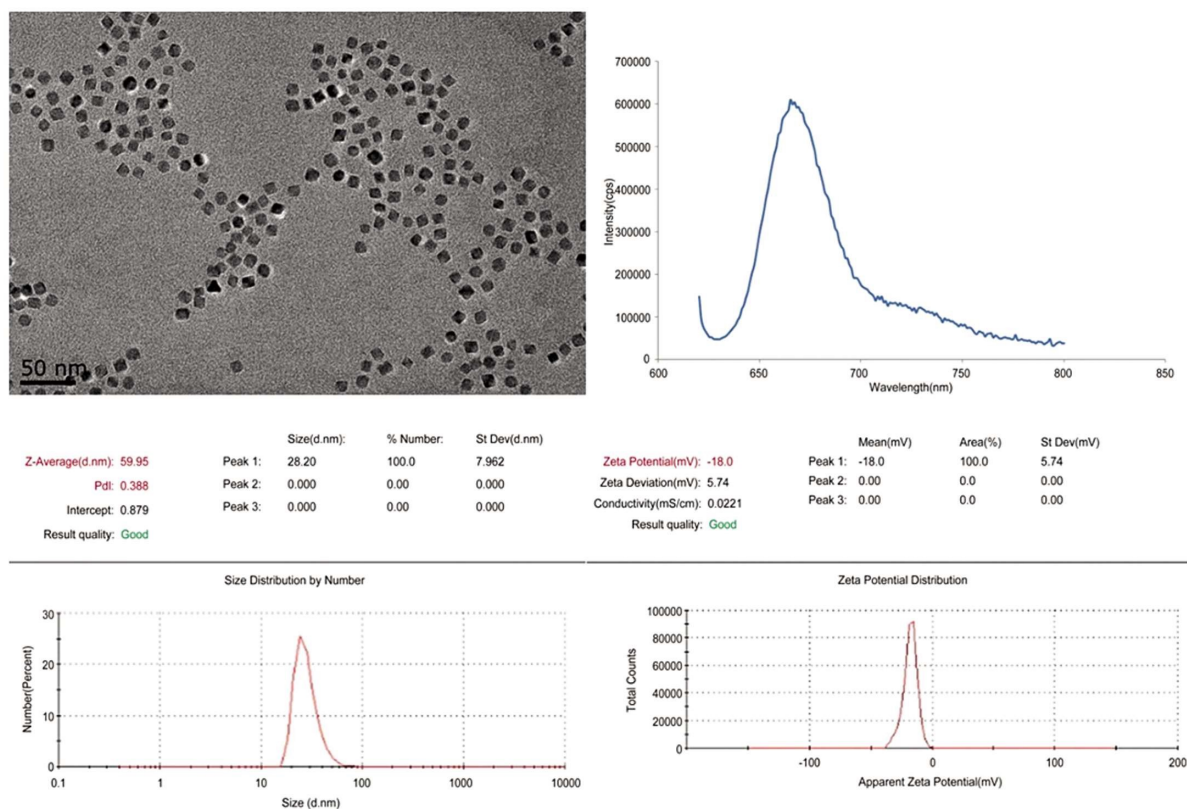


图 1 Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 探针表征

A: Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 透射电镜图; B: Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 荧光光谱; C: Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 水合粒径; D: Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ Zeta 电位

Fig.1 Characterization of Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ probe

A: Transmission electron microscope of Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ probe; B: Fluorescence spectrum of Cy5.5-PEG-Fe₃O₄;

C: Hydrated particle size of Cy5.5-PEG-Fe₃O₄; D: Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ Zeta potential

2.2 弛豫率检测

经纽迈小核磁检测出 Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 100.0、75.0、50.0、20.0 μg/mL 的 T2 弛豫时间,经 Origipro 8.0 进行线性拟合,得到 R² 为:0.9887。弛豫率为:39.5 mM⁻¹·s⁻¹。见图 2。

2.3 细胞毒性

选用 CCK-8 法检测 USPIO 对人甲状腺癌 FRO 的细胞毒性,其原理为 WST-8 在电子耦合剂的作用下被细胞的脱氢酶还原成具有高度水溶性的甲臞产物,呈黄色,其反应颜色与细胞数量呈正比。可在酶标仪 450 nm 处检测 OD 值。如图所示,USPIO 作用 FRO 细胞 24 h 对细胞的影响。0.2 mg/mL 时,对

FRO 细胞影响与对照组相比损伤较小无统计学意义,而当浓度达到 0.3 mg/mL 和 0.5 mg/mL 时对细胞有轻微毒性,活细胞数

量为 73.06 %和 67.05 %, $P < 0.05$, 具有统计学意义。毒性与浓度呈依赖性。见图 3。

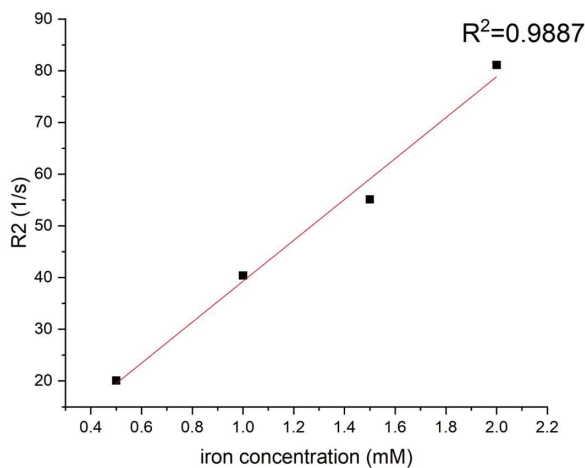


图 2 Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 弛豫率

Fig.2 The relaxivity of Cy5.5-PEG-Fe₃O₄

2.4 细胞成像

使用激光共聚焦显微镜观 FRO 细胞系摄取 Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 的情况,24 h 后,使用 Cy5.5 专用光源激发,激发探针发出红光,提示 Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 被 FRO 细胞系所摄取,见图 4。

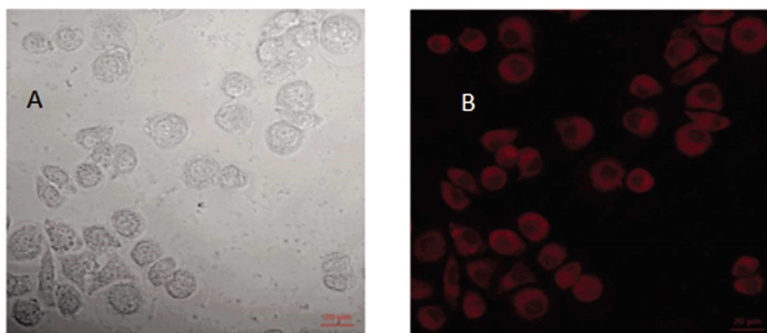


图 4 Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 激光共聚焦成像图

A 激光共聚焦显微镜明场细胞图; B 激光共聚焦显微镜明场细胞图

Fig.4 Laser confocal microscope of Cy5.5-PEG-Fe₃O₄

A: The cells bright field picture; B: The fluorescence of cells

3 讨论

超小超顺磁性氧化铁颗粒作为新型的纳米级别的微粒,具有表面能量高、血浆半衰期较长,大量聚集时可以降低组织的 T₂ 信号,产生负强化,增加组织间的对比度^[10-13],可以被网状内皮系统摄取而实现特异性成像^[14,15]的特性。但未进行表面修饰的 Fe₃O₄ 纳米颗粒具有在空气中极易氧化且由于其具有高比表面积和强磁偶极矩的特点极易发生团聚^[16,17]的特性。所以本实验制备的分子探针应具有可在核磁、荧光双模态显像,在去离子水中稳定性较好,细胞毒性较低,并为后续动物实验奠定良好的基础^[18,19]。

本研究选择使用二甲基亚砜为溶剂溶解 Cy5.5, 先前查阅有关文献多数选择使用氯仿为溶剂^[20,21]。氯仿虽然可以溶解 Cy5.5,但是它作为一种有毒化学溶剂且易挥发,实验过程中影

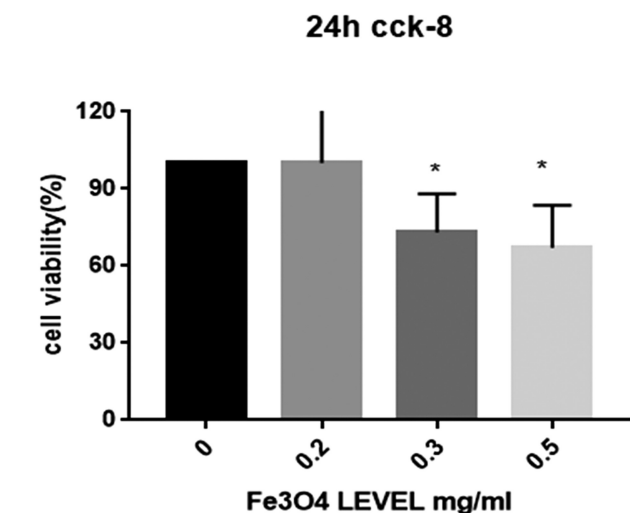


图 3 Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 细胞毒性

Fig. 3 The Cytotoxicity of Cy5.5-PEG-Fe₃O₄

Note: The Cytotoxicity of Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ in FRO cells. Compared with 0 mg/mL, 0.3 mg/mL and 0.5 mg/mL $^*P < 0.05$.

响了实验人员的身体健康,而二甲基亚砜可以溶解荧光 Cy5.5 的同时具有高沸点,高极性,热稳定性好等特点,同时它的萃取温度低,且不与烷烃、烯烃、水反应,萃取工艺简单、设备少、节能,制作方便被称为 " 万能溶剂 " ^[22],因此它可以更好的代替氯仿进行实验。

由于光波在近红外区段的组织透过性更好^[23-26],且细胞和组织的自发荧光在近红外波段最小,所以,本实验选用 Cy5.5 作为染料制备探针,实验中制备所得 Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 双模态探针在荧光光谱 670 nm 处可检测到发射光,适合应用于活体小动物体内成像代替放射性元素;同时,制备所得探针透射电镜颗粒大小为 (16.8±2.4 nm),水和粒径为 (3.4±17.6 nm),表面电位为 (-18.0 mV)。水和粒径及 Zeta 电位反映了其在体内分布,稳定,代谢等情况^[27]。经检测制备的双模态探针具有相对稳定,且与水相有良好的相容性的特点。

近红外荧光 Cy5.5 也具有显著的优势,由于细胞和组织的自发荧光在近红外波段最小,因此在检测复杂生物系统时,近红外染料能提供更高的特异性和灵敏度。同时,由于光波在近红外区段的组织透过性更好^[27]。菁染料的摩尔吸光系数在荧光染料中是最高的,Cy5.5 的吸收在近红外区背景非常低,是荧光强度最高、最稳定的长波长染料。实验中制备的 Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 双模态探针通过荧光光谱在 670 nm 处可检测到发射光,特别适合于活体小动物体内成像代替放射性元素。

超小超顺磁性造影剂主要由氧化铁或者铁 / 锰复合物组成其内部核心,外部由多聚物基质包裹防止其核心聚集以及沉淀,优点显著,如可进行功能性表面修饰以及具有较好的生物相容性、形貌尺寸均一等,不仅可以作为磁共振造影剂,同时在高靶向性药物载体等肿瘤诊疗方面也具有相当广阔的应用前景。但未经表面修饰的铁氧体纳米结构粒径较大及稳定性不足等缺点,无法满足较为精细的生物医学实验的要求,本实验对磁性纳米材料进行一定的“加工”,对其表面进行修饰以改变颗粒之间的相互作用,并且增加它的水溶性、稳定性。研究中通过 PEG 来包覆 USPIO 表面,可以增加 USPIO 的生物相容性,并可降低其毒性。同时,PEG 还能降低 USPIO 的抗原性和免疫原性,可帮助生物大分子更有效地进入血液,并起到防护作用^[28-30]。本实验通过 CCK-8 法检测 Cy5.5-PEG-Fe₃O₄ 双模态探针与甲状腺癌 FRO 细胞共培养对细胞产生的毒性,结果显示,0.2 mg/mL 时,对 FRO 细胞影响与对照组相比损伤较小无统计学意义,而当浓度达到 0.3 mg/mL 和 0.5 mg/mL 时对细胞有轻微毒性,活细胞数量为 73.06 % 和 67.05 %。证明修饰过的 USPIO 毒性降低,对细胞影响较小。

本研究将 USPIO 与 Cy5.5 通过 PEG 连接制备了磁共振 / 荧光双模态分子探针,其具备较低的生物毒性,较宽的激发波长,良好的生物相容性、较好的稳定性等优点,但同时仍有部分不足之处,如本实验仅针对 FRO 一种细胞系进行了研究,未来可选择多种细胞系进行体外成像及探究细胞毒性。且后期可以连接单抗或小分子抑制剂等靶向集团,为进一步实现靶向探针做准备。

参考文献(References)

[1] 黄庆. 磁共振 / 荧光双模式造影剂的合成、表征及其在生物分析中的应用[D]. 中国人民解放军陆军军医大学, 2019

[2] Tang Hong. The current situation and application prospect of multifunctional contrast agents[J]. Western medicine, 2017, 29(4): 445-449

[3] Zhang Fang, Sha Yan. Research progress of MRI contrast agents [J]. Shanghai medical, 2014, 16(13): 3-7

[4] Zhao Yajing, Wang Zhigang, Ran Haitao, et al. Preparation and in vitro phase transition and bimodal development of Fe₃O₄ and liquid fluorocarbon loaded polymer nanoparticles[J]. China medical imaging technology, 2015, 32(4): 9-13

[5] Chen K, Chen X. Design and Development of Molecular Imaging Probes [J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2010, 10(12): 1227-1236

[6] Yu EY, Bishop M, Zheng B, et al. Magnetic particle imaging: A novel in vivo imaging platform for cancer detection[J]. Nano Lett, 2017, 17

(6): 1648-1654

[7] Ye DW, Li Y, Gu N. Magnetic labeling of natural lipid encapsulations with iron - based nanoparticles[J]. Nano Res, 2018, 8(11): 2970-2991

[8] Zhao J, Chen J, Ma S, et al. Recent developments in multimodality fluorescence imaging probes [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2018, 8(3): 320-338

[9] Yang Y, Zhang L, Cai J, et al. Tumor Angiogenesis Targeted Radio-sensitization Therapy Using Gold Nanoprobes Guided by MRI / SPECT Imaging[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8(9): 1718-1732

[10] Linlin W, Jingliang C, Feifei W, et al. Comparative study on the enhancement effect of meglumine zatetate and meglumine zapenoate in hepatic blood vessels [J]. Chinese Journal of medical computer imaging, 2017, 23(05): 418-421

[11] Yan X, Song X, Wang Z. Construction of specific magnetic resonance imaging / optical dual-modality molecular probe used for imaging angiogenesis of gastric cancer [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2017, 45(3): 399-403

[12] Xinsheng J, Xiao H. Calculation of NMR chemical shifts of biomacromolecules based on block quantum chemistry method [J]. Journal of applied technology, 2019, 19(03): 279-282

[13] Ruannan W. Research on design method of magnetic resonance imaging superconducting magnet [J]. China Equipment Engineering, 2019, 45(15): 126-127

[14] Ali A, Zafar H, Zia M, et al. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles [J]. Nanotechnol Sci Appl, 2016, 9(6): 49-67

[15] Ling DS, Lee NY, Hyeon T W. Chemical synthesis and assembly of uniformly sized iron oxide nanoparticles for medical applications[J]. Acc Chem Res, 2015, 48(5): 1276-1285

[16] Belkahl H, Antunes JC, Lalatonne Y, et al. USPIO-PEG nanoparticles functionalized with a highly specific collagen-binding peptide: a step towards MRI diagnosis of fibrosis [J]. Mater Chem B, 2020, 8(25): 5515-5528

[17] Abbas H, Broche LM, Ezdoglian A, et al. Fast field-cycling magnetic resonance detection of intracellular ultra- small iron oxide particles in vitro: Proof- of- concept[J]. Magn Reson, 2020, 3(20): 1050-1062

[18] Su X, Chan C, Shi J, et al. A graphene quantum dot@Fe₃O₄@SiO₂ based nanoprobe for drug delivery sensing and dual-modal fluorescence and MRI imaging in cancer cells [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2016: 489-495

[19] Nishie A, Togao O, Tamura C, et al. In Vitro and In Vivo Detection of Drug-induced Apoptosis Using Annexin V-conjugated Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide (USPIO): A Pilot Study [J]. Magn Reson Med Sci, 2019, 18(2): 142-149

[20] Yu XR, Cao BL, Li W, et al. Accuracy of Tumor Perfusion Assessment in Rat C6 Gliomas Model with USPIO [J]. Open Med, 2019, 7(14): 778-784

[21] Yamamoto A, Takaki K, Morikawa S, et al. Histologic Distribution and Characteristics on MR Imaging of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide in Ethyl-nitrosourea-induced Endogenous Rat Glioma[J]. Magn Reson Med Sci, 2020, 21(5): 1035-1041

- nutrition in patients with mild acute pancreatitis [J]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*, 2018, 75(4): 240-247
- [12] Jin Z, Wang Z, Wang J. Early Enteral Nutrition Prevent Acute Pancreatitis From Deteriorating in Obese Patients [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2020, 54(2): 184-191
- [13] Arutla M, Raghunath M, Deepika G, et al. Efficacy of enteral glutamine supplementation in patients with severe and predicted severe acute pancreatitis- A randomized controlled trial [J]. *Indian J Gastroenterol*, 2019, 38(4): 338-347
- [14] 唐丽萍, 齐凤楠, 张锦锦. 早期肠内营养递增输注速度对重症急性胰腺炎患者腹内压和喂养耐受的影响 [J]. *护理实践与研究*, 2021, 18(16): 2470-2472
- [15] 刘娟, 冯秀, 白晶莹. 肠内营养不同递增输注速度对重症急性胰腺炎患者的影响[J]. *中国医药导报*, 2020, 17(7): 102-105
- [16] 李琴, 吴永红, 贡浩凌. 输注递增速度对重症急性胰腺炎患者腹内压及早期肠内营养耐受性的影响 [J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(5):998-1003
- [17] 仪娜, 赵凯. 容积输液泵在急性重症胰腺炎肠内营养治疗中的应用[J]. *实用药物与临床*, 2012, 15(7): 442-443
- [18] Murphy AE, Codner PA. Acute Pancreatitis: Exploring Nutrition Implications[J]. *Nutr Clin Pract*, 2020, 35(5): 807-817
- [19] Fonseca Sepúlveda EV, Guerrero-Lozano R. Acute pancreatitis and recurrent acute pancreatitis: an exploration of clinical and etiologic factors and outcomes[J]. *J Pediatr (Rio J)*, 2019, 95(6): 713-719
- [20] Qiu Z, Cheng F, Jiang H, et al. Efficacy of Microecopharmaceutics Combined with Early Enteral Nutrition Support in the Treatment of Severe Acute Pancreatitis[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2020, 30(1): 96-98
- [21] Li H, Yang Z, Tian F. Risk factors associated with intolerance to enteral nutrition in moderately severe acute pancreatitis: A retrospective study of 568 patients[J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2019, 25(6):362-368
- [22] Agarwala R, Rana SS, Sharma R, et al. Gastrointestinal Failure Is a Predictor of Poor Outcome in Patients with Acute Pancreatitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2020, 65(8): 2419-2426
- [23] Phillips AE, Ooka K, Pothoulakis I, et al. Assessment of Weight Loss and Gastrointestinal Symptoms Suggestive of Exocrine Pancreatic Dysfunction After Acute Pancreatitis [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2020, 11(12): e00283
- [24] Guo YB, Liu Y, Ma J, et al. Effect of early enteral nutrition support for the management of acute severe pancreatitis: A protocol of systematic review[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(32): e21569
- [25] Zhang J, Yu WQ, Wei T, et al. Effects of Short-Peptide-Based Enteral Nutrition on the Intestinal Microcirculation and Mucosal Barrier in Mice with Severe Acute Pancreatitis[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2020, 64(5): e1901191
- [26] Wang X, Xu J, Li J, et al. Effect of regional arterial infusion combined with early enteral nutrition on severe acute pancreatitis[J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(12): 6235-6243
- [27] 宋巍, 刘心娟, 杨立新, 等. 中度重症急性胰腺炎患者早期经鼻胃管与经鼻空肠管肠内营养的疗效对比[J]. *中华消化杂志*, 2021, 41(4): 260-264
- [28] 周成杰, 陈国忠, 安敏飞. 早期肠内营养支持对重症急性胰腺炎患者免疫功能的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2018, 25(3): 272-274
- [29] Chen X, Yang K, Jing G, et al. Meta-Analysis of Efficacy of Rhubarb Combined With Early Enteral Nutrition for the Treatment of Severe Acute Pancreatitis [J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2020, 44(6): 1066-1078
- [30] Jin Y, Xu H, Chen Y, et al. Therapeutic effect of Bifidobacterium combined with early enteral nutrition in the treatment of severe acute pancreatitis: a pilot study [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(12): 4018-4024

(上接第 1833 页)

- [22] Xiangru L, Zun W, Sudan Ke, et al. Preparation and characterization of a bimodal molecular probe uspio-cy5.5-crgd targeting integrin $\alpha V\beta 3$ [J]. *Journal of Clinical Radiology*, 2017, 15(3): 425-429
- [23] Yu XR, Cao BL, Li W, et al. Accuracy of Tumor Perfusion Assessment in Rat C6 Gliomas Model with USPIO [J]. *Open Med*, 2019, 7(14): 778-784
- [24] Xiaowei K. Construction of molecular probe targeting neovascularization of gastric cancer and Study on in vivo MR / optical multimodal imaging [D]. Fourth Military Medical University, 2014
- [25] Wu L, Mendoza-Garcia A, Li Q, et al. Organic phase syntheses of magnetic nanoparticles and their applications[J]. *Chem Rev*, 2016, 116(4): 10473-10512
- [26] Sun Mingxia, Feng Yue, Xie min, et al. Monitoring the changes of atherosclerosis intercellular adhesion molecule-1 by targeting ultra-miniature superparamagnetic iron oxides molecular probe combined with magnetic resonance [J]. *Cardio-Cerebrovasc Dis Prev Treat*, 2020, 20(04): 348-351
- [27] Li Y, Liu J, Huang J W, et al. In vivo MRI detection of atherosclerosis in ApoE-deficient mice by using tenascin-C-targeted USPIO [J]. *Acta Radiologica*, 2018: 284185118762613
- [28] Miralles-Robledillo JM, Torregrosa Crespo J, Martí nez Espinosa RM, et al. DMSO Reductase Family: Phylogenetics and Applications of Extremophiles[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 356-364
- [29] Kim W, Yoon HY, Lim S, et al. In vivo tracking of bioorthogonally labeled T-cells for predicting therapeutic efficacy of adoptive T- cell therapy[J]. *Control Release*, 2021, 10(329): 223-236
- [30] Khandhar AP, Wilson GJ, Kaul MG, et al. Evaluating size dependent relaxivity of PEGylated USPIOs to develop gadolinium free T1 contrast agents for vascular imaging [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2018, 106(9): 2440-2447