

基于 Oncomine 和 GEO 数据库分析 SIRP α 基因在乳腺癌中的表达意义以及丹参酚酸 B 的干预作用研究

李 丹¹, 余 涛^{2*}, 曾 智¹, 叶 鹏¹, 吴 杰¹, 沈秉正¹

1. 武汉大学人民医院 药学部, 湖北 武汉 430060

2. 华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院 中西医结合肿瘤科, 湖北 武汉 430014

摘要: 目的 通过挖掘 Oncomine 和 GEO 基因芯片数据库中的相关数据, 分析信号调节蛋白 α (SIRP α) 基因在乳腺癌中的表达及其临床意义, 并探讨丹参酚酸 B 对乳腺癌细胞中 SIRP α 基因的干预作用。方法 检索 Oncomine 和 GEO 数据库中有关乳腺癌和丹参酚酸 B 干预乳腺癌的数据集, 对所获取的数据资料进行数据挖掘, 并结合文献资料综合分析。考察丹参酚酸 B 作用于乳腺癌 MCF7 细胞的基因表达谱。结果 对 Oncomine 数据库中共收集的 9 项关于乳腺癌和乳腺正常组织 SIRP α 基因有差异表达的研究数据进行分析, 发现乳腺癌组织中 SIRP α 基因的表达明显低于乳腺正常组织, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。通过生存分析发现低表达 SIRP α 基因乳腺癌患者无病生存期明显差于高表达者, 高表达患者的预后更好 ($P < 0.05$)。通过挖掘 GEO 数据库中的数据 GSE85871 发现丹参酚酸 B 能够上调乳腺癌细胞 SIRP α 基因的表达 ($P < 0.01$)。结论 SIRP α 基因在乳腺癌组织中呈现低表达, 并与乳腺癌患者的预后相关, 该基因可能是丹参酚酸 B 干预乳腺癌细胞的一个新靶点。

关键词: 丹参酚酸 B; 乳腺癌; SIRP α 基因; 数据挖掘

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)05-1013-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.05.002

Expression and clinical significance of SIRP α in breast cancer and effects of salvianolic acid B on the expression of SIRP α : Analysis based on the data-mining of Oncomine and GEO database

LI Dan¹, YU Tao², ZENG Zhi¹, YE Peng¹, WU Jie¹, SHEN Bing-zheng¹

1. Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

2. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Ward of Oncology, the Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430014, China

Abstract: **Objective** To analyze the expression and its clinical significance of signal regulatory protein α (SIRP α) gene in breast cancer through mining the related microarray data from Oncomine and GEO database, and to explore the effects of salvianolic acid B on the expression of SIRP α in breast cancer cells. **Methods** The datasets about breast cancer and effects of salvianolic acid B on breast cancer cell were retrieved from Oncomine and GEO database, and then the datasets were deeply mined and analyzed with literature. Gene expression profiles of salvianolic acid B against breast cancer MCF7 cells were investigated. **Results** The mRNA expressions of SIRP α gene in breast carcinoma tissues were significantly lower than those of breast normal tissues through mining and analyzing the 9 datasets about SIRP α gene in breast carcinoma from Oncomine database ($P < 0.05$). Survival analysis showed that the disease-free survival of breast cancer patients with higher expression of SIRP α gene was significantly worse than that of patients with lower expression of SIRP α , and the prognosis of patients with low expression of SIRP α gene was better ($P < 0.05$). The mRNA expression of SIRP α gene was down-regulated by salvianolic acid B in the datasets of GSE85871 through mining the GEO database ($P < 0.01$). **Conclusion** SIRP α gene is under-expressed in breast cancer and its expression level is related with the prognosis of breast cancer,

收稿日期: 2018-02-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81704023、81602535); 湖北省卫计委中西医结合科研一般项目(23); 武汉市卫计委科研项目(WZ15Z07)

作者简介: 李 丹(1986—), 女, 主管药师, 博士, 研究方向为中药药理学与临床药学。Tel: (027)88041911-88810 E-mail: lidandorren@126.com

*通信作者 余 涛(1986—), 男, 主治医师, 博士在读, 研究方向为中西医结合肿瘤防治。E-mail: yutao1986cn@163.com

which may be a new target of effects of salvianolic acid B on breast cancer cells.

Key words: salvianolic acid B; breast cancer; SIRP α gene; data mining

信号调节蛋白 α (signal regulatory protein α , SIRP α) 是 SIRPs 家族中第一个被鉴定的成员, 主要表达在骨髓细胞和神经元细胞的胞膜, 也有少量表达在平滑肌细胞和血管内皮细胞等。SIRP α 胞外区含有 3 个免疫球蛋白超家族 (IgSF) 结构域和多个糖基化位点。其胞质区高度保守, 具有富含酪氨酸残基的免疫抑制性基序 (ITIMs)。由于其特殊的细胞定位和结构, 决定了它在不同细胞中传递不同的信号, 发挥不同的功能。该结构可以被蛋白激酶如 Src 蛋白磷酸化, 进而与含有 SH2 结构域的蛋白如酪氨酸磷酸酶 SHP1 和 SHP2 结合, 从而抑制蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 依赖的细胞活化, 抑制免疫细胞的激活。潘宇飞等^[1]研究确立了 SIRP α 在肿瘤微环境中巨噬细胞功能调节中有着重要地位, 其表达下调可能是肝癌促进自身发生发展的重要途径。SIRP α 蛋白在乳腺癌组织中的研究相对较少, 多数研究是在细胞层面进行。Kaur 等^[2]研究表明乳腺癌细胞通过诱导 SIRP 的抑制信号, 并高表达 CD47 蛋白, 以防止被巨噬细胞吞噬。该研究揭示了 SIRP α 在乳腺癌中独特的机制。因此推测 SIRP α 基因在乳腺癌中可能是一个抑癌基因, 改变其被下调的状态将有助于预后。因此本研究收集 GEO 和 Oncomine 数据库中的公共数据集, 并对其进行挖掘分析, 以了解 SIRP α 基因在乳腺癌中的表达和临床意义。由于中医中药在临床乳腺癌综合治疗中所起的作用越来越受到重视, 在中医中药中寻求治疗乳腺癌的方法和药物不失为一条值得探寻的途径。在分析过程中, 发现丹参酚酸 B 对乳腺癌细胞 SIRP α 基因表达存在影响。因此本研究一并探讨, 以期从中医药中寻找治疗乳腺癌的靶点和药物提供思路。

1 资料和方法

1.1 数据提取

1.1.1 从 Oncomine 数据库中提取数据 登录 Oncomine 数据库主页面 <https://www.oncomine.org/>, 首先进行注册以获得本数据库的使用权限, 然后根据筛选条件在数据库中进行设定, 用来筛选和提取所需要的目标数据。本研究中, 在数据库检索界面输入筛选条件是: (1) cancer type: breast cancer; (2) gene: SIRP α ; (3) data type: mRNA or DNA; (4) analysis type: cancer vs normal analysis。

1.1.2 从 GEO 数据库中提取数据 在 PUBMED 主界面 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> 搜索栏中找到 GEO datasets, 根据筛选条件在对应检索栏输入 “Salvianolic acid B”, “Organism” 设置为 “Homo sapiens” 来查找符合条件的数据集并下载。

1.2 统计学分析

采用 t 检验来比较正常组织与乳腺癌病例组织之间 SIRP α 表达的差异。采用 GEO 数据库网站自带的 GEO2R 分析基因表达谱中的具有差异表达的基因。采用 Kaplan-Meier 方法计算 SIRP α 表达与乳腺癌预后的关系。所有统计学分析处理采用 SPSS 20.0 软件进行, 作图采用 Graphpad Prism 5.0 软件进行, 当 $P \leq 0.05$ 时认为有统计学显著性差异。

2 结果

2.1 SIRP α 在乳腺癌中的总体表达情况

利用 Oncomine 数据库筛选有关乳腺癌基因差异表达的研究, 设置相应的筛选条件后可见, 自 2001 年起共有 9 项研究涉及 SIRP α 在乳腺癌和正常组织中的表达, 共包括 2 484 例标本。文章分别发表于 Breast Cancer Res^[3]、Nature^[4-5]、Cancer Cell^[6]、Proc Natl Acad Sci U S A^[7-8]、Mol Biol Cell^[9]等杂志。在 Oncomine 数据库中对这 9 项研究结果进行统计分析发现, 与对照组比较, SIRP α 在乳腺癌中呈现低表达, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 不同数据集中 SIRP α 基因在乳腺癌和正常乳腺组织中的表达差异

Oncomine 数据库中 SIRP α 在不同乳腺癌研究数据集中的表达结果见图 2。研究显示, 在 Ma 等、Curtis 等、TCGA、Richardson 等、Sorlie 等、Perou 等和 Zhao 等研究中, SIRP α 在乳腺癌中的表达量均显著低于正常乳腺组织, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。该 9 项不同研究中对应的 SIRP α 低表达倍数和对应的 P 值见表 1。

2.3 SIRP α 基因与乳腺癌患者预后的相关性

利用 GEO 和 Oncomine 数据库挖掘的生存信息, 采用 Kaplan-Meier 法分析发现, SIRP α 基因的表达水平与乳腺癌患者生存预后之间存在相关性, 低表达 SIRP α 基因的乳腺癌患者无病生存期明显差于高表达患者, 高表达患者的预后更好 ($P < 0.05$)。见图 3。

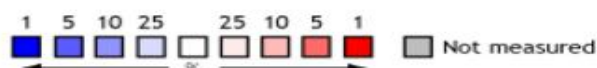
Comparison of SIRPA Across 9 Analyses

Under-expression

Median Rank	p-Value	Gene									
370.0	0.001	SIRPA									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9

Legend

1. Invasive Ductal Breast Carcinoma vs. Normal
Curtis Breast, Nature, 2012
2. Ductal Breast Carcinoma in Situ Epithelia vs. Normal
Ma Breast 4, Breast Cancer Res, 2009
3. Invasive Ductal Breast Carcinoma Epithelia vs. Normal
Ma Breast 4, Breast Cancer Res, 2009
4. Ductal Breast Carcinoma vs. Normal
Perou Breast, Nature, 2000
5. Ductal Breast Carcinoma vs. Normal
Richardson Breast 2, Cancer Cell, 2006
6. Ductal Breast Carcinoma vs. Normal
Sorlie Breast, Proc Natl Acad Sci U S A, 2001
7. Ductal Breast Carcinoma vs. Normal
Sorlie Breast 2, Proc Natl Acad Sci U S A, 2003
8. Invasive Ductal Breast Carcinoma vs. Normal
TCGA Breast, No Associated Paper, 2011
9. Invasive Ductal Breast Carcinoma vs. Normal
Zhao Breast, Mol Biol Cell, 2004



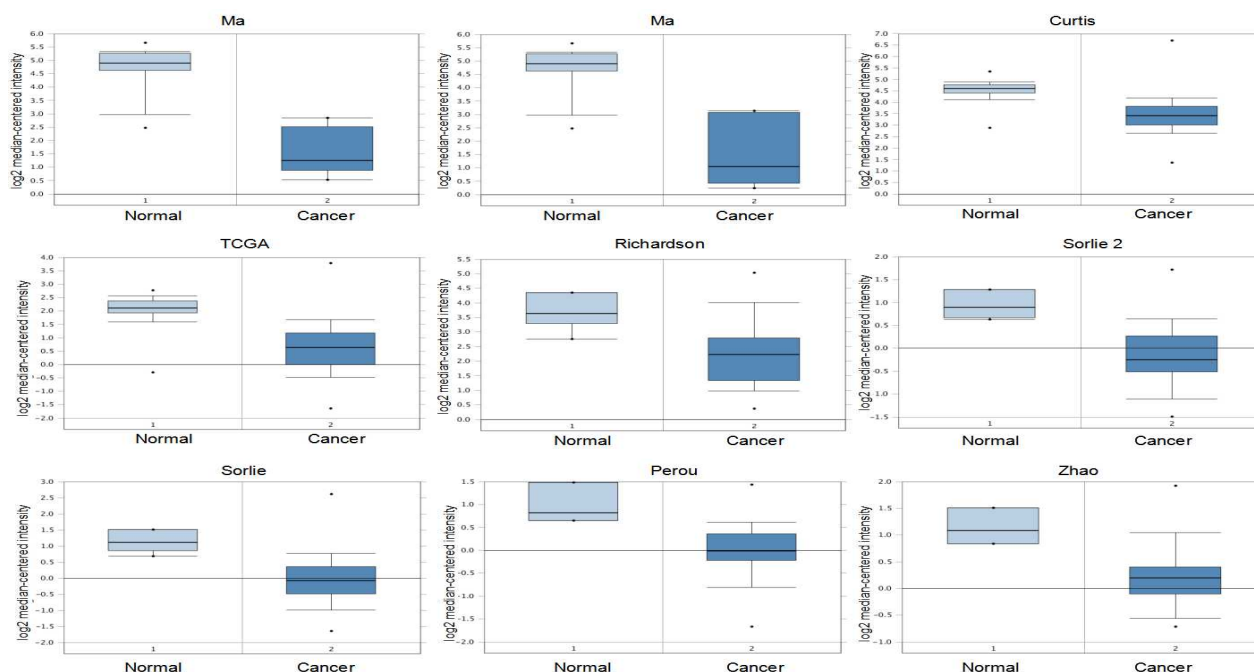
The rank for a gene is the median rank for that gene across each of the analyses.
The p-Value for a gene is its p-Value for the median-ranked analysis.

1—9 分别表示 9 项研究结果，颜色越深表示 SIRPA 基因在该芯片中表达越低

1—9 represent the 9 studies on the expressions of SIRPA in breast cancer, and darker blue indicates lower SIRPA expression in the chips

图 1 SIRPA 基因在 Oncomine 数据库中乳腺癌中的表达

Fig. 1 Expression of SIRPA gene in breast cancer in Oncomine database



与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

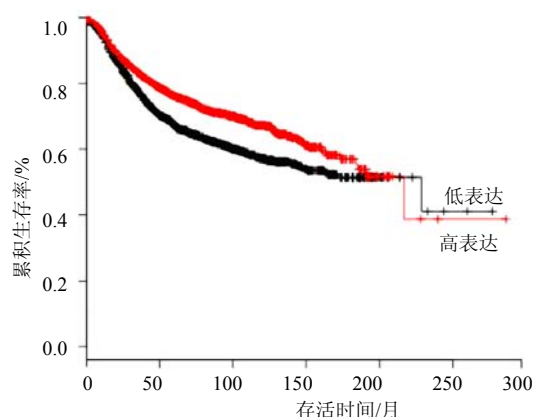
图 2 Oncomine 数据库中 SIRPA 在不同乳腺癌研究数据集中的表达

Fig. 2 Expression of SIRPA mRNA in different studies identified in Oncomine database

表1 SIRP α 基因在不同的研究者数据集中的低表达情况

Table 1 Low expression of SIRP alpha gene in different researchers' data sets

研究者	正常乳腺组织的病例数	乳腺癌组织病例数	低表达倍数	P 值	参考文献
Ma	14	9 (乳腺浸润性导管癌)	-8.341	1.02×10^{-7}	[3]
Ma	14	9 (乳腺导管原位癌)	-7.764	2.17×10^{-5}	[3]
Curtis	144	1 556	-2.172	7.62×10^{-96}	[4]
TCGA	61	389	-2.681	1.15×10^{-39}	No Associated Paper
Richardson	7	40	-2.606	1.93×10^{-5}	[6]
Sorlie 2	4	88	-2.133	0.001	[8]
Sorlie	4	65	-2.204	0.002	[7]
Perou	3	36	-1.983	0.021	[5]
Zhao	3	38	-1.922	0.012	[9]

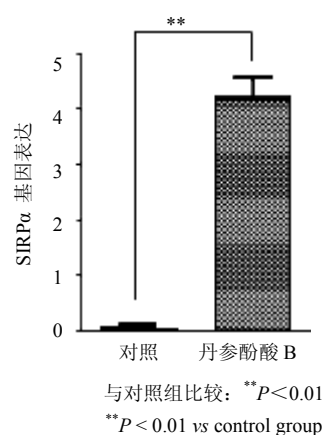
图3 SIRP α 基因表达与乳腺癌患者预后之间的关系Fig. 3 Relationship between expression of SIRP α and prognosis of breast cancer

2.4 丹参酚酸 B 对乳腺癌细胞 SIRP α 基因表达的影响

通过分析 GEO 数据库中的数据 GSE85871, 其中有关丹参酚酸 B 作用于乳腺癌 MCF7 细胞的基因表达谱, 从中提取探针号为 202895_s_at 的 SIRP α 基因表达数据, *t* 检验分析干预组和对照组之间的基因表达差异, 发现丹参酚酸 B 能够上调乳腺癌 MCF7 细胞 SIRP α 基因的表达 ($P < 0.01$), 见图 4。

3 讨论

免疫系统在肿瘤的治疗和预后中发挥着重要作用。研究表明, SIRP α 参与了机体免疫系统的发育和免疫细胞的活化, 其作用是通过 CD47-SIRP α 信号通路实现的。Willingham 等^[10]发现 CD47-SIRP α 信号通路有可能成为实体瘤治疗的靶点。Nagahara 等^[11]研究发现乳腺癌中 CD47 蛋白与 SIRP α 蛋白有相关性。Yamasaki 等^[12]研究表明, 无论是高表达

图4 丹参酚酸 B 体外对乳腺癌细胞 MCF7 中 SIRP α 基因表达的影响Fig. 4 Effects of salvianolic acid B on expression of SIRP α gene in breast cancer MCF7 cells *in vitro*

SIRP α 1 还是高表达 SIRP α 2, 均能在体外显著抑制乳腺癌 Hs578T 细胞的非依赖性生长。同样单独过表达 SIRP α 1 也能显著抑制乳腺癌 MCF7 细胞非依赖性生长。结果提示 SIRP α 1、SIRP α 2 可能在乳腺癌中扮演着抑癌基因的作用。Galbaugh 等^[13]研究表明 SIRP α 通过调节催乳素受体整合素而在乳腺癌中发挥着重要的作用。McHale 等^[14]在研究血清催乳素升高与绝经后妇女患乳腺癌直接的相关性时, 利用 40 例乳腺癌组织芯片探讨催乳素相关的受体信号通路, 结果发现 SIRP α 在乳腺癌组织中表达下调 ($P = 0.002\ 060$)。这些研究结果与本实验通过生物信息学分析的结果具有一致性, 提示 SIRP α 基因可能在乳腺癌的发生、发展和预后中具有抑癌基因的作用。

本研究利用数据挖掘的方法在众多研究者组成的大样本中分析 *SIRPα* 基因在乳腺癌中的表达情况,避免因研究方法、样本量和人群的差异导致的结论偏颇。众所周知,Oncomine 数据库和 GEO 数据库是当前世界上较大、较全面的基因芯片数据库和数据提取平台,其中整合的文献、芯片数据以其高质量和可信度得到学界的广泛认可。本研究通过深度挖掘 Oncomine 数据库中收录的乳腺癌基因表达谱数据,纳入 9 项研究共包括 2 484 例标本,结果发现 *SIRPα* 基因在乳腺癌组织中的表达明显低于癌旁组织。再通过 Kaplan-Meier 方法分析生存数据发现,*SIRPα* 基因低表达的乳腺癌患者无病生存期明显差于高表达者,即高表达患者的预后更好。结合诸多学者已有的研究结果可推知 *SIRPα* 在乳腺癌的发展中起抑癌基因的作用,有望成为乳腺癌治疗的新靶点和预后的新标志。

目前中医药在乳腺癌综合治疗中发挥着重要作用,日益受到人们的重视,因此在中医中药中寻求治疗乳腺癌的方法和药物势在必行。中药品种很多,单个品种中成分也非常复杂,为抗肿瘤治疗方法和药物的研发提供了丰富的来源。本研究中关注的丹参酚酸 B 是丹参中有效成分。丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎,始载于《神农本草经》,为常用的活血化瘀药。其味苦,微寒,归心、肝经。据《中国药典》记载,丹参具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痛的功效,临床上主要用于胸痹心痛、脘腹胁痛、癥瘕积聚、热痹疼痛、心烦不眠、月经不调、痛经经闭、疮疡肿痛等。研究表明丹参酚酸类成分具有较强的药理活性,因此受到了广泛关注^[15]。

丹参酚酸 B 属于丹参中的酚酸类物质。目前国内外的相关药理学研究证实,丹参酚酸 B 具有抗炎抗氧化、清除体内氧自由基的作用,同时还具有抑制血小板聚集和血栓形成,改善微循环,抑制细胞凋亡、抗纤维化等多种活性。丹参酚酸 B 对于心血管系统、脑组织、肝脏、肺等重要器官均具有十分重要的保护功能^[16-18]。有报道^[19]称丹参酚酸 B 通过下调肝癌 SMMC7721 和 HepG2 细胞的 AT1R 的表达,减少 VEGF 的分泌,从而使 VEGF 以旁分泌的形式作用于血管内皮细胞,抑制了肝癌血管生成。Jing 等^[20]报道丹参酚酸 B 作为一种新型的自噬诱导剂,可通过抑制 PI3K/Akt 通路发挥其在结直肠癌细胞中的抗肿瘤作用。Yang 等^[21]研究发现丹参酚酸 B

对口腔鳞状癌细胞生长具有抑制作用,其抗肿瘤作用可能是由于肿瘤血管生成中某些关键调控基因的表达减少而增加其抗血管生成的潜能。Ding 等^[22]研究发现丹参酚酸 B 可以保护纳米载体 TiO_2 引起的心肌损伤,并与经叶酸靶向和聚乙二醇改性的 TiO_2 纳米粒子的姜黄素释药系统一起协同抗乳腺癌作用。

本研究搜集到 GEO 数据库中的数据集 GSE85871,该数据集采用 DNA 微阵列检测了 102 种中药单体成分作用于乳腺癌 MCF7 细胞后的基因表达谱,以方便研究者识别中药组分的潜在药理机制和分子靶向途径。该数据集中提供了丹参酚酸 B 作用于乳腺癌 MCF7 细胞后的基因表达谱,以 *SIRPα* 基因对应的探针号 202895_s_at 从中可以提取该基因的表达数据。对数据进行统计分析后发现,丹参酚酸 B 能够上调乳腺癌 MCF7 细胞 *SIRPα* 基因的表达。这个结果提示 *SIRPα* 基因可能是丹参酚酸 B 作用于乳腺癌的新靶点。

通过中药单体成分的基因表达谱探索药物的新机制和新靶点对于中药研究人员来说是非常方便有效的方法。本研究结果表明通过数据挖掘的方式,发现丹参酚酸 B 作用于乳腺癌的新靶点 *SIRPα* 基因,并结合文献资料推测可能存在的新抗肿瘤机制。本研究包含了目前为止最大的样本量,并且所有数据均来自基因芯片,研究方法一致,因此极大地增加了结论的可信度,将为乳腺癌的治疗药物的开发提供重要的理论依据和借鉴思路。

参考文献

- [1] 潘宇飞. 信号调节蛋白 α 调节肿瘤相关巨噬细胞功能的作用与机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- [2] Kaur S, Elkahoul A G, Singh S P, et al. A function-blocking CD47 antibody suppresses stem cell and EGF signaling in triple-negative breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9): 10133-10152.
- [3] Ma X J, Dahiya S, Richardson E, et al. Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression [J]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(1): R7.
- [4] Curtis C, Shah S P, Chin S F, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups [J]. *Nature*, 2012, 486(7403): 346-352.
- [5] Perou C M, Sorlie T, Eisen M B, et al. Molecular portraits of human breast tumours [J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 747-752.

- [6] Richardson A L, Wang Z C, De Nicolo A, *et al.* X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer [J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(2): 121-132.
- [7] Sorlie T, Perou C M, Tibshirani R, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(19): 10869-10874.
- [8] Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(14): 8418-8423.
- [9] Zhao H, Langerod A, Ji Y, *et al.* Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(6): 2523-2536.
- [10] Willingham S B, Volkmer J P, Gentles A J, *et al.* The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction is a therapeutic target for human solid tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(17): 6662-6667.
- [11] Nagahara M, Mimori K, Kataoka A, *et al.* Correlated expression of CD47 and SIRPA in bone marrow and in peripheral blood predicts recurrence in breast cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(18): 4625-4635.
- [12] Yamasaki Y, Ito S, Tsunoda N, *et al.* SIRP α 1 and SIRP α 2: their role as tumor suppressors in breast carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(1): 7-13.
- [13] Galbaugh T, Feeney Y B, Clevenger C V. Prolactin receptor-integrin cross-talk mediated by SIRP α in breast cancer cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(10): 1413-1424.
- [14] McHale K, Tomaszewski J E, Puthiyaveetil R, *et al.* Altered expression of prolactin receptor-associated signaling proteins in human breast carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2008, 21(5): 565-571.
- [15] 梁文仪, 陈文静, 杨光辉, 等. 丹参酚酸类成分研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5): 806-812.
- [16] Wang J, Xiong X, Feng B. Cardiovascular effects of salvianolic acid B [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 247948.
- [17] Ren Y, Tao S, Zheng S, *et al.* Salvianolic acid B improves vascular endothelial function in diabetic rats with blood glucose fluctuations via suppression of endothelial cell apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 791: 308-315.
- [18] 韩秀娟, 顾俊菲, 刘 丹, 等. 基于体外血脑屏障模型的丹酚酸组分活性成分的筛选分析 [J]. 中草药, 2016, 47(20): 3639-3646.
- [19] 周 梁. 基于生物网络调控下丹参抗肿瘤血管生成研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [20] Jing Z, Fei W, Zhou J, *et al.* Salvianolic acid B, a novel autophagy inducer, exerts antitumor activity as a single agent in colorectal cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(38): 61509-61519.
- [21] Yang Y, Ge P J, Jiang L, *et al.* Modulation of growth and angiogenic potential of oral squamous carcinoma cells in vitro using salvianolic acid B [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2011, 11: 54.
- [22] Ding L, Li J, Huang R, *et al.* Salvianolic acid B protects against myocardial damage caused by nanocarrier TiO₂; and synergistic anti-breast carcinoma effect with curcumin via codelivery system of folic acid-targeted and polyethylene glycol-modified TiO₂ nanoparticles [J]. *Int J Nanomed*, 2016, 11: 5709-5727.