论著

文章编号:1000-5404(2009)06-0498-04

纳米微粒介导反义寡脱氧核苷酸逆转乳腺癌细胞多药耐药的实验研究

彭志平,李少林,文 明,蒋明东,段 红,王树斌 (重庆医科大学基础医学院放射医学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨纳米微粒介导耐药基因mdr-1、mrp反义寡脱氧核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)转染对多药耐药乳腺癌MCF-7/ADR细胞的影响。**方法** 采用纳米微粒介导mdr-1、mrp-ASODN转染耐药细胞株MCF-7/ADR,RT-PCR、Western blot检测转染48 h后细胞耐药基因mdr-1、mrp的表达;MTT法检测经转染后MCF-7/ADR细胞对阿霉素(ADR)、表柔比星(epirubicin)、5-氟脲嘧啶(5-FU)和紫杉醇(paclitaxel)的敏感性。**结果** 纳米微粒介导mdr-1、mrp ASODN转染48 h后,MCF-7/ADR细胞的mdr-1、mrp在mRNA和蛋白质表达水平上均显著降低($P<0.05$);细胞对ADR、表柔比星、5-氟脲嘧啶和紫杉醇的耐药指数均显著降低($P<0.05$)。**结论** 耐药基因反义寡脱氧核苷酸能在体外抑制耐药基因的表达,从而提高细胞的药物敏感性;纳米微粒具有较好的体外介导反义寡脱氧核苷酸转染效果。

关键词: 乳腺癌;多药耐药;反义寡脱氧核苷酸;纳米微粒

中图法分类号: R394-33;R394.6;R737.9 **文献标识码:** A

Reversal of multidrug resistance of breast carcinoma by antisense oligodeoxynucleotide combined with nanometer particle

PENG Zhi-ping, LI Shao-lin, WEN Ming, JIANG Ming-dong, Duan Hong, WANG Shu-bin (Department of Radiation Medicine, Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the reversing effect of antisense oligodeoxynucleotide (ASOND) mediated by nanometer particle against multidrug resistance genes mdr-1 and mrp on the multidrug resistance of breast cancer cell line MCF-7/ADR. **Methods** ASOND of mdr-1 and ASODN of mrp were respectively transfected into MCF-7/ADR cells by nanometer particle. Their sense oligodeoxynucleotides were also transduced to serve as control. The changes of mdr-1 and mrp expressions were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting in 48 h after transfection. MTT assay were performed to evaluate the sensibility of the transfected cells to adriamycin, epirubicin, 5-fluorouracil and paclitaxel respectively. **Results** After 48 hours' exposure to mdr-1-ASODN or mrp-ASODN mediated by nanometer particle, MCF-7/ADR cells significantly reduced the expressions of mdr-1 and mrp in mRNA and protein levels ($P<0.05$), and enhanced drug sensitivity to adriamycin, epirubicin, 5-fluorouracil and paclitaxel respectively ($P<0.05$). **Conclusion** ASOND enhances the drug sensitivity of breast cancer cell line MCF-7/ADR by inhibiting the expressions of drug resistance genes. Nanometer particle is a valid tool to mediate ASOND *in vitro*.

Key words: breast cancer; multidrug resistance; antisense oligodeoxynucleotide; nanometer particle

化疗在乳腺癌的综合治疗中起着不可替代的作用,尽管新的抗癌药物及化疗方案不断推出,但部分患者治疗效果仍不尽如人意,其中一个重要原因就是肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性。据美国癌症协会提供的统计资料显示,90%以上的肿瘤患者死因或多或少都与耐药有关[1]。多药耐药(multidrug resistance, MDR)是化疗失败的主要原因。因此,对MDR的临床预防与逆转已成为肿瘤治疗亟待解决的问题,亦是肿瘤研究的难点及热点领域。

Mdr-1和mrp基因及其表达蛋白MDR-1、P190的异常表达是乳腺癌产生MDR的主要因素[2]。本研究

基金项目:国家自然科学基金(30070230);重庆市自然科学基金(2007BB5305)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070230) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5305)

作者简介:彭志平,男,四川省资中县人,博士,讲师,主要从事肿瘤药学方面的研究。电话:(023)68485007,E-mail:pengzhiping@cqmu.edu.cn
通信作者:李少林,E-mail:shaolinli202@sina.com

收稿日期:2008-08-26;修回日期:2008-09-28

在建立乳腺癌耐药细胞稳定株 MCF-7/ADR 的基础上,以纳米微粒为载体,使耐药基因反义寡脱氧核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)转染 MCF-7/ADR 细胞,通过目的基因的反义抑制作用,逆转乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 的多药耐药性,探讨纳米微粒介导耐药基因 mdr-1、mrp-ASODN 转染 MCF-7/ADR 细胞,实现逆转 MDR 的效应。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验仪器　　480 型 PCR 扩增仪(美国 RE 公司)。FOTODYNE 60-2107 型凝胶成相系统(美国 Image 公司),550 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),H7500 型透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司)。

1.1.2　主要试剂　　生物技术级牛血清白蛋白(美国 Amresco 公司),表皮生长因子(英国 PeproTech EC LTD),戊二醛(美国 Sigma 公司),RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司),Western blot Kit 和 PVDF 膜(Life Science 公司),MDR-1 和 P190 抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司),mdr-1 ASODN、mrp-ASODN 和引物(上海生工生物技术有限公司),阿霉素(ADR,意大利 Pharmacia 公司)、表柔比星(epirubicin, 辉瑞制药有限公司)、5-氟脲嘧啶(5-FU, 江苏同泰药业有限公司)和紫杉醇(paclitaxel, 北京四环医药有限公司)。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养与实验分组　　乳腺癌细胞株 MCF-7 购自中国科学院上海细胞所,多药耐药乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 的制备按照文献[3]方法,由本实验室采用浓度递增法培育诱导并鉴定、经筛选出稳定细胞株多代培养后使用。MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞分别接种到含新生小牛血清 RPMI1640 培养液,置 37 ℃、5% CO_2,饱和湿度培养,常规观察细胞生长和换液。传代分瓶:对数生长期细胞用 0.25% 胰酶和 0.02% EDTA 溶液消化 3 min, RPMI1640 液终止消化,1 500 r/min 离心机离心 5 min,弃上清液,再用 PBS 液重悬细胞,再离心 5 min,ELX800 微孔板读数仪调整细胞浓度,再接种到新培养瓶。

实验分组:纳米微粒转染液,纳米微粒 + mdr-1 SODN,纳米微粒 + mrp-SODN,纳米微粒 + mdr-1 ASODN,纳米微粒 + mrp-ASODN。

1.2.2　mdr-1 ASODN 和 mrp-ASODN 序列筛选、合成　　耐药基因 mdr-1、mrp 的 ASODN 序列在 GenBank 中查出并经 Primer Premier 5.0 软件设计完成,最后确定 mdr-1 的 ASODN 序列为 5′-GTCCCCTTCAAGATCCAT-3′,正义寡脱氧核苷酸(sense oligodeoxynucleotide, SODN)序列为 5′-ATGGATCTTGAAGGGGAC-3′;针对 MRP mRNA 起始编码区 352 ~ 369 的 ASODN 序列为 5′-ATGTAGCCTCGGTCATGT-3′,正义寡脱氧核苷酸序列为 5′-ACATGACCGAGGCTACAT-3′。以上寡脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotide, ODN)序列经硫代磷酸化修饰,放置低温下备用。

1.2.3　纳米微粒的制备及其对寡脱氧核苷酸的包载　　纳米微粒的制备参见文献[4],二次超声乳化和溶剂(甲苯和环己烷)挥发技术制备牛血清白蛋白纳米粒(bovine serum albumin nanometer particle, BSANP),通过可溶性交联剂 EDC 对表皮生长因子(EGF)和 BSANP 进行共价连结,纯化并冻干纳米微粒溶液,低温保存备用。纳米微粒冻干品加入双蒸水复溶,振动 5 min,即成纳米微粒溶液。取纳米微粒溶液适量,激光散射法测定纳米微粒的粒径,加蒸馏水适量稀释,0.22 μm 滤器过滤,用 1.5%(质量体积分数)醋酸双氧铀负染色,滴于镀膜的电镜铜网上,晾干后,置于透射电镜下观察,拍照。按体积为 1∶1 比例将 1 000 μg/ml 纳米粒加入 400 μg/ml 寡脱氧核苷酸溶液中,37 ℃温育 1 h,即得载药纳米粒溶液。取 2 ml 载药纳米粒溶液,加入 10% 三氯乙酸溶液 0.5 ml,离心沉淀,取上清液用紫外分光光度计在 260 nm 处测光密度值[$D(260)$],按 1$D(260)$ = 33 μg/ml 计算寡脱氧核苷酸的量。

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{纳米粒包载的寡脱氧核苷酸量}}{\text{寡脱氧核苷酸投入总量}} \times 100\%$$

1.2.4　mdr-1 和 mrp 寡脱氧核苷酸转染　　MCF-7/ADR 细胞接种于 25 ml 培养瓶,37 ℃、5% CO_2 孵育,待细胞贴壁、80% 融合后,换入无血清 RPMI1640 培养基 5 ml,加入载寡脱氧核苷酸的纳米微粒溶液 2 ml,轻微振荡混匀,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱转染 20 h,弃上清液,加新鲜 RPMI1640 继续培养 72 h,进行 Western blot、RT-PCR 和 MTT 法实验。

1.2.5　mdr-1 和 mrp mRNA 及其蛋白 MDR-1 和 P190 的表达测定

1.2.5.1　Western blot 检测转染后 MDR-1 和 P190 蛋白表达　取 10^6/ml 实验细胞,参照 TaKaRa 公司提供的方法,提取细胞总蛋白;按照蛋白定量试剂盒的说明测定蛋白浓度。每例标本取总蛋白 40 μg,经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移至 PVDF 膜上,封闭后,加一抗(羊抗人 MDR-1 和 P190 抗体,1∶1 000工作浓度)及二抗(IgG/HRP 二抗,1∶4 000 工作浓度)进行杂交。发光试剂盒显色,凝胶成像系统分析处理。

1.2.5.2　RT-PCR 检测转染后 mdr-1 和 mrp mRNA 表达　　取 10^6/ml 实验细胞,按试剂盒说明抽提 RNA,取 2 μl RNA 以 Oligo dT 为引物,进行 RT 反应(30 ℃ 10 min,42 ℃ 60 min,99 ℃ 5 min),取 2 μl RT 产物分别针对 mdr-1、mrp 基因的引物进行 PCR。mdr-1 上下游引物序列分别为 5′-CCCATCATTG-CAATAGCAGG-3′和 5′-GTTCAAACTTCTGCTCCTGA-3′,扩增产物长度为 157 bp;mrp 上下游引物序列分别为 5′-GGACCTG-GACTTCGTTCTCA-3′和 5′-CGTCCAGACTTCTTCATCCG-3′,扩增产物长度为 292 bp;β-actin 上下游引物序列分别为 5′-AC-CCCCACTGAAAAAGATGA-3′ 和 5′-ATCTTCAAACCTCCATGA-TG-3′,扩增产物长度为 120 bp。PCR 反应体积为 25 μl,包括 50 mmol/L $MgCl_2$ 0.8 μl, 10 × buffer 2.5 μl, dNTP 2.5 μl, 5 pmol 混合引物 2.5 μl, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μl(5 U/μl), cDNA模板 2.5 μl,余量用三蒸水补足混匀。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,56 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,35 个循环,72 ℃ 10 min。取 PCR 产物 5 μl 加 1 μl 载样缓冲液,行 1.8% 琼脂糖凝胶电泳(65 V,2 h),溴化乙锭染色,紫外灯下观察电泳条带,UVP 凝胶扫描仪扫描并读取光密度值,用 mdr-1 cDNA/β-actin cDNA 比值表示 mdr-1 mRNA 的相对表达水平,用 mrp cDNA/β-actin cDNA 比值表示 mrp mRNA 的相对表达水平。各标本重复 2 次,取平均值。

1.2.6　MTT 法检测转染后耐药细胞的药物敏感性　　用

0.25%胰蛋白酶消化,收集经转染 48 h 后的 MCF-7/Adr 实验细胞,用含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液配成单个细胞悬液(终浓度为 2×10^4/ml),每孔加 200 μl 细胞悬液于 96 孔培养板中,分组加入 10 μl 不同浓度的阿霉素、表柔比星、5-氟脲嘧啶和紫杉醇,设 3 平行孔,37 ℃、5% CO_2 分别作用 72 h 后,每孔加入 0.5 g/L 四甲基偶氮唑蓝(MTT)20 μl,继续培养 4 h,弃上清,加入二甲基亚砜每孔 150 μl,振荡 5 min,酶联免疫分析仪以 490 nm 波长测每孔光密度值[D(490)]。

肿瘤细胞存活率 = [实验孔 D(490)/对照孔 D(490)] × 100%。以药物浓度为横轴,存活率为纵轴绘制浓度效应曲线,确定半数抑制浓度(IC_{50})。耐药指数(RI) = 耐药细胞 IC_{50}/亲本细胞 IC_{50}。

1.3 统计学处理

实验所获数据使用 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料用 χ^2 检验,计量资料用 t 检验。数据用 SPSS 12.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 纳米粒的形态、粒径大小及分布

纳米微粒复溶后透射电镜观察,纳米粒形态圆整,大小较均匀,分散度好,微粒间无明显粘连和聚集(图 1)。激光散射法测定 EGF-BSANP 平均粒径为 36 nm,90% 的粒径小于39 nm。纳米微粒对寡脱氧核苷酸的包封率为(53.9 ± 6.2)%。

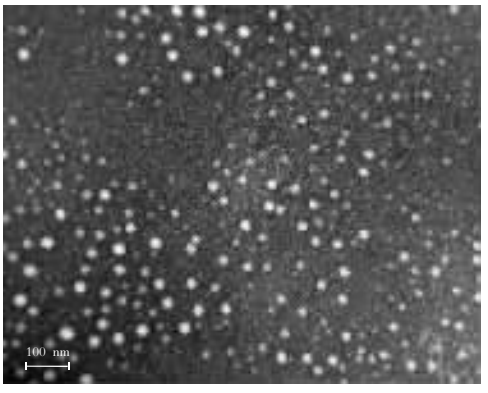
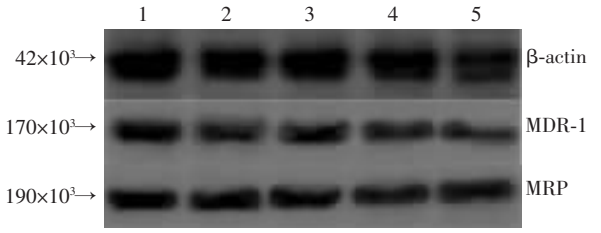


图 1 透射电镜观察 EGF-BSANP 形态变化

2.2 纳米粒介导的 mdr-1 和 mrp ASODN 转染分别对细胞 MDR-1 和 MRP 蛋白表达的影响

纳米粒介导的 mdr-1 反义寡脱氧核苷酸能显著降低MDR-1 蛋白表达($P<0.05$),而纳米粒介导的 mrp 反义寡脱氧核苷酸同样能显著降低 MRP 蛋白表达($P<0.05$)。采用纳米粒介导的正义寡脱氧核苷酸对蛋白表达的影响均不明显($P>0.05$),在凝胶电泳图上显示为较强条带(图 2)。

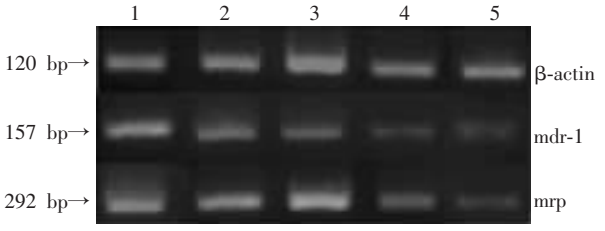


1:纳米微粒转染液组;2:纳米微粒 + mdr-1 SODN 组;3:纳米微粒 + mrp-SODN 组;4:纳米微粒 + mdr-1 ASODN 组;5:纳米微粒 + mrp-ASODN 组

图 2 Western blot 检测 MCF-7/ADR 细胞转染耐药基因 ASODN 后蛋白表达

2.3 纳米粒介导的 mdr-1 和 mrp ASODN 转染分别对 mdr-1 和 mrp mRNA 表达的影响

纳米粒介导的 mdr-1 反义寡脱氧核苷酸可显著降低 mdr-1 mRNA 表达($P<0.05$),纳米粒介导的 mrp 反义寡脱氧核苷酸同样能显著降低 mrp mRNA 表达($P<0.05$)。而正义寡脱氧核苷酸对 mRNA 表达的影响不明显($P>0.05$),在凝胶电泳图上可见较强条带(图 3)。



1:纳米微粒转染液组;2:纳米微粒 + mdr-1 SODN 组;3:纳米微粒 + mrp-SODN 组;4:纳米微粒 + mdr-1 ASODN 组;5:纳米微粒 + mrp-ASODN 组

图 3 RT-PCR 检测 MCF-7/ADR 细胞转染耐药基因 ASODN 后 mdr-1 和 mrp 的 mRNA 表达

2.4 寡脱氧核苷酸转染后耐药细胞对药物敏感性的变化

MCF-7/ADR 细胞转染 mdr-1 ASODN 和 mrp-ASODN 后,每组细胞对阿霉素、表柔比星、5-氟脲嘧啶和紫杉醇各药物的 IC_{50} 和 RI 均有显著降低($P<0.05$,表 1),提示药物敏感性提高。而采用 mdr-1-SODN 和 mrp-SODN 转染后,各组的 IC_{50} 和 RI 与空白试剂对照组之间未见明显改变($P>0.05$)。

表 1 化疗药物对各组细胞的 IC_{50} 及 RI 变化

组别	IC_{50}(μg/ml)				RI			
	阿霉素	表柔比星	5-氟脲嘧啶	紫杉醇	阿霉素	表柔比星	5-氟脲嘧啶	紫杉醇
纳米微粒转染液组	19.16 ± 4.04	1.24 ± 0.05	46.93 ± 5.65	7.21 ± 0.42	98.5	48.2	79.0	95.9
纳米微粒 + mdr-1 SODN 组	18.93 ± 2.73	1.58 ± 0.18	47.52 ± 4.71	8.03 ± 0.34	96.0	46.5	80.7	94.1
纳米微粒 + mrp-SODN 组	18.04 ± 3.76	1.33 ± 0.08	43.25 ± 5.27	7.45 ± 0.39	92.7	51.7	72.8	99.1
纳米微粒 + mdr-1 ASODN 组	1.39 ± 0.47[a]	0.27 ± 0.05[a]	4.16 ± 1.26[a]	0.65 ± 0.09[a]	7.1[a]	7.9[a]	7.1[a]	7.6[a]
纳米微粒 + mrp-ASODN 组	1.72 ± 0.54[b]	0.25 ± 0.07[b]	5.62 ± 1.01[b]	0.76 ± 0.10[b]	8.8[b]	9.7[b]	9.5[b]	10.1[b]

a: $P<0.05$,与纳米微粒转染液组和纳米微粒 + mdr-1 SODN 组比较; b: $P<0.05$,与纳米微粒转染液组和纳米微粒 + mrp-SODN 组比较

3　讨论

肿瘤 MDR 严重阻碍了临床综合治疗效果,因此,探寻高效、安全逆转肿瘤 MDR 的方法和作用机制迫在眉睫。目前研究方法主要包括拮抗细胞药物外排泵功能的各类逆转剂,对抗耐药细胞解毒系统功能的 GST 耗竭剂,阻断细胞 MDR 相关信号转导通路的各种抗 PKC 功能药物,导入促凋亡基因促进 MDR 细胞凋亡,反义技术或核酶技术抑制 MDR 相关基因[5],RNA 干扰抑制耐药基因表达,低强度超声等物理方法逆转肿瘤细胞 MDR 等[6]。但是,由于肿瘤 MDR 形成机制的复杂性,迄今为止仍然没有一种方法能够完全有效地逆转肿瘤 MDR。

基因工程技术成果的应用,为研究肿瘤 MDR 逆转提供了新的方向[7,8]。但基因技术的使用同样存在如基因转染效率等问题。本研究将基因工程技术与纳米微粒技术相结合,通过纳米微粒介导耐药基因反义寡脱氧核苷酸转染后,耐药基因的 mRNA 和蛋白表达水平有明显降低,细胞对化疗药物的敏感性增加,表明反义寡脱氧核苷酸在纳米微粒介导下能有效进入目的细胞并起到反义抑制基因表达的作用,为临床解决肿瘤 MDR,进行肿瘤根治性治疗提供实验依据。

目前研究认为,肿瘤 MDR 常常是多个机制共同作用的结果,而肿瘤细胞 mdr-1、mrp 基因及蛋白 MDR-1、MRP 的异常是肿瘤产生 MDR 的重要机制[9,10],因此本研究选择纳米微粒介导耐药基因 ASODN 转染逆转乳腺癌 MDR 的作用,主要通过抑制肿瘤 mdr-1、mrp 基因的表达,从而实现对肿瘤细胞 MDR 的逆转。实验结果显示,MCF-7/ADR 细胞经 mdr-1 ASODN + 纳米微粒或 mrp-ASODN + 纳米微粒作用后,mdr-1、mrp 基因的 mRNA 和蛋白表达均出现下降,产生逆转 MDR 效应。笔者认为,其机制可能是由于 ASODN 封闭或下调细胞 mdr-1 及 mrp 基因活性和表达蛋白的功能,造成肿瘤细胞 MDR 部分逆转,鉴于细胞的 MDR 机制主要由 MRP 和 MDR-1 两种耐药蛋白介导,它们均为细胞跨膜转运蛋白,具有 ATP 酶(ATPase)活性,能够借助分解 ATP 获得能量,使药物从细胞内向细胞外作逆浓度梯度转运,导致细胞内药物呈低浓度状态,产生 MDR。通过本实验,可以推测耐药蛋白表达的降低抑制了 ATPase 活性,进而减少细胞内药物的外排,使细胞内药物浓度呈相对高水平状态,进而部分逆转了肿瘤 MDR。

本实验还表明纳米微粒具有较好的体外反义寡脱氧核苷酸转染效果,推测原因可能在于本实验所制备纳米粒自身粒径较小,加上纳米微粒上联接的 EGF 与 MCF-7/ADR 细胞上高表达 EGF 受体[11]的特异性结合,增加了反义寡脱氧核苷酸在目的细胞周围的浓度,同时也促进了细胞对包载反义寡脱氧核苷酸的纳米微粒的内吞作用,从而提高了介导反义寡脱氧核苷酸的纳米粒载体的细胞转染效果。据报道纳米粒具有比脂质体更优越的体内安全性和生物学特性[12,13]。本研究为纳米粒在体内介导反义寡脱氧核苷酸逆转乳腺癌的多药耐药研究提供了实验基础。

参考文献:

[1] Gonzalez-Angulo A M, Morales-Vasquez F, Hortobagyi G N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2007, 608: 1 - 22.

[2] Coley H M. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2008, 34(4): 378 - 390.

[3] 严　婷, 张莲芬, 张熔熔, 等. 人乳腺癌多药耐药细胞系 MCF-7/MDRa 的建立及其生物学特性的初步研究[J]. 细胞生物学杂志, 2006, 28(4): 591 - 595.

[4] 王树斌, 袁　飞, 彭志平, 等. EGF 偶联白蛋白靶向纳米载体在荷瘤裸鼠体内分布的研究[J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(9): 516 - 519.

[5] 常　城, 孔佩艳, 陈幸华, 等. NHE-1 特异性抑制剂 DMA 逆转 HL-60/ADM 细胞多药耐药的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(4): 328 - 331.

[6] 蒋明东, 彭志平, 李少林, 等. 反义寡核苷酸并超声微泡造影剂转染联合超声照射逆转肝癌多药耐药[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(5): 341 - 345.

[7] Stuart D D, Kao G Y, Allen T M. A novel, long-circulating, and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(3): 466 - 475.

[8] Wei H L, Wu Y J, Jing T, *et al*. Sensitization and apoptosis augmentation of K562/ADM cells by anti-multidrug resistance gene peptide nucleic acid and antisense oligodeoxyribonucleotide[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(8): 805 - 811.

[9] Ambudkar S V, Kimchi-Sarfaty C, Sauna Z E, *et al*. P-glycoprotein: from genomics to mechanism[J]. Oncogene, 2003, 22(47): 7468 - 7485.

[10] Faneyte I F, Kristel P M, Maliepaard M, *et al*. Expression of the breast cancer resistance protein in breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(4): 1068 - 1074.

[11] Kruger J S, Reddy K B. Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of cell migration in epidermal growth factor receptor-overexpressing cells[J]. Mol Cancer Res, 2003, 1(11): 801 - 809.

[12] 苏　华, 胡晋红, 李凤前. 白蛋白纳米粒的制备工艺及其靶向性研究进展[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(9): 641 - 644.

[13] 张良珂, 侯世祥, 卢　懿, 等. 叶酸偶联米托蒽醌白蛋白纳米粒的制备及体外性质研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(10): 763 - 765.

(编辑　栾　嘉)