文章编号:1000-5404(2012)08-0749-05

论著

PEI/ASON纳米组装体对肺腺癌A549细胞增殖活性及其hTERT基因表达的影响

王志平[1],周建超[2],张振中[2,3],付 蕾[2] (450003 郑州,郑州人民医院药务科[1];450052 郑州,郑州大学:药学院[2],纳米药物研究中心[3])

[摘要] **目的** 以聚乙烯亚胺多聚阳离子纳米载体(polyethylenimine, PEI)作为端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)载体转染A549细胞,研究其对A549细胞的增殖活性及hTERT mRNA表达的影响。**方法** 采用MTT法检测PEI/ASODN纳米组装体对细胞的增殖作用情况;激光共聚焦显微镜检测5′-FITC标记的ASODN(FASODN)转染细胞后PEI/FASODN纳米组装体的细胞摄入情况;RT-PCR检测转染后hTERT mRNA的表达;免疫细胞化学技术检测端粒酶hTERT蛋白的表达;流式细胞术Annexin-V-FITC和PI双标法检测细胞凋亡情况;PEI/ASON-PEG-CNGR组装体动物体内分布实验观察NGR的肿瘤靶向作用。**结果** PEI/ASODN纳米组装体转染细胞后产生良好的生长抑制作用;FASODN转染细胞后,PEI/FASODN组细胞内有大量荧光物质,而单纯FASODN组细胞内无明显荧光;RT-PCR检测结果表明PEI/ASODN纳米组装体作用于A549细胞72 h时,hTERT mRNA水平明显降低,与空白对照组相比有显著差异($P<0.05$);细胞hTERT蛋白的表达也显著降低;转染72 h后PEI/ASODN组出现明显早期凋亡和晚期凋亡,凋亡率分别为36.53%和54.28%;动物体内分布实验表明PEI/ASON-PEG-CNGR具有良好的肿瘤靶向作用。**结论** PEI介导的hTERT ASODN能有效抑制A549细胞增殖,降低hTERT mRNA水平从而抑制hTERT蛋白的表达,使细胞产生凋亡,对该细胞生长有明显抑制作用。

[关键词] 聚乙烯亚胺;反义寡核苷酸;肺癌细胞系A549;端粒酶逆转录酶
[中图法分类号] R734.2;R944.9;R966 [文献标志码] A

PEI/ASON-mediated nanoparticle assembly suppresses proliferation and hTERT mRNA expression in lung cancer cell line A549

Wang Zhiping[1], Zhou Jianchao[2], Zhang Zhenzhong[2,3], Fu Lei[2] ([1]Department of Pharmacy, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou, Henan Province, 450003; [2]College of Pharmacy, [3]Research Center of Nanometer Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of nanoparticles for antisense oligodeoxynucleotide (ASODN) of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA on the proliferation and hTERT expression in A549 cells. **Methods** MTT assay was used to detect the proliferation in A549 cells, and the cells treated by ASODN, PEI/SODN and PEI/ASODN (40 μg/ml). Intracellular fluorescence intensity was detected by laser confocal microscopy in the cells after being transfected with 5′-FITC-labelled ASODN (FASODN). Inverse microscopy was used to observe the modality of A549 cells transfected by PEI/ASODN. The expression of hTERT mRNA were determined by RT-PCR. The expression of hTERT protein was detected by immunohistochemictry assay kit. Cell apoptosis were determined by flow cytometry (FCM). To observe the tumor targeting effect of NGR (Asn-Gly-Arg), a total of 36 A549 cells transplanted nude rats were injected with ASON, PEI/ASON, PEI/ASON-PEG and PEI/ASON-PEG-CNGR solutions respectively *via* tail vein. The distribution of PEI/ASON-PEG-CNGR in the heart, brain, kidneys, lungs and liver was observed in 1, 3 and 6 h after injection. **Results** PEI/ASODN exerted inhibitory effects on the proliferation in A549 cells in a time-dependent manner. The intracellular fluorescence in PEI/FASODN treated cells was obviously stronger than that in FASODN group (PEI free) after transfection. After transfecting PEI/ASODN for 72 h, the hTERT mRNA expression was decreased obviously compared with control group ($P<0.05$). The hTERT protein expression of PEI/ASODN group was reduced. FCM showed that the early and later apoptosis rates in PEI/ASODN group was 36.53% and 54.28% respectively. Animal *in vivo* experiment showed that PEI/ASON-PEG-CNGR had good

[基金项目] 国家自然科学基金(30772671)
[通信作者] 付 蕾,E-mail: fulei@163.com

tumor targeting effect. **Conclusion** PEI/FASODN of hTERT can inhibit the proliferation in A549 cells effectively, suppress mRNA and protein expression of hTERT and cause cell apoptosis.

[**Key words**] polyethylenimine; antisense oligodeoxynucleotide; lung carcinoma A549; human telomerase reverse transcriptase

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30772671). Corresponding author: Fu Lei, E-mail: fulei@163.com

端粒酶为目前已知最为广泛的肿瘤标志物之一，其特异性地表达于大多数肿瘤细胞。端粒酶的激活、端粒长度的调节与肿瘤的发生密切相关，肿瘤细胞的无限增殖与端粒酶的活化有着密切的关系[1]。抑制端粒酶的表达已成为肿瘤基因治疗的一种新手段。端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是端粒酶的重要组成部分，是端粒酶激活的限速决定因素[2]。近年来，有很多针对端粒酶逆转录酶的抗肿瘤作用研究[3-4]，而其中的反义核酸技术逐渐成为这类研究的热点。研究显示 NGR 多肽(N:天冬酰氨酸，G:氨基乙酸，R:精氨酸)可以与肿瘤的新生血管受体 CD13 特异性的结合，使其具有肿瘤细胞靶向性的特点[5]。PEG 是最为常用的亲水性修饰物，PEI/ASON-PEG-CNGR 通过 PEG 修饰偶联 CNGR 配体，能够制得体内传染效率极高的缩合体，从而达到较好的肿瘤靶向修饰作用。本研究利用人工合成的反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)，以 hTERT mRNA 为靶点，以聚乙烯亚胺多聚阳离子作为纳米载体转染肺腺癌 A549 细胞，观察 hTERT ASODN 对该细胞生长的影响；同时实验制备了 PEI/ASON-PEG-CNGR 纳米组装体，对其在动物体内的靶向性进行了研究。为此新型纳米载体在肺癌治疗中的应用及肺癌的基因靶向治疗提供一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

肺腺癌细胞株 A549(中国典型培养物保藏中心)，聚乙烯亚胺(PEI，Sigma 公司)，RPMI1640 培养基和胰蛋白酶(trypsin，Gibco 公司)，胎牛血清(TBD 公司)，四甲基偶氮唑蓝(MTT，Sigma 公司)；Trizol 试剂，1 000 bp DNA Lodaer，M-MLV，引物及 β-actin(北京赛百盛基因技术有限公司)；鼠 S-P 免疫组化染色试剂盒、鼠抗人 hTERT 单克隆抗体(北京博奥森生物公司)；Spectra Mr 型全波长酶标仪(美国 DYNEX 公司)；梯度 PCR 扩增仪(BIO-RAD 公司)；BIO-BEST200 型凝胶成像分析系统(美国 SIM 公司)；PAS 型流式细胞仪(Partec 公司)；Dextran-70(Amersham Biosciences AB)；$CNGRCK_2$ HK_3 HK_{11}(上海波泰生物科技有限公司)。

1.2 体外实验

1.2.1 PEI/ASODN 纳米组装体的制备 在 pH 为 7.0 的 HEPES 溶液中加入 ASODN 溶液，按照 N/P = 4.0 的条件加入适量的 PEI 溶液和 PEG，使溶液中的 PEG/PEI = 2.0，制备成纳米复合物溶液，溶液中加入一定量的 Dextran-70 溶液，使其在溶液中的最终浓度为 1%[6]。

1.2.2 寡核苷酸的设计及合成 hTERT ASODN 根据 hTERT DNA 序列(AF128893)设计了 ASODN，其作用的基因位点是调节基因转录的 c-myc 蛋白的结合位点，其序列为：5′-CCACGTGGCGGAGGGACTGG-3′；另设计正义寡核苷酸(sense oligodeoxynucleotide, SODN)序列为 5′-CCAGTCCCTCCGCCACGTGG-3′作为对照。已知寡核苷酸正义序列及反义序列均与 hTERT 以外的人类基因无同源性。

1.2.3 细胞培养及实验分组 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(含 100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素)在 5% CO_2 饱和湿度，37 ℃细胞培养箱中进行常规细胞培养。实验分 4 组：空白对照组、ASODN 组、PEI/SODN 组和 PEI/ASODN 组。

1.2.4 PEI/ASODN 纳米组装体转染细胞 在细胞密度达到约 60% 时准备转染，加入 RPMI1640 培养基和 PEI/ASODN 纳米组装体溶液，两者的体积比为 3∶2，使 PEI/ASODN 终浓度为 40 μg/ml，培养细胞 6 h；空白对照组以培养液代替转染液，ASODN 组加入等量 ASODN 溶液。

1.2.5 FASODN 的细胞摄入实验 分为纯 FASODN 组和 PEI/FASODN 组：分别用 FASODN 和 PEI/FASODN 组装体转染细胞。激光扫描共聚焦显微镜透射模式观察细胞轮廓及形态，同时激光(激发波长：488 nm)激发模式观察细胞摄入情况。

1.2.6 MTT 法测定细胞的生长抑制率 分别于转染后 24、48、72、96 h，在 492 nm 波长处测各孔的光密度值[D(492)]，并计算生长抑制率。

1.2.7 半定量 RT-PCR 两步法检测 hTERT mRNA 水平 hTERT 基因 PCR 扩增引物参照引物设计原则及文献[7]，并经 GenBank 检索证实。hTERT mRNA 引物序列上游：5′-CACCTGCCGTCTTCACTTCC- 3′；下游：5′-TTACTCCCACAGCACCTCCC-3′。β-actin 为内参照，序列上游：5′-GAGCTACGAGCTGCCTGACG-3′；下游：5′-CCTAGAAGCATTTGCGGTGG-3′。采用 25 cm^2 培养瓶培养 A549 细胞至密度约 60% 时转染，转染组 ASODN 终浓度为 40 μg/ml，培养 72 h 时后提取各组 A549 细胞中总 RNA。然后用 RT-PCR 两步法扩增，扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统下观察，并用凝胶成像系统定量分析软件分析。

1.2.8 hTERT 蛋白的免疫组化检测 在 6 孔板内放置盖玻片，接种细胞培养至密度约 60% 时转染，转染 72 h 后，按 S-P 免疫组化染色试剂盒说明书操作，进行免疫细胞化学染色，苏木精复染后中性树胶封片。在光镜下观察，阴性结果为胞核/浆着蓝色，阳性结果为胞核/浆着棕黄色颗粒。

1.2.9 流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡 采用 25 cm^2 规格的培养瓶培养 A549 细胞，实验分为：细胞固定组(上流式细胞仪的前天晚上事先处理好消化细胞，离心，PBS 漂洗 2 次，用 70% 的冰乙醇固定，4 ℃过夜)、空白对照

组、PEI/SODN 组、PEI/ASODN 组、ASODN 组，培养至细胞密度约 60% 时转染，培养 72 h 收集细胞，每组计数 5×10^5 个细胞，进行流式细胞术定量检测，同时用另外不加 AnnexinV-FITC 及 PI 的一管作为阴性对照。然后用 Phoenix Flow 计算机软件 Multicycle AV 进行分析。

1.3 体内实验

1.3.1 PEI/ASON-PEG-CNGR 组装体的制备 取一定量 pH 为 7.0 的 HEPES 溶液，加入 ASON 溶液 30 μl，按照 N/P = 4.0，加入适量的 PEI 溶液，并按照 DSPE-PEG-maleimide∶DSPE-PEG = 1∶1的配比加入 PEG，使溶液中的 G/I = 2.0，并加入 CNGR 溶液 10 μl，涡旋振荡 1 min，静置 20 min 后进行粒径和 Zeta 电位的测量和稳定性考察[8]。

1.3.2 肿瘤模型的制备 36 只 SPF 级 4 ~ 6 周龄 BALB/c 雌性裸鼠（体质量 18 ~ 22 g，中国医学科学院实验动物研究所）前肢腋下接种 A549 肺腺癌细胞混悬液 0.2 ml（细胞浓度：1×10^7/ml），瘤体长径长到 1 cm 左右，尾缘静脉给药。

1.3.3 体内分布试验设计 试验分 3 组，分别为 1、3、6 h 给药组，每组又包括 4 个分组（每分组 3 只，共 12 只）：注射 ASON 溶液组、注射 PEI/ASON 压缩体溶液组、注射 PEI/ASON-PEG 组装体溶液组和注射 PEI/ASON-PEG-CNGR 组装体溶液组。

1.3.4 药品的制备及给药 取 5′-FAM 标记的 ASON 溶液适量配制成浓度为 100 μg/ml 的溶液，取出适量供第 1 分组试验注射用，记为药品Ⅰ，其余放置备用，以配制下一步所需药品。取上步剩余溶液加入适量 PEI 溶液，制备 ASON/PEI 溶液，完成后取出适量作为第 2 分组注射药品，记为药品Ⅱ；同法逐步加入 DSPE-PEG-maleimide 溶液和 CNGR 溶液分别制备药品Ⅲ和药品Ⅳ。药品制备及存放需要在避光的环境中。制备完成后每组裸鼠给予尾缘静脉注射相应的药品。

1.3.5 组织的取材与观察 裸鼠尾缘静脉注射 5′-FAM 标记的 ASON 对应药物溶液后，分别在 1、3、6 h 断头处死并放血。放血结束后，立即取出心、脑、肾、肺、肝和瘤体组织，作冰冻切片，切片厚度为 3 ~ 5 μm，每个组织取 3 张片，激光扫描显微镜下观察各组织中的药物分布情况。

1.4 统计学方法

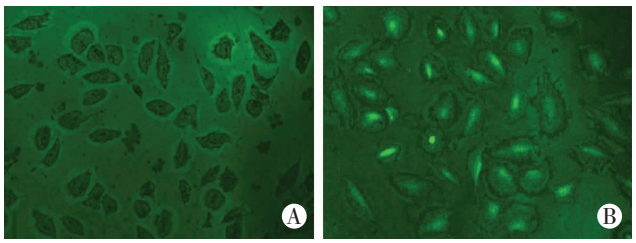
数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件包进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 体外实验结果

2.1.1 FASODN 的细胞摄入实验 FASODN 转染细胞后，细胞内荧光强度极弱；用 PEI/FASODN 组装体转染细胞后，可见大量荧光物质聚集在胞浆及胞核内。见图 1。

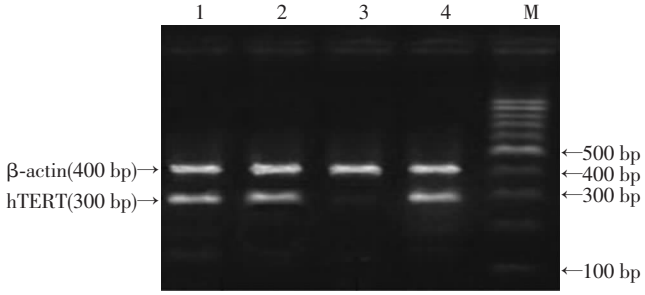
2.1.2 MTT 法检测实验结果 A549 细胞转染后，MTT 检测结果见表 1。PEI/SODN 组及 ASODN 组作用于细胞各时间段与 CELL 组同一时段相比无显著差异（$P>0.05$）；PEI/ASODN 作用于 A549 细胞，在不同时间，与对照组比较，均有显著性差异（$P<0.05$）且抑制作用随时间的延长而增强，72 h 达到最大值，96 h 略有下降。



A：FASODN 组；B：PEI/FASODN 组

图 1 激光扫描显微镜观察 PEI/FASODN 转染细胞摄取情况（×400）

2.1.3 半定量 RT-PCR 检测结果 转染 72 h 后，PEI/ASODN 转染组细胞 hTERT mRNA 的表达显著降低（图 2）。空白对照组、PEI/ASODN 组、ASODN 组、PEI/SODN 组 hTERT 条带与内参照条带灰度值的比值分别为（0.874 ± 0.028）、（0.089 ± 0.007）、（0.827 ± 0.046）和（0.845 ± 0.034）。PEI/ASODN 组与空白对照组、ASODN 组，PEI/SODN 组比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；ASODN 组和 PEI/SODN 组与空白对照组比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。



1：PEI/SODN 组；2：ASODN 组；3：PEI/ASODN 组；4：空白对照组；M：标准（1 000 bp）

图 2 RT-PCR 检测各组 A549 细胞 hTERT mRNA 的表达

2.1.4 免疫组化检测结果 转染 72 h 时，空白对照组、ASODN 组及 PEI/SODN 组细胞胞浆/核为阳性着色，见棕黄色颗粒（图 3A、C、D）；阴性对照组（PBS 代替一抗）（图 3B）与 PEI/ASODN 组细胞胞浆/核为阴性着色（图 3E）。

2.1.5 流式细胞术双染色法检测细胞凋亡结果 转染 A549 细胞 72 h 后，空白对照组、ASODN 组、PEI/SODN 组细胞凋亡均不明显（图 4A、B、C）；而 PEI/ASODN 组却出现明显早期凋亡和晚期凋亡，其凋亡率分别为 36.53% 和 54.28%（图 4D）。

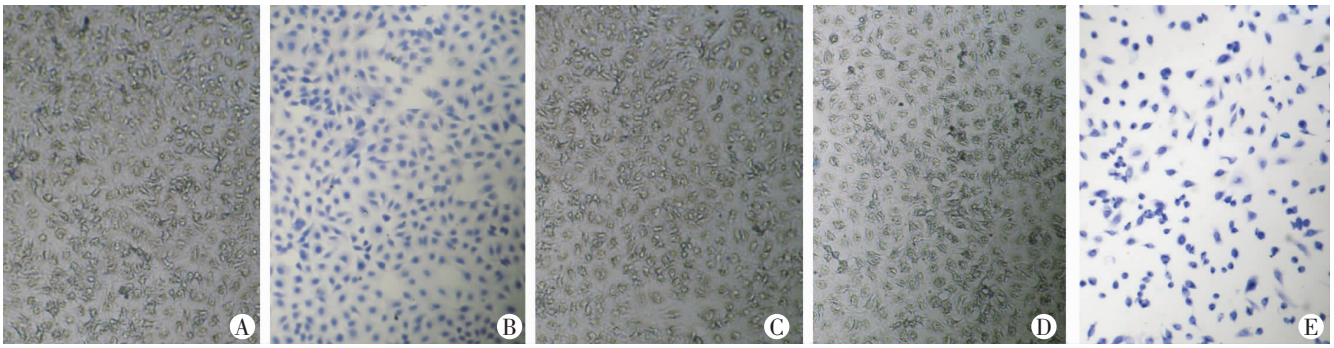
表 1 不同时间内 PEI/ASODN 对 A549 细胞生长的抑制作用（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	24 h		48 h		72 h		96 h	
	D(492)	抑制率(%)	D(492)	抑制率(%)	D(492)	抑制率(%)	D(492)	抑制率(%)
空白对照组	0.179 ± 0.017	–	0.278 ± 0.016	–	0.463 ± 0.016	–	0.592 ± 0.021	–
ASODN 组	0.173 ± 0.012	3.35	0.261 ± 0.023	3.96	0.438 ± 0.015	5.41	0.566 ± 0.016	4.39
PEI/SODN 组	0.178 ± 0.016	0.34	0.276 ± 0.017	0.62	0.462 ± 0.019	0.14	0.591 ± 0.024	0.11
PEI/ASODN 组	0.126 ± 0.026[a]	29.46	0.171 ± 0.016[a]	38.65	0.145 ± 0.015[a]	68.78	0.216 ± 0.016[a]	63.51

a：$P<0.05$，与空白对照组比较

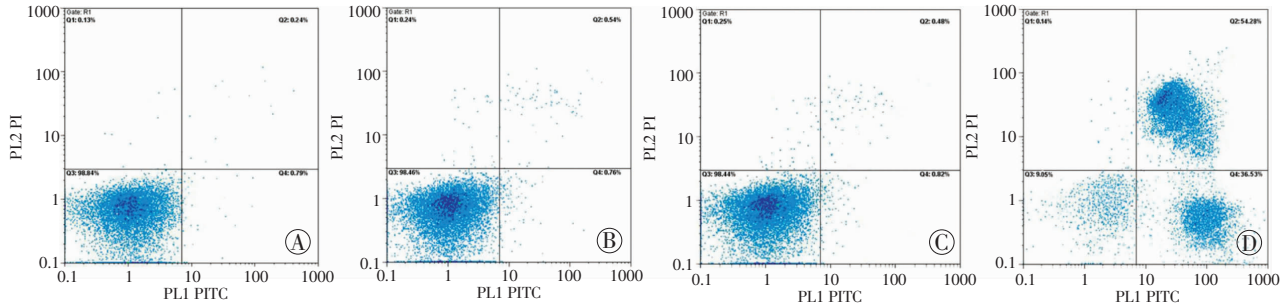
2.2 体内实验结果

除了在肾脏中各种形式的药物均有分布以外，其他组织中各种形式药物的靶向作用的强弱在动物体内药物组织分布中可以明显地体现出来。注射单纯 ASON 溶液组除了肾脏组织外，1、3、6 h 在各个组织中分布均较弱，组织切片中荧光强度均不强(图 5A)。把 ASON 制备成为 ASON/PEI 压缩体以后，组织分布中压缩体的含量略有增加，但是还没有达到理想的浓度，除了在肝脏中荧光强度增加较大外，其他组织中的荧光强度增加不大(图 5B)。在压缩体上加上靶向集团 DSPE-PEG-maleimid，当压缩体制备成成组装体以后在同等实验条件下各组织中的荧光强度均有所增加(图 5C)。当组装体通过半胱氨酸和 NGR 分子结合成为 ASON/PEI-PEG-NGR 组装体以后，可



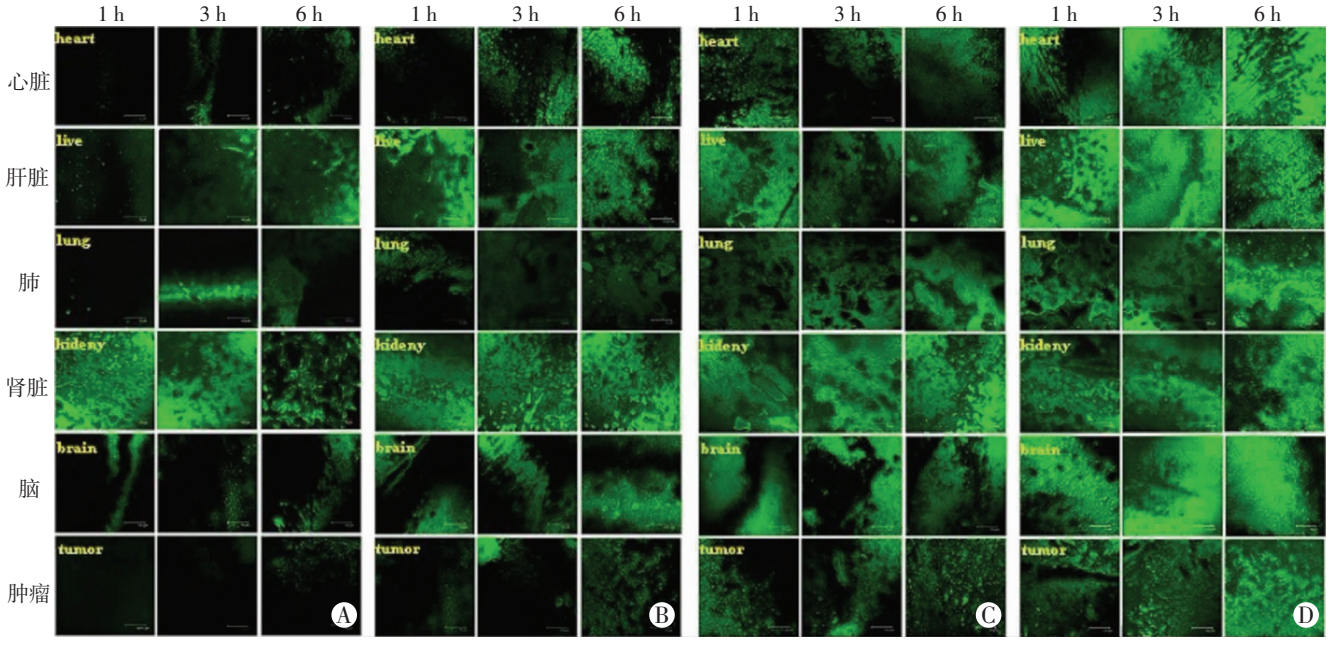
A：空白对照组；B：阴性对照组；C：ASODN 组；D：PEI/SODN 组；E：PEI/ASODN组

图 3 转染 72 h 后各组 hTERT 蛋白的表达 (S-P ×200)



A：空白对照组；B：ASODN 组；C：PEI/SODN 组；D：PEI/ASODN 组

图 4 流式细胞术双染色法检测细胞凋亡情况



A：注射 ASON 溶液组；B：注射 ASON/PEI 压缩体溶液组；C：注射 ASON/PEI-PEG 组装体溶液组；D：注射 ASON/PEI-PEG-CNGR 组装体溶液组

图 5 注射不同药物后 1、3、6 h 各组裸鼠各器官组织内药物分布

以看出各个组织中的荧光强度均较强(图 5D),尤其在肿瘤组织中,荧光强度变化尤为明显,随着加药时间的变化,组织切片中荧光强度呈增强的趋势,在加药 6 h 组中,荧光强度达到最大值。在脑部切片中可以看出随着 ASON 制剂的不同,脑部的荧光强度有很大的不同,说明其在脑中分布的数量也有很大的差异,通过荧光强度的不同,可以显示通过血脑屏障的 ASON/PEI 压缩体的数量,当 ASON 最终被制作成为 ASON/PEI-PEG-NGR 组装体以后,该实验组脑部切片的荧光强度最大,可以认为组装体对于携带 ASON 通过血脑屏障具有积极的意义。

3 讨论

有研究显示,约 85% 的恶性肿瘤组织中端粒酶活性表达阳性,而正常组织及良性病变组织中的端粒酶活性很低,约 4%[9]。近年来,hTERT 的结构和基因已被识别,hTERT 的转录调节主要发生在转录起始部至上游 181 bp 这个狭小的区域,故把这一区域称为核心启动子[10]。转录因子 c-myc 特异性的与 hTERT 启动子结合后可明显增加转录活性[11]。

FASODN 的细胞摄入实验结果表明 PEI/ASODN 组装体能够转染进入细胞内;MTT 检测,72 h 抑制率达到最高值,96 h 后 PEI/ASODN 对细胞的生长抑制作用依然在较高的水平,但是略有下降,可能是由于随着时间的延长 ASODN 被不断代谢失活,这些结果表明反义核酸的作用呈现时间依赖性,经过多次转染后,可增强其效应。RT-PCR 两步法检测结果显示转染 72 h 后端粒酶 hTERT mRNA 及其蛋白的表达均显著降低。正义寡核苷酸转染后,对细胞端粒酶的活性无明显的影响;流式细胞术双染色法检测结果显示,应用 PEI/ASODN 在体外对 A549 细胞转染 72 h 后,肿瘤细胞出现了明显的凋亡现象,且晚期凋亡率较早期凋亡明显,我们认为 hTERT ASODN 可能通过特异性的抑制 A549 的端粒酶活性,使端粒进行性缩短,破坏了其 DNA 的稳定性,从而导致 DNA 损伤启动凋亡程序,而正义对照组均无明显抑制作用及凋亡现象,实验表明 A549 肿瘤细胞系有很高的端粒酶活性。

有研究证实 NGR 多肽分子能有效地靶向转运病毒或抗肿瘤药物到肿瘤血管中[12]。本实验中体内实验表明:①压缩体对 ASON 具有明显的保护作用,可以阻止 ASON 被体内的各种生物酶降解,使部分 ASON 可以达到组织细胞中;②验证了当 ASON/PEI 压缩体加上 PEG 集团以后,可以提高纳米制剂的生物利用度,使更多的 ASON 纳米粒在其未达到半衰期之前进入细胞中起到抑制肿瘤的目的;③当 ASON/PEI-PEG 组装体通过半胱氨酸和 NGR 连接以后,可以更加有效地针对肿瘤细胞起效,使 ASON 浓集在肿瘤细胞中,发挥其抑瘤机制。结果表明:ASON/PEI-PEG-NGR 组装体可以较好地靶向肿瘤组织,在肿瘤组织中富集,体表现出了良好的靶向。

本实验结果也进一步证实了端粒酶逆转录酶基因与端粒酶活性密切相关,而由 PEI 介导能明显提高反义核酸的细胞摄入,从而使反义寡核苷酸的生物学作用更明显;NGR 修饰过的 ASON/PEI 组装体对动物体内肿瘤组织具有良好的靶向作用;hTERT 基因的反义寡核苷酸以序列特异性方式抑制其基因的表达,从而抑制端粒酶的活性,对肺腺癌细胞生长有明显的抑制作用。

参考文献:

[1] Shay J W. Telomerase therapeutics: telomeres recognized as a DNA damage signal[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(10 Pt 1): 3521 - 3525.

[2] Ohsako Y, Tsutsumi K, Li X, *et al*. Studies on RNA-protein interactions and enzyme activity by mutational analysis of telomerase[J]. Nucleic Acids Symp Ser (Oxf), 2007, (51): 419 - 420.

[3] Harley C B. Telomerase and cancer therapeutics[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(3): 167 - 179.

[4] Zhang J F, Wei F, Wang H P, *et al*. Potent anti-tumor activity of telomerase-dependent and HSV-TK armed oncolytic adenovirus for non-small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 20: 29 - 52.

[5] 冯飞雪, 夏海滨. 新生血管靶向肽 NGR 与肿瘤靶向治疗[J]. 生命的化学, 2011, 31(1): 27 - 30.

[6] 周天洋, 王瑾, 李惠翔, 等. 分枝型聚乙烯亚胺/寡核苷酸组装体的制备及细胞摄取研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(10): 766 - 770.

[7] 张新宇, 高燕宁. PCR 引物设计及软件使用技巧[J]. 生物信息学, 2004, 2(4): 15 - 18, 46.

[8] Zhou T, Jia X, Li H, *et al*. New tumor-targeted nanosized delivery carrier for oligonucleotides: characteristics *in vitro* and *in vivo*[J]. Int J Nanomedicine, 2011, 6: 1527 - 1534.

[9] Biroccio A, Leonetti C. Telomerase as a new target for the treatment of hormone-refractory prostate cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2004, 11(3): 407 - 421.

[10] Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, *et al*. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers[J]. Cancer Sci, 2008, 99(8): 1528 - 1538.

[11] 孟志强, 吴红梅, 陈震, 等. 干扰素对肝癌细胞端粒酶活性及 c-myc 蛋白的影响[J]. 上海医学, 2001, 24(3): 137 - 139.

[12] Jullienne B, Vigant F, Muth E, *et al*. Efficient delivery of angiostatin K1-5 into tumors following insertion of an NGR peptide into adenovirus capsid[J]. Gene Ther, 2009, 16(12): 1405 - 1415.

(**收稿**:2011-12-31;**修回**:2012-02-28)

(编辑 汪勤俭)