

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.04.012

· 基础研究 ·

聚酰胺树形分子-脂质体介导 survivin 反义寡核苷酸诱导肝癌细胞的凋亡

厉周¹, 方素珍¹, 韩帅¹, 崔大祥², 李强¹, 蔡寨¹, 朱卉娟¹, 黄宗海¹ (1. 南方医科大学珠江医院 普外科, 广东 广州 510282; 2. 上海交通大学微纳米科学技术研究院 生物纳米工程研究室, 上海 200030)

[摘要] **目的:**评价聚酰胺-胺型树枝状高聚合物 (polyamidoamine, PAMAM)-脂质体复合物作为 survivin 反义寡核苷酸 (survivin antisense oligonucleotide, survivin-asODN) 载体传递系统的可行性, 及其对人肝癌 SMMC-7721 细胞 survivin 表达、细胞凋亡的影响。**方法:**制备 PAMAM 与脂质体的复合物 (PAMAM-脂质体), 将 survivin-asODN 与 PAMAM-脂质体或 PAMAM 混合, 分别制备 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN。透射电镜观察复合物的形态、粒径; zeta 电位分析仪测定复合物的 zeta 电位; 离心法和紫外分光光度仪测定复合物的包封率、载药率。将 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 转染 SMMC-7721 细胞, 测定其转染率; Western blotting 检测转染后 SMMC-7721 细胞中 survivin 蛋白的表达; 流式细胞术检测 SMMC-7721 细胞的凋亡。**结果:**成功制备 PAMAM-脂质体、PAMAM-脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN。PAMAM-脂质体-survivin-asODN 粒径与 PAMAM-survivin-asODN 粒径无显著差异 [(189.33 ± 15.42) vs (181.83 ± 13.67) nm, $P > 0.05$], 包封率和载药率也无显著差异 ($P > 0.05$), 但 zeta 电位高于后者 [(42.83 ± 7.14) vs (32.33 ± 5.57) mV, $P < 0.05$], PAMAM-脂质体-survivin-asODN 转染 SMMC-7721 细胞的效率高于 PAMAM-survivin-asODN [(73.33 ± 9.29)% vs (60.67 ± 7.81)%, $P < 0.05$], 转染后 SMMC-7721 细胞中 survivin 蛋白的表达较低 (24.67 ± 11.74 vs 43.17 ± 11.63, $P < 0.05$), 但细胞凋亡率高于 PAMAM-survivin-asODN 组 SMMC-7721 细胞 [(73.31 ± 12.59)% vs (52.67 ± 12.19)%, $P < 0.05$]。**结论:**PAMAM-脂质体能将 survivin-asODN 高效递送到人肝癌 SMMC-7721 细胞, 诱导细胞凋亡。

[关键词] 聚酰胺-胺型树枝状高聚合物-脂质体; 反义寡核苷酸; 肝癌; survivin

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)04-0408-06

Survivin antisense oligonucleotide mediated by polyamidoaminedendrimer liposome induces apoptosis of hepatic cancer cells

LI Zhou¹, FANG Su-zhen¹, HAN Shuai¹, CUI Da-xiang², LI Qiang¹, CAI Zhai¹, ZHU Hui-juan¹, HUANG Zong-hai¹ (1. Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China; 2. Research Institute of Micro-nanometer Science & Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the possibility of polyamidoaminedendrimer (PAMAM)-liposome for survivin antisense oligonucleotide (survivin-asODN) delivery system and explore the effects of PAMAM-liposome-survivin-asODN on survivin expression and apoptosis of human hepatic cancer cell line SMMC-7721. **Methods:** The liposome modified PAMAM (PAMAM-liposome) was synthesized with liposome and PAMAM. Survivin-asODN was combined with the PAMAM-liposome or PAMAM to form PAMAM-liposome-survivin-asODN or PAMAM-survivin-asODN complexes. The shape and size of the two complexes were observed under a transmission electron microscope and their zeta potentials were measured with a zeta analytical tool. The encapsulating efficiency and DNA loading level were determined by ultraviolet spectrophotometer using a centrifuging method. PAMAM-liposome-survivin-asODN and PAMAM-survivin-asODN were transfected into SMMC-7721 cells, and the transfection efficiency was measured. The protein expression of survivin in SMMC-7721 cells

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目 (No. 9151051501000071)。Project supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 9151051501000071)

[作者简介] 厉周 (1967 -), 男, 浙江省义乌市人, 博士, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 主要从事胃肠道肿瘤的临床及基础研究。E-mail: lee Zhou888@yahoo.com.cn

[通信作者] 黄宗海 (HUANG Zong-hai, corresponding author), E-mail: Dr HuangZh@yahoo.com.cn

was measured by Western blotting, and the apoptosis of SMMC-7721 cells was assessed by flow cytometry. **Results:** PAMAM-liposome, PAMAM-liposome-survivin-asODN and PAMAM-survivin-asODN were successfully established. No significant difference appeared in diameter between PAMAM-liposome-survivin-asODN and PAMAM-survivin-asODN ($[189.33 \pm 15.42]$ vs $[181.83 \pm 13.67]$ nm, $P > 0.05$), as well as the encapsulating efficiency and drug loading level, but the zeta potential of PAMAM-liposome-survivin-asODN was higher than that of PAMAM-survivin-asODN ($[42.83 \pm 7.14]$ vs $[32.33 \pm 5.57]$ mV, $P < 0.05$). The transfection efficiency of PAMAM-liposome-survivin-asODN was higher than that of PAMAM-survivin-asODN ($[73.33 \pm 9.29]\%$ vs $[60.67 \pm 7.81]\%$, $P < 0.05$) in SMMC-7721 cells. The expression of survivin protein in SMMC-7721 cells of PAMAM-liposome-survivin-asODN group was less than that of PAMAM-survivin-asODN group (24.67 ± 11.74 vs 43.17 ± 11.63 , $P < 0.05$), while the apoptosis rate was higher than that of PAMAM-survivin-asODN ($[73.31 \pm 12.59]\%$ vs $[52.67 \pm 12.19]\%$, $P < 0.05$). **Conclusion:** The PAMAM-liposome can delivery survivin-asODN into SMMC-7721 cells effectively and induce SMMC-7721 cell apoptosis.

[**Key words**] polyamidoaminodendrimer liposome; antisense oligonucleotide; hepatic cancer; survivin

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(4): 408-413]

原发性肝癌是我国常见的消化系统肿瘤,手术、化疗及介入治疗对晚期或复发的肝癌疗效有限,基因治疗已成为继传统疗法之后一种具有良好应用前景的治疗新措施。基因治疗的重要目标是遗传物质在转导细胞中的持久整合及稳定地表达,因此除目的基因外,载体的选择及基因转染途径也是关键因素^[1]。Survivin 基因是迄今发现的最强的凋亡抑制因子,在胚胎组织和恶性肿瘤组织中表达,在正常组织中不表达^[2],survivin 在癌组织中的表达与恶性肿瘤的侵袭性、预后、肿瘤供血等有一定关系。采用反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, asODN)等方法可以抑制 survivin 的表达,从而诱导肿瘤细胞的凋亡、抑制细胞增殖并增强对化疗药物的敏感性,具有良好的靶向性、特异性和安全性^[3]。目前针对 survivin 在恶性肿瘤治疗中的研究仍存在基因载体转染效率低下、不能长期稳定表达、易被酶降解等难题^[4]。聚酰胺-胺型树枝状高聚合物(polyamidoamine, PAMAM)是一种新型的纳米材料,其表面的氨基基团可与带负电荷的 DNA 形成纳米级复合物,并能有效地保护 DNA 免遭核酸酶的降解,是较理想的基因递送载体^[5]。虽然实验^[6-7]表明, PAMAM 比其他阳离子载体的基因转染效率高,但仍达不到理想的要求。因此,通过添加其他的转染试剂提高 PAMAM 转染效率是当前研究的热点^[8]。AsODN 是一段人工合成的寡核苷酸链,通过 Watson-Crick 氢键或 Hoogsteen 氢键与特定的 mRNA 或 DNA 结合后,可封闭和抑制特定基因的表达^[9],是一种比较有效的基因治疗手段^[10]。本实验中制备了 PAMAM-脂质体作为载体材料,递送 survivin-asODN,观察 PAMAM-脂质体的表征、转染活性及其转染 survivin-asODN 对人肝癌细胞 SMMC-7721 的

体外诱导凋亡作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人肝癌细胞株 SMMC-7721 购自中科院上海细胞所,兔抗人 survivin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,碘化丙啶购自美国 Sigma 公司, DOTAP(1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropane, 1,2-二油酰基-3-三甲胺丙烷)、DOPE(dioleoylphosphatidyl ethanolamine, 二油酰基磷酸基乙醇胺)购自美国 Sigma 公司, Western blotting 试剂盒购自博士德公司。Survivin-asODN 由上海生工公司合成,序列为:5'-CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG-3',每端 5 个磷酸碱基采用硫代修饰,5'端以 FAM 标记。PAMAM 由上海交通大学微纳米研究院生物纳米工程研究室提供。

1.2 DOTAP/DOPE 脂质体的制备

在烧瓶中加入 6.986 mg DOTAP 和 7.44 mg DOPE,加入氯仿溶解,40 °C 恒温水浴,旋转蒸发器蒸发,真空抽吸 15 min,加入 40 °C 无菌水,再旋转蒸发器 30 min,取复合脂质超声处理 10 min,收集脂质体,4 °C 保存。

1.3 PAMAM-survivin-asODN 和 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 的制备

根据预试验找到最佳条件后,取 survivin-asODN 加入 TE 缓冲液中,配成 200 μg/L 的 A 溶液,混匀后置室温下孵育 10 min;然后取等量 TE 缓冲液,分别加入 PAMAM 和 DOTAP/DOPE 脂质体,分别配成浓度为 3.66 mg/L 的 B 液和 1.83 mg/L 的 C 液,混匀后置室温下孵育 10 min;将等体积 A 液和 B 液混合,得到 PAMAM-survivin-asODN。将等量 A、B 和 C 溶液混匀,得到 PAMAM-脂质体-survivin-asODN。

1.4 PAMAM-survivin-asODN 和 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 的形态、粒径与 zeta 电位测定

取少量 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 混悬液滴加在覆盖碳膜的铜网上, 自然干燥后用 2% 磷钨酸负染 2 min, 于透射电子显微镜下观察纳米粒形态并拍照。再取适量纳米粒混悬液, 加双蒸水稀释后用动态激光散射仪在波长 660 nm, 散射角为 90° 的条件下, 测定各转染复合物的粒径, 重复测定 6 次。用 zeta 电位分析仪测定 zeta 电位, 重复 6 次。

1.5 PAMAM-survivin-asODN 和 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 包封率的测定

取 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN, 离心后吸取上清液, 用紫外分光光度计于 260nm 处测定光密度值 (D), 按 $1D = 33 \mu\text{g}/\text{ml}$ 计算溶液中 DNA 浓度, 推算游离 DNA 的含量, 按下式计算各转染复合物包封率。包封率 (%) = (总 DNA 量 - 游离 DNA 量) / 总 DNA 量 $\times 100\%$ 。

1.6 PAMAM-survivin-asODN 和 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 载药率的测定

取 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 各 10 mg, 加入三氯甲烷充分溶解后, 再加入 TE 缓冲液, 振荡混匀 1 min, 静置分层后, 吸取上清液测光密度值, 推测出 DNA 含量, 方法同上。

1.7 PAMAM-survivin-asODN 和 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 转染 SMMC-7721 细胞效率的测定

将 SMMC-7721 细胞按 3×10^4 / 孔分别接种于 6 孔细胞培养板中, 设置 PAMAM-脂质体组和 PAMAM 组, 分别加入 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 200 μl 。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 继续培养 24 h 后, 倒置荧光显微镜定时观察细胞。48 h 后收集细胞用冷 PBS 洗涤 2 次, 制成单细胞悬液上流式细胞仪, 检测细胞染色率 α 和细胞内平均荧光强度 X , 计算细胞内荧光总强度 N ($N = \alpha \times X$), 每份标本分析 1×10^4 个细胞, 实验重复 5 次。

1.8 Western blotting 法检测转染后 SMMC-7721 细胞中 survivin 蛋白的表达

将 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 分别转染 SMMC-7721 细胞 24 h, 空白对照组加入血清培养基替代转染复合物, 48 h 后收集 5×10^6 个细胞, 提取胞质蛋白, 行 SDS-PAGE, 转膜后加入一抗 (兔抗人 survivin, 1:1 000) 和二抗 (羊抗兔 IgG/HRP, 1:4 000) 并显色, 凝胶图像分析仪分析 survivin 蛋白的表达。

1.9 流式细胞术检测转染后 SMMC-7721 细胞的凋亡率

分别以 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 处理 SMMC-7721 细胞 24 h, 空白对照组加入血清培养基, 继续培养 48 h, 收集 5×10^5 个细胞, 制备单细胞悬液, 加入 70% 乙醇/PBS 于 0 $^{\circ}\text{C}$ 固定, 贮存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。检测前以 PBS 重悬并洗涤细胞, 加入 RNA 酶 I 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 然后加入碘化丙啶 4 $^{\circ}\text{C}$ 染色, 用流式细胞术检测细胞凋亡率。

1.10 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件, 采用 t 检验及单因素方差分析 (组间多重比较应用 LSD 法)。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PAMAM-survivin-asODN 和 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 的形态、粒径及 zeta 电位

透射电镜观察 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 呈圆形或类圆形颗粒 (图 1), 两者粒径之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而前者的 zeta 电位高于后者的 zeta 电位 ($P < 0.05$, 表 1)。

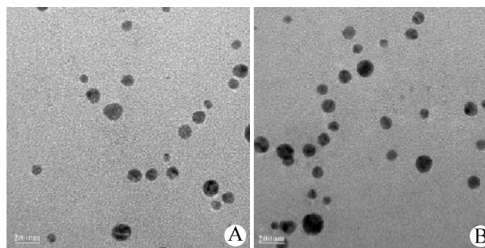


图 1 透射电镜观察 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 的形态 ($\times 12\ 000$)
Fig. 1 Shape of PAMAM-liposome-survivin-asODN and PAMAM-survivin-asODN detected under transmission electron microscope ($\times 12\ 000$)

A: PAMAM-liposome-survivin-asODN;

B: PAMAM-survivin-asODN

2.2 PAMAM-survivin-asODN 和 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 的包封率和载药率

实验结果显示, PAMAM-脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 之间包封率、载药率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

表1 PAMAM-survivin-asODN 和 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 的粒径、zeta 电位、包封率、载药率

Tab.1 Diameter, zeta potential, encapsulating efficiency and drug loading rate of PAMAM-survivin-asODN 和 PAMAM-liposome-survivin-asODN

Complex	Diameter (d/nm)	Zeta potential (V/mV)	Encapsulating efficiency (%)	Drug loading rate (%)
PAMAM-liposome-survivin-asODN	189.33 ± 15.42	42.83 ± 7.14	82.17 ± 5.71	4.22 ± 1.15
PAMAM-survivin-asODN	181.83 ± 13.67	32.33 ± 5.57	81.50 ± 9.69	4.30 ± 1.14
<i>t</i>	0.891	2.840	0.145	0.126
<i>P</i>	0.394	0.018	0.887	0.902

2.3 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 转染 SMMC-7721 细胞的效率

PAMAM-脂质体-survivin-asODN 与 PAMAM-survivin-asODN 转染 SMMC-7721 细胞 24 h 后, 荧光显微镜下观两种复合物在 SMMC-7721 细胞内均可见绿色荧光, PAMAM-survivin-asODN 转染的细胞内绿色荧光点与 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 转染的细胞内绿色荧光点特征一致(图 2)。但随着细胞培养时间增加, PAMAM-脂质体组发射绿色荧光的细胞数增加、强度增强, 48 h 可获得最高转染效率。流式细胞术检测细胞内荧光强度, PAMAM-脂质体组的荧光强度[(73.33 ± 9.29)%] 高于 PAMAM 组[(60.67 ± 7.81)%], 两者之间差异有统计学意义(P < 0.05)。由此可见, PAMAM-脂质体-survivin-asODN 的转染效率高于 PAMAM-survivin-asODN。

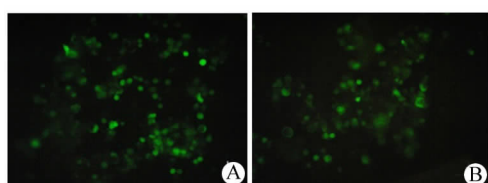


图2 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 转染 SMMC-7721 细胞的效率(×200)

Fig. 2 Transfection efficiency of PAMAM-liposome-survivin-asODN in SMMC-7721 cells(×200)

A: PAMAM-survivin-asODN;

B: PAMAM-liposome-survivin-asODN

2.4 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 转染对 SMMC-7721 细胞 survivin 蛋白表达的影响

空白对照组的 SMMC-7721 细胞 survivin 蛋白的表达为(79.67 ± 8.85), PAMAM-脂质体-survivin-asODN 组和 PAMAM-survivin-asODN 组 SMMC-7721 细胞 survivin 蛋白的表达分别为(24.67 ± 11.74)和(43.17 ± 11.63), 两者均低于空白对照组(P <

0.01), 且 PAMAM-脂质体组 survivin 蛋白的表达低于 PAMAM 组(P < 0.05, 图 3)。由此可见, PAMAM-脂质体-survivin-asODN 转染可降低 survivin 蛋白在 SMMC-7721 细胞中的表达, 其效果优于 PAMAM-survivin-asODN。

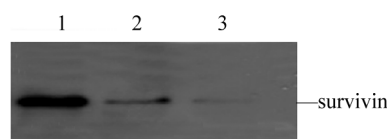


图3 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 转染抑制 SMMC-7721 细胞中 survivin 蛋白的表达

Fig. 3 PAMAM-liposome-survivin-asODN transfection inhibited expression of survivin protein in SMMC-7721 cells

1: Control; 2: PAMAM survivin-asODN;

3: PAMAM-liposome-survivin-asODN

2.5 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 转染对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测 SMMC-7721 细胞凋亡率, 与空白对照组比较, PAMAM 组-survivin-asODN 和 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 组 SMMC-7721 细胞凋亡率显著增高[(52.67% ± 12.19)%、(73.31% ± 12.59)% vs (3.83% ± 2.48)%], P < 0.01, 且 PAMAM-脂质体组 SMMC-7721 细胞凋亡率高于 PAMAM 组(P < 0.05)。由此可见, PAMAM-脂质体-survivin-asODN 转染较 PAMAM-survivin-asODN 可明显促进 MC-7721 细胞的凋亡。

3 讨论

肿瘤的基因治疗是应用遗传工程的方法, 将目的基因导入患者肿瘤细胞内, 使其在细胞内得到一定的表达, 产生基因表达产物, 杀死或诱导肿瘤细胞凋亡^[11]。Survivin 是最强的凋亡抑制因子, 只在胚胎和恶性肿瘤组织中表达, 而在癌旁正常组织和成

人正常分化组织中并不表达^[12]。AsODN 能与特定的 DNA 或 RNA 以碱基互补配对的方式结合, 并阻止其转录和翻译^[9]。应用 survivin-asODN 可以诱导肿瘤细胞凋亡, 而对正常组织几乎没有影响, 具有良好的靶向性、特异性及安全性^[13]。

载体的选择是基因治疗的关键之一, 与传统非病毒载体以及其他阳离子聚合物相比, PAMAM 作为基因载体, 基因转染效率较高^[14-15], 但仍达不到理想的要求。脂质体是由连续的双层或多层复合脂质组成的人工小球囊。借助超声处理使复合脂质在水溶液中膨胀, 即可形成脂质体。它可以捕获树形分子, 将它们更有效地运送到靶细胞, 经细胞融合而释放^[16]。PAMAM 是一种人工合成的高度支化、尺寸均一、球形单分散的纳米级大分子(分子直径为 2~10 nm), 其表面高密度胺基团在生理 pH 下带正电荷, 可与 DNA 或寡核苷酸上磷酸基团负电荷发生静电作用, 形成纳米载体与 DNA 的复合物, 协助基因进入细胞^[17]。因此, 通过在 PAMAM 中添加其他的转染试剂增加 PAMAM 运载基因的能力是一种可行的方法。本研究在 PAMAM 中加入 DOTAP/DOPE 脂质体, 形成 PAMAM-脂质体, 期望通过在 PAMAM 表面形成一层脂质层, 增加载体分子的 zeta 电位和疏水性, 最终达到提高细胞摄入的效果。

DNA 纳米复合物的粒径大小、疏水性和 zeta 电位是影响细胞摄入纳米复合物的三个重要因素。粒径小的纳米复合物有利于通过细胞胞吞和胞饮作用进入细胞, 提高转染效率^[16]; 转染复合物疏水性高有利于与细胞相互融合, 促进复合物进入细胞^[18]; 微粒的正性 zeta 电位增高, 能够增强与带负电荷的细胞膜之间的静电作用, 从而促进纳米复合物的摄入^[19-20]。本研究制备的 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 与 PAMAM-survivin-asODN 之间的粒径无明显差异, 而 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 的 zeta 电位高于 PAMAM-survivin-asODN; 这是由于 PAMAM 表面覆盖了一层脂质膜, 增加了疏水作用力, 进一步增强了 PAMAM 与 survivin-asODN 的相互作用, 使 PAMAM 对 survivin-asODN 的压缩效果更为明显, 最终形成的复合物的粒径虽没有明显改变; 但同时加入带正电荷的脂质体, 使 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 复合物的 zeta 电位较 PAMAM 增高。通过流式细胞术检测, 发现 PAMAM-脂质体组细胞对 survivin-asODN 的摄入量明显高于 PAMAM 组。

本研究发现, PAMAM-脂质体-survivin-asODN 和 PAMAM-survivin-asODN 转染 SMMC-7721 细胞后, 与空白对照组比较, survivin 蛋白在 SMMC-7721 细

胞内的表达降低, 表明它们均具有携带 survivin-asODN 进入肝癌细胞的能力, 并能有效封闭 survivin 蛋白的表达; 此外, PAMAM-脂质体转染组的 survivin 蛋白表达明显低于 PAMAM 转染组, 这可能与 PAMAM-脂质体对基因的转染效率较高有关。通过流式细胞仪检测 SMMC-7721 细胞的凋亡率, 发现与空白对照组比较, PAMAM-脂质体-survivin-asODN 组和 PAMAM-survivin-asODN 组 SMMC-7721 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$); 且 PAMAM-脂质体组 SMMC-7721 细胞凋亡率低于 PAMAM 组 ($P < 0.05$)。

本研究发现, PAMAM-脂质体与 PAMAM 均可作为 survivin-asODN 的转染载体, PAMAM-脂质体-survivin-asODN 与 PAMAM-survivin-asODN 的粒径无显著差异, 但 PAMAM-脂质体-survivin-asODN 的疏水性强, zeta 电位高, 所以具有较高的转染效率, 并能通过 survivin-asODN 更有效地下调 survivin 基因的表达, 诱导 SMMC-7721 细胞的凋亡。因此, 利用 PAMAM-脂质体作为 survivin-asODN 的转染载体, 作用于 SMMC-7721 细胞可获得良好的疗效。

[参考文献]

- [1] Majoros U, Thomas TP, Mehta GB, et al. Poly(amidoamine) dendrimer-based multifunctional engineered nanodevice for cancer therapy [J]. J Med Chem, 2005, 48(19): 5892-5899.
- [2] Mognetti B, Barberis A, Marino S, et al. Survivin gene expression in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma [J]. Hepatogastroenterology, 2007, 54(79): 2040-2044.
- [3] Delvaeye M, De Vriese A, Zwerts F, et al. Role of the 2 zebrafishsurvivin genes in vasculo-angiogenesis, neurogenesis, cardiogenesis and hematopoiesis [J]. BMC Dev Biol, 2009, 9: 25.
- [4] Yue Z, Carvalho A, Xu Z, et al. Deconstructing Survivin: Comprehensive genetic analysis of survivin function by conditional knockout in a vertebrate cell line [J]. J Cell Biol, 2008, 183(2): 279-296.
- [5] Pan B, Cui D, Sheng Y, et al. Dendrimer-modified magnetic nanoparticles enhance efficiency of gene delivery system [J]. Cancer Res, 2007, 67(17): 8156-8163.
- [6] Lee CC, John AM, Jean MJ, et al. Designing dendrimers for biological applications [J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(12): 1517-1526.
- [7] Dufes C, Uchegbu IF, Schatzlein AG. Dendrimers in gene delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57(15): 2177-2202.
- [8] Byrappa K, Ohara S, Adschiri T. Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology-towards biomedical applications [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(3): 299-327.
- [9] Surendiran A, Sandhiya S, Pradhan S, et al. Novel applications of nanotechnology in medicine [J]. Indian J Med Res, 2009, 130(6): 689-701.

- [10] Glodde M, Sirsi SR, Lutz GJ. Physicochemical properties of low and high molecular weight poly(ethylene glycol)-grafted poly(ethylene imine) copolymers and their complexes with oligonucleotides [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(1): 347-356.
- [11] Millan A, Huerta S. Apoptosis-inducing factor and colon cancer [J]. *J Surg Res*, 2009, 151(1): 163-170.
- [12] Zhang M, Guo R, Wang Y, et al. Multifunctional dendrimer/combrastatin A4 inclusion complexes enable *in vitro* targeted cancer therapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 2337-2349.
- [13] Prabha S, Zhou WZ, Panyam J, et al. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: Studies with fractionated nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2002, 244(1/2): 105-115.
- [14] 厉周, 黄宗海, 姚航, 等. 聚酰胺树形分子递送 survivin 反义寡核苷酸诱导结肠癌细胞凋亡的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26(5): 612-614.
- [15] 厉周, 黄宗海, 崔大祥, 等. 聚酰胺-胺型树枝状高聚合物介导 survivin 反义寡核苷酸抑制结肠癌裸鼠皮下移植瘤生长的作用 [J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(11): 1935-1938.
- [16] Samadikhah HR, Majidi A, Nikkiah M, et al. Preparation, characterization, and efficient transfection of cationic liposomes and nanomagnetic cationic liposomes [J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 2275-2283.
- [17] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nature Med*, 1997, 3(8): 917-921.
- [18] Thomas TP, Patri AK, Mye A, et al. *In vitro* targeting of synthesized antibody-conjugated dendrimer nanoparticles [J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(6): 2265-2274.
- [19] Huang M, Khor E, Lim LY. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: Effects of molecular weight and degree of deacetylation [J]. *Pham Res*, 2004, 21(2): 344-353.
- [20] Venson S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 71(3): 445-462.
- [收稿日期] 2012-03-18 [修回日期] 2012-05-26
[本文编辑] 王莹

· 撤稿声明 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部接举报电话,本刊2012年第1期发表的王继承等人的论文“阻断诱导型共刺激分子信号通路对小鼠急性移植物抗宿主病的影响”涉嫌抄袭其他课题组研究成果。接到举报后本刊编辑部十分重视,组成经调查后发现,上海海军医学研究所工作人员包晓辰在其博士研究生导师不知情的情况下,擅自将其攻读博士学位期间的研究成果以海口187医院呼吸内科王继承的名义发表,此举涉嫌学术不端。鉴于上述事实,《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部特作如下论文撤销声明:

(1) 在本刊纸质版和网络版上撤销此论文:王继承,朱其聪. 阻断诱导型共刺激分子信号通路对小鼠急性移植物抗宿主病的影响. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(1): 56-60。

(2) 本刊今后不再受理包晓辰和王继承署名的任何稿件。

(3) 本刊编辑部向著作权受侵害者及广大读者致以歉意,并请广大读者停止引用该论文。

(4) 本刊编辑部对需单位介绍信录用稿件等规章制度执行不严的问题进行了全面整改,并对相关人员作了严肃处理。编辑部将以此为戒,进一步严格规范化管理,加强对学术不端行为的严格审查和坚决抵制。

《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部
2012-07-30

· Retraction Note ·

Retraction: “Effect of blocking inducible costimulatory signaling pathway on mouse model of acute-graft-versus host disease”

The editorial office of *Chin J Cancer Biother* received a prosecute that the article titled “Effect of blocking inducible costimulatory signaling pathway on mouse model of acute-graft-versus host disease. WANG Ji-cheng, ZHU Qi-chong. *Chin J Cancer Biother*, 2012, 19(1): 56-60”, was suspected of plagiarism. After further investigation, it was found that, without the knowledge of her doctoral tutor, Bao Xiao-chen from Shanghai Institute of Naval Medicine published her doctoral research findings in the name of Wang Ji-cheng from the Department of Respiratory Medicine, No. 187 Hospital in Haikou, which was considered as an academic misconduct. In view of these facts, the editorial office of *Chin J Cancer Biother* decided to retract this article in full.

Editorial office of *Chin J Cancer Biother*
2012-07-30