

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.009

· 基础研究 ·

PAMAM-NK4 纳米复合物对乳腺癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用

延艳¹, 刘民锋^{1▲}, 孙世强¹, 刘润奇², 董建宇¹, 郭昭泽¹, 郭婧昀¹, 王恒雨¹, 叶长生¹, 李文姬¹(1. 南方医科大学 南方医院 乳腺科, 广东 广州 510515; 2. 东莞市人民医院 乳腺科, 广东 东莞 523000)

[摘要] **目的:** 探讨新型纳米材料聚酰胺-胺型树枝状高聚合物(polyamidoamine dendrimer, PAMAM)介导 NK4 基因对乳腺癌 MDA-MB-231、MCF-7 细胞生长的抑制作用及对 MDA-MB-231 细胞移植瘤裸鼠模型的治疗作用。**方法:** 制备 PAMAM-NK4 纳米复合物颗粒, 纳米复合物和空载体 PAMAM 分别转染 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞作为实验组和对照组。MTT 实验、Western blotting 和流式细胞术分别检测转染 PAMAM-NK4 对细胞增殖、NK4 蛋白表达和细胞凋亡的影响。40 只雌性裸鼠经皮下注射建立 MDA-MB-231 细胞移植瘤裸鼠模型, 随机分成 4 组, 每组 10 只裸鼠: 空白组肿瘤接种部位旁皮下注射 0.2 ml 0.9% NaCl 溶液、空载体组注射 0.2 ml 含 100 μ g PAMAM-LacZ 质粒的溶液、给药组注射 0.2 ml 含 100 μ g PAMAM-NK4 质粒的溶液、阳性对照组腹腔注射 0.2 ml 多柔比星(100 μ g)溶液。连续注射 7 d, 第 30 天处死裸鼠, 完整摘除肿瘤, 测量肿瘤体积和质量。Western blotting 检测各组移植瘤组织 NK4 蛋白表达。**结果:** PAMAM-NK4 纳米粒转染 MDA-MB-231、MCF-7 细胞后能够稳定表达 NK4 蛋白、抑制细胞增殖和增加细胞凋亡率。成功建立 MDA-MB-231 细胞移植瘤裸鼠模型, 给药组和阳性对照组肿瘤体积及质量显著低于空白组($P < 0.05$), 且安全性良好; 给药组 NK4 蛋白表达显著高于空白组($P < 0.05$)。**结论:** PAMAM-NK4 纳米粒对乳腺癌 MDA-MB-231、MCF-7 细胞生长具有抑制作用, 并对人乳腺癌细胞移植瘤裸鼠模型具有治疗作用。

[关键词] 聚酰胺-胺型树枝状高聚合物; NK4 基因; 乳腺癌; 基因治疗

[中图分类号] R737.9; R73-36⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)02-0206-06

Inhibitory effect of PAMAM-NK4 nanocomposite on the growth of breast cancer xenografts in nude mice

YAN Yan¹, LIU Minfeng^{1▲}, SUN Shiqiang¹, LIU Runqi², DONG Jianyu¹, GUO Zhaoze¹, GUO Jingyun¹, WANG Hengyu¹, YE Changsheng¹, LI Wenji¹(1. Department of Galactophore, Nanfang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China; 2. Department of Galactophore, the People's Hospital of Dongguan City, Dongguan 523000, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the inhibitory effect of polyamidoamine dendrimer (PAMAM)-mediated NK4 gene on the growth of breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7, and its therapeutic effect on MDA-MB-231 cell transplantation tumor in nude mouse model. **Methods:** PAMAM-NK4 nanoparticles and blank plasmids were prepared and respectively transfected into MDA-MB-231 and MCF-7 cells as the experiment group (PAMAM-NK4 group) and the control group (PAMAM group). MTT, Western blotting and flow cytometry assays were used to examine effect of the PAMAM-NK4 transfection on proliferation of the cells, expression of NK4 protein and apoptosis of the cells, respectively. Forty female nude mice were subcutaneous injected with human breast cancer MDA-MB-231 cell to establish nude mouse model with the xenograft tumor. The mice were randomly divided into 4 groups with 10 mice in each. Mice of the blank control group were subcutaneously injected with 0.2 ml of 0.9% NaCl surrounding the xenograft tumor, those of the blank plas-

[基金项目] 广东省科技计划资助项目(No. 2013B010404023)。Project supported by the Science and Technology Planning Programe of Guangdong Province (No. 2013B010404023)

[作者简介] 延艳(1991-),女,河南省驻马店市人,硕士生,主要从事乳腺肿瘤的防治研究,E-mail: triples_yy@163.com;刘民锋(1973-),男,安徽省合肥市人,博士,主治医师,主要从事乳腺肿瘤的基础和临床研究,E-mail: matthewliu007@163.com。▲为共同第一作者

[通信作者] 李文姬(LI Wenji, corresponding author),E-mail: liwenji1979@163.com;叶长生(YE Changsheng, co-corresponding author),E-mail: yechsh2006@126.com

mid group with 0.2 ml of plasmid solution containing 100 μg PAMAM-LacZ, those of the PAMAM-NK4 group with 0.2 ml of plasmid solution containing 100 μg PAMAM-NK4 and those of the positive control group with 0.2 ml of solution containing 100 μg adriamycin, respectively. All of the nude mice were continuously injected for 7 d and then sacrificed on 30th day. The xenograft tumors were removed completely to measure their weights and sizes. Expressions of the NK4 protein in the xenograft tissues were detected by Western blotting assay. **Results:** The transfection of PAMAM-NK4 nanocomposites, could result in stable expression of the NK4 protein, and inhibition of the cell proliferation and promotion of the cell apoptosis. The nude mouse models with human breast carcinoma xenografts were successfully constructed. The volumes and weights of the carcinoma xenografts in the PAMAM-NK4 and the positive control groups were significantly smaller than those in the blank control group ($P < 0.05$) with a fairly good safety. The expression of NK4 protein in the PAMAM-NK4 group significantly increased, comparing with that in the blank control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** PAMAM-NK4 nanocomposites could inhibit growth of the breast cancer MDA-MB-231 and MCF-7 cells, and have therapeutic effect on the human breast carcinoma xenografts in nude mouse model.

[**Key words**] polyamidoamine dendrimer (PAMAM); NK4 gene; breast cancer; genetic therapy

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(2): 206-211. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.009]

随着对乳腺癌相关基因和发病机制研究的不断深入,乳腺癌基因治疗已成为研究的热点。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)通过与受体 c-Met(c-metprotoncogene)结合发挥诱导上皮细胞侵袭和新生血管生成等作用,促进肿瘤组织发生、发展^[1-2]。NK4 由 HGF α 链 N 末端的 447 个氨基酸和 4 个 Kringle 区域构成,和 HGF 具有共同抗原部分,最早作为 HGF 的特异性拮抗剂被发现^[3-5];其能通过竞争性抑制 HGF-cMet 通路以及新生血管生成,抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭与转移,已被证实包括乳腺癌的多种实体瘤中具有显著的抗肿瘤作用^[6-11]。要把目的基因成功转染到肿瘤细胞内,载体的选择至关重要^[12]。本实验选取第 5 代新型纳米材料聚酰胺-胺型树枝状高聚合物(polyamidoamine dendrimer, PAMAM),除了具有非病毒型载体的共同优点外,还具有稳定性强、转染率高、安全性好的特点^[13-14]。本研究通过构建 PAMAM-NK4 纳米复合物,将目的基因 NK4 转染到乳腺癌细胞,观察其体外对乳腺癌细胞的作用,并建立人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞裸鼠肿瘤模型,观察 PAMAM-NK4 体内的抑瘤效果,为乳腺癌基因治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人乳腺癌 MDA-MB-231、MCF-7 细胞株购自上海细胞生物研究所。BALB/c-nu/nu 小鼠(雌性, 4~6 周龄,体质量 14~19 g)购自南方医科大学实验动物中心,实验动物合格证号:SCXK-粤 2011-0015。

pcDNA3.1-NK4 质粒由南方医科大学肿瘤研究所保存。胰蛋白酶、MTT、DMEM 和 PAMAM(G5.0) 均购自美国 Sigma 公司,细胞裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司,胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司,多柔比星购自深圳万乐药业有限公司,批号 0209E2。NK4 一抗(人 HGF 单抗)、HRP 标记的兔抗鼠二抗均购自美国 Leinco 公司,ECL 发光试剂盒购自美国 Thermo Pierce 公司,BCA 蛋白定量分析试剂盒购自上海玉博生物技术有限公司,Annexin V-FITC 凋亡试剂盒、碘化丙啶(propidium iodide, PI)均购自南京凯基生物公司。

1.2 PAMAM-NK4 纳米粒制备

将第 5 代 PAMAM 和重组质粒 pcDNA3.1-NK4 按照氮磷比(N:P)5:1 的比例置于 PBS 溶液中^[14],震荡混合 15 s,室温下静置 30 min。

1.3 空载体或纳米粒转染 MDA-MB-231 和 MCF-7 株乳腺癌细胞

MDA-MB-231、MCF-7 细胞接种于 6 孔培养板(1×10^5 个/孔),细胞生长至 50%~70% 汇合时,PBS 洗涤 2 次。将空载体 PAMAM 和纳米粒 PAMAM-NK4 分别用等量无血清 DMEM 培养基稀释成 100 nmol/L 的悬液,各取 2 ml 悬液分别转染细胞,于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养。4 h 后更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,继续培养 24 h。实验重复 3 次。

1.4 MTT 检测 PAMAM-NK4 转染对乳腺癌细胞增殖的影响

将对数生长期的转染了 PAMAM-NK4 的 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞接种于 96 孔板(5×10^4 个/孔),分为对照组(未转染组)、空载体组(PAMAM 空

载体转染组)和实验组(PAMAM-NK4 纳米粒转染组),每组 5 个复孔,分别加入 40 μ l MTT 溶液,培养 4 h 后弃上清液。加入 150 μ l DMSO,震荡 10 min。另设空白孔(培养基 + DMSO),以空白孔调零,在酶联免疫检测仪上测定波长 570 nm 处各孔光密度(D)值,比较两组细胞增殖能力的差异。增殖抑制率(%)=(1-实验组 D 值/对照组 D 值) $\times$ 100%。

1.5 Western blotting 检测 PAMAM-NK4 转染对乳腺癌细胞 NK4 蛋白表达的影响

取对数期对照组、空载体组和实验组细胞,用细胞裂解液提取细胞蛋白样品,用 BCA 法在酶标仪上测定各样品的蛋白浓度。样品经 SDS-PAGE 分离、转膜和封闭后,依次加入 NK4 一抗(人 HGF 单抗)、HRP 标记的二抗,洗膜 3 次后 ECL 化学发光试剂盒显影。扫描胶片,以 β -actin 为内参,用 IPP6.0 软件分析条带的灰度值。实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测 PAMAM-NK4 转染对乳腺癌细胞凋亡的影响

分别取对照组、空载体组和实验组细胞悬液,按照 1×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板,培养 3 h 后弃培养液,PBS 冲洗 2 次,收集细胞,加入适量 Annexin V-FITC 和 PI 避光室温孵育 15 min,流式细胞仪分析各组细胞凋亡率。

1.7 构建人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞移植瘤裸鼠模型

取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,胰酶消化后用无血清培养基重悬成 5×10^7 /ml 的细胞悬液,在裸鼠右侧第二乳头脂肪皮下注射 0.2 ml 细胞悬液,共接种 40 只裸鼠。接种后,每 2 d 观察并测量肿瘤结节生长情况,第 7 天后每天观察。用游标卡尺测量并记录瘤体长径(a)和短径(b),计算肿瘤体积(V)。 $V = ab^2/2$ 。

1.8 监测 PAMAM-NK4 对荷瘤鼠模型肿瘤生长的影响

将荷瘤鼠随机分为 4 组,每组 10 只。空白组:肿瘤接种部位旁皮下注射 0.2 ml 0.9% 氯化钠溶液;空载体组:肿瘤接种部位旁皮下注射 0.2 ml 质粒溶液,含 100 μ g 空载体 PAMAM-LacZ;给药组:肿瘤接种部位旁皮下注射 0.2 ml 质粒溶液,含 100 μ g PAMAM-NK4;阳性对照组:腹腔注射 0.2 ml 多柔比星溶液,含 100 μ g 多柔比星。于细胞接种第 7 天开始,连续注射 7 d。观察荷瘤鼠存活状态及肿瘤生长情况,记录各组荷瘤鼠死亡数。每天记录并计算肿瘤体积。第 30 天处死荷瘤鼠,完整摘除肿瘤,测量肿瘤直径及质量,计算肿瘤体积。

1.9 Western blotting 检测 PAMAM-NK4 对移植瘤组织 NK4 蛋白表达的影响

分别取 4 组移植瘤组织各 0.2 g,剪碎后在裂解液中磨匀,离心后吸取上清,测细胞蛋白浓度。Western blotting 检测各组移植瘤组织 NK4 蛋白的表达,方法同 1.5。

1.10 统计学处理

用 SPSS 19.0 统计软件处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用多元方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PAMAM-NK4 转染抑制人乳腺癌细胞增殖

MTT 检测结果(图 1)显示,空载体组和对数期细胞的增殖能力无显著差异;与对照组相比,转染了 PAMAM-NK4 的 MDA-MB-231[(0.27 ± 0.06) vs (0.54 ± 0.06)],MCF-7[(0.30 ± 0.05) vs (0.43 ± 0.05)]细胞 D 值均显著下降(均 $P < 0.05$),且 MDA-MB-231 细胞的抑制率显著高于 MCF-7 细胞(50.4% vs 30.6%)($P < 0.05$)。

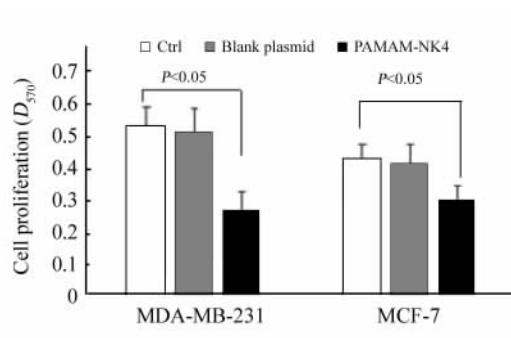


图 1 转染 PAMAM-NK4 抑制人乳腺癌细胞的增殖

Fig.1 Proliferation of human breast cancer cells inhibited by PAMAM-NK4 transfection

2.2 PAMAM-NK4 转染提高人乳腺癌细胞 NK4 蛋白表达

Western blotting 检测结果(图 2)显示,对照组和空载体组细胞蛋白表达带均为内源性 NK4 蛋白。对照组和空载体组 MDA-MB-231 细胞内源性 NK4 蛋白表达水平均高于相应 MCF-7 细胞,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验组 MDA-MB-231[(2.26 ± 0.02) vs (0.88 ± 0.03)]和 MCF-7[(1.26 ± 0.01) vs (0.35 ± 0.01)]细胞 NK4 蛋白表达均显著高于对照组($P < 0.05$)。

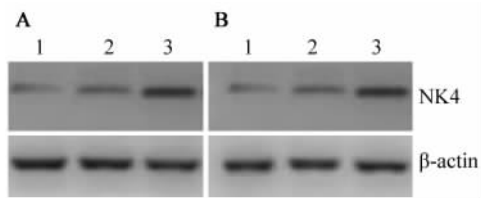


图2 PAMAM-NK4 转染后人乳腺癌细胞内 NK4 蛋白表达水平升高

Fig.2 Expressions of NK4 protein in human breast cancer cells increased after transfection of PAMAM-NK4

A: MCF-7; B: MDA-MB-231

1: Blank; 2: Blank plasmid; 3: PAMAM-NK4

2.3 PAMAM-NK4 转染促进人乳腺癌细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图3)显示,MDA-MB-231、MCF-7 细胞凋亡率差异在对照组和空载体组间无统计学意义($P > 0.05$)。实验组 MDA-MB-231

[$(4.21 \pm 0.03)\%$ vs $(2.26 \pm 0.06)\%$]和 MCF-7 [$(3.95 \pm 0.05)\%$ vs $(2.40 \pm 0.04)\%$]细胞凋亡率高于对照组(均 $P < 0.05$)。

2.4 成功构建 MDA-MB-231 细胞移植瘤裸鼠模型

接种 1 周后,肉眼均可见接种处皮下肿块,皮肤无红肿、破溃。成瘤率 100%。各组荷瘤鼠一般情况可,食欲、睡眠、二便、精神及活动状况等均无明显改变。

2.5 PAMAM-NK4 转染抑制荷瘤鼠移植瘤生长

连续给药后,持续监测肿块直径及荷瘤鼠生存状况,在观察期间无荷瘤鼠因不良反应死亡。第 30 天处死荷瘤鼠,测量肿瘤体积(图4A)及质量(图4B)。肿瘤体积和质量在空白组和空载体组之间、给药组和阳性对照组之间均无显著差异(均 $P > 0.05$),而给药组和阳性对照组肿瘤体积 [1.50 ± 0.43], [1.64 ± 0.31] vs [2.42 ± 0.62] cm^3]及质量 [(1.41 ± 0.47)], [1.54 ± 0.38] vs [3.86 ± 1.12] g]均显著低于空白组(均 $P < 0.05$)。

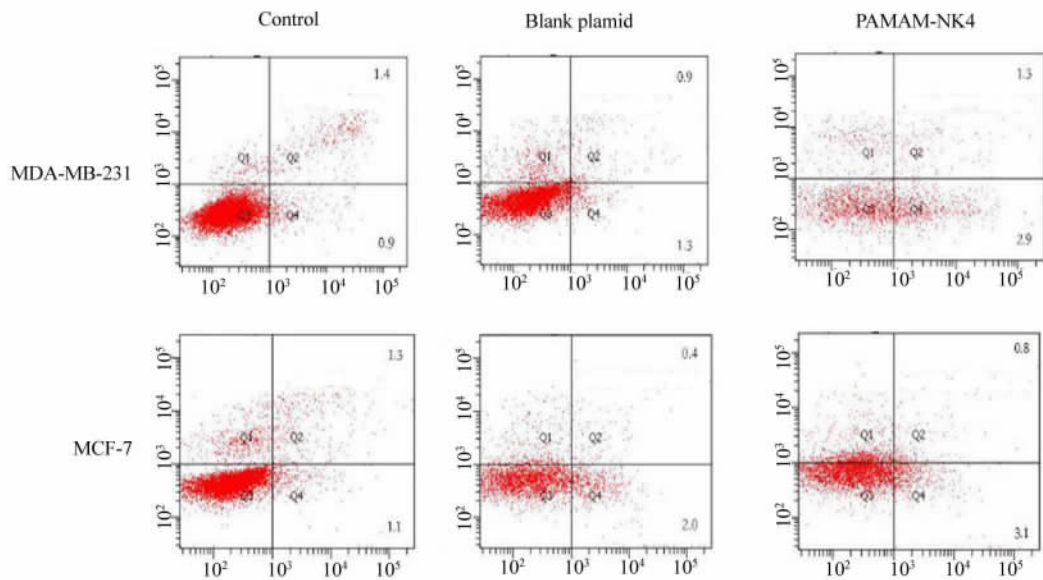


图3 过表达 NK4 提高人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 的凋亡率

Fig.3 Apoptosis rates of breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7 enhanced by overexpression of NK4

2.6 PAMAM-NK4 转染提高移植瘤细胞 NK4 蛋白表达水平

Western blotting 检测结果显示(图5),空白组、空载体组和阳性对照组移植瘤细胞 NK4 蛋白相对表达量无显著差异[(0.82 ± 0.05) vs (0.87 ± 0.11) vs (0.84 ± 0.08) , $P > 0.05$],而转染PAMAM-NK4 纳米粒的给药组 NK4 蛋白相对表达量($3.44 \pm$

0.07)高于其他 3 组(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

HGF 是间质细胞产生的细胞因子,通过与受体 c-Met 结合,发生自体磷酸化,促进肿瘤的增殖、侵袭、转移以及血管形成^[15]。有文献^[16-18]报道 HGF 高表达在乳腺癌的发生、发展和侵袭、转移中具有重

要作用。NK4 能够竞争性拮抗 HGF 与 c-Met 结合, 从而抑制肿瘤细胞的增殖与侵袭, 具有显著的抗肿瘤作用^[19-21]。NK4 对胰腺癌^[22]、宫颈癌^[23]、肝癌^[24]等多种恶性肿瘤具有抗肿瘤作用, 并在裸鼠动物模型上得到验证。因此本实验选取 NK4 基因作为目的基因, 研究其对乳腺癌的抗肿瘤作用。

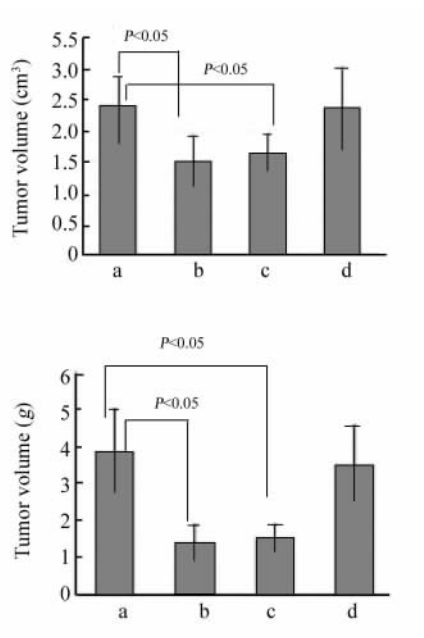


图 4 第 30 天各组裸鼠移植瘤的体积 (A) 和质量 (B)

Fig. 4 Tumor volumes (A) and mass (B) of the xenografts in nude mouse of various groups on 30th day
a: Blank; b: PAMAM-NK4; c: Positive control; d: Blank plasmid

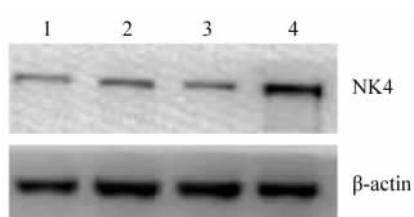


图 5 Western blotting 检测移植瘤细胞 NK4 蛋白的表达
Fig. 5 Expressions of NK4 protein in the transplanted tumor cells of various groups detected using Western blotting assay
1: Blank; 2: Blank plasmid; 3: Positive control; 4: tPAMAM-NK4

准确地将目的基因转染到肿瘤组织, 载体的选择至关重要。载体主要分为病毒型载体和非病毒载体两类, 其中非病毒载体聚酰胺-胺型树枝状大分子 PAMAM 具有无免疫原性、毒副作用小、易修饰等优点^[25-27]。更重要的是, PAMAM 能够和 DNA 形成稳定的 PAMAM-DNA 复合物, 缓冲细胞内溶酶体的降解作用, 从而提高转染效率和复合物的生物利用度^[28]。大量实验证明 PAMAM 具有低毒、高效、抗

血清等优点^[29-31], 成为基因载体的极佳选择。

本研究构建 PAMAM-NK4 纳米复合物, 用纳米复合物和空载体分别转染不同的乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞, 发现 PAMAM 载体在体内和体外均可将目的基因成功转染至肿瘤细胞并稳定表达, 并且转染 PAMAM-NK4 纳米粒能在体外和模型小鼠体内显著地抑制乳腺癌细胞增殖, 增加细胞凋亡率。研究中发现 MDA-MB-231 细胞内源性和外源性 NK4 蛋白表达平均值均高于 MCF-7 细胞, 因此选取 MDA-MB-231 细胞株构建人乳腺癌移植瘤裸鼠模型。观察期间给药组荷瘤鼠食欲、睡眠、二便、精神及活动状况等无明显改变, 也无荷瘤鼠因不良反应死亡。证明 PAMAM 在体内未产生明显不良反应, 安全性良好, 提示 PAMAM-NK4 纳米粒安全性高、肿瘤抑制效果显著。

本研究构建了稳定表达抗癌基因 NK4 的纳米粒复合物 PAMAM-NK4, 并证实其能够安全高效地抑制肿瘤生长, 为乳腺癌的综合治疗提供了新思路。但尚未探究 PAMAM-NK4 对乳腺癌细胞侵袭能力的影响, 以及基因治疗联合化疗是否能够更高效地抑制肿瘤生长, 这为接下来的实验和临床研究提供了方向。

[参 考 文 献]

- [1] ZHANG J, JIANG X, JIANG Y, et al. Recent advances in the development of dual VEGFR and c-Met small molecule inhibitors as anticancer drugs [J]. Eur J Med Chem, 2016, 108: 495-504. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.12.016.
- [2] GARAJOVA I, GIOVANNETTI E, BIASCO G, et al. c-Met as a target for personalized therapy [J]. Transl Oncogenomics, 2015, 7(Suppl 1): 13-31. DOI: 10.4137/TOG.S30534.
- [3] RABQUER B J, KOCH A E. NK4 therapy: a new approach to target angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(5): 119. DOI: 10.1186/ar4320.
- [4] TSUNEMI S, IWASAKI T, KITANO S, et al. Molecular targeting of hepatocyte growth factor by an antagonist, NK4, in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(4): R75. DOI: 10.1186/ar4252.
- [5] MAEHARA N, MATSUMOTO K, KUBA K, et al. NK4, a four-kringle antagonist of HGF, inhibits spreading and invasion of human pancreatic cancer cells [J]. Br J Cancer, 2001, 84(6): 864-873. DOI: 10.1054/bjoc.2000.1682.
- [6] TADA Y, HIROSHIMA K, SHIMADA H, et al. A clinical protocol to inhibit the HGF/c-Met pathway for malignant mesothelioma with an intrapleural injection of adenoviruses expressing the NK4 gene [J/OL]. Springerplus, 2015, 4: 358 [2015-11-02]. <http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-015-1123-3>. DOI: 10.1186/s40064-015-1123-3.
- [7] ZHU Y, CHENG M, YANG Z, et al. Mesenchymal stem cell-

- based NK4 gene therapy in nude mice bearing gastric cancer xenografts [J/OL]. Drug Des Devel Ther, 2014, 8: 2449-2462 [2015-11-02]. <http://www.dovepress.com/mesenchymal-stem-cell-based-nk4-gene-therapy-in-nude-mice-bearing-gast-peer-reviewed-article-DDDT>. DOI: 10. 2147/DDDT. S71466.
- [8] DENG X B, XIAO L, WU Y, et al. Inhibition of mesothelioma cancer stem-like cells with adenovirus-mediated NK4 gene therapy [J]. Int J Cancer, 2015, 137(2): 481-490. DOI: 10. 1002/ijc. 29391.
- [9] MATSUMOTO G, OMI Y, LEE U, et al. NK4 gene therapy combined with cisplatin inhibits tumour growth and metastasis of squamous cell carcinoma [J]. Anti Cancer Res, 2011, 31(1): 105-111.
- [10] YUED, WANG Y, MA P, et al. Effects of transferred NK4 gene on proliferation, migration, invasion and apoptosis of human prostate cancer DU145 cells [J]. Asian J Androl, 2010, 12(3): 381-389. DOI:10.1038/aja.2010.22.
- [11] 李松林, 李霏, 刘新莉, 等. NK4 基因转染对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 生物学特性的影响 [J]. 山西医科大学学报, 2013, 44(3): 192-195.
- [12] 刘晓华, 税青林. 乳腺癌的基因治疗研究 [J]. 现代诊断与治疗, 2011, 22(1): 29-31. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-8174. 2011. 01. 012.
- [13] 宋炯, 付仲学. 肿瘤的抗血管生成基因治疗 [J]. 国外医学 (外科学分册), 2003, 30(5): 290-294.
- [14] 张璐. 基于 PAMAM 联合包载 siRNA 与 PTX 靶向给药系统的构建 [D]. 苏州大学, 2014.
- [15] 胡明泰, 哈小琴, 高鹏. 肝细胞生长因子拮抗剂 NK4 抑制肿瘤的机制 [J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(1): 86-88. DOI: 10. 3321/j. issn: 1000-2790. 2008. 01. 026.
- [16] 杨晓蕾. IGF-I、HGF 及胰岛素与乳腺癌患者雌激素受体及淋巴结转移的相关性研究 [J]. 中国实验诊断学, 2015(3): 432-435.
- [17] MINUTI G, LANDI L. MET deregulation in breast cancer [J/OL]. Ann Transl Med, 2015, 3(13): 181 [2015-11-02]. <http://atm.amegroups.com/article/view/6991/7937>. DOI = 10. 3978/j. issn. 2305-5839. 2015. 06. 22.
- [18] TSAI P C, FU Y S, CHANG L S, et al. Cardiotoxin III inhibits hepatocyte growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition and suppresses invasion of MDA-MB-231 cells [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2016, 30(1): 12-21. DOI: 10. 1002/jbt. 21735.
- [19] DATE K, MATSUMOTO K, SHIMURA H, et al. HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor [J]. FEBS Lett, 1997, 420(1): 1-6.
- [20] NAKAMURA T, SAKAI K, NAKAMURA T, et al. Anti-cancer approach with NK4: Bivalent action and mechanisms [J]. Anti-cancer Agents Med Chem, 2010, 10(1): 36-46.
- [21] MATSUMOTO K, NAKAMURA T, SAKAI K, et al. Hepatocyte growth factor and Met in tumor biology and therapeutic approach with NK4 [J]. Proteomics, 2008, 8(16): 3360-3370. DOI: 10. 1002/pmic. 200800156.
- [22] 赖人旭, 张世能, TOSHIKAZU N, 等. NK4 基因转染对裸鼠胰腺癌移植瘤生长的影响 [J]. 癌症, 2005, 24(10): 1191-1195. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-467X. 2005. 10. 005.
- [23] 王冬冬, 王晓黎, 林蓓. 肝细胞生长因子拮抗剂 NK4 对裸鼠体内人宫颈瘤种植瘤生长的影响 [J]. 山东医药, 2012(12): 54-56. DOI: 10. 3969/j. issn. 1002-266X. 2012. 12. 025.
- [24] 李霏, 李松林, 尹元琴. NK4 基因重组慢病毒载体的构建及在肝癌细胞中的表达 [J]. 中国医科大学学报, 2011, 40(12): 1081-1084. DOI: 21-1227/R. 20111226. 1615. 028.
- [25] 姚翀, 武鑫, 台宗光, 等. MicroRNA 基因递送系统抗激素非依赖型前列腺癌增殖作用研究 [J]. 第二军医大学学报, 2015, 36(2): 117-123. DOI: 10. 3724/SP. J. 1008. 2015. 00117.
- [26] 石楠, 张悦, 王燕铭. 肿瘤靶向性聚酰胺-胺型树枝状高分子基因载体的合成及性能研究 [J]. 南开大学学报(自然科学版), 2012, 45(6): 7-11.
- [27] 李晓琳, 胡海梅. 聚酰胺-胺形树状大分子表面修饰的研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2014, 30(2): 253-257. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-8783. 2014. 02. 031.
- [28] 叶垚平, 朱宏. 树枝状大分子 PAMAM 及其复合物在药物/基因载体方面的研究进展 [J]. 材料导报, 2012, 26(21): 75-79.
- [29] 刘军安, 魏晓磊, 江洪, 等. 新型改性 PAMAM 树状大分子的合成及其转染效率初探 [J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(3): 333-334.
- [30] PAN S, WANG C, ZENG X, et al. Short multi-armed polylysine-graft-polyamidoamine copolymer as efficient gene vectors [J]. Int J Pharm, 2011, 420(2): 206-215. DOI: 10. 1016/j. ijpharm. 2011. 08. 036.
- [31] SHAKHBAZAU A, ISAYENKA I, KARTEL N, et al. Transfection efficiencies of PAMAM dendrimers correlate inversely with their hydrophobicity [J]. Int J Pharm, 2010, 383(1/2): 228-235. DOI: 10. 1016/j. ijpharm. 2009. 09. 020.
- [收稿日期] 2015-11-20 [修回日期] 2016-02-20
[本文编辑] 宋关鸿

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司	封二
德国美天旆生物技术有限公司	封三
索尼(中国)有限公司生命科学业务部	封四
上海细胞治疗工程技术研究中心集团	后插页