

## ·实验研究 Experiment research·

## 经导管动脉输送转铁蛋白增强 p53 基因转染效率的研究

卢 勤, 牛焕章, 朱光宇, 安艳丽, 邱定红, 滕皋军

【摘要】目的 研究转铁蛋白(Tf)对 p53 基因转染效率的影响,并探讨介入技术与 Tf 联合应用对基因治疗肝癌的双重靶向作用。方法 应用 pCMV-myc-p53 质粒与阳离子脂质体 LipofectAMINE 复合物,转染 3 种肝癌细胞株 LM6、Hep3B、YY 以及正常肝细胞株 L02,以不同浓度 Tf(0、10、25、50 及 100  $\mu\text{g}$ )介导转染,蛋白印迹法检测各细胞株中 p53 表达情况,并对 Tf 影响 p53 转染效率的关系进行分析。再建立兔 VX2 肝癌动物模型,经介入导管输注 Tf-质粒-脂质体复合物,提取肿瘤组织蛋白,蛋白印迹法检测 P53 表达。结果 4 种细胞应用 p53-脂质体复合物以及不同浓度 Tf 转染后 48 h 的蛋白印迹法检测,发现 Tf 在 10 ~ 100  $\mu\text{g}$  可明显增强 p53-脂质体的转染效率,且转染效率随 Tf 浓度增加而增强。动物模型组织提取蛋白检测结果,显示 Tf 明显增强 P53 蛋白表达。结论 Tf 能增强脂质体-基因转染,介入技术与 Tf 联合双重靶向对肝癌的基因治疗具有相当的应用前景。

【关键词】转铁蛋白;介入;p53 基因;转染效率;肝癌细胞

中图分类号 R735.7 文献标识码 A 文章编号:1008-794X(2007)02-0099-05

**Investigation of transfection efficacy with transcatheter arterial transporting transferrin to enhance p53 gene** LU Qin, NIU Huan-zhang, ZHU Guang-yu, AN Yan-li, QIU Ding-hong, TENG Gao-jun. Radiologic Department, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the function of transferrin-DNA complex, transported by transferrin(Tf) and trans-arterial injection via interventional approach be the dual-target-orientated delivery and the transferring into malignant cells to get more effective therapy. **Methods** p53-LipofectAMINE ligand with different concentrations of Tf(0, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}$ ) transfected the 4 strains including LM6, Hep3B, YY and L02 in vitro to evaluate the gene transfection efficiency through western blot. Then, after setting up the VX2 hepatocarcinoma models, we delivered the Tf-p53-LipofectAMINE complex into the hepatic arteries via interventional techniques to analyse the transfection efficiency in vivo. **Results** Tf, within the range of 10 ~ 100  $\mu\text{g}$ , could increase gene transfection efficiency mediated by liposome, and the efficiency increases with the raise of Tf concentration. Combination with interventional technique to inject Tf-DNA complex into tumor arteries, gene transfection efficiency was enhanced in rabbit models. **Conclusion** Tf can enhance gene-liposome transfection efficiency, furthermore with combination of interventional catheter technique, there would be a potential dual-target-orientated gene therapy method. (J Intervent Radiol, 2007, 16: 99-103)

【Key words】Transferrin; Intervention; p53; Transfection efficiency; Hepatic tumor

基因治疗的关键是将 DNA 成功导入靶细胞。但目前几乎所有的治疗方法都因为 DNA 的低效转运和表达而受到很大限制。因此,基因的定向运输和靶细胞特异性治疗是研究的热点。转铁蛋白受体

(transferrin receptor, TfR)是存在于细胞表面的跨膜糖蛋白,它通过与转铁蛋白(transferrin, Tf)特异性结合,介导铁(Fe)自细胞外向细胞内的转运<sup>[1-4]</sup>。TfR 还参与细胞生长增殖分化过程。正常肝细胞、胰岛细胞及红细胞表面有 TfR 表达,但大多数肿瘤细胞表面的 TfR 表达量及亲和力比正常细胞高许多倍,可能与肿瘤细胞增殖活跃造成 TfR 表达失控有关<sup>[3, 4]</sup>。因此,利用 Tf 作为配体,与治疗基因形成结合物,通过

作者单位 210009 南京 东南大学附属中大医院放射科(卢勤、牛焕章、朱光宇、安艳丽、滕皋军);东南大学基础医学院生物化学系(邱定红)

通讯作者:滕皋军

Tf-TfR 系统的转运,对肿瘤细胞进行靶向性基因治疗成为关注的热点。而对某些实体瘤如肝癌,全身治疗效果不好,介入治疗技术可以通过导管把治疗基因输送到肿瘤供血血管,从治疗技术上做到定向输送。那么,将形成的靶向性治疗基因复合物,结合介入治疗技术,可以双重靶向,对实体瘤进行治疗,以得到更好疗效。本研究首先以体外细胞实验观察不同浓度 Tf 对 p53 基因转染效率的影响,然后建立肝癌动物模型,经导管输注 Tf-p53 复合物,进一步探讨介入技术与 Tf 联合应用影响基因转染效率,为介入性及全身性基因治疗效率的增强提供信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

真核细胞表达质粒 pCMV-myc-p53 由本校生化实验室构建,大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  菌株为本实验室保存菌株,正常人肝细胞 L02、肝癌细胞 LM6、Hep3B、YY,4 种细胞株均购自南京凯基生物科技发展有限公司。铁饱和转铁蛋白为 Sigma 公司产品,阳离子脂质体 LipofectAMINE、鼠抗 myc 单克隆抗体为 Clontech 公司产品。RPMI 1640 培养基、胎牛血清为 GIBCO BRL 公司产品,二抗及 ECL 显色试剂盒为 Santa Cruz 公司产品,质粒提取试剂盒 Roche 公司产品。蛋白提取试剂盒为南京凯基生物科技发展有限公司产品。新西兰大白兔,南京金陵种兔场提供,体重 2.5 ~ 3.2 kg,雌雄不限。VX2 肿瘤细胞株由江苏省人民医院苗毅教授惠赠。影像设备 CT 机( GE Hispeedicti ),MR 机( Marconi 1.5 T ),DSA( GE INNOVA 3000 ),介入用导管等购自 Boston Scientific, Cordis, USA。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 L02、YY 细胞均用含 10%胎牛血清的 1640 培养液(含青霉素 100 u/ml,链霉素 100 u/ml),LM6、Hep3B 用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。

1.2.2 质粒的扩增纯化 采用 CaCl<sub>2</sub> 转化法将 pCMV-myc-p53 质粒导入大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  菌株,用含氨苄西林的 LB 平板培养基培养,选择挑取阳性菌落,接种于 LB 培养液中,振荡培养过夜。按质粒提取试剂盒说明书步骤操作进行质粒提取纯化,并测序鉴定。

1.2.3 细胞转染 将 L02、LM6、Hep3B、YY,按 2 × 10<sup>5</sup> 个细胞/皿接种于 5 个 35 mm 细胞培养皿中,37℃ 5%CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 后转染。实验组按每株细胞分别加入 Tf 10、25、50 和 100  $\mu$ g,对照组不

加 Tf。分别用 1640 或 DMEM 无血清培养基将相应细胞的 Tf 稀释至 100  $\mu$ l 后,每份加入 Lipofect AMINE 4  $\mu$ l,室温放置 10 min,形成 Tf-脂质体复合物。同时准备 5 份含有 0.5  $\mu$ g pCMV-myc-p53 质粒的 1640 无血清培养液 100  $\mu$ l。将上述两者混合,室温放置 20 min,形成 Tf-脂质体-DNA 复合物,按质粒 0.5  $\mu$ g/皿,加入培养板,最后用 1640 或 DMEM 无血清培养基补足体积至 1ml/皿。37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养 5 h,换成 10%胎牛血清的 1640 或 DMEM 培养液,培养 48 h 后进行蛋白印迹法检测。

1.2.4 蛋白印迹法检测 将上述细胞,用预冷 PBS 洗 2 次后,按蛋白提取试剂盒步骤提取细胞蛋白,加入 2 × SDS 上样缓冲液,煮沸 3 min 后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。再按文献[5]方法,将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转至硝酸纤维素薄膜。封闭缓冲液(3% BSA,0.2% TWEEN 20 的 PBS)中封闭 1 h,加入一抗(1:1000 鼠抗 myc 单克隆抗体),室温下摇床振荡结合 2 h,洗涤缓冲液(0.2% Tween 20 PBS)洗涤 2 次,加入二抗,室温下置于摇床振荡反应 1h。室温用洗涤缓冲液洗膜 4 次,每次 10 min。按 ECL 试剂盒步骤加入发光试剂,显影曝光摄片,并对显示条带用 Lab Work 4.5 软件进行半定量分析。

1.2.5 肝癌动物模型的建立 将 VX2 肿瘤细胞接种于兔后肢皮下成瘤并传代。待瘤体长至 2 ~ 3 cm<sup>3</sup>,外科方法将肿瘤取出,剪成约 1 mm<sup>3</sup> 大小碎块,植入模型兔肝脏左叶。2 周后,CT 或 MR 扫描,肿瘤生长成直径约 2 cm 的肿块。进行下述介入手术<sup>[6]</sup>。

1.2.6 介入性分组实验 15 只肝癌兔模型,平均分为 3 组,进行介入手术,经导管,超选择于肿瘤供血动脉(肝固有动脉或左肝动脉),造影证实肿瘤显影后,注入药物:第 1 组 5%葡萄糖液 500  $\mu$ l 与 Lipofect AMINE 40  $\mu$ l,混合后静置 10 min,导管注入肿瘤供血血管;第 2 组 5%葡萄糖液 500  $\mu$ l 与 Lipofect AMINE 40  $\mu$ l 混合后静置 10 min,再加入 pCMV-myc-p53 10  $\mu$ g,混合后静置 20 min,经导管注入肿瘤供血血管;第 3 组 5%葡萄糖液 500  $\mu$ l、LipofectAMINE 40  $\mu$ l 及 Tf 200  $\mu$ g,混合后静置 10 min,再加入 pCMV-myc-p53 10  $\mu$ g,混合后静置 20 min,导管注入肿瘤供血血管。术后动物饲养 48 h,处死。取肿瘤组织,按组织蛋白提取试剂盒说明书,提取组织蛋白,同前进行蛋白印迹试验,观察基因转染情况。

## 2 结果

## 2.1 细胞转染后蛋白印迹法检测

L02、LM6、Hep3B、YY 4 种细胞株,在转染后 48 h 均显示特异性 P53 蛋白表达(图 1)。随 Tf 浓度的增高, P53 蛋白表达水平逐渐增强,呈明显的浓度梯度差异,说明 4 种细胞株,应用 Tf 脂质体-DNA 转染效率的增强,并且在 10 ~ 100  $\mu\text{g}$  的范围内,随 Tf 浓度增加,转染效率有逐渐增高的趋势。图 2 为对显示条带用 Lab Work 4.5 软件进行光密度半定量分析的结果。

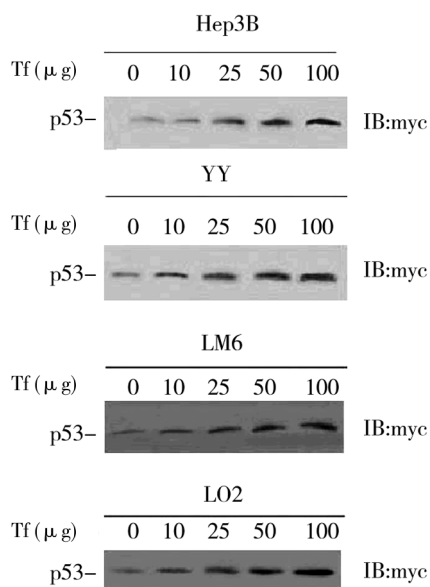


图 1 4 种细胞不同浓度 Tf 介导 p53 转染后的蛋白印迹法检测结果

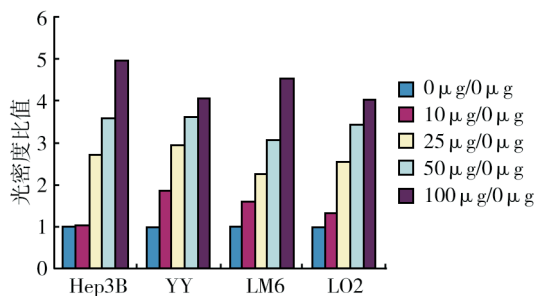


图 2 4 种细胞不同 Tf 浓度 p53 条带光密度比值(将每种细胞未加 Tf 的对照组蛋白条带吸光度值设定为 1)

## 2.2 肿瘤模型的建立

兔接种肿瘤 1 周, CT/MRI 显示率低, 接种 2 周后 CT/MRI 均能显示肿瘤, 直径 1.5 ~ 2.0 cm。DSA 显示明显肿瘤染色, 见图 3。接种 2 ~ 3 周后肿瘤迅速生长, 并可出现坏死表现。接种 4 周左右, 肿瘤全身转移, 动物衰竭至死亡。

## 2.3 动物模型组织蛋白印迹法检测结果

1 组、2 组及 3 组组织蛋白显示 P53 蛋白表达,

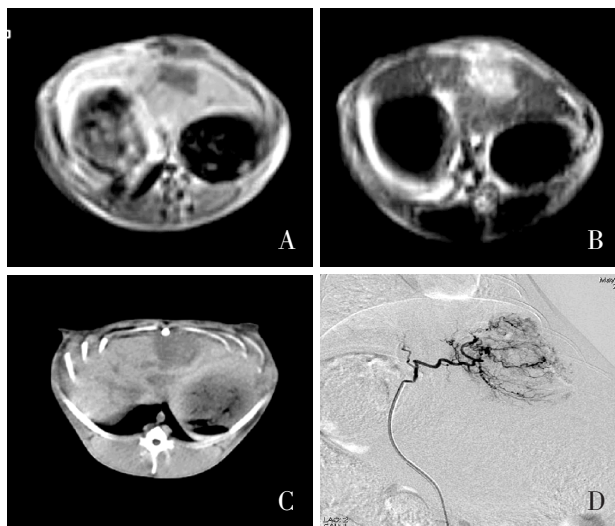


图 3 A MR 显示 T1WI 肿瘤呈低信号, 中心坏死区信号更低; B: T2WI 瘤区呈非均匀略高信号, 中心坏死区呈高信号; C CT 显示肝脏内低密度肿瘤影; D DSA 造影显示肿瘤染色

但表达强度 2、3 组明显增高, 3 组 P53 蛋白表达明显较 2 组强。对显示条带用 Lab Work 4.5 软件进行光密度半定量分析的结果显示, 3 组为 2 组的 2.5 倍。见图 4。

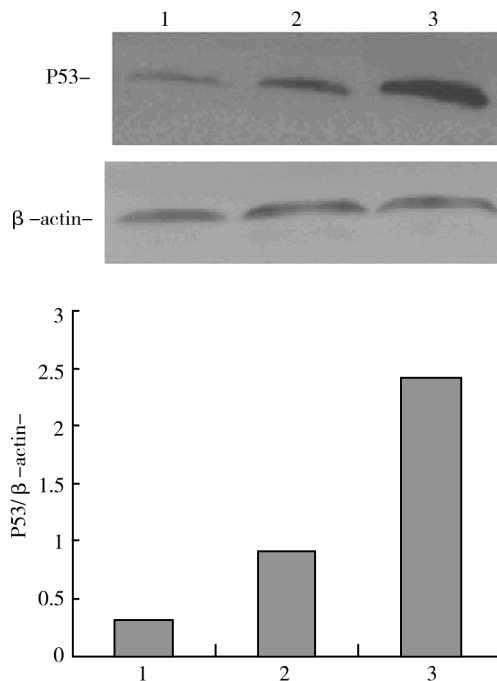


图 4 组织提取蛋白检测结果(1 LipofectAMINE 2 LipofectAMINE + pCMV-myc-p53 3 LipofectAMINE + Tf + pCMV-myc-p53), 下方条图为相应条带光密度比值

## 3 讨论

基因转染效率及基因治疗靶向性始终是基因治疗发展的瓶颈, 影响着基因治疗的临床应用。因此提高转染效率或构建靶向性载体一直是基因治



疗工作者的研究热点。理想的基因转导载体应具有安全性好、转染特异性强、转染率高和操作简便等特点<sup>[7]</sup>。病毒载体可能存在插入突变、同源重组、并可引起宿主较强的免疫反应等问题。而非病毒载体,主要是阳离子脂质体,具有转染效率较高、制备和应用简便、安全可靠、低毒、无免疫原性和无随机整合致突变等优点,正逐步被推广应用于基因治疗的基础研究和临床试验。但与病毒载体相比阳离子脂质体转染效率较低,表达时间短,缺乏细胞特异性,注入体内优先与初次接触的细胞结合,降低对靶器官治疗效果,因此可以增加靶向性配体,以提高转染效率<sup>[8]</sup>。配体-受体介导的转运系统近年来备受关注。正常配体和受体的结合不仅可以使配体导入特定位置,还能为生物所分解,无毒,无免疫原性<sup>[9]</sup>。

Tf-转铁蛋白受体(Tf-TfR)是近年研究较多的一种配体-受体系统。关于 Tf-TfR 的作用机制与生物学特性,有大量的研究报道<sup>[2,4]</sup>。TfR 是由 2 个亚基组成的二聚体,每个亚基由 761 个氨基酸组成,分子量为 93 ku。正常人除肝脏细胞外,十二指肠黏膜上皮细胞、骨髓早期红细胞等都有 TfR 表达,而心、肺、脾、肾上腺和骨髓中则无表达。在静止的肝细胞中 TfR 约有 80% 存在于细胞内,形成内源性受体池,仅 20% TfR 存在于细胞膜表面。细胞表面的 TfR 与内源性受体池内的 TfR 不断相互交换,处于动态平衡中。细胞增殖旺盛时,细胞表面的 TfR 受体可能增多。转铁蛋白(Tf)是一单链糖基化蛋白,由 670 ~ 700 个氨基酸组成,分子量 80 ku 左右。每个 Tf 分子有 2 个铁结合位点。TfR 通过与 Tf 的特异性结合,介导细胞对铁的摄取,通过内吞模式转运铁后,再经胞吐作用返回细胞表面出胞,进行新一轮转运。Tf 主要由肝细胞合成,合成过多的 Tf 与细胞增殖和分化密切相关。许多肿瘤细胞表面存在丰富的 TfR。有学者报道 TfR 在肝癌细胞膜表面的数量明显高于正常细胞,且其与 Tf 亲和力明显高于正常细胞膜表面的 TfR 与 Tf 的亲和力<sup>[3,4]</sup>。TfR 不易发生抗原调变和基因缺失,周围血中几乎无游离成分。因此用 Tf 作为脂质体的靶向部分具有较好的肝癌细胞靶向性。

有较多研究将 Tf 掺入到脂质体-核酸复合物或多聚核酸复合物中,靶向肿瘤细胞。Joo 等<sup>[10]</sup>用构建的 Tf-DDAB-DNA 聚合物(DDAB 为一种阳离子脂质体)转染人头颈部肿瘤细胞与 Hela 细胞,结果该聚合物 Tf-DDAB-DNA 比不聚合 Tf 的 DDAB-DNA 转染效率高 5 倍,而比另一种脂质体 Lipofectin 高 2 倍

(Lipofectin 被认为是目前应用较为广泛,转染效率较高的市场化脂质体之一),并认为该聚合物对头颈部肿瘤尤为有效。Bellocq 等<sup>[11]</sup>也构建了一种含乙二醇、cyclodextrin 等物质的特殊聚合物,结合荧光素酶基因,在 Tf 表面修饰后转染 K562、PC-3 细胞,观察基因表达情况。结果表明一定量的 Tf 修饰后基因转染效率大大提高,他们认为,这样的 Tf-聚合物适合于基因治疗转移性肿瘤。大量研究<sup>[12-15]</sup>显示了相似的结果。Joshee 等<sup>[16]</sup>还发现结合了 Tf 的 DNA 聚合物不易凝聚,易于被细胞所吞饮。Tros de Ilarduya 等<sup>[17]</sup>发现结合了 Tf 的聚合物 DNA 性能稳定,不易被 DNA 酶降解。众多研究显示 Tf 的优越性,可以靶向性介导 DNA 聚合物被肿瘤细胞吞饮,提高 DNA 转染的效率,而且结合物性能稳定,有利于基因的表达。

本研究 Tf 对转染效率的影响实验, L02、LM6、Hep3B、YY 细胞加入 Tf, Tf 明显增强了脂质体-DNA 的转染效率,并且在 10 ~ 100  $\mu\text{g}$  范围内,随 Tf 浓度的增加,转染效率有逐渐增高的趋势,其中 Hep3B 在加入 100  $\mu\text{g}$  Tf 时,转染效率是对照组的近 5 倍。本组体外实验结果:Tf 能够增强脂质体介导的基因转染,其增强效率与 Tf 浓度呈正相关。另外,文献报道,肿瘤细胞 TfR 与 Tf 的亲和力也有增加,而且游离 Tf 对 Tf-脂质体-DNA 复合物是否有竞争拮抗,本实验均未涉及,该方向研究还有待继续。

我们研究也注意到, Tf 也可以增强正常人肝细胞 L02 的转染效率,这在基因转染治疗中,存在靶向的非特异性。虽然 L02 的 TfR 与 Tf 的亲和力可能没有多数肿瘤细胞强,但本实验仍然显示了转染效率的明显增强。这就提醒我们对肿瘤基因治疗的途径进行选择。通常治疗是全身给药,虽然文献报道经 Tf 修饰的 DNA 聚合物可以具有稳定的性能, DNA 不易降解,而且避免了脂质体优先与初次接触细胞结合的缺陷,并且增强了基因转染效率,提高疗效,尤其可能对转移性肿瘤细胞有优越性。但我们认为,基因药物通常是通过肝脏代谢,那么正常肝细胞对 Tf-DNA 聚合物的摄取增加是难以避免的,这在相当程度上减低了治疗效率。经介入方法进行基因治疗,尤其对某些实体瘤,如肝癌、肺癌等,可以经皮穿刺直接将治疗基因注入瘤体,也可经肿瘤供血动脉行导管引入,这样可以很大程度地避免正常肝细胞对 Tf-DNA 聚合物的摄取,同时不会降低基因转染效率,还可合并进行肿瘤血管的栓塞或灌注化疗,获得更好的疗效。韩国有研究者进行不同肿瘤多种治疗基

因引入方法实验比较认为,经肿瘤供血动脉注入及经静脉同样为安全有效的方法,并且经肿瘤供血动脉注入不良反应小,对肝癌、肺癌等更为有效。对肝癌合并使用化疗药物,同样获得较好结果。美国 and 英国也有研究者对结肠、直肠癌肝转移患者经肝动脉灌注 p53 重组腺病毒进行治疗,肯定了介入技术在基因治疗中的应用<sup>[7]</sup>。Seol 等<sup>[18]</sup>利用  $\beta$  半乳糖苷酶基因作为报告基因,将 Tf-脂质体-DNA 复合物经动脉注入兔 VX2 肿瘤模型内,结果 Tf 明显增强了基因转染后的表达。本研究动物实验部分同样证实了这一结果,结合了 Tf 的质粒基因注入肿瘤较未结合 Tf 的基因,其组织内基因蛋白表达明显增高,前者是后者的 2.5 倍。因此如果利用 Tf 增强基因转染效率,提高肿瘤治疗的靶向性,并通过介入技术进行肿瘤供血动脉导管引入或直接瘤体注入途径,双重靶向,进行基因治疗,一定会有广泛的应用前景。当然,不同大小的基因片段,其转染效率会有明显差异。具有治疗功能的基因,通常片段较大,转染效率较低,尤其如果是多种基因联合治疗,可能转染效率更低。虽然质粒载体的选择非常重要,但 Tf 增强基因转染效率的特性是否适用于其他治疗基因,还有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Li H, Qian ZM. Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery[J]. *Med Res Rev*, 2002, 22: 225 - 250.
- [2] Feelders RA, Kuiper-Kramer EP, van Eijk HG. Structure, function and clinical significance of transferrin receptors[J]. *Clin Chem Lab Med*, 1999, 37: 1 - 10.
- [3] Kuiper-Kramer EP, Coenen JL, Huisman CM, et al. Relationship between soluble transferrin receptors in serum and membrane-bound transferrin receptors[J]. *Acta Haematologica*, 1998, 99: 8 - 11.
- [4] Hubers HA, Finch CA. The physiology of transferrin and transferrin receptors[J]. *Physiol Rev*, 1987, 67: 520 - 582.
- [5] Sambrook J, Russell DW, 主编著,黄培堂,译. 分子克隆实验指南. 第 3 版[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 1713 - 1726.
- [6] 牛焕章, 滕皋军, 陈 晟, 等. 兔 VX2 肝癌模型的影像学表现和栓塞技术的实验研究[J]. *中国医学影像技术*, 2006, 22: 797 - 800.
- [7] 卢 勤, 滕皋军. p53 基因治疗肿瘤的研究进展[J]. *中华放射学杂志*, 2000, 34: 659 - 661.
- [8] Xu L, Pirollo KF, Chang EH. Tumor-targeted p53-gene therapy enhances the efficacy of conventional chemo/radiotherapy[J]. *J Control Release*, 2001, 74: 115 - 128.
- [9] 常彦忠, 袁其朋, 钱忠明. 转铁蛋白-转铁蛋白受体系统在药物运输和定向给药中的应用[J]. *科学通报*, 2003, 48: 213 - 218.
- [10] Joo SY, Kim JS. Enhancement of gene transfer to cervical cancer cells using transferrin-conjugated liposome[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2002, 28: 1023 - 1031.
- [11] Bellocq NC, Pun SH, Jensen GS, et al. Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery[J]. *Bioconjug Chem*, 2003, 14: 1122 - 1132.
- [12] Kursu M, Walker GF, Roessler V, et al. Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer[J]. *Bioconjug Chem*, 2003, 14: 222 - 231.
- [13] Ogris M, Walker G, Blessing T, et al. Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes[J]. *J Control Release*, 2003, 91: 173 - 181.
- [14] Li Y, Ogris M, Wagner E, et al. Nanoparticles bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin as gene carriers: preparation and in vitro evaluation[J]. *Int J Pharm*, 2003, 259: 93 - 101.
- [15] Seki M, Iwakawa J, Cheng H, et al. p53 and PTEN/MMAC1/TEP1 gene therapy of human prostate PC-3 carcinoma xenograft, using transferrin-facilitated lipofection gene delivery strategy[J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13: 761 - 773.
- [16] Joshee N, Bastola DR, Cheng PW. Transferrin-facilitated lipofection gene delivery strategy: characterization of the transfection complexes and intracellular trafficking[J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13: 1991 - 2004.
- [17] Tros de Ilarduya C, Arango MA, Moreno-Aliaga MJ, et al. Enhanced gene delivery in vitro and in vivo by improved transferrin-lipoplexes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1561: 209 - 221.
- [18] Seol JG, Heo DS, Kim HK, et al. Selective gene expression in hepatic tumor with trans-arterial delivery of DNA/liposome/transferrin complex[J]. *In Vivo*, 2000, 14: 513 - 517.

(收稿日期 2006-10-12)