

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.12.007

# Trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> 修饰紫杉醇免疫脂质体对人大肠癌 HT-29 细胞的杀伤作用

吴爱国, 焦得闯, 李 鹏, 邵国利, 纪术峰, 韩明阳

## Killing Effects of Immunoliposomal Paclitaxel Tagged with Trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> on Colorectal Cancer Cells

WU Ai-guo, JIAO De-chuang, SHAO Guo-li, LI Peng, JI Shu-feng, HAN Ming-yang

Department of General Surgery, Zhujiang Hospital of Nanfang Medical University, Guangzhou 510282, China

**Abstract: Objective** To construct the immunoliposomal Paclitaxel tagged with trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> and to investigate its killing effects on human colorectal cancer cells *in vitro*. **Methods** Liposomal paclitaxel was made in a reversal-phase evaporation method and trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> was obtained by cutting the J hinge at the Fc side of the antibodies with pepsin, then the trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> and the liposomal Paclitaxel were linked together. The figures of immunoliposomes were observed by TEM and their size distribution was measured by graphics software. The encapsulation efficiency of the immunoliposomes was estimated by RP-HPLC. The immune activity of immunoliposomes was evaluated using the fluorescence microscopy after the fluorescent immunoliposomes or liposomes were incubated together with HT-29 cells. Apoptotic index of the HT-29 cells was measured using MTT assay. **Results**

The immunoliposomal Paclitaxel tagged with trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> that was constructed *in vitro* had an average diameter of 210 nm, and that the diameters under 200 nm accounted for 91.37% of the total. The encapsulation efficiency and stability of the immunoliposomal Paclitaxel tagged with trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> were perfect and the immunoliposome was superior to liposome at the identification capability to HT-29 cells in the same condition. Immunoliposomal Paclitaxel tagged with trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> can kill the HT-29 cells in a time-dependent manner ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The immunoliposomal Paclitaxel tagged with trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> was constructed successfully and it can kill the HT-29 cells effectively *in vitro*.

**Key words:** Immunoliposome; Paclitaxel; Colorectal cancer

**摘要:目的** 构建 Trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> 修饰的紫杉醇免疫脂质体并测定其对体外生长的人大肠癌 HT-29 细胞的杀伤作用。**方法** 采用逆相蒸发法合成紫杉醇脂质体,使用胃蛋白酶在 Trastuzumab 抗体 J 链 Fc 段侧切断抗体以获得抗体 F(ab')<sub>2</sub> 段,抗体交联法制备 Trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> 段修饰的紫杉醇免疫脂质体;透射电子显微镜观察免疫脂质体的形态及粒径分布;采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)及荧光标记法测定免疫脂质体包封率和活性;MTT 检测细胞的杀伤率。**结果** 成功构建了 Trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> 修饰的紫杉醇免疫脂质体;所得免疫脂质体平均粒径为 210nm,粒径小于 200nm 者占 91.37%;且其具有较高的包封率和稳定性;相同时间内,HT-29 细胞对紫杉醇免疫脂质体的摄取要明显高于对照组;Trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> 修饰的紫杉醇免疫脂质体对 HT-29 细胞的杀伤作用强于对照组 ( $P < 0.01$ ),且该作用具有时间依赖性 ( $P < 0.01$ )。**结论** 成功构建 Trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> 修饰的紫杉醇免疫脂质体,其对体外生长的大肠癌细胞具有较强的杀伤作用。

**关键词:** 免疫脂质体;紫杉醇;大肠癌

中图分类号:R735.3 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2010)12-1360-04

收稿日期:2009-04-02;修回日期:2009-12-01

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(04105743)

作者单位:510282 广州,南方医科大学珠江医院普通外科

作者简介:吴爱国(1956-),男,博士,主任医师,主要从事胃肠、乳腺外科的基础与临床研究

## 0 引言

肿瘤免疫靶向治疗是靶向治疗的重要内容之一,其中利用脂质体作为药物载体所建立的脂质体化疗药物,其表面主要由天然磷脂和胆固醇组成,具

有被动靶向性,进入体内后被生物降解而不会积累在体内,其内包裹的药物从脂质体缓慢释放,药效持续时间长,是化疗药物理想的载药系统<sup>[1]</sup>。脂质体经过单克隆抗体修饰后形成的免疫脂质体,更是集脂质体的特性与抗体的靶向性于一体,成为开展靶向治疗最有效的手段之一<sup>[2-5]</sup>。本实验构建的 Trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> 修饰的紫杉醇免疫脂质体,不仅可以克服当前紫杉醇的剂型不足,并且通过抗体修饰紫杉醇,实现药物的定向释放,减轻化疗药物对正常组织及器官的不良反应,达到靶向化疗的目的。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大肠癌 HT-29 细胞株由南方医科大学基础医学院免疫教研室惠赠;原料紫杉醇购自连云港万科生物科技有限公司;Trastuzumab 单克隆抗体,购自美国 GeneTech 公司;聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE)、荧光剂 NBD 标记 DSPE(NBD-DSPE),均为美国 Avanti Lipid 公司产品;氢化大豆磷脂(HSPC)、胆固醇(Chol),均为广州鸿雨精细化工有限公司产品;N-羧基琥珀酰-3-(N-马来酰亚胺)丙酸酯(MPS),购自美国 Sigma 公司;ImmunoPure@F(ab')<sub>2</sub> 制备试剂盒,购自美国 PIERCE 公司。

### 1.2 紫杉醇脂质体的制备

参照 Dmitri Kirpotin 所述方法合成  $\beta$ -马来酰亚胺基修饰 PEG-DSPE 衍生物(MP-PEG-DSPE)<sup>[6]</sup>。将 HSPC、DSPE 衍生物(PEG-DSPE、MP-PEG-DSPE 和 NBD-DSPE)、Chol、紫杉醇按照 185:100:15:6 的摩尔比例混合后,采用逆相蒸发法合成紫杉醇脂质体。

### 1.3 F(ab')<sub>2</sub> 段与紫杉醇脂质体的连接

按 ImmunoPure@F(ab')<sub>2</sub> 制备试剂盒说明书获取 Trastuzumab 单抗 F(ab')<sub>2</sub> 段。将所得 F(ab')<sub>2</sub> 段加入含有紫杉醇脂质体的 HEPES 缓冲盐溶液,每 1ml 缓冲液加 0.3g 抗体片段,NaOH 溶液调定 pH 值到 7.3~7.4,在氮气吹拂下于室温反应 12h;加入 2 mm 的  $\beta$ -巯基乙醇封闭 30 min;Sepharaos 4B 凝胶柱去除过量的  $\beta$ -巯基乙醇和抗体片段,于外水体积收集免疫脂质体溶液;0.2 $\mu$ m 的无菌滤膜除菌后 4 $^{\circ}$ C 储存。部分免疫脂质体溶液经冷冻干燥后制成冻干剂,亦于 4 $^{\circ}$ C 密封保存。

### 1.4 免疫脂质体形态及粒径分布

取少量紫杉醇免疫脂质体悬液滴于载玻片上,用浓度为 1% 的磷钨酸进行负染,再转滴至含支持膜的 200 目网孔铜网表面,透射电子显微镜观察免疫脂质体的形态;图形分析软件处理电子显微镜照

片,考察脂质体粒径分布情况和平均粒径。

### 1.5 免疫脂质体包封率的测定

采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定免疫脂质体悬液中游离紫杉醇的含量,地西洋作为内标。色谱条件为:色谱柱为 YPW-Kromasil C18 柱(5  $\mu$ m,4.6 mm $\times$ 250 mm),流动相为甲醇-乙腈-水混合液(体积比 3:4:3),流速为 1.0 ml/min,进样量为 20  $\mu$ l,检测波长 227 nm。依下述公式计算紫杉醇包封率,式中 C<sub>1</sub> 为游离紫杉醇的含量,C<sub>0</sub> 为制备该样品所需紫杉醇的量。免疫脂质体悬液 4 $^{\circ}$ C 下分别静置 10 d、20 d、30 d 后,按此法重新测定其包封率,考察其变化情况。包封率(%) =  $(1 - C_1/C_0) \times 100\%$ 。

### 1.6 免疫脂质体抗体活性的测定

取常规培养的 HT-29 细胞接种于 6 块培养皿(35mm,细胞数  $1.5 \times 10^4$  个/皿),37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下继续培养 72h,待丰度达 80%,分别加入荧光标记的紫杉醇免疫脂质体和紫杉醇脂质体各 3 块,相同条件孵育 10、30 及 50 min,95%乙醇溶液固定 5 min,加入 PBS 溶液封裱后置于荧光显微镜下观察。

### 1.7 体外细胞实验

实验设紫杉醇免疫脂质体组、紫杉醇脂质体组和抗体组;各组药物均设 7 个给药浓度,每浓度 3 复孔,每板另设细胞对照与空白对照;紫杉醇免疫脂质体和紫杉醇脂质体药物各浓度(以紫杉醇计)别为:400、200、100、50、25、12.5、6.25  $\mu$ g/ml;抗体组各浓度分别为:2800、1400、700、350、175、87.5、43.75  $\mu$ g/ml;在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下分别与药物作用 8 h、16 h、24 h、32 h 后,四唑盐(MTT)比色法测算细胞杀伤率。杀伤率(%) =  $(1 - \text{处理组 OD} / \text{细胞对照组 OD}) \times 100\%$ 。

### 1.8 统计学方法

采用 SPSS11.5 统计软件进行数据分析,用析因设计资料方差分析评估药物种类、药物剂量、药物作用时间及其交互作用对细胞杀伤率的影响,LSD 法比较不同药物对细胞杀伤率的影响,取  $P < 0.05$  时为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 免疫脂质体的形态及包封率

电子显微镜下可见所得免疫脂质体为球形小体,分布比较均匀,见图 1。测算样品中免疫脂质体粒径分布于 59~497nm 之间,平均粒径为 210nm,粒径小于 200nm 者占 91.37%。新制备的免疫脂质体包封率为 89.32%,在 4 $^{\circ}$ C 下放置 10、20、30 天后所测包封率分别为 88.50%、86.03%、84.42%,下

降最大幅度为 4.9%。

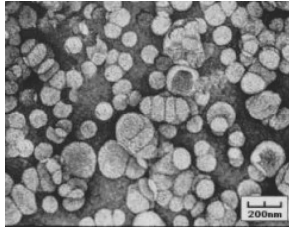
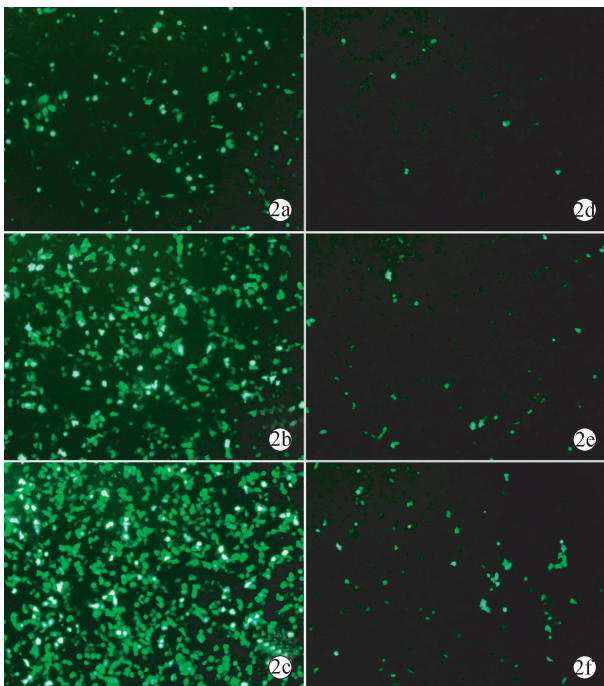


图 1 免疫脂质体透射电子显微镜照片(磷钨酸染色)  
Figure 1 Transmission electron microscopy of immunoliposome (Dyed by PTA)

### 2.2 免疫活性

荧光显微镜观察可见:投药 10 min 后,紫杉醇免疫脂质体和紫杉醇脂质体均有部分被 HT-29 细胞所摄取,摄取脂质体者可激发绿色荧光;并且随着孵育时间的延长,摄取脂质体的细胞数不断增加;相同时间内,HT-29 细胞对紫杉醇免疫脂质体的摄取要明显高于对紫杉醇脂质体的摄取,见图 2。



2a; Immunoliposome, 10min; 2b; Immunoliposome, 30min;  
2c; Immunoliposome, 50min; 2d; Liposome, 10min;  
2e; Liposome, 30min; 2f; Liposome, 50min

图 2 HT-29 细胞对 NBD 标记免疫脂质体和脂质体的摄取(10×20)

Figure 2 NBD marked immunoliposome and liposome intaked by HT-29 cells(10×20)

### 2.3 细胞杀伤

结合实验结果,见表 1。在作用相同时间、浓度水平相当情况下,紫杉醇免疫脂质体对细胞的杀伤率分别优于紫杉醇脂质体和 Trastumab 单克隆抗体,细胞杀伤效应最强(94.58%)出现在 32 h、400 μg/ml 的紫杉醇免疫脂质体组,细胞杀伤效应

最弱(0.17%)出现在 16 h、43.75 μg/ml 的 Trastumab 单抗组。药物种类的差异( $F = 5751.178, P < 0.001$ )、用药时间的差异( $F = 342.119, P < 0.001$ )、药物浓度的差异( $F = 4302.472, P < 0.001$ )、药物种类与用药时间交互作用的差异( $F = 58.370, P < 0.001$ )、药物种类与药物浓度交互效应的差异( $F = 912.283, P < 0.001$ )、用药时间与药物浓度交互效应的差异( $F = 43.985, P < 0.001$ )以及三处理因素交互效应的差异( $F = 10.042, P < 0.001$ )均有统计学意义,见表 2。多重比较可知任意两种药物之间差异亦有统计学意义( $P < 0.001$ ),见图 3。

表 2 处理因素方差分析

| Source                       | DF  | SS     | MS    | F        | P      |
|------------------------------|-----|--------|-------|----------|--------|
| Drugs                        | 2   | 3.490  | 1.745 | 5751.178 | <0.001 |
| Time                         | 3   | 0.311  | 0.104 | 342.119  | <0.001 |
| Concentrations               | 6   | 7.832  | 1.305 | 4302.472 | <0.001 |
| Drugs & Time                 | 6   | 0.106  | 0.018 | 58.370   | <0.001 |
| Drugs & Concentration        | 12  | 3.321  | 0.277 | 912.283  | <0.001 |
| Time & Concentration         | 18  | 0.240  | 0.013 | 43.985   | <0.001 |
| Drugs & Time & Concentration | 36  | 0.110  | 0.003 | 10.042   | <0.001 |
| Error                        | 168 | 0.051  | 0.000 |          |        |
| Corrected Total              | 251 | 15.461 |       |          |        |

### 3 讨论

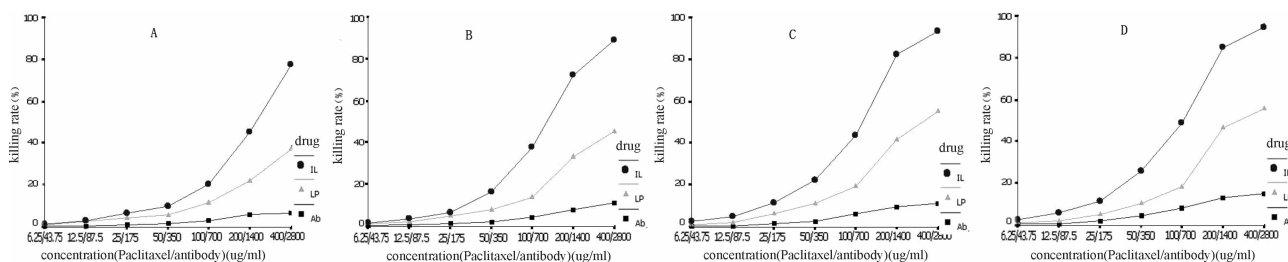
免疫脂质体的发展经历了三个类型:(1)传统的免疫脂质体;(2)长循环免疫脂质体;(3)聚乙二醇末端抗体型免疫脂质体<sup>[7]</sup>。本实验合成的紫杉醇免疫脂质体即属于第 3 型,即聚乙二醇连接在抗体 Trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> 段和脂质体之间。

最初的第 3 型免疫脂质体,其抗体部分都是完整的单克隆抗体,随着连接抗体数量的增加,免疫脂质体在血液中的清除率也会增加,而且反复用药者会更加明显,这可能和人类巨噬细胞能够识别外来抗体 Fc 段有关。本实验用 Fab' 段代替完整抗体制备免疫脂质体,因为它不仅具备识别抗原的能力,而且能够避免 Fc 段的不良影响,同时铰链区巯基可提供远离抗原识别区的脂质体结合位点<sup>[8-9]</sup>。在实验中标记有 NBD 的免疫脂质体与细胞共同孵育 10min 即被细胞摄取,有利证明了这一点。同时,在实验中我们发现,当 NBD 标记的 Trastuzumab F(ab')<sub>2</sub> 修饰的免疫脂质体与高表达 HER-2 的 HT-29 细胞共同孵育时,其荧光强度要远高于作用相同时间的非特异性脂质体。

表 1 4 个时间点不同浓度药物的肿瘤杀伤率(%,  $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Killing rate at the four times with drugs in different concentration(%,  $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| Drugs           | Time (h) | Concentration of Paclitaxel/Ab( $\mu\text{g/ml}$ ) |             |              |              |              |              |              |
|-----------------|----------|--|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                 |          | 6.25/43.75   | 12.5/87.5   | 25/175       | 50/350       | 100/700      | 200/1400     | 400/2800     |
| Immuno-liposome | 8        | 1.29 ± 1.09  | 2.80 ± 0.35 | 6.67 ± 1.24  | 9.86 ± 0.51  | 20.34 ± 1.10 | 45.27 ± 3.02 | 77.48 ± 2.02 |
|                 | 16       | 1.64 ± 0.35  | 3.67 ± 1.22 | 6.71 ± 1.03  | 16.41 ± 0.90 | 37.90 ± 3.13 | 72.48 ± 1.37 | 89.17 ± 1.67 |
|                 | 24       | 2.62 ± 1.59  | 4.89 ± 0.79 | 11.38 ± 2.13 | 22.41 ± 1.64 | 43.63 ± 0.71 | 82.54 ± 1.00 | 93.63 ± 1.72 |
|                 | 32       | 2.68 ± 1.33  | 5.92 ± 0.48 | 11.39 ± 2.10 | 25.96 ± 1.70 | 49.02 ± 3.56 | 85.20 ± 5.13 | 94.58 ± 2.11 |
| Liposome        | 8        | 1.01 ± 1.10  | 2.63 ± 1.53 | 4.26 ± 0.76  | 5.66 ± 0.78  | 11.60 ± 1.89 | 22.18 ± 1.91 | 37.03 ± 1.97 |
|                 | 16       | 1.18 ± 0.59  | 1.97 ± 0.85 | 5.02 ± 0.87  | 7.78 ± 1.69  | 13.71 ± 1.78 | 33.33 ± 1.50 | 45.40 ± 6.21 |
|                 | 24       | 0.85 ± 1.37  | 2.10 ± 1.28 | 6.14 ± 1.19  | 11.04 ± 2.74 | 19.40 ± 1.49 | 41.64 ± 1.90 | 55.18 ± 1.59 |
|                 | 32       | 1.23 ± 1.02  | 2.12 ± 0.92 | 5.30 ± 0.68  | 10.55 ± 2.70 | 18.31 ± 3.17 | 46.57 ± 0.77 | 55.95 ± 4.53 |
| Tratuzumab      | 8        | 0.39 ± 0.39  | 0.39 ± 0.42 | 0.84 ± 0.17  | 1.68 ± 0.50  | 2.97 ± 0.98  | 5.94 ± 1.12  | 6.72 ± 1.38  |
|                 | 16       | 0.17 ± 0.17  | 0.51 ± 0.00 | 1.35 ± 0.45  | 1.92 ± 0.93  | 4.40 ± 1.06  | 7.84 ± 1.27  | 11.17 ± 0.00 |
|                 | 24       | 0.67 ± 0.44  | 0.78 ± 0.19 | 2.07 ± 0.39  | 4.58 ± 1.51  | 8.21 ± 2.63  | 13.23 ± 1.21 | 15.08 ± 1.34 |
|                 | 32       | 0.39 ± 0.33  | 0.51 ± 0.27 | 1.46 ± 0.61  | 2.73 ± 1.49  | 5.47 ± 2.44  | 9.17 ± 2.98  | 11.03 ± 3.28 |



IL: Immunoliposome group; LP: Liposome group; Ab: Antibody Liposome group

A: 8h; B: 16h; C: 24h; D: 32h

图 3 不同时间药物对细胞的杀伤率

Figure 3 The killing rate of different drugs at several times

结肠癌细胞表面存在 HER2 高表达的情况, 约为 40%~90%<sup>[10]</sup>。Kim 等<sup>[11]</sup>在利用槲皮苷(Quercetin)治疗结肠癌的研究中也发现, 伴随肿瘤细胞大量凋亡的发生, 还有包括 HT-29 细胞在内的结肠癌细胞 HER2 蛋白的表达下调以及由它介导的 AKt 信号通路的中断。本课题组已在体外成功构建靶向 HER2 的 RNA 干扰重组表达质粒<sup>[10]</sup>, 并证实其对体外生长的 HT-29 细胞具有明显的杀伤作用。这些都为以 HER2 为靶点治疗结肠癌提供了理论依据。

紫杉醇是红豆杉植物的次生代谢产物, 目前主要用于非小细胞肺癌、晚期卵巢癌等癌症的化疗。本实验采用免疫脂质体和普通脂质体装载紫杉醇在体外治疗结肠癌, 均得到较高的细胞杀伤率, 高剂量时可达 50% 以上, 尤其是免疫脂质体组, 其细胞杀伤率最高达 94.58%, 远远超过脂质体组。

采用本实验方法合成紫杉醇免疫脂质体, 具有较高的药物包封率和满意的粒径, 其悬液在 4℃ 下储存 30 天, 药物无严重渗漏。其他条件相同时, 细胞识别免疫脂质体的能力优于对脂质体的识别, 且免疫脂质体对体外生长的大肠癌细胞的杀伤作用强于一般脂

质体。结合实验数据可以推断, 免疫脂质体在体内应用时, 其抑制肿瘤的效果可能仍然优于普通脂质体, 因为除了如前所述优势外, 免疫脂质体能更早的定位于肿瘤局部而减少由于循环时间过长造成的药物损失, 但这需要进一步研究去证实。

参考文献:

- [1] Drummond DC, Noble CO, Guo Z, et al. Development of highly stable and targetable nanoliposomal formulation of toptotecan [J]. J Control Release, 2010, 141(1):13-21.
- [2] Atobe K, Ishida T, Ishida E, et al. In vitro efficacy of a sterically stabilized immunoliposomes targeted to membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(5):927-928.
- [3] Noble CO, Guo Z, Hayes ME, et al. Characterization of highly stable liposomal and immunoliposomal formulations of vincristine and vinblastine [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, 64(4):741-1751.
- [4] Harata M, Soda Y, Tani K, et al. CD19-targeting liposomes containing imatinib efficiently kill Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells [J]. Blood, 2004, 104(5):1442-1449.

(下转第 1373 页)

- [6] Kucia M, Wojakowski W, Rea R, et al. The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner[J]. Arch Immunol Ther Exp(Warsz), 2006, 54(2): 121-135.
- [7] Suratt BT, Petty JM, Young SK, et al. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis [J]. Blood, 2004, 104(2): 565-571.
- [8] Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, et al. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34+ cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival[J]. Blood, 2000, 95(3): 756-768.
- [9] N. Lamerant-Fayel, C. da Crola Silva and C. Kieda. Tumor and Host Endothelial Cell Selective Interactions and Modulation by Microenvironmental Chemokines: Tumor-Endothelial Cell Cross Talk Specificity [J]. Cancer Growth and Progression, 2005, 15(0): 219-231.
- [10] Jin H, Su J, Garmy-Susini B, et al. Integrin $\alpha$ 4 $\beta$ 1 promotes monocyte trafficking and angiogenesis in tumors[J]. Cancer Res, 2006, 66(4): 2146-2152.
- [11] Carr AN, Howard BW, Yang HT, et al. Efficacy of systemic administration of SDF-1 in a model of vascular insufficiency: Support for an endothelium-dependent mechanism[J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(4): 925-935.
- [12] Jin H, Aiyyer A, Su J, et al. A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature[J]. J Clin Invest, 2006, 116(3): 652-662.
- [13] Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors [J]. Annu Rev Biochem, 1998, 57 (2): 375 - 413.
- [14] Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, et al. Canstatin, a novel matrix derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. J Biol Chem, 2000, 275(2): 1209-1215.
- [15] Capo-Chichi CD, Smith ER, Yang DH, et al. Dynamic alterations of the extracellular environment of ovarian surface epithelial cells in premalignant transformation, tumorigenicity, and metastasis[J]. Cancer, 2002, 95(8): 1802-1815.
- [16] Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice [J]. Hepatology, 2004, 40(6): 1304- 1311.

[编辑:周永红;校对:黄园玲]

(上接第 1363 页)

- [5] Brignole C, Marimpietri D, Pagnan G, et al. Neuroblastoma targeting by c-myc-selective antisense oligonucleotides entrapped in anti-GD2 immunoliposome: immune cell-mediated anti-tumor activities[J]. Cancer Lett, 2005, 228(1-2): 181-186.
- [6] Kirpotin D, Park JW, Hong K, et al. Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro[J]. Biochemistry, 1997, 36(1): 66-75.
- [7] Noble CO, Kirpotin DB, Hayes ME, et al. Development of ligand-targeted liposomes for cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2004, 8(4): 335-353.
- [8] Brignole C, Marimpietri D, Gambini C, et al. Development of Fab' fragments of anti-GD(2) immunoliposomes entrapping doxorubicin for experimental therapy of human neuroblastoma [J]. Cancer Lett, 2003, 197(1-2): 199-204.
- [9] Xianghua Y, Zirong X. The use of immunoliposome for nutrient target regulation (a review) [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2006, 46(8): 629-638.
- [10] 韩明阳, 吴爱国, 郭爱林, 等. HER-2 基因靶向 RNA 干扰重组表达载体的构建及序列分析[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(31): 3284-3288.
- [11] Kim WK, Bang MH, Kim ES, et al. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells[J]. J Nutr Biochem, 2005, 16(3): 155-162.

[编辑:周永红;校对:黄园玲]