

用于高效磁转染的鱼精蛋白修饰的铁氧磁性纳米粒研究

陈本科^{1,2}, 王晓文¹, 阚思行^{1,2}, 杨欣^{1,2}, 盛军³, 唐劲天¹

1. 清华大学工程物理系; 粒子技术与辐射成像教育部重点实验室, 北京 100084
2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102
3. 长春生物制品研究所, 长春 130062

摘要 功能化铁氧磁性纳米粒在生物医学中应用广泛, 可用于肿瘤磁感应热疗、磁共振成像 (Magnetic Resonance Imaging, MRI)、药物输送及磁转染等方面。为了探讨鱼精蛋白功能化修饰的铁氧磁性纳米粒的制备及其作为基因载体在体外磁转染中的可行性, 采用共沉淀法制备 Fe_3O_4 磁性纳米粒, 经表面氨基化修饰后在其表面偶联鱼精蛋白。利用透射电镜、傅里叶红外光谱仪、zeta 电位与粒度分析仪等, 对磁性纳米粒进行形态、粒径及 zeta 电位分析等表征检测。共聚焦显微镜观察磁转染方法转染报告基因绿色荧光蛋白质粒 pEGFP-N1 进入 HepG2 细胞的表达, 以真核转染试剂 *vigofect* 为对照。结果显示, 实验中制备的磁性纳米粒粒径 10nm 左右, 在交变磁场下具有良好的升温性能。鱼精蛋白功能化修饰磁性纳米粒后, 其 zeta 电位进一步增大, 更利于与 DNA 有效结合, 在 HepG2 细胞系, 其转染 pEGFP-N1 质粒的效率高于 *vigofect*。研究表明, 鱼精蛋白功能化修饰的铁氧磁性纳米粒可作为磁转染的有效载体, 由于其同时具备在交变磁场下升温的性能, 在基因治疗联合热疗的研究领域具有一定的应用价值。

关键词 磁转染; 鱼精蛋白; 磁性纳米粒; 基因载体; 热疗

中图分类号 R394

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)19-0062-06

Protamine-Modified Iron Oxide Magnetic Nanoparticles are Efficient Gene Vectors for Magnetofection

CHEN Benke^{1,2}, WANG Xiaowen¹, KAN Sixing^{1,2}, YANG Xin^{1,2}, SHENG Jun³, TANG Jintian¹

1. Key Laboratory of Particle & Radiation Imaging, Ministry of Education; Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China
2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China
3. Changchun Institute of Biological Products, Changchun 130062, China

Abstract Functionalized magnetic iron oxide nanoparticles (MNPs) can play crucial roles in medical applications, including cancer magnetic fluid hyperthermia, magnetic resonance imaging, anticancer drug delivery, and magnetofection. Here, the use of modified MNPs coated with protamine peptides containing nuclear localization signal sequences as gene carriers (PRO-MNPs) for magnetofection of HepG2 cells was tested. Fe_3O_4 nanoparticles were synthesized by chemical co-precipitation, modified by 3-aminopropyltriethoxysilane, and were covalently attached to protamine. The size, zeta potential, and coating characteristics of MNPs were analyzed by transmission electron microscopy, Zetaplus zeta potential measurement, and Fourier transform infrared imaging, respectively. The magnetofection efficiency of PRO-MNPs was observed by a laser scanning confocal microscope using pEGFP-N1 as the reporter gene. The mean size of the magnetic nanoparticles was about 10nm. The expression level of green fluorescence protein in HepG2 cells transfected with PRO-MNPs was

收稿日期: 2010-04-14; 修回日期: 2010-08-12

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2007AA021805); 北京市科委项目 (Z07000200540704); 清华大学裕元医学基金项目; 中国博士后科学基金面上项目 (20090460354)

作者简介: 陈本科, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤热疗联合基因治疗, 电子信箱: ding1123@163.com; 唐劲天 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: S090800253M, E190003065S), 教授, 研究方向为肿瘤磁感应治疗, 电子信箱: tangjt@mail.tsinghua.edu.cn

significantly higher than that of cells transfected using vigofectin reagent. The results indicate that PRO-MNPs offer a novel non-viral gene transfection vector, particularly for cancer gene therapy when combined with magnetic-induced hyperthermia.

Keywords magnetofection; protamine; magnetic nanoparticles; gene vector; hyperthermia

0 引言

随着分子生物学和免疫学等生命科学的发展,以及人们对肿瘤发生发展分子机制认识的不断深入,肿瘤基因治疗已成为继肿瘤放化疗之后的有效治疗手段。如何将外源治疗基因有效导入细胞内并稳定表达,成为制约基因治疗的关键因素。目前最有效的基因转移工具为病毒类载体,但其存在潜在的安全性问题^[1],因此人们逐渐将目光转向非病毒载体。非病毒基因转运体系的方法主要包括电穿孔、显微注射、基因枪、重组蛋白、各类聚合物等^[2],该类载体的优点是安全性高,但其转染效率低的缺陷限制了该类载体的应用。

磁性纳米粒 (Magnetic Nanoparticles, MNPs) 的出现使得非病毒类基因载体在肿瘤基因治疗中的应用得到了前所未有的发展。铁氧磁性纳米粒被有机化合物氨基硅烷修饰后,表面携带大量正电荷,可依靠静电相互作用力与带负电的 DNA 结合,形成纳米复合物。该复合物能吸附在细胞表面,通过细胞内吞、溶酶体途径等机制将基因导入细胞核,并获得表达 (图 1)^[3]。

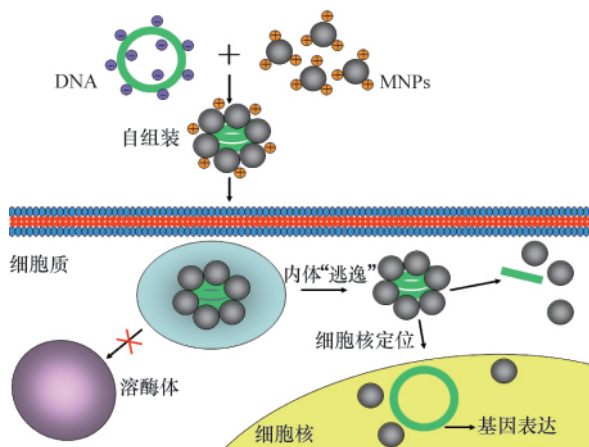


图 1 磁性纳米粒作为基因载体的转染机制
Fig. 1 Mechanism of magnetic nanoparticles based gene delivery

体外条件下,在细胞培养皿底部外加磁铁,借助静态磁场作用,可加快复合物的沉积速度,使其快速接触细胞膜并进入胞质,提高转染速率 (图 2)。体内条件下,通过磁转染的方式可将载体定向输送到靶部位,克服了载体聚集缓慢以及靶部位载体浓度过低的问题,提高了基因载体的靶向性和基因转染效率,为基因治疗提供了一条新途径^[4]。

为了提高铁氧纳米粒对外源基因的转染效率,选用鱼精

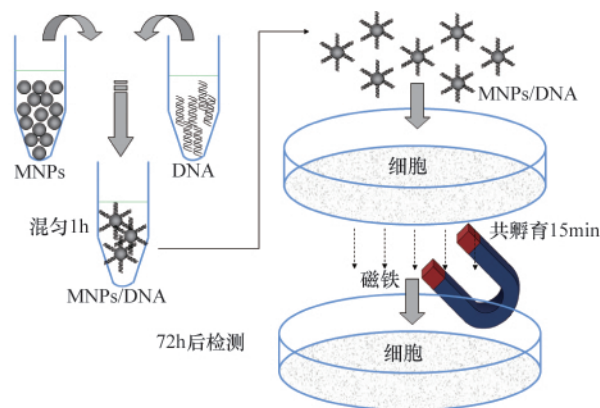


图 2 体外磁转染示意图
Fig. 2 Sketch of magnetofection in vitro

蛋白对氨基硅烷修饰的磁性纳米粒进行功能化修饰。鱼精蛋白是一个富含精氨酸的小肽,存在于鱼类精子头部,能够结合 DNA,帮助其形成致密结构,并在受精后转移精子 DNA 到受精卵的核区,避免被溶酶体酶降解。鱼精蛋白包含一个核定位信号 (Nuclear Localization Signal, NLS),它能引导结合形成的复合物靶向转移到细胞核,提高外源物质进入细胞核的效率。Xu 等^[5]研究发现,将 NLS 短肽偶联到 Fe_3O_4 纳米粒后, Hela 细胞对纳米粒的吞噬率可以提高 233%,且偶联 NLS 短肽的纳米粒子可进入细胞核,未偶联 NLS 的纳米粒子未进入细胞核。

本文利用共沉淀法制备了粒径均一的 Fe_3O_4 磁性纳米粒,并采用氨基硅烷对其进行表面修饰,以增强其生物相容性和稳定性。分别以偶联鱼精蛋白的磁性纳米粒 (Protamine Modified Magnetic Nanoparticles, PRO-MNPs) 和氨基硅烷修饰的磁性纳米粒 (Amino Silane Coated Magnetic Nanoparticles, APTS-MNPs) 进行体外转染实验,以期获得转染效率高的非病毒基因载体。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 实验材料

3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (3-aminopropyltriethoxysilane, APTS)、硫酸鱼精蛋白 (protamine sulfate) 购自 Sigma 公司;氯化铁 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、氯化亚铁 ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、25% 氨水、戊二醛等均为国产分析纯。实验所用细胞为 HepG2 细胞系,由清华大学医疗新技术研究室冻存和复苏,培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中。质粒 pEGFP-

N1 由清华大学医疗新技术研究室保存。

1.1.2 实验仪器

日本 Hitachi H-7650 型透射电镜,美国 Nicolet Magna-IR 560 型红外光谱仪,日本 Olympus FluoView FV1000 共聚焦显微镜,美国 Varian Vista-MPX 全谱直读电感耦合等离子体发射光谱仪,BIO RAD-680 酶标仪,UV2000 紫外可见分光光度计,Zetaplus 型电位及粒度分析仪等。

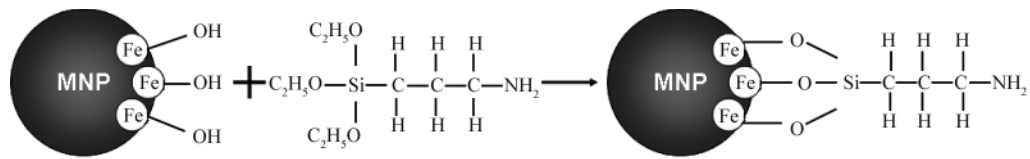


图 3 APTS-MNPs 制备原理示意图

Fig. 3 Illustration of the coating reaction of APTS with magnetic nanoparticles

1.2.2 PRO-MNPs 的制备

将鱼精蛋白偶联到 Fe_3O_4 磁性纳米粒之前,先用戊二醛对 APTS-MNPs 进行活化,戊二醛终浓度为 3%。反应结束后,去除过剩的戊二醛。将活化的磁性纳米粒悬浮于磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline,PBS)用于连接信号肽。

取适量鱼精蛋白,溶解于 PBS(冰浴),然后加入 10mg 经戊二醛活化过的 Fe_3O_4 磁性纳米粒中,于冰浴条件下旋转搅拌,使鱼精蛋白与 Fe_3O_4 磁性纳米粒充分接触混合,24h 后停止反应。磁分离,用 PBS 冲洗 4 次,磁性纳米粒保存于 PBS 中,即得 PRO-MNPs 悬液。

1.2.3 体外升温实验

将制备的磁性纳米粒配置成一定浓度的磁流体,分别取 0.2,0.5,1.0mL 悬液置于 EP 管中,置于高频磁感应加热线圈下进行体外升温实验,热电偶测温。交变磁场频率 300kHz,电流 300A。

1.2.4 细胞毒性检测

用 0.25% 的胰蛋白酶消化单层培养的 HepG2 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基制成单细胞悬液,以每孔 7000 个细胞接种于 96 孔板,每孔体积 200 μL 。细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24h,吸出各孔的培养基,用 PBS 冲洗 1 次,加入不同浓度的磁性纳米粒悬液,继续孵育 24h 后进行 MTT 检测,酶标仪检测波长 490nm。

1.2.5 体外转染实验

取对数生长期的 HepG2 细胞以 2×10^5 /孔接种于 6 孔板培养 24h,用 PBS 冲洗 2 次,换无血清的 DMEM 培养基。将 PRO-MNPs、APTS-MNPs 分别与 2 μg pEGFP-N1 质粒 DNA 按质量比 2:1 混合后震荡混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1h 以充分形成复合物,加至上述单层培养的细胞上。将 6 孔板置于强磁铁上 15min,放回二氧化碳培养箱培养 5h 后替换完全培养基。完全培养基继续培养 36h 后,共聚焦显微镜观察绿色荧光蛋白报道基因 pEGFP-N1 在细胞中的瞬时表达。

1.2 实验方法

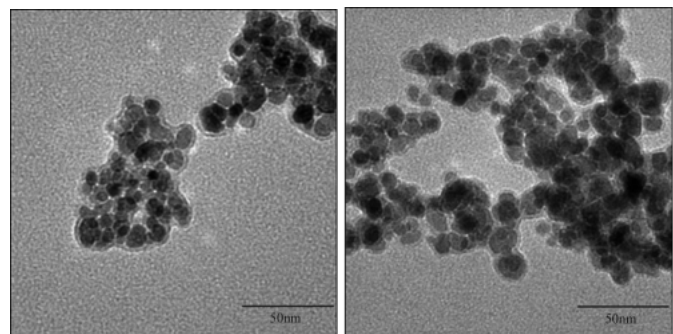
1.2.1 制备 APTS-MNPs

共沉淀法制备 Fe_3O_4 磁性纳米粒,采用 APTS 对纳米粒进行表面氨基化修饰。主要过程:取 Fe_3O_4 磁性纳米粒的乙醇悬液置于三口烧瓶,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴搅拌下加入 APTS 10mL,反应 2h (图 3)。产物用无水乙醇冲洗数遍,磁分离,保存于乙醇中,即 APTS-MNPs 乙醇悬液。

2 结果与分析

2.1 形态及表面电位分析

采用 Hitachi H-7650 型透射电镜对所制备的磁性纳米粒进行检测。图 4 给出了 Fe_3O_4 磁性纳米粒的 TEM 图。可以看出,采用共沉淀法制备的 Fe_3O_4 磁性纳米粒为近球形,粒径均一,约为 10nm(图 4(a))。经氨基硅烷修饰后(图 4(b)),其粒径无明显增加,形态保持良好,且分散性明显改善。



(a) Fe_3O_4

(b) APTS-MNPs

图 4 Fe_3O_4 磁性纳米粒的 TEM 图

Fig. 4 TEM image of Fe_3O_4 and APTS-MNPs

采用 Zetaplus 型电位和粒度分析仪对各种磁性纳米粒的表面电位进行检测,检测结果见表 1。从表 1 可以看出,磁性纳米粒表面进行氨基化修饰后,其 zeta 电位由负变正;其表面偶联鱼精蛋白后,由于鱼精蛋白携带大量正电荷导致 PRO-MNPs 的 zeta 电位进一步增大。

2.2 FTIR 分析

为检测是否将氨基硅烷、鱼精蛋白修饰到磁性纳米粒上,对制备的 APTS-MNPs、PRO-MNPs 进行 FTIR 检测。图 5(a)为氨基硅烷修饰前后 Fe_3O_4 磁性纳米粒的红外吸收图谱。可以看出,修饰前后 Fe_3O_4 磁性纳米粒在 581 cm^{-1} 处有红外吸收峰,这是由于 Fe_3O_4 纳米粒中的 $\text{Fe}-\text{O}-\text{Fe}$ 伸缩振动引起

表 1 各种磁性纳米粒的 zeta 电位
Table 1 Zeta potential of various of MNPs

纳米粒类型	粒径/nm	修饰物	zeta 电位 /mV
裸 MNPs	5~10	—	-9.24
APTS-MNPs	10	3-氨基丙基三乙氧基硅烷	4.06
PRO-MNPs	15	鱼精蛋白	14.5

的;修饰后 APTS-MNPs 在 1049cm^{-1} 出现的吸收峰是氨基硅烷中 Si—O 的特征吸收峰^[6],而修饰前裸 MNPs 无此吸收峰。红外图谱分析表明,在氨基硅烷修饰后的 Fe_3O_4 磁性纳米粒上存在 Si—O 特征峰,证明已经在 Fe_3O_4 纳米粒表面成功修饰了氨基硅烷。

图 5(b)为 PRO-MNPs 及单纯鱼精蛋白的 FTIR 图谱。图中 PRO-MNPs 在 581cm^{-1} 处的吸收峰是 Fe_3O_4 纳米粒中的 Fe—O—Fe 伸缩振动引起的,单纯鱼精蛋白中未出现该吸收峰;在 1652cm^{-1} 处的吸收峰是鱼精蛋白中酰胺键的特征峰,在 PRO-MNPs 中也出现了该特征峰,证明鱼精蛋白偶联到 Fe_3O_4 纳米粒表面。

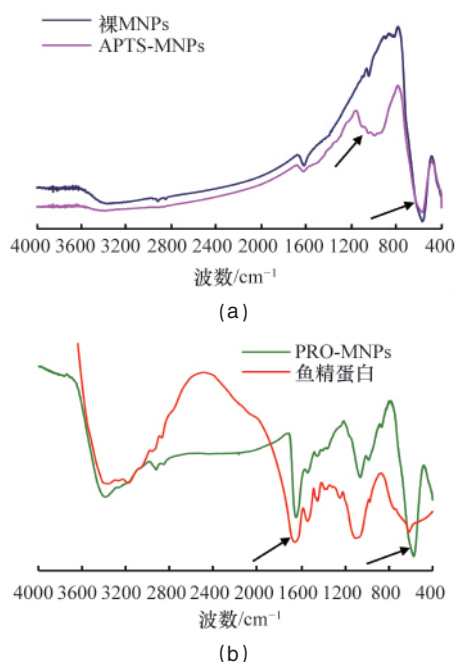


图 5 Fe_3O_4 磁性纳米粒的 FTIR 图谱
Fig. 5 FTIR spectra of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles

2.3 体外升温实验

体外升温实验采用 APTS-MNPs 磁流体,其质量浓度为 30mg/mL ,测试结果如图 6 所示。可以看出,制备的 APTS-MNPs 在交变磁场下具有良好的升温性能,10min 内,1mL APTS-MNPs 磁流体即可升温约 40°C ($\Delta T=38.2^\circ\text{C}$)。在相同浓度条件下,磁流体的升温性能呈现剂量依赖性,随着所用磁流体体积的增大,其升温速率及最终温度也相应提高。相同

体积不同浓度的磁流体体外升温实验发现,在一定浓度范围内,浓度越高,其升温性能越好。

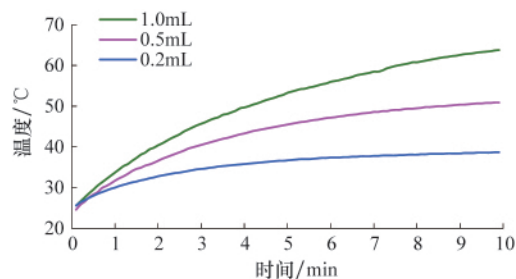


图 6 APTS-MNPs 交变磁场体外升温测试
Fig. 6 Thermodynamic test of APTS-MNPs in the alternating magnetic field *in vitro*

2.4 细胞毒性检测

为了检测 APTS-MNPs 及 PRO-MNPs 是否具有细胞毒作用,采用 MTT 法检测磁性纳米粒对 HepG2 细胞增殖活力的影响,图 7 给出了检测结果。可以看出,在一定的浓度范围内 ($<20\mu\text{g/mL}$),这两种磁性纳米粒均无明显的细胞毒作用,细胞存活率保持在 85%以上。

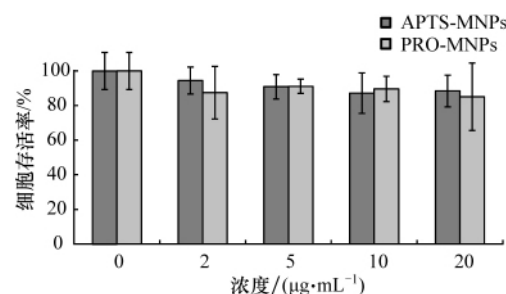


图 7 不同浓度 APTS-MNPs 和 PRO-MNPs 的体外细胞毒作用
Fig. 7 Cytotoxicity of APTS-MNPs and PRO-MNPs with different concentration *in vitro*

2.5 体外转染实验

将 APTS-MNPs 和 PRO-MNPs 分别以质量比 2:1 的比例与 $2\mu\text{g}$ 绿色荧光蛋白报告基因 $pEGFP-N1$ 质粒混合后转染 HepG2 细胞,以市售的高效真核转染试剂 *vigofect* 为对照。由于修饰后的纳米粒表面带正电荷,易与负电性的 DNA 形成 DNA/MNPs 复合体,复合体转染 HepG2 细胞 36h 后在共聚焦显微镜下观察 GFP 在 HepG2 细胞中的表达情况。转染结果见图 8,其中蓝色为 *hoechst333258* 标记的细胞核,绿色为细胞表达的绿色荧光蛋白。可以看出,对照组单纯 *vigofect* 转染试剂转染 $pEGFP-N1$ 后,在 HepG2 细胞中有一定的绿色荧光蛋白表达;而采用 APTS-MNPs 转染的 HepG2 细胞中 GFP 的表达量有所增加,绿色荧光信号增强;采用 PRO-MNPs 转染的 HepG2 阳性细胞数目多且信号进一步增强。结果表明,本实验中 PRO-MNPs 及 APTS-MNPs 在 HepG2 细胞系的转

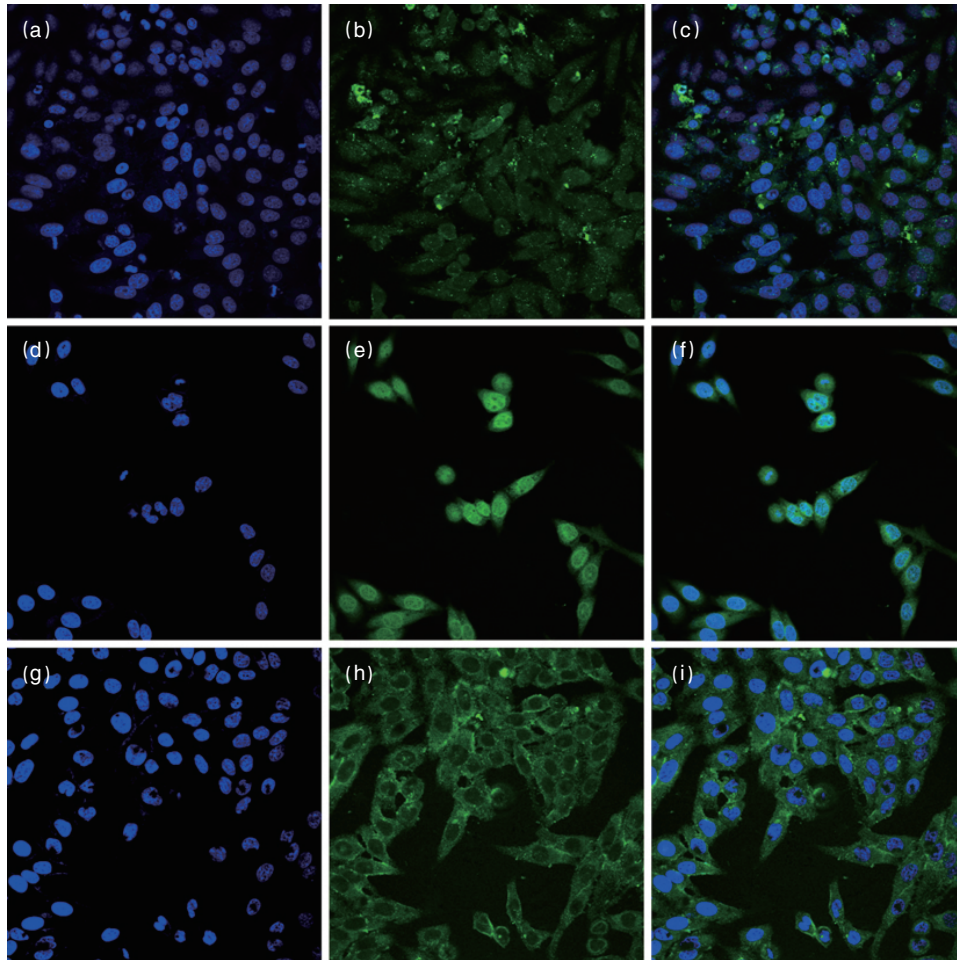


图 8 pEGFP-N1 质粒体外转染 HepG2 细胞绿色荧光蛋白的表达

Fig. 8 GFP expressed by HepG2 cells transfected with pEGFP-N1

注: (a)、(b)、(c) 为 vigofect 转染组; (d)、(e)、(f) 为 APTS-MNPs 转染组; (g)、(h)、(i) 为 PRO-MNPs 转染组。蓝色为 hoechst333258 染色的细胞核, 绿色为绿色荧光蛋白。(c)、(f)、(i) 分别为(a)和(b)、(d)和(e)、(g)和(h)的叠加图。

Notes: Cells were incubate with vigofect/DNA (figures (a), (b) and (c)) or APTS-MNPs/DNA (figures (d), (e) and (f)) or PRO-MNPs/DNA (figures (g), (h) and (i)) for 36h. Cells were washed, fixed, and stained with hoechst333258, a nuclear stain. Cell nuclei shown by the hoechst333258 (blue); Green fluorescent protein expressed by cells (green); Figure (c) overlay of parts (a) and (b); Figure (f) overlay of parts (d) and (e); Figure (i) overlay of parts (g) and (h).

染效率均高于市售的 vigofect 转染试剂, 且偶联鱼精蛋白的 PRO-MNPs 的转染效率最高。

3 讨论

目前应用的基因载体主要分为病毒载体和非病毒载体两大类^[7]。虽然病毒载体转染效率高, 但存在诸多缺陷, 在安全问题上存在很大隐患, 因此, 人们逐渐转向非病毒载体。纳米粒因其亚细胞的尺寸效应能有效地被细胞内吞, 并快速地从溶酶体逃逸出来进入细胞质^[8], 这样可将 DNA 包裹在聚合物基质中, 保护 DNA 免受各种酶的消化降解, 且 DNA 可随着聚合物的水解而缓慢地从纳米粒中释放出来, 提高转染效率。在外加磁场的作用下, 磁纳米粒定向移动, 能更多地吸附于单层细胞表面, 增加载体及基因与细胞的接触时间和接触量。这些优势决定了磁纳米粒的高转染活性, 促进了基因的

高效持续表达^[9]。

采用鱼精蛋白对磁性纳米粒进行功能化修饰用于磁转染有三大优势: ① 鱼精蛋白携带大量正电荷, 能够有效压缩负电性的 DNA^[10], 使得 DNA/MNPs 复合体粒径变小, 提高转染效率; ② 鱼精蛋白携带 NLS 序列, 具有靶向定位于细胞核的功能, 便于携带外源 DNA 进入细胞核^[11]; ③ 鱼精蛋白已被 FDA 批准用于胰岛素缓释制剂和中和术后过量的肝素, 安全性好^[12]。本实验结果显示, 偶联鱼精蛋白的磁性纳米粒 zeta 电位显著高于 APTS-MNPs, 可有效地与 DNA 结合并保护 DNA 免于酶解; 在外加磁场的作用下能有效转移 pEGFP-N1 质粒 DNA 进入 HepG2 细胞, 获得目标蛋白高表达, 其转染效率明显高于 vigofect, 可作为一类新型有效的基因转移载体。

磁感应加温治疗是近年来发展的一种加温治疗恶性肿瘤的新方法, 其利用铁磁性物质能在交变磁场中升温的物理

研究论文 (Articles)

特性,将铁磁性物质作为热介质引入肿瘤组织,热介质在外加交变磁场作用下降温并将热量传递给周围的肿瘤组织,当肿瘤组织温度高于 43℃ 时发生凋亡或坏死。 Fe_3O_4 是目前常用的热介质之一^[13]。

目前国内外研究报道中,大多将 Fe_3O_4 纳米粒用作基因载体或磁感应热疗介质,未见有以 Fe_3O_4 纳米粒为介质,将基因治疗和磁感应加热治疗联合起来治疗肿瘤的报道。如果以功能化的 PRO-MNPs 为基因载体,除了具备一般纳米载体的优势,还可利用温敏铁氧体磁感应升温 and 自动控温恒温的特性进行治疗基因的热控表达,有望将基因治疗和磁感应加热治疗联合起来治疗肿瘤。

研究中采用电感耦合等离子体发射光谱仪分析了单个细胞吞噬 MNPs 的量。HepG2 细胞与 PRO-MNPs 共孵育 16h 后,细胞内的铁含量可达 99.30pg。收集吞噬实验中的细胞沉淀,置于磁感应加热线圈上,检测吞噬 MNPs 的肿瘤细胞在交变磁场下的升温情况,但未见明显温度升高。分析原因,可能与细胞数量少、单个细胞吞噬的纳米粒数量少有关。体内试验中,如果将 PRO-MNPs 直接注入肿瘤内,在肿瘤部位不但有被细胞吞噬的纳米粒,还有黏附在细胞表面和分散在组织间质中的纳米粒,有望获得更明显的升温效果。如何提高肿瘤细胞吞噬磁性纳米粒的能力使其在交变磁场下高效升温,以及如何优化基因磁转染条件以进一步提高转染效率,将成为下一步研究重点。

4 结论

本研究成功制备出偶联鱼精蛋白的功能化磁性纳米粒,其红外图谱上酰胺吸收带的存在证明鱼精蛋白已结合到氨基化修饰的磁性纳米粒上。TEM 检测显示所制备的磁性纳米粒为球形,粒径 10~15nm。鱼精蛋白偶联的磁性纳米粒 zeta 电位呈正电性,能够通过静电吸附与负电性的 DNA 结合。MTT 实验验证在一定浓度范围内,PRO-MNPs 对 HepG2 细胞无明显的细胞毒作用,安全性好。体外转染实验结果显示,PRO-MNPs 可以高效地转染 pEGFP-N1 外源质粒 DNA 进入 HepG2 细胞,实现 GFP 的高表达。由此可见,PRO-MNPs 可以作为一种有效的基因转染载体,以 PRO-MNPs 为载体的磁转染方法是一种高效的非病毒基因转染方法。

体外升温实验证实,磁性纳米粒在交变磁场下具有良好的升温能力,结合其高效的转染能力,可以为基因治疗联合磁感应加热治疗肿瘤提供良好的工作基础。

参考文献 (References)

- [1] Kimmelman J. Protection at the cutting edge: The case for central review of human gene transfer research [J]. *Canadian Medical Association Journal*, 2003, 169(8): 781-782.
- [2] Hou S, Yang K, Yao Y, et al. DNA condensation induced by a cationic polymer studied by atomic force microscopy and electrophoresis assay[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, 62(1): 151-156.
- [3] Saccardo P, Villaverde A, González-Montalbán N. Peptide-mediated

DNA condensation for non-viral gene therapy [J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(4): 432-438.

- [4] Tang Q S, Zhang D S, Cong X M, et al. Using thermal energy produced by irradiation of Mn-Zn ferrite magnetic nanoparticles (MZF-NPs) for heat-inducible gene expression [J]. *Biomaterials*, 2008, 29 (17): 2673-2679.
- [5] Xu C, Xie J, Kohler N, et al. Monodisperse magnetite nanoparticles coupled with nuclear localization signal peptide for cell-nucleus targeting [J]. *Chem Asian J*, 2008, 3(3): 548-552.
- [6] Ma M, Zhang Y, Yu W, et al. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by aminosilane [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2003, 212(2-3): 219-226.
- [7] Yang Y, Xu Z, Jiang J, et al. Poly(imidazole/DMAEA)phosphazene/DNA self-assembled nanoparticles for gene delivery: Synthesis and *in vitro* transfection[J]. *Journal of Controlled Release*, 2008, 127(3): 273-279.
- [8] Panyam J, Zhou W Z, Prabha S, et al. Rapid endo-lysosomal escape of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: Implications for drug and gene delivery[J]. *The FASEB Journal*, 2002, 16(10): 1217-1226.
- [9] 周林珠, 甘璐, 杨祥良. PLA-PAMAM 纳米粒作为非病毒基因载体的研究[J]. 华中科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(6): 122-125. Zhou Linzhu, Gan Lu, Yang Xinagliang. *Journal of Huazhong University of Science and Technology: Nature Science Edition*, 2007, 35(6): 122-125.
- [10] 孙逊, 田聆, 聂宇, 等. 阳离子脂质体-DNA 复合物与脂质-鱼精蛋白-DNA 复合物体外细胞转染率比较[J]. 生物医学工程学杂志, 2007, 24(1): 191-195. Sun Xun, Tian Ling, Nie Yu, et al. *Journal of Bionedical Engineering*, 2007, 24(1):191-195.
- [11] Reynolds F, Weissleder R, Josephson L. Protamine as an efficient membrane-translocating peptide [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2005, 16 (5): 1240-1245.
- [12] Kim T W, Chung H, Kwon I C, et al. Polycations enhance emulsion-mediated *in vitro* and *in vivo* transfection [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 295(1-2): 35-45.
- [13] 刘轩, 徐波, 夏启胜, 等. 一种观察纳米铁氧化物在交变磁场中升温情况的技术[J]. 癌症, 2005, 24(9): 1148-1150. Liu Xuan, Xu Bo, Xia Qisheng, et al. *Chinese Journal of Cancer*, 2005, 24(9): 1148-1150.

(责任编辑 吴晓丽)

本期完词填空答案

		钧					
		鱼	翔	浅	底		
	贾	岛		水		力	
家			海	湾	战	争	
书	法					上	六
抵			同	是	官	游	人
万			仁				行
金	马	玉	堂				