

文章编号:1005-6947(2008)06-0578-06

· 基础研究 ·

磁性纳米介导的 pcDNA3.1(+)-p53 对 HepG2 细胞的作用

欧阳德群^{1,2}, 张阳德¹, 何翦太¹

(1. 中南大学 卫生部肝胆肠中心, 湖南 长沙 410008; 2. 湖南省宁远县人民医院 普通外科, 湖南 宁远 425600)

摘要:目的 探讨氨基硅烷化 Fe₃O₄ 磁性纳米介导的 pcDNA3.1(+)-p53 质粒(-p53 质粒)对人肝癌 HepG2 细胞的作用。方法 (1)以 -p53 质粒作为表达基因,用氨基硅烷化 Fe₃O₄ 磁性纳米粒进行细胞转染,计算转染率,并与脂质体转染组,空白载体组及空白对照组进行比较。(2)观察在外加磁场条件下的氨基硅烷化 Fe₃O₄ 磁性纳米粒的转染效率和速度。(3)观察 -p53 磁性纳米粒对 HepG2 细胞生长增殖的抑制作用。结果 (1)RT-PCR 及 Western blot 检测证实,载有氨基硅烷化 Fe₃O₄ 的磁性纳米粒能成功的在人肝癌 HepG2 细胞中导入了外源性的野生型 p53 基因,其转运效率(39%)略高于相同条件下脂质体的转染效率(36%)($P > 0.05$)。(2)在外加磁场条件下氨基硅烷化 Fe₃O₄ 磁性纳米粒的转染效率明显增强。(3)转染的外源性 p53 基因可明显抑制人肝癌 HepG2 细胞的生长速度及集落形成能力,使细胞阻滞于 G₁ 期,抑制率为 46%。结论 (1)氨基硅烷化 Fe₃O₄ 纳米颗粒是良好的基因转运载体,可将外源性基因成功的转入靶细胞。(2)转入外源性野生型 p53 能有效抑制 HepG2 细胞的生长增殖。该研究为基因治疗恶性肿瘤的在体实验奠定了基础。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(6): 578-583]

关键词: 癌, 肝细胞; 基因, p53; 氨基硅烷化 Fe₃O₄ 纳米粒; 基因治疗

中图分类号: R 735.7

文献标识码: A

Effect of amino-functional Fe₃O₄ nanoparticles-mediated pcDNA3.1(+)-p53 on HepG2 Cells in vitro

OUYANG Dequn^{1,2}, ZHANG Yangde¹, HE Jiantai¹

(1. Hepatobiliary and Intestinal Research Center of Health Administration, Central South University, Changsha 410008, China; 2. People's Hospital of Ningyuan County, Ningyuan, Hunan 425600, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of amino-functional Fe₃O₄ nanoparticles-mediated pcDNA3.1(+)-p53(-p53) on human hepatoma cell line-HepG2 cell. **Methods** (1) Use of functional Fe₃O₄ nanoparticle as a vector to transfect-p53 into HepG2 cells, calculate the transfected rate, and compare it with lipofectamine vector group, blank functional Fe₃O₄ nanoparticles (FFN) group and control group. (2) Observation of the transfected rate and velocity of FFN under addition of extra-magnetic field. (3) Observation of the inhibition effect of transfected-p53 on HepG2 cells growth. **Results** (1) RT-PCR and Western blot examination confirmed that FFN could successfully transfect-p53 into HepG2 cells, the transfection rate (39%) was slightly higher than that of liposome (36%) ($P > 0.05$). (2) The transfection rate and velocity could be increased by addition of extra-magnetic field. (3) Transfected-p53 obviously inhibited the growth of HepG2 at G₁ phase; the growth inhibition rate of HepG2 was 46%. **Conclusions** (1) FFN is a

收稿日期: 2008-01-10; 修订日期: 2008-04-09.

作者简介: 欧阳德群, 男, 中南大学卫生部肝胆肠中心博士研究生, 主要从事胃肠肝胆胰肿瘤方面的研究。

通讯作者: 欧阳德群 E-mail: oydq6269868@163.com

good vector for gene transfection, it can successfully transfect the gene into target cells. (2) Transected-p53 can effectively inhibit the growth of HepG2. This result can establish a foundation for animal experimental research of gene therapy of malignancy.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(6): 578 - 583]

Key words: Carcinoma, Hepatocellular; Gene, p53; Amino-functional Fe₃O₄ Nanoparticle; Gene Therapy

CLC number: R735.7

Document code: A

p53 基因异常与肝癌的分化状态有关, p53 基因异常可能影响肝癌治疗的疗效及预后^[1-3]。p53 基因是公认的人类肿瘤中突变率最高的基因, 野生型 p53 被认为是一个肿瘤抑制基因^[4]。利用基因转染技术恢复肿瘤细胞中野生型 p53 的功能是基因治疗恶性肿瘤的重要途径。

传统上基因转染系统被分为病毒载体系统和非病毒载体系统两大类, 但均存在某些难以克服的局限性^[5]。纳米技术的出现为解决基因转移载体问题提供了新的思路。磁性纳米除了具有一般纳米颗粒的特性外, 还具有超顺磁性^[6], 并能在外加磁场的作用下定向移动, 从而实现靶向治疗^[7]。

本研究采用本中心制备的氨基硅烷化 Fe₃O₄ 磁性纳米粒作为基因转运载体, 它能以静电吸附作用和质粒 DNA 连接, 具有较高的结合效率, 对 DNA 有保护作用, 且毒性较低(另文报告)。本研究主要探讨氨基硅烷化 Fe₃O₄ 磁性纳米粒对基因的转染效率, 以及外加磁场对转染效率的影响, 企以为后续动物体内转染的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞系 HepG2 细胞来源于人肝细胞癌组织, 本中心保存。

1.1.2 pcDNA3.1(+) 质粒 由中南大学湘雅医学院肿瘤研究所胡多沙博士惠赠。

1.1.3 主要试剂 新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所), RPMI1640 培养基和 DMEM 培养基(GIBCOBRL 公司), MTT 试剂(上海生工生物工程公司), DMSO, 溴化乙锭(EB)(Sigma 公司), 青霉素、链霉素(华北制药有限公司产品), PBS 缓冲液(pH 7.2~7.4)(本实验室自配), 胰蛋白酶(1:250)(华美生物工程公司), 硝酸纤维素膜(NC 膜)(宝泰克公司), 琼脂糖(电泳级)(Promega 公司), 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)分析纯、随机引物 DNA 标记试剂盒、

DEPC(上海生工生物工程公司), Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司), Ex Taq 聚合酶(TakaRa 公司), PCR Marker ladder 2000(大连宝生公司), Western Blotting 检测试剂盒(美国 Promega 公司), SDS(华美生物公司), 无水乙醇(上海振兴化工一厂), Lipofectamine 转染试剂(美国 Invitrogen 公司)。

1.1.4 主要实验仪器 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司), PCR 仪(Gene Cyclor TM, 美国 BIO-RAD 公司), 钕铁硼稀土永久性强磁铁(中南大学物理教研室提供), 凝胶扫描成像系统(Gel Doc 1000, 美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 氨基硅烷化 Fe₃O₄ 磁性纳米粒介导 pcDNA3.1(+) - p53 质粒(-p53 质粒)体外转染 HepG2 细胞

(1) 转染前 1 d, 在 6 孔板中每孔种入大约 $0.5 \sim 1 \times 10^5$ 个 HepG2 细胞, 每孔加入 1 mL 的完全培养基, 37 °C 在 CO₂ 孵箱中至细胞融合至 70~80%。(2) 分别将氨基硅烷化 Fe₃O₄ 磁性纳米粒与绿色荧光蛋白的 -p53 质粒按质量比 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 0.1:1 混合, 室温下超净台内放置 1 h, 形成纳米粒/DNA 复合物。(3) 转染前 2 h, 将培养液吸出, 用无血清的 RPMI1640 培养基洗涤 2 次, 更换新鲜培养基。加入一定量的纳米粒子 DNA 复合物(约含 -p53 表达质粒 DNA 3 ug), 置 37 °C 培养箱中培养 5 h。(4) 5 h 后加入 1 mL 含 20% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 继续培养 18~24 h 后, 更换培养液继续培养。37 °C 在孵箱中孵育 5 h。(5) 在转染开始后的 48 h, 观测转染效率。以上每组平行实验 3 次。

1.2.2 Lipofectamine 试剂介导 -p53 质粒体外转染 HepG2 细胞

(1) 转染前 1 d, 在 6 孔板中每孔种入大约 $(0.5 \sim 1) \times 10^5$ 个 HepG2 细胞, 每孔加入 1 mL 的完全培养基, 37 °C 在 CO₂ 孵箱中至细胞融合至 70%~80%。(2) 将稀释的质粒 DNA 和

Lipofectamine试剂混合,室温孵育45 min以便形成DNA-脂质体复合物(可能出现溶液不清澈的现象,但并不影响转染)。当复合物形成后,用无血清的转染培养基代替孔板中含血清的培养基。(3)加入0.5 mL的无血清的转染培养基到含有复合物的管中,轻轻混匀,将稀释后的复合物溶液加入到洗过的细胞中(可加入带血清的培养基,在转染过程中不要在培养基中加入抗生素),37℃在孵箱中孵育5 h。(4)孵育后,在不除去转染混合物的情况下,加入0.5 mL血清浓度为平时两倍的培养基。如果在第6步含有血清时,则此时加入0.5 mL完全生长培养基。(5)转染18~24 h后,用新鲜的完全培养基取代原来的培养基。在转染开始后的48 h,观测转染效率。以上每组平行实验3次

1.2.3 外加磁场的条件下对氨基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒介导-p53质粒体外转染HepG2细胞的影响 在基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒介导-p53质粒体外转染HepG2细胞的6孔板下,置放钕铁硼稀土永久性强磁铁,观察外加磁场的条件下对转染效率的影响。转染步骤同前。连续培养5 d,分别与1,2,3,4 d时点的相同条件下用0.25%胰酶消化收集的转染细胞进行观测比较。

1.2.4 流式细胞仪检测体外转染效率 用荧光显微镜观察GFP的表达情况后,将各孔中的培养液吸尽,细胞用PBS清洗后,加入0.25%的胰酶消化5 min,用培养基终止消化,用吸管将细胞轻轻吹下,形成细胞悬液,加入到离心管中,800 r/m离心10 min,弃上清加入PBS,轻轻吹吸,形成细胞悬液,样本上流式细胞仪通过检测发绿色荧光的细胞数而获得转染效率。

1.2.5 RT-PCR检测HepG2细胞体外转染-p53基因 HepG2肝癌细胞中总RNA的提取参照Trizol™说明书。将HepG2细胞黏附于直径90 mm的无菌塑料平皿,去上清,PBS液洗2次,加入Trizol试剂,吹打细胞使之裂解,室温孵育5 min,移入经DEPC处理的Eppendorf管,加200 μL 氯仿/管,剧烈振荡15 s,室温下静置3 min,4℃,8 000 r/m离心15 min,取上清,加入500 μL 异丙醇,室温静置10 min,4℃8 000 r/m离心10 min,弃上清,沉淀用75%酒精洗1遍,室温干燥沉淀,溶于无RNase的DEPC水,测其OD260/OD280的

值,判断所提RNA的质量,并取2 μL 进行电泳,其余存入-80℃。参照TaKaRa公司说明书取1 μg 总RNA先进行逆转录,然后进行PCR扩增。

反应设置:(1)48℃,温育45 min;(2)94℃,3 min。(2)PCR反应:各组样品均分别扩增p53 cDNA片段和 β -actin cDNA片段, β -actin cDNA作为内对照。引物设计:设计p53和 β -actin引物序列。扩增的片段长度p53 cDNA片段为1.4 kb, β -actin为617 bp。引物序列(由上海生物工程公司设计):p53基因上游引物:5'TCAGTCT-GAGTCAGGCCCT 3',p53基因下游引物:5'ATG-GAGGAGCCGCAGTCAG 3'; β -actin上游引物:5'-GGATTCCTATGTGGCGACG-3', β -actin下游引物:5'-G-GAACCCTCATTGCCAATG-3'。

反应条件:94℃2 min,94℃45 s,62℃40 s,72℃1.5 min,35个循环;72℃10 min,4℃终止反应。PCR反应结束后,进行1%琼脂糖凝胶电泳,验证反应结果。

1.2.6 Western Blot 实验

1.2.6.1 蛋白质的抽提及电泳 (1)用PBS洗2次HepG2细胞,加入SDS加样缓冲液至培养瓶中,用橡胶刮子刮下细胞(由于染色体DNA的释放,使溶液变得很粘稠),将细胞裂解液吸入置于微量离心管中,沸水煮5~10 min。(2)用超声波打碎染色体DNA,直至溶液不粘为止。(3)室温下1 000 r/min离心10 min,取上清液置于另1个离心管中。(4)对上述细胞抽提液进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析:开始时电压为8 V/cm凝胶,染料进入分离胶后,将电压增加到15 V/cm凝胶,继续电泳直到染料抵达分离胶底部,断开电源,取下凝胶,进行Western Blot实验。

1.2.6.2 Western Blot检测P53蛋白 严格按照试剂盒说明书进行操作。最后行DAB显色,显色后蒸馏水洗涤,并观察,照相。

1.2.7 细胞生长曲线及集落形成测定 指数生长期的细胞以每孔 1.5×10^4 个细胞密度接种24孔培养板,每组4个复孔,培养24 h后用台盼兰染色,每天计数活细胞数,未测细胞每日半量更换培养液。6孔板每孔接种500个细胞,培养2周后,计数>50个细胞的集落数。

1.2.8 透射电镜观察细胞凋亡情况 转染后

72 h,将 HepG2 细胞用 0.25% 的胰酶消化,培养基中止消化,轻轻吸吹细胞形成细胞悬液,加入到离心管中,800 r/m 离心 10 min,弃上清,将细胞团用戊二醛固定后,制作成超薄切片,投射电镜下观察细胞的形态。

1.2.9 流式细胞仪检测 HepG2 细胞凋亡率 转染后 72 h,将各孔细胞用 0.25% 的胰酶消化,培养基中止消化,轻轻吹吸细胞形成细胞悬液,加入到离心管中,800 r/m 离心 10 min,弃上清,加入 PBS,轻轻吹吸,形成细胞悬液,然后将等体积的细胞悬液和碘化丙啶 (PI) 染液混合,4 ℃ 放置 30 min 后,将样品用 300 目尼龙膜过滤,用流式细胞仪检测各样品细胞的凋亡率。

1.3 统计学方法

应用 SPSS (11.0 for windows) 软件进行数据的

处理及统计分析。各转染组对细胞生长抑制率的比较采取配对比较的 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 氨基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒介导 - p53 质粒体外转染 HepG2 细胞的结果

结果显示,氨基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒可以成功的将 - p53 质粒报告基因转入 HepG2 细胞,在氨基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒与绿色荧光蛋白报告基因 - p53 质粒按质量比为 1:1 时效率最高,测定的转染率为 39%,略高于脂质体的 36%,但无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 1-2)。

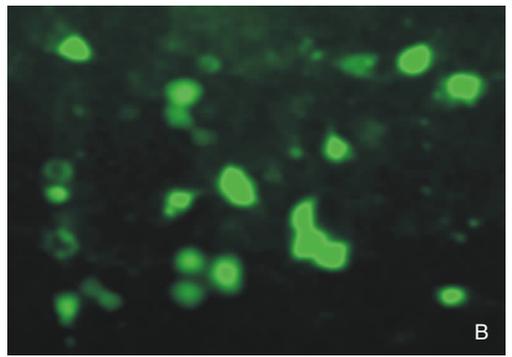
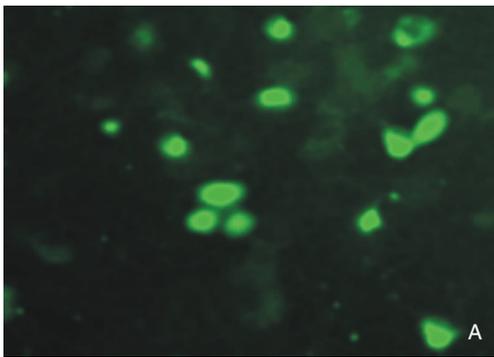


图 1 pEGFP-C1 质粒在 HepG2 细胞中的表达 A:氨基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒(m/m = 1:1) 转染; B:脂质体转染

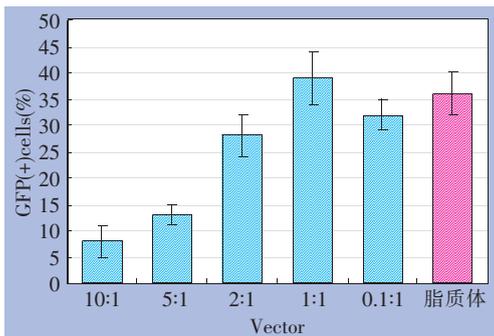


图 2 不同质量比氨基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒和脂质体转染质粒 pEGFP-C1 在 HepG2 细胞中阳性表达的比较

2.2 外加磁场对氨基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒基因转导的影响

结果显示,与无外加磁场作用相比,外加磁场作用的第 2 天,转染的阳性细胞率达 43%,相当于未加磁场第 3 天的转染效率;而外加磁场作用

的第 3 天,转染的阳性细胞率高达 54%,远高于未加磁场时的 45%。表明载基因氨基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒的转染效率随着 Fe_3O_4 磁性纳米粒与 - p53 质粒的作用时间增加而增加,然后呈逐渐降低的趋势;外加磁场作用不仅可以提高转染速度,而且可以提高转染效率。

2.3 RT-PCR 检测 HepG2 细胞体外转染目的基因的结果

RT-PCR 检测的结果显示,无论是在纳米粒转染组还是脂质体转染组中,PCR 反应产物的凝胶电泳结果均在 617 bp 和 1.4 kb 处出现了 2 条条带,符合 β -actin 和 p53 基因片段大小(图 3),说明 - p53 基因已被成功转导入 HepG2 细胞内。

2.4 Western blot 法检测各组细胞中 p53 蛋白的表达情况

结果显示,纳米粒转染组的 - p53 转染率最高,脂质体转染组稍低 裸质粒转染组几乎无表达(图 4)。

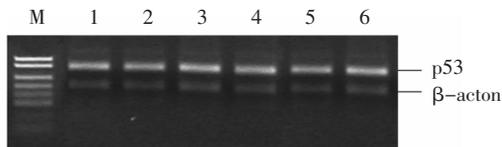


图3 RT-PCR反应结果的凝胶电泳图 M: DNA标志物; 1, 3, 5: 纳米粒转染组; 2, 4, 6: 脂质转染组

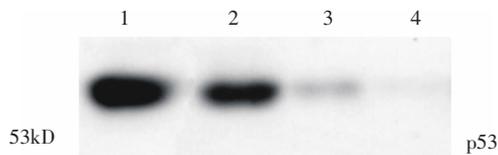


图4 Western blot检测结果 1: 磁性纳米粒介导转染-p53质粒, 表达水平最高; 2: 脂质体介导的转染, 表达水平略低于纳米粒组; 3: 裸质粒DNA组, 几乎无蛋白表达; 4: 空白对照组, 无表达

2.5 p53基因对HepG2细胞生长速度的影响

转染人野生型 p53 cDNA 组的细胞的生长速度较氨基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒空载体组的细胞及空白对照组 HepG2 细胞的生长速度明显减慢, 组间比较, 有统计学意义 ($P < 0.05$), 后两者细胞生长曲线相似, 组间比较, 无统计学意义 ($P > 0.05$) (图5)。

2.6 p53基因对HepG2细胞集落形成的影响

空白对照组, 转染空载体细胞及转染 p53 基因细胞的每孔集落形成数分别为 (102.7 ± 9.5) 个, (98.3 ± 7.6) 个, (56.0 ± 3.8) 个。转染 p53 基因的细胞的集落形成数明显低于前两者, 差异有显著性, ($P < 0.05$), 而前两者之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。转染 p53 基因细胞的集落形成率与空白对照组相比, 抑制率为 46%。

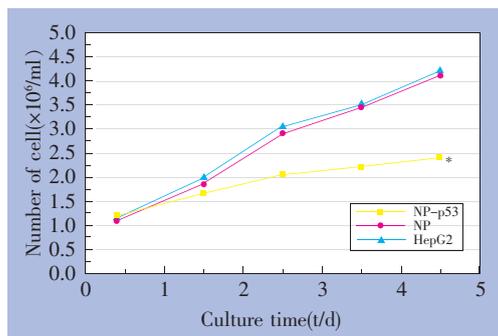


图5 p53基因对HepG2细胞生长速度影响曲线图

2.7 流式细胞仪检测凋亡

FCM 分析结果显示, 转染 - p53 质粒的人肝癌 HepG2 细胞与未经转染的细胞及纳米粒空载体组细胞比较, S 期和 G_2/M 期比例明显下降, G_1 期比例明显增加。未经转染的人肝癌 HepG2 细胞及纳米粒空载体组细胞周期中 G_1/G_0 , S, G_2/M 各期比例接近 (表1)。

表1 p53基因对HepG2细胞周期的影响(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	G_1/G_0	S	G_2/M
空白对照组	40.80 ± 2.45	$34.98 \pm 2.07^{1)}$	$14.82 \pm 0.96^{2)}$
空载体组	43.15 ± 1.49	$33.40 \pm 2.78^{1)}$	$14.45 \pm 1.04^{2)}$
p53质粒组	61.76 ± 2.27	22.22 ± 0.89	11.02 ± 0.75

注: 1) 与 p53 质粒组比较, 1) $P < 0.01$; 2) $P < 0.05$

3 讨论

修饰了的氨基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒具备了转运外源性 DNA 的特性, 包括可以以静电吸附作用与 DNA 结合, 具有较高的 DNA 结合效率和保护 DNA 免受核酸酶分解和超声剪切力的破坏作用, 毒性作用较小, 且转染效率略高于脂质体。然而脂质体对细胞具有较大的毒性作用, 转染的操作流程较氨基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒为复杂和繁琐。

氨基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒的制备过程也比较容易, 原材料价格较低, 具有成本上的优势。使用前仅通过 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤除菌后即可转染细胞, 不需要另行消毒。转染实验中也并未发现细胞有污染的现象。总体看来, 氨基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒作为基因载体具有一定的优越性。

研究表明, 基因体外转染效率与载体/DNA 复合物接触靶细胞的时间和接触的量密切相关。载体在靶部位聚集缓慢, 以及靶部位载体浓度过低是导致基因转染及表达效率不高的主要障碍^[7], 但借助外力的作用可将基因载体聚集于靶部位。本实验表明, 外加磁场有助于加快转染速度和增加转染效率, 这可能与外加磁场作用使得磁性纳米粒子定向移动有关。在外加磁场的定向作用下, 纳米粒/DNA 复合物可快速聚集并吸附于单层培养的细胞表面, 既增加了纳米粒/DNA 复合物与细胞的接触速度, 又增加了与转染细胞的接触, 而且在纳米粒转染的整个过程中, 培养液无需

更换,更延长了与细胞的接触时间。因此氨基硅烷化 Fe_3O_4 磁性纳米粒在外加磁场作用下对于基因转染起到了增效的作用。国外的研究也证实应用磁性纳米粒及外加磁场不仅可以大大提高基因转染效率,而且可以缩短达到转染峰值所需要的时间^[8-10]。本研究结果与之一致。

野生型 p53 基因是细胞生长的“监控器”,它的主要功能为调节细胞的生长周期,使受损伤的细胞停滞于 G_1 期,以使细胞有足够的时间修复损伤,如果修复失败,则通过诱导细胞凋亡,从而保证有癌变倾向的细胞不能继续存活^[11]。如果 p53 基因突变或缺失,则这些功能丧失,受损伤的细胞得不到很好的修复而继续增殖,进而发生癌变。

人肝癌中 p53 基因的异常率较高,因而对肝癌的 p53 基因治疗研究有良好的临床应用前景。本研究结果显示,外源的 p53 基因明显抑制了肝癌 HepG2 细胞生长速度及集落形成能力,说明人野生型 p53 基因能抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖能力及恶性表型。细胞周期分析结果表明,p53 基因可使肝癌 HepG2 细胞 G_1/G_0 期所占比例增高,S 期及 G_2/M 期所占比例下降,说明野生型 p53 基因能将肝癌 HepG2 细胞阻滞于 G_1 期,阻止其恶性生长。其作用机制可能是外源性 p53 表达的 p53 蛋白作为一种转录因子,对其下游的基因进行调控,激活下游的某些细胞增殖抑制基因及抑制某些与细胞增殖有关的基因表达,从而使细胞发生 G_1 期阻滞,抑制细胞增殖,并诱导 DNA 损伤的细胞凋亡。

参考文献:

[1] Lin Y, Shi CY, Li B, *et al.* Tumor Suppressor P53 and Rb genes in human hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Acad Med*

Singapore, 1996, 25(1): 22 - 30.

- [2] Puisieux A, Galvin K, Troalen F, *et al.* Retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes in human hepatoma cell lines [J]. *The FASEB J*, 1993, 7(14): 1407 - 1413.
- [3] Bressac B, Galvin KM, Liang TJ, *et al.* Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma [J]. *Proc Natl Acad*, 1990, 87(5): 1973 - 1977.
- [4] Nielsen LL, Lipari P, Dell J, *et al.* Adenovirus - mediated p53 gene therapy and paclitaxel have synergistic efficacy in models of human head and neck, ovarian, prostate, and breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(4): 835 - 846.
- [5] Tandia BM, Loney C, Vandenbranden M, *et al.* Lipid mixing between liposomes and plasma lipoproteins is a major barrier for intravenous transfection mediated by cationic lipids [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(13): 12255 - 12261.
- [6] Dobson J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nano particle based-gene delivery [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(4): 283 - 287.
- [7] Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, *et al.* Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells [J]. *J Vet Sci*, 2006, 7(4): 321 - 326.
- [8] Luo D, Saltzman WM. Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(8): 893 - 895.
- [9] Schere F, Anton M, Schilling U, *et al.* Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo [J]. *Gene therapy*, 2002, 9(2): 102 - 109.
- [10] Krötz F, de Wit C, Sohn HY, *et al.* Magnetofection - a Highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo [J]. *Mol Ther*, 2003, 7(5 Pt 1): 700 - 710.
- [11] Plank C, Scherer F, Schilling U, *et al.* Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields [J]. *J Liposome Res*, 2003, 13(1): 29 - 32.
- [12] Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome [J]. *Nature*, 1992, 358(6381): 15 - 16.