

蜂毒多肽空间稳定免疫脂质体的制备及体外对肿瘤细胞的选择性

胡海洋^{1*}, 陈大为¹, 刘彦仿², 乔明曦¹, 赵秀丽¹

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 第四军医大学 基础医学院 病理教研室, 陕西 西安 710032)

摘要: 蜂毒多肽在肿瘤治疗中的应用引起研究者的极大兴趣。本研究使用大豆磷脂、胆固醇、羧酸化 PEG-胆固醇制备了蜂毒多肽空间稳定脂质体,并将二硫键稳定抗人肝癌单链抗体联结 PEG-胆固醇末端。使用酶联免疫法考察了蜂毒多肽空间稳定免疫脂质体的活性。蜂毒多肽空间稳定免疫脂质体有较高的肿瘤细胞选择性。体外实验证明,其对 SMMC-7721 细胞的杀伤能力远强于蜂毒多肽空间脂质体,而对 HeLa 细胞的杀伤能力与蜂毒多肽空间脂质体无区别。蜂毒多肽空间稳定免疫脂质体对肿瘤细胞的选择性,可使其成为一种有效的靶向制剂。

关键词: 蜂毒多肽; 空间稳定免疫脂质体; 肿瘤细胞选择性; 体外细胞毒作用

中图分类号: R943.4 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)11 - 1201 - 05

Preparation and *in vitro* tumor cells selectivity of sterically stabilized immunoliposomal peptides in bee venom

HU Hai-yang^{1*}, CHEN Da-wei¹, LIU Yan-fang², QIAO Ming-xi¹, ZHAO Xiu-li¹

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. School of Basic Medicine, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Recently the use of peptides in bee venom (PBV) for cancer therapy has attracted considerable attention. In this study, the sterically stabilized liposomal PBV (PBV-SL) was prepared using soybean phosphatidylcholine, cholesterol, and cholesterol-PEG-COOH. The humanized anti-hepatoma disulfide-stabilized Fv (hdscFv25) was coupled to sterically stabilized liposomes using the N-hydroxysuccinimide ester method. The hdscFv25-immunoliposomes (SIL [hdscFv25]) were immunoreactive as determined by ELISA assay. SIL [hdscFv25] showed higher tumor cells selectivity. PBV-SIL [hdscFv25] can kill SMMC-7721 cells *in vitro* with higher efficiency than non-targeted liposomes. Whereas cytotoxicities were compared for HeLa cells, no significant differences was observed between PBV-SIL [hdscFv25] and PBV-SL. Sterically stabilized immunoliposomal peptides in bee venom could be one drug targeting delivery system.

Key words: peptide in bee venom; sterically stabilized immunoliposome; tumor cells selectivity; *in vitro* cytotoxicity

蜂毒多肽 (PBV) 主要由蜂毒肽 (melittin)、蜂毒明肽、MCD肽、含组胺肽、磷脂酶 A₂、透明质酸酶等组成,其中蜂毒肽是蜂毒的主要活性物质,约占干蜂毒的 50%。目前,蜂毒多肽主要应用于对心血管系统疾病治疗,具有抗菌、抗感染作用。近年来,蜂毒多肽所具有的抗肿瘤活性引起大量研究者的关注,

但它的强溶血性所产生的毒副作用限制其在临床上的广泛应用。众多降低蜂毒多肽毒副作用的方案中,蜂毒多肽脂质体是最有希望的一种。尽管脂质体在肿瘤治疗中是一种能够降低药物毒副作用的药物传递系统^[1],但传统脂质体只能使极少量的药物被动传递到肿瘤部位。脂质体表面结合一定抗肿瘤单克隆抗体或片段(第 1 代免疫脂质体),可使脂质体有效聚集于肿瘤区^[2],但这种免疫脂质体在体内的治疗效果相对较低,可能脂质体到达靶部位前,

收稿日期: 2007-05-28.

* 通讯作者 Tel: 86 - 24 - 23986308, Fax: 86 - 24 - 23986306,

E-mail: haiyang_hu@hotmail.com

已被 RES 系统识别、吞噬。在第 1 代免疫脂质体的基础上, 将如 PEG 等亲水性大分子同时接在脂质体表面(第 2 代免疫脂质体), 延长了脂质体在体内的循环时间^[3-5], 但 PEG 长链对单克隆抗体的屏蔽作用, 免疫脂质体的主动靶向能力极大下降。将 PEG 末端官能团改变, 使单克隆抗体可接在 PEG 末端, 制得的免疫脂质体为空间稳定免疫脂质体(sterically stabilized immunoliposomes, SIL), 为第 3 代免疫脂质体。体内实验证明, 空间稳定免疫脂质体具有较高的治疗效果^[6]。

基因工程技术的进步, 使从单克隆抗体中寻找、分离主要识别区成为可能^[7]。重组识别区轻链(V_H)、重链(V_L)构成的单链抗体(single-chain antibody, scFv), 具有原抗体的免疫活性, 可以达到靶向治疗的目的^[8,9]。现已有研究将单链抗体用于脂质体的制备^[10-12], 体外效果良好^[13]。

本实验制备了蜂毒多肽空间稳定免疫脂质体(PBV-SIL[hdscFv25]), 采用荧光磷脂(NBD-PE)标记免疫脂质体, 考察二硫键稳定抗人肝癌单链抗体(hdscFv25)介导的空间稳定免疫脂质体对肿瘤细胞(SMMC-7721 细胞, HeLa 细胞)的体外靶向性及影响因素, 并对其机制进行初步探讨。

材料与方 法

材料与试剂 蜂毒多肽(PBV)由本实验室精制, 蜂毒肽含量为 95%。PEG-胆固醇(PEG-Chol, PEG 相对分子质量为 2 000), 胆固醇-聚乙二醇琥珀酸衍生物 [α -(3 β)cholest-5-en-3- ω -succinct-poly(oxy-1, 2-ethanediy), Chol-PEG-COOH], 日本油脂株式会社; 大豆磷脂(SPC, 药用级, PC > 85%), 上海泰伟药业; 胆固醇(生化试剂), 北京化学试剂公司; Sephadex G-50、Sephacrose CL-4B(生化试剂), 瑞典 Pharmacia Biotech 公司; 乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)、氮羟基琥珀酰亚胺磺酸钠(S-NHS), Reckford 公司(IL); Fluorescein isothiocyanate (FITC), 美国 Sigma 化学试剂公司。荧光磷脂(NBD-PE), Avanti Polar Lipids(美国); HRP 标记羊抗鼠抗体、噻唑蓝(MTT)、DMSO、胰酶, Sigma 公司(美国); RPMI-1640 培养基, GIBCO(美国); 新生牛血清, 杭州四季青生物制品公司; hdscFv25、鼠抗人抗 His 抗体, 由第四军医大学病理教研室提供。其他试剂均为分析纯。

仪器 流式细胞仪, BECKMAN-COULTER Inc. (美国); BIORAD 550 型酶联免疫测定仪, BIO-RAD

Inc. (美国); IX51 型荧光显微镜, Olymas 公司(日本); UV-9100 型紫外分光光度计, 北京瑞利分析仪器厂; LS 型激光粒度仪, 美国贝克曼公司; 650-60 型荧光分光光度计, Hitachi 公司(日本)。

Chol-PEG-COOH 的合成及结构鉴定 胆固醇-聚乙二醇(240 mg, 0.1 mmol)、琥珀酸酐(59 mg, 0.5 mmol), 溶解于无水氯仿 5 mL、无水吡啶 100 μ L 的混合溶剂中。氮气保护下, 回流搅拌 48 h 后, 反应混合物过滤, 滤液减压除去溶剂。剩余物溶解于饱和碳酸氢钠 10 mL, 过滤后, 使用 1 mol \cdot L⁻¹ HCl 调溶液至 pH 3。氯仿萃取 3 次, 合并氯仿并用无水硫酸钠脱水。过滤后, 减压浓缩到 2 mL, 加入乙醚 20 mL 使产物析出, 抽滤除去溶剂。合成产物加入丙酮 10 mL 溶解, 重结晶。将原料和产物进行 TLC 分析, 展开剂: 氯仿-甲醇-冰醋酸 90:10:0.1, 以碘蒸气显色, 计算 R_f 值。合成产物使用红外光谱仪、核磁共振仪分析, 进行结构确证。

hdscFv25-PEG 修饰物的制备 将 Chol-PEG-COOH, EDC, S-NHS, 溶解于 10 mmol \cdot L⁻¹ MES 缓冲液 1 mL 中 (pH 5.5), 室温快速搅拌 2 h, 使用 0.1 mol \cdot L⁻¹ NaOH 调反应液 pH 值至 7.5, 加入 hdscFv25 (28 mg), 室温反应 16 h。将反应混合物在水中透析, 除去过量 Chol-PEG-COOH, 冷冻干燥后, 0 $^{\circ}$ C 保存。

蜂毒多肽空间稳定免疫脂质体(PBV-SIL)的制备 用薄膜超声法制备蜂毒-磷脂脂质体, 将磷脂, 胆固醇, Chol-PEG-COOH 及 NBD-PE 按处方量(3:2:0.2:1)溶于氯仿中, 使用旋转薄膜蒸发仪, 在真空下除去氯仿, 于瓶壁中形成均匀干膜, 用 10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.8) / 5 mmol \cdot L⁻¹ EDTA / NaCl 缓冲液配制 2 mg \cdot mL⁻¹ 蜂毒溶液, 按一定比例加入瓶中, 涡旋振荡, 超声 3 min, 过 220 nm 筛整粒。将蜂毒多肽长循环脂质体(PBV-SL)在 10 mmol \cdot L⁻¹ MES (pH 5.5) / 20 mmol \cdot L⁻¹ NaCl 缓冲液中 4 $^{\circ}$ C 透析, 过夜。取脂质体溶液(20 μ mol 磷脂) 1 mL, 加入 0.5 mol \cdot L⁻¹ EDC 100 μ L 和 0.5 mol \cdot L⁻¹ S-NHS 100 μ L, 室温反应 2 h。过量的 EDC 和 S-NHS 用 10 mmol \cdot L⁻¹ Tris 缓冲液 (pH 7.5) 透析除去。将 hdscFv25 按 hdscFv25 与磷脂比为 1:250, 加入到脂质体溶液中, 反应 16 h。Sephacrose CL-4B 柱分离后, 4 $^{\circ}$ C 保存。

ELISA 法检测 hdscFv25-PEG 修饰物的细胞结合活性 将 SMMC-7721 细胞和 HeLa 细胞接种于 96 孔板中, 培养 24 h。分别加入不同量 (2.5, 5.0,

10, 20, 40 ng)的 hdscFv25 和 hdscFv25-PEG 修饰物, 37 °C 培养 1 h。小心吸去培养液, 使用 PBS 清洗后, 加入一抗 (鼠抗人抗 His 抗体), 37 °C 培养 30 min。PBS 清洗 3 次后, 加入二抗 (HRP 标记的羊抗鼠抗体), 37 °C 继续培养 30 min。PBS 清洗 3 次后, 加入 OPD 100 μL 显色。15 min 后, 加入 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{SO}_4$ 50 μL 停止反应, 使用酶联免疫仪在 550 nm 处测定吸光度。每个浓度为 3 复孔。

流式细胞仪检测空间稳定免疫脂质体细胞结合与内化 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞, 接种于 100 mL 培养瓶中, 培养 24 h。分别取 SIL 和空间稳定脂质体 (SL), 以无血清的培养液稀释至磷脂浓度为 $400\text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$, 加入到培养瓶中, 37 °C 培养 1 h。部分实验在加入 SIL 前, 先加入 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ hdscFv25 100 μL , 37 °C 培养 30 min。将培养液小心吸出, 用预冷的 PBS 清洗未与细胞结合的脂质体。细胞消化后, 加入 PBS 分散细胞, $800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞。使用 75% 乙醇 2 mL 分散并固定细胞。在流式细胞仪中检测荧光强度。

荧光显微镜下观察空间稳定免疫脂质体细胞结合与内化 将 SMMC-7721 细胞、HeLa 细胞接种于 6 孔板中, 每个 6 孔板中预先放入 3 块无菌盖玻片, 培养 24 h。取 SIL [hdscFv25], 以无血清的培养液稀释至磷脂浓度为 $400\text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$, 加入到 6 孔板中, 2 mL 孔, 37 °C 培养 1 h。用 PBS 清洗去除未结合的脂质体。在荧光显微镜下观察 (200 倍), 并拍照。

蜂毒多肽空间稳定免疫脂质体的体外细胞毒作用 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞和 HeLa 细胞, 消化后用含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液轻轻吹打, 配制成单细胞悬液, 使用细胞记数板计细胞数。调整细胞浓度后, 以 100 μL 孔接种于 96 孔板中, 细胞数为 1×10^4 孔, 37 °C 培养 24 h。倒置显微镜下观察, 细胞生长面积达到 96 孔板培养面的 80% ~ 90%。分别加入不同浓度的蜂毒多肽 (PBV) 溶液、PBV-SIL [hdscFv25]、PBV-SL、PBV-SL + hdscFv25、hdscFv25 溶液、SIL [hdscFv25]、PBV-hdscFv25 溶液各 100 μL , 37 °C 培养 1 h。部分实验在加入 PBV-SIL [hdscFv25] 前, 预先加入 hdscFv25 ($50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 50 μL , 37 °C 培养 30 min。培养后小心吸出药液, 每孔加入新的培养液 200 μL , MTT ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 50 μL , 继续培养 4 h, 吸出液体, 每孔再加入 DMSO 200 μL 。在恒温摇床上, 振摇 10 min, 使沉淀溶解。将 96 孔板放入酶

标仪中, 于 490 nm 处测定吸光度。计算抑制率, 得到抑制浓度 IC_{50} 。每个浓度为 3 复孔, 实验重复 3 次。

数据统计 使用分析软件 SPSS 12.0 (Post Hoc 检验) 统计数据, $P < 0.05$ 认为有显著性差别。

结果

1 Chol-PEG-COOH 的结构鉴定

干燥后得到产物 224 mg, 产率为 90%。Chol-PEG-OH 与产物的 R_f 值分别为 0.62, 0.54。经丙酮重结晶后, TLC 分析表现单一产物点。红外光谱分析在 1 733.7 (酯, C=O)、1 647.5 (C=C) 处出现特征峰。核磁共振仪分析: $^1\text{H NMR}$ (DMSO, δ) 在 5.28 (1H, m, H-6), 3.55 ~ 3.63 (PEG \approx 180H) 处出现特征峰; $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO, δ) 检测在 175.24 (C-4'), 172.64 (C-1'), 69.10 (C-PEG) 处出现特征峰。结果表明, 所得产物为 Chol-PEG-COOH。

2 蜂毒多肽空间稳定免疫脂质体理化性质考察

经过测定后, 蜂毒多肽空间稳定免疫脂质体粒度分布呈单峰, 粒径为 (85.46 ± 5.48) nm。蜂毒多肽空间稳定免疫脂质体的 zeta 电位为 -32.1 mV。脂质体的封装率为 (85.87 ± 2.46)%。12 h 释放度为 (23.26 ± 2.45)%。

3 hdscFv25-PEG 修饰物的细胞结合活性变化

随着 hdscFv25 和 hdscFv25-PEG 修饰物浓度增加, SMMC-7721 细胞表面结合量增加, 但 hdscFv25 经过修饰后, 与 SMMC-7721 细胞的结合活性有所下降; hdscFv25 和 hdscFv25-PEG 修饰物对 HeLa 细胞均无结合活性 (图 1)。结果表明 hdscFv25 经过修饰后仍可保持其免疫活性。

4 空间稳定免疫脂质体的细胞结合与内化

流式细胞仪检测表明, SMMC-7721 细胞对 SIL 的结合与内化的量大于 SL。而游离的 hdscFv25 可显著性地抑制 SMMC-7721 细胞对 SIL 的结合与内化, 结果见图 2。hdscFv25 作为靶头有利于 SIL 与 SMMC-7721 细胞的结合与内化。

5 荧光显微镜下观察空间稳定免疫脂质体的细胞结合与内化

在荧光显微镜下观察发现, SIL [hdscFv25] 在 SMMC-7721 细胞中有明显的绿色荧光, 荧光主要分布于细胞表面和细胞浆内 (图 3A), 而 SIL [hdscFv25] 在 HeLa 细胞中绿色荧光较弱, 图象不清晰 (图 3B)。

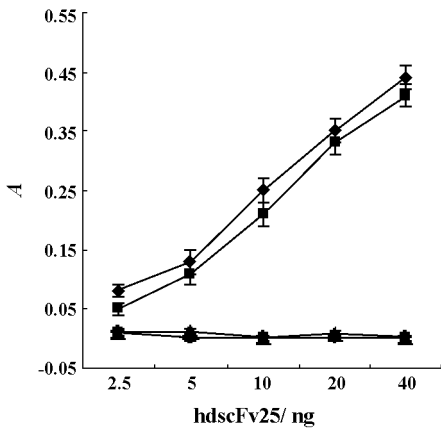


Figure 1 Effect of free hdscFv25 and hdscFv25 conjugated with Chol-PEG-COOH on binding to SMMC-7721 cells and HeLa cells. (◆—◆) Free hdscFv25 to SMMC-7721 cells; (■—■) hdscFv25 conjugated with Chol-PEG-COOH to SMMC-7721 cells; (▲—▲) free hdscFv25 to HeLa cells; (●—●) hdscFv25 conjugated with Chol-PEG-COOH to HeLa cells ($n = 3$). hdscFv25: Humanized anti-hepatoma disulfide-stabilized Fv

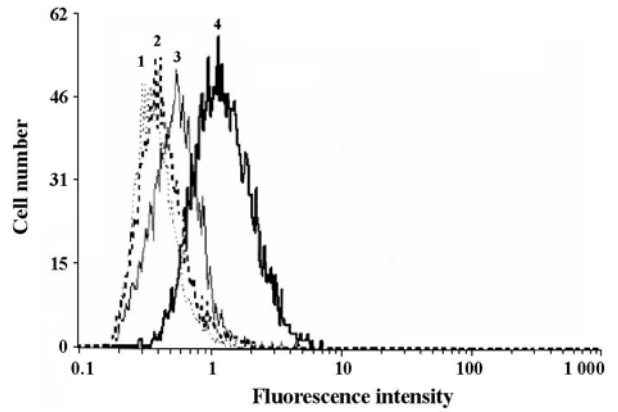


Figure 2 Flow cytometry analysis of cellular binding and uptake of SL and SIL[hdscFv25] by SMMC-7721 cells. 1: Control; 2: NBD-labeled SL; 3: Free hdscFv25 ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + NBD-labeled SIL [hdscFv25]; 4: NBD-labeled SIL [hdscFv25]. SL: Sterically stabilized liposome; SIL [hdscFv25]: hdscFv25-immunoliposomes

结果表明, SIL[hdscFv25] 对不同肿瘤细胞有选择性结合与内化。

6 不同脂质体体外细胞毒作用

体外细胞毒试验表明, PBV-SIL[hdscFv25] 对 SMMC-7721 细胞毒作用显著地强于 PBV-SL, 但对 HeLa 细胞毒作用与 PBV-SL 相同。加入 hdscFv25 溶液, 能抑制 PBV-SIL[hdscFv25] 对 SMMC-7721 细胞毒作用, 而对于 HeLa 细胞则无影响。hdscFv25 溶液、SIL[hdscFv25] 对 SMMC-7721 细胞和 HeLa 细胞均无杀伤作用 (表 1)。结果表明, 在治疗肿瘤中, PBV-SIL[hdscFv25] 具有更强的优势。

Table 1 Cytotoxicity effect of free peptides in bee venom (PBV) and various fomulations of PBV on SMMC-7721 cells and HeLa cells ($n = 9$)

Fomulation	IC ₅₀ / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	
	SMMC-7721 cell	HeLa cell
Free PBV	11.02 ± 1.14	7.63 ± 1.47
PBV-SIL[hdscFv25]	14.66 ± 2.47	100.21 ± 2.12
PBV-SIL[hdscFv25] and hdscFv25	27.4 ± 1.31*	104.57 ± 3.14
PBV-SL	113.3 ± 4.75**	103.81 ± 3.75
PBV-SL and hdscFv25	115.21 ± 3.71	107.21 ± 3.21
Free hdscFv25	-	-
SIL[hdscFv25]	-	-
Free peptides and hdscFv25	11.63 ± 0.75	7.96 ± 1.28

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PBV-SIL[hdscFv25]

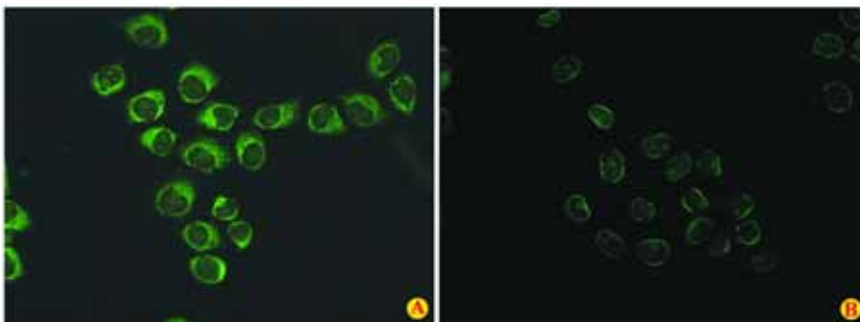


Figure 3 Immunofluorescence analysis of SIL[hdscFv25] in SMMC-7721 cells (A) and HeLa cells (B)

讨论

选择合适的交联方法对抗体的结合量和结合脂质体后的活性保留具有极大的影响。而交联方法的选择与抗体的结构和 PEG 末端所具有功能基团有关。目前, PEG 末端基团有 ① NH_2^- ; ② $\text{NH}_2\text{-NH}_2^-$; ③ PDP $^-$; ④ $-\text{COOH}$; ⑤ NHS $^-$; ⑥ MPB $^-$ 。虽然 NH_2 可以通过双功能交联剂进行结构改造, 如 PDP $^-$, MPB 均从 NH_2 得到的衍生物, 但使用 NH_2 或其衍生物(如 PDP $^-$)时, 交联的抗体必须存在 $-\text{SH}$ 或者使用 DTT 产生 $-\text{SH}$, 本实验使用的 hdscFv25 在结构设计上加入 4 条二硫键以增强 hdscFv25 的稳定性。使用 DTT 在 hdscFv25 分子中产生 $-\text{SH}$, 有违 hdscFv25 结构设计的目的, 尽管 PDP 法对抗体的结合量最大, 但在本实验中不适用。Manuyama 等^[9]使用磷脂-PEG-COOH 结合单克隆抗体, 体外实验证明, 依此制备的免疫脂质体能有效地靶向肺内皮细胞, 体内也可有效靶向肿瘤组织。考虑到 hdscFv25 分子的结构特点, 选择并合成了含有 $-\text{COOH}$ 的胆固醇 PEG 衍生物, 并应用于空间稳定免疫脂质体的制备。

一般认为, 脂质体药物释放到肿瘤细胞有 4 种机制: (1) 细胞外释药; (2) 亲脂性药物从脂质双分子层转移到肿瘤细胞膜; (3) 抗体介导的内吞; (4) 与细胞膜或核内体膜融合后释药^[14]。本实验使用荧光磷脂标记脂质体, 荧光磷脂作为脂质体的组成成分不可丢失, 使用流式细胞仪检测和荧光显微镜观察, 均发现 SIL[hdscFv25] 在细胞内有明显绿色荧光, 证明脂质体确实进入了细胞内部。因此, 可以表明 hdscFv25 介导的脂质体靶向不是前两种机制。

脂质体只有先与细胞结合, 才能进一步通过内化的方式进入细胞内部。实验证明, 游离 hdscfv25 对免疫脂质体细胞内化存在竞争抑制作用, 说明免疫脂质体主要通过“锚定作用”增加免疫脂质体与细胞的结合和内化。

References

- [1] Willis M, Forssen E. Ligand-targeted liposomes [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 29: 249 - 271.
- [2] Manuy K, Holmberg E, Kennel SJ, et al. Characterization of *in vivo* immunoliposome targeting to pulmonary endothelium [J]. *J Pharm Sci*, 1990, 79: 978 - 984.
- [3] Huang SK, Lee KD, Hong K, et al. Microscopic localization of sterically stabilized liposomes in colon carcinoma-bearing mice [J]. *Cancer Res*, 1992, 52: 5135 - 8143.
- [4] Wu HB, Deng YH, Wang SN, et al. The distribution of azidothymidine palmitate galactosylated liposomes in mice [J]. *Acta Pharm Sin (药理学学报)*, 2007, 42: 538 - 544.
- [5] Pan H, Niu GQ, Pan J, et al. Preparation and *in vitro* targeting of sterically stabilized liposomes modified with chimeric TNT23 monoclonal antibody [J]. *Acta Pharm Sin (药理学学报)*, 2006, 41: 506 - 512.
- [6] Williams SS, Alosco TR, Mayhew E, et al. Arrest of human lung tumor xenograft growth in severe combined immunodeficient mice using doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes [J]. *Cancer Res*, 1993, 53: 964 - 967.
- [7] Shao BY, Chen WB, Jiang SX, et al. The determination methods of transgenic products [J]. *Lett Biotechnol (生物技术通讯)*, 2004, 15: 516 - 518.
- [8] Liu GM, Xu QY, Long MN. The study on transgenic products using PCR-ELISA [J]. *Food Sci (食物科学)*, 2003, 24: 101 - 105.
- [9] Manuyama K, Takizawa T. Targeting of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)-s-conjugated at their distal terminals to monoclonal antibody [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1234: 74 - 80.
- [10] Tina V, Peter H, Thomas M, et al. Targeting of immunoliposomes to endothelial cells using a single-chain Fv fragment directed against human endoglin (CD105) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1663: 158 - 166.
- [11] Vertut-Doi A, Ishiwata H, Miyajima K. Binding and uptake of liposomes containing a poly(ethylene glycol) derivative of cholesterol (stealth liposomes) by the macrophage cell line J774: influence of PEG content and its molecular weight [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 278: 19 - 28.
- [12] Park JW, Kipotin DB, Hong K, et al. Tumor targeting using anti-her 2 immunoliposomes [J]. *J Control Release*, 2001, 74: 95 - 113.
- [13] Lu WY, Liu M, Pan J. Preparation of folate liposome and its delivery into cultured Hela cells [J]. *J Shanghai Med Univ (上海医科大学学报)*, 2000, 27: 4 - 8.
- [14] He AW. The study on liposome modified with PEG [J]. *Foreign Med Sci (Biol Prod Prophylaxis, Diag Ther) (国外医学 预防、诊断、治疗用生物制品分册)*, 2004, 27: 170 - 175.