

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.02.0191

PAMAM/sh-miR-34a 纳米复合物对黑素瘤细胞的抑制作用

李佳飞¹, 张紫杰¹, 陈秀慧¹, 籍涛², 王彦宗^{2*}

1. 河北北方学院, 张家口 075000

2. 北京军区卫生干部训练中心, 北京 102300

[摘要] **目的** 将树枝状聚合物聚酰胺-胺(PAMAM)包载可以表达具有抑制人恶性黑素瘤细胞 A375 增殖、侵袭和转移的 miR-34a 的质粒 sh-miR-34a, 构建聚阳离子纳米复合物 PAMAM/sh-miR-34a。考察形成的复合物的粒径、zeta 电位、细胞摄取, 以及对 A375 细胞的抑制作用。**方法** 利用粒度测定仪测定纳米复合物的粒径和电位, 凝胶电泳实验测定 PAMAM 对 sh-miR-34a 的包裹能力; 利用罗丹明标记的 sh-miR-34a 考察 A375 细胞对纳米复合物的摄取; CCK8 法测定 PAMAM/sh-miR-34a 对 A375 细胞的抑制作用; Transwell 法测定 PAMAM/sh-miR-34a 抑制 A375 细胞迁移和侵袭作用; 蛋白质印迹法测定 PAMAM/sh-miR-34a 对 A375 细胞中 pAkt, pRb, pERK1/2 蛋白表达的阻滞作用。**结果** PAMAM 包裹 sh-miR-34a 可形成稳定的纳米复合物, 在 N/P=20 时, 细胞对 PAMAM/sh-miR-34a 的摄取达最高 ($P<0.05$)。PAMAM 可以有效携带 sh-miR-34a 进入 A375 细胞, 体外抑制 A375 细胞的增殖、侵袭和迁移, 并且可以阻滞 A375 细胞中 pAkt, pRb 和 pERK1/2 蛋白的表达。**结论** PAMAM 可以包裹 sh-miR-34a 并对人恶性黑素瘤 A375 细胞起到抑制作用。

[关键词] 纳米复合物; 聚酰胺-胺; miR-34a; 黑素瘤

[中图分类号] R 739.5

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)02-0191-06

Inhibitory effect of PAMAM/sh-miR-34a nanocomplexes on malignant melanoma cells

LI Jia-fei¹, ZHANG Zi-jie¹, CHEN Xiu-hui¹, JI Tao², WANG Yan-zong^{2*}

1. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China

2. Health Cadre Training Center, PLA Beijing Military Area Command, Beijing 102300, China

[Abstract] **Objective** To use polyamidoamine dendrimers (PAMAM) loaded with sh-miR-34a for constructing PAMAM/sh-miR-34a nanocomplexes and to observe its inhibitory effect on the proliferation, invasion and metastasis of malignant melanoma A375 cells. **Methods** Particle size analyzer was used to investigate the potential and size of the constructed PAMAM/sh-miR-34a nanocomplex, and sh-miR-34a enrichment capability was determined by gel electrophoresis assay. The intracellular uptake of PAMAM/sh-miR-34a by A375 cells was investigated using sh-miR-34a labeled by rhodamine. CCK8 method was used to determine the inhibitory effect of the nanocomplex against A375 cell proliferation. Transwell assay was used to determine the inhibition effect of nanocomplex against A375 cell migration and invasion. Western blotting analysis was used to examine the inhibitory effect of PAMAM/sh-miR-34a on the protein expression of pAkt, pRb, and pERK1/2 in A375 cells. **Results** PAMAM loaded with sh-miR-34a could form stable nanocomplexes. The intracellular uptake of PAMAM/sh-miR-34a by A375 cells was the highest when N/P=20 ($P<0.05$). PAMAM effectively mediated sh-miR-34a entry into A375 cells, inhibiting the cell proliferation, invasion and metastasis and blocking the protein expression of pAkt, pRb, and pERK1/2 in A375 cells. **Conclusion** PAMAM can enwrap sh-miR-34a and inhibit malignant melanoma A375 cells.

[Key words] nanocomplex; polyamidoamine dendrimers; miR-34a; melanoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(2): 191-196]

黑素瘤 (malignant melanoma, MM) 是由黑素细胞产生的恶性肿瘤, 具有恶性程度高、转移发生早、预后效果差、死亡率高等特点, 目前临床上主要

采用化疗、生物抗体治疗等手段, 但这些治疗方法存在用药顺应性差、组织选择性差、毒性反应大及耐药性等问题^[1]。因此近年来基因治疗逐渐成为恶性黑

[收稿日期] 2015-05-30 **[接受日期]** 2015-07-29

[作者简介] 李佳飞, 硕士生, E-mail: ljf1678@126.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 010-84923632, E-mail: 13701081036@139.com

素瘤治疗领域的研究热点^[2]。研究表明,黑素瘤的发生和发展与 *p53* 基因的缺陷有关^[3]。*miR-34a* 作为 *miR-34* 家族的一员,在 *p53* 的调控通路中至关重要,*miR-34a* 的转录受 *p53* 蛋白的调节并对 *p53* 的活性产生正反馈调节作用^[4-6]。同时 *miR-34a* 能在转录水平抑制 *SIRT1* 基因的表达,从而抑制黑素瘤细胞的生长^[7]。这提示我们,利用合理的基因载体将 *miR-34a* 递送至黑素瘤组织,有望为治疗恶性黑素瘤提供一种新的思路和方法。

聚酰胺-胺型大分子(PAMAM)作为当前研究较为广泛的非病毒载体材料,其表面带有大量正电荷,可以与带有负电荷的 *miRNA* 有效结合,在药物载体领域有着较为广泛的应用^[8]。此外,与病毒载体相比,PAMAM 具有的高稳定性、无免疫原性、靶向特异性、易被修饰等优点在基因转染载体方面也具有良好的应用前景。因此,本研究使用 PAMAM 包裹可以表达 *miR-34a* 的质粒 *sh-miR-34a*,制备纳米复合物 PAMAM/*sh-miR-34a*,体外考察其对 A375 人黑素瘤细胞增殖、凋亡、侵袭和转移能力的影响,探讨 *miR-34a* 用于治疗人黑素瘤的应用前景。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂 Leica 倒置荧光显微镜 (Leica, 德国); FACSCalibur 流式细胞仪 (BD, 美国); *sh-miR-34a* 和 *sh-miR-NC* 质粒 (英为信公司, 中国); ECM GEL (Sigma, 美国); Cy3 Label IT[®] Tracker[™] (Mirus Bio LLC, 美国); G5 PAMAM 甲醇溶液 (体积分数 5%), Hanging Cell Culture Inserts (Millipore, 瑞士); Z90 激光粒度测定仪 (Malvern, 英国)。

1.2 A375 人黑素瘤细胞原代培养 将 A375 人黑素瘤细胞株 (中国科学院细胞库) 置于含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI 1640 培养基中,于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,每 2 d 换液 1 次,当细胞生长至 80% 融合状态时用于实验。

1.3 PAMAM/*sh-miR-34a* 复合物的制备及粒径和 zeta 电位测定 PAMAM 与 *sh-miR-34a* 溶液按照 PAMAM 与 DNA 的氮磷比 (N/P) 1 : 1、5 : 1、10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1 漩涡混合 10 s, 制得 PAMAM/*sh-miR-34a* 复合物。不同 N/P 值的

PAMAM/*sh-miR-34a* 复合物的粒径和 zeta 电位通过 Z90 激光粒度测定仪进行测定。

1.4 复合物凝胶电泳阻滞分析 采用琼脂糖凝胶电泳实验检测 N/P 为 0、0.5 : 1、1 : 1、5 : 1、10 : 1、15 : 1、20 : 1 时, PAMAM 对 *sh-miR-34a* 的包裹情况。条件为 1% (质量体积分数) 琼脂糖凝胶 (含 0.5% EB)、1×TAE 缓冲液、电压 100 V、电泳时间 60 min, 紫外投射仪 (上海复日科技有限公司) 观察、拍照。

1.5 荧光显微镜观察 A375 细胞对 PAMAM/*sh-miR-34a* 复合物的摄取 A375 人黑素瘤细胞以 1×10⁵/孔接种于 48 孔培养板中, 培养 24 h, 待细胞融合度为 70% 时进行实验。每孔加入 0.5 μg *sh-miR-34a-Cy3*, 按照 N/P 为 0、5 : 1、10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1 制备载基因复合物。实验前弃去原有培养基, 更换为无血清的 RPMI 1640 培养基并加入制得的复合物, 孵育 3 h 后采用荧光显微镜观察红色荧光并拍照, 激发波长为 548 nm, 发射波长为 562 nm。

1.6 流式细胞术检测 A375 细胞对 PAMAM/*sh-miR-34a* 复合物的摄取 A375 人黑素瘤细胞以 4×10⁵/孔接种于 12 孔培养板中, 培养 24 h, 待细胞融合度为 70% 时进行实验。按照 Cy3 Label IT[®] Tracker[™] 试剂盒的操作方法标记 *sh-miR-34a*, 以 1.3 μg *sh-miR-34a-Cy3*/孔制备复合物。弃去原有培养基并加入新鲜无血清的 RPMI 1640 培养基, 加入制备的复合物, 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 3 h, 弃去培养基, PBS 洗 3 次, 胰酶消化后离心并用 PBS 重悬收集细胞。以空白细胞为阴性对照。使用流式细胞仪检测 Cy3 的阳性率。

1.7 CCK8 法检测 PAMAM/*sh-miR-34a* 纳米复合物抗恶性黑素瘤细胞增殖效果 以 0.5 μg 质粒/孔、N/P 值为 20 制备 PAMAM/*sh-miR-34a* 纳米复合物。使用不表达任何 *miRNA* 序列的 *sh-miR-NC* 与 PAMAM 结合形成的纳米复合物作为对照。A375 人黑素瘤细胞以 1×10⁴/孔接种于 96 孔培养板中, 培养 24 h。弃去原有培养基, 取上述纳米复合物以 100 μL/孔加至 96 孔培养板, 37℃、5% CO₂ 条件下培养 3 h, 吸去纳米复合物。每孔加入 100 μL 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 继续培养至 24、48、72 h。取出培养板, 每孔加入 10 μL CCK8 试剂,

37℃、5% CO₂ 继续培养 3 h。结束后,取出培养板并震荡 10 min,酶标仪测定各孔在 450 nm 处的光密度(D)值。以未经纳米复合物处理的细胞孔为对照孔,其细胞存活率设为 100%,以未接种细胞的孔为空白孔。细胞存活率(%) = $[1 - (D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.8 PAMAM/sh-miR-34a 复合物抑制 A375 细胞迁移和侵袭能力考察 采用 Transwell 小室检测。取生长状态良好的 A375 细胞,按照 8×10^5 /孔接种于 6 孔培养板中,培养 24 h,待细胞融合度为 70% 时进行实验;利用不表达任何 miRNA 序列的 sh-miR-NC 与 PAMAM 结合形成的纳米复合物作为对照。实验时更换为无血清的培养基,按照 4 μg 质粒/孔、N/P 值为 20 制备 PAMAM/sh-miR-34a 复合物并用 PBS 稀释至 400 μL 加至 6 孔板中。转染 3 h 后更换为含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基继续培养 24 h。胰酶消化,使用无血清的 RPMI 1640 培养基调整细胞密度为 5×10^4 /孔。提前 1 h 从 -20℃ 冰箱中取出基质胶并于 4℃ 冰箱中解冻,按照基质胶:无血清培养基 = 1:7 的比例稀释并铺于 Transwell 上室,每个上室加入 100 μL 细胞悬液,下室加入 600 μL 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基。培养 24 h 后用 4% 甲醇固定 15 min,用棉签擦去上室细胞,再用 0.1% 结晶紫染色 15 min 后,置于显微镜下观察并拍照,随机选取 4 个视野(×100)进行细胞计数,计算平均值,实验重复 3 次。

1.9 蛋白质印迹法检测 PAMAM/sh-miR-34a 纳米复合物对 A375 细胞中相关蛋白的抑制 恶性黑色素瘤 A375 细胞同 1.2 项下培养,利用不表达任何 miRNA 序列的 sh-miR-NC 与 PAMAM 结合形成的纳米复合物作为对照。以每孔 1.5 μg 质粒,N/P 值为 20 分别制备 PAMAM/sh-miR-34a 和 PAMAM/sh-miR-NC 纳米复合物并加至 6 孔培养板,加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基使终体积为 2 000 μL,37℃、5% CO₂ 培养 3 h,吸去复合物。按照 2 000 μL/孔更换含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基,继续培养至 48 h。吸去培养基,用预冷的 pH 7.4 的 PBS 清洗 2 次,每孔加入 200 μL RIPA 裂解液于冰面上裂解 15 min,2 600 × g、4℃ 离心 30 min,吸取上清液。采用 BCA 法进行蛋白定

量,取等量蛋白(20 μg)进行 SDS-PAGE 电泳,恒压 100 V 电泳约 15 min,150 V 电泳 1 h;然后在 250 mA 的条件下电转膜 1.5 h,将蛋白转移至 PVDF 膜上;用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入相应的一抗(pAKt、pRb、pERK1/2 抗体的稀释度均为 1:200;β-actin 的稀释度为 1:5 000)4℃ 孵育过夜;加入相对应的 HRP 标记的二抗(均为 1:1 000 稀释)室温下孵育 2 h;0.1% Triton X-100/PBS 于室温摇床洗膜 3 次,每次 20 min。PVDF 膜经 ECL 发光液处理后压片、曝光 15 min、拍照。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 18.0 分析软件进行独立样本 *t* 检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 不同 N/P 值的 PAMAM/sh-miR-34a 复合物粒径和 zeta 电位考察 PAMAM 和 sh-miR-34a 形成的复合物粒径随着 N/P 值的增大而减小(图 1A),zeta 电位随着 N/P 值的增大由带负电变为带正电(图 1B),说明随着 N/P 值的增大,载体所带电荷增加,形成的复合物更加紧密。N/P=20 时形成的纳米复合物的粒径分布均匀(图 2A),电位适中(图 2B)。

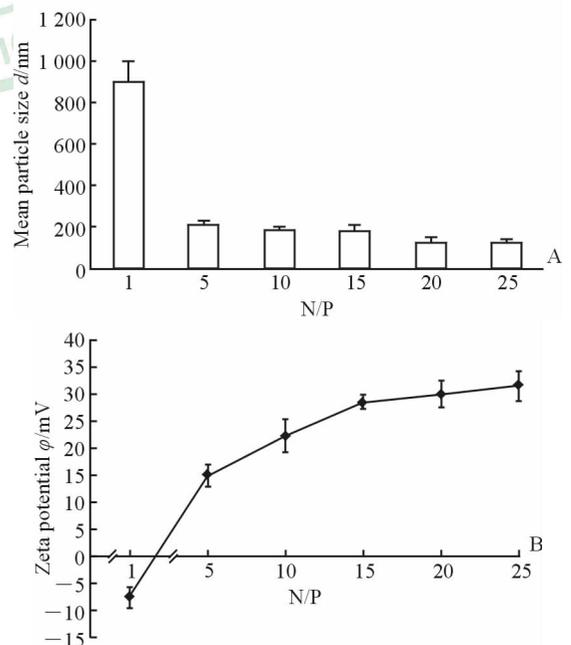


图1 不同 N/P 值时 PAMAM/sh-miR-34a 复合物粒径(A)和电位(B)

Fig 1 Sizes (A) and zeta potentials (B) of PAMAM/sh-miR-34a complexes at various N/P ratios

PAMAM: Polyamidoamine dendrimers. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

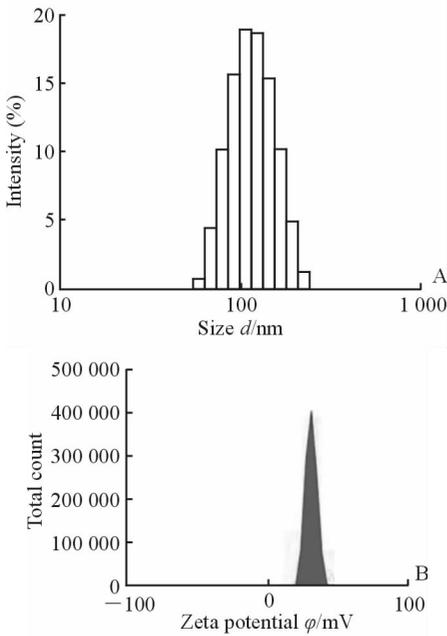


图2 N/P值为20时PAMAM/sh-miR-34a复合物粒径(A)和电位(B)

Fig 2 Sizes (A) and zeta potential (B) of PAMAM/sh-miR-34a complexes when N/P ratio was 20

PAMAM: Polyamidoamine dendrimers

2.2 复合物凝胶电泳阻滞分析结果 复合物的N/P值在0.5~1时,sh-miR-34a不能被PAMAM完

全包裹,在紫外线照射下可以看到清晰的条带。随着N/P值的升高,sh-miR-34a可以完全被PAMAM包裹,不能随着电场迁移,在紫外灯下未见条带检出(图3)。

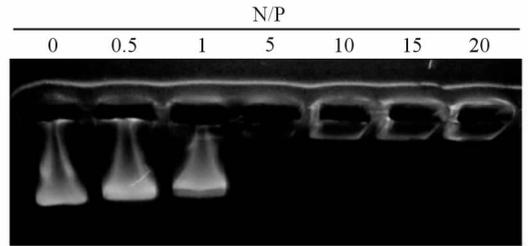


图3 不同N/P值时PAMAM/sh-miR-34a复合物琼脂糖凝胶电泳分析结果

Fig 3 Results of agarose gel electrophoresis of PAMAM/sh-miR-34a complexes at various N/P ratios

PAMAM: Polyamidoamine dendrimers

2.3 定性观察和定量 A375细胞对PAMAM/sh-miR-34a复合物的摄取 荧光显微镜和流式细胞仪的检测结果显示,随着N/P值的增加,A375对PAMAM/sh-miR-34a-Cy3的摄取也增加。在N/P=20时,细胞对PAMAM/sh-miR-34a-Cy3的摄取达最高。

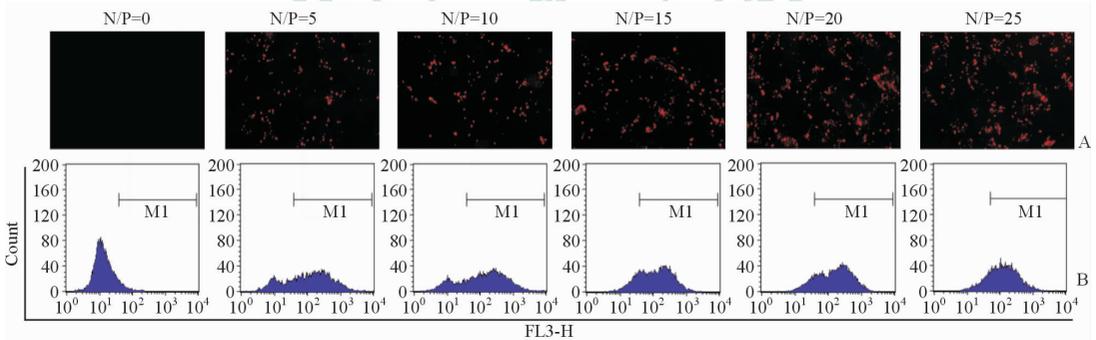


图4 荧光显微镜(A)和流式细胞仪(B)检测A375细胞对不同N/P值的PAMAM/sh-miR-34a-Cy3复合物摄取

Fig 4 Uptake of PAMAM/sh-miR-34a-Cy3 by A375 cells under fluorescence microscopy (A) and by flow cytometry (B) at various N/P ratios

PAMAM: Polyamidoamine dendrimers. Original magnification: $\times 200$ (A)

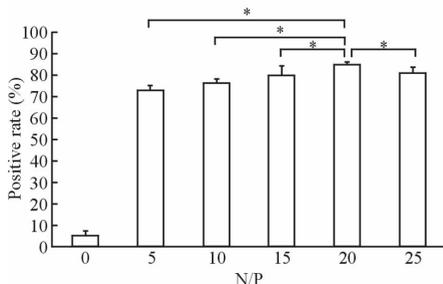


图5 不同N/P值时A375细胞对PAMAM/sh-miR-34a-Cy3复合物的摄取

Fig 5 Uptake of PAMAM/sh-miR-34a-Cy3 by A375 cells using flow cytometry at various N/P ratios

PAMAM: Polyamidoamine dendrimers. * $P < 0.05$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.4 PAMAM/sh-miR-34a复合物抗A375人黑色素瘤细胞增殖效果 由图6可以看出,转染72h后,PAMAM/sh-miR-34a组A375细胞的增殖受到抑制,抑制率为38.8%,而PAMAM/sh-miR-NC组和PAMAM组A375的抑制率分别为6.2%和9.8%,这是由于PAMAM本身为阳离子聚合物,末端氨基带有的正电荷使其具有潜在毒性。PAMAM/sh-miR-34a组和PAMAM/sh-miR-NC组以及PAMAM组差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

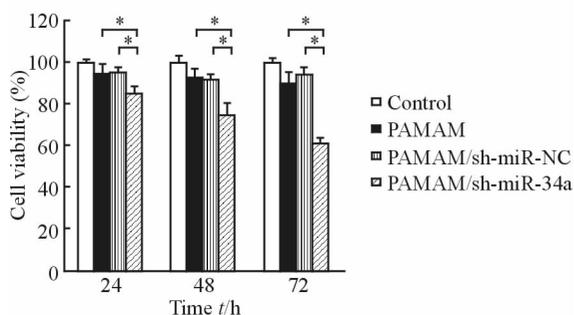


图6 PAMAM/sh-miR-34a对A375细胞的抑制作用

Fig 6 Inhibitory effect of PAMAM/sh-miR-34a against A375 cells

PAMAM; Polyamidoamine dendrimers. * $P < 0.05$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.5 PAMAM/sh-miR-34a复合物抑制A375细胞

迁移 Transwell 迁移实验显示,转染可以表达 sh-miR-34a 和 sh-miR-NC 的质粒后,PAMAM/sh-miR-34a 组发生迁移的细胞数目为 119.8 ± 21.3 , PAMAM/sh-miR-NC 组为 258.5 ± 10.2 ,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 PAMAM/sh-miR-34a复合物抑制A375细胞

侵袭 Transwell 侵袭实验显示,转染可以表达 miR-34a 的质粒和阴性对照后,PAMAM/sh-miR-34a 组发生侵袭的 A375 细胞数目为 72.2 ± 5.7 , PAMAM/sh-miR-NC 组为 164.9 ± 15.2 ,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.7 PAMAM/sh-miR-34a复合物对A375细胞中

pAkt、pRb、pERK1/2 蛋白抑制效果 PAMAM/sh-miR-34a 复合物与 A375 细胞作用 48 h 后,A375 细胞中 pAkt、pRb、pERK1/2 蛋白的表达较 PAMAM/sh-miR-NC 组降低。说明 miR-34a 起到了抑制恶性黑色素瘤 A375 细胞中 pAkt、pRb、pERK1/2 蛋白表达的作用(图 7)。

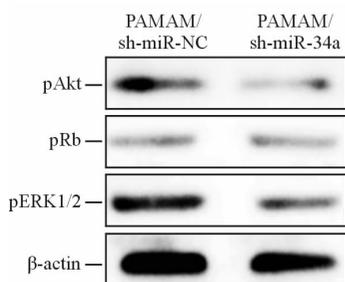


图7 PAMAM/sh-miR-34a对A375细胞中pAkt、pRb、pERK1/2蛋白的抑制效果

Fig 7 Inhibitory effect of PAMAM/sh-miR-34a and PAMAM/sh-miR-NC against expression of pAkt, pRb and pERK1/2 in A375 cells at 48 h post-transfection

PAMAM; Polyamidoamine dendrimers

3 讨论

黑色素瘤是皮肤常见的恶性肿瘤,转移复发率较高。黑色素瘤的发病原因尚不明确,目前认为与紫外线照射、化学致癌物以及病毒侵入等有关。但无论是化疗还是生物治疗都存在易产生耐药性以及适用范围窄等缺点,从基因水平进行治疗可以改善这些问题。目前 miRNA 在肿瘤发生和发展过程中所起的作用受到广泛关注。miRNA 在黑色素瘤发生和发展中的作用已有了一定的研究基础,Yang 等^[9]研究表明 miR-21 在 B16 细胞中表达显著升高,并抑制其靶基因 *PTEN* 的表达进而增强黑色素瘤细胞的增殖和侵袭能力。Mazar 等^[10]研究发现在黑色素瘤细胞中 miR-34b 的表达显著降低,高表达的 miR-34b 可以抑制黑色素瘤细胞的侵袭和迁移能力。合适的电位粒径是纳米复合物发挥作用的条件^[11]。本研究发现 N/P 值大于 5 时,PAMAM 与 sh-miR-34a 形成较为稳定的纳米复合物,当 N/P 值为 20 时,纳米复合物电位粒径最为理想,这为纳米复合物进入黑色素瘤细胞并发挥作用提供了前提。从摄取的结果也可以看出,当 N/P 值为 20 时,人黑色素瘤 A375 细胞对 PAMAM/sh-miR-34a 的摄取达最高($P < 0.05$)。这可能是由于随着 N/P 值的升高 PAMAM 的正电性增强,对 sh-miR-34a 的包裹更加紧密。PAMAM 末端的氨基在进入细胞后可以发挥类似“质子海绵效应”的作用,当溶酶体内的 pH 下降时,PAMAM 能够大量捕获质子,引起 Cl^- 内流,造成溶酶体渗透性肿胀,导致溶酶体破裂从而促进 PAMAM/sh-miR-34a 纳米复合物从溶酶体中逃逸^[12],最终表达出 miR-34a 进而抑制 A375 细胞的增殖、侵袭和迁移,本实验的结果也证明了这一点。

Akt 是一种信号转导蛋白,作为磷脂酰肌醇 3 (PI3K)通路的关键效应因子,在细胞存活和凋亡的平衡关系中起重要作用^[13]。有研究发现磷酸化的 Akt(pAkt)在黑色素瘤组织中表达升高,可以作为药物靶点^[14]。Rb 基因属于抑癌基因,在控制细胞进入或脱离细胞周期的过程中起重要作用,Rb 失活后成为 pRb,释放多种转录因子,从而造成细胞增殖失控^[15]。细胞外调节蛋白激酶(ERK)分为 ERK1 和 ERK2,统称为 ERK1/2。ERK1/2 磷酸化后(pERK1/2)会导致细胞增殖加速进而形成肿瘤^[16]。

本研究发现,PAMAM/sh-miR-34a 复合物与 A375 细胞作用 48 h 后,A375 细胞中 pAkt、pRb、pERK1/2 蛋白的表达降低,从而起到抑制 A375 增殖、侵袭和迁移的作用。

综上所述,本研究以目前研究最为广泛和深入的非病毒载体材料 PAMAM 为载体,构建了基因递送系统,发现 PAMAM/sh-miR-34a 纳米复合物对人恶性黑色素瘤 A375 细胞具有抑制作用,为 miR-34 临床治疗恶性黑色素瘤提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] Webster R M, Mentzer S E. The malignant melanoma landscape[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014,13:491-492.
- [2] Jochemsen A G. Reactivation of p53 as therapeutic intervention for malignant melanoma [J]. *Curr Opin Oncol*, 2014,26:114-119.
- [3] Stretch J R, Gatter K C, Ralfkiaer E, Lane D P, Harris A L. Expression of mutant p53 in melanoma [J]. *Cancer Res*, 1991,51:5976-5979.
- [4] Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein C J. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008,105:13421-13426.
- [5] Zhang D G, Zheng J N, Pei D S. PP53/microRNA-34-induced metabolic regulation: new opportunities in anticancer therapy[J]. *Mol Cancer*, 2014,13:115.
- [6] Bommer G T, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski A J, Kuick R, Love R E, et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes[J]. *Curr Biol*, 2007,17:1298-1307.
- [7] Bader A G. miR-34—a microRNA replacement therapy is headed to the clinic[J]. *Front Genet*, 2012,3:120.
- [8] 沈楠,朱宏. 药物载体 PAMAM 树状大分子的毒理[J]. *材料导报*, 2012,26:72-77,89.
- [9] Yang C H, Yue J, Pfeffer S R, Handorf C R, Pfeffer L M. MicroRNA miR-21 regulates the metastatic behavior of B16 melanoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2011,286:39172-39178.
- [10] Mazar J, Khaitan D, DeBlasio D, Zhong C, Govindarajan S S, Kopanathi S, et al. Epigenetic regulation of microRNA genes and the role of miR-34b in cell invasion and motility in human melanoma [J]. *PLoS One*, 2011,6:e24922.
- [11] Pack D W, Hoffman A S, Pun S, Stayton P S. Design and development of polymers for gene delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005,4:581-593.
- [12] Wang X, Wu X, Fan W, Ding B, Wang X, Zhang W, et al. Surface modification with pluronic P123 enhances transfection efficiency of PAMAM dendrimer [J]. *Macromol Res*, 2012, 20:162-167.
- [13] Maes H, Martin S, Verfaillie T, Agostinis P. Dynamic interplay between autophagic flux and Akt during melanoma progression *in vitro* [J]. *Exp Dermatol*, 2014,23:101-108.
- [14] Gowda R, Madhunapantula S V, Kuzu O F, Sharma A, Robertson G P. Targeting multiple key signaling pathways in melanoma using leelamine [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014,13:1679-1689.
- [15] 欧阳学农,王文武,姜浩. 人乳腺癌细胞凋亡与去磷酸化 RB 蛋白的关系 [J]. *中国癌症杂志*, 2004,14:306-308.
- [16] 陈办成,姚勇丰,杨媛慧,钟绮丽,邵勇,张杰,等. U0126 对黑色素瘤细胞 A375 侵袭的抑制作用 [J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2013,29:88-91.

[本文编辑] 周燕娟