

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00852

## c-FLIP 反义寡核苷酸纳米粒抑制人眼眶横纹肌肉瘤裸鼠移植瘤的生长

梁 莉<sup>1</sup>, 魏锐利<sup>2\*</sup>

1. 安徽省立医院眼科, 合肥 230001
2. 第二军医大学长征医院眼科, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 探讨 c-FLIP 反义寡核苷酸(c-FLIP ASODN)纳米粒(NP)对裸鼠体内人眼眶横纹肌肉瘤移植瘤生长的影响,评估纳米粒作为基因载体的可行性。**方法** 皮下种植法建立裸鼠人眼眶横纹肌肉瘤动物模型,瘤体内分别注射 c-FLIP 反义寡核苷酸纳米粒(ASODN NP组)、未包裹的 c-FLIP 反义寡核苷酸(ASODN组)及生理盐水(NS组),观察肿瘤体积、组织形态学改变;应用蛋白质印迹分析及免疫组化染色检测各组肿瘤组织 c-FLIP 的表达情况;应用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒检测肿瘤组织细胞凋亡情况。**结果** 与其他两组相比,ASODN NP 组肿瘤的生长受到抑制;蛋白质印迹分析显示 ASODN NP 组和 ASODN 组的 c-FLIP 表达均较 NS 组减少( $P < 0.05$ );免疫组化显示 c-FLIP 表达于胞质,ASODN NP 组 c-FLIP 阳性细胞较其余两组减少( $P < 0.05$ );ASODN NP 组及 ASODN 组肿瘤组织凋亡细胞增多,ASODN NP 组更加明显,NS 组仅见个别细胞凋亡。**结论** c-FLIP ASODN NP 可有效抑制人眼眶横纹肌肉瘤裸鼠移植瘤的生长。NP 可作为一种安全有效的 ASODN 导入载体。

**[关键词]** 反义寡核苷酸类;纳米粒子;c-FLIP;横纹肌肉瘤;裸小鼠

**[中图分类号]** R 739.72 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)08-0852-05

## c-FLIP antisense oligonucleotide-loaded nanoparticles inhibit growth of human orbital rhabdomyosarcoma xenograft in nude mice

LIANG Li<sup>1</sup>, WEI Rui-li<sup>2\*</sup>

1. Department of Ophthalmology, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, Anhui, China
2. Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme-inhibitory protein (c-FLIP) antisense oligonucleotide (ASODN)-loaded nanoparticles (NP) on the human orbital rhabdomyosarcoma xenograft in nude mice, so as to assess the feasibility of nanoparticles as a gene vector. **Methods** The model of human orbital rhabdomyosarcoma xenograft was established in nude mice, and the tumors were injected with c-FLIP ASODN NP, c-FLIP ASODN or normal saline (NS). The tumor volume and histopathological changes of tumor were observed. Western blotting analysis and immunohistochemical analysis were used to examine the expression of c-FLIP in tumor tissues of each group. Apoptosis of tumor cells was detected using TUNEL method. **Results** The growth of human orbital rhabdomyosarcoma in nude mice was significantly inhibited in ASODN NP group compared with the other two groups. Western blotting analysis showed that c-FLIP protein expression in ASODN NP and ASODN groups was significantly decreased compared with NS group ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemical study showed that c-FLIP expression was found in the endochylema, and the c-FLIP positive cells in ASODN NP group was significantly less than those in the other two groups ( $P < 0.05$ ). Tumor cell apoptosis was observed in both ASODN NP and ASODN groups, with more found in the former, and only a few apoptotic cells were found in the NS group. **Conclusion** c-FLIP ASODN NP can effectively inhibit the growth of human orbital rhabdomyosarcoma xenograft in nude mice, indicating that nanoparticles may serve as a safe and effective vector for ASODN.

**[Key words]** antisense oligonucleotides; nanoparticles; c-FLIP; rhabdomyosarcoma; nude mice

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(8):852-856]

**[收稿日期]** 2013-05-10 **[接受日期]** 2013-06-30

**[基金项目]** 上海市科委纳米专项基金(0352nm114). Supported by Special Fund for Nano-research of Shanghai Science and Technology Committee (0352nm114).

**[作者简介]** 梁 莉, 硕士, 主治医师. E-mail: doctorlily@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885921, E-mail: ruiliwei@gmail.com

细胞型 Fas 相关死亡结构域样白介素-1 $\beta$  转换酶抑制蛋白(Fas-associated death domain-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme-inhibitory protein, c-FLIP)是细胞凋亡的抑制蛋白<sup>[1]</sup>,在 mRNA 水平上存在多种剪接形式,在体内有 2 种蛋白表达形式,即 28 000 的 c-FLIP<sub>S</sub>(短型)和 55 000 的 c-FLIP<sub>L</sub>(长型)<sup>[2]</sup>。c-FLIP 在很多肿瘤组织中高表达,如胆管癌、结肠癌、恶性黑素瘤、胃癌、肝癌、淋巴瘤等<sup>[3-8]</sup>。我们的前期研究证实 c-FLIP 在眼眶横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma)中高表达,应用 c-FLIP 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASODN)纳米粒转染人胚胎型横纹肌肉瘤细胞株 RD 后,细胞凋亡率明显增加<sup>[9]</sup>;此外,我们还成功建立了裸鼠人眼眶横纹肌肉瘤的移植瘤模型<sup>[10]</sup>。本研究在此模型基础上进一步采用 c-FLIP ASODN 纳米粒进行瘤体内注射,观察其对肿瘤的生长抑制作用,探讨纳米粒作为新型导入载体的可行性,为后续研究奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 人胚胎型横纹肌肉瘤细胞株 RD 由中国科学院细胞库提供。BALB/c 裸小鼠 4~6 周龄,雌雄各半,体质量 15~20 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[许可证号:FCXK(沪)2003-0003]。在第二军医大学实验动物中心 SPF 动物实验室饲养及实验。参照文献[11],c-FLIP ASODN 序列为 5'-ACT TGT CCC TGC TCC TTG AA-3',相对分子质量为 6 000;由上海赛百胜生物技术有限公司合成,下划线的部分采用硫代修饰以提高其稳定性。PAGE 纯化。ASODN 纳米粒在第二军医大学药学院药剂学实验室制备。TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;鼠抗人 c-FLIP 蛋白多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA, 50:50,相对分子质量为 34 000, RG503H)购于德国勃林格殷格翰公司。

1.2 裸鼠移植瘤模型的建立 RD 细胞培养于含 10% 灭活胎牛血清、2 mol/L 谷氨酰胺、青霉素(100 U/mL)、链霉素(100  $\mu$ g/mL)的 IMEM 培养液(Gibco 公司)。接种前 1 d 对裸鼠进行<sup>60</sup>Co 照射,1 Gy/只;取对数生长期的 RD 单细胞制成悬液,重悬于生理盐水中,裸鼠腋部皮下注射(细胞数为  $1 \times 10^7$ /只,体积 0.1 mL)。大约 6 周后长成绿豆大小肿瘤,第 8 周时剥离肿瘤,在 PBS 中切成直径为 2 mm

的肿瘤块,移植入实验裸鼠腋部皮下。

1.3 ASODN 纳米粒的制备 参考文献[12]制备纳米粒。c-FLIP ASODN (600  $\mu$ g)冻干粉适量溶于 150 mL 超纯水中,作为水相;将适量(50 mg) PLGA 溶于 1.5 mL 乙酸乙酯中,作为油相;将水相与油相混合,冰浴条件下超声乳化 20 s (功率 20 W),形成初乳;取 3 mL 1% PVA 溶液加至初乳中,冰浴条件下再次超声乳化 20 s(功率 20 W),形成复乳;将复乳加至 30 mL 0.3% PVA 溶液中,37 $^{\circ}$ C 水浴低速搅拌 4 h,挥发有机溶剂乙酸乙酯,然后 5 600 $\times$ g 离心 10 min,收集沉淀,超纯水洗涤 3 次,制成冻干粉备用。在冻干之前加入支架剂,确保其良好的重分散性及外观。

1.4 ASODN 纳米粒的体内治疗 将 18 只成瘤体积大体相近的裸鼠随机分成 3 组:c-FLIP ASODN 纳米粒(ASODN NP)组、c-FLIP 单纯 ASODN(ASODN)组及生理盐水(NS)组,每组 6 只,雌雄各半。治疗前经过预实验得出 ASODN NP 组及 ASODN 组按总量为净含 ASODN 1 mg/kg 体质量(第 1 次注药前体质量)进行瘤内注射,共分 5 次注射完毕,第 1 次注射记为 0 d,分别在第 3、7、10、14 天注射 1 次;NS 组给药时刻同其余两组,每次瘤内注射与其余两组等量的生理盐水。分别于注药的第 0、3、7、10、14、17、21 天用游标卡尺测量肿瘤的最长径( $a$ )和最短径( $b$ ),计算肿瘤体积( $V = a \times b^2 / 2$ ),第 21 天处死裸鼠,部分肿瘤组织置 10% 甲醛溶液中进行组织学检测,部分肿瘤组织在 5 min 内投入液氮进行后续提取蛋白实验。

1.5 蛋白质印迹分析检测移植瘤组织中 c-FLIP 蛋白表达 将各组肿瘤块称质量后按比例加入蛋白裂解液于玻璃研磨器皿中,提取各组总蛋白,用紫外分光光度计(Eppendorf AG 22331 Hamburg)进行蛋白定量后,安装垂直电泳仪,配制 15% SDS 分离胶及浓缩胶,取 20  $\mu$ L 样本及蛋白标记物上样。电泳后组装湿式转印夹层,恒压(100 V)转移蛋白 2 h 后,取出硝酸纤维素膜,根据标准蛋白条带定位目的蛋白,再依次用 5% 脱脂奶粉封闭、c-FLIP<sub>L/S</sub>-一抗(1:1 000)室温孵育、HRP 偶联的抗小鼠二抗(1:1 000)室温孵育后,滴加显色液作用,压 X 线片,定影,显影,在磷屏成像系统(Bio-Rad Molecular Imager FX)上扫描结果。洗膜后  $\beta$ -actin 二次检测作为内对照,并作灰度扫描比较。

1.6 原位免疫组化检测移植瘤组织 c-FLIP 蛋白表达 石蜡切片常规脱蜡至水,PBS 洗涤;0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

抑制内源性过氧化物酶;PBS 洗涤;加入 c-FLIP<sub>L/S</sub> 一抗(1 : 50);PBS 洗涤;加入 EnVision 试剂(鼠抗人);PBS 洗涤;加入 DAB 显色,苏木精衬染,热水蓝化;树脂封片。阳性表达肿瘤细胞数量平均值由两名实验者在至少 5 个随机视野(放大倍数×400)独立计数并根据以下标准评定:0 分, <5%;1 分, 5%~25%;2 分, 25%~50%;3 分, 50%~75%;4 分, ≥75%。c-FLIP 蛋白免疫组化染色强度可记为:1 分,低表达;2 分,中等表达;3 分,高表达。c-FLIP 阳性表达肿瘤细胞数量评分和染色强度相乘得到加权分数用来进行统计分析。

1.7 组织学观察及原位细胞凋亡检测 肿瘤组织常规石蜡包埋切片,经脱蜡水化、苏木精染液染色、0.5%~1%盐酸乙醇溶液分化、弱碱性溶液显蓝、水反复冲洗、伊红复染、脱水透明后树脂封固。肿瘤组织常规石蜡包埋切片,参照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒的步骤经阻断、通透(组织切片逐级脱蜡、水化,蛋白酶 K 消化)后,分别与反应混合液及转化剂 37℃ 孵育、显色、对比染色、脱水透明后封片观察。显微镜下观察有蓝紫色颗粒者为阳性。

1.8 统计学处理 肿瘤体积使用 GraphPad Prism 5.0 软件对重复测量资料进行双因素方差分析,免疫组化中 c-FLIP 蛋白表达用 Kruskal-Wallis 等级方差分析(Tukey 事后检验)。检验水平(α)为 0.05。

## 2 结果

2.1 各组裸鼠移植瘤体积比较 18 只裸鼠腋部皮下植入的人横纹肌肉瘤瘤块逐渐增大,成瘤率为 100%。结果(图 1)表明:3 组肿瘤体积随着时间延长而增长,与 NS 组相比,ASODN NP 组肿瘤生长受到明显抑制,组间体积差异有统计学意义(第 17 天,  $P < 0.05$ ; 第 21 天,  $P < 0.01$ );ASODN 组与 NS 组相比,肿瘤体积差异无统计学意义;ASODN NP 组与 ASODN 组相比,肿瘤受到更大抑制,组间体积差异有统计学意义(第 21 天,  $P < 0.01$ )。以 NS 组作为对照组,ASODN NP 组和 ASODN 组的抑瘤率在第 3、7、11、14、17、21 天分别为 0.13%、66.2%、73.43%、81.25%、86.93%、84.52%和 0%、17.7%、29.47%、46.74%、46.72%、46.68%。

2.2 移植瘤组织 H-E 染色结果 H-E 染色可见各组移植肿瘤细胞核大深染,分裂相不规则,肿瘤细胞可见呈腺样生长,ASODN NP 组肿瘤细胞分布较其他两组稀疏,有变性坏死灶(图 2)。

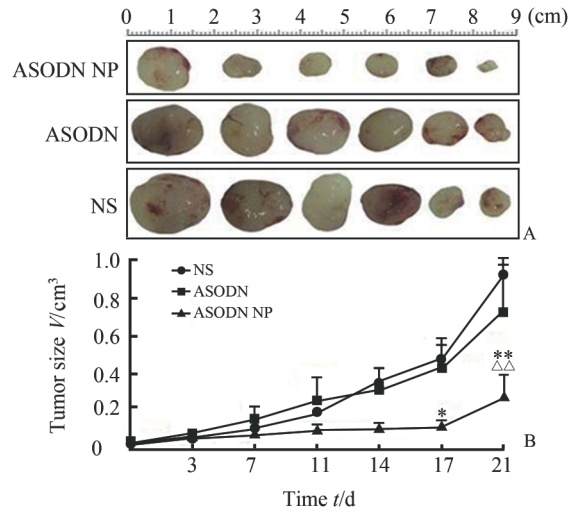


图 1 各组裸鼠肿瘤组织体积的比较

Fig 1 Comparison of the tumor volumes in nude mice of different groups

A: Tumor tissues in different groups at 21 d; B: Tumor size at different time points. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs NS;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs ASODN.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.3 蛋白质印迹分析检测结果 结果(图 3)表明:ASODN NP 组 c-FLIP<sub>S</sub> 蛋白表达较 NS 组下降  $0.71 \pm 0.03$ , ASODN 组下降  $0.51 \pm 0.06$ ; ASODN NP 组及 ASODN 组 c-FLIP<sub>L</sub> 蛋白表达较 NS 组均下降  $0.62 \pm 0.05$  ( $P < 0.05$ )。

2.4 原位免疫组化染色结果 结果(图 4)显示:c-FLIP 蛋白表达于胞质;NS 组与 ASODN NP 组 c-FLIP 蛋白表达差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),其余组间差异无统计学意义。

2.5 移植瘤组织原位细胞凋亡检测结果 ASODN NP 组肿瘤组织中检测到多量且有呈片状凋亡细胞,ASODN 组有少量凋亡细胞,NS 组只检测到极少的凋亡细胞(图 5)。

## 3 讨论

横纹肌肉瘤是一种分化程度不同的由横纹肌母细胞所构成的高度恶性肿瘤,胞质内含有或不全有肌原纤维及横纹,在人体中发病率较高,占恶性实体肿瘤的 5%~15%,在眼眶肿瘤中约占 2%~5%<sup>[13]</sup>。根据主要细胞成分可分胚胎型、腺泡型和多形性。其中胚胎型占 75%,多见于 10 岁以下的儿童,是儿童时期常见的眶内恶性肿瘤<sup>[14]</sup>;恶性程度高,发展快,如治疗不及时,多于 1 年内死亡<sup>[15]</sup>。c-FLIP 在人眼眶胚胎型、腺泡型横纹肌肉瘤细胞中较高表达,体外应用 ASODN 转染人胚胎型横纹肌肉瘤细胞后细胞凋亡增加<sup>[9]</sup>。

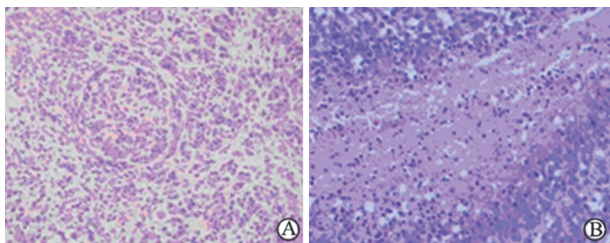


图 2 肿瘤组织 H-E 染色结果

Fig 2 H-E staining results of tumor tissues

A: H-E staining; B: Denaturalized necrotic foci. Original magnification:  $\times 40$

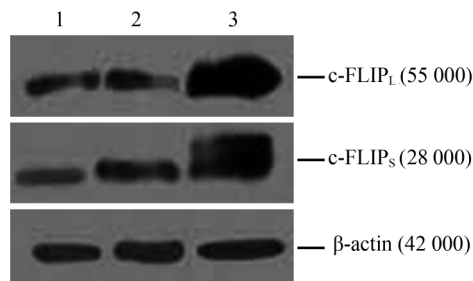


图 3 蛋白质印迹分析结果

Fig 3 Results of Western blotting analysis

1: ASODN NP; 2: ASODN; 3: NS

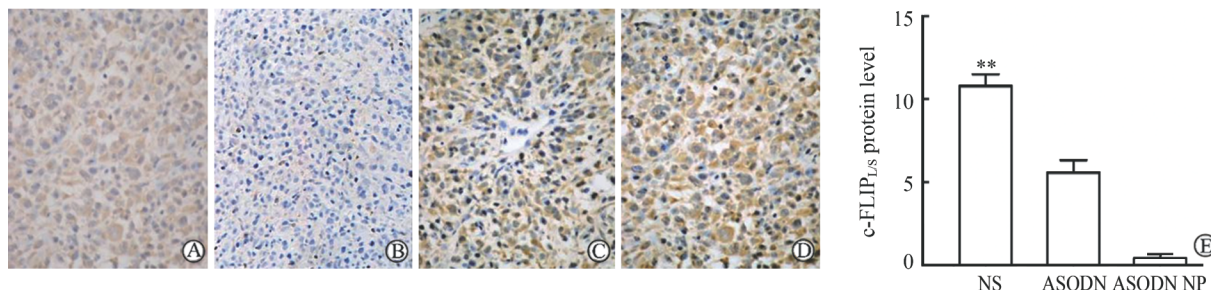


图 4 肿瘤组织原位免疫组化染色检测 c-FLIP 蛋白表达

Fig 4 Expression of c-FLIP protein of tumor tissues in each group as detected by *in situ* immunohistochemical staining

A: c-FLIP protein expressed in the endochylema; B-D: c-FLIP protein expression in ASODN NP group, ASODN group, and NS group, respectively. Original magnification:  $\times 40$  (A-D).  $** P < 0.01$  vs ASODN NP group;  $n = 6, \bar{x} \pm s$

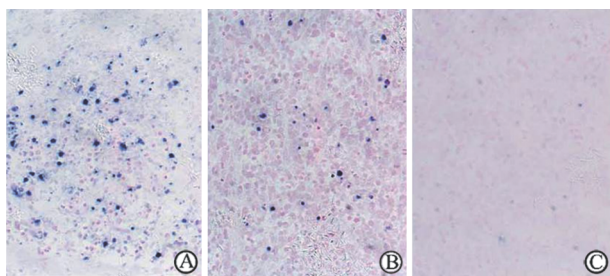


图 5 肿瘤组织细胞凋亡 TUNEL 检测结果

Fig 5 Tumor cell apoptosis as examined by TUNEL assay

A: ASODN NP; B: ASODN; C: NS. Original magnification:  $\times 40$

c-FLIP 是在病毒型 FLIP( $v$ -FLIP)基础上最新克隆的凋亡抑制蛋白<sup>[16]</sup>, c-FLIP 在体内的 2 种剪切形式( $FLIP_S$ 、 $FLIP_L$ )都能同 Fas 相关死亡结构域蛋白(FADD)或半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8(caspase 8)结合, 显著抑制 Fas 和肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1)以及肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的受体(TRAIL-R)和死亡受体 3(DR-3)等凋亡受体诱导的凋亡, 主要在肌肉和淋巴组织中表达<sup>[3-8,17]</sup>。

研究表明, 死亡受体介导的凋亡信号途径的失效是细胞摆脱免疫监视、形成肿瘤的一个重要成

因<sup>[18]</sup>。目前已知的细胞凋亡抑制蛋白主要分为 3 类: IAP 家族、Bcl-2 家族及 c-FLIP。因此希望通过靶细胞内植入特定基因, 关闭、抑制这些基因的表达, 达到治疗肿瘤的目的。因此本实验设计筛选了 c-FLIP ASODN 进行研究。ASODN 即为人工合成的长度为 10~30 个碱基的 DNA 分子及其类似物, 通过 Watson-Crick 碱基配对, 与靶基因 mRNA 上的特定序列杂交, 从而抑制蛋白质的表达。但 ASODN 的细胞内渗透能力弱, 胞内外稳定性差, 易被 3'核酸外切酶降解, 目前硫代修饰碱基可以提高 ASODN 的体内稳定性, 但过多的修饰增加了毒性。随着纳米技术的发展, 纳米粒将在生物领域广泛应用。ASODN 和纳米粒结合或混合可以增加 ASODN 对核酸酶降解的抵抗力<sup>[19]</sup>, 同时可以降低机体对 ASODN 的免疫反应<sup>[20]</sup>。PLGA 可经过生物降解聚合物在体内通过碳链的水解作用降解为乳酸和羟基乙酸, 对人体基本无毒性。为此, 本研究尝试在实验中引入 PLGA, 采用二次超声乳化和溶剂挥发法将 PLGA 制备成纳米粒用于传递 c-FLIP ASODN。

本实验结果发现, c-FLIP ASODN 进入瘤体明

显抑制了 c-FLIP 蛋白的合成,使细胞凋亡增加,达到抑制瘤体的目的。但未经包裹修饰的单纯 ASODN 片段虽经部分碱基硫代修饰,其体内稳定性及生物膜的通透性较差,实验中抑瘤效果不明显,与 NS 组比较差异无统计学意义。另外,本研究中纳米粒包裹的 ASOND 的用量较小、时间间隔较长,裸鼠在实验中生长状况良好、无明显毒性反应,从而可以证实纳米粒的缓释性以及可作为一种有效、安全的导入载体应用于 ASODN 治疗中。但本实验中纳米粒缺少主动靶向性,因此未进行静脉给药,而采用瘤内和瘤旁注射给药。目前随着纳米技术的不断发展,可以对纳米粒进行表面修饰,如在其表面偶联特异性的靶向分子,如特异性的配体、单克隆抗体等,通过靶向分子与细胞表面特异性受体结合,实现主动靶向治疗<sup>[21]</sup>,具有广阔的应用前景。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Micheau O. Cellular FLICE-inhibitory protein: an attractive therapeutic target[J]. *Expert Opin Ther Targets*,2003,7:559-573.

[2] Thome M, Tschopp J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP[J]. *Nat Rev Immunol*,2001,1:50-58.

[3] Que F G, Phan V A, Phan V H, Celli A, Batts K, LaRusso N F, et al. Cholangiocarcinomas express Fas ligand and disable the Fas receptor[J]. *Hepatology*,1999,30:1398-1404.

[4] Bullani R R, Huard B, Viard-Leveugle I, Byers H R, Irmeler M, Saurat J H, et al. Selective expression of FLIP in malignant melanocytic skin lesions[J]. *J Invest Dermatol*,2001,117:360-364.

[5] Ryu B K, Lee M G, Chi S G, Kim Y W, Park J H. Increased expression of cFLIP<sub>L</sub> in colonic adenocarcinoma [J]. *J Pathol*,2001,194:15-19.

[6] Lee S H, Kim H S, Kim S Y, Lee Y S, Park W S, Kim S H, et al. Increased expression of FLIP, an inhibitor of Fas-mediated apoptosis, in stomach cancer[J]. *APMIS*,2003,111:309-314.

[7] Shin E C, Shin J S, Park J H, Kim J J, Kim H, Kim S J. Expression of Fas-related genes in human hepatocellular carcinomas[J]. *Cancer Lett*,1998,134:155-162.

[8] Uherova P, Olson S, Thompson M A, Juskevicius R, Hamilton K S. Expression of c-FLIP in classic and nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma[J]. *Appl Im-*

*munohistochem Mol Morphol*,2004,12:105-110.

[9] 聂有华,魏锐利. c-FLIP 反义寡核苷酸诱导胚胎型横纹肌肉瘤细胞凋亡的研究[J]. *眼科新进展*,2006,26:569-572.

[10] 梁莉,魏锐利,马晓晔,蔡季平. 人眼眶横纹肌肉瘤动物模型的建立[J]. *第二军医大学学报*,2006,27:902-904.

Liang L, Wei R L, Ma X Y, Cai J P. Establishment of human orbital rhabdomyosarcoma model in mice [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*,2006,27:902-904.

[11] Bannerman D D, Tupper J C, Ricketts W A, Bennett C F, Winn R K, Harlan J M. A constitutive cytoprotective pathway protects endothelial cells from lipopolysaccharide-induced apoptosis[J]. *J Biol Chem*,2001,276:14924-14932.

[12] 聂友华,魏锐利,李国栋,马晓晔,蔡季平,岳岩. 载 c-FLIP 反义寡核苷酸聚乳酸-聚乙二醇纳米粒的制备及特性评价[J]. *第二军医大学学报*,2005,26:547-550.

Nie Y H, Wei R L, Li G D, Ma X Y, Cai J P, Yue Y. Preparation and characterization of c-FLIP-antisense oligodeoxynucleotide-epoly D, L-lactico-glycolic acid nan-oparticle[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*,2005,26:547-550.

[13] 倪 逵,马小葵,郭秉宽. 1 422 例眼眶肿瘤的病理分类 [J]. *中华眼科杂志*,1991,27:71.

[14] Rootman J. 眼眶疾病[M]. 2 版. 孙丰源,译. 天津:天津科技翻译出版公司,2006:225.

[15] 宋国祥. 眼眶病学[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:156.

[16] Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP[J]. *Nature*,1997,388:190-195.

[17] Rippo M R, Moretti S, Vescovi S, Tomasetti M, Orecchia S, Amici G, et al. FLIP overexpression inhibits death receptor-induced apoptosis in malignant mesothelial cells[J]. *Oncogene*,2004,23:7753-7760.

[18] French L E, Tschopp J. Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape [J]. *Semin Cancer Biol*,2002,12:51-55.

[19] Reynolds A R, Moein Moghimi S, Hodivala-Dilke K. Nanoparticle-mediated gene delivery to tumour neovasculature[J]. *Trends Mol Med*,2003,9:2-4.

[20] Ravi Kumar M, Hellermann G, Lockey R F, Mohapatra S S. Nanoparticle-mediated gene delivery: state of the art[J]. *Expert Opin Biol Ther*,2004,4:1213-1224.

[21] Yuba E, Kojima C, Sakaguchi N, Harada A, Koiwai K, Kono K. Gene delivery to dendritic cells mediated by complexes of lipoplexes and pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes[J]. *J Control Release*,2008,130:77-83.