

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.30.009

## TATp 和 CXCR4 修饰的载 VP3 基因超声微泡制备及体外寻靶实验\*

曾 峥<sup>1</sup>, 邱丽华<sup>2△</sup>, 高 志<sup>3</sup>, 李 攀<sup>4</sup>, 何 力<sup>1</sup>, 易品诗<sup>1</sup>

(1. 重庆医科大学附属口腔医院颌面外科/口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147;

2. 重庆医科大学附属口腔医院颌面外科/重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验, 重庆 401147;

3. 重庆医科大学附属第二医院口腔科, 重庆 400016; 4. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010)

**[摘要]** **目的** 制备一种载 VP3 基因、反式激活转录激活肽(TATp)与基质细胞衍生因子-1(SDF-1)同时修饰的新型载基因高分子靶向超声造影剂, 表征其性质。**方法** 采用 W/O/W 双乳化法制备载基因超声微泡。并通过硫醚键将 SDF-1 与 TATp 共价连接到聚乳酸/羟基乙酸共聚物(PLGA)微泡的表面, 制备成靶向载基因超声微泡。Malvern 测量仪测定其粒径、分布及表面电位, 流式细胞仪及共聚焦显微镜检测 TATp、SDF-1 在高分子微泡表面的连接状况, 酶切反应实验鉴定其对 DNA 的保护性, 光镜观察及流式细胞仪初步评估其体外寻靶能力, 超声考察体外成像。**结果** 靶向载基因超声微泡呈规则球形。粒径为(536.00±16.55)nm, 分布集中, 表面电位为(-0.08±0.08)mV。平均载药量为 0.62%, 平均包封率为 36.13%。对 DNA 保护作用持续 60 min, 未见损坏。TATp、SDF-1 同时加载于 PLGA 微泡表面的连接率为 69.84%。体外寻靶实验显示, 靶向微泡较多地稳定簇聚在舌癌 SCC-15 细胞膜上, 连接率为 91.44%。而非靶向微泡较少结合, 连接率为 12.96%。体外超声显像呈细小点状、均匀高回声。**结论** 成功制备出 TATp-SDF-1-VP3-PEG-PLGA 微泡, 其能在体外高效靶向结合舌鳞癌 SCC-15 细胞, 且短时间穿过细胞膜。体外成像效果较好。

**[关键词]** 聚乳酸/羟基乙酸共聚物; 超声微泡; 靶向舌鳞癌细胞; 分子成像**[中图分类号]** R739.86; R445.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)30-4203-04**Preparation of VP3 gene-loaded ultrasound microbubbles decorated with TATp and SDF-1 and targeting study in vitro\***Zeng Zheng<sup>1</sup>, Qiu Lihua<sup>2△</sup>, Gao Zhi<sup>3</sup>, Li Pan<sup>4</sup>, He Li<sup>1</sup>, Yi Pinshi<sup>1</sup>

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital of Chongqing Medical

University/Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147, China;

2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University/

Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education,

Chongqing 401147, China; 3. Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University,

Chongqing 400016, China; 4. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**[Abstract]** **Objective** To prepare a innovative VP3 gene-loaded ultrasound microbubble decorated with TATp and SDF-1, having the extracellular accumulation and intracellular permeation function, and characterize their property. **Methods** VP3 gene-loaded ultrasound microbubbles were prepared with the method of W/O/W double emulsion. SDF-1 and TATp were covalently conjugated to the surface of poly-lactic/acid-glycolic acid(PLGA) microbubble though thioether bonds to prepare gene-loaded targeted ultrasound microbubbles. Their particle size, distribution and surface potential were determined by Malvern measuring instrument. The conjugation status of TATp and SDF-1 were evaluated by flow cytometry and confocal microscopy. Their DNA protection were identified by digestion reaction test. The vitro targeting capacity was preliminarily assessed by light microscopy and flow cytometry, and the vitro ultrasound imaging was investigated under high frequency imaging condition. **Results** The gene-loaded targeted ultrasound microbubbles showed regularly sphericity. The diameter was (536.00±16.55)nm, and showed a narrow distribution. The zeta potential was(-0.08±0.08)mV. The average gene loading was 0.62%, with the average rate of 36.13% gene encapsulation efficiency. The DNA protective effect sustained 60 min without damage. Connection rate of TATp and SDF-1 coupled with PLGA microbubbles surface was 69.84%. The vitro targeting study showed that more targeted microbubbles stably clustered together in the tongue SCC-15 cell membranes with the connection rate of 91.44%, while non-targeted microbubbles combination rate was 12.96%. Moreover, the vitro ultrasound imaging was tiny dot, even high echo. **Conclusion** TATp-SDF-1-VP3-PEG-PLGA microbubbles were prepared successfully, which can efficiently target to tongue SCC-15 cells, and pass through the cell membranes at a short time in company with outstanding ultrasound imagings in vitro.

**[Key words]** poly-lactic/acid-glycolic acid; ultrasound microbubbles; targeted tongue squamous cell; molecular imaging

舌癌作为颌面部发生率最高的恶性肿瘤, 早期易发生颈部 淋巴结转移, 严重增加了决定肿瘤分期、治疗方案及预后的难

\* 基金项目: 重庆市卫计委重点基金资助项目(2011-1-060)。 作者简介: 曾峥(1983-), 住院医师, 硕士, 主要从事口腔颌面外科肿瘤学研究。 △ 通讯作者, Tel: 13883585181; Email: Gqyidi2001@163.com。

度<sup>[1]</sup>。及时诊断及治疗舌癌患者颈部转移淋巴结成为提高生存率的迫切需求。基于临床上尚无一种可靠客观的无创性检查和治疗手段,第 4 代声学造影剂由于具备靶向诊断和靶向给药的功能<sup>[2]</sup>,成为诊疗舌癌原发灶及其颈部淋巴道转移灶的探索方向。趋化因子基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor 1, SDF-1),其唯一结合并激活的受体为 CXC 趋化性细胞因子受体 4(CXCR4),高表达于出现淋巴结转移的舌鳞癌细胞膜上<sup>[3]</sup>。在不同口腔鳞癌细胞中阳性表达率高达 72.3%~89.6%。而反式激活转录激活肽(transactivating transcriptional activator peptide, TATp)作为细胞穿膜肽之一,不受温度和细胞类型的影响,能够将载药微泡直接、高效、安全地带入细胞内,并滞留在细胞内部<sup>[4]</sup>。凋亡素蛋白(apoptin)由鸡贫血病毒 VP3 基因编码,能够选择性地诱导肿瘤细胞凋亡,而对正常细胞无毒性<sup>[5]</sup>,同时也具有一定靶向性。试将 VP3 基因包裹在超声造影剂内部,再通过硫醚键将 SDF-1 和 TATp 共轭于载药超声造影剂壳层上。制备所得的超声造影剂既能主动靶向目的细胞又能迅速穿过细胞膜,将 VP3 基因转染至舌鳞癌细胞内部,通过超声造影剂显像同时起到诊断和治疗的作用。因此,本实验旨在制备一种 TATp 与 SDF-1 修饰、新型载 VP3 基因靶向超声造影剂,并初步探索其体外寻靶能力,从而为舌癌及其颈部淋巴道转移灶的无创早期诊断和非手术治疗提供一种新思路和新手段。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 人舌鳞癌细胞株 SCC-15(口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室保种);MAL-PEG3500-OH(北京键凯科技);PEG-PLGA12000(75:25,济南岱罡生物工程);pIRES2-VP3-EGFP 质粒(金斯瑞生物科技);无内毒素质粒大提试剂盒;全氟丙烷;SDF-1(南京拓达生物科技);TATp(北京中科亚光生物科技)。

**1.2 主要仪器** 紫外分光光度计(美国 Nano-Drop 公司);超声波处理;均质机;磁力热搅拌器;倒置显微镜(美国 Olympus 公司);Malvern 激光粒度仪及表面电位检测仪(美国 Zetasizer 公司);真空冷冻干燥机;彩色多普勒超声成像诊断仪(意大利 Esaote 公司);流式细胞仪;激光扫描共聚焦显微镜。

### 1.3 方 法

**1.3.1 质粒抽提** pIRES2-VP3-EGFP 质粒单克隆筛选并扩增。抽提参照高纯度质粒大提试剂盒说明书。

**1.3.2 空白高分子超声微泡(MPP-UM)制备** 采用双乳法。称取 50 mg MAL-PEG-PLGA 溶解于 2 mL 二氯甲烷中,加入 200  $\mu$ L 双蒸水,声振,制得初乳;抽取适量聚乙烯醇(PVA)溶液加入初乳液,均质,形成复乳;磁力 2~3 h;离心洗涤(9 000 r/min,15 min)3 次,收集沉淀物;加入适量 5% 甘露醇冻干保护剂,振荡混匀,冻干。

**1.3.3 VP3-PEG-PLGA 超声微泡(VPP-UM)制备** 参照 MPP-UM 制备,不同之处:保持低温,用 VP3 基因溶液替换双蒸水,初乳声振采用脉冲模式。在微泡制备过程中,收集所有洗涤液,容量瓶定容。离心,取上清液。取 MPP-UM 作为空白对照组。两组同时进行紫外分光光度计测定 DNA 浓度。一个样品测 3 次。按以下公式计算载药量(DL)和包封率(IE): $DL = (\text{总投 DNA 量} - \text{游离 DNA 量}) / \text{微泡质量} \times 100\%$ ;  $IE = (\text{总投 DNA 量} - \text{游离 DNA 量}) / \text{总投药量} \times 100\%$ 。

**1.3.4 联合 TATp 的靶向超声微泡(TSVP-UM)制备及检**

测 TATp 与 SDF-1 末端同时巯基化修饰,并分别标记荧光罗丹明、异硫氰酸荧光素。马来酰亚胺基团修饰 PEG-PLGA 末端。依据文献[6],TATp 及 SDF-1 同时加入 VPP-UM 中(TATp+SDF-1/Mal-PEG-PLGA=1:3 或 1:1,TATp/SDF-1=1:1,mol:mol)。氮气中,60 r/min 恒温振荡 8~9 h。离心(9 000 r/min,5 min),洗涤 3 次,制得 TSVP-UM。流式细胞仪检测 TATp 和 SDF-1 连接率;激光扫描共聚焦显微镜观察连接形态。

**1.3.5 3 种超声微泡基本特性检测** 采用倒置显微镜观察微泡外观形态、大小及分散度;Malvern 测量仪测定粒径、粒径分布及表面电位。每份样品测 3 次。

**1.3.6 TSVP-UM 外壳酶切保护实验** 取 4 份 TSVP-UM、1 份质粒抽提液,分别调节至相同 VP3 浓度,定容;另取 5 份体积相同的脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)反应缓冲液、DNase I 分别与上述 5 份实验组混匀;4 组 TSVP-UM 分别温育 15、30、45、60 min,质粒组温育 15 min;适量乙二胺四乙酸(EDTA)终止酶切反应。4 组 TSVP-UM 提取 VP3 基因法同 VPP-UM。琼脂糖凝胶电泳分析各组处理后 DNA 结构。

**1.3.7 细胞培养** 舌癌 SCC-15 细胞,于 DMEM/F12 培养基、37  $^{\circ}$ C、体积分数为 5%  $CO_2$ 、完全饱和湿度条件下培养,1~2 d 传代 1 次。接种对数生长期细胞至 6 孔板中。预设两组:一组靶向微泡组,另一组空白微泡组,每组 2 孔。A 孔制备细胞爬片,B 孔制备细胞悬液。常规培养待细胞贴壁后继续培养 24 h。

**1.3.8 靶向与非靶向组制作及检测体外寻靶效果** 空白微泡制备,并将 DiI 染于聚乳酸-羟基乙酸共聚(PLGA)壳层上;靶向微泡制备同 TSVP-UM。吸净 4 个孔内培养基,取适量空白微泡、靶向微泡分别与 0.5 mL 新鲜 DMEM 培养基混合至相同浓度,铺于空白微泡组及靶向微泡组,常规孵育 30 min~1 h。磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次。取两组 A 孔细胞爬片,行光镜比较观察微泡与细胞结合情况;两组 B 孔,经 0.25% 胰酶消化,1 000 r/min,4 min 离心 1 次,沉淀物 1 mL DMEM 培养基重悬,行流式细胞仪量化检测。

**1.3.9 TSVP-UM 体外超声成像** 配置浓度为 2.5% TSVP-UM 移至 3% 琼脂糖 EP 试管模型中。使用彩色多普勒超声成像诊断仪,在二次谐波模式下观察其显影情况。

**1.4 统计学处理** 采用 SAS9.2 统计分析软件对 3 组超声微泡的粒径大小和电位进行单因素方差分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组之间比较采用 Dunnett-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 PLGA 微泡物理特性比较** 3 组微泡粒径依次增大 40 nm 左右,组间差异均有统计学意义( $F = 36.86, P = 0.0004$ )。表面电位由负电荷向中性电荷转换,只有 TSVP-UM 组与 MPP-UM 组之间差异有统计学意义( $F = 10.87, P = 0.0101$ ),见表 1。

**2.2 VPP-UM 的 DL 和 IE** 3 次测量结果 DL 及 IE 相差不大,见表 2。

**2.3 TSVP-UM 流式细胞仪及共聚焦检测结果** TATp 与 SDF-1 同时共轭与 VPP-UM 壳层上的连接率为 69.84%,连接 TATp 及 SDF-1 微泡比率分别为 71.08%、99.88%,见图 1 中 A1~3。微泡外形均呈规整球形,大小分布较均匀,分散性好,

见图 1B、C、D。

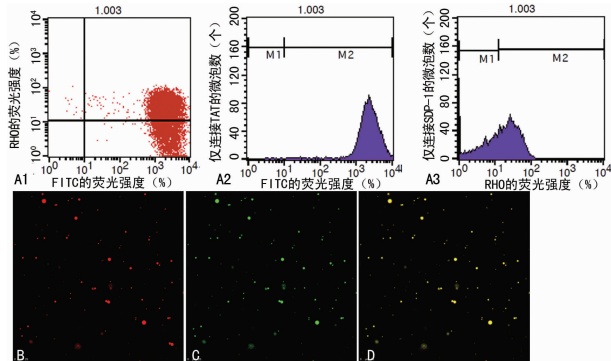
表 1 3 组微泡粒径及电位比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	粒径(nm)	电位(mV)
MPP-UM 组	447.73±4.91	-12.83±4.76
VPP-UM 组	491.20±13.33*	-11.17±4.13
TSVP-UM 组	536.00±16.55*	-0.08±0.08*
F	36.86	10.87
P	0.000 4	0.010 1

\*:  $P < 0.05$ , 与 MPP-UM 组比较。

表 2 VPP-UM 的 DL 和 IE (%)

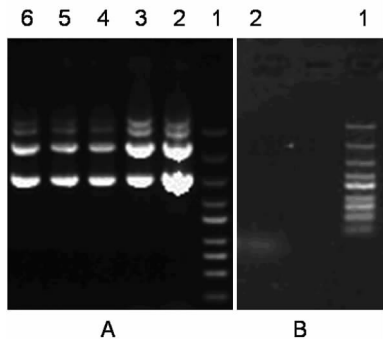
次数	DL	IE
1	0.60	34.78
2	0.59	33.42
3	0.67	40.19



A1: TAT<sub>p</sub> 与 SDF-1 同时共轭与 TSVP-UM 壳层上连接率; A2: 仅 TAT<sub>p</sub> 共轭与 TSVP-UM 壳层上连接率; A3: 仅 SDF-1 共轭与 VPP-UM 壳层上连接率; B: 仅 TAT<sub>p</sub> 共轭与 TSVP-UM 壳层荧光分布图; C: 仅 SDF-1 共轭与 TSVP-UM 壳层荧光分布图; D: TAT<sub>p</sub> 与 SDF-1 同时共轭与 TSVP-UM 壳层荧光分布图。

图 1 TSVP-UM 流式细胞检测图及共聚焦外形图 (×400)

2.4 TSVP-UM 对 VP3 基因的酶切保护 质粒与 DNase I 37 °C 温育 15 min 后全部降解, 见图 2B。而 TSVP-UM 组基因在 60 min 后, 仍保持正常结构, 见图 2A。

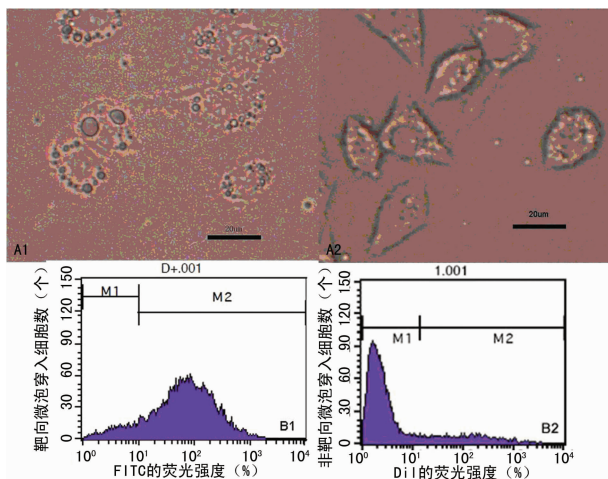


A: TSVP-UM 酶切实验组; 1: DNA ladder DL2503; 2: 15 min; 3: 30 min; 4: 45 min; 5: 60 min; 6: 未酶切质粒。B: 质粒酶切实验组; 1: DNA ladder DL2503; 2: 15 min。

图 2 DNase I 酶切时间变化电泳图

2.5 体外寻靶定性、定量结果 光镜观察显示, 靶向微泡组 TSVP-UM 簇聚在 SCC-15 细胞膜区域, 少量已穿过细胞膜进入到胞质内部(图 3 A1)。而空白微泡组较少黏附(图 3 A2)。

流式细胞仪半定量结果, 靶向微泡组为 91.44%, 空白微泡组仅 12.96% (图 3 B1、B2)。



A1: 靶向微泡组光镜结果; A2: 非靶向微泡组光镜结果; B1: 靶向微泡组流式细胞仪结果; B2: 非靶向微泡组流式细胞仪结果。

图 3 体外寻靶光镜及流式细胞仪结果

2.6 TSVP-UM 体外超声成像 2.5% TSVP-UM 表现出良好的显影效果, 内部呈高回声, 点状回声细小、均匀, 后方回声无明显衰减, 见图 4。

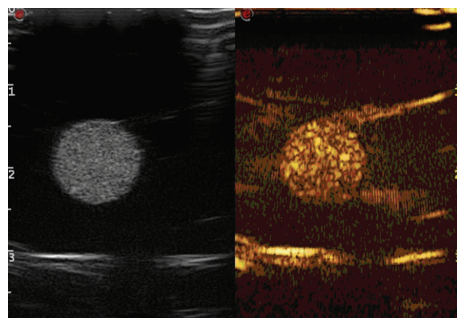


图 4 TSVP-UM 体外超声成像图

### 3 讨论

CXCR4/SDF-1 生物轴密切影响口腔鳞状细胞癌的增殖、侵袭及转移, 并在多种癌细胞膜上均检测到 CXCR4 高表达, 如肺癌、直肠癌、子宫癌等<sup>[7-8]</sup>。目前, 以 CXCR4 为靶点, 数种拮抗剂已得以发展并表现出对多种鳞癌细胞的高亲和性和拮抗性能。Chittasupho 等<sup>[9]</sup>借助 PLGA 纳米粒子表面与 CXCR4 高结合性的 LFC131 拮抗剂靶向人肺癌基底上皮细胞, 表现出对癌细胞更高的结合率, 从而实现较好的鳞癌细胞靶向性。Mei 等<sup>[10]</sup>联合应用 CXCR4 拮抗剂多肽 S 和载阿奇霉素脂质体靶向 CXCR4 阳性表达的 B16F10 黑色素瘤, 同样显示两者高亲和性。

本实验直接借助体外合成活性 SDF-1, 通过化学硫醚键将 TAT<sub>p</sub> 和 SDF-1 同时连接到 VPP-UM 壳层表面, 便捷、高效地制备出靶向舌鳞癌细胞的 TSVP-UM。体外寻靶验证了其较强的靶向性。SDF-1 与舌癌原发灶及发生淋巴道转移的舌鳞癌细胞膜上受体 CXCR4 高效匹配, 既能暂时性完全拮抗自身 SDF-1 与 CXCR4 作用引起的生物学反应, 又能借助 TAT<sub>p</sub> 和超声波产生的机械效应和空化效应, 增加细胞膜通透性, 将所载 VP3 基因快速、安全地带入细胞内部<sup>[11]</sup>, 起到特异性强、毒副作用小的疗效。

所制备的 TSVP-UM 选用 PEG-PLGA 为外壳材料, PL-

GA 具备优异的生物相容性、可控生物降解性、良好成球或成膜性能。PLGA 表面 PEG 化可使微泡更长时间停留在血液中,便于载体系统积聚到已受损(漏)血管的各种病理部位。PEG 所构成的亲水微环境还有利于基因类药物保持活性。Patel 等<sup>[12]</sup>通过比较分析 PLGA 与 PEG-PLGA 不同多聚物类型的各种物理特性,证实了 PEG-PLGA 的优势。本研究体外酶切保护实验同样显示 PEG-PLGA 能较长时间抵抗酶切作用,保持 DNA 结构。证明该 TSVP-UM 具备应用于体内的潜能。

通过双乳化法制备的靶向载基因微泡组,其粒径相较于载基因微泡组增加了 40 nm 左右,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。可能是由于 TATp 与 SDF-1 微泡壳层上的连接增加了粒径。最终平均粒径为 $(9\ 536.00 \pm 16.55)$ nm,分布较窄,能够顺利通过癌组织脉管系统中内皮细胞之间的窗孔尺寸 $300 \sim 4\ 700$  nm<sup>[13]</sup>,并增强了渗透性和滞留效应来特异性地靶向肿瘤组织细胞的能力,提示能够用于静脉给药。体外成像实验显示,TSVP-UM 在二次谐波模式下,具有良好的显影效果。因此,本实验制备的 TSVP-UM,兼具诊断和治疗的理想载药超声造影剂系统的基本性能。

双乳化法制备工艺受到制备过程中多因素的影响,本实验制得的 TSVP-UM,平均 DL 和 IE 均处于较低水平,与近年来 Liu 等<sup>[14]</sup>、Zhao 等<sup>[15]</sup>所制备的高分子载基因纳米粒子 IE $(80.9 \pm 6.7)\%$ 、 $(91.8 \pm 0.3)\%$ 有较大差距。有待进一步优化制备工艺以提高 DL 及 IE。对舌鳞癌细胞及其淋巴道转移组织的靶向释药性能、治疗需更深入的研究,为临床试验打下基础。

#### 参考文献

- [1] Dai J, Zou S, Pei Y, et al. Polyethylenimine-grafted copolymer of poly(L-lysine) and poly(ethylene glycol) for gene delivery[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(6): 1694-1705.
- [2] Ahmed A, Gianpiero G, Chung WY, et al. Targeted microbubbles in the experimental and clinical setting[J]. *Am J Surg*, 2012, 204(3): 355-366.
- [3] Delilbasi CB, Okura M, Iida S, et al. Investigation of CXCR4 in squamous cell carcinoma of the tongue[J]. *Oral Oncology*, 2004, 40(2): 154-157.
- [4] Trabulo S, Cardoso AL, Mano M, et al. Cell-penetrating peptides-mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems[J]. *Pharmaceuticals*, 2010, 3(4): 961-993.
- [5] Rollano Peñaloza OM, Lewandowska M, Stetefeld J, et al. Apoptins: selective anticancer agents[J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(9): 519-528.
- [6] Li J, Feng L, Fan L, et al. Targeting the brain with PEG-PLGA nanoparticles modified with phage-displayed peptides[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(21): 4943-4950.
- [7] Albert S, Riveiro ME, Halimi C, et al. Focus on the role of the CXCL12/CXCR4 chemokine axis in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Head Neck*, 2013, 35(12): 1819-1828.
- [8] Walentowicz-Sadlecka M, Sadlecki P, Bodnar M, et al. Stromal derived factor-1 (SDF-1) and its receptors CXCR4 and CXCR7 in endometrial cancer patients[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84629.
- [9] Chittasupho C, Lirdprapamongkol K, Kewsuwan P, et al. Targeted delivery of doxorubicin to A549 lung cancer cells by CXCR4 antagonist conjugated PLGA nanoparticles[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 88(2): 529-538.
- [10] Mei L, Liu Y, Zhang Q, et al. Enhanced antitumor and anti-metastasis efficiency via combined treatment with CXCR4 antagonist and liposomal doxorubicin[J]. *J Control Release*, 2014(196): 324-331.
- [11] 许婷婷, 吴凤林. 超声激励微泡“空化效应”增敏肿瘤化疗现状与进展[J]. *临床超声医学杂志*, 2012, 14(11): 756-758.
- [12] Patel B, Gupta V, Ahsan F. PEG-PLGA based large porous particles for pulmonary delivery of a highly soluble drug, low molecular weight heparin[J]. *J Control Release*, 2012, 162(2): 310-320.
- [13] Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(4): 1363-1380.
- [14] Liu P, Yu H, Sun Y, et al. A mPEG-PLGA-b-PLL copolymer carrier for adriamycin and siRNA delivery[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(17): 4403-4412.
- [15] Zhao K, Li W, Huang T, et al. Preparation and Efficacy of Newcastle Disease Virus DNA Vaccine Encapsulated in PLGA Nanoparticles[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82648.

(收稿日期:2016-03-21 修回日期:2016-06-24)

(上接第 4202 页)

- [10] Osborne JK, Larsen JE, Shields MD, et al. NeuroD1 regulates survival and migration of neuroendocrine lung carcinomas via signaling molecules TrkB and NCAM[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(16): 6524-6529.
- [11] Lee Y, Kim H, Kim KH, et al. Activation of toll-like receptor 2, 3 or 5 induces matrix metalloproteinase-1 and 9 expression with involvement of MAPKs and NF- $\kappa$ Bs in

human epidermal keratinocytes[J]. *Exp Dermatol*, 2010, 19(8): e44-49.

- [12] Morrell NW, Archer SL, Albert D, et al. Anticipated classes of new medications and molecular targets for pulmonary arterial hypertension[J]. *Pulm Circ*, 2013, 3(1): 226-244.

(收稿日期:2016-04-02 修回日期:2016-07-10)