

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2008)16-06-0424-05

## 血管支架固定化抗体携带和靶向投递基因研究

张琳华<sup>1</sup>, 张超<sup>1</sup>, 宋存先<sup>1</sup>, 金旭<sup>1</sup>, 罗彤<sup>2</sup>, 罗鹏<sup>2</sup>, 高润霖<sup>2</sup>

(中国协和医科大学 1. 中国医学科学院生物医学工程研究所, 天津市 300192;

2. 阜外心血管病医院, 北京市 100037)

[关键词] 生物工程学; 血管支架; 靶向投递基因; 再狭窄

[摘要] **目的** 将基因通过化学偶联和特异性免疫结合在血管支架上, 评价基因递送、局部转染及预防再狭窄的效果。**方法** 以增强型绿色荧光蛋白基因为报告基因, 通过化学偶联和特异性免疫结合在血管支架上进行细胞转染实验, 评价其基因转染效率; 以人肝脏来源的诱导型一氧化氮合酶基因为治疗基因, 将携带治疗基因的蛋白涂层支架植入猪冠状动脉进行动物在体实验研究, 评价其进行局部转染的效果。**结果** 细胞转染实验发现, 实验组支架胶原涂层的表面有大量绿色荧光蛋白基因转染的细胞浸润生长, 与支架接触的培养皿表面生长的细胞转染效率约为 21.8%, 明显高于单纯物理吸附携带基因的支架, 而未与支架直接接触的周边细胞几乎没有被转染。猪冠状动脉支架植入实验中, 支架植入 28 天后逆转录聚合酶链反应表明支架段血管内有诱导型一氧化氮合酶基因的表达, 肺、肝、肾等远离组织内没有该基因的表达。**结论** 通过化学和免疫双重偶联将基因固定在血管支架上的新型基因递送体系具有局部靶向和高效基因转运的特征, 猪冠状动脉实验初步验证通过该方法携带治疗基因进行局部转染、靶向投递基因的有效性。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

## Study on Gene Delivery System Based on Antibody Immobilized Coronary Stent for Intravascular Site-Specific Gene Therapy

ZHANG Lir-Hua<sup>1</sup>, ZHANG Chao<sup>1</sup>, SONG Cui-Xian<sup>1</sup>, JIN Xu<sup>1</sup>, LUO Tong<sup>2</sup>, LUO Peng<sup>2</sup>, and GAO Run-Lin<sup>2</sup>

(1. Institute of Biomedical Engineering, Peking Union Medical College &amp; Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China; 2. Fu Wai Hospital for Cardiovascular Disease, Peking Union Medical College &amp; Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China)

[KEY WORDS] Endovascular Stent; Intravascular Site-Specific Gene; Restenosis

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the efficiency of endovascular stent-based gene delivery system using antibody tethered plasmid DNA. **Methods** Endovascular stents were formulated with a collagen coating. Anti-DNA antibodies were covalently bound to the collagen surface by a cross linking reagent and then pEGFP-C1 (enhanced green fluorescent protein) was immunobound to endovascular stent. Gene transduction efficiency was evaluated in cell culture. Furthermore, inducible nitric oxide synthase (iNOS) was chosen as therapeutic gene and bound to endovascular stent. Stents with antibody-tethered iNOS were implanted in pig coronary artery to evaluate the transduction efficiency and the effect of restenosis prevention. **Results** Gene delivery from stents carrying antibody-tethered pEGFP-C1 demonstrated efficient and site-specific pEGFP-C1 transduction in cell culture. GFP-positive cells were only observed in the site that directly contact with the collagen matrices and the transduction efficiency was 21.8% vs less than 5% in control group. In pig coronary artery stent deployment studies, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses showed that iNOS was only observed in the blood vessel that contact with the stent, iNOS was undetectable in distal tissues such as lung, liver and spleen, etc. **Conclusion** Gene delivery system based on antibody immobilized coronary stents provided localized and highly efficient gene delivery for intravascular site-specific gene therapy.

经皮冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)及冠状动脉支架植入已广泛地应用于心血管疾病的治疗,然而再狭窄

是术后的主要并发症之一,至今仍无有效的预防及治疗措施。随着心血管疾病的分子及基因机制研究的深入,血管内再狭窄的基因治疗已成为目前研究的热点。传统的基因载运方案大部分还只是集中于将病毒载体悬浮液注入血管内腔,导致病毒颗粒大部分进入全身,病灶血管组织中的基因量很少,其有效性和安全性都不符合临床应用的要求。用血管支架携带基因可以在介入治疗的同时将基因定位递送,目前的研究多采用浸泡方式使基因物理吸附在支架蛋白涂层上,该方法携带的基因容易被过早洗

[收稿日期] 2008-02-26

[修回日期] 2008-06-04

[基金项目] 国家自然科学基金(50473059);天津市重点项目(043803011);教育部博士点基金(20030023004)

[作者简介] 张琳华,助理研究员,主要从事心血管支架基因运载体系及载药纳米粒的研究,E-mail为 elley2001@sina.com。张超,助理研究员,主要从事载基因支架的研究。通讯作者宋存先,研究员,教授,博士研究生导师,主要从事药物缓释和控释、纳米粒子及基因治疗和心血管疾病的研究,E-mail为 scxian@tom.com。

脱使得携带到血管病变部位的基因量很少,达不到治疗所需的剂量。我们的研究已经表明通过化学偶联和特异性免疫结合作用将质粒 DNA 结合在蛋白涂层的支架上,可以极大提高基因结合稳定性,同时避免了使用病毒载体带来的不安全隐患<sup>[1]</sup>。本研究在此基础上,以增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因为报告基因,通过化学偶联和特异性免疫结合在血管支架上进行细胞转染实验,在细胞水平验证了偶联报告基因的支架具有较高的基因转染效率,然后以人肝脏来源的诱导型一氧化氮合酶基因(human inducible nitric oxide synthase from hepatocytes, hep iNOS)为治疗基因,将携带质粒介导的 hep iNOS 蛋白涂层支架植入小型猪冠状动脉进行动物在体实验研究,评价蛋白涂层血管支架通过化学偶联和特异性免疫结合携带治疗基因进行局部转染、靶向投递治疗基因的效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

316L 不锈钢冠状动脉支架由微创医疗器械上海有限公司赠送。iv型牛皮胶原购于 Vitrogen 聚合技术公司。N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯[N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate, SPDP]购于 Pierce 化学公司。鼠抗牛 DNA 单克隆抗体购于美国 US Biological 公司。1-乙基-3-(3-N,N 二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐[1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide, hydrochloride, EDAC]购于 Sigma 公司。Lipofectamine 2000 转染试剂、Superscript<sup>TM</sup> III First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒和 Trizol 购于 Invitrogen 公司。质粒 pcDNA3 介导的 hep iNOS (pcDNA3-hep iNOS) 基因由阜外心血管病医院高润霖教授惠赠。二硫苏糖醇(DTT)购自北京鼎国生物技术的发展中心。其它均为市售分析纯试剂。中华小型香猪(雄性, 20~25 kg)购于中国农业大学饲养场。

### 1.2 携带报告基因 pEGFP-C1 血管支架的制备

将 iv 型牛皮胶原按操作说明书调至 pH7.4, 加入交联剂 EDAC, 将支架浸于该胶原溶液片刻后取出, 置于 37℃ 干燥, 反复数次至每一支架表面包被约 1.0 mg 胶原。包被胶原的支架置于 SPDP 溶液, 室温反应 2 h, 连接了 SPDP 的支架经 PBS 冲洗后与 DTT 室温反应 0.5 h, 然后用 PBS 冲洗后放入与 SPDP 反应并纯化的特异性鼠抗牛 DNA 单克隆抗体(IgM-SPDP)的溶液中室温反应过夜。结合了抗体的支架经 PBS 充分冲洗后, 放入 pEGFP-C1 质粒 DNA

溶液中, 37℃ 孵育 1 h 后取出, 用 PBS 充分洗涤除去未结合的 pEGFP-C1 质粒 DNA。加入 15  $\mu$ L Lipofectamine 2000 转染试剂, 室温反应 15 min 后进行下述细胞转染实验。

### 1.3 支架偶联报告基因 pEGFP-C1 的细胞转染

通过上述化学和免疫偶联制备的 SPDP-特异性抗 DNA IgM-pEGFP-C1 支架(简称为 SPDP-S IgM-pEGFP-C1)为实验组, 同时设立两个对照组: 对照 1 是用非特异性 IgM 取代特异性抗 DNA IgM (SPDP-IgM-pEGFP-C1), 对照 2 不使用抗体, pEGFP-C1 直接与 SPDP 活化的支架连接 (SPDP-pEGFP-C1)。各组均采用 100  $\mu$ g pEGFP-C1 质粒 DNA, 同胶原膜 37℃ 反应 1 h, 经大量 PBS 充分冲洗后, 加入 15  $\mu$ L Lipofectamine 2000 转染试剂, 室温反应 15 min, 将反应后的支架浸于 1 mL 含有  $1 \times 10^6$  A10 细胞悬液中, 37℃ 孵育 1 h 后, 将支架取出放入 35 mm<sup>2</sup> 培养皿中, 加入  $1 \times 10^5$  A10 细胞悬浮液, 置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。转染 48 h 后, 吸除培养液后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 使用含 4', 6'-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6'-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI) 的封片剂封片后, 用倒置荧光显微镜观察转染情况。观察绿色荧光时, 可见 GFP 阳性表达细胞; 观察蓝色荧光时, DAPI 阳性(细胞核染料)表示细胞总体数目。直接计数 GFP 阳性细胞及 DAPI 荧光染色的细胞核总数, 计算细胞转染率。每培养孔至少随机观察计数 5 个高倍镜视野, 并取其平均数。

### 1.4 携带治疗基因诱导型一氧化氮合酶血管支架的制备

将胶原涂层后的支架进行灭菌处理并压握球囊导管, 按 1.2 所述方法, 用治疗基因 pcDNA3-hep iNOS 取代报告基因 pEGFP-C1, 通过化学和免疫偶联进行携带治疗基因 iNOS 血管支架的制备, 并在支架制备好 15 min 后进行下述动物实验。

### 1.5 携带治疗基因诱导型一氧化氮合酶血管支架植入猪冠状动脉

选用 4~6 月龄、体重为 50~60 kg 的正常中华小型香猪 6 只, 雌雄不限, 实验期间喂饲普通谷物饲料(北京农业大学提供)。称重后, 给予小型猪肌注氯胺酮 (25 mg/kg) 和安定 (1 mg/kg) 进行麻醉, 采用外科手术方法, 分离暴露股动脉, 远端结扎, 以 12 号穿刺针局部穿刺股动脉插入引导钢丝, 送入 7F 鞘管。经鞘管给予肝素 200 IU/kg 进行肝素化。系统肝素化后, 在 X 线透视下置入 7F JR 引导导管先后至左右冠状动脉开口, 于冠状动脉内注射 200  $\mu$ g 硝酸甘油后进行冠状动脉造影。观测冠状动脉解剖结

构形态,实验组动物分别于左冠状动脉左前降支近端和右冠状动脉近中段植入胶原涂层上化学偶联抗 DNA 抗体,并免疫结合治疗基因 pcDNA3-hep iNOS 支架。阳性对照组动物为不做任何处理的正常健康猪,阴性对照组动物植入胶原涂层但不携带治疗基因 pcDNA3-hep iNOS 支架。支架置入后 15 min 重复冠状动脉造影以确定冠状动脉是否通畅。术后结扎股动脉,缝合伤口,并常规肌肉注射青霉素。支架植入术后第 28 天,将猪麻醉重复冠状动脉造影观察管腔狭窄情况后,迅速开胸取出心脏,置入含肝素 25 kIU/L、罂粟碱 60 mg/L 预冷的生理盐水溶液中,并用上述溶液灌洗冠状动脉 5 min。分别收取左、右冠状动脉植入支架血管段,迅速取出血管壁内的支架钢丝;同时收取冠状动脉回旋支、支架部位处心肌、支架下游 1 cm 处血管、肝、肺、肾组织标本各 3 g 左右。血管及组织迅速置于液氮中,15 min 完全冷冻后置 -80℃冰箱内保存备用。

#### 1.6 逆转录聚合酶链反应检测目的基因的表达

将收集的左、右冠状动脉支架植入段血管标本以及冠状动脉回旋支、支架部位处心肌、支架下游 1 cm 处血管及肝、脾、肺、肾组织标本按照 Trizol 一步法分别提取 RNA。根据 Invitrogen Superscript<sup>TM</sup> III First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒说明书,建立 20  $\mu$ L 反应体系,各组样品取 4  $\mu$ g 总 RNA 逆转录成为 cDNA。取 2  $\mu$ L cDNA 产物进行 PCR 循环。以 Genebank 中已知的 iNOS 序列(L09210,人肝细胞来源,cDNA 全长 4145 bp,编码区 207~3668 bp)为模板,选取间隔 515 bp 的一组上、下游序列做为 PCR 引物,上游引物(F1)为 5'-AGC GGT AAC AAA GGA GAT AGA-3',下游引物(R1)为 5'-AAC CAC TCG TAT TTG GGA TG-3'。以管家基因 GAPDH 为作为内源性对照。反应体系为 50  $\mu$ L, 10 $\times$  PCR buffer (MgCl<sub>2</sub>) 5  $\mu$ L, DNTP (10 mmol/L) 2.5  $\mu$ L, Tag 酶 (2 Mu/L) 2.5  $\mu$ L, 上游引物 (5  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L, 下游引物 (5  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L, 剩余用无菌的三次蒸馏水补足。反应参数为 94℃初变性 5 min, 94℃变性 30 s $\rightarrow$ 57℃退火 30 s $\rightarrow$ 72℃延伸 30 s, 30 次循环, 末次循环后 72℃再延伸 7 min。PCR 反应产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭染色。以紫外成像扫描系统 BIO-RAD Gel Doc 1000 检查有无特异性条带, 并获取图像。对电泳显示有 iNOS 基因表达的标本组进行除外质粒 DNA 的干扰实验。以 pcDNA3.1 启动子 T7 序列为上游引物, 取待检验组逆转录产物重复 PCR 扩增和产物电泳。上游引物(T7)为 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3', 下游引物为 5'-AAC CAC TCG TAT TTG

GGA TG-3'。

#### 1.7 统计学分析

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 支架偶联报告基因 pEGFP-C1 细胞转染情况

A10 细胞培养发现实验组支架胶原涂层的表面有大量 GFP 转染的细胞浸润生长(图 1), 与支架接触的培养皿表面生长的细胞大量转染, 而未与支架直接接触的周边细胞几乎没有被转染, 支架上通过抗 DNA 抗体免疫偶联质粒 DNA 的细胞转染效率约为 21.8%, 明显高于单纯物理吸附携带基因的支架, 并且呈明显的局部定位转染特征; SPDP-IgM-pEGFP-C1 组转染效率约为 3.7%, SPDP-pEGFP-C1 组转染效率约为 4.9%, 明显低于实验组, 而且转染细胞分散, 不具备局部特征, 两组转染效率有显著性差异。

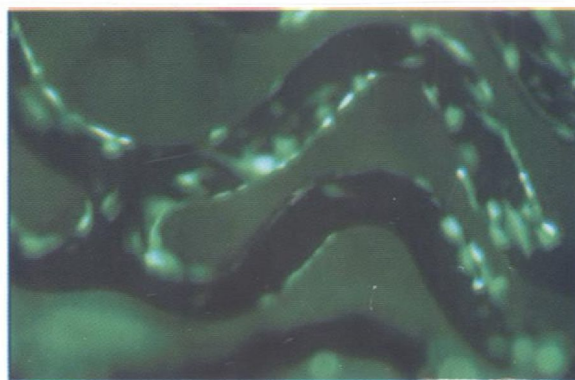


图 1. 实验组支架转染 A10 细胞( $\times 100$ )

#### 2.2 支架偶联治疗基因诱导型一氧化氮合酶的动物在体实验情况

实验组支架植入段血管组织逆转录产物以 F1/R1 进行 PCR 扩增后电泳均获得 500 bp 左右条带, 与引物设计预期相符(515 bp), 说明该段血管内有 iNOS 基因表达产物; 对照段血管(冠状动脉回旋支初始段)组织逆转录产物以 F1/R1 进行 PCR 扩增后电泳无条带, 但以管家基因 GAPDH 标准引物对扩增后电泳可得 650 bp 条带, 说明提取对照段血管内 RNA 成功, 但未发现 iNOS 基因表达(图 2)。实验支架段下游 1 cm 处血管、支架段血管旁心肌及肝、肺、肾组织逆转录产物以 F1/R1 进行 PCR 扩增后电泳无条带, 但以管家基因 GAPDH 标准引物对扩增后电泳可得 650 bp 条带, 说明提取组织内 RNA 成功, 但



未发现 iNOS 基因表达(图 3)。实验支架段血管组织逆转录产物以 T7/R1 进行 PCR 扩增后电泳无条带,而 pcDNA3-iNOS 质粒以 T7/R1 进行 PCR 扩增可得 1200 bp 左右条带,说明试验支架段血管组织逆转录产物未受质粒 DNA 污染,确有 iNOS 基因的表达(图 4)。

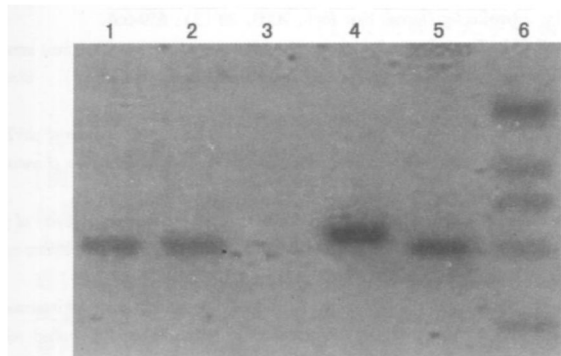


图 2. 实验支架段血管及对照段血管逆转录产物以 F1/R1 扩增结果 条带 1 和 2 取材于支架段血管,有 iNOS 基因条带;条带 3 和 4 取材于对照段血管,无 iNOS 基因条带,有 GAPDH 条带;条带 5 取材为 pcDNA3-iNOS 质粒,有 iNOS 基因条带;条带 6 为 DNA Marker。

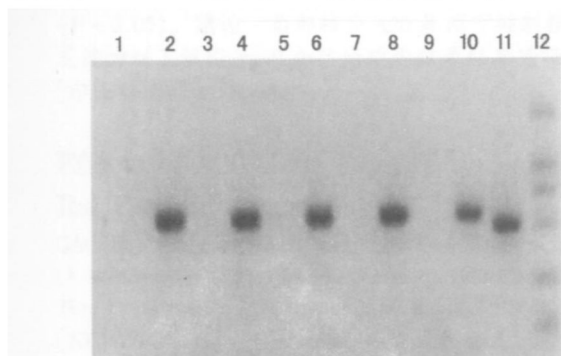


图 3. 远处组织逆转录产物以 F1/R1 扩增结果 条带 1 和 2 为实验支架段下游 1 cm 处血管;条带 3 和 4 为实验支架周围心肌组织;条带 5 和 6 为肝组织;条带 7 和 8 为肺组织;条带 9 和 10 为肾组织;条带 11 为 pcDNA3-iNOS 质粒,有 iNOS 条带;条带 12 为 DNA Marker。

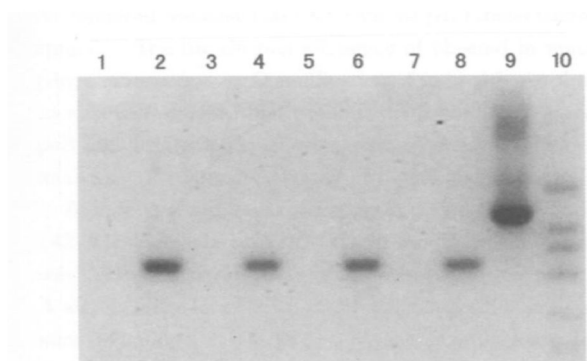


图 4. 实验支架段血管逆转录产物以 T7/R1 扩增结果 条带 1~8 为 4 段支架段血管,均无 T7/R1 扩增条带,有 GAPDH 条带;条带 9 为 pcDNA3-iNOS 质粒,有 T7/R1 扩增条带;条带 10 为 DNA Marker。

### 3 讨论

诱导型一氧化氮合酶(iNOS)基因是目前认为可以同时作用于再狭窄发生多环节的基因<sup>[2,3]</sup>。有研究发现,在动脉球囊损伤模型中,转入非常低剂量的腺病毒-iNOS 基因,6 周后发现 iNOS 表达可有效抑制早期细胞增殖,而且低剂量就可以产生治疗作用<sup>[4,6]</sup>。本研究选用的 pcDNA3-hep iNOS 质粒 DNA 是人肝脏来源的,具有巨细胞病毒启动子,能使转染基因获得高转染活性。同时,由于一氧化氮在细胞外介质中的寿命只有 5~10 s 左右,很容易被氧化成硝酸和亚硝酸,只能在局部起作用。本研究在支架植入的同时即有效转入 iNOS 基因,通过其表达可持续释放一氧化氮,发挥一氧化氮在心血管生理和病理过程中的作用,理论上应该有很好的防治再狭窄的效果。

基因治疗的成功离不开高效、低毒、安全表达治疗基因的载体。病毒载体是高效基因载体,但具有潜在致癌性、自身免疫原性以及目的基因容量小、靶向特异性差等,限制了它的应用;质粒 DNA 作为一种新的非病毒转基因载体,优点是安全可靠、稳定、对外源基因的容纳量不限、不会引起免疫系统反应及易于生产等;缺点是基因表达的时间短、转染效率较低等<sup>[7-10]</sup>。本研究所采用的载体是一种高效安全的非病毒型基因载体,首先通过化学键将抗 DNA 抗体结合在支架的蛋白涂层上,然后通过免疫偶合作用连接质粒 DNA,再连接阳离子脂质体,构成质粒 DNA-抗 DNA 抗体-阳离子脂质体三元复合基因载体,克服了基因物理吸附在支架上容易被血流冲刷掉从而使携带到病变部位的基因量很少的缺点。同时,抗 DNA 抗体能够通过免疫偶联作用使支架上携带更多的质粒 DNA,其核定位特征还能促进质粒 DNA 进入细胞核,从而与阳离子脂质体协同作用增加了质粒 DNA 的转染和表达。

再狭窄基因治疗的成功离不开有效的投递方式,用血管支架携带基因可以在介入治疗的同时将基因定位递送<sup>[11]</sup>。本研究以不锈钢冠状动脉支架为载体,将质粒 DNA 通过化学和免疫双重偶联在支架的蛋白涂层上,用细胞实验证实该新型的基因递送体系的高效性和局部定位的特征后,用 iNOS 为治疗基因进行动物在体实验,初步验证了在胶原涂层的血管支架上通过化学键合抗 DNA 抗体,再通过免疫偶联质粒 DNA 可以介导一氧化氮合酶基因转染猪冠状动脉,并且转染靶向性良好,具有抑制内膜增生从而抑制猪冠状动脉再狭窄发生的潜力。

心血管疾病基因治疗在过去 10 年取得了令人瞩目的成就,但大多数仍处于动物实验向临床应用的过渡阶段,距离广泛应用于临床这一既定目标还很远。主要存在的问题是: 靶基因的界定和选择; ④安全、高效、免疫原性低的载体的构建; ④安全有效的基因导入方法。本研究通过化学和免疫双重偶联质粒 DNA 构建了新型安全高效的非病毒载体,选择了同时作用于再狭窄发生多环节的治疗基因 iNOS,并用蛋白涂层的冠状动脉支架直接将治疗基因导入血管局部,实验结果初步显示了其具有良好的靶向性,还有待于进一步研究其抑制再狭窄的有效性 & 进行植入时间更长的实验研究。

#### [参考文献]

- [1] 周晓红, 冷希岗, 宋存先, 等. 不锈钢血管支架蛋白涂层和携带质粒 DNA 的实验研究[J]. 天津医药, 2006, **34** (4): 217-219.
- [2] Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, et al. Restenosis after coronary placement of various stent types [J]. *Am J Cardiol*, 2001, **87** (1): 34-39.
- [3] 李拥军, 管衍, 王宗立. 血管再狭窄的基因治疗[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, **9** (1): 77-81.
- [4] Wang K, Kessler PD, Zhou Z, et al. Local adenoviral-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer inhibits neointimal formation in the porcine coronary stented model [J]. *Mol Ther*, 2003, **7** (5 Pt 1): 597-603.
- [5] Andreas M, Bernd H, Jens S, et al. Preclinical evaluation of inducible nitric oxide synthase lipoplex gene therapy for inhibition of stent-induced vascular neointimal lesion formation [J]. *Hum Gene Ther*, 2003, **14** (3): 375-383.
- [6] Dulak J, Jęzkowicz A, Dembinska-Kieć A, et al. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (3): 659-666.
- [7] Jewell CM, Zhang J, Fredin NJ, et al. Release of plasmid DNA from intravascular stents coated with ultrathin multilayered polyelectrolyte films [J]. *Biomacromolecules*, 2006, **7** (9): 2 483-491.
- [8] Walter DH, Cejna M, Diaz-Sandoval L, et al. Local gene transfer of p hVEGF-2 plasmid by gene eluting stents: an alternative strategy for inhibition of restenosis [J]. *Circulation*, 2004, **110** (1): 36-45.
- [9] Takahashi A, Palmer-Opolski M, Smith RC, et al. Transgene delivery of plasmid DNA to smooth muscle cells and macrophages from a biostable polymer-coated stent [J]. *Gene Ther*, 2003, **10** (17): 1 471-478.
- [10] Perlstein I, Connolly JM, Cui X, et al. DNA delivery from an intravascular stent with a denatured collagen-poly(lactic-polyglycolic acid)-controlled release coating: mechanisms of enhanced transfection [J]. *Gene Ther*, 2003, **10** (17): 1 420-428.
- [11] 金旭, 宋存先, Levy RJ, 等. 冠状动脉支架固定化抗体携带基因和靶向基因投递[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, **14** (7): 573-576.

(此文编辑 文玉珊)