

New Gene Therapy Vector—Nano-Hydroxyapatite*

Suju Xu, Xiangdong Kong, Ruibo Zhao, Huafeng Han

College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou
Email: bluexsj@126.com, kongxiangdong@gmail.com, ruibozhao@126.com, hanhuafeng.922@163.com

Received: Oct. 16th, 2012; revised: Nov. 3rd, 2012; accepted: Nov. 15th, 2012

Abstract: Hydroxyapatite (HAp) is the natural inorganic component of vertebrate bone and tooth tissues. It is currently one of the most important inorganic biological materials what can be synthesized by chemical regulation in large amounts. In recent years, owing to its good biocompatibility, excellent biodegradability and chemical synthesis of controllability, it received more and more attention in the application of hard tissue repair materials and drug controlled release vectors. This article reviews its transfection mechanism, biosecurity, controllability of chemical synthesis, biodegradability and targeting used as gene therapy vectors.

Keywords: Nano-Hydroxyapatite; Gene Therapy Vector; Transfection Mechanism; Biocompatibility; Biodegradability

新型基因治疗载体——纳米羟基磷灰石*

须苏菊, 孔祥东, 赵瑞波, 韩华锋

浙江理工大学生命科学学院, 杭州
Email: bluexsj@126.com, kongxiangdong@gmail.com, ruibozhao@126.com, hanhuafeng.922@163.com

收稿日期: 2012年10月16日; 修回日期: 2012年11月3日; 录用日期: 2012年11月15日

摘要: 羟基磷灰石(Hydroxyapatite, Hap)是脊椎动物骨、牙中的天然组分, 它具有优异的生物相容性和良好的生物降解性, 是目前可通过化学调控大量合成无机生物材料, 已被广泛用于硬组织修复材料、药物缓释载体材料等。本文详细综述了近年来纳米羟基磷灰石在基因治疗载体领域的研究进展, 阐述了其用于基因治疗载体的转染机制、生物安全性、化学合成的可控性、可降解性及其靶向性等。

关键词: 纳米羟基磷灰石; 基因治疗载体; 转染机制; 生物相容性; 生物降解性

1. 引言

基因治疗是通过合适的载体携带目的基因转染患者特定组织细胞(靶细胞)并进行适当的表达, 以纠正或改善该致病基因所产生的缺陷, 达到治疗或者预防疾病的目的^[1,2]。基因治疗的主要过程包括载体, 目的基因的获得以及高效的基因转染, 其中载体是基因治疗成败的关键。研制安全、有效转染靶细胞的载体系统目前仍然是基因治疗研究的重点与热点^[3]。截至

2007年^[4], 全球已经获批准临床试验的基因治疗方案有1340例, 其中病毒作为载体占67.4%, 裸DNA占18%, 脂质体占7.6%, 其它非病毒载体占3%; 美国对基因治疗的研究投入了巨额经费, 这些临床试验有864例在美国本土进行的, 约占总数的64%。

基因治疗的载体系统可分为两类: 病毒载体系统和非病毒载体系统。病毒型载体转染效率比较高, 但病毒蛋白有诱发机体产生免疫反应、体内潜在的病毒复制、生产成本高、不能反复应用、应用范围窄、不能携带多重基因或大片段基因等缺点^[5-9]。为了解决病毒载体的安全性问题, 目前已经发展了多种非病毒载

*基金项目: 国家自然科学基金(项目编号 51272236、51002139); 浙江省“生物医学工程”重中之重学科开放基金(项目编号 SWYX 0906)。

体^[10-14]：裸 DNA、脂质体、有机阳离子聚合物(聚乙烯二铵，聚丙烯酰胺树突状物，多聚左旋赖氨酸，树状聚合物，壳聚糖，明胶等)、无机纳米粒子(硅、铁氧化物、碳纳米管、层状双氢氧化物、金属纳米粒子、蒙脱石、碳酸钙或磷酸钙)等。与病毒载体相比，非病毒载体可大量生产、毒性及免疫方面的问题少、应用范围广。但是多数非病毒载体转染率较低，作用时间短，降解周期长，部分载体同样存在较为严重的安全性问题^[15,16]。

为克服上述载体的某些缺陷，很多研究者尝试使用羟基磷灰石(Hydroxyapatite, 简称为 HAp)作为基因治疗载体。HAp 具有很好的生物相容性和生物降解性，它不仅可以作为载体携带目的基因靶向治疗缺陷组织；同时，纳米 HAp 本身对于肿瘤细胞的生长具有遏制作用，对正常细胞基本没有负面作用^[17,18]。因此，通过化学合成纳米 HAp 并应用于基因治疗的研究逐渐成为生物学、化学、材料学、医学等交叉学科领域研究的热点问题之一。本文对纳米 HAp 作为基因治疗载体研究进展进行综述。

2. 纳米 HAp 的理化性质

羟基磷灰石分子式为 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ，是一种磷酸钙复合物，晶体为六方晶系，结构为六角柱体，熔点在 1650°C ，含有人体必须的钙和磷元素，不含其它有害元素，其钙磷比为 1.67。它是人体硬组织如骨骼、牙齿的天然成分，在人的牙釉质中羟基磷灰石的含量在 96% 以上，在骨中的含量在 50% 以上，力学性能优异。具有良好的生物活性和化学稳定性^[19,20]。已被广泛用于骨、牙的修复，并被用于药物缓释载体和基因治疗载体。

3. 纳米 HAp 的转染机制

纳米 HAp 主要通过穿过细胞膜将药物或生物分子转运到靶细胞内从而起到预防或治疗疾病的作用^[21]。纳米 HAp 介导目的基因转染细胞大致过程如下：首先，将目的基因包裹在纳米 HAp 颗粒之内或吸附在其表面，通过内吞等方式进入靶细胞，以囊泡的形式存在。一部分的载体-基因复合物会被溶酶体摄取降解，另一部分在细胞内，尤其是肿瘤细胞内偏酸性的环境下，HAp 降解生成 DNA、 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 。囊泡内

渗透压升高，囊泡裂解。随后，DNA 进入细胞核并表达相应的蛋白并发挥活性功能^[22-24]。一般来说，分子都是通过核孔复合物进入细胞核^[25]。

纳米载体分为纳米囊和纳米颗粒^[26,27]：前者是目的基因包裹在载体内部，而后者是目的基因通过吸附或者化学键结合在颗粒表面。载体的主要作用是将目的基因转运到细胞核内，并保护目的基因在进入细胞核之前不被降解。载体对目的基因的保护方式主要有两种：其一，由于载体颗粒相对较大，与核酸酶、溶酶体等形成位阻作用，不易被摄取、降解，DNA 快速通过细胞质进入细胞核^[28]；其二，基因携载体被溶酶体摄取后，酸性环境下，HAp 很快降解，渗透压改变，溶酶体膜破裂，重新释放出 DNA^[29]。因此也有部分被溶酶体摄取的载体-基因复合物可以顺利转运 DNA 进入细胞核，这取决于 HAp 的降解速度，溶酶体膜能否在 DNA 降解之前破裂。

4. 纳米 HAp 作为基因治疗载体的优势

4.1. 生物相容性好

生物相容性是指机体免疫系统对外源异物的反应及耐受能力。人体内天然存在 HAp，HAp 降解所得产物 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 可以进行体内再循环利用，对机体基本没有毒性^[18,30,31]。

羟基磷灰石的生物相容性与其理化性质有很大关系。B. Muller 等研究表明^[32]，表面越光滑的纳米 HAp 颗粒被单核细胞吸收后，生物相容性越好，越不会引起免疫反应。M. Motskin 等^[33]利用溶胶-凝胶共沉淀法，通过控制溶胶-凝胶的比例，合成了五种不同理化性质的 HAp，转染人单核-巨噬细胞，然后通过 MTT，乳酸脱氢酶漏出率以及共聚焦显微镜观察确定其对细胞生存情况的影响。结果证明，纳米 HAp 的理化性质决定了其进入细胞的量，进入的越多，对细胞渗透压的改变越大，细胞越容易发生坏死，细胞毒性越大。因此 HAp 的生物相容性与理化性质有很大关系，且影响很大。Cheng Liang 等^[34]对纳米 HAp 进行表面修饰，使其带不同的电荷，进而研究带不同电荷 HAp 转染细胞后，对细胞的影响。首先，通过对 HAp 表面修饰两种羧酸：12-氨基十二烷酸(正电荷)和十二烷二酸(负电荷)，使 HAp 表面分别带有正电荷和负电荷，再以未经处理的 HAp 和经十二碳酸修饰

带中性电荷的 HAp 为对照组, 分别转染人成骨细胞 MC3T3-E1, 并观察细胞的变化。结果显示, 带中性电荷的 HAp 由于团聚比较严重, 颗粒较大, 不能穿过细胞膜进入细胞。MTT 和乳酸脱氢酶漏出率实验反应, 经 HAp 转染的细胞, 生存力和细胞增殖情况都很好, 其中的带正电荷的 HAp 可以促进细胞增殖。因此, HAp 的表面的带电情况, 与转染效率有关, 同时与生物相容性有关。

4.2. 生物降解性好

非病毒基因治疗载体转染效率低, 其中一个很重要的原因是载体降解速率慢, 循环周期长, DNA 在被释放出来以前, 已经在细胞内核酸酶或者偏酸性的环境中, 发生降解^[35], 或者并未释放。例如 L-聚乳酸, 在机体内降解很慢, DNA 不能释放出来, 且容易聚集, 产生细胞毒性^[36]。而 HAp 与多数非病毒载体不同, 它在溶酶体或者肿瘤细胞内的偏酸性环境中极易降解, 释放出 DNA, 释放出目的基因和 Ca^{2+} ^[37]。 Ca^{2+} 不仅可以参与骨和牙齿的形成, 还对细胞有极重要的生理功能, 调节着许多的生理活动, 可作为细胞的第二信使而发挥作用。 Ca^{2+} 可激活细胞内 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖型核酸内切酶, 使 DNA 发生降解并导致细胞凋亡^[38]。因此 HAp 本身也具有抗癌作用。

Li Jun 等^[37]在研究脂质包裹的可降解性纳米磷酸钙介导 siRNA 转染人肺癌细胞株 H-460 时, 利用钙离子指示探针 Fura-2 AM 研究了磷酸钙载体的降解情况。在细胞与载体-siRNA 共培养 24 小时后, 通过荧光显微镜观察 340 nm 和 380 nm 波长下的细胞内情况。检测结果显示, 脂质包裹的 HAp 在细胞内发生了降解, 释放出 Ca^{2+} 。

4.3. HAp 合成过程可控性好

在转染细胞时, HAp 颗粒的尺寸, 形貌, 结构、表面电荷等特性与转染效率, 细胞毒性, 靶向性等都有关系^[18,39]。理论上, 在制备纳米 HAp 时, 可以通过控制反应条件, 控制这些理化特性。

纳米 HAp 转染肿瘤细胞时, 载体的粒径尺寸与它的生物膜穿透力有很大关系^[40]: 在人体内, 120~500 nm 的颗粒存在于血管内膜; 93 nm 的中等颗粒可以渗透到内膜及外膜; 2~6 nm 的小颗粒传递效果最好, 可

以穿透整个血管壁。HAp 颗粒太大时, 载体-基因复合物移动困难, 穿不过细胞膜, 但粒径并不是越小越好。粒径太小时, 容易产生载体-基因复合物还未到达靶位置被降解的情况^[41]。B. D. Chithrani 等研究表明^[42], 50 nm 的纳米 HAp 颗粒转染效率要好于小于 15 nm 或者大于 200 nm 的颗粒。

纳米颗粒在转染细胞时, 转染效率还有颗粒的表面形貌有关。X. L. Huang 等^[43]研究了氧化硅纳米颗粒形貌与细胞摄取颗粒以及内部循环的关系。首先合成三种大小, 组成, 表面电位相似, 但是表面形貌不同的氧化硅颗粒(纵横比分别接近 1, 2, 4), 用它们分别转染人黑色素瘤细胞 A375, 电镜下观察。结果发现, 纵横比越大的颗粒, 被细胞摄取的越多, 而且对细胞增殖、分化、迁移、凋亡的生理过程的影响越大。

4.4. 易于实现靶向性

首先可以通过在纳米 HAp 颗粒表面吸附特异性的配体实现主动靶向性。纳米颗粒粒径小, 比表面积大, 具有很好的生物活性, 易于与生物活性分子(DNA、RNA、药物、蛋白质等)附合。如通过在其表面吸附特异性配体叶酸^[44], 叶酸受体广泛分布在正常组织及肿瘤组织中, 多数肿瘤细胞叶酸受体的数量和活性远远超过正常细胞, 且叶酸受体在正常细胞呈极性分布, 载体很难接近, 而肿瘤组织表面叶酸受体失去极性, 使载体可接触到该受体, 可以将载体基因复合物靶向导入癌细胞。Z. D. Guy 等^[45]通过在载体表面复合叶酸实现了载体的靶向性。

其次, 还可以通过控制纳米颗粒的粒径实现被动靶向性。研究表明, HAp 静脉注射进入血管后随血液循环, 可以通过血管壁细胞之间的间隙扩散到周围组织中。正常组织周围血管壁细胞间隙为 100~200 nm, 而肿瘤组织周围血管壁细胞间隙为 200~300 nm。如果把载体粒径控制在 200~300 nm, 那么一定程度上可以实现基因治疗的靶向性, 减小对正常细胞的伤害, 同时还可以降低目的基因的非靶向性流失。

4.5. 其它

纳米 HAp 做为基因治疗载体还在于以下优点^[38,46-48]: 应用范围广泛(既可以携载基因, 也可以携载小分子药物, 蛋白等); 能够使核酸缓慢释放, 有效地

延长作用时间, 维持有效的产物浓度; 颗粒制备时, 重复性好; 生物稳定性好等。

5. 结论与展望

用作基因治疗载体的理想生物材料还应具以下特点^[18,49]: 粒径合适; 与靶基因有效结合; 高效转染靶细胞; 保护靶基因不被破坏, 提高其生物利用度; 生物安全性好。纳米 HAp 作为一种新型的无机纳米基因载体, 目前已经能够通过各种途径成功地获得纳米 HAp 颗粒, 安全、低毒、无免疫原性, 是被 FDA 批准用于临床的无机材料之一。但是目前对纳米 HAp 作为基因治疗载体的研究仍处于起步阶段, 尚有许多问题需要解决。首先颗粒较小的纳米 HAp 转染效率相对较高, 但是, 当颗粒变小, HAp 非常容易团聚, 粒径反而增大, 不利于靶细胞的摄取, 因此研究纳米 HAp 粒子的合成、分散方法显得尤为重要; 另外, 虽然目前经特殊处理后的纳米 HAp 的转染效率有所提高, 但是与病毒载体相比仍然较低^[50], 如何在保证生物安全性的前提下, 提高转染效率也是迫切需要解决的问题。

参考文献 (References)

- [1] A. P. Cotrim, B. J. Baum. Gene therapy: Some history, applications, problems, and prospects. *Toxicologic Pathology*, 2008, 36(1): 97-103.
- [2] Y. Hattori. Development of non-viral vector for cancer gene therapy. *Yakugaku Zasshi*, 2010, 130(7): 917-923.
- [3] J. W. B. Bainbridge, A. J. Smith, S. S. Barker, S. Robbie, R. Henderson, K. Balagan, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *The New England Journal of Medicine*, 2008, 358(21): 2231-2239.
- [4] M. L. Edelstein, M. R. Abedi and J. Wixon. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007—An update. *The Journal of Gene Medicine*, 2007, 9(10): 833-842.
- [5] S. Daya, K. I. Berns. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008, 21(4): 583-593.
- [6] H. Herweijer, J. A. Wolff. Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery. *Gene Therapy*, 2007, 14(2): 99-107.
- [7] A. Mohyeldin, E. A. Chiocca. Gene and viral therapy for glioblastoma: A review of clinical trials and future directions. *Cancer Journal*, 2012, 18(1): 82-88.
- [8] C. Strambio-De-Castillia, M. Niepel and M. P. Rout. The nuclear pore complex: Bridging nuclear transport and gene regulation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2010, 11(7): 490-501.
- [9] L. E. Vinge, P. W. Raake and W. J. Koch. Gene therapy in heart failure. *Circulation Research*, 2008, 102(12): 1458-1470.
- [10] M. S. Al-Dosari, X. Gao. Nonviral gene delivery: Principle, limitations, and recent progress. *AAPS Journal*, 2009, 11(4): 671-681.
- [11] M. Donkuru, I. Badea, S. Wettig, R. Verrall, M. Elsabahy and M. Foldvari. Advancing nonviral gene delivery: Lipid- and surface-tant-based nanoparticle design strategies. *Nanomedicine*, 2010, 5(7): 1103-1127.
- [12] K. Gao, L. Huang. Nonviral methods for siRNA delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 2009, 6(3): 651-658.
- [13] X. Kong, S. Xu, X. Wang, F. Cui and J. Yao. Calcium carbonate microparticles used as a gene vector for delivering p53 gene into cancer cells. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 2012, 100(9): 2312-2318.
- [14] I. Roy, M. K. Stachowiak and E. J. Bergey. Nonviral gene transfection nanoparticles: Function and applications in the brain. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2008, 4(2): 89-97.
- [15] N. G. Abraham, A. Asija, G. Drummond and S. Peterson. Heme oxygenase-1 gene therapy: Recent advances and therapeutic applications. *Current Gene Therapy*, 2007, 7(2): 89-108.
- [16] S. M. Conley, X. Cai and M. I. Naash. Nonviral ocular gene therapy: Assessment and future directions. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2008, 10(5): 456-463.
- [17] H. Urch, M. Vallet-Regi, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet and M. Epple. Calcium phosphate nanoparticles with adjustable dispersability and crystallinity. *Journal of Materials Chemistry*, 2009, 19(15): 2166-2171.
- [18] V. Uskokovic, D. P. Uskokovic. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B*, 2011, 96(1): 152-191.
- [19] R. Z. LeGeros. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chemical Reviews*, 2008, 108(11): 4742-4753.
- [20] G. M. Cunniffe, F. J. O'Brien, S. Partap, T. J. Levingstone, K. T. Stanton and G. R. Dickson. The synthesis and characterization of nanophase hydroxyapatite using a novel dispersant-aided precipitation method. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 2010, 95(4): 1142-1149.
- [21] E. T. Castellana, P. S. Cremer. Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science*, 2006, 61(10): 429-444.
- [22] 李新新, 侯森, 冯喜增. 无机纳米粒子作为基因载体的研究进展. *生命科学*, 2008, 20(3): 402-407.
- [23] V. Sokolova, M. Epple. Inorganic nanoparticles as carriers of nucleic acids into cells. *Angewandte Chemie, International Edition*, 2008, 47(8): 1382-1395.
- [24] A. Kovtun, R. Heumann and M. Epple. Calcium phosphate nanoparticles for the transfection of cells. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2009, 19(2-3): 241-247.
- [25] M. Brisson, W. C. Tseng, C. Almonte, S. Watkins and L. Huang. Subcellular trafficking of the cytoplasmic expression system. *Human Gene Therapy*, 1999, 10(16): 2601-2613.
- [26] A. H. Faraji, P. Wipf. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, 17(8): 2950-2962.
- [27] R. B. Huang, S. Mocherla, M. J. Heslinga, P. Charoenphol and O. Eniola-Adefeso. Dynamic and cellular interactions of nanoparticles in vascular-targeted drug delivery (review). *Molecular Membrane Biology*, 2010, 27(7): 312-327.
- [28] S. Bisht, G. Bhakta, S. Mitra and A. Maitra. pDNA loaded calcium phosphate nanoparticles: Highly efficient non-viral vector for gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 288(1): 157-168.
- [29] S. Elangovan, S. Jain, P. C. Tsai, H. C. Margolis and M. Amiji. Nano-sized calcium phosphate particles for periodontal gene therapy. *Journal of Periodontology*, 2012, 84(1): 117-125.
- [30] B. D. Hahn, J. M. Lee, D. S. Park, J. J. Choi, J. Ryu, W. H. Yoon, et al. Enhanced bioactivity and biocompatibility of nanostructured hydroxyapatite coating by hydrothermal annealing. *Thin Solid Films*, 2011, 519(22): 8085-8090.
- [31] G. Li, L. Ye, J. Pan, M. Long, Z. Zhao, H. Yang, et al. Antitumoural hydroxyapatite nanoparticles-mediated hepatoma-targeted trans-arterial embolization gene therapy: *In vitro* and *in vivo* studies. *Liver International*, 2012, 32(6): 998-1007.
- [32] B. Muller. Tailoring biocompatibility: Benefitting patients. *Materials Today*, 2010, 13(4): 58.

- [33] M. Motskin, D. M. Wright, K. Muller, N. Kyle, T. G. Gard, A. E. Porter, et al. Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *Biomaterials*, 2009, 30(19): 3307-3317.
- [34] L. A. Chen, J. M. Mccrate, J. C. M. Lee and H. Li. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. *Nanotechnology*, 2011, 22(10): Article ID: 105708.
- [35] M. Kester, Y. Heakal, T. Fox, A. Sharma, G. P. Robertson, T. T. Morgan, et al. Calcium phosphate nanocomposite particles for *in vitro* imaging and encapsulated chemotherapeutic drug delivery to cancer cells. *Nano Letters*, 2008, 8(12): 4116-4121.
- [36] Q. Zhang, D. Zhao, X. Z. Zhang, S. X. Cheng and R. X. Zhuo. Calcium phosphate/DNA co-precipitates encapsulated fast-degrading polymer films for substrate-mediated gene delivery. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B*, 2009, 91(1): 172-180.
- [37] J. Li, Y. C. Chen, Y. C. Tseng, S. Mozumdar and L. Huang. Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 2010, 142(3): 416-421.
- [38] E. H. Chowdhury, A. Maruyama, A. Kano, M. Nagaoka, M. Koutaka, S. Hirose, et al. pH-sensing nano-crystals of carbonate apatite: Effects on intracellular delivery and release of DNA for efficient expression into mammalian cells. *Gene*, 2006, 376(1): 87-94.
- [39] Z. P. Xu, Q. H. Zeng, G. Q. Lu and A. B. Yu. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chemical Engineering Science*, 2006, 61(3): 1027-1040.
- [40] I. Nadra, A. R. Boccaccini, P. Philippidis, L. C. Whelan, G. M. McCarthy, D. O. Haskard, et al. Effect of particle size on hydroxyapatite crystal-induced tumor necrosis factor alpha secretion by macrophages. *Atherosclerosis*, 2008, 196(1): 98-105.
- [41] S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2008, 105(33): 11613-11618.
- [42] B. D. Chithrani, W. C. W. Chan. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters*, 2007, 7(6): 1542-1550.
- [43] X. L. Huang, X. Teng, D. Chen, F. Q. Tang and J. Q. He. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials*, 2010, 31(3): 438-448.
- [44] J. M. Oh, S. J. Choi, G. E. Lee, S. H. Han and J. H. Choy. Inorganic drug-delivery nanovehicle conjugated with cancer-cell-specific ligand. *Advanced Functional Materials*, 2009, 19(10): 1617-1624.
- [45] G. Zuber, L. Zammuto-Italiano, E. Dauty and J. P. Behr. Targeted gene delivery to cancer cells: Directed assembly of nanometric DNA particles coated with folic acid. *Angewandte Chemie International Edition*, 2003, 42(23): 2666-2669.
- [46] T. N. Do, W. H. Lee, C. Y. Loo, A. V. Zavgorodniy and R. Rohanizadeh. Hydroxyapatite nanoparticles as vectors for gene delivery. *Therapeutic Delivery*, 2012, 3(5): 623-632.
- [47] D. Olton, J. H. Li, M. E. Wilson, T. Rogers, J. Close, L. Huang, et al. Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: Influence of the synthesis parameters on transfection efficiency. *Biomaterials*, 2007, 28(6): 1267-1279.
- [48] G. Zuo, Y. Wan and Y. Zhang. Preparation and characterization of a novel laminated magnetic hydroxyapatite for application on gene delivery. *Materials Letters*, 2012, 68: 225-227.
- [49] B. Sumer, J. M. Gao. Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine*, 2008, 3(2): 137-140.
- [50] F. Ye, H. Guo and H. Zhang. Biomimetic synthesis of oriented hydroxyapatite mediated by nonionic surfactants. *Nanotechnology*, 2008, 19(24): Article ID: 245605.