

# 肝靶向十六酸拉咪呋啶酯固体脂质纳米粒抗乙肝病毒的研究

王九平,白雪帆,张三奇,李谨革,张颖,张岩,薛克昌,顾宜,王平忠,骆抗先

王九平,白雪帆,李谨革,张颖,张岩,王平忠,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
张三奇,薛克昌,顾宜,中国人民解放军第四军医大学西京医院药剂科 陕西省西安市 710038  
骆抗先,中国人民解放军第一军医大学南方医院传染科 广东省广州市 500515  
王九平,女,1961-10-25生,汉族,医学博士,讲师,陕西省西安市人。  
项目负责人:王九平,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心。 jpwang@fmmu.edu.cn  
电话:028-85422476 传真:028-85423724  
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-19

## Anti-HBV effect of targeted lamivudine palmitate solid lipid nano-particles

Jiu-Ping Wang, Xue-Fan Bai, San-Qi Zhang, Jin-Ge Li, Ying Zhang, Yan Zhang, Ke-Chang Xue, Yi Gu, Ping-Zhong Wang, Kang-Xian Luo

Jiu-Ping Wang, Xue-Fan Bai, San-Qi Zhang, Jin-Ge Li, Ying Zhang, Yan Zhang, Ke-Chang Xue, Yi Gu, Ping-Zhong Wang, The Center of Diagnosis and Treatment of Infection Diseases of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China  
Kang-Xian Luo, Department of Infections Diseases Nanfang Hospital the First Military Medical University Guangzhou 510515, Guangzhou Province, China  
Correspondence to: Jiu-Ping Wang, The Center of Diagnosis and Treatment of Infection Diseases of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China.  
jpwang@fmmu.edu.cn  
Received: 2002-10-25 Accepted: 2002-11-19

## Abstract

AIM: To investigate the anti-HBV effect of targeted lamivudine palmitate solid lipid Nano-particles (LAP-SLN).

METHODS: The nano-particles modified by galactosides (LAP-GSLN) were prepared and delivered into 2.2.15 cells. HBsAg, HBeAg and HBVDNA of 2.2.15 cells were detected by ELISA and hepatitis B virus fluorescence polymerase chain reaction (PCR). The cytotoxicity of targeted LAP-GSLN on 2.2.15 cells were observed. Fifteen male mice (2 months old) were randomly divided into 3 groups: LAP-SLN group, LAP-GSLN group and LA group. Levels of lamivudine in serum, liver, kidney, lung and spleen tissue were detected by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC).

RESULTS: LAP-GSLN could be targeted to the liver. Liver LAP-GSLN content in LAP-GSLN group was 3.3 times of that in the LA group. HBV DNA was inhibited on the 4th day. HBV DNA in LAP-GSLN group and LA group with concentration of lamivudine at 10 mg/L was less than  $1.11 \times 10^7$  /L and  $5.06 \times 10^9$  /L, respectively. Inhibition of HBsAg and HBeAg showed on the 6th day, the inhibition rate of LAP-GSLN on HBsAg and HBeAg with concentration of lamivudine at 0.01 mg/L was 52.9%, 53.9%, respectively; while the inhibition rate of LA on HBsAg and HBeAg was 32.2%, 31.1%, respectively. When the concentration of lamivudine was

10 mg/L, the inhibition rate of LAP-GSLN on HBsAg and HBeAg was 67.2%, 69.0%, respectively; while the inhibition rate of LA on HBsAg and HBeAg was 45.1%, 41.0%, respectively. No cytotoxic effect on 2.2.15 cells was found.

CONCLUSION: LAP-GSLN can target liver effectively *in vivo* and inhibit HBV expression and DNA replication.

Wang JP, Bai XF, Zhang SQ, Li JG, Zhang Y, Zhang Y, Xue KC, Gu Y, Wang PZ, Luo KX. Anti-HBV effect of targeted lamivudine palmitate solid lipid nano-particles. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(2):191-194

## 摘要

目的: 探讨肝靶向十六酸拉咪呋啶酯固体脂质纳米粒抗HBV的作用。

方法: 以半乳糖苷为载体, 构建十六酸拉咪呋啶酯固体脂质纳米粒 (PLN-LAGS), 将其靶向导入 2.2.15 细胞, 共同温育 10 d 后, 观察对细胞的毒性作用; 同时将 LAP-GSLN 尾静脉注入小鼠体内, RP-HPLC 测定拉咪呋啶 (lamivudine, LA) 在血清、肝、肾、肺及脾中的分布, 用 ELISA 和荧光定量 PCR 检测多个时期培养上清中 HBsAg, HBeAg 和 HBV DNA。

结果: LAP-GSLN 在肝脏中具有靶向性, LAP-GSLN 组肝脏的含药量为 LA 组的 3.3 倍; 导向后 4 d 出现对 HBV-DNA 的抑制, 在药物浓度 10.0 mg/L 时 LAP-GSLN 组 HBV DNA  $< 1.11 \times 10^7$  拷贝/L, 而单纯 LA 组则为  $5.06 \times 10^9$  拷贝/L; 6 d 出现对 HBsAg, HBeAg 抑制, 在药物浓度 0.01 mg/L 时, LAP-GSLN, LA 组对 HBsAg, HBeAg 抑制率分别为 52.9%, 53.9%; 32.2%, 31.1%; 在药物浓度 10.0 mg/L 时, LAP-GSLN, LA 组对 HBsAg, HBeAg 抑制率分别为 67.2%, 69.0%; 45.1%, 41.0%。未发现对 2.2.15 细胞的毒性作用。

结论: 小剂量半乳糖介导十六酸拉咪呋啶酯脂质纳米粒能快速有效的抑制 HBV 抗原表达和 DNA 复制。

王九平,白雪帆,张三奇,李谨革,张颖,张岩,薛克昌,顾宜,王平忠,骆抗先. 肝靶向十六酸拉咪呋啶酯固体脂质纳米粒抗乙肝病毒的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(2):191-194

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/191.htm>

## 0 引言

近年来国内外有关使用核苷类药物治疗乙型肝炎业已取得了初步疗效,特别是近来拉咪呋啶(lamivudine, LA)的临床应用<sup>[1-6]</sup>,证实其对乙肝病毒有效,但疗效尚不理想<sup>[5]</sup>.主要是由于乙肝病毒核心抗原存在于肝细胞内,核苷类药物须进入肝细胞,并经胸腺嘧啶核苷激

酶催化三磷酸后方显效.而核苷类药物不易透过肝细胞,且乙肝病毒感染的细胞缺少胸腺嘧啶核苷激酶,宿主细胞磷酸化作用缓慢,达不到抑制病毒复制的有效浓度.许多研究表明<sup>[13,14]</sup>,靶向给药不仅可使给药量约80%的药物浓集于肝脏,而且可迅速进入肝细胞,为了提高拉米夫定的疗效,我们研制半乳糖苷介导的十六酸拉咪味啶脂质纳米粒,并证实了肝靶向性和对乙肝病毒抗原(HBV)表达和HBV-DNA复制的抑制作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 拉咪味啶(英国葛兰素);十六酸(分析纯、天津市化学试剂二厂);卵磷脂(美国Sigma公司);D-半乳糖(上海试剂二厂);(2-C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>-羟基乙基)-r-十二烷基醚(MOA)(江苏海安石油化工厂,经柱层析纯化);其他药品和试剂均为分析纯. HepG<sub>2</sub>2.2.15细胞为HepG<sub>2</sub>肝癌细胞转染HBV后能表达HBsAg, HBeAg, HBV DNA及Dane颗粒等的细胞,购于北京医科大学.DMEM粉、胎牛血清为美国Gibco, G418(Geneticin)为美国Sigma公司.MTT为德国Boehringer公司产品.昆明种小鼠,体质量19-21g,雌雄各半(第四军医大学实验动物中心).

1.2 方法 合成十六酸拉咪味啶酯(lamivudinyl palmitate, LAP)用拉咪味啶1.29g,十六酸1.55g,二环己基碳二亚胺(DCC)1.50g,4-二甲氨基吡啶(DMAP)置于100ml干燥的二氯甲烷中,室温反应12h,抽滤浓缩,硅胶柱层析(氯仿40:1),得白色粉末.合成半乳糖苷Gal<sub>1</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>(GMOA):用四乙酰溴代半乳糖2.17g,MOA1.25g,AgCO<sub>3</sub>1.05g,置于30mL氯仿中,室温避光搅拌16h,过滤浓缩,加入200mol/L CH<sub>3</sub>ONa的甲醇溶液20mL,搅拌0.5h.加入浓盐酸1滴.浓缩,硅胶柱层析纯化(氯仿-甲醇30:1)得无色膏状物1.35g.制备半乳糖脂质纳米粒十六酸拉咪味啶 lamivudiny palmitate-solid lipid nanoparticles modified by galactoside, LAP-GSLN).LAP-SLN处方:LAP 11.3mg,卵磷脂100mg;LAP-GSLN处方:LAP 11.3mg,卵磷脂95mg,GMOA5mg.精密称取处方量物质于100mL园底烧瓶中,加入氯仿15mL溶解.旋转蒸发除去氯仿,在烧瓶壁上形成一层薄膜,加入60g/L甘露醇水溶液10mL,水溶液超声2次,1min/次,无菌过滤装于安瓿中放入冰箱待用. HepG<sub>2</sub>2.2.15细胞培养按文献<sup>[7]</sup>等方法进行.在HepG<sub>2</sub>2.2.15细胞长满培养瓶后转种于24孔板,每孔1mL,密度1×10<sup>8</sup>个细胞/L,第2天加入不同浓度的药物,留一不加药为对照孔,每2d换液1次,仍加入原浓度的药物,10d终止试验.收集各孔培养上清液测定HBsAg, HBeAg和HBV DNA.每种药物浓度均加3孔,取3孔之平均值.

1.2.1 十六酸拉咪味啶酯固体脂质纳米粒对细胞内HBV的抑制 ELSIA检测HBsAg, HBeAg:按试剂盒说明书操作,测定每孔吸光度(A)值,换算成P/N值(X),计算

抑制率.抑制率计算公式为抑制率=(对照组X-实验组X)÷(对照组X-2.1)×100%.无效:抑制率<30%,轻度抑制=30-50%,明显抑制>50%.HBV-DNA检测:采用Hepatitis B virus fluorescence polymerase chain reaction(PCR)定量方法.试剂由广州中山大学达安基因诊断公司提供.不对称引物P<sub>1</sub>5' ATCCTGCTGCTATGCCTCATCTT23'3bp;P<sub>2</sub>5' ACAGTGGGGAAAGCCCTACGAA3'23bp;信号引物为:5' TGGCTAGTTTACTAGTGCCA TTTTG3'25bp.按操作说明常规碱基解法从血清中提取HBV-DNA,不对称扩增,取提上清液5μL,加不对称扩增反应混合液10μL(含不对称扩增引物P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, dNTP, Taq酶及PCR缓冲液),先预变性93-120s,然后93-45s,55-60s10个循环,再按93-30s,55-45s做30循环;使用PE5700荧光DNA检测仪(美国Perkin Elmer公司),并依据纯化HBV-DNA建立直线回归方程,ASAP专用软件自动分析,读出HBV-DNA模板数.

1.2.2 细胞毒性及肝脏靶向性观察 按上述HepG<sub>2</sub>2.2.15细胞方法培养,也加入不同浓度的靶向药物,每个浓度设3孔,设空孔对照,继续培养6d后观察结果.取健康昆明种幼鼠15只,体质4±1g,随机分3组,分别于LAP-SLN组, LAP-GSLN组和LA组,小鼠禁食12h后尾静脉给药.给药后30min时小鼠眼眶取血,处死后取出肝、肾、肺、脾加二倍水制自匀浆.取血清或匀浆0.1mL,加入甲醇0.5mL,离心10min(14000g),上清液20μL进样,用反相高效液相色谱(reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)测定LA含量.

## 2 结果

2.1 LAP-SLN、LAP-GSLN和LA抑制2.2.15细胞分泌HBsAg和HBeAg LAP、LAP-SLN及LAP-GSLN对2.2.15细胞分泌HBsAg和HBeAg均有抑制作用,抑制作用的大小随着药物作用延长而增大,LAP-SLN、LAP-GSLN组在6d时对HBsAg, HBeAg呈现明显抑制作用,而LA组在8d后,1.0mg/L以上的浓度才有明显的抑制作用表1.

2.2 LAP、LAP-SLN及LAP-GSLN对2.2.15细胞HBV-DNA复制的影响 LA、LAP-SLN及LAP-GSLN对HepG<sub>2</sub>2.2.15细胞HBV DNA的抑制作用(图1),在HepG<sub>2</sub>2.2.15细胞培养中,LA组细胞外HBV DNA(培养上清液中)随着培养时间的延长,HBV DNA含量缓慢的下降,到第8天时,HBV DNA含量降至正常.LAP-SLN组在第6天HBV DNA含量接近正常,LAP-GSLN组的HBV DNA含量下降很快,在第4天HBV DNA含量达到正常.结果表明:LA、LAP-SLN及LAP-GSLN对HepG<sub>2</sub>2.2.15细胞HBV DNA有抑制作用,但LAP-SLN及LAP-GSLN较LA作用迅速,尤以LAP-GSLN组明显.

表 1 LAP-SLN, LAP-GSLN 和 LA 对 HBsAg 和 HBeAg 抑制率(%).

药名	浓度 mg/L	HBsAg(HBeAg)%					
		1 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d
LAP-SLN	0.01	12.2(17.4)	20.1(25.8)	29.8(30.3)	45.9(43.2)	55.1(52.1)	64.2(60.3)
	0.10	20.6(21.2)	28.4(30.2)	31.9(32.5)	54.2(52.4)	59.8(50.3)	66.3(59.3)
	1.00	23.4(23.6)	32.0(32.5)	39.9(40.3)	53.3(51.4)	64.9(55.2)	70.2(55.2)
	10.00	28.9(27.4)	19.9(21.1)	30.9(33.0)	60.1(51.9)	62.8(67.7)	65.5(59.0)
LAP-GSLN	0.01	15.2(17.0)	19.9(21.2)	30.9(33.0)	52.5(53.9)	62.8(67.7)	65.5(59.0)
	0.10	21.9(22.3)	30.3(33.4)	37.2(38.2)	60.2(59.1)	71.4(77.5)	70.2(70.9)
	1.00	28.7(29.0)	36.9(40.3)	44.7(45.3)	60.4(54.3)	71.3(69.2)	71.9(68.4)
	10.00	30.1(32.3)	35.3(41.2)	60.5(61.2)	67.2(69.0)	72.4(51.9)	74.2(67.7)
LA	0.01	10.2(15.4)	15.8(11.5)	26.2(27.3)	30.2(31.1)	45.2(44.3)	60.9(61.2)
	0.10	17.2(19.3)	20.9(21.0)	33.3(35.4)	33.5(36.6)	49.8(55.5)	61.8(59.2)
	1.00	20.3(21.6)	29.8(29.6)	40.1(39.2)	42.7(41.2)	56.2(40.2)	59.6(60.3)
	10.00	25.1(26.9)	27.9(30.2)	40.9(40.3)	45.1(41.0)	53.4(49.8)	60.3(64.0)

括号外为对 HBsAg 的抑制率,括号内为对 HBeAg 的抑制率.

表 2 给药 30min 后 LA 在血清和脏器中的含量占总药量的百分比.

药物	血清	肝脏	肾脏	肺脏	脾脏
LA	40.0	39.4	12.8	6.4	1.4
LAP-SLN	25.2	52.1	12.7	7.3	2.7
LAP-GSLN	11.4	77.4	5.2	3.6	2.4

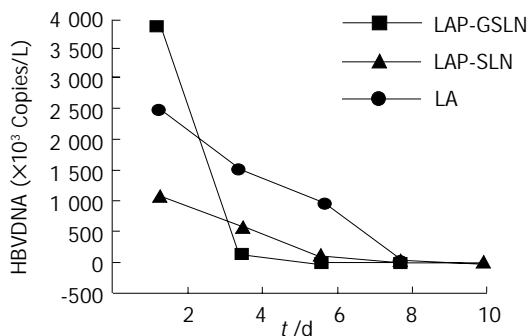


图 1 LA、LAP-SLN 及 LAP-GSLN 对 HepG<sub>2</sub>.2.15 细胞 HBV DNA 的作用.

2.3 细胞毒性效应和体内分布观察 实验组与对照组比较均未见细胞生长、形态和活细胞计数有明显改变.各脏器含量分布及各脏器药物含量占总药量的百分比见表 2,利用 SPSS 软件对 3 次肝脏药物含量数据进行方差分析,证明 LAP-SLN 和 LAP-GSLN 在肝脏中都有靶向性,且 LAP-GSLN 强于 LAP-SLN (P < 0.01).LAP-GSLN 组肝脏的含药量为 LA 组的 3.3 倍,是 LAP-SLN 组的 2.0 倍.LAP-SLN 组肝脏的含量为 LA 组的 1.7 倍,进一步证明 LAP-SLN 和 LAP-GSLN 在肝脏中有靶向性,且 LAP-GSLN > LAP-SLN.

### 3 讨论

拉咪味啶作为一种新的抗 HBV 药物<sup>[8-11]</sup>,其疗效已取得公认,且无毒性,不良反应轻微,可口服,有

望成为干扰素以外新的另一治疗选择.然而,拉咪味啶的作用只能阻断 HBV 复制过程中的中间环节,但不能清除肝细胞内及肝外组织细胞中 HBV 的复制源 cccDNA,同时对整合入宿主细胞基因的 HBV-DNA 亦无能为力.对肝细胞内病毒状态似无影响,停药后易复发<sup>[12, 14-15]</sup>.因此寻找一条小剂量,快速持续在肝细胞内 HBV-DNA 势在必行.固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)是近年正在发展的一种新型毫微粒类给药系统<sup>[12,13,16-25]</sup>,以类脂为载体,将药物包裹于类脂核中制成酸态给药体.进入机体后,很快被网状内皮系统吞噬而被动进入肝脾,达到肝靶向作用.SLN 主要适用于包封亲脂性药物,LA 的脂溶性,故将其酶化制成十六酸拉咪味啶酯(LAP),增加脂溶性.肝细胞膜上有半乳糖受体(ASGP-R)<sup>[23]</sup>交联物与受体结合后,通过细胞的吞噬作用进入肝细胞,随后到达溶酶体.由于溶酶体 PH 较低,交联物与载体分离,在肝细胞中发挥药效.

HepG<sub>2</sub>.2.15 细胞是转染了 HBV-DNA 序列的肝癌细胞,能长期稳定地产生 HBV-DNA 颗粒,其表面存在 ASGP-R<sup>[7]</sup>.LA 对 HepG<sub>2</sub>.2.15 细胞 HBV-DNA 具有抑制作用.本文以 HepG<sub>2</sub>.2.15 细胞为靶细胞,以半乳糖苷修饰十六酸拉咪味啶酯固体脂质纳米粒治疗手段,将 LA 直接运载至肝脏,观察肝细胞内抗乙型肝炎病毒作用.结果观察到 LAP-GSLN 4d 对 HBV-DNA 复制有明显抑制,6 d 对 HBeAg,HBsAg 有明显抑制作用,而单纯 LA 需 8 d 后只有 > 1.0 mg/L 才对 HBV-DNA 和 HBV 抗原表达有明显抑制作用.且 LAP-SLN, LAP-GSLN 和单用 LA 无论是对 HBV 的 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 的抑制还是对 HepG<sub>2</sub>.2.15 细胞的存活率的影响均相似.本结果显示,靶向的 LA 只需短暂作用于细胞,即可对病毒抗原分泌和 DNA 复制产生有效的抑制作用.半乳糖修饰的 LAP-SLN 可以迅速、完全地进入 HepG<sub>2</sub>.2.15 细胞,使细

胞内的LA增多发挥更高的抗病毒效应.这一结果与多位学者采用半乳糖修饰后的抗乙肝病毒药物疗效提高作用相似<sup>[22-25]</sup>.

研究结果还表明,LAP-SLN和LAP-GSLN对小鼠肝组织有明显的选择亲和力,这种靶向能将LA定向的转入肝细胞,且LAP-GSLN与肝细胞膜上的ASGP-R迅速结合,故LAP-GSLN靶向性作用强于LAP-SLN,这对提高药物疗效,减少用量,有一定意义.

#### 4 参考文献

- Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998;27:1670-1677
- Lai CL, Ching CK, Tung AK, Li E, Young J, Hill A, Wong BC, Dent J, Wu PC. Lamivudine is effective in suppressing hepatitis B virus DNA in Chinese hepatitis B surface antigen carriers: a placebo-controlled trial. *Hepatology* 1997;25:241-244
- Nevens F, Main J, Honkoop P, Tyrrell DL, Barber J, Sullivan MT, Fevery J, De Man RA, Thomas HC. Lamivudine therapy for chronic hepatitis B: a six-month randomized dose-ranging study. *Gastroenterology* 1997;113:1258-1263
- Mutimer D, Naoumov N, Honkoop P, Marinos G, Ahmed M, de Man R, McPhillips P, Johnson M, Williams R, Elias E, Schalm S. Combination alpha-interferon and lamivudine therapy for alpha-interferon-resistant chronic hepatitis B infection: results of a pilot study. *J Hepatol* 1998;28:923-929
- Mason WS, Cullen J, Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, Miller DS, Tennant B, Frick L, Averett D, Condreay LD, Jilbert AR. Lamivudine therapy of WHV-infected woodchucks. *Virology* 1998;245:18-32
- Wu GY, Wu CH. Specific inhibition of hepatitis B viral gene expression in vitro by targeted antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 1992;267:12436-12439
- Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 1987;262:4429-4432
- Lai CL, Chen RN, Leung NWY. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1998;339:61-68
- 姚光弼,王宝恩,崔振宇.拉咪味啶治疗慢性乙型肝炎患者的长期疗效.中华肝病杂志 1999;7:80-83
- Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B-antigen-negative/ hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. *Hepatology* 1999;29:889-896
- Buti M, Cotrian M, Cruzde Castro E. One year treatment with lamivudine in different hepatitis B virus related hepatic disease. *Gastroenterol Hepatol* 1999;22:117-121
- 张志荣,廖共铁,侯世祥.米托噻醌聚氰基丙烯酸正丁酯毫微粒的研究.药学报 1994;29:544-547
- 张志荣,何勤.肝靶向万乃洛韦毫微粒的研究.药学报 1998;33:702-706
- Sokal EM, Mieli-Vergani G. A dose ranging study of the pharmacokinetics, safety, and preliminary efficacy of lamivudine in children and adolescents with chronic hepatitis B. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:590-597
- Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999;341:1256-1263
- Moynihan JS, Jones DH, Farrar GH, Howard CR. A novel microencapsulated peptide vaccine against hepatitis B. *Vaccine* 2001;19:3292-3300
- Moynihan JS, D'Mello FI, Howard CR. 48-mer synthetic peptide analogue of the hepatitis B virus "a" determinant induces an anti-HBs antibody response after a single injection. *J Med Virol* 2000;62:159-166
- Agudde MT. Future approaches to vaccine development: single-dose vaccines using controlled-release delivery systems [J]. *Vaccine* 1993;11:596-604
- 柳钟勋.新型免疫佐剂在疫苗中的应用.中华微生物学和免疫学杂志 1997;17:337-341
- 吴晓蓉,贾文祥,刘莉,张再蓉,邝玉,李孝红,邓先模. PELA微球乙型肝炎疫苗的免疫原性研究.生命科学研究 2000;4:167-172
- Hashida M, Nishedawa M, Tadakura Y. Hepatic targeting of drugs and proteins by chemical modification. *J Controll Rel* 1995;36:99-107
- Nishikawa M, Kamijo A, Fujita T. Synthesis and pharmacokinetics of a new liver-specific carrier, glycosylated Carboxymethyl-Dextran, and its application to drug targeting. *Pharm Res* 1993;10:1253-1261
- 谢青,郭清,周霞秋,谷瑞瑛.乳糖化清蛋白单磷酸阿糖腺苷的抗鸭乙型肝炎病毒作用.世界华人消化杂志 1999;7:125-126
- Torrani Cerenzia M, Fiume L, De Bernardi Venon W, Lavezzo B, Brunetto MR, Ponzetto A, Di Stefano G, Busi C, Mattioli A, Gervasi GB, Bonino F, Verme G. Adenine arabinoside monophosphate coupled to lactosaminated human albumin administered for 4 weeks in patients with chronic type B hepatitis decreased viremia without producing significant side effects. *Hepatology* 1996;23:657-661
- 陈永鹏,章廉,胡俊,刘定立,冯筱榕,骆抗先.脂质体的乳糖化修饰极其肝脏靶向性的研究.第一军医大学学报 2001;21:177-179