

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.07.002

5-氨基水杨酸纳米粒对 TNBS 诱导小鼠结肠炎的治疗作用*

陈文娟 刘 亮 胡道德[△] 刘皋林

(上海交通大学附属第一人民医院 上海 200080)

摘要 目的:评价超临界分散法制备的 5-氨基水杨酸(5-ASA)结肠定位纳米粒对小鼠结肠炎的治疗作用。**方法:**将 24 只 6 周龄 BABL/c 小鼠随机分为空白对照组,结肠炎模型组,5-ASA 治疗组,5-ASA 纳米粒治疗组。三硝基苯磺酸(TNBS)造模后的第 2-7 d 分别给予 0.9%氯化钠,5-ASA 和 5-ASA 纳米粒灌胃,于第 8 d 处死所有小鼠,评估小鼠的疾病活动指数(DAI),组织病理形态以及结肠组织学损伤情况;检测结肠组织髓过氧化物酶(MPO)活性。**结果:**5-ASA 和 5-ASA 纳米粒均能明显减轻结肠重量,缩小溃疡面积,降低 MPO 活性。超临界分散法制备的 5-ASA 纳米粒在 DAI,减轻局部的炎症程度(MPO 水平)方面,其疗效与 5-ASA 组(50 mg/Kg)相当。**结论:**超临界分散法制备的 5-ASA 纳米粒对 TNBS 诱导小鼠的结肠炎有明显的治疗作用。

关键词:5-ASA;纳米粒;结肠炎;髓过氧化物酶

中图分类号:Q95-3;R574.62;R965 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)07-1205-04

Effects of 5-ASA Nanoparticles on TNBS-Induced Colitis in Rats*

CHEN Wen-juan, LIU Liang, HU Dao-de[△], LIU Gao-lin

(First Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiao tong University, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the effects of 5-ASA-nanoparticles (NP) on TNBS-induced colitis in rats. **Methods:** Twenty-four BALB/c rats were randomized into normal control group, colitis group, 5-ASA group, and 5-ASA-NP group, with six rats in each group. 5-ASA, 5-ASA-NP and normal saline solution were oral administrated respectively on day 2-7 after the establishment of colitis. On day 8, all animals were sacrificed. The change of body weight, weight to length ratio of colon, and macroscopic and pathologic score of colon were assessed. MPO activity of colonic tissue was measured. **Results:** Compared with normal group, the DAI, macroscopic and pathologic scores, MPO activity in colonic tissue in TNBS-control group increased significantly. In rats treated with 5-ASA or 5-ASA-NP, all the above-mentioned indices decreased significantly, and efficacy of 5-ASA-NP was almost the same as 5-ASA (50 mg/Kg). **Conclusion:** 5-ASA-NP prepared by supercritical dispersion has significant effect on TNBS-induced colitis in rats with lower side effects, which suggested that it might be a potential therapeutic strategy for IBD.

Key words: 5-ASA; Nanoparticles; Colitis; MPO

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R574.62; R965 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)07-1205-04

前言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一类发病机制复杂的肠道炎症性疾病,包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)^[1]。目前 IBD 确切的病因和发病机制仍不清楚,多种因素如基因、环境、生活习性、微生物以及免疫因子等都可能诱发该疾病。

5-氨基水杨酸(5-aminosalicylic acid, 5-ASA)即美沙拉嗪(Mesalazine, Mesalamine)是临床常用的治疗 IBD 的主要药物之一。5-ASA 主要通过抑制白三烯、前列腺素 E 及自由基的产生而发挥抗炎作用。5-ASA 直接口服后可被胃及小肠吸收后在小肠上皮细胞及肝脏中乙酰化,失去治疗效果。不仅没有足够的药物到达结肠而起抗炎作用,同时吸收入体内的药物易产生肾毒性^[2,3]。因此,5-ASA 的结肠靶向给药便显得尤为重要。纳米

粒具有在结肠炎症部位处聚集的性质,因此将 5-ASA 用肠溶性材料包裹,制备成合适粒径和分布的纳米粒,可以达到药物的结肠炎症靶向输送的目的^[4,5]。

近年来,超临界流体抗溶剂(supercritical fluid antisolvent precipitation, SAS)技术在药物的包埋、超细微粒的制备领域得到迅速发展^[6]。在 SAS 基础上发展起来的超临界流体强化溶液分散法(solution enhanced dispersion by supercritical fluids, SEDS),将同轴喷嘴应用于 SAS 过程以使溶液充分雾化,增强传质效果,以制备更小的颗粒。我们前期的工作已经完成了 5-ASA 纳米粒的制备^[7]。本实验以三硝基苯磺酸(TNBS)诱导小鼠实验性结肠炎为模型,评价 SEDS 制备的 5-ASA 纳米粒对结肠炎的治疗效果。

1 材料与方法

* 基金项目:上海市科委纳米技术专项基金(1052nm04000);上海交通大学医工交叉基金(090YG016)

作者简介:陈文娟(1986-),女,硕士研究生,主要研究方向:药物新剂型,E-mail:chenwenjuan1986@126.com

[△] 通讯作者:胡道德,E-mail:shanghaiyao@sina.com

(收稿日期:2014-08-17 接受日期:2014-09-15)

FA2004 电子分析天平 (上海天平仪器厂);800B 超声仪 (上海安亭科学仪器厂);SK-1 混匀器 (常州国华电器有限公司);UNICO7200 分光光度计 (尤尼柯仪器有限公司);HH-4 恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司);FS-2 可调高速匀浆机 (常州国华电器有限公司);显微镜及摄像系统 (尼康);HM 340 石蜡切片机 (德国莱卡公司)。

1.1 药品和试剂

Eudragit S100 (德国 EVONIK 公司赠送,分析纯);5-ASA (上海达瑞精细化学品有限公司,纯度 $\geq 98\%$);TNBS (Sigma 公司,批号:109K5008);丙酮,乙醇,二甲亚砜 (国药集团化学试剂有限公司,分析纯);MPO 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.2 实验动物

BALB/c 小鼠,♂,体重 18-20 g,上海斯莱克实验动物有限公司。

2 实验方法

2.1 动物分组及模型建立

24 只 BALB/c 小鼠适应性喂养一周,随机分为 A:正常对照组、B: TNBS 结肠炎组、C:5-ASA 治疗组、D:5-ASA 纳米粒治疗组,每组各 6 只,每组饲养于同一鼠笼中。给予充足的水,小鼠造模前禁食 24 h,称重后轻度乙醚麻醉,用直径 2 mm 硅胶管从肛门插入肠道深 4 cm,TNBS 结肠炎组、5-ASA 治疗组、5-ASA 纳米粒治疗组分别注入溶于 50% 乙醇的 TNBS 0.1 mL (75 mg/kg),正常对照组给予 0.9 %氯化钠 0.1 mL 灌肠,倒提 30 s,使药液全部到达结肠^[8]。

造模后第 2 d, 各组分别给予不同处理: 正常对照组和 TNBS 结肠炎组给予 0.9%氯化钠 1 ml 灌胃;5-ASA 治疗组给予 5-ASA 1 mL 灌胃 (50 mg/Kg);5-ASA 纳米粒治疗组给予 5-ASA 纳米粒 1 mL 灌胃 (10 mg/Kg,每次灌胃前将纳米粒分散于 0.9 %氯化钠中,超声 1 min,使之形成均一的乳状液体)。每日一次,持续 7 d。

2.2 疾病活动指数 (DAI) 的评估

每日记录小鼠体重变化,观察大便性状,检测大便隐血,按照 Murthy 等^[9]制定的标准进行 DAI 评分,评分标准见表 1。

表 1 DAI 评分标准

Table1 Disease active index scores

Score	Lose of weight (%)	Feces character	Hematochezia
0	0	Normal	Negative
1	1-5	--	--
2	6-10	Semi-loose stools	Occult blood (+)
3	11-15	--	--
4	>15	Loose stools	Bloody naked eye

2.3 病理学损伤的评估

给药后第 8 d,在乙醚麻醉下打开小鼠腹腔,腹主动脉放血处死小鼠,固定于鼠板之上,沿腹中线逐层剪开皮肤、皮下组织、腹膜,分离肠系膜及结肠组织,从肛门向上截取 8 cm 结肠,肉眼观察肠粘膜有无损伤,充血水肿及溃疡,进行大体形态评分^[10]。在冰浴中沿肠系膜缘剪开肠腔,漂洗内容物。精确称量肠道重量,计算肠道重量指数 (肠道重量 / 结肠长度)。

选择炎症严重部位取 0.5 cm 左右组织置于 10%福尔马林溶液固定,石蜡包埋、切片,常规 HE 染色,光学显微镜下观察炎症浸润情况^[11],并进行组织学评分。剩余部分置于冻存管中,放入液氮罐中保存待测定 MPO 活性。

大体形态损伤评分指标包括粘连、局部充血、溃疡及炎症。具体评分标准如下:无损伤计 0 分;局部充血,未见溃疡计 1 分;溃疡不伴充血计 2 分;1 个部位的溃疡和炎症计 3 分;2 个或更多部位的溃疡和炎症计 4 分;溃疡长度大于 2 cm 计 5 分。

显微镜下观察小鼠结肠组织,评价组织学损伤程度。具体标准如下:无炎症表现计 0 分;极少量白细胞浸润计 1 分;少量白细胞浸润计 2 分;较多白细胞浸润,肠密度增厚计 3 分;全层有白细胞浸润,杯状细胞丢失,血管密度增加,肠壁增厚计 4 分。

2.4 髓过氧化物酶 (MPO) 测定

操作前处理:准确称取组织重量,按重量体积比加入 9 倍的生理盐水制成 10%的组织匀浆,根据试剂盒说明书步骤,测定髓过氧化物酶活性。

2.5 统计学处理

所有数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,使用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠一般状况

正常对照组小鼠饮食、大便形状正常,体质量增长,无血便,且活泼好动,毛发光泽,未见异常。由图 1 可知,结肠炎模型组小鼠第 5 d 体重开始回升,5-ASA 和 5-ASA 纳米粒组小鼠体重虽有下降,但下降程度较轻,饮食、活动等一般状况较结肠炎模型组均有明显好转。

结肠炎模型组小鼠在 TNBS/ 乙醇造模后精神萎靡,活动量减少,体重增加缓慢,大便为稀便,有程度不同的腹泻,肉眼可见血便。5-ASA 和 5-ASA 纳米粒组小鼠体重下降程度较结肠炎模型组小鼠低,有稀便,偶可见血便。如图 2 所示,随着给药天数的延长,5-ASA 和 5-ASA 纳米粒组小鼠 DAI 评分较结肠炎模型组明显降低 ($P < 0.05$)。

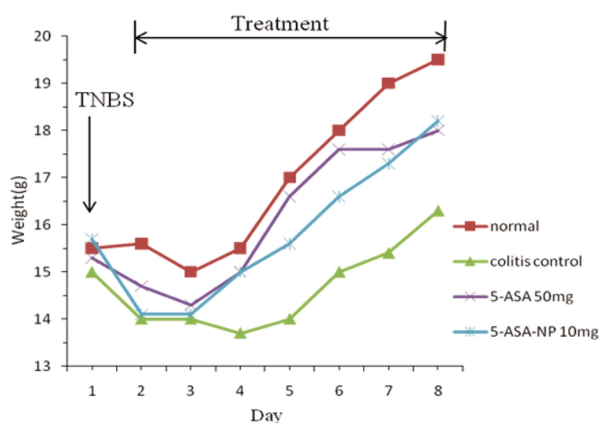


图 1 各组小鼠体重变化

(A- 正常组, B- TNBS 结肠炎组, C- 5-ASA 治疗组, D- 5-ASA 纳米粒治疗组)

Fig. 1 Body weight changes of rat groups

(A-normal group, B-TNBS induced inflammation model group, C-5-ASA treatment group, D-5-ASA nanoparticle treatment group)

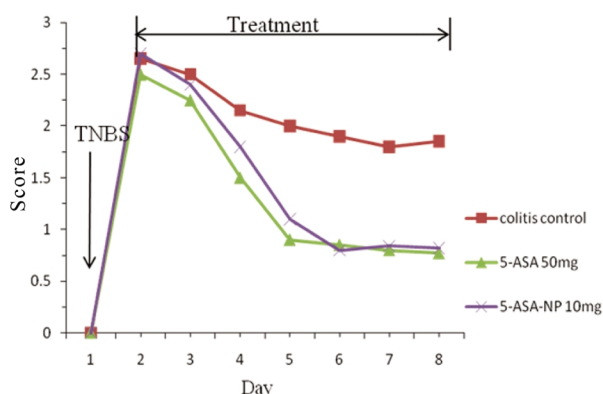


图 2 各组小鼠 DAI 评分变化

(A- 正常组, B- TNBS 结肠炎组, C- 5-ASA 治疗组, D- 5-ASA 纳米粒治疗组)

Fig. 2 DAI score changes of rat groups

(A-normal group, B-TNBS induced inflammation model group, C-5-ASA treatment group, D-5-ASA nanoparticle treatment group)

3.2 结肠大体形态损伤

TNBS/乙醇模型组小鼠结肠炎症病变主要靠近肛门段结肠,病变粘膜弥漫性充血水肿,脆性增加,糜烂、溃疡形成,局部肠壁增厚,部分小鼠结肠与周围组织黏连。正常对照组小鼠结肠粘膜无充血水肿、糜烂及溃疡形成;结肠炎模型组小鼠结肠明显可见充血水肿,糜烂及散在溃疡形成,肠壁较正常对照组增厚;5-ASA 和 5-ASA 纳米粒两组小鼠结肠可见充血水肿,少有糜烂,无明显溃疡及坏死。具体评分见表 2。

由表 3 中可以看出,与结肠炎模型组相比 5-ASA 和 5-ASA 纳米粒两组小鼠肠道重量指数较正常对照组有显著性差异($P<0.05$)。

3.3 结肠组织学损伤

镜下可见结肠炎模型组小鼠结肠组织结构清晰,粘膜完整,肠腺排列整齐。结肠炎组小鼠肠壁明显增厚,组织上皮破损,大量白细胞浸润并伴明显组织坏死,腺体结构部分消失,说明造模成功^[12]。5-ASA 及 5-ASA 纳米粒治疗组与模型组比较,

结肠组织损伤均有不同程度的减轻,小鼠结肠黏膜水肿少见,无溃疡和炎性渗出物,光镜下腺体排列整齐,仅见少量淋巴细胞和中性粒细胞浸润,损伤指数明显低于模型组($P<0.05$)。结果见表 4,图 3。

表 2 各组小鼠大体形态学评分

Table 2 Colon morphological scores

Group	Morphological scores
A	0.24± 0.32 ^a
B	5.9± 1.43
C	1.03± 0.45 ^a
D	0.9± 0.42 ^a

(Data are shown as mean ± SD. n=6, a $P<0.05$ vs group B).

表 3 各组小鼠肠道重量指数评分

Table 3 Colon weight/length scores

Group	Colon weight/length(g/cm)
A	26.86± 1.97 ^a
B	48.84± 4.43
C	41.04± 2.45 ^a
D	39.81± 3.37 ^a

(Data are shown as mean ± SD. n=6, a $P<0.05$ vs group B).

表 4 各组小鼠组织学评分

Table 4 Colon histological scores

Group	Histological scores
A	0.85± 0.42 ^a
B	5.7± 1.2
C	1.5± 0.51 ^a
D	1.23± 0.32 ^a

(Data are shown as mean ± SD. n=6, a $P<0.05$ vs group B).

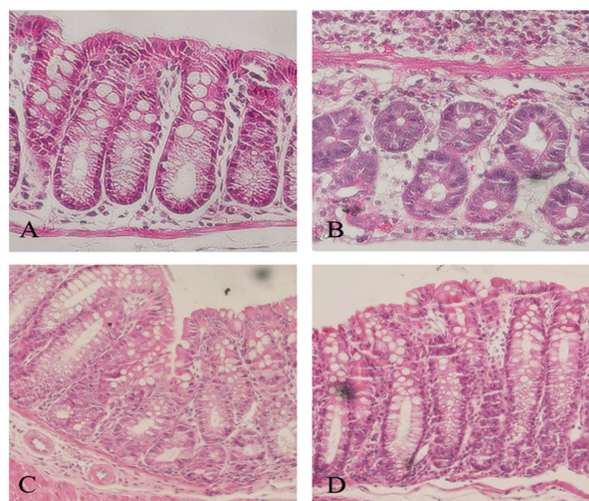


图 3 各组小鼠结肠组织病理学 HE 染色($\times 200$)

(A- 正常组, B- TNBS 结肠炎组, C- 5-ASA 治疗组, D- 5-ASA 纳米粒治疗组)

Fig. 3 Pathological changes of colitis tissue (HE $\times 200$)

(A-normal group, B-TNBS induced inflammation model group, C-5-ASA treatment group, D-5-ASA nanoparticle treatment group).

3.4 结肠组织 MPO 活性测定

MPO 主要存在于炎症细胞内,尤其是中性粒细胞的细胞质中,其活性反映了组织中炎症细胞的浸润程度^[13]。各组 MPO 活性检测发现:与正常组相比结肠炎组的 MPO 活性明显升高($P<0.05$),给药后,MPO 的活性明显降低。5-ASA 和 5-ASA 纳米粒治疗组 MPO 活性与结肠炎相比有统计学意义($P<0.05$),具体数据见表 5。

表 5 各组小鼠结肠组织 MPO 活性
Table 5 Myeloperoxidases (MPO) activities

Group	MPO activity(U/gprot)
A	0.2600± 0.0051 ^a
B	0.3068± 0.2044
C	0.2537± 0.2481 ^a
D	0.2360± 0.3110 ^a

(Data are shown as mean± SD. n=6, a $P<0.05$ vs group B).

4 讨论

氨基水杨酸类药物是目前治疗溃疡性结肠炎最经典的抗炎剂,目前仍是治疗各型 IBD 的主要药物^[14]。直接口服该药,可被胃及小肠吸收而破坏,导致无足够的药量到达结肠。不仅没有足够的药物到达结肠而起抗炎作用,同时吸收入体内的药物易产生肾毒性。因此,避免 5-ASA 在通过胃肠道时被破坏,保持病变结肠内有一个稳定有效的药物浓度,是治疗成功、减少不良反应的重要环节。近年来,国内外已开发出多种新制剂,使其能更好的发挥疗效。5-ASA 主要口服制剂在国外,主要有 2 种:一种为缓释剂型,另外一种为肠溶性包膜,由乙基纤维素半透膜包衣的 0.7~1 mm 的微粒压制而成,为扩散控释制剂^[15]。

炎症部位往往都伴随着较强的细胞免疫,如:中性粒细胞、自然杀伤细胞以及巨噬细胞等免疫细胞的显著增加。研究表明,纳米粒可以高效地被这些免疫细胞吞噬,从而使纳米粒在炎症部位聚集而起到炎症靶向的作用。进一步的研究也证明纳米粒的炎症靶向性及其潜在的应用价值,而且发现纳米粒在炎症部位的聚集程度与纳米粒的粒径呈现负相关,即纳米粒粒径越小,纳米粒越易粘附于炎症部位。然而,当纳米药物通过消化道时也容易被破坏失活。为了克服这个难题,将药物用 pH 肠溶性材料包裹,可以避免药物在早期通过胃肠道时被破坏,又能使药物富集于结肠炎症处,显示出很好的应用前景^[16,17]。

MPO 是中性粒细胞中含量较高的一种酶,检测 MPO 能较好地反映急性炎症期(致炎后 1 周内)中性粒细胞浸润情况,是评价炎症性损伤程度的重要指标之一^[18]。本实验结果显示, TNBS 模型组小鼠 MPO 活性明显升高,而给予 5-ASA 和 5-ASA 纳米粒处理后,小鼠结肠 MPO 活性较 TNBS 模型组显著降低,表明 5-ASA 可明显减轻 TNBS 诱导的结肠炎症性损伤。

本实验选用 BALB/c 小鼠 TNBS 结肠炎模型进行动物实验研究。观察到 TNBS 灌肠诱导小鼠结肠炎症后,小鼠出现明显的结肠炎症改变,疾病活动指数,组织学评分、MPO 活性较正常对照组明显增高。同时,还观察到 5-ASA 组小鼠经过

5-ASA (50 mg/Kg) 治疗后,症状和体征均有明显好转,且各项指标均与结肠炎模型组有显著性差异。本实验采用超临界流体强化溶液分散法制备的负载 5-ASA 的 Eudragit S100 纳米粒用药量只有 5-ASA 组的 1/5 (10 mg/mL) 即可达到相同的治疗效果。显示了 5-ASA 纳米粒在治疗结肠炎症方面较好的应用前景。

参考文献 (References)

- [1] Xiao B, Merlin D. Oral colon-specific therapeutic approaches toward treatment of inflammatory bowel disease[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2012, 9(11): 1393-1407
- [2] Head KA, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease Part I: ulcerative colitis-pathophysiology and conventional and alternative treatment options[J]. Altern Med Rev, 2003, 8(3): 247-283
- [3] Williams C, Panaccione R, Ghosh S, et al. Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease[J]. Ther Adv Gastroenterol, 2011, 4(4): 237-248
- [4] Ulbrich W, Lamprecht A. Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases [J]. J R Soc Interface, 2010, 7: S55-S56
- [5] Moulari B, Pertuit D, Pellequer Y, et al. The targeting of surface modified silica nanoparticles to inflamed tissue in experimental colitis[J]. Biomaterials, 2008, 29(34): 4554-4560
- [6] Byrappa K, Ohara S, Adschiri T. Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology - towards biomedical applications [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(3): 299-327
- [7] Hu D, Ling L, Chen W, et al. A Novel Preparation Method for 5-Aminosalicylic Acid Loaded Eudragit S100 Nanoparticles[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13: 6454-6468
- [8] Tozaki H, Odoriba T, Okada N, et al. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: enhanced localization of 5-aminosalicylic acid in the large intestine accelerates healing of TNBS-induced colitis in rats[J]. J Control Release, 2002, 82(1): 51-61
- [9] Murthy SN, Cooper HS, Shim H, et al. Treatment of dextran sulfate sodium induced murine colitis by intyacolonic cyclosporin[J]. Dig Dis Sci, 1993, 38(9): 1772
- [10] Meissner Y, Pellequer Y, Lamprecht A. Nanoparticles in inflammatory bowel disease: particle targeting versus pH-sensitive delivery[J]. Int J Pharm, 2006, 316(1-2): 138-143
- [11] Kriegel C, AmijiOral M. TNF- α gene silencing using a polymeric microsphere-based delivery system for the treatment of inflammatory bowel disease[J]. J Control Release, 2011, 150(1): 77-86
- [12] Miroliac AE, Esmaily H, Vaziri-Bami A, et al. Amelioration of experimental colitis by a novel nanoselenium-silymarin mixture [J]. Toxicol Mech Methods, 2011, 21(3): 200-208
- [13] Bhavsar MD, Amiji MM. Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2007, 4(3): 197-213
- [14] 江学良, 崔慧斐. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见的解析[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(11): 1141-1143
- [15] Jiang Xue-liang, Cui Hui-fei. Analysis on Chinese consensus on diagnosis and treatment standard of inflammatory bowel disease[J]. World Chin J Dig, 2008, 16(11): 1141-1143

- 临床分析[J].现代生物医学进展, 2010, 10(12): 2269-2271
- Yue Xin, Han Guo-rong, Wu Kai-hua, et al. Clinical analysis of [J]. progress in modern biomedicine associated liver function of pregnant women with preterm B changes, 2010, 10 (12): 2269-2271
- [5] 陈颖, 王瑾, 刘元昉, 等. 利妥昔单抗联合 CHOP 化疗治疗感染乙肝病毒的非霍奇金淋巴瘤患者的安全性分析 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(10): 1871-1874
- Chen Ying, Wang Jin, Liu Yuan-fang, et al. Development of [J]. Modern biomedical safety of rituximab and CHOP chemotherapy in the treatment of hepatitis B virus infection in patients with non Hodgkin's lymphoma analysis, 2014, 14 (10): 1871-1874
- [6] 曹瑞华. HBsAg 阴性献血者乙肝五项标志物及 HBV-DNA 检测性分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2009, 13(5): 538-540
- Cao Rui-hua. HBsAg negative blood donors and five items of hepatitis B markers and HBV-DNA detection analysis [J]. Chinese Journal of disease control, 2009, 13 (5): 538-540
- [7] 施志农, 陈继梅. 1546 例乙型肝炎患者血清 HBV-M、HBVDNA、肝功能检测结果分析[J]. 中华全科医学, 2011, 9(6): 966-968
- Shi Zhi-nong, Chen Jim-ei. 1546 cases of serum HBV-M in patients with hepatitis B, HBVDNA, liver function test results analysis [J]. Chinese Journal of family medicine, 2011, 9 (6): 966-968
- [8] McMahon BJ, Bulkow L, Simons B, et al. Relationship between level of hepatitis B virus DNA and liver disease: a population-based study of hepatitis B e antigen-negative persons with hepatitis B [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2014, 12(4): 224-231
- [9] 范公忍, 熊锦华, 王帅, 等. 药物治疗过程中乙型肝炎患者血清病毒外膜大蛋白与病毒核酸的检测分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32 (15): 1714-1715
- Fan Gong-ren, Xiong Jin-hua, Wang Shuai, et al. The detection of serum hepatitis B virus in patients with drug treatment in the process of outer membrane protein and nucleic acid analysis of [J]. International Journal of laboratory medicine, 2011, 32 (15): 1714-1715
- [10] 吴引伟, 文剑. 慢性乙型肝炎患者 B 淋巴细胞及其活化状况对治疗和预后的影响[J]. 临床荟萃, 2006, (21): 31
- Wu Yin-wei, Wen Jian. B in patients with chronic hepatitis B lymphocytes and their activation effect on the treatment and prognosis of [J]. Clinical focus, 2006, (21): 31
- [11] 邓益斌, 罗艳红, 邹佳峻, 等. 反基因锁核酸体外阻断乙肝病毒前 S2 基因表达[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(19): 3641-3644
- Deng Yi-bin, Luo Yan-hong, Zou Jia-jun, et al. Antisense locked nucleic acid in vitro blocking [J]. Progress in modern biomedical hepatitis B virus S2 gene expression, 2013, 13(19): 3641-3644
- [12] Chen T, Luk J M, Cheung S T. Evaluation of quantitative PCR and branched-chain DNA assay for detection of hepatitis B virus DNA in sera from hepatocellular carcinoma and liver transplant patients [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, (05): 1977-1980
- [13] 肖光明, 姚细安, 连粤湘. 乙型肝炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化[J]. 实用肝脏病杂志, 2005, (01): 22
- Xiao Guang-ming, Yao Xi-an, Lian Yue-xiang. Hepatitis B patients peripheral blood T lymphocyte subsets of [J]. Journal of Clinical hepatology, 2005, (01): 22
- [14] 吕玉凤, 李晓光, 王晓燕, 等. RNA 干扰对乙肝病毒基因的抑制作用[J]. 现代生物医学进展, 2011, 23(23): 4569-4572
- Lv Yu-feng, Li Xiao-guang, Wang Xiao-yan, et al. RNA interfere with progression of hepatitis B virus gene inhibition of [J]. modern medicine, 2011, 23 (23): 4569-4572
- [15] Lambert C, Mann S, Prange R. Assessment of determinants affecting the dual topoi of hepadna-viral large envelope proteins [J]. Journal of General Virology, 2004, (5): 1221-1225
- [16] 李建国, 王璐莎, 柴艳云, 等. YMDD 变异与 ALT、HBeAg 及 HBV DNA 的相关性分析 [J]. 中华实验和临床感染病杂志 (电子版), 2012, 6(4): 316-318
- Li Jian-guo, Wang Lu-sha, Chai Yan-yun, et al. YMDD mutation and ALT, HBeAg and HBV DNA correlation analysis [J]. Chinese Journal of experimental and clinical infectious diseases (electronic version), 2012, 6 (4): 316-318
- [17] Fan X, Fang D, Bin D, et al. Serum levels of surface large envelope-proteins: prognostic marker for hepatitis Be antigen-negative patients with adefovir dipivoxil treatment [J]. Antivir Ther, 2009, 14 (8): 1149-1156
- [18] Zhang L, Meng HX, Han XY, et al. The relationship between HBV serum markers and the clinicopathological characteristics of hepatitis B virus-associated glomerulonephritis (HBV-GN) in the northeastern Chinese population [J]. Virology J, 2012, 9(200): 1-9
- [19] Kessler H H, Preininger S, Stelzl E. Identification of different states of hepatitis B virus infection with a quantitative PCR assay [J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2000, (02): 298-300
- [20] Schweitzer B, Kingsmore S. Combining nucleic acid amplification and detection [Review] [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2001, (01): 21-27

(上接第 1208 页)

- [15] Omwancha WS, Mallipeddi R, Valle BL, et al. Chitosan as a pore former in coated beads for colon specific drug delivery of 5-ASA [J]. Int J Pharm, 2013, 441(30): 343-351
- [16] Damge C, Socha M, Ubrich N, et al. Poly (epsilon caprolactone)/eudragit nanoparticles for oral delivery of aspart-insulin in the treatment of diabetes [J]. J Pharm Sci, 2010, 99(2): 879-889
- [17] Makhlof A, Tozuka Y, Takeuchi H. PH-sensitive nanospheres for colon-specific drug delivery in experimentally induced colitis rat model [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2009, 72(1): 1-8
- [18] Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models [J]. Gastroenterology, 1984, 87: 1344-1350