

去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)在*N*-二硝基亚乙胺诱导原位肝癌模型、原位移植肝癌模型大鼠体内的表达与分布

杨文川¹, 张发斌^{1*}, 胡春晖^{1*}, 孔宪梅¹, 都涛¹, 赵振文²

1. 青海大学 医学院, 青海 西宁 810001

2. 厦门大学公共卫生学院 分子影像暨转化医学研究中心, 福建 厦门 361000

摘要: 目的 测定去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)在*N*-二硝基亚乙胺(DEN)诱导大鼠原位肝癌模型(DEN-HCC-Rat)和原位移植大鼠肝癌模型(OTT-HCC-Rat)中的表达。方法 DEN-HCC-Rat造模: 模型组SD大鼠按照20 mg·kg⁻¹ ig 0.25% DEN水溶液,每周1次,0.025% DEN水溶液供动物饮用;对照组每周ig 1次0.9%氯化钠溶液,灭菌水供动物饮用,于造模第4、10、18、22周取材。OTT-HCC-Rat造模: 模型组SD大鼠肝叶注射N1-S1细胞,假手术组大鼠麻醉后给予微创缝合处理,于注射后14 d取材。HE染色观察肝组织病变;通过免疫组化、免疫荧光、Western blotting和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)实验检测各组ASGPR表达及分布。结果 通过HE染色确定DEN-HCC-Rat和OTT-HCC-Rat造模成功。在DEN-HCC-Rat中,免疫组化、免疫荧光、Western blotting、qRT-PCR结果均显示,与对照组比较,模型组大鼠肝组织ASGPR表达显著上调($P<0.05$ 、 0.01),且呈时间相关性;在OTT-HCC-Rat中,免疫组化结果显示模型组ASGPR表达显著高于假手术组($P<0.05$),免疫荧光、Western blotting、qRT-PCR结果显示ASGPR在模型组与假手术组之间无显著性差异。结论 DEN-HCC-Rat模型更好地模拟肿瘤微环境改变,且ASGPR在肝癌区域表达高于对照组大鼠肝脏,故可利用ASGPR介导肝靶向制剂的转运,提高肝靶向药物治疗效果。

关键词: 去唾液酸糖蛋白受体; *N*-二硝基亚乙胺; 大鼠诱导原位肝癌模型; 大鼠移植肝癌模型; 靶向

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)02-0302-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.02.009

Expression and distribution of asialoglycoprotein receptor (ASGPR) in *N*-dinitroethylamine-induced hepatocellular carcinoma model and orthotopic transplantation tumor mode in rats

YANG Wenchuan¹, ZHANG Fabin¹, HU Chunhui¹, KONG Xianmei¹, DU Tao¹, ZHAO Zhenwen²

1. Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China

2. Center for Molecular Imaging and Translational Medicine, Xiamen University, Xiamen 361000, China

Abstract: Objective To determine the role of asialoglycoprotein receptor (ASGPR) in *N*-dinitroethylamine (DEN) -induced hepatocellular carcinoma model in rats (DEN-HCC-Rat) and orthotopic transplantation tumor mode in rats (OTT-HCC-Rat). **Methods** DEN-HCC-Rat modeling: SD rats in the model group were ig given a 0.25% DEN aqueous solution of 20 mg·kg⁻¹, once a week, with 0.025% DEN aqueous solution for animal consumption; The control group received 0.9% sodium chloride solution once a week, sterilized water for animal consumption, and samples were taken at weeks 4, 10, 18, and 22 of modeling. OTT-HCC-Rat modeling: SD rats in the model group were injected with N1-S1 cells into the liver lobes, while rats in the sham surgery group were anesthetized and treated with minimally invasive suturing. Samples were taken 14 days after injection. HE staining was used to observe liver tissue lesions. Immunohistochemistry, immunofluorescence, Western blotting and real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) were used to detect the expression and distribution in the liver tissue of two orthotopic liver cancer rat models and normal rats. **Results** In DEN-HCC-Rat, immunohistochemistry, immunofluorescence, Western blotting, and qRT-PCR results all

收稿日期: 2023-10-26

基金项目: 2022年中科院“西部之光”人才培养计划

第一作者: 杨文川,男,硕士研究生,研究方向为慢性病防治研究。E-mail:2414817382@qq.com

*共同通信作者: 张发斌,男,教授,研究方向为慢性病、地方病防治研究。E-mail:qhmczfb@126.com

胡春晖,男,副教授,研究方向为物理药剂学。E-mail:chunhuihu@qhu.edu.cn

showed that compared with the control group, the ASGPR expression in the liver tissue of the model group rats was significantly upregulated ($P < 0.05, 0.01$), and showed a time correlation. In OTT-HCC-Rat, immunohistochemistry results showed that the expression of ASGPR in the model group was significantly higher than that in the sham surgery group ($P < 0.05$). Immunofluorescence, Western blotting, and qRT-PCR results showed no significant difference in ASGPR between the model group and the sham surgery group. **Conclusion** The DEN-HCC-Rat model can better simulate the changes of tumor microenvironment and the expression of ASGPR in liver cancer is higher than that in normal rat liver. Therefore, ASGPR can be used to mediate the transport of liver targeted agents and improve the therapeutic effect of liver targeted drugs.

Key words: asialoglycoprotein receptor; *N*-dinitroethylamine; induced hepatocellular carcinoma rat model; orthotopic transplantation tumor rat mode; target

原发性肝细胞癌(HCC,简称肝癌)是我国最常见癌症之一,也是癌症死亡的主要原因,我国每年新发病例和死亡人数约占全球的一半^[1]。根据全球肝癌负担显示,HCC发病率仍有上升趋势。乙型肝炎(HBV)是引起HCC发生的主要诱因^[2-3],我国仍面临阳性人数逐渐上升的巨大挑战^[4]。目前对于HCC的防治仍以手术切除为手段,但术后5年复发率高达70%,且大部分HCC晚期或转移无法进行手术,故药物治疗尤为重要^[5]。目前治疗HCC的药物均为全身给药,没有肝靶向性,导致肝局部药物浓度低,疗效欠佳,容易引起全身副作用,故目前研发新型的HCC治疗的肝靶向制剂是治疗肝癌的重点方向之一^[6-7]。

有研究表明^[8-9],去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)是一种特异分布于肝脏的内吞型转载受体,可识别并结合糖基偶联物,并转运进入肝细胞,利用该受体的内吞机制可以实现药物或基因的肝靶向递送^[8,10]。基于ASGPR的药物递送已成为一种具有应用前景的递送策略^[11]。而要将其应用于HCC口服肝靶向的递送,需验证ASGPR在HCC肝脏组织的表达情况。

本研究通过*N*-二硝基亚乙胺(DEN)诱导法构建原位肝癌大鼠模型(DEN-HCC-Rat),通过N1-S1细胞原位移植法构建原位移植肝癌大鼠模型(OTT-HCC-Rat)。采用免疫组化、实时荧光定量PCR(qRT-PCR)、Western blotting和免疫荧光检测ASGPR在2种原位肝癌大鼠模型及正常大鼠的肝脏组织的表达水平,为肝癌治疗药物通过ASGPR靶向转运入肝提供参考。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

6~8周龄SPF级雄性^[12]SD大鼠,体重(200±20)g,购于南京市江宁区青龙山动物繁殖场,实验动物生产许可证号SCXK(苏)2020-0009。饲养于青海省高原医学中心重点实验室,自由进

食,按实验要求规格饮水。伦理学声明:本研究方案于2019年11月16日经由青海大学医学院实验动物伦理委员会审批,批号:2019-81960641,符合实验室动物管理与使用准则。

1.2 主要试剂

DEN购于Macklin公司;大鼠肝癌N1-S1细胞购于ATCC公司;ASGPR兔多克隆抗体(11739-1-AP)、 β -actin兔多克隆抗体(20536-1-AP)购于proteintech公司;RNA提取试剂盒、qRT-PCR试剂盒购于Takara公司;引物购于上海生工生物工程公司;HRP标记山羊抗兔抗体(ab6721)购于abcam公司;FITC标记山羊抗兔抗体(GB22303)、HRP标记山羊抗兔抗体(GB23303)购于Servicebio公司。

1.3 主要仪器

GeneAmp PCR System 9700 PCR扩增仪、Multiskan Sky型酶标仪(美国ThermoFisher公司);LightCycler480 II实时荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司);Universal 320R型高速冷冻离心机(德国Hettich公司);Resona 7彩色多普勒超声系统(深圳Mindray公司);AI600超灵敏多功能成像仪(美国GE公司);P250 FLASH数字切片扫描仪(济南丹吉尔电子有限公司);BMJ-A型冷冻切片机、BMJ-III型石蜡包埋机(常州市中盛电子仪器有限公司)。

2 方法

2.1 DEN-HCC-Rat模型的建立

SD大鼠按体质量随机分为对照组、DEN-HCC-Rat组。DEN-HCC-Rat^[13]组:按照20 mg·kg⁻¹ ig 0.25% DEN水溶液,每周1次,每天0.025% DEN水溶液供动物饮用。对照组:每周ig 1次0.9%氯化钠溶液,灭菌水供动物饮用。于实验第4、10、18、22周(DEN-HCC-Rat-4 W、10 W、18 W、22 W),随机抽取每组动物6只,打开腹腔,暴露并取肝脏标本组织固定和冷冻保存。

2.2 OTT-HCC-Rat模型的建立^[14]

SD大鼠按体质量随机分为假手术组、OTT-

HCC-Rat组。培养大鼠肝癌N1-S1细胞增殖到浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,收集细胞,用磷酸缓冲液(PBS)悬浮细胞并调节细胞浓度到 $5 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。通过ip 100 μL 3%戊巴比妥钠注射液对大鼠进行麻醉、脱毛、消毒,用剪刀在剑突下方打开一个长约1 cm的伤口。用无菌棉签将大鼠肝脏的左外叶拨至体外,然后用胰岛素针吸取约 5×10^6 个N1-S1细胞,缓慢注射进入肝叶。用棉签按住针孔,以免细胞悬液流出,然后拔出针头。确定针孔不再流血之后将肝脏送回大鼠腹腔内,然后缝合伤口,完全消毒之后放进鼠笼继续饲养。假手术组大鼠麻醉后给予微创缝合处理。待接种瘤长大并于14 d取造模组肿瘤组织和假手术组大鼠同位置肝脏组织保存、固定。

2.3 免疫组织化学

根据参考文献报道方法^[15],对于固定的肝脏样本,石蜡切片脱蜡至水,浸泡在柠檬酸缓冲液中的切片经微波加热修复。用过氧化氢冲洗阻断内源性过氧化物酶,加入牛血清阻断液20 min。加入一抗(ASGPR 1:100)4 °C孵育过夜。加入二抗37 °C孵育30 min。通过BA400 Digital成像系统采集图像并分析吸光度($A_{\text{免疫组化}}$)值。

2.4 qRT-PCR法检测基因表达水平

采用RNA提取试剂盒提取RNA后,去基因组DNA反转录得到cDNA。引物序列见表1,内参基因选用18S核糖体基因序列。配制PCR反应液,LightCycler480 System进行qRT-PCR反应,得到ASGPR基因与18S基因 C_t 值,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 为统计量分析得出其相对表达量^[15]。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

靶基因	引物序列
ASGPR	F: 5'-TGGCTGAGAGTCTGGCTTCCTG-3' R: 5'-AGTCATCTGGCTGCCCTGGTC-3'
18S(内参基因)	F: 5'-GTAAACCCGTTGAACCCATT-3' R: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'

2.5 Western blotting检测蛋白表达水平

冰上超声处理后,用RIPA裂解液提取肝组织蛋白,BCA法测定蛋白浓度。然后用12% SDS-PAGE将蛋白电泳并转移到PVDF膜上,10%的脱脂乳封闭。ASGPR(1:1 000)和 β -actin(1:2 000)抗体下孵育4 °C过夜,用TBST冲洗,在室温下与HRP标记的山羊抗兔抗体(1:1 000)孵育1 h。冲洗后用ECL显影液显影并拍照,Image J进行灰度分析。

2.6 免疫荧光

组织石蜡切片脱蜡至水,并将切片浸入柠檬酸盐缓冲液,采用微波加热进行修复后,PBS冲洗3次(每次5 min),滴加山羊血清封闭液室温封闭20 min;一抗(ASGPR 1:100)4 °C过夜孵育。清洗后滴加FITC二抗37 °C 30 min,DAPI复染孵育10 min,使用抗荧光衰减封片剂封片,荧光显微镜观察并采集图像(DAPI紫外激发波长330~380 nm,发射波长420 nm,发蓝光;FITC激发波长480 nm,发射波长525 nm,发绿光),分析荧光强度值。

2.7 统计学方法

采用SPSS 25.0对数据进行分析处理,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述,使用 t 检验来比较两组间数据,单因素方差分析来比较3组间数据,组内比较使用LSD- t 检验两两比较进行检验。

3 结果

3.1 DEN-HCC-Rat及OTT-HCC-Rat模型肝组织学观察

对照组大鼠肝脏组织被膜完整,形态正常,无异形坏死细胞。DEN-HCC-Rat-22 W肝组织行HE染色后于显微镜下观察可见,肝脏组织被膜完整,门管区及增生胆管周围见少量炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主;肝组织内见大面积肿瘤细胞浸润形成浸润灶,由较厚的纤维组织所包裹,胞核有异性性,可见核分裂象(图1白色箭头所示)。

假手术组大鼠肝脏组织被膜完整,形态正常,无异形坏死细胞;OTT-HCC-Rat组肝组织可见肿瘤细胞侵袭,结构模糊,肿瘤生长区域肿瘤细胞排列无规律,肿瘤细胞胞浆丰富,胞核大小不一,胞核有异性性。

结果表明DEN-HCC-Rat和OTT-HCC-Rat模型均形成肝癌病变。

3.2 ASGPR在2种HCC大鼠模型肝组织中的表达与分布

ASGPR在2种HCC大鼠模型肝组织中的表达分布免疫组化结果显示,ASGPR表达于肝实质细胞膜上,且在细胞表达区域(灰褐色区域)的 $A_{\text{免疫组化}}$ 值比较结果显示,在2种HCC模型中ASGPR呈现高表达,较相应对照组/假手术组有上调趋势,其中DEN-HCC-Rat-22 W组、OTT-HCC-Rat组差异显著($P < 0.05, 0.01$,图2,表2、3)。

qRT-PCR结果显示,与对照组比较,DEN-HCC-Rat组ASGPR mRNA相对表达量在肝癌形成过程中呈逐渐上升趋势,从10周开始出现表达显著升

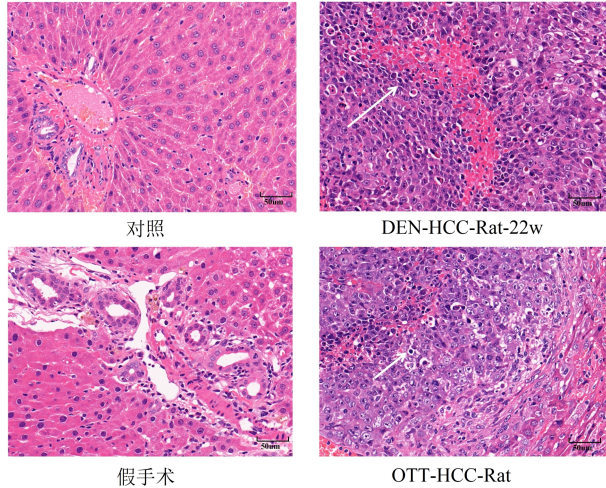


图1 DEN-HCC-Rat-22 W和OTT-HCC-Rat肝癌大鼠肝脏HE染色

Fig. 1 HE staining of livers from DEN-HCC-Rat-22 W and OTT-HCC-Rat

高 ($P < 0.05, 0.01$, 表2)。与假手术组比较, OTT-HCC-Rat组 *ASGPR* 表达无差异(表3)。

Western blotting 结果显示, 与对照组比较,

DEN-HCC-Rat 组 *ASGPR* 表达量从 18 周开始显著升高 ($P < 0.05$) (图3、表2); 与假手术组比较, OTT-HCC-Rat 组 *ASGPR* 蛋白表达无差异(图3、表3)。

免疫荧光镜检结果显示, *ASGPR* 在肝细胞膜上存在高表达, 与对照组比较, DEN-HCC-Rat-18, 22 W 组 *ASGPR* 荧光强度显著增加 ($P < 0.05$, 图4、表2); 与假手术组比较, OTT-HCC-Rat 组荧光强度有升高, 但无统计学差异(图4、表3)。与 qRT-PCR、Western blotting 结果一致。

4 讨论

根据研究显示^[16], 2020年肝癌死亡患者共830180例, 是全球癌症死亡的第三大原因。而我国2020年HCC新发病例数410038例, 占全球的45.27%^[17-18]。对于HCC早期患者可进行手术切除治疗, 但中晚期常采用靶向化疗药物治疗^[19]。然而肝癌患者的一线用药肝靶向效果较差, 口服后肝脏局部病灶部位药物浓度低^[20], 故提高口服肝靶向化疗药物疗效尤为重要。

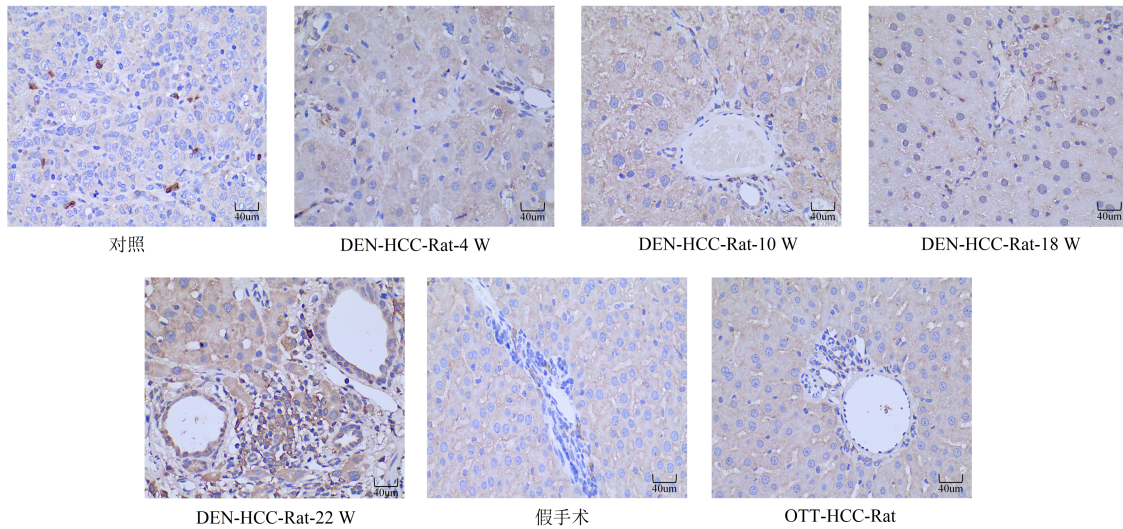


图2 ASGPR在2种HCC模型大鼠肝脏组织的表达分布(x40)

Fig. 2 Distribution of ASGPR expression in liver tissue of two HCC models rats (x40)

表2 ASGPR在DEN-HCC-Rat模型肝脏组织中的表达与分布($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Expression and distribution of ASGPR in liver tissue of DEN-HCC-Rat model ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	A 免疫组化	免疫荧光强度	条带灰度(ASGPR/ β -actin)	ASGPR mRNA 相对表达量
对照	2.36 \pm 0.71	29.88 \pm 4.41	0.51 \pm 0.04	0.99 \pm 0.21
DEN-HCC-Rat-4 W	2.37 \pm 0.25	36.28 \pm 1.31	0.51 \pm 0.03	1.39 \pm 0.35
DEN-HCC-Rat-10 W	2.41 \pm 0.59	39.92 \pm 2.85	0.53 \pm 0.08	1.68 \pm 0.40*
DEN-HCC-Rat-18 W	2.43 \pm 0.21	42.64 \pm 1.38*	0.65 \pm 0.12*	2.02 \pm 0.46*
DEN-HCC-Rat-22 W	6.32 \pm 0.94**	43.06 \pm 0.71*	1.24 \pm 0.27*	2.51 \pm 0.77**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

表 3 ASGPR 在 OTT-HCC-Rat 模型肝脏组织中的表达与分布 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Expression and distribution of ASGPR in liver tissue of OTT-HCC-Rat model ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	A 免疫组化	免疫荧光强度	条带灰度(ASGPR/ β -actin)	ASGPR mRNA 相对表达量
假手术	2.34 \pm 0.68	28.91 \pm 4.02	0.69 \pm 0.03	0.99 \pm 0.53
OTT-HCC-Rat	3.57 \pm 0.34 [*]	31.35 \pm 1.06	0.72 \pm 0.08	0.98 \pm 0.34

与对照组比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group.

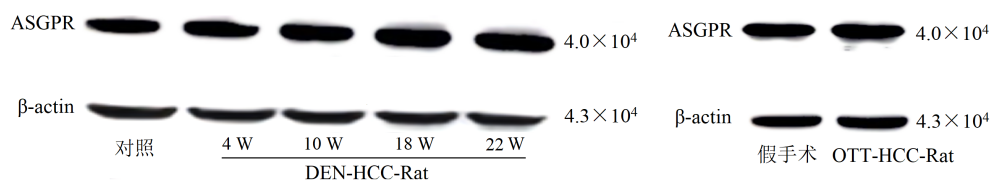


图 3 ASGPR 在 2 种模型大鼠肝脏组织的表达

Fig. 3 ASGPR expression in liver tissue of two model rats

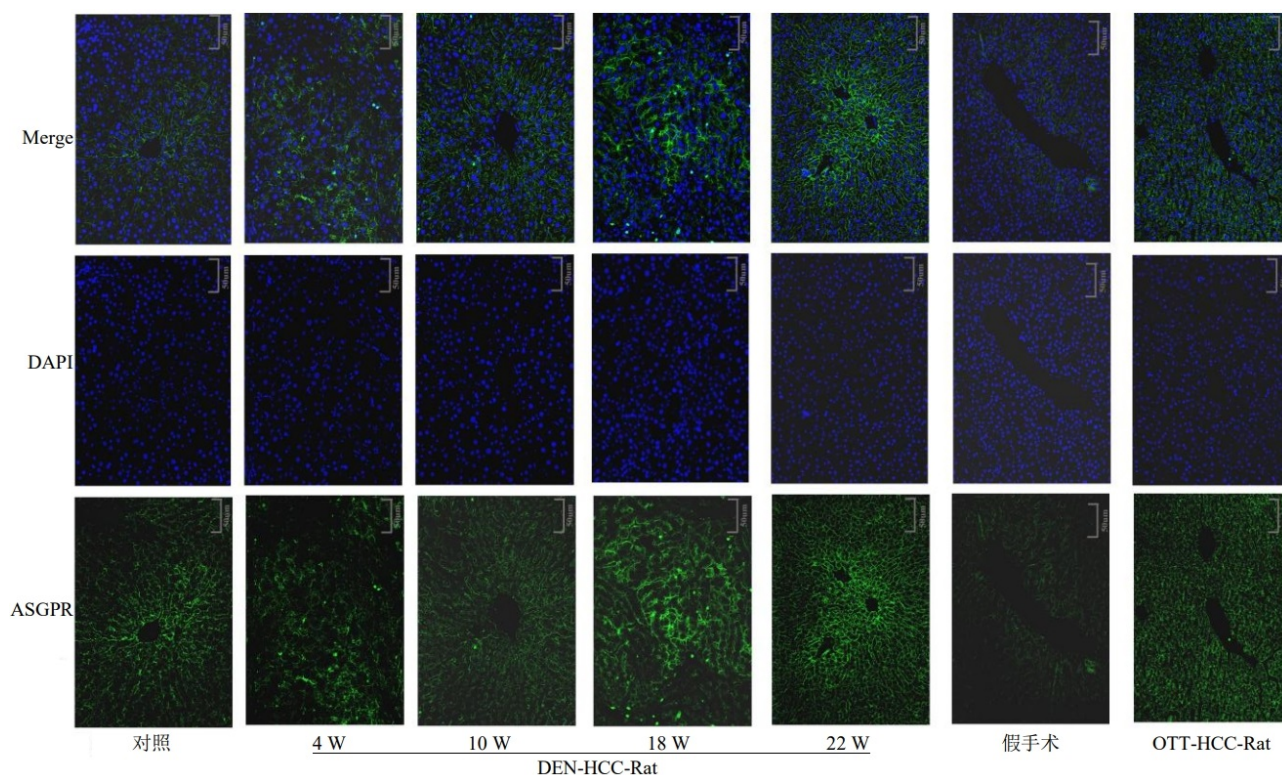


图 4 ASGPR 在 2 种模型大鼠肝脏组织的表达分布 ($\times 200$)

Fig. 4 Expression and distribution of ASGPR in liver tissue of two model rats ($\times 200$)

研究显示^[21-23], ASGPR 是肝细胞特异性表达的内存型受体, 去唾液酸糖蛋白、*N*-乙酰半乳糖胺等糖分子对其有高亲和力。Zhang 等^[24]利用 ASGPR 对 *N*-乙酰半乳糖胺转运机制, 制成载有半乳糖的球阿托伐他汀药物, 促进了阿托伐他汀的肝脏吸收。Latavia 等^[25]采用 ASGPR 特异性配体尝试标记载体, 与药物结合运送至肝细胞内, 提高药物摄取率。故 ASGPR 可成为肝癌靶向给药的物质基础, 本研究验证了 ASGPR 在 HCC 肝脏组织的表达情况。

以往研究表明^[26-27], DEN 诱发的肝癌模型发病过程较接近人类, 能够较好地模拟肝癌的发生及其病变微环境的变化, 其不足之处为诱发所需时间通常需 4 个月甚至更长, 这使得肿瘤微环境及病灶周围的变化更接近正常发病后的病理环境。而移植模型能够明确地确定病灶部位, 造模周期短, 可模拟肿瘤生长浸润^[28], 但其肿瘤演变的动态变化受到时间的影响, 移植模型(外来细胞)多数受到大鼠自体免疫排斥反应, 造模后具有逐渐扩散与自行消退

的免疫现象,肝癌移植模型造模成功所需的时间较短,可导致肿瘤微环境及病灶周围的变化尚未发生或变化不明显^[29-30]。本研究显示DEN-HCC-Rat组ASGPR表达水平在病变发展阶段逐渐升高,OTT-HCC-Rat组在肿瘤生长过程中ASGPR表达与正常大鼠无差异。由于DEN-HCC-Rat诱导肝癌模型,可观察到肝脏由肝损伤-肝炎-肝硬化到肝癌的长期发生过程的微环境改变,所以认为诱导模型可能更接近人体发病后的真实结果。

本研究构建HCC大鼠模型,并采用免疫组化、qRT-PCR、Western blotting和免疫荧光对ASGPR在HCC大鼠模型及对照/假手术大鼠的肝脏组织的表达水平进行分析,发现在诱导肝癌病变环境下ASGPR表达水平在病变发展阶段逐渐升高。故若以ASGPR为受体的肝癌转运药物研发成功,当其进入HCC患者体内,越接近HCC病变时期的患者可提高药物靶向传递的效果,可有效解决了当前药物肝脏病变局部血药浓度较低的问题。因此,将ASGPR作为治疗药物的肝靶向给药系统的受体,是一种解决化疗药物靶向效果较差的可行的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Feng R M, Zong Y N, Cao S M, et al. Current cancer situation in China: Good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics ? [J]. *Can Commun*, 2019, 39(1): 22.
- [2] Tan D J H, Setiawan V W, Ng C H, et al. Global burden of liver cancer in males and females: Changing etiological basis and the growing contribution of NASH [J]. *Hepatology*, 2023, 77(4): 1150-1163.
- [3] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(15): 1450-1462.
- [4] 单姗, 李敏, 田永谦, 等. 医疗大数据分析有助于监测低年龄组乙肝表面抗原阳性率及评估免疫效果 [J]. *肝脏*, 2020, 25(5): 472-475, 479.
Shan S, Li M, Tian Y Q, et al. The real-word big data can be used to evaluate the HBsAg positive rate and immunity effects in children [J]. *Chin Hepatol*, 2020, 25(5): 472-475, 479.
- [5] 夏勇, 杨田, 王葵. 肝细胞癌肝切除术后复发预防和治疗中国专家共识(2020版) [J]. *中国实用外科杂志*, 2021, 41(1): 20-30.
Xia Y, Yang T, Wang k. Chinese expert consensus on the prevention and management of recurrent hepatocellular carcinoma after hepatic resection(2020 edition) [J]. *Chin J Pract Surg*, 2021, 41(1): 20-30.
- [6] Wei X B, Yang D P, Xing Z, et al. Hepatocyte-targeted delivery using oleanolic acid-loaded liposomes for enhanced hepatocellular carcinoma therapy [J]. *Biomater Sci*, 2023, 11(11): 3952-3964.
- [7] Zhang X Q, Wang X M, Li Z Q, et al. Lactose-modified enzyme-sensitive branched polymers as a nanoscale liver cancer-targeting MRI contrast agent [J]. *Nanoscale*, 2023, 15(2): 809-819.
- [8] 龙国璋, 张卓, 陈五红, 等. 基于去唾液酸糖蛋白受体的肝靶向药物的研究 [J]. *药学学报*, 2023, 58(2): 235-245.
Long G Z, Zhang Z, Chen W H, et al. The research of liver-targeted drugs based on asialoglycoprotein receptor [J]. *Acta Pharm Sin*, 2023, 58(2): 235-245.
- [9] Stockert R J. The asialoglycoprotein receptor: Relationships between structure, function, and expression [J]. *Physiol Rev*, 1995, 75(3): 591-609.
- [10] Wang Y F, Yu R Z, Henry S, et al. Pharmacokinetics and clinical pharmacology considerations of GalNAc₃-conjugated antisense oligonucleotides [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2019, 15(6): 475-485.
- [11] Cui H, Zhu X Y, Li S Y, et al. Liver-targeted delivery of oligonucleotides with N-acetylgalactosamine conjugation [J]. *ACS Omega*, 2021, 6(25): 16259-16265.
- [12] He C Y, Fan X Y, Chen R, et al. Osteopontin is involved in estrogen-mediated protection against diethylnitrosamine-induced liver injury in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(8): 2878-2885.
- [13] Nagaraju G P, Dariya B, Kasa P, et al. Epigenetics in hepatocellular carcinoma [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86(Pt 3): 622-632.
- [14] 李鑫, 刘凤永, 袁宏军, 等. SD大鼠原位肝癌模型构建及影像学检查 [J]. *介入放射学杂志*, 2018, 27(12): 1177-1181.
Li X, Liu F Y, Yuan H J, et al. The establishment of *in situ* liver cancer model in SD rats and its imaging examinations [J]. *J Interv Radiol*, 2018, 27(12): 1177-1181.
- [15] 高瑞雪, 胡春晖, 张发斌, 等. 口服肝靶向制剂介导受体ASBT和ASGPR在肝泡型包虫病大鼠模型体内的表达分析 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(4): 846-851.
Gao R X, Hu C H, Zhang F B, et al. Expression of ASBT and ASGPR mediated receptors for oral liver-targeting preparations in a rat model of hepatic alveolar echinococcosis [J]. *J Clin Hepatol*, 2021, 37(4): 846-851.
- [16] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J].

- CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [17] Llovet J M, Kelley R K, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7: 6.
- [18] Jiang D M, Zhang L J, Liu W B, et al. Trends in cancer mortality in China from 2004 to 2018: A nationwide longitudinal study [J]. Can Commun, 2021, 41(10): 1024-1036.
- [19] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2022, 400(10360): 1345-1362.
- [20] Benet L Z, Broccatelli F, Oprea T I. BDDCS applied to over 900 drugs [J]. AAPS J, 2011, 13(4): 519-547.
- [21] Zimmermann T S, Karsten V, Chan A, et al. Clinical proof of concept for a novel hepatocyte-targeting GalNAc-siRNA conjugate [J]. Mol Ther, 2017, 25(1): 71-78.
- [22] Yu R Z, Graham M J, Post N, et al. Disposition and pharmacology of a GalNAc3-conjugated ASO targeting human lipoprotein (a) in mice [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2016, 5(5): e317.
- [23] Huang Y Y. Preclinical and clinical advances of GalNAc-decorated nucleic acid therapeutics [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2017, 6: 116-132.
- [24] Zhang Y X, Zhang X F, Zeng C X, et al. Targeted delivery of atorvastatin via asialoglycoprotein receptor (ASGPR) [J]. Bioorg Med Chem, 2019, 27(11): 2187-2191.
- [25] Singh L, Indermun S, Govender M, et al. Drug delivery strategies for antivirals against hepatitis B virus [J]. Viruses, 2018, 10(5): 267.
- [26] Kurma K, Manches O, Chuffart F, et al. DEN-induced rat model reproduces key features of human hepatocellular carcinoma [J]. Cancers, 2021, 13(19): 4981.
- [27] 韦武, 郭红星. 大鼠肝癌模型建立的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 119-123.
Wei W, Guo H X. Research progress in establishing rat liver cancer models [J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2019, 27(1): 119-123.
- [28] Xu Z T, Ding H, Fu T T, et al. A nude mouse model of orthotopic liver transplantation of human hepatocellular carcinoma HCCLM3 cell xenografts and the use of imaging to evaluate tumor progression [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 8694-8703.
- [29] Tan S M, Yang Y Q, Yang W J, et al. Exosomal cargos-mediated metabolic reprogramming in tumor microenvironment [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 59.
- [30] Mao X Q, Xu J, Wang W, et al. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: New findings and future perspectives [J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 131.

[责任编辑 兰新新]