

不同粒径、电荷、形状 PLGA 纳米粒跨越模拟肠道屏障能力的研究

王湏羽^{1,2}, 李言佳¹, 赵世康¹, 钟欣^{1,3*}, 汪小又^{1*}

¹ 西南大学药学院 重庆

² 四川大学华西药学院 四川成都

³ 内江市第一人民医院 四川内江

【摘要】在口服给药中, 纳米递药系统在增加药物胃肠道稳定性、提高药物口服生物利用度等多方面具备优良潜力, 而纳米递药系统穿越肠道黏液层和上皮屏障的能力与其粒径、电荷、形状等性质息息相关。聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA) 纳米粒在口服给药中研究广泛, 为探究不同大小、电荷、形状的 PLGA 纳米粒穿越肠道屏障的能力, 本研究采用乳化溶剂蒸发法、薄膜拉伸法制备上述不同性质的 PLGA 纳米粒, 对其粒径、电位、形态、贮存稳定性、荧光泄漏进行了验证, 并在体外水平比较了不同 PLGA 纳米粒穿越模拟黏液层的能力及在 Caco-2 细胞中的摄取能力。所制备的 PLGA 纳米粒具有预期制剂学性质, 且贮存稳定性良好、在模拟黏液中无明显荧光泄漏, 其穿越黏液层的程度及肠上皮细胞的摄取能力均与上述性质有较直接的关系。粒径、电荷、形状等性质是纳米粒设计中的重要参数, 相关研究有望对口服纳米粒的合理设计提供信息。

【关键词】口服给药; PLGA 纳米粒; 粒径; 电荷; 形状

【收稿日期】2024 年 6 月 27 日 **【出刊日期】**2024 年 8 月 22 日 **【DOI】**10.12208/j.jmbr.20240009

Penetration of PLGA nanoparticles with different sizes, charges and shapes through simulated intestinal barrier

Zhenyu Wang^{1,2}, Yanjia Li¹, Shikang Zhao¹, Xin Zhong^{1,3*}, Xiaoyou Wang^{1*}

¹College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing

²West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan

³The First People's Hospital of Neijiang, Neijiang, Sichuan

【Abstract】 In oral drug administration, nano drug delivery systems possess excellent potential in various aspects including promoting drug stability and improving oral bioavailability. The ability of nano-drug delivery systems to penetrate oral absorption barrier is closely related to their size, charge, shape, and relevant properties. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles have been extensively studied in oral drug delivery. To explore the influence of sizes, charges, and shapes of PLGA nanoparticle on their ability to cross the intestinal barrier, emulsion solvent evaporation and film-stretching methods were employed to prepare PLGA nanoparticles with the aforementioned properties. Their particle size, zeta potential, morphology, storage stability, and fluorescence leakage in simulated mucus were verified, and their ability to cross simulated mucus layer and their cellular uptake capacity in Caco-2 cells were evaluated in vitro. The PLGA nanoparticles exhibited the aforementioned different properties, along with good storage stability and negligible fluorescence leakage. The ability to cross the mucus layer and the cellular uptake capacity are directly related to these properties. Size, charge, and shape are important parameters in the design of nanoparticles, and relevant research could provide information for the rational design of oral nanoparticles.

*共同通讯作者: 钟欣, 汪小又

【Keywords】Oral administration; PLGA nanoparticles; Particle size; Electric charge; Shape

口服给药是应用最广泛的递药途径之一, 药物口服后经胃肠道吸收入血, 再经血液循环到达局部或全身组织, 达到治疗疾病的目的。在口服给药中, 胃肠道中的多种酶、特殊 pH 环境、肠道的黏液层和药物的肠道吸收等因素均可能对口服给药的生物利用度和最终疗效产生影响, 甚至可能导致药物只能通过注射等非口服途径给药^{[1][2]}。为克服口服递药的上述挑战, 纳米递药系统受到了研究者的广泛关注^[3]。将药物包载入纳米递药系统后, 能够在一定程度上减少药物与胃肠道内消化酶和特殊 pH 环境的接触, 从而保护药物不被破坏, 提高药物口服后的稳定性^[4]; 部分纳米递药系统可增强药物在黏液层中的黏附和滞留, 或快速穿透肠道的黏液层, 并增加药物在肠上皮细胞中的吸收和转运^{[5][6]}; 同时, 部分纳米递药系统还具备靶向和控释的能力, 在特定的环境或靶标处释放药物, 增强药物递送的特异性^[7]。通过对纳米递药系统的合理设计, 可以实现多种不同的功能, 调控稳定性、黏液层黏附、肠道屏障穿透、药物释放等等诸多行为, 最终达到增强口服递药效果的目的。

研究中常见的口服纳米递药系统种类繁多, 包括纳米粒、纳米乳、脂质体、包合物等等, 其中纳米粒得到了广泛的关注^[7]。在口服纳米粒的设计中, 其粒径、电荷、形状等物理属性将对其在胃肠道中的行为产生较重要的影响。例如, 研究比较了不同粒径纳米粒在黏液层中的穿透情况, 结果显示粒径较小的纳米粒更容易穿透黏液层到达肠上皮细胞^{[1][8]}。Gan 等^[9]比较了棒状和球状纳米粒在黏液层中的行为, 发现棒状纳米颗粒能相对更深地穿透黏液层, 并在胃肠道中具有更长的滞留时间, 分子动力学模拟和实验结果显示棒状纳米颗粒的穿透能力与其在黏液层中的旋转相关; Qi 等^[10]报道棒状纳米粒在体内被淋巴输送的程度也高于纳米球。Wu 等^[11]比较了正电纳米粒、负电纳米粒和电中性纳米粒在胃肠道中的行为, 发现中性纳米粒具有最强的黏液层穿透能力, 负电纳米粒与黏液层易发生静电相斥作用, 而正电纳米粒易被黏液层捕获从而滞留其中; 而 Huang 等^{[12][13][14]}报道了多种电荷可变的纳米粒, 例如一种表面修饰磷酸丝氨酸的、电荷近中性的仿生纳米粒可

较好地穿透黏液层, 随后其表面的磷酸丝氨酸水解并暴露出带正电的穿膜肽 octa-arginine (R8), 进一步增强其在肠上皮细胞中的摄取和转运。此外, 多项研究报道疏水性也对纳米粒的口服吸收有重要影响, 例如聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 对疏水性的载体表面进行修饰后, 可增强载体穿透黏液层的能力^[15]。

PLGA (Poly(lactic-co-glycolic acid)) 材料是一种常见的生物可降解材料, 已获 FDA 批准在人体中应用, 广泛用于各种不同功能纳米粒的构建^[16]。为探索用于口服吸收的 PLGA 纳米粒的合理设计, 本研究制备了不同粒径、电荷、形状的 PLGA 纳米粒, 并对其跨越口服吸收屏障的行为进行考察和比较, 以期对口服 PLGA 纳米粒的设计提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及仪器

PLGA (Poly(lactic-co-glycolic acid)), 上海笛柏生物科技有限公司; PVA (Polyvinyl alcohol), 上海阿拉丁生化科技有限公司; 胃黏蛋白, Sigma-Aldrich; 磷钨酸水合物, 上海麦克林生化科技有限公司; CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide), 北京欣华绿源科技有限公司; 香豆素-6, 上海阿拉丁生化科技有限公司; HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), 上海阿拉丁生化科技有限公司; 透析袋 (MWCO 3500), 上海优高玖贸易有限公司; Transwell 细胞培养板, 重庆铂锆钛科技有限公司。

Zetasizer Nano 激光粒度仪, Malvern Panalytical; HT7800 型生物透射电子显微镜, Hitachi, Ltd; SHZ-82 气浴恒温振荡器, 常州金坛宏华仪器; Operetta CLS 高内涵细胞分析系统, PerkinElmer, USA; MCGS 薄膜拉伸装置, 深圳昆仑态科技有限责任公司。

1.2 实验细胞

Caco-2 细胞, 武汉普诺赛生命科技有限公司。使用含有 10% 血清、1% 非必需氨基酸的 DMEM 培养液, 在 37℃, 5%CO₂ 的细胞培养箱中对 Caco-2 细胞进行培养。

1.3 PLGA 纳米粒 (PLGA NP) 的制备

采用乳化溶剂蒸发法, 按表 1 处方制备不同粒径、形状、电荷的 PLGA 纳米粒, 并使用香豆素-6

对纳米粒进行荧光标记。精密称取 10mg PLGA 和 10 μ g 香豆素-6, 加入 200 μ l 有机溶剂超声溶解, 混合后缓慢加入 1ml 水相溶液, 振摇混合均匀, 使用探头超声制备纳米粒后, 于 37 $^{\circ}$ C 旋蒸除去有机溶剂, 即得不同性质 PLGA NP。

其中, 使用了不同有溶剂及不同浓度的聚乙烯醇制备了不同粒径的 PLGA NP; 使用了聚乙烯醇 (PVA), 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB), 泊洛沙姆 188 (F68) 等不同乳化剂制备了不同电荷的 PLGANP。在 PEG 修饰的球形 PLGANP 的基础上,

采用薄膜拉伸法制备了短棒状、长棒状的纳米粒^[1], 以纵横比 (aspect ratio, ar) 作为形状的表征参数。以含甘油的 10% PVA 为膜材, 与 PLGA NP 混合后铺入平板, 放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 24h 后取出, 将所得薄膜剪成 5cm $\times$ 5cm 的小块, 安装于薄膜拉伸装置, 按 150 $^{\circ}$ C, 预热 10min 的条件进行拉伸, 拉伸完成后降温至 40 $^{\circ}$ C, 放入 50ml EP 管中, 分别用 30, 30, 20, 10mL 水离心洗涤, 并用 1mL 水重悬, 即得不同形状的 PLGANPs。

表 1 不同粒径、电荷、形状的 PLGA NP 的制备处方

纳米粒种类	有机溶剂	水相
大粒径 NP (L)	乙酸乙酯:CH ₂ Cl ₂ =1:1	0.1% PVA
中粒径 NP (M)	乙酸乙酯	0.1% PVA
小粒径/电中性 NP (S/neutral)	乙酸乙酯	1% PVA
正电荷 NP (positive)	乙酸乙酯	1% CTAB
负电荷 NP (negative)	乙酸乙酯	1% F68
球形 NP (ar=1)	乙酸乙酯	0.1% PVA +1% PEG

1.4 PLGA NP 的制剂学评价

使用 Zetasizer Nano 激光粒度仪测定粒径和电位。将制得的 PLGANP 用蒸馏水适当稀释, 置于检测池进行粒径分析及 zeta 电位测定。

使用 HT7800 型生物透射电子显微镜观察 PLGA NP 的大小和形貌。将 PLGA NP 适当稀释后滴加在铜网上, 15min 后用 1% 磷钨酸染色 45s, 使用一级水漂洗并干燥, 通过电子显微镜观察。

将 PLGANP 避光贮存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中, 分别于 1d、3d、5d、7d、10d 测定粒径, 考察其贮存稳定性。

1.5 PLGA NP 在模拟黏液层中的泄漏情况验证

将胃黏蛋白用 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) 分散, 配制成 3mg/mL (0.3%) 的黏蛋白溶液^[17]。取纳米粒溶液置于透析袋内密封, 置于黏蛋白溶液中, 保证香豆素浓度满足漏槽条件, 使用气浴恒温振荡器, 在 37 $^{\circ}$ C, 100rpm 条件下进行泄漏实验。分别于 0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h 取出 1mL 透析袋外黏蛋白溶液, 并补充同温等体积的空白黏蛋白溶液。测定各时间点取出样品液的荧光强度, 计算荧光素浓度进而计算累积泄漏率。

1.6 PLGA NP 与模拟黏液接触后的制剂学性质

变化

将 PLGA NP 与模拟黏液混合后放入气浴恒温振荡器, 于 37 $^{\circ}$ C, 100rpm 振摇 30 分钟。将混合物以 2000rpm 离心 5min, 弃去上清液, 沉淀离心洗涤两次并用一级水重新分散后测量粒径和电位。

1.7 PLGA NP 对模拟黏液层的穿透性考察

在 transwell 12 孔板下室内加入 1.5mL HBSS 缓冲液。于 transwell 小室中加入 100 μ L 黏蛋白溶液作为模拟黏液层, 随后加入同荧光浓度、不同性质的 PLGA 纳米粒, 在 37 $^{\circ}$ C, 100rpm 下振摇 8h, 每小时从下室中取液 100 μ L, 并补充同温同体积的新鲜 HBSS 缓冲液。测定各时间点取出样品液的荧光强度, 计算累积渗透量并绘制渗透曲线。

1.8 Caco-2 细胞摄取实验

取对数期生长的 Caco-2 细胞, 接种于 12 孔细胞培养板及 96 孔培养板中, 同条件培养 24h 至细胞贴壁。将荧光标记的不同性质 PLGA NP 用 DMEM 培养液稀释并使荧光强度相等。吸弃培养板内的原有培养液, 无菌 PBS 洗涤 3 次后, 分别加入等量的不同性质 PLGA NP, 将细胞置于培养箱内孵育 3h。孵育结束后, 用预冷灭菌 PBS 洗涤细胞 3 次, 随后

立即将 96 孔板置于 Operetta CLS 高内涵细胞分析系统中, 观察细胞摄取情况。

1.9 统计分析

数值表示为平均值 $\pm$ 标准差, 使用单因素方差分析 (ANOVA) 进行统计学分析, $p<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 不同 PLGA NPs 的表征

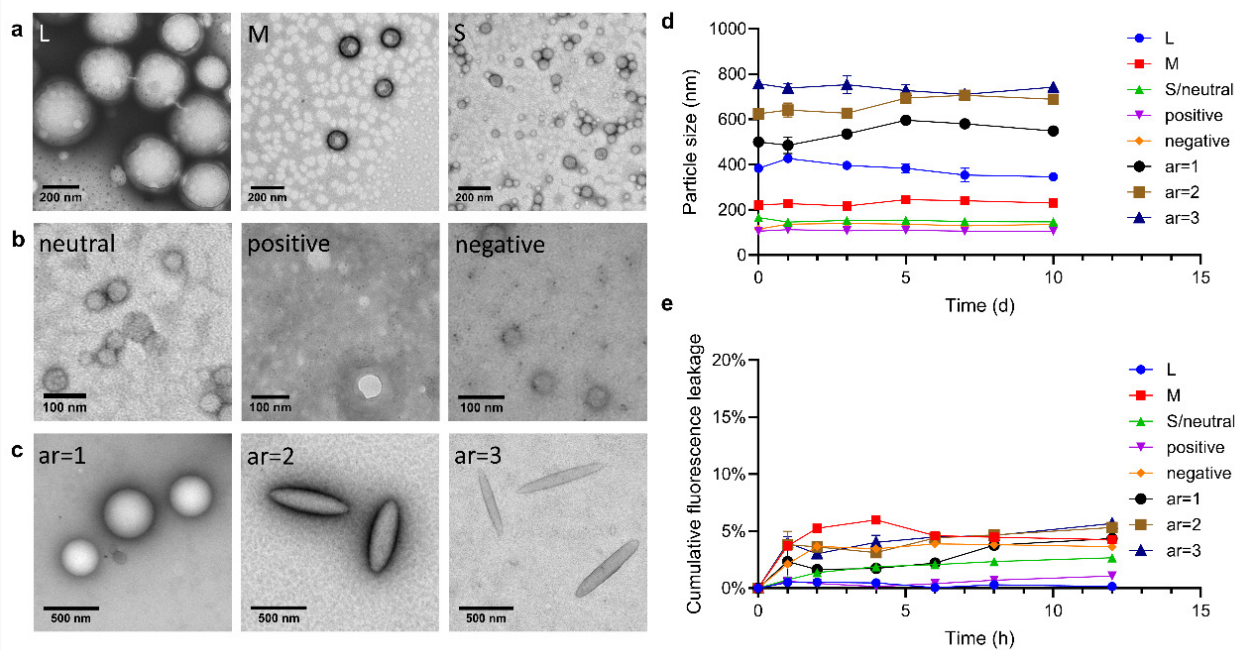
成功制备了不同粒径、不同电荷、不同形状的 PLGA NP, 各组纳米粒的粒径和电位测量结果见表 2。不同大小、电荷的 PLGA NP 表面形态都是均匀

光滑的球形 (图 1a、b)。纵横比 (ar) 为 1 的 PLGA NP 是表面光滑的球形, 而 ar=2 和 3 的纳米粒呈表面光滑的短棒状和长棒状, ar 值越大, 纳米粒形态也更细长 (图 1c)。各组 PLGA NP 在 10 天内稳定性良好 (图 1d)。

使用黏蛋白溶液模拟黏液层, 荧光标记的 PLGA NP 在模拟黏液中的荧光泄露情况见图 1e。12h 内各组荧光标记的 PLGA NP 在模拟黏液中泄漏量均小于 6%, 12h 内无显著游离香豆素-6 释放, 表明可用香豆素-6 荧光素较稳定地标记 PLGA NP, 荧光信号可有效反映 PLGA NP 的行为。

表 2 不同性质 PLGA NP 粒径及电位 (n=3)

PLGA NP 种类	粒径 (nm)	PDI	Zeta 电位 (mv)
大粒径 NP (L)	384 $\pm$ 2.45	0.095 $\pm$ 0.021	-0.959 $\pm$ 0.214
中粒径 NP (M)	221 $\pm$ 1.70	0.126 $\pm$ 0.012	-0.918 $\pm$ 0.289
小粒径/电中性 NP (S/neutral)	166 $\pm$ 3.27	0.213 $\pm$ 0.034	0.727 $\pm$ 0.113
正电荷 NP (positive)	142 $\pm$ 2.83	0.098 $\pm$ 0.052	51.8 $\pm$ 0.740
负电荷 NP (negative)	166 $\pm$ 2.94	0.136 $\pm$ 0.049	-7.86 $\pm$ 0.467
球形 NP (ar=1)	500 $\pm$ 20.40	0.385 $\pm$ 0.212	-5.39 $\pm$ 0.510
短棒状 NP (ar=2)	625 $\pm$ 7.41	0.249 $\pm$ 0.113	-1.42 $\pm$ 0.097
长棒状 NP (ar=3)	757 $\pm$ 13.10	0.185 $\pm$ 0.013	-4.14 $\pm$ 0.556



a.大粒径 (L)、中粒径 (M)、小粒径 (S) PLGA NP 的电镜图像; b.电中性 (neutral)、带正电 (positive)、带负电 (negative) PLGA NP 的电镜图像; c.球状 (ar=1)、短棒状 (ar=2)、长棒状 (ar=3) PLGA NP 的电镜图像; d.不同 PLGA NP 的储存稳定性; e.荧光标记 PLGA NP 在模拟黏液中的荧光泄露情况 (n=3)

图 1 不同 PLGA NP 的制剂学表征

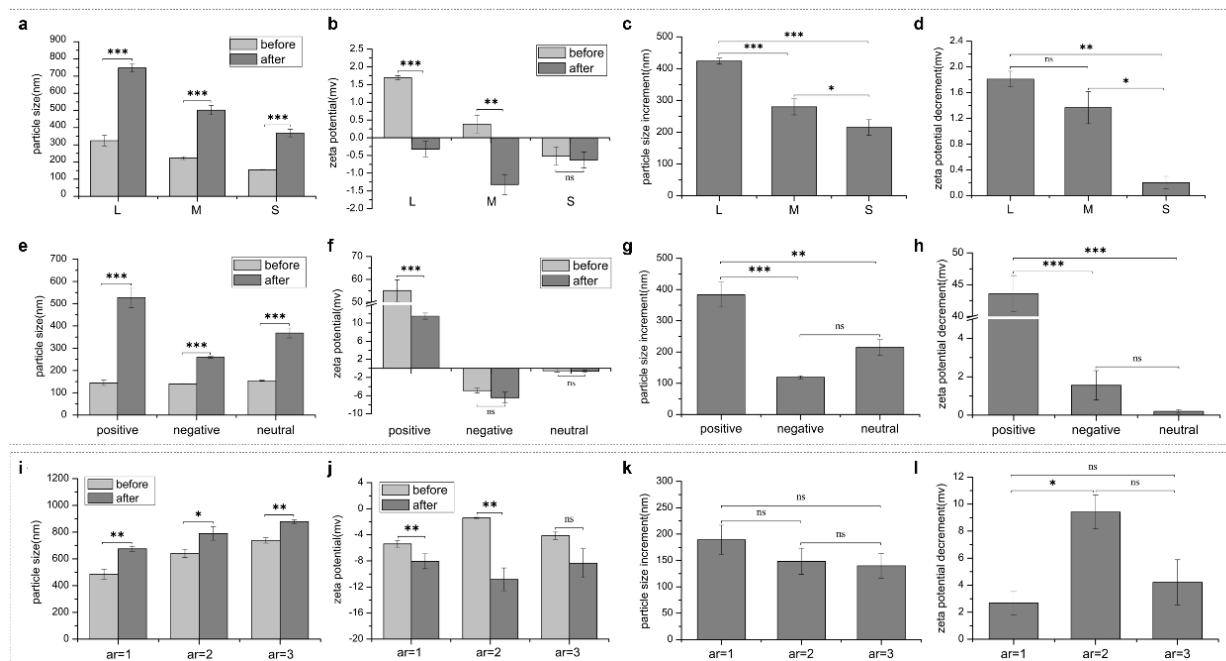
2.2 不同 PLGANP 与模拟黏液接触后的性质变化

为了考察 PLGA NPs 与黏液接触后的制剂学性质变化, 将 PLGANP 与模拟黏液孵育后比较其作用前后的粒径电位。

不同大小的 PLGA NP 在模拟黏液中孵育后粒径均显著增加, 电位均有所降低(图 2a,b)。其中, 各组之间粒径增加量为 $L>M>S$ (图 2c)。而对于电位降低量, L、M 与模拟黏液吸附前后的电位具有显著性差异, 而 S 无显著性差异(图 2d)。虽然处方优化后各组初始电位均为近中性, 但由于制备条件有一定区别, 因此 S 组初始电位仍相对较低, 不能排除其是造成电位改变较小的原因之一。

不同电荷的 PLGANP 在模拟黏液中孵育后, 粒径均显著增加, positive 组电位显著降低, 而 negative 与 neutral 组电位无明显变化(图 2e,f), 表明负电荷和中性纳米粒在模拟黏液中较稳定, 表面电位不易改变。对各组变化量进行分析, 与 neutral、negative 组相比, positive 组的粒径增加量及电位降低量显著更大, 更易吸附黏液蛋白(图 2g,h)。

不同形状的纳米粒在模拟黏液中孵育后, 粒径均显著增加, 但各组之间粒径增加量不具有显著性差异。球状($ar=1$)、短棒状($ar=2$) PLGANP 与模拟黏液吸附前后的电位具有显著性差异, 而长棒状($ar=3$) PLGANP 无显著性差异。(图 2i-l) 该实验条件下形状因素对粒径电位变化影响相对较小。



a-d.大粒径(L)、中粒径(M)、小粒径(S) PLGA NP与模拟黏液接触前后的粒径(a)、电位(b)、粒径变化量(c)、电位变化量(d); e-h.电中性(neutral)、带正电(positive)、带负电(negative) PLGA NP与模拟黏液接触前后的粒径(e)、电位(f)、粒径变化量(g)、电位变化量(h); i-l.球状($ar=1$)、短棒状($ar=2$)、长棒状($ar=3$) PLGA NP与模拟黏液接触前后的粒径(i)、电位(j)、粒径变化量(k)、电位变化量(l)。(n=3, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, ns为无显著差异)

图2 不同 PLGA NP 与模拟黏液接触后的性质变化

2.3 不同 PLGA NPs 对模拟黏液层的穿透性考察比较

通过 PLGA NPs 穿越 transwell 小室中模拟黏液层的渗透量对其穿透黏液层的能力进行了初步评估(图 3)。在不同大小的 PLGANP 中, L、M、S 在模拟黏液层中的渗透量具有显著性差异, 其中 S 组最易穿透黏液层, 在 8h 时累积渗透量接近 80%, M

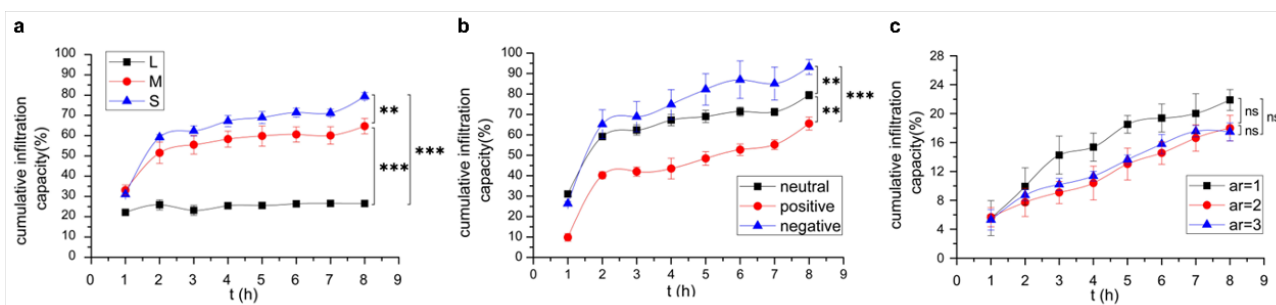
组 64%, 而 L 组仅为 26%, 该组 PLGA NP 穿透黏液层的能力与粒径有较强的相关性(图 3a)。在不同电荷的 PLGA NP 中, negative 组累积渗透量接近 90%, neutral 组约为 80%, 而 positive 组仅为 63%, 证明该实验条件下带正电的 PLGA NP 穿透黏液层的能力相对较低(图 3b)。在不同形状的 PLGANP 中, 球形纳米粒累积渗透量为 22%, 短棒状($ar=2$)

为 17%, 长棒状 ($ar=3$) 为 18%, 该实验条件下三种 PLGANP 在模拟黏液层中的渗透量接近, 无显著性差异 (图 3c)。同时, 在讨论形状对 PLGANP 的影响时, 本研究保持了纳米粒的体积一致, 而未保持水合粒径相同, 导致随着 ar 值的增加, 水合粒径相应增加, 考虑到粒径对纳米粒穿透黏液层能力的影响较强, 后续研究可考虑优先保持不同形状纳米粒的水合粒径一致, 再进行考察比较。

2.4 不同 PLGA NPs 的细胞摄取考察比较

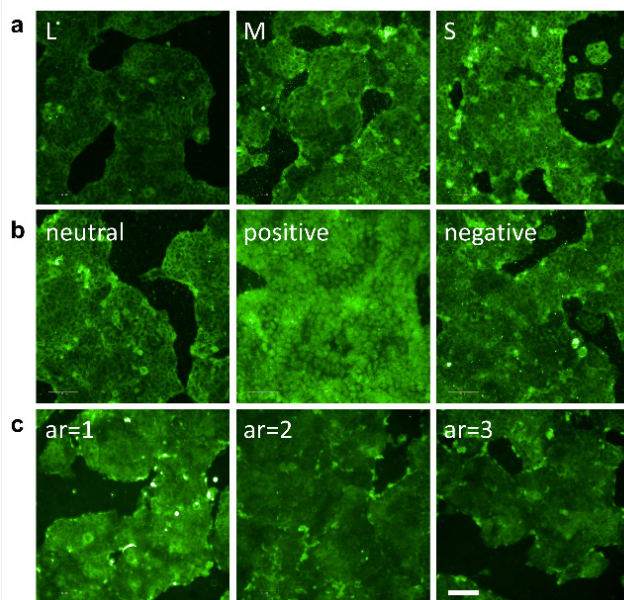
细胞摄取结果显示, 不同粒径的 PLGA NP 中, Caco-2 细胞对 M、S 的摄取量比 L 明显更多, 而 M 组和 S 组之间荧光强度相近 (图 4a)。虽然 L、M、

S 组随粒径减少, 对黏液层穿透能力逐渐增强, 但在细胞摄取中并未明显体现该规律, 可能由于细胞对 M、S 粒径的 PLGANP 具备类似的摄取机制和速度, 而对于 L 组 PLGANP 具有不同的摄取机制。不同电荷的 PLGANP 中, 细胞对正电荷纳米粒的摄取比负电荷、中性纳米粒的摄取明显更多 (图 4b), 有待制备更多粒径区间的不同电荷 PLGANP, 结合多种设计参数进行进一步比较。不同形状的 PLGANP 中, ar 值越大, 细胞摄取显著越少, 可能的原因同样为本实验中随着 ar 值的增加, 水合粒径相应增加, 粒径对细胞摄取造成了更大的影响。(图 4c)



a.大粒径 (L)、中粒径 (M)、小粒径 (S) PLGA NP 穿透模拟黏液层的情况; b.电中性 (neutral)、带正电 (positive)、带负电 (negative) PLGA NP 穿透模拟黏液层的情况; c.球状 ($ar=1$)、短棒状 ($ar=2$)、长棒状 ($ar=3$) PLGA NP 穿透模拟黏液层的情况。
($n=3$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, ns 为无显著差异)

图 3 不同 PLGA NP 对模拟黏液层的穿透能力



a.大粒径 (L)、中粒径 (M)、小粒径 (S) PLGA NP 在 Caco-2 细胞中摄取的荧光图像; b.电中性 (neutral)、带正电 (positive)、带负电 (negative) PLGA NP 在 Caco-2 细胞中摄取的荧光图像; c.球状 ($ar=1$)、短棒状 ($ar=2$)、长棒状 ($ar=3$) PLGA NP 在 Caco-2 细胞中摄取的及荧光图像。scale bar=100 μ m

图 4 不同 PLGA NP 在 Caco-2 细胞中的摄取情况

3 结论与展望

本实验通过乳化溶剂蒸发法制备出表面形态良好, 粒径均匀的不同大小、电荷、形状的纳米粒, 肠道模拟黏液的吸附、穿越实验结果表明所制备的 PLGANPs 中粒径小、带负电荷、及球形纳米粒与黏液吸附不明显, 也更容易穿越肠道黏液层。在 Caco-2 细胞摄取实验中, 细胞对所制备的粒径小、球形的 PLGANP 摄取能力更强。纳米粒的大小、电荷、形状等性质对于其穿越肠道屏障的行为在体外水平显示出显著影响, 后续应开展相关的动物实验, 进一步考察其对药物口服递送的效果。

在实验中, 棒状纳米粒 ($ar=2$, $ar=3$) 组与球形纳米粒 ($ar=1$) 组保持体积相同, 但由于形状因素, 水合粒径随 ar 值上升而上升, 由于粒径本身对纳米粒行为的影响, 难以总结形状这一单一因素对纳米粒行为的影响。后续可考虑制备水合粒径一致、形状不同的纳米粒, 再进行相关实验考察其行为; 或在设计实验时, 将形状、粒径、电荷等关键参数的改变与黏液层穿越、细胞摄取等能力的改变进行系统性考察和数据分析, 总结出综合各关键参数的设计指导原则, 以协助设计性质合适的 PLGA 纳米粒, 更好地达到增强口服递送效果的目的。另外, 不同疾病条件下肠道黏液层的组成、厚薄等性质可能受到改变, 有必要探讨在不同黏液层状态下, 纳米粒各性质对其黏液层穿透能力的影响程度的改变, 并在具体条件下确定具体的优化设计方案。

参考文献

- [1] Banerjee, Amrita, Qi, Jianping, Gogoi, Rohan, et al. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery[J]. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 2016, 238:176-185.
- [2] Goldberg Michael, Gomez-Orellana Isabel. Challenges for the oral delivery of macromolecules[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2003, 2(4):289-295.
- [3] Des Rieux A, Fievez V, Garinot M, et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach[J]. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 2006, 116(1):1-27.
- [4] Mørseth, R.J.. Oral drug delivery research in Europe[J]. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 2012, 161(2):247-253.
- [5] Banerjee A, Lee J, Mitragotri S. Intestinal mucoadhesive devices for oral delivery of insulin. Bioeng Transl Med. 2016, 1(3):338-346.
- [6] Ensign, L.M., Cone, R., Hanes, J.. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers[J]. Advanced drug delivery reviews, 2012, 64(6):557-570.
- [7] Yun, Y., Cho, Y.W., Park, K.. Nanoparticles for oral delivery: Targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery[J]. Advanced drug delivery reviews, 2013, 65(6):822-832.
- [8] He, C., Yin, L., Tang, C., et al. Size-dependent absorption mechanism of polymeric nanoparticles for oral delivery of protein drugs[J]. Biomaterials, 2012, 33(33):8569-8578.
- [9] Yu, Miaorong, Wang, Jiuling, Yang, Yiwei, et al. Rotation-facilitated rapid transport of nanorods in mucosal tissues[J]. Nano letters, 2016, 16(11):7176-7182.
- [10] Li, Dong, Zhuang, Jie, He, Haisheng, et al. Influence of particle geometry on gastrointestinal transit and absorption following oral administration[J]. ACS applied materials & interfaces, 2017, 9(49):42492-42502.
- [11] Yu, Zhou, Fan, Wufa, Wang, Luting, et al. Effect of surface charges on oral absorption of intact solid lipid nanoparticles [J]. Molecular pharmaceutics, 2019, 16(12):5013-5024.
- [12] Wu, Jiawei, Zheng, Yaxian, Liu, Min, et al. Biomimetic viruslike and charge reversible nanoparticles to sequentially overcome mucus and epithelial barriers for oral insulin delivery[J]. ACS applied materials & interfaces, 2018, 10(12):9916-9928.
- [13] Liu, Min, Zhang, Jian, Zhu, Xi, et al. Efficient mucus permeation and tight junction opening by dissociable "mucus-inert" agent coated trimethyl chitosan nanoparticles for oral insulin delivery[J]. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 2016, 222:67-77.
- [14] Shan W, Zhu X, Liu M, et al. Overcoming the diffusion barrier of mucus and absorption barrier of epithelium by

- self-assembled nanoparticles for oral delivery of insulin. ACS Nano. 2015;9(3):2345-2356.
- [15] Huckaby, Justin T., Lai, Samuel K.. PEGylation for enhancing nanoparticle diffusion in mucus[J]. Advanced drug delivery reviews,2018,124:125-139.
- [16] Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., et al. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications[J]. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society,2012,161(2):505-522.
- [17] Crater, J.S., Carrier, R.L.. Barrier properties of gastrointestinal mucus to nanoparticle transport[J]. Macromolecular bioscience, 2010,10(12):1473-1483.