

普朗尼克 F-127 包裹的三甲基壳聚糖纳米传递系统

郑雅娴, 张吴楠, 何丽萍, 吴蕊男, 山伟, 刘敏, 黄园*

(四川大学华西药学院, 靶向药物与传递系统教育部重点实验室, 成都 610041)

摘要 该研究旨在构建普朗尼克 F-127 (PF-127) 包裹的三甲基壳聚糖 (TMC) 纳米粒 (F-S NPs), 以提高 TMC 纳米粒 (S NPs) 克服黏液屏障的能力。以胰岛素 (INS) 为模型药物, 采用单因素筛选法优化纳米粒 (F-S NPs) 的处方, 获得粒径为 (240.6 ± 6.51) nm、Zeta 电位 (10.42 ± 1.60) mV、包封率 $(43.39 \pm 2.83)\%$ 、载药量 $(3.39 \pm 0.57)\%$ 的纳米粒。分别采用黏蛋白吸附实验和尤斯室实验考察纳米粒克服黏液屏障的能力。用黏液分泌型细胞 HT29-MTX-E12 考察纳米粒的摄取能力。结果表明, F-S NPs 与黏蛋白的亲和能力仅为 S NPs 的 28%, 其表观黏液渗透系数为 S NPs 的 2.79 倍。F-S NPs 的细胞摄取能力分别为游离胰岛素、S NPs 的 16 和 1.4 倍。PF-127 成功包裹于 S NPs 的表面, 显著提高了纳米粒克服黏液屏障和 E12 细胞的摄取能力。

关键词 普朗尼克 F-127; 三甲基壳聚糖; 纳米粒; 黏液屏障

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000–5048(2016)04–0442–06

doi:10.11665/j.issn.1000–5048.20160409

引用本文 郑雅娴, 张吴楠, 何丽萍, 等. 普朗尼克 F-127 包裹的三甲基壳聚糖纳米传递系统 [J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(4):442–447.
Cite this article as: ZHENG Yaxian, ZHANG Wunan, HE Liping, et al. Trimethyl chitosan nanoparticles coated with Pluronic F-127 for oral insulin delivery system [J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(4):442–447.

Trimethyl chitosan nanoparticles coated with Pluronic F-127 for oral insulin delivery system

ZHENG Yaxian, ZHANG Wunan, HE Liping, WU Ruinan, SHAN Wei, LIU Min, HUANG Yuan*

Key Laboratory of Drug Targeting and Drug Delivery Systems (Ministry of Education), West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract The purpose of this investigation was to develop Pluronic F-127 coated *N*-trimethyl chitosan nanoparticles (F-S NPs) of insulin as the model drug and assess their penetration of the mucosal barriers. Single factor screening was used to optimize the formulations of nanoparticles and the nanoparticles were characterized. Their particle size, Zeta potential, encapsulation efficiencies and drug loading were assayed to be (240.6 ± 6.51) nm, (10.42 ± 1.60) mV, $(43.39 \pm 2.83)\%$ and $(3.39 \pm 0.57)\%$, respectively. The impact of PF-127 on mucin binding *in vitro* and nanoparticles's transport in freshly obtained mucus were also evaluated. The mucin affinity of F-S NPs was significantly reduced when compared to that of the *N*-trimethyl chitosan nanoparticles (S NPs), i.e., 28% of the latter. And F-S NPs was found to have an improved mucosal penetrating capability. Mucus-secreting HT29-MTX-E12 (E12) cell monolayer was selected to investigate their cellular uptake. F-S NPs exhibited higher penetration coefficient than both free insulin and S NPs in mucus-secreting epithelium cells, i.e., 16-fold and 1.4-fold, respectively. Data suggest that F-S NPs be potential carriers to cross mucosal barriers and enhance the cellular uptake of insulin.

Key words Pluronic F-127; *N*-trimethyl chitosan; nanoparticles; mucosal barrier

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81173010)

随着现代生物技术的发展,蛋白多肽类药物在临床应用中受到广泛关注。口服给药能有效解决注射给药存在的患者依从性差、安全性低等问题^[1]。但由于蛋白多肽类药物在胃肠道中易受环境 pH、酶及肠道表面的黏液层等各类生理屏障的影响,其口服生物利用度较低^[2]。

近年来,纳米技术的飞速发展为蛋白多肽类药物的口服给药提供了新思路。壳聚糖及其衍生物三甲基壳聚糖(TMC)为载体的口服纳米给药系统因增加蛋白多肽类药物在胃肠道中的稳定性,能可逆地打开细胞间的紧密连接,促进药物的跨膜转运而被广泛运用^[3-4]。然而,肠上皮细胞表面的黏液层带负电,带正电的壳聚糖纳米粒在静电吸附的作用下,大部分滞留在黏液层,并随着黏液层的更新被清除,严重影响了壳聚糖纳米粒的转运吸收^[5-7]。

本课题组设想将一种亲水性、电中性材料包裹在纳米粒表面以屏蔽其正电荷,使之能快速通过黏液层。普朗克尼 F-127(PF-127)是一种聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯构成的非离子式三嵌段共聚物,能在三甲基壳聚糖纳米粒表面形成疏松的网状结构层,该网状结构层能有效屏蔽纳米粒表面的正电荷,且具有较强的亲水性,可以减少纳米粒与黏液层之间的静电作用和疏水作用。本研究采用黏蛋白吸附实验和尤斯室实验考察了 PF-127 包裹的三甲基壳聚糖纳米粒克服黏液屏障的效果。用黏液分泌型 HT29-MTX-E12 细胞评价纳米粒的细胞摄取能力。

1 材 料

1.1 药品与试剂

胰岛素(INS, 江苏万邦生化医药股份有限公司);三甲基壳聚糖(TMC, 自制);三聚磷酸钠(TPP, 武汉市天源兴有限公司);胰酶(trypsin, 美国 Amresco 公司);普朗尼克 F-127(PF-127)猪黏蛋白、考马斯亮蓝 G250(CBB)、Alamar Blue(美国西格玛公司);DMEM 高糖培养基、胎牛血清(美国海克隆公司),其他试剂均为分析纯。

1.2 仪 器

Zetasize NanoZS90 激光粒度分析仪(美国马尔文公司);JEM-100CX 透射电子显微镜(日本电子公司);Agilent 1200 Series 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);ZHWY-103B 恒温摇床(上海智诚分

析仪器制造有限公司);Vavioskan flash 化学发光分析仪(美国赛默飞世尔公司);VCC MC6-6 六孔道尤斯灌流室系统(美国 Physiologic Instruments 公司);IsoporeTM聚碳酸酯膜(美国密理博公司)。

1.3 细胞株

HT29-MTX 细胞株由法国 Thecla Lesuffleu 教授赠送,细胞代数为 20~40 代。

2 方 法

2.1 载胰岛素三甲基壳聚糖纳米粒(S NPs)及 PF-127 包裹的载胰岛素三甲基壳聚糖纳米粒(F-S NPs)的制备及表征

根据文献[8],采用单离子交联法制备纳米粒。以 TMC(0.2~0.5 mg/mL)、胰岛素(INS)(0.1~0.5 mg/mL)、三聚磷酸钠(TPP)(0.02~0.10 mg/mL)、PF-127(50~80 mg/mL)为考察因素,以纳米粒的粒径(size)、多分散指数(PDI)、Zeta 电位、纳米粒的包封率(encapsulation efficiency, EE)等为考察指标,单因素筛选得到较优处方。精密称量处方量的 TMC、INS、TPP 适量溶于纯水中,调 pH 至 7.0,混合均匀后室温搅拌 10 min,制备 S NPs 混悬液。再精密称量处方量的 PF-127 溶于纯水中,缓慢滴加至 S NPs 中,室温搅拌 10 min,制备 F-S NPs 混悬液。分别表征 S NPs、F-S NPs 的粒径、PDI、Zeta 电位、EE 及载药量(DL)。将纳米粒混悬液离心分离(13 000 r/min, 4 °C, 15 min),分离纳米粒与游离药物。取上清液,采用 RP-HPLC 测定游离 INS 的含量[Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相 0.2 mol/L 无水硫酸钠-乙腈(72:28),流速 1 mL/min,检测波长 214 nm,柱温 40 °C,进样量 20 μL]。计算纳米粒的包封率和载药量。

2.2 纳米粒形态观察

取少量纳米粒混悬液稀释到适当的浓度,滴加 2% 磷钨酸染色,滴至铜网上,在透射电子显微镜下观察粒子形态。

2.3 纳米粒的形成机制

纳米粒中的静电作用用 NaCl 环境中纳米粒的粒径变化百分数来评价。取 F-S NPs、S NPs 混悬液至 NaCl(0, 2, 10, 60, 120, 180, 240, 300 g/L)溶液中(1:9),孵育 30 min,用激光粒度分析仪测其粒径并计算粒径变化百分数。用 t 检验计算显著性差异。照上述方法,采用尿素(0, 50, 100, 150, 200,

300 g/L)溶液评价纳米粒中的氢键作用。并利用 *t* 检验计算显著性差异。

纳米粒的疏水作用通过考马斯亮蓝(CBB)的最大吸收波长的变化来评价。分别将 S NPs 和 F-S NPs 重新分散在磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)2 mL 中,滴加 0.1 mol/L CBB 溶液(10:1),室温孵育 30 min,于 400~800 nm 范围内测定 CBB 的最大吸收波长,以空白 CBB 溶液为对照,计算波长移动的距离。

2.4 纳米粒中药物释放考察

采用透析法考察纳米粒的体外释放行为。分别取 F-S NPs、S NPs 纳米粒分散液 1.5 mL 置于透析管内,在温度为 37 °C 的漏槽条件,以 PBS(pH 7.4)900 mL 为释放介质,研究药物从纳米粒中的释放行为^[9~10]。在固定时间点(0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 h)取出透析管内混悬液,加入 0.1 mol/L HCl 溶液破坏纳米粒结构,离心分离,用 RP-HPLC 法测定上清液中 INS 的含量,计算累积释放百分率,并绘制纳米粒的释放曲线。利用 *t* 检验计算组间显著性差异。并采用 *f*₂ 因子比较法进行曲线相似性评价^[11]。

2.5 纳米粒的酶稳定性考察

分别将 S NPs 和 F-S NPs 分散于含有 0.2% 胰酶的 PBS (pH 7.4) 中,以游离胰岛素为对照组,在 37 °C、100 r/min 恒温振荡器中振摇。于不同时间点(0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 h)取出溶液 0.2 mL,加入 0.1 mol/L HCl 溶液终止胰酶活性并破坏纳米粒结构,离心分离,用 RP-HPLC 测定上清液中胰岛素的含量,绘制出纳米粒的酶稳定曲线。

2.6 纳米粒克服黏液屏障考察

根据上述制备方法用处方量的 TMC、荧光标记胰岛素(FITC-INS)、TPP、PF-127 制备荧光标记三甲基壳聚糖纳米粒(FITC-S NPs)及 PF-127 包裹的荧光标记三甲基壳聚糖纳米粒(FITC-F-S NPs)。

采用黏蛋白吸附实验考查纳米粒与黏蛋白的亲和力^[12]。将 FITC-S NPs 与 FITC-F-S NPs 分散于 PBS(pH 7.4)中,各取出一定体积的上述溶液,分别加入 3 mol/L NaOH 溶液破坏纳米粒结构,用化学发光仪测出初始荧光强度(*I*₀)。取上述纳米粒分散液与 0.1% 黏蛋白溶液混合,37 °C 孵育 30 min,3 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,用 PBS(pH 7.4)将纳米粒-黏蛋白沉淀洗涤两次,再

加入 3 mol/L NaOH 溶液坏纳米粒-黏蛋白沉淀,测出最终荧光强度(*I*),分别计算 FITC-S NPs、FITC-F-S NPs 的荧光强度比值(*I*/*I*₀),以评价纳米粒与黏蛋白的亲和力及纳米粒在黏蛋白溶液中的稳定性。利用 *t* 检验计算组间显著性差异。

使用尤斯室实验评价纳米粒在黏液层的透过作用。取猪肠黏液 50 μL 装填在两张聚碳酸酯膜之间(孔径 2.0 μm),固定于分离夹(有效渗透面积 0.50 cm²)上,插入尤斯室小室。于 A 室加入纳米粒分散液(FITC-S NPs、FITC-F-S NPs)1 mL 和 PBS(pH 7.4)1.5 mL,向 B 室加入 PBS(pH 7.4)2.5 mL,通入气体(95% O₂,5% CO₂)保持两室液体循环,37 °C 恒温。于不同时间点(0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 h)从 B 室取出 200 μL,同时补加等体积的 PBS(pH 7.4)。在取出的样品中加入 0.1 mol/L HCl 溶液破坏纳米粒结构,用化学发光仪测定 FITC-INS 荧光强度(*I*),计算累积渗透量(*Q*),并根据以下计算公式计算表观渗透系数(apparent permeability coefficient, *P*_{app})。利用 *t* 检验计算组间显著性差异。

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{A \times c_0} \quad (1)$$

dQ/dt:纳米粒的跨膜转运速率; *A*:有效渗透面积; *c*₀:药物初始浓度。

2.7 纳米粒在 HT29-MTX-E12(E12) 细胞模型上的考察

将 E12 细胞放置在 37 °C、5% CO₂ 及 95% 湿度的无菌环境中培养。按每毫升 5 × 10⁴ 个细胞的密度接种于 96 孔板中,培养 7 d 后用于细胞毒性、细胞摄取实验。

根据文献[13],采用 MTT 法进行细胞毒性测定,考察不同浓度纳米粒对 E12 细胞活性的影响。实验前,去除 96 孔板中的培养基,用 PBS 溶液(pH 7.4)轻轻润洗。将不同浓度 FITC-S NPs、FITC-F-S NPs(FITC-INS 的质量浓度为 100, 200, 300 μg/mL)与细胞孵育 3 h,弃去样品液。再用 PBS 溶液(pH 7.4)润洗每孔,加入 DMEM 培养基 200 μL,再加入 MTT 溶液 20 μL,继续孵育 4 h。终止培养,弃去孔内溶液。每孔加入二甲亚砜 200 μL,振荡 30 min,使结晶物充分溶解。细胞存活率(cell viability)用空白组吸收度校正后的样品组与对照组的吸收度之比表示。

用细胞摄取实验评价纳米粒的细胞摄取能力。实验前用 0.01 mg/mL 刀天青溶液与细胞孵育 1 h, 测定各孔荧光强度以定量活性细胞数。移去刀天青溶液, 用 PBS 溶液 (pH 7.4) 润洗。随后分别加入 FITC-S NPs、FITC-F-S NPs (FITC-INS 的质量浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$) $100 \mu\text{L}$ 与细胞孵育 3 h。终止培养, 弃去孔内溶液。每孔加入二甲亚砜 $100 \mu\text{L}$ 破坏纳米粒, 测定被摄取入细胞的药物荧光强度。用刀天青测定的细胞相对数量对摄取量进行校正, 结果用相对荧光强度 (relative fluorescence intensity) 表示。

3 结果与讨论

3.1 载胰岛素三甲基壳聚糖纳米粒 (S NPs) 及普朗尼克 (PF-127) 包裹的载胰岛素三甲基壳聚糖纳米粒 (F-S NPs) 的制备及表征

本课题组采用单因素筛选法考察了 TMC、INS、TPP 的浓度对纳米粒的影响。综合纳米粒的粒径、PDI、Zeta 电位、纳米粒的包封率 (EE) 等指标, 确定最优处方: TMC (0.45 mg/mL)、INS (0.25 mg/mL)、TPP (0.07 mg/mL)、PF-127 (70 mg/mL)。

用 PF-127 包裹纳米粒后, 纳米粒粒径由 $(190.47 \pm 2.06) \text{ nm}$ 增加至 $(240.6 \pm 6.51) \text{ nm}$, Zeta 电位由 $+ (19.17 \pm 0.47) \text{ mV}$ 降低至 $+ (10.42 \pm 1.60) \text{ mV}$, 包封率为 $(43.36 \pm 2.88)\%$, 载药量为 $(3.39 \pm 0.57)\%$ 。以上结果表明, PF-127 成功包裹于三甲基壳聚糖纳米粒上, 使纳米粒粒径增大, 电位降低。

3.2 纳米粒的形态观察

S NPs、F-S NPs 的透射电镜 (TEM) 照片如图 1 所示, S NPs、F-S NPs 为分散的球型纳米粒。

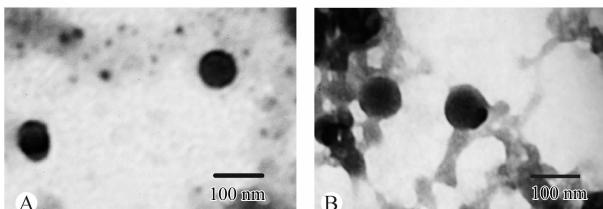


Figure 1 TEM photos of S NPs (A) and F-S NPs (B)
S-NPs: N-Trimethyl chitosan nanoparticles; F-S NPs: Pluronic F-127 coated N-trimethyl chitosan nanoparticles

3.3 纳米粒的形成机制

为研究纳米粒的形成机制, 使用 NaCl、尿素和

考马斯亮蓝分别探究纳米粒的离子键作用、氢键作用和疏水键作用。

NaCl 溶液是强电解质溶液, 可以破坏纳米粒内部的静电作用, 引起其粒径变化。如图 2 所示, S NPs 的粒径随 NaCl 质量浓度呈先减小后变大的趋势, 在 NaCl 质量浓度为 0.01 g/mL 时, 粒径减小为原粒径的 80.2% ; 当 NaCl 质量浓度增加至 0.30 g/mL 时, 粒径增大为原粒径的 $125.2\% (P < 0.01)$ 。S NPs 随 NaCl 质量浓度增加呈先松散后聚集的变化趋势。同时, F-S NPs 的粒径随 NaCl 浓度增加显著减小 ($P < 0.01$), 这可能是由于 PF-127 屏蔽了 TMC 的部分正电荷, 减弱了 TMC 与 INS 的相互作用, 使其纳米结构因外界高强度离子作用解体, 表现为粒径减小。因此, S NPs 和 F-S NPs 都存在静电力作用。

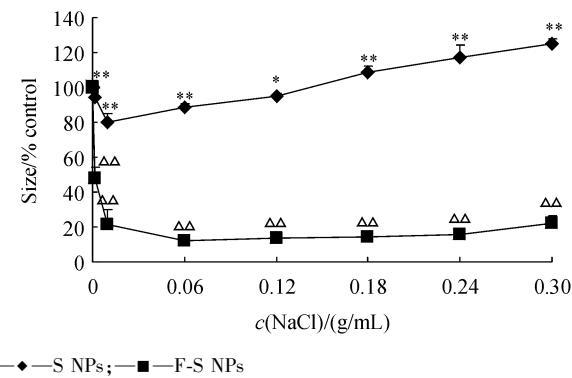


Figure 2 NaCl concentration-induced size of S NPs and F-S NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs S NPs group; △△ $P < 0.01$ vs F-S NPs group

如图 3 所示, 随着尿素浓度增加, S NPs、F-S NPs 粒径改变无明显差异 ($P > 0.05$), 因此两种纳米粒形成的作用力中不存在氢键作用。CBB 的最大吸收波长可在环境中的疏水结构影响下红移。实验表明, CBB 溶液中分别加入 TMC、INS、TPP、S NPs 后, 其最大吸收波长与空白 CBB 相比, 无明显位移。而加入 PF-127 和 F-S NPs 后, 最大吸收波长分别红移 17 和 26 nm, 因此推测 F-S NPs 中存在更为疏水的结构域。PF-127 疏水的聚氧丙烯单元, 可通过与 TMC 骨架中的疏水区域相互作用, 形成 PF-127 包裹的纳米粒。

3.4 纳米粒药物释放的考察

两种纳米粒在 PBS (pH 7.4) 中的胰岛素释放曲线如图 4 所示, F-S NPs 较 S NPs 的药物释放显

著降低($P < 0.05$)。计算得纳米粒释放的 f_2 因子为 29.5, 可判定两种纳米粒的释放曲线不相同^[11]。PF-127 的包裹使纳米粒在 PBS(pH 7.4)中的释放速率显著降低($P < 0.05$)。

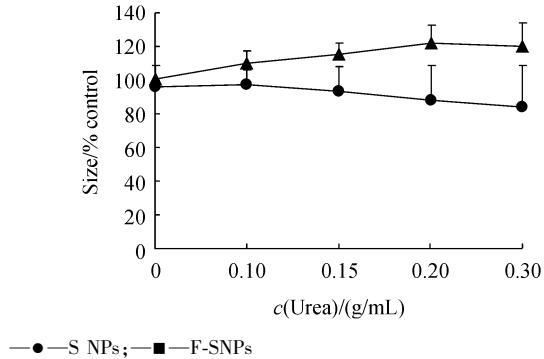


Figure 3 Urea concentration-induced size of S NPs and F-S NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

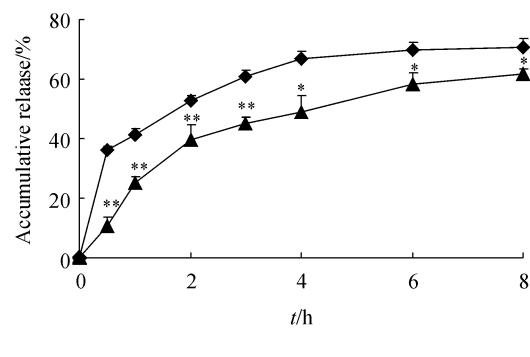


Figure 4 Release profiles of NPs in PBS (pH 7.4) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs S NPs group

3.5 纳米粒的酶稳定性

采用纳米粒的酶稳定性实验模拟纳米粒在含酶介质(pH 7.4)中的稳定性。如图 5 所示, 在 1 h 内胰酶快速降解 S NPs、F-S NPs 表面吸附的 INS, 之后降解速度逐渐减慢。两种纳米粒的 INS 在胰酶中的降解速度远小于游离 INS 的降解速度, 均提高了胰岛素的酶稳定性。

3.6 纳米粒克服黏液屏障考察

黏蛋白是黏液的主要成分, 其含有带负电的高密度硫酸唾液酸、糖基以及疏水区域, 部分纳米粒通过疏水键、离子键与黏蛋白发生吸附作用, 聚集形成沉淀, 难以到达上皮细胞层^[14]。因此黏蛋白吸附实验能在一定程度上反映纳米粒克服黏液屏障的能力及纳米粒在黏蛋白中的稳定性。实验表明, 在 0.1% 黏蛋白环境下, F-S NPs 的荧光强度比

值 I/I_0 (0.71)仅为 S NPs(2.52)的 28%, F-S NPs 对黏蛋白的亲和力显著降低($P < 0.05$), 稳定性增加。这可能是由于 PF-127 的包裹作用能屏蔽 TMC 表面的正电荷, 降低了纳米粒与黏蛋白的相互作用。

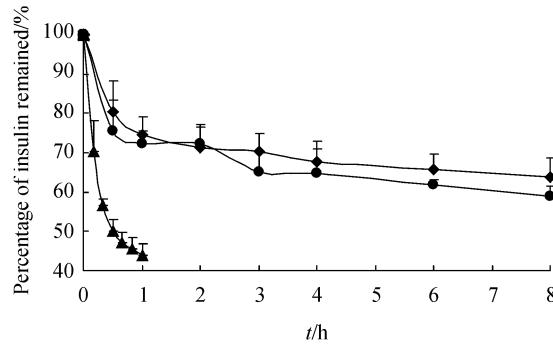


Figure 5 Percentage of residual amount of insulin (INS) after F-S NPs or S NPs incubating with trypsin (pH 7.4) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

为了模拟人体黏液屏障, 本课题组选用尤斯灌流室法考察 F-S NPs 克服黏液屏障的能力。实验结果显示, F-S NPs 的表观渗透系数(6.87×10^{-6})是 S NPs 表观渗透系数(2.46×10^{-6})的 2.79 倍。上述结果说明, PF-127 包裹于纳米粒表面形成疏松的网状结构, 屏蔽了纳米粒表面的正电荷且具有较强的亲水性, 能显著提高纳米粒克服黏液屏障的能力。

3.7 纳米粒在 HT29-MTX-E12 细胞模型上考察

E12 细胞具有高表达黏液的特征, 是考察纳米粒与胃肠道上皮组织相互作用的良好模型。采用 MTT 法评估 S NPs、F-S NPs 的对 E12 细胞的安全性。结果如图 6 所示, S NPs、F-S NPs 在考察浓度范围内(FITC-INS 的质量浓度为 100, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)无细胞毒性。

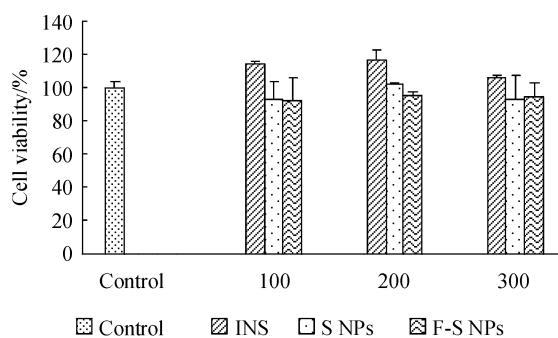


Figure 6 Cytotoxicity of S NPs and F-S NPs to HT29-MTX-E12 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

两种纳米粒的细胞摄取结果如图 7 所示。结果表明, S NPs、F-S NPs 与游离 FITC-INS 相比, 均显著性地增加 E12 细胞对 FITC-INS 的摄取 ($P < 0.01$)。同时, F-S NPs 的细胞摄取量分别是游离 FITC-INS、S NPs 的 16 和 1.4 倍。实验结果表明, F-S NPs 能显著提高细胞对药物的摄取能力 ($P < 0.01$)。结合纳米粒在黏蛋白、黏液中的实验考察结果可得, F-S NPs 具有较好的克服黏液屏障的能力, 同时增加了细胞对药物的摄取, 有效促进了药物跨过胃肠道黏膜屏障。

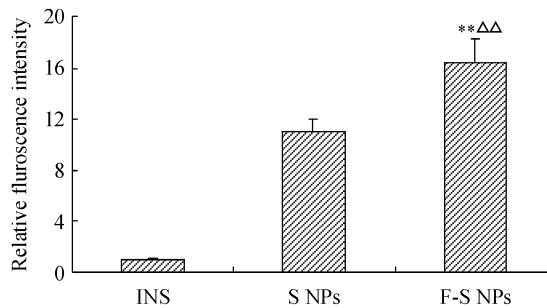


Figure 7 Cellular uptake of INS, S NPs or F-S NPs on HT29-MTX-E12, respectively ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* * $P < 0.01$ vs S NPs group; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs INS group

4 结 论

本研究构建了克服黏液屏障的普朗尼克 F-127 包裹的载胰岛素三甲基壳聚糖纳米给药系统。采用单因素筛选, 表征其粒径、电位、包封率和载药量。探究纳米粒的形成机制及其稳定性, 考察纳米粒克服黏液屏障及细胞摄取的能力。结果表明, PF-127 包裹的纳米粒能有效克服黏液屏障并提高药物的细胞摄取。在此基础上, 本课题组将进一步考察纳米粒在黏液中的结构变化, 并开展体内药效学及药动学研究。

参 考 文 献

- [1] Chin RL, Martinez R, Carmel G. Gas gangrene from subcutaneous insulin administration [J]. *Am J Emerg Med*, 1993, **11**(6): 622–625.
- [2] Bakhrus SH, Furtado S, Morello AP, et al. Oral delivery of proteins by biodegradable nanoparticles [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, **65**(6): 811–821.
- [3] Smith J, Wood E, Dornish M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions [J]. *Pharm Res*, 2004, **21**(1): 43–49.
- [4] Sonaje K, Lin KJ, Tseng MT, et al. Effects of chitosan-nanoparticle-mediated tight junction opening on the oral absorption of endotoxins [J]. *Biomaterials*, 2011, **32**(33): 8712–8721.
- [5] Ensign LM, Cone R, Hanes J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, **64**(6): 557–570.
- [6] Cone RA. Barrier properties of mucus [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, **61**(2): 75–85.
- [7] Behrens I, Pena AIV, Alonso MJ, et al. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport [J]. *Pharm Res*, 2002, **19**(8): 1185–1193.
- [8] Sadeghi AMM, Dorkoosh FA, Avadi MR, et al. Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods [J]. *Int J Pharm*, 2008, **355**(1): 299–306.
- [9] Yin L, Ding J, He C, et al. Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery [J]. *Biomaterials*, 2009, **30**(29): 5691–5700.
- [10] Mao S, Germershaus O, Fischer D, et al. Uptake and transport of PEG-graft-trimethyl-chitosan copolymer-insulin nanocomplexes by epithelial cells [J]. *Pharm Res*, 2005, **22**(12): 2058–2068.
- [11] Xie MF. Evaluation methods of comparability of dissolution curve [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2009, **40**(4): 308–311.
- [12] 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 [J]. *ACS Nano*, 2015, **9**(3): 2345–2356.
- [13] Jin Y, Song Y, Zhu X, et al. Goblet cell-targeting nanoparticles for oral insulin delivery and the influence of mucus on insulin transport [J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(5): 1573–1582.
- [14] Lai SK, Wang YY, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, **61**(2): 158–171.