

载胰岛素口服固体脂质纳米粒的构建及其跨肠上皮细胞转运的研究*

郑雅娴^{1,2}, 何琴¹, 徐敏¹, 黄园^{2△}

1. 成都市第三人民医院/西南交通大学临床医学院 药学部(成都 610014);
2. 四川大学华西药学院 靶向药物与释药系统教育部重点实验室(成都 610041)

【摘要】目的 采用混合溶剂构建载多肽蛋白类药物的固体脂质纳米递药系统(solid lipid nanoparticles, SNPs), 探究SNPs跨肠上皮细胞的转运机理, 提高多肽蛋白类药物的细胞摄取和跨膜转运效率。**方法** 采用甲醇-氯仿混合溶剂制备载胰岛素的水包油包水型固体脂质纳米粒(INS-SNPs)。通过单因素筛选法优化INS-SNPs的处方, 并表征最优纳米粒的形态、体外稳定性和药物释放等性质。通过Caco-2细胞考察INS-SNPs的细胞毒性、细胞摄取和入胞机制。采用Transwell®单层细胞模型进一步评价纳米粒的跨膜转运效率。**结果** 筛选得到的最优处方INS-SNPs的粒径为(145.4±0.5) nm, 电位为(-12.9±0.2) mV, 载药量为(7.93±0.02)%。INS-SNPs在模拟肠液中展现出良好的胶体稳定性, 能持续缓慢释放药物。细胞摄取结果显示, INS-SNPs在与细胞孵育2 h时达到最大的摄取量, 较游离胰岛素提高了1.53倍。摄取机制表明, INS-SNPs主要通过网格蛋白和小窝蛋白介导的内吞途径进入肠上皮细胞。进一步考察纳米粒跨膜转运发现, 跨膜转运效率较游离胰岛素提高了1.54倍, 与细胞摄取的提高程度(1.53倍)相当, 提示纳米粒具有较好的跨膜转运效率。**结论** 本研究采用混合溶剂构建的INS-SNPs能显著提高多肽蛋白类药物跨膜转运效率, 展现出较大的口服应用潜力, 可为后续口服纳米递药系统的设计提供参考。

【关键词】 口服递药 固体脂质纳米粒 混合溶剂 跨膜转运

Construction of Oral Insulin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Their Intestinal Epithelial Cell Transcytosis Study ZHENG Ya-xian^{1,2}, HE Qin¹, XU Min¹, HUANG Yuan^{2△}. 1. Department of Pharmacy, Third People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610014, China; 2. Key Laboratory of Drug-Targeting and Drug Delivery System of the Ministry of Education, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: huangyuan0@163.com

【Abstract】 Objective To construct solid lipid nanoparticle (SNPs) drug delivery system loaded with peptide and protein drugs by using mixed solvents, to study the transcytosis mechanisms of SNPs across intestinal epithelial cells, and to improve the endocytosis and transcytosis efficiency of peptide and protein drugs. **Methods** The formulation of insulin-loaded water-in-oil-in-water solid lipid nanoparticles (INS-SNPs) was prepared by using a methanol-chloroform mixed solvent. The formulation was optimized with the single factor screening method. The optimized INS-SNPs were then characterized in terms of their morphology, stability and drug release properties. The cytotoxicity, cellular uptake and endocytosis mechanisms of INS-SNPs were then assessed on Caco-2 cells. The transcytosis efficiency of INS-SNPs was finally evaluated by using cellular monolayer in Transwell® insert. **Results** The size, zeta potentials and drug loading efficiency of the optimized INS-SNPs were observed to be (145.4±0.5) nm, (-12.9±0.2) mV and (7.93±0.02)%, respectively. INS-SNPs were then shown to maintain desirable colloidal stability and sustained release of insulin in the simulated intestinal fluid. It was revealed that the cellular uptake of INS-SNPs reached its maximum after cellular incubation for 2 hours and was 1.53-fold higher than that of free insulin. Investigation of the endocytic mechanism revealed that INS-SNPs enter intestinal epithelial cells mainly through the clathrin-mediated and caveolae-mediated endocytosis pathways. Further investigation revealed that the amount of INS-SNPs permeating the cell monolayers was 1.54-fold higher than that of free insulin, which was comparable to the increase in their cellular uptake efficiency, indicating that INS-SNPs displayed enhanced absorption across the intestinal epithelium. **Conclusion** The INS-SNPs prepared with mixed solvents in this study could significantly enhance the transcytosis efficiency of peptide and protein drugs, displaying great potentials in the application of oral drug delivery. This study may provide information and reference for the designing of efficient oral nano-drug delivery system in the future.

【Key words】 Oral delivery Solid lipid nanoparticles Mixed solvent Transcytosis

* 国家自然科学基金(No. 81872818)和四川省医学青年创新科研课题计划(No. Q20019)资助

△ 通信作者, E-mail: huangyuan0@163.com

多肽蛋白类药物具有生物专属性强、使用剂量小、副作用低等特点,在临床应用中得到广泛应用^[1]。口服给药虽然可以提高患者的顺应性,但由于该类药物存在稳定性差和透膜性低的问题,生物利用度普遍较低^[2-3]。因此,寻找合适方法提高该类药物的口服生物利用度,是递药领域亟待解决的难点问题^[4-5]。

固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SNPs)通过对多肽蛋白类药物的包裹,提高了药物的稳定性和口服吸收,在递药领域获得了较多关注^[6]。SNPs多采用具有良好生物相容性的脂质制备,能避免网状内皮系统损伤和细胞毒性等安全隐患。当SNPs口服到达肠上皮细胞表面后,往往通过内吞方式入胞,再通过胞内转运和出胞等过程进入血液循环^[7]。但是纳米粒的入胞途径可能影响其胞内分布和出胞,最终影响其跨膜转运效率^[8]。目前多数研究集中于纳米粒细胞摄取的考察,对入胞机制和跨膜转运的研究较少^[9-10]。因此,研究口服SNPs的入胞机制和跨膜转运十分重要。

目前,SNPs的多种制备方法已被报道,其中水包油包水(water-in-oil-in-water, W/O/W)型复乳法的制备条件温和,可避免多肽蛋白类药物失去活性;同时,复乳内外的水相被油相隔开,能有效减少药物从内水相向外扩散,提高载药量,是制备载蛋白多肽类药物SNPs的理想方法^[6]。在SNPs的制备过程中,多采用单一的溶剂如二氯甲烷、氯仿等溶解脂质材料,使具有一定极性的材料在此类溶剂中较难溶解^[11]。相较于单一溶剂,混合溶剂能增加材料的溶解性;且能形成共沸物,降低除去溶剂的旋蒸温度,或许能避免长时间加热或搅拌导致多肽蛋白类药物的生物活性遭到破坏。然而,目前采用混合溶剂制备SNPs的方法鲜有报道。

因此,本研究拟采用甲醇-二氯甲烷混合溶剂制备载胰岛素(insulin, INS)的固体脂质纳米粒(insulin loaded solid lipid nanoparticles, INS-SNPs),筛选出最优处方,并考察纳米粒的稳定性。进一步采用Caco-2细胞为肠上皮细胞模型考察纳米粒的细胞摄取、入胞机制和跨膜效率。期望该研究为口服纳米递药系统的设计提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 三棕榈酸甘油酯(TP,阿法埃莎有限公司);硬脂酸(SA,湖州展望药业有限公司);大豆卵磷脂(SPC,上海太伟药业有限公司);胆酸钠(SC,北京奥博星生物技术有限公司);普朗尼克F68(南京威尔化工有限公司);INS(徐州万邦生化医药股份有限公司)。

激光粒度分析仪(Malvern Zeta-size NanoZS9);高效液相色谱仪(Agilent 1200 series);酶标仪(Varioskan Flash Multimode Reader);透射电子显微镜(FEI Tecnai G2F20)。

1.1.2 细胞株 人克隆结肠腺癌 Caco-2细胞株购于上海细胞生物研究所,采用含10%胎牛血清、1%青霉素链霉素混合液、1%非必需氨基酸的DMEM高糖培养基,置于相对湿度95%、37℃的细胞培养箱,通入体积分数为5%的CO₂。

1.2 方法

1.2.1 纳米粒的制备及表征 称取TP、SA、SPC适量溶于甲醇/二氯甲烷(V/V, 1:9),形成油相。再称取INS和SC,溶于pH2的盐酸溶液中形成水相。将水相滴入油相中,超声(80 W, 10 s/次, 6次)形成初乳。将初乳加入至普朗尼克F-68(F68)溶液中,超声(120 W, 10 s/次, 6次)形成复乳。用F68溶液稀释,在25℃旋蒸至有机溶剂完全挥尽后,定容得INS-SNPs。将INS替换为FITC标记的INS,制备F-INS-SNPs。使用激光粒度分析仪测定纳米粒的粒径、多分散系数(PDI)和电位。将纳米粒加至截留相对分子质量为100×10³超滤管中,离心(5 000 r/min, 15 min)分离出游离INS,取分离后的INS-SNPs溶液待用。参照文献^[2],通过RP-HPLC对INS-SNPs中INS和游离INS进行定量分析,计算包封率(encapsulation efficiency, EE)。将分离得到的纳米粒冷冻干燥后称重,计算载药量(drug loading, DL)。

1.2.2 纳米粒的形态表征 参照文献^[6],将INS-SNPs滴加至碳膜铜网上,用磷钨酸染液染色,采用透射电子显微镜观察和采集图像。

1.2.3 稳定性考察 参照文献^[2],将INS-SNPs分散于模拟胃液(SGF)、模拟肠液(SIF)中,恒温振荡(37℃, 100 r/min),测定INS-SNPs的粒径。采用透射电子显微镜观察INS-SNPs形态。

1.2.4 药物释放考察 将INS-SNPs加入截留相对分子质量为100×10³的透析管中。将透析管置于不含酶的SIF搅拌,取200 μL透析管内样品,加入甲醇-氯仿(3:1, V/V)破坏INS-SLNs后用RP-HPLC测定INS的质量浓度,计算INS的累积释放量。

1.2.5 细胞毒性考察 为考察纳米粒的肠道吸收潜力,我们将INS替换为FITC标记的INS(F-INS),采用Caco-2细胞模型模拟体内肠道上皮细胞,考察F-INS-SNPs的细胞学行为。参照文献^[2],将Caco-2细胞接种于96孔板中,培养2 d后使用。将F-INS-SNPs和荧光标记的INS(F-INS)分别加入细胞中孵育3 h,两种制剂中F-INS质量浓度范围为25~125 μg/mL,然后换成培养基孵育24 h。参照文献^[6],

通过MTT实验考察细胞存活率。

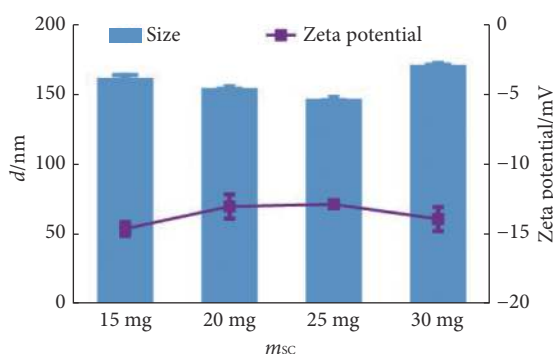
1.2.6 细胞摄取考察 参照文献^[2],将Caco-2细胞接种于96孔板中,培养3 d后使用。将F-INS-SNPs(F-INS质量浓度为25~100 μg/mL)和25~100 μg/mL F-INS与细胞孵育2 h后,PBS润洗3遍。加入细胞裂解液裂解细胞。离心(5 000 r/min, 3 min)后,取上清液测定F-INS的荧光强度,用BCA试剂盒测定蛋白含量。摄取量以每毫克蛋白含有F-INS的质量表示。

为考察给药时间对细胞摄取的影响,分别加入F-INS-SNPs(F-INS质量浓度为100 μg/mL)和100 μg/mL F-INS与Caco-2细胞孵育0.5、1、2和3 h后,按照上述方法测定摄取量。

1.2.7 细胞摄取机制考察 参照文献^[2],将Caco-2细胞接种于96孔板中,培养3 d后使用。将5 mg/mL叠氮钠、30 μmol/L氯丙嗪和0.4 mol/L高渗糖、10 μg/mL洛伐他汀、1 mmol/L甲基-β-环糊精(m-β-cd)和10 μmol/L粗糠柴碱分别与Caco-2细胞预孵育30 min后,再将F-INS-SNPs与上述同浓度的抑制剂混合后与细胞共同孵育3 h,然后按照1.2.6的方法测定摄取量,将未经抑制剂处理的纳米粒设定为对照组,实验结果表示为各实验组药物的摄取量占对照组摄取量的百分比。

1.2.8 跨膜转运考察 参照文献^[12],将Caco-2细胞接种于Transwell®小室的A室中,在小室的B室加入培养基,培养17 d后进行跨膜转运实验。实验时,在A室中加入F-INS或F-INS-SNPs(F-INS质量浓度为100 μg/mL),B室中加入HBSS。在0、0.5、1、2、3 h时从B室取出样品,补加HBSS。孵育前后采用电阻仪(Millicell ERS-2,德国默克密理博公司,德国)测定跨膜电阻值(TEER值)。用DMSO破坏F-INS-SNPs后,测定荧光强度,计算药物的累积透过率(Papp)。

$$Papp = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$



dQ/dt 表示跨膜转运速率, C_0 表示初始浓度, A 表示渗透面积(cm^2)。

1.2.9 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 INS-SNPs的处方优化和表征

预实验发现,以甲醇-氯仿混合溶剂溶解的TP、SA和SPC为油相,以SC和INS为内水相,再采用F68为外水相能成功制备INS-SNPs。由于采用混合溶剂后,除去有机溶剂的旋蒸温度由40 °C降低为25 °C,能避免长时间加热导致多肽蛋白类药物的生物活性遭到破坏。由于主要成分对INS-SNPs的性质有较大影响,因此,本研究以材料的投料量为考察因素,通过单因素筛选法优化INS-SNPs的处方。

首先考察SC的投料量对INS-SNPs的影响。当SC的投料量为25 mg时,INS-SNPs的粒径最小,具有较高的包封率(77.8%)和载药量(7.93%)(图1),因此将SC的投料量确定为25 mg。

当INS的投料量由6 mg增至10 mg时,INS-SNPs的包封率和载药量缓慢增加。当INS由10 mg增至12 mg时,INS-SNPs的粒径变化不明显,而载药量降低至2.5%(图2)。因此,确定INS的处方用量为10 mg。

随着TP用量增加,INS-SNPs的载药量呈先增大后减小的趋势(图3)。值得注意的是,SA的加入能显著提高INS-SNPs的包封率(图4)。当采用15 mg TP和1 mg SA时,INS-SNPs的载药量(7.93%)最高,因此确定TP和SA的用量分别为15 mg和1 mg。

随着SPC的用量增加,INS-SNPs的电位由-10 mV降为-17 mV。而INS-SNPs的电位随着F68的增加,电位由负电逐渐趋于电中性。当SPC的投料量为15 mg、F68的浓度为2.0%时,INS-SNPs的电位近中性,且具有最高的载

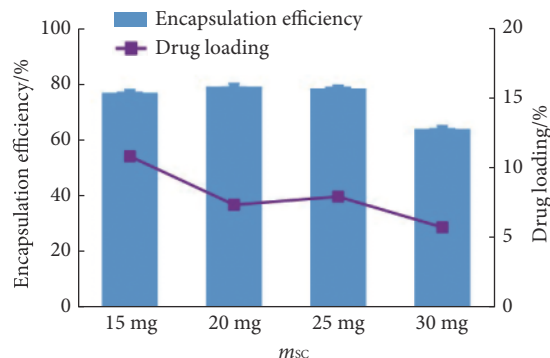


图1 SC用量对INS-SNPs的粒径、电位、包封率和载药量的影响 ($n=3$)

Fig 1 The effect of varied amount of SC on the particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency and drug loading of INS-SNPs ($n=3$)

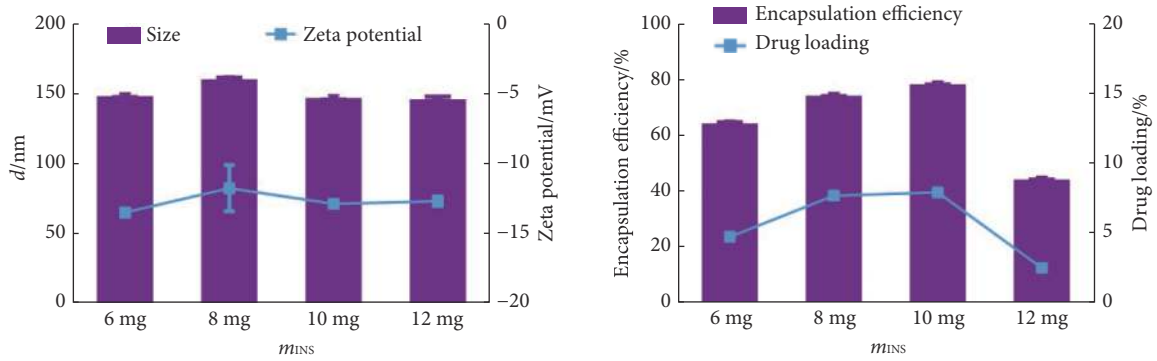


图 2 INS用量对INS-SNPs的粒径、电位、包封率和载药量的影响 (n=3)

Fig 2 The effect of varied amount of INS on the particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency and drug loading of INS-SNPs (n=3)

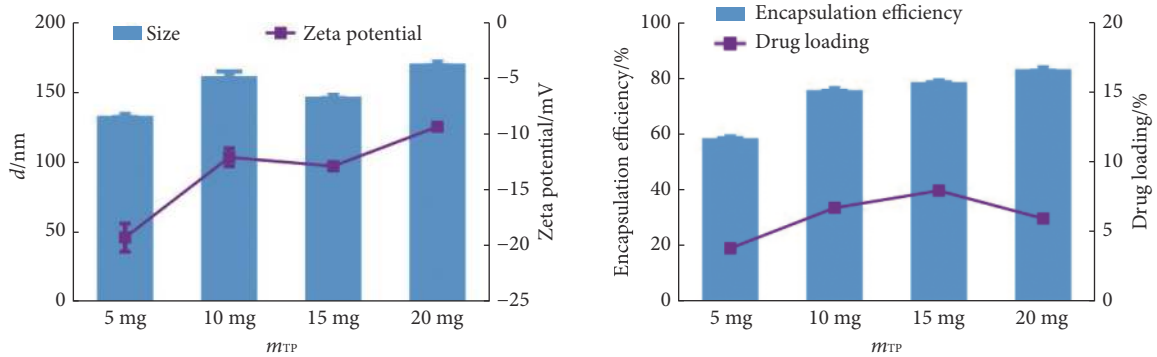


图 3 TP用量对INS-SNPs的粒径、电位、包封率和载药量的影响 (n=3)

Fig 3 The effect of varied amount of TP on the particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency and drug loading of INS-SNPs (n=3)

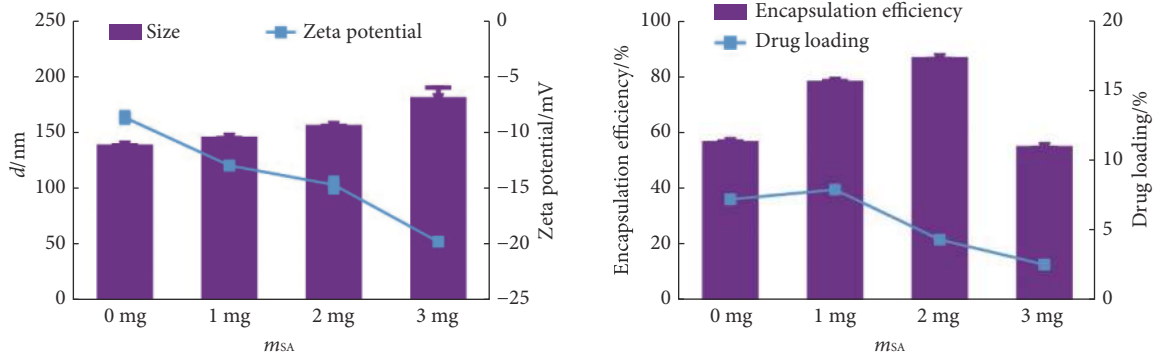


图 4 SA用量对INS-SNPs的粒径、电位、包封率和载药量的影响 (n=3)

Fig 4 The effect of varied amount of SA on the particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency and drug loading of INS-SNPs (n=3)

药量(7.93%)(图5、图6)。因此,确定处方采用15 mg SPC和2.0% F68。

通过最优处方制备的INS-SNPs粒径为(145.4±0.5) nm, PDI为0.170±0.016, Zeta电位为(-12.9±0.2) mV, 包封率为(77.77±0.78)%, 载药量为(7.93±0.02)%。透射电子显微镜的结果表明, INS-SNPs呈类球形且表面光滑, 具有明显的核壳结构(图7A)。

2.2 稳定性和药物释放考察

考察INS-SNPs在模拟胃肠液中的胶体稳定性发现,

INS-SNPs在SGF中出现明显聚集(图7B), 这可能是由于SPC发挥稳定作用主要依靠静电斥力, 而这一机制易被酸性环境破坏。在SIF中孵育4 h后, INS-SNPs的粒径变化差异无统计学意义, 在8 h时增大至原始粒径的1.3倍; TEM显示, INS-SNPs仍具有表面光滑、单一分散的球形形态。但与SIF孵育后, 纳米粒的表面形成了一层冠状结构(图7C, 箭头所示), 推测粒径的略微增加可能是其表面吸附蛋白酶所致(图7D)。INS-SNPs在SIF中能持续缓慢地释放药物, INS在8 h时的累积释放量约70%(图7E)。

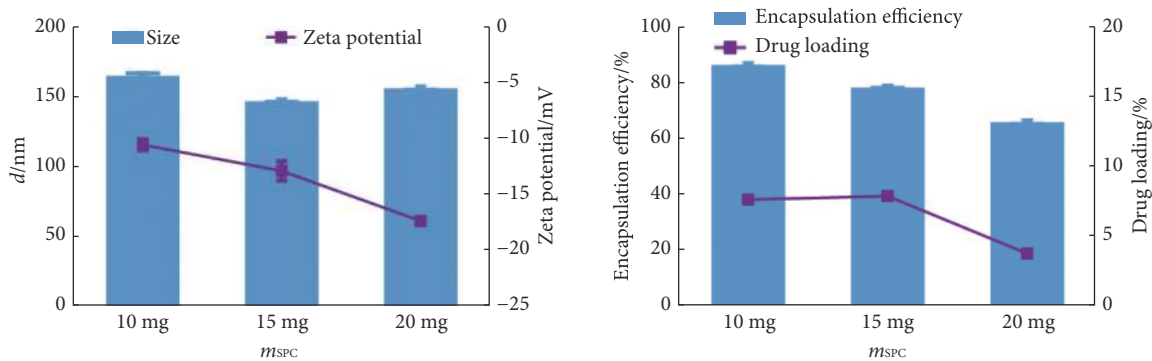


图 5 SPC用量对INS-SNPs的粒径、电位、封装率和载药量的影响 (n=3)

Fig 5 The effect of varied amount of SPC on the particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency and drug loading of INS-SNPs (n=3)

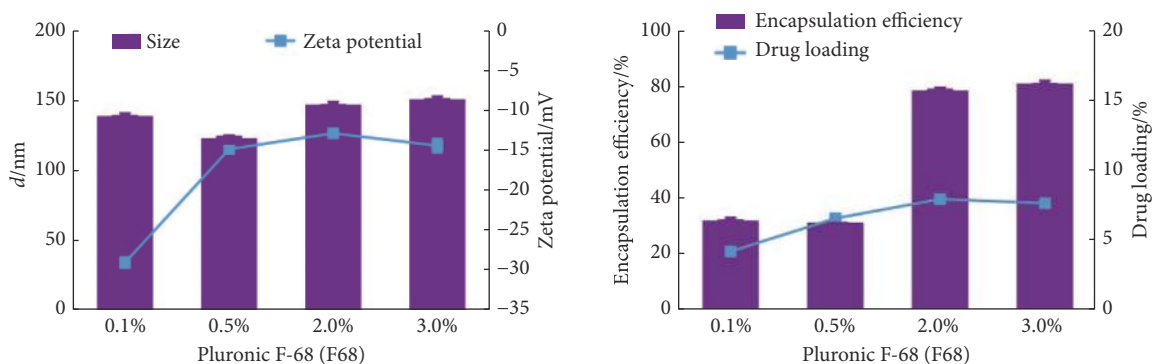


图 6 F68浓度对INS-SNPs的粒径、电位、封装率和载药量的影响 (n=3)

Fig 6 The effect of varied concentra of F68 on the particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency and drug loading of INS-SNPs (n=3)

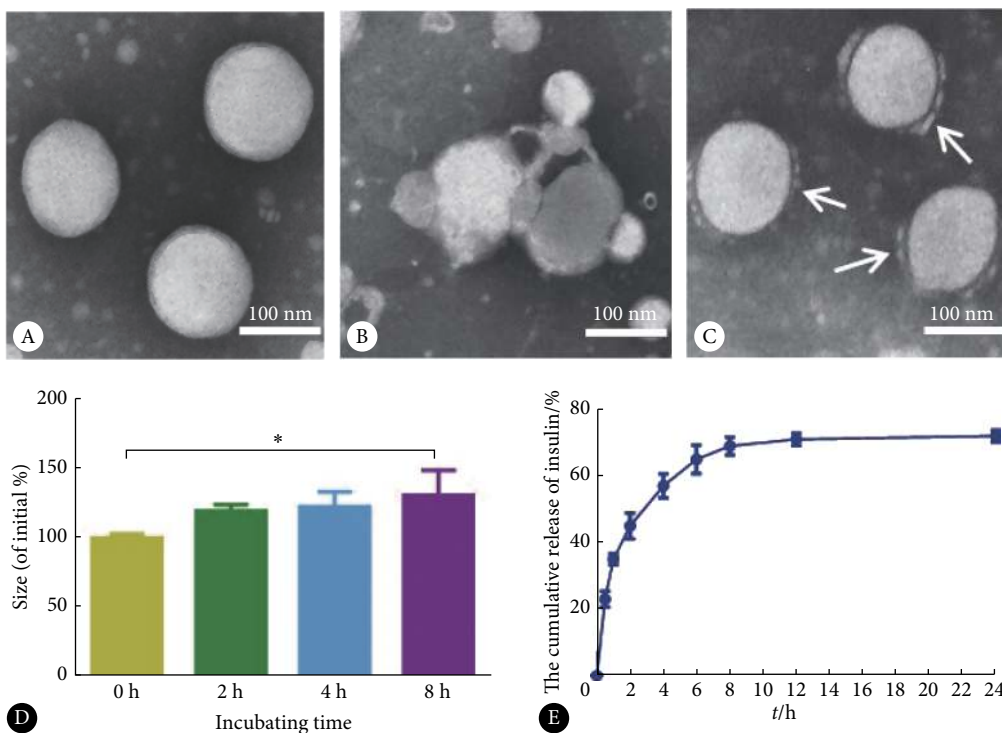


图 7 INS-SNPs的形态和在SGF和SIF的稳定性

Fig 7 The morphology and stability of INS-SNPs in SGF and SIF

A: The TEM images of INS-SNPs; The TEM images of INS-SNPs in SGF (B) and in SIF (incubate for 8 h, C); D: The colloidal stability of INS-SNPs in SIF (n=3),

*P<0.05; E: The cumulative release of INS in SIF.

2.3 细胞毒性的考察

F-INS-SNPs组和F-INS组的细胞存活率均在80%~120%的正常范围,说明在给药质量浓度范围内对Caco-2细胞活性无明显影响(图8)。

2.4 细胞摄取和入胞途径考察

定量结果表明, F-INS-SNPs具有浓度依赖性摄取。当F-INS-SNPs为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 摄取量最高, 较游离原药(F-INS)提高了1.53倍(图9A)。F-INS-SNPs在给药2 h时的摄取量显著高于1 h, 但与3 h时的细胞摄取差异无统计学意义, 说明纳米粒的摄取在2 h时达到饱和(图9B)。

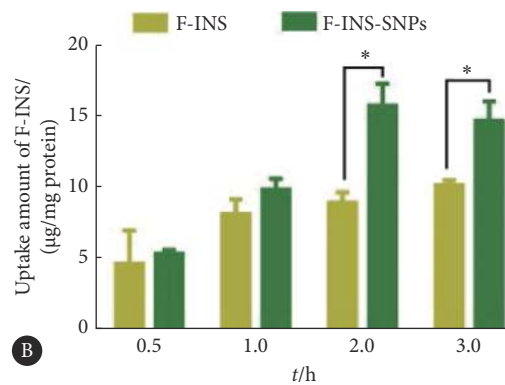
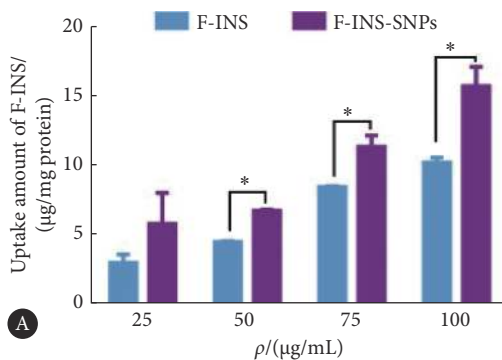


图9 不同质量浓度(A)和不同时间(B) F-INS-SNPs和F-INS在Caco-2细胞中的摄取量 ($n=3$)

Fig 9 The cellular uptake of F-INS-SNPs and F-INS on Caco-2 at different concentration (A) and different time (B) ($n=3$)

* $P<0.05$.

抑制剂实验表明(图10), F-INS-SNPs的摄取受到能量抑制剂 NaN_3 的抑制。F-INS-SNPs的摄取也受到了网格蛋白抑制剂, 即氯丙嗪和高渗糖的抑制($P<0.05$), 以及小窝蛋白抑制剂洛伐他汀的抑制($P<0.05$); 但未受到大胞饮抑制剂粗糠柴碱和脂质筏途径抑制剂甲基- β -环糊精

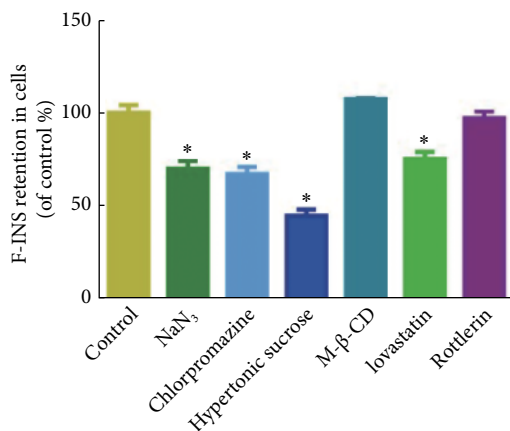


图10 入胞抑制剂对F-INS-SNPs细胞摄取的影响 ($n=3$)

Fig 10 Endocytosis of F-INS-SNPs in the presence of endocytosis inhibitors ($n=3$)

* $P<0.05$, vs. control.

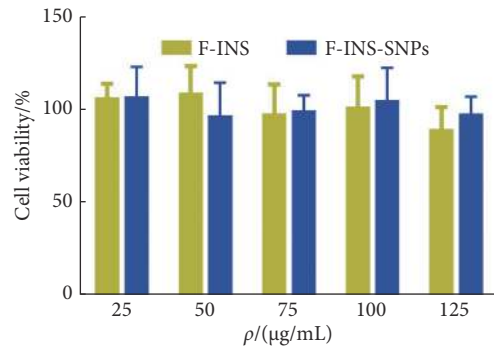


图8 F-INS-SNPs和F-INS对Caco-2细胞活性的影响 ($n=3$)

Fig 8 The cytotoxicity of F-INS-SNPs and F-INS on Caco-2 cells ($n=3$)

的影响($P>0.05$), 表明F-INS-SNPs主要通过小窝蛋白和网格蛋白介导的摄取途径入胞。

2.5 纳米粒跨膜转运的考察

采用Transwell模型(图11)考察F-INS-SNPs的跨膜转运发现, F-INS-SNPs的累积透过率较F-INS提高了1.54倍($P<0.05$), 且F-INS和F-INS-SNPs未显著影响细胞单层的TEER值($P>0.05$), 说明F-INS-SNPs不会破坏细胞单层的完整性。

3 讨论

SNPs能提高多肽蛋白类药物在胃肠道中的稳定性, 促进药物在肠上皮细胞的吸收^[13]。然而, 前期研究的制备方法均采用单一的溶剂如二氯甲烷、氯仿等溶解脂质材料, 导致一些有一定极性的材料较难溶解, 影响纳米粒的均一性和稳定性。本文对此进一步研究发现, 相较于单一溶剂, 采用甲醇和二氯甲烷的混合溶剂能更好溶解脂质材料, 从而使纳米粒更易成型, 且在室温即可减压去除溶剂, 从而避免长时间加热或搅拌导致药物的生物活性遭到破坏。

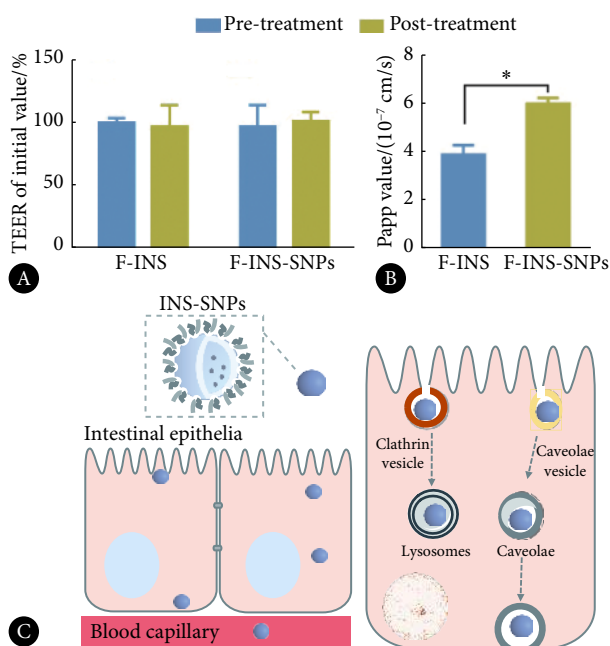


图 11 F-INS-SNPs在Caco-2细胞中的跨膜转运观察

Fig 11 Transepithelial transport of F-INS-SNPs in Caco-2 cells

A: The TEER values of Transwell before and after incubation ($n=3$); B: Papp value of F-INS transported across Transwells ($n=3$), $*P<0.05$; C: The schematic illustration of INS-SNPs across the intestinal epithelium.

SC是INS-SNPs的重要组成成分,是一种来源于体内、具有两亲性的阴离子化合物,能提高药物的溶解性,减少药物的泄露^[14]。SC也能主动靶向于肠上皮细胞表面的转运体,促进INS的摄取^[15]。将SC与INS混合后加入至内水相形成胶束,发现形成的胶束越稳定,INS-SNPs的粒径越小,包封率越高。脂质材料对纳米载体的稳定性具有较大影响。在制备及贮存过程中,脂质材料会发生晶格老化和多晶型转变,导致药物容易析出。课题组前期研究发现,TP和SA混合能降低脂质晶格的转变,在体外稳定性、细胞摄取和体内药效等方面呈现出明显优势^[11]。SPC和F68是两亲性分子,其疏水端能插入纳米粒的内核,亲水端暴露于纳米粒表面起稳定作用^[13]。由于肠溶胶囊既能充分保护纳米粒在胃中的稳定性,到达小肠后又能快速释放纳米粒,确保药物的有效吸收。因此在接下来的研究中,可将INS-SNPs装入肠溶胶囊,实现药物的口服递送。

我们系统研究了纳米粒的入胞和跨膜转运。细胞摄取研究发现,纳米粒系通过网格蛋白和小窝蛋白介导的内吞途径进入肠上皮细胞,可将原药的细胞摄取提高1.53倍。进一步考察纳米粒的跨膜转运发现,纳米粒能将药物的跨膜转运效率提高1.54倍,与细胞摄取的提高程度相当。提示,采用混合溶剂制备的载胰岛素固体脂质纳米粒具有良好的口服递药的潜力。我们期望通过该研究,改进固体脂质纳米粒的制备工艺,为后续纳米粒的设

计提供理论依据和数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] DRUCKER D J. Advances in oral peptide therapeutics. *Nat Rev Drug Discovery*, 2020, 19(4): 277–289.
- [2] WU J, ZHENG Y, LIU M, *et al.* Biomimetic viruslike and charge reversible nanoparticles to sequentially overcome mucus and epithelial barriers for oral insulin delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(12): 9916–9928.
- [3] AGUIRRE T A, TEIJEIRO-OSORIO D, ROSA M, *et al.* Current status of selected oral peptide technologies in advanced preclinical development and in clinical trials. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 106(Pt B): 223–241.
- [4] 姚晟瑜, 樊星砚, 江宽, 等. 胰岛素口服给药的困境与突破. *药学学报*, 2020, 55(7): 1549–1561.
- [5] 高明月, 霍英楠, 申欣, 等. 改良的在体循环法用于胰岛素的鼻腔吸收研究. *药学学报*, 2018, 53(9): 1551–1556.
- [6] XU Y, ZHENG Y, WU L, *et al.* Novel solid lipid nanoparticle with endosomal escape function for oral delivery of insulin. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(11): 9315–9324.
- [7] BELOQUI A, DES RIEUX A, PREAT V. Mechanisms of transport of polymeric and lipidic nanoparticles across the intestinal barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 106(Pt B): 242–255.
- [8] ZHANG S, GAO H, BAO G. Physical principles of nanoparticle cellular endocytosis. *ACS Nano*, 2015, 9(9): 8655–8671.
- [9] ZHU X, WU J, SHAN W, *et al.* Polymeric nanoparticles amenable to simultaneous installation of exterior targeting and interior therapeutic proteins. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55(10): 3309–3312.
- [10] SONG X, LI R, DENG H, *et al.* Receptor mediated transcytosis in biological barrier: The influence of receptor character and their ligand density on the transmembrane pathway of active-targeting nanocarriers. *Biomaterials*, 2018, 180: 78–90.
- [11] CHEN C, ZHU X, DOU Y, *et al.* Exendin-4 loaded nanoparticles with a lipid shell and aqueous core containing micelles for enhanced intestinal absorption. *J Biomed Nanotechnol*, 2015, 11(5): 865–876.
- [12] WU L, LIU M, SHAN W, *et al.* Bioinspired butyrate-functionalized nanovehicles for targeted oral delivery of biomacromolecular drugs. *J Control Release*, 2017, 262: 273–283.
- [13] CHEN C, FAN T, JIN Y, *et al.* Orally delivered salmon calcitonin-loaded solid lipid nanoparticles prepared by micelle-double emulsion method via the combined use of different solid lipids. *Nanomedicine*, 2012, 8(7): 1085–1100.
- [14] LIU J, GONG T, FU H, *et al.* Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *Int J Pharm*, 2008, 356(1): 333–344.
- [15] FAN W, XIA D, ZHU Q, *et al.* Functional nanoparticles exploit the bile acid pathway to overcome multiple barriers of the intestinal epithelium for oral insulin delivery. *Biomaterials*, 2018, 151: 13–23.

(2021-01-25收稿, 2021-06-01修回)

编辑 汤 洁