

· 论著 ·

负载 pVAX1-wapA 的壳聚糖及季铵化壳聚糖纳米粒的制备研究

向婧洁, 钟延强, 陆一鸣, 鲁莹 (第二军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 制备负载抗龋 DNA 疫苗 pVAX1-wapA 质粒的壳聚糖和季铵化壳聚糖纳米粒, 优化其制备工艺, 测定其细胞转染效率。方法 以包封率和粒径为主要指标, 单因素法考察载体浓度、pH 值、N/P、TPP 浓度等因素的影响, Realtime-PCR 检测细胞对质粒编码蛋白的转录表达水平以评价载质粒纳米粒的促转染作用。结果 制得的载 DNA 疫苗纳米粒粒径均一, 形态圆整。壳聚糖(CS)纳米粒粒径为(219.2±18.2) nm, Zeta 电位为(24.7±3.5) mV, 包封率为 91.24%。季铵化壳聚糖(CSTM)纳米粒粒径为(222.5±15.6) nm, Zeta 电位为(19.6±1.2) mV, 包封率为 87.66%。纳米粒可以促进 pVAX1-wapA 进入细胞, 并成功被转录。结论 制备的包载 pVAX1-wapA 的季铵化壳聚糖纳米粒可用于重组基因疫苗的运送。

[关键词] DNA 疫苗; 壳聚糖纳米粒; wapA 蛋白; 转染; 季铵化壳聚糖

[中图分类号] Q78 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)01-0019-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.01.006

Preparation of DNA-loaded chitosan nanoparticle vaccine

XIANG Jingjie, ZHONG Yanqiang, LU Yiming, LU Ying (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To study and optimize the preparation condition of pVAX1-wapA-loaded nanoparticles and determine the transfection efficiency. **Methods** The related effects of the crucial factors for the formation of nanoparticles; concentration of chitosan and TPP, pH value, N/P ratio were studied by single-factor experiment, with nanoparticles size and zeta potential as index. Cell transfection test was carried out to indicate that enhancement of cell transfection efficiency of nano-carrier. **Results** Nanoparticles loaded DNA vaccine were nearly spherical shape with uniform particle size chitosan nanoparticle (CS), (219.2±18.2) nm; quaternary ammonium chitosan nanoparticles (CSTM), (222.5±15.6) nm. Zeta potential of CS and CSTM was (24.7±3.5) mV, (19.6±1.2) mV and encapsulation efficiency was 91.24%, 87.66%, respectively. CSTM nanoparticle could enhance cellular uptake of pVAX1-wapA obviously. **Conclusion** CSTM nanoparticle was proved to be an efficient DNA vaccine delivery vector.

[Key words] DNA vaccine; chitosan nanoparticle; wapA protein; transfection; quaternary ammonium chitosan

DNA 疫苗是 20 世纪 90 年代初出现的一种新型疫苗^[1], 应用前景广阔。但研究表明裸 DNA 疫苗溶于盐溶液中注射接种存在剂量偏大、生物利用度低、免疫效果差、持续时间不够长等缺点^[2], 其原因在于裸 DNA 疫苗即使注射给药, 在经过细胞间质和细胞质的转录前过程中也会大部分被核酸酶降解而失活。因此, 研究开发出能有效保护 DNA 疫苗和增强其抗原表达效率的载体成为疫苗研发中亟待解决的问题。

壳聚糖在 DNA 递送系统中有着广泛应用, 是目前 DNA 疫苗口服和黏膜递送系统的首选载体材

料^[3]。壳聚糖分子可与 DNA 通过静电作用凝聚, 使 DNA 压缩成结构相对致密的纳米级颗粒^[4]。这种纳米粒可以有效保护 DNA 在体内转运过程中免受核酸酶降解, 并通过细胞吞作用将基因递送入细胞^[5-9]。然而壳聚糖在生理条件下的溶解度低, 大大限制了其使用^[10]。因此, 我们对壳聚糖进行修饰季铵盐化以提高它在生理条件下的可溶性。季铵盐化壳聚糖纳米粒作为用于防龋 DNA 疫苗给药系统未见报道。本实验制备了包载质粒的壳聚糖和季铵化壳聚糖纳米粒, 并转染 HEK293 验证和比较两者对抗原蛋白表达的增强作用, 考察 CSTM 纳米粒作为新型 DNA 疫苗递送系统的应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料与设备 聚磷酸钠(TPP, Nichtdirektem Sonnenlicht aussetzen), 壳聚糖(CS, 脱乙酰度

[作者简介] 向婧洁, 硕士, 研究方向: 纳米粒递送系统. Tel: (010) 84556522; E-mail: minny1989@163.com

[通讯作者] 鲁莹, 博士, 副教授, 硕士生导师. 研究方向: 药剂学. Tel: (021) 81871290; E-mail: acuacc@163.com

85%, $M_r = 50\,000 \sim 190\,000$, sigma); 琼脂糖(上海生工生物有限公司); 溴化乙啶(EB, 上海浩然科技有限公司分装); DNA marker [DL5000, 大连宝生物(TAKARA)公司]; 季铵化壳聚糖(CSTM, 实验室合成^[10, 11], 季铵化程度为 52%); 质粒 DNA(由本实验室提取); Hoechst 33258(碧云天生物技术研究); Trizol Reagent、高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、Lipo2000、0.25% 胰蛋白酶溶液(含 0.02% EDTA)均购自 Invitrogen Life Technologies; Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit(赛默飞世尔科技公司); THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix[东洋纺(上海)生物科技有限公司]; PCR 仪(美国伯乐 BIO-RAD 公司); SLAN 荧光定量 PCR 检测系统(上海宏石医疗科技有限公司); 纳米激光粒度分析仪(Zetasizer nano ZS, Malvern 公司); 透射电镜(JEM-2010, 日本 JEOL 公司)。

1.2 细胞株 HEK293A 细胞株(中科院上海生科院细胞资源中心)。

2 实验方法

2.1 空白纳米粒的制备 采用离子交联法制备空白壳聚糖/季铵化壳聚糖纳米粒。即将不同浓度的 CS(CSTM)溶液和 TPP 溶液各 500 μl 分别置于 55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 10 min。将 TPP 溶液加到 CS(CSTM)溶液中, 涡旋混合 2 min, 室温下静置稳定后, 即得空白 CS(CSTM)纳米粒混悬液^[10]。

2.2 载质粒纳米粒的制备 采用离子交联法制备载质粒(pDNA)纳米粒: 将 TPP 溶液溶解的 pDNA 溶液和一定浓度 CS(CSTM)溶液各 200 μl 置于 55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 10 min 后, 将等体积 pDNA 溶液加到 CS(CSTM)溶液中, 涡旋 1 min, 室温下静置稳定, 即得。

2.3 包载效果观察和评价 采用琼脂糖凝胶电泳考察纳米复合物的形成及电荷性质, 初步观察载药纳米粒的质粒包载效果。配制 1% 的琼脂糖凝胶作为电泳基质, 电泳样品为裸 pDNA (pVAX1-wapA 或 pVAX1)和包载 pDNA 的纳米粒。

2.4 形态测定 取少量纳米粒混悬液滴至铺有碳膜的铜网上, 静置 2 min, 用滤纸吸干混悬液, 再滴加 2% (W/V) 磷钨酸负染 2 min, 于透射电子显微镜下观察纳米粒形态。选取代表性视野拍照。

2.5 包封率测定 采用包封率对纳米粒包载效果进行评价。将纳米粒混悬液于高速冷冻离心机上 10 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 1.5 h, 精密量取上清液作为待测液, 用荧光分光光度计按测定条件 ($E_x =$

350 nm, $E_m = 464$ nm, SlitEx/ E_m : 5 nm/5 nm) 测定上清液中游离质粒基因含量。按下式计算包封率, 包封率(%) = $(W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$ ($W_{\text{总}}$: pDNA 的投入质量; $W_{\text{游}}$: 上清液中 pDNA 的质量)。

2.6 细胞转染 将 HEK293A 以 1×10^6 cells/well 的密度接种于 6 孔板, 培养过夜待细胞贴壁, 待细胞融合度达到 70% 时进行转染。实验组是 pVAX1-wapA/CSTM 纳米粒、pVAX1-wapA/CS 纳米粒 pVAX1-wapA, 阳性对照组是 pVAX1-wapA 与 Lipo2000 复合物, 阴性对照组是 pVAX1 与 Lipo2000 复合物, 空白对照组是 pVAX1/CSTM 纳米粒、pVAX1/CS 纳米粒。所有组转染量均以质粒计 4 μg /孔。无血清培养基转染 6 h 后换含血清的培养液, 转染 48 h 后 TRIzol 法提取细胞总 RNA。将 RNA 反转录成的 cDNA 进行定量 PCR, 内参法进行结果处理。

3 结果和分析

3.1 影响纳米粒粒径与电位的因素

3.1.1 壳聚糖与 TPP 的比值对粒径及 Zeta 电位的影响 在 CS 为 0.25 mg/ml、CSTM 为 1 mg/ml、醋酸钠缓冲液的 pH 值为 5.5 的条件下, 改变 TPP 的浓度使 CS(CSTM)/TPP 的比值分别为 9、7、5、3、1 水平时, 随着 CS(CSTM)/TPP 比值的减小, 即 TPP 的浓度逐渐增大, 空白纳米粒的平均粒径逐渐减小。当 TPP 浓度增大到一定程度时, 粒径显著增大发生聚集, Zeta 电位逐渐降低(图 1)。

3.1.2 pH 值对纳米粒粒径及 Zeta 电位的影响 在固定 CS 为 0.25 mg/ml、TPP 为 0.05 mg/ml 浓度时, 同样固定 CSTM 为 1 mg/ml, TPP 为 0.2 mg/ml 浓度。纳米粒的平均粒径随着 pH 值的增大而逐渐增大, Zeta 电位逐渐降低(图 2)。相比于 CS, CSTM 溶解度大大改善, 在 pH 4.5~6.5 范围内都可溶解, 随着 pH 的减小, CSTM 的质子化程度增大, 所带正电荷增加, Zeta 电位逐渐增大。

3.1.3 壳聚糖浓度对粒径及 Zeta 电位的影响 CS(CSTM)/TPP 的比值固定为 5, pH 为 5.5, CS 浓度为 0.05、0.1、0.2、0.3、0.5 mg/ml 水平, CSTM 浓度为 0.1、0.3、0.5、1、3、5 mg/ml 水平制备纳米粒, 随着 CS(CSTM)浓度增大, 纳米粒粒径逐渐增大, Zeta 电位保持稳定(图 3)。

3.2 载 pDNA 的纳米粒表征

3.2.1 载 pDNA 的纳米粒的粒径及 Zeta 电位 CS 溶液浓度为 0.25 mg/ml, CSTM 溶液浓度为 5 mg/ml, 缓冲体系 pH 为 5.5, 0.02 mmol/L,

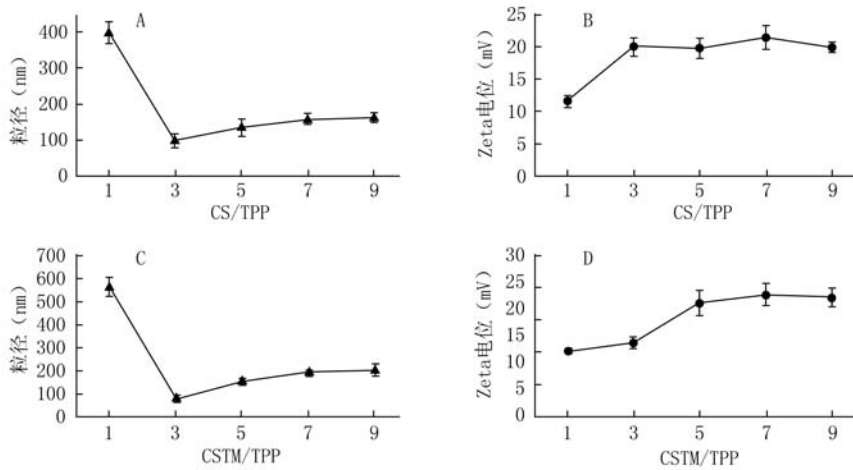


图1 壳聚糖/TPP浓度比对空白纳米粒粒径与 Zeta 电位的影响

A. 空白 CS 纳米粒的平均粒径; B. 空白 CS 纳米粒的 Zeta 电位;
C. 空白 CSTM 纳米粒的平均粒径; D. 空白 CSTM 纳米粒的 Zeta 电位

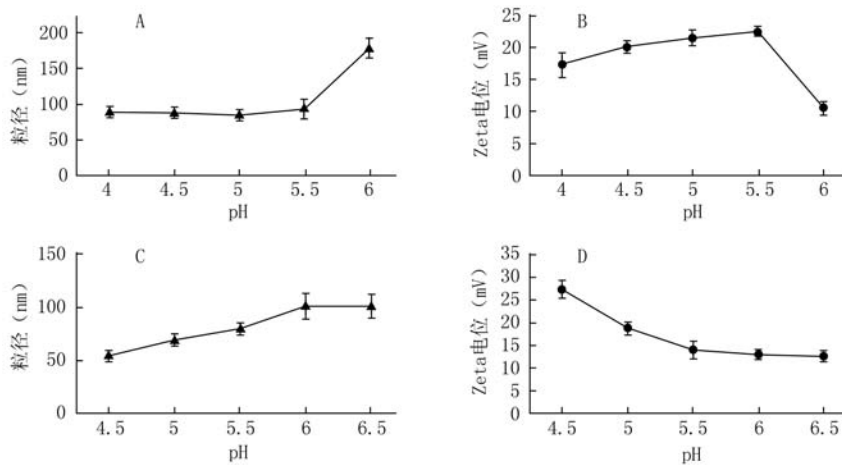


图2 pH值对空白纳米粒粒径与 Zeta 电位的影响

A. 空白 CS 纳米粒的平均粒径; B. 空白 CS 纳米粒的 Zeta 电位;
C. 空白 CSTM 纳米粒的平均粒径; D. 空白 CSTM 纳米粒的 Zeta 电位

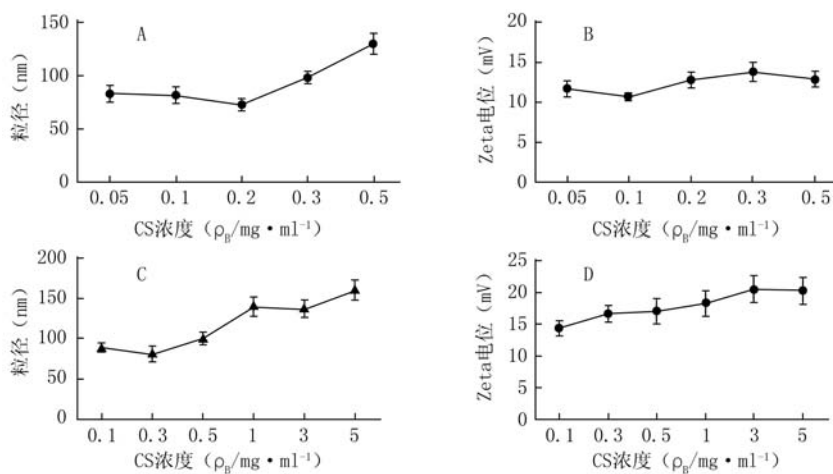


图3 壳聚糖浓度对空白纳米粒粒径与 Zeta 电位的影响

A. 空白 CS 纳米粒的平均粒径; B. 空白 CS 纳米粒的 Zeta 电位;
C. 空白 CSTM 纳米粒的平均粒径; D. 空白 CSTM 纳米粒的 Zeta 电位

TPP,不同浓度的 pDNA (pVAX1 和 pVAX1-wapA)制备的 CS 纳米粒平均粒径和 Zeta 电位见表 1。不同浓度的质粒制备的 CSTM 纳米粒平均粒径和 Zeta 电位见表 2。纳米粒的平均粒径和 Zeta 电位均随着质粒浓度的增大而增大,当质粒浓度继续增大,纳米粒会出现聚集。

表 1 不同浓度 pDNA 制备的 CS 纳米粒平均粒径及 Zeta 电位

pDNA 浓度 (ng/ μ l)	pVAX1		pVAX1-wapA	
	粒径 (nm)	Zeta 电位 (mV)	粒径 (nm)	Zeta 电位 (mV)
20	173.0 \pm 13.2	5.45 \pm 1.2	116.1 \pm 10.1	4.33 \pm 1.5
50	150.9 \pm 8.5	17.5 \pm 2.1	186.8 \pm 17.2	9.38 \pm 1.2
100	212.9 \pm 12.4	21.4 \pm 2.3	209.5 \pm 16.3	12.5 \pm 1.1
150	236.0 \pm 18.6	23.7 \pm 3.2	219.2 \pm 18.2	24.7 \pm 3.5
200	320.3 \pm 21.2	29.8 \pm 3.5	235.8 \pm 13.3	28.0 \pm 5.2

表 2 不同浓度 pDNA 制备的 CSTM 纳米粒平均粒径及 Zeta 电位

pDNA 浓度 (ng/ μ l)	pVAX1		pVAX1-wapA	
	粒径 (nm)	Zeta 电位 (mV)	粒径 (nm)	Zeta 电位 (mV)
50	165.0 \pm 12.3	14.2 \pm 1.2	120.1 \pm 8.1	12.2 \pm 0.5
100	152.9 \pm 8.5	23.9 \pm 1.9	111.8 \pm 10.3	12.0 \pm 0.6
200	191.9 \pm 20.4	28.7 \pm 2.2	219.2 \pm 18.2	21.6 \pm 1.2
300	266.0 \pm 18.6	29.5 \pm 2.2	222.5 \pm 15.6	19.6 \pm 1.2
350	311.1 \pm 24.3	31.4 \pm 4.2	335.8 \pm 23.3	34.1 \pm 4.5

3.2.2 纳米粒的包载效果 纳米粒凝胶电泳图见图 4,裸质粒跑出上样孔有条带,而各纳米粒组样品均滞留在上样孔中。pDNA 被纳米粒包载后荷正电,因此无法随电流向负极移动。不同浓度质粒制备的纳米粒包封率结果见表 3 和表 4。

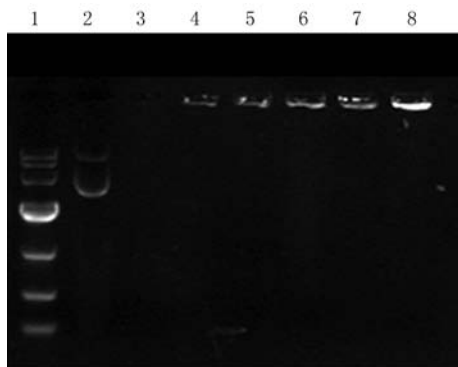


图 4 载 pDNA 的纳米粒凝胶电泳图

1. DL10,000 DNA marker; 2. pVAX1-wapA; 4-8. 不同质粒浓度的载 pVAX1-wapA 的纳米粒

表 3 不同浓度 pDNA 制备的 CS 纳米粒包封率结果(%)

pDNA 浓度 (ng/ μ l)	pVAX1	pVAX1-wapA
20	36.97	50.83
50	41.67	39.65
100	76.26	83.95
150	89.57	91.24
200	94.63	97.65

表 4 不同浓度 pDNA 制备的 CSTM 纳米粒包封率结果(%)

pDNA 浓度 (ng/ μ l)	pVAX1	pVAX1-wapA
50	18.07	23.09
100	22.09	66.01
200	61.84	68.78
300	74.60	87.66
350	88.68	93.78

3.2.3 纳米粒的形态测定结果 于透射电镜下观察纳米粒形态见图 5。粒径均一性好,形态圆整,分布均匀,无聚集。

3.3 转染细胞实验 细胞转染 48 h 后细胞中质粒编码 wapA 蛋白的转录水平见图 6。包载 pVAX1 壳聚糖纳米粒、包载 pVAX1 季铵化壳聚糖纳米粒以及与 Lipo2000 共转染的 pVAX1 都没有检测到 wapA 基因的 mRNA。pVAX1-wapA 直接转染的细胞几乎检测不到 wapA 基因的 mRNA 转录,证明裸质粒(pVAX1-wapA)基本无法进入细胞进行正常转录;季铵化壳聚糖包载 pVAX1-wapA 纳米粒转染细胞的 wapA 基因 mRNA 水平接近 pVAX1-wapA 和 Lipo2000 共转染细胞的 wapA 基因 mRNA 水平,是包载 pVAX1-wapA 壳聚糖纳米粒转录水平的 3.18 倍,证明我们制备的壳聚糖纳米粒和季铵化壳聚糖纳米粒均可以促进包载的质粒(pVAX1-wapA)进入细胞并成功被转录,而季铵化壳聚糖纳米粒效果显著高于壳聚糖纳米粒。

4 讨论

在空白纳米粒制备工艺基础上,考虑 DNA 疫苗后续动物实验通过鼻腔免疫直接接触黏膜以及肌注免疫对肌肉的刺激性,确定在 pH5.0~6.0 条件下,改变质粒和载体的种类和用量,以粒径、电位和包封率为指标优化载基因纳米粒的处方。实验结果表明,载质粒纳米粒的包封率都随质粒浓度的增大而增大,但质粒浓度增大后纳米粒的粒径也随之增大。已有报道认为 pDNA/CS 纳米粒进入细胞并表达的能力与壳聚糖的类型及

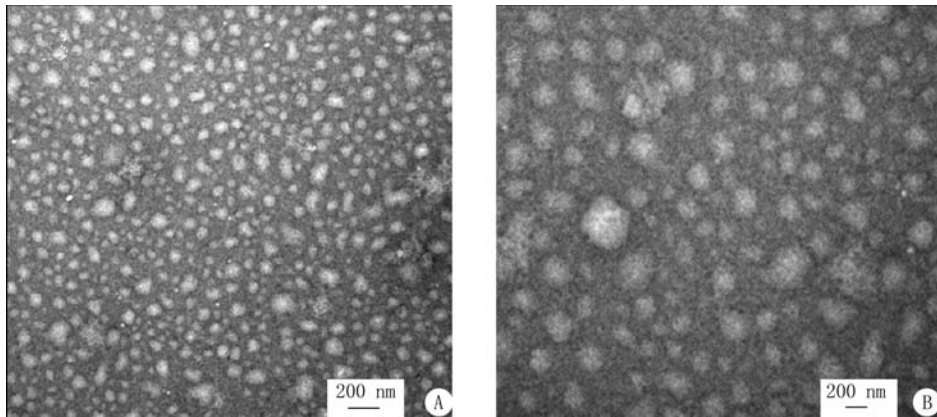


图5 透射电镜下的纳米粒形态

A. pVAX1-wapA-CS 纳米粒; B. pVAX1-wapA-CSTM 纳米粒

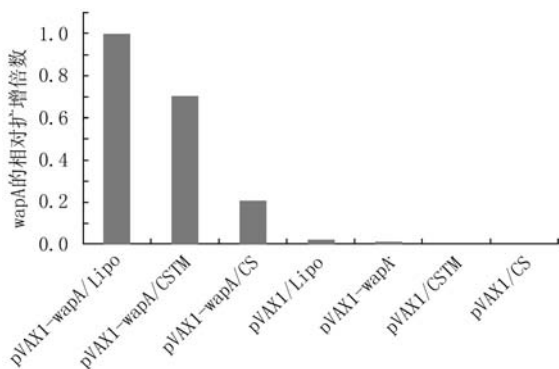


图6 细胞转染48 h后细胞中质粒编码 wapA 蛋白的转录水平

纳米粒粒径、电性等性质有关^[5,13],粒径在100~200 nm时转染效率最高,Zeta电位越高,转染效率越高,同时细胞毒性也增大。综合各因素的影响,后续实验选择包封率高、Zeta电位约20 mV、粒径200 nm左右的处方制备载基因纳米粒,即CS浓度0.25 mg/ml,pVAX1-wapA 150 ng/ μ l,体系pH5.5,TPP浓度0.02 mmol/L;CSTM浓度5 mg/ml,pVAX1-wapA浓度300 ng/ μ l,体系pH5.0,TPP浓度0.02 mmol/L。

DNA疫苗不依靠载体很难进入细胞且易被核酸酶降解,最终导致DNA疫苗免疫原性低,不能有效刺激机体产生免疫反应。作为具有潜力的载体,壳聚糖纳米粒具有较好的生物相容性和独特的理化性质,如能促进功能分子入胞、保护DNA免受降解。本实验细胞转染结果也证实,壳聚糖纳米粒和季铵化壳聚糖纳米粒均可以提高质粒进入细胞的效率。值得注意的是,季铵化壳聚糖纳米粒表现出优于壳聚糖纳米粒的促转染效果。原因可能是:纳米粒可以有效保护包载的质粒免受酶解,同时可以促进包载的质粒被细胞摄取,而且毒性较低^[14]。本部

分实验结果表明季铵化壳聚糖纳米粒可以有效促进包载质粒目标蛋白的转录和表达,从而有望提高DNA疫苗的免疫原性,后续将通过动物体内试验进一步验证。

【参考文献】

- [1] 樊明文,边专.防龋疫苗主动免疫的现状与未来[J].中华口腔医学杂志,2002,37(6):401-403.
- [2] 刘善奎,高申,钟延强,等.DNA疫苗微球给药系统的研究进展[J].中国药学杂志,2004,38(11):828-831.
- [3] 白枫,孙大庆.DNA疫苗递送系统研究进展[J].国际免疫学杂志,2008,31(3):236-239.
- [4] 李艳红,胡四海.壳聚糖纳米粒介导基因转染的影响因素及改性修饰[J].微生物学免疫学进展,2010,38(3):50-53.
- [5] Erbacher P,Zou S,Bettinger T,et al. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: Biophysical Characteristics and Transfection Ability [J]. Pharm Res, 1998, 15(9): 1332-1339.
- [6] Lee M,Nah JW,Kwon Y,et al. Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery [J]. Pharm Res, 2001, 18(4): 427-431.
- [7] Ishii T,Okahata Y,Sato T. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1514(1): 51-64.
- [8] Huang M,Fong CW,Khor E,et al. Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation [J]. J Control Release, 2005, 106(3): 391-406.
- [9] 杨晓容,宗莉,朱敏艳,等.荧光探针示踪pDNA/壳聚糖纳米粒在细胞内转运[J].中国药学杂志,2009,43(10):727-731.
- [10] 王江峰,鲁莹,黄景彬,等.聚氨基酯载基因纳米粒的研究[J].第二军医大学学报,2011,32(5):473-476.
- [11] Qian F,Cui F,Ding J,et al. Chitosan graft copolymer nanoparticles for oral protein drug delivery: preparation and characterization [J]. Biomacromolecules, 2006, 7(10): 2722-2727.

(下转第40页)

明,该方法准确度高。

2.5.6 重复性试验 取同一批号(批号为20120821)吉西他滨温敏凝胶注射剂样品6份,按“2.5.1”项下制备样品溶液,测定峰面积,计算得到RSD为0.04%, $n=6$,表明该方法重复性良好。

2.5.7 稳定性试验 取“2.5.1”项下储备液,稀释至一定浓度,分别在0、2、4、8、12 h进行测定,按吉西他滨峰面积计算RSD=0.10%, $n=3$ 。表明吉西他滨溶液在24 h内稳定性良好。

2.5.8 含量测定 取3批吉西他滨温敏凝胶注射剂样品(40 mg/ml),按“2.5.1”项下处理方法制备样品,按“2.5.2”项下色谱条件测定峰面积。根据外标法标准曲线方程计算得3批样品中吉西他滨的平均含量为标示量的(101.87±2.95)%、(99.4±2.73)%、(98.98±0.71)%, $n=3$,均在标示量的95%~105%之间,符合含量测定要求。

3 讨论

PLGA-PEG-PLGA具有温敏成胶性质,即常温下成液体,遇生理温度快速变成凝胶。以吉西他滨为模型药物,PLGA-PEG-PLGA聚合物为递药系统制备吉西他滨原位凝胶注射剂,将其于肿瘤局部注射,可延长作用时间、提高药物肿瘤内浓度,同时使药物浓集在肿瘤部位并缓慢释药、达到安全有效的治疗目的。

本实验所建立的HPLC法,专属性强,线性关系良好,回收率、精密度、重复性、溶液稳定性均符合要求,可用于吉西他滨温敏凝胶注射剂的质量控制。

【参考文献】

[1] Cascium S, Craziano F, Catalana G. Chemotherapy for ad-

vanced pancreatic cancer; It may no longer be ignored [J]. Ann Oncol, 1999, 10(1):105.

[2] Saif MW. A new developments in the treatment of pancreatic cancer[J]. Highlights from the "44th ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA. May 30-June 3, 2008. JOP 2008, 9; 391-397.

[3] Tanaka M, Javle M, Dong X, *et al.* Gemcitabine metabolic and transporter gene polymorphisms are associated with drug toxicity and efficacy in patients locally pancreatic cancer [J]. Cancer, 2010, 116(22): 5325-5335.

[4] Vervenne W, Bennouna J, Humblet Y, *et al.* A randomized, double blind, placebo controlled multicenter phase III trial to evaluate the efficacy and safety of adding bevacizumab to erlotinib and gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(suppl): 4507.

[5] Okino H, Maeyama R, Manabe T. Trans-tissue, sustained release of gemcitabine from photo cured gelatin gel inhibits the growth of heterotopic human pancreatic tumor in nude mice[J]. Clin Cancer Res. 2003, 9 (15): 5786-5793.

[6] Rosemurgy AS, Serafini FM. New directions in systemic therapy of pancreatic cancer [J]. Cancer Control, 2000, 7 (5): 437-51.

[7] Howell SB. Clinical applications of a novel sustained-release injectable drug delivery system: DepoFoamTM technology [J]. Cancer J 2001, 7(3): 219-227.

[8] Kim YJ, Kim SW. Controlled drug delivery from injectable biodegradable triblock copolymer [M]. Washington: American Chemical Society, 2003:300-311.

[9] Jeong B, Bae YH. Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems [J]. Nature, 1997, 388 (6645): 860-862.

[10] 杨 梅,李井泉,汤致强. PLGA 吉西他滨缓释微球在荷胰腺癌裸鼠体内的药动学研究[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(4): 295-299.

[收稿日期] 2014-09-12 [修回日期] 2015-07-09

[本文编辑] 陈 静

(上接第23页)

[12] 刘世伟,孙 逊,聂 宇,等. 载基因壳聚糖纳米粒的制备及其相关性质的初步研究[J]. 华西药学杂志, 2005, 19(6): 409-411.

[13] Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, *et al.* Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency [J]. J Control Release, 2001, 70(3):

399-421.

[14] Goldmann K, Ensminger SM, Spriewald BM. Oral gene application using chitosan-DNA nanoparticles induces transferable tolerance [J]. Clin Vaccine Immunol, 2012, 19 (11): 1758-1764.

[收稿日期] 2015-08-24 [修回日期] 2015-11-16

[本文编辑] 顾文华