

# 胰岛素/维生素 B12-透明质酸纳米粒的制备及口服给药 体内外性质的评价

韩丽娜<sup>1,2</sup>, 尹丽芳<sup>1,2</sup>, 赵月芳<sup>1,2</sup>, 梁 扬<sup>1,2</sup>, 黄 欢<sup>1,2</sup>, 冯 敏<sup>1,2\*</sup>

(1.中山大学药学院, 广东 广州 510006; 2.广东省创新药物制剂工程技术研究开发中心, 广东 广州 510006)

**摘 要:**【目的】维生素 B12 修饰的透明质酸纳米粒口服递送胰岛素的体内外性质评价。【方法】采用二次乳化法制备载胰岛素/维生素 B12 修饰透明质酸纳米粒(INS/VB12-HA NP), 激光粒度分析仪测定纳米粒粒径和分布, 反相高效液相法测定纳米粒包封率和载药量; 并用人结肠腺癌细胞(Caco-2)单层膜模型体外评价 INS/VB12-HA NP 的细胞摄取与跨膜转运; 以糖尿病模型大鼠降血糖实验评价口服 INS/VB12-HA NP 的药效。【结果】所制备的 INS/VB12-HA NP 粒径在 185 ~ 286 nm 之间, PDI 小于 0.25, 包封率在 55% 左右。细胞摄取实验表明在 25 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  胰岛素浓度范围内和孵育 0.5 h 后 Caco-2 细胞对 INS/VB12-HA NP 的摄取量显著高于胰岛素溶液组。Caco-2 细胞单层膜跨膜转运实验中, 4 h 内跨膜电阻没有明显变化, VB12-HA NP 组比对照溶液组有更多的胰岛素跨膜量和更快的跨膜速率。糖尿病大鼠的降糖实验显示, 与口服胰岛素溶液相比, 纳米粒组均有显著的口服降血糖作用。【结论】VB12 修饰的透明质酸纳米粒可促进胰岛素跨过 Caco-2 细胞单层膜, 且对糖尿病大鼠的口服降糖作用优于胰岛素溶液。

**关键词:**口服胰岛素; 维生素 B12; 透明质酸纳米粒; 降糖作用

中图分类号: R945 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2012)05-0597-06

## Vitamin B12-conjugated Hyaluronic Nanoparticles Enhance Oral Delivery of Insulin

HAN Li-na<sup>1,2</sup>, YIN Li-fang<sup>1,2</sup>, ZHAO Yue-fang<sup>1,2</sup>, LIANG Yang<sup>1,2</sup>, HUANG Huan<sup>1,2</sup>, FENG Min<sup>1,2\*</sup>

(1.Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 2.Research and Development Center of Pharmaceutics of Guangdong Province, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effects of vitamin B12-conjugated hyaluronic nanoparticles on oral delivery of insulin. 【Methods】 Insulin loaded vitamin B12-conjugated hyaluronic nanoparticles (INS/VB12-HA NP) were prepared by a modified double-emulsion method. The particle size and Zeta potential measurements were carried out by photon correction spectroscopy. The insulin entrapment efficiency and loading efficiency were quantified by RP-HPLC. Caco-2 monolayer was applied as a cell model for the uptake and penetration experiment. Hypoglycemic effects of INS/VB12-HA NP on the blood glucose level of STZ- diabetic rats were evaluated. 【Results】 The particle size was in the range of 185–286 nm, and their PDI values were less than 0.25. The insulin entrapment efficiency was around 55%. The cellular uptake of INS/VB12-HA NP by Caco-2 cells was significantly higher than those of insulin solution after incubation 0.5h and in the insulin concentration of 25–200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The Caco-2 cell monolayer treating with INS/VB12-HA NP for 4 h did not show any significant change in TEER. The VB12-HA NP transferred more insulin across the Caco-2 cell monolayer than insulin solution did. In vivo experiments, the INS/VB12-HA NP could reduce the blood glucose level of STZ- diabetic rats after oral administration. 【Conclusion】 Compared with insulin solution, VB12-HA NP enhanced the insulin through Caco-2 cell monolayer by transcellular pathway and showed strong hypoglycemic effects on STZ-diabetic rats.

**Key words:** oral insulin; vitamin B12; hyaluronic nanoparticles; hypoglycemic effect

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(5):597–602]

胰岛素(insulin)作为目前所知唯一有降血糖功能的体内激素,临床上主要采用皮下注射给药,

给患者带来许多不便和痛苦。鉴于口服给药方式对患者顺应性强,研究胰岛素口服给药剂型一直

收稿日期:2012-05-12

基金项目:高校基本科研业务费培育项目(3161002)

作者简介:韩丽娜,硕士,E-mail:lingluo263@sina.com; \*通信作者,冯敏,博士,副教授,硕士生导师,E-mail:fengmin@mail.sysu.edu.cn

是药剂学的热点之一。研究表明, 维生素 B<sub>12</sub> (vitamin B<sub>12</sub>, VB<sub>12</sub>) 作为分子质量较大的辅酶, 可与胃部内因子 (intrinsic factor, IF) 结合形成 VB<sub>12</sub>-IF 复合物, 而保护维生素 B<sub>12</sub> 不受酸性胃液破坏和胃蛋白酶降解。之后 VB<sub>12</sub>-IF 复合物与小肠壁细胞内因子受体结合, 穿过细胞顺利进入血液循环。已有研究证明, 将维生素 B<sub>12</sub> 与蛋白或多肽进行化学键结合, 可以使蛋白顺利穿过小肠壁、携带进入血液循环而不失活性<sup>[1-3]</sup>。但由于人类每日所需维生素 B<sub>12</sub> 总量有限 (2 ~ 3 μg)<sup>[4]</sup>, 多摄入的维生素 B<sub>12</sub> 并不被吸收, 所以携带的蛋白剂量通常难以达到治疗要求。本实验采用将胰岛素包裹入维生素 B<sub>12</sub> 修饰的纳米粒 (INS/VB<sub>12</sub>-HA NP) 中的方式来增大载药剂量。以往研究表明, 胰岛素被包裹入纳米粒<sup>[5]</sup>、微球<sup>[6]</sup>、脂质体等载体后亦可以达到保护蛋白不受胃肠道酶降解的目的。本实验采用生物相容性高的天然高分子材料透明质酸 (HA) 作为纳米粒制备材料, 将维生素 B<sub>12</sub> 与透明质酸进行化学键合制得 VB<sub>12</sub>-HA, 用 HA:VB<sub>12</sub>-HA 不同投料比的方式得到不同修饰度的纳米粒, 采用 Caco-2 细胞单层膜模型和糖尿病大鼠动物实验进行体外和体内评价。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

人结肠癌细胞 (Caco-2) 购于美国模式培养物集存库 (ATCC), SD 雄性大鼠 (Sprague-Dawley Rats, 体质量 150 ~ 200 g, SPF 级) 购于广州中医药大学实验动物中心。

### 1.2 实验试剂

人重组胰岛素冻干粉 (徐州万邦), 透明质酸钠 (山东福瑞达生物医药有限公司, MW=1.0 × 10<sup>6</sup> Da), 维生素 B<sub>12</sub> (国药集团化学试剂有限公司), 人重组内因子 (Prospec)。DMEM 高糖培养液 (Gibco), 胎牛血清 (Gibco), Hank's 缓冲液 (Gibco), 胰酶 (含 EDTA, Gibco)。1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) (广州齐云生物技术有限公司), 异硫氰酸荧光素 (FITC, Sigma-Aldrich), 链脲佐菌素 (STZ, Sigma-Aldrich)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 透明质酸与 VB<sub>12</sub> 的化学结合反应 VB<sub>12</sub>

先与 CDI (羰二咪唑) 和己二胺反应, 生成 VB<sub>12</sub> 的衍生物; 之后 HA 的羧基与 VB<sub>12</sub> 衍生物的氨基反应 (见图 1), 之后透析除去未反应的 VB<sub>12</sub>, 冷冻干燥得橘红色 VB<sub>12</sub>-HA 产物。VB<sub>12</sub>-HA 的 H1NMR 氢谱显示除了 HA 的羟基和甲基特征峰 (δ1.75 ~ 1.95) 外, 还包含 VB<sub>12</sub> 咕啉环侧链上亚甲基、甲基与核苷上羟基氢的特征峰 (δ0.85 ~ 1.00), 证明 VB<sub>12</sub>-HA 已成功合成 (图 2)。H1NMR 氢谱测定 VB<sub>12</sub> 的接枝率为 16.04%。

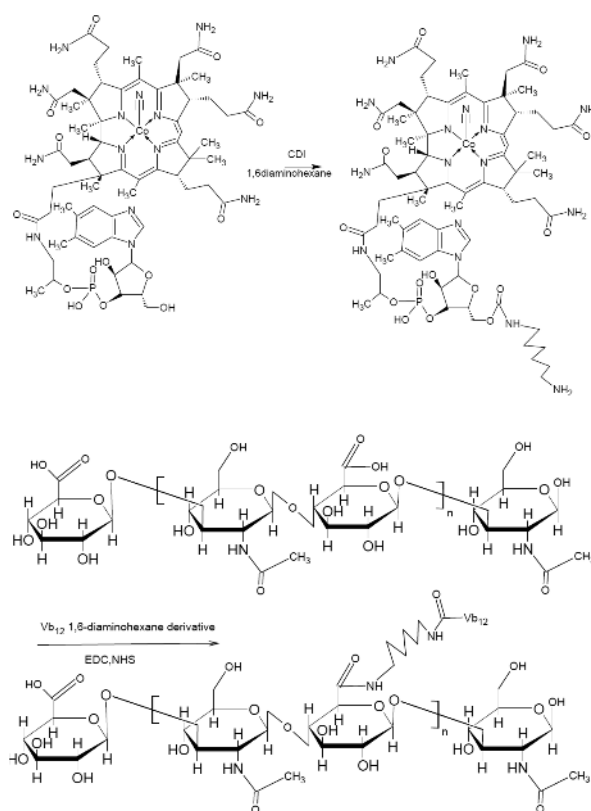


图 1 维生素 B<sub>12</sub> 与透明质酸的化学反应

Fig.1 The chemical reaction between vitamin B<sub>12</sub> and hyaluronic acid

1.3.2 二次乳化法制备载药纳米粒 不同质量比的透明质酸钠 (HA) 与 VB<sub>12</sub>-HA 混合, 制得混合溶液 (10 mg/mL), 加入质量分数 1.0% 吐温 80 作为水相, 与正己烷 (含 1.0% 司盘 80) 以体积比 1:4 混合, 高压均质 (1 × 10<sup>8</sup> Pa, 5 次) 后制得 W/O 纳米乳液。真空干燥除去有机溶剂, 纳米粒在水中重新分散, 再次高压均质 (1 × 10<sup>8</sup> Pa, 5 次), 加入 NHS/EDC 体系进行纳米粒的交联固化, 透析除去未反应的交联剂, 加入冻干保护剂, 冻干得到纳米粒干粉。将纳米粒干粉浸入胰岛素溶液中充分溶胀, 即

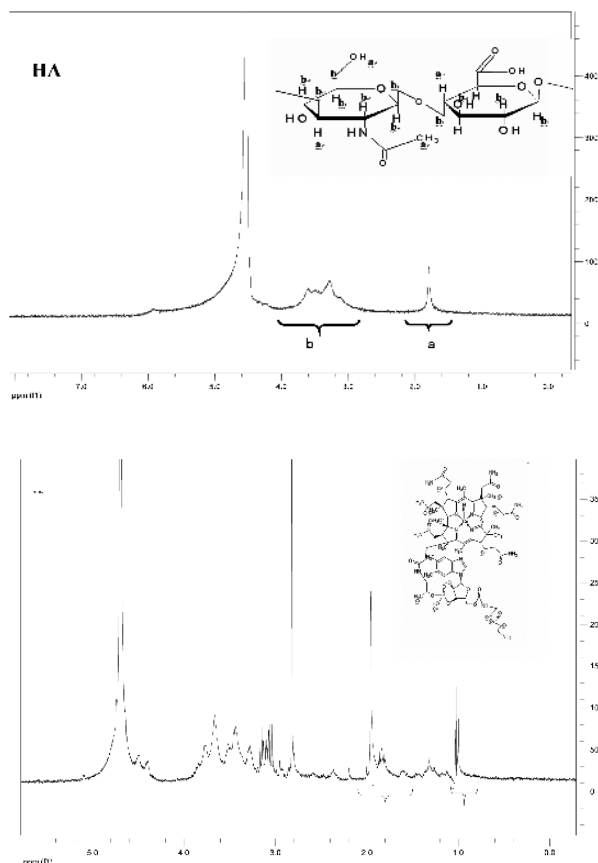


图2 HA和VB12-HA的核磁分析  
Fig.2  $^1\text{H-NMR}$  of HA and VB12-HA

得载药纳米粒。用  $\text{pH} = 1.2$  的盐酸溶液清洗纳米粒,离心弃去上清,回收纳米粒沉淀。

1.3.3 纳米粒的表征 用马尔文激光粒度仪 (Malvern ZS 90) 测定纳米粒的粒径和电位,测定 3 次取平均值。用透射电镜 TEM (JEM-1400, JEOL) 观察并记录纳米粒的形态。

1.3.4 包封率与载药量的测定 采用反向高效液相色谱法测定, 色谱条件为磷酸盐缓冲液 ( $\text{pH} = 3.0$ ) 与乙腈的体积比 = 73:27, 检测波长  $\lambda = 214 \text{ nm}$ 。用超高速离心法分离上清液和纳米粒沉淀。包封率计算公式为:  $\text{EE}\% = (m_{\text{总}} - m_{\text{上清}}) / m_{\text{总}} \times 100\%$ 。

其中  $m_{\text{总}}$  为总投药量,  $m_{\text{上清}}$  为上清中检测出未包封药量。

1.3.5 Caco-2 细胞单层膜摄取实验 Caco-2 细胞接种于 24 孔板中, 种板密度为  $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ , 培养 2~3 周, 隔天换液。摄取介质为预热至  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  的 Hank's 液, FITC 荧光标记的胰岛素 (FITC-insulin) 和纳米粒干粉溶解于 Hank's 液中, 均加入内因子 ( $0.5 \text{ pmol/well}$ ), 不同浓度的样品 ( $25 \sim 200$

$\mu\text{g/mL}$ ) 和对照品加至培养板中, 并于 2 h 后用  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  的 Hank's 液充分冲洗细胞 3 次, 终止摄取。考察不同时间摄取情况时, 样品浓度为  $100 \mu\text{g/mL}$ ; 分别于 0.5、1 和 2 h 时终止摄取。每孔中加入 0.25 mL 裂解液裂解细胞, 利用荧光分光光度计测定含量。用 BCA 试剂盒测定每孔总蛋白含量, 摄取量单位为  $\mu\text{g/mg}$ 。

1.3.6 Caco-2 细胞单层膜跨膜转运实验 将 Caco-2 细胞接种于已经涂有鼠尾胶原的 Transwell 聚碳酸酯膜上, 接种密度为  $2 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ , 上腔 A 面加入 0.5 mL DMEM 培养液, 下腔 B 面加入 1.5 mL DMEM 培养液。接种后 24 h 换液, 1 周内隔天换液, 1 周后每天换液, 培养 21 d。用 EVOM 细胞跨膜电阻仪测定跨膜电阻值 (TEER), 当 TEER 值大于  $400 \Omega \cdot \text{cm}^2$  时, 可用作跨膜转运实验。跨膜转运实验时, 上腔 A 面加入溶解纳米粒干粉的 Hank's 液, 对照组为胰岛素溶液, 均加入内因子 ( $1 \text{ pmol/well}$ ); 下腔 B 面均为 Hank's 液。定时取出下腔 B 面溶液, 测定其中胰岛素含量。纳米粒、对照溶液中的胰岛素均事先用 FITC 标记, 测定方法为荧光分光光度法。

1.3.7 糖尿病大鼠降血糖实验 SD 雄性大鼠腹腔注射  $60 \text{ mg/kg}$  STZ (链脲佐菌素), 1 周后用罗氏血糖仪测定大鼠血糖, 随机血糖高于  $\geq 16.7 \text{ mmol/L}$  可视为造模成功。将大鼠分为 5 组, 采取灌胃或皮下注射的方式给药。对照组 (皮下或灌胃) 所用胰岛素溶液为胰岛素干粉与磷酸盐缓冲液 ( $\text{pH} 7.4$ ) 配制而成。血糖仪测定不同时间点的大鼠血糖值, 实验过程中大鼠禁食不禁水。

1.3.8 统计学处理 全部数据用 SPSS 17.0 统计软件进行处理。数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。两组间均数比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 载药纳米粒的性能表征

由表 1 可见, 3 种投料比例下均可得到纳米粒, 粒径范围在  $185.27 \sim 286.03 \text{ nm}$  之间。多分散系数 (PDI) 均小于 0.25, 表明粒度分布集中, 无粘连、聚结现象。Zeta 电位为  $-40 \text{ mV}$  左右, 负电荷较高, 粒子间电荷斥力较大, 因此体系比较稳定。从

表 1 VB<sub>12</sub>-HA 纳米粒的性质表征Table 1 Characterization of insulin loaded VB<sub>12</sub>-HA nanoparticles

(n = 3)

Sample	VB <sub>12</sub> -1-HA NP	VB <sub>12</sub> -2-HA NP	VB <sub>12</sub> -3-HA NP
m <sub>VB12-HA</sub> :m <sub>HA</sub>	1 : 1	1 : 5	1 : 10
d/nm	286 ± 6	198 ± 8	185 ± 4
PDI	0.250 ± 0.006	0.239 ± 0.012	0.201 ± 0.011
Zeta potential/mV	-43.3 ± 2.5	-43.9 ± 1.0	-41.3 ± 2.4
Entrapment efficiency/%	55 ± 17	59 ± 9	55 ± 13
Loading content/%	2.4 ± 0.7	2.6 ± 0.4	2.4 ± 0.5

PDI: polydispersity index

表中同样可以看出,随着纳米粒中 HA 的比例增多,纳米粒的粒径减小,多分散系数 PDI 减小,更趋于稳定。

从电镜图片(图 3)可以看出,VB<sub>12</sub>-HA 纳米粒近似圆形或椭圆形,无粘连现象。

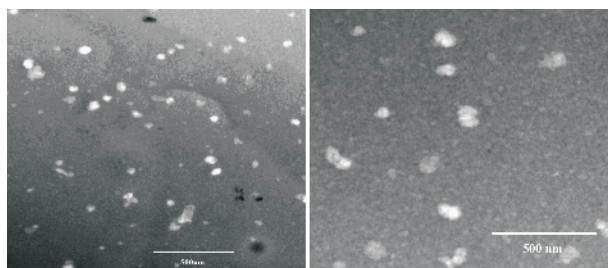


图 3 纳米粒透射电镜图片

Fig.3 The TEM image of nanoparticles

三组 VB<sub>12</sub>-HA 纳米粒的包封率均在 55% 左右,不同 VB<sub>12</sub> 修饰度的纳米粒载药没有明显区别,本实验采用二次载药的方式,避免了制备工艺过程对胰岛素活性的影响。载药量在 2.39% ~ 2.57% 之间,同样没有明显区别(表 1)。

## 2.2 Caco-2 细胞单层膜对纳米粒的摄取实验

由图 4 可见,当孵育时间为 2 h 时,胰岛素浓度在 25 ~ 200 μg/mL 范围内,纳米粒组的胰岛素摄取量均显著高于对照胰岛素溶液组,并具有浓度依赖性。但不同 VB<sub>12</sub> 修饰率的纳米粒之间并没有显著性差异。由图 5 可见,当加药浓度固定于 100 μg/mL 时,0.5 h 时实验组与对照组的胰岛素摄取量没有差异,但至 1 h 和 2 h 时,INS/VB<sub>12</sub>-HA NP 实验组的摄取量显著高于对照溶液组。

## 2.3 纳米粒过 Caco-2 细胞单层膜的跨膜转运实验

利用跨膜电阻仪检测实验过程中的电阻变

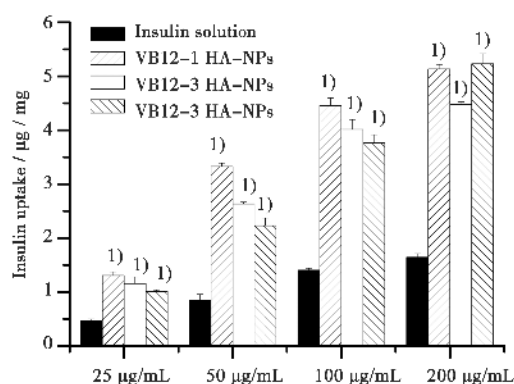


图 4 胰岛素 Caco-2 细胞摄取量随加药浓度的变化

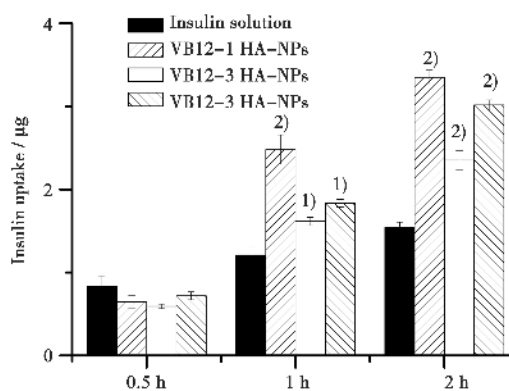
Fig.4 The cellular uptake of FITC-insulin loaded VB<sub>12</sub>-HA NP by Caco-2 cell monolayers varying the adding concentration of insulinEach value represents  $\bar{x} \pm s$  (n = 3); 1) P < 0.01

图 5 胰岛素 Caco-2 细胞摄取量随孵育时间的变化

Fig.5 The cellular uptake of FITC-insulin loaded VB<sub>12</sub>-HA NP by Caco-2 cell monolayers varying the incubation timeEach value represents  $\bar{x} \pm s$  (n = 3); 1) P < 0.05; 2) P < 0.01

化,如图 6 所示 VB<sub>12</sub>-HA 纳米粒组和溶液组均未

使跨膜电阻显著降低,表明 INS/VB<sub>12</sub>-HA NP 并非通过破坏 Caco-2 单层膜细胞间紧密连接的细胞间途径穿过细胞,而是通过细胞内途径跨膜。

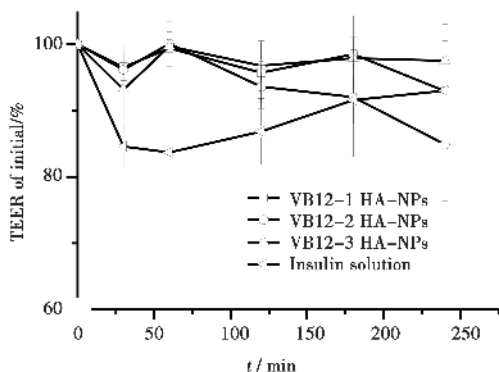


图6 跨膜转运实验中细胞单层膜电阻的变化  
**Fig.6 TEER values were monitored as a function of time evaluated during permeability experiments**  
*n = 3; data represented as  $\bar{x} \pm s$*

对各个不同组别胰岛素跨过 Caco-2 细胞单层膜的量进行分析(图 7),结果显示 INS/VB<sub>12</sub>-1-HA 和 INS/VB<sub>12</sub>-2-HA 纳米粒组递送胰岛素的过膜量显著高于胰岛素溶液组。其中,VB<sub>12</sub> 含量最高的 VB<sub>12</sub>-1-HA NP 组有最高的胰岛素过膜量为 (10.03 ± 0.20) μg, 是对照溶液组 (4.93 ± 0.20) μg 的两倍以上。降低纳米粒的 VB<sub>12</sub> 含量, 则胰岛素过膜量减少。

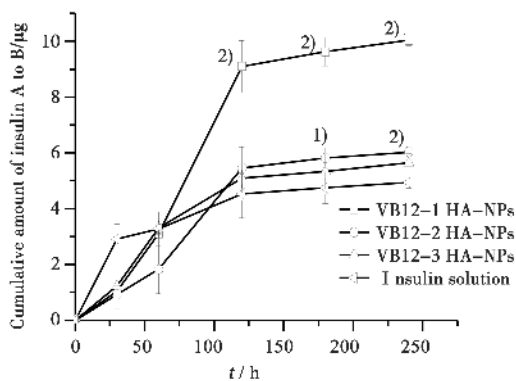


图7 胰岛素累积过膜量随时间的变化  
**Fig.7 Cumulative amount of FITC-insulin transported across Caco-2 cell monolayers from apical chamber to basolateral chamber**  
*Each value represents  $\bar{x} \pm s$  ( $n = 3$ ); 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$ .*

## 2.4 糖尿病大鼠降血糖实验

口服 INS/VB<sub>12</sub>-HA 纳米粒组的糖尿病大鼠均表现了一定程度的血糖降低现象,VB<sub>12</sub>-1-HA、VB<sub>12</sub>-2-HA 和 VB<sub>12</sub>-3-HA 组在 8 h 后血糖分别变为初始血糖量的 (50.47 ± 11.82)%、(62.22 ± 13.25)%和(56.22 ± 8.40)%,显著优于口服胰岛素溶液组的降血糖作用(91.84 ± 2.10)%。与皮下注射组相比,纳米粒组表现为缓慢、持续的降血糖作用,在 8 h 内没有血糖反弹上升情况。

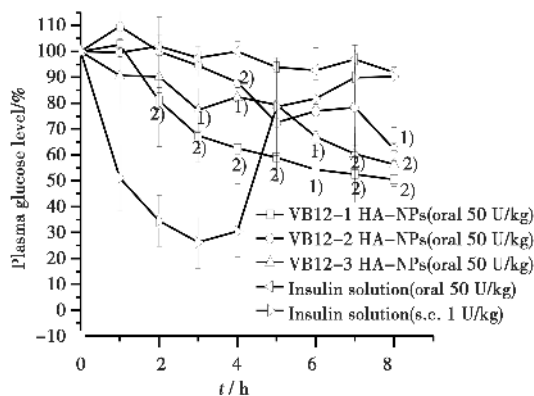


图8 糖尿病大鼠给药后血糖变化曲线  
**Fig.8 Changes in blood glucose level versus time profiles**  
 Oral administration of 50 IU/kg insulin solution, 50 IU/kg insulin loaded HA nanoparticles and 1 IU/kg insulin solution s.c. to STZ-induced diabetic rats.  
*Each value represents  $\bar{x} \pm s$ . ( $n = 6$ ); 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$ .*

## 3 讨论

已有文献和临床实验表明,采用同时口服胰岛素和肠道吸收促进剂的方式可以达到一定的降糖效果,但吸收促进剂对肠黏膜有持续刺激和破坏作用<sup>[7]</sup>,鉴于糖尿病患者需要长期服药控制血糖,任何潜在健康危害都应降至最低。VB<sub>12</sub> 是分子质量较大的辅酶,可与胃部内因子结合的形成 VB<sub>12</sub>-IF 复合物,而保护维生素 B<sub>12</sub> 不受酸性胃液破坏和胃蛋白酶降解。之后 VB<sub>12</sub>-IF 复合物与小肠壁细胞内因子受体结合,穿过细胞顺利进入血液循环。已有研究证明,将维生素 B<sub>12</sub> 与蛋白或多肽进行化学键结合,可以使蛋白顺利穿过小肠壁、携带进入血液循环而不失活性<sup>[8]</sup>。透明质酸(HA),广泛存在于人体胎盘、羊水、晶状体、关节软骨、皮肤

真皮层等组织中,在眼玻璃体、关节腔中几乎以纯态形式存在,具有很好的生物相容性<sup>[9]</sup>。本实验将 VB<sub>12</sub> 键合在 HA 表面,制备 VB<sub>12</sub>-HA 纳米粒。HA 纳米粒作为药库装载胰岛素,利用人体自身吸收维生素 B<sub>12</sub> 的过程来实现胰岛素口服给药,达到有效给药且降低毒性的效果。

Caco-2 细胞摄取实验显示在 25 ~ 200 μg/mL 胰岛素浓度范围内和孵育 0.5 h 后 Caco-2 细胞对 INS/VB<sub>12</sub>-HA 纳米粒的摄取量显著高于胰岛素溶液组。由于在摄取介质中 VB<sub>12</sub>-HA 纳米粒与胰岛素均带负电荷,与细胞膜电荷相同,故并非电荷吸附作用。摄取量随着给药浓度的增加而趋于饱和。进一步 Caco-2 细胞单层膜跨膜转运实验中,跨膜电阻并未降低,可见纳米粒并非通过破坏胞间连接的方式(paracellular pathway)穿过细胞单层膜,而是通过跨细胞方式(transcellular pathway)。且跨膜转运实验中显示,VB<sub>12</sub> 含量最高的 VB<sub>12</sub>-1-HA 组具有最强的胰岛素转运能力,提示 VB<sub>12</sub> 修饰纳米粒的程度与跨膜转运胰岛素的能力有关。根据现有理论分析,推测 VB<sub>12</sub>-HA 纳米粒是利用与细胞膜上 VB<sub>12</sub>-IF 受体结合的方式进入细胞,并穿过细胞。鉴于蛋白质和纳米粒的细胞摄入机制是一个十分复杂的过程,本研究仅作初步探讨。

糖尿病大鼠降糖实验中,与皮下注射相比,口服 VB<sub>12</sub>-HA 纳米粒组的大鼠表现为持续、平缓的血糖降低作用,提示载药纳米粒逐步跨过小肠壁,之后进入血液循环。3 组口服 INS/VB<sub>12</sub>-HA 纳米粒组 8 h 的降糖作用均显著优于胰岛素溶液组,说明纳米粒对胰岛素的包裹,对其具有保护蛋白生物活性、维持其结构稳定性的作用。VB<sub>12</sub> 含量最高的 VB<sub>12</sub>-1-HA 纳米粒组具有最强的降血糖作用,鉴于各组具有相似的载药量,说明在一定范围内 VB<sub>12</sub> 修饰程度与降血糖能力正相关。

综上所述,VB<sub>12</sub> 修饰的透明质酸纳米粒可促进胰岛素跨过 Caco-2 细胞单层膜,且对糖尿病大鼠的口服降糖作用优于胰岛素溶液。

#### 参考文献:

- [1] Russell-Jones GJ, Arthur L, Walker H. Vitamin B12-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 cells [J]. *Int J Pharm*, 1999, 179(2): 247-255.
- [2] Chalasani KB, Russell-Jones GJ, Jain AK, et al. Effective oral delivery of insulin in animal models using vitamin B12-coated dextran nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2007, 122(2): 141-150.
- [3] Petrus KA, Fairchild TJ, Doyle RP. Traveling the vitamin B12 pathway: oral delivery of protein and peptide drugs [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48(6): 1022-1028.
- [4] Farquharson J, Adams JF. The forms of vitamin B-12 in foods [J]. *Br J Nutr*, 1976, 36(1): 127-136.
- [5] Damgé C, Maincent P, Ubrich N. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats [J]. *J Control Release*, 2007, 117(2): 163-170.
- [6] Zhang Y, Wei W, Lv P, et al. Preparation and evaluation of alginate-chitosan microspheres for oral delivery of insulin [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 77(1): 11-19.
- [7] Ramesan RM, Sharma CP. Challenges and advances in nanoparticle-based oral insulin delivery [J]. *Expert Rev Med Devices*, 2009, 6(6): 665-676.
- [8] Chalasani KB, Russell-Jones GJ, Yandrapu SK, et al. A novel vitamin B12-nanosphere conjugate carrier system for peroral delivery of insulin [J]. *J Control Release*, 2007, 117(3): 421-429.
- [9] Bodnár M, Daróczy L, Batta G, et al. Preparation and characterization of cross-linked hyaluronan nanoparticles [J]. *Colloid Polym Sci*, 2009, 287(8): 991-1000.

(编辑 孙慧兰)