

# Man-PEI<sub>25k</sub> 纳米复合物在微针作用下的透皮性能研究<sup>△</sup>

许娇娇<sup>1,2\*</sup>, 杨云旭<sup>1</sup>, 徐蓓华<sup>1</sup>, 胡 英<sup>1#</sup>(1.浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100; 2.温州医科大学药学院, 浙江 温州 325000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)22-3062-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.22.12

**摘要** 目的:研究高分子质量聚乙烯亚胺(PEI<sub>25k</sub>)的甘露糖衍生物(Man-PEI<sub>25k</sub>)的纳米复合物在微针作用下的透皮性能。方法:以荧光染料水溶性羧基 CdSe/ZnS 量子点(QD)为模型药物,与 PEI<sub>25k</sub>、Man-PEI<sub>25k</sub> 溶液通过静电吸附形成 PEI<sub>25k</sub>/QD 和不同嫁接率(1:3、1:6)的 Man-PEI<sub>25k</sub>/QD 纳米复合物,同时以游离的 QD 作为对照,通过共聚焦显微镜观察微针作用下 QD 在皮肤活性表皮层和真皮层中的分布情况;用荧光分光光度计测定微针作用下 PEI<sub>25k</sub>/QD 和 Man-PEI<sub>25k</sub>/QD 纳米复合物在皮肤活性表皮层和真皮层中 QD 的累积滞留量。结果:微针作用于在体皮肤,Man-PEI<sub>25k</sub>/QD 纳米复合物在活性表皮层和真皮层的量明显高于 PEI<sub>25k</sub>/QD 纳米复合物;Man-PEI<sub>25k</sub>/QD (1:6) 纳米复合物在活性表皮层和真皮层的量明显高于 Man-PEI<sub>25k</sub>/QD (1:3) 纳米复合物。体外透皮试验显示,微针能明显提高纳米复合物在活性表皮层和真皮层中的滞留量;微针作用 48 h 后,Man-PEI<sub>25k</sub>/QD 纳米复合物在活性表皮层和真皮层的滞留量约比 PEI<sub>25k</sub>/QD 增加了 2、1.5 倍,二者差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论:微针可提高 Man-PEI<sub>25k</sub>/QD 纳米复合物在活性表皮层的透皮性能。

**关键词** 高分子质量聚乙烯亚胺的甘露糖衍生物;纳米复合物;微针;透皮给药;水溶性羧基 CdSe/ZnS 量子点

## Study on the Percutaneous Properties of Man-PEI<sub>25k</sub> Nanocomplex under the Treatment of Microneedles

XU Jiaojiao<sup>1, 2</sup>, YANG Yunxu<sup>1</sup>, XU Beihua<sup>1</sup>, HU Ying<sup>1</sup> (1.Zhejiang Pharmaceutical College, Zhejiang Ningbo 315100, China; 2.School of Pharmacy, Wenzhou Medical University, Zhejiang Wenzhou 325000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the percutaneous properties of Man-PEI<sub>25k</sub> nanocomplex under the treatment of microneedles. METHODS: Using fluorescent dye water-soluble carboxyl CdSe/ZnS quantum dot (QD) as model drug, Man-PEI<sub>25k</sub>/QD and Man-PEI<sub>25k</sub>/QD nanocomplex with different grafting rates (1:3, 1:6) were formed through electrostatic adherence with PEI<sub>25k</sub> and Man-PEI<sub>25k</sub>. The distribution of QD in the active epidermal layer and dermis of skin were observed by confocal microscopy after the treatment of microneedles, using free QD as control. The accumulative retention amounts of QD in the active epidermal layer and dermis of skin were determined by fluorescence spectrophotometer after PEI<sub>25k</sub>/QD and Man-PEI<sub>25k</sub>/QD nanocomplex treated with microneedles. RESULTS: The amounts of Man-PEI<sub>25k</sub>/QD nanocomplex in active epidermal layer and dermis were significantly higher than that of PEI<sub>25k</sub>/QD nanocomplex under the treatment of microneedles *in vivo*; the amounts of Man-PEI<sub>25k</sub>/QD (1:6) nanocomplex in active epidermal layer and dermis of skin were significantly higher than that of Man-PEI<sub>25k</sub>/QD (1:3) nanocomplex. In *in vitro* transdermal diffusion experiments, microneedles could increase the retention amounts of nanocomplex in active epidermal layer and dermis of skin significantly. The retention amounts of Man-PEI<sub>25k</sub>/QD nanocomplex in active epidermal layer were increased by 2 times of that of PEI<sub>25k</sub>/QD under the treatment of microneedles after 48 h; at the same time, in the dermis that was increased by 1.5 times, with statistical significance ( $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: Microneedles can improve the percutaneous properties of Man-PEI<sub>25k</sub> nanocomplex in active epidermal layer.

**KEYWORDS** Man-PEI<sub>25k</sub>; Nanocomplex; Microneedles; Transdermal drug delivery; Water-soluble carboxyl CdSe/ZnS quantum dot

经皮免疫作为一种新型免疫治疗手段被广泛关注。人体皮肤角质层下的活性表皮层中存在着一大类树突状细胞(DCs)——郎格汉斯细胞(LCs)。当抗原被这类细胞捕捉,刺激 DCs 并使其成熟,并可使 DCs 离开皮肤活性表皮向局部淋巴结游走,产生很强的免疫效应,因此活性表皮层被认为是疫苗接种的最佳部位<sup>[1]</sup>。理想的免疫策略是选择适宜的免疫措施和给药系统,刺激 DCs 成熟,提高 DCs 对抗原的摄取、表达

和递呈,从而提高疫苗的免疫效应。

由于 DCs 为未分化细胞,其转染效率是影响免疫递呈的重要原因,已知 DCs 细胞膜表面分布 3 种受体:Fc 受体、甘露糖(Mannose, Man)受体(MMR)、DEC-205 受体<sup>[2]</sup>。通过药剂学和化学合成手段,可在载体材料分子上引入 MMR,通过 MMR 的介导,可将 DNA 疫苗纳米粒直接导向于 DCs,以增加 DCs 对 DNA 疫苗的细胞摄取<sup>[3-5]</sup>。

聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, PEI)是近期研究最为广泛的阳离子聚合物材料,因其较强的 DNA 结合和细胞转染能力,被公认为非病毒基因载体的一个“黄金对照准则”<sup>[6-9]</sup>。根据目前的研究报道,PEI 的转染效率很大程度上依赖于其分子量,当分子量高于 25 kDa(即 PEI<sub>25k</sub>)时,表现出很高的转染能力,但毒性也随之增大,因其比较高的细胞毒性及在体内无特

△ 基金项目:浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目(No. 2013R433003);宁波市第二批科技项目(No.2015C110027);宁波市科技创新团队项目

\* 硕士研究生。研究方向:药物新剂型、新技术。电话:0574-88222707。E-mail: 1037979619@qq.com

# 通信作者:教授。研究方向:药物新剂型、新技术。电话:0574-88222707。E-mail: pharmhawk@126.com

异性转染,使其应用受到限制<sup>[10-11]</sup>。为了降低高分子质量PEI的细胞毒性,同时提高靶向性,笔者根据DCs膜表面的MMR,利用PEI单体上的活泼氨基,通过还原胺化反应,在分子中引入Man基团。由于PEI结构中的部分氨基被Man基取代,从而降低了PEI的正电性,提高了其对DCs的靶向性。本研究是采用甘露吡喃异硫氰酸苯酯(MPITC)修饰PEI<sub>25k</sub>,得到PEI<sub>25k</sub>的Man衍生物Man-PEI<sub>25k</sub><sup>[12]</sup>。

根据皮肤在免疫、生理和生物等方面的特性,以皮肤作为DNA疫苗接种部位有其独特的优势<sup>[13-14]</sup>,而DNA疫苗经皮免疫最大的阻力来源于皮肤外层的角质层。微针阵列(Microneedles)技术是一种新兴的物理经皮促透方法,具有精确、高效、无痛、便利等优势,是替代传统经皮给药系统的一种有效的治疗方式<sup>[15-16]</sup>。其作用后可在角质层产生微米级的空洞,从而形成能使微粒穿透到达活性表皮层的药物通道<sup>[17]</sup>。本文主要是考察Man-PEI<sub>25k</sub>纳米复合物在微针作用下的透皮性能。

## 1 材料

### 1.1 仪器

FV-1000 共聚焦荧光显微镜(澳大利亚 Olympus 公司); RF-5301 荧光分光光度计(日本岛津公司);光学显微镜(日本 Olympus 公司);TK-6H 透皮测试仪(上海凯偕科技贸易有限公司);TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);TOTA-580 III 显微镜成像系统(上海上光新光学有限公司);电动微针(韩国 Ugoigo 公司,可调的针刺深度:0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mm,进针速度最高可达:1 000 r/min)。

### 1.2 药品与试剂

PEI<sub>25k</sub>(美国 Sigma 公司,CAS:9002-98-6);Man-PEI<sub>25k</sub> 纳米复合物(笔者按文献<sup>[12]</sup>方法自制得到);水溶性羧基 CdSe/ZnS 量子点(QD,北京中科物源生物技术有限公司,发射波长:535 nm);苏木素-伊红(HE)染色剂、磷酸盐缓冲液(PBS)购自碧云天生物技术有限公司;包埋剂 O.C.T.(美国 Sakura 公司)。

### 1.3 动物

BALB/c 小鼠,体质量 18~22 g,♂,上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,合格证号:2008001652799;SD 大鼠,体质量 200 g 左右,♂,浙江省医学科学院动物中心提供,合格证号:2008001654050。

## 2 方法

### 2.1 鼠皮的制备

取 SD 大鼠,乙醚麻醉处死,用电动剃毛刀除去腹部毛,剥去腹部皮肤,除去皮下脂肪组织及黏连物,生理盐水反复冲洗,铝箔包裹,置于-80℃下保存备用。临使用前浸入生理盐水,自然融化,并仔细检查鼠皮的完整性。

### 2.2 微针阵列皮肤刺入实验

为了说明微针阵列对经皮免疫的有效性和安全性,笔者考察不同规格(微针长度:0.25、0.5、1.0 mm)的微针阵列作用皮肤后所形成的微孔及皮肤自我愈合情况。用微针阵列处理 6 只 SD 大鼠腹部皮肤(2 cm×2 cm)2 min,立即颈椎脱臼处死,其中 3 只取皮,除去皮下脂肪组织黏连物,包埋于冰冻包埋剂 O.C.T.中,-80℃下冰冻过夜;于皮肤纵行面切片,厚度 7 μm,HE 染色,PBS 漂洗多次,磷酸-甘油封片,在光学显微镜下观察皮肤穿刺情况,并用显微成像系统拍照记录。另将上述微针处理过的其余 3 只 SD 大鼠继续正常饲养,分别于 24、72 h 后,颈椎脱臼处死,取皮,冰冻切片,染色,于光学显微镜下观察皮肤愈合情况。

### 2.3 微针作用下 Man-PEI<sub>25k</sub> 纳米复合物在皮肤中的分布考察

实验前 24 h 先剪去 BALB/c 小鼠腹部的毛,形成 1 cm×1 cm 的无毛区域。以荧光染料 QD(带负电荷)为模型药物,与 PEI<sub>25k</sub>、Man-PEI<sub>25k</sub> 纳米复合物溶液通过静电吸附形成 PEI<sub>25k</sub>/QD 和不同嫁接率(1:3、1:6)的 Man-PEI<sub>25k</sub>/QD 纳米复合物<sup>[12]</sup>,同时以游离的 QD 作为对照,在小鼠去毛的腹部皮肤上用微针阵列作用 2 min。取上述纳米复合物溶液,固定 QD 含量,涂布于微针作用区域,3 h 后,用 PBS 清洗去除残留在皮肤上的药物,颈椎脱臼处死,取皮,除去皮下脂肪组织及黏连物。一部分皮肤样本浸入 O.C.T.液中包埋,-80℃下冰冻过夜,冰冻切片,每片包括表皮、真皮和皮肤附属器(包括毛囊、汗腺、皮脂腺等),将切片直接置于共聚焦显微镜下中观察荧光分布,并拍照记录。另一部分皮肤样本置于载玻片上,在共聚焦显微镜下观察纳米复合物在皮肤中的分布,以皮肤角质层为扫描的起始点,沿垂直于皮肤角质层的 Z 轴,进行逐层皮肤扫描,每隔 6.66 μm 扫描一次,激发波长为 488 nm。同时以空白皮肤为对照,观察皮肤自体荧光强度。

### 2.4 体外透皮试验

2.4.1 接收液中 QD 含量的测定 将微针阵列处理后的 SD 大鼠腹部皮肤固定在 Franz 扩散池上(有效面积 0.5 cm<sup>2</sup>),角质层面向供应室。各取含相同量 QD 的 PEI<sub>25k</sub>/QD 和 Man-PEI<sub>25k</sub>/QD 纳米复合物约 500 μl 置于供应室中(分别平行 3 组),封口,防止液体蒸发;接收室中注入已超声除气并预热至 37℃的 PBS(100 mmol/L,pH 7.4);将扩散池放置于 37℃恒温水浴循环中持续搅拌,搅拌速度为 350 r/min。在设定的时间点(3、6、12、24、48 h),从接收室中取样 1 ml,立刻补充等量新鲜接收液。样品经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,用荧光分光光度法测定不同时间点接收液中 QD 的含量,激发波长为 488 nm,发射波长为 530 nm。

2.4.2 皮肤中 QD 滞留量的测定 共聚焦显微镜实验初步证实了 Man-PEI<sub>25k</sub> 阳离子聚合物材料对皮肤有靶向性。为了更加凸显其在皮肤各层的靶向性分布,笔者分离活性表皮层和真皮层,荧光定量分析了 QD 的滞留量。在“2.4.1”项下各设定时间点,将皮肤从扩散池中卸下,置于 50℃左右的铁板上 5 min,用镊子小心分离皮肤的活性表皮层和真皮层,分别剪碎剥离,并置于离心管中,加入 10 ml 萃取混合液[生理盐水-异丙醇(9:1)],超声 45 min,以离心半径 8.5 cm、12 000 r/min 离心 20 min,取上清液,重复上述步骤,将 2 次上清液合并作为待测样品。稀释到适当浓度后,用荧光分光光度计测量其荧光值,代入标准曲线方程计算 PEI<sub>25k</sub>/QD 和 Man-PEI<sub>25k</sub>/QD 纳米复合物在皮肤活性表皮层和真皮层中 QD 的滞留量(μmol/cm<sup>2</sup>)。

### 2.5 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 统计学软件分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。通过 *t* 检验对处理组与对照组的实验数据进行差异分析。*P*<0.05 时认为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 微针阵列的皮肤刺入情况

不同长度微针作用于皮肤后 HE 染色图见图 1。

由图 1 可知,微针处理后,刺破了活体大鼠皮肤的角质层,并在皮肤表面形成了与针体形状尺寸相似的微通道,这可用于传输药物。本实验采用电动微针,垂直角度进针,可大大减轻创伤,微针处理后再正常饲养大鼠 72 h 后皮肤基本恢复正常,特别是 0.25 mm 微针处理的皮肤愈合情况比较理想。故本研究以下实验都采用 0.25 mm 微针给药。0.25 mm 微针作用 24、72 h 后皮肤的 HE 染色图见图 2(其他图略)。

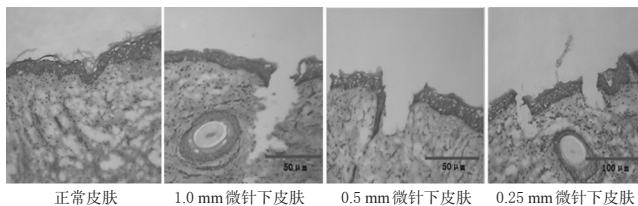


图1 不同长度微针作用于皮肤后HE染色图

Fig 1 HE staining of skin after pierced by microneedles with different lengths

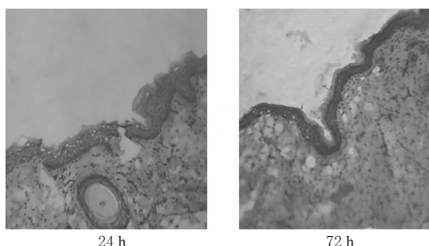


图2 0.25 mm微针作用24、72 h后皮肤的HE染色图

Fig 2 HE staining of skin after pierced by 0.25 mm microneedle for 24, 72 h

### 3.2 微针递送的纳米复合物在皮肤中的分布

不同条件下皮肤切片中QD分布的共聚焦显微镜图见图3。

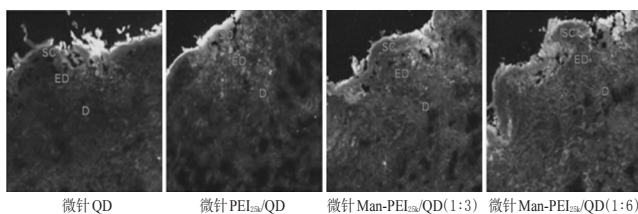


图3 不同条件下皮肤切片中QD分布的共聚焦显微镜图

Fig 3 Distribution of QD in skin section under different conditions observed by confocal microscopy

由图3可知,微针递送Man-PEI<sub>25k</sub>纳米复合物后活性表皮层和真皮层中荧光强度明显高于PEI<sub>25k</sub>纳米复合物,这说明Man-PEI<sub>25k</sub>能将药物靶向传递于皮肤中甘露糖受体高表达的LCs所在的活性表皮层和真皮层。此外,Man-PEI<sub>25k</sub>(1:6)介导的QD在活性表皮层和真皮层的荧光强度明显高于Man-PEI<sub>25k</sub>(1:3),这说明Man配体在PEI<sub>25k</sub>分子中的嫁接率会影响载体材料介导的效率,Man在整个载体材料中比例不宜过大,这部分将进行后续研究。

以Z轴扫描观察不同条件下皮肤内QD的共聚焦扫描电镜图见图4。

由图4空白皮肤的逐层扫描情况可知,其在488 nm激发光下几乎没有自发荧光,说明皮肤本身对实验的观察无干扰。微针作用下Man-PEI<sub>25k</sub>/QD(1:6)在皮下可达到66.6 μm,而微针作用下PEI<sub>25k</sub>/QD和QD只达到皮下39.96 μm。

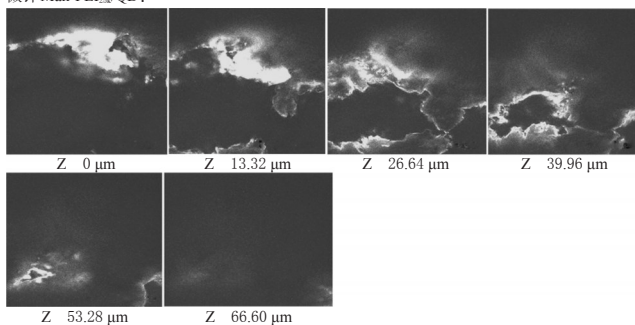
### 3.3 体外透皮试验

3.3.1 量子点QD的标准曲线 以QD溶液的荧光值(y)为纵坐标、QD溶液的浓度(x)为横坐标,得到标准曲线方程为 $y=13\ 183x-1.845\ 3(r^2=0.999\ 7)$ 。结果表明,QD在0.001~0.018 μmol/L浓度范围内线性关系良好。

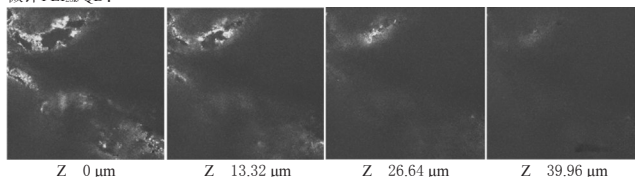
3.3.2 接收液中QD的含量 结果发现,体外透皮48 h后,在接收液中没有检测到纳米粒。曾有人研究表明经毛囊递送纳

米粒,也未能在接收液中检测到纳米粒<sup>[11]</sup>。

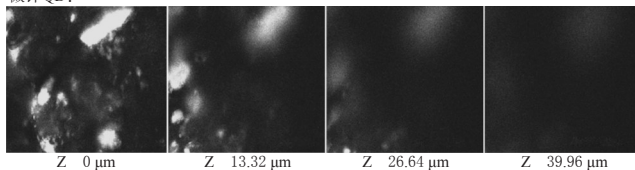
微针Man-PEI<sub>25k</sub>/QD:



微针PEI<sub>25k</sub>/QD:



微针QD:



空白皮肤:

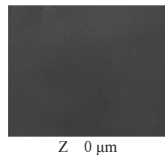


图4 以Z轴扫描观察不同条件下皮肤内QD的共聚焦扫描电镜图

Fig 4 Confocal SEM micrograph of QD in skin under different conditions observed by Z-axis scanning

3.3.3 皮肤中的QD滞留量 随着纳米复合物与皮肤作用时间的延长,纳米复合物渗透进入皮肤内的量也随之增加;在不同设定时间点,微针作用下在活性表皮层和真皮层中的QD滞留量均明显高于不用微针的情况( $P<0.01$ )。微针作用后48 h,Man-PEI<sub>25k</sub>/QD纳米复合物在活性表皮层的滞留量约比PEI<sub>25k</sub>/QD增加2倍,真皮层的滞留量增加1.5倍。Man-PEI<sub>25k</sub>/QD纳米复合物在活性表皮层的滞留量明显高于在真皮层中的量( $P<0.01$ )。该结果与荧光定性实验结果符合,说明微针作用能将Man-PEI<sub>25k</sub>/QD纳米复合物靶向作用于活性表皮层。PEI<sub>25k</sub>/QD、Man-PEI<sub>25k</sub>/QD纳米复合物在活性表皮层和真皮层中的累积滞留量见图5。

## 4 讨论

以微针作用于鼠的离体或在体皮肤,Man-PEI<sub>25k</sub>/QD纳米复合物在皮肤活性表皮层的量明显大于PEI<sub>25k</sub>纳米复合物,并且不同嫁接率的Man-PEI<sub>25k</sub>介导QD在活性表皮层的量存在明显差异。在体外透皮扩散实验中发现,微针作用下,在预定时间内,纳米复合物无法透过皮肤层进入接收池中;且发现体外扩散后,Man-PEI<sub>25k</sub>/QD纳米复合物在皮肤活性表皮层的量明显大于PEI<sub>25k</sub>/QD纳米复合物。微针作用后48 h,Man-PEI<sub>25k</sub>/QD组表皮层滞留量约比PEI<sub>25k</sub>/QD增加2倍,真皮层滞留量增加1.5倍。这说明微针可提高Man-PEI<sub>25k</sub>/QD纳米复合物在活

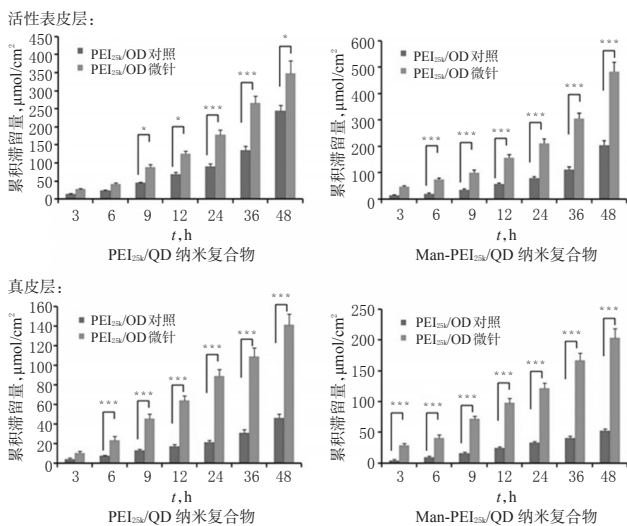


图5 PEI<sub>25k</sub>/QD、Man-PEI<sub>25k</sub>/QD 纳米复合物在活性表皮层和真皮层中的累积滞留量

注: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$

Fig 5 Accumulative retention amount of PEI<sub>25k</sub>/QD and Man-PEI<sub>25k</sub>/QD nanocomplexes in active epidermal layer and dermis

Note: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$

性表皮层的透皮性能,为进一步研究经皮免疫给药奠定了基础。

经皮免疫将皮肤作为免疫系统,其主要针对分布在皮肤活性表皮层和真皮层的专职抗原呈递细胞。微针属于微创性的传递系统,精准地调节微针刺入长度,使其不触及痛觉神经几乎可以实现无痛。利用受体配体特异性结合的特性修饰载体,其载药后能更加高效地传递抗原至抗原呈递细胞,进而引发系列强大的免疫应答。因此,靶向性微针经皮免疫,是一种将皮肤渗透性、抗原的免疫刺激性和树突细胞的抗原呈递的高度靶向性相结合的治疗新策略,其能极大地提高免疫自主性,具有着广阔的实际应用前景。

## 参考文献

[1] Mikszta JA, Alarcon JB, Brittingham JM, *et al.* Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery [J]. *Nat Med*, 2002, 8(4): 415.

[2] Joshi MD, Unger WJ, Storm G, *et al.* Targeting tumor antigens to dendritic cells using particulate carriers[J]. *J Control Release*, 2012, 161(1): 25.

[3] Hattori Y, Kawakami S, Suzuki S, *et al.* Enhancement of immune responses by DNA vaccination through targeted gene delivery using mannosylated cationic liposome formulations following intravenous administration in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317(4): 992.

[4] Layek B, Lipp L, Singh J. APC targeted micelle for enhanced intradermal delivery of hepatitis B DNA vaccine

[J]. *J Control Release*, 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.04.014.

[5] Li A, Qin L, Wang W, *et al.* The use of layered double hydroxides as DNA vaccine delivery vector for enhancement of anti-melanoma immune response[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(2): 469.

[6] Hobel S, Aigner A. Polyethylenimine (PEI)/siRNA-mediated gene knockdown in vitro and in vivo[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, doi: 10.1007/978-1-60761-588-0\_18.

[7] Swami A, Kurupati RK, Pathak A, *et al.* A unique and highly efficient non-viral DNA/siRNA delivery system based on PEI-bisepoxide nanoparticles[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(4): 835.

[8] 卢韵,姚静,周建平,等. 聚乙烯亚胺-DNA复合物的形成和聚集行为研究[J]. *药学学报*, 2009, 44(6): 667.

[9] 尹东锋,游庆霞,刘璟,等. 聚乙烯亚胺的修饰及其作为基因载体的研究[J]. *中国药房*, 2009, 20(34): 2 673.

[10] Kunath K, Merdan T, Hegener O, *et al.* Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer [J]. *J Gene Med*, 2003, 5(7): 588.

[11] Park K. PEI-DNA complexes with higher transfection efficiency and lower cytotoxicity[J]. *J Control Release*, 2009, 140(1): 1.

[12] Hu Y, Xu BH, Xu JJ, *et al.* Synthesis of mannosylated polyethylenimine and its potential application as cell-targeting non-viral vector for gene therapy[J]. *Polymers*, 2014, 6(10): 2 573.

[13] Kaurav M, Minz S, Sahu K, *et al.* Nanoparticulate mediated transcutaneous immunization: myth or reality[J]. *Nanomedicine*, 2016, 12(4): 1 063.

[14] Bal SM, Ding Z, van Riet E, *et al.* Advances in transcutaneous vaccine delivery: do all ways lead to Rome? [J]. *J Control Release*, 2010, 148(3): 266.

[15] Li N, Peng LH, Chen X, *et al.* Transcutaneous vaccines: novel advances in technology and delivery for overcoming the barriers[J]. *Vaccine*, 2011, 29(37): 6 179.

[16] Ita K. Transdermal delivery of drugs with microneedles: strategies and outcomes[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2015, doi: 10.1016/j.jddst.2015.05.001.

[17] Coulman S, Barrow D, Anstey A, *et al.* Minimally invasive cutaneous delivery of macromolecules and plasmid DNA via microneedles[J]. *Current Drug Delivery*, 2006, 3(1): 65.

(收稿日期:2015-12-05 修回日期:2016-03-17)

(编辑:邹丽娟)