

人胃癌细胞 HGC-27 对 PEG 化聚乳酸羟基乙酸纳米粒的摄取

秦利芳¹ 林东海^{1*} 李刚² 王俊腾¹ 闻真¹ 郭桂萍¹(烟台大学¹药学院;²生命科学学院,烟台 264005)

摘要 制备黏惰性纳米粒(mPEG-PLGA-NPs)以克服人胃癌 HGC-27 细胞周围黏液的黏附,研究 mPEG-PLGA-NPs 理化性质对纳米粒穿透黏液被 HGC-27 细胞摄取的影响。体外黏蛋白黏附实验证明,mPEG-PLGA-NPs 具有良好的黏惰性;激光共聚焦显微镜及 HPLC 法考察 HGC-27 细胞对不同理化性质 mPEG-PLGA-NPs 的摄取。结果显示:HGC-27 细胞对纳米粒的摄取与孵育时间(0~4 h)成依赖关系。同一孵育时间内,HGC-27 细胞对纳米粒的摄取随着 mPEG 相对分子质量和修饰密度的增加而增加,10%PEG₂₀₀₀-PLGA-NPs 的摄取量是 PLGA-NPs 的 1.7~2.0 倍,是荷正电荷 CS-PLGA-NPs 的摄取量的 1.8~2.4 倍,粒径 400 nm 的纳米粒的摄取量仅为粒径 120 nm 的 55.9%~70.3%。结果表明,亲水性且表面电荷接近中性、大小适宜的 mPEG-PLGA-NPs 对黏蛋白具有一定的黏惰性,能够快速穿透 HGC-27 细胞周围黏液被细胞摄取。mPEG-PLGA-NPs 有望成为一种新型的载药系统用于胃黏液癌的治疗。

关键词 黏惰性纳米粒;单甲氧基聚乙二醇;黏液;HGC-27 细胞;细胞摄取

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2013)05-0410-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130505

Uptake of mPEG-PLGA nanoparticles by human gastric cancer HGC-27 cell

QIN Lifang¹, LIN Donghai^{1*}, LI Gang², WANG Junteng¹, WEN Zhen¹, GUO Guiping¹¹School of Pharmacy; ²School of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China

Abstract Muco-inert nanoparticles (mPEG-PLGA-NPs) was prepared to overcome the adhesion of mucus in this study and the cellular uptake of nanoparticles with different physio-chemical properties by human gastric cancer HGC-27 cells was investigated. The muco-inert activity of nanoparticles was evaluated by pig gastric mucin (PM) binding experiments. Cellular uptake of nanoparticles in HGC-27 cells was analyzed by confocal laser scanning microscope and HPLC. The results indicated that mPEG-PLGA-NPs had good mucin-inert activity. The mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs could be rapidly uptaken by HGC-27 cells. The cellular uptake of 10% mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs was 1.7-2.0 folds higher than PLGA-NPs and 1.8-2.4 folds higher than CS-PLGA-NPs during the same incubation time. The intake of diameter nanoparticles with 400 nm was only 55.9%-70.3% of those with 120 nm. mPEG-PLGA-NPs possess hydrophilic and near neutrally-charged surfaces that minimize mucoadhesion. mPEG-PLGA-NPs can quickly penetrate the mucus surrounding HGC-27 cells and be uptaken by cells. mPEG-PLGA-NPs are expected to be used for the treatment of mucinous carcinoma.

Key words muco-inert nanoparticles; mPEG; mucin; HGC-27 cells; cellular uptake

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30973949); and the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2009CM012)

胃黏液癌(mucinous gastric carcinoma, MGC)是胃癌中病死率较高、术后生存率很低的一种恶性肿瘤。胃黏液癌以分泌大量黏液为基本特征,具有侵袭性强、进展快和预后差的特点^[1-3]。肿瘤细胞

外黏液主要由黏蛋白和水分组成,可通过黏附作用和空间阻碍限制药物或药物载体的摄入^[4],同时黏蛋白还导致组织自吸(tissue imbibition),有利于肿瘤细胞的扩散和转移^[5],因此增加了临床对胃

* 收稿日期 2013-01-12 * 通信作者 Tel:0535-6706022 E-mail:ldh@ytu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 30973949);山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2009CM012)

黏液癌的药物治难度。人胃癌细胞 HGC-27 来源于未分化胃黏液腺癌的转移淋巴结,能够分泌黏液素^[6],常被用于胃黏液癌的体外细胞研究^[7-9]。

近年来,逐渐出现了一些纳米微粒载体与黏液相互作用的研究报道。Lai 等^[10]将聚乙二醇(PEG)以共价键修饰于聚苯乙烯纳米粒表面,使得纳米粒能够在黏液凝胶网孔纤维之间的组织液中迅速扩散,并将该粒子称为黏液穿透粒子(mucus penetrating particles, MPPs)。研究表明, MPP 在新鲜的未稀释的女性宫颈黏液中的扩散速率是水中的 14%~20%,而未聚乙二醇修饰的聚苯乙烯纳米粒几乎完全被固定在宫颈黏液中。Suk 等^[11]报道了一种黏惰性粒子(muco-inert particles, MIPs),采用低分子量的 PEG 高密度包裹在 200 nm 的粒子表面,在未稀释的囊纤维化痰的平均扩散速率是同体积未被 PEG 包裹粒子的 90 倍。Primard 等^[12]的研究也表明,由疏水性聚合物聚乳酸制备的 300 nm 左右的纳米粒主要集中在结扎的小鼠肠段的非淋巴组织黏液层中。

本研究选用单甲氧基聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物(mPEG-PLGA)为载体材料,以香豆素-6(coumarin 6, C6)为荧光探针,研制对黏蛋白具有黏惰性,能够迅速穿透 HGC-27 细胞黏液被细胞摄取的纳米粒,为制备能够避免黏液黏附、传递抗肿瘤药物的微粒载体奠定实验基础。

1 材料

1.1 试剂

聚乳酸-羟基乙酸共聚物[PLGA, $M_r = 18$ kD, $m(\text{LA}) : m(\text{GA}) = 75 : 25$],单甲氧基聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物($x\text{mPEG}_y\text{-PLGA}$, x 代表 mPEG 修饰密度, y 代表 mPEG 相对分子质量)(山东济南岱罡生物科技有限公司);壳聚糖(脱乙酰

度 > 90.0%)、*N*-乙酰半胱氨酸(纯度大于 99%, TLC)、香豆素-6(C6, 美国 Sigma 有限公司); DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(美国 Gibco 有限公司);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Nicomp380 Z3000 纳米粒径与 Zeta 电位分析仪(苏州微流纳米生物技术有限公司); Micro21R 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司); FV1000 共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司); Synergy HT 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司); 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

1.3 细胞

人胃癌细胞(未分化) HGC-27 购自中国科学院上海细胞库。

2 方法与结果

2.1 纳米粒的制备

采用改良后的纳米沉淀法(nanoprecipitation method)^[13]和乳化溶剂挥发法(emulsion-solvent evaporation method)^[14]制备 PLGA-NPs、PEG 修饰的 PLGA-NPs、壳聚糖包裹的 PLGA 纳米粒(CS-PLGA-NPs)及 C6 荧光标记纳米粒。纳米粒样品经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后,冷冻高速离心,等体积纯化水重新悬浮沉淀纳米粒,重复洗涤 3 次后,分装于西林瓶中,冷冻干燥,得纳米粒冻干品,备用。

2.2 纳米粒的粒径、表面电位及 C6 荧光标记率测定

取适量的纳米粒,纯化水稀释,激光粒度仪测得 PLGA-NPs、mPEG-PLGA-NPs 和 CS-PLGA-NPs 粒径、Zeta 电位及葡聚糖凝胶柱离心法^[14]测定的 C6 荧光标记率如表 1 所示。

Table 1 Physicochemical properties and adhesive rate of nanoparticles (NP) to pig gastric mucin (PM) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Nanoparticles	Size/nm	Polydispersity	Zeta potential/mV	EE/%	Adhesive rate to PM/%
PLGA-NPs	133.25 \pm 2.48	0.124 \pm 0.011	-25.79 \pm 1.28	82.73	64.5 \pm 1.9
5% mPEG ₁₀₀₀ -PLGA-NPs	143.55 \pm 3.92	0.100 \pm 0.011	-15.37 \pm 1.36	85.56	13.2 \pm 0.4
10% mPEG ₁₀₀₀ -PLGA-NPs	139.75 \pm 3.07	0.089 \pm 0.004	-11.10 \pm 1.22	89.07	12.0 \pm 0.7
15% mPEG ₁₀₀₀ -PLGA-NPs	122.85 \pm 4.20	0.106 \pm 0.009	-5.76 \pm 1.73	86.09	11.2 \pm 0.3
5% mPEG ₂₀₀₀ -PLGA-NPs	138.85 \pm 3.90	0.136 \pm 0.012	-12.21 \pm 1.75	92.50	9.2 \pm 1.9
10% mPEG ₂₀₀₀ -PLGA-NPs	131.30 \pm 4.90	0.094 \pm 0.002	-8.02 \pm 1.11	90.95	7.5 \pm 1.4
15% mPEG ₂₀₀₀ -PLGA-NPs	131.45 \pm 5.07	0.083 \pm 0.033	-3.84 \pm 0.87	87.78	6.5 \pm 0.5
CS-PLGA-NPs	174.25 \pm 6.07	0.145 \pm 0.023	+22.82 \pm 3.73	81.19	51.2 \pm 3.7
10% mPEG ₂₀₀₀ -PLGA-NPs*	426.70 \pm 13.2	0.340 \pm 0.018	-11.63 \pm 1.23	88.02	20.5 \pm 2.4

PLGA: poly(lactic-co-glycolic acid); PEG: polyethyleneglycol; * Nanoparticles were prepared by emulsion-solvent evaporation method

纳米沉淀法和乳化溶剂挥发法制备的纳米粒的平均粒径分别为 100 ~ 150 nm 和 400 ~ 450 nm,分布均匀; Zeta 电位平稳,且随着 mPEG 相对分子质量和修饰密度的增加, Zeta 电位更趋近于电中性。壳聚糖包裹的纳米粒带正电荷; HPLC 法测定 C6 在 0.05 ~ 4.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,范围内线性关系良好,线性回归方程为 $A = 37.638c + 0.2200$, $r^2 = 0.9999$ 。葡聚糖凝胶柱法测得的荧光标记率均大于 80%, 荧光标记率良好。

2.3 纳米粒的扫描电镜观察

将 mPEG-PLGA-NPs 混悬液稀释,滴至铝片表面 40 $^{\circ}\text{C}$ 烘干,喷铂金后置 S-4800 冷场发射 SEM 观察纳米粒呈球形,粒径在 100 ~ 150 nm 左右,形态规整,表面光滑,分散性好。与激光粒度仪测定结果相近。

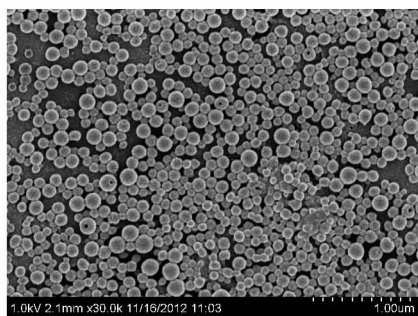


Figure 1 SEM images of 10% mPEG₂₀₀₀-PLGA nanoparticles

2.4 C6 标记纳米粒的体外渗漏实验

精密量取同批制备的 C6 标记的 PLGA-NPs、10% mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs、CS-PLGA-NPs 1 mL 于磷酸盐缓冲液中 (pH 7.4) 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡,于不同时间点取样,样品经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后,冷冻高速离心。取沉淀纳米粒经乙腈溶解提取 C6,离心取上清, HPLC 法测定各时间点时纳米粒混悬液中 C6 的含量,计算 24 h 内的泄漏百分率均低于 14%。摄取的 4 h 内泄漏百分率小于 5%,表明 C6 能够较稳定的包载于纳米粒中,不易泄漏,无突释现象,可作为荧光标记物准确地示踪纳米粒的细胞摄取行为。

2.5 纳米粒的体外黏蛋白黏附实验

采用体外黏蛋白结合法^[15]评价 PLGA-NPs 及 mPEG-PLGA-NPs 对黏蛋白的黏附性。表 1 结果显示: mPEG-PLGA-NPs 的黏附性比 PLGA-NPs 明显提高,并随着修饰的 mPEG 相对分子质量和密度的增加,10% mPEG₂₀₀₀ 和 15% mPEG₂₀₀₀ 修饰的纳米

粒的 PM 黏附率比 PLGA-NP 降低约 90%。

2.6 HGC-27 细胞培养与染色

HGC-27 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 双抗(青霉素和链霉素)的 DMEM 高糖的培养液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、相对湿度 90% 条件下培养。细胞长至 80% ~ 90% 后用含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化,按 1:3 比例传代。

取对数生长期的 HGC-27 细胞,胰酶消化后加培养液稀释,按每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于含圆形盖玻片(Lab-Tek[®])的 24 孔培养板,37 $^{\circ}\text{C}$ (5% CO_2) 培养 36 h。取出盖玻片后, PBS 洗涤 2 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,进行阿利新蓝-过碘酸雪夫氏染色(AB-PAS)和 Mager 胭脂红染色。采用 5 mmol/L 乙酰半胱氨酸洗涤细胞表面以除去黏蛋白,同法进行染色。图 2 细胞染色结果显示, HGC-27 细胞能够分泌黏液物质(主要为中性黏液),黏液染色后呈现紫色或红色。经乙酰半胱氨酸(5 mmol/L)孵育 30 min 后,细胞表面的大部分黏液物质被除去,细胞染色结果明显变淡。

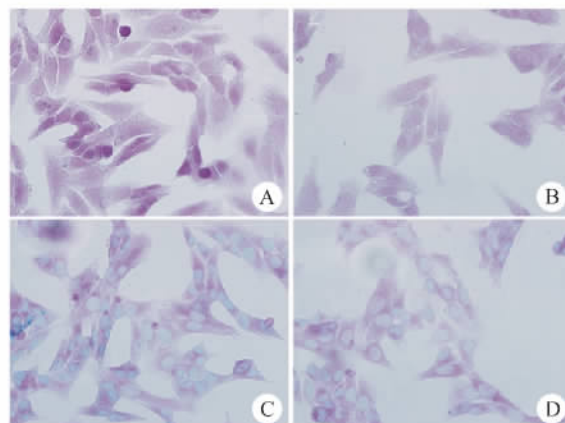


Figure 2 Photomicrographs of HGC-27 cells staining
A: Alcian blue-periodic acid Schiff (AB-PAS) staining; B: AB-PAS staining after acetylcysteine washed; C: Mager coccinellin staining; D: Mager coccinellin staining after acetylcysteine washed

2.7 纳米粒对细胞增殖的影响

采用四唑盐比色法(MTT assay)检测纳米粒对人胃癌细胞 HGC-27 增殖的影响。取对数生长期细胞,胰酶消化后加培养液稀释,按每孔 3×10^4 个细胞的密度接种 96 孔培养板,培养 24 h 后,分别加入不同的纳米粒混悬液(纳米粒的浓度为 0 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每组设 3 孔平行,实验重复 3 次。继续培养 24 h 后,每孔加入 MTT(10 mg/mL)溶液 10 μL ,孵育 4 h 后弃去上清液,每孔加入 DMSO

150 μL , 水平振荡 10 min 后, 用酶联检测仪在 490 nm 处测定吸收度, 计算细胞存活率。结果表明随着纳米粒浓度的增加细胞存活率有一定程度的降低。纳米粒的浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, HGC-27 细胞 24 h 的存活率大于 90%, 表明该浓度纳米粒在摄取时间内不影响细胞的活性, 因此确定摄取的纳米粒浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.8 HGC-27 细胞摄取纳米粒的研究

2.8.1 激光共聚焦分析 取对数生长期 HGC-27 细胞, 胰酶消化后加培养液稀释, 按每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于含圆形盖玻片 (Lab-Tek[®]) 的 24 孔培养板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养 36 h。

24 孔培养板中的细胞贴壁生长后, 分别加入 C6 标记的 PLGA-NPs、mPEG-PLGA-NPs 和 CS-PLGA-NPs 混悬液 (载体材料的量为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 相当于 C6 的量为 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 孵育不同时间后, 弃去含纳米粒的培养液, PBS 洗涤 2 次, 加入乙酰半胱氨酸 (5 mmol/L) 1 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 取出盖玻片, PBS 洗涤 2 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min 后, 取出晾干, 在激光共聚焦显微镜 (激发波长 488 nm, 发射波长 520 nm) 下观察 HGC-27 细胞对纳米粒的摄取情况。

2.8.2 HGC 细胞对纳米粒的定量摄取检测 取对数生长期 HGC-27 细胞, 胰酶消化后加培养液稀释, 按每孔 3×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔培养板, 37 $^{\circ}\text{C}$ (5% CO_2) 培养 36 h。

细胞贴壁生长后, 分别加入 C6 标记的 PLGA-NPs、mPEG-PLGA-NPs 和 CS-PLGA-NPs 混悬液 (载体材料的量为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 相当于 C6 的量为

0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 孵育一定时间后, 弃去含纳米粒的培养液, PBS 洗涤 2 次, 加入 1 mL 乙酰半胱氨酸 (5 mmol/L) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 胰酶消化收集细胞, 一部分进行细胞蛋白含量测定, 一部分裂解, HPLC 测定 C6 纳米粒的摄取量。HGC-27 细胞对纳米粒的摄取量 ($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{protein}$) = C6 摄取量 / 细胞蛋白量。

2.8.3 HGC-27 细胞对不同理化性质纳米粒的摄取结果

2.8.3.1 HGC-27 细胞对不同 mPEG 相对分子质量及修饰密度纳米粒的摄取 如图 3、图 4 所示, 经 mPEG 修饰后, 纳米粒更容易被 HGC-27 细胞摄取。而且随着 mPEG 修饰密度 (0% ~ 15%) 的增加, HGC-27 细胞摄取纳米粒的荧光强度逐渐增加。10% 和 15% mPEG 修饰的 mPEG-PLGA-NPs, 胞内的平均荧光强度显著高于 PLGA-NPs, HPLC 结果显示 15% mPEG₂₀₀₀ 修饰的 mPEG-PLGA-NPs 的摄取量是 PLGA-NPs 的 2.0 倍左右; 10% 和 15% PEG 修饰的 mPEG-PLGA-NPs 之间没有明显差异。同一密度修饰的 mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs 的摄取量是 10% mPEG₁₀₀₀-PLGA-NPs 摄取量的 1.3 倍左右。

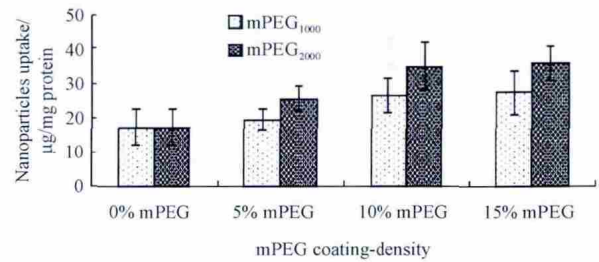


Figure 3 Nanoparticles uptake analyzed by HPLC

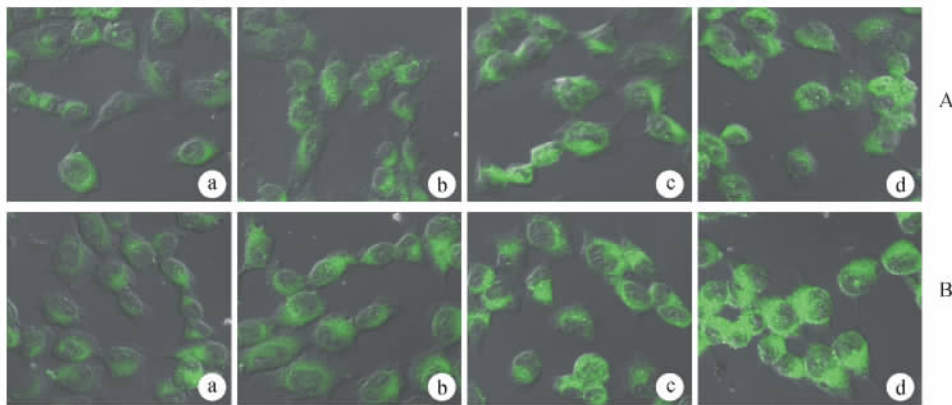


Figure 4 mPEG₁₀₀₀-PLGA-NPs (A) and mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs (B) uptake analyzed by confocal laser scanning microscope (CLSM) a: PLGA-NPs; b: 5% mPEG-PLGA-NPs; c: 10% mPEG-PLGA-NPs; d: 15% mPEG-PLGA-NPs

2.8.3.2 HGC-27 细胞对不同电荷纳米粒的摄取

图5-A是HGC-27细胞摄取不同电荷的纳米粒4h的实验结果。激光共聚焦照片显示,荷正电荷的CS-PLGA-NPs(Zeta电位为+22.8 mV)的荧光强度与荷负电荷的PLGA-NPs(Zeta电位为-11.1 mV)无显著性差异,HPLC检测结果表明:HGC-27细胞摄取PLGA-NPs的量是CS-PLGA-NPs的1.07~1.18倍($P > 0.05$)。10% mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs(Zeta电位为-8.0 mV)的荧光强度明显高于CS-PLGA-NPs和PLGA-NPs,HPLC检测结果表明:10% mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs的摄取量是CS-PLGA-NPs组的1.83~2.36倍,是PLGA-NPs组的1.71~2.0倍($P < 0.01$)。

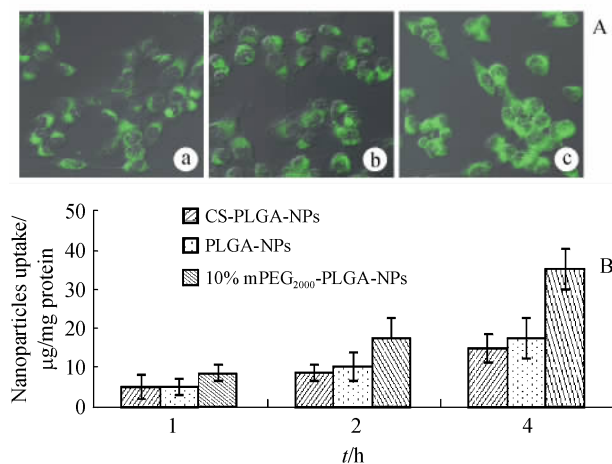


Figure 5 Uptake of the different electrical nanoparticles by HGC-27 cell analyzed by CLSM (A) and HPLC (B)
a: CS-PLGA-NPs (+22.8 mV); b: PLGA-NPs (-11.1 mV); c: 10% mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs (-8.0 mV)

2.8.3.3 HGC-27 细胞对不同粒径纳米粒的摄取

由激光共聚焦和HPLC检测结果显示:纳米粒的体积大小显著影响HGC-27细胞对其摄取情况。如图6所示,HGC-27细胞摄取120 nm左右的10%

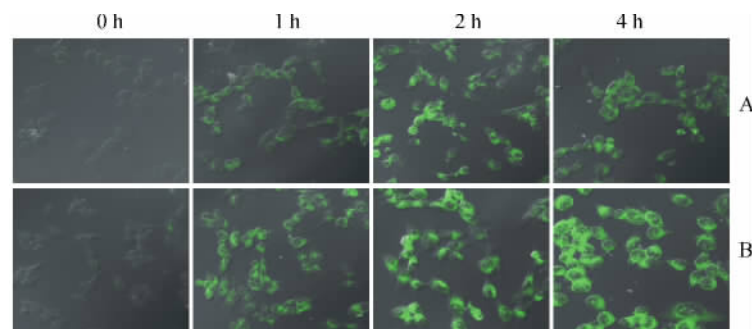


Figure 7 Uptake of PLGA-NPs (A) and 10% mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs (B) by HGC-27 cells in different time

mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs量是420 nm纳米粒的1.4~1.8倍。

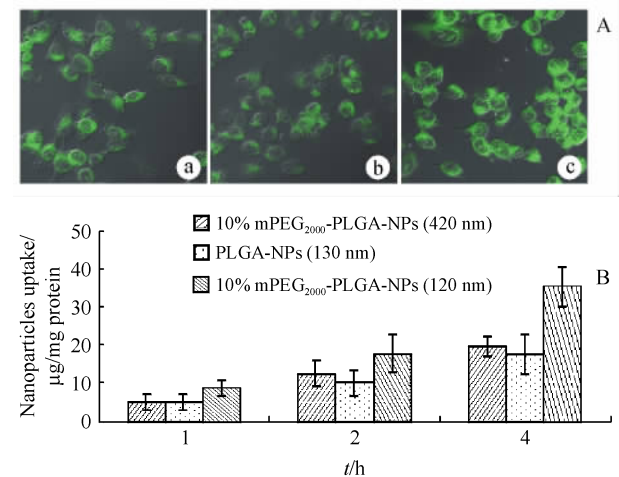


Figure 6 Uptake of the different size nanoparticles by HGC-27 cell analyzed by CLSM (A) and HPLC (B)
a: 10% mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs (420 nm); b: PLGA-NPs (130 nm); c: 10% mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs (120 nm)

2.8.3.4 HGC-27 细胞对纳米粒的摄取与孵育时间的关系

图7所示,HGC-27细胞对纳米粒的摄取程度与孵育时间成显著依赖关系,4h时,各组荧光粒子的强度基本达到饱和。激光共聚焦的照片显示,PLGA-NPs在1h时被HGC-27细胞摄取的荧光强度较弱,而10% mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs显示出较强的荧光,相同孵育时间,HGC-27细胞摄取10% mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs的荧光强度显著高于PLGA-NPs。HPLC测定结果证明PLGA-NPs在1h的摄取量仅为10% mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs摄取量的58.3%。相同孵育时间内,HGC-27细胞对10% mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs的摄取量是PLGA-NPs的1.7~2.1倍。以上结果表明,与PLGA-NPs比较,10% mPEG₂₀₀₀-PLGA-NPs更容易被HGC-27细胞摄取,而且速度更快。

3 讨论

HGC-27 细胞是能够分泌黏液的未分化胃癌细胞。通过 AB-PAS 染色和 Mager 胭脂红染色可以看出, HGC-27 细胞能够大量分泌黏液, 且主要以中性黏液为主, 黏液紧紧黏附于细胞表面。

mPEG 化改变了纳米粒的表面化学性质, 如亲水性和电中性^[16], 使得纳米粒不易被黏液中的黏蛋白黏附, 能够快速穿透黏液, 到达细胞表面被细胞摄取。而壳聚糖是自然界中具有正电性的生物黏附材料, 其分子结构中大量存在的氨基易与 HGC-27 细胞周围黏液发生黏附作用, 使得 CS-PLGA-NPs 在细胞黏液中黏附的较多, 而细胞摄取量较少。PLGA-NPs 主要因其疏水性而与黏液发生多重低亲和力的黏附作用, 在细胞黏液中黏附也较多。

mPEG 是不带电荷的亲水性线形高分子聚合物, 其相对分子质量和修饰密度是影响纳米粒亲水性及荷电性的主要因素^[16], 因此也是影响纳米粒穿透黏液被细胞摄取的主要因素。纳米粒的体积也是影响其穿过黏液网孔, 被细胞摄取的主要因素。

参考文献

- [1] Kawamura H, Kondo Y, Osawa S *et al.* A clinicopathologic study of mucinous adenocarcinoma of the stomach [J]. *Gastric Cancer*, 2001, **4**(2): 83-86.
- [2] Choi JS, Kim MA, Lee HE *et al.* Mucinous gastric carcinomas: clinicopathologic and molecular analyses [J]. *Cancer*, 2009, **115**(15): 3581-3590.
- [3] Hamilton SR, Aaltonen LA *eds.* *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumours of the Digestive System* [M]. Lyon, France: IARC Press, 2000: 37-66.
- [4] Cone RA. Barrier properties of mucus [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, **61**(2): 75-85.
- [5] Perez RO, Bresciani BH, Bresciani C *et al.* Mucinous colorectal adenocarcinoma: influence of mucin expression (Muc1, 2 and 5) on clinicopathological features and prognosis [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2008, **23**(8): 757-765.
- [6] Akagi T, Kimoto T. Human cell line (HGC-27) derived from the metastatic lymph node of gastric cancer [J]. *Acta Med Okayama*, 1976, **30**(3): 215-219.
- [7] Linsalata M, Cavallini A, Messa C *et al.* Lactobacillus rhamnosus GG influences polyamine metabolism in HGC-27 gastric cancer cell line: a strategy toward nutritional approach to chemoprevention of gastric cancer [J]. *Curr Pharm Des*, 2010, **16**(7): 847-853.
- [8] Cui J, Zhang G, Hao C *et al.* The expression of TIPE1 in murine tissues and human cell lines [J]. *Mol Immunol*, 2011, **48**(12/13): 1548-1555.
- [9] Tamura G, Sakata K, Nishizuka S *et al.* Inactivation of the E-cadherin gene in primary gastric carcinomas and gastric carcinoma cell lines [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1996, **87**(11): 1153-1159.
- [10] Lai SK, O'Hanlon DE, Harrold S *et al.* Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(5): 1482-1487.
- [11] Suk JS, Lai SK, Wang YY *et al.* The penetration of fresh undiluted sputum expectorated by cystic fibrosis patients by non-adhesive polymer nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2009, **30**(13): 2591-2597.
- [12] Primard C, Rochereau N, Luciani E *et al.* Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells [J]. *Biomaterials*, 2010, **31**(23): 6060-6068.
- [13] Zhang Q, Wang XQ, Zhang T *et al.* Study on preparation conditions for polylactide nanoparticles loaded cyclosporine A and its oral bioavailability in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2004, **39**(1): 68-71.
- [14] Sorensen EN, Weisman G, Vidaver GA. A Sephadex column procedure for measuring uptake and loss of low molecular weight solutes from small, lipid-rich vesicles [J]. *Anal Biochem*, 1977, **82**(2): 376-384.
- [15] Yin YS, Chen DW, Qiao MX *et al.* Preparation of lectin-conjugated PLGA nanoparticles and evaluation of their *in vitro* bioadhesive activity [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2007, **42**(5): 550-556.
- [16] Wang YY, Lai SK, Suk JS. Addressing the PEG mucoadhesivity paradox to engineer nanoparticles that "slip" through the human mucus barrier [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, **47**(50): 9726-9729.