偶联法制备生物降解的聚乳酸-羟基乙酸/聚乙二醇共聚物及其在色素上皮衍生因子载体中的应用

赵俊颖^{†,a} 朱艳吉^{†,a} 王岩岩^b 朱君^{*,b} 沈玺^{*,a}^(a) 上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海 200025^(b) 纳米技术及应用国家工程研究中心 上海 200241

摘要 以商业化的端羧基聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA-COOH)和氨基聚乙二醇羧基(NH₂-PEG-COOH)为原料,以生物型分子 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)为媒介,以 4-二甲氨基吡啶(DMAP)为催化剂,通过简单、绿色的羧基和胺基的偶联反应,制备了聚乳酸-羟基乙酸/聚乙二醇(PLGA-PEG)共聚物分子,并以该 PLGA-PEG 分子为载体包裹色素上皮衍生因子(PEDF),得到了 PLGA-PEG/PEDF 乳剂,并进一步考察了该乳剂作为抑制血管内皮生长因子(VEGF)的潜能. 采用核磁共振氢谱表征了 PLGA-PEG 分子结构及其接枝率,并进一步表征了在不同条件下, PLGA-PEG/PEDF 乳剂对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中 VEGF 水平的抑制作用. 结果表明,以偶联法制备的 PLGA-PEG 分子为载体,得到的 PLGA-PEG/PEDF 乳剂具有良好的生物安全性,其对 VEGF 具有较高的抑制作用.

关键词 PLGA-PEG 分子; 偶联反应; 色素上皮衍生因子; 血管内皮生长因子

Preparation of Biodegradable Poly(lactic-co-glycolic acid)/Polyethylene Glycol Copolymer and Its Application as a Carrier for Pigment Epithelium-Derived Factor

Zhao Junying^{†,a} Zhu, Yanji^{†,a} Wang, Yanyan^b Zhu, Jun^{*,b} Shen, Xi^{*,a}^(a) Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025^(b) National Engineering Research Center for Nanotechnology, Shanghai 200241

Abstract A biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid)/polyethylene glycol (PLGA-PEG) copolymer molecule was prepared by the simple and green coupling reaction between carboxyl group of poly(lactide-co-glycolide)-carboxylic acid endcap (PLGA-COOH) and amino group of poly(ethylene glycol)amine and carboxylic acid endcap (NH₂-PEG-COOH) in the presence of 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS). The molecular structure of PLGA-PEG copolymer was characterized by ¹H NMR spectroscopy, and the grafting yield of polyethylene glycol (PEG) on poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) was calculated. Furthermore, pigment epithelium-derived factor (PEDF) was encapsulated in the PLGA-PEG copolymer to prepare a PLGA-PEG/PEDF emulsion for highly efficient inhibition on vascular endothelial growth gene expression (VEGF). The results showed that the obtained PLGA-PEG copolymer was bio-safety and the PLGA-PEG/PEDF emulsion was a good agent for effective inhibition VEGF expression under different conditions. Thus, the PLGA-PEG copolymer can be used as a bio-carrier and the PLGA-PEG/PEDF emulsion can be used as a good angiogenesis inhibitor, which has a potential application for some diseases by anti angiogenesis.

Keywords poly(lactic-co-glycolic acid)/polyethylene glycol (PLGA-PEG) molecule; coupling reaction; pigment epithelium-derived factor (PEDF); vascular endothelial growth factor (VEGF)

* Corresponding authors. E-mail: carl_shen2005@126.com; yzjzhu@163.com

Received August 22, 2016; revised September 5, 2016; published online September 12, 2016.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81470639), and the Shanghai Natural Science Foundation (No. 14411968400). 国家自然科学基金(No. 81470639) 和上海市自然科学基金(No. 14411968400)资助项目.

[†]共同第一作者(These authors contributed equally to this work).

视网膜新生血管是导致许多眼致盲性疾病(如早产儿视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、糖尿病性视网膜病变等)的主要因素. 其造成的渗出、出血和增生等病理改变, 对眼部结构和功能的损害是引起视力障碍的重要原因^[1]. 目前对其发生机制的研究表明: 缺氧是诱导一些生长因子、整合素、蛋白酶表达上调的初始因素, 进而促进血管内皮细胞的增殖和迁移. 具体表现为: 视网膜色素上皮细胞能够表达血管内皮生长因子(VEGF)和基质细胞衍生因子定向趋化骨髓来源细胞, 并参与眼新生血管的发生发展^[1,2], 而在高糖和缺氧刺激下这种作用更为明显^[3]. 因此, 通过抗血管化作用, 有望实现对这类疾病的治疗.

色素上皮衍生因子(PEDF)被证明是眼内一种重要的新生血管生成抑制因子. PEDF的抗新生血管生成作用、抗氧化作用及抗血管通透性作用已有很多研究^[4,5], 近年来其用于抑制炎症作用报道也越来越多^[6,7]. 例如, Gao等^[7]证明了PEDF作为血管抑制剂参与了眼后新生血管形成的调节. 而Stellmach等认为, PEDF可能是通过促进活化的血管内皮细胞凋亡, 使血管内皮细胞对缺氧诱发的新生血管的信号不起反应.

近年来, 聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)已成为一种极具潜力的给药载体, 其药物包封率高、可修饰性强、生物安全性好, 对药物可起到很好的保护作用. 但PLGA表

面疏水性强, 入血易被网状内皮系统(RES)清除, 很难有效送达靶部位. 另一方面, 聚乙二醇(PEG)亲水性强、生物安全性好、抗原性和免疫原性. 通过PLGA和PEG反应合成PLGA-PEG共聚物, 可以有效地将两者结合起来, 延缓RES的清除, 延长循环时间, 具有极好的发展前景^[8]. 目前PLGA-PEG共聚物的制备方法主要包括开环聚合法和缩合共聚法. 这两种方法均以乳酸或丙交酯为原料, 通过多步反应得到目标产物. 其中需要用到二氯甲烷、氯仿等有机溶剂, 反应后需要深度的干燥才能除去有机溶剂. 这难以适用于生物领域的应用.

首先以商业化的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA-COOH)和氨基聚乙二醇羧基($\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$)为原料, 以生物型分子 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)为媒介, 以 4-二甲氨基吡啶(DMAP)为催化剂, 通过简单、绿色的羧基和胺基的偶联反应, 制备了 PLGA-PEG 共聚物, 合成路线如图 1 所示. 以制备的 PLGA-PEG 共聚物为载体, 进而包裹 PEDF 得到了 PLGA-PEG/PEDF 乳剂, 并进一步考察了该乳剂作为抑制 VEGF 的潜能. 研究表明, 所开发的 PLGA-PEG/PEDF 能够作为一种良好的新生血管生成抑制剂, 对于某些通过抗血管化生成治疗的疾病具有良好的应用前景. PLGA-PEG/PEDF 乳剂及其与细胞相互作用如图 2 所示.

图 1 PLGA-PEG 分子的合成示意图

Figure 2 Preparation of PLGA-PEG molecule

图 2 PLGA-PEG/PEDF 乳剂及其与细胞相互作用示意图

Figure 2 Schematic illustration of PLGA-PEG/PEDF emulsion preparation and its interaction with HUVEC cell

1 结果与讨论

1.1 PLGA-PEG 共聚物及 PLGA-PEG/PEDF 乳剂的制备

PLGA-PEG 由 PLGA-COOH 和 $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ 分子反应合成产物采用核磁共振氢谱表征 PLGA-PEG 的结构. 如图 3 所示, PLGA-COOH 分子中的 H_a 化学位移 δ 5.2, H_b 化学位移 δ 4.8, $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ 分子中的 H_d 化学位移 δ 3.6, H_c 化学位移 δ 1.6, 谱线中同时出现了 4 个峰, 说明 PLGA-PEG 被成功地合成. 另外, 根据文献[9]报道, PEG 的接枝率可以通过以下方式计算: PLGA 分子中单体的分子量为 130, 本实验中所用 PLGA 聚合物分子量为 20000, 所以每个 PLGA 聚合物分子中含有约 154 个单体, 而每个单体中有两个 H_b 原子. 同样的, 就可以计算出一个 PEG 分子链由有 77 个单体组成, 而每个单体中有四个 H_d 原子. 因此, 单个 PLGA 聚合物分子中 H_b 原子的数量等于单个 PEG 分子中 H_d 原子的数量. 如果 PLGA 与 PEG 完全反应, 那么在核磁氢谱上 H_b 与 H_d 的峰面积应该是一样的. 但由于存在未反应的 PEG, 且已经通过透析将其除去, 所以 H_d 的峰面积与 H_b 的峰面积比就是 PEG 在 PLGA 上的接枝率, 即 $3.52/4.18 \approx 84\%$. 因此, 本实验中反应的接枝率约为 84%, 其与文献[9]报道类似.

图 3 PLGA-PEG 的结构式和核磁氢谱

Figure 3 Chemical formula and ^1H NMR of PLGA-PEG

以 PLGA-PEG 为原料制备 PLGA-PEG/PEDF 乳剂后, 对乳剂进行了粒径、zeta 电位和 TEM 表征. 如图 4 所示, 当乳剂中无 PEDF 时, PLGA-PEG 乳剂的水合平均粒径为 218 nm, zeta 电位为 -30.5 mV. 加载 PEDF 后, 纳米乳剂的平均粒径为 254 nm, zeta 电位为 -12.3 mV. 结果表明, PEDF 成功地加入到 PLGA-PEG 聚合物中.

此外, 在插入的透射电子显微镜图显示 PLGA-PEG/PEDF 乳剂为球形纳米结构, 外层的黑色为 PLGA-PEG 壳, 内部灰色的为 PEDF 核. 得到纳米乳剂分散性好, 无明显团聚, 平均粒径大约在 250 nm 左右. 高速离心法得到 PEDF 的包封率为 74.6%.

图 4 PLGA-PEG 和 PLGA-PEG/PEDF 乳剂的粒径分布图
Figure 4 Size distribution of PLGA-PEG emulsion and PLGA-PEG/PEDF emulsion

1.2 PLGA-PEG/PEDF 乳剂与细胞的相互作用

首先, 用 CCK-8 法检测评价 PLGA-PEG/PEDF 乳剂的细胞毒性. 如图 5 所示, 研究了不同浓度的 PLGA-PEG/PEDF 乳剂 ($0 \sim 25 \mu\text{g/mL}$) 与人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 细胞共培养 12 和 24 h 后的细胞活性. 由图 5a 可见, 随着 PLGA-PEG/PEDF 乳剂浓度的增加和培养时间的延长, HUVEC 细胞活性明显降低. 相比于对照组, 培养 12 和 24 h 后, 随着 PLGA-PEG/PEDF 乳剂浓度的递增, 细胞存活率有显著的差异. 当 PLGA-PEG/PEDF 乳剂浓度达到 $25 \mu\text{g/mL}$ 的高剂量时, 细胞存活率分别维持在 67.3% 和 65.1%. 这可能是由于其原因 PLGA-PEG/PEDF 乳剂中释放出来的 PEDF 对 HUVEC 细胞中 VEGF 基因表达有抑制作用. 为进一步证明细胞活性提高的原因, 检测了 PLGA-PEG 乳剂的细胞毒性. 如图 5b 所示, 在乳剂浓度提高的过程中, 相比于正常培养基培养的细胞, 除了在 $25 \mu\text{g/mL}$ 浓度下共孵育 24 h 的实验组有轻微的下降低外, 其他组细胞活性无明显变化.

进一步地, 观察了 PLGA-PEG/PEDF 乳剂对 HUVEC 细胞体外生长的抑制情况. 如图 6 所示, 随着 PLGA-PEG/PEDF 乳剂浓度和纯 PEDF 浓度的增加, HUVEC 细胞的活性均降低, PLGA-PEG/PEDF 乳剂实验组的细胞活性降低的更为明显. 此结果表明, PLGA-PEG/PEDF 乳剂具有比纯 PEDF 具有更显著的抑制效率. 此外, 由图 6 可以得出, 在 PLGA-PEG/PEDF 乳剂实验组中, IC_{50} 值是 $16.9 \mu\text{g/mL}$; 纯 PEDF 实验组中, IC_{50} 值

图5 (a) PLGA-PEG/PEDF 乳剂和(b) PLGA-PEG 乳剂对 HUVEC 细胞的细胞毒性

Figure 5 *In vitro* HUVEC cell cytotoxicity of (a) PLGA-PEG/PEDF emulsion and (b) PLGA-PEG emulsion (concentration was calculated by PLGA-PEG)

是 $18.3 \mu\text{g/mL}$. 此结果也显示, PLGA-PEG/PEDF 乳剂增加了对 HUVEC 细胞的体外生长的抑制作用.

图6 PLGA-PEG/PEDF 乳剂和 PEDF 对 HUVEC 细胞的抑制效果

Figure 6 Inhibitory effects of PLGA-PEG/PEDF emulsion and free PEDF on HUVEC cells as examined by CCK-8 assay

1.3 PLGA-PEG/PEDF 乳剂对 VEGF 的抑制

为了说明 PLGA-PEG/PEDF 乳剂处理过程中, HUVEC 细胞活性降低的原因, 进行 ELISA 分析检测细胞 VEGF 的水平. 如图 7 所示, 评估了在不同培养时间和 PLGA-PEG/PEDF 乳剂浓度的条件下 VEGF 的水平. 无 PLGA-PEG/PEDF 乳剂时, VEGF 含量约为 220 pg/mL , 这是以往报道一致^[10]. 但如图 7a 所示, 随 PLGA-PEG/PEDF 乳剂浓度的增加, HUVEC 细胞的 VEGF 水平逐渐下降. $25 \mu\text{g/mL}$ PLGA-PEG/PEDF 培养 24 h 后, 其 VEGF 含量为 174 pg/mL . 结果表明, PLGA-PEG/PEDF 乳剂中释放的 PEDF 可以抑制 VEGF 的表达, 减少细胞增殖. 此外, 我们检查了不同培养时间下的 VEGF 水平. 如图 7b 所示, 随着培养时间的增加, HUVEC 细胞中 VEGF 水平也逐渐减小. 在 $25 \mu\text{g/mL}$ PLGA-PEG/PEDF 乳剂条件下培养 48 h, 其 VEGF 的含量约为 153 pg/mL . 这些结果表明, 获得的 PLGA-PEG/PEDF 乳剂可以抑制 VEGF, 从而控制血管化.

图7 ELISA 法检测不同条件下 HUVEC 细胞中 VEGF 的表达情况

Figure 7 The VEGF levels in the HUVEC cell culture medium by ELISA with the different condition

(a) Concentration of PLGA/PEDF emulsion at 24 h culture and (b) culture time at $25 \mu\text{g/mL}$ PLGA/PEDF emulsion

在以前的报道中, 缺氧是一种应激因素, 不仅影响肿瘤相关因子的转录表达, 而且为新血管的生成提供了

图8 ELISA法检测不同条件下HUVEC细胞中VEGF的表达情况

Figure 8 The VEGF levels in the HUVEC cell culture medium at the concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ PLGA-PEG/PEDF by ELISA (a) Different oxygen concentration at 8 h hypoxia treatment time and (b) hypoxia treatment time at 1% oxygen concentration

途径^[11]。此外, PEDF 可以更好地在缺氧条件下调节 VEGF 的表达^[12]。因此, 我们进一步观察了在 25 $\mu\text{g/mL}$ PLGA-PEG/PEDF 乳剂在不同氧气浓度下调节 VEGF 水平的能力。如图 8a 所示, 当氧气浓度降低时, 对照组的 VEGF 水平不断升高, 氧气浓度从正常氧浓度降低到 1% 氧浓度时, VEGF 浓度从 220 pg/mL 提高到 385 pg/mL 。此结果表明, 缺氧可以激活 HUVEC 细胞中的 VEGF 水平。但是, 当 PLGA-PEG/PEDF 加入后, 降低了 VEGF 表达。抑制率从正常氧浓度的 26.4% 提高到 1% 氧浓度的 30.1%。此外, 随着缺氧时间的增加, HUVEC 细胞中 VEGF 的表达和被抑制也逐渐增大(图 8b)。这些结果表明, 获得的 PLGA-PEG/PEDF 乳剂在缺氧条件下可以更加有效抑制 VEGF 的表达。

2 结论

以 PEG 和聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)成功制备了 PLGA-PEG 材料, 其反应的接枝率约为 84%。以该

PLGA-PEG 材料为载体通过包裹 PEDF, 得到了 PLGA-PEG/PEDF 乳剂, 其粒径约为 218 nm, 对 PEDF 的包封率为 74.6%。通过 PLGA-PEG/PEDF 乳剂与 HUVEC 共培养发现, 该乳剂能明显降低细胞存活率, 其原因在于 PLGA-PEG/PEDF 乳剂中释放的 PEDF 能有效抑制细胞中 VEGF 的生成, 从而降低细胞活性。考察了不同氧浓度下, 乳剂对 VEGF 的抑制作用。结果发现, 乳剂在缺氧条件下可以更加有效抑制 VEGF 的表达。体内分布实验表明, PLGA-PEG/PEDF 乳剂能有效到达眼部等部位。因此, PLGA-PEG/PEDF 能够作为一种良好的新生血管生成抑制剂, 对于某些通过抗血管化生成治疗的眼部疾病具有良好的应用前景。

3 实验部分

3.1 PLGA-PEG 的合成

PLGA-PEG 的合成方法简述如下^[13]: 利用 PLGA-COOH 的羧基与 $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ 的氨基进行反应合成 PLGA-PEG。将 200 mg PLGA-COOH、1.8 mg NHS、2.9 mg EDC、1 mg DMAP 加入 10 mL 二氯甲烷(CH_2Cl_2)中室温反应 24 h 时, 然后加入 34 mg $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ 和 8.6 L 三乙胺继续反应 8 h。待反应结束后, 用旋转蒸发仪减压除掉 CH_2Cl_2 后, 加 5 mL 二甲基甲酰胺(DMF)溶解。把溶液用截留分子量为 14000 的透析袋透析除掉小分子杂质和未反应掉的 PEG, 冷冻干燥得到目标产物备用。

3.2 PLGA-FITC 的合成与提纯

把 300 mg PLGA-COOH、1.8 mg NHS、2.9 mg EDC、1 mg DMAP 加入 10 mL CH_2Cl_2 中室温反应 24 h。然后加入 1.8 mg 乙二醇和 8.6 L 三乙胺继续反应 3 h。待反应结束后, 再往溶液中加入 35 mg 异硫氰酸荧光素(FITC)继续反应 8 h。用旋转蒸发仪减压除掉 CH_2Cl_2 , 加 5 mL DMF 溶解。把溶液用截留分子量 14000 的透析袋透析除掉小分子杂质, 冷冻干燥得到目标产物。

产物采用凝胶柱进行提纯^[14], 在凝胶柱中加入一定量的 PLGA-FITC 乳剂, 待乳剂全部进入凝胶后, 缓慢向柱中加满纯水, 以纯水进行洗脱, 收集最先下来的浊液。

3.3 PLGA-PEG/PEDF 乳剂的制备

PLGA-PEG/PEDF 乳剂的制备方法^[15]简述如下: 分别将 10 mg PLGA-PEG 溶解在 200 μL 二氯甲烷, 100 μg PEDF 溶解在 200 μL 司盘 80@二氯甲烷(司盘 80 溶解在二氯甲烷中, 司盘 80 的质量分数为 15%)中。经过充分混合, 用匀浆机在冰浴条件下超声 1 min。然后在冰浴条件下超声 3 min(工作 3 s、停止 10 s)。进一步地, 在冰

浴条件下搅拌 10 min(工作 1 min, 停止 1 min), 最后敞口搅拌 2~3 h 除去二氯甲烷。

3.4 材料表征

采用氢核磁表征 PLGA-PEG, 以氘代氯仿(CDCl_3)为溶剂在仪器 Bruker AM-400 中检测 PLGA-PEG 的氢核磁图谱。采用纳米激光粒度仪表征乳剂尺寸, 将合成的 PLGA-PEG 乳剂及 PLGA-PEG/PEDF 乳剂稀释 5 倍后, 分别置于 Malvern Zetasizer Nano ZS 仪器中检测其粒度及 zeta 电位。采用透射电子显微镜观察乳剂大小与形貌, 将合成的 PLGA-PEG/PEDF 乳剂稀释 5 倍后滴至铜网上, 在远红外灯下烘干, 置于 JEOL-2100F 透射电子显微镜中观察。

3.5 包封率测定

用高速离心法测定 PEDF 的包封率。具体如下: 取 PLGA-PEG/PEDF 乳剂 1 mL, 高速离心 (HITACHI-CP100WX, 16000 r/min), 20 min 后取上清液测定 $m_{\text{游}}$ 。

包封率的计算公式: $\text{EE}(\%) = (m_{\text{总}} - m_{\text{游}}) / m_{\text{总}} \times 100\%$

式中, EE、 $m_{\text{总}}$ 、 $m_{\text{游}}$ 分别代表包封率、系统中的包封与未包封的总药量、未包封的药量。其中, $m_{\text{游}}$ 通过测定上清液中的药量获得, $m_{\text{总}}$ 通过加乙腈溶解乳剂后测定获得。

3.6 细胞毒性

用 CCK-8 法测定 PLGA-PEG/PEDF 乳剂的毒性作用。将 HUVEC 细胞接种密度为在 96 孔板中, 每孔分别有 5000 个细胞。48 h 后, 用 100 μL 含不同浓度的 PLGA-PEG/PEDF 乳剂代替培养基(对照组细胞用 DMEM 培养基单独培养)。培养一定时间后(12 和 24 h), 弃上清液, 加入 10 μL CCK-8 溶液, 然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育细胞。培养 4 h 后, 用酶标仪测定吸光度 (IMark Bio-Rad, 美国), 以 450 nm 为测定波长。

3.7 低氧下的细胞培养

将 HUVEC 细胞接种密度为在 96 孔板中, 每孔分别有 5000 个细胞。48 h 后, 用 100 μL 含不同浓度的 PLGA-PEG/PEDF 乳剂代替培养基(对照组细胞用

DMEM 培养基单独培养)。在 1% 或 10% O_2 浓度的三气培养箱中缺氧条件下, 培养一定时间后(0~48 h), 弃上清液, 加入 10 μL CCK-8 溶液, 然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育细胞。培养 4 h 后, 用酶标仪测定吸光度 (IMark Bio-Rad, 美国), 以 450 nm 为测定波长。

辅助材料(Supporting Information) PLGA-PEG 分子的 ^1H NMR 谱图。这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Tomita, M.; Yamada, H.; Adachi, Y.; Cui, Y. Z.; Yamada, E.; Higuchi, A.; Minamino, K.; Suzuki, Y.; Matsumura, M. *Stem Cells* **2004**, 22, 21.
- [2] Hou, H. Y.; Wang, Y. S.; Xu, J. F.; Wang, Y. C.; Liu, J. P. *Curr. Eye Res.* **2006**, 31, 1051.
- [3] Zhang, Z. X.; Wang, Y. S.; Shi, Y. Y.; Hou, H. Y.; Zhang, C.; Cai, Y.; Dou, G. R.; Yao, L. B.; Li, F. Y. *Curr. Eye Res.* **2011**, 36, 838.
- [4] Barnstable, C. J.; Tombran-Tink, J. *Prog. Retinal Eye Res.* **2004**, 23, 561.
- [5] Mori, K. G. P.; Ando, A.; McVey, D.; Wei, L. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2002**, 43, 2428.
- [6] Zhang, S. X.; Wang, J. J.; Gao, G.; Parke, K.; Ma, J. X. *J. Mol. Endocrinol.* **2006**, 37, 1.
- [7] Gao, G.; Li, Y.; Gee, S.; Dudley, A.; Fant, J.; Crosson, C.; Ma, J. X. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 9492.
- [8] Yoneki, N.; Takami, T.; Ito, T.; Anzai, R.; Fukuda, K.; Kinoshita, K.; Sonotaki, S.; Murakami, Y. *Colloids Surf., A* **2015**, 469, 66.
- [9] Cheng, J. J.; Teply, B. A.; Sherifi, I.; Sung, J.; Luther, G.; Gu, F. X.; Levy-Nissenbaum, E.; Radovic-Moreno, A. F.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. *Biomaterials* **2007**, 28, 869.
- [10] De la Riva, B.; Sánchez, E.; Hernández, A.; Reyes, R.; Tamimi, F.; López-Cabarcos, E.; Delgado, A.; Évora, C. *J. Control. Release* **2010**, 143, 45.
- [11] Hao, N. B.; Lü, M. H.; Fan, Y. H.; Cao, Y. L.; Zhang, Z. R.; Yang, S. M. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 2012, 948098.
- [12] Stellmach, V.; Crawford, S. E.; Zhou, W.; Bouck, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98, 2593.
- [13] van der Vlies, A. J.; O'Neil, C. P.; Hasegawa, U.; Hammond, N.; Hubbell, J. A. *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 653.
- [14] Mogensen, C. E. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **2009**, 21, 77.
- [15] Pisani, E.; Tsapis, N.; Paris, J.; Nicolas, V.; Cattel, L.; Fattal, E. *Langmuir* **2006**, 22, 4397.

(Qin, X.)