M 细胞模型及其在生物大分子药物口服递药研究中的应用

李亨芬, 邹 金, 白如玉, 邢永梅, 聂金梅, 刁 勇*

(教育部分子药物工程研究中心, 华侨大学分子药物学研究所, 福建 泉州 362021)

摘要:如何克服胃肠道吸收屏障是蛋白质、多肽和核酸等生物大分子药物口服给药面临的重大挑战。M 细胞是胃肠道上皮细胞内一种特殊的抗原摄取细胞,具有高内吞和低降解特征,可能对生物大分子药物的口服吸收发挥重要作用。M 细胞体外共培养系统的开发,以及在其基础上建立的体外模型,促进了对 M 细胞本身以及大分子药物口服给药系统的研究。本文综述了 M 细胞特殊的结构、功能、形成及生物标志特点,讨论了 M 细胞 体外模型在开发生物活性大分子药物口服给药系统的应用。

关键词: M 细胞; 体外模型; 大分子药物; 口服递药系统; 口服疫苗 中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2011) 12-1429-07

M cell *in vitro* model and its application in oral delivery of macromolecular drugs

LI Heng-fen, ZOU Jin, BAI Ru-yu, XING Yong-mei, NIE Jin-mei, DIAO Yong*

(Engineering Research Center of Molecular Medicine, Ministry of Education, Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: The oral administration of bioactive macromolecular drugs such as proteins, peptides and nucleic acids represents unprecedented challenges from the drug delivery point of view. One key consideration is how to overcome the gastrointestinal tract absorption barrier. Recent studies suggest that microfold cell (M cell), a kind of specialized antigen-sampling epithelial cell which is characterized by a high endocytic rate and low degradation ability, may play an important role in macromolecule oral absorption. The development of an *in vitro* M cell coculture system and its modified models greatly advanced the study of M cells and the development of oral delivery system for macromolecular drugs. The special structure, function and formation characteristics, and biomarkers of M cell are summarized in this review. The applications of *in vitro* M cell models in developing oral delivery system of bioactive macromolecular drugs are discussed.

Key words: M cell; in vitro model; macromolecular drug; oral delivery system; oral vaccine

口服给药应用方便、患者依从性高,因而成为药物递药系统的首选。随着生物技术的发展,多肽、蛋白、核酸类等生物大分子药物在疾病的预防与治疗中越来越发挥重要作用,但其口服递药技术的研究远滞后于小分子药物,临床应用仍大多采用注射等侵入性方法。与小分子药物比较,生物大分子药物具有

体积大、水溶性高等特点, 难以通过跨肠上皮细胞或 细胞旁路等途径吸收。近年来有关肠道黏膜滤泡相关 上皮 (FAE) 中 M 细胞的研究表明: M 细胞转运可能 是生物大分子药物口服吸收的主要机制^[1]。因此, 对 肠道 M 细胞结构、功能及形成特点、M 细胞体外模 型的建立与应用等方面的深入研究, 将有利于生物 大分子药物口服递药系统的建立和优化。

1 M 细胞

1.1 结构特点

M 细胞摄取转运功能的发挥与其特殊的结构特

收稿日期: 2011-04-18.

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30973591, 30900351);福建 省生物医药工程研究生教育创新基地资助项目 (06070205). *通讯作者 Tel / Fax: 86-595-22692516, E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn

点密切相关。在肠道中 M 细胞与肠上皮细胞紧密排 列,共同形成天然的上皮屏障。但在结构上 M 细胞 与肠上皮细胞有显著区别 (图1):其表面的糖被层厚 度仅为 20 nm,显著低于肠上皮细胞的 400 nm,且其 顶端缺乏刷状缘,有利于肠腔内容物的接触和黏附。 M 细胞内缺乏水解酶,可降低对外源物质的胞内降 解^[2]。在 M 细胞内广泛分布有肌动蛋白,有利于促进 外源物质的胞内转运。另外 M 细胞基底膜向顶部穹 窿状凹入,缩短了外源物质的跨胞转运距离。M 细 胞基底层凹陷形成"口袋"样结构,该结构中含有 丰富的淋巴细胞及少量巨噬细胞,有利于抗原物质 快速进入上皮下淋巴组织^[2,3],从而诱导黏膜免疫应 答^[4,5]。另外,M 细胞独特的表面寡聚糖侧链可用作 M 细胞靶向性递药的特异性识别表位。



Figure 1 Schematic structure of enterocytes and M cell. M: M cell; E: Enterocyte; MA: Macrophage; L: Lymphocyte; N: Nucleus; TJ: Tight-junction; AP: Apical; BA: Basolateral

1.2 功能特点

M 细胞顶层膜表面刷状缘的缺失和胞内酶活性 的缺乏表明它们的主要功能不太可能是吸收或消化 作用。肠腔内物质的跨上皮转运、病原微生物的监 测与黏膜免疫反应的启动等可能是 M 细胞最主要的 功能。与正常肠上皮细胞相比, M 细胞内的溶酶体体 积与溶菌酶 (酸性磷酸酶) 活性显著降低, 因而经 M 细胞跨胞转运的物质可基本完好地释放至肠道固有 层^[3]。实验证明多种生物大分子(如铁蛋白、辣根过 氧化物酶、霍乱毒素结合亚基、凝集素和抗病毒抗体), 纳米颗粒 (如乳胶颗粒、碳颗粒、脂质体等)、微生物 (如霍乱弧菌、鼠伤寒沙门氏菌) 等物质可以经 M 细 胞跨肠上皮转运^[2]。M 细胞介导的跨上皮转运呈温 度依赖性,说明该过程是主动转运^[2,6]。M 细胞介导 的跨上皮细胞转运可分为3个阶段: 肠腔内物质首先 被吸附于细胞顶膜, 然后通过内吞囊泡被转运至胞 内内涵体,最后从基底膜经胞吐作用出胞^[5,6]。

呈口袋形状的 M 细胞的细胞质层较薄,可以快速完成内吞--胞吐过程。M 细胞的转运机制与被转运

物的性质有关,如体积大小、表面 pH 值、表面电荷、 疏水性,以及是否存在 M 细胞特异性受体等^[2]。纳米 粒和细菌可引起 M 细胞顶膜皱裂和肌动蛋白细胞骨 架的重排,继而被细胞吞噬^[3,7]。病毒等则通过网格 蛋白包被小泡被 M 细胞内吞。麦胚凝集素 (WGA) 则通过受体介导被内吞。M 细胞通过吞噬、胞吞、胞 饮和跨胞转运等多种机制将肠腔中的外源性大分子 物质运送至肠道固有层。

1.3 形成特点

小肠微绒毛和派氏结圆顶之间隐窝内的干细胞 是 FAE 中 M 细胞的起源已被广泛认可。该类干细胞 具有两种完全不同的分化、迁移轴,向微绒毛方向迁 移的细胞分化成为吸收性肠上皮细胞、杯状细胞和肠 内分泌细胞,而向派氏结圆顶迁移的细胞则分化成 为 FAE 细胞和 M 细胞。但对于 M 细胞的前体细胞在 何时确定分化方向,何种因素是诱导其发生分化的 关键尚无定论。

从 M 细胞的结构、功能及形成特点可知, M 细胞 在营养成分及小分子药物的吸收方面不具有重要意 义。但对于病原微生物, M 细胞是肠道免疫反应的前 哨^[3, 8]; 对于生物大分子药物,则是经肠吸收的关键。 因此,疫苗及生物大分子药物胃肠道传递研究日益 深入,以 M 细胞为主要靶点的口服吸收研究,应当 成为现代药剂学的重要课题。

2 M 细胞模型

2.1 M 细胞的体外诱导分化

早期对 M 细胞的结构及功能的认识主要建立在 动物模型研究的基础上^[9-11],因 M 细胞在肠上皮组 织中所占比例很小,各物种间又存在较大的种属差 异,所得到的研究结果不尽一致^[2, 12-14],因此迫切需 要 M 细胞体外模型的建立。

Kerneis 等^[15, 16]首次利用小鼠派氏淋巴结细胞 (PPL) 与 Caco-2 细胞共培养,诱导分化出形态及功 能特征与 M 细胞极其类似的 M 样细胞 (M-like cell)。 Gullberg 等^[13]利用人 Raji B 细胞代替小鼠 PPL 与 Caco-2 共培养,也成功地将 Caco-2 细胞诱导成为 M 样细胞,说明 B 细胞相关的细胞因子和趋化因子 是诱导 Caco-2 细胞分化的主要因素。应用人 Raji B 细胞代替小鼠 PPL,操作更简便,模型建立的同源 性更高。

关于 M 细胞体外诱导分化的机制,学术界仍存 在不同意见。有人认为 Caco-2 细胞的性质更类似于 隐窝干细胞,在理论上能分化成吸收性肠上皮细胞 或 M 样细胞^[17]。也有人认为吸收性肠上皮细胞的表 现型可塑性较强,在一定条件下可以被转化为 M 细胞^[16],但最近的研究表明成熟的肠上皮细胞不可能 再分化为 M 细胞^[18],Caco-2 细胞与成熟肠上皮细胞 的性质并不等同。Gebert 等^[18]的研究表明,经过短期 (3 h)诱导后,M 细胞的数量不会发生明显变化,但 其抗原转运能力可以显著提高。该结果提示可以通过 生物药剂学手段即时促进生物小分子药物的口服吸 收速度和程度,降低胃肠道对该类药物的降解^[1]。

2.2 M细胞模型的建立

经过不断改进与优化,建立 M 细胞模型的 3 种基本方法如图 2 所示。

最初的方法是将 Caco-2 细胞悬液接种于 Transwell 细胞培养插件的聚碳酸酯膜基底面^[15, 16], 培养过夜后,将细胞培养插件顺置于24孔板中培养。 14 d 后,向细胞培养插件聚碳酸酯膜顶面加入新鲜 分离的 PPL 进行共培养。共培养 3 d 后 Caco-2 可分 化形成 M 样细胞 (图 2A)。

为避免使用鼠源性 PPL 分离操作繁琐、B 和 T 淋巴细胞含量难以标准化、以及种属差异等缺陷, Gullberg 等^[13]构建了 Caco-2/Raji B 细胞共培养模型: Transwell 细胞培养插件聚碳酸酯膜的顶面用鼠尾胶 原涂布后顺置于 24 孔板中,加入 Caco-2 细胞悬液培 养 14 d, 然后向 24 孔板中加入 Raji B 细胞悬液进行 共培养。此模型中 Raji B 细胞位于聚碳酸酯膜基底面 之下,未紧密接触 Caco-2 细胞,共培养 3 天后仍然能 诱导 Caco-2 细胞分化形成 M 样细胞 (图 2B)。

随后, des Rieux 等^[19]对 Caco-2/Raji B 细胞共培 养模型进行了优化: Caco-2 细胞悬液在 Transwell 细胞 培养插件聚碳酸酯膜的顶面培养 3 d 后, 将细胞培养 插件倒置于含培养基的培养皿中继续培养 11 d, 然后 向聚碳酸酯膜的基底面上加入 Raji B 细胞共培养 (图 2C)。该方法 Raji B 细胞与 Caco-2 细胞通过聚碳酸酯 膜密切接触,促进了 M 样细胞的分化。呈口袋形状的 M 细胞的细胞质层较薄,从物理性质上讲 M 细胞的跨上皮电阻低于肠上皮细胞的电阻,因此 TEER 下降被认为是 Caco-2 细胞分化形成 M 样细胞的重要标志^[19],优化的 M 细胞模型的 TEER 也明显降低。M 细胞的胞内酶活性较低,其胞转能力优于肠上皮细胞,研究显示优化后 M 细胞模型的甘露醇表观渗透系数 (*P*app) 是 Caco-2 细胞单层的4倍,是优化前的2倍,表明优化后 M 细胞模型药物转运效率有显著提高^[19]。

2.3 M 细胞模型特性的表征

2.3.1 细胞单层完整性 用细胞电阻仪测定跨上皮 细胞电阻 (transepithelium electrical resistance, TEER), 了解细胞单层的完整性情况。TEER 在 300 Ω·cm² 左 右表示细胞单层是完整的。

2.3.2 细胞单层膜通透性 可通过标志物被动扩散 的跨膜通量来检测,通常采用甘露醇^[7,19]、葡聚糖^[17]、 菊粉及荧光微球^[16]等。甘露醇为小分子物质,具有水 溶性,非离子化,膜通透性且不易代谢,可放射性标 记后使用,是个较好的指标。

2.3.3 M 样细胞特征 经 Caco-2 细胞诱导分化产生的 M 样细胞的细胞特征总结于表 1。其中碱性磷酸酶 (AP) 活性和 Galectin-9 的表达常被用作 M 样细胞的鉴别特征。

3 M 细胞模型在口服递药研究中的应用

与小分子药物口服递药研究常用的 Caco-2 细胞 模型相比, M 细胞模型具有突出的特点和用途: ① Caco-2 细胞模型由单一的肠上皮细胞构成, 缺乏细 胞异质性; 而 M 细胞模型是共培养体系, 不仅有肠



Figure 2 The protocols for developing *in vitro* M cell model. A: Caco-2 and lymphocytes of Peyer's patch (PPL) co-culture procedure; B: Caco-2 and Raji B cells co-culture procedure in a normally orientation; C: Caco-2 and Raji B cells co-culture procedure in an inverted orientation

Characteristic	Indicator	Changes compared with monocultured Caco-2	Reference
Cell morphology	Microvilli	Fewer and shorter	[7, 19]
Tight-junction	TEER	Lower	[19, 20]
Enzyme activity	AP	Lower	[2, 15, 21]
	Lactase	Lower	[17]
	Sucrase	Lower	[17]
	SI	Lower	[15, 22]
Receptor expression	β_1 -Integrin	Up regulated in the apical membrane	[6, 13, 23, 24]
	Villion	Redistributed from the apical surface to the cytoplasm	[2, 21]
	$\alpha_5\beta_1$ -Integrin	Up regulated and restricted to the apical surface	[2, 21, 24]
	TLR-4	Restricted to the apical surface	[25]
Cell adhesion molecule	ICAM-1	Up regulated	[13]
	VCAM	Up regulated in the basolateral membrane, no expression in the apical membrane	[13]
	CD9	Up regulated	[21, 24]
Special marker	SLAA	Up regulated	[13, 20, 22]
	Galectin-9	Up regulated	[17, 26]

Table 1Characteristics of human M-like cells compared with monocultured Caco-2 cells.AP: Alkaline phosphatase; SI: Su-
crase-isomaltase; SLAA: Sialyated Lewis antigen A; ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1; VCAM: Vascular cell adhesion
molecule

上皮细胞,还含有 M 样细胞,能更好模拟体内环境。 ② 与肠上皮细胞不同, M 细胞能特异摄取生物大分 子及抗原物质,并转运至其下的固有层。因此 M 细 胞模型是模拟生物大分子药物及疫苗口服吸收和转 运过程的最佳模型。

3.1 多肽和蛋白类药物

随着基因工程技术的飞速发展,蛋白和多肽类 药物日益成为新药研究的热点。但蛋白和多肽类药物 在胃肠道酸碱及酶环境下极易降解,口服生物利用 度很低,一般以注射方式给药。

des Rieux 等^[27]以毒蜥素为代表, 研究了多肽类 药物跨肠上皮细胞转运的情况。毒蜥素是自蜥蜴毒液 中分离的含 35 个氨基酸残基的线性多肽,结构与分 泌素和血管活性肠肽非常类似。M 细胞转运毒蜥素 的效率高出 Caco-2 细胞单层近 20 倍, 被转运的毒蜥 素分子结构完整, 而经 Caco-2 细胞单层转运后则有 75%的毒蜥素被代谢。为避免胃肠道内环境对毒蜥素 的降解, des Rieux 等以高分子 PLA 和 PLGA 包裹毒 蜥素,得到毒蜥素纳米微粒。该纳米微粒经 M 细胞 转运的效率是 Caco-2 细胞单层的数百倍, 转运过程 呈温度依赖性。纳米微粒 PEG 化还可以提高 M 细胞 转运的效率。该研究表明, M 细胞是多肽类大分子跨 肠上皮细胞转运的主要靶点, 其胞内较低的酶功能 有利于药物的口服吸收。纳米化制剂可有效降低药物 在胃肠道的降解, 对其表面进行修饰还可以进一步 提高口服吸收效率。

槲寄生是用来增强免疫力的常用天然药物,其

蛋白类有效成分槲寄生凝集素因具有良好的抗肿瘤 活性而被广泛用于抗肿瘤治疗研究。荆豆凝集素可与 小鼠 M 细胞顶端膜受体特异性结合^[26],槲寄生凝集 素也早被报道可以选择性与人派氏结中的 M 细胞表 面结合^[28],提示凝集素有可能通过 M 细胞靶向传递。 Lyu 等^[29]研究表明,槲寄生凝集素经 M 细胞转运的 速度与效率均明显高于 Caco-2 细胞单层,且能激活 在 M 细胞单层下共培养的树突状细胞。遗憾的是, 关于人 M 细胞表面是否存在凝集素受体仍未定论, 所以槲寄生凝集素经 M 细胞转运未必与其靶向传递 有关。

3.2 基因治疗药物

基因治疗药物必需采用适当的载体将 DNA 或 RNA 等核酸分子传递至靶细胞, 深入理解载体与靶 细胞的关系是载体合理设计的关键。

腺病毒 (Ad) 载体是目前应用最广泛的基因治 疗载体,世界上首个批准上市的基因治疗药物采用 的载体即 Ad 载体。整合素和硫酸乙酰肝素蛋白多糖 是肠上皮细胞表面广泛存在的两种 Ad 受体。Caco-2 细胞分化成熟后,这两种受体主要分布在基底膜,顶 端膜表分布明显降低,但 Ad 从 Caco-2 细胞顶端转导 的效率却高于基底膜,提示它们可能不是 Ad 转导的 关键受体。Kesisoglou等^[30]研究了 Ad 载体转导 Caco-2 细胞单层及 M 细胞的机制,认为位于肠上皮细胞间 紧密连接处的柯萨基病毒及腺病毒受体 (CAR) 才 是介导 Ad 载体转导肠上皮细胞的关键受体。Ad 载 体可以跨 Caco-2 细胞单层和 M 细胞转运,但跨 M 细

• 1433 •

胞转运的效率更高,特别是在高剂量时差异更显著。 该实验结果恰好可以解释前人在大鼠^[31]及兔^[32]体内 进行的研究。大鼠和兔肠内灌注 Ad 载体后,在回肠 内的基因表达高于空肠,其原因正是回肠内存在大 量的派氏结,而 M 细胞是派氏结的重要细胞。

重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV) 载体因具有无致病性、低免疫原性、能介导外源基因长期表达和宿主范围广泛等特点,被认为是最有发展前景的基因治疗载体。本课题组首次从rAAV 基因药物的药效学和药动学层面进行了其口服给药的可行性研究^[1]。直接转导肠上皮细胞、M 细胞转运、跨上皮细胞转运、细胞旁路转运和淋巴细胞主动摄取是rAAV 基因药物可能的 5 种口服吸收途径,作者利用 M 细胞模型开展的初步实验结果表明, M 细胞转运应该是 rAAV 基因药物口服吸收的关键。

3.3 疫苗

临床前及临床研究结果表明,口服疫苗既可以 诱导局部黏膜免疫反应,又可以诱导全身免疫反应, 相对于注射给药更安全,也更容易控制。虽然在世界 范围内已经开展多项口服疫苗的临床研究,但成功 上市的却为数不多。其中重要的原因是口服疫苗抗原 递送效率低,而且容易产生免疫耐受^[33,34]。目前虽然 对 M 细胞如何转运抗原的机制尚未完全理解,但 M 细胞介导的抗原摄取被公认为是口服疫苗诱导免疫 反应的关键^[14,35]。因此,提高口服疫苗的 M 细胞靶 向传递应成为提高抗原吸收效率的可行策略^[36]。

靶向作用于 M 细胞表面的特定受体, 可能有助 于增加抗原的吸收和呈递、从而启动免疫反应。在实 验动物进行的凝集素结合研究表明, M 细胞表面具有 特定的糖基化表达模式。荆豆凝集素-1 (UEA-1) 是 一种可专属性结合 α-岩藻糖残基的凝集素, 可选择 性地结合到小鼠 Peyer 氏斑的 M 细胞^[37]。表面修饰 UEA-1 的微粒后可选择性结合到 M 细胞的顶膜面^[37]。 由灭活菌和 UEA-1 组成的口服疫苗, 可诱导小鼠模 型产生对经胃肠道活菌感染的保护性免疫反应^[38]。 Hase 等^[39]的研究发现, 肠道 M 细胞顶端膜表达的糖 蛋白 GP2 是黏膜抗原跨胞转运的重要受体。重组 GP2 蛋白可选择性结合位于肠内共生菌和致病菌外膜上 的 I 型菌毛组分 FimH。细菌表面 FimH 表达缺失, 或 M 细胞 GP2 表达缺失, 均导致 I 型菌毛细菌跨 M 细 胞转运的缺陷,继而导致抗原特异性免疫应答的降 低。因此针对 GP2 受体开发 M 细胞靶向口服疫苗应 成为今后研究的重点。

一些重要的病原体识别受体 (PRRs), 如 Toll 样

受体 4 (TLR-4)、血小板活化因子受体 (PAFR)、α₅β₁-整合素^[5, 25, 40]、CD155^[41]及小窝蛋白-1^[42]等在人和小 鼠 M 细胞表面都有表达^[43]。这些 PRRs 与细菌的病 原相关分子模式 (PAMPs),如脂多糖、脂磷壁酸、肽 聚糖和细菌鞭毛蛋白分子等相互作用,构成消化道 内细菌转位的关键。因此,针对 PRRs 入手也应成为 M 细胞靶向口服疫苗设计的策略。

Fievez 等^[44]首次运用噬菌体展示技术筛选可靶 向作用于 M 细胞的配体,发现疫苗纳米载体经多肽 LRVG 或 CTGKSC 修饰后,口服吸收效率能显著提 高。随后 Kim 等^[45]将筛选获得的 Co1、Co2 及 Co3 肽类分别连接到模拟抗原 EGFP 上构建成配体--抗原 融合蛋白,3种融合蛋白不仅能与M样细胞紧密结合, 而且还能结合到小鼠肠M细胞,而单独的EGFP则不 发生结合。其中 Co1 促进抗原向 M 细胞及 M 样细胞 靶向转运的能力最佳。小鼠口服 3 种融合蛋白 6 周后, 可诱导 EGFP 特异性 IgG 及 IgA 的高效表达。经融 合蛋白 EGFP-Co1 诱导分泌的 IgG 水平是另外两种 融合蛋白的两倍, EGFP-Co1 还能诱导 T 淋巴细胞的 扩增并引起强烈的 Th2 型免疫反应。因此, Co1 配体 可作为 M 细胞靶向佐剂在口服疫苗研究中发挥重要 作用。

4 小结

由于 M 细胞具有独特的结构和功能特点, 使其 本身及体外细胞模型成为口服生物大分子药物的吸 收转运方面的研究热点。但是 M 细胞模型还存在一 些缺点和局限性: ① M 细胞模型仅限于口服疫苗及 生物大分子药物的口服吸收研究,并不适用于小分 子药物;② 模型建立时间较长,一般为 21~28 天; ③ M 样细胞不能完全表达出 M 细胞的表型特征,其 受体的表达与体内的情况存在差异^[46];④ 体外 M 样 细胞数量占到总数的15%~30%左右,与体内情况差 异较大,体外的研究结果可能高估了体内的吸收和 转运[17]; ⑤ Caco-2/PPL 共培养体系存在种属差异和 重现性差; Caco-2/Raji B 细胞共培养体系同源性好, 但缺乏在 M 样细胞形成中发挥重要作用的 T 淋巴 细胞^[36]。尽管生物大分子药物的口服给药仍然面临 诸多挑战,但随着 M 细胞的体外诱导分化技术的日 益成熟及体外 M 细胞模型的完善及广泛应用, 生物 大分子药物经口服给药技术的突破并不是无法攻克 的难题。

References

[1] Diao Y, Xu RA. Oral recombinant adeno-associated virus

gene medicine [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2009, 44: 703-709.

- [2] Corr SC, Gahan CC, Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008, 52: 2–12.
- [3] Miller H, Zhang J, Kuolee R, et al. Intestinal M cells: the fallible sentinels? [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13: 1477–1486.
- [4] Hathaway LJ, Kraehenbuhl JP. The role of M cells in mucosal immunity [J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57: 323–332.
- [5] Trochim J, Wysocka J, Żelazowska-Rutkowska B. M cells the pathway of antigen penetration into lymphoid tissue [J]. Int Rev Allergol Clin Immunol, 2010, 16: 1–2.
- [6] des Rieux A, Ragnarsson EG, Gullberg E, et al. Transport of nanoparticles across an *in vitro* model of the human intestinal follicle associated epithelium [J]. Eur J Pharm Sci, 2005, 25: 455–465.
- [7] Liang E, Kabcenell AK, Coleman JR, et al. Permeability measurement of macromolecules and assessment of mucosal antigen sampling using *in vitro* converted M cells [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2001, 46: 93–101.
- [8] Li FQ, Fei YB, Su H, et al. Oral vaccination and vaccineentrapped microparticle delivery system [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2007, 42: 245-251.
- [9] Jones B, Pascopella L, Falkow S. Entry of microbes into the host: using M cells to break the mucosal barrier [J]. Curr Opin Immunol, 1995, 7: 474–478.
- [10] Gebert A, Rothkötter HJ, Pabst R. M cells in Peyer's patches of the intestine [J]. Int Rev Cytol, 1996, 167: 91–159.
- [11] Thomas NW, Jenkins PG, Howard KA, et al. Particle uptake and translocation across epithelial membranes [J]. J Anat, 1996, 189: 487–490.
- [12] Claeys S, De Belder T. M cells and antigen presentation: the role of mucosal epithelium in antigen presentation [J]. Int Congr Ser, 2003, 1254: 101–104.
- [13] Gullberg E, Leonard M, Karlsson J, et al. Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M-cell model [J]. Biochem Biophy Res Commun, 2000, 279: 808–813.
- [14] Kyd JM, Cripps AW. Function differences between M cells and enterocytes in sampling luminal antigens [J]. Vaccine, 2008, 6: 6221–6224.
- [15] Kerneis S, Bogdanova A, Kreahenbuhl JP, et al. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria [J]. Science, 1997, 277: 949–952.

- [16] Kerneis S, Caliot E, Stubbe H. Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using cocultures of epitheial and immune cells: a technical update [J]. Microbes Infect, 2000, 2: 1119–1124.
- [17] Kalischuk LD, Leggett F, Inglis GD. Campylobacter jejuni induces transcytosis of commensal bacteria across the intestinal epithelium through M-like cells [J]. Gut Pathog, 2010, 2: 14.
- [18] Gebert A, Steinmetz I, Fassbender S, et al. Antigen transport into Peyer's patches: increased uptake by constant numbers of M cells [J]. Am J Pathol, 2004, 164: 65–72.
- [19] des Rieux A, Fievez V, Théate I, et al. An improved *in vitro* model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells [J]. Eur J Pharm Sci, 2007, 30: 380–391.
- [20] Gullberg E. Particle Transcytosis Across the Human Intestinal Epithelium: model development and target identification for improved drug delivery [D]. Uppsala: Uppsala Universitet, 2005.
- [21] Tyrer P, Ruth Foxwell A, Kyd J, et al. Validation and quantitation of an *in vitro* M-cell model [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 299: 377–383.
- [22] Brayden DJ, Jepson MA, Baird AW. Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting [J]. Drug Discov Today, 2005, 10: 1145–1157.
- [23] Hamzaoui N, Kernéis S, Caliot E, et al. Expression and distribution of β1 integrins in *in vitro*-induced M cells: implications for *Yersinia* adhesion to Peyer's patch epithelium [J]. Cell Microbiol, 2004, 6: 817–828.
- [24] Gullberg E, Keita AV, Salim SY, et al. Identification of cell adhesion molecules in the human follicle-associated epithelium that improve nanoparticle uptake into the Peyer's patches [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 319: 632–639.
- [25] Tyrer P, Foxwell AR, Cripps AW, et al. Microbial pattern recognition receptors mediate M-cell uptake of a gram-negative bacterium [J]. Infect Immun, 2006, 74: 625–631.
- [26] Pielage JF, Cichon C, Greune L, et al. Reversible differentiation of Caco-2 cells reveals galectin-9 as a surface marker molecule for human follicle-associated epithelia and M cell-like cells [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39: 1886–1901.
- [27] des Rieux A, Fievez V, Momtaz M, et al. Helodermin-loaded nanoparticles:characterization and transport across an *in vitro* model of the follicle-associated epithelium [J]. J Control Release, 2007, 118: 294–302.
- [28] Carreno-Gómez B, Woodley JF, Florence AT. Studies on the

uptake of tomato lectin nanoparticles in everted gut sacs [J]. Int J Pharm, 1999, 183: 7–11.

- [29] Lyu SY, Park WB. Mistletoe lectin transport by M-cells in follicle-associated epithelium (FAE) and IL-12 secretion in dendritic cells situated below FAE *in vitro* [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33: 1433–1441.
- [30] Kesisoglou F, Schmiedlin-Ren P, Fleisher D, et al. Adenoviral transduction of enterocytes and M-cells using *in vitro* models based on Caco-2 cells: the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) mediates both apical and basolateral transduction [J]. Mol Pharm, 2010, 7: 619–629.
- [31] Croyle MA, Walter E, Janich S, et al. Role of integrin expression in adenovirus-mediated gene delivery to the intestinal epithelium [J]. Hum Gene Ther, 1998, 9: 561–573.
- [32] Foreman PK, Wainwright MJ, Alicke B, et al. Adenovirusmediated transduction of intestinal cells *in vivo* [J]. Hum Gene Ther, 1998, 9: 1313–1321.
- [33] Sun JB, Czerkinsky C, Holmgren J. Mucosally induced immunological tolerance, regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit [J]. Scand J Immunol, 2010, 71: 1–11.
- [34] Harandi AM, Medaglini D, Shattock RJ, et al. Vaccine adjuvants: a priority for vaccine research [J]. Vaccine, 2010, 28: 2363–2366.
- [35] Neutra, MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues [J]. Nat Immunol, 2001, 2: 1004–1009.
- [36] Foxwell AR, Cripps AW, Kyd JM. Optimization of oral immunization through receptor-mediated targeting of M cells [J]. Hum Vaccin, 2007, 3: 220–223.
- [37] Manocha M, Pal PC, Chitralekha KT, et al. Enhanced mucosal and systemic immune response with intranasal immunization

of mice with HIV peptides entrapped in PLG microparticles in combination with Ulex Europaeus-I lectin as M cell target [J]. Vaccine, 2005, 23: 5599–5617.

- [38] Chionh YT, Wee JL, Every AL, et al. M-cell targeting of whole killed bacteria induces protective immunity against gastrointestinal pathogens [J]. Infect Immun, 2009, 77: 2962– 2970.
- [39] Hase K, Kawano K, Nochi T, et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH (+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response [J]. Nature, 2009, 462: 226–230.
- [40] Clark MA, Blair H, Liang L, et al. Targeting polymerised liposome vaccine carriers to intestinal M cells [J]. Vaccine, 2001, 20: 208–217.
- [41] Lai YH, D'Souza MJ. Microparticle transport in the human intestinal M cell model [J]. J Drug Target, 2008, 16: 36–42.
- [42] Lim JS, Na HS, Lee HC. Caveolae-mediated entry of Salmonella typhimurium in a human M-cell model [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 390: 1322–1327.
- [43] Azizi A, Kumar A, Diaz-Mitoma F, et al. Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal M cells [J]. PLoS Pathog, 2010, 6: e1001147.
- [44] Fievez V, Plapied L, Plaideau C, et al. *In vitro* identification of targeting ligands of human M cells by phage display [J]. Int J Pharm, 2010, 394: 35–42.
- [45] Kim SH, Seo KW, Kim J, et al. The M cell-targeting ligand promotes antigen delivery and induces antigen-specific immune responses in mucosal vaccination [J]. J Immunol, 2010, 185: 5787–5795.
- [46] van der Lubben IM, van Opdorp FA, Hengeveld MR, et al. Transport of chitosan microparticles for mucosal vaccine delivery in a human intestinal M-cell model [J]. J Drug Target, 2002, 10: 449–456.