

疫苗皮内接种技术的研究进展

严琴英, 翁嘉琦, 张正晗, 吴谢琦, 严欢欢, 杨根生* (浙江工业大学药学院, 杭州 310014)

摘要: 接种疫苗是防治传染病最为有效的解决办法, 而接种方式则是免疫成功的关键因素。皮肤富含抗原递呈细胞, 尤其是朗格汉斯细胞, 是疫苗理想的接种位置。然而, 传统的注射器在皮内接种方面有着诸多限制, 比如操作难度大、患者顺应性差以及对环境潜在的污染风险等。近年来, 随着经皮给药系统的深入研究, 一系列新型的皮内接种技术及装置得到了大力的开发。本文综述了目前疫苗接种的方式及现状, 介绍了皮内接种的优势, 重点阐述了微针、激光、基因枪等新技术及其在皮内接种方面的研究进展。

关键词: 疫苗; 皮内接种; 微针; 基因枪

中图分类号: R186 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)17-2228-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.17.023

引用本文: 严琴英, 翁嘉琦, 张正晗, 等. 疫苗皮内接种技术的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(17): 2228-2235.

Advances in the Intradermal Vaccination

YAN Qinying, WENG Jiaqi, ZHANG Zhenghan, WU Xieqi, YAN Huanhuan, YANG Gensheng* (College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: Vaccination is the most effective solution to fighting against infectious diseases. The method of inoculation is the key factor for successful immunization. Skin is the ideal inoculation site for vaccines because of the huge amounts of antigen-presenting cells especially Langerhans cells. However, conventional syringes have many limitations in intradermal inoculation, such as the high difficulty in operation, poor patient compliance, and potential contamination risks to the environment. In recent years, with the in-depth study of transdermal drug delivery systems, a series of new intradermal inoculation techniques and devices have also been vigorously developed. In this review, we summarize the current methods and status of vaccination, introduce the advantages of intradermal vaccination, and focus on new technologies such as microneedle, laser, and gene gun, as well as their application research progress in intradermal vaccination.

KEYWORDS: intradermal; vaccination; microneedle; gene gun

种疫苗是人类历史上最成功的医学干预措施之一, 它大大降低了死亡率和发病率。接种方式是疫苗与身体接触的途径, 是免疫成功的关键因素。目前, 大多数疫苗采取肌肉或皮下注射接种, 然而, 传统注射方式引起的针头恐惧以及接种引发的各种不适, 又使得患者(特别是儿童), 拒绝或抵制疫苗的接种。因此, 寻求高效、安全、方便的新型疫苗接种方式, 提高疫苗的免疫效力及患者的顺应性, 是现代免疫学应用及发展的重点研究内容。

人体皮肤富含抗原递呈细胞, 例如朗格汉斯细胞和其他树突状细胞, 是疫苗理想的接种位置。此外, 表皮中缺乏神经末梢和毛细血管, 而真皮中的淋巴系统又可使疫苗能被快速而有效地吸收^[1]。因此, 皮内接种既可避免胃肠道的降解和肝脏的首过效应, 又可达到无痛、小剂量、高效之目的,

得到了人们的广泛关注。随着皮内接种新技术和装置的大力发展, 皮肤免疫的操作难度大幅降低, 皮肤作为人体最大器官的免疫功能也有望得到充分发挥。

1 疫苗的接种方式

免疫接种的方法有很多, 除了少数疫苗采用口服之外, 主流的接种方式为注射免疫法, 即通过皮内(intradermal, ID)、皮下(subcutaneous, SC)、肌肉(intramuscular, IM)、静脉(intravenous, IV)等4种途径接种疫苗, 见图1。其中, 皮内接种因其用药量少、不良反应小、免疫效果好等优点, 得到了人们的关注。然而, 皮内接种操作难度大、技术含量高, 又限制了该技术在临床上的广泛应用, 目前临床上仅适用于极少数疫苗和药物, 比如卡介苗(*Bacillus Calmette-Guéri*, BCG)及青霉素、普鲁卡因皮试。近年来, 人们在疫苗皮内接

基金项目: 浙江省科技厅公益技术研究国际合作项目(2015C34005)

作者简介: 严琴英, 女, 博士, 副教授 Tel: (0571)88871077 E-mail: yqy@zjut.edu.cn *通信作者: 杨根生, 男, 博士, 教授 Tel: (0571)88871077 E-mail: yanggs@zjut.edu.cn

种研究方面取得了很大的进展。

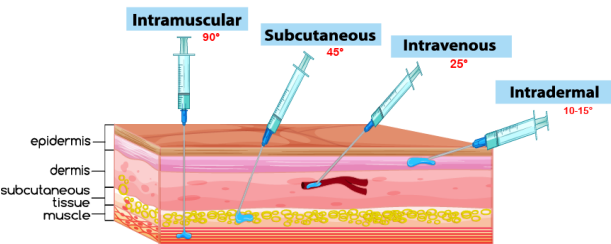


图 1 4 种常见的注射免疫接种方式

Fig. 1 Four common administration immunization methods

2 疫苗皮内接种的优势

皮肤作为人体的最大器官，主要由表皮、真皮和皮下组织构成。皮肤不仅能够抵御体外物质(如病原微生物、化学物质)等的侵入，还能作为与外界进行物质交换的场所，有望成为理想的免疫部位。表皮中富含朗格汉斯细胞，约占上皮细胞的 2%~4%^[1]，见图 2。朗格汉斯细胞是皮肤的抗原递呈细胞，能识别、结合和处理侵入皮肤的抗原，并把抗原传送给 T 细胞，是皮肤免疫功能的重要细胞；真皮中也发现丰富的树突状细胞，并且 CD14⁺巨噬细胞可以促使 B 细胞产生抗体^[2]。因此，通过皮内途径递送疫苗是一种非常有效的手段。如果正确施用，低剂量疫苗通过皮内接种，依然可以诱导出与高剂量或皮下、肌肉注射相当甚至更高的免疫应答^[3]。

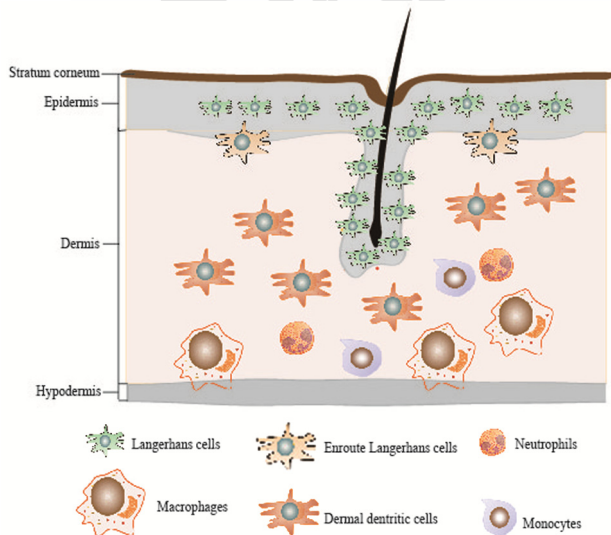


图 2 皮肤相关抗原递呈细胞

Fig. 2 Population of skin associated antigen-presenting cells

以微针为例，当微针穿透表皮时，疫苗抗原被释放到皮内，抗原经由朗格汉斯细胞和树突状

细胞处理，激发 CD4⁺、CD8⁺效应 T 细胞活化，其中 CD4⁺ T 细胞进一步激活 B 细胞分泌特异性抗体^[4]，达到免疫效果，见图 3。

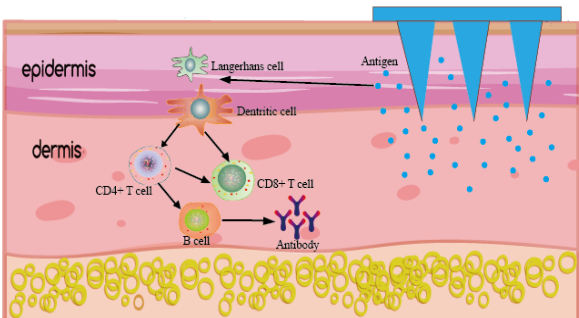


图 3 微针皮内接种疫苗激活免疫反应示意图

Fig.3 Activation of immune responses by the vaccine using microneedle

3 疫苗皮内接种的新技术及其应用

近年来，微针阵列(microneedle patch, MNP)、喷射、基因枪、激光等新设备与技术，已被越来越多地应用于经皮递送领域。其中，MNP、激光、基因枪技术在疫苗皮内接种方面得到了大力发展，其优势和缺点见表 1。

表 1 疫苗皮内接种新技术的优缺点

Tab. 1 Advantages and disadvantages of the new intradermal vaccination

免疫方式	优点	缺点
涂层微针	可递送各种药物、疫苗；制作简单；机械性能好。	载药量低且不均；无法批量生产；注射效率低；针体不可溶，具有潜在生物安全风险；皮肤伤害大。
固体微针	制作简单；机械性能好。	无法准确定量；无法批量生产；注射效率低；针体不可溶，具有潜在生物安全风险；皮肤伤害大。
空心微针	载药量高；定量准确；机械性能好。	注射装置要求高、制作工艺复杂；针体不可溶，具有潜在生物安全风险。
可溶性微针	成本低廉，可批量生产；使用方便、高效，可自主给药；无残留、生物相容性好；对皮肤伤害小，无痛。	接种者可能需要等待较长时间以确保微针在皮内的完全溶解。
激光	无残留、生物相容性好；对皮肤伤害小，无痛。	接种设备、技术要求高，无法自主给药。
基因枪	无残留、生物相容性好；使用简单、操作方便。	造价昂贵；透皮能量大。

3.1 MNP

MNP 是微小的针状结构集合，针体直径

<300 μm , 长度范围为 50~1 000 μm ^[5]。据报道, 微针可以穿透角质层来促进药物传递, 且不会触及神经及血管, 而让患者感知无痛^[6-7]。研究表明^[8-9], SC、IM 和 MNP 组注射相同剂量的疫苗, 结果显示 MNP 组表现更加优越, 接种疫苗后的免疫应答和保护也能持续更长的时间^[8]。有证据显示, 这可能是由于 MNP 对表皮中的抗原递呈细胞(如朗格汉斯细胞)的集合有独特的促进作用^[10-11]。

MNP 根据制备工艺、材料等不同, 大体上可以分成 4 类, 即固体 MNP、涂层 MNP、可溶性 MNP、空心 MNP, 见图 4。4 类 MNP 已在麻疹、流感、卡介苗、狂犬、疟疾、艾滋病等多种疫苗中进行试验, 见表 2。

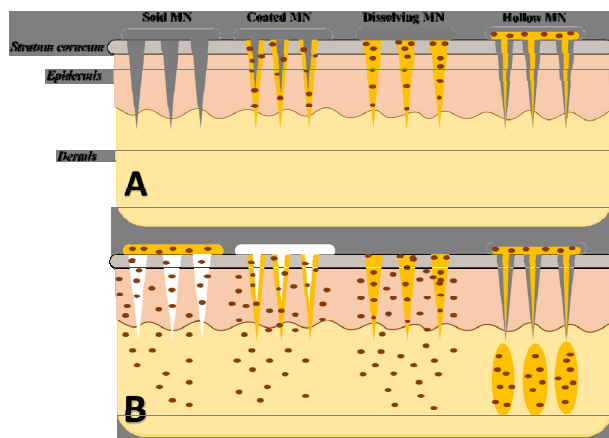


图 4 4 类 MNP 及其给药途径

Fig. 4 Four different types of MNP and the routes of administration

表 2 微针技术在皮内免疫中的研究及应用

Tab. 2 Researches and applications of microneedle technique in intradermal immunization

空心微针	可溶性微针	涂层微针
金黄色葡萄球菌 ^[12]	破伤风 ^[13]	麻疹 ^[14]
狂犬病病毒 ^[15]	脊髓灰质炎病毒 ^[16]	流感 ^[17-18]
脊髓灰质炎病毒 ^[19]	麻疹 ^[20]	乙型肝炎 ^[21-22]
流感 ^[23]	疟疾 ^[24]	丙型肝炎 ^[25]
肉毒毒素 ^[26]	流感 ^[9]	BCG ^[27]
	艾滋病毒 ^[28]	腺病毒 ^[29]
	白喉 ^[13]	HPV ^[30]
	腺病毒 ^[31]	疱疹病毒 ^[33]
	BCG ^[32]	天花病毒 ^[34]

近三年来, 微针技术在皮内免疫接种方面取得了一定的进展, 比如: Arya 等^[35]用蔗糖和聚乙烯醇混合基质制备的载狂犬病 DNA 疫苗可溶性微针, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存 3 周后, 疫苗活性保持稳定。对比格犬微针经皮免疫后发现, 接种部位皮肤伴有短暂性的轻微红斑, 7 d 内全部消退。经 RFFIT 法检

测抗体发现, 用微针贴片接种产生了与同剂量肌肉接种相当的免疫应答, 产生的中和抗体滴度远高于 0.5 IU·mL⁻¹; Esser 等^[36]用聚乙烯醇、蔗糖和羧甲基纤维素混合基质制备载破伤风疫苗可溶性微针, 对 BALB/c 小鼠接种的结果显示, 无佐剂破伤风疫苗微针接种比肌肉注射诱导了更强的免疫应答, 提高了对破伤风毒素攻击的保护, 与肌肉注射市售铝盐佐剂疫苗的效果相当。与常规肌肉注射接种相比, 微针接种无佐剂疫苗母鼠所生幼鼠 3 周龄时, 可检测到更高的特异性 IgG 抗体, 且幼鼠在 6 周攻毒后未出现死亡, 而肌肉注射接种的母鼠所生的 6 周龄幼鼠, 在攻毒后均无法存活; Rouphael 等^[37]用蔗糖和聚乙烯醇混合基质制备了载流感疫苗可溶性微针, 对人进行了免疫接种, 临床试验结果显示, 微针接种疫苗的群体综合反应原性是轻微、短暂的红肿和瘙痒, 无明显疼痛感, 具有良好的耐受性。微针接种引发强烈的抗体反应, 免疫效力与同剂量肌肉注射相当甚至更好, 且明显高于安慰剂组, 其中微针接种 B 株产生的抗体滴度是肌肉注射的 2 倍。微针疫苗贴片在 5, 25, 40 $^{\circ}\text{C}$ 下稳定保存至少 1 年, 故可简化疫苗冷链运输及储存程序; Chen 等^[32]以透明质酸钠制备了载卡介苗干粉可溶性微针, 在 BALB/c 小鼠免疫接种后发现, 微针能将 BCG 干粉运送到皮内形成储库, 19 h 内缓慢释放, 并被皮内的抗原递呈细胞捕获, 引发强烈的免疫应答。与常规注射器皮内接种的对照组小鼠相比, 卡介苗微针经皮免疫可产生相似甚至是更好的免疫效果, 且不会造成皮肤永久伤痕。载疫苗微针在室温下存储 60 d 后, 依然保持良好的机械强度和疫苗活性; Liu 等^[38]以不锈钢涂层微针, 对 BALB/c 小鼠接种埃博拉病毒糖蛋白亚单位疫苗, 结果显示, 微针接种诱导的抗体应答水平比肌肉注射高 4 倍, 保护性更持久。埃博拉病毒攻毒后, 微针接种无佐剂疫苗能够保护 80% 的小鼠免于致死, 显著优于常规肌肉注射, 且微针接种佐剂疫苗能提供 100% 完全保护; Joyce 等^[39]用蔗糖、羧甲基纤维素混合基质制备载麻疹、风疹疫苗可溶性微针, 对婴儿恒河猴接种后发现, 微针免疫组中的所有恒河猴都免受野生型麻疹病毒的攻击, 而常规皮下注射接种组中, 仅 75% 的恒河猴受到保护。此外, 微针接种后有非常轻微的短暂红斑, 无任何水肿或出血, 1 h 后恢复正常; Du 等^[40]制备了硅材料涂层微针和二氧化硅空心微针, 对 BALB/c 小鼠接种白喉类

毒素纳米疫苗, 结果表明: 使用涂层微针和空心微针均能成功接种疫苗, 并引起特异性抗体反应。空心微针接种后, 纳米包封的抗原能诱导比裸抗原更强的免疫应答。而涂层微针接种时, 两者没有显著差异, 其可能的原因是涂层微针的制备是以带正电荷的 *N*-三甲基壳聚糖与带负电荷的纳米疫苗交替逐层涂覆实现疫苗的装载, 这一制备工艺影响了接种后纳米疫苗在皮内的释放及被抗原递呈细胞的捕获。因此, 纳米包封和微针的类型都是抗原免疫原性的影响因素。

3.1.1 涂层 MNP 涂层微针的工作原理是在微针上涂覆了疫苗, 刺入皮肤后发生疫苗的溶解。微针预涂技术包括重复浸涂^[41-42]、单一浸涂^[42]、气流干涂^[43]、雾化涂层^[44]和喷涂^[45]。因此, 疫苗的输送会受到微针尺寸的限制和涂层技术的影响^[46]。

3.1.2 固体 MNP 固体微针通常长 70~800 μm , 排列成一维或二维阵列。目前, 已有大量的材料用于测试制造固体微针, 包括硅、金属、不可降解的聚合物和陶瓷等^[1]。固体 MNP 可以对裸露的皮肤进行预处理, 即插入皮肤后并将其去除, 在皮肤表面形成微孔道, 然后将疫苗置于经预处理后的皮肤表面, 从而增强疫苗在表皮内的传递。这一技术, 目前在美容中应用甚广; 但由于无法确定进入皮内的疫苗剂量, 以及潜在的针体断裂造成的安全风险, 限制了其在疫苗接种方面的应用。

3.1.3 空心 MNP 空心 MNP 是采用微加工技术制成的, 由多个空心微针组成的 MNP, 以微注射的形式输送药物, 可允许在更广泛的皮肤区域同时应用疫苗制剂, 起效快, 作用面积大, 能产生更高的生物利用度及更强的抗原递呈作用^[46], 通常需要非常精确且成本非常高的制造技术。空心 MNP 还可对疫苗以外的其他药物发挥特殊作用, 比如①连接微型泵系统可通过空心微通道持续释药^[1]; ②与微型传感器和微型驱动器结合可实现精密释药^[47]; ③空心微针可抽吸供化验使用的微量体液, 比如抽取微量血液, 快速测定血糖含量, 并根据治疗需要注入微升容积的胰岛素或其他治疗药物^[48]。

3.1.4 可溶性 MNP 可溶性微针是指用水溶性的或可生物降解的高分子材料作为基质材料, 并将疫苗包封于内制备形成的^[49-50], 可在皮肤内完全溶解或降解, 同时将内部包封的疫苗释放进入人体内发挥作用。不同于上述已经讨论的 3 种 MNP,

可溶性 MNP 具有更高的生物相容性, 不产生生物危害废物, 具有更明显的优势^[51-52]。与空心、涂层 MNP 不同, 使用可溶性 MNP 方式免疫的接种者可能需要等待较长时间以确保微针的完全溶解。近年来, 可溶性微针已成为经皮给药系统中最引人关注的领域之一, 其在皮内免疫方面取得了可喜的进展。2017 年, 《The Lancet》杂志报道了乔治亚理工学院 Prausnitz 教授团队研制的流感疫苗微针贴片首次在人体临床实验中获得成功, 该贴片为 1 cm×1 cm, 由蔗糖和聚乙烯醇制备而成。实验结果显示, 疫苗活性在 5, 25, 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下依然能稳定保持 1 年, 可实现自我给药, 没有不良反应, 免疫效力与肌肉注射相当甚至更好, 其中微针接种 B 株产生的抗体滴度是相同剂量肌肉注射的 2 倍^[37]。

可溶性 MNP 的制备工艺也在不断改进, 形成了以模具为主, 辅以铸造、注塑、热压花、扩散以及喷射等技术联用的较为成熟的工艺体系^[53-55]。常用的可溶性微针的材料大多为各种聚合物或糖, 聚合物包括: 聚乳酸^[50]、聚乙醇酸^[56]、聚乳酸-乙醇酸^[57]、羧甲基纤维素^[58]、透明质酸钠^[59]、聚乙烯吡咯烷酮^[60]、硫酸软骨素^[61]、聚乙烯醇^[37]等可生物降解的高分子; 而最常用的糖是海藻糖、麦芽糖、蔗糖和半乳糖^[53, 62]。

3.2 激光技术

激光技术已经被广泛应用于皮肤病症的临床治疗中, 激光对皮肤热消融的主要机制是有选择的去除角质层而不损坏更深的组织, 激光通过光能的沉积消融角质层, 导致水分蒸发和皮肤中微通道的形成^[63-64], 从而提高了亲脂性和亲水性的药物进入皮肤层^[65-68]。因激光对皮内的抗原递呈细胞有聚集效应, 可发挥免疫佐剂作用, 同时又能作为疫苗接种提供新途径, 受到了广泛的关注。

近 2 年来, 激光皮内免疫研究取得了一定的进展, Engelke 等^[69]以 Er:YAG 激光对猪皮递送罗丹明 B 标记的葡聚糖(作为疫苗模型药物), 结果表明, 经激光热消融后的猪皮表面实现微孔化, 与未处理皮肤相比, 皮肤水分流失增加 4~5 倍, 在此皮肤上使用水溶性 PVA 薄膜贴剂(内含罗丹明 B 标记的葡聚糖)可大大促进生物大分子皮内递送, 经皮传递效果明显优于单一 PVA 薄膜; Fujimoto 等^[70]以 CO_2 激光在裸鼠皮肤递送 OVA-FITC(作为疫苗模型药物), 可显著增强 OVA-FITC 的经皮渗透; Cai

等^[71]对患有鼻咽 HPV11 阳性复发性呼吸道乳头状瘤的患者使用 CO₂ 激光接种四价人乳头瘤病毒疫苗后,复发病灶缩小,手术后 33 个月或 6 年的长期随访中没有复发病变; Morse 等^[72]对小鼠进行激光辅助皮内流感疫苗接种,研究发现,连续波 NIR 激光可广泛调节迁移性 DC(migDC)群体,特别是增强皮肤中朗格汉斯细胞对抗原的捕获。相比之下,脉冲波 NIR 激光对 migDC 子集的影响不大。连续波 NIR 激光的佐剂效果明显优于脉冲波激光,它为 migDC 提供了理想的免疫刺激微环境,因此,优化激光参数对于激光免疫具有十分重要的作用; Scheiblhofer 等^[73]用烧蚀性点阵激光经皮递送乙型肝炎表面抗原(HBsAg)免疫 BALB/c 小鼠,ELISA 法评估特异性抗体滴度结果显示,抗体滴度与激光致孔的深度有关,并且激光能量密度在 8.4 J·cm⁻² 时,抗体滴度达到峰值。

3.3 基因枪

基因枪技术,又被称为“生物弹道技术”(Biolistic Technology)或“微粒轰击技术”(Particle Bombardment Technology),是用火药爆炸或者高压气体加速将包裹了 DNA 的球状金粉或者钨粉颗粒(微米级)直接送入完整的组织或者细胞中的一种技术^[74-75]。基因枪技术自 1987 年诞生以来,发展迅速,根据其动力原理,可分为粉末基因枪、高压电子基因枪和气基因枪。粉末基因枪是使用台式设备点火药作为推动力,对加载到子弹上的微粒子进行加速^[76];电子基因枪则使用高压蒸发水滴,使气体膨胀,用于实现微粒的加速^[77];而气体基因枪主要依靠高压气体加速微粒达到足够的速度以到达靶位^[78]。近年来,随着第三代手持式基因枪技术的快速发展和基因疫苗的不断研究,基因枪技术用于 DNA 疫苗的皮内接种也得到推广。基因枪皮内接种 DNA 疫苗示意图见图 5。

近 3 年来,基因枪技术用于免疫取得了一定进展,APS 等^[79]以枯草芽孢杆菌孢子作为 DNA 疫苗载体,并同时作为基因枪中金微粒的替代品,在 DNA 吸收及诱导蛋白质表达水平方面,可产生与金微粒类似的效果,能有效地将 DNA 疫苗传递到小鼠体内,并诱导产生特异性抗体反应; Yamshchikov 等^[80]对 Swiss 小鼠以肌肉注射和基因枪注射 2 种不同方式接种减毒西尼罗河 DNA 疫苗,攻毒后小鼠均无死亡,且基因枪接种显示

出了更强的免疫效果; Wu 等^[81]将表达 HPV 16 型 E7 基因的肿瘤细胞 TC-1 接种 4 d 后,每隔 5 d,基因枪技术传递 BAFF-E7 DNA 疫苗对 C57BL/6 小鼠进行皮内免疫治疗,累计 3 次,16 d 后,肿瘤生长速度得到了明显的抑制,存活率较对照组显著提高; Fynan 等^[82]使用基因枪技术,对 BALB/c 小鼠进行流感疫苗接种,大大提高了抵抗流感病毒攻击的效果,其质粒 DNA 比其他给药途径少 250~2 500 倍。

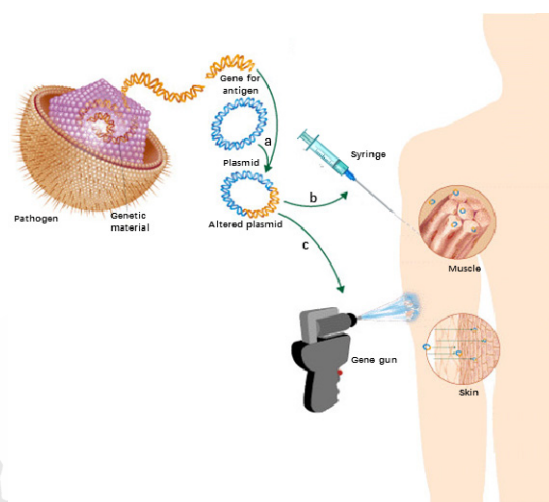


图 5 基因枪皮内接种 DNA 疫苗示意图

Fig. 5 Schematic diagram of DNA vaccine inoculated by gene gun

多项研究表明^[76, 79, 81-84],基因枪接种后,血液中的抗体水平高于肌肉接种,而 DNA 的用量远低于肌肉注射,主要是因为基因枪是直接把 DNA 疫苗打入机体细胞,而不是像肌肉注射靠细胞吸收,故而可极大地提高 DNA 疫苗的利用率。

基因枪是一种纯物理的基因转移方法,对靶细胞几乎没有要求,对基因大小也无严格要求,并且可以大大减少疫苗的使用剂量,使用简单,操作方便,应用面广。主要的缺点是造价昂贵、透皮能量大。但随着生物、材料、应用物理等相关学科的不断发 展,将会涌现出更多价格低廉、制备方便的新工艺来实现基因枪皮内免疫技术的重大突破,广泛拓展其应用领域。

4 皮内接种的研究意义和前景展望

综上所述,皮内接种有着其他方式无可比拟的优越性,随着新技术及相关学科的不断发 展,未来有望在预防性和治疗性疫苗中得以广泛使用,可显著提高透皮给药系统的市场价值。因此,加强新型皮内接种方式的研究,寻求高效、安全、方便的给

药途径, 意义重大。

激光、基因枪技术虽已被证明在皮内免疫上的可行性, 然而使用成本高昂的缺点限制其推广应用, 期待未来有更便携、更经济的设备来解决这一问题。

而 MNP 因其成本低廉、无残留、生物相容性好、使用方便、无痛、高效等优点, 在皮内免疫及经皮给药领域显示出了巨大的潜力, 特别对于发展中国家意义更为重大, 通过 MNP 的免疫计划可以用最少的医疗培训和较低的相关成本来对人民实施疫苗的接种。但目前 FDA 批准的 MNP 疫苗产品仍然很少, 毕竟将生产制造扩大到工业水平, 还需要进行系统地规划与设计, 制定科学的标准并进行严格监管, 才能实现 MNP 大规模生产的低成本、高质量、高效益。

REFERENCES

- [1] KIM Y C, PARK J H, PRAUSNITZ M R. Microneedles for drug and vaccine delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(14): 1547-1568.
- [2] ROMANI N, FLACHER V, TRIPP C H, et al. Targeting skin dendritic cells to improve intradermal vaccination [M]// *Intradermal Immunization*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011: 113-138. Doi: 10.1007/82_2010_118.
- [3] COMBADIÈRE B, LIARD C. Transcutaneous and intradermal vaccination [J]. *Human Vaccines*, 2014, 7(8): 811-827.
- [4] KWON K M, LIM S M, CHOI S, et al. Microneedles: quick and easy delivery methods of vaccines [J]. *Clin Exp Vaccine Res*, 2017, 6(2): 156-159.
- [5] MOSS G P J. Introduction [M]// *Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015: 1-40. Doi: 10.1002/9781118734506.ch1.
- [6] BIRCHALL J C, CLEMO R, ANSTEY A, et al. Microneedles in clinical practice: an exploratory study into the opinions of healthcare professionals and the public [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(1): 95-106.
- [7] ESCOBAR-CHÁVEZ J J, BONILLA-MARTÍNEZ D, VILLEGAS-GONZÁLEZ M A, et al. Microneedles: a valuable physical enhancer to increase transdermal drug delivery [J]. *J Clin Pharmacol*, 2011, 51(7): 964-977.
- [8] KOUTSONANOS D G, VASSILIEVA E V, STAVROPOULOU A, et al. Delivery of subunit influenza vaccine to skin with microneedles improves immunogenicity and long-lived protection [J]. *Sci Rep*, 2012(2): 357.
- [9] SULLIVAN S P, KOUTSONANOS D G, DEL PILAR MARTIN M, et al. Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination [J]. *Nat Med*, 2010, 16(8): 915-920.
- [10] PEARTON M, KANG S M, SONG J M, et al. Influenza virus-like particles coated onto microneedles can elicit stimulatory effects on Langerhans cells in human skin [J]. *Vaccine*, 2010, 28(37): 6104-6113.
- [11] PEARTON M, PIRRI D, KANG S M, et al. Host responses in human skin after conventional intradermal injection or microneedle administration of virus-like-particle influenza vaccine [J]. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2(10): 1401-1410.
- [12] RYAN E, GARLAND M J, SINGH T R R, et al. Microneedle-mediated transdermal bacteriophage delivery [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47(2): 297-304.
- [13] MATSUO K, HIROBE S, YOKOTA Y, et al. Transcutaneous immunization using a dissolving microneedle array protects against tetanus, diphtheria, malaria, and influenza [J]. *J Control Release*, 2012, 160(3): 495-501.
- [14] EDENS C, COLLINS M L, AYERS J, et al. Measles vaccination using a microneedle patch [J]. *Vaccine*, 2013, 31(34): 3403-3409.
- [15] LAURENT P E, BOURHY H, FANTINO M, et al. Safety and efficacy of novel dermal and epidermal microneedle delivery systems for rabies vaccination in healthy adults [J]. *Vaccine*, 2010, 28(36): 5850-5856.
- [16] EDENS C, DYBDAHL-SISSOKO N C, WELDON W C, et al. Inactivated polio vaccination using a microneedle patch is immunogenic in the rhesus macaque [J]. *Vaccine*, 2015, 33(37): 4683-4690.
- [17] KIM Y C, YOO D G, COMPANS R W, et al. Cross-protection by co-immunization with influenza hemagglutinin DNA and inactivated virus vaccine using coated microneedles [J]. *J Control Release*, 2013, 172(2): 579-588.
- [18] KIM Y C, QUAN F S, COMPANS R W, et al. Formulation and coating of microneedles with inactivated influenza virus to improve vaccine stability and immunogenicity [J]. *J Control Release*, 2010, 142(2): 187-195.
- [19] SCHIPPER P, VAN DER MAADEN K, ROMELIN S, et al. Determination of depth-dependent intradermal immunogenicity of adjuvanted inactivated polio vaccine delivered by microinjections via hollow microneedles [J]. *Pharm Res*, 2016, 33(9): 2269-2279.
- [20] EDENS C, COLLINS M L, GOODSON J L, et al. A microneedle patch containing measles vaccine is immunogenic in non-human Primates [J]. *Vaccine*, 2015, 33(37): 4712-4718.
- [21] GUO L, QIU Y Q, CHEN J M, et al. Effective transcutaneous immunization against hepatitis B virus by a combined approach of hydrogel patch formulation and microneedle arrays [J]. *Biomed Microdevices*, 2013, 15(6): 1077-1085.
- [22] YIN D F, LIANG W Q, XING S X, et al. Hepatitis B DNA vaccine-polycation nano-complexes enhancing immune response by percutaneous administration with microneedle [J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(8): 1283-1291.
- [23] LIN Y H, LEE I C, HSU W C, et al. Rapid fabrication method of a microneedle mold with controllable needle height and width [J]. *Biomed Microdevices*, 2016, 18(5): 85. Doi: 10.1007/S10544-016-0113-8.
- [24] CAREY J B, VRDOLJAK A, O'MAHONY C, et al. Microneedle-mediated immunization of an adenovirus-based malaria vaccine enhances antigen-specific antibody immunity and reduces anti-vector responses compared to the intradermal route [J]. *Sci Rep*, 2014(4): 6154. Doi: 10.1038/srep06154.
- [25] GILL H S, SÖDERHOLM J, PRAUSNITZ M R, et al. Cutaneous vaccination using microneedles coated with hepatitis C DNA vaccine [J]. *Gene Ther*, 2010, 17(6): 811-814.
- [26] TORRISI B M, ZARNITSYN V, PRAUSNITZ M R, et al. Pocketed microneedles for rapid delivery of a liquid-state botulinum toxin A formulation into human skin [J]. *J Control Release*, 2013, 165(2): 146-152.
- [27] HIRAISHI Y, NANDAKUMAR S, CHOI S O, et al. *Bacillus Calmette-Guérin* vaccination using a microneedle patch [J]. *Vaccine*, 2011, 29(14): 2626-2636.

- [28] PATTANI A, MCKAY P F, GARLAND M J, et al. Microneedle mediated intradermal delivery of adjuvanted recombinant HIV-1 CN54gp140 effectively primes mucosal boost inoculations [J]. *J Control Release*, 2012, 162(3): 529-537.
- [29] VRDOLJAK A, MCGRATH M G, CAREY J B, et al. Coated microneedle arrays for transcutaneous delivery of live virus vaccines [J]. *J Control Release*, 2012, 159(1): 34-42.
- [30] CORBETT H J, FERNANDO G J, CHEN X F, et al. Skin vaccination against cervical cancer associated human *Papillomavirus* with a novel micro-projection array in a mouse model [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13460. Doi: 10.1371/journal.pone.0013460.
- [31] MATSUO K, YOKOTA Y, ZHAI Y, et al. A low-invasive and effective transcutaneous immunization system using a novel dissolving microneedle array for soluble and particulate antigens [J]. *J Control Release*, 2012, 161(1): 10-17.
- [32] CHEN F, YAN Q Y, YU Y, et al. BCG vaccine powder-laden and dissolvable microneedle arrays for lesion-free vaccination [J]. *J Control Release*, 2017(255): 36-44.
- [33] CHEN X F, KASK A S, CRICHTON M L, et al. Improved DNA vaccination by skin-targeted delivery using dry-coated densely-packed microprojection arrays [J]. *J Control Release*, 2010, 148(3): 327-333.
- [34] HOOPER J W, GOLDEN J W, FERRO A M, et al. Smallpox DNA vaccine delivered by novel skin electroporation device protects mice against intranasal poxvirus challenge [J]. *Vaccine*, 2007, 25(10): 1814-1823.
- [35] ARYA J M, DEWITT K, SCOTT-GARRARD M, et al. Rabies vaccination in dogs using a dissolving microneedle patch [J]. *J Control Release*, 2016(239): 19-26.
- [36] ESSER E S, ROMANYUK A, VASSILIEVA E V, et al. Tetanus vaccination with a dissolving microneedle patch confers protective immune responses in pregnancy [J]. *J Control Release*, 2016(236): 47-56.
- [37] ROUPHAEL N G, PAINE M, MOSLEY R, et al. The safety, immunogenicity, and acceptability of inactivated influenza vaccine delivered by microneedle patch (TIV-MNP 2015): a randomised, partly blinded, placebo-controlled, phase 1 trial [J]. *Lancet*, 2017, 390(10095): 649-658.
- [38] LIU Y, YE L, LIN F, et al. Intradermal immunization by Ebola virus GP subunit vaccines using microneedle patches protects mice against lethal EBOV challenge [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 11193.
- [39] JOYCE J C, CARROLL T D, COLLINS M L, et al. A microneedle patch for measles and *Rubella* vaccination is immunogenic and protective in infant rhesus macaques [J]. *J Infect Dis*, 2018, 218(1): 124-132.
- [40] DU G S, WOYTHE L, VAN DER MAADEN K, et al. Coated and hollow microneedle-mediated intradermal immunization in mice with diphtheria toxoid loaded mesoporous silica nanoparticles [J]. *Pharm Res*, 2018, 35(10): 189.
- [41] FUN M Y, SCOTT S, JAMES M, et al. Apparatus and method for transdermal delivery of influenza vaccine [M]. CA. 2005.
- [42] GILL H S, PRAUSNITZ M R. Coated microneedles for transdermal delivery [J]. *J Control Release*, 2007, 117(2): 227-237.
- [43] CHEN X F, FERNANDO G J, CRICHTON M L, et al. Improving the reach of vaccines to low-resource regions, with a needle-free vaccine delivery device and long-term thermostabilization [J]. *J Control Release*, 2011, 152(3): 349-355.
- [44] CORMIER M, JOHNSON B, AMERI M, et al. Transdermal delivery of desmopressin using a coated microneedle array patch system [J]. *J Control Release*, 2004, 97(3): 503-511.
- [45] MCGRATH M G, VRDOLJAK A, O'MAHONY C, et al. Determination of parameters for successful spray coating of silicon microneedle arrays [J]. *Int J Pharm*, 2011, 415(1-2): 140-149.
- [46] HARVEY A J, KAESTNER S A, SUTTER D E, et al. Microneedle-based intradermal delivery enables rapid lymphatic uptake and distribution of protein drugs [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(1): 107-116.
- [47] CIUI B, MARTIN A, MISHRA R K, et al. Wearable wireless tyrosinase bandage and microneedle sensors: toward melanoma screening [J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7(7): e1701264. Doi: 10.1002/adhm.201701264.
- [48] VINAYAKUMAR K B, KULKARNI, PRACHIT G, et al. A hollow stainless steel microneedle array to deliver insulin to a diabetic rat [J]. *J Micromech Microeng*, 2016, 26(6): 065013. Doi: 10.1088/0960-1317.
- [49] SULLIVAN S P, MURTHY N, PRAUSNITZ M R. Minimally invasive protein delivery with rapidly dissolving polymer microneedles [J]. *Adv Mater Weinheim*, 2008, 20(5): 933-938.
- [50] LEE J W, PARK J H, PRAUSNITZ M R. Dissolving microneedles for transdermal drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(13): 2113-2124.
- [51] PRAUSNITZ M R, LANGER R. Transdermal drug delivery [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11): 1261-1268.
- [52] LAHIJI S F, DANGOL M, JUNG H. A patchless dissolving microneedle delivery system enabling rapid and efficient transdermal drug delivery [J]. *Sci Rep*, 2015(5): 7914. Doi: 10.1038/srep07914.
- [53] DONNELLY R F, SINGH T R R, WOOLFSON A D. Microneedle-based drug delivery systems: Microfabrication, drug delivery, and safety [J]. *Drug Deliv*, 2010, 17(4): 187-207.
- [54] MOORE A, VRDOLJAK A. Method for fabricating a microneedle, and produced microneedle: Ireland, WO2012153266 A2 [P]. 2012-11-15.
- [55] MCGRATH M G, VUCEN S, VRDOLJAK A, et al. Production of dissolvable microneedles using an atomised spray process: Effect of microneedle composition on skin penetration [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 86(2): 200-211.
- [56] ZHANG J, WANG Y, JIN J Y, et al. Use of drawing lithography-fabricated polyglycolic acid microneedles for transdermal delivery of itraconazole to a human basal cell carcinoma model regenerated on mice [J]. *JOM*, 2016, 68(4): 1128-1133.
- [57] NGUYEN H X, BANGA A K. Delivery of methotrexate and characterization of skin treated by fabricated PLGA microneedles and fractional ablative laser [J]. *Pharm Res*, 2018, 35(3): 68. Doi: 10.1007/s11095-018-2369-6.
- [58] PARK Y H, HA S K, CHOI I, et al. Fabrication of degradable carboxymethyl cellulose (CMC) microneedle with laser writing and replica molding process for enhancement of transdermal drug delivery [J]. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2016, 21(1): 110-118.
- [59] CHOI S Y, KWON H J, AHN G R, et al. Hyaluronic acid microneedle patch for the improvement of crow's feet wrinkles [J]. *Dermatol Ther*, 2017, 30(6). DOI: 10.1111/dth.12546.
- [60] SHIM W S, HWANG Y M, SUN G P, et al. Role of polyvinylpyrrolidone in dissolving microneedle for efficient transdermal drug delivery: *in vitro* and clinical studies: fast dissolving microneedle [J]. *Bulletin- Korean Chem Soc*, 2018, 39(6): 789-793.

- [61] POIRIER D, RENAUD F, DEWAR V, et al. Hepatitis B surface antigen incorporated in dissolvable microneedle array patch is antigenic and thermostable [J]. *Biomaterials*, 2017(145): 256-265.
- [62] FUKUSHIMA K, ISE A, MORITA H, et al. Two-layered dissolving microneedles for percutaneous delivery of peptide/protein drugs in rats [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(1): 7-21.
- [63] YAN Q, XIEQI W, ZHANG Z, et al. Cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate (cGAMP): a novel vaccine adjuvant [J]. *Chin J Microbiol Immunol*(中华微生物学和免疫学杂志), 2017, 37(10): 790-794.
- [64] BARON E D, HARRIS L, REDPATH W S, et al. Laser-assisted penetration of topical anesthetic in adults [J]. *Arch Dermatol*, 2003, 139(10): 1288-1290.
- [65] ALEXANDER A, DWIVEDI S, AJAZUDDIN, et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery [J]. *J Control Release*, 2012, 164(1): 26-40.
- [66] PAUDEL K S, MILEWSKI M, SWADLEY C L, et al. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery [J]. *Ther Deliv*, 2010, 1(1): 109-131.
- [67] GÓMEZ C, COSTELA Á, GARCÍA-MORENO I, et al. Laser treatments on skin enhancing and controlling transdermal delivery of 5-fluorouracil [J]. *Lasers Surg Med*, 2008, 40(1): 6-12.
- [68] NELSON J S, MCCULLOUGH J L, GLENN T C, et al. Mid-infrared laser ablation of stratum corneum enhances *in vitro* percutaneous transport of drugs [J]. *J Invest Dermatol*, 1991, 97(5): 874-879.
- [69] ENGELKE L, WINTER G, ENGERT J. Application of water-soluble polyvinyl alcohol-based film patches on laser microporated skin facilitates intradermal macromolecule and nanoparticle delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018(128): 119-130.
- [70] FUJIMOTO T, ITO M, ITO S, et al. Fractional laser-assisted percutaneous drug delivery via temperature-responsive liposomes [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2017, 28(7): 679-689.
- [71] CAI Y, MEREVA V S, LEE A H, et al. Nasopharyngeal papillomas treated with CO₂ laser and human *Papillomavirus* vaccination [J]. *Laryngoscope*, 2017, 127(10): 2279-2281.
- [72] MORSE K, KIMIZUKA Y, CHAN M P K, et al. Near-infrared 1064 nm laser modulates migratory dendritic cells to augment the immune response to intradermal influenza vaccine [J]. *J Immunol*, 2017, 199(4): 1319-1332.
- [73] SCHEIBLHOFER S, STROBL A, HOEPFLINGER V, et al. Skin vaccination via fractional infrared laser ablation-optimization of laser-parameters and adjuvantation [J]. *Vaccine*, 2017, 35(14): 1802-1809.
- [74] O'BRIEN J A, LUMMIS S C. Diolistics: incorporating fluorescent dyes into biological samples using a gene gun [J]. *Trends Biotechnol*, 2007, 25(11): 530-534.
- [75] VALSALAKUMARI J, BABY J, BIJIN E, et al. Novel gene delivery systems [J]. *Int J Pharma Invest*, 2013, 3(1): 1.
- [76] HUANG P H, CHEN P Y. Design of a two-stage electromagnetic impulse force circuit for gene gun [J]. *J Marine Sci Technol*, 2011, 19(6): 686-692.
- [77] CHRISTOU P, MCCABE D, MARTINELL B, et al. Soybean genetic engineering - commercial production of transgenic plants [J]. *Trends Biotechnol*, 1990(8): 145-151.
- [78] ZHANG D, DAS D B, RIELLY C D. An experimental study of microneedle-assisted microparticle delivery [J]. *J Pharm Sci*, 2013, 102(10): 3632-3644.
- [79] APS L R M M, TAVARES M B, ROZENFELD J H K, et al. Bacterial spores as particulate carriers for gene gun delivery of plasmid DNA [J]. *J Biotechnol*, 2016(228): 58-66.
- [80] YAMSHCHIKOV V, MANUVAKHOVA M, RODRIGUEZ E. Development of a human live attenuated West Nile infectious DNA vaccine: Suitability of attenuating mutations found in SA14-14-2 for WN vaccine design [J]. *Virology*, 2016(487): 198-206.
- [81] WU C C, WU F C, HSU Y T, et al. Enhanced anti-tumor therapeutic efficacy of DNA vaccine by fusing the E7 gene to BAFF in treating human papillomavirus-associated cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 33024-33036.
- [82] FYNAN E F, LU S, ROBINSON H L. One group's historical reflections on DNA vaccine development [J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(9): 966-970.
- [83] BERGMANN-LEITNER E S, LEITNER W W. Vaccination using gene-gun technology [M]//*Malaria Vaccines*. New York, NY: Springer New York, 2015: 289-302. Doi: 10.1007/978-1-4939-2815-6_22.
- [84] KIS E E, WINTER G, MYSCHEK J. Devices for intradermal vaccination [J]. *Vaccine*, 2012, 30(3): 523-538.

收稿日期: 2018-12-05
(本文责编: 曹粤锋)