

❖ 实验研究

Ciliary neurotrophic factor-loaded polyethylene glycol-poly lactic-co-glycolic acid microbubbles combined with ultrasound for protection of retinal ganglion cells

WANG Wen-ting¹, LIU Su^{1*}, WANG Zhi-gang², ZHOU Xi-yuan¹

(1. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Institute of Ultrasonic Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] Objective To prepare and observe the properties of ciliary neurotrophic factor-loaded polyethylene glycol-poly lactic-co-glycolic acid ultrasound contrast agents (CNTF-PEG-PLGA), and to assess the protection effect of CNTF-loaded PEG-PLGA microbubbles combined with ultrasound on retinal ganglion cells (RGCs) after optic nerve injury in rats.

Methods CNTF-loaded PEG-PLGA ultrasound microbubbles were prepared using double emulsion technique, and the properties of the ultrasound microbubbles were observed. Totally 145 adult SD rats were randomly divided into 7 groups. After optic nerve injury, RGCs were retrograde labeled with the fluorescent tracer fluorogold (FG) to count RGCs number. The expressions of growth associated protein 43 (GAP-43) were detected by immunohistochemistry on the 3rd day, the 1st, the 2nd and the 4th week after optic nerve injury. The retinal pathological morphology change was observed at different times. **Results** CNTF-loaded PEG-PLGA ultrasound microbubbles were smooth and spherical with a mean size of (312.5 ± 57.35) nm, with the drug loading $0.298 \mu\text{g}/\text{mg}$ and encapsulation efficiency of 62.35%. There were 93.60% CNTF-PEG-PLGA release within 28 days. The results showed that after RGCs were retrograde labeled with FG, the RGCs count of group G was higher than that of other groups at every time, (all $P < 0.05$), but less than group A ($P < 0.05$). The expression of group G was higher than that of other groups ($P < 0.05$) on the 1st, the 2nd and the 4th week after optic nerve injury. PEG-PLGA microbubbles did not induce any histology signs of ocular inflammation after their injection in the vitreous. **Conclusion** The ciliary neurotrophic factor-loaded PEG-PLGA microbubbles combined with ultrasound can protect retinal ganglion cells against after optic nerve injury in rats.

[Key words] PEG-PLGA; Ultrasonics; Microbubbles; Ciliary neurotrophic factor; Retinal ganglion cells

载睫状神经营养因子聚乙二醇-乳酸/羟基乙酸共聚物微泡联合超声对视网膜神经节细胞的保护作用

王文婷¹, 刘 苏^{1*}, 王志刚², 周希媛¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院眼科, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010)

[摘要] 目的 制备载睫状神经营养因子(CNTF)的聚乙二醇(PEG)-乳酸/羟基乙酸共聚物(PLGA)超声微泡造影剂(CNTF-PEG-PLGA), 观察其联合超声对神经损伤大鼠视网膜神经节细胞(RGCs)的保护作用。方法 采用双乳化法制备CNTF-PEG-PLGA, 并检测其基本特性。随机选取SD大鼠145只(双眼兼用), 将其分为7组, 采用视神经钳夹法制作

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81130025)、国家自然科学基金面上项目(81071157)。

[作者简介] 王文婷(1986—), 女, 宁夏银川人, 在读硕士, 医师。研究方向: 青光眼的发病机制与基因治疗。E-mail: tingting.9999@163.com

[通讯作者] 刘苏, 重庆医科大学附属第二医院眼科, 400010。E-mail: liusu2836@sina.com

[收稿日期] 2012-12-09 **[修回日期]** 2013-03-22

大鼠视神经损伤模型。治疗后应用荧光金(FG)逆行标记法比较各组大鼠 RGCs 存活数;视网膜组织病理切片观察视网膜的形态结构改变,评价载药微泡及联合超声的安全性;生长相关蛋白-43(GAP-43)免疫组化染色,观察大鼠视网膜 GAP-43 的表达情况。结果 CNTF-PEG-PLGA 微泡平均粒径(312.5 ± 57.35)nm,包封率 62.35%,载药量 $0.298 \mu\text{g}/\text{mg}$,体外释放 28 天时微泡释放率达 93.60%。FG 标记 RGCs 示,在每个观察时间点 G 组平均 RGCs 计数均显著高于其他各损伤组($P < 0.05$),但仍低于 A 组($P < 0.05$);G 组 GAP-43 表达可持续到伤后 4 周,且明显高于其他各组($P < 0.05$);视网膜组织病理切片示玻璃体腔注射微泡后视网膜未见明显炎性细胞浸润现象。结论 载睫状神经营养因子 PEG-PLGA 微泡联合超声可增强药物对视神经损伤大鼠视网膜神经节细胞的保护作用,延长药物作用时间。

[关键词] 聚乙二醇-乳酸/羟基乙酸共聚物;超声学;微泡;睫状神经营养因子;视网膜神经节细胞

[中图分类号] R774; R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2013)06-0875-05

治疗青光眼视神经病变、黄斑病变等多种眼后节疾病的较为合理的给药方式是玻璃体腔注射给药,可避开血-视网膜屏障对眼内用药的限制,但存在药物体内半衰期较短、生物利用率较低及反复球内注射带来的损伤和并发症等问题。作为一种新型靶向定位药物释放载体系统,超声微泡可增强药物的稳定性,减轻不良反应,延长药物作用时间,从而提高疗效^[1]。由生物可降解型常用药物/基因缓释载体 PLGA 发展而来的多功能高分子材料超声微泡延续了缓释载体良好的载药性能,成为近年来发展起来的一种新型超声微泡造影剂^[2]。本研究制备载睫状神经营养因子(CNTF)的聚乙二醇(PEG)-乳酸/羟基乙酸共聚物(PLGA)超声微泡造影剂(CNTF-PEG-PLGA),观察其联合超声对视神经损伤大鼠视网膜神经节细胞(RGCs)的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料及动物 重组人睫状神经营养因子(rhCNTF, PeproTech 公司);PEG-PLGA (PEG, $M_w = 2000$;PLGA, LA/GA 75/25, $M_w = 34000$, 济南岱罡生物技术公司);聚乙烯醇(PVA, Sigma 公司);荧光金(FG, Biotium 公司);生长相关蛋白-43(GAP-43, 北京博奥森公司);CGZZ 型超声基因转染治疗仪。健康成年清洁级 SD 大鼠 145 只,体质量 $200 \sim 250 \text{ g}$,平均(227.30 ± 14.54)g,由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 PEG-PLGA 超声微泡的制备^[3-4] ①制备载 CNTF-PEG-PLGA 超声微泡:将 $10 \mu\text{g}$ CNTF 和一定量 BSA 溶于 $100 \mu\text{l}$ 去离子水中。将适量 PEG-PLGA 溶于 2 ml 有机溶剂(二氯甲烷:丙酮=3:1)的混合溶液中充分溶解,加入蛋白溶液,冰浴条件下声振 50 s ,加到适量 1% PVA 溶液中,均质作用 5 min ,磁力搅拌 3 h ,挥发有机溶剂,离心、漂洗,真空冷冻干燥 48 h 后充入氟烷气体,即制得 CNTF-PEG-PLGA 超声微泡冻干粉,备用。②制备空白 PEG-PLGA 微泡:

将与①中同等量的 BSA 溶于 $100 \mu\text{l}$ 去离子水中,余过程同①,得到空白 PEG-PLGA 微泡。

1.2.2 微泡表征 ①应用 Malvern 激光粒径仪测定微泡粒径及 Zeta 电位;②透射电子显微镜分析微泡结构。

1.2.3 微泡载药量及包封率的测定 精密称取一定量 CNTF-PEG-PLGA 超声微泡冻干粉,溶于 1.0 ml 有机溶剂中于 37°C 下溶解,恒温振荡过夜,萃取微泡中的蛋白。采用 ELISA 法测定萃取液中的 CNTF 浓度,计算微泡的包封率及载药量。

1.2.4 体外释放行为 10 mg 微泡冻干粉置于磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)中(pH 值 7.4),在 37°C 、 100 转/分 的条件下恒温振荡动态透析,分别在预设时间点从缓冲液中取样 1 ml ,并及时补充等量释放液。用 ELISA 法测定 CNTF 浓度,绘制释药时间曲线。

1.2.5 大鼠视神经损伤模型的建立及实验分组 腹腔注射麻醉 SD 大鼠,手术显微镜下采用眼科剪从上睑外侧 $1/3$ 处剪开颞侧球结膜,暴露球后视神经,于眼球后极部后 2 mm 处使用微型血管夹钳夹视神经 10 s 。直接检眼镜下观察,将眼底血管充盈良好者纳入实验。将 145 只 SD 大鼠随机分为 7 组:A 组不予任何处理;B~G 组建立大鼠视神经损伤模型。B 组玻璃体腔注射 $10 \mu\text{l}$ 生理盐水;C 组玻璃体腔注射 CNTF 溶液 $10 \mu\text{l}$ ($0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$);D 组玻璃体腔注射 CNTF 溶液 $10 \mu\text{l}$ 后立即用超声辐照大鼠眼球,频率 1 MHz ,声强为 $0.5 \text{ W}/\text{cm}^2$,脉冲辐照 60 s ^[5];E 组玻璃体腔注射 CNTF-PEG-PLGA 微泡 $10 \mu\text{l}$ (含 CNTF $2 \mu\text{g}$);F 组玻璃体腔注射空白 PEG-PLGA 微泡 $10 \mu\text{l}$ 后立即超声辐照;G 组玻璃体腔注射 CNTF-PEG-PLGA 微泡 $10 \mu\text{l}$ 后立即给予超声辐照,F、G 组超声参数同 D 组。

1.3 荧光金标记 RGCs 造模前 7 天,将大鼠于俯卧位保定于大鼠立体定位仪,暴露颅骨前凶骨性标志,于两侧正中点后 6.8 mm 中线旁开 1.6 mm 处、正中点

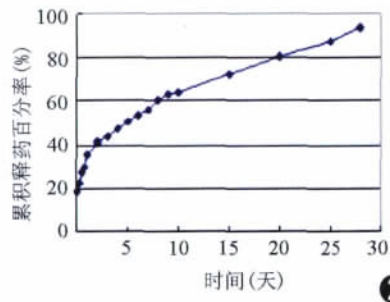
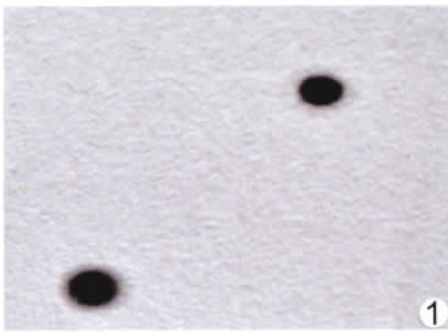


图 1 透射电镜下观察 CNTF-PEG-PLGA 微泡($\times 10\ 000$)

图 2 CNTF-PEG-PLGA 微泡体外释药曲线

后 4.6 mm 中线旁开 4 mm 处分别造孔, 2% FG 各孔内缓慢注入 $2\ \mu\text{l}$ 标记 RGCs。分别于视神经损伤后 1、2、4 周剥离视网膜, 定向铺片。激光共聚焦显微镜下拍片, 对每个视野中标记的 RGCs 进行计数, 计算 RGCs 密度平均值。

1.4 常规组织病理学检查 大鼠视神经损伤后 1、2、4 周制作眼球组织石蜡切片, 行 HE 染色, 于光学显微镜下观察各组大鼠视网膜组织病理学变化。

1.5 GAP-43 免疫组化染色 造模后 3 天、1 周、2 周、4 周眼球取材, 常规固定、石蜡切片, 行 GAP-43 免疫组化染色, 光学显微镜下观察阳性细胞数及着色深度。应用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件对图像进行分

析, 表达强度以平均光密度 (average optical density, AOD) 表示。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件包, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用单因素方差分析对不同时间点组内、相同时间点组间 RGCs 计数及视网膜 GAP-43 表达的水平多重比较, 两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微泡表征 透射电镜下微泡形态圆整, 表面光滑, 无粘连破损现象 (图 1); 粒径范围为 $220.35 \sim 496.60\ \text{nm}$, 平均粒径 $(312.5 \pm 57.35)\ \text{nm}$, Zeta 电位范围为 $-23.10 \sim -27.50\ \text{mV}$, 平均 $-(25.9 \pm 0.8)\ \text{mV}$, 封装率 62.35%, 载药量 $0.298\ \mu\text{g}/\text{mg}$ 。24 h 微泡有明显的突释现象, 药物释放百分率为 35.59%, 之后表现为温和缓慢释放, 28 天时释放百分率达 93.60%, 体外释药时间曲线见图 2。

2.2 各组大鼠 RGCs 计数 在不同干预条件下, 各损伤组不同观察时间点 RGCs 计数均较 A 组减少 (P 均

表 1 不同处理组各观察时间点 RGCs 计数 ($\bar{x} \pm s$, 个/ mm^2) 及存活率

组别	1 周	2 周	4 周
A 组	$2350.40 \pm 175.86 (100\%)^{**\#\#}$	$2350.40 \pm 175.86 (100\%)^{**\#\#}$	$2350.40 \pm 175.86 (100\%)^{**\#\#}$
B 组	$1305.60 \pm 120.82 (55.55\%)^{\#\#}$	$1048.80 \pm 204.11 (44.62\%)^{\#\#\star}$	$826.20 \pm 103.90 (35.15\%)^{\#\#\star\star}$
C 组	$1568.60 \pm 149.99 (66.74\%)^{**\#\#}$	$1316.60 \pm 106.10 (56.02\%)^{\#\#\star}$	$965.80 \pm 141.82 (41.09\%)^{\#\#\star\star}$
D 组	$1620.80 \pm 88.40 (68.96\%)^{**\#\#}$	$1331.40 \pm 126.58 (56.65\%)^{\#\#\star}$	$955.00 \pm 134.64 (40.63\%)^{\#\#\star\star}$
E 组	$1609.00 \pm 173.86 (68.46\%)^{**\#\#}$	$1547.80 \pm 132.28 (65.85\%)^{**\#\#}$	$1356.00 \pm 77.05 (57.69\%)^{**\#\#\star}$
F 组	$1336.80 \pm 94.31 (56.84\%)^{\#\#}$	$1056.80 \pm 124.25 (45.96\%)^{\#\#\star}$	$883.60 \pm 125.47 (37.59\%)^{\#\#\star\star}$
G 组	$1857.80 \pm 161.74 (79.04\%)^{**}$	$1782.00 \pm 241.23 (75.82\%)^{**}$	$1543.60 \pm 60.56 (65.67\%)^{**\star\star}$

注: 与 B 组比较, $*$: $P < 0.05$, $**$: $P < 0.01$; 与 G 组比较, $\#$: $P < 0.05$, $\#\#$: $P < 0.01$; 与同组 1 周比较, \star : $P < 0.05$; 与同组 2 周比较, $\star\star$: $P < 0.05$ 。括号内数据为存活率

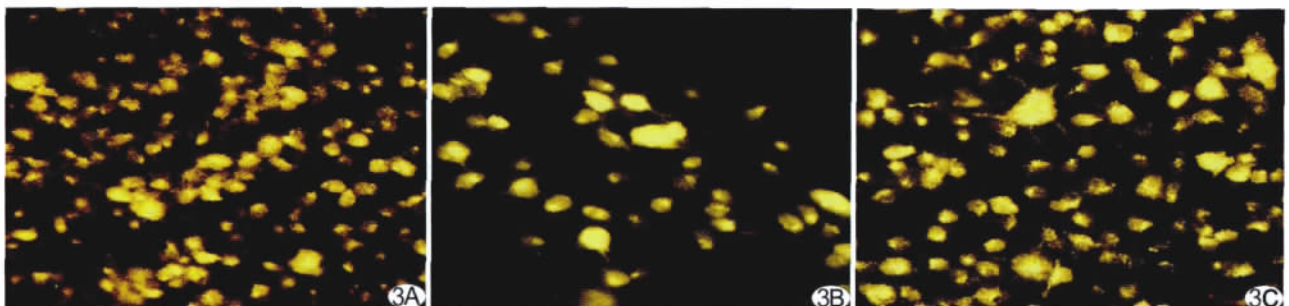


图 3 大鼠 RGCs 逆行 FG 标记 ($\times 400$) A. 正常对照 A 组可见 RGCs 分布密集, 胞体着色, 胞浆中荧光分布均匀; B. 单纯损伤 B 组 RGCs 密度较 A 组明显减低, 少量细胞可见轴突; C. G 组 CNTF-PEG-PLGA 微泡联合超声组 RGCs 密度较 B 组明显增高

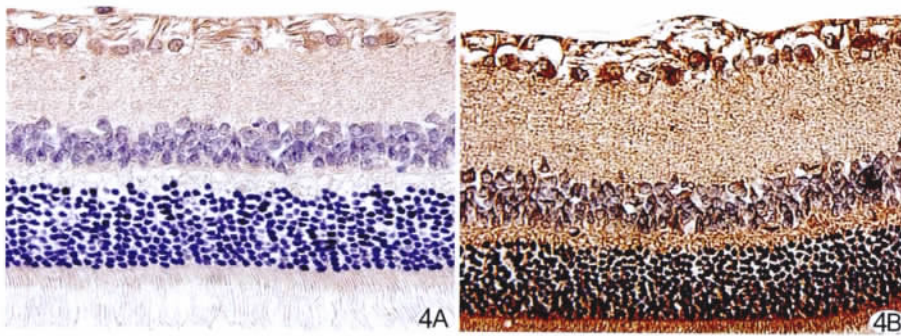


图 4 造模后大鼠视网膜 GAP-43 免疫组织化学染色(×400) A. 视神经损伤后 1 周, 单纯损伤 B 组 GAP-43 表达增高, 呈黄色, 主要位于 NFL、GCL、IPL、INL, 以 NFL、GCL 表达最强; B. G 组载 CNTF-PEG-PLGA 微泡联合超声组大鼠视网膜 GAP-43 表达较 B 组明显增高, 呈深棕黄色

<0.05)。造模后 1、2 周, C、D、E、G 组 RGCs 数目均较 B 组多 (P 均 <0.05)。造模后 4 周, C、D 组与 B 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); E、G 组与 B 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在每个观察时间点 G 组均能显著提高视神经损伤后 RGCs 存活数, 且其作用优于 C、D、E 组, 但仍少于 A 组, G 组与其他各组两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。不同观察时间点 F 组和 B 组两两比较差异无统计学意义 ($P_{1w} = 0.731, P_{2w} = 0.940, P_{4w} = 0.470$)。不同处理组各观察时间点 RGCs 存活数及其存活率比较见表 1、图 3。

2.3 组织病理学检查结果 玻璃体腔注射微泡后, E、F、G 组大鼠视网膜等眼内组织结构表现与其他各组比较未见明显炎性细胞浸润。

2.4 免疫组化分析 GAP-43 蛋白表达 大鼠视网膜 GAP-43 免疫组化染色见图 4。相同时间点组间比较: 造模后 3 天, 各损伤组 GAP-43 表达开始增强, 但组间两两比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 造模后 1 周, 除 A 组外, 各组 GAP-43 表达达高峰; 造模后 2 周, B、F 组 GAP-43 表达明显减弱, 与 A 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 4 周时, 各损伤组 GAP-43 表达均减弱, G 组与其他各组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), A、B、C、D、F 组两两比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。不同观察时间点, G 组 GAP-43 表达明显高于 C、D、E 组 ($P < 0.05$)。各组视网膜 AOD 值见图 5。

3 讨论

近年来, 随着各种超声微泡造影剂的研究和开发应用, 能够同时具备显像与治疗等多种功能的高分子材料超声微泡造影剂应运而生。国外研究^[6-7]表明, 超声或超声靶向微泡联合纳米粒相互作用, 可通过改变血管或细胞膜的通透性而有效促进纳米粒进入肌肉和

多种肿瘤组织。Chumakova 等^[8]成功制备了粒径 200 nm 的 PLGA/聚乙炔亚胺 (PEI)/DNA 高分子造影剂, 将其经静脉注入体内并联合超声, 可持续增强肿瘤细胞的转染效率。Du 等^[5]通过低频超声联合聚乙二醇单甲醚-乳酸/羟基乙酸共聚物-多聚赖氨酸 (mPEG-PLGA-PLL) 纳米粒包裹血小板源性生长因子-BB 小片段干扰核糖核酸 (PDGF-BB siRNA) 体外转染视网膜色素

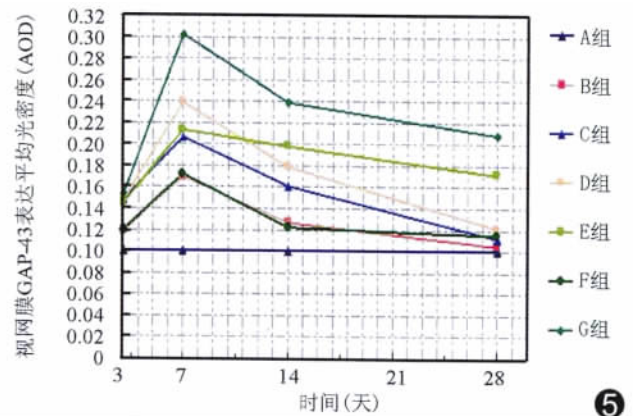


图 5 不同处理组各观察时间点 GAP-43 表达

上皮 (RPE) 细胞, 发现超声联合 mPEG-PLGA-PLL 纳米粒能够显著提高细胞摄取纳米粒的能力。目前认为超声与高分子纳米粒相互作用的可能机制为超声与纳米粒子相互作用产生的非热能效应, 包括纳米粒在声场中的振动, 超声辐射力、声孔效应、空化效应及微声流等协同作用使得辐照区域细胞膜发生机械性伸展, 细胞膜上产生一过性空隙, 促进纳米粒进入细胞内, 增强体内外药物/基因的传递效率; 另外, 纳米粒粒径极小, 可通过内吞方式被细胞摄取^[9], 超声作用后细胞膜的通透性可能改变, 细胞摄取纳米粒入胞作用增强^[10]。

视神经保护治疗是未来药物治疗青光眼的发展方向^[11]。除了药物自身作用, 改变给药方式也有利于保护视神经。本研究中视神经损伤后不同观察时间点, G、E、D、C 组与 B 组比较平均 RGCs 计数差异均有统计学意义, 表明 CNTF-PEG-PLGA 超声微泡同 CNTF 单剂一样对 RGCs 的存活具有保护作用; 各时间点 G 组平均 RGCs 计数明显高于其他各损伤组 (P

<0.05), 表明相对于其他治疗组, G 组具有明显的 RGCs 保护作用; 结合超声与纳米粒的相互作用机制, 考虑由于上述多种因素共同结果改变了细胞膜的通透性, 增强了细胞摄取微泡的能力, 促进了药物吸收。此外, 比较 F 组和 B 组, 两组平均 RGCs 计数比较差异无统计学意义, 视网膜病理组织观察也未见玻璃体腔注射微泡后有任何视网膜毒性反应, 提示 PEG-PLGA 微泡作为药物载体应用于玻璃体腔, 膜材本身及其降解产物对 RGCs 的存活及视网膜组织无明显影响。

CNTF 是一种多效能神经营养因子, 对多种神经元的存活具有支持作用^[12]。本实验中造模后各损伤组视网膜 GAP-43 表达均呈先增强后减弱趋势。B 组和 F 组 GAP-43 表达增高时间短暂, 程度有限, 视神经损伤 2 周已明显减弱, 而在药物的干预下, C 组、D 组、E 组及 G 组 GAP-43 表达较 B 组有明显增高, 且 G 组可持续到伤后 4 周并与其他各组比较差异仍有统计学意义, 提示超声联合微泡组能够在玻璃体腔内以有效质量浓度缓慢持续发挥效应, 长时间促进受损视网膜 GAP-43 表达, 使 GAP-43 长时期处于高水平的状态, 为 RGCs 的修复再生提供良好环境, 不仅表现出了高分子材料超声微泡作为一种缓释剂型的优越性, 同时体现了超声与微泡协同作用的优势。

[参考文献]

- [1] Hernot S, Klibanov AL. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(10): 1153-1166.
- [2] Waeckerle-Men Y, Groettrup M. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(3): 475-482.
- [3] 张亚萍, 冉海涛, 王志刚, 等. 载血卟啉 PLGA 微泡用于声动力治疗小鼠 H22 肝癌移植瘤. *中国医学影像技术*, 2010, 26(4): 593-596.
- [4] 谷海刚, 龙大宏, 李晓滨, 等. 异硫氰酸荧光素标记的神经生长因子缓释微球的制备及评价. *中华生物医学工程杂志*, 2007, 13(6): 393-396.
- [5] Du J, Shi QS, Sun Y, et al. Enhanced delivery of monomethoxy-poly(ethylene glycol)-poly(lactic-co-glycolic acid)-poly L-lysine nanoparticles loading platelet-derived growth factor BB small interfering RNA by ultrasound and/or microbubbles to rat retinal pigment epithelium cells. *J Gene Med*, 2011, 13(6): 312-323.
- [6] Figueiredo M, Esenaliev R. PLGA nanoparticles for ultrasound-mediated gene delivery to solid tumors. *J Drug Delivery*, 2012; 767839.
- [7] Chappell JC, Song J, Burke CW, et al. Targeted delivery of nanoparticles bearing fibroblast growth factor-2 by ultrasonic microbubble destruction for therapeutic arteriogenesis. *Small*, 2008, 4(10): 1769-1777.
- [8] Chumakova OV, Liopo AV, Andreev VG, et al. Composition of PLGA and PEI/DNA nanoparticles improves ultrasound-mediated gene delivery in solid tumors in vivo. *Cancer Lett*, 2008, 261(2): 215-225.
- [9] Qi XL, Chen XY, Sun Y, et al. Cytotoxicity and cellular uptake evaluation of mitoxantrone-loaded poly(lactic acid-co-lysine) arginine-glycine-aspartic acid nanoparticles. *J Appl Polymer Sci* 2011, 119(6): 1011-1015.
- [10] Schlicher RK, Radhakrishna H, Tolentino TP, et al. Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. *Ultrasound Med Biol*, 2006, 32(6): 915-924.
- [11] 葛坚, 黄晶晶, 蓝卫忠, 等. 国内外青光眼领域近五年进展. *中华眼科杂志*, 2010, 46(10): 893-899.
- [12] Maclaren RE, Buch PK, Smith AJ, et al. CNTF gene transfer protects ganglion cells in rat retinae undergoing focal injury and branch vessel occlusion. *Exp Eye Res*, 2006, 83(5): 1118-1127.