

外磁场下磁性纳米 C3 转移酶载体在大鼠损伤脊髓中的分布

刘 举¹, 冯世庆¹, 高仕杰¹, 陈 有¹, 冯洪永¹, 周恒星¹, 常 津², 康世胤²

(1 天津医科大学总医院 300052 天津市; 2 天津大学材料学院纳米生物技术研究所 300072 天津市)

【摘要】目的:观察施加外磁场后磁性纳米 C3 转移酶药物载体 (简称载药微球) 在大鼠损伤脊髓局部的分布情况, 并观察不同时间作用的外磁场对该载体分布的影响。**方法:**构建载药微球, 检测其粒径、Zeta 电位, 透射电镜观察形态、测定磁场顺应性及药物释放; MTT 法测定其细胞毒性; 观察体外培养条件下细胞的摄取情况。82 只大鼠建立 T10 损伤模型 (NYU 法), 随机分为 5 组: A 组, 经尾静脉注射异硫氰酸荧光素组, 20 只; B 组, 经尾静脉注射载药微球组, 20 只; C 组, 经尾静脉注射载药微球+外磁场 15min 组, 20 只; D 组, 经尾静脉注射载药微球+外磁场 30min 组, 12 只; E 组, 经尾静脉注射载药微球+外磁场 1h 组, 10 只。A、B、C 组各取 10 只大鼠, 经尾静脉注射 1h 后, 取肝、肾、脾及 T10 为中心的脊髓组织做冰冻切片并观察载药微球在其中的分布; 5 组各 10 只大鼠经尾静脉注射 1h 后取 T10 为中心 4cm 脊髓组织, 火焰原子吸收分光光度法测定铁含量; D 组取 2 只大鼠, 电镜观察载药微球在脊髓组织中分布。**结果:**载药微球分散性好, 载药微球磁化强度饱和度值为 63.5emu/g, 载药微球缓慢释放药物且释药时间超过 9d, 载药微球与细胞共培养, 细胞平均存活率为 78.10%, 与细胞共培养 5s 后能够在细胞内达到良好聚集效果。C 组脊髓损伤中心荧光强度高于 A、B 组。C 组脊髓铁元素含量高于 A、B 组, D 组测定铁含量高于 C 组 ($P<0.05$), E 组测定铁含量高于 C 组 ($P<0.05$), D 组测定铁含量与 E 组无统计学意义 ($P>0.05$)。电镜观察载药微球聚集在损伤中心, 可进入神经细胞胞体内。**结论:**磁性纳米 C3 转移酶药物载体可靶向聚集在损伤区局部, 载药微球可进入脊髓损伤区神经细胞内; 损伤后施加外磁场 30min, 载药微球可达到最佳聚集效果。

【关键词】脊髓损伤; 药物载体; 靶向; 大鼠; C3 转移酶

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.03.14

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2012)-03-0265-07

Target distribution of magnetic nano C3- transferase carrier under external magnetic field in injured spinal cord in rats/LIU Ju, FENG Shiqing, GAO Shijie, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(3): 265~271

【Abstract】 Objectives: To observe the target distribution of magnetic nano C3- transferase carrier under external magnetic field in injured spinal cord and explore this time-related effect. **Methods:** Drug carrier microsphere was constructed; the particle size, zeta potential, magnetic properties, drug release were assessed; the morphology was observed by transmission electron microscopy; the in vitro cytotoxicity was tested either; and the cellular uptake was analyzed using fluorescence microscopy. Eight-two SCI rats were divided into 5 groups randomly: Group A (n=20), fluorescein isothiocyanate group (FITC) administered by caudal vein, 20 rats; Group B (n=20), drug carrier microsphere administered by caudal vein; Group C (n=20), drug carrier microsphere administered by caudal vein and external magnetic 15min; Group D (n=12), drug carrier microsphere administered by caudal vein and external magnetic 30min; Group E (n=10), drug carrier microsphere administered by caudal vein and external magnetic 1h. 10 rats in Group A, B and C respectively were selected, and the tissues including liver, kidney, spleen and T10 spinal cord were harvested 1h after administration by caudal vein, then the liposome distribution in these tissues was observed under fluorescence

基金项目: 国家自然科学基金 (30872603)

第一作者简介: 男 (1985-), 硕士研究生, 研究方向: 脊柱脊髓损伤

电话: (022)60364654 E-mail: liujucool@126.com

通讯作者: 冯世庆 E-mail: fengsq@hotmail.com

microscopy. 10 rats in Group A, B, C, D and E respectively were sacrificed and the T10 spinal cord was harvested 1h after administration by caudal vein, and the iron contents were assayed by flame atomic absorption spectrophotometry. 2 rats in Group D sacrificed and the T10 spinal cord was harvested 1h after administration by caudal vein, and the distribution of drug carrier microsphere was observed under electron microscope. **Results:** Drug carrier microspheres showed good dispersion, with the saturation value of magnetization of 63.5emu/g, and the carrier could maintain drug release in vitro until day 9; when co-culturing with MCF-7 cells, the average cell survival rate was 78.10%; FITC fluorescence density of Group C in injured center was more than group A and B. The iron contents in spinal cord of Group C showed significant difference than Group A and B ($P<0.05$), and those in group E were more than group C ($P<0.05$), while those in group D showed no difference than group C. The carriers were noted gathering in the center of injury and into neurocyte under electron microscopy. **Conclusions:** Magnetic nano C3- transferase drug carriers can accumulate into injured site of spine cord and enter neurocyte; adding external magnetic field of 30min after SCI can achieve optimal effect for aggregation.

[Key words] Spinal cord injury; Drug carrier; Targeting; Rat

[Author's address] Department of Orthopaedics, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin, 300052 China

近年来脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 的发病率呈上升趋势, 因成人中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 自身修复能力有限, 且治疗难度大、致残率高, 显著增加了患者及社会的负担。目前药物依然是治疗脊髓损伤的主要手段, 但由于血脊髓屏障的存在, 大分子药物较难到达损伤部位而发挥疗效^[1]。本研究探讨经尾静脉注射异硫氰酸荧光素标记跨膜肽-聚乙二醇-C3 转移酶磁性纳米药物载体在外磁场作用下损伤脊髓组织区的聚集作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物、主要试剂及仪器

健康 Wistar 大鼠, 82 只, 雌性, 8 周龄, 体重 $220\pm 10\text{g}$, 购自中国医学科学院放射医学研究所动物实验中心。Impactor Mode II 打击器 (NYU, 美国); CO_2 培养箱 (NAPCO 5410, USA); 荧光倒置显微镜 (OLYMPUS BX-60, Japan); 恒温冰冻切片机 (LEICER, USA); 透射电子显微镜 (JEOL-100CXII, 日本电子光学公司); VSM 磁性能测试仪 (LDJ9600-1, 美国数字仪器公司); 激光粒度仪及 Zeta 电位仪 (BL-90 plus, Brookhaven Instruments Corporation); 红外光谱仪 (Bio-Rad FTS3000, 美国 Bio-Rad 公司); 日立 Z-5000 型原子吸收分光光度计 (天津医科大学公共卫生学院实验室供); UV-240 型紫外可见分光光度计 (SHIMADZU 公司, Japan); 外磁场 (1T 永磁铁, 天津大学材料学院纳米生物技术研究所); C3 转移

酶 (Sigma-Aldrich, Inc. USA); 人乳腺癌上皮细胞 (MCF-7 细胞, 南开大学生命科学院)。

1.2 实验方法

1.2.1 载药微球制备及表征分析 通过化学方法将聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)、跨膜肽 (trans-activator transcription, TAT) 接枝到实验室自制的赖氨酸壳聚糖十八烷基季铵盐 (OQLCS-5) 上, 制备出 PEG-OQLCS、FITC-OQLCS 及 TAT-OQLCS; 再利用薄膜分散法^[2], 按照一定质量比, 将制得的各种功能化高分子, 以及胆固醇包裹事先制备的聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 载药微球, 其中 PLGA 包裹 C3 转移酶和纳米级四氧化三铁, 获得实验用的多功能复合载药微球。透射电子显微镜观察脂质体形状, 激光粒度仪和 Zeta 电位仪分别测定脂质体粒径和 Zeta 电势。

1.2.2 载药微球磁场顺应性及体外释药 载药微球制成粉末状, 放在 VSM 磁性能测试仪的试样架上, 在室温下测量磁场顺应性; 根据电磁感应, 测量样品内部磁通量来确定 M_s 值; 载药微球在外磁场作用下磁化, 开始随着外磁场强度逐渐增加, 微球磁化强度亦不断增大; 当外磁场增加到一定强度, 物质的磁化强度停止增加而保持在一个稳定的数值上, 此时达到了饱和磁化状态, 外加磁场的变化范围在 $-1\text{T}\sim 1\text{T}$ 。载药微球溶液 (5mg 溶于 5ml 的 PBS) 倒入透析袋, 密封。透析袋置入装有 50ml PBS 容器中, 室温下以 80r/min 振荡, 紫外分光光度计测定其吸光度。依下式计算出累计释药

率:累积释药率=(释放出的药物浓度/理论药物浓度) $\times 100\%$ 。

1.2.3 载药微球细胞毒性 选取生长期的 MCF-7 细胞,消化后用连续加样器以每孔 100 μ l (约 2000~3000 个)接种于 96 孔培养板,其边缘孔用 100 μ l 无菌 PBS 填充。37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱孵育 24h,至细胞单层铺满孔底。加入不同浓度梯度的载药微球 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、800 $\mu\text{g}/\text{ml}$),每孔 100 μ l 载药微球,每个浓度设置 6 个复孔,并设置调零孔 6 孔、对照孔 6 孔,共制备 4 个 96 孔板。与细胞共孵育 4、12、24、48h 后,各取 1 个 96 孔板,加入 MTT 溶液,孵育 4h,滤纸吸去上清,溶解结晶。无菌 PBS 冲洗,加入二甲亚砜。在酶联免疫检测仪 570nm 处测量各孔吸光值(A 值),用 620nm 作参考波长。细胞存活率%=(实验孔 A 值-调零孔 A 值)/(对照孔 A 值-调零孔 A 值) $\times 100\%$ 。

1.2.4 细胞摄取载药微球 MCF-7 细胞以 1×10^7 /孔接种至六孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱孵育 24h 后分 2 组:载药微球组,取 3 孔,每孔加入载药微球 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$);FITC 组,取 3 孔,每孔加入 FITC 溶液 (0.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。与细胞共培养 5s、30s、1min 后,每组各取 1 孔,去除培养基,无菌 PBS 冲洗掉未进入细胞的载药微球和 FITC,荧光显微镜观察细胞内变化。

1.2.5 分组及模型制备 82 只 Wistar 大鼠随机分 5 组:A 组,FITC (0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)组,20 只;B 组,载药微球组 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$),20 只;C 组,载药微球 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)+外磁场 15min 组,20 只;D 组载药微球 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)+外磁场 30min 组,12 只;E 组载药微球 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)+外磁场 1h 组,10 只。FITC 及载药微球均尾静脉注射。10%水合氯醛腹腔麻醉 (0.30ml/100g),大鼠俯卧位固定于手术台,常规备皮、消毒,以 T10 为中心纵行依次切开,剥离两侧椎旁肌,暴露并咬除 T10 棘突及椎板,显露硬膜,采用 Impactor Model II 打击器 (打击动能 25mm $\times$ 10g),制备 T10 损伤模型,打击脊髓后出现一过性鼠尾摆动和后肢痉挛视为造模成功。各组动物均经尾静脉注射 1h 后,取肝脏、肾、脾脏及 T10 为中心的脊髓组织行实验观察和测定。大鼠造模成功后,将其脊髓损伤中心置于外磁场下,磁场 N 极位于背侧,S 极位于腹侧。

1.2.6 载药微球体内分布 A、B、C 组各取 10

只,10%水合氯醛麻醉后,PBS 灌注,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 4%多聚甲醛灌注。取出肝、肾、脾及以 T10 中心 4cm 脊髓组织,4%多聚甲醛后固定 6h,PBS 冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 30%蔗糖脱水,O.C.T 包埋,肝、肾、脾横行连续 5 μm 冰冻切片,脊髓组织损伤中心段垂直纵轴连续 5 μm 冰冻切片,荧光显微镜观察微球分布。

1.2.7 透射电镜观察载药微球在损伤脊髓中分布 D 组随机选取 2 只大鼠,经尾静脉注射 1h 后,2.5%戊二醛灌注,取出 T10 为中心脊髓组织,2.5%戊二醛固定过夜,以损伤处中心切取数块约 1 $\times$ 1 $\times$ 1mm 的脊髓组织块,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 锇酸固定 2h,PBS 漂洗,丙酮梯度脱水,醋酸铀 4 $^{\circ}\text{C}$ 染色 4h,环氧树脂 618 包埋,电镜观察载药微球分布。

1.2.8 火焰原子吸收分光光度法测定铁含量 各组取 10 只大鼠,经尾静脉注射 1h 后 4%多聚甲醛灌注固定,取以 T10 为中心 4cm 脊髓组织,烘干 48h,记录干重,浓硝酸、高氯酸混合液 (5:1)消化、赶酸,0.1%稀盐酸定容至 10ml,最终消化液行火焰原子吸收分光光度法^[3]测定铁含量。

1.3 统计学方法

SPSS 16.0 软件进行统计学分析。数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,所得数据采用方差分析 (ANOVA),组间比较采用 SNK-q 检验,设 $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 载药微球表征

透射电镜观察载药微球分散性好,呈球形,典型的核/壳结构,外层壳的高亮影为实验室自制的赖氨酸壳聚糖十八烷基季铵盐,核心包裹纳米铁颗粒和 C3 转移酶 (图 1)。粒度分析仪测得平均粒径为 324.4nm,Zeta 电位值为 5.62mV。

2.2 载药微球磁场顺应性及体外药物释放

载药微球的磁化强度饱和度值为 63.5emu/g (图 2),磁场敏感性高。37 $^{\circ}\text{C}$ PH 7.4 PBS 中,载药微球缓慢持续释放药物,药物释放时间超过 9d (图 3)。

2.3 载药微球细胞毒性

载药微球与细胞共培养后,平均存活率为 78.10%,载药微球浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,细胞存活率高,平均细胞存活率高达 90.1%,且细胞存活率随着药物浓度增加逐渐减小,随着共培养时间延长存活率减小 (图 4)。

2.4 细胞摄取载药微球

MCF-7 细胞与载药微球共培养 5s、30s、1min, 胞内均可观察到绿色荧光, 随共培养时间延长胞内荧光强度增加。MCF-7 细胞与 FITC 共培养 5s、30s、1min 后, 荧光物质聚集细胞膜周围, 胞内未观察到荧光物质, 且随时间延长胞内荧光强度未见变化(图 5)。

2.5 载药微球体内分布

A 组脊髓内未观察到绿色荧光; B、C 组脊髓

内均能观察到绿色荧光, 且 C 组损伤脊髓内荧光强度明显高于 A、B 组, C 组高倍镜下可见载药微球围绕神经细胞核分布, 其胞外基质存在较少(图 6)。A、B、C 组肝、肾、脾脏均可观察到绿色荧光(图 7)。

2.6 火焰原子吸收分光光度法测定铁含量

各组脊髓标本铁含量见表 1, A、B 及 C 组比较, C 组铁元素含量高于 A、B 组($P < 0.05$)。C、D、E

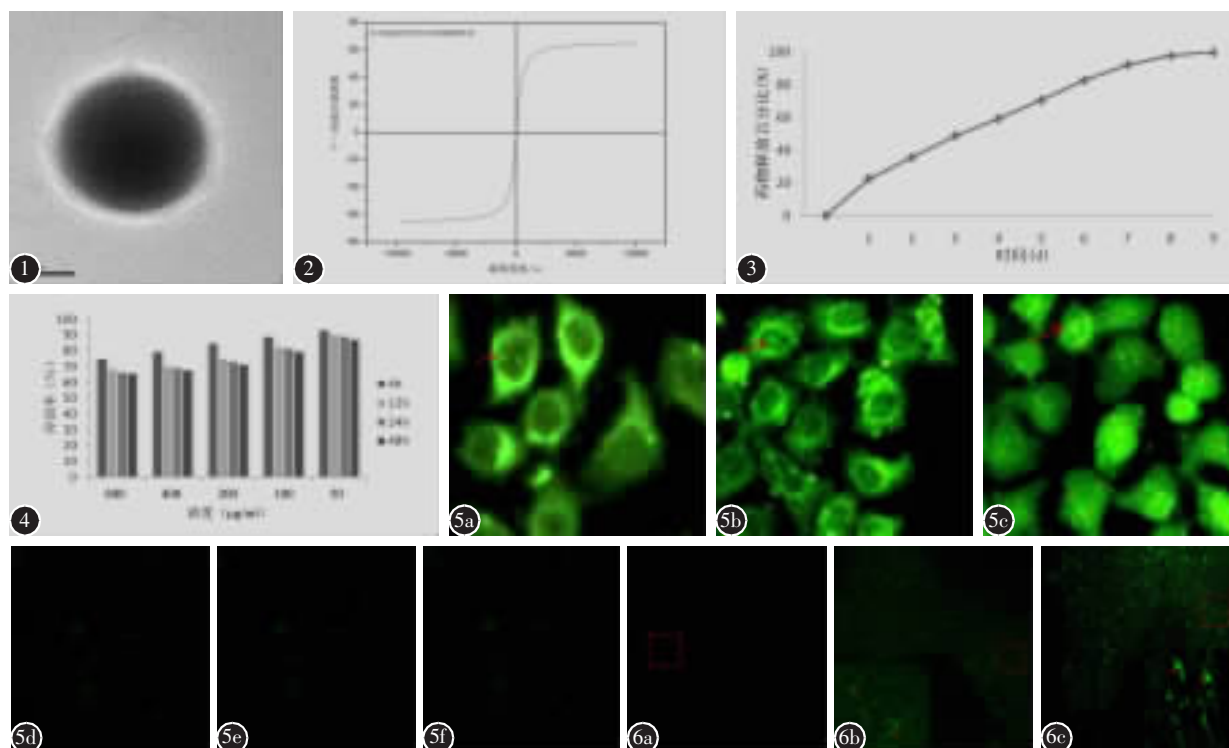


图 1 透射电镜观察载药微球呈球形, 典型的核/壳结构, 外层高亮影为赖氨酸壳聚糖十八烷基季铵盐, 核心包裹纳米铁和 C3 转移酶 图 2 VSM 测定载药微球的磁场顺应性曲线。外加磁场为 1T 或 -1T 时, 磁化强度达饱和, 值为 63.5emu/g 图 3 室温下, 载药微球药物释放曲线, 药物释放时间超过 9d 图 4 MCF-7 细胞与载药微球在不同浓度、不同时间共培养后细胞存活率。其平均存活率为 78.10%, 载药微球浓度为 50 μ g/ml 时, 平均细胞存活率高达 90.1% 图 5 MCF-7 细胞摄取载药微球组 a、b、c MCF-7 分别与载药微球共培养 5s、30s、1min, 红箭头示微球在胞质内分布($\times 200$) d、e、f MCF-7 与 FITC 共培养 5s、30s、1min, 胞内未见微球 图 6 脊髓内载药微球分布 a 为 A 组 b 为 B 组 c 为 C 组($\times 200$) 右下角为红虚线内高倍镜图像($\times 400$), 其中红箭头示载药微球在神经细胞胞内分布

Figure 1 Drug carrier microsphere observed by TEM sounds spherical, core-shell structure; bright shell is OQLCS, nano-Fe and C3-transferase are encapsulated into the core **Figure 2** VSM surveys the curve of magnetic conformability of drug carrier microsphere, it achieves the saturation of magnetization under additional magnetic field of 1T or -T, the value is 63.5emu/g **Figure 3** Drug releasing curve of drug carrier under room temperature, it continued drug release in vitro until 9 days **Figure 4** MCF-7 cell viability upon incubation with microspheres exposed different concentrations and different times of co-culture, the average of cell survival rate is 78.10%, when concentration of microspheres is 75 μ g/mL, cell survival rate achieves 90.10% **Figure 5** MCF-7 cells intake microspheres observed by fluorescence microscopy a、b、c MCF-7 cells treated with microspheres 5s, 30s and 1min, red arrows show microspheres are in cells ($\times 200$) d、e、f MCF-7 cells treated with FITC 5s, 30s and 1min, microspheres are not found in cells ($\times 200$) **Figure 6** Distribution of microspheres in spinal cord a is Group A b is Group B c is Group C ($\times 200$), bottom (right) are correspondingly high magnification of a, b, c ($\times 400$); red arrows show microspheres are in nerve cells

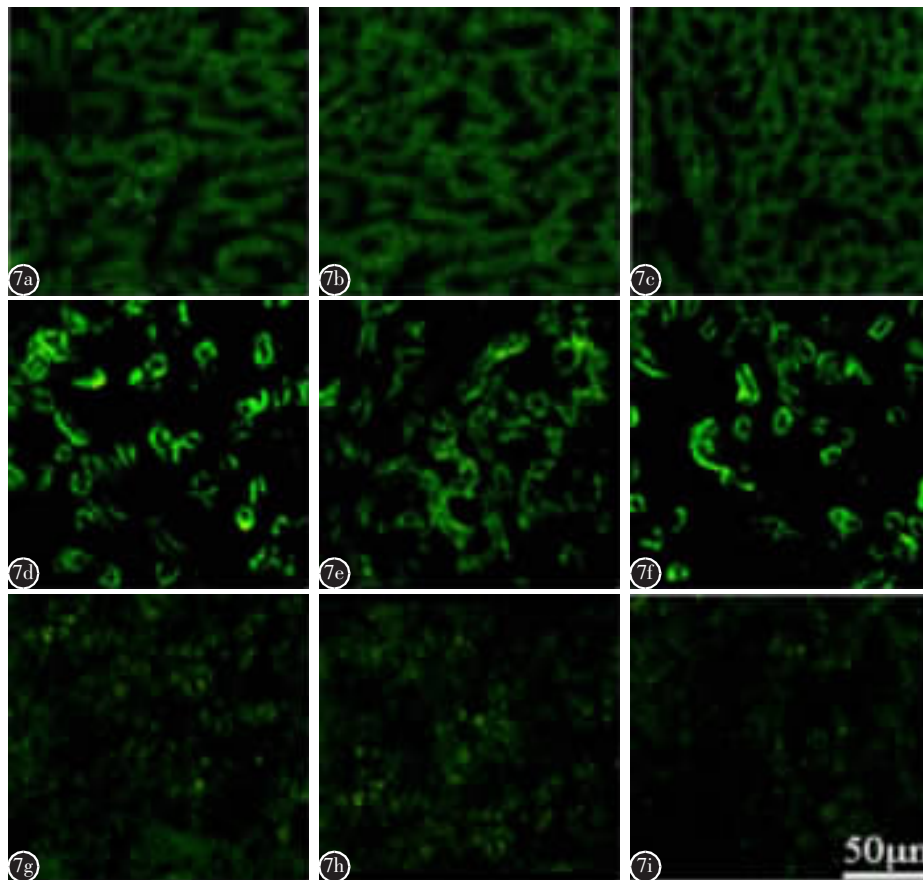


图 7 载药微球在肝、肾、脾脏器中分布 a、b、c 为 A 组 d、e、f 为 B 组 g、h、i 为 C 组, A、B、C 三组均可观察到载药微球分布(bar=50μm)

Figure 7 Distribution of drug carrier microspheres in liver, kidney and spleen a、b、c is Group A d、e、f is Group B g、h、i is Group C. Group A, B and C had microspheres (bar=50μm)

组比较, D 组及 E 组铁含量均高于 C 组 ($P<0.05$), 但 D 组与 E 组间比较无差异 ($P>0.05$); 施加外磁场 30min 时载药微球可达最佳富集效果。

2.7 透射电镜观察损伤脊髓中载药微球分布

表 1 各组大鼠脊髓标本铁元素含量比较 ($\bar{x}\pm s$, μmol/mg)

Table 1 Comparison of iron content among five groups

	<i>n</i>	铁元素含量 Iron of Fe ³⁺ (μmol/mg)
A组 Group A	10	1.30±0.15
B组 Group B	10	1.31±0.17
C组 Group C	10	1.58±0.15 ^{①②}
D组 Group D	10	1.70±0.08 ^{①②③}
E组 Group E	10	1.66±0.12 ^{①②}

注: ①与 A 组比较 $P<0.05$; ②与 B 组比较 $P<0.05$; ③与 C 组比较 $P<0.05$
 Note: ①Compared with group A $P<0.05$; ②Compared with group B $P<0.05$; ③Compared with group C $P<0.05$

外加磁场施加 30min 后, 载药微球在损伤局部聚集明显, 且可跨过细胞膜, 大量聚集在神经细胞胞体内, 而组织间液内载药微球未见明显聚集情况(图 8)。

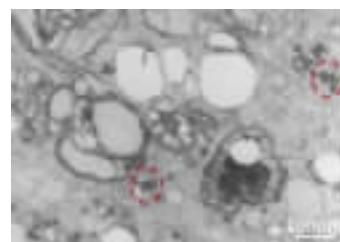


图 8 透射电镜观察到载药微球在损伤脊髓组织中聚集 (E 组)。红色虚线示载药微球在神经细胞内聚集 (bar=100μm)

Figure 8 Drug carrier microspheres observed by TEM was noted to aggregate into injury spinal cord (Group E). Red imaginary circles show microspheres gathering into cells in the CNS (bar=100μm)

3 讨论

脊髓损伤修复是医学界的难题, 药物修复脊髓损伤仍是临床主要治疗手段^[3,4], 研究已证实 C3 转移酶可以阻断神经轴突抑制因子信号转导的关键蛋白 RhoA 的活性, 促进轴突的再生和延伸^[5,6]。本实验应用的载药微球包裹治疗性药物可跨膜靶向聚集在神经细胞体内。

3.1 载药微球表征

载药微球作为药物载体, 其疏水性核心可以包裹药物及纳米级四氧化三铁, PEG、TAT 修饰的亲水性的羟甲基十八烷基季铵盐外壳可以增加 CNS 对药物吸收, 形成具有生物活性的核/壳结构脂质体。载药微球大体呈球形, 分布均匀, 平均粒径为 324.4nm。Jeffery 等^[8]证实粒径相对大的颗粒药物载药率高, 包裹超顺磁铁的磁场顺应性强, 未功能化载药颗粒不能够跨越血脊髓屏障等优势。本实验应用的载药微球有以下特点: ①典型的多层核/壳结构, 可防止药物在循环过程中的生物降解; ②核心包裹的纳米级超顺磁铁, 对外加磁场具有高度敏感性; ③PEG 修饰的载药微球可延长其体内循环时间及躲避内皮网状系统捕获, TAT 修饰载药微球通过巨噬细胞胞饮作用介导其跨过血脊髓屏障^[9]; ④合成载药微球大体呈球形, 分布均匀, 载药率高; ⑤羟甲基壳聚糖作为骨架材料, 细胞相容性好, 有研究发现其能够特异作用于损伤细胞^[10]; ⑥ Zeta 电位值较低, 细胞毒性小。因此本实验应用的药物载体具有生物功能、靶向功能及有效阻止其包装治疗分子降解功能。

3.2 载药微球的磁场顺应性、释药性及细胞毒性

载药微球对外磁场具有高度敏感性, 损伤局部外加磁场后, 载药微球在损伤部位富集。载药微球体外缓慢释放其核心包裹的 C3 转移酶, 证明药物成功包裹在载药微球核心内, 在循环中可避免药物生物活性破坏。Dergham^[11]研究表明 24h 内大剂量注射 C3 转移酶能够起到神经保护作用, 本实验应用的载药微球第 1 天内出现药物大量释放现象, 随后药物缓慢释放, 可在损伤局部维持有效药物浓度。MCF-7 细胞与载药微球共培养, 随着载药微球浓度下降细胞生存率随之升高, 浓度为 50 μ g/ml 时平均存活率可达 90.1%。实验所使用载药微球细胞毒性低, 具有良好的生物相容性。

3.3 MCF-7 细胞摄取载药微球

细胞与载药微球共培养 5s 细胞内观察到绿

色荧光, 与 FITC 共培养 5s, 绿色荧光物质分散在细胞膜周围, 胞内未观察到荧光物质。因此, TAT 修饰的载药微球有利于其跨过细胞膜在细胞核周围聚集。荧光显微镜观察到载药微球与细胞培养时间延长胞内荧光强度逐渐增强, 说明载药微球能够有效穿过细胞膜达到细胞内。Ziegler 等^[11]研究发现 TAT 修饰的纳米颗粒与细胞共培养 4min 可以跨过细胞膜达到胞内, 本实验载药微球共培养 5s 后即可在细胞达到良好聚集效果。

3.4 载药微球体内分布

B、C 组观察到绿色荧光物质分布在神经细胞内、外, 以神经细胞内分布为主, 而胞外基质存在较少, 与细胞体外摄取实验结果一致。C 组荧光强度明显高于 A、B 组, 说明外加磁场有利于载药微球在脊髓损伤局部聚集。Jeffery 等^[8]研究发现, TAT 修饰的纳米颗粒通过“被动靶向”的方式集中在损伤神经周围。本实验发现单侧尾静脉注射 TAT 修饰的载药微球在脊髓局部聚集效果不佳, 而损伤局部外加磁场 30min 后 (1T), 载药微球能够达到较好富集效果。载药微球滞留在脊髓损伤局部的毛细血管内, 超顺磁性纳米颗粒在外加磁场作用下可相互聚集, 使得靶向区域的毛细血管血流减慢或停滞, 提高了药物在局部组织的浓度, 有利载药微球聚集于损伤部位^[13,14]。定量测定脊髓中铁含量, C 组高于 B 组 ($P<0.05$), 示外加磁场可促进载药微球在损伤局部富集。电镜观察到载药微球在外磁场下聚集在损伤中心, 进入神经细胞胞体内, 围绕细胞核周边分布。大鼠肝、肾、脾内均有载药微球分布, 说明载药颗粒能够在循环中能够有效清除, 故在大鼠体内药物毒性低。

3.5 脊髓中铁元素测定及应用外磁场最佳时间

定量测定脊髓组织中载药微球分布, 结果示施加外磁场 30min, 载药微球可以达到理想的富集效果, 为进一步实验及临床应用具有指导意义。

综上所述, 磁性纳米 C3 转移酶药物载体在损伤局部外加磁场下, 可靶向聚集在损伤部位, 并进入神经细胞内; 损伤后应用外磁场 30min, 载药微球可以达到理想的聚集效果。磁靶向给药提高了药物疗效, 降低毒副作用, 为修复脊髓损伤开辟了新的途径。

4 参考文献

1. Garbuzova-Davis S, Haller E, Saporta S, et al. Ultrastructure

- of blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS[J]. Brain Research, 2007, 1157: 126-137.
2. 刘晓谦, 王锦玉, 仝燕, 等. 脂质体制备技术及其研究进展[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(14): 1084-1088.
3. Tan EY, Law JW, Wang CH, et al. Development of a cell transducible RhoA inhibitor TAT-C3 transferase and its encapsulation in biocompatible microspheres to promote survival and enhance regeneration of severed neurons [J]. Pharm Res, 2007, 24(12): 2297-2308.
4. Fu Q, Hue J, Li S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs promote axon regeneration via rhoA inhibition [J]. J Neurosci, 2007, 27(15): 4154-4164.
5. Lord-Fontaine S, Yang F, Diep Q, et al. Local inhibition of rho signaling by cell-permeable recombinant protein BA-210 prevents secondary damage and promotes functional recovery following acute spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2010, 25(11): 1309-1322.
6. Boato F, Hendrix S, Huelsenbeck SC, et al. C3 peptide enhances recovery from spinal cord injury by improved regenerative growth of descending fiber tracts[J]. J Cell Sci, 2010, 123(10): 1652-1662.
7. SIKIRIC' M, BRAJENOVIC' N, PAVLOVIC' I, et al. The determination of metals in cow's milk by flame atomic absorption spectrophotometry[J]. Czech J Anim Sci, 2003, 48(11): 481-486.
8. Jeffery ND, McBain SC, Dobson J, et al. Uptake of systemically administered magnetic nanoparticles in areas of experimental spinal cord injury[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2009, 3(2):153-157.
9. Liu Y, Wang CY, Feng SQ, et al. Ability of novel multifunctional PEG-TAT-modified liposomes to cross the blood-spinal cord barrier after spinal cord injury[J]. J Drug Target, 2010, 16(6): 420-429.
10. Cho Y, Shi R, Borgens RB. Chitosan produces potent neuroprotection and physiological recovery following traumatic spinal cord injury[J]. J Exp Biol, 2010, 213(9):1513-1520.
11. Dergham P, Ellezam B, Essagian C, et al. Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair[J]. J Neurosci, 2002, 22(5): 6570-6577.
12. Ziegler A, Nervi P, Durrenberger M, et al. The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical and metabolic evidence[J]. Biochemistry, 2005, 44(1): 138-148.
13. 周洲, 徐华, 宋涛, 等. 靶向治疗中铁磁流体聚集及其动力学研究[J]. 北京生物医学工程, 2006, 25(6): 619-622.
14. Chertok B, Moffat BA, David AE, et al. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors[J]. Biomaterials, 2008, 29(4): 487-496.

(收稿日期:2011-08-01 修回日期:2011-09-26)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 刘彦)

消息

欢迎订阅 2012 年《中国脊柱脊髓杂志》

《中国脊柱脊髓杂志》是由卫生部主管,中国康复医学学会与中日友好医院主办,目前国内唯一以脊柱脊髓为内容的国家级医学核心期刊。及时反映国内外脊柱脊髓领域的科研动态、发展方向、技术水平,为临床医疗、康复及基础研究工作提供学术交流场所。读者对象:从事脊柱外科、骨科、神经科、康复科、肿瘤科、泌尿科、放射科、基础研究及生物医学工程等及相关学科的专业人员。

本刊为中国科技信息中心“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”,中科院中国科学计量评价研究中心“中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊”,入选北京大学“中文核心期刊要目总览”,已分别入编 Chinainfo(中国信息)网络资源系统(万方数据)及以中国学术期刊光盘版为基础的中国期刊网(中国知网),影响因子名列前茅。

2012 年本刊仍为月刊,大 16 开,正文增至 96 页,每月 10 日出版。全册铜版纸彩色印刷。每册定价 16 元,全年 192 元。全国各地邮局均可订阅,邮发代号 82-457。国外读者订阅请与中国国际图书贸易总公司中文报刊科联系(100044,北京车公庄西路 35 号),代号:BM6688。

本刊经理部可随时为国内外读者代办邮购(免邮寄费)。

地址:北京市朝阳区樱花园东街中日友好医院内,邮编:100029。

电话:(010)64284923,84205233。E-mail:cspine@263.net.cn;http:www.cspine.org.cn。

可为相关厂家、商家提供广告园地。广告经营许可证:京朝工商广字 0148 号。

欢迎投稿,欢迎订阅!