

## 基础研究

## 折叠式人工玻璃体体外缓释小鼠神经生长因子

徐宁<sup>1</sup>, 安平<sup>2</sup>, 李艳丽<sup>3</sup>, 蒋瑶祁<sup>1</sup>, 贺艳<sup>1</sup><sup>1</sup>广州市第八人民医院眼科, 广东 广州 510440; <sup>2</sup>广州市第一人民医院, 广东 广州 510180; <sup>3</sup>广州市民政局精神病医院, 广东 广州 510060

**摘要:**目的 通过折叠式人工玻璃体(FCVB)对小鼠神经生长因子(NGF)在体外缓释作用的研究,为FCVB能否建成眼内药物缓释系统提供初步实验依据。**方法** 体外实验在透皮仪中进行,将4 mL浓度为3 μg/ml的NGF注入FCVB,浸没于含15 mL无菌水的小烧杯中,收集30 min、1、2、4、8和12 h FCVB外的缓释液,用分光光度法制作NGF溶液标准曲线,并检测样品中NGF的浓度,吸收波长定为280 nm。**结果** 实验数据显示,FCVB能够缓释NGF,并且缓释浓度随着时间的延长而增长。**结论** FCVB能够在体外物理缓释NGF,并且缓释浓度呈时间依赖性增长。此研究为进一步研究FCVB能否建成眼内药物缓释系统提供依据,同时为临床相应疾病的治疗提供帮助。

**关键词:** 折叠式人工玻璃体; 药物缓释; 神经生长因子

## The research of the foldable capsular vitreous body (FCVB) in mechanically releasing nerve growth factor

Xu Ning<sup>1</sup>, An Ping<sup>2</sup>, Li Yanli<sup>3</sup>, Jiang Yanqi<sup>1</sup>, He Yan<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Eighth People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510440, China; <sup>2</sup>First People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180, China; <sup>3</sup>Psychiatric hospital of civil affairs bureau of Guangzhou, Guangzhou 510060, China

**Abstract: Objective** To investigate the role of the foldable capsular vitreous body (FCVB) in mechanically releasing nerve growth factor (NGF). Our study supplies the experimental evidences for further investigation contributing in intraocular drug deliver system exploration. **Methods** We choose in vitro study. NGF sustained-release studies in vitro was finished in cups of modified Franz diffusion cells. Concentration of 3 ug/ml NGF diluted in steril water was injected into the FCVB capsules, immersed into small cup with 15 ml steril water. Two hundred (200) μl liquid was aspirated at time intervals of 30 min, 2, 4, 8, 12 h separately. Standard curve was made through ultraviolet spectrophotometry examination. The assumption length of NGF examination was 280 nm. **Results** The data from in vitro study indicated that FCVB could mechanically release NGF in dose and time dependent manner. At 12h time point, NGF was released at concentration of 465ng/ml. **Conclusions** Data from in vitro study showed that FCVB could sustainably, mechanically release NGF via capsule apertures in a time-dependent and dose-dependent manner. This research for the further study can confirm FCVB built intraocular drug sustained-release system to provide the basis for clinical at the same time corresponding treatment of diseases.

**Key words:** foldable capsular vitreous body; drug delivery system; nerve growth factor

玻璃体视网膜疾病在眼部疾病占有较高的发病率,严重危害人类的健康及生活质量<sup>[1]</sup>。其发病机理不明,有效防治手段有限,目前国内外的治疗主要依靠药物和手术。由于血-眼屏障的存在,全身和局部用药对玻璃体视网膜疾病收效甚微,因此,探索一种能够有效治疗玻璃体视网膜疾病的新给药途径成为目前研究的重点内容之一。我们研究发明了折叠式人工玻璃体(FCVB),其为兼有玻璃体替代物及缓释系统作用于一体的模拟人或兔眼折叠人工玻璃体,在FCVB腔中注入小鼠神经生长因子(NGF),观察FCVB在体外是否有缓释作用,为FCVB能否建成眼内药物缓释系统提供实验依据。同时,有望为玻璃体视网膜疾病的防治提供一种

新的治疗模式<sup>[2-3]</sup>。

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要实验试剂与仪器

小鼠神经生长因子(mouse NGF):苏肽生注射剂,粉末状,30 μg,舒泰神(北京)生物制药股份有限公司;NGF的溶剂:无菌注射用水;分光光度计:DU800紫外/可见光分光光度计;智能透皮试验仪:BECKMAN COULTER公司YB-P6

#### 1.2 折叠式人工玻璃体(FCVB)

FCVB由美国道康宁公司提供的液态硅橡胶通过计算机模拟人或兔眼玻璃体的形状尺寸加工而成,无色透明,具有良好的透光性。FCVB主要由薄膜球囊、引流管和引流阀组成,薄膜球囊存在300 nm大小的微

收稿日期:2015-05-21

作者简介:徐宁, E-mail: anxu28@163.com

孔。标准人和兔子FCVB的重量分别是0.33±0.005 g和0.21±0.005 g。

1.3 分光光度法制作NGF的标准曲线

用无菌注射用水溶解苏肽生粉剂,稀释为8个浓度梯度作为标准品:5 µg/mL、4 µg/mL、3 µg/mL、2 µg/mL、

1 µg/mL、500 ng/mL、250 ng/mL、125ng/mL。用分光光度计对2 µg/mL的NGF溶液进行吸收波长扫描,扫描范围为200~800 nm,发现在280 nm处有最大吸收峰(表1)。

用分光光度计检测各个浓度标准品的Abs值,吸收

表1 小鼠神经生长因子(NGF)标准的Abs值

| NGF浓度 | 125 ng/mL | 250 ng/mL | 500 ng/mL | 1 µg/mL | 2 µg/mL | 3 µg/mL | 4 µg/mL | 5 µg/mL |
|-------|-----------|-----------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Abs值  | 0.0055    | 0.0085    | 0.0100    | 0.0133  | 0.0282  | 0.0406  | 0.0556  | 0.0660  |

吸收波长为280 nm.

波长设定为280 nm,并用SPSS 13.0 制作出标准曲线,(表2)。

表中显示本标准曲线模型的R<sup>2</sup>=0.998,接近于1,说明本标准曲线可用。

表2 小鼠神经生长因子(NGF)标准曲线模型总结

| Equation | Nodel Summary |         |     |     |       | Parameter Estimates |           |           |           |
|----------|---------------|---------|-----|-----|-------|---------------------|-----------|-----------|-----------|
|          | R Square      | F       | df1 | df2 | Sig.  | Constant            | b1        | b2        | b3        |
| Cubic    | 0.998         | 852.609 | 3   | 4   | 0.000 | 0.006               | 6.16E-006 | 3.03E-009 | -3.7E-013 |

Dependent Variable: A1.

1.4 体外缓释实验

采用水平扩散池装置(YB-P6智能透皮试验仪)进行体外缓释实验,以无菌水作为扩散介质。将3 µg/mL的NGF溶液注入2个人折叠式人工玻璃体的球囊内,每

个球囊都注射4 mL。球囊置于含15 mL无菌注射液的透皮仪小杯中,37℃恒温振荡,并于第30 min、1、2、4、8和12 h,抽取400 µL小杯中液体。用分光光度计测定样品中NGF的浓度(表3)。

表3 折叠式人工玻璃体体外缓释小鼠神经生长因子各时间点的缓释浓度

| 时间点  | 30 min    | 1 h       | 2 h       | 4 h       | 8 h       | 12 h      |
|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Abs值 | 0.005 312 | 0.006 352 | 0.007 498 | 0.007 21  | 0.008 197 | 0.009 187 |
| 对应浓度 | 68 ng/mL  | 134ng/mL  | 289 ng/mL | 211 ng/mL | 358 ng/mL | 472 ng/mL |

2 结果

用分光光度计检测不同时间点的缓释液样品,将得到的Abs值从NGF标准曲线上拟合出不同时间点的缓释浓度,采用SPSS 13.0软件处理数据。结果表明,FCVB能够缓释NGF,并且缓释浓度呈时间依赖性增长(图1)。

3 讨论

玻璃体视网膜疾病是常见的慢性致盲眼病,发病率逐年增长,治疗主要采用眼局部和全身给药。由于血-眼屏障的存在,全身和局部给药对玻璃体视网膜疾病难

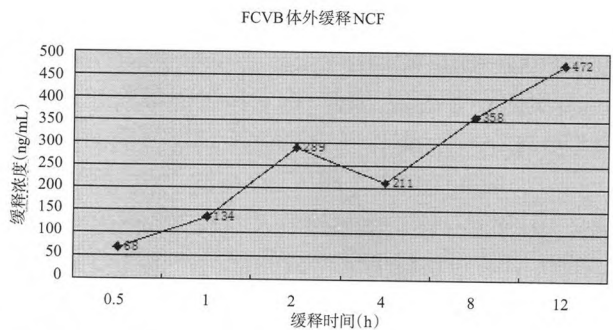


图1 折叠式人工玻璃体体外缓释小鼠神经生长因子的缓释曲线以发挥作用,因此,目前采用玻璃体注射,能够达到直接疗效。但玻璃体给药药效不能持久,需要频繁玻璃体注

射,增加了眼内感染及出血的风险<sup>[4-5]</sup>。为了维持有效的药物浓度,近年来,眼内缓释给药系统在眼局部治疗方面的研究获得满意疗效。应用药物缓释系统(DDS)使药物在眼部缓慢或有控制地释放,减少眼部给药的剂量和次数,明显提高药物的生物利用度并降低毒性<sup>[6-7]</sup>。目前应用的DDS主要有:(1)脂质体;(2)载药微粒;(3)眼植入物;(4)封闭材料细胞技术。然而单纯玻璃体内应用DDS不但缺少玻璃体支撑视网膜的最重要功能,而且其价格比较昂贵,并发症较多,严重限制其普及性。因此,玻璃体视网膜疾病的防治迫切需要一种可将玻璃体替代物和药物缓释系统的功能合二为一的新技术。理想的眼内DDS应该不但可以缓释药物,而且可以替代自然玻璃体,支撑视网膜<sup>[8]</sup>。

出于以上目的,我们发明了折叠式人工玻璃体(FCVB)。FCVB主要由球囊、引流管和引流阀组成。球囊由计算机模拟人或兔子玻璃体的形状,由高分子材料制造而成,可薄至30 μm,薄膜上存在直径约300 nm的微孔。引流管和引流阀起注入和控制注入药液作用。已经证实FCVB能够在体内和体外缓释地塞米松,并且缓释浓度呈时间依赖性和剂量依赖性<sup>[9]</sup>。

在本实验中,我们使用在治疗视网膜疾病与视神经病变中有较好的作用神经生长因子(NGF)作为缓释液<sup>[10]</sup>。FCVB内注射了4 mL浓度为3 μg/mL的NGF,从5 min到12 h,用分光光度计分6个时间段测定缓释液中NGF的浓度,发现NGF的缓释浓度从60 ng/mL上升到了465 ng/mL(表3)。由此实验得出结论,FCVB能够在体外物理缓释NGF,并且缓释浓度呈时间依赖性增长。

通过FCVB可以在体外通过球囊薄膜的微孔呈时间依赖方式持续地、机械性地释放NGF,为FCVB能否建成眼内药物缓释系统提供实验依据,也为探索将玻璃

体替代物和药物缓释系统功能合二为一的治疗玻璃体视网膜疾病的新技术提供应用基础。

#### 参考文献:

- [1] Pastor JC. Proliferative vitreoretinopathy: an overview [J]. *Surv Ophthalmol*, 1998, 43: 3-18.
- [2] Gao Q, Mou S, Ge J, et al. A new strategy to replace the natural vitreous by a novel capsular artificial vitreous body with pressure-control valve [J]. *Eye*, 2008, 22: 461-8.
- [3] Gao Q, Chen X, Ge J, et al. Refractive shifts in four selected artificial vitreous substitutes based on gullstrand-emsley and liou-brennan schematic eyes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50: 3529-34.
- [4] Diago T, McCannel CA, Bakri SJ, et al. Infectious endophthalmitis after intravitreal injection of antiangiogenic agents [J]. *Retina*, 2009, 29: 601-5.
- [5] Artunay O, Yuzbasioglu E, Rasier R, et al. Incidence and management of acute endophthalmitis after intravitreal bevacizumab (Avastin) injection [J]. *Eye*, 2009. [Epub ahead of print].
- [6] Kane FE, Burdan J, Cutino A, Green KE. Iluvien: a new sustained delivery technology for posterior eye disease [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2008, 5: 1039-1046.
- [7] Guidetti B, Azéma J, Malet-Martino M, Martino R. Delivery systems for the treatment of proliferative vitreoretinopathy: materials, devices and colloidal carriers [J]. *Curr Drug Deliv*, 2008, 5: 7-19.
- [8] Colthurst MJ, Williams RL, Hiscott PS, et al. Biomaterials used in the posterior segment of the eye [J]. *Biomaterials*, 2000, 21: 649-65.
- [9] Yaqin Liu, Zhaoxin Jiang, Qianying Gao, et al. Technical Standards of a Foldable capsular vitreous body in terms of mechanical, optic, and biocompatible properties [J]. *Artificial Organs*, 2010. [Epub ahead of print].
- [10] Xiaodong Sun, Xun Xu, Fenghua Wang, et al. Nerve growth factor helps protect retina in experimental retinal detachment [J]. *Ophthalmologica*, 2008, 222: 58-61.