

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000121

PLGA 微球载 NGF 联合超声对视神经节细胞的保护作用

周 鹤¹, 刘 苏¹, 王志刚²

(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:探讨乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)微球联合神经生长因子(nerve growth factor, NGF)对视神经损伤大鼠视神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的保护作用。**方法:**PLGA 为原料制备包载有 NGF 的 PLGA 微球。检测载药微球的载药量和包封率, 观察其形态特点测量粒径分布。将 Sprague-Dawley (SD) 雄性成年大鼠 69 只随机分为 5 个组, 正常组(A 组)和假手术组(B 组)各 9 只大鼠, 生理盐水注射组(C 组)、神经生长因子注射组(D 组)、PLGA 微球联合 NGF 注射组(E 组)各 17 只大鼠, B~E 组大鼠均行超声辐照处理。各组分别于 0.5、1、3、7 d 取样行视网膜切片免疫组化染色和苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE), 观察视网膜上葡萄糖钙调蛋白(glucose regulated protein 78 kD, GRP78)表达和组织病理的变化, 并采用荧光金(fluorogold, FG)逆行标记视神经节细胞于视神经钳夹损伤造模后第 7 d 取样计数各组 RGCs 数量。**结果:**PLGA 载药微球包封率 68.4%, 载药量 0.032 3%, 体外 7 d 的累计释放率 82.6%, 微球粒径(3.17 ± 0.6) μm 。FG 逆行标记 RGCs 计数 5 组间差异有统计学意义($F=65.858, P=0.000$), A 组与 B 组间差异无统计学意义($P=0.862>0.05$), 其它各组间差异均有统计学意义($P<0.05$)。免疫组化染色 A 组、B 组未见阳性细胞, RGCs 的 GRP78 阳性细胞率显示, C~E 组不同时间各组间差异有统计学意义($F_{\text{组别}}=184.330, P_{\text{组别}}=0.000$), 各组在各时间点间差异亦有统计学意义($F_{\text{时间}}=21.472, P_{\text{时间}}=0.000$)。HE 染色提示第 7 天时 E 组视网膜水肿较 C、D 组减轻。**结论:**NGF-PLGA 微球联合超声治疗视神经损伤大鼠能提高对 RGCs 的保护作用。

【关键词】视神经损伤; 神经生长因子; 乳酸-羟基乙酸共聚物; 微球; 视神经节细胞

【中图分类号】R774.6+3

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-11-15

Protective effect of NGF loaded PLGA microspheres combined with ultrasonic irradiation on the rat retinal ganglion cells following the optic nerve injury

Zhou He¹, Liu Su¹, Wang Zhigang²(1. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;
2. Institute of Ultrasound Imaging Research, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the protective effect of nerve growth factor(NGF) loaded poly lactic-co-glycolic acid(PLGA) microspheres on retinal ganglion cells(RGCs) following the optic nerve injury. **Methods:** The NGF-PLGA microspheres were made using PLGA and the properties of microspheres were tested. Totally 69 SD adult male rats were randomly divided into 5 groups: normal control group (group A), sham operated group (group B), physiological saline injection group (group C), NGF injection group (group D) and NGF-PLGA injection group (group E). Nine rats in groups A and B, 17 rats in groups C, D and E. All rats in groups B-E underwent ultrasound irradiation. Samples of retinal section were collected for immunohistochemistry staining and HE staining to observe the performance of glucose regulated protein 78 kD (GRP78) and the pathological morphology change of retina of each group at 12 h and on the 1st d, 3rd d, 7th d. Number of RGCs retrograde labeled by fluorogold (FG) before the operation was checked on the 7th d. **Results:** The mean size of microspheres was (3.17 ± 0.60) μm . The encapsulation efficiency of NGF-PLGA microspheres was 68.4%, the loading rate was 0.0323% and the cumulative rate of drug-release on the 7th d was 82.6%. There were significant differences among 5 groups in RGCs count ($F=65.858, P=0.000$). There was no difference in RGCs count between group A and B ($P=0.862>0.05$), but apparent differences among other groups were observed ($P<0.05$). Immunohistochemistry staining showed no positive cell in groups A or B. There were significant differences in GRP78 positive rate of RGCs among groups C-E at different time points ($F_{\text{group}}=184.330, P_{\text{group}}=0.000$) and among each group at different time points ($F_{\text{time}}=21.472, P_{\text{time}}=0.000$). HE staining showed the retinal edema of group E was reduced on the 7th d compared with that of group C and D. **Conclusion:** NGF loaded PLGA microspheres combined with ultrasonic irradiation can improve the protective effect on RGCs after the optic nerve injury.

【Key words】 optic nerve injury; nerve growth factor; poly (lactic-co-glycolic acid); microsphere; retinal ganglion cells

作者介绍: 周 鹤, Email: 464927180@qq.com,

研究方向: 青光眼。

通信作者: 刘 苏, Email: liusu2836@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81371578)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000121.html>

保护视神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)凋亡进而控制青光眼疾病进程的研究非常重要。曾有研究报道在急性青光眼大鼠模型和慢性青光眼大鼠模型中分别观察到,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)及其受体的表达均明显低于正常水平,推测 NGF 对视神经损伤病程有重要影响^[1-2],但临床上使用的 NGF 药物,多采用肌肉注射,给药时间频繁,研究新的给药方式意义重大。在诸多药物载体中,乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)微球独特的缓释作用能延长药物的作用时间,结合超声辐照进行转染更能达到靶向治疗作用。实验将进一步探讨运用 PLGA 微球联合超声辐照提高 NGF 疗效的可能。

1 材料和方法

1.1 材料

PLGA(50:50)分子量 $M_w=10\ 000$ (济南岱罡生物科技有限公司),神经生长因子(北京苏肽生),聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)(美国 Sigma 公司),荧光盒(fluorogold, FG)(美国 Biotium 公司),兔抗大鼠葡萄糖钙调蛋白(glucose regulated protein 78 kD, GRP78)多克隆抗体(美国 Bioword 公司),羊抗兔 IgG(美国 Sigma 公司),DAB 试剂盒、苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)染色试剂盒(北京中杉金桥生物试剂公司),声振仪、超声转染仪由重庆医科大学超声影像学研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 PLGA 载药微球制作 按 w/o/w 溶剂挥发复乳化法制备微球^[3]。称取适量 PLGA,溶解于 1 ml 二氯甲烷中,加入 NGF 浓度为 $0.05\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 双蒸水溶液 200 μl ,声震 30 s,所得初乳混合于 4% PVA 溶液中,搅拌 30 s 后 5 000 r/min 均质 3 min,在冰浴中磁力搅拌 3 h,3 000 r/min 离心 3 min,洗涤 3 遍,冷冻干燥 48 h。另以同法制备空白微球。

1.2.2 载药率和包封率测定 配置不同浓度的样本溶液,用微量紫外线分光光度计进行测量,NGF 溶液的最大吸收波峰在 218 nm 处,计算出标准曲线。将一份干燥样本称重后,溶于 1 ml 有机溶液置于恒温摇床中震荡 24 h,离心后收集上清液测吸光度,计算微球包封率及载药量。

1.2.3 体外释放百分率计算 取 20 mg 冻干粉加入 0.5 ml 磷酸盐缓冲液,密封放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床,于 0.5、1、3、7 d 离心收集上清液,并补充等量溶液,测出吸光度,计算累计释放百分率。

1.2.4 电镜观察及粒径分布测量 用透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察载药微球及空白微球,对比二

者的形态特征。在 400 倍光镜下拍摄载药微球图片计数 300 个载药微球粒径,用 SPSS 18.0 统计分析软件分析粒径分布。

1.2.5 大鼠建模及给药 SD 雄性成年大鼠 69 只由重庆医科大学动物实验中心提供。体质量 200~230 g,均以左眼作为手术眼。随机分为 5 组, A 组、B 组各 9 只, A 组不做处理; B 组 9 只暴露视神经 20 s 后抽取 5 μl 玻璃体腔液体再注射 10 μl 生理盐水。C 组、D 组、E 组各 17 只,均行视神经钳夹造模,用中号血管钳于视神经后 2 mm 处钳夹 20 s,术眼涂红霉素眼膏^[4]。C~E 组造模后均先抽取 5 μl 玻璃体腔液体,再分别注入 10 μl 生理盐水、10 μl 浓度 $(0.2\ \mu\text{g}/\mu\text{l})$ NGF 溶液、10 μl (含 2 μg NGF)的 NGF-PLGA 微球。B~E 组完成相应注射后立即行超声辐照处理(超声波频率 0.3 MHz,超声波声强范围 $0.5\ \text{w}/\text{cm}^2$,辐照大鼠眼球 4 次,每次 5 s,间隔 10 s)^[5]。

1.2.6 免疫组化法测定 RGCs 中 GRP78 的表达 各组分别在造模后 0.5、1、3、7 d 取大鼠眼球,4%多聚甲醛固定 48 h 做视网膜石蜡切片(A 组、B 组各时间点取 1 只大鼠, C~E 组各时间点取 3 只大鼠),行 GRP78 免疫组化染色, C~E 组各时间点随机选择 10 个 400 倍显微视野,计数 RGCs 阳性细胞百分率。

1.2.7 FG 逆行标记 RGCs 模型建立参考文献[6],每组随机选取 5 只大鼠,于视神经钳夹造模前 5 d 行 FG 逆行标记建模。麻醉大鼠,备皮、分离颅顶皮肤及筋膜,定位双侧上丘及外侧膝状体颅骨表面投影点,造骨孔,各点进样 2 μl (20 mg/ml) FG。造模后第 7 天处死大鼠,取出眼球于 4%多聚甲醛溶液中浸泡 12 h,制备视网膜铺片。拍摄激光共聚焦显微镜(Eiss, 德国)图片计数 RGCs^[6-7]。

1.2.8 组织切片 HE 染色 各组于 0.5、1、3、7 d 4 个时间点取大鼠眼球样本的石蜡切片,行常规视网膜组织切片 HE 染色,在光学显微镜下观察拍照。

1.3 统计学处理

利用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。RGCs 计数和阳性细胞率为计量资料,用均数 $\pm$ 标准差表示,差异比较分别采用成组设计资料的方差分析和析因设计的方差分析,分别用 SNK 做两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 载药率、包封率测量、体外释放试验

紫外线分光光度法得出标准曲线方程为: $y=13.7x+0.017$, $r^2=0.996\ 1$ 。算出 NGF-PLGA 载药微球包封率为 68.4%,载药量为 0.032 3%,体外释放试验 0.5、1、3、7 d 的累计释放百分率分别是 24.7%、38.5%、60.1%、82.6%。

2.2 电镜及粒径分布

在 TEM 下观察可见微球成球形,载药微球密度较高见图 1,统计分析得微球粒径均值为 $(3.17 \pm 0.60)\ \mu\text{m}$ 。

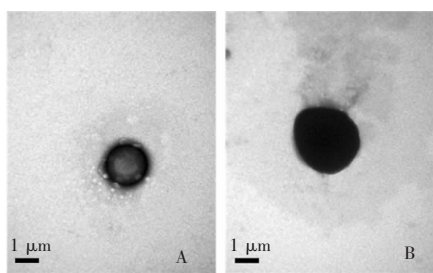


图 1 透射电镜观察空白微球 (A) 和 NGF-PLGA 微球 (B) 的形态

Fig.1 Morphology of blank microsphere (A) and NGF-PLGA microsphere (B) observed by transmission electron microscope

2.3 GRP78 免疫组化半定量分析

A 组、B 组样本切片无明显 RGCs 阳性着染, E 组各时间点的阳性细胞均明显多于 C、D 2 组, 3 组的阳性细胞数量均在第 1 天时达到峰值见图 2。析因分析 C~E 组 RGCs 阳性细胞率显示, 不同时间各组间差异有统计学意义 ($F_{\text{组别}}=184.330$, $P_{\text{组别}}=0.000$), 不同组别各时间点差异亦有统计学意义 ($F_{\text{时间}}=21.472$, $P_{\text{时间}}=0.000$), 组别和时间之间不存在交互作用结果无统计学意义 ($F_{\text{组别} \times \text{时间}}=1.945$, $P_{\text{组别} \times \text{时间}}=0.08$) (表 1)。

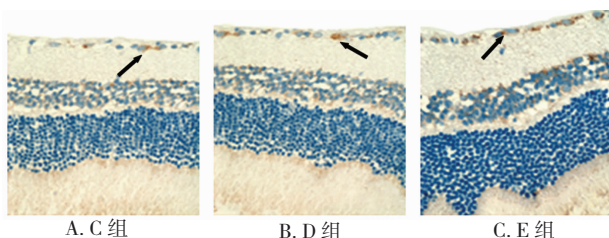


图 2 第 1 天时 GRP78 免疫组化染色 (400 ×)
E 组 RGCs 中的阳性表达细胞比 C 组、D 组更多
(箭头所指为阳性着染的 RGCs)

Fig.2 Immunohistochemical staining of GRP78 on the 1st d (400 ×)

2.4 逆行 FG 标记计数分析

激光共聚焦显微镜下可见清晰黄色荧光着染的 RGCs 及较小的胶质细胞。A 组、B 组切片中直径大于 8 μm 的有轴突细胞明显多于其余 3 组, C 组细胞明显少于 D 组与 E 组, E 组较 D 组稍多。5 组间节细胞计数差异有统计学意义 ($F=65.858$, $P=0.000$)。两两比较, A 组与 B 组间差异无统计学意

义 ($P=0.862$), 其它各组间差异均有统计学意义 ($P_{\text{ac}}=0.000$; $P_{\text{ad}}=0.000$; $P_{\text{ae}}=0.002$; $P_{\text{bc}}=0.000$; $P_{\text{bd}}=0.000$; $P_{\text{be}}=0.002$; $P_{\text{cd}}=0.000$; $P_{\text{ce}}=0.000$; $P_{\text{de}}=0.000$) (图 3、图 4)。

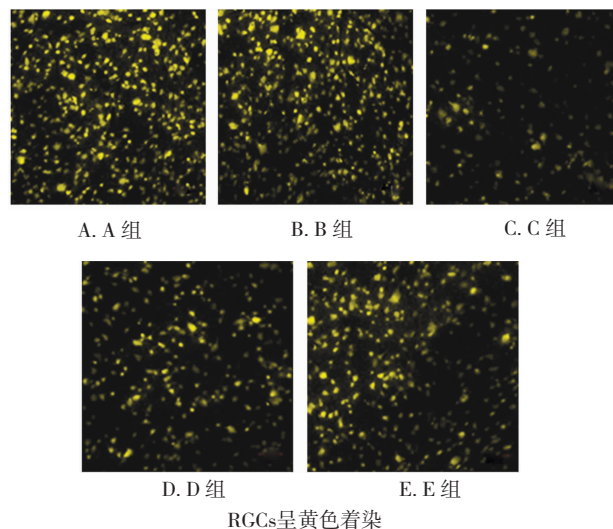


图 3 第 7 天时激光共聚焦显微镜下 FG 逆行标记 RGCs 图片 (200 ×)

Fig.3 FG-labeled RGCs observed by Confocal laser scanning microscope on the 7th d (200 ×)

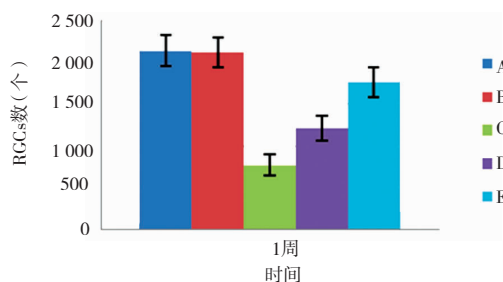


图 4 第 7 天各组 RGCs 计数

Fig.4 RGCs counts of each group on the 7th d

2.5 HE 分析

A 组、B 组视网膜层次清晰排列有序, C~E 组均有一定程度的细胞层水肿增厚、细胞间排列紊乱及部分神经节细胞丧失, 但 E 组细胞的水肿比 C 组、D 组轻, 节细胞的空泡化较少、细胞的排列更有序, 第 7 d 时改变最明显见图 5。

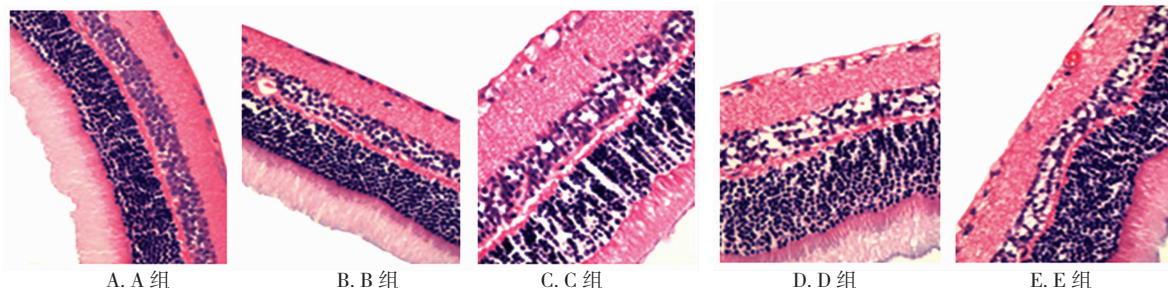


图 5 第 7 天时视网膜组织病理学染色 (400 ×)
A 组、B 组视网膜结构完整, C~E 组视网膜均有水肿及节细胞的丧失

Fig.5 Retinal HE staining on the 7th d (400 ×)

表 1 不同时间 C~E 组阳性细胞率比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Tab.1 Positive cell rate of groups C-E at different times ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	0.5 d	1 d	3 d	7 d
C 组	9.811 ± 3.394	11.093 ± 3.966	7.707 ± 2.364 ^d	4.829 ± 1.667 ^{ab}
D 组	16.264 ± 5.520 ^a	22.029 ± 6.319 ^{ac}	13.433 ± 4.878 ^{ad}	10.358 ± 3.698 ^{ad}
E 组	35.241 ± 7.333 ^{ab}	39.009 ± 10.496 ^{ab}	32.761 ± 7.048 ^{ab}	22.313 ± 6.096 ^{abc}

注: $F_{\text{组别}}=184.330, P_{\text{组别}}=0.000; F_{\text{时间}}=21.472, P_{\text{时间}}=0.000; F_{\text{组别} \times \text{时间}}=1.945, P_{\text{组别} \times \text{时间}}=0.080$; a, 与 C 组比较, $P<0.05$; b, 与 D 组比较, $P<0.05$; c, 与 12 h 比较, $P<0.05$; d, 与 1 d 比较, $P<0.05$; e, 与 3 d 比较, $P<0.05$

3 讨 论

在青光眼发病机制的研究中,已证实视网膜神经节细胞凋亡是青光眼视神经损害的最终通路,因而如何抑制 RGCs 的凋亡成为治疗青光眼的关键,也是青光眼视神经萎缩研究的重点。但因生物体内存在的血-视网膜屏障,致使常规治疗手段难以高效、靶向的到达病变部位。

近年来国内外对运用 PLGA 微球载药进行了诸多研究。PLGA 微球粒径可以控制在数百纳米到几十微米之间,根据适用情况不同,能选择不同的载药粒径^[8-9],而与病毒载体相比,PLGA 微球安全性更高。在同时结合超声辐照作用下,载药 PLGA 微球能靶向作用于组织,其作用机理主要为,超声波的物理作用使细胞膜的局部温度上升,这改变了细胞磷脂双层膜的流动性,能进一步提高细胞膜的通透性。同时,在超声波的空化作用、可修复的声孔效应下细胞表面能产生瞬态开口,增大细胞膜的局部通透性,促进细胞对微球的摄取,从而提高药物利用率^[10]。

神经生长因子是神经元和神经元支配的靶细胞或胶质细胞分泌的小分子多肽,对神经元的生存和功能维持等均发挥重要作用,具有良好的神经修复功能。在视神经损伤模型中,通过直接玻璃体腔注射一定量 NGF,能明显提升节细胞生存率^[11]。然而 NGF 局部使用易被稀释和代谢,直接行玻璃体腔注射半衰期仅约 0.9 h^[12],且其较难透过组织屏障,更为有效的应用还存在一些困难,故而影响了该类药物在临床上的应用。

体外释放试验结果表明,该 PLGA 微球给药系统具有较好的缓释作用,能延长同等剂量药物的作用时间。比较 NGF 玻璃体腔注射和运用 PLGA 释药体系组,7 d 时荧光金着染的 RGCs 计数存在统计学差异,后者 RGCs 存活量更多且明显多于仅用生理

盐水治疗的对照组,证明在同等药物剂量下该载药体系能更有效的减少 RGCs 凋亡。

GRP78 是内质网上的重要分子伴侣,属于热休克蛋白。GRP78 参与内质网膜上多肽的易位并作为凋亡调节分子与 caspase7、caspase12 形成复合体,抑制 caspase 家族的释放和激活。当细胞受到应激刺激时,GRP78 表达升高,保护蛋白结构和功能的稳定,以对抗内质网应激诱导的细胞凋亡^[13],其表达量的变化,能反应组织细胞的凋亡进程。免疫组化染色结果提示 E 组 RGCs 的 GRP78 阳性细胞率在各时间点均高于 C、D 两组且组间比较差异具有统计学意义。推测 NGF 可以作用于三大经典细胞凋亡通路之一的内质网应激通路从而抑制 RGCs 凋亡,同时显示 NGF-PLGA 微球能明显提高治疗效果。

结合光镜下观察 HE 染色切片 E 组的视网膜各层组织的水肿比仅用生理盐水或单纯注射神经生长因子的 2 组都有所减轻,视神经节细胞的丧失亦少于这 2 组,而 D 组的水肿又比 C 组轻,可推测 NGF 对损伤的大鼠视神经有一定的保护治疗作用,而使用 NGF-PLGA 药物体系结合超声辐照方式给药,在同等剂量相同作用时间下能提高 NGF 的疗效,在治疗中优越性明显,这为临床用药提供了一种新的参考方式。

参 考 文 献

- [1] Sposato V, Bucci MG, Coassin M, et al. Reduced NGF level and TrkA protein and TrkA gene expression in the optic nerve of rats with experimentally induced glaucoma[J]. Neurosci Lett, 2008, 446(1): 20-24.
- [2] Colafrancesco V, Coassin M, Rossi S, et al. Effect of eye NGF administration on two animal models of retinal ganglion cells degeneration[J]. Ann Ist Super Sanita, 2011, 47(3): 284-289.
- [3] Fu K, Pack DW, Klibanov AM, et al. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres[J]. Pharm Res, 2000, 17(1): 100-106.

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000267

沉默三联基序蛋白 25 基因对 A549/DDP 细胞株顺铂耐药性及凋亡的影响

栗林, 秦霞, 敬怀志, 屈灿, 邱峰
(重庆医科大学第一附属医院药学部, 重庆 400016)

【摘要】目的:三联基序蛋白 25(tripartite motif containing 25, TRIM25)为泛素化 E3 连接酶,通过抑制 TRIM25 表达,研究其对肺癌顺铂(cis-dichlorodiamine platinum, DDP)耐药细胞株 A549/DDP 耐药性及凋亡的影响。**方法:**针对 TRIM25 基因设计 4 条不同序列 shRNA,分别构建重组质粒载体 pt1、pt2、pt3、pt4。利用脂质体将质粒转染至 A549/DDP 细胞,采用 real-time PCR、Western blot 检测抑制效果,MTT 实验和流式细胞仪(flow cytometry, FCM)实验分别检测在 DDP 作用下细胞耐药性改变和凋亡情况。**结果:**干扰质粒 pt1 在 mRNA 和蛋白质水平上均能特异性地抑制 TRIM25 的表达;MTT 法结果显示,抑制 TRIM25 表达后,干扰组 pt1 细胞 IC₅₀ 值低于 pNC 组($P=0.001$)及对照组($P=0.000$);FCM 结果显示,干扰组 pt1 的细胞凋亡率明显低于 pNC 组($P=0.005$)、对照组($P=0.004$)。**结论:**抑制 TRIM25 表达后,能有效地降低 A549/DDP 细胞株的 DDP 耐药性并促进其凋亡。

【关键词】siRNA; TRIM25; A549/DDP 细胞; 肿瘤耐药**【中图分类号】**R73**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-01-01

Effects of tripartite motif containing 25 gene silencing on cisplatin resistance and apoptosis in A549/DDP cells

Su Lin, Qin Xia, Jing Huaizhi, Qu Can, Qiu Feng

(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To research the effects of silencing tripartite motif containing 25 (TRIM25) gene on cisplatin resistance and apoptosis in cisplatin resistant lung cancer cell lines A549/DDP.

作者介绍: 栗林, Email: sulin2010cherry@126.com,

研究方向: 肺癌蛋白基础研究与临床。

通信作者: 邱峰, Email: qiufeng.cn@gmail.com。

基金项目: 重庆市卫生局医学科重点资助项目(编号: 2011-1-036)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000267.html>

Methods: Four types of short hairpin RNA were designed and prepared. The recombinant plasmids (pt1, pt2, pt3, pt4) were constructed respectively, which were transfected into A549/DDP cells using lipofectamine. Real-time PCR and Western

[4] Yoles E, Schwartz M. Elevation of intraocular glutamate levels in rats with partial lesion of the optic nerve[J]. Arch Ophthalmol, 1998, 116(7): 906-910.

[5] 傅轶, 刘苏, 王志刚, 等. 超声微泡造影剂介导脑源性神经营养因子联合转染视网膜和视皮质对视神经损伤后视网膜神经节细胞的保护作用[J]. 中华眼底病杂志, 2011, 27(1): 65-69.

[6] 任蕾, 牛建军, 王一, 等. 利用荧光金逆行示踪技术评价视神经不完全损伤后视网膜神经节细胞的存活率[J]. 眼科新进展, 2005, 25(1): 21-23.

[7] Germain F, Calvo M, de la Villa P. Rabbit retinal ganglion cell survival after optic nerve section and its effect on the inner plexiform layer[J]. Exp Eye Res, 2004, 78(1): 95-102.

[8] Schnieders J, Gbureck U, Thull R, et al. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement[J]. Biomaterials, 2006, 27(23): 4239-4249.

[9] Shive MS, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1997, 28(1): 5-24.

[10] Schlicher RK, Radhakrishna H, Tolentino TP, et al. Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation[J]. Ultrasound Med Biol, 2006, 32(6): 915-924.

[11] Carmignoto G, Maffei L, Candeo P, et al. Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section[J]. J Neurosci, 1989, 9(4): 1263-1272.

[12] 陈慷, 郭希, 让鲍玉, 等. 大鼠眼玻璃体内注射神经生长因子的药代动力学研究[J]. 眼科研究, 2003, 21(3): 267-269.

[13] Rao RV, Peel A, Logvinova A, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78[J]. FEBS letters, 2002, 514(2-3): 122-128.

(责任编辑: 关蕴良)