

机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001853

载 BDNF 基因阳离子超声微泡联合超声靶向微泡破裂技术治疗大鼠急性不完全脊髓损伤的实验研究

宋昭君¹, 胡侦明², 叶永杰¹, 郑佳状¹, 汪凡栋¹, 陈 宇¹, 刘元彬¹, 张 智¹

(1. 四川省遂宁市中心医院骨科中心, 遂宁 629000; 2. 重庆医科大学第一附属医院骨科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨超声靶向破裂技术介导载脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)基因阳离子微泡(brain-derived neurotrophic factor-loaded cationic nanobubbles, BDNF/CNBs)治疗大鼠急性不完全脊髓损伤的可行性及效果。**方法:**96 只成年雄性 SD 大鼠构建急性不完全脊髓损伤模型(Allen 法)后随机分为 4 组:生理盐水(normal saline, NS)组;载 BDNF 基因阳离子微泡(BDNF/CNBs)组;BDNF 基因+超声(brain-derived neurotrophic factor + ultrasound, BDNF+US)组;载 BDNF 基因阳离子微泡+超声(BDNF/CNBs + US)组, 每组 24 只。经大鼠尾静脉注射药物后再按上述分组进行处理, 在不同时间点采用 HE 染色观察脊髓损伤后的病理变化;Nissl 染色观察神经元存活及再生情况;TUNEL 染色法检测神经元凋亡情况;采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 BDNF 基因和蛋白的表达情况;通过倒置荧光显微镜观察偶联绿色荧光蛋白的表达情况;最终采用 BBB 法(Basso, Beattie, and Bresnahan test, BBB)评估大鼠神经功能恢复情况。**结果:**本实验所制备的 BDNF/CNBs 阳离子超声微泡的平均粒径为(339.8 ± 210.3) nm, Zeta 电位为(24.30 ± 6.24) mV。BDNF/CNBs + US 治疗组能有效减轻脊髓组织损伤, 明显增加 BDNF 基因及 BDNF 蛋白的表达(0.61 ± 0.10 vs. 0.70 ± 0.13 vs. 0.83 ± 0.15 vs. 1.55 ± 0.19 , $P=0.000$; 31.65 ± 1.30 vs. 45.62 ± 1.50 vs. 49.55 ± 1.20 vs. 75.83 ± 2.10 , $P=0.000$);与对照组相比, BDNF/CNBs + US 治疗组尼氏小体数量明显增多(51.00 ± 4.95 vs. 90.80 ± 6.87 vs. 99.60 ± 7.50 vs. 159.40 ± 8.56 , $P=0.000$), 神经元凋亡数明显减少(60.19 ± 1.84 vs. 54.97 ± 2.40 vs. 36.70 ± 2.23 vs. 17.08 ± 1.42 , $P=0.000$);且最终促进脊髓损伤后神经功能的恢复, 即表现为明显增高的 BBB 评分(10.10 ± 0.33 vs. 10.60 ± 0.43 vs. 11.70 ± 0.36 vs. 17.20 ± 0.45 , $P=0.000$)。**结论:**载 BDNF 阳离子超声微泡联合超声靶向微泡破裂治疗能有效地将 BDNF 基因转染入损伤脊髓组织, 并能促进脊髓损伤的功能恢复。以 BDNF/CNBs 为基础的超声辐照联合基因治疗在治疗脊髓损伤及其他中枢神经系统疾病方面有广阔的应用前景, 为脊髓损伤的治疗提供了一种新型、安全的方法。

【关键词】阳离子微泡; 脑源性神经营养因子; 脊髓损伤; 细胞凋亡; 基因治疗**【中图分类号】**R651.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-05-14

BDNF-loaded cationic nanobubbles for targeted therapy of acute spinal cord injury in rats

Song Zhaojun¹, Hu Zhenming², Ye Yongjie¹, Zheng Jiazhuang¹, Wang Fandong¹,Chen Yu¹, Liu Yuanbin¹, Zhang Zhi¹

(1. Department of Trauma Surgery, Suining Central Hospital;

2. Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effect of ultrasound(US)-mediated destruction of cationic nanobubbles(CNBs) expressing brain-derived neurotrophic factor(BDNF/CNBs) on nerve regeneration in rats following spinal cord injury(SCI). **Methods:** Ninety-six adult male sprague-dawley rats were randomly divided into four treatment groups after Allen hit models of SCI being established. The groups were: normal saline(NS) group, BDNF/CNBs group, BDNF and US group, BDNF/CNBs and US group. Histological changes after SCI were observed by hematoxylin and eosin staining. Neuron viability was determined by Nissl staining. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL) staining was used to examine cell apoptosis. BDNF gene and protein expression were detected by quantitative reverse-transcription PCR and Western blot. Green fluorescent protein(GFP) expression in the spinal cord was examined using an inverted

作者介绍: 宋昭君, Email: songzhaojunluojuan@163.com,

研究方向: 脊髓损伤与基因治疗。

通信作者: 叶永杰, Email: yongjieguke@163.com。

资金资助: 四川省卫生和计划生育委员会科研课题资助项目(编号: 16PJ523)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20180929.1706.024.html>
(2018-09-30)

fluorescence microscope. The recovery of neural function was determined using the Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) test. **Results:** The mean diameter of the BDNF/CNBs was (339.8 ± 210.3) nm and the zeta potential was (24.30 ± 6.24) mV. BDNF therapy using US-mediated BDNF/CNBs destruction significantly increased BDNF expression (0.61 ± 0.10 vs. 0.70 ± 0.13 vs. 0.83 ± 0.15 vs. 1.55 ± 0.19 , $P=0.000$; 31.65 ± 1.30 vs. 45.62 ± 1.50 vs. 49.55 ± 1.20 vs. 75.83 ± 2.10 , $P=0.000$), attenuated histological injury, improved the expression of Nissl body and decreased neuron loss (51.00 ± 4.95 vs. 90.80 ± 6.87 vs. 99.60 ± 7.50 vs. 159.40 ± 8.56 , $P=0.000$), inhibited neuronal apoptosis in injured spinal cords (60.19 ± 1.84 vs. 54.97 ± 2.40 vs. 36.70 ± 2.23 vs. 17.08 ± 1.42 , $P=0.000$), and increased BBB scores in SCI rats (10.10 ± 0.33 vs. 10.60 ± 0.43 vs. 11.70 ± 0.36 vs. 17.20 ± 0.45 , $P=0.000$). **Conclusions:** UTMD-mediated BDNF/CNBs destruction effectively transfects the BDNF gene into target tissues and has a significant effect on the injured spinal cord. The combination of US irradiation and gene therapy through BDNF/CNBs holds great promise for the future of nanomedicine and the development of non-invasive treatment options for SCI and other diseases.

[Key words] cationic nanobubbles; brain-derived neurotrophic factor; spinal cord injury; apoptosis; gene therapy

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种可逆性差、致残率高的中枢神经系统损伤性疾病。流行病学研究显示:交通事故为脊髓损伤的首要原因,约占 46.9%;其次是工伤事故,约占 33.1%,其他损伤包括运动损伤、火器伤及锐器伤等^[1]。脊髓损伤在分子及细胞水平机制复杂,病理生理过程亦十分复杂,目前对脊髓损伤的治疗仍是一大医学难题。目前虽然还没有一种基因治疗方法可应用于临床治疗脊髓损伤,但利用目的基因在靶细胞中的表达及其相关特性来保护神经元、促进神经元再生,以及抑制局部胶质瘢痕增生等,最终达到脊髓神经功能恢复,是目前治疗脊髓损伤的研究方向。

近年来,超声靶向微泡破裂(ultrasound-mediated microbubble destruction, UTMD)技术成为基因转染领域研究的热点,其技术原理主要是体外目的基因或药物与超声微泡结合,然后将载基因或药物超声微泡导入体内,再进行体外超声辐照,利用超声微泡在超声辐照下产生的空化效应,在细胞膜上形成可逆孔隙,从而使目的基因或药物更容易进入细胞达到靶向治疗目的。目前,UTMD 已成功应用于体内外多种组织器官研究^[2-5],且均表现出安全和高转染效率的优点。

本研究以脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)基因作为目的基因,在优化超声微泡制备工艺的基础上,制备出一种载 BDNF 基因的阳离子超声微泡(brain-derived neurotrophic factor-loaded cationic nanobubbles, BDNF/CNBs),然后通过 UTMD 介导 BDNF 基因治疗大鼠急性脊髓

损伤,初步评估 UTMD 联合 BDNF/CNBs 治疗急性不完全脊髓损伤的疗效,以期治疗脊髓损伤提供一种新的思路和治疗方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂 二硬脂酰磷脂酰胆碱(distearoyl Phosphatidylcholine, DSPC)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(dipalmitoyl Phosphoethanolamine, DPPE)、全氟丙烷(C3F8)、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-羧基(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-PEG-carboxylic acid, DSPE-PEG2000-COOH)、氯仿、甘油; pCMV6-BDNF-GFP 质粒、琼脂糖、PBS、无菌蒸馏水、DH-5 α 细胞、LB 培养基、氨苄青霉素、E.Z.N.A. Plasmid Maxi Kit。

1.1.2 实验动物 成年健康雄性 SD 大鼠 96 只,体质量 180~200 g,来源于重庆医科大学动物实验中心。

1.1.3 实验仪器 精密移液器、普通光学显微镜(Olympus CKX41,加拿大)、透射电镜(S3400N,日本)、激光粒径分析系统(Zeta SIZER, Malvern, 美国)、紫外分光光度计(Thermo NanoDrop 2000)、超声基因转染仪(UTG 1025, 中国)、恒温震荡仪等。

1.2 实验方法

1.2.1 携 BDNF 基因阳离子超声微泡的制备及性质检测 采用机械振荡法阳离子超声微泡。DSPC、DPPE、PEG4000、DSPE-PEG2000-COOH 按 15:5:6.3:2.2 的体积比加入氯仿中,60 $^{\circ}\text{C}$ 磁力搅拌 2 h,然后真空冻干;加入一定体积溶媒液(由 50%葡萄糖、丙二醇、甘油和精蛋白按体积比为 7.3:0.9:0.9:0.9 组成),室温 120 r/min 搅拌 3 h,充入 C3F8,超声处理(100 W, 30 s)即得。制备单纯的阳离子微泡经钴-60 射线辐照消毒(1~1.5 万 Gy)后,加入不同质量(分别为 0.1、0.2、0.4、

0.8、1.0 mg)的 pCMV6-BDNF-GFP 质粒,各组置于摇床在室温下低速震荡,共孵育 30 min。再检测阳离子超声微泡形态结构,测定粒径、电位及分散系数、基因包封率。

1.2.2 动物模型建立、分组及体内 BDNF 基因转染 本动物实验研究部分符合遂宁市中心医院实验动物伦理委员会伦理学标准。采用改良 Allen 法^[6],将 10 g 撞针由 5 cm 高处做自由落体运动打击大鼠第 10 段胸脊髓,造成急性不完全脊髓损伤模型。大鼠急性不完全脊髓损伤模型构建成功后,随机把 SD 大鼠分成以下 4 组。对照组:0.5 mL 生理盐水(NS)经尾静脉注入体内($n=24$);载 BDNF 基因阳离子微泡组(BDNF/CNBs)组:0.5 mL BDNF/CNBs(50 μ g)溶液经尾静脉注入体内($n=24$);BDNF 基因+超声(BDNF + US)组:0.5 mL BDNF 质粒 DNA(50 μ g)溶液经尾静脉注入体内,再接受超声基因转染仪超声辐照 5 min,超声强度 2.5 W/cm²($n=24$);载 BDNF 基因阳离子微泡+超声(BDNF/CNBs + US)组:0.5 mL BDNF/CNBs(50 μ g)(BDNF/CNBs)溶液经尾静脉注入体内,再接受超声基因转染仪超声辐照 5 min,超声强度 2.5 W/cm²($n=24$)。所有大鼠按分组给予相应的药物注射和进行辐照(2.5 W/cm²,5 min),每 12 h 1 次,持续 3 d 后开始收集标本。前期预实验部分已采用改良 Allen 法进行大量大鼠脊髓不完全损伤模型构建的可行性研究,证实总体模型构建成功。

1.2.3 基因治疗后大鼠脊髓损伤处 NGF 表达水平检测 基因治疗后 14 d,随机抽取 3 只 SD 大鼠,麻醉及心脏灌注成功后切取损伤脊髓组织约 1 cm,液氮保存。采用荧光定量 PCR 检测各治疗组术后 BDNF 基因的 mRNA 表达量,以 GAPDH 为内参,计算 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 值进行各组间比较^[7]。另采用 Western blot 检测各治疗组术后 BDNF 蛋白表达水平,采用 ImageJ 定量分析软件进行灰度值测定,以 β -actin 为内参,BDNF 的相对表达量为 BDNF 灰度值/ β -actin 灰度值。

1.2.4 GFP 表达水平检测 为了检测 BDNF 表达位置及表达量,本实验构建了含 GFP 报告基因的质粒 DNA,优化了转染条件。脊髓标本制成冰冻切片(10 μ m),采用倒置荧光显微镜观察 GFP 表达情况,再使用 Image J 软件进行荧光强度定量分析。

1.2.5 常规组织病理学检测 基因治疗后 14 d,采用 HE 染色观察大鼠脊髓组织损伤后的病理变化,采用尼氏染色观察大鼠脊髓损伤后损伤区尼氏小体数量及形态,高倍光学显微镜下计数尼氏小体数量,了解脊髓损伤区神经元再生情况。

1.2.6 神经元凋亡检测 基因治疗后 14 d,采用 TUNEL-DAB 法检测大鼠损伤脊髓区域神经元的凋亡情况。高倍光学显微镜下观察可见细胞核固缩,有的呈碎片状、不规则、大小不一致,呈棕黄色颗粒者为阳性细胞,计数凋亡细胞百分率。

1.2.7 神经功能恢复评估 在大鼠脊髓损伤后第 7、14、21、28 天采用 BBB 法(Basso, Beattie, and Bresnahan test, BBB)^[8]评估神经功能恢复情况。具体方法:脊髓损伤后大鼠被放置于一

自制纸箱(80 cm $\times$ 130 cm $\times$ 30 cm)内,观察其活动,并按照 BBB 法记录其双后肢运动得分,每次观察时间为 3 min。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,所有数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。单因素方差分析多组计量资料差异,两组计量资料采用两独立样本 t 检验,多变量方差分析重复测量数据。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 BDNF/CNBs 的一般性质

本实验采用机械震荡法制备的 BDNF/CNBs 在普通光学显微镜及透射电镜下观察,微泡分散度良好,呈球形,形态较均匀,大小较一致(图 1、图 2)。经激光粒径分析系统检测,制备 BDNF/CNBs 的平均粒径为(339.8 $\pm$ 210.3) nm(图 3),Zeta 电位为(24.30 $\pm$ 6.24) mV(图 4),分散系数为 0.179。采用紫外分光光度法测定 BDNF/CNBs 中 BDNF 基因包封率,在采用不同投放总量 BDNF 质粒 DNA 的情况下,当 BDNF 质粒 DNA 投放量为 0.4 mg 时,BDNF 基因包封率达到最高,为(46.86 $\pm$ 5.16)%。

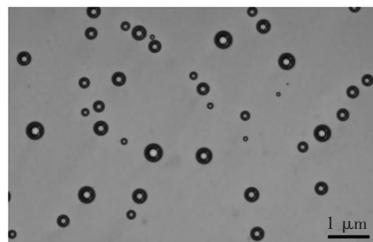


图 1 光镜下观察载 BDNF 阳离子微泡

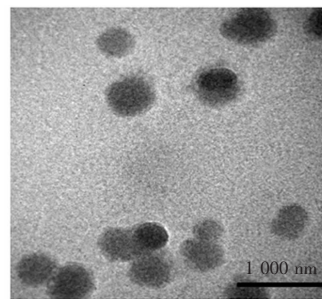


图 2 载 BDNF 阳离子微泡透射电镜图

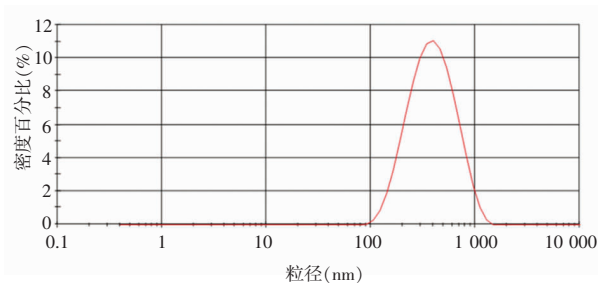


图 3 载 BDNF 阳离子微泡粒径分布及分散度

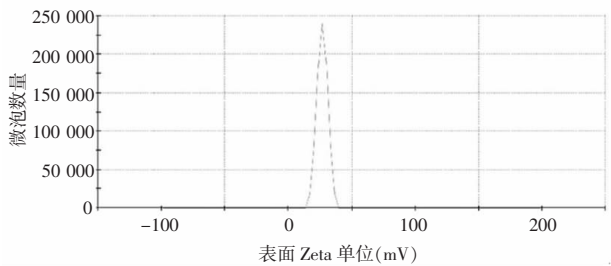


图 4 载 BDNF 阳离子微泡 Zeta 电位图

2.2 大鼠急性脊髓损伤模型构建

本实验采用改良 Allen 打击法成功构建了大鼠 T10 节段脊髓急性不完全损伤模型(图 5A、B)。模型构建后各治疗组随机抽取 1 只实验大鼠行 7.0 T 核磁共振成像检测及 HE 染色,病理染色结果(图 5C、D)及 MRI 检测结果(图 5E)均证实本实验大鼠 SCI 模型构建成功。

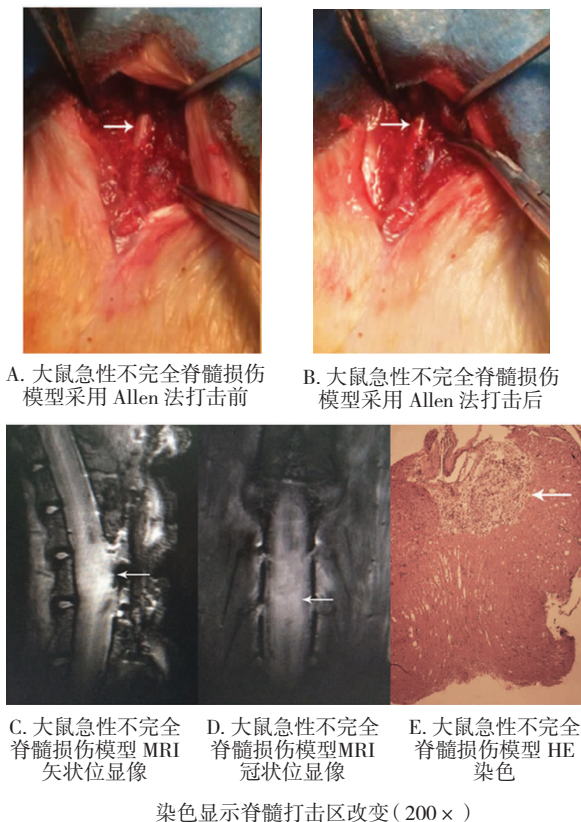


图 5 Allen 打击法成功构建大鼠 T10 节段脊髓急性不完全损伤模型

2.3 BDNF 基因表达水平

在基因治疗 14 d 时, BDNF/ CNBs +US 组 BDNF 基因 mRNA 的相对表达量明显高于其他治疗组($n=3$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值: NS 组 vs. BDNF/ CNBs 组 vs. BDNF+US 组 vs. BDNF/ CNBs+US 组为 0.61 ± 0.10 vs. 0.70 ± 0.13 vs. 0.83 ± 0.15 vs. 1.55 ± 0.19 ; $F=25.217$, $P=0.000$), 如图 6 所示。在基因治疗 14 d 时, BDNF/ CNBs + US 组 BDNF 蛋白表达水平明显高于其他治疗组($n=3$, BDNF 相对表达量: NS 组 vs. BDNF/ CNBs 组 vs. BDNF+US

组 vs. BDNF/ CNBs+US 组为 31.65 ± 1.30 vs. 45.62 ± 1.50 vs. 49.55 ± 1.20 vs. 75.83 ± 2.10 ; $F=32.328$, $P=0.000$), 如图 7 所示。BDNF/ CNBs 联合超声治疗组 BDNF 在基因水平及蛋白质水平均高于其他 3 个治疗组, 表明载 BDNF 阳离子超声微泡联合 UTMD 治疗能更有效地将 BDNF 基因转染入损伤脊髓组织, 从而发挥 BDNF 的生理作用。

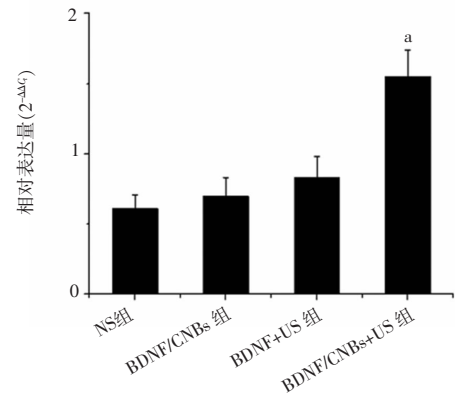
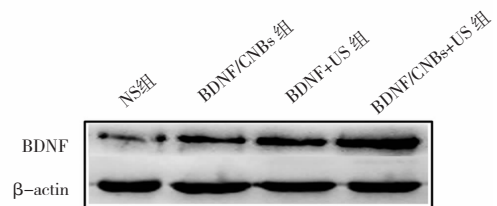
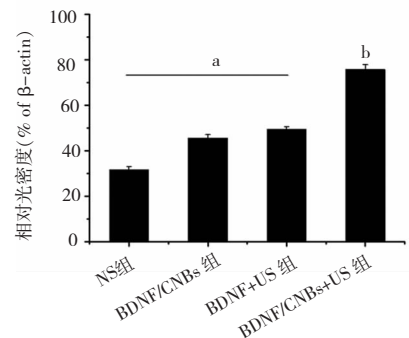
a: 与所有组比较, $P<0.05$

图 6 各组 BDNF 基因 mRNA 的相对表达量



A. 各组术后 BDNF 蛋白 Western blot 结果

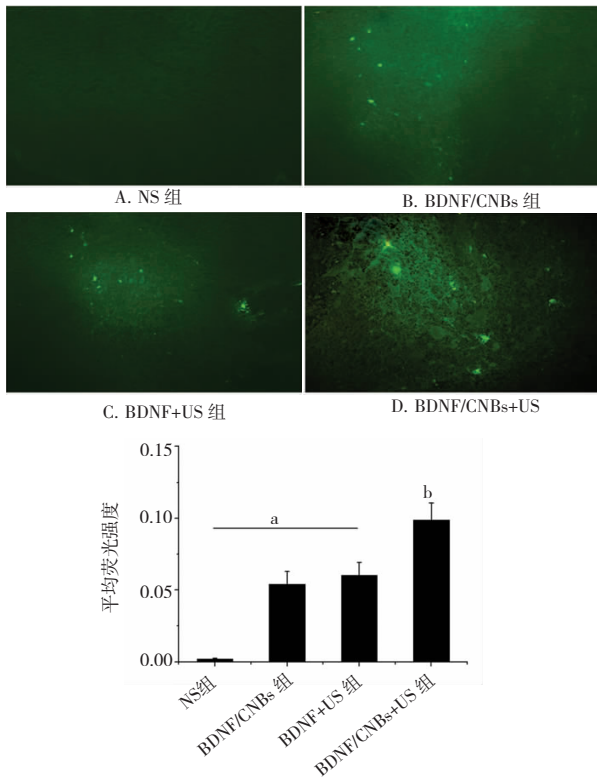
a: BDNF+US 组、BDNF/ CNBs 组与 NS 组比较, $P<0.05$; b: 与所有组比较, $P<0.05$

B. 各组术后 BDNF 蛋白相对表达量对比

图 7 载 BDNF 阳离子超声微泡联合 UTMD 治疗能增加脊髓损伤区 BDNF 蛋白的表达

2.4 GFP 表达水平检测

在基因治疗后 14 d, 采用倒置荧光显微镜观察各治疗组术后 GFP 表达情况。如图 8 所示, BDNF/ CNBs + US 组 GFP 蛋白表达水平明显高于其他治疗组($n=3$, GFP 平均荧光强度: NS 组 vs. BDNF/ CNBs 组 vs. BDNF+US 组 vs. BDNF/ CNBs+US 组为 0.002 ± 0.001 vs. 0.054 ± 0.009 vs. 0.060 ± 0.009 vs. 0.099 ± 0.012 ; $F=18.965$, $P=0.000$)。GFP 荧光强度在 BDNF/ CNBs + US 组最高, 其次是 BDNF + US 组, 再次是 BDNF/ CNBs 组和 NS 组。



E. 各组术后 GFP 表达平均光密度对比

图 8 载 BDNF 阳离子超声微泡联合 UTMD 治疗增加脊髓损伤区 GFP 表达(200×)

2.5 一般病理变化及尼氏染色

在基因治疗后 14 d, 采用 HE 染色观察损伤脊髓组织处的病理组织学改变。如图 9 所示, SCI 后各治疗组在灰质中观察到出血, 只有少数神经元存活, 残余白质中可见肿胀的轴突和空泡区; 而与其他治疗组相比, BDNF/CNBs + US 治疗后的病理损伤程度要明显轻于其他治疗组, 可观察到部分胶质细胞增殖, 大量神经元存活, 形态尚正常。

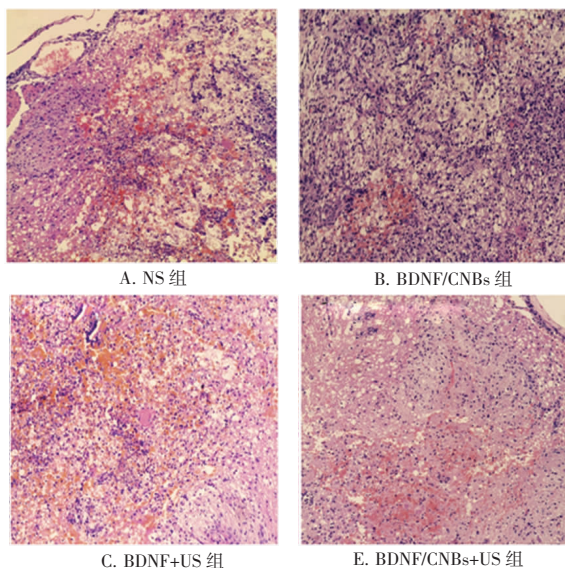
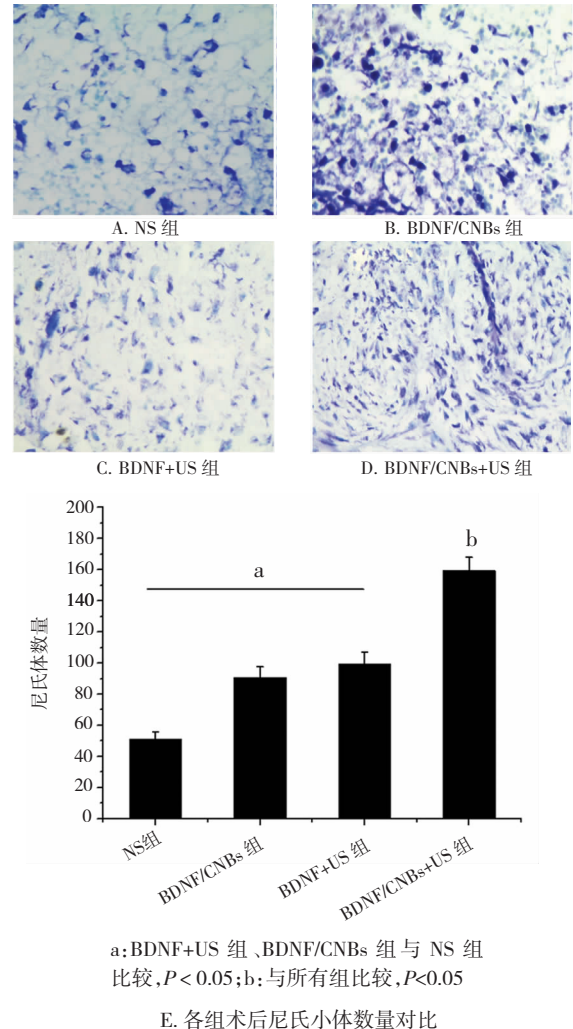


图 9 UTMD 联合载 BDNF 阳离子超声微泡治疗减轻脊髓损伤区病理改变(200×)

通过尼氏染色观察神经元活性。如图 10 所示, 4 个治疗组治疗后 14 d 存活神经元数量差异有统计学意义, BDNF/CNBs + US 治疗组尼氏小体计数明显高于其他治疗组 ($n=3$, 尼氏小体计数: NS 组 vs. BDNF/CNBs 组 vs. BDNF+US 组 vs. BDNF/CNBs+US 组为 51.00 ± 4.95 vs. 90.80 ± 6.87 vs. 99.60 ± 7.50 vs. 159.40 ± 8.56 ; $F=28.880$, $P=0.000$), 且尼氏小体体积大而丰满。



E. 各组术后尼氏小体数量对比

图 10 UTMD 联合载 BDNF 阳离子超声微泡治疗促进脊髓损伤区神经元再生(200×)

2.6 神经元凋亡检测

TUNEL-DAB 显色法检测各治疗组在治疗后 14 d 时脊髓损伤区域神经元凋亡情况如图 11 所示, BDNF/CNBs + US 治疗组神经元凋亡率明显低于其他治疗组; 在 NS 组和 BDNF/CNBs 组, 有大量 TUNEL 阳性细胞; 而在 BDNF+US 治疗组 TUNEL 阳性细胞数略有下降 ($n=3$, 凋亡细胞百分比: NS 组 vs. BDNF/CNBs 组 vs. BDNF+US 组 vs. BDNF/CNBs+US 组为 60.19 ± 1.84 vs. 54.97 ± 2.40 vs. 36.70 ± 2.23 vs. 17.08 ± 1.42 ; $F=12.283$, $P=0.000$)。这些结果表明, 采用超声靶向微泡破坏技术联合 BDNF 基因治疗明显减少了脊髓损伤区神经元凋亡, BDNF 基因能通过抑制细胞凋亡途径保护神经元。

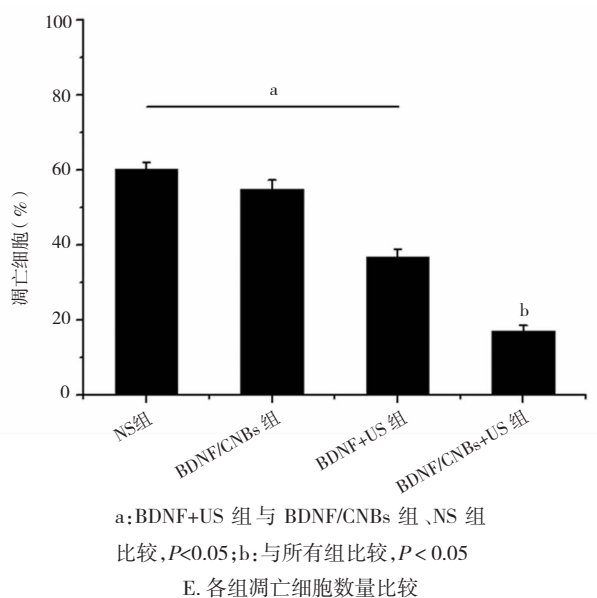
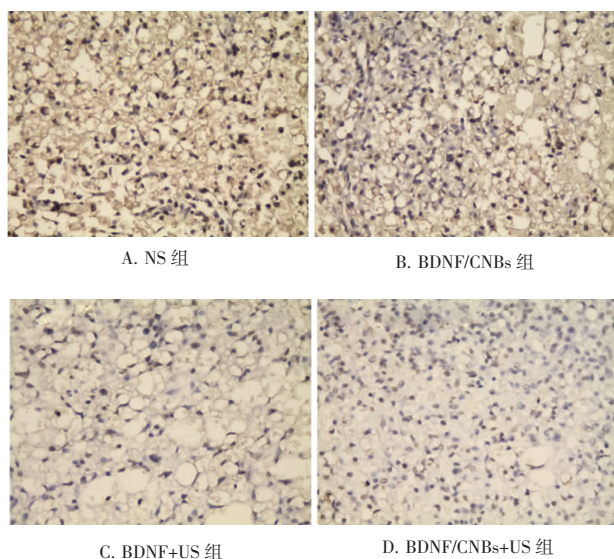
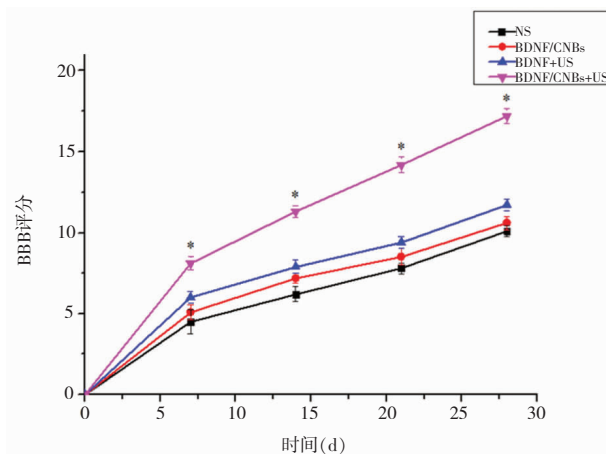


图 11 UTMD 联合载 BDNF 阳离子超声微泡治疗抑制脊髓损伤区神经元凋亡(200×)

2.7 神经功能恢复评估

本实验部分采用 BBB 法评估大鼠脊髓经治疗 7、14、21 及 28 d 后后肢神经功能恢复情况。脊髓损伤前所有大鼠肢体功能正常, BBB 评分为 21 分; 术后即刻所有大鼠 BBB 评分降低到 0, 表明 SCI 模型有效建立。治疗后 7 d 开始, BDNF/CNBs + US 组大鼠 BBB 评分明显高于其他治疗组; 与其他治疗组相比, BDNF/CNBs+US 治疗组大鼠的神经功能得到持续改善, 即表现为明显增高的 BBB 评分 ($n=5$, BBB 评分 NS 组 vs. BDNF/CNBs 组 vs. BDNF+US 组 vs. BDNF/CNBs+US 组分别为: 7 d, 4.50 ± 0.73 vs. 5.10 ± 0.45 vs. 6.00 ± 0.37 vs. 8.10 ± 0.41 , $F=28.333$, $P=0.000$; 14 d, 6.20 ± 0.47 vs. 7.20 ± 0.32 vs. 7.90 ± 0.42 vs. 11.30 ± 0.36 , $F=4.471$, $P=0.000$; 21 d, 7.80 ± 0.34 vs. 8.50 ± 0.51 vs. 9.40 ± 0.38 vs. 14.20 ± 0.48 , $F=9.369$,

$P=0.000$; 28 d, 10.10 ± 0.33 vs. 10.60 ± 0.43 vs. 11.70 ± 0.36 vs. 17.20 ± 0.45 , $F=11.642$, $P=0.000$) (图 12)。



采用重复测量设计方差分析, Manuchly 球形度检验 $P=0.884$ 。在不同治疗时间点, BBB 评分差别有统计学意义 ($F=103.112$, $P=0.000$); 7 d, $P=0.000$; 14 d, $P=0.000$; 21 d, $P=0.000$; 28 d, $P=0.000$ 。不同治疗时间点和治疗组间不存在交互作用 ($F=1.384$, $P=0.216$)

图 12 UTMD 联合载 BDNF 阳离子超声微泡治疗有效促进脊髓后神经功能恢复

3 讨论

SCI 一直是临床治疗的难题, 尽管目前存在许多治疗策略用于减少脊髓损伤后的继发性损伤以及促进神经轴突的再生, 但是疗效不尽如人意。近年来, 利用外源性基因促进神经元再生的治疗方法广泛应用于基础研究及动物实验^[8-9], 然而这些外源基因的安全性和缺乏连续表达的能力必须得到解决, 才可以实现基因治疗 SCI 在临床实践中的运用。

BDNF 是由德国神经化学家 Barde 等于 1982 年从猪脑中分离纯化出的一种具有促进神经生长活性的蛋白质, 其单体是由 119 个氨基酸残基组成的分泌型多肽, 分子量 13.15 kD。1991 年, Ozcelik 等^[10]证实人 BDNF 基因位于 11 号染色体的近端短臂上 (11q13), 由 11 个外显子组成, 是单拷贝基因。BDNF 作为脊髓运动神经元一个强有力的生成因子, 参与 SCI 后的复杂病理过程^[11]。BDNF 能提高受损脊髓运动和感觉神经元的存活^[12-13], 并能促进神经元的修复与再生, 还可以刺激轴突和树突出芽^[14-15]。BDNF 对损伤脊髓有保护作用, 能够预防脊髓损伤后神经的萎缩, 刺激脊髓损伤后神经元红核中再生基因的表达^[16-18]。BDNF 的受体结构及其信号通路:

BDNF 的受体包括高亲和力受体(络氨酸受体 TrkB 家族:BDNF/TrkB 信号通路)和低亲和力受体(P75NTRs 受体:BDNF/P75 信号通路)。TrkB 的胞内区域具有内在的酪氨酸激酶活性,BDNF 与 TrkB 结合后激活胞内区域,引起 TrkB 自身磷酸化作用增强,进而激活 Ras-MAPK 通路,最后在 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)的丝氨酸位点激活 CREB。CREB 通过增加 BDNF 基因及抗凋亡蛋白基因 Bcl-2 的表达来促进神经细胞生存,增加突触可塑性及神经发生。BDNF 的作用机制主要有刺激受损神经元产生自由基清除酶,以降低自由基活性,加速自由基的清除,从而减少自由基对神经元的损伤^[19],使神经元内钙结合蛋白含量增加,继而排除神经元内超量的钙离子,维持神经元内稳态,减少钙离子超载引起的损伤^[20]。

近年来,UTMD 技术成为基因转染领域研究的热点,已在心血管疾病、视网膜疾病、肝脏肿瘤及乳腺肿瘤等的转染实验中表现出了安全及高转染效率等优点^[21-24]。本实验利用阳离子超声微泡联合 UTMD 介导 BDNF 基因治疗大鼠急性不完全脊髓损伤,探讨其对神经元的保护及促进再生作用。结果显示,BDNF/CNBs 组及 BDNF 基因联合超声治疗组的疗效明显差于 BDNF/CNBs 联合超声治疗组。阳离子超声微泡联合 UTMD 介导 BDNF 基因治疗能明显增加 BDNF 基因的表达,减轻脊髓组织损伤,减少神经元的丢失,能抑制神经细胞凋亡,最终促进脊髓损伤后大鼠神经功能的恢复。

在本实验研究中,阳离子超声微泡联合 UTMD 介导 BDNF 基因治疗大鼠急性不完全脊髓损伤。实验动物模型通过经典的 Allen 打击法来构建,术后其病理表现及组织学特点均与其他学者所报道的相似^[25-26],证明模型成功构建。尼氏小体存在于蛋白质合成的场所-粗面内质网,广泛用于反映大脑和脊髓等神经结构的营养状况。尼氏小体在病理条件下数量会降低。在本研究中,BDNF/CNBs 组及 BDNF 基因联合超声治疗组的尼氏小体计数明显少于 BDNF/CNBs 联合超声治疗组,表明载 BDNF 阳离子超声微泡联合 UTMD 治疗能有效促进损伤脊髓神经元的再生。细胞凋亡是脊髓损伤后的一个特征性变化。神经元凋亡进一步加重了脊髓的继发性损伤过程^[27]。本实验中,载 BDNF 阳离子超声微泡联合 UTMD 治疗脊髓损伤能明显减少神经元凋亡,且能

促进损伤脊髓功能的恢复。

神经功能恢复是治疗 SCI 最终的目的。本实验研究通过 BBB 法评估 SCI 大鼠经治疗后的后肢功能恢复情况。实验结果证实载 BDNF 阳离子超声微泡联合 UTMD 治疗 SCI 能明显促进神经功能的恢复,但在实验过程中仍存在一些不利于神经功能恢复的情况。在实验过程中,极少数大鼠在手术后出现相关并发症,如死亡、尿路感染、切口感染和自残行为等。除此之外,在一些没有出现并发症的实验大鼠也表现出神经功能恢复不良的情况,这可能与术中神经根损伤或术后脊髓神经退变有关。值得注意的是,本研究仅仅是对 SCI 大鼠是神经功能恢复进行了较短时间的观察评估,而脊髓神经功能的恢复时间漫长,所以在今后的研究中需延长观察时间。

本实验研究还存在以下一些局限性:①本实验采用低频超声进行体外超声辐照,但未进行超声微泡体内超声显像,没有研究目的基因在非靶器官的代谢特点及高剂量的外源性 DNA 的毒性效应。因此,在后期的实验中,需要进一步检测目的基因在非靶组织或器官内的代谢及生物学反应。②在本研究中超声波照射时间短且能量有限,需要在今后的实验中进一步研究及优化超声辐照参数,以提高提高基因转染效果。③该基因治疗在临床应用之前需要克服一些局限性,即在不接受开窗减压手术的脊髓损伤患者中,超声波难以到达由骨性结构包绕的脊髓,基因转染效率会受到很大影响。对此,本课题组提出的设想是设计一种新的椎间孔镜和超声聚焦系统,通过经皮经椎间孔镜实现 SCI 的超声介导靶向基因治疗。

综上所述,本实验成功证明载 BDNF 阳离子超声微泡联合 UTMD 技术能有效地将 BDNF 基因转染入损伤脊髓组织,并能促进 SCI 的修复。以 BDNF/CNBs 为基础的超声辐照联合基因治疗在治疗 SCI 及其他中枢神经系统疾病方面有广阔的应用前景,为 SCI 的治疗提供了一种新型、安全的方法。

参 考 文 献

- [1] Yang R, Guo L, Wang P, et al. Epidemiology of spinal cord injuries and risk factors for complete injuries in Guangdong, China: a retrospective study[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84733.
- [2] Zhong S, Shu S, Wang Z, et al. Enhanced homing of mesenchymal stem cells to the ischemic myocardium by ultrasound-targeted microbub-

- ble destruction[J]. Ultrasonics, 2012, 52(2): 281–286.
- [3] Xenariou S, Griesenbach U, Liang HD, et al. Use of ultrasound to enhance nonviral lung gene transfer in vivo[J]. Gene Ther, 2007, 14(9): 768–774.
- [4] Huang Q, Deng J, Wang F, et al. Targeted gene delivery to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood-brain barrier disruption[J]. Exp Neurol, 2012, 233(1): 350–356.
- [5] Chen Z, Liang K, Xie M, et al. Novel ultrasound-targeted microbubble destruction mediated short hairpin RNA plasmid transfection targeting survivin inhibits gene expression and induces apoptosis of HeLa cells[J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(8): 2059–2067.
- [6] Allen AR. Surgery of experimental lesions of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation—a preliminary report[J]. JAMA, 1911, LVII(11): 878–880.
- [7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [8] Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair[J]. Annu Rev Neurosci, 2001, 24: 1217–1281.
- [9] Kwon BK, Liu J, Lam C, et al. Brain-derived neurotrophic factor gene transfer with adeno-associated viral and lentiviral vectors prevents rubrospinal neuronal atrophy and stimulates regeneration-associated gene expression after acute cervical spinal cord injury[J]. Spine, 2007, 32(11): 1164–1173.
- [10] Ozcelik T, Rosenthal A, Foancke U, et al. Chromosomal mapping of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 genes in man and mouse[J]. Genomics, 1991, 10(3): 569–575.
- [11] Xu K, Uchida K, Nakajima H, et al. Targeted retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene prevents loss of mouse (twy/twy) anterior horn neurons *in vivo* sustaining mechanical compression[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2006, 31(17): 1867–1874.
- [12] Nakajima H, Uchida K, Kobayashi S, et al. Rescue of rat anterior horn neurons after spinal cord injury by retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene[J]. J Neurotrauma, 2007, 24(4): 703–712.
- [13] Kim DH, Zhao X, Tu CH, et al. Prevention of apoptotic neuronal cell death following neuronal injury by neurexins signaling through the tyrosine kinase receptor[J]. Neurosurgery, 2004, 100(1): 79–87.
- [14] Kwon BK, Liu J, Lam C, et al. Brain-derived neurotrophic factor gene transfer with adeno-associated viral and lentiviral vectors prevents rubrospinal neuronal atrophy and stimulates regeneration-associated gene expression after acute cervical spinal cord injury[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2007, 32(11): 1164–1173.
- [15] Blesch A, Tuszynski MH. Transient growth factor delivery sustains regenerated axons after spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2007, 27(39): 10535–10545.
- [16] Ruitenberg MJ, Blits B, Dijkhuizen PA, et al. Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of brain-derived neurotrophic factor reverses atrophy of rubrospinal neurons following both acute and chronic spinal cord injury[J]. Neurobiol Dis, 2004, 15(2): 394–406.
- [17] Kwon BK, Liu J, Lam C, et al. Brain-derived neurotrophic factor gene transfer with adeno-associated viral and lentiviral vectors prevents rubrospinal neuronal atrophy and stimulates regeneration-associated gene expression after acute cervical spinal cord injury[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2007, 32(11): 1164–1173.
- [18] Nakajima H, Uchida K, Kobayashi S, et al. Rescue of rat anterior horn neurons after spinal cord injury by retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene[J]. Neurotrauma, 2007, 24(4): 703–712.
- [19] Bifare YD, Kummer J, Joss P, et al. Brain derived neurotrophic factor protects against multiple forms of brain injury in bacterial meningitis[J]. J Infect Dis, 2005, 191(1): 40–50.
- [20] Bachis A, Mocchetti I. Brain derived neurotrophic factor is neuro-protective against human immunodeficiency virus envelope proteins[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1053: 247–257.
- [21] 曹治寰, 曹省, 宋宏宁, 等. 超声靶向破坏阳离子微泡介导 SDF-1 α 基因转染提高外源性血管新生效应的研究[J]. 临床超声医学杂志, 2015, 17(5): 289–292.
- [22] 许燕. 超声辐照阳离子微泡介导内皮抑素基因治疗视网膜新生血管的实验研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2015.
- [23] 修阳阳, 曾燕, 赵建农, 等. 低强度超声联合载 HSV-1-TK/GCV 自杀基因阳离子微泡对高强度聚焦超声不完全消融后残余肝癌细胞的抑制作用[J]. 中国介入影像与治疗学, 2017, 14(1): 45–49.
- [24] 周宇, 简嘉, 王志刚, 等. 中性微泡、阳离子微泡及靶向阳离子微泡携内皮抑素基因经超声转染治疗裸鼠乳腺癌种植瘤的实验研究[J]. 临床超声医学杂志, 2016, 18(5): 293–296.
- [25] He B, Nan G. Neuronal regeneration after acute spinal cord injury in adult rats[J]. Spine J, 2016, 16(12): 1459–1467.
- [26] Zhang M, Chai Y, Liu T, et al. Synergistic effects of Buyang Huanwu decoction and embryonic neural stem cell transplantation on the recovery of neurological function in a rat model of spinal cord injury[J]. Exp Ther Med, 2015, 9(4): 1141–1148.
- [27] Emery E, Aldana P, Bunge MB, et al. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury[J]. J Neurosurg, 1998, 89(6): 911–920.

(责任编辑: 罗萍)