

脑源性神经营养因子治疗视网膜色素变性的研究进展

闫博婧 综述 李根林 审校

100730 首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科学与视觉科学重点实验室

通信作者:李根林,Email:ligenglin@263.net

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.03.017

【摘要】 脑源性神经营养因子(BDNF)是一种由脑组织合成并广泛分布于中枢神经系统的小分子碱性蛋白。研究发现,BDNF对视网膜神经节细胞(RGCs)、视网膜感光细胞(RPCs)和视网膜色素上皮(RPE)细胞均有保护、营养及抗凋亡作用。视网膜色素变性(RP)是由于RPCs及RPE细胞凋亡引起的视网膜退行性疾病。RP动物模型证实了BDNF的长期给药对于RP的治疗价值。然而BDNF在体内的半衰期较短,且无法跨越血-视网膜屏障由循环系统输送到视网膜,这给BDNF用于RP的治疗带来了挑战。为了使BDNF在眼内可以稳定持续地释放,多种新型给药方式已被尝试,包括基因工程技术、细胞移植技术、高分子材料缓释系统及滴眼液等。本文就BDNF对RP治疗的研究现状及BDNF的新型给药方式做一综述。

【关键词】 脑源性神经营养因子; 视网膜色素变性; 治疗

基金项目: 国家自然科学基金项目(81271046)

Current advances on the brain-derived neurotrophic factor in therapy of retinitis pigmentosa Yan Bojing, Li Genlin

Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University; Beijing Tongren Eye Center; Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab, Beijing 100730, China

Corresponding author: Li Genlin, Email: ligenglin@263.net

【Abstract】 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a kind of small molecule basic protein mainly synthesized in cortical areas and widely expressed in central nervous system. According to recent studies, BDNF plays a role in protection, nutrition and anti-apoptosis to retinal cells, including retinal ganglion cells (RGCs), retinal photoreceptor cells (RPCs) and retinal pigment epithelium (RPE) cells. Retinitis pigmentosa (RP) is a degenerative fundus disease due to the progressive degeneration of the RPCs in the retina. Mammalian modules verified the value of long-term BDNF in RP therapy. However, short half-life *in vivo* and failing to pass the blood-retina barrier become the obstacles to deliver BDNF intraocular, which bring challenges to BDNF applying in clinic. To make BDNF release intraocular stable and sustained, novel delivery system for BDNF have been tasted, such as gene engineering techniques, cell plantation techniques, sustained-released polymer delivery system and eye-drops. This article focuses on current research status of BDNF to RP treatment and its novel drug delivery system.

【Key words】 Brain-derived neurotrophic factor; Retinitis pigmentosa; Therapy

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81271046)

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一组由于视网膜感光细胞(retinal photoreceptor cells, RPCs)和视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞渐进性凋亡或死亡引起患者夜盲、视野缺损及中心视力下降的疾病^[1],具有遗传性和异质性,目前已有190个相关基因及近3100种基因突变被证实与RP相关,该病已成为世界范围内发病率较高的致盲眼病之一^[2]。RP的临床治疗以药物治疗为主,包括口服维生素、氨基酸、不饱和脂肪酸、Ca离子拮抗剂等,然而疗效欠佳。近年研究人员发现了以脑源性神经营养因子(brain-derived

neurotrophic factor, BDNF)为代表的神经营养因子(nervous tissue growth factors, NTFs)可以由眼内细胞分泌,对于视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)、RPCs和RPE细胞均有保护、营养及抗凋亡作用。所以应用BDNF控制RP的细胞凋亡研究越来越受到重视,本文就此方面的研究现状作一介绍。

1 BDNF的生物特性

BDNF是一种小分子碱性蛋白,于1982年首先由Barde

等^[3]从猪脑提取液中分离获得,由于发现该分子可以促进鸡胚的感觉神经元存活、纤维生长,因此命名为 BDNF。随后,Leibrock 等^[4]用逆转录 PCR 法从猪脑中提取 mRNA 并成功克隆了 BDNF cDNA,序列比较分析表明 BDNF 结构与之前发现的神经生长因子(nerve growth factor,NGF)结构相似。目前已知 BDNF 基因定位于人 11p13,主要由脑组织合成,分布于中枢神经系统。BDNF 以靶源性、自分泌、旁分泌方式分泌后,顺行性轴浆运输至轴突末梢,通过与靶细胞表面的特异性受体结合后激发分子间级联放大效应,发挥生物学功能。受体由 2 种类型的跨膜糖蛋白介导:高亲和力酪氨酸激酶受体 TrkB 和低亲和力神经生长素受体 p75NTR^[5]。与其他阳离子蛋白质相同,BDNF 无法跨越生物膜屏障,这为 BDNF 给药方式提出了新的挑战^[6]。BDNF 与其他神经生长因子同属于神经营养素家族,作用相似,但 BDNF 作用更广泛,对细胞的保护作用更强,故其在神经分化发育、功能维持及损伤修复上引起了广泛关注。

2 BDNF 对视网膜的保护作用

随着 BDNF 在中枢神经系统和周围神经系统中应用研究的进展,其在退行性视网膜病变的发生和发展中的作用逐渐受到重视。BDNF 在眼部主要由 RPE 细胞产生^[7]。mRNA 定位于视网膜感光细胞层、内核层和神经节细胞层。因此,BDNF 对于视网膜的保护主要体现在对视网膜 RGCs、RPCs 和 RPE 细胞的保护。

BDNF 是 RGCs 存活所必需的神经营养因子。一项关于斑马鱼的研究显示,在胚胎期就可以观察到 BDNF 对于 RGCs 分化及其后有丝分裂期的促进作用^[8]。BDNF 能通过 mi-RNA132 作用于 RGCs 轴突上的靶点 p250GAP,促进 RGCs 突触生长、分支^[9]。大鼠视神经横断损伤后,玻璃体腔注射 BDNF 可以在第 1 周保护 50% RGCs,在第 2 周保护近 90% RGCs^[10],BDNF 主要通过 TrkB 受体作用,延缓 RGCs 程序性死亡的速度和数量,对 RGCs 的抗凋亡效果与 caspase-3 抑制剂等同^[11]。然而,BDNF 对于 RGCs 的保护作用可能仅限不含视黑素的 RGCs,对于含有视黑素的 RGCs 无效^[12]。

眼内的 BDNF 主要通过 RPE 细胞产生^[13],也可通过胶质细胞产生。BDNF 与视网膜神经上皮的 TrkB 受体结合与活化,可以反过来促进 RPE 细胞的存活和分化^[14]。RPE 细胞本身对于 RPCs 具有营养、保护、支持作用。对于 RP 的 RPCs,RPE 细胞的作用尤为重要。光损伤时,BDNF 可以通过作用于 Müller 细胞上的受体提供前馈环,刺激 Müller 细胞产生睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor,CNTF)和成纤维生长因子(fibroblast growth factor,bFGF),间接延缓了 RPCs 的凋亡^[15]。在 BDNF 的保护下,光损伤后 1 周大鼠闪光视网膜电图(flash electroretinogram, fERG)较对照组明显提高,外核层 RPCs 的层数及厚度明显增加^[16]。除光损伤外,BDNF 玻璃体腔注射对于维替泊芬在光动力治疗(photodynamic therapy,PDT)中引起的视网膜毒性也具有保护作用。BDNF 使 RPCs 的数目没有因为 PDT 而减少,且使大鼠多焦 ERG 反应优于对照组,同时,BDNF 没有减少 PDT 对于脉络膜血管的作用^[17]。

3 BDNF 的最新给药技术

像其他 NTFs 一样,BDNF 由于具有相对分子质量大、半衰期短、在体内易降解、自身聚集以及吸收差的缺点,常规给药方法难以取得治疗效果。全身给药时,BDNF 无法穿透血-视网膜屏障,进入眼内的营养因子无法达到有效浓度,且成本高。眼部疾病多采用玻璃体腔注射的方法,然而视网膜病变病程长,为保证 NTFs 保持在有效浓度需要反复多次注射,这就增加了感染和出血等并发症的发生风险。因此,近年来一些用于 BDNF 给药的新技术不断出现。

3.1 经基因工程法释药技术

基因工程法是将 BDNF 基因与载体连接,再通过转染或感染细胞最终得到 BDNF 蛋白。载体包括病毒载体及非病毒载体。病毒载体是指能够携带目的基因的复制缺陷病毒,如腺相关病毒(adeno associated virus,AAV)载体、腺病毒(adenovirus,Ad)载体、慢病毒载体。病毒载体是目前所能得到的最高效的体内载体。然而病毒载体由于制备工艺复杂、转染细胞范围小、具有免疫原性,尤其是体内安全性等问题的存在,限制了其由动物实验向临床治疗的发展;非病毒载体常用的是质粒载体,与病毒载体相比无致癌性,无病毒感染,但整合效率很低^[18]。

基因工程法分为体内途径和体外途径。体内途径也称直接途径,是指将重组的外源基因直接注入眼内,在眼内直接表达出所需要的功能蛋白,从而发挥作用。注入眼内的部位主要是玻璃体腔和视网膜下腔。Zhang 等^[19]将构建的 BDNF-GFP 融合真核表达质粒注入玻璃体腔和视网膜下腔,以活体电穿孔的方法成功导入 RP 模型 RCS 大鼠 RPE 细胞,显著提高了视网膜 RPCs 的存活数目,证实了活体电穿孔对于基因导入治疗的有效性。此外,由于 Müller 细胞突触遍及视网膜全层,且对于维持 RGCs 的生存和功能具有重要作用,也成为了基因导入的备选细胞。Gauthier 等^[20]通过眼内注射含 BDNF 的 Ad 包装病毒,使其感染 SD 大鼠 Müller 细胞,对光损伤视网膜 RPCs 在形态结构和功能上都具有保护作用。体外途径也称间接途径,则是将经过转基因后的靶细胞移植到眼内,使外源性基因得以表达。Lawrence 等^[21]将逆转录病毒包装的 BDNF 基因或 GDNF 基因感染 Schwann 细胞得到含有病毒的稳定细胞系(SCTM41),将细胞注射入 RCS 大鼠视网膜下腔,可以在至少 4 个月内对 RPCs 的数量和功能起到保护作用。此外最新研究认为,将 BDNF 玻璃体腔注射与 AAV-BDNF 基因导入联合应用可以补偿病毒包装表达在初始的低浓度,使 RGCs 数量提高 97.4%^[22]。

3.2 经细胞移植术释药技术

RP 的发病机制之一是由于 RPCs 中出现异常基因产物堆积,最后导致细胞坏死。对于 RPE 细胞移植技术的研究为将来治疗因 RPE 细胞功能异常引起的 RP 提供了依据。RPE 细胞对感光细胞具有吞噬视杆细胞外节、保护、转运视网膜下积液、代谢维生素 A 等至关重要的作用。对于移植后 RPE 细胞的最新研究表明,移植后 RPE 可以挽救感光细胞,维持其完整性(特别是外段);帮助失活的视网膜保持 S 抗原并延缓 mRNA

的降解;防止视网膜新生血管的产生、正常血管的萎缩并保持其内平衡;维持传导过程中膜整合蛋白的基因表达和合成;通过吞噬作用去除碎片;再建感光细胞的细胞间质、维持外丛状层的突触联系,延缓内外核层细胞的衰老;分泌多种 NTFs,包括 bFGF、BDNF、血管内皮生长因子、肝细胞生长因子等^[23-25]。目前对于 RPE 细胞移植的研究为临床前研究,目的是为临床治疗做充分的准备。考虑到同种异体细胞的排斥反应,更多的研究倾向于采用自体诱导人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)或人工诱导的多能干细胞分化的 RPE 细胞进行移植。将这种自体来源的 RPE 细胞植入 RP 模型鼠 RCS 大鼠的视网膜下腔后,通过基因检测验证植入的 RPE 细胞可发挥眼部发育、视循环及吞噬作用等功能。目前尚未开展实验用 RPE 细胞向人视网膜下腔移植的临床研究,但已为临床 I/II 期试验做好准备^[26]。

此外,由于虹膜色素上皮细胞(iris pigment epithelium, IPE)与 RPE 细胞胚胎学来源相同,且取材方便,目前一些研究采用 IPE 用于视网膜下腔移植。Saito 等^[27]将 AAV 介导的 BDNF 成功转导至 IPE 细胞中形成 AAV-BDNF-IPE 复合体,当视网膜下腔中植入复合体病毒衣壳数目超过 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 时对 RPCs 有明显的保护作用。

眼内,甚至眼外的一些细胞可以分泌 BDNF 等 NTFs,近年来被越来越多地用于视网膜下腔移植,如嗅鞘细胞^[28]、Schwann 细胞^[29]、骨髓来源干细胞(marrow-derived stem cells, MSCs)^[30]等。嗅鞘细胞是一种功能上介于 Schwann 细胞和少突胶质细胞之间的一种特殊的胶质细胞,可以分泌包括 BDNF 在内的多种神经营养因子。将嗅鞘细胞与嗅神经细胞的混合物移植入 RP 模型 RCS 大鼠视网膜下腔后可检测到 BDNF、NGF 及 bFGF 的表达,对视网膜外节起到保护作用,下调了 caspase 阳性细胞的凋亡数目,维持了 ERG b 波振幅^[31]。小鼠生后 5~7 d 的 Schwann 细胞可以分泌包括 BDNF 在内的多种神经营养因子。RP 模型 rho(-/-)小鼠在生后 35 d 给予视网膜下腔移植 Schwann 细胞,结果显示在生后 70 d 内对于其视网膜 RPCs 发育起到重要的保护作用,RPCs 数目较对照组增加 55%;然而 140 d 时移植细胞对于 RPCs 的保护作用基本消失^[29],可能是由于 Schwann 细胞分泌 NTFs 的能力下降。因此寻找一种使 BDNF 在眼内可以缓慢、持久释放的方法对于 RP 的治疗具有重要意义。MSCs 移植对于 RP 的治疗基于以下 2 个方面:(1)根据细胞置换疗法的理论,可以使不同来源(小梁网和结膜)的 MSCs 在体内产生光感受器样细胞^[32-33];(2)基于 MSCs 旁分泌假设的研究认为,MSCs 可以分泌多种 NTFs,如 BDNF,保护光感受器退行性改变。在敲除鼠模型中已验证了 MSCs 移植对于退行性病变 RPCs 的保护作用^[34]。

3.3 经高分子材料缓释系统的释药技术

最初用于眼内承载 NTFs 的缓释系统是细胞包裹技术(encapsulated cell therapy, ECT),由封装膜、治疗细胞、细胞攀附支架和基质组成,封装膜是中空纤维半透膜,允许低相对分子质量 NTFs 透过,而阻止高相对分子质量抗体进入以避免机体免疫系统对治疗细胞的攻击。Neurotech 公司将包裹 CNTF

的 ECT 商品化,命名为 NT-501,希望可以将神经营养因子推向临床,目前已进入 II 期临床实验,目的是检测 NT-501 用于治疗 RP 的安全性及治疗效果。II 期临床实验根据植入物植入时间(6、12、18 和 24 个月)及 RP 发病时间将志愿者分为 4 个组(CNTF1~CNTF4),对每组患者 1 眼均植入高剂量或低剂量 NT-501。经过观察,植入眼内的 NT-501 可以在玻璃体腔稳定释放 CNTF 达 2 年以上;6~24 个月后检测结果显示,ECT 持续释放 CNTF 的半衰期为 51 个月;此外,NT501 没有使血清中产生抗 CNTF 抗体或抗 ECT 抗体^[35]。

目前,一类新型的纳米材料在神经营养因子应用领域受到关注。纳米微球是一类可用于蛋白类药物投递的可生物降解高分子材料,由于其在人体内不会造成有毒物质的释放、菌群失调等问题,且具有热塑性、抗牵拉性、可控结晶温度、可控降解速率、可控亲水性等诸多优点,已得到美国食品药品监督管理局的批准应用于临床药物的研究。其中,聚乳酸羟基乙酸(poly-lactide-co-glycolide, PLGA)由乳酸和羟基乙酸聚合而成,其结构中含有亲水性基团,在体内可降解为二氧化碳和水,具有良好的生物相容性和安全性,是微球制备中常用的载体材料。Seiler 等^[36]将人视网膜祖细胞包被于含有 BDNF 的 PLGA 中,植入视网膜变性大鼠视网膜下腔。60 d 后,通过对视觉头部追踪仪及上丘视觉电生理检测发现,实验组的视网膜功能较 PLGA 包被 BDNF 组及 PLGA 空白手术组均有明显提高。

3.4 经滴眼液给药的释药技术

近 3 年内,出现了采用 NGF 制成滴眼液用于眼部的双盲、随机对照研究,用于了解滴眼液在眼部的安全性及药代动力学,结果显示给予不同浓度的 NGF 未对血浆 NGF 浓度造成影响,在血浆中未检出抗 NGF 抗体,无严重并发症发生^[37]。RP 患者给予含有由大鼠下颌腺提取纯化的 NGF 滴眼液,1 mg NGF 稀释入 5 ml 生理盐水中,每天点眼 3 次,连续 10 d。结果显示,受试者除一过性结膜充血及眼痛外,无其他不适症状,表明 NGF 滴眼液具有良好的耐受性,少量受试者试验眼较对照眼主观视力提高,视野扩大,ERG 表现更佳^[38-39]。滴眼液给药可能成为一种新的神经营养因子给药方式。

RP 在临床上仍然缺少成熟、有效的治疗方法。以 BDNF 为代表的 NTFs 对于 RP 的有效性已经在动物实验中得到充分肯定,然而其应用于临床还存在很多问题。首先是没有应用于临床的医用级 BDNF,目前实验用 BDNF 价格昂贵,寻找一种经济、安全的制备方法至关重要。此外,BDNF 的眼内给药方式仍在探索阶段。RP 的病程决定了缓释制剂必将取代玻璃体腔注药成为主流研究方向。我们期待着 NT-501 的成功及更好的缓释给药方式为 RP 的临床治疗带来希望。

参考文献

- [1] Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa [J]. Lancet, 2006, 368(9549): 1795-1809.
- [2] Daiger SP, Sullivan LS, Bowne SJ. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa [J]. Clin Genet, 2013, 84(2): 132-141. DOI: 10.1111/cge.12203.
- [3] Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic

- factor from mammalian brain[J]. EMBO J, 1982, 1(5): 549-553.
- [4] Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, et al. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor [J]. Nature, 1989, 341(6238): 149-152. DOI: 10.1038/341149a0.
- [5] Rostami E, Krueger F, Plantman S, et al. Alteration in BDNF and its receptors, full-length and truncated TrkB and p75 (NTR) following penetrating traumatic brain injury[J]. Brain Res, 2014, 1542: 195-205. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.10.047.
- [6] Lee SS, Hughes PM, Robinson MR. Recent advances in drug delivery systems for treating ocular complications of systemic diseases[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2009, 20(6): 511-519. DOI: 10.1097/ICU.0b013e328330ccb9.
- [7] Machalińska A, Kawa MP, Pius-Sadowska E, et al. Endogenous regeneration of damaged retinal pigment epithelium following low dose sodium iodate administration; an insight into the role of glial cells in retinal repair[J]. Exp Eye Res, 2013, 112: 68-78. DOI: 10.1016/j.exer.2013.04.004.
- [8] de Felice E, Porreca I, Alleve E, et al. Localization of BDNF expression in the developing brain of zebrafish[J]. J Anat, 2014, 224(5): 564-574. DOI: 10.1111/joa.12168.
- [9] Marler KJ, Suetterlin P, Dopplapudi A, et al. BDNF promotes axon branching of retinal ganglion cells via miRNA-132 and p250GAP[J]. J Neurosci, 2014, 34(3): 969-979. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1910-13.2014.
- [10] Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, et al. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(5): 1632-1636.
- [11] Sánchez-Migallón MC, Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, et al. Apoptotic retinal ganglion cell death after optic nerve transection or crush in mice; delayed RGC loss with BDNF or a caspase 3 inhibitor[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57(1): 81-93. DOI: 10.1167/iov.15-17841.
- [12] Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, et al. BDNF rescues RGCs but not intrinsically photosensitive RGCs in ocular hypertensive albino rat retinas[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(3): 1924-1936. DOI: 10.1167/iov.15-16454.
- [13] Ming M, Li X, Fan X, et al. Retinal pigment epithelial cells secrete neurotrophic factors and synthesize dopamine; possible contribution to therapeutic effects of RPE cell transplantation in Parkinson's disease[J]. J Trans Med, 2009, 7: 53. DOI: 10.1186/1479-5876-7-53.
- [14] 郑学栋, 徐国兴, 侯泽江, 等. 联合共培养系统诱导骨髓间充质干细胞分化为视网膜色素上皮样细胞[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2011, 13(2): 88-93. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2011.02.003.
Zheng XD, Xu GX, Hou ZJ, et al. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into retinal pigment epithelial-like cells by a systematic induction *in vitro* [J]. Chin J Optometry Ophthalmol Vis Sci, 2011, 13(2): 88-93. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2011.02.003.
- [15] Wilson RB, Kunchithapautham K, Rohrer B. Paradoxical role of BDNF: BDNF+/- retinas are protected against light damage-mediated stress[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(6): 2877-2886. DOI: 10.1167/iov.06-1079.
- [16] Cerri E, Origlia N, Falsini B, et al. Conjunctivally applied BDNF protects photoreceptors from light-induced damage [J/OL]. Transl Vis Sci Technol, 2015, 4(6): 1 [2016-12-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4867954/>. DOI: 10.1167/tvst.4.6.1.
- [17] Paskowitz DM, Donohue-Rolfe KM, Yang H, et al. Neurotrophic factors minimize the retinal toxicity of verteporfin photodynamic therapy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(1): 430-437. DOI: 10.1167/iov.06-0690.
- [18] 高妍, 刘新玲, 李筱荣, 等. 新型壳聚糖季铵盐载体介导 VEGF siRNA 转染 RPE 细胞的研究[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(7): 616-620. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.010.
Gao Y, Liu XL, Li XR, et al. Study of novel polymeric liposome as a nonviral vector for transfection of VEGF siRNA into RPE cells [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(7): 616-620. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.010.
- [19] Zhang M, Mo X, Fang Y, et al. Rescue of photoreceptors by BDNF gene transfer using *in vivo* electroporation in the RCS rat of retinitis pigmentosa[J]. Curr Eye Res, 2009, 34(9): 791-799.
- [20] Gauthier R, Joly S, Pernet V, et al. Brain-derived neurotrophic factor gene delivery to muller glia preserves structure and function of light-damaged photoreceptors[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(9): 3383-3392.
- [21] Lawrence JM, Keegan DJ, Muir EM, et al. Transplantation of Schwann cell line clones secreting GDNF or BDNF into the retinas of dystrophic Royal College of Surgeons rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(1): 267-274.
- [22] Ren R, Li Y, Liu Z, et al. Long-term rescue of rat retinal ganglion cells and visual function by AAV-mediated BDNF expression after acute elevation of intraocular pressure[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(2): 1003-1011. DOI: 10.1167/iov.11-8484.
- [23] Bertolotti E, Neri A, Camparini M, et al. Stem cells as source for retinal pigment epithelium transplantation[J]. Prog Retin Eye Res, 2014, 42: 130-144. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2014.06.002.
- [24] Alexander P, Thomson HA, Luff AJ, et al. Retinal pigment epithelium transplantation: concepts, challenges, and future prospects [J]. Eye (Lond), 2015, 29(8): 992-1002. DOI: 10.1038/eye.2015.89.
- [25] Thomas BB, Zhu D, Zhang L, et al. Survival and functionality of hESC-derived retinal pigment epithelium cells cultured as a monolayer on polymer substrates transplanted in RCS rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57(6): 2877-2887. DOI: 10.1167/iov.16-19238.
- [26] Li Y, Tsai YT, Hsu CW, et al. Long-term safety and efficacy of human-induced pluripotent stem cell (iPS) grafts in a preclinical model of retinitis pigmentosa [J]. Mol Med, 2012, 18: 1312-1319. DOI: 10.2119/molmed.2012.00242.
- [27] Saito T, Abe T, Wakusawa R, et al. TrkB-T1 receptors on Muller cells play critical role in brain-derived neurotrophic factor-mediated photoreceptor protection against phototoxicity[J]. Curr Eye Res, 2009, 34(7): 580-588.
- [28] Huo SJ, Li YC, Xie J, et al. Transplanted olfactory ensheathing cells reduce retinal degeneration in royal college of surgeons rats [J]. Curr Eye Res, 2012, 37(8): 749-758. DOI: 10.3109/02713683.2012.697972.
- [29] Keegan DJ, Kenna P, Humphries MM, et al. Transplantation of syngeneic Schwann cells to the retina of the rhodopsin knockout (rho(-/-)) mouse [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(8): 3526-3532.
- [30] Zhang Y, Wang W. Effects of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on light-damaged retina [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(7): 3742-3748. DOI: 10.1167/iov.08-3314.
- [31] Huo SJ, Li YC, Xie J, et al. Transplanted olfactory ensheathing cells reduce retinal degeneration in Royal College of Surgeons rats [J]. Curr Eye Res, 2012, 37(8): 749-758. DOI: 10.3109/02713683.2012.697972.
- [32] Nadri S, Yazdani S, Arefian E, et al. Mesenchymal stem cells from trabecular meshwork become photoreceptor-like cells on amniotic membrane [J]. Neurosci Lett, 2013, 541: 43-48. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.12.055.
- [33] Nadri S, Kazemi B, Eslaminejad MB, et al. High yield of cells committed to the photoreceptor-like cells from conjunctiva mesenchymal stem cells on nanofibrous scaffolds [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(6): 3883-3890. DOI: 10.1007/s11033-012-2360-y.
- [34] Arnhold S, Absenger Y, Klein H, et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the

- dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2007, 245 (3): 414-422. DOI: 10.1007/s00417-006-0382-7.
- [35] Kauper K, McGovern C, Sherman S, et al. Two-year intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor by encapsulated cell technology implants in patients with chronic retinal degenerative diseases [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53 (12): 7484-7491. DOI: 10.1167/iovs.12-9970.
- [36] Seiler MJ, Thomas BB, Chen Z, et al. BDNF-treated retinal progenitor sheets transplanted to degenerate rats; improved restoration of visual function [J]. Exp Eye Res, 2008, 86 (1): 92-104. DOI: 10.1016/j.exer.2007.09.012.
- [37] Buda JJ, Carroll FI, Kosten TR, et al. A double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of single, escalating oral doses of JDTC [J]. Neuropsychopharmacology, 2015, 40 (9): 2059-2065. DOI: 10.1038/npp.2015.27.
- [38] Lambiase A, Tirassa P, Micera A, et al. Pharmacokinetics of conjunctivally applied nerve growth factor in the retina and optic nerve of adult rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46 (10): 3800-3806.
- [39] Falsini B, Iarossi G, Chiaretti A, et al. Erratum to: NGF eye-drops topical administration in patients with retinitis pigmentosa, a pilot study [J]. J Transl Med, 2016, 14: 43. DOI: 10.1186/s12967-016-0800-5.

(收稿日期: 2016-01-17)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)

· 临床经验 ·

复方樟柳碱联合局部肉毒素注射治疗特发性眼睑痉挛的临床观察

韩崧 齐越

100730 首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科学与视觉科学重点实验室

通信作者: 韩崧, Email: hansongart@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.03.018

特发性眼睑痉挛是一种临床常见的慢性进行性眼睑疾患,多发于中老年患者,轻者表现为频繁和不自地眼睑痉挛收缩,导致睁眼困难,严重者可致视功能障碍。特发性眼睑痉挛的发病原因包括精神紧张、眼肌疲劳、睡眠不足、慢性疾病前兆和面瘫后遗症等。眼部疾病、焦虑、抑郁与眼睑痉挛患病呈正相关,也是导致特发性眼睑痉挛发病的独立危险因素^[1-2]。特发性眼睑痉挛通常起病隐匿,可误诊为上睑下垂、重症肌无力、结膜炎等,从而贻误治疗。特发性眼睑痉挛尚无特效治疗方法,既往采用针灸、手术以及 A 型肉毒杆菌毒素注射等治疗方法,但效果不理想或存在一定毒性。北京同仁医院眼科中心采用复方樟柳碱联合局部肉毒素注射治疗原发性眼睑痉挛,以观察其疗效。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用前瞻性研究设计,纳入 2014 年 1 月至 2015 年 1 月在北京同仁医院眼科中心诊断的原发性眼睑痉挛患者 90 例,按照随机数字表法随机分为 I 组、II 组和 III 组,每组 30 例。I 组患者给予复方樟柳碱注射液 2 ml 颞浅动脉旁注射,II 组患者给予 A 型肉毒杆菌毒素局部注射,III 组患者局部注射 A 型肉毒杆菌毒素,次日注射复方樟柳碱注射液 2 ml。I 组患者中男 11 例,女 19 例;年龄为 35~60 岁,平均(47.8±7.3)岁;病程 6 个月~5 年,平均(26±9)个月;单眼 21 例,双眼 9 例。II 组患者中男 12 例,女 18 例;年龄为 35~60 岁,平均(48.2±7.5)岁;病程 6 个月~5 年,平均(28±8)个月;单眼 22 例,双眼 8 例。III 组患者中男 10 例,女 20 例;年龄为 35~60 岁,平均(47.5±7.0)岁;病程 6 个月~5 年,平均(27±19)个月;单眼 21 例,双眼 9 例。3 个组间患者基线特征的差异均无统计

学意义(均 $P>0.05$)。纳入标准:(1)眼轮匝肌或者面肌痉挛呈进行性发展者;(2)中药、局部封闭、针灸等治疗无好转者;(3)能配合全程治疗者。排除标准:(1)眼病性痉挛患者;(2)神经系统器质性病变患者;(3)急性期脑出血或眼出血患者;(4)肿瘤患者;(5)应用镇静剂等精神类药物者。本研究设计经北京同仁医院伦理委员会批准,符合《赫尔辛基宣言》,患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 手术步骤 I 组患者行复方樟柳碱(北京华润紫竹药业有限公司)2.0 ml 颞浅动脉旁注射,使用 4.5 号针头呈 45° 倾斜刺入皮下缓慢注射,每天 1 次,14 d 为 1 个疗程,共治疗 2 个疗程,疗程间间隔 5 d。II 组用 2.5 U(商品单位)/0.1 ml 的 A 型肉毒杆菌毒素(兰州生物制品研究所有限责任公司)行眼睑轮匝肌及面肌多点注射,采用 4.5 号针头,注射部位为上下眼睑两侧、眉弓、眉间及外眦皮下或肌肉内注射,每点注射 0.1~0.2 ml(2.5~5.0 U),各点累计总剂量不超过 50 U。III 组先局部注射肉毒素,方法同 II 组,次日注射复方樟柳碱注射液 2 ml,方法同 I 组。

1.2.2 观察指标 所有患者均随访 6~12 个月,进行 Cohen 痉挛强度分级,评估痉挛缓解及复发情况:治疗后眼睑痉挛消失,至少 6 个月以上未复发为治愈;治疗后眼睑痉挛症状明显减轻,痉挛临床分级标准下降 1 个级别以上为好转;治疗后眼睑痉挛无改善为无效;随访半年症状再次出现即为复发。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。本研究中的计数资料以百分比表示,3 个组患者治疗前后痉挛程度评级、临床疗效和复发率的比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。