

· 实验研究 ·

新型纳米睫状神经营养因子复合物玻璃体腔注射对食蟹猴眼部的安全性——形态学评价

张天璐¹ 刘一帆¹ 沈吟^{1,2}¹武汉大学人民医院眼科中心, 武汉 430060; ²武汉大学医学研究院, 武汉 430071

通信作者: 沈吟, Email: yinshen@whu.edu.cn

【摘要】 目的 评估一种新型纳米神经营养因子复合物(NP-CNTFs)在非人灵长类动物眼内应用的安全性。方法 利用纳米工艺制备包裹睫状神经营养因子(CNTF)的纳米粒。选取3只成年雄性食蟹猴,单眼玻璃体腔注射10 μl NP-CNTFs(1 μg/μl)作为NP-CNTFs组,对侧眼注射等体积磷酸盐缓冲液作为对照组。在注射前、注射后第3天和第7天,对食蟹猴行常规眼前节检查以评估结膜充血、前房闪辉及前房细胞等眼部症状并评分;采用彩色眼底照相观察眼底情况;采用频域光学相干断层扫描(SD-OCT)检测视网膜形态结构及厚度。结果 所制备NP-CNTFs粒径为(317±3)nm,多分散性指数为0.042±0.015,Zeta电位为(-38.9±0.7)mV,具备较好的稳定性、生物利用度和生物相容性。眼前节检查显示,NP-CNTFs组在注射后第3天表现出较对照组稍明显的结膜充血、前房闪辉和前房细胞,但在注射后第7天基本恢复正常。NP-CNTFs组与对照组注射后第3天眼前节症状评分分别为(2.67±0.88)和(1.00±0.58)分,注射后第7天分别为(0.67±0.33)和(0.33±0.33)分,组间比较差异均无统计学意义($t=2.50, 1.00$, 均 $P>0.05$)。彩色眼底照相结果显示,NP-CNTFs组和对照组在注射后第7天眼底均正常,未见玻璃体混浊、玻璃体出血、视网膜出血或视盘水肿等异常改变。SD-OCT结果显示,NP-CNTFs组和对照组在注射后第7日均未见明显视网膜组织学改变。NP-CNTFs组和对照组视网膜神经纤维层厚度分别为(107.67±0.88)和(111.00±3.22)μm,黄斑中央凹厚度分别为(255.67±2.03)和(254.67±3.84)μm,组间比较差异均无统计学意义($t=1.43, 0.50$, 均 $P>0.05$)。结论 新型纳米药物NP-CNTFs在食蟹猴眼内应用的安全性较好。

【关键词】 纳米粒; 睫状神经营养因子; 食蟹猴; 安全性评估

基金项目: 政府间国际科技创新合作重点专项(2017YFE0103400)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220212-00052

Ocular safety of intravitreal injection of a novel nanoparticle ciliary neurotrophic factor complex in cynomolgus macaques—a morphological evaluation

Zhang Tianlu¹, Liu Yifan¹, Shen Yin^{1,2}¹Eye Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; ²Medical Research Institute, Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: Shen Yin, Email: yinshen@whu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To evaluate the safety of a novel nanoparticle neurotrophic factor complex for intraocular application in non-human primates. **Methods** Nanoparticles incorporated with ciliary neurotrophic factor (NP-CNTFs) were produced utilizing nanotechnology. Three adult male cynomolgus macaques were included and intravitreally injected with 10 μl NP-CNTFs at a concentration of 1 μg/μl into one of the two eyes, and these three eyes were designated as the NP-CNTFs group. The contralateral eyes received the same volume of phosphate buffered saline and were designated as the control group. Before the injection and on days 3 and 7 after the injection, routine clinical examinations of the anterior segment were performed to evaluate the ocular clinical symptoms such as conjunctival congestion, anterior chamber flare and cells. The fundus condition was observed by fundus photography. The morphological structure and thickness of retinas were detected by spectral domain-optical coherence tomography (SD-OCT). The use and care of animals were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals issued by the National Institutes of Health and the standards of Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care. The study protocol complied with the ethics of laboratory animal welfare and was approved

by Hubei Topgene Biotechnology Co., Ltd. (No. IACUC-2019-012). **Results** The NP-CNTFs prepared in this study had a particle size of (317 ± 3) nm, a polydispersity index of 0.042 ± 0.015 , and a zeta potential of (-38.9 ± 0.7) mV, and exhibited relatively good stability, bioavailability, and biocompatibility. Clinical examinations revealed that the clinical manifestations of conjunctival congestion, anterior chamber flare and cells were slightly more obvious in the NP-CNTFs group at 3 days after injection compared to the control group, but basically returned to normal at 7 days after injection. The scores of anterior-segment clinical symptoms of the NP-CNTFs and control group were (2.67 ± 0.88) and (1.00 ± 0.58) at 3 days after injection, and (0.67 ± 0.33) and (0.33 ± 0.33) at 7 days after injection, respectively, with no statistical differences between them ($t = 2.50, 1.00$; both at $P > 0.05$). Fundus photography showed normal fundus in both groups at 7 days after injection with no abnormal changes including vitreous opacity, vitreous hemorrhage, retinal hemorrhage or papilloedema. SD-OCT showed no significant histological changes in the retinas at 7 days after injection in both groups. The retinal nerve fiber layer thickness of the NP-CNTFs and control group were (107.67 ± 0.88) and (111.00 ± 3.22) μm , respectively, and the macular foveal thickness of the two groups were (255.67 ± 2.03) and (254.67 ± 3.84) μm , respectively, with no statistical differences between them ($t = 1.43, 0.50$; both at $P > 0.05$). **Conclusions** The complex NP-CNTFs shows good safety for intraocular application in cynomolgus macaques.

[**Key words**] Nanoparticles; Ciliary neurotrophic factor; Cynomolgus macaques; Safety evaluation

Fund program: Key Projects for Intergovernmental Cooperation in International Scientific and Technological Innovation (2017YFE0103400)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220212-00052

视网膜退行性疾病是全世界致盲的主要原因之一,目前临床上尚无有效的预防和治疗方法^[1-3]。睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)、脑源性神经营养因子、胶质细胞源神经营养因子等在以视网膜神经节细胞损伤为主要表现的神经退行性疾病及遗传性视网膜退行性疾病中均表现出一定的神经保护作用,其中对于 CNTF 的研究尤为广泛^[4-7]。研究表明, CNTF 可在视网膜变性过程中延缓光感受器细胞死亡,并促进视锥细胞外节再生;此外,其还通过影响视网膜色素上皮细胞的生理特性以及其他细胞因子/神经营养因子的分泌调节远端视网膜/视网膜色素上皮/Bruch 膜复合体微环境,对视网膜组织表现出一定的保护作用^[7-9]。据报道, CNTF 可降低视网膜退行性疾病动物模型中光感受器细胞死亡导致的视力丧失的发生率^[10-11]。然而, CNTF 半衰期较短,治疗过程中需进行多次玻璃体腔注射以维持长期疗效,而多次注射引起眼内炎、视网膜脱离、视网膜血管阻塞等一系列严重并发症的发生风险增加^[12-13]。因此,寻求安全、长效的 CNTF 治疗方法至关重要。纳米粒作为一种新型药物递送载体,可实现缓释、控释和靶向给药,从多方面提高了药物治疗的安全性、有效性和可靠性。在众多纳米粒载体中,硫酸葡聚糖-壳聚糖纳米载体(dextran sulfate-chitosan nanoparticles, DSCS NPs)尤其适用于蛋白质类药物的递送^[14]。DSCS NPs 可有效包裹并稳定治疗性多肽/蛋白质,提高药物生物利用度,增强治疗效果^[15-18]。将 CNTF 蛋白包裹于 DSCS NPs

中所制备的一种新型纳米睫状神经营养因子复合物(nanoparticles incorporated with ciliary neurotrophic factor, NP-CNTFs)可通过控制聚合物的性质和降解时间来调控药物的扩散,有望实现单次玻璃体腔注射即达到长效治疗效果。目前, NP-CNTFs 玻璃体腔注射的眼部安全性尚不明确。本研究拟制备 NP-CNTFs 并观察其玻璃体腔注射后对食蟹猴眼部组织的短期影响,探索其应用于非人灵长类动物的眼部安全性,为开发基于纳米粒治疗视网膜退行性疾病的潜在药物提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 5 岁龄雄性食蟹猴(编号为 M1、M2、M3)3 只,体质量 4~5 kg,无全身及眼部疾病,购自广州相观生物科技有限公司(实验动物质量合格证号:4481830000089)。实验动物饲养于湖北天勤生物科技股份有限公司动物房[许可证号:SYXK(鄂)2016-0090],每只动物被单独放置于 60 cm×68 cm×75 cm 铁笼内,并设置室温 22~24 ℃、相对湿度 50%~60%、12 h/12 h 明暗循环环境。动物的饲养和护理遵循美国国立卫生研究院颁布的《实验动物护理和使用指南》和国际实验动物管理评估和认证协会的标准。本研究对动物的实验操作均遵守实验动物福利伦理,并通过湖北天勤生物科技股份有限公司伦理审查(批文号:IACUC 准-2019-012)。各食蟹猴任意选取一眼

接受 NP-CNTFs 玻璃体腔注射作为 NP-CNTFs 组,对侧眼接受等量磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 玻璃体腔注射作为对照组。

1.1.2 主要试剂及仪器 DS (相对分子质量 5 000 000, 1585-100)、CS (相对分子质量 50 000 ~ 190 000, 75% ~ 85% 脱乙酰化, 448869) (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 琥珀酸盐、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳酰二亚胺 [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC]、N-羟基丁二酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS) (美国 Sigma-Aldrich 公司); CNTF 蛋白 (BP07001C, 美国 Bonopus 公司); 舒眠宁 II (南京农业大学小动物疾病研究室); 复方托吡卡胺滴眼液、透明质酸钠滴眼液 (日本参天制药株式会社); 盐酸丙美卡因滴眼液、妥布霉素地塞米松眼膏 (美国 Alcon 公司)。纳米粒度电位仪 Zetasizer (英国 Malvern Instruments 公司); 手持式裂隙灯显微镜 (LS-1A/B, 重庆上邦医疗设备有限公司); Horus 手持式眼底照相机 (DEC100, 中国台湾金鸿科技有限公司); iUVE 光学相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT) 仪 (美国 OPTOVUE 公司)。

1.2 方法

1.2.1 NP-CNTFs 药物制备 参照文献 [19] 的方法制备 DSCS NPs。将 DSCS NPs 悬浮于 100 mmol/L HEPES 缓冲液中 (pH = 7.0), 并与 20 mmol/L 琥珀酸盐混合, 室温孵育 1 h; 15 000×g 离心 15 min 收集沉淀颗粒, 并重悬于 100 mmol/L HEPES 缓冲液中; 加入 45 mmol/L EDC 和 45 mmol/L NHS, 室温交联 20 h 获得交联纳米粒 (crosslinked nanoparticles, xNPs) (由于 DSCS NPs 在生理盐水中易聚集, 为增强其盐稳定性, 将纳米粒内核与琥珀酸交联生成 xNPs)。将所得 xNPs 颗粒转至 3 倍 DPBS 溶液中室温孵育 3 h 以增强其在盐溶液中的稳定性, 200×g 离心 15 min 收集上清液中 xNPs, 加入 DPBS 溶液 15 000×g 离心 15 min, 通过 0.22 μm 无菌 PVDF 膜进一步过滤收集 xNPs, 随后重悬于 5% 甘露醇中, -80 °C 冻存备用。在 DPBS 溶液稀释的 xNPs 中缓慢加入 CNTF 蛋白 (参照文献 [19] 将 CNTF 蛋白与带电葡萄糖硫酸盐单元的摩尔比优化为 1.8:100), 以 800 r/min 转速持续搅拌 20 min; 15 000×g 离心 15 min 收集沉淀, 即为 NP-CNTFs, 最后将 NP-CNTFs 以 1 μg/μl 悬浮于 5% 甘露醇中, -80 °C 冻存备用。使用纳米粒度电位仪 Zetasizer 检测各制备阶段纳米粒粒径、多分散性指数和 Zeta 电位, 其中粒径越小, 表面积/体积越大, 溶解度越高; 多分散性指数

与相对分子质量分布均一性有关; Zeta 电位绝对值与体系稳定性有关。

1.2.2 食蟹猴玻璃体腔注射 NP-CNTFs 药物 麻醉前对动物行 12 h 禁食, 称重后以 0.5 ml/kg 剂量肌肉注射舒眠宁 II 进行全身麻醉。动物被麻醉后, 将其舌头从口中拉出以防窒息。实验操作过程中, 如出现麻醉变浅症状 (眼睑运动、肌肉紧张等), 立即以前次麻醉剂量的 1/3 追加麻醉。麻醉后用复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳, 并滴加盐酸丙美卡因滴眼液进行眼表麻醉以减轻动物在注射过程中的不适。采用 25G 胰岛素针头进行玻璃体腔注射, 注射位置为角巩膜缘下 3 mm, 其中 NP-CNTFs 组给予 10 μl NP-CNTFs 玻璃体腔注射, 对照组给予等量 PBS 玻璃体腔注射。注射后眼表涂抹妥布霉素地塞米松眼膏。注射操作均由同一经验丰富的医师完成。待动物苏醒后放回笼内并提供充足的食物和水。术后每日对实验动物进行观察。

1.2.3 裂隙灯显微镜检查食蟹猴眼前节临床症状及评分 在注射前及注射后第 3 天和第 7 天, 将动物立位固定于检测台上。使用手持式裂隙灯显微镜在暗室中对实验动物进行眼前节症状检查及图像拍摄。依据眼前节症状评分系统 (表 1) 对食蟹猴的双眼眼前节症状进行详细评估, 包括结膜充血、前房闪辉和前房细胞等情况。操作及评分均由同一经验丰富的医师完成。

1.2.4 彩色眼底照相观察食蟹猴眼底情况 在注射

表 1 眼前节症状评分系统
Table 1 Grading system of anterior-segment clinical symptoms

眼前节症状	评分
结膜充血	
无充血, 血管颜色正常	0
轻微充血, 血管呈鲜红色 (轻度)	1
充血明显, 血管呈深红色 (中度)	2
弥漫性充血, 血管呈紫红色 (重度)	3
前房闪辉	
无闪辉	0
轻度闪辉	1
中度闪辉 (虹膜及晶状体细节可辨)	2
重度闪辉 (难辨虹膜及晶状体细节)	3
前房细胞数 (裂隙灯显微镜下 1 mm×1 mm 光带中的细胞数, 个)	
0	0
1-4	0.5
5-10	1
11-20	2
21-50	3

前及注射后第 7 天依上述方法对食蟹猴进行全身麻醉,复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳。将动物仰卧置于检测台上,使用开睑器撑开眼睑以充分暴露眼表。使用 Horus 手持式眼底照相机在暗室中对动物进行眼底观察及拍摄。操作均由同一经验丰富的医师完成。检测过程中使用透明质酸钠滴眼液点眼以防角膜干燥。

1.2.5 频域 OCT 仪检测食蟹猴视网膜结构及厚度 在注射后第 7 天依上述方法对食蟹猴进行全身麻醉,复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳。将动物仰卧置于检测台上,使用 iUVE OCT 仪对视网膜进行扫描。扫描区域包括视盘和黄斑中央凹处,扫描深度为 2 mm,扫描面积为 6 mm×6 mm。操作均由同一经验丰富的医师完成。检测过程中使用透明质酸钠滴眼液点眼以防角膜干燥。通过自动检测系统测量黄斑中央凹处视网膜厚度,通过视盘分析模式计算视网膜神经纤维层厚度。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad 8.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。2 个组间视网膜厚度、视网膜神经纤维层厚度和临床症状评分比较采用配对样本 t 检验。采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NP-CNTFs 药物特征

DSCS NPs 包含 1 个由 DS、CS 和 $ZnSO_4$ 组成的中性和不带电的疏水内核,以及由 DS 片段组成的带负电外壳(图 1)。制备各阶段的纳米粒物理特性如表 2 所示,其中 NP-CNTFs 粒径最小,提示其可能具备良好的生物利用度和生物相容性;其多分散性指数居中,提示其相对分子质量分布较均一,稳定性较好。虽然 NP-CNTFs 的 Zeta 电位绝对值相对较低,但在制备过程中 3 种纳米粒的 Zeta 电位绝对值整体水平较高。综上, NP-CNTFs 药物具备相对较好的稳定性、生物利用度及生物相容性。

2.2 各组眼部症状及评分比较

所有食蟹猴在注射前均未表现出任何眼部症状。注射后第 3 天,在 M1 和 M2 的 NP-CNTFs 注射眼中观察到中度结膜充血,对侧眼也表现出轻到中度结膜充血,在 M3 的 NP-CNTFs 注射眼中仅观察到轻度结膜充血,对侧眼未见结膜充血表现;注射后第 7 天, M1 和 M2 双眼结膜充血症状均减轻, M3 结膜充血症状完全

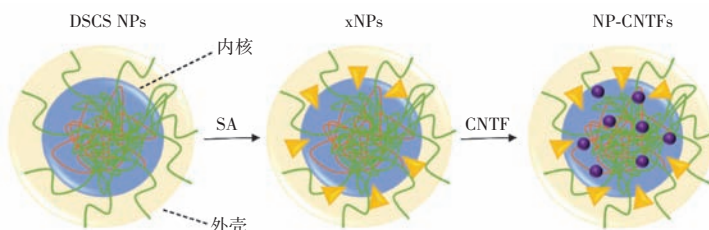


图 1 NP-CNTFs 复合物制备各阶段形成的纳米粒示意图 绿色线段代表 DS,橙色线段代表 CS,黄色三角代表琥珀酸;紫色圆球代表 CNTF 蛋白 DSCS NPs:硫酸葡聚糖-壳聚糖纳米载体;xNPs:交联纳米粒;NP-CNTFs:纳米睫状神经营养因子复合物;SA:琥珀酸

Figure 1 Schematic diagrams of NP-CNTFs formed at each stage of preparation The green line represented dextran sulfate. The orange line represented chitosan. The yellow triangle represented succinic acid. The purple sphere represented ciliary neurotrophic factor DSCS NPs: dextran sulfate-chitosan nanoparticles; xNPs: crosslinked nanoparticles; NP-CNTFs: nanoparticles incorporated with ciliary neurotrophic factor; SA: succinic acid

表 2 各制备阶段纳米粒粒径、多分散性指数和 Zeta 电位 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Diameter, polydispersity, and zeta potential of nanoparticles at each stage of preparation ($\bar{x}\pm s$)

各阶段纳米粒	样本量	粒径 (nm)	多分散性指数	Zeta 电位 (mV)
DSCS NPs	12	417±12	0.079±0.014	-46.4±3.6
xNPs	12	371±14	0.041±0.021	-50.0±4.7
NP-CNTFs	10	317±3	0.042±0.015	-38.9±0.7

注: DSCS NPs: 硫酸葡聚糖-壳聚糖纳米载体; xNPs: 交联纳米粒; NP-CNTFs: 纳米睫状神经营养因子复合物

Note: DSCS NPs: dextran sulfate-chitosan nanoparticles; xNPs: crosslinked nanoparticles; NP-CNTFs: nanoparticles incorporated with ciliary neurotrophic factor

消失(图 2)。此外,注射后第 3 天在 M1 和 M2 的 NP-CNTFs 注射眼内观察到轻度前房闪辉,在 M1 眼前节还检测到少量前房细胞,注射后第 7 天消失;整个实验过程中均未观察到 M3 眼内出现前房闪辉和前房细胞。所有食蟹猴的角膜、瞳孔、虹膜和晶状体经检查均未见明显异常。NP-CNTFs 组与对照组注射后第 3 天和第 7 天眼前节症状评分差异均无统计学意义 ($t = 2.50、1.00$, 均 $P > 0.05$) (表 3)。

2.3 各组眼底情况比较

所有食蟹猴在玻璃体腔注射前均未出现任何眼底异常,眼底照相可见椭圆形视盘,颜色浅红,边界清晰,中央生理性凹陷可见;视盘颞下方可见黄斑结构,其中心有一星样反光点,周围有反光轮;视网膜中央动脉颜色鲜红,静脉颜色暗红,视网膜透明,可见下方色素上皮及脉络膜。注射后第 7 天,各组眼底情况均无明显异常,未观察到玻璃体混浊、玻璃体出血、视网膜出血或视盘水肿等异常眼底表现(图 3)。

2.4 各组视网膜形态及厚度比较

玻璃体腔注射后第 7 天频域 OCT 结果显示,双侧

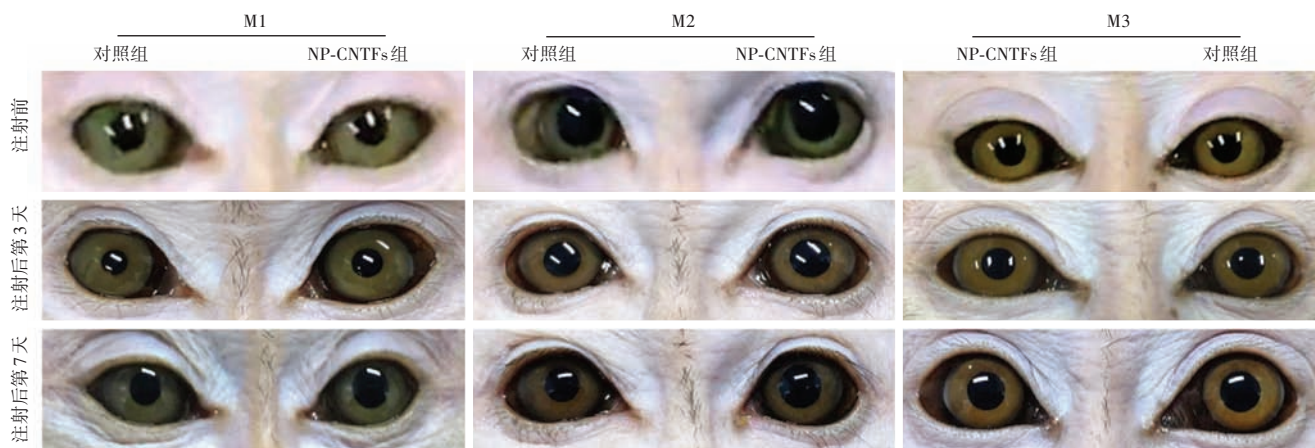


图 2 玻璃体腔注射前后 3 只食蟹猴的眼前节照片 NP-CNTFs: 纳米睫状神经营养因子复合物

Figure 2 Anterior-segment images of three cynomolgus macaques before and after intravitreal injection NP-CNTFs: nanoparticles incorporated with ciliary neurotrophic factor

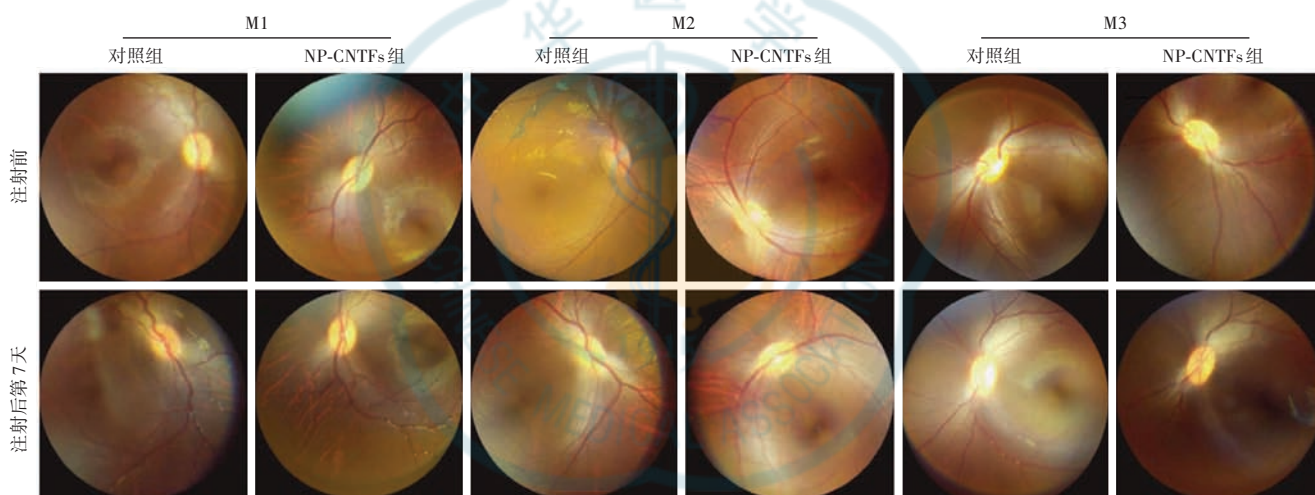


图 3 玻璃体腔注射前后 3 只食蟹猴的眼底图像 NP-CNTFs: 纳米睫状神经营养因子复合物

Figure 3 Color fundus images of three cynomolgus macaques before and after intravitreal injection NP-CNTFs: nanoparticles incorporated with ciliary neurotrophic factor

表 3 玻璃体腔注射前后各组食蟹猴眼前节症状评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

Table 3 Comparison of scores of anterior-segment clinical symptoms in cynomolgus macaques before and after intravitreal injection between two groups ($\bar{x} \pm s$, score)

组别	眼数	各检查时间点		
		注射前	注射后第3天	注射后第7天
对照组	3	0.00±0.00	1.00±0.58	0.33±0.33
NP-CNTFs 组	3	0.00±0.00	2.67±0.88	0.67±0.33
t 值	/	/	2.50	1.00
P 值	/	/	0.13	0.42

注: (配对样本 t 检验) NP-CNTFs: 纳米睫状神经营养因子复合物
 Note: (Paired sample t-test) NP-CNTFs: nanoparticles incorporated with ciliary neurotrophic factor

CNTFs 组与对照组神经纤维层厚度和黄斑中央凹厚度比较差异均无统计学意义 ($t = 1.43, 0.50$, 均 $P > 0.05$) (表 4)。

表 4 玻璃体腔注射后第 7 天各组食蟹猴视网膜神经纤维层和黄斑中央凹厚度比较 ($\bar{x} \pm s$, μm)

Table 4 Comparison of the thickness of retinal nerve fiber layer and macular fovea in cynomolgus macaques between two groups at 7 days after injection ($\bar{x} \pm s$, μm)

组别	眼数	视网膜神经纤维层厚度	黄斑中央凹厚度
对照组	3	111.00±3.22	254.67±3.84
NP-CNTFs 组	3	107.67±0.88	255.67±2.03
t 值	/	1.43	0.50
P 值	/	0.29	0.67

注: (配对样本 t 检验) NP-CNTFs: 纳米睫状神经营养因子复合物
 Note: (Paired sample t-test) NP-CNTFs: nanoparticles incorporated with ciliary neurotrophic factors

视网膜形态大致正常, 视盘及黄斑中央凹结构可见, 视网膜各层结构清晰, 无明显组织学改变 (图 4)。NP-

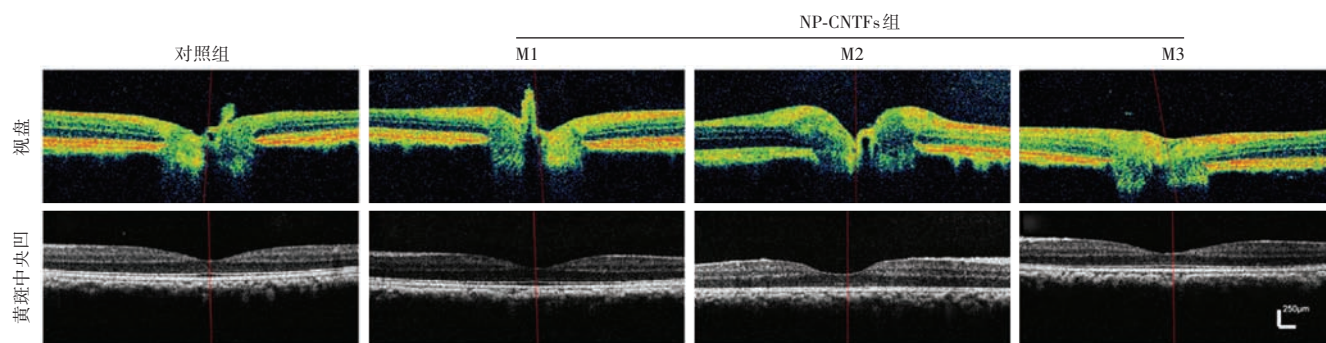


图4 玻璃体腔注射后第7天3只食蟹猴的频域OCT图像 各组视盘及黄斑中央凹结构可见,视网膜各层结构清晰,无明显组织学改变 NP-CNTFs:纳米睫状神经营养因子复合物

Figure 4 Spectral domain-OCT images of three cynomolgus macaques at 7 days after intravitreal injection The structure of the optic disc and macular fovea was visible in each group, and the structure of retinal layers was clear without obvious histological changes NP-CNTFs: nanoparticles incorporated with ciliary neurotrophic factor

3 讨论

CNTF 是一种神经源性细胞因子,在高眼压/视神经损伤等应激条件下可表达于视网膜并作为损伤激活信号起到神经保护作用^[7,20]。Chong 等^[21]研究表明,通过多次玻璃体腔注射持续补充 CNTF 蛋白可对视网膜光感受器起到长期保护作用。然而,反复侵入性注射可增加眼内炎等并发症的发生风险。有研究提出使用携带 CNTF 基因的病毒载体对视网膜退行性疾病进行治疗,可实现对视网膜光感受器细胞更持久的保护作用^[11,22-26]。尽管重组病毒载体有一定优势,但其转基因表达的起始时间较晚,大约在注射后 6 周蛋白表达达高峰,一定程度上限制了其在急性视网膜疾病中的应用^[27]。此外,重组病毒载体介导的基因疗法并未在视网膜退行性疾病动物模型中表现出明显的视功能恢复作用^[11,22-26]。目前,使用封装细胞疗法眼内递送 CNTF 治疗视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 和地图样萎缩已进入临床试验阶段^[28-30]。多项研究表明,该药物在短期内可引起视网膜厚度呈剂量依赖性增加,但高剂量药物会引起视野敏感性的显著下降,在长期随访中也并未观察到 RP 患者视力、视网膜电图反应和视网膜 OCT 测量眼部结构的改善^[28-29,31]。还有研究表明,该药物可能在延缓高剂量组的地图样萎缩患者视力下降方面有一定作用,但对于患者的视网膜地图样萎缩面积、视网膜电图反应、视野灵敏度以及视力提升方面均未表现出明显益处^[30]。因此,仍需进一步寻找合适的载体以达到更理想的治疗效果。

纳米粒具有体积小、制备简单、易降解、刺激性弱等优点,作为载体向眼内传递药物具有一定优势。传统的纳米载体,如二氧化硅和氧化铁仅具有简单的药

物递送功能,甚至可能在体内产生一定的毒性作用^[32-33]。多糖纳米载体作为一种新型理想给药系统,具有广泛的应用范围(包括蛋白药物、基因药物、抗癌化学药物等的递送)和给药途径(包括口服、鼻腔、静脉、眼部等给药途径),在体内药物递送方面极具优势^[34-38],其中天然多糖衍生物 DS 和 CS 具有良好的生物相容性和生物降解能力,被广泛应用于纳米生物载体的研究^[39-41]。多项研究表明,将多肽/蛋白质同 DSCS NPs 结合可增强其稳定性并延长体内效应,进而提高药物的治疗效果^[19]。此外,DSCS NPs 是通过 DS 和 CS 电荷间相互作用生成的,所引起结合蛋白变性或失活的可能性也较小^[19]。DS 具有与肝素或硫酸乙酰肝素相似的化学性质,易与 CNTF 等肝素结合蛋白相结合^[42-43]。因此将 CNTF 蛋白与 DSCS NPs 结合原则上可增强其稳定性并延长体内作用时间,从而提高体内生物利用度^[19]。本研究中介联反应生成的 xNPs 外壳具有与 DSCS NPs 相同的 DS 组分,可表现出类似的结合 CNTF 蛋白的特性。本研究将 CNTF 包裹入 xNPs 生成 NP-CNTFs,可以更好地维持其体内的活性和稳定性。

目前已有研究证实,单次玻璃体腔注射 NP-CNTFs 可显著提高视神经钳夹急性青光眼模型大鼠视网膜神经节细胞的存活率,并可挽救 RP 模型大鼠的视力和光感受器细胞存活情况,疗效至少长达 70 d^[44]。本研究结果表明,2 个组在注射前后不同时间点的眼前节症状评分差异无统计学意义,提示食蟹猴在注射后短期内出现的结膜充血、前房闪辉等眼部临床症状很可能和玻璃体腔注射操作引起的炎症反应有关,而非 NP-CNTFs 药物导致,而且上述临床症状随着时间推移逐渐减轻或消失,也在一定程度上证明了该药物的眼内安全性。玻璃体腔注射给药后并未在食

蟹猴眼部观察到明显的炎症反应、毒性作用和不良反应,研究对象也未表现出明显的视网膜组织学改变和/或纳米载体注射相关的视网膜变性,总体上相对安全。

本研究成功制备了一种基于多糖纳米载体 DSCS NPs 向眼内递送 CNTF 的新型纳米药物 NP-CNTFs,具备相对较好的稳定性、生物利用度及生物相容性,并首次在非人灵长类动物中评估了玻璃体腔注射 NP-CNTFs 的眼部安全性。然而,本研究纳入的食蟹猴数量有限,且观察时间较短,同时未对其视网膜功能进行检测,具有一定的局限性。未来仍需进一步评估玻璃体腔注射 NP-CNTFs 的长期安全性及其在非人灵长类视网膜退行性疾病模型中的有效性。鉴于 NP-CNTFs 在大鼠视网膜退行性疾病模型中的有效性结果,结合本研究安全性结果, NP-CNTFs 有望成为未来临床上治疗视网膜退行性疾病的理想药物之一。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 张天璐:实验设计、研究实施、数据采集、数据统计分析及文章撰写;刘一帆:研究实施及数据采集;沈吟:实验设计、文章审阅及定稿

志谢 感谢美国生物科技公司 Hebecell 在纳米药物制备方面提供的支持

参考文献

- [1] Bressler NM. Age-related macular degeneration is the leading cause of blindness[J]. JAMA, 2004, 291(15): 1900-1901. DOI: 10.1001/jama.291.15.1900.
- [2] Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa[J]. Lancet, 2006, 368(9549): 1795-1809. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69740-7.
- [3] Mitchell P, Liew G, Gopinath B, et al. Age-related macular degeneration[J]. Lancet, 2018, 392(10153): 1147-1159. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31550-2.
- [4] Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, et al. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration[J]. Prog Retin Eye Res, 2005, 24(2): 275-306. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2004.08.002.
- [5] Fudalej E, Justyniarska M, Kasarek H, et al. Neuroprotective factors of the retina and their role in promoting survival of retinal ganglion cells: a review[J]. Ophthalmic Res, 2021, 64(3): 345-355. DOI: 10.1159/000514441.
- [6] Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, et al. Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor[J]. Nature, 1990, 347(6288): 83-86. DOI: 10.1038/347083a0.
- [7] Wen R, Tao W, Li Y, et al. CNTF and retina[J]. Prog Retin Eye Res, 2012, 31(2): 136-151. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2011.11.005.
- [8] Chucair-Elliott AJ, Elliott MH, Wang J, et al. Leukemia inhibitory factor coordinates the down-regulation of the visual cycle in the retina and retinal-pigmented epithelium[J/OL]. J Biol Chem, 2012, 287(29): 24092-24102 [2023-10-10]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22645143. DOI: 10.1074/jbc.M112.378240.
- [9] Li R, Wen R, Banzon T, et al. CNTF mediates neurotrophic factor secretion and fluid absorption in human retinal pigment epithelium[J/OL]. PLoS One, 2011, 6(9): e23148 [2023-10-10]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21912637. DOI: 10.1371/journal.pone.0023148.
- [10] LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, et al. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(3): 592-602.
- [11] Liang FQ, Dejneka NS, Cohen DR, et al. AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse[J]. Mol Ther, 2001, 3(2): 241-248. DOI: 10.1006/mthe.2000.0252.
- [12] Emerich DF, Thanos CG. Intracompartmental delivery of CNTF as therapy for Huntington's disease and retinitis pigmentosa[J]. Curr Gene Ther, 2006, 6(1): 147-159. DOI: 10.2174/156652306775515547.
- [13] Jonas JB, Spandau UH, Renssch F, et al. Infectious and noninfectious endophthalmitis after intravitreal bevacizumab[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2007, 23(3): 240-242. DOI: 10.1089/jop.2006.0146.
- [14] Wen R, Song Y, Kjellstrom S, et al. Regulation of rod phototransduction machinery by ciliary neurotrophic factor[J/OL]. J Neurosci, 2006, 26(52): 13523-13530 [2023-10-10]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17192435. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4021-06.2006.
- [15] Gribova V, Crouzier T, Picart C. A material's point of view on recent developments of polymeric biomaterials: control of mechanical and biochemical properties[J/OL]. J Mater Chem, 2011, 21(38): 14354-14366 [2023-10-10]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25067892. DOI: 10.1039/C1JM11372K.
- [16] Sullad AG, Manjeshwar LS, Aminabhavi TM. Novel semi-interpenetrating microspheres of dextran-grafted-acrylamide and poly(vinyl alcohol) for controlled release of abacavir sulfate[J/OL]. Ind Eng Chem Res, 2011, 50(21): 11778-11784 [2023-10-10]. https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ie2006438. DOI: 10.1021/ie2006438.
- [17] Lauten EH, VerBerkmoes J, Choi J, et al. Nanoglycan complex formulation extends VEGF retention time in the lung[J]. Biomacromolecules, 2010, 11(7): 1863-1872. DOI: 10.1021/bm100384z.
- [18] Yin T, Bader AR, Hou TK, et al. SDF-1 α in glycan nanoparticles exhibits full activity and reduces pulmonary hypertension in rats[J]. Biomacromolecules, 2013, 14(11): 4009-4020. DOI: 10.1021/bm401122q.
- [19] Zaman P, Wang J, Blau A, et al. Incorporation of heparin-binding proteins into preformed dextran sulfate-chitosan nanoparticles[J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 6149-6159. DOI: 10.2147/IJN.S119174.
- [20] Adler R. Ciliary neurotrophic factor as an injury factor[J]. Curr Opin Neurobiol, 1993, 3(5): 785-789. DOI: 10.1016/0959-4388(93)90154-q.
- [21] Chong NH, Alexander RA, Waters L, et al. Repeated injections of a ciliary neurotrophic factor analogue leading to long-term photoreceptor survival in hereditary retinal degeneration[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(6): 1298-1305.
- [22] Cayouette M, Gravel C. Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(4): 423-430. DOI: 10.1089/hum.1997.8.4-423.
- [23] Cayouette M, Behn D, Sendtner M, et al. Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse[J]. J Neurosci, 1998, 18(22): 9282-9293. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.18-22-09282.1998.
- [24] Liang FQ, Aleman TS, Dejneka NS, et al. Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV. CNTF in animal models of retinitis pigmentosa[J]. Mol Ther, 2001, 4(5): 461-472. DOI: 10.1006/mthe.2001.0473.
- [25] Bok D, Yasumura D, Matthes MT, et al. Effects of adeno-associated

- virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice with a P216L rds/peripherin mutation [J]. *Exp Eye Res*, 2002, 74(6) : 719-735. DOI: 10. 1006/exer. 2002. 1176.
- [26] Schlichtenbrede FC, MacNeil A, Bainbridge JW, et al. Intraocular gene delivery of ciliary neurotrophic factor results in significant loss of retinal function in normal mice and in the Prph2Rd2/Rd2 model of retinal degeneration [J]. *Gene Ther*, 2003, 10(6) : 523-527. DOI: 10. 1038/sj. gt. 3301929.
- [27] Hellström M, Pollett MA, Harvey AR. Post-injury delivery of rAAV2-CNTF combined with short-term pharmacotherapy is neuroprotective and promotes extensive axonal regeneration after optic nerve trauma [J]. *J Neurotrauma*, 2011, 28(12) : 2475-2483. DOI: 10. 1089/neu. 2011. 1928.
- [28] Birch DG, Weleber RG, Duncan JL, et al. Randomized trial of ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for retinitis pigmentosa [J]. *Am J Ophthalmol*, 2013, 156(2) : 283-292. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2013. 03. 021.
- [29] Talcott KE, Ratnam K, Sundquist SM, et al. Longitudinal study of cone photoreceptors during retinal degeneration and in response to ciliary neurotrophic factor treatment [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(5) : 2219-2226. DOI: 10. 1167/iov. 10-6479.
- [30] Zhang K, Hopkins JJ, Heier JS, et al. Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(15) : 6241-6245. DOI: 10. 1073/pnas. 1018987108.
- [31] Birch DG, Bennett LD, Duncan JL, et al. Long-term follow-up of patients with retinitis pigmentosa receiving intraocular ciliary neurotrophic factor implants [J]. *Am J Ophthalmol*, 2016, 170 : 10-14. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2016. 07. 013.
- [32] Hurbankova M, Volkovova K, Hraskova D, et al. Respiratory toxicity of Fe₃O₄ nanoparticles: experimental study [J]. *Rev Environ Health*, 2017, 32(1-2) : 207-210. DOI: 10. 1515/reveh-2016-0022.
- [33] Mirshafiee V, Sun B, Chang CH, et al. Toxicological profiling of metal oxide nanoparticles in liver context reveals pyroptosis in kupffer cells and macrophages versus apoptosis in hepatocytes [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(4) : 3836-3852. DOI: 10. 1021/acsnano. 8b01086.
- [34] Yin L, Ding J, He C, et al. Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(29) : 5691-5700. DOI: 10. 1016/j. biomaterials. 2009. 06. 055.
- [35] Wang X, Chi N, Tang X. Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 70(3) : 735-740. DOI: 10. 1016/j. ejpb. 2008. 07. 005.
- [36] Huo M, Zhang Y, Zhou J, et al. Synthesis and characterization of low-toxic amphiphilic chitosan derivatives and their application as micelle carrier for antitumor drug [J]. *Int J Pharm*, 2010, 394(1-2) : 162-173. DOI: 10. 1016/j. ijpharm. 2010. 05. 001.
- [37] de Campos AM, Diebold Y, Carvalho EL, et al. Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems; *in vitro* stability, *in vivo* fate, and cellular toxicity [J]. *Pharm Res*, 2004, 21(5) : 803-810. DOI: 10. 1023/b:pham. 0000026432. 75781. cb.
- [38] Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery [J]. *J Control Release*, 2004, 100(1) : 5-28. DOI: 10. 1016/j. jconrel. 2004. 08. 010.
- [39] Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(1) : 3-11. DOI: 10. 1016/j. addr. 2009. 09. 004.
- [40] Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers [J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6 : 765-774. DOI: 10. 2147/IJN. S17296.
- [41] Zhang J, Zhan P, Tian H. Recent updates in the polysaccharides-based Nano-biocarriers for drugs delivery and its application in diseases treatment; a review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 182 : 115-128. DOI: 10. 1016/j. ijbiomac. 2021. 04. 009.
- [42] Tillgren V, Onnerfjord P, Haglund L, et al. The tyrosine sulfate-rich domains of the LRR proteins fibromodulin and osteoadherin bind motifs of basic clusters in a variety of heparin-binding proteins, including bioactive factors [J/OL]. *J Biol Chem*, 2009, 284(42) : 28543-28553 [2023-10-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700767>. DOI: 10. 1074/jbc. M109. 047076.
- [43] Watters DJ, Hendry IA. Purification of a ciliary neurotrophic factor from bovine heart [J]. *J Neurochem*, 1987, 49(3) : 705-713. DOI: 10. 1111/j. 1471-4159. 1987. tb00951. x.
- [44] Yang JY, Lu B, Feng Q, et al. Retinal protection by sustained nanoparticle delivery of oncostatin m and ciliary neurotrophic factor into rodent models of retinal degeneration [J/OL]. *Transl Vis Sci Technol*, 2021, 10(9) : 6 [2023-10-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34347033>. DOI: 10. 1167/tvst. 10. 9. 6.

(收稿日期:2023-11-22 修回日期:2024-05-31)

(本文编辑:张宇 骆世平)

读者·作者·编者

本刊投稿方式

初次投稿作者请按照下列步骤投稿:登录中华医学会网站 (<http://www.cma.org.cn>) → 点击页面右上角的“注册” → 选项注册账号 → 返回首页 → 点击页面右下方的“申请成为杂志作者”成为本刊作者进行投稿。投稿时请使用 Word 格式(.doc 文件类型),投稿后请注意自留原稿,并保留论文相关的原始资料,以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”,填写有关项目并请每位作者亲笔签字,加盖第一作者单位公章后寄 2 份至本刊编辑部,其中作者签名顺序和作者单位署名名称应与投稿时文章中著录的相一致,如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意:(1)在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章不属于一稿两投,但投稿时应向编辑部说明,非中文文字期刊已发表的文稿再次在本刊投稿须征得首次发表期刊和本刊编辑部的同意。(2)作者须告知与该研究有关的利益冲突,如该研究被某机构资金资助的声明等利益关系。(3)如涉及保密问题,需附有关部门审查同意发表的证明。

(本刊编辑部)