

超声控释载 rtPA 的普朗尼克-F127 控释给药系统对 脑内血肿促溶的实验研究

孙 伟 段友容 钱忠心 刘卫东

摘要 目的 制备载重组组织型纤溶酶原激活剂(rtPA)的普朗尼克-F127(NP-rtPA)控释给药系统,并检验超声对其在人体外血肿和大鼠脑出血模型中血肿溶解的情况,评价大鼠脑出血模型术后的行为学改变情况。方法 人体外血肿溶解实验采用高血压性脑出血患者的血肿块作为标本,分为对照组、rtPA 组、rtPA+US 组、NP-rtPA 组及 NP-rtPA+US 组,分别在 6 h、24 h、72 h 检测血肿的溶解情况。建立大鼠脑出血模型,分为假手术组、阴性对照组、rtPA 组、rtPA+US 组、NP-rtPA 组及 NP-rtPA+US 组,在 0 d、1 d、3 d 及 7 d 测定体内 rtPA 浓度,在 7 d 测定脑组织含水量,在 0 d、1 d、3 d、7 d、14 d、21 d 及 28 d 采用改良神经功能评分(mNSS)评价大鼠行为学变化,并观察脑组织病理学变化。**结果** 人体外血肿溶解实验中 NP-rtPA+US 组在 6 h、24 h 及 72 h 的血肿溶解率分别与 rtPA 组、rtPA+US 组及 NP-rtPA 组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。大鼠脑出血中血肿溶解实验中,NP-rtPA+US 组在 0 d 和 1 d 体内 rtPA 浓度与 rtPA+US 组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);且 NP-rtPA+US 组在 1 d、3 d 及 7 d 体内 rtPA 浓度比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。NP-rtPA+US 组脑组织含水量最低,与阴性对照组和 rtPA+US 组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。阴性对照组在 21 d 和 28 d 的 mNSS 评分与 rtPA+US 组和 NP-rtPA+US 组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 超声能控制 NP-rtPA 控释给药系统释放 rtPA,使其更好地溶解血肿,较单纯 rtPA 溶解效果更好,可以更好地减轻动物体内的脑水肿,为高血压性脑出血的微侵袭外科治疗提供了一种有效的清除残余血肿的方法。

关键词 重组组织型纤溶酶原激活剂;普朗尼克-F127;超声;血肿;大鼠

[中图分类号] R722.15;R445.1

[文献标识码] A

Study on hemolysis by ultrasound activated controlled release of rtPA-loaded Pluronic F127 micelles

SUN Wei, DUAN Yourong, QIAN Zhongxin, LIU Weidong

Department of Neurosurgery, Punan Hospital, Shanghai 200125, China

ABSTRACT Objective To prepare Pluronic -F127 delivery system loaded with recombinant tissue type plasminogen activator(rtPA)(NP-rtPA), and detect the effect of ultrasound on hemolysis in vitro and in rat hematoma model of cerebral hemorrhage in vivo, and to evaluate the neurological behavior changes after establishment of rat cerebral hemorrhage model. **Methods** NP-rtPA delivery system was prepared, the effect of ultrasound in dissolving the hematoma in vitro was assessed by using hematoma specimens from the patients with hypertensive cerebral hemorrhage. The hematomas were divided into control group, rtPA group, rtPA+US group, NP-rtPA group and NP-rtPA+US group, respectively. The dissolution of the hematoma was detected 6 h, 24 h and 72 h after the treatment. A rat model of intracerebral hemorrhage(ICH) in vivo was established, the rats were divided into false operation group, negative control group, rtPA, rtPA +US, NP -rtPA and NP -rtPA +US group. The rtPA concentration were measured on 0 d, 1 d, 3 d and 7 d. The brain water content were measured on 7 d. The neurological behaviors of rats were evaluated on 0 d, 1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d and 28 d with modified neurologic severity score(mNSS). **Results** In vitro experiment, there was significant difference of dissolution rate of the hematoma between NP-rtPA+US group and rtPA, rtPA+US and NP-rtPA group on 6 h, 24 h and 72 h ($P < 0.05$). In vivo experiment, there was significant difference of rtPA concentration between NP-rtPA+US group and rtPA+US group on 0 d, 1 d ($P < 0.05$). In NP-rtPA+US group, the rtPA concentration had significant difference on 1 d, 3 d and 7 d ($P < 0.05$). The water content in brain tissue was found to be statistically different.

基金项目:上海市浦东新区科委项目(PKJ2012-Y58, PKJ2015-Y25);上海市浦东新区卫生系统优秀青年医学人才培养(PWRq2013-13)

作者单位:200125 上海市浦东新区浦南医院神经外科(孙伟、钱忠心、刘卫东);上海市肿瘤研究所国家重点肿瘤基因研究室(段友容)

通信作者:刘卫东, Email:liuwd8b@sh163.net

Differences in the behavior of rats treated with rtPA+US and NP-rtPA+US were statistically significant on 21 and 28 d.

Conclusion Ultrasound can control the release of rtPA from rtPA-Pluronic F127 (NP-rtPA), making it better at dissolving hematoma, the effect was better than that achieved with common rtPA. In addition, this treatment may reduce brain edema and provide an effective method for the removal of residual hematoma in ICH using minimally invasive surgery.

KEY WORDS Recombinant tissue-type plasminogen activator; Pluronic -F127; Ultrasound; Hematoma; Rat

微侵袭技术已应用于神经外科临床治疗,其在清除高血压性脑出血后脑内血肿已得到越来越广泛的临床应用^[1-2],然而术后常有不同程度的血块残留,需逆行注入促进纤溶药物如尿激酶等促进残留血块溶解^[3]。目前临床证实重组组织型纤溶酶原激活剂(recombinant human tissue-type plasminogen, rtPA)较传统的尿激酶溶解血肿效果更好,然而因其起效快,半衰期短,不能在局部持续发挥作用,多次应用可能会增加颅内感染^[1,4]。若将常规治疗药物纳米化,增加药物颗粒的表面积,使其与组织的接触面积增大,从而达到提高药效、减少用量及降低副作用的目的^[5]。普郎尼克嵌段共聚物家族,如普郎尼克-F127(pluronic F127, F127)具有温度敏感性的水凝胶特性,使其能够作为优良的药物载体包裹药物。本实验通过制备载 rtPA 的 F127(NP-rtPA)控释给药系统,并检验超声对其在人体外血肿和大鼠脑出血模型中血肿溶解的情况,评价大鼠脑出血模型术后的行为学改变情况,旨在为临床寻找一种有效清除脑出血残余血肿的方法。

材料与方 法

一、主要仪器与试剂

F127(德国 BASF 公司);rtPA(50 mg,德国勃林格殷格翰制药公司);PHYSIOSON-EXPERT 双频超声治疗系统(德国非兹曼医用电子公司);恒温水浴,漩涡混合器,手动固定式移液器(大龙医疗设备上海有限公司)。

二、制备 NP-rtPA 给药系统

将 rtPA 加入 0.9%生理盐水,制备成浓度为 1 mg/ml 的 rtPA 溶液,取 1 ml 加入 25% F127 溶液中,常温下在漩涡混合器上振荡,与 rtPA 作用形成溶胶,置于普通玻璃瓶中,常温或低温储存。

三、人体外血肿溶解实验

1.制备人体外血肿模型:血肿块来源于高血压性脑出血行开颅血肿清除术的患者。用天平精准称量均分成 1 g 的血肿块,放入恒温水浴箱内 2 h,共制备 30 份;血肿质量记为 W_0 。

2.分组及方法:常温下,将 30 份血肿块分为 5 组,每组 6 份,具体分组如下:①对照组,未使用 rtPA,未进行超声辐照;②rtPA 组,使用普通 rtPA;③rtPA+US 组,

使用 rtPA 和超声辐照;④NP-rtPA 组,使用 NP-rtPA 给药系统;⑤NP-rtPA+US 组,使用 NP-rtPA 给药系统和超声辐照。将 rtPA+US 组和 NP-rtPA+US 组装有血肿的小管置于表面涂满耦合剂的超声仪探头上,然后在 6 h、24 h、72 h 行超声辐照溶解血肿。超声治疗仪频率 1 MHz,功率 0.4 W,每次辐照时间 1 min,共辐照 2 次,每次间隔 1 min。各组小管均放在 37℃的恒温水浴中观察,在 6 h、24 h、72 h 分别测量血肿的质量,记为 W_1 ;计算血肿的溶解率,公式为:溶解率= $W_1/W_0 \times 100\%$ 。

四、大鼠脑出血中血肿溶解实验

1.实验动物:健康雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 250~300 g。上海市斯莱克动物有限责任公司提供,动物生产许可证号 SCXK(沪)200720005,使用许可证号 SYXK(沪)200420011。

2.建立大鼠脑出血模型:参照 Yang 等^[6]的方法,应用立体定向技术,用大鼠自体颈内动脉不抗凝动脉血液 40 μ l 缓慢注入大鼠右侧尾状核,制成中等量脑出血,建立稳定的脑出血动物模型。见图 1A~C。

3.实验分组及方法:60 只大鼠分为 6 组,每组 10 只,分别为:①假手术组,只穿刺不进行血肿注射;②阴性对照组,注入 40 μ l 自体动脉血和 10 μ l 0.9%生理盐水;③rtPA 组,注入 40 μ l 自体动脉血和 10 μ l 普通 rtPA;④rtPA+US 组,注入 40 μ l 自体动脉血和 10 μ l 普通 rtPA,并进行超声辐照;⑤NP-rtPA 组,注入 40 μ l 自体动脉血和 10 μ l 制备的 NP-rtPA 给药系统;⑥NP-rtPA+US 组,注入 40 μ l 自体动脉血和 10 μ l 制备的 NP-rtPA 给药系统,并进行超声辐照(图 1D)。超声辐照时应用多频超声治疗仪(频率 1 MHz,功率 0.4 W)贴近大鼠头部,引发控释溶解血肿。

4.观察指标

(1)体内 rtPA 浓度:在 0 d、1 d、3 d、7 d,将 rtPA 组、rtPA+US 组、NP-rtPA 组及 NP-rtPA+US 组大鼠在麻醉状态下断头取脑后,加入 PBS 缓冲液洗净,用滤纸吸干后,放入匀浆器中充分匀浆 15 min,然后放入离心机中,50 000 r/min 离心 10 min,取出上清液应用高效液相色谱法检测其体内 rtPA 浓度。

(2)脑组织含水量:在 7 d 时将假手术组、阴性对照组、rtPA+US 组及 NP-rtPA+US 组大鼠在麻醉状态

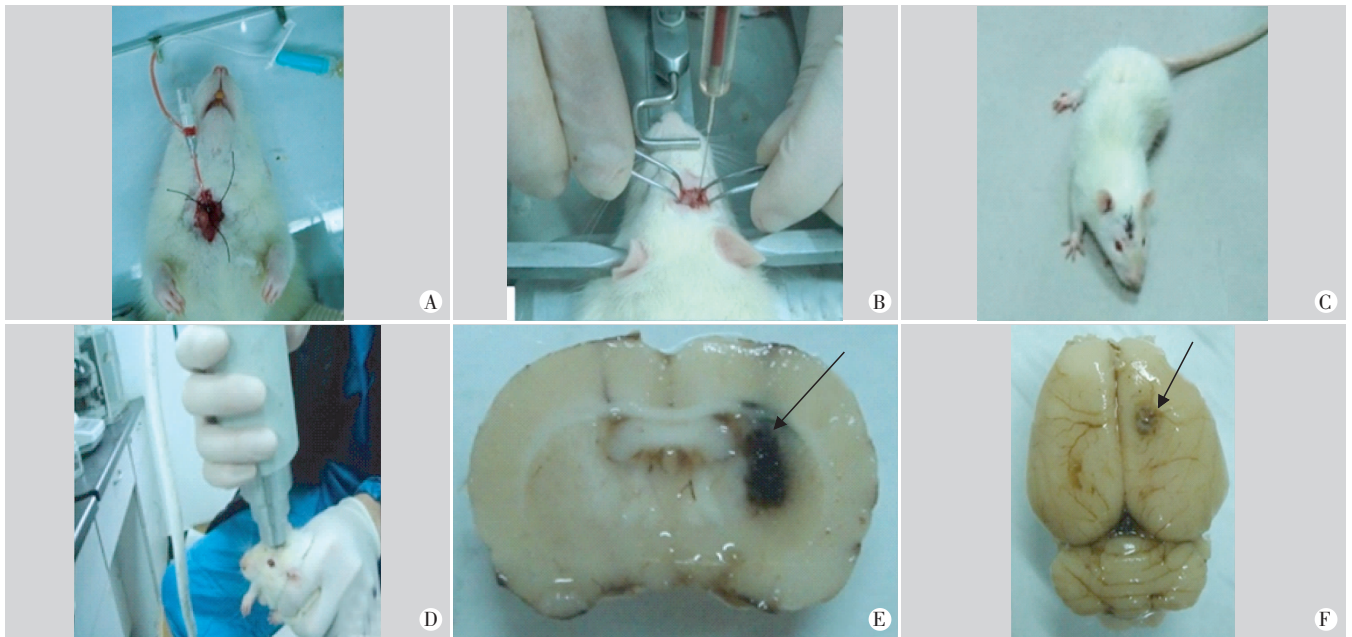
下断头取脑,取出脑组织行冠状切片,厚 3 mm,距离额极 4 mm。脑组织切片沿中线分成两个半球,每个半球再分成皮质和髓质;小脑也进行分离作为对照。脑组织立即在电子分析天平上称质量,计为湿质量;脑组织标本在 100℃ 烘干 24 h 再称干质量,计算公式为:脑组织含水量=(湿质量-干质量)/湿质量。见图 1E,F。

(3)动物行为学改变:采用改良大鼠神经功能缺

损(modified neurological severity score, mNSS)评分^[7]进行评价,0~18 分,0 分为正常、18 分为严重病损。评价阴性对照组、rtPA+US 组及 NP-rtPA+US 组在 0 d、1 d、3 d、7 d、14 d、21 d 及 28 d 的神经功能缺损变化。

五、统计学处理

应用 SPSS 18.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



A: 血块样本来源于大鼠颈内动脉;B: 使用动物专用的立体定向仪向大鼠右侧尾状核注入 50 μl 的大鼠颈内动脉血;C: 制备成功的大鼠模型,显示左侧肢体偏瘫;D: 使用超声控制 NP-rtPA 释放 rtPA;E、F: 大鼠脑出血模型的脑组织的病理切片,箭头示水肿和穿刺部位。

图 1 大鼠脑出血模型的制作及实验研究

结 果

一、人体外血肿溶解实验结果

对照组与 NP-rtPA 组在 6h、24h 及 72h 的血肿溶解率比较,差异均无统计学意义;rtPA 组与 rtPA+US 组在各时段血肿溶解率比较,差异均无统计学意义;NP-rtPA+US 组各时段的血肿溶解率与 rtPA 组、rtPA+US 组及 NP-rtPA 组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 2。

二、大鼠脑出血中血肿溶解实验结果

1.体内 rtPA 浓度比较:rtPA+US 组各时间段体内 rtPA 浓度变化差异无统计学意义;且在 3 d 和 7 d 时均未检测到 rtPA。NP-rtPA+US 组在 0 d 和 1 d 体内 rtPA 浓度与 rtPA+US 组比较,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。NP-rtPA+US 组在 1 d、3 d 及 7 d 体内 rtPA 浓度比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 3。

2.脑组织含水量比较:NP-rtPA+US 组脑组织含水量最低,与阴性对照组和 rtPA+US 组比较,差异均有

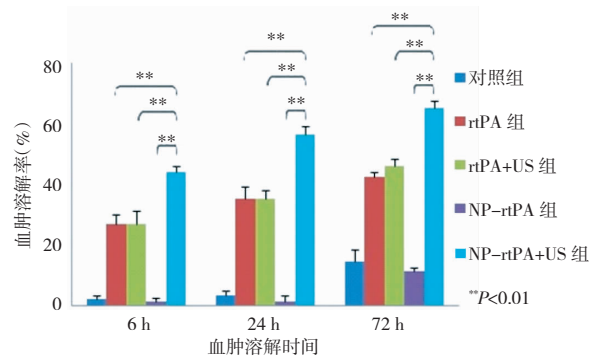


图 2 体外血肿溶解情况比较图

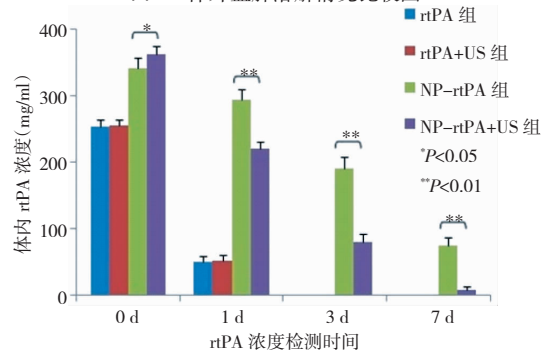


图 3 大鼠脑出血模型体内 rtPA 浓度比较图

统计学意义($P<0.05$ 、 0.01),见图 4。

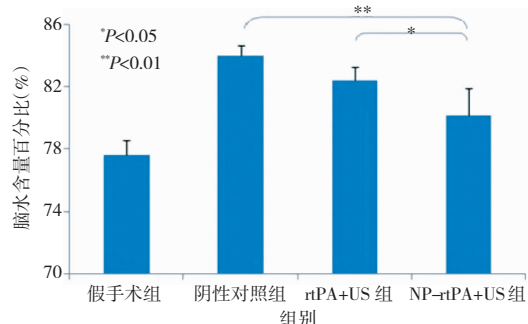


图 4 脑出血模型大鼠脑组织含水量比较图

3. mNSS 评分比较: 阴性对照组、rtPA+US 组及 NP-rtPA+US 组在术后 7 d 内 mNSS 评分比较, 差异无统计学意义; 在 21 d 和 28 d 的 mNSS 评分比较, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$), 见图 5。

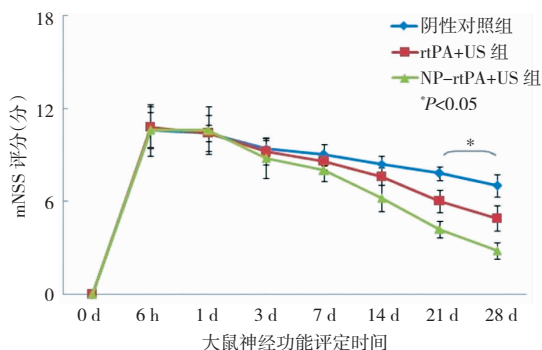


图 5 大鼠脑出血模型神经功能缺损评估图

讨 论

F127 具有如下特征: ①常温溶解后自组装形成可以包裹药物的溶胶; ②对温度敏感, 常温下是溶胶, 体温下转变成凝胶; ③超声可以引发胶束释放所包含的药物。这种特性使其能够作为优良的药物载体包裹药物, 在机械搅拌作用下制备缓释水凝胶, 均匀度好, 包封率高^[8]。临床上目前仅国外报道^[9]超声引发对于胶束包裹抗肿瘤药物有释放作用, 对于局部应用方面并无直接报道, 国内相关报道更少。前期研究^[10-11]中关于载尿激酶结合 Pluronic P105(简称 P105)制备的缓释给药系统曾经应用在体外血肿溶解, 研究中发现 P105 对于尿激酶的药物包封率很低, 不利于大剂量药物的包裹, 而且 P105 常温下为凝胶, 黏性大, 不易操作。而 F127 常温下为固态, 性状稳定, 且药物包封率大; 临床也已明确 rtPA 较尿激酶溶解效果好, 所以在前期研究的基础上本试验成功制备了载 NP-rtPA 控释给药系统, 在超声引发下控制其释放并溶解血肿, 这在国内外均无报道。

理想的 rtPA 控释制剂应具备以下特点: ①常温下是液态, 便于注入体内; ②进入体内后, 在体温下是固态, 可以贴附于血肿表面, 不易随血肿引流液排出; ③术后可以根据残余血肿的情况适时适量地释放 rtPA, 使血肿溶解; ④制剂可自然降解, 且降解程度应缓慢而安全。超声具有无侵害性, 能够穿过机体组织, 集中超声能量, 达到细微控制。F127 包裹所形成的载药系统, 可为超声引发, 释放所包裹的药物; 超声停止时, 未作用的药物则自行组装再次包裹药物。

本实验制备的 NP-rtPA 给药系统符合临床所需制剂要求: 首先载药系统具有温敏性, 在室温下是液态, 便于储存和在微侵袭治疗的术中注入颅脑血肿内; 进入体内后, 在体温下包裹在血肿的表面形成固态, 不随引流液排出体外; 术后根据临床头颅 CT 检查残余血肿的情况, 适时通过超声引发释放 rtPA, 加速血肿的溶解。若术后复查显示血肿量大于初始血肿的 25%, 则利用超声引发释放 rtPA, 反之则无需超声引发。F127 本身降解缓慢, 但在溶剂、体液及脑脊液等环境中, 在 24 h 后逐渐溶于水, 因为其形成的微粒是纳米级的, 故溶解也是很微弱的, 满足临床需要的安全性。

人体外血肿实验结果显示超声对于普通的 rtPA 溶解血肿无明显影响, 而对于所制备的 NP-rtPA 控释给药系统有明显的控释作用, 所以可以根据血肿的有无和大小, 调控超声来促进血肿的溶解。大鼠脑出血中血肿溶解实验显示脑组织含水量各组有明显差异。其中 NP-rtPA+US 组对脑水肿的减低效果最好, 原因是超声能够激发 rtPA 逐步释放, 与血肿充分结合, 故溶解效果好。各实验组与阴性对照组脑水肿比较, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$), 原因在于 rtPA 本身是短效纤溶制剂, 半衰期短, 阴性对照组一次注入 rtPA 后, 若不能发挥作用则会迅速降解消失。而 NP-rtPA 控释给药系统具有自我降解作用, 可以缓慢而持续地释放 rtPA, 故水肿减轻效果好^[12]。同时在超声激发缓释给药系统的 rtPA 释放后, 若 rtPA 未全部作用于血肿, 则被 F127 再次包裹, 在下次激发时释放, 提高了 rtPA 的利用率, 能够更有效地溶解血肿。

大鼠脑出血中血肿溶解实验采用了 mNSS 评分评价大鼠神经功能缺损, 结果表明 NP-rtPA+US 组在 7 d 后行为学上的表现好于其他组, 说明 NP-rtPA+US 组虽然短期内神经功能表现同于其他组, 但对于长期的神经功能恢复却有着显而易见的差异。

通过对超声引发缓释系统在大鼠脑出血模型中的

研究,证实缓释系统可以在活体内通过超声控制下释放且血肿的溶解效果较好,并且初步探索了在临床应用的一些有效数据,如超声时间、超声方法、rtPA 剂量,为药物的临床应用奠定了基础,对于高血压性脑出血的微侵袭外科治疗和其他相关领域有潜在的巨大作用。

本研究也有一定的缺陷,如对于成人脑出血患者,常规采用的是血肿引流的方法,但在动物上固定引流管有困难,且动物清醒状态下活跃异常,影响引流管的固定及引流液的记录。对于血肿大小的影响,我们也曾考虑过选用大动物,出血量可以接近人脑,但血肿溶解是按照量效关系进行的,而且参照脑出血动物模型的制作,研究^[13]显示相比大动物,大鼠的脑出血模型制作比较稳定,神经功能的缺损比较明显,对于预后比较差异性显著;基于以上原因,本试验才考虑选择了小剂量的大鼠脑出血模型。在未来的研究中可以考虑进行大动物和血肿量较大的动物模型制作和研究。

NP-rtPA 控释给药系统联合应用超声不仅可以在体外加快血肿的溶解,在大鼠体内超声可以达到控制 NP-rtPA 控释给药系统释放 rtPA,达到促进血块溶解减轻脑水肿的目的,并且其溶解颅内血肿的效果较单纯 rtPA 更好,为高血压性脑出血的微侵袭外科治疗提供了一种有效的清除残余血肿的方法。

参考文献

- [1] Mendelow AD, Gregson BA, Fernandes HM, et al. Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial intracerebral haematomas in the InterNptioNpl Surgical Trial in Intracerebral Haemorrhage (STICH): a randomised trial[J]. Lancet, 2005, 365(9457): 387-397.
- [2] Satter AR, Islam MR, Haque MR, et al. Comparison between decompressive craniectomy with durotomy and conservative treatment in spontaneous supratentorial intracerebral hemorrhage[J]. Med J, 2016, 25(2): 316-325.
- [3] 孙伟,刘卫东.高血压性脑出血的微侵袭外科治疗[J].国际神经病学神经外科学杂志, 2006, 31(1): 37-40.
- [4] Ziai W, Nyquist P, Hanley DF. Surgical Strategies for Spontaneous Intracerebral Hemorrhage[J]. Semin Neurol, 2016, 36(3): 261-268.
- [5] Giede-Jeppe A, Bobinger T, Gerner ST, et al. Lymphocytopenia is an independent predictor of unfavorable functional outcome in spontaneous intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2016, 47(5): 1239-1246.
- [6] Yang GY, Betz AL, Chenevert TL, et al. Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats[J]. J Neurosurg, 1994, 81(1): 93-102.
- [7] Wang C, Li F, Guan Y, et al. Bone marrow stromal cells combined with oxiracetam influences the expression of B-cell lymphoma 2 in rats with ischemic stroke[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2014, 23(10): 2591-2597.
- [8] Tian Y, Shi C, Sun Y, et al. Designing micellar nanocarriers with improved drug loading and stability based on solubility parameter[J]. Mol Pharm, 2015, 12(3): 816-825.
- [9] Munshi N, Rapoport N, Pitt WG, et al. Ultrasonic activated drug delivery from Pluronic P-105 micelles[J]. Cancer Lett, 1997, 118(1): 13-19.
- [10] 孙伟,刘卫东,段友容,等.超声控释对载尿激酶缓释系统助溶的研究[J].临床超声医学杂志, 2008, 10(1): 1-4.
- [11] 孙伟,段友容,刘卫东,等.超声控释载尿激酶缓释给药系统的体外实验[J].中国新药与临床杂志, 2008, 27(3): 173-176.
- [12] Liu Y, Lu WL, Wang JC, et al. Controlled delivery of recombinant hirudin based on thermo-sensitive Pluronic F127 hydrogel for subcutaneous administration: in vitro and in vivo characterization[J]. J Control Release, 2007, 117(3): 387-395.
- [13] Alexander A, Saraf S, Saraf S. Understanding the role of poloxamer 407 based thermoreversible in situ gelling hydrogel for delivery of PEGylated melphalan conjugate[J]. Curr Drug Deliv, 2016, 13(4): 621-630.

(修回日期:2016-10-17)

欢迎基金资助课题的论文投稿

为了进一步提高本刊的学术水平,鼓励基金资助课题(国家自然科学基金,国家各部委及省、市、自治区各级基金)的论文投到本刊。本刊决定,上述基金课题论文,本刊将以绿色通道快速发表。请作者投稿时,在文中注明基金名称及编号,并附上基金证书复印件。

欢迎广大作者踊跃投稿!

本刊编辑部