

载 BDNF 基因 PEG-PLGA 纳米微球的制备及其转染外源性神经干细胞的研究

余勇波,唐健,张桂龙,朱治翰,杨芳,陈陆旭

【摘要】 目的 构建转染后能表达神经修复功能蛋白的载脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 基因的聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸纳米微球 [poly(ethylene glycol)-poly(lactin-co-glycolic acid)-BDNF-nanoparticles, PEG-PLGA-BDNF-NPs]; 探讨其转染外源性神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 后对细胞生物学功能的影响。**方法** 采用 W/O/W 复乳溶剂挥发法制备装载 BDNF 基因质粒的 PEG-PLGA 纳米微球转染复合体。用扫描电镜和透射电镜表征纳米微球的形貌, 粒度电位分析仪测量纳米微球的粒径及 Zeta 电位。测定纳米微球对 BDNF 基因质粒的包封率和载药量; 检测 PEG-PLGA 纳米微球转染复合体的体外缓释质粒的情况。倒置显微镜观察纳米微球转染复合体对 NSCs 形态的影响; 并用 CCK-8 法检测其对 NSCs 增殖的影响。荧光倒置显微镜观察 NSCs 胞吞纳米微球转染复合体后的分泌作用; Western-blot 及 RT-PCR 检测其 BDNF 的分泌能力。**结果** (1) 制备了包载 BDNF 基因的 PEG-PLGA 纳米微球, 微球的粒径约为 200 nm, 粒径均一; 包封率及载药量均较高, 具有一定的缓释效果。(2) 分离培养出了具有不断增殖能力, 表达神经巢蛋白的 NSCs; 并能经过诱导分化为神经元和神经胶质细胞。(3) 载 BDNF 基因的 PEG-PLGA 纳米微球高效转染 NSCs, 且转染不会引起显著细胞毒性; Western-blot 及 RT-PCR 检测显示其大量表达 BDNF。**结论** 采用 W/O/W 复乳溶剂挥发法制备得到安全高效的 PEG-PLGA-BDNF 纳米微球。并首次构建了装载 PEG-PLGA-BDNF-NPs, 能表达具有神经修复功能的 BDNF 的外源性 NSCs 系。

【关键词】 纳米微球; 神经干细胞; 基因治疗; 转染

【中图分类号】 RQ78; Q291 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-7770(2019)02-0109-06

Preparation of PEG-PLGA-BDNF nanoparticles and exploratory study on transfection of exogenous neural stem cells YU Yong-bo, TANG Jian, ZHANG Gui-long, et al. Department of Neurosurgery, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

Corresponding author: CHEN Lu-kui

Abstract: Objective To construct nano-gene microspheres (PEG-PLGA-BDNF-NPs) with the function of express nerve repair protein, and explore the effects of transfection on exogenous neural stem cells (NSCs) on their biological functions. **Methods** PEG-PLGA nanoparticles transfected with BDNF gene plasmids were prepared by double emulsion-solvent evaporation method. The morphology of nanoparticles was observed by scanning electron microscopy and transmission electron microscope. The particle size and Zeta potential of nanoparticles were measured by laser particle size analyzer. The entrapment efficiency of PEG-PLGA nanoparticles and the drug loading of BDNF gene plasmids were examined. The in vitro release plasmid of PEG-PLGA nanoparticle transfection complex was tested. The biocompatibility of the nanoparticle transfection complex and the effect of the nanoparticle complex on the morphology of NSCs were detected by CCK-8. The secretion of neural stem cells after transfection of nanoparticles transfected complex was observed by inverted fluorescence microscope. Western blot and quantitative RT-PCR were used to detect the secretion of

基金项目:国家自然科学基金(81671819,81471780);江苏省六大人才高峰项目(2015-WSW-001)

作者单位:210009 南京,东南大学附属中大医院神经外科(余勇波,张桂龙,陈陆旭);东南大学医学院(朱治翰);东南大学生物科学与医学工程学院,生物电子国家重点实验室,江苏省生物材料与器件重点实验室(唐健,杨芳)

通信作者:陈陆旭

BDNF. Results (1) The gene-loaded PEG-PLGA nanoparticles were prepared. The encapsulation efficiency and drug loading were high, which had a certain sustained release effect. (2) The neural stem cells with the ability to proliferate and express the nestin protein are isolated and cultured, and can be induced to differentiate into neurons and glial cells. (3) PEG-PLGA nanoparticles containing BDNF gene were highly transfected into neural stem cells, and transfection did not cause significant cytotoxicity. Western-blot and RT-PCR showed that BDNF was abundantly expressed in these stem cells. **Conclusions** The rat neural stem cells were successfully extracted and cultured, and the PEG-PLGA-BDNF-NPs were prepared. An exogenous neural stem cell line loaded with PEG-PLGA-BDNF-NPs was first constructed to express BDNF protein with neurorestorative function.

Key words: nanoparticle; neural stem cells; gene therapy; transfection

近年来研究证实,外源性神经干细胞(neural stem cells, NSCs)可以在某些炎症趋化因子的引导下有效地靶向、远程迁移至脑缺血区,并发挥修复作用^[1-2]。因此,其在神经损伤修复和退行性疾病治疗研究中有着重要的地位。基因修饰的外源性 NSCs 可以通过旁观者效应分泌细胞因子,减轻病灶处的炎症反应;从而增强组织的修复能力^[3-4],实现基因治疗和细胞移植治疗的双重作用,有着广泛的应用前景。然而,目前常用的基因转染方法转染 NSCs 存在诸多困难和不足。病毒转染可引起免疫反应,有致癌、致畸风险,限制了其使用^[5];脂质体转染对干细胞的转染效率低,且细胞毒性大、性质不稳定^[6];显微注射及电转不适合用于大量转染,细胞致死率高。因此,建立安全高效的干细胞稳转体系有着潜在的应用前景。本研究用无毒性、无致敏性、无致畸、致癌作用的聚乙二醇修饰的聚乳酸/羟基乙酸共聚物[poly(ethylene glycol)-poly(lactin-co-glycolic acid), PEG-PLGA]制备 PEG-PLGA 纳米微球(NPs)构建具有表达神经修复功能的脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的 PEG-PLGA 纳米基因颗粒,建立 PEG-PLGA-BDNF 纳米颗粒转染外源性 NSCs 的稳转体系;并检测外源性 NSCs 装载该纳米基因后的分泌能力。旨在为后续将该装载 PEG-PLGA-BDNF-NPs 的外源性 NSCs 应用于神经损伤修复,如缺血性脑卒中的细胞移植与基因治疗,提供实验依据。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 孕 2 周 SD 大鼠 3 只(南京青龙山动物场);PEG-PLGA(Sigma-Aldrich 公司),BDNF 质粒(优宝生物),二氯甲烷(dichloromethane, DCM, 上海凌峰化学试剂有限公司),Span-80(国药集团化学试剂有限公司),聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA, average $M_w = 31\ 000$; 德国 Sigma-Aldrich 中国有限公司),

DMEM/F12 培养基(Life Technologies Corporation)。兔抗小鼠 BDNF 单克隆抗体(Abcam),羊抗小鼠 β -Actin 单克隆抗体(杭州联科生物技术股份有限公司),HRP 标记兔抗山羊 IgG 二抗(杭州联科生物技术股份有限公司),HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(杭州联科生物技术股份有限公司),兔抗小鼠巢蛋白(Nestin)多克隆抗体(Abcam),兔抗小鼠 Class III β -Tubulin(Tuj1)多克隆抗体(Abcam),兔抗小鼠胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)多克隆抗体(Abcam)。Western-Blot 法总蛋白 RIPA 裂解液(南京凯基生物);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(武汉塞维尔生物),Total RNA 提取试剂盒 I (OMEGA),RT-PCR 检测试剂盒(Roche)。

1.2 方法

1.2.1 PEG-PLGA-BDNF-NPs 纳米微球复合体的制备与验证 采用 W/O/W 复乳-溶剂挥发法制备载药的纳米微球复合体。称取 200 mg 聚乙二醇修饰的 PEG-PLGA 溶于 2 mL 二氯甲烷(DCM, 10% *wt/vol*)中作为油相,将一定量的 BDNF 质粒溶液(1 000 ng/ μ L)作为水相逐滴加入油相中,在一定的超声功率下冰浴超声 30 s,得到溶液油包水(W/O)初乳。向初乳溶液中加入 5% PVA 溶液,以相同的超声功率冰浴超声 30 s,得到水包油包水 W/O/W 复乳溶液。再将复乳倒入 20 mL 0.5% PVA 水溶液中,室温下高速分散机搅拌,蒸干二氯甲烷,离心洗涤微球 3 次后,用 0.22 μ m 滤器过滤除菌,冻干储存。同法制备包载 PBS 的空白微球。使用扫描电镜和透射电镜观察纳米粒的物理形状,马尔文 ZS90 粒度分析仪测量纳米微球的粒径及 Zeta 电位。分 3 组实验,每组测量 3 次。

1.2.2 PEG-PLGA 纳米粒携带质粒的包封率、质粒载量测定 精确称取 3 个批次各 2.5 mg 冻干后的 PEG-PLGA-BDNF-NPs 粉末置于 1.5 mL EP 管中,加入 500 μ L 三氯甲烷使之完全溶解;再加入 500 μ L TE

缓冲液,室温下震荡 30 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清。用紫外分光光度计测定上清中 DNA 浓度;根据公式计算 BDNF 纳米微球中质粒含量及包封率。

1.2.3 载 BDNF 质粒纳米粒的体外缓释实验 缓释率通过释放动力学测定约 45 d 内基因药物累积释放比例,并绘制体外释放曲线。取 3 个 2 mL 离心管,每管内加入 1 mL 溶有 10 mg PEG-PLGA-BDNF-NPs 的 PBS 溶液,放入恒温振荡器内,37 °C,50 r/min。分别在第 1 d、3 d、5 d、7 d、14 d、21 d、28 d、45 d,将 3 个管取出,10 000 r/min 离心 5 min,取全部的上清液放入 -20 °C 保存;同时再向 3 个离心管补充 PBS 缓冲液 1 mL。BDNF 释放后,将收集的 24 个样本用核酸分析仪测量每个样本质粒 DNA 浓度,计算在各个时间点释放质粒 DNA 的量,计算 PEG-PLGA-BDNF-NPs 累积释放百分率,绘制释药曲线。

1.2.4 外源性 NSCs 的提取、培养与鉴定 将孕 12~14 d 的 SD 大鼠颈椎脱臼处死,浸泡于 75% 乙醇消毒后,剖腹取胎鼠。冰袋上操作,取胎鼠脑组织浸泡 PBS 中,清除血管膜,取海马组织,反复冲洗;用眼科剪剪碎,吹打,加入 1 mL 胰酶中消化,37 °C 水浴 5 min,加 DMEM 终止消化;离心后加 NSCs 培养基重悬,400 目细胞筛过滤,1 000 r/min 离心 5 min,完全培养基重悬。接种培养瓶中,每 3 d 半量换液 1 次,6~7 d 传代 1 次。取培养至第 3 代第 4 d 的细胞球,室温下封闭 1 h;加入一抗 anti-Nestin (1:200),4 °C 过夜;PBS 洗涤 3 次,加入 FITC 偶联的二抗 (1:400),室温孵育 1 h;然后加入 DAPI (0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 10 min, PBS 洗涤后用荧光封片剂封片,在荧光显微镜下观察。

1.2.5 NSCs 的分化及鉴定 取第 3 代第 4 d 的 NSCs 消化为单个细胞后,种植于预先用多聚赖氨酸包被的 12 孔平板,用分化培养基 (DMEM/F12 + 10% FBS) 继续孵育 7 d 后取出;体积分数 10% 山羊血清封闭 15 min;分别加入一抗 TuJ1 (1:1 000)、GFAP (1:1 000)、MOG (1:1 000),4 °C 过夜;弃一抗, PBS 洗涤 3 次,然后分别加入相应 FITC 及 Cy3 偶联的二抗 (1:400),室温孵育 1 h 后,DAPI 染色 10 min, PBS 洗 3 次后,用荧光封片剂封片,在荧光显微镜下观察。

1.2.6 PEG-PLGA-BDNF-NPs 对细胞形态和增殖的影响 取体外传代的 NSCs 种植到 12 孔板内,孵育 4 h 后取出,加入含 PEG-PLGA-BDNF-NPs 6 mg/mL 的完全培养基 300 μL ,37 °C、5% CO_2 孵育 3 d 后,用倒置显微镜观察。取第 3 代的 NSCs,消化为单个细胞后,用培养基将其调整为 20×10^4 个/mL,加入

96 孔板;每板设 27 个实验孔,分为 3 组,每孔 50 μL (约 10^4 个细胞)。孵育 4 h 后取出,第 1 组加入含 BDNF 纳米微球 (6 mg/mL) 的完全培养基 50 μL ,第 2 组加入含空载纳米微球 (6 mg/mL) 的完全培养基 50 μL ,第 3 组加入完全培养基 50 μL ,放入培养箱孵育;第 1 d、3 d、5 d 取出。每次每组取 3 个复孔加入 10 μL CCK-8,设 A1 孔为空白对照,用于调零;放入培养箱孵育 4 h 后取出,450 nm 波长处测量各孔的吸光度;吸光度间接反映纳米微球对 NSCs 的增殖效应。

1.2.7 携载 BDNF 基因质粒纳米微球的外源性 NSCs 的分泌能力检测 取第 3 代第 6 d 细胞形成的神经球,消化吹打为单细胞悬液,种植于预先用多聚赖氨酸包被的 6 孔平板 (细胞浓度为 50×10^4 /孔)。实验孔加入含 6 mg/mL 载 BDNF 基因质粒 (内含绿色荧光蛋白 GFP 基因) PEG-PLGA 纳米微球的培养液 500 μL ;对照组加入含 6 mg/mL 包被 PBS 的 PEG-PLGA 纳米微球的培养液 500 μL ,置 37.5 °C、5% CO_2 培养箱中继续培养,第 3 d 取出,于荧光显微镜下观察。采用 Western-Blot 法测定 BDNF 蛋白,用总蛋白提取试剂盒提取各组培养第 4 d 的细胞总蛋白;取蛋白样品 10 μL 用于蛋白定量,剩余样品按 5:1 加入 SDS buffer,沸水浴 5 min。每孔加样蛋白约 20 μg ,行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳;采用半干法将蛋白转移至硝酸纤维素 (NC) 膜,用 5% 脱脂奶封闭,加入 BDNF 多克隆抗体 (1:5 000) 和 β -actin 多克隆抗体 (1:5 000) 过夜后 PBS 洗涤 3 遍;二抗为 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体和山羊抗小鼠抗体,室温孵育 60 min, PBS 洗涤后用 BCIP-NBT 液于室温下避光显色,扫描图像,分析结果;以 β -actin 作为内参照。采用定量 RT-PCR 法测定 BDNF mRNA;用 Trizol 试剂盒提取 RNA,逆转录为 cDNA,用 RT-PCR 进行定量分析。

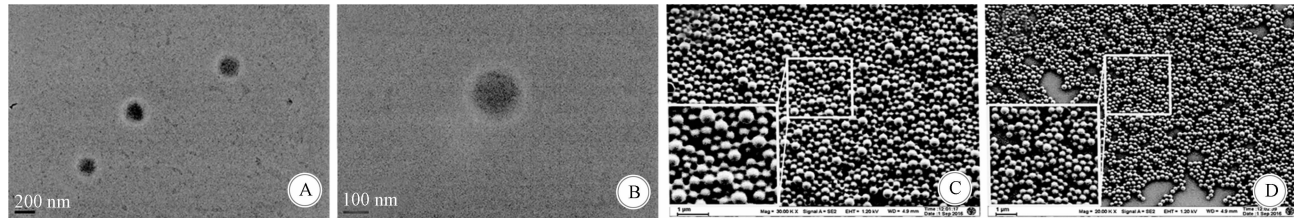
1.3 统计学方法 用 SPSS16.0 软件进行统计分析。实验检测数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间均数比较采用单因素方差分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 prism5 软件绘制统计图。

2 结果

2.1 纳米微球复合体的表征 扫描电镜和透射电镜下观察包载有 BDNF 质粒的 PEG-PLGA 纳米微球显示,微球外观成球形,表面光滑完整,大小分布均一,单分散性好,少有相互融合现象,未见明显破裂 (图 1)。激光粒度分析仪测定携带质粒的纳米微球的粒径为 (217.60 ± 5.40) nm, Zeta 电位为 (-26.33 ± 0.24) mV;包被 PBS 的纳米微球的粒径

为 (216.70 ± 5.30) nm, Zeta 电位为 (-27.23 ± 0.74) mV; 装载质粒后, PLGA 纳米粒呈现出负电荷

性质, 两者粒径之差为 0.9 nm, PDI 为 (0.071 ± 0.036) 和 (0.081 ± 0.053) 。



A, B: 透射电镜图; C, D: 扫描电镜图
图 1 PEG-PLGA 纳米微球的透射电镜和扫描电镜图

2.2 纳米微球复合体的包封率及质粒载量 通过检测上清中质粒的量, 计算纳米微球质粒的包封率, 得到 PLGA 纳米微球的包封率为 $(83 \pm 3)\%$ ($n = 6$); 1 mg PLGA 纳米粒载有质粒 (1.38 ± 0.02) μ g。

2.3 装载 BDNF 基因的纳米微球复合体的体外缓释率 见图 2。体外缓释以包入微球中的质粒百分比表示, 以时间为横坐标。结果显示, PLGA 微球在起始段没有突释效应, 释放量持续稳定增加; 24 h 后 PLGA 释放 BDNF 基因量的速度加快, 1 周后释放速度进入平台期; 28 d 累积释放量达到 80%。

2.4 培养 NSCs 的形态及 Nestin 表达 提取出的 NSCs 在装有无血清培养基的培养瓶中进行培养, 在倒置显微镜下观察到 NSCs 呈球形悬浮生长, 培养的时间越长, 细胞形成的球越大。Nestin (属中间

丝蛋白) 是 NSCs 的标志性蛋白; 将培养至第 3 代第 4 d 的 NSCs 行 Nestin 抗体免疫荧光染色显示阳性表达 (神经球有明显荧光反应)。见图 3。

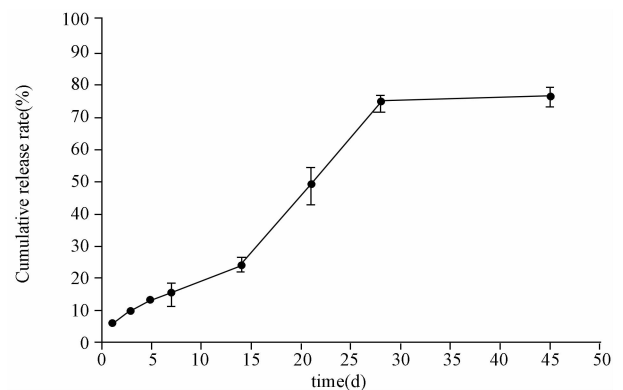
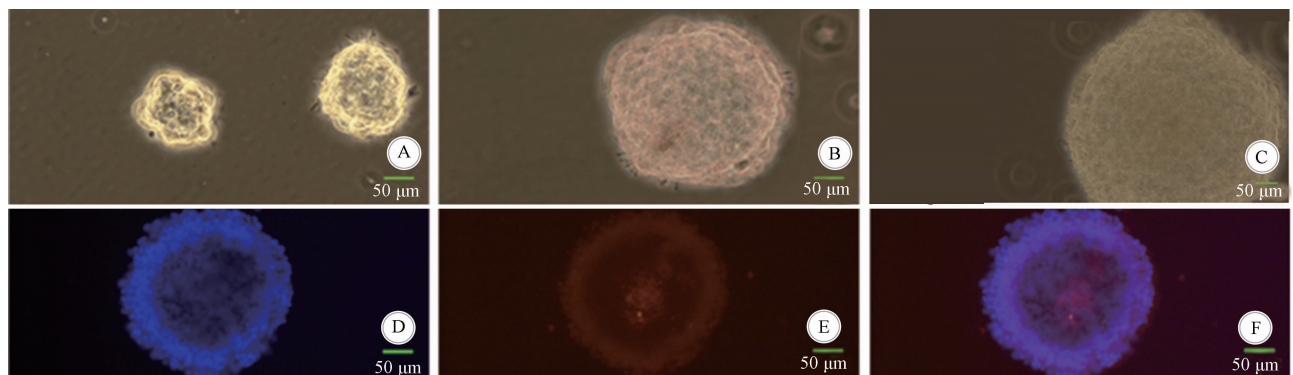


图 2 PEG-PLGA 纳米微球载 BDNF 基因的体外释放率

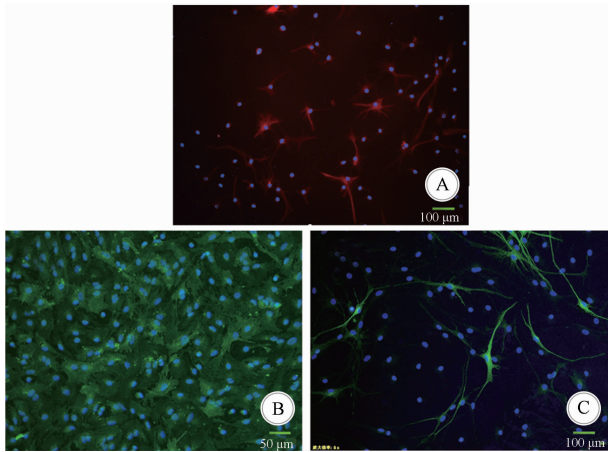


A: 培养 2 d 时的神经球形态; B: 培养 4 d 时神经球形态; C: 培养 6 d 时的神经球形态; D: DAPI 抗体染色; E: Nestin 抗体染色; F: D 和 E 合成 ($\times 200$)
图 3 培养 NSCs 的形态及免疫荧光染色

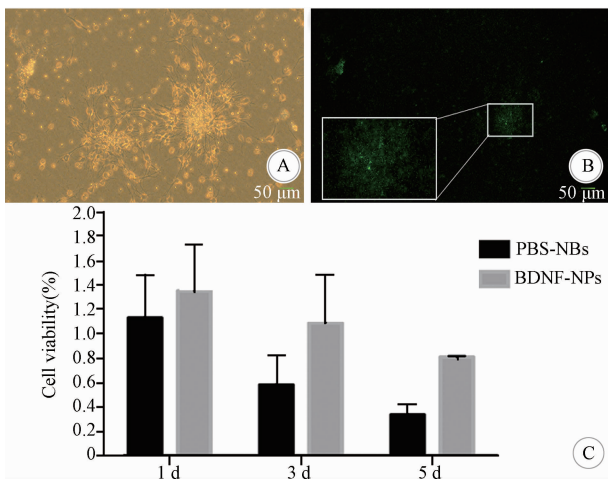
2.5 NSCs 分化为神经元的鉴定 将培养至第 3 代第 4 d 的 NSCs 加入含有 10% 胎牛血清的培养基, 继续培养 7 d 后, 子代 NSCs 可分化为神经元、少突胶质细胞、星形胶质细胞。将分化后的细胞行 TUJ1、MOG、GFAP 免疫荧光染色, 由 NSCs 分化来的神经元、少突胶质细胞及星形胶质细胞有明显的荧光显示 (图 4)。

2.6 PEG-PLGA-BDNF-NPs 对细胞形态和增殖的影响 PEG-PLGA-BDNF-NPs 与 NSCs 共培养 3 d 后, 用倒置显微镜观察见 NSCs 成球生长, 无明显神经

球形态改变及分化现象。荧光显微镜下观察显示, 载质粒 PEG-PLGA 转染组细胞可见绿色荧光, 而空 PEG-PLGA 载体组和空白对照组未见绿色荧光, 表明带有 GFP 基因的质粒成功转入 NSCs, 并能表达绿色荧光蛋白 (图 5A、B)。CCK-8 法检测 BDNF-NPs、PBS-NPs 对细胞增殖的影响, 结果显示 BDNF-NPs 对 NSCs 在第 1 d、3 d 均为促进增殖, 在第 5 d 为抑制增殖; 且相对增殖率大于 80%; PBS-NPs 在第 3 d 为轻度抑制增殖, 在第 5 d 显示为明显抑制增殖 (图 5C)。



A:GFAP 抗体荧光染色阳性,为星形胶质细胞(×200); B:MOG 抗体荧光染色阳性,为少突胶质细胞(×100); C:TUJ1 抗体荧光染色阳性,为神经元(×200)
图 4 NSCs 分化为 3 种细胞系的免疫荧光染色鉴定



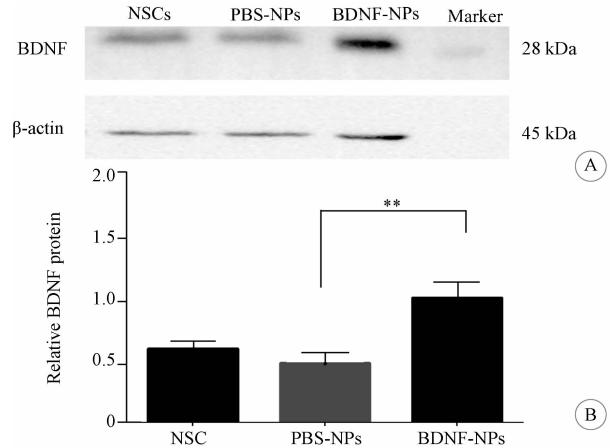
A,B:转染后的 NSCs 表达 GFP(同视野,×100); C:BDNF-NPs 组和 PBS-NPs 组 NSCs 的增殖活力
图 5 转染 NSCs 的 GFP 表达及增殖活力

2.7 转染 NSCs 的 BDNF 蛋白表达 Western-Blot 检测结果显示,载 BDNF 基因 PEG-PLGA-NPs 共培养组 NSCs 在 28 kDa 处可见一清晰条带,灰度值明显高于空 PEG-PLGA 载体组和空白对照组 ($P < 0.01$)。表明 BDNF 基因片段成功转染入 NSCs,并能表达具有生物活性的 BDNF 蛋白。见图 6。

2.8 转染后 NSCs 的 BDNF mRNA 表达 RT-PCR 检测结果显示,载质粒 PEG-PLGA 转染组细胞的 BDNF mRNA 表达水平明显高于空白对照组和空 PEG-PLGA 载体组 ($P < 0.05$)。表明在转染细胞中有外源性 BDNF mRNA 表达。见图 7。

3 讨论

近年来研究证明 NSCs 具有穿血-脑屏障能力和趋向迁移至病理部位的潜能^[7],可以在作为种子细胞进行细胞移植治疗的同时,作为载体运送基因药



A:Western-Blot 检测 BDNF 蛋白表达; B:3 组细胞的 BDNF 蛋白表达水平比较 (* *BDNF-NPs 组与 PBS-NPs 组比较 $P < 0.01$)
图 6 3 组细胞的 BDNF 蛋白表达水平比较

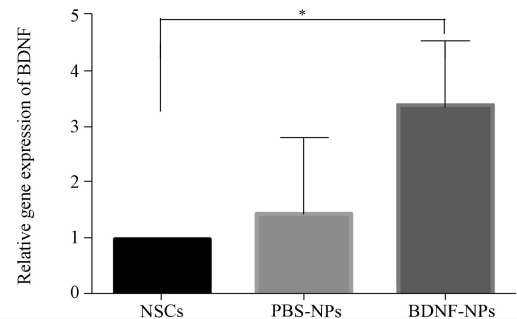


图 7 3 组细胞 BDNF mRNA 表达水平的比较 (*BDNF-NPs 组与空白对照组比较 $P = 0.044$)

物发挥基因治疗的作用。而目前对 NSCs 的基因载体转运系统的研究重点从病毒载体系统转移到了非病毒载体系统^[8]。其中研究最多的为脂质体^[9],但是脂质体对 NSCs 的基因转移效率不高,性质不稳定、容易被细胞内外的水解酶消化,成本较高;并具有一定的细胞毒性,限制了其应用^[10]。

纳米颗粒基因转运体作为近年发展起来的一种新型非病毒基因转载体,受到了越来越多研究者的重视。PLGA 作为可生物降解的生物材料之一,由于其可控地缓慢释放,效果确切,无毒性、无致敏性、无致畸致癌作用及相对廉价被广泛采用^[11-13]。PLGA 纳米基因由于粒径小,通过胞吞方式进入细胞,不需要转染试剂,其自身具有转染能力;且利用 PLGA 纳米颗粒转染外源性 NSCs 能发展更多的功能选项,如多种基因同时表达标记等;并有进一步活化内源性 NSCs 的潜能;是非常理想的转染材料^[14-17]。PEG-PLGA 与传统的 PLGA 相比改善了亲水性和隐身特性^[18],具有低疏水性的药物成分(API),能被有效地包封在 PEG-PLGA 纳米颗粒中^[19]。

BDNF 主要由神经元产生,在动物模型上的应用表明,其能够防止神经元萎缩、促进轴突生长及促

进神经元间新突触形成和神经通路的再生,并抑制神经元凋亡^[20];在中枢神经系统受损伤后可以通过发挥神经保护作用、增强神经可塑性、促进神经再生来修复神经组织^[21]。

本研究首先采用复乳-溶剂挥发法^[22]制备纳米微球。微球对 NSCs 形态和增殖影响实验显示,载 BDNF 纳米微球对 NSCs 的干性无明显影响,实验浓度 BDNF 纳米微球仅在第 5 d 见细胞相对增值率有所下降,但仍大于 80%。通过在生长旺盛的 NSCs 中加入装载有 BDNF 基因质粒的纳米微球转染 BDNF 基因,在荧光显微镜下观察显示,载质粒 PEG-PLGA 转染组细胞可见绿色荧光,而空 PLGA 载体组和空白对照组未见绿色荧光。结果表明,目的基因质粒成功转入 NSCs,能表达绿色荧光蛋白。通过 RT-PCR、Western-Blot 检测方法证实,转染入 NSCs 的 BDNF 基因能够大量表达具有生物活性的 BDNF 蛋白。

综上所述,本研究成功提取并培养了大鼠 NSCs,制备出安全经济的 PEG-PLGA-BDNF 纳米基因颗粒;并首次构建了装载 PEG-PLGA-BDNF-NPs 的,能表达具有神经修复功能的 BDNF 的外源性 NSCs 系。此结果为以后开展装载 BDNF 的 PEG-PLGA 纳米微球转染的 NSCs 应用于神经损伤性疾病治疗,如缺血性脑卒中的基因治疗的研究奠定了基础;并为进一步应用外源性 NSCs 运载基因质粒转染复合体至受损神经组织处释放后,激活关键性内源性 NSCs 的研究提供了基础实验数据。

[参 考 文 献]

- [1] Imitola J, Raddassi K, Park KI, *et al.* Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1 α /CXC chemokine receptor 4 pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101:18117.
- [2] Cheng Y, Zhang J, Deng L, *et al.* Intravenously delivered neural stem cells migrate into ischemic brain, differentiate and improve functional recovery after transient ischemic stroke in adult rats [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8:2928.
- [3] Chang DJ, Lee N, Choi C, *et al.* Therapeutic effect of BDNF-overexpressing human neural stem cells (HBI. F3. BDNF) in a rodent model of middle cerebral artery occlusion [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22:1441.
- [4] Doepfner TR, Ewert TA, Toenges LA, *et al.* Transduction of neural precursor cells with TAT-Heat shock protein 70 chaperone: therapeutic potential against ischemic stroke after intrastriatal and systemic transplantation [J]. *Stem Cells*, 2012, 30:1297.
- [5] Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, *et al.* Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998, 45:41.
- [6] Csoka I, Eros I. Stability of multiple emulsions. 1. Determination of factors influencing multiple drop breakdown [J]. *Int J Pharm*, 1997, 156:00206.
- [7] Muller FJ, Loring JF. Gene therapy: can neural stem cells deliver? [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7:75.
- [8] Wu X, Li Y, Crise B, *et al.* Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration [J]. *Science*, 2003, 300:1749.
- [9] Schott DH, Cureton DK, Whelan SP, *et al.* An antiviral role for the RNA interference machinery in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102:18420.
- [10] Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, *et al.* Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23:1002.
- [11] Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: Entering the mainstream [J]. *Science*, 2004, 303:1818.
- [12] Xiang SD, Selomulya C, Ho J, *et al.* Delivery of DNA vaccines: an overview on the use of biodegradable polymeric and magnetic nanoparticles [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2010, 2:205.
- [13] Kumari AK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 75:1.
- [14] Li X, Tzeng SY, Liu X, *et al.* Nanoparticle-mediated transcriptional modification enhances neuronal differentiation of human neural stem cells following transplantation in rat brain [J]. *Biomaterials*, 2016, 84:157.
- [15] Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, *et al.* The effect of particle design on cellular internalization pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105:11613.
- [16] Wang Z, Zhang R, Wang Z, *et al.* Bioinspired nanocomplex for spatiotemporal imaging of sequential mRNA expression in differentiating neural stem cells [J]. *ACS Nano*, 2014, 8:12386.
- [17] Shah S, Solanki A, Lee KB. Nanotechnology-based approaches for guiding neural regeneration [J]. *Acc Chem Res*, 2016, 49:17.
- [18] Colzani B, Speranza G, Dorati R, *et al.* Design of smart GE11-PLGA/PEG-PLGA blend nanoparticulate platforms for parenteral administration of hydrophilic macromolecular drugs: synthesis, preparation and in vitro/ex vivo characterization [J]. *Int J Pharm*, 2016, 511:1112.
- [19] Almoustafa HA, Alshawsh A, Chik Z. Technical aspects of preparing PEG-PLGA nanoparticles as carrier for chemotherapeutic agents by nanoprecipitation method [J]. *Int J Pharm*, 2017, 533:275.
- [20] Blum R, Kafitz KW, Konnerth A. Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9. [J]. *Nature*, 2002, 419:687.
- [21] Fouda AY, Alhusban A, Ishrat T, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor knockdown blocks the angiogenic and protective effects of angiotensin modulation after experimental stroke [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54:661.
- [22] Eley JG, Mathew P. Preparation and release characteristics of insulin and insulin-like growth factor-one from polymer nanoparticles [J]. *J Microencapsul*, 2007, 24:225.

(收稿 2018-12-09 修回 2018-12-31)