

中耳局部给药治疗内耳疾病的研究进展

李 聪 敖华飞

内耳疾病主要包括梅尼埃病、突发感音神经性耳聋(SSNHL)、自身免疫性内耳疾病(AIED)等,目前治疗包括全身用药和局部用药。由于内耳的解剖结构特点以及膜迷路屏障,全身用药很难到达局部,只能依靠增加全身用药量来增加局部的浓度,但这样会对身体造成较多的不良反应。然而,局部用药具有使药物直接作用到患处,提高局部药物浓度的优点,一直为内耳疾病治疗的研究重点,本文就将中耳局部给药治疗内耳疾病的研究进展进行综述。

将药物灌注到中耳,药物通过前庭窗和蜗窗渗透进入到内耳发挥作用。这种通过中耳局部的给药方式已使用60年之久,目前仍然是内耳疾病常用的局部治疗方法^[1]。随着科技的进步,目前这种局部治疗方式已经超越了最初的简单的中耳灌注。目前研究的中耳给药方式有被动和主动两种给药方式。

一、被动给药方式

结合目前药剂学的新进展,利用具有某种特殊性质的聚合物作为药物载体,将药物以特定形式分散在聚合物中,利用体内的局部环境条件(如:温度,pH值等)达到释放药物的目的。

1. 可生物降解聚合物:可生物降解聚合物已经成功的应用到许多临床领域中,如置入到晶体中治疗多形性胶质母细胞瘤、子宫内膜异位症、青光眼等。可生物降解聚合物早期应用是原于聚乳酸-乙醇酸共聚物,这种聚合物也已被应用到治疗内耳疾病。

作为快-慢载药基质的硅氧烷组成的药物释放聚合物是目前研究治疗内耳疾病(如耳鸣)的一种可持续性的释放药物结构。相关研究显示,用含倍氯米松的可生物降解聚合物治疗突发性耳聋的豚鼠模型,将豚鼠的中耳充满该聚合物,发现需28天左右的时间药物释放完毕,释放药物的速度大约在15~50 $\mu\text{g}/\text{d}$ 之间^[2]。通过检测给药后的ABR阈值、实验室检查及组织学检查结果评估豚鼠听力水平。结果

显示:在几乎所有中耳灌注该聚合物的豚鼠中都检测到倍氯米松的存在,表明利用可生物降解聚合物作为载体的给药释放药物是完全的。同时与对照组相比,实验组豚鼠在3000~12000Hz的频率的范围内,听力有3~12dBHL的提高。

以可生物降解聚合物作为载体的给药方式是否是一种有效的释药方式,不同的实验结果不同。一项研究表明,将以可生物降解聚合物明胶海绵为载体的庆大霉素灌注到梅尼埃患者的中耳内,改善了患者的眩晕、耳鸣的症状达到了显著的疗效($P < 0.05$)^[3]。而另一项研究表明,同样应用以可生物降解聚合物明胶海绵为载体的药物,实验结果却显示其在逆转豚鼠的听力损失和促进螺旋神经节细胞生长方面未有改善^[4]。事实上大多实验已经证明聚合物的药物释放一直在进行,但以明胶海绵为载体治疗突发性耳聋的豚鼠模型时,螺旋神经节细胞的生长并没有改变。但另一项研究却表明,用褐藻酸聚合物代替明胶海绵,给药耳的螺旋神经节细胞的生长得到维持^[5]。这表明,聚合物的药物动力学和局部药物浓度的维持取决于特定的聚合物给药载体及其降解特性。

2. 水凝胶基质:由于具有环境敏感性的性质,以水凝胶作为载药基质的给药方式药物能够精确定位到具体的组织和器官。具有该特性的水凝胶系列其触发因素是不同的,可以包括化学因素(如pH值、某些离子因素等)以及物理因素(温度、压力等)。具体的触发因素具体量不同时,水凝胶的性质会发生变化,载药的有效释放量也会不同。在已经以可生物降解聚合物作为载药基质治疗内耳疾病的患者中,再给予以水凝胶作为载药基质治疗时,需要特别注意到局部部位的酸碱度值。在如此一项研究中^[6],在成功制造噪声创伤模型后研究通过中耳灌注局部给药方式的疗效。大鼠在受到急性噪声创伤后,应用载有氨基末端激酶(JNK)抑制剂AM-111的透明质酸凝胶。观察结果表明以水凝胶为基质的给药方式为原发创伤提供了重要和快速的恢复方式。这可能是由于水凝胶快速降解的特性,及药物从中耳跨蜗窗快速

作者单位:201900 上海交通大学医学院附属第三人民医院耳鼻喉-头颈外科

通讯作者:敖华飞,电子信箱:david5882004@126.com

运输到耳蜗的鼓阶发挥药效的作用。

噪声导致听力损失 (NIHL) 时为保护耳蜗功能可采用胰岛素样生长因子 (IGF)。在一项研究中将重组人胰岛素样生长因子-1 (rhIGF-1) 加载到可生物降解的水凝胶戊二醛交联蛋白中^[7], 通过中耳灌注给药后, 药物作用到内耳中。通过检测噪声暴露后 ABR 阈值及免疫学监控外毛细胞变性情况来反应听力水平。结果显示, 含 rhIGF-1 的可生物降解的水凝胶对外毛细胞有显著性保护作用。

在另一项研究中使用相同的可生物降解的水凝胶载体, 应用脑源性神经营养因子 (BDNF), 评估 BDNF 对听觉神经元是否具有保护作用^[8]。将含 BDNF 的水凝胶连续中耳灌注 7 天, 后行 ELISA 分析评估。结果表明: 相对于对照组, 水凝胶组豚鼠的耳蜗外淋巴内有高浓度的 BDNF。即以水凝胶为基质的载药具有较高的药物释放度, 药物能较容易的通过蜗窗进入耳蜗的鼓阶, 达到局部治疗内耳疾病的作用。

3. 纳米颗粒: 以纳米颗粒形式经中耳灌注给药后药物作用到内耳, 这是一种可持续的、可控的耳蜗给药方式, 目前已经成为一种有前景的新型给药方式。根据相应药理学及药代动力学, 纳米颗粒可以与可生物降解或者可生物溶解材料相结合。在一项研究中, Tamura 等^[9]在豚鼠模型中通过可追踪的荧光染料比较封闭在含人纤溶酶原激活剂 (PLGA) 的纳米颗粒中的罗丹红 B 和未封闭的罗丹红 B 分子。其中纳米颗粒直径约 150nm, 应用乳酸: 乙醇酸 = 50: 50 的比例将罗丹红封闭在颗粒中。将两种药物分别经中耳灌注给药, 通过跟踪计算荧光颗粒来评估比较。结果显示: 纳米颗粒组豚鼠的耳蜗内还有高水平的罗丹红, 而未封闭组没有检测到罗丹红的存在。

Praetorius 等将纳米颗粒替代病毒作为载体治疗内耳疾病, 显示具有明显的疗效, 但更加值得关注的是其携带药物的安全性, 以及具有对特定细胞和组织的较精确的定位特性。在另一模型中, Praetorius 将含标记上荧光染料的二氧化硅的纳米颗粒经中耳灌注到大鼠的耳蜗内。其中的硅颗粒的直径约 20nm, 给药后通过检测免疫组化和观察组织学结构进行评估, 并时常检测 ABR 值以确保听觉阈值未发生改变。观察结果是实验者在逆向轴突运输中发现的, 通过观察内耳毛细胞、前庭内细胞及螺旋神经细胞, 未发现细胞毒性的证据, 即纳米颗粒的给药方式具有一定的安全性。

在另一项研究中, 含 PLGA 的纳米颗粒就是将超

顺磁性氧化铁纳米颗粒均一分散在 PLGA 基质中, 并将其注射到豚鼠的中耳内^[11]。纳米颗粒直径的范围在 100 ~ 300nm 之间, 而嵌入材料的直径在 5 ~ 15nm 之间。实验观察显示: 含 PLGA 的纳米颗粒经中耳灌注后 40min, 无论有无磁场暴露, 在耳蜗内、外淋巴液中、毛细胞、螺旋神经节细胞等都能检测到磁性氧化铁、PLGA。众所周知, 低分子质量的化合物如庆大霉素可较容易的通过紧密连接或细胞内途径穿过蜗窗进入内耳^[12]。通过对含 PLGA 的纳米颗粒的相关研究, 可利用其特性建立长期的药物释放模型, 使药物经蜗窗进入内耳, 达到治疗内耳疾病的作用。

4. 脂质体: 脂质体代表另一种以粒子为基础的内耳给药形式, 这种方式已经在基因治疗中被广泛研究。阳离子脂质体能够结合无数细胞类型的 DNA 转染体, 可直接通过微导管进入耳蜗内。在相关研究中, Wareing 等^[13]报道在转基因表达 14 天后观察到毒性或炎症反应缺失。将含 DNA 复合物的阳离子脂质体通过中耳灌注或用渗透泵的给药形式作用到豚鼠的内耳后, 对部分组织进行免疫组化和 PCR 分析。从耳蜗基底到顶端, 化验结果显示螺旋韧带中浓度最高。另外比较微导管和渗透泵的两种给药方式, 观察 2 周转基因的持续表达, 结果显示渗透泵的给药方式与局部创伤和炎症反应相关联。这表明以脂质体形式的给药是一种可行的给药形式, 但关键是以脂质体为载体的药物作用到耳蜗给药方法的选择。

二、主动给药方式

提前将特殊装置置入到患者的耳内, 利用此装置的可方便的多次、持续、大剂量的给药, 达到药物持续作用的目的。

早在 1950 年就探索利用此种给药方式用链霉素治疗梅尼埃患者的眩晕症, 结果显示: 患者的前庭功能减退, 耳蜗功能丧失, 即证明了链霉素具有耳毒性^[14]。虽然早些时候在此方面有广泛的研究, 如在地塞米松治疗耳鸣方面, 但是并没有取得突破性进展, 直到 20 世纪 90 年代后^[15]。此种方式是目前梅尼埃病患者眩晕症最常用的一线治疗方式^[16]。除了针对眩晕症外, 目前还利用其治疗 SSNHL、AIED、耳鸣及梅尼埃病伴有听力损失等。运用到此种给药方式的药物也是多种的, 如氨基糖苷类抗生素、蛋白酶抑制剂、抗氧化剂、神经营养因子等^[17]。主动给药的具体方法是不同的, 目前在此方面的研究发展主要关注两点: ①药物经蜗窗的直接转运能力; ②能够多次、持续、大剂量地给药。具体中耳内的药物浓度和滞留

时间将受到给药浓度、残留药物浓度、及咽鼓管的通畅度的影响。目前具体的主动给药方式包括:

1. 圆窗微导管:圆窗微导管有 μ -CathTM 和 e-CathTM 两种类型,先后分别由 IntraEAR 和 Durect 发明。随后它们在动物和临床实验中开始被研究应用。 μ -CathTM 有两个腔,一个用于输药,另一个用于药物的消除; e -CathTM 比 μ -CathTM 多一腔,用于监视耳信号。微导管有直径分别为 1.5、2.0、2.5mm 的不同容量的型号。导管尖端可压缩是专门用来固定圆窗的位置。置入圆窗微导管手术需要全身麻醉,同时还需要一个通过圆窗暴露的鼓室外耳道皮瓣。目前置入手术已经取得很大进展,使用经鼓膜或中耳腔的内镜可以减少并发症的发生。

相关的治疗研究很多,其结果也各不相同。例如,Seidman 等初步报道了 9 位患者应用此种给药方式治疗各自内耳疾病,包括庆大霉素治疗眩晕、甲强龙治疗 SSNHL、罂粟碱和甲强龙治疗轻度的内耳炎、硫酸镁和谷氨酸治疗耳鸣。结果显示大多数病人的眩晕、听力水平、耳鸣等症状有所改善。

2. 西尔弗斯坦微芯 (Silverstein microwick):微芯首次应用是在用庆大霉素治疗梅尼埃患者的眩晕症时,以聚醋酸乙烯酯微芯(直径为 1mm,长为 9mm)为载体携带药物,直接经中耳作用到蜗窗。微芯通过嵌入到通风管中穿过鼓膜或者经鼓膜造口术进入到中耳,这个过程只需要局麻,不需要进手术室进行操作,操作要比置入圆窗微导管简单。患者平时可自行给药,并可通过检测听力和前庭功能来判断滴定药物的适当量和治疗终止时间。常用的治疗方案需要每天 3 次,每次 5~10mg/ml 的庆大霉素给药 15min,疗程为 1~3 周。此种微芯也可携带地塞米松用于治疗 SSNHL、AIED。虽然达到耳蜗内的具体药物浓度还没有统一的定量标准,但是治疗效果已经被认可。目前,大量动物实验利用此微芯载药,旨在研究药物代谢动力学。

3. Alzet 渗透泵:可置入式的 Alzet 渗透泵能够提供可持续的个体化给药方式。这种泵有 100 μ l、200 μ l、2ml 不同容量的型号,流动率在 0.11~10.00 μ l/h 的范围内。该泵可以配置在微导管或其他输液套管中,置入动物体内。这种泵能够提供持续的药物释放,时间可在 1 天~6 周不等。药物经具有半渗透作用的外膜可向周围组织渗透,进而发挥作用。目前在动物的研究阶段,相关参量还需要进一步深入研究。

被动与主动给药方式均克服了传统给药方式的缺陷。在保持局部有效药物浓度的前提下,被动给药减少了给药次数,未破坏局部解剖结构;主动给药改变了给药途径,易于操作,减少了对局部的反复多次的损伤。但是被动给药方式的局部药物浓度不易控制,而主动给药方式的装置需要外科手术置入,对局部解剖结构影响较大。

总之通过中耳局部给药治疗内耳疾病有了很大的进步和发展,但是蜗窗是一物理屏障,需要较大的药物浓度梯度才能进入内耳;由于个体间蜗窗厚度的差异使得每个患者的限制剂量是不同的,无法获得特定的药物给药参数。虽然面临着不可避免的一些难题,但是现代各学科发展突飞猛进,科技成果不断涌现,会进一步促进内耳疾病治疗方面的进展,使治疗更满意,效果更满意。

参考文献

- Schuknecht HF. Ablation therapy for the relief of meniere's disease [J]. Laryngoscope, 1956, 66(7): 859-870
- Arnold W, Senn P, Hennig M, *et al.* Novel slow- and fast-type drug release round-window microimplants for local drug application to the cochlea: an experimental study in guinea pigs [J]. Audiol Neurotol, 2005, 10(1): 53-63
- Richardson RT, Noushi F, O'Leary S. Inner ear therapy for neural preservation [J]. Audiol. Neurotol, 2006, 11(6): 343-356
- Pasic T, EW R. Rapid changes in cochlear nucleus cell size following blockage of auditory nerve electrical activity in gerbils [J]. Comp Neurol, 1989, 283(4): 474-480
- Noushi F, Richardson RT, Hardman J, *et al.* Delivery of neurotrophin-3 to the cochlea using alginate beads [J]. Otol. Neurotol, 2005, 26(3): 528-533
- Coleman JKM, Littlesunday C, Jackson R, *et al.* Am-111 protects against permanent hearing loss from impulse noise trauma [J]. Hear Res, 2007, 226(1-2): 70-78
- Iwai K, Nakagawa T, Endo T, *et al.* Cochlear protection by local insulin-like growth factor-1 application using biodegradable hydrogel [J]. Laryngoscope, 2006, 116(4): 529-533
- Endo T, Nakagawa T, Kita T, *et al.* Novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel [J]. Laryngoscope, 2005, 115(11): 2016-2020
- Tamura T, Kita T, Nakagawa T, *et al.* Drug delivery to the cochlea using plga nanoparticles [J]. Laryngoscope, 2005, 115(11): 2000-2005
- Praetorius M, Brunner C, Lehnert B, *et al.* Transsynaptic delivery of nanoparticles to the central auditory nervous system [J]. Acta Otolaryngol, 2007, 127(5): 486-490
- Ge X, Jackson RL, Liu J, *et al.* Distribution of plga nanoparticles in chinchilla cochleae [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2007, 137(4): 619-623

- 12 Juhn S, Hamaguchi Y, Goycoolea M. Review of round window membrane permeability [J]. Acta Otolaryngol Suppl, 1989, 457: 43-48
- 13 Wareing M, Mhatre AN, Pettis R, *et al.* Cationic liposome mediated transgene expression in the guinea pig cochlea [J]. Hear Res, 1999, 128(1-2): 61-69
- 14 Schuknecht HF. Ablation therapy in the management of meniere's disease [J]. Acta Otolaryngol. Suppl, 1957, 132: 3-42
- 15 Sakata E, Ito Y, Itoh A. Clinical experiences of steroid targeting therapy to inner ear for control of tinnitus [J]. Int Tinnitus, 1997, 3(2):

117-121

- 16 Jackson LE, Silverstein H. Chemical perfusion of the inner ear [J]. Otolaryngol Clin North Am, 2002, 35(3): 639-653
- 17 Hong SM, Park CH, Lee JH. Hearing outcomes of daily intratympanic dexamethasone alone as a primary treatment modality for ISSHL [J]. Otolaryngol Head Neck Surg. 2009; 141(5): 579-583

(收稿: 2012-06-13)

(修回: 2012-07-05)

维甲酸在内耳发育中的作用及其机制

管 明 徐娅苹

感音神经性耳聋患者在临床上多见, 约占总人口的 10%。主要是因为衰老、噪声、耳毒性药物、外伤、感染、肿瘤、遗传、免疫等体内外因素所致, 且哺乳动物耳蜗毛细胞破坏后再生能力有限, 常引起不可逆性的听力下降, 治疗困难。随着内耳发育机制研究的深入和干细胞组织工程技术的逐渐成熟, 科学家们发现许多因子, 如 EGF、FGF、TGF- α 、甲状腺素等在内耳毛细胞、支持细胞的分化、成熟、再生中起作用, 试图通过加入这些活性因子促进毛细胞再生, 或诱导干细胞分化为毛细胞来治疗感音神经性耳聋。维甲酸(RA)作为维生素 A 的活性衍生物, 在许多器官的发育中必不可少。同样, RA 在胚胎期内耳发育和出生后内耳功能维持中起关键作用。本文就维甲酸合成酶、维甲酸分解酶, 维甲酸受体在内耳中的特异性表达及维甲酸在内耳发育中的作用及其机制做综述。

一、维甲酸的代谢及维甲酸合成酶和分解酶在内耳的分布

1. 维甲酸的代谢: 在细胞内, 维生素 A 与维生素 A 结合蛋白(CRBP)紧密结合后, 首先, 在酒精脱氢酶家族(ADH 家族)的作用下, 维生素 A 氧化成视黄醛; 接着, 视黄醛在视黄醛脱氢酶(RALDHs, 又称 RA 合成酶, 包括 RALDH1、RALDH2、RALDH₃、RALDH4)的作用下, 视黄醛氧化成全反式维甲酸(ATRA)和 9-cis 维甲酸(9-cisRA)^[1]。而在细胞色素 P450 超家族成员 CYP26(又称 RA 分解酶: 包括 CYP26A1、CYP26B1、CYP26C1)的作用下, RA 被代谢分解。RA

在内耳的特定时间、特定部位的表达是通过 RALDHs 和 CYP26 来调控的, 所以了解 RALDHs 和 CYP26 在内耳的表达有助于我们理解 RA 在内耳发育过程中的作用。

2. RA 合成酶在内耳的表达: RALDH1、RALDH2、RALDH3 存在于胚胎第 9.5~10 天(E9.5~10)的听泡中。在 E10.5, RALDH1、2、3 表达局限于听泡上皮。其中 RALDH1 表达范围最广, 表达在内淋巴管原基和听泡上皮腹外侧; RALDH2 仅表达于听泡上皮侧面; RALDH3 表达于听泡上皮腹侧和中间区。在所有 RALDH 中, RALDH2 在此期表达量最高。在 E12.5, RALDH1、2、3 存在于将发育为前庭、耳蜗上皮的听泡上皮区, 另外 RALDH1、2 还存在于内淋巴管上皮中。在 E14.5, RALDH1 存在于半规管上皮、内淋巴管、壶腹嵴; RALDH2 存在于前庭邻近壶腹嵴的上皮区及耳蜗非感觉上皮区。在 E18.5, RALDH1 局限于前庭球囊、椭圆囊和嵴的一些区域及耳蜗柯替氏器。RALDH2 局限于耳蜗血管纹、前庭膜及前庭邻近壶腹嵴的上皮区。而在 E14.5、E18.5, RALDH3 均表达于半规管、壶腹嵴、球囊、椭圆囊的感觉上皮区及耳蜗螺旋神经节^[2]。

3. RA 分解酶在内耳的表达: 在 E9.5, CYP26A1 已存在于听泡上皮侧面和腹侧, 及其周围间质。在 E10.5, CYP26A1 局限于听泡上皮的腹侧, 但在周围间质腹侧、中间区、侧面表达丰富; CYP26B1 表达局限于听泡上皮侧面和中间区; CYP26C1 存在于听泡上皮腹侧和间质区。在 E12.5, CYP26A1 表达在听泡上皮腹侧、侧面, 及围绕后半规管的间质区; CYP26B1 表达在听泡间质的腹侧及围绕水平半规管的间质区,

作者单位: 310006 杭州市第一人民医院耳鼻咽喉科(管明); 浙江大学医学院附属第二医院耳鼻咽喉科(徐娅苹)