

尤丽丽,付文亮,裴洁,等. Penetratin 复合神经生长因子治疗中度创伤性颅脑损伤小鼠 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33 (8): 114-121.

You LL, Fu WL, Pei J, et al. Treatment of moderate traumatic brain injury in mice by coadministration of nerve growth factor and penetratin [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 114-121.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.08.015

Penetratin 复合神经生长因子治疗中度创伤性 颅脑损伤小鼠

尤丽丽^{1,2}, 付文亮², 裴洁^{1,2}, 俞昶乐², 邢微微², 蔡贵玲², 张超^{2*}, 徐东刚^{1,2*}

(1.安徽医科大学基础医学院,合肥 230032;2.军事科学院军事医学研究院军事认知与脑科学研究所,北京 100850)

【摘要】目的 探讨 penetratin 介导神经生长因子 (NGF) 对中度创伤性颅脑损伤 (TBI) 小鼠的治疗作用。

方法 首先在细胞水平利用细胞免疫荧光法评估不同细胞渗透肽 (CPP) 复合 NGF 蛋白的穿膜效果,明确最佳的复合比例。随后在构建的中度 TBI 小鼠模型上分析给药后各组小鼠的行为学变化;利用 Morris 水迷宫实验检测小鼠的空间记忆功能,转棒实验评估小鼠的协调运动能力。采用免疫组化染色法观察脑组织 GFAP、NeuN 蛋白的表达情况。结果 体外细胞免疫荧光实验结果显示,NGF/penetratin 组细胞内 NGF 蛋白含量显著高于其他组,且在 penetratin 与 NGF 的摩尔比为 20:1 时荧光强度最高。动物实验结果显示,NGF/penetratin 治疗组小鼠的协调运动功能、空间记忆能力以及脑组织内 NeuN 蛋白表达水平均显著高于 TBI 组与 NGF 组小鼠,其脑组织内 GFAP 蛋白表达水平显著低于 TBI 组以及 NGF 组小鼠 ($P<0.05$)。结论 Penetratin 作为一种药物递送载体可促进 NGF 通过血脑屏障 (BBB) 进入受损脑组织内,对中度 TBI 小鼠具有较好的治疗作用。

【关键词】细胞渗透肽;penetratin;神经生长因子;中度创伤性颅脑损伤;血脑屏障

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2023) 08-0114-08

Treatment of moderate traumatic brain injury in mice by coadministration of nerve growth factor and penetratin

YOU Lili^{1,2}, FU Wenliang², PEI Jie^{1,2}, YU Changle², XING Weiwei², CAI Guiling², ZHANG Chao^{2*}, XU Donggang^{1,2*}

(1. School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032, China.

2. Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Academy of Military Medical Sciences,
Academy of Military Sciences, Beijing 100850)

【Abstract】Objective To evaluate the therapeutic potential of nerve growth factor (NGF) with penetratin on

moderate traumatic brain injury (TBI). Methods The effect of various cell-penetrating peptides combined with NGF on membrane penetration was analyzed by fluorescence immunocytochemistry in cells *in vitro*, and the optimal molar ratio was selected. Subsequently, rotarod performance and Morris water maze tests were performed to analyze behavioral changes of the moderate TBI mouse model in each group after administration, including coordinative motor ability and the spatial

【基金项目】军队后勤科研项目。

【作者简介】尤丽丽 (1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:病理学与病理生理学。E-mail:1826738635@qq.com

【通信作者】徐东刚 (1965—),男,研究员,博士生导师,研究方向:脑损伤诊治及认知增强关键技术。E-mail:xudg@bmi.an.cn

张超 (1983—),男,助理研究员,研究方向:脑损伤诊治及认知增强关键技术。E-mail:zhangchao1@bmi.an.cn

* 共同通信作者

memory function. GFAP and NeuN protein expression was observed by immunohistochemistry. **Results** Fluorescence immunocytochemistry showed that the content of NGF protein in cells of the NGF/penetratin group was significantly higher than that in the other groups, and the fluorescence intensity was the highest at a molar ratio of 20 : 1 (penetratin:NGF). Behavioral test showed that the coordination motor function and spatial memory ability of mice in the NGF/penetratin group were significantly better than those in TBI and NGF groups. Additionally, NeuN protein expression in brain tissue of mice in the NGF/penetratin group were also significantly higher than that in TBI and NGF groups, while GFAP protein expression in brain tissue was significantly lower than that in the two groups ($P<0.05$). **Conclusions** Penetratin as a drug delivery carrier promotes NGF to cross the blood-brain barrier and enter damaged brain tissue, which has a good therapeutic effect on moderate TBI mice.

[Keywords] cell-penetrating peptide; penetratin; nerve growth factor; moderate traumatic brain injury; blood-brain barrier

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

创伤性颅脑损伤(traumatic brain injury, TBI)导致神经功能障碍,严重危害患者健康,且受其困扰的患者呈现增长的趋势^[1]。TBI 损伤原因包括机动车碰撞、运动相关损伤、家庭暴力、军事行动等^[2]。研究显示轻中度 TBI 占比高达 90%,其继发性损伤会导致一些病理产物积累、神经功能障碍以及神经退行性疾病的发生,因此对该疾病的早期干预治疗非常重要^[3]。目前尚缺乏对于中度 TBI 的高效治疗药物,一系列临床前治疗药物主要包括自由基清除剂、抗炎剂、抗凋亡剂、神经营养因子、乙酰胆碱酶抑制剂等^[4-5]。

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是由两条氨基酸单链通过非共价键形成的二聚体蛋白,包含三条反向平行 β 链和三个交叉的二硫键,在很多临床试验中均展现了较好的应用潜力^[6]。血脑屏障(blood brain barrier, BBB)阻碍了许多外源性物质向脑组织内渗透^[7-8],也制约了 NGF 的临床应用。目前许多研究致力于通过 BBB 向脑内递送药物的技术研究,包括细胞介导的递送^[9-10]、CPP 介导的递送^[11]、特异性受体介导递送^[12]、纳米材料介导递送^[13]等不同技术类型。其中 CPP 对于促进多肽药物透过 BBB 具有独特的优势^[14],已被应用于脑胶质瘤、脑缺血、脑中风等多种疾病^[15-16]。CPP 作为药物递送载体具有合成简单、生物相容性佳、组织渗透性高以及与其他给药系统兼容等多种优势^[17]。CPP 一般通过共价键结合药物并将其递送入胞,然而研究表明将一些 CPP 可以通过与药物非共价复合实现药物的细胞摄取^[18],这种结合方式具有简单易操作,不改变药物的生物活性等优势^[19]。因此本研究旨在选择能有效地促进 NGF 蛋白穿过细胞膜的 CPP,观察其与 NGF 药物复合给药后对中度 TBI 模型小鼠的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

100 只雄性 SPF 级 ICR 品系小鼠,体重 23~28 g,6~8 周,来源于北京华阜康生物科技有限公司[SCXK(京)2019-0008]。所有小鼠饲养在军事科学院军事医学研究院 SPF 级动物饲养中心[SYXK(军)2017-0023],饲养环境 20~24℃,相对湿度 50%~60%。动物实验遵循军事科学院军事医学研究院实验动物伦理委员会管理规定(IACUC-DWZX-2023-P520),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 细胞

小鼠脑微血管内皮细胞 bEND.3 细胞系源于 ATCC 库(货号:CL-0598)。

1.2 主要试剂与仪器

CPP 序列均由上海楚肽生物科技有限公司合成;鼠神经生长因子(批号:S20060023)购自舒泰神北京生物制药股份有限公司;封闭用山羊血清原液购自北京索莱宝科技有限公司(货号:SL038);NGF 兔单克隆抗体(货号:ab52918)、NeuN 兔单克隆抗体(货号:ab177487)、山羊抗兔 Alexa Fluor® 488 荧光二抗(货号:ab150077)均购自美国 Abcam 公司;GFAP 兔单克隆抗体(货号:#80788)购自美国 CST 公司;Hoechst 核染料(货号:C1028)购自上海碧云天生物技术有限公司。

二氧化碳培养箱(货号:320)购于阿什威尔赛默飞世尔科技有限公司;超净工作台(型号:DL-CJ-1NDII)购自北京东联哈尔仪器制造有限公司;倒置荧光显微镜(型号:ECLIPSE Ts2)购自上海尼康精机有限公司;电子控制皮层撞击装置(货号:68099

II)、立体定位仪(货号:68528)、小鼠专用颅钻(货号:78001)均购自深圳瑞沃德生命科技有限公司;水迷宫设备(型号:XR-XM101)、转棒设备(型号:XR-YLS-4C)均购自上海欣软信息技术公司。

1.3 实验方法

1.3.1 体外细胞培养

本研究中的 bEND.3 细胞培养在 T25 细胞培养瓶内,用 DMEM 培养基(含有 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素)。在 37℃、95%相对湿度和 5%CO₂ 的培养箱中培养。当细胞密度达到 80%以上时,进行细胞传代培养并以所需的接种密度转移到实验孔板中。

1.3.2 体外细胞免疫荧光实验

将 NGF 溶解在 PBS 缓冲液(pH=7.4)中,然后与特定数量的 CPP 溶液混合,37℃孵育 30 min。随后将 CPP/NGF 混合物与细胞共孵育 4 h。依据包含的不同 CPP 设立 NGF 组、NGF/pep-1 组、NGF/penetratin 组。孵育后用 PBS 洗涤 3 次,随后用 4%多聚甲醛固定 40 min,洗涤后加入 0.3% Triton-100 通透 15 min,然后用 PBS 洗涤 3 次加入山羊血清封闭 1 h。弃封闭液后加入 NGF 兔单克隆抗体(工作浓度 1:300),于 4℃中避光过夜孵育(16~18 h)。次日加入山羊抗兔 Alexa Fluor® 488 荧光二抗(工作浓度 1:500),37℃避光孵育 1 h。洗涤后加入核染料,37℃避光孵育 10 min,封片后于倒置荧光显微镜下观察 NGF 蛋白在细胞内的表达情况。通过设置不同的 CPP 与 NGF 的复合比例,然后进行细胞免疫荧光实验,用 Image J 软件依次对于图像的荧光强度进行分析。

1.3.3 中度 TBI 小鼠模型构建及评价

参考文献采用控制皮层撞击法建立 TBI 模型^[20]。取实验小鼠称重,腹腔注射 1%戊巴比妥钠麻醉。待小鼠麻醉后,刮去头部的毛,固定在立体定位仪上,用红霉素涂抹小鼠眼睛避免冷光对其造成伤害;将头部皮肤消毒后沿矢状缝切开,棉签沾上双氧水推开骨膜。用电子控制皮层撞击装置对小鼠右侧顶叶皮层进行击打;打击后止血并缝合头皮,用碘伏或抗生素擦拭伤口避免感染。假手术组小鼠只开骨窗不给予打击,其余处理同 TBI 组小鼠。TBI 术后 24 h 采用改良神经损伤严重缺损评分表(modified neurological severity score, mNSS)^[21]评估神经功能缺陷,并采用 HE 染色法观察脑组织损伤情况。

1.3.4 实验分组与各组干预方法

取 15 只假手术处理后小鼠作为 Sham 组。其余小鼠采用控制皮层撞击法建立 TBI 模型,并随机分为:TBI 组、NGF 低剂量组、NGF 高剂量组、NGF/penetratin 低剂量组和 NGF/penetratin 高剂量组。在 TBI 术后 6 h 经过尾静脉给予治疗组药物,在给药前将 penetratin 与 NGF 以 20:1 的摩尔比溶解在 PBS(pH=7.4)中制备 NGF/penetratin 组药物。低剂量治疗组与高剂量治疗组小鼠 NGF 剂量分别为 10 μg/kg、50 μg/kg,TBI 组小鼠则给药同等体积的 PBS,每 2 d 通过尾静脉途径给药 1 次,治疗持续 1 个月。

1.3.5 水迷宫实验检测小鼠空间学习和记忆能力

在 TBI 术后第 8 天进行水迷宫适应性训练,第 9~13 天进行定位训练实验,每天 4 次。在定位训练实验中,将小鼠从面向池壁四个不同象限位点放入池中,并记录从进入水中到发现和站在水下隐藏平台所需的时间和在此期间游行的总距离。小鼠入水后 60 s 内无法找到隐藏平台,则将其轻轻引导至平台,使其在平台上站立 30 s。在第 14 天拆除平台,进行空间记忆能力测试。记录 60 s 内小鼠穿越原平台的次数,小鼠停留在原目标平台象限的时间和路径。

1.3.6 转棒实验检测小鼠运动能力与协调功能

在 TBI 建模前 3 d 将各组实验小鼠按 0~40 r/min 转速训练 3 次,每次 5 min,两次训练之间至少间隔 0.5 h 作为疲劳恢复时间。正式实验时将所有小鼠均按转速 40 r/min 进行测试,记录小鼠在转棒仪上连续行走的时间,测试 3 次取最大值。

1.3.7 免疫组化法检测 GFAP、NeuN 蛋白表达

依据前期给药治疗后行为学检测的结果,选取治疗效果具有明显差异且具代表性脑组织样本进行进一步免疫组化检测分析。分别取 Sham 组、TBI 组、NGF 低剂量组、NGF/penetratin 低剂量组小鼠脑组织后使用 4%多聚甲醛固定后包埋切片,加入一抗后置于 4℃冰箱进行过夜孵育,随后使用 PBS 漂洗 3 次,每次漂洗时间为 3 min,滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体(比例为 1:250),然后在 37℃条件下孵育 20 min;DAB 显色后使用苏木精复染,脱水后采用树胶进行封片。扫描脑片,储存数据,采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件测定 GFAP、NeuN 蛋白表达水平。

1.4 统计学方法

采用软件 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统

计分析。计量资料结果以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,所有实验的样本数量均 $n\geq 3$ 。多组比较采用单因素方差分析,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CPP 介导 NGF 体外穿膜作用

本研究筛选合成了两条 CPP, pep-1 (序列为: Ac-KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-Cys-NH₂) 和 penetratin (序列为: Ac-RQIKIWFQNRRMKWKK-NH₂),其纯度分别为 95.51%、97.79%。将合成后的 CPP 分别与 NGF 共孵育后进行细胞免疫荧光实验。结果表明与 NGF 组相比,加入 CPP 后 bEND.3 细胞对于 NGF 的摄取增加,提示 CPP 可以促进 NGF 进入细胞内(图 1)。

2.2 CPP 不同浓度配比介导 NGF 穿膜作用分析

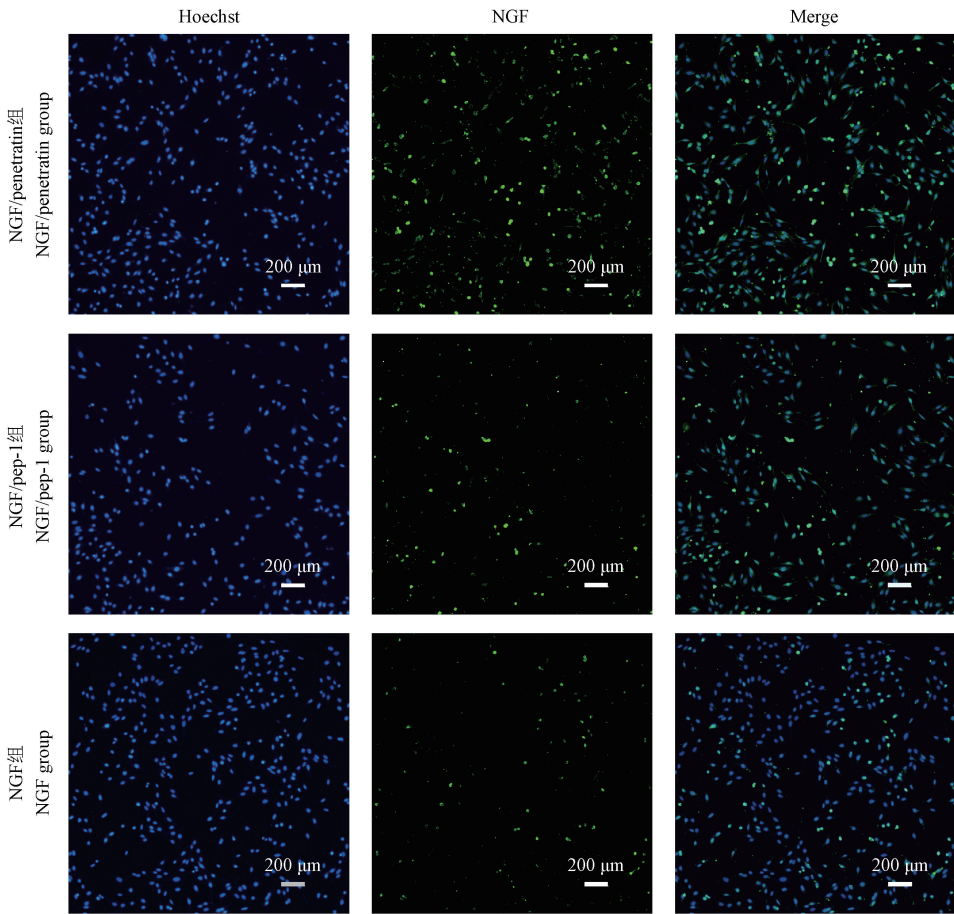
将不同浓度配比 CPP/NGF 复合物分别与细胞

共孵育进行细胞免疫荧光实验。结果显示加入 CPP 以后目的蛋白的荧光强度增加,加入 penetratin 的荧光强度显著高于 pep-1。而且在 penetratin 与 NGF 的摩尔比为 20 : 1 时荧光强度最高(图 2)。

2.3 中度 TBI 小鼠模型建立及评价

按照 1.3.3 的控制皮层撞击方法构建 TBI 小鼠模型。要求实验小鼠能在术后 3 h 内苏醒,恢复运动、进食、饮水等行为表现,且 24 h 内存活。对 TBI 术后 24 h 对小鼠脑组织进行的 HE 染色结果显示(图 3),Sham 组小鼠的皮层、海马及深部脑组织等均完整无损;TBI 组小鼠的皮层和部分海马组织受损,损伤部位周围组织颜色变浅,提示神经元数量明显减少。

分别于打击前和打击后 24 h 对 Sham 组小鼠和 TBI 组小鼠进行 mNSS 测试。测试人员未参与造模和分组过程,以保证测试结果的客观性。评分结果为(9.1±1.6),参考得分评定提示 TBI 后小鼠神经功能受到中等程度损伤,可用于后续实验研究。



注:蓝色荧光标记 bEND.3 细胞核;绿色荧光标记 NGF 抗体蛋白;Merge 为融合通道。

图 1 荧光显微镜观察细胞对 NGF 蛋白的摄取情况($n=3$)

Note. bEND.3 nucleus was labeled with blue fluorescence. Green fluorescence labeled NGF antibody. Merge is the fusion channel.

Figure 1 Observe the uptake of NGF protein by cells with fluorescence microscope

2.4 给药后 Morris 水迷宫测试

Morris 水迷宫实验结果(图 4),在水迷宫训练期的第 1~5 天,随着训练时间的延长,各组小鼠逃逸潜伏期呈缩短趋势。在测试期,TBI 组小鼠通过平台的次数比 Sham 组减少 ($P < 0.05$),NGF/penetratin 组小鼠穿过平台次数显著高于 TBI 组以及 NGF 组小鼠($P < 0.05$);TBI 组与 NGF 组小鼠穿过平台次数无显著差异($P > 0.05$);NGF 高、低剂量组间以及 NGF/penetratin 高、低剂量组间均无显著差异($P > 0.05$)。停留在原目标平台象限的时间与路径的占比,TBI 组小鼠(分别为(14.96 ± 1.84)%、(19.36 ± 2.23)%)与 Sham 组小鼠(分别为(45.10 ± 2.22)%、(40.91 ± 2.15)%)比较均显著降低($P < 0.05$)。NGF/Penetratin 低、高剂量组小鼠在目标象限停留时间占比分别为(36.60 ± 2.03)%、(30.04 ± 1.31)%,均显著高于 TBI 组小鼠;NGF 低、高剂量

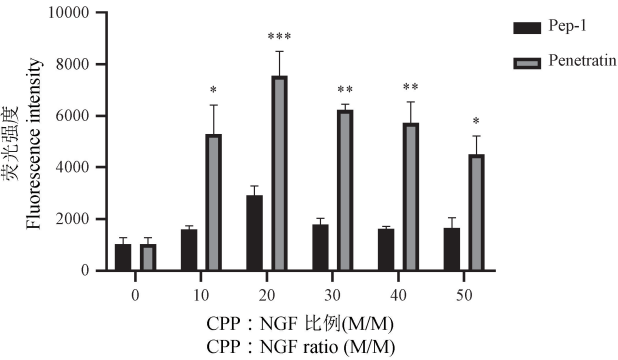
组小鼠在目标象限停留时间占比为(23.29 ± 2.19)%、(17.21 ± 2.13)%,分别显著低于 NGF/penetratin 低、高剂量组小鼠($P < 0.05$)。NGF/penetratin 低、高剂量组小鼠在目标象限停留路径占比分别为(34.50 ± 1.80)%、(29.81 ± 1.17)%,显著高于 TBI 组小鼠;NGF 低、高剂量组小鼠在目标象限路径占比为(23.94 ± 1.46)%、(19.45 ± 2.10)%,分别显著低于 NGF/penetratin 低、高剂量组小鼠($P < 0.05$)。结果提示 TBI 后小鼠空间记忆能力下降,NGF/penetratin 组给药治疗后显著改善了其空间记忆能力,且 NGF/penetratin 组小鼠的空间记忆能力显著优于 NGF 组。

2.5 给药后转棒测试

转棒实验显示,给药组小鼠在转棒上的停留时间均显著长于 TBI 组小鼠。在给药后第 14 天,TBI 组小鼠在转棒上停留时间(229.8 ± 9.7)s 与 Sham 组小鼠比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);NGF/penetratin 低、高剂量组小鼠在转棒上停留时间分别为(286.2 ± 7.4)s、(298.3 ± 1.7)s,高于 TBI 组小鼠;NGF 低、高剂量组小鼠在转棒上停留时间分别为(249.8 ± 7.8)s、(259.5 ± 10.6)s,分别低于 NGF/penetratin 低、高剂量组小鼠($P < 0.05$)(图 5)。结果表明 TBI 后小鼠协调运动能力下降,NGF/penetratin 组给药治疗后显著提高了 TBI 后小鼠的协调运动能力,且疗效优于 NGF 组。

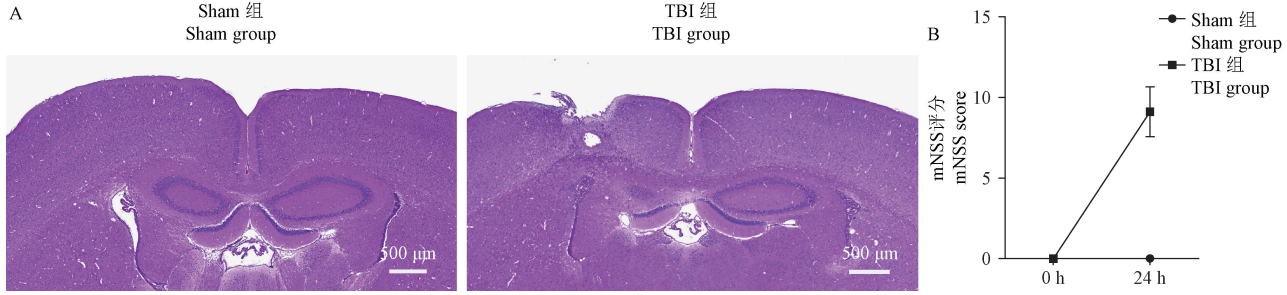
2.6 给药后小鼠 GFAP、NeuN 蛋白表达水平

免疫组化结果(图 6,表 1)显示 TBI 组、NGF 组、NGF/penetratin 组小鼠脑组织病灶周围 GFAP 蛋白表达水平均高于 Sham 组,NeuN 蛋白表达水平均低于 Sham 组($P < 0.05$)。NGF/penetratin 组 GFAP 蛋白表达水平低于 TBI 组与 NGF 组,NeuN 表达水平高于 TBI 组与 NGF 组($P < 0.05$),提示

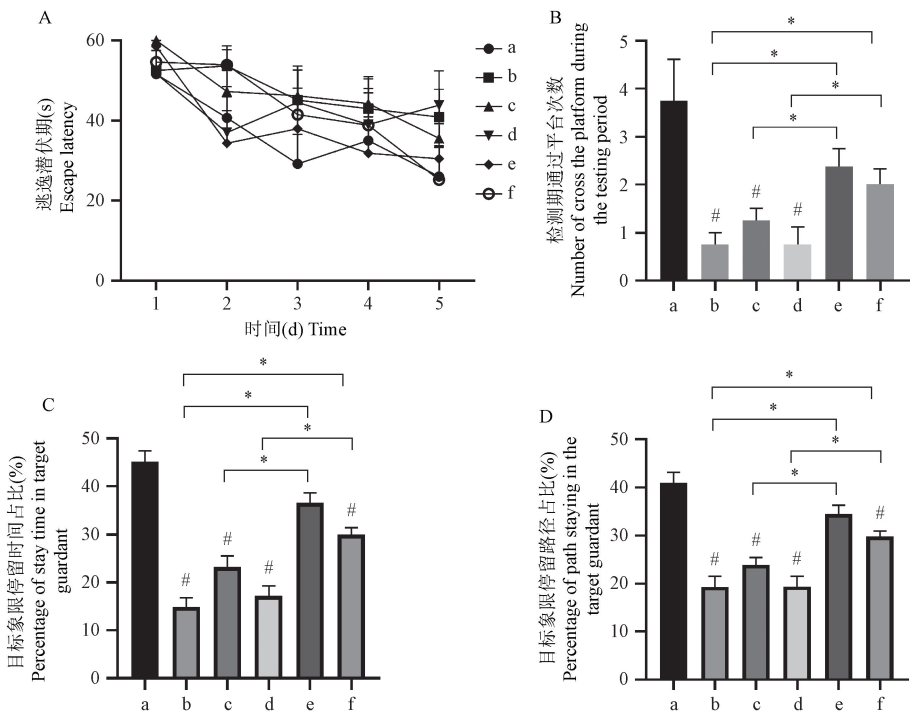


注:与 CPP:NGF 比例为 0 的 NGF 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。
图 2 CPP 浓度对于 bEND.3 细胞摄取 NGF 的影响($n = 3$)
Note. Compared with the NGF group with a CPP:NGF ratio of 0, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Effect of CPP concentration to stimulate the uptake of NGF by bEND.3 cells



注:A:中度 TBI 后小鼠脑组织切片 HE 染色结果($n = 3$);B:中度 TBI 后小鼠 mNSS 评分($n = 8$)。
图 3 中度 TBI 模型小鼠脑损伤情况分析
Note. A, HE staining results of brain tissue sections of mice after moderate TBI($n = 3$). B, mNSS score of mice after moderate TBI.
Figure 3 Analysis of brain injury in moderate TBI model mice

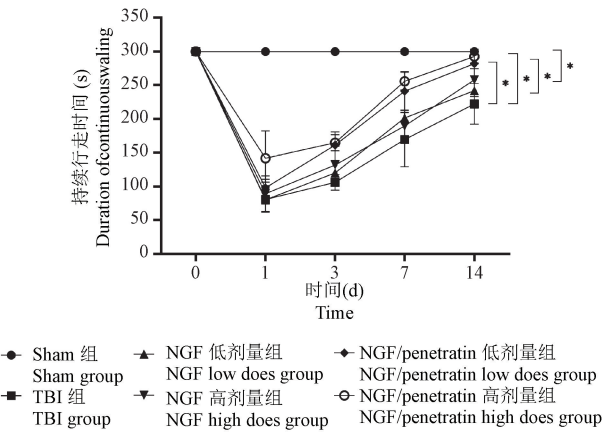


注:a;Sham 组;b:TBI 组;c:NGF 低剂量组;d:NGF 高剂量组;e:NGF/penetratin 低剂量组;f:NGF/penetratin 高剂量组。A;逃逸潜伏期;B;检测期通过平台次数;C:目标象限停留时间占比;D:目标象限停留路径占比。与 Sham 组相比, # $P<0.05$;与 TBI 组、NGF 低剂量组、NGF 高剂量组、NGF/penetratin 低剂量组或 NGF/penetratin 高剂量组相比, * $P<0.05$ 。

图 4 Morris 水迷宫实验检测结果($n=8$)

Note. a, Sham group. b, TBI group. c, NGF low does group. d, NGF high does group. e, NGF/penetratin low does group. f, NGF/penetratin high does group. A, Escape latency. B, Number of cross the platform during the testing period. C, Percentage of stay time in target guardant. D, Percentage of path staying in the target guardant. Compared with the Sham group, # $P<0.05$, Compared with the TBI group, NGF low dose group, NGF high dose group, NGF/penetratin low dose group, or NGF/penetratin high dose group, * $P<0.05$.

Figure 4 Morris water maze test results



注:与 TBI 组、NGF 低剂量组、NGF 高剂量组、NGF/penetratin 低剂量组或 NGF/penetratin 高剂量组相比, * $P<0.05$ 。

图 5 转棒实验检测结果($n=8$)

Note. Compared with the TBI group, NGF low dose group, NGF high dose group, NGF/penetratin low dose group, or NGF/penetratin high dose group, * $P<0.05$.

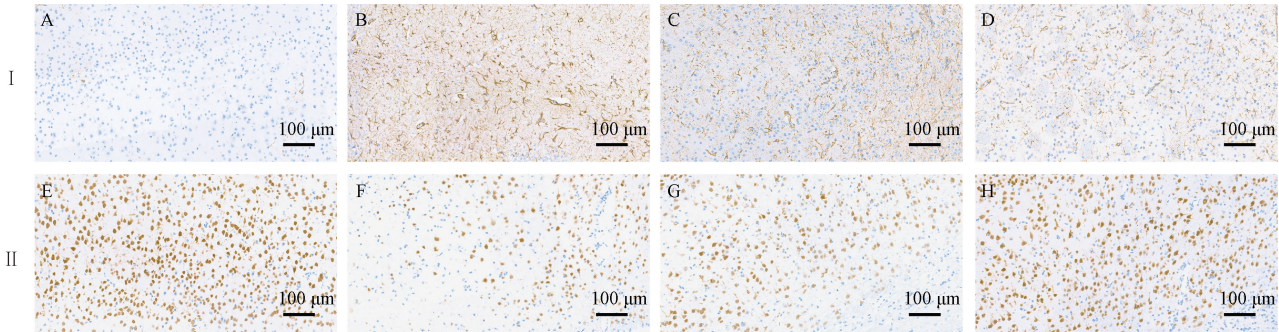
Figure 5 Rotating rod test results

penetratin 复合 NGF 给药后小鼠脑组织 GFAP 反应性星形胶质细胞以及受损神经元比 TBI 小鼠少,降低 TBI 后小鼠炎症反应并保护受损的神经元。

3 讨论

TBI 已成为全球性公共卫生问题。研究表明 NGF 具有保护受损神经元并降低神经功能障碍等作用^[22-23],是治疗 TBI 的潜在药物。然而目前将这类蛋白质药物以安全和有效的方式递送到中枢神经系统仍然是一个难题和挑战。CPP 具有携带大分子物质穿过细胞膜以及生理屏障的性质,其中一些 CPP 可通过与递送物质简单混合形成复合物,通过生物膜以及生理屏障传递寡核苷酸^[24]、蛋白质以及肽类物质^[25-26]等。本研究基于 CPP 的策略递送 NGF 进入受损脑组织,进而通过保护受损神经元及减轻神经炎症等作用治疗中度 TBI 小鼠。

首先利用小鼠脑微血管内皮细胞分别测试了 penetratin 和 pep-1 介导 NGF 的透膜效果。细胞免



注：Ⅰ：小鼠脑组织 GFAP 蛋白表达；Ⅱ：小鼠脑组织 NeuN 蛋白表达；A、E:Sham 组；B、F:TBI 组；C、G:NGF 组；D、H:NGF/penetratin 组。

图 6 小鼠脑组织免疫组化结果 (n=3)

Note. Ⅰ, GFAP protein expression in brain tissue of mouse. Ⅱ, NeuN protein expression in brain tissue of mouse. A/E, Sham group. B/F, TBI group. C/G, NGF group. D/H, NGF/penetratin group.

Figure 6 Immunohistochemistry results of mouse brain tissue

表 1 小鼠 GFAP、NeuN 表达水平比较 (n=9)

Table 1 Comparison of expression levels of GFAP and NeuN of mouse

组别 Groups	Sham 组 Sham group	TBI 组 TBI group	NGF 组 NGF group	NGF/penetratin 组 NGF/penetratin group
GFAP	0.075±0.004	0.175±0.013 ^{ad}	0.156±0.009 ^{ad}	0.116±0.010 ^{abc}
NeuN	0.269±0.005	0.149±0.007 ^{ad}	0.159±0.014 ^{ad}	0.214±0.022 ^{abc}

注：与 Sham 组相比，^a*P*<0.05；与 TBI 组相比，^b*P*<0.05；与 NGF 组相比，^c*P*<0.05；与 NGF/penetratin 组相比，^d*P*<0.05。
Note. Compared with sham group, ^a*P*<0.05. Compared with TBI group, ^b*P*<0.05. Compared with NGF group, ^c*P*<0.05. Compared with NGF/penetratin group, ^d*P*<0.05.

疫荧光实验表明,penetratin 比 pep-1 能更好地将 NGF 蛋白递送进细胞内,且当它与 NGF 的比例为 20:1 时转导效果最佳。结果提示,不同 CPP 对不同蛋白分子的递送效能存在差异。CPP 主要是通过疏水作用和离子结合与递送物质之间形成非共价络合物,利用其正电荷与带负电的膜蛋白结合,通过扰动磷脂双分子层形成一个反向胶束,在胶束内并携带功能分子穿过生物膜以及生理屏障。其构象形状和柔韧性等会影响与结合物质以及细胞表面的结合,因从与其递送物质之间需要很强的亲和力和,使得产生的复合物能稳定地运输,从而实现更好地被吸收。此外 CPP 进入细胞的机制不仅取决于 CPP 的类型,还取决于其与递送物质之间的浓度配比, CPP 浓度较低则穿膜效果不佳,而使用较高的比例则会导致形成沉淀或较大的颗粒,从而不利于进入胞内。

关于 NGF 给药剂量选择是依据药物的使用说明,在应用于外周神经损伤方面,小鼠注射剂量为 5 μg/kg 时,具有促进神经损伤恢复的作用。另外, NGF 的药代动力学研究表明,小鼠肌肉注射 10 μg/kg 的 NGF 血药浓度时间曲线符合二室开放模型,在脑和脊髓等组织有少量分布。本实验为进一步提升 NGF 到达脑组织含量,改善其对脑损伤的治疗

效果,将 CPP 与 NGF 复合给药,但 BBB 的存在极大地限制 NGF 进入脑组织发挥作用,因此实验使用剂量为注射剂量的 2 倍、10 倍。penetratin 介导 NGF 治疗中度 TBI 小鼠的实验结果表明,注射不同剂量 NGF/penetratin 组均可有效抑制 TBI 小鼠协调能力以及空间记忆能力下降,尽管结果显示 NGF/penetratin 的低剂量组有相对较好的疗效趋势,然而高、低剂量组间相比并无显著差异,提示我们后续实验中可进一步探索优化给药剂量。此外 NGF/penetratin 组可显著减少 TBI 组小鼠脑组织病灶周围神经元损伤,降低脑组织反应性星形胶质细胞的数量。综上,本研究表明 penetratin 以非共价复合形式向受损脑组织内递送 NGF 是治疗中度 TBI 的一种有效途径,具有良好的临床应用前景。

参考文献:

[1] Dewan MC, Rattani A, Gupta S, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury [J]. J Neurosurg, 2018, 130 (4): 1080-1097.
[2] Haarbauer-Krupa J, Pugh MJ, Prager EM, et al. Epidemiology of chronic effects of traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2021, 38(23): 3235-3247.
[3] Kong LZ, Zhang RL, Hu SH, et al. Military traumatic brain injury: a challenge straddling neurology and psychiatry [J]. Mil

- Med Res, 2022, 9(1): 2.
- [4] Ismail H, Shakkour Z, Tabet M, et al. Traumatic brain injury: oxidative stress and novel anti-oxidants such as mitoquinone and edaravone [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(10): 943.
- [5] Corrigan F, Arulsamy A, Teng J, et al. Pumping the brakes: neurotrophic factors for the prevention of cognitive impairment and dementia after traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2017, 34(5): 971-986.
- [6] Eftimiadi G, Soligo M, Manni L, et al. Topical delivery of nerve growth factor for treatment of ocular and brain disorders [J]. Neural Regen Res, 2021, 16(9): 1740-1750.
- [7] Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders [J]. Nat Rev Neurol, 2018, 14(3): 133-150.
- [8] 解一舟, 李玉珍, 朱慧, 等. 蛋白和肽类物质跨血脑屏障转运研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2): 128-134.
- [9] Turk OM, Woodall RC, Gutova M, et al. Delivery strategies for cell-based therapies in the brain: overcoming multiple barriers [J]. Drug Deliv Transl Res, 2021, 11(6): 2448-2467.
- [10] Qin C, Wang K, Zhang L, et al. Stem cell therapy for Alzheimer's disease: an overview of experimental models and reality [J]. Animal Model Exp Med, 2022, 5(1): 15-26.
- [11] Oller-Salvia B, Sánchez-Navarro M, Giralte E, et al. Blood-brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery [J]. Chem Soc Rev, 2016, 45(17): 4690-4707.
- [12] Chen ZL, Huang M, Wang XR, et al. Transferrin-modified liposome promotes α -mangostin to penetrate the blood-brain barrier [J]. Nanomed-Nanotechnol Biol Med, 2016, 12(2): 421-430.
- [13] Pieper S, Onafuye H, Mulac D, et al. Incorporation of doxorubicin in different polymer nanoparticles and their anticancer activity [J]. Beilstein J Nanotechnol, 2019, 10: 2062-2072.
- [14] Stalmans S, Bracke N, Wynendaele E, et al. Cell-penetrating peptides selectively cross the blood-brain barrier *in vivo* [J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0139652.
- [15] Zhang L, Zhang Y, Tai L, et al. Functionalized cell nucleus-penetrating peptide combined with doxorubicin for synergistic treatment of glioma [J]. Acta Biomater, 2016, 42: 90-101.
- [16] Zhang DD, Jin C, Zhang YT, et al. A novel IL-1RA-PEP fusion protein alleviates blood-brain barrier disruption after ischemia-reperfusion in male rats [J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 16.
- [17] Shahbazi S, Bolhassani A. Comparison of six cell penetrating peptides with different properties for *in vitro* and *in vivo* delivery of HPV16 E7 antigen in therapeutic vaccines [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 62: 170-180.
- [18] Gros E, Deshayes S, Morris MC, et al. A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1758(3): 384-393.
- [19] Kamei N, Yamaoka A, Fukuyama Y, et al. Noncovalent strategy with cell-penetrating peptides to facilitate the brain delivery of insulin through the blood-brain barrier [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(4): 546-554.
- [20] Marklund N. Rodent models of traumatic brain injury: methods and challenges [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1462: 29-46.
- [21] 高倩, 王建宇, 孟伟建, 等. 大豆皂苷 Bb 预处理对脑缺血再灌模型大鼠的神经保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 74-80.
- [22] 王丽萍, 邱泽文, 梁桂英, 等. 外源性神经生长因子对痴呆老龄鼠学习和记忆能力影响的初步探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(2): 88-91.
- [23] 王蓉, 李林. 神经生长因子与神经系统老化 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(4): 63-66.
- [24] Coutinho FP, Green CR, Rupenthal ID. Intracellular oligonucleotide delivery using the cell penetrating peptide Xentry [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 11256.
- [25] Morris MC, Depollier J, Mery J, et al. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(12): 1173-1176.
- [26] Khafagy ES, Kamei N, Fujiwara Y, et al. Systemic and brain delivery of leptin *via* intranasal coadministration with cell-penetrating peptides and its therapeutic potential for obesity [J]. J Control Release, 2020, 319: 397-406.

〔收稿日期〕2023-02-21