

# 基质金属蛋白酶响应性脑源性神经营养因子控释材料的合成与表征分析

黑俊如<sup>1,2</sup>, 王翠<sup>3</sup>, 宋梦文<sup>3</sup>, 谢胜强<sup>1,2</sup>, 王秉贤<sup>1,2</sup>, 兰晓娟<sup>4</sup>, 张涵博<sup>1,2</sup>, 程岗<sup>2</sup>, 刘志强<sup>3</sup>, 杨锡琴<sup>3\*</sup>, 张剑宁<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>解放军医学院, 北京 100853; <sup>2</sup>解放军总医院第一医学中心神经外科医学部, 北京 100853; <sup>3</sup>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; <sup>4</sup>解放军总医院第六医学中心神经外科, 北京 100048

[中图分类号] R651.15 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2024.0701

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 黑俊如, 王翠, 宋梦文, 等. 基质金属蛋白酶响应性脑源性神经营养因子控释材料的合成与表征分析[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(11): 1319-1326.

[收稿日期] 2024-02-19 [录用日期] 2024-04-28 [上线日期] 2024-07-01

**[摘要]** 目的 研制以透明质酸(HA)为基质的基质金属蛋白酶(MMP)响应性脑源性神经营养因子(BDNF)控释材料, 以期对创伤性脑损伤(TBI)的干预及损伤修复提供新的治疗方案。方法 HA经过氨基化处理后, 与 Sulfo-SMCC 羧基缩合成酰胺, 再与谷胱甘肽(GSH)连接, 合成HA-GSH; 通过分子克隆技术经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, DNA测序后构建谷胱甘肽S转移酶(GST)-金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)-BDNF表达质粒, 在大肠埃希菌原核表达系统中诱导表达 GST-TIMP-BDNF重组蛋白, 采用离子交换层析分离纯化, Western blotting 验证纯化后的重组蛋白; 在MMP稀释液中分别加入PBS、MMP抑制剂Marimastat和不同浓度(0.4、0.6、0.8 mg/ml)的GST-TIMP-BDNF或GST-BDNF, 采用MMP活性检测试剂盒检测不同组别MMP-2的活性, 评价该重组蛋白对MMP的抑制作用。提取大鼠原代神经元, 培养后建立谷胱甘肽过氧化物酶4抑制剂(RSL3)诱导神经元铁死亡模型, 采用免疫荧光染色检测GST-TIMP-BDNF对神经元损伤的影响。结果 MRI氢谱鉴定结果显示, 成功合成了HA-GSH; Western blotting检测结果显示, 利用大肠埃希菌原核表达系统成功表达了含GST标签的重组蛋白GST-TIMP-BDNF; MMP活性检测结果显示, 重组蛋白GST-TIMP-BDNF对MMP-2活性的抑制作用优于GST-BDNF( $P<0.05$ ); 免疫荧光染色结果显示, RSL3处理后加入重组蛋白GST-TIMP-BDNF的大鼠神经元荧光强度明显增高( $P<0.05$ )。结论 成功研制了一种MMP响应性HA基体BDNF控释材料, 对神经元损伤具有一定的保护作用。

**[关键词]** 透明质酸; 基质金属蛋白酶; 脑源性神经营养因子; 创伤性脑损伤; 控释<sup>®</sup>

## Synthesis and characterization of matrix metalloproteinase-responsive BDNF controlled-release materials

Hei Jun-Ru<sup>1,2</sup>, Wang Cui<sup>3</sup>, Song Meng-Wen<sup>3</sup>, Xie Sheng-Qiang<sup>1,2</sup>, Wang Bing-Xian<sup>1,2</sup>, Lan Xiao-Juan<sup>4</sup>, Zhang Han-Bo<sup>1,2</sup>, Cheng Gang<sup>2</sup>, Liu Zhi-Qiang<sup>3</sup>, Yang Xi-Qin<sup>3\*</sup>, Zhang Jian-Ning<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China

<sup>2</sup>Department of Neurosurgery, the First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

<sup>3</sup>Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China

<sup>4</sup>Department of Neurosurgery, the Sixth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China

\*Corresponding author. Zhang Jian-Ning, E-mail: jnzhang2018@163.com; Yang Xi-Qin, E-mail: yangxiqin001@163.com

**[Abstract]** **Objective** To develop a matrix metalloproteinase (MMP)-responsive hyaluronic acid (HA)-based controlled-release material for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to provide a novel therapeutic strategy for intervention and repair of traumatic brain injury (TBI). **Methods** HA was modified with amination, followed by condensation with Sulfo-SMCC carboxyl group to form amide, and then linked with glutathione (GSH) to synthesize HA-GSH. The recombinant glutathione S-transferase (GST)-tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)-BDNF (GST-TIMP-BDNF) expression plasmid was constructed using

**[作者简介]** 黑俊如, 硕士研究生, 主要从事创伤性脑损伤方面的研究

**[通信作者]** 张剑宁, E-mail: jnzhang2018@163.com; 杨锡琴, E-mail: yangxiqin001@163.com

molecular cloning technique with double enzyme digestion by *Bam*H I and *Eco*R I. The recombinant GST-TIMP-BDNF protein was expressed in the *Escherichia coli* prokaryotic expression system, and purified by ion exchange chromatography, confirmed by Western blotting. MMP diluents were supplemented with PBS, MMP inhibitor marimastat, and varying concentrations (0.4, 0.6, 0.8 mg/ml) of GST-TIMP-BDNF or GST-BDNF. MMP-2 activity was analyzed using an MMP activity detection kit to evaluate the inhibitory effect of the recombinant protein on MMP. Primary rat neurons were extracted and cultured to establish an iron death model induced by RSL3. The effect of recombinant protein GST-TIMP-BDNF on neuronal injury was detected by immunofluorescence staining. **Results** MRI hydrogen spectrum identification confirmed the successful synthesis of HA-GSH. Western blotting results showed the successful expression of the recombinant protein GST-TIMP-BDNF containing the GST tag using the *E. coli* prokaryotic expression system. MMP activity detection results indicated that the recombinant protein GST-TIMP-BDNF had a superior inhibitory effect on MMP-2 activity compared to GST-BDNF ( $P < 0.05$ ). Immunofluorescence staining results showed a significant increase in fluorescence intensity in rat neurons treated with GST-TIMP-BDNF after RSL3 induction ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** A MMP-responsive HA-based BDNF controlled-release material has been successfully developed, exhibiting a protective effect on neuron damage.

**[Key words]** hyaluronic acid; matrix metalloproteinase; brain-derived neurotrophic factor; traumatic brain injury; controlled release

创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)在青少年人群中发病率较高。据全球统计数据显示,约20%的35岁以下年轻人死亡与TBI有关<sup>[1-4]</sup>。目前TBI的临床治疗缺少有效的药物或修复材料<sup>[5]</sup>,且大部分患者伴有长期的精神与认知功能损伤,严重影响其工作与生活<sup>[6-7]</sup>。因此,开发可减轻TBI或促进脑损伤修复的新型材料与药物具有重要意义。透明质酸(hyaluronic acid, HA)是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中的一种天然多糖成分,在维持组织结构、调节细胞行为及多种生理病理过程中发挥重要作用<sup>[8-10]</sup>。研究显示,HA可对受损大脑中的神经干细胞发挥调控作用,包括神经干细胞/祖细胞的增殖、迁移和分化等,但天然的HA生物活性较为有限<sup>[11]</sup>。本研究采用生物与化学修饰的方法改进HA基体材料,以提升其抑制TBI后神经损伤或促进神经修复的潜能,并针对TBI后基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)高表达的微环境,研发具有抗铁死亡、协同MMP响应释放脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的HA基体新材料,以改善其对TBI微环境的适应性,提升脑损伤修复效果,以期为TBI的干预及治疗提供候选功能材料。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与设备** HA(北京华熙生物科技股份有限公司); 乙二胺(中国国药集团); 4-二甲氨基吡啶(DAMP)、3-二甲氨基丙基-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)、谷胱甘肽(GSH)(上海安耐吉化学有限公司); pMD18-T和pGEX-4T-2质粒载体(北京索莱宝科技有限公司); 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺酸基琥珀酰亚胺酯钠盐(Sulfo-SMCC)、T<sub>4</sub> DNA连接酶,限制性内切酶

*Bam*H I和*Eco*R I(德国Merck公司); 大肠杆菌(*E. coli*) BL21(DE3)和*E. coli* DH5 $\alpha$ (南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 谷胱甘肽S转移酶(GST)/BDNF兔单克隆抗体(英国Abcam公司); ECL化学发光试剂(美国PerkinElmer公司); 蛋白分子量标准(蛋白marker)、DNA分子量标准(DNA marker)(美国赛默飞世尔科技公司); 考马斯亮蓝快速染色液、BCA蛋白含量检测试剂(北京碧云天生物技术公司); MMP活性检测试剂盒(美国AAT Bioquest公司); MMP抑制剂Marimastat、MMP-2(美国MCE公司)。SPARK 10M多功能酶标仪(瑞士TECAN公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 HA-GSH的制备** (1)HA的氨基化(HA-NH<sub>2</sub>)。首先配制1 mol/L HCl和1 mol/L NaOH溶液。1 mol/L HCl: 准确称取12 mol/L的浓HCl 8.4 ml, 倒入烧杯, 量取60 ml蒸馏水加入烧杯中, 搅拌溶解, 放置冷却至室温后, 转移到100 ml容量瓶中, 10 ml蒸馏水冲洗烧杯, 并转移到容量瓶中, 冲洗3次, 最后加蒸馏水定容到100 ml; 1 mol/L NaOH: 准确称取NaOH 4 g, 倒入烧杯, 量取60 ml蒸馏水加入烧杯中, 搅拌溶解, 放置冷却至室温后, 转移到100 ml容量瓶中, 10 ml蒸馏水冲洗烧杯, 一并转移到容量瓶中, 冲洗3次, 最后加蒸馏水定容到100 ml。准确称取500 mg HA, 加入100 ml蒸馏水, 磁力搅拌器搅拌至溶解, 配制成5 mg/ml的HA溶液, 加HA(以重复单元计算)的摩尔量30倍的乙二胺溶至HA溶液中, 再加入5 mg DAMP混合均匀促进反应的进行。向反应液中滴加1 mol/L HCl溶液, 调节pH至5.0。然后分别加入HA(重复单元)的摩尔量50倍的EDC和NHS, 充分溶解后用1 mol/L HCl调节pH至5.0。在磁力搅拌器上室温反应48 h, 反应期间始终维持pH在5.0左右。反应结束后, 用1 mol/L NaOH调节pH至7.0,

终止反应。然后用透析袋透析,先用30%乙醇透析24h,然后1%NaCl溶液透析24h,最后蒸馏水透析24h。透析结束后,离心去除沉淀,冷冻干燥备用(-20℃保持72h,20℃保持4h)。

(2)与 Sulfo-SMCC 羧基缩合成酰胺。用1ml蒸馏水溶解2.5mg Sulfo-SMCC,并将其加入含有5mmol/L EDTA的PBS中( $V_{\text{PBS}}=9\text{ml}$ )。将配制好的 Sulfo-SMCC 溶液加入同体积的HA-NH<sub>2</sub>中( $V=10\text{ml}$ ),4℃下孵育2h。随后,将混合物在PBS中透析24h,且每8h更换一次PBS,共更换3次。

(3)接入GSH。向混合物中加入相同体积含有26mg GSH的PBS溶液,4℃下孵育2h,并将其在PBS溶液中透析24h,每8h更换一次PBS;透析后,离心去除沉淀,冷冻干燥备用。

**1.2.2 GST-金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)-BDNF 重组蛋白的构建** (1)引物设计。根据NCBI上TIMP-BDNF基因序列,采用Primer 5软件设计TIMP-BDNF基因的引物:上游5'-GCGGATCCCCGCTGGGCTTG GCGGGTATGACCATCCTTTCCTT-3';下游5'-GCG AATTCTCTTCCCCTTTTAATGGT-3'。

(2)TIMP-BDNF重组基因的扩增与回收。以human-BDNF质粒DNA为模板进行PCR反应扩增,反应条件:95℃预变性5min;95℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸1min,共30个循环;最后72℃延伸10min。采用琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物,紫外灯下观察结果;对PCR产物进行回收,获得重组目的基因片段。

(3)TIMP-BDNF重组质粒的构建。重组目的基因片段,与载体pMD18-T在T<sub>4</sub>DNA连接酶的作用下连接入载体,获得重组体,将其连接产物转化感受态细胞DH5 $\alpha$ ,挑取单克隆菌落进行PCR鉴定,然后挑选阳性菌落,小量抽提质粒并进行DNA测序,获得含有目的基因的重组质粒。

(4)GST-TIMP-BDNF表达质粒的构建。重组TIMP-BDNF质粒经BamH I和EcoR I双酶切,将插入到pMD18-T载体中的目的片段切出,回收目的基因片段;与同样经BamH I和EcoR I双酶切的pGEX-4T-2表达载体连接,转化感受态细胞DH5 $\alpha$ ,挑取单克隆菌落,小量抽提质粒,获得重组GST-TIMP-BDNF表达质粒并进行DNA测序。

(5)GST-TIMP-BDNF重组蛋白的诱导表达与纯化。将BL21(DE3)感受态细胞从-80℃下取出,迅速置于冰上融化,取1 $\mu\text{l}$ 重组GST-TIMP-BDNF表达质粒加入100 $\mu\text{l}$ BL21(DE3)感受态细胞中,轻弹管壁混匀(避免用枪吹打),冰上静置30min,然后放入42℃水浴中热激90s,再迅速置于冰上静置2min,加入1ml LB培养基,混匀后置于摇床(37℃,200r/min)中

复苏1h,然后5000r/min离心3min,弃上清,用LB培养基重悬后均匀涂布在含氨苄西林(AMP)的LB固体培养基平板上,倒置37℃培养12~16h,挑取单克隆菌落接种于含AMP的LB固体培养基平板上,混匀后置于摇床(37℃,220r/min)培养至对数生长期,加入含AMP的Magic Media™大肠杆菌表达培养基,混匀后置于摇床(4℃,220r/min),诱导表达24h后,离心收集菌体,超声破碎,离心收集裂解液上清和沉淀,SDS-PAGE电泳鉴定蛋白表达;采用离子交换层析分离纯化蛋白。

(6)重组蛋白GST-TIMP-BDNF的鉴定。上述纯化蛋白经SDS-PAGE电泳后,低温下用湿转法转移到NC膜上,5%脱脂奶粉封闭1h,TBST洗涤3次 $\times$ 5min,然后加入抗BDNF抗体(1:1000)和抗GST抗体(1:1000)4℃摇床孵育过夜,TBST洗涤3次 $\times$ 5min;加入HRP标记的山羊抗小鼠IgG(1:5000)和山羊抗兔IgG(1:5000)二抗,室温孵育1h,TBST洗涤3次 $\times$ 5min,用高灵敏度ECL化学发光试剂在暗室中显影,根据蛋白条带深浅调整曝光时间。

**1.2.3 重组蛋白GST-TIMP-BDNF对MMP-2活性影响的检测**按照下列分组,采用MMP活性检测试剂盒(表1)检测混合上清液中MMP-2的活性,评价GST-TIMP-BDNF对MMP-2的抑制作用。(1)底物对照组,缓冲液;(2)溶剂对照组,MMP稀释液+溶解BDNF的溶剂;(3)抑制物对照组,MMP稀释液+BDNF抑制剂;(4)实验组,MMP稀释液+0.4、0.6、0.8mg/ml GST-TIMP-BDNF或GST-TIMP-BDNF。

为了激活pro-MMP-2,首先用测定缓冲液(成分C)稀释1mol/L APMA(1:500)得到2mmol/L APMA工作溶液(2 $\times$ ),再将MMP-2与等体积的2mmol/L APMA工作液(2 $\times$ )孵育1h;孵育结束后将等量的MMP-2(35nmol/L)和不同浓度梯度(0.4、0.6、0.8mg/ml)的GST-TIMP-BDNF用测定缓冲液(成分C)溶解至50 $\mu\text{l}$ ,然后加入50 $\mu\text{l}$ MMP底物工作液(成分A),将混合物在室温下避光孵育30min至1h。用酶标仪在490nm激发波长和525nm发射波长下检测每个样品终点的荧光强度,输出以相对荧光单位(RFU)表示。

**1.2.4 原代神经元细胞提取和培养**取E16.5 SD大

表1 MMP活性检测试剂盒的试剂信息

Tab. 1 Specific reagent information of MMP activity detection kit

成分	贮藏条件	数量
成分A: MMP绿色底物	低温贮藏(<-15℃)	1瓶(60 $\mu\text{l}$ )
成分B: 4-氨基苯亚汞醋酸酯(APMA)	低温贮藏(<-15℃)	1瓶(20 $\mu\text{l}$ , 1mol/L)
成分C: 测定缓冲液	低温贮藏(<-15℃)	1瓶(20ml)

鼠1只,腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉后用75%乙醇浸泡消毒约5 min,在超净台(提前紫外照射灭菌)中解剖取出胚胎小鼠浸泡在10 mmol/L的冷冻无菌HEPES溶液中,体视显微镜(提前紫外照射灭菌)下去除皮质以外的大脑组织,剥离皮质血管膜,用10 mmol/L的冷冻无菌HEPES溶液洗3次皮质组织,机械剪碎组织,向剪碎的组织中加入0.125%胰酶消化液,置于37℃培养箱消化15 min;用等消化液体积的含FBS培养基终止消化,加入0.1 mg/ml DNase I,轻柔吹打未消化充分的脑组织,至完全形成单细胞悬液后,过70 μm细胞筛,1000 r/min离心5 min,弃上清,用DMEM培养基(DMEM basic+20% FBS+1% Penicillin-Streptomycin)重悬细胞,轻柔吹打混匀后接种至PDL包被过的48孔板中,“十字手摇”法混匀细胞,置入37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养;培养4~6 h待细胞完全贴壁后弃去培养基,更换为Neurobasal完全培养基(Neurobasal+2% B27+1% GlutaMAX™+1% Penicillin-Streptomycin),在37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,每3 d半量更换Neurobasal完全培养基,小心轻放。

**1.2.5 原代神经元谷胱甘肽过氧化物酶4抑制剂(RSL3)模型的建立<sup>[11]</sup>和免疫荧光染色** 原代神经元细胞培养5~7 d,去除原有培养基,用冷冻PBS清洗3次,然后分为以下4组进行不同的干预:(1)对照组,Neurobasal完全培养基;(2)RSL3组,Neurobasal完全培养基+1 mmol/L RSL3;(3)GTB(10 ng/ml)组,Neurobasal完全培养基+1 mmol/L RSL3+10 ng/ml GST-TIMP-BDNF重组蛋白;(4)GTB(50 ng/ml)组,Neurobasal完全培养基+1 mmol/L RSL3+50 ng/ml GST-TIMP-BDNF重组蛋白。

继续培养12 h后弃培养基,用冷冻PBS清洗3次×5 min;4%多聚甲醛溶液固定30 min后,PBS清洗3次×5 min;加入0.3% Triton X-100室温10 min;加入5% BSA室温封闭1 h,然后加入一抗Tuj1(1:500)4℃孵育过夜,PBS洗3次×5 min;加入荧光二抗(1:500),室温避光孵育1 h,PBS洗3次×5 min;加入Hoechst室温避光孵育15 min,PBS洗3次×5 min,吸出多余液体,加入抗荧光淬灭剂,在激光共聚焦显微镜下拍照。采用ImageJ软件对图像进行分析处理。

**1.3 统计学处理** 采用GraphPad Prism 8软件进行统计分析及作图。计量资料均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HA-GSH的制备和表征** 使用乙二胺对HA的羧基进行氨基化修饰,形成HA-NH<sub>2</sub>,并接入中间体

Suflo-SMCC,随后GSH与中间体连接形成HA-GSH。对氨基修饰的HA及HA-GSH进行磁共振氢谱分析,结果显示,与未修饰的HA比较,在化学位移2.75、3.00处有二乙基特征峰出现并成正比,提示乙二胺成功接入HA中;而经GSH修饰后,二乙基的化学位移发生变化,提示GSH引入成功(图1A-D)。

**2.2 GST-TIMP-BDNF重组蛋白的构建及鉴定** *TIMP-BDNF*基因经PCR扩增后,产物行0.8%琼脂糖凝胶电泳,得到约756 bp的*TIMP-BDNF*目的基因片段;对目的基因片段进行产物回收及鉴定,然后与载体pMD18-T连接,转化感受态细胞DH5α,挑选单克隆阳性菌落小量抽提质粒,获得含有目的基因的重组质粒,并进行DNA测序(图2A-G)。将重组*TIMP-BDNF*质粒经*Bam*HI和*Eco*RI双酶切后再次回收目的基因片段,与pGEX-4T-2表达载体连接后获得重组*GST-TIMP-BDNF*表达质粒。将重组*GST-TIMP-BDNF*表达质粒转入Rosetta(DE3)感受态细胞,利用大肠埃希菌原核表达系统诱导重组蛋白表达,表达产物经超声裂解后得到培养上清和细菌包涵体,行SDS-PAGE电泳并通过考马斯亮蓝染色鉴定表达情况,结果显示,预期分子量蛋白在包涵体的表达量高于上清,故选择对包涵体的蛋白进行离子交换层析分离纯化,经不同浓度NaCl洗脱液少量多次洗脱,收集洗脱液进行SDS-PAGE电泳,通过Q柱纯化的重组蛋白表达纯度最高。利用Western blotting鉴定上述纯化蛋白中GST和BDNF蛋白的特异性表达情况,结果显示,成功诱导表达并纯化了*GST-TIMP-BDNF*重组蛋白(图2H-L)。

**2.3 重组蛋白GST-TIMP-BDNF对MMP-2活性的影响** MMP-2活性检测结果显示,溶剂对照组MMP-2活性明显高于底物对照组和抑制物对照组( $P<0.0001$ )。0.4、0.6、0.8 mg/ml GST-TIMP-BDNF组的MMP-2活性均明显低于同一浓度的GST-BDNF组( $P<0.05$ )(图3)。

**2.4 GST-TIMP-BDNF对体外神经元损伤的影响** 免疫荧光染色结果显示,给予GST-TIMP-BDNF重组蛋白的GTB(10 ng/ml)组和GTB(50 ng/ml)组神经元荧光强度均高于RSL3组,差异有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ,图4)。

## 3 讨论

TBI发生后,其病理事件包括急性损伤与慢性发展两个主要过程<sup>[12]</sup>。过去数十年里,研究人员在TBI的病理机制与干预方法等基础研究领域开展了大量工作,逐步揭示了在TBI病理进展中发挥重要作用的影响因素,包括神经炎症<sup>[13-16]</sup>、活性氧、兴奋性氨基酸毒性等,并据此发展了一系列治疗手段,

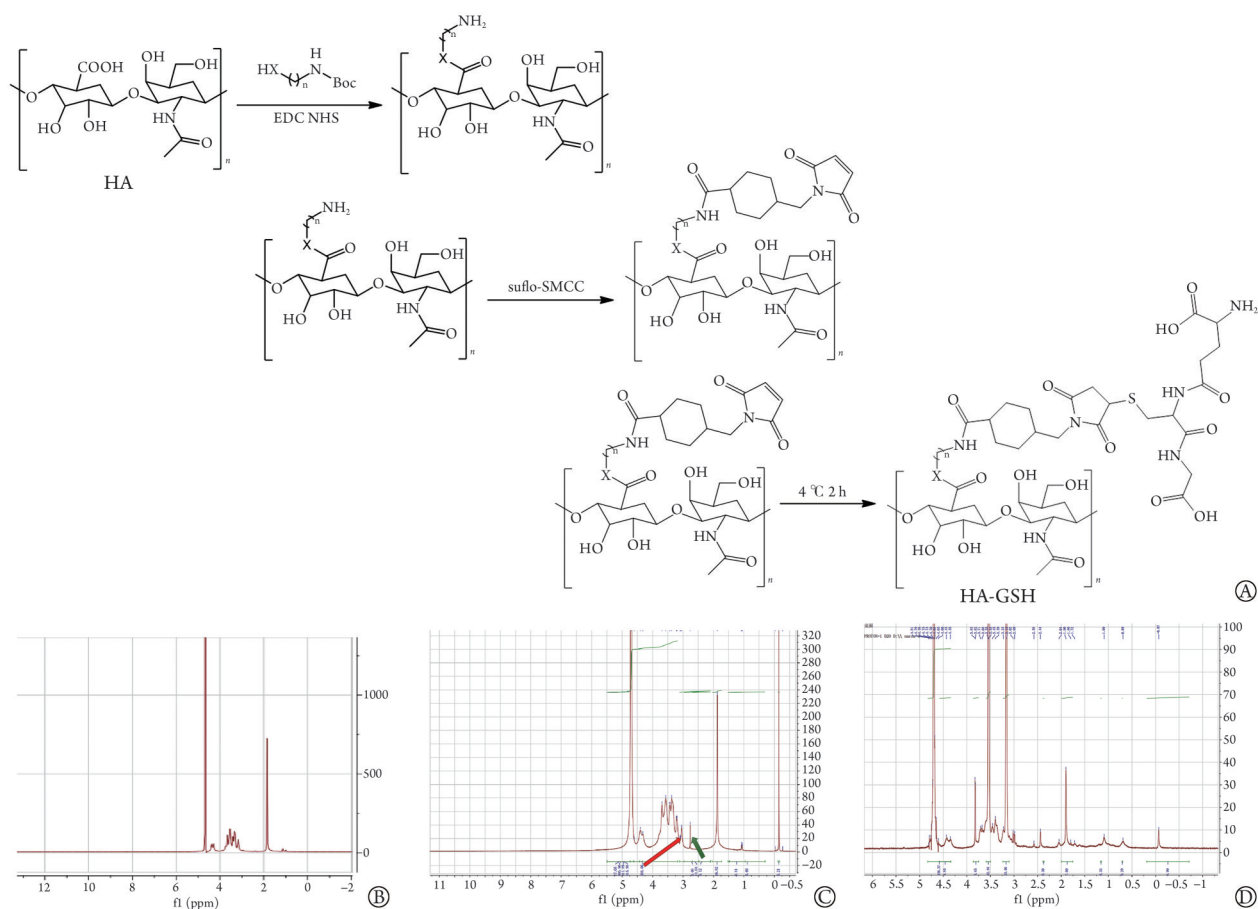


图1 HA-GSH的合成

Fig. 1 Synthesis of HA-GSH

包括抗炎治疗<sup>[17]</sup>、抗氧化治疗<sup>[18-19]</sup>、基因干预及干细胞疗法等<sup>[20-21]</sup>，此外还发现了多个潜在的TBI干预靶点，为TBI救治方法的发展提供了重要基础。过去30年中，有超过50种TBI候选药物被提出或进入临床试验<sup>[22]</sup>，但这些药物开发的进展有限，目前尚无有效的TBI救治药物获准上市。因此，进一步挖掘更为关键的损伤机制与干预靶点，发展新的疗法，是TBI救治研究的主要方向。

本课题组的前期研究显示，ECM中的HA可通过CD44受体抑制神经铁死亡，调控急性脑损伤<sup>[11]</sup>。然而，天然HA的生物活性较为有限。在TBI损伤微环境中HA可降解为具有生物活性的小片段，调节免疫反应并促进血管生成，对神经免疫反应产生积极影响<sup>[23-24]</sup>。因此，针对TBI后的病理微环境特征，通过生物或化学修饰改进HA基体材料，提升其抑制神经损伤或促进神经修复的效能，可能是未来研发TBI修复材料的重要途径。

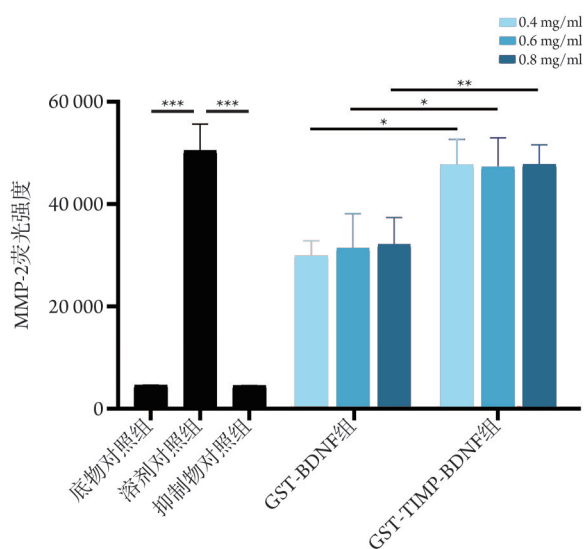
MMP是一类在ECM降解中发挥关键作用的酶，在TBI的发病机制中扮演着重要角色(尤其是MMP-2和MMP-9)<sup>[25]</sup>。TBI后，免疫细胞和星形胶质细胞的

活化导致MMP表达迅速上调，可引起ECM过度降解，进而造成脑组织中的蛋白大量降解，加重继发性脑损伤。有研究发现，抑制MMP-2和MMP-9的活性可减轻神经元损伤<sup>[26-28]</sup>。BDNF在中枢神经系统发育和神经元可塑性中起着重要作用，对TBI后神经元的存活、再生、突触重建及功能恢复也具有重要影响<sup>[29-32]</sup>。

本研究针对TBI后病理发展过程中MMP显著上调的特征，研制了MMP响应性控释神经修复因子BDNF的HA基体材料。首先将MMP敏感的肽段TIMP与BDNF功能序列连接，然后与GST标签融合表达，制备出GST-TIMP-BDNF融合蛋白，并使用GSH基团修饰透明质酸基体材料，获得GSH修饰的透明质酸基材料(HA-GSH)，随后通过GSH与GST的亲和作用合成HA-GSH-GST-TIMP-BDNF功能材料(图5)。

本研究合成了GSH修饰的HA基材料，并利用大肠埃希菌原核表达系统构建了GST-TIMP-BDNF重组蛋白，纯化得到了GST标签的重组蛋白。重组GST-TIMP-BDNF中含有TIMP(一种MMP底物肽)，





GST. 谷胱甘肽 S-转移酶; TIMP. 金属蛋白酶组织抑制剂; BDNF. 脑源性神经营养因子; MMP-2. 基质金属蛋白酶-2; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$

图3 重组蛋白 GST-TIMP-BDNF 对 MMP-2 活性的影响

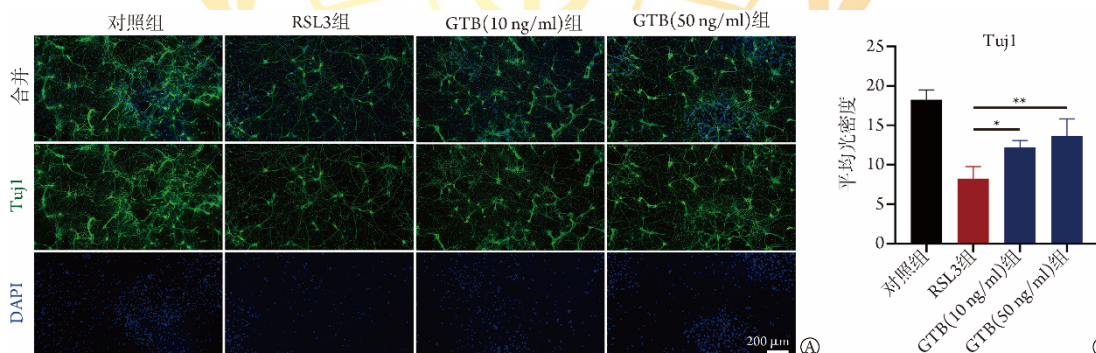
Fig. 3 Effect of recombinant protein GST-TIMP-BDNF on activity of MMP-2

多肽, 与 BDNF 连接形成前药, 通过 HA 结合到损伤区后在 MMP 的作用下断裂释放活性 BDNF, 发挥持

续的神经损伤修复作用。因而, 此功能材料可发挥 HA 和 BDNF 治疗 TBI 的双重功效, 同时适应不同程度 TBI 神经保护的需求, 改善 TBI 的预后。

本研究针对 TBI 后 MMP 的过度表达, 将其作为药物释放的靶点, 旨在实现局部及按需给药, 增强治疗的针对性。考虑到 TBI 损伤活动的动态变化, 包括病情恶化和缓解期, 目前研究中的药物递送系统无法实现与 TBI 活动同步的药物释放, 可能导致在疾病加重或缓解时释放不足或过量。因此, 根据 TBI 损伤程度来诱导药物释放的局部给药策略具有一定的应用价值, 值得进一步探索和研究。

本研究存在一定局限性。首先, 在 HA 修饰过程中, 羧基被 GSH 占据, 导致该缓释材料无法与其他物质交联形成水凝胶, 对缓释材料部分生物学功能的验证形成了挑战, 期望未来能够解决这一问题, 以进一步完善研究; 其次, 仅从蛋白层面验证了 TBI 后 MMP 的高表达, 未能从其他维度, 如基因和形态特征等方面进行验证, 后续可考虑采用 RNA 测序等技术手段, 对 TBI 后 MMP 的调控机制进行更深入的探讨, 还可进一步探讨该材料对正常神经元生长和发育的影响; 最后, 在体内 TBI 动物模型方面, 本研究缺乏足够的组织病理学验证。为了更准确地



GST. 谷胱甘肽 S-转移酶; TIMP. 金属蛋白酶组织抑制剂; BDNF. 脑源性神经营养因子; TuJ1.  $\beta$ -微管蛋白 III; DAPI. 4',6-二脒基-2-苯基吡啶; RSL3. 谷胱甘肽过氧化物酶 4 抑制剂; GTB. GST-TIMP-BDNF 重组蛋白; A. SD 大鼠原代神经元免疫荧光染色; B. TuJ1 荧光定量; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图4 GST-TIMP-BDNF 重组蛋白对体外大鼠神经元损伤的影响

Fig. 4 Effect of GST-TIMP-BDNF recombinant protein on neural cell injury model *in vitro*

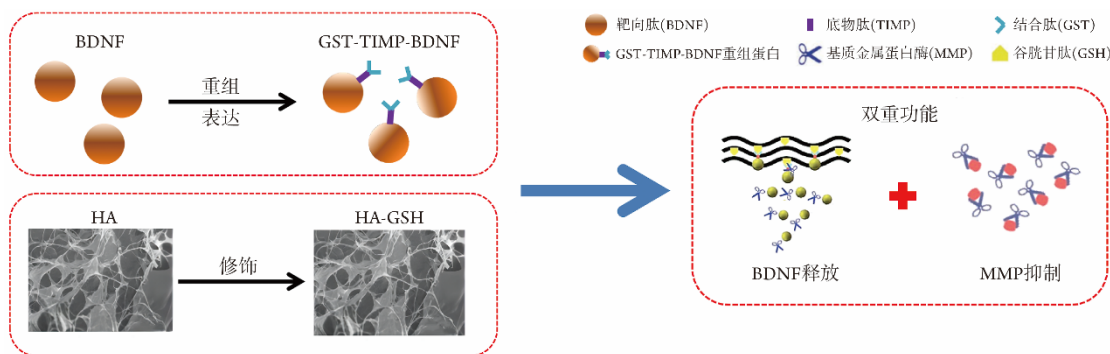


图5 MMP 响应性透明质酸基 BDNF 功能材料合成过程

Fig. 5 Process of MMP responsive hyaluronic-based BDNF functional material synthesis

评估该材料在TBI治疗中的效果,未来可通过组织病理学染色、免疫组化等技术,对受损脑组织的病理变化进行更详细的观察和分析。这将有助于更准确地评估该材料对TBI的治疗效果,并为后续的临床研究提供有力证据。

### 【参考文献】

- [1] Jiang J, Gao G, Feng J, *et al.* Traumatic brain injury in China[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(3): 286-295.
- [2] Campbell M, Hanrahan F, Gobbo OL, *et al.* Targeted suppression of claudin-5 decreases cerebral oedema and improves cognitive outcome following traumatic brain injury[J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 849.
- [3] Jassam YN, Izzy S, Whalen M, *et al.* Neuroimmunology of traumatic brain injury: time for a paradigm shift[J]. *Neuron*, 2017, 95(6): 1246-1265.
- [4] Kwon EJ, Skalak M, Lo Bu R, *et al.* Neuron-targeted nanoparticle for siRNA delivery to traumatic brain injuries[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(8): 7926-7933.
- [5] Alouani AT, Elfouly T. Traumatic brain injury (TBI) detection: past, present, and future[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(10): 2472.
- [6] Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, *et al.* Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research[J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(12): 987-1048.
- [7] Sharma R, Kambhampati SP, Zhang Z, *et al.* Dendrimer mediated targeted delivery of sinomenine for the treatment of acute neuroinflammation in traumatic brain injury[J]. *J Control Release*, 2020, 323: 361-375.
- [8] Li J, Ma J, Zhang Q, *et al.* Spatially resolved proteomic map shows that extracellular matrix regulates epidermal growth[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4012.
- [9] Haggerty AE, Marlow MM, Oudega M. Extracellular matrix components as therapeutics for spinal cord injury[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 652: 50-55.
- [10] Chio JCT, Punjani N, Hejrati N, *et al.* Extracellular matrix and oxidative stress following traumatic spinal cord injury: physiological and pathophysiological roles and opportunities for therapeutic intervention[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2022, 37(1-3): 184-207.
- [11] Liu Z, Xing Xi, Zhu P, *et al.* Hyaluronic acid extracellularly inhibits ferroptosis *via* cell-surface receptors in acute traumatic brain injury[J]. *Nano Today*, 2022, 46: 101625.
- [12] Padmakumar S, Kulkarni P, Ferris CF, *et al.* Traumatic brain injury and the development of Parkinsonism: understanding pathophysiology, animal models, and therapeutic targets[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 149: 112812.
- [13] Li Y, Ren X, Zhang L, *et al.* Microglial polarization in TBI: signaling pathways and influencing pharmaceuticals[J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 901117.
- [14] Ritzel RM, Li Y, Jiao Y, *et al.* Brain injury accelerates the onset of a reversible age-related microglial phenotype associated with inflammatory neurodegeneration[J]. *Sci Adv*, 2023, 9(10): eadd1101.
- [15] Russo MV, McGavern DB. Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury[J]. *Science*, 2016, 353(6301): 783-785.
- [16] Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury[J]. *JAMA Neurol*, 2015, 72(3): 355-362.
- [17] Feng X, Ma W, Zhu J, *et al.* Dexmedetomidine alleviates early brain injury following traumatic brain injury by inhibiting autophagy and neuroinflammation through the ROS/Nrf2 signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(3): 661.
- [18] Hall ED, Wang JA, Miller DM, *et al.* Newer pharmacological approaches for antioxidant neuroprotection in traumatic brain injury[J]. *Neuropharmacology*, 2019, 145(Pt B): 247-258.
- [19] Han Z, Han Y, Huang X, *et al.* A novel targeted nanoparticle for traumatic brain injury treatment: combined effect of ROS depletion and calcium overload inhibition[J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11(11): e2102256.
- [20] Bao Z, Liu Y, Chen B, *et al.* Prokineticin-2 prevents neuronal cell deaths in a model of traumatic brain injury[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4220.
- [21] Joy MT, Ben Assayag E, Shabashov-Stone D, *et al.* CCR5 is a therapeutic target for recovery after stroke and traumatic brain injury[J]. *Cell*, 2019, 176(5): 1143-1157.e13.
- [22] Miller G. New guidelines aim to improve studies of traumatic brain injury[J]. *Science*, 2010, 328(5976): 297.
- [23] Peters A, Sherman LS. Diverse roles for hyaluronan and hyaluronan receptors in the developing and adult nervous system[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 5988.
- [24] Nakka K, Hachmer S, Mokhtari Z, *et al.* JMJD3 activated hyaluronan synthesis drives muscle regeneration in an inflammatory environment[J]. *Science*, 2022, 377(6606): 666-669.
- [25] Trivedi A, Noble-Haesslein LJ, Levine JM, *et al.* Matrix metalloproteinase signals following neurotrauma are right on cue[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(16): 3141-3156.
- [26] Fan C, Shi J, Zhuang Y, *et al.* Myocardial-infarction-responsive smart hydrogels targeting matrix metalloproteinase for on-demand growth factor delivery[J]. *Adv Mater*, 2019, 31(40): e1902900.
- [27] Fan C, Yang W, Zhang L, *et al.* Restoration of spinal cord biophysical microenvironment for enhancing tissue repair by injury-responsive smart hydrogel[J]. *Biomaterials*, 2022, 288: 121689.
- [28] Sifringer M, Stefovská V, Zentner I, *et al.* The role of matrix metalloproteinases in infant traumatic brain injury[J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 25(3): 526-535.
- [29] Treble-Barna A, Heinsberg LW, Puccio AM, *et al.* Acute brain-derived neurotrophic factor DNA methylation trajectories in cerebrospinal fluid and associations with outcomes following severe traumatic brain injury in adults[J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2021, 35(9): 790-800.
- [30] Sims SK, Wilken-Resman B, Smith CJ, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor therapeutics for brain injury: the current translational challenges in preclinical and clinical research[J]. *Neural Plast*, 2022, 2022: 3889300.
- [31] Yin R, Zhao S, Qiu C. Brain-derived neurotrophic factor fused with a collagen-binding domain inhibits neuroinflammation and promotes neurological recovery of traumatic brain injury mice *via* TrkB signalling[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72(4): 539-550.
- [32] Sada N, Fujita Y, Mizuta N, *et al.* Inhibition of HDAC increases BDNF expression and promotes neuronal rewiring and functional recovery after brain injury[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(8): 655.