

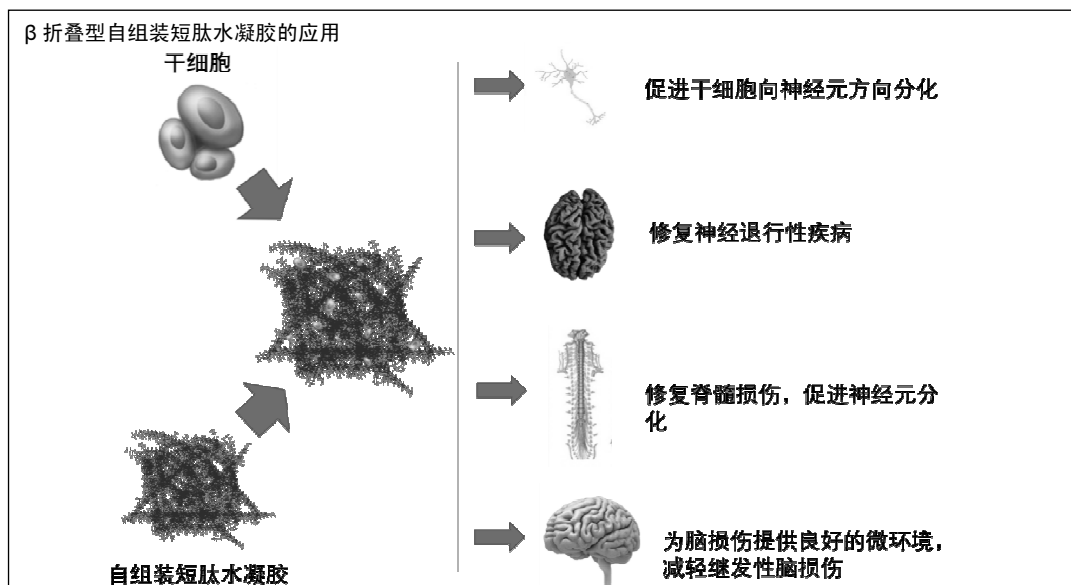
# β折叠型自组装短肽水凝胶特性及在神经组织工程中的应用前景

卫巍<sup>1</sup>, 刘燕飞<sup>1</sup>, 何洋<sup>2</sup>, 张玲<sup>1</sup> (<sup>1</sup>遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室, 贵州省遵义市 563000; <sup>2</sup>遵义医学院, 贵州省遵义市 563003)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0720

ORCID: 0000-0002-4152-9432(卫巍)

文章快速阅读:



卫巍, 男, 1992 年生, 湖北省十堰市人, 汉族, 遵义医学院在读硕士, 主要从事自组装短肽设计、特性及组织工程方向的研究。

通讯作者: 刘燕飞, 博士, 副教授, 硕士生导师, 遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室, 贵州省遵义市 563003

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2018-02-01



## 文题释义:

**分子自组装:** 是自然界中普遍存在的现象, 它无需外界干预而自发形成稳定结构。自 1993 年 Zhang 等首次报道了在 Zuotin 蛋白中发现自组装短肽 EAK16-II 后, 一系列自组装短肽材料相继被发现和设计合成, 其中最具有代表性自组装短肽为 RADA16-I。这类短肽材料由相互交替的亲水性和疏水性氨基酸序列组成, 在一定条件刺激下, 能够自发且有规律的通过非共价键作用形成稳定的 β 折叠结构, 再进一步堆叠为纳米纤维, 最终形成含水量超过 99% 的水凝胶支架。

**水凝胶:** 凡是水溶性或亲水性的高分子, 通过一定的化学交联或物理交联都可形成水凝胶。自组装短肽材料能够依靠物理性的非共价键作用介导, 自组装形成纳米纤维水凝胶, 自组装短肽水凝胶材料具有以下优势:

①具有良好的生物相容性, 无细胞毒性, 低免疫原性, 不影响组织正常愈合; ②能形成稳定的三维支架, 该支架结构具有适度的机械张力和通透性; ③自组装短肽水凝胶降解产物为氨基酸, 不引起组织炎症反应, 可被吸收再利用。因此, 自组装短肽作为一种理想生物支架材料在细胞三维培养、组织工程、再生医学及药物缓释等领域的应用有着巨大的潜力。

## 摘要

**背景:** 自组装短肽具有能够优化其三维支架的组分和结构特性, 可作为新型组织工程支架材料应用于生物医药领域。

**目的:** 概述 β 折叠型自组装短肽的生物学特性及其在神经组织工程中的研究进展。

**方法:** 以“β 折叠, 自组装短肽, 水凝胶, 神经干细胞, 神经组织工程; β sheet, self-assembling peptide, hydrogel, neural stem cell, neural tissue engineering”为检索词, 检索 PubMed、CNKI、万方数据库 2000 至 2017 年发表的相关文献。

**结果与结论:** β 折叠型自组装短肽可模拟细胞外基质结构, 促进神经干细胞的黏附、迁移、分化和突触发生, 引导神经细胞生长和轴突连接。在神经组织工程中, 自组装短肽 RADA16、LDLK12、QL6 及其衍生出的功能化序列已被证实具有良好的实用性。细胞培养与动物实验显示, β 折叠型自组装短肽可促进干细胞的神经元分化, 在神经退行性疾病、脊髓损伤、脑损伤及外周神经损伤中有很好的应用前景。

## 关键词:

β 折叠; 自组装短肽; 水凝胶; 神经干细胞; 神经组织工程; 生物材料

## 主题词:

蛋白质折叠; 水凝胶; 神经干细胞; 组织工程

## 基金资助:

贵州省联合资金资助项目(黔科合 J 字 LKZ[2013]01 号); 贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教合 KY 字 [2015]418)

Wei Wei, Master candidate, Key Laboratory of Cell Engineering in Guizhou Province, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Liu Yan-fei, M.D., Associate professor, Master's supervisor, Key Laboratory of Cell Engineering in Guizhou Province, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

## The application of beta-sheet self-assembling peptide hydrogels in neural tissue engineering

Wei Wei<sup>1</sup>, Liu Yan-fei<sup>1</sup>, He Yang<sup>2</sup>, Zhang Ling<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Key Laboratory of Cell Engineering in Guizhou Province, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; <sup>2</sup>Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Self-assembling peptides, which allow for an optimal control over the scaffold structure and composition, are described as the innovative tissue-engineered scaffolds in the field of biological medicine.  
**OBJECTIVE:** To summarize the biological features of  $\beta$ -sheet self-assembling peptides and current research progress in the neural tissue engineering.  
**METHODS:** We took “ $\beta$  sheet, self-assembling peptide, hydrogel, neural stem cell, neural tissue engineering” as the key words in Chinese and English, respectively, to retrieve the related literatures (2000–2017) from PubMed, CNKI, WanFang databases based on internet search.  
**RESULTS AND CONCLUSION:**  $\beta$ -sheet self-assembling peptide, designed to function as an engineered mimic of the extra-cellular matrix (ECM), may be used with as a medium to direct growth and axonal connection, promoting neural stem cells adhesion, migration, division, outgrowth, neurogenesis and synaptogenesis. The self-assembling peptides RADA16, LDLK12, QL6 and their functionalized sequences have been proven to be of good utility. As the excellent performance of inducing peripheral nerve regeneration, mediating spinal cord injury and attenuating neuroinflammation,  $\beta$ -sheet self-assembling peptides have promising applications in the neural tissue engineering.  
**Subject headings:** Protein Folding; Hydrogel; Neural Stem Cells; Tissue Engineering  
**Funding:** the Key Project of Guizhou Provincial Science and Technology Department, No. LKZ[2013]01; the Natural Science Research Project of Education Department of Guizhou Province, No. [2015]418

## 0 引言 Introduction

分子自组装是自然界中普遍存在的现象,它无需外界干预而可自发形成稳定结构。自1993年Zhang等<sup>[1]</sup>首次报道了在Zuotin蛋白中发现自组装短肽EAK16-II后,一系列自组装短肽材料相继被发现和设计合成,其中最具有代表性自组装短肽为RADA16-I。这类短肽材料由相互交替的亲水性和疏水性氨基酸序列组成,在一定条件刺激下能够自发且有规律的通过非共价键作用形成稳定的 $\beta$ 折叠结构,再进一步堆叠为纳米纤维,最终形成含水量超过99%的水凝胶支架。研究证实,自组装短肽水凝胶材料具有以下优势:①具有良好的生物相容性,无细胞毒性,低免疫原性,不影响组织正常愈合;②能形成稳定的三维支架,该支架结构具有适度的机械张力和通透性;③自组装短肽水凝胶降解产物为氨基酸,不引起组织炎症反应,可被吸收再利用。因此,自组装短肽作为一种理想的生物支架材料,在细胞三维培养、组织工程、再生医学及药物缓释等领域有着巨大的应用潜力<sup>[2-4]</sup>。

神经组织工程是目前神经损伤治疗的一个重要手段,方法是将细胞种植于适宜生长的生物材料后,移植至受损神经组织,修复被破坏的神经组织。自组装短肽纳米纤维支架可作为新型组织工程支架材料,理想地控制支架的组成和结构,为体外细胞提供一个三维生长环境模型,增强组织生长速度,促进神经修复、组织再生和伤口愈合等。在神经组织工程中部分互补性自组装短肽材料已被证明具有良好的实用性,如RADA16、LDLK12、QL6及其衍生出的功能化序列,以下对其在神经组织工程中的最新研究进展进行综述。

## 1 资料和方法 Data and methods

**1.1 资料来源** 由第一作者以“ $\beta$ 折叠,自组装短肽,水凝胶,神经干细胞,神经组织工程; $\beta$  sheet,

self-assembling peptide, hydrogel, neural stem cell, neural tissue engineering”为检索词,检索PubMed、CNKI、万方数据库2000至2017年发表的相关文献。

**1.2 纳入标准** 文章内容与 $\beta$ 折叠型自组装短肽生物学特性、神经组织工程内容相关,实验方法和数据可靠,结果及结论具有说服力;同一领域选择近期发表或在权威杂志上发表的文章。

**1.3 排除标准** 重复性研究,被现有证明反对的研究及未正式发表的文献。

**1.4 数据提取** 共检索到文献68篇,其中中文文献5篇,英文文献63篇,排除与研究目的相关性差及内容陈旧、重复的文献,纳入46篇符合标准的文献进行综述。文献[1-4]介绍了背景资料,文献[5-9]介绍了短肽自组装机制,文献[10]介绍了 $\beta$ 折叠二级结构,文献[11-44]介绍了 $\beta$ 折叠型自组装短肽在神经组织工程中的应用,文献[45-46]介绍了 $\beta$ 折叠型自组装短肽的应用前景。

## 2 结果 Results

### 2.1 $\beta$ 折叠型自组装短肽

**2.1.1 短肽自组装机制** 短肽分子可通过非共价作用力(氢键、静电作用、疏水作用、范德华力和 $\pi$ - $\pi$ 堆积等)共同作用,自发地组装形成高度稳定、有序的纳米结构<sup>[5]</sup>。每一种作用力都在短肽自组装过程中发挥重要作用,其中疏水作用是 $\beta$ 折叠型短肽自组装最重要的驱动力,同时在维持短肽二级结构的稳定性中扮演重要的角色。氢键是短肽分子间常见的作用力,短肽主链的氨基键与侧链上的功能基团(如氨基、羧基、羟基、巯基等)易形成氢键,从而维持自组装的稳定性,产生明确的分子结构特性<sup>[6-7]</sup>。Hartgerink等<sup>[7]</sup>通过增加甘氨酸残基的N端甲基化来减少氢键的形成,结果显示形成的水凝胶由于氢键作用力的降低而变得脆弱。因此,氢键作用在纳米纤维的稳定性和纳米结构形态学的维持中非常重要。

由Yokoi等<sup>[8]</sup>设计的RADA16-I, 由带正电的精氨酸残基、带负电的天冬氨酸残基和不带电的丙氨酸残基相互交替排列组成短肽序列, 天冬氨酸残基与精氨酸残基之间的静电作用力和精氨酸残基的疏水作用力, 使RADA16-I 堆叠形成直径为8-10 nm的纳米纤维, 随后聚合形成 $\beta$ 折叠型自组装短肽水凝胶(图1)。

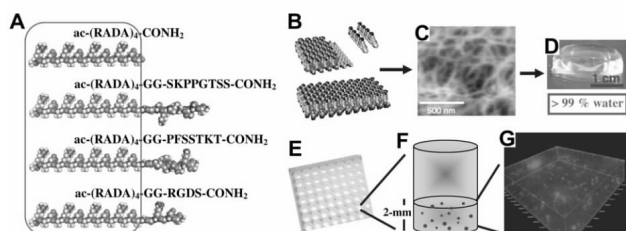


图1 自组装短肽 RADA16 类的分子模型、纳米纤维水凝胶结构及植入其中的神经细胞<sup>[9]</sup>

图注: 图中 A 为自组装短肽 RADA16-I 和连接不同功能化序列后的分子模型图; B 为自组装短肽分子自发性地堆叠形成纳米纤维体; C 为自组装短肽纳米纤维支架的透射电镜图; D 为短肽自组装为含水量大于 99% 的水凝胶; E、F 为 96 孔板中神经细胞植入水凝胶支架的模型图; G 为激光共聚焦显微镜拍摄 2 mm 厚的水凝胶中神经细胞的三维生长图。

短肽分子还可通过亲水和疏水区域的相互作用形成不同的聚合体结构。调整短肽中疏水或亲水性氨基酸的种类、数量和位置, 就可得到具有不同形貌和理化特性的组装体。

**2.1.2  $\beta$  折叠二级结构** 自组装短肽有多种二级机构, 包括 $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 折叠、 $\beta$ 发夹和卷曲螺旋等, 其中 $\beta$ 折叠结构是最常见且应用最广泛的二级结构。

一般来讲, 疏水性氨基酸与亲水性氨基酸周期性排列决定了 $\beta$ 折叠的结构特性, 随后通过分子内疏水性界面间的疏水作用力和分子内亲水性界面间的静电作用力共同堆积形成纳米纤维。由于驱动 $\beta$ 折叠自组装的分子内作用力十分强劲, 因此水凝胶可在体外培养环境和体内移植植物中稳定存在。这些水凝胶具有自我修复能力, 通过使用超声波处理破坏分子间作用力, 促使水凝胶瓦解为液体状态, 随着时间推移, 短肽分子会逐渐重组为与原先结构相同的纳米纤维。重组的水凝胶机械强度等力学特性未发生太大改变。通过计算分析表明, 由于氢键较好的定向连接, 反平行 $\beta$ 折叠比平行结构键能更高<sup>[10]</sup>。

肽间及链间的非共价键作用增加了自组装短肽水凝胶支架的硬度。那些疏水与亲水氨基酸相互交替较多的短肽通常更容易形成 $\beta$ 折叠, 并且自组装成为超分子结构。

## 2.2 $\beta$ 折叠型自组装短肽在神经组织工程中的应用 见表 1。

**2.2.1 对干细胞的促分化作用** 神经干细胞的生存、分化和增殖受细胞外基质成分、纳米拓扑结构和机械应力

传导特性等的调控, 而这些条件可在自组装短肽水凝胶支架中被部分重现<sup>[11]</sup>。自组装短肽水凝胶支架包含长度为5-200 nm的微孔, 这种微孔尺寸与已发现的天然神经细胞外基质结构类似, 细胞可迁移和黏附其中, 为神经干细胞的迁移、分化和增殖提供一个极佳的基质环境<sup>[12]</sup>。

体外二维环境中, 神经干细胞的分化研究已取得了显著进步, 但目前三维环境中对神经干细胞的定向分化研究较少。研究发现, 在三维环境中至少有2个关键变量——机械应力和生物活性, 会影响神经干细胞的命运。神经干细胞对周围生长环境十分敏感, 在刚性较强的三维基质中倾向于分化为星形胶质细胞, 而在较软的基质中则倾向于分化为神经元细胞<sup>[13]</sup>。因为RADA16与促进细胞黏附的纤连蛋白、层粘连蛋白和胶原蛋白的序列RGD相似, 在RADA16组成三维水凝胶支架微环境中的 $\beta$ -Tubulin、GFAP和Nestin阳性细胞数量与人工基质胶中的相似, 结果显示它们对神经干细胞的分化有促进作用<sup>[14]</sup>。

经典的RADA16是最具有代表性的 $\beta$ 折叠型自组装短肽材料, 拥有良好的成胶性, 但溶于水后显示出其较低的pH值(3.0-4.0), 易引起组织损伤, 且生物活性并不理想。因此, 研究人员从一系列自然活性肽中挑选出不同的功能序列与 $\beta$ 折叠型短肽连接, 设计出功能丰富的水凝胶短肽。这些短肽既保持了良好的成胶特性, 又显示出一定的生物学活性。如Cheng等<sup>[15]</sup>将层粘连蛋白衍生肽IKVAV序列连接于RADA16末端, 得到功能化的 $\beta$ 折叠型自组装短肽, 形成的RADA16-IKVAV水凝胶支架与大脑组织的机械强度相似, 可增强神经干细胞的黏附及向神经元细胞分化的能力。IKVAV序列模体并没有诱导分化, 而是通过影响神经生长因子来增强分化, 随着自组装短肽水凝胶支架硬度的增加, 神经元细胞的密度下降而星形胶质细胞数量增加。Cunha等<sup>[12]</sup>采用RGD序列和BMHP(来源于骨髓归巢肽)序列分别修饰RADA16, 研究了小鼠神经干细胞的三维分化, 结果发现加入功能化序列的水凝胶支架增强了神经干细胞的生存、增殖和分化能力。空间中高密度的功能化序列可能是提高神经干细胞分化效果的关键。Luo等<sup>[16]</sup>通过腺病毒载体将人脑源性神经营养因子基因导入大鼠骨髓间充质干细胞中, 再将其种入不同的水凝胶支架中, 结果显示RADA16-PRG(PRG中包含RGD序列)水凝胶组的细胞生长、分化、神经营养因子蛋白和神经特异性烯醇酶表达均明显高于RADA16水凝胶组, 证明在自组装短肽水凝胶中, 骨髓间充质干细胞可通过人脑源性神经营养因子基因修饰分化为神经细胞。Sahab Negah等<sup>[17]</sup>设计的RADA4-GGS-IKVAV短肽, 可促进神经干细胞的生存、黏附、分化和迁移, 并且可减少神经干细胞向神经胶质细胞分化。Wang等<sup>[18]</sup>设计了RADA16-FGL水凝胶支架, 可形成较弱的 $\beta$ 折叠结构, 与RADA16混合后

表 1 神经组织工程中的  $\beta$  折叠型自组装短肽

序列	结果	参考文献
Ac-RADARADARADARADA-NH <sub>2</sub> =(RAD16-I)	促神经元分化; 促多巴胺分泌; 促多巴胺能神经; 轴突再生; 减少瘢痕组织	12-14, 23-25
RADA16-RGD	促神经细胞存活、增殖和分化; 促神经营养因子表达	12, 16
RADA16-BMHP	轴突再生; 促神经细胞的黏附; 上调基质蛋白、神经营养因子; 部分恢复运动功能; 止血	12, 26-29, 33, 42-44
RADA16-IKVAV	促神经细胞的存活、分化、黏附和迁移; 轴突再生; 抑制星形胶质细胞	15, 17, 30-31, 42
RADA16-FGL	促神经细胞的增殖、迁移	18
RADA16-BDNF	促神经元分化、神经营养因子分泌; 神经再生	21
RADA16-YIGS	促神经细胞分化; 抗神经炎症反应; 旁分泌作用; 改善阿尔茨海默病	22
RADA16-CQIK	神经再生; 运动功能部分恢复	28-29
CH <sub>3</sub> CONH-RLDLRLALRLDLR-CONH <sub>2</sub> =(SPG-178)	促神经营养因子; 神经元再生; 减少瘢痕	39
RADA16-SVVYGLR	促血管再生; 神经生长; 恢复视顶盖功能	41
LDLK12-FAQRVPP	促神经再生, 改善运动功能恢复; 止血	20, 33
K <sub>2</sub> (QL) <sub>6</sub> K <sub>2</sub> =(QL6)	轴突再生; 促神经元分化; 部分恢复运动功能	34-38

自组装为纳米纤维体结构, 不仅对大鼠脊髓神经干细胞无细胞毒性, 还可促进干细胞的增殖及其向三维支架中迁移。

Caprini等<sup>[19]</sup>从调节干细胞增殖和分化的蛋白中选出短肽序列KLPGWSG, 与LDLK12自组装短肽结合, 设计出新型功能化短肽支架, 可明显增强神经干细胞的神经元分化。Gelain等<sup>[20]</sup>将FAQRVPP序列连接于LDLK12得到功能化的Ac-FAQ-LDLK12水凝胶支架, 可促进人源和鼠源神经干细胞向神经细胞和少突胶质细胞分化。Koutsopoulos等<sup>[9]</sup>通过对比实验证明了相较于人工基底膜和I型胶原蛋白培养系统,  $\beta$ 折叠自组装短肽水凝胶支架明显促进了神经干细胞的神经元向分化, 提高了细胞长期生存率。Shi等<sup>[21]</sup>将人脐带间充质干细胞和活化的星形胶质细胞共同种入RADA16-脑源性神经营养因子短肽水凝胶支架, 该三维支架可促进具有神经轴突的典型神经元样细胞分化。此外, 结果显示共培养体系会促进更多脑源性神经营养因子的分泌, 有助于外源性人脐带间充质干细胞的神经元分化和内源性神经再生。

**2.2.2 治疗神经退行性疾病** 阿尔茨海默病的神经病理学特征, 包括细胞外 $\beta$ 淀粉样蛋白斑块形成及神经元的减少。Cui等<sup>[22]</sup>将神经干细胞植入RADA16-YIGSR支架, 发现该自组装短肽可自发地组装为纳米纤维, 它不仅可在普通培养条件下促进细胞生存率, 还可减少由 $\beta$ 淀粉样蛋白诱导的凋亡细胞数量。与单独使用神经干细胞相比, 种植于自组装短肽水凝胶中的神经干细胞能表现出更多的神经元向分化。在阿尔茨海默病模型中, 神经干细胞联合自组装短肽治疗对阿尔茨海默病模型大鼠学习、认知和记忆功能方面都有显著改善。因此,  $\beta$ 折叠自组装短肽生物材料可优化神经干细胞移植治疗阿尔茨海默病的疗效, 通过改善移植干细胞的生存和分化能力, 促进神经保护效应, 发挥抗神经炎症作用和旁分泌作用。

帕金森病是一种以黑质多巴胺能神经元选择性变性为主要病理改变的神经系统退行性疾病。Ni等<sup>[23]</sup>发现, 自组装短肽水凝胶可为多巴胺能神经分化提供一个真实的三维环境。将小鼠胚胎干细胞和诱导多能干细胞植入RADA16支架中, 应用于体外帕金森疾病模型, 结果显示与层粘连蛋白包被的二维环境和基质胶的三维环境相比, 自组装短肽水凝胶支架能提高多巴胺能神经元分化和成熟的基因表达水平, 显著增强多巴胺的释放。

**2.2.3 治疗脊髓损伤** 脊髓损伤的病理生理学特点包括创伤后炎症反应、细胞凋亡和脱髓鞘发生, 导致组织瘢痕和髓内空腔形成, 影响神经修复。星形胶质瘢痕形成和神经再生抑制是脊髓损伤恢复中的两大难题。Guo等<sup>[24]</sup>分离出许旺细胞和神经祖细胞种植于RADA16自组装短肽水凝胶支架中, 再将水凝胶支架移植入脊髓损伤大鼠脊柱中, 发现移植细胞迁移, 其轴突能够长入纳米纤维支架中, 第一次观察到了脊髓修复, 证明自组装短肽水凝胶支架在受损脊髓组织中起桥联作用。随后, 他们又进行了一项研究来评估纳米纤维支架对已产生大脑损伤的协助修复, 结果显示纳米级基质在损伤部位进行了组装及再重建, 减轻了损伤部位的炎症反应和胶质瘢痕形成<sup>[25]</sup>。

Cigognini等<sup>[26]</sup>将骨髓归巢短肽BMHP1序列通过甘氨酸连接于RADA16自组装短肽支架上, 注入大鼠脊髓损伤模型中, 结果显示GAP-43、神经营养因子和细胞外基质重塑蛋白基因表达均上调, 基底膜增厚, 新生的轴突可长入囊肿中, 大鼠后肢运动功能和前后肢协调功能明显改善。Tavakol等<sup>[27]</sup>同样将BMHP1连于RADA16序列中, 研究了该水凝胶支架对子宫内基质细胞的影响和慢性脊髓组织损伤的恢复, 分析证明了BMHP1纳米纤维支架能诱导子宫内基质细胞向神经元分化, 增强轴突再生, 减轻炎症反应的同时可改善运动神经元功能。Tavakol等<sup>[28-29]</sup>又进一步发现在脊髓损伤模型中, 适当增加水凝胶支架的硬度可能通过激活

Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路的同时抑制了BMP-4信号通路,改善神经再生并减少星形胶质细胞的发生。体内实验显示,水凝胶的硬度对GFAP阳性细胞上调和运动神经元恢复有明显的效用。因此推断存在一个明确的临界浓度,过高或过低的浓度都会通过不同的分子途径改变细胞行为和神经元分化。

短肽序列IKVAV通过结合 $\alpha$ 6整合素位点激活FAK、JNK、PI3/Akt和ERK信号通路,诱导轴突生长<sup>[30]</sup>,与 $\beta$ 1整合素位点结合抑制星形胶质细胞分化<sup>[31]</sup>。Tavakol等<sup>[32]</sup>研究发现,较长的层粘连蛋白序列CQAASIKVAV比IKVAV能更好地模拟活性位点构象,将其连于RADA16主链上,较BMHP序列短肽水凝胶支架能显著提高人子宫内膜基质细胞向神经元分化。基因表达结果显示,TH基因和Bcl-2基因过表达及GFAP基因抑制,短肽序列通过 $\beta$ -Catenin信号通路上调Bcl-2基因促进神经、轴突再生,抑制凋亡。

Shi等<sup>[21]</sup>发现将人脐带间充质干细胞在与活性星形胶质细胞共培养时,细胞的增殖及神经元分化增强。于是将人脐带间充质干细胞与星形胶质细胞共同种植于RADA16-BDNF水凝胶支架中,所得的共培养体系可促进脑源性神经营养因子分泌,增加外源人脐带间充质干细胞向神经元的分化及内源性的神经再生。移植细胞的短肽水凝胶支架对中、小型脑损伤空腔有较好的治疗效果。

Gelain等<sup>[20]</sup>将Ac-FAQ-LDLK12自组装短肽水凝胶支架注入急性脊髓损伤模型中,结果显示其能促进神经组织的再生,改善运动功能。Cigognini等<sup>[33]</sup>将RADA16-4G-BMHP1和Ac-FAQ-LDLK12水凝胶注入脊髓损伤部位,两种短肽在损伤后第3天都能发挥较好的止血作用,在第28天都能观察到轴突再生,明显改善脊髓血肿。

Liu等<sup>[34]</sup>将QL6水凝胶注入脊髓损伤大鼠模型脊髓组织中,发现QL6水凝胶可明显减少创伤后的细胞凋亡、炎症反应和星形胶质细胞增生,发挥组织保护作用。此外,QL6还能促进轴突再生。体外实验发现,QL6水凝胶支架可增强神经元分化,抑制星形胶质细胞发育。神经电生理结果显示,QL6水凝胶可明显改善轴突功能,包括传导速度增加、减少不应性、增强高频传导。Iwasaki等<sup>[35]</sup>将QL6联合神经干细胞共同注入颈髓损伤大鼠,发现QL6能减少脊髓损伤囊性空洞的体积,促进神经干细胞分化为运动神经元,减轻病灶周围的炎症反应。QL6和神经干细胞的联合作用可改善大鼠前肢的神经行为功能,增加大鼠前肢活动区域及步长。Zweckberger等<sup>[36]</sup>在脊髓损伤急性期后2周将QL6自组装短肽支架注射至损伤中心,将神经前体细胞注射于临近脊髓,联合一个缓释生长因子的微泵以保证细胞存活率,结果显示,水凝胶基质可有效提高细胞的生存能力

和分化潜能,减少瘢痕组织形成。后续又将神经前体细胞种于QL6支架中联合治疗脊髓损伤,发现联合治疗组中神经元和少突胶质细胞增多,脊髓髓内囊肿体积减小,硫酸软骨素蛋白聚糖沉积减少,突触连接增加,皮质脊髓束行为学结果得到改善。结果表明QL6支架可优化脊髓损伤后微环境,并协同加强神经干细胞治疗效果<sup>[37]</sup>。Zhao等<sup>[38]</sup>将神经前体细胞和QL6自组装短肽注射于损伤部位尾侧及吻侧,行为学分析显示,自组装短肽和神经前体细胞联合移植组可显著改善运动功能评分,增强存活率。联合移植组同样可改善神经传导速度,但并没有影响空腔体积。Ando等<sup>[39]</sup>设计的自组装短肽水凝胶SPG-178支架可诱导神经营养因子治疗脊髓损伤,体外实验证明SPG-178可增加神经生长因子、脑源性神经营养因子、NT-4、TrkA和TrkB的表达,促进运动神经元的神经突生长,体内实验显示使用SPG-178能够提高神经营养因子和神经生长因子的表达,减少炎症反应和胶质瘢痕。

**2.2.4 治疗创伤性脑损伤** 现阶段创伤性脑损伤仍是一个临床难题,因直接的脑损伤和后续炎症反应及贫血造成的持续性继发性神经损伤,可引发大脑组织缺陷和严重残疾<sup>[40]</sup>。Wang等<sup>[41]</sup>通过调节RADA16-SVYGLR短肽水凝胶的pH值和离子浓度等微环境因素,使该水凝胶支架表现出多种理化特性。这种水凝胶支架可支持内皮细胞形成管道样结构,促进神经干细胞的存活和增殖。在体内斑马鱼大脑损伤模型实验中,RADA16-SVYGLR水凝胶移植组出现了向外生长的血管和神经元发育,有效恢复了横断的视顶盖功能。Shi等<sup>[21]</sup>为了促进移植的人脐带间充质干细胞向损伤脑组织迁移,将人脐带间充质干细胞与趋化因子受体CXCR4联合,发现移植了混有人脐带间充质干细胞、CXCR4和活化星形胶质细胞的水凝胶支架,可修复中等尺寸大小的创伤性脑损伤空腔。Sun等<sup>[42]</sup>将设计的短肽应用于脑出血、坐骨神经缺损和脊髓横断模型中,发现相比RADA16支架,RADA16-IKVAV和RADA16-RGD水凝胶支架可为神经再生提供一个更为宽松的环境。

**2.2.5 治疗外周神经损伤** 外周神经较脆且易损伤,通常会导致神经组织、运动和感觉功能丧失。损伤修复的关键在于连接受损组织和创造一个允许轴突通过受损组织再生的环境。Wu等<sup>[43]</sup>将功能化序列IKVAV和RGD修饰于RADA16-1上,再将两种新合成的肽混合得到纳米纤维水凝胶RADA16-Mix,它克服了RADA16-1酸性较强的主要缺点。最近的研究将RADA16-Mix水凝胶移植于大鼠坐骨神经横断间隙中,对轴突的再生效果进行检测,同时与传统的RADA16-1进行比较。结果发现,RADA16-1水凝胶中再生的神经只是沿着水凝胶形成的空腔表面生长,而RADA16-Mix水凝胶中神经则长入水凝胶中并沿远端生长。同时,RADA16-Mix水凝胶诱导了更多的轴突再生和

许旺细胞迁移,促进了更好的功能恢复和新的神经肌肉连接结构形成。结果表明,功能化的RADA16-Mix水凝胶可提供更好的外周神经再生环境,以促进外周神经损伤修复。Nune等<sup>[44]</sup>将PLGA与RADA16-I-BMHP1混合得到一种新型纳米纤维体,发现其可有效增强许旺细胞的黏附和分化,同时促进神经发育标志基因SEM3F、NRP2和PLX1的表达。因此,自组装短肽水凝胶支架在外周神经功能再生方面有广阔的前景。

### 3 展望 Prospects

自组装短肽水凝胶作为一种新型的生物材料,具有可编程、成本低、黏弹性好、生物相容性高、免疫原性低等优点,在医学领域被广泛地应用于组织工程、药物释放、止血和抗菌剂等方面<sup>[45]</sup>。研究发现,生物体内部分短肽自组装形成的致病性淀粉样纤维或蛋白病理折叠,常常是导致某些疾病发生的主要原因<sup>[46]</sup>。因此,对分子自组装机制的深入研究,有助于探索相关疾病的病理过程,并针对该疾病设计出相应的治疗手段。虽然 $\beta$ 折叠型自组装短肽已在神经组织工程中表现出优势,但该领域的研究始终处于初期,十多年来大部分的系统研究都集中在体外细胞培养和体内联合干细胞移植。自组装短肽材料与神经组织的弹性模量相近,能较好地模拟神经组织的细胞外基质环境,而目前的研究大部分集中于联合干细胞修复脊髓损伤,对神经系统疾病的研究不够全面及深入,且针对自组装短肽材料其他优良特性进行联合研究的报道较少,例如 $\beta$ 折叠型自组装短肽的抗菌、止血和药物释放等优势的研究较少。目前, $\beta$ 折叠型自组装短肽的种类和功能化序列不够丰富,生物学效应有限,相信随着对自组装短肽种类、性质的不断优化探索,其在组织工程的应用将发展至新的高度。

**致谢:** 感谢遵义医学院何洋对资料搜集、选取提供意见与帮助。

**作者贡献:** 卫巍进行构思设计、资料收集及综述撰写,刘燕飞博士指导。

**经费支持:** 该文章接受了“贵州省联合资金资助项目(黔科合 J 字 LKZ[2013]01 号)”、“贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教合 KY 字[2015]418)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南)。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协

议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

### 4 参考文献 References

- [1] Zhang S,Holmes T,Lockshin C,et al.Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane.Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90(8):3334-3338.
- [2] Bott K,Upton Z,Schroback K,et al.The effect of matrix characteristics on fibroblast proliferation in 3D gels. Biomaterials.2010;31(32):8454-8464.
- [3] de la Rica R,Matsui H.Applications of peptide and protein-based materials in bionanotechnology. Chem Soc Rev.2010;39(9):3499-3509.
- [4] Lee MS,Kim S,Kim BG,et al.Snail1 induced in breast cancer cells in 3D collagen I gel environment suppresses cortactin and impairs effective invadopodia formation.Biochim Biophys Acta. 2014;1843(9):2037-2054.
- [5] Whitesides GM,Mathias JP,Seto CT.Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures.Science.1991;254(5036):1312-1319.
- [6] Li LS,Jiang H,Messmore BW,et al.A torsional strain mechanism to tune pitch in supramolecular helices.Angew Chem Int Ed Engl.2007;46(31):5873-5876.
- [7] Paramonov SE,Jun HW,Hartgerink JD.Self-assembly of peptide-amphiphile nanofibers: the roles of hydrogen bonding and amphiphilic packing.J Am Chem Soc.2006;128(22):7291-7298.
- [8] Yokoi H,Kinoshita T,Zhang S.Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scaffold. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(24):8414-8419.
- [9] Koutsopoulos S,Zhang S.Long-term three-dimensional neural tissue cultures in functionalized self-assembling peptide hydrogels, matrigel and collagen I.Acta Biomater. 2013;9(2): 5162-5169.
- [10] Perczel A,Gaspari Z,Csizmadia IG.Structure and stability of beta-pleated sheets.J Comput Chem. 2005;26(11): 1155-1168.
- [11] Tatman PD,Muhonen EG,Wickers ST,et al.Self-assembling peptides for stem cell and tissue engineering.Biomater Sci. 2016;4(4):543-554.
- [12] Cunha C,Panseri S,Villa O,et al.3D culture of adult mouse neural stem cells within functionalized self-assembling peptide scaffolds.Int J Nanomedicine.2011;6:943-955.
- [13] Sur S,Newcomb CJ,Webber MJ,et al.Tuning supramolecular mechanics to guide neuron development. Biomaterials. 2013; 34(20):4749-4757.
- [14] Gelain F,Bottai D,Vescovi A,et al.Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for adult mouse neural stem cell 3-dimensional cultures.PLoS One.2006;1:e119.
- [15] Cheng TY,Chen MH,Chang WH,et al.Neural stem cells encapsulated in a functionalized self-assembling peptide hydrogel for brain tissue engineering.Biomaterials. 2013; 34(8):2005-2016.
- [16] Luo H,Xu C,Liu Z,et al.Neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells with human brain-derived neurotrophic factor gene-modified in functionalized self-assembling peptide hydrogel in vitro.J Cell Biochem. 2017.doi:10.1002/jcb.26408.[Epub ahead of print]

- [17] Sahab Negah S, Khaksar Z, Aligholi H, et al. Enhancement of Neural Stem Cell Survival, Proliferation, Migration, and Differentiation in a Novel Self-Assembly Peptide Nanofiber Scaffold. *Mol Neurobiol.* 2017;54(10):8050-8062.
- [18] Wang J, Zheng J, Zheng Q, et al. FGL-functionalized self-assembling nanofiber hydrogel as a scaffold for spinal cord-derived neural stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;46:140-147.
- [19] Caprini A, Silva D, Zanoni I, et al. A novel bioactive peptide: assessing its activity over murine neural stem cells and its potential for neural tissue engineering. *N Biotechnol.* 2013; 30(5):552-562.
- [20] Gelain F, Cigognini D, Caprini A, et al. New bioactive motifs and their use in functionalized self-assembling peptides for NSC differentiation and neural tissue engineering. *Nanoscale.* 2012; 4(9):2946-2957.
- [21] Shi W, Huang C J, Xu X D, et al. Transplantation of RADA16-BDNF peptide scaffold with human umbilical cord mesenchymal stem cells forced with CXCR4 and activated astrocytes for repair of traumatic brain injury. *Acta Biomater.* 2016;45:247-261.
- [22] Cui G H, Shao S J, Yang J J, et al. Designer Self-Assemble Peptides Maximize the Therapeutic Benefits of Neural Stem Cell Transplantation for Alzheimer's Disease via Enhancing Neuron Differentiation and Paracrine Action. *Mol Neurobiol.* 2016;53(2):1108-1123.
- [23] Ni N, Hu Y, Ren H, et al. Self-assembling peptide nanofiber scaffolds enhance dopaminergic differentiation of mouse pluripotent stem cells in 3-dimensional culture. *PLoS One.* 2013;8(12):e84504.
- [24] Guo J, Su H, Zeng Y, et al. Reknitting the injured spinal cord by self-assembling peptide nanofiber scaffold. *Nanomedicine.* 2007;3(4):311-321.
- [25] Guo J, Leung K K, Su H, et al. Self-assembling peptide nanofiber scaffold promotes the reconstruction of acutely injured brain. *Nanomedicine.* 2009;5(3):345-351.
- [26] Cigognini D, Satta A, Colleoni B, et al. Evaluation of early and late effects into the acute spinal cord injury of an injectable functionalized self-assembling scaffold. *PLoS One.* 2011; 6(5):e19782.
- [27] Tavakol S, Saber R, Hoveizi E, et al. Chimeric Self-assembling Nanofiber Containing Bone Marrow Homing Peptide's Motif Induces Motor Neuron Recovery in Animal Model of Chronic Spinal Cord Injury; an In Vitro and In Vivo Investigation. *Mol Neurobiol.* 2016;53(5):3298-3308.
- [28] Tavakol S, Mousavi S M, Tavakol B, et al. Mechano-Transduction Signals Derived from Self-Assembling Peptide Nanofibers Containing Long Motif of Laminin Influence Neurogenesis in In-Vitro and In-Vivo. *Mol Neurobiol.* 2017; 54(4):2483-2496.
- [29] Tavakol S, Musavi S M, Tavakol B, et al. Noggin Along with a Self-Assembling Peptide Nanofiber Containing Long Motif of Laminin Induces Tyrosine Hydroxylase Gene Expression. *Mol Neurobiol.* 2016;54(6):4609-4616.
- [30] Mruthyunjaya S, Rumma M, Ravibhushan G, et al. c-Jun/AP-1 transcription factor regulates laminin-1-induced neurite outgrowth in human bone marrow mesenchymal stem cells: role of multiple signaling pathways. *FEBS Lett.* 2011;585(12): 1915-1922.
- [31] Pan L, North H A, Sahni V, et al. beta1-Integrin and integrin linked kinase regulate astrocytic differentiation of neural stem cells. *PLoS One.* 2014;9(8):e104335.
- [32] Tavakol S, Saber R, Hoveizi E, et al. Self-Assembling Peptide Nanofiber Containing Long Motif of Laminin Induces Neural Differentiation, Tubulin Polymerization, and Neurogenesis: In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Studies. *Mol Neurobiol.* 2016;53(8): 5288-5299.
- [33] Cigognini D, Silva D, Paloppi S, et al. Evaluation of Mechanical Properties and Therapeutic Effect of Injectable Self-Assembling Hydrogels for Spinal Cord Injury. *J Biomed Nanotechnol.* 2014;10(2):309-323.
- [34] Liu Y, Ye H, Satkunendrarajah K, et al. A self-assembling peptide reduces glial scarring, attenuates post-traumatic inflammation and promotes neurological recovery following spinal cord injury. *Acta Biomater.* 2013;9(9):8075-8088.
- [35] Iwasaki M, Wilcox J T, Nishimura Y, et al. Synergistic effects of self-assembling peptide and neural stem/progenitor cells to promote tissue repair and forelimb functional recovery in cervical spinal cord injury. *Biomaterials.* 2014;35(9): 2617-2629.
- [36] Zweckberger K, Liu Y, Wang J, et al. Synergetic use of neural precursor cells and self-assembling peptides in experimental cervical spinal cord injury. *J Vis Exp.* 2015;(96):e52105.
- [37] Zweckberger K, Ahuja C S, Liu Y, et al. Self-assembling peptides optimize the post-traumatic milieu and synergistically enhance the effects of neural stem cell therapy after cervical spinal cord injury. *Acta Biomater.* 2016;42:77-89.
- [38] Zhao X, Yao G S, Liu Y, et al. The role of neural precursor cells and self assembling peptides in nerve regeneration. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;42:60.
- [39] Ando K, Imagama S, Ito Z, et al. Self-assembling Peptide Reduces Glial Scarring, Attenuates Posttraumatic Inflammation, and Promotes Neurite Outgrowth of Spinal Motor Neurons. *Spine (Phila Pa 1976).* 2016;41(20): E1201-E1207.
- [40] Risdall J E, Menon D K. Traumatic brain injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011;366(1562):241-250.
- [41] Wang T W, Chang K C, Chen L H, et al. Effects of an injectable functionalized self-assembling nanopeptide hydrogel on angiogenesis and neurogenesis for regeneration of the central nervous system. *Nanoscale.* 2017;9(42):16281-16292.
- [42] Sun Y, Li W, Wu X, et al. Functional Self-Assembling Peptide Nanofiber Hydrogels Designed for Nerve Degeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(3):2348-2359.
- [43] Wu X, He L, Li W, et al. Functional self-assembling peptide nanofiber hydrogel for peripheral nerve regeneration. *Regen Biomater.* 2017;4(1):21-30.
- [44] Nune M, Krishnan U M, Sethuraman S. PLGA nanofibers blended with designer self-assembling peptides for peripheral neural regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 62:329-337.
- [45] Rad-Malekshahi M, Lempink L, Amidi M, et al. Biomedical Applications of Self-Assembling Peptides. *Bioconjug Chem.* 2016;27(1):3-18.
- [46] Chiti F, Dobson C M. Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat Chem Biol.* 2009;5(1):15-22.