

杨科岳, 刘权, 赵成龙, 等. 重组猫神经生长因子-2 的表达纯化与体外活性验证 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (8): 40-46.

YANG K Y, LIU Q, ZHAO C L, et al. Expression, purification and *in vitro* activity validation of recombinant feline nerve growth factor-2 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (8): 40-46.

重组猫神经生长因子-2 的表达纯化与体外活性验证

杨科岳^{1,2}, 刘权³, 赵成龙³, 姚建林⁴, 陈兴祥^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210014;

2. 中宠科技(烟台)有限公司, 山东 烟台 264003;

3. 南京瀚星信息科技有限公司, 江苏 南京 210000;

4. 东富龙科技集团股份有限公司, 上海 201108)

摘要: 旨在开发适用于犬猫神经营养治疗的安全制剂。采用基因工程技术应用 pET-32a 载体构建猫神经生长因子(FNGF)-2 重组表达载体, 蛋白诱导表达后通过 Western blot 方法使用 His 标签抗体和商品化神经生长因子抗体对表达产物进行特异性验证, 并利用大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(PC12)细胞分化试验评估其生物学活性。结果: 试验优化了 FNGF 基因序列并去除信号肽序列与前导肽序列, 将优化后的片段命名为 FNGF-2, 在成功克隆 FNGF-2 基因后, 构建了 pET-32a-FNGF-2 表达载体, 成功表达 FNGF-2; Western blot 方法证实 FNGF-2 可被特异性识别; PC12 细胞分化试验显示, 经 FNGF-2 处理 48 h 后, 可观察到神经突生长, 表明 FNGF-2 能有效诱导细胞分化且具备良好的生物活性。综上所述, 本研究成功获得具有生物活性的重组 FNGF-2, 为其在犬猫神经营养治疗中的临床应用提供了试验依据。

关键词: 猫神经生长因子-2; 原核表达; 蛋白纯化; PC12 细胞

中图分类号: S857.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)08-0040-07

Expression, purification and *in vitro* activity validation of recombinant feline nerve growth factor-2

YANG Keyue^{1,2}, LIU Quan³, ZHAO Chenglong³, YAO Jianlin⁴, CHEN Xingxiang^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China;

2. Zhongchong Technology (Yantai) Co., Ltd., Yantai 264003, China;

3. Myriad Stars Information Technology Co., Ltd., Nanjing 210000, China;

4. Tofflon Science and Technology Group Co., Ltd., Shanghai 201108, China)

Abstract: This study aimed to develop a safe preparation suitable for neurotrophic therapy in dogs and cats. Using gene engineering technology, the pET-32a vector was employed to construct and express the recombinant feline nerve growth factor (FNGF) -2. The expressed product was specifically verified by Western blot using a His-tag antibody and a commercial nerve growth factor antibody. Its biological activity was evaluated using a differentiation assay on rat adrenal pheochromocytoma (PC12) cell. The results were as follows: The FNGF gene was successfully cloned, and the pET-32a-FNGF-2 expression vector was constructed, leading to successful expression of FNGF-2. Western blot confirmed that FNGF-2 could be specifically recognized. The PC12 cell differentiation assay showed that neurite outgrowth was observed after 48 h of treatment with FNGF-2, indicating that FNGF-2 could effectively induce cell differentiation and possessed good biological activity. In summary, this study successfully obtained recombinant FNGF-2 with biological activity, providing an experimental basis for its clinical application in neurotrophic therapy for dogs and cats.

Keywords: feline nerve growth factor-2; prokaryotic expression; protein purification; PC12 cell

神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 作为

神经营养因子家族中最早被发现且研究最为深入的成员, 在神经系统的发育、维持及损伤修复中扮演着核心角色^[1]。NGF 为效应神经元 (如交感神经元和感觉神经元) 的存活与分化所必需, 它通过与其高亲和力和受体原肌球蛋白受体激酶 A (TrkA) 结合, 激活下游信号通路, 调控神经元的基因表达, 促进神经突起的生长、定向延伸以及突触的形成, 并有效防止

收稿日期: 2025-09-22; 修回日期: 2026-05-19

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFD1800302); 国家自然科学基金面上项目 (32273081)

第一作者: 杨科岳, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 陈兴祥, 博士, 教授, 主要研究方向为小动物疾病防治, E-mail: cxx@njau.edu.cn。

发育过程中神经元数量的自然凋亡减数^[2-3]。其次,对于成熟神经系统,NGF 持续发挥着维持神经元功能与结构完整性的作用,例如,由海马和皮层产生的 NGF 可通过逆行运输机制维持基底前脑胆碱能神经元的存活及其功能活性^[4-5]。当神经系统遭受外伤、缺血、缺氧或毒性损害时,NGF 能通过抑制毒性氨基酸的释放、减轻钙离子超载、清除氧自由基以及抑制细胞凋亡等多种机制,发挥显著的神经保护效应,并为轴突再生提供适宜的微环境,影响再生神经的质量与速度^[6-7]。NGF 的神经营养作用并非局限于外周神经系统,其对中枢神经系统(如胆碱能神经元、肾上腺素能神经元等)同样具有重要的调控功能^[8]。

值得注意的是,NGF 还可以促进创口组织的修复反应,加速创口愈合。例如,NGF 可以通过激活角膜上皮细胞的增殖和迁移,加速溃疡愈合。研究表明,局部应用 NGF 可改善角膜上皮缺损,缩短愈合时间,并减少继发感染风险^[9-10]。NGF 是连接靶组织与神经元、调控神经系统正常生理功能与损伤后修复的关键信号分子。对 NGF 功能的深入理解不仅揭示了神经系统发育与维持的基本规律,也为多种疾病的治疗提供了重要的理论依据与应用前景,例如在周围神经损伤及多种疼痛综合征中的治疗潜力^[1, 8]。随着基因工程抗体、递送系统(如纳米载体)等技术的不断发展,以 NGF 为靶点的治疗策略显示出日益广阔的应用前景。本研究通过原核系统成功表达出猫神经生长因子-2 (feline nerve growth factor -2, FNGF-2),其在具备促进轴突生长及调控突触可塑性的同时具备更好的犬猫同源性,在宠物“家人化”趋势深化及宠主的支付能力提升的背景下,有望扩展到犬猫神经营养性疾病领域,为犬猫神经营养性治疗的制剂研发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 猫组织样本

猫脑组织和肺组织样本来源于南京农业大学动物医学院内科组冻存。试验获得南京农业大学伦理委员会的伦理批准[认证编号:SYXK(Su)2011-0036]。

1.2 主要试验材料

一抗稀释液、T4 连接酶、NGF 兔单克隆抗体、His 标签蛋白纯化试剂盒(耐变性剂型),购自上海碧云天生物技术股份有限公司;Bradford 法蛋白浓度试剂盒、SDS-PAGE 上样缓冲液,购自北京兰杰柯科技有限公司;2×Pro Taq PCR 预混液(含染料)、2×ApexHF FS PCR 预混液、TRIzol RNA 提取试剂盒、反转录试剂预混液,购自湖南艾科瑞生物工程有限公

司;胶回收试剂盒购自建诺为生物技术(江苏)有限公司;限制性内切酶 *Xho* I、*Eco*R I 购自 TaKaRa (日本);超灵敏 ECL 化学发光检测试剂盒购自 Abbkine (美国);180 kDa 预染蛋白分子量标准(Prestained Protein Marker)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;200 kDa Prestained Protein Marker 购自武汉赛维尔生物科技有限公司;250 kDa Prestained Protein Marker 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;His 标签一抗购自武汉三鹰生物技术有限公司;鼠兔通用二抗购自 Abmart (美国)。试验所用 PC12 细胞以及基因工程菌 DH5α 与 BL21 均来自南京农业大学动物医学院内科组实验室。

1.3 FNGF 序列获取

根据 NCBI 公布的 FNGF 对应的 CDS 基因序列,利用设计好的特异性引物 FNGF-F (5'-ATGTCCATGTTGTTCTACACTCTGATC-3') 作为上游, FNGF-R (5'-TCAGGCTCTTCTCCAGCCTTC-3') 作为下游,从猫组织中提取 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL): 25 μL 2×ApexHF FS PCR 预混液, 2 μL 上游引物, 2 μL 下游引物, 2 μL cDNA 模板, 19 μL ddH₂O。反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min; 98 ℃ 15 s, 55 ℃ 15 s, 72 ℃ 1 min, 共 30 次循环; 72 ℃ 终延伸 5 min, 4 ℃ 保存。PCR 产物在 120 V、30 min 的条件下进行琼脂糖凝胶电泳,在紫外凝胶成像系统中观察电泳结果。

1.4 FNGF-2 基因序列获取与酶切位点添加

采用基因与蛋白质分析工具 Novofocus、ExPASy 等对其进行空间构象、亲水性、疏水性等分析,比对确定 FNGF 第 113~238 位氨基酸复性后为成熟肽的同时去除了信号肽,更易于表达,截取该段序列并进行序列优化为 FNGF-2。设计引物,上游引物 FNGF-2-F: 5'-CGGAATTCTTCAACAGGACTC-3' (下划线处为 *Eco*R I 酶切位点),下游引物 FNGF-2-R: 5'-CCGCTCGAGCCCAGCCTTCCTG-3' (下划线处为 *Xho* I 酶切位点),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以 1.3 中扩增出的 FNGF 基因为模板,PCR 扩增获取 FNGF-2 序列。PCR 反应体系(50 μL): 25 μL 2×ApexHF FS PCR 预混液, 2 μL 上游引物, 2 μL 下游引物, 2 μL 模板, 19 μL ddH₂O。反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min; 98 ℃ 15 s, 55 ℃ 15 s, 72 ℃ 1 min, 共 30 次循环; 72 ℃ 终延伸 5 min, 4 ℃ 保存。PCR 产物在 120 V、30 min 的条件下进行琼脂糖凝胶电泳,在紫外凝胶成像系统中观察电泳结果。

1.5 pET-32a-FNGF-2 原核表达载体的构建

pET-32a 原核表达载体经 *Eco*R I 和 *Xho* I 限制

性核酸内切酶双酶切处理, 37 ℃ 酶切 2 h。pET-32a 载体酶切产物与鉴定无误后的 PCR 产物 FNGF-2 经 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 参考胶回收试剂盒 GenePrep Gel Extraction Kit 说明进行回收纯化。将 FNGF-2 基因的胶回收片段也按上述酶切体系进行酶切, 之后利用 T4 连接酶与酶切后的原核表达载体 pET-32a 于 16 ℃ 连接 20 h, 成功构建了 pET-32a-FNGF-2 原核表达载体。

1.6 pET-32a-FNGF-2 重组菌株构建与 PCR 鉴定

吸取全部 pET-32a-FNGF-2 质粒与 DH5 α 感受态细胞混匀, 冰浴 30 min, 42 ℃ 热激 45 s, 再次冰浴 2 min, 加入无抗性的 LB 液体培养基, 置于摇床 1 h (37 ℃ 200 r/min)。12 000 r/min 短暂离心后吸弃部分上层上清液, 余下液体与沉淀用移液枪混匀, 用涂布器涂布于含有氨苄抗性的琼脂平板上, 37 ℃ 培养 12 h。挑取白色圆形的单菌落, 接种于 5 mL 氨苄抗性的 LB 液体培养基中培养, 37 ℃、200 r/min 振荡培养 10 h。提取质粒, 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对提取的 pET-32a-FNGF-2 质粒进行双酶切, 37 ℃ 水浴酶切 2 h。酶切成功的质粒送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序鉴定, 及时保存经测序鉴定正确的菌液和质粒。将 pET-32a-FNGF-2 质粒与 BL21 感受态细胞混匀, 冰浴 30 min, 42 ℃ 热激 45 s, 再次冰浴 2 min, 加入无抗性的 LB 液体培养基, 置于摇床 1 h (37 ℃, 200 r/min)。12 000 r/min 短暂离心后吸弃上层, 余下的用移液枪混匀, 涂布于氨苄抗性的平板上, 在 37 ℃ 温箱中倒置培养 12 h。挑取单菌落接种于含有氨苄霉素的 LB 液体培养基中, 180 r/min 振荡培养 8 h, 可获得 pET-32a-FNGF-2 重组表达菌。取菌液进行 PCR 鉴定, PCR 反应体系 (50 μ L): 25 μ L 2 $\times$ Pro *Taq* PCR 预混液, 2 μ L 上游引物, 2 μ L 下游引物, 1 μ L 菌液模板, 20 μ L ddH₂O。上游引物为 T7-F: 5'-TAATACGACTCAC-TATAGG-3', 下游引物为 FNGF-2-R: 5'-CCGCTCGAGCCCAGCCTTCCTG-3'。反应条件: 94 ℃ 预变性 8 min; 98 ℃ 5 s, 55 ℃ 15 s, 72 ℃ 1 min, 共 35 次循环; 72 ℃ 终延伸 2 min, 4 ℃ 保存。

1.7 重组蛋白 FNGF-2 的表达及纯化复性

把复苏完毕的菌液接种于含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中, 持续培养, 细菌 $OD_{600\text{ nm}}$ 值达到 0.6 后, 加入诱导剂 IPTG 于菌液中, 进行诱导培养, 培养期间收集诱导菌液。使用 PBS 溶液洗涤菌体 3 次, 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液加入其中, 混匀吹散后, 于沸水中进行煮样, 之后进行 SDS-PAGE 检测, 确定蛋白的表达情况, 探索蛋白表达条件。

将可以表达 FNGF-2 的 BL21 甘油保存菌于

37 ℃、180 r/min 过夜复苏, 将复苏菌置于 LB 培养基中大量扩增培养至 $OD_{600\text{ nm}}$ 值 0.6 左右, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4 h, 收集菌体, 将菌体悬液反复冻融 3 次并进行超声破碎, 将菌体悬液置于离心机进行离心, 离心后收集其上清液, 利用滤器对杂质进行去除。利用 His 标签蛋白纯化试剂盒 (耐变性剂型) 进行蛋白纯化, 使用 10 倍于纯化柱体积的去离子蒸水对蛋白纯化柱进行清洗, 再使用 5 倍于纯化柱体积的包涵体 Binding buffer 对蛋白纯化柱进行结合平衡操作。将 FNGF-2 蛋白样品上柱, 保证其缓慢流出, 使其充分结合于蛋白纯化柱, 并使用 5 倍体积的包涵体 Binding buffer 对蛋白进行除杂操作, 最后使用 5 倍于纯化柱体积的包涵体 Elution buffer (含有 250 mmol/L 咪唑) 对目的蛋白进行洗脱。将洗脱后的蛋白样品制样并进行 SDS-PAGE 确定蛋白纯化效果。

将纯化后的 FNGF-2 蛋白装入透析袋中, 依次将透析袋置于含有 6、4、2 和 0 mol/L 不同浓度尿素的复性缓冲液中, 对 FNGF-2 进行包涵体蛋白的复性。复性结束后, 将蛋白置于无 K⁺ PBS 中进行透析, 除去咪唑, 共透析 3 次, 复性和透析操作每隔 8 h 换液 1 次。

1.8 Western blot 鉴定

将 FNGF-2 蛋白原液与 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液混合并充分混匀, 随后在沸水浴中加热变性。处理后的样品进行 SDS-PAGE 分离, 之后将蛋白条带转印至 PVDF 膜上。分别使用 His 标签抗体或商品化 NGF 抗体作为一抗进行孵育, 随后利用鼠兔通用二抗进行孵育。二抗孵育结束后, 回收二抗工作液, 并使用 TBST 缓冲液对膜进行清洗。在清洗的同时, 将 ECL 化学发光底物 A 液与 B 液按等体积比例混合, 配制新鲜的检测工作液。随后用洁净的镊子取出 PVDF 膜, 以滤纸吸去膜表面残留液体, 将 ECL 工作液均匀覆盖在膜上, 于避光条件下孵育 1 min。最后, 将膜的蛋白面朝上置于超灵敏化学发光成像系统中, 进行曝光检测。

1.9 重组蛋白 FNGF-2 活性鉴定

将 PC12 细胞以每孔 3×10^5 个的密度接种于 12 孔板中。使用含 5% 胎牛血清和 10% 马血清的 RPMI-1640 完全培养基, 于 37 ℃、5% CO₂ 条件下在细胞培养箱中进行培养。培养 18 h 后, 弃去原培养基, 每孔加入 1 mL 新鲜配制的完全培养基, 分别设置空白对照组 (加入 PBS), pET-32a 空载蛋白组 (加入 pET-32a 空载蛋白 100 ng/mL, 即阴性蛋白对照), FNGF-2 处理组 (加入 FNGF-2 蛋白 100 ng/mL)。每组设 6 个复孔。加样后, 将细胞放回培养箱继续培

养至 48 h。培养结束后，在倒置相差显微镜下系统观察细胞形态变化。

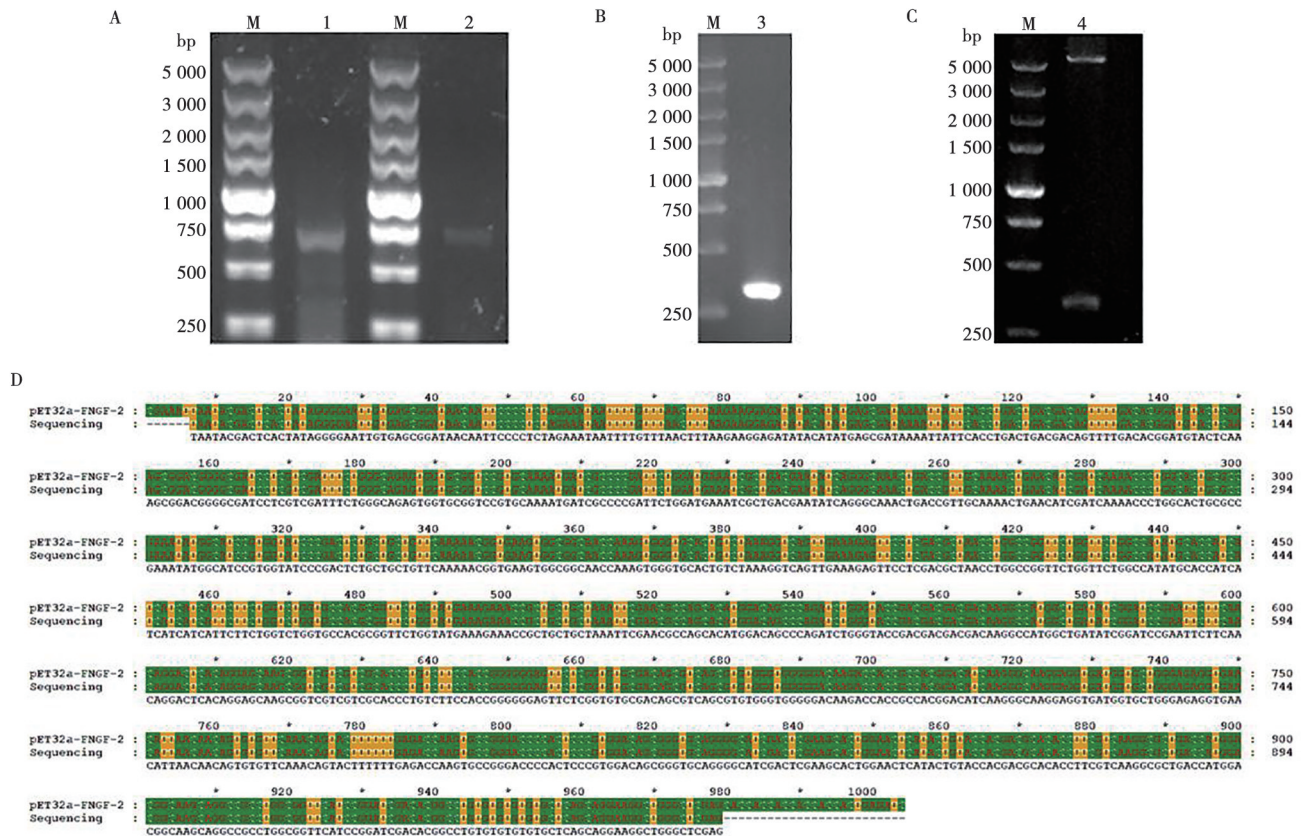
2 结果与分析

2.1 FNGF-2 序列获取与 pET-32a-FNGF-2 质粒的构建

以猫组织中提取的 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增，如图 1A 所示，获得 725 bp 大小的 FNGF 基因序列，与预期相符。

以 FNGF-2-F 为上游引物，FNGF-2-R 为下游引物进行 PCR 扩增后，如图 1B 所示，在 500 bp 与 250 bp 之间得到单一条带，其结果与 FNGF-2 序列预期大小（395 bp）相符。

pET-32a-FNGF-2 质粒测序结果如图 1D 所示，质粒双酶切鉴定结果如图 1C 所示，被酶切的质粒呈现为 2 段，分别为目的基因 FNGF-2（395 bp）与被酶切的 pET-32a 质粒（5 855 bp）。



M. DNA Marker DL2000; 1. 脑组织; 2. 肺组织; 3. FNGF-2 基因片段; 4. pET-32a-FNGF-2 酶切产物。

A. FNGF 基因 PCR 扩增; B. FNGF-2 PCR 扩增; C. pET-32a-FNGF 重组质粒双酶切鉴定; D. pET32a-FNGF-2 测序结果比对。

图 1 pET-32a-FNGF-2 质粒的构建

2.2 pET-32a-FNGF-2 重组菌菌落的构建

挑取单克隆菌落扩大培养后进行菌液 PCR 检测，结果如图 2A 所示，核酸胶条带结果与预期大小（976 bp）相符，经测序与目标序列 100% 匹配。

pET-32a-FNGF-2 重组菌菌落如图 2B 所示，白色菌落为已经导入 pET-32a-FNGF-2 质粒的重组菌菌落。

2.3 FNGF-2 最适表达条件优化

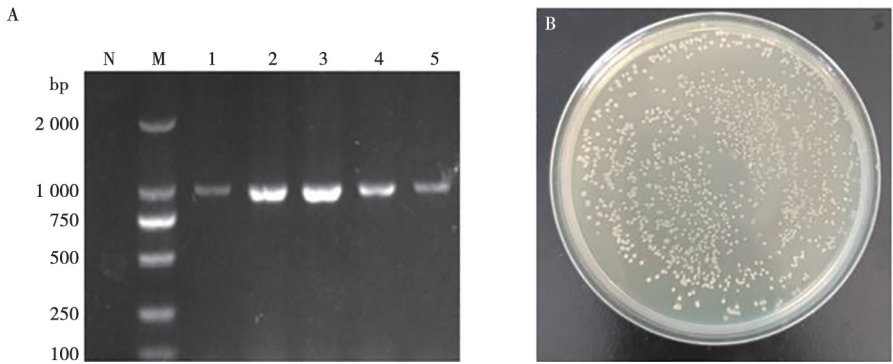
最适诱导温度、诱导时间的优化，结果如图 3A 所示，其分子量在 33 kDa 左右。pET32a-FNGF-2 在

37 °C 诱导 4 h 表达量最高。

在最适诱导温度与诱导时间的条件下，对最适 IPTG 浓度进行优化并进行可溶性检测，结果如图 3B 所示。pET-32a-FNGF-2 在 1 mmol/L 浓度 IPTG 下表达量最高，目的蛋白分子量在 33 kDa 左右，部分为包涵体沉淀。

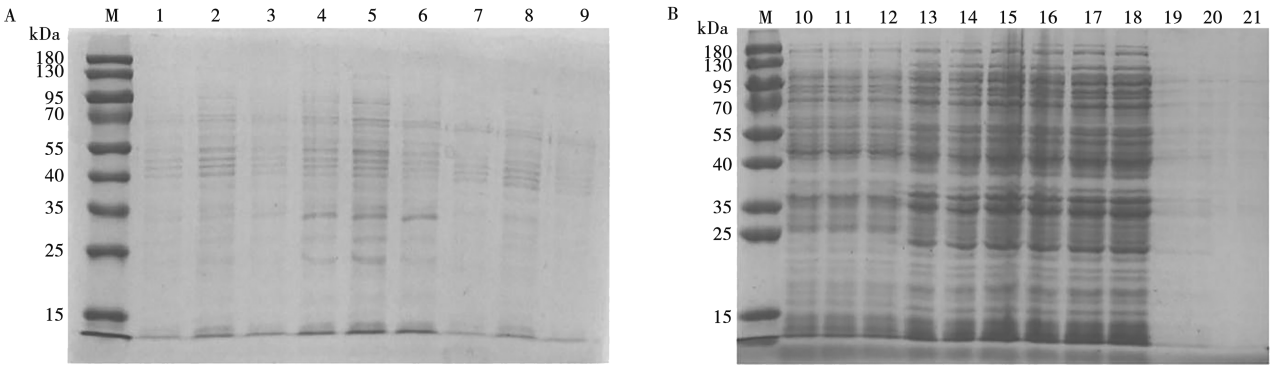
2.4 FNGF-2 蛋白纯化

按照最适条件进行大量培养，经镍柱上样、洗脱后在约 33 kDa 处可获得较为纯净的 FNGF-2 蛋白，其纯化结果如图 4 所示。



M. DNA Marker DL2000; N. 空质粒阴性对照; 1~5. 菌落 PCR 阳性菌株。
A. pET-32a-FNGF-2 重组菌 PCR 鉴定; B. pET-32a-FNGF-2 重组菌菌落。

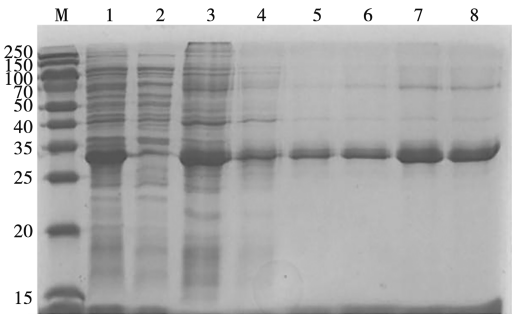
图 2 pET-32a-FNGF-2 重组菌鉴定与菌落形态



M. 蛋白质分子质量标准; 1. 16 ℃ 诱导 2 h; 2. 16 ℃ 诱导 4 h; 3. 16 ℃ 诱导 6 h; 4. 37 ℃ 诱导 2 h; 5. 37 ℃ 诱导 4 h; 6. 37 ℃ 诱导 6 h; 7. 对照菌 pET-32a 空载; 8. 未诱导 pET-32a-FNGF-2 表达菌; 9. 未诱导对照菌 pET-32a 空载; 10. 对照菌 pET-32a 空载; 11. 未诱导 pET-32a-FNGF-2 表达菌; 12. 未诱导对照菌 pET-32a 空载; 13. 0.2 mmol/L 诱导全菌; 14. 0.5 mmol/L 诱导全菌; 15. 1 mmol/L IPTG 诱导全菌; 16. 0.2 mmol/L 诱导菌破碎后 (含沉淀); 17. 0.5 mmol/L 诱导菌破碎后 (含沉淀); 18. 1 mmol/L 诱导菌破碎后 (含沉淀); 19. 0.2 mmol/L 诱导菌破碎后上清液; 20. 0.5 mmol/L IPTG 诱导菌破碎后上清液; 21. 1 mmol/L IPTG 诱导菌破碎后上清液。

A. pET-32a-FNGF-2 表达菌 1 mmol/L IPTG 诱导的最适温度与诱导时间优化; B. pET-32a-FNGF-2 表达菌 37 ℃ 诱导 4 h 的最适 IPTG 浓度优化与可溶性检测。

图 3 FNGF-2 最适表达条件优化



M. 蛋白质分子质量标准; 1. pET-32a-FNGF-2 表达菌全菌; 2. 蛋白上样后的流穿液; 3. pET-32a-FNGF-2 表达菌沉淀; 4~8. 分别为纯化洗脱时按时间顺序第 1~5 个洗脱液收集管中的纯化产物。

图 4 FNGF-2 蛋白的纯化

2.5 FNGF-2 蛋白稳定性

测定纯化的 FNGF-2 样品的浓度, 分析在纯化过程中以及-20 ℃ 冻存 3 个月的条件下, 是否会造成 FNGF-2 的降解。结果如图 5 显示, FNGF-2 在凝胶上呈单一条带, 且条带位置在纯化前后和冻存前后没有发生变化。经 ImageJ 软件分析, 纯化的 FNGF-2 纯度在 90% 左右, 表明在纯化过程中以及-20 ℃ 保存 3 个月的条件下, FNGF-2 没有降解, 其分子量为 33 kDa 左右。

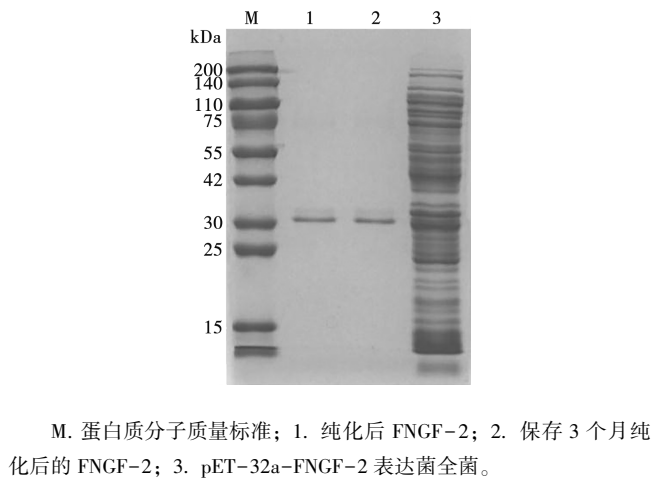


图 5 FNGF-2 蛋白的稳定性检测

2.6 FNGF-2 蛋白与抗 His 标签和商品化 NGF 抗体免疫印迹检验

Western blot 结果如图 6A 所示，His 标签抗体可与 FNGF-2 蛋白产生特异性反应，在 33 kDa 左右处出现特异性条带。如图 6B 所示，商品化 NGF 抗体可与 FNGF-2 蛋白产生特异性反应，在 33 kDa 左右处出现特异性条带。

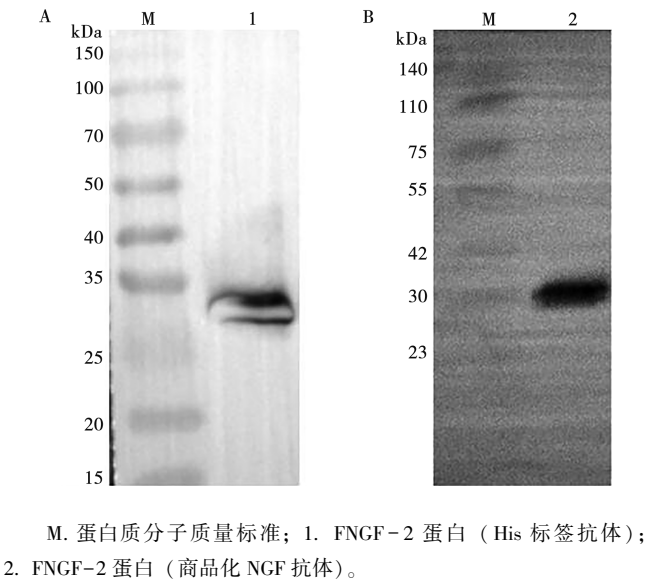


图 6 FNGF-2 蛋白利用抗 His 标签抗体 (A)、商品化 NGF 抗体 (B) 的 Western blot 检测

2.7 PC12 诱导法检测 FNGF-2 的活性

PC12 细胞诱导试验结果显示，空白对照组与 pET32a 空载蛋白组 24 h 与 48 h 并未见明显细胞分化如图 7A、7B、7D、7E。加入 FNGF-2 组 24 h 出现细胞形态变化如图 7C，48 h 出现细胞分化如图 7F。

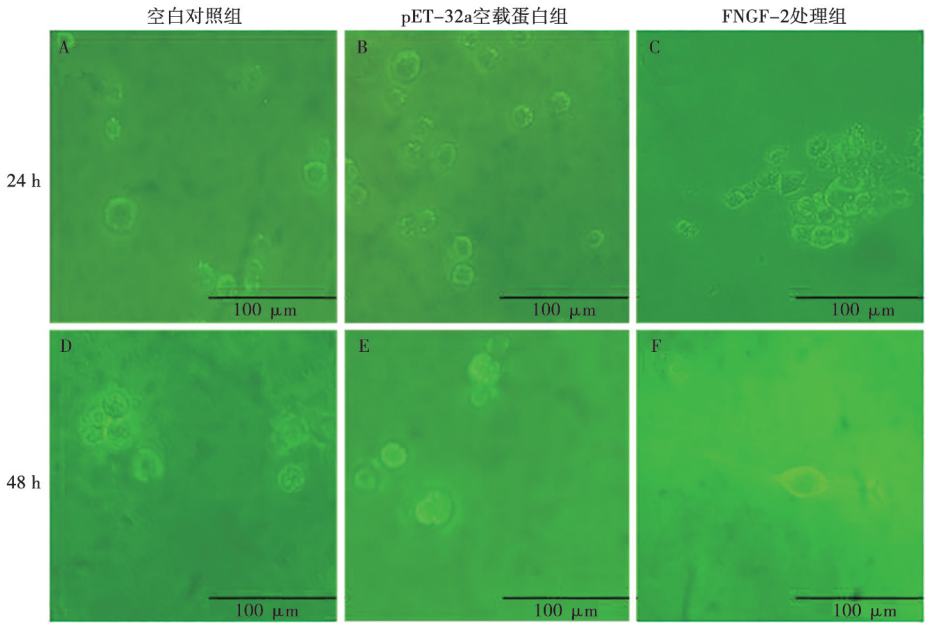


图 7 PC12 细胞诱导分化试验

3 讨论

本研究成功构建了 pET-32a-FNGF-2 表达载体，实现了 FNGF-2 的原核表达。Western blot 分析显示，His 标签与商品化 NGF 抗体均呈特异性阳性反应，证

实了表达蛋白的正确性与抗原性。进一步的 PC12 细胞分化试验表明，FNGF-2 能够诱导细胞突触延伸和形态分化，验证了其具备完整的生物学活性。这一结果与神经生长因子通过激活高亲和力和受体 TrkA 调控神经元发育与分化的经典机制相符^[11-12]。NGF 作为

神经营养因子家族的核心成员，不仅在外周神经系统（如感觉神经元和交感神经元）的存活、突触形成及损伤修复中发挥关键作用，对中枢神经系统（如基底前脑胆碱能神经元的功能维持）亦具有重要调控功能^[13-14]。本研究通过原核系统高效表达具有生物活性的 FNGF-2，为犬猫神经营养性治疗制剂的开发提供了可靠的蛋白来源。

然而，原核表达系统虽具有成本低、产量高的优势，但其真核蛋白修饰能力的缺失可能导致表达产物在翻译后修饰（如糖基化）方面与天然蛋白存在差异^[15]。尽管 PC12 细胞试验证实了 FNGF-2 的体外活性，但其在体内的稳定性、免疫原性及药代动力学特性仍需进一步评估。此外，NGF 的双重功能特性（兼具神经营养与致痛作用）要求其在治疗应用中需精准调控剂量与递送方式，以避免痛觉敏化等不良反应^[16-17]。

未来研究会聚焦于以下方向：优化 FNGF-2 的复性工艺与规模化制备流程，以提高其产率与稳定性；开发高效递送系统（如缓释微球、靶向纳米载体或基因治疗策略），实现 NGF 在损伤部位的可控释放与长效作用；在大型动物模型中系统评估 FNGF-2 制剂的安全性、药代动力学特性及神经修复效能，探索其与其他神经营养因子的协同效应，以全面提升其对感觉与运动神经功能的恢复能力。此外，进一步探索 FNGF-2 制剂在慢性疼痛管理中的平衡点，通过精准剂量调控最大化其神经营养作用的同时最小化致痛风险。

综上所述，本研究尝试为开发具有自主知识产权的兽用神经营养制剂提供理论基础，通过多技术融合与剂型创新，FNGF-2 有望为犬猫等宠物的神经损伤修复与功能恢复提供安全有效的解决方案。后续工作可结合递送技术突破与大型动物模型验证，推动 FNGF-2 制剂向临床应用转化。

参考文献：

- [1] GAVIOLI E, MANTELLI F, CESTA M C, et al. The history of nerve growth factor: from molecule to drug [J]. *Biomolecules*, 2024, 14 (6): 635.
- [2] BRACCI-LAUDIERO L, DE STEFANO M E. NGF in early embryogenesis, differentiation, and pathology in the nervous and immune systems [J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2016, 29: 125-152.
- [3] MARLIN M C, LI G. Biogenesis and function of the NGF/TrkA signaling endosome [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2015, 314: 239-257.
- [4] BIANE J, CONNER J M, TUSZYNSKI M H. Nerve growth factor is primarily produced by GABAergic neurons of the adult rat cortex [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 220.
- [5] SHI B, MOCCHETTI I. Dexamethasone induces TrkA and p75NTR immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus [J]. *Exp Neurol*, 2000, 162 (2): 257-267.
- [6] BOHMWALD K, ANDRADE C A, MORA V P, et al. Neurotrophin signaling impairment by viral infections in the central nervous system [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (10): 5817.
- [7] RICHNER M, ULRICHSEN M, ELMGAARD S L, et al. Peripheral nerve injury modulates neurotrophin signaling in the peripheral and central nervous system [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 50 (3): 945-970.
- [8] NORATA D, CAPONE F, MOTOLESE F, et al. 1953 - 2023. seventy years of the nerve growth factor: a potential novel treatment in neurological diseases? [J]. *Aging Dis*, 2024, 16 (4): 2293-2314.
- [9] LAMBIASE A, MANNI L, BONINI S, et al. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41 (5): 1063-1069.
- [10] 蔡永民. 重组人神经生长因子对大鼠神经营养性角膜炎模型药效评估 [D]. 天津: 天津医科大学, 2021.
- [11] FERRERO RESTELLI F, FONTANET P A, DE VINCENTI A P, et al. Tetraspanin1 promotes NGF signaling by controlling TrkA receptor proteostasis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77 (11): 2217-2233.
- [12] WIATRAC B, KUBIS-KUBIAK A, PIWOWAR A, et al. PC12 cell line: cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions [J]. *Cells*, 2020, 9 (4): 958.
- [13] MANNI L, ROCCO M L, BIANCHI P, et al. Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications [J]. *Growth Factors*, 2013, 31 (4): 115-122.
- [14] ROCCO M L, SOLIGO M, MANNI L, et al. Nerve growth factor: early studies and recent clinical trials [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16 (10): 1455-1465.
- [15] HUANG L, LIANG Y, HOU H, et al. Prokaryotic expression and affinity purification of DDX3 protein [J]. *Protein Pept Lett*, 2024, 31 (3): 236-246.
- [16] HIROSE M, KURODA Y, MURATA E. NGF/TrkA signaling as a therapeutic target for pain [J]. *Pain Pract*, 2016, 16 (2): 175-182.
- [17] ZHOU N, GU T, XU Y, et al. Challenges and progress of neurodrug: bioactivities, production and delivery strategies of nerve growth factor protein [J]. *J Biol Eng*, 2023, 17 (1): 75.