

Review on the Research of Cell-Penetrating Peptides

Yueru Chen¹, Mengxi Wu¹, Qian Hu¹, Huarong Guo^{1,2*}

¹Ministry of Education Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao Shandong

²Institute of Evolution and Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao Shandong

Email: *huarongguo@ouc.edu.cn

Received: Apr. 26th, 2018; accepted: May 16th, 2018; published: May 23rd, 2018

Abstract

Although biomacromolecules play an important role in the treatment of many diseases, its practical application is limited due to the natural barrier of the cell membrane. Cell-penetrating peptides are a kind of small molecular peptides with remarkable capacity for membrane translocation and can carry various macromolecules into cells including peptides, proteins, nucleic acids, and so on, opening a new way for exogenous substances to enter into cells. As a novel delivery tool, CPPs have promising application prospect. In this paper, we reviewed the classification and transmembrane mechanism of CPPs, and its use in the cancer therapy and marine biology as carrier.

Keywords

Cell-Penetrating Peptides, Structure, Classification, Transmembrane Mechanism, Cancer Therapy, Marine Biology

细胞穿膜肽的研究概况

陈月如¹, 毋梦茜¹, 胡倩¹, 郭华荣^{1,2*}

¹中国海洋大学海洋生命学院, 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室, 山东 青岛

²中国海洋大学海洋生物多样性与进化研究所, 山东 青岛

Email: *huarongguo@ouc.edu.cn

收稿日期: 2018年4月26日; 录用日期: 2018年5月16日; 发布日期: 2018年5月23日

摘要

生物大分子在许多疾病的治疗中发挥着重要的作用, 但由于细胞膜的天然屏障作用, 使得这些生物大分

*通讯作者。

文章引用: 陈月如, 毋梦茜, 胡倩, 郭华荣. 细胞穿膜肽的研究概况[J]. 海洋科学前沿, 2018, 5(2): 29-37.

DOI: 10.12677/ams.2018.52004

子的实际应用受到限制。细胞穿膜肽(cell-penetrating peptides, CPPs)是一类具有较强跨膜转运能力的小分子肽,可携带多肽、蛋白质和核酸等多种大分子物质进入细胞,开辟了外源物质进入细胞的新途径。细胞穿膜肽作为一种新型递送工具,具有广阔的应用前景。本文综述了细胞穿膜肽的分类、穿膜机制及其作为转载体在癌症治疗以及海洋生物中的应用。

关键词

细胞穿膜肽, 结构, 分类, 穿膜机制, 癌症治疗, 海洋生物

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

多肽、蛋白质和基因类生物大分子药物在许多疾病的治疗中发挥着重要的作用,但由于其尺寸较大和低亲脂特性,导致其不能有效穿过细胞膜,使得这些具有治疗价值的生物大分子在医学等领域的应用受到了极大限制。当前常用的将生物大分子导入细胞的方法有脂质体介导法、病毒载体介导法、电穿孔法和显微注射法等,但这些方法具有转运效率低、细胞毒性大、安全性差、靶向特异性差等缺点,极大地限制了其大规模应用。因此,开发高效、安全的生物大分子跨膜转运技术成为了一项重要挑战,而细胞穿膜肽(cell-penetrating peptides, CPPs)的发现为以上问题的解决提供了新的思路。Green 等(1988)最早发现人类免疫缺陷病毒 HIV 的转录反式激活因子(trans-activator of transcription, TAT)具有穿过细胞膜的能力[1];随后 Vives 等又证实,TAT 蛋白的 47~57 位氨基酸对穿膜效应起关键作用[2]。像这类具有跨膜转运能力的小分子短肽被称为细胞穿膜肽,其由 5~30 个氨基酸残基组成,不仅能够自身穿透细胞膜,还能以共价或非共价结合的方式携带多肽、蛋白质、核酸和纳米颗粒等多种外源性物质进入细胞,又被称为膜转运蛋白(membrane transduction peptides, MTPs)或蛋白转导结构域(protein transduction domains, PTDs)。CPPs 的穿膜目标非常广泛,可以进入多种细胞类型,在体内应用时甚至能够通过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)。迄今为止已发现多种天然存在及人工合成的细胞穿膜肽,如人类免疫缺陷病毒 HIV 的转录反式激活因子 TAT、果蝇同源异型转录因子 ANTP、单纯疱疹病毒 1 型(HSV-1)转录因子 VP22 以及人工合成的多聚精氨酸和多聚赖氨酸等。本文就细胞穿膜肽的分类、穿膜机制及其在癌症治疗和海洋生物中的应用进行综述。

2. 细胞穿膜肽的结构特点与分类

CPPs 的种类繁多,其分类依据有物理化学特性、来源、摄入机制、生物医学应用等,目前尚没有统一的定论。根据其物理化学特性, CPPs 可以分为三种类型:阳离子型、两亲型和疏水型,其中以阳离子型和两亲型 CPPs 为主,约占 85%,而疏水型 CPPs 仅占 15% [3]。

2.1. 阳离子型 CPPs

阳离子型 CPPs 由富含精氨酸、赖氨酸和组氨酸的短肽组成,如 TAT, Penetratin, Polyarginine, P22N, DPV3 和 DPV6 等。其中,精氨酸含有胍基,能和细胞膜上带负电荷的磷酸基团以氢键连接,在生理 PH 值条件下介导 CPPs 入膜。寡聚精氨酸(从 3 R 到 12 R)的研究表明,精氨酸的数量最低为 8 时才具有穿膜

能力,且随着精氨酸数量的增加,穿膜能力也逐渐增加。而赖氨酸虽然和精氨酸一样带有阳离子,但其不含胍基,因此当其单独存在时,其穿膜效率就不太高[4]。Futaki等(2001)发现阳离子型细胞穿膜肽至少含有8个带正电荷的氨基酸时才能达到好的穿膜效果[5]。尽管带正电荷的氨基酸残基对于CPPs穿膜至关重要,但其他氨基酸也同样重要,例如当W₁₄突变成F后,Penetratin的穿膜性就消失了[6]。

有一类特殊的阳离子型CPPs为核定位信号序列(nuclear localization sequences, NLSs),是由一段富含精氨酸、赖氨酸和脯氨酸的短肽组成,能够通过核孔复合体而转运到细胞核内。NLSs可以进一步分为单分型和双分型,分别由一簇和两簇碱性氨基酸组成,例如来至猿猴病毒40(SV40)的PKKKRKV为单分型NLS,而核质蛋白为双分型NLS,其发挥穿膜能力的最短序列为KRPAATKKAGQAKKKL。由于大多数NLSs的电荷数小于8,所以NLSs并不是有效的细胞穿膜肽[7],但当其与疏水性肽序列共价连接形成两亲型CPPs时可以有效穿膜。

2.2. 两亲型 CPPs

两亲型CPPs由亲水结构域和疏水结构域构成,分为初级两亲型、次级 α -螺旋两亲型、 β -折叠两亲型和脯氨酸富集两亲型共四种[3]。

初级两亲型CPPs分为两类,一类由疏水性肽序列和NLSs共价连接而成,如MPG(GLAFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKRKV)和Pep-1(KETWWETWWTEWSQPKKRKV),二者均以SV40的核定位信号PKKKRKV为基础,其中MPG的疏水结构域来至于HIV糖蛋白41的融合序列(GALFLGFLGAAGSTMGA),而Pep-1的疏水结构域来至于对膜有高亲和性的色氨酸富集簇(KETWWETWWTEW),但二者的疏水结构域均通过WSQP与核定位信号PKKKRKV连接。另一类初级两亲型CPPs则从天然蛋白质中分离获得,如pVEC, ARF(1-22)和BPrPr(1-28)。

次级 α -螺旋两亲型CPPs则是通过 α -螺旋与膜结合,其亲水性氨基酸残基和疏水性氨基酸残基分别位于螺旋结构的不同表面,如MAP(KLALKLALK ALKAALKLA)。对于 β -折叠两亲型CPPs,其形成 β -折叠片的能力对其穿膜能力是至关重要的,如在VT5(DPKGDPKGVTVTVTVTGKDPKPD)的穿膜能力研究过程中,运用D-型氨基酸突变产生的类似物不能形成 β -折叠片,其穿膜能力则变得非常差[8]。在脯氨酸富集的两亲型CPPs中,当脯氨酸在多肽结构中非常富集时,其在纯水中极易形成聚脯氨酸II(PPII)。PPII为左旋螺旋,每圈含3.0个氨基酸残基,与标准的右旋 α -螺旋结构每圈3.6个氨基酸残基完全相反。脯氨酸富集的两亲型CPPs有牛抗菌肽7(Bac7)、合成多肽(PPR)_n(其中n可为3、4、5和6)等。

2.3. 疏水型 CPPs

疏水型CPPs只含有非极性氨基酸残基,净电荷量低于氨基酸序列总电荷量的20%,或者含有穿膜至关重要的疏水性基序或化学基团。尽管这类细胞穿膜肽常常被忽视,但它们确实存在,如来源于卡波西式肉瘤的成纤维细胞生长因子(K-FGF)和成纤维细胞生长因子12(F-GF12)。

3. 细胞穿膜肽的穿膜机制

CPPs虽然已经成为近年来的研究热点,但其穿膜机制目前仍存在很大争议。目前主要存在两种CPPs穿膜机制:一种是直接穿膜(即非能量依赖型途径),另一种是能量依赖型的内吞作用。具体采用哪种方式进入细胞,这跟CPPs本身的物理化学特性,携带货物的大小、电荷和种类,CPPs与货物复合体的浓度,以及所处理的组织和细胞类型等都密切相关[9]。

3.1. 直接穿膜

直接穿膜是一种非能量依赖型途径,现已提出的直接穿膜机制包括:反转微团模式、地毯模式、打

孔模式以及质膜稀疏模式[10]。所有这些模式,均需要阳离子型 CPPs 先与细胞质膜上的磷脂双分子层等阴离子成分相互作用,导致质膜的稳定性改变,而随后的内在化过程则依赖于 CPPs 的类型和浓度、货物的特性、所处理的细胞系以及孵育条件等。这些机制虽能够解释 CPPs 跨膜转运的某些方面,但均不能提供适用于所有类型 CPPs 的一个完整的内在化途径。

反转微团模式是应用核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)研究 penetratin 与磷脂膜相互作用时提出来的。这种机制的核心内容是阳离子型 CPPs 首先与磷脂膜上阴离子相互作用,接着在 CPPs 的疏水性氨基酸残基和磷脂膜的相互作用下磷脂双分子层发生重排和穿梭运动,随后 CPPs 被包埋进入反转微团中,微团移动到脂双层膜的另一侧,直接将 CPP 释放到胞浆中。由于这种模式假设在翻转微团形成过程中,需要 CPPs 中疏水氨基酸残基的参与,因此对于 TAT 和寡聚精氨酸这类不含疏水性氨基酸残基的 CPPs 来说,这类机制并不适用。

地毯模式被用来描述一些抗菌肽的转位机制,但也用来描述高浓度 CPPs 的细胞毒性。在这种模式中,阳离子型 CPPs 像地毯一样覆盖在负电荷质膜表面,随后由于 CPPs 中碱性氨基酸残基朝向质膜表面,疏水性氨基酸残基与质膜的疏水性核心相互作用,当 CPPs 的浓度达到阈值时,就会局部破坏磷脂膜,使得 CPPs 进入细胞[11] [12]。

打孔模式,也称为木桶板模式,是抗菌肽进入细菌的一种内在化机制。孔型通道的形成需要两亲型 CPPs 的 α -螺旋结构的参与。CPPs 成束聚集排列于细胞表面并平行排列插入细胞膜中,形成桶样结构的通道,其螺旋的疏水区域结合到膜脂中形成孔道的外表面,而亲水部分则与磷脂亲水头部结合,形成孔道的中心内腔,从而介导 CPPs 发生跨膜转位,实现内在化。

“质膜稀疏”效应,首先被用来解释爪蟾抗菌肽的作用机制[13]。在这个模型中, CPPs 形成地毯结构后,外小叶电荷间相互作用产生的扰动,会引起负电荷膜脂重排,质膜变薄。质膜表面 CPPs 间相互作用或者聚合,使得质膜局部表面的表面张力减少,允许 CPPs 插入质膜中,随后进入细胞内。然而由于没有观察到质膜出现透性,使得这种机制的可信度大打折扣。若把质膜孔道的瞬时特性与细胞膜修复反应相结合,或许可以解释细胞膜为什么没有出现透性这一现象[14]。

3.2. 内吞途径

内吞途径是否参与 CPPs 的穿膜,一直是 CPPs 穿膜机制研究的焦点。早期的穿膜机制研究认为, CPPs 的穿膜机制是一个非受体、非转运蛋白和非能量依赖的直接内在化作用。Vives 等(1997)发现 TAT 在 4℃ 且能量被剥夺时能够进入细胞,由此认为 CPPs 入胞是非能量依赖型的内在化机制,排除了内吞通路参与 CPPs 内在化机制的可能[15]。但早期的这些研究存在一些问题,例如使用甲醇/甲醛固定细胞后,可能会使结合在细胞表面的 CPPs 重新分布[16];阳离子型 CPPs 具有很强的膜亲和性,多次洗涤后也不能使其和细胞膜彻底分离,当使用流式细胞术观察时就不能很好地区分膜结合肽和内在化肽,产生 CPPs 内在化的假象。Richard 等(2003)把细胞固定和流式细胞术等客观因素考虑在内,通过核内体分布与摄取动力学证实,在这种条件下 TAT 是通过内吞形式进入细胞的[17]。Wadia 等(2004)进一步利用胞吞作用和荧光标志物 FM4-64 研究了 TAT-Cre 的跨膜转导现象,发现二者具有胞内共定位作用,从而充分说明了 TAT 蛋白转导肽介导的外源靶分子跨膜转运是一个内吞机制[18]。

尽管一些情况下, CPPs 通过直接跨膜的方式穿过细胞膜,但普遍认为大多数的 CPPs 及其装载的货物是通过内吞作用进入细胞的。当 CPPs 携带货物以内吞的方式进入细胞,被转运的物质可能不被 CPPs 释放而转移至溶酶体中被降解掉(Patel, 2007),而在 CPPs 与货物复合体被运送到溶酶体降解之前,其命运取决于其逃脱核内体小室的能力。内吞作用具体可以分为四种类型:网格蛋白介导的内吞作用、小窝蛋白/脂筏介导的内吞作用、网格蛋白/小窝蛋白非依赖性的内吞作用和大胞饮作用[19]。

特定 CPPs 的内吞途径, 不仅依赖于其自身的特性, 还依赖于其结合货物的类型、大小、电荷或者疏水性[20]。例如, 当 TAT 和蛋白结合时, 通过脂筏介导的内吞作用进入细胞, 而当其与荧光基团结合时, 则通过网格蛋白介导的内吞作用进入细胞。当 CPPs 结合大分子货物时(MW > 30 kD), 则通过大胞饮的形式进入细胞, 其中大胞饮为肌动蛋白依赖性的内吞途径, 具有膜波动和囊泡形成特性, 不同于其他类型的内吞作用。

4. 细胞穿膜肽作为转运载体的应用

4.1. 细胞穿膜肽作为转载体在癌症治疗中的应用

CPPs 依赖性的药物传递系统, 已用于各种疾病的治疗研究, 包括: 神经性疾病、哮喘、局部缺血、糖尿病以及癌症, 其中癌症的治疗研究居于首位。作为有效的转运工具, CPPs 已成功将多种细胞毒性药物导入肿瘤细胞, 用于诱导肿瘤细胞凋亡。

4.1.1. CPPs 介导小分子药物的跨膜转运

小分子抗癌药物具有体积小和亲油特性, 能够高效扩散进入肿瘤细胞, 但当肿瘤细胞频繁地暴露于相同的药物时就会出现多重耐药性(multidrug resistance, MDR)。为了解决这个问题, 一些研究者尝试将这些药物和 CPPs 结合, 介导这些小分子药物进入细胞。Dubikovskaya 等通过二硫键将八聚精氨酸 R8 与抗癌药物紫杉酚连接, 形成 R8-紫杉酚共价物[21]。结果显示, 对于紫杉酚敏感的肿瘤模型, R8-紫杉酚共价物与紫杉酚单独作用具有相似的效应, 而对于具有紫杉酚抗性的肿瘤模型, R8-紫杉酚共价物要比紫杉酚单独作用更容易诱导肿瘤细胞凋亡。小分子药物与 CPPs 结合有很多优点, 除了能够克服多重耐药性, 还能够增加药物的水溶性, 提高药物的利用率。为了增加抗癌药物的细胞毒性和靶向转运, Lee 等利用化学方法将阿霉素、TAT 和聚合壳聚糖骨架结合, 产生壳聚糖/阿霉素/TAT 嵌合体, 与无 TAT 嵌合的阿霉素或者壳聚糖/阿霉素相比, 此嵌合体显示出更有效的细胞内化, 且能够改变阿霉素在生物体内的分布, 增强肿瘤定位, 从而显著地抑制肿瘤生长[22]。

4.1.2. CPPs 介导多肽和蛋白质的跨膜转运

抑癌基因发生突变, 可引起多种癌症的发生[23] [24]。一些研究者尝试向癌细胞内转运抑癌基因相对应的全长蛋白质或者多肽, 用于恢复该类蛋白质的功能, 以达到治疗癌症的目的。Snyder 等构建了 TAT-p53 嵌合肽, 通过腹腔注射到晚期腹膜癌转移的小鼠体内, 与平均存活时间为 10 天的对照组相比, 实验组小鼠的平均存活时间提高了 6 倍以上[25]。为了恢复 p16 蛋白活性, Hosotani 等通过二硫键将 p16 蛋白的 20 个氨基酸残基构成的短肽与 penetratin 共价连接, 并在胰腺肿瘤动物模型中验证其功效。结果显示, 该复合物能够明显抑制肿瘤的增长(处理组肿瘤: 79 ± 17 mg; 对照组肿瘤: 149 ± 12 mg) [26]。

一些研究者尝试采用不同的处理方法诱导肿瘤细胞的凋亡。第二线粒体衍生的半胱天冬酶激活物(second mitochondria-derived activator of caspase, SMAC)作为线粒体起源的蛋白质, 在线粒体调控细胞凋亡过程中起着重要作用[27]。当 SMAC 从线粒体释放后, 能够使细胞凋亡蛋白的抑制剂失活, 从而促进细胞凋亡。Fulda 等将 SMAC 氨基端的 7 个氨基酸残基与 TAT 构成嵌合肽, 体外研究发现此嵌合肽并不能有效促进肿瘤细胞凋亡, 但却使肿瘤细胞对细胞凋亡刺激剂敏感, 如肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)。在人胶质瘤异种移植的小鼠模型中, TRAIL 与 SMAC-TAT 肽的结合物能够明显抑制肿瘤的生长, 且使用 0.6 或者 2 μ g 的 TRAIL 时能够将肿瘤细胞根除[28]。植物来源的白树毒素, 属于核糖体失活蛋白(ribosome inactivating proteins, RIPs), 当其半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)为皮摩尔水平时, 即能有效抑制蛋白翻译, 然而由于其穿膜能力较差, 往往达不到治疗肿瘤的效果[29]。为了克服这一障碍, Park 等将白树毒素与 TAT 或者 LMWP

通过化学方法结合, 在小鼠结肠癌细胞中显示出较强的抗肿瘤活性, 且当 CPPs 和白树毒素嵌合肽注射总剂量达到 100 μg 时, 能够完全抑制肿瘤生长[30]。

4.1.3. CPPs 介导基因的跨膜转运

基因、反义寡核苷酸链以及小干扰 RNA (small interference RNA, siRNAs) 可能是治疗癌症的有效方法[31]。RNA 干扰技术对靶基因具有高度特异性且具有独特的肿瘤抑制效应, 使其成为了特别有吸引力的治疗策略, 然而, siRNA 药物电荷较强且尺寸偏大, 细胞穿透能力较弱。曾尝试利用阳离子脂质体、阳离子聚合物以及 CPPs 介导 siRNA 进入细胞, 其中 CPPs 由于毒性较低, 引起了广泛的关注。siRNA 可以共价或者非共价的形式与 CPPs 结合, 虽然共价结合是最理想的结合形式, 但由于二者之间超强的电荷作用, 极易形成紧密的复合体或者聚合体, 与 siRNA 和 CPP 按 1:1 共价结合体相比, 不易通过细胞膜。此外, 带负电荷的 siRNA 极易中和阳离子型 CPPs 的电荷, 使 siRNA 和 CPPs 失去其原有的生物学功能。考虑到共价结合的诸多不利因素, 研究者们纷纷选择将 siRNA 以非共价的形式与 CPPs 结合, 且主要关注 siRNA-CPP 嵌合肽在体外研究的可行性, 动物体内的研究也在持续增加。

血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 在肿瘤生长所必须的血管生成中扮演着重要作用, 封闭 VEGF 受体或者沉默 VEGF 基因是治疗肿瘤的有效方法。Kim 等利用胆固醇和 R9 的嵌合体作为载体, 与抗 VEGF 的 siRNA (即 siVEGF) 结合形成胆固醇/R9/siVEGF 复合体, 能够明显地抑制肿瘤生长和血管生成[32]。Cyclin B 是一种有丝分裂周期蛋白, 对于细胞分裂至关重要, 但在肿瘤细胞中表达明显失调, 一些研究者尝试使用 RNA 干扰技术达到治疗的目的。Crombez 等将抗 cyclinB1 的 siRNA 与缩短版的 MPG (命名为 MPG-8) 结合, 形成 siRNA/MPG-8 复合体, 能够明显下调 cyclinB1 的表达水平, 诱导细胞周期发生阻滞, 从而抑制各种肿瘤细胞的增殖[33]。

4.1.4. CPPs 介导纳米粒子的跨膜转运

虽然细胞穿膜肽的跨膜机制尚不完全清楚, 但已被广泛用于各种纳米粒子的跨膜转运, 例如磁性纳米粒子、脂质纳米粒子、金纳米粒子、胶团和量子点等。1999 年, Josephson 等将 TAT 与交联氧化铁颗粒 (cross-linked iron oxide particles, CLIOs) 结合形成 TAT/CLIO 复合体, 平均粒径 41 nm, 与无 TAT 结合的 CLIO 相比, 穿膜效率提高了约 100 倍, 能够有效标记细胞, 有利于核磁共振成像或者磁性分选[34]。随着 TAT/CLIO 比值的增加, TAT/CLIO 的穿膜效率呈非线性增长, 当其比值达到 15 时, 穿膜效率最高。此外, 脂质体与 CPPs 结合形成的复合体能够有效进入各种细胞, 如小鼠心脏肌细胞、小鼠肺癌细胞和人乳腺癌细胞等, 且脂质体的穿膜效率与 CPPs 的密度成正比[35]。与 TAT/脂质体复合物相比, penetratin/脂质体复合物的穿膜速度更快, 1 h 内即可达到最大吸收值。鉴于 CPPs 能够成功介导各种纳米粒子的跨膜转运, 研究者们对利用 CPP/纳米粒子复合体转运各种抗肿瘤药物产生了浓厚的兴趣。Balzeau 等利用 CPP 修饰的脂质纳米胶囊装载紫杉醇, 能够高效进入恶性胶质瘤细胞, 抑制肿瘤细胞生长[36]。

4.2. 细胞穿膜肽作为转运载体在海洋生物中的应用

目前关于 CPPs 的转导机制仍存有争议, 然而现有研究表明无论是动物细胞还是高等植物细胞, CPPs 都能够适用, 但 CPPs 在海洋生物中的研究较为匮乏, 主要集中在海洋生物育种和疫苗递送等方面。海洋生物育种方面, 郝萧等为获得红鳍东方鲀精巢细胞的 iPS 细胞, 选取 Oct4 与 Sox2 这两个维持胚胎干细胞特征所必须的转录因子, 同时引入细胞穿膜肽 11R, 通过原核表达系统诱导表达出其编码蛋白。与体外培养的红鳍东方鲀精巢细胞系的细胞共孵育, 发现细胞穿膜肽能有效介导 Oct4 和 Sox2 重组蛋白穿膜进入红鳍东方鲀精巢细胞, 且主要集中于细胞核内, 为红鳍东方鲀精巢细胞诱导转化为 iPS 细胞, 进行优质、高产、抗逆红鳍东方鲀的细胞工程育种奠定了基础[37]。韦一凡等成功利用异硫氰酸荧光素

(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的九聚精氨酸(FITC-R9)转入浒苔、紫菜和海带这三种常见的大型海藻, 转入的效率与藻体细胞壁结构有一定联系, 且 R9 对大型海藻的光合作用没有负面影响。此外, 还探索了细胞穿膜肽非共价连接 siRNA 导入微藻的条件, 其中杜氏盐藻能够大量摄入 R9/siRNA 复合体。这些工作将为今后的大型海藻育种、藻类基因沉默和基因功能的研究提供技术支持[38] [39]。在疫苗递送方面, Sun 等在海豚链球菌的保护抗原 Sia10 的氨基端和羧基端分别引入细胞穿膜肽 Antp 和 TAT, 构建了四种融合蛋白, 其中 TAT-Sia10 融合蛋白穿膜能力最强。将 TAT-Sia10 融合蛋白从腹腔注入牙鲆体内, 此融合蛋白能够穿过前肾淋巴细胞和鳃细胞, 同时增强巨噬细胞活性和外周血白细胞增殖, 上调与免疫相关的基因表达。而且接种免疫 2~8 周后诱导产生特异性的抗体, 提高了牙鲆存活率[40]。此外, Ma 等也成功将细胞穿膜肽应用于细菌载体疫苗研究, 并在斑马鱼中进行了验证[41]。

5. 小结与展望

CPPs 可以穿过细胞膜, 并将多肽、蛋白质和核酸等多种生物大分子物质携带进入细胞, 克服了传统药物在输送上的难题, 给药物载体研究带来了新的机遇, 并取得了不错的进展, 尤其在肿瘤治疗、心血管疾病、神经系统疾病和疫苗研究等领域, 但 CPPs 真正应用于临床仍有一系列问题需要解决。其一是 CPPs 在输送蛋白质或多肽时, 由于蛋白水解作用和快速的肝肾清除而导致其血浆半衰期较短, 导致 CPPs 稳定性较差。面对这个问题, 可能要将 CPPs 与药物双双嵌入大分子载体中(如脂质体或生物聚合物), 或连接亲水性的 PEG 等解决[42]。其二是 CPPs 介导穿膜时缺乏组织特异性和细胞类型特异性, 使得药物无法在靶部位定向积累, 而对正常组织和细胞的损伤较大。为了克服这一问题, 一些研究者尝试利用肿瘤微环境的特性, 设计一系列的修饰 CPPs, 在未到达靶部位之前掩盖其穿膜特性, 而当其到达靶部位后, 利用肿瘤微环境的改变如 PH 值、酶的种类和活性的改变, 或者借助外界的刺激, 使 CPPs 的跨膜转运功能恢复, 从而携带药物分子进入肿瘤细胞, 实现抗肿瘤靶向治疗。

目前关于 CPPs 运载系统的研究越来越深入, 细胞穿膜肽介导的转导技术为外源性生物分子进入细胞提供了全新的思路, 为疾病的治疗带来了曙光。随着研究的进行, 将会有越来越多的细胞穿膜肽及其类似物被发现和设计出来, 并对其穿膜机制进一步研究。相信在不久的将来, 转导技术的相关疗法一定会造福人类。

基金项目

国家自然科学基金项目(31472274 和 31172391)、中央高校基本科研业务费专项(201822018 和 201762003)资助。

参考文献

- [1] Green, M. and Loewenstein, P.M. (1988) Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus Tat Trans-Activator Protein. *Cell*, **55**, 1179-1188. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90262-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90262-0)
- [2] Vives, E., Brodin, P. and Lebleu, B. (1997) A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 16010-16017. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.25.16010>
- [3] Milletti, F. (2012) Cell-Penetrating Peptides Classes, Origin and Current Landscape. *Drug Discovery Today*, **17**, 850-860. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.002>
- [4] Tunnemann, G., Ter-Avetisyan, G., Martin, R.M., et al. (2008) Live-Cell Analysis of Cell Penetration Ability and Toxicity of Oligo-Arginines. *Journal of Peptide Science*, **14**, 469-476. <https://doi.org/10.1002/psc.968>
- [5] Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., et al. (2001) Arginine-Rich Peptides. An Abundant Source of Membrane Permeable Peptides Having Potential as Carriers for Intracellular Protein Delivery. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 5836-5840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007540200>

- [6] Prochiantz, A. (1996) Getting Hydrophilic Compounds into Cells: Lessons from Homeopeptides. *Current Opinion in Neurobiology*, **6**, 629-634. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(96\)80095-X](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(96)80095-X)
- [7] Mueller, J., Kretzschmar, I., Volkmer, R., *et al.* (2008) Comparison of Cellular Uptake Using 22 CPPs in 4 Different Cell Lines. *Bioconjugate Chemistry*, **19**, 2363-2374. <https://doi.org/10.1021/bc800194e>
- [8] Oehlke, J., Krause, E., Wiesner, B., *et al.* (1997) Extensive Cellular Uptake into Endothelial Cells of an Amphipathic [beta]-Sheet Forming Peptide. *FEBS Letters*, **415**, 196-199. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01123-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01123-X)
- [9] Brock, R. (2014) The Uptake of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides: Putting the Puzzle Together. *Bioconjugate Chemistry*, **25**, 863-868. <https://doi.org/10.1021/bc500017t>
- [10] Shin, M.C., Zhang, J., Min, K.A., *et al.* (2014) Cell-Penetrating Peptides: Achievements and Challenges in Application for Cancer Treatment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **102**, 575-587. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34859>
- [11] Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., *et al.* (1992) Interaction of Antimicrobial Dermaseptin and Its Fluorescently Labeled Analogues with Phospholipid Membranes. *Biochemistry*, **31**, 12416-12423. <https://doi.org/10.1021/bi00164a017>
- [12] Matsuzaki, K. (1999) Why and How Are Peptide-Lipid Interactions Utilized for Self-Defense? Magainins and Tachyplesins as Archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Biomembranes*, **1462**, 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00197-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00197-2)
- [13] Ludtke, S., He, K. and Huang, H. (1995) Membrane Thinning Caused by Magainin 2. *Biochemistry*, **34**, 16764-16769. <https://doi.org/10.1021/bi00051a026>
- [14] Palm-Apergi, C., Lorents, A., Padari, K., *et al.* (2009) The Membrane Repair Response Masks Membrane Disturbances Caused by Cell-Penetrating Peptide Uptake. *FASEB Journal*, **23**, 214-223. <https://doi.org/10.1096/fj.08-110254>
- [15] Vives, E., Granier, C., Prevot, P., *et al.* (1997) Structure-Activity Relationship Study of the Plasma Membrane Translocating Potential of a Short Peptide from HIV-1 Tat Protein. *Letters in Peptide Science*, **4**, 429-436. <https://doi.org/10.1023/A:1008850300184>
- [16] Lundberg, M. and Johansson, M. (2002) Positively Charged DNA-Binding Proteins Cause Apparent Cell Membrane Translocation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **291**, 367-371. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6450>
- [17] Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., *et al.* (2003) Cellpenetrating Peptides. A Reevaluation of the Mechanism of Cellular Uptake. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 585-590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209548200>
- [18] Wadia, J.S., Stan, R.V. and Dowdy, S.F. (2004) Transducible TAT-HA Fusogenic Peptide Enhances Escape of TAT-Fusion Proteins after Lipid Raft Macropinocytosis. *Nature Medicine*, **10**, 310-315. <https://doi.org/10.1038/nm996>
- [19] Conner, S.D. and Schmid, S.L. (2003) Regulated Portals of Entry into the Cell. *Nature*, **422**, 37-44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>
- [20] Maiolo, J.R., Ferrer, M. and Ottinger, E.A. (2005) Effects of Cargo Molecules on the Cellular Uptake of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1712**, 161-172. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.04.010>
- [21] Dubikovskaya, E.A., Thorne, S.H., Pillow, T.H., *et al.* (2008) Overcoming Multidrug Resistance of Small-Molecule Therapeutics through Conjugation with Releasable Octaarginine Transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 12128-12133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805374105>
- [22] Lee, J.Y., Choi, Y.S., Suh, J.S., *et al.* (2011) Cell-Penetrating Chitosan/Doxorubicin/TAT Conjugates for Efficient Cancer Therapy. *International Journal of Cancer*, **128**, 2470-2480. <https://doi.org/10.1002/ijc.25578>
- [23] Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., *et al.* (1991) p53 Mutations in Human Cancers. *Science*, **253**, 49-53. <https://doi.org/10.1126/science.1905840>
- [24] Liggett, W.H. and Sidransky, D. (1998) Role of the p16 Tumor Suppressor Gene in Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **16**, 1197-1206. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.3.1197>
- [25] Snyder, E.L., Meade, B.R., Saenz, C.C., *et al.* (2004) Treatment of Terminal Peritoneal Carcinomatosis by a Transducible p53-Activating Peptide. *PLOS Biology*, **2**, E36. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020036>
- [26] Hosotani, R., Miyamoto, Y., Fujimoto, K., *et al.* (2002) Trojan p16 Peptide Suppresses Pancreatic Cancer Growth and Prolongs Survival in Mice. *Clinical Cancer Research*, **8**, 1271-1276.
- [27] Vucic, D., Deshayes, K., Ackerly, H., *et al.* (2002) SMAC Negatively Regulates the Anti-Apoptotic Activity of Melanoma Inhibitor of Apoptosis (MLIAP). *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 12275-12279. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112045200>
- [28] Fulda, S., Wick, W., Weller, M., *et al.* (2002) Smac Agonists Sensitize for Apo2L/TRAIL- or Anticancer Drug-Induced Apoptosis and Induce Regression of Malignant Glioma *In Vivo*. *Nature Medicine*, **8**, 808-815. <https://doi.org/10.1038/nm735>

- [29] Stirpe, F., Olsnes, S. and Pihl, A. (1980) Gelonin, a New Inhibitor of Protein Synthesis, Nontoxic to Intact Cells. Isolation, Characterization, and Preparation of Cytotoxic Complexes with Concanavalin A. *The Journal of Biological Chemistry*, **255**, 6947-6953.
- [30] Park, Y.J., Chang, L.C., Liang, J.F., *et al.* (2005) Nontoxic Membrane Translocation Peptide from Protamine, Low Molecular Weight Protamine (LMWP), for Enhanced Intracellular Protein Delivery: *In Vitro* and *In Vivo* Study. *THE FASEB Journal*, **19**, 1555-1557. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2322fje>
- [31] Lu, P.Y., Xie, F.Y. and Woodle, M.C. (2003) siRNA-Mediated Antitumorigenesis for Drug Target Validation and Therapeutics. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, **5**, 225-234.
- [32] Kim, W.J., Christensen, L.V., Jo, S., *et al.* (2006) Cholesteryl Oligoarginine Delivering Vascular Endothelial Growth Factor siRNA Effectively Inhibits Tumor Growth in Colon Adenocarcinoma. *Molecular Therapy*, **14**, 343-350. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.03.022>
- [33] Crombez, L., Morris, M.C., Dufort, S., *et al.* (2009) Targeting Cyclin B1 through Peptide-Based Delivery of siRNA Prevents Tumour Growth. *Nucleic Acids Research*, **37**, 4559-4569. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp451>
- [34] Josephson, L., Tung, C.H., Moore, A., *et al.* (1999) High-Efficiency Intracellular Magnetic Labeling with Novel Superparamagnetic-Tat Peptide Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, **10**, 186-191. <https://doi.org/10.1021/bc980125h>
- [35] Torchilin, V.P. (2008) Cell Penetrating Peptide-Modified Pharmaceutical Nanocarriers for Intracellular Drug and Gene Delivery. *Biopolymers*, **90**, 604-610. <https://doi.org/10.1002/bip.20989>
- [36] Balzeau, J., Pinier, M., Berges, R., *et al.* (2013) The Effect of Functionalizing Lipid Nanocapsules with NFL-TBS. 40-63 Peptide on Their Uptake by Glioblastoma Cells. *Biomaterials*, **34**, 3381-3389. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.068>
- [37] 郝萧. 红鳍东方鲀重编程因子 Oct4 和 Sox2 原核表达载体的构建、精巢细胞原核表达产物的导入及其检测研究[D]: [硕士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学海洋生命学院, 2011.
- [38] 伟一凡. 细胞穿膜肽在藻类细胞外源物质转导中的应用[D]: [硕士学位论文]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2014.
- [39] 伟一凡, 郇丽, 等. 细胞穿膜肽转导大型海藻及其对其光合作用的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(5): 1235-1240.
- [40] Sun, Y. and Hu, Y.H. (2015) Cell-Penetrating Peptide-Mediated Subunit Vaccine Generates a Potent Immune and Protection against *Streptococcus iniae* in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **167**, 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.07.008>
- [41] Ma, J., Xu, J., Guan, L., *et al.* (2014) Cell-Penetrating Peptides Mediated Protein Cross-Membrane Delivery and Its Use in Bacterial Vector Vaccine. *Fish and Shellfish Immunology*, **39**, 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.003>
- [42] 宫春爱, 胡楚玲, 等. 细胞穿膜肽在抗肿瘤靶向治疗中的研究进展[J]. *第二军医大学学报*, 2017, 38(6): 774-779.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2376-4260, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: ams@hanspub.org