# 富精氨酸细胞穿透肽在内化中的直接易位机制

乔蓉 宁淑香 王继红\* 肖蓉\* (辽宁师范大学,生命科学学院,大连116081)

摘要 富精氨酸细胞穿透肽(cell-penetrating peptides, CPPs)是能够有效内化到细胞内的一系 列短肽, 被广泛用作生物活性分子的载体。富精氨酸CPPs的内化机制至少可分为内吞途径及直接 易位2类。其中, 直接易位的内化途径发生在膜局部区域即膜核化区, 富精氨酸CPPs与质膜反荷阴 离子相互作用结合在质膜上, 在膜电位的驱动下诱导局部膜结构发生动态变化如膜颗粒形成、局 部膜翻转、膜曲率改变、瞬态孔隙形成及脂质排布松散等。此外, 反荷阴离子芘丁酸能够有效促 进富精氨酸CPPs的直接易位。肽浓度、所运送分子的性质、培养温度、质膜脂质组成、细胞系类 型以及细胞氧化状态等都能够影响甚至决定富精氨酸CPPs采用何种内化机制。细胞特异性CPPs 或许可以解决CPPs靶向性较差的问题。

关键词 富精氨酸细胞穿透肽; 直接易位; 反荷阴离子; 花丁酸; 核化区; 细胞特异性穿透肽

## Direct Translocation Mechanism in the Internalization of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides

QIAO Rong, NING Shuxiang, WANG Jihong\*, XIAO Rong\* (College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China)

**Abstract** Arginine-rich CPPs (cell-penetrating peptides) are a series of short peptides that can be effectively internalized into cells. They are widely used as carriers of bioactive molecules. The internalization mechanisms of arginine-rich CPPs can be divided into at least two types: endocytic pathway and direct translocation. Directly translocation of internalization is limited in the local area of membrane nucleation zones. Arginine-rich CPPs interact with counteranions in the plasma membrane to induce dynamic alterations in membrane structures such as particle and transient porosity formation, local membrane inversion, changing of membrane curvature, transient void formation, and loosening of the lipid packing driven by membrane potential. In addition, counteranions pyrenebutyrate can effectively facilitate the direct translocation of arginine-rich CPPs. Concentration of CPPs, characters of the transported molecules, cultivation temperature, lipid composition of plasma membrane, cell line type, and cell oxidation state can all influence even determine the internalization mechanism of arginine-rich CPPs. Cell-specific CPPs may address the poor targeting of CPPs.

**Keywords** arginine-rich cell-penetrating peptides; direct translocation; counteranions; pyrenebutyrate; nucleation zones; specific cell-penetrating peptides

细胞穿透肽(cell-penetrating peptides, CPPs) 或者说是蛋白转导域(protein transduction domains, PTDs)通常含有 5~30个氨基酸,是能够有效内化到 细胞内的一系列短肽,被广泛用作细胞内运输生物

收稿日期: 2020-03-06 接受日期: 2020-05-15

Received: March 6, 2020 Accepted: May 15, 2020

URL: http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5352

辽宁省自然科学基金计划(批准号: 20180550829)资助的课题

<sup>\*</sup>通讯作者。Tel: 0411-85992862, E-mail: jihongwang999@hotmail.com; xiaorong\_lnnu@126.com

This work was supported by the Natural Science Foundation of Liaoning (Grant No.20180550829)

<sup>\*</sup>Corresponding authors. Tel: +86-411-85992862, E-mail: jihongwang999@hotmail.com; xiaorong\_lnnu@126.com

活性分子的载体,且具有低毒、对导入物限制较少 的特点,因此受到科研人员的广泛关注。

根据CPPs的理化性质,可将其分为3类:阳离子 型CPPs、两亲性CPPs以及疏水性CPPs<sup>[1]</sup>。其中,富 含精氨酸的CPPs主要为阳离子型CPPs,如来自人类 免疫缺陷病毒1型(human immunodeficiency virus type 1, HIV1)的反式激活蛋白(trans-activator, Tat)、来自 触角突变体果蝇同源区段的穿膜肽等天然蛋白、根 据天然蛋白设计的多聚精氨酸肽及基于重组抗菌肽 (buforin IIb, BR3)改造的穿透肽BR2等。此外,血管 内皮钙黏蛋白衍生肽(vascular endothelial-cadherinderived peptide, pVEC)及来自肿瘤抑制因子p14ARF 的N末端具有22个氨基酸的细胞穿透肽ARF等两亲 性CPPs的阳离子区通常也富含精氨酸。这些CPPs表 现出了较高的内化效率,能够介导质粒DNA、寡核 苷酸、肽核酸、显像剂(荧光染料或量子点)、多肽、 蛋白质、核酸、siRNA、纳米颗粒、脂质体等进入 细胞<sup>[2]</sup>。提高富精氨酸CPPs介导的细胞内分子传递 效率对细胞内化药物、疾病诊断、靶向治疗等研究 具有重要意义。

虽然关于富精氨酸CPPs进入细胞的分子机制仍然存在争议,但人们普遍认为其大体可分为2类:内吞途径和非内吞途径(即直接易位)。

富精氨酸 CPPs 的内吞途径主要包括巨胞饮介 导(macropinocytosis-dependent)<sup>[3]</sup>、网格蛋白介导 (clathrin-dependent)<sup>[4]</sup>以及小凹/脂筏介导(caveolae/ raft-dependent)<sup>[5]</sup>的内吞途径。已知所有内吞途径都 涉及细胞皮质重塑(cell-cortex remodelling), 这一过程 由肌动蛋白细胞骨架重组调节<sup>[6]</sup>。通过内吞方式进 入细胞的分子首先位于内吞作用形成的内体中,而 后内体要么被转运至溶酶体进行降解,要么重新回 到细胞表面。通过内吞途径进入细胞的生物活性分 子如果想在细胞质和细胞核中发挥其生物活性就必 须穿过内体膜。然而,荧光显微镜观察结果显示,即 使经过长时间的培养,荧光标记CPPs仍在细胞质中 以囊泡状信号存在,这表明大多数通过内吞途径内 化的富精氨酸CPPs似乎不能有效地从内体中释放出 来。目前尚不清楚富精氨酸CPPs从内体逃逸的具体 机制,但此过程或许有质子海绵效应的参与,带有正 电荷的精氨酸积累最终导致内体的渗透膨胀及破裂, 从而释放内容物[7]。

大量证据表明,除内吞途径外,当因低温或细

胞膜的胆固醇消耗等导致内吞途径受到抑制时,细 胞内可能会出现一种不依赖于能量的能够直接透过 细胞膜且不会对细胞膜造成损坏的非内吞途径。由 于非内吞途径无需能量,无需经过从内体逃逸的复 杂过程, 高效且更易精准控制, 不会破坏细胞膜的完 整性, 也不会产生免疫反应, 因此, 对富精氨酸CPPs 直接易位机制的研究较其内吞机制更具有实用意 义。到目前为止,对富精氨酸CPPs直接易位机制的 假设主要包括倒置胶束、形成孔隙、类地毯模式以 及膜稀释模式[8-9],但无论是上述何种假设,富精氨 酸CPPs内化的第一步都需与质膜结合,这一步由细 胞膜表面反荷阴离子(counteranions)介导,之后引起 特定膜区域即核化区(nucleation zones, NZs)结构及 组分变化,最终实现富精氨酸CPPs的直接易位。为 更好地理解及应用富精氨酸CPPs的直接易位机制, 本文详细阐述了富精氨酸CPPs直接易位过程中2个 重要因素——反荷阴离子和NZs以及两者之间的 联系,对影响富精氨酸CPPs内化机制的因素进行了 讨论,并针对CPPs靶向性较弱的问题提出了解决思 路。

### 1 反荷阴离子介导的直接易位及其机制

精氨酸具有高pKa值,在生理条件下精氨酸残 基的胍基会发生质子化并以胍正离子形式存在,胍 正离子距离较近因而相互排斥,带有正电荷胍基的 富精氨酸CPPs为高极性分子,很难穿透具有疏水 内部的磷脂双分子层。由于电荷之间存在"邻近效 应", 富精氨酸 CPPs 中的胍正离子始终与亲水的磷 酸盐或氯化物等反荷阴离子进行离子配对,以消除 胍正离子间的排斥力<sup>[10]</sup>。当结合有反荷阴离子的 富精氨酸CPPs到达脂质膜后会与细胞表面脂肪酸、 磷脂以及其他疏水性反荷阴离子的硫酸根、磷酸 根、羧酸根等进行交换并以多齿氢键及静电相互 作用结合在一起,促使富精氨酸CPPs在细胞表面 吸附积累,根据反荷阴离子的不同性质使多聚精氨 酸肽获得亲水或疏水特性[11-12]。此外,反荷阴离子 会促进多精氨酸肽的正确折叠以降低其穿过磷脂 双分子层的能量壁垒[13]。获得疏水性的富精氨酸 CPPs通过质膜上的瞬态孔隙进入质膜疏水相中,之 后通过交换反荷阴离子再次转变进入胞质侧亲水 相,进而使多聚精氨酸肽通过疏水性质的膜环境, 在胞质侧反荷阴离子质子化并释放富精氨酸CPPs,



Fig.1 Schematic representation of direct translocation mechanism of arginine-rich CPPs (modified from the reference [10])

以此实现多聚精氨酸的直接易位(图1)<sup>[14-15]</sup>。而当胍 正离子-反荷阴离子易位较慢时,就会发生来自内 吞作用的动力学竞争,这或许有助于内体逃逸<sup>[10]</sup>。 TAKECHI-HARAYA等<sup>[16]</sup>证明了带负电荷的硫酸糖 胺聚糖(sulfated glycosaminoglycans, GAGs)与富精 氨酸CPPs的相互作用在直接内化过程中至关重要, 胍基与GAGs的硫酸根或羧酸根形成独特的多齿氢 键,促使胍基与GAGs高亲和力结合,从而启动富精 氨酸CPPs高效内化。实际上,GAGs在内吞途径中 也发挥着关键作用,GAGs位于质膜上富含胆固醇 和鞘磷脂的动态瞬时微区,CPPs可以结合并招募作 为自主受体的GAGs,然后以特定的内吞途径进入 细胞<sup>[17]</sup>。

我们已经知道质膜上固有的反荷阴离子在富精氨酸CPPs的直接易位过程中具有重要作用,此外,外加反荷阴离子可以作为CPPs激活剂催化并加速CPPs的跨膜直接易位。有报道指出,芘丁酸(pyrenebutyrate, PyB)是一种具有阴离子清除功能(anion scavenging)的疏水反荷阴离子,可显著促进R8肽及 Tat肽等的膜转位<sup>[18]</sup>。PyB具有4个芳香基团,与精 氨酸残基通过阳离子-π或者π-π相互作用而形成相 对稳定的净中性络合物并增加富精氨酸CPPs的疏 水性<sup>[19]</sup>。PyB不会诱导细胞膜的急剧损伤也不会在 长时间培养过程中降低细胞活力。PyB对富精氨酸 CPPs直接易位的激活作用可以被血清抑制,这可能 是由于血清蛋白与PyB之间发生的非特异性相互作 用,显著降低了培养基中PyB的有效浓度<sup>[20]</sup>。

PyB的促转膜作用仅限于含有胍基的富精氨酸 CPPs。PyB很容易进入细胞并且定位到核周围区域, 这种细胞分布不受富精氨酸CPPs的影响。同样,用 缓冲液进行简单处理也很容易从细胞中消除PyB。 膜电位可能是肽直接内化的驱动力,有研究表明,当 膜电位降低时,PyB辅助的易位过程会受到强烈抑 制<sup>[21]</sup>,因此,我们猜测PyB介导的膜转运很有可能类 似于依赖NZs的直接易位。

首先, PyB可使负性质膜与富精氨酸CPPs的相互 作用加强。与未用 PyB处理的细胞相比,在 PyB存在 时, R8-Alexa在巨大单膜囊泡(giant unilameller vesicles, GUVs)负性质膜上的积累速度显著加快,并且荧光各 向异性衰败分析表明, PyB可协同促进 R8肽与负电荷 质膜的结合,影响质膜的结构及理化性质。其次, PyB 能够增加膜的流动性。未加入 PyB时,GUVs膜中有 序相与无序相之间界限明显,在 PyB存在的情况下, GUVs膜上有序相与无序相之间的相位分离会消失, 这说明 PyB似乎能够增加膜的流动性<sup>[22]</sup>。此外, MU-RAYAMA等<sup>[23]</sup>研究认为, PyB具有很强的诱导膜正曲 率的内在趋势,扫描离子电导显微镜观察显示,在用 PyB处理HeLa细胞后,几分钟内细胞表面出现明显小 突起。此外,PyB处理会导致GUVs内部管膜结构的 形成,这是一种负曲率的膜结构特征<sup>[22]</sup>。因此,我们 可以得出,PyB可能通过诱导膜曲率的改变而在细胞 膜上形成瞬间孔隙,为富精氨酸CPPs的直接易位创造 条件。除PyB以外,用外加曲率诱导肽Epsin-1等处理 细胞,也可以通过改变膜曲率在细胞膜上形成瞬间孔 隙,这也说明了质膜曲率的改变在富精氨酸CPPs的直 接易位过程中至关重要<sup>[23]</sup>。值得注意的是,有人提出 富精氨酸CPPs本身也可调节膜曲率<sup>[24-25]</sup>。倒置胶束 假设认为,膜曲率的改变使质膜内部形成倒置胶束,

而倒置胶束内部亲水环境有利于富精氨酸CPPs的内 化,随后不稳定的倒置胶束被破坏,富精氨酸CPPs及 其运送物质被释放到细胞质中<sup>[9]</sup>。 最近有人提出,PyB作为富精氨酸CPPs直接易

 位的激活剂并不是最佳选择,相比于具有π-碱性芘 的激活剂,具有极化"推拉式"芳烃激活剂的催化效 率更高,同时超分子化学概念的引入使全氟化脂肪 酸等更加强大的超分子CPPs激活剂进入了人们的 视野<sup>[10,26]</sup>。

### 2 NZs介导的直接易位及其机制

DUCHARDT等<sup>[27]</sup>应用延时成像和共聚焦显 微镜成像研究荧光标记的R9肽在直接易位过程中 的动态变化。结果发现,在内化的初始阶段,荧光 信号并非在膜上均匀分布,而是仅出现在膜的局部 区域,DUCHARDT等<sup>[27]</sup>将其称为"核化区",WALL-BRECHER等<sup>[28]</sup>同样也在HeLa细胞内化R9肽的过程 中观察到这一特征。这表明,富精氨酸CPPs的直接 易位可能仅仅局限于膜部分区域即NZs,富精氨酸 CPPs的高效内化严格依赖于NZs的形成。用肝素酶 对细胞表面硫酸肝素进行消化则会强烈抑制R9肽 的直接易位,由此可见,硫酸肝素似乎是NZs内化所 必需的物质。

在富精氨酸CPPs的直接易位过程中,NZs区域 发生脂质排布松散(loosening of lipid packing)的现 象。MURAYAMA等<sup>[23]</sup>发现,质膜脂质排布松散是 促进富精氨酸CPPs直接易位的关键因素。在直接易 位的刺激条件下,如胆固醇耗竭、反荷阴离子及曲 率诱导肽处理,质膜脂质排布状态明显变得松散,更 多膜脂酰基链在磷脂双分子层外侧暴露出来,而富 精氨酸CPPs肽骨架上的亚甲基基团亲水性较差,因此在穿过疏水脂质核心区时可能会与脂质疏水核心之间发生疏水相互作用,最终导致直接易位的发生, PyB诱导膜曲率改变似乎也是通过脂质排布松散来 实现的。

HIROSO等<sup>[29]</sup>通过微分干涉差显微镜成像研究 R12肽的内化过程,发现R12肽内化时,在NZs中一 类直径约为1~3 µm的颗粒状结构瞬间形成。同样 地,在Tat肽进入成纤维细胞的细胞质及细胞核时也 出现了颗粒状结构<sup>[30]</sup>。电镜下观察到膜颗粒是由一 些具有多层膜结构的小泡组成的。霍乱毒素B亚基 (cholera toxin B subunit, CTxB)和胞溶素(lysenin)是 脂筏主要成分神经节苷脂及鞘磷脂的特异性标记 物,膜颗粒中可以特异性检测到这2种标记物,因此 猜测脂筏或许在直接易位中发挥作用。此外,Annexin V染色发现,膜颗粒及肽内化位点均可被染色, 这表明膜颗粒的形成及随后的肽内化过程中可能涉 及到局部膜翻转。这种膜的局部翻转很有可能与质 膜鞘磷脂有关<sup>[28]</sup>。

除此之外,膜结构的动态变化似乎与膜电位驱 动下质膜瞬态孔隙的形成以及细胞内酸性鞘磷脂酶 (acid sphingomyelinase, ASMase)的激活及向细胞外叶 转移有关。富精氨酸CPPs中的精氨酸残基是电压门 控离子通道中主要的电压敏感残基<sup>[13]</sup>。HERCE等<sup>[31]</sup> 发现,在膜静息电位下,R9肽可以诱导离子流通过磷 脂双分子层,同时打开膜上瞬态孔隙,在骨肉瘤细胞 和人类平滑肌细胞中均可观察到这种现象。丙咪嗪 能够诱导 ASMase被溶酶体降解从而抑制 ASMase的 激活, VERDURMEN等<sup>[32]</sup>利用丙咪嗪处理HeLa细胞 极大地降低了高肽浓度下HeLa细胞对R9肽的直接易 位,而对低肽浓度下的内吞途径无显著影响。丙咪嗪 的抑制作用可以通过添加外源 ASMase来挽救。同样 地,阳离子CPPs人乳铁蛋白肽(human lactoferrin, hLF) 的内化也受丙咪嗪的抑制,但是在外加ASMase后有 所恢复。WALLBRECHER等<sup>[28]</sup>在研究质膜组成以及 跨膜电位对HeLa细胞及HEK细胞内化R9肽的影响时 发现, HeLa细胞质膜上存在一种浓度依赖性开关, 在 高肽浓度下,细胞内ASMase被激活,鞘磷脂被ASMase 催化形成神经酰胺,而质膜神经酰胺的积累使浓度依 赖性开关被打开同时将肽高效内化。在10 μmol肽浓 度下,用杆菌肽A对HeLa细胞膜诱导去极化,这使得 细胞内化机制完全由NZs依赖的直接易位转化为内

吞,而ASMase的激活则需要完整的静息膜电位。因此推测膜电位的改变很有可能通过抑制ASMase激活而抑制浓度依赖性开关的打开,进一步影响R9肽的内化方式。添加ASMase可以降低CPPs直接易位的阈值,但ASMase可以增强R9肽介导的低分子量货物的转位,而对高分子量货物的转位没有影响。

综上所述,反荷阴离子及NZs是富精氨酸CPPs 直接易位过程中的2个重要因素。CPPs直接易位仅 局限于质膜NZs区域,富精氨酸CPPs正电荷胍基与 膜负电荷组分或外源反荷阴离子(如PyB)形成氢键 及静电相互作用使肽在细胞表面累积,在膜电位驱 动下诱导NZs膜结构的动态改变——质膜相位及曲 率改变、脂质排布松散、膜颗粒与瞬态孔隙以及局 部膜翻转形成等,最终导致富精氨酸CPPs的直接跨 膜渗透,但其具体运行机制还有待继续探究。

#### 3 富精氨酸CPPs内化机制的影响因素

研究发现, CPPs的肽浓度、所运分子的性质、 培养温度、质膜脂质组成成分、细胞系类型以及细 胞氧化状态等都能够影响甚至决定富精氨酸CPPs 采用何种内化机制。

富精氨酸CPPs浓度是细胞采用何种内化方式的 决定因素。WALLBRECHER等<sup>[28]</sup>观察到,当R9肽浓 度较低时, HeLa细胞通过内吞途径摄取R9肽; 当R9肽 浓度超过10 µmol时,质膜上的浓度依赖性开关迅速而 高效地将R9肽导入细胞质。DUCHARDT等[27]也证明, 在用浓度大于10 μmol的Tat肽、穿透肽以及R9肽处理 HeLa细胞后,这些肽向胞内的转化增强;而在低浓度 条件下,这些肽则主要以囊泡状分布于细胞内。一般 来说,在低浓度肽条件下细胞采用内吞途径,而当肽 浓度高于某个阈值时(通常为10 µmol), 细胞则较为明 显地采用直接易位途径。富精氨酸CPPs协同动力学 表明, 富精氨酸CPPs需要超过一定的阈值浓度才能保 证直接易位过程中的有效转运, SUN等[33]的研究表明, 高肽浓度下, R8肽的胍正离子深入到脂质甘油区域扩 大脂质双分子层的表面积导致膜变薄,为缓解表面张 力质膜可能会形成膜孔,此外,质膜表面结合的R8肽 还可以将精氨酸侧链插入到瞬态孔隙以稳定膜孔,促 进肽快速内化。

富精氨酸CPPs采用何种内化方式受其所运送 分子的性质的影响。MAIOLO等<sup>[34]</sup>发现,单独R7肽 及R7W肽在被细胞内化后表现出弥漫性分布信号, 但当它们与货物分子结合后,弥散信号明显减弱,而标志内体存在的囊泡状信号显著增多。GUTERS-TAM等<sup>[35]</sup>研究发现,在PyB存在时,寡核苷酸与R9肽形成的非共价化合物呈现出囊泡状分布,这表明PyB不会使寡核苷酸通过直接易位内化入细胞。寡核苷酸是高负电荷分子,它能够与PyB竞争性结合R9肽,使PyB介导的CPPs-寡核苷酸化合物不能被充分激活。TÜNNEMANN等<sup>[36]</sup>发现,当Tat肽所运送短肽少于50个氨基酸时能够迅速以直接内化的方式进入细胞,而运送多于50个氨基酸的大蛋白时则会通过内吞作用缓慢进入细胞。此外,CPPs介导的疏水性颗粒比亲水性颗粒更容易被转运。

在细胞穿透肽早期研究中人们就发现,培养温度能够影响CPPs的内化机制。FRETZ等<sup>[37]</sup>发现,在 37 °C下用R8肽处理HeLa细胞,细胞内出现囊泡状 荧光信号,然而在4 °C条件下进行相同的实验,内吞 途径受到抑制,但仍能在细胞质中观察到弥散状的 荧光信号。这表明,当温度降低导致内吞途径受到 抑制后,直接易位的内化方式占据主导地位。

细胞质膜组分通过影响质膜流动性以及刚 性影响富精氨酸CPPs的内化方式。CROSIO等<sup>[38]</sup> 在研究由二油酰磷脂酰甘油(dioleoyl phosphatidylglycerole, DOPG)、二油酰基卵磷脂(dioleoyl phosphatidylcholine, DOPC)及二棕榈酰磷脂酰胆碱 (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC) 组成的不同组分膜(由DOPG/DPPC组成的饱和膜、 由DOPG/DOPC或DOPC与胆固醇的混合物组成的 不饱和膜)对KR9C肽内化的影响时发现,该肽可以 同时插入到DOPG/DOPC和DOPG/DPPC层中,但 是,当它进入含有胆固醇的单分子层时,其插入受到 了破坏,这表明KR9C肽能够通过胆固醇吸附于膜 上,但并不能因此内化进入细胞。相比之下,DOPC/ DOPG膜对KR9C肽内化的促进作用似乎是最好的。 另外, FRETZ等<sup>[37]</sup>利用甲基-β-环糊精处理细胞进而 耗尽膜胆固醇后,用R8肽处理CD34<sup>+</sup>白血病细胞,发 现在胞质中出现了R8肽弥散状荧光信号。这表明胆 固醇的消耗也会影响富精氨酸 CPPs 的内化机制。有 研究表明,胆固醇的缺乏会导致Rac1在细胞膜上定位 失败, 而Rac参与F-actin的重组, 因而进一步影响巨胞 饮体的形成。此外,计算机模拟表明,与纯脂质双分 子层相比, 膜中包含的蛋白质成分尤其是螺旋蛋白或 具有微极性表面的蛋白将降低精氨酸向膜中转移的

自由能壁垒[13]。

富精氨酸CPPs内化途径在不同细胞系之间存在 差别。MUELLER等<sup>[39]</sup>使用了22种不同的CPPs在4个 细胞系(MDCK、HEK293、HeLa和Cos-7)中进行筛选。 结果发现, CPPs内化方式在不同细胞系之间存在差 别, Tat肽在所有细胞类型中均以囊泡状分布为主。然 而,HeLa和MDCK细胞中的弥散状信号更为明显,胞 质和核定位也更明显。在研究2种不同的细胞系A431 和U2OS对R7肽和R7W肽内化的区别时发现,A431 细胞的内吞作用比U2OS细胞更为普遍<sup>[34]</sup>。WALL-BRECHER等<sup>[28]</sup>研究发现,与HeLa细胞不同,HEK细胞 即使在低R9肽浓度条件下也是采用直接易位的内化 途径,这与我们之前低CPPs浓度下细胞以内吞途径为 主的认识相反。此外, HEK细胞膜鞘磷脂含量较低, 质膜电位的改变对其内化效率无显著影响,其内化过 程仅伴随轻微去极化,这说明R9肽进入HEK细胞的直 接易位机制与高肽浓度下HeLa细胞依赖NZs的直接 易位有所不同。

多聚精氨酸肽的跨膜易位依赖于细胞的氧化 状态。当MCH58细胞缺氧或被抗氧化剂处理后, TMR-r13以及TMR-r9的直接易位受到显著抑制,相 反,用亲脂氧化剂过氧化氢异丙苯或过氧化氢处理 HDF细胞,能够促使TMR-r13、TMR-r11以及TMRr9进入细胞,且促进程度与细胞内活性氧水平成正 比<sup>[40]</sup>。

#### 4 细胞特异性CPPs与直接易位

与大多数药物载体相比,富精氨酸CPPs毒性更低,能更好地保持细胞的完整性,但其特异性靶向性较弱,这使得细胞特异性CPPs的研究具有必要性。 迄今为止,多种CPPs已被发现具有细胞特异性,如由神经纤毛蛋白-1的C末端规则序列靶向肽段CRMP-1(YGNKRTR)及肺癌靶向肽段CS(CSNIDARAC)融 合而成的新型肿瘤穿透肽YCCS能介导异硫氰酸荧 光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)特异性地与非 小细胞肺癌细胞A549结合,而基本不与乳腺癌细胞 及正常细胞结合<sup>[41]</sup>;基于BR3改造的穿透肽BR2具有 2次重复的RLLR序列,对HaLe、HCT-116、B16等多 种癌细胞系具有特异性,而对正常细胞系如HaCat、 BJ以及NIH 3T3无毒性,癌细胞膜上神经节苷脂是与 BR2结合的主要靶分子,上文提到在NZs区域能够特 异性地检测到神经节苷脂,这提示BR2内化或许涉

及NZs介导的直接易位,但有研究者认为,BR2是通 过脂筏介导的内吞方式内化的[42-43]; 富含赖氨酸的阳 离子CPP KRP容易通过静电相互作用与肿瘤细胞膜 上的负电荷硫酸肝素D结合以实现被动靶向肿瘤细 胞<sup>[44]</sup>; 富精氨酸CPPMT23能够介导凋亡蛋白、FITC 等特异性进入小鼠黑色素瘤B16细胞,外加肝素会显 著抑制B16细胞对MT23-FITC的摄取,因为肝素会与 细胞表面硫酸肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)竞争性结合MT23-FITC<sup>[45]</sup>。KRP以及 MT23的作用机制也提示,细胞特异性CPPs内化过程 与富精氨酸CPPs直接易位机制有相似之处, 与质膜 反荷阴离子的结合或许也是细胞特异性CPPs直接易 位的第一步,但此结合过程是否与前文所述相同仍 需继续探究。目前有关这些CPPs具有细胞特异性原 因的报道少之又少,笔者认为,这或许与靶细胞过表 达成分及CPPs的特定序列有关,未来关于细胞特异 性CPPs的研究可朝此方向进行。此外,使用非特异 性穿透肽运输具有靶向活性的分子也为解决CPPs 细胞特异性提供了思路,如人工设计肿瘤细胞过表 达产物-药物-CPPs-肝素肿瘤靶向给药系统实现药 物靶向肿瘤细胞,或者利用肿瘤组织特异性靶向共 聚物N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide, HPMA]设计靶向给药系统等<sup>[46]</sup>。

#### 5 展望

在传统受体介导的分子内化的研究中,受体下 调几乎完全阻断内化过程,然而一般而言,富精氨酸 CPPs介导的分子内化过程中可同时具有内吞和直 接易位2种内化方式,这种特殊机制有利于充分发挥 药物作用,当一个途径受到阻断时,细胞可以找到替 代途径使内化可以继续进行。然而想要药物快速进 入细胞需要CPPs完全以直接易位方式内化,目前仍 未发现1种CPPs严格按照直接易位方式内化, CPPs 直接易位机制的临床应用仍面临巨大挑战。富精氨 酸CPPs介导的跨膜直接易位是一种独特的内化方 式,在不扰动质膜的情况下,富精氨酸CPPs与反荷 阴离子结合并通过质膜NZs区域转运到胞质侧,细 胞膜结构的改变可能是导致富精氨酸CPPs直接易 位的关键因素, 而膜结构的动态变化以及局部膜区 域的结构变化如何导致肽内化的分子机制仍有待阐 明。膜表面负电荷组分如蛋白聚糖或者反荷阴离子 PyB在膜结构变化中扮演着怎样的角色以及富精氨

酸CPPs的内化机制还有待深入研究。此外, CPPs在临床应用中的活性不可控、特异性靶向性较弱等问题仍有待解决。

#### 参考文献 (References)

- MILLETTI F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape [J]. Drug Discov Today, 2012, 17(15/16): 850-60.
- [2] GUO Z R, PENG H Y, KANG J W, et al. Cell-penetrating peptides: possible transduction mechanisms and therapeutic applications [J]. Biomed Rep, 2016, 4(5): 528-34.
- [3] NAKASE I, NOGUCHI K, AOKI A, et al. Arginine-rich cellpenetrating peptide-modified extracellular vesicles for active macropinocytosis induction and efficient intracellular delivery [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1991.
- [4] HEMALATHA A, MAYOR S. Recent advances in clathrinindependent endocytosis [J]. F1000Research, 2019, 8: 138.
- [5] NABI I R, LE P U. Caveolae/raft-dependent endocytosis [J]. J Cell Biol, 2003, 161(4): 673-7.
- [6] HE L, SAYERS E J, WATSON P, et al. Contrasting roles for actin in the cellular uptake of cell penetrating peptide conjugates [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 7318.
- [7] WOJNILOWICZ M, GLAB A, BERTUCCI A, et al. Super-resolution imaging of proton sponge-triggered rupture of endosomes and cytosolic release of small interfering RNA [J]. ACS Nano, 2019, 13(1): 187-202.
- [8] AVCI F G, AKBULUT B S, OZKIRIMLI E. Membrane active peptides and their biophysical characterization [J]. Biomolecules, 2018, 8(3): 1-43.
- [9] RUSESKA I, ZIMMER A. Internalization mechanisms of cellpenetrating peptides [J]. Beilstein J Nanotechnol, 2020, 11: 101-23.
- [10] CHUARD N, FUJISAWA K, MORELLI P, et al. Activation of cell-penetrating peptides with ionpair-π interactions and fluorophiles [J]. J Am Chem Soc, 2016, 138(35): 11264-71.
- [11] ROTHBARD J B, JESSOP T C, LEWIS R S, et al. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells [J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(31): 9506-7.
- [12] FUTAKI S, NAKASE I. Cell-surface interactions on argininerich cell-penetrating peptides allow for multiplex modes of internalization [J]. Acc Chem Res, 2017, 50(10): 2449-56.
- [13] MACCALLUM J L, BENNETT W F, TIELEMAN D P. Transfer of arginine into lipid bilayers is nonadditive [J]. Biophys J, 2011, 101(1): 110-7.
- [14] SAKAI N, TAKEUCHI T, FUTAKI S, et al. Direct observation of anion-mediated translocation of fluorescent oligoarginine carriers into and across bulk liquid and anionic bilayer membranes [J]. ChemBioChem, 2005, 6(1): 114-22.
- [15] HERCE H D, GARCIA A E, CARDOSO M C. Fundamental molecular mechanism for the cellular uptake of guanidinium-rich molecules [J]. J Am Chem Soc, 2014, 136(50): 17459-67.
- [16] TAKECHI-HARAYA Y, SAITO H. Current understanding of physicochemical mechanisms for cell membrane penetration of arginine-rich cell penetrating peptides: role of glycosaminoglycan interactions [J]. Curr Protein Pept Sci, 2018, 19(6): 623-30.

- [17] WALRANT A, CARDON S, BURLINA F, et al. Membrane crossing and membranotropic activity of cell-penetrating peptides: dangerous liaisons [J]? Acc Chem Res, 2017, 50(12): 2968-75.
- [18] TAKEUCHI T, KOSUGE M, TADOKORO A, et al. Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate [J]. ACS Chem Biol, 2006, 1(5): 299-303.
- [19] SAKAI N, MATILE S. Anion-mediated transfer of polyarginine across liquid and bilayer membranes [J]. J Am Chem Soc, 2003, 125(47): 14348-56.
- [20] TAKEUCHI T, FUTAKI S. Current understanding of direct translocation of arginine-rich cell-penetrating peptides and its internalization mechanisms [J]. Chem Pharm Bull, 2016, 64(10): 1431-7.
- [21] JABLONSKI A E, HUMPHRIES W H, PAYNE C K. Pyrenebutyrate-mediated delivery of quantum dots across the plasma membrane of living cells [J]. J Phys Chem B, 2009, 113(2): 405-8.
- [22] KATAYAMA S, NAKASE I, YANO Y, et al. Effects of pyrenebutyrate on the translocation of arginine-rich cell-penetrating peptides through artificial membranes: recruiting peptides to the membranes, dissipating liquid-ordered phases, and inducing curvature [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1828(9): 2134-42.
- [23] MURAYAMA T, MASUDA T, AFONIN S, et al. Loosening of lipid packing promotes the entry of oligoarginine into the cell [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2017, 56(26): 7644-7.
- [24] AFONIN S, FREY A, BAYERL S, et al. The cell-penetrating peptide TAT(48-60) induces a non-lamellar phase in DMPC membranes [J]. Chemphyschem, 2006, 7(10): 2134-42.
- [25] SAKAMOTO K, ABURAI K, MORISHITA T, et al. Bioinspired mechanism for the translocation of peptide through the cell membrane [J]. Chem Lett, 2012, 41: 1078-80.
- [26] FUJISAWA K, HUMBERT-DROZ M, LETRUN R, et al. Ion pair-π interactions [J]. J Am Chem Soc, 2015, 137(34): 11047-56.
- [27] DUCHARDT F, FOTIN-MLECZEK M, SCHWARZ H, et al. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cellpenetrating peptides [J]. Traffic, 2007, 8(7): 848-66.
- [28] WALLBRECHER R, ACKELS T, OLEA R A, et al. Membrane permeation of arginine-rich cell-penetrating peptides independent of transmembrane potential as a function of lipid composition and membrane fluidity [J]. J Control Release, 2017, 256(28): 68-78.
- [29] HIROSE H, TAKEUCHI T, OSAKADA H, et al. Transient focal membrane deformation induced by arginine-rich peptides leads to their direct penetration into cells [J]. Mol Ther, 2012, 20(5): 984-93.
- [30] ZIEGLER A, NERVI P, DÜRRENBERGER M, et al. The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence [J]. Biochemistry, 2005, 44(1): 138-48.
- [31] HERCE H D, GARCIA A E, LITT J, et al. Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides [J]. Biophys J, 2009, 97(7): 1917-25.
- [32] VERDURMEN W P, THANOS M, RUTTEKOLK I R, et al.

Cationic cell-penetrating peptides induce ceramide formation via acid sphingomyelinase: implications for uptake [J]. J Control Release, 2010, 147(2): 171-9.

- [33] SUN D, FORSMAN J, LUND M, et al. Effect of arginine-rich cell penetrating peptides on membrane pore formation and lifetimes: a molecular simulation study [J]. Phys Chem Chem Phys, 2014, 16(38): 20785-95.
- [34] MAIOLO J R, FERRER M, OTTINGER E A. Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1712(2): 161-72.
- [35] GUTERSTAM P, MADANI F, HIROSE H, et al. Elucidating cell-penetrating peptide mechanisms of action for membrane interaction, cellular uptake, and translocation utilizing the hydrophobic counter-anion pyrenebutyrate [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1788(12): 2509-17.
- [36] TÜNNEMANN G, MARTIN R M, HAUPT S, et al. Cargodependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells [J]. FASEB J, 2006, 20(2): 1775-84.
- [37] FRETZ M M, PENNING N A, AL-TAEI S, et al. Temperature-, concentration- and cholesterol-dependent translocation of Land D-octa-arginine across the plasma and nuclear membrane of CD34+ leukaemia cells [J]. Biochem J, 2007, 403(2): 335-42.
- [38] CROSIO M A, VIA M A, CÁMARA C I, et al. Interaction of a polyarginine peptide with membranes of different mechanical properties [J]. Biomolecules, 2019, 9(10): 625.
- [39] MUELLER J, KRETZSCHMAR I, VOLKMER R, et al. Com-

parison of cellular uptake using 22 CPPS in 4 different cell lines [J]. Bioconjugate Chem, 2008, 19(12): 2363-74.

- [40] WANG T Y, SUN Y S, MUTHUKRISHNAN N, et al. Membrane oxidation enables the cytosolic entry of polyarginine cellpenetrating peptides [J]. J Biol Chem, 2016, 291(15): 7902-14.
- [41] 周惠君, 董萍, 蔡华伟, 等. 含神经纤毛蛋白-1靶向序列的细胞 穿透肽的合成及其与非小细胞肺癌的特异性结合研究 [J]. 四 川大学学报(医学版)(ZHOU H J, DONG P, CAI H W, et al. Cellular uptake and localization of novel NSCLC penetrating peptide with Neuropilin-1 binding motif [J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban), 2016, 47(1): 19-22, 38.
- [42] LIM K J, SUNG B H, SHIN J R, et al. A cancer specific cellpenetrating peptide, BR2, for the efficient delivery of an scFv into cancer cells [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66084.
- [43] LEE Y W, HWANG Y E, LEE J Y, et al. VEGF siRNA delivery by a cancer-specific cell-penetrating peptide [J]. Microbiol Biotechnol, 2018, 28(3): 367-74.
- [44] YU M, LI X L, HUANG X F, et al. New cell penetrating peptide (KRP) with multiple physicochemical properties endows doxorubicin with tumor targeting and improves its therapeutic index [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018 11(2): 2448-58.
- [45] ZHOU N, WU J, QIN Y Y, et al. Novel peptide MT23 for potent penetrating and selective targeting in mouse melanoma cancer cells [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2017, 120: 80-8.
- [46] HABAULT J, POYET J L. Recent advances in cell penetrating peptide-based anticancer therapies [J]. Molecules, 2019, 24(5): 927.