

生物大分子相分离的生物医药应用

赵振男¹ 欧阳松应^{1,2} 吴军军^{1*}

(¹福建师范大学生命科学学院, 福州 350117; ²福建师范大学南方生物医学研究中心, 福州 350117)

摘要 细胞复杂的内部成分与结构为细胞高效有序地完成不同生化反应和调控活动提供了基础。细胞内的各种功能区室对维持正常、高效的生理过程起到关键作用, 如有膜区室内质网和高尔基体等, 无膜区室P颗粒和应激颗粒等。无膜区室通过多价相互作用驱使的相分离过程进行组装, 又被称为生物分子凝聚体。相分离现象在细胞内具有重要的生物学功能, 包括调节生物化学反应速度、保证生化反应的特异性、截留储存生物分子以及灵敏地调控微环境变化等。在药物靶标治疗和作为药物递送载体方面, 相分离已展现突出的应用潜力。该综述主要阐述相分离的发生机制及生物分子凝聚体的生物功能, 总结近期相分离在药物靶标治疗以及作为药物递送载体方面的研究进展, 为生物大分子相分离在生物医药领域的相关研究提供参考。

关键词 生物大分子相分离; 生物分子凝聚体; 药物靶标治疗; 药物递送载体

Biomedical Applications for Phase Separation of Biomacromolecules

ZHAO Zhennan¹, OUYANG Songying^{1,2}, WU Junjun^{1*}

(¹College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China;

²FJNU Biomedical Research Center of South China, Fuzhou 350117, China)

Abstract The complex internal components and structures of a cell provide the foundation for the cell to efficiently and orderly carry out various biochemical reactions and regulatory activities. The various functional compartments within the cell play a crucial role in maintaining normal and efficient physiological processes, such as membrane-bound organelles like the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, and membrane-less compartments such as P-bodies and stress granules. Membrane-less compartments are assembled through phase separation driven by multivalent interactions, also known as biomolecular condensates. Phase separation phenomena have important biological functions within the cell, including regulating the speed of biochemical reactions, ensuring the specificity of biochemical reactions, sequestering and storing biomolecules, and sensitively regulating minor environmental changes. In terms of drug targeting and as drug delivery carriers, phase separation has shown outstanding application potential. This review mainly elaborates on the mechanism of phase separation occurrence and the biological functions of biomolecular condensates, summarizes recent research progress of phase separation in drug targeting and as drug delivery carriers, and provides references for the study of biomacromolecule phase separation in the field of biomedicine.

Keywords biomacromolecule phase separation; biomolecular condensates; drug targeting; drug delivery carriers

收稿日期: 2024-07-15 接受日期: 2024-08-27

福建省自然科学基金面上项目(批准号: 2023J01506)、福建省中青年教育科研项目(批准号: JAT220044)和翔安创新实验室/传染病疫苗研发全国重点实验室科技项目(批准号: 2023XAKJ0101011)资助的课题

*通信作者。Tel: 0591-22868199, E-mail: junwu@fjnu.edu.cn

Received: July 15, 2024

Accepted: August 27, 2024

This work was supported by the Fujian Provincial Natural Science Foundation (Grant No.2023J01506), Fujian Provincial Foundation for Education and Scientific Research Projects of Young and Middle-Aged Teachers (Grant No.JAT220044), and the Xiang An Biomedicine Laboratory (Grant No.2023XAKJ0101011)

*Corresponding author. Tel: +86-591-22868199, E-mail: junwu@fjnu.edu.cn

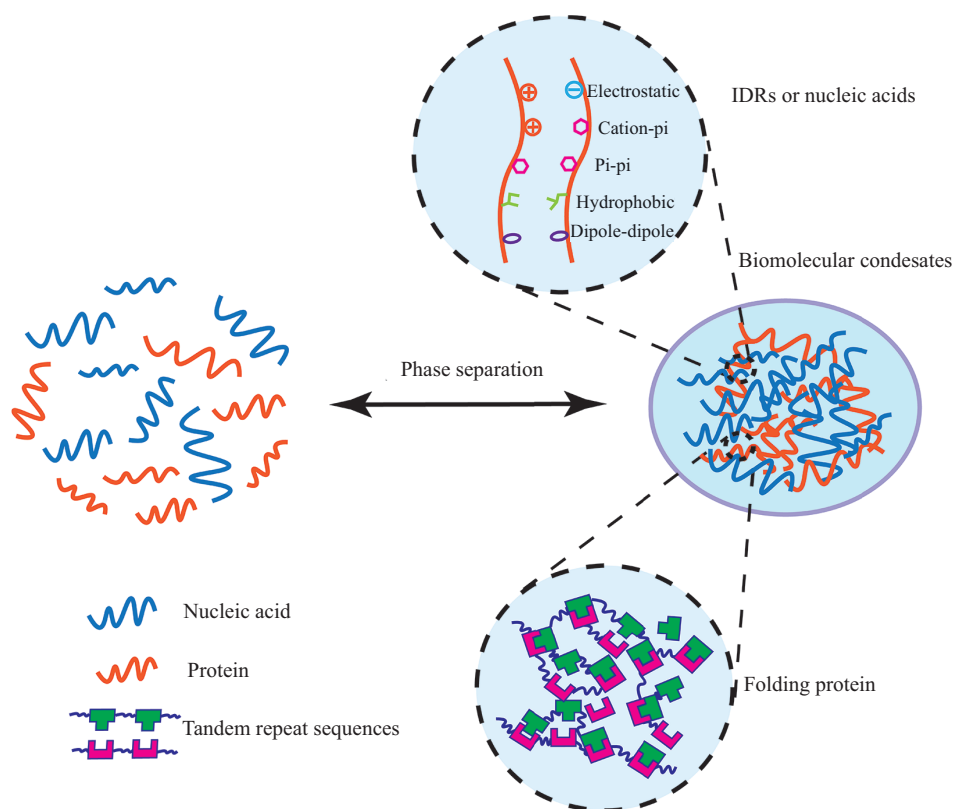
细胞内部的成分和结构非常复杂。为了高效有序地完成不同的生化反应和调控活动,细胞内形成了多种隔离区室。较为常见的是有膜区室(membrane compartments),如内质网和高尔基体等^[1]。此外,细胞还存在一些无膜区室(membrane-less compartments),也被称为“无膜细胞器”(membrane-less organelles)^[2]。2009年,BRANGWYNNE等^[3]发现了秀丽隐杆线虫P颗粒(P granule)中存在相分离(phase separation)过程,这些颗粒在细胞质内呈现球状且能相互融合,也能与细胞外部进行快速的物质交换,类似于相分离中的凝聚体。随后的研究发现,相分离过程也发生于其他无膜区室,如应激颗粒(stress granules)、核仁(nucleoli)等^[4-5]。相分离是介导生物体内形成无膜区室的一种重要机制,生物大分子如蛋白质和核酸发生相分离过程,在特定条件下能够聚集形成液体状态的凝胶样结构。这些结构不含膜,但能够在细胞内形成独立的功能区域,被称为生

物分子凝聚体(biomolecular condensates)^[6]。本文主要阐述相分离的发生机制及生物分子凝聚体的生物功能,总结近期相分离在药物靶标以及作为递送载体方面的研究进展,为生物大分子相分离在生物医药领域的相关研究提供参考。

1 生物大分子相分离的原理

1.1 相分离发生的机制及影响因素

相分离是物理与化学中的常见现象,是指由单一的混合相转变为互不相溶的两个相的过程(图1)。在细胞内,能否形成相分离取决于多种物理条件,包括温度、pH值、离子强度和渗透压等^[7-8]。在温度、pH值等外部环境相同的条件下,生物大分子浓度高于饱和浓度就会发生相分离。生物大分子相分离是指蛋白质、核酸等大分子在均匀溶液中自发地聚集形成两个相的过程,两相分别是密相和稀相,密相能够作为一个隔室,对细胞内部的生物活动起到调节



核酸和蛋白质都会发生相分离,主要包括有序的多价作用力介导折叠蛋白的线性结构域之间的相互作用以及蛋白质的内在无序区和核酸依靠的多种相互作用力。

Nucleic acids and proteins both undergo phase separation, which mainly includes the interactions between the linear structural domains of folded proteins mediated by ordered multivalent forces, as well as the various interactions relied upon by the intrinsically disordered regions of proteins and nucleic acids.

图1 相分离的机制

Fig.1 The mechanism of phase separation

和隔离作用^[9]。

1.1.1 生物大分子相分离中主要存在的相互作用 2023年研究人员建立一个相分离促进肽模块文库, 这些构建模块可形成具有不同化学成分和生物物理特性的合成生物分子凝聚体^[10]。肽序列直接影响相分离倾向和液滴形成, 通过改变序列能够调节液滴的材料特性。得益于细胞内相分离及生物分子凝聚体的存在, 化学性质不同的各个区室能够通过分子间的快速运动来维持平衡。生物分子凝聚体中富集着大量多价分子, 分子内或分子间发生复杂的多价相互作用, 如氢键相互作用、静电相互作用、阳离子- π 相互作用、 π - π 相互作用、偶极-偶极相互作用、疏水相互作用等(图1)^[7,11-14]。生物大分子序列改变可能导致多价相互作用发生变化, 进而影响相分离过程。GK-16是一种衍生自初级黏附蛋白Mfp-5的肽, 在海水条件下会形成凝聚体, 氢键相互作用是其凝聚过程必不可少的, 控制氢键相互作用的强度还可以改变GK-16凝聚体的性质^[15]。静电相互作用是微管相关蛋白家族中的Tau蛋白发生相分离的关键因素之一, 相分离过程主要由带负电荷的N-端和带正电荷的其他区域间的静电相互作用驱动^[16]。 π - π 相互作用对于相分离也具有重要影响, 对生殖细胞的特异性蛋白DDX4(dead-box ATPase 4)及其突变体的相互作用进行评估, 突变体相分离趋势大大降低, 这主要由于突变改变了分子间 π - π 相互作用^[17]。人类视黄醇X受体 γ 中的内在无序区(intrinsically disordered regions, IDRs)在高盐浓度下有相分离倾向, 其凝聚体的形成过程对1,6-己二醇敏感, 这都表明了疏水相互作用对形成凝聚体的重要性^[18]。多数情况下, 相分离过程通过多种相互作用协同介导, 如精氨酸侧链可与蛋白质和核酸形成静电、氢键、疏水、 π - π 和阳离子- π 等相互作用, 从而驱动相分离以及与DNA和RNA的相互作用, 而甘氨酸主链酰胺键与蛋白质和RNA形成氢键和 π - π 相互作用, 这再次凸显了相分离的复杂性^[17,19-20]。

1.1.2 生物大分子间的多价相互作用对相分离发生的影响 生物大分子的多价相互作用是相分离发生的重要驱动因素, 包括蛋白质-蛋白质、蛋白质-核酸以及RNA-RNA等多种分子间相互作用。蛋白质和蛋白质之间的相互作用主要包括多价作用力介导折叠蛋白的线性结构域之间的相互作用, 以及内在无序蛋白IDPs(intrinsically disordered proteins)和内在

无序区之间的相互作用(图1)^[7,9]。折叠蛋白之间的相分离主要依赖于结构域之间的相互作用, 蛋白质串联重复序列越多, 相互作用力越强, 相分离的倾向也越高^[13,21]。与折叠蛋白不同, 蛋白质的内在无序区几乎不存在芳香族和脂肪族氨基酸, 不能形成低能量的单一的折叠结构, 一般没有固定的结构。无序蛋白更加灵活, 具有更多的分子间接触和相互作用的机会, 相较于结构稳定的蛋白质, 它的保守性较差, 通常以较弱的作用相互结合^[22-23]。核酸与蛋白质分子间也会出现相分离现象, 可以分为DNA与蛋白质之间的相分离以及RNA与蛋白质之间的相分离。例如, cGAS(cyclic GMP-AMP synthase)-DNA的相分离会抑制TREX1的核酸酶活性, 延缓TREX1降解DNA, 确保在存在TREX1的环境中DNA依然可以激活cGAS介导的免疫反应^[24]。在核糖核蛋白颗粒中, 长的、柔性的和多价的RNA可作为理想的支架分子。RNA与蛋白质分子间的多价相互作用以及RNA和蛋白无序区域间的相互作用, 促进相分离发生, 进而促使RNP颗粒组装^[25]。RNA-RNA之间也会发生相分离, 含扩增的CAG重复序列的RNA可以通过发生相分离来调控翻译延伸因子从而使细胞蛋白质合成速度下降^[26]。

1.1.3 翻译后修饰对相分离发生的影响 翻译后修饰(post-translational modification, PTM)是调节相分离的重要因素之一^[27]。翻译后修饰改变分子间相互作用, 包括磷酸化、泛素化、甲基化、乙酰化、SUMO化等, 进而影响相分离发生过程。线虫胚胎发育过程发生相分离并组装形成P颗粒。在热应激条件下, 雷帕霉素复合物1(mechanistic target of rapamycin complex 1, mTORC1)介导PGL-1与PGL-3的磷酸化水平升高。PGL-1与PGL-3加速发生相分离, 形成抗自噬降解的P颗粒^[28-29]。此外, 甲基化也可促进相分离的发生。肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)的致病蛋白FUS(fused in sarcoma)会发生相分离, 该过程由FUS中的内在无序低复杂度结构域(intrinsically disordered low-complexity domain)驱动, 该结构域中C末端的精氨酸甲基化会进一步促进相分离的发生, 诱导FUS形成大分子凝聚体^[30-31]。将真核生物的染色质显微注射到细胞核中, 组蛋白随即发生相分离, 而组蛋白乙酰化可以拮抗染色质的相分离。该现象表明翻译后修饰可能抑制相分离发生。在多溴结构域蛋

白BRD(bromodomain-containing protein)存在时,高度乙酰化的染色质形成新的相分离状态,凝聚体表现出不同的物理性质^[32]。错误折叠的蛋白质可通过选择性自噬降解,泛素化的错误折叠蛋白被支架蛋白p62组装成凝聚体,随后被自噬体吞噬降解。在体外环境中,p62不会主动发生相分离,但在p62中加入K63多聚泛素链会导致高分子量泛素信号在p62液滴中富集,诱导p62发生相分离^[33]。翻译后修饰还能影响相分离形成液滴的大小。秀丽隐杆线虫的多梳蛋白介导抑制发育相关的基因,如*HOX*基因,SOP-2作为PRC1复合体的功能对应物,调控*HOX*基因的表达。SUMO化修饰后SOP-2比未修饰的SOP-2相分离形成的凝聚体液滴尺寸更大、数量更多^[34]。翻译后修饰影响生物分子凝聚体的形成和功能,对相分离过程起重要调节作用,在生物体中发挥关键调控作用。

1.2 生物大分子相分离具有广泛的生物学功能

随着研究的深入,我们发现相分离在许多生物学功能中都扮演着重要角色,相分离不仅是细胞的基础组成部分,而且还是理解细胞功能和调节能力的关键机制之一。

1.2.1 生物分子凝聚体影响生化反应的进行 生物分子凝聚体形成可以显著增加生化反应中的局部组分浓度,从而影响反应速率和效率。多数情况下,凝聚体的形成能够促进反应进行。例如,非编码微小RNA(microRNA, miRNA)可以诱导沉默复合物凝聚体形成,导致脱腺苷酸化活性升高。研究发现,在超级增强子处发生相分离的蛋白质如BRD4和MED1(mediator complex subunit 1),可以将转录复合物聚集在超级增强子周围,使参与转录的复合物的局部浓度明显升高,促进转录进程^[35]。类似地,锤头状核酶与其底物RNA链在体外浓缩成相分离的凝聚体时,其溶液活性可提高大约70倍^[36]。KAT8是细胞内组蛋白H4K16ac的主要乙酰转移酶,KAT8可催化非组蛋白底物。研究发现KAT8可乙酰化转录因子IRF1的K78位点形成凝聚体,使催化速率提高约40倍^[37]。然而,并非所有凝聚体的形成都会导致反应速率增加。例如,向导RNA通常被集中在斑马鱼Cajal小体(Cajal bodies)内部。破坏Cajal小体的凝聚体形成,向导RNA的修饰过程不会受到影响^[38]。

1.2.2 生物分子凝聚体保证生化反应的特异性 生物大分子相分离在保证细胞内生化反应的特异性

方面发挥重要作用。凝聚体可以在细胞内形成隔室,将特定蛋白质及其相互作用的分子集中在一起,同时排除其他干扰分子,确保生化过程的特异性。这种特异性使得特定生物途径的分子能够集中于凝聚体内,同时排除其他途径的成分^[39]。举例来说,应激颗粒蛋白ATXN2和ATXN2L是节律性翻译的主调控分子,ATXN2作为RNA结合蛋白,其相分离形成的凝聚体会随节律振荡,并依序招募和富集一系列RNA,特别是在振荡高峰期会募集核糖体和特定RNA,从而促进关键节律蛋白的翻译过程^[40]。值得提出的是,生物大分子的凝聚体可以特异性招募生物大分子以抑制生化反应的进行。例如,当细胞缺失NORAD(non-coding RNA-activated by DNA damage)时,PUMILIO蛋白表现出高度活性,抑制在有丝分裂中维护基因组稳定性的关键蛋白翻译。在正常条件下,NORAD可以促进PUM蛋白的相分离,将其募集到相分离所形成的凝聚体中,从而抑制其功能,维护基因组的稳定性^[41]。

1.2.3 相分离能够截留和储存生物大分子 通过生物大分子相分离发生,蛋白质或核酸可以被螯合并以凝聚体形式储存下来,以供机体后续使用或下调酶促反应。真核细胞中不参与翻译的mRNA聚集成胞质mRNP颗粒,被称为P小体和应激颗粒,直接或间接参与mRNA的降解、早期发育以及神经元中的翻译控制。脆性X综合征蛋白FXR1(fragile X mental retardation syndrome related protein 1)与其他RNA结合蛋白共同结合胞质mRNA转录本,组装成翻译抑制状态的mRNP。精子发育后期FXR1表达水平升高,FXR1发生相分离形成凝聚体并富集特定的mRNA,这些凝聚体与翻译起始因子如EIF4G3相互作用,激活凝聚体中存储的mRNA的翻译,大量合成后期精子形成所需的蛋白质,保障精子细胞的发育和精子生成^[42]。对P小体和应激颗粒的分析表明,mRNP可以在多聚核糖体、P小体和应激颗粒之间移动,因此P小体被认为是翻译抑制的mRNA的储存库^[4,43],并且调节脂滴融合的重要蛋白CIDEA可通过相分离富集,组装成允许脂质在脂滴间交换转移的结构,促进中性脂从小脂滴向大脂滴转移,实现高效的脂质储存^[44]。

1.2.4 生物分子凝聚体对环境微小变化的调控 细胞通过动态调控生物分子凝聚体形成应对环境中的微小变化。许多蛋白质对物理化学条件敏感,

环境出现微小变化,蛋白质大分子凝聚体就会发生相应改变以适应新的环境。例如, poly(A)结合蛋白1[poly(A)-binding protein 1, Pab1]在响应热力和胞质pH变化时会发生相分离。Pab1的凝聚体在环境温度和细胞酸碱度发生变化时,会调整其组成和结构以适应细胞内的新环境^[45]。Sup35是一种在真核生物中发挥重要作用的蛋白质, Sup35的凝聚是由能量耗竭诱导的胞质酸化引起的,在细胞能量水平下降时蛋白凝聚体会发生相应变化,可能是为了保护其功能或在新的代谢状态下完成特定的细胞活动^[46]。RNA结合蛋白Pbp1能够感知细胞的氧化还原状态并在还原条件下形成凝聚体, Pbp1凝聚体能够整合并使TORC1(target of rapamycin complex 1)信号通路失活,从而将代谢氧化还原状态与TOR(target of rapamycin)信号转导偶联起来,细胞在氧化还原状态变化时通过Pbp1凝聚体来调节TOR信号通路^[47]。DNA损伤后会诱导生成RNA通过调控53BP1蛋白发生相分离,促使DNA损伤修复的相关蛋白在DNA损伤位点聚集,这种动态的相分离过程能够帮助细胞适应DNA损伤和启动相应的DNA修复反应^[48-50]。综上所述,细胞内的生物分子凝聚体具有高度的动态性和适应性,能够感知和响应微小的环境变化,这种动态调控有助于细胞维持稳态和适应不同环境条件,在细胞的正常功能和适应性生存中扮演关键角色。

2 相分离在生物医药方面的应用

2.1 以生物分子凝聚体作为药物治疗靶标

许多疾病的发生与生物大分子相分离有关,例如神经系统疾病阿尔茨海默病、帕金森病、淀粉样蛋白病等与神经元内的蛋白质相变紧密相关^[51-52]。生物大分子凝聚体和蛋白聚集体作为相变的两种不同形式,影响着细胞的正常生理活动和疾病的发生。ALS与应激颗粒异常相变存在关联,研究人员通过细胞和蛋白质筛选,发现脂酰胺及其相关的化合物硫辛酸可以抑制应激颗粒蛋白在体外聚集的倾向,并可阻止秀丽隐杆线虫在生命周期内蛋白质的聚集。这些化合物可以防止ALS患者来源的运动神经元轴突的萎缩,使FUS突变的果蝇有运动能力,为治疗ALS提供了一个新的思路,即通过改变细胞质中应激颗粒蛋白的聚集体来实现治疗效果^[53]。作为相变的另一种形式,细胞生命活动重要环节的生物大

分子凝聚体或可成为药物治疗的新靶点:通过干预生物分子凝聚体的形成和分解有望为相分离相关的疾病的治疗提供研究方向。

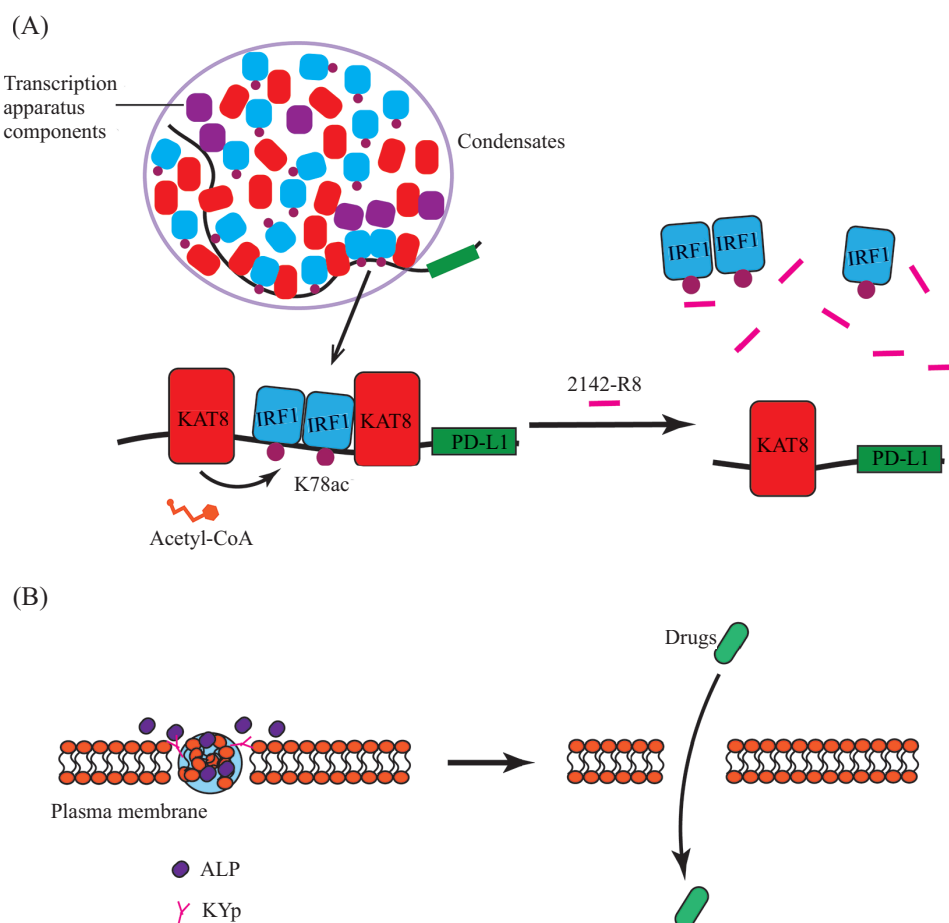
2.1.1 通过抑制或者破坏相分离的形成达到治疗目的 通过药物干预影响生物分子凝聚体的形成,可以阻止分子凝聚体的聚集,从而达到减缓疾病的发展甚至是阻止疾病出现的作用。2021年, ZHU等^[54]发现抗HIV药物埃替格韦(elvitegravir, EVG)可以有效抑制转录激活因子SRC-1的相分离进而抑制肿瘤细胞生长。Hippo/YAP信号通路在调控器官大小、组织再生及细胞命运决定中起关键作用,转录因子YAP的异常活化与癌症的发生和转移密切相关^[55-56]。SRC-1是YAP/TEAD转录复合物中一个重要的共活化剂, EVG可以直接结合SRC-1蛋白,抑制其凝聚体的形成,进而抑制YAP下游基因的表达及SRC-1和YAP介导的肿瘤细胞生长。2020年CARLSON等^[57]发现SARS-CoV-2核蛋白(nucleocapsid protein, NP)与病毒RNA共同形成生物分子凝聚体。2021年ZHOU等^[58]提出了一种通过破坏NP与RNA的相分离实现新冠肺炎治疗的方案。NP的二聚结构域是其与RNA相互作用所必需的,研究人员开发了一种靶向NP二聚结构域的肽NIP-V,可以破坏NP和RNA凝聚体的相分离作用,并能有效抑制病毒复制和增强先天抗病毒免疫反应强度。同一年ZHAO等^[59]也发现两个靶向NP的小分子,通过干预相分离来提高其他抗病毒药物的药效。2023年研究人员发现了一种阻断肽,通过阻断KAT8-IRF1凝聚体形成抑制PD-L1的表达,增强抗肿瘤免疫效果^[37]。肿瘤细胞表达的PD-L1是抗肿瘤免疫监视的主要抑制蛋白之一^[60-61]。肿瘤微环境中IFN- γ 可诱导PD-L1表达, IRF1是IFN- γ 通路的下游分子之一^[62]。研究发现KAT8与IRF1发生相分离形成生物分子凝聚体引起PD-L1上调, KAT8和IRF1的聚集会促进IRF1中K78乙酰化,并引起KAT8-IRF1与PD-L1启动子的结合,进一步富集转录装置以促进PD-L1 mRNA的转录。2142-R8阻断肽可以破坏KAT8-IRF1凝聚体形成,从而抑制PD-L1表达并增强体外和体内抗肿瘤免疫效果(图2A)。

2021年RISSO-BALLESTER等^[63]报道了鲇体生物碱环巴胺及其化学类似物A3E可以通过破坏和硬化病毒诱导的包涵体的凝聚体,抑制人呼吸道合胞病毒的复制。病毒诱导的包涵体是病毒RNA的“合

成工厂”, 它的形貌表明其是相分离的凝聚体。通过作用于M2-1, 环巴胺和A3E可以在几分钟内造成病毒诱导的内涵体的紊乱, 从而达到抑制病毒复制的作用。2022年, XIE等^[64]通过破坏雄激素受体凝聚体抑制雄激素转录活性, 并抑制表达雄激素受体耐药突变体的前列腺癌细胞增殖和肿瘤生长。研究发现去势耐药性前列腺癌患者不可避免地会获得对抗雄激素治疗的耐药性, 部分原因是雄激素受体突变或剪接变异, 引起雄激素受体信号的重新恢复。小分子化合物ET516专门破坏雄激素受体凝聚体, 抑制雄激素受体转录活性, 有效抑制表达雄激素受体耐药突变体的前列腺癌细胞的增殖和肿瘤生长。研

究表明, 干预相分离过程, 影响生物分子凝聚体稳定性等在一些难以解决的疾病治疗应用上具有潜在前景。

2.1.2 通过诱导或促进相分离的形成达到治疗目的
通过诱导或促进相分离的形成, 调控机体中的特殊功能活动或影响生化反应进行, 可能可以作为潜在的疾病治疗策略。治疗性肽一直受到广泛关注, 但因其疗效无法穿透细胞膜而受到限制, 这是肽类药物应用的瓶颈之一。2021年GUO等^[65]提出了一种诱导细胞膜相分离的体内自组装策略来提高肽药物的内化。治疗肽一直受到广泛关注, 但其疗效受到无法穿透细胞膜的限制, 这是肽药物递送的关键瓶颈。



A: 在IFN- γ 刺激下, KAT8和IRF1形成的凝聚体可以促进*PD-L1*转录。2142-R8肽可以破坏KAT8-IRF1凝聚体, 抑制IRF1 K78ac和DNA结合进而抑制*PD-L1*转录。B: KYP与ALP相互作用使KYP释放磷酸基团并自组装, 导致ALP聚集以及细胞膜蛋白质和脂质发生相分离使细胞膜渗漏, 进而让更多的肽类药物进入细胞。

A: under the stimulation of IFN- γ , the condensates formed by KAT8 and IRF1 can promote the transcription of *PD-L1*. The 2142-R8 peptide can disrupt the KAT8-IRF1 condensates, inhibit the acetylation of IRF1 at K78ac and its binding to DNA, thereby suppressing the transcription of *PD-L1*. B: the interaction between KYP and ALP causes KYP to release a phosphate group and self-assemble, leading to the aggregation of ALP and phase separation of membrane proteins and lipids, which makes the cell membrane leaky and allows more peptide drugs to enter the cell.

图2 以相分离作为药物治疗的靶标(根据参考文献[37,65]修改)

Fig.2 Phase separation as the target of drug therapy (modified from the references [37,65])

在此, 研究人员开发了一种体内自组装策略来诱导细胞膜的相分离, 从而提高肽药物的内化。他们合成了含有抗癌肽[KLAKLAK]₂(K)和磷酸化Y(Yp)的磷酸肽KYp。KYp与碱性磷酸酶(ALP)相互作用后, 可以去磷酸化并在原位自组装, 从而诱导ALP在细胞膜上的聚集和蛋白-脂质相分离(图2B)。这使得KYp的内化作用增强了2倍, 半抑制浓度值(IC₅₀)大约比游离肽低5倍。这一研究为提高多肽类药物肿瘤治疗效率提供了新的策略。2023年LIU等^[66]发现核circRNA ASH2可以介导核内YBX1发生相分离, 改变肿瘤细胞的骨架结构以抑制肝癌侵袭转移。核circRNA ASH2通过介导核内YBX1发生相分离, 从而靶向调控细胞骨架重要稳定蛋白——原肌球蛋白4(tropomyosin-4, TPM4)的mRNA/pre-mRNA剪接过程, 并诱导其发生无义介导的mRNA降解(nonsense-mediated mRNA decay, NMD), 最终改变肿瘤细胞的骨架结构以抑制肝癌侵袭转移。随着circRNA人工合成以及RNA纳米脂质体递送技术的日趋成熟, circRNA ASH2成为一种潜在的抑制肿瘤转移的核酸药物候选者, 这为转移性肝癌的临床治疗提供了新的思路。

2.2 基于相分离的药物递送策略

生物大分子相分离在药物递送中的应用非常有前景, 特别是针对那些难以传递到细胞内的药物。相比传统的药物递送载体如脂质体, 生物分子凝聚体具有更好的生物相容性和可控性, 还能够通过改变凝聚体的形态和特性实现对药物的释放及调控。

早在2018年, LIM等^[67]就利用自凝聚组氨酸富含喙肽(his-rich beak protein, HBp)制备了一种新的葡萄糖响应性胰岛素递送系统。该递送系统包裹了胰岛素和葡萄糖氧化酶, 能够对增加的葡萄糖水平做出快速反应并形成局部酸性环境, 迅速触发pH敏感的凝聚体的解离, 释放胰岛素物质。胰岛素的释放率取决于葡萄糖水平, 在高血糖条件下释放量更多, 在正常血糖条件下释放量减少, 这种葡萄糖反应性可以模拟胰腺β细胞的功能, 有望为治疗糖尿病提供新的治疗策略。阿霉素是一种常被用于治疗肝癌的药物, 严重的副作用限制了其高剂量下的使用, 这使其治疗效果有限。为了克服这一难题, 2020年LIM等^[68]设计了一种仿生肽并将其命名为DMC, 其能够自组装成微液滴容纳阿霉素和磁性纳米颗粒。负载了阿霉素的磁性凝聚体可通过外部的交替磁场触发阿霉素的可控释放, 实现热疗和化疗双重治疗。

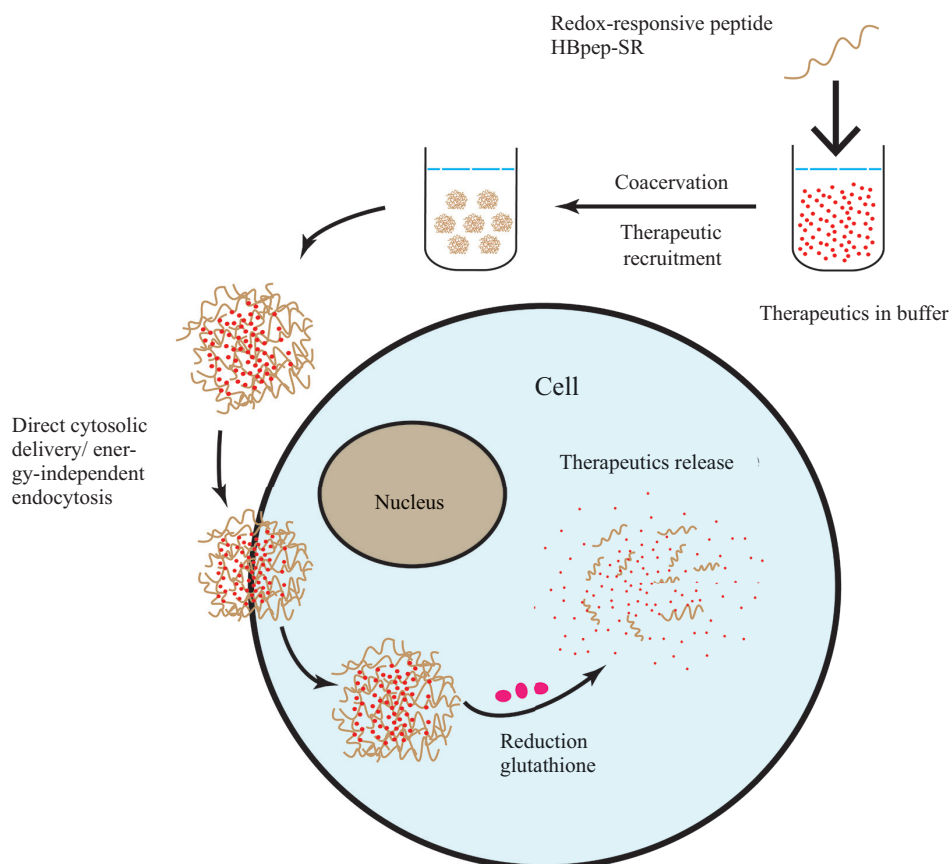
DMC还能够通过能量非依赖的机制被细胞内吞, 提高治疗效果。DMC可以有效诱导HepG2肿瘤细胞死亡, 尤其是热化疗组合比单独的热疗或化疗更加有效。2022年, SUN等^[69]进一步构建了一种通过相分离形成pH和氧化还原响应凝聚体肽HBpep, 用于生物大分子的细胞内递送。HBpep能快速招募广泛的大分子, 包括小到多肽、大到430 kDa的酶和mRNA, 通过非内吞依赖的进入方式提高药物的递送效率(图3)。该封装方法不影响药物的生物活性, 并且载体几乎没有任何毒性。

通过调节相分离的性质, 可以实现对药物的控制释放, 提高药物的疗效并减少副作用, 这种基于相分离的药物递送策略有望为疾病治疗提供新的解决方案。

3 展望

生物大分子相分离作为细胞内生物分子组织和调控的一种机制, 近年来在药物靶标治疗和药物递送策略中的应用潜力逐渐显现。在药物靶标治疗方面, 有很多研究通过直接靶标生物分子凝聚体来调节相分离的发生进而达到治疗的目的, 其中大部分情况是通过抑制和破坏生物分子凝聚体来阻止相分离的发生。而在药物递送策略中, 将生物分子凝聚体作为药物载体并调节其性质, 可以实现对药物的控制释放, 可以提高药物疗效, 且有较高的递送效率。

但是同时也还有一些问题等待解决。一方面, 尽管我们可以将生物分子凝聚体作为药物治疗的靶标, 但是生物分子凝聚体在生物体内广泛存在, 蛋白质组成中30%的成分是无序的, 所以我们在确定药物作用的特异性方面仍然面临巨大挑战。虽然我们在细胞层面对大生物分子凝聚体作为载体取得了一系列成果, 但对于动物层面的验证还需要进一步补充。我们应当开发更多的细胞模型以及动物模型, 对于生物分子凝聚体的药物靶标治疗和作为药物载体进一步验证, 帮助药物的开发, 获得更多的临床数据证明其可行性。另一方面, 在疾病治疗中, 如何平衡相分离的干预以避免潜在的副作用? 生物大分子相分离在不同细胞类型和生物体中是否具有普适性, 其机制是否存在显著差异? 相分离在药物靶标治疗和药物递送策略中的应用前景广阔, 有望为多种疾病的治疗提供新的解决方案。随着研究的不断



通过相分离形成的凝聚体肽以非内吞依赖的方式高效率递送药物。

Condensates formed through phase separation efficiently deliver drugs in a non-endocytic manner.

图3 相分离作为药物递送策略(根据参考文献[69]修改)

Fig.3 Phase separation as a drug delivery strategy (modified from the reference [69])

深入和技术的创新, 预计将会有更多基于相分离原理的药物和治疗方法被开发出来。

参考文献 (References)

- [1] BURBRIDGE E, ADRAIN C. Organelle homeostasis: from cellular mechanisms to disease [J]. FEBS J, 2022, 289: 6822-31.
- [2] GOMES E, SHORTER J. The molecular language of membraneless organelles [J]. J Biol Chem, 2019, 294: 7115-27.
- [3] BRANGWYNNE C P, ECKMANN C R, COURSON D S, et al. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation [J]. Science, 2009, 324: 1729-32.
- [4] DECKER C J, PARKER R. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4: a012286.
- [5] MAO Y S, ZHANG B, SPECTOR D L. Biogenesis and function of nuclear bodies [J]. Trends Genet, 2011, 27: 295-306.
- [6] NAKASHIMA K K, VIBHUTE M A, SPRUIJT E. Biomolecular chemistry in liquid phase separated compartments [J]. Front Mol Biosci, 2019, 6: 21.
- [7] BANANI S F, LEE H O, HYMAN A A, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18: 285-98.
- [8] BOEYNAEMS S, BOGAERT E, KOVACS D, et al. Phase separation of C9orf72 dipeptide repeats perturbs stress granule dynamics [J]. Mol Cell, 2017, 65: 1044-55.e5.
- [9] ALBERTI S, GLADFELTER A, MITTAG T. Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates [J]. Cell, 2019, 176: 419-34.
- [10] BARUCH LESHEM A, SLOAN-DENNISON S, MASSARANO T, et al. Biomolecular condensates formed by designer minimalistic peptides [J]. Nat Commun, 2023, 14: 421.
- [11] HAN T W, KATO M, XIE S, et al. Cell-free formation of RNA granules: bound RNAs identify features and components of cellular assemblies [J]. Cell, 2012, 149: 768-79.
- [12] KING O D, GITLER A D, SHORTER J. The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease [J]. Brain Res, 2012, 1462: 61-80.
- [13] LI P, BANJADE S, CHENG H C, et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins [J]. Nature, 2012, 483: 336-40.
- [14] NOTT T J, PETSALAKI E, FARBER P, et al. Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles [J]. Mol Cell, 2015, 57: 936-47.
- [15] GUO Q, ZOU G, QIAN X, et al. Hydrogen-bonds mediate liquid-liquid phase separation of mussel derived adhesive peptides

- [J]. Nat Commun, 2022, 13: 5771.
- [16] BOYKO S, QI X, CHEN T H, et al. Liquid-liquid phase separation of tau protein: the crucial role of electrostatic interactions [J]. J Biol Chem, 2019, 294: 11054-9.
- [17] DAS S, LIN Y H, VERNON R M, et al. Comparative roles of charge, π , and hydrophobic interactions in sequence-dependent phase separation of intrinsically disordered proteins [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117: 28795-805.
- [18] SOŁTYS K, WYCISK K, OŻYHAR A. Liquid-liquid phase separation of the intrinsically disordered AB region of hRXR γ is driven by hydrophobic interactions [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 183: 936-49.
- [19] CHONG P A, VERNON R M, FORMAN-KAY J D. RGG/RG motif regions in RNA binding and phase separation [J]. J Mol Biol, 2018, 430: 4650-65.
- [20] MURTHY A C, DIGNON G L, KAN Y, et al. Molecular interactions underlying liquid-liquid phase separation of the FUS low-complexity domain [J]. Nat Struct Mol Biol, 2019, 26: 637-48.
- [21] SU X, DITLEV J A, HUI E, et al. Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction [J]. Science, 2016, 352: 595-9.
- [22] DAS R K, RUFF K M, PAPPU R V. Relating sequence encoded information to form and function of intrinsically disordered proteins [J]. Curr Opin Struct Biol, 2015, 32: 102-12.
- [23] JENSEN M R, RUIGROK R W, BLACKLEDGE M. Describing intrinsically disordered proteins at atomic resolution by NMR [J]. Curr Opin Struct Biol, 2013, 23: 426-35.
- [24] ZHOU W, MOHR L, MACIEJOWSKI J, et al. cGAS phase separation inhibits TREX1-mediated DNA degradation and enhances cytosolic DNA sensing [J]. Mol Cell, 2021, 81: 739-55.e7.
- [25] YANG P, MATHIEU C, KOLAITIS R M, et al. G3BP1 is a tunable switch that triggers phase separation to assemble stress granules [J]. Cell, 2020, 181: 325-45.e28.
- [26] PAN Y, LU J, FENG X, et al. Gelation of cytoplasmic expanded CAG RNA repeats suppresses global protein synthesis [J]. Nat Chem Biol, 2023, 19: 1372-83.
- [27] RHOADS S N, MONAHAN Z T, YEE D S, et al. The role of post-translational modifications on prion-like aggregation and liquid-phase separation of FUS [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 886.
- [28] BANJADE S, ROSEN M K. Phase transitions of multivalent proteins can promote clustering of membrane receptors [J]. eLife, 2014, 3: e04123.
- [29] ZHANG G, WANG Z, DU Z, et al. mTOR regulates phase separation of PGL granules to modulate their autophagic degradation [J]. Cell, 2018, 174: 1492-506.e22.
- [30] QAMAR S, WANG G, RANDLE S J, et al. FUS phase separation is modulated by a molecular chaperone and methylation of arginine cation- π interactions [J]. Cell, 2018, 173: 720-34.e15.
- [31] HOFWEBER M, HUTTEN S, BOURGEOIS B, et al. Phase separation of FUS is suppressed by its nuclear import receptor and arginine methylation [J]. Cell, 2018, 173: 706-19.e13.
- [32] GIBSON B A, DOOLITTLE L K, SCHNEIDER M W G, et al. Organization of chromatin by intrinsic and regulated phase separation [J]. Cell, 2019, 179: 470-84.e21.
- [33] SUN D, WU R, ZHENG J, et al. Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation [J]. Cell Res, 2018, 28: 405-15.
- [34] QU W, WANG Z, ZHANG H. Phase separation of the *C. elegans* polycomb protein SOP-2 is modulated by RNA and sumoylation [J]. Protein Cell, 2020, 11: 202-7.
- [35] SABARI B R, DALL'AGNESE A, BOJJA A, et al. Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control [J]. Science, 2018, 361: eaar3958.
- [36] STRULSON C A, MOLDEN R C, KEATING C D, et al. RNA catalysis through compartmentalization [J]. Nat Chem, 2012, 4: 941-6.
- [37] WU Y, ZHOU L, ZOU Y, et al. Disrupting the phase separation of KAT8-IRF1 diminishes PD-L1 expression and promotes anti-tumor immunity [J]. Nat Cancer, 2023, 4: 382-400.
- [38] DERYUSHEVA S, GALL J G. Small Cajal body-specific RNAs of *Drosophila* function in the absence of Cajal bodies [J]. Mol Biol Cell, 2009, 20: 5250-9.
- [39] GOOD M C, ZALATAN J G, LIM W A. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information [J]. Science, 2011, 332: 680-6.
- [40] ZHUANG Y, LI Z, XIONG S, et al. Circadian clocks are modulated by compartmentalized oscillating translation [J]. Cell, 2023, 186: 3245-60.e23.
- [41] LEE S, KOPP F, CHANG T C, et al. Noncoding RNA NORAD regulates genomic stability by sequestering PUMILIO proteins [J]. Cell, 2016, 164: 69-80.
- [42] KANG J Y, WEN Z, PAN D, et al. LLPS of FXR1 drives spermiogenesis by activating translation of stored mRNAs [J]. Science, 2022, 377: eabj6647.
- [43] HUBSTENBERGER A, COUREL M, BENARD M, et al. P-body purification reveals the condensation of repressed mRNA regulons [J]. Mol Cell, 2017, 68: 144-57.e5.
- [44] LYU X, WANG J, WANG J, et al. A gel-like condensation of Cidec generates lipid-permeable plates for lipid droplet fusion [J]. Dev Cell, 2021, 56: 2592-606.e7.
- [45] RIBACK J A, KATANSKI C D, KEAR-SCOTT J L, et al. Stress-triggered phase separation is an adaptive, evolutionarily tuned response [J]. Cell, 2017, 168: 1028-40.e19.
- [46] FRANZMANN T M, JAHNEL M, POZNIAKOVSKY A, et al. Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness [J]. Science, 2018, 359: eaao5654.
- [47] KATO M, YANG Y S, SUTTER B M, et al. Redox state controls phase separation of the yeast Ataxin-2 protein via reversible oxidation of its methionine-rich low-complexity domain [J]. Cell, 2019, 177: 711-21.e8.
- [48] PESSINA F, GIAVAZZI F, YIN Y, et al. Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors [J]. Nat Cell Biol, 2019, 21: 1286-99.
- [49] PICCINNO R, MINNEKER V, ROUKOS V. 53BP1-DNA repair enters a new liquid phase [J]. EMBO J, 2019, 38: e102871.
- [50] KILIC S, LEZAJA A, GATTI M, et al. Phase separation of 53BP1 determines liquid-like behavior of DNA repair compartments [J]. EMBO J, 2019, 38: e101379.
- [51] SCHERZINGER E, SITTLER A, SCHWEIGER K, et al. Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 4604-9.
- [52] PESKETT T R, RAU F, O'DRISCOLL J, et al. A liquid to solid

- phase transition underlying pathological huntingtin exon1 aggregation [J]. *Mol Cell*, 2018, 70: 588-601, e6.
- [53] BABINCHAK W M, DUMM B K, VENUS S, et al. Small molecules as potent biphasic modulators of protein liquid-liquid phase separation [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 5574.
- [54] ZHU G, XIE J, FU Z, et al. Pharmacological inhibition of SRC-1 phase separation suppresses YAP oncogenic transcription activity [J]. *Cell Res*, 2021, 31: 1028-31.
- [55] MA S, MENG Z, CHEN R, et al. The Hippo pathway: biology and pathophysiology [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 577-604.
- [56] CUNNINGHAM R, HANSEN C G. The Hippo pathway in cancer: YAP/TAZ and TEAD as therapeutic targets in cancer [J]. *Clin Sci*, 2022, 136: 197-222.
- [57] CARLSON C R, ASFAHA J B, GHENT C M, et al. Phosphorylation modulates liquid-liquid phase separation of the SARS-CoV-2 N protein [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.06.28.176248.
- [58] WANG S, DAI T, QIN Z, et al. Targeting liquid-liquid phase separation of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein promotes innate antiviral immunity by elevating MAVS activity [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23: 718-32.
- [59] ZHAO D, XU W, ZHANG X, et al. Understanding the phase separation characteristics of nucleocapsid protein provides a new therapeutic opportunity against SARS-CoV-2 [J]. *Protein Cell*, 2021, 12: 734-40.
- [60] RIBAS A, WOLCHOK J D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade [J]. *Science*, 2018, 359: 1350-5.
- [61] SANMAMED M F, CHEN L. A paradigm shift in cancer immunotherapy: from enhancement to normalization [J]. *Cell*, 2019, 176: 677.
- [62] GARCIA-DIAZ A, SHIN D S, MORENO B H, et al. Interferon receptor signaling pathways regulating PD-L1 and PD-L2 expression [J]. *Cell Rep*, 2019, 29: 3766.
- [63] RISSO-BALLESTER J, GALLOUX M, CAO J, et al. A condensate-hardening drug blocks RSV replication *in vivo* [J]. *Nature*, 2021, 595: 596-9.
- [64] XIE J, HE H, KONG W, et al. Targeting androgen receptor phase separation to overcome antiandrogen resistance [J]. *Nat Chem Biol*, 2022, 18: 1341-50.
- [65] GUO R C, ZHANG X H, FAN P S, et al. *In vivo* self-assembly induced cell membrane phase separation for improved peptide drug internalization [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60: 25128-34.
- [66] LIU B, SHEN H, HE J, et al. Cytoskeleton remodeling mediated by circRNA-YBX1 phase separation suppresses the metastasis of liver cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120: e2220296120.
- [67] LIM Z W, PING Y, MISEREZ A. Glucose-responsive peptide coacervates with high encapsulation efficiency for controlled release of insulin [J]. *Bioconjug Chem*, 2018, 29: 2176-80.
- [68] LIM Z W, VARMA V B, RAMANUJAN R V, et al. Magnetically responsive peptide coacervates for dual hyperthermia and chemotherapy treatments of liver cancer [J]. *Acta Biomater*, 2020, 110: 221-30.
- [69] SUN Y, LAU S Y, LIM Z W, et al. Phase-separating peptides for direct cytosolic delivery and redox-activated release of macromolecular therapeutics [J]. *Nat Chem*, 2022, 14: 274-83.