

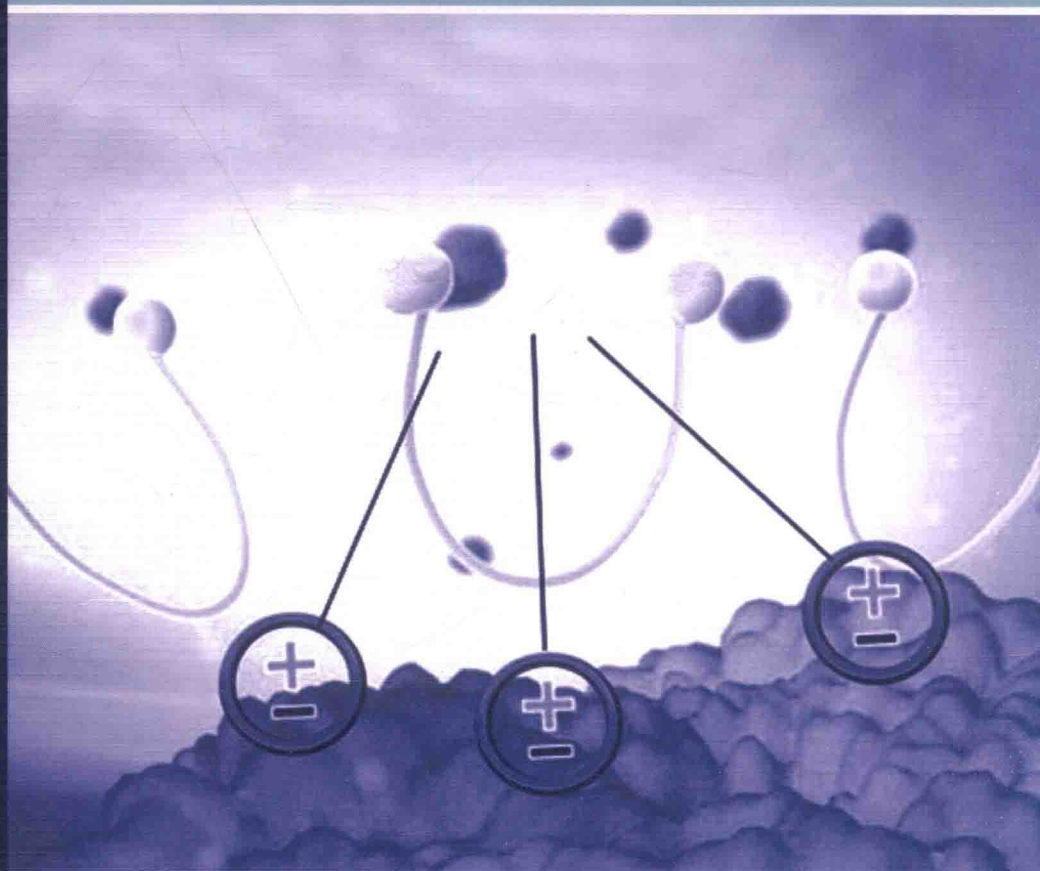


细胞穿透肽

研究方法与实践指南

Cell-Penetrating Peptides Methods and Protocols

- 原著 [瑞典] Ulf Langel
- 主审 王建
- 主译 付爱玲



中国出版集团

世界图书出版公司

细胞穿透肽

研究方法与实践指南

Cell-Penetrating Peptides Methods and Protocols

原著 [瑞典] Ülo Langel
主审 王 建
主译 付爱玲

中国出版集团
世界图书出版公司
西安 北京 广州 上海

图书在版编目(CIP)数据

细胞穿透肽 研究方法 with 实验指南/(瑞典)朗格尔著;付爱玲译.
—西安:世界图书出版西安有限公司,2016.9

书名原文:Cell-Penetrating Peptides Methods and Protocols

ISBN 978-7-5192-0093-0

I. ①细… II. ①朗… ②付… III. ①细胞生物学—研究—指南 ②细胞生物学—实验—指南 IV. ①Q2-62 ②Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 219009 号

版权贸易登记号 25-2013-020

Translation from English language edition:

Cell-Penetrating Peptides

by Ülo Langel

Copyright © 2011 Humana Press

Humana Press is a part of Springer Science + Business Media

All Rights Reserved

细胞穿透肽研究方法 with 实验指南

原 著	[瑞典] Ülo Langel
主 译	付爱玲
责任编辑	杨 莉 马元怡

出版发行	世界图书出版西安有限公司
地 址	西安市北大街 85 号
邮 编	710003
电 话	029-87233647(市场营销部)
	029-87234767(总编室)
传 真	029-87279675
经 销	全国各地新华书店
印 刷	陕西金德佳印务有限公司
开 本	787mm × 1092mm 1/16
印 张	26
印 数	480 千字

版 次	2016 年 9 月第 1 版
印 次	2016 年 9 月第 1 次印刷
书 号	ISBN 978-7-5192-0093-0
定 价	130.00 元

☆如有印装错误,请寄回本公司更换☆

F 序

foreword

细胞膜是细胞与细胞外环境之间的半通透性屏障,它将细胞内外分离开来,从而保障了细胞内环境的稳定性。尽管细胞的这层磷脂双分子膜对细胞的存活和功能必不可少,但在细胞内出现故障时,具有修理能力的蛋白质和核酸等大分子物质却难以进入细胞内并达到有效的浓度。近 20 年来,研究者发现自然界存在着可引导大分子物质进入细胞的多肽,即细胞穿透肽 (cell-penetrating peptides, CPPs)。CPPs 的发现和快速发展,成为解决上述问题的有力工具。

CPPs 是一类由 5 ~ 30 个氨基酸组成的短肽,其特征是可以有效地将其他物质转运至细胞内;有些 CPPs 甚至能够携带生物分子穿过哺乳动物的生理屏障;而有些 CPPs 本身具有生物学功能,因此, CPPs 在生物学基础研究和药物开发方面,均具有广泛而重要的应用前景。

CPPs 作为一种新型多肽,其研究方法具有独特性。在技术手段上涉及了多个学科领域,包括药理学、生物化学与分子生物学、细胞生物学、药剂学、生物物理学等方面的内容,因此与传统的、比较局限的单学科内容不同。实验方法和技术是从事科学研究的必要手段,在进行 CPPs 研究时,有必要有一本反映时代进展、阐述 CPPs 实验方法的参考书。由瑞典 Stockholm 大学 Ulo Langel 教授主编的 *Cell-Penetrating Peptides Methods and Protocols* 一书涵盖了 CPPs 热点研究的多种技术手段,包括跨膜机制的研究方法、功能研究方法和体内实验技术等,参与人员包括了世界范围内从事 CPPs 工作的科学家,如 Alain Joliot, Steven F. Dowdy 等。

目前,由付爱玲教授翻译的这本著作即将出版。通读全稿,感觉翻译内容清晰易懂,实验细节详实,尤其在每章后的注意事项中,详细罗列了实验必须注意的要点和条件,有利于初学者和研究人员顺利地进行实验操作。总之,该书的出版将为提高 CPPs 及相关研究提供很大帮助,是以为序。

中国科学院院士

付爱玲

P 前言

reface

1980 年代末至 2000 年代初,几个重要的实验推翻了蛋白质和多肽不能通透细胞膜的传统学说。第一个实验是在 1988 年,两个独立的研究组分别证明了 HIV 转激活子蛋白的细胞间穿梭能力^[1,2];第二个实验是在 1991 年,Alain Prochiantz 研究组报道了触角同源区(一种果蝇同源蛋白)的细胞内在化现象^[3],并且随后在 1994 年发现了 pAntp (43~58)或者称为穿透素(penetraxin)的短肽,是细胞内在化所必需的必需的区域^[4]。今天,已报道了上百种这类短肽,它们被统称为细胞穿透肽(cell-penetrating peptides, CPPs)^[5],一些实验组称其为蛋白转导区(protein transduction domains, PTDs)、特洛伊木马肽、模型双极性肽或膜转位序列。总体而言,目前仍难以对 CPPs 下准确的定义,因为它们的穿透机制尚不明确。尽管如此,如今对 CPPs 的理解是:CPPs 为一类含有 5~40 个氨基酸的短肽,具有进入细胞内部的能力,它们以内吞等多种机制进入细胞;当它们与生物活性分子通过共价或非共价方式连接后,可使生物分子转运入细胞^[6]。

本书分为 5 个部分,覆盖了 CPPs 研究中最重要方面。第一部分简短介绍了 CPPs 的研究历史、背景和分类,总结了预测它们的可能性;该部分还对 CPPs 的一个重要组分——穿透素的研究概况做了介绍。由于本书主要针对现有的 CPPs 研究方法,没有 CPPs 的摄取机制完全展开阐述。第二部分介绍了 CPPs 穿膜机制的检测方法。由于在与磷脂膜相互作用的细胞摄取中, CPPs 的结构起了重要作用,因此 CPPs 进入细胞的检测方法是本书的重要内容。这部分详细介绍了使用细胞组织化学、激光共聚焦技术、电子显微镜技术等检测 CPPs 的穿膜机制。在研究方法上,药物动力学和热力学摄取是研究 CPPs 机制的重要工具。第三部分阐述了 CPPs 的功能。例如使用 CPPs 的独特性质,研究细胞内(间)相互作用和信号转导的生化机制。CPPs 的功能是 CPPs 研究中最令人振奋的内容之一,在调节细胞内蛋白与蛋白之间相互作用中可能成为一种重要的药物治疗方法。第四部分总结了 CPPs 在应用领域的飞速发展,尤其在基因调节方面促进小干扰 RNA(siRNA)等寡核苷酸的转运,以诱导基因沉默。第五部分是这本书的另一个重要内容,讨论了 CPPs 在体内的应用,以及作为药物的应用前景,例如具有肿瘤选择性的柔性 CPPs 技术经过多年的发展,目前终于结出硕果,器官选择性的 CPPs 输送方法是近几年研究的热点,其他研究热点还包括 CPPs 与具有临床治疗价值的纳米颗粒和多聚物连接在体内的输送等等。

总之,在这 20 多年的研究历程中,对 CPPs 的研究不仅帮助我们拓宽了现有的理论知识和技术方法,更好地了解细胞对物质的摄取机制,还对临床药物的发展大有裨益。

Ülo Langel

参考文献

- [1] Frankel A D, Pabo C O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1988; 1189-1193.
- [2] Green M, Loewenstein P M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55, 1988; 1179-1188.
- [3] Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, Prochiantz A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl Acad Sci USA* 88, 1991; 1864-1868.
- [4] Derossi D, Joliot A H, Chassaing G, et al. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*, 1994, 269; 10444-10450.
- [5] Hansen M, Kilk K, Langel U. Predicting cell-penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 2008; 572-579.
- [6] Langel ü. Preface//Langel ü. Handbook of Cell-Penetrating Peptides. 2th ed. Boca Raton: *CRC Press/Taylor & Francis ü*, 2006.

原著作者

RACHIDA ABES
GUDRUN ALDRIAN
PAULO F. ALMEIDA
ANDREY A. ARZUMANOV
THOMAS J. BELL
MATTIAS BELTING
CORINNE BETTS
ROLAND BROCK
DAN BROWNE
DANIEL CAPALDI
YI-DA CHUNG
LIDIJA COVIC
LAURENCE CROMBEZ
MICHAEL D. DAKE
SÉBASTIEN DESHAYES
GILLES DIVITA
CHRISTIAN DOHMEN
STEVEN F. DOWDY
EDMOND DUPONT
JAMES EBERWINE
AKIKO EGUCHI
EMELÍA EIRÍKSDÓTTIR
SAMIR EL ANDALOUSSI
ANDERS FLORÉN
SHIROH FUTAKI
MICHAEL J. GAIT
JOSE GOMEZ
ASTRID GRÄSLUND
PETER GUTERSTAM
HIDEYOSHI HARASHIMA
STEPHEN D. HARRISON
FRÉDÉRIC HEITZ
TINA HOLM
LARS HOLMBERG
JOHN HOWL

MATTIAS HÄLLBRINK
SUZANNE L. JACQUES
HENRIK J. JOHANSSON
RANDOLPH M
EIJA JOKITALO
ALAIN JOLIOT
LISA RENEE JONES
SARAH JONES
KENTARO KOGURE
KARIDIA KONATE
GEORGIOS KOUKOS
ATHAN KULIOPULOS
PIRJO LAAKKONEN
ÜLO LANGEL
BERNARD LEBLEU
JANE LEE
TAAVI LEHTO
MARIA LINDGREN
MARK A. LINDSAY
ANNELY LORENTS
PER LUNDIN
DEREK MACLEAN
SHIGEMI MATSUYAMA
STERGHIOS A. MOSCHOS
HONG MOULTON
FRANZISKA MUSSBACH
IMRE MÄGER
LENA MÄLER
IKUHIKO NAKASE
PETER E. NIELSEN
KÄRT PADARI
CAROLINE PALM-APERGI
REGINA PIETRUCHA
MARGUS POOGA
ALAIN PROCHIANTZ

SIEGMUND REISSMANN

ANTTI RIVINOJA

PAUL D. ROBBINS

JONATHAN B. ROTHBARD

IVO R. RUTTEKOLK

HELIN RÄÄGEL

FATOUMA SAID HASSANE

AMER F. SALEH

RETO SAUDER

RUPA SAWANT

BUERK SCHAEFER

ANTHONY SCOZZARI

JOACHIM SEELIG

TAKEHIKO SHIRAISHI

KAREN G. SPINK

PILLE SÄÄLIK

BORIS TCHERNYCHEV

ULF TEDEBARK

VLADIMIR P. TORCHILIN

SARAH L. TRESSEL

WOUTER P. R. VERDURMEN

ERNST WAGNER

JACOB M. WAUGH

OLEG WERBITZKY

ANDERS WITTRUP

MATTHEW WOOD

HAIFANG YIN

MALIHA ZAHID

SI-HE ZHANG

ANDRÉ ZIEGLER

目 录

content

第一部分 总 论

第 1 章	细胞穿透肽的分类和预测.....	(3)
第 2 章	穿透素的故事.....	(13)

第二部分 细胞穿透肽进入细胞的机制研究

第 3 章	检测细胞穿透肽与膜的相互作用.....	(21)
第 4 章	双极性细胞穿透肽与模型膜的相互作用.....	(28)
第 5 章	应用 NMR 研究细胞膜模型的三维结构及细胞穿透肽在其中的定位	(40)
第 6 章	测定细胞穿透肽在细胞内的稳定性.....	(49)
第 7 章	多肽结合和插入脂质双层膜的预测工具.....	(57)
第 8 章	蛋白聚糖参与细胞穿透肽介导的转运.....	(69)
第 9 章	细胞穿透肽的摄取动力学.....	(82)
第 10 章	脂质与细胞穿透肽相互作用的热力学研究	(91)
第 11 章	钙与细胞膜修复	(107)
第 12 章	利用荧光显微镜检测蛋白转导通路	(114)
第 13 章	电子显微镜观测细胞穿透肽的入胞方式	(124)
第 14 章	细胞穿透肽的毒性研究	(133)
第 15 章	细胞穿透肽摄取方法的研究和比较	(141)
第 16 章	细胞穿透肽介导寡核苷酸转运的细胞内在化方式	(148)

第三部分 细胞穿透肽的功能研究

第 17 章	细胞穿透肽对功能性蛋白质的模仿	(159)
第 18 章	同源蛋白的细胞内转导——细胞穿透肽的隐藏功能	(170)
第 19 章	靶脑型细胞穿透肽的构建与功能研究	(177)
第 20 章	应用肽噬菌体展示技术确定和表征组织特异性蛋白转导区	(183)

第 21 章 细胞穿透肽作为信号调节剂选择性诱导细胞凋亡 (193)

第四部分 细胞穿透肽在基因调控中的作用

第 22 章 检测 CPP - ON 的有效性和机制的简便方法——剪接重定位 (205)

第 23 章 在假肥大型肌营养不良动物模型中 CPP 介导的寡核苷酸外显子跳跃
..... (216)

第 24 章 PTD - DRBD 介导的 siRNA 转运 (229)

第 25 章 多肽通过非共价方式介导 siRNA 的转运 (237)

第 26 章 应用 PepFect 肽转运剪切 - 校正寡核苷酸 (246)

第 27 章 不同的 CPP 与 JBS - 核素形成复合物促进磷酸核苷内在化进入活细胞
..... (256)

第 28 章 光化学内在化促进 CPP - 肽核酸复合物的细胞内转运 (268)

第五部分 细胞穿透肽在体内及未来作为药物的应用

第 29 章 体内噬菌体展示技术确定管家肽 (277)

第 30 章 检测 CPP - siRNA 在肺中的作用 (289)

第 31 章 应用细胞穿透肽向细胞内输送纳米粒子 (298)

第 32 章 应用多功能 CPP 聚合物系统靶向肿瘤运输质粒和 siRNA (314)

第 33 章 细胞穿透肽和 Bax 抑制肽的使用方法 (323)

第 34 章 PAIR 技术:活细胞中分离外显子特异性的 RNA 结合蛋白 (329)

第 35 章 细胞和局部摄取荧光素 - 寡聚精氨酸偶联物的定量方法 (340)

第 36 章 公司规模化生产 CPP 连接的寡聚核苷酸药物 (353)

第 37 章 应用融合肽 GALA 进行细胞内物质转运 (368)

第 38 章 以细胞穿透肽为载体的药物转运系统基础和临床研究 (375)

第 39 章 在局部药物开发中自组装 CPP 多肽系统的非临床和临床试验 (392)

第一部分

总 论

细胞穿透肽的分类和预测

Maria Lindgren, Ülo Langel

摘要:细胞穿透肽(cell-penetrating peptides, CPPs)领域的研究改变了多肽难以进入细胞的传统观念。在过去的 15 年里,已证明有 100 多个氨基酸的多肽能够进入细胞,并且能够携带其他生物分子进行细胞内转运。这里总结和分析了 CPPs 的共性,并以此为基础,推测其他多肽是否具有细胞通透性。总之,本章通过多个实例介绍了 CPPs 的研究进展、分类和摄取机制,并对具有治疗潜力的 CPPs 进行了详细阐述。

关键词:细胞穿透肽;细胞摄取;胞内输送;药物转运;siRNA;选择性输送

1. 细胞穿透肽

在过去的几年里,细胞穿透肽(cell penetrating peptides, CPPs)或者称为蛋白转导区(protein transduction domains, PTDs)的相关文献数量快速增多。CPPs 是输送生物活性分子进入细胞最有前途的载体之一,在未来的药物治疗中将起到重要作用^[1-3]。CPPs 能够促进不同类型的生物分子向细胞内转运,这些生物分子包括质粒 DNA、寡核苷酸、小干扰 RNA(short interfering RNA, siRNA)、肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)、蛋白和多肽,以及脂质体和纳米颗粒等。

发现的第一批 CPPs 是天然蛋白的一部分,这些蛋白具有通透细胞的能力,如 pAnt 和 Tat(trans-activating protein, 反式激活蛋白)。随后设计合成了非天然 CPPs,如模型双极性肽(model amphipathic peptide, MAP)和其他没有任何天然母体蛋白的多肽等。尽管 CPP 的一级结构不同,但它们有共同的基本性质,即都具有转运其他分子进入细胞的能力,而这种性质使其成为了一类新型多肽,分类的方法已在“前言”中阐述。

在 CPPs 的分类中,有几个亚类。这几个亚类由他们的来源或序列特征所定义(表 1-1)。这种分类是理解 CPPs 功能机制和他们相互关系的一种方式,并用以阐明其他多肽是否为 CPP 家族的成员。

如上所述,天然来源的 PTDs 是 CPPs 的一种亚类。例如,CPP 中来源于同源蛋白的 pAnt 或称穿透素^[2],由 Prochiantz 和 Joliot 两位科学家发现,他们

认为 CPPs 或 PTDs 包含一个区域^[4],细胞可以识别这个特殊的区域,并在细胞内转运中起着必要的作用。然而,一些文献认为不存在这个特殊的区域^[5,6],这可能是由于天然来源的 CPPs,其结构与膜活性肽,如穿孔素或短杆菌肽结构相似,因此可能具有相似的功能,即进入非靶向细胞并引发内在免疫反应的溶酶体裂解作用^[7]。

表 1-1 CPPs 家族的几个例子

家族	名称与序列	来源	参考文献
天然蛋白来源的多肽	穿透素 RQIKIWFAQRRMKWKK - NH ₂	果蝇触角同源蛋白	[7]
	Tat (48 ~ 60) GRKKRRQRRRPPQ	人免疫缺陷病毒 1 (HIV - 1) 的, Tat	[16]
	pVEC LLILRRRIKQAHASK - 酰胺	VE - 钙黏着蛋白	[58]
	VP22 肽 NAKTRRHERRRKLAIER	单纯疱疹病毒	[14]
	MPG GALFLGLGAAGSTMGA - cya	HIV gp41 和猴病毒 40 T 抗原 NLS 融合序列的一个疏水区	[20]
嵌合肽	Pep - 1 KETWETWTEWSQPKKKRKV - cya	猴病毒大 T 抗原和 HIV 反转录酶的 NLS	[23]
	转运素/TP10 GWTLS - / AGYLLGK*INLKALAALAKKIL - NH ₂	甘丙肽和肥大细胞脱粒肽	[6,25]
	M918 MVTVLFRRLRIRACGPPRVV - NH ₂	肿瘤抑制蛋白 p14ARE, 其中 3 ~ 8 为反转的 1 ~ 22 位氨基酸序列	[53]
	YTA2,4 YTAIAWVKAFIRKLK - NH ₂ , IAWVKAFIRKLKGPLG - NH ₂	种子序列的 MMP 切割位点	[35]
	MAP KLALKLALKALKAALKLA	模型双极性多肽	[28]
合成肽	八聚或九聚精氨酸 RRRRRRRR/R	阳性电荷序列	[40,50]
	CADY GLWRALWRLRLRWLLWRA - cya	来源于 PPTG1 和带电荷的氨基酸	[32]
	POD GGG[ARKKAAGA]4	眼部转运多肽	[86]

—NH₂为 N 基末端;—cya 为 N—末端的巯乙胺;a 为侧链连接

2. CPPs 家族

根据 CPPs 的来源和序列特征,可将其分为 3 类:蛋白来源的多肽、嵌合肽和设计(合成)肽(表 1-1)。嵌合肽和设计肽的区别在于嵌合肽的部分序列来源于天然蛋白。

蛋白来源的多肽是最大、也是最为人熟知的一类 CPPs 家族成员,其中, pAnt 或穿透素的地位比较突出(第 2 章)。穿透素是一种同源区来源的多肽。同源区是作为转录因子的同源蛋白与 DNA 结合的一段序列,长度为 60 个氨基酸。穿透素的发现是在研究果蝇触角同源蛋白的内在化过程中,观察到分泌的转录因子可被周围活细胞所摄取^[8];为进一步了解其进入细胞的机制,设计了几个位点突变的同源区,发现它的第三个螺旋(48~53 位氨基酸)是细胞穿透的必需结构^[9],这些结果最终导致穿透素的发现(表 1-1),并且对其构效关系的研究又得到了几个具有穿透活性或没有活性的拟似物^[11]。穿透素是目前文献中应用最为广泛的 CPPs。

来源于 Tat 蛋白的 CPP 是蛋白的部分序列(86~102 位氨基酸)。Tat 蛋白参与 HIV 的复制,它包含 3 个不同的功能区^[12,13]:①对转录激活重要的酸性 N-末端区;②含有锌指模块的富半胱氨酸 DNA 结合区(22~37 位氨基酸);③与入核有关的碱性区(49~58 位氨基酸)。与同源蛋白和单纯疱疹病毒类型 1 蛋白 VP22 相似^[14],Tat 蛋白被活细胞分泌后,随即进入周围细胞^[13,15]。Tat 蛋白进入细胞具有时间和浓度依赖性,但低温可部分抑制其细胞穿透能力。Tat 蛋白中穿透能力最强的片段是 Tat 48~60,该片段包含了蛋白的整个碱性区^[16]和核定位信号区(nuclear localization signal, NLS)。NLS 本身不能进入细胞,但可使 CPP 进入细胞后定位于细胞核。另外,Tat 48~60 虽然不像穿透素那样含有螺旋结构,但仍可以进入细胞,并聚集于细胞核^[16]。随后,将 Tat 48~60 简化为 6~9 个精氨酸(表 1-1),其功能与 CPP 相同,目前作为 CPP 应用于重组蛋白的构建^[17,18]。

第二个 CPPs 家族是嵌合肽,它们的部分序列来源于天然多肽或蛋白,如蛋白的信号序列或 NLS。其中信号序列可被受体蛋白识别,帮助蛋白前体进入细胞器,例如内质网或线粒体,以及具有相同结构特征的区域。与 NLS 偶联的信号序列可进入一些细胞器并浓集于核。例如,卡波西肉瘤纤维母细胞生长因子 1^[19]、HIV-1 gp41 融合区的疏水区^[20]、保守的免疫球蛋白轻链 Ig(v) 信号肽^[21]和来源于核转录因子 κ B(nuclear transcription factor κ B, NF- κ B)^[22]或猴病毒 40(Simian virus 40, SV40)T 抗原的 NLS 连接形成的嵌合肽^[23]。

来源于甘粒肽(galparan)的转运素^[24],由神经肽甘丙肽 1~13 和黄蜂毒

素肽肥大细胞脱粒肽融合而来。它的产生是源于使用嵌合方法开发甘丙肽受体的抑制剂,当时已知甘丙肽的脯氨酸 13 和 N ϵ -生物素-赖氨酸的取代物对甘丙肽受体的亲和力相似,将这两种取代物加入到细胞培养基后,观察到甘丙肽或脯氨酸 13 不能进入细胞,但甘丙肽或 N ϵ -生物素-赖氨酸分布在细胞质和细胞核,这个能通透细胞的多肽后来被命名为转运素(表 1-1)^[25]。在大量的类似物中,转运素 10(transportan 10, TP10)最有效,因此被大量应用于外源物质的细胞内转运^[26,27]。

合成肽的结构多被设计形成双极性 α 螺旋,因此成为目前同源性最高的 CPPs 家族。最早合成的 CPPs 为模型双极性肽(model amphipathic peptide, MAP)。它的合成是在研究肥大细胞脱粒肽和 P 物质等多聚阳离子肽与 G 蛋白之间可能存在直接接触时,Oehlke 等^[28]设计了一个包含 18 个氨基酸的 MAP(表 1-1)。这个肽能以能量依赖性或非依赖性的途径进入巨细胞和内皮细胞,并且可作为其他多肽的转运载体^[29]。MAP 在 $\geq 4\mu\text{mol/L}$ 时显示出浆膜穿孔毒性,但其他几个类似物却具有毒性低、细胞摄取率高的特点^[30]。

Divita 研究组开发了几个 CPPs,与 ON 和 siRNA 非共价结合后,以实现它们的细胞内转运^[31]。CADY 也是合成 CPP 家族里的一份子(表 1-1)^[31,32]。CADY 通过其双极性肽与压缩质粒的性质,非共价连接 ON 和 siRNA,以介导它们的细胞内转运^[33]。

另外两个合成 CPPs 的例子是 YTA-2 和 YTA-4(表 1-1)。这两个肽的设计是以一个相对非特异的基质蛋白酶酶切位点对应的一个小氨基酸片段作为种子序列,然后根据 Hallbrink 的 CPPs 序列预测方法^[34],在种子序列上增加几个氨基酸,使其具有膜通透性。实验证明 YTA-2 和 YTA-4 均能够将荧光素和氨甲蝶呤(MTX)等化合物转运进入耐药性的乳腺癌细胞^[35]。

如前所述,目前已有超过 100 个多肽序列被认为是 CPP。这里仅陈述了几个最常用和新近报道的 CPP,以说明 CPP 成员地发现历史。

3. 穿膜机制

文献中关于 CPPs 的主要研究内容是证明其能够成功用作转运载体,其次就是 CPPs 进入细胞的机制(图 1-1)。

当对比一些 CPPs 的一级结构时,容易发现它们与裂解肽,如蜂毒肽、爪蟾抗菌肽、穿孔素或其他蛋白有一定程度的相似性。细胞裂解肽能够在细胞膜上聚集并使膜形成孔洞,通过这些孔洞裂解肽进入细胞。这种直接穿透的方式会使细胞膜遭到破坏,最终可能导致细胞死亡;另外,蛋白质还可通过受体介导的内吞方式进入到细胞内,例如胰岛素或甘丙肽与细胞膜上的

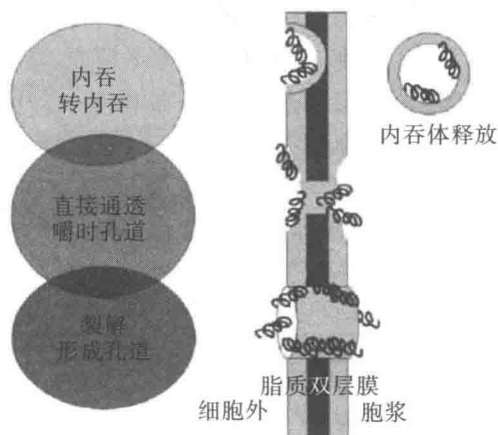


图 1-1 CPPs 进入细胞的可能机制(圆圈内表示有争议的穿膜机制)

受体结合后,经内吞方式进入细胞。这种内吞转运方式需要在细胞表面有一个特异性的受体,并且有一定的机制调节细胞摄取,但这种摄取方式对细胞不产生毒性。胰岛素和甘丙肽本身不是 CPP,没有显示出能够作为 CPP 转运载体的能力。由上述两种蛋白质的入胞机制进行推测, CPPs 可能兼有两种细胞转运方式的某些特征,具有无毒和大量转运的独特能力。

目前的观点认为, CPP 至少有两个比较合理的入胞机制:内吞和直接穿透。不同的 CPP 穿膜机制不同。一个 CPP 的具体机制有赖于几个参数,如分子大小(偶联物)、温度、细胞类型和细胞内外的稳定性等^[36,37]。

尽管 CPPs 进入细胞的机制仍存在争议^[38],但第一批报道的 CPPs,尤其是 Tat 和穿透素,以及多聚 Arg^[39-41]、转运素^[25]、MPG^[20]或 Pep-1^[42]等,能够以不依赖能量的途径通过浆膜。由于以往多聚甲醛固定细胞的方法导致富含阳离子的 CPPs 在细胞内重新分布^[45],产生 CPPs 不依赖能量在脂质双分子层上直接穿透的错误判断,所以目前使用显微镜观测 CPPs 的细胞内转运和定位均在活细胞上进行^[46,47]。

后来报道的 TP10、抗生素和细胞裂解肽可通过结构中的螺旋构象或疏水序列增加与浆膜的结合,然后在膜上形成一些瞬时的孔洞^[42,48],通过这些孔洞, CPPs 直接进入细胞,细胞通过囊泡与胞浆膜的融合,从而对破坏膜进行修复^[49]。已经证明一些低浓度的 CPPs 通过该方式进入细胞,膜修复系统可能与细胞膜的完整性有关。

富含精氨酸的短 CPPs 主要通过内吞方式进行细胞摄取^[50-52]。首先,富含阳离子氨基酸残基的 CPP 与细胞膜上的阴离子组分,如硫酸肝素、唾液酸或者磷脂酸以静电作用结合^[8,53-55];然后,不同的 CPPs 以不同形式的内吞途径进入细胞,如形成细胞质膜微囊(胞膜窖)、巨胞饮、网格蛋白依赖的途径或者胆固醇依赖的网格蛋白介导的途径^[56-59]。另外,不同的肽浓度可能以不同的内吞方式进入细胞^[4],例如,较高浓度 CPPs ($>10\mu\text{mol/L}$)的入胞机