

抗肿瘤活性的新型高效细胞穿膜肽[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的设计及活性评价

李 莉, 张 云, 倪京满*

(兰州大学药学院, 药剂学研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 本文将半胱氨酸-喜树碱 (Cys-camptothecin, Cys-CPT) 引进 penetratin 第 2、9 位, 合成新型穿膜肽类似物 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin, 旨在探索一条具有强穿膜活性且具有抗肿瘤活性的新型细胞穿膜肽。通过激光共聚焦实验和流式细胞术观察 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 在 HeLa 细胞中荧光摄取情况, 使用不同内吞抑制剂研究 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的细胞摄取机制, 最后通过 MTT 实验测试 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 抗肿瘤活性。在激光共聚焦及流式细胞术实验中显示 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的穿膜活性显著增强, 它的胞内荧光强度比 penetratin 明显提高 5 倍。而对于 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的细胞摄取机制, 它主要通过网格蛋白和巨胞饮内吞途径进入细胞内。[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 对 HeLa 细胞具有抗肿瘤活性, 并强于抗肿瘤药物喜树碱。结果说明, [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 是一个新的高膜转导活性的细胞穿膜肽, 同时对 HeLa 细胞具有抗肿瘤活性。

关键词: 细胞穿膜肽; 半胱氨酸; 喜树碱; 抗肿瘤活性; 细胞摄取率; 内吞

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 05-0802-07

Development of novel cell-penetrating peptide [Cys-CPT^{2,9}] penetratin with high translocation ability and antitumor activity

LI Li, ZHANG Yun, NI Jing-man*

(Pharmaceutics Institute, School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: To develop a cell-penetrating peptide with high membrane penetrating ability and effective antitumor activity, we designed and synthesized an analogue of penetratin, [Cys-CPT^{2,9}] penetratin, by substitution of Gln² and Asn⁹ with Cys-CPT. We investigated the transmembrane activity and antitumor activity of [Cys-CPT^{2,9}] penetratin. The fluorescence intensity of [Cys-CPT^{2,9}] penetratin in HeLa cells was observed by laser confocal microscopy and flow cytometry, and the cell uptake mechanism of [Cys-CPT^{2,9}] penetratin was evaluated by using different endocytic inhibitors, finally the anti-tumor activity of [Cys-CPT^{2,9}] penetratin was tested by MTT assay. The results showed that the membrane activity of [Cys-CPT^{2,9}] penetratin was significantly enhanced in laser confocal microscopy and flow cytometry assay, and the intracellular fluorescence intensity was 5 times higher than penetratin. The cell uptake mechanism study of [Cys-CPT^{2,9}] penetratin indicated that it mainly entered the cell through the clathrin and endocytosis. Moreover, [Cys-CPT^{2,9}] penetratin exhibited anti-tumor activity against HeLa cells, and its inhibitory effect on cancer cells was stronger than CPT. [Cys-CPT^{2,9}] penetratin is a new cell-penetrating peptide with high translocation ability, and has anti-tumor activity against HeLa cells.

Key words: cell-penetrating peptide; cysteine; camptothecin; antitumor activity; cellular uptake; endocytosis

收稿日期: 2017-01-08; 修回日期: 2017-02-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273440); 兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (lzujbky-2015-30).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-931-8915683, E-mail: nijm@lzu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0036

在正常的人类生命活动中, 基因的选择性剪切会表达不同功能的蛋白分子来参与人体正常的生理代谢过程。当基因的剪切出现紊乱时, 会产生异常的表达产物, 它们可能会影响正常的生理过程, 甚至导致疾病的发生^[1, 2]。目前全世界每年有大约 700~1 000 万人死于癌症, 因此癌症是一个巨大的医学挑战^[3, 4]。而它的产生和发展与许多癌症相关基因 BCL-X、MDM2 和 FGFR1 等过表达密切相关^[5, 6]。在癌症治疗中, 许多化疗药物和几乎全部生物大分子药物由于难以透过细胞膜限制了抗肿瘤作用的发挥。因此, 发展促使这些药物被细胞摄取的策略变得尤为重要^[7]。

细胞穿膜肽 (CPPs) 作为一种由 5~30 氨基酸组成的短肽, 是非常有潜力的药物递送载体之一^[8]。它能够递送各种大分子药物穿透细胞膜进入细胞内且不影响它们的生物活性^[9-11]。因此, 作者希望以 CPPs 作为模板设计出高效的非病毒载体。Penetratin 来源于果蝇触角蛋白同源结构域, 是一条两亲性的穿膜肽; 因为它具有较好的穿膜效应被作为一个潜在药物载体用于各种目的^[12-14]。Penetratin 序列中的阳离子氨基酸精氨酸 (Arg) 和赖氨酸 (Lys) 是发挥穿膜活性的不可替代的位点, 如果对它们进行替换或改造会降低穿膜效应^[15]。而序列中的色氨酸 (Trp)、苯丙氨酸 (Phe) 和异亮氨酸 (Ile) 为疏水性氨基酸, 可以促进肽与细胞膜脂质的相互作用^[16-18]。因此, penetratin 具有穿膜特性和两亲性, 使它可作为设计新型非病毒载体的潜在模板。

在本研究中, 以 penetratin 作为设计的母肽, 将它的 2 位和 9 位的氨基酸替换为半胱氨酸-喜树碱 (Cys-camptothecin, Cys-CPT) 以增加 penetratin 的两亲性, 旨在提高其穿膜效率的同时也使它具有的抗肿瘤效应, 最后得到了肽[Cys-CPT^{2,9}] penetratin (图 1), 作为新型载体用于肿瘤基因治疗。

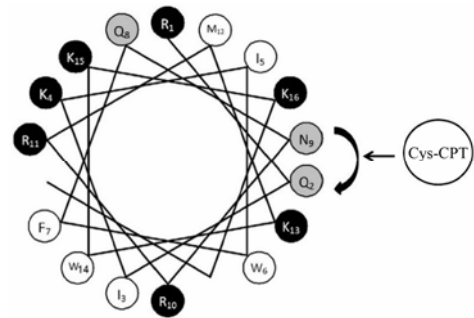


Figure 1 Spiral wheel structure of penetratin. Black: Basic amino acids; Gray: Hydrophilic amino acids, uncharged; White: Nonpolar amino acids; Cys: Cysteine; CPT: Camptothecin

材料与方法

实验材料与仪器 RPMI-1640 培养基和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自 Gibco 公司; 新生牛血清 (newborn bovine serums, NBS) 购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 噻唑蓝 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-*H*-tetrazolium bromide, MTT]、头孢哌酮 (cefoperazone, CPZ)、异丙基阿米洛利 [5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl) amiloride, EIPA]、甲基- β -环糊精 (methyl- β -cyclodextrin, $M\beta$ CD) 和 CPT 均购自 Sigma-Aldrich 公司; 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 购自苏州亚科化学试剂有限公司。全自动酶标仪 (Bio-Rad 公司); 激光共聚焦显微镜 (Zessie 公司); 流式细胞仪 (Becton Dickinson 公司)。

Penetratin 和[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 肽的合成 选择的方法为采用经典的多肽固相合成法合成。采用 MBHA 树脂 (取代值为 $0.54 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 合成, 表 1 中所述肽序列。其中荧光素 FITC 通过连接子六氨基己酸 (6-aminocaproic acid, AHX) 连接在肽链的氮末端, 而[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的合成是在主链[Cys^{2,9}] penetratin 的合成后, 通过二硫键连接反应将 CPT 偶联到[Cys^{2,9}] penetratin 的第 2,9 位半胱氨酸的侧链巯基基团上。最后经 RP-HPLC 纯化和 ESI-MS 质谱鉴

Table 1 Amino acid sequence of peptides. ^aFluorescein moiety (FITC) was attached to the N-terminus of peptide *via* an amino-hexanoic acid (AHX) spacer

Peptide	Amino acid sequence
Penetratin	RQIKIWFQRRMKWKK-NH ₂
FITC-penetratin	FITC-AHX-RQIKIWFQRRMKWKK-NH ₂ ^a
[Cys ^{2,9}] penetratin	R[Cys]IKIWFQ[Cys]RRMKWKK-NH ₂
FITC-[Cys ^{2,9}] penetratin	FITC-AHX-R[Cys]IKIWFQ[Cys]RRMKWKK-NH ₂
[Cys-CPT ^{2,9}] penetratin	R[Cys-CPT]IKIWFQ[Cys-CPT]RRMKWKK-NH ₂
FITC-[Cys-CPT ^{2,9}] penetratin	FITC-AHX-R[Cys-CPT]IKIWFQ[Cys-CPT]RRMKWKK-NH ₂
Transportan 10 (TP10)	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂
FITC-TP10	FITC-AHX-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂

定后的目标肽^[19], 用于后续实验。

细胞培养 HeLa 细胞 (人宫颈癌细胞, 上海中国科学院细胞库) 用灭活小牛血清 NBS 与 RPMI-1640 培养基配成 10% 小牛血清培养基培养细胞, 培养基中含硫酸链霉素 ($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和青霉素 G 钠盐 ($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 以避免细胞污染。细胞株培养在 37°C 、5% CO_2 无菌细胞培养箱中。

FITC 摄取实验 HeLa 细胞以每皿 4×10^4 个接种于玻璃底的培养小皿内, 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。然后在皿中加入无血清 RPMI-1640 培养液配制的 FITC-penetratin、FITC-[Cys^{2,9}] penetratin 和 FITC-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin, 浓度为 $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养箱中孵育 30 min。再用 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 洗涤细胞 3 次, 最后在激光共聚焦显微镜下观察细胞内 FITC 的荧光强度, 激发波长为 488 nm。

CPT 内化实验 HeLa 细胞以每皿 4×10^4 个接种于玻璃底的培养皿内, 在培养箱内培养 24 h, 然后在皿中加入 $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CPT、[Cys-CPT^{2,9}] penetratin, 放置于培养箱内孵育 30 min, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 最后通过激光共聚焦在 405 nm 波长下观察细胞内的蓝色荧光强度 (CPT 荧光)。

流式细胞仪检测实验 HeLa 细胞以每孔 2×10^5 个接种于 12 孔板中, 培养 24 h 后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 然后将无血清 RPMI-1640 培养液配制的不同浓度 (1、2 和 $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 FITC-penetratin、FITC-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 溶液加入到培养板孔内, 与细胞共孵育 30 min, 再用胰酶消化并收集细胞, 用预冷的 PBS 清洗样品 3 次, 最后加入 PBS 500 μL 重悬细胞, 流式细胞仪检测荧光强度, 激发波长 488 nm。

为了进一步证实 FITC-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的穿膜效率, 选择被广泛研究证实穿膜活性强的穿膜肽 Transportan 10 (TP10) 作为阳性对照, 对 FITC-penetratin、FITC-[Cys^{2,9}] penetratin、FITC-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 和 FITC-TP10 的穿膜效率进行分析和比较, 浓度设为 $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

细胞摄取的机制研究 为了研究 penetratin 与 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的细胞摄取机制, 采用不同内吞抑制剂探究它们对肽穿膜效率的影响作用。HeLa 细胞以每孔 2×10^5 个接种于 12 孔板, 培养箱中培养 24 h 备用。先用 PBS 洗涤细胞 3 次后, 在小孔内加入无血清 RPMI-1640 培养液配制的不同抑制剂溶液 ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 网格蛋白介导型内吞抑制剂 CPZ、 $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 巨胞饮型内吞抑制剂 EIPA 和 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

小窝蛋白介导型内吞抑制剂 M β CD), 预处理 30 min, 然后在样品孔内分别加入 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FITC-penetratin 和 $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FITC-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 继续共孵育 30 min。最后, 将收集到的细胞在流式细胞仪中测定荧光强度。实验中只加 FITC-penetratin 和 FITC-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的样品作为空白对照。

肽对肿瘤细胞增殖的影响 HeLa 细胞以每孔 5×10^3 个接种于 96 孔微板中培养 24 h。将无血清 RPMI-1640 培养液配制的 CPT、penetratin、[Cys^{2,9}] penetratin、[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 溶液 (0.3125、0.625、1.25、2.5 和 $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别加入到培养孔内, 孵育 30 min 后用 PBS 清洗细胞, 然后加入含 5% NBS 的新培养液 180 μL , 继续培养 72 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 ($5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 20 μL , 继续孵育 4 h, 最后吸取上清, 每孔加入 DMSO 溶液 150 μL , 微板器上震动 5 min 后, 用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度值 (OD)。细胞存活率 (%) = $\text{OD}_{\text{药物组}} / \text{OD}_{\text{control}} \times 100$; 另外采用同样处理方法考察以每孔 1×10^4 个接种于 96 孔板的 HeLa 细胞在 CPT、penetratin、[Cys^{2,9}] penetratin 和 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin (1、2、5、10 和 $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 1 h 后的存活率。

结果

1 细胞摄取

当 FITC 标记的 penetratin 系列肽与 HeLa 细胞共孵育 30 min 后, 在激光共聚焦下能检测到它们在细胞内的绿色荧光。但在同一浓度下, 发现 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 组的细胞内荧光强度明显高于 penetratin 和 [Cys^{2,9}] penetratin 组, 结果显示较多的 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 被摄入细胞内 (图 2A)。说明改造后的 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的穿膜能力明显高于 penetratin。

流式细胞术实验对 FITC-penetratin、FITC-[Cys^{2,9}] penetratin、FITC-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 和 FITC-TP10 的细胞摄取水平进行了直观的比较。从图 2B 可见, FITC-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的荧光强度高于 FITC-penetratin、FITC-[Cys^{2,9}] penetratin 约 5 倍, 此结果与激光共聚焦的结果一致, 显示 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 具有更高的穿膜能力。[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的穿膜能力与阳性对照药 TP10 相近。通过细胞摄取实验证实, 将 Cys-CPT 与 penetratin 第 2,9 位氨基酸替换后得到的 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 具有明显优于母体的穿膜能力。

2 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 细胞摄取的量效关系

对 penetratin 和 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 细胞摄取进行更深入的量效关系研究。如图 3 所示, 当 HeLa 细

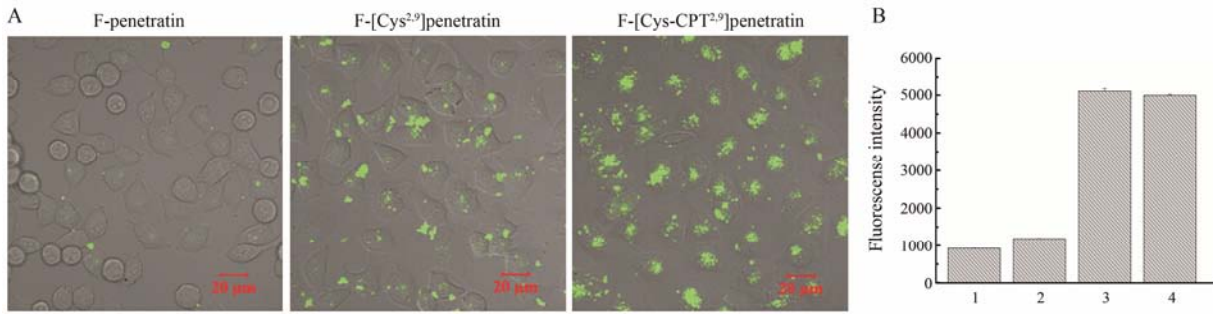


Figure 2 Cellular uptake of peptides in HeLa cells. Cells were incubated with 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FITC-labeled peptides for 30 min in serum-free medium. A: Laser confocal images of cellular uptake of peptides; B: Flow cytometry analysis of peptides internalized into cells. 1, 2, 3 and 4 were FITC-penetratin (F-penetratin), FITC-[Cys^{2,9}] penetratin (F-[Cys^{2,9}] penetratin), FITC-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin (F-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin) and FITC-TP10 (F-TP10, positive control). TP10: Transportan 10

胞与不同浓度的 FITC-penetratin 和 FITC-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 共孵育 30 min 后, 流式细胞仪检测发现两个肽作用后胞内荧光强度均随浓度的增加而增加, 而各个浓度下 FITC-penetratin 的荧光强度均低于相同浓度 FITC-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的荧光强度, 且 FITC-penetratin 的浓度增加到 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 它的细胞内的荧光强度且略低于 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 FITC-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 所对应的荧光强度。

3 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的细胞摄取机制

不同内吞抑制剂 (网格蛋白介导型内吞抑制剂 CPZ、小窝蛋白介导型内吞抑制剂 M β CD、巨胞饮内吞抑制剂 EIPA) 对 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 细胞摄取的影响^[20]。如图 4A 所示, 在母肽 penetratin 处理组中, 发现 3 种内吞抑制剂 CPZ、M β CD 和 EIPA 均可明显降低它的细胞摄取, 其中各个抑制剂作用后对应的细胞摄取水平是 penetratin 对照组的 73%、66% 和 56%; 在图 4B 中, HeLa 细胞经 CPZ 和 EIPA 预处理后, [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的细胞摄取率明显降低至 43.1% 和 82%, 但 M β CD 处理组的细胞摄取率与对照组一致, 没有表现出细胞摄取抑制作用。结果表明,

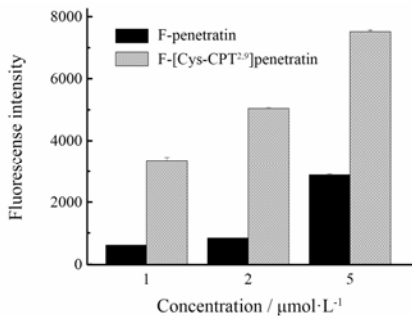


Figure 3 Response value of FITC-penetratin (F-penetratin) and FITC-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin (F-[Cys-CPT^{2,9}] penetratin) under different concentrations on HeLa cells. It was investigated quantitatively by flow cytometry after 30 min treatment

[Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的细胞摄取机制主要是经由网格蛋白、巨胞饮内吞通路内化进细胞的, 不经过细胞膜穴样内陷过程, 与 penetratin 进入细胞途径略有不同。

4 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 诱导的细胞内 CPT 摄取量

为了考察 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 大量进入细胞时, 是否将 CPT 一起带入细胞内, 从而发挥抗肿瘤活性, 利用激光共聚焦对 CPT 内化情况进行直观分析。如图 5 所示, 在 CPT 的激发波长下 CPT 和 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 组细胞内均能检测到蓝色荧光, 显

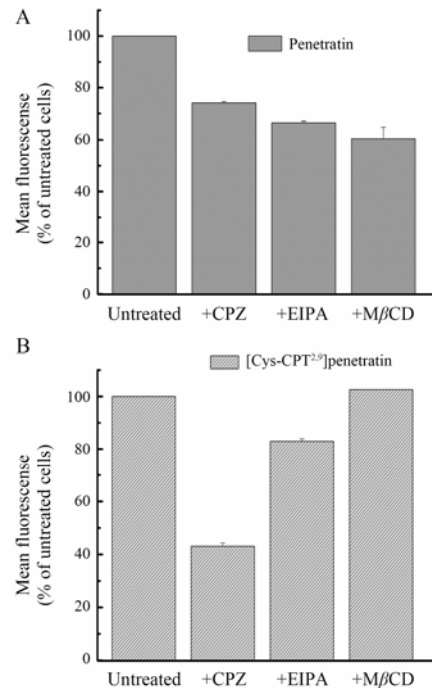


Figure 4 The internalization of penetratin (A) and [Cys-CPT^{2,9}] penetratin (B) evaluated by flow cytometry in the presence of specific endocytosis inhibitors. CPZ: Cefoperazone; EIPA: 5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride; M β CD: Methyl-beta-cyclodextrin

示 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 导入细胞的同时自身所携带的 CPT 随之进入细胞内, 具有一定的抗肿瘤效应。

5 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的抗肿瘤活性

为了进一步证明 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 抗肿瘤活性, 采用 MTT 法探讨 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 对 HeLa 作用不同时间后细胞的存活率状态。在 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 作用下, 细胞存活率表现出浓度依赖性, 对 HeLa 细胞的增殖具有抑制作用, 且抑制活性高于 CPT 组 (图 6A), 而 penetratin 和 [Cys^{2,9}] penetratin 对 HeLa 细胞的增殖未产生任何影响。在图 6B 中, [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 在短时间内也能抑制肿瘤细胞增殖, CPT 对 HeLa 细胞未产生明显的杀伤作用, 进一步印证了 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 具有高穿膜活性的同时也具有抗肿瘤活性。

讨论

在 CPPs 的二级结构图中, 序列中的极性基团集中分布于结构一侧, 而非极性基团集中分布于另一侧, 从而形成双亲性的肽结构。肽的两亲性在它的穿膜活性中发挥着非常重要的作用, 因此, 对 CPPs 进行两亲性设计改造成为开发新型高效穿膜肽的策略之一^[21-23]。本研究选择 penetratin 作为母肽, 在不改变序列中碱性氨基酸及芳香性、疏水性氨基酸等关键基团的前提下, 将 2 位 Gln 和 9 位 Asn 替换为疏水性基团 Cys-CPT 以期扩大母肽的疏水结构区域, 目的在于增加 penetratin 的双亲性, 进而得到更有潜力的穿膜肽 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin。在激光共聚焦结果中, [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 被摄入细胞内更多, 显示

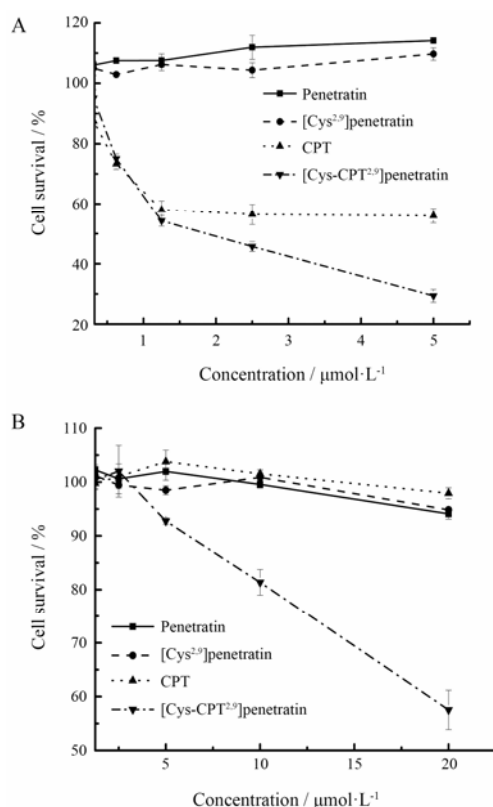


Figure 6 Inhibitory activity of [Cys-CPT^{2,9}] penetratin on tumor cell proliferation. A: Survival rate of HeLa cells in drug treatment for 30 min and then cultured for about 72 h; B: Survival rate of HeLa cells in drug treatment for 1 h and determined using the MTT method. *n*=3, $\bar{x} \pm s$. MTT: 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-*H*-tetrazolium bromide

它的穿膜活性明显高于 penetratin, 表明 penetratin 的双亲性增加后促进了穿膜肽与细胞膜之间的相互作用, 使更多的肽被细胞内化。同时流式数据也进一步

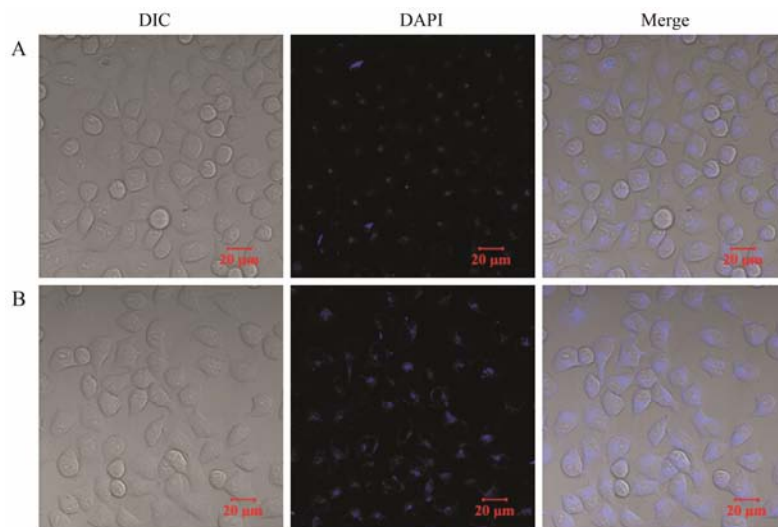


Figure 5 CPT uptake in HeLa cells. Cells were incubated with serum-free medium containing 2 μmol·L⁻¹ CPT (A) and [Cys-CPT^{2,9}] penetratin (B) for 30 min and finally investigated by confocal laser scanning microscopy. DIC: Differential interference contrast microscopy; DAPI: Cells which took up CPT appear blue under fluorescent light

证实了此结论, [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 具有更高的穿膜活性, 而比较 penetratin 与 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 量化结果发现, [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的荧光强度比 penetratin 高 5 倍, 凸显它的穿膜优势。

基于 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 具有较好的穿膜活性, 作者对它的穿膜机制进行了探索。目前普遍认可 CPPs 的穿膜机制是细胞内化过程^[24, 25], 所以使用网格蛋白介导型内吞抑制剂、小窝蛋白介导型内吞抑制剂和巨胞饮型内吞抑制剂探究 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 细胞摄取机制^[18]。结果显示, 抑制剂 CPZ、EIPA 均能降低 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的细胞摄取率, 这与 penetratin 摄取机制一致^[13, 16]。但是, [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的摄取过程中小窝蛋白未发挥作用, 这与 penetratin 摄取机制有所不同, 可能是因为引入 CPT 基因影响了小窝蛋白介导的内吞作用^[26, 27]。由此认为 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的细胞摄取机制是首先通过静电作用与细胞膜结合, 然后通过疏水性作用与膜脂质结合, 最后由网格蛋白、巨胞饮介导的内吞途径进入到细胞内。

由激光共聚焦实验可见, CPT 随 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 被细胞摄取, 抗肿瘤活性实验也显示 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 具有抗肿瘤活性, 且比 CPT 抑制癌细胞作用更强, 表明 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 中引入 Cys-CPT 基因不仅具有更好的穿膜活性, 也有抗肿瘤活性, 此结果与作者设计理念一致。高穿膜活性和抗肿瘤活性的 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 在临床应用中具有更大优势: 高效穿膜活性使 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 可开发成潜在的药物载体, 克服 CPT 在肿瘤治疗中难以通透细胞膜和胞内转运问题; 携带的 CPT 也通过凋亡通路诱使癌细胞死亡^[28, 29]。两者通过协同作用来增强治疗药物的抗肿瘤活性, 同时也降低了化学药物的给药剂量, 有利于降低药物的毒副作用及肿瘤耐受现象出现的几率。总之, 新型高效穿膜肽 [Cys-CPT^{2,9}] penetratin 的发现对后续肿瘤治疗方案的研究和发展提供了前期基础。

References

- [1] Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease [J]. *Genes Dev*, 2003, 17: 419–437.
- [2] Riffo-Campos ÁL, Castillo J, Vallet-Sánchez A, et al. *In silico* RNA-seq and experimental analyses reveal the differential expression and splicing of EPDR1 and ZNF518B genes in relation to KRAS mutations in colorectal cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36: 3627–3634.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65: 5–29.
- [4] Ali I, Saleem K, Aboul-Enein HY, et al. Social aspects of cancer genesis [J]. *Cancer Ther*, 2011, 8: 6–14.
- [5] Srebrow A, Kornbliht AR. The connection between splicing and cancer [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119: 2635–2641.
- [6] Pajares MJ, Ezponda T, Catena R, et al. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology [J]. *Lancet Oncol*, 2007, 8: 349–357.
- [7] Zhang L, Wei G, Lu WY. Application of activatable cell-penetrating peptide in the field of tumor therapy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 1639–1643.
- [8] Fan B, Jin MJ, Huang W, et al. The development of cell-penetrating peptides in drug delivery system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 264–271.
- [9] Mäe M, Langel Ü. Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2006, 6: 509–514.
- [10] Stewart KM, Horton KL, Kelley SO. Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine [J]. *Org Biomol Chem*, 2008, 6: 2242–2255.
- [11] Vivès E, Schmidt J, Pèlegri A. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1786: 126–138.
- [12] Bera S, Kar RK, Mondal S, et al. Structural elucidation of the cell-penetrating penetratin peptide in model membranes at the atomic level: probing hydrophobic interactions in the blood-brain barrier [J]. *Biochemistry*, 2016, 55: 4982–4996.
- [13] Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, et al. The third helix of the antennapedia homeodomain translocates through biological membranes [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 10444–10450.
- [14] Lundin P, Johansson H, Guterstam P, et al. Distinct uptake routes of cell-penetrating peptide conjugates [J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19: 2535–2542.
- [15] Binder H, Lindblom G. A molecular view on the interaction of the trojan peptide penetratin with the polar interface of lipid bilayers [J]. *Biophys J*, 2004, 87: 332–343.
- [16] Drin G, Mazel M, Clair P, et al. Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide: role of lipid-binding affinity [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 1304–1314.
- [17] Letoha T, Gaál S, Somlai C, et al. Membrane translocation of penetratin and its derivatives in different cell lines [J]. *J Mol Recognit*, 2003, 16: 272–279.
- [18] Christiaens B, Symoens S, Vanderheyden S, et al. Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides

- with model membranes [J]. Eur J Biochem, 2002, 269: 2918–2926.
- [19] Zhang W, Song JJ, Zhang BZ, et al. Design of acid-activated cell penetrating peptide for delivery of active molecules into cancer cells [J]. Bioconjug Chem, 2011, 22: 1410–1415.
- [20] Doan ND, Létourneau M, Vaudry D, et al. Design and characterization of novel cell-penetrating peptides from pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide [J]. J Control Release, 2012, 163: 256–265.
- [21] Ho A, Schwarze SR, Mermelstein SJ, et al. Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential *in vitro* and *in vivo* [J]. Cancer Res, 2001, 61: 474–477.
- [22] Oehlke J, Krause E, Wiesner B, et al. Nonendocytic, amphipathicity dependent cellular uptake of helical model peptides [J]. Prot Peptide Lett, 1996, 3: 393–398.
- [23] Oehlke J, Scheller A, Wiesner B, et al. Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1414: 127–139.
- [24] Duchardt F, Fotin-Mieczek M, Schwarz H, et al. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides [J]. Traffic, 2007, 8: 848–866.
- [25] Futaki S, Nakase I, Tadokoro A, et al. Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms [J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35: 784–787.
- [26] Maiolo JR, Ferrer M, Ottinger EA. Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1712: 161–172.
- [27] Tünnemann G, Martin RM, Haupt S, et al. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells [J]. FASEB J, 2006, 20: 1775–1784.
- [28] Sánchez-Alcázar JA, Ault JG, Khodjakov A, et al. Increased mitochondrial cytochrome C levels and mitochondrial hyperpolarization precede camptothecin-induced apoptosis in Jurkat cells [J]. Cell Death Differ, 2000, 7: 1090–1100.
- [29] Yuan Q, Ray RM, Johnson LR. Polyamine depletion prevents camptothecin-induced apoptosis by inhibiting the release of cytochrome C [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 282: C1290–C1297.