

酸敏感多肽在药物递送方面的作用机制及其应用

赵欢乐¹, 梁菊^{1*}, 吴文澜², 李军波¹

(河南科技大学 1. 化工与制药学院, 2. 医学院, 河南 洛阳 471023)

摘要: 作为一类新型的递送载体, 多肽具有丰富的生物活性、较低的免疫原性及良好的生物相容性, 近年来利用多肽递送药物或基因的研究得到广泛关注。其中, 具有酸敏感性的多肽, 在肿瘤微环境或溶酶体的弱酸性条件下可以产生二级结构的改变。因此, 将酸敏感多肽作为递送载体, 或其修饰在其他载体上, 负载药物后形成的纳米组装体可以在肿瘤组织中定点释放药物, 促进药物的细胞内化, 增强药物的治疗效果。目前发现酸敏感多肽种类较多, 多肽的氨基酸侧链、极性氨基酸数量、氨基酸序列及肽链二级结构都可以影响其酸敏感性。本文列举了近年来文献中报道的酸敏感多肽类型, 分析了多肽的结构与其酸敏感性之间的关系, 并介绍了酸敏感多肽及其修饰载体在药物递送方面的作用机制和应用, 为更好地开发和利用酸敏感多肽, 实现药物的高效递送提供参考。

关键词: 多肽; 酸敏感性; 载体; 药物递送; 肿瘤; 纳米组装体

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)03-0440-08

Mechanism and application of acid-sensitive peptides in drug delivery

ZHAO Huan-le¹, LIANG Ju^{1*}, WU Wen-lan², LI Jun-bo¹

(1. Chemical Engineering and Pharmaceutics School, 2. Medical School, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

Abstract: As a part of novel drug delivery carriers, peptides have diverse biological activities, low immunogenicity and good biocompatibility. In recent years, studies on the delivery carriers modified by peptides have attracted much attention. Among them, the peptides with acid sensitivity can change their secondary structures under slightly acidic microenvironment of the tumor or in lysosome. Therefore, the carriers made or modified by acid-sensitive peptides can specifically release the loaded drug in the tumor tissue, enhance the cell internalization of drugs and improve its therapeutic effects. In accordance with acid-sensitive peptides studied, the side chains, number of polar residues, sequence and secondary structure of the peptides might be involved in the acid sensitivity. In this review, we summarize the acid-sensitive peptides from recent literatures, analyze the connection between the structure and the acid sensitivity, and focus on the mechanism and application of acid-sensitive peptides in drug delivery. This provides the basis for further development and utilization for acid-sensitive peptides for efficient drug delivery.

Key words: peptide; acid sensitivity; carrier; drug delivery; tumor; nano-assemblies

多肽是由 α -氨基酸按照一定的排列顺序通过肽键结合而成的生物活性物质, 普遍存在于生物体内, 是构成蛋白质的结构片段, 同时也是生物体进行代谢调控

的重要物质。自然界和人体中存在多种功能性多肽, 如温度敏感肽、还原响应肽、智能靶向肽和酸敏感肽等^[1,2]。这些多肽构建的药物或基因载体, 特别在肿瘤治疗领域, 显示出强大的优势: 将多肽与药物分子偶联, 可以制备具有靶向性的前体药物; 多肽自组装形成的药物载体, 可负载药物并递送到特定肿瘤组织; 利用富含正电荷的功能性多肽作为基因载体, 可静电结合

收稿日期: 2018-08-31; 修回日期: 2018-12-17.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (51403055).

*通讯作者 Tel: 86-379-64231914, E-mail: liangju@haust.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0799

siRNA 或质粒, 并实现基因的高效递送; 此外, 多肽能修饰各种纳米材料, 如脂质体、无机和高分子材料等, 形成多功能纳米载体, 从而增强药物的靶向性和细胞利用度^[3,4]。在针对肿瘤的药物和基因递送中, 多肽表现出功能多样、生物活性高、毒性低、低免疫原性和易于负载等优良特点^[5,6]。这主要归因于其特定的氨基酸序列和空间结构, 多肽可以利用氨基酸残基间的氢键、范德华力、静电作用及 π - π 堆积形成独特的结构并展现不同的功能^[7], 而氨基酸残基中不同官能团(疏水、亲水、碱性、酸性、极性基团)的巧妙结合是多肽实现多种功能的关键因素。

肿瘤组织具有特殊的糖酵解代谢过程, 从而形成微环境的弱酸性 (pH_{ex} 6.8), 而正常组织 pH_{ex} 及血液 pH 值均为 7.4。因此, 酸敏感多肽在靶向递送抗肿瘤药物和基因的领域具有明显优势。酸敏感多肽对酸性环境高度敏感, 通过氨基酸残基侧链基团的质子化或去质子化, 影响多肽不同残基之间的相互作用并产生二级结构的构型变化(如无规则卷曲和 α 螺旋之间的相互转变), 从而体现其酸响应性, 有利于酸敏感多肽自组装或修饰的纳米载体靶向释放药物或基因。近年来, 以肿瘤组织的弱酸性微环境为靶点的多肽相关载体系统的设计和研究得到了快速发展。表 1^[8-20] 列举了目前报道的酸敏感多肽的序列, 这些多肽的酸敏感性与其结构之间的关系密切。本文有针对性地分析这些多肽的结构特征, 阐述并总结这些酸敏感多肽在抗肿瘤药物递送系统方面的作用机制及其应用, 为进一步开发相关递送系统提供数据参考。

1 酸敏感多肽的结构特征

由于多肽链上各种氨基酸残基具有不同的侧链基团, 因此氨基酸残基之间甚至多肽之间可以通过静电作用、氢键及疏水作用等实现一定的二级结构或自组装结构。当外界环境, 如温度、 pH 值、氧化还原状态等发生变化时, 氨基酸残基之间的作用力发生改变, 从而影响多肽的二级结构或自组装结构^[21]。酸敏感多肽中的一些残基的侧链基团, 例如酸性氨基酸的羧基、碱性氨基酸的含氮官能团都具有质子化或去质子化的能力, 这些侧链基团的表面电荷的改变可以引起残基间作用力发生改变, 从而影响多肽的二级结构。

2 由氨基酸侧链基团引起的酸敏感

根据氨基酸侧链 R 基团的不同, 氨基酸可以分为 3 大类: 酸性氨基酸、碱性氨基酸和中性氨基酸。不同的碱性氨基酸侧链包含: 胍基、氨基或咪唑基, 对应的氨基酸分别是精氨酸、赖氨酸和组氨酸; 而酸性氨基酸的侧链都含有羧基, 如谷氨酸和天冬氨酸。常见的酸敏感氨基酸主要包括: 含有咪唑基团的组氨酸、含有氨基侧链的赖氨酸及含有羧基侧链的谷氨酸和天冬氨酸。当环境 pH 值从中性降至酸性时, 酸敏感多肽的这些残基侧链基团质子化, 影响静电相互作用, 从而使这些多肽具有酸敏感性。

2.1 由组氨酸侧链咪唑基团引起的酸敏感 在组成蛋白质的 20 种氨基酸中, 组氨酸归属于碱性氨基酸, 其 pK_a 约为 6.5^[22], 这是 pK_a 值唯一接近于 7.0 的特殊氨基酸, 也是负责生物系统缓冲能力的主要氨基酸^[23,24]。组氨酸在正常的生理环境下略带负电, 在 $\text{pH} \leq 6.5$ 时会

Table 1 Acid-sensitive peptides and their sequences. Y* represents the amino acid 3,5-diiodotyrosine

Peptide	Sequence
TH ^[8]	AGYLLGHINLHHLAHL(Aib)HHIL-NH ₂
TR ^[9]	c(RGDfK)-AGYLLGHINLHHLAHL(Aib)HHIL-NH ₂
Chol-H ₈ R ₈ ^[10]	HHHHHHHRRRRRRRR-CHOL
HR ₁₅ -Chol ^[11]	HHHHHRRRRRRRRRR-CHOL
HR ₂₀ -Chol ^[11]	HHHHHHHHHRRRRRRRRRR-CHOL
HA-R ₆ H ₄ -L ^[12]	HA-RRRRRRHHHH-L
V ₆ K ₂ RGDS ^[13]	VVVVVVKKGRGDS
MAX1 ^[14]	VKVKVKVDPPTKVKVKVKV-NH ₂
RGDS-E ₁₀ -Lys(C ₁₈) ^[15]	RGDSEEEEEEEEEK(C ₁₈)
p-RRL ^[16]	pal-RLRRLRARARA
(HE) ₁₀ ^[17]	HEHEHEHEHEHEHEHEHEHE
GALA ^[18]	WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA
GALAdel3E ^[18]	WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA
YALA ^[18]	WEAALAEALAEALAY*HLAEALAEALAEALAA
pHLIP ^[19]	ACEQNPIYWARYADWLFPTPLLLLDLALLVDADEGT
pHLIP/Gla ^[20]	AEQNPIYWARYAGlaWLFPTPLLLLDLALLVDADEGT
pHLIP/Gla/Aad ^[20]	AEQNPIYWARYAGlaWLFPTPLLLLAadLALLVDADEGT
pHLIP/Var3 ^[20]	ADDQNPWRAYLDLLFPTDLLLLDLLW
pHLIP/Var3/Gla ^[20]	ADDQNPWRAYLGlaLFFPTDLLLLDLLW
pHLIP/Var3/GLL ^[20]	GEEQNPWLGAYLDLLFPLELLGLLELGLW
ATRAM ^[20]	GLAGLAGLLGLELLGLPLGLLEGLWGLEEGN

发生质子化带正电。组氨酸的侧链咪唑基团在生理环境下既能释放质子又能接受质子,同时还能与其他一些基团形成氢键。增加组氨酸或咪唑官能团已被证明是加强多肽酸敏感性的有效策略,研究人员据此设计出许多含有组氨酸的酸敏感多肽^[12,25,26]。

TP₁₀-5 (TK) [AGYLLGKINLKKLAKL(Aib)KKIL-NH₂] 是 TP₁₀ 类似物中具有良好穿膜特性的穿膜肽 (cell-penetrating peptide, CPP),但其低特异性和较高的毒性限制了其应用于药物递送系统。为了克服TK的不足,Zhang等^[8]用组氨酸替换TK模板中所有的赖氨酸,合成了一种新型的多肽——TH [AGYLLGHINLHHLAHL(Aib)HHIL-NH₂]。不同于TK模板,TH的毒性显著降低,且仅在低pH值条件下实现其穿膜特性,证实组氨酸的参与能使多肽链产生显著的酸敏感性。在后续研究中,Zhang等^[27]设计了酸敏感多肽TH修饰的脂质体TH-Lip。体外实验证明,在pH为6.3的环境中TH-Lip的zeta电位由-4.8 mV转变为10.8 mV,肿瘤细胞对TH-Lip的摄取明显增加,且负载紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 的TH-Lip能显著抑制肿瘤细胞的生长;在荷瘤小鼠中,负载PTX的TH-Lip能很好地靶向富集于肿瘤组织,显著提高PTX的治疗效果,肿瘤生长抑制率达到86.3%。以上实验证实,当TH-Lip处于正常生理环境(正常组织及血液循环中),TH的细胞穿膜特性被掩蔽;当TH-Lip位于肿瘤组织外部的微酸性环境,TH组氨酸残基的咪唑基团质子化,使得TH-Lip表面电荷由负电荷转变为正电荷,TH的穿膜特性被激活,从而提高了肿瘤细胞对TH-Lip的摄取能力。此外,Shi等^[9]将TH的C末端连接环肽RGDfK,合成了新的肽链TR [c(RGDfK)-AGYLLGHINLHHLAHL(Aib)HHIL-NH₂],TR不仅具有酸响应的细胞穿膜特性,同时能够特异性识别肿瘤细胞表面过表达的整合素 $\alpha_v\beta_3$,进一步增强了TH的靶向性。

Singh等^[28]发现组氨酸具有质子海绵效应,能够通过增强内涵体逃逸来提高基因递送效率。Sun等^[10]以7个组氨酸(H₇)和8个精氨酸(R₈,穿膜肽)为亲水端,胆固醇为疏水端,合成了一种两亲性酸敏感多肽(Chol-H₇R₈),并用于多柔比星(doxorubicin, DOX)和质粒DNA的协同递送。由于共轭组氨酸的侧链咪唑基团的存在,Chol-H₇R₈不仅具有优良的穿膜性能,同时兼具酸敏感性,在酸性内涵体(pH_{en}≤6.5)中,通过质子海绵效应破坏内涵体膜,释放Chol-H₇R₈负载的DOX和质粒,实现高效的递送效果^[29]。

与Sun等^[10]的设计思路类似,Guo等^[11]合成了两种结合胆固醇的His₅Arg₁₀(HR₁₅-Chol)和His₁₀Arg₁₀(HR₂₀-Chol)嵌合肽递送系统。在生理环境(pH 7.4)

下,多肽嵌段中的组氨酸片段疏水性较强,递送系统难以释放负载的DOX;当递送系统被细胞内化并与溶酶体(pH 5.0)结合后,咪唑基团质子化,组氨酸片段亲水性增加,且静电排斥作用会破坏递送系统的稳定结构,从而促进DOX的快速释放。为了比较这两种肽组装体的酸敏感性能,研究者将临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)作为pH的函数进行研究。结果发现,在pH 5.0磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)中,HR₁₅-Chol和HR₂₀-Chol的CMC分别为17.8和28.21 g·mL⁻¹。原因可能是,此pH值下HR₂₀-Chol质子化的组氨酸残基更多。当两种嵌合肽的胆固醇部分的比例相同时,HR₂₀-Chol需要更大的驱动力来形成HR₂₀-Chol胶束,疏水相互作用抵消来自HR₂₀-Chol分子的亲水性嵌段产生的静电排斥作用,导致HR₂₀-Chol的CMC更高。随着pH值的增加,两种肽CMC显示出下降趋势。在pH 7.4 PBS中分别测定两种肽的CMC,为9.6和11.71 g·mL⁻¹。这种下降可能是由于亲水质子化组氨酸残基转变成疏水性组氨酸残基造成的。此外,Moreira等^[29]利用富含组氨酸和精氨酸的R₆H₄[RRRRRRHHHH-NH₂]和透明质酸(hyaluronic acid, HA)通过共修饰得到一种双功能靶向脂质体HA-R₆H₄-L,同样表现出很好的酸敏感性和肿瘤靶向功能。

2.2 由赖氨酸侧链伯氨基团引起的酸敏感 赖氨酸是一种碱性氨基酸,也是20种氨基酸中唯一侧链含有伯氨基的氨基酸,其pK_a约为9.2。本课题组设计出一种含有两个赖氨酸的酸敏感两亲性多肽[VVVVVVK-KGRGDS],以其自组装胶束作为抗肿瘤药物的递送载体,该多肽自组装胶束的载药和释药过程如图1所示^[13]。选择DOX作为模型药物,检测环境pH值的变化对自组装胶束的药物释放行为影响。结果显示,胶束在中性介质(pH 7.0)中持续缓慢地释放DOX,而在酸性介质(pH 5.0)中,胶束结构破坏,DOX释放速度显著加快。由于整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在肿瘤细胞表面的过表达,将负载DOX的胶束与HeLa和COS7细胞同时孵育时,多肽胶束可以有效利用RGD序列将DOX靶向递送到HeLa细胞中^[30]。该两亲性多肽在其结构中含有2个赖氨酸残基、1个精氨酸残基和天冬氨酸残基。2个赖氨酸残基的氨基在酸性环境中可以质子化,质子化氨基的量与游离氨基在pH 5.0的比例较pH 7.0时大约高100倍。氨基质子化加剧了两亲性多肽之间的静电排斥,自组装胶束解体,药物得以释放^[21]。

Schneider等^[14]合成了一种含有20个氨基酸残基的肽MAX1,由疏水性的缬氨酸(V)和亲水性的赖氨酸(K)交替排列而成,MAX1分子结构如图2所示。

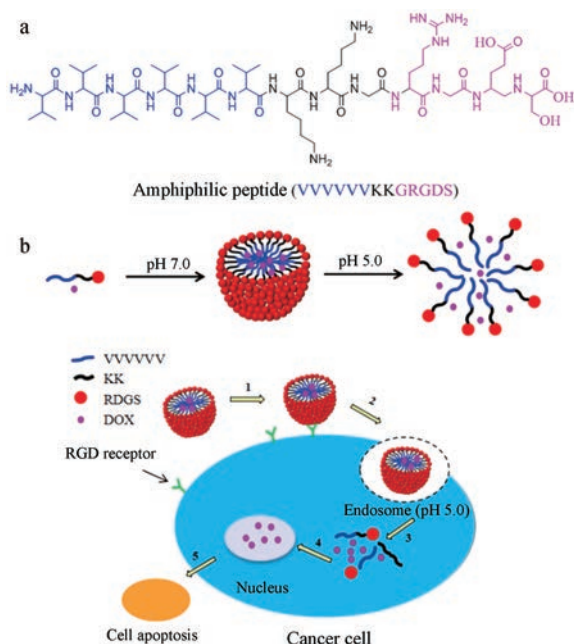


Figure 1 Schematic diagram showing pH-responsive self-assembly of an amphiphilic peptide of VVVVVVKKGRGDS (a) and targeted release of an anti-tumor drug from self-assembled micelles (b) of an amphiphilic peptide. During targeted drug release, RGD-mediated endocytosis (1) leads to cancer cells taking up amphiphilic peptides (2) anti-tumor drugs (purple) micelles. During this endocytosis, low pH in tumor cells induces lysis of micelles and rapid release of anti-tumor drugs in cancer cells (3). After entering the nucleus (4), anti-tumor drugs can exert their therapeutic effects, leading to apoptosis of cancer cells (5)

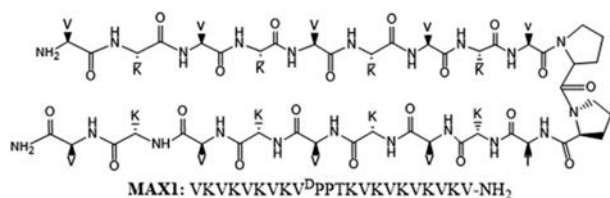


Figure 2 Sequence and proposed β -hairpin structure of MAX1

研究发现, 在 pH 5.5 条件下赖氨酸氨基质子化, 赖氨酸残基之间的静电排斥作用使多肽 MAX1 以无规卷曲的形式存在; 通过 NaOH 将 pH 调节至 9.0, 赖氨酸氨基去质子化, 多肽 MAX1 则转变成以缬氨酸残基为外层, 赖氨酸残基为内层的 β -发夹结构, 并进一步自组装形成纳米纤维结构; 若将 pH 值再次调节至 6.0, MAX1 由 β -发夹结构恢复至无规卷曲形式。多肽 MAX1 可逆的自组装过程显然是通过赖氨酸氨基质子化和去质子化调节的结果。此外, Dehsorkhi 等^[31]设计出一种酸敏感两亲脂肽 (PA)_{C₁₆}-KTTKS。由于存在 2 个赖氨酸残基和羧基末端, C₁₆-KTTKS 的极性头部在低 pH 值条件下带 2 个正电荷, 在 pH 7.0 时带有 1 个正电荷。PA 通

过氢键、疏水缔合和静电作用的调节, 在不同 pH 值会形成不同的自组装结构, 如 pH 2.0 时, 能够自组装成球形胶束; pH 3.0 时, 形成扁平的带状结构; pH 4.0 时, 组装形成扭曲的右手螺旋结构; pH 7.0 时, 这些扭曲的结构再次转变成扁平的带状结构 (β -折叠)。为了研究赖氨酸的含量对 PA 的二级构象和自组装行为的影响, Wan 等^[32]将不同数量的赖氨酸残基加入到 PA 中, 合成了一系列的 PA 衍生物 (PA-K_n)。研究发现, 在酸性介质 (pH 1.0) 中, PA-K₂ 的氨基被完全质子化, 带电荷的氨基基团增加了体系的亲水性, 并抑制了由于静电排斥而形成的 β -折叠。而在碱性条件下, 氨基因去质子化变得疏水性更强, 从而促进了分子间氢键相互作用和 β -折叠的形成。

2.3 由谷氨酸侧链羧基引起的酸敏感 谷氨酸的聚合物, 聚 (L-谷氨酸) 具有优异的生物相容性、无毒性和非免疫原性等生物学性能, 大量的侧链羧基可以用来修饰和调节 pH 值, 常用于药物递送和作为组织工程的生物材料^[33,34]。谷氨酸侧链上羧基的 pK_a 约为 4.1, 在酸性 pH 条件下, 羧基以质子化形式存在, 疏水性增强; 而在中性 pH 下, 羧基去质子化, 成为可溶性的多肽分子^[35,36]。Chang 等^[15]设计并合成了以 RGDSEEEEE EEEEEK 为亲水端和以硬脂酸为疏水端 RGDS-E₁₀-Lys (C₁₈) 的新型脂肽。如图 3 所示, 该脂肽能够形成由疏水性的硬脂酸核心和亲水性的 RGDS-E₁₀ 外壳组成的自组装胶束, 环境 pH 值的不同会影响其自组装行为。透射电镜 (TEM) 测试显示, 在 pH 7.4 介质中, 该两亲肽可以形成均匀分散的自组装纳米胶束; 而在 pH 5.0 介质中, 纳米胶束分解。圆二色谱 (CD) 结果也证实, 在中性条件 (pH 7.4) 下, 多肽主要以无规卷曲的形式存在; 而在 pH 5.0 条件下, CD 信号显著减弱, 脂肽的溶解度降低。此外, 采用疏水的 DOX 作为模型药物以评估酸敏感 RGDS-E₁₀-Lys (C₁₈) 的药物递送行为。在 pH 7.4 和 pH 5.0 的介质中, 56 h 累积 DOX 释放率分别达到 51.7% 和 89.2%, 表明 RGDS-E₁₀-Lys (C₁₈) 胶束在酸性环境中能够更快速释放 DOX。抗肿瘤细胞实验也



Figure 3 Structure and micellization of peptide amphiphiles

显示, 脂肽 RGDS-E₁₀-Lys(C₁₈) 作为抗癌药物载体具有很大的潜力。

2.4 由天冬氨酸侧链羧基引起的酸敏感 天冬氨酸与谷氨酸同为酸性氨基酸, pK_a 约为 3.9。多肽 pHLP 是一种含有天冬氨酸的 36 肽 (表 1)。癌细胞表面的微酸环境能够触发 pHLP 改变结构, 并插入到癌细胞的细胞膜上^[20]。pHLP 在溶液中具有 3 种构象, 非结构单体 (状态 I)、膜结合非结构单体 (状态 II) 和膜插入单体 (状态 III)^[37,38]。从状态 II 到 III 的转换是通过在酸性条件下天冬氨酸的羧基质子化形成 α -螺旋实现的^[19]。pHLP 的跨膜部分含有两个天冬氨酸残基, 在生理 pH 值条件下羧基去质子化, 带负电荷的残基增加了多肽的亲水性, 阻止其进入细胞膜脂质的疏水区, 并起到了将多肽锚定到细胞膜表面的作用。而在酸性环境下, pHLP 由于天冬氨酸的羧基质子化而且转变形成 α -螺旋结构。此外, 由于形成较小的极性, 多肽 pHLP 的疏水性增强, 增加了多肽对脂质双层疏水区的亲和力, 由状态 II 转变形成状态 III, pHLP 的 C 末端穿过细胞膜, 形成稳定的跨膜 α -螺旋结构^[39]。同时有实验证实, 用赖氨酸、丙氨酸或天冬酰胺取代天冬氨酸残基会导致多肽 pHLP 的这种酸敏感穿膜特性的丧失。此外, 用谷氨酸取代 pHLP 跨膜部分中的 1 个天冬氨酸会提高触发状态转变的 pH 值 (由 6.0 提高至 6.5); 若用谷氨酸取代 2 个天冬氨酸则导致肽的聚集性增强, 在中性 pH 下多肽会聚集在脂质双层表面^[37,40]。在药物递送的应用中, 研究者发现 pHLP 比较适用于递送极性较强, 无法穿透细胞膜的药物。通过改变负载药物与 pHLP 的连接方式或将调节性分子连接到多肽的插入端, 可以进一步促进极性较强药物的细胞内化。此外, 对于依赖被动扩散的药物分子, pHLP 相关的递送系统不仅可以显著增加药物在血液中的保留时间, 同时会提高针对肿瘤组织的靶向性^[41]。Wei 等^[19]也通过引入 pHLP, 增强了超顺磁纳米颗粒的肿瘤靶向性, 并实现了体内肿瘤组织的核磁共振诊断, 进一步验证了 pHLP 优良的酸敏感特性。此外, 为了更好地理解和运用具有酸敏感性的多肽 pHLP, Wyatt 等^[20]根据 pHLP 的穿膜区构建了一系列的突变体 (表 1), 其中包括利用两种非天然氨基酸 (Gla 和 Aad) 替换天冬氨酸的 pHLP/Gla 和 pHLP/Gla/Aad; 截短的 pHLP 类似物 (pHLP/Var3、pHLP/Var3/Gla 和 pHLP/Var3/GLL) 及从头设计的酸敏感多肽 ATRAM, 表征了它们的酸敏感特性并验证了药物递送应用效果。结果表明, 在这些 pHLP 的突变体中, 与 pHLP 相比, Gla 替代的突变体 (pHLP/Gla) 的肿瘤靶向性有所降低。但突变体 pHLP/Var3 在酸性环境诱导下, 具有更快的状态转变

速度, 从而更早形成稳定的跨膜 α -螺旋结构, 而且在不同的浓度范围都能表现持续稳定的结果。

3 多肽中特定序列对酸敏感的影响

3.1 组氨酸-谷氨酸 (histidine-glutamic acid, HE) 酸敏感序列 由于酸敏感基团的存在, 组氨酸和谷氨酸都具有质子化和去质子化的潜力, 而它们的重复序列 (histidine-glutamic acid repeats, (HE)_n) 同样具有酸敏感的特性。为克服富含正电荷的穿膜肽 MAP [KLALKLALKALKAALKLA] 特异性不强的缺陷, Zaro 等^[42]构建含有 (HE)₁₀ 序列、MAP 及谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-S-transferase, GST) 的融合表达载体质粒, 通过 GST-GSH 系统纯化得到一种具有酸敏感性的重组蛋白 GST-(HE)₁₀-MAP。在生理条件下 (pH 7.4), (HE)₁₀ 序列中组氨酸保持电中性, 而谷氨酸带负电荷, 因此带负电荷的 (HE)₁₀ 序列可以与带正电荷的 MAP 片段之间产生静电相互作用, 从而屏蔽 MAP 的穿膜特性。当重组蛋白暴露于微酸性环境时, 咪唑基团的质子化使得组氨酸带正电荷, 谷氨酸带电性能不变, 总体上 (HE)₁₀ 序列转变形成电中性, 不再屏蔽 MAP 的穿膜性能。体外实验结果也证实了这一点, 在 pH ≤ 6.8 时, GST-(HE)₁₀-MAP 能够有效展示 MAP 的穿膜性能, 很快被 HeLa 细胞内化; 而当 pH > 7.0 时, HeLa 细胞内无法观察到 GST-HE-MAP 的存在, 证明特定的 (HE)₁₀ 序列赋予该重组蛋白酸敏感特性。同一个课题组的 Fei 等^[17]分别利用 ¹²⁵I 及近红外 IR800 染料标记该重组蛋白, 通过体内实验证实 GST-HE-MAP 能更好地富集在小鼠的肿瘤组织, 与 GST-MAP 和 GST-HE 比较, 能有效降低其他正常组织对 MAP 的非特异性结合。

为进一步研究此类酸敏感多肽的作用, Sun 等^[43]重组表达了一系列的融合蛋白 GST-(HE)_n-CPPs, 具有不同长度的重复序列 (HE)_n ($n = 8, 10, 12$), 并连接不同的富含正电荷的穿膜肽 [YGR₆G₆、YG(RG)₆ 和 Tat]。检测了不同 pH 值 (6.0、6.5、7.0 和 7.5) 及不同 (HE)_n 的长度对 CPP 活性的影响, 从而系统研究这些重组蛋白的酸敏感特性。通过细胞内化实验结果发现, 细胞摄取各类重组蛋白的能力在微酸性环境下均有较大提高, 首先证明了 (HE)_n 重复序列作为一个酸敏感序列, 赋予了相应重组蛋白在低 pH 值条件下穿膜并内化 GST 的功能。通过对比各组实验结果也发现, (HE)_n 重复序列并不是越长越好, 含有 (HE)₈ 和 (HE)₁₀ 的融合蛋白在所有 pH 值范围内的细胞内化均明显高于含有 (HE)₁₂ 的融合蛋白, 其中在低 pH 值条件下被细胞摄取的重组蛋白中最多的是 (HE)₁₀-YGR₆G₆。此外, 其酸敏感的特性对 CPP 的结构也有一定要求, 具有相同氨基酸成分但序列不同的 YGR₆G₆ [YGRRRRRRGGG

GGG] 和 YG(RG)₆ [YGRGRGRGRGRG] 在细胞内化方面有区别, YGR₆G₆ 明显高于 YG(RG)₆。通过 CD 光谱分析发现, 多肽的二级结构也可以反过来影响多肽的酸敏感性。虽然 (HE)₁₀-YG(RG)₆ 的反向平行 β -折叠的构象随着 pH 值的降低而减少, 但依然存在的 β -折叠可以维持 (HE)₁₀ 与 YG(RG)₆ 静电相互作用的稳定, 一定程度上减弱了 (HE)₁₀-YG(RG)₆ 的酸敏感性。而体现出较强的酸敏感性的 (HE)₁₀-Tat 和 (HE)₁₀-YGR₆G₆ 普遍以无规卷曲的形式存在, 且 pH 值对二级结构基本没有影响。结果提示, 富含正电荷残基的 CPP 的特定序列会影响重组多肽 (HE)₁₀-CPP 的二级结构, 稳定的构象会导致酸敏感性的降低。

基于类似的原理, Ouahab 等^[44]将 (HE)₅ 序列片段和穿膜肽 (RG)₅ 分别连接到聚乙二醇-聚乳酸 (PEG-PLA) 的末端, 合成 (HE)₅-PEG-PLA 和 (RG)₅-PEG-PLA, 并将两者以 45:55 摩尔比混合形成酸敏感聚合物胶束 PHPO (pH-sensitive with peptides outside)。由于位于胶束表面的 (HE)₅ 和 (RG)₅ 形成独特的相互作用, 负载多烯紫杉醇 (docetaxel, DTX) 的 PHPO 胶束在 pH 6.8 的条件下明显增强了细胞对胶束的摄取, 体现了良好的酸敏感特性。

3.2 GALA (Glu-Ala-Leu-Ala) 酸敏感序列 GALA 的序列包含 4 个 Glu-Ala-Leu-Ala 残基的重复序列, 由 30 个残基组成 [WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA]。GALA 是根据病毒包膜上的融合肽设计的人工序列, 不仅具有促进磷脂膜融合的功能, 还有明显的酸敏感性^[45], 是目前被广泛研究的酸敏感肽之一, 常用于修饰脂质体^[18]。

Kakudo 等^[46]将 GALA 与胆固醇偶联 (Chol-GALA) 并制备转铁蛋白 (transferrin) 修饰的脂质体, 通过细胞内吞实验发现 GALA 必须存在于脂质体的表面才能促进内涵体逃逸。当 GALA 封装在脂质体内部时, 即便环境 pH 值从 7.4 降至 5.0, 仍无法有效促进脂质体的脂质双分子层与内涵体膜的融合。而 GALA 位于脂质体的表面时, 当环境 pH 值为 5.0 时, 内涵体逃逸的情况显著增强, 说明谷氨酸残基的质子化改变了 GALA 与细胞膜结构的作用模式。Schach 等^[47]进一步研究发现 GALA 呈 α -螺旋或无规卷曲的二级结构取决于环境 pH 值。在 pH>6.0 时, 谷氨酸残基去质子化, GALA 为无规卷曲的二级结构; 而在 pH<6.0 时, GALA 呈稳定的 α -螺旋二级结构, 在微酸性环境下易于与膜结构结合, 并且能够插入膜结构中^[48]。有意思的是, Nouri 等^[49]将具有靶向功能的组蛋白 H2A 亚基、核定位信号肽和不同的酸敏感序列 (INF7、GALA、KALA、H5WYG 和 RALA) 进行了重组表达和纯化, 并评估了这几种融

合蛋白的酸敏感特性、细胞毒性及对基因递送效率。实验结果表明, 具有 GALA 的融合蛋白的内涵体逃逸性能最高效, 并能有效提高基因递送效率, 且细胞毒性极低。

从以上结果可以发现, 在中性条件下, 带负电荷的谷氨酸残基之间的静电斥力可以使 GALA 维持无规卷曲的结构, 而且不能有效结合带负电荷的细胞膜^[50]。而在酸性环境下, 谷氨酸的质子化使得 GALA 由负电荷转变成正电荷, 促进 GALA 与细胞膜的静电结合。此外, GALA 会由亲水的无规卷曲构象转变成成为两亲性的 α -螺旋结构, 其疏水面有利于该多肽插入到脂质双层的疏水区, 从而促进脂质体与细胞膜的融合, 协助负载的药物或基因释放到细胞内部^[18,45]。

4 展望

由于固有的生物源性, 多肽具有良好的生物相容性及可降解性, 在纳米药物递送系统的研究领域具有重要的一席之地。而鉴于肿瘤微环境及内涵体的弱酸性, 酸敏感多肽自组装或修饰的纳米药物递送系统已被证明是一种有效的治疗策略。但由于诱导酸敏感多肽结构改变的 pH 值普遍小于 6.5, 增强内涵体逃逸是目前更为现实的研究目标。因此, 更多研究者将酸敏感多肽与其他靶向性配体共修饰纳米药物递送系统, 以实现更高效的肿瘤组织靶向性。

就酸敏感多肽而言, 对单个或少数氨基酸侧链基团的研究, 仅能说明单个残基或局部序列对多肽酸敏感性的影响。实际上, 当外界 pH 值发生改变时, 往往是整个多肽序列参与了其结构的改变, 进而影响其酸敏感性。由于较多的氨基酸种类和侧链基团的复杂性, 影响多肽结构改变的因素很多, 多肽序列与酸敏感性之间的定量构象关系的研究极具挑战性。从头设计或筛选天然的酸敏感多肽, 并在不同水平上全面系统地开展酸敏感多肽结构与功能的研究仍是一项长期的基础性工作。

References

- [1] Aluri S, Janib SM, Mackay JA. Environmentally responsive peptides as anticancer drug carriers [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 940-952.
- [2] MacEwan SR, Callahan DJ, Chilkoti A. Stimulus-responsive macromolecules and nanoparticles for cancer drug delivery [J]. *Nanomedicine*, 2010, 5: 793-806.
- [3] Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, et al. Synthetic therapeutic peptides: science and market [J]. *Drug Discov Today*, 2010, 15: 40-56.
- [4] Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, et al. The future of peptide-based drugs [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2013, 81: 136-147.

- [5] Lee S, Xie J, Chen XY. Peptide-based probes for targeted molecular imaging [J]. *Biochemistry*, 2010, 49: 1364-1376.
- [6] Li ZJ, Cho CH. Development of peptides as potential drugs for cancer therapy [J]. *Curr Pharm Design*, 2010, 16: 1180-1189.
- [7] Estroff LA, Hamilton AD. Water gelation by small organic molecules [J]. *Chem Rev*, 2004, 104: 1201-1218.
- [8] Zhang W, Song JJ, Zhang BZ, et al. Design of acid-activated cell penetrating peptide for delivery of active molecules into cancer cells [J]. *Bioconjugate Chem*, 2011, 22: 1410-1415.
- [9] Shi KR, Li JP, Cao ZL, et al. A pH-responsive cell-penetrating peptide-modified liposomes with active recognizing of integrin $\alpha_3\beta_3$ for the treatment of melanoma [J]. *J Control Release*, 2015, 217: 138-150.
- [10] Sun YX, Zhang XZ. Cholesteryl pH-responsive cell-penetrating peptide for co-delivery of drug and gene [J]. *J Control Release*, 2017, 259: E185-E185.
- [11] Guo XD, Zhang LJ, Chen Y, et al. Core/shell pH-sensitive micelles self-assembled from cholesterol conjugated oligopeptides for anticancer drug delivery [J]. *Aiche J*, 2010, 56: 1922-1931.
- [12] Jiang TY, Zhang ZH, Zhang YL, et al. Dual-functional liposomes based on pH-responsive cell-penetrating peptide and hyaluronic acid for tumor-targeted anticancer drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 9246-9258.
- [13] Liang J, Wu WL, Xu XD, et al. pH responsive micelle self-assembled from a new amphiphilic peptide as anti-tumor drug carrier [J]. *Colloid Surf B*, 2014, 114: 398-403.
- [14] Schneider JP, Pochan DJ, Ozbas B, et al. Responsive hydrogels from the intramolecular folding and self-assembly of a designed peptide [J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 15030-15037.
- [15] Chang C, Liang PQ, Chen LL, et al. pH-responsive nanoparticle assembly from peptide amphiphiles for tumor targeting drug delivery [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2017, 28: 1338-1350.
- [16] Kang YJ, Zhou XR, Luo SZ. Synthesis and characterization of a pH-responsive amphiphilic peptide hydrogel composed of pal-RLRRRLRARARA [J]. *China Sciencepaper (中国科技论文)*, 2012, 7: 437-441.
- [17] Fei LK, Yap LP, Conti PS, et al. Tumor targeting of a cell penetrating peptide by fusing with a pH-sensitive histidine-glutamate co-oligopeptide [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 4082-4087.
- [18] Haas DH, Murphy RM. Design of a pH-sensitive pore-forming peptide with improved performance [J]. *J Pept Res*, 2004, 63: 9-16.
- [19] Wei YS, Liao RF, Mahmood AA, et al. pH-responsive pHLIP (pH low insertion peptide) nanoclusters of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a tumor-selective MRI contrast agent [J]. *Acta Biomater*, 2017, 55: 194-203.
- [20] Wyatt LC, Moshnikova A, Crawford T, et al. Peptides of pHLIP family for targeted intracellular and extracellular delivery of cargo molecules to tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: E2811-E2818.
- [21] Xu XD, Chu YF, Chen CS, et al. Facile construction of nanofibers as a functional template for surface boron coordination reaction [J]. *Small*, 2011, 7: 2201-2209.
- [22] Tian L, Bae YH. Cancer nanomedicines targeting tumor extracellular pH [J]. *Colloid Surf B*, 2012, 99: 116-126.
- [23] Toriyabe N, Hayashi Y, Harashima H. The transfection activity of R8-modified nanoparticles and siRNA condensation using pH sensitive stearylated-octahistidine [J]. *Biomaterials*, 2013, 34: 1337-1343.
- [24] Wu H, Zhu L, Torchilin VP. pH-sensitive poly(histidine)-PEG/DSPE-PEG co-polymer micelles for cytosolic drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2013, 34: 1213-1222.
- [25] Midoux P, Pichon C, Yaouanc JJ, et al. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157: 166-178.
- [26] Zhao BX, Zhao Y, Huang Y, et al. The efficiency of tumor-specific pH-responsive peptide-modified polymeric micelles containing paclitaxel [J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 2508-2520.
- [27] Zhang QY, Tang J, Fu L, et al. A pH-responsive alpha-helical cell penetrating peptide-mediated liposomal delivery system [J]. *Biomaterials*, 2013, 34: 7980-7993.
- [28] Singh RS, Goncalves C, Sandrin P, et al. On the gene delivery efficacies of pH-sensitive cationic lipids *via* endosomal protonation: a chemical biology investigation [J]. *Chem Biol*, 2004, 11: 713-723.
- [29] Moreira C, Oliveira H, Pires LR, et al. Improving chitosan-mediated gene transfer by the introduction of intracellular buffering moieties into the chitosan backbone [J]. *Acta Biomater*, 2009, 5: 2995-3006.
- [30] Ma YY, Li L, Huang HF, et al. Advances of tumor targeting peptides drug delivery system with pH-sensitive activities [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 717-724.
- [31] Dehsorkhi A, Castelletto V, Hamley IW, et al. The effect of pH on the self-assembly of a collagen derived peptide amphiphile [J]. *Soft Matter*, 2013, 9: 6033-6036.
- [32] Wan YM, Liu LB, Yuan SS, et al. pH-responsive peptide supramolecular hydrogels with antibacterial activity [J]. *Langmuir*, 2017, 33: 3234-3240.
- [33] Huang HH, Li JY, Liao LH, et al. Poly(L-glutamic acid)-based star-block copolymers as pH-responsive nanocarriers for cationic drugs [J]. *Eur Polym J*, 2012, 48: 696-704.
- [34] Ding JX, He CL, Xiao CS, et al. pH-responsive drug delivery systems based on clickable poly(L-glutamic acid)-grafted comb copolymers [J]. *Macromol Res*, 2012, 20: 292-301.
- [35] Liu LH, Li ZY, Rong L, et al. Self-assembly of hybridized peptide nucleic acid amphiphiles [J]. *ACS Macro Lett*, 2014, 3: 467-471.

- [36] Itoh T, Tamamitsu T, Shimomoto H, et al. Surface structure and composition of narrowly-distributed functional polystyrene particles prepared by dispersion polymerization with poly(*L*-glutamic acid) macromonomer as stabilizer [J]. *Polymer*, 2015, 70: 183-193.
- [37] Andreev OA, Karabadzak AG, Weerakkody D, et al. pH (low) insertion peptide (pHLIP) inserts across a lipid bilayer as a helix and exits by a different path [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 4081-4086.
- [38] Reshetnyak YK, Andreev OA, Segala M, et al. Energetics of peptide (pHLIP) binding to and folding across a lipid bilayer membrane [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 15340-15345.
- [39] Deacon JC, Engelman DM, Barrera FN. Targeting acidity in diseased tissues: mechanism and applications of the membrane-inserting peptide, pHLIP [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2015, 565: 40-48.
- [40] Musial-Siwiek M, Karabadzak A, Andreev OA, et al. Tuning the insertion properties of pHLIP [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1798: 1041-1046.
- [41] Burns KE, McClérey TP, Thevenin D. pH-selective cytotoxicity of pHLIP-antimicrobial peptide conjugates [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28465.
- [42] Zaro JL, Fei LK, Shen WC. Recombinant peptide constructs for targeted cell penetrating peptide-mediated delivery [J]. *J Control Release*, 2012, 158: 357-361.
- [43] Sun CM, Shen WC, Tu JS, et al. Interaction between cell-penetrating peptides and acid-sensitive anionic oligopeptides as a model for the design of targeted drug carriers [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11: 1583-1590.
- [44] Ouahab A, Cheraga N, Onoja V, et al. Novel pH-sensitive charge-reversal cell penetrating peptide conjugated PEG-PLA micelles for docetaxel delivery: *in vitro* study [J]. *Int J Pharm*, 2014, 466: 233-245.
- [45] Li W, Nicol F, Szoka FC Jr. GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56: 967-985.
- [46] Kakudo T, Chaki S, Futaki S, et al. Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system [J]. *Biochemistry*, 2004, 43: 5618-5628.
- [47] Schach DK, Rock W, Franz J, et al. Reversible activation of a cell-penetrating peptide in a membrane environment [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 12199-12202.
- [48] Parente RA, Nir S, Szoka FC Jr. Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA [J]. *Biochemistry*, 1990, 29: 8720-8728.
- [49] Nouri FS, Wang X, Dorrani M, et al. A recombinant biopolymeric platform for reliable evaluation of the activity of pH-responsive amphiphile fusogenic peptides [J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14: 2033-2040.
- [50] Yu PH, Liang J, Zhao HL, et al. Advances in peptide-modified pH-sensitive liposomes [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2018, 53: 849-853.