VEGFA/B 拮抗超分子肽的制备及其在小鼠黑色素瘤治疗中的应用

张　倩[1,2]，刘文琦[2]，方跃霖[1,2]，张馨欣[1,2,3]*

（1. 天津中医药大学，天津 301600；2. 中科环渤海（烟台）药物高等研究院，烟台新药创制山东省试验室，山东烟台 264100；
3. 中国科学院上海药物研究所，上海 201203）

摘要：多肽药物凭借高特异性与强活性，在肿瘤治疗领域占据独特地位，但普遍存在稳定性差、细胞摄取效率低的问题，临床转化与应用受限。基于此，该研究以血管内皮生长因子 A/B 拮抗肽 VGB3 为模型药物，筛选携带离子对结构的两亲性分子，与盐离子共同作用驱动制备了超分子肽（V-SMP）。所得 V-SMP 的平均粒径约为 150 nm，透射电镜下观察到其呈单分散的规则球体，具有良好的稳定性。细胞试验结果显示，V-SMP 在小鼠黑色素瘤细胞（B16F10 细胞）的摄取效率较游离 VGB3 肽提升了 1.49 倍，可有效抑制肿瘤细胞增殖。在小鼠 B16F10 黑色素瘤皮下移植瘤模型中，V-SMP 能显著抑制肿瘤的生长，肿瘤抑制率较游离肽提高约 2 倍。该超分子肽有利于提高多肽药物稳定性及药物活性，为肿瘤治疗和多肽药物开发提供了参考。

关键词：多肽药物；VEGFA/B 拮抗肽；超分子肽；抗肿瘤；黑色素瘤

中图分类号：R979.1^{+}9；R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)05-0546-11

引用：张　倩, 刘文琦, 方跃霖, 等. VEGFA/B拮抗超分子肽的制备及其在小鼠黑色素瘤治疗中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(5): 546-556. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.05.007

Preparation of VEGFA/B Antagonistic Supramolecular Peptides and Their Application in the Treatment of Melanoma in Mice

ZHANG Qian[1,2], LIU Wenqi[2], FANG Yuelin[1,2], ZHANG Xinxin[1,2,3]*

(*1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600; 2. Shandong Lab. of Yantai Drug Discovery, Bohai Rim Advanced Research Institute for Drug Discovery, Yantai 264100; 3. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Peptide drugs occupy a unique position in the field of tumor therapy due to their high specificity and potent activity. However, their clinical translation and application are often restricted by poor stability and low cellular uptake efficiency. To address this, this study employed the vascular endothelial growth factor A/B antagonistic peptide VGB3 as the model drug, and screened amphiphilic molecules bearing ion-pair structures in combination with salt ions to drive the preparation of VGB3 supramolecular peptide (V-SMP). The average particle size of V-SMP was approximately 150 nm, and it appeared as monodisperse regular spherical particles under a transmission electron microscope and exhibited good stability. Cell experiment results showed that V-SMP increased the uptake efficiency of VGB3 in mouse melanoma cells (B16F10 cells) by 1.49-fold and effectively inhibited tumor cell proliferation. In a subcutaneous syngeneic model of B16F10 melanoma, V-SMP significantly inhibited tumor growth, achieving antitumor efficacy nearly twice that of the free peptide. In summary, this supramolecular peptide formulation improves both the stability and therapeutic activity of peptide drugs, providing a valuable reference for tumor therapy and peptide drug development.

Key Words: peptide drug; vascular endothelial growth factor A/B antagonist peptide; supramolecular peptide; antitumor; melanoma

多肽药物是内源性或人工设计的功能肽[1]，兼具高特异性、高活性、低毒性的优势，在恶性肿瘤、感染、糖尿病等多种疾病治疗中显示出巨大的潜力。得益于多肽药物精准的靶点识别能力、可调控的生物学活性，以及相较于传统化疗药物更低的毒性和不良反应[2]，其在抗肿瘤领域的表现尤为突出[3]。例如，由14个氨基酸组成的血管内皮生长因子A/B（vascular endothelial growth factor A/B，VEGFA/B）拮抗肽VGB3，可识别并中和肿瘤细胞上的血管内皮生长因子受体1/2（vascular endothelial growth factor receptor 1/2，VEGFR1/2），从而抑制血管生成和肿瘤生长[4]。然而，多肽药物也存在一些缺点，如稳定性差[5]，对酸碱等微环境敏感且易被酶解失活。不仅如此，游离肽的入胞能力较弱[6]，导致其生物利用率低，治疗效果受限。纳米递送载体是克服多肽药物这些缺点的有效策略。例如，聚合物纳米颗粒[7]和脂质体[8]等载体可显著提高多肽药物的稳定性、生物利用度和半衰期。然而，面对肿瘤治疗的高剂量药物需求，常规载体普遍存在载药量不足、保护作用有限、病灶部位药物富集受限等问题，导致多肽药物的抗肿瘤潜能无法充分释放。

超分子肽（supramolecular peptide，SMP）是一种通过非共价键相互作用组装形成的有序纳米结构[9]。其不仅具备优异的生物相容性与稳定性[10]，还展现出超越单体多肽分子的优势[11]，为解决多肽药物的递送问题提供了新思路。构建超分子结构的策略主要包括主客体相互作用、氢键、静电相互作用和疏水相互作用等。其中，疏水相互作用在SMP的构建中具有独特优势。它能有效驱动多肽链在溶剂环境中发生定向聚集，促进纳米结构的形成，同时避免对多肽的生物活性产生影响。在多肽溶液中引入两亲性分子，可通过屏蔽电荷、减弱静电作用，增加肽链间的疏水相互作用，促进肽分子的聚合与自组装[12]。这一诱导组装策略为构建SMP提供了重要途径。

本研究以VGB3肽作为模型药物，通过筛选不同种类的两亲性分子，驱动VGB3多肽组装形成VEGFR1/2超分子肽（V-SMP），旨在提高多肽的摄取效率和稳定性。

1 仪器与试药

Zetasizer Lab型粒度分析仪（英国Malvern公司）；RODI-220BI型超纯水仪（厦门锐思捷水纯化技术有限公司）；XSR105型天平［梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司］；1260型高效液相色谱仪（美国Agilent公司）；JEOL-120 kV型透射电镜（日本电子株式会社）；TDE60086FV-ULTS型超低温冰箱、371GP型二氧化碳培养箱均购自美国Thermo Fisher公司；FV3000型共聚焦显微镜（日本Olympus公司）；Aurora型流式细胞仪（美国Cytek Biosciences公司）；Chirascan V100型圆二色光谱仪（英国Applied Photophysics公司）；超滤管（15 mL，截留分子量100 000，上海甪端百行生命科技有限公司）。

VGB3肽（序列H_2N-KAWAECRPPDEGLC-COOH，批号C6698KEBG0-1/PE2280）、FITC-VGB3肽（批号C429H984G0-1/PE9778）均购自南京金斯瑞生物科技股份有限公司；枸橼酸钠（trisodium citrate，TSC，国药集团化学试剂有限公司，批号20250219）；椰油酰谷氨酸钠（sodium cocoyl glutamate，SCG，批号C17069457）、月桂酰谷氨酸钠（sodium lauroyl glutamate，SLG，批号C16442696）均购自上海麦克林生化科技股份有限公司；十二烷基硫醇钠（sodium dodecyl thiolate，SDT，上海毕得医药科技股份有限公司，批号DRC128）；十二烷基硫酸钠（sodium lauryl sulfate，SLS，上海泰坦科技股份有限公司，批号P2493099）；DMEM培养基、FBS、青霉素/链霉素溶液、胰蛋白酶、CCK-8、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒均购自大连美仑生物技术有限公司；细胞核染料DAPI（上海碧云天生物技术股份有限公司）；盐酸氯丙嗪（chlorpromazine，CPZ）、阿米洛利（amiloride，Ami）、染料木黄素（genistein，Gen）均购自美国MedChemExpress公司。

小鼠皮肤黑色素瘤细胞（B16F10细胞）购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库，使用含有10% FBS和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基，于37 ℃、5% CO_2培养

收稿日期：2026-01-07

基金项目：国家重点研发计划资助项目（2024YFA1210100）、药品监管科学全国重点实验室课题（2025SKLDRS0327）

作者简介：张　倩，硕士研究生，专业方向：抗肿瘤多肽药物递送。

通信作者：张馨欣，博士生导师，从事药物纳米载药系统的应用基础研究。

箱中培养。

SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠，体质量（20±2）g，20 只，购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司，生产许可证编号为 SCXK2021-0013。由烟台药物研究所动物实验中心饲养，所有的动物试验均符合烟台药物研究所实验动物管理与使用委员会（Institutional Animal Care & Use Committee，IACUC）的规定，IACUC 审批编号为 20250926-01。

2　方法与结果

2.1　VGB3 含量的 HPLC 测定法

色谱条件：色谱柱 ZORBAX Eclipse XDB C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相 A 为 0.065％三氟乙酸水溶液，B 为 0.05％三氟乙酸乙腈溶液，梯度洗脱（0—25 min，B 5％—65％；25—25.01 min，B 65％—95％；25.01—27 min，B 95％；27—27.01 min，B 95％—5％；27.01—35 min，B 5％）；流速 1.0 mL/min；检测波长 220 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

该色谱条件下，VGB3 出峰时间约为 12 min（图 1）。以峰面积（*A*）为纵坐标、VGB3 质量浓度（*c*）为横坐标进行线性回归，所得标准曲线方程为 A=11459c - 78.28，R^2=0.999 7，表明 VGB3 质量浓度为 0.008 ～ 0.5 mg/mL 时与峰面积线性关系良好。低、中和高浓度 VGB3 样品的方法回收率分别为 97.4％、95.9％和 96.2％，RSD 小于 5％，表明该方法准确度良好。

2.2　两亲性分子筛选

两亲性分子通过增强多肽链间的疏水相互作用，驱动肽分子发生非共价组装，此外，盐离子的加入可进一步放大疏水效应[13]，协同促进高度有序的超分子结构形成。基于此，本研究选用携带离子对结构的两亲性分子和盐离子共同作用，驱动 V-SMP 的形成（图 2A）。

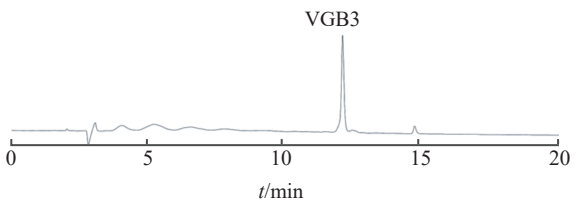


图 1　VGB3 的典型色谱

Fig.1　Typical Chromatogram of VGB3

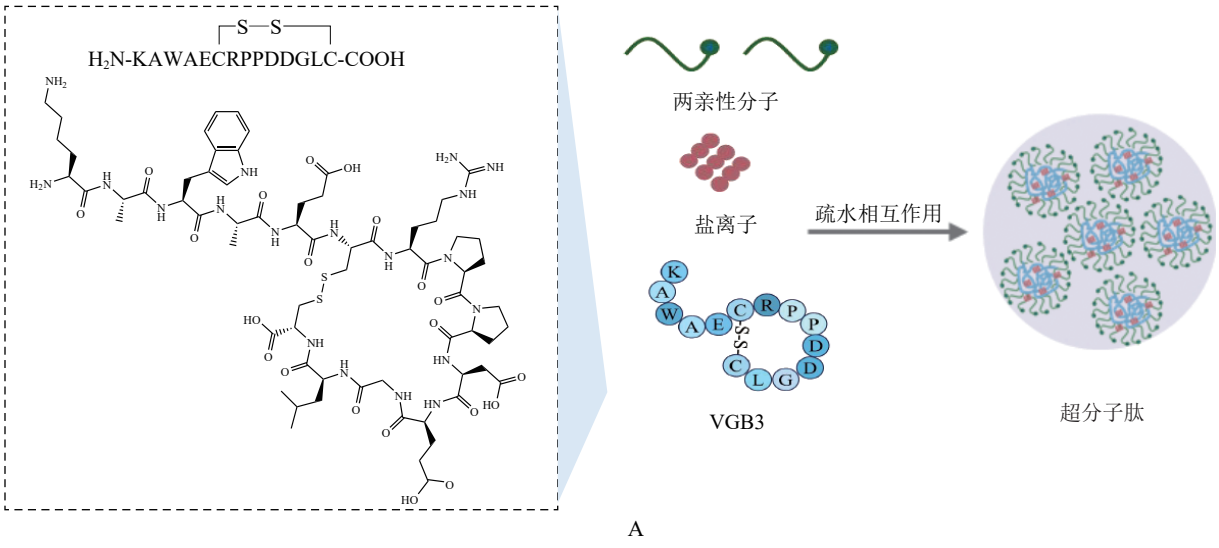
选取 4 种两亲性分子（SLG、SDT、SCG 和 SLS），分别用 0.01 mol/L TSC 溶液溶解；另将 VGB3 以物质的量比 1 ∶ 5 分别与 SLG、SDT、SCG、SLS 混合，室温搅拌（500 r/min）20 min 以形成 V-SMP。采用圆二色谱（circular dichroism，CD）对比所得产物的二级结构变化。结果（图 2B、C）显示，SLG、SCG、SLS 试验组的 CD 谱图与游离 VGB3 几乎重叠，而 SDT 组出现明显的峰位移。采用 CDNN 2.1 软件解析数据，结果显示 SDT 试验组所得 V-SMP 的无规卷曲含量从（35.07±0.26）％减少到（25.07±1.44）％，*β*- 折叠含量由（46.13±1.16）％增加至（54.8±1.27）％。这表明 SDT 可促使 VGB3 肽链形成更紧凑、有序的结构。此外，SLG、SCG、SLS 体系透明澄清，而 SDT 体系呈乳光淡蓝色，提示形成了纳米级分散相（图 2D）。

采用动态光散射（dynamic light scattering，DLS）法测定各组 V-SMP 的粒径和 PDI。结果显示，SDT 试验组所得 V-SMP 的粒径为（179.03±1.64）nm，PDI 为 0.09±0.01，佐证了纳米级组装体的形成；而 SLG、SCG、SLS 试验组未观察到纳米级物质的生成。

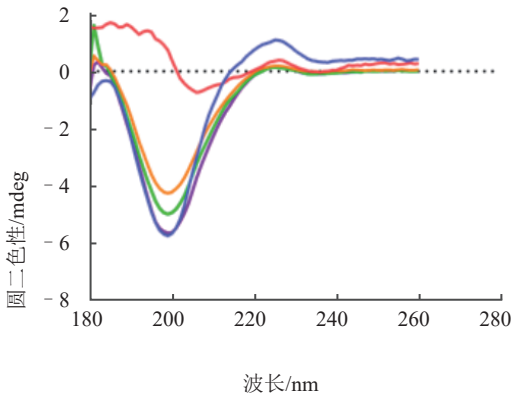
随后，通过超滤离心法［4 ℃下离心（2 000×*g*）10 min］去除游离肽，按“**2.1**”项下色谱条件检测各试验组体系中的肽含量，按式①计算诱导组装后的装载量。结果（图 2E）显示，SLG、SCG 和 SLS 试验组的多肽装载量均不足 1％，而 SDT 组高达（67.23±3.49）％。

$$\text{装载量} = (\text{多肽投入量} - \text{游离肽量}) / \text{多肽投入量} \times 100\% \quad ①$$

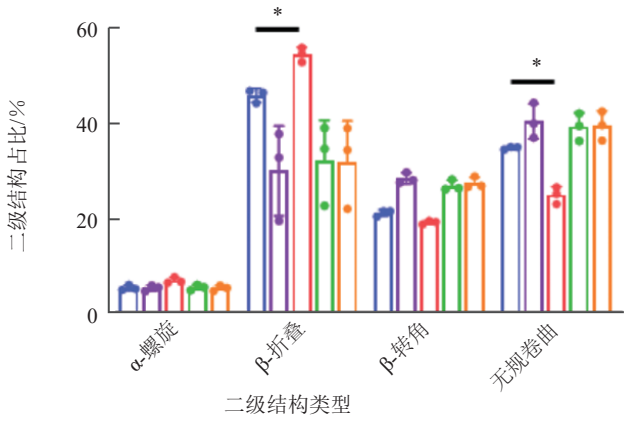
综上所述，SDT 可驱动 VGB3 形成 SMP，表现出优良的组装诱导能力。两亲性分子的诱导组装作用与其分子结构密切相关。SLG 和 SCG 的头基为谷氨酰残基，体积较大，空间位阻可能干扰多肽链之间的有序折叠与堆积，不利于形成规整的超分子结构。SLS 的硫酸根头基是强酸根，电负性强、水化半径大，易在头基周围形成致密水化层，可能会削弱其疏水链与多肽的相互作用。相比之下，SDT 的巯基头基电负性和水化作用较弱，可使疏水链更有效



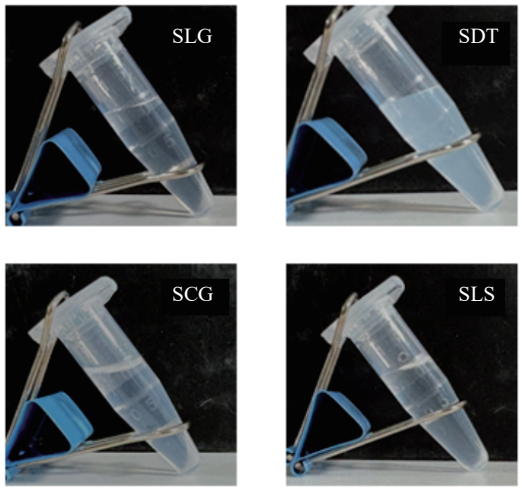
A



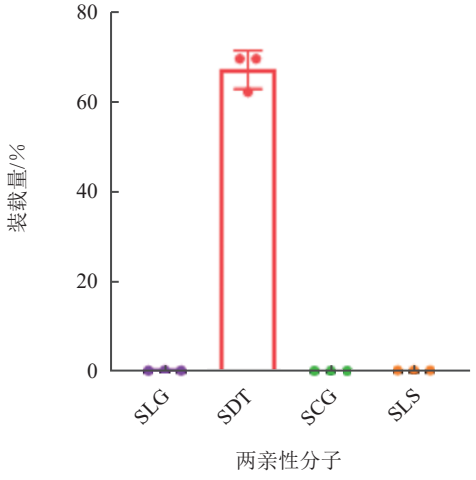
B



C



D



E

A—V-SMP 制备示意图；B—VGB3 和 V-SMP 的 CD 谱图；C—各试验组产物的二级结构比例（与 VGB3 相比，* 表示 $P<0.05$；$n=3$）；D—各试验组外观图；E—各组 V-SMP 的多肽装载量对比图（$n=3$）。

——VGB3；——SLG；——SDT；——SCG；——SLS。

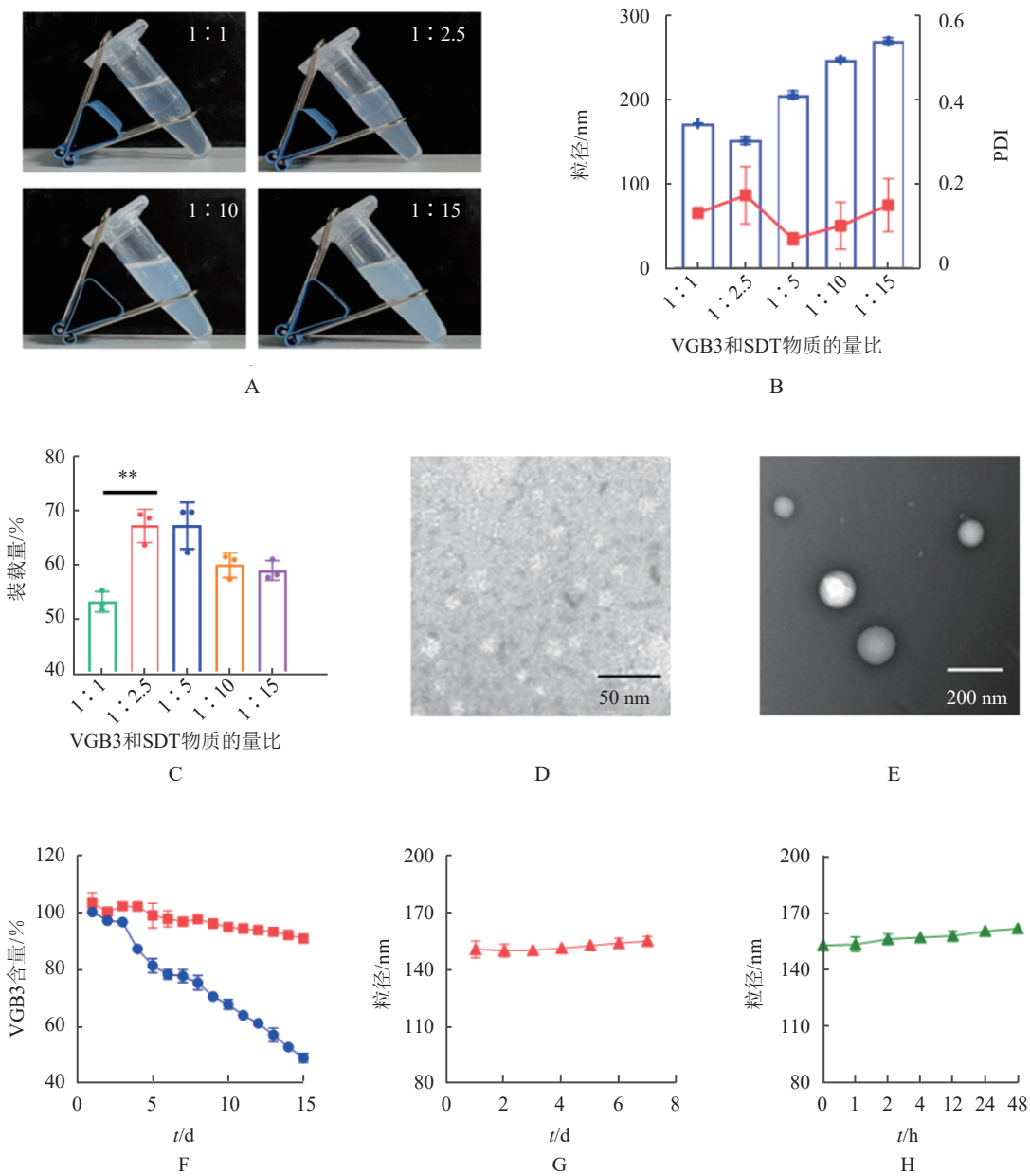
图 2 两亲性分子种类对 V-SMP 形成的影响

Fig.2 Effects of Amphiphilic Molecule Types on the Formation of V-SMP

地与多肽的疏水区域相互作用，从而驱动组装过程。

2.3　SMP 的处方优化

继续考察 SDT 用量对 V-SMP 形成的影响。取 VGB3 和 SDT，分别以物质的量比为 1 ∶ 1、1 ∶ 2.5、1 ∶ 5、1 ∶ 10、1 ∶ 15 混合，按“**2.2**”项下方法自组装 V-SMP，按“**2.1**”项下色谱条件检测含量。结果（图 3A ～ 3C）显示，物质的量比为 1 ∶ 2.5 时，所形成的 V-SMP 平均粒径较小，约为 150 nm，



A—各试验组外观图；B—各试验组 V-SMP 粒径（□）和 PDI（■）变化图（n=3）；C—各试验组 V-SMP 的多肽装载量对比图（** 表示两组间 P<0.01；n=3）；D—VGB3 的 TEM 照片（×50 000）；E—V-SMP 的 TEM 照片（×50 000）；F—VGB3（●）和 V-SMP（■）中 VGB3 的含量（n=3）；G—V-SMP 的粒径稳定性（n=3）；H—V-SMP 在模拟血清环境中的粒径稳定性（n=3）。

图 3　V-SMP 的处方优化及表征

Fig.3　Formulation Optimization and Characterization of V-SMP

随着 SDT 用量增加，V-SMP 粒径增大；而装载量并未随着 SDT 用量的增加而不断提高，物质的量比超过 1 ∶ 5 后装载量出现下降趋势，表明 VGB3 与两亲性分子在此比例以上难以有效组装。故后续优选 VGB3 与 SDT 物质的量比为 1 ∶ 2.5 进行试验。

2.4 V-SMP 的制备与表征

按“**2.2**”项下方法，取 VGB3 和 SDT，以物质的量比 1 ∶ 2.5 制备 V-SMP。

取 VGB3 和 V-SMP 样品滴加到铜网中，使用乙酸铀染色，用 TEM 观察样品并拍摄。结果（图 3D、3E）显示，游离 VGB3 主要以具有三维折叠构象的多肽单体形式存在，而 V-SMP 呈单分散的球形结构，粒径为 100 ～ 150 nm，与 DLS 测定结果一致。

将游离 VGB3 与 V-SMP 于（25±2）℃放置 15 d，考察含量稳定性。结果（图 3F）显示，游离 VGB3 含量在 D15 降至（48.92±1.34）%，而 V-SMP 中的 VGB3 含量维持在（91.07±1.22）%，且在整个试验观察期内含量较稳定。这表明将游离肽制备成 SMP 可提升稳定性，有效抑制其被降解。

将 V-SMP 加至 PBS（pH 7.4）中，于（25±2）℃放置 7 d。结果（图 3G）显示，在 7 d 内，V-SMP 粒径稳定在约 160 nm，且未观察到明显的粒径增大或聚集现象，提示其粒径稳定性良好。进一步将 V-SMP 加至含 10% FBS 的 PBS 中，于（37±2）℃放置 48 h，考察其在模拟血清环境中的稳定性。结果（图 3H）显示，各时间点测得 V-SMP 的粒径均稳定在约 160 nm，说明 V-SMP 在模拟生理环境下同样能保持结构完整性。

2.5 V-SMP 的细胞摄取研究

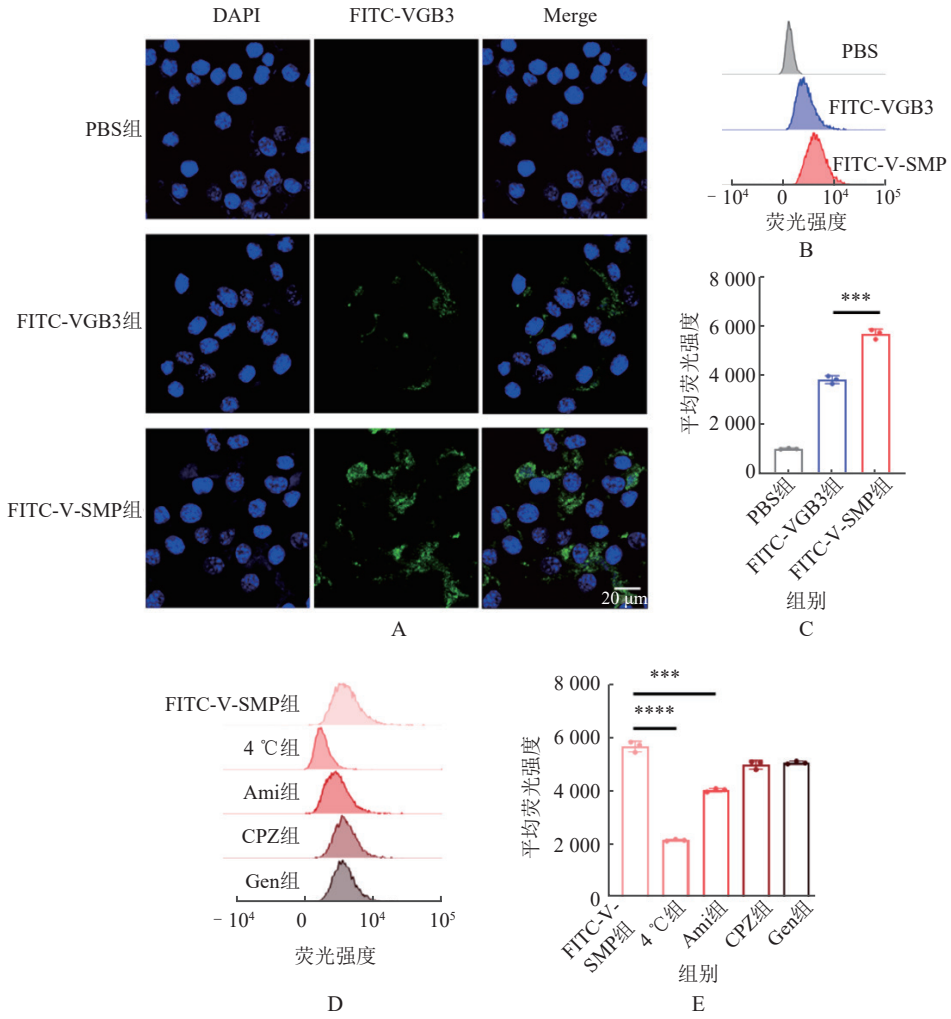
取 FITC-VGB3，按“**2.4**”项下条件制备 FITC-V-SMP。取对数生长期的 B16F10 细胞，以每孔 1×10^5 个的细胞密度接种于预先放入爬片的 24 孔板中，在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 24 h；吸出培养基，剩余物中分别加入用 DMEM 培养基稀释的 PBS、FITC-VGB3 和 FITC-V-SMP，按多肽终质量浓度 2 000 ng/mL 给药，孵育 4 h 后，置共聚焦显微镜下观察并拍摄图像。

另取对数生长期的 B16F10 细胞，以每孔 3×10^5 个的密度接种于 6 孔板，在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 24 h；吸出培养基，剩余物中分别加入 PBS、FITC-VGB3 和 FITC-V-SMP，给药浓度同上，孵育 4 h 后，用流式细胞仪检测荧光强度，用 FlowJo_v10.8.1 软件分析数据。

结果（图 4A、B、C）显示，FITC-V-SMP 组的 FITC 绿色荧光信号增强，细胞质内可见密集且均匀分布的荧光斑点；而游离 FITC-VGB3 组仅观察到微弱的、局限于细胞膜附近的弥散荧光。流式细胞术的定量检测结果与激光共聚焦显微镜的观察结果一致，荧光强度分布直方图显示，FITC-V-SMP 组的信号峰值相较于 FITC-VGB3 组发生右移，且荧光强度提高了 1.49 倍，表明 V-SMP 结构可提高肿瘤细胞对多肽的摄取效率。

为系统阐明 V-SMP 的细胞摄取路径，选取巨胞饮作用、网格蛋白介导的内吞作用以及小窝介导的内吞作用的代表性抑制剂 Ami、CPZ 和 Gen 进行试验，并设置 4 ℃能量阻断组（将 B16F10 细胞预冷至 4℃并全程维持低温孵育）与 37 ℃正常摄取组为阴、阳对照。取对数生长期的 B16F10 细胞，分别与 15 μmol/L 抑制剂孵育 1 h 后，加入 FITC-VGB3、FITC-V-SMP 至终质量浓度为 2 000 ng/mL，继续孵育 4 h，收集细胞，使用流式细胞仪检测不同组的荧光强度。

结果（图 4D、4E）显示，能量阻断组的平均荧光强度相较于 FITC-V-SMP 组降低 61.3%，提示 FITC-V-SMP 的跨膜转运高度依赖 ATP 驱动的能量依赖性主动运输，而非被动扩散；Ami 处理组细胞内的荧光信号出现显著衰减，相较于 FITC-V-SMP 组降低 28.6%；CPZ 和 Gen 处理组未表现出明显抑制效应。该结果表明，V-SMP 细胞摄取效率的提高可能是由巨胞饮途径引起，另 2 条内吞途径对 SMP 的摄取贡献相对较小。已有研究[14]表明，巨胞饮作用是 SMP 细胞内化的重要方式，与本研究结果一致。这可能与超分子结构能与细胞膜上的受体发生特异性识别与聚集，触发肌动蛋白重排和膜褶皱形成，从而提高巨胞饮途径介导的摄取效率有关。



A—各组细胞的激光共聚焦显微镜图像；B—FITC-VGB3 和 FITC-V-SMP 的细胞摄取流式细胞术分析；C—图 B 的平均荧光强度定量分析（与 FITC-VGB3 组相比，*** 表示 P<0.001；n=3）；D—FITC-V-SMP 细胞摄取途径的流式细胞术分析；E—图 D 的平均荧光强度定量分析（与 FITC-V-SMP 组相比，*** 表示 P<0.001，**** 表示 P<0.000 1；n=3）。

图 4　FITC-VGB3 和 FITC-V-SMP 的细胞摄取

Fig.4　Cellular Uptake of FITC-VGB3 and FITC-V-SMP

2.6　SDT+TSC 的细胞毒性考察与 V-SMP 的体外抗肿瘤活性评价

2.6.1　SDT+TSC 的细胞毒性考察

采用 CCK-8 法考察 SDT 和 TSC 对 B16F10 细胞增殖能力的影响。将 B16F10 细胞以每孔 1×10^4 个的密度接种于 96 孔板中；取 0.01 mol/L TSC 溶液和“**2.3**”项下优选处方中的 SDT 混合，采用 DMEM 培养基将 SDT+TSC 稀释至 0、200、1 000、2 000、3 000、4 000、5 000 ng/mL，加至上述 96 孔板中孵育 24 h；每孔加入 CCK-8 溶液 20 μL，于 37 ℃避光孵育 2 h，采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度（OD）值。另外，试验设置空白组（不含药物和细胞）和对照组（不含药物，含细胞），并按式②计算细胞活力。

细胞活力 =（加药组 OD 值 - 空白组 OD 值）/（对照组 OD 值 - 空白组 OD 值）×100%　　②

结果（图 5A）显示，SDT+TSC 质量浓度为 0 ～ 5 000 ng/mL 时，细胞活力均保持在 100% 左右，表明即使是高浓度的 SDT+TSC，对肿瘤细胞的毒性仍非常低。这说明在试验浓度下，SDT 和 TSC 本身不会诱导细胞凋亡或抑制肿瘤生长。

2.6.2　细胞增殖活性考察

采用 CCK-8 法考察 VGB3 和 V-SMP 对 B16F10

细胞增殖能力的影响。将 B16F10 细胞以每孔 1×10^4 个的密度接种于 96 孔板中；另用 DMEM 培养基将 VGB3 游离肽和 V-SMP 分别稀释至 0、100、500、1 000、1 500、2 000、2 500、3 000 ng/mL，加至上述 96 孔板中孵育，按“**2.6.1**”项下方法检查细胞活力。

结果（图 5B、C）显示，随着质量浓度的增加，VGB3 与 V-SMP 处理组的 B16F10 细胞活力均逐渐下降，说明 VGB3 和 V-SMP 均以浓度依赖的方式抑制 B16F10 细胞增殖；在相同浓度下，V-SMP 处理组的细胞活力低于 VGB3 处理组，且 V-SMP 处理组的半数抑制浓度（IC_{50}）显著低于 VGB3 处理组，表明 SMP 可显著增强多肽对肿瘤细胞增殖的抑制作用。

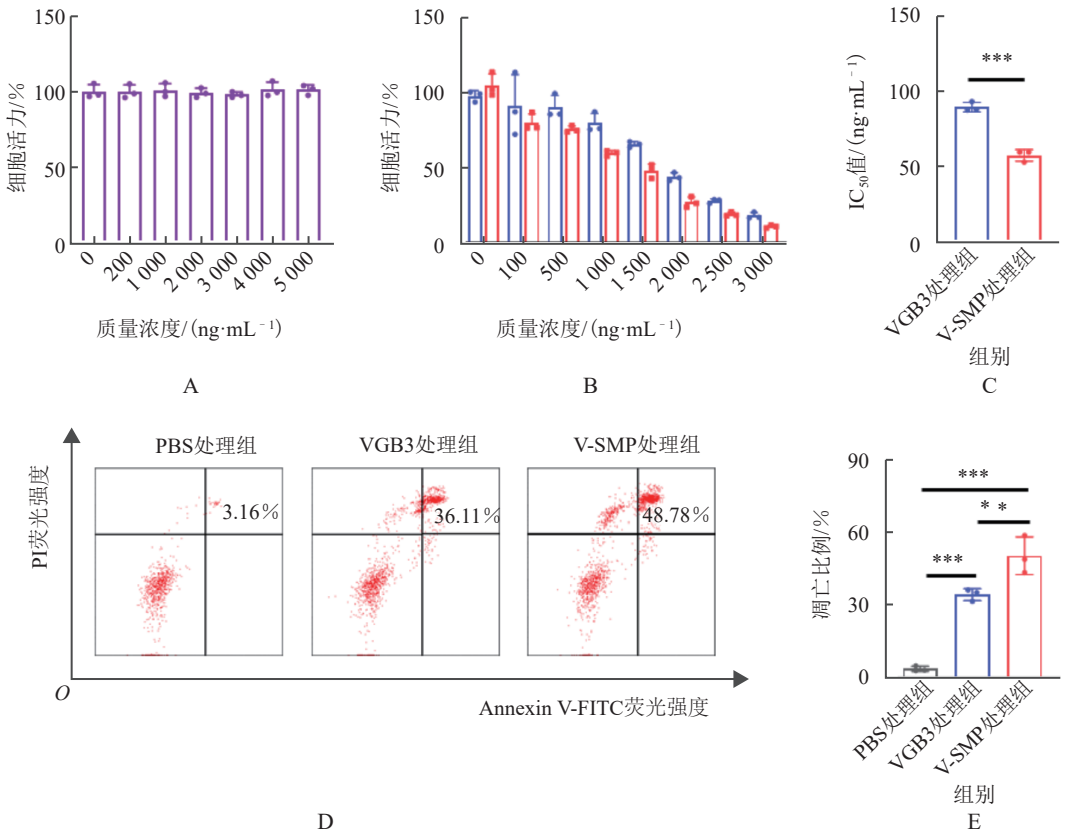
2.6.3 细胞凋亡考察

将 B16F10 细胞以每孔 3×10^5 个的密度接种于 6 孔板中，设置 3 组，分别为 PBS、VGB3 和 V-SMP 处理组，按 VGB3 肽终质量浓度 2 000 ng/mL 给药（VGB3 和 V-SMP 用 DMEM 培养基稀释）。孵育 24 h 后，每组加入染料 Annexin V-FITC 5 μL 和碘化丙啶（propidium iodide，PI）10 μL，轻轻混匀进行染色，室温避光孵育 15 min 后用流式细胞仪检测。

结果（图 5D、E）显示，与 VGB3 相比，V-SMP 展现出更强的促凋亡作用，总凋亡率达到 48.78%。定量结果显示，V-SMP 处理组的凋亡诱导能力较 VGB3 处理组提高了 1.47 倍，提示 VGB3 与 SDT 形成 SMP 后，通过提高细胞摄取效率，有效增强了促凋亡效应，进而提升了其体外抗肿瘤能力。

2.7 V-SMP 在小鼠黑色素瘤模型中的药效学评价

取 7 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠 18 只，体质量为 18 ～ 22 g，腋窝皮下注射细胞密度为每 1 mL 含 3×10^6 个的 B16F10 细胞悬液 0.1 mL，观察小鼠肿瘤生长情况，测量肿瘤球的长径（*L*）和宽径（*W*），并记录小鼠体质量，按式③计算肿瘤体积（*V*）。待



A—SDT+TSC 的细胞活力（n=3）；B—VGB3（□）和 V-SMP（□）处理组的细胞活力（n=3）；C—VGB3 和 V-SMP 处理组的 IC_{50} 值（*** 表示 P<0.001；n=3）；D—细胞凋亡试验的流式细胞术分析；E—细胞凋亡比例的定量分析（* 表示 P<0.05，*** 表示 P<0.001；n=3）。

图 5 SDT+TSC 的细胞毒性及 V-SMP 体外抗肿瘤表征

Fig.5 Cytotoxicity of SDT+TSC and *in vitro* Antitumor Characterization of V-SMP

肿瘤生长至体积为 50 mm^3 时，将小鼠随机分为 3 组，每组 6 只，分别瘤周注射等渗 PBS、VGB3、V-SMP，每 2 日注射 1 次，共注射 6 次；按照多肽含有量计算，给药剂量为 1 mg/kg，对应给药体积 100 μL。同时，按式④计算抑瘤率。

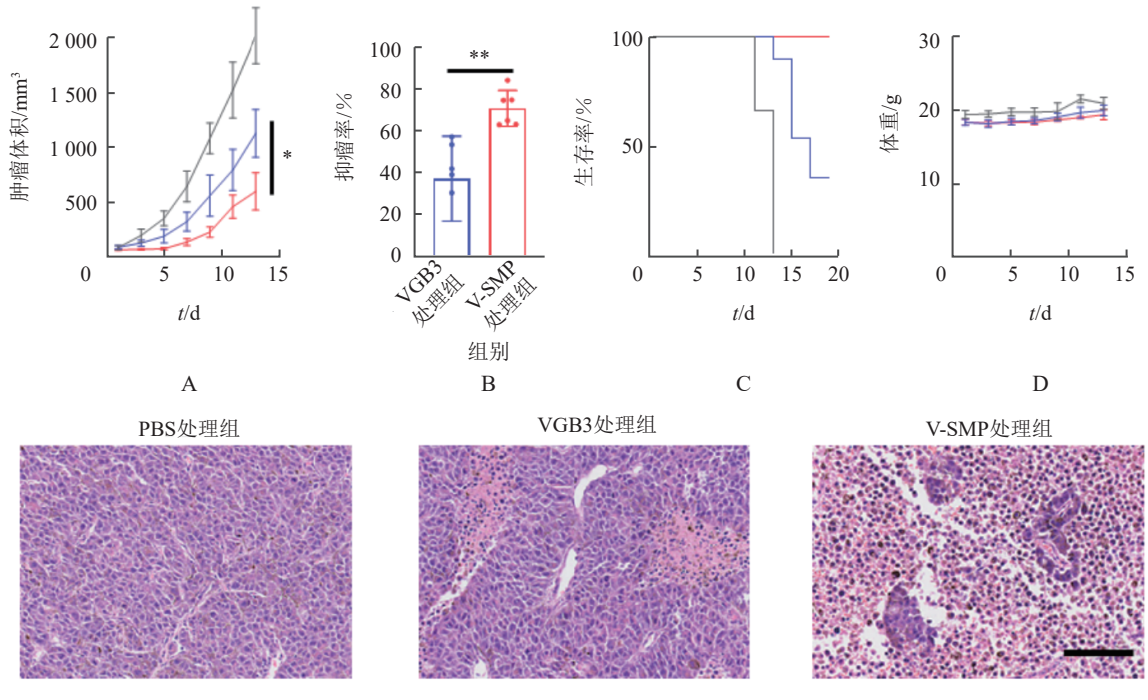
$$V=0.5\times L\times W^2 \quad ③$$

抑瘤率 =（对照组肿瘤体积 - 试验组肿瘤体积）/ 对照组肿瘤体积 ×100%　④

治疗结束后处死小鼠，解剖分离肿瘤、心、肝、脾、肺、肾组织，迅速于 4% 多聚甲醛固定液中固定 48 h，然后包埋在蜡块中依次进行 HE 染色、中性树胶封片，封片后利用组织多光谱病理成像分析系统观察肿瘤细胞坏死情况。

结果（图 6A ～ D）显示，PBS 处理组小鼠肿瘤快速进展，各时间点的肿瘤体积均高于其他组；尽管 VGB3 处理组展现出一定的肿瘤抑制活性，但疗效有限，D13 时平均肿瘤体积已突破 1 000 mm^3；相比之下，V-SMP 抑制肿瘤生长的作用较为显著，肿瘤平均体积显著小于 VGB3 处理组。在治疗终点处，V-SMP 处理组的肿瘤抑制率可达 70%，约为 VGB3 处理组（36%）的 2 倍，表明 V-SMP 具有优越的抗肿瘤活性。D11 时，PBS 组小鼠开始出现死亡，至 D13 时小鼠全部死亡。结合试验期间的观察结果，该组小鼠随肿瘤体积的增长，逐渐出现活动减少、弓背蜷缩等特征，死亡可能与肿瘤负荷过大有关。D13 时，VGB3 处理组小鼠也开始出现死亡，至 D17 时生存率仅 40%；而 V-SMP 处理组小鼠在观察期内存活率为 100%，表明 V-SMP 可显著延长荷瘤小鼠生存期。

HE 染色分析结果（图 6E）显示，PBS 处理组肿瘤组织呈现典型的黑色素瘤高密度细胞增殖特征，肿瘤细胞排列紧密，核质比高、核深染、核膜清晰、胞浆非常少，表明细胞处于高度未分化状态，增殖活性强；VGB3 处理组细胞间出现明显间隙，核固



A—PBS、VGB3 和 V-SMP 处理组肿瘤生长曲线（与 VGB3 处理组相比，* 表示 $P<0.05$；$n=6$）；B—抑瘤率（** 表示 $P<0.01$；$n=6$）；C—小鼠生存曲线（$n=6$）；D—小鼠体质量变化曲线（$n=6$）；E—治疗结束后小鼠肿瘤的病理切片（标尺为 100 μm）。

——PBS 处理组；——VGB3 处理组；——V-SMP 处理组。

图 6　VGB3 和 V-SMP 体内抗肿瘤表征

Fig.6　*In vivo* Antitumor Characterization of VGB3 and V-SMP

缩现象出现，并于肿瘤中心区域可见局部坏死灶；V-SMP 处理组肿瘤细胞密度进一步降低，大量细胞呈现核碎裂特征，细胞核体积显著缩小，核膜完整性丧失，染色质凝集并崩解为多个嗜碱性碎片，并观察到大面积坏死区域，坏死区域占据肿瘤实质的大部分区域，表现为大片结构崩解，可见嗜酸性增强的颗粒状物质，肿瘤组织结构塌陷。以上结果表明，V-SMP 显示出更强的抗肿瘤效果。VGB3 和 V-SMP 治疗期间小鼠体质量无明显变化，表明二者对小鼠的不良反应较小，安全性良好（图 6D）。

小鼠的心、肝、脾、肺、肾的 HE 染色组织病理学分析结果（图 7）显示，各组小鼠主要器官均未见明显的病理学改变，各器官的细胞形态、大小及间质结构均维持在正常生理状态。这表明，在本试验采用的瘤周给药剂量和方案条件下，该制剂未对正常组织造成形态学损伤或毒性，安全性良好。

3 总结与讨论

本研究提出两亲性分子与盐离子协同驱动策略，通过增强多肽分子间疏水相互作用及屏蔽静电排斥，诱导其发生非共价组装，成功构建具有纳米尺度的 SMP。同时，以多肽二级结构转变程度、装载量及粒径为评价指标进行多维度筛选，确定了优化处方。以优化处方制备的 V-SMP 呈单分散的球形纳米粒，稳定性良好。这表明通过合理调控两亲性分子种类与比例，可提升多肽的化学稳定性，有效克服多肽稳定性差问题。

多肽的空间构象对其摄取效率至关重要[15]。SMP 的规整排列使其与膜表面受体形成多点互补识别，可提高细胞对其的摄取效率。与游离 VGB3 相比，V-SMP 细胞摄取效率显著提升，从而显著增强了多肽的抗肿瘤作用。本研究为克服多肽稳定性差、摄取效率低等问题提供了一种有效策略，也为提高抗肿瘤多肽的治疗效果和多肽的应用开发提供了数据参考与借鉴。但值得注意的是，由于不同肽序列的二级结构倾向性各异，组装为 SMP 后的超分子构象亦呈现差异，可能导致摄取效率出现差异，故后续还需进一步阐明结构和功能之间的关系，以为其他多肽的 SMP 构建提供理论基础。此外，SMP 的临床转化和生产应用仍面临诸多挑战。例如，当前实验室制备规模的 SMP 制剂存在批次间差异大、放大效应显著等问题。未来需要寻找合适的原辅料以及制剂工艺，推动 SMP 从概念验证迈向真正的临床与生产应用。

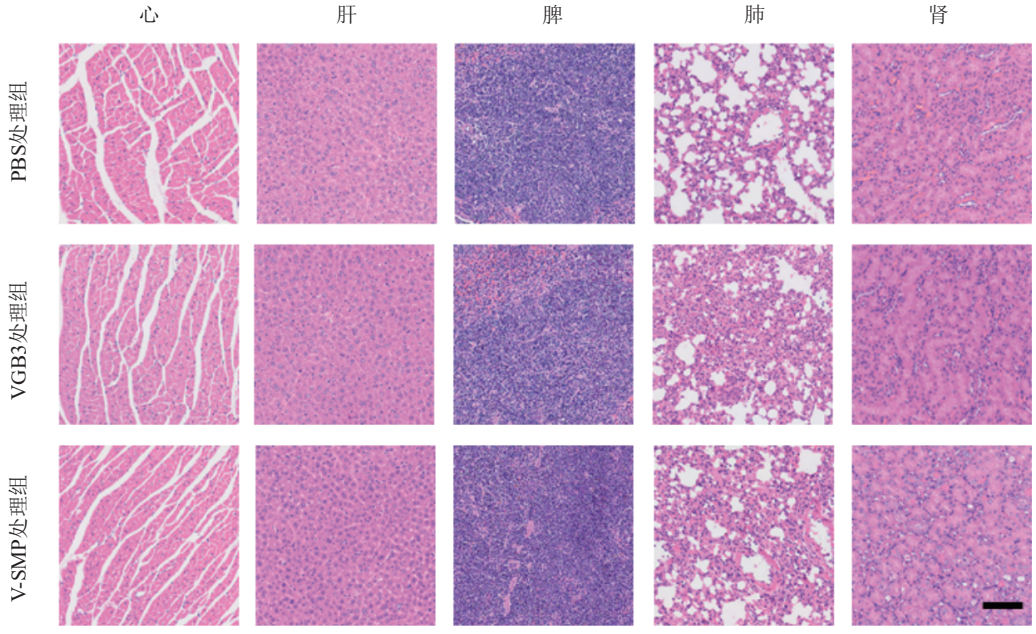


图 7 治疗结束后各组小鼠心、肝、脾、肺、肾的 HE 染色切片（标尺为 100 μm）

Fig.7 HE Staining Sections of Heart, Liver, Spleen, Lung, and Kidney Tissues from Mice after Treatment (scale bar: 100 μm)

参考文献：

[1] CHEN Z H, WANG R X, GUO J Q, *et al*. The role and future prospects of artificial intelligence algorithms in peptide drug development [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, **175**: 116709.

[2] BATHGATE R A D, PRAVEEN P, SETHI A, *et al*. Noncovalent peptide stapling using alpha-methyl-l-phenylalanine for α-helical peptidomimetics [J]. *J Am Chem Soc*, 2023, **145**(37): 20242-20247.

[3] NHAN N T T, YAMADA T, YAMADA K H. Peptide-Based agents for cancer treatment: current applications and future directions [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(16): 12931.

[4] ZANJANCHI P, ASGHARI S M, MOHABATKAR H, *et al*. Conjugation of VEGFR1/R2-targeting peptide with gold nanoparticles to enhance antiangiogenic and antitumoral activity [J]. *J Nanobiotechnol*, 2022, **20**(1): 7.

[5] NUGRAHADI P P, HINRICHS W L J, FRIJLINK H W, *et al*. Designing formulation strategies for enhanced stability of therapeutic peptides in aqueous solutions: a review [J]. *Pharmaceutics*, 2023, **15**(3): 935.

[6] CUI G H, SUN Y P, WANG S Q, *et al*. Muramyl dipeptide-presenting polymersomes as artificial nanobacteria to boost systemic antitumor immunity [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2024, **16**(45): 61655-61663.

[7] HAIM ZADA M, ROTTENBERG Y, DOMB A J. Peptide loaded polymeric nanoparticles by non-aqueous nanoprecipitation [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2022, **622**: 904-913.

[8] 王思明, 尹翌秋, 张鹏飞, 等. 载RGD肽脂质体的优化和初步评价[J]. 中国医药工业杂志, 2017, **48**(5): 706-710.

[9] ZHANG Z H, HU X J, HU Y H, *et al*. An enzyme-activated and structural transformable supramolecular oncolytic peptide for efficient cancer immunotherapy through systemic administration [J]. *Nano Today*, 2025, **62**: 102699.

[10] CAI X Y, XU W, REN C H, *et al*. Recent progress in quantitative analysis of self-assembled peptides [J]. *Exploration* (Beijing), 2024, **4**(4): 20230064.

[11] PARK I S, KIM S, YIM Y, *et al*. Multifunctional synthetic nano-chaperone for peptide folding and intracellular delivery [J]. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 4568.

[12] TANG Y, LUO Z Y, MA Z N, *et al*. Condensate nanovaccine adjuvants augment $CD8^+$ T-cell-dependent antitumor immunity through mtDNA leakage-triggered cGAS-STING axis activation [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, **10**(1): 349.

[13] 于伟康, 张珊珊, 杨占一, 等. 超分子多肽自组装在生物医学中的应用[J]. 生物工程学报, 2021, **37**(7): 2240-2255.

[14] WANG J M, YOU W M, HE W X, *et al*. Artificial intelligence-guided cancer engineering for tumor normalization executed by tumor lysosomal-triggered supramolecular chiral peptide [J]. *ACS Nano*, 2025, **19**(18): 17273-17286.

[15] ZHANG F, ANGELOVA A, GARAMUS V M, *et al*. Mitochondrial voltage-dependent anion channel 1-hexokinase-Ⅱ complex-targeted strategy for melanoma inhibition using designed multiblock peptide amphiphiles [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, **13**(30): 35281-35293.