

细胞穿透肽应用的研究进展*

刘芸 李锦梅 谭婷 姜勇**

(南方医科大学病理生理学教研室, 广东省蛋白质组学重点实验室, 广州 510515)

摘要 细胞穿透肽是一类具有特殊细胞膜穿透作用的短肽, 研究发现其为药物大分子物质的细胞内转运提供了有力工具, 现已得到了广泛关注和大量研究. 一方面, 近年来发现, 细胞穿透肽的应用面临着药物释放率、代谢降解、细胞系的分化状态和 Rho-GTPases 活性的依赖性问题, 从而阻碍了其研究开发的进程. 另一方面, 细胞穿透肽在肿瘤治疗、抗菌和抗炎靶向药物等方面的研究却取得了显著的进展, 甚至进入了临床前和临床研究阶段. 本文围绕细胞穿透肽在应用开发中所面临的挑战和机遇两方面, 综述了近期的研究进展, 并对细胞穿透肽在新领域中的应用进行了展望.

关键词 细胞穿透肽, 应用, 研究进展, 挑战, 机遇

学科分类号 R915, Q516

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00336

细胞膜是细胞与细胞外环境间的半透性屏障, 具有选择性通透作用, 有力保证了细胞内环境的相对恒定. 尽管这种磷脂双分子层对于细胞的存活和功能必不可少, 但却给细胞内外货物分子的交换造成障碍. 由于蛋白质、多肽、核酸等药物大分子物质难以进入细胞内并达到足够的浓度, 导致其治疗效果难如人意, 从而阻碍了这些大分子物质在基础研究以及临床应用. 近 20 年来, 随着人们认识和研究的不断深入, 细胞穿透肽(cell penetrating peptides, CPPs)被认为是有望解决上述问题的有力工具, 逐渐显露出诱人的应用前景.

CPPs 被定义为一类由 5~30 个氨基酸组成的短肽, 可以有效地将包括亲水性蛋白质和多肽^[1]、核酸片段(DNA、RNA 和反义寡聚核苷酸)^[2-3]、小分子药物^[4]、量子点^[5]和 MRI 成像造影剂^[6]等在内的多种货物分子, 通过离体和在体的方式导入种类广泛的细胞中, 细胞毒性低, 能够在保证活性分子正常发挥作用的同时不会产生免疫反应^[7]. 某些 CPPs 甚至能够携带货物分子穿过血脑屏障、血睾屏障、胎盘屏障等人体重要的屏障系统发挥作用^[8]. 此外, CPPs 不仅可以充当药物分子的运载工具, 而且有些本身就具有一定的生物学功能^[8-9]. 因而, CPPs 作为有效的生物活性分子细胞内转运工具,

在细胞生物学和细胞免疫学, 尤其是在药物开发、基因生物治疗以及肿瘤靶向治疗等研究领域, 均具有广阔而重要的应用前景^[10]. 自从来源于人 HIV-1 转录激活因子(trans-activator of transcription, Tat)的 CPPs 首次被报道, 至今已过去 25 年, 本文将围绕 CPPs 在应用研究中面临的挑战以及新机遇两方面综述近期的研究进展.

1 面临的挑战

1.1 细胞内运输途径

越来越多的数据显示, 相当数量的 CPPs 内化后会包裹在内体中, 直接导致其携带的药物分子无法得到有效释放. Wadia 等^[11]提出 CPPs 转运药物的限速步骤就在于其逃离胞吞囊泡的过程. 他们在实验中发现, 大多数 Tat(48~57)-Cre 通过脂筏发

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2010CB529704), 国家自然科学基金(81030055), 广东省自然科学基金资助项目(10251051501000003), 教育部博士点基金项目(20104433120008), 2012 年南方医科大学科研启动计划资助项目(B1012008)和广东省医学科学技术研究基金面上项目(A2013354).

** 通讯联系人.

Tel: 020-61648231, E-mail: yjiang@fimmu.com

收稿日期: 2013-12-01, 接受日期: 2014-02-26

生胞吞后,都被滞留在胞吞内体中长达 24 h,证实这一逃离过程的效率是非常低下的.为了改善这种状况,氯喹(chloroquine)作为一种离子转运体 ATP 酶的抑制剂曾得到应用.这种物质能够通过阻止酸化作用抑制内体的形成,因此能够提高 Tat-Cre 在细胞内的释放效率,但同时也会引起较高的细胞毒性.此外, Wadia 等^[11]还发现一种 pH 敏感融合肽 dTat-HA2 同样能够显著促进 Tat-Cre 在细胞内的释放,且对细胞的生长状态影响不明显.流感病毒血凝素 2 (HA2) N 端的 20 个氨基酸是一种 pH 敏感融合肽,在低 pH 值条件下能够破坏囊泡膜结构的稳定性.后来, Liu 等^[12]设计将 CPPs R9(九聚精氨酸)与渗透促进肽序列 (penetration accelerating peptide sequence, Pas)相结合组成 PR9,这一改造被证实能够有效减少内吞引起的溶酶体降解,显著提高量子点在 A549 细胞中的转运效率.综上所述,通过破坏胞吞内体膜的稳定性、延缓或阻止胞吞内体与溶酶体融合以及降低溶酶体酶的活性,将有望提高 CPPs 的胞质释放量,从而提高被输送物质的生物学效应.

1.2 代谢降解

限制 CPPs 应用的另一主要障碍在于,多肽通常会在接触或通过上皮细胞和内皮细胞内酶体系时被快速地代谢降解清除. Koppelhus 等^[13]报道,实验中观察到 CPPs 内化效率低下的原因可能就在于荧光标记的 CPPs 在细胞内的快速降解.目前,尽管关于 CPPs 降解和稳定性研究的重要性日益突显,但是这一领域的成果却十分有限. Elmquist 等^[14]研究了穿透肽 pVEC 在大鼠脑内皮细胞裂解液中的代谢降解情况,提出当其序列中所有的 L-型氨基酸都被取代成为与其对应的非天然 D-型氨基酸后, pVEC 的代谢稳定性显著增强. Verdurmen 等^[15]还发现,对于阳离子型 CPPs 而言, L-型氨基酸取代成为 D-型氨基酸的结构修饰不仅能提高其在细胞内的稳定性,同时还可能导致其内化效率的提高.此外, Foerg 等^[16]将人降钙素来源穿透肽 hCT、Tat (47~7)和 Pentratin (43~58)分别与三种上皮细胞(MDCK、Calu-3 和 TR146)孵育,分析比较了它们的代谢降解动力学特点和清除模式.研究发现,虽然三种上皮细胞中蛋白质水解活性不同,但是三种不同 CPPs 在其中的代谢模式却具有一致性,且 Tat 的稳定性强于 hCT 和 Pentratin.同时,通过与多寡聚阳离子的猿类病毒 40(simian virus 40, SV40)

进行偶联修饰, hCT 的稳定性能得到显著提高,并衍生得到一种新的 CPP,即 hCT(9-32)-br^[17].总之,对现有 CPPs 进行修饰改进,或者寻找具有较高稳定性的 CPPs,是当前解决 CPPs 体内降解问题的主要途径.

1.3 细胞系和分化状态的依赖性

近来,关于 CPPs 内化效率具有细胞系和分化状态依赖性的报道日益增多.尤其,有研究发现, CPPs 在“渗漏(leaky)”和“非渗漏(non-leaky)”细胞模型培养物中的穿膜能力存在显著差异.所谓“leaky”细胞模型,如 HeLa 细胞,是指不能形成紧密连接(tight junctions, TJs),而生长成为具有高可渗透单层的细胞.“non-leaky”细胞模型则是指细胞之间的连接通过分布在细胞顶面的连接复合体形成 TJs 来实现,例如融合的犬肾传代细胞系(Madin-Darby canine kidney, MDCK).

TJs 与 CPPs 穿膜作用的相关性近年来引起了不少关注.例如, Violini 等^[18]选择了几种高度分化的上皮细胞为模型,考察并量化比较了 L-和 D-型 Tat 立体异构体内化的效率.他们发现,当采用能够形成 TJs 结构的融合单层肾细胞 MDCK 和结肠癌细胞 CaCo-2 模型时, Tat 两种异构体经上皮细胞的渗透率与大分子物质菊粉几乎无异,即仅具有很低的细胞旁通透性.然而,在存“渗漏”的 HeLa 和 KB3-1 细胞中,可以在细胞质和核区观察到带有荧光标记的 Tat 聚集.这些结果提示: CPPs 的内化具有某种程度的细胞特异性,而这种特异性取决于细胞是否能形成紧密连接的屏障. Trehin 等^[19]比较了人降钙素来源穿透肽 hCT、Tat (47~57)和 Pentratin (43~58)对不同细胞系的内化能力,发现几乎所有 CPPs 对 HeLa 细胞都有较强的穿透能力,而对于融合 MDCK 细胞的作用则要小得多.因此,细胞间紧密连接能够明显抑制多种 CPPs 的内化能力.

除了 TJs,还有学者关注到细胞分化状态对 CPPs 穿膜效率和机制的影响. Foerg 等^[20]发现,处在渐进性细胞分化阶段的 MDCK(如形成 TJs)细胞通常伴随着内吞作用的减慢和 CPPs 内化效率的显著降低.当 MDCK 处于增殖期时,人们能够观察到 CPPs 通过脂筏介导和包涵素依赖的内化,而一旦细胞达到融合,内化现象将显著减弱.总之,这种内化效率上的显著差异不仅存在于“渗漏”(如 HeLa)和“非渗漏”(如 MDCK)之间,同时也表现

在刚接种不久的“渗漏”MDCK和分化完全的“非渗漏”MDCK之间。因此, 决定CPPs内化效率的关键因素在于细胞是否发生融合, 形成紧密的连接。从某种意义上讲, 与HeLa、KB 3-1、人类黑色素瘤或MC57纤维肉瘤这些缺乏紧密连接的细胞系相比, 类似融合型MDCK的上皮类型细胞是筛选具有潜在应用价值CPPs更加严格的模型。

1.4 Rho-GTPases 活性的依赖性

Rho GTPases 是广泛表达于真核细胞内的一类重要信号转导分子, 是许多膜表面受体如G蛋白偶联、酪氨酸激酶、细胞因子和黏附分子受体的下游效应蛋白, 在细胞信号转导过程中发挥着“分子开关”的作用, 也参与了细胞内吞活性的调节。Rho GTPases 在接受到细胞外分子信号后, 能够快速转换于GTP结合的活化状态和GDP结合的非活化状态之间, 并与其细胞内多种下游效应分子相互作用, 将信号传递给细胞骨架等元件, 诱发肌动蛋白(actin)细胞骨架的重构及其他重要效应, 启动细胞膜运输的动态调节过程, 发挥了内吞运输和肌动蛋白细胞骨架之间的信号桥梁作用^[21]。人Rho GTPases 家族已经得到分离鉴定的蛋白质成员有23种, 已知其中至少有5种参与了内吞的运输调节过程, 它们是Rac、RhoA、RhoD、RhoB和Cdc42, 而Rac、RhoA和Cdc42三者的研究最为透彻。在融合的MDCK细胞中, RhoA的活化能够激活顶面和基底面之间的内吞作用, Rac1的活化则会引起内吞作用的减弱^[22-23]。并且, 当MDCK由非融合向融合转变时, 其Rac1和Cdc42的活性会特征性地增高, 而RhoA的活性则有所降低^[24]。当组成型活性形式的Rac1或Cdc42过表达时, 细胞与细胞连接处的E-cadherin定位以及actin聚集增多。综上所述, CPPs的内吞效率主要和RhoA的活性正相关, 而Rac1和Cdc42的活化则与内吞作用的降低、细胞密度的改变和细胞分化有关。

2 未来的机遇

尽管CPPs的内化存在着一定的限制和不足, 然而其在某些疾病应用领域的价值逐步得到关注和发掘, 部分研究成果已进入到临床前和临床研究阶段, 这些工作仍显示CPPs未来良好的应用前景。

2.1 CPPs 在肿瘤治疗领域

CPPs 为寻找更有效的癌症治疗方法提供了有价值的工具, 这里重点讨论CPPs如何通过多种途径提高抗肿瘤药物疗效(图1)。

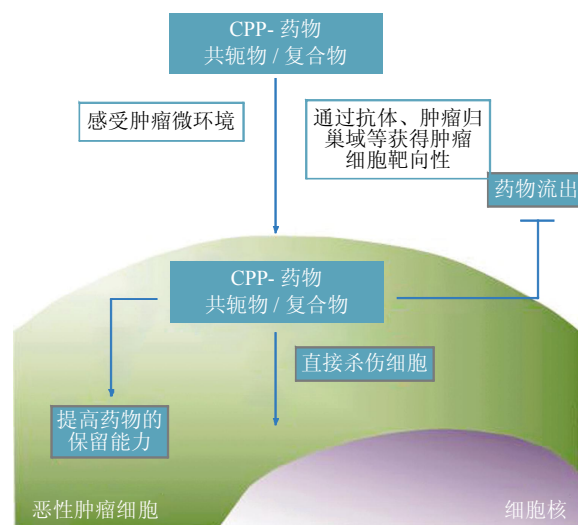


Fig. 1 CPPs improve anti-cancer drug efficacy via diverse pathways

图1 细胞穿透肽通过多种途径提高抗肿瘤药物疗效

2.1.1 研发对肿瘤微环境敏感的 CPPs 靶向载体

为了减少CPPs在正常组织中的积累和损害, 同时降低其在血液中的清除速度, 研发对肿瘤组织微环境敏感的CPPs载体, 成为最近CPPs靶向研究的热点^[25]。靶向可控的实现主要基于肿瘤组织病理环境与正常组织的差异, 这些差异表现在: 肿瘤组织由于缺氧, 发生无氧糖酵解, 产生乳酸累积, 导致局部呈现酸性。这种载体中的CPPs在正常组织中活性较低, 而在进入微环境变化的肿瘤组织后被激活, 从而将药物带入细胞中发挥杀伤作用, 达到靶向作用的效果。最常用的修饰手段是将药物包裹进纳米颗粒, 并在纳米颗粒的表面偶联上CPPs和pH值敏感铰链区, 铰链区的另一端则连接聚乙二醇(PEG)。包被的PEG作用有二, 一是可以延长载体在人体血液循环中的半衰期^[26];二是能够减小载体的内化效率, 使药物难以进入正常组织细胞发挥作用。而在恶变部位, 伴随pH值的降低, pH值敏感铰链区发生结构的改变, 导致PEG链的解离, 进而载体表面CPPs分子被暴露, 载体内化肿瘤细胞的能力得到提高, 药物的作用得以发挥。这种技术目前已应用到多功能脂质体等纳米颗粒, 结合肿瘤靶标的特异性抗体, 还可以实现更好的主动靶向作用^[27]。

2.1.2 通过修饰以获得肿瘤细胞治疗靶向性

如上所述, CPPs 能够内化几乎所有的哺乳动物细胞, 其能力的大小受到细胞系和分化状态的影响. 这种作用的普遍性在多数情况下是有利的, 然而在某些应用领域中却是不利的, 如肿瘤的靶向治疗. 为了克服这一不足, 研究者设计将 Tat 与抗 Her-2/neu 的模拟肽 AHNP 相连接. 该模拟肽能够特异性地与表皮生长因子受体 ErB2 相结合, 而在 30% 的乳腺癌患者中受体 ErB2 都出现过量表达^[28]. 为了达到治疗癌症的目的, 经过改造后的药物转运体系中还引入了 STAT3 的活化抑制肽(STAT3BP). 由于在 50% 的乳腺癌患者中, 转录因子 STAT 都发生组成性激活, 同时这种活化也与患者的不良预后存在相关性, 因此 STAT3BP 作为治疗药物货物分子被构建进入靶向体系(Tat-AHNP)中. 体内和体外的实验数据均证实, 靶向体系能够引导 STAT3BP 特异性进入肿瘤细胞, 而非未转化细胞. 同时, STAT3BP 的活性也并未因 Tat-AHNP 的存在而产生明显影响, 在体内仍然可以诱导癌细胞的凋亡, 抑制肿瘤的生长.

另一种靶向改造的策略则是利用了肿瘤归巢结构域(tumour homing domains)的特点. PEGA(cCPGPEGAGC)是一种能够在乳腺肿瘤血管中发生聚集的环状肽^[29], Myrberg 等^[30]将这一肿瘤归巢结构域和穿透肽 pVEC 进行共轭交联. 由于引入了 CPPs, 肿瘤归巢结构域也获得了透过细胞的能力, 并且在小鼠体内观察到其有效并特异性地进入乳腺肿瘤血管中. 接下来, 这一体系被用来验证转运化疗药物苯丁酸氮芥的效率. 实验结果显示, 借助于转运体系, 化疗药物作用的有效性提高了 4 倍以上. 同时, 转运到细胞内的药物并没有进入到溶酶体, 保证了绝大多数药物分子能够发挥抑制细胞增殖的活性.

2.1.3 利用 CPPs 提高药物在肿瘤中的保留能力

放射免疫疗法是指将抗体标记上放射性同位素导入体内, 同时提供辐射以达到局部杀伤肿瘤细胞的目的, 这种特异性建立在抗体的肿瘤定位能力上. 然而, 实际上单链的 FVs(scFVs)抗体片段在肿瘤中聚集的过程较为缓慢, 容易进入循环系统而被清除^[31]. 为了改善这种状况, 人们利用 CPPs 来引导 scFVs 快速内化进入肿瘤, 进而避免了抗体片段的体内迅速代谢. Jain 等^[32]将 Penetratin 和 scFVs 一同注射体内, 并研究了抗体在肿瘤中的吸收和保留情况. 结果显示, 在 CPPs 的帮助下, 抗体在肿

瘤中的停留能力明显改善, 并呈现更加均一的分布. 同时, CPPs 的存在也没有改变抗体的特异性识别能力, 共轭分子更加倾向定位于癌变后的部分而非正常组织. 上述工作无疑对改善目前放射免疫疗法的治疗效果具有重要意义.

2.1.4 利用 CPPs 克服化疗药物耐药性

对于多药耐药性的产生而言, 其最常见的一种机制是由于肿瘤细胞过量表达了某些膜蛋白, 即药物流出泵^[33]. 这些蛋白能够以能量依赖的形式将被动进入胞内的药物泵出细胞, 导致细胞对一系列化疗制剂都产生耐药, 严重影响了药物的疗效. 由于 CPPs 能够携带货物分子以主动而非被动的方式穿透细胞膜, Dubikovskaya 等^[34]提出设想, 将化疗药物与 CPPs 设计形成复合物, 则该复合物就可以通过非被动的途径进入细胞, 能有效减少药物的泵出. 他们将穿透肽 Octaarginines(十聚精氨酸)与应用广泛的化疗药物紫杉醇通过二硫键进行连接. 当该复合物进入细胞后, 该共价键能够在胞内高浓度谷胱甘肽作用下发生断裂, 这时 CPPs 将与紫杉醇相分离, 以减小 CPPs 对药物活性的干扰. 结果证实, 无论是采用细胞系还是动物模型, 复合物显示出的活性均高于紫杉醇单独用药. 甚至在紫杉醇耐药的细胞中, 也能观察到药物活性的发挥. 同时, 由于 Octaarginines 中的精氨酸能够迅速地吸附聚集在细胞膜上, 当复合物通过腹腔注射入小鼠体内后, 药物分子能够快速地在注射部位附近, 既能增加肿瘤部位药物的浓度, 亦可减小对机体的整体毒性. 这一实验提出了利用 CPPs 与药物分子通过可逆二硫键形成复合物, 克服化疗药物耐药性的思路, 鉴于许多抗菌和抗寄生虫药物耐药性的产生也是源于药物流出泵的作用, 因此该应用还具有进一步拓展的空间.

2.1.5 具备肿瘤细胞毒性的 CPPs 蛋白

p14ARF 是一种非常有效的肿瘤抑制物, 其基因在肿瘤组织中经常受到下调^[35]. 2000 年, 有报道称, p14ARF N 端 22 个氨基酸组成的多肽能够发挥并模拟完整蛋白的功能^[36-37]. 后续研究发现这个多肽序列中含有 20% 精氨酸, 符合 CPPs 的一些序列特征. 结果证实, 该肽能够穿透细胞膜, 其能力与已知的穿透肽 Transportan 10 相当. 同时, 这个肽还保留了 p14ARF 的细胞毒性, 能导致共孵育细胞的增殖能力下降 45%^[9]. 另一个同时具备抗增殖和细胞穿透能力的 CPPs 是来自铜绿假单胞菌分泌蛋白的 Azurin^[8]. 结构与功能研究发现, 该蛋白

质序列中第 50~67 位氨基酸的片段(p18)以及第 50~77 位氨基酸的片段(p28)分别具有优先内化肿瘤分子和抑制细胞增殖的作用。

2.2 CPPs 在抗菌剂领域

虽然 CPPs 的功能在种类广泛的哺乳动物细胞中都得到了研究和验证, 但是其对于细菌、真菌和酵母细胞影响的认识却相对有限。考虑到大部分 CPPs 分子序列中含有阳离子或是呈现兼性, 而這些特点与某些具有膜活性的抗菌肽分子非常类似, Nekhotiaeva 等^[38]开始注意到 CPPs 作为抗菌剂的潜力。TP10 和 pVEC 已被证实能够在几分钟内迅速地在细胞膜表面聚集, 进而穿透细菌和真菌的细胞膜。在已验证对 HeLa 细胞相对无害的较低浓度下, TP10 可以抑制白色念珠菌和金黄色葡萄球菌的生长, 而 pVEC 则能抑制包皮垢分支杆菌的生长。换言之, 虽然 TP10 和 pVEC 可以内化所有已测试的细胞, 但是它们却优先破坏微生物类型的细胞。事实上, 这种能力的差异, 足以帮助清除 HeLa 细胞培养物中感染的金黄色葡萄球菌。近年来, Holm 等^[39]研究比较了 pVEC、Penetratin 和 (KFF) 3K 三种 CPPs 内化酿酒酵母和白色假丝酵母的能力, 并发现 pVEC 和 (KFF) 3K 均能够高效转导进入酵母细胞中。此后, 该小组还首次研究发现 5 条 CPPs 在亚微摩尔的浓度下显示出较高的抗合轴马拉色菌的活性, 同时在此浓度下对人类角质细胞不造成膜损伤^[40]。该成果预示了部分 CPPs 在治疗过敏性湿疹、溢脂性湿疹以及头皮屑等皮肤疾病中的潜在应用价值。当然, 目前 CPPs 作为抗菌剂的潜力和价值还有待于进一步的发掘。

2.3 CPPs 在炎症靶向治疗领域

如上所述, 处于融合单层 MDCK 细胞外的 CPPs 其内化效率会发生显著下降, 而当 MDCK 细胞位于分化状态时, 上述现象则会出现逆转。Foerg 等^[41]发现, 类似的变化也出现在用 IFN- γ 和 TNF- α 混合物预处理过的融合单层 MDCK 细胞中。在炎症肠道疾病以及炎症呼吸道相关疾病过程中, 炎症上皮细胞将特征性地释放大量细胞因子, 并发生屏障功能的严重障碍。采用干扰素 γ (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 混合物预处理融合单层 MDCK 细胞, 可以从一定程度上模拟炎症状态的上皮细胞。研究发现, 与未经处理的融合单层 MDCK 细胞相比较, CPPs 穿膜进入预处理后细胞的能力得到显著提高。同时, 这种能力的提高与细胞上清中炎症因子的浓度呈现正向相关性, 并最大

可提高恢复至 90%。这一现象提示, 在炎症条件下, MDCK 细胞中与脂筏微区相关的 TJ 蛋白可能发生了重新分布和组合, 继而在 MDCK 中重新打开了脂筏介导的内吞通路^[42]。Rothbard 等^[43]也对 CPPs 的抗炎应用进行了研究, 他将环孢菌素 A (cyclosporine A) 与七聚精氨酸进行共轭结合得到复合物 R7-CsA, 并通过局部给药的方式导入体内。实验证实, 非修饰的环孢菌素 A 无法穿透皮肤, 而 R7-CsA 则可以有效进入小鼠和人体皮肤, 并到达真皮 T 淋巴细胞, 进而抑制皮肤炎症^[44]。上述结果均揭示出 CPPs 携带抗炎药物用于炎症靶向治疗的潜在应用价值。结合自身的研究方向, 我们利用呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 感染呼吸道上皮细胞 (tracheal epithelial cell, TEC) 表面表达的差异蛋白, 正在应用噬菌体随机肽库筛选特异性靶向 RSV 感染呼吸道上皮细胞的穿透肽, 该项工作旨在为实现抗 RSV 感染药物的靶向治疗奠定基础。

2.4 CPPs 的临床应用研究

由于 CPPs 能够携带外源物质进入各种类型的细胞, 甚至透过各种生理屏障, 因此, 目前 CPPs 的药物临床研究主要集中在中枢退行性疾病 (老年性痴呆和帕金森氏症)、脑缺血 (中风)、疼痛、心肌梗死和恶性肿瘤等疾病的治疗上。而给药途径几乎包括了临床所有的方式, 包括口服、注射给药 (肌肉、静脉、皮下)、皮肤涂剂^[45]、黏膜给药和鼻腔喷雾^[46]等等。我国的相关研究大多尚处于临床前研究阶段。付爱玲等^[43]利用 Tat (47~57) 与胆碱乙酰基转移酶进行连接, 采用腹腔注射、静脉注射或者黏膜给药等方式给予老年性痴呆模型小鼠。在避暗实验中, 偶联物可延长模型小鼠进入暗室的记忆保留时间; 在水迷宫实验中, 可缩短动物自起点至终点的游泳时间。这些结果说明该偶联物具有增强实验动物学习记忆的作用, 进而有可能成为治疗老年性痴呆的药物。近年, 他们将罗丹明 B 标记的狂犬病毒糖蛋白衍生肽 (rabies virus glycoprotein derived peptide, RDP) 注射入昆明小鼠体内, 冷冻切片观察其在体内的分布, 结果发现该肽能快速地穿过血脑屏障分布于中枢神经系统, 从而为治疗中枢神经系统的药物开发提供新的思路^[47]。张洪杰等^[45]在思考小 RNA 的体内给药途径问题后, 选取皮肤相关的疾病 (如色斑代谢异常症和银屑病) 作为模型, 通过局部给药, 实现了小 RNA 给药的组织专一性, 在 CPPs 携带小 RNA 的临床应用方面做

出了有益的尝试. 在美国食品药品监督管理局(FDA), 已有数条 CPPs 相关药物进入了临床试验阶段, 其中包括 AZX100 [Capstone Therapeutics(<http://www.capstonethx.com/>); 瘢痕疙瘩; II 期], RT001 [ReVance Therapeutics (<http://www.revance.com/>); 皮肤皱纹; II 期], KAI-9803 [KAI Pharmaceuticals (<http://www.kaipharma.com/>); 心肌梗塞; II 期]和 XG-102 [Auris Medical (<http://www.aurismedical.com/>); 听力丧失; II 期]. 而 DTS-108 (Diatos SA; 肿瘤)则正处在临床前研究阶段^[46].

3 结 语

20 多年来, 为了实现将药物活性分子导入细胞内却不影响细胞正常生理功能的愿望, 人们开始大量关注 CPPs. 随着 CPPs 应用研究的不断开展和深入, 其局限性逐渐得到认识. 与此同时, 通过不断的探索和改进, CPPs 在某些方向和领域的应用前景却得到了高度肯定, 研究成果正逐步向临床应用方面转化. 有理由相信, CPPs 作为目前实现细胞内运输最为有效的手段之一, 一定会在其应用领域的深度和广度上取得进一步的拓展, 从而为人类健康事业做出更多的贡献.

参 考 文 献

- [1] Mussbach F, Franke M, Zoch A, *et al.* Transduction of peptides and proteins into live cells by cell penetrating peptides. *J Cell Biochem*, 2011, **112**(12): 3824–3833
- [2] Chiu Y L, Ali A, Chu C Y, *et al.* Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. *Chem Biol*, 2004, **11**(8): 1165–1175
- [3] El A S, Said H F, Boisguerin P, *et al.* Cell-penetrating peptides-based strategies for the delivery of splice redirecting antisense oligonucleotides. *Methods Mol Biol*, 2011, **764**: 75–89
- [4] Rothbard J B, Garlington S, Lin Q, *et al.* Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat Med*, 2000, **6**(11): 1253–1257
- [5] Santra S, Yang H, Stanley J T, *et al.* Rapid and effective labeling of brain tissue using TAT-conjugated CdS: Mn/ZnS quantum dots. *Chem Commun (Camb)*, 2005, **7**(25): 3144–3146
- [6] Lewin M, Carlesso N, Tung C H, *et al.* Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow *in vivo* tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(4): 410–414
- [7] Suhorutsenko J, Oskolkov N, Arukuusk P, *et al.* Cell-penetrating peptides, PepFects, show no evidence of toxicity and immunogenicity *in vitro* and *in vivo*. *Bioconjug Chem*, 2011, **22**(11): 2255–2262
- [8] Taylor B N, Mehta R R, Yamada T, *et al.* Noncationic peptides obtained from azurin preferentially enter cancer cells. *Cancer Res*, 2009, **69**(2): 537–546
- [9] Johansson H J, El-Andaloussi S, Holm T, *et al.* Characterization of a novel cytotoxic cell-penetrating peptide derived from p14ARF protein. *Mol Ther*, 2008, **16**(1): 115–123
- [10] Fonseca S B, Pereira M P, Kelley S O. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, **61**(11): 953–964
- [11] Wadia J S, Stan R V, Dowdy S F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med*, 2004, **10**(3): 310–315
- [12] Liu B R, Lo S Y, Liu C C, *et al.* Endocytic trafficking of nanoparticles delivered by cell-penetrating peptides comprised of nona-arginine and a penetration accelerating sequence. *PLoS One*, 2013, **8**(6): e67100
- [13] Koppelhus U, Awasthi S K, Zachar V, *et al.* Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2002, **12**(2): 51–63
- [14] Elmquist A, Langel U. *In vitro* uptake and stability study of pVEC and its all-D analog. *Biol Chem*, 2003, **384**(3): 387–393
- [15] Verdurmen W P, Bovee-Geurts P H, Wadhvani P, *et al.* Preferential uptake of L- versus D-amino acid cell-penetrating peptides in a cell type-dependent manner. *Chem Biol*, 2011, **18**(8): 1000–1010
- [16] Foerg C, Merkle H P. On the biomedical promise of cell penetrating peptides: limits versus prospects. *J Pharm Sci*, 2008, **97**(1): 144–162
- [17] Foerg C, Weller K M, Rechsteiner H, *et al.* Metabolic cleavage and translocation efficiency of selected cell penetrating peptides: a comparative study with epithelial cell cultures. *AAPS J*, 2008, **10**(2): 349–359
- [18] Violini S, Sharma V, Prior J L, *et al.* Evidence for a plasma membrane-mediated permeability barrier to Tat basic domain in well-differentiated epithelial cells: lack of correlation with heparan sulfate. *Biochemistry*, 2002, **41**(42): 12652–12661
- [19] Trehin R, Krauss U, Muff R, *et al.* Cellular internalization of human calcitonin derived peptides in MDCK monolayers: a comparative study with Tat (47-57) and penetratin (43-58). *Pharm Res*, 2004, **21**(1): 33–42
- [20] Foerg C, Ziegler U, Fernandez-Carneado J, *et al.* Differentiation restricted endocytosis of cell penetrating peptides in MDCK cells corresponds with activities of Rho-GTPases. *Pharm Res*, 2007, **24**(4): 628–642
- [21] Qualmann B, Mellor H. Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. *Biochem J*, 2003, **371**(Pt 2): 233–241
- [22] Jou T S, Leung S M, Fung L M, *et al.* Selective alterations in biosynthetic and endocytic protein traffic in Madin-Darby canine kidney epithelial cells expressing mutants of the small GTPase Rac1. *Mol Biol Cell*, 2000, **11**(1): 287–304
- [23] Leung S M, Rojas R, Maples C, *et al.* Modulation of endocytic traffic in polarized Madin-Darby canine kidney cells by the small GTPase RhoA. *Mol Biol Cell*, 1999, **10**(12): 4369–4384
- [24] Noren N K, Niessen C M, Gumbiner B M, *et al.* Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J Biol Chem*, 2001,

- 276(36): 33305–33308
- [25] Macewan S R, Chilkoti A. Harnessing the power of cell-penetrating peptides: activatable carriers for targeting systemic delivery of cancer therapeutics and imaging agents. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2013, **5**(1): 31–48
- [26] Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, *et al.* Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. Angew Chem Int Ed Engl, 2010, **49**(36): 6288–6308
- [27] Koren E, Apte A, Jani A, *et al.* Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. J Control Release, 2012, **160**(2): 264–273
- [28] Park B W, Zhang H T, Wu C, *et al.* Rationally designed anti-HER2/neu peptide mimetic disables P185HER2/neu tyrosine kinases *in vitro* and *in vivo*. Nat Biotechnol, 2000, **18**(2): 194–198
- [29] Essler M, Ruoslahti E. Molecular specialization of breast vasculature: a breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99**(4): 2252–2257
- [30] Myrberg H, Zhang L, Mae M, *et al.* Design of a tumor-homing cell-penetrating peptide. Bioconjug Chem, 2008, **19**(1): 70–75
- [31] Batra S K, Jain M, Wittel U A, *et al.* Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. Curr Opin Biotechnol, 2002, **13**(6): 603–608
- [32] Jain M, Chauhan S C, Singh A P, *et al.* Penetratin improves tumor retention of single-chain antibodies: a novel step toward optimization of radioimmunotherapy of solid tumors. Cancer Res, 2005, **65**(17): 7840–7846
- [33] Pauwels E K, Erba P, Mariani G, *et al.* Multidrug resistance in cancer: its mechanism and its modulation. Drug News Perspect, 2007, **20**(6): 371–377
- [34] Dubikovskaya E A, Thorne S H, Pillow T H, *et al.* Overcoming multidrug resistance of small-molecule therapeutics through conjugation with releasable octaarginine transporters. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, **105**(34): 12128–12133
- [35] Bates S, Phillips A C, Clark P A, *et al.* p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. Nature, 1998, **395**(6698): 124–125
- [36] Lohrum M A, Ashcroft M, Kubbutat M H, *et al.* Contribution of two independent MDM2-binding domains in p14 (ARF) to p53 stabilization. Curr Biol, 2000, **10**(9): 539–542
- [37] Midgley C A, Desterro J M, Saville M K, *et al.* An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination *in vitro* and can activate p53 *in vivo*. Oncogene, 2000, **19**(19): 2312–2323
- [38] Nekhotiaeva N, Elmquist A, Rajarao G K, *et al.* Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell-penetrating peptides. FASEB J, 2004, **18**(2): 394–396
- [39] Holm T, Netzereab S, Hansen M, *et al.* Uptake of cell-penetrating peptides in yeasts. FEBS Lett, 2005, **579**(23): 5217–5222
- [40] Holm T, Bruchmann J, Scheynius A, *et al.* Cell-penetrating peptides as antifungals towards *Malassezia sympodialis*. Lett Appl Microbiol, 2012, **54**(1): 39–44
- [41] Nasrollahi S A, Taghibiglou C, Azizi E, *et al.* Cell-penetrating peptides as a novel transdermal drug delivery system. Chem Biol Drug Des, 2012, **80**(5): 639–646
- [42] Kamei N, Nielsen E J, Khafagy E, *et al.* Noninvasive insulin delivery: the great potential of cell-penetrating peptides. Ther Deliv, 2013, **4**(3): 315–326
- [43] Fu A L, Li Q, Dong Z H, *et al.* Alternative therapy of Alzheimer's disease *via* supplementation with choline acetyltransferase. Neurosci Lett, 2004, **368**(3): 258–262
- [44] 王逸麟, 付爱玲. 狂犬病毒糖蛋白衍生物作为靶脑载体初探. 科学技术与工程, 2011, **11**(36): 8974–8977
- Wang Y L, Fu A L. Science Technology and Engineering, 2011, **11**(36): 8974–8977
- [45] 张洪杰, 殷勤伟. 细胞穿透肽及其结构改造在 siRNA 传递中的应用. 生物化学与生物物理进展, 2012, **39**(5): 402–409
- Zhang H J, Yin Q W. Prog Biochem Biophys, 2012, **39**(5): 402–409
- [46] Milletti F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discov Today, 2012, **17**(15–16): 850–860

Progress of Cell Penetrating Peptides Application as Delivery Agent*

LIU Yun, LI Jin-Mei, TAN Ting, JIANG Yong**

(Department of Pathophysiology, Key Laboratory of Proteomics of Guangdong Province, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract Cell penetrating peptide (CPP) is a kind of small peptide with the capability of penetrating through cell membrane, which provides efficient tools for achieving intracellular access for macromolecular drugs. At present, it has obtained widespread attention and extensive research. Although it has been found recently that many problems hinder the process of its application research and development, such as drug release rate, metabolic degradation, cell lines and differentiation status and Rho GTPases activity dependence, lots of progress has been made in the research of CPPs in cancer treatment, antibacterial and anti-inflammatory targeted drugs, some of which even has entered the stage of preclinical and clinical research. In this article, we focus on two aspects, the challenges and new opportunities in the studies of CPP application, to summarize the recent research progress, and highlight the prospect of new fields of CPP application in the future.

Key words cell penetrating peptide (CPP), application, research progress, challenges, opportunities

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00336

* This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2010CB529704), The National Natural Science Foundation of China (81030055), The Natural Science Foundation of Guangdong Province (10251051501000003), Doctoral Fund of Ministry of Education of China (20104433120008), Scientific Research Foundation of Southern Medical University in 2012 and Medical Science and Technology Research Foundation of Guangdong Province (A2013354).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-61648231, E-mail: yjiang@fimmu.com

Received: December 1, 2013 Accepted: February 26, 2014