

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.06.0774

• 综述 •

细胞穿膜肽在抗肿瘤靶向治疗中的研究进展

宫春爱, 胡楚玲, 顾芬芬, 夏清明, 高原, 高申*

第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433

[摘要] 随着生物技术的发展, 生物大分子在疾病治疗中的作用愈加重要, 如蛋白质、寡核苷酸、多肽等。但是由于细胞膜的天然屏障作用, 这些生物大分子的实际应用受到限制。细胞穿膜肽(cell-penetrating peptides, CPPs)是一类具有较强细胞膜穿透能力的小分子短肽, 可携带多种大分子物质进入细胞。本文综述了作为纳米载体的 CPPs 的分类及跨膜机制, 以及近年其在抗肿瘤靶向治疗中的研究进展。

[关键词] 细胞穿膜肽; 肿瘤; 纳米医学; 靶向治疗

[中图分类号] R 730.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)06-0774-06

Research progress of cell-penetrating peptides in tumor-targeted therapy

GONG Chun-ai, HU Chu-ling, GU Fen-fen, XIA Qing-ming, GAO Yuan, GAO Shen*

Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Advances in biotechnology give much importance to the therapeutic biomacromolecules in the therapy of diseases, such as proteins, oligonucleotides, and peptides. But their effects are limited in practical application because of cell membrane barrier. Cell-penetrating peptides (CPPs) are promising oligopeptides with a remarkable capacity for membrane translocation, which can carry various macromolecules into cells. In this paper, we reviewed the classification and transmembrane mechanism of CPPs as nanoparticles, with particular focus on their recent progress in tumor-targeted therapy.

[Key words] cell penetrating peptides; neoplasmas; nanomedicine; targeted therapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(6): 774-779]

由于细胞膜的天然屏障作用, 许多生物大分子很难进入细胞发挥疗效, 为克服这一障碍, 需要采用人工手段促进这些生物大分子跨细胞膜, 如电穿孔、显微注射、重组质粒等。虽然这些方法应用广泛, 但存在很多局限性, 如细胞毒性大、转入效率低等。在肿瘤治疗过程中, 常规的化疗、放疗药物没有选择性, 会不可避免地损伤正常细胞。因此, 开发针对肿瘤细胞的靶向载体可大大提高肿瘤的治疗效果而不损伤正常细胞。

1988年, Green 和 Loewenstein^[1] 报道称人类免疫缺陷病毒(HIV)转录激活因子(transactivator of transcription, Tat)能单独进入细胞。1994年, Fawell等^[2]报道 Tat 蛋白能介导外源性蛋白进入细

胞, 且负责转导的部位是 Tat 蛋白的 47~57 位氨基酸, 被称作“Tat 蛋白转导结构(peptide transduction domain, PTD)”, 即蛋白转导域, 也被称为细胞穿膜肽(cell-penetrating peptides, CPPs)。此后, CPPs 很快被用于药物靶向和导入的研究, 发现其可以有效地将亲水性蛋白质和多肽^[3]、核苷酸^[4]、小分子药物等导入细胞, 开辟了介导药物进入细胞的新途径。本文综述了 CPPs 在纳米靶向抗肿瘤治疗领域的研究进展, 旨在为抗肿瘤治疗提供新的参考。

1 CPPs 分类

CPPs 是一个庞大的家族, 其分类依据有来源、功能、序列、摄入机制、生物学应用等, 目前尚未统一。

[收稿日期] 2016-11-16 **[接受日期]** 2017-04-12

[基金项目] 国家自然科学基金(81372762, 81672516, 81672545)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81372762, 81672516, 81672545)。

[作者简介] 宫春爱, 硕士。E-mail: gongchunai@163.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81873715, E-mail: ggss99@126.com

基于 CPPs 的物理化学性质, CPPs 被分成阳离子型、两亲性、疏水型 3 类, 应用比较广泛的是阳离子型和两亲性 CPPs

1.1 阳离子型 CPPs 阳离子型 CPPs 是指其短肽序列主要含有精氨酸、赖氨酸及组氨酸的多肽, 这类多肽通过其正电荷与细胞膜上的负电荷相互作用, 通过一种非受体依赖的方式进入细胞, 包括 Tat、Antp-(43/58) (RQIKIYFQNRRMKWKK)、果蝇的触角足突变蛋白、小寡聚精氨酸、小寡聚赖氨酸等^[5]。其中第 1 条被发现的穿膜肽 Tat (RKKKRRQRRR) 是从 HIV-1 蛋白中分离出来的。Wender 等^[6]发现 Tat(49~57) (RKKRRQRRR) 中阳离子型氨基酸残基的存在是 Tat 发挥穿膜作用的关键。Hsieh 等^[7]将穿膜肽 Tat (YGRKKRRQRRR) 与核定位信号 (NLS, RKRRK)、 β -连环素/淋巴增强因子 1 结合域 (β -catenin/LEF-1 binding domain, BLBD) 结合形成 Tat-NLS-BLBD-6 融合肽, 其中淋巴增强因子 1 (LEF-1) 的前 76 个氨基酸可以有效地和 β -catenin 反应; β -catenin/LEF-1 复合物是一种核响应转录因子, 参与调节 Wnt 信号通路, 表明 TAT-NLS-BLBD-6 融合肽是一种有前景的通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号进而抑制乳腺癌的 CPPs。

在阳离子型氨基酸(组氨酸、精氨酸、鸟氨酸等)中, 精氨酸是比较有潜力的 CPPs。研究显示 5~11 个精氨酸连续串联具有较强的细胞膜穿透能力, 其中八聚精氨酸最有效^[8]。Lee 研究小组^[9]研究显示富含组氨酸和精氨酸的穿膜肽 HR₉ (C-H₉-R₉-H₅-C) 结合量子点 (QD) 可以在 4 min 内进入细胞; 即使在 E-肌动蛋白聚合和主动转运被制止的情况下, 细胞对 HR₉/QD 复合物的摄取也不会被抑制, 提示 HR₉ 具有较强的细胞膜穿透能力。上述研究表明在纳米粒子表面修饰富含精氨酸的 CPPs 可以促进药物通过直接跨膜机制进行输送, 而不会影响治疗效果。分析其机制可能是由于精氨酸结构中的胍基和细胞膜上具有负电荷的黏多糖结合形成了比较牢固的二齿状氢键, 其产生的离子对在膜电位作用下易位穿过细胞膜, 采取一种非受体依赖的方式进入细胞, 进而在膜内部分离, 释放 CPPs 到细胞质中。有研究表明, 将精氨酸中的胍基和可质子化的氨基结构进行自组装, 形成胍基化的赖氨酸多肽, 胍基化的赖氨酸多肽比氨基化的赖氨酸多肽以及含有胍基的精氨酸多肽呈现出的细胞膜亲和力更强, 并且具有低浓度时转染效率高、溶

酶体逃逸功能强、细胞毒性低等优势^[10]。Li 等^[11]发现与精氨酸结构相似的胍基吡咯环结构 (GCP) 与阳离子多肽 (Ka)₄ 组装后具有惊人的基因转染能力。另有研究显示支化的精氨酸与线状精氨酸相比穿膜效应更强; 此外, 该研究中的 CPPs 不仅具有细胞穿膜效应, 且具有 pH 响应性, 可在酸性条件下引发 pH 敏感脂质体包封药物的释放^[12]。

1.2 两亲性 CPPs 两亲性 CPPs 大多含有带正电荷的赖氨酸, 同时具有疏水性和亲水性尾部, 用于介导多肽通过细胞膜进入细胞, 包括支多抗原肽 (MAP) 及它的类似物、转运素^[13]。两亲性 CPPs 的两亲性特征主要表现在其一级和二级结构中。一级结构是具有高亲水性的 N 端和高疏水性的 C 端。两亲性 CPPs 的一级结构基础是信号肽系列或融合肽结合亲水性的核定位序列, 它们与药物结合形成共价键或形成疏水或静电的复合物。Fernández-Carneado 等^[13]设计的两亲载体 FP₅ 一级结构中的疏水部分来源于 HIV-1 的 gp41 蛋白, 亲水性部分来源于病毒 SV40 的核定位序列 (PKKKRKV)。二级结构依赖于分子特定的构象产生, 极性氨基酸残基和非极性氨基酸残基各指向一面。

两亲性 CPPs 中的疏水部分可与细胞膜表面结合, 另一端带正电的部分则可以通过静电作用与带负电的基因结合, 压缩基因药物, 从而起到共载基因的作用。Kamat 等^[14]发现 R₃F₃ 多肽可以压缩 RNA 并能透过细胞膜。两亲性 CPPs 对核苷酸类分子的转运是以跨膜为主的传递模式, 其中蜂毒素 (melittin, MLT) 就是该类 CPPs 的典型代表。MLT 是蜂毒天然抗菌肽, 1~20 位为疏水性氨基酸 N 端, 构成疏水核心区, 具有很强的亲脂性; 21~24 位为带正电荷的氨基酸, 具有较强的亲水性。其疏水核心对跨越细胞膜至关重要; 而 21~24 位氨基酸则可能具有核定位功能, 可以促进外源物质在细胞核内聚集。有研究表明, MLT 疏水性短肽可以增强聚乙炔亚胺的基因转染效率^[15]。

富含脯氨酸的多肽作为一种两亲性 CPPs 也受到了学者们的关注, 其脯氨酸的吡咯烷结构与疏水性基团(如脂肪酸类和含硅的脯氨酸)连接后, 细胞内化能力显著提高。Pujals 等^[16]研究用两亲性的富含脯氨酸的穿膜肽 SAP 输送金纳米粒子 (AuNP), 发现 SAP 可通过半胱氨酸形成硫醇化合物吸附在金纳米粒子上, 表明其具有巨大的诊断和治疗潜力。

1.3 疏水性 CPPs 疏水性 CPPs 包括来源于卡波西式肉瘤的成纤维细胞生长因子 (K-FGF)、成纤维

细胞生长因子 12 (FGF-12)。Ryu 等^[17] 研究发现, 疏水性的氨基酸可以增强短阳离子多肽的细胞摄取能力。疏水性 CPPs 是两亲性 CPPs 中的重要组成部分。短多聚精氨酸本身传递小 RNA 的能力较弱, 通常需要适当的疏水基团, 如 R₃V₆ 肽通过 6 个疏水缬氨酸使多肽具有疏水和亲水两性肽的性质, 从而使其自身能在水溶液中形成胶束。

2 CPPs 穿膜机制

关于 CPPs 的穿膜机制目前仍存有较大争议, 其机制可能与 CPPs 的物理化学性质、浓度、电荷、长度有关, 还可能与 CPPs 所运载的药物分子的类型、尺寸、电荷有关, 从而导致药物分子在体内产生不同的治疗效果。CPPs 的穿膜机制可分成 3 类: 胞吞介导的途径、倒转胶束模型、地毯式模型^[18]。

2.1 胞吞介导的途径 大多数 CPPs 通过胞吞机制进入细胞, 通常包括两步, 即内吞和溶酶体逃逸。内吞主要包括网格蛋白介导的内吞、非网格蛋白介导的内吞(由脂质筏介导的内吞或胞膜内陷)、微胞饮作用。CPPs 通过内吞进入细胞的机制很多, 而 CPPs 进入细胞后也可能发生溶酶体逃逸, 因此, CPPs 在细胞内的分布也不尽相同。Tat 融合大分子时主要在内涵体内, 而黏附小分子时主要分布在细胞质中, 表明 CPPs 所输送药物分子的类型和尺寸很可能影响其细胞摄取途径和分布^[19]。

2.2 倒转胶束模型 1996 年, Derossi 等^[20] 首次报道 CPPs 可能通过倒转胶束进入细胞, 他们假设 pAntp 进入细胞是通过倒转胶束或者流动相吞饮模型, 通过替代 CPPs 中对倒转胶束的形成起关键作用的色氨酸残基, 发现其穿透能力丧失, 为倒转胶束机制提供了有力证据。在低温条件下富含精氨酸和赖氨酸的 CPPs 可以穿透细胞膜, 提示其穿膜机制可能为能量非依赖型, 且不依赖任何膜受体^[21]。倒转胶束模型中富含阳离子氨基酸残基的 CPPs 可与细胞膜表面带负电荷的磷脂相结合, 进一步选择性地透过细胞膜^[22]。

2.3 地毯式模型 地毯式模型首次被提出时是用于解释某些抗菌肽的穿膜机制^[18]。CPPs 通过分子运动与细胞膜双分子层相互作用, 与磷脂头部外层和里层的脂单层结合使脂质双分子层稀疏, 从而穿透细胞膜。而高浓度 CPPs 可使细胞膜产生瞬时孔隙, 这可以解释一些高浓度 CPPs 的毒性作用^[23]。

2.4 其他 阳离子型 CPPs 是以直接的自适性易位通过细胞膜。亲水性带电荷的多肽一般不能直接

移动通过疏水性的磷脂双分子层, 对此, Rothbard 等^[24] 将阳离子型 CPPs 与带负电荷的细胞膜结合形成短暂性的离子对复合物, 使复合物中带正电荷的多肽介导其自适性的扩散通过细胞膜。Hirose 等^[25] 发现, 疏水性小分子与多聚十二精氨酸(R₁₂) CPPs 通过在细胞膜上形成“颗粒状”的多囊泡结构进入细胞, 而当 R₁₂ 连接疏水性荧光染料 Alexa Fluor[®] 488 或来源于血细胞凝集素多肽时, “颗粒状”多囊泡的形成显著加快。药物分子的化学特性也可能增加 R₁₂ 多肽的穿透能力^[22]。Henriques 等^[26] 研究发现一种富含二硫键的多肽可与 CPPs 连接形成大环寡肽 kalata B1, kalata B1 能以内吞和直接易位的机制进入细胞, 且这两种机制都是靶向细胞膜上的磷脂酰乙醇胺磷脂, 诱导细胞膜“弯曲”。这种不寻常的内化机制可以用在肿瘤细胞中, 因为肿瘤细胞膜表面暴露有较高的磷脂酰乙醇胺磷脂成分, 推测 CPPs 可作为一种有潜力的药物载体在细胞内调节蛋白-蛋白相互作用。

总之, 关于 CPPs 的跨膜机制至今尚未完全清楚, 是一种机制占主导地位, 还是多个机制共同发挥作用, 有待探索。此外, CPPs 与不同化学特性的药物分子连接时, 药物分子对其穿膜机制的影响, 以及 CPPs 入胞之后的定位及其与溶酶体等有关代谢和降解的问题, 至今尚未明确。

3 CPPs 在抗肿瘤靶向治疗中的应用

虽然 CPPs 能够有效地输送药物进入细胞, 但是往往缺乏特异性。而肿瘤的产生和发展伴随着基因和蛋白的一系列代谢变化, 导致肿瘤细胞与正常细胞有所区别; 此外, 由于其特有的肿瘤微环境, 导致肿瘤细胞比正常细胞有过表达的受体、周边组织的微酸环境和肿瘤组织中特有的基质金属蛋白酶(MMP)。因此, 研究者们利用肿瘤的生理特征设计了一系列修饰 CPPs, 在到达靶部位之前掩盖其穿膜活性, 避免正常组织中的非特异性摄取; 到达靶部位后, 在肿瘤微环境的响应下暴露 CPPs, 携带药物分子进入细胞, 使摄取能力大大提高, 最终靶向输送治疗药物至肿瘤细胞, 实现抗肿瘤靶向治疗。

实体瘤部位具有微酸性, 其微环境中 pH 值为 6.5, 肿瘤细胞内 pH 值为 4.5~5.5^[27], 针对该特点可以实现环境响应型靶向抗肿瘤。Zhao 等^[12] 将肿瘤特异性 pH 响应的穿膜多肽[H₇K(R₂)₂]作为载体修饰胶束, 顺利输送紫杉醇进入肿瘤细胞, 评估了其在人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、人乳腺癌细胞

MCF-7 中的体外抗肿瘤效应。此后,该研究组又进一步将载体修饰在 pH 敏感的脂质体上,并在其中负载多柔比星,结果发现该复合脂质体对神经胶质瘤的靶向作用和抗肿瘤效应都大大提高^[28]。Sun 等^[29]报道了一种可以在 pH 值为 6.5 时断裂的 Dlink 键,将具有长循环功能的亲水性聚噁唑啉 [poly(2-ethyl-2-oxazoline), PEOz] 或聚乙二醇 (PEG) 与 Dlink 键连接,使纳米粒子在高通透性和滞留 (enhanced permeability and retention, EPR) 效应及长循环作用下在肿瘤部位富集,在微酸性条件下 Dlink 键断裂,暴露内层 CPPs,实现肿瘤微环境敏感的靶向,避免了 CPPs 穿透正常细胞。Nishimura 等^[30]报道了一种可以促进溶酶体逃逸的 GALA 肽,该多肽为两亲性、pH 敏感型;当 pH 值为 5 时,质子化的谷氨酸具有膜融合能力。pH 敏感的嵌段还有胍键,其在肿瘤酸性微环境下可发生断裂,进而暴露 CPPs,完成穿膜^[31]。

肿瘤不仅具有酸性微环境,肿瘤细胞中谷胱甘肽 (GSH) 的浓度还是胞外或循环系统的 100~1 000 倍(胞内约 2~10 mmol/L,胞外仅为 2~20 μ mol/L)^[32]。当携带药物的纳米胶束进入肿瘤细胞中时,其二硫键在高浓度 GSH 作用下打开,导致载体降解,纳米胶束在胞内释放药物发挥药效。Fu 等^[33]通过二硫键将 PEG 与紫杉醇和 Tat 修饰的脂质体相连接 (PTX-C-Tat-LP),到达肿瘤部位后,二硫键在还原性 GSH 的作用下断裂脱去 PEG,暴露 CPPs;高浓度 GSH 的肿瘤微环境使 C-Tat-LP 具有增强的细胞摄取能力和改善的三维立体肿瘤渗透能力,表明 C-Tat-LP 作为肿瘤靶向药物载体具有很大的应用前景。

MMP 是一类金属离子依赖的蛋白水解酶,在肿瘤细胞内高表达,而在正常细胞中水平很低^[34]。研究发现对 MMP-2 敏感的八肽 (pp, GPLGIAGQ) 已经在聚合物胶束、siRNA 等输送上取得很好的疗效^[35-36],近年来研究设计了一种刺激响应型自组装多功能聚合物 PEG-ppTat-DOX,其中 Tat 为 CPPs,研究将 MMP 敏感的肽与 PEG 相连,避免载药纳米粒子被内皮系统吞噬,结果显示该纳米复合物能高效地靶向输送抗肿瘤药物和增强化疗药物治疗效果^[37]。

核苷酸可用于治疗各种基因性疾病,但由于核苷酸类物质的尺寸较大且带有负电荷,导致其不能有效地被细胞摄取。近年来将核苷酸与 CPPs 通过非共价键相连形成纳米复合物的研究备受关注。

Margus 等^[38]报道以转运素 10 为基础的新一代来源于新转染肽 PepFect 和 NickFect 家族的 CPPs 可压缩核酸类药物为直径 30~60 nm 的纳米复合物,具有较大的治疗前景。

4 小结与展望

CPPs 可以穿透细胞膜并输送药物分子至靶细胞,克服了传统抗肿瘤药物在输送上的难题。虽然临床前关于 CPPs 介导的小分子、多肽、寡核苷酸等药物分子输送的研究前景良好,但是基于 CPPs 的治疗至今仍未获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 的批准。因此,尚需要进一步的实验研究,以期 CPPs 在临床中得到应用。

有研究表明, CPPs 高效进入细胞后,并不是散落存在于水溶性的细胞质中,而是与细胞内的特异性位点结合^[23]。许多生物微粒是通过不连续的蛋白-蛋白相互作用导致的显性位点失活突变而影响生物进程。研究表明,从富亮氨酸重复受体激酶 2 中获得的生物微粒可间接影响帕金森病的关键治疗靶点^[39]。小的细胞穿透序列包括生物微粒,其具有穿透能力和生物活性,可以实现细胞内靶向进而调节细胞动力学,因此 CPPs 靶向细胞内特异性位点需要进一步研究。

有关 CPPs 作为药物载体的研究还存在许多难题。其一是 CPPs 在输送小分子物质或多肽时,由于蛋白水解作用和快速的肝肾清除而导致其血浆半衰期较短,一般可能要通过使用非天然氨基酸,或将 CPPs 与药物双双嵌入大分子载体中(如脂质体或生物聚合物),或连接亲水性的 PEG、PEOz 等解决。另一个难题就是 CPPs 介导穿膜对肿瘤组织和正常组织缺乏特异性,易发生不良反应。这一般可以根据肿瘤部位区别于正常组织部位所特有的微环境,实现微环境敏感的靶向释药。此外,还可以从不同肿瘤细胞表面高表达的抗原入手,通过寻找合适的靶头实现靶向作用,例如适体 (aptamer) 与单克隆抗体相似,可与靶细胞高亲和力特异性结合。由于适体分子体积更小,比抗体的穿透力更强,连接到药物载体表面时无抗体介导的靶向所产生结合位屏障效应^[40]。Marangoni 等^[41]报道了一种新型适体 CG₃-aptamer (CG₃),为前列腺癌特异性肽的适体,可以实现靶向作用。

目前关于 CPPs 运载系统的研究越来越深入,也为外源性治疗肿瘤的生物大分子或化疗药物高效进入肿瘤细胞提供了全新的思路和途径,具有很大

的发展前景。相信随着多学科交叉应用的深入研究, CPPs 将会在抗肿瘤治疗中发挥越来越重要的作用。

[参考文献]

- [1] GREEN M, LOEWENSTEIN P M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein[J]. *Cell*, 1988, 55: 1179-1188.
- [2] FAWELL S, SEERY J, DAIKH Y, MOORE C, CHEN L L, PEPINSKY B, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 664-668.
- [3] KELLER A A, BREITLING R, HEMMERICH P, KAPPE K, BRAUN M, WITTIG B, et al. Transduction of proteins into leishmania tarentolae by formation of non-covalent complexes with cell-penetrating peptides[J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115: 243-252.
- [4] DE FIGUEIREDO I R, FREIRE J M, FLORES L, VEIGA A S, CASTANHO M A. Cell-penetrating peptides: a tool for effective delivery in gene-targeted therapies[J]. *IUBMB Life*, 2014, 66: 182-194.
- [5] FUTAKI S. Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocation mechanisms[J]. *Int J Pharm*, 2002, 245: 1-7.
- [6] WENDER P A, MITCHELL D J, PATTABIRAMAN K, PELKEY E T, STEINMAN L, ROTHBARD J B. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 13003-13008.
- [7] HSIEH T H, HSU C Y, TSAI C F, CHIU C C, LIANG S S, WANG T N, et al. A novel cell-penetrating peptide suppresses breast tumorigenesis by inhibiting β -catenin/LEF-1 signaling[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19156. doi:10.1038/srep19156.
- [8] FUTAKI S, SUZUKI T, OHASHI W, YAGAMI T, TANAKA S, UEDA K, et al. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 5836-5840.
- [9] LIU B R, HUANG Y W, WINIARZ J G, CHIANG H J, LEE H J. Intracellular delivery of quantum dots mediated by a histidine- and arginine-rich HR₆ cell-penetrating peptide through the direct membrane translocation mechanism[J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 3520-3537.
- [10] OBA M, KATO T, FURUKAWA K, TANAKA M. A cell-penetrating peptide with a guanidinyethyl amine structure directed to gene delivery[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19913. doi:10.1038/srep19913.
- [11] LI M, EHLERS M, SCHLESIGER S, ZELLERMANN E, KNAUER S K, SCHMUCK C. Incorporation of a non-natural arginine analogue into a cyclic peptide leads to formation of positively charged nanofibers capable of gene transfection[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55: 598-601.
- [12] ZHAO B X, ZHAO Y, HUANG Y, LUO L M, SONG P, WANG X, et al. The efficiency of tumor-specific pH-responsive peptide-modified polymeric micelles containing paclitaxel[J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 2508-2520.
- [13] FERNÁNDEZ-CARNEADO J, KOGAN M J, PUJALS S, GIRALT E. Amphipathic peptides and drug delivery[J]. *Biopolymers*, 2004, 76: 196-203.
- [14] KAMAT N P, TOBÉ S, HILL I T, SZOSTAK J W. Electrostatic localization of RNA to protocell membranes by cationic hydrophobic peptides [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54: 11735-11739.
- [15] BOECKLE S, FAHRMEIR J, ROEDL W, OGRIS M, WAGNER E. Melittin analogs with high lytic activity at endosomal pH enhance transfection with purified targeted PEI polyplexes[J]. *J Control Release*, 2006, 112: 240-248.
- [16] PUJALS S, BASTÚ S N G, PEREIRO E, LÓPEZ-IGLESIAS C, PUNTES V F, KOGAN M J, et al. Shuttling gold nanoparticles into tumoral cells with an amphipathic proline-rich peptide [J]. *Chembiochem*, 2009, 10: 1025-1031.
- [17] RYU D W, KIM H A, RYU J H, LEE D Y, LEE M. Amphiphilic peptides with arginine and valine residues as siRNA carriers[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113: 619-628.
- [18] EHRENSTEIN G, LECAR H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers[J]. *Q Rev Biophys*, 1977, 10: 1-34.
- [19] EL-ANDALOUSSI S, JÄRVER P, JOHANSSON H J, LANGEL U. Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study [J]. *Biochem J*, 2007, 407: 285-292.
- [20] DEROSI D, CALVET S, TREMBLEAU A, BRUNISSEN A, CHASSAING G, PROCHIANTZ A. Cell internalization of the third helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 18188-18193.

- [21] HOWL J, JONES S. Insights into the molecular mechanisms of action of bioportides: a strategy to target protein-protein interactions[J/OL]. *Expert Rev Mol Med*, 2015, 17: e1. doi:10.1017/erm.2014.24.
- [22] PROCHIANTZ A. Homeoprotein intercellular transfer, the hidden face of cell-penetrating peptides [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 683: 249-257.
- [23] HERCE H D, GARCIA A E. Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 20: 984-993.
- [24] ROTHBARD J B, JESSOP T C, WENDER P A. Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57: 495-504.
- [25] HIROSE H, TAKEUCHI T, OSAKADA H, PUJALS S, KATAYAMA S, NAKASE I, et al. Transient focal membrane deformation induced by arginine-rich peptides leads to their direct penetration into cells[J]. *Mol Ther*, 2012, 20: 984-993.
- [26] HENRIQUES S T, HUANG Y H, CHAOUSIS S, SANI M A, POTH A G, SEPAROVIC F, et al. The prototypic cyclotide kalata B1 has a unique mechanism of entering cells[J]. *Chem Biol*, 2015, 22: 1087-1097.
- [27] TANNOCK I F, ROTIN D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation[J]. *Cancer Res*, 1989, 49: 4373-4384.
- [28] ZHAO Y, REN W, ZHONG T, ZHANG S, HUANG D, GUO Y, et al. Tumor-specific pH-responsive peptide-modified pH-sensitive liposomes containing doxorubicin for enhancing glioma targeting and anti-tumor activity[J]. *J Control Release*, 2016, 222: 56-66.
- [29] SUN C Y, SHEN S, XU C F, LI H J, LIU Y, CAO Z T, et al. Tumor acidity-sensitive polymeric vector for active targeted siRNA delivery[J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 15217-15224.
- [30] NISHIMURA Y, TAKEDA K, EZAWA R, ISHII J, OGINO C, KONDO A, et al. A display of pH-sensitive fusogenic GALA peptide facilitates endosomal escape from a Bio-nanocapsule via an endocytic uptake pathway[J/OL]. *J Nanobiotechnol*, 2014, 12: 11. doi: 10.1186/1477-3155-12-11.
- [31] SAWANT R M, HURLEY J P, SALMASO S, KALE A, TOLCHEVA E, LEVCHENKO T S. "SMART" drug delivery systems: double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers [J]. *Bioconjug Chem*, 2006, 17: 943-949.
- [32] CHEN W, ZHONG P, MENG F, CHENG R, DENG C, FEIJEN J, et al. Redox and pH-responsive degradable micelles for dually activated intracellular anticancer drug release[J]. *J Control Release*, 2013, 169: 171-179.
- [33] FU H, SHI K, HU G, YANG Y, KUANG Q, LU L, et al. Tumor-targeted paclitaxel delivery and enhanced penetration using TAT-decorated liposomes comprising redox-responsive poly(ethylene glycol)[J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104: 1160-1173.
- [34] ROY R, YANG J, MOSES M A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27: 5287-5297.
- [35] ZHU L, WANG T, PERCHE F, TAIGIND A, TORCHILIN V P. Enhanced anticancer activity of nanopreparation containing an MMP2-sensitive PEG-drug conjugate and cell-penetrating moiety[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 17047-17052.
- [36] ZHU L, PERCHE F, WANG T, TORCHILIN V P. Matrix metalloproteinase 2-sensitive multifunctional polymeric micelles for tumor-specific co-delivery of siRNA and hydrophobic drugs[J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 4213-4222.
- [37] TU Y, ZHU L. Enhancing cancer targeting and anticancer activity by a stimulus-sensitive multifunctional polymer-drug conjugate[J]. *J Control Release*, 2015, 212: 94-102.
- [38] MARGUS H, ARUKUUSK P, LANGEL Ü, POOGA M. Characteristics of cell-penetrating peptide/nucleic acid nanoparticles [J]. *Mol Pharm*, 2016, 13: 172-179.
- [39] JONES S, UUSNA J, LANGEL Ü, HOWL J. Intracellular target-specific accretion of cell penetrating peptides and bioportides: ultrastructural and biological correlates[J]. *Bioconjug Chem*, 2016, 27: 121-129.
- [40] CHAMES P, VAN REGENMORTEL M, WEISS E, BATY D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157: 220-233.
- [41] MARANGONI K, NEVES A F, ROCHA R M, FARIA P R, ALVES P T, SOUZA A G, et al. Prostate-specific RNA aptamer: promising nucleic acid antibody-like cancer detection[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12090. doi:10.1038/srep12090.