

基于D型氨基酸超分子水凝胶的制备和在癌症治疗方面的研究进展

付成, 李雯慧, 邓云, 刘敏, 丁菲

(江汉大学 交叉学科研究院, 湖北 武汉 430056)

摘要:寡肽自组装形成的超分子水凝胶,是一种在水溶液内被非共价键作用力驱动组装的三维纳米结构。它具有容易设计、易修饰的化学性质和良好的生物相容性、较低的免疫毒性、特有的生物降解性、快速响应性等生物学特性。通过特别设计合成的L型氨基酸寡肽水凝胶因子在生物医学领域已经有广泛的应用,尤其是在癌症治疗方面的研究进展迅速。但L型氨基酸存在生物稳定性较差的缺陷,而D型氨基酸既具有L型氨基酸的多种优势,又比L型氨基酸在生物体内具有更好的生物稳定性。因此,利用D型氨基酸参与合成寡肽并自组装形成的超分子水凝胶在癌症治疗的研究会更广泛。主要介绍以D型氨基酸寡肽及其衍生物作为水凝胶因子制备超分子水凝胶的特点及其在癌症治疗方面的研究进展,并简单探讨了其在癌症治疗应用中面临的困难和挑战。

关键词:D型氨基酸;超分子水凝胶;癌症治疗

中图分类号:R318.08

文献标志码:A

文章编号:1673-0143(2020)04-0030-10

DOI:10.16389/j.cnki.cn42-1737/n.2020.04.005

Preparation of Supramolecular Hydrogel Made of D-Amino Acid and Their Applications in Cancer Treatment

FU Cheng, LI Wenhui, DENG Yun, LIU Min, DING Fei

(Interdisciplinary Sciences Institute, Jianghan University, Wuhan 430056, Hubei, China)

Abstract: The supramolecular hydrogel, made of oligopeptide in a self-assembled way, is a kind of three-dimensional nanostructures formed through non-covalent bond force in aqueous solution. It owns so many advantages, such as easy to design and modify chemical properties, good biological modification, low immunotoxicity, easy to degrade, rapid response, and other biological characteristics. The L-amino acid oligopeptide hydrogelator, specially designed and synthesized, has been widely used in the field of biomedicine, especially in the research of cancer treatment. Due to better biological stability, D-amino acids are preferred in biomedicine than L-amino acids. Supramolecular hydrogel, self-assembled from oligopeptides synthesized from D-amino acids, will be more widely studied

收稿日期:2020-03-13

基金项目:湖北省教育厅指导性项目(B2019237)

作者简介:付成(1986—),女,实验师,硕士,研究方向:超分子水凝胶的制备与应用。

in cancer treatment. In this paper, supramolecular hydrogel prepared by D-amino acid oligopeptides and their derivatives as hydrogel are introduced, and their applications in the treatment of cancer are summarized. Also, the disadvantages and challenges of supramolecular hydrogel prepared by D-amino acid oligopeptides in cancer therapy are discussed.

Key words: D-amino acid; supermolecular hydrogel; cancer therapy

0 引言

基于小分子非共价相互作用自组装形成的超分子水凝胶是一种具有纳米结构的新材料^[1]。能够组装成超分子水凝胶的小分子有很多,氨基酸和氨基酸衍生物及它们合成的寡肽就是一类重要的自组装小分子,它们自组装形成的超分子水凝胶在生物医药和生物技术领域展现出广泛的应用前景^[2]。利用天然L型氨基酸自组装得到的超分子水凝胶已经作为前体药物或者药物传递系统得到广泛应用^[3],但是有报道显示天然氨基酸制备的超分子水凝胶存在生物稳定性较差的问题,而D型氨基酸则具有较好的生物稳定性,因此采用D型氨基酸代替L型氨基酸用于超分子水凝胶的制备是一种有效的解决方法^[4]。

近十年来,采用D型氨基酸及其衍生物作为水凝胶因子,利用氢键、疏水作用力、 $\pi-\pi$ 堆积作用力和静电作用力等非共价作用力控制水凝胶因子自组装制备的超分子水凝胶,已经作为一类性能独特的新型生物材料在治疗癌症方面取得了不少进展^[5]。D型氨基酸及其衍生物自组装制备的超分子水凝胶用于癌症治疗的途径有多种,包括水凝胶因子自组装包裹抗癌药物分子在细胞内释放药物^[6]、水凝胶因子与药物分子共价交联在体内自组装并定向运输药物^[7],研究发现超分子水凝胶有助于减少抗癌药物的毒性和提升药物的选择性。此外,D型氨基酸及其衍生物制备的水凝胶纳米纤维可以直接用于抑制癌细胞的生长^[8],甚至可以有选择性地杀死癌细胞^[9]。随着研究的深入,未来利用D型氨基酸及其衍生物制备的超分子水凝胶将在癌症治疗方面展现出更为广泛的应用前景。

1 基于D型氨基酸及其衍生物自组装制备的超分子水凝胶

1.1 基于D型氨基酸及寡肽水凝胶因子的超分子水凝胶

氨基酸作为一类分子骨架稳定的小分子,除固有的亲水氨基和羧基外,侧链上还存在着亲水或者疏水的侧链基团^[10]。氨基酸通过自然或者人工缩合得到的寡肽在一定条件下可自组装形成超分子水凝胶^[11]。虽然D型氨基酸缩合而来的寡肽主要靠人工合成,但是其分子结构与天然多肽的一致,D型寡肽也与天然寡肽一样具有很强的自组装能力^[12-13]。Luo等^[13]详细研究了L型EAK16和D型EAK16分别自组装形成三维纳米纤维的理化性质,发现两种纳米纤维的流变性能一致,但D型EAK16形成的纳米纤维在酶溶液中更稳定。进一步的研究^[14-15]发现,D型EAK16水凝胶具有的良好理化性能,使其在制备三维细胞培养支架^[14]和促进骨骼愈合^[15]方面有很好的应用前景。Marchesan等^[16]则发现^LPhe^DPhe^DVal和^DPhe^LPhe^LVal两种水凝胶的X射线衍射图谱、流变性能甚至生物兼容性都非常相似,且二者在溶液中均没有细胞毒性。两种水凝胶主要驱动力是苯环的 $\pi-\pi$ 堆积、肽骨架之间的氢键以及氨基酸残基离子化形成盐桥作用等。但是深入研究发现,如果PhePheVal寡肽中第二位和第三位的氨基酸构象不一样,会导致寡肽无法自组装,如^LPhe^DPhe^LVal、^DPhe^LPhe^DVal、^DPhe^DPhe^LVal和^LPhe^LPhe^DVal都不能自组装形

成水凝胶。在此基础上, Marchesan 等^[17]研究了 Val-Phe-Phe 三肽, 如果第二位和三位两个 Phe 的构象不一致, 寡肽的自组装能力差别很大。如两组具有立体异构三肽都能在生理 pH 值下形成超分子水凝胶, 但是其中一组对映异构体 ^lVal-^DPhe-^DPhe 和 ^DVal-^lPhe-^lPhe 可以形成更规则的超分子序列, 水凝胶也更稳定; 而另外一组对映异构体 ^lVal-^DPhe-^lPhe 和 ^DVal-^lPhe-^DPhe 形成的水凝胶则机械性能很差且不稳定。

D 型寡肽自组装形成的水凝胶除了机械性能和生物兼容性与天然寡肽的相似之外, 它还能形成 β 折叠^[13-17, 18-19]、 γ 转角^[20] 等与天然寡肽相似的二级结构。Luo 等^[13] 发现 D 型 EAK16 寡肽自组装纳米纤维结构中含有 β 折叠, 其形成原因是寡肽一级结构中疏水的丙氨酸侧链位于立体构象的一侧, 而亲水带正电的赖氨酸和带负电的谷氨酸侧链位于立体构象另外一侧, 疏水作用和静电作用共同驱动寡肽产生 β 折叠。寡肽 GL13K 是在人腮腺分泌蛋白中发现的, 其 D 型对映异构体 D-GL13K 自组装形成二级结构时, 随着 pH 值和时间变化, D-GL13K 的二级结构可从无序结构转变成 α 螺旋、 β 折叠或者 β 转角^[18]。Restu 等^[19] 发现 ^DPhe^DPhe^DPheGly^DLys 五肽凝胶因子在质量百分比浓度高于 0.5% 时即可形成含 β 折叠的水凝胶。Marchesan 等^[16] 研究具有立体异构体的两组三肽水凝胶, 可以分别形成 β 折叠和反平行 β 折叠, 其中 ^lVal-^DPhe-^DPhe 和 ^DVal-^lPhe-^lPhe 能形成 β 折叠, 而 ^lVal-^DPhe-^lPhe 和 ^DVal-^lPhe-^DPhe 则可以形成反平行 β 折叠。将反平行 β 折叠三肽中的 ^DVal 残基换成 ^lPhe 残基后, 制备的 ^lPhe^lPhe^DPhe 可以自组装形成 γ 转角, 此二级结构的主要驱动力是分子间氢键、分子内氢键和苯环的 $\pi-\pi$ 堆积作用^[20]。

1.2 基于 D 型氨基酸修饰后寡肽水凝胶因子的超分子水凝胶

1.2.1 芳香基团修饰的 D 型氨基酸及寡肽 由于芳香基团具有 $\pi-\pi$ 堆积和疏水相互作用等弱相互作用力, 将芳香基团修饰在寡肽上, 有利于水凝胶因子的制备。芳香基团如苄氧羰基 (Fmoc)^[21]、萘衍生物 (Nap)^[7, 9, 22]、5-氯-4-硝基-2, 1, 3-苯噁二唑 (NBD)^[23]、氟比洛芬 (Fbp)^[24]、卡洛芬 (Car)^[24]、苯丁酸氮芥 (CRB)^[8]、芘 (Py)^[25] 和苯甲酰 (Bz)^[26] 等都可以促进寡肽在水相中自组装形成超分子水凝胶。报道显示, 没有任何修饰的 L/D 型苯丙氨酸均不能自组装形成超分子水凝胶, 而 Fmoc-^DPhe 可以直接在生理 pH 值时形成超分子水凝胶^[27]。

在图 1 显示的 8 种芳香修饰基团中, Fmoc 和 Nap 较为常用。Fmoc 一般用于多肽合成的氨基保护基团, 而 Nap 则是一种用于临床的普通药物分子, 可以和一些寡肽共轭制备水凝胶因子^[28]。Chronopoulou 等^[21] 发现 Fmoc-^DPhe^DPhe^DPhe 水凝胶中纳米纤维存在左旋手性; 相较 L 型的 Fmoc 寡肽, Fmoc-^DPhe^DPhe^DPhe 对蛋白酶的降解作用有很强的抵抗能力, 亦可将其用于地塞米松抗炎药物的控制释放。早在 2009 年, Liang 等^[22] 就合成了 Nap-^DPhe^DPhe 水凝胶因子, 并首次利用 ¹²⁵I 作为示踪剂研究 Nap-^DPhe^DPhe 超分子水凝胶在体内被蛋白酶 K 降解的过程, 研究发现 D 型超分子水凝胶在体内确实有一定抵抗蛋白酶 K 水解作用的能力, 即比 L 型的水凝胶更适合用于药物在体内的控制释放。在此基础上, Li 等^[7] 又合成了磷酸根修饰的 Nap^DPhe^DPhe^DLys^DTyr 寡肽, 即 Nap^DPhe^DPhe^DLys^DTyr (P), 他们首次发现氨基酸的构象不会影响碱性磷酸酶催化寡肽中磷酸根的水解作用。因此, 可以利用碱性磷酸酶控制 Nap^DPhe^DPhe^DLys^DTyr 水凝胶因子的自组装, 一旦 Nap^DPhe^DPhe^DLys^DTyr (P) 中的磷酸根被酶水解就能释放水凝胶因子, 从而达到利用酶诱导寡肽自组装的目标。为了更加仔细研究酶水解反应控制水凝胶因子在生物体内自组装的过程, 科研工作者将荧光探针 NBD 修饰到 ^DPhe^DPhe^DTyr (P)^DLys 寡肽上, 利用荧光光谱监测水凝胶因子在细胞中的自组装情况, 发现在细胞内水凝胶因子可以自组装形成纳米级别的聚集体^[23]。

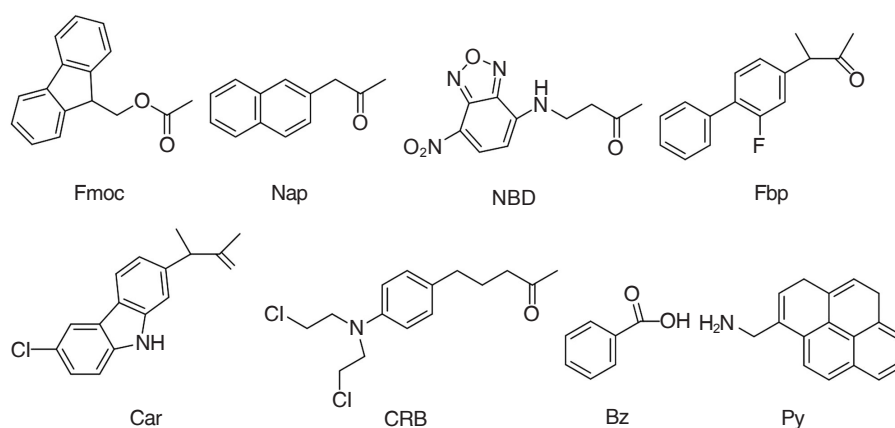


图1 几种修饰D型氨基酸的芳香基团分子结构示意图

Fig. 1 Schematic presentation of several aromatic protecting groups contained in D-amino acid

与Nap、NBD一样,Fbp、Car、CRB这3种基团和D型GFFY(P)寡肽共价连接后,也不会影响碱性磷酸酶对寡肽酪氨酸残基中磷酸根的水解作用,并且水解之后的凝胶因子都可以自组装制备超分子水凝胶^[8,24]。以上几种芳香基团修饰的寡肽,在形成超分子水凝胶时都含有 β 折叠。但是也有芳香基团修饰的寡肽水凝胶因子,如Py能够通过芳香基团的堆积促进水凝胶中 α 螺旋到 β 折叠的转变。Li等^[25]设计了两种Py修饰的寡肽,分别是RMLRF-Py(A-Py)和IQEVN-Py(B-Py),使用D型氨基酸作为合成底物,将两种寡肽分别标记为^DA-Py和^DB-Py。研究发现^DA-Py和^DB-Py可分别自组装形成 α 螺旋,但是混合之后自组装的超分子水凝胶中是 β 折叠结构,此研究表明D型寡肽水凝胶因子自组装的二级结构可以被人为控制。除了水凝胶纤维内二级结构具有可控性外,也有研究报道表明超分子水凝胶的纤维网络可以用于控制蛋白质的结晶^[26]。Conejero-Muriel等^[26]在半胱氨酸衍生物水凝胶中研究以葡萄糖异构酶为模型的蛋白质结晶,发现该酶在D型寡肽水凝胶中结晶效果最好。

1.2.2 烷基类基团修饰的D型氨基酸及寡肽 烷基长链Alkyl作为一类常见的疏水基团,具体分子结构如图2所示。将烷基与亲水寡肽序列连接,能形成“两亲”寡肽小分子(PA)^[29]。当PA溶解到水溶液中,疏水烷基链暴露,寡肽的疏水尾巴就会诱导亲水头部形成三维网络结构。Zhang等^[30]将烷基长链与苏氨酸二肽结合制备寡肽,利用寡肽的苏氨酸残基形成分子间氢键,寡肽的烷基长链形成分子间疏水作用力,两种作用力共同促进寡肽自组装形成 β 折叠。自组装过程中,D型寡肽的手性使 β 折叠发生左旋的螺旋。

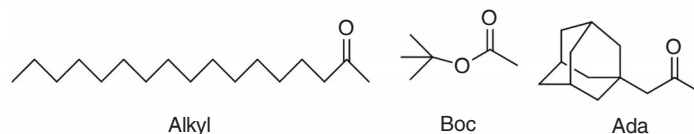


图2 几种修饰D型氨基酸烷基基团的分子结构示意图

Fig. 2 Schematic presentation of several alkyl groups protecting groups contained in D-amino acid

叔丁氧羰基(Boc)也是一种氨基酸合成过程中常用的氨基保护基团,由于它含有叔丁基,利用其作为修饰基团修饰寡肽制备水凝胶的研究也不少^[31]。Basu等^[31]合成了Boc-PhePhePhe寡肽的4组对映异构体,发现除Boc-^LPhe^LPhe^DPhe和Boc-^DPhe^DPhe^LPhe这一组寡肽无法自组装形成水凝胶之外,其余3组都可以自组装成水凝胶。在3组能够自组装的水凝胶因子中,Boc-^LPhe^DPhe^DPhe水凝胶因子应对蛋白酶水解的能力以及包裹药物的效果最好。此外,金刚烷(Ada)与Gly^DPhe^DPhe^DTry连接制备的寡肽能够形成水凝胶,说明Ada也是一种可以促进寡肽自组装的疏水基团^[32]。

1.3 基于 D 型氨基酸及寡肽参与的超分子水凝胶

1.3.1 D 型氨基酸与其他小分子共价结合的超分子水凝胶因子 除了利用芳香基团、烷基类结构修饰 D 型氨基酸外,将修饰后的 D 型氨基酸与 L 型氨基酸缩合连接制备水凝胶因子的研究也已经展开^[33]。Giri 等^[33]合成两种水凝胶因子 Boc-Gly-^lPhg-^DPhe-OMe 和 Boc-Gly-^lPhg-^DPhg-OMe,研究发现这两种水凝胶因子虽然都能自组装形成反平行 β 折叠,但是两种反平行 β 折叠继续自组装的结构分别形成单螺旋链和双螺旋链。

此外,为了研究烷基长链对水凝胶因子的影响,同时利用两种基团修饰 D 型氨基酸制备 Boc- δ -Ava-Phe-OH 水凝胶因子,发现 δ -Ava 长链的长度可以控制水凝胶的形成。当烷基数量是 4 的时候,Boc- δ -Ava-^DPhe-OH 和 Boc- δ -Ava-^lPhe-OH 均可以制备水凝胶;而当烷基数量是 3 或者 5 的时候,两种寡肽都不能形成水凝胶。高倍透射电镜图显示,Boc- δ -Ava-^DPhe-OH 水凝胶纤维要比 Boc- δ -Ava-^lPhe-OH 水凝胶纤维的孔隙更多更大,但是将两种水凝胶用于吸附孔雀绿和罗丹明 B 时,发现二者的吸附速率没有明显的区别^[34]。

1.3.2 D 型寡肽与小分子混合共组装制备的超分子水凝胶 D 型寡肽在自组装过程中除了受氨基酸序列、 π - π 共轭和疏水作用力影响之外,还能通过与小分子共混来改善水凝胶的性能^[35]。Zhang 等^[35]将 Pyr-^DAla^DAla 与万古霉素混合,发现二者可以共组装并大幅提高水凝胶的弹性模量。但是将万古霉素与 Fmoc-^DAla^DAla 共混时,会导致 Fmoc-^DAla^DAla 水凝胶瓦解成溶液^[36]。Zhao 等^[37]合成 OTE-^DPhe 小分子,并将其与 Fmoc-^lPhe 共混制备了超分子水凝胶,发现制备的水凝胶能够分别捕获大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,同时也能在特定材料上选择性地杀死金黄色葡萄球菌。此外,Biswas 等^[38]制备含亮氨酸二肽的 PA 立体异构体,并将其分别与 L 型、D 型酒石酸混合制备水凝胶。研究发现只有当亮氨酸均为 L 型时,PA 分子分别与 L 型或 D 型酒石酸混合才能形成水凝胶。由此可见,D 型寡肽在与小分子共混制备水凝胶时,其手性结构对水凝胶影响很大,如何充分地利用并发挥手性结构优势,还需要进一步的探索。

2 D 型氨基酸超分子水凝胶在抗癌方面的研究进展

2.1 超分子水凝胶包含抗癌药物用于抗癌研究

2.1.1 水凝胶因子自组装包裹小分子抗癌药物用于抗癌研究 水凝胶因子自组装纳米纤维形成的疏水区域可以包裹疏水药物,在纳米纤维降解的时候,可以原位控制释放药物分子。近年来,利用 D 型寡肽自组装纳米纤维来增强疏水性抗癌药物传递与释放的研究,受到了广泛关注^[24,34]。基于 D 型寡肽的水凝胶不仅可以作为载体控制负载率和释放率,还能够增强水凝胶对体内蛋白酶水解作用的抗性。相较 L 型寡肽,D 型寡肽制备的纳米纤维在体外实验和生物体内都显示出更好的稳定性^[39-40]。

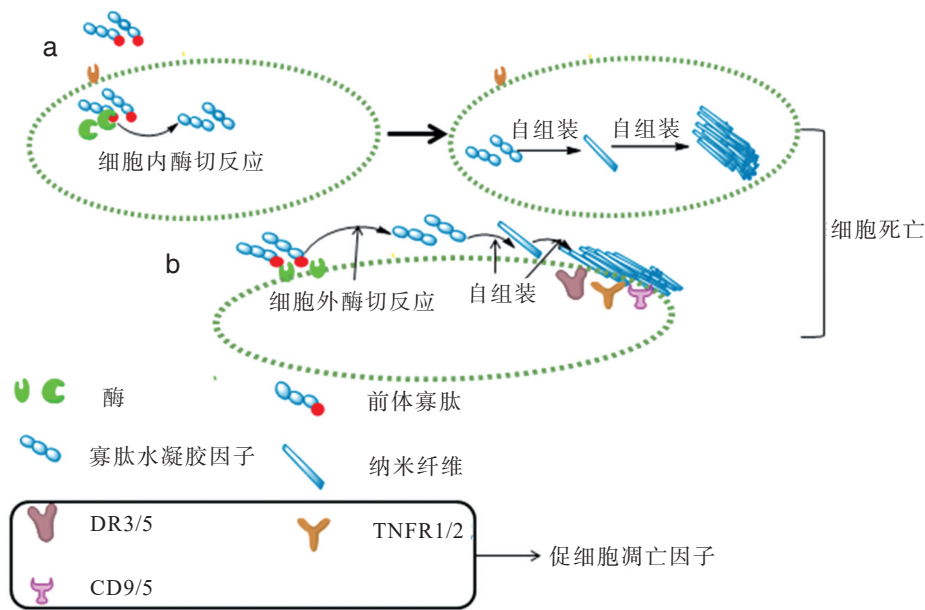
Yang 等^[39]系统地研究了 L 型氨基酸和 D 型氨基酸分别制备的寡肽水凝胶因子在动物模型中的稳定性、体内分布情况和细胞毒性。他们将 D 型和 L 型 Nap-GFFY 寡肽与整联蛋白识别寡肽 RGD^[41]结合,制备 D/L 型的 Nap-GFFYGRGD 水凝胶因子,并分别将其自组装的纳米纤维注射到 BALB/c 小鼠体内。24 h 后小鼠血液中 L 型水凝胶因子基本降解,而 D 型水凝胶因子则保存完好。使用 ¹²⁵I 分别标记 D/L 型寡肽上的酪氨酸残基,并将形成的寡肽纳米纤维分别通过静脉注射到 BALB/c 小鼠体内,研究随时间变化 D/L 型两种纳米纤维在小鼠体内的分布情况,发现两种纳米纤维以及两种水凝胶因子在体内各个组织器官的分布区别很大:L 型纳米纤维主要分布在胃组织,水解后的 L 型寡肽主要分布在小肠;而 D 型纳米纤维和其水解的寡肽,则主要分布在肝组织、肾脏和大肠。但是 L 和 D 型纳米纤维都能在 12 h 后消失,显示出它们对肝组织和肾脏的

低毒性^[39]。在此基础上,Liu等^[40]以十羟基喜树碱 HCPT 作为模型药物,比较 L 型和 D 型 Nap-GFFYGRGD 寡肽水凝胶分别包裹 HCPT 的抗肿瘤效果,发现 D 型寡肽水凝胶的抗肿瘤效果更好。数据显示,将 D 型和 L 型纳米纤维分别包裹 HCPT,即使没有有机溶剂的辅助,HCPT 的负载率也能分别到达 66% 和 73%,而且 HCPT 对纳米纤维自组装的影响很小,可以忽略不计。采用末端标记法监测小鼠体内 D 型纳米纤维/HCPT、L 型纳米纤维/HCPT、HCPT 的抗肿瘤效果,定量分析凋亡细胞比例的数据分别是 $(68.3 \pm 3.6)\%$ 、 $(51.9 \pm 3.2)\%$ 、 $(37.9 \pm 3.5)\%$,说明 D 型纳米纤维/HCPT 的抗癌效果最好^[40]。

2.1.2 水凝胶因子与抗癌药物小分子共价交联用于抗癌研究 Wang等^[5]总结了 D 型寡肽水凝胶用于治疗癌症的多种方式,引起了广泛的关注,研究结果显示 D 型寡肽与抗癌药物分子共价交联用于抗癌药物传递与释放,是 D 型寡肽水凝胶用于治疗癌症的另外一种重要方式。Li等^[7]分别将 D/L 型寡肽与抗癌药物紫杉醇共价连接合成 D/L 型 Nap-PhePheLysTry(P)-紫杉醇化合物,X 衍射射线显示 D 型化合物和 L 型化合物都可以与碱性磷酸酶的活性位点结合。因此,两种化合物均可通过碱性磷酸酶水解得到含紫杉醇的水凝胶因子,而且核磁共振波谱还显示碱性磷酸酶对两种化合物磷酸根水解速率一致。通过优化两种化合物、酶的浓度,发现在生理 pH 值下碱性磷酸酶可控制两种水凝胶因子制备直径在 9 nm 左右的水凝胶纳米纤维。体内实验显示,将紫杉醇与 D/L 型寡肽共价合成两种化合物所制备的纳米纤维可以分别用于癌症的治疗。虽然两种纳米纤维的抗癌效果都比无修饰紫杉醇的效果要好,但是 D 型寡肽的抗癌效果又比其对应 L 型寡肽的更好。

2.2 D 型氨基酸及其衍生物寡肽原位自组装水凝胶纤维用于抗癌研究

除了增强临床抗癌药物的治疗效果外,寡肽自组装纳米结构的另一个重要功能是可以选择性地杀死癌细胞。目前已经发现寡肽原位自组装形成的纳米纤维有两种选择性杀死癌细胞的方式:一是寡肽进入癌细胞,通过癌细胞内特异性过度表达的酶,驱动水凝胶因子在癌细胞内自组装,自组装纳米纤维能够影响癌细胞内物质运送,从而影响癌细胞的存活^[42],如图 3a 所示。Kuang等^[43]的研究发现,在癌细胞内被酯酶控制制备的 D 型 Nap-PhePhe 寡肽水凝胶因子自组装能形成纳米纤维,形成的纳米纤维均可以抑制 HeLa 细胞生长。但是由于天然 L 型氨基酸形成的转运蛋白或者寡肽转运通道对 D 型寡肽的吸收效率较低,所以研究 D 型寡肽进入细胞的方式非常重要^[44]。二是 D 型寡肽特异性地在癌细胞表面聚集,诱导癌细胞内几种细胞凋亡因子的分泌,从而选择性杀死癌细胞^[45],如图 3b 所示。Du等^[45]研究数据显示 D 型寡肽 Nap-^DPhe^DPhe^DTry(P) 可以通过癌细胞表面过度表达的膜外磷酸酶控制释放 Nap-^DPhe^DPhe^DTry 水凝胶因子,释放的水凝胶因子在癌细胞表面能原位自组装形成纳米纤维,而正常细胞表面磷酸酶含量较低,水凝胶因子难以达到自组装浓度。癌细胞表面形成的纳米纤维,阻碍癌细胞间信息交流和营养物质吸收,从而特异性地杀死癌细胞。Zhou等^[9]对 Nap-^DPhe^DTry(P)^DPhe^DTry(P)、Nap-^DPhe^DTry^DPhe^DTry(P)、Nap-^DTry(P)^DPhe^DPhe^DTry(P)、Nap-^DTry^DPhe^DPhe^DTry(P)、Nap-^DPhe^DPhe^DTry^DTry(P) 和 Nap-^DPhe^DPhe^DTry(P)^DTry(P) 6 种寡肽在碱性磷酸酶控制下形成的超分子水凝胶进行深入研究。发现在采用 1 U/mL 的磷酸酶分别水解 6 种寡肽时,制备的超分子水凝胶的最低凝胶化浓度均在 1~2.5 wt% 之间,水凝胶纳米纤维的直径在 3~9 nm 之间。当分别使用 6 种寡肽培养不同细胞时,6 种寡肽对不同的细胞产生的细胞毒性有区别。推测可能是由于不同细胞的细胞膜表面磷酸酶含量有所不同,影响寡肽在细胞附近的自组装,从而影响了细胞的存活^[46]。



a. 细胞内自组装影响细胞内黏度变化导致细胞死亡; b. 细胞外自组装诱导促细胞凋亡因子导致细胞死亡。

图 3 前体寡肽原位自组装诱导细胞死亡的示意图

Fig. 3 Schematic diagram of cell death induced by in situ self-assembly of precursor oligopeptides

2.3 基于 D 型氨基酸及其衍生物参与的共组装水凝胶用于治疗癌症的研究

大分子水凝胶作为癌症治疗的药物载体,已经有几十年的研究历程。将 D 型氨基酸及其衍生物小分子水凝胶因子与大分子混合制备的共组装水凝胶,可以用于培养干细胞^[47]、负载抗癌药物^[48]和制备抑菌水凝胶^[49]等。Zheng 等^[47]分别将 D 型和 L 型的 Fmoc-FFC 与聚乙二醇混合共组装制备 D 型水凝胶和 L 型水凝胶,发现聚乙二醇光交联结构不影响 D 型或 L 型的 Fmoc-FFC 水凝胶因子的自组装。圆二色谱信号显示 D 型水凝胶和 L 型水凝胶具有对称的振动吸收峰,且两种水凝胶的流变性能和稳定性一致。但是采用三维细胞技术将两种水凝胶培养干细胞时,发现 D 型水凝胶和 L 型水凝胶对干细胞的影响不一样。D 型水凝胶能明显影响细胞的黏附、转移和分化。因此,可通过水凝胶控制干细胞的分化继而维持干细胞形态,从而可以抑制干细胞转移产生的肿瘤。

3 结语

多年以来,D 型氨基酸、寡肽或者经修饰的 D 氨基酸衍生物作为水凝胶因子制备超分子水凝胶的研究已经非常深入,研究内容包括它们与天然氨基酸具有相似二级结构、有相同甚至更好的载药能力以及更好的抗癌效果等多个方面。而 D 型氨基酸及寡肽除了自组装外,它们还能与其他小分子或者高分子共组装制备超分子水凝胶并用于癌症治疗的研究。研究还发现,D 型氨基酸修饰基团的不同或者 D 型寡肽中氨基酸序列的改变,对超分子水凝胶的物理性质影响显著。此外,虽然 D 型氨基酸寡肽自组装纳米纤维具有良好的生物稳定性,但是 D 型氨基酸对生物体内蛋白质目标无法特异性识别,导致它的应用有一定局限。因此,如何准确迅速地让 D 型氨基酸及 D 型寡肽水凝胶识别目标细胞、怎样更加合理地设计 D 型寡肽的氨基酸序列以便增强其自组装水凝胶在癌症治疗中的作用等都是 D 型氨基酸及 D 型寡肽自组装超分子水凝胶目前需要解决的问题。随着技术的进步和研究的深入,相信不久的将来,D 型氨基酸及 D 型寡肽超分子水凝胶用于癌症治疗的研究会取得更加重要的进展。

参考文献 (References)

- [1] 李旋,蒋瑶,谢千秋,等. 超分子水凝胶材料研究进展[J]. 应用化工, 2019, 48(5):1140—1145.
- [2] 张玲,余丽梅,刘燕飞. 短肽水凝胶 RADA16 结构特征及在生物医学中的应用研究与进展[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(34):5538—5544.
- [3] CHANG R, ZOU Q L, XING R R, et al. Peptide-based supramolecular nanodrugs as a new generation of therapeutic toolboxes against cancer [J]. *Advanced Therapeutics*, 2019, 2(8):1900048.
- [4] SWANEKAMP R J, WELCH J J, NILSSON B L. Proteolytic stability of amphipathic peptide hydrogels composed of self-assembled pleated β -sheet or coassembled rippled β -sheet fibrils [J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(70):10133—10136.
- [5] WANG H M, FENG Z Q Q, XU B. D-amino acid-containing supramolecular nanofibers for potential cancer therapeutics [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017, 110—111:102—111.
- [6] LI J Y, KUANG Y, GAO Y, et al. D-amino acids boost the selectivity and confer supramolecular hydrogels of a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) [J]. *Journal of The American Chemical Society*, 2013, 135(2):542—545.
- [7] LI J Y, GAO Y, KUANG Y, et al. Dephosphorylation of D-peptide derivatives to form biofunctional, supramolecular nanofibers/hydrogels and their potential applications for intracellular imaging and intratumoral chemotherapy [J]. *Journal of The American Chemical Society*, 2013, 135(26):9907—9914.
- [8] LIANG C H, ZHENG D B, SHI F, et al. Enzyme-assisted peptide folding, assembly and anti-cancer properties [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(33):11987—11993.
- [9] ZHOU J, DU X W, YAMAGATA N, et al. Enzyme-instructed self-assembly of small D-peptides as a multiple-step process for selectively killing cancer cells [J]. *Journal of The American Chemical Society*, 2016, 138(11):3813—3823.
- [10] 马文丽,德伟,王杰. 生物化学与分子生物学[M]. 2版. 北京:科学出版社, 2018.
- [11] KRYSMANN M J, CASTELLERRO V, KELARAKIS A, et al. Self-assembly and hydrogelation of an amyloid peptide fragment [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(16):4597—4605.
- [12] SATO K, JI W, ÁLVAREZ Z, et al. Chiral recognition of lipid bilayer membranes by supramolecular assemblies of peptide amphiphiles [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019, 5(6):2786—2792.
- [13] LUO Z L, WANG S K, ZHANG S G. Fabrication of self-assembling D-form peptide nanofiber scaffold d-EAK16 for rapid hemostasis [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(8):2013—2020.
- [14] LUO Z L, YUE Y Y, ZHANG Y F, et al. Designer D-form self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3-dimensional cell cultures [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(21):4902—4913.
- [15] HE B, OUA Y S, CHEN S, et al. Designer bFGF-incorporated D-form self-assembly peptide nanofiber scaffolds to promote bone repair [J]. *Materials Science and Engineering C*, 2017, 74:451—458.
- [16] MARCHESAN S, EASTON C D, STYAN K E, et al. Chirality effects at each amino acid position on tripeptide self-assembly into hydrogel biomaterials [J]. *Nanoscale*, 2014, 6(10):5172—5180.
- [17] MARCHESAN S, STYAN K E, EASTON C D, et al. Higher and lower supramolecular orders for the design of self-assembled heterochiral tripeptide hydrogel biomaterials [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, 3(41):8123—8132.
- [18] YE Z, ZHU X, ACOSTA S, et al. Self-assembly dynamics and antimicrobial activity of all L- and D-amino acid enantiomers of a designer peptide [J]. *Nanoscale*, 2019, 11(1):266—275.
- [19] RESTU W K, YAMAMOTO S, NISHIDA Y, et al. Hydrogel formation by short D-peptide for cell-culture scaffolds [J]. *Materials Science & Engineering C*, 2020, 111:110746.
- [20] OZAWA Y, SATO H, KAYANO Y, et al. Self-assembly of tripeptides into γ -turn nanostructures [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2019, 21(21):10879—10883.

- [21] CHRONOPOULOU L, SENNTO S, BORDI F, et al. Designing unconventional Fmoc-peptide-based biomaterials: structure and related properties [J]. *Soft Matter*, 2014, 10(12):1944-1952.
- [22] LIANG G L, YANG Z M, ZHANG R J, et al. Supramolecular hydrogel of a D-amino acid dipeptide for controlled drug release in vivo [J]. *Langmuir*, 2009, 25(15):8419-8422.
- [23] WANG H M, FENG Z Q Q, WANG Y Z, et al. Integrating enzymatic self-assembly and mitochondria targeting for selectively killing cancer cells without acquired drug resistance [J]. *Journal of The American Chemical Society*, 2016, 138(49):16046-16055.
- [24] WANG Z Y, LIANG C H, SHI F, et al. Cancer vaccines using supramolecular hydrogels of NSAID-modified peptides as adjuvants abolish tumorigenesis [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(37):14058-14064.
- [25] LI J, DU X W, HASHIM S, et al. Aromatic-aromatic interactions enable α -helix to β -sheet transition of peptides to form supramolecular hydrogels [J]. *Journal of The American Chemical Society*, 2017, 139(1):71-74.
- [26] CONEJERO-MURIEL M, GAVIRA J A, PINEDA-MOLINA E, et al. Influence of the chirality of short peptide supramolecular hydrogels in protein crystallogenesis [J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(18):3862-3865.
- [27] 付成, 袁发浒, 胡芸瑕, 等. Fmoc-苯丙氨酸水凝胶及其复配 EGCG 抑菌作用研究 [J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(10):37-42.
- [28] FICHMAN G, GAZIT E. Self-assembly of short peptides to form hydrogels: design of building blocks, physical properties and technological applications [J]. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10(4):1671-1682.
- [29] HABIBI N, KAMALY N, MEMIC A, et al. Self-assembled peptide-based nanostructures: smart nanomaterials toward targeted drug delivery [J]. *Nano Today*, 2016, 11(1):41-60.
- [30] ZHANG H, XIN X, SUM J C, et al. Self-assembled chiral helical nanofibers by amphiphilic dipeptide derived from D- or L-threonine and application as a template for the synthesis of Au and Ag nanoparticles [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2016, 484:97-106.
- [31] BASU K, BARAL A, BASAK S, et al. Peptide based hydrogels for cancer drug release: modulation of stiffness, drug release and proteolytic stability of hydrogels by incorporating D-amino acid residue(s) [J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(28):5045-5048.
- [32] YANG C B, REN X R, DING D, et al. Enzymatic induction of supramolecular order and bioactivity [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(20):10768-10773.
- [33] GIRI R S, MANDAL B. Formation of supramolecular single and double helix-like structures from designed tripeptides [J]. *CrystEngComm*, 2019, 21(37):5618-5625.
- [34] TIWARI P, BASU A, VIJ A, et al. Rationally designed bioinspired δ -amino valeric acid based hydrogel: one shot solution for drug delivery and effluent management [J]. *ChemistrySelect*, 2019, 4(23):6896-6905.
- [35] ZHANG Y, YANG Z M, YUAN F, et al. Molecular recognition remolds the self-assembly of hydrogelators and increases the elasticity of the hydrogel by 106-fold [J]. *Journal of The American Chemical Society*, 126(46):15028-15029.
- [36] ZHANG Y, GU H W, YANG Z M, et al. Supramolecular hydrogels respond to ligand-receptor interaction [J]. *Journal of The American Chemical Society*, 2003, 125(45):13680-13681.
- [37] ZHAO Q, ZHAO Y T, LU Z N, et al. Amino acid-modified conjugated oligomer self-assembly hydrogel for efficient capture and specific killing of antibiotic-resistant bacteria [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(18):16320-16327.
- [38] BISWAS S, DAS A K. Tuning the handedness: role of chiral component in peptide-appended bolaamphiphile-based coassembled hydrogels [J]. *Langmuir*, 2019, 35(6):2383-2391.
- [39] YANG C H, CHU L P, ZHANG Y M, et al. Dynamic biostability, biodistribution, and toxicity of L/D-peptide based supramolecular nanofibers [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(4):2735-2744.

- [40] LIU J F, LIU J J, CHU L P, et al. Self-assembling peptide of D-amino acids boosts selectivity and antitumor efficacy of 10-hydroxycamptothecin [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014, 6(8):5558-5565.
- [41] HALL E R, SLACK R J. The effect of divalent metal cations on the αv integrin binding site is ligand and integrin specific [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 110:362-370
- [42] YANG Z M, XU K M, GUO Z F, et al. Intracellular enzymatic formation of nanofibers results in hydrogelation and regulated cell death [J]. Advanced Materials, 2007, 19(20):3152-3156.
- [43] KUANG Y, DU X W, ZHOU J, et al. Supramolecular nanofibrils inhibit cancer progression in vitro and In vivo [J]. Advanced Healthcare Materials, 2014, 3(8):1217-1221.
- [44] WENDER P A, GALLIHER W C, GOUN E A, et al. The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 60(4/5):452-472.
- [45] DU X W, ZHOU J, WANG H N, et al. *In situ* generated D-peptidic nanofibrils as multifaceted apoptotic inducers to target cancer cells [J]. Cell Death & Disease, 2017, 8:e2614.
- [46] KUANG Y, SHI J F, LI J, et al. Pericellular hydrogel/nanonets inhibit cancer cells [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2014, 53(31):8104-8107.
- [47] ZHENG H Y, YOSHITOMI T, YOSHIMOTO K. Analysis of chirality effects on stem cell fate using three dimensional fibrous peptide hydrogels [J]. ACS Applied Bio Materials, 2018, 1(3):538-543.
- [48] WANG H M, FENG Z Q Q, XU B. Dynamic continuum of molecular assemblies for controlling cell fates [J]. ChemBioChem, 2019, 20(19):2442-2446.
- [49] MALHOTRA K, SHANKAR S, CHAUHAN N, et al. Design, characterization, and evaluation of antibacterial gels, Boc-D-Phe- γ 4-L-Phe-PEA/chitosan and Boc-L-Phe- γ 4-L-Phe-PEA/chitosan, for biomaterial related infections [J]. Materials Science & Engineering C, 2020, 110:110648.

(责任编辑:范建凤)