

分子动力学模拟研究穿透肽的跨膜机制及引导新肽设计

曹赞霞*, 刘磊, 王吉华

山东省功能大分子生物物理重点实验室(德州学院), 德州 253023

* 联系人, E-mail: qiayilai@mail.ustc.edu.cn

2014-04-17 收稿, 2014-05-19 接受, 2014-06-17 网络版发表

国家自然科学基金(31000324, 61271378)和山东省自然科学基金(ZR2011FL011, ZR2012CL09)资助

摘要 细胞穿透肽在体内缺乏细胞和组织专一性, 使得这类载体的临床应用受到很多限制. 成功设计各类疾病特异性靶向穿透肽的关键是充分认识这类多肽的跨膜分子机制. 分子动力学模拟已逐渐成为开展该领域研究不可或缺的重要工具, 与实验研究相互促进, 对特异性靶向穿透肽的设计具有重要的指导作用. 目前, 利用分子动力学模拟主要开展的研究内容包括跨膜过程、跨膜自由能变化、多肽序列结构特征以及不同细胞膜组成如何影响其跨膜机制等. 随着分子模型及增强采样方法的发展, 单组模拟能够直接快速获取多肽跨膜自由能和构象变化. 因此, 分子动力学模拟对如何改造或设计细胞靶向穿透肽提供理论依据和指导, 对改善药物跨膜能力、减少药物对其他健康组织的毒害等方面有着重要的科学和实际意义.

关键词

细胞穿透肽
跨膜分子机制
跨膜自由能
分子动力学模拟
细胞靶向穿透肽

由于细胞膜的选择渗透性, 许多具有疗效的药物分子不易穿膜, 这使得一些有治疗价值但不能穿透细胞膜的分子在生物医学等领域的应用受到极大的限制. 细胞穿透肽(cell-penetrating peptides, CPPs)的发现^[1-3]为解决这一难题提供了一条崭新的途径. 细胞穿透肽是具有细胞膜穿透能力的小分子多肽, 能作为载体高效运送多种不同大小和性质的生物活性物质(包括蛋白、多肽、核酸分子、脂质体和小分子有机化合物等)进入几乎所有的哺乳动物细胞. 穿透肽在疾病靶向治疗、建立新型给药方式以及增强药物吸收等领域具有良好的应用前景^[4-6]. 截至目前, CPPsite (<http://crdd.osdd.net/raghava/cppsite/>)数据库^[7]里共包含 843 条不同穿膜效率的多肽序列, 有天然多肽, 也有人工设计合成的多肽. 穿透肽的长度多集中于 5~30 个氨基酸, 多富含赖氨酸和精氨酸. 按照氨基酸组成可将它们分成 3 类: 第一类是带较多正电荷的阳离子型; 第二类是同时带有极性和非极性区域的两性分子型; 第三类是只包含非极性残基的疏水型. 目前发现的穿透肽大多数都属于前 2 类, 第三类

数量非常少. 穿透肽作为药物载体, 相比其他非天然的分子而言, 具有较低的细胞毒性, 且没有明显证据表明其运载极限.

但是, 由于穿透肽载体不能专一地递送药物分子到病变的靶细胞, 所以这类穿透肽的临床应用受到限制. 因此, 发现或设计各类疾病特异性靶向穿透肽是当今药物研发的热点^[8,9], 这对改善药物跨膜能力、减少药物摄入量等方面有着重要的科学和实际意义. 设计药用肽的途径之一是将不同类型或功能的多肽连接起来. 而能否成功设计这类药用肽的关键在很大程度上取决于对其跨膜分子机制的认识. 只有通过深入理解穿透肽的跨膜分子机制及其影响因素, 才能有效改造或设计具有疾病特异性的各类靶向穿透肽.

实验研究是解决这类问题的重要途径. 不同的实验方法及其组合能够用于研究细胞穿透肽的定位、跨膜效率和跨膜机制^[10]. 研究表明, 目前有关跨膜机制有以下两种比较流行的观点^[11-13](图 1): 第一, 不消耗自由能的直接跨膜, 穿透肽是直接通过孔隙

引用格式: 曹赞霞, 刘磊, 王吉华. 分子动力学模拟研究穿透肽的跨膜机制及引导新肽设计. 科学通报, 2014, 59: 2160-2168

Cao Z X, Liu L, Wang J H. Molecular mechanism of translocation and design of cell penetrating peptides based on molecular dynamics simulation (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 2160-2168, doi: 10.1360/N972014-00329

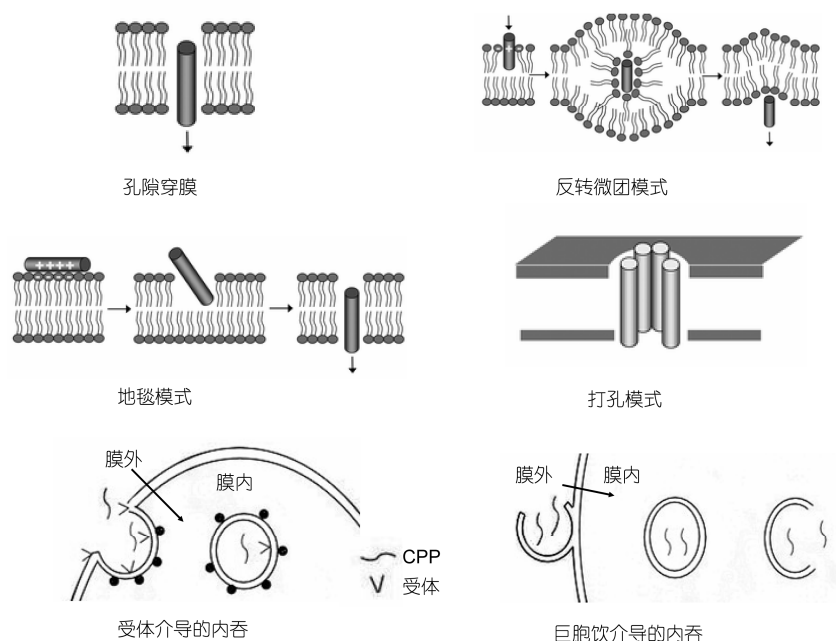


图1 穿透肽的跨膜机制示意图

穿膜(pore formation)或形成某种跨膜结构而进入胞内,包括反转微团模式(inverted micelle formation)、地毯模式(carpet model)和打孔模式(barrel-stave pore formation);第二,消耗自由能的细胞内吞,穿透肽通过受体介导的内吞(receptor-mediated endocytosis)或巨胞饮介导的内吞(macropinocytosis)进入胞内。但是迄今为止,穿透肽的实验研究存在以下两方面的主要问题:一方面,有关上述穿透肽的跨膜分子机制仍然存在很多问题有待于进一步深入探讨^[14-16]。例如:对同一种穿透肽而言,直接跨膜和细胞内吞是否同时参与;穿透肽所携带分子的大小如何影响跨膜机制;多种不同直接跨膜途径之间是否存在内在联系;两种细胞内吞途径之间有何联系;穿透肽进膜之后的定位及代谢问题;穿透肽分子的性质与细胞膜的组成如何影响跨膜机制,等。另一方面,在穿透肽的研究过程中,需要不同的实验方法及其组合,这些方法有各自的优缺点,不同实验方法甚至可能会得出不同的结论,即使是同一种方法,不同的细胞系或浓度等条件都会导致不同的实验结果^[10]。因此,有关细胞穿透肽的实验研究具有一定的局限性。

分子动力学模拟已经成为探索微观世界生命现象的强有力工具, Martin Karplus 等人由于他们在“发展复杂化学体系多尺度模型”方面所做的贡献而获得

2013 年诺贝尔化学奖^[17]。基于分子动力学模拟这一重要工具研究跨膜分子机制(包括跨膜过程、跨膜自由能变化、多肽序列结构特征及不同细胞膜组成如何影响其跨膜机制等)是一条重要途径,能够作为实验研究的有力补充,为疾病特异性靶向穿透肽的设计和改造提供理论基础和指导。分子动力学模拟方法^[18]的优势在于,它不但能够提供构象平均值,还可以追踪体系构象随时间的变化过程,给出任何可定义量(实验可观察或不可观察)随时间的变化。随着计算机性能的大幅度提高和模拟采样方法的快速发展,在生命科学的分子和细胞层次,分子模拟已经成为一种重要工具,与实验研究相辅相成、互为补充、共同发展。本文就细胞穿透肽跨膜分子机制及其靶向改造的分子动力学模拟研究和展望进行评述。

1 穿透肽跨膜机制的分子动力学模拟

分子动力学模拟是研究细胞穿透肽跨膜机制的重要工具(现有文献整理见表 1)。目前针对细胞穿透肽的分子模拟研究主要使用 3 类模型。大多数是采用全原子的方式处理细胞膜和多肽,在表 1 中 18 篇文献中有 15 篇是基于全原子模型;部分采用粗粒化的方式处理细胞膜和多肽,表 1 中有 2 篇文献是基于粗粒化模型;还有少数直接采用隐式的细胞膜模型,表 1 中有 1 篇文献。

表 1 文献涉及的分子动力学模拟方法研究细胞穿透肽的跨膜机制(按照发表时间)

体系	残基个数	细胞膜体系	模拟方法	分子力学	分析结果
Penetratin ^[19]	16	POPC, POPC/POPA (7:1), POPC/POPG (7:1), POPC/POPS (7:1)	常规全原子分子动力学模拟(300 K)	GROMOS 43A2	Penetratin 与细胞膜之间的相互作用, 关键残基突变或细胞膜改变对结果的影响
Tat47-57 ^[20]	11	DOPC	常规全原子分子动力学模拟(323, 343, 363 K)	GROMACS	Tat 的跨膜机制, Tat 及细胞膜浓度变化对其跨膜机制的影响
Buforin II ^[21]	21	POPC, POPG, POPE	常规全原子分子动力学模拟(300 K)	GROMACS	不同细胞膜对 Buforin II 结构及跨膜效率的影响
Arg-9 ^[22]	9	DOPC	常规全原子分子动力学模拟(323 K)	GROMACS	Arg-9 的跨膜机制
Tat48-60	13	DOPC	常规全原子分子动力学模拟和伞形采样(323 K)	GROMOS 43A2	2 个穿透肽的跨膜机制
Penetratin ^[23]	16	DPPC		CHARMM	多肽与不同细胞膜之间的相互作用
六碳酰胺化的 RRWQWR 多肽 ^[24]	6	POPC	常规全原子分子动力学模拟(323 K)	CHARMM	
Transportan 10 ^[25]	21	POPE:POPG (3:1)	常规全原子分子动力学模拟(298, 353, 453 K)	GROMACS	Transportan 10 的结构特征及跨膜机制
Antennapedia Arginine-rich ^[26]	16 8	DPPC	粗粒化模拟	本文优化参数	CPPs 同细胞膜之间强的吸引相互作用对倒置胶粒形成的重要作用
Transportan 10 ^[27]	21	DPPC	常规全原子分子动力学模拟(315 K)	GROMOS 53A6	残基突变对跨膜机制的影响
牛乳铁素 268~284 ^[28]	17	DMPG:DMPC (13:5)	常规全原子分子动力学模拟(313 K)	CHARMM	多肽在细胞膜中的结构特征及定位
RW9	9	POPC/POPG (4:1)	常规全原子分子动力学模拟(310 K)	CHARMM CMAP	比较两种富含 Arg 但穿膜效率截然不同的多肽同细胞膜之间的相互作用
RL9 ^[29]	9	POPC:CHOL (3:2)	常规全原子分子动力学模拟(300 K)	GROMOS 43A1	负电荷穿透肽同细胞膜之间的相互作用
LE10 ^[30]	20	DOPC	伞形采样分子动力学模拟	GROMACS	穿透肽的跨膜机制和跨膜自由能
Cyclic Arg9 ^[31]	9	DPPC	常规全原子分子动力学模拟(323 K)	GROMACS	穿透肽同细胞膜之间的相互作用
Penetratin ^[32]	16	DPPC	伞形采样分子动力学模拟	GROMACS	穿透肽的跨膜机制和跨膜自由能
Transportan ^[33]	27	DPPC	常规全原子分子动力学模拟(310 K)	CHARMM CMAP	两种多肽在细胞膜环境下的结构特征变化
RW9	9	POPC/POPG (4:1)	粗粒化分子动力学模拟	MARTINI	跨膜机制
RL9 ^[34]	9	DPPC	常规分子动力学模拟	IMM1	跨膜自由能
Linear 或 Cyclic Arg9 ^[35]	9	隐式的处理细胞膜			
S4 helix ^[36]	12				

1.1 基于全原子模型的分子动力学模拟

全原子分子动力学模拟研究主要致力于分析以下 2 个方面的问题: 第一, 基于常规分子动力学模拟研究下面问题: 穿透肽结合到细胞膜上之后, 细胞膜构象的变化; 跨膜过程中, 多肽构象发生的变化, 以及多肽浓度、残基突变及不同细胞膜对跨膜机制的影响等。第二, 基于伞形采样方法分析研究: 不同多肽的跨膜过程需要克服的自由能垒的高度, 以及某些残基突变或序列改变对自由能变化的影响等。

2005 年, Rosseneu 小组^[19]首次使用分子动力学模拟方法研究了细胞穿透肽 Penetratin 同中性和带电细胞膜之间的结合模式及原子的相互作用, 以及关键残基突变对这些结果的影响。模拟结果表明, 多肽同细胞膜之间的静电相互作用使得多肽-细胞膜的结合成为一个快速过程, 同时, 带负电细胞膜能加强同多肽的结合能力; 随后, Penetratin 肽以螺旋结构水平结合在细胞膜上, 侧链会插入膜中导致整个多肽进入细胞膜的疏水中心。不同细胞膜会影响细胞穿透肽的跨膜机制及跨膜能力。Elmore 小组^[21]基于分子动力学模拟研究了 3 种不同细胞膜如何以不同的方式同 Buforin II 结合, 如何改变 Buforin II 结构及跨膜效率。Angel 小组^[20,22]利用分子动力学模拟方法研究 Tat 和 Arg-9 肽的跨膜机制及多肽/细胞膜浓度变化对其跨膜机制的影响。模拟结果发现, Arg 不仅促进多肽同细胞膜表面结合, 而且 Arg 的侧链会插入膜中, 同膜的磷酸盐头部相互作用并在膜中间形成孔洞, 导致细胞膜结构不稳定, 除此之外, 不同浓度的多肽, 其跨膜过程不一样。但是, Mark 小组^[23]基于常规分子动力学模拟和伞形采样方法对 Tat 肽得到完全不同的结果, 发现 Tat 肽在跨膜过程中没有自发形成孔道, 模拟结果提示 Tat 以微胞饮的形式进入细胞。Grossfield 小组^[24]将 NMR 同分子模拟结合, 研究被六碳氨酰化的 RRWQWR 多肽与不同类型细胞膜之间的相互作用, 并用于分析其抗菌机制, 结果发现针对细菌细胞膜而言, 此多肽的 Arg 残基首先同膜发生相互作用, 而对哺乳动物细胞膜而言, 氨酰化尾巴先同膜发生相互作用。人工设计的细胞穿透肽 Transportan 10 是实验和分子动力学模拟研究热点。Lee 研究小组^[25]基于分子动力学模拟研究了 Transportan 10 同 POPC 膜如何结合, 以及多肽的结构特征及跨膜机制等。模拟结果发现, Lys 残基同膜的磷酸盐头部强的

相互作用不仅促进多肽同细胞膜结合, 还决定了多肽的非极性区域以水平方向同细胞膜结合。Wang 小组^[27]基于分子动力学模拟比较 Transportan 10 及其类似多肽的跨膜机制。模拟结果表明, 扰动多肽的螺旋结构或替换 Arg 会减小多肽的跨膜能力, 但增加正电荷数量能有效的增强其跨膜能力。Naito 小组^[28]将 NMR 同分子模拟结合, 研究 17 残基的牛乳铁素在细菌细胞膜中的结构特征和定位。RW9 和 RL9 虽然都富含 Arg 残基, 但跨膜能力差异显著, RW9 具有较大的跨膜能力, 但 RL9 虽然能结合到细胞膜上, 但不能跨膜。Alves 小组^[29,34]基于分子动力学模拟方法比较了这 2 种多肽同细胞膜之间的相互作用及结构特征变化。结果表明, 多肽结合会影响膜的结构和柔性, 但 RW9 对膜的影响要明显大于 RL9 对膜的影响, Trp 残基所涉及的疏水相互作用非常重要。另外, 多肽的结构也会发生改变。以上模拟研究主要针对带较多正电荷的阳离子型细胞穿透肽或者同时带有极性和非极性区域的两性分子型细胞穿透肽, 对带较多正电荷的阳离子型细胞穿透肽, 大多数采取无规结构形式插入细胞膜, 而对同时带有极性和非极性区域的两性分子型细胞穿透肽, 大多采用螺旋形式水平结合在细胞膜上, 极性区域面向水中, 非极性区域面向细胞膜并插入细胞膜中。带负电荷的细胞穿透肽非常少, 这类穿透肽如何跨膜? Artur 小组^[30]利用常规分子动力学模拟研究了带负电荷的 LE10 多肽的跨膜过程, 结果发现, 细胞膜会将多肽吞住, 同细胞内吞的早期过程非常类似。

上述研究均采用全原子分子动力学模拟方法结合显式水模型, 能很好地研究小肽对细胞膜结构的影响及整体构象随时间的变化。但是, 由于模拟体系所包含的原子数量比较大, 目前模拟时间较短, 尺度都在几百纳秒(ns)的数量级, 所以受采样时间限制, 这种模拟很难直接观察到小肽的跨膜过程和自由能变化。

采样方法的发展可以在某种程度上弥补这种不足。伞形采样方法就是现阶段研究跨膜自由能常用的方法。Angel 小组^[31]利用伞形采样方法计算 Arg-9 肽在距细胞膜中心不同位置时的自由能变化, 由此推断跨膜分子机制, 结果发现两种不同的跨膜机制, 形成水孔通道和不形成水孔通道的情况, 前者跨膜自由能比后者低的多。Karttunen 小组^[33]利用伞形采样方法计算 Transportan 肽在距细胞膜中心不同位置时的自由能变化及相应的构象特征, 由此推断跨膜

过程, 结果发现 Transportan 肽跨膜在热力学上是有利的, 且没有形成水孔通道. 伞形采样方法因为每个不同距离对应一组模拟, 为了得到跨膜自由能变化, 要进行多组模拟(一般 20~40 组)才能进行充分采样, 这样就会导致所需要的计算资源巨大.

1.2 基于粗粒化模型的分子动力学模拟

粗粒化模拟方法通过适当的简化全原子模型, 降低了模拟的计算量, 在生物膜研究领域应用广泛, 可以用来研究更长时间跨度和更大体积的多肽-细胞膜体系. Nagao 小组^[26]基于粗粒化模型研究两个不同细胞穿透肽同细胞膜之间的相互作用, 结果表明多肽同细胞膜之间强的相互吸引作用对倒置胶粒的形成起着非常重要作用. Patel 小组^[35]基于 Martini 力场, 将 Arg-9 肽及膜体系粗粒化, 利用伞形采样分子动力学模拟方法研究其跨膜过程及自由能变化, 所得结果同全原子分子模拟结果一致. 但是, 粗粒化分子模拟很难抓取多肽跨膜过程中构象变化的细节. 为此, 可以探索下面两种模拟思路: 一方面, 可以通过更长时间的粗粒化模拟得到较为准确的宏观的分子运动行为; 另一方面, 把粗粒化模拟和全原子模拟结合起来, 以粗粒化模拟的结果为起始结构, 后续采用全原子模拟, 期望获得更加精确的结果.

1.3 基于隐式细胞膜模型的分子动力学模拟

另一种降低模拟计算量的方法是采取隐式细胞膜模型. 通过加入溶剂自由能项衡量细胞膜和水的作用. Pebenito 研究小组^[36]基于隐式细胞膜模型 IMM1 研究不同体系从水里进入细胞膜内的自由能变化及结构特征, 采样到的构象空间广泛, 但不能详细分析多肽同细胞膜之间的相互作用.

2 跨膜机制研究能引导新型穿透肽的设计

2.1 实验寻找或设计各类疾病特异性靶向穿透肽是药物研发的热点

穿透肽作为一种很有潜力的药物运送载体, 由于缺乏细胞特异性而且定位不准确, 所以它的进一步发展及临床应用受到限制. 因此, 设计各类细胞靶向穿透肽成为现在研究的热点, 这类穿透肽能准确定位到特定细胞, 并穿膜输送, 在很多疾病治疗中能发挥重要作用^[8]. 一种思路是寻找或直接设计具有疾

病特异性靶向穿透肽. 例如, Kondo 小组^[37]以新合成的大量多肽为研究对象, 研究各种癌细胞对它们吸收的难易程度, 从中发现 10 种穿透肽能有选择性的进入多种人类肿瘤细胞, 这将有利于癌症的诊断和治疗. Yang 小组^[38]新设计的 CPP(命名为 LMWP), 能在不影响细胞活性的情况下, 特异性携带药物分子进入红细胞, 用于治疗急性淋巴细胞白血病. 除了这些新设计的具有特定细胞靶向性的穿透肽, 一些早期的穿透肽被发现具有新的特点和功能. Knuckey 小组^[39]发现 Tat 等 4 个穿透肽具有神经保护效果, 能用于神经退行性疾病的治疗. 另一种设计思路是将一些具有不同特征的多肽整合到穿透肽中. Hilchie 等人^[40]将 7 个精氨酸同牛乳铁素的 4~9 残基片段(RRWQWR)连接, 新合成的多肽会通过破坏膜的活性并选择性的杀死白血病及淋巴瘤细胞. 浙江大学汪以真研究组^[41]将牛乳铁素的 4~9 残基片段(RRWQWR)同 protegrin-1 的 5~17 片段连接, 新整合多肽会选择性的干扰红血球中细菌的 DNA 合成, 具有很强的细胞特异性. 细胞靶向肽(cell targeting peptides, CTPs)^[42]就是一类能通过胞吞作用内化进入特定靶标细胞的多肽. 其中特定的一类就是肿瘤靶向肽(tumor homing peptides, THPs)^[43]. 我们可以充分利用细胞靶向肽的这种靶向定位特性将一些穿透肽改造成具有特定细胞靶向的穿透肽, 这样即能提高了疗效, 又能避免抗癌药物对其他健康组织的毒害作用. Raghava 课题组^[44]于 2012 年搭建了肿瘤靶向肽数据库(TumorHoPe 数据库: <http://crdd.osdd.net/raghava/umorhope/index.php>)(截至目前已经有 744 条 THPs 被收录到该数据库中). RGD(Arg-Gly-Asp)短肽^[45]是被广泛应用的一类肿瘤靶向肽, 能特异性识别并结合到肿瘤细胞表面整合素上. Lee 小组^[46]设计的包含多个 RGD 或类似物的多肽是一种新颖的 CPP. 因此, 将不同类型或功能的多肽整合在一起, 是寻找或设计各类疾病特异性靶向穿透肽的一条路径. 但目前的研究对如何选择细胞靶向肽以及怎样整合仍然存在很多疑问.

2.2 分子动力学模拟对如何设计新型穿透肽提供指导

CPPs 的序列结构特征是影响其跨膜能力的关键因素, 如 RW9 和 RL9 虽然都富含 Arg 残基^[34], 但跨膜能力差异显著, RW9 具有较大的跨膜能力, 但 RL9

虽然能结合到细胞膜上,但不能跨膜;人乳铁素的19~40残基片段是细胞穿透肽^[47],其跨膜能力依赖于是否形成环状结构.因此,对天然穿透肽进行修饰改造或将不同多肽整合在一起,是寻找或设计细胞靶向穿透肽的有效途径.但这些新设计的多肽如何考虑带正电荷残基与疏水残基之间的平衡,从而使新的多肽能同时具有靶向性和穿膜特性?CPPsite数据库中人工设计的穿透肽主要考虑以下4种方式来改变其跨膜能力:(1)对穿透肽进行特定的人工修饰,如对穿透肽的N末端残基或者C末端残基进行修饰;(2)对组成穿透肽的氨基酸的构型进行改变,如使全部氨基酸由L型变成D型,或部分氨基酸由L型变成D型;(3)使链式的穿透肽转变为环式的穿透肽;(4)对组成穿透肽的氨基酸进行含量上的改变.在CPPsite数据库中,穿透肽的穿膜活性分成3种:高穿膜活性、中间穿膜活性、低穿膜活性.图2反映了各种氨基酸在不同穿膜活性肽中的存在概率,如色氨酸残基(Trp)能增加穿透肽的穿膜活性,但过多的Trp反而导致穿膜活性稍有降低.

我们可以基于分子动力学模拟,一方面在原子层次研究穿透肽序列和结构变化如何影响其跨膜能力和跨膜分子机制;另一方面研究连接不同细胞靶向肽对穿透肽跨膜分子机制的影响.找出什么样的多肽不仅具有细胞靶向性,还具有跨膜能力.这方面研究能将实验和计算有效结合,同时也能对定量理解及设计疾病靶向穿透肽作出贡献.

3 结论及展望

综上所述,现有研究表明,分子动力学模拟是研究细胞穿透肽跨膜机制的一种有效工具,是实验研

究的有力补充.这些研究不仅能帮助我们深入理解不同多肽的跨膜效率及分子机制,揭示多种因素对跨膜分子机制的影响;而且还能有利于我们在原子水平上揭示穿透肽的跨膜分子机制,为进一步设计和改进细胞穿透肽提供重要的理论指导.

但是,目前使用分子动力学模拟开展细胞穿透肽跨膜机制的研究还不够广泛深入,主要集中在多肽同细胞膜之间的相互作用、多肽导致细胞膜的结构变化以及多肽的跨膜自由能变化及最佳跨膜途径等.所采用的分子模型是全原子模型(显式的处理所有的多肽、细胞膜和水)、粗粒化模型(粗粒化的处理所有的多肽、细胞膜和水)和隐式细胞膜模型(全原子模型处理多肽、隐式细胞膜模型处理细胞膜和水).所使用的采样方法是常规分子动力学模拟和伞形采样增强模拟.此外,模拟参数还需要进一步优化设置,上海交通大学魏冬青研究组同Jokob组合作^[48]发现抗菌肽与细胞膜相互作用的结果受两方面因素影响:一是所用的蛋白分子力场及脂质力场,尽量选择一致的分子力场;二是模拟时间,考虑到蛋白质在细胞膜中需要较长的时间才能实现大的构象转换.

当前,基于分子动力学模拟开展穿透肽跨膜分子机制及穿透肽设计的研究还有大量问题有待深入研究:(1)通过解决不同模拟结果的矛盾,加强对分子跨膜机制的认识.针对同一穿透肽的不同模拟,所得到的结果存在明显的差异,具体原因是什么?是否不同模拟参数导致不一致结果?是否同一穿透肽存在不同的跨膜机制?这些不同跨膜机制之间的关系是什么?(2)发展或整合现有增强采样方法,更加有效模拟细胞穿透肽问题.采用伞形采样方法后计算量仍然很大,该方法并不适合多肽在各种条件下的模拟研究,目前还尚未见到有关通过增强采样方法用单组分子动力学模拟直接获取穿透肽的跨膜过程及自由能变化的报道,所以有效整合增强采样方法,可望获得更好模拟结果.(3)对细胞穿透肽跨膜分子机制的认识还非常有限.如果针对同一穿透肽,结合多种不同模拟方案,开展深入系统的跨膜微观机制研究,综合考虑其跨膜机制,可能有助于其机制的理解.(4)应用研究成果,设计全新的穿透肽.如何将分子动力学模拟和实验研究很好地结合起来,进一步改进和设计新的细胞靶向性穿透肽,将可能对新型肽药发现有重要的指导作用.最近,本课题组采用正交空间无规行走增强采样方法(orthogonal

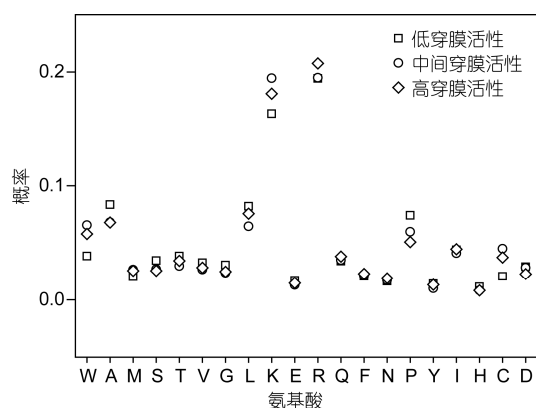


图2 不同穿膜活性穿透肽中各种氨基酸的出现概率

space random walk, OSRW)^[49], 对多肽-细胞膜-水体系进行充分采样(模拟结果正在整理中), 从而为基于单组模拟直接快速获取多肽距离细胞膜中心不同位置时的自由能、分析不同位置时多肽的构象特征提供了新的可能. 因此, 基于增强采样的分子动力学模拟

方法, 研究不同因素对穿透肽的跨膜分子机制的影响以及设计新的细胞靶向性穿透肽是一条值得尝试的途径, 也是一个亟需加强的领域. 这将对细胞穿透肽跨膜分子机制的认识, 进而设计新型肽药起到重要的促进作用.

致谢 感谢澳大利亚格里菲斯大学周耀旗教授的有益讨论.

参考文献

- 1 Wang F, Wang Y, Zhang X, et al. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. *J Control Release*, 2014, 174: 126–136
- 2 Stalmans S, Wynendaele E, Bracke N, et al. Chemical-functional diversity in cell-penetrating peptides. *PLoS One*, 2013, 8: e71752
- 3 Bechara C, Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett*, 2013, 587: 1693–1702
- 4 Papadopoulou L C, Tsiftoglou A S. The potential role of cell penetrating peptides in the intracellular delivery of proteins for therapy of erythroid related disorders. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2013, 6: 32–53
- 5 Shin M C, Zhang J, Min K A, et al. Cell-penetrating peptides: Achievements and challenges in application for cancer treatment. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102: 575–587
- 6 Vasconcelos L, Parn K, Langel U. Therapeutic potential of cell-penetrating peptides. *Ther Deliv*, 2013, 4: 573–591
- 7 Gautam A, Singh H, Tyagi A, et al. CPPsite: A curated database of cell penetrating peptides. *Database (Oxford)*, 2012, 2012: bas015
- 8 Wang H X, Xiao H, Zhong L, et al. Cell-penetrating fusion peptides OD1 and OD2 interact with Bcr-Abl and influence the growth and apoptosis of K562 cells. *Mol Cell Biochem*, 2014, 385: 311–318
- 9 Sgolastra F, Deronde B M, Sarapas J M, et al. Designing mimics of membrane active proteins. *Acc Chem Res*, 2013, 46: 2977–2987
- 10 Holm T, Andaloussi S E, Langel U. Comparison of CPP uptake methods. *Methods Mol Biol*, 2011, 683: 207–217
- 11 Trabulo S, Cardoso A L, Mano M, et al. Cell-penetrating peptides-mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2010, 3: 961–993
- 12 Madani F, Lindberg S, Langel U, et al. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys*, 2011, 2011: 414729
- 13 Beevers A J, Dixon A M. Helical membrane peptides to modulate cell function. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 2146–2157
- 14 Rydberg H A, Matson M, Amand H L, et al. Effects of tryptophan content and backbone spacing on the uptake efficiency of cell-penetrating peptides. *Biochemistry*, 2012, 51: 5531–5539
- 15 Eiriksdottir E, Konate K, Langel U, et al. Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1798: 1119–1128
- 16 Wollack J W, Zeliadt N A, Ochocki J D, et al. Investigation of the sequence and length dependence for cell-penetrating prenylated peptides. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 161–163
- 17 Nussinov R. The significance of the 2013 Nobel Prize in Chemistry and the challenges ahead. *PLoS Comput Biol*, 2014, 10: e1003423
- 18 Dror R O, Dirks R M, Grossman J P, et al. Biomolecular simulation: A computational microscope for molecular biology. *Annu Rev Biophys*, 2012, 41: 429–452
- 19 Lensink M F, Christiaens B, Vandekerckhove J, et al. Penetratin-membrane association: W48/R52/W56 shield the peptide from the aqueous phase. *Biophys J*, 2005, 88: 939–952
- 20 Hecce H D, Garcia A E. Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 20805–20810
- 21 Fleming E, Maharaj N P, Chen J L, et al. Effect of lipid composition on buforin II structure and membrane entry. *Proteins*, 2008, 73: 480–491
- 22 Hecce H D, Garcia A E, Litt J, et al. Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophys J*, 2009, 97: 1917–1925
- 23 Yesylevskyy S, Marrink S J, Mark A E. Alternative mechanisms for the interaction of the cell-penetrating peptides penetratin and the TAT peptide with lipid bilayers. *Biophys J*, 2009, 97: 40–49
- 24 Romo T D, Bradney L A, Greathouse D V, et al. Membrane binding of an acyl-lactoferricin B antimicrobial peptide from solid-state NMR experiments and molecular dynamics simulations. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1808: 2019–2030

- 25 Dunkin C M, Pokorny A, Almeida P F, et al. Molecular dynamics studies of transportan 10 (tp10) interacting with a POPC lipid bilayer. *J Phys Chem B*, 2011, 115: 1188–1198
- 26 Kawamoto S, Takasu M, Miyakawa T, et al. Inverted micelle formation of cell-penetrating peptide studied by coarse-grained simulation: Importance of attractive force between cell-penetrating peptides and lipid head group. *J Chem Phys*, 2011, 134: 095103
- 27 Song J, Kai M, Zhang W, et al. Cellular uptake of transportan 10 and its analogs in live cells: Selectivity and structure-activity relationship studies. *Peptides*, 2011, 32: 1934–1941
- 28 Tsutsumi A, Javkhlantugs N, Kira A, et al. Structure and orientation of bovine lactoferrampin in the mimetic bacterial membrane as revealed by solid-state NMR and molecular dynamics simulation. *Biophys J*, 2012, 103: 1735–1743
- 29 Walrant A, Vogel A, Correia I, et al. Membrane interactions of two arginine-rich peptides with different cell internalization capacities. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1818: 1755–1763
- 30 Antunes E, Azoia N G, Matama T, et al. The activity of LE10 peptide on biological membranes using molecular dynamics, *in vitro* and *in vivo* studies. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 106: 240–247
- 31 Huang K, Garcia A E. Free energy of translocating an arginine-rich cell-penetrating peptide across a lipid bilayer suggests pore formation. *Biophys J*, 2013, 104: 412–420
- 32 Pourmoussa M, Karttunen M. Early stages of interactions of cell-penetrating peptide penetratin with a DPPC bilayer. *Chem Phys Lipids*, 2013, 169: 85–94
- 33 Pourmoussa M, Wong-ekkabut J, Patra M, et al. Molecular dynamic studies of transportan interacting with a DPPC lipid bilayer. *J Phys Chem B*, 2013, 117: 230–241
- 34 Witte K, Olausson B E, Walrant A, et al. Structure and dynamics of the two amphipathic arginine-rich peptides RW9 and RL9 in a lipid environment investigated by solid-state NMR and MD simulations. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828: 824–833
- 35 Hu Y, Liu X, Sinha S K, et al. Translocation thermodynamics of linear and cyclic nonaarginine into model dppc bilayer via coarse-grained molecular dynamics simulation: Implications of pore formation and nonadditivity. *J Phys Chem B*, 2014, 118: 2670–2682
- 36 Lazaridis T, Leveritt J M 3rd, Pebenito L. Implicit membrane treatment of buried charged groups: Application to peptide translocation across lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838: 2149–2159
- 37 Kondo E, Saito K, Tashiro Y, et al. Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides as anticancer molecular delivery systems. *Nat Commun*, 2012, 3: 951
- 38 He H, Ye J, Wang Y, et al. Cell-penetrating peptides mediated encapsulation of protein therapeutics into intact red blood cells and its application. *J Control Release*, 2014, 176: 123–132
- 39 Meloni B P, Craig A J, Milech N, et al. The neuroprotective efficacy of cell-penetrating peptides TAT, penetratin, Arg-9, and Pep-1 in glutamic acid, kainic acid, and *in vitro* ischemia injury models using primary cortical neuronal cultures. *Cell Mol Neurobiol*, 2014, 34: 173–181
- 40 Hilchie A L, Vale R, Zemlak T S, et al. Generation of a hematologic malignancy-selective membranolytic peptide from the antimicrobial core (RRWQWR) of bovine lactoferricin. *Exp Mol Pathol*, 2013, 95: 192–198
- 41 Liu Y, Xia X, Xu L, et al. Design of hybrid beta-hairpin peptides with enhanced cell specificity and potent anti-inflammatory activity. *Biomaterials*, 2013, 34: 237–250
- 42 Juliano R L, Alam R, Dixit V, et al. Cell-targeting and cell-penetrating peptides for delivery of therapeutic and imaging agents. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2009, 1: 324–335
- 43 Enback J, Laakkonen P. Tumour-homing peptides: Tools for targeting, imaging and destruction. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35: 780–783
- 44 Kapoor P, Singh H, Gautam A, et al. TumorHoPe: A database of tumor homing peptides. *PLoS One*, 2012, 7: e35187
- 45 Dijkgraaf I, Liu S, Kruijtz J A, et al. Effects of linker variation on the *in vitro* and *in vivo* characteristics of an ¹¹¹In-labeled RGD peptide. *Nucl Med Biol*, 2007, 34: 29–35
- 46 Mokhtarieh A A, Kim S, Lee Y, et al. Novel cell penetrating peptides with multiple motifs composed of RGD and its analogs. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432: 359–364
- 47 Duchardt F, Ruttekolk I R, Verdurmen W P, et al. A cell-penetrating peptide derived from human lactoferrin with conformation-dependent uptake efficiency. *J Biol Chem*, 2009, 284: 36099–36108
- 48 Wang Y, Zhao T, Wei D, et al. How reliable are molecular dynamics simulations of membrane active antimicrobial peptides? *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838: 2280–2288
- 49 Lee S, Chen M, Yang W, et al. Sampling long time scale protein motions: OSRW simulation of active site loop conformational free energies in formyl-CoA: Oxalate CoA transferase. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 7252–7253

Molecular mechanism of translocation and design of cell penetrating peptides based on molecular dynamics simulation

CAO ZanXia, LIU Lei & WANG JiHua

Shandong Provincial Key Laboratory of Functional Macromolecular Biophysics, Dezhou 253023, China

The lack of cell specificity of cell penetrating peptides (CPPs) remains a major issue for their clinical application. To successfully design disease targeting CPPs, it is necessary to improve our understanding of the molecular mechanism of membrane translocation of CPPs and locate the key factors that affect this mechanism. Molecular dynamics simulations have been proven to be a valuable tool to study the molecular mechanism of membrane penetration by small peptides. Molecular dynamics simulations have mainly been used to study the translocation process, including structural properties of transition states, free energy profiles, and the effect of cell membrane peptide sequence/structure variation on possible molecular mechanisms and delivery efficiency. With the development of enhanced sampling techniques, it is possible to obtain translocation free energy and possible transition pathways from one continuous simulation. Hence, molecular dynamics simulations will provide in depth mechanistic understanding for designing cell targeting CPPs that are critical for reducing side effects and enhancing the efficient delivery of drugs into target cells.

cell penetrating peptide, translocation mechanism, translocation free energy, molecular dynamics simulation, cell targeting cell penetrating peptide

doi: 10.1360/N972014-00329