

文章编号: 1008-9357(2026)04-0281-10

DOI: 10.14133/j.cnki.1008-9357.20260529001

构象介导的聚氨基酸囊泡用于大分子药物递送

张 秀¹, 祝天雯¹, 汪桂锦¹, 徐鹏博¹, 杜春翊¹, 郑 毅^{1,2}, 李洁华¹, 谭 鸿¹, 丁明明¹
(四川大学 1. 高分子科学与工程学院, 先进高分子材料国家重点实验室; 2. 华西医院, 成都 610065)

摘 要: 大分子药物因其高特异性、多功能性及良好的生物相容性而备受关注,但其稳定性差、跨膜能力不足等缺陷严重制约了临床转化。纳米药物载体虽可有效提高药物的生物利用度与靶向性,但如何实现大分子药物的高效胞内递送及可控释放,仍是该领域亟待攻克的核心难题。本研究设计并合成了具有不同构象的两亲性聚氨基酸,该类聚合物可自组装形成囊泡,用于高效包载亲水性大分子药物。研究表明,与具有 β -折叠构象的聚氨基酸囊泡相比,具有 α -螺旋构象的聚氨基酸囊泡因分子间作用力相对较弱,从而表现出更优异的膜通透性,有利于亲水性大分子药物的有效释放。尤为重要的是, α -螺旋构象增强了囊泡的膜活性,不仅能够促进肿瘤细胞对囊泡的高效摄取,还可有效介导其逃逸内吞-溶酶体途径,进而促进大分子药物在胞内的释放与分布。本研究为大分子药物的胞内递送提供了新策略,所构建的 α -螺旋聚氨基酸囊泡作为一类新型纳米药物载体,展现出广阔的应用前景。

关键词: 聚氨基酸; 构象; 囊泡; 药物递送; 大分子药物

中图分类号: O63

文献标志码: A

Conformation-Mediated Poly(amino acid) Vesicles for Macromolecular Drug Delivery

ZHANG Xiu¹, ZHU Tianwen¹, WANG Guijin¹, XU Pengbo¹, DU Chunyi¹, ZHENG Yi^{1,2},
LI Jiehua¹, TAN Hong¹, DING Mingming¹

(1. College of Polymer Science and Engineering, National Key Laboratory of Advanced Polymer Materials; 2. West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610065)

Abstract: Macromolecular drugs have attracted considerable attention owing to their high specificity, multifunctionality, and favorable biocompatibility. However, their clinical translation is severely hampered by inherent limitations, including poor stability and insufficient membrane-crossing ability. Although nanocarriers can improve the bioavailability and targeting of these drugs, achieving efficient intracellular delivery with controlled release remains a critical challenge. In this study, we design and synthesize amphiphilic poly(amino acid) derivatives with distinct conformations. These polymers self-assemble into polymersomes that efficiently encapsulate hydrophilic macromolecular drugs. Compared to their β -sheet counterparts, α -helical poly(amino acid) polymersomes exhibit relatively weaker intermolecular interactions, resulting in superior

收稿日期: 2026-05-29

基金项目: 国家自然科学基金(52525305、52273140、52473313、52503189); 中国博士后科学基金(BX20240241、2024 M762213)

作者简介: 张 秀(2001—), 女, 陕西榆林人, 硕士生, 主要研究方向为生物医用材料。E-mail: 15291255838@163.com

通信联系人: 郑 毅, E-mail: 1790878917@qq.com; 丁明明, E-mail: dmmshx@163.com

引用格式: 张 秀, 祝天雯, 汪桂锦, 徐鹏博, 杜春翊, 郑 毅, 李洁华, 谭 鸿, 丁明明. 构象介导的聚氨基酸囊泡用于大分子药物递送 [J]. 功能高分子学报, 2026, 39(4): 281-290.

Citation: ZHANG Xiu, ZHU Tianwen, WANG Guijin, XU Pengbo, DU Chunyi, ZHENG Yi, LI Jiehua, TAN Hong, DING Mingming. Conformation-Mediated Poly(amino acid) Vesicles for Macromolecular Drug Delivery [J]. Journal of Functional Polymers, 2026, 39(4): 281-290.

membrane permeability, thereby facilitating more effective release of the encapsulated cargo. Remarkably, the α -helical conformation also imparts enhanced membrane activity, which not only facilitates efficient uptake by tumor cells but also promotes endo-lysosomal escape, leading to improved intracellular release and distribution of macromolecular drugs. This study proposes a novel strategy for macromolecular drug delivery, and the engineered α -helical poly(amino acid) polymersomes emerge as a promising category of nanocarriers with extensive translational application prospects.

Key words: poly(amino acid); conformation; vesicle; drug delivery; macromolecular drug

生物大分子是生物体内天然存在的高分子量化合物,主要包括核酸、蛋白质等。它们在生物催化、遗传存储与传递、物质运输和免疫防御等生命活动中发挥核心作用^[1]。近年来,随着基因编辑、基因治疗和蛋白质药物等技术的迅猛发展,生物大分子已成为化学、生物学和医学等多学科交叉领域的研究前沿^[2]。相较于传统小分子化学药物(通常相对分子量低于 500),生物大分子药物展现出独特的治疗优势:一是高特异性,能够精准识别并作用于疾病相关靶点,例如程序性细胞死亡蛋白 1(Programmed cell death protein 1, PD-1)、人表皮生长因子受体 2(Human epidermal growth factor receptor 2, HER2)等是肿瘤免疫治疗的重要靶点,靶向药物通过特异性结合上述分子,可减少对正常组织的非特异性损伤;二是多功能性,既可阻断蛋白-蛋白相互作用,也可替代缺失的酶或调节基因表达;三是良好的生物相容性,其天然来源或仿生设计有助于减少机体免疫排斥反应。然而,生物大分子药物的临床转化仍受诸多固有缺陷制约。例如,此类药物在体循环中易被酶降解,稳定性差且半衰期短;同时,其分子尺寸较大,难以跨越细胞膜^[3]。

利用纳米载体进行药物递送是提升生物大分子药物疗效的一种极具应用前景的策略。过去十年间,研究者已开发出多种纳米递送系统用于生物大分子药物的高效递送,包括脂质体^[4,5]、聚合物纳米粒子^[6-8]、纳米凝胶^[9]及无机纳米颗粒^[10]等。利用纳米载体递送生物大分子药物可显著延长药物的循环半衰期、提高细胞内化效率及靶向能力。例如,Dong 等^[11]设计了一种可电离的脂质纳米颗粒,该颗粒在啮齿类动物及非人灵长类动物模型中实现了 siRNA 的高效、选择性递送,并有效沉默了与治疗相关的靶基因。Wang 课题组^[12]设计了一种新型阳离子脂质体,该脂质体能够模拟丝状肌动蛋白的功能,完全绕过内吞作用及溶酶体降解,实现蛋白质的高效递送,同时保持蛋白质的高生物活性。

聚合物囊泡由两亲性嵌段共聚物自组装形成,其疏水链段构成膜层,亲水链段分别朝向囊泡内外两侧的水相环境^[13-18]。这一独特结构使其能够同时将疏水性药物和亲水性药物分别装载于膜层和内腔中,从而实现多药协同递送。与脂质体相比,聚合物囊泡具有更高的结构稳定性和优异的分子可裁剪性。Iatridi 等^[19]报道了一种基于星型四元共聚物的聚合物囊泡,该囊泡可同时包载亲水性化疗药物盐酸阿霉素和疏水性化疗药紫杉醇,在 pH 与温度双响应条件下实现两种药物的控释,显著增强了对癌细胞的协同杀伤效果。然而,现有刺激响应型聚合物囊泡的释药策略多依赖于囊泡结构的崩解,常引发药物突释或释放动力学不可控的问题。本课题组^[20]构建的光还原自降解囊泡,其在病灶区域胞内过表达的还原性物质作用下发生崩解,进而引发药物突释。因此,如何在保持囊泡膜结构完整性的前提下实现精准且可调节的药物控释仍是一个亟待解决的科学问题。

本研究采用具有不同构象的聚氨基酸衍生物,使其自组装形成聚合物囊泡,并利用该囊泡包载不同分子量的亲水性大分子药物模型。相比于具有 β -折叠构象的两亲性聚半胱氨酸(PPC)形成的囊泡,具有 α -螺旋构象的氧化型聚半胱氨酸衍生物(PPCO)形成的囊泡表现出更高的膜通透性,能够有效释放大分子药物。此外,PPCO 具有更强的膜活性,能够快速进入肿瘤细胞并逃逸溶酶体,在胞内高效释放亲水性大分子药物蜂毒肽,从而实现显著的抗肿瘤效果。本研究揭示了聚氨基酸二级结构对囊泡膜通透性、细胞内在化及溶酶体逃逸能力的影响,为设计高效的大分子药物递送载体提供了新策略。

1 实验部分

1.1 原料和试剂

甲氧基聚乙二醇胺(MPEG-NH₂, 相对分子质量 5 000, w=98%):苏州诺德派森医药科技有限公司;胆固醇

甲酰氯($w=97\%$)、三光气($w=99\%$)、L-半胱氨酸(L-Cysteine, $w=97\%$):上海阿达玛斯试剂有限公司; Cy5-*N*-羧基琥珀酰亚胺酯(Cy5-NHS, $w=98\%$)、细胞计数试剂盒-8(CCK-8):德国 Sigma-Aldrich 公司; 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、溶酶体红色荧光探针(LysoTracker Red):上海碧云天生物技术股份有限公司; 荧光素异硫氰酸酯标记的葡聚糖(FITC-Dextran, 重均分子量(M_w)分别为 $3\times 10^3\sim 5\times 10^3$ 与 20×10^3):西安瑞禧生物科技有限公司; 罗丹明 6G(R6G, $w=95\%$):日本东京化成工业株式会社; 蜂毒肽(Melittin, $w\geq 97\%$):上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 氢氧化钠(NaOH, $w=98\%$):成都长联化工试剂有限公司; 二甲亚砜(DMSO)、四氢呋喃(THF)、无水乙醚:分析纯,成都科隆化学品有限公司。

1.2 测试与表征

核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$):瑞士 Bruker 公司 AV III HD 型核磁共振仪,溶剂为氘代氯仿(CDCl_3), 400 MHz; 傅里叶变换红外光谱(FT-IR):美国 Thermo Fisher 公司 Nicolet-IS10 型红外光谱仪; 圆二色谱(CD):英国 Applied Photophysics 公司 Chirascan V100 型圆二色谱仪,波长范围 190~260 nm, 10 mm 光程石英比色皿,样品 PPC、PPCO 质量浓度为 0.1 mg/mL; 荧光分光光度计:日本日立有限公司 F-4600 型; 激光共聚焦显微镜(CLSM):日本奥林巴斯公司 FV1000 型; 动态光散射仪(DLS):英国马尔文 Zetasizer Nano ZS 型; 透射电子显微镜(FE-TEM):美国 Thermo Fisher 公司 Tecnai G2 F20 S-TWIN 型场发射透射电子显微镜。

1.3 氨基酸羧酸酐的合成

以 1.1 节的 L-Cysteine 为起始原料,经 2 mol/L NaOH 溶液溶解成盐后,参照文献 [13] 的合成方法制备得到胆固醇修饰的半胱氨酸(L-Cys-Chol)。将 L-Cys-Chol(3.1 g)溶于干燥的 THF(30 mL)后,在氩气保护气氛下向 Schlenk 烧瓶中滴加溶于无水 THF(20 mL)的三光气(0.6 g)溶液。将上述混合体系置于氩气氛围中,于 50 °C 条件下搅拌反应 4 h,使 L-Cys-Chol 与三光气发生环化反应,生成相应的 α -氨基酸环内酸酐(NCA, N-carboxyanhydride)。反应结束后,将所得澄清液进行减压浓缩处理,随后在干燥的 THF/正己烷混合溶剂中重结晶 3 次。最终,将所得产物进行真空干燥,得到疏水基团修饰的 L-半胱氨酸环内羧酸酐(L-Cys-Chol-NCA)白色粉末(收率为 70%)。

1.4 PPC 的合成

通过 MPEG-NH_2 引发 L-Cys-Chol-NCA 开环聚合制备了疏水基团修饰的 PPC。首先,将 L-Cys-Chol-NCA(2.4 g)溶于 Schlenk 管的无水 THF(30 mL)中。然后,将 MPEG-NH_2 (1.0 g)加入无水 THF(10 mL)中,在 35 °C、干燥氩气条件下反应 3 d。最后,将两溶液混合,经蒸发浓缩,在冰乙醚中沉淀 3 次,得到淡黄色固体 PPC(收率为 70%)。

1.5 PPCO 自组装体的制备

将 PPC 侧链的硫醚基团氧化为砜,得到 PPCO。将 10 mg PPC 溶于 DMSO 后,逐滴加入 9 mL 去离子水中,同时快速搅拌。组装完成后,将溶液转移至截留分子量为 3500 的透析袋中,并置于去离子水中透析 2 d,期间每天替换 6 次外部的去离子水。将溶液以 5000 r/min 的转速进行 10 min 的离心操作,接着用孔径为 0.45 μm 的注射器式滤器(Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland)进行过滤,过滤所得滤液即为 PPC 自组装体溶液。随后,取 10 mL、1 mg/mL 的 PPC 自组装体溶液,置于含有 10%(体积分数) H_2O_2 和 5%(体积分数)乙酸的水溶液中进行氧化处理,在 37 °C 下搅拌 16 h,经透析过滤即可得到 PPCO 自组装体。

1.6 FITC-Dextran 的包载

将 1 mg FITC-Dextran 分散于 1 mL 去离子水中,所得溶液稀释 20 倍后,取 150 μL 滴加至 PPC 或 PPCO 的自组装体溶液中,超声处理 2 h。随后,将溶液转移至截留分子量为 30×10^3 的透析袋中,在磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH=7.4)中透析 2 d,期间定期更换透析液。透析结束后将溶液过滤,即得包载 FITC-Dextran 的自组装体,分别记为 FITC-Dextran@PPC 和 FITC-Dextran@PPCO。

1.7 药物释放测定

将 FITC-Dextran@PPC 与 FITC-Dextran@PPCO 分别置于释放介质中,于不同的时间点取样,采用荧光分光光度计测定 FITC-Dextran 的荧光发射光谱。激发波长设为 488 nm,发射波长扫描范围为 500~800 nm。

1.8 细胞摄取

首先,将人乳腺癌细胞(MCF-7)以每孔 1×10^5 个的密度接种于 6 孔板中的盖玻片上。培养 24 h 后,将 Cy5-NHS 标记的 PPC(PPC-Cy5)和 PPCO(PPCO-Cy5)分别以恒定的 Cy5 质量浓度(4 $\mu\text{g/mL}$)加入孔板中,再

继续培养 4 h。孵育结束后,弃去上清液,用 PBS 洗涤孔板 3 次。接着,采用 LysoTracker Red 对溶酶体进行 30 min 染色,再用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 15 min。然后,用 DAPI 染色 10 min 以标记细胞核。最后,滴加适量封片剂封片,采用 CLSM 进行观察。

1.9 胞内药物递送

首先,将 MCF-7 细胞以每孔 1×10^5 个的密度接种于 6 孔板中的盖玻片上。培养 24 h 后,将 FITC-Dextran@PPC 或 FITC-Dextran@PPCO 加入孔板中,使 FITC-Dextran 的最终质量浓度均为 $6 \mu\text{g/mL}$,再继续培养 4 h,以便借助 FITC 的荧光性质,通过荧光显微镜观察 FITC-Dextran 在细胞内的分布,研究细胞的内吞情况。孵育结束后,弃去上清液,用 PBS 洗涤孔板 3 次。然后,使用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 15 min,再用 DAPI 染色 10 min 以标记细胞核。最后,滴加适量封片剂封片,采用 CLSM 进行观察。流式细胞术定量分析数据以平均值 $\pm$ 标准误差表示 ($n=5$)。采用独立样本检验进行统计学显著性分析: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ 。

1.10 细胞毒性

使用 CCK-8 测定细胞活性。将 MCF-7 细胞以每孔 5×10^3 个的密度接种于 96 孔板中培养 24 h。随后,向各孔中加入不同制剂。继续培养 24 h 后,每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂,再孵育 30 min。使用酶标仪测量 450 nm 处的光密度(OD),以不含细胞和药物的培养基孔为空白对照,无药物处理的细胞孔为对照,按公式 $(\text{OD}_S - \text{OD}_B) / (\text{OD}_N - \text{OD}_B) \times 100\%$ 计算相对细胞活性,式中 OD_S 、 OD_B 、 OD_N 分别表示给药组、空白组、阴性对照组的光密度。

2 结果与讨论

2.1 聚氨基酸的合成及结构表征

为验证 L-Cys-Chol-NCA 的成功合成,采用 $^1\text{H-NMR}$ (图 1(a))和 FT-IR(图 1(b))对其进行表征。如图 1(a)所示, $^1\text{H-NMR}$ 谱图中可清晰地观察到胆固醇基团的特征质子信号(化学位移为 5.3、4.5、2.3、0.6~1.8 处)以及半胱氨酸的特征信号(化学位移为 3.2、2.9、2.6、1.9 处)。同时,归属于 NCA 环上次甲基质子的信号出现在 4.8 处。如图 1(b)所示, FT-IR 分析进一步证实了 NCA 环结构的存在: $1800 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 范围内出现了归属于环内羧酸酐羰基伸缩振动的特征吸收峰。

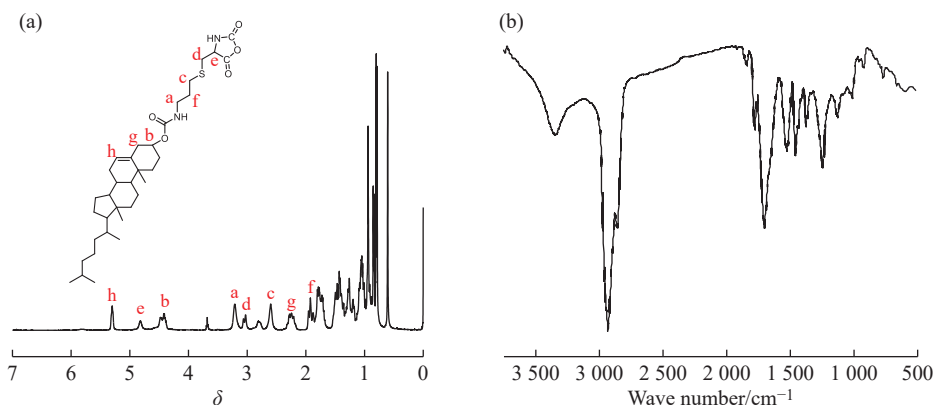


图 1 L-Cys-Chol-NCA 的(a) $^1\text{H-NMR}$ 波谱和(b)FT-IR 光谱
Fig. 1 (a) $^1\text{H-NMR}$ spectrum and (b) FT-IR spectrum of L-Cys-Chol-NCA

PPC 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图如图 2(a)所示,各结构单元的特征质子信号清晰可辨:侧链中与硫原子相邻的亚甲基(CH-S-CH)质子信号出现在化学位移 2.8 与 2.9 处;侧链酰胺键相邻的亚甲基(CH-NH-CO)质子信号位于 3.2 处;胆固醇基团双键质子(C=CH)信号出现在 5.3 处,证明疏水性单元成功引入聚氨基酸侧链。此外, MPEG- NH_2 主链中亚甲基($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$)质子信号在 3.6 处呈现强峰;而与酰胺键直接相连的次甲基(NH-CH-CO)质子信号则位于 4.4 处。通过比较 MPEG- NH_2 特征峰(3.6 处)与胆固醇特征峰(5.3 处)的积分面积,计算出疏水性基团修饰的半胱氨酸嵌段聚合度约为 25。由于 $-\text{SO}_2-$ 基团的高极性,PPCO 的 $^1\text{H-}$

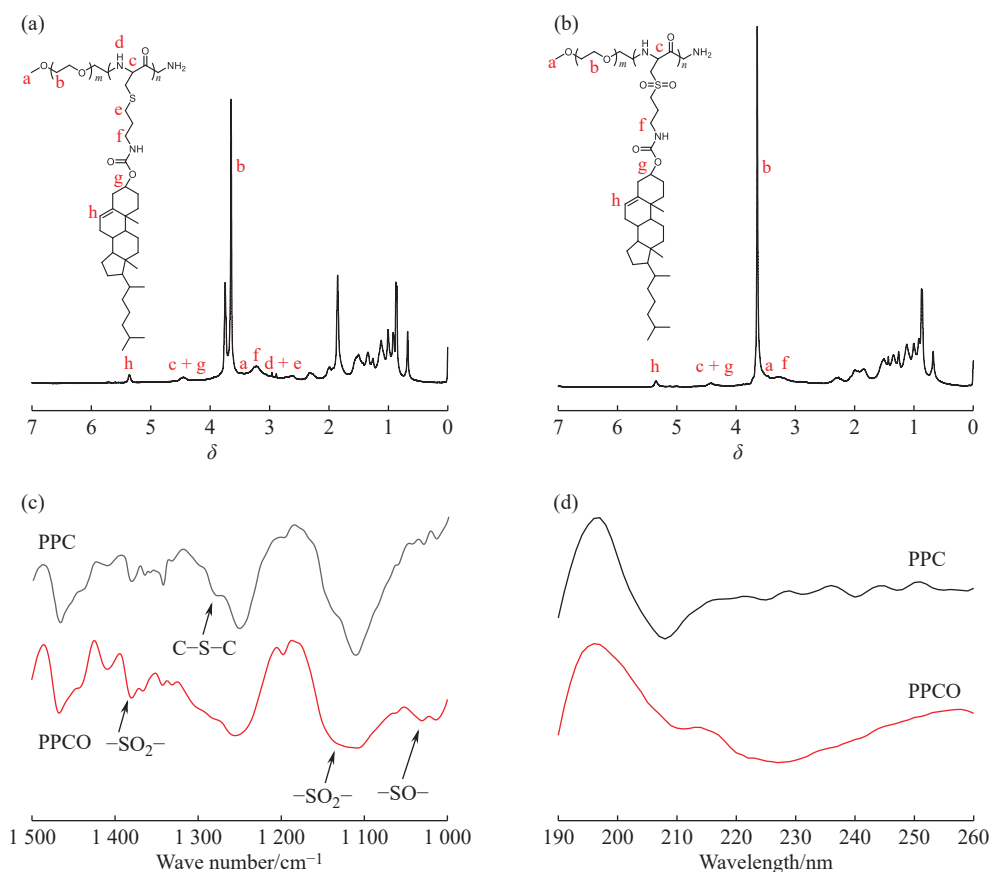


图2 (a)PPC和(b)PPCO的¹H-NMR波谱; PPC和PPCO的(c)FT-IR光谱和(d)圆二色谱图

Fig. 2 ¹H-NMR spectra of (a) PPC and (b) PPCO; (c) FT-IR spectra and (d) CD spectra of PPC and PPCO

NMR谱图中与硫原子相邻的甲基质子的信号显著减弱(图2(b))。FT-IR谱图(图2(c))进一步证实了PPCO的结构: PPC在1280 cm⁻¹处的硫醚伸缩振动吸收带消失, 同时在1040、1138、1380 cm⁻¹处检测到归属于—SO₂—伸缩振动的吸收峰[13, 14, 21, 22]。PPC与PPCO分子极性的差异可能影响其二级构象。圆二色谱结果表明, PPC主要呈 β -折叠构象, 而PPCO则呈现 α -螺旋构象(图2(d))。

2.2 聚氨基酸的自组装性能

借助DLS对PPC与PPCO自组装体粒径(d)及多分散指数(PDI)进行表征。如图3(a、b)所示, PPC和PPCO自组装体的平均粒径分别为163.1 nm和173.9 nm, PDI分别为0.158和0.125, 表明两者均具有较好的粒径均一性。为探究自组装体的形貌特征, 借助CLSM观察其对亲水性荧光染料R6G的包载行为。

如图3(c、d)所示, PPC与PPCO自组装体内部均呈现清晰的球形荧光轮廓, 表明两者均具备包载亲水性分子的能力, 进而证实其囊泡状结构。为了更为直观地观察PPC和PPCO组装体的形貌, 采用TEM对其形貌进行表征(图3(e、f))。结果显示, PPC和PPCO组装体均具有典型的中空球形形貌, 为囊泡结构, 与CLSM结果一致。

2.3 构象介导的药物释放

为了探究构象的变化是否会影响药物释放行为, 将 M_w 分别为 $3 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 和 20×10^3 的亲水性大分子FITC-Dextran装载到PPC与PPCO自组装体中, 测定其随着时间变化的荧光发射光谱。有趣的是, 在具有 β -折叠构象的PPC组装体中, 不同分子量的葡聚糖释放均受到显著抑制, 随着孵育时间延长, 体系中药物的荧光强度仅发生微弱变化(图4(a、c)), 说明完整的囊泡壁结构具有低通透性, 对不同分子量的包载药物均起到了良好的封存效果。

然而, 在具有 α -螺旋构象的PPCO组装体中, 随着孵育时间的延长, FITC-Dextran的荧光强度显著上升, 且FITC-Dextran@PPCO最终荧光强度几乎达到药物在水溶液中的自由状态水平(图4(b、d)), 说明药物完全释放。这主要归因于PPCO的 α -螺旋构象赋予了聚氨基酸囊泡相对更弱的分子间作用力, 使其具有更好的膜通透性, 因此FITC-Dextran具有更好的药物释放性能。

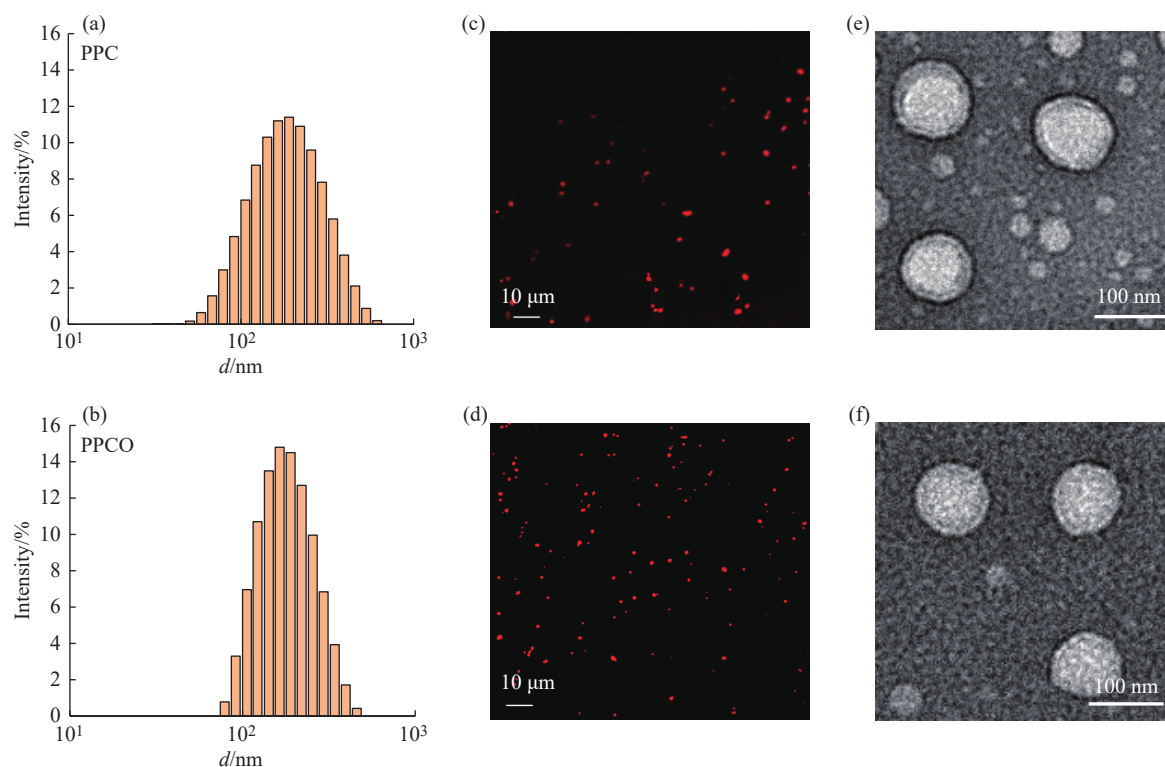


图 3 (a)PPC 和(b)PPCO 的粒径分布图; 加载 R6G 的(c)PPC 和(d)PPCO 的 CLSM 图; (e)PPC 和(f)PPCO 的 FE-TEM 图

Fig. 3 Particle size distributions of (a) PPC and (b) PPCO; CLSM images of R6G-loaded (c) PPC and (d) PPCO; FE-TEM images of (e) PPC and (f) PPCO

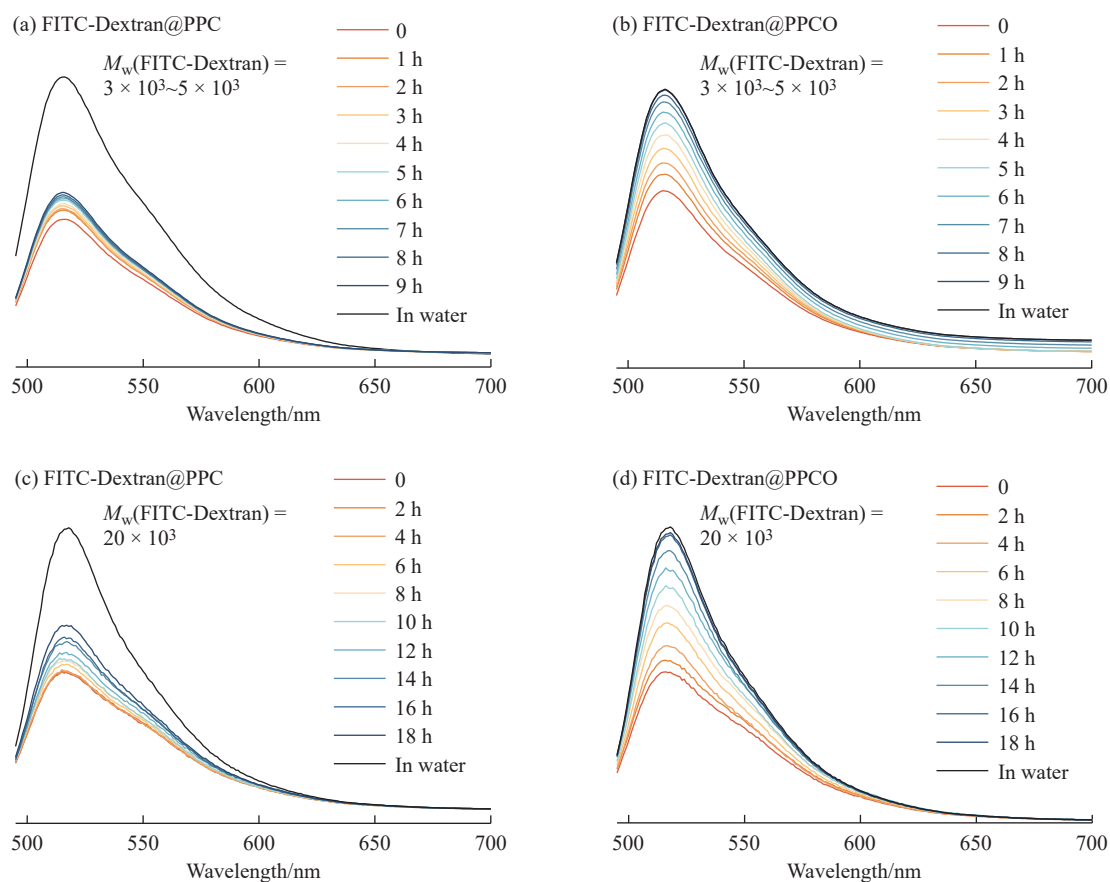


图 4 FITC-Dextran 从 PPC 和 PPCO 中释放的荧光发射光谱

Fig. 4 Fluorescence emission spectra of FITC-Dextran released from PPC and PPCO

2.4 构象介导的细胞内化

在药物递送领域,天然细胞穿透肽与抗菌肽的独特性能为新型递送系统的设计提供了重要启示。研究者已开发出多种不同构象的多肽及聚氨基酸,其生物学性能与构象密切相关^[23-25]。为深入探究不同构象对材料与细胞相互作用的影响,本研究采用 Cy5 荧光染料标记聚合物组装体,并将其与 MCF-7 细胞共孵育 4 h,从共孵育后的 CLSM 图像(图 5(a))可以观察到从溶酶体逃逸的纳米粒子。PPC 和 PPCO 纳米粒子的胞内荧光分布图及相应的归一化荧光信号强度如图 5(b~d)所示。PPC 组装体在细胞中呈现较弱的 Cy5 信号,且与 LysoTracker Red 高度共定位,表明该载体进入细胞的效率较低,并主要滞留于溶酶体中。相比之下,具有 α -螺旋构象的 PPCO 与 LysoTracker Red 的共定位程度显著降低,同时细胞内 Cy5 荧光强度明显增强,证明其具备更强的溶酶体逃逸能力。这一现象可归因于 PPCO 刚性的 α -螺旋结构赋予其更优异的跨膜性能^[23-26]。

2.5 构象介导的胞内药物递送

构象转变所增强的细胞内化和药物释放行为有望实现大分子药物的特异性及高效细胞内递送。为验证这一假设,本研究使用 FITC-Dextran($M_w=20\times 10^3$)作为生物大分子药物模型,通过 CLSM 监测其在 MCF-7 细胞内的递送情况。

MCF-7 细胞与 FITC-Dextran@PPC 和 FITC-Dextran@PPCO 共孵育 4 h 后的 CLSM 图像如图 6(a)所示。与 PPC 处理组相比,PPCO 处理组细胞中 FITC-Dextran 的荧光信号显著增强(图 6(b)),且荧光主要分布于细胞质中(图 6(c))。进一步采用流式细胞术对细胞内药物递送效率进行定量分析(图 6(d))。结果表明,PPCO 组的胞内荧光强度显著高于 PPC 组;随着孵育时间延长,PPCO 组的胞内药物荧光强度持续升高,在各

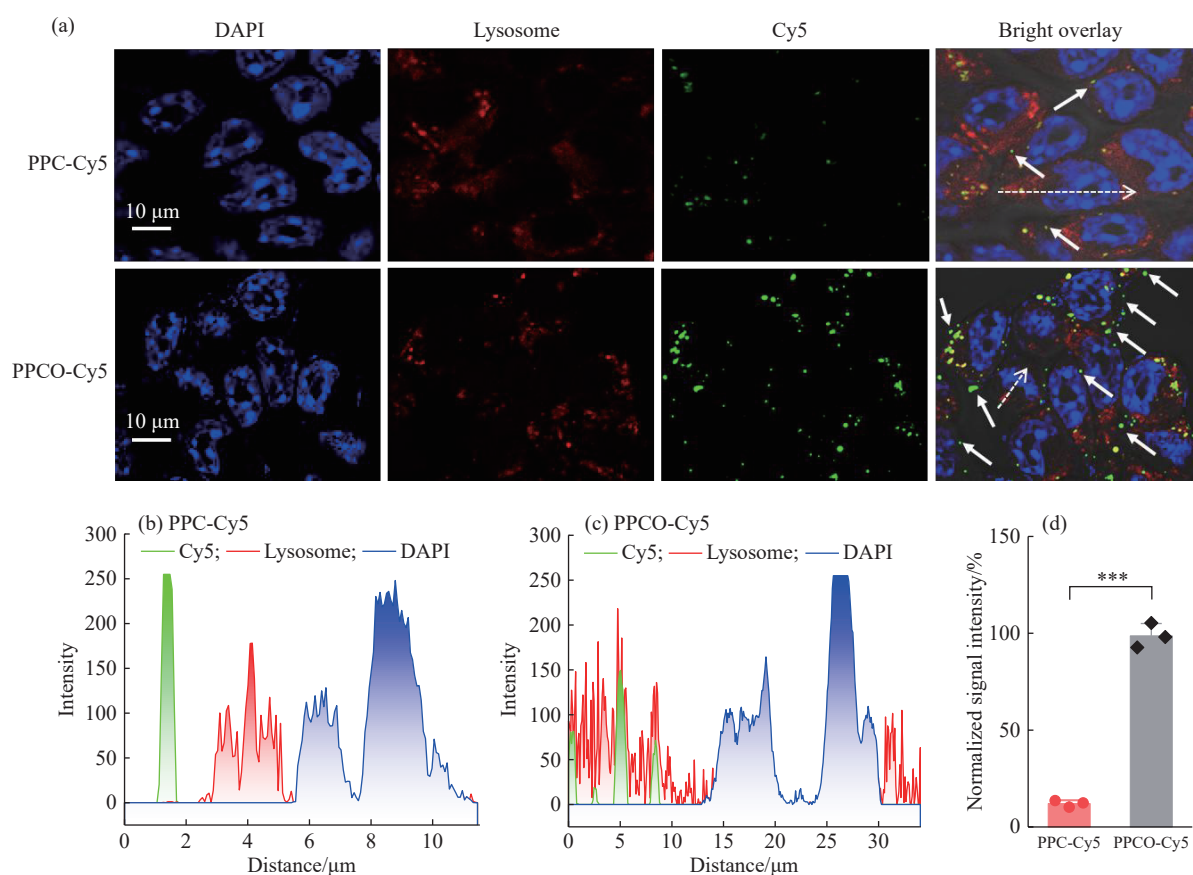


图5 (a)PPC-Cy5 和 PPCO-Cy5 纳米粒子与 MCF-7 细胞共孵育 4 h 后的 CLSM 图像(溶酶体经 LysoTracker Red 染色,细胞核经 DAPI 染色,白色箭头指示从溶酶体逃逸的纳米粒子);(b)PPC-Cy5 和(c)PPCO-Cy5 纳米粒子的胞内荧光分布图;(d)MCF-7 细胞内 PPC-Cy5 和 PPCO-Cy5 纳米粒子的归一化信号强度

Fig. 5 (a) CLSM images of PPC-Cy5 and PPCO-Cy5 nanoparticles after 4 h of co-incubation (Lysosomes were stained with LysoTracker Red, and nuclei were stained with DAPI. Nanoparticles that escaped from lysosomes are indicated by white arrows); Intracellular fluorescence distribution of (b) PPC-Cy5 and (c) PPCO-Cy5; (d) Normalized signal intensity of PPC-Cy5 and PPCO-Cy5 nanoparticles in MCF-7 cells

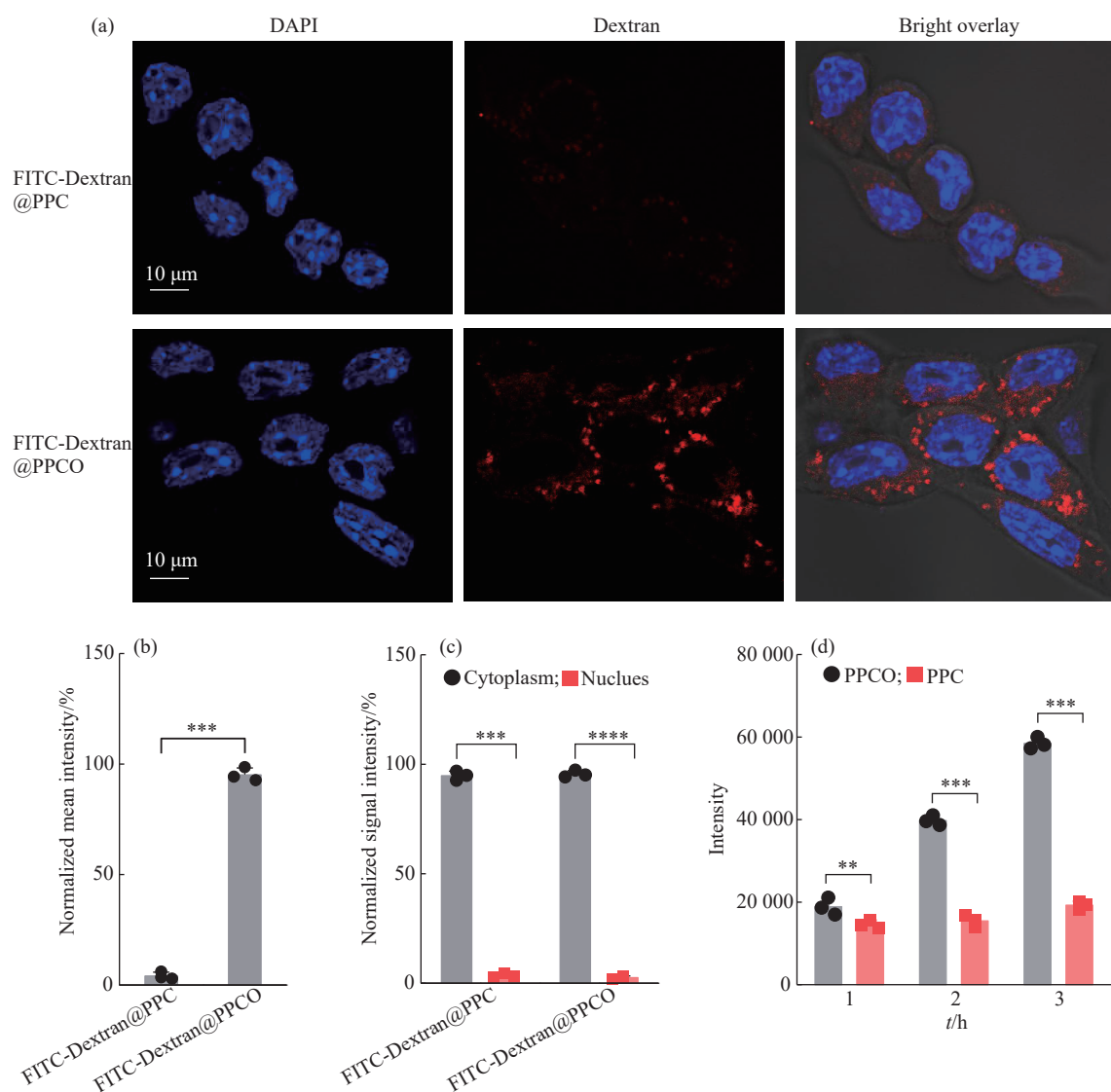


图 6 (a)MCF-7 细胞与 FITC-Dextran@PPC 和 FITC-Dextran@PPCO 共孵育 4 h 后的 CLSM 图像; (b)每个细胞的归一化平均荧光强度; (c)细胞核与细胞质的归一化平均荧光信号强度; (d)不同孵育时间的流式细胞术定量分析结果

Fig. 6 (a) CLSM images of MCF-7 cells co-incubated with FITC-Dextran@PPC and FITC-Dextran@PPCO for 4 h of co-incubation; (b) Normalized average fluorescence intensity per cell; (c) Normalized average fluorescence signal intensity in the nucleus and cytoplasm; (d) Flow cytometry quantitative analysis at different incubation time

时间点均显著高于 PPC 组。孵育 3 h 后, PPCO 组的胞内 FITC-Dextran 荧光强度约为 PPC 组的 3 倍。以上结果证实, α -螺旋构象显著提升了聚合物载体对大分子药物的胞内递送效率, 并实现了大分子药物在细胞质中的有效分布。

2.6 细胞毒性

在上述实验验证了构象在大分子药物高效递送中具有关键作用的基础上, 本研究选择亲水性蜂毒肽 (Melittin) 作为模型药物, 进一步评估其抗肿瘤活性。如图 7 所示, Melittin@PPCO 组的细胞存活率随药物的质量浓度增大呈现出与游离 Melittin 高度一致的下降趋势; 两者在较高质量浓度 (大于 $1 \mu\text{g/mL}$) 下均表现出显著的细胞杀伤效应, 且两者的半数抑制浓度 (IC_{50}) 相近。相比之下, Melittin@PPC 组的细胞毒性显著减弱, 即使在较高药物质量浓度下, 细胞存活率仍维持在较高水平。上述结果证实, 具有 α -螺旋构象的聚合物载体能够显著提高大分子药物的细胞内在化效率及溶酶体逃逸能力, 并有效实现药物在胞内的释放及其生物活性的发挥。

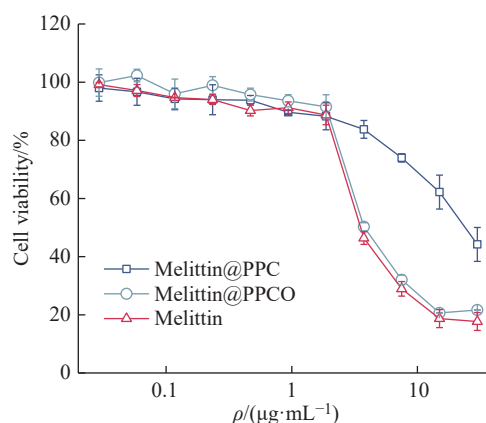


图7 MCF-7 细胞与 Melittin@PPC 和 Melittin@PPCO 在不同药物质量浓度下共培养后的细胞活性

Fig. 7 Cell viability of MCF-7 cells co-cultured with Melittin@PPC and Melittin@PPCO at different drug mass concentrations

3 结 论

(1)成功制备了具有不同构象的聚半胱氨酸衍生物 PPC(β -折叠)和 PPCO(α -螺旋),两者均能够自组装形成粒径均一的聚合物囊泡,并可高效包载不同分子量的亲水性大分子药物。

(2)与 β -折叠构象的 PPC 囊泡相比,具有 α -螺旋的 PPCO 囊泡通过重塑氢键网络,弱化分子间相互作用,显著提高了囊泡膜的通透性,从而实现了大分子药物的有效释放。

(3)PPCO 囊泡展现出更强的膜活性,能够高效进入肿瘤细胞并逃逸溶酶体,在胞内高效释放大分子药物,进而实现对肿瘤细胞的有效杀伤。

参考文献:

- [1] QIN X, YU C, WEI J, LI L, ZHANG C, WU Q, LIU J, YAO S Q, HUANG W. Rational design of nanocarriers for intracellular protein delivery [J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(46): 1902791.
- [2] LIU M Y, SVIRSKIS D, PROFT T, LOH J, YIN N B, LI H, LI D H, ZHOU Y Z, CHEN S, SONG L Z, CHEN G Y, LU W Y, ZHANG Z W, ZHOU Z, LI L, HUANG Y, BUNT C, SUN G J, HARRIS P W R, BRIMBLE M A, WEN J Y. Progress in peptide and protein therapeutics: Challenges and strategies [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2025, 15(12): 6342-6381.
- [3] CHESHOMI M, SHOBEIRI N, TAJANI A S, KHAMENEH B. Strategic approaches for overcoming peptide and protein drug limitations [J]. *The Protein Journal*, 2026, 45(1): 8-21.
- [4] WANG M, SUN S, NEUFELD C I, PEREZ-RAMIREZ B, XU Q B. Reactive oxygen species-responsive protein modification and its intracellular delivery for targeted cancer therapy [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(49): 13444-13448.
- [5] WANG M, ALBERTI K, SUN S, ARELLANO C L, XU Q B. Combinatorially designed lipid-like nanoparticles for intracellular delivery of cytotoxic protein for cancer therapy [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(11): 2893-2898.
- [6] LEE Y, ISHII T, KIM H J, NISHIYAMA N, HAYAKAWA Y, ITAKA K, KATAOKA K. Efficient delivery of bioactive antibodies into the cytoplasm of living cells by charge-conversional polyion complex micelles [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(14): 2552-2555.
- [7] NG D Y W, ARZT M, WU Y Z, KUAN S L, LAMLA M, WEIL T. Constructing hybrid protein zymogens through protective dendritic assembly [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(1): 324-328.
- [8] CHANG H, LV J, GAO X, WANG X, WANG H, CHEN H, HE X, LI L, CHENG Y Y. Rational design of a polymer with robust efficacy for intracellular protein and peptide delivery [J]. *Nano Letters*, 2017, 17(3): 1678-1684.
- [9] NOCHI T, YUKI Y, TAKAHASHI H, SAWADA S I, MEJIMA M, KOHDA T, HARADA N, KONG I G, SATO A, KATAOKA N, TOKUHARA D, KUROKAWA S, TAKAHASHI Y, TSUKADA H, KOZAKI S, AKIYOSHI K, KIYONO H. Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines [J]. *Nature Materials*, 2010, 9(7): 572-578.
- [10] CHEN Y P, CHEN C T, HUNG Y, CHOU C M, LIU T P, LIANG M R, CHEN C T, MOU C Y. A new strategy for intracellular delivery of enzyme using mesoporous silica nanoparticles: Superoxide dismutase [J]. *Journal of the American Chemical Society*,

- 2013, 135(4): 1516-1523.
- [11] DONG Y, LOVE K T, DORKIN J R, SIRIRUNGRUANG S, ZHANG Y, CHEN D, BOGORAD R L, YIN H, CHEN Y, VEGAS A J, ALABI C A, SAHAY G, OLEJNIK K T, WANG W, SCHROEDER A, LYTTON-JEAN A K R, SIEGWART D J, AKINC A, BARNES C, BARROS S A, CARIOTO M, FITZGERALD K, HETTINGER J, KUMAR V, NOVOBRANTSEVA T I, QIN J, QUERBES W, KOTELIANSKY V, LANGER R, ANDERSON D G. Lipopeptide nanoparticles for potent and selective siRNA delivery in rodents and nonhuman primates [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(10): 3955-3960.
- [12] XIA Y Q, WU K Y, LIU C, ZHAO X J, WANG J, CAO J X, CHEN Z X, FANG M C, YU J, ZHU C, ZHANG X H, WANG Z L. Filamentous-actin-mimicking nanoplatfor for enhanced cytosolic protein delivery [J]. *Advanced Science*, 2024, 11(10): 2305600.
- [13] ZHENG Y, WANG Z J, LI Z F, LIU H, WEI J, PENG C, ZHOU Y Q, LI J S, FU Q, TAN H, DING M M. Ordered conformation-regulated vesicular membrane permeability [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(41): 22529-22536.
- [14] ZHENG Y, LIU Y, WU Z C, PENG C, WANG Z J, YAN J Y, YAN Y, LI Z F, LIU C C, XUE J X, TAN H, FU Q, DING M M. Photoallosteric polymersomes toward on-demand drug delivery and multimodal cancer immunotherapy [J]. *Advanced Materials*, 2023, 35(24): 2210986.
- [15] ZHENG Y, WENG C, CHENG C, ZHAO J L, YANG R, ZHANG Q, DING M M, TAN H, FU Q. Multiblock copolymers toward segmentation-driven morphological transition [J]. *Macromolecules*, 2020, 53(14): 5992-6001.
- [16] DISCHER B M, WON Y Y, EGE D S, LEE J C M, BATES F S, DISCHER D E, HAMMER D A. Polymersomes: Tough vesicles made from diblock copolymers [J]. *Science*, 1999, 284(5417): 1143-1146.
- [17] LEE J S, FEIJEN J. Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization [J]. *Journal of Controlled Release*, 2012, 161(2): 473-483.
- [18] AMSTAD E, KIM S H, WEITZ D A. Photo- and thermoresponsive polymersomes for triggered release [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(50): 12499-12503.
- [19] IATRIDI Z, ANGELOPOULOU A, VOULGARI E, AVGOUSTAKIS K, TSITSILIANIS C. Star-graft quarterpolymer-based polymersomes as nanocarriers for co-delivery of hydrophilic/hydrophobic chemotherapeutic agents [J]. *ACS Omega*, 2018, 3(9): 11896-11908.
- [20] WENG C, CHEN H D, XU T R, LI Z F, LIU X F, DING M M, ZHANG Q, TAN H, FU Q. Photo-responsive self-reducible polymers: Overcoming the spatiotemporal barriers for hypersensitivity [J]. *ACS Materials Letters*, 2020, 2(6): 602-609.
- [21] LIU H, WANG R, WEI J, CHENG C, ZHENG Y, PAN Y, HE X L, DING M M, TAN H, FU Q. Conformation-directed micelle-to-vesicle transition of cholesterol-decorated polypeptide triggered by oxidation [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(21): 6604-6610.
- [22] LI Z F, LIU Y, WANG Y W, ZHENG Y, PENG C, WANG Z J, ZHOU Y Q, DONG X H, DING M M. Visual β -sheet to β -turn transition in luminescent polymeric vesicles for color-reporting drug delivery [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2025, 64(37): e202503875.
- [23] LIU H, ZHOU Y Q, LIU Y, WANG Z J, ZHENG Y, PENG C, TIAN M, ZHANG Q, LI J S, TAN H, FU Q, DING M M. Protein-inspired polymers with metal-site-regulated ordered conformations [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(6): e202213000.
- [24] PENG C, ZHANG G, ZHU Y L, YAO Y, LUO Y, HAN G Q, WANG Y W, ZHENG Y, ZHOU Y Q, LIU Y, FU W L, XUE J X, TAN H, DING M M. Copper-driven allosteric and self-encapsulating polymers for tumor-specific fluorescence imaging and dual-enzymatic cancer therapy [J]. *Advanced Materials*, 2026, 38(2): e05829.
- [25] ZHENG Y, ZHANG X, XU L X, YAN Y, WANG Z J, PENG C, FAN F, XU Q R, LIU Y, XUE J X, DING M M. Conformational regulation of poly(amino acids): Challenges, strategies, and applications [J]. *Chemistry of Materials*, 2026, 38(3): 961-979.
- [26] LI Z F, YANG Y X, PENG C, LIU H, YANG R, ZHENG Y, CAI L P, TAN H, FU Q, DING M M. Drug-induced hierarchical self-assembly of poly(amino acid) for efficient intracellular drug delivery [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2021, 32(4): 1563-1566.

(责任编辑: 王吉晶)