

· 综 述 ·

超分子多肽自组装在生物医学中的应用

于伟康, 张珊珊, 杨占一, 王家俊, 单安山

东北农业大学 动物营养研究所, 黑龙江 哈尔滨 150030

于伟康, 张珊珊, 杨占一, 等. 超分子多肽自组装在生物医学中的应用. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2240-2255.

Yu WK, Zhang SS, Yang ZY, et al. Application of supramolecular peptide self-assembly in biomedicine. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2240-2255.

摘 要: 近年来, 自组装多肽纳米技术因其可形成规则有序的结构、具有多样的功能而备受关注。研究发现自组装多肽能在特定的条件下形成具有确定结构的聚集体, 这种聚集体具备生物相容性好、稳定性高等优点, 表现出不同于单体多肽分子的特性和优势, 因此其在药物传递、组织工程、抗菌等领域具有良好的应用前景。文中介绍了自组装多肽形成的分子机理、类型、影响因素, 综述了自组装多肽形成的纤维肽基水凝胶与自组装抗菌肽的最新进展, 并提出目前多肽自组装技术所存在的问题及展望。

关键词: 自组装多肽, 影响因素, 分子机理, 纤维肽基水凝胶, 抗菌肽

Application of supramolecular peptide self-assembly in biomedicine

Weikang Yu, Shanshan Zhang, Zhanyi Yang, Jiajun Wang, and Anshan Shan

Institute of Animal Nutrition, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

Abstract: In recent years, peptide self-assembly has received much attention because of its ability to form regular and ordered structures with diverse functions. Self-assembled peptides can form aggregates with defined structures under specific conditions. They show different characteristics and advantages (e.g., good biocompatibility and high stability) compared with monomeric peptides, which form the basis for potential application in the fields of drug delivery, tissue engineering, and antiseptics. In this paper, the molecular mechanisms, types and influencing factors of forming self-assembled peptides were reviewed, followed by introducing the latest advances on fibrous peptide hydrogels and self-assembled antimicrobial peptides. Furthermore, the challenges and perspectives for peptide self-assembly

Received: July 21, 2020; **Accepted:** October 8, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31672434, 31872368), China Agriculture Research System (No. CARS-35), Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, China (No. TD2019C001).

Corresponding authors: Anshan Shan. Fax: +86-451-55191585; E-mail: asshan@neau.edu.cn

Jiajun Wang. Fax: +86-451-55191585; E-mail: wjj1989@neau.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31672434, 31872368), 国家现代农业产业技术体系项目 (No. CARS-35), 黑龙江省自然科学基金 (No. TD2019C001) 资助。

网络出版时间: 2020-10-22

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201021.1049.005.html>

technology were discussed.

Keywords: self-assembled peptides, influencing factors, molecular mechanisms, fibrous peptide hydrogels, antimicrobial peptides

多肽是肽分子之间通过多个氨基酸脱水缩合形成的肽链连接的化合物,多肽广泛存在于生物体中,是生命活动以及生物材料开发的基础,此外多肽还是调节体内机体功能的重要物质。目前,很多生理疾病的发生与体内缺少相关多肽有关。近几十年来,多肽分子已被用作靶向肿瘤治疗、合成治疗糖尿病骨质疏松症的关键药物、模拟激素进行体外注射已应用于临床。因此多肽类药物对生物医药领域的进步与发展具有巨大意义。但随着多肽药物应用的进一步深入,多肽药物发展的瓶颈也随之而来,单体多肽药物稳定性差、细胞毒性强、半衰期短。这些缺点限制了多肽药物的临床应用,因此单体分子被修饰为特定纳米结构的大分子聚集体被广泛研究以优化这些问题并拓展多肽药物未来发展的前景。1993年,Zhang等偶然从酵母蛋白(Yeast protein)中分离出一个奇怪的重复片段AEAEAKAAEAEAKAK(EAK16),这种肽可以通过离子互补作用自组装成纳米纤维进而形成水凝胶结构^[1]。EAK16因其良好的生物相容性可用于临床治疗、修复神经、药物缓释等。自此以后,多肽纳米自组装技术进入大众视野,各个领域的科学家开始着手研究自组装多肽的功能。

自组装多肽是一种肽或多种肽分子依靠分子间相互作用,自发地或触发地在体系中结合连接,从而形成在显微镜下可见的纳米结构聚集体^[2]。如图1所示,这些纳米结构包括球形胶束、囊泡、线状、带状、层状、柱状、管状、球状和网状等结构^[3]。单体肽分子可自组装成微纳米结构,如纳米纤维、纳米管、纳米囊、纳米粒等^[4]。目前,多肽自组装系统已在各个领域广泛应用:(1)利用不同细胞之间酶表达的差异(酶量或酶活性)来控制多肽自组装,从而完成控制细胞死亡和作为形态改变的上下文信号^[5-6]。(2)基于多肽组装生

产疫苗,显著抑制肿瘤细胞生长^[7]。(3)纳米探针的原位肽自组装用于构建新型成像系统包括光声成像、放射性核素成像、磁共振成像等,用于癌症治疗^[8-10]。此外,多肽自组装纳米结构呈现多样性、亦可形成刚性水凝胶、这些聚集体表现出的高生物相容性和良好的生物活性已被用作多用途模块和纳米器件的构建^[11-14]。同时,自组装多肽形成的二维、三维结构都可以通过诸如pH、温度、离子强度、酶、溶剂等因素得到有效的控制^[15]。自组装多肽已显示出比单体多肽分子更加多样的功能性,其表现出的刺激响应性也可以制备新型生物材料,对于体内多肽作用产生的毒性也会有一定的缓解,由此可见,超分子自组装系统的发展已成为必然趋势。

1 自组装多肽的形成

单体多肽分子形成自组装肽的关键是非共价键的连接和分子间作用力。主要包括:氢键、疏水键作用力、范德华力、离子键、 π - π 堆积、静电引力等。力与键的相互配合、相互协同使得分子间

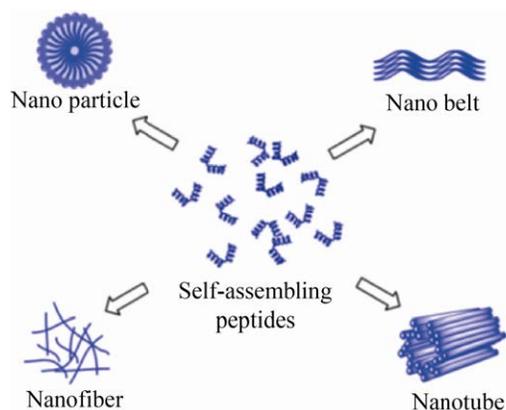


图1 多肽分子自组装可形成的纳米结构^[16]
Fig. 1 Nanostructures that is formed by self-assembly of polypeptides^[16].

通过引力自发地形成复杂有序、规则的、并赋予多种功能的多肽序列和高级结构^[17],这种结构通过逐个分子或原子自下而上形成新颖的纳米结构体。

肽分子的合成与设计主要基于 α -螺旋、 β -折叠形成的稳定二级结构肽序列。首先,氨基酸的选择与排列赋予多肽不同的一级结构。二级结构被一级结构控制以显示出纳米形貌的改变。因此,二级结构被认为是多肽自组装行为的重要基点。 α -螺旋会通过内部氢键稳定,通过疏水键作用力和范德华力有利于 α -螺旋结构的产生^[18]。 β -折叠结构会将肽序列中的疏水区和亲水区分开,为肽提供两亲性,驱动多肽自组装进程。 β -发夹的自组装过程是通过两个 β -折叠在反平行的平面上排列形成。

最近的研究表明,多肽在不同溶剂下自组装过程中不会影响二级结构的转变,但是聚集体的长度及宽度的增加导致聚集体横截面变宽。以 A_8K 、 $A_{10}K$ 为例,本应在水中形成的扭曲纳米带却在甲醇溶液中伸直为纤维,这是由于疏水作用力以及 β -折叠含量推动氢键自由能增加的结果^[19]。总而言之,自组装多肽的形状大小乃至性质的改变离不开非共价键与分子作用力的相互配合,而二级结构作为自组装多肽形成的前提与支架通常是不会被改变的,稳定二级结构的产生是单体肽形成具有纳米结构体的基本要素。

天然和人工合成的肽自组装后会产生不同于单体肽的结构特征与功能,通过合理的设计与结构的把控可得到各种类型的纳米材料,这种纳米材料的开发与制造得益于对分子机理的理解与掌握。

2 自组装多肽的类型

2.1 离子互补性多肽

离子互补性多肽的特征是带负电的氨基酸残基和带正电的氨基酸残基交替排列,通过静电相互作用、氢键、范德华力来启动分子自组装。其亲水区和疏水区交替排列,分成两个有序的区域,疏

水氨基酸残基折叠屏蔽水分子,亲水区具有规则有序的正负电荷相互吸引。分子间氢键的形成加速了肽的自组装,离子键的相互嵌合使自组装结构强度增加。该类肽形成模式: I 型 (-+); II 型 (-++); IV 型 (---++++)。通过重复和结合电荷分布可合理设计离子互补性肽。目前, RADA16-I 作为经典的离子互补性多肽,其在水溶液中自发地形成纤维水凝胶的能力已经用于生物医学和临床领域^[20],但同时, RADA16-I 也暴露出大多数此类肽的通病,即在低 pH 时造成不稳定性。为了进一步巩固离子互补肽在医学上的应用,科学家们已经致力于“改装”此类肽。Zhang 等^[21]开发了一种新的设计模式,以 Ac-RVQVRVQVRVQV-COOH(Z1) 为例, Z1 的设计与传统的设计理念不同:在带正电的氨基酸和负电的氨基酸中间穿插极性未带电的氨基酸保持电荷分离并在 N 端酰化,与传统离子互补性多肽相比, Z1 在形成纤维的能力以及水凝胶的机械强度上都优于前者,并在全 pH (0-14) 中不影响 Z1 通过盐触发形成 β -折叠结构的自组装。此外,为了更好地完善离子互补性多肽的优点,近期已有研究表明,在生理 pH 条件下,带有相反电荷的两种离子互补性多肽驱动生成的水凝胶表现出对成纤维细胞更好的生物相容性,再一次证明了水凝胶在生物医学中应用的潜力^[22]。离子互补性多肽是自组装肽的研究起点,揭开了广大科研工作者研究自组装肽的序幕。

2.2 表面活性剂类多肽

为了进一步完善离子互补性多肽的特点,人们开始致力于改变疏水作用力来进一步研究亲水氨基酸和疏水氨基酸的比例关系,表面活性剂类多肽 (Surfactant-like peptides, SLP) 就此产生。SLP 有一个显著的特征:模拟多肽聚合与表面活性剂分子的性质,该肽分为疏水区和亲水区。亲水头部一般由 1-2 个带电的氨基酸残基 (His、Asp、Glu) 组成。疏水尾部一般由 3-9 个非极性氨基酸 (Ala、Phe、Ile、Val) 组成。一般来说疏水尾部

不会超过 9 个氨基酸, 因为过多的疏水氨基酸会影响此类肽在介质中的溶解度^[23]。SLP 可组装成纳米管、纳米囊、纳米纤维结构。Wang 等^[24]揭示了传统 SLP (A_3K 、 A_6K 、 A_9K) 在水溶液中的自组装形态与趋势, A_3K 会自组装成膜结构, A_6K 组装成纳米纤维结构, A_9K 会组装成直径更小的纳米棒状结构, 同时赖氨酸的存在赋予了这 3 种肽抗菌效力。由此可见, 增加疏水链长度会影响肽动态自组装的趋势或自聚行为, 此外, 以上研究都是使用亲水氨基酸作为头部搭配不超过 9 个氨基酸的疏水尾, 这就证明了疏水链长度要适当, 太长会降低肽在水溶液中的溶解度, 太短又会导致自聚集的可能性变小, 所以合理设计头部基团与疏水尾的长度可以获得合适的表面活性剂类多肽。当然, SLP 并不拘泥于形成特定的结构模式, Mello LR 及同事^[25]讨论了不同两亲性设计所引起的肽纳米形貌的改变, 其设计的双嵌段八聚体肽 FFFRRRR-NH₂ 与对照肽 RRFFFFR-NH₂ 分别形成球状胶束以及纳米带结构。FFFRRRR-NH₂ 形成胶束的原因可能是静电斥力导致的 β -折叠结构含量的降低, 这种情况下氢键的支持力减弱, 维持组装体的疏水作用力可能是主要作用力, 当疏水作用力的作用超过氢键时, 为了适应球形界面的曲率要求, 肽粒子结合朝向球状转变。而对于 RRFFFFR-NH₂ 形成纳米带的原因可能是当 Arg 两侧分布时, 氨基端羧基端都会形成有序的水平面, 在 Phe 提供的疏水力驱动肽链侧向结合, 从而延展为纳米带形貌。另外 Zhao 等^[26]所设计的 SLP ($I_2K_2I_2$ 、 I_4K_2 、 KI_4K) 通过改变序列排列设计不同纳米结构体, 其中 I_4K_2 、 KI_4K 分别形成纳米纤维与纳米管, 而 $I_2K_2I_2$ 却因缺乏 β -折叠没有形成纳米结构, 这证明了 β -折叠结构的侧向堆积与氨基酸侧链之间的相互作用有利于纳米结构的形成。

通过添加阳离子残基可赋予 SLP 类似表面活性剂抗菌的能力。高抑菌性、低毒性、低成本似

乎已成为此类肽的标签。对于未来抗菌肽和细胞穿透肽的发展, 添入 SLP 的设计因素或许具有明朗的应用前景。

由于 SLP 表面极性亲水面与非极性疏水面在多肽螺旋轮中均匀分布, 因此两亲性成为这类肽组装过程的重要参数, 它不仅可以通过调节疏水引力将多肽联结在一起, 还可以通过两亲性设计调节 SLP 所涉及的不同细胞反应。SLP 虽没有离子互补性多肽作为缓释功能的应用强, 但 SLP 对于各领域的应用潜力较高, 其结构设计简单、生产成本较低、生物相容性不亚于离子互补性多肽的特点, 会使其在不久的将来广泛应用于生物医药领域。

2.3 化学基团修饰类多肽

近年来, 科学家们已经不满足于通过对天然氨基酸的改变来设计自组装多肽, 而是使用高度疏水的烷基链、脂质基团以及糖类修饰多肽。化学基团修饰多肽已被证明是可行的。化学基团修饰多肽表现出二级结构增多从而使纳米体更加稳定^[27]。化学基团可以通过在肽链本身设计相应的功能区域发挥特定的作用。目前, 关于疏水烷基链两亲性多肽自组装的工作被广泛报道。疏水作用力作为驱动分子自组装的核心力, 通过在氨基端设计连接烷基碳链, 可以使此类肽的功能和性质发生改变。Otsuka 等^[28]讨论了 C_{16} - W_3K 的疏水性烷基尾长度和其他外部因素对 C_{16} - W_3K 溶液凝胶行为的影响, C_{16} - W_3K 可形成 α -螺旋结构, 结果表明, 较长的烷基化尾促进了 C_{16} - W_3K 多肽溶液的自组装, 该脂肽 (Lipopeptide) 分子可以逐渐从球状结构转变成蠕虫状最终变为凝胶状。遗憾的是, 此文献未阐明纳米结构转变的机制, 但脂质尾的偶联被证明确实增加了自组装趋势。在此基础上, Hasan 等^[29]的工作也表明尾长是影响自组装的主要因素, 脂肽的抗菌活性也明显依赖于尾长, 并且多肽形成胶束结构具有更优的抗菌效果。许多烷基化的两亲性多肽自组装成直径约为几纳米、长度约为几微米的圆柱形纳米纤维,

还有少数可形成巨大纳米带。笔者在实验过程中发现,并不是连接脂质尾就可以促进多肽分子自组装,在中性条件的水溶液中,脂质尾长度 C8 及以下以及 C18 以上并不会促进多肽自组装进程,反而在水溶液中多肽显示出无序结构,由此可见,适当的脂质尾对于多肽组装成稳定的有序结构是具有积极作用的,可根据改变不同脂肪链的长度和正电荷数从而影响脂肽分子生物学活性。疏水作用力过强或过弱可能会影响氢键的生成和稳定,从而导致纳米结构的崩裂。

众所周知,设计脂肽分子并不仅仅局限于连接碳链,棕榈酰基 (Palmitoyl)、肉豆蔻酸 (Myristic acid) 等脂质基团也是很好的选择。有研究表明,人 α -防御素 5 (HD5) 通过在 C 端肉豆蔻酰化形成的纳米宿主防御肽 (Host defense peptide) 表现出比 HD5 单体更强的体外杀菌效果以及自组装行为,这种纳米自组装体在小鼠体内实验中成功治疗由大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC25922 引起的脓毒症 (Sepsis),并表现出相当低的细胞毒性和溶血活性,这为维持肠道动态平衡以及减少炎症反应提供了理论基础^[30]。到目前为止,人们致力于合成具有可控结构的糖肽聚合物用于开发新型生物材料。Qi 等^[31]设计了一种壳聚糖-肽偶联物,它是由壳聚糖 (Chitosan) 主链与一条抗菌肽 (Antimicrobial peptides, AMPs) 和另外一条酶裂解肽组成 (CPC-1),CPC-1 起初会在聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 的诱导下

形成纳米颗粒,然后在多种细菌分泌的明胶酶的切割下,CPC-1 会自发地转变为纤维结构,当被明胶酶切割时,CPC-1 被裂解致使由壳聚糖与 PEG 稳定的纳米颗粒完成解体,AMPs 被暴露出来,完成杀菌过程。被化学修饰的多肽已表现出更加优异的应用于疾病诊断、临床医学的潜力^[32]。天然肽的缺点日益凸显,如何优化天然肽形成纳米肽,并发挥出纳米肽的优势已成为科研人员的当务之急。文中阐述的 3 种纳米多肽类型为纳米肽的设计提供了新的思路。3 种多肽的优缺点如表 1 所示。

3 影响多肽自组装的因素

多肽自组装是一个动态平衡过程,氢键、疏水力、静电引力等对小分子组装成有序的纳米结构起着至关重要的作用。同样地,环境因素的改变也会引起自组装体形态和性质上的变化。

3.1 pH 值

二肽和多肽的自组装的重要核心驱动力是分子之间形成氢键。但氢键的形成易受 pH 的影响,改变溶液的 pH 会使肽链的 C 端和 N 端或一些化学基团出现正电化或负电化。这就意味着肽链形成带正负电荷的多肽,从而表现出不同的自组装趋势、纳米结构和结构功能特点。Chen 等^[33]设计了带有不同长度的组氨酸 AMPs: $WH_5(QL)_6K_2$ 、 $WH_7(QL)_6K_2$ 和 $WH_9(QL)_6K_2$ 。3 种 AMPs 都可在中性 pH 下形成基于 β -折叠诱导的纳米纤维结构,

表 1 自组装多肽的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of self-assembled peptides

Polypeptide types	Advantages	Disadvantages
Ionic complementary peptides	Simple structure design, low production cost, strong slow release ability and good biocompatibility	Low stability and easy to be affected by pH
Surfactant like-peptides	Simple structure design, low production cost, AMPs can be designed and has antibacterial activity	Poor water solubility, low drug loading and low stability
Chemical modified peptides	High stability, low toxicity, high trend of self-assembly and little limitation	High production cost

当 pH 低于组氨酸的 pKa 时, 静电斥力导致纳米结构的解体, 实验表明, 当 pH 较低时, 组氨酸发生质子化, 赖氨酸与组氨酸形成静电斥力, 纳米结构解体转为单体 AMPs 分子, 引起细菌膜的裂解。此项研究为以细菌代谢产生的乳酸引起的局部感染输送 pH 响应性药物提供了理论基础。

最近的研究表明, 两条胶原模拟肽 (CMPS) NapFFGKO 和 NapFFGDO 会通过 pH 切换实现溶胶到凝胶的转变, 当 pH 为生理条件下时, 两条肽都不会形成凝胶, 当 pH 为 9.0 时, 阴离子与 NapFFGKO 的胺基通过分子间缔合诱导凝胶的形成, 当 pH 为 5.0 时, 去质子化的 NapFFGDO 又会与正离子结合形成凝胶, 有趣的是, 当两条肽聚合一起又可以在生理 pH 下共组装成水凝胶^[22], 由此可见, 静电相互作用对于多肽的聚合产生了显著的影响。

pH 值对于富含带电的氨基酸肽序列 (如 Glu、Asp、Lys、His 和 Arg) 至关重要, 并对氢键的形成与多肽首尾基团的呈电化具有显著影响。因此通过控制 pH, 可以合理地设计基于不同酸碱度的具有释放药物、缓释等应用的自组装多肽。

3.2 肽浓度

浓度是寡肽的自组装聚合的重要参数, 浓度研究可以确定寡肽开始聚集的临界聚集浓度 (Critical aggregation concentration, CAC)。寡肽在 CAC 下以单体分子形式存在, 高于 CAC 时开始聚集。肽浓度高于临界胶束浓度 (Critical micelle concentration, CMC) 时, 肽分子之间才发生缔结作用。Fung 等^[34]探究了 EAK16-II 的自组装随浓度变化而变化的过程。原子力显微镜 (Atomic force microscopy, AFM) 显示当浓度为 0.05 mg/mL 时, 溶液中观察到一条条孤立的细丝以及少量的球状聚集体。在浓度为 0.1、0.2、0.5 mg/mL 的溶液中发现有细长的纤维, 当浓度低于 0.1 mg/mL 时, 观察到的纳米结构 (即纤维、细丝和球状聚集体) 的数量减少, 纤维宽度也随浓度的变化而变化。Chang 等^[35]

设计了一种用肝素 (Heparin) 结合成的自组装肽两亲性分子 (PA), 序列为 AKKARKAKKARK, 该肽通过自身的疏水性和 β -折叠结构可形成直径为 7–10 nm 的圆柱形结构, 当浓度达到 CMC 时, 两亲性多肽表现出更强的杀灭革兰氏阴性菌 (Gram-negative bacteria) 的能力。最近的研究表明 α -糜蛋白酶 (α -chymotrypsin) 吸附在 KLOEt 表面可以控制寡肽的自组装, 当寡肽到达 CAC 时可形成几纳米的纤维网络, α -糜蛋白酶的表面密度介导了寡肽的自组装动力学, 得出的结论是多肽的聚集浓度与酶浓度呈负相关^[36]。在该酶促自组装系统中, 低浓度和中浓度的多肽倾向于 α -螺旋, 而高浓度的多肽又转变为 β -折叠, 但所有浓度的多肽都有形成纤维网络的趋势, 只是形成自组装体的时间不同。

浓度的改变导致氢键等非共价键力的含量发生改变, 这会引发肽分子之间电子云重排, 进而引起纳米形貌的改变, 此外, 致密的纤维网络表面可能与水等溶剂发生协同作用从而使纳米结构更加稳定, 这为自组装生物传感器功能材料的发展提供新的视野^[37]。

3.3 离子浓度

离子浓度向来是影响肽分子堆积和蛋白质性质结构功能的重要因素, 盐离子的存在会使带电荷的基团产生屏蔽作用, 从而使分子之间的静电作用减弱。电荷屏蔽作用还会引起分子间疏水键作用力的增强, 使肽分子更容易聚合引起自组装。离子还会与个别氨基酸序列特异性识别并作用, 在极性氨基酸中构成盐桥, 从而通过分子间的物理交联促进自组装结构生成。

Hong 等^[38]研究了 NaCl 对 EAK16-I (AEAKAEAKAEAKAEAK) 的自组装的影响。在盐离子存在的条件下, 平台处的表面张力值大约为 55 MJ/m², 在盐离子不存在的条件下, 平台处的表面张力值大约为 57 MJ/m², 由此可见在盐离子存在的条件下, EAK16-I 的自组装表面活性要高

于无盐离子存在时。在 NaCl 存在且肽浓度相同时, EAK16- I 形成不同于无 NaCl 形成的球状结构的纤维。盐离子的存在可能有利于纤维纳米结构的产生。Ozbas 等^[39]研究了 MAX1 有无盐离子的构象显示, 在肽浓度(<2 wt%)、温度都相同时, pH 为 7.4 无盐的情况下, 肽分子呈现无序结构。在溶液中添加少量的盐后, 离子与带电荷氨基酸的静电相互作用使 MAX1 迅速形成 β -发夹结构并随后形成 β -折叠。发夹分子通过疏水塌陷和氢键超分子组装成三维水凝胶网络。由于多种离子在体内具有调控细胞新陈代谢、维持血管内外离子平衡以及促进骨质发育等作用, 基于离子浓度响应的自组装多肽在医学领域具有广泛的应用潜能。

3.4 温度

温度的升高会破坏体系的氢键, 使自组装体系的稳定性减弱, 从而发生构象上的改变。从头设计的肽分子 (KIGAKI)₃-NH₂ 与一个中心四肽 Thr-^DPro-Pro-Gly 相连接, 由于 Pro 的存在, 该肽偶联物分子在 20–50 °C 水溶液中表现为无规卷曲的形式, 而将体系温度升高到 60 °C 时, 该偶联物初步显示为 β -折叠, 继续升高温度至 70 °C, β -折叠结构显著增加并形成纳米纤维进而形成刚性水凝胶, 笔者认为这是一种亲水和疏水不平衡现象导致的, 温度的升高提高了疏水基团的溶解度, 影响了亲疏水基团的平衡, 这种行为可根据温度的变化发生可逆性转变^[40]。

Tiné 等^[41]的研究结果表明, 其设计的四离子肽 RWDW 的自组装过程受温度的影响很大, 在 15 °C 和 25 °C 时, 四肽形成紧密且相互缠绕的纤维, 当温度上升至 35 °C, 纤维结构崩裂且线条相聚较远, 此外 25 °C 显示的纤维层也逐渐弱化, 在所研究的 3 种温度下, 分子聚集体的形态与解聚过程都有所差异。由此可见, 升高温度后, 多肽自身的氢键发生断裂, 二级结构发生改变, 疏水作用力和 π 水作堆积成为主要推动分子自组装的作用力, 这会导致纳米结构的转变。当温度返

还时, 氢键重新生成, 二级结构恢复, 自组装多肽的纳米形态随之恢复。

3.5 手性

自然界中的天然氨基酸都是 L 型的, 而其对应异构体被设计出来显现出更好的优点和特性。手性氨基酸在控制多肽或蛋白质的折叠与超分子组装中起着关键作用^[42]。最近的研究已经表明了肽的手性不同导致了分子在溶液中的自组装趋向和分子结构的差异^[43]。有研究表明, 用 D-异构体取代 L 型氨基酸会导致形成组装体的重要参数(两性性)的变化^[44]。Zhou 等^[45]研究了 D-GL13K 和 L-GL13K 的自组装特性和抗菌活性, 实验表明在 pH 为 9.8 的溶液反应 2 d 后, L-GL13K 仅仅开始形成纳米纤维, 而 D-GL13K 已经组装成高浓度的扭曲纳米带, 且抗菌活性 D-GL13K 也高于 L-GL13K, 从而进一步强调了 D-型自组装 AMPs 的抗菌剂应用, 其抗酶解的特性也为抗菌剂的开发提供了良好的途径。外界因素对多肽自组装的影响如表 2 所示。

4 超分子多肽自组装系统在生物医学中的应用

4.1 肽类水凝胶在传递药物中的应用

肽类水凝胶具有良好的生物相容性、亲水性、易被加工等特点被广泛应用于治疗剂和承接给药载体。它是寡肽分子通过物理交联形成纳米纤维堆叠而成的。目前, 自组装多肽水凝胶材料已被

表 2 外界因素对自组装多肽的作用位点

Table 2 Target sites of external factors on self-assembled peptides

Influencing factors	Target sites
pH	Hydrogen bond, charged amino acids
Polypeptide concentration	Self-assembly rate and morphology
Ionic concentration	Hydrophobic bond, electrostatic force
Temperature	Hydrogen bond
Chirality	Secondary structure

用于承载蛋白质类药物和输送药物装置。水凝胶材料的优势在于:基于外界因素制备响应性水凝胶用于调控体外释药过程^[46];使用多肽偶联修饰基团的化学反应进程促进药物与水凝胶的络合^[47];两种带有相反电荷的多肽共组装形成的水凝胶在有效控制载药量的同时还可以协同免疫器官抑瘤^[48];靶向性的输送药物用于癌症治疗^[49]等。

分子间的非共价相互作用是形成超分子网络和水凝胶的重要驱动力,单体肽可以在特定的生理缓冲条件下分子内折叠形成水凝胶。当启动肽类自组装探针或前体存在时,大分子类物质可包裹在水凝胶结构中,随后水凝胶通过纳米纤维的舒展和扩散释放药物。通过调节肽分子的浓度和分子序列来改变这些凝胶的结构、厚度和包裹在凝胶中的大分子的流动性^[50]。将药物包被在结构简单的三肽水凝胶中已被证明是开发新型的伤口敷料和抗菌剂的良好策略,例如将环丙沙星(Ciprofloxacin)与^DLeu-Phe-Phe疏水三肽混合在生理 pH 下会产生宏观水凝胶,这是第一次将药物与三肽交联合成纳米结构的水凝胶,并用于药

物的输送^[51]。Ren 等^[46]设计了一种短肽衍生物 Nap-GFFYGD(Thi), C 末端偶联对 H₂O₂ 敏感的噻唑烷酮(Thiazolidinone),该衍生物在一定浓度下可自组装成纳米纤维进而形成超分子水凝胶,通过氧化消除反应去除噻唑烷酮会生成亲水性更强的多肽 napGFFYGD 并导致纳米纤维向水凝胶的转变,研究表明,该凝胶包裹的药物吉西他滨(Gemcitabine)的释放速率与体系中 H₂O₂ 的含量呈正相关,这为开发靶向输送抗癌药物的方法提供了新的思路,氧化反应过程以及纳米纤维的崩裂形成水凝胶的过程如图 2 所示。Abbas 等^[52]通过将带正电的多肽(聚-L-赖氨酸,PLL)和带负电的二肽 Fmoc-二苯丙氨酸(Fmoc-FF)共组装,制备了具有良好生物降解性、流变性可调的可注射水凝胶(Fmoc-FF/PLL),该多肽结合物形成直径 50–100 nm 的纤维紧密排列交联成网,最终形成具有褶皱的层状,它可以有效结合光敏药物三氯乙烷(Trichloroethane, Ce6),解决了光敏药物在体内易被清除和溶解性低等缺点,结果显示,包裹在共聚水凝胶中的 Ce6 可以靶向输送

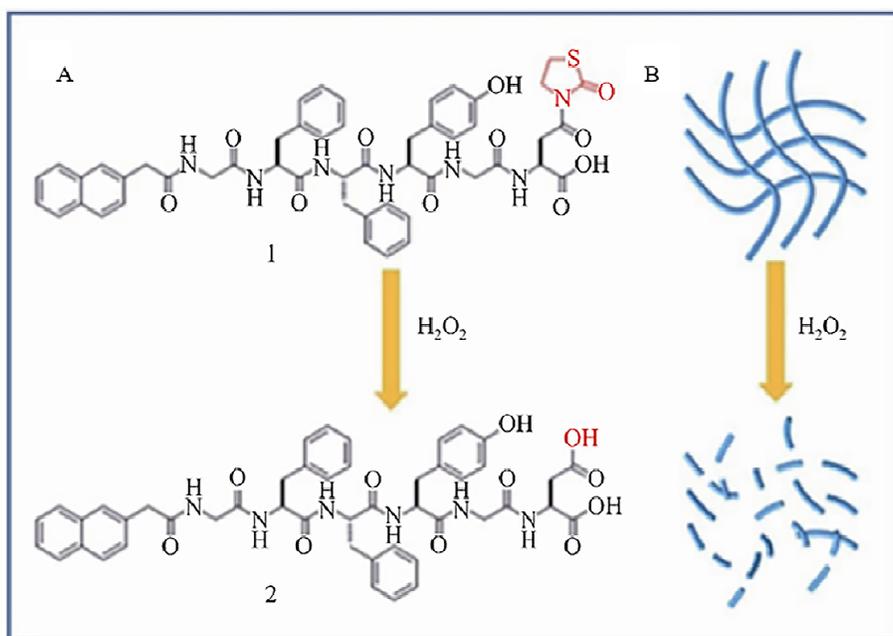


图 2 氧化消除反应 (A) 以及纳米纤维解体过程 (B)^[46]

Fig. 2 Oxidation elimination reaction (A) and nanofiber dis-assembly process (B)^[46].

到肿瘤部位并在 48 h 表现出局部和持续的输送,即使在 8 d 后,在体内依然可以检测到药物的存在,此项研究为抗肿瘤治疗和光疗法提供了广阔的应用前景。

纳米递送系统 (NDDS) 被认为是一个快速发展的领域用于炎症、癌症、神经系统疾病的治疗与诊断^[53]。与传统载体负载药物相比,表现出易于合成、载药量高、免疫活性好等诸多优点。遗憾的是,结构简单的纳米自组装体又表现出不稳定的缺点,如何提升 NDDS 的稳定性又成为了焦点与热点。

对于体内给药与缓释,绝大多数的多肽需要被化学基团修饰才可以提高其在体内的稳定性。例如传统 SLP 纳米体系稳定性差、水溶性差、载药量低等缺点限制了 SLP 在体内给药中的应用。为了克服这些局限性,聚乙二醇修饰对于改善多肽在水溶液的稳定性和溶解度早有报道,PEG 修饰的多肽还有其他优点:延长血浆的半衰期以及降低免疫原性^[54]。随后 PEG 化多肽的优点被证明,Diego 等^[55]将 SLP (DDAAAAA、DDVVVVVV) 羧基端偶联 PEG 甲氧基分子形成 mPEG_{1.9kDa}-DDAAAAA 和 mPEG_{1.9kDa}-DDVVVVVV,并与未偶联的 SLP 进行了对比,结果表明被修饰的多肽显示出更强的形成胶束的能力,证实了在水溶液中多肽的水溶性以及稳定性提高的观点,通过降低免疫原性从而增加全身循环时间;此外作者还提出了 PEG 修饰不影响多肽本身的二级结构,但会诱导多肽自组装趋势按照既细且长的胶束方向发展。由此可见,传统的超分子多肽自组装系统缓释能力稍有欠缺,通过偶联化学基团或许是提高纳米多肽缓释药物能力的有效途径。

如今,肽基水凝胶将传统药物输送理论与靶向性治疗疾病的优点进行了整合,某一个肽基水凝胶甚至具有多重功效。不可忽视的是,肽基水凝胶可能存在的缺点也有很多,例如在输送过程中存在药物泄露、过早释放药物、水凝胶的代谢

不稳定可能产生的炎症反应等缺点。因此,引入监测装置实时观察水凝胶包裹释放药物的行为可以检查水凝胶的包封度以及药物释放能力以改善这些缺点。

4.2 超分子多肽自组装系统在组织工程修复与模拟人工酶中的应用

肽类自组装成的水凝胶作为新一类治疗烧伤创面被认为是有效的,它可以提供理想的水面环境,并在创伤面形成的敷料具有可渗透气体的特性^[56]。Loo 等^[57]开发了两个超短脂族多肽 Ac-ILVAGK-NH₂、Ac-LIVAGK-NH₂,该类肽可自组装成纤维结构进而形成水凝胶,并在大鼠烧伤模型中表现出使伤口快速闭合的高效率性,与用作一般护理的硅胶涂层聚酰胺网 (Mepitel) 相比,两种肽发生了更快的自溶清创,且伤口闭合率有所增加。另外,仿生性两亲性肽形成的纳米支架可以与碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase) 协同促进成骨细胞的增生,展示了肽自组装用于修复骨组织的潜力^[58]。

Hauser 课题组^[59]设计了两个含有半胱氨酸的肽 (LIVAGKC 和 LK₆C),二硫键连接使肽基水凝胶刚性更强,该水凝胶用于小鼠全面创伤的敷料,结果表明 LK₆C 形成水凝胶结构后,肉眼可见的透明胶体不仅有利于在伤口上直接操作,而且对于小鼠创面的敏感性极低,与对照组相比水凝胶敷料促进了小鼠伤口完全的上皮再生,证明了局部使用水凝胶的安全性和高效性,超分子肽基水凝胶已被证明了可以促进伤口的愈合,这为组织工程领域和临床应用提供了新的平台。除此之外,肽基水凝胶还可用于细胞内部调节趋化因子 (Chemotactic factor) 的表达。一种单核细胞趋化蛋白因子 (CCL2) 的基因多态性会参与多种病理过程, Kim 等设计的自组装多肽 K(SL)₆KGWKNFQTI 在水溶液中自发形成水凝胶,它可以减缓 CCL2 的趋化性防止 CCL2 流出细胞外引起的炎症反应,此项研究为调节组织内生物

反应的统一性提供参考^[60]。同样地, Silva 等^[61]通过研究表明共轭两亲性多肽 IKVAV 可组装成纳米纤维网络并用于创建细胞分化为神经元的支架。肽水凝胶可以通过改变 pH、温度实现功能的转变,通过这个优势能实现在体内环境下进行组织修复、缓和炎症和提高免疫性。

此外,多肽自组装还被用来模拟细胞类物质以及天然酶,实现对于软材料的开发利用。最近的研究表明, Fores 等^[62]设计的七肽 Fmoc-GFFYGHY 被用来模拟酶的性质与应用,该七肽是不能自发组装的,为了驱动自组装,磷酸基用来修饰酪氨酸的残基形成 Fmoc-GFFpYGHpY (HP₂),当碱性磷酸酶 (AP) 存在时,七肽上的磷酸基被水解,3D 水凝胶纤维网格随之生成,这种类酯水凝胶被证明可以水解部分酯类。通过将含 Cys 的肽固定在金纳米粒子表面是开发人工酶很有效的策略^[63]。多肽与金纳米颗粒的结合表现出明显的协同作用,模拟酶的催化效率与专一性可能会更优于天然酶^[64]。

多肽水凝胶具有生物相容性良好、特异性程度高、耐受性强等诸多优点,已成为组织工程领域不可或缺的纳米材料,但是其缺点还没有被完全发掘,例如,在特定的环境下肽基水凝胶是否还具有浸润伤口的能力、在个体的差异下产生的致敏性、肽基水凝胶还能否用于全面伤口的应用等,诸如此类的问题有待于进一步研究。而对于模拟酶的应用,如何更好地确定活性中心并提升模拟酶对于底物的特异性与专一性既是研究难点也是重点。

4.3 超分子自组装抗菌肽的抗菌机制与应用

对于自组装多肽的抗菌机制,科学家们提出了两种可能的形式。如图 3 所示,第一种是形成纳米结构的肽一般是靠本身的两亲性和正电性靠近细胞膜表面,然后多肽与细菌表面的膜结合,进而导致磷脂膜移位形成裂口,纳米 AMPs 插入裂口并使细菌裂解^[65]。另一种是 AMPs 形成的自

组装体一般不具有抗菌活性或活性较弱,它通过水解后形成单体分子发挥作用,AMPs 的正电荷与细胞膜表面的负电荷产生静电相互作用,从而使细菌细胞膜裂解,达到杀灭细菌的目的^[6]。事实上,当单肽分子组装成聚集体时,会导致电荷分布与二级结构的改变,从而引起抗菌活性变强或变弱,在某种情况下,当肽自组装成具有纳米结构的大颗粒时,抗菌效果可显著增强^[66]。此外,纳米结构的产生提高了抗菌肽自身的稳定性,使它们对酶降解、肾过滤等具有抵抗作用^[67]。

自组装多肽作为抗菌涂层已被广泛研究,可以根据生物材料的肽骨架应用而改变,一类 AMPs 水凝胶已被生产用于响应特定的致病菌和环境刺激,从而在一定时间内大规模减少生物膜 (Biofilm) 的形成^[68]。Schneider 等^[69]证明了二苯丙氨酸 (FF) 的自组装纳米结构作为抗菌超分子聚合物的最小模型具有完全抑制细菌生长并产生

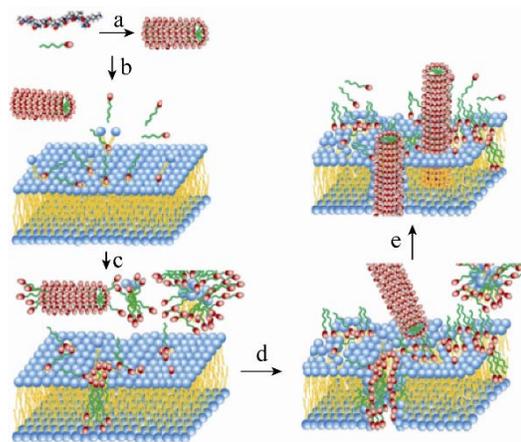


图 3 纳米多肽插入细菌膜引起裂解^[65]

Fig. 3 Bacterial lysis caused by insertion of nano-peptides into bacterial membrane^[65]. (a) A9K molecules self-assemble into nanorods. (b) A9K molecules inserted in the membrane through hydrophobic effect and net charge. (c) through barrel" or micelles to cause leakage or lysis. (d) Nanorods might also associate with the cell membrane surface directly through charge interaction and (e) become inserted subsequently due to different effects including electrostatic and hydrophobic interactions.

膜通透性 (Membrane permeability) 和去极化 (Depolarization), 这项研究将自组装和抗菌活性紧密地联系在了一起, 并为开发新型抗菌剂和抗菌材料提供重要见解。有研究认为生物膜对 AMPs 产生耐药性的机制是 AMPs 会与生物膜外带负电的细胞聚合物作用, 从而使生物膜隔离 AMPs 产生耐药性^[70]。Porter 等^[71]证明了由二苯丙氨酸组成的肽纳米管所具备的抗菌活性足以清除医疗感染中经常涉及的成熟被膜形式的细菌, 这是首次使用肽纳米管根除生物膜的公告。

当然, 类似 AMPs 的新型抗菌剂同样也可以通过自组装赋予抗菌效力。例如阳离子环糊精 (Cyclodextrin, CD⁺)、阴离子海藻酸钠 (Alginate, ALG⁻) 通过吸附于碳酸钙微粒上制备微囊, 两类聚电解质通过静电作用自组装, 这种微胶囊颗粒具有杀灭革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的能力^[72]。CD 是常用的包封剂之一, 可通过与阴离子物质共组装或自组装为核壳状形成微球, 从而将药物包封于微囊内^[73]。

例如 Li 等^[74]将 β -CD 与天然 AMP——CM4 形成多肽纳米颗粒, 微球结构保护了 CM4 不受蛋白酶的影响, 在不降低抗菌活性的同时, 增加了 CM4 在体内的稳定性, β -CD-CM4 微囊在体内外都能有效地杀死大肠杆菌 *E. coli* K₁₂D₃₁ 和铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 并且基本不受外界因素的影响。

笔者发现, 富含 Arg 和 Trp 的 AMPs 在高浓度下引起铜绿假单胞菌 ATCC27853 聚集, 当 AMPs 浓度达到 32 $\mu\text{mol/L}$ 时, ATCC27853 由杆状转变为芽孢状, 似乎形成自我保护的行为并聚集在 AMPs 四周, 这可能是一种新的抗菌机制。一种合理的解释是 AMPs 表面的正电荷与细菌带负电荷的外膜负电膜结合, 并通过疏水作用裂解细菌膜, 从而达到杀菌抑菌的目的, 但实际上, 在高浓度下 Arg 的胍基会与 Trp 芳香吡

啉环结合形成纳米结构从而掩盖了 AMPs 的正电性和疏水性, 从而降低抗菌活性。此外对于高浓度 AMPs 引起的细菌聚集已有文献作出另一种解释: 革兰氏阴性菌膜的主要成分脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 引起了 AMPs 的自组装, 他们认为 LPS 的尾部会与 AMPs 的某些特定基团结合, 而且 LPS 的二级结构会在不同的生理条件下发生变化来应对 AMPs 的侵入效果^[75-76]。总之, 这些实验结果都表明了当 AMPs 的正电荷降低或疏水作用力引起的自组装会降低 AMPs 的杀菌活性。

不同的是, 对于 AMPs 自组装后的杀菌能力是否降低尚无定论, 有人认为 AMPs 形成的纳米纤维破坏细菌带负电的脂膜并形成气孔, 既降低了细菌膜表面的流动性, 又增加了内外膜的通透性从而增加了细菌膜的渗漏率, 从而增加杀菌活性^[77]。Chen 等^[78]对 PTP-7b (FLGALFKALSHLL) 产生新的细胞裂解机制从而引起细胞损伤进行了研究, 结果表明, 该肽的自组装与肽-细胞膜相互作用密切相关, 并对抗癌和抗菌活性提高起到的作用不弱于肽本身的正电荷量和二级结构。Chang 等^[35]设计了一种用肝素结合成的自组装肽两性亲性分子 (PA), 其序列为 AKKARKAKKARK, 该肽通过自身的疏水性和 β -折叠结构形成圆柱形纳米结构, 并在形成纳米结构时的抗菌效力要高于未形成组装体结构的 AMPs。AMPs 在自组装应用中已经显示出对单体 AMPs 分子的优势, 自组装结构能增加肽的稳定性以及半衰期, 并增强抗菌效力^[70]。目前对于 AMPs 形成纳米结构对杀菌效果的增强与否尚无定论, 但总体而言自组装 AMPs 的作用效果的全面性是要大于单体 AMPs 的, 例如其体内稳定性的提升、纳米结构体系合理规避酶切位点、良好的生物相容性、毒性低等优点已被证明。已知的自组装多肽以及水凝胶的种类与用途如表 3 所示。

表 3 已知自组装多肽以及肽类水凝胶的种类与用途
Table 3 Applications of existing self-assembled peptides and hydrogels

Name	Application	References
RADA16-I	Slow-release drug, tissue repair	[20]
A ₉ K	Antibacterial	[24]
HD5	Antibacterial	[30]
Nap-GFFYGD (Thi)	Slow-release drug	[46]
LK ₆ C	Promote tissue regeneration	[59]
Ac-ILVAGK-NH ₂	Treatment of burns	[57]
PTP-7b	Anticancer and antibacterial	[78]

5 总结与展望

笔者团队多年来从事 AMPs 的研究, 对于 AMPs 的来源、结构、功能、抗菌机理等方面进行了系统的研究。最近的研究发现^[79], 纳米自组装 AMPs 抗菌效果不及单体 AMPs, 实验偶然发现肽 13 (WKIWKDPGIKKWIKGGGQKRPRVRLSA) 在溶液中的自聚行为会提高对大肠杆菌 *E. coli* ATCC25922 的抗菌活性, 该肽属于特异性靶向抗菌肽 (Stamp), 对于杀死大肠杆菌 *E. coli* ATCC25922 具有高度特异性, 此外肽 13 显示出较低的细胞毒性和溶血活性并对于盐离子、血清环境表现出低敏感度。作者认为肽 13 的一系列特性可能会与该肽的自聚行为有关, 自此本团队开始对 AMPs 分子自组装的行为进行深入研究。

本团队研究发现: (1) 脂酰化设计赋予 AMPs 自组装特性。(2) 脂酰化修饰 AMPs 可以提高抗菌活性和盐离子稳定性, 由于脂肪酸是细胞膜的重要组成部分, 脂肪链的存在会大幅度提高脂酰肽与细菌的结合能力。(3) 自组装可以降低脂酰肽的系统性毒性, 提高其细胞选择性。我们认为 AMPs 在自组装后, 疏水域和非极性面会包裹在自组装体内, 从而降低与正常细胞的接触面积以达到减少毒性的效果。(4) 脂酰肽自组装对其蛋白酶稳定性有稳定的提升效果。脂酰肽在自组装后会隐蔽疏水面酶切位点, 规避蛋白酶的水解作

用。此外, 药物在体内的持续释放意味着需要提高多肽的浓度。这可能会引起细胞毒性的升高, 关于这一缺陷, 我们即将通过超分子自组装系统考虑 AMPs 自组装在体内持续释放问题, 或许通过 pH 响应解组装的 AMPs 会是一个很好的思路。目前看来, 超分子自组装系统已成为未来生物工程、医学材料研发的方向。

自组装多肽在医学、材料、生物、工程等领域已经展示了发展前景, 但是该种技术的全面普及还面临着很多困难。例如自组装的原理和趋势需要深入阐明, 自组装形成的纳米结构容易受到环境因素的影响, 其不稳定性需要控制。在医学领域, 肽基水凝胶虽然显示出诸多优势, 但发掘不足。在畜牧领域, 饲用抗生素将在今年下半年被全面禁止在饲料中添加, 运用自组装技术研发安全、稳定、低成本、高效率的抗菌肽产品替代饲用抗生素, 既是严峻挑战, 也是希望所在。

REFERENCES

- [1] Zhang S, Holmes T, Lockshin C, et al. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(8): 3334-3338.
- [2] Mahadevi AS, Sastry GN. Cooperativity in noncovalent interactions. *Chem Rev*, 2016, 116(5): 2775-2825.
- [3] Panda JJ, Chauhan VS. Short peptide based self-assembled nanostructures: implications in drug delivery and tissue engineering. *Polym Chem*, 2014, 5(15): 4418-4436.
- [4] Fichman G, Gazit E. Self-assembly of short peptides to form hydrogels: design of building blocks, physical properties and technological applications. *Acta Biomater*, 2014, 10(4): 1671-1682.
- [5] Wang HM, Feng Z, Xu B. Instructed assembly as context-dependent signaling for the death and morphogenesis of cells. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58(17): 5567-5571.
- [6] Wang HM, Feng Z, Yang CH, et al. Unraveling the cellular mechanism of assembling cholesterol for

- selective cancer cell death. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(4): 907-917.
- [7] Luo ZC, Wu QJ, Yang CB, et al. A powerful CD8⁺ T-cell stimulating D-tetra-peptide hydrogel as a very promising vaccine adjuvant. *Adv Mater*, 2017, 29(5): 1601776.
- [8] Wu CF, Zhang R, Du W, et al. Alkaline phosphatase-triggered self-assembly of near-infrared nanoparticles for the enhanced photoacoustic imaging of tumors. *Nano Lett*, 2018, 18(12): 7749-7754.
- [9] Yang CH, Ren CH, Zhou J, et al. Dual fluorescent-and isotopic-labelled self-assembling vancomycin for *in vivo* imaging of bacterial infections. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56(9): 2356-2360.
- [10] Lin YX, Qiao SL, Wang Y, et al. An *in situ* intracellular self-assembly strategy for quantitatively and temporally monitoring autophagy. *ACS Nano*, 2017, 11(2): 1826-1839.
- [11] Brown N, Lei JT, Zhan CD, et al. Structural polymorphism in a self-assembled tri-aromatic peptide system. *ACS Nano*, 2018, 12(4): 3253-3262.
- [12] Kim DH, Singh N, Oh J, et al. Coordination-driven self-assembly of a molecular knot comprising sixteen crossings. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57(20): 5669-5673.
- [13] Guo XQ, Zhou LP, Cai LX, et al. Self-assembled bright luminescent lanthanide-organic polyhedra for ratiometric temperature sensing. *Chem A Eur J*, 2018, 24(27): 6936-6940.
- [14] Lakshmanan A, Zhang SG, Hauser CAE. Short self-assembling peptides as building blocks for modern nanodevices. *Trends Biotechnol*, 2012, 30(3): 155-165.
- [15] Qian YX, Wang WZ, Wang ZH, et al. pH-triggered peptide self-assembly for targeting imaging and therapy toward angiogenesis with enhanced signals. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(9): 7871-7881.
- [16] Tian XB, Sun FD, Zhou XR, et al. Role of peptide self-assembly in antimicrobial peptides. *J Peptide Sci*, 2015, 21(7): 530-539.
- [17] Wang J, Liu K, Xing RR, et al. Peptide self-assembly: thermodynamics and kinetics. *Chem Soc Rev*, 2016, 45(20): 5589-5604.
- [18] Boyle AL, Woolfson DN. *De novo* designed peptides for biological applications. *Chem Soc Rev*, 2011, 40(8): 4295-4306.
- [19] Del Giudice A, Rüter A, Pavel NV, et al. Self-assembly of model amphiphilic peptides in nonaqueous solvents: changing the driving force for aggregation does not change the fibril structure. *Langmuir*, 2020, 36(29): 8451-8460.
- [20] Rad-Malekshahi M, Lempsink L, Amidi M, et al. Biomedical applications of self-assembling peptides. *Bioconjugate Chem*, 2016, 27(1): 3-18.
- [21] Zhang HY, Park J, Jiang YH, et al. Rational design of charged peptides that self-assemble into robust nanofibers as immune-functional scaffolds. *Acta Biomater*, 2017, 55: 183-193.
- [22] Pal VK, Jain R, Roy S. Tuning the supramolecular structure and function of collagen mimetic ionic complementary peptides via electrostatic interactions. *Langmuir*, 2020, 36(4): 1003-1013.
- [23] Dasgupta A, Das D. Designer peptide amphiphiles: self-assembly to applications. *Langmuir*, 2019, 35(33): 10704-10724.
- [24] Wang J, Han SY, Meng G, et al. Dynamic self-assembly of surfactant-like peptides A₆K and A₉K. *Soft Matter*, 2009, 5(20): 3870-3878.
- [25] Mello LR, Aguiar RB, Yamada RY, et al. Amphipathic design dictates self-assembly, cytotoxicity and cell uptake of arginine-rich surfactant-like peptides. *J Mater Chem B*, 2020, 8(12): 2495-2507.
- [26] Zhao YR, Wang JQ, Deng L, et al. Tuning the self-assembly of short peptides via sequence variations. *Langmuir*, 2013, 29(44): 13457-13464.
- [27] Wu DN, Zhang SY, Zhao YY, et al. The effects of motif net charge and amphiphilicity on the self-assembly of functionally designer RADA16-I peptides. *Biomed Mater*, 2018, 13(3): 035011.
- [28] Otsuka T, Maeda T, Hotta A. Effects of salt concentrations of the aqueous peptide-amphiphile solutions on the sol-gel transitions, the gelation

- speed, and the gel characteristics. *J Phys Chem B*, 2014, 118(39): 11537-11545.
- [29] Hasan A, Saxena V, Castelletto V, et al. Chain-end modifications and sequence arrangements of antimicrobial peptoids for mediating activity and nano-assembly. *Front Chem*, 2020, 8: 416.
- [30] Lei RY, Hou JC, Chen QX, et al. Self-assembling myristoylated human α -defensin 5 as a next-generation nanobiotics potentiates therapeutic efficacy in bacterial infection. *ACS Nano*, 2018, 12(6): 5284-5296.
- [31] Qi GB, Zhang D, Liu FH, et al. An “on-site transformation” strategy for treatment of bacterial infection. *Adv Mater*, 2017, 29(36): 1703461.
- [32] Lee SS, Fyrner T, Chen F, et al. Sulfated glycopeptide nanostructures for multipotent protein activation. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12(8): 821-829.
- [33] Chen WK, Li SX, Renick P, et al. Bacterial acidity-triggered antimicrobial activity of self-assembling peptide nanofibers. *J Mater Chem B*, 2019, 7(18): 2915-2919.
- [34] Fung SY, Keyes C, Duhamel J, et al. Concentration effect on the aggregation of a self-assembling oligopeptide. *Biophys J*, 2003, 85(1): 537-548.
- [35] Chang R, Subramanian K, Wang M, et al. Enhanced antibacterial properties of self-assembling peptide amphiphiles functionalized with heparin-binding cardin-motifs. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(27): 22350-22360.
- [36] Vigier-Carrière C, Wagner D, Chaumont A, et al. Control of surface-localized, enzyme-assisted self-assembly of peptides through catalyzed oligomerization. *Langmuir*, 2017, 33(33): 8267-8276.
- [37] Boccia AC, Lukeš V, Eckstein-Andicsová A, et al. Solvent- and concentration-induced self-assembly of an amphiphilic perylene dye. *N J Chem*, 2020, 44(3): 892-899.
- [38] Hong YS, Lau LS, Legge RL, et al. Critical self-assembly concentration of an ionic-complementary peptide EAK16-I. *J Adhes*, 2004, 80(10/11): 913-931.
- [39] Ozbas B, Kretsinger J, Rajagopal K, et al. Salt-triggered peptide folding and consequent self-assembly into hydrogels with tunable modulus. *Macromolecules*, 2004, 37(19): 7331-7337.
- [40] Liu YF, Yang YL, Wang C, et al. Stimuli-responsive self-assembling peptides made from antibacterial peptides. *Nanoscale*, 2013, 5(14): 6413-6421.
- [41] Tiné MR, Alderighi M, Duce C, et al. Effect of temperature on self-assembly of an ionic tetrapeptide. *J Therm Anal Calorim*, 2011, 103(1): 75-80.
- [42] Li J, Wang JQ, Zhao YR, et al. Surfactant-like peptides: from molecular design to controllable self-assembly with applications. *Coordinat Chem Rev*, 2020, 421: 213418.
- [43] Melchionna M, Styan KE, Marchesan S. The unexpected advantages of using D-amino acids for peptide self-assembly into nanostructured hydrogels for medicine. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16(18): 2009-2018.
- [44] Garcia AM, Iglesias D, Parisi E, et al. Chirality effects on peptide self-assembly unraveled from molecules to materials. *Chem*, 2018, 4(8): 1862-1876.
- [45] 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. *Nanoscale*, 2019, 11(1): 266-275.
- [46] Ren CH, Chu LP, Huang F, et al. A novel H₂O₂ responsive supramolecular hydrogel for controllable drug release. *RSC Adv*, 2017, 7(3): 1313-1317.
- [47] Zhang PC, Cheetham AG, Lock LL, et al. Cellular uptake and cytotoxicity of drug-peptide conjugates regulated by conjugation site. *Bioconjugate Chem*, 2013, 24(4): 604-613.
- [48] Cai YB, Shen HS, Zhan J, et al. Supramolecular “trojan horse” for nuclear delivery of dual anticancer drugs. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(8): 2876-2879.
- [49] Liu RW, Li XC, Xiao WW, et al. Tumor-targeting peptides from combinatorial libraries. *Ad Drug Delivery Rev*, 2017, 110-111: 13-37.

- [50] Branco MC, Pochan DJ, Wagner NJ, et al. Macromolecular diffusion and release from self-assembled β -hairpin peptide hydrogels. *Biomaterials*, 2009, 30(7): 1339-1347.
- [51] Marchesan S, Qu Y, Waddington LJ, et al. Self-assembly of ciprofloxacin and a tripeptide into an antimicrobial nanostructured hydrogel. *Biomaterials*, 2013, 34(14): 3678-3687.
- [52] Abbas M, Xing RR, Zhang N, et al. Antitumor photodynamic therapy based on dipeptide fibrous hydrogels with incorporation of photosensitive drugs. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017, 4(6): 2046-2052.
- [53] Wang Q, Jiang N, Fu B, et al. Self-assembling peptide-based nanodrug delivery systems. *Biomater Sci*, 2019, 7(12): 4888-4911.
- [54] Hamley IW. PEG-peptide conjugates. *Biomacromolecules*, 2014, 15(5): 1543-1559.
- [55] Perinelli DR, Campana M, Singh I, et al. PEGylation affects the self-assembling behaviour of amphiphilic octapeptides. *Int J Pharmaceut*, 2019, 571: 118752.
- [56] Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharmaceut Sci*, 2008, 97(8): 2892-2923.
- [57] Loo Y, Wong YC, Cai EZ, et al. Ultrashort peptide nanofibrous hydrogels for the acceleration of healing of burn wounds. *Biomaterials*, 2014, 35(17): 4805-4814.
- [58] Anderson JM, Vines JB, Patterson JL, et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells synergistically enhanced by biomimetic peptide amphiphiles combined with conditioned medium. *Acta Biomater*, 2011, 7(2): 675-682.
- [59] Seow WY, Salgado G, Lane EB, et al. Transparent crosslinked ultrashort peptide hydrogel dressing with high shape-fidelity accelerates healing of full-thickness excision wounds. *Sci Rep*, 2016, 6: 32670.
- [60] Kim KK, Siddiqui Z, Patel M, et al. A self-assembled peptide hydrogel for cytokine sequestration. *J Mater Chem B*, 2020, 8(5): 945-950.
- [61] Silva GA, Czeisler C, Niece KL, et al. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers. *Science*, 2004, 303(5662): 1352-1355.
- [62] Fores JR, Criado-Gonzalez M, Chaumont A, et al. Autonomous growth of a spatially localized supramolecular hydrogel with autocatalytic ability. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59(34): 1455-14563.
- [63] Mikolajczak DJ, Scholz J, Kokscha B. Tuning the catalytic activity and substrate specificity of peptide-nanoparticle conjugates. *ChemCatChem*, 2018, 10(24): 5665-5668.
- [64] Mikolajczak DJ, Berger AA, Kokscha B. Catalytically active peptide-gold nanoparticle conjugates: prospecting for artificial enzymes. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59(23): 8776-8785.
- [65] Chen CX, Pan F, Zhang SZ, et al. Antibacterial activities of short designer peptides: a Link between propensity for nanostructuring and capacity for membrane destabilization. *Biomacromolecules*, 2010, 11(2): 402-411.
- [66] He B, Ma SY, Peng GF, et al. TAT-modified self-assembled cationic peptide nanoparticles as an efficient antibacterial agent. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*, 2018, 14(2): 365-372.
- [67] Hong W, Zhao YN, Guo YR, et al. PEGylated self-assembled nano-bacitracin a: probing the antibacterial mechanism and real-time tracing of target delivery *in vivo*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(13): 10688-10705.
- [68] McCloskey AP, Gilmore BF, Laverty G. Laverty garry evolution of antimicrobial peptides to self-assembled peptides for biomaterial applications. *Pathogens*, 2014, 3(4): 791-821.
- [69] Schnaider L, Brahmachari S, Schmidt NW, et al. Self-assembling dipeptide antibacterial nanostructures with membrane disrupting activity. *Nat Commun*, 2017, 8: 1365.
- [70] Lombardi L, Falanga A, Del Genio V, et al. A new hope: self-assembling peptides with antimicrobial activity. *Pharmaceutics*, 2019, 11(4): 166.
- [71] Porter SL, Coulter SM, Pentlavalli S, et al. Self-assembling diphenylalanine peptide nanotubes

- selectively eradicate bacterial biofilm infection. *Acta Biomater*, 2018, 77: 96-105.
- [72] Belbekhouche S, Bousserhine N, Alphonse V, et al. From beta-cyclodextrin polyelectrolyte to layer-by-layer self-assembly microcapsules: from inhibition of bacterial growth to bactericidal effect. *Food Hydrocolloids*, 2019, 95: 219-227.
- [73] Konjaria ML, Scriba GKE. Enantioseparation of analogs of the dipeptide alanyl-phenylalanine by capillary electrophoresis using neutral cyclodextrins as chiral selectors. *J Chromatogr A*, 2020, 1623: 461158.
- [74] Li JF, Zhang JX, Wang ZG, et al. Identification of a cyclodextrin inclusion complex of antimicrobial peptide CM4 and its antimicrobial activity. *Food Chem*, 2017, 221: 296-301.
- [75] Bagheri M, Nikolenko H, Arasteh S, et al. Bacterial aggregation triggered by fibril forming tryptophan-rich sequences: effects of peptide side chain and membrane phospholipids. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(24): 26852-26867.
- [76] Petrlova J, Hansen FC, van der Plas MJA, et al. Aggregation of thrombin-derived C-terminal fragments as a previously undisclosed host defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(21): E4213-E4222.
- [77] Shen ZW, Guo Z, Zhou LM, et al. Biomembrane induced *in situ* self-assembly of peptide with enhanced antimicrobial activity. *Biomater Sci*, 2020, 8(7): 2031-2039.
- [78] Chen L, Patrone N, Liang JF. Peptide self-assembly on cell membranes to induce cell lysis. *Biomacromolecules*, 2012, 13(10): 3327-3333.
- [79] Tan P, Lai ZH, Zhu YJ, et al. Multiple strategy optimization of specifically targeted antimicrobial peptide based on structure-activity relationships to enhance bactericidal efficiency. *Acs Biomater Sci Eng*, 2020, 6(1): 398-414.

(本文责编 郝丽芳)