氧化还原调控自组装短肽水凝胶的形成

曹长海^①, 曹美文^①, 范海明^①, 夏道宏^①, 徐海^{①*}, Lu Jian R^{②*}

^① 中国石油大学(华东)生物工程与技术中心, 青岛 266580;

^② Biological Physics Group, School of Physics and Astronomy, University of Manchester, Manchester M13 9JP, United Kingdom

* 联系人, E-mail: xuh@upc.edu.cn; j.lu@manchester.ac.uk

国家自然科学基金(21003160)和山东省自然科学基金(ZR2010BQ003 和 JQ201105)资助

近年来, 肽分子自组装备受关注. 一些天然或人工设计的肽类分子可以在水溶液通过自组装过程形成具有纳米纤维结构的水凝胶. 由于其微观结构与胞外基质(ECM)类似, 以及良好的生物相容性和可控降解性, 肽自组装水凝胶在生物医学领域展示出巨大的应用潜力. 离子互补肽(如 RAD16)和 β -发夹肽(如 MAX1)自组装水凝胶已被广泛用于细胞培养、再生医学和药物控制释放等研究领域.

目前, 可以通过自组装形成水凝胶的肽类分子通常含有十几个或更多的氨基酸残基, 或者分子中含有强疏水性的非氨基酸官能团, 如 Fmoc 基团或长的脂肪链. 相对而言, 残基数目少于 10 个的短肽或超短肽不仅合成成本低, 利于日后的大规模应用, 而且其分子结构和分子间作用方式的可调控性强. 为此, 我们一直致力于自组装短肽或超短肽的分子设计和应用研究.

在前期工作中, 基于异亮氨酸(I)强的疏水性和形成 β -折叠的能力, 我们设计合成了两亲性超短肽分子 Ac-I₃K-NH₂, 其中赖氨酸(K)作为亲水头基, III 序列作为疏水尾部. Ac-I₃K-NH₂ 在水溶液中自组装形成纳米纤维(直径约 10 nm), 分子在组装体中采取 β -折叠二级结构; Ac-I₃K-NH₂ 水溶液

在 4 mmol/L 以下都是以流动液体的形式存在, 随着浓度升高, 纳米纤维进一步缠绕, 在浓度为 10 mmol/L (0.53%, w/v)时可以形成水凝胶, 但该水凝胶的力学性能很差, 其储存模量(G')在 0.1~10 Hz 频率扫描范围内仅为 200~300 Pa.

由于水凝胶力学性能的调控或增强与实际应用密切相关, 因此, 在本研究中, 我们在分子中引入半胱氨酸(C)残基, 设计合成了 Ac-I₃CGK-NH₂ 分子, 希望通过氧化还原控制二硫键的形成来调控水凝胶的性能. 结果表明, Ac-I₃CGK-NH₂ 水溶液的成胶浓度大大降低, 在浓度为 0.5 mmol/L 时放置 40 天后即可形成水凝胶, 所形成水凝胶的力学性能也得到显著提高, 例如浓度为 1.71 mmol/L 的 Ac-I₃CGK-NH₂ 水溶液放置 6 天后所形成水凝胶的 G' 达到 4500 Pa. 为此, 我们推断这些变化源于二硫键的形成, C 残基位于该两亲分子的亲水头部, 自组装形成纳米纤维后分布在其外表面, 纳米纤维间二硫键的形成可以提高纤维交联程度和强度, 从而使得 Ac-I₃CGK-NH₂ 水溶液的成胶浓度大大降低.

为验证上述推断, 我们在实验中控制了氧化还原反应的条件, 结果发现, 通过加入 H₂O₂ 代替空气中自然氧

化, 可以快速调控水凝胶的形成动力学及提高其力学性能; 而加入还原剂二硫苏糖醇(DTT)可以防止水凝胶的形成. 同时, 通过 Ellman 试剂跟踪了 Ac-I₃CGK-NH₂ 水凝胶中的巯基含量, 结果发现, 随着氧化时间的加长, 肽水凝胶的强度增加, 自由巯基的含量降低. 而透射电子显微镜(TEM)、原子力显微镜(AFM)和圆二色光谱(CD)等结构表征表明, Ac-I₃CGK-NH₂ 仍然组装形成纳米纤维(直径约 10 nm), 分子在组装体中采取 β -折叠二级结构.

此外, 我们设计了一个对比分子 Ac-I₃MGK-NH₂, 用甲硫氨酸(M)来代替半胱氨酸残基. 结果表明, 与 Ac-I₃CGK-NH₂ 相比, 尽管 Ac-I₃MGK-NH₂ 也可以自组装形成纳米纤维和 β -折叠二级结构, 但在相同浓度范围内, 其水溶液一直以流动液体的形式存在, 不能形成水凝胶. 综上所述, 在超短肽两亲分子的亲水头部引入半胱氨酸残基后, 其自组装纳米纤维间二硫键的形成可以提高纤维的交联程度, 从而促使水凝胶的形成; 在此基础上, 通过控制氧化还原条件可以调控肽水凝胶的形成动力学及其力学性能, 而这些性能的调控将利于肽自组装水凝胶在生物医学中的实际应用.

全文见: Cao C H, Cao M W, Fan H M, et al. Redox modulated hydrogelation of a self-assembling short peptide amphiphile. Chin Sci Bull, 2012, 57: 4296–4303, doi: 10.1007/s11434-012-5487-2