

· 综 述 ·

## 细胞穿膜肽入胞检测方法概述

杨成良<sup>1</sup>, 邹黎黎<sup>2\*</sup>

(1. 三峡大学 人民医院, 中国湖北 宜昌 443002; 2. 三峡大学医学院, 中国湖北 宜昌 443002)

**摘 要:** 迄今为止, 已有多达上百种的细胞穿膜肽(cell-penetrating peptides, CPPs)被发现报道, 但这类多肽分子的入胞能力参差不齐, 限制了其作为药物载体的应用。虽然已有多种实验方法可用于细胞穿膜肽入胞的检测, 但由于缺乏通用的技术来确切证实 CPPs 的入胞能力, 所以应当结合使用多种方法以降低误差。对不同的技术在检测 CPPs 入胞时的优缺点进行比较, 并针对性地提出比较理想的解决方案, 可为制订 CPPs 入胞标准化检测步骤提供一些参考。

**关键词:** 细胞穿膜肽; 荧光分析; 电子显微镜; 生物效应

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2015)01-0080-05

## An Overview of Detection Methods of Transmembrane Ability of Cell-penetrating Peptides

YANG Cheng-liang<sup>1</sup>, ZOU Li-li<sup>2\*</sup>

(1. *The People's Hospital, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China*; 2. *Medical School, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China*)

**Abstract:** Hundreds of cell-penetrating peptides (CPPs) have been found and reported. Since their transmembrane abilities are uneven, limiting their application as the drug carriers, yet need some effective analysis techniques to compare. A large number of experiments can be used to detect the penetrating abilities of CPPs into the cells, since there is no universal method can confirm the capacity, a variety of methods should be used in conjunction to reduce the errors. Thus comparing the advantages and disadvantages of different detection techniques of penetrating abilities of CPPs into cells can raise the ideal solution in order to standardize the detection steps.

**Key words:** cell-penetrating peptides; fluorescent analysis; electron microscopes; biological effect

(*Life Science Research*, 2015, 19(1): 080-084)

1965 年, Ryser 等研究发现哺乳动物细胞摄取组蛋白的速度是血清白蛋白的 3 000 倍, 并且血清白蛋白中加入组蛋白后能显著提高肿瘤细胞摄取血清白蛋白的能力 (50 倍), 这是研究史上首例关于多肽分子能协助生物活性分子穿过细胞脂质双分子层的报道<sup>[1]</sup>。1994 年, 这种具有穿膜能力的多肽分子被正式命名为细胞膜穿透肽(cell-penetrating peptides, CPPs) 或蛋白转导结构域(protein

transduction domains, PTDs)<sup>[2]</sup>。CPPs 是具有细胞膜穿透能力的小分子多肽, 能携带生物活性物质进入细胞内, 既不影响转导物质的生物活性也不会损伤细胞, 是一种非常理想的运载工具。但 CPPs 的入胞能力参差不齐, 限制了其作为药物载体的应用, 因而需要一些确切的手段对 CPPs 进行筛选、比较。许多课题组在评估 CPPs 穿膜时, 都有自己最优先的方法, 但这些方法是否最适宜却

收稿日期: 2014-03-04; 修回日期: 2014-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81201766); 三峡大学人才科研启动基金资助项目(KJ2011B051)

作者简介: 杨成良(1973-), 男, 湖北宜昌人, 三峡大学人民医院主管技师, 武汉大学生物医学工程硕士研究生, 主要从事医学检验研究; \* 通讯作者: 邹黎黎(1982-), 女, 重庆人, 三峡大学医学院副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事感染与免疫、药物的分子递送相关研究, Tel: 0717-6397438, E-mail: zoulili@ctgu.edu.cn。

值得考量。本文拟比较不同的技术检测 CPPs 穿膜的优缺点,并针对缺陷提出比较理想的解决方案,以期为 CPPs 穿膜标准化检测进程提供一些参考。

## 1 荧光分析

荧光分析法是评估 CPPs 穿膜最常见的方法。多肽分子首先用荧光素标记,然后通过不同的技术手段对穿膜效率进行检测,包括荧光显微镜观察、高效液相色谱法、荧光激活细胞分选术、荧光光谱测定法。如 Fischer 等成功应用荧光显微镜比较了来源于果蝇触角基因同源结构域蛋白(antennapedia homeodomain protein, AntpHD)的多肽分子与来源于卡波氏瘤成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)的膜上转移序列(membrane trans-locating sequence, MTS)的入胞效率,结果显示 AntpHD 来源的多肽分子是 FGF 来源的多肽分子穿膜效率的 3~4 倍<sup>[3]</sup>。尽管所有的荧光分析技术都能检测 CPPs 的穿膜,但需要注意的是考虑到荧光可能粘附在细胞表面,因此即使检测到荧光基团的摄取也不能直接等同于多肽分子的穿膜。此外,某些荧光基团可能会对多肽分子的穿膜效率及胞内分布产生影响<sup>[3-5]</sup>(表 1)。

### 1.1 荧光显微镜观察

使用荧光显微镜除了能提供 CPPs 的穿膜信息以外,它的另一个优势是能够利用白光下的细胞形态及染色(例如碘化丙啶)情况来确定细胞活性。因为只有细胞膜受损的细胞才能被染色。2001 年以前,研究者利用荧光显微镜探讨 CPPs 的穿膜机制时都是观察多肽分子进入固定细胞的情况。然而, Lundberg 等发现由于荧光显微镜并不能分辨多肽分子是结合在细胞膜上还是进入细胞内,因而一定程度上影响了结果的准确性<sup>[6]</sup>。近年来新兴的共聚焦显微镜因其具有完整显示活细胞聚焦平面的能力,弥补了荧光显微镜观察的技术缺陷。如 Richard 等成功利用共聚焦显微镜观察到 TAT 及多聚精氨酸(polyarginine)进入细胞内并主要定位于细胞核<sup>[7]</sup>,因而特别推荐荧光显微镜配合使用共聚焦显微镜进行观察,能准确地对 CPPs 进行亚细胞定位,使得对 CPPs 穿膜的检测更具说服力。Jones 等成功应用共聚焦显微镜结合荧光显微镜观察了 antennapedia (Antp)及 TAT 的穿膜情况,结果显示两者均穿膜进入了细胞内,并且穿膜作用是脂筏依赖的内吞作用而非网格蛋

白依赖的内吞作用<sup>[8]</sup>。

虽然荧光显微镜几乎是唯一能定性分析 CPPs 入胞的方法,并且这种技术应用非常广泛,但它较费时费力且不能同时分析多个样本。此外, CPPs 进入细胞后并不十分稳定,容易发生降解,从而导致图像不清晰。因而特别推荐荧光显微镜结合使用其他的观察技术来确定多肽分子是完整的还是降解的,以保证结果的准确性。如 Adams 等成功利用荧光共振能量转移实验(fluorescence resonance energy transfer, FRET)实时分析细胞穿膜肽 H<sub>2</sub>N-aha-R-CONH<sub>2</sub> 及 H<sub>2</sub>N-GGR<sub>10</sub>-CONH<sub>2</sub> 对 HeLa 细胞的穿膜,结果发现两者的入胞都具有时间依赖性,并且最终入胞的完整多肽分子与在胞外时基本持平<sup>[8,9]</sup>。

### 1.2 高效液相色谱法

多肽分子的降解是影响 CPPs 穿膜测定的重要因素,如 Oehlke 等将经过化学修饰的多肽分子 FLUOS-KLALKLALKALKALKLA-NH<sub>2</sub> 吸附在细胞膜表面以增加胞膜的疏水性,同时发现这种经过修饰的多肽分子发生降解的几率显著降低<sup>[10]</sup>。此实验强调了多肽分子降解的重要影响。反相高效液相色谱法(reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)可利用待测样品中各成分与色谱柱中固定相发生作用的不同,在检测器中出现不同的信号峰,从而将完整的多肽分子与发生降解的多肽分子区分开来。Palm 等成功地运用 RP-HPLC 定量分析了 MAP 及 penetratin 在细胞内的降解情况,结果显示进入细胞内的多肽分子呈两极分化趋势,其中一部分迅速降解,另一部分一直保持稳定<sup>[11]</sup>。虽然 RP-HPLC 可有效定量测定入胞及降解的多肽分子,但由于该色谱分析法是建立在待检成分与固定相相互作用的基础上的,因而对组成多肽分子的氨基酸种类有一定的要求,并且 HPLC 价格昂贵,一般实验室没有这个设备且仪器的操作需要一定的经验,因而不是十分经济便利。

### 1.3 荧光激活细胞分选术

检测 CPPs 穿膜最经典的荧光分析法是荧光激活细胞分选术(fluorescence activated cell sorting, FACS),这是一种依赖荧光对单一细胞系进行分选的技术,通过这种方法可在定量分析 CPPs 穿膜的同时辨别靶细胞是活细胞还是死细胞。此外, CPPs 孵育后必须用酶处理细胞,例如胰蛋白酶或链酶蛋白酶,可去除结合于膜上的多肽分子,

因此 FACS 最大的优势是能够测定 CPPs 的转导比率(多肽分子进入一个细胞内的 CPPs 的量)<sup>[7]</sup>。大部分荧光技术都不能确定多肽分子是结合在细胞膜表面,是锚定在膜上还是进入细胞内的,而荧光激活细胞分选术能弥补这个缺陷。如 Jones 等成功应用 FACS 对 Antp、TAT、transportan (TP) 及 polyarginine 的穿膜情况进行了比较,研究发现它们在胞内表现出非常相似的代谢动力学特性,此外 polyarginine 与 TP 携带货物的能力最强(polyarginine=TP>Antp>TAT),而 Antp 的细胞毒性最低(Antp<TAT<TP<polyarginine)<sup>[4]</sup>。但需要注意的是,虽然 FACS 可评估 CPPs 的转导比例与鉴别细胞是否存活,但不能分辨多肽分子是膜结合还是入胞或是存在内囊泡内<sup>[6]</sup>。

#### 1.4 荧光光谱测定法

当需要一次性对大量的多肽分子进行穿膜分析时,就需要选择一种简便、快捷的筛选方法。荧光光谱测定法能通过检测与 CPPs 结合的荧光基团来对被细胞摄取的多肽分子进行定量分析,在分析前用中浓度的胰蛋白酶洗脱孵育时结合在细胞表面的荧光基团,通过比较细胞裂解释放的荧光和溶液中的荧光可以确定被细胞摄取的 CPPs 的摩尔数,再进一步通过量化蛋白量确定 CPPs 的穿膜。这个方法十分快捷,可在数小时内同时比较几种甚至十几种 CPPs,并且此技术较经济,是一种比较理想的用于 CPPs 初筛的方法。此外,若使用荧光光谱测定法检测多肽分子的不同摄取通路时,加入不同摄取通路的相关抑制剂即可获得 CPPs 的穿膜途径的相关资料。如 Lundin 等检测了 7 种 CPPs 的入胞途径,包括阳离子 CPPs (M918、penetratin、TAT) 和两亲性 CPPs (TP、TP10、MAP、pVEC),结果显示两类 CPPs 是通过不同的途径进入细胞内的<sup>[12]</sup>。

## 2 电子显微镜

电子显微镜较之普通光学显微镜在细胞水平上有更高的分辨率,成像更清晰;共聚焦显微镜依赖荧光,而不同的荧光基团在不同细胞器的淬灭时间不同,与电子显微镜相比容易影响多肽分子亚细胞定位的准确性,如 Saalik 等对 TP 及 TP10 的入胞途径进行了研究,结果显示使用共聚焦显微镜进行观察时,大约有 20% 的 CPPs 与脂筏途径标记物发生了共定位,而电子显微镜弥补了这一缺陷<sup>[14]</sup>。虽然电子显微镜提供了最高的分

辨率,并能更好地对入胞后的 CPPs 进行定位,但电子显微镜价格昂贵,一般实验室没有这个设备且样本的制作需要一定的经验<sup>[13,14]</sup>,因而不是十分经济便利(表 1)。

## 3 质谱分析

阻碍多肽分子作为体内药物递送载体的最大因素是其在血清内的快速降解,唯一可显示多肽分子的降解并分辨多肽分子的降解产物的方法是质谱分析法(mass spectrometry, MS)。然而,样品中存在的血清会导致高背景与低信号噪声比,可通过使用 ZipTips<sup>®</sup> (Millipore)克服这一难题。ZipTips 是一个含有层析介质床的无固定死腔的 10  $\mu$ L 枪头,可有效收集纯化曝光液或细胞裂解液中的多肽分子。如 Elmquist 等将疏水性多肽 pVEC (protein from murine vascular endothelial cadherin) 与 ZipTips 上的层析介质结合以收集样品,再通过 MS 进行分析,结果显示 pVEC 在含有 10 个单位的胰蛋白酶的 PBS 缓冲液中的半衰期是 10.5 min,在含有 4.2 个单位羧肽酶 A 及 1.8 个单位羧肽酶 B 的 PBS 缓冲液中的半衰期是 44.6 min<sup>[15]</sup>。Burlina 等利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 分析法定量测定 penetratin, (Arg)<sub>9</sub> 及 TAT<sub>48-59</sub> 时,通过 ZipTips 收集纯化细胞裂解液中生物素化的 CPPs 及内参。CPPs 与靶细胞孵育后,用胰蛋白酶消化膜上的多肽分子,并在细胞裂解时,引入内参以监控多肽分子在制样时的降解<sup>[16]</sup>。MS 不仅能够定量测定一个 CPP 的摄取与降解,还可用于分子质量不同的 CPPs 混合物的测定。由此可见,这是一个高效的检测 CPPs 穿膜的方法,但值得注意的是,由于许多洗脱步骤都不允许多样品上样,且许多疏水性多肽分子在上样之前可能发生丢失,易影响实验结果的准确性(表 1)。

## 4 生物效应

CPPs 被定义为经典的运载工具,这意味着它们可被广泛应用于不同货物的运输。虽然荧光分析技术可高效地用于新 CPPs 的初筛,但最近大量研究都表明荧光的吸收会产生不可避免的生物应答,如荧光标记的寡核苷酸或其类似物如肽核酸 (PNA) 与 CPPs 结合入胞后可引起剧烈的生物反应,因而考虑生物效应的分析方法是更佳的选择<sup>[12,17-20]</sup>(表 1)。

表 1 细胞穿膜肽穿膜效率检测方法概述

Table 1 Overview of detection methods of transmembrane ability of cell-penetrating peptides

方法(Method)	目的(Objective)	优点(Advantage)	缺点(Disadvantage)
荧光显微镜观察	荧光标记细胞内多肽分子的分布情况	能够确定细胞活性,且细胞膜结合多肽分子无位移	不能鉴别多肽分子结合在细胞膜上还是进入细胞内;不能分辨多肽分子是完整的还是降解的
高效液相色谱法	多肽分子的分解与胞内定位	可定量测定入胞和降解的多肽分子	组成多肽分子的氨基酸种类限制了其使用
荧光激活细胞分选术	多肽分子的摄取	可评估转导比例与鉴别细胞是否存活	不能鉴别多肽分子是膜结合还是入胞或是存在内囊泡内
荧光光谱测定法	细胞内多肽分子的定量	快速、简单、经济的方法初筛新的穿膜肽	不能鉴别多肽分子是膜结合还是入胞或是存在内囊泡内
电子显微镜观察	多肽分子的胞内分布	高放大倍数使细胞器可视化	制样困难,需要有经验者
质谱分析法	肽的摄取与降解的定量测定	追踪多肽分子的降解和鉴定降解产物	不能鉴别多肽分子是膜结合还是入胞或是存在内囊泡内
链接校正	CPPs 链接校正的寡核苷酸的生物活性	避免非特异性毒性干扰;不仅定位还测定货物生物活性	昂贵,需要特殊细胞系
Cre-重组酶	功能蛋白的胞内递送	避免非特异性毒性干扰	需要 CPP-Cre 蛋白的重组表达
凋亡与增殖	诱导凋亡和阻止增殖	不仅定位还测定货物生物活性	可能被多肽分子的非特异性毒性干扰

#### 4.1 链接校正

使用链接校正寡核苷酸(SCOS)来评估 CPPs 递送货物的能力是近几年十分常见的研究手段,此方法最初由 Kole 等于 1998 年建立。HeLa pLuc 705 细胞稳定转染荧光素酶,报告基因被含有一个异常剪接位点的来自  $\beta$ -珠蛋白的前体 mRNA 打断,异常剪接位点激活潜在的剪接位点,在正常情况下会产生非功能性的荧光素酶;若引入 SCOS 互补绑定异常剪接位点,剪接后则会产生功能性荧光素酶。因而可通过结合不同的 CPPs 到潜在剪接位点的互补 SCOS,评估 CPPs 作为药物载体的能力<sup>[21]</sup>。如 Lehto 等通过链接校正技术对硬脂酰改造的(RxR) (4)进行分析时发现,该 CPP 具有强大的运载货物的能力<sup>[20]</sup>。由于剪接发生在核内,这种分析手段可给出 SCOS 在胞内的分布情况及 CPP-SCOS 复合体是否发生内囊泡逃逸等相关信息,是一种优于荧光分析技术的检测手段<sup>[22]</sup>。但是链接校正技术需要特殊的细胞系 HeLa pLuc 705,且该检测依赖于荧光素酶底物的发光,不是十分经济。

#### 4.2 Cre-重组酶

基于 Cre-loxP 系统的检测技术是另一个比较理想的用于确定 CPPs 携带货物能力的方法。这是目前国内外研究和应用比较广泛的一种位点特异性重组系统,主要包含两个部分:一个是 loxP 位点,另一个是识别 loxP 位点的 Cre-重组酶。Cre-重组酶是一种无须辅助因子便能催化 loxP 位点之间的 DNA 特殊位点重组的拓扑异构酶。Wadia 等将 Cre-loxP 系统用于 CPPs 转导蛋

白入胞的检测,TAT-Cre 蛋白被转导到包含 loxP-STOP-loxP 的增强型绿色荧光蛋白基因(enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的小鼠 T 细胞中,Cre-重组酶切除了 STOP 片段从而抑制了 EGFP 的表达,因其非特异性毒性且不干扰结果,具有明显的优势<sup>[23]</sup>。此技术虽然特异性非常强,但它依赖于 CPP-Cre 的表达,相当费时费力且很难取得足够的蛋白量,因而未得到普及。此外,Cre-重组酶是一个相对分子质量相当大的货物,会影响 CPPs 的性状。

#### 4.3 凋亡与增殖

绝大多数 CPPs 的潜在用途是作为载体运输药物到人或动物,而 CPPs 在癌症领域的应用主要是为了增加细胞凋亡以减少细胞增殖。如 Aroui 等研究发现,阿霉素阻碍肿瘤细胞的增殖的同时可引起抑制凋亡的原癌基因 *Bcl-2* 的过表达,从而阻碍细胞凋亡的发生,而利用 CPP 运送阿霉素在有效阻碍 MDA-MB231 乳腺癌细胞的增殖同时,可驱动其他的细胞凋亡途径<sup>[24]</sup>。虽然 CPPs 已被成功用于癌症治疗中化疗药物的运送载体,但新的研究发现这种应用还有继续改良的空间,利用此方法的主要目的是监控阻止肿瘤细胞增殖,但大量的研究发现 CPPs 的非特异性非细胞毒性可能会对治疗效果发生干扰,而不能体现运送的货物的相应生物学效应<sup>[24]</sup>。

迄今为止,有许多不同的方法可用于评估 CPPs 的入胞能力,但单一的检测技术各有优缺点,不能确切地证实 CPPs 的入胞能力。建议结合使用几种方法,以弥补各检测手段的缺陷,防止假阳性结果的出现。

## 参考文献(References):

- [1] RYSER H J, HANCOCK R. Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture[J]. *Science*, 1965, 150(3695): 501–503.
- [2] DEROSI D, JOLIOT A H, CHASSAING G, *et al.* The third helix of the antennapedia homeodomain translocates through biological membranes[J]. *Journal of Biology Chemistry*, 1994, 269(14): 10444–10450.
- [3] FISCHER R, WAIZENEGGER T, KOHLER K, *et al.* A Quantitative validation of fluorophore-labelled cell-permeable peptide conjugates: fluorophore and cargo dependence of import[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1564(2): 365–374.
- [4] JONES S W, CHRISTISON R, BUNDELL K, *et al.* Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2005, 145(8): 1093–1102.
- [5] DUPONT E, PROCHIANTZ A, JOLIOT A. Identification of a signal peptide for unconventional secretion[J]. *Journal of Biology Chemistry*, 2007, 282(12): 8994–9000.
- [6] LUNDBERG M, JOHANSSON M. Is VP22 nuclear homing an artifact?[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(8): 713–714.
- [7] RICHARD J P, MELIKOV K, VIVES E, *et al.* Cell-penetrating peptides, a re-evaluation of the mechanism of cellular uptake[J]. *Journal of Biology Chemistry*, 2003, 278(1): 585–590.
- [8] ADAMS S R, TSIEN R Y. Imaging the influx of cell-penetrating peptides into the cytosol of individual cells. *Handbook of cell-penetrating peptides* (Ü. Langel, Ed.)[M]. Boca Raton: CRC Press, 2006. 505–512.
- [9] ADAMS S R, TSIEN R Y. Preparation of the membrane-permeant biarsenicals FAsH-EDT2 and ReAsH-EDT2 for fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins[J]. *Nature Protocol*, 2008, 3(9): 1527–1534.
- [10] OEHLKE J, SCHELLER A, WIESNER B, *et al.* Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1414(1–2): 127–139.
- [11] PALM C, JAYAMANNE M, KJELLANDER M, *et al.* Peptide degradation is a critical determinant for cell-penetrating peptide uptake[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1768(7): 1769–1776.
- [12] LUNDIN P, JOHANSSON H, GUTERSTAM P, *et al.* Distinct uptake routes of cell-penetrating peptide conjugates[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2008, 19(12): 2535–2542.
- [13] SÄÄLIK P, PADARI K, NIINEP A, *et al.* Protein delivery with transportans is mediated by caveolae rather than flotillin-dependent pathways[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2009, 20(5): 877–887.
- [14] PADARI K, SÄÄLIK P, HANSEN M, *et al.* Cell transduction pathways of transportans[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2005, 16(6): 1399–1410.
- [15] ELMQUIST A, LANGEL Ü. *In Vitro* uptake and stability study of pVEC and its all-D analog[J]. *Biology Chemistry*, 2003, 384(3): 387–393.
- [16] BURLINA F, SAGAN S, BOLBACH G, *et al.* Quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Angewandte Chemie International Edition England*, 2005, 44(27): 4244–4247.
- [17] MÄE M, EL ANDALOUSSI S, LUNDIN P, *et al.* A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy[J]. *Journal of Control Release*, 2009, 134(3): 221–227.
- [18] ABES S, MOULTON H M, CLAIR P, *et al.* Vectorization of morpholino oligomers by the (R-Ahx-R)<sub>4</sub> peptide allows efficient splicing correction 217 comparison of CPP uptake methods in the absence of endosomolytic agents[J]. *Journal of Control Release*, 2006, 116(3): 304–313.
- [19] ABES R, MOULTON H M, CLAIR P, *et al.* Delivery of steric block morpholino oligomers by (R-X-R)<sub>4</sub> peptides: structure-activity studies[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(20): 6343–6354.
- [20] LEHTO T, ABES R, OSKOLKOV N, *et al.* Delivery of nucleic acids with a stearylated (RxR)<sub>4</sub> peptide using a non-covalent co-incubation strategy[J]. *Journal of Control Release*, 2010, 141(1): 42–51.
- [21] KANG S H, CHO M J, KOLE R. Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(18): 6235–6239.
- [22] EL ANDALOUSSI S, GUTERSTAM P, LANGEL Ü. Assessing the delivery efficacy and internalization route of cell-penetrating peptides [J]. *Nature Protocol*, 2007, 2(8): 2043–2047.
- [23] WADIA J S, STAN R V, DOWDY S F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis[J]. *Nature Medicine*, 2004, 10(3): 310–315.
- [24] AROUI S, BRAHIM S, DE WAARD M, *et al.* Efficient induction of apoptosis by doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides compared to unconjugated doxorubicin in the human breast cancer cell line MDA-MB 231[J]. *Cancer Letter*, 2009, 285(1): 28–38.