

综述

硫醇介导细胞摄取机制与应用研究进展

魏泓贝, 张慧, MASTER Mwafulirwa,
KHAMIS Abdalla, 孙晓龙*

(西安交通大学 生命科学与技术学院, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 陕西 西安 710049)

摘要: 细胞摄取是生物体内多种生物活性物质进入细胞的主要途径之一。硫醇介导的摄取通过巯基化合物与细胞内的巯基-二硫键进行动态共价交换, 然后通过融合、内吞或直接跨膜转运等方式完成对物质的递送, 在提高治疗效果和生物活性物质的应用效率方面具有优势。该文综述了具有不同环张力的二硫化物、聚二硫醚、环状寡硫族化合物、二硒化物、动态硫醚键、迈克尔受体等分子结构与巯基的相互作用机制; 总结了这一途径对量子点、核酸、蛋白质、纳米颗粒、药物和脂质体等物质在细胞内的递送, 以及通过封闭细胞内的巯基来抑制细胞对通过这一途径进入的化合物的摄取; 此外, 介绍了硫醇介导摄取在植物和微生物中的应用; 最后, 展望了硫醇介导摄取未来的发展趋势。

关键词: 动态共价交换; 硫醇介导摄取; 作用机制; 物质递送; 治疗

中图分类号: O623.81; Q25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2025) 07-1406-12

Advances in mechanism and application of thiol-mediated cell uptake

WEI Hongbei, ZHANG Hui, MASTER Mwafulirwa,
KHAMIS Abdalla, SUN Xiaolong*

(The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China)

Abstract: Cellular uptake is one of the main pathways through which various bioactive substances enter cells in living organisms. Thiol mediated cellular uptake involves dynamic covalent exchange between thiol compounds and intracellular thiol disulfide bonds, followed by delivery through fusion, endocytosis, or direct transmembrane transport, which has advantages in improving therapeutic efficacy and the efficiency of biologically active substances. Herein, the interaction mechanisms between molecular structures and thiol groups were reviewed, including disulfides with different cyclic tensions, polydisulfide, cyclic oligochalcogenides, diselenides, dynamic sulfide bonds, and Michael acceptors. The delivery of substances such as quantum dots, nucleic acids, proteins, nanoparticles, drugs, and liposomes within cells through this pathway, as well as the inhibition of cellular uptake of compounds entering through this pathway by blocking intracellular thiol groups was summarized. In addition, the application of thiol mediated uptake in plants and microorganisms was introduced. Finally, the future development trends of thiol mediated uptake were discussed.

Key words: dynamic covalent exchange; thiol mediated uptake; mechanism; material delivery; treatment

硫醇化合物 (R-SH) 中的巯基 (-SH) 具有独特的亲核性、金属螯合性以及氧化还原性。因此,

硫醇化合物能够与烯烃或炔烃发生反应生成硫醚或硫代醛; 能够与 Hg 形成配合物改变硫醇化合物的

收稿日期: 2024-05-24; 定用日期: 2024-07-01; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240423

基金项目: 大连理工大学精细化工全国重点实验室开放基金重点项目 (KF2301)

作者简介: 魏泓贝 (1995—), 女, 博士生, E-mail: bei095@stu.xjtu.edu.cn. 联系人: 孙晓龙 (1986—), 男, 教授, E-mail: x.l.sun86@xjtu.edu.cn.

性质;也能与 Ag 发生络合反应促进纳米颗粒的组装^[1-2]。—SH 中的 S 原子与另一个巯基化合物中的 S 原子结合形成二硫键的过程涉及 S 原子的氧化,因此,是一种氧化还原反应。蛋白质结构中的二硫键表现出动态特性,并受溶液中的氧化还原环境影响,在特定条件下发生断裂和重组^[3-4]。在细胞内,硫氧还蛋白还原酶(TrxR)是一种高效的氧化还原酶,能够催化硫氧还蛋白(Trx),使其内部二硫键转化为还原的状态^[5]。Trx 还通过与其他蛋白质发生氧化还原反应,参与调控细胞内诸多重要的过程,如 DNA 合成、细胞增殖和凋亡等,发挥着重要的调节和平衡作用^[6];硫醇也可以作为辅酶,调节 T 细胞的增殖和分化,对免疫系统的调节起到关键作用^[7]。综上所述,生物体内的硫醇-二硫键交换,对于维持生物活性和调控生物过程至关重要。深入研究这些反应的动力学、影响因素以及涉及的生物分子,有助于更好地理解生物体内硫醇-二硫键的作用机制。

细胞表面的硫醇含量和氧化还原状态与多种物质的跨膜运输密切相关^[8-9]。经过巯基修饰的化合物在细胞中的摄取量明显高于未修饰的化合物,巯基抑制剂的加入对含巯基化合物的摄取量明显降低。2009 年, AUBRY 等^[10]提出了硫醇介导摄取(TMU)的概念,即通过巯基反应性促进或抑制细胞对含巯基物质的摄取或转运,细胞表面的巯基能够增强与硫醇化合物的结合能力,与细胞其他经典摄取途径有所区别。这些反应参与多种生物化学过程,如细胞信号传导、抗氧化防御以及蛋白质结构和功能的调节^[11]。调节硫醇含量以控制摄取速率,在生物体的健康和疾病治疗中具有重要意义。

本综述将探讨硫醇介导摄取的概念、机制、影响因素及其在生物学上的应用,总结当前研究的进展和面临的挑战,同时展望其在其他生物学研究领域的潜力,为相关领域的研究和应用提供参考。

1 硫醇介导摄取的发展

硫醇介导的摄取是利用硫醇的反应性将物质传送至细胞内的运输途径。这一现象最早可以追溯到 20 世纪 90 年代,研究发现,病毒包膜糖蛋白中的二硫键可能促使人类免疫缺陷病毒(HIV)进入细胞并引发感染,减少细胞表面糖蛋白中的二硫键,也能够阻止辛德比斯病毒与细胞膜融合,从而降低感染率^[12]。随后,采用不同的方法探索这一现象的机制。2012 年, TORRES 等^[13]利用 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)阻断了细胞表面的二硫键后,

细胞对经过巯基修饰的肽段的摄取量显著减少,初步证明了硫醇参与肽段摄取的过程。将修饰了末端硫醇基团(如半胱氨酸残基)的微小 RNA 与未修饰的 RNA 进行比较,发现细胞对修饰后的 RNA 具有更高的摄取效率,表明硫醇修饰是改变细胞对化合物摄取速率的关键因素。直到 20 世纪后半叶至 21 世纪初,随着对硫醇介导摄取机制的深入研究,人们意识到这一过程在生物医学领域中的潜在应用价值,开发了一系列能够发生硫醇-二硫键动态共价交换的硫醇结构。例如:穿透性聚二硫醚(CPDs)、环状寡硫族化合物(COCs)和硫代二酮哌嗪(ETP)以及含有半胱氨酸-甘氨酸-半胱氨酸(CGC)的肽探针等,成功实现了对功能蛋白和天然小分子药物、核苷酸、纳米颗粒、量子点等的细胞内递送^[14]。2024 年, SAIDJALOLOV 等^[15]利用抑制剂、转运体、伴侣蛋白敲除以及一些蛋白二硫化物异构酶(PDI)家族蛋白抑制剂之间的相互关系,为理解和使用 TMU 途径提供了坚实的基础。也为研究其他化合物的摄取方式提供多样性,开辟了新的研究思路。

2 硫醇介导摄取的机制

硫醇介导的摄取交换机制是指利用硫醇分子作为中介,通过与细胞膜表面的二硫键发生动态共价交换,实现物质进入细胞内的过程。在这一机制中,硫醇分子能够与细胞表面的二硫键形成稳定的共价连接,从而促进物质的摄取和内部运输。

2.1 硫醇-二硫键的交换机制

由于硫醇介导摄取过程主要通过硫醇-二硫键动态共价交换来调控,这种交换机制的探索对进一步了解硫醇介导摄取过程至关重要。在细胞外环境中已经发现了 3 种可能的二硫键交换机制(图 1)。

(1)氧化还原反应:氧化还原酶中的硫醇基团通过攻击底物中的二硫键,裂解成 R_1-S^- ;接着混合二硫化物可通过分子内硫醇-二硫化物交换自发分解,生成更稳定的二硫化物,在该过程中,硫醇酸盐 R_2-S^- 也可能被裂解;(2)碱性水解反应: HO^- 通过进攻二硫键,裂解硫醇盐使得 R_1-S^- 离去,生成次磺酸 R_2-S-OH ;(3)酸碱辅助水解反应:羧酸根阴离子 $R_4-CO_2^-$ 进攻二硫键后,在铵阳离子 $R_3-NH_3^+$ 的协助下,促进硫醇盐 R_1-S^- (作为硫醇 R_1-SH)的裂解,生成胺 R_3-NH_2 。中间体次磺酸酯 R_4-CO_2-S-OH 在 H_2O 分子作用下自发裂解,生成 R_2-S-OH 和羧酸 R_4-COOH ^[16]。这种多样的动态共价交换方式为细胞表面和细胞内蛋白发生不同形式的硫醇化合物交换提供了理论支持。

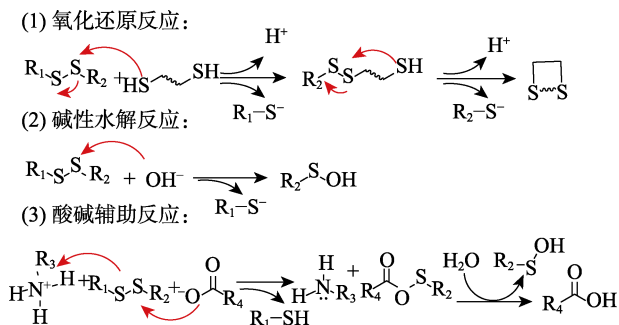


图 1 二硫键断裂的 3 种机制^[16]

Fig. 1 Three mechanisms of disulfide bond cleavage^[16]

2.1.1 环张力对硫醇介导摄取的影响

分子内部环状结构扭曲产生的张力会影响分子的结构和稳定性,进而影响反应的进行和产物的选择性。2015 年, GASPARINI 等^[17]探索了细胞对具有不同环张力的二硫化物聚合后荧光探针的摄取,与碳-硫-硫-碳(CSSC)二面角为 90°无应变的二硫化物(1)相比,芦笋酸(AspA)衍生物(5, CSSC=27°)、硫辛酸衍生物(3, CSSC=35°)和二硫苏糖醇(DTT)衍生物(2, CSSC=62°)更容易聚合被摄取更容易聚合被摄取(图 2a),初步证明,环张力更大的二硫化物更容易通过硫醇介导摄取的方式进入细胞。2017 年, ZONG 等^[18]开发了二面角接近 0°的 ETP 荧光素探针(4)(图 2b),其摄取效率比 AspA 提高了 20 倍,研究结果进一步表明,二面角 CSSS 越趋近于 0,环张力越大,越有利于通过硫醇介导的摄取途径进行摄取。

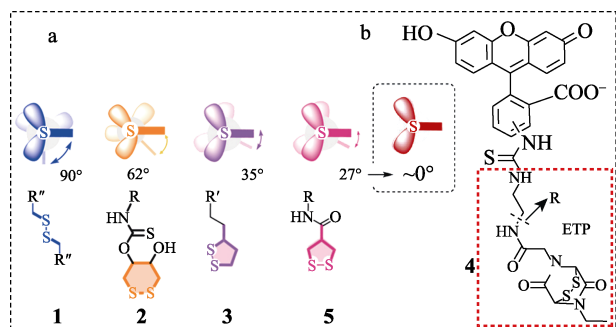


图 2 不同环张力的二硫化物(a)^[17]; 荧光素连接的 ETP 分子(b)^[18]

Fig. 2 Disulfides with different cyclic tensions (a)^[17]; ETP molecules connected by fluorescein (b)^[18]

2.1.2 CPDs 对硫醇介导摄取的影响

新型药物或探针的生物应用常因无法有效地递送到细胞中而倍受限制,特别是“大分子”底物(如蛋白质、纳米颗粒等)的递送尤为困难。2013 年, BANG 等^[19]结合硫醇介导摄取的概念引入聚二硫化物,一类含有二硫键的聚合物 CPDs,与传统的细胞穿透肽(CPPs)相比,其在生理条件下快速生成一

种高效、无毒的递送载体。

2014 年, GASPARINI 等^[20]通过硫辛酸衍生物中的二硫键进行开环聚合形成了 siCPDs。在该合成过程中,硫醇衍生物引发剂中的巯基进攻单体 M 中的二硫键,导致二硫键的断裂并产生 2 个巯基。其中,1 个巯基与引发剂形成共价键,而另 1 个巯基则会攻击下一个单体 M,依次进行硫醇-二硫键的交换并生成聚合物,通过碘乙酰胺(终止剂)与巯基反应来终止聚合(图 3a)。后来利用上述方法对不同的单体 M1~M6 进行聚合形成不同的 siCPDs,并探索其对细胞的递送能力(图 3b)。在这些聚合物中, M1 中的 L-精氨酸提供了穿越双层膜聚合物所需的胍阳离子,促使基于 M1 的 siCPDs 进入到细胞核中;在 M2 中,用苯酯取代 M1 的甲酯增加疏水性,使基于 M2 的 siCPDs 主要进入内涵体;在 M3 中,用反应性更强的 AspA 取代 M1 的硫辛酸,具有更好地进入细胞质的能力;在 M4 中,缩短了胍阳离子和硫辛酸之间的距离, M5 和 M6 含有苯丙氨酸和色氨酸,具有类似的极短间隔物,可以与阳离子 M4 共聚。结果表明,不同的单体 M 会影响细胞对聚合物的摄取速率以及靶向位置;此外,还探索了不同引发剂 6 和 7 对 siCPDs 摄取的影响,不同的引发剂不影响聚合物进入细胞的位置,也说明了 siCPDs 介导的摄取主要受单体结构的影响(图 3c、d)。同样,使用硫醇抑制剂 DTNB 将膜表面的巯基全部转化为二硫键后, siCPDs 的运输受到显著的抑制,从侧面证实了细胞对 siCPDs 的摄取受巯基的影响。2016 年,设计的 FRET 探针以绿色荧光团为引发剂、红色荧光团为终止剂,能量共振转移效应显示, CPDs 在溶液中具有较强的荧光,表明 CPDs 是聚合的状态,解聚后荧光消失,进一步验证了 CPDs 的形成机制(图 3e)^[21]。通过 siCPDs 摄取的优势是能够在 5 min 内快速进入细胞,并在摄取后不到 1 min 内解聚;其毒性远低于细胞穿透肽(CPP); siCPDs 能够靶向不同细胞器,通过内吞作用或直接穿越膜屏障进入细胞。

2.1.3 COCs 在硫醇介导摄取中的影响

COCs 是一类特殊的硫化物,其分子结构呈环状。这些环状结构通常是由数个 S 原子构成,这些 S 原子可以通过不同的连接方式形成大小不同的环。CHENG 等^[22]根据多硫醚键(如三硫醚、四硫醚等)的动态共价性,进一步提出以 COCs 促进硫醇介导摄取的方法,用于调控物质进入细胞的速度和选择性。使用流式细胞仪和共聚焦成像分析了 COCs 中最常见的苯并五硫醚(BPS5)以及其他环状低聚硫化物的摄取情况(图 4)。结果发现, BPS5 的摄取率比之前最佳的 ETP4 高出 10 倍,并

且对内吞抑制剂不敏感。同时发现, BPS5 在中性 PBS 缓冲液中非常稳定, 但当加入含有巯基的化合物时, BPS5 会迅速转化生成 1 个包含从二聚到七聚物的动态共价网络, 表明 BPS5 的交换速率很高。

2.1.4 二硒化物对硫醇介导摄取的影响

Se 通常以硒代半胱氨酸的形式存在于蛋白质中, 硒代胱氨酸在细胞内能够加速硫醇-二硫键交换并促进核糖核酸酶 A (RNase A) 正确折叠, 对蛋白的结构和功能产生影响。例如: 硒代谷胱甘肽过氧化氢酶和硒代甲硫氨酸酶在抗氧化过程中发挥关键

的作用^[23]。Se 原子本身较强的亲核能力和较大的极性以及形成的硒醇 ($pK_a \approx 5.2$) 比硫醇 ($pK_a \approx 8.2$) 有更高的酸性, 这些条件决定了硒醇更有利于进行动态共价交换。在 1,2-二硒烷中 (图 5a), 碳-硒-硒-碳 (CSSC) 的二面角约为 0.2° , 形成的五元环具有更大的环张力, 因而具有更快的聚合速率^[24]。由于 Se 和 S 属于同一主族, 因而具有相似的性质, 二硒戊烷同样可以开环聚合, 且形成的 Se—Se 键比 S—Se 键具有更好的交换性能^[24]。在 $CSSC=0^\circ$ 时, 从 O 到 S 和 Se 最大键能递减, 表明二硒化物的环张力低于二硫化物。

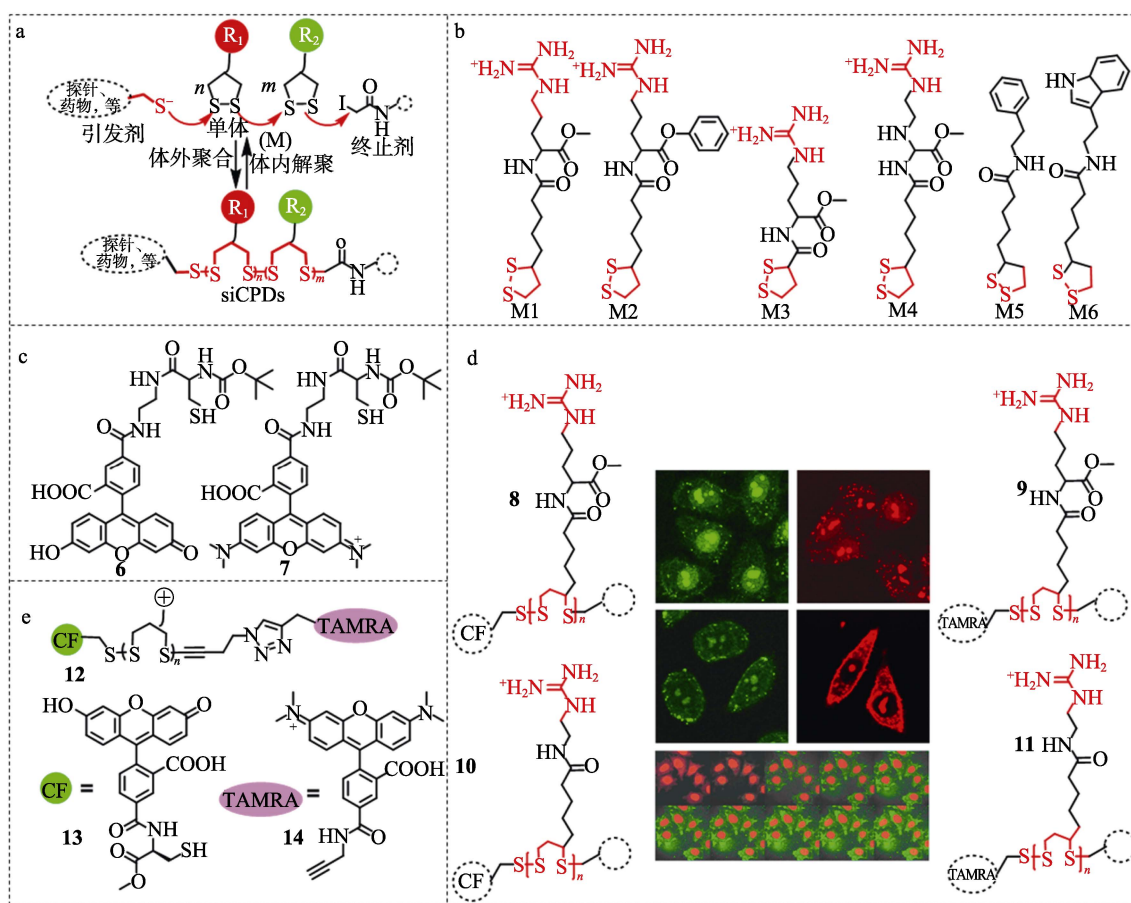


图 3 siCPDs 在细胞内的作用机制 (a)、用于通过二硫键开环交换聚合的单体 M1~M6 (b)、用于引发聚合的引发剂 6 和 7 (c)、用 CF (13) 或 TAMRA (14) 制备的聚合物 8、9、10、11 的荧光成像 (d)^[20]; 基于 siCPDs 的 FRET 结构及成像机制 (e)^[21]

Fig. 3 Intracellular mechanism of action of siCPDs (a), monomer M1~M6 used for ring opening exchange polymerization through disulfide bonds (b), initiators 6 and 7 used to initiate polymerization (c), fluorescence imaging of polymers 8, 9, 10 and 11 prepared with CF (13) or TAMRA (14) (d)^[20]; FRET structure based on siCPDs and imaging mechanism (e)^[21]

CHUARD 等^[24]开发了基于二硫戊烷介导的细胞摄取方法, 含有硫醇结构的底物直接促进二硫戊烷的聚合, 进入细胞后可以利用小分子硫醇谷胱甘肽 (GSH) 发生解聚, 释放底物。为研究二硫戊烷介导的细胞摄取过程, 开发了含二硫化物和二硒化物的探针 (如 23、24、25), 其共聚焦激光扫描成像见图 5b。用 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 23、24、25 与细

胞核染料 Hoechs33342 (蓝色) 共孵育后表明, 二硫戊烷衍生物摄取效果更好, 且 25 的效果比 23 更好, 二硫戊烷进入细胞主要聚集在细胞质中。硫醇-二硫化物交换作为主要的动态共价交换形式, 通常需要较长的时间才能达到反应平衡。2021 年, CANAL-MARTIN 等^[25]报道了一种以硒代半胱氨酸为催化剂, 在生理 pH 和低温条件下加速硫醇-二硫

化物交换的策略。这项研究进一步证明了 Se 的反应活性以及与 S 相似的催化活性。硒代胱氨酸作为催化剂拓宽了生物环境中动态交换的范围，即使在低温下也能加速平衡时间而不影响效果。

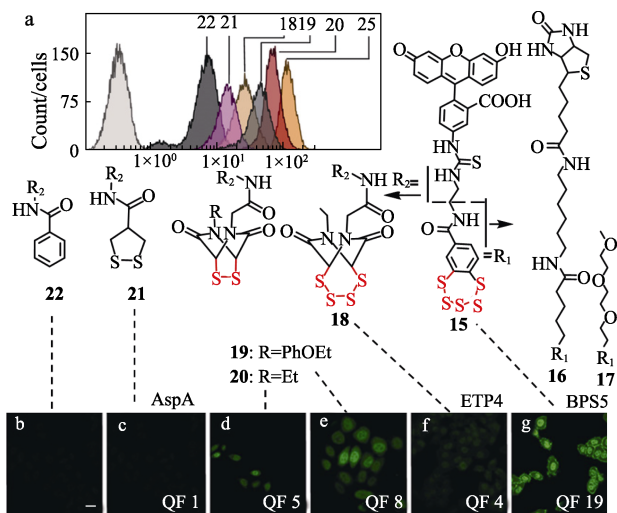


图 4 化合物的结构以及细胞穿透实验结果^[22]

Fig. 4 Structure of compounds and results of cell penetration experiments^[22]

2.1.5 动态硫醚键介导的摄取

硫醇介导的摄取除了涉及细胞表面的蛋白质外，GSH 也能通过胞膜输送到细胞外与二硫化物反应，形成谷胱甘肽混合二硫化物或游离硫醇，或者二者兼而有之（图 6a）。

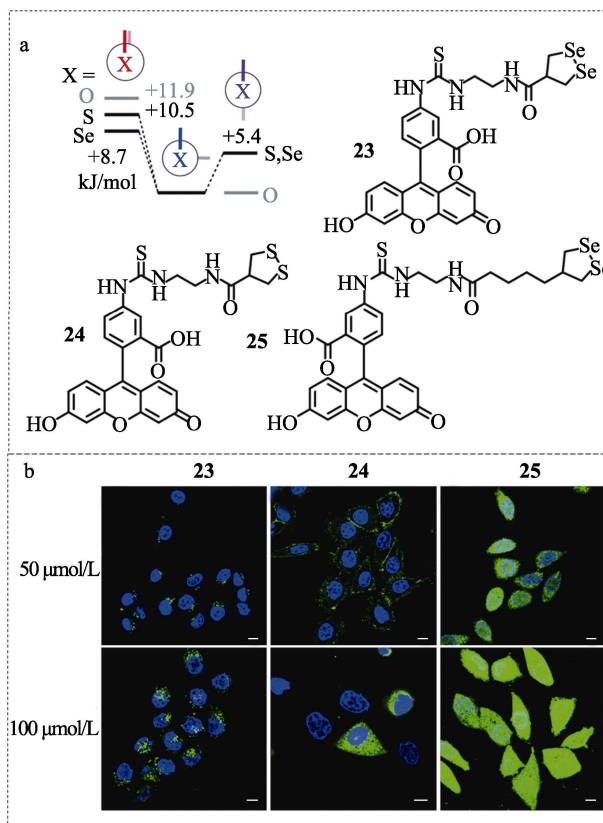


图 5 CSSC 二面角的理论计算能量图及荧光探针结构 (a) 及共聚焦激光扫描显微成像 (b)^[24]

Fig. 5 Theoretical calculation energy diagram and fluorescence probe structure (a) and confocal laser scanning microscopy imaging (b) of CSSC^[24]

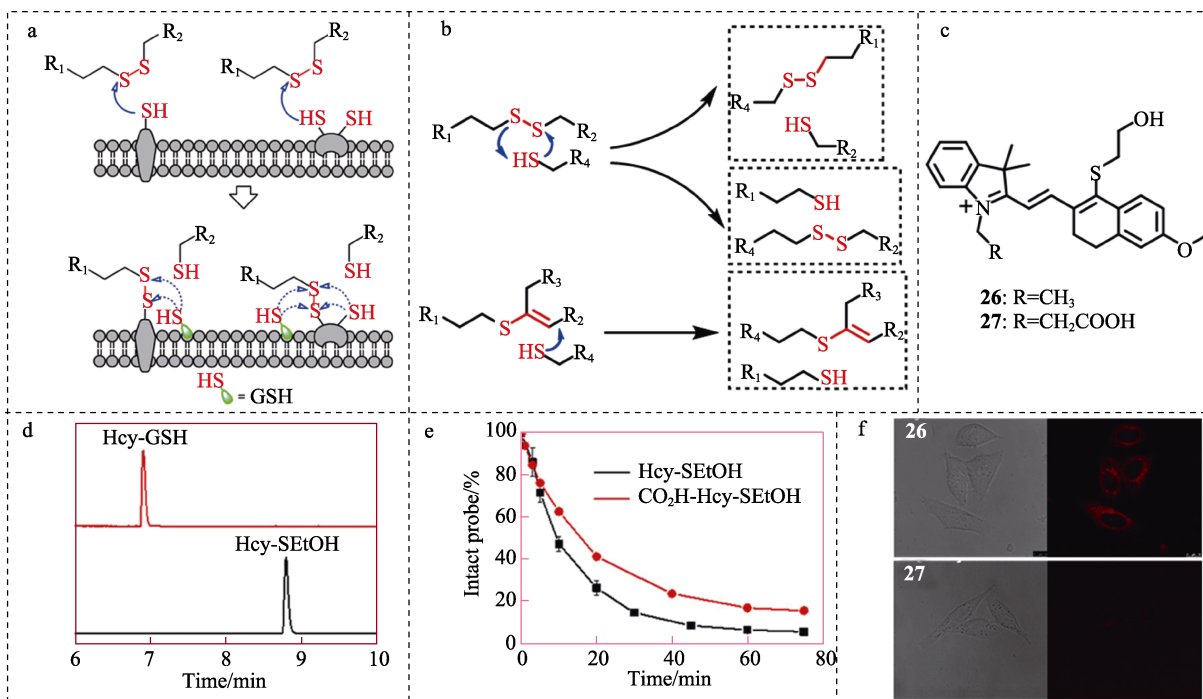


图 6 细胞表面硫醚键与二硫键的交换示意图 (a)；二硫键和硫醚键与巯基化合物的反应示意图 (b)；基于硫醚键的荧光分子结构 (c)；硫醚探针与 GSH 反应的液相色谱图 (d、e) 及硫醚探针的细胞成像 (f)^[26]

Fig. 6 Schematic diagram of exchange of thioether bonds and disulfide bonds on cell surface (a); Schematic diagram of reaction of disulfide bonds and thioether bonds with thiol compounds (b); Structure of fluorescent molecules based on thioether bonds (c); Liquid chromatography of reaction between thioether probe and GSH (d, e) and cell imaging using thioether probes (f)^[26]

由于二硫键对硫醇具有双向反应性, 每个硫醇-二硫键交换步骤中可能形成混合二硫化物或游离硫醇, 增加了对递送途径研究的复杂性。为解决上述问题, 利用对硫醇具有单向反应的动态硫醚键 (—C—S—) 化合物进行探索 (图 6b)。2017 年, GAO 等^[26]合成了含有硫醚键的探针 **26** 和 **27**, 这种硫醚键在生理 pH (7.4) 下 9.0 min 内被 GSH 逐渐裂解一半, 生成 GSH 混合硫醚 (Hcy-GSH) (图 6c~e)。通过细胞成像发现, 相比探针 **27**, 探针 **26** 在 30 min 内逐渐出现红色荧光信号, 荧光强度约为探针 **27** 的 10 倍 (图 6f)。同时探针 **26** 对孵育温度 (4 和 37 °C) 以及标准的内吞作用/巨胞吞作用抑制剂 (如 Wortmannin 和 Cytochalasin D) 不敏感。表明 Hcy-GSH 从胞外空间中的硫醚与巯基的交换进行摄取的, 而探针 **26** 和 **27** 之间的摄取效率差异可能源于生物硫醇取代化合物的不同跨膜能力。

2.2 迈克尔受体 (MAC) 与巯基的作用机制

迈克尔加成是重要的有机化学反应, 通常形成 C—C 键。在生物体内, MAC 与巯基之间的作用机制具有重要的生物学意义。相比硫醇介导摄取过程中巯基与含硫醇基团相互作用的过程, MAC 通常不直接参与硫醇介导摄取的过程, 主要通过巯基化合物与 α,β -不饱和羰基化合物相互作用。因此, 虽然 MAC 和硫醇介导的摄取都涉及分子间的相互作用, 但它们涉及的化合物和作用机制不同。

2.2.1 MAC 促进硫醇化合物的摄取

MAC 认为是可能的级联交换器 (CAX) 与共价药物中的硫醇发生生物偶联。在迈克尔加成反应中, 马来酰亚胺是 MAC, 可以与巯基等亲核试剂发生加成反应。2014 年, LI 等^[27]用酰亚胺对脂质体进行了功能化修饰, 提高了药物在细胞内的递送效率。在对巯基相关的还原酶 (如 PDI) 的活性抑制后发现, 细胞对马来酰亚胺修饰的脂质体的摄取率降低了 15%~45%。而对于经典的内吞途径, 如抑制网格蛋白介导的内吞、小窝介导的内吞和巨胞饮抑制剂后不能有效地抑制修饰后脂质体的摄取。因而马来酰亚胺修饰的脂质体摄取量的增强在于细胞摄取过程中存在硫醇优化。

2.2.2 卤素元素影响 MAC 摄取硫醇化合物

马来酰亚胺与巯基的反应具有不可逆性。2022 年, SHYBEKA 等^[28]通过在 MAC I 中引入氰基, 增加其亲电性和酸性, 以探索其与硫醇的反应。MAC I 可以在 30 min 内与巯基化合物反应生成 MAC II 并达到平衡。但不会增加解耦的氰基乙酸酯 (在产物 II 中) 的酸性, 因此平衡向产物 II 的方向移动, 这时二硫化物会与 MAC II 中的硫醚键进一步反应, 生成 MAC III (图 7a、b)。对 TMU 而言, 类似 I 的

MAC 可以与细胞中的硫醇反应, 然后二硫化物进一步与硫醚键反应释放硫醇。这种受体最终可通过类似的反应与蛋白上的二硫化物反应附着在蛋白上, 并可用于硫醇介导的摄取。基于上述特点, 选用 MAC **8**, 进一步分析细胞对不同取代基 MAC 的摄取能力与反应活性 (通过 Hammett σ_p 表示) 和疏水性 (通过 logP 表示) 之间的关系 (图 7c)。结果表明, TMU 的抑制作用与反应活性 (包括取代基位置和卤化状态) 有关, 而与亲疏水性无关。并且随着 MACs **8**~**10** 的卤化取代基 σ -hole 作用的增加, 反应活性也增加, 表明卤素键合开关有利于 MAC I 与硫醇的反应, 并促进 MAC II 移动到下一个反应位点。

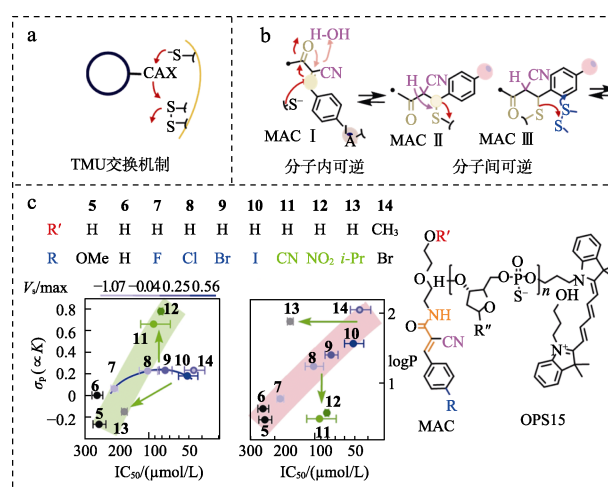


图 7 TMU 反应的级联交换器 (CAX) (a); 可逆 MAC I 具有卤素键开关 (MAC I~II) 及与分子间二硫化物交换 (MAC III) (b); MAC **5**~**14** 抑制 OPS15 (500 nmol/L, R"= 碱基对, n=18: AGGTCCCATACACCGAC) 摄取到 Hela 细胞中的 IC₅₀, 与 R 的 σ_p 和 logP 相关性 (c)^[28]

Fig. 7 Definition of TMU reaction cascade exchanger (CAX) (a); Reversible MAC I having a halogen bond switch (MAC I~II) and exchanging with intermolecular disulfides (MAC III) (b); IC₅₀ of MAC **5**~**14** inhibiting the uptake of OPS15 into Hela cells (500 nmol/L, R"=nucleobases, n=18: AGGTCCCCATACACCGAC), correlated to σ_p of R and logP (c)^[28]

3 硫醇介导摄取的应用

3.1 硫醇介导的摄取在细胞内递送的应用

随着硫醇介导摄取机制的研究和功能的拓展, 这种摄取方式已广泛应用于研究细胞内各种底物的运输和生理过程。将细胞外物质输送到细胞内, 不仅有助于细胞的代谢、增殖和分化, 同时也有助于新药物的开发和疾病治疗。一些经典的细胞内吸收机制, 如胞吞作用、胞内消化和胞质内吸收, 可能因酶功能异常或缺乏而导致代谢紊乱, 使胞吞作用

无法被触发和调控。尤其是一些大分子，如蛋白质和 DNA/RNA 等，由于其分子结构较大，输送到细胞内的难度更大。而许多小分子药物由于疏水性和水溶性差，也很难进入细胞。为了实现蛋白质的胞内递送，已经开发了许多方法，如细胞穿透肽、增压蛋白质、脂质体、纳米颗粒和聚合物等。尽管已取得了重大进展，但仍存在一些蛋白质需要修饰、递送效率低或存在内吞体/内体逃逸无效等问题^[14]。

3.1.1 荧光小分子的递送

荧光素由于自身的特点而不被细胞主动摄取，2014 年，GASPARINI 等^[20]将罗丹明和荧光素与 CPDs 进行连接后，将荧光团转运到 HeLa Kyoto 细胞中。2017 年，LI 等^[29]合成的具有双半胱氨酸闭环特性基序的肽探针与外部蛋白质硫醇/二硫键之间存在着动态共价交换（图 8a）。对 6 个含有不同序列的半胱氨酸进行比对，与基序 1（SGG）相比，含 CGC 基序 4 的阳离子肽的细胞摄取效率提高了 20~50 倍，与单个半胱氨酸类似物 2（CGG）、3（CCG）和 5（CGGC）相比，CGC 的摄取增加了 3~10 倍（图 8b）。

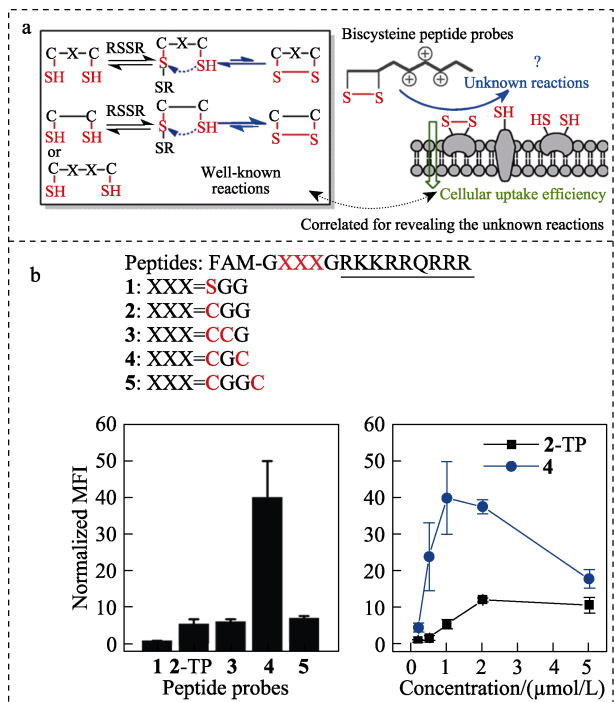


图 8 含双半胱氨酸基序的肽探针与细胞表面二硫键的交换示意图 (a) 及不同含有半胱氨酸的序列的闭环肽 (b)^[29]

Fig. 8 Schematic diagram of exchange of disulfide bonds between peptide probes containing cysteine motifs and cell surfaces (a) and closed loop peptides with different sequences containing cysteine (b)^[29]

上述结果表明，含有 CGC 的肽探针可以更有效地被细胞吸收，其优越的细胞摄取驱动力可能源于

CGC 被细胞吸收，CGC 基序与外部蛋白质形成双桥二硫键，为进一步利用细胞表面的硫醇进行药物递送提供了更好的设计思路。

3.1.2 量子点的递送

量子点作为一种非常明亮且光稳定的纳米粒子，在体外单分子动力学研究中得到广泛的应用。目前的方法（如细胞穿透肽）提供的穿透量非常低，主要是因为量子点停留在细胞膜上，难以进入到细胞内，或进入细胞后滞留内体难以释放到细胞质中。基于这个原因，DERIVERY 等^[30]采用 CPDs 技术来解决这个问题，细胞可以摄取约 70 个量子点，约 90%的量子点在细胞质中自由扩散；此外，这些量子点可通过功能化修饰，搭载绿色荧光蛋白（GFP）或具有靶向性的纳米抗体，以实现特定的生物标记或检测功能。基于硫醇介导摄取技术为细胞和活体动物的单分子成像铺平了道路，可以用于探测细胞质的生物物理特性。

3.1.3 核苷酸递送

核苷酸由于相对分子质量较大，且具有复杂的结构，本身带有的负电荷与细胞膜上的负电荷相斥，增加了穿过细胞膜的难度。2021 年，GUO 等^[31]基于 CPDs 探究了一系列聚二硫化物递送 3 种形式 CRISPR-Cas9 组分的能力，即 Cas9 质粒（编码 Cas9 蛋白和 sgRNA）、Cas9mRNA 复合体（Cas9mRNA 和 sgRNA）及 Cas9RNP。证明了 CPDs 在体外可以高效传递不同形式基因组编辑的生物大分子。同时，硫醇介导的细胞内传递可以通过扰乱细胞膜产生较强内体逃逸能力。在胞内谷胱甘肽存在下，CPDs 主链内的二硫键很容易裂解，含有基因的 CPDs 物降解不仅可以引起 CRISPR-Cas9 的及时释放，而且可有效减少聚合物在细胞内积累引起的细胞毒性。2024 年，STENGEL 等^[32]利用这一机制探索了评估脂质基纳米颗粒的硫醇化对细胞摄取核酸的研究。此外，含有谷胱甘肽保护基团的磷酸二酯基团、寡核苷酸、寡核硫代磷酸酯、DNA 纳米组装体均通过硫醇介导摄取的方式递送到细胞内^[33-34]。

3.1.4 肽段、蛋白质、抗体的递送

2017 年，ABEGG 等^[35]通过蛋白组学分析了细胞对含有二硫醚键的单个 AspA 残基与肽进行连接后的摄取能力，证明了 AspA 通过硫醇-二硫键交换的方式与转铁蛋白受体表面的半胱氨酸 556 和 558 之间形成共价键，随后通过内吞作用实现了肽段的摄取。2017 年，QIAN 等^[36]报道了利用 CPDs 辅助蛋白质摄取的方法，其与传统的内吞途径和基因工程引入蛋白的方式有所区别，用以递送蛋白质。主要通过化学酶法将叠氮基团加入到天然糖蛋白中作为生物正交标签，与相应的用四嗪修饰的 CPDs 进

行生物正交连接。然后,细胞将含有 CPDs 的蛋白通过硫醇介导的方式进行摄取,细胞内的 GSH 对 CPDs 解聚后得到基本不含 CPDs 的蛋白质,并且基本不会改变蛋白质的性质。2019年, YUAN 等^[37]将生物可降解的 SiO₂ 纳米颗粒连接上 CPDs 和三苯基膦,使其能够靶向转运到线粒体中,在线粒体中的谷胱甘肽对 CPDs 部分进行降解,从而进行靶向释放。GOERDELER 等^[38]开发了一种含半胱氨酸的纳米抗体 (CB2),利用半胱氨酸转肽酶 SrtA 将抗肿瘤药物单甲基奥瑞他汀与 CB2 通过一个可切割的连接体偶联,然后在细胞内被组织蛋白酶裂解并释放药物,表明这种含有半胱氨酸的纳米抗体 CB2 能够在淋巴瘤细胞内传递药物,以硫醇依赖方式特异性地识别 B 细胞淋巴瘤和乳腺癌。硫醇还可以通过改变细胞膜的通透性或特定的细胞表面受体结合,来提高抗肿瘤药物在细胞内的摄取率。这种方法对于药物的输送和精确靶向具有一定的应用价值。

3.1.5 纳米颗粒和药物的递送

2022年, ZHU 等^[39]通过双硫交换聚合得到了一系列富含精氨酸的可降解聚脒化合物,结果表明,双硫交换聚合物可以在还原性物质的作用下实现有效降解,避免了体内堆积可能造成的潜在生物安全性问题。抑制剂 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 的加入显著减少了细胞对聚合物的摄取,证明了聚合物细胞内化主要是通过硫醇介导的摄取机制完成的。进一步的细胞实验表明,双硫聚合物对质粒 DNA (pKR-p53 和 pEGF) 具有优异的递送性能,并考察了其对表皮全层缺损的抗菌作用,显示出显著的促愈合效果。环糊精作为药物辅料能提高药物的溶解性和稳定性。2023年, KAPLAN 等^[40]对环糊精进行巯基化修饰,增强了其在细胞内摄取和逃逸到细胞质的性能。2022年, GENG 等^[41]开发了一种 pH 响应性 CaCO₃ 纳米平台,该平台搭载有低毒性的脒基含量的细胞穿透聚合物。在 pH=6.8 下,该平台能够快速释放硫辛酸,并通过硫醇介导的摄取,促进纳米球进入细胞质,从而避免了内体参与非特异性免疫 TLRs 蛋白的激活,进而抑制炎症反应。AspA 介导口服药物递送系统利用健康和疾病状态下细胞表面硫醇表达水平的变化,可用于治疗糖尿病和某些炎症性疾病^[42-43]。此外,该法还可以用于细胞内转运、抗癌治疗以及提高抗氧化应激能力。

3.1.6 脂质体的递送

脂质体是由脂质分子构成的人工合成的微小囊泡,已广泛应用于治疗递送纳米载体中,能够封装和增强多种治疗方法的药代动力学特性。但增强细胞内渗透能力和促进脂质体表面衍生化是需要改进

的 2 个主要方面。2022年, QUALLS 等^[44]对含环状二硫键脂质 (CDL) 的脂质体平台进行了研究,旨在对脂质体膜进行功能化,并通过硫醇-二硫键交换进入细胞,设计并合成了由硫辛酸和 AspA 组成的 CDL-1 和 CDL-2。结果表明,当 CDL 掺入脂质体中时,细胞递送显著增强;多功能 CDL 作为新的表面装饰和增强细胞递送的载体,具有在药物递送、生物医学应用、抗氧化应激和细胞内转运等方面发挥积极作用的潜力。

3.2 内体逃逸过程的递送

纳米颗粒主要通过内吞作用进入细胞,进而进入细胞质或其他亚细胞区室进行治疗,然而药物载体最初被困于囊泡内,这对药物释放不利。因此,纳米载体从内体中逃逸,对于有效的药物靶向治疗至关重要。2022年, KANJILAL 等^[45]设计了含有二硫键 (DS-NGs) 和不含二硫键 (NonDS-NGs) 的聚合物纳米凝胶,探讨了二硫键对纳米颗粒进入细胞和从内体逃逸的影响。与 NonDS-NGs 相比,细胞对 DS-NGs 的摄取增加了约 4 倍,这种差异可能源于 DS-NGs 中二硫键与细胞表面硫醇的相互作用。由于体积较大,纳米颗粒更可能通过内吞途径进入细胞,通过加入不同的抑制剂验证了细胞对 DS-NGs 和 NonDS-NGs 的摄取主要通过网格蛋白介导的内吞作用进行。

为了深入了解内化过程,将 DS-NGs 与绿色荧光团 (AF488) 结合,将 NonDS-NGs 与红色荧光团 sulfo-cy3 结合。结果表明,2种纳米凝胶均能够被细胞摄取到内体中。为了评估其从内体中逃逸的能力,对 DS-NGs 和 NonDS-NGs 进行标记,并与 Lyso Tracker Green 进行共定位实验,在孵育 18 和 48 h 后观察。如图 9a、b 所示,DS-NGs 能够从内体中逃逸,并在细胞质中显示为红色荧光;相反,NonDS-NGs 与 LysoTracker Green 表现出明显的共定位效果,表明它们被内体囊泡包围^[45]。上述结果表明,二硫键能够促进聚合物纳米凝胶的细胞摄取,进一步增强其从内体中逃逸的能力。这可能是因为,二硫键纳米凝胶与细胞膜上的硫醇发生共价接触,增加了内体膜的应力。促进纳米载体从内体中逃逸,对解决当前纳米药物面临的药物释放难题、提高药物靶向性和效果以及推动细胞内动态过程的研究,具有重要的科研意义和应用前景。

3.3 深层组织的递送

大多数含有聚阳离子细胞穿透肽的分子面临将药物有效输送至深层组织的挑战,因为这些穿透肽需要通过转胞吞作用被细胞摄取,并进一步释放到细胞质中。

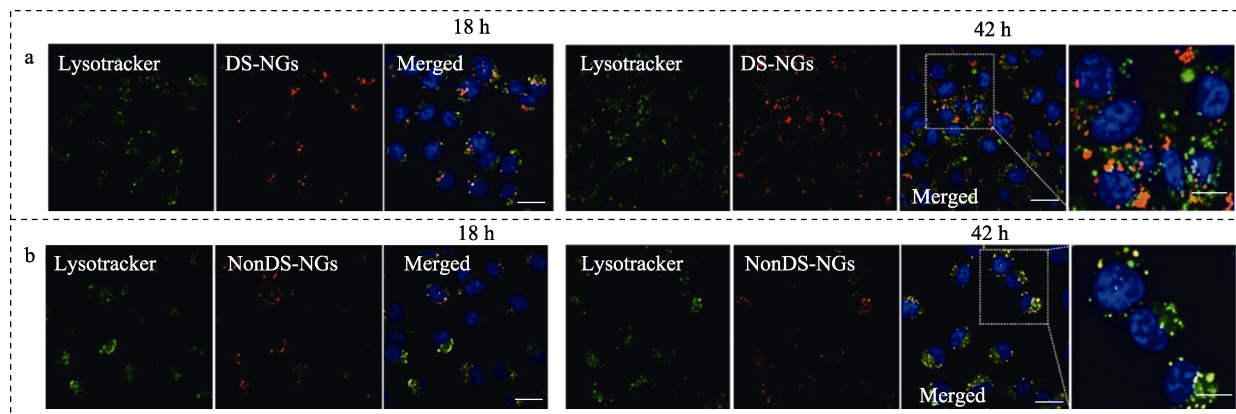


图 9 溶酶体分别与 DS-NGs (a) 和 NonDS-NGs (b) 18 和 42 h 的共定位^[45]
 Fig. 9 Co localization of lysosomes with DS-NGs (a) and NonDS-NGs (b) for 18 and 42 h^[45]

转铁蛋白 (TfR) 是一个转胞吞作用的受体, 能够识别和结合转铁蛋白-铁复合物, 通过内吞作用进入细胞, 并通过胞吐作用返回表面。TfR1 是细胞表面的一种糖蛋白, 由 2 个同源二聚体的亚基通过二硫键连接而成。由于 TfR1 具有 2 个巯基, 可以与 TfR 上的硫醇 C556 和 C558 结合, 形成环状硫化物 COC1, 并通过至少 1 个二硫键将转运蛋白束缚在膜蛋白上 (图 10a、b)。

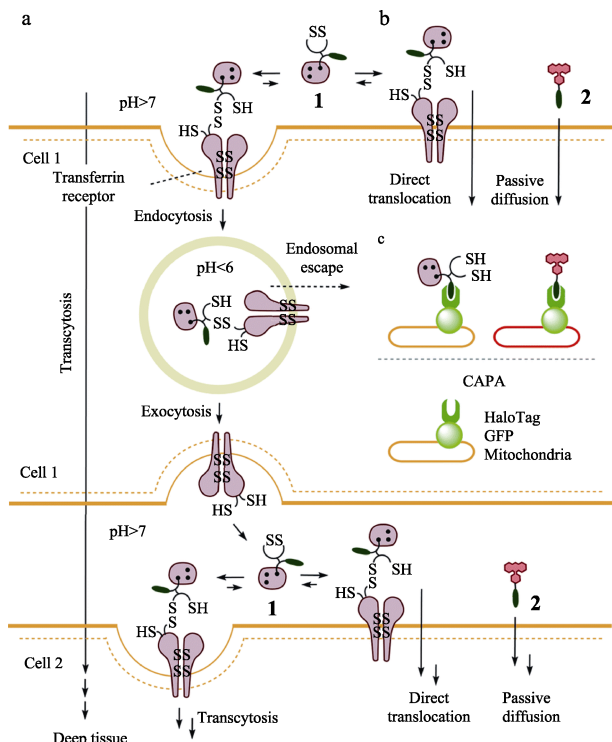


图 10 硫醇介导的转胞吞作用机制 (a); 将转运蛋白 1 转运到深层组织 (b); 使用荧光探针 2 定量深层组织中未被 HaloTag 标记的细胞质递送 (c)^[46]
 Fig. 10 Mechanism of thiol-mediated transcytosis (a); Direct translocation of transporter 1 to deep tissues (b); quantitative cytosolic delivery in deep tissue by labeling all unoccupied HaloTag with fluorescent reporter 2 (c)^[46]

随后, 硫醇盐-二硫化物交换级联沿着 TfR 或其他伴侣蛋白直接易位, 将 COC1 等递送到胞质中。同时, TfR 的内吞作用将带有 COC1 的结构带入体内与荧光标记的 TfR 共定位, 确定了内体的点状模式 (图 10c)。但在低 pH 下, 动态共价交换受到不利影响, 从而终止反应。因此, 像 COC1 这样的转运蛋白能够重新返回第一个细胞表面, 在较高 pH 下重新进行动态共价交换, 释放硫醇, 并与下一个细胞上的 TfR 进行交换, 以确保胞吞作用持续进行^[46]。综上所述, 硫醇介导的摄取应该在胞质递送至深层组织中表现出色。这种机制使 TfR 能够有效地穿透肿瘤并克服血脑屏障, 将药物输送至大脑。许多疾病, 如肿瘤、神经系统疾病等, 需要药物能够有效到达深层组织才能发挥治疗效果。深层组织递送的研究对药物研发和治疗有重要的应用意义。

3.4 硫醇介导摄取的抑制作用

硫醇介导的摄取已被开发用于解释附着在硫醇反应性基团上底物的高效细胞内摄取。细胞表面硫醇参与硫醇-二硫键的交换通常使用 DTNB 抑制来探测, 但由于 DTNB 的反应性相对较差, 测试结果存在一定的误差。2021 年, LIM 等^[47]发现, 化合物 28 和 29 具有较高的反应活性, 因此, 连接荧光素后作为报告基因并进行抑制剂筛选实验, 报告基因的摄取受到抑制剂的影响而导致细胞内荧光减弱。结果发现, 报告基因 30 的最有效抑制剂是 31 和 32 (图 11), 并且报告基因 15 比报告基因 30 更难受到抑制。巯基反应性试剂可以有效地抑制硫醇介导摄取, 再次证实了硫醇介导摄取的存在, 并且最佳的抑制剂比 Ellman 试剂高出 5000 倍以上。磷酸化是一种重要的翻译后修饰途径, 其通过蛋白酪氨酸磷酸化 (PTPs) 等细胞信号传导、增殖、分化、代谢、运动和凋亡等方面发挥了至关重要的作用。PTPs 通过攻击半胱氨酸的活性位点来催化酪氨酸去磷酸化, 形成共价磷酸半胱氨酸中间体, 并迅速水解以再生活性酶。

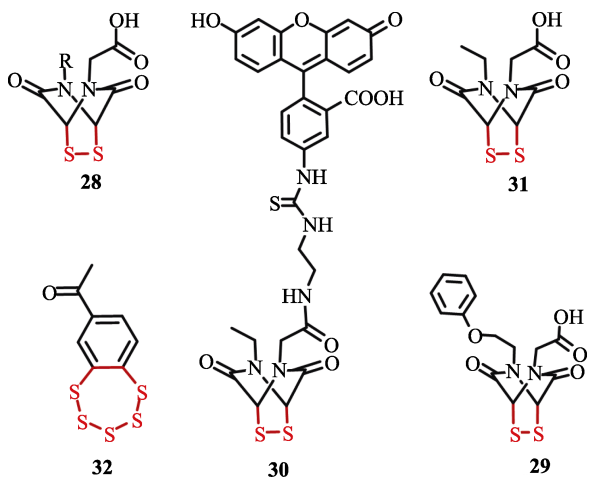


图 11 用于硫醇介导摄取的抑制剂和报告基因^[47]

Fig. 11 Inhibitors and reporter genes used for thiol mediated uptake^[47]

2017 年, TJIN 等^[48]开发了一种谷胱甘肽响应基序, 用于促进新型硒硫化物磷酸酶抑制剂的细胞内有效递送。主要利用细胞外和细胞内谷胱甘肽水平的巨大差异, 将硒代硫化物磷酸酶抑制剂输送到

细胞, 再通过硒硫化物与活性位点半胱氨酸交换的方式来定向抑制靶向 PTP 活性位点的选择性。这种磷酸酶抑制平台是通过硒代硫化物基团与 PTP 活性位点的半胱氨酸反应, 形成抑制 PTP 的共价硒硫化物加合物的方式来达到抑制效果。因而, 硫醇介导抑制剂可以通过多种途径对细胞的生理和代谢过程产生影响, 具有潜在的药物研发和治疗应用前景。

3.5 硫醇介导摄取在植物中的应用

植物不仅为人类生活提供食物和 O₂, 同时也提供了能源、染料、化妆品以及药品等的原料。2022 年, MOU 等^[49]将硫醇介导摄取用作核酸进入植物细胞, 通过用二硫化物对 DNA 四面体进行修饰(图 12a) 实现了高效率将 DNA 分子递送进入拟南芥和烟草活细胞内。与植物细胞中 DNA 纳米结构介导的递送方法相比, SS-HS/DNA-FAM 处理的叶片的荧光强度在拟南芥和烟草中分别提高了 14 和 17 倍(图 12b), 为进一步改进植物内 DNA 的输送提供了新的研究思路。

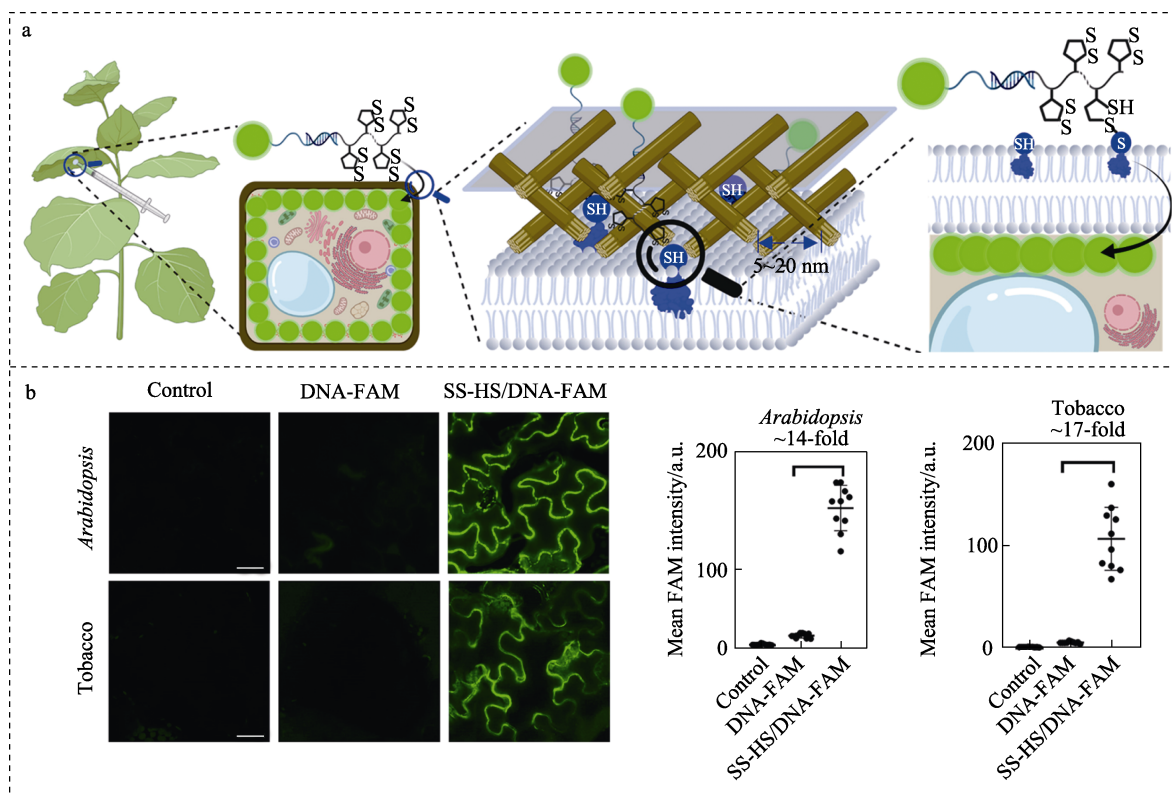


图 12 通过巯基介导摄取将 SS-HS/DNA-FAM 浸润和内化到植物叶细胞中的示意图 (a) 及浸润后 24 h 用对照、DNA-FAM 和 SS-HS/DNA-FAM 浸润的拟南芥叶和烟叶的共聚焦图像 (b)^[49]

Fig. 12 Schematic diagram of SS-HS/DNA-FAM infiltration and internalization into plant leaf cells through thiol mediated uptake (a) and confocal images of *Arabidopsis* leaves and tobacco leaves infiltrated with control, DNA-FAM, and SS-HS/DNA-FAM at 24 h after infiltration (b)^[49]

3.6 硫醇介导的摄取在细菌中的应用

巯基介导的摄取正在成为将生物相关底物递送至细胞中的重要方式。与哺乳动物细胞类似, 革兰

氏阳性菌和阴性菌的细胞包膜上都存在硫醇^[50]。因此, 巯基介导摄取正在成为关注的热点。为了测试巯基介导的细菌摄取, 2019 年, LAURENT 等^[51]将抗

生素与 COCs 偶联, 通过测量细菌悬浮液的光密度对抗菌性能进行评估。5 种抗生素配备了多达 3 种不同的 COCs: 1 种二硒烷和 2 种二硫醇 (图 13)。结果发现, COCs 与抗生素的偶联物无法穿透革兰氏阴性菌的细胞膜, 抗生素-COCs 的偶联体同样对革兰氏阳性菌不起作用。硫醇介导摄取在细菌的 2 种膜中均不起作用。COCs 可能与内膜上的硫醇交换, 也可能与外膜上的硫醇交换, 但不会继续前进。COCs 抑制而不是介导抗生素向革兰氏阴性或阳性细菌的递送。

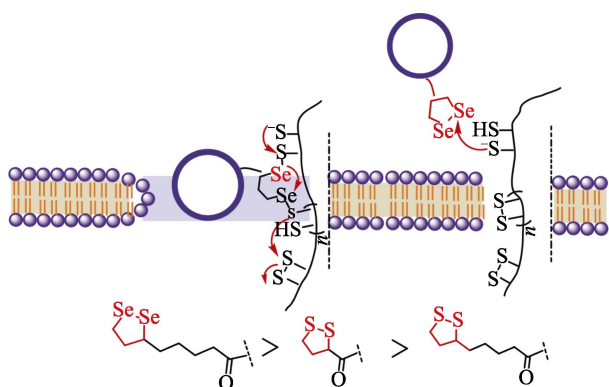


图 13 细菌介导摄取示意图^[51]

Fig. 13 Schematic diagram of bacterial mediated uptake^[51]

黏蛋白是一类重要的细胞外糖基化蛋白, 其 N 和 C 末端具有富含半胱氨酸结构域, 有助于形成半胱氨酸硫醇之间的二硫键内部结构域。2022 年, LUO 等^[52]提出了通过细菌-宿主界面相互作用来操纵细菌定位的概念。首先, 将细菌表面的氨基转化为巯基, 然后利用细菌上的巯基与富含半胱氨酸的黏蛋白表面的二硫键进行交换反应, 细菌表现出硫醇化水平依赖性附着, 细菌对黏蛋白的空肠实现了 170 倍的附着。这是肠道微生物群定殖的一个具有挑战性的位置。硫醇在细菌的生物学中扮演着多重角色, 不仅影响其生存和繁殖能力, 还可能与其适应性、代谢调节以及对外界环境的响应有密切关系。因此, 深入研究和理解这些过程, 对于开发新的抗菌策略或者理解细菌的生物学行为, 都具有重要意义。

3.7 硫醇介导摄取在病毒内的应用

HIV 的进入是最早观察到的硫醇介导摄取例子之一。2007 年, ABOU-JAOUDE 等^[53]的研究证明, 三角洲肝炎病毒的进入需要乙型肝炎病毒包膜蛋白抗原环的保守半胱氨酸残基, 可被硫醇-二硫键交换抑制剂所阻断。蓖麻毒素是一种从蓖麻 (*Ricinus communis*) 植物种子中纯化得到的毒性蛋白, 其通过不可逆地作用于核糖体 28S rRNA 中高度保守的环状结构, 特异性切除腺嘌呤残基, 从而导致哺乳

动物细胞的蛋白质合成抑制并引发细胞死亡。2004 年, SPOONER 等^[54]的研究表明, 低浓度二硫苏糖醇可以破坏蓖麻毒素的耐性, 表明存在硫醇-二硫键的交换。因而内质网腔内的内源性 PDI 与蓖麻毒素内源性表达的 Ricin B chain 蛋白也可以通过硫醇-二硫键相互作用并发生免疫共沉淀。内质网中的 PDI 参与各种疾病状态的生理学和病理, 包括神经退行性疾病、癌症、心血管疾病、寄生虫感染和病毒进入宿主细胞^[55]。这个特点为一些疾病的治疗提供了新的作用位点。此外, 类似的硫醇介导的过程也存在于一些冠状病毒、鼠白血病病毒以及新城疫病毒等病毒^[56]。硫醇介导摄取途径也可能被用作辅助手段, 帮助增强病毒治疗的效果。例如: 通过调节细胞内硫醇相关的生物学过程可能影响病毒的复制和感染能力, 从而达到抑制病毒的治疗效果。也可以作为一种有效的途径用于传递抗病毒药物到感染病毒的细胞内。

4 结束语与展望

近年来, 硫醇介导摄取策略通过将递送物质与反应性巯基共价结合, 不仅显著提升了递送载体的细胞内传递效率, 还促进了原本难以跨膜转运的生物活性分子的成功递送, 从而为实现治疗干预或其他生物医学应用提供了有效途径。多种因素影响硫醇介导摄取的速率, 如递送载体硫化物的反应速率、细胞内环境、巯基含量等。因此, 如何开发出良好的载体和有效的连接手段仍面临着较大的挑战。硫化物载体的反应活性和种类决定了动态共价交换的速率, 从而影响了递送物质的摄取动力学、释放动力学以及最终的靶向能力和治疗效果。

与传统的摄取方式相比, 硫醇介导摄取提供了一种通过硫醇-二硫键动态共价交换反应进入细胞的新途径。该方式不仅适用于传递蛋白、药物和纳米材料, 而且通过硫醇-二硫键交换成功解决了原本难以递送进入细胞溶质的问题, 甚至在深层组织传递方面也显示出一定的潜力。除了在生物领域的应用外, 一些病毒入侵细胞的方式也涉及到硫醇介导摄取。通过使用抑制剂阻断其与细胞表面硫醇的反应, 可以防止病毒入侵, 如 HIV 等经典病毒, 从而达到治疗效果, 具有进一步的应用潜力。

基于硫醇介导摄取以及抗病毒药物的研究和临床应用仍需进一步深入研究。本文为未来的相关研究提供了参考。

参考文献:

- [1] JIANG H S, ZHANG Y Z, LU Z W, *et al.* Interaction between silver nanoparticles and two dehydrogenases: Role of thiol groups[J].

- Small, 2019, 15(27): e1900860.
- [2] ANDERSON S B, LIN C C, KUNTZLER D V, *et al.* The performance of human mesenchymal stem cells encapsulated in cell-degradable polymer-peptide hydrogels[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(14): 3564-3574.
- [3] DONG H L, WANG M S, FAN S H, *et al.* Redox-regulated conformational change of disulfide-rich assembling peptides[J]. *Angewandte Chemie International Edition Engl*, 2022, 61(44): e202212829.
- [4] ZHU C J, WU D F, LIU H L, *et al.* Transformation of thiols to disulfides via an oxidant-free radical pathway on the zeolite ETS-10[J]. *Green Chemistry*, 2022, 24(23): 9033-9039.
- [5] ZHANG L W, DUAN D Z, LIU Y P, *et al.* Highly selective off-on fluorescent probe for imaging thioredoxin reductase in living cells[J]. *Journal of American Chemical Society*, 2014, 136(1): 226-233.
- [6] TUNCAY M E, ATAGUN M I, EREL O. Thiol disulfide homeostasis in psychiatric disorders: A comprehensive review[J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2023, 123: 110719.
- [7] FILOMENE G, ROTILIO G, CIRIOLO M R. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *The FASEB Journal*, 2003, 17(1): 64-66.
- [8] KNUESTING J, SCHEIBE R. Small molecules govern thiol redox switches[J]. *Trends in Plant Science*, 2018, 23(9): 769-782.
- [9] TORRES A G, GAIT M J. Exploiting cell surface thiols to enhance cellular uptake[J]. *Trends in Biotechnology*, 2012, 30(4): 185-190.
- [10] AUBRY S, BURLINA B, DUPOMT E, *et al.* Cell-surface thiols affect cell entry of disulfide-conjugated peptides[J]. *The FASEB Journal*, 2009, 23(9): 2956-2967.
- [11] CHU Z X (储正相), WANG Y T (王雨田), MA Z X (马振兴), *et al.* Synthesis and photophysical properties of biothiols fluorescent probe based on BODIPY[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2020, 37(7): 1371-1378.
- [12] ABELL B A, BROWN D T. Sindbis virus membrane fusion is mediated by reduction of glycoprotein disulfide bridges at the cell surface[J]. *Journal of Virology*, 1993, 67: 5496-5501.
- [13] TORRES A G, FABANI M M, VIGORITO E, *et al.* Chemical structure requirements and cellular targeting of microRNA-122 by peptide nucleic acids anti-miRs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(5): 2152-2167.
- [14] FU J Q, YU C M, LI L, *et al.* Intracellular delivery of functional proteins and native drugs by cell-penetrating poly(disulfide)s[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(37): 12153-12160.
- [15] SAIDJALOLOV S, COELHO F, MERCIER V, *et al.* Inclusive pattern generation protocols to decode thiol-mediated uptake[J]. *ACS Central Science*, 2024, 10(5): 1033-1043.
- [16] HOGG P J. Disulfide bonds as switches for protein function[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, 28(4): 210-214.
- [17] GASPARINI G, SARGSYAN G, BANG E K, *et al.* Ring tension applied to thiol-mediated cellular uptake[J]. *Angewandte Chemie International Edition Engl*, 2015, 127(25): 7436-7439.
- [18] ZONG L L, BARTOLAMI E, ABEGG D, *et al.* Epidithiodiketopiperazines: Strain-promoted thiol-mediated cellular uptake at the highest tension [J]. *ACS Central Science*, 2017, 3(5): 449-453.
- [19] BANG E K, GASPARINI G, MOLINARD G, *et al.* Substrate-initiated synthesis of cell-penetrating poly(disulfide)s[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(6): 2088-2091.
- [20] GASPARINI G, BANG E K, MOLINARD G, *et al.* Cellular uptake of substrate-initiated cell-penetrating poly(disulfide)s[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(16): 6069-6074.
- [21] MORELLI P, MARTIN-BENLLOCH X, TESSIER R, *et al.* Ethynyl benziodoxolones: Functional terminators for cell-penetrating poly(disulfide)s [J]. *Polymer Chemistry*, 2016, 7(20): 3465-3470.
- [22] CHENG Y Y, ZONG L L, LOPEZ-ANDARIAS J, *et al.* Cell-penetrating dynamic-covalent benzopolysulfane networks[J]. *Angewandte Chemie International Edition Engl*, 2019, 58(28): 9522-9526.
- [23] MOUSA R, NOTIS D R, METANIS N. Selenium and selenocysteine in protein chemistry[J]. *Angewandte Chemie International Edition Engl*, 2017, 56(50): 15818-15827.
- [24] CHUARD N, POBLADOR-BAHAMONDE A I, ZONG L L, *et al.* Diselenolane-mediated cellular uptake[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(7): 1860-1866.
- [25] CANAL-MARTIN A, PEREZ-FERNANDEZ R. Biomimetic selenocysteine based dynamic combinatorial chemistry for thiol-disulfide exchange [J]. *Nature Communication*, 2021, 12(1): 163.
- [26] GAO W, LI T, WANG J H, *et al.* Thioether-bonded fluorescent probes for deciphering thiol-mediated exchange reactions on the cell surface [J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(1): 937-944.
- [27] LI T S, TAKEOKA S. Enhanced cellular uptake of maleimide-modified liposomes via thiol-mediated transport[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2014, 9(1): 2849-2861.
- [28] SHYBEKA I, MAYNARD J, SAIDJALOLOV, *et al.* Dynamic covalent michael acceptors to penetrate cells: Thiol mediated uptake with tetrel-centered exchange cascades, assisted by halogen-bonding switches[J]. *Angewandte Chemie International Edition Engl*, 2022, 61: e202213433.
- [29] LI T, GAO W, LIANG J J, *et al.* Biscysteine-bearing peptide probes to reveal extracellular thiol-disulfide exchange reactions promoting cellular uptake[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(16): 8501-8508.
- [30] DERIVERY E, BARTOLAMI E, MATILE S, *et al.* Efficient delivery of quantum dots into the cytosol of cells using cell-penetrating poly(disulfide)s[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(30): 10172-10175.
- [31] GUO J J, WAN T, LI B W, *et al.* Rational design of poly(disulfide)s as a universal platform for delivery of CRISPR-Cas9 machineries toward therapeutic genome editing[J]. *ACS Central Science*, 2021, 7(6): 990-1000.
- [32] STENDEL D, JÖRGENSEN A M, POLIDORI I, *et al.* The power of sulfhydryl groups: Thiolated lipid-based nanoparticles enhance cellular uptake of nucleic acids[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2024, 654: 1136-1145.
- [33] ZHOU J, SUN L Q, WANG L P, *et al.* Self-assembled and size-controllable oligonucleotide nanospheres for effective antisense gene delivery through an endocytosis-independent pathway[J]. *Angewandte Chemie International Edition Engl*, 2019, 58(16): 5236-5240.
- [34] YANG W, LIU X C, LI H F, *et al.* Disulfide-containing molecular sticker assists cellular delivery of DNA nanoassemblies by bypassing endocytosis[J]. *CCS Chemistry*, 2020, 2: 1178-1186.
- [35] ABEGG D, GASPARINI G, HOCH D G, *et al.* Strained cyclic disulfides enable cellular uptake by reacting with the transferrin receptor[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(1): 231-238.
- [36] QIAN L H, FU J Q, YUAN P Y, *et al.* Intracellular delivery of native proteins facilitated by cell-penetrating poly(disulfide)s[J]. *Angewandte Chemie International Edition Engl*, 2017, 57(6): 1532-1536.
- [37] YUAN P Y, MAO X, WU X F, *et al.* Mitochondria-targeting, intracellular delivery of native proteins using biodegradable silica nanoparticles[J]. *Angewandte Chemie International Edition Engl*, 2019, 58(23): 7657-7661.
- [38] GOERDELER F, REUBER E E, LÜHLE J, *et al.* Thiol-mediated uptake of a cysteine-containing nanobody for anticancer drug delivery [J]. *ACS Central Science*, 2023, 9(6): 1111-1118.
- [39] ZHU Y W, LIN M Y, HU W T, *et al.* Controllable disulfide exchange polymerization of polyguanidine for effective biomedical applications by thiol-mediated uptake[J]. *Angewandte Chemie International Edition Engl*, 2022, 61(23): e202200535.