



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.02.06

文章编号: 2095-1264(2023)02-0167-06

低 pH 插入肽-蛋白酶激活受体 1 复合物抑制三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的实验研究^{*}

陈月华¹, 王振光², 李大成², 于明明^{2*}

(青岛大学附属医院¹重症医学科, ²核医学科, 山东 青岛, 266100)

摘要: **目的** 观察低 pH 插入肽-蛋白酶激活受体 1(pHLIP-P1AP)复合物对三阴性乳腺癌(TNBC)MDA-MB-231 细胞增殖的影响。**方法** 设计、合成荧光标记的 pHLIP-P1AP。观察 MDA-MB-231 细胞与 MCF-10A 细胞表面蛋白酶激活受体 1(PAR1)的表达情况。分析不同 pH 值(7.4、6.0)条件下荧光标记的 pHLIP-P1AP 与 MDA-MB-231 细胞的结合情况及其对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响。**结果** 成功合成了 pHLIP-P1AP 并进行荧光标记。在酸性环境下(pH 6.0), 荧光标记的 pHLIP-P1AP 与表面高表达 PAR1 的 MDA-MB-231 细胞有较强的结合能力, 可明显抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖, pHLIP-P1AP 为 0.5 μ g、1 μ g、2 μ g、4 μ g、8 μ g 时, 细胞的增殖抑制率分别为 3.39%, 5.27%, 14.29%, 22.14%、35.69%。**结论** MDA-MB-231 细胞表面表达大量的 PAR1。pHLIP-P1AP 在酸性环境下能够有效靶向 MDA-MB-231 细胞, 并抑制 MDA-MB-231 细胞的生长, 有望成为治疗 TNBC 的有价值的新型药物。

关键词: 低 pH 插入肽; 蛋白酶激活受体 1; 三阴性乳腺癌; 细胞增殖

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A

The inhibitory effects of pHLIP-P1AP on the proliferation of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells^{*}

CHEN Yuehua¹, WANG Zhengguang², LI Dacheng², YU Mingming^{2*}

(¹Intensive Care Unit, ²Nuclear Medicine Department, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, 266100, Shandong, China)

Abstract: Objective To observe the effects of pHLIP [pH (low) insertion peptide]-P1AP on the proliferation of triple-negative breast cancer (TNBC) MDA-MB-231 cells. **Methods** Fluorescent-labeled pHLIP-P1AP was designed and synthesized. Protease-activated receptor 1 (PAR1) expression on the surface of MDA-MB-231 cells and human MCF10A mammary epithelial cells were observed. The binding between fluorescent-labeled pHLIP-P1AP and MDA-MB-231 cells under different pH values (pH=7.4, 6.0) was analyzed. The effects of pHLIP-P1AP on the proliferation of MDA-MB-231 cells was analyzed under the conditions of pH 7.4 and 6.0. **Results** pHLIP-P1AP was successfully synthesized and fluorescent-labeled. PAR1 was highly expressed on the surface of MDA-MB-231 cells. In an acidic environment (pH 6.0), fluorescent-labeled pHLIP-P1AP and MDA-MB-231 cells had a high binding ability. In an acidic environment (pH 6.0), pHLIP-P1AP significantly inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells. With 0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 4 μ g, and 8 μ g of pHLIP-P1AP, the cell proliferation inhibition rates were 3.39%, 5.27%, 14.29%, 22.14%, and 35.69%, respectively. **Conclusion** PAR1 was highly expressed on the surface of MDA-MB-231 cells. pHLIP-P1AP can effectively target MDA-MB-231 cells in an acidic environment and inhibit the growth of MDA-MB-231 cells. Therefore, pHLIP-P1AP is expected to be a valuable new drug in the treatment of TNBC.

Keywords: pH (low) insertion peptide; Protease-activated receptor 1; Triple-negative breast cancer; Cell proliferation

^{*}基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(202009040347)。

作者简介: 陈月华, 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 内科学。

引言

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TN-BC)是指雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)均为阴性的乳腺癌,在所有乳腺癌患者中占15%~20%。TNBC具有侵袭性强、进展快和预后差等临床特点,乳腺癌治疗常用的内分泌治疗和靶向治疗对TNBC无效,因此,迫切需要针对TNBC开发新的治疗药物,以改进治疗策略^[1]。

蛋白酶激活受体1(protease-activated receptor 1, PAR1)参与多种肿瘤的侵袭和转移过程,包括TNBC,是治疗肿瘤的潜在靶点^[2]。Pepducin PZ-128是棕榈酰化的肽,由脂质部分和PAR1同源蛋白片段P1AP组成。有研究显示,PZ-128能够通过靶向PAR1的第三细胞内环抑制肿瘤细胞中的PAR1/G蛋白信号转导^[2]。但PZ-128对肿瘤细胞不具有选择性,也可与人体正常细胞结合,因此PZ-128的不良反应较大、药理活性较弱。若能寻找一种新的载体将P1AP运送至肿瘤细胞内,可大大提高P1AP靶向治疗肿瘤的作用。

低pH插入肽[pH(low)insertion peptide, pHLP]家族来源于细菌视紫红质C-螺旋,是一类可以靶向酸性肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)的新型载体^[3-4],靶向的分子机制是基于pHLP在pH值较低的TME中插入肿瘤细胞膜并形成pH依赖性跨膜 α -螺旋^[5]。pHLP将其C末端穿过细胞膜插入肿瘤细胞内,标记其C末端能够达到将治疗性分子运送到肿瘤细胞内的目的,并避免耐药,使P1AP高效积聚于肿瘤细胞内,达到更佳的治疗效果。

在本研究中,我们设计将pHLP的C端与P1AP的N端通过二硫键连接起来,得到pHLP-P1AP复合物。通过实验验证pHLP是否能够将其C端连接的P1AP运送至TNBC细胞株MDA-MB-231内,并通过靶向PAR1的细胞内环抑制PAR1/G蛋白信号转导,探讨其对TNBC的治疗作用。

1 材料与amp;方法

1.1 材料 PAR1兔单克隆抗体(Affinity Biosciences, 江苏常州);Cy3标记山羊抗兔IgG(江苏康为世纪生物科技有限公司, 江苏泰州);4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)(南京凯基生物科技发展有限公司, 江苏南

京);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司, 上海]。

1.2 (FITC)pHLP-P1AP的设计、合成及纯化 通过固相多肽合成法分别合成pHLP(Var7)Cys与CysP1AP序列。pHLP(Var7)Cys: AEEQNPNWARYLEW-LFPTETLLLELC; CysP1AP: CKKSRALEF。将pHLP(Var7)Cys与CysP1AP通过二硫键连接,得到pHLP-P1AP序列,在pHLP-P1AP的N端标记异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC),C端进行酰胺化修饰,最终得到(FITC)pHLP-P1AP:(FITC)AE-EQNPNWARYLEWLFPTETLLLELC-CKKSRALEF。将多肽通过反相高效液相色谱(reversed phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)纯化(Gemini NX 10 μ C18 100A, 4.6 mm \times 250 mm, 流速1.0 mL \cdot min⁻¹),测定其纯度,并采用电喷雾电离质谱法(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)进行质谱分析。

1.3 细胞培养及细胞表面PAR1表达情况 人乳腺癌细胞系MDA-MB-231和人正常乳腺细胞MCF-10A购自中国科学院细胞研究所。MDA-MB-231细胞培养条件:用含10%小牛血清的L-15培养基,于37 $^{\circ}$ C、无CO₂条件下培养。MCF-10A细胞培养条件:DMEM/F12(1:1)培养基+马血清(5%)+胰岛素(10 μ g \cdot mL⁻¹)+表皮生长因子(20 ng \cdot mL⁻¹)+霍乱毒素(100 ng \cdot mL⁻¹)+氢化可的松(0.5 μ g \cdot mL⁻¹),在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养。

在培养板中将达到细胞饱和密度的培养皿用PBS浸洗3次;用4%多聚甲醛固定15 min, PBS浸洗培养皿3次;0.5% Triton X-100(PBS配制)室温通透20 min。PBS浸洗培养皿3次;在培养皿内滴加5% BSA, 37 $^{\circ}$ C封闭30 min。用移液枪吸掉封闭液,在培养皿内滴加足够量稀释好的PAR1兔单克隆抗体(1:200), 37 $^{\circ}$ C孵育3 h; PBS浸洗培养皿3次,滴加稀释好的荧光Cy3标记山羊抗兔IgG(1:200), 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, PBS浸洗培养皿3次。滴加DAPI避光孵育5 min,对标本进行染核,用PBS冲洗多余的DAPI;用50%甘油封闭培养皿,然后在荧光显微镜(OLYMPUS)下观察并采集图像。

1.4 (FITC)pHLP-P1AP与MDA-MB-231细胞结合分析 将MDA-MB-231细胞以5.0 \times 10⁴个/孔接种在24孔板中。细胞附着于平板后,除去培养基,用磷酸盐缓冲液(25 mmol \cdot L⁻¹, pH 7.4)洗涤细胞。将

细胞分为两组,将 pH 值为 7.4、6.0 的 pH 特异性 L-15 培养基分别加入孔中,置于 37 °C、无 CO₂ 环境下孵育过夜。向每孔中加入 30 μL 100 nmol·L⁻¹ 的 (FITC) pHLP-P1AP,然后将 24 孔板置于培养箱内的摇动混合器中 2 h。用相应的 pH 值(7.4、6.0)特异性磷酸盐缓冲液(25 mmol·L⁻¹)洗涤所有细胞 5 次以除去任何未结合的探针,然后进行细胞荧光显像。

1.5 抗增殖实验 将 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞以 5.0×10⁴ 个/孔接种在 24 孔板中。细胞附着于平板后,除去培养基,用磷酸盐缓冲液(25 mmol·L⁻¹, pH 7.4)洗涤细胞。将 pH 值为 7.4、6.0 的 L-15 培养基分别加入孔中,置于 37 °C、无 CO₂ 环境下孵育过夜。将不同量的 pHLP-P1AP(0 μg、0.5 μg、1 μg、2 μg、4 μg、8 μg)分别加入孔中,然后将 24 孔板置于培养箱内培养 72 h。用相应的 pH 值(7.4、6.0)特异性磷酸盐缓冲液(25 mmol·L⁻¹)洗涤所有细胞 5 次以除去任何未结合的探针。使用比色 MTT 测定法测定细胞活力,将 20 μL 5 mg·mL⁻¹ MTT 溶液加入细胞中,37 °C 孵育 4 h。将所得的晶体溶解于 150 μL

DMSO 中,并使用酶标仪在 490 nm 处测量吸光度,计算细胞增殖抑制率。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 24.0.0.0(IBM)统计学软件进行数据处理。变量以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 one-way ANOVA 进行变量的比较, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 (FITC)pHLP-P1AP 的合成及纯化 成功合成 (FITC) pHLP-P1AP,简言之,pHLP(Var7) Cys 和 CysP1AP 通过固相多肽合成法合成,通过氧化反应使两条肽之间形成二硫键,得到 pHLP-P1AP,在 pHLP-P1AP 的 N 端标记 FITC,得到 (FITC) pHLP-P1AP。(FITC) pHLP-P1AP 的 RP-HPLC 分析显示有 1 个主峰(96.877 7%, 11.193 min)和 2 个较小的杂质峰(图 1A);ESI-MS 分析显示 3 个质谱峰, m/z 分别为 753.8([$m+6H$]⁶⁺)、904.3([$m+5H$]⁵⁺)、1 130.2([$m+4H$]⁴⁺)(图 1B)。实测分子量(4 516.8、4 516.5)与理论分子量(4 517.17)基本相符。

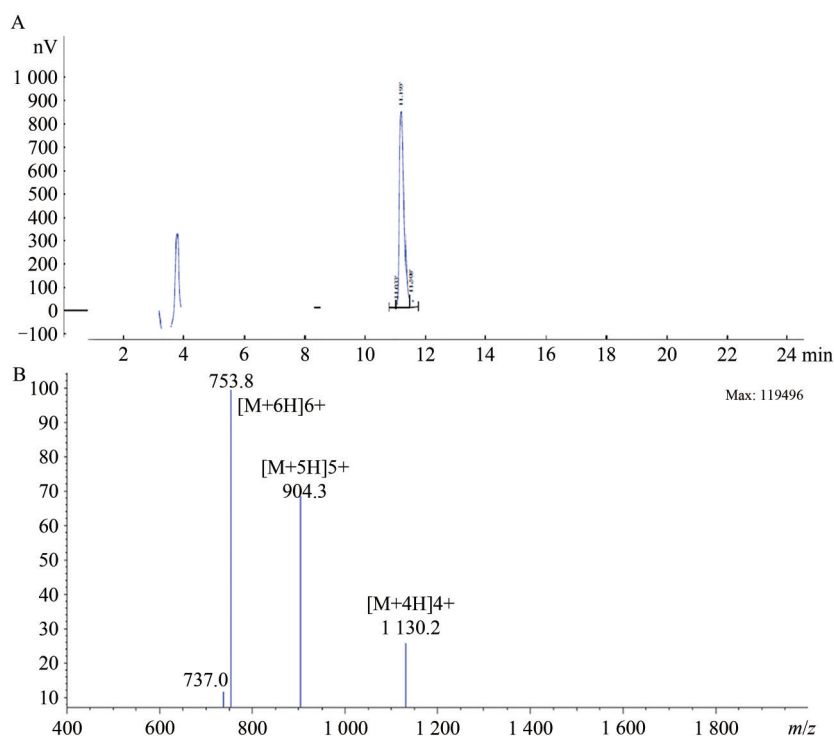


图 1 (FITC)pHLP-P1AP 的 HPLC(A)和 ESI-MS(B)分析

Fig. 1 HPLC (a) and ESI-MS (b) analysis of (FITC)pHLP-P1AP

2.2 MDA-MB-231 和 MCF-10A 细胞表面 PAR1 表达 MDA-MB-231 细胞高表达 PAR1,而 MCF-10A 细胞中 PAR1 表达水平较低(图 2)。半定量分

析显示,MDA-MB-231 细胞相对荧光强度/细胞为 (100.00±3.53)%,MCF-10A 细胞的相对荧光强度/细胞为 (39.04±5.70)%,前者明显高于后者,差异有统

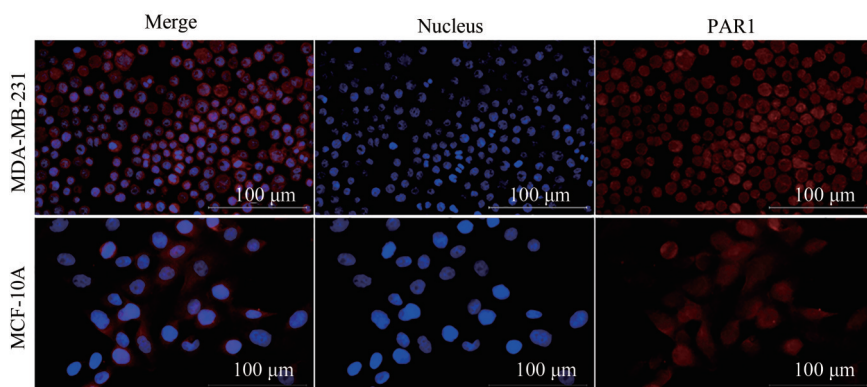


图2 MDA-MB-231 和 MCF-10A 细胞表面 PAR1 的表达情况(400 倍)

Fig. 2 PAR1 expression in MDA-MB-231 and MCF-10A cells (400×)

计学意义($F=254.629$, $P<0.01$)。

2.3 (FITC)pHLIP-P1AP 与 MDA-MB-231 细胞结合分析

在酸性 pH 下(pH 6.0), 探针与 MDA-

MB-231 细胞有较高的结合能力; 在 pH 7.4 时, 探针与 MDA-MB-231 细胞仅有轻微的结合(图3)。

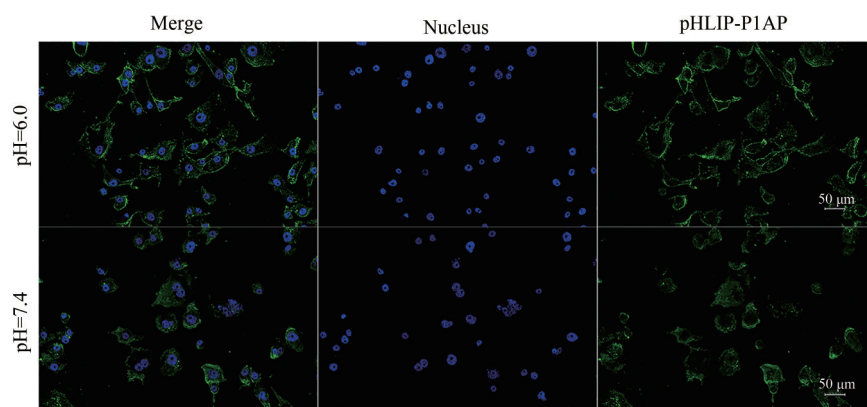


图3 (FITC)pHLIP-P1AP 与 MDA-MB-231 细胞结合的荧光显像(200 倍)

Fig. 3 Fluorescence imaging of (FITC)pHLIP-P1AP binding to MDA-MB-231 cells (200×)

2.4 抗增殖实验 与 pH 7.4 时相比, pH 6.0 时 pHLIP-P1AP 可明显抑制 MDA-MB-231 细胞增殖($P<0.05$)(图4)。在 pH 6.0, 探针剂量为 0.5 μg 、1 μg 、2 μg 、4 μg 、8 μg 时, MDA-MB-231 细胞增殖抑制率分别为: $(3.39\pm0.7)\%$ 、 $(5.27\pm1.1)\%$ 、 $(14.29\pm0.1)\%$ 、 $(22.14\pm1.2)\%$ 、 $(35.69\pm1.2)\%$ 。

3 讨论

TNBC 发病年龄较小, 早期易发生转移, 因缺乏相应的受体导致常规治疗无效, 已成为乳腺癌治疗领域的难点和研究热点^[1]。PAR1 是一种 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR), 存在于多种肿瘤细胞表面, 是肿瘤的潜在治疗靶点^[2]。本研究通过免疫组化证实 TNBC MDA-MB-231 细胞表面存在大量 PAR1, 而正常人乳腺细胞 MCF-10A

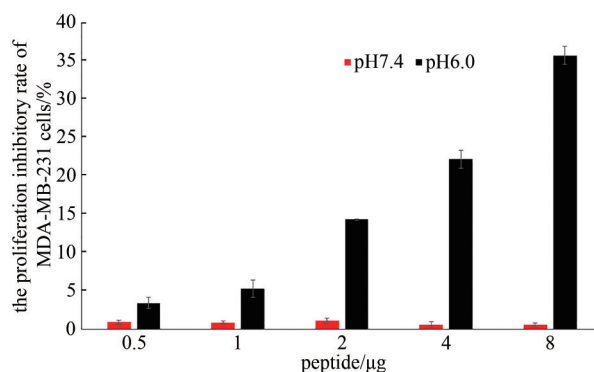


图4 不同 pH 值条件下 pHLIP-P1AP 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

Fig. 4 The effects of pHLIP-P1AP on the proliferation of MDA-MB-231 cells under different pH conditions

细胞表面基本未见 PAR1 表达, 因此, PAR1 有望成为 TNBC 诊断、治疗的潜在靶点。

PAR1 抑制剂 PZ-128 是一类脂化肽,能够进入细胞内并抑制 PAR1/G 蛋白信号转导^[2]。PZ-128 目前处于 II 期临床试验阶段,正在开发其通过靶向血小板表面 PAR1 抑制血小板功能的作用,对于急性冠状动脉综合征(acute coronary syndromes, ACS)患者和接受冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)患者的有效治疗至关重要^[6]。另外有研究证实,PZ-128 可以抑制乳腺癌、肺癌、卵巢癌的生长和转移^[7]。PZ-128 与 GPCR 确切的作用机制仍不清楚,但有研究者提出,肽可以直接与其同源受体相互作用,使受体处于活性或非活性构象^[8]。PZ-128 并不能特异性靶向肿瘤细胞,如果能利用特异性靶向肿瘤的载体代替棕榈酸,将 P1AP 运送至肿瘤细胞内,则可以最大程度避免探针进入正常细胞内从而减少不良反应的发生。

TME 的特征是呈酸性^[9-10]。几乎所有实体肿瘤细胞内 pH 为中性或碱性,而细胞外 pH 为酸性,可低至 6.0^[11-13]。TME 呈酸性的机制包括缺氧引起的无氧糖酵解、有氧糖酵解(Warburg 效应)、失控的细胞生长导致的 CO₂ 产生增加,以及细胞膜上离子泵活性增加^[9, 11]。酸性 TME 具有稳定性,不受肿瘤克隆选择的影响,因此也被认为是具有前景的肿瘤靶向检测标志物^[3, 5]。研究显示,pHLIP 家族肽能够靶向 TME,该肽来源于细菌视紫红质 C-螺旋,最初被称为 BRC 肽^[14]。pHLIP 能够感应细胞膜附近的 pH 值,当细胞外环境呈酸性时可自发插入细胞膜中并形成螺旋结构^[15]。pHLIP 的最大优势之一是能够将极性和中度疏水的分子直接运送到细胞内,避免了因细胞内吞产生的耐药性。许多研究表明,pHLIP 可以连接多种不同的分子,如荧光染料、毒素、药物、肽和肽核酸等^[16-23]。pHLIP 变体中有 4 条序列具有较高的肿瘤靶向性:野生型(WT)、变体 3(Var3)、变体 7(Var7)及 ATRAM^[24]。有研究通过一种不可切割连接子(chloro-acetylchloride)将 pHLIP(WT)与 P1AP 肽连接起来,得到 pHLIP(WT)-P1AP,可以抑制高表达 PAR1 受体的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF7 的生长^[21]。我们在此研究的基础上做了一些改动:(1)本研究选用的载体是 pHLIP 家族 Var7 序列。pHLIP(Var7)是靶向肿瘤的 pHLIP 家族中最短、极性最强的肽序,具有容易合成、血液清除快等优点,最初应用于靶向 GPCR 的研究。血液清除快能够提高显像剂的靶/非靶比值,提高显像质量,这一特点提示 pHLIP(Var7)也有成为显像剂的潜力

(如通过荧光标记、放射性核素标记等),从而兼顾肿瘤的显像与治疗。(2)利用二硫键代替 chloro-acetylchloride 连接 pHLIP(Var7)与 P1AP 肽,二硫键可在细胞内裂解,从而将 P1AP 送至细胞内,该方法简化了 pHLIP-P1AP 的合成,有利于推广。

本研究细胞结合实验显示,(FITC) pHLIP-P1AP 与 MDA-MB-231 细胞在酸性环境下(pH 6.0)有较高的结合能力,在 pH 7.4 时基本上没有结合,提示 pHLIP 可以靶向酸性组织,与既往关于 pHLIP 的研究结果一致。抗增殖试验显示,pH 为 6.0 时,pHLIP-P1AP 可以显著抑制 MDA-MB-231 细胞的生长,提示在酸性条件下 pHLIP 可以有效地将 P1AP 运送至 MDA-MB-231 细胞内,二硫键裂解并释放 P1AP,通过抑制 PAR1/G 蛋白信号转导起到细胞毒性作用。

本研究在前人的研究基础上设计合成了可抑制 MDA-MB-231 细胞生长的新型治疗性分子 pHLIP-P1AP,从细胞水平证实 pHLIP-P1AP 能够靶向 MDA-MB-231 细胞并有效抑制其生长,但能否抑制 TNBC 实体肿瘤的生长尚不清楚。由于条件限制,本研究没有进行动物水平的治疗性研究,在条件允许时将会进行后续研究,也希望其他的研究者能够对本研究进行补充。

4 结论

目前,TNBC 缺乏有效的临床治疗手段,患者预后较差。新型靶点的开发对 TNBC 未来的治疗策略具有重要意义。MDA-MB-231 细胞表面表达大量 PAR1,可以将 PAR1 作为其治疗靶点。pHLIP-P1AP 在酸性环境下能够有效靶向 MDA-MB-231 细胞,并通过抑制 PAR1/G 蛋白信号转导抑制 MDA-MB-231 细胞的生长,有望成为治疗 TNBC 有价值的新型药物。

参考文献

- [1] WANG X R, LIU Y P. PD-L1 expression in tumor infiltrated lymphocytes predicts survival in triple-negative breast cancer [J]. Pathol Res Pract, 2020, 216(3): 152802. DOI: 10.1016/j.prp.2019.152802.
- [2] YANG E, BOIRE A, AGARWAL A, et al. Blockade of PAR1 signaling with cell-penetrating pepducins inhibits Akt survival pathways in breast cancer cells and suppresses tumor survival and metastasis [J]. Cancer Res, 2009, 69(15): 6223-6231. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0187.
- [3] VILA-VIÇOSA D, SILVA T F D, SLAYBAUGH G, et al. Membrane-induced pK_a shifts in wt-pHLIP and its L16H variant [J]. J Chem Theory Comput, 2018, 14(6): 3289-3297. DOI: 10.1021/acs.jctc.8b00102.

- [4] CHITRAK, GUPTA, . Cooperative nonbonded forces control membrane binding of the pH-low insertion peptide pHLIP [J]. *Biophys J*, 2018, 115(12): 2403–2412. DOI: 10.1016/j.bpj.2018.11.002.
- [5] BAÑÓ-POLO M, MARTÍNEZ-GIL L, BARRERA F N, et al. Insertion of bacteriorhodopsin helix C variants into biological membranes [J]. *ACS Omega*, 2019, 5(1): 556–560. DOI: 10.1021/acsomega.9b03126.
- [6] ZHANG P, GRUBER A, KASUDA S, et al. Suppression of arterial thrombosis without affecting hemostatic parameters with a cell-penetrating PAR1 pepducin [J]. *Circulation*, 2012, 126(1): 83–91. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.091918.
- [7] COVIC L, KULIOPULOS A. Protease-activated receptor 1 as therapeutic target in breast, lung, and ovarian cancer: pepducin approach [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2237. DOI: 10.3390/ijms19082237.
- [8] DIMOND P, CARLSON K, BOUVIER M, et al. G protein-coupled receptor modulation with pepducins: moving closer to the clinic [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1226: 34–49. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06039.x.
- [9] XU H, MA B X, JIANG J Z, et al. Integrated prodrug micelles with two-photon bioimaging and pH-triggered drug delivery for cancer theranostics [J]. *Regen Biomater*, 2020, 7(2): 171–180. DOI: 10.1093/rb/rbz035.
- [10] CHEN L L, XU S, LI W, et al. Tumor-acidity activated surface charge conversion of two-photon fluorescent nanoprobe for enhanced cellular uptake and targeted imaging of intracellular hydrogen peroxide [J]. *Chem Sci*, 2019, 10(40): 9351–9357. DOI: 10.1039/C9SC03781K.
- [11] DE LA CRUZ-LÓPEZ K G, CASTRO-MUÑOZ L J, REYES-HERNÁNDEZ D O, et al. Lactate in the regulation of tumor microenvironment and therapeutic approaches [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1143. DOI: 10.3389/fonc.2019.01143.
- [12] GARCÍA-CAÑAVÉRAS J C, CHEN L, RABINOWITZ J D. The tumor metabolic microenvironment: lessons from lactate [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(13): 3155–3162. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3726.
- [13] LEE S H, MCINTYRE D, HONESS D, et al. Carbonic anhydrase IX is a pH-stat that sets an acidic tumour extracellular pH *in vivo* [J]. *Br J Cancer*, 2018, 119(5): 622–630. DOI: 10.1038/s41416-018-0216-5.
- [14] HUNT J F, EARNEST T N, BOUSCHÉ O, et al. A biophysical study of integral membrane protein folding [J]. *Biochemistry*, 1997, 36(49): 15156–15176. DOI: 10.1021/bi970146j.
- [15] SON S M, YUN J, LEE S H, et al. Therapeutic effect of pHLIP-mediated *CEACAM6* gene silencing in lung adenocarcinoma [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 11607. DOI: 10.1038/s41598-019-48104-5.
- [16] KAPLAN A R, PHAM H, LIU Y F, et al. Ku80-targeted pH-sensitive peptide-PNA conjugates are tumor selective and sensitize cancer cells to ionizing radiation [J]. *Mol Cancer Res*, 2020, 18(6): 873–882. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0661.
- [17] ZHANG H J, ZHAO X, CHEN L J, et al. pH-driven targeting nanoprobe with dual-responsive drug release for persistent luminescence imaging and chemotherapy of tumor [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(1): 1179–1188. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b04318.
- [18] KARABADZHAK A G, AN M, YAO L, et al. pHLIP-FIRE, a cell insertion-triggered fluorescent probe for imaging tumors demonstrates targeted cargo delivery *in vivo* [J]. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(11): 2545–2553. DOI: 10.1021/cb500388m.
- [19] CHENG C J, BAHAL R, BABAR I A, et al. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment [J]. *Nature*, 2015, 518(7537): 107–110. DOI: 10.1038/nature13905.
- [20] BRITO J, GOLIJANIN B, KOTT O, et al. Ex-vivo imaging of upper tract urothelial carcinoma using novel pH low insertion peptide (variant 3), a molecular imaging probe [J]. *Urology*, 2020, 139: 134–140. DOI: 10.1016/j.urology.2019.01.008.
- [21] BURNS K E, THÉVENIN D. Down-regulation of PAR1 activity with a pHLIP-based allosteric antagonist induces cancer cell death [J]. *Biochem J*, 2015, 472(3): 287–295. DOI: 10.1042/BJ20150876.
- [22] BURNS K E, ROBINSON M K, THÉVENIN D. Inhibition of cancer cell proliferation and breast tumor targeting of pHLIP-monomethyl auristatin E conjugates [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(4): 1250–1258. DOI: 10.1021/mp500779k.
- [23] BURNS K E, MCCLEEREY T P, THÉVENIN D. pH-selective cytotoxicity of pHLIP-antimicrobial peptide conjugates [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28465. DOI: 10.1038/srep28465.
- [24] WYATT L C, MOSHNIKOVA A, CRAWFORD T, et al. Peptides of pHLIP family for targeted intracellular and extracellular delivery of cargo molecules to tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(12): E2811–E2818. DOI: 10.1073/pnas.1715350115.

校稿: 李征 王娟

本文引用格式: 陈月华, 王振光, 李大成, 等. 低 pH 插入肽-蛋白酶激活受体 1 复合物抑制三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的实验研究 [J]. *肿瘤药 学*, 2023, 13(2): 167–172. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.02.06.

Cite this article as: CHEN Yuehua, WANG Zhenguang, LI Dacheng, et al. The inhibitory effects of pHLIP-P1AP on the proliferation of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2023, 13(2): 167–172. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.02.06.