

低 pH 插入肽研究概况

贾学丽¹, 张佳¹, 赵婷¹, 杜青¹, 曹德英¹, 向柏^{1*},
耿革霞^{2*}, 齐宪荣³

(1. 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017; 2. 河北省食品药品审评认证中心,
河北 石家庄 050091; 3. 北京大学药学院, 北京 100191)

摘要: 许多疾病状态体内的新陈代谢往往导致细胞外酸化, 如癌症、缺血性中风、神经外伤和感染。细胞外微酸环境已成为肿瘤等疾病诊断和治疗的有效靶点。低 pH 插入肽 (pH low insertion peptides, pHLIPs) 是一种可以靶向细胞外微酸环境的多肽载体, 这种载体可将负载物以低 pH 依赖方式选择性转运至病变细胞。本文从分子靶向转运和纳米载体靶向递送两方面, 综述了 pHLIP 介导的靶向形式在疾病诊疗中的应用。

关键词: 低 pH 插入肽; 细胞外微酸环境; 诊疗; 肿瘤; 纳米载体

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2018) 03-0375-08

Research situation of pH low insertion peptides

JIA Xue-li¹, ZHANG Jia¹, ZHAO Ting¹, DU Qing¹, CAO De-ying¹,
XIANG Bai^{1*}, GENG Ge-xia^{2*}, QI Xian-rong³

(1. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Hebei Center For Food And Drug Evaluation and Certification, Shijiazhuang 050091, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: Extracellular acidity has been associated with many pathological states, such as cancer, ischemic stroke, neurotrauma and infection, which makes it an effective target for therapy and diagnosis of such diseases. As a polypeptide vector, pH low insertion peptides (pHLIPs) are endowed with high sensitivity to extracellular acidic environment, which can insert the membrane and deliver payload to pathological cells in a pH dependent manner. Here, theranostic applications of pHLIP in disease, are reviewed in two aspects: pHLIP-mediated single-molecule transporter and nano-sized carrier.

Key words: pH low insertion peptide; extracellular acidic environment; theranostic; tumor; nano-sized carrier

病变组织及受损细胞的新陈代谢往往导致细胞外酸化, 如果能够找到一种可以靶向细胞外酸性环境的载体, 对于改善细胞外酸性环境相关的癌症、缺

血性中风、神经外伤和感染等病理状态具有积极的意义。但是这种方法的应用具有一定的难度, 因为病变组织胞外 pH 值与正常组织 pH 值相差甚微 (约低 0.5~0.8 个 pH 单位)^[1]。这种差别在生物学上可使细胞功能改变, 但从化学角度而言差别非常小, 调节靶向因子的化学性质非常困难。

低 pH 插入肽 (pH low insertion peptides, pHLIPs) 的发现为胞外微酸环境敏感靶向给药系统的发展提供了新的契机。pHLIP 由侧翼序列和跨膜 (transmembrane, TM) 序列组成 (图 1), 其中侧翼序列由质

收稿日期: 2017-08-30; 修回日期: 2017-10-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773666, 81302725); 河北省自然科学基金资助项目 (H2015206356).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-311-86266050,

E-mail: baixiang@hebm.edu.cn;

Tel: 86-311-67305769, Fax: 86-311-67305763,

E-mail: gengexia@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0830



Figure 1 Sequence of pH low insertion peptide (pHLIP)

子化氨基酸残基构成, TM 序列由疏水残基构成。TM 序列影响 pHLIP 与膜相互作用, 侧翼-1 (氨基端) 与 pHLIP 的水溶性相关, 通常含有极性带电残基^[2-5]。膜插入侧翼-2 (羧基端) 不仅与 pHLIP 的水溶性有关而且影响 pHLIP 进出细胞膜的比率^[6]。随着对 pHLIP 生物物理学性质的不断了解, 基于 pHLIP 具有低 pH 靶向行为这一特点, 考虑将其作为诊断或治疗药物的载体。学者们首先对 pHLIP 是否可用于将细胞不可渗透药物易位到细胞中进行研究。Wijesinghe 等^[7]借助 pHLIP 成功将荧光小分子药物、肽核酸和鬼笔毒素递送至肿瘤细胞内, 建立了治疗药物细胞内传递的新方法, 实现了药物分子细胞水平的靶向递送。在此基础上, 进一步预测 pHLIP 或许可以在体内选择性靶向酸性肿瘤。Andreev 等^[8]首次使用肿瘤模型鼠证实了 pHLIP 具有体内靶向能力。

随着对 pHLIP 研究的不断深入, 发现野生型 pHLIP [pHLIP (WT)] 的应用受到一些关键因素的限制, 如体内清除慢、羧基端所带电荷对膜插入过程的影响。学者们尝试通过对 pHLIP 氨基酸序列进行调整, 设计具有更好性能的 pHLIP 衍生物。目前 pHLIP 序列调节方式主要包括: ① 切除或反转野生型 pHLIP 序列的膜插入末端^[9]; ② 用谷氨酸残基、带正电的赖氨酸残基或质子化的非标准氨基酸残基 (γ -羧基酸、 α -氨基乙酸) 替换跨膜区部分或全部天冬氨酸^[10]。经序列调节产生的 pHLIP 衍生物, 如 pHLIP 变体 3 (切除膜插入末端), 可减少 pHLIP 所带电荷, 加快 pHLIP 进入细胞膜形成跨膜螺旋的过程, 提高其肿瘤靶向性。pHLIP 变体 7, 在保持良好靶向性的同时加快在血液中的消除速度, 有利于实现药物的体内递送。可以借鉴当前 pHLIP 的序列调节方法发展更为先进的 pHLIP 衍生物。值得注意的是, pHLIP 第 14 位、第 25 位天冬氨酸及第 20 位脯氨酸是其具有 pH 依赖靶向活性的重要结构, 当 pHLIP 序列中这三个位置的氨基酸发生改变后可能会使 pHLIP 失去膜插入活性^[10]。

pHLIP 多肽家族成员的序列一般含有天然和/或非天然氨基酸, 这些氨基酸在低 pH 条件下具有疏水性或呈现质子化状态。疏水残基保证了 pHLIP 与膜的亲和性, 质子化残基保证了 pHLIP 在中性 pH 条件下的水溶性^[8, 11, 12]。作为一种适度疏水性肽, 正常 pH 条件下与细胞膜有高度亲和性, 但在低 pH 条件下可

以折叠插入细胞膜, 可用于检测病变组织细胞表面 pH^[10, 13]。本文从单分子靶向转运和纳米载体靶向递送两方面对 pHLIP 的应用研究进行分述。pHLIP 介导的载体递送系统见图 2。

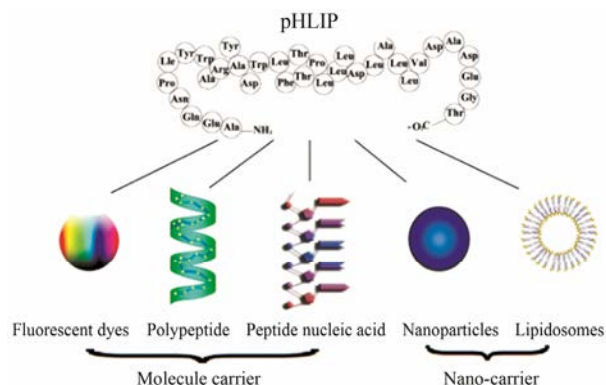


Figure 2 pHLIP-mediated carrier system

1 单分子靶向转运研究

pH 降低促使 pHLIP 形成跨膜螺旋并插入细胞膜, 这一折叠过程可释放 $2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的能量^[2], 这些能量可用于促进极性药物穿过细胞膜。多数药物分子通过二硫键连接在 pHLIP 插入末端, 转运到靶细胞中并在细胞质中释放, 如荧光染料、环肽、极性毒素和肽核酸等。pHLIP 单分子靶向转运过程的跨膜环节具有以下特点: 速度快、pH 及浓度依赖性, 并且可通过调节 pHLIP 插入末端的疏水性调节其靶向性。

1.1 pHLIP 介导荧光染料靶向转运研究

用特定生物标记物标记肿瘤细胞表面, 研究发现生物标记物在肿瘤表面及肿瘤间的表达不同, 这影响了药物对肿瘤细胞的靶向性。健康组织细胞外 pH 约为 7.4, 肿瘤细胞表面 pH 值存在梯度: 靠近细胞膜处的 pH 最低 (约 6.0~6.2)^[14], 随着与膜距离的增加, pH 逐渐升高, 所以将荧光染料与 pHLIP 连接形成的荧光探针可靶向肿瘤细胞。

pHLIP 荧光探针曾被广泛用于不同肿瘤模型系统的靶向研究, 如 pHLIP 与近红外荧光染料 Alexa750 结合形成的荧光探针可以靶向胰腺导管腺瘤。有学者^[15, 16]将 pH 敏感型 pHLIP 变体 7 与近红外荧光染料 Alexa750 结合, 基于人 S2VP10 和 S2013 胰腺癌异种移植模型鼠的多光谱声学层析成像技术 (multispectral optoacoustic tomography, MSOT) 分析表明, 形成的荧光探针对于模型鼠的胰腺导管腺瘤有靶向作用, 首次实现了 MSOT 对 pH 敏感靶向探针体内分布的表征。这一研究预示 MSOT 和其他酸敏感靶向制剂的联合使用可用于提高胰腺导管腺瘤的成像效果, 同时也

可尝试将酸敏感靶向制剂与 MSOT 联用的方法用于其他实体肿瘤成像。Cruz-Monserrate 等^[17, 18]使用荧光标记的 pHLIPs 作为胰腺导管腺癌的成像方法, 发现在人移植瘤胰腺导管腺癌病变的基因工程模型鼠的病变组织中可检测到荧光标记的 pHLIP, 说明 pHLIP 介导荧光染料可用于胰腺癌诊断。目前胰腺导管腺癌的常规诊断需要进行伤害性检查 (如内镜超声检查), 常规诊断的风险高但准确性相对较低, 使用 pHLIP 荧光探针对实体肿瘤进行成像不仅可以提高癌症诊断的准确性而且降低了诊断的伤害性。

pHLIP 荧光探针还可作为乳腺癌的成像工具, 有学者在皮下注射 4T1 细胞的乳腺癌模型鼠肿瘤部位检测到荧光标记的 pHLIP, 表明 pHLIP 介导荧光染料可用于乳腺癌的诊断^[17, 18]。Tapmeier 等^[19]将 pHLIP 变体 3 与 Alexa546 荧光染料组装成 pHLIP-Alexa546 探针, 该探针以序列特异性方式靶向自发性乳腺癌 BALB/neu-T 模型鼠肿瘤细胞。使用核磁共振波谱分析, 结果显示 pHLIP 变体 3 只在 pH 低于 6.7 的肿瘤组织中有保留, 说明 pHLIP 可特异性识别 pH 较低的肿瘤组织。Adochite 等^[20]选用 4T1 乳腺癌异种移植的 BALB/c 模型鼠对 3 种 pHLIP 变体 (变体 3、变体 7 和 WT) 与 8 种荧光染料 [Alexa546、Alexa647、Alexa750、Cy5.5、DyLight 680、DyLight 680 4×PEG-conjugate (DyP680)、IRDye[®] 680RD (IR680) 及 IRDye[®] 800CW (IR800)] 所形成共聚物的生物分布及肿瘤靶向性进行研究。结果表明, 荧光标记的 pHLIP 均具有明显的肿瘤靶向性, 其中 Alexa546 与 pHLIP 所形成共聚物的肿瘤靶向性最好且在肝脏、肾脏和肌肉中积累较少。该课题组给模型鼠注射荧光标记的 pHLIP, 发现 24 h 后模型鼠肌肉和肝脏组织中的荧光信号逐渐减弱, 而肿瘤组织和肾脏中荧光信号基本不变, 表明荧光标记的 pHLIP 在 pH 值正常的组织中可被清除, 这对未来 pHLIP 靶向成像用于临床研究具有重要意义。

Golijanina 等^[21]用吡啶花青绿 ICG 标记 pHLIP, 进行人膀胱上皮癌及根治性膀胱切除术癌前期病变靶向研究。发现 ICG-pHLIP 对肌层浸润性和非肌层浸润性膀胱上皮癌均具有靶向作用, 且目前研究未发现 ICG-pHLIP 对非肿瘤组织有损害作用, 所以使用 ICG-pHLIP 成像有助于膀胱癌早期诊断。同时发现 ICG-pHLIP 对根治性膀胱切除术癌前期病变也具有准确的靶向性, 其灵敏性高达 97%, 专属性达 100%, 但假如靶向膀胱癌假阳性坏死组织的专属性降低至 80%。ICG-pHLIP 有望用于尿道上皮癌早期检测, 同

时 ICG-pHLIP 靶向成像的成功为膀胱癌靶向治疗提供了可能性。

1.2 多肽类

1.2.1 毒素

鹅膏蕈碱具有体外抑癌作用, 但因具有一定极性不可穿过细胞膜, 且易被肝细胞选择性吸收导致肝损伤, 所以临床应用受限。pHLIP 可靶向酸性病变组织如肿瘤和炎症部位, 为细胞不可渗透性药物的抗癌研究提供了可能。pHLIP 介导 α -鹅膏蕈碱进入癌细胞后以 pH 依赖方式引起癌细胞凋亡^[22], 从而发挥抗癌作用。

鹅膏蕈碱与反人类上皮细胞黏膜抗体结合后, 有抑制细胞增殖及胰腺瘤生长的作用。将鹅膏蕈碱通过二硫键与 pHLIP 插入末端 (羧基端) 连接, 可将鹅膏蕈碱靶向转运到癌细胞中, 并通过二硫键的裂解将鹅膏蕈碱释放到细胞质中诱导细胞凋亡^[22]。Moshnikova 等^[23]提出 pHLIP 以 pH 依赖方式介导极性毒素 RNA 聚合酶 II 抑制剂 α -鹅膏蕈碱进入肿瘤细胞, 并在 48 h 内诱导癌细胞凋亡。水溶性肽 pHLIP 折叠产生的能量可用来将细胞不可渗透性药物 α -鹅膏蕈碱以跨膜转运的方式转运到癌细胞的细胞质中。

1.2.2 环肽

pHLIP 可促进鬼笔环肽的易位, 介导鬼笔环肽进入肿瘤细胞并抑制肿瘤细胞增殖。将鬼笔环肽连接在 pHLIP 羧基末端, 在微酸性条件下 pHLIP 成功介导鬼笔环肽进入靶细胞并通过二硫键的裂解将鬼笔环肽释放到靶细胞的细胞质中^[24]。为了更易发挥鬼笔环肽的抗癌作用, 可通过调节疏水链的长度来改变药物分子的极性, 从而扩大极性药物的应用。Wijesinghe 等^[7]首次尝试通过二元胺的连接调节疏水链的长度从而调整极性药物鬼笔环肽的疏水性。使用生物物理学方法和荧光显微镜法对实验进行观察, 结果表明 pHLIP 可以穿过脂质囊泡及癌细胞的细胞膜, 将连接在其羧基末端的极性环肽递送至靶细胞。在低 pH 条件下, 连接在 pHLIP 羧基末端的类鬼笔环肽药物以浓度依赖方式抑制癌细胞增殖。此研究为极性药物的抗癌应用提供了新的思路, 除对靶向载体的结构进行调节外也可尝试通过调节药物的疏水性来提高药物靶向转运的能力。

1.2.3 微管抑制因子

微管抑制因子单甲基澳瑞他汀 E (monomethylauristatin E, MMAE) 对乳腺肿瘤细胞具有强大的细胞毒性, pHLIP 与 MMAE 结合形成 pHLIP-MMAE 后可在不引起明显质膜扰动的前提下以浓度和 pH 依赖方式抑制癌细胞增殖。相比生理 pH 值, 在低 pH 条件下 pHLIP-MMAE 对癌细胞的抗增殖作用更强。Burns 课题组^[25]使用 Fmoc 固相合成法

合成 pHLIP (WT) 及 pHLIP 变体 [pHLIP (D25E)] (表 1), 使用反向高效液相色谱仪对 pHLIP (WT) 及其变体 pHLIP (D25E) 进行纯化, 并通过电离飞行时间质谱仪进行检测, 证明 pHLIP 及其变体 pHLIP (D25E) 成功合成。然后将 MMAE 与 pHLIP (WT) 及 pHLIP (D25E) 分别连接得到共聚物 pHLIP (WT)-MMAE 和 pHLIP (D25E)-MMAE。使用 HeLa 和 MDA-MB-231 细胞进行实验, 在低 pH 条件下, pHLIP (WT)-MMAE 可有效抑制 HeLa 细胞和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞增殖; 而在 pH 7.4 条件下, pHLIP (WT)-MMAE 及 pHLIP (D25E)-MMAE 对这两种细胞几乎没有增殖抑制作用。使用 MDA-MB-231 异种移植模型鼠对 Alexa750-pHLIP (WT)-MMAE 的体内肿瘤靶向性进行评价, 静脉注射后在模型鼠肿瘤组织中发现荧光标记的 pHLIP (WT)-MMAE, 证明 pHLIP (WT)-MMAE 体内肿瘤靶向性的存在。该课题组^[26]进一步使用 Fmoc 固相合成法合成了 pHLIP 变体 pHLIP (WT)、pHLIP (D25E)、pHLIP (P20G)、pHLIP (R11Q)、pHLIP (R11Q; D14Up) 和 pHLIP (D14Gla; D25Aad) (表 1), 将微管抑制因子单甲基澳瑞他汀 F (monomethyl auristatin F, MMAF) 与以上 6 种 pHLIP 变体分别连接, 得到 6 种不同共聚物: pHLIP (WT)-MMAF、pHLIP (D25E)-MMAF、pHLIP (P20G)-MMAF、pHLIP (R11Q)-MMAF、pHLIP (R11Q; D14Up)-MMAF 和 pHLIP (D14Gla; D25Aad)-MMAF。使用 HeLa 细胞进行细胞毒性实验, 发现 6 种 pHLIP-MMAF 共聚物均具有 pH 选择性及浓度依赖性, 且在低 pH 条件下的细胞毒性均大于生理 pH 条件下的细胞毒性。在低 pH 条件下, pHLIP (WT)-MMAF 的肿瘤增殖抑制作用最强, pHLIP (D25E)-MMAF 肿瘤增殖抑制作用弱于 pHLIP (WT)-MMAF, 且 pH 选择性最低。基于 HeLa 异种移植及携带表皮样癌 A431 的肿瘤模型鼠, 该课题组对 pHLIP (WT)-MMAF 的体内治疗效果进行评价, 发现 pHLIP (WT)-MMAF 在一定浓度内可有效抑制 HeLa 异种移植模型鼠肿瘤的生长, 但对携带表皮样癌 A431 肿瘤模型鼠作用较弱, 这可能源于表皮样癌 A431 细胞对澳瑞他

汀的敏感性较低。Burns 课题组^[26]使用 Fmoc 固相合成法成功合成了 pHLIP 及其衍生物, 解决了 pHLIP 由于肽链长及疏水性强难合成这一问题。另外从该课题组的研究中可以发现在这些实验条件下, pHLIP 变体的肿瘤抑制作用虽然弱于 pHLIP (WT), 但是不同 pHLIP 变体与澳瑞他汀所形成的共聚物在不同 pH 条件下对不同癌细胞株的治疗效果之间存在差异, 所以可以通过调节 pHLIP (WT) 的序列发展更为优良的 pHLIP 变体, 进一步用于澳瑞他汀抗癌治疗作用的研究。

1.2.4 其他 蛋白酶激活受体 (protease-activated receptor, PAR1) 与多种肿瘤侵袭及转移相关, 被学者们视为肿瘤治疗的一个靶点。P1AP 肽是一种 PAR1 异构肽, 该异构肽可抑制 PAR1 的表达。Burns 课题组^[27]证实 P1AP 与 pHLIP 的偶联物 (pHLIP-P1AP) 以浓度及 pH 依赖方式抑制 PAR1 的活性并诱导肿瘤细胞凋亡。该课题组进行流式细胞术分析, 结果表明 MDA-MB-231 细胞表面高表达 PAR1, 而 MCF7 和 HeLa 细胞则几乎不表达 PAR1。pHLIP-P1AP 的处理结果显示, 在低 pH 和正常 pH 条件下, MCF7 和 HeLa 细胞活性均无显著差异。相反, MDA-MB-231 细胞在低 pH 条件增殖明显受到抑制。可见, pHLIP-P1AP 的抗增殖作用与细胞表面 PAR1 的表达水平相关。在此基础上, 该课题组^[28]借助 pHLIP 的导引对不同抗菌肽 [KLAK、KGGK、KKKK、KAAK、KLLK、(KLAKLAK)₂ 及 KLAKLAK] 抗癌细胞增殖作用进行评价。在发现低 pH 条件下, pHLIP-KLAK 以浓度和 pH 依赖方式抑制 MDA-MB-231 肿瘤细胞增殖。但生理 pH 条件下, pHLIP-KLAK 不影响 MDA-MB-231 细胞的活性。此外, 在所有 pHLIP-4 氨基酸抗菌肽共聚物中, pHLIP-KGGK 的细胞增殖抑制作用最强, 这是由于 pHLIP-KGGK 共聚物的酸性更强。pHLIP-(KLAKLAK)₂ 和 pHLIP-KLAKLAK 共聚物相比其他 pHLIP-抗菌肽共聚物具有更强的细胞增殖抑制作用, 研究显示, 这两种共聚物并不是通过破坏肿瘤细胞膜的完整性诱导细胞凋亡, 而是以 pH 依赖方式穿过

Table 1 Sequences of pHLIP variants^[26]

pHLIP variant	Sequence
WT	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
D25E	AAEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLELALLVDADEGTCG
P20G	AAEQNPIYWARYADWLFTTGLLLDLALLVDADEGTCG
R11Q	AAEQNPIYWAQYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
R11Q/D14Up	AAEQNPIYWAQYDAWLFTTPLLLLDLALLVDADEGTCG
D14Gla/D25Aad	AAEQNPIYWARYAGlaWLFTTPLLLLAadLALLVDADEGTCG

细胞膜、扰乱线粒体膜电位从而发挥抗增殖作用。Burns 课题组^[28]的研究首次实现了使用 pHILIP 转运膜受体调节肽, 尽管目前研究只针对 PAR1 受体, 但人类基因中包括 100 多个受体, 所以利用 pHILIP 介导多肽靶向于肿瘤细胞表达的蛋白酶激活受体颇有希望。

1.3 肽核酸

反义核酸 (microRNA antagonists, anti-miR) 可通过影响多种基因的表达治疗癌症, 然而只有将 anti-miR 运送至肿瘤细胞内才能发挥抗癌作用。但是, anti-miR 分子一般较大且有极性, 所以难以转运至细胞内。Wagner 等^[29]进行了 pHILIP 介导 anti-miR 寡聚核苷酸肽的体内靶向性研究。将 anti-miR-155 肽核酸通过二硫键连接在 pHILIP 末端, 从而把 anti-miR-155 肽核酸转运至肿瘤细胞内。实验表明, 细胞摄取及 pHILIP-anti-miR 肽核酸转运只能在细胞外 pH 6.2 环境下进行, 生理条件 (pH 7.4) 下则不能发生。此外, 寡聚核苷酸肽药物还可用于自发弥散性转基因淋巴瘤模型鼠。Cheng 等^[30]构建了表达 miR-155 的转基因模型鼠 (mir-155^{LSLTA} 模型鼠), 这种 mir-155^{LSLTA} 模型鼠在 2~3 个月龄时可发育成弥散性淋巴瘤模型鼠。研究显示, 连接 pHILIP 后 anti-miR 肽核酸在肝脏中的分布显著降低。同时观察到 pHILIP-anti-miR 具有肾脏靶向作用, 这可能是由于肾小管呈微酸性。该课题组随后又证明了 pHILIP-anti-miR-155 可抑制 mir-155^{LSLTA} 模型鼠肿瘤细胞增殖。静脉注射低剂量 pHILIP-anti-miR-155 可以抑制皮下淋巴瘤生长及转移, 不连接 pHILIP 的 anti-miR-155 肽核酸则没有此作用。pHILIP 的介导解决了 anti-miR 较大分子尺寸和极性阻碍细胞跨膜转运的难题, 开创了 anti-miR 抗癌研究的新传递方式。

HOX 转录反义 RNA (HOTAIR) 与癌症发生密切相关, Özeş 等^[31]设计合成了一种具有降低 HOTAIR 表达的肽核酸, 记为 PNA3。研究表明 PNA3 可沉默 HOTAIR 的表达, 但难以直接靶向肿瘤微酸环境。为此, 该课题组将 pHILIP 与 PNA3 连接形成 pHILIP-PNA3, 使用高度耐铂卵巢癌细胞 (A2780_CR5) 进行实验, 发现 pHILIP-PNA3 在 pH 6.0 条件下可明显降低 A2780_CR5 细胞的存活率, 而在生理 pH 条件下, 对 A2780_CR5 细胞无明显影响。此外, pHILIP-PNA3 可恢复 A2780_CR5 细胞对化疗药物顺铂 (CDDP) 的敏感性。基于携带 A2780_CR5 细胞模型鼠的研究发现, pHILIP-PNA3 与 CDDP 联合使用可使模型鼠肿瘤体积减小, 并且显著提高模型鼠的存活率。

心肌肥大、心力衰竭及心肌缺血等均由 miRNA

失调相关, pHILIP-anti-miR 靶向转运研究具有治疗心脏疾病的潜力。Bernardo 等^[32,33]使用心力衰竭模型鼠、冠状动脉阻塞心肌缺血模型鼠及低流速心肌缺血模型鼠等进行研究, 结果表明 pH 敏感型 WT-pHILIP、pHILIP 变体 3 及附着有 WT-pHILIP 的脂质体均只对病变心肌组织有靶向作用, 而非 pH 敏感型 K-pHILIP 变体 7 及附着有 PEG 的脂质体对病变心肌组织及正常心肌组织无选择性靶向作用。pHILIP-anti-miR 肽核酸的构建为未来 anti-miR 偶联药物的研究提供了新思路。

2 靶向纳米载体递送系统的研究

除了上述荧光探针等分子外, pHILIP 也可介导纳米载体靶向转运至细胞表面, 如纳米粒和脂质体。

2.1 金纳米系统

金纳米粒是一种优良的新型纳米载体, 其粒径一般在 1~150 nm, 具有毒性低、易于与药物分子结合且制备简单等优点。这种载体可用于小分子药物及生物大分子药物的靶向递送^[34], 在药物靶向递送系统中具有广阔应用前景。Davies 等^[35]报道过一种与 pHILIP 有关的新型纳米载体递送系统 pHILIP-EuL-Au, 这种纳米载体递送系统由 pHILIP、发光络合物和金纳米粒组成, 其中金纳米粒作为发光络合物和 pHILIP 的连接中介。这种新型纳米载体递送系统可将每个纳米粒中大约 640 镧系探针传递并内化至血小板。在此基础上, 该课题组进一步研究发现这种纳米载体递送系统只靶向 pH 6.5 的异常血小板而对 pH 7.4 的正常血小板无靶向作用, 说明这种 pHILIP 纳米载体递送系统对微酸环境具有靶向性。

金纳米粒在肿瘤诊疗领域的应用非常广泛, 有学者^[36,37]将纳米金共价结合在 pHILIP 的氨基末端形成纳米金-pHILIP 偶联物, 并对纳米金-pHILIP 偶联物和未连接 pHILIP 的纳米金粒子进行肿瘤靶向性比较。研究表明无论是血管内给药还是肿瘤内给药, 纳米金-pHILIP 偶联物的肿瘤靶向性都明显优于未连接 pHILIP 的纳米金粒子。Antosh 等^[38]使用 A594 细胞对 pHILIP-纳米金与纳米金的肿瘤细胞摄取率进行分析。结果发现, 与纳米金的细胞摄取率相比, pHILIP-纳米金的细胞摄取率显著提高 (约 34%)。随后该课题组又比较了正常生理 pH 条件下 (pH 7.4) 与微酸条件下 (pH 6.0) pHILIP-纳米金的细胞摄取率, 发现微酸条件下 pHILIP-纳米金的细胞摄取率相比正常生理 pH 条件提高了 53%。Yu 等^[39]使用静电学方法成功将二氢卟吩 e6 (Ce6) 和 pHILIP 同时吸附于空心金纳米球 (HAuNS) 表面, 合成具有 pH 靶向性及 NIR 光热治疗效果的 HAuNS-pHILIP-Ce6。在激光照射 5 min

内 HAuNS-pHLIP-Ce6 便可对肿瘤产生光热治疗作用, 随后由于静电作用的减弱将药物释放于靶细胞中。近期, 有报道用 pHLIPs 修饰金纳米星 (GNS), 成功设计了一种 pH 应答式多功能纳米制剂 GNS-pHLIP。使用 MCF-7 细胞及其模型动物对 GNS-pHLIP 的体外及体内靶向性进行研究, 在 pH 6.4 条件下 GNS-pHLIP 的细胞内化作用相比 GNS 提高了 1 倍。GNS-pHLIP 在模型动物肿瘤部位的积累量较 GNS-mPEG 显著增加, 且光热治疗后具有明显肿瘤抑制作用^[40]。由此可见, GNS-pHLIP 在肿瘤成像及治疗中具有良好的潜在应用价值。

2.2 脂质体

Reshetnyak 课题组^[41]首次将 pHLIP 修饰于脂质体表面, 用于介导神经酰胺的选择性传递。研究显示 pHLIP 修饰的脂质体可促进 pH 依赖的细胞膜融合及脂质交换, 使细胞摄取率及载体中的负载药物释放度提高, 进而实现细胞增殖抑制。基于缺血模型小鼠的实验证明, pHLIP 修饰于脂质体后可靶向酸性缺血组织, 而该载体对正常心肌组织没有靶向性, 将脂质体与 PEG 结合的形式对酸性缺血组织则没有靶向性^[32]。

该团队的另一项研究证实, 联合 pHLIP 与脂质体可选择性地将短杆菌肽靶向转运到癌细胞。短杆菌肽插入癌细胞的细胞膜后可使质子流进细胞质, 扰乱其他一价阳离子 (如钠离子和钾离子) 进出细胞膜的动态平衡, 进而导致细胞凋亡^[42]。这说明细胞内外空间离子平衡对于维持细胞正常功能非常重要, 离子膜电导率的变化将导致细胞凋亡。但是, 只有在低 pH 条件下, pHLIP 修饰的载短杆菌肽脂质体才具有这种促凋亡效应。在微酸环境下, pHLIP 插入细胞膜促使载有短杆菌肽的脂质体膜与细胞膜融合, 从而使短杆菌肽插入肿瘤细胞膜并在细胞膜上形成纳米孔扰乱细胞膜离子平衡诱导癌细胞凋亡^[40]。

2.3 其他

有学者将含有游离半胱氨酸的 pHLIP 连接于载多柔比星介孔硅纳米粒表面 (pHLIPss-MSN)^[43]。研究显示, 在生理 pH 7.4 条件下, pHLIPss-MSN 纳米载体与细胞膜松散结合; 在 pH 6.5 条件下, pHLIPss 以螺旋形式插入到脂膜, 随后将载有药物的 MSN 迅速转运到细胞内, 最后通过二硫键裂解及 pHLIP 解离将药物释放到细胞质。该研究对 pHLIPss-MSN 的血清中稳定性进行考察, 结果显示, 随着孵育时间延长, pHLIPss-MSN 和 pHLIPss 的转运能力均逐渐降低, 12 h 后 pHLIPss-MSN 在低 pH 条件下仍然具有促转运效果, 而 pHLIPss 不再具有该作用, 说明 MSN 可

抑制 pHLIPss 在血清中分解, 更有效地保留其跨膜转运功能。

超顺磁性氧化铁纳米粒 (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPION) 是一种用于非侵入性肿瘤核磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 的造影剂, Wei 等^[44]将 PEG 化的极性右旋赖氨酸 (poly-D-lysine, PDL)、pHLIP 和 SPION 组装构建一种 pH 敏感型 SPION 纳米粒 SPION-PDL-pHLIP。该课题组选用 Bel-7402 肝癌细胞进行实验, 结果表明在酸性环境下 pHLIP 可提高 SPION 的细胞累积量。在此基础上, 对 SPION-PDL-pHLIP 的体内肿瘤靶向性进行考察, 基于肝癌 H22 肿瘤模型鼠和人黑色素瘤 B16-F1 模型鼠的核磁共振及荧光成像结果表明, SPION-PDL-pHLIP 选择性积聚在肿瘤部位, 使肿瘤部位的 MIR 成像对比度显著增强, MRI 的敏感性和特异性均得到提高。

与 pHLIP 作为单分子转运体 (单个药物分子与单个 pHLIP 连接) 相比, pHLIP 介导纳米载体 (多个 pHLIP 附着于纳米载体表面) 的靶向转运能够发挥多个 pHLIP 的协同作用, 更有效地促进细胞膜变形^[2]。pHLIP 介导的纳米载体可促进脂质交换膜融合, 同时将疏水药物转运至细胞膜亦或将极性药物转运至细胞质。

3 结论

借助化疗方法治疗癌症的最大问题是药物给健康组织带来的毒性, 使用 pHLIP 将药物以低 pH 依赖方式靶向转运至癌细胞, 在保证药物对癌细胞有杀伤效应的前提下大大减小了其对健康组织的毒性。pHLIPs 家族具有非常广阔的应用前景, 不仅可用于靶向酸性病变组织, 还可通过改变氨基酸序列调节 pHLIP 性质, 进而调节其药动学特性及靶向性。此外, pHLIP 可用于研究新型药物递送系统: ① 单分子转运研究可适用于将极性药物传递到病变组织; ② pHLIPs 与脂质体或纳米粒的结合可促进细胞膜变形融合, 有效运送药物至细胞质或细胞膜。

References

- [1] Hashim AI, Zhang X, Wojtkowiak JW, et al. Imaging pH and metastasis [J]. NMR Biomed, 2011, 24: 582–591.
- [2] Andreev OA, Engelman DM, Reshetnyak YK. Targeting diseased tissues by pHLIP insertion at low cell surface pH [J]. Front Physiol, 2014, 5: 97.
- [3] Hunt JF, Earnest TN, Bouché O, et al. A biophysical study of integral membrane protein folding [J]. Biochemistry, 1997,

- 36: 15156–15176.
- [4] Reshetnyak YK, Segala M, Andreev OA, et al. A monomeric membrane peptide that lives in three worlds: in solution, attached to, and inserted across lipid bilayers [J]. *Biophys J*, 2007, 93: 2363–2372.
- [5] Barrera FN, Weerakkody D, Anderson M, et al. Roles of carboxyl groups in the transmembrane insertion of peptides [J]. *J Mol Biol*, 2011, 413: 359–371.
- [6] Karabadzhak AG, Weerakkody D, Wijesinghe D, et al. Modulation of the pHLIP transmembrane helix insertion pathway [J]. *Biophys J*, 2012, 102: 1846–1855.
- [7] Wijesinghe D, Engelman DM, Andreev OA, et al. Tuning a polar molecule for selective cytoplasmic delivery by a pH (low) insertion peptide [J]. *Biochemistry*, 2011, 50: 10215–10222.
- [8] Andreev OA, Dupuy AD, Segala M, et al. Mechanism and uses of a membrane peptide that targets tumors and other acidic tissues *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 7893–7898.
- [9] Weerakkody D, Moshnikova A, Thakur MS, et al. Family of pH (low) insertion peptides for tumor targeting [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 5834–5839.
- [10] Musial-Siwiek M, Karabadzhak A, Andreev OA, et al. Tuning the insertion properties of pHLIP [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1798: 1041–1046.
- [11] Andreev OA, Karabadzhak AG, Weerakkody D, et al. pH (Low) insertion peptide (pHLIP) inserts across a lipid bilayer as a helix and exits by a different path [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 4081–4086.
- [12] Thévenin D, An M, Engelman DM. pHLIP-mediated translocation of membrane-impermeable molecules into cells [J]. *Chem Biol*, 2009, 16: 754–762.
- [13] Scott HL, Nguyen VP, Alves DS, et al. The negative charge of the membrane has opposite effects on the membrane entry and exit of pH-low insertion peptide [J]. *Biochemistry*, 2015, 54: 1709–1712.
- [14] Deacon JC, Engelman DM, Barrera FN. Targeting acidity in diseased tissues: mechanism and applications of the membrane-inserting peptide, pHLIP [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2015, 565: 40–48.
- [15] Reshetnyak YK. Imaging tumor acidity: pH-low Insertion peptide probe for optoacoustic tomography [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21: 4502–4504.
- [16] Kimbrough CW, Khanal A, Zeiderman M, et al. Targeting acidity in pancreatic adenocarcinoma: multispectral optoacoustic tomography detects pH-low insertion peptide probes *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21: 4576–4585.
- [17] Cruz-Monserrate Z, Roland CL, Deng D, et al. Targeting pancreatic ductal adenocarcinoma acidic microenvironment [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 4410.
- [18] Karabadzhak AG, 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: 2545–2553.
- [19] Tapmeier TT, Moshnikova A, Beech J, et al. The pH low insertion peptide pHLIP variant 3 as a novel marker of acidic malignant lesions [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 9710–9715.
- [20] Adochite RC, Moshnikova A, Golijanin J, et al. Comparative study of tumor targeting and biodistribution of pH (low) insertion peptides (pHLIP® peptides) conjugated with different fluorescent dyes [J]. *Mol Imag Biol*, 2016, 18: 686–696.
- [21] Golijanina J, Aminc A, Moshnikovab A, et al. Targeted imaging of urothelium carcinoma in human bladders by an ICG pHLIP peptide *ex vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: 11829–11834.
- [22] Moldenhauer G, Salnikov AV, Lüttgau S, et al. Therapeutic potential of amanitin-conjugated anti-epithelial cell adhesion molecule monoclonal antibody against pancreatic carcinoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2012, 104: 622–634.
- [23] Moshnikova A, Moshnikova V, Andreev OA, et al. Anti-proliferative effect of pHLIP-amanitin [J]. *Biochemistry*, 2013, 52: 1171–1178.
- [24] Reshetnyak YK, Andreev OA, Lehnert U, et al. Translocation of molecules into cells by pH-dependent insertion of a transmembrane helix [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 6460–6465.
- [25] Burns KE, Robinson MK, Thévenin D. Inhibition of cancer cell proliferation and breast tumor targeting of pHLIP-monomethyl auristatin E conjugates [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12: 1250–1258.
- [26] Burns KE, Hensley H, Robinson MK, et al. Therapeutic efficacy of a family of pHLIP-MMAF conjugates in cancer cells and mouse models [J]. *Mol Pharm*, 2017, 14: 415–422.
- [27] Burns KE, Thévenin D. Down-regulation of PAR1 activity with a pHLIP-based allosteric antagonist induces cancer cell death [J]. *Biochem J*, 2015, 472: 287–295.
- [28] Burns KE, McCleerey TP, Thévenin D. pH-selective cytotoxicity of pHLIP-antimicrobial peptide conjugates [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28465.
- [29] Wagner E. Tumor-targeted delivery of anti-microRNA for cancer therapy: pHLIP is key [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54: 5824–5826.
- [30] Cheng CJ, Bahal R, Babar IA, et al. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment [J].

- Nature, 2015, 518: 107–110.
- [31] Özeş AR, Wang Y, Zong X, et al. Therapeutic targeting using tumor specific peptides inhibits long non-coding RNA HOTAIR activity in ovarian and breast cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 894.
- [32] Bernardo BC, Ooi JY, Lin RC, et al. miRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7: 1771–1792.
- [33] Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Sosunov AA, et al. pH (Low) insertion peptide (pHLIP) targets ischemic myocardium [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 82–86.
- [34] Cui T, Hong J, Ding Y, et al. Polymer-modified gold nanoparticles for cancer therapy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 281–286.
- [35] Davies A, Lewis DJ, Watson SP, et al. pH-controlled delivery of luminescent europium coated nanoparticles into platelets [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: 1862–1867.
- [36] Kyrychenko A. NANOGOLD decorated by pHLIP peptide: comparative force field study [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2015, 17: 12648–12660.
- [37] Yao L, Daniels J, Moshnikova A, et al. pHLIP peptide targets nanogold particles to tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 465–470.
- [38] Antosh MP, Wijesinghe DD, Shrestha S, et al. Enhancement of radiation effect on cancer cells by gold-pHLIP [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 5372–5376.
- [39] Yu M, Guo F, Wang J, et al. A pH-driven and photoresponsive nanocarrier: remotely-controlled by near-infrared light for stepwise antitumor treatment [J]. *Biomaterials*, 2016, 79: 25–35.
- [40] Tian Y, Zhang Y, Teng Z, et al. pH-Dependent transmembrane activity of peptide-functionalized gold nanostars for computed tomography/photoacoustic imaging and photothermal therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 2114–2122.
- [41] Yao L, Daniels J, Wijesinghe D, et al. pHLIP[®]-mediated delivery of PEGylated liposomes to cancer cells [J]. *J Control Release*, 2013, 167: 228–237.
- [42] Wijesinghe D, Arachchige MC, Lu A, et al. pH Dependent transfer of nano-pores into membrane of cancer cells to induce apoptosis [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 3560.
- [43] Zhao Z, Meng H, Wang N, et al. A controlled-release nanocarrier with extracellular pH value driven tumor targeting and translocation for drug delivery [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52: 7487–7491.
- [44] Wei Y, Liao R, Mahmood AA, et al. pH-responsive pHLIP (pH low insertion peptide) nanoclusters of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a tumor-selective MRI contrast agent [J]. *Acta Biomater*, 2017, 55: 194–203.