

PEG 修饰有效提高热休克蛋白 gp96 抑制性多肽抗乳腺癌的功能

刘璐璐^{1#}, 高建伟^{4#}, 李长菲², 武岳⁵, 孟颂东^{2,3}

1 安徽大学 物质科学与信息技术研究院, 安徽 合肥 230039

2 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

3 中国科学院大学, 北京 100049

4 北京康明海慧生物科技有限公司, 北京 100101

5 佛山热休生物技术有限公司, 广东 佛山 528000

刘璐璐, 高建伟, 李长菲, 武岳, 孟颂东. PEG 修饰有效提高热休克蛋白 gp96 抑制性多肽抗乳腺癌的功能. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3363-3378.

LIU LL, GAO JW, LI CF, WU Y, MENG SD. PEGylation effectively improves anti-breast cancer efficiency of heat shock protein gp96 inhibitory polypeptide. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3363-3378.

摘要: 乳腺癌是女性恶性肿瘤中发病率最高的肿瘤, 严重威胁女性生命健康。其中三阴性乳腺癌因其特殊的生理学特点, 成为乳腺癌中预后最差的亚型, 因此急需寻找新的靶点进行治疗来提高患者预后及生存率。多项研究表明, 热休克蛋白 gp96 在多种癌细胞的膜表面过表达, 且胞膜 gp96 与乳腺癌的恶性程度与不良预后密切相关, 因此其可能是乳腺癌治疗的新靶点。前期研究根据 gp96 的结构, 开发一种靶向胞膜 gp96 ATP 结合区的 α 螺旋肽 p37。虽然 p37 多肽作用位点专一, 但其在体内容易被降解, 因此本研究将多肽的 N 端或 C 端分别偶联 PEG₂₀₀₀ 或 PEG₅₀₀₀, 得到 4 个具有抑瘤功能的 PEG 多肽: mPEG₂₀₀₀CY、mPEG₅₀₀₀CY、mPEG₂₀₀₀LC 和 mPEG₅₀₀₀LC。它们可以抑制乳腺癌细胞 SK-BR-3 的增殖和侵袭, 其中抑制效果最明显的是 mPEG₂₀₀₀CY。经测定, mPEG₂₀₀₀CY 在体内的半衰期较多肽 p37 明显延长, 且有效抑制三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 小鼠移植瘤的生长。这为研发新型抗乳腺癌尤其是三阴性乳腺癌的靶向药物提供了依据。

关键词: 肿瘤; 三阴性乳腺癌; 胞膜 gp96; 抑制性多肽; PEG 修饰多肽

Received: January 26, 2022; **Accepted:** April 19, 2022

Supported by: Industrial Innovation Team Grant from Foshan Industrial Technology Research Institute (81761128002); Zhongguancun Frontier Technology Achievement Transformation and Industrialization Project

[#]This author contributed equally to this study

Corresponding author: MENG Songdong. E-mail: mengsd@im.ac.cn

基金项目: 中国科学院佛山产业技术研究院产业创新团队资助 (81761128002); 中关村前沿技术成果转化和产业化项目

PEGylation effectively improves anti-breast cancer efficiency of heat shock protein gp96 inhibitory polypeptide

LIU Lulu^{1#}, GAO Jianwei^{4#}, LI Changfei², WU Yue⁵, MENG Songdong^{2,3}

1 Institutes of Physical Science and Information Technology, Anhui University, Hefei 230039, Anhui, China

2 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 Cominghealth Biotechnology Co. Ltd., Beijing 100101, China

5 Foshan Heat Shock Biotech Co. Ltd., Foshan 528000, Guangdong, China

Abstract: Breast cancer is the most common tumor in female, which seriously threatens the health of women. Triple-negative breast cancer is a subtype with the worst prognosis because of its special physiological characteristics and lack of targeted drugs. Therefore, it is urgent to develop new targeted treatments to improve the prognosis and survival rate of the patients. Previous studies have shown that heat shock protein gp96 is expressed on the membrane of a variety of cancer cells but not on the normal cells. Cell membrane gp96 levels are closely related to the poor prognosis of breast cancer, which may serve as a new target for breast cancer treatment. Based on the structure of gp96, we designed an α -helical peptide p37 that specifically targeting the ATP binding region of gp96. To improve the stability and decrease the degradation of the peptide, the N-terminus or C-terminus of p37 was coupled to PEG₂₀₀₀ or PEG₅₀₀₀ respectively, and four PEGylated polypeptides were obtained: mPEG₂₀₀₀CY, mPEG₅₀₀₀CY, mPEG₂₀₀₀LC, and mPEG₅₀₀₀LC. The PEGylated polypeptides inhibited the proliferation and invasion of breast cancer cell SK-BR-3, among which mPEG₂₀₀₀CY showed the most significant inhibitory effect. The half-life of mPEG₂₀₀₀CY *in vivo* was significantly longer than p37, and it effectively inhibited the growth of xenografted tumors of triple-negative breast cancer MDA-MB-231. The results provide a basis for the development of new targeted drugs against breast cancer, especially the triple-negative breast cancer.

Keywords: cancer; triple-negative breast cancer; cell membrane gp96; inhibitory peptide; PEGylation of peptide

据 2020 年国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 调查数据显示, 全球新发乳腺癌 230 万例, 占全球新发癌症病例的 11.7%, 居所有癌症的首位^[1]。国内女性乳腺癌的发病率、死亡率在恶性肿瘤中排名首位^[2], 严重威胁女性健康。乳腺癌治疗手段包括手术治疗、激素受体的内分泌治疗、放

射治疗、靶向治疗、化学治疗及免疫疗法等, 目前仍以手术切除为主要治疗手段^[3]。其中靶向治疗具有定位准确、针对性强、毒副作用小等特点, 能够明显地延长患者的生存期, 提高患者的生存质量, 尤其适于晚期病人或无法耐受放、化疗的患者。现有的乳腺癌的靶向治疗主要针对的是人表皮生长因子受体 2 (human

epidermal growth factor receptor 2, HER-2) 阳性乳腺癌, 曲妥珠单抗作为全球首个获批上市的抗 HER-2 乳腺癌的靶向药物, 它的应用极大改善了 HER-2 阳性乳腺癌的转归和预后^[4]。对 HER-2 基因扩增和过表达的乳腺癌患者, 曲妥珠单抗单独应用或与其他药物联合应用有效率可分别达到 25% 或 50%。而 HER-2 阳性的乳腺癌患者仅占乳腺癌患者总数的 15%–20%^[3], 因此急需寻找新的乳腺癌靶点, 开发出更为广谱的抗乳腺癌靶向药物。

三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 是指通过免疫组织化学技术或荧光原位杂交技术检测提示雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 及 HER-2 表达均为阴性的乳腺癌^[5], 约占乳腺癌的 15%–20%, 多发于 40–50 岁绝经前的年轻女性^[6]。因其进展迅速、侵袭力强、肿瘤体积大、分化差、复发风险高、预后差、肿瘤负荷高、耐药性强, 且目前没有特效治疗药物及治疗可预测的生物标记物, 5 年生存率约为 60%, 占总体乳腺癌死亡率的 25% 左右, 严重威胁患者的生命健康^[7]。临床研究显示, 30%–40% 的 TNBC 可发生转移^[8], 是各亚型中预后最差的高度异质性肿瘤, 内分泌治疗 (如他莫昔分) 和抗 HER-2 靶向治疗 (如曲妥珠单抗) 对三阴性乳腺癌均无效^[6]。TNBC 仍有一些靶点表达阳性^[9], 故我们可以研发新的靶向治疗手段。

热休克蛋白 gp96 (glycoprotein 96, 糖蛋白 96), 又名 GRP94 (glucose-regulated protein 94, 糖调控蛋白 94), 是 HSP90 家族的重要成员^[10], 在正常生理条件下定位于细胞内质网^[11]。与其他热休克蛋白一样, gp96 的主要生物学功能是分子伴侣。它参与新生蛋白的折叠、转运、降解及多聚体的组装等^[12]。与其他分子伴侣不同的是, gp96 能结合的蛋白、多肽链种类有限,

更具选择性。据报道目前已有 20 多种蛋白的成熟需要 gp96 的参与^[13], 这些研究揭示 gp96 作为分子伴侣与多个客户蛋白形成蛋白质复合物发挥调控作用^[14]。尽管 gp96 在正常细胞中定位于内质网, 但在特定细胞和外界刺激下 gp96 也可能分布于细胞膜表面、高尔基体、细胞核和细胞外环境中^[15–16]。这种现象通常与疾病等慢性应激相关^[17], 受到了许多研究者广泛的关注^[18]。越来越多的研究发现, 细胞膜 gp96 在小鼠 Meth-A 肉瘤细胞、结肠癌和纤维肉瘤细胞等多种癌细胞表面过表达, 提示其与癌症的发生、发展密切相关^[19]。早期研究表明, 胞膜 gp96 在乳腺癌细胞高表达, 但在正常乳腺组织中不表达^[20]。Dejeans 等^[21]研究发现, gp96 在乳腺癌中的过度表达与抵抗氧化应激和促进癌细胞增殖和迁移有关。gp96 在复发性乳腺癌中的表达水平高于原发肿瘤^[22]。最近的研究还表明, gp96 的过表达与乳腺癌患者的脑转移和低生存率有关^[23], 并且发现 gp96 过表达通过 Wnt/ β -catenin 信号通路导致三阴性乳腺癌脑转移^[24]。我们课题组利用 HER-2 过表达的乳腺癌模型证明, 胞膜 gp96 的 N 端结构域 (N-terminal domain, NTD) 与 HER-2 在细胞膜上互作, 从而增加了 HER-2 蛋白的异源二聚化并活化下游细胞信号通路, 促进肿瘤细胞的增殖和侵袭^[25]。同时, 胞膜 gp96 通过与 ER- α 36 互作从而促进乳腺癌细胞的生长和侵袭^[26]。且胞膜 gp96 表达与乳腺癌的恶性程度与不良预后密切相关, 因此胞膜 gp96 可作为包括三阴性乳腺癌在内的乳腺癌治疗的新靶点^[17]。

基于热休克蛋白 gp96 氨基酸序列及空间构象, 我们设计含有 α -螺旋序列的多肽 p37。该多肽能靶向 gp96 的 ATP 结合区, 干扰 gp96 与 HER-2 的相互作用并降低其稳定性、促进 HER-2 在肿瘤细胞中的降解^[27]。虽然多肽类药

物的作用位点专一,但和其他多肽类药物一样,p37的溶解度低、稳定性差、肾脏清除速度快及血浆半衰期短等问题严重地制约了其临床应用^[28]。聚乙二醇修饰又称分子的PEG化,即将多肽连接到非天然聚合物,是最早用于蛋白质修饰的化合物之一。PEG本身是一种不带电的亲水聚合物,不可生物降解,大部分无毒性,是目前已知聚合物中细胞及蛋白吸收水平最低的聚合物^[29-30]。PEG链是由环氧乙烷的重复单位构成的一类高分子化合物^[31]。PEG链延长半衰期主要是通过隐藏肽的抗原决定因素,使抗体无法识别到它是一个异物,并增加其大小而不会被肾脏轻易清除^[32]。本研究尝试对p37多肽进行聚乙二醇修饰,以期增强其稳定性和抗肿瘤活性,这将为研发新型抗乳腺癌的靶向药物提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 主要实验材料

1.1.1 细胞系和实验动物

SK-BR-3细胞和MDA-MB-231细胞购自中国医学科学院基础医学研究所;BALB/c-*nu*小鼠购自北京斯贝福生物技术有限公司;SD大鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司。动物实验遵守相关实验动物福利规定,动物实验方案经中国科学院微生物研究所伦理委员会批准,批准号为APIMCAS2022085。

1.1.2 主要试剂与设备

多肽CY和LC由上海吉尔生化有限公司合成;蛋白gp96由本实验室人员胎盘提取;PEG₂₀₀₀和PEG₅₀₀₀购自北京键凯科技股份有限公司;紫杉醇注射液购自扬子江药业集团有限公司;L-15培养基、RPMI-1640培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Gibco公司;gp96 monoclonal antibody购自Enzo Life

Sciences公司;Cell Counting Kit-8 (CCK-8)检测试剂盒购自DOJINDO公司;Tanswell plate购自Corning公司;Matrigel基质胶购自BD公司;Biacore3 000仪器由中国科学院微生物研究所公共仪器平台提供;分析性高效液相色谱仪、色谱柱Eclipse XDB-C18 Semi-Prep (5 μm, 9.4 mm×250 mm)和XSELECT CSH C18 (5 μm, 4.6 mm×150 mm)购自Agilent公司;游标卡尺购自西安艾瑞泽商贸有限公司。

1.1.3 主要溶液配制

流动相A1液:20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 1 mmol/L EDTA·Na₂, 0.01% NaN₃。

流动相B1液:20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 1 mmol/L EDTA·Na₂, 0.01% NaN₃, 1 000 mmol/L NaCl。

流动相A2液:0.1% TFA (H₂O)。

流动相B2液:0.1% TFA (acetonitrile)。

PBST (0.05%): NaCl 4 g, KCl 0.1 g, KH₂PO₄ 0.12 g, Na₂HPO₄·12H₂O 1.814 g, 25 μL Tween-20, 500 mL, pH 7.4。

HBS缓冲盐溶液:10 mmol/L HEPES, 0.15 mol/L NaCl, 3.4 mol/L EDTA, 0.05% PBST; pH 7.4。

p37和mPEG₂₀₀₀CY母液(动物实验):溶剂为PBS,终浓度分别为8 mg/mL和12 mg/mL。

流动相A液:0.1% TFA (H₂O)。

流动相B液:0.1% TFA (acetonitrile)。

1%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA):1 g BSA,溶于100 mL PBS。

紫杉醇(原始浓度为6 mg/mL,动物实验):按照1:3比例稀释加入PBS。

PEG-p37母液:本实验所有剂量均按照mPEG₂₀₀₀CY中活性多肽部分(p37)计算。高剂量组的实际称样量需要经折算因子1.44折算,详细信息如下:mPEG₂₀₀₀CY的称样量=p37理论需要

量/含多肽的量 (载药率)=p37 理论需要量 \times 1.44。加入 PBS 溶解,使其浓度为 1.44 mg/mL (以称量总量计算),然后用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤至无菌容器,最终得到浓度为 1 mg/mL 的母液。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与传代

SK-BR-3 培养在含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱。MDA-MB-231 培养在含 10%胎牛血清的 L-15 培养液中,置于 37 $^{\circ}$ C、无 CO₂ 的细胞培养箱。两种细胞均为贴壁细胞,传代时需要通过胰酶消化:用移液器吸去培养基,加入 2 mL 磷酸缓冲盐 (phosphate-buffered saline, PBS),清洗 2 次,洗掉残留的培养基,吸去 PBS;加入 2 mL 10% 胰酶,晃动培养皿,使胰酶作用 1–2 min,轻轻拍培养皿侧面,当大部分细胞开始脱落时加入 2 mL 新鲜培养基,混合均匀,终止消化;将消化后的细胞加入 15 mL 离心管中,100 \times g 离心 4 min;倒掉上清,加入 1 mL 新鲜培养基重悬细胞;根据细胞生长速度,接种适当比例的细胞到含有新鲜培养基的培养皿中,轻轻摇晃均匀后,放入培养箱中培养。

1.2.2 乳腺癌模型构建

收集对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,用 PBS 重悬至 3 \times 10⁷ 个/mL,在 BALB/c-nu 小鼠右侧腋下皮下接种 0.2 mL (6 \times 10⁶ 个) 细胞,共接种 5 只 BALB/c-nu 小鼠。接种后每天观察肿瘤生长情况。待肿瘤生长至 500–600 mm³ 时,处死小鼠取出瘤块。在健康 BALB/c-nu 小鼠右侧腋下皮下瘤块移植,每只 BALB/c-nu 小鼠移植的瘤块体积约为 1 mm³,待肿瘤生长至平均体积 70–150 mm³ 左右,根据肿瘤大小随机分组。

1.2.3 多肽的 PEG 化

我们选取一端修饰有马来酰亚胺的 PEG (另一端连接甲氧基),在 p37 的 N 端或 C 端引入

含巯基的半胱氨酸,通过马来酰亚胺与巯基间的 Michael 加成反应,合成 4 种 PEG 化的 p37 多肽,即 mPEG₂₀₀₀CY、mPEG₅₀₀₀CY、mPEG₂₀₀₀LC 和 mPEG₅₀₀₀LC。

CY 为将 p37 的 N 端添加半胱氨酸得到的多肽。LC 为将 p37 的 C 端添加半胱氨酸得到的多肽。PEG 为 mPEG_xMal 结构。甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺, x 为 PEG 的平均分子量;Mal 表示马来酰亚胺,马来酰亚胺修饰在 PEG 的一端;m 表示甲氧基,甲氧基连接在 PEG 的另一端。PEG 化方法如下:(1) 将 20 mg (0.010 mmol) mPEG₂₀₀₀Mal/(0.004 mmol) mPEG₅₀₀₀Mal 与 10 mg (0.002 mmol) 多肽 CY/LC 的混合物溶于 10 mL (5 mmol/L) 的 NaH₂PO₄ 缓冲溶液中,用 5 mmol/L 的 Na₂HPO₄ 溶液调节反应溶液 pH 值至 7.2, HPLC 监测反应,直至多肽反应完全。(2) 采用 HiTrap SP FF (1 mL) 大量纯化连接产物,洗脱液为流动相 A1 液和流动相 B1 液,洗脱条件为:先用 A1 液和 B1 液的体积比分别为 80%和 20%的混合液冲平,再用 A1 液和 B1 液的体积比分别为 67%和 33%的混合液洗脱收集样品。当吸光值开始升高时则开始收集样品。(3) 将收集到的样品用 Millipore 超滤离心管 (3 kDa) 4 $^{\circ}$ C、3 500 r/min 离心浓缩至 500 μ L。浓缩后的样本用 HiTrap Desalting (5 mL) 进行脱盐处理。冻干溶剂后得到的蓬松状态的 PEG 化多肽纯品。p37 的 N 端和 C 端 PEG 修饰原理分别如图 1 和图 2 所示。

mPEG₂₀₀₀CY/mPEG₂₀₀₀LC 纯度由分析型高效液相色谱仪 (流速为 1 mL/min) 给出,色谱柱为 Angilent Eclipse XDB-C18 Semi-Prep (5 μ m, 9.4 mm \times 250 mm)。色谱操作条件:线性梯度洗脱,洗脱液由流动相 A2 液和流动相 B2 液组成。线性梯度洗脱 B2 液的体积百分比由 40%匀速升至 65%,A2 液的体积百分比由 60%匀速降至

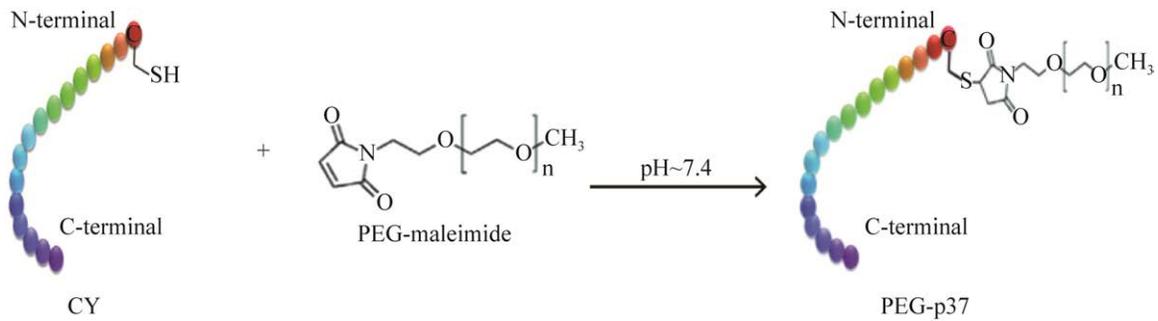


图1 p37的N端PEG修饰

Figure 1 PEG modification on the N-terminal of p37.

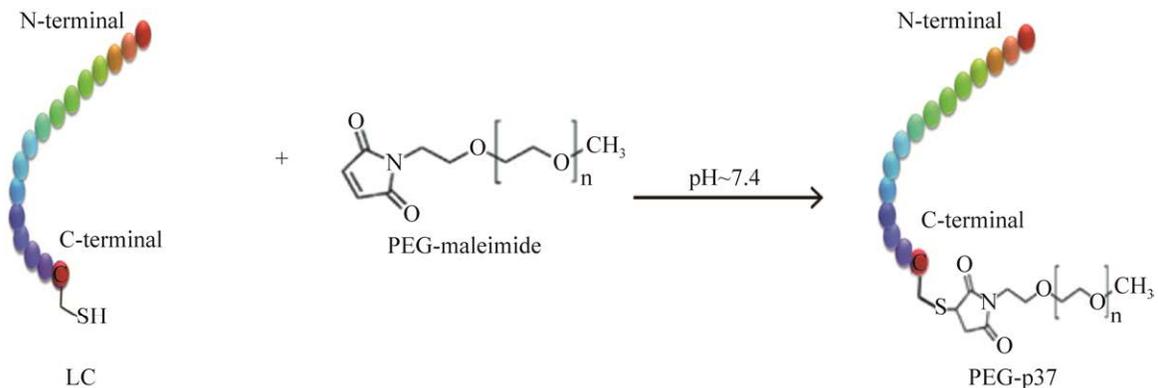


图2 p37的C端PEG修饰

Figure 2 PEG modification on the C-terminal of p37.

35%，洗脱时间 11 min，洗脱流速为 1 mL/min，紫外检测波长 220 nm。

mPEG₅₀₀₀CY/mPEG₅₀₀₀LC 用反相高效液相色谱仪对按照上述步骤所得的反应产物进行纯化，线性梯度洗脱 B2 液的体积百分比由 30% 匀速升至 52%，A2 液的体积百分比由 70% 匀速降至 48%，洗脱时间 11 min，洗脱流速为 2.5 mL/min，紫外检测波长为 220 nm。冻干溶剂后得到蓬松状态的 PEG 多肽纯品。纯度分析同 mPEG₂₀₀₀CY，不同的是线性梯度洗脱 B2 液的体积百分比由 20% 匀速升至 100%，A2 液的体积百分比由 80% 匀速降至 0，洗脱时间 25 min。

1.2.4 药理学实验 (Biacore 和半衰期测定)

通过 Biacore 方法分别检测制备的 PEG 多肽片段与 gp96 蛋白之间的相互作用。检测所用

仪器为 Biacore 3 000 系统，使用 CM5 传感芯片。将浓度为 1 mg/mL 的蛋白 gp96 用不同 pH 值 (5.5、5.0、4.5、4.0) 的缓冲液稀释至 50 μg/mL，体积 100 μL，使其带上不同量的电荷。然后，将蛋白以 5 μL/min 的流速流过芯片表面，观察它与芯片的结合曲线，判断最合适的 pH 条件。取同体积 N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS) 和 N-乙基-N-二甲基-氨丙基碳二亚胺 (N-ethyl-N-dimethyl-aminopropylcarbodiimide, EDC) 混合成 100 μL，12 000 r/min 离心 5 min；取一定体积的 gp96 蛋白，按预结合的比例稀释，稀释后需要 150 μL；取 100 μL 乙醇胺 (ethanolamine) HCl。以上试剂平衡到室温 25 °C 左右，高速离心 5 min。将上述 3 种试剂放在样品架上，设定加样流速为 10 μL/min，点击“inject”选项进样，

使 gp96 偶联在芯片上。设定结合 gp96 的流通池为检测通道,未结合 gp96 蛋白的流通池为参比通道, HBS 缓冲溶液为流动相,流通池的流速为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。将各 PEG 多肽用 HPS 稀释成不同浓度 (156、312、625、1 250、2 500 nmol/L),离心后上样,观察结合过程。

半衰期则使用 UPLC-MS 对各个样品浓度进行测量。用硼砂缓冲液 (pH 9.5) 配制多肽 p37 和 PEG 多肽浓度为 1 mg/mL 的储备液。取该储备液适量用乙腈体积百分比为 50% 的乙腈水溶液配制成多肽浓度为 25.0、37.5、50.0、75.0、100.0、150.0、250.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准曲线工作液。取准备好的标准曲线工作液 20 μL ,加入空白鼠血浆 80 μL ,配制多肽浓度为 5.0、7.5、10.0、15.0、20.0、30.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准曲线样品,标准曲线样品中加入 20 μL 20% (质量百分比) 磷酸溶液和 300 μL 甲醇-乙腈 (甲醇与乙腈的体积比为 1:1),涡旋混匀约 2 min; 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液上样分析,得 2 个多肽的标准曲线,并依该方法配置质控样品检测其精密度。试验动物为雌雄 SD 大鼠,体重 160–180 g, p37 和 mPEG₂₀₀₀CY 多肽分别处理每组 4 只 SD 大鼠,雌雄各 2 只。给药前称定体重,通过静脉注射给药,剂量为 8 mg/kg。给药后,分别在 0 min 和 30 min、1、2、4、6、10、12、24 h 通过尾静脉每次取血 0.3 mL 收集在装有 6 μL 抑肽酶和 5 μL 肝素钠的离心管中,4 500 r/min 离心 5 min 分离上层血浆置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。取 100 μL 待测样本的血浆,加入 20 μL 20% 磷酸溶液、20 μL 50% 乙腈水溶液和 300 μL 甲醇-乙腈 (1:1) 溶液,涡旋混匀约 2 min,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液上样分析。洗脱液由 A 相和 B 相组成,洗脱液中 B 相的体积百分比由 20% 匀速升至 35%,A 相的体积百分比由 80% 匀速降至 65%,洗脱时间

10 min,洗脱流速为 1 mL/min,紫外检测波长为 220 nm,进样体积为 20 μL 。待程序完成后,计算样品峰面积以及对应的浓度。做成代谢曲线,并计算半衰期。

1.2.5 体外杀伤实验

体外杀伤实验采用 CCK-8 方法。取对数生长长期的 SK-BR-3 细胞,用 2 mL PBS 洗 1 次,弃去 PBS 加入胰酶消化,2 min 后加入 RPMI-1640 培养基终止消化并反复吹打。收集后,用 PBS 清洗 1 次,后用血细胞计数板计数,在 96 孔板中每孔加入 7×10^3 个细胞,体积为 100 μL 。将铺好的 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中 24 h。

配制浓度为 20 mg/mL 的各个样品母液,将多肽母液、阳性对照品 (紫杉醇) 和阴性对照 (PBS) 与培养基混合,稀释为 9 个浓度梯度。取出 96 孔板,吸弃旧培养基后,加入含不同浓度样品的培养基,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,每个浓度做 3 个复孔。将 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中 48 h。

48 h 后弃去含药物的培养基,加入含 10% CCK-8 新鲜培养基,110 $\mu\text{L}/\text{孔}$,避免产生气泡。再将 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中 1–4 h。用酶标仪测定 OD_{490} 吸光值,参比波长选择 630 nm。细胞生长抑制率计算公式为: (对照组 $OD_{490-630}$ 平均值 - 实验组 $OD_{490-630}$ 平均值) / 对照组 $OD_{490-630} \times 100\%$ 。

MDA-MA-231 细胞的增殖抑制实验方法同 SK-BR-3 细胞,不同的是 MDA-MB-231 细胞培养方法为用 L-15 培养基无 CO_2 培养箱培养。

1.2.6 细胞侵袭实验

实验前 1 d 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱融化 Matrigel,在 Transwell 上层小室中加入 60 μL 的 Matrigel,37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 1 h, PBS 缓冲液洗涤 2 次。将已消化计数好的乳腺癌细胞 SK-BR-3 用 p37 及 4 个

PEG 多肽的无血清培养液 (终浓度为 $6 \mu\text{mol/L}$) 稀释到 4×10^5 个/mL, 取 $100 \mu\text{L}$ 加入 Transwell 上层小室, Transwell 下层小室加入 $600 \mu\text{L}$ 完全细胞培养液, 作为实验组; 用无血清培养液代替含多肽片段的无血清培养液, 作为阴性对照组。在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 的培养箱中继续培养 24 h , 用棉签刮去上层 Transwell 小室中的细胞, 50% 甲醇/ 50% 丙酮固定 15 min 后, 再用 PBS 缓冲液洗 3 次, DAPI 染色, 荧光显微镜下计数侵袭的细胞数。侵袭抑制率的计算公式为: (阴性对照组中侵袭的细胞数-实验组中侵袭的细胞数)/阴性对照组中侵袭的细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.7 SK-BR-3 和 MDA-MB-231 细胞膜表面 gp96 检测

取对数生长期的 SK-BR-3 和 MDA-MB-231 细胞, 吸弃培养基。PBS 洗 2 次, 加入 1 mL 胰酶, 消化 2 min 。加入 1 mL 含血清培养基终止消化, $100 \times g$ 离心 4 min 。吸弃上清, 用 PBS 洗 3 次。实验组按照 5×10^5 个细胞/ $100 \mu\text{L}$ 混合细胞与抗体溶液, 其中抗体使用浓度为 1% , 溶剂为 1% BSA。室温孵育 1 h 后, 在 $100 \times g$ 条件下离心 4 min , 用 PBS 洗 3 次。 $100 \mu\text{L}$ 用 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 二抗, 抗体使用浓度为 1% , 溶剂为 1% BSA, 室温孵育 30 min 。在 $100 \times g$ 条件下离心 4 min , PBS 洗 3 次后再用 $100 \mu\text{L}$ PBS 重悬。对照组不添加 gp96 抗体。只

加二抗。用流式细胞仪进行检测细胞膜 gp96 表达情况。

1.2.8 体内抑瘤实验

使用上文 1.2.2 构建的乳腺癌小鼠模型, 阴性对照组注射 PBS 溶液, 阳性对照组注射紫杉醇制剂。给药剂量与方式见表 1。给药第 1 天起每 2 d 称量 1 次肿瘤体积, 计算公式为: $V=0.5 \times a \times b^2$ (a 、 b 分别代表肿瘤的长径和短径)。本次试验的试验终点为阴性对照组肿瘤体积均值超过 2000 mm^3 。试验结束后, 剥离瘤块称重并拍照, 将瘤块分别储存在 10% 福尔马林固定液以及液氮中。根据测量的结果计算相对肿瘤抑制率 (TGI) 计算公式为: $\text{RTV}=\text{VT}/\text{VI}$; $\text{T}/\text{C}=\text{TRTV}/\text{CRTV} \times 100\%$; $\text{TGI}=(1-\text{T}/\text{C}) \times 100\%$ (VI 为给药前测量的肿瘤体积, VT 为每次测量的肿瘤体积。 TRTV 为治疗组平均 RTV, CRTV 为对照组平均 RTV)。

2 结果与分析

2.1 PEG 化多肽 p37 的鉴定

用分析型高效液相色谱仪检测结果显示, 所得 mPEG₂₀₀₀CY 的纯度为 93.4% , mPEG₅₀₀₀CY 的纯度为 95.3% , mPEG₂₀₀₀LC 的纯度为 94.7% , mPEG₅₀₀₀LC 的纯度为 92.2% 。利用中国科学院微生物研究所公共仪器平台的质谱系统, 采用 VG PLATFORM 质谱仪, 用 MALDI-TOF 技术进

表 1 抑瘤实验中各实验组给药剂量与方式

Table 1 Dosage and method of administration of each experimental group in the transplanted tumor experiment

Groups	Group name	Quantity	Dosage (mg/kg)	Concentration (mg/mL)	Volume ($\mu\text{L}/\text{mouse}$)	Route	Frequency
1	Negative control	6	N/A	N/A	200	i.v	Q2D
2	Positive control	6	15.0	1.50	200	i.p	BIW
3	Low-dose group	6	2.5	0.25	200	i.v	Q2D
4	Mid-dose group	6	5.0	0.50	200	i.v	Q2D
5	High-dose group	6	10.0	1.00	200	i.v	Q2D

i.v: intravenous injection, i.p: intraperitoneal injection; Q2D: once every two days, BIW: twice every week.

样,鉴定出相应分子量的 PEG 多肽 mPEG₂₀₀₀CY、mPEG₅₀₀₀CY、mPEG₂₀₀₀LC、mPEG₅₀₀₀LC (分别如图 3A、3B、3C、3D 所示)。结果显示, mPEG₂₀₀₀CY 和 mPEG₂₀₀₀LC 的分子量为 6.5 kDa

左右, mPEG₅₀₀₀CY 和 mPEG₅₀₀₀LC 的分子量为 9.5 kDa 左右, 与理论相符。并且 Biacore3 000 的检测结果表明, 4 个 PEG 化多肽 p37 与 gp96 蛋白均有亲和力 (表 2), 仅比 p37 稍低。

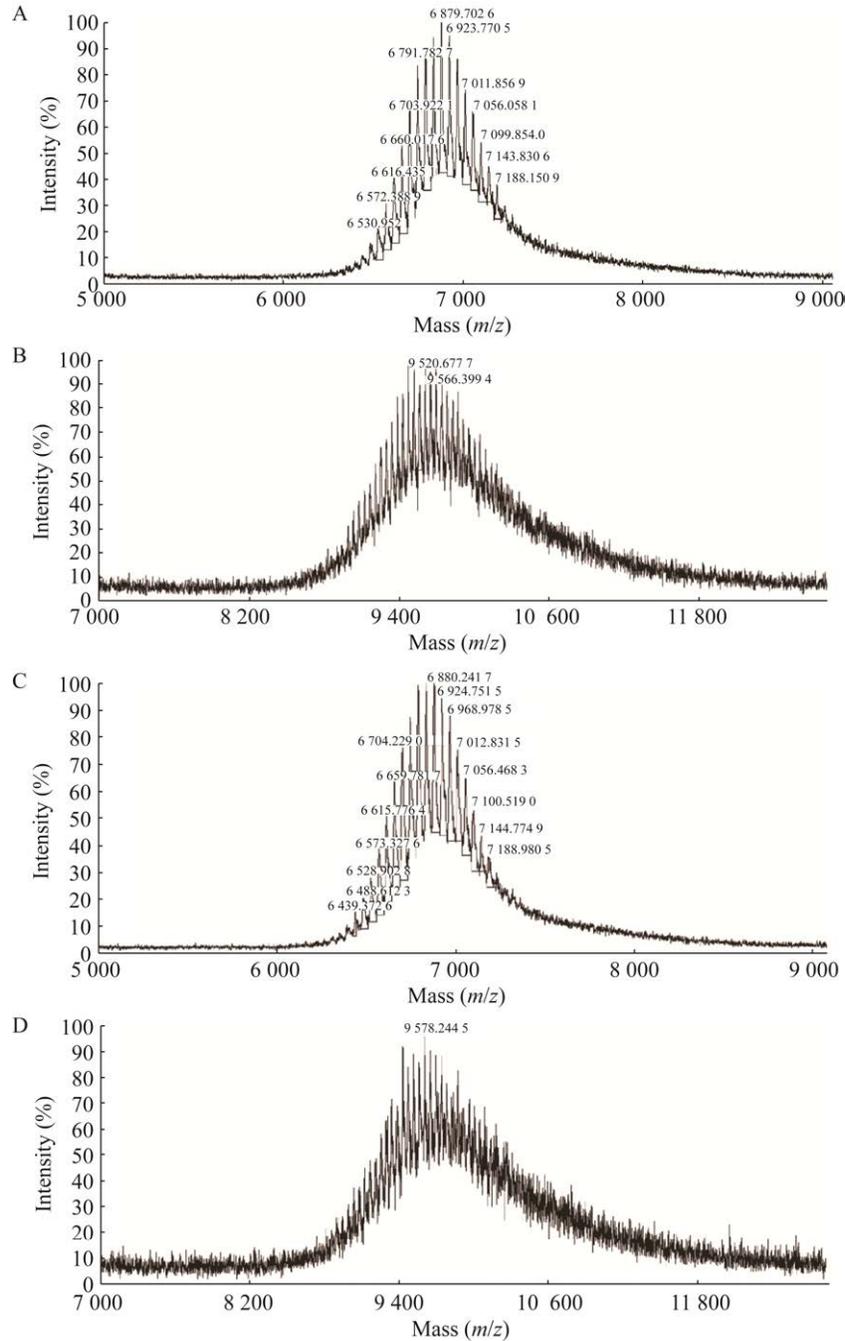


图 3 4 个 PEG 化多肽 p37 的鉴定

Figure 3 Identification of four PEG-conjugated peptides. The molecular weight of mPEG₂₀₀₀CY (A), mPEG₅₀₀₀CY (B), mPEG₂₀₀₀LC (C), and mPEG₅₀₀₀LC (D) is determined by MALDI-TOF-MS.

表 2 PEG 化多肽 p37 与 gp96 结合反应的系数
Table 2 Coefficiency of binding reaction between PEGylated peptide and gp96

Peptide	K_d (mol/L)
P37	6.33×10^{-8}
mPEG ₂₀₀₀ CY	6.90×10^{-8}
mPEG ₅₀₀₀ CY	7.32×10^{-8}
mPEG ₂₀₀₀ LC	7.54×10^{-8}
mPEG ₅₀₀₀ LC	8.23×10^{-8}

2.2 PEG 多肽 p37 对乳腺癌细胞增殖与侵袭的作用

2.2.1 PEG 多肽抑制乳腺癌细胞增殖

流式细胞检测发现, 乳腺癌细胞 SK-BR-3 和 MDA-MB-231 细胞膜上高表达热休克蛋白 gp96 (图 4A), 进一步采用 CCK-8 法检测 p37、PEG-p37 对 SK-BR-3 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的体外增殖抑制作用。阳性对照采用紫杉醇, 阴性对照为 PBS。

在 SK-BR-3 的体外增殖实验中, 紫杉醇浓度为 $0.0234 \mu\text{mol/L}$, 是其对 SK-BR-3 的 IC_{50} 对应浓度。计算得出 p37 对 SK-BR-3 的 IC_{50} 值为 $126.4 \mu\text{mol/L}$ (图 4B 左), 在此 IC_{50} 相同摩尔浓度下, 测试 mPEG₂₀₀₀CY、mPEG₅₀₀₀CY、mPEG₂₀₀₀LC、mPEG₅₀₀₀LC 对 SK-BR-3 的增殖抑制率分别为 58%、48%、33%和 30%, 如图 4B (右) 所示。mPEG₂₀₀₀CY 抑制率最高, 达到 58%。

在 MDA-MB-231 细胞的体外增殖实验中, 紫杉醇浓度为 $0.11 \mu\text{mol/L}$, 是其对 MDA-MB-231 的 IC_{50} 对应浓度。计算得出 p37 对 MDA-MB-231 的 IC_{50} 值为 $281.2 \mu\text{mol/L}$ (图 4C 左), 在此 IC_{50} 相同摩尔浓度下, 测试 mPEG₂₀₀₀CY、mPEG₅₀₀₀CY、mPEG₂₀₀₀LC、mPEG₅₀₀₀LC 对 MDA-MB-231 的增殖抑制率分别为 59.2%、47.3%、36.4%、29.6%, 如图 4C (右) 所示。mPEG₂₀₀₀CY 抑制率最高, 达到 59.2%。

2.2.2 PEG 化多肽 p37 抑制乳腺癌细胞的侵袭

随后, 我们利用 Transwell plate 和 Matrigel 分别检测 p37 和 PEG-p37 对乳腺癌细胞 SK-BR-3 侵袭的影响。结果表明, p37 和 4 个 PEG 多肽能显著抑制乳腺癌细胞 SK-BR-3 的侵袭, 其中 mPEG₂₀₀₀CY、mPEG₅₀₀₀CY、mPEG₂₀₀₀LC、mPEG₅₀₀₀LC 的抑制率分别为 53.8%、41.2%、36.3%和 28.5% (图 5), mPEG₂₀₀₀CY 抑制效果最明显。

2.2.3 PEG 化多肽在 SD 大鼠体内血浆半衰期的评价

根据以上结果, 我们选取对乳腺癌细胞 SK-BR-3 增殖抑制和侵袭抑制效果最明显的 PEG 多肽 mPEG₂₀₀₀CY, 计算其与 p37 的各项药动学参数 (表 3)。结果表明: 相对于 p37, mPEG₂₀₀₀CY 在动物体内的半衰期 ($T_{1/2}$) 明显延长 (p37 vs. mPEG₂₀₀₀CY, 2.44 ± 0.39 vs. 10.90 ± 5.03 , $P < 0.01$); mPEG₂₀₀₀CY 的清除率 (Cl_{F_obs}) 显著低于多肽 p37, 平均滞留时间 (MRT_{last}) 显著延长。以上结果可说明 PEG 多肽 mPEG₂₀₀₀CY 在动物体内代谢时间和稳定性均明显延长, 达到延长药物作用时间的目的。

2.3 mPEG₂₀₀₀CY 抑制三阴性乳腺癌移植瘤生长

鉴于 SK-BR-3 细胞成瘤性较差, 所以选择三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞开展移植瘤实验。动物实验结果表明低剂量 (2.5 mg/kg)、中剂量 (5 mg/kg) 和高剂量 (10 mg/kg) 的 mPEG₂₀₀₀CY 均能显著抑制肿瘤生长, 且对肿瘤的抑制呈剂量依赖性 (图 6A), 低剂量组 TGI 为 60.41%, 中剂量组 TGI 为 84.57%, 高剂量组 TGI 为 79.38%; 中剂量组、高剂量组出现明显抑瘤效果 (TGI > 60%), 且与紫杉醇阳性对照组 (78.95%) 相近。

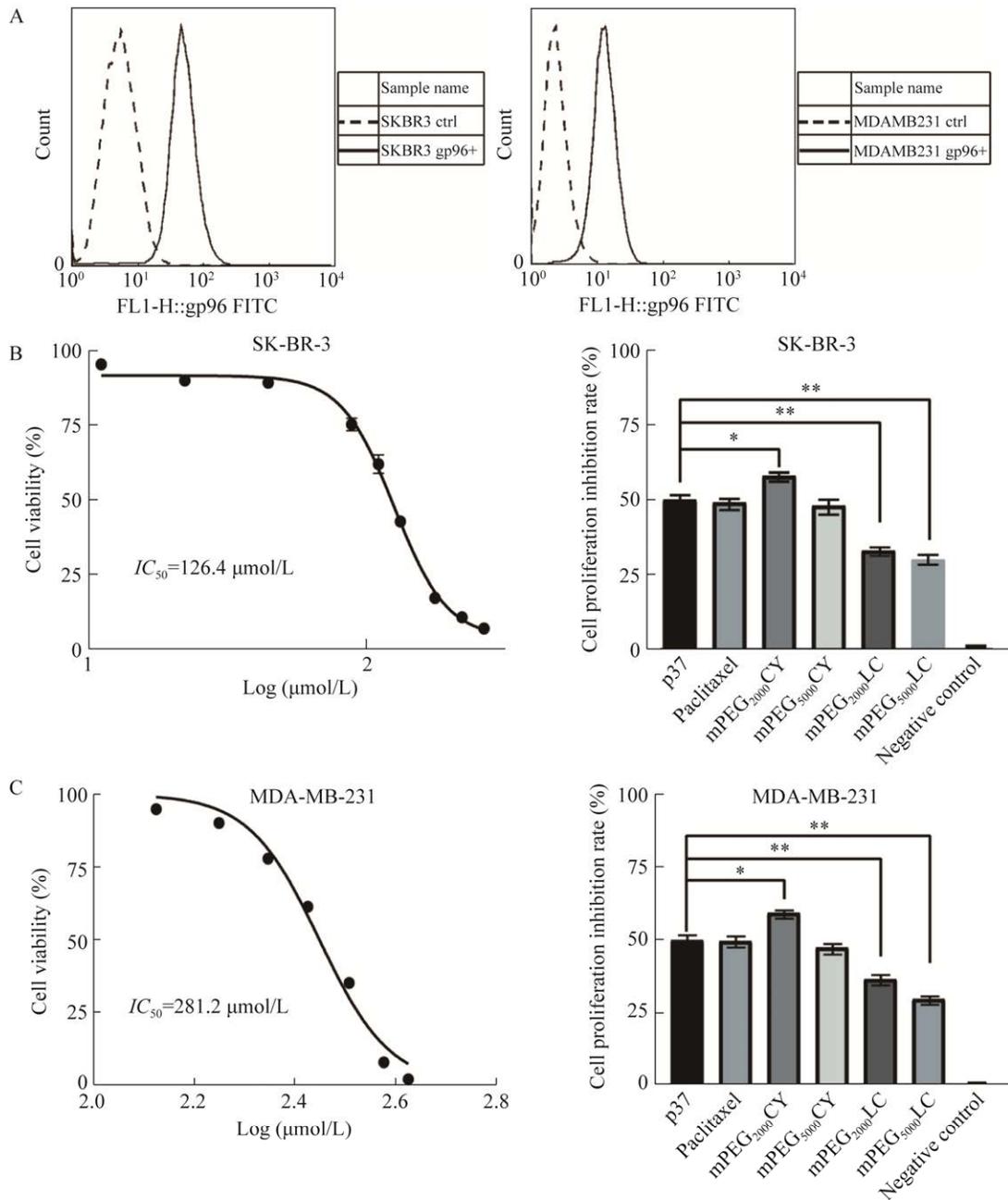


图4 PEG-p37 抑制乳腺癌细胞 SK-BR-3 和 MDA-MB-231 的增殖

Figure 4 PEGylated polypeptide p37 inhibits the proliferation of breast cancer cell SK-BR-3 and MDA-MB-231. (A) Expression of cell membrane gp96 was detected on SK-BR-3 and MDA-MB-231 cells. (B) The effect of SK-BR-3 cell viability under treatment with the indicated concentrations of p37 was determined by CCK-8 assay (left). At the IC_{50} concentration (126.4 $\mu\text{mol/L}$) of p37 on SK-BR-3, the proliferation inhibition rates of mPEG₂₀₀₀CY, mPEG₅₀₀₀CY, mPEG₂₀₀₀LC and mPEG₅₀₀₀LC were determined respectively (right). (C) The effect of MDA-MB-231 cell viability under treatment with the indicated concentrations of p37 was determined by CCK-8 assay (left). At the IC_{50} concentration (281.2 $\mu\text{mol/L}$) of p37 on MDA-MB-231, the proliferation inhibition rates of mPEG₂₀₀₀CY, mPEG₅₀₀₀CY, mPEG₂₀₀₀LC and mPEG₅₀₀₀LC were determined respectively (right). Data were shown as $\bar{x} \pm s$ of three replicates. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ by t -test.

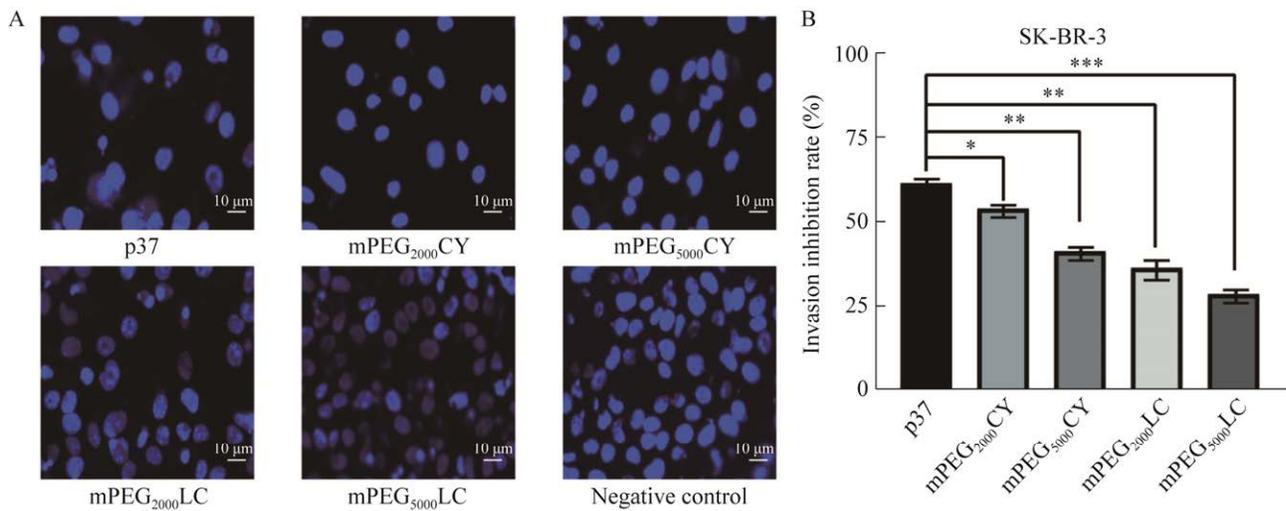


图5 PEG-p37 抑制乳腺癌细胞 SK-BR-3 的侵袭

Figure 5 PEGylated p37 inhibits the invasion of breast cancer cell SK-BR-3. SK-BR-3 cells were treated with p37, mPEG₂₀₀₀CY, mPEG₅₀₀₀CY, mPEG₂₀₀₀LC, or mPEG₅₀₀₀LC for 24 h. Cell invasion was measured by Transwell invasion assay. (A) Images of cells on the other side of the chamber stained by DAPI were shown. (B) The invasion inhibition rates of p37, mPEG₂₀₀₀CY, mPEG₅₀₀₀CY, mPEG₂₀₀₀LC and mPEG₅₀₀₀LC were determined respectively. Data were shown as $\bar{x} \pm s$ of three replicates. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ by t -test.

表3 p37 和 mPEG₂₀₀₀CY 的各项药动学参数

Table 3 The pharmacokinetic parameters of p37 and mPEG₂₀₀₀CY

Peptide	$T_{1/2}$ (h)	T_{max} (h)	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	Cl_{F_obs} (mL/kg)	MRT _{last} (h)
p37	2.44 ± 0.39	0.94 ± 0.17	91.64 ± 26.18	430.66 ± 78.13	1.89 ± 0.31
mPEG ₂₀₀₀ CY	$10.90 \pm 5.03^{**}$	$1.78 \pm 0.29^*$	$79.41 \pm 19.53^*$	$145.31 \pm 23.15^{**}$	$8.45 \pm 2.74^{**}$

Data were shown as $\bar{x} \pm s$ of four mice. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ by t -test.

同时我们对小鼠的总生存期 (overall survival, OS) 进行了评估 (图 6B), 从接受药物治疗开始至小鼠死亡 (判断标准为肿瘤体积 $> 500 \text{ mm}^3$), 得到阴性对照组、低剂量 mPEG₂₀₀₀CY、中剂量 mPEG₂₀₀₀CY、高剂量 mPEG₂₀₀₀CY、紫杉醇阳性对照组的的中位 OS 分别为 27、43、61、59、52 d, 说明中剂量和高剂量 mPEG₂₀₀₀CY 组与其他组相比, 在治疗乳腺癌中有更好的预后。

3 讨论

本研究通过亲和力分析、细胞实验和动物

实验系统考察了不同 PEG 修饰策略 (多肽 N 端和 C 端修饰、不同分子量的 PEG) 对 p37 多肽抗乳腺癌功能的影响, 我们得到 4 种 PEG 修饰的抑制乳腺癌的 p37 多肽, 分别是 N 端 PEG 修饰的 mPEG₂₀₀₀CY 和 mPEG₅₀₀₀CY, C 端 PEG 修饰的 mPEG₂₀₀₀LC 和 mPEG₅₀₀₀LC。我们检测了 4 个 PEG 多肽对乳腺癌细胞 SK-BR-3 的增殖及侵袭力影响, 结果显示 N 端 PEG 修饰的多肽比 C 端 PEG 修饰的多肽对 SK-BR-3 的增殖和侵袭的抑制效果更强, 其中 mPEG₂₀₀₀CY 的抑制效果最明显。因此我们选择 mPEG₂₀₀₀CY, 计算它和未修饰的多肽 p37 的各项药动学参数, 结果

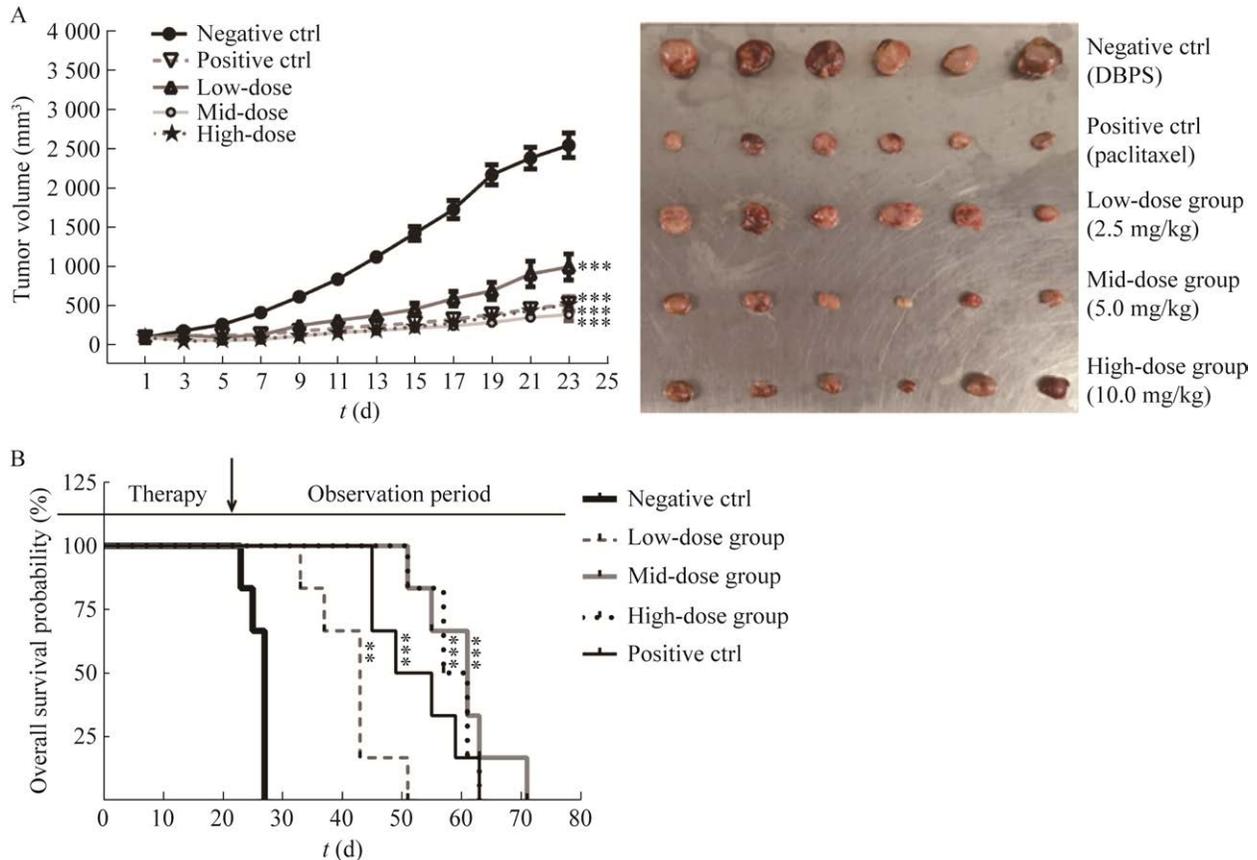


图 6 mPEG₂₀₀₀CY 抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的移植瘤生长，延长荷瘤小鼠的生存期

Figure 6 mPEG₂₀₀₀CY inhibits the tumor growth of transplanted breast cancer cell MDA-MB-231. (A) Effect of mPEG₂₀₀₀CY treatment on tumor growth, determined by measuring implanted tumor volume at the indicated times (left) and tumor weight (right) at day 23 post treatment when the nude mice were sacrificed. Mice treated with PBS or paclitaxel served as negative or positive control. (B) Overall survival from treatment to death (tumor volume > 2 500 mm³) for each group. Data were shown as $\bar{x} \pm s$ of six mice. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ by t -test.

显示，PEG 修饰的多肽在大鼠体内的半衰期明显延长、肾脏清除率显著降低、平均滞留时间显著延长。说明 PEG 修饰的确可以增加多肽在体内的稳定性，延长其作用时间。进一步通过荷瘤小鼠实验验证 mPEG₂₀₀₀CY 有效抑制乳腺癌肿瘤生长，为研发靶向胞膜 gp96 的新型靶向药物提供了依据。

细胞实验发现与 p37 多肽相比，mPEG₂₀₀₀CY 对乳腺癌细胞增殖的抑制明显增强，但抑制细胞侵袭性的活性减弱 (图 4 和图 5)，造成不一

致的原因可能是 p37 和 mPEG₂₀₀₀CY 靶向胞膜 gp96 后对不同 gp96 客户蛋白 HER2、EGFR、ER- α 36、uPAR 的稳定性和下游通路的抑制程度存在一定差异^[25-26,33]，例如 HER2/EGFR 通路在促进乳腺癌细胞增殖方面发挥重要作用，而 uPAR 则主要促进细胞侵袭，具体分子机制需要进一步研究。此外，本研究通过 gp96 结合亲和力实验、体外细胞增殖和侵袭实验验证与 p37 相比，mPEG₂₀₀₀CY 具有大致类似的亲和力和抑制活性，而 mPEG₂₀₀₀CY 在动物体内的半衰期

增加约 4.5 倍 (表 3), 提示 mPEG₂₀₀₀CY 在体内具有更高的抑瘤功能, 因此体内抑瘤实验使用低、中、高剂量的 mPEG₂₀₀₀CY, 研究其对乳腺肿瘤生长的抑制效果。

本文中使用的细胞系包括 HER-2 阳性的乳腺癌细胞系 SK-BR-3 和三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231, gp96 在这两种细胞系的膜表面均有高表达。对于 HER-2+乳腺癌细胞, mPEG₂₀₀₀CY 的作用机制是可能包括干扰胞膜 gp96 与 HER-2 相互作用并降低其稳定性、促进 HER-2 降解; 而对于 MDA-MB-231, mPEG₂₀₀₀CY 的作用机制可能是干扰 gp96 与 ER- α 36、uPAR 相互作用, 从而降低这些客户蛋白的稳定性。

我们对 p37 PEG 化延长其半衰期, 主要目的是增强其在体内抗肿瘤的功能、降低毒副作用, 我们通过前期动物试验观察发现 p37 存在肾脏清除速度快、血浆半衰期短和小鼠皮肤的刺激性大、容易造成注射部位皮肤溃烂等缺陷, 对多肽 PEG 修饰后的 mPEG₂₀₀₀CY 对小鼠的上述毒副作用明显减弱, 尤其是皮肤刺激性基本消失 (未发表数据), 我们推测可能与药物溶解性提高、降低药物在注射部位和血管壁的沉积有关, 因此药物的成药性显著提高。通过本研究证明 mPEG₂₀₀₀CY 可明显抑制小鼠移植瘤的生长、延长荷瘤小鼠的生存期, 对皮下荷瘤小鼠生存期的延长可能与药物有效抑制体内乳腺癌细胞的侵袭和转移有关。

目前临床治疗三阴性乳腺癌的药物为紫杉醇和靶向 PD-1 或 PD-L1 抗体药物联合使用, 单纯紫杉醇治疗并不能达到预期疗效, 鉴于本研究中荷瘤小鼠为 BALB/c-nu 裸鼠, 不适用 PD-1 或 PD-L1 抗体, 因此抑瘤实验中阳性对照为单独使用紫杉醇。紫杉醇属于广谱化疗药, 它通过与细胞骨架蛋白微管蛋白结合而促进细胞凋亡, mPEG₂₀₀₀CY 属于靶向药物, 通过靶向

胞膜 gp96、降低其通路客户的稳定性来发挥作用, 因此紫杉醇和 mPEG₂₀₀₀CY 的作用机理不同, 使用紫杉醇并不是最合适的阳性对照, 但由于三阴性乳腺癌目前临床上缺乏有效的治疗药物, 选择合适的对照药物仍具有一定难度。

PEG 分子作为一种良好的修饰材料在生物制药领域被广泛用于修饰各种蛋白、酶和药物转运载体, PEG 修饰后的蛋白多肽能降低免疫原性与免疫反应性, 增加分子的大小、质量, 减少组织器官的摄取, 最终通过改变药代动力学的方式有效地解决了困扰其临床应用的一系列问题^[34]。

基于 gp96 独特的结构域, 已经发现多种特异性化合物^[35], 如 PU-H54、PU-WS13 和 PU-H39 等, 这些化合物多数为靶向 HSP90、gp96 的 ATP 结合区及其调控区域^[36]。有研究通过化合物库筛选与模拟、并与计算分析相结合, 发现了一种靶向 gp96 嘌呤结构的选择性抑制剂 PU-H54^[37]。对该化合物进一步结构修饰后, 得到具有更强特异性的化合物 PU-WS13。PU-WS13 的发现为研究 gp96 的分子伴侣功能提供了新的工具^[38]。Hua 等^[39]的研究表明, PU-WS13 可以通过靶向抑制 gp96 活性, 阻断 Wnt/LRP Survivin 通路, 抑制骨髓瘤细胞生长并诱导其发生凋亡和坏死, 为多发性骨髓瘤的治疗提供了新的思路。Rothan 等^[40]的研究发现, PU-WS13 还可以抑制登革热病毒和寨卡病毒的复制, 是黄病毒感染的有效小分子抑制剂。这些研究结果显示, gp96 是多种疾病和癌症的潜在药物靶标, 因此以 gp96 为靶点的药物开发具有巨大前景。

然而, gp96 作为重要分子伴侣在几乎所有的有核细胞 (包括正常细胞) 中表达, 并具有重要生理功能, 以上靶向 HSP90、gp96 的小分子化合物不可避免地也进入正常细胞, 如果用于肿瘤治疗必将带来多种毒副作用。越来越多

的证据表明, 细胞膜 gp96 可作为治疗多种恶性肿瘤的新型靶点^[20], 这为设计特异性靶向胞膜 gp96 的药物提供了可能, 由于正常细胞表面并不表达 gp96, 所以设计靶向胞膜 gp96 的药物可避免小分子化合物干扰正常细胞生理功能所带来的潜在毒副作用。鉴于目前三阴性乳腺癌急需研发新型靶向药物, mPEG₂₀₀₀CY 有望开发成为特异性高、毒副作用小的新型治疗乳腺癌和三阴性乳腺癌的靶向药物。

REFERENCES

- [1] 史润泽, 李志高. 三阴性乳腺癌各亚型精准医疗策略研究进展. 实用肿瘤学杂志, 2021, 35(6): 529-533. Shi RZ, Li ZG. Research progress of precision medical strategy for different subtypes of triple negative breast cancer. *Pract Oncol J*, 2021, 35(6): 529-533 (in Chinese).
- [2] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] 何馨彤, 王上, 张紫箏, 等. HER2 阳性乳腺癌靶向治疗药物的临床研究进展. 药物评价研究, 2021, 44(12): 2697-2704. He XT, Wang S, Zhang ZZ, et al. Clinical research progress of targeted therapy for HER2-positive breast cancer. *Drug Eval Res*, 2021, 44(12): 2697-2704 (in Chinese).
- [4] 张爱玲, 温润耀. 乳腺癌的诊治进展. 当代医学, 2021, 27(34): 1-4. Zhang AL, Wen RY. Progresses in diagnosis and treatment of breast cancer. *Contemp Med*, 2021, 27(34): 1-4 (in Chinese).
- [5] Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(11): 674-690.
- [6] 毛婷, 毛玲, 管晓翔. PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂治疗三阴性乳腺癌的研究进展. 东南国防医药, 2021, 23(5): 511-515. Mao T, Mao L, Guan XX. Research progress of PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in the treatment of triple negative breast cancer. *Mil Med J Southeast China*, 2021, 23(5): 511-515 (in Chinese).
- [7] Rigidacciolo DC, Nohata N, Lappano R, et al. IGF-1/IGF-1R/FAK/YAP transduction signaling prompts growth effects in triple-negative breast cancer (TNBC) cells. *Cells*, 2020, 9(4): 1010.
- [8] 杨小平, 杨哲, 崔洁, 等. 三阴性乳腺癌的分子靶向治疗进展. 海南医学, 2014, 25(24): 3675-3677. Yang XP, Yang Z, Cui J, et al. Progress of molecular targeted therapy for triple negative breast cancer. *Hainan Med J*, 2014, 25(24): 3675-3677 (in Chinese).
- [9] 董国雷, 赵伟鹏, 佟仲生. 三阴性乳腺癌靶向治疗进展. 中国肿瘤临床, 2019, 46(12): 649-652. Dong GL, Zhao WP, Tong ZS. Advances in targeted therapy for triple-negative breast cancer. *Chin J Clin Oncol*, 2019, 46(12): 649-652 (in Chinese).
- [10] 高熙, 李三强. 热休克蛋白 Gp96 在肝癌、肝纤维化、乙型肝炎中作用的研究进展. 肿瘤基础与临床, 2019, 32(6): 550-552. Gao X, Li SQ. Research progress on the role of heat shock protein Gp96 in liver cancer, liver fibrosis and hepatitis B. *J Basic Clin Oncol*, 2019, 32(6): 550-552 (in Chinese).
- [11] Liu ES, Lee AS. Common sets of nuclear factors binding to the conserved promoter sequence motif of two coordinately regulated ER protein genes, GRP78 and GRP94. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(19): 5425-5431.
- [12] Hummasti S, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res*, 2010, 107(5): 579-591.
- [13] Wu B, Chu XY, Feng C, et al. Heat shock protein gp96 decreases p53 stability by regulating Mdm2 E3 ligase activity in liver cancer. *Cancer Lett*, 2015, 359(2): 325-334.
- [14] Rachidi S, Sun SL, Li ZH. Endoplasmic reticulum heat shock protein gp96/grp94 is a pro-oncogenic chaperone, not a tumor suppressor. *Hepatology*, 2015, 61(5): 1766-1767.
- [15] Robert J, Ménoret A, Cohen N. Cell surface expression of the endoplasmic reticular heat shock protein gp96 is phylogenetically conserved. *J Immunol*, 1999, 163(8): 4133-4139.
- [16] Altmeyer A, Maki RG, Feldweg AM, et al. Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96. *Int J Cancer*, 1996, 69(4): 340-349.
- [17] Yan PR, Patel HJ, Sharma S, et al. Molecular stressors engender protein connectivity dysfunction through aberrant N-glycosylation of a chaperone. *Cell Rep*, 2020, 31(13): 107840.
- [18] Kim JW, Cho YB, Lee S. Cell surface GRP94 as a

- novel emerging therapeutic target for monoclonal antibody cancer therapy. *Cells*, 2021, 10(3): 670.
- [19] Lee JH, Kang KW, Kim JE, et al. Differential expression of heat shock protein 90 isoforms in small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(8): 9487-9493.
- [20] Duan XF, Iwanowycz S, Ngoi S, et al. Molecular chaperone GRP94/GP96 in cancers: oncogenesis and therapeutic target. *Front Oncol*, 2021, 11: 629846.
- [21] Dejeans N, Glorieux C, Guenin S, et al. Overexpression of GRP94 in breast cancer cells resistant to oxidative stress promotes high levels of cancer cell proliferation and migration: implications for tumor recurrence. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(6): 993-1002.
- [22] Langer R, Feith M, Siewert JR, et al. Expression and clinical significance of glucose regulated proteins GRP78 (BiP) and GRP94 (GP96) in human adenocarcinomas of the esophagus. *BMC Cancer*, 2008, 8: 70.
- [23] Sanz-Pamplona R, Aragüés R, Driouch K, et al. Expression of endoplasmic reticulum stress proteins is a candidate marker of brain metastasis in both ErbB-2+ and ErbB-2- primary breast tumors. *Am J Pathol*, 2011, 179(2): 564-579.
- [24] Smid M, Wang YX, Zhang Y, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*, 2008, 68(9): 3108-3114.
- [25] Li X, Sun L, Hou JW, et al. Cell membrane gp96 facilitates HER2 dimerization and serves as a novel target in breast cancer. *Int J Cancer*, 2015, 137(3): 512-524.
- [26] Hou JW, Deng MM, Li X, et al. Chaperone gp96 mediates ER- α 36 cell membrane expression. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 31857-31867.
- [27] Li X, Wang BZ, Liu WW, et al. Blockage of conformational changes of heat shock protein gp96 on cell membrane by a α -helix peptide inhibits HER2 dimerization and signaling in breast cancer. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124647.
- [28] Werle M, Bernkop-Schnürch A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids*, 2006, 30(4): 351-367.
- [29] Davis FF. The origin of peganology. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(4): 457-458.
- [30] Jevsevar S, Kunstelj M, Porekar VG. PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnol J*, 2010, 5(1): 113-128.
- [31] 杨旭, 贡济宇. 蛋白多肽类药物聚乙二醇化修饰研究进展. *中国当代医药*, 2012, 19(31): 16-17, 20. Yang X, Gong JY. Research progress on PEGylation of protein and peptide drugs. *China Mod Med*, 2012, 19(31): 16-17, 20 (in Chinese).
- [32] 庞丽然, 贺丞, 魏敬双, 等. 蛋白多肽类药物长效化技术研究策略. *生物技术进展*, 2021, 11(3): 304-310. Pang LR, He C, Wei JS, et al. Research strategy on long-acting technology of protein and peptide drugs. *Curr Biotechnol*, 2021, 11(3): 304-310 (in Chinese).
- [33] Hou JW, Li X, Li CF, et al. Plasma membrane gp96 enhances invasion and metastatic potential of liver cancer via regulation of uPAR. *Mol Oncol*, 2015, 9(7): 1312-1323.
- [34] 刘洪涛, 尚明美, 宋海峰. 聚乙二醇化修饰对蛋白多肽类药物药代动力学的影响. *生物技术通讯*, 2005, 16(5): 577-579. Liu HT, Shang MM, Song HF. The effects of pegylation on the pharmacokinetics of polypeptide. *Lett Biotechnol*, 2005, 16(5): 577-579 (in Chinese).
- [35] Duerfeldt AS, Peterson LB, Maynard JC, et al. Development of a Grp94 inhibitor. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(23): 9796-9804.
- [36] Wu BX, Hong F, Zhang YL, et al. GRP94/gp96 in cancer: biology, structure, immunology, and drug development. *Adv Cancer Res*, 2016, 129: 165-190.
- [37] Patel PD, Yan PR, Seidler PM, et al. Paralog-selective Hsp90 inhibitors define tumor-specific regulation of HER2. *Nat Chem Biol*, 2013, 9(11): 677-684.
- [38] Patel HJ, Patel PD, Ochiana SO, et al. Structure-activity relationship in a purine-scaffold compound series with selectivity for the endoplasmic reticulum Hsp90 paralog Grp94. *J Med Chem*, 2015, 58(9): 3922-3943.
- [39] Hua YP, White-Gilbertson S, Kellner J, et al. Molecular chaperone gp96 is a novel therapeutic target of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(22): 6242-6251.
- [40] Rothan HA, Zhong YW, Sanborn MA, et al. Small molecule grp94 inhibitors block dengue and zika virus replication. *Antiviral Res*, 2019, 171: 104590.

(本文责编 陈宏宇)