

质谱在金属抗癌药物与蛋白质相互作用研究中的应用

胡文兵, 汪福意

(中国科学院化学研究所, 北京分子科学国家实验室, 北京 100190)

摘要: 研究细胞毒性金属抗肿瘤药物与蛋白质的相互作用, 以及这种相互作用对药物的细胞摄入、转运、代谢和生物利用度的影响, 对金属抗癌药物的结构设计和优化, 提高药物的抗癌活性, 降低毒副作用具有重要意义。基于软电离技术的电喷雾质谱和基质辅助激光解析电离质谱能够在分析检测过程中很好的保留金属抗癌药物与蛋白质的共价(配位)结合, 获得药物与蛋白质结合位点的信息。同时, 质谱分析还具有灵敏度高, 所需样品量少, 耗时短以及适用于分析复杂生物样品等优点, 已成为研究金属抗癌药物与蛋白质相互作用最强有力的工具, 在为药物发现提供大量化学、生物信息的同时, 也极大地促进了质谱技术自身的发展。本文将结合我们在金属抗癌药物相互作用组学研究中取得的最新进展, 系统地总结、评述 Bottom-up 和 Top-down 质谱分析方法在铂、钌类金属抗癌药物与蛋白质相互作用研究中的发展动态, 并分析这一前沿交叉领域未来的发展趋势。

关键词: 质谱; 金属抗癌药物; 蛋白质; 相互作用

中图分类号: O 657. 63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2010)06-0354-08

Application of Mass Spectrometry in Research on the Interactions of Anticancer Metallodrugs with Proteins

HU Wen-bing, WANG Fu-yi

(Beijing National Laboratory for Molecular Science, Institute of Chemistry,
Chinese Academy of Science, Beijing 100190, China)

Abstract: Investigating the interactions of anticancer metallodrugs with proteins, as well as their effects on the process of drug transport, cellular uptake, metabolism and bioavailability, is very important for structure-based design, improvement of activity and reduction of side effects of anticancer metallodrugs. The soft ionization mass spectrometry including ESI and MALDI can greatly preserve the coordination of drug molecules to biomolecules during the performance, and provide direct information on the binding sites of metallodrugs on proteins. Additionally, mass spectrometry has many advantages such as high sensitivity, low sample consumption, speed, suitable for complex biological samples and so on. Thus, it has become the most powerful tool for studying the interactions of anticancer metallodrugs

收稿日期: 2010-10-08; **修回日期:** 2010-11-10

基金项目: 国家自然科学基金(20975103, 90713020), 科技部 973 重大基础研究项目(2007CB935601)资助

作者简介: 胡文兵(1983~), 男(汉族), 博士研究生, 分析化学专业。E-mail: wenbhu@iccas. ac. cn

通信作者: 汪福意(1964~), 男(汉族), 研究员, 博士生导师。E-mail: fuyi. wang@iccas. ac. cn

with proteins. The increasing researches on this field provide not only valuable chemical and biological information for drug discovery, but also greatly promote mass spectrometry itself. Bases on the update progress of our own group on the interactomic studies of anticancer metallodrugs, we presents a review of the latest achievements of research on the interactions of platinum- and ruthenium-based anticancer drugs (or candidates) with proteins using bottom-up and top-down mass spectrometric approaches. A brief analysis on the possible future research trends and development in this area is also given.

Key words: mass spectrometry; anticancer metallodrug; protein; interaction

40 多年前,顺铂被发现具有抗癌活性,并于 1978 年进入临床使用,开启了金属配合物作为抗癌药物的新时代。顺铂和第二代铂类抗癌药物卡铂,第三代铂类抗癌药物奥沙利铂已广泛应用于睾丸癌、卵巢癌、脑癌、膀胱癌等恶性肿瘤的治疗中^[1-2]。铂类抗癌药物与 DNA 分子内的鸟嘌呤和腺嘌呤(主要是鸟嘌呤)配位,形成链内或链间复合物,破坏 DNA 的构象,从而阻止细胞内 DNA 的复制,诱导癌细胞的凋亡或者坏死^[3-5]。正因为 DNA 被认为是铂类药物的终极作用靶标,在过去的 30 年,研究者的目光主要集中在研究铂类药物与 DNA 的相互作用^[1,4]。但是,铂类抗癌药物中的铂原子具有很高的反应活性,除与 DNA 反应外,还易与蛋白质分子中的亲核基团结合,如半胱氨酸残基的巯基、蛋氨酸残基的硫甲基和组氨酸残基的咪唑环等^[6-8]。因而,铂类金属抗癌药物经静脉注射给药后,在达到终极作用靶标 DNA 前,会与血液中以及细胞内的蛋白质广泛作用,对药物在人体内的摄入、转运、分布和生物利用度等起着至关重要的作用^[6, 9-10]。此外,如果药物与蛋白质之间的这种相互作用是不可逆的,则可能导致金属药物在组织中的累积和聚集,从而产生毒副作用,如中毒性肾毒性和耳毒性等^[11]。铂类金属抗癌药物与细胞内负责药物输入和排泄的蛋白质相互作用,如铜转蛋白(CTR1)、腺苷三磷酸酶 7A/7B(ATPases7A/7B)等,与癌细胞获得性或先天性的耐药性密切相关^[12]。

顺铂和第二代、第三代铂类抗癌药物与非 DNA 生物分子的相互作用导致严重的毒副作用,以及癌细胞对铂类药物先天性和获得性的抗药性,促使药物化学家们将目光转向其他金属化合物。其中,三价钆配合物 NAMI-A、KP1019 和二价钆芳烃基配合物是最有临床应用前景的两类抗癌候选药物。三价钆配合物 NAMI-A 和

KP1019 已完成 1 期临床试验^[13-14]。NAMI-A 只对转移的肿瘤细胞具有抑制活性,其终极作用靶标仍然不明确,有文献报道认为其作用靶标可能是控制肿瘤细胞转移的蛋白质/酶,而不是 DNA。In vivo 研究表明,NAMI-A 类抗癌化合物在静脉注射给药后,80%~90%的钆与血清白蛋白结合^[13]。在临床前实验中,二价钆有机金属配合物 HC11 对异种移植的卵巢癌表现出与顺铂相当的抑制活性^[15]。与铂类药物相似,DNA 也是有机金属钆抗癌化合物的潜在作用靶标^[16-17]。但是,有机金属钆抗癌化合物同样对半胱氨酸、蛋氨酸^[18]和组氨酸^[19]以及多肽和蛋白质^[20-21]中的这 3 种氨基酸残基表现出不同程度的反应活性。所以,研究金属抗肿瘤药物与蛋白质的相互作用,以及这种相互作用对药物细胞摄入、转运以及代谢和生物利用度的影响,有利于金属抗癌药物的结构设计和优化,提高药物的抗癌活性、降低毒副作用。

研究药物与生物靶分子相互作用的方法主要有 X-射线晶体衍射(XRD),核磁共振(NMR)波谱和质谱(MS)。由于药物-生物大分子复合物的单晶通常是在非生理环境下培养的,尽管 XRD 能准确的鉴定药物与靶分子的结合位点,但晶体学解析数据有时并不能客观、真实地反映药物与生物分子相互作用的动态过程。NMR 能直接分析溶液状态下生物大分子及其复合物的三维结构,全面地记录模拟生理条件下小分子和生物大分子相互作用的动态过程。但是,NMR 在药物相互作用研究中的应用还存在一些急需解决的问题,如耗样量大、灵敏度低、只能分析单一组分的生物大分子-药物复合物等。对复杂生物样品,如血清、血浆或细胞内低丰度、大分子量蛋白质与药物分子形成的复合物,或性质相近的多种蛋白质与药物分子形成的复合物混合物,其动态相互作用研究及作用位点的鉴定仍

然是 NMR 分析面临的一大挑战。近年来,随着质谱技术的发展,基于软电离技术的电喷雾质谱和基质辅助激光解析电离质谱能够在分析检测过程中很好的保持金属抗癌药物与蛋白质的共价(配位)结合,直接获得药物与蛋白质结合位点的信息^[9]。同时,质谱具有灵敏度高、所需样品量少、耗时短,以及适用于分析复杂生物样品等优点^[22-23],使其迅速成为研究金属抗癌药物与蛋白质相互作用强有力的工具,大大促进了该领域的研究和发展^[6]。通过质谱分析不但能够鉴定纯蛋白与金属抗癌药物的作用位点,而且通过与各种色谱分离技术联用(如二维液相色谱、二维凝胶电泳等)能够直接分析复杂体系(如细胞或组织)中的蛋白质与金属抗癌药物的相互作用,得到在生理环境下药物相互作用的结构信息,在为药物发现提供化学、生物信息的同时,也极大地促进了质谱技术自身的发展及其在生命科学领域的应用。

质谱分析研究金属抗癌药物与蛋白质的相互作用和结合位点,类似于鉴定蛋白质翻译后修饰的蛋白组学研究方法,主要有自下而上(Bottom-up)和自上而下(Top-down)两种策略。其中 Bottom-up 比 Top-down 方法发展得更为成熟,应用也更加广泛。本文将结合我们在金属抗癌药物相互作用组学研究中取得的成果,系统地总结、评述 Bottom-up 和 Top-down 质谱分析方法在铂、钌类金属抗癌药物与蛋白质相互作用研究中的最新进展,并分析这一前沿交叉领域未来的发展趋势。

1 Bottom-up 方法在金属抗癌药物与蛋白质相互作用研究中的应用

Bottom-up 方法是将蛋白质-金属抗癌药物复合物先酶解成肽段,肽段混合物经液相色谱分离,再进行在线质谱检测。金属药物中过渡金属铂或钌的特征同位素分布非常有利于结合金属抗癌药物肽段的鉴定。如进一步将结合药物的肽段裂解,可以将药物在肽段上的结合位点精确到单个的氨基酸残基上。由于 Bottom-up 方法将样品酶解后再进行 LC/MS 分析,因此该方法更适合研究质量数较大的蛋白质和金属抗癌药物的相互作用,如转铁蛋白、血清白蛋白等。但在蛋白样品的前处理过程中,为了避免金属抗癌药物从蛋白质上解离或发生转移、转化,样品前

处理过程的时间应尽量缩短,并且尽可能少用含亲核基团的试剂,如 DTT 等。

1.1 铂类和钌类抗癌药物与血清白蛋白的相互作用研究

血清白蛋白是人体血浆中丰度最高的蛋白质,它能结合和转运多种内源代谢产物和药物^[24]。目前绝大多数的金属抗癌药物都是经静脉注射的方式给药,药物在进入人体后与血清白蛋白发生广泛的结合^[6]。如顺铂注射后,大约 80% 的药物与血清白蛋白结合^[6, 25],而钌抗癌药物 KP1019 的 80%~90% 也是结合在该蛋白上^[13]。这些结合与药物的活性、耐药性和毒副作用密切相关,研究它们的相互作用对这一类型抗癌药物的结构设计和优化具有非常重要的意义。

Sheldrick 小组^[26]利用二维液相色谱与串联质谱联用技术研究了顺铂与含有多种蛋白的人血清之间的反应。在将顺铂与人血清在体外孵育 3 h 后,离心超滤去除未反应的药物分子,加入胰蛋白酶酶解,将酶解得到的肽段用二维液相色谱(2D-LC)分离后,经质谱检测,得到铂化肽段的二级质谱图。通过 SWISS-PORT 数据库的检索,鉴定顺铂在血清白蛋白(HSA)、转铁蛋白(Tf)等蛋白质上的作用位点。研究发现,顺铂与血清白蛋白的 Cys34、Met329、Met548、Tyr150(或 Tyr148)、Asp375(或 Asp376)氨基酸残基配位结合。由于蛋白质酶解鉴定的肽段覆盖率低,有可能导致顺铂与 HSA 部分作用位点的丢失,即出现假阴性结果。

近期我们研究小组^[21]利用 LC-ESI-Q-TOF MS 研究了 HSA 与两种有机金属钌抗肿瘤化合物 $[(\eta^6\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{en})]\text{PF}_6$ 、 $[(\eta^6\text{-biphenyl})\text{RuCl}(\text{en})]\text{PF}_6$ (en = ethylenediamine) 的相互作用。为了提高肽段鉴定的覆盖率,在蛋白质样品酶解前,先对蛋白质和蛋白质-钌复合物进行变性、还原二硫键、封闭半胱氨酸残基的处理,使 HSA 胰蛋白酶酶解肽段的鉴定率达 77%。在此基础上发现 $[(\eta^6\text{-cymene})\text{Ru}(\text{en})]^{2+}$ 能与氨基酸残基 Cys34 的巯基生成配位键,并诱导巯基氧化生成亚磺酸,对 HSA 的抗氧化功能产生不可逆的影响,而 $[(\eta^6\text{-biphenyl})\text{Ru}(\text{en})]^{2+}$ 受有机配体联苯的位阻影响不能与 Cys34 结合。此外, $[(\eta^6\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{en})]\text{PF}_6$ 、 $[(\eta^6\text{-biphenyl})\text{RuCl}(\text{en})]\text{PF}_6$ 都能与 HSA 表面的

His128、His247、His510 组氨酸残基、Met298 蛋氨酸残基共价(配位)结合,且前者的结合程度比后者高。因此,研究表明,通过改变钆抗癌药物的有机配体结构可以很好地调控药物与蛋白质的反应活性。这一发现对进一步优化有机金属钆抗癌化合物的结构,提高药物在体内的转运效率和生物利用度具有重要的意义。采用类似的质谱分析方法,我们还研究了顺铂和 HSA 的相互作用^[27],结果显示顺铂与 HSA 的氨基酸残基 His67、His247 形成链内交联复合物,而此位点正是 HSA 转运锌离子的主要结合位点^[28-29],因此顺铂与 HSA 的结合可能干扰人体血液中锌离子的转运,导致锌缺乏症相关的毒副作用。早期已有文献^[30]报道,顺铂能够诱导 HSA 二硫键的断裂,但荧光和圆二色谱(CD)等不能确定二硫键断裂的位置以及生成产物的结构。研究发现,顺铂能够诱导二硫键 Cys124-Cys169 断裂,并且与还原的 Cys124 氨基酸残基的巯基结合。由于二硫键对于维持蛋白构型的稳定有重要作用,因此顺铂诱导二硫键的断裂可能对血清白蛋白的生物功能产生重要影响,如脂肪酸、胆红素转运等^[31]。除此之外,顺铂还能与 HSA 表面的 His128 和 Met298 氨基酸残基共价(配位)结合。

1.2 铂类和钆类抗癌药物与转铁蛋白的相互作用研究

人血清转铁蛋白(hTf)是由一条多肽链折叠而含 2 个铁离子结合部位的转运蛋白,它通过与细胞表面转铁蛋白受体的特异性结合,将铁离子转运至细胞内^[32-33]。在生理条件下,血清转铁蛋白只有部分(约 30%)被铁离子占据,因此转铁蛋白还能与进入血清的其他金属离子结合并将其转运,如铂、钆金属抗癌药物等^[32, 34]。通常肿瘤细胞的表面会过表达 Tf 受体,转铁蛋白通过与抗癌药物的结合可以提高药物运输的靶向特异性^[35]。因此,研究金属抗癌药物与转铁蛋白相互作用,有助于加深对金属抗癌药物在人体内转运和摄入过程的认识。

Dyson 小组^[36]利用 LC-ESI-Q-TOF MS 研究了顺铂与 Tf 的相互作用,发现顺铂与 Tf 的 Thr457 氨基酸残基配位。Thr457 位于转铁蛋白的 C 裂片,是铁离子的结合位点之一。紫外和分子模拟的结果表明,顺铂、铁离子在与 Tf 的结合位点上存在竞争,并且顺铂与转铁蛋白 C 裂片的 Thr457 残基配位后,在空间上阻碍铁离

子在该位点的结合。而 Sheldrick 等^[26]利用 2D-LC-ESI-MS/MS 同样研究顺铂与转铁蛋白的相互作用,发现顺铂除与 Thr457 残基结合外,还与 Met256、E265、Y314、E385 残基结合。不同研究小组得到有差异的结果可能是由于顺铂与转铁蛋白反应条件的不同而造成,如反应时间、温度、pH 值等,也有可能是由分离方法所引起。二维液相能更好的分离和富集铂化肽段,从而提高质谱的检测限,获得更多的结合位点信息。大量实验表明,钆抗癌药物的毒性比铂类抗癌药物低,且更易被肿瘤组织吸收,主要的原因被认为是钆可以模拟铁离子与血浆中的转铁蛋白结合,从而使得药物更容易进入癌细胞内^[37]。因此研究钆基有机金属抗癌药物和转铁蛋白的结合作用同样具有非常重要的意义。我们研究小组利用 LC-ESI-Q-TOF MS 研究了转铁蛋白与 $[(\eta^6\text{-p-cymene})\text{RuCl}(\text{en})]\text{PF}_6$, $[(\eta^6\text{-biphenyl})\text{RuCl}(\text{en})]\text{PF}_6$ 两种有机金属钆抗肿瘤化合物的配位反应^[38]。结果发现,两种钆基配合物均可共价(配位)结合在 His261(His268)、His292、Tyr593(His597)和 His625 残基上。研究同时发现,*p*-cymene 配合物还可与 His554 和 Tyr578 氨基酸结合,biphenyl 配合物则可能与 Asp375 氨基酸残基发生相互作用。从中可以看出,钆金属抗癌药物与顺铂在转铁蛋白上的结合位点存在较大差异,钆抗癌药物与组氨酸残基配位能力强,与铁离子在结合位点上不存在竞争关系,这也可能是钆抗癌药物具有较低毒副作用的原因之一。

1.3 铂类和钆类抗癌药物与细胞内蛋白质的相互作用研究

金属抗癌药物通过被动扩散和蛋白质(如铜转蛋白、有机阳离子转运蛋白等)的转运进入细胞^[12]。金属抗癌药物除与细胞核内的 DNA 作用外,还与细胞质中富含巯基的生物分子结合,如与谷胱甘肽、金属硫蛋白、腺苷三磷酸酶 7A/7B 等的相互作用。越来越多的实验表明,这些结合作用与金属抗癌药物的活性和抗药性密切相关,因此,金属抗癌药物与细胞内蛋白质相互作用的研究受到越来越多的重视。

Sheldrick 等^[39]研究了钆抗癌药物 $[(\eta^6\text{-p-cymene})\text{RuCl}_2(\text{DMSO})]$ 与大肠杆菌的蛋白质相互作用。先将大肠杆菌与钆抗癌药物孵化,再破碎细胞提取蛋白,加入胰蛋白酶酶解,二维液相分离,MS/MS 鉴定药物结合的蛋白质。研

究发现,该钌化合物主要与细胞内的应激蛋白和解旋酶结合。得到这种研究结果的原因可能是在实验中使用了高浓度的钌化合物($10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)与大肠杆菌孵化,由于细胞的应激效应刺激了应激蛋白和解旋酶的大量表达,使得研究中主要发现钌抗癌药物与这两种蛋白的相互作用。由此可以看出,金属抗癌药物在细胞中的作用靶点研究需在接近人体内的药物浓度下进行才能得到真实的信息。近期,Ratanaphan 等^[40]报道利用 LC-MS/MS 研究乳腺癌抑制蛋白 1(BRCA1)与顺铂的相互作用。BRCA1 主要生物功能是参与维护染色体的完整性,临床研究发现,通过将 BRCA1 失活可以提高癌细胞对药物的敏感性,因此 BRCA1 可作为铂类抗癌药物设计的一个潜在的增敏靶点。质谱结果发现,顺铂可以结合在单体 BRCA1 的 His117 残基上,也可以形成 BRCA1 的二聚体复合物,并且铂化后的 BRCA1 具有更高的热稳定性。

Bottom-up 方法研究金属抗癌药物与蛋白质相互作用通常需要经过液相分离的步骤,以富集金属药物结合的肽段减少电喷雾过程中的抑制作用。但是,如果蛋白质的质量数较小($<15\text{ ku}$),金属药物与蛋白质反应程度高,酶解后的肽段可以直接用 MS 检测而不需要经过分离步骤。细胞色素 C 质量数较小,且含有易于与金属抗癌药物结合的 Met、His 等残基,因此通常被当作研究蛋白质与金属抗癌药物相互作用的模型。最近 King 等^[41]报道直接使用高分辨的 FT-MS 研究细胞色素 C 与顺铂的相互作用,通过比较细胞色素 C 和细胞色素 C-顺铂复合物酶解肽段的不同,找到与顺铂结合的肽段,再用 MSⁿ 方法最终确定顺铂结合在细胞色素 C 的 Met65 残基上。同样,Gibson 等^[42]利用 LTQ-Orbitrap 研究卡铂与细胞色素 C 的相互作用,发现卡铂也是与 Met65 残基结合。Messori 等^[43]利用 LC/MS、NMR 研究了 *trans*-[PtCl₂{(E)-HN=C(OCH₃)CH₃}₂] 与细胞色素 C 的反应,同样发现该铂化合物与 Met65 残基结合。Janiak 等^[44]采用 LC/MS 研究 [Ru(bipy)(terpy)L](PF₆)₂ (bipy = 2,2'-bipyridine, terpy = 2,2':6,2'-terpyridine, L = imidazole) 与细胞色素 C 的反应,确定该钌化合物结合在细胞色素 C 的 His39 残基上。上述研究结果表明,在细胞色素 C 上,铂类抗癌药物优先与 S 原子配位,而钌

类抗癌药物优先与组氨酸残基的 N 配位。因此,铂类和钌类抗癌药物在细胞内的结合蛋白靶点可能存在差异,这可能是有机金属钌抗癌化合物与顺铂没有交叉抗药性的原因之一。

2 Top-down 方法在金属抗癌药物与蛋白质相互作用研究中的应用

Top-down 方法主要步骤是先将金属药物-蛋白质复合物离子化,利用 CID、IRMPD、ECD 等裂解技术将全蛋白裂解,分析鉴定含金属药物的碎裂片段,得到药物在蛋白上的结合位点信息。Top-down 方法优点是,样品不需酶解等前处理步骤,能够最大限度的保留金属药物和蛋白质相互作用的信息。但是该方法也存在较大的局限,由于现有蛋白质裂解技术的限制,蛋白的裂解无法较好的控制,并且蛋白质的裂解机理复杂,对于质量数较大的蛋白质,大量的碎裂片段难以解析。因此,目前该方法只适用于研究质量数较小的蛋白质($<10\text{ ku}$)与金属药物的相互作用。

泛素是一个含有 76 个氨基酸残基的蛋白质,其广泛存在于细胞质和细胞核中。泛素在细胞的泛素化信号通路中起着关键的作用,与肿瘤的增值具有密切的关系,是金属抗癌药物在癌细胞中的潜在作用靶标^[45-46]。Hartinger 等^[8]利用 ESI-FT-MS/MS 研究了顺铂,奥沙利铂,反铂与泛素蛋白质的相互作用。在将铂类药物-泛素的复合物离子化后,通过 CID 方法直接裂解该蛋白复合物。分析含铂的片段发现,顺铂和奥沙利铂结合在泛素 Met1 残基上,而反铂结合在 19Pro-Ser-Asp-Thr-Ile-Glu24 的肽段上,但不能进一步确定结合的氨基酸残基。此外,研究发现 CID 和 IRMPD 裂解方法都能获得含铂蛋白碎裂片段,而使用 ECD 的裂解方法没有发现,原因可能是由于铂离子捕获电子使产生的含铂片段中性化,而不能被质谱检测。

近期,Gomez 等^[47]利用 ESI-LIT-MS/MS 研究了胰岛素和顺铂之间的相互作用。胰岛素同样是一个小蛋白,含有 2 条肽链,被 2 条分子内的二硫键相连。胰岛素与顺铂反应最多可以结合 3 个顺铂分子。利用 CID 裂解和 MSⁿ 分析发现,顺铂主要结合在胰岛素 B 链的 N 端、His5 和 His10 残基上。此外,研究结果显示,顺铂还可能结合在 Cys7 残基上,虽然该残基在蛋白中

形成了二硫键。金属硫蛋白是一个低分子质量,富含半胱氨酸,并且对多种金属离子具有高亲和性的蛋白质。大量实验表明,金属硫蛋白和癌细胞与铂类抗癌药物的耐药性密切相关^[12, 48]。Li等^[49]利用 ESI-QQ-TOF 研究了金属硫蛋白和顺铂的相互作用,结果发现顺铂可以结合在 Cys5 和 Cys7 残基上。

3 结束语

基于软电离技术的质谱已成为研究金属抗癌药物与蛋白质相互作用最强有力的工具,质谱技术的进步大大促进了该领域的研究和发展。但是目前大部分的研究都是在模拟生理条件下将蛋白质与金属药物孵化,并且为了提高反应中生成金属药物-蛋白质复合物的比率,通常金属药物都是大大过量于蛋白质,而这种情况在生理环境中往往是不存在的。因此,体外实验的研究结果可能与临床应用中药物的作用途径存在较大差异。目前,在生理条件下研究金属抗癌药物与蛋白质的相互作用,主要面临着实际样品复杂性高以及金属药物-蛋白质复合物含量极低的挑战。要解决这些问题,可以充分发挥 ICP-MS 和 ESI-MS 各自的优势,利用 1D 或 2D 的 HPLC-ICP-MS 分析鉴定复杂生物样品,如临床样品中与金属药物结合的蛋白质,确定药物与蛋白质结合的化学计量比。然后,从生物样品中选择性富集结合金属药物的蛋白,再应用 Bottom-up 或 Top-down ESI-MS 分析确定金属药物在蛋白质上的结合位点。

参考文献:

- [1] WANG D, LIPPARD S J. Cellular processing of platinum anticancer drugs [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, 4(4): 307-320.
- [2] OZOLS R F. Ovarian cancer: New clinical approaches [J]. *Cancer Treatment Reviews*, 1991, 18 (Suppl 1): 77-83.
- [3] TODD R C, LIPPARD S J. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds [J]. *Metallomics*, 2009, 1(4): 280-291.
- [4] KELLAND L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy [J]. *Nature Reviews: Cancer*, 2007, 7(8): 573-584.
- [5] JUNG Y W, LIPPARD S J. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage [J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(5): 1 387-1 407.
- [6] TIMERBAEV A R, HARTINGER C G, ALEKSENKO S S, et al. Interactions of antitumor metal-lodrugs with serum proteins; Advances in characterization using modern analytical methodology [J]. *Chemical Reviews*, 2006, 106(6): 2 224-2 248.
- [7] GIBSON D. The mechanism of action of platinum anticancer agents-what do we really know about it? [J]. *Dalton Transactions*, 2009, 48: 10 681-10 689.
- [8] HARTINGER C G, TSYBIN Y O, FUCHSER J, et al. Characterization of platinum anticancer drug protein-binding sites using a top-down mass spectrometric approach [J]. *Inorganic Chemistry*, 2008, 47(1): 17-19.
- [9] ESTEBAN-FERNANDEZ D, MORENO-GORDALIZA E, CANAS B, et al. Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs [J]. *Metallomics*, 2010, 2(1): 19-38.
- [10] KHALAILA I, BERGAMO A, BUSSY F, et al. The role of cisplatin and NAMI-A plasma-protein interactions in relation to combination therapy [J]. *International Journal of Oncology*, 2006, 29(1): 261-268.
- [11] MORENO-GORDALIZA E, CANAS B, PALACIOS M A, et al. Novel insights into the bottom-up mass spectrometry proteomics approach for the characterization of Pt-binding proteins: The insulin-cisplatin case study [J]. *Analyst*, 135(6): 1 288-1 298.
- [12] HALL M D, OKABE M, SHEN D W, et al. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy [J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2008, 48: 495-535.
- [13] HARTINGER C G, JAKUPEC M A, ZORBASSEIFRIED S, et al. KP1019, a new redox-active anticancer agent-preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2008, 5(10): 2 140-2 155.
- [14] ANTONARAKIS E S, EMADI A. Ruthenium-based chemotherapeutics: Are they ready for prime time? [J]. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2010, 66(1): 1-9.
- [15] AIRD R E, CUMMINGS J, RITCHIE A A,

- et al. In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer [J]. British Journal of Cancer, 2002, 86(10): 1 652-1 657.
- [16] CHEN H M, PARKINSON J A, PARSONS S, et al. Organometallic ruthenium(II) diamine anticancer complexes: Arene-nucleobase stacking and stereospecific hydrogen-bonding in guanine adducts[J]. Journal of the American Chemical Society, 2002, 124(12): 3 064-3 082.
- [17] CHEN H M, PARKINSON J A, NOVAKOVA O, et al. Induced-fit recognition of DNA by organometallic complexes with dynamic stereogenic centers[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(25): 14 623-14 628.
- [18] WANG F Y, CHEN H M, PARKINSON J A, et al. Reactions of a ruthenium(II) arene antitumor complex with cysteine and methionine[J]. Inorganic Chemistry, 2002, 41 (17): 4 509-4 523.
- [19] WANG F Y, BELLA J, PARKINSON J A, et al. Competitive reactions of a ruthenium arene anticancer complex with histidine, cytochrome c and an oligonucleotide[J]. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2005, 10(2): 147-155.
- [20] WANG F Y, WEIDT S, XU J J, et al. Identification of clusters from reactions of ruthenium arene anticancer complex with glutathione using nanoscale liquid chromatography Fourier transform ion cyclotron mass Spectrometry combined with O-18-Labeling[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2008, 19 (4): 544-549.
- [21] HU W B, LUO Q, MA X Y, et al. Arene control over thiolate to sulfinate oxidation in albumin by organometallic ruthenium anticancer complexes[J]. Chemistry-A European Journal, 2009, 15(27): 6 586-6 594.
- [22] 王兆伏, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 质谱技术在中药小分子与生物大分子相互作用研究中的应用[J]. 质谱学报, 2010, 31(3): 129-137.
- [23] 杨何仪, 蔡 耘, 钱小红. 生物质谱在核糖核酸领域的应用[J]. 质谱学报, 2004, 25(1): 52-60.
- [24] CARTER D C, HO J X. Structure of serum-albumin[J]. In Advances in Protein Chemistry, 1994, 45: 153-203.
- [25] DECONTI R C, TOFTNESS B R, LANGE R C, et al. Clinical and pharmacological studies with cis-diamminedichloroplatinum (II) [J]. Cancer Research, 1973, 33(6): 1 310-1 315.
- [26] WILL J, WOLTERS D A, SHELDRIK W S. Characterisation of cisplatin binding sites in human serum proteins using hyphenated multidimensional liquid chromatography and ESI tandem mass spectrometry[J]. Chemmedchem, 2008, 3 (11): 1 696-1 707.
- [27] HU W B, LUO Q, WANG F Y, et al. Reactions of the anticancer drug cisplatin with human albumin can induce disulfide bond cleavage and block the major zinc site novel binding sites of cisplatin to albumin revealed by LC-MS/MS: Occupancy of coordination sites of zinc and induced cleavage of disulfide bond cys 124-Cys 169[J]. Submitted.
- [28] BLINDAUER C A, HARVEY I, BUNYAN K E, et al. Structure, properties, and engineering of the major zinc binding site on human albumin [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284 (34): 23 116-23 124.
- [29] STEWART A J, BLINDAUER C A, BEREZENKO S, et al. Interdomain zinc site on human albumin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(7): 3 701-3 706.
- [30] YOTSUYANAGI T, OHTA N, FUTO T, et al. Multiple and irreversible binding of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) to human serum-albumin and its effect on warfarin-binding[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1991, 39 (11): 3 003-3 006.
- [31] TRYNDA-LEMIESZ L, KOZLOWSKI H, KEPPLER B K. Effect of *cis*-, *trans*-diamminedichloroplatinum(II) and DBP on human serum albumin [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 1999, 77 (3/4): 141-146.
- [32] SUN H Z, LI H Y, SADLER P J. Transferrin as a metal ion mediator[J]. Chemical Reviews, 1999, 99(9): 2 817-2 842.
- [33] MOOS T, MORGAN E H. Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems [J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2000, 20(1): 77-95.
- [34] ZHAO Y Y, MANDAL R, LI X F. Intact human holo-transferrin interaction with oxaliplatin [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry

- try, 2005, 19(14): 1 956-1 962.
- [35] KOSTOVA I. Ruthenium complexes as anticancer agents [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2006, 13(9): 1 085-1 107.
- [36] KHALAILA I, ALLARDYCE C S, VERMA C S, et al. A mass spectrometric and molecular modelling study of cisplatin binding to transferrin [J]. *Chembiochem*, 2005, 6(10): 1 788-1 795.
- [37] ANG W H, DYSON P J. Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: Towards targeted chemotherapy [J]. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2006, 20: 4 003-4 018.
- [38] GUO W, HU W B, WANG F Y, et al. Investigation of interactions between organometallic ruthenium anticancer complexes and transferrin by LC/MS [J]. Submitted.
- [39] WILL J, KYAS A, SHELDRIK W S, et al. Identification of (η^6 -arene) ruthenium(II) protein binding sites in E-coli cells by combined multidimensional liquid chromatography and ESI tandem mass spectrometry: specific binding of [$(\eta^6$ -p-cymene) RuCl₂ (DMSO)] to stress-regulated proteins and to helicases [J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2007, 12(6): 883-894.
- [40] ATIPAIRIN A, CANYUK B, RATANAPHAN A. Cisplatin affects the conformation of apo form, not holo form, of BRCA1 ring finger domain and confers thermal stability [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2010, 7(8): 1 949-1 967.
- [41] ZHAO T, KING F L. Direct determination of the primary binding Site of cisplatin on cytochrome c by mass spectrometry [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2009, 20(6): 1 141-1 147.
- [42] GABBIANI C, CASINI A, MASTROBUONI G, et al. Peculiar mechanistic and structural features of the carboplatin-cytochrome c system revealed by ESI-MS analysis [J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2008, 13(5): 755-764.
- [43] CASINI A, GABBIANI C, MASTROBUONI G, et al. Insights into the molecular mechanisms of protein platination from a case study: The reaction of anticancer Platinum(II) iminoethers with horse heart cytochrome c [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(43): 12 220-12 230.
- [44] YANG X J, DREPPER F, WU B, et al. From model compounds to protein binding: syntheses, characterizations and fluorescence studies of [RuII(bipy)(terpy)L]²⁺ complexes (bipy=2,2'-bipyridine; terpy=2,2':6,2'-terpyridine; L = imidazole, pyrazole and derivatives, cytochrome c) [J]. *Dalton Transactions*, 2005, 2: 256-267.
- [45] HOELLER D, HECKER C M, DIKIC I. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6(10): 776-788.
- [46] WILLIAMS J P, PHILLIPS H I A, CAMPUZANO I, et al. Shape changes induced by N-terminal platination of ubiquitin by cisplatin [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2010, 21(7): 1 097-1 106.
- [47] MORENO-GORDALIZA E, CANAS B, PALACIOS M A, et al. Top-down mass spectrometric approach for the full characterization of insulin-cisplatin adducts [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(9): 3 507-3 516.
- [48] KNIPP M. Metallothioneins and platinum(II) anti-tumor compounds [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2009, 16(5): 522-537.
- [49] MANDAL R, LI X F. Top-down characterization of proteins and drug-protein complexes using nanoelectrospray tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, 20(1): 48-52.