铂类抗肿瘤药物与蛋白质的作用机理

房田田¹, 曹开明¹, 程岚军¹, 赵林泓^{2*}, 刘扬中^{1*}

1. 中国科学技术大学化学与材料科学学院, 合肥 230026

2. 东南大学生命科学研究院, 南京 210096

*通讯作者, E-mail: liuyz@ustc.edu.cn; zhaolinhong@seu.edu.cn

收稿日期: 2016-08-15; 接受日期: 2016-11-08; 网络版发表日期: 2017-01-12

国家自然科学基金(编号: U1332210, 21573213)和高等学校博士学科点专项科研基金(编号: 20133402110041)资助项目

摘要 铂类抗肿瘤药物在癌症化疗中被广泛应用, 通常认为铂类药物通过与肿瘤细胞的DNA形成交联物, 抑制DNA复制, 造成DNA损伤, 进而诱导细胞凋亡。然而, 近年来的研究表明, 铂类药物在进入细胞核与DNA结合之前, 会与细胞内外的多种蛋白质发生复杂的相互作用。这些作用一方面会影响铂类药物的运输、代谢以及与DNA靶点的作用, 从而对铂类药物的药效、耐药性产生影响; 另一方面, 铂类药物的作用会影响蛋白质的活性, 与铂类药物的毒副作用以及蛋白质靶点所贡献的药效紧密相连。本文将从这两方面介绍近年来铂类药物与蛋白质相互作用研究取得的进展、小分子化合物对铂类药物与蛋白质作用的影响, 并对铂类药物与非抗癌作用靶点蛋白的作用进行了介绍, 以及研究这些相互作用的常用方法。

关键词 铂配合物, 抗癌药物, 蛋白质, 铜伴侣蛋白, 锌指蛋白

1 引言

自从1978年顺铂(cisplatin, $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$)被美国食品和药物管理局(FDA)批准用于肿瘤化疗以来^[1,2], 铂类药物已被广泛用于多种癌症的治疗。顺铂具有许多其他药物无法替代的优势, 目前, 临床上40%~80%的肿瘤患者接受了含有铂类药物的化疗^[3], 其中, 顺铂对睾丸癌的治愈率已超过95%^[4], 对肺癌、卵巢癌、头颈部肿瘤等也具有明显疗效^[5,6]。顺铂与其他药物的联用可以更好地发挥治疗效果。例如, 顺铂联合吉西他滨是治疗晚期非小细胞肺癌(NSCLC)的标准方案^[7]。第2代铂类药物卡铂和第3代铂类药物奥沙利铂表现出更好的疗效和低毒性。

然而, 铂类药物的毒副作用和耐药性限制了其临

床应用。顺铂有着较为明显的肾毒性、神经毒性和胃肠道副作用^[8]。此外, 某些癌细胞对顺铂具有耐药性, 包括固有耐药性和治疗过程中产生的耐药性^[9,10]。因此, 开发具有更高抗癌活性、毒副作用小、无交叉耐药性的新型铂类药物是必要的。过去的40年中, 数十种铂类药物已进入临床试验^[11], 仅近两年, 临床试验病例就超18万6千例(图1)^[12]。然而迄今为止, 只有顺铂、卡铂和奥沙利铂这3种铂类药物被批准用于全球临床使用, 此外还有奈达铂、依铂、洛铂3个化合物分别在日本、韩国和中国被批准使用(表1)^[11]。

由于铂类药物的成功应用, 其作用机理研究得到广泛的关注。通常认为DNA是铂类药物的作用靶点, 因而早期的研究主要集中在铂类药物与DNA靶点的作用, 包括反应产物、反应动力学、热力学等都得到

引用格式: 房田田, 曹开明, 程岚军, 赵林泓, 刘扬中. 铂类抗肿瘤药物与蛋白质的作用机理. 中国科学: 化学, 2017, 47: 200–219
Fang T, Cao K, Cheng L, Zhao L, Liu Y. Protein interaction in the mechanism of platinum anticancer drugs. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 200–219,
doi: 10.1360/N032016-00167

图 1 铂类药物用于癌症治疗的里程碑^[2,12] (网络版彩图)

表 1 临床中使用的一些铂类抗肿瘤药物

药物	结构	CAS号	剂量限制性毒性	应用国家(时间) ^[12]
顺铂		15663-27-1	肾毒性	全球(1978)
卡铂		41575-94-4	骨髓抑制	全球(1989)
奥沙利铂		61825-94-3	神经毒性	全球(2002)
奈达铂		95734-82-0	骨髓抑制	日本(1995)
洛铂		135558-11-1	血小板减少	中国(2010)
依铂		146665-77-2	肾毒性	韩国(1999)

了详细的研究. 然而实验结果显示, 进入细胞内的铂仅有不到1%形成了Pt-DNA交联产物^[13]. 配位化学原

理及实验结果都表明, 蛋白质比DNA具有更强的顺铂反应活性. 研究显示, 细胞大部分的铂(65%~98%)与

蛋白质发生作用^[14], 因此研究蛋白质与铂类药物的相互作用显得尤为重要。

2 蛋白质与Pt-DNA复合物的作用

顺铂与DNA反应形成Pt-DNA复合物包括1,2-链内交联(90%)、1,3-链内交联(5%~10%)以及少量的链间交联产物(ICLs)和单功能复合物^[15]。细胞内一些蛋白质可以特异性地识别这些Pt-DNA复合物, 在细胞对铂药物的早期响应过程中发挥重要作用。Lippard课题组^[16,17]利用光亲和性标记的方法, 将具有光活性的化合物PtBP₆标记到短链DNA, 用于捕获癌细胞核提取物中结合Pt-DNA的蛋白质。结果发现了多种能够结合Pt-DNA的蛋白质, 包括识别和修复DNA损伤的相关蛋白(核酸剪切修复蛋白(NER)、错配修复蛋白(MMR)等)、含高迁移率族蛋白HMG结构域蛋白以及其他类型蛋白质(PARP-1、p53等), 如图2所示^[18]。

2.1 识别和修复DNA损伤相关蛋白

顺铂作用于肿瘤细胞导致其DNA损伤, 细胞将启动DNA修复机制^[19], 该过程与顺铂的耐药性密切相关; 当修复不成功时, 细胞则启动凋亡机制, 进而显示出顺铂的细胞毒性^[18]。核酸剪切修复(NER)是细胞用来去除DNA上受损伤核苷酸的常见机制, 包含去除顺铂等化疗药物造成的DNA损伤^[20], 有多种NER系统可以有效修复顺铂与DNA形成的1,2-GG链内交联产物^[21], 但也有文献报道, 相比于顺铂与DNA形成的1,2-GG链内交联产物, 1,3-GG链内交联产物更容易被NER修复^[22]。NER

过程主要包括: 识别损伤DNA、招募蛋白质到损伤位点、切除损伤位点的碱基、修复合成DNA 4个过程^[23]。着色性干皮病C融合蛋白(XPC-hHR23B)是损伤识别过程中的关键蛋白, 也是第一个被报道的NER损伤识别因子。当识别蛋白结合损伤DNA后, 会招募其他NER蛋白(XPA、RPA、TFIIH等)结合到损伤位点形成复合物。DNA修复蛋白(XPA)是对紫外(UV)损伤DNA高亲和的锌指蛋白, 分子量为32 kDa, 通过受损DNA链螺旋扭曲程度的差异实现对损伤DNA的识别。复制蛋白A (replication protein A, RPA)是由DNA代谢过程中复制、重组、修复3单元组成的复合物, 可能招募DNA合成和复制因子到损伤DNA上^[18]。人转录因子II (transcription factor II human, TFIIH)是由9个蛋白组成的复合物, 可以促进RNA聚合酶II转录并且可能参与细胞周期调控, 对NER活性极其重要。NER相关蛋白之间也可以发生相互作用促进核酸剪切修复。例如, XPC-hHR23B, XPA和RPA可以与顺铂的链内交联产物相结合^[24], XPA蛋白可以和RPA、TFIIH发生相互作用, 促使细胞完成对损伤DNA的修复过程^[23]。

错配修复(MMR)是在DNA复制过程中, 修正单个碱基插入/删除不匹配的过程, MMR对维持基因组完整性非常重要^[15]。MMR系统也可以识别顺铂引起的DNA损伤, 与顺铂的细胞毒性密切相关。错配修复蛋白本身的修复功能和其调控顺铂诱导的细胞死亡是两个独立的过程^[25], 顺铂引起的细胞死亡与MLH1的蛋白酶解相关, 会引起细胞凋亡蛋白抑制蛋白的不稳定, 进而使细胞凋亡蛋白(caspase)被活化触发细胞凋亡路径^[26]。错配修复蛋白(MutSα)可以识别顺铂损伤

图2 顺铂-DNA复合物(1,2-d(GpG)、1,3-d(GpTpG)和ICL DNA)的结合蛋白。NER蛋白包括复制蛋白A1 (RPA1); MMR蛋白包括错配修复蛋白hMSH2和hMSH3; 单链损伤修复蛋白(SSBR)包括PARP1/DNA ligaseIII、XRCC1和PNK; 非同源末端连接蛋白(NHEJ)包括DNA-PKcs、Ku80和Ku70; HMG结构域蛋白包括HMGB1/2/3和UBF1^[16] (网络版彩图)

DNA, 人细胞内的损伤识别蛋白hMutSa (MSH2/MSH6) 可以专一性识别1,2-d(GpG)交联产物^[27,28]. 近期有研究表明, 顺铂的凋亡功能受一种MSH2/MSH6依赖的机制调控^[29]. 并且在顺铂耐药细胞系中发现, MMR系统中的DNA错配修复蛋白MLH1基因发生突变, 因此MSH蛋白在错配修复中发挥着重要作用^[20].

此外, 顺铂在造成DNA损伤的过程中, 也有其他类型蛋白参与作用, 如p53、DNA-PK等蛋白. 研究表明, 顺铂对细胞内DNA的损伤与细胞内p53蛋白的活性密切相关^[30,31]. DNA依赖的蛋白激酶DNA-PK也参与细胞内DNA的修复过程, 如双链修复过程, 有文献报道DNA-PK蛋白可以与顺铂DNA复合物相结合^[15].

2.2 含HMG结构域蛋白

高迁移率族蛋白(high mobility group protein, HMG蛋白)是染色体蛋白中含量最多的非组蛋白类蛋白质, 它们可以结合DNA或染色体上的特殊结构. HMG结构域由约80个相对保守氨基酸残基组成, 包含3个 α 螺旋结构^[15]. 其中, HMGB1是细胞内含量较多的核蛋白, 可以结合核小体核心颗粒之间的linker-DNA进而影响核小体DNA结构的稳定性. 通过与HMGB1的作用, 细胞内许多参与DNA修复和凋亡路径的蛋白可以对顺铂引起的DNA损伤作出响应^[32]. 早期文献报道, HMG结构域可以识别顺铂与DNA所形成的1,2-链内交联产物, 进而抑制DNA的损伤修复^[33]. 郭子建课题组^[34]设计、合成了一种基于His-tag与寡聚核苷酸构成分子探针, 从细胞裂解液中钓出了与Pt-DNA复合物作用的蛋白质. 通过二维凝胶电泳和质谱鉴定, 获得了结合Pt-DNA复合物的蛋白质信息. 其中, 检测到4种类型的高度乙酰化的HMGB1异构体, 另外有两种不同磷酸化的HMGB1对cisplatin-DNA复合物表现出相对较高的亲和性结合能力. 结果表明, 细胞内HMGB1蛋白的翻译后修饰对Pt-DNA复合物的识别具有重要作用.

Sharma等^[35]利用免疫组织化学、蛋白质印迹和RT-PCR来研究顺铂对皮肤鳞状癌细胞的作用, 发现顺铂治疗的开始阶段主要是引起细胞凋亡, 癌细胞内HMG蛋白只是缓慢地增加; 随着时间增加, 顺铂引起细胞坏死, 同时HMGB蛋白表达水平显著升高. 研究结果表明, HMGB蛋白与顺铂引起的细胞死亡的状态密切相关. 此外, 细胞内的还原性环境也可以影响HMGB1与铂化DNA的作用, 可能与HMGB1中A-domain的还原态有关^[36].

2.3 其他蛋白

除了细胞识别和修复相关的蛋白质以及含有HMG结构域的蛋白质之外, 细胞内还有其他一些可以识别和结合顺铂修饰DNA的蛋白, 这些蛋白通过与顺铂作用发挥各自的功能并且影响顺铂的抗癌活性^[18].

PARP蛋白是一种DNA修复酶, 是细胞凋亡核心成员半胱天冬酶(caspase)的底物, 在DNA损伤修复与细胞凋亡中发挥着重要作用. Lippard课题组^[37]报道了PARP-1蛋白对铂修饰DNA具有高亲和性, 相比于未损伤DNA, PARP-1对顺铂损伤DNA具有更高的亲和力, 主要与顺铂-DNA的1,2-d(GpG)链内交联产物结合. 与此同时, 有研究证实, PARP-1也可以和其他铂损伤DNA结合. 例如, 奥沙利铂和吡啶铂的DNA复合物^[38]. 因而研究PARP-1与Pt-DNA复合物的作用机理, 可能促进对铂类药物作用机理的理解.

p53是一个重要的抑癌基因, 参与细胞周期调控、DNA修复、细胞分化、细胞凋亡等重要生物学进程. p53基因编码一个含有393氨基酸残基的蛋白质. p53蛋白可以结合顺铂-DNA复合物中的1,2-d(GpG)链内交联产物, 而与1,3-d(GpTpG)链内交联产物、链间交联产物以及单功能复合物没有显著作用^[39]. 此外, p53也可以与反铂-DNA复合物作用. 据文献报道, 反式4-羟甲基吡啶铂配合物(*trans*-PtHMP)和反铂(*trans*platin)的DNA配合物均能结合p53蛋白, 但两者结合方式存在明显差异^[40].

NF- κ B由一个转录因子家族组成, 对细胞炎症、免疫响应、细胞增殖和细胞程序性死亡具有重要的调控功能, 在包括顺铂在内的抗肿瘤药物引起的细胞响应过程中发挥重要作用^[41]. 有研究表明, NF- κ B蛋白对顺铂和反铂修饰的DNA化合物可以表现出不同的亲和性^[41]. 除此之外, 其他蛋白质, 如Y-family聚合酶Dpo4^[42]、DNA聚合酶 η ^[43]也可以与Pt-DNA复合物作用.

3 蛋白质与铂类药物的直接作用

除上述介绍的与Pt-DNA复合物作用的蛋白质之外, 还存在大量与铂类药物直接结合的蛋白质. 铂类药物通过静脉注射的方式给药, 在进入细胞之前可能会与含量丰富的血浆蛋白反应, 如人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)和转铁蛋白(transferrin, Tf), 一般认为这些蛋白与铂类药物从血液向细胞表面的运输

相关^[44]。此外,进入细胞的顺铂可以与多种胞内蛋白作用,从而影响药物以及蛋白质的生物活性。

3.1 血浆蛋白

HSA是血浆中最丰富的蛋白(约50 g/L),含有585个氨基酸残基,分子量约为66.5 kDa^[45]。HSA结构由3个类似的 α 螺旋结构域(I~III)组成,在体内发挥着不可或缺的功能^[46]。顺铂和HSA之间的反应也被认为是铂与人血浆蛋白结合的主要途径^[47]。体积排阻色谱诱导耦合等离子质谱法(SEC-ICP-MS)研究结果表明,通过输液形式进入体内的卡铂可形成Pt-HSA复合物,并且随着代谢从人体持续地排出铂复合物。凝胶色谱结果显示,铂与HSA的结合可能引发蛋白交联而导致蛋白质聚集^[48]。

HSA与顺铂复合物的晶体结构研究表明,HSA蛋白质中有多个顺铂的结合位点。HSA含有一个自由半胱氨酸Cys34,尽管理论上半胱氨酸与顺铂的反应活性很高,但在晶体结构中并没有观察到Cys34与药物结合。在所获得的晶体结构中,顺铂直接配位于HSA中域IA的His105和域IIB的Met329(图3)。有趣的是,顺铂结合HSA后,不仅两个 NH_3 配体被保留,还有一个Cl离子保持配位在Pt上,表明顺铂结合HSA后仍然以活性药物的形式存在。晶体结构还观测到顺铂的其他结合位点,如结构域II的His288和Met298、结构域IIIB的Met548残基^[49]。

人转铁蛋白(Tf)含有679个氨基酸残基,分子量约80 kDa,血液浓度约2.5 g/L (35 μM)。每个Tf蛋白分子可以结合2个 Fe^{3+} 离子^[50],Tf也具有结合其他金属离子的能力^[51]。电喷雾-四极杆-飞行时间串联质谱(ESI-Q-

TOF)质谱分析显示,Tf可以结合顺铂及奥沙利铂^[52,53]。由于肿瘤细胞过表达Tf受体,可以使用Tf特异性递送各种治疗性金属离子药物^[54]。在利用铂类药物治疗中,Tf-Pt复合物的形成可以显著改善药物本身的毒性和选择性^[44]。

3.2 铜蛋白

对于外来元素Pt,人体并没有其特定的转运系统,因此铂类药物必须借助人体中现有的转运体系实现其摄取和运输。从配位化学角度分析,Cu(I)与Pt(II)具有类似的配位选择性,因而铜蛋白可能是铂类药物首选的胞内结合蛋白。研究表明,铜转运相关蛋白CTR1、Atox1、Cox17、ATP7ase均存在与铂类药物的相互作用,与铂类药物的运输和细胞内分布密切相关。

3.2.1 与铂类药物细胞摄取相关的蛋白质

早期的研究认为顺铂通过被动扩散进入细胞,然而实验发现铜离子与铂类药物具有交叉耐药性^[55-59],推测铜蛋白可能参与了铂的细胞摄取与运输。进一步的实验显示,顺铂可能通过铜转运蛋白CTR1实现细胞摄取^[60,61]。

铜转运蛋白(CTR1)是具有高保守性的糖基化蛋白,尽管不同物种的CTR1在蛋白序列和分子量上存在较大的差异,但均具有保守的3个跨膜区域(TM)、N端胞外金属结合区以及C端胞内金属结合区^[62]。冷冻电镜结构结果显示,hCTR1在细胞膜上形成同源三聚体,其中心的空腔跨越磷脂分子层形成铜离子通道^[63,64]。其中TM2是离子通道的关键部分,所包含的蛋氨酸残基可能参与铜离子的跨膜运输。N端和C端结构域分别位于细胞膜的两侧。N端富含的蛋氨酸序列(MxxM或MxM)和C端HCH序列对铜离子具有较强的亲和性。

对酵母细胞中的yCTR1的N端模型肽(Met7)的研究显示,Met7可以直接与顺铂反应^[65]。圆二色谱(CD)结果表明,Met7具有无规则卷曲结构,与顺铂结合后形成两个 β -转角^[65]。反应后顺铂的两个氨基会被取代,以裸铂的形式与Met7按1:1比例结合,而反铂的两个氨基则会保留^[66]。核磁共振波谱(¹⁹⁵Pt-NMR)结果表明,铂类药物结合到蛋氨酸的硫原子上。对人hCTR1的N端结构域(hCTR1-N55)的研究显示,蛋氨酸是顺铂的主要结合位点,顺铂在水解之后可以结合到组氨酸上^[67];与质谱实验结果不同,NMR检测显示在中性反应条件下,顺铂结合hCTR1的N端结构域后氨配体仍可以保

图3 顺铂与HSA复合物的晶体结构。(a) 铂结合于 His105 残基; (b) 铂结合HSA于Met329残基^[49] (网络版彩图)

留^[67], 这一现象与顺铂和hCTR1的C端结构域反应的结果一致^[68]. 上述研究结果显示, 尽管蛋氨酸的硫原子配位具有较强的反位效应, 顺铂结合hCTR1后仍可能保留其氨配位以药物活性配合物的形式存在.

由于CTR1与顺铂的摄取相关, 因而它的表达水平影响铂类药物的药效. 敲除CTR1基因的酵母细胞和哺乳动物细胞对顺铂、卡铂、奥沙利铂摄取量均下降^[61,69,70]; 而对于CTR1过表达的细胞, 铂类药物的摄取量升高, 细胞毒性增强^[69,71], 表明细胞的耐药性也与CTR1的表达水平相关. 细胞实验发现, 顺铂通过下调CTR1的表达使细胞产生耐药性. 而铜螯合剂能够促进CTR1的表达, 提高铂类药物的摄取从而提高药效. 动物实验研究发现, 注射顺铂药物之前, 通过四硫代钼酸盐预处理小鼠, 顺铂药效显著提高^[72]. 此外, CTR1蛋白的糖基化也与细胞耐药性相关. 如果Ser27的糖基化被抑制, 则CTR1蛋白很容易被蛋白酶水解而失去N端金属结合域, 其运输金属离子能力也随之丧失^[73].

CTR1虽然参与铂类药物的运输, 但在作用机制上与铜的运输存在一些差异. 胞外区中的蛋氨酸突变为甘氨酸后, 顺铂将无法结合到CTR1的N端, 但Cu(I)可以结合到蛋白上并通过胞吞进入细胞^[74,75]. 将M2保守序列MxxxM中的蛋氨酸突变为异亮氨酸后, 铜离子转运受到抑制但顺铂的摄取量反而增加. 荧光共振能量转移(FRET)实验分析可知, Cu(I)的摄取能够增强FRET效应, 但顺铂的结合对此没影响^[76], 这些结果说明, 尽管hCTR1能够转运Cu⁺和顺铂, 但由于铜和顺铂的配体选择性、反应活性和结构不同, 可能的反应机制也存在差异^[77].

CTR2是哺乳动物体内的另一种铜转运蛋白, 主要分布于内涵体和溶酶体中, 在氨基酸序列上与CTR1有一定的同源性^[78]. 与CTR1相比, 其胞外N端的序列比较短, 跨膜区中TM2也包含保守序列MxxxM. 在胞外铜离子浓度高时, hCTR2可以将铜离子运入胞内^[79,80]. CTR2对铂类药物的积累有重要影响, 实验证明敲除CTR2后, 顺铂和卡铂的细胞摄取量提高2~3倍^[81]. 这一结果表明, 尽管CTR1与CTR2均能结合顺铂, 但二者对顺铂的功能具有不同的影响, 可能与蛋白质的定位及作用机理相关.

3.2.2 与铂类药物胞内转运过程相关的蛋白质

顺铂的细胞耐药性是由多种因素导致的, 包括细

胞摄取量降低、外排提高等. 越来越多的证据显示, 顺铂的细胞内分布以及细胞耐药性受到多种铜转运蛋白的调控. 研究发现, Atox1可以和顺铂结合, 调节顺铂在细胞内的积累以及顺铂的细胞毒性.

铜伴侣蛋白Atox1是由68个氨基酸残基组成的可溶性蛋白, 它可以从hCTR1获得Cu然后转运到P型ATPase上. Atox1具有类似于铁氧还蛋白的 $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ 结构, 金属结合位点CxxC位于二级结构 β_1 与 α_1 之间^[82]. 其C端有一段富含赖氨酸序列的核定位信号肽KKTKGK. 当Atox1与Cu结合之后, Atox1通过信号肽引导进入细胞核而具有转录因子的功能^[83-85]. Atox1蛋白保守序列的两个半胱氨酸能与一个Cu(I)结合, 而铜螯合剂硫代钼酸盐能与Cu/Atox1通过硫桥键形成铜-钼簇, 从而抑制了Cu向下游蛋白转移^[86]. 研究发现, 敲除Atox1后由于影响ATP水平及脂肪的生成而抑制细胞增殖和肿瘤细胞的生长, 能结合Atox1的小分子具有同样的作用^[87].

体外实验结果表明, 铂类药物的结合会导致Atox1蛋白的去折叠或聚集^[88]. 在转染Atox1的大肠杆菌培养过程中加入顺铂, 通过电泳分离Atox1蛋白, ICP-MS检测到蛋白上有Pt存在^[89]. Atox1与顺铂复合物的晶体结构表明, 顺铂结合到Atox1的铜结合位点, 在有TCEP做还原剂时蛋白以单体存在, 而无还原剂时蛋白以二聚体形式存在(图4)^[90]. 核磁共振结果显示, 顺铂和Atox1的结合会导致Cys12、Cys15和Ala16化学位移变化^[89]. 利用in-cell NMR检测生理条件下顺铂与Atox1的相互作用, 实验发现在细胞还原环境中, 蛋白处于活性状态而易与顺铂结合. 在Atox1过表达的大肠杆菌中顺铂结合到铜结合位点的两个半胱氨酸上, Pt桥连两个Atox1形成同源二聚体^[89]. 由此可知, 顺铂能够穿过细胞膜结合Atox1蛋白的保守序列CxxC.

Atox1对各种铂配合物具有不同的结合能力^[91]. 顺铂中位于顺位的两个氯水解后与CxxC中半胱氨酸结合, 由于硫原子具有较强的反位效应, 顺铂的两个氨被活化取代, 从而形成裸铂. 由于反位效应, 反铂与Atox1的结合速率较顺铂快. 卡铂的水解速率极慢($t_{1/2}=99$ h)^[92], 在体内通过生物转化失去螯合环, 与Atox1的结合方式与顺铂的类似. 奥沙利铂也极难水解($t_{1/2}=160$ h)^[93], 在体内由于生物转化失去乙二酸根. 尽管奥沙利铂的水解速度很慢, 但与含巯基的生物分子反应速度快^[94], 可能是因为硫原子可以直接与未水解的奥沙利铂配位结合^[94].

图4 Atox1与cisplatin反应产物的晶体结构PDB1TL5^[90](网络版彩图)

Atox1表达水平可能与顺铂的细胞耐药性相关,但不同的研究方法显示不同结论.有文献报道,Atox1蛋白的高表达导致细胞的顺铂耐药性^[88].Atox1蛋白的过表达可以使细胞内DNA上铂的含量降低,顺铂的细胞毒性下降^[88].Howell等^[95]研究表明,将Atox1敲除,细胞摄取顺铂的量将降低,导致DNA上铂的积累量下降.Atox1能与CTR1的C端产生相互作用,这种相互作用可能促进CTR1的内在化、泛素化以及蛋白酶的水解过程,但在Atox1敲除的细胞中,由顺铂导致的CTR1表达水平下调受到抑制^[95].在*E.coli*中过表达Atox1可以抑制细胞丝状生长程度及细胞形态学变化^[89].然而,也有研究认为,Atox1能将顺铂转移至ATPase的金属结合结构域上,过量表达Atox1可能会促使更多的顺铂被ATP7A/B泵出细胞^[88,96].

3.2.3 与铂类药物细胞外排相关的蛋白质

铂类药物在体内产生耐药性的一个原因是药物在体内的累积量下降^[2,97].研究发现,铜泵出蛋白ATPase可以将顺铂隔离在囊泡中或运出体外从而导致顺铂耐药性^[98,99].P型ATPase包括ATP7A和ATP7B,定位于高尔基体内膜上,二者有54%的同源性^[100].ATP7A/7B接受来自Atox1的铜离子并将其转运出细胞.这两种蛋白分别与门克森病(Menkes disease)和威尔逊病(Wilson's disease)相关.ATP7A/7B都由3部分组成:N端金属结合区、跨膜区及C端区.N端包括6个金属结合域(MBD),每个金属结合域含有能与铜相互作用的CxxC序列^[101].金属结合域在结构上高度保守,具有与Atox1蛋白类似的 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 结构^[82].核磁共振结果表明,Cu(I)结合到CxxC序列的半胱氨酸上,并引起蛋白质的构象变化^[102,103].通过定点突变实验发现,靠近跨膜区的第6个MBD对铜的泵出十分重要^[104].第6个MBD可以接受第4个MBD传递的铜离子,然后将其送至跨

膜通道中排出体外^[105].ATP7B的G591D突变会导致威尔逊疾病^[106],该突变会使第6个MBD不稳定而且不可溶^[105].跨膜部分的N区和P区参与ATP的结合与水解,而A区与ATP结合位点相互作用,参与ATP水解过程中的结构变化^[107].

ATP7A和ATP7B的金属结合域有着与Atox1相似的结构,也同样具有与铂类药物结合的能力.Howell课题组^[104]研究发现,ATP7B能与顺铂直接结合并将其运输到亚细胞囊泡中.细胞实验研究表明,当ATP7B金属结合域的保守序列CxxC突变为SxxS后,蛋白质失去运输铜或顺铂的能力,并使细胞的耐药性下降^[104].将表达ATP7A的微粒体(microsomes)吸附在固体支持膜(SSM)上,连接电极形成回路,电学性质实验测定发现,在ATP存在条件下,顺铂和奥沙利铂可以结合在ATP7A的N端金属结合域并引起电荷转移,而ATP7A第6个MBD的C575A/C578A突变干扰了铂的结合,从而抑制ATP相关的电荷转移^[100].由此可见,ATPase的N端CxxC序列与顺铂的结合对顺铂的运输及细胞耐药性密切相关.此外,研究发现,第1个MBD包含高尔基体(trans golgi network, TGN)定位信号,ATP7B的第1个MBD缺失时蛋白质不能定位在TGN,从而影响了其运输铂类药物的功能^[108].ATP7B的第6个金属结合域的CxxC结合顺铂后能引起蛋白质结构的变化,促使顺铂进入囊泡而离开TGN^[108].

顺铂与铜转运蛋白的结合与细胞耐药性相关.细胞实验研究发现,通过ATP7B的siRNA干扰可以使OSC-19-R细胞对顺铂药物的敏感性增强10.6倍^[109].诱导表达ATP7B的1~4 MBD能抑制顺铂导致的大肠杆菌纤维状生长^[99].研究酶促反应及遗传学改变发现,顺铂药物的敏感性与Atox1蛋白及ATPase的表达水平密切相关^[110,111].研究表明,ATP7A和ATP7B可以由Atox1获取铂(图5),这一过程可能参与顺铂的细胞泵出,可能对顺铂的耐药性产生影响^[112,113].

3.3 金属硫蛋白

金属硫蛋白(MT)是一类在组织中广泛存在的富含半胱氨酸的蛋白质,分子量约为7 kDa. MT富含半胱氨酸,与重金属离子有很强的结合能力,通常发挥重金属离子的储存和解毒功能^[114],而高浓度的重金属离子也会诱导细胞对MT的高表达.通常MT作为细胞中锌离子的储存池,能够结合7个锌离子,然而当其他具有更高亲和力的金属(如Cd^{II}、Hg^{II}、Pt^{II})与之反应,

图5 Pt由Atox1向MNK4 (门克森蛋白(ATP7A)第4个金属结合结构域)传递(网络版彩图)

锌离子就会被这些金属取代^[44]. 质谱结果显示, 每个MT分子至多可以结合12个顺铂, 并且顺铂的4个配体会全部离去, 以裸铂形式结合于蛋白质^[115]. 一般认为, 铂药物与MT的结合会导致铂药物活性的丧失, 对铂药物的药效产生负面影响. 有文献推测某些癌细胞对铂药物的耐药性, 与细胞中高水平的MT含量相关^[116]. 降低铂配合物与MT的反应活性对克服顺铂的耐药性有帮助^[117].

3.4 线粒体蛋白

线粒体通过改变膜电位、释放凋亡信号蛋白、改变氧化还原电势等方式在调控细胞凋亡的过程中发挥重要的作用^[118]. 研究表明, 线粒体与顺铂的作用机理相关^[119,120], 铂类药物可以在线粒体蛋白上大量聚集. 顺铂对线粒体蛋白的亲合性较细胞总蛋白更高, 特别是与细胞凋亡相关的电压依赖型阴离子通道蛋白(voltage-dependent anion channel,VDAC), 其顺铂结合能力比细胞中其他蛋白高200倍^[121]. 提高铂类药物在线粒体的富集能够促进肿瘤细胞的凋亡^[122].

Sco1、Cox17和Cox11在Cu(I)转运至线粒体过程中发挥重要作用^[123,124]. Sco1是内膜蛋白, 包含一个跨膜螺旋和一个球状区域, 存在于线粒体膜间隙^[125]. Cox17是一种可溶性蛋白, 存在于线粒体膜间隙和细胞质中^[126], 可以通过线粒体C端膜间隙目标信号(inter-membrane space targeting signal, ITS)由细胞质进入线粒体^[127]. Cox17蛋白有3种不同的氧化还原态: 氧化态Cox17_{3S-S}有3个二硫键, 还原态Cox17_{0S-S}没有二硫键, 处于两者之间的中间态Cox17_{2S-S}有2个二硫键. 细胞摄取铜之后, 通过Cox17_{2S-S}经Sco1和Cox11传递到细胞色素c氧化酶(CCO)上^[123]. 在酵母细胞中, Cox17突变会导致CCO功能和细胞呼吸系统的缺陷, 这种缺陷可以通过向培养基中加入0.4%的铜盐消除.

本课题组^[128]的研究显示, 铜伴侣蛋白Cox17与顺铂向线粒体运输有关. 体外实验表明, Cox17_{2S-S}的两个自由半胱氨酸(Cys23、Cys24)可以与顺铂结合, 并将铂运送到线粒体中(图6). 通过转染质粒或用Cox17 siRNA干扰的方法调控细胞中Cox17的表达水平, 发现Cox17的表达量与线粒体中铂的含量相关. Cox17过表达的细胞中, 线粒体中铂的积累量可以提高28%, 而下调Cox17表达的细胞中线粒体内铂积累量下降35%^[128], 由此表明, Cox17与顺铂向线粒体的转运密切相关. 细胞毒性实验显示, Cox17表达水平和线粒体中铂的含量与细胞对顺铂的敏感性相关. Cox17高表达的细胞对顺铂更加敏感, 而Cox17低表达细胞则显示出顺铂耐药性. 由于Cox17在一些肿瘤细胞(如非小细胞肺癌)中过表达, 因此该蛋白被认为是肿瘤治疗的药物作用靶点^[129]. 顺铂也是非小细胞肺癌的治疗药物, 它与Cox17作用的研究表明, Cox17可能是顺铂在细胞内除DNA之外的另一个作用靶点.

3.5 锌指蛋白

锌指蛋白(zinc-finger-proteins, ZFP)是一类含有锌指结构域的蛋白质. 锌指蛋白家族作为最大的转录因子成员, 在细胞内广泛存在. 人类基因组测序计划结果表明, 锌指蛋白基因占据了整个人类基因组的2%~3%^[130]. 锌指结构域在结构上较为保守, 即通过Zn²⁺与半胱氨酸或组氨酸残基的四面体配位形成“手指状”结构, 任何破坏Zn²⁺配位的因素都可能对ZF稳定性造成影响, 从而影响其与DNA的结合过程, 最终影响锌指蛋白的功能^[131]. 一些与疾病相关的锌指蛋白被

图6 Cox17转运顺铂至线粒体并诱导细胞凋亡示意图^[128] (网络版彩图)

认为是潜在的药物作用靶点^[132]。由于Pt(II)对硫原子具有很高的亲和性, 锌指蛋白中的Cys残基很可能是铂类化合物的潜在作用位点^[133]。

3.5.1 Sp1

转录因子Sp1 (specificity protein 1)是第一个被发现并被克隆的可以结合特异DNA序列的蛋白质。它通过调控一系列基因的表达在众多生命过程中发挥重要作用^[134]。从基因序列上分析, Sp1转录因子的C端有着3个连续的C2H2型锌指结构域, 该结构域通过特异地识别富含GC序列的DNA, 介导相关基因的转录过程^[135]。蛋白质水平研究表明, 在许多肿瘤组织中Sp1蛋白常表现异常(过表达或异常活化), Sp1通过调控一系列肿瘤相关基因的表达而在肿瘤细胞的增殖、转移以及血管生成等过程发挥重要的作用^[136]。例如, 胃癌细胞中Sp1的表达水平明显增高^[137]; 原癌蛋白c-Met在转录水平上受Sp1和Sp3转录因子所调控, 肺癌细胞中, 降低Sp1蛋白的表达和活力可以起到抑制c-Met蛋白的表达, 在癌症治疗中取得较好疗效^[138]。Sp1已作为癌症发生的一个检测指标, 并认为是癌症治疗中的一个重要靶点^[139]。

本课题组选取Sp1锌指结构域为研究对象, 系统地比较了不同配体和构型的铂类化合物对Sp1锌指结构域的反应活性, 研究不同铂类化合物在作用机理上的差异, 发现配体具有调控铂类化合物与Sp1反应活性的作用。在此基础上, 选取了具有高反应活性的反式噻唑铂化合物(*trans*-PtTz)进行了详细的研究。CD光谱和NMR实验发现*trans*-PtTz的结合对Sp1蛋白的二级结构有着较大影响, 导致其锌指结构被破坏。由于锌指结构是Sp1转录因子与DNA结合并执行基因转录调控的基础, 我们通过电泳迁移率实验(EMSA)研究发现, *trans*-PtTz的结合抑制了DNA与Sp1的结合; 细胞成像实验表明, *trans*-PtTz可以通过破坏Sp1的锌指结构阻碍Sp1从细胞质到细胞核的迁移(图7)。通过该研究推测, 铂类药物可能通过影响细胞内转录因子的功能而影响到下游目标基因的表达, 这个过程可能与*trans*-PtTz的活性机理相关, 这些证据进一步丰富了非经典反式铂化合物的抗癌机理^[140]。

3.5.2 PARP

PARP蛋白(poly(ADP-ribose) polymerase)在DNA修复中起着关键作用^[141], 有报道显示, PARP可以结合铂

图7 反式噻唑铂(*trans*-PtTz)影响Sp1结构与功能示意图^[140] (网络版彩图)

修饰的DNA^[37,142]。铂类药物能够与Zn²⁺在ZF-PARP1的结合位点进行竞争, 从而抑制其活性, 并且效果高于基准抑制剂3-AB^[143]。除铂类药物之外, 其他金属药物也能与PARP直接作用, 包括Au、Ru、As等^[143], 如本课题组^[144]通过等温滴定微量热(ITC)的方法测量PARP1与砷的反应亲和力, 并通过CD证明砷对其结构的破坏。

3.5.3 其他锌指蛋白

除上述两种锌指蛋白外, 还有其他的锌指蛋白可以与铂类药物作用, 如顺铂可以与DNA聚合酶 α 的C4-ZF序列中的半胱氨酸残基结合, 并抑制蛋白质的活性^[145]。乳腺癌易感蛋白1 (BRCA1)具有类似锌指的环指结构域, 顺铂结合BRCA1并形成分子内和分子间的Pt-BRCA1复合物, 其中Pt优先结合在His117位点^[146]。体外研究表明, 顺铂及其类似物对BRCA1环指结构域的结合导致BRCA1的泛素连接酶活性被抑制^[147]。此外, 铂类药物与人类免疫缺陷病毒(HIV)核衣壳蛋白NCp7锌指的作用导致蛋白质的锌逐出^[148], 提示金属配合物具有成为以NCp7为靶点的抗HIV药物的潜在可能。

4 小分子化合物对蛋白质与铂类药物结合的影响

细胞是一个由多种分子组成的高度复杂的体系, 由于金属药物配位结合的非特异性, 各种分子可能对金属药物具有竞争结合作用。同时, 特定蛋白质与金属药物的反应也可能受到其他分子以及环境因素的影响, 使得在体外溶液中获得的结果可能无法完全地反映细胞内的真实情况。因此, 研究各种环境条

件对反应影响可以更好地理解金属药物的作用机理.

铜蛋白与铂类药物的摄取、外排及耐药性的产生密切相关. 这些蛋白质具有较强的铜离子结合能力, 因此, 金属离子配位可能影响金属蛋白与金属药物的反应活性. 例如, 铜离子的结合可以增强Atox1蛋白的热力学稳定性, 引起金属结合部位的构象稳定性改变^[102,103]. 本课题组^[149]通过NMR和电喷雾电离质谱(ESI-MS)研究顺铂与apo-Atox1和Cu-Atox1的反应, 结果显示顺铂可以配位在Atox1中铜的结合位点. 此外, 我们意外地发现, 尽管顺铂与铜离子的结合位点相同, 但铜离子的存在极大地促进了顺铂与Atox1的结合, 同时抑制二巯苏糖醇(DTT)、GSH与顺铂的相互作用. 对比反式铂的反应发现, 虽然铜离子的存在也同样提高了反铂与蛋白质的反应活性, 但促进了铂从Atox1蛋白质向GSH的转移^[150], 表明铜离子配位对不同铂配合物与蛋白质的反应具有不同的影响. 临床试验发现, 铜离子对顺铂的疗效有显著影响. 例如, 铜螯合剂与铂类药物联合给药可以降低卵巢癌患者的铂耐药性^[151]. 同样的现象也在Cox17的反应中观察到, 铜离子的存在能大大加快顺铂、反铂、奥沙利铂与Cox17的反应. 这些结果也解释了为何铂类药物在细胞内更倾向于结合铜蛋白. 因此, 铜离子对蛋白反应活性影响可能与顺铂的作用机制相关.

谷胱甘肽(GSH)是细胞质中一种含巯基的三肽, 在细胞中的含量可达0.5~10 mM, 尤其在顺铂耐药细胞中的含量更高. GSH与铂类药物有很高的反应活性, 研究发现GSH可以与顺铂反应形成多种不同的产物, 包括稳定的Pt(GS)₂^[152]. 早期的研究认为, 进入细胞的铂药物大部分会和高浓度的GSH反应. 然而, Gibson课题组^[153]研究细胞提取物与¹⁵N标记的顺铂作用时发现, 细胞提取物中Pt(GS)₂所占的比例不超过20%. 虽然GSH可能不是铂药物的主要结合对象, 但GSH的存在对铂药物与蛋白质的结合有重要的影响. 本课题组^[154]研究发现, GSH可以促进3种抗癌药物(顺铂、卡铂、奥沙利铂)与Cox17的反应, 却能够抑制反铂与Cox17的反应, 表明GSH对不同结构铂配合物的反应具有不同的影响^[154]. 此外, 通过凝胶电泳(SDS-PAGE)分析发现, 顺铂、反铂、奥沙利铂都会导致Cox17的聚集. 同时, 我们还观测到, GSH可以显著提高Cox17与顺铂和卡铂的反应程度, 但GSH的存在会减少顺铂导致的蛋白聚集. 由此可见, 蛋白聚集与Pt反应程度可能不一

致, 而且胞内的环境也对蛋白铂化产生影响. 有研究表明, 顺铂能够引起Atox1蛋白聚集, 并认为这种聚集可能与顺铂的耐药性相关^[88,91]. 研究显示, 由于GSH的作用, 体外所发现的蛋白质聚集不一定会在细胞内发生.

金属蛋白的半胱氨酸残基是铂类药物反应的重要位点, 体外实验时为维持半胱氨酸的巯基处于还原状态, 通常加入三(2-羧乙基)膦(TCEP)、DTT等还原剂. 但是TCEP和DTT的存在会对蛋白质的反应产生极大的影响. 例如, Sp1对顺铂的反应活性较低, 而TCEP会与顺铂反应而使其活化, 显著促进顺铂与Sp1的反应^[155]. Natile课题组^[156]在研究Pt由Atox1向ATP7A的MBD转移时发现, TCEP作为还原剂能够促进铂的转移. 结合各种反应现象可知, 在研究铂药物与蛋白质的作用时, 都应当考虑到环境中的小分子所产生的影响, 从而使结果能够更好地反映药物作用机理.

5 非抗肿瘤药物作用靶点

5.1 蛋白内含子

蛋白质内含肽(intein)是存在于前体蛋白中的一段蛋白序列, 在蛋白质翻译后从前体蛋白中自我剪切并将两端蛋白序列连接形成成熟的蛋白质^[157]. 蛋白质内含肽分布广泛, 可存在于细菌、古细菌和真菌中^[158]. 由于某些致病菌的关键蛋白质的成熟依赖于intein的活性, 而在人体内并不存在intein, 因此特异性的intein抑制剂可能成为安全的抗菌药物.

前期研究显示, Zn²⁺、Cu²⁺金属离子可以抑制intein的体外剪接活性^[159-161]. Zn²⁺和Cu²⁺可以结合到RecA intein的活性位点, 抑制intein剪接过程中所产生的肽键的重排^[162,163]. 肺结核菌内有3种关键的酶(RecA、DnaB和SurfB)通过intein剪接成熟, 因此intein抑制剂可能具有抑制结核菌生长的作用. intein含有保守的半胱氨酸(Cys1、Cys-1)对蛋白剪接起着至关重要的作用^[164,165], 而His73和His439等关键氨基酸残基在空间上与这些半胱氨酸靠近, 形成RecA intein的活性中心^[166]. 根据软硬酸碱规则, 半胱氨酸与组氨酸中的硫原子易与铂类药物结合, 因此可以利用铂类药物抑制RecA intein的剪接活性, 从而达到抑制结核杆菌生长的目的^[167]. 利用基因突变的大肠杆菌, 转入具有intein插入的外源基因, 通过基于大肠杆菌的筛选方法, 检测体外筛选所获得的配合物中具有对细菌内蛋白剪

接有活性的配合物. 结果发现, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 离子虽然表现出了较高的体外抑制活性, 它们对细菌内的蛋白剪接均无效果. 多数Pt的配合物在细菌中的作用效率较体外有显著下降, 只有顺铂(*cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$)显示出了良好的抑制作用. 抑菌实验表明, 具有抑制蛋白质剪接活性的顺铂可以抑制结核杆菌的生长, 而反铂则无抑菌作用, 表明抑制蛋白剪接效率与抑菌作用具有很高的相关性. 转入外源intein质粒DNA可以降低顺铂对结核菌作用, 证实顺铂在结核菌中的作用靶点为intein. 通过核磁共振、质谱、EXAFS等方法探讨顺铂与intein的作用机理, 发现顺铂在intein蛋白中的结合位点为蛋白剪接的关键残基Cys1、His73. EDTA的存在不影响顺铂与intein的作用, 谷胱甘肽GSH可以阻碍顺铂的配位, 但顺铂配位后对intein的抑制作用不会被GSH恢复^[167]. 这一研究显示, 铂类金属配合物可能通过抑制intein介导的蛋白剪接实现抗结核菌生长的作用.

5.2 A β 肽

阿尔兹海默症(AD)是一种渐进型的神经退行性疾病, 可以引起突触传导功能丧失、神经元死亡. 初期病症表现为健忘, 最后会丧失认知能力^[168]. 阿尔兹海默病理学特征表现为大脑半球形成老年斑、神经纤维缠结、广泛性神经细胞死亡^[169]. 老年斑主要由 β 淀粉样肽(A β)聚集产生^[170,171]. 这些小肽包含39~43个氨基酸残基, 是 β 淀粉样前体蛋白(APP)在 β -和 γ -分泌酶的酶切后产生的. 因此, A β 在阿尔兹海默症中起着关键的作用.

研究发现, Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 离子的存在能够促进A β 的聚集^[172~174], 这主要是由于A β 肽对过渡金属有很强的亲和性. 这些金属离子可能通过两个过程促进A β 的聚集: (1) 直接配位结合于A β 并促进其聚集^[175]; (2) 氧化还原活性的金属离子(如铜离子和铁离子)诱导产生活性氧(ROS)和氧化应激^[176,177]. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 离子能与A β 的组氨酸配位^[178~183], 体外实验结果表明, 将3个组氨酸的咪唑侧链甲基化可以抑制金属离子与A β 的结合, 从而降低神经毒性^[184]. 因此, 螯合疗法可通过除去金属离子降低A β 的毒性^[185], 如螯合剂氯碘羟喹已进入临床试验^[186].

近来发现铂配合物可以结合A β 并抑制其聚集^[187]. 与螯合剂作用机理不同, 铂配合物通过共价结合至

A β 并抑制其聚集, 同时消除铜诱导的氧化还原过程和降低A β 引起的神经毒性^[188]. 本课题组^[189]采用高效液相色谱(HPLC)、ESI-MS和NMR等方法研究了A β 的N-端金属结合域与 $[\text{PtCl}_2(\text{phen})]$ 的作用机理. 结果表明, 邻菲罗啉配位体可诱导A β 肽和铂配合物之间的非共价相互作用, 从而导致A β 快速铂化. 通过串联质谱表征复合物的组成, 发现在反应中有多个反应产物的生成, 其优先形成His6/His14结合产物, 同样也发现了Asp7、His13和Lys16等结合产物. 多数产物都是与 $[\text{Pt}(\text{phen})]^{2+}$ 配位, 这阻碍了A β 肽的分子间相互作用. 此外, 通过NMR光谱和荧光测量证实了A β 肽和 $[\text{PtCl}_2(\text{phen})]$ 之间的相互作用为非共价相互作用. 这种非共价相互作用促进铂配合物与A β 肽的结合, 铂原子和邻菲罗啉配位体对抑制A β 聚集发挥协同作用. 除此之外, 通过研究 $[\text{PtCl}_2(\text{phen})]$ 与Cu-A β 复合物的反应, HPLC结果表明, 铜的存在降低了 $[\text{PtCl}_2(\text{phen})]$ 与A β 肽的反应速率并影响产物在HPLC图谱的分布^[190]. EPR结果表明, A β 肽结合 $[\text{Pt}(\text{phen})]^{2+}$ 的同时, 铜离子与A β 肽的配位也存在, 但铜离子的配位位置改变. 通过ESI-MS确认双金属配位络合物 $[\text{Pt}(\text{phen})+\text{A}\beta+\text{Cu}]$ 的形成, 而串联质谱分析表明, 铜离子存在下结合方式也是类似于apo-A β 肽的反应, 其优先形成His6/His14结合产物. EPR谱显示的是, 结合 $[\text{Pt}(\text{phen})]^{2+}$ 后的A β 肽会改变铜的配位方式, 从模式I到模式II. 串联质谱分析表明, 在双金属复合物中, His13和N末端氨基能够参与铜离子配位. 类似的结果在 Zn^{2+} 结合的A β 肽反应中也发现了, 验证了双金属复合物的形成. 这些结果表明, 铂配合物在抑制A β 肽聚集的同时, 也干扰 $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 的最有利配位模式, 从而降低了金属诱导的A β 聚集和毒性^[190].

综上所述, 铂类药物可以与细胞中的多种蛋白质发生相互作用(图8), 这些相互作用对铂类药物的生理学作用机制至关重要.

6 铂类药物与蛋白质作用的分析方法

6.1 质谱

由于反应动力学的原因, 质谱在研究铂类药物与蛋白质的反应中可以发挥重要作用. 多数情况下, HPLC分离与ESI-MS的联合使用可以用于检测蛋白质

图 8 顺铂与不同蛋白质的作用机理示意图(网络版彩图)

与铂类药物的结合形式^[191], 也可以通过电感耦合等离子质谱(ICP-MS)对铂的结合量进行定量分析^[192].

为了更准确识别铂与蛋白质的结合位点, 通常有两种方法可用于蛋白质的质谱分析: 自上而下(top-down)方法和自下而上(bottom-up)方法. top-down方法是通过多级质谱直接测量完整的蛋白质鉴定蛋白质种类. bottom-up方法则采用预先部分酶解的方法将蛋白质剪切为不同大小的肽段, 然后通过质谱肽段进行表征. 在top-down方法中, 串联质谱利用不同的解离的方法, 如碰撞活化解离(CAD)、电子捕获解离(ECD)或红外多光子解离(IRMPD)等可以用来产生不同的蛋白质碎片, 并对碎片进行进一步的质谱分析. 这意味着在质谱分析前不需要蛋白加工, 但所获得的质谱谱图的复杂性高、数据量大, 限制了其应用, 仅适用于分析小蛋白质. bottom-up的方法则需要对蛋白质进行酶解, 在这一过程中样品的稳定性需要关注, 即样品制备或电离过程需保持铂与蛋白质复合物的稳定. 有研究表明, ESI比基质辅助激光解吸电离(MALDI)更适合对铂-蛋白质复合物的分析, 因为后者过度高能电离过程在分析过程中可能导致不稳定配体的损失^[193].

使用top-down方法研究顺铂与胰岛素的反应中发现, 铂结合在胰岛素B链的His5、His10、Cys7残基, 但铂的其他结合位点质谱未能归属^[194]. 而使用bottom-up

的方法将消化产物通过nESI-LIT-MS串联质谱的直接分析, 发现铂结合位点包括胰岛素A链的Cys6、Cys7和Cys20残基以及B链的His5、His10、Cys7和Cys19残基^[195]. 这项研究表明, 铂原子在蛋白质中具有多个结合位点, 对于顺铂与胰岛素的反应而言, bottom-up的方法获得了更丰富的结合位点信息. 然而, 在奥沙利铂对胰岛素的结合位点的判断研究中, 发现bottom-up方法无法获得明确的铂结合位点^[196]. 事实上, 铂化胰岛素在蛋白酶消化后, 发现铂从蛋白质复合物中解离. 此外, 蛋白酶解过程中, 被释放的铂原子可以重新结合到不同的氨基酸从而影响结合位点的分析.

top-down和bottom-up质谱方法的适当组合可以更加准确地分析铂在蛋白质中的结合位点, 因而两种方法具有互补性. 例如, 对钙调蛋白(CAM)的研究中, 通过top-down和bottom-up方法的结合, 使用傅里叶变换离子回旋共振质谱法(FT-ICR-MS)研究药物与CAM的结合位点^[197]. 除了蛋白质结合位点的鉴定, 质谱技术也能够提供蛋白质的构象变化信息, 如利用离子迁移率质谱法(IM-MS)研究顺铂存在下泛素的构象变化^[198].

6.2 X射线晶体衍射

X射线晶体衍射是应用最广泛的结构测定手段, 可在原子水平上准确地分析蛋白质中金属离子的配

位结合信息以及金属配位对蛋白质结构的影响。然而对于铂类金属药物而言, 由于铂配位的非特异性、以及在反应动力学上Pt(II)的配位结合速度较慢, 铂配合物与蛋白质结合往往会有多种不同结合位点的产物。此外由于铂类药物的多种配体取代可能性, 蛋白质产物的复杂性更高, 因而往往无法获得合适的单晶用于结构分析, 所得到晶体通常是蛋白质的多种产物中比较容易结晶的组分。就其特点而言, X射线晶体衍射是分析药物与蛋白质结合的最准确的结构分析方法。目前, 已有多种蛋白质与铂类药物的晶体结构被解析, 包括Atox1、核糖核酸酶A、细胞色素C等, 为理解药物与蛋白质的作用提供了重要信息。

如前所述, 顺铂与Atox1的结构表明顺铂可以在两个蛋白质分子之间形成桥连, 这一过程与铜离子的配位结合相似; 而氨配体的存在表明顺铂以药物活性的形式与蛋白结合。这些结构信息体现了X射线晶体衍射在分析药物与蛋白质结合中的优势^[90]。RNA酶A与顺铂的复合物的晶体结构表明, 顺铂结合于RNase A的Met29和Gln28, 这是第一次通过X-ray提供了结构证据证明顺铂以二齿模式结合蛋白质。顺铂结合之后蛋白质整体结构的变化很小, 表明对于RNase A而言, 顺铂的结合不引起蛋白质构象的重大结构变化^[199]。对其他铂类药物对RNA酶A作用的研究发现, 卡铂和顺铂的结合方式类似, 而奥沙利铂显示出不同的行为^[200], 其结合位点包括Asp14、His105和His119残基, 表明不同药物与蛋白质反应的差异。对于细胞色素c-顺铂复合物的结构研究发现, 顺铂以 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]$ 形式单齿结合于Met65或以 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]$ 形式双齿结合于Met65和Glu61。证实蛋白质中顺铂可能有不同的结合模式(单齿或二齿), 且不同的结合模式允许出现在同一顺铂结合位点^[201]。

6.3 核磁共振波谱

核磁共振(NMR)是在原子水平研究溶液状态下生物大分子最有效的方法, 尤其是反应和变化的动态过程。利用不同NMR技术和同位素标记方法, 可以获得金属药物与蛋白质多种信息。

铂类抗癌药物的Pt配位位点均含有NH, 这为铂类药物的¹⁵N标记及NMR研究提供了方便。利用核磁共振异核单量子相干谱(¹H-¹⁵N HSQC)分析¹⁵N标记的顺铂与蛋白质的反应, 可以获得其动力学信息以及铂化合物配体转化过程^[150,202]。此外, ¹⁵N的化学位移受到Pt

对位原子的影响。例如, 顺铂在蛋白质反应时, 氯配体被氧、氮或硫配体取代后, 氨配体的化学位移会呈现特征变化, 因此可以根据其化学位移的变化分析铂类药物的配位结构、配体取代过程以及不同配合物反应的差异^[67,203]。

蛋白质的同位素标记是NMR研究中常用的方法, 通过蛋白质全标记研究铂类化合物对蛋白质结构的影响是非常有效的手段。我们采用这一方法对Atox1、Sp1、Cox17、NCp7、ER α 、intein等多种蛋白进行了研究^[140,163,204,205]。此外, 也可以通过对蛋白中一些特定氨基酸(如Cys, Met等)进行¹³C或¹⁵N的选择性标记, 采集相应的¹H-¹⁵N或¹H-¹³C HSQC谱图, 判断铂类抗肿瘤药物与蛋白的反应及相关结合形式。例如, 采用蛋氨酸的¹³C标记, 可以研究在细胞摄取后, 细胞破碎液这样复杂环境中特定蛋白质与顺铂的结合情况^[206]。

¹⁹⁵Pt的核自旋 $I=1/2$, 天然丰度达到33.8%, 其化学位移取决于Pt的价态和配位原子, 化学位移跨度超过15000 ppm。由于铂的化学位移与Pt的化合价态及其对位的配位原子类型相关, 因而可以采用一维¹⁹⁵Pt谱或二维¹H-¹⁹⁵Pt HMQC谱研究铂类药物的配位环境与反应过程。采用二维¹H-¹⁹⁵Pt HMQC和二维¹H-¹³C HSQC相关谱, 可以看出Pt与Met的硫原子和氨基配位^[207]。¹H-¹⁹⁵Pt HMQC谱图简单, 每一个产物仅有少数几个峰, 可以简化分析过程(图9)。

除此之外, in-cell NMR方法可用于研究细胞内铂类药物反应过程。In-cell NMR波谱法提供了在生理条件下的分子结构的原子级分辨率。生物大分子的NMR活性核对化学环境的变化极为敏感^[208], 因此, 通过in-cell NMR可以对活细胞内的蛋白质反应进行研究^[209,210]。例如, 采用in-cell NMR研究细胞内Atox1与顺铂的相互作用, 观察到 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]$ -Atox1复合物形成, 随反应时间延长, 发现蛋白二聚体的形成及氨配体被取代的过程^[211]。

6.4 其他表征手段

通过CD测定二级结构百分含量的变化, 可以确定铂类药物对蛋白质结构的影响。天然蛋白质通常具有特定空间结构, 与铂类抗肿瘤药物作用后, 空间结构可能发生变化, 从而对蛋白质的功能产生影响。在对铂类药物对Sp1蛋白功能影响研究中, 通过CD谱分析发现trans-PtTz作用Sp1-zf2锌指蛋白后导致了Sp1锌指结构的丧失, 而在同样反应条件下, 顺铂对Sp1-zf2锌

图9 二维核磁共振谱检测反式铂配合物 trans-EE 与 ^{15}N - ^{13}C 同位素标记蛋氨酸的反应产物. (a) 二维 ^1H - ^{195}Pt HMQC 相关谱; (b) 二维 ^1H - ^{13}C HSQC 相关谱

指结构的影响较小^[140].

紫外-可见光谱也是检测铂类药物与蛋白质反应的有效手段. 由于Pt通常配位在蛋白质的Cys残基, 而Pt-S配位键在285 nm的吸收可用于验证药物与蛋白反应的进行. 例如, 铂类药物与锌指蛋白结构域内的Cys残基配位时, 可以通过监测285 nm处紫外吸收随反应时间的变化来监测铂类药物与蛋白的反应动力学过程.

通过荧光光谱可以判断因蛋白结合铂类药物而造成蛋白质内氨基酸环境的变化, 且荧光是一种十分灵敏、高效的检测方法. 对于含内源性荧光(如色氨酸)残基的蛋白质, 铂类药物的结合可能导致的发色基团的疏水环境变化, 从而影响蛋白质的荧光强度. 因此可以运用荧光的方法检测铂类药物与蛋白的相互作用^[154].

通过SDS-PAGE方法研究铂类药物与蛋白之间的作用. 研究表明, 顺铂的结合会促进Atox1进行解折叠, 并导致蛋白质的聚集^[88]. 因此可以通过凝胶电泳比较不同铂化合物诱导蛋白质聚集的情况^[90,192]. 值得注意的是, 蛋白质聚集状态可能与其铂化程度并不一致, 因而, 仅通过凝胶电泳方法判断蛋白质的反应是不够的.

通过量子力学/分子力学(QM/MM)方法可以分析蛋白-配体复合物的构象和能量. 例如, 对溶液中Atox1与顺铂复合物三维结构计算发现, Pt-Atox1与Pt-Mnk1的结构相似, 且该模型与光谱研究数据相符^[212]. 分子

动力学(MD)计算也被用于研究铂类药物与蛋白质的作用, MD计算结果表明, 奥沙利铂比顺铂和反铂对蛋白质构象的影响更大^[213], 这些计算数据可与实验结果相互补充与验证.

7 总结与展望

与大多数有机药物不同, 金属药物具有较高的反应活性与非特异性, 这就要求在研究金属药物作用机理时考虑到金属药物可能具有多靶点功能, 同时一些非靶点作用可能影响金属药物的反应活性以及产生毒副作用. 尽管目前普遍认为DNA是铂类药物的作用靶点, 但无论从配位化学理论(2价铂的配位取代反应)的分析还是实验结果(进入细胞内的铂仅有不到1%形成DNA交联产物)的考虑, 都不能忽略蛋白质对铂类药物的作用机理的影响. 近年来, 蛋白质在铂药物的运输、传递、活性改变、DNA损伤应答等方面的作用正在不断得到阐明, 以蛋白质作为铂药物靶点的尝试也在不断进行之中. 然而, 由于金属药物配位取代反应的非特异性, 蛋白质和铂药物的作用是一个非常复杂的过程, 可能有许多生物分子的反应尚未掌握, 而且配位取代反应还会受到环境中各种小分子的影响. 蛋白质与铂药物在体内的作用机理还有很多未知之处, 需要我们运用各种常规方法和开发新的方法进行不断的研究和探索.

参考文献

- 1 Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. *Nature*, 1965, 205: 698–699
- 2 Kelland L. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 573–584

- 3 Berners-Price SJ. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 804–805
- 4 Bosl GJ, Motzer RJ. *N Engl J Med*, 1997, 337: 242–254
- 5 McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M. *N Engl J Med*, 1996, 334: 1–6
- 6 Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, Gatzemeier U, Boyer M, Emri S, Manegold C, Niyikiza C, Paoletti P. *J Clin Oncol*, 2003, 21: 2636–2644
- 7 Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, Serwatowski P, Gatzemeier U, Digumarti R, Zukin M, Lee JS, Mellemaard A, Park K, Patil S, Rolski J, Goksel T, de Marinis F, Simms L, Sugarman KP, Gandara D. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 3543–3551
- 8 Daugaard G, Abildgaard U. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1989, 25: 1–9
- 9 Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. *Oncogene*, 2012, 31: 1869–1883
- 10 Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. *Pharmacol Rev*, 2012, 64: 706–721
- 11 Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. *Dalton Trans*, 2010, 39: 8113–8127
- 12 Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. *Chem Rev*, 2016, 116: 3436–3486
- 13 Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. *Mol Pharmacol*, 2001, 59: 657–663
- 14 Gullo JJ, Litterst CL, Maguire PJ, Sikic BI, Hoth DF, Woolley PV. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1980, 5: 21–26
- 15 Kartalou M, Essigmann JM. *Mutat Res*, 2001, 478: 1–21
- 16 Zhu G, Lippard SJ. *Biochemistry*, 2009, 48: 4916–4925
- 17 Zhang CX, Chang PV, Lippard SJ. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 6536–6537
- 18 Jung Y, Lippard SJ. *Chem Rev*, 2007, 107: 1387–1407
- 19 Woźniak K, Błasiak J. *Acta Biochim Pol*, 2002, 49: 583–596
- 20 Basu A, Krishnamurthy S. *J Nucleic Acids*, 2010, 2010: 1–16
- 21 Kasparkova J, Novakova O, Farrell N, Brabec V. *Biochemistry*, 2003, 42: 792–800
- 22 Huang JC, Zamble DB, Reardon JT, Lippard SJ, Sancar A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 10394–10398
- 23 Costa R. *Biochimie*, 2003, 85: 1083–1099
- 24 Riedl T. *EMBO J*, 2003, 22: 5293–5303
- 25 Avdievich E, Reiss C, Scherer SJ, Zhang Y, Maier SM, Jin B, Hou H Jr, Rosenwald A, Riedmiller H, Kuchelapati R, Cohen PE, Edelmann W, Kneitz B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 4247–4252
- 26 Ding X, Mohd AB, Huang Z, Baba T, Bernardini MQ, Lysterly HK, Berchuck A, Murphy SK, Buermeier AB, Devi GR. *Br J Cancer*, 2009, 101: 269–277
- 27 Mello JA, Acharya S, Fishel R, Essigmann JM. *Chem Biol*, 1996, 3: 579–589
- 28 Yamada M. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 491–496
- 29 Topping RP, Wilkinson JC, Scarpinato KD. *J Biol Chem*, 2009, 284: 14029–14039
- 30 Lin X, Howell SB. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5: 1239–1247
- 31 Shimodaira H, Yoshioka-Yamashita A, Kolodner RD, Wang JYJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2420–2425
- 32 Krynetskaia NF, Phadke MS, Jadhav SH, Krynetskiy EY. *Mol Cancer Therapeutics*, 2009, 8: 864–872
- 33 He Q, Ohndorf UM, Lippard SJ. *Biochemistry*, 2000, 39: 14426–14435
- 34 He Y, Ding Y, Wang D, Zhang W, Chen W, Liu X, Qin W, Qian X, Chen H, Guo Z. *Chem Sci*, 2015, 6: 2074–2078
- 35 Sharma A, Ramanjaneyulu A, Ray R, Rajeswari MR. *DNA Cell Biol*, 2009, 28: 311–318
- 36 Park S, Lippard SJ. *Biochemistry*, 2011, 50: 2567–2574
- 37 Guggenheim ER, Xu D, Zhang CX, Chang PV, Lippard SJ. *ChemBioChem*, 2009, 10: 141–157
- 38 Zhu G, Chang P, Lippard SJ. *Biochemistry*, 2010, 49: 6177–6183
- 39 Kasparkova J, Pospisilova S, Brabec V. *J Biol Chem*, 2001, 276: 16064–16069
- 40 Stehlíková K, Kaspárková J, Nováková O, Martínez A, Moreno V, Brabec V. *FEBS J*, 2006, 273: 301–314
- 41 Kasparkova J, Thibault T, Kostrhunova H, Stepankova J, Vojtiskova M, Muchova T, Midoux P, Malinge JM, Brabec V. *FEBS J*, 2014, 281: 1393–1408
- 42 Wong JHY, Brown JA, Suo Z, Blum P, Nohmi T, Ling H. *EMBO J*, 2010, 29: 2059–2069
- 43 Reißner T, Schneider S, Schorr S, Carell T. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 3077–3080
- 44 Casini A, Reedijk J. *Chem Sci*, 2012, 3: 3135
- 45 Espósito BP, Najjar R. *Coord Chem Rev*, 2002, 232: 137–149
- 46 Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. *Protein Eng*, 1999, 12: 439–446
- 47 Yang F, Liang H. *Future Med Chem*, 2016, 8: 89–91

- 48 Xie R, Johnson W, Rodriguez L, Gounder M, Hall GS, Buckley B. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 387: 2815–2822
- 49 Ferraro G, Massai L, Messori L, Merlino A. *Chem Commun*, 2015, 51: 9436–9439
- 50 Gomme PT, McCann KB, Bertolini J. *Drug Discov Today*, 2005, 10: 267–273
- 51 Sun H, Li H, Sadler PJ. *Chem Rev*, 1999, 99: 2817–2842
- 52 Khalaila I, Allardyce CS, Verma CS, Dyson PJ. *ChemBioChem*, 2005, 6: 1788–1795
- 53 Zhao YY, Mandal R, Li XF. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19: 1956–1962
- 54 Li H, Qian ZM. *Med Res Rev*, 2002, 22: 225–250
- 55 Naredi P, Heath DD, Enns RE, Howell SB. *J Clin Invest*, 1995, 95: 1193–1198
- 56 Naredi P, Heath DD, Enns RE, Howell SB. *Cancer Res*, 1994, 54: 6464–6468
- 57 Katano K, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M, Kuo YM, Rochdi M, Howell SB. *Cancer Res*, 2002, 62: 6559–6565
- 58 Safaei R, Howell SB. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005, 53: 13–23
- 59 Safaei R, Katano K, Samimi G, Naerdemann W, Stevenson JL, Rochdi M, Howell SB. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, 53: 239–246
- 60 Holzer AK, Varki NM, Le QT, Gibson MA, Naredi P, Howell SB. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54: 1041–1049
- 61 Lin X. *Mol Pharmacol*, 2002, 62: 1154–1159
- 62 Puig S, Lee J, Lau M, Thiele DJ. *J Biol Chem*, 2002, 277: 26021–26030
- 63 Aller SG, Unger VM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 3627–3632
- 64 De Feo CJ, Aller SG, Siluvai GS, Blackburn NJ, Unger VM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 4237–4242
- 65 Nguyen TH, Arnesano F, Scintilla S, Rossetti G, Ippoliti E, Carloni P, Natile G. *J Chem Theory Comput*, 2012, 8: 2912–2920
- 66 Arnesano F, Scintilla S, Natile G. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 9062–9064
- 67 Wang X, Du X, Li H, Chan DSB, Sun H. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 2706–2711
- 68 Wang E, Xi Z, Li Y, Li L, Zhao L, Ma G, Liu Y. *Inorg Chem*, 2013, 52: 6153–6159
- 69 Holzer AK, Samimi G, Katano K, Naerdemann W, Lin X, Safaei R, Howell SB. *Mol Pharmacol*, 2004, 66: 817–823
- 70 Holzer AK, Manorek GH, Howell SB. *Mol Pharmacol*, 2006, 70: 1390–1394
- 71 Noordhuis P, Laan AC, van de Born K, Losekoot N, Kathmann I, Peters GJ. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76: 53–61
- 72 Ishida S, McCormick F, Smith-McCune K, Hanahan D. *Cancer Cell*, 2010, 17: 574–583
- 73 Maryon EB, Zhang J, Jellison JW, Kaplan JH. *J Biol Chem*, 2009, 284: 28104–28114
- 74 Gupta A, Lutsenko S. *Future Med Chem*, 2009, 1: 1125–1142
- 75 Guo Y, Smith K, Petris MJ. *J Biol Chem*, 2004, 279: 46393–46399
- 76 Sinani D, Adle DJ, Kim H, Lee J. *J Biol Chem*, 2007, 282: 26775–26785
- 77 Du X, Wang X, Li H, Sun H. *Metallomics*, 2012, 4: 679–685
- 78 Zhou B, Gitschier J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 7481–7486
- 79 Bertinato J, L'Abbé MR. *J Biol Chem*, 2003, 278: 35071–35078
- 80 van den Berghe PVE, Folmer DE, Malingré HEM, van Beurden E, Klomp AEM, van de Sluis B, Merckx M, Berger R, Klomp LWJ. *Biochem J*, 2007, 407: 49–59
- 81 Blair BG, Larson CA, Safaei R, Howell SB. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 4312–4321
- 82 Arnesano F, Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Molteni E, Huffman DL, O'Halloran TV. *Genome Res*, 2002, 12: 255–271
- 83 Itoh S, Ozumi K, Kim HW, Nakagawa O, McKinney RD, Folz RJ, Zelko IN, Ushio-Fukai M, Fukai T. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46: 95–104
- 84 Itoh S, Kim HW, Nakagawa O, Ozumi K, Lessner SM, Aoki H, Akram K, McKinney RD, Ushio-Fukai M, Fukai T. *J Biol Chem*, 2008, 283: 9157–9167
- 85 Jeney V, Itoh S, Wendt M, Gradek Q, Ushio-Fukai M, Harrison DG, Fukai T. *Circ Res*, 2005, 96: 723–729
- 86 Alvarez HM, Xue Y, Robinson CD, Canalizo-Hernández MA, Marvin RG, Kelly RA, Mondragón A, Penner-Hahn JE, O'Halloran TV. *Science*, 2010, 327: 331–334
- 87 Wang J, Luo C, Shan C, You Q, Lu J, Elf S, Zhou Y, Wen Y, Vinkenborg JL, Fan J, Kang H, Lin R, Han D, Xie Y, Karpus J, Chen S, Ouyang S, Luan C, Zhang N, Ding H, Merckx M, Liu H, Chen J, Jiang H, He C. *Nat Chem*, 2015, 7: 968–979
- 88 Palm ME, Weise CF, Lundin C, Wingsle G, Nygren B, Björn E, Naredi P, Wolf-Watz M, Wittung-Stafshede P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 6951–6956
- 89 阳新明, 许德晨, 程天凡, 郝照勇, 赵林泓, 刘扬中, 孙红哲. 铜/镍金属伴侣蛋白的研究进展. 化学进展, 2013, 25: 495–510
- 90 Boal AK, Rosenzweig AC. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 14196–14197
- 91 Palm-Espling ME, Wittung-Stafshede P. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83: 874–881
- 92 Gust R, Schnurr B. *Monatsh Chem*, 1999, 130: 637–644

- 93 Jerremalm E, Videhult P, Alvelius G, Griffiths WJ, Bergman T, Eksborg S, Ehrsson H. *J Pharm Sci*, 2002, 91: 2116–2121
- 94 Jerremalm E, Wallin I, Yachnin J, Ehrsson H. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 28: 278–283
- 95 Safaei R, Maktabi MH, Blair BG, Larson CA, Howell SB. *J Inorg Biochem*, 2009, 103: 333–341
- 96 Arnesano F, Losacco M, Natile G. *Eur J Inorg Chem*, 2013, 2013: 2701–2711
- 97 Hall MD, Okabe M, Shen DW, Liang XJ, Gottesman MM. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008, 48: 495–535
- 98 Dmitriev OY. *Biochem Cell Biol*, 2011, 89: 138–147
- 99 Dolgova NV, Olson D, Lutsenko S, Dmitriev OY. *Biochem J*, 2009, 419: 51–59
- 100 Tadini-Buoninsegni F, Bartolommei G, Moncelli MR, Inesi G, Galliani A, Sinisi M, Losacco M, Natile G, Arnesano F. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 1297–1301
- 101 Banci L, Bertini I, Cantini F, Migliardi M, Natile G, Nushi F, Rosato A. *Biochemistry*, 2009, 48: 7849–7855
- 102 Hussain F, Wittung-Stafshede P. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1774: 1316–1322
- 103 Anastassopoulou I, Banci L, Bertini I, Cantini F, Katsari E, Rosato A. *Biochemistry*, 2004, 43: 13046–13053
- 104 Safaei R, Adams PL, Maktabi MH, Mathews RA, Howell SB. *J Inorg Biochem*, 2012, 110: 8–17
- 105 Achila D, Banci L, Bertini I, Bunce J, Ciofi-Baffoni S, Huffman DL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 5729–5734
- 106 Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Nurchi A, Sturniolo GC, Marcellini M, Zancan L, Bragetti P, Akar N, Yagci R, Vegnente A, Cao A, Pirastu M. *Hum Mutat*, 1998, 12: 89–94
- 107 Gourdon P, Sitsel O, Lykkegaard Karlsen J, Birk Møller L, Nissen P. *Biol Chem*, 2012, 393: 205
- 108 Safaei R, Adams PL, Mathews RA, Manorek G, Howell SB. *Metallomics*, 2013, 5: 964–972
- 109 Yoshizawa K, Nozaki S, Kitahara H, Ohara T, Kato K, Kawashiri S, Yamamoto E. *Oncol Rep*, 2007, 18: 987
- 110 Mangala LS, Zuzel V, Schmandt R, Leshane ES, Halder JB, Armaiz-Pena GN, Spannuth WA, Tanaka T, Shahzad MMK, Lin YG, Nick AM, Danes CG, Lee JW, Jennings NB, Vivas-Mejia PE, Wolf JK, Coleman RL, Siddik ZH, Lopez-Berestein G, Lutsenko S, Sood AK. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 3770–3780
- 111 Arnesano F, Natile G. *Coord Chem Rev*, 2009, 253: 2070–2081
- 112 Dolgova NV, Nokhrin S, Yu CH, George GN, Dmitriev OY. *Biochem J*, 2013, 454: 147–156
- 113 Palm-Espling ME, Andersson CD, Björn E, Linusson A, Wittung-Stafshede P. *PLoS One*, 2013, 8: e70473
- 114 Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2000, 35: 35–70
- 115 Knipp M, Karotki AV, Chesnov S, Natile G, Sadler PJ, Brabec V, Vasák M. *J Med Chem*, 2007, 50: 4075–4086
- 116 Knipp M. *Curr Med Chem*, 2009, 16: 522–537
- 117 Min Y, Mao CQ, Chen S, Ma G, Wang J, Liu Y. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 6742–6747
- 118 Jeong SY, Seol DW. *BMB Rep*, 2008, 41: 11–22
- 119 Ferrin G, Linares CI, Muntane J. *Curr Pharm Des*, 2011, 17: 2002–2016
- 120 Cullen KJ, Yang Z, Schumaker L, Guo Z. *J Bioenerg Biomembr*, 2007, 39: 43–50
- 121 Yang Z, Schumaker LM, Egorin MJ, Zuhowski EG, Guo Z, Cullen KJ. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 5817–5825
- 122 Wisnovsky SP, Wilson JJ, Radford RJ, Pereira MP, Chan MR, Laposa RR, Lippard SJ, Kelley SO. *Chem Biol*, 2013, 20: 1323–1328
- 123 Horng YC, Cobine PA, Maxfield AB, Carr HS, Winge DR. *J Biol Chem*, 2004, 279: 35334–35340
- 124 Leary SC, Kaufman BA, Pellicchia G, Guercin GH, Mattman A, Jaksch M, Shoubbridge EA. *Human Mol Genet*, 2004, 13: 1839–1848
- 125 Buchwald P, Krummeck G, Rödel G. *Molec Gen Genet*, 1991, 229: 413–420
- 126 Beers J, Glerum DM, Tzagoloff A. *J Biol Chem*, 1997, 272: 33191–33196
- 127 Sideris DP, Petrakis N, Katrakili N, Mikropoulou D, Gallo A, Ciofi-Baffoni S, Banci L, Bertini I, Tokatlidis K. *J Cell Biol*, 2009, 187: 1007–1022
- 128 Zhao L, Cheng Q, Wang Z, Xi Z, Xu D, Liu Y. *Chem Commun*, 2014, 50: 2667–2669
- 129 Suzuki C, Daigo Y, Kikuchi T, Katagiri T, Nakamura Y. *Cancer Res*, 2003, 63: 7038–7041
- 130 Klug A. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 213–231
- 131 Anzellotti AI, Farrell NP. *Chem Soc Rev*, 2008, 37: 1629–1651
- 132 Quintal SM, dePaula QA, Farrell NP. *Metallomics*, 2011, 3: 121
- 133 Maret W, Li Y. *Chem Rev*, 2009, 109: 4682–4707
- 134 Kadonaga JT, Carner KR, Masiaz FR, Tjian R. *Cell*, 1987, 51: 1079–1090
- 135 Kadonaga JT, Courey AJ, Ladika J, Tjian R. *Science*, 1988, 242: 1566–1570
- 136 Safe S, Abdelrahim M. *Eur J Cancer*, 2005, 41: 2438–2448
- 137 Zhang J. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 2213–2217
- 138 Colon J, Basha MR, Madero-Visbal R, Konduri S, Baker CH, Herrera LJ, Safe S, Sheikh-Hamad D, Abudayyeh A, Alvarado B, Abdelrahim M.

- Invest New Drugs*, 2011, 29: 41–51
- 139 Sankpal UT, Goodison S, Abdelrahim M, Basha R. *Med Chem*, 2011, 7: 518–525
- 140 Chen S, Xu D, Jiang H, Xi Z, Zhu P, Liu Y. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 12258–12262
- 141 Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 517–528
- 142 Guggenheim ER, Ondrus AE, Movassaghi M, Lippard SJ. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 10121–10128
- 143 Mendes F, Groessl M, Nazarov AA, Tsybin YO, Sava G, Santos I, Dyson PJ, Casini A. *J Med Chem*, 2011, 54: 2196–2206
- 144 Zhao L, Wang Z, Xi Z, Xu D, Chen S, Liu Y. *Inorg Chem*, 2014, 53: 3054–3061
- 145 Evanics F, Maurmann L, Yang WW, Bose RN. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1651: 163–171
- 146 Atipairin A, Canyuk B, Ratanaphan A. *Chem Biodivers*, 2010, 7: 1949–1967
- 147 Atipairin A, Canyuk B, Ratanaphan A. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 126: 203–209
- 148 de Paula QA, Mangrum JB, Farrell NP. *J Inorg Biochem*, 2009, 103: 1347–1354
- 149 Xi Z, Guo W, Tian C, Wang F, Liu Y. *Chem Commun*, 2013, 49: 11197–11199
- 150 Xi Z, Guo W, Tian C, Wang F, Liu Y. *Metallomics*, 2014, 6: 491–497
- 151 Liang ZD, Long Y, Tsai WB, Fu S, Kurzrock R, Gagea-Iurascu M, Zhang F, Chen HHW, Hennessy BT, Mills GB, Savaraj N, Kuo MT. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11: 2483–2494
- 152 Sadowitz PD. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30: 183–190
- 153 Kasherman Y, Sturup S, Gibson D. *J Med Chem*, 2009, 52: 4319–4328
- 154 Zhao L, Wang Z, Wu H, Xi Z, Liu Y. *Biochem J*, 2015, 472: 217–223
- 155 Chen S, Jiang H, Wei K, Liu Y. *Chem Commun*, 2013, 49: 1226–1228
- 156 Galliani A, Losacco M, Lasorsa A, Natile G, Arnesano F. *J Biol Inorg Chem*, 2014, 19: 705–714
- 157 Perler FB, Davis EO, Dean GE, Gimble FS, Jack WE, Neff N, Noren CJ, Thorner J, Belfort M. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 1125–1127
- 158 Novikova O, Topilina N, Belfort M. *J Biol Chem*, 2014, 289: 14490–14497
- 159 Mills KV, Paulus H. *J Biol Chem*, 2001, 276: 10832–10838
- 160 Ghosh I, Sun L, Xu MQ. *J Biol Chem*, 2001, 276: 24051–24058
- 161 Dassa B, Amitai G, Caspi J, Schueler-Furman O, Pietrokovski S. *Biochemistry*, 2007, 46: 322–330
- 162 Zhang L, Xiao N, Pan Y, Zheng Y, Pan Z, Luo Z, Xu X, Liu Y. *Chem Eur J*, 2010, 16: 4297–4306
- 163 Zhang L, Zheng Y, Xi Z, Luo Z, Xu X, Wang C, Liu Y. *Mol Biosyst*, 2009, 5: 644–650
- 164 Muralidharan V, Muir TW. *Nat Methods*, 2006, 3: 429–438
- 165 Xu MQ, Evans TC Jr. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, 16: 440–446
- 166 Van Roey P, Pereira B, Li Z, Hiraga K, Belfort M, Derbyshire V. *J Mol Biol*, 2007, 367: 162–173
- 167 Zhang L, Zheng Y, Callahan B, Belfort M, Liu Y. *J Biol Chem*, 2011, 286: 1277–1282
- 168 Masters CL, Cappai R, Barnham KJ, Villemagne VL. *J Neurochem*, 2006, 97: 1700–1725
- 169 Jakob-Roetne R, Jacobsen H. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 3030–3059
- 170 Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 4245–4249
- 171 Glenner GG, Wong CW. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 120: 885–890
- 172 Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. *J Neurol Sci*, 1998, 158: 47–52
- 173 Barnham KJ, Bush AI. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, 12: 222–228
- 174 Rivera-Mancia S, Pérez-Neri I, Ríos C, Tristán-López L, Rivera-Espinosa L, Montes S. *Chem Biol Interact*, 2010, 186: 184–199
- 175 Faller P, Hureau C. *Dalton Trans*, 2009, 7: 1080–1094
- 176 Brewer GJ. *Chem Res Toxicol*, 2010, 23: 319–326
- 177 Lynch T. *Exp Gerontol*, 2000, 35: 445–451
- 178 Karr JW, Szalai VA. *Biochemistry*, 2008, 47: 5006–5016
- 179 Stellato F, Menestrina G, Serra MD, Potrich C, Tomazzolli R, Meyer-Klaucke W, Morante S. *Eur Biophys J*, 2006, 35: 340–351
- 180 Streltsov VA, Titmuss SJ, Epa VC, Barnham KJ, Masters CL, Varghese JN. *Biophys J*, 2008, 95: 3447–3456
- 181 Drew SC, Masters CL, Barnham KJ. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 8760–8761
- 182 Bousejra-ElGarah F, Bijani C, Coppel Y, Faller P, Hureau C. *Inorg Chem*, 2011, 50: 9024–9030
- 183 Tsvetkov PO, Kulikova AA, Golovin AV, Tkachev YV, Archakov AI, Kozin SA, Makarov AA. *Biophys J*, 2010, 99: L84–L86
- 184 Smith DP, Smith DG, Curtain CC, Boas JF, Pilbrow JR, Ciccotosto GD, Lau TL, Tew DJ, Perez K, Wade JD, Bush AI, Drew SC, Separovic F, Masters CL, Cappai R, Barnham KJ. *J Biol Chem*, 2006, 281: 15145–15154
- 185 Bolognin S, Drago D, Messori L, Zatta P. *Med Res Rev*, 2009, 29: 547–570

- 186 Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, Macfarlane S, Mastwyk M, MacGregor L, Kiers L, Cherny R, Li QX, Tammer A, Carrington D, Mavros C, Volitakis I, Xilinas M, Ames D, Davis S, Beyreuther K, Tanzi RE, Masters CL. *Arch Neurol*, 2003, 60: 1685–1691
- 187 Barnham KJ, Kenche VB, Ciccotosto GD, Smith DP, Tew DJ, Liu X, Perez K, Cranston GA, Johanssen TJ, Volitakis I, Bush AI, Masters CL, White AR, Smith JP, Cherny RA, Cappai R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 6813–6818
- 188 Lisman J. *Philos Trans R Soc Land B Biol Sci*, 2003, 358: 829–842
- 189 Ma G, Huang F, Pu X, Jia L, Jiang T, Li L, Liu Y. *Chem Eur J*, 2011, 17: 11657–11666
- 190 Ma G, Wang E, Wei H, Wei K, Zhu P, Liu Y. *Metallomics*, 2013, 5: 879
- 191 Ma G, Wu Q, Wu X, Arnesano F, Natile G, Sletten E, Liu Y. *J Inorg Biochem*, 2015, 153: 239–246
- 192 Xu D, Xi Z, Zhao L, Liu Y. *Inorg Chem Front*, 2014, 1: 149–152
- 193 Pinato O, Musetti C, Sissi C. *Metallomics*, 2014, 6: 380–395
- 194 Moreno-Gordaliza E, Cañas B, Palacios MA, Gómez-Gómez MM. *Anal Chem*, 2009, 81: 3507–3516
- 195 Moreno-Gordaliza E, Cañas B, Palacios MA, Gómez-Gómez MM. *Analyst*, 2010, 135: 1288–1298
- 196 Møller C, Sprenger RR, Stürup S, Højrup P. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401: 1619–1629
- 197 Li H, Lin TY, Van Orden SL, Zhao Y, Barrow MP, Pizarro AM, Qi Y, Sadler PJ, O'Connor PB. *Anal Chem*, 2011, 83: 9507–9515
- 198 Williams JP, Phillips HIA, Campuzano I, Sadler PJ. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2010, 21: 1097–1106
- 199 Messori L, Merlino A. *Inorg Chem*, 2014, 53: 3929–3931
- 200 Messori L, Marzo T, Merlino A. *J Inorg Biochem*, 2015, 153: 136–142
- 201 Ferraro G, Messori L, Merlino A. *Chem Commun*, 2015, 51: 2559–2561
- 202 Berners-Price SJ, Ronconi L, Sadler PJ. *Prog Nucl Magn Res Sp*, 2006, 49: 65–98
- 203 Hadi S. *J Math Sci*, 2006, 11: 146–152
- 204 Du Z, Shemella PT, Liu Y, McCallum SA, Pereira B, Nayak SK, Belfort G, Belfort M, Wang C. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 11581–11589
- 205 Xi Z, Shi C, Tian C, Liu Y. *Metallomics*, 2013, 5: 1566–1573
- 206 Li C, Li Z, Sletten E, Arnesano F, Losacco M, Natile G, Liu Y. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 8497–8500
- 207 Li C, Huang R, Ding Y, Sletten E, Arnesano F, Losacco M, Natile G, Liu Y. *Inorg Chem*, 2011, 50: 8168–8176
- 208 Reckel S, Löhr F, Dötsch V. *ChemBioChem*, 2005, 6: 1601–1606
- 209 Reckel S, Hänsel R, Löhr F, Dötsch V. *Prog Nucl Magn Res Sp*, 2007, 51: 91–101
- 210 Maldonado AY, Burz DS, Shekhtman A. *Prog Nucl Magn Res Sp*, 2011, 59: 197–212
- 211 Arnesano F, Banci L, Bertini I, Felli IC, Losacco M, Natile G. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 18361–18369
- 212 Calandrini V, Nguyen TH, Arnesano F, Galliani A, Ippoliti E, Carloni P, Natile G. *Chem Eur J*, 2014, 20: 11719–11725
- 213 Wang X, Li C, Wang Y, Chen G. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 75–99

Protein interaction in the mechanism of platinum anticancer drugs

Tiantian Fang¹, Kaiming Cao¹, Lanjun Cheng¹, Linhong Zhao^{2*}, Yangzhong Liu^{1*}

¹ School of Chemistry and Materials Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

² Institute of Life Sciences, Southeast University, Nanjing 210096, China

*Corresponding authors (email: liuyz@ustc.edu.cn; zhaolinhong@seu.edu.cn)

Abstract: Platinum anti-tumor drugs are widely used in cancer chemotherapy. These compounds are believed to induce apoptosis in tumor cells by DNA crosslinking, which causes DNA damage and suppresses DNA replication. However, recent studies indicate that platinum drugs can react with a large variety of intracellular and extracellular proteins before binding to the nuclear DNA. These protein interactions can alter the transportation and metabolism of platinum drugs as well as their interactions with the DNA target, which have significant influence on the efficacy and resistance of platinum drugs. On the other hand, platinum reactions can alter the function of proteins, which contributes to the drug efficacy and side-effects of platinum drugs. In this article, we review the recent progress in the protein interaction of platinum drugs. The influence of small molecules on the reaction, the reaction of non-cancer target proteins, and the research methods for the investigation are also discussed.

Keywords: platinum complexes, anti-cancer drugs, proteins, copper chaperones, zinc finger proteins

doi: [10.1360/N032016-00167](https://doi.org/10.1360/N032016-00167)