



质谱在金属抗肿瘤化合物分子作用机理研究中的应用

吴魁, 罗群, 赵耀, 郑伟, 汪福意*

北京分子科学国家实验室, 北京国家质谱中心, 活体分析化学中国科学院重点实验室, 中国科学院化学研究所, 北京 100190

*通讯作者, E-mail: fuyi.wang@iccas.ac.cn

收稿日期: 2016-07-15; 接受日期: 2016-10-11; 网络版发表日期: 2017-01-12

国家自然科学基金(编号: 21135006, 21127901, 21275148, 21321003, 21505141)和国家重点基础研究发展计划(编号: 2013CB531805)资助项目

摘要 软电离质谱, 包括电喷雾质谱(ESI-MS)和基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)已成为研究金属抗肿瘤药物与蛋白质、DNA等生物大分子相互作用最强有力的工具. 质谱成像技术在组织、细胞水平上探索金属抗肿瘤化合物作用机理研究上的应用也方兴未艾. 本文基于在金属抗肿瘤配合物分子作用机理研究中的工作进展, 系统地总结、评述质谱在铂基和钌基金属抗肿瘤配合物分子作用机理研究中的应用, 介绍质谱研究金属抗肿瘤配合物与蛋白质和DNA相互作用及作用位点的最新研究成果, 并展望质谱在这一前沿交叉领域的应用前景和趋势.

关键词 质谱, 金属抗肿瘤药物, 铂, 钌, 分子作用机理

1 引言

顺铂对肿瘤细胞增殖抑制活性的偶然发现^[1,2]及其在实体肿瘤临床治疗上的广泛应用^[3], 标志着无机药物化学学科的复兴和崛起. 但是, 作为一种细胞毒性药物, 顺铂缺乏区分增殖较快的正常细胞和癌细胞的能力, 由此产生严重的毒副作用如肾毒性、耳毒性、恶心和呕吐等, 限制了它的临床应用. 另外, 顺铂所引起的DNA损伤不仅导致恶性肿瘤细胞坏死, 还能在基因水平上诱导一系列的抗凋亡反应, 降低癌细胞对顺铂治疗的敏感度. 细胞通过其主动排出机制、去毒性和DNA修复机制等减少药物在胞内的聚集, 从而产生对药物的抵抗而降低治疗水平, 即产生获得性抗药性^[4,5]. 因而, 研究者将目光转向其他金属化合物, 期望

发现克服顺铂及第2代、第3代铂类抗癌药物的缺陷, 而且疗效更好的金属抗肿瘤药物.

金属钌以其多样性、可控的配位化学性质, 与铂近似的配体交换速率, 以及生理条件下多价态(+2、+3、+4)稳定存在的特性获得越来越多的关注^[6-8]. 目前已进入II期临床试验的两种钌基抗肿瘤化合物NAMI-A和KP1019均为3价钌化合物^[9]. 其中KP1019对原发性肿瘤具有显著的增殖抑制活性^[10], 但DNA并不是其唯一的靶标^[11], NAMI-A则只对转移的肿瘤有效^[12]. 但是, 迄今为止, 3价钌金属配合物抗癌作用的分子机理还不清楚. Clarke等^[13,14]认为 Ru^{3+} 可能在体内被还原为 Ru^{2+} 而发挥作用. 基于此, 近年来2价钌抗肿瘤配合物的设计和开发取得了较大进展. 其中, Sadler等^[15-17]报道的一系列半三明治钢琴凳(half-sandwich piano-stool)结

引用格式: 吴魁, 罗群, 赵耀, 郑伟, 汪福意. 质谱在金属抗肿瘤化合物分子作用机理研究中的应用. 中国科学: 化学, 2017, 47: 233-248
Wu K, Luo Q, Zhao Y, Zheng W, Wang F. Investigations of molecular mechanism of action of metal-based anticancer complexes by mass spectrometry. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 233-248, doi: 10.1360/N032016-00146

构的有机金属钌化合物(通式: $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{YZ})(\text{X})]$, 其中, arene为芳烃配体, YZ为螯合配体, X为离去基团)和Dyson等^[7,18-20]设计合成的一类含有有机磷配体的有机金属钌配合物RAPTA ($[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-arene})(\text{pta})]$, pta=1,3,5-triaza-7-phospha-adamantane), 具有引人瞩目的抗肿瘤活性. 部分RAPTA系列配合物具有与NAMI-A相似的活性, 即只对二级转移的肿瘤才有抑制效果^[21]. Sadler等^[15,22]开发的有机金属钌配合物能通过对芳烃配体、螯合配体和离去基团进行结构上的修饰、改造, 调节这类化合物的理化性质和抗肿瘤活性. 其中以乙二胺(en)为螯合配体, 氯为离去基团的系列化合物 $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{en})(\text{Cl})][\text{PF}_6]$ 在体内和体外研究中表现出较好的抗癌活性, 并且随着芳香烃配体体积的增大, 其活性呈现增长趋势. 例如, 对人卵巢癌细胞株A2780的抑制活性随芳香烃配体体积增大的顺序为: 苯(ben)<对甲基异丙基苯(cym)<联苯(bip)<二氢蒽(dha)<四氢蒽(tha). 其中联苯配合物的活性与卡铂相当, 四氢蒽配合物的活性与顺铂近似, 而且与顺铂没有交叉抗药性^[23].

金属抗肿瘤药物大多通过静脉注射方式给药. 所以, 尽管DNA被认为是以顺铂为代表的金属抗肿瘤药物的终极靶标, 药物在进入血液系统后不可避免地将会与血浆、血清中的蛋白质, 特别是高丰度蛋白质作用. 进入细胞后, 胞内蛋白质也将与DNA竞争和金属配合物的结合. 金属抗肿瘤药物与蛋白质的相互作用是影响药物生物利用度的关键因素, 同时也是其产生毒副作用和细胞抗药性的可能原因^[5,24]. 近年的研究表明, 蛋白质也可能是金属抗肿瘤药物的药效靶标, 通过与金属药物-DNA靶向作用产生协同效应, 增加药物的抗肿瘤活性^[25,26]. 因而, 金属抗肿瘤药物与蛋白质的作用也是其药理学研究的重要组成部分.

金属抗肿瘤药物与DNA、蛋白质等生物大分子的相互作用具有多样性和复杂性. 随着基于软电离技术的电喷雾电离质谱(ESI-MS)、基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)等的日益成熟, 质谱分析以其灵敏度高、所需样品量少、耗时短等优点, 已成为研究药物分子与生物大分子相互作用强有力的工具^[27,28]. 通过质谱分析, 不仅能够鉴定金属药物与蛋白质、DNA等生物大分子的作用方式和作用位点, 还可以结合稳定同位素标记技术获得药物和靶分子结合的定量信息. 与各种不同性能、不同维度色谱分离、富集

技术的联用, 使质谱分析能够直接分析较复杂的生物样品^[29-31], 在为药物分子机理研究提供丰富的化学和生物信息的同时, 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. Keppler等^[28]、Hartinger等^[27]、Timerbaev^[32]对质谱在研究金属抗肿瘤化合物分子作用机理方面的应用分别进行了全面的总结和评述. 本文将结合本课题组近年来在金属抗肿瘤化合物分子作用机理研究中的进展, 系统地总结ESI-MS和电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)在金属抗肿瘤化合物与蛋白质和DNA相互作用研究中的发展动态, 并展望和分析质谱技术在这一前沿交叉领域未来的应用前景和趋势.

2 质谱研究金属抗肿瘤化合物与DNA的相互作用

DNA被普遍认为是细胞毒性抗肿瘤药物的终极靶标. 金属类抗肿瘤药物与DNA的作用方式按是否形成配位键分为共价结合和非共价结合^[33,34]. 顺铂是能与DNA发生共价结合的经典抗肿瘤药物^[33]. 早期在研究顺铂与DNA的相互作用时多应用核磁共振波谱(NMR)、光谱(包括紫外/可见分光光度法、圆二色谱法、拉曼光谱法等)、色谱、X射线单晶衍射法(XRD)或传统的分子生物学技术等^[35-40], 它们在结合位点鉴定、结合方式、构型研究等方面获得了大量有价值的信息. Berners-Price、Hambley、Lippard、Lippert、Reedijk、Sadler等在这一领域做出了突出的贡献^[24,33,35-37,41-44]. 他们的研究表明, 顺铂选择性地与DNA大沟内相邻的两个鸟嘌呤(G)、或腺嘌呤(A)和鸟嘌呤、或相隔一个碱基的两个鸟嘌呤之间的7位N原子以配位键形成链内交联(intrastrand crosslink, 包括1,2-GpG、1,2-ApG和1,3-GpNpG)或链间交联(interstrand crosslink)复合物^[33,43,45,46]. 其中1,2-GG和1,2-AG链内交联产物各占47%~50%和23%~28%; 1,3-GNG链内交联产物、链间交联产物和单配位铂化产物分别占到铂化DNA产物的8%~10%和2%~3%^[47].

与顺铂类似, DNA也是细胞毒性有机金属钌抗肿瘤化合物 $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{en})(\text{Cl})][\text{PF}_6]$ (图1所示为该系列配合物的典型代表)的潜在靶标. X射线晶体衍射和NMR研究表明, 在中性pH条件下, 这类有机金属钌配合物对4种DNA碱基的反应活性顺序为: G(N7)>T(N3)>C(N3)>A(N7)、A(N1)^[48,49]. 乙二胺配体

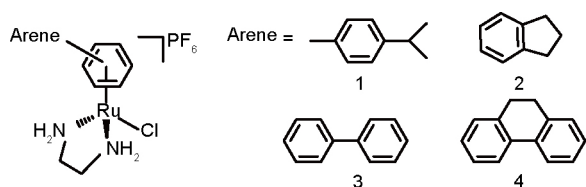


图1 本文涉及的有机金属钌抗肿瘤配合物的化学结构式

的NH₂与鸟嘌呤上6位C上的O之间形成的氢键对于钌化合物对G碱基的高选择性起关键性的作用^[48-50]。芳烃-嘌呤之间的憎水作用和 π - π 堆积也增加钌与鸟嘌呤N7结合的高选择性,这一点在含多环芳烃配体的钌化合物和DNA作用中更明显^[49,51-53]。分子生物学和生物物理研究证实了有机金属钌配合物与DNA作用时对G碱基的高选择性^[54,55]。

随着质谱技术的快速发展,特别是新型离子源和高分辨质量分析器的开发和应用,再加上与各种不同类型的分离技术的结合,质谱以其样品制备简单、耗样量少、分辨率高、灵敏度高、检测范围宽、分析速度快等优点在金属药物-DNA相互作用研究方面的应用越来越广泛和深入^[27,56,57]。与基于质谱的蛋白质组学研究类似,质谱研究金属药物与DNA的相互作用也有“自下而上”(bottom-up)和“自上而下”(top-down)两种方法。自下而上的方法一般借助于DNA外切酶(如蛇毒磷酸二酯酶(snake venom phosphodiesterase, SVP)和牛脾磷酸二酯酶(bovine spleen phosphodiesterase, BSP)等),将DNA-药物复合物酶解成片段(图2(a)),经由液相色谱分离后进行质谱分析。DNA外切酶能够识别碱基之间的磷酸二酯键,从5'端(BSP)或3'端(SVP)将DNA链上的磷酸二酯键逐个水解为核苷酸碎片。当DNA碱基被药物修饰时,水解会停止在被修饰的碱基位点^[58]。通过对药物修饰的DNA片段的质谱分析,就可以获得药物-DNA相互作用位点的信息。这种方法在鉴定铂类抗癌药物与DNA的相互作用位点上发挥了重要的作用。例如, Ralph等^[59]利用ESI-MS分析顺铂与不同序列的8碱基和16碱基寡核苷酸链的复合物的BSP、SVP酶解产物,成功鉴定出低丰度的1,2-GA交联产物。Chottard等^[60]也同时利用BSP和SVP两种DNA外切酶,结合ESI-MS和MALDI-MS研究了[Pt(NH₃)₃(H₂O)]²⁺与单链寡核苷酸d(TTGGCCAA)的相互作用,发现铂化合物倾向于与5'CG结合,其反应速率是与3'CG结合的两倍。

Bierbach等^[61]在应用液质联用(LC-MS)技术研究顺铂类似物[PtCl(en)(ACRAMTU-S)](NO₃)₂(ACRAMTU=1-[2-(acridin-9-ylamino)ethyl]-1,3-dimethylthiourea)与小牛胸腺DNA (CT-DNA)的酶解反应产物时,发现铂配合物中的大环DNA插入式配体改变了2价铂与G碱基原本具有的高亲和性,转而倾向于与A碱基配位,这为设计新型靶向性铂配合物提供了重要的理论依据。Sadler等^[62]在研究有机金属钌抗肿瘤配合物的早期即应用ESI-MS研究了钌配合物1(图1)与寡核苷酸d(ATACATGGTACATA)的反应,利用SVP酶解钌化产物,LC-MS分析表明,钌的结合位点是鸟嘌呤碱基G。本课题组^[63]结合SVP外切酶酶解和LC-ESI-MS分析进一步证实了有机金属钌抗肿瘤化合物2、3对寡核苷酸序列中G碱基的高选择性结合。在该序列的类似序列-C₇G₈A₉-、-A₇G₈T₉-、-T₇G₈A₉-上,我们还观察到有机金属钌配合物与G₈碱基结合的反应速率和亲和常数都受相邻碱基性质的影响,表明钌配合物与DNA的结合存在一定序列选择性。进一步的LC-ESI-MS研究还发现,有机金属钌配合物能在双链DNA上的G碱基间发生迁移,即从初始结合的G碱基上解离而游离到互补链表面,与互补链上相近的鸟嘌呤再结合^[64]。其原因可能是由于DNA双螺旋产生较大的应力作用造成的。在生理条件下,与DNA形成交联复合物的顺铂很少发生链内或链间迁移^[65],除非在特别苛刻的色谱分离条件,如使用含高浓度氯化钠的流动相^[66],或顺铂类似物中含有较大配体的情况下^[67-70]才可能发生。反铂配合物和三核铂配合物BBR3464在DNA链上也有类似的链接异构化(linkage isomerization)现象的报道^[71]。

前面已经提到芳烃配体的大小对有机金属钌配合物抗肿瘤活性有较大的影响^[23],在鉴定钌配合物与DNA的结合位点时也观察到,较大的芳烃配体也可能会影响DNA外切酶的效率,干扰结合位点的鉴定^[72]。在利用5'核酸外切酶BSP水解钌配合物3(图2(a))和单链寡核苷酸5'CCCA₄G₅C₆CC-3'、5'CCC₃G₄A₅CCC-3'的复合物时,MS结果表明酶解位点停留在A₄上或C₃上,与此前观察到的钌配合物对G碱基的高选择性相互矛盾。所以,应用自上而下的质谱方法进一步研究了以上两种钌化产物的钌化位点,结果表明钌配合物单元确实是结合在其中的G碱基上。这一结果表明,金属钌中心结合的大体积配体,如联苯等可能通过与相邻碱

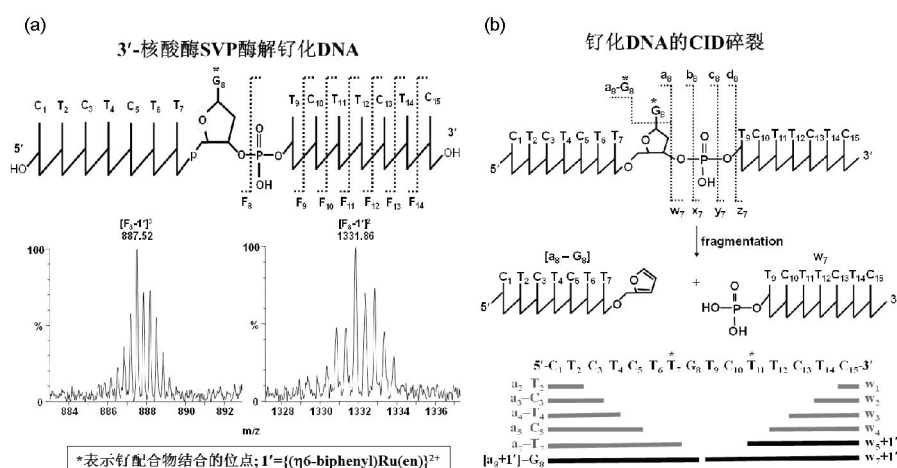


图2 (a) 自下而上和(b)自上而下的质谱分析鉴定有机金属钌化合物与DNA结合位点示意图

基的 π - π 堆积作用阻止了核酸外切酶碱基之间磷酸二酯键的催化水解作用. 因此, 在利用核酸外切酶酶解DNA-金属药物复合物鉴定药物的结合位点时, 应注意配合物上大体积配体对酶解反应的影响^[72].

除了应用DNA外切酶与LC-MS结合鉴定金属配合物与DNA的作用位点之外, 还可以将多种不同性质的DNA酶联合起来, 获得金属与DNA结合的更多信息. 例如, Linscheid等^[73]将核酸酶benzonase、碱性磷酸酶和核酸酶S1联合使用, 应用MS定量分析了奥沙利铂与DNA上鸟嘌呤和腺嘌呤碱基的相对结合量, 发现两种产物之间的比例会随着反应时间的变化而变化. 研究者还把这种联合酶解的方法应用在研究G-四链体DNA与铂类配合物的作用位点鉴定上, 发现铂类化合物仍可以与G-四链体DNA形成G-G、G-A交联产物. 但是, 相对于单链DNA, 铂对loop环上A碱基的亲合力明显增强^[74,75].

随着质谱仪器质量、分辨率的提高和母离子解离技术的发展, 自上而下的质谱方法在鉴定药物与DNA结合位点领域的应用也逐渐增加. 自上而下质谱分析选择金属化合物与DNA复合物的准分子离子为母离子, 利用碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)或电子捕获解离(electron capture dissociation, ECD)等裂解技术, 将母离子裂解, 分析获得DNA碎片离子质谱信息, 从而鉴定金属化合物与DNA的结合位点. 该方法不需要经过酶解等前处理步骤, 因此能更好地保留金属化合物和DNA相互作用的信息. DNA复合物母离子在气相中的裂解具有一定规律, 一般情况下DNA

会先发生碱基丢失, 接下来是3'端C-O键的断裂, 产生 w_{m-n} 和 $[a_n-B_n]^+$ 互补离子(m 为DNA链所含的碱基数, n 为C-O键断裂位置)(图2(b))^[76,77]. 金属药物等小分子与DNA共价结合不会对DNA的断裂产生很大影响, 因此大大简化了质谱数据的解析, 在金属抗癌药物与DNA相互作用研究中得到越来越多的青睐^[78-80]. Egger等^[79]利用傅里叶变换离子回旋共振质谱(FTICR-MS)研究了顺铂与双链DNA的反应, 发现顺铂先以 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]^+$ 的形式与DNA形成单配位复合物, 然后再生成1,2-或1,3-链间交联产物. Stucki等^[80]应用自上而下的质谱方法研究顺铂与单分子、双分子和四分子G四链体DNA的反应时发现, 碎裂中双分子和四分子G四链体DNA会优先解链, 顺铂倾向于与G-四链体DNA链末端的碱基结合. 前述在应用自下而上的质谱方法鉴定有机金属钌配合物与单链DNA的结合位点, 受钌配合物中大体积芳烃配体的影响, 鉴定结果与NMR等获得的结果相矛盾. 所以, 采用CID方式直接碎裂单钌化的单链寡核苷酸, 通过质谱分析获得的互补和阶梯式的钌化/非钌化寡核苷酸碎片离子, 明确地鉴定出钌化合物在单链DNA上的结合位点^[72].

金属配合物与DNA的相互作用大多是动力学控制的反应^[81], 热力学稳定的最终产物往往出现在最初发生配位反应的碱基位点上, 其结合强度和产率都会受到DNA序列的影响, 而不同复合物的形成将会导致不同的生物学效应^[36]. 因此, 金属化合物与DNA相互作用的动力学研究对于研究金属抗癌药物的作用机理具有重要意义. 基于此, 应用LC-ESI-MS

研究了有机金属钌配合物**3**与15个碱基的单链DNA 5'-CTCTCTT₇G₈T₉CTTCTC-3'的反应动力学,发现在反应初期,除了与G碱基结合的单钌化产物外,还有一个新的单钌化DNA产物出现,随着反应时间增加,这一新产物几乎消失.该化合物与类似DNA序列(-C₇G₈A₉-, -A₇G₈T₉-, -T₇G₈A₉-)反应时也有类似现象.但是,当使用DNA外切酶酶解钌化产物后,质谱分析只观察到钌化合物与G碱基结合的产物.可能的原因是该复合物在热力学上不稳定,在酶解过程中发生解离而被破坏.于是,引入自上而下的质谱分析对该动力学优先的钌化产物进行鉴定.结合CID解离方法,通过对反应30 min的产物进行自上而下质谱分析,比较获得的w和a-B碎片,鉴定出-T₇G₈T₉-链上的T₇和T₁₁碱基都有可能与钌结合,形成单钌化的DNA复合物.类似地,我们鉴定出钌配合物也能与其他3条类似序列中部的T (T₆、T₇或T₁₁)结合^[77].进一步的研究表明,单链DNA上的T碱基在动力学上能与G碱基竞争与钌的配位^[63].这是首次关于有机金属钌抗肿瘤配合物与DNA的T碱基结合的报道.这个新位点的鉴定使我们相信T碱基在有机金属钌抗肿瘤化合物的作用过程中可能扮演重要的角色.基于此,本课题组应用自下而上和自上而下相结合的质谱分析方法,研究了人端粒DNA片段d(A₁GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG₂₂)与有机金属钌配合物的相互作用.人端粒DNA片段是一段富G和T序列,形成G-四链体结构后G碱基间形成Hoogsteen氢键占据钌化化合物的结合位点G-N7,而T碱基则位于相对灵活的外侧环上^[82,83],这种结构变化可能会改变G、T与钌的反应活性.根据质谱分析证实,有机金属钌基团的主要结合位点确实是G-四链体末端外环上的T碱基T₁₈(或T₁₇)^[63].随着反应时间的延长,G结合的DNA产物质谱峰相对强度没有明显变化,而T结合的DNA产物质谱峰相对强度则随着反应时间的延长而增加,表明G-四链体外环上的T碱基在动力学和热力学上都能与G-四分体平面上的G竞争和钌的结合.进一步的分子模拟结果显示,钌配合物中乙二胺基团与相邻碱基上的氢键作用,以及芳烃配体与碱基之间的 π - π 电子堆积作用提高了钌对T碱基的亲合力,并有助于G-四链体-小分子复合物结构的稳定性^[63].这一结果表明,人类基因组中普遍存在的G-四链体DNA有可能是细胞毒性有机金属钌抗癌化合物的潜在作用靶标.研究也表明,在金属药物的研究过程中,对动力学过程的

探讨与对热力学稳定产物的研究同等重要,因为药物与动力学竞争力强的靶标的结合同样会对生命体信号转导过程产生重要影响.

关于有机金属钌化合物与DNA相互作用的二级质谱研究报道相对较少^[84],我们在一开始就选择了5'-TpG和5'-GpT两种二核苷酸作为模型分子,探索钌化DNA的CID解离模式,获得了大量有助于结合位点鉴定的信息.在CID解离中,有机金属钌配合物中的乙二胺和芳烃配体会发生丢失,甚至整个钌配位基团会从钌化核苷酸上解离,钌化合物与3'或5'端碱基结合时会导致不同的碎裂方式,最重要的,发现G碱基相对于T碱基极易从糖环上解离^[77].如果钌结合在G碱基上,这种解离将导致G结合位点信息的丢失.所以,自上而下的质谱分析可能不太适合鉴定DNA上G碱基钌化位点.钌配合物的结合对DNA的CID特征碎裂没有明显影响,与DNA和顺铂^[79]、RAPTA配合物^[84]复合物的CID碎裂相似,主要产生互补的w和a-B碎片离子.钌与芳烃配体的作用一般较强,化学键不易断裂.但是在RAPTA配合物中,含磷配体强烈的反式效应(trans effect)会使钌-芳烃键变弱,在CID中发生解离^[29].钌和乙二胺形成的Ru-N键与铂和氨基配体的Pt-N键类似,在钌化、铂化DNA的二级质谱分析中都有可能发生解离^[80,85,86],解析DNA复合物的二级质谱时需要特别注意.

综上所述,研究表明,自下而上和自上而下两种质谱分析方法在鉴定金属配合物与DNA的结合位点时各有优势和不足(表1),如果能将两者结合起来,利用两者的互补性,将会对研究金属抗肿瘤化合物与DNA的相互作用大有裨益.

3 质谱鉴定金属抗肿瘤化合物与蛋白质的结合位点

绝大多数细胞毒性的金属抗肿瘤药物,如临床上使用最为广泛的顺铂及第2、3代铂类药物卡铂、奥沙利铂等,都是通过静脉注射方式给药.从化学角度分析,软Lewis酸性质的铂族金属,如铂、钌等易和多肽、蛋白质中含Lewis软碱基团的半胱氨酸、蛋硫氨酸、组氨酸残基结合(亲和力Cys(-S)>Met(-S)>N>-O),生成稳定的配合物^[87-92].因而,静脉注射的金属抗肿瘤药物在到达细胞内的药物靶标(DNA)之前,胞内外蛋白质中一些暴露于溶剂的半胱氨酸(Cys)、甲硫氨酸

表1 “自上而下”和“自下而上”的质谱分析方法的优缺点

	分析流程	优点	缺点
自上而下 top-down	(1) 获取完整的金属-靶分子药物复合物质谱信息; (2) 选择合适的金属-靶分子离子为母离子, 以CID、ECD或IRMPD电离方法将复合物裂解; (3) 获取含金属和不含金属的碎片离子质谱信息, 鉴定药物在靶分子上的结合位点	样品不需要经过酶解等前处理步骤, 能够最大限度地保留金属药物和靶分子结合的结构信息, 并且可以将金属药物与靶分子的结合位点确定到单个氨基酸残基或碱基上	蛋白质和DNA的裂解机理复杂, 大量碎片离子的质谱解析非常困难, 一般只适用于研究质量数较小的蛋白质或DNA片段(<10 kD)与金属药物的相互作用; 在DNA-金属复合物的二级质谱分析中, 碱基的优先丢失可能会影响位点鉴定, 不太适合鉴定DNA上的G碱基金属化位点
自下而上 bottom-up	(1) 将金属-靶分子药物复合物酶解成较小的片段; (2) 小片段混合物经液相色谱分离, 进行在线质谱分析; (3) 结合肽段文库和DNA碱基比对技术鉴定金属化肽段或碱基片段, 获取金属结合位点信息	能与多种不同色谱分离富集方法联用, 序列覆盖率高, 可以获得较多的金属结合位点信息, 适合研究质量数较大的蛋白质或DNA和金属药物的相互作用	酶解不仅耗时而且会涉及使用高浓度的变性剂、还原剂等, 可能导致金属-蛋白质配位键的解离使位点信息丢失; 对于DNA-药物复合物, 含较大配体的金属基团可能影响DNA外切酶的效率, 进而影响金属结合位点鉴定

(Met)和组氨酸(His)等氨基酸会与它们配位形成稳定的金属-蛋白质复合物. 例如, 血液中含有丰富的血清白蛋白(HSA)、转铁蛋白(Tf), 细胞内的铜伴侣蛋白(Atox1、Cox17等)、金属硫蛋白(MT)、谷胱甘肽转移酶 π (GST π)、蛋白酪氨酸磷酸酶1B (PTP1B)等. 分子水平的研究证实, 这些细胞内外的蛋白质都会参与或影响了顺铂或有机金属钆抗肿瘤化合物的药理学过程, 包括药物传输、代谢、细胞凋亡信号转导等, 也可能涉及细胞抗药性和毒副作用的产生^[5,87,93]. 所以, 研究金属抗肿瘤药物和蛋白质的相互作用对更好地理解药物作用机理, 优化药物分子结构非常重要.

应用质谱研究金属药物和蛋白质的相互作用同样有自下而上和自上而下两种途径. 自下而上质谱是最为常用的分析方法, 其一般流程如图3所示. 金属药物和蛋白质反应的混合物通过超滤或透析的方法除去没有结合的药物分子, 药物-蛋白复合物经由变性、还原二硫键等处理后, 选择合适的蛋白酶(如胰蛋白酶)酶解后, 应用LC-ESI-MS分析肽段混合物, 鉴定金属结合的肽段, 结合蛋白质侧链化学修饰, 即可确定金属药物在蛋白质上的结合位点^[94]. 鉴定金属配合物在多肽上氨基酸残基结合位点的另一个方法是二级质谱(串联质谱MS/MS)方法. 在一级质谱鉴定出金属修饰的肽段后, 选择该金属结合肽段的离子为母离子, 利用碰撞诱导解离(CID)或电子捕获解离(ECD)等技术裂解金属化肽段. 多肽(或蛋白质)的碎裂根据解离方法不同在肽键不同位置断裂, 产生不同的互补离子

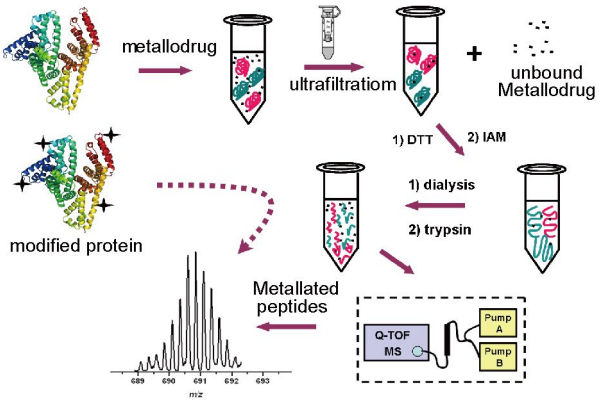


图3 自下而上的质谱法分析研究金属药物与蛋白质相互作用的一般流程示意图(网络版彩图)

(图4). CID裂解主要产生y, b离子对, 而ECD裂解则主要产生c, y互补离子. 根据质谱检测到的含金属离子的碎片离子, 即可确定金属准确的结合位点^[95,96].

血清白蛋白(albumin)是血清中丰度最高的蛋白质, 其与金属药物的相互作用, 对于药物的生物利用度、毒副作用的产生起着至关重要的作用. 顺铂经静脉注射给药后大部分(50%~72%)与血清白蛋白结合^[97], 3价钆类抗癌药物KP1019在给药后有80%~90%与血清白蛋白结合^[28]. Farrell等^[98]综合利用荧光光谱、NMR和ESI-MS研究发现, 三核钆化合物BBR3464首先通过静电和氢键等非共价作用与血清白蛋白结合, 然后可能共价结合到蛋白表面的Cys34或Met298残基上, 而这有可能导致该药物不稳定并且失活. Sheldrick等^[31]利

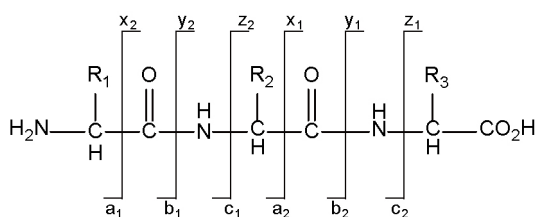


图4 多肽二级质谱碎片离子示意图

用多维液相色谱-质谱联用方法研究顺铂与血清孵育3 h后的蛋白质复合物,发现顺铂在血清白蛋白上的结合位点包括Cys34、Met329、Tyr150 (或Tyr148)和Asp375 (或Glu376)残基.利用自下而上质谱分析研究蛋白质和金属药物复合物时,一直存在肽段覆盖率低,导致作用位点丢失的问题^[30,31,99].本课题组^[94,95,100]通过选择合适的变性试剂,采用硒代胱氨酸催化蛋白质二硫键还原等方法,显著改善了蛋白质,特别是富含二硫键蛋白质(如血清白蛋白(HSA)、转铁蛋白(Tf))的酶解效率,使分析金属-HSA、金属-Tf复合物的肽段覆盖率约增加到80%,大大提高了鉴定金属抗肿瘤药物和蛋白质结合位点的鉴定效率.由于一级质谱鉴定的金属结合肽段可能同时含有几个能与金属结合的氨基酸残基,为了将金属结合位点确定到单个氨基酸残基上,在金属配合物和蛋白质反应前,选择性地使蛋白质暴露在溶剂中的组氨酸或蛋氨酸侧链进行封闭,然后,通过蛋白质修饰前后金属结合肽段信号强度的变化判断金属在蛋白质上的结合位点.利用该方法,我们研究了有机金属钌抗肿瘤配合物**1**和**3**(图1)与人重组血清白蛋白(rHA)的相互作用,结果显示,两种钌配合物都能与血清白蛋白表面的组氨酸残基His218、His247、His510和蛋氨酸残基Met298结合,但只有甲基异丙基苯配合物**1**能够进入含有半胱氨酸残基Cys34的口袋内,与Cys34的巯基结合,并诱导巯基氧化成亚磺酸基^[94].此前的高分辨FTICR-MS研究表明,有机金属钌配合物与GSH中的巯基配位诱导巯基从分子氧或水中获得氧原子,氧化为亚磺酰或亚磺酸基^[101].巯基的氧化可能降低Ru-S间的稳定性,DNA碱基能置换亚磺酰/亚磺酸基,生成DNA-Ru复合物^[92].鉴于巯基在蛋白质功能和活性发挥中的重要性,这一结果意味着在缺氧的肿瘤细胞内,水分子有可能参与有机金属钌抗肿瘤配合物诱导的巯基氧化和钌由结合到蛋白质到结合到DNA的转化过程.结果还显

示,含联苯配体的配合物**3**不能进入狭窄的口袋内与Cys34结合,表明芳烃配体的大小对于有机金属钌抗肿瘤化合物与蛋白质的结合起着至关重要的作用.

二级质谱(MS/MS)分析是确认金属结合肽段上金属结合位点的首选方法,但研究发现,在二级质谱的碰撞诱导解离(CID)中,钌化肽段上的Ru-S、Ru-N键在肽键之前断裂,导致钌化位点丢失.但是,Pt-N和Pt-S配位键较Ru-N、Ru-S键强,能在多肽的CID碎裂中得以保留,所以,二级质谱分析可以将钌化位点确定到单个氨基酸残基上.利用二级质谱分析研究顺铂与血清白蛋白结合产生的钌化肽段,结果表明,顺铂除了能与蛋白表面的His128、His247和Met298残基结合之外,还能交联His67和His247两个组氨酸残基,形成交联蛋白复合物^[95].血清白蛋白是锌离子的转运蛋白,His67和His247是锌离子在血清白蛋白上的主要结合位点^[102].因而,顺铂交联占据锌的结合位点,可能干扰血清白蛋白对锌离子的结合和转运.这一发现为从分子水平上解释顺铂的使用导致病人的低血锌和高尿锌症状^[103]提供了可能的理论依据.此外,顺铂还能诱导Cys124-Cys169二硫键的断裂,并与还原的Cys124的巯基共价结合.该二硫键是维持血清白蛋白上血红素、胆红素结合区域疏水性的关键化学键,其诱导断裂可能会影响血清白蛋白与血红素、胆红素的结合,干扰它们的转运和代谢.确切的生物学效应还要等待进一步的研究.

转铁蛋白(transferrin, Tf)是人体血液中不可缺少的生物分子,在血清中转铁蛋白的质量浓度为2.5 g/L,是血清中除血清白蛋白之外丰度最高的蛋白质.转铁蛋白分为含铁(holo-Tf)和不含铁(apo-Tf)两类,含铁蛋白约占30%,每个蛋白上能结合两个3价铁离子,转铁蛋白向细胞内转运铁离子是通过转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)介导的内吞作用完成的,而转铁蛋白受体在很多肿瘤细胞上是高表达的^[104].转铁蛋白也可以同许多金属化合物如3价钌、3价镓、铟和4价钛等形成复合物^[104-108],这些金属-转铁蛋白复合物依然可以被转铁蛋白受体所识别,使通过转铁蛋白受体介导的内吞作用向肿瘤细胞内定向输送金属药物或诊断试剂成为可能^[109,110].Dyson等^[111]结合胰蛋白酶酶解和LC-MS/MS研究转铁蛋白与顺铂的结合位点,发现顺铂与转铁蛋白的Thr457氨基酸残基配位. Thr457位于C-端铁离子结合位点口袋底部,这个

可能的结合位点也通过分子模拟得以证实. 但是在Dyson等^[111]的研究中, 并未发现顺铂与Met256位点的结合, 而这个位点是此前Sadler课题组^[112]利用NMR鉴定的顺铂与转铁蛋白的主要结合位点. Dyson等^[111]还利用自下而上的质谱方法研究了钐化合物RAPTA-T与转铁蛋白的相互作用, MS分析发现, RAPTA-T可以结合到K₂₃₉DCHLAQVPSHTV₂₅₁肽段上, 其中His249残基参与了铁离子的结合, 但CID碎裂显示钐化合物结合在His242而不是His249上. Sheldrick等^[31]利用二维液相色谱-串联质谱研究顺铂与转铁蛋白的相互作用, 他们发现顺铂除与Thr457残基结合外, 还与Met256、Glu265、Tyr314和Glu385残基结合. 不同课题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, 如反应物摩尔比、反应时间、温度、pH等, 也有可能是分离方法而引起. 二维液相色谱能更好地分离和富集铂化肽段, 从而提高质谱的分析效率, 获得更多的结合位点信息. 本课题组也利用LC-MS方法, 结合分子模拟计算, 以顺铂作为对照, 研究了在模拟生理条件下, 有机金属钐抗肿瘤化合物**1**和**3**与人源转铁蛋白的共价相互作用^[100]. 我们发现, 两种钐化合物无论是与含铁或不含铁的转铁蛋白反应, 都倾向于与蛋白表面裸露的组氨酸残基His242、His273、His578和His606共价结合; 但顺铂除了与含铁或不含铁的转铁蛋白中的His273、His578结合外, 还能与表面裸露的Tyr136、Tyr317、Met256残基配位. 除此之外, 也发现顺铂还能与不含铁的转铁蛋白C-端铁离子结合口袋底部的Thr457残基结合^[100].

铜伴侣蛋白(copper chaperon protein)是在动植物、细菌及人体内均存在的一类蛋白质, 它们在细胞内执行双重功能, 即运输铜和防止铜离子暴露于胞质^[113]. 大量研究表明, 人体内的铜转运系统蛋白质参与了顺铂的作用过程, 影响顺铂的细胞毒性和抗药性^[93,114]. 人铜伴侣蛋白Atox1由68个氨基酸残基构成, 具有维持细胞内铜离子的平衡功能^[115], 已有研究表明, 顺铂能够与Atox1上铜离子的结合位点结合^[116,117]. 本课题组与中国科技大学刘扬中课题组^[118,119]合作, 综合应用NMR、自下而上质谱分析研究了顺铂和两种具有抗癌活性的反铂类化合物(*trans*-[PtCl₂{E-HN=C(OCH₃)CH₃}₂], *trans*-EE和*trans*-[PtCl₂(NH₃)(thiazole)], *trans*-PtTz)与Atox1的相互作用, 对有机金属钐化合物**1**和**3**与Atox1的反应也进行了初步探索. 结果表明, 在有Cu⁺和无

Cu⁺共存条件下, 5种金属配合物与Atox1的结合形式基本相同, 均能与铜离子结合位点Cys12和Cys15残基结合. 我们还发现, Cu⁺的存在加快顺铂、反铂化合物与Atox1的反应, 对钐化合物与Atox1的结合没有明显影响. 此外, 5种金属配合物的结合促进蛋白聚集的程度各异, 顺铂相比其他4种金属配合物更容易促进蛋白二聚体的生成. 在顺铂与Atox1的反应过程中, 顺铂分子中氨基配体的离去加快铂与Atox1的配位结合, 并且加快分子间交联产物的生成. 结合了顺铂的Atox1的聚集可能是细胞对顺铂产生抗药性的原因之一^[116]. 两种反铂配合物及两种有机金属钐配合物在与Atox1的反应过程中, 配体基团非常稳定, 很难从化合物分子上离去, 分子间交联产物的生成较少. 这些研究结果表明, 金属抗肿瘤配合物与Atox1反应机制的不同将会对相应金属配合物在细胞中的代谢过程产生不同性质的影响.

人细胞色素氧化酶的组装蛋白17(Cox17)也是一种铜伴侣蛋白, 它负责将Cu⁺转运到线粒体中^[120]. Cox17含有6个半胱氨酸残基, 根据形成二硫键的个数可有3种不同的氧化态, 即Cox17_{1s-s}、Cox17_{2s-s}和Cox17_{3s-s}. 其中, Cox17_{2s-s}是功能化态, 负责将铜离子转移到线粒体膜间隙(intermembrane space)^[121]. 刘扬中等^[122]利用NMR、ESI-MS和光谱等技术研究了顺铂与Cox17的相互作用, 发现Cox17能将顺铂转运到线粒体中, 其结合位点应该是铜离子结合位点中的半胱氨酸巯基, 并且能将铜离子竞争下来. 他们还发现顺铂与Cu⁺-Cox17的反应活性比顺铂与apo-Cox17的反应活性高, 其中可能的原因是Cu⁺-Pt在铂化产物形成中发生相互作用的缘故. 本课题组^[123]则利用自下而上的质谱方法, 对比研究了顺铂和有机金属钐抗肿瘤化合物**1**和**3**与Cox17的反应. 结果表明, 虽然顺铂与有机金属钐化合物在Cox17上结合位点相同(Met4、Cys27/Cys26和His47), 但顺铂与Cox17的反应活性要比有机金属钐化合物与Cox17的反应活性高得多. 质谱分析可获得单铂化到四铂化的Cox17的多电荷质谱峰, 但是在同样的反应比例下钐化合物与Cox17反应的主要产物是单钐化的金属-蛋白质复合物及少量双钐化的产物. CD光谱显示顺铂对Cox17蛋白质构型的破坏要比两种有机金属钐配合物大得多, 表明Cox17可能并没有参与有机金属钐抗肿瘤配合物的作用过程.

谷胱甘肽转移酶(GST)是与肿瘤细胞抗药性相关

的含巯基的活性物质. 这类酶能够催化疏水性较强的药物分子偶联上亲水性强的还原型谷胱甘肽(GSH), 使药物分子亲水性增加, 进而在消耗ATP的情况下, 将药物排出细胞, 这也是GST导致抗药性的机制^[124]. GST有很多类型, 其中GST π 在多种癌细胞中都高表达^[125], 所以, 特异性的GST π 抑制剂也成为肿瘤靶向药物设计的方向. 我们利用自下而上的质谱方法, 比较研究了有机金属钌配合物**1**、**3**、**4**和GST π 的相互作用及作用位点^[126]发现, 3种有机金属钌配合物都能结合在位于G-site上的Cys15和Cys48, 以及位于二聚体界面上的Cys102和Met92残基上, 并诱导半胱氨酸残基上巯基氧化为亚磺酰基. 其中, Cys15和Cys48位点是GST π 底物GSH的结合区, Cys102和Met92则属于二聚化区, 钌配合物与这些残基的结合会干扰GST π 的功能, 是抑制GST π 催化活性的原因. 3种钌配合物抑制GST π 的IC₅₀值分别是59.4 $\pm$ 1.3、63.2 $\pm$ 0.4和37.2 $\pm$ 1.1 μ M, 它们对GST π 不同程度抑制的原因可能是配合物的芳香配基不同.

自下而上的质谱分析必须将蛋白质-金属药物复合物先酶解成肽段, 肽段混合物经液相色谱分离, 进行在线的质谱检测, 鉴定金属化的肽段^[127]. 蛋白质或蛋白质复合物的酶解是一个耗时的过程, 其中涉及使用高浓度的变性剂、还原剂, 由此可能导致金属-蛋白质配位键的解离, 使金属-蛋白质结合信息丢失(表1)^[111,126]. 所以, 自上而下的质谱分析方法也在研究金属药物与蛋白质的相互作用领域得到青睐. 自上而下的质谱分析直接针对蛋白质-金属复合物, 先利用ESI-MS或MALDI-MS分析, 鉴定金属-蛋白质复合物的质谱信号, 再以确认的金属-蛋白质离子为母离子, 以CID、红外多光子解离(IRMPD)、ECD等技术将全蛋白裂解, 分析鉴定含金属药物的碎片离子, 获得药物在蛋白上的结合位点信息^[128,129]. 自上而下的质谱方法的优点是, 样品不需要经过酶解等前处理步骤, 能够最大限度地保留金属药物和蛋白质结合的结构信息(表1).

Hartinger等^[130]基于自上而下策略, 利用电喷雾电离傅里叶变换离子回旋共振串联质谱(ESI-FTICR-MS/MS)研究了顺铂、奥沙利铂、反铂与泛素的相互作用. CID裂解获得的碎片离子显示, 顺铂和奥沙利铂结合在泛素N端的Met1残基上, 而反铂则可能结合在His68残基上. 他们还发现, CID

和IRMPD裂解方法都能获得含铂的蛋白碎片离子, 但使用ECD裂解方法却没有发现含铂片段, 可能的原因是由于铂离子捕获电子, 使产生的含铂片段中性化, 不能被质谱检测^[131]. 但是, O'Connor等^[96,132]利用ECD裂解, 结合高分辨FTICR-MS/MS质谱检测到顺铂、[Pt(dien)Cl]Cl和[(η^5 -C₅Me₅)Ir(phpy)Cl]、[(η^5 -C₅Me₅C₆H₄C₆H₅)Ir-(phpy)Cl]与钙调蛋白(calmodulin)复合物产生的M*-Met碎片离子, 显示Pt、Ir对钙调蛋白甲硫氨酸残基的亲中性. 进一步的自上而下的质谱研究表明, 顺铂能通过交联蛋白上的Met残基, 形成蛋白交联复合物^[132]. 在应用自上而下ECD质谱分析研究顺铂和Cox17蛋白的作用位点时, 检测到Pt结合在K₂₄PCCACPET₃₂片段上的碎片离子^[133], 也证实ECD裂解可以获得金属-蛋白质残基碎片离子. 根据顺铂对不同氨基酸残基的亲中性, 推测这个片段上的Cys26或Cys27可能是顺铂的结合位点, 与之前自下而上的质谱分析获得的结果一致^[123]. Gómez-Gómez等^[134]利用线性离子阱(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条由一个分子内二硫键联接的肽链. 胰岛素与顺铂反应最多可以结合3个顺铂分子. 利用CID裂解和多级质谱(MSⁿ)分析发现, 顺铂主要结合在胰岛素B链N端的His5和His10残基上. 研究结果还显示, 顺铂也可能结合在Cys7残基上, 虽然该残基在蛋白中形成了二硫键. 金属硫蛋白(metallothionein, MT)富含半胱氨酸残基, 可能是顺铂在细胞内结合的重要蛋白分子. 本课题组^[135]利用MALDI-TOF-MS研究了顺铂和金属硫蛋白在酸性和中性条件下的反应, 发现在酸性条件下顺铂的反应活性更高, 最多有5个顺铂分子结合在金属硫蛋白上. Li等^[136]利用四极杆-四极杆(ESI-QQ)-TOF-MS, 结合CID裂解研究了金属硫蛋白与顺铂的结合位点, 发现顺铂主要结合在Cys5和Cys7残基上.

4 质谱定量研究金属抗肿瘤化合物与蛋白质的相互作用

电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)是一种元素质谱定量分析技术. 通过在高达10000℃高温ICP炬中的热解反应, 分析物裂解为气态原子, 并进一步激发电离产生元素离子, 通过质量分析器分离, 可检测分析物组成元素的质荷比信号, 对元素离子进行绝对定量分析. ICP-MS具有灵敏度高、线性范围宽、分析速度快、

多元素同时测定及同位素分辨等优点, 已成为痕量元素分析中一种主要的检测手段^[137~139], 对金属元素的检测限可达ppm (pg/mL)级, 特别适合金属药物-蛋白质复合物的定量分析. ICP-MS能同时获得金属和蛋白质硫元素的定量信息^[140], 其与各种色谱分离技术联用已被广泛用于金属-蛋白质复合物的定量分析^[141]. 例如, 体积排阻柱(SEC)-HPLC-ICP-MS结合柱后同位素稀释法定量分析顺铂和MT结合化学计量比^[142], 结果表明, 顺铂可定量取代MT结合的Zn离子, 但不能取代在同一位点结合的Cd离子. Sadler等^[143]用ICP-MS精确测量了转铁蛋白-顺铂复合物溶液中铂的浓度, 检测限可达0.03 $\mu\text{g/L}$. Keppler、Szpunar、Hartinger及其合作者在ICP-MS与色谱(HPLC、毛细管电泳(CE))等技术联用定量研究金属药物与蛋白质相互作用方面做了大量工作^[127,28,144~147], 他们将HPLC与ICP-MS联用研究了顺铂与人血清蛋白的反应动力学^[148], 反应3 h后没有检测到铂-蛋白质复合物, 80%的药物仍然是自由态, 这比之前报道的顺铂与血清蛋白的反应活性低. 他们应用CE-ICP-MS研究的结果表明, 当顺铂/血清白蛋白摩尔比增加时, 反应速率明显增加^[149]. 在20倍过量顺铂浓度下, 反应速率达到最大值, 反应50 h后每一个血清白蛋白结合10个铂原子. 按照准一级反应计算的反应速率常数(k)为 $5.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. 3价钆候选药物KP1019水溶性差^[150], 制成钠盐(KP1339)时水溶性得以改善. 但Keppler等^[151]利用CE-ICP-MS研究KP1019和KP1339与HSA和Tf的反应时, 发现两种化合物与两种蛋白的反应速率基本相似. Dyson等^[152]利用SEC-HPLC-ICP-MS和ESI-MS研究了有机金属钆化合物RAPTA-T和顺铂与holo-Tf、apo-Tf和HSA的相互作用, 发现顺铂与3种蛋白的结合比在0.2~0.35 mol (pt)/mol (蛋白质)之间; 而RAPTA-T对holo-Tf的亲合力最高, 每个蛋白分子上可以结合1.4个钆原子; RAPTA-T对apo-Tf和HSA的亲合力也比顺铂高, 每个蛋白复合物分子结合0.5~1.0个钆原子. RAPTA-T对holo-Tf较高的亲合力表明, 铁离子的存在有助于钆化合物与Tf的结合. Mandal等^[153]也应用SEC-HPLC-ICP-MS实时监测了铂类化合物(顺铂、卡铂和奥沙利铂)和血红蛋白反应产物中 ^{57}Fe 和 ^{195}Pt 的摩尔比. 结果显示, 奥沙利铂和顺铂与血红蛋白的反应活性相似, 其结合导致铁血红素从蛋白上部分解离. 尽管卡铂与血红蛋白的结合也能引起铁血红素的部分解离, 但与顺铂和奥沙利铂相比, 卡铂与血红

蛋白的反应活性要低得多. 他们还综合应用纳升喷雾Q-TOF-MS和SEC-HPLC-ICP-MS表征了顺铂和兔源金属硫蛋白(MT)的反应产物. 兔源金属硫蛋白含1.4%的锌和7.9%的镉. 他们的结果显示在中性条件下, 顺铂能置换结合在半胱氨酸残基上的锌, 与镉结合在同一蛋白分子上, 形成 $\text{Cd}_4\text{-Pt}_n\text{-MT}$ ($n=1\sim7$)产物. 这与此前文献报道的结果, 即顺铂不能取代金属硫蛋白结合的镉的结论是一致的. 另一方面, 金属硫蛋白能结合顺铂, 可能与细胞对顺铂的抗药性有关^[154].

虽然ICP-MS测定蛋白质分子中金属元素的丰度具有极高的灵敏度, 但由于其测定的是总蛋白结合金属的化学计量比, 很难确定结合在特定氨基酸残基上的金属元素的量. 在ESI-MS和MALDI-MS分析中, 由于金属的结合对蛋白质或多肽离子化效率影响的不确定性, 不能简单地通过比较金属药物-蛋白质复合物或金属药物-多肽复合物的质谱信号强度, 定量表征金属药物与蛋白质结合的化学计量比. 而金属化多肽标准品的缺乏, 使通过内标(或外标)自下而上质谱分析定量测定金属化多肽几乎不可能. 所以, 应用ESI-MS和MALDI-MS定量表征金属药物结合在蛋白质特定氨基酸残基上的计量比是一个颇具挑战性的课题. 本课题组基于定量蛋白质组学分析中稳定同位素标记技术, 发展了一种稳定同位素标记和LC-ESI-MS相结合的方法, 实现了金属抗肿瘤配合物与蛋白质特定氨基酸残基结合计量比的定量测定^[118,119,155]. 如图5所示, 将等摩尔比的蛋白质和蛋白质-金属药物复合物分别以胰蛋白酶酶解, 将“轻标”和“重标”同位素试剂, 如乙酸-N-琥珀酰亚胺酯(*N*-acetoxysuccinimide, NAS)和N-乙基马来酰亚胺(*N*-ethylmaleimide, NEM)分别加入到蛋白质和蛋白质-金属复合物的酶解混合物中, 化学标记酶解肽段; 轻同位素试剂标记的肽段为“轻肽”, 重同位素标记的肽段为“重肽”; 然后, 将“轻肽”和“重肽”按1:1体积混合, 进行LC-MS分析, 通过比较同一条轻/重标记肽段的质谱信号, 两者信号相等即表明对应的肽段没有和金属药物反应; 如两者信号有显著差异, 其信号强度差即对应这条肽段与金属药物结合的比例. NAS是一种针对肽段末端和侧链上氨基($-\text{NH}_2$)的特异性标记试剂, 能定量与氨基通过缩合反应, 生成稳定的酰胺化合物. NAS带有3个标记同位素(H-D), 每一个标记试剂将给轻重标记的肽段引入3个质量数(Da)的差异, 质谱分析可以灵敏地区分轻重标记肽段

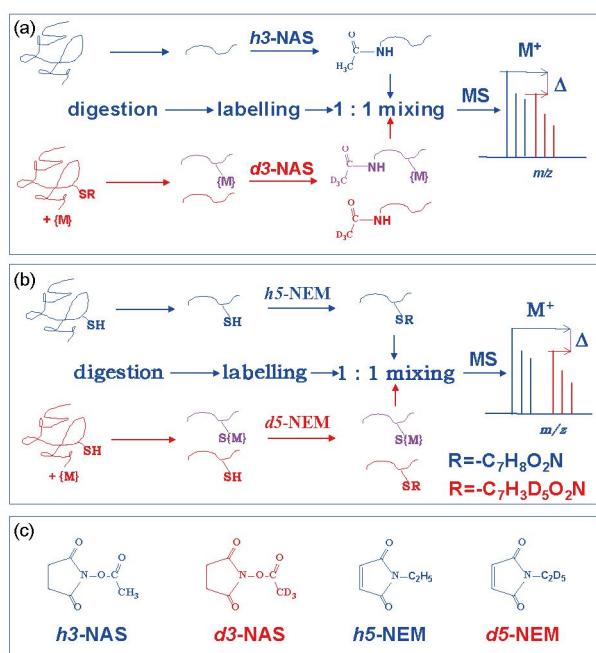


图5 基于稳定同位素标记的ESI-MS定量分析金属药物与蛋白质结合计量比的流程示意图。(a)针对多肽氨基(-NH₂)的同位素标记方法;(b)针对多肽巯基(-SH)的同位素标记方法;(c)同位素标记试剂N-乙酸琥珀酰亚胺(NAS)和N-乙基马来酰亚胺(NEM)(网络版彩图)

(图5(a)).应用NAS标记方法,通过LC-MS分析,定量测定了3种有机金属钕抗肿瘤配合物1、3和4(图1)与谷胱甘肽转移酶GST π 结合计量比^[155].之前的自下而上的质谱分析表明,3种钕配合物都能与GST π 上的Cys15、Cys48、Met92和Cys102结合^[126].定量分析结果表明,3种钕配合物都对Met92表现高反应活性,对Cys48和Cys15的反应活性次之,对Cys102的活性最低.因为3种化合物在有、无GSH存在时,对GST π 的抑制活性几乎不变,但在GSH存在时,他们与Met92和Cys102的结合急剧减少,所以,3种配合物和Cys15和Cys48的结合是它们抑制GST π 活性的主要原因. Cys15和Cys48都是位于GST π 分子中G-site,即GSH结合域内的残基,钕配合物的结合会干扰GST π 与GSH的结合,所以抑制GST π 的催化活性.我们的这一结果说明,定量表征金属配合物与蛋白质(或酶)的相互作用,将有助于进一步理解他们的分子作用机理.

N-乙基马来酰亚胺(NEM)是一种针对蛋白质巯基的特异性标记试剂,通过亲核加成的方式和巯基反应,生成硫醚衍生物^[156]. NEM含有5个同位素置换

的H原子(H-D),标记一个巯基将给轻重标记肽段引入5个质量数的差异.基于NEM同位素标记技术,应用LC-ESI-MS定量研究了钕/铂抗肿瘤配合物与蛋白质Atox1、过氧化物氧化还原酶I(Prx-I)的巯基(功能)催化位点的配合反应^[155].定性研究结果表明^[118,119],顺铂能与Atox1中Cu⁺的结合位点Cys15和Cys18结合,而且Cu⁺可以加快Pt与巯基的结合.定量分析结果表明,在没有Cu⁺存在时,顺铂能与蛋白中13.5%的Cys15/Cys18发生反应;而在Cu⁺存在下,相同反应时间内顺铂结合Cys15/Cys18的比例达到50.3%.这一结果给Cu⁺能促进顺铂与Atox1巯基的结合提供了直接的证据^[118]. NEM标记除了可以定量分析金属药物与蛋白质巯基的反应计量比之外,还可以在一个肽段含有多个巯基的情况下,结合串联质谱,不需要再借助其他化学修饰试剂,同时实现对巯基结合位点的定性鉴定.定量分析的结果直接证明,顺铂可以占据Cu⁺的结合位点,结合Atox1上的Cys15、Cys18形成交联复合物^[118,119]. NEM标记技术还被用于LC-MS定量研究有机金属钕抗肿瘤配合物1、2和4与Prx-I巯基催化位点的结合计量比.结果表明,3种钕配合物都能与Prx-I的共催化位点Cys173结合,并诱导巯基氧化为亚磺酰基,而配合物2与Cys173的反应活性最高,与其抑制Prx-I活性最好相一致.

5 展望

尽管DNA被认为是传统细胞毒性金属抗肿瘤药物的终极靶标,但是一方面金属药物对蛋白质的亲和性使药物与蛋白质的相互作用不可避免,这种作用不仅在很大程度上影响金属药物的生物利用度,而且与金属药物的毒副作用以及肿瘤细胞抗药性的产生密切相关.另一方面,最近的研究表明,金属药物与蛋白质的相互作用可能在其活性发挥中扮演重要角色,或通过协同作用,增强细胞毒性金属抗肿瘤药物的活性.所以,研究金属药物与蛋白质的相互作用和研究药物与DNA的相互作用同等重要.

基于软电离技术的质谱分析,能够在检测过程中保留金属抗肿瘤药物与蛋白质的共价(配位)结合,甚至较强的非共价结合信息.而质量分析器的发展也大大提高了质谱分析的质量分辨率,为生物活性分子,特别是生物大分子及其复合物的分析鉴定提供了更为快速、准确和灵敏的技术.但是,目前大部分药物分

子作用机理的研究都是在模拟生理条件下将蛋白质或肿瘤细胞与金属药物孵育,而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,不能真实地反映药物在人体内作用过程的真实情况。而且,大剂量药物与细胞孵育会导致细胞异常的应激反应,使药物与蛋白质或DNA的作用出现偏离,导致假阳性、假阴性结果的产生。因此,临床剂量条件药物分子作用机理研究面临着实际样品组成复杂及金属药物-蛋白质(DNA)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色谱分离技术和质谱联用技术分析血液、组织或细胞等复杂(临床)生物样品,鉴定与金属药物结合的生物靶分子,表征药物分子与靶分子结合的化学计量比。另外,发展针对性的分离富集方法,从实际生物样品中选择性富集结合金属药物的低丰度蛋白质和DNA复合物,再应用自下而上或自上而下的质谱方法分析鉴定金属药物在生物靶分子上的结合位点和作用方式。目前,自上而下的质谱分析方法主要应用于小分子量的蛋白质-金

属、DNA-药物复合物的结构鉴定,随着质谱分析质量分辨率的提高、解离技术的发展和完善,应用自上而下的质谱分析研究大分子量蛋白质(DNA)-药物复合物指日可待。

细胞、组织和人体是非常复杂的生物体系,如果单纯从化学角度在体外研究抗肿瘤化合物与生物靶分子的作用,建立药物的构效关系,由此筛选和发现的先导化合物可能进入体内试验时并不能产生预期的生物活性。所以未来药物作用机理的研究必须更多的需要与临床生物医学家、药学家合作^[157,158],探索药物在体内的作用机制,实现药物早期的成药性和安全性评价,这样才能更好地提高药物发现的成功率。近年来飞速发展的质谱成像技术,包括激光烧蚀(LA)-ICP-MS成像、MALDI-MS成像和二次离子质谱成像,可以在微、纳米空间分辨率下,从组织到单细胞水平上研究金属药物在体内的靶向传输、代谢和细胞摄入、分布等^[159-168],将在金属抗肿瘤药物成药性、安全性评价,药物代谢动力学研究、分子作用机理研究等领域得到越来越多的应用。

参考文献

- 1 Rosenberg B, van Camp L, Krigas T. *Nature*, 1965, 205: 698-699
- 2 Rosenberg B, Vancamp L, Trosko JE, Mansour VH. *Nature*, 1969, 222: 385-386
- 3 Boulikas T, Vougiouka M. *Oncol Rep*, 2004, 11: 559
- 4 Brabec V, Kasparkova J. *Drug Resis Updates*, 2005, 8: 131-146
- 5 Wang D, Lippard SJ. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4: 307-320
- 6 Bruijninx PCA, Sadler PJ. *Adv Inorg Chem*, 2009, 61: 1-62
- 7 Hartinger CG, Dyson PJ. *Chem Soc Rev*, 2009, 38: 391-401
- 8 Jakupec MA, Galanski M, Arion VB, Hartinger CG, Keppler BK. *Dalton Trans*, 2008, 2008: 183-194
- 9 Sava G, Bergamo A, Dyson PJ. *Dalton Trans*, 2011, 40: 9069
- 10 Kapitza S, Jakupec MA, Uhl M, Keppler BK, Marian B. *Cancer Lett*, 2005, 226: 115-121
- 11 Kapitza S, Pongratz M, Jakupec MA, Heffeter P, Berger W, Lackinger L, Keppler BK, Marian B. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, 131: 101-110
- 12 Rademaker-Lakhai JM, van den Bongard D, Pluim D, Beijnen JH, Schellens JHM. *Clinic Cancer Res*, 2004, 10: 3717-3727
- 13 Clarke MJ. *Metal Ions Biol Sys*, 1980, 11: 231-283
- 14 Clarke MJ, Bitler S, Rennert D, Buchbinder M, Kelman AD. *J Inorg Biochem*, 1980, 12: 79-87
- 15 Melchart M, Sadler PJ. In: Jaouen G, Ed. *Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine*. Weinheim: Wiley-VCH, 2006
- 16 van Rijt SH, Sadler PJ. *Drug Discov Today*, 2009, 14: 1089-1097
- 17 Yan YK, Melchart M, Habtemariam A, Sadler PJ. *Chem Commun*, 2005, 38: 4764
- 18 Chatterjee S, Kundu S, Bhattacharyya A, Hartinger CG, Dyson PJ. *J Biol Inorg Chem*, 2008, 13: 1149-1155
- 19 Sclaro C, Chaplin AB, Hartinger CG, Bergamo A, Cocchietto M, Keppler BK, Sava G, Dyson PJ. *Dalton Trans*, 2007, 2007: 5065
- 20 Vock CA, Ang WH, Sclaro C, Phillips AD, Lagopoulos L, Juillerat-Jeanneret L, Sava G, Scopelliti R, Dyson PJ. *J Med Chem*, 2007, 50: 2166-2175
- 21 Ang WH, Dyson PJ. *Eur J Inorg Chem*, 2006, 2006: 4003

- 22 Wang F, Habtemariam A, van der Geer EPL, Fernández R, Melchart M, Deeth RJ, Aird R, Guichard S, Fabbiani FPA, Lozano-Casal P, Oswald IDH, Jodrell DI, Parsons S, Sadler PJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 18269–18274
- 23 Aird RE, Cummings J, Ritchie AA, Muir M, Morris RE, Chen H, Sadler PJ, Jodrell DI. *Brit J Cancer*, 2002, 86: 1652–1657
- 24 Jung Y, Lippard SJ. *Chem Rev*, 2007, 107: 1387–1407
- 25 Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. *Chem Rev*, 2016, 116: 3436–3486
- 26 Wang X, Guo Z. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 202–224
- 27 Hartinger CG, Groessl M, Meier SM, Casini A, Dyson PJ. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 6186–6199
- 28 Timerbaev AR, Hartinger CG, Aleksenko SS, Keppler BK. *Chem Rev*, 2006, 106: 2224–2248
- 29 Will J, Kyas A, Sheldrick WS, Wolters D. *J Biol Inorg Chem*, 2007, 12: 883–894
- 30 Will J, Sheldrick WS, Wolters D. *J Biol Inorg Chem*, 2008, 13: 421–434
- 31 Will J, Wolters DA, Sheldrick WS. *ChemMedChem*, 2008, 3: 1696–1707
- 32 Timerbaev AR. *J Anal Atom Spectrom*, 2014, 29: 1058
- 33 Jamieson ER, Lippard SJ. *Chem Rev*, 1999, 99: 2467–2498
- 34 Suntharalingam K, Mendoza O, Duarte AA, Mann DJ, Vilar R. *Metallomics*, 2013, 5: 514–523
- 35 Berners-Price SJ, Ronconi L, Sadler PJ. *Prog Nucl Mag Res Sp*, 2006, 49: 65–98
- 36 Hambley TW. *J Chem Soc Dalton Trans*, 2001, 2001: 2711–2718
- 37 Ronconi L, Sadler PJ. *Coord Chem Rev*, 2008, 252: 2239–2277
- 38 Sirajuddin M, Ali S, Badshah A. *J Photochem Photobiol B*, 2013, 124: 1–19
- 39 Wu Y, Pradhan P, Havener J, Boysen G, Swenberg JA, Campbell SL, Chaney SG. *J Mol Biol*, 2004, 341: 1251–1269
- 40 Brabec V, Vrana O, Boudny V. *Prog Biophys Mol Biol*, 1996, 65: Pb113
- 41 Reedijk J. *Eur J Inorg Chem*, 2009, 2009: 1303–1312
- 42 Vinje J, Sletten E. *Anti-Cancer Agent Med Chem*, 2007, 7: 35–54
- 43 Lippard SJ. *Pure Appl Chem*, 1987, 59: 731–742
- 44 Lippert B. *Biometals*, 1992, 5: 195–208
- 45 Sherman SE, Lippard SJ. *Chem Rev*, 1987, 87: 1153–1181
- 46 Takahara PM, Rosenzweig AC, Frederick CA, Lippard SJ. *Nature*, 1995, 377: 649–652
- 47 Fichtinger-Schepman AMJ, Van der Veer JL, Den Hartog JHJ, Lohman PHM, Reedijk J. *Biochemistry*, 1985, 24: 707–713
- 48 Chen H, Parkinson JA, Morris RE, Sadler PJ. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 173–186
- 49 Chen H, Parkinson JA, Parsons S, Coxall RA, Gould RO, Sadler PJ. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 3064–3082
- 50 Chen H, Parkinson JA, Nováková O, Bella J, Wang F, Dawson A, Gould R, Parsons S, Brabec V, Sadler PJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 14623–14628
- 51 Liu HK, Berners-Price SJ, Wang F, Parkinson JA, Xu J, Bella J, Sadler PJ. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 8153–8156
- 52 Liu HK, Wang F, Parkinson JA, Bella J, Sadler PJ. *Chem Eur J*, 2006, 12: 6151–6165
- 53 Liu HK, Parkinson JA, Bella J, Wang F, Sadler PJ. *Chem Sci*, 2010, 1: 258–270
- 54 Novakova O, Chen H, Vrana O, Rodger A, Sadler PJ, Brabec V. *Biochemistry*, 2003, 42: 11544–11554
- 55 Novakova O, Kasparkova J, Bursova V, Hofr C, Vojtiskova M, Chen H, Sadler PJ, Brabec V. *Chem Biol*, 2005, 12: 121–129
- 56 Beck JL, Colgrave ML, Ralph SF, Sheil MM. *Mass Spectrom Rev*, 2001, 20: 61–87
- 57 Triolo A, Arcamone FM, Raffaelli A, Salvadori P. *J Mass Spectrom*, 1997, 32: 1186–1194
- 58 Wang B, Sayer JM, Yagi H, Frank H, Seidel A, Jerina DM. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 10079–10084
- 59 Gupta R, Beck JL, Sheil MM, Ralph SF. *J Inorg Biochem*, 2005, 99: 552–559
- 60 Gonnet F, Kocher F, Blais JC, Bolbach G, Tabet JC, Chottard JC. *J Mass Spectrom*, 1996, 31: 802–809
- 61 Barry CG, Baruah H, Bierbach U. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 9629–9637
- 62 Morris RE, Aird RE, del Socorro Murdoch P, Chen H, Cummings J, Hughes ND, Parsons S, Parkin A, Boyd G, Jodrell DI, Sadler PJ. *J Med Chem*, 2001, 44: 3616–3621
- 63 Wu K, Liu S, Luo Q, Hu W, Li X, Wang F, Zheng R, Cui J, Sadler PJ, Xiang J, Shi Q, Xiong S. *Inorg Chem*, 2013, 52: 11332–11342
- 64 Wu K, Luo Q, Hu W, Li X, Wang F, Xiong S, Sadler PJ. *Metallomics*, 2012, 4: 139–148
- 65 Téletchéa S, Skauge T, Sletten E, Kozelka J. *Chem Eur J*, 2009, 15: 12320–12337
- 66 del Socorro Murdoch P, Guo Z, Parkinson JA, Sadler PJ. *J Biol Inorg Chem*, 1999, 4: 32–38
- 67 Gaucheron F, Malinge JM, Blacker AJ, Lehn JM, Leng M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 3516–3519
- 68 Johnson NP, Mazard AM, Escalier J, Macquet JP. *J Am Chem Soc*, 1985, 107: 6376–6380

- 69 Payet D, Gaucheron F, Sip M, Leng M. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 5846–5851
- 70 Dalbiès R, Boudvillain M, Leng M. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 949–953
- 71 Malina J, Kasparkova J, Farrell NP, Brabec V. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 720–728
- 72 Liu S, Wu K, Zheng W, Zhao Y, Luo Q, Xiong S, Wang F. *Analyst*, 2014, 139: 4491–4496
- 73 Mowaka S, Ziehe M, Mohamed D, Hochkirch U, Thomale J, Linscheid MW. *J Mass Spectrom*, 2012, 47: 1282–1293
- 74 Bertrand H, Bombard S, Monchaud D, Talbot E, Guédin A, Mergny JL, Grünert R, Bednarski PJ, Teulade-Fichou MP. *Org Biomol Chem*, 2009, 7: 2864–2871
- 75 Rao L, Bierbach U. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 15764–15765
- 76 McLuckey SA, Habibi-Goudarzi S. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 12085–12095
- 77 Wu K, Hu W, Luo Q, Li X, Xiong S, Sadler PJ, Wang F. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2013, 24: 410–420
- 78 Barry CG, Day CS, Bierbach U. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 1160–1169
- 79 Egger AE, Hartinger CG, Ben Hamidane H, Tsybin YO, Keppler BK, Dyson PJ. *Inorg Chem*, 2008, 47: 10626–10633
- 80 Stucki SR, Nyakas A, Schürch S. *J Mass Spectrom*, 2011, 46: 1288–1297
- 81 Elmroth SKC, Lippard SJ. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 3633–3634
- 82 Neidle S, Parkinson G. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1: 383–393
- 83 Parkinson GN, Lee MPH, Neidle S. *Nature*, 2002, 417: 876–880
- 84 Groessl M, Tsybin YO, Hartinger CG, Keppler BK, Dyson PJ. *J Biol Inorg Chem*, 2010, 15: 677–688
- 85 Iannitti-Tito P, Weimann A, Wickham G, Sheil MM. *Analyst*, 2000, 125: 627–634
- 86 Hagemester T, Linscheid M. *J Mass Spectrom*, 2002, 37: 731–747
- 87 Casini A, Reedijk J. *Chem Sci*, 2012, 3: 3135–3144
- 88 Han Y, Luo Q, Hao X, Li X, Wang F, Hu W, Wu K, Lü S, Sadler PJ. *Dalton Trans*, 2011, 40: 11519–11529
- 89 Reedijk J. *Chem Rev*, 1999, 99: 2499–2510
- 90 Wang F, Bella J, Parkinson JA, Sadler PJ. *J Biol Inorg Chem*, 2005, 10: 147–155
- 91 Wang F, Chen H, Parkinson JA, Murdoch PS, Sadler PJ. *Inorg Chem*, 2002, 41: 4509–4523
- 92 Wang F, Xu J, Habtemariam A, Bella J, Sadler PJ. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 17734–17743
- 93 Kelland L. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 573–584
- 94 Hu W, Luo Q, Ma X, Wu K, Liu J, Chen Y, Xiong S, Wang J, Sadler PJ, Wang F. *Chem Eur J*, 2009, 15: 6586–6594
- 95 Hu W, Luo Q, Wu K, Li X, Wang F, Chen Y, Ma X, Wang J, Liu J, Xiong S, Sadler PJ. *Chem Commun*, 2011, 47: 6006–6008
- 96 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
- 97 Sooriyaarachchi M, Narendran A, Gailer J. *Metallomics*, 2011, 3: 49–55
- 98 Montero EI, Benedetti BT, Mangrum JB, Oehlsen MJ, Qu Y, Farrell NP. *Dalton Trans*, 2007, 2007: 4938
- 99 Allardyce CS, Dyson PJ, Coffey J, Johnson N. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16: 933–935
- 100 Guo W, Zheng W, Luo Q, Li X, Zhao Y, Xiong S, Wang F. *Inorg Chem*, 2013, 52: 5328–5338
- 101 Wang F, Weidt S, Xu J, Mackay CL, Langridge-Smith PRR, Sadler PJ. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2008, 19: 544–549
- 102 Stewart AJ, Blindauer CA, Berezenko S, Sleep D, Sadler PJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3701–3706
- 103 Sweeney JD, Ziegler P, Pruet C, Spaulding MB. *Cancer*, 1989, 63: 2093–2095
- 104 Sun H, Li H, Sadler PJ. *Chem Rev*, 1999, 99: 2817–2842
- 105 Pongratz M, Schluga P, Jakupec MA, Arion VB, Hartinger CG, Allmaier G, Keppler BK. *J Anal Atom Spectrom*, 2004, 19: 46–51
- 106 Chitambar CR. *Curr Opin Oncol*, 2004, 16: 547–552
- 107 Harris WR, Chen Y, Wein K. *Inorg Chem*, 1994, 33: 4991–4998
- 108 Sun H, Li H, Weir RA, Sadler PJ. *Angew Chim Int Ed*, 1998, 37: 1577–1579
- 109 Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. *Adv Drug Deliver Rev*, 2002, 54: 631–651
- 110 Qian ZM. *Pharmacol Rev*, 2002, 54: 561–587
- 111 Khalaila I, Allardyce CS, Verma CS, Dyson PJ. *ChemBioChem*, 2005, 6: 1788–1795
- 112 Cox MC, Barnham KJ, Frenkiel TA, Hoeschele JD, Mason AB, He QY, Woodworth RC, Sadler PJ. *J Biol Inorg Chem*, 1999, 4: 621–631
- 113 Tisato F, Marzano C, Porchia M, Pellei M, Santini C. *Med Res Rev*, 2010, 30: 708
- 114 Siddik ZH. *Oncogene*, 2003, 22: 7265–7279
- 115 Hamza I, Prohaska J, Gitlin JD. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 1215–1220
- 116 Arnesano F, Banci L, Bertini I, Felli IC, Losacco M, Natile G. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 18361–18369
- 117 Boal AK, Rosenzweig AC. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 14196–14197

- 118 Xi Z, Guo W, Tian C, Wang F, Liu Y. *Chem Commun*, 2013, 49: 11197–11199
- 119 Xi Z, Guo W, Tian C, Wang F, Liu Y. *Metallomics*, 2014, 6: 491–497
- 120 Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Leontari I, Martinelli M, Palumaa P, Sillard R, Wang S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 15–20
- 121 Palumaa P. *FEBS Lett*, 2013, 587: 1902–1910
- 122 Zhao L, Cheng Q, Wang Z, Xi Z, Xu D, Liu Y. *Chem Commun*, 2014, 50: 2667–2669
- 123 Li L, Guo W, Wu K, Wu X, Zhao L, Zhao Y, Luo Q, Wang Y, Liu Y, Zhang Q, Wang F. *J Inorg Biochem*, 2016, 161: 99–106
- 124 Tsuchida S, Sato K. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1992, 27: 337–384
- 125 Wilce MCJ, Parker MW. *BBA-Protein Struct Mol Enzym*, 1994, 1205: 1–18
- 126 Lin Y, Huang Y, Zheng W, Wang F, Habtemariam A, Luo Q, Li X, Wu K, Sadler PJ, Xiong S. *J Inorg Biochem*, 2013, 128: 77–84
- 127 Cristoni S, Bernardi LR. *Expert Rev Proteom*, 2004, 1: 469–483
- 128 Pesavento JJ, Kim YB, Taylor GK, Kelleher NL. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 3386–3387
- 129 Demirev PA, Feldman AB, Kowalski P, Lin JS. *Anal Chem*, 2005, 77: 7455–7461
- 130 Hartinger CG, Tsybin YO, Fuchser J, Dyson PJ. *Inorg Chem*, 2008, 47: 17–19
- 131 Hartinger CG, Casini A, Duhot C, Tsybin YO, Messori L, Dyson PJ. *J Inorg Biochem*, 2008, 102: 2136–2141
- 132 Li H, Zhao Y, Phillips HIA, Qi Y, Lin TY, Sadler PJ, O'Connor PB. *Anal Chem*, 2011, 83: 5369–5376
- 133 Li L, Guo W, Wu K, Zhao Y, Luo Q, Zhang Q, Liu J, Xiong S, Wang F. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2016, 30: 168–172
- 134 Moreno-Gordaliza E, Cañas B, Palacios MA, Gómez-Gómez MM. *Anal Chem*, 2009, 81: 3507–3516
- 135 Zhang G, Hu W, Du Z, Lv S, Zheng W, Luo Q, Li X, Wu K, Han Y, Wang F. *Int J Mass Spectrom*, 2011, 307: 79–84
- 136 Mandal R, Li XF. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20: 48–52
- 137 Razumienko E, Ornatsky O, Kinach R, Milyavsky M, Lechman E, Baranov V, Winnik MA, Tanner SD. *J Immunol Methods*, 2008, 336: 56–63
- 138 Baranov VI, Quinn Z, Bandura DR, Tanner SD. *Anal Chem*, 2002, 74: 1629–1636
- 139 Baranov VI, Quinn ZA, Bandura DR, Tanner SD. *J Anal Atom Spectrom*, 2002, 17: 1148–1152
- 140 Bouyssiere B, Baco F, Savary L, Lobiński R. *J Chromatogr A*, 2002, 976: 431–439
- 141 Kannamkumarath SS, Wrobel K, Wrobel K, B'Hymer C, Caruso JA. *J Chromatogr A*, 2002, 975: 245–266
- 142 Esteban-Fernández D, Cañas B, Pizarro I, Palacios MA, Gómez-Gómez MM. *J Anal Atom Spectrom*, 2007, 22: 1113–1121
- 143 Christodoulou J, Kashani M, Keohane BM, Sadler PJ. *J Anal Atom Spectrom*, 1996, 11: 1031–1035
- 144 Bytzek AK, Boeck K, Hermann G, Hann S, Keppler BK, Hartinger CG, Koellensperger G. *Metallomics*, 2011, 3: 1049–1055
- 145 Heffeter P, Böck K, Atil B, Reza Hoda MA, Körner W, Bartel C, Jungwirth U, Keppler BK, Micksche M, Berger W, Koellensperger G. *J Biol Inorg Chem*, 2010, 15: 737–748
- 146 Szpunar J. *Analyst*, 2005, 130: 442–465
- 147 Holtkamp H, Grabmann G, Hartinger CG. *Electrophoresis*, 2016, 37: 959–972
- 148 Szpunar J, Makarov A, Pieper T, Keppler BK, Lobiński R. *Anal Chim Acta*, 1999, 387: 135–144
- 149 Timerbaev AR, Aleksenko SS, Polec-Pawlak K, Ruzik R, Semenova O, Hartinger CG, Oszwaldowski S, Galanski M, Jarosz M, Keppler BK. *Electrophoresis*, 2004, 25: 1988–1995
- 150 Hartinger CG, Zorbas-Seifried S, Jakupec MA, Kynast B, Zorbas H, Keppler BK. *J Inorg Biochem*, 2006, 100: 891–904
- 151 Polec-Pawlak K, Abramski JK, Ferenc J, Foteeva LS, Timerbaev AR, Keppler BK, Jarosz M. *J Chromatogr A*, 2008, 1192: 323–326
- 152 Groessl M, Terenghi M, Casini A, Elviri L, Lobinski R, Dyson PJ. *J Anal Atom Spectrom*, 2010, 25: 305–313
- 153 Mandal R, Kalke R, Li XF. *Chem Res Toxicol*, 2004, 17: 1391–1397
- 154 Mandal R, Jiang G, Li XF. *Appl Organomet Chem*, 2003, 17: 675–681
- 155 Lin Y, Huang Y, Zheng W, Wu K, Luo Q, Zhao Y, Xiong S, Wang F. *J Inorg Biochem*, 2015, 146: 44–51
- 156 Zabet-Moghaddam M, Kawamura T, Yatagai E, Niwayama S. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 4891–4895
- 157 Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N. *J Med Chem*, 2011, 54: 3–25
- 158 Hartinger CG, Metzler-Nolte N, Dyson PJ. *Organometallics*, 2012, 31: 5677–5685
- 159 Wedlock LE, Berners-Price SJ. *Aust J Chem*, 2011, 64: 692–704
- 160 Lee RFS, Escrig S, Croisier M, Clerc-Rosset S, Knott GW, Meibom A, Davey CA, Johnsson K, Dyson PJ. *Chem Commun*, 2015, 51: 16486–16489
- 161 Legin AA, Schintlmeister A, Jakupec MA, Galanski M, Lichtscheidl I, Wagner M, Keppler BK. *Chem Sci*, 2014, 5: 3135–3143
- 162 Wedlock LE, Kilburn MR, Cliff JB, Filgueira L, Saunders M, Berners-Price SJ. *Metallomics*, 2011, 3: 917–925
- 163 Du J, Zhang E, Zhao Y, Zheng W, Zhang Y, Lin Y, Wang Z, Luo Q, Wu K, Wang F. *Metallomics*, 2015, 7: 1573–1583
- 164 Cobice DF, Goodwin RJA, Andren PE, Nilsson A, Mackay CL, Andrew R. *Brit J Pharmacol*, 2015, 172: 3266–3283
- 165 Lanni EJ, Rubakhin SS, Sweedler JV. *J Proteom*, 2012, 75: 5036–5051

- 166 Rubakhin SS, Jurchen JC, Monroe EB, Sweedler JV. *Drug Discov Today*, 2005, 10: 823–837
- 167 Du J, Kang Y, Zhao Y, Zheng W, Zhang Y, Lin Y, Wang Z, Wang Y, Luo Q, Wu K, Wang F. *Inorg Chem*, 2016, 55: 4595–4605
- 168 Wedlock LE, Kilburn MR, Liu R, Shaw JA, Berners-Price SJ, Farrell NP. *Chem Commun*, 2013, 49: 6944–6946

Investigations of molecular mechanism of action of metal-based anticancer complexes by mass spectrometry

Kui Wu, Qun Luo, Yao Zhao, Wei Zheng, Fuyi Wang*

Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, National Centre for Mass Spectrometry in Beijing; CAS Key Laboratory of Analytical Chemistry for Living Biosystems, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

*Corresponding author (email: fuyi.wang@iccas.ac.cn)

Abstract: Soft ionization mass spectrometry, including electrospray ionization (ESI) and matrix-assistant laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry, has emerged to be one of the most powerful tool for studying the interactions between metal-based anticancer complexes and biological targets such as proteins and DNA. While the application of mass spectrometry imaging for the researches in the mechanism of action of anticancer metallodrugs *in vitro* and *in vivo* is being ascendant. Based on the research progress of our group in exploring the mechanism of action of metal-based anticancer complexes, this article summarizes and reviews the applications of mass spectrometry in deciphering the antitumor mechanism of platinum- and ruthenium-based anticancer complexes, discusses the update advances in the investigation of interactions between metal-based anticancer complexes and proteins/DNA by mass spectrometry, and looks into the future application and tendency at this cutting-edge research field.

Keywords: mass spectrometry, anticancer metallodrug, platinum, ruthenium, molecular mechanism of action

doi: [10.1360/N032016-00146](https://doi.org/10.1360/N032016-00146)