

抗肿瘤药物顺铂和血清白蛋白的相互作用研究

胡文兵, 刘健安, 熊少祥, 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)

Study on Interactions between Anticancer Drug Cisplatin and Human Serum Albumin

HU Wen-bing, LIU Jian-an, XIONG Shao-xiang, WANG Fu-yi

(Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Institute of Chemistry,

Chinese Academy of Science, Beijing 100190, China)

Abstract: Cisplatin is a widely used anticancer agent to treat solid tumours such as ovarian, testicular cancers. The interaction of platinum drugs with human albumin is an important issue that contributes to understanding the transport process of platinum drugs, cell uptake and their side-effects. Here, we applied a bottom-up proteomic approach to study the interaction of cisplatin with recombinant human albumin(rHA). The cisplatin-rHA complexes were prepared under physiological conditions in vitro at different cisplatin/rHA molar ratios for different incubation times. LC/MS analysis enables to identify four platinated peptides and further MS/MS analysis characterizes the platinum binding sites. The results show that cisplatin binds to His67, His128, His247 and Met298 residues in albumin involving an intramolecular crosslinking of His67 to His247 by platinum. Besides, cisplatin is shown to induce the cleavage of the disulfide bond Cys124-Cys169 of albumin and bind to the thiol in the reduced Cys124 residue.

Key words: human serum albumin; cisplatin; interaction; LC-MS/MS

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0097-02

顺铂是一种被广泛应用于治疗实体肿瘤, 如卵巢癌、睾丸癌等的抗癌药物。研究铂类抗癌药物和血清白蛋白间的相互作用有助于人们深化对铂类药物在人体内的转运和细胞摄入过程, 以及它们的毒副作用的认识。本研究利用自下而上的蛋白质组学质谱方法研究了顺铂和人重组血清白蛋白(rHA)的相互作用。在体外模拟生理条件下, 顺铂和rHA以各种不同的摩尔比, 经不同的反应时间反应制备顺铂-血清白蛋白复合物。利用LC/MS分析共鉴定出4个铂化的肽段, 这些肽段再经二级质谱分析确定铂的结合位点。研究结果发现, 水解的顺铂可以共价结合在His67、His128、His247和Met298氨基酸残基上, 其中His67和His128氨基酸残基被水解的顺铂分子交联, 形成分子内交联复合物。除此之外, 研究同时发现顺铂能诱导血清白蛋白二硫键Cys124-Cys169的断裂, 并与还原的Cys124残基的巯基共价结合。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

CapLC XE 液相系统: 美国 Waters 公司产品; Micromass 四极杆-飞行时间串联质谱仪(Q-TOF),

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20745002, 90713020)、科技部 973 重大基础研究项目(批准号: 2007CB935601)资助

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

通信作者: 汪福意(1964~), 男(汉族), 研究员, 博士生导师, 从事药物设计与分析。E-mail: fuyi.wang@iccas.ac.cn

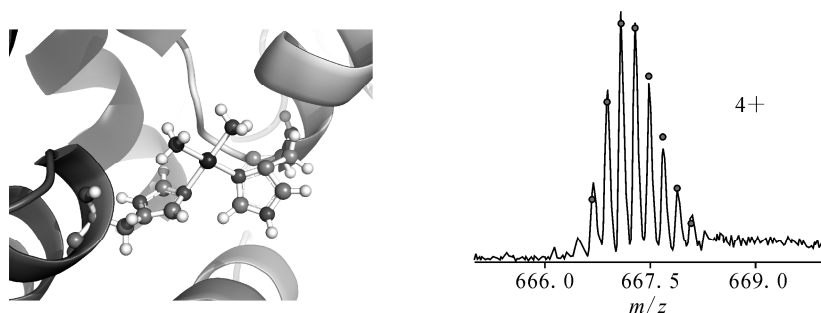
配有电喷雾离子源 (ESI) 和数据处理系统。顺铂: 沈阳金科试剂厂产品; 重组人血清白蛋白: Delta 公司产品; 胰蛋白酶: 美国 Promega 公司产品; TEAA (2 mol): 美国 Transgenomic 公司产品; 乙腈 (色谱纯): 美国 Tedia 公司产品; 水: Millipore 纯水系统制得。

1.2 测试条件

Waters CapLC: Symmetry C₁₈ 柱 (5 mm×1.0 mm×3.5 μm); 流动相: A 为水 (含 0.1% 甲酸), B 为乙腈 (含 0.1% 甲酸); 流速 30 μL·min⁻¹。ESI 离子源, 喷雾电压 3.3 kV, Core 电压 35 kV, 源温度 80 °C, 碰撞能量 (CE) 9.9 kV。

2 结果与讨论

顺铂-血清白蛋白复合物经胰蛋白酶酶解和 LC/MS 分析, 共发现 4 个含铂肽段。分析铂化肽段的精确分子质量, 结合胰蛋白酶特异性酶切的特性, 成功鉴定出 4 个铂化肽段的氨基酸序列。为了进一步确定顺铂在血清白蛋白上结合的氨基酸残基, 将铂化的肽段用 CID 串联质谱分析, 归属含铂的碎片离子峰, 从而确定了铂所结合的氨基酸残基位置。研究结果显示, 顺铂在水解失去 2 个氯离子后, 可以与 rHA 的氨基酸残基 His67、His247 形成链内交联复合物, 示于图 1, 而此位点也是 rHA 转运锌离子的主要结合位点。先前已有文献报道, 顺铂能够诱导 rHA 二硫键的断裂, 但不能确定二硫键断裂的位置以及生成的产物。本研究发现顺铂能够诱导二硫键 Cys124-Cys169 断裂, 并且与还原的 Cys124 氨基酸残基的巯基共价结合。由于二硫键对于维持蛋白构型的稳定有重要作用, 因此顺铂诱导的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。除此之外, 顺铂还能与白蛋白表面的 His128 和 Met298 氨基酸残基共价结合。



注: 圆点代表理论值, 实线代表实验值

图1 顺铂与 His67、His247 共价结合的分子模型 (左) 和顺铂与含 His67、His247 的肽段 SLHTLFGDK、VHTECCHGDLLECADDR 生成的共价复合物的质谱图 (右)

Fig.1 The molecular model of HSA with cisplatin binding to His67 and His247 (left) and mass spectrum for the peptides of SLHTLFGDK and VHTECCHGDLLECADDR with the fragment cisplatin binding to His67 and His247 (right)

3 结论

在体外模拟生理条件下, 顺铂与血清白蛋白反应既能形成链内交联复合物, 又能诱导二硫键的断裂, 这对于血清白蛋白的生物功能将产生重大影响, 并且可能与顺铂的毒副作用相关。

参考文献:

- [1] MOMEKOV G, MOMEKOVA D. Recent developments in antitumour platinum coordination compounds[J]. Expert Opin Ther Pat, 2006, 16: 1 383-1 403.
- [2] MORENO-GORDALIZA E, CANAS B, PALACIOS M A, et al. Top-down mass spectrometric approach for the full characterization of insulin-cisplatin adducts[J]. Anal Chem, 2009, 81: 3 507-3 516.