

# 天青蛋白突变体的表达及其与顺铂前药的作用

刘晓璇<sup>1</sup>, 王震<sup>2</sup>, 梁高林<sup>2</sup>, 赵林泓<sup>2,3</sup>

(1. 中国药科大学药学院, 江苏南京 211198; 2. 中国科学技术大学化学系, 安徽合肥 230026;

3. 东南大学生命科学研究院, 江苏南京 210096)

**摘要:**天青蛋白是含有铜离子配位的蛋白质。基于天青蛋白的配位化学特点和生物学特性, 将蛋白质进行改造得到了 H117G 突变体, 使其具有结合外源咪唑和组氨酸的功能。该突变体可以用于结合具有抗癌作用的顺铂的 Pt(IV) 前体药物。采用紫外可见滴定等方法对蛋白质与咪唑类化合物的结合作用进行了研究, 在此基础上, 制备了一种新型的蛋白-药物复合物, 并初步检验了该复合物对肿瘤细胞生长的抑制作用。

**关键词:**顺铂; 前药; 天青蛋白

**中图分类号:** O614. 82; R979. 1 **文献标识码:** A doi:10. 3969/j. issn. 0253-2778. 2016. 10. 006

**引用格式:** 刘晓璇, 王震, 梁高林, 等. 天青蛋白突变体的表达及其与顺铂前药的作用[J]. 中国科学技术大学学报, 2016, 46(10): 832-837.

LIU Xiaoxuan, WANG Zhen, LIANG Gaolin, et al. Expression of an Azurin mutant and its interaction with a prodrug of cisplatin[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2016, 46(10): 832-837.

## Expression of an Azurin mutant and its interaction with a prodrug of cisplatin

LIU Xiaoxuan<sup>1</sup>, WANG Zhen<sup>2</sup>, LIANG Gaolin<sup>2</sup>, ZHAO Linhong<sup>2,3</sup>

(1. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

2. Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

3. Institute of Life Sciences, Southeast University, Nanjing 210096, China)

**Abstract:** Azurin is a copper protein and possesses antitumor activity. The H117G mutant of Azurin (Az-H117G) was prepared, which is capable to bind exogenous imidazole or histidine. The interaction of Az-H117G with imidazole-based derivatives was investigated using UV-vis spectroscopy. Results show that the protein mutant can bind imidazole, histidine and Pt-His complex, a Pt(IV) prodrug of cisplatin. Based on this information, the protein/drug conjugate was prepared and the anti-proliferation of tumor cells was studied. The result indicates that this protein/drug conjugate might be potentially applicable to antitumor drug design.

**Key words:** cisplatin; prodrug; Azurin

收稿日期: 2016-04-22; 修回日期: 2016-06-07

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金(BK20150649)资助。

作者简介: 刘晓璇, 女, 1998年生, 本科生。研究方向: 药理学。E-mail: jenna\_davis@sina.com

通讯作者: 赵林泓, 博士/讲师。E-mail: zhaolinhong@seu.edu.cn

## 0 引言

天青蛋白(Azurin)是由假单胞菌分泌的含铜蛋白,由 128 个氨基酸残基和 1 个 Cu 离子组成,属于 I 型铜蛋白家族,具有铜蓝蛋白结构与特征,在生物体内起到氧化还原和电子传递的作用<sup>[1]</sup>. 晶体结构研究显示,蛋白质由 1 个  $\alpha$  螺旋以及 8 个  $\beta$  折叠链组成,形成三明治样三维空间结构<sup>[2]</sup>,蛋白质中含有 1 个 Cu 离子的配位中心,对蛋白质的功能起着核心的作用<sup>[3]</sup>. Cu(II) 与 5 个氨基酸残基的配基配位(见图 1),呈三角双锥状几何构型,其中,His117 N<sup>ε</sup>, His46 N<sup>ε</sup>, Cys112 S<sup>γ</sup> 3 个原子构成的平面形成强配位键, Met121 S<sup>γ</sup> 和 Gly45 酰胺 O 在轴向上形成两个较弱的配位键. 此外,该蛋白质的另外两个半胱氨酸(Cys3 与 Cys26)形成二硫键<sup>[4]</sup>.

顺铂是临床上广泛使用的抗癌药物<sup>[15]</sup>,但毒副作用限制了它的应用<sup>[16]</sup>,四价铂的前药是目前受到广泛关注的策略<sup>[17]</sup>. Pt(IV) 配合物的配位取代反应较为惰性,因而其毒副作用较 Pt(II) 配合物更低. 在细胞内 Pt(IV) 在谷胱甘肽等生物还原剂的作用下还原为 Pt(II),同时失去两个配体,由 6 配位结构转为 4 配位的顺铂<sup>[17]</sup>. Pt(IV) 配合物中两个可脱落的额外配体为前药设计提供了方便.

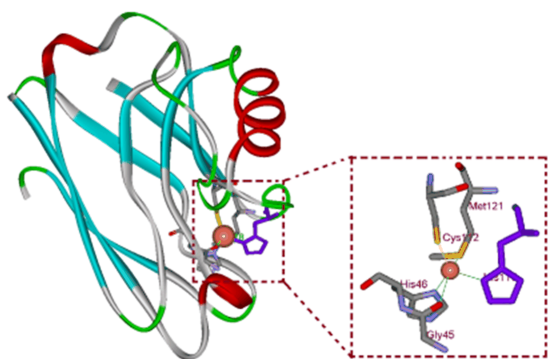
本文研究了 Azurin 突变体与抗肿瘤药物顺铂前药的相互作用,并根据这一作用设计了基于 Azurin 蛋白的药物运输体系. 我们将 Azurin 的 Cu(II) 结合位点进行点突变,将其中 117 位组氨酸残基改变为甘氨酸,得到 Azurin H117G 突变体(以下简称 Az-H117G),使该蛋白具有结合外源咪唑的功能. 我们将顺铂进行改造制备含有组氨酸的前药,使其具有结合 Azurin 突变体的功能,从而形成化学药物与蛋白药物的复合物. 这样利用 Azurin 的透膜作用,提高药物对肿瘤细胞的选择性.

## 1 实验

### 1.1 Azurin 突变体的表达与纯化

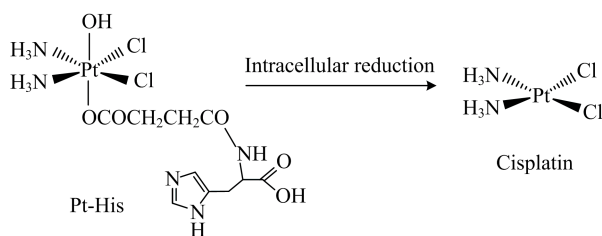
表达载体 pST-GB1 通过改造商用 pET21a 质粒,在 pET21a 上 Nde I 和 BamH I 酶切位点间插入 (His)<sub>6</sub> 标签、GB1 助溶标签及 1 段含 SspI 酶切位点的 LIC 序列. 用 T4 聚合酶(Takara 公司)37℃ 处理 Ssp I 酶切后的 pST-GB1,将 Azurin 的 cDNA 序列插入 pST-GB1 原核表达载体中,得到带有 N-端 (His)<sub>6</sub> 标签的 GB1-Azurin 融合蛋白的表达质粒. 然后通过定点突变将 117 位的组氨酸突变为甘氨酸,得到 Az-H117G 的表达质粒. 将质粒转入 BL21 感受态细菌中,在含氨苄青霉素(0.1 g/L)的 LB 培养基中 37℃ 培养 OD<sub>600</sub> = 0.8,加入氯化铜(20 μmol/L)和异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖甘(IPTG, 0.2 mmol/L)中,25℃ 诱导 10 h. 然后 4 000 r/min 离心 20 min 收菌,重悬(30 mL/L)后细菌超声细胞,在 4℃ 条件下 16 000 r/min 离心细菌破碎液 30 min,抽滤将上清液倒入 Ni-NTA 亲和树脂柱中,4℃ 条件下旋转摇床摇 30 min,使 (His)<sub>6</sub>-GB1-Azurin 融合蛋白结合到 Ni-NTA 树脂柱上;弃去穿透液,用 10 mL 缓冲液洗去杂蛋白;用 20 mL 洗脱缓冲液洗脱融合蛋白.

收集洗脱缓冲液,加入 TEV 酶(含 1 mmol/L DTT 和 EDTA)16℃ 酶切 12 h 后,超滤除去洗脱缓



待突变的氨基酸残基 His117 以紫色显示

(a) 野生型天青蛋白的三维结构以及铜配位中心的氨基酸



(b) 组氨酸铂的结构及其还原活化产生顺铂

图 1 天青蛋白与顺铂前药

Fig. 1 Azurin and cisplatin prodrug

Azurin 本身的功能是与细胞色素 c-551 作用并发生电子转移<sup>[5-9]</sup>. 然而在 2002 年 Yamada 等<sup>[10]</sup>发现 Azurin 具有抑制黑色素瘤细胞生长的作用,随后人们发现天青蛋白在不同的癌细胞中均有类似的作用,包括乳腺癌<sup>[11]</sup>、骨肉瘤<sup>[12]</sup>、口腔鳞状细胞癌<sup>[13]</sup>等. 机理研究表明, Azurin 可以穿过肿瘤细胞的细胞膜并促进其凋亡<sup>[10]</sup>,并具有稳定抑癌蛋白 P53 的功能<sup>[14]</sup>.

冲液中的咪唑。然后将酶切液加入 Ni-NTA 树脂柱中,在旋转摇床中 4 °C 条件下旋转 30 min,使 (His)<sub>6</sub>-GB1 标签、融合蛋白及 TEV 酶结合到树脂上,收集含有 Azurin 的流透液。加入 DTT 和 EDTA,4 °C 超滤浓缩后,使用 AKTA purifier 蛋白纯化仪通过 Hiload 16/60 Superdex 75 色谱柱(GE Health)纯化后得到天青蛋白。

### 1.2 Azurin 的紫外表征

取 100 μL 纯化的 apo-Azurin H117G 蛋白质,用 20 mmol/L pH 5.0 的 MES (含 100 mmol/L NaCl)缓冲液稀释至 50 μmol/L。取 200 μL 测其 220~1 000 nm 的紫外吸收光谱,然后用 0.5 mmol/L 的 CuCl<sub>2</sub> 滴定,检测 Cu 离子与蛋白质的结合。

### 1.3 组氨酸铂配合物的合成

在砂芯柱中加入负载了 167 mg Fmoc-His (Trs)-OH 的固相合成树脂,从底部鼓入 N<sub>2</sub> 气,加入适量 DMF 和 97.2 mg *c, c, c, c*-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OH)(OOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH),31 mg 1-羟基苯并三唑(HOBT),86 mg 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU),40 μL N,N-二异丙基乙胺(DIEA),反应 2 h 后,用 DMF、异丙醇、正己烷各洗 6 次除去未反应原料和杂质。用 20 mL 1% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液将反应产物从树脂上切下,40 °C 旋转蒸发至油状,加入 10 mL 冰乙醚,弃上清,收集沉淀并干燥。

将产物溶于 5 mL 95% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液搅拌反应 3 h 脱去保护基,产物于 40 °C 旋转蒸发至油状,用 10 mL 冰乙醚沉淀,弃上清并干燥后得到目标产物组氨酸铂 *c, c, t*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(succinic acid-histidine)(OH)]。

### 1.4 紫外可见光谱滴定

取 100 μL 负载 Cu 的 Az-H117G 蛋白质,用 20 mmol/L pH 5.0 的 MES(含 100 mmol/L NaCl)缓冲液稀释至 50 μmol/L,根据浓度逐渐加入滴定溶液(咪唑、组氨酸或组氨酸铂),同时检测 220~1 000 nm 的紫外吸收光谱,并取最大吸收值做浓度曲线。

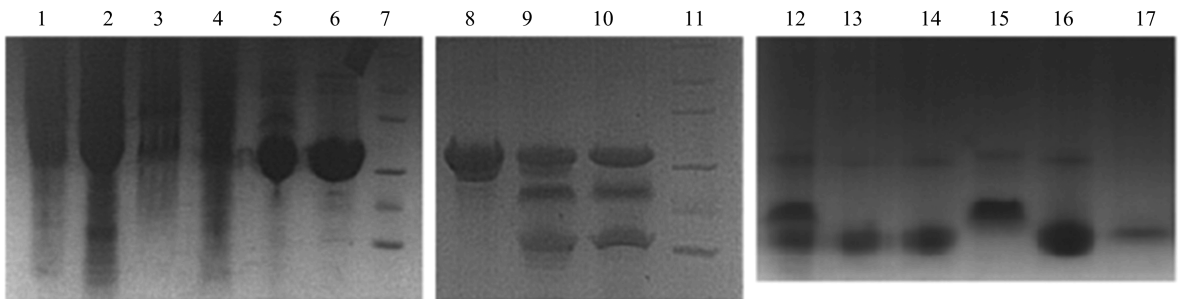
### 1.5 细胞毒性检测

将 1 mmol 的负载 Cu 的 Az-H117G 蛋白溶液中加入 1 mmol 组氨酸铂,在水溶液中混合均匀,25 °C 反应 1 h,得到组氨酸铂配位的结合的天青蛋白复合物。将该复合物加入 MCF-7 乳腺癌细胞或 A549 肺癌细胞中,在含 10% 小牛血清的培养基中于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,通过 MTT 方法检测细胞生长。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Az-H117G 突变体的表达与纯化

为提高蛋白质的表达量,我们设计表达了含有 GB1 的融合蛋白。将 (His)<sub>6</sub> 标签和 GB1 助溶标签的基因序列插入到 Nde I 和 BamH I 酶切位点之间,蛋白质的 N-端含有 His 标签,以便通过亲和层析柱纯化蛋白质,得到纯度较高的 His-GB1-Azurin 融合蛋白(图 2(a))。由于融合蛋白在 GB1 与目标蛋白之间含有 1 个 TEV 酶切位点,我们通过 TEV 酶切去 GB1 标签,然后再次通过镍柱纯化,将含有 His 标签的 TEV 酶、GB1 以及没有酶切完全的融合蛋白负载到树脂上除去,从而在洗脱液中获得较纯的 Azurin 蛋白质(图 2(b))。最后,再通过超滤浓缩、凝胶色谱纯化,得到高纯度的目标蛋白 Azurin-H117G(图 2(c))。



电泳条带分别为: 1. 细胞破碎液、2. 上清、3. 包涵体、4. 流穿、5. 洗杂、6. 洗脱、7. Marker

(a) GB1-Az-H117G 融合蛋白的表达纯化

电泳条带分别为: 8. 酶切前、9. 酶切 10 h、10. 酶切 16 h、11. Marker

(b) TEV 酶切处理后分析

电泳条带分别为: 12. TEV 酶切后、13. 镍柱反穿、14. 20 mmol/L 咪唑洗杂、15. 280 mmol/L 咪唑洗脱、

16. 超滤后分子筛进样前、17. 分子筛纯化产物

(c) 酶切产物经亲和层析柱反穿、纯化后电泳分析

图 2 Az-H117G 蛋白质的表达纯化的 Tricine-SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 1 SDS PAGE analyses of the expression and purification of Az-H117G protein

## 2.2 蛋白质结合铜离子

野生型 Azurin 中  $\text{Cu}(\text{II})$  离子与 5 个氨基酸残基配位, 包括 His46, His17, Cys112, Met121, Gly45 (见图 1). 为验证 His117 突变后蛋白质的铜结合能力, 我们通过紫外可见光谱分析了蛋白质对  $\text{Cu}(\text{II})$  离子的结合. 图 3 显示, 当加入 2 价铜离子后, 蛋白质在 645 nm 出现一个强吸收峰, 这是 Azurin 蛋白的典型吸收, 突变体的这一吸收峰较野生型蛋白的吸收波长稍长. 这一吸收峰的强度随着铜离子浓度的增加, 在二者物质的量浓度大约 1 : 1 时吸收峰达到最高. 这一结果显示, H117G 突变之后, 蛋白质仍具有结合铜离子的功能. 吸收光谱表明蛋白突变体仍保持了 I 型铜的配位形式<sup>[18]</sup>.

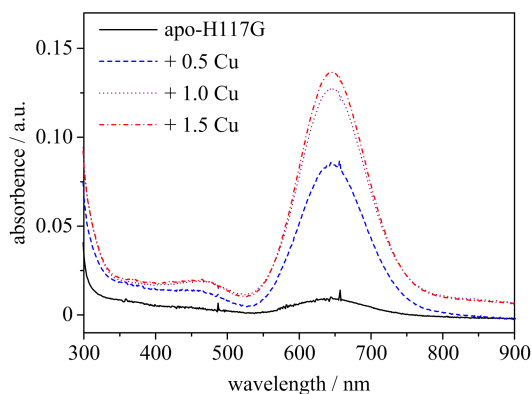


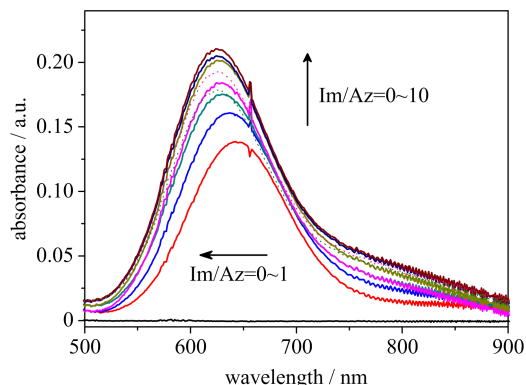
图 3  $\text{CuCl}_2$  滴定 apo-Az-H117G 的 UV-vis 谱图

Fig. 3 UV-vis spectroscopy of apo-Az-H117G titrated with  $\text{CuCl}_2$

## 2.3 咪唑配体与 Az-H117G 的结合

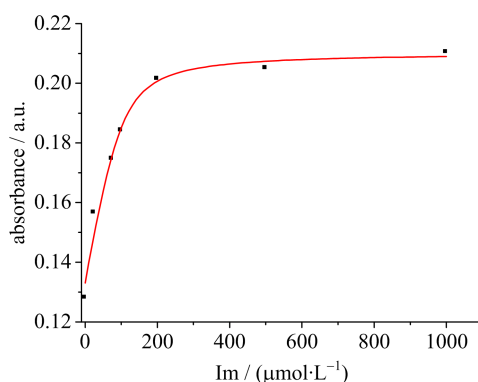
由于蛋白质中 1 个铜的结合位点 His117 被突变, Az-H117G 突变体中的  $\text{Cu}(\text{II})$  离子缺少 1 个咪唑的配位, 因而应该具有对外源咪唑的结合作用. 为验证这一假设, 我们采用紫外-可见光谱检测了含咪唑的分子对蛋白质的结合作用. 在  $100 \mu\text{mol/L}$  Cu-Az-H117G 蛋白样品中加入不同浓度的咪唑, 使咪唑/蛋白的物质的量浓度比 ( $\text{Im}/\text{Az}$ ) 逐渐增加 (0, 0.25, 0.75, 1, 2, 5, 10, 20, 30). 图 4(a) 显示, 随着咪唑的加入, 蛋白质在 645 nm 处的吸收增强, 同时最大吸收峰稍有蓝移, 由突变体的 645 nm 向野生型的 625 nm 转变. 这一结果表明  $\text{Cu}(\text{II})$  的配位方式逐渐变成与野生型类似的结构. 图 4(b) 显示了最大吸收峰随  $\text{Im}/\text{Az}$  的变化. 这一结果表明外来的咪唑配体可以在 H117G 突变体中参与铜的配位, 起到野生型蛋白质中 His117 残基的配位功能. 这一现象证实了外源性咪唑可以通过铜离子的配位作用结合

到 Az-H117G 突变体中.



箭头指示吸收峰强度随  $\text{Im}/\text{Az}$  物质的量浓度比的变化

(a) 咪唑滴定 Cu-Az H117G 的谱图

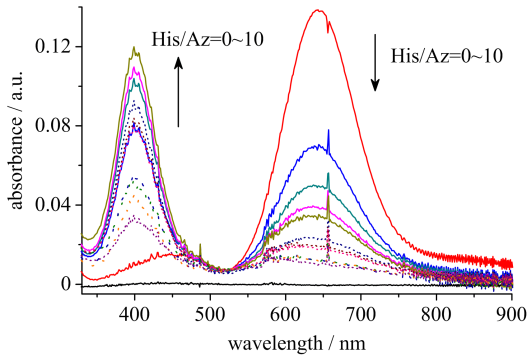


(b) 最大吸收峰高的拟合曲线

图 4 紫外可见吸收光谱检测咪唑与 Cu-Az H117G 蛋白的结合

Fig. 4 Interaction of imidazole with Cu-Az H117G protein detected by UV-vis spectroscopy

在咪唑实验结果的基础上, 我们进一步研究了外源性组氨酸对 Az-H117G 突变体的结合作用. 图 5 的结果显示, 组氨酸的加入使得 645 nm 处的吸收显著下降, 同时, 在 399 nm 处有新的峰出现. 这一结果显示, 与简单的咪唑的作用不同, 组氨酸的加入使得  $\text{Cu}(\text{II})$  配位有所变化, 这一结果可能与组氨酸的结构相关. 与蛋白质中组氨酸残基相似, 外来的咪唑分子仅有一种配位方式, 即通过咪唑环上的 N 原子与  $\text{Cu}$  配位, 因而咪唑的配位对蛋白质的吸收光谱影响较小, 而且在咪唑配位后蛋白质的吸收光谱与野生型蛋白一致. 而组氨酸分子中除了具有咪唑基团外, 还具有可能参与  $\text{Cu}$  配位的氨基, 且由于空间位阻的原因, 氨基配位的可能性较高, 因而组氨酸可能与咪唑和  $\text{Cu}$  的配位方式有所不同, 使得最大吸收峰由 645 nm 移至 399 nm, 这一吸收峰表明蛋白质仍然属于 I 型  $\text{Cu}$  的配位.



箭头指示吸收峰强度随 His/Az 物质的量浓度比的变化

图 5 紫外可见吸收光谱检测组氨酸与 Cu-Az H117G 蛋白的结合

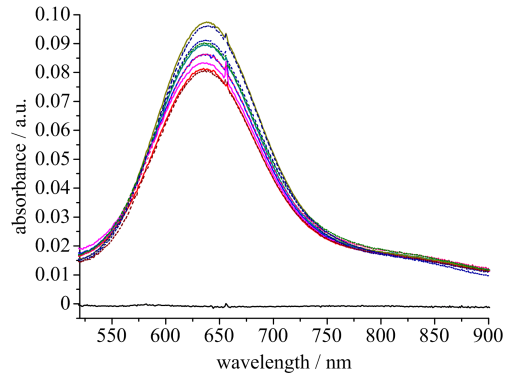
Fig. 5 Interaction of histidine with Cu-Az H117G protein detected by UV-vis spectroscopy

在组氨酸实验的基础上,我们进一步检测了组氨酸铂配合物(His-Pt)与 Az-H117G 蛋白质结合.结果显示,加入 His-Pt 使得 645 nm 的吸收峰增加,这一现象与咪唑的实验结果相似,这一结果表明组氨酸铂能够与蛋白质中的铜配位(图 6).组氨酸铂与蛋白质的反应现象与咪唑相似而与组氨酸不同,可能是由于在组氨酸铂结构中组氨酸的氨基与铂的配体形成酰胺键从而降低了配位能力,并且由于空间位阻,组氨酸铂只能采用咪唑与铜离子配位.这一结果也间接验证了在组氨酸与蛋白质的结合反应中,氨基参与了铜离子的配位结合作用.

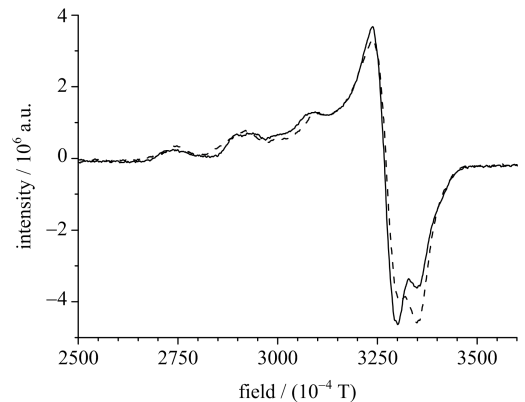
为验证铜离子在蛋白质中的配位结合,我们检测了结合组氨酸铂的天青蛋白(Pt-Az)的电子顺磁共振(EPR)波谱.结果显示,蛋白质表现为典型的铜蛋白特征,其中  $g_x = 2.0445$ ,  $g_y = 2.0445$ ,  $g_z = 2.233$ ,这些数值与野生型天青蛋白相似( $g_x = 2.045$ ,  $g_y = 2.045$ ,  $g_z = 2.238$ ).铜离子在蛋白质中具有多个结合位点,包括两个组氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸和甘氨酸.虽然 EPR 的结果不能区分铜在蛋白质中的结合位点,图 6(b)的结果显示在 Pt-Az 蛋白复合物中仍保留了 I 型铜蛋白的配位模式.

#### 2.4 Pt-His 与天青蛋白复合物的细胞毒性

组氨酸铂作为顺铂的 Pt(IV)前药,可以在细胞内被还原成 Pt(II),并脱去轴向上的两个配体成为顺铂.因此,我们初步检测了结合组氨酸铂的天青蛋白(Pt-Az)对肿瘤细胞生长的抑制作用.我们将 Pt-Az 与 A MCF-7 乳腺癌细胞共孵育,结果显示,复合物可以有效地抑制肿瘤细胞的生长,随着 Pt-Az 浓度增加肿瘤细胞的生长抑制更加明显(图 7).与文



(a) 紫外可见吸收光谱检测组氨酸铂 (Pt-His) 与 Cu-Az H117G 蛋白的结合



(b) 野生型天青蛋白(虚线)与组氨酸铂天青蛋白(实线)复合物的电子顺磁共振谱图

图 6 组氨酸铂与 Cu-Az H117G 蛋白结合的特征  
Fig. 6 Characterization of the binding of Pt-His to Cu-Az H117G protein

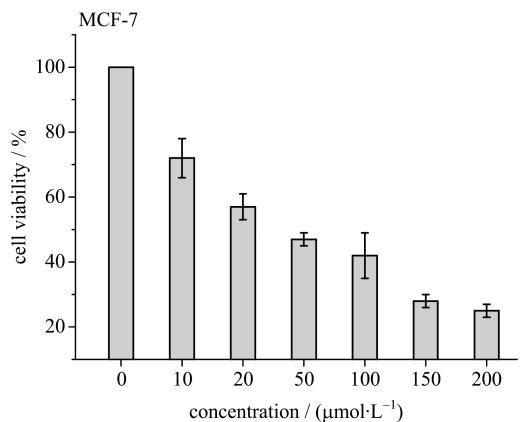


图 7 组氨酸铂的天青蛋白(Pt-Az)对乳腺癌 MCF-7 细胞生长抑制的实验结果

Fig. 7 Inhibition of proliferation of MCF-7 cells with Pt-Az complex

献结果相比,其抑制效率虽然不如顺铂,但比其他一些 Pt(IV)前药效率更高<sup>[19]</sup>.由于取代反应的惰性,4 价铂前药通常比 2 价的顺铂细胞毒性低,并且相应



的毒副作用也降低. 结合天青蛋白后其抑制效率的提高可能与蛋白质的作用相关. 这一研究结果为新型药物的设计提供了一个新的策略.

### 3 结论

本文表达了天青蛋白的 H117G 突变体 (Az-H117G), 通过紫外可见光谱检验了该蛋白与外源咪唑的结合作用. 结果显示, 咪唑分子、组氨酸以及组氨酸铂配合物均能够通过 Az-H117G 蛋白质中的铜离子配位结合到蛋白质, 其中咪唑和组氨酸铂与蛋白质中铜离子的配位方式相似, 而组氨酸可能通过自由的氨基与铜离子配位. 在此基础上, 制备了蛋白质与顺铂前药的复合物, 初步检测了该复合物对肿瘤细胞的作用. 实验结果显示, 蛋白质与顺铂前药的复合物能够较好地抑制肿瘤细胞的生长.

#### 参考文献 (References)

- [1] SUTHERLAND I W, WILKINSON J F. Azurin: A copper protein found in bordetella [J]. *Microbiology*, 1963, 30(1): 105-112.
- [2] ZHU D W, DAHMS T, WILLIS K, et al. Crystallization and preliminary crystallographic studies of the crystals of the azurin *Pseudomonas fluorescens* [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1994, 308(2): 469-470.
- [3] CASCELLA M, MAGISTRATO A, TAVERNELLI I, et al. Role of protein frame and solvent for the redox properties of azurin from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(52): 19 641-19 646.
- [4] BONANDER N, KARLSSON B G, VANNGARD T. Disruption of the disulfide bridge in azurin from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1251(1): 48-54.
- [5] CUMMINS D, GRAY H B. Electron-transfer protein reactivities. Kinetic studies of the oxidation of horse heart cytochrome c, Chromatium vinosum high potential iron-sulfur protein, *Pseudomonas aeruginosa* azurin, bean plastocyanin, and *Rhus vernicifera* stellacyanin by pentaamminepyridineruthenium (III) [J]. *Journal of The American Chemical Society*, 1977, 99(15): 5 158-5 167.
- [6] BRUNORI M, GREENWOOD C, WILSON M T. A temperature-jump study of the reaction between azurin and cytochrome c-551 from *Pseudomonas aeruginosa* (short communication) [J]. *Biochemical Journal*, 1974, 137(1): 113-116.
- [7] ANTONINI E, FINAZZI-AGRÒ A, AVIGLIANO L, et al. Kinetics of electron transfer between azurin and cytochrome 551 from *Pseudomonas* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1970, 245(18): 4 847-4 849.
- [8] WILSON M T, GREENWOOD C, BRUNORI M, et al. Electron transfer between azurin and cytochrome c-551 from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Biochemical Journal*, 1975, 145(3): 449-457.
- [9] ROSEN P, SEGAL M, PECHT I. Electron transfer between azurin from *alcaligenes faecalis* and cytochrome c551 from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1981, 120(2): 339-344.
- [10] YAMADA T, GOTO M, PUNJ V, et al. Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(22): 14 098-14 103.
- [11] PUNJ V, BHATTACHARYYA S, SAINT-DIC D, et al. Bacterial cupredoxin azurin as an inducer of apoptosis and regression in human breast cancer [J]. *Oncogene*, 2004, 23(13): 2 367-2 378.
- [12] YANG D S, MIAO X D, YE Z M, et al. Bacterial redox protein azurin induce apoptosis in human osteosarcoma U2OS cells [J]. *Pharmacological Research*, 2005, 52(5): 413-421.
- [13] CHO J H, LEE M H, CHO Y J, et al. The bacterial protein azurin enhances sensitivity of oral squamous carcinoma cells to anticancer drugs [J]. *Yonsei Medical Journal*, 2011, 52(5): 773-778.
- [14] APIYO D, WITTUNG-STAFSHED P. Unique complex between bacterial azurin and tumor-suppressor protein p53 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 332(4): 965-968.
- [15] ALI I, WANI W A, SALEEM K, et al. Platinum compounds: A hope for future cancer chemotherapy [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(2): 296-306.
- [16] BOULIKAS T, PANTOS A, BELLIS E, et al. Designing platinum compounds in cancer: Structures and mechanisms [J]. *Cancer Therapy*, 2007, 5537-546.
- [17] HALL M D, HAMBLEY T W. Platinum(IV) antitumor compounds: Their bioinorganic chemistry [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002, 232(1/2): 49-67.
- [18] WILSON T D, YU Y, LU Y. Understanding copper-thiolate containing electron transfer centers by incorporation of unnatural amino acids and the CuA center into the type 1 copper protein azurin [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2013, 257(1): 260-276.
- [19] KASPARKOVA J, NOVAKOVA O, VRANA O, et al. Molecular aspects of antitumor effects of a new platinum (IV) drug [J]. *Molecular Pharmacology*, 2006, 70(5): 1 708-1 719.