

猪胰铁蛋白释放铁和磷酸盐的动力学特性

林志超, 陈平, 胡晓慧, 黄慧英, 黄河清*
(厦门大学生命科学学院 生物化学与生物技术学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 猪胰铁蛋白 (pig pancreas ferritin, PPF) 铁核由 179 phosphate/PPF 和 1698 Fe^{3+} /PPF 组成, 平均磷铁比值为 1: 9.5 PPF 铁核表层由较高的磷铁比组成. 选用电子光谱技术研究 PPF 释放铁和磷酸盐全过程, 发现 PPF 以两种不同速率途径释放铁与磷酸盐. 在弱酸条件下, PPF 释放铁的速率明显高于在弱碱条件下的速率, 证实 PPF 蛋白壳的柔性调节能力强弱是控制释放铁和磷酸盐速率的重要因素之一.

关键词: 铁蛋白; 猪胰; 铁释放; 动力学; 磷酸盐

中图分类号: Q 75

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)S-0050-04

在体内, 铁蛋白的主要生理功能是参与释放和储存铁的反应^[1]. 在临床上, 血清铁蛋白含量高低可作为评判人体是否患肿瘤的参考依据之一^[2]. 铁蛋白分子结构由铁核和蛋白壳组成. 铁核组成可被区分为含高磷铁比的铁核表层和含低磷铁比的铁核内层^[3], 认为铁核表层的磷铁结构参与实施铁蛋白的生理功能, 而铁核内层的磷铁组成作为铁源, 仅起着供铁的作用^[4]. 在体内, 铁蛋白释放铁的过程由铁核中心逐步向铁核表层延伸, 在体外, 则相反. 至今, 大量有关铁蛋白释放铁的动力学研究结果均表明, 铁蛋白释放铁的动力学全过程呈复杂化特点, 推测这一过程是受到铁蛋白蛋白壳柔性调节速度、节奏和幅度的影响, 与铁核表层的磷铁结构无关^[5].

磷酸盐是铁蛋白铁核结构的主要成分之一, 起着缓释铁的作用, 但无法使释放铁动力学级数由复杂转化为简单^[6]. 提高反应介质的 pH 值, 可以明显降低铁蛋白释放铁的速率, 使铁蛋白释放铁的动力学过程由复杂转化成简单类型, 并以一级反应动力学方式释放完整铁核中的铁. 说明当铁蛋白蛋白壳的柔性调节速率与释放铁的速率同步时, 其释放铁的速率受蛋白壳柔性调节控制, 并以一级反应动力学方式释放铁, 与铁核中的铁和磷酸盐组成无关. 本论文选用电子光谱技术研究 PPF 铁核组成和释放铁与磷酸盐的动力学特

性, 它为更合理地阐明 PPF 在胰腺内所发挥的生理功能提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 材料

提取铁蛋白原材料均取材于新鲜猪胰脏. DEAE-52 分离介质购置于华美公司, 纯度为 99% 的 Tris 缓冲剂和牛血清白蛋白均购置于 Sangon 公司. 其他化学试剂均选用国产分析纯.

1.2 粗 PPF 的制备

取新鲜猪胰脏, 去除脂肪和结缔组织并剪成小块后, 以湿质量 1: 1.5 的比例加入蒸馏水. 采用组织捣碎机高速捣碎猪胰脏成匀浆 (约 15 min 左右), 随后, 将匀浆液置于恒温 (75~ 80°C) 水浴锅内热变性处理 20 min, 使非耐热杂蛋白变性. 匀浆液置于 4°C 冰箱冷却后, 离心 (15 000 g) 30 min, 取上清液, 弃去沉淀物. 按每 100 mL 上清液加入 35 g 硫酸铵的比例, 加入硫酸铵于所收集的上清液, 使铁蛋白产生沉淀, 并置于 4°C 冰箱过夜, 促使铁蛋白缓慢地析出, 并形成晶体. 取出 PPF 晶体混合物, 以 15 000 g 离心 30 min, 弃上清, 收集棕色沉淀物. 用 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.25) 溶解棕色沉淀物, 并置于透析袋内, 用蒸馏水透析过夜, 除去硫酸铵和其他盐. 取透析液, 以 15 000 g 离心 20 min, 弃杂蛋白, 收集上清备用. 此时, 上清液中的蛋白浓度为 4.4 mg/mL.

1.3 PPF 的脱盐

Sephadex G-25 柱层析介质经预处理后, 装柱 (1.7

收稿日期: 2005-12-25

基金项目: 国家自然科学基金 (30470372) 和厦门市科技项目基金 (350Z2001263) 资助

作者简介: 林志超 (1978-), 男, 在职硕士研究生. 现在漳州师院工作.

* 通讯作者: hqhuan@xmu.edu.cn

cm × 32 cm), 并用 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.25) 平衡. 粗 PPF 再次经 Sephadex G-25 层析柱进一步除盐.

1.4 PPF 的分离纯化

用 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.25) 平衡 DEAE-52 层析柱 (1.7 cm × 32 cm). 直接加入粗铁蛋白于层析柱中, 随后以相同的 pH 7.25 和不同的浓度梯度的 (0~0.4 mol/L, 流速为 2 mL/min) NaCl 洗脱 PPF. 蛋白样品洗脱峰选用蛋白质检测仪 (280 nm) 连续监测. 盐浓度采用原子吸收分光光度法监测. 分离纯化后的 PPF 在 PAGE 层析胶上呈单条带 (图 1).

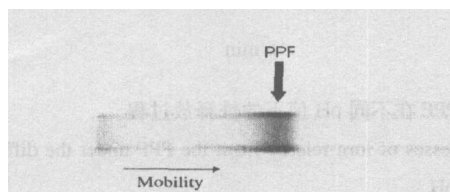


图 1 PPF 天然 PAGE 图谱

Fig 1 Native page of PPF

1.5 元素分析

PPF 蛋白浓度采用改良的 Lowry 方法测定, 标准蛋白浓度的配制选用 99% 纯度的牛血清白蛋白. PPF 磷铁含量分别采用磷钼钼蓝法和原子吸收光谱法测定.

1.6 在不同 pH 条件下, PPF 释放铁的速率分析

将 PPF 分别加入 pH 为 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 的磷酸缓冲液中, 同时定时按本实验室早期描述的方法^[7]测定 PPF 总铁量和释放铁的速率.

2 结果与讨论

2.1 PPF 释放铁动力学过程

研究表明, 马脾铁蛋白 (horse spleen ferritin, HSF) 和细菌铁蛋白 (bacterial ferritin, BF) 铁核结构中的磷铁组成存在着非均匀性, 可区分为含高磷铁比的铁核表层和含低磷铁比的铁核内层^[6,8]. 图 2 是 PPF 释放铁的全过程, 其过程与猪脾铁蛋白 (pig spleen ferritin, PSF) 很类似^[6], 同样可区分为快速释放表层铁 (图 2A) 和慢速释放内层铁两个过程 (图 2B). 这一现象说明了 PPF 和 PSF 释放铁途径类似, 两者均受到铁蛋白蛋白壳柔性调节速度、节奏和幅度的控制. 由于 PPF 和 PSF 蛋白壳一级结构和物质隧道宽度可能略有差别, 导致两者释放铁的速率和趋势稍微不同.

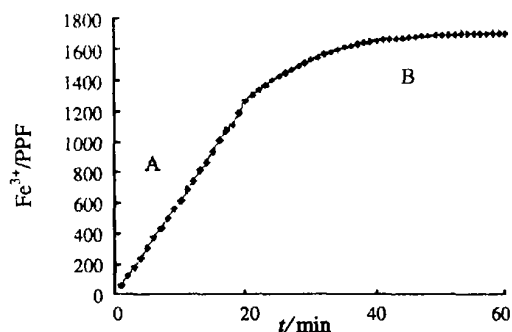


图 2 PPF 释放铁的全过程

Fig 2 A complete process of iron release from PPF

2.2 PPF 释放磷动力学过程

大量的实验结果已证实了, 不同来源的铁蛋白铁核中的铁和磷酸盐含量不同, 但铁核表层均含有较高的磷铁比值, 但它是否与释放和储存铁的生理功能有关尚未清楚. 图 3 结果表明, 每分子 PPF 铁核约含有 180 分子磷酸盐; 随着 PPF 释放铁的数量递增, 铁核中的磷酸盐释放量也随之增加, 并显示出两种不同的释放速率, 其速率转折点约在 22 min 左右. 比较图 2 实验结果, 作者发现 PPF 释放磷酸盐的趋势 (图 3) 与释放铁的趋势很相似, 二者是同步协调进行的; 在反应时间为 22 min 内, PPF 释放磷酸盐含量已占总磷量 70% 左右. 由于铁蛋白释放铁的过程是由铁核表层趋于铁核内层, 因而可推算出 PPF 铁核表层的磷铁比值明显高于铁核内层的铁核组成变化趋势, 指出大多数磷酸盐处于 PPF 铁核表层. 这一现象与其他哺乳动物铁蛋白铁核组成及分布很相似, 其铁核中的磷铁组成处于非均匀性结构.

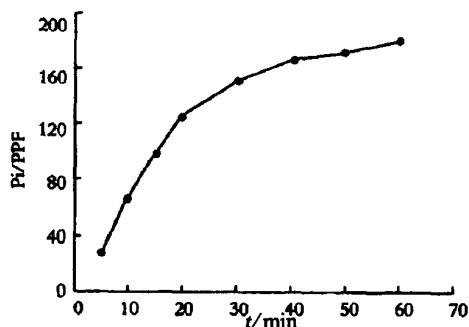


图 3 PPF 释放磷酸盐全过程

Fig 3 A complete process of phosphate release from the PPF

2.3 PPF 释放铁速率的转折点

了解铁蛋白释放铁速率转折点对正确理解铁蛋白释放铁的动力学过程及规律起着至关重要的作用. 参

考黄河清^[9]已建立的猪脾铁蛋白释放铁反应级数转换公式 $[(C_{max} - C_t)^{1/2} = (T_{max} - T_t)]$ 和图 2 结果, 可获得图 4 结果; C_{max} 表示最大的铁释放量, T_{max} 表示铁蛋白释放铁核中的最大铁量 C_{max} 时所需要的反应时间, T 和 C_t 表示在单位时间内, 铁蛋白释放一定铁量时所需要的反应时间. 图 4 C 为不同释放铁速率的转折点, 其速率转换时间约为 22 min 左右, 这一实现结果与 PSF 释放铁全过程中所呈现的不同速率的转折点时间 (25 min) 很靠近. 由此可见, PPF 和 PSF 释放铁的动力学规律和特性很相似. 进一步分析图 2 结果可获悉, PPF 含铁量为 $1.698 \text{ Fe}^{3+} / \text{PPF}$, 明显低于 HSF 和 PSF 的含铁量^[4, 5], 但 PPF 平均释放铁的速率仅为 $28.3 \text{ Fe}^{3+} / \text{PPF} / \text{min}$, 低于其他的哺乳动物铁蛋白. 由于释放铁的速率受 PPF 蛋白壳调控, 因而推测 PPF 和 PSF 的一级结构具有较高的同源性.

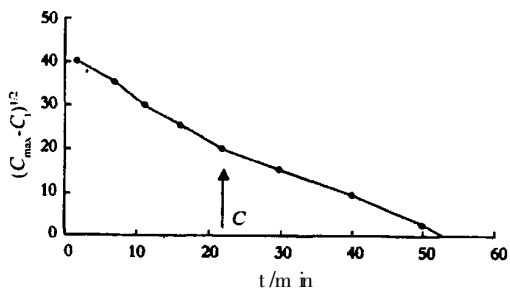


图 4 参考图 2 结果, 以 $(C_{max} - C_t)^{1/2}$ 作图

Fig 4 Plot of $(C_{max} - C_t)^{1/2}$ Versus reactive time according to Fig 2 results

2.4 在不同 pH 值下, PPF 释放铁速率

图 5 结果表明, 在不同 pH 值下, PPF 释放铁的速率随着反应介质中的碱度逐步递增而急剧下降 (表 1). PPF 释放完整铁核中的铁所需要的时间分别是 20、34、54 和 150 min. 在 pH 5.0 条件下, PPF 释放完整铁核中的铁所需要的时间仅为在 pH 8.0 的 1/8 倍. 这些现象说明了, 反应体系中的 H^+ 和 OH^- 浓度高低直接影响到铁蛋白铁核组成的稳定性, 进而影响蛋白壳的柔性调节能力, 从而引起铁蛋白以不同速率释放铁核中的铁, 这一点与 PSF 释放铁的规律很相似. 在反应介质中, H^+ 和 OH^- 浓度对铁释放的速率有很大的影响, 这是铁蛋白的共性. 这也暗示, 体内环境下, 处于不同组织的不同 pH 环境下, 铁蛋白很可能也以不同的速率释放铁, 来满足不同组织对游离铁浓度的

不同需求.

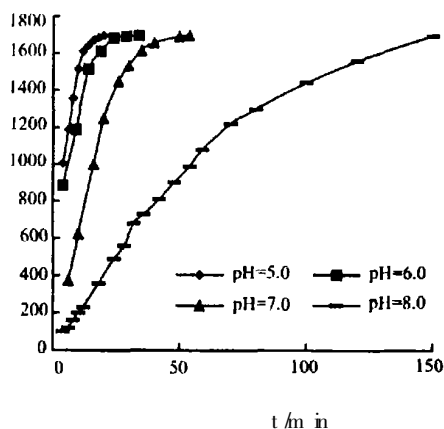


图 5 PPF 在不同 pH 值下的铁释放过程

Fig 5 Processes of iron release from the PPF under the different pH

表 1 不同 pH 值下 PPF 平均铁释放速率

Tab 1 The average velocities of iron release from PPF under different pH

pH	5.0	6.0	7.0	8.0
平均铁释放速率 ($\text{Fe}^{3+} / \text{PPF} / \text{min}$)	84.9	49.9	31.4	11.3

参考文献:

- [1] De Silva D M, Askwith C C, Kaplan J. Molecular mechanisms of iron uptake in eukaryotes [J]. *Physiology Review*, 1996, 76: 31-47.
- [2] Li F, Kishida T, Kobayashi N. Serum iron and ferritin levels in patients with colorectal cancer in relation to the size, site and disease stage of cancer [J]. *J Gastroenterol*, 1999, 34 (1): 195-199.
- [3] 黄河清, 林庆梅, 张凤章, 等. 猪脾铁蛋白电子隧道特性及释放铁途径的研究 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15: 10-14.
- [4] 黄河清, 林庆梅, 罗大民, 等. 鱼肝铁蛋白铁核表层接受电子能力的研究 [J]. *生物物理学报*, 2001, 17 (4): 754-759.
- [5] 王群力, 黄河清, 颜利, 等. 鲑鱼肝铁蛋白释放铁动力学研究 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2004, 43: 861-864.
- [6] 黄河清, 张凤章, 许良树. 猪脾和马脾铁蛋白理化特性的比较 [J]. *动物学报*, 1997, 43 (2): 170-177.
- [7] Huang H Q, Kofford M, Simpson F B, et al. Purification, composition, charge, and molecular weight of the FeMoco factor

- from azotobacter vinelandii nitrogenase [J]. Journal of inorganic Biochemistry, 1993, 52: 59-75
- [8] 黄河清, 张凤章, 陈灿和, 等. 细菌铁蛋白释放铁的动力学研究 [J]. 生物物理报, 1996, 12 (1): 33-38
- [9] 黄河清, 张凤章, 林庆梅, 等. 马脾铁蛋白释放铁的反应级数和速率相数的转换 [J]. 动物学报, 1999, 45 (2): 170-177.

Kinetic Characteristics of Iron and Phosphate Release from the Pig Pancreas Ferritin

LI N Zhi-chao, CHEN Ping, HU Xiao-hui, HUANG Hui-ying, HUANG He-qing*

(Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The iron core of pig pancreas ferritin (PPF) is composed of 179 phosphates and 1698 Fe^{3+} per molecule PPF. The ratio of phosphate to iron within the PPF core is determined to be 1:9.5. The ratio on the surface of the iron core in PPF is higher than that in the inside of the core. A complete process of iron and phosphate releasing from the PPF is observed using electron spectra technique. The results showed that both the iron and phosphate releasing presented two different rates. In weak acid medium, the releasing rate of iron in PPF is much faster than that in weak basic medium.

Key words ferritin; pig pancreas; iron release; kinetics; phosphate; iron; releasing rate

(上接第 49 页)

human serum albumin using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2003, 1009: 111-117.

torga A., 2003, 1009: 111-117.

The Application of MALD-TOF MS in Mining Different Peptides and Proteins from the Sera of Lung-cancer Patients

CHEN Dong-shi, JIN Hong-wei, HUANG Hui-ying, WENG Lu-na, HUANG He-qing*

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract A combined technology of simple column of size exclusion chromatography (SEC) and MALD-TOF MS was adopted to analyze the peptides and proteins of human male serum (HMS). The experimental results showed that the separation column of Sephadex G-75 separated LAP in the HMS more effectively than Sephadex G-50 and G-100 and 56 proteins and peptides with different mass/charge (m/z) from the HMS were directly measured by MALD-TOF MS after the serum was separated by Sephadex G-75 column. The discrepancy of LAP between HMS and serum of human male with lung-cancer (LCHMS) are directly compared by MALD-TOF MS respectively. It is found that the molecular mass of differential proteins with m/z 4808, 6867, 6912, 6867, 7036, 27990, 28120, 50687 from the HMS and 6139, 6544, 8417, 8480, 11109 from the LCHMS, indicating that different proteins of both HMS and LCHMS might be used as the specific biomarkers for diagnosing the diseases of lung-cancer in clinic.

Key words Sephadex G-75; MALD-TOF MS; serum; lung cancer; clinic diagnosis; differential peptides