

马脾铁蛋白释放铁的反应级数和 速率相数的转换*

黄河清^① 张凤章^① 林庆梅^② 曾润颖^③ 邱雪慧^① 许良树^①

(^①厦门大学生物学系, 厦门 361005)

(^②厦门大学环境科学研究中心, 厦门 361006)

(^③国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005)

摘要 采用差示法研究铁蛋白释放铁的动力学规律和反应级数的转换。结果表明: 马脾铁蛋白释放铁的速率及相数与还原剂 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 浓度及铁还原速率无关, 与该蛋白蛋白壳的调节速率有关。在 pH5.0~6.0 范围内, 马脾铁蛋白以三相不同速率方式释放占原铁核总铁量 80% 的铁。但在 pH9.0 介质中, OH^- 不仅能参与铁蛋白铁核组成, 减缓释放铁的速率, 而且使原混合级反应转换为一级反应, 从而使铁蛋白释放铁的动力学过程由复杂转化为简单。

关键词 马脾铁蛋白 蛋白壳自身调节 释放铁动力学 反应级数及速率

铁蛋白的主要生理功能是储存机体中过剩的铁和释放铁给需铁的细胞合成含铁的酶。此外, 铁蛋白还能表达吸氢活性和直接从铂电极上接收电子等新的生理功能 (Huang *et al.*, 1998a, b)。迄今为止, 虽然已对铁蛋白释放铁的动力学进行了较详细的研究 (Richards *et al.*, 1996), 但对铁蛋白释放铁的规律和特性仍持有争议 (Funk *et al.*, 1985, Strange *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1998c), 尤其对脱铁核铁蛋白 (Apoferitin) 重新组装新铁核的机理和途径仍有多种不同见解。Treffry 等 (1996) 认为铁蛋白储存铁的过程与铁核表层的双铁簇有关, 而作者的研究结果却表明: 铁蛋白释放和储存铁的速率高低受该蛋白壳调节能力强弱及幅度大小控制, 与铁核表层复杂的结构可能无关 (黄河清等, 1997, 1999)。

如何证实蛋白壳的柔性调节速率是铁蛋白释放和储存铁的限制性步骤? 作者采用差示法研究铁蛋白释放铁的动力学规律及反应级数转换的可行性, 从中进一步阐明蛋白壳自身调节能力的强弱对铁蛋白释放铁速率的重要作用, 它对正确理解铁蛋白在体内进行铁代谢途径提供了理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

马脾铁蛋白 (Horse spleen ferritin, HSF) 是美国 Sigma 公司产品, 蛋白浓度为 100mg/ml。实验

1997-08-29 收稿, 1999-02-16 修回

* 国家自然科学基金 (No. 49876027) 及国家教育部回国留学人员基金资助项目

第一作者简介 黄河清, 男, 41 岁, 副教授。研究方向: 生物技术。

前样品为 25mg/ml。实验样品经 2cm X32cm Sephadex G-25 层析柱, 用 0.025mol/L Tris-HCL 缓冲液 (pH7.25) 除去样品中的游离 Fe^{3+} 离子和磷酸盐。经纯化后的 HSF 含铁量为 2450~2600 Fe^{3+} /HSF (pH7.25)。

1.2 方法

1.2.1 元素分析: HSF 含铁量测定按作者方法 (1993), 无机磷酸盐含量按常规的 Cooper 方法测定。铁蛋白铁核中的亚铁离子浓度用分光光度法测定 (Huang *et al.*, 1993, 1998c)。

1.2.2 蛋白浓度分析: 蛋白浓度测定按常规的 Lowry 方法, 标准蛋白浓度选用 98% 纯度的牛血清蛋白。

1.2.3 差示法测定铁蛋白释放铁速率: 铁蛋白释放铁的速率测定按作者的方法 (1997, 1999)。根据实验要求, 加入等当量的 $Na_2S_2O_4$ 和 α -联吡啶使 HSF 释放一定量的铁, 随后该蛋白经 1.7cm X 32cm Sephadex G-25 层析柱纯化, 并用相对应的 pH 值的 0.025mol/L Tris-HCl 缓冲液洗脱样品中的游离 Fe^{2+} 离子和其它污染物。经收集的不完整铁核 HSF 在相对应的 pH 缓冲液中温育 6 小时, 其目的使 HSF 蛋白壳缓慢地进行自身柔性调节, 且控制剩余的铁和磷酸盐稳定于蛋白壳内。最后再次根据实验所需的释放铁量要求, 加入等当量的 $Na_2S_2O_4$ 和 α -联吡啶使 HSF 继续释放一定量的铁。

1.2.4 不同 pH 的 HSF 样品制备按作者先前的方法 (1993, 1997, 1999)。

1.2.5 不同磷酸盐浓度对 HSF 释放铁速率的影响: 按 1.2.3 的方法制备含有不同铁核结构的 HSF, 根据每分子 HSF 的含铁量, 以 Fe (HSF 铁核含铁量) : Pi (外加磷酸盐) = 1 : 1 为计量单位外加不同量的磷酸盐于实验样品中, 并均匀混合。不同磷酸盐浓度对 HSF 释放铁的速率测定按作者的方法 (1997, 1999)。

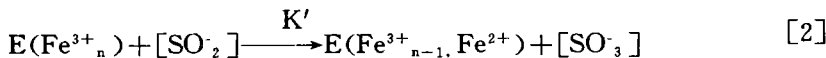
2 结果

2.1 $Na_2S_2O_4$ 对 HSF 释放铁速率的影响

$Na_2S_2O_4$ 是双电子供体的还原剂, 它在水溶液中易分解成 $[SO_2^-]$ 并以 1/2 级方式参与金属酶 (含铁) 的氧化还原反应, 因而可得如下动力学方程式:

$$K_h = \frac{[SO_2^-]}{[S_2O_4]^{1/2}} \quad [1]$$

K_h 是 $Na_2S_2O_4$ 的水解常数。 $[SO_2^-]$ 参与金属酶 $[E(Fe^{3+n})]$ 的还原过程如下:



K'_1 表示 $[SO_2^-]$ 参与 $E(Fe^{3+n})$ 铁还原的速率常数, 把方程 [2] 代入方程 [1] 并积分, 可得如下动力学方程:

$$\frac{d[E(Fe^{3+n-1}, Fe^{2+})]}{dt} = K[S_2O_4]^{1/2} \quad [3]$$

$K = K_h + K'$ 表示 $Na_2S_2O_4$ 参与 $E(Fe^{3+n})$ 还原过程的速度常数。此时, 如在严格厌氧条件下, 根据酶中的含铁量, 加入等当量的 $Na_2S_2O_4$ 还原 HSF 铁核中的铁, 那么 $Na_2S_2O_4$ 消耗量与酶中 Fe^{2+} 离子形成量始终成对应正比关系, 因而可得如下反应式:

$$[Na_2S_2O_4] = [E(Fe^{2+n})_{max}] - [E(Fe^{2+n})_t] \quad [4]$$

把反应式 [4] 代入方程式 [3], 积分后可得出如下方程:

$$[E(Fe^{2+n})_{max}] - [E(Fe^{2+n})_t]^{1/2} = K[T_{max} - T_t] \quad [5]$$

$[E(Fe^{2+}_n)_{max}]$ 表示 $E(Fe^{3+}_n)$ 完全被还原后的最大 Fe^{2+} 量, T_{max} 表示还原 $E(Fe^{3+}_n)$ 中的所有 Fe^{3+} 时所需的时间, $[E(Fe^{2+}_m)_t]$ 表示在单位时间内还原 $E(Fe^{3+}_n)$ 中部分铁量。 T_t 表示还原 $E(Fe^{3+}_n)$ 中部分铁量所需的时间。 因而, 根据反应式[5]分析可知; $Na_2S_2O_4$ 以 1/2 级反应方式参与酶的氧化还原反应。

鉴于上述结果, 作者也认为 $Na_2S_2O_4$ 以 1/2 级方式参与 HSF 释放铁的动力学, 且 $Na_2S_2O_4$ 的消耗量与铁蛋白铁核中的 Fe^{2+} 离子形成量或释放 Fe^{3+} 量成对应的正比关系, 因而可推导出如下 $Na_2S_2O_4$ 参与铁蛋白释放铁的动力学方程:

$$[HSF(Fe^{2+}_n)_{max}] - [HSF(Fe^{2+}_m)_t]^{1/2} = K_{HSF}(T_{max} - T_t) \quad [6]$$

$[HSF(Fe^{2+}_n)_{max}]$ 表示 HSF 释放最大(整体铁核)的铁量, T_{max} 表示 HSF 释放完整铁核的铁时所需的反应时间。 $[HSF(Fe^{2+}_m)_t]$ 表示在单位时间 (T_t) 内 HSF 释放一定铁量。 K_{HSF} 表示 $Na_2S_2O_4$ 以 1/2 级反应方式参与 HSF 释放铁的速度常数。 根据 HSF (pH 7.25) 总的铁量, 分别加入不同等当量(等当量为 100%) $Na_2S_2O_4$ 和 a'-a-联吡啶使 HSF 释放整体铁核的铁, 并把释放铁的速率和反应时间分别代入方程 [6], 即可获得图 1 结果。

图 1 为 $Na_2S_2O_4$ 参与 HSF 释放完整铁核的动力学。 从图 1 可看出: HSF 以两种不同的速率方式释放整体铁核的铁, 在 16 分钟(曲线 1)处出现两相不同释放铁速率的转折点, 可区分为 A、B 两相。 为了加强 $Na_2S_2O_4$ 浓度扩散效应, 我们又采用分别增加还原剂浓度的反应方式, 使 $Na_2S_2O_4$ 浓度由 100% 逐步递增到 250%, 但所获结果只是稍微增加 HSF 释放铁的速率, 并引起两相速率转折点时间推延 6 分钟, 并不能通过加强 $Na_2S_2O_4$ 扩散效应使原有两相(A、B 区)不同释放铁速率转化为单相速率。 此外, 增加 $Na_2S_2O_4$ 浓度却能达到稍微扩大 HSF 在 A 区 [一级反应(黄河清等, 1997)] 的控制铁量(转折点右移)目的, 减少在 B 区(零级反应)的控制铁量。

2.2 释放铁两相速率的转化

图 2 为在 pH5.0~8.0 范围内, HSF 释放铁占原铁核总铁量 40% 的铁的动力学。 从图 2 可看出, 当不同 pH 的 HSF 分别释放占

原铁核总铁量 (pH7.25, $2550Fe^{3+}/HSF$) 40% 的铁时, 在酸性 pH5.5 和 pH6.5 曲线上首先分别出现两相速率的转折点, 两者均可被分为 A、B 两区。 转折点的时间分别位于 5 和 13.3 分钟处。 从图 2 所列的转折点时间分析可知, 曲线(2)的 A 区含铁量比曲线(1)的 A 区的含铁量大, 而前者 B 区含铁量比后者 B 区的含铁量小。 在 pH7.5 和 pH8.0 曲

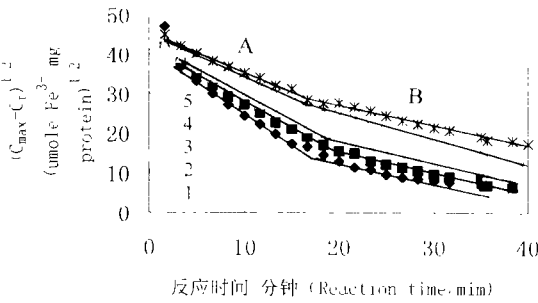


图 1 连二亚硫酸钠参与 HSF (pH7.25) 释放完整铁核的动力学
Fig. 1 Kinetics of complete iron release from HSF (pH7.25) in the presence of dititronite

C_{max} : 每分子 HSP 释放最大的铁量 (Maximum numbers of iron released per HSF molecule)
 C_t : 在反应时间 (T) 内, HSF 释放的铁量 (Numbers of iron released per HSF molecule during the reaction time)
 $Na_2S_2O_4$ concentration (连二亚硫酸钠浓度): 曲线 1 (Curve 1) 为 100% [等当量浓度 (equivalent concentration)]; 曲线 2 (Curve 2) 为 125%; 曲线 3 (Curve 3) 为 150%; 曲线 4 (Curve 4) 为 200%; 曲线 5 (Curve 5) 为 250%

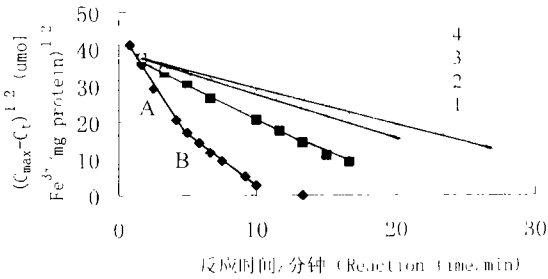


图 2 在 pH5.0~8.0 范围内, HSF 释放铁占原铁核总铁量 40% 的铁的动力学
 Fig. 2 Kinetics of iron releasing 40% of original iron from the HSF core at pH range from 5.0 to 8.0

C_{max} : 每一分子 HSP 释放最大的铁量 (Maximum numbers of iron released per HSF molecule)
 C_t : 在反应时间(T)内, HSF 释放的铁量 (Numbers of iron released per HSF molecule during the reaction time)
 1. pH5.5, 2. pH6.5, 3. pH7.0, 4. pH8.0

剩 70% 的铁时, 释放铁的速度仍然可区分为快速释放铁的 A 区和慢速释放铁的 B 区。当还原剂 $Na_2S_2O_4$ 的浓度由 100% (等当量) 递增至 350% 时, HSF 仍然是以两种不同的释放铁速度释放剩余 70% 的铁。显然, 增加 $Na_2S_2O_4$ 浓度均不能使释放整体铁核 (图 1) 和不完整铁核 (表 1) 的铁的动力学特性由复杂转化为简单, 但却能使 HSF 以几乎相

表 1 已释放占原铁核含铁量 30% 的 HSF 释放铁的动力学 (pH7.25)
 Table 1 Kinetics of iron release after releasing 30% of its original iron from the HSF core (pH7.25)

$Na_2S_2O_4$ (%)	K_1	K_2
100	21.4	14.1
125	22.0	8.5
200	21.4	6.4
250	20.9	6.3
300	22.9	6.2
350	20.9	6.2

K_1 和 K_2 为速度常数 (K_1 and K_2 are rate constant)
 速度常数单位 (Unit of rate constant): $\mu molFe^{3+} / mg protein)^{1/2} / min$

控制 A 区的铁量越大, 则释放铁核内层的铁的速率越低。但是, 当 $Na_2S_2O_4$ 浓度增高到 200% 时, HSF 控制 A 区的铁量已达到最大量, 此时如果再继续增加 $Na_2S_2O_4$ 浓度已无法进一步提高 HSF 控制 A 区的铁量, 因而产生较稳定的 K_2 值。

2.4 铁核结构、磷酸盐对 HSF 释放铁速率的影响

表 2 结果为铁核结构、不同磷酸盐浓度对 HSF 释放铁的速率及相数转换的影响。从表 2 结果可看出; 当 HSF 分别释放占原铁核总铁量 0~60% 铁时, HSF 释放的铁组分已

线上, HSF 释放铁的动力学曲线并不呈现两相释放铁速度转折点现象。如把图 2 结果分别代入一级或零级反应动力学方程可得: 曲线 (1) 的 A 区、(2) 的 A 区、(3) 和 (4) 均能获得一条以用自然对数纵坐标表示释放铁的速率和横坐标表示反应时间的直线, 因而可知它们释放铁的动力学过程均遵循一级反应动力学规律。曲线 (1) 的 B 区和 (2) 的 B 区均能获得一条以纵坐标表示释放铁的速度和横坐标表反应时间的线性对应关系的直线, 符合零级动力学规律。因此, 通过改变反应体系的酸碱度不仅能调节 HSF 释放铁的速率而且能产生反应级数的转换效应。

2.3 HSF 蛋白壳自身的调节能力

表 1 为已释放占原铁核含铁量 30% 的 HSF 释放铁的动力学。从表 1 可看出; 已释放占原铁核总铁量 30% 铁的 HSF 再次释放

相同的速率 (速度常数, K_1) 释放不完整铁核的铁核表层的铁 (表 1, A 区)。此外, 由于递增 $Na_2S_2O_4$ 的浓度能使 HSF 控制 A 区的铁量增加 (转折点不一样), 因而引起 HSF 释放铁核内层的铁 (剩余的铁量不一样) 的速率也有差异 (表 1, K_2), 即 HSF

从铁核的铁核表层深入到铁核的内层。此时, HSF 分别再次进一步释放占原铁核总铁量 (pH7.25) 的 20% 铁时所获的速度常数 ($K_{20\%}$) 几乎相近或相似, 不存在两相速率现象。这一结果说明了含有不同铁核结构的 HSF 再次释放低于原铁核总铁量的 20% 铁时, 其速率相似且反应级数均相同。从表 2 结果进一步分析可知: 外加不同浓度的磷酸盐 (外加磷酸盐分子: HSF 铁核中的铁分子 = 1 : 1) 均能抑制不同铁核结构 HSF 释放铁的速率, 但抑制 HSF 释放铁核内层的铁的速率要比释放铁核表层的铁的速率更为强烈。因而可知, 磷酸盐抑制 HSF 释放铁速率及强弱与铁核的结构有关。

表 2 铁核结构、磷酸盐影响 HSF 释放占原铁核总铁量 20% 的铁的速率 (pH7.25)
Table 2 Effect of iron core structure and phosphate on rate of releasing 20% of original iron from the HSF core (pH7.25)

每分子 HSF 含铁量 (Fe ³⁺ /HSF)	已释放铁量的百分比 (%) percentage of released iron	每分子 HSF 释放铁量 Numbers of Fe ³⁺ release/HSF	速度常数 Rate constant (K)	磷酸盐存在下的速度常数 Rast constant in the presence of phosphate (K _p *)
2560	0	512	8.0	7.3
2432	5	512	8.2	
2304	10	512	8.3	7.3
2178	15	512	8.0	
2048	20	512	8.0	6.6
1920	25	512	8.3	
1792	30	512	8.0	6.6
1664	35	512	8.0	
1536	40	512	8.0	6.6
1408	45	512	8.0	
1280	50	512	8.0	6.5
1152	55	512	8.1	
1024	60	512	8.2	6.4

速度常数单位 (Unit of rate constant): ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg protein}$)^{1/2}/min

* 外加磷酸盐分子 (Pi): HSF 铁核中的铁分子 (Fe³⁺) (Molecule of adding extra phosphate: iron Molecule of the core of HSF) = 1 : 1

2.5 释放铁的过渡状态及转换

表 3 是在 pH5.0~9.0 的范围内, HSF 释放占原铁核总铁量 80% 的铁的动力学性质。从表 3 可看出: 在酸性介质区域里 (pH5.0, 5.5, 6.0), HSF 以 3 种不同的速率释放占原体核的 80% 的铁, 其中 K_1 表示 HSF 释放铁核表层铁的速度常数, K_3 表示 HSF 释放铁内层铁的速度常数, K_2 表示 K_1 和 K_3 之间的转换过渡速度常数。在生理 pH 区域里 (pH7.0~8.0), HSF 以两种不同速率释放占原铁核的 80% 的铁, 并不存在着过渡释放铁速率状态。在 pH9.0 的介质中, HSF 却以单相速率的方式释放占原铁核总铁量 80% 的铁。显然, 通过调节反应介质的酸碱度, 改善 HSF 蛋白壳自身地调节能力能增加或消除释放完整铁核的铁的过渡速率状态。此外, 当反应体系的 pH 值逐渐递高时, HSF 释放铁核表层铁的速率及速度常数 (K_1) 逐渐降低, 在 pH5.0 所获的 $K_{1,pH5.0}$ 比在 pH8.0 所获的 $K_{1,pH8.0}$ 大 7.6 倍, 而释放铁核内层的铁的速率及速度常数 (K_3) 几乎相似。

表3 在 pH5.0~9.0 的范围内, HSF 释放占原铁核总铁量 80% 的铁的动力学性质
 Table 3 Kinetic characteristics of releasing 80% original iron from the HSF core at a pH range of 5.0 to 9.0

pH	速度常数 Rate constant (K ₁)	速度常数 Rate constant (K ₂)	速度常数 Rate constant (K ₃)
5.0	70.8	39.3	9.1
5.5	60.0	40.8	8.8
6.0	40.8	29.5	8.8
7.0	21.6		9.0
7.5	16.7		9.2
8.0	13.2		8.9
9.0	10.2		

速度常数单位 (Unit of rate constant): ($\mu\text{ mol Fe}^{3+}/\text{mg protein})^{1/2}/\text{min}$

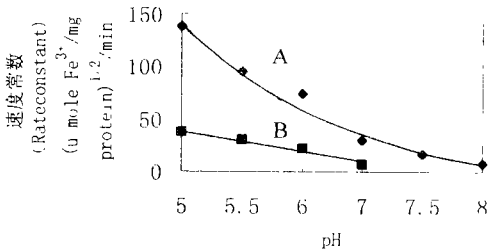


图3 酸碱介质对HSF释放铁速率常数的影响
 Fig.3 Effect of acid-base medium on the rate constants of iron release from HSF

图中所示的动力学反应过程是建立在不同 pH 的 HSF 释放占原铁核总铁量 40% 的铁 (The Kinetic process showed in Fig. 3 was based on the release of 40% original iron from the HSF core at different pH)
 A: A 相 [A phase (k₁)] B: B 相 [B phase (K₂)]

图3结果为酸碱介质对 HSF 释放占原铁核总铁量 40% 的铁的动力学特性及反应相数转化现象。从图3可看出在 pH5.0~7.0 区域中 HSF 以两相速率释放占原铁核总铁量 40% 的铁 (铁核表层)。在 pH7.0~8.0 区域中 HSF 却以单相速率方式释放占原铁核总铁量 40% 的铁。在 pH5 的 HSF 释放铁的速率 [$140 (\mu\text{ mole Fe}^{3+}/\text{mg protein})^{1/2}/\text{min}$] 比在 pH8.0 的 HSF 释放铁的速率 [$10.8 (\mu\text{ mole Fe}^{3+}/\text{mg protein})^{1/2}/\text{min}$] 高 13 倍 (图3)。但在相同 pH 介质中, HSF 释放占原铁总铁量 40% 的铁的速度比释放 80% 的铁的平均速率却要快得多。此外, 从表3和图3可看出, 在 pH6.0~7.0 范围内是相数转换区间, 即前者释放铁的速率相数由原三相转化为单相, 而后者释放铁的相数却由原三相数转化成双相数。

3 讨论

铁蛋白有三相 (X、Y、Z) 横穿蛋白壳内外的物质交换隧道结构 (图4), 它起着进行物质代谢和储存的桥梁作用 (Harrison *et al.*, 1974; Strange *et al.*, 1993)。Na₂S₂O₄ 只能利用浓度扩散方式穿过 HSF 蛋白壳的三相隧道才能还原蛋白壳内的 Fe³⁺ 组分。按上述推论分析, 显然, 如果 HSF 的蛋白壳是刚性不变结构, 即隧道宽度应始终保持不变, 并不随着 HSF 储存铁量递增而变宽或释放铁量增加而变窄。因此, 采用逐步递增还原剂的浓度做法完全有可能迅速提高 Na₂S₂O₄ 扩散速率, 并达到提高释放铁速率的效果。但图1结果表明: 增加 Na₂S₂O₄ 浓度并不是提高 HSF 释放铁速率的关键性因素, 也不能产生速率相数的转换效果。HSF 释放铁的动力学复杂特性实际上与蛋白壳的三相隧道起着限

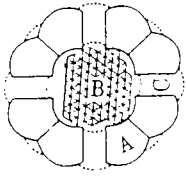


图 4 HSF 分子结构

Fig. 4 Molecular structure of HSF

- A: 蛋白壳 (Protein Shell)
 B: 铁核 (iron core)
 C: 隧道 (channel)

制 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的扩散速率有关。然而, 尽管限制 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 扩散速率是受蛋白壳隧道的宽度调节或开关速率的控制, 但它们的制约程度和方式还是由蛋白壳自身的柔性调控强弱及幅度所决定, 与铁核结构无关。所以, HSF 蛋白壳很可能不是刚性结构, 而是具有柔性调节能力的结构。

此外, 在酸性介质中的 H^+ 能迫使蛋白壳产生了构象变化, 并引起蛋白壳自身的调节能力变弱, 使制约 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 扩散速率迟钝或能力变弱, 从而使 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 浓度扩散速率提高及加快释放铁的速率, 并首先在酸性介质区中呈现两相不同释放铁的速率和反应级数的现象 (图 2)。但由于随着释放铁量迅速递增, 蛋白壳控制铁核中的剩余铁的能力也在增强, 这就导致使 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的扩散速率受牵制和约束程度也随之增强, 并产生了 HSF 以

三相不同的速率方式释放占原铁核含铁量 80% 的铁的结果 (表 2、3), 比在中性及偏碱性区域中 (pH 7.0~8.0) 多了一相反应级数转换的过渡阶段。因而可知, 在 HSF 释放铁的过程中所形成的多相速率现象是因为蛋白壳产生柔性调节作用并引起三相隧道控制 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 扩散速率的制约程度随着释放铁量递增而增强。进一步分析, 如果蛋白壳确有这样的调节能力, 那么, 当 HSF 释放的铁量低于占原铁核铁量的 20% 时, 含有不同铁量的蛋白壳控制 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的扩散速率的制约程度应该一致或很相似, 与该蛋白铁核中的含铁量无关, 所获得释放铁的速率也应一致。从表 2 中所列出的所有较相近的 K 值可证实上述推论的正确性, 即 HSF 蛋白壳确实存在柔性调节的功能。

在稀碱性的 pH 区域里, OH 同样也能引起 HSF 蛋白壳产生较大幅度的自身调节作用及构象变化。也许这种调节作用与 H^+ 所引起的蛋白壳的调节作用机理不一样, 导致 HSF 能较有效地利用隧道的开关控制作用或改变隧道宽度, 达到控制 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的扩散速率的目的, 并使 HSF 随着反应体系 pH 递增, 能有效地降低释放铁的速率, 减少不同速率的相数, 最终以单相一级反应方式和有规律地释放铁核表层的铁, 达到释放铁速率相数转换的结果 (表 3, 图 3)。HSF 铁核表层的含磷量比铁核内层的含磷量高得多 (Huang *et al.*, 1993)。因而, 外加的磷酸盐抑制 HSF 释放铁核内层的铁的强度应比抑制释放铁核表层的铁强 (表 2)。此外, 根据表 2 结果可知磷酸盐抑制释放铁速率强弱可按 HSF 铁核磷铁比结构分为中强区 (铁核表层, 较高磷铁比结构) 和强区 (铁核内层, 较高铁磷比结构)。磷酸盐抑制 HSF 释放铁的速率与铁核结构和含磷量有关。

参 考 文 献 (References)

- Funk, F., J. P. Lenders, R. R. Crichton and W. Schneider 1985 Reductive mobilisation to apo and holo mammalian ferritin. *Eur. J. Biochem.* **152**:167~172.
 Harrison, P. M., T. G. Hoy and I. G. Macara 1974 Ferritin iron uptake and release. *Biochem. J.* **143**:445~451.
 Huang, H. Q., R. K. Watt, R. B. Frankel and G. D. Watt 1993 Role of Fe^{2+} binding to horse spleen holoferritin. *Biochemistry* **32**:1681~1687.
 Huang, H. Q., F. Z. Zheng and L. S. Xu 1997 Comparison of physio-chemical properties of ferritins between pig and

- horse spleens. *Acta Zool. Sin.* **43**(2):170~177. [黄河清,张凤章,许良树 1997 猪脾和马脾铁蛋白理化特性的比较. *动物学报* **43**(2):170~177.]
- Huang, H. Q., F. Z. Zhang, L. S. Xu, Q. M. Lin, J. W. Huang and D. Zeng 1998b Spectroelectrochemical investigation of *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin. *J. of Electroanal. Chem.* **44**:30~1307.
- Huang, H. Q., L. S. Xu, F. Z. Zhang, X. H. Qiu, Q. L. Lin, J. W. Huang, H. Zhao, N. C. Huang, R. Y. Zeng and D. Zeng 1998a H₂-uptake activity, Spectra, reductive potential and kinetics of iron release on the surface of iron core from *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin. *J. of protein Chem.* **17**(1):45~52.
- Huang, H. Q., Q. M. Lin, F. Z. Zhang, C. H. Chen, X. Chen and Z. Chen 1998c Studies on the home H₂-uptake reaction from *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin. *Bioelectrochem. and Bioenerg.* **34**:5 397~5 403.
- Huang, H. Q., Q. M. Lin, F. Q. Zhang, Z. Chen, Z. B. Lou and L. S. Xu Studies on characteristics of electron tunnel and pathway of iron release from pig spleen ferritin. 1999 *Chinese J. of Biochem. and Mole. Biol.* **13**(1):10~14. [黄河清,林庆梅,张凤章,陈中,洛占波,许良树 1999 猪脾铁蛋白电子隧道特性及释放铁途径的研究. *中国生物化学与分子生物学报* **13**(1):10~14.]
- Richards, T. D., K. R. Pitts, and G. D. Watt 1996 A kinetic study of iron release from *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin. *J. of Inorg. Biochem.* **61**:1~13.
- Strange, R., S. Morante, S. Stefanini, E. Chiancone and A. Desideri 1993 Nucleation of the iron core occurs at the three-fold channels of horse spleen apoferritin; an EXAFS Study on the native and chemically-modified protein. *Biochim Biophys Acta* **1664**:331~334.
- Treffry, A., C. Hawkins, J. M. Williams, T. R. Guest and P. M. Harrison 1996 Lability of iron at the dinuclear centers of ferritin studied by competition with four chelators. *J. of Bio. Inorg. Chem.* **1664**:331~334.

外 文 摘 要 (Abstract)

TRANSFER OF REACTION ORDERS AND PHASE NUMBERS OF IRON RELEASE RATE OF HORSE SPLEEN FERRITIN*

HUANG He-Qing^① ZHANG Feng-Zhang^① LIN Qing-Mei^②

ZENG Run-Ying^③ QIU Xue-Hui^① XU Liang-Shu^①

(^①Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

(^②Research Center of Environment Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

(^③Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

A differential technique was used to study kinetics about the law of iron release as well as the transfer of reaction order of horse spleen ferritin. The rate of iron release and the phasic numbers from ferritin are independent of the reducer (Na₂S₂O₄) concentration and the rate of iron reduction, but related to the regulation rate of the protein shell. Ferritin released 80% of its original iron content at different rates of three phases between pH 5.0 and 6.0. However, at pH 9.0 of the medium, OH⁻ ions not only took part in the composition of the iron core and retard the rate of iron release from the ferritin, but also caused the rate of reaction turn from mix-orders to first-order, thus transferring the complicated process of kinetics of iron release into a simple form.

Key words Horse spleen ferritin, Self-regulation of protein shell, Kinetics of iron release, Reaction order and rate

* This work was supported by The National Natural Science Foundation of China (No. 49876027) and The Educational Department Foundation of China (No. 9302)