

· 研究快报 ·

猪脾铁蛋白电子隧道特性及释放铁途径的研究*

黄河清 林庆梅* * 张凤章 陈 中 雒占波 许良树

(厦门大学生物学系, 厦门 361005; * * 厦门大学环境科学研究中心, 厦门 361005)

摘要 维生素 C 和连二亚硫酸钠混合后只能加速猪脾铁蛋白释放铁的速率, 并不能使铁蛋白释放铁的动力学途径由复杂转化为简单. 而单独维生素 C 却能利用蛋白壳上的电子隧道传递电子, 迫使铁蛋白以二分之一的反应级数方式释放整体铁核的铁并起着抗磷酸盐阻碍释放铁速率的作用, 简化释放铁的途径. 对维生素 C 参与铁蛋白释放铁的机理进行了讨论.

关键词 猪脾铁蛋白, 电子隧道, 动力学, 蛋白壳调节作用

Studies on Characteristics of Electron Tunnel and Pathway of Iron Release from Pig Spleen Ferritin

HUANG Heqing, LIN Qingmei* *, ZHANG Fengzhang, CHEN Zhong, LOU Zhanbo, XU Liangshu

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005;

* * The Reseach Center of Environment Science, Xiamen Univeristy, Xiamen 361005)

Abstract Rate of iron release from horse spleen ferritin was only accelerated by mixing both vitamin C and dithionite, which could hardly transfer kinetic pathway that the ferritin released iron could from complexity to simplicity. However, vitamin C alone was able to utilize the electrons tunnel on the protein shell for transferring electron to make the ferritin release the iron of whole core as a form of half-order reaction, playing a role in resisting the effect phosphate on inhibition rate of iron release, and simplifying the pathway of iron release. The mechanism involving in the process of ferritin releasing iron with the vitamin C reduction was suggested.

Key words Pig spleen ferritin, Electron tunnel, Kinetics, Regulation action of protein shell

铁蛋白已被发现广泛地存在动植物及微生物的机体中. 铁蛋白的主要生理功能是释放铁给细胞生物合成含铁的酶和储存体内过剩的铁, 避免铁中毒. 虽然至今有关铁蛋白的结构与功能及理化特性已有大量的研究报告并进行较深入的研究, 但对铁蛋白在体内所进行的铁代谢机理和途径仍然不是很清楚. EXAFS 技术研究铁蛋白储存铁的机理时指出: 马脾铁蛋白(horse spleen ferritin, HSF)能利用蛋白壳上的三相隧道(X, Y, Z)作为内外物质交换的通道并参与释放和储存铁的反应^[1]. Treffry 在研究铁蛋白结构与功能特性时指出: 脱铁核铁蛋白(apo-ferritin)储存铁的过程与铁核表层含有能催化 Fe²⁺ 成 Fe³⁺ 的双铁簇结构有关, 与蛋白壳的三相隧道无关^[2]. 但是, 电子光谱技术研究 HSF 和猪脾铁蛋白(pig spleen ferritin, PSF)释放铁的动力学机理时发

现, 两者铁蛋白的蛋白壳自身的柔性调节能力是释放铁的限制性步骤, 与铁核表层复杂磷铁结构无关^[3]. 此外, 虽然生物大分子氧化态铜蛋白()和细胞色素 C 无法直接穿过大约 60 ~ 80 Å 厚度的蛋白壳或通过铁蛋白的三相物质交换隧道(channel)的情况下(Fig. 1^[4,5]), 但却能直接氧化 HSF 蛋白壳内的 Fe²⁺ 成为 Fe³⁺ 并自身得到还原. 因而, 建议铁蛋白可能含有与三相物质交换隧道不同的另一种电子隧道(electron tunnel), 其生理功能是用于接受或传递电子. 近期, 生物光谱电化学技术证实了棕色固

* 国家自然科学基金(No. 49876027)及国家教育部留学回国人员基金(No. 9302)资助项目

联系人: 黄河清, 男, 1956年5月出生, 副教授

Tel: (0592) 2186392 Fax: (0592) 2186116

收稿日期: 1998-06-23, 修回日期: 1998-09-18

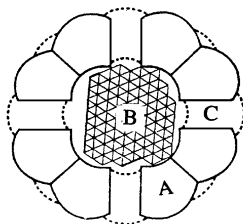


Fig 1 Molecular structure of PSF

A: Protein shell B: Iron core C: Channel

氮菌细菌铁蛋白 (bacterial ferritin of *Azotobacter vinelandii*, AVBF) 含有血红素链 (heme) 结构的电子隧道 (electron-tunnel-heme), 并能从铂电极上直接接收电子并还原自身铁核中的 Fe^{3+} , 使释放铁的过程由原混合级方式转化为零级反应途径, 提出如用低电位的铂电极作为电子供体源, 则释放铁的速率快慢与铁蛋白的铁核结构及蛋白壳上的物质交换隧道无关, 却与蛋白壳上的电子隧道接收及传递电子速率有关等看法^[6].

是否生物还原剂也能利用铁蛋白的电子隧道进行代谢及储存铁呢? 本文选用具有弱还原性及双电子特性的维生素 C (简称 Vc) 作为探针, 研究 Vc 利用电子隧道参与 PSF 释放铁的动力学反应的特性及规律, 提出 PSF 接受电子的机理, 它对今后正确理解铁蛋白在体内释放铁的机理提供理论依据.

1 材料与方 法

1.1 材料与 PSF 制备

选用新鲜猪脾, 除去脂肪和杂物. PSF 的制备参考黄河清的方法^[3]. 经纯化的 PSF 铁核中总的铁磷比值为 11 : 1. Vc 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 等药品购于美国 Sigma 公司产品.

1.2 方 法

1.2.1 含低磷量的 PSF 制备及纯化: 经纯化的 PSF 样品再次用饱和的硫酸镉溶液处理 30 min. 高盐浓度处理铁蛋白的目的是迫使该蛋白能直接释放出铁核中对高盐度不稳定的铁和磷酸盐于蛋白壳外, 随后将该蛋白溶液的 pH (7.25) 值用 0.02 mol/L NaOH 调节到 pH9.0, 并平衡 40 min 以上. 此时, OH^- 已扩散到铁蛋白的壳内并引起铁核中绝大多数磷酸盐进一步释放到蛋白壳外. 经 OH^- 处理后的 PSF 样品再次经 Sephadex G-25 层析柱 (1.7 cm \times 32 cm) 除去样品中的游离 Fe^{3+} 和磷酸盐. 经柱纯化后的 PSF 样品仍需用 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲

液 (pH9.0) / 0.15 mol/L NaCl 平衡的 1.8 cm \times 30 cm 的 DEAE 纤维素层析柱纯化若干次直到所获的 PSF 铁核中总的磷铁组成比为 $\text{Fe}^{3+} : \text{P}_i = 130 : 1$. 此时, 铁核中的磷酸盐含量很低 (相当天然纯铁结构).

1.2.2 元素和蛋白分析: 铁蛋白浓度测定按改良的 Lowry 方法. 标准蛋白浓度的配制选用纯度为 98% 的牛血清清蛋白. 用原子吸收仪测度 PSF 总的含铁量. PSF 的含磷量的测定按常规的 Cooper 的方法. PSF 释放铁的动力学测定和反应级数计量按 Huang 等人的方法^[3,8].

1.2.3 Vc 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的配制及浓度定量分析: 均在严格的厌氧条件下进行, 并分别用 2,6-二氯酚靛酚法滴定法和分光光度法 (315 nm) 测定.

1.2.4 外加磷酸盐对 PSF 释放铁速率的影响: 根据每分子的 PSF 铁核中含铁量, 以 Fe^{3+} (PSF 铁核含铁量) $:\text{P}_i$ (外加磷酸盐) = 1 : 1 为计量单位外加磷酸盐于实验样品中, 并均匀混合. 随后, 按作者的方法^[3,8] 测定 PSF 释放铁的速率. 还原剂选用纯度为 90% 的 Vc. 所有反应条件均在严格厌氧环境中进行.

2 结 果

2.1 PSF 释放铁的动力学特性 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 还原法)

Fig. 2 是用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 作还原剂时, PSF 释放整体铁核的铁的全过程, 总平均每 mol PSF 释放铁 (Fe^{3+}) 的速率 (0 ~ 55 min) 为 24 mol/min. 如把 Fig. 2 结果代入一级反应动力学方程, 即可得到 Fig. 3 结果. 从 Fig. 2, 3 结果分析可知: PSF 释放铁的全过程中存在两相不同释放铁的速率 (A 和 B 相), 两相速率的转折点时间位于反应时间 20 min 处. 在 A 相区 (0 ~ 20 min) 内, 每 mol PSF 平均释放 Fe^{3+} 速率 (K_1) 是 62.5 mol/min, 可称它为释放铁的

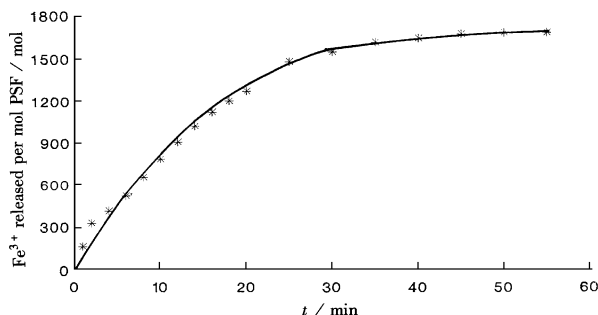


Fig. 2 Kinetic curve of complete iron release from PSF by

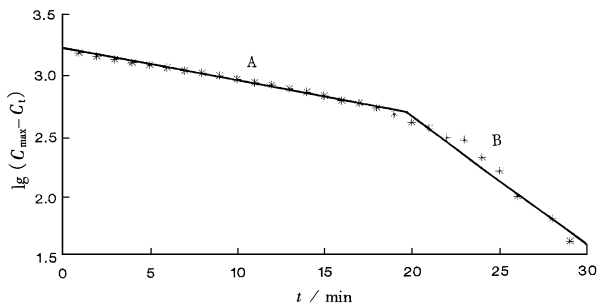


Fig. 3 Plot of $\lg(C_{\max} - C_t)$ as determined in Fig. 2 against reaction time

C_{\max} : The maximum numbers of iron release per molecular PSF; C_t : Numbers of iron released per molecular PSF at indicated time

快速区域. 在 B 相区 (20 ~ 55 min), 每 mol PSF 平均释放 Fe^{3+} 的速率 (K_2) 为 12.8 mol/min, 可称它为释放铁的慢速区域. 两者速率 (K_1/K_2) 比值为 4.9. 如把 Fig. 2 结果也分别代入零级, 二分之一级或二级反应动力学方程后, 其结果均象 Fig. 3 结果那样无法得到一条以释放铁的速率为纵坐标和反应时间为横坐标的直线, 至少呈现两相或两相以上不同释放铁速率.

2.2 用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 和 Vc 混合作为还原剂时, PSF 释放铁的动力学特性

Fig. 4 的结果表明了由 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (-527 mV vs. NHE) 和 Vc (-12 mV vs. NHE) 混合组成的还原剂 (1:1) 不仅能够还原 PSF 铁核中所有的 Fe^{3+} 成为 Fe^{2+} , 而且还能加速 PSF 释放铁的速率, 总的平均每 mol PSF 释放铁 (Fe^{3+}) 速率为 52 mol/min, 比 Fig. 2 结果所获得平均的速率快一倍. 显然, Vc 也参与 PSF 释放铁的还原反应. 如把 Fig. 4 结果也分别代入各种常规的动力学方程式均可获得类似 Fig. 3 所示的两相或两相以上的不同释放铁速率的结果. 这

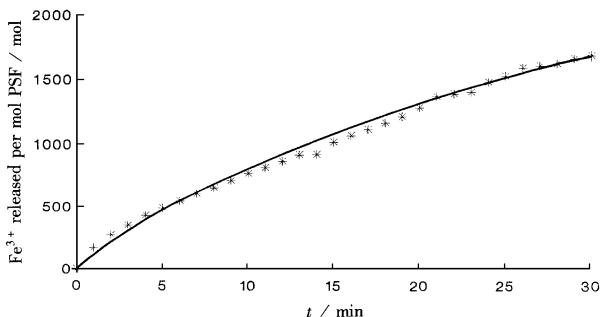


Fig. 4 Kinetic curve of complete iron release from PSF by

mixing reducers with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ and Vc reduction

一现象说明了通过提高释放铁的速率, 也并不能使 PSF 释放铁的动力学特性由原复杂步骤转化为简单的反应途径.

2.3 用 Vc 作为铁的还原剂时, PSF 释放铁的动力学特性

Fig. 5 是用 Vc 单独作为铁核组分的还原剂时, PSF 释放铁的全过程. 平均每 mol PSF 释放铁 (Fe^{3+}) 的速率为 23 mol/min, 其速率与 Fig. 2 所示的速率相当靠近. 如把 Fig. 5 的结果也分别代入零级, 一级, 二级反应动力学方程式, 其结果均可获得类似 Fig. 3 所示的两相或两相以上的不同释放铁速率. 但如代入二分之一级的动力学方程式即可获得一条以释放铁的速率为纵坐标与反应时间为横坐标的对应直线, 并未出现两相或两相以上的不同速率的现象 (Fig. 6). 因而推出, Vc 以二分之一级的反应级数方式参与 PSF 释放铁的反应, 并迫使 PSF 以二分之一级的反应方式释放整体铁核的铁组分.

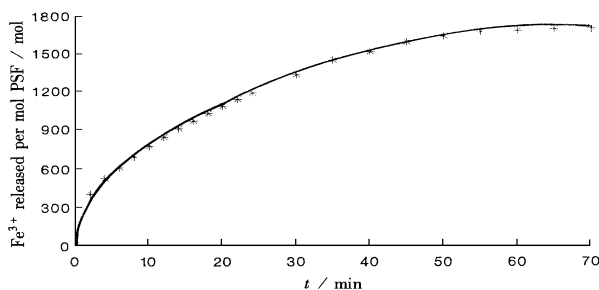


Fig. 5 Kinetic curve of complete iron released by Vc reduction

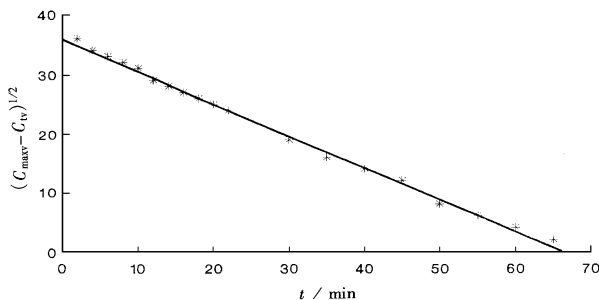


Fig. 6 Plot of $[C_{\max} - C_t]^{1/2}$ as determined in Fig. 5 against reaction time

C_{\max} : The maximum numbers of iron released per molecular PSF; C_t : Numbers of iron released per molecular PSF at indicated time

2.4 外加磷酸盐对 PSF 释放铁速率的影响

Fig. 7 为外加磷酸盐对 PSF 释放铁速率的影

响。从 Fig. 7 的结果可看出: 如用 V_c 作为还原剂时, 外加磷酸盐失去抑制 PSF 释放铁速率的能力, 平均每 mol PSF 释放铁 (Fe^{3+}) 的速率仍保持在 22.5 mol/min. 但如把 Fig. 7 结果代入二分之一级动力学方程式时, 其结果仍可获得一条以释放铁速率为纵坐标和反应时间为横坐标的直线 (Fig. 8). 显然, 用 V_c 作为还原剂时, 外加磷酸盐即不能改变 PSF 释放铁的动力学级数及速率, 也不能使 PSF 释放铁途径及机理由简单转化为复杂.

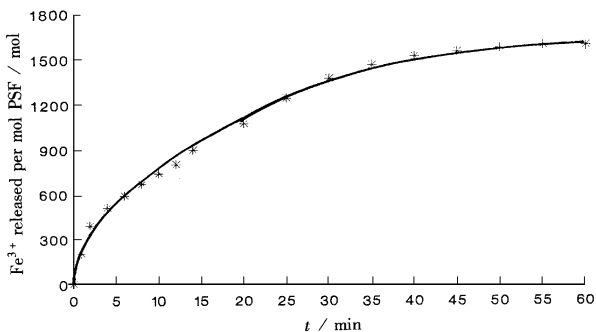


Fig. 7 Kinetic curve of complete iron released by V_c reduction in the presence of phosphate

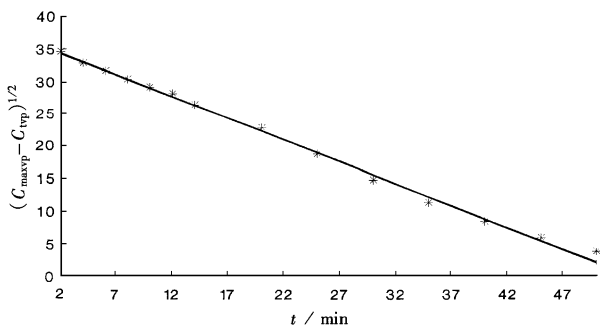


Fig. 8 Plot of $[C_{maxvp} - C_{tvip}]^{1/2}$ as determined in Fig. 6 against reaction time

C_{maxvp} : The maximum numbers of iron released per molecular PSF; C_{tvip} : Numbers of iron released per molecular PSF at indicated time

3 讨 论

从 Fig. 2~4 结果可很清楚地看出, 虽然 PSF 铁核中含磷量很低, 其铁核结构几乎由 Fe^{3+} 组分成为天然的 Fe^{3+} 核. 但, 并不因为铁核中磷酸盐的大量丢失及铁核结构变化就能使 PSF 释放铁的动力学过程由复杂转化为简单. 显然, 这种特性与 $Na_2S_2O_4$ 通过浓度扩散方式抵达 PSF 蛋白壳表层的速率和被还原的铁核结构均无关, 却与能限制

$Na_2S_2O_4$ 从蛋白壳外部进入到铁核内的速率的三相隧道有关, 而这种限制因素又受到 PSF 蛋白壳的调控, 因而可知, PSF 蛋白壳的构象变化大小及调节能力强弱是决定释放铁速率及级数的关键性因子.

生物电子供体 V_c 的中点电位 ($E \cong -14$ mV) 比铁蛋白铁核中的中点电位 (HSF, $E \cong -190$ mV; AVBF, $E \cong -420$ mV) 高. 如果 V_c 也象 $Na_2S_2O_4$ 那样通过扩散方式和穿过三相隧道去直接还原 HSF, PSF 或 AVBF 的铁核中的 Fe^{3+} 组分似乎不大可能. 但 Fig. 4~8 结果却证实了 V_c 有足够能力还原 PSF 铁核中的 Fe^{3+} 组分. 显然, V_c 只能是利用其它电子传递途径还原 PSF 铁核中的铁组分, 根据上述结果, 作者建议性地提出 V_c 参与铁蛋白铁还原反应的机理, 具体如下:

(1) $V_c(H_2)$ (还原态) 是一种有机组分的生物还原剂, 它可通过扩散方式络合于 PSF 蛋白壳表层的某些氨基酸组成, 并使 PSF 蛋白壳发生构象变化及产生较高的氧化电位, 而位于蛋白壳内的铁核仍处于低电位的状态.

(2) 高电位的 PSF 蛋白壳接收 $V_c(H_2)$ 的还原电子后, 瞬时产生调节作用并迅速降低蛋白壳自身的还原电位 (此时, 还原态蛋白壳的氧化还原电位比铁核的电位低).

(3) 还原态的蛋白壳利用自身的电子隧道迅速传递电子给铁核并还原 Fe^{3+} 组分为 Fe^{2+} .

(4) 当还原态的蛋白壳释放电子的同时再次产生蛋白壳柔性调节作用, 并恢复原有的蛋白壳的电位和准备再次接收 V_c 的络合和电子.

外加磷酸盐强烈地抑制铁蛋白释放铁的速率, 其原因是磷酸盐强烈地络合在铁蛋白三相物质交换隧道上. 这一种络合现象不仅加剧阻遏还原剂通过隧道的速率, 并且减缓蛋白壳柔性调节速率和扩大蛋白壳控制铁核中的铁量^[3]. 但, 这种抑制释放铁速率的效果只是针对需要穿过三相物质交换隧道才能提供电子的还原剂, 例 $Na_2S_2O_4$. 而 V_c 是通过蛋白壳上的电子隧道传递电子, 无需通过穿过蛋白壳的三相隧道还原铁核中的 Fe^{3+} 组分, 因而使释放铁的机理简单化. 所以, 如单独用 V_c 作为还原剂时, PSF 释放铁的速率及级数的限制性因素与 V_c 提供电子速率及级数或蛋白壳传递电子速率有关, 与铁核结构无关.

$Na_2S_2O_4$ 是一种双电子还原剂, 它能以 1/2 级反应方式参与固氮酶钼铁蛋白中的铁硫簇及铁蛋白中铁簇的还原反应, 有关这方面研究已有详细报道.

但 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 是以遵循浓度扩散和穿梭蛋白壳隧道规律参与铁蛋白释放铁的反应, 其扩散速率受蛋白壳构象及隧道宽度的限制, 因而使释放铁动力学特性呈复杂化(见 Fig. 2). 而 V_c 也是双电子有机生物还原剂, 它象 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 一样以 1/2 级方式提供电子, 因而 PSF 释放铁的速率依赖于 V_c 所提供电子的速率, 并只能以 1/2 级反应方式释放整体铁核的铁, 不产生两相或多相速率(Fig. 4 ~ 6), 即使是外加磷酸盐也不影响 PSF 释放铁的速率(见 Fig. 7, 8). 但如用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 和 V_c 混合还原剂体系, 因部分释放铁的速率仍受 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的直接影响, 因而仍然表现出复杂地释放铁的动力学特性.

References

- 1 Strang S, Morante S, Stefanini S, Chiancone E, Desideri A. 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*, 1993, **1164**: 331 ~ 341
- 2 Treffry A, Zhao Z, Quail M A, Guest J R, Harrison P M. Dinuclear center of ferritin: Studies of iron binding and oxidation show differences in the two iron sites. *Biochemistry*, 1995, **34**: 15204 ~ 15213
- 3 黄河清, 张凤章, 许良树. 猪脾和马脾铁蛋白理化特性的比较. 动物学报(Huang Heqing, Zhang Fengzhang, Xu Liangshu. Comparison of physico-chemical properties of ferritins between pig and horse spleen. *Acta Zool Sin*), 1977, **43**: 170 ~ 177
- 4 Watt G D, Jacobs D, Frankel R B. Redox reactivity of bacterial and mammalian ferritin: Is reductant entry into the ferritin interior a necessary step for iron release? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **85**: 7457 ~ 7461
- 5 Harrison P M, Hoy T G, Macara I G, Hoare R J. Ferritin iron uptake and release. *Biochem J*, 1974, **143**: 445 ~ 451
- 6 Huang Heqing, Zhang Fengzhang, Xu Liangshu, Lin Qingmei, Hung Jianwei, Zeng Ding. Spectroelectrochemical investigation of *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin. *J Electroanal Chem*, 1998, **44**: 301 ~ 307
- 7 Huang Heqing, Xu Liangshu, Zhang Fengzhang, Qiu Xiehui, Lin Qingmei, Zhao Hong, Huang Nanchang, Zeng Runying, Zeng Ding. H_2 -uptake activity, spectra, reduction potentials, and kinetics of iron release on the surface of iron core *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin. *J Protein Chem*, 1998, **17**: 45 ~ 51
- 8 HUANG Heqing, Watt R K, Frankel R B, Watt G D. Role of phosphate in Fe^{2+} binding to horse spleen holo-ferritin. *Biochemistry*, 1992, **32**: 1681 ~ 1687