

铁核结构对马脾铁蛋白释放铁动力学的影响^{*}

黄河清^{①②} 林庆梅^③ 肖志群^① 陈晶^① 曾骥^① 童丽^①

(^①厦门大学生物学系; ^②厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室;

^③厦门大学环境科学研究中心 厦门 361005)

摘要:建立 H^+ 参与马脾铁蛋白释放铁的动力学方程。 H^+ 以 1/2 级反应方式参与铁蛋白释放铁核表层的铁。在酸性介质(pH 6.5)中,铁蛋白释放铁的总平均速率($332 Fe^{3+}/HSF \cdot min$)比在碱性介质(pH 8.0)中释放铁的总平均速率($73 Fe^{3+}/HSF \cdot min$)高 4.6 倍。铁蛋白的铁核结构和外加的磷酸盐均能影响该蛋白释放铁的速率,但并不改变其反应级数。

关键词:马脾铁蛋白;反应级数;铁核结构;动力学方程;磷酸盐

中图分类号:Q617 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2001)01-18-05

^{*} 国家自然科学基金(No. 49876027),教育部高等学校骨干教师资助计划及固体表面物理化学国家重点实验室基金资助项目;

第一作者介绍 黄河清,男,43,教授;研究方向:蛋白质工程;E-mail: hqhuang@jingxian.xmu.edu.cn

收稿日期:1999-06-24,修回日期:2000-08-25

Effect Structure of Iron Core on Kinetics of Iron Release from Horse Spleen Ferritin

HUANG He-Qing^{①②} LIN Qing-Mei^③ XIAO Zhi-Qun^①
CHEN Jing^① ZENG Ji^① TONG Li^①

(^①Department of Biology; ^②State Key Laboratory for Physical Chemistry of Solid Surfaces;

^③Research Center of Environment Science, Xiamen University Xiamen 361005, China)

Abstract: A Kinetic equation of iron release with H^+ existing was established from horse spleen ferritin. H^+ as a form of half-order reaction took part in the reaction that the ferritin released it on the surface of iron core. Average rate of iron release ($332 Fe^{3+}/HSF \cdot min$) in the acid-medium (pH 6.5) was higher 4.6 times than that ($73 Fe^{3+}/HSF \cdot min$) in basic-medium (pH 8.0). The structure of iron core from horse spleen ferritin and the extra phosphate had an effect upon the rate of iron release, but the reaction order was not changed.

Key words: Horse spleen ferritin; Reaction order; Structure of iron core; Kinetic equation; Phosphate

哺乳动物的脾脏细胞内含有能高效储存铁离子的蛋白质,称为铁蛋白(ferritin),每分子铁蛋白所储存的铁量可高达数千铁离子和数百磷酸盐分子^[1,2]。铁蛋白的分子结构由铁核(iron core)和蛋白壳(protein shell)组成,铁核位于蛋白壳中心^[1,3~5]。早期的研究认为,铁蛋白铁核结构中的磷铁组成是非均匀的,可被区分为铁核表层及铁核内层^[6]。而近期的研究又进一步指出了铁蛋白铁核表层的高磷铁比结构可能与蛋白所表达的生理功能有一定的联系^[7]。

虽然对铁蛋白释放铁的动力学研究已经有了大量详细地报道,但所获得研究结果却表明,铁蛋白释放铁的动力学曲线均无法用常规的零级、一级或二级等反应动力学公式来阐明释放铁的规律^[8,9]。此外,Watt^[10]和Huang^[11]分别报道了铁蛋白能高效储存体外的磷酸盐于蛋白壳中,但有关磷酸盐的作用仍然缺乏了解^[12]。

本文选用马脾铁蛋白(horse spleen ferritin, HSF)为研究材料,制备不同铁核结构且用于分析HSF释放铁的动力学规律,为今后深入探讨铁蛋白的新生理功能提供了有价值的理论研究依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料 HSF蛋白浓度为100 mg/ml并用Sephadex G-25层析柱(2 cm×12 cm)纯化。纯化后的HSF经聚丙烯酰胺凝胶电泳纯度验证呈单条带。

1.2 方 法

1.2.1 元素分析和不同铁核结构的HSF制备 HSF总铁量用分光光度法测定。磷含量选用常规的Cooper方法测定。HSF蛋白浓度选用改良的Lowry方法测定。制备不同铁核结构的HSF操作步骤如下:1)用0.05 mol/L NaOH调节HSF所需的pH值,并稳定2小时;2)把不同pH值的样品分别加入1.2 cm×6.0 cm Sephadex G-25层析柱并用相对应pH值的Tris-HCl缓冲剂洗脱HSF已释放的游离铁和磷酸盐。上述实验步骤均用高灵敏度的酸度计监测。不同铁核结构HSF总的铁量、磷量和磷铁比如表1所示。

1.2.2 不同铁核结构的HSF释放铁速率测定 1)定量分析不同铁核结构HSF的总铁量;2)根据实验所要释放的铁量,定量加入 $Na_2S_2O_4$ 和 α' -联吡啶分别用于铁还原和释放;3)用分

光光度法 (520 nm) 测定 HSF 释放铁的速率^[12]。

1.2.3 外加磷酸盐对 HSF 释放铁速率的影响
根据不同铁核结构 HSF 的总铁量, 用 20 mmol/L Na_2HPO_4 配制成反应体系中总磷量与 HSF 总铁量, 比值范围在 0.00 ~ 1.20 之间。HSF 释放铁的速率和反应级数测定按作者的方法进行^[12]。

2 结果

2.1 不同 pH 对 HSF 直接释放铁速率的影响
表 1 的结果表明, 不同 pH 介质中的 H^+ 和 OH^- 均能使 HSF 直接释放 (无需额外加入 Fe^{3+} 还原剂及 Fe^{2+} 螯合剂的条件下) 出铁核中对弱酸或弱碱不稳定的铁组分。从表 1 可看出, 在弱酸性介质中 (pH 7.0 ~ 5.0), HSF 直接释放铁的平均速率为 $566 \text{ Fe}^{3+} / \text{pH}$ 。在弱碱性介质中 (pH 9.0 ~ 7.0), HSF 直接释放铁的平均速率为 $308 \text{ Fe}^{3+} / \text{pH}$, 两者速率比约为 2:1。

表 1 不同 pH 值 HSF 铁核中的磷铁结构

pH	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
Pi/HSF	286	308	340	230	170
$\text{Fe}^{3+}/\text{HSF}$	1 181	1 701	2 316	1 817	1 700
Fe^{3+}/Pi	4.1	5.5	6.8	7.9	10.0

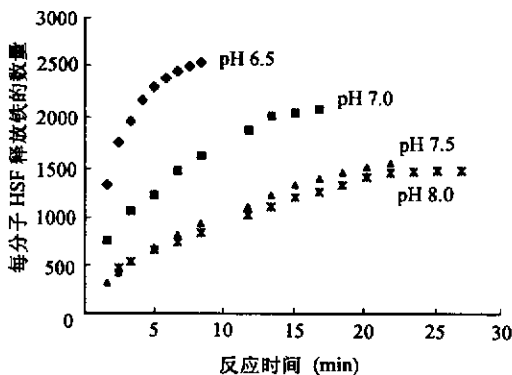


图 1 不同 pH 值 HSF 释放完整铁核中的铁动力学曲线

图 1 结果表示, 在不同 pH 反应介质条件下, HSF 释放铁的全过程。从图 1 结果可看出, 在弱酸性 (pH 6.5) 介质中, HSF 释放铁的全过程所需要的反应时间仅为 7.5 分钟, 而在

弱碱性 (pH 8.0) 介质中, HSF 释放铁的全过程所需的时间却要 23 分钟, 两者反应时间的比值为 1:3。此外, 图 1 结果表明, 当反应介质的 pH 值分别为 6.5 和 8.0 时, HSF 释放铁的总平均速率分别为 $332 \text{ Fe}^{3+} / \text{HSF} \cdot \text{min}$ 和 $73 \text{ Fe}^{3+} / \text{HSF} \cdot \text{min}$, 前者释放铁的速率比后者释放铁的速率快 4.6 倍。可见, 反应介质中 H^+ 加快 HSF 释放铁的速率, 而 OH^- 却减缓 HSF 释放铁的速率, 这一现象与早期 Funk^[13] 曾报道在不同的 pH 介质中, HSF 释放铁的结果及规律很相似。然而, 如把图 1 结果分别代入零级、一级或二级的反应动力学方程, 其结果均无法获得一条以用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, 虽然在不同弱酸和弱碱介质中, HSF 释放铁的速率不同, 但它释放铁的动力学全过程仍然呈复杂混合级反应。这一现象说明了 HSF 释放铁过程中呈混合级的现象与释放铁的速率高低无关。

2.2 不同铁核结构对 HSF 释放铁核表层铁的影响
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 是一种具有双电子供体的强还原剂, 它以 1/2 级快速方式参与铁蛋白释放铁的反应, 其铁核中 Fe^{2+} 离子形成量与 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 消耗量成对应的正比关系^[9]。因而可推导如下动力学方程:

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

$[\text{HSF}(\text{Fe}_m^{2+})_{\max}]$ 表示 HSF 释放铁全过程总铁量。 T_{\max} 是指 HSF 释放铁全过程所需的反应时间。 T_t 表示 HSF 释放一定铁量 ($m\text{Fe}^{2+}$) 所需的反应时间。 $[\text{HSF}(\text{Fe}_m^{2+})_t]$ 表示在一定的反应时间内 HSF 释放铁的含量。 K 表示 HSF

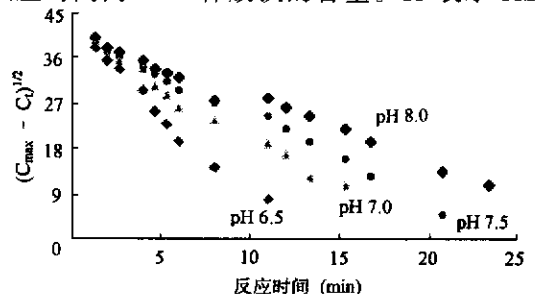


图 2 $(C_{\max} - C_t)^{1/2}$ 对时间作图

释放铁的速率常数。

多次实验结果已肯定,当不同铁核结构的 HSF 分别释放占各自原铁核总铁量 20% 的铁时,其释放铁的速率明显不同。在酸性介质中,HSF 释放铁的速率明显高于在碱性介质。如把结果分别代入方程[1],即可得出图 2 结果。从图 2 结果可看出,HSF 释放铁核表层的铁时,其释放铁速率 $[(C_{max} - C_t)^{1/2}]$ 与反应时间成对应的线性关系,均未出现转折点和反应级数的转换。可见,铁蛋白释放铁核中部分铁时,其动力学过程呈一定的规律性。但是,HSF 释放铁的速率高低仍然与铁核结构和铁核中的 pH 有关(其 pH 值与反应介质的 pH 相同)。

2.3 不同铁核结构对铁蛋白释放铁速率的影响 当不同铁核结构的 HSF 分别释放占原铁核总铁量 10% 和 20% 的铁时,并把所获得速率分别代入方程[1],即可求出 HSF 释放铁的速率常数(K)。如用纵座标表示速率常数(K)和以横座标表示 pH 作图时,即获得图 3 结果。从表 1 结果可看出,随着反应介质递增,铁核中的磷铁比也随之递增。因而,从图 3 结果进一步分析可知,随着整体铁核结构中的铁磷比值递增,HSF 释放铁的速率常数(K)逐渐降低,K 值递减率和铁核中的 pH 值增加量的变化趋势呈对应线性关系。

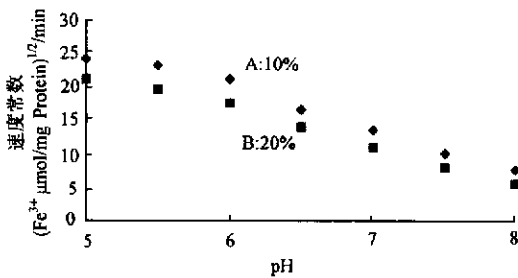
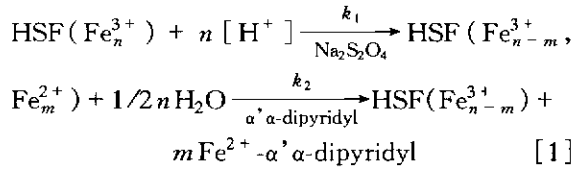


图 3 不同 pH 影响 HSF 释放铁的速度常数

2.4 建立 H⁺ 参与 HSF 释放铁动力学方程

根据 Harrison 提出铁蛋白释放铁的动力学模型^[1]和图 1~3 的结果,可认为当加入等量 Na₂S₂O₄ 和 α'-α-联吡啶时,不同铁核结构的 HSF 释放相同铁量的过程,可遵循如下反应:



根据题意和方程[1],即可得出 H⁺ 参与 HSF 释放铁动力学方程:

$$\frac{d\{\text{HSF}(\text{Fe}_n^{3+-m}, \text{Fe}_m^{2+})\}}{dt} = k_3 \{\text{HSF}(\text{Fe}_n^{3+})\} [\text{H}^+]^n \quad [2]$$

k₃ 表示不同铁核结构的 HSF 释放铁的速率常数。n 表示 H⁺ 参与 HSF 释放铁动力学反应级数。{HSF(Fe_n³⁺)} 表示 HSF 蛋白浓度。但当 HSF 参与释放铁反应时,只有 HSF 铁核中的铁浓度不断地减少,HSF 蛋白壳的浓度始终不变,因而可认为 {HSF(Fe_n³⁺)} 为常数,

$$N = \frac{\text{pH}_2}{\text{pH}_1} \lg \frac{k_{\text{pH}_2}}{k_{\text{pH}_1}} \quad [3]$$

k₃{HSF(Fe_n³⁺)} 可用 k 表示。根据结果和条件,对方程[2]进行积分、简化后,可得动力学方程[3],方程[3]中所列出的 k_{pH₁} 和 k_{pH₂} 分别表示相对应 pH 的 HSF 释放铁的速度常数。把图 3 结果代入方程[3],可获得 N = 1/2,则表明 H⁺ 以 1/2 级的方式参与 HSF 释放铁核表层的铁。

2.5 磷酸盐对 H⁺ 参与 HSF 释放铁的反应级数的影响 实验结果表明,外加磷酸盐能强烈地抑制 HSF 释放铁的速率,其抑制强度在酸性区明显高于碱性区。然而,尽管外加磷酸盐能强烈抑制 HSF 释放铁的速率,但并不能转化 HSF 释放铁的反应级数,其机理仍有待于进一步研究。

3 讨论

早期的研究已表明,铁蛋白释放铁的动力学性质均呈复杂化,其原因与铁蛋白的复杂铁结构有关^[13]。然而,从图 1~3 结果分析得出,虽然不同铁核结构、外加磷酸盐能直接影响 HSF 释放铁的速率,但并不能改变反应级数。这一现象说明了 HSF 所呈现的复杂动力学规

律可能与复杂的铁核表层结构无关,却与蛋白壳构象及调节能力有关。因而,迫使不同铁核结构的铁蛋白以不同的速率和相同的反应级数释放铁核表层的铁^[14,15]。

根据 Harrison 提出 HSF 释放铁的模式结构分析可知^[1], $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 只能通过浓度扩散方式穿过铁蛋白的蛋白壳隧道进入铁核中,并以 1/2 级的方式参与铁蛋白铁的还原和释放。从表面现象分析可知, H^+ 的作用是迫使 HSF 释放一定的铁量、构建不同的铁核结构及引起释放铁速率差异。但实际上,释放铁的速率差异的起因很可能与 H^+ 直接作用于蛋白壳的物质交换隧道有关,从而使 HSF 适当地调节了隧道宽度,加速了 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的扩散速率,产生了 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的扩散速率与 H^+ 浓度成对应正比关系及与 OH^- 浓度成反比关系的结果,并引起了铁核中的 Fe^{3+} 被还原速率递增,最终达到释放铁速率与 H^+ 浓度成对应的正比关系。因此可认为, H^+ 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 一样均也以 1/2 级的方式参与铁蛋白释放铁的全过程。铁蛋白蛋白壳的自身调节能力对限制释放速率起着关键的作用,并受环境因素强烈地制约,铁核表层的复杂磷铁结构对释放铁及储存其它过渡重金属离子起着辅助性作用^[16]。

参 考 文 献

- [1] Harrison, P. M., T. G. Hoy, I. G. Macara *et al.* Ferritin iron uptake and release. *Biochem. J.*, 1974, **143**: 445 ~ 451.
- [2] Chasteen, N. D., P. M. Harrison. Mineralization in ferritin: An efficient means of iron storage. *Journal of Structural Biology*, 1999, **126**: 182 ~ 194.
- [3] Meldrum, F. C., B. R. Heywood, S. Mann. Magnetoferitin: *In vitro* Synthesis of a novel magnetic protein. *Science*, 1992, **257**: 522 ~ 523.
- [4] Yang, X. K., Y. Chen-Barrett, P. Arosio *et al.* Reaction paths of iron oxidation hydrolysis in horse spleen and recombinant human ferritins. *Biochemistry*, 1999, **37**: 9 743 ~ 9 750.
- [5] Harrison, P. M., P. Arosio. Ferritins; Molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochem. Biophys. Acta*, 1996, **1 275**: 161 ~ 203.
- [6] 黄河清, R. K. Watt, G. D. Watt *et al.* 马脾铁蛋白铁核表层特性. 厦门大学学报(自然科学版), 1993, **32**: 628 ~ 633.
- [7] Johson, J. L., M. Cannon, R. K. Watt *et al.* Forming the phosphate layer in reconstituted horse spleen ferritin and the role of phosphate in promoting core surface redox reactions. *Biochemistry*, 1999, **38**: 6 706 ~ 6 713.
- [8] Richards, T. D., K. R. Pitts, G. D. Watt. A kinetic study of iron release from *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1996, **61**: 1 ~ 13.
- [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. 动物学报, 1999, **45**(2): 170 ~ 177.
- [10] Watt, G. D., R. B. Frankel, D. Jacobs *et al.* Fe^{2+} and phosphate interaction in bacterial ferritin from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*, 1993, **31**: 745 ~ 758.
- [11] Huang, H. Q., R. K. Watt, G. D. Watt *et al.* Role of phosphate in Fe^{2+} binding to horse spleen ferritin. *Biochemistry*, 1993, **32**: 1 681 ~ 1 687.
- [12] Huang, H. Q., Q. M. Lin, B. Kong *et al.* Role of phosphate and kinetic characteristics of complete iron release from native pig spleen ferritin-Fe. *Journal of Protein Chemistry*, 1999, **18**: 497 ~ 504.
- [13] Funk, F., J. P. Lenders, R. R. Crichton *et al.* Reductive mobilization to apo and holo mammalian ferritin. *Eur. J. Biochem.*, 1985, **152**: 167 ~ 172.
- [14] 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, 1997, **43**(2): 170 ~ 177.
- [15] 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. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, **13**: 10 ~ 14.
- [16] 林庆梅, 乔玉欢, 黄河清. 铁蛋白反应器储存有毒金属离子的初步研究. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, **38**: 871 ~ 876.