

配体与金属硫蛋白反应动力学和机理研究

岳 晟 仲维清 张保林* 朱凌燕 唐雯霞

(南京大学配位化学国家重点实验室 南京 210093)

摘要 制备了 Cd_7Th , Zn_7Th , Pb_7Th , Hg_7Th , Bi_7Th 等一系列金属硫蛋白 (Thionein 简称 Th), 研究了它们与配体反应的动力学, 根据表观假一级反应速率常数, 提出了不同配体与金属硫蛋白反应的两种机理, 并且讨论了金属硫蛋白被 Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} 等重金属离子在体内诱导的不同形成行为.

关键词 金属硫蛋白, 动力学, 机理, 诱导

金属硫蛋白 (metallothionein, 简称 MT) 是一种富含半胱氨酸的低分子量金属结合蛋白. 大量研究表明, MT 参与体内若干重金属离子的解毒及某些必需元素的代谢过程^[1,2]. 研究硫蛋白与金属离子的结合, 以及配体与金属硫蛋白的作用对了解和阐明金属硫蛋白在细胞中的功能有重要意义^[3]. 其中以 DTNB, EDTA 与 Zn_7Th 作用研究报道较多^[4~7], 但对配体与其它金属硫蛋白的作用研究较少, 而 Hg^{2+} , Pb^{2+} 等重金属离子的中毒及解毒过程就涉及到硫蛋白与 Hg^{2+} , Pb^{2+} 的作用以及解毒剂-各种配体-与汞或铅硫蛋白的取代过程. 本文重点研究和报道了 EDTA 等配体与汞, 铅, 铋, 镉, 锌等金属硫蛋白体外作用的反应动力学及机理, 用所得结果讨论了有关体内金属硫蛋白诱导形成的不同行为.

1 实验

所有化学试剂均为 A.R., 生化试剂均为 G.R.. Sephadex G-50, G-25 均系 Pharmacia 产品, DEAE DE-52 为 Whatman 进口分装, 超滤膜 YM-1 (Cut off 1000Da) 和超滤器均为美国 Amicon 出品. 动力学实验在 UV-3100 紫外可见分光光度计 (日本 Shimadzu) 上进行, 数据用 Graphic 软件 (Golden Software) 线性拟合计算.

1.1 金属硫蛋白的合成

实验溶液均先经真空脱氧充氮, 全部操作都在氮气氛中进行. 按文献[8]方法用 ZnSO_4 诱导并分离纯化得 MT-2, HPLC 分析和巯基含量以及氨基酸组成测定的结果表明产物为高度均一的金属硫蛋白. 将 MT-2 溶于 $0.1\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 盐酸中, 10min 后经已用 $0.01\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 盐酸预平衡的 G-25 柱脱去 Zn^{2+} , 按 1:7 比例分别加入 Cd^{2+} , Zn^{2+} 离子, 用 $0.5\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris-base 滴定至 pH 7.4. 制备 Pb_7Th 时要用 HClO_4 代替 HCl , Bi_7Th 时则需将 BiCl_3 事先溶于 $0.4\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 盐酸中, 其余操作同上. 制备 Hg_7Th 时则是在 pH 7.4 按 7:1 的比例用 Hg^{2+} 置换 Zn_7Th 得^[9]. 所有产物均超滤 4 次, 稀释成 $8\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ MT 的 $0.05\text{mol} \cdot$

dm^{-3} Tris-HCl (或 HClO_4) 的溶液, pH 为 6.70. 根据 pH 1.0 时 apo MT 在 220nm 处吸收值来确定蛋白浓度 ($\epsilon_{220} = 47300 \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$)^[10], 等离子发射光谱 (ICP) 测定蛋白中金属和巯基的浓度. 结果表明所得金属硫蛋白均符合 M_7Th ($\text{M} = \text{Cd}, \text{Zn}, \text{Bi}, \text{Hg}, \text{Pb}$) 的组成.

1.2 金属硫蛋白和配体反应动力学

取 2.5mL MT 溶液于比色皿中密封, 注入 EDTA 等配体, 浓度为 $0.8 \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (混合后). 迅速混合均匀 (时间小于 4s), 在 18°C 测定 MT 特征吸收波长的吸光值随时间的变化. 其中 Cd_7Th 为 245nm, Zn_7Th 为 215nm^[11], Hg_7Th 为 303nm, Pb_7Th 为 265nm, Bi_7Th 为 250nm^[12]. 由于反应是按假一级反应条件进行的, 将 $\ln(A-A_\infty)$ 对时间 t 作图, 可以看到反应分两段进行 (图 1), 第二段可直接按假一级过程处理, 第一段还与 EDTA 浓度还有关.

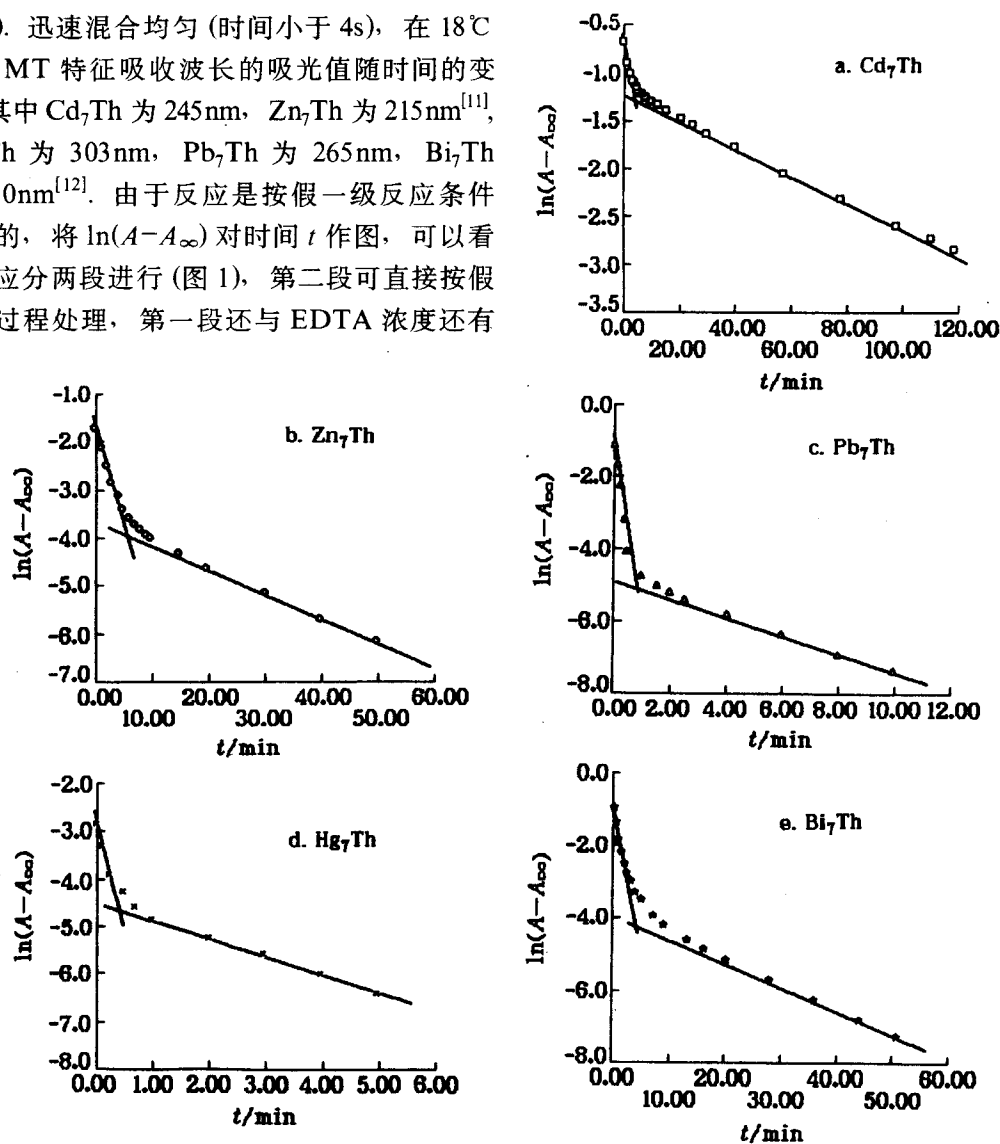


图1 MT 与 EDTA 反应动力学

MT 的浓度均为 $8 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, EDTA 浓度 $0.8 \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 18°C , $0.05 \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris-HCl (或 HClO_4), $0.1 \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl (或 HClO_4), pH 6.70 缓冲溶液

2 结果与讨论

2.1 EDTA 与金属硫蛋白的反应

EDTA 与各种 MT 反应的两段反应速率常数 k_I 和 k_{II} 均列于表 1. k_I 和 k_{II} 的顺序大体

为 $k_{\text{Pb}_7\text{Th}} > k_{\text{Hg}_7\text{Th}} > k_{\text{Bi}_7\text{Th}} > k_{\text{Zn}_7\text{Th}} > k_{\text{Cd}_7\text{Th}}$. 文献[7]曾通过监测 $\text{Cd}_5\text{Zn}_2\text{Th}$ 在 215nm 吸光

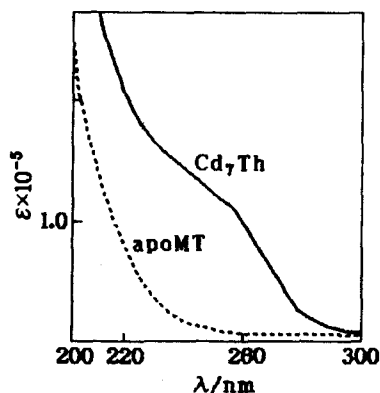


图2 Cd_7Th 及 apoMT 紫外可见吸收光谱图

表1 EDTA 与 MT 反应速率常数

	Cd_7Th	Zn_7Th	Bi_7Th	Hg_7Th	Pb_7Th
$k_I (\text{min}^{-1})$	0.0952	0.379	0.849	1.02	6.14
$k_{II} (\text{min}^{-1})$	0.0139	0.0529	0.0700	0.397	0.289

MT: $8 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; EDTA: $0.8 \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 18°C ; $0.05 \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris-HCl (或 HClO_4), pH 6.70 $0.1 \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl (或 KClO_4) 的缓冲溶液.

值变化来确定 Zn—S 键解离动力学, 但因 Cd—S 键在这一波长下也有很强的吸收 (见图 2), 这样测得的结果不能代表纯 Zn—S 键被 EDTA 取代反应的速率, 造成其反应速率常数有一定偏差. 由于 Cd_7Th 与 EDTA 反应速度比 Zn_7Th 与 EDTA 的反应速度要慢得多 (见表 1), 因而

文献[7]测得 Zn—S 与 EDTA 反应速率常数 ($k_I = 0.0335 \text{min}^{-1}$, $k_{II} = 0.0314 \text{min}^{-1}$) 和 Cd—S 与 EDTA 反应速率常数 ($k_I = 0.0296 \text{min}^{-1}$, $k_{II} = 0.0257 \text{min}^{-1}$) 相差无几, 而与本文直接由 Zn_7Th , Cd_7Th 与 EDTA 反应测得的结果相差甚远.

改变 EDTA 的浓度, 发现 k_I 随 EDTA 的浓度增加而变大, k_{II} 则没有明显变化 (表 2). Li T-Y 等^[6]发现 Zn_7Th 与 EDTA 反应时第一段反应遵循下式:

$$k_I = k'[\text{EDTA}] + k'' \quad (1)$$

k_{II} 也与 EDTA 浓度无关. 将表 2 中的 k_I 对 EDTA 浓度进行直线拟合 (图 3), 发现亦符合上式关系. 由此 EDTA 与 Pb_7Th 反应第一段速率常数表示为:

$$k_I = 1.971[\text{EDTA}] + 0.0325 \quad (2)$$

即 $k' = 1.971 \text{min}^{-1}$, $k'' = 0.0325 \text{min}^{-1}$.

表2 不同浓度 EDTA 与 Pb_7Th 反应速度常数

$c_{\text{EDTA}} (\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})$	0.3	0.5	0.7	1.0	1.5	2.0
$k_I (\text{min}^{-1})$	0.560	0.970	1.45	2.13	3.01	3.91
$k_{II} (\text{min}^{-1})$	0.342	0.349	0.358	0.360	0.371	0.351

Pb_7Th : $2 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; 缓冲溶液: $0.01 \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris- HClO_4 , $0.01 \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KClO_4 , 18°C .

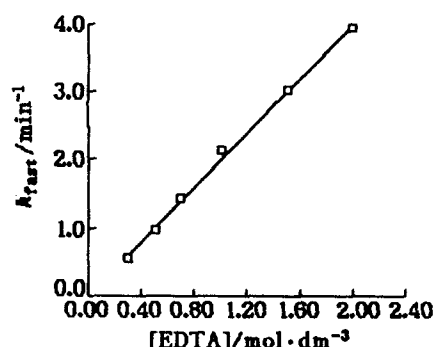
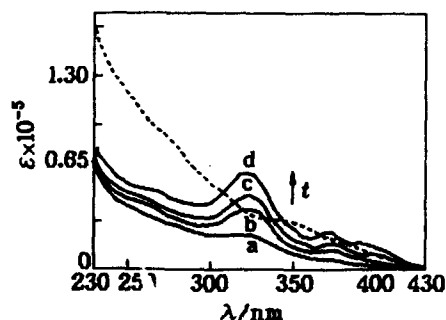


图3 Pb_7Th 与 EDTA 反应第一段反应速率常数对 EDTA 浓度的依赖关系
 Pb_7Th : $2 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 其余同前

由图 1a, b 可以看出, 第一段反应吸光值变化 ΔA 占整个反应的比例较小, 因而 EDTA 浓度的改变对平衡时间影响不大. 从图 1c 知 Pb_7Th 与 EDTA 反应时第一段的 ΔA 占整个反应 ΔA 的 70% 左右, 当溶液中 Pb_7Th 浓度为 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, EDTA 浓度为 $0.3 \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时, 整个反应的平衡时间约为 30min, 而当 EDTA 浓度骤增至 $2 \text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时, 平衡时间已锐减至 13min 左右. 由此可见 EDTA 浓度是影响 Pb_7Th 和 EDTA 反应平衡的重要因素.

2.2 Cys, GSH 和 Pb_7Th 反应

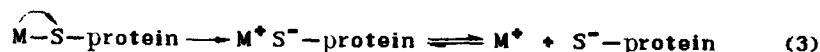
GSH, Cys 与 Pb_7Th 反应 (图 4), 在 326nm, 374nm, 400nm 处各出现了三个新峰. 以 $\ln(A-A_0)$ 对时间 t 作图同样发现反应分两段进行, 速率常数列于表 3. Cys 和 Pb_7Th 反应速率常数要大于 GSH 与 Pb_7Th 反应速率常数. 对于同一种配体来说, $k_I \gg k_{II}$, 与上面 EDTA 的反应显著不同.

图4 Cys 与 Pb₇Th 反应过程紫外光谱变化图

—— Pb₇Th; ——— 反应中间产物
 Pb₇Th: 8 μmol · dm⁻³; Cys: 8 mmol · dm⁻³,
 18℃, 缓冲液: 0.05 mol · dm⁻³ Tris-HClO₄,
 0.1 mol · dm⁻³ KClO₄, pH 6.70
 a—2min; b—5min; c—20min; d—90min

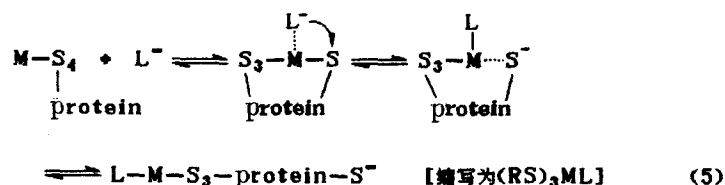
解离机理^[5].

MT 与配体反应的解离机理可表示为:



L(ligand) 表示 EDTA 等配体. 反应 (4) 速度较快, (3) 是速控步骤. M—S—protein 中 M—S 键的解离是单分子反应, 因而 MT 与 EDTA 反应时 k_{II} 都与 EDTA 的浓度无关. 至于第一段反应, 影响因素较多, 紫外区特征波长处的吸收除 M—S 键吸收外, 还包含了金属—硫簇吸收的贡献, 因而 k_I 不仅包含了金属—硫键的解离, 还包括了金属—硫簇在配体作用下的“崩解”. “崩解”是在配体作用下产生的, 因而 k_I 与 EDTA 浓度有着直接的关系. 式 (1) 中第 2 项 k'' 就表示金属—硫键的解离, 与 EDTA 浓度无关. 一般认为簇“崩解”的速度较快^[2], 因而式 (2) 中 $k' > k''$.

MT 与配体反应的缔合机理则表示为 (以 α 域为例)



其中 L(ligand) 是指含巯基的配体, 如 DTNB^[5] 等. 本文研究的 Cys-Pb₇Th 或 GSH-Pb₇Th 反应体系的光谱中 326nm, 374nm, 400nm 处出现的吸收峰就表明了新配合物 (RS)₃ML 甚至进一步的产物 (RS)₂ML₂ 的可能生成, 而 EDTA 等配体与 Pb₇Th 反应过程中就没有上述平衡产物出现, 因而也未观察到新的吸收峰生成.

缔合机理中, 反应的速控步骤是增加中心离子的配位数, 具有较大体积的配体由于位阻效应取代速率将大大减慢, 这也是缔合机理的一个显著特征. GSH 作为一个三肽, 位阻远大于单个氨基酸(Cys), 因而表 3 中 $k_{\text{GSH}} < k_{\text{Cys}}$. 相反, 由于解离机理中过渡态减少了配位数, 速控步骤为 M—S 键的断裂, 反应速率理论上不受外来配体位阻大小的影响. NTA, DTPA, EDTA 即是一组位阻各异的配体, 但它们与 Cd—S 反应速率常数却基本相同^[7].

表 3 GSH, Cys 和 Pb₇Th 反应速率常数

	Cys + Pb ₇ Th	GSH + Pb ₇ Th
k_I (min ⁻¹)	1.12	0.650
k_{II} (min ⁻¹)	2.63×10^{-3}	2.19×10^{-3}

Pb₇Th: 8 μmol · dm⁻³; 配件: 0.8 mmol · dm⁻³; 缓冲液:
 0.05 mol · dm⁻³ Tris-HClO₄, 0.1 mol · dm⁻³ KClO₄, pH 6.70,
 18℃, 326nm 监测.

2.3 反应机理

MT 的肽链较短, 只有 61 个氨基酸, 因而不以包埋两个金属—硫簇核, 金属结合位则基本是裸露的, 很容易受溶剂分子和配体进攻^[13]. 扩散作用不是影响反应速率的主要因素. MT 与各配体反应的机理大致可分为两类: 缔合机理和

2.4 MT 对重金属体内代谢的影响

MT 在金属离子体内代谢过程中所起的作用一直存在各种说法^[2], 各种金属离子对 MT 在体力的诱导合成的情况也不同, 这些问题均可以 MT 的动力学性质来解释. 已经发现, 用 Cd^{2+} 诱导兔时, 注射 24h 后即诱导体内金属硫蛋白浓度升到最大值^[14], 而用 Pb^{2+} 诱导时, 注射 6h 后鼠体内铅硫蛋白的含量即不再增加, 到 24h 时体内诱导得铅硫蛋白已基本消失, 所剩少量的 MT 中诱导元素铅的含量几乎为零, 主要为含锌硫蛋白^[15,16]. 这可从本文所测得的 MT 与配体取代反应的速率常数的大小顺序来解释. 生物体是一个多配体的体系, 由于金属硫蛋白中的 Cd^{2+} 被配体取代的速度最慢, 因而一经生成就可以在体内积累, 经过一昼夜后方才逐渐被取代消失. 而铅硫蛋白中 Pb^{2+} 被配体取代的速度很快, 生成后即会受到体内天然小分子配体如氨基酸, 多肽等的作用, 快速失去结合的金属, 使得失去金属的硫蛋白在体内很快降解^[9]. 到一昼夜时, 只剩下了少量主要含锌的金属硫蛋白. 同样的原因可以解释 Hg^{2+} , Bi^{3+} 等离子诱导 MT 生成能力较弱, 而且最后分离所得的少量 MT 中所含 Hg^{2+} , Bi^{3+} 较少, 反而 Zn^{2+} 等离子较多的结果^[17]. 此外, 金属硫蛋白可能并不是解毒过程中最后一个环节, Cd^{2+} 等离子仍要和其他配体或体外注射的促排药物-螯合剂结合, 通过体内循环排出.

参考文献

- 1 I. Bremner, *Experientia Suppl.*, **1987**, 52, 81.
- 2 J.H.R. Kagi, Y. Kojima (Eds.), "Metallothionein-II", Birkhauser, Basel, **1987**.
- 3 J.D. Otvos, D.H. Petering, C.F. Shaw, *Comment Inorg. Chem.*, **1989**, 9(1), 1.
- 4 M. Savas, D.H. Petering, C.F. Shaw, *Inorg. Chem.*, **1991**, 30(3), 581.
- 5 Li T-Y, D.T. Minkel, *Biochem. J.*, **1981**, 193, 441.
- 6 Li T-Y, A.J. Kraker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1980**, 77(11), 6334.
- 7 Huang Z-X, Hu H-Y, Gu W-Q, *Chinese J. Chem.*, **1992**, 10(6), 508.
- 8 J.H.R. Kagi, M. Vasak, *J. Biol. Chem.*, **1974**, 249, 3535.
- 9 K.B. Nielson, C.L. Arkin, D.R. Winge, *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260(9), 5342.
- 10 R.H.O. Buhler, J.H.R. Kagi, "Metallothionein", Ed. by J.H.R. Kagi, Birkhauser, Basel, **1979**, p. 210.
- 11 M. Vasak, *Biochem. J.*, **1981**, 20, 2852.
- 12 W. Bernald, M. Good, *Inorg. Chim. Acta*, **1983**, 79(B7), 154.
- 13 M. Vasak, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 3953.
- 14 L.R. Beach, R.O. Palmiter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1981**, 78, 2110.
- 15 H. Ikebuchi, R. Teshima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1986**, 136(2), 535.
- 16 H. Ikebuchi, R. Teshima, *Biochem. J.*, **1986**, 233, 541.
- 17 R.O. Palmiter, *Experientia Suppl.*, **1987**, 52, 63.

Kinetics and Mechanism Studies of Reaction of Metallothionein with Some Ligands

YUE Sheng ZHONG Wei-Qing ZHANG Bao-Lin* ZHU Ling-Yan TANG Wen-Xia

(Coordination Chemistry State Key Laboratory, Nanjing University, Nanjing, 210093)

Abstract Cd_7Th , Zn_7Th , Bi_7Th , Hg_7Th and Pb_7Th have been prepared, and the kinetics of reactions of these five MTs with varied ligands were discussed. From the observed pseudo-first order rate constants, two possible mechanism were determined respectively. The reason of induction behaviors of varied heavy metal ions *in vivo* also was suggested on the basis of above results.