

Zn(II)、Mn(II)竞争结合人血清蛋白研究*

Studies of Competitive Binding for Human Serum Albumin between Zn(II) and Mn(II)

王卓渊,沈星灿,闫海刚,梁宏**

WANG Zhuo-yuan, SHEN Xing-can, YAN Hai-gang, LIANG Hong**

(广西师范大学药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室,广西桂林 541004)

(Key Laboratory for Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, Ministry of Education, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi, 541004, China)

摘要:用平衡透析法在生理 pH 值(7.43)条件下,研究了等摩尔比的 Zn(II)与 Mn(II)离子竞争结合人血清白蛋白(HSA)。Scatchard图分析表明,Zn(II)与 Mn(II)在 HSA中没有共同的强结合位点,在竞争和非竞争结合时,Zn(II)的强结合位点数目均为 1, Mn(II)的强结合位点数目均为 2 Hill图分析说明 Zn(II)与 Mn(II)之间具有一定的正协同效应。

关键词: 锌(II) 锰(II) 血清白蛋白 竞争结合 协同效应

中图分类号: O657 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2009)02-0170-04

Abstract Equilibrium dialysis was used to investigate the competition binding for human serum albumin (HSA) between equimolar Zn(II) and Mn(II) ions at physiological pH(7.43). The results of Scatchard plots indicated that HSA possesses two strong binding sites for Mn(II), and one strong binding site for Zn(II). The competitive bindings have no insignificant effect on the number of strong binding sites for Zn(II) and Mn(II), which suggested that there are not any common strong binding sites for Zn(II) and Mn(II) in HSA. Whereas, the competitive binding increased the number of weak binding sites of Zn(II) and Mn(II) in serum albumins. The analyses of Hill plots also showed that the cooperative effect existed between Zn(II) and Mn(II) ions during the process of competitive binding with HSA.

Key words Zinc(II), Manganese(II), serum albumin, competitive binding, cooperative effect

血清白蛋白是血浆中含量最高的蛋白质,能结合、载运和传送包括:金属离子、药物、激素、脂肪酸等多种内源和外源小分子^[1]。有关血清白蛋白与金属离子相互作用的研究一直受到人们的关注,例如: Zn(II)^[2-4]、Mn(II)^[5,6]、Cu(II)^[7,8]、Cd(II)^[8,9]等金属离子分别与人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)作用的简单体系已有广泛研究。由于生物体内同时存在着几十种微量元素,多种金属离子参与竞争结合生物大分子的反应广泛存在于生物体系中,如:金属元素在体内的传递、吸收、代谢,金属中毒的促

排,缺乏必需微量元素元素的补给治疗等,都涉及这一基本的反应。但是相关领域的研究才刚起步,有关两种金属离子竞争结合血清白蛋白的复杂体系研究鲜见报道^[8]。锌与锰都是生命必需元素,有关这两种金属离子同时竞争结合血清白蛋白的研究未有报道。本文用平衡透析法研究生理 pH 值条件下 Zn(II)与 Mn(II)离子竞争结合 HSA,发现 Zn(II)与 Mn(II)之间具有一定的协同效应。该研究能够为了解锌与锰的生理行为及其相互作用提供一些理论依据。

1 实验部分

1.1 试剂和方法

HSA购自华美生物工程公司,电泳纯,保鲜邮寄,用前未经进一步纯化,其它试剂均为分析纯。透析袋购自华美生物工程公司,用前经常规处理^[10]。所有溶液都用去离子水配制。pH值在 pHS-10A型精密酸度计上(上海,雷磁)测定。紫外-可见吸收光谱在

收稿日期: 2008-11-17

作者简介:王卓渊(1975-),男,硕士研究生,实验师,主要从事生物无机化学及配位化学研究。

* 国家自然科学基金项目(No. 29961001),广西壮族自治区教育厅项目(No.桂教科研[1998]334)及广西“十百千人才工程”项目(No.桂政发[1998]60)资助。

** : 通讯作者。

Varian-100型紫外-可见分光光度计上测定(美国, Varian)

1.2 研究方法

用 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl 及 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris-HCl 缓冲剂以保持相同的离子强度和生理 pH 值 7.43 ± 0.02 。MnCl₂ 和 ZnCl₂ 的浓度均用 EDTA 标定。HSA 溶液用前新鲜配制, 固定浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 用光度法测定^[11]。透析时间为 24h, 透析温度保持 $(20.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。MnCl₂, ZnCl₂ 浓度均取 20 个值, 在 $10^{-5} \sim 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 的范围内变化, 每个点至少平行做 2 次。用甲醛肟作为 Mn^{2+} 的显色剂, Zn^{2+} 不干扰 Mn^{2+} 的显色; 锌试剂作为 Zn^{2+} 的显色剂, 三乙醇胺作为 Mn^{2+} 的掩蔽剂, 用分光光度法测定透析平衡后未被结合 Zn(II) 和 Mn(II) 的浓度^[12, 13]。

对不同体系进行对比, 研究 Zn(II) 或 Mn(II) 与 HSA 的竞争结合平衡。首先, 将 Zn(II) 或 Mn(II) 分别与 HSA 平衡透析 24h, 研究 Zn(II) 与 Mn(II) 非竞争(单独)结合 HSA。其次, 将等摩尔浓度比的 Zn(II) 与 Mn(II) 混合后同时与 HSA 平衡透析 24h, 了解 Zn(II) 与 Mn(II) 同时竞争结合 HSA 的情况, 同时竞争结合的体系表示为 Mn(II)-Zn(II)。最后, 将等摩尔浓度比的 Zn(II) 与 Mn(II) 先后竞争结合 HSA, 首先选其中一种金属离子与 HSA 透析 24h, 再加入等量的另一种金属离子, 继续透析 24h 达到平衡。先后竞争结合的体系表示为: 先加入金属离子 [后加入的金属离子]。

2 结果与分析

2.1 Zn(II) 与 Mn(II) 竞争结合 HSA 的结合部位及结合数目

将 Zn(II) 与 Mn(II) 同时竞争结合 HSA 所得到的饱和曲线与相同条件下 Zn(II) 或 Mn(II) 非竞争(单独)结合 HSA 所得的结果对比(图 1)可以发现, 不论是 Zn(II), 还是 Mn(II), 其竞争结合 HSA 的饱和曲线始终在它们非竞争(单独)结合 HSA 的饱和曲线上方。这表明 Zn(II)、Mn(II) 同时存在时, 能相互促进对 HSA 的结合能力。

为了分析 Zn(II) 与 Mn(II) 在 HSA 上结合位点的类型和数目, 由平衡透析结果, 作 Scatchard 图^[14]如图 1 所示。图 1 结果显示的数据点可拟合为斜率大和斜率小的两种直线, 与横坐标的交点分别代表了强结合位点和弱结合位点, 由图 1 的数据拟合可得表 1 的结果, 表明两种金属离子在 HSA 均有强弱两类结合位点; Zn(II) 在非竞争(单独)结合 HSA 时, 有 1 个强结

合位点, 而与 Mn(II) 竞争结合 HSA 时, 表现出有 1 个强结合位点。Mn(II) 在非竞争(单独)结合 HSA 时, 表现出 2 个强结合位点, 而与 Zn(II) 竞争结合 HSA 时, Mn(II) 仍有 2 个强结合位点。图 2 显示, 两种金属离子竞争结合时的趋势线始终在非竞争结合的上方, 这说明竞争结合使 Zn(II) 与 Mn(II) 的弱结合位点数略有增加。其结果如表 1 所示。

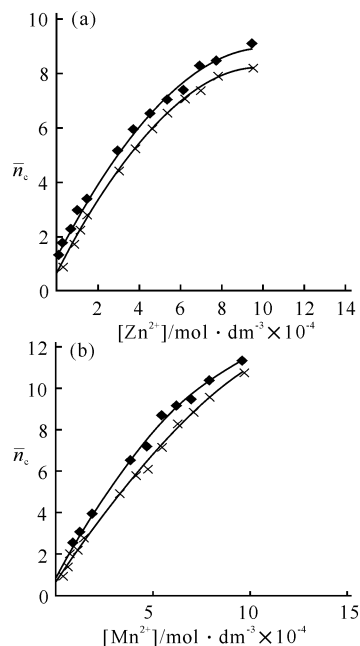


图 1 Zn(II) 与 Mn(II) 同时竞争结合和非竞争结合 HSA 的饱和曲线

Fig. 1 Saturated curves of Zn(II) and Mn(II) ions competitive binding and non-competitive binding for HSA

(a) Zn(II), (b) Mn(II).

—◆—: 竞争结合; -×-: 非竞争结合。

—◆—: Competing for binding; -×-: Non-competitive binding.

为了进一步了解竞争结合对结合位点的影响, 改变平衡透析中加入金属离子的顺序, 首先仅用一种金属离子与 HSA 透析, 达到结合平衡后, 再加入等量的另一种金属离子, 在其它实验条件不变的情况下, 与血清白蛋白继续透析达到结合平衡。按上述方法, 用 Scatchard 图分析 Zn(II) 与 Mn(II) 分别先后竞争结合 HSA 所表现出的强结合位点及其数目(表 1) 仍然不变: Zn(II) 的强结合位点数为 1, Mn(II) 的强结合位点数为 2。而表 1 也表明, 在同时竞争结合或先后竞争结合能使 Zn(II) 或 Mn(II) 的弱结合位点数都略有增加。

上述研究结果表明, 竞争结合并不改变这两种金属离子的强结合位点数, 由此可以推测, Zn(II) 与 Mn(II) 在 HSA 中并没有共同的强结合位点, 它们各自有着特定的强结合位点。

Zn(II) 单独结合 HSA 表现出 1 个强结合部位,

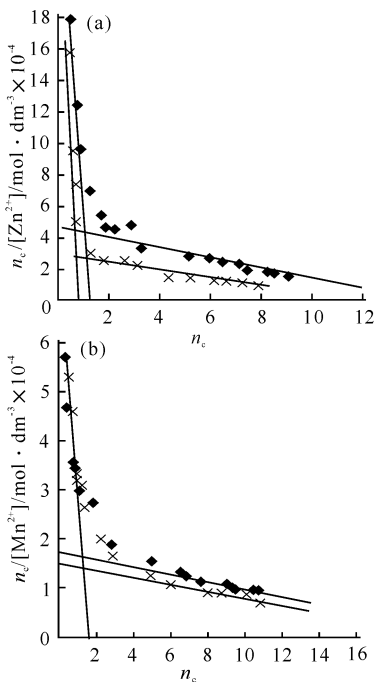


图 2 Zn(II)与 Mn(II)同时竞争结合和非竞争结合 HSA 的 Scatchard 图

Fig. 2 Scatchard plots of (a) Zn(II) and (b) Mn(II) ions competitive binding and non-competitive for HSA

(a) Zn(II), (b) Mn(II).

—◆—: 竞争结合; -×-: 非竞争结合.

—◆—: Competitive binding; -×-: Non-competitive binding.

表 1 Zn(II)与 Mn(II)同时竞争结合和非竞争结合 HSA 的强弱结合点数目

Table 1 The number of strong and weak binding sites of Zn(II) and Mn(II) ions competitive and non-competitive for binding with HSA

| 体系 Systems | 金属离子 Metal ions | 数目 Number | |
|-----------------|--------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| | | 强结合位点 Strong binding sites | 弱结合位点 Weak binding sites |
| Mn(II) | Mn(II) | 2 | 18 |
| Mn(II)-Zn(II) | | 2 | 20 |
| Mn(II) [Zn(II)] | | 2 | 22 |
| Zn(II) [Mn(II)] | | 2 | 19 |
| Zn(II) | Zn(II) | 1 | 9 |
| Mn(II)-Zn(II) | | 1 | 13 |
| Mn(II) [Zn(II)] | | 1 | 12 |
| Zn(II) [Mn(II)] | | 1 | 15 |

可能位于 Site A, Zn(II)以四面体构型主要与 2~ 3 个 His 咪唑基氮, 以及 1 个羧基氧进行配位^[15]. Mn(II)单独结合 HSA 表现有 2 个结合位点, 1 个位于 N 端三肽段(天冬氨酸-丙氨酸-组氨酸, 即: Asp¹-Ala²-His³-), Mn(II)以四方锥或平面四方构型与 Asp 的 -NH, Ala 和 His 的去质子胺氮, His 的咪唑基氮和 Asp 上的羧基氧进行配位; 另 1 个位置在 Site B, 其配位原子可能全是氧, 至多 1 个氮^[6]. 对于同为第一过渡系的两价金属离子 Zn(II)与 Mn(II), 在 HSA 上各

有特定的强结合位点, 没有共同的强结合位点. 这可能是由于 Mn(II)为硬酸, 而 Zn(II)为软硬交界酸^[16], 它们的靶向配位原子、配位习性都存在区别.

2.2 Zn(II)与 Mn(II)竞争结合 HSA 的协同效应

无论 Zn(II)与 Mn(II)是同时竞争结合, 还是先后竞争结合 HSA, 共存使它们的弱结合位点数均有增加. 令人感兴趣的是, 这是否提示, Zn(II)与 Mn(II)能相互促进, 提高对血清白蛋白的结合能力, 具有较为少见的协同效应. Hill 图可以定量分析具有多个结合位点的分子中各结合位点之间的协同性^[17].

Hill 方程为: $\log [Y/(1-Y)] = h \log [M^{2+}] - \log K$, 式中, Y 为 HSA 结合金属离子 $[M^{2+}]$ 的饱和分数, $Y = n/n_{\text{总}}$, $n_{\text{总}}$ 为白蛋白结合 Zn(II)或 Mn(II)的总数. 根据表 1 所列结果, 在竞争结合中, 对 Zn(II), HSA 体系取 $n_{\text{总}} = 14$; 对 Mn(II), HSA 体系取 $n_{\text{总}} = 22$. Hill 系数 h 是曲线各部分的斜率, 它是各结合位点之间协同性的测量. h 愈大, 则正协同性愈强, h_{max} 取曲线的最大斜率值. 若 $h = 1$, 无协同性, $h < 1$, 有负协同性 (即拮抗性), $h > 1$, 有正协同性.

图 3 是生理 pH 值条件下, Zn(II)与 Mn(II)同时竞争结合 HSA 的 Hill 图. 通过曲线分段分析, h_{max} 取其中最大斜率值, 计算结果为: Zn(II)单独结合 HSA 时, $h_{\text{max}} \approx 0.89$, 与 Mn(II)竞争结合 HSA 时, $h_{\text{max}} \approx$

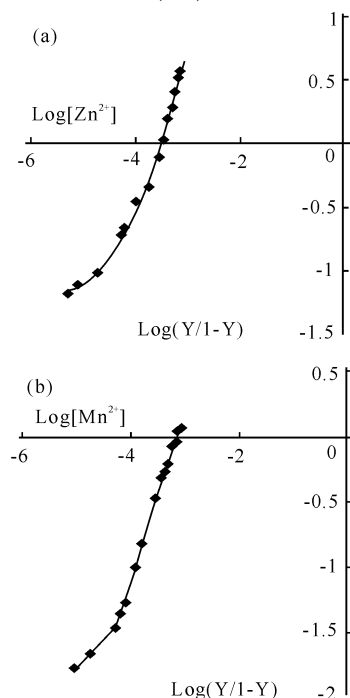


图 3 Zn(II)与 Mn(II)同时竞争结合 HSA 的 Hill 图

Fig. 3 Hill plots of Zn(II) and Mn(II) ions competitive binding with HSA

(a) Zn(II), (b) Mn(II).

1. 23 Mn(II) 单独结合 HSA 时 $h_{\max} \approx 1.2$, 与 Zn(II) 竞争结合 HSA 时 $h_{\max} \approx 1.6$ 由以上结果可发现, Zn(II) 单独结合血清白蛋白, $h_{\max} < 1$, 无协同效应, 而与 Mn(II) 竞争结合时, $h_{\max} > 1$, 表现为正协同效应 Mn(II) 单独结合血清白蛋白有协同效应, 与 Zn(II) 竞争结合时, h_{\max} 增大, 协同效应更为明显. Zn(II) 、 Mn(II) 竞争结合 HSA 的 h_{\max} 值比它们单独结合白蛋白的 h_{\max} 值明显要大, 由此说明 Zn(II) 与 Mn(II) 之间具有协同效应. 推测这是由于位于白蛋白内部的强结合位点 Site A 与 Site B 分别与 Zn(II) 、 Mn(II) 结合后, 可能会引起白蛋白构象发生变化, 使原来包在 HSA 分子疏水腔内部潜在的结合位点外露, 导致这两种金属离子对弱结合位点结合增加.

3 结论

Zn(II) 与 Mn(II) 在竞争和非竞争结合 HSA 时, 强结合位点数不变, 分别为 1 和 2 个. 竞争结合使这两种金属离子的弱结合位点数略有增加. 逐级稳定常数增大, 结合能力增强. Hill 图分析也说明, Zn(II) 与 Mn(II) 竞争结合 HSA 时, 具有一定的协同效应. 相关原因还有待于进一步的研究.

参考文献:

- [1] He X M, Cater D C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin [J]. Nature, 1992, 358: 209-215.
- [2] Yang Z H, Xie C S. Zn^{2+} release from zinc and zinc oxide particles in simulated uterine solution [J]. Colloids and Surfaces, Colloids Surf B Biointerfaces, 2006, 47(2): 140-145.
- [3] André C, Guillaume Y C. Zinc human serum albumin association: testimony of two binding sites [J]. Talanta, 2004, 63: 503-508.
- [4] Sadle P J, Viles J H. ^1H and ^{113}Cd NMR investigations of Cd^{2+} and Zn^{2+} binding sites on serum albumin competition with Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} [J]. Inorg Chem, 1996, 35(15): 4490-4496.
- [5] Budak H. Water proton relaxation rate enhancements and

association constants for Mn(II) to serum proteins determined by NMR T1 measurements [J]. Z Naturforsch, 2005, 60(9-10): 807-812.

- [6] Liang H, Tu C Q, Zhang H Z. Binding equilibrium study between Mn(II) and HSA or BSA [J]. Chinese J Chem, 2000, 18(1): 35-41.
- [7] Rozga M, Sokolowska M, Protas A M. Human serum albumin coordinates Cu(II) at its N-terminal binding site with 1 pM affinity [J]. J Biol Inorg Chem, 2007, 12(6): 913-918.
- [8] 梁彦秋, 刘婷婷, 费洪博, 等. 荧光光谱和紫外光谱法研究 Cu(II) 、 Cd(II) 与血清白蛋白的作用 [J]. 分析科学学报, 2007, 23(3): 303-306.
- [9] 涂楚桥, 张宏志, 梁宏. Cd(II) 与 HSA 或 BSA 的结合平衡研究 [J]. 化学学报, 2000, 58(2): 229-234.
- [10] Liang H, Xing B G, Wang X J, et al. Equilibrium dialysis study on the interaction between Cu(II) and HSA or BSA [J]. Chinese Science Bulletin, 1998, 43(5): 404-408.
- [11] Edward F B, Rombauer R B, Campbell B J. Thioldisulfide interchange reactions between serum albumin and disulfides [J]. Biochim Biophys Acta, 1969, 194(1): 234-245.
- [12] Marzenko A. 元素的分光光度测定 [M]. 北京: 地质出版社, 1983: 297-299.
- [13] 张孙伟, 吴水生, 刘绍璞. 有机试剂在分析化学中的应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1981: 246-248.
- [14] Scatchard G, Scheinberg I H, Howard S, et al. Physical chemistry of protein solutions IV: The combination of human serum albumin with chloride ion¹ [J]. J Am Chem Soc, 1950, 72(1): 535-540.
- [15] Sadler P J, Viles J H. ^1H and ^{113}Cd NMR investigations of Cd^{2+} and Zn^{2+} binding sites on serum albumin. Competition with Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} [J]. Inorg Chem, 1996, 35(15): 4490-4496.
- [16] Lippard S J, Berg J M. 生物无机化学原理 [M]. 席振峰, 姚光庆, 项斯芬, 等译. 北京: 北京大学出版社, 2000: 14-15.
- [17] Fersht A. 酶的结构和作用机制 [M]. 杜锦珠, 茹柄根, 卫新成, 等译. 北京: 北京大学出版社, 1991: 292.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 169 页 Continue from page 169)

法有如下优点: (1) 对相同大小的滤窗口, 该算法比中值滤波、自适应中值滤波能滤除密度更大的噪声; (2) 小滤波窗口使滤波后图像保留和还原了更多的细节信息; (3) 虽然该算法的 GetMedian() 函数比自适应中值滤波算法多了同值压缩过程, 算法复杂度为 $O(n^2) + O(n)$, 但是, 采用同值压缩的方法, 较小的滤波窗口就能滤除密度更大的噪声, 提高了滤波速度.

参考文献:

- [1] Ptas I, Venetsanopou A N. Nonlinear digital filters principles and application [M]. Norwell, MA: Kluwer, 1990.
- [2] Gonzalez R C, Woods R E. Digital image processing [M]. 第二版. 北京: 电子工业出版社, 2002.
- [3] 胡旺, 李志蜀, 黄奇. 基于双窗口和极值压缩的自适应中值滤波 [J]. 中国图象图形学报, 2007, 12(1): 43-50.
- [4] 王勋, 毕笃彦. 一种变分自适应中值滤波算法 [J]. 计算机应用, 2006, 26(9): 2059-2062.

(责任编辑: 尹 闯)