

Pb²⁺对胰蛋白酶活性影响的作用机理研究洪法水^{*1} 王玲² 吴康¹ 王雪峰¹ 刘超¹ 陶冶³⁽¹⁾ 苏州大学生命科学院, ⁽²⁾ 图书馆, 苏州 215006)⁽³⁾ 中国科学院高能物理研究所同步辐射实验室, 北京 100039)

在胰蛋白酶介质中加入 Pb²⁺, 研究其对胰蛋白酶活性影响的作用机理。结果表明低浓度的 Pb²⁺ 对酶有激活作用, 高浓度则严重抑制酶活性。在高浓度下, Pb²⁺ 能完全竞争出胰蛋白酶中的 Ca²⁺ 而结合到了胰蛋白酶上, 其 EXAFS 的测试表明 Pb²⁺ 与多肽链氨基酸残基上的氨基或羧基发生了配位, 配位数为 2, Pb-N 或 Pb-O 键长为 0.241 nm。圆二色谱测试表明高浓度的 Pb²⁺ 结合使胰蛋白酶的二级结构被破坏, α -螺旋含量、 β -转角及无规则卷曲下降, β -折叠增加, 因而使酶失去活性。

关键词: 胰蛋白酶 Pb²⁺ 酶活性 EXAFS 二级结构
分类号: O614.43+3 Q599

铅是环境重金属污染中最主要的元素之一, 且有日益加剧的趋势。有关铅与人类健康的问题早已引起人们的广泛关注。铅可通过各种途径进入生物体内, 导致代谢紊乱, 严重影响生物体的生长发育。诸多研究表明 Pb²⁺ 对各种酶的活性有明显的影[1-7]。牛胰蛋白酶是一种含 Ca²⁺ 蛋白酶, 含有 1 个 Ca²⁺, 其 k_a 值为 $11 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 它催化蛋白质的水解反应[8]。我们以往的研究表明 Cd²⁺、Hg²⁺ 对萌发种子的 α -淀粉酶、蛋白酶等活性有明显的抑制作用[9-11], Ce³⁺、Cd²⁺、Pb²⁺ 等低浓度重金属离子对猪胰 α -淀粉酶、核糖核酸酶有激活作用, 高浓度则严重抑制酶活性。在高浓度下, Ce³⁺、Cd²⁺、Pb²⁺ 能完全竞争出 α -淀粉酶、核糖核酸酶中的 Ca²⁺。荧光滴定表明 Ce³⁺、Cd²⁺、Pb²⁺ 不仅可完全占据 Ca²⁺ 的结合位点, 而且还可在 Ca²⁺ 结合位点以外的氨基酸残基上结合, 从而推测酶的构象发生改变[12-14]。但是高浓度的重金属离子为什么抑制酶活性, 又是如何结合到酶上, 结合后对酶的二级结构有无影响等尚缺乏有力的证据, 尤其是 Pb²⁺ 与胰蛋白酶的作用关系研究尚不够深入。扩展 X 射线吸收精细结构光谱 (Extended X-ray Absorption Fine Structure, EXAFS) 是研究金属离子在生物大分子中配位环境的一种强

有力工具, 有关 Mo、Fe、Zn、Cd、Cu 等重金属离子在金属蛋白和酶中的 EXAFS 研究自 20 世纪 70 年代以来已有许多报道[15-21], 而圆二色 (CD) 谱则可以灵敏地反映出蛋白质溶液构象的变化, 在蛋白质结构研究中也已得到广泛应用。

基于上述原因, 本文在以往工作的基础上研究 Pb²⁺ 对胰蛋白酶活性的影响, 并利用 EXAFS 研究 Pb²⁺ 结合后在酶中的配位环境, 利用 CD 谱探讨 Pb²⁺ 结合后对酶结构的破坏情况, 这些均旨在进一步揭示重金属离子在生物体内的分子作用机制。

1 实验部分

1.1 仪器和材料

仪器: UV2100-紫外可见分光光度计 (日本岛津); ICP-96B 型高频等离子体发生器 (ICP-AES, 美国产); JASCO-J-500C 圆二色仪 (日本分光); 透析袋 (8000 ~ 12000) (美国产); 可调移液管 (5 ~ 25 μL , 5 mL)。

1.2 实验方法

1.2.1 金属离子溶液的配制

材料: 牛胰蛋白酶、酪蛋白为 sigma 产品, 其它试剂均为国产分析纯。

用双蒸去离子水配制 0 ~ 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的

收稿日期: 2002-07-23。收修改稿日期: 2002-08-31。

苏州大学人才引进基金资助项目 (No. Q3114102)。

* 通讯联系人。E-mail: hongfs_cn@sina.com

第一作者: 洪法水, 男, 42 岁, 博士, 教授; 研究方向: 生物无机化学。

CaCl_2 、 $\text{Pb}(\text{Ac})_2$, 并用 HCl 和 NaOH 调节以上溶液, 使其 pH 值均为 6。

1.2.2 牛胰蛋白酶的制备

将已纯化的牛胰蛋白酶溶解在 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液中, 使其浓度为 $5\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 置于 4°C 冰箱中备用。

1.2.3 金属离子对牛胰蛋白酶的激活反应

在 3mL, $1\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的牛胰蛋白酶溶液中分别加入 $5\mu\text{L}$ $0 \sim 60\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ca^{2+} 、 Pb^{2+} , 置于 4°C 冰箱中作用 24h 后, 用酚试剂法测定酶活性^[22]。

1.2.4 Pb^{2+} 与 Ca^{2+} 的竞争结合

在含有 Ca^{2+} 的牛胰蛋白酶溶液中分别加入 50, $60\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Pb^{2+} , 置于 4°C 冰箱中作用 24h, 酶液对 $2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 7.4 缓冲液透析 48h 后, 用 ICP-AES 检测酶液和缓冲液中 Ca^{2+} 和 Pb^{2+} 含量。

1.2.5 Pb^{2+} 竞争结合后的牛胰蛋白酶 EXAFS 测定

利用荧光 EXAFS 测试 Pb^{2+} 竞争结合后牛胰蛋白酶中 Pb^{2+} 的扩展 X 射线吸收精细结构光谱。 Pb^{2+} 试样的 L_3 边 (13055eV) 的 EXAFS 在北京同步辐射 XAFS 站 4W1B 光束线上测量, 储存环的电子能量为 2.2GeV, 单色器为平面双晶 Ge (V), 电流强度在 80 ~ 90mA 之间, 探测器采用充入 Ar 混合气的荧光电离室收集数据。数据分析采用英国 Daresbury 实验室开发的 EXCURV 92 软件包。

1.2.6 Pb^{2+} 竞争结合后的牛胰蛋白酶 CD 谱测定及二级结构计算

CD 谱使用 JASCO-J-500C 圆二色仪测定, 石英样品池的光程为 0.1cm, 灵敏度为 $2\text{mdeg} \cdot \text{cm}^{-1}$, 牛胰蛋白酶浓度为 $0.1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。测定波长范围为 195 ~ 250nm。CD 谱数据为三次扫描平均值。取酶的平均氨基酸残基分子量为 117, CD 强度以平均残基摩尔椭圆值 $[\theta]$ 表示, 单位为 $(^\circ) \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ 。采用 LINCOMB 处理 CD 谱数据, 以计算二级结构含量。该程序按照 Perczel 等人的方法, 并进行了改进^[23]。

2 结果与讨论

2.1 Pb^{2+} 对牛胰蛋白酶活性的影响

本实验在反应介质中以不加 Pb^{2+} 和 Ca^{2+} 为对照, 研究了不同浓度的 Pb^{2+} 和 Ca^{2+} 对牛胰蛋白酶的

影响, 如图 1 所示。 Pb^{2+} 在 $0.5 \sim 3\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度范围内, 随浓度增高, 牛胰蛋白酶活性显著增加, 增加幅度为 10.87% ~ 50.66%。但当 Pb^{2+} 浓度超过 $3\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 酶活性又急剧下降, 表现为明显的抑制作用。而 Ca^{2+} 在 $0 \sim 60\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内, 随其浓度增加, 酶活性逐渐提高, 尚未发生抑制现象。 Pb^{2+} 对牛胰蛋白酶活性的上述影响结果与前人及我们以前对其 α -淀粉酶、核糖核酸酶的研究结果基本相似^[9~14]。至于低浓度 Pb^{2+} 增加酶活性的原因尚还不能作出满意解释。而高浓度 Pb^{2+} 抑制酶活性则可能是 Pb^{2+} 完全占据了牛胰蛋白酶中 Ca^{2+} 的结合位点, 使酶的构象遭到破坏。

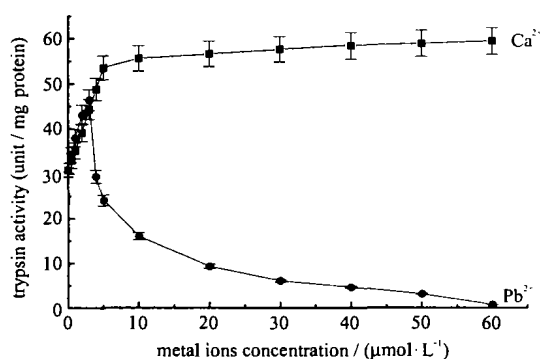


图 1 Pb^{2+} 和 Ca^{2+} 对牛胰蛋白酶的激活作用

Fig. 1 Effect of Pb^{2+} and Ca^{2+} on activation of trypsin

2.2 Pb^{2+} 与 Ca^{2+} 竞争结合

高浓度的 Pb^{2+} 使牛胰蛋白酶丧失了活性, 可能是 Pb^{2+} 与牛胰蛋白酶中的 Ca^{2+} 发生了竞争作用, 置换出 Ca^{2+} 。为了证实这种竞争作用, 实验在含有 Ca^{2+} ($3.33 \times 10^{-3}\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的牛胰蛋白酶溶液中分别加入了 $8 \times 10^{-3}\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \times 10^{-3}\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Pb^{2+} 溶液, Pb^{2+} 与牛胰蛋白酶作用后, 酶中 Ca^{2+} 含量为 $0\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而 Pb^{2+} 含量分别为 $5.94 \times 10^{-3}\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $6.48 \times 10^{-3}\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。表 1 结果说明 Pb^{2+} 不仅能完全置换出牛胰蛋白酶中的 Ca^{2+} 而占据其结合位点, 并同时在酶的其他部位还有结合。

表 1 Pb^{2+} 竞争后牛胰蛋白酶中 Ca^{2+} 和 Pb^{2+} 含量

Table 1 Ca^{2+} and Pb^{2+} Contents after Interaction of Pb^{2+} with Trypsin

Pb^{2+} treatment $\times 10^{-3}\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$[\text{Ca}^{2+}]/[\text{trypsin}]$	$[\text{Pb}^{2+}]/[\text{trypsin}]$
0	1.11	0.00
8	0.05	1.98
10	0.02	2.16

2.3 Pb^{2+} 竞争结合后的牛胰蛋白酶 EXAFS 谱

实验选择了 Pb^{2+} 竞争结合后已丧失活性的牛胰蛋白酶进行了 Pb 的荧光 EXAFS 谱的研究 (图 2)。由图 2 看出, 牛胰蛋白酶中有较强的 Pb 的 L_3 边吸收边谱, 表明牛胰蛋白酶中结合有 Pb^{2+} , 其吸收边形状表明 Pb 为二价。图 3 表示拟合结果, 对第一壳层用 N 或 O 原子拟合得 Pb^{2+} 是与 2 个 N 或 O 原子配位, Pb-N 或 Pb-O 键长为 0.241nm。这表明 Pb 是与牛胰蛋白酶多肽链氨基酸残基上的氨基氮或羧基氧发生了配位, 推测可能导致酶的构象改变, 因而酶失去活性。

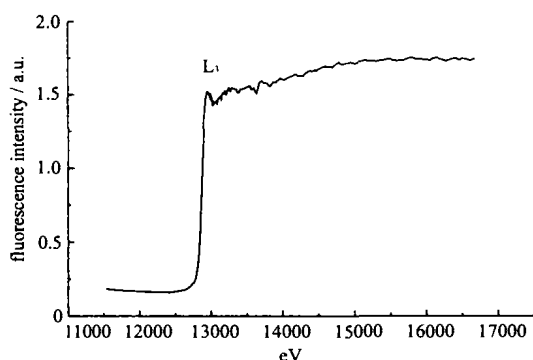


图 2 牛胰蛋白酶中 Pb^{2+} 的荧光扩展 X 射线吸收精细结构光谱

Fig. 2 Fluorescence extended X-ray absorption fine structure spectrum of Pb^{2+} in trypsin

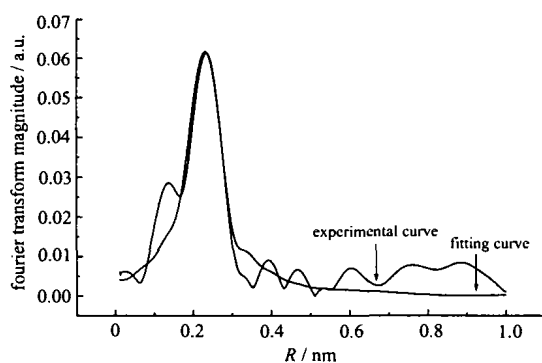


图 3 牛胰蛋白酶中 Pb^{2+} 的径向结构函数

Fig. 3 Radial distribution function Pb^{2+} in trypsin

2.4 Pb^{2+} 结合对牛胰蛋白酶二级结构的影响

为了进一步证实 Pb^{2+} 结合后对酶结构可能造成的影响, 实验选择 Pb^{2+} 结合后已丧失酶活性的牛胰蛋白酶进行了远紫外 CD 谱的测定, 以未加 Pb^{2+} 处理的、具高活性的酶为对照, 结果如图 4。由图 4 看出, 丧失酶活性的牛胰蛋白酶与对照的 CD 谱有明显的差异, 只表现出 209nm 的负峰, 且负吸收峰

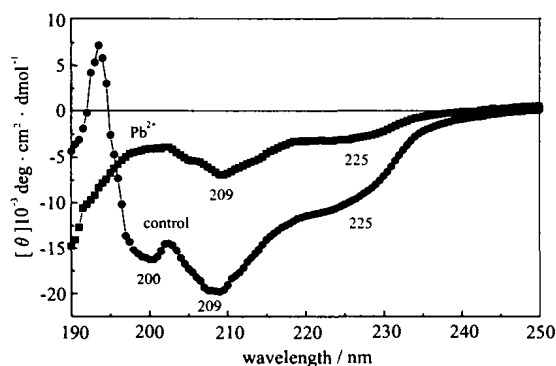


图 4 Pb^{2+} 对牛胰蛋白酶 CD 谱的影响

Fig. 4 Effect of Pb^{2+} on CD spectra of trypsin

强度也很弱, 在 220 ~ 230nm 有一小的、负的宽峰, 而对照此负峰不明显。利用四种标准结构 (α -螺旋含量、 β -折叠、 β -转角及无规则卷曲) 的图谱拟合^[23]后表明 (表 2), 丧失酶活性的牛胰蛋白酶与对照相比, α -螺旋含量、 β -转角及无规则卷曲分别下降了 15.2%、22.8%、9.5%; β -折叠增加了 47.6%。这充分证明高浓度 Pb^{2+} 结合到酶上后, 使酶的二级结构遭到了严重的破坏, 因而酶失去了活性。魏欣等发现铅结合到含锌的金属硫蛋白后其二级结构也发生了明显的变化^[24]。

表 2 Pb^{2+} 对牛胰蛋白酶二级结构的影响

Table 2 Effect of Pb^{2+} on Secondary Structure of Trypsin

trypsin	α -helix	β -sheet	β -turn	random coil
control	15.3%	10.1%	46.3%	28.3%
Pb^{2+}	0.1%	57.7%	23.5%	18.8%

参 考 文 献

- [1] LI Shu-Yuan (栗淑媛), ZHAO Sheng-Hao (赵昇皓) *Shengwu Huaxue Zazhi (Chinese Biochemical Journal)*, **1988**, *4*(3), 210.
- [2] LI Xin-Min (李新民), NI Jia-Zuan (倪嘉纘), WANG Ping-Yuan (王平原) *Shengwu Huaxue Zazhi (Chinese Biochemical Journal)*, **1995**, *11*(3), 281.
- [3] DUAN Chang-Qun (段昌群), WANG Huan-Xiao (王焕校), QU Zhong-Xiang (曲仲湘) *Huanjing Kexue (Environmental Science)*, **1992**, *13*(5), 31.
- [4] Bruce F., Ann E., Alan N. S., Christian B. A. *The Journal of Biological Chemistry*, **1973**, *248*(16), 5821.
- [5] WU Jia-Yuan (吴家燕), XIA Zeng-Lu (夏增禄), BA Yin (巴音), LI Sen-Zhao (李森照) *Yingyong Shengtai Xuebao (Chinese Journal of Applied Ecology)*, **1991**, *2*(1), 5821.

- [6] DUAN Chang-Qun(段昌群), WANG Huan-Xiao(王焕校) *Shengtai Xuebao (Acta Ecologica Sinica)*, **1998**, **18**(4), 413.
- [7] SHEN Dun-Yu(沈敦瑜), GUO Shun-Qin(郭顺勤) *Bioinorganic Chemistry (生物无机化学)*, Chengdu: Chengdu Science and Technology University, **1993**, p197.
- [8] Alan F. ed. Translated by DU Jing-Zhu(杜锦珠), RU Bing-Gen(茹炳根), WEI Xin-Cheng(卫新成) *Structure and Mechanism of Enzyme (酶的结构和作用机制)*, Beijing: Beijing University Press, **1991**, p445.
- [9] MA Cheng-Cang(马成仓), HONG Fa-Shui(洪法水), LI Qing-Fang(李清芳) *Zhongguo Youliao (Oil Crops of China)*, **1995**, **17**(2), 54.
- [10] MA Cheng-Cang(马成仓), HONG Fa-Shui(洪法水), LI Qing-Fang(李清芳) *Yingyong Shengtai Xuebao (Chinese Journal of Applied Ecology)*, **1997**, **8**(1), 110.
- [11] MA Cheng-Cang(马成仓), HONG Fa-Shui(洪法水) *Zhiwu Shengtai Xuebao (Acta Phytocologica Sinica)*, **1998**, **22**(4), 373.
- [12] HONG Fa-Shui(洪法水), WU Kang(吴康), WANG Xue-Feng(王雪峰), SU Guo-Xing(苏国兴), PAN Xin-Fa(潘新法) *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chemical Journal of Chinese University)*, **2001**, **22**(12), 1979.
- [13] HONG Fa-Shui(洪法水), WANG Xue-Feng(王雪峰), SHEN Song Dong(沈颂东), SU Guo-Xing(苏国兴), PAN Xin-Fa(潘新法) *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi (Spectroscopy and Spectral Analysis)*, **2002**, **22**(4), 651.
- [14] HONG Fa-Shui(洪法水), WANG Xue-Feng(王雪峰), SHEN Song-Dong(沈颂东), SU Guo-Xing(苏国兴), PAN Xin-Fa(潘新法) *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhang (Progress in Biochemistry and Biophysics)*, **2002**, **29**(1), 74.
- [15] Stephen P. C., Wilian O. G., Keth O. H., Leonard E. M., Edward I. S., John R. C., Winston J. B., Vinod K. S. *Journal of the American Chemical Society*, **1978**, **100**(12), 3814.
- [16] Teo B. K., Shulman R. G., Brown G. S., Meixner A. E. *Journal of the American Chemical Society*, **1979**, **101**(19), 5624.
- [17] Garner C. D., Hasain S. S., Bremner I., Bordas J. *Journal of Inorgainc Biochemistry*, **1982**, **16**, 253.
- [18] Phillips J. C., Bordas J., Foote A. M., Koch H. J., Moody M. F. *Biochemistry*, **1982**, **21**, 830.
- [19] Abrahams I. L., Garner C. D. *Journal of the American Chemical Society*, **1985**, **107**, 4596.
- [20] Abrahams I. L., Bremner I., Diakun G. P., Garner C. D., Hasnain S. S., Ross I., Vasak M. *Biochem. J.*, **1986**, **236**, 585.
- [21] Peariso K., Zhou Z. S., Smith A. E., Matthews R. G., Penner-Hahn J. E. *Biochemistry*, **2001**, **40**, 987.
- [22] Biochemistry Teaching and Research Group of Department in Beijing Normal University(北京师范大学生物系生物化学教研室) *Experiment of Basic Biochemistry(基础生物化学实验)*, Beijing: High Education Press, **1987**, p142.
- [23] XU Xiao-long(徐小龙) *Thesis for the Doctorate of University of Science and technology of China(中国科技大学博士学位论文)*, **2000**.
- [24] WEI Xin(魏欣), RU Bing-Gen(茹炳根) *Zhongguo Shengwu Huaxue Yu Fenzi Shengwu Xuebao (Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology)*, **1999**, **15**(2), 289.

Study of Pb^{2+} on the Mechanism of Trypsin Activity

HONG Fa-Shui^{*1} WANG Ling² WU Kang¹ WANG Xue-Feng¹ LIU Chao¹ TAO Ye³

(¹ College of Life Science, ² Library, Suzhou University, Suzhou 215006)

(³ Synchrotron Radiation Laboratory, Institute of High Energy Physics, The Chinese Academy of Science, Beijing 100039)

The activity of trypsin from bovine pancreas was enhanced under the treatment by Pb^{2+} at low concentration ($0.5 \sim 3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), but was inhibited by Pb^{2+} at high concentration ($3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ above). Pb^{2+} at high concentration could competitively displace Ca^{2+} from trypsin. The EXAFS demonstrated that Pb^{2+} bound to polypeptide chain of trypsin, coordination atom was nitrogen or oxygen, its coordination number was 2 and Pb-N (or O) bond length was 0.241nm. The secondary structure of trypsin was greatly changed by Pb^{2+} at high concentration, e. g. α -helix, β -turn and Random coil contents decreased and β -sheet increased. It suggested that Pb^{2+} bound result in trypsin conformational changed, and enzyme activity decreased.

Keywords: trypsin lead ion enzyme activity EXAFS secondary structure