

超氧化物歧化酶的结构与功能

李 益 新

(军事医学科学院放射医学研究所)

“1969年 McCord 和 Fridovich^[1] 首先从牛红细胞中发现了超氧化物歧化酶活力。有关氧代谢的分子生物学方面的研究工作,可与 DNA 双螺旋结构学说的成就相比拟。”^[2] 超氧化物歧化酶 (EC 1.15.1.1) 是一类金属酶,按金属辅基成份不同分为三类,第一类含 Cu 和 Zn (简称 CuZn-SOD),主要存在于真核细胞的细胞浆中;第二类含 Mn(Mn-SOD),存在于真核细胞的线粒体和原核细胞中;第三类含 Fe(Fe-SOD),只存在于原核细胞内。这三类 SOD 都催化超氧化物阴离子自由基 (O_2^-) 发生歧化反应: $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ 。由于 SOD 能清除 O_2^- ,所以在防御氧的毒性、抗辐射损伤、预防衰老以及防治肿瘤和炎症等方面起着重要作用,越来越受到重视^[3-6]。本文试就三类 SOD 的分子结构与催化功能作一简要综述与比

较。

一、一级结构与序列同一性

迄今为止已经完成全部氨基酸序列分析工作的超氧化物歧化酶共六个,其中四个是 CuZn-SOD,分别来源于牛、人的红细胞,马肝和酵母,另外两个是 Mn-SOD,来源于大肠杆菌和一种嗜热细菌。这两种 Mn-SOD 的全序列同一性为 60%,而对多种来源的 Mn-SOD 和 Fe-SOD 进行的 N-末端序列分析揭示了这两类 SOD 在氨基酸序列上具有高度一致性,从而判断进化上可能来源于同一祖先。CuZn-SOD 与上述两类 SOD 没有这种进化上的相关性,但不同来源的 CuZn-SOD 之间却呈现出明显的进化保守性和高度的序列同一性^[7],如图 1 所示,在人和牛的红细胞 CuZn-SOD 之间,全

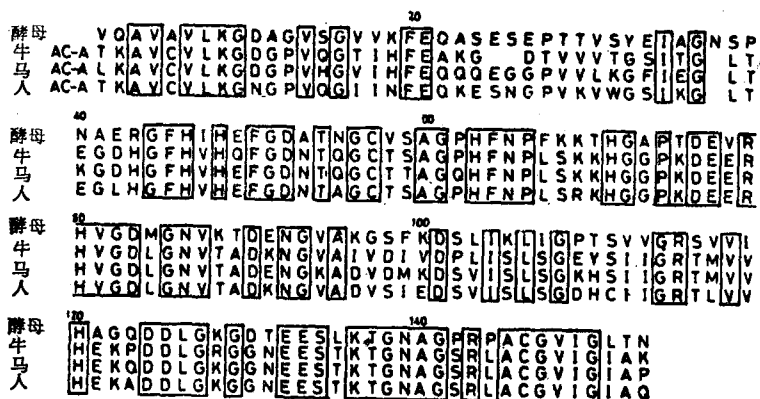


图 1 酵母、牛、马和人 CuZn-SOD 的氨基酸全序列比较

序列同一性高达 80%,同时考虑四种不同来源的 CuZn-SOD,全序列同一性为 49.6%,而从这四种来源的细胞色素 c 的序列同一性为 55.7%,细胞色素 c 是进化上高度保守的典型蛋白质,由此可见, CuZn-SOD 也是一类进化

上高度保守的酶。CuZn-SOD 的结构同一性还进一步表现在以下三方面: 1. 与金属辅基 Cu、Zn 相连结的和参与肽链内部二硫键形成部位附近的氨基酸残基都相同; 2. 全序列中都有一个超可变区,位于分子结构的表面部

分,可能与酶的免疫性质有关。与此相对应的是在 C-末端都有一个序列同一性程度更高的区域,在此区域中都有一个精氨酸(R)残基;3.富含甘氨酸(G)残基。G的存在对于肽链的折叠和形成发夹状结构有关,这说明 CuZn-SOD 之间不仅在一级结构上,而且在空间结构上也具有相同性,事实正是如此。生命体系在设计 SOD 的结构时,至少通过三条途径以确保清除 O_2^- 自由基功能的顺利发挥,其一是采取金属辅基形式的多样性,这样一旦某类 SOD 的合成由于其金属辅基的缺乏而受阻时,就可以由另一类 SOD 来补偿;其二是在进化上高度保守,防止发生变异;其三是在与催化活性直接有关的部位上表现出高度的结构同一性,以利于催化功能的顺利进行。从这里可以看出酶的结构形式与催化功能是何等的统一!

二、空间结构

X-射线衍射晶体结构分析对牛红细胞 CuZn-SOD 的三维结构提供了详细可靠的信息,在这方面,1972 年 Richardson^[8] 实验室首先获得了可供 X-射线晶体结构分析的单晶。1974 年得到了 5.5 Å 粗分辨率的电子密度图,表明该酶的两个亚基结构上是相同的,整个结构由 β -片层组成,几乎没有 α -螺旋成份。1975 年获得的 3 Å 分辨率电子密度图可以分辨肽链骨架的走向和金属配位体的组成。两个相同亚基之间通过非共价键的疏水相互作用而缔合,肽链内部由半胱氨酸 C₅₅ 和 C₁₄₄ 的-SH 基构成的二硫桥对亚基缔合起重要作用。整个结构特征是由八股反平行的 β -折迭片围成的圆桶状结构,称之为 β -barrel, 其一侧尚有两个无代表性结构的环(loop)。由 X-射线结构分析计算出整个结构含 5% 的 α -螺旋,45% 的反平行 β 折迭结构。在每个亚基中,Cu 分别与四个组氨酸残基配位, Zn 则与三个组氨酸和一个门冬氨酸配位。Cu, Zn 之间相距约 6 Å。根据 X-射线晶体结构分析给出的每个亚基中 151 个氨基酸残基的 α -碳原子和金属结合位点的分子坐标,

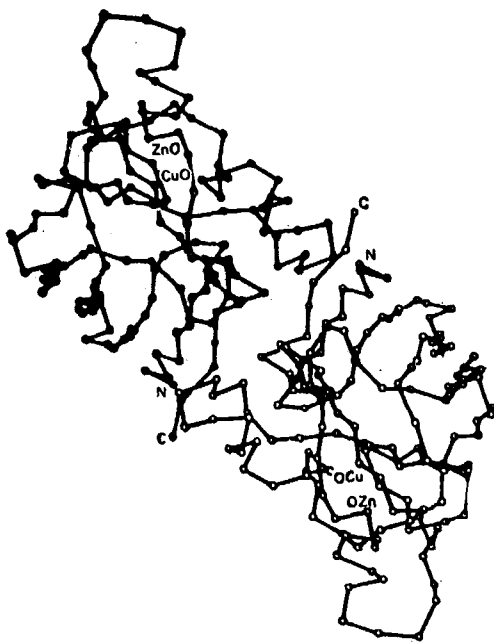


图2 牛红细胞 CuZn-SOD 二聚体的碳链走向

确定整个肽链在空中的走向,如图2所示。由 X-射线衍射结构分析所得的结论基本上证实了从 1971 年以来由旋光色散(ORD)、圆二色性(CD)和红外光谱(IR)研究所得到的结果。Mn-SOD、Fe-SOD 与 CuZn-SOD 在一级结构上明显不同,在空间结构上也表现出差异。Fe-, Mn-SOD 的 CD 谱表明,这两类 SOD 含有较高程度(>32%)的 α -螺旋结构,较少 β 折迭片,整个结构比较紧凑。初步的 X-射线晶体结构分析表明 Fe- 和 Mn-SOD 每个结晶学不对称单位是含一个酶分子,而 CuZn-SOD 则是由两个酶分子(4 个亚基)组成,而且各种来源的 Fe-, Mn-SOD 与牛红细胞 CuZn-SOD 的单晶胞参数也各异,可以肯定在整个空间结构上 Fe-, Mn-SOD 与 CuZn-SOD 将有明显的不同。

三、活性中心——“咪唑桥”结构模型

1980 年获得的 2 Å 分辨率电子密度图^[9],可以比较清楚地看到 CuZn-SOD 活性中心附近位置的排列。结合底物 O_2^- 的是一个椭圆形“口袋”,长 15 Å,宽 9 Å,深 6 Å,口袋外缘一

边是由苏氨酸 T 135, 甘氨酸 G 136, 丙氨酸 A138 和甘氨酸 G139 组成, 另一边由甘氨酸 G59, 脯氨酸 P60, 组氨酸 H61 以及苯丙氨酸 P62 和门冬酰胺 N63 组成, 赖氨酸 K134 和精氨酸 R141 的侧链锁住口袋两侧, 口袋底部是 Cu、Zn, 门冬氨酸 D81, 以及 H118, H44, H78 和 H69。在已知一级结构的全序列的四个 CuZn-SOD 中, 上述活性部位的氨基酸残基的排列方式都相同。而高分辨率的 ^1H NMR 谱已经揭示人红细胞、酵母和麦胚的 CuZn-SOD 与牛红细胞 CuZn-SOD 的活性中心构象是相同的。

对 SOD 中金属辅基配位场几何构型研究是探讨活性中心结构的重要方面, 应用 ESR, NMR, 化学修饰结合 X-射线晶体结构分析, 确定了 Cu 是与四个组氨酸残基咪唑环的 N 原子构成近似四方平面的配位结构, Cu 和 Zn 之间通过共同连接组氨酸 H61 而形成所谓的“咪唑桥”结构。在应用组氨酸 C-2 质子交换技术^[10] 和 γ -射线扰动角关联 (PAC) 技术^[11] 研究酵母 CuZn-SOD 中金属与酶蛋白的配位关系后, 有人对活性中心的“咪唑桥”结构提出了疑议, 认为 H63 (即相对于牛酶中的 H61) 很可能单独与 Zn 配位。由于不同来源的 CuZn-SOD 之间具有结构的同一性, 所以推测由酵母酶得到的结论可以推广到其它来源的 CuZn-SOD, 即酶的活性中心不一定呈现“咪唑桥”结构特征。当然, “咪唑桥”结构的提出是基于 X-射线晶体结构分析, 而酵母酶的工作是基于溶液构象研究,

晶体结构与溶液构象之间出现某些差别是可以理解的, 更重要的是“咪唑桥”活性中心绝非刚性的固定结构, 而应该是一种柔韧的灵活的连结, 任何化学、物理的因素都可能影响它, 而这种若接若离的结构灵活性可能正是酶发挥催化功能所必需的。

ESR 和电子能谱测定 CuZn-SOD 中 Cu 的超精细耦合常数 A_{H} 为 0.143 cm^{-1} , 这是典型五配位 Cu 络合物的值, 而 NMR 对 CuZn-SOD 水溶液中水的质子交换弛豫时间测定, 发现 Cu 与组氨酸咪唑环 N 原子构成的四方平面配位场的轴向位置上还结合有一分子 H_2O , 从 $2\text{ \AA}$ 分辨率电子密度图上也发现 Cu 的轴向位置上有一水分子的吸收峰, 而 Fe-, Mn-SOD 的金属离子上也都结合有一个水分子, 这一水分子的存在可能与催化机理有关。对 Fe-SOD 的化学修饰表明色氨酸残基是与 Fe 形成配位关系的, ESR 和 NMR 研究揭示了 Fe-和 Mn-SOD 中的金属离子是处于高自旋态的三价铁 Fe^{3+} 和 Mn^{3+} , 但有关这两类酶活性中心的结构细节目前所知尚少。

四、氨基酸残基与酶的催化活性

1. 组氨酸 是首先被发现与金属辅基 Cu 和 Zn 相连且与酶的催化活性直接相关的氨基酸残基。这主要来自三方面的实验证据: 一是光敏氧化失活, 二是化学修饰观察; 三是辐射失活实验。在有光敏染料亚甲兰存在下, 去除 Cu、Zn 后的酶蛋白经光照后组氨酸残基遭到破坏, 这时再加入 Cu、Zn 重组, 酶活性不能恢复。用组氨酸特异性试剂重氮 ^1H -四唑 (DHT) 修饰发光细菌中提取的 Fe-SOD, 发现经 DHT 修饰后的酶完全失去活性, 而且去 Fe 后的酶蛋白经修饰后再加入 Fe 就不能重组复活。我们对牛红细胞 CuZn-SOD 的重组研究^[12] 表明, 去除 Cu、Zn 后的酶蛋白经较低剂量 γ -射线照射后就丧失了再与 Cu、Zn 重组复活的能力。

2. 半胱氨酸和-SH 基 Malinowski 和 Fridovich^[13] 用对-氯汞苯磺酸修饰半胱氨酸-SH 基后, 发现牛红细胞的、麦胚的和猪的 CuZn-SOD

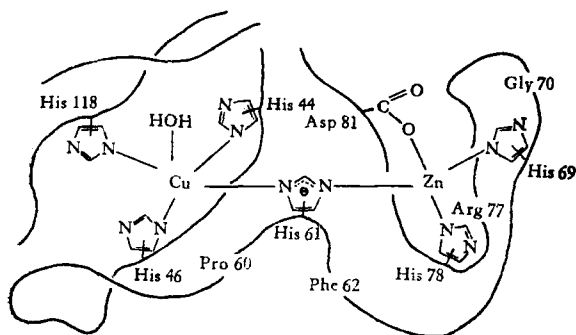


图3 牛红细胞 CuZn-SOD 活性中心的“咪唑桥”结构示意图

并不丧失活性,对鸡肝 CuZn-SOD 的修饰也得同样结果。顺丁烯二酰亚胺氮氧自由基自旋标记物 (Maleimido) 可以特异地与蛋白质分子中半胱氨酸-SH 基结合,并根据-SH 基所处不同环境给出特征性的 ESR 波谱,我们对牛红细胞 CuZn-SOD 的游离-SH 基进行自旋标记,只能给出弱固定化的 ESR 信号,表明该-SH 基并不是包埋在蛋白质分子疏水内部而是位于比较接近溶剂的表层中,标记后的酶仍然有酶活性,其紫外图谱也未发生大的改变,表明-SH 基与酶的活性无直接联系。

3. 精氨酸 1975 年对牛红细胞 CuZn-SOD 的 X-射线晶体结构分析就发现有一个精氨酸 R 141 是位于溶剂接近酶活性中心的 Cu 的通道口上,与 Cu 相距约 6 Å,但是真正发现 R 与酶活性有关则是七十年代末和八十年代初的化

学修饰实验。由于 R 本身带正电荷,可以诱导 O_2^- 负离子进入活性中心,并可在催化过程中提供质子,使催化速度大大加快。用精氨酸试剂丁二酮或苯乙二醛进行修饰,可使 CuZn-SOD 的活力丧失 99% 以上,而且探明这个精氨酸在啤酒酵母提取的 CuZn-SOD 中为 R143,对应于牛酶中的 R 141,前文已经提到这个关键性的 R 为目前已知氨基酸全序列的所有 CuZn-SOD 所共有,位于超同一性的 C-末端区域内。Koppenol^[14]进一步分析了 CuZn-SOD 活性中心部位的电荷分布,考察了精氨酸对于催化活性的重要性。比较 R141 被修饰前后活性中心部位的电势分布图(图 4),不难看出,当 R141 被修饰后中和了活性中心大部分的正电荷,对吸引 O_2^- 、催化歧化反应十分不利。

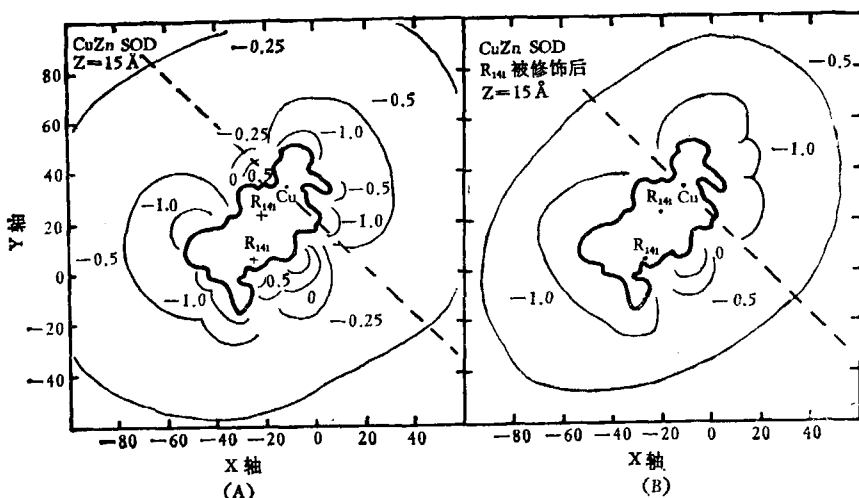


图 4 修饰精氨酸 R141 对活性中心电荷分布的影响

(A) 修饰前; (B) 修饰后

五、金属辅基的重要性

1. 稳定酶蛋白结构 酶蛋白分子受到外界各种物理化学因素如变性剂、还原剂、极端的温度、pH 的变化、电离辐射等等作用时,结构常遭到破坏。SOD,尤其是牛红细胞 CuZn-SOD,与一般酶相比在承受上述种种变性因素的攻击时表现出异常的稳定,这种稳定性主要来源于金属辅基的存在。牛红细胞 CuZn-SOD 在含

有 SDS、EDTA 的 6M 尿素中加热可引起解聚,但是单独用 8M 尿素却不被解聚。应用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳比较了牛 CuZn-SOD 的几种衍生物形式的亚基解聚行为,发现其容易解聚的顺序为: E_2E_2 -SOD > E_2Zn_2 - 或 E_2Co_2 -SOD > Cu_2Zn_2 -SOD,也就是说同时去除 Cu 和 Zn 的酶蛋白 (E_2E_2 -SOD) 比单独去 Cu 的 (E_2Zn_2 -SOD) 或用 Co 取代 Zn 后的 (E_2Co_2 -SOD) 酶蛋白更容易解聚,而后两者又比天然

酶 ($\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$) 容易解聚。各种金属离子对 CuZn-SOD 不可逆热变性的影响见表 1。金属辅基对于 pH 变化所引起的酶蛋白结构改变的影响也十分明显, 去除 Cu、Zn 后的酶蛋白, 在 $\text{pH} < 3$ 时先解聚成亚基, pH 上升, 这些亚基就无序卷曲成无规线团。同样条件下含有金属辅基的天然酶仍保持二聚体的完整结构。电离辐射对酶蛋白分子结构的破坏反映在紫外吸收光谱和 CD 谱的改变上, 照射前加入 Cu、Zn 重组后的酶, 虽经同样剂量照射, 其结构的变化要比去除 Cu、Zn 的酶蛋白小得多。

表 1 金属离子对 CuZn-SOD 不可逆热变性的影响

	$T(^{\circ}\text{C})^*$
天然酶	77.2
酶蛋白 (APO)	49.4
APO + Cu^{2+}	73.2
APO + Cu^{2+} + Zn^{2+}	77.2
APO + Cu^{2+} + Co^{2+}	76.6
APO + Cu^{2+} + Hg^{2+}	85.6
APO + Zn^{2+}	41.1
APO + Co^{2+}	55.2
APO + Hg^{2+}	46.8
**APO + Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} 或 Fe^{2+}	49.4

* 0.035M, pH7.8 磷酸钾缓冲液中 10 分钟内, 使酶活力丧失 50% 的温度值。

** 金属离子加入量为天然酶中 Cu、Zn 含量的 5 倍, 其余实验中加入量与天然酶中浓度相等。

2. 发挥催化功能 Cu 对于 CuZn-SOD 的催化活性直接有关, 一系列金属离子取代衍生物的研究表明, 某些二价的金属离子如 Co^{2+} 和 Hg^{2+} , 可以取代 Zn^{2+} 的作用, 但是没有任何一种金属能够取代 Cu 而起恢复酶活力的作用, 一系列金属离子取代后对酶活力的影响见表 2。Cu 对于酶活性的作用从 DDC(二乙基二硫代氨基甲酸盐) 螯合实验中得到证实。DDC 可以选择性地从 CuZn-SOD 中除去 Cu 而不去除 Zn, 单独去 Cu 的 $\text{E}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$ 没有酶活力, 这在离体和整体动物试验中都得到证实。Fe 为 Fe-SOD 催化活性所必需, 而 Mn 则与 Mn-SOD 的活性直接相关。很有意义的是尽管 Mn-SOD 和 Fe-SOD 在氨基酸序列及结构上具有显著的同质性, 但是对于去除 Mn 的酶蛋白, Fe 却不能

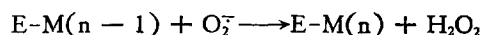
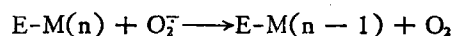
表 2 CuZn-SOD 的不同金属衍生物的酶活性

金属衍生物	相对酶活性(%)
$\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$ (即天然酶)	100
$\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$ (重组酶)	110
E_2E_2 (即酶蛋白 APO)	<0.1
E_2Co_2	0
E_2Zn_2	0
Cu_2E_2	20—80
Cu_2Co_2	90
Cu_2Hg_2	90
Cu_2Cd_2	70
Ag_2Cu_2	5
Ag_2Co_2	微量
Cu_2Cu_2	100

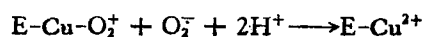
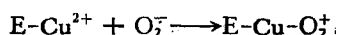
有效地与 Mn 竞争, 即使在 Fe 浓度大大过量的情况下结合到酶蛋白上后, 也没有活性。这说明金属辅基在发挥催化活性方面的高度专一性。

六、催化机理与反应动力学研究

SOD 与一般的酶不同之处在于其底物是一寿命很短的自由基 O_2^- , 这给催化机理和反应动力学研究带来困难。应用脉冲辐射分解技术能够直接获得催化速度常数以及有关 pH、抑制剂等对反应速度的影响等方面的信息。SOD 在催化反应中有共性也有个性。其共同之点是在催化中都出现活性中心金属离子的交替还原和再氧化, 可用通式表示:



其中 $\text{M}(n)$ 可以是 Cu(II) 、也可以是 Fe(III) 、 Mn(III) , 而 $\text{M}(n-1)$ 当然就代表 Cu(I) 、 Fe(II) 和 Mn(II) 。上述机理可称为机理 I。但是从无机 Cu 离子催化 O_2^- 歧化反应中, 发现有 Cu-O_2^+ 这一中间产物的信号, 同时观察到 CuZn-SOD 在 77K 下受 γ -射线照射后, 产生一种与酶结合的 $\cdot\text{OH}$ 自由基 $\text{E-Cu(II)}\cdots\cdot\text{OH}$ 的信号, 所以最近认为催化过程可能按下列机理 II 方式进行:





上述机理对 Fe-, Mn-SOD 是否适用尚未证实。自从 X-射线晶体结构分析揭示了“咪唑桥”活性中心结构后,对催化机理研究的兴趣也集中到“咪唑桥”上,催化反应对“咪唑桥”结构的影响包括以下三个方面: 1. 催化过程中是否发生“咪唑桥”的断开和重接? 2. 如果发生断开,那么是哪一侧上断开? 3. “咪唑桥”在断开和重接过程中需要进行质子化和去质子化,其质子从何而来? 研究结果首先表明在催化过程中随着吸收一个质子,两个金属离子之间的“咪唑桥”确实断开,第二个问题的解决来自四方面的实验证据,首先对 Co(II) 取代 Zn(II) 后的衍生物研究表明催化过程中咪唑环与 Cu 相连的一侧的 N 原子快速地发生了质子化和去质子化的变化,表明催化过程中是“咪唑桥”与 Cu 相连的一侧断开和再重接;接着的证据来自 X-射线吸收边研究,表明 Cu(II) 还原成 Cu(I) 时, Zn 的结合位点只受到小的扰动,仍旧保持着 Zn-N 键的完整性;证据之三是 Bailey 等的 ^{113}Cd NMR 研究,证据之四来自 CNS⁻ 负离子取代了 Cu₂Cu₂-SOD 中与 Cu 相连的咪唑环后 ESR 波谱变化,上述四方面的结果都支持了下列催化过程:

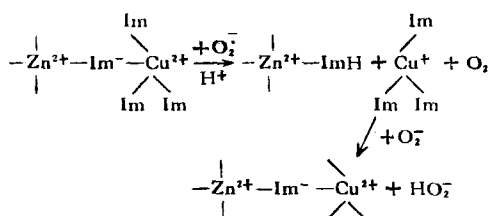


图5 CuZn-SOD 催化过程中“咪唑桥”的断开和重接

至于在催化过程中“咪唑桥”断开和再接上所需要的质子来源有几种不同看法,有的认为是从与 Cu(II) 配位的水分子解离而来,有的则认为这个质子来自组氨酸 H 61 的咪唑环本身。从表 3 可以看出, CuZn-SOD 的反应速度常数比 Mn- 或 Fe-SOD 高一个数量级。CuZn-SOD 在 pH5.3—10.5 范围内,反应速度与 pH 变化无关,而 Mn- 和 Fe-SOD 的反应速度则随 pH 升高而下降。在酶活性中心一节曾提到三

类 SOD 的金属辅基上都结合有一分子 H₂O, 利用一系列单价负离子如 CN⁻, OH⁻, N₃⁻ 等对酶进行竞争性抑制实验研究表明底物 O₂⁻ 及竞争性抑制剂都是结合在 Cu(II) 平时接纳 H₂O 的部位上,催化反应中很可能牵涉到底物 O₂⁻ 顶替 H₂O 这一步。

表 3 不同来源不同类型 SOD 的催化反应速度常数

类 型	来 源	K(M ⁻¹ S ⁻¹)
CuZn-SOD	牛红细胞	1.8×10 ⁹
		1.5×10 ⁹
	人红细胞	2.37±0.18×10 ⁹ 1.2—1.6×10 ⁹
Mn-SOD	<i>E. coli</i>	1.5±0.15×10 ⁸
	<i>B. Sterothermophila</i>	5.5±0.2×10 ⁸
Fe-SOD	<i>P. Leiognathis</i>	4.2—6.1×10 ⁸
	<i>Englena gracilis</i>	8.13±0.36×10 ⁷

七、酶的失活及其有关机理

酶活力丧失的原因是酶蛋白分子结构和金属辅基及其配位场结构遭到破坏,而破坏酶蛋白分子的因素有很多;如变性剂、还原剂、化学修饰剂、极端温度或 pH 等,另外还有破坏组氨酸或色氨酸残基的光敏氧化等。通过破坏酶活性中心的金属配位场结构而引起酶失活的因素主要包括三类: 一类是金属辅基的螯合剂如 EDTA、DDC 等,通过螯合作用除去金属辅基而失活酶;第二类是金属辅基的还原剂,如连二亚硫酸钠、H₂O₂ 等;第三类是底物的竞争性抑制剂,主要是指几种单价负离子,与底物 O₂⁻ 竞争,结合到金属辅基上,改变配位场的几何构型,使酶失去再与 O₂⁻ 结合的能力。电离辐射既可以通过破坏酶蛋白分子结构,又可以通过破坏金属辅基配位场结构使酶失活。例如 CuZn-SOD 中的组氨酸或 Fe-SOD 中的色氨酸残基是辐射攻击的敏感环节。辐射还可造成“咪唑桥”结构的破坏。造成上述损伤的主要因素是辐射溶液中产生的 ·OH 自由基。如在照前加入 ·OH 自由基消除剂甲酸钠,不仅对酶活力有良好保护作用,而且能有效地保护酶蛋白的天

然构象^[5]。SOD 是一类金属酶,与过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等一样,都在体内起清除自由基的作用,所以这类酶一旦遭到损伤,后果是很严重的,所以研究这类金属酶的辐射损伤及其对结构功能的影响将是很有意义的课题。

参 考 文 献

- [1] McCord, J. M., Fridovich, I., *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049, 1969.
- [2] Michelson, A. M., *Superoxide and Superoxide Dismutases*, Academic Press, London, 1977.
- [3] Steinman, H., *Superoxide Dismutase*, Vol. I, CRC Press, Florida, pp 11—68, 1982.
- [4] Oberley, L. W., *Superoxide Dismutase* Vol. II, CRC Press, Florida, pp. 127—165, 1982.
- [5] Fridovich, I., *Oxygen and Oxy-Radicals in Chemistry and Biology*, Academic Press, New York,

- pp. 197—204, 1981.
- [6] Hassan, H. M., Fridovich, I., *Eur. J. Rheumatol. Inflammation*, **4**(2), 160, 1981.
- [7] Bannister, J. V. and Bannister, W. H., *Biochem. Edu.*, **9**, 42, 1981.
- [8] Richardson, J. S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1349, 1975.
- [9] Tainer, J. A. et al.: *Fed. Proc.*, **39**, 1976, 1980.
- [10] Cass, A. E. G. et al.: *Biochem. J.*, **183**, 127, 1979.
- [11] Dunbar, J. C. et al.: *Carlsberg Res. Commun.*, **45**, 349, 1980.
- [12] 李益新等,《生物化学与生物物理学报》, **16**, 480, 1984.
- [13] Malinowski, D. P. and Fridovich, I., *Biochemistry*, **18**, 5055, 1979.
- [14] Koppenol, W. H., *Bull. Europ. Physiopath. Resp.*, **17** (suppl.): 85, 1981.
- [15] 李益新等:《生物化学与生物物理进展》, **3**:38, 1983.

[本文于1984年4月11日收到]

混合配位络合物的结构稳定性及其生物学意义(上)

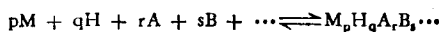
黄 仲 贤

(复旦大学化学系,上海)

在大自然中,生物体系内发生的各种生物化学反应的特异选择性和高效性常使人惊叹不已。现代分子生物学的发展已充分揭示了这与生物体内存在的各种生命金属元素息息相关^[1,2]。越来越多的证据支持下述论点,即金属离子是通过金属络合物,特别是它的复杂络合物—混合络合物(mixed complex)在生命体内发挥作用的。

混合络合物可分为混合金属络合物(mixed metal complex)和混合配体络合物(mixed ligand complex)。由于生物体内存在着大量的各种各样的配位体,它们的浓度大大超过体内的金属元素,因此生物体内大量、经常存在的是混合配体络合物。本文主要介绍有关混合配体络合物方面的内容和进展。

混合配体络合物的定义是几个不同的配位体同时络合于一个中心金属离子所生成的多元络合物。定量的描述可以用下式表达:



$$\beta_{pqrs} = \frac{[M_pH_qA_rB_s\dots]}{[M]^p[H]^q[A]^r[B]^s\dots}$$

其中 $M_pH_qA_rB_s\dots$ 即为混合络合物, M 为金属离子, H , A , $B\dots$ 为质子和各种配位体, $p, q, r, s\dots$ 为混合络合物中各组分的份数。如若 $p = 1$, 则为混合配体络合

物。当发生从配位水上质子解离,即生成羟基络合物。 $\beta_{pqrs}\dots$ 就是混配络合物的生成常数。它可以用多种物理化学方法测得,但目前获得的精确稳定常数主要来自 pH 电位滴定法。鉴于混合络合物是一个多元体系,涉及到一系列复杂的酸碱和电离平衡,同时为了精化计算结果,需要进行繁琐的数学处理。因此常借助于一系列计算机程序如 ZPLOT、MAGEC、MINIQUAD、COMICS 等,通过计算机模拟获得正确的二元和三元络合物的络合常数^[3-5]。近年来有些作者整理发表了已有的混配络合物的稳定常数^[6,7]。这些数据为估价药物和金属离子在生物体中的作用提供了重要依据^[8]。

可以通过许多实验方法直接检测混合络合物的存在。Neumann 等^[9]用超离心法和同位素 ^{64}Cu 示踪技术研究了血清白蛋白和各种氨基酸在入血清中对铜的竞争。正常人血浆中铜的浓度约为 $15\mu\text{M}$,其中 7% 是以铜-氨基酸形式存在。血浆中有 23 种氨基酸,总浓度为 3mM 左右。Neumann 等发现若把 23 种氨基酸以血浆中浓度与铜离子放在一起,它们络合的铜要比按各个氨基酸分别结合铜离子的浓度的总和大多得多。显然,除了氨基酸和铜离子的二元络合物外,混合氨基酸络合物无疑起着极为重要的作用。这一结论已为尔后