

列的作用不仅仅是将-35序列和-10序列分开,而且还参与RNA聚合酶的结合,特别是其下游几个碱基对<sup>[8]</sup>,间隔序列还能够通过嘌呤和嘧啶的排列顺序调节它们的实际长度<sup>[17]</sup>.因此我们常常面对一些被启动子间隔序列的多重功能所复杂化了的情况.

### 参 考 文 献

- 1 孙乃恩,孙东旭,朱德熙.分子遗传学.南京:南京大学出版社,1993;187-192
- 2 Simpson R B. In: Rodriguez R L eds. Promoters. New York: Praeger Publishers, 1982; 164-180
- 3 Sun N E, Shen B H, Zhou J M *et al.* DNA Cell Biol, 1994; 13 (1): 83
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 5 杨香娇,陈常庆,王德宝等.生物化学与生物物理学报, 1991; 23: 178
- 6 Imanaka T, Tanaka T, Tsunekawa H *et al.* J Bacteriol,

- 1981; 147: 776
- 7 Hsiung H M, Mayne N G, Becker G W. Bio/Technology, 1986; 4: 991
- 8 Siebenlist U, Simpson R B, Gilbert W. Cell, 1980; 20: 269
- 9 Hawley D K, McClure W R. Nucleic Acids Res, 1983; 11: 2237
- 10 Harley C B, Reynolds R P. Nucleic Acids Res, 1987; 15: 2343
- 11 McClure W R. Annu Rev Biochem, 1985; 54: 171
- 12 Travers A A. Crit Rev Biochem, 1987; 22: 181
- 13 Maqwat L E, Reznikoff W S. J Mol Biol, 1978; 125: 467
- 14 Stefano J E, Grella J D. In: Rodriguez R L eds. Promoters. New York: Praeger Publishers, 1982; 69-79
- 15 Jaurin B, Grundstrom T, Edlund T *et al.* Nature, 1981; 290: 221
- 16 Brosius J, Erfle M, Storella J. J Biol Chem, 1985; 260: 3539
- 17 Beutel B A, Record M T. Nucleic Acids Res, 1990; 18: 3597

## 金属硫蛋白与红细胞的相互作用<sup>1)</sup>

张保林 卢景霁<sup>2)</sup> 王文清<sup>3)</sup> 茹炳根<sup>4)</sup> 唐雯霞

(南京大学配位化学研究所, 配位化学国家重点实验室, 南京 210008)

**摘要** 根据金属硫蛋白(MT)对标记在膜上的马来酰亚胺自旋标记物的ESR波谱的影响,研究了MT与红细胞膜的相互作用,发现不同种属的MT对膜构象的影响不同.体外实验表明,MT可以吸附在红细胞的表面,用CdCl<sub>2</sub>诱导家兔,对血浆和红细胞溶血液中的MT组分进行色谱分离,发现血液中的MT主要存在于血细胞中.进而对血液MT的来源、分布及其重要的生物学意义进行了讨论.

**关键词** 金属硫蛋白,红细胞,红细胞膜,吸附,自旋标记

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类低分子量、富含半胱氨酸的金属结合蛋白.已经知道,MT在重金属解毒<sup>[1]</sup>、清除自由基<sup>[2-4]</sup>以及金属离子运输<sup>[5]</sup>等方面发挥着重要作用.最近研究发现,MT对胃溃疡、心肌梗塞和风湿等疾病有着显著疗效<sup>[6,7]</sup>.越来越多的证据表明,MT可望作为一种新型的消炎及抗衰老药物在临床上得到应用<sup>[8,9]</sup>.

MT不仅存在于动物的肝、肾等组织中,而且存在于血液和组织液中.1970年Nordberg<sup>[10]</sup>首次从注射CdCl<sub>2</sub>后的大鼠的血液中分离出了MT.最近,通过放射免疫法进一步证

1) 国家 863-103-09 资助课题.

2) 北京医科大学天然与仿生药物国家重点实验室.

3) 北京大学技术物理系.

4) 北京大学生物系蛋白质工程国家重点实验室.

收稿日期: 1993-09-13, 修回日期: 1993-11-25

明了血液中 MT 的存在<sup>[11,12]</sup>。但是,关于血液 MT 的来源及在血浆和血细胞之间的分布,尤其 MT 与血细胞相互作用的性质,迄今尚无报道。显然,深入研究 MT 在血液中的行为,对于更好地阐明其在金属离子运输中的作用以及指导 MT 作为药物在临床上应用都具有重要意义。本文首次通过自旋标记方法,用电子自旋共振技术(ESR)研究了不同种属的 MT 对红细胞膜构象的影响。在体外研究了 MT 与完整红细胞的相互作用,并通过  $\text{CdCl}_2$  诱导家兔后,对血浆和血细胞溶血液中的 MT 分别进行分离,对有关性质进行了深入研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

兔肝  $\text{Zn}_7\text{MT}_1$ ,  $\text{Zn}_7\text{MT}_2$ ,  $\text{Cd}_7\text{MT}_1$  和  $\text{Cd}_7\text{MT}_2$ , 鼠肝  $\text{Cd}_7\text{MT}_1$  和  $\text{Cd}_7\text{MT}_2$ , 鸭肝  $\text{Cd}_7\text{MT}$  (按文献[13]分离纯化,并体外重组); 马来酰亚胺自旋标记物 (Sigma); 其它试剂均为分析纯。青紫蓝家兔若干只,体重约 3kg; 新鲜人血 (北京市血站); Sephacryl S-100 柱 (2cm×30cm) 及低压柱层析系统 (Pharmacia); WH-861 型旋涡混合器 (上海科达测试仪器厂); ESP-300 型 X 波段顺磁共振仪 (Bruker); PU-9200 型原子吸收分光光度计 (Philips)。

### 1.2 ESR 测量

按 Dodge<sup>[14]</sup>法分别处理新鲜的人血和兔血,得到膜蛋白含量分别为 2.50mg/ml 和 2.43mg/ml 的兔、人红细胞膜悬液。按体积比 120:1 (膜:标记物) 加入 2mmol/L 的马来酰亚胺自旋标记物溶液,冰水浴中搅拌 3min, 4℃ 培育 10h, 3000g 离心 3min, 弃上清。用同一磷酸盐缓冲溶液 (0.01mol/L, pH7.4, PBS) 洗至上清液中无 ESR 信号为止。

取 20 $\mu\text{l}$  自旋标记的膜悬液,分别加入 0, 5, 10, 15, 20 和 30 $\mu\text{l}$  5mmol/L 不同的 MT 溶液,用 PBS 将总体积补至 50 $\mu\text{l}$ 。室温培育 10min 后,进行 ESR 测量。测量条件:增益  $5 \times 10^4$ , 中心磁场 335mT, 扫场宽度 10mT, 微波功率 10mW, 调制幅度 0.2mT, 调制频率

100kHz。

### 1.3 $\text{Cd}_7\text{MT}$ 与完整红细胞的作用

取 1ml 人红细胞悬液 (约  $2 \times 10^8$  个/ml), 分别加入不同浓度的兔肝  $\text{Cd}_7\text{MT}_1$  或  $\text{Cd}_7\text{MT}_2$  溶液,用等渗 PBS 定容至 2.0ml, 37℃ 培育不同时间。取出上清液,将红细胞用 PBS 冲洗至无 Cd 检出。分别测定上清液和细胞溶血液中 Cd 的浓度。

### 1.4 家兔血液 MT 的分离

分别在第 1, 2, 4, 7 天给家兔皮下注射  $\text{CdCl}_2$  溶液。一组剂量为 0.25, 0.25, 0.5 和 1.0mg/ (kg·d), 另一组剂量为 4.0, 8.0, 16.0 和 32.0mg/ (kg·d)。第 8 天从颈动脉导管取血, 1500g 离心 5min, 将血浆和血细胞分离。取 1ml 血浆或血细胞溶血液上预先用 0.01mol/L, pH8.6 Tris-HCl 平衡过的 Sephacryl S-100 柱 (2cm×30cm), 用同一缓冲液淋洗, 0.5ml/min, 每管 2.5ml。分别测定各流分在 254nm 和 280nm 的吸光度及相应的 Cd, Zn 浓度。

## 2 结 果

### 2.1 兔肝 MT 与兔红细胞膜的作用

马来酰亚胺能特异地与膜蛋白巯基结合, 导致原来等强度、等距离的三重谱线的裂距和线宽增加, 表现为弱、强固定化成分的叠加。强、弱固定化的两种波谱对应着巯基的两种不同位置。弱固定化 (W) 表示马来酰亚胺氮氧自由基与处于表面结构的巯基形成特异结合, 具有较大的自由度。强固定化 (S) 表示与处于膜三维结构深部的巯基结合, 其运动受到限制。通过测定 ESR 波谱的弱、强固定化波峰高度之比 (W/S) 及旋转相关时间  $\tau_c$ , 就可以表征膜蛋白巯基结合的性质, 进而给膜的构象提供信息<sup>[2]</sup>。

将兔肝 MT 与马来酰亚胺自旋标记的兔红细胞膜作用平衡后, 测得的 ESR 波谱参数分别为:  $\text{Zn}_7\text{MT}_1$ :  $W/S = 2.76 \pm 0.06$ ,  $\tau_c = (8.4 \pm 0.4) \times 10^{-10}\text{s}$ ;  $\text{Zn}_7\text{MT}_2$ :  $W/S = 2.53 \pm 0.14$ ,  $\tau_c = (9.1 \pm 0.4) \times 10^{-10}\text{s}$ ;  $\text{Cd}_7\text{MT}_1$ :

$W/S=2.80\pm0.23$ ,  $\tau_c=(8.9\pm0.5)\times10^{-10}s$ ;  $Cd_7MT_2$ :  $W/S=3.37\pm0.22$ ,  $\tau_c=(8.7\pm0.4)\times10^{-10}s$ . 不加 MT 的对照样品  $W/S=2.72\pm0.20$ ,  $\tau_c=(8.4\pm0.5)\times10^{-10}s$ . 显然, 上述 4 种兔肝 MT (不论是  $Zn_7MT$  或是  $Cd_7MT$ ) 对兔红细胞膜的 ESR 参数均无显著影响, 进而表明膜的构象无显著变化.

## 2.2 兔、鼠和鸭肝 MT 与人红细胞膜的作用

兔  $Zn_7MT_1$  或  $Zn_7MT_2$  与人红细胞膜作用时,  $W/S$  和  $\tau_c$  与对照样相比无明显变化. 但是, 兔  $Cd_7MT_1$  或  $Cd_7MT_2$  与人红细胞膜作用时, 随作用时间增长,  $W/S$  显著增加,  $\tau_c$  则相应减小, 且相同时间内  $Cd_7MT_2$  引起的 ESR 参数的改变量大于  $Cd_7MT_1$  (图 1). 在实验时

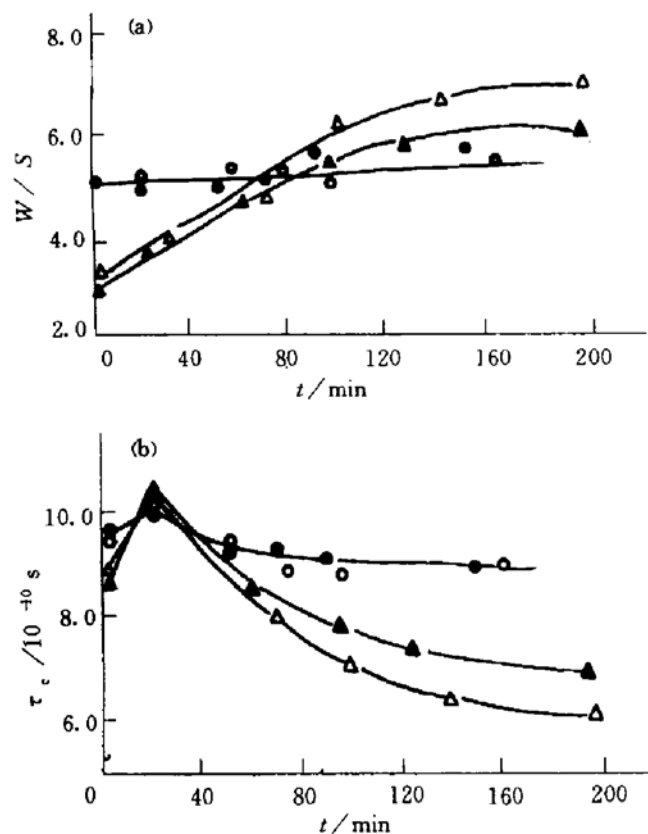


图 1 兔肝金属硫蛋白与自旋标记的人红细胞膜培育不同时间后 ESR 波谱

●—●,  $Zn_7MT_1$ , ○—○,  $Zn_7MT_2$ , ▲—▲,  $Cd_7MT_1$ ,  
△—△,  $Cd_7MT_2$ .

$Cd_7MT$ , 在与膜作用短时间内 (约 20min),  $\tau_c$  都比对照大, 之后又逐渐减小. 推测原因是, 在 MT 与膜接触短时间内, MT 在膜表面形成扩散吸附层, 从而对标记物的氮氧自由基的活动产生阻碍. 随时间增长, MT 进一步贴近膜表面, 对伸展在外的 N—O 基团直接的空间阻碍减小, 通过与膜作用引起膜构象变化而间接地使  $W/S$  和  $\tau_c$  发生变化.

不同种属的 MT 在不同浓度下与同一浓度的自旋标记人红细胞膜作用平衡后相应的 ESR 波谱参数示于图 2. 在实验浓度范围内, 兔肝  $Zn_7MT_1$  和  $Zn_7MT_2$  对自旋标记的人红细胞膜的 ESR 波谱参数  $W/S$  几乎没有影响, 而

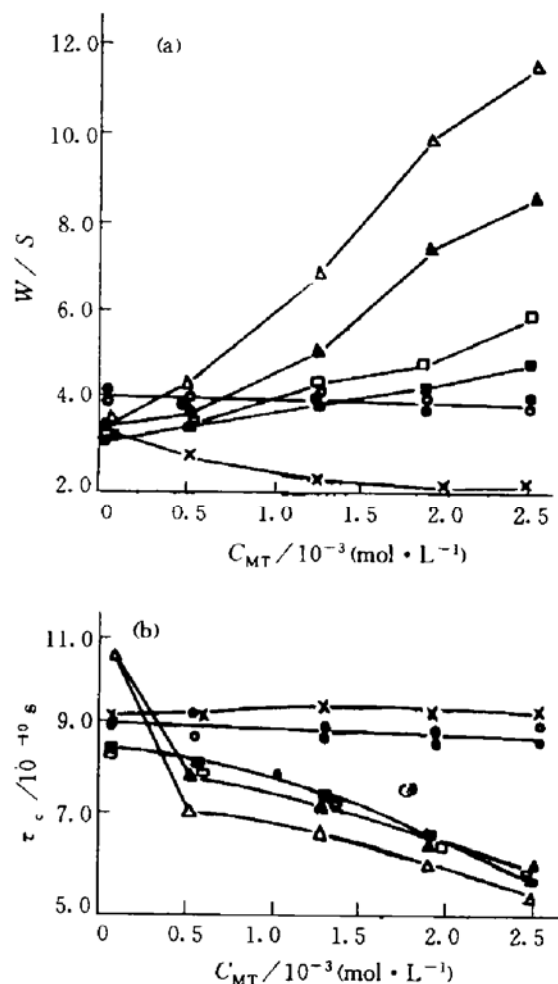


图 2 不同浓度的金属硫蛋白与自旋标记的人红细胞膜培育 5min 后的 ESR 谱

●—●, 兔  $Zn_7MT_1$ , ○—○, 兔  $Zn_7MT_2$ , ■—■, 兔  $Cd_7MT_1$ , □—□, 兔  $Cd_7MT_2$ , ▲—▲, 鼠  $Cd_7MT_1$ ,  
△—△, 鼠  $Cd_7MT_2$ , ×—×, 鸭  $Cd_7MT$ .

间内, 对照样的 ESR 波谱不发生变化, 所以上述变化完全是由  $Cd_7MT$  与膜的作用引起的. 从图 1b 还可以看出, 无论是  $Zn_7MT$  或是

$\text{Cd}_7\text{MT}_1$  和  $\text{Cd}_7\text{MT}_2$  则使  $W/S$  显著增大. 鼠肝  $\text{Cd}_7\text{MT}$  对谱参数的影响与兔肝  $\text{Cd}_7\text{MT}$  相似, 即  $W/S$  增大,  $\tau_c$  减小, 且变化幅度大于兔  $\text{Cd}_7\text{MT}$ , 其中  $\text{Cd}_7\text{MT}_2$  引起的变化又大于  $\text{Cd}_7\text{MT}_1$ . 鸭  $\text{Cd}_7\text{MT}$  引起的  $W/S$  和  $\tau_c$  的变化则正好相反, 即随 MT 浓度增加,  $W/S$  略有减小,  $\tau_c$  略有增大.

### 2.3 兔肝 $\text{Cd}_7\text{MT}$ 与完整人红细胞的作用

正常血细胞中不含 Cd, 所以通过测量 Cd 的浓度就可以表征与红细胞作用时  $\text{Cd}_7\text{MT}$  浓度的变化. 在 pH7.40, 37℃ 下, 1.0ml 新鲜人红细胞与 1ml 5.52ppm 兔肝  $\text{Cd}_7\text{MT}_1$  或 2.65ppm  $\text{Cd}_7\text{MT}_2$  培育 10min 后, 本体溶液中的  $\text{Cd}_7\text{MT}$  浓度便下降 96%, 100min 后几乎全部从本体溶液消失. 将红细胞用等渗 PBS 冲洗至无 Cd 检出, 在细胞溶血液中没有监测到 Cd. 通过测定本体溶液和洗出液在 417nm 的

吸光度, 表明在这些处理过程中红细胞的溶血率低于 5%<sup>[1]</sup>. 据此可以认为, 当 MT 与红细胞共存时, MT 快速地扩散并被吸附于细胞的表面. 但是这种吸附纯属物理性吸附, 可以被 PBS 等缓冲溶液解吸.

### 2.4 MT 在血液中的分布

给家兔皮下注射不同剂量的  $\text{CdCl}_2$ , 所得血浆和血细胞溶血液的凝胶层析图谱示于图 3. 根据各流分在 254nm 和 280nm 的吸光度以及用牛血清白蛋白 (分子量 66 000), 细胞色素 c (14 000) 和标准 MT (6500) 对柱子的校正结果, 确定 15—18 管为 MT 组分峰<sup>[15]</sup>. 图 3 清楚表明, 增大  $\text{CdCl}_2$  剂量, 血浆和血细胞中 MT 的浓度都明显升高. 而且同一剂量下, 血细胞溶血液中 MT 的浓度显著大于血浆 MT 的浓度.

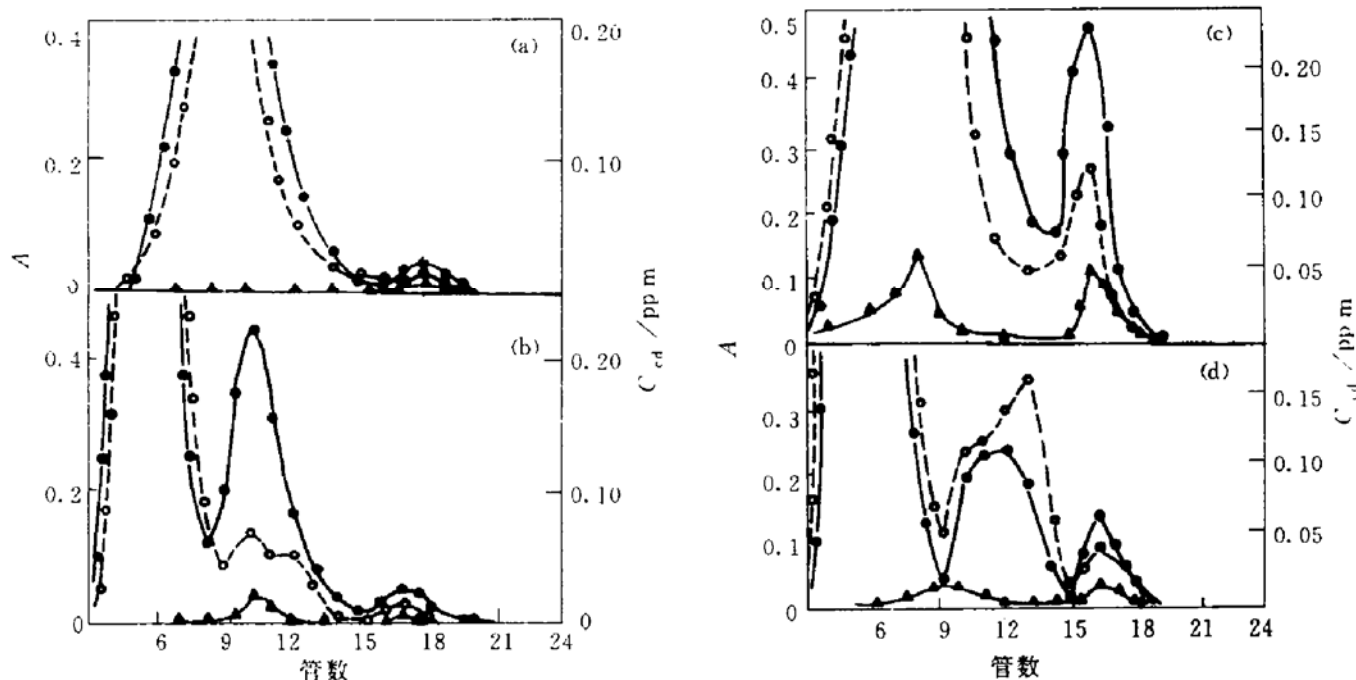


图 3 兔血细胞溶血液 (a, c) 和血浆 (b, d) 在 Sephacryl S-100 柱上的层析图谱

淋洗剂: 0.01mol/L, pH8.6 Tris-HCl, 每管 2.5ml, 流速: 0.5ml/min. (a, b): 分别在第 1, 2, 4, 7 天给家兔皮下注射  $\text{CdCl}_2$  的剂量为 0.25, 0.25, 0.5 和 1.0mg/(kg·d); (c, d): 对应的处理剂量为 4.0, 8.0, 16.0 和 32.0mg/(kg·d). ●—●,  $A_{254\text{nm}}$ , ○—○,  $A_{280\text{nm}}$ , ▲—▲,  $C_{\text{Cd}}$ .

## 3 讨 论

本文结果表明, MT 与红细胞膜之间存在

着很强的相互作用, 且不同种属、不同金属型式和不同亚型的 MT 对膜构象的影响不同. 作为生物体内源性的  $\text{Zn}_7\text{MT}$  (如兔  $\text{Zn}_7\text{MT}_1$  和

Zn<sub>7</sub>MT<sub>2</sub>)与同源的(兔)或不同源(人)的红细胞膜作用时,对膜的构象均不产生影响. Cd<sub>7</sub>MT对同源的红细胞膜的构象也几乎无影响,但却引起非同源的动物红细胞膜构象的强烈变化. 其中兔和鼠 Cd<sub>7</sub>MT都使自旋标记的人红细胞膜的 ESR 波谱的 W/S 增大,  $\tau_c$  减小. 表明此时膜可能向更加伸展的构象转化,致使原来处于深层的巯基翻转到膜表面. 关于不同 MT 对膜构象具有不同影响的原因,目前还不清楚. 很可能与 MT 的溶液构象及结合金属离子的性质差异有关.

Bremner 等<sup>[16]</sup>曾观察到 MT 与血细胞一起培育后,本体溶液中的 MT 浓度急剧下降. 本文在体外实验中观察到了同样的现象,而且证明 MT 吸附在红细胞的表面,可以被 PBS 所解吸. 体内实验进一步发现,给家兔皮下注射 CdCl<sub>2</sub> 后,血浆和血细胞溶血液中都存在有相当量的 MT,而且血细胞溶血液中的 MT 浓度明显高于血浆中的浓度.

虽然有核红细胞可以在 Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 的诱导下合成 MT,但是在成熟红细胞中则缓慢消失<sup>[17]</sup>. 关于血液 MT 的来源,目前认为主要来自肝脏<sup>[5,18]</sup>. 根据上述结果,可以认为血液中的 MT 主要吸附在血细胞的表面,并和存在于血浆中的少量 MT 建立一个动态平衡. 初步的研究结果表明,血液 MT 在金属离子的运输中发挥着重要作用<sup>[5]</sup>,本文的发现对更深刻地阐明 MT 的这一功能具有重要意义. 同时,细胞表面 MT 吸附层的存在,无疑会对细胞免受各种异物(重金属、自由基等)进攻起到积极的

防护作用. 另外, ZnMT 所具有的抗胃溃疡, CuMT 所具有的消炎、抗风湿作用也可能与 MT 在细胞表面的强吸附能力有关.

## 参 考 文 献

- 1 张保林, 王文清, 茹炳根等. 生物化学与生物物理学报, 1993; **25** (4): 425
- 2 张保林, 卢景雾, 王文清. 生物物理学报, 1992; **8** (3): 539
- 3 张保林, 王文清, 唐雯霞等. 科学通报, 1993; **38** (17): 1626
- 4 Thornalley P J, Vasak M. Biochim Biophys Acta, 1985; **827**: 36
- 5 张保林, 王文清, 任宏伟等. 科学通报, 1994; **39** (3): 227
- 6 Tsutomu M, Kazatake T, Naohiro Y *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1987; **151**: 725
- 7 日本国特許庁 (JP), 公開特許公報 (A), 平 1-172342 (1989 年 7 月); 平 1-141288 (1991 年 6 月)
- 8 Miesel R, Hartmann H J, Weser U. Inflammation (New York), 1990; **14** (5): 471
- 9 张保林, 王文清, 卢景雾. 生物物理学报, 1993; **9**: 15
- 10 Nordberg G F, Piscater M, Nordberg M. Acta Pharmacol Toxicol, 1971; **30**: 289
- 11 Garvey J S, Chang C C. Science, 1981; **214**: 805
- 12 Mehra R K, Bremner I. Biochem J, 1983; **213**: 459
- 13 Comeau R D, McDonald K W. Prep Biochem, 1992; **22**: 151
- 14 Dodge J T. Arch Biochem Biophys, 1963; **100**: 119
- 15 Suzuk Y. Ind Health, 1980; **18**: 19
- 16 Bremner I, Mehra R K, Sato M. Experimentia Suppl, 1987; **52**: 507
- 17 Tanaka K, Min K-S, Dnosaka S *et al.* Toxicol Appl Pharmacol, 1985; **78**: 63
- 18 Bremner I. Experimentia Suppl, 1987; **52**: 81

type and C-17 deleted plasmids were determined using ampicillin as substrate, and the tolerances of the bacteria to ampicillin were tested. The results indicate that the C-17 deletion increases the promoter strength by about 60%. The mutant has more resistance to ampicillin. The half-inhibition concentration of ampicillin for the mutant growth is 280 µg/ml. At the same concentration, the wild-type cell density is only about half as much as that of the mutant. The causes for the promoter-up mutation were discussed.

**Key words**  $\beta$ -lactamase, promoter-up mutation, ampicillin

***In vitro* and *in vivo* Interaction of Metallothionein with Erythrocyte.** Zhang Baolin, Lu Jingfen, Wang Wenqing, Ru Binggen, Tang Wenxia. (*Coordination Chemistry Institute of Nanjing University, State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing 210008*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 439—443

Maleimide was used as spin label for studying the effect of metallothionein (MT) on the conformation of erythrocyte membrane by ESR technique. The results show that the presence of different MTs resulted in considerable changes of the ESR parameters,  $W/S$  and  $\tau_c$ , implying that MT can interact strongly with

membrane. The experiments carried out *in vitro* demonstrated that MT could be absorbed on the surface of erythrocytes. In addition, rabbits were injected s. c. with  $CdCl_2$  to induce the biosynthesis of MT, the presence of MT mainly in the erythrocyte is first suggested after chromatographic separation of plasma and blood haemolysates from Cd-loaded rabbits. It is claimed that a dynamic equilibrium could be

established between MT absorbed on the surface of erythrocytes and presence in plasma. The significance of the above findings is discussed in brief.

**Key words** metallothionein, erythrocyte, erythrocyte membrane, absorption, spin label

**Isolation and Extraction of Gangliosides with High Purity From the Pig Brain.** Huang Rubin, Pan Ying, Wang Zhesheng, Tong Dashan, Shi Xiaoling. (*Department of Biochemistry, Capital Institute of Medicine, Beijing 100054*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 444—446

Sephadex LH-20 and silica gel centrifugal liquid chromatography were applied to isolation and purification of gangliosides from the pig brain. The highly purified gangliosides were obtained. The concentration of lipid-bound sialic acid determined is 30.1% (W/W). The results determined by silica gel G-60 HPTLC and 580nm scanning were GM1 19.5%, GD3 13.8%, GD1a 27.8%, GD1b 14.2% and GT1b 19.3%.

**Key words** gangliosides, pig brain, centrifugal liquid chromatography, purification

**Purification of Metallothioneins by Metal Chelate Affinity Chromatography.** Tie Feng, Ru Gang, Li Lingyuan, Liu Defu, Ru Binggen. (*Department of Biology, Peking University, Beijing 100871*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 447—450

An affinity chromatography column for isolation and purification of metallothionein (MT) was prepared with Chelating Sepharose Fast Flow gel bound with bivalent copper. Zinc-induced rabbit liver, or cadmium-induced mouse liver was homogenized and precipitated with