

Yuxiao, Xie Bangtie, Wang Jingyi, Chen Yuping (Naval General Hospital, Beijing 100037, China).

**Abstract** The cDNA encoding human manganese superoxide dismutase was amplified from the human liver total RNA by RT-PCR, ligated into pBV220. The cloned gene was analyzed by restriction enzymes EcoR I, Sal I, and BamH I. The sequence of the cloned gene was deter-

mined. hMnSOD was induced and expressed upon temperature shift from 32°C to 42°C. Mn<sup>2+</sup> supplementation in the bacterial growth media resulted in about 3-fold increasing of SOD activity. The special protein expressed accounts for 14% of the total protein of the bacteria.

**Key words** manganese superoxide dismutase, RT-PCR, gene cloning

## 锌<sub>7</sub>与镉<sub>7</sub>-金属硫蛋白清除羟自由基的比较\*

岳新萍 周杰昊 程 时

(北京医科大学生物物理系, 北京 100083)

**摘要** 分离及纯化兔肝金属硫蛋白, 制备去金属金属硫蛋白、锌<sub>7</sub>与镉<sub>7</sub>-金属硫蛋白, 在不同 pH 条件下, 比较后二者清除羟自由基能力; 在 pH 6 条件下, 比较锌<sub>7</sub>-金属硫蛋白与有关蛋白和无机锌盐清除羟自由基效果。结论是在近生理 pH 条件下锌<sub>7</sub>-金属硫蛋白清除羟自由基能力远强于镉<sub>7</sub>-金属硫蛋白。金属硫蛋白清除羟自由基的能力主要来源于蛋白中处于还原态的巯基。

**关键词** 金属硫蛋白, 锌<sub>7</sub>-金属硫蛋白, ESR 顺磁捕集, 羟自由基, 还原态巯基

金属硫蛋白 (metallothionein, MT)<sup>[1-3]</sup> 是一类富含巯基与金属的低分子量非酶蛋白, 遍存于生物界。该蛋白中占分子质量 30% 的半胱氨酸残基均处于还原态, 通过其上的巯基, MT 与二价金属离子结合。哺乳类 MT 可结合 7 个二价金属离子, 形成两个金属硫簇。MT 为诱导性蛋白, 它可被金属、糖皮质激素、一些化学毒物、细胞因子及某些物理、化学应激因素诱导合成。虽然人们认为 MT 参与机体某些重要元素 (如 Zn、Cu) 的储存、运输与代谢、对抗金属中毒, 但 MT 的生理功能仍在探讨中。近年来, 我们对 MT 的清除自由基、生物膜保护功能进行了研究, 结果表明 MT 有明显的细胞保护作用<sup>[4-8]</sup>, 因此 MT 在医学领域有应用前景。该蛋白中的巯基显然与清除自由基有关, 它所结合的二价金属特别是 Zn 也有稳定生物膜功能。为进一步研

究 MT 的生物膜保护功能, 以及 MT 与不同金属结合时清除自由基、保护膜功能的变化, 我们又进行了一系列实验。本研究报道 Zn<sub>7</sub>-MT 与 Cd<sub>7</sub>-MT 在不同 pH 下清除羟自由基能力的比较及 Zn-MT 与无机 Zn 盐、有关蛋白清除羟自由基能力的比较。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂

Sephadex G-50、G-25 购自 Pharmacia 公司, 二硫苏糖醇, 二硫双吡啶, Tris 购自 Sigma 公司。含锌胰岛素由刘树森教授赠。其他试剂系国产分析纯。

#### 1.2 动物

大耳白兔, 雌雄不限, 2.5~3 kg, 本校

\* 国家自然科学基金资助 29270356。

收稿日期: 1995-10-19, 修回日期: 1996-02-11

动物部提供。

### 1.3 兔肝 MT 诱导合成及提纯

按 Vasak<sup>[9]</sup>方法, 皮下注射氯化锌, 冷乙醇沉淀, Sephadex G-50 过柱分离, 经 YM 1 膜超滤浓缩, 再经冷冻干燥后 -20℃ 保存。

### 1.4 去金属 MT (apo-MT) 制备

约 20 mg 兔肝 MT 溶于 2 ml 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 8.6) 中, 加入 10 mg 二硫赤糖醇, 将 pH 降至 1.5, 过 Sephadex G-25 柱, 以除去金属, 收集 220 nm 部分, 冻干。

### 1.5 含单一金属的 MT 制备

取 apo-MT 5 mg 溶于 2 ml 0.01 mol/L HCl 中, 加入 8 倍 Zn 当量的 ZnCl<sub>2</sub>, 通入氮气, 用 Tris 溶液将 pH 增至 pH 7.5, 过 Sephadex G-50 柱, 以去除过多的金属离子。取 220 nm 部分, 得 Zn<sub>7</sub>-MT。Cd<sub>7</sub>-MT 的制备基本与上同。不同之处为用 Tris 溶液将 pH 增至 8.6, 取 254 nm 吸收峰部分<sup>[10]</sup>。

### 1.6 变性 apo-MT (d. apo-MT) 的制备

2 mg apo-MT 溶于 pH 8.6 的 Tris-HCl 中, 放置 12 h。以上诸实验所用器皿均经硝酸(纯)浸泡后用纯水(电阻为 18 MΩ)冲洗。在制取 apo-MT、Zn<sub>7</sub>-MT 和 Cd<sub>7</sub>-MT 前, 配制试剂所用纯水必须严格除氧。一切试剂均用纯水配制。

### 1.7 MT 检测

**1.7.1 蛋白定量:** MT 在酸性环境中, 金属离子脱离蛋白, 形成 apo-MT, apo-MT 在 220 nm 处有吸收峰。根据  $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ ,  $\epsilon_{220}$ (兔肝) = 48200 L/mol 计算 MT 含量。

**1.7.2 巯基定量:** 将样品加入含饱和二硫双吡啶的乙酸钠溶液中, 测定 343 nm 吸收值。根据  $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ ,  $\epsilon_{343}$  = 7600 L/mol 计算样品巯基含量。

**1.7.3 金属含量测定:** 用火焰原子吸收分光光度法测定。

### 1.8 MT 清除羟自由基效应的 ESR 检测

以 FeCl<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为 OH· 发生系统, 用氮酮类电子顺磁共振自旋捕集剂 DMPO 捕集

OH·, 生成 DMPO-OH。如图 1 所示。

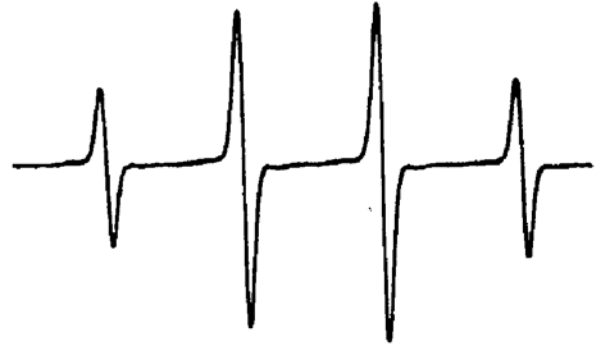


图 1 DMPO 捕集 OH· 生成的 DMPO-OH 信号  
E-109 型 ESR 波谱仪, 微波功率 5 mW, 调制幅度 1 G, X 波段, 时间常数 0.128 s, 温度 293°K。

## 2 结 果

由兔肝分离及纯化的 MT 约 100 mg, 与蛋白的摩尔比为 5.5:1。制备的 apo-MT 中巯基与蛋白比值为 19:1 (即每个分子 MT 蛋白含有 19 个巯基, 标准为 19:1~21:1), Zn 和 Cd 含量接近 0。由 apo-MT 制备的 Zn<sub>7</sub>-MT 与 Cd<sub>7</sub>-MT 中金属与蛋白的摩尔比分别为 7.1:1 与 7.3:1 (标准为 7.0:1)<sup>[9]</sup>。

在不同 pH 条件下, Zn<sub>7</sub>-MT 和 Cd<sub>7</sub>-MT 清除羟自由基能力不同。将 FeCl<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液溶解或稀释, 分别控制 pH 值为 pH 7 ± 0.2、pH 5 ± 0.2、pH 4 ± 0.2 和 pH 2 ± 0.2。在每种 pH 条件下, 实验分三组: 对照组、Zn<sub>7</sub>-MT 组和 Cd<sub>7</sub>-MT 组。两种 MT 终浓度均为 1.5 × 10<sup>-5</sup> mol/L。如图 2 所示, 在上述条件下, 两种 MT 均有清除羟自由基能力。在 pH 7 与 pH 5 时, Zn<sub>7</sub>-MT 清除羟自由基能力明显强于 Cd<sub>7</sub>-MT ( $P < 0.05$ )。pH 降至 4 时, 虽然 Zn<sub>7</sub>-MT 仍强于 Cd<sub>7</sub>-MT, 但差异无显著性 ( $P > 0.1$ ),  $t = 1.61$ , 当 pH 进一步降至 2, 两种 MT 作用相同。

由图 3 可见, 在 pH 6 条件下, Zn<sub>7</sub>-MT 与 apo-MT 对羟自由基都有很强的清除能力, 且两者间无显著差异。与 MT 相同摩尔浓度的牛血清白蛋白 (分子质量为 MT10 倍)、胰

胰岛素 (分子质量与 MT 相同)、变性 apo-MT 及与 Zn<sub>7</sub>-MT 中 Zn 摩尔浓度相当的 ZnSO<sub>4</sub> 溶液均无清除能力。

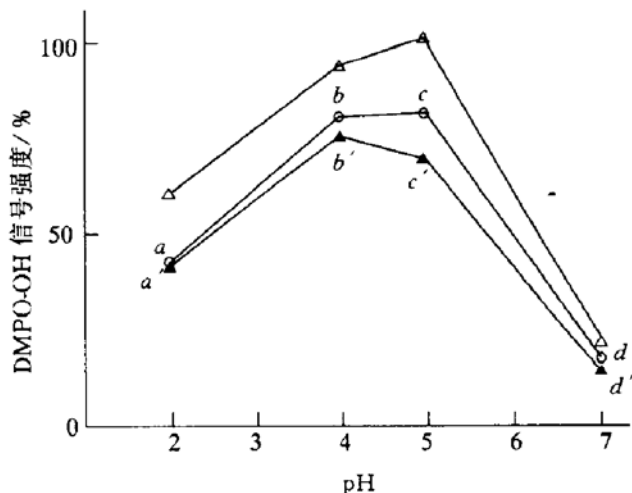


图 2 在不同 pH 条件下, Zn<sub>7</sub>, Cd<sub>7</sub>-MT 清除羟自由基能力的比较

△—△: 空白对照 (只有 OH<sup>·</sup> 发生系统和 DMPO);  
○—○: Cd<sub>7</sub>-MT; ▲—▲: Zn<sub>7</sub>-MT. a、b、c、d 分别为在 pH 2、pH 4、pH 5 及 pH 7 时加入 Cd<sub>7</sub>-MT 后的信号强度; a'、b'、c'、d' 分别为在上述四种 pH 条件下加入 Zn<sub>7</sub>-MT 后的信号强度. 与相应对照比: a'、a、c'、d' 和 d, P < 0.01; c 和 b', P < 0.05; b, P < 0.1.

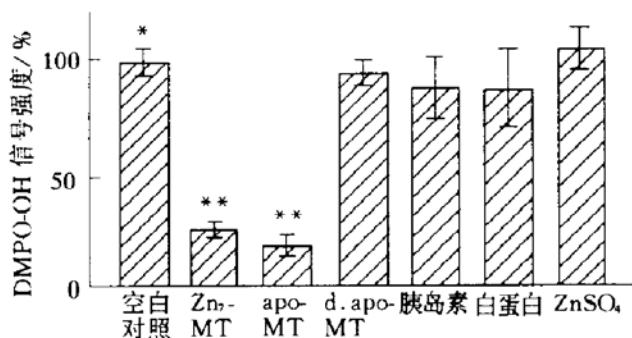
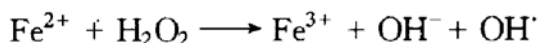


图 3 Zn<sub>7</sub>-MT 清除羟自由基能力与有关蛋白和无机锌盐的比较

\*: 空白对照 (仅有 OH<sup>·</sup> 发生系统与 DMPO), 与 \* 对比, \*\* P < 0.01.

### 3 讨 论

Fe<sup>2+</sup> 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 Fenton 反应为 OH<sup>·</sup> 来源。



OH<sup>·</sup> 的 pK 值为 11.85. 因此在碱性环境中不利于 OH<sup>·</sup> 生成. 氮酮类 ESR 自旋捕集剂在水溶液中易水解, 虽然环状氮酮类的 DMPO 在中性水溶液中颇稳定, 但在低 pH 环境中仍不稳定, 不利于捕集 OH<sup>·</sup>. 据此可解释我们用相同浓度的 Fe<sup>2+</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及 DMPO, 但是在不同 pH 条件下, DMPO—OH 信号的强度不同, 在 pH 5 时信号强度相对最大。

Kagi 研究组<sup>[11]</sup>发现, apo-MT 对 Cd<sup>2+</sup> 的结合能力远高于对 Zn<sup>2+</sup> 的结合能力. 在 pH 7 时, 兔肝 Cd<sub>7</sub>-MT 解离常数  $K'_{Cd} = 5 \times 10^{-17}$  L/mol, 而 Zn<sub>7</sub>-MT 为  $K'_{Zn} = 5 \times 10^{-13}$  L/mol. 据此, 可推出结合常数, 即在 pH 7 时兔肝  $K_{Cd} = 0.2 \times 10^{17}$  mol/L.  $K_{Zn} = 0.2 \times 10^{13}$  mol/L. 显而易见, 在 pH 7 时, MT 蛋白对 Cd<sup>2+</sup> 的结合比对 Zn<sup>2+</sup> 强 10<sup>4</sup> 倍. 由无机化学角度看, —SH 为软碱, Cd<sup>2+</sup> 为软酸, 而 Zn<sup>2+</sup> 为中界酸. 软酸与软碱的结合比中界酸与软碱的结合牢固得多. 在溶液体系中, Zn<sub>7</sub>-MT 要比 Cd<sub>7</sub>-MT 产生更多的 apo-MT. 当溶液 pH 降低时, 蛋白质质子化, 结合金属能力下降. 因而说明在 pH 7 与 pH 5 时 Zn<sub>7</sub>-MT 与 Cd<sub>7</sub>-MT 都有清除 OH<sup>·</sup> 作用, 但前者的作用明显强于后者, 当 pH 降低至 pH 4 时, 二者清除 OH<sup>·</sup> 作用虽有差别, 但无显著性. 待 pH 降至 pH 2 时, 这两种 MT 中的金属全部解离, 均成为 apo-MT, 二者作用相同. 因此, 该实验表明 MT 的抗 OH<sup>·</sup> 作用与该蛋白结合的金属无关, 完全是蛋白质部分的功能。

以巯基被氧化的 apo-MT (即变性 apo-MT)、分子质量与 MT 近似并含锌的胰岛素和分子质量比 MT 高 10 倍的白蛋白为蛋白对照, 以金属摩尔浓度相同的 ZnSO<sub>4</sub> 为金属离子对照, 在 pH 6 时观察 Zn<sub>7</sub>-MT 和 apo-MT 的清除作用. 显而易见, MT 清除 OH<sup>·</sup> 功能与 Zn 无关, 亦非蛋白质部分的非特异作用, 仅与半胱氨酸残基上还原态的巯基有关. Zn<sub>7</sub>-MT 与 apo-MT 均有明显清除 OH<sup>·</sup> 功能, 后者略强于前者, 但差异无显著性. 在 pH 6 时,

虽然不利于维持 apo-MT 中的巯基处于还原态,但在实验 3 nmin 短暂的时间内, apo-MT 还保持了一定的还原性. 这又一次表明 MT 的抗 OH<sup>·</sup> 功能与所结合金属无关, 而主要是蛋白质部分中还原态的巯基作用.

### 参 考 文 献

- 1 周杰昊, 程 时. 生理科学进展, 1995; 26: 9
- 2 程 时, 谢 靖. 国外医学分子生物学分册, 1993; 15: 256
- 3 Suzuki K T, Imura N, Kimura M. In: Suzuki K T eds. *Metallothionein III*. Basel: Birkhauser Verlag, 1993; 29
- 4 华 玥, 程 时, 卢景秀等. 科学通报, 1992; 37: 1217
- 5 程 时, 常英姿, 王冬森等. 中华医学杂志, 1992; 72: 749
- 6 程 时, 侯 琳, 买鸿宴等. 动物学报, 1993; 39: 412
- 7 程 时, 谢一琳, 华 玥. 生物物理学报, 1992; 8: 104
- 8 Wang G, Hou L, Cheng S *et al.* Chinese Journal of Physiological Sciences, 1994; 10: 227
- 9 Vasak M. *Methods in Enzymology*, 1991; 205: 39
- 10 Vasak M. *Methods in Enzymology*, 1991; 205: 433
- 11 Kagi J H R. In: Suzuki K T eds. *Metallothionein III*. Basel: Birkhauser Verlag, 1993; 29

**A Comparison of Scavenging Hydroxyl Radical Between Zn<sub>7</sub>- and Cd<sub>7</sub>-Metallothionein.** Yue Xiping, Zhou Jiehao, Cheng Shi (*Department of Biophysics, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

**Abstract** Metallothionein (rabbit liver) (MT), apo-MT, Zn<sub>7</sub>-MT and Cd<sub>7</sub>-MT were prepared respectively. The scavenging effects of Zn<sub>7</sub>-MT and Cd<sub>7</sub>-MT on hydroxyl radical were compared at various pH values, and at pH 6 the effects of Zn<sub>7</sub>-MT were compared with related proteins and inorganic zinc salt. From these results it is concluded that the ability of Zn<sub>7</sub>-MT to scavenge hydroxyl radical is far stronger than that of Cd<sub>7</sub>-MT and that the ability of MT to scavenge hydroxyl radical derives from reduced —SH group in MT.

**Key words** metallothionein, hydroxyl radical, Zn-metallothionein, ESR spin trapping, reduced —SH group

(上接第 333 页)

- 13 Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90: 9031
- 14 Qian N Q, Kovach I M. FEBS, 1993; 336: 263
- 15 Ashani Y, Radic Z, Tsigelny I *et al.* J Biol Chem, 1995; 270: 6370
- 16 Harel M, Su C T, Frolow F *et al.* J Mol Biol, 1991; 221: 909
- 17 Saxena A, Doctor B P, Maxwell D M *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1993; 197: 343
- 18 Ordentlich A, Kronman C, Barak D *et al.* FEBS Lett, 1993; 334: 215
- 19 Segall Y, Waybort D, Barak D *et al.* Biochemistry, 1993; 32: 13441
- 20 Steinberg A, Drift A C M, Grunwald J *et al.* Biochemistry, 1989; 28: 1248
- 21 Masson P, Gouet P, Clery C. J Mol Biol, 1994; 238: 466

**Progress in the Studies of Structures and Functions of Acetylcholinesterase and the Reactivation Mechanism of Organophosphate-inhibited Enzyme.** Luo Chunyuan (*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military*

*Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

**Abstract** After the elucidation of the three-dimensional structure of Torpedo acetylcholinesterase by X-ray diffraction in 1991, studies by computer modelling and site-directed mutagenesis have led to significant progress in the elucidation of the structure-function relationship of this enzyme. And based upon this, efforts have been made to investigate further mechanism of inhibition by irreversible inhibitors (organophosphate), and that of the reactivation of the irreversibly inhibited enzyme. In addition, progress in study of aging mechanism of the inhibited enzyme was also reviewed.

**Key words** acetylcholinesterase, organic phosphate, phosphorylated enzyme, reactivation mechanism