

- 5 Wang J, Yai Y, Garrett T P *et al.* Atomic structure of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature* (London), 1990, **348**: 411~ 418
- 6 Schuler G D. A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Proteins: Struct Func Gen*, 1991, **9**: 180 ~ 187
- 7 Chotnia C, Lesk A M, Tramontano A *et al.* Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* (London), 1989, **342**: 877~ 883
- 8 Shenkin P S, Yarmush D L, Fine R M *et al.* Predicting antibody hypervariable loop conformation. I. Ensembles of random conformations for ringlike structures. *Biopolymers*, 1987, **26**: 2053~ 2085
- 9 Summers N L, Carlson W D, Karplus M. Analysis of side chain orientations in homologous proteins. *J Mol Biol*, 1987, **196**: 175~ 198
- 10 Luthy R, Bowie J U, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 1992, **356**: 83~ 85
- 11 Gilson M K, Honig B H. Calculation of electrostatic potentials in an enzyme active site. *Nature* 1987, **330**: 84~ 86
- 12 Yawata H, Yasukawa K, Natsuka S *et al.* Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6 binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *EMBO J*, 1993, **12**: 1705~ 1712

Homology Modeling of the Functional Domain of the Extracellular Region of Human IL-6 Receptor. SUN Tao, REN Yunfang, LU Zhongzheng¹⁾, LI Song¹⁾, JIAO Kefang¹⁾, SHEN Beifen (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;* ¹⁾*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military*

Medical Sciences, Beijing 100850, China).

Abstract Interleukin-6 receptor (IL-6R) is a member of the hematopoietin receptor superfamily which has its common conservative structure “the cytokine binding domain (CBD)”. CBD is the functional domain of the extracellular region of IL-6R, because only this domain of IL-6R is responsible for IL-6 binding and for IL-6 signal transduction through gp130. It is proposed that the β -sheets folding motif of the IL-6R CBD is very similar to that seen in the crystal structure of human growth hormone receptor (hGH-R), which also belongs to the cytokine receptor family, and CD4. By means of computer-guided homology modeling techniques, the three-dimensional (3D) structures of hGH-R and CD4 were used as template protein to predict the 3D-structure of the functional domain (residue 106 ~ 322) of hIL-6R. The characteristics of the conservative structure-conformation in CBD of hIL-6R were described. The model may provide for the interpretation of the results obtained with introducing site-directed mutation into soluble IL-6R and the 3D-quantitative analysis on the structure-function relationship of IL-6R functional domain.

Key words IL-6 receptor, functional domain, homology modeling

柠檬酸铁对过亚硝酸根硝化酪氨酸反应的影响

廖力夫 何玉媛 刘传湘 袁亚莉 李贵荣

(衡阳医学院基础化学教研室, 衡阳 421001)

摘要 由一氧化氮和超氧阴离子迅速反应生成的过亚硝酸根 (ONOO^-) 是一种强细胞毒性物质. 使含酚基物质如酪氨酸等硝化, 是过亚硝酸根损伤生物系统的重要途径之一. 研究了柠檬酸铁和草酸铁对过亚硝酸根硝化酪氨酸反应的影响. 在生理 pH 条件下柠檬酸铁和草酸铁对硝化反应无影响. 在弱酸性条件下柠檬酸铁和草酸铁可催化硝化反应. 对 pH 影响铁配合物在硝化反应中的催化活性的原因进行了讨论.

关键词 过亚硝酸根, 硝化, 酪氨酸, 柠檬酸铁, 草酸铁

生物体内产生的一氧化氮 (NO) 和超氧阴离子 (O_2^-) 可迅速反应结合成过亚硝酸根 ($ONOO^-$)^[1,2], 反应速率常数达 $6.7 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, 为扩散控制型反应^[3]. O_2^- 损伤机体的主要途径可能是通过生成 $ONOO^-$ 后进行的^[3]. 新近的研究已经表明 $ONOO^-$ 作为强氧化剂, 硝化剂和羟自由基产生剂^[3~5], 可以以多种方式攻击许多生理活性物质, 如引发脂质过氧化^[6], 修饰低密度脂蛋白^[7], 抑制酶活性^[8], 损伤 DNA^[9] 等, 从而以多种方式对机体造成细胞毒性等各种损伤^[10]. 因此研究 $ONOO^-$ 损伤机体的作用机制和影响因素具有重要意义.

$ONOO^-$ 使酪氨酸, 嘌呤等含芳基物质硝化是 $ONOO^-$ 损伤生物系统的重要途径之一^[11, 12]. 有关 $ONOO^-$ 硝化酪氨酸的反应机制及其影响因素的研究已有一些报道^[11, 13]. 三价铁与 EDTA 的配合物 $\text{Fe}(\text{III})$ EDTA 对以 $ONOO^-$ 为硝化剂的酪氨酸的硝化反应在生理 pH 范围内有显著的催化作用^[11]. 生物体内广泛存在着各种形式的铁配合物, 但却不存在 $\text{Fe}(\text{III})$ EDTA, 因此生物体内实际存在的铁配合物对硝化反应的影响是否与 $\text{Fe}(\text{III})$ EDTA 存在着相似性还有待于进一步的研究.

柠檬酸和草酸都是生物体内的正常代谢物质, 柠檬酸铁 (III) 和草酸铁 (III) 都是铁在生物体内的存在形式之一. 本文研究柠檬酸铁和草酸铁对 $ONOO^-$ 硝化酪氨酸反应的影响, 以了解某些生物体内存在的铁配合物在以 $ONOO^-$ 为硝化剂的酪氨酸硝化反应中的作用.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

过氧化氢; 亚硝酸钠; 盐酸; 氢氧化钠; L, D-酪氨酸; 柠檬酸铁; 草酸铁 (由 Fe^{3+} 与草酸按 1: 3 的摩尔比生成); $\text{Fe}(\text{III})$ EDTA (由 EDTA 与 Fe^{3+} 按 1: 1 的摩尔比生成); pH 3.5 至 pH 6 的邻苯二甲酸盐缓冲溶液; pH 6 至 pH 8.5 的磷酸盐缓冲溶液. 所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水.

754 型紫外可见分光光度计.

1.2 过亚硝酸根的合成

参考文献 [3] 所用方法合成 $ONOO^-$. 合成过程简述如下: 将 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{NaNO}_2 + 0.35 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 的混合溶液与 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液等速压入三通管内混合, 在溶液流出三通管的过程中 NaNO_2 与 H_2O_2 在酸性条件下反应生成不稳定的过亚硝酸 $ONOOH$, 将流出液引入 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液中, 即获得在碱性条件下可稳定数周的 $ONOO^-$ 溶液. 溶液中过剩的 H_2O_2 用颗粒状二氧化锰催化分解除去. $ONOO^-$ 的产率为 80% 以上. 每次硝化反应实验之前, 根据溶液在 302 nm 处的吸光度确定 $ONOO^-$ 的准确浓度, $ONOO^-$ 在 302 nm 处的摩尔吸光系数为 $1670 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[13].

1.3 酪氨酸硝化反应实验

将一定量的酪氨酸和铁配合物溶于 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐或邻苯二甲酸盐缓冲溶液中, 再加入一定量的 $ONOO^-$ 溶液, 迅速混匀使之反应. 反应在 25 °C 下进行. 用 pH 计测定反应前后溶液的 pH 变化, 在所有实验中, pH 变化均不超过 0.1 个 pH 单位. 将反应后的溶液用 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调整到 pH 10 ~ 11 的范围内, 以未加 $ONOO^-$ 的空白试液为参比, 在 428 nm 处测溶液的吸光度, 根据吸光度值计算硝化产物 3-硝基酪氨酸的含量. 3-硝基酪氨酸在 428 nm 处的摩尔吸光系数为 $4200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[13].

2 结果

试验了在 pH 不高于 8.5 的情况下, 当不存在酪氨酸时 $ONOO^-$ 自行分解为硝酸的速率, 结果表明完全分解所需时间不超过 2 min. 这表明硝化反应完成时间亦不超过 2 min.

分别以 pH 6 的磷酸盐缓冲溶液和 pH 6 的邻苯二甲酸盐缓冲溶液进行硝化反应实验, 结果表明改变缓冲体系对硝化反应无影响.

试验了在无 Fe^{3+} 存在时, 柠檬酸, 草酸, EDTA 在各种 pH 条件下对硝化反应的影响,

结果表明均无影响。

pH 值对硝化反应的影响见图 1。图 1 中及后面各图中反应物的浓度均指初始浓度，各点数据均为五次平行实验结果的统计平均值，变异系数均不超过 8%。图 1 表明，当不存在铁配合物时，硝化产物 3-硝基酪氨酸在生理 pH 范围内生成量最多。Fe (III) EDTA 可显著催化硝化反应，并且在生理 pH 范围内催化活性最强。柠檬酸铁和草酸铁在生理 pH 范围内均对硝化反应无影响，只在弱酸性条件下有一定催化作用，在 pH 4 至 5 范围内催化作用较大。

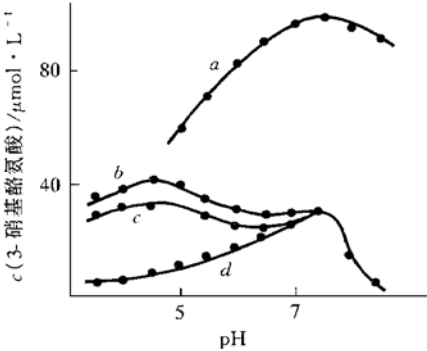


图 1 pH 对硝化反应的影响

a: Fe (III) EDTA; b: 柠檬酸铁; c: 草酸铁; d: 不存在铁, 条件: 50 mmol/L 缓冲液, 0.5 mmol/L 酪氨酸, 0.5 mmol/L ONOO⁻, 0.5 mmol/L 铁配合物。

铁配合物浓度对硝化反应的影响见图 2。

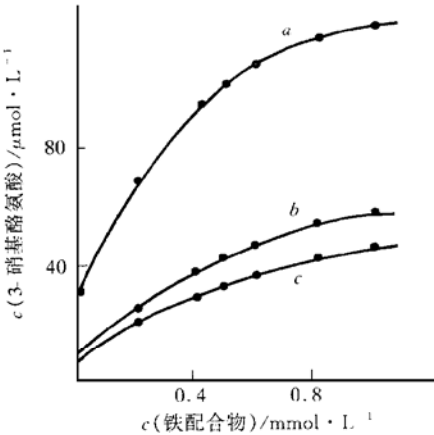


图 2 铁配合物对硝化反应的影响

a: Fe (III) EDTA, pH 7.4; b: 柠檬酸铁, pH 4.5; c: 草酸铁, pH 4.5. 其余条件同图 1。

在 pH 7.4 的条件下, 3-硝基酪氨酸剂量依赖地随 Fe (III) EDTA 的浓度的增加而增加。在 pH 4.5 的条件下, 3-硝基酪氨酸剂量依赖地随柠檬酸铁, 草酸铁的浓度的增加而增加。这些都表明铁配合物参与了反应。

ONOO⁻ 浓度和酪氨酸浓度对硝化反应的影响分别见图 3 和图 4。不论铁配合物存在与否, 3-硝基酪氨酸的浓度均与 ONOO⁻ 浓度成直线关系。当酪氨酸浓度大于 0.2 mmol · L⁻¹ 时, 3-硝基酪氨酸的浓度基本与酪氨酸的浓度无关。

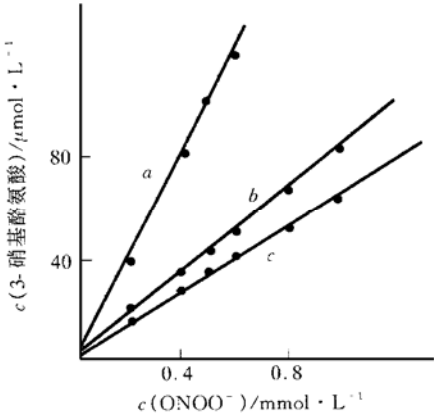


图 3 ONOO⁻ 对硝化反应的影响

a: Fe (III) EDTA, pH 7.4; b: 柠檬酸铁, pH 4.5; c: 草酸铁, pH 4.5. 其余条件同图 1。

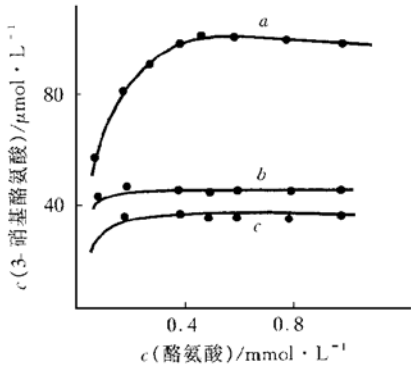


图 4 酪氨酸对硝化反应的影响

a: Fe (III) EDTA, pH 7.4; b: 柠檬酸铁, pH 4.5; c: 草酸铁, pH 4.5. 其余条件同图 1。

3 讨 论

已有报道和我们的实验都表明，在生理 pH 条件下 Fe(III) EDTA 可显著催化 ONOO⁻

硝化酪氨酸等含酚基化合物的反应. 根据硝化产物与 ONOO^- 和 Fe(III)EDTA 浓度有关而与含酚基化合物浓度无关的事实, Beckman 等^[11] 提出了催化反应可能的历程是 ONOO^- 与 Fe(III)EDTA 先作用生成具有 NO_2^+ 性质的中间过渡态物质且为历程中的限速步骤, 中间态物质再与含酚基化合物发生亲电取代反应生成硝基化合物. 我们的实验表明, 在 pH 4.5 条件下, 柠檬酸铁和草酸铁对硝化反应的影响类似于 Fe(III)EDTA , 故反应机制应是相似的.

Beckman 等^[11] 还报道了 Fe(III)DTPA 不同于 Fe(III)EDTA , 无催化活性. 对于这种差异, Beckman 等认为其原因是两种配合物中 Fe^{3+} 配位点被占据情况不同. Fe^{3+} 有七个配位点, 在 Fe(III)EDTA 中只被占据六个, 还剩余一个配位点, 因而具有催化活性; 在 Fe(III)DTPA 中其配位点则被七个配位原子全部占据, 因而失去催化活性. 但在柠檬酸铁和草酸铁中, Fe^{3+} 的配位点分别只被配位原子占据 4 个和 6 个, 而我们的实验表明二者在生理 pH 条件下都没有催化活性, 因此不能只根据 Fe^{3+} 配位点占据情况来判断铁配合物的催化活性.

铁配合物的电正性可能是影响其催化活性的重要因素之一. 其电正性越高, 越有利于具有 NO_2^+ 性质的中间过渡态的形成, 催化活性就越强. Fe(III)EDTA 中羧基解离出的 H^+ 仍结合在分子内的氮原子上, 而柠檬酸铁和草酸铁中羧基解离出的 H^+ 却不能再结合到配合物上, 因而 Fe(III)EDTA 具有更高的电正性, 从而显示出更高的催化活性. 在酸性条件下, 柠檬酸和草酸解离出的 H^+ 比在中性条件下少, 相应配合物电正性增加, 因而显示出一定的催化活性. 至于 Fe(III)EDTA 在酸性条件下催化活性有所下降, 则应是酸性条件下 ONOO^- 自行分解速率加快与硝化反应竞争所致.

ONOO^- 对芳基化合物的硝化是 ONOO^- 损伤生物系统的重要途径之一. 虽然柠檬酸铁和草酸铁对 ONOO^- 引起的硝化反应影响不大, 但生物系统内尚存在许多其他类型的铁配合物, 可以预料, 如这些铁配合物有较高的电

正性, 则可能将对 ONOO^- 引起的硝化反应产生显著的催化作用.

参 考 文 献

- 1 Squadrito G L, Pryor W A. *Chem Biol Interact*, 1995, **96** (2): 203~ 206
- 2 Royall J A, Kooy N W. *Portland Pres Proc*, 1994, **8**: 169 ~ 171
- 3 Radi R, Beckman J S, Bush K M *et al.* *J Biol Chem*, 1991, **266** (7): 4244~ 4250
- 4 Vander V A, O'Neill C A, Halliwell B *et al.* *FEBS Lett*, 1994, **339** (1-2): 89~ 92
- 5 Augusto O, Gatti R M, Radi R. *Arch Biochem Biophys*, 1994, **310** (1): 118~ 125
- 6 Rubbo H, Radi R, Trujillo M *et al.* *J Biol Chem*, 1994, **269** (42): 26066~ 26075
- 7 Moore K P, Darle-Usmar V, Morrow J *et al.* *Circ Res*, 1995, **77** (2): 335~ 341
- 8 Castro L, Rodriquez M, Radi R. *J Biol Chem*, 1994, **269** (47): 29409~ 29415
- 9 Salgo M G, Bermudez E, Squadrito G L *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1995, **322** (2): 500~ 505
- 10 Crow J P, Beckman J S. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1995, **196**: 57~ 73
- 11 Beckman J S, Ischiropoulos H, Zhu L *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1992, **298** (2): 438~ 445
- 12 Yermilov V, Rubio J, Becchi B *et al.* *Carcinogenesis*, 1995, **16** (9): 2045~ 2050
- 13 Vander V A, Eiserich J P, O'Neill C A *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1995, **319** (2): 341~ 349

The Effects of Ferric Citrate on the Nitration of Tyrosine by Peroxynitrite. LIAO Lifu, HE Yuyuan, LIU Chuanxiang, YUAN Yali, LI Guirong (*Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China*).

Abstract Peroxynitrite is a powerful cytotoxic species formed by the rapid reaction between nitric oxide and superoxide. The nitration of phenolics such as tyrosine by peroxynitrite is one of important paths peroxynitrite damaging biological systems. The effects of ferric citrate and ferric oxalate on the nitration of tyrosine by peroxynitrite have been studied. At physiological pH, ferric citrate and ferric oxalate have no effects on the reaction. At weakly acidic pH the reaction can be catalyzed by ferric citrate and ferric oxalate. The cause of the effects of pH on the catalytic activity of ferric chelates has been discussed.

Key words peroxynitrite, nitration, tyrosine, ferric citrate, ferric oxalate