

# 螯合剂对结合在人血清白蛋白 (HSA) 上的铜离子 活动化能力的研究

高黎明 李荣昌 王 夔

(北京医科大学, 无机教研室, 北京 100083)

用凝胶色谱法研究了螯合剂使结合在人血清白蛋白上的铜(II)活动化的能力, 若用在螯合剂存在时和无螯合剂存在时蛋白部分结合金属量之比作为表征活动化能力的参数, 有如下顺序:

Trien > DTPA > EDTA > EGTA > NTA > IDA

除 Trien 和 DTPA 外, 其他几种螯合剂的活动化能力的对数值与其相应的条件稳定常数的对数值之间有一线性关系。Trien 和 DTPA 的反常被认为与复杂的反应历程有关, 这可能涉及三元配合物的形成。

关键词: 人血清白蛋白 金属铜 螯合剂 活动化

## 引 言

有生物大分子配体参与的两种配体竞争金属离子的反应与两小分子配体竞争反应有所不同<sup>[1,2]</sup>。若不考虑大分子在竞争中可能表现的特殊性, 决定不同螯合剂从同一螯合物上活动金属离子的能力的主要因素应该是它们在给定条件下的条件稳定常数的大小。而事实上, 对于上述反应来说常有偏离条件稳定常数的情况<sup>[1,2,3]</sup>。我们研究 Cd-牛血清白蛋白 (BSA), Cd-金属硫蛋白 (MT) 和 Ni-BSA 与一系列螯合剂间的竞争反应, 所得结果表明螯合剂的竞争能力 (按  $\log F$  值计<sup>[1]</sup>) 也常不与条件稳定常数的高低一致<sup>[1,4]</sup>。因此, 进一步研究大小分子配体竞争金属离子的反应热力学及动力学, 对于我们更清楚地认识这类反应的特殊性无疑是非常必要的。为此, 我们用凝胶色谱法对一系列螯合剂使结合在人血清白蛋白(HSA)上的铜离子活动化能力进行了研究。

## 实 验 部 分

### 1. 药品及仪器

试剂: 人血清白蛋白 (HSA), 北京市红十字血液中心 (含量不低于 95%)。葡聚糖凝胶 (Sephadex) G-25 (Pharmacia 进口分装, 上海化学试剂采购供应站试剂厂)。氯化铜, 乙二胺四乙酸 (EDTA), 氨三乙酸 (NTA) 和亚氨二乙酸 (IDA) 为分析纯试剂 (北京试剂)。三乙三胺五乙酸 (DTPA), 乙二醇二乙醚 N, N' 一二胺四乙酸 (EGTA) 和三乙四胺盐酸盐 (Trien) 为化学纯, 使用前重结晶二次。DTPA 和 EDTA 溶液用配位滴定法标定其浓度。

本文于1988年5月30日收到。

国家自然科学基金资助课题。

\* 本文为高黎明硕士论文的一部分。

EGTA, NTA 和 IDA 分别采用加入过量碱, 后用标准酸回滴法确定浓度。Trien 用 pH 电位法确定其浓度。实验中各体系均用 Tris-HCl 缓冲液维持 pH7.73 (25℃), pH8.4 (4℃)。所有溶液均用去离子水配制。

仪器: 柱层析分离系统 (LKB 公司); WFX-1B 型原子吸收分光光度计 (第二光学仪器厂); UV-260 型可见—紫外分光光度计 (岛津); HM-20 型 pH 计 (东洋 (TOA))。

## 2. 实验方法及结果

(1) 整合剂存在下 HSA 结合铜 (II) 量的测定——HSA, Cu (II) 和整合剂 (L) 的化学计量比为 1:1:1, 浓度均为  $2.60 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ 。在 HSA-Cu (II) (1:1) 溶液中分别加入等摩尔的整合剂, 25℃ 下恒温 5 小时后放入冷室 (4℃), 15 分钟后上柱。用 Tris-HCl 缓冲溶液 (pH8.40) 淋洗。用火焰原子吸收法测定淋出液中的铜含量, 用紫外分光光度法测 HSA 的含量。图 1 画出了上述各体系的以铜 (II) 结合量 (mole) 表示的凝胶色谱图。观察蛋白质部分的铜 (II) 含量峰, 可见其峰面积按下列顺序递增:



说明其相映的整合剂竞争能力越来越低。由蛋白质部分峰对映的 HSA 总量 (mol) 和结合铜总量 (mol), 可求得整合剂存在下, 每摩尔 HSA 结合铜量 (见表 1)。

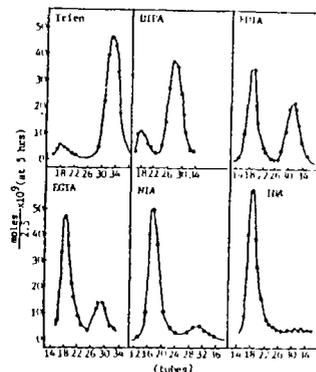


图 1 HSA-Cu 加各种整合剂体系的凝胶色谱图

Fig.1 Gel chromatogram of the systems involving HSA-Cu(II) and various chelating agents

表 1 整合剂存在下每摩尔 HSA 结合 Cu(II) 的摩尔数

Table 1 Moles of Cu(II) Bound to HSA (per Mole of HSA) in the Presence of Chelating Agents, HSA:Cu(II):L=1:1:1 (at 5 hrs, pH=7.73(25℃) and the Relative Parameters

chelators	Cu(II)(mole)	$F^*$	$f^{**} \left( \frac{1}{F} - 1 \right)$	log f
	HSA(mole)			
DTPA	0.239	0.230	3.35	0.525
EDTA	0.646	0.621	0.610	-0.215
EGTA	0.794	0.763	0.311	-0.507
Trien	0.122	0.117	7.55	0.878
NTA	0.933	0.897	0.115	-0.935
IDA	1.00	0.962	0.0395	-1.40

$f^{**} = \frac{\text{The percentage of low molecular weight complex of copper(II) in the presence of chelator (CuL\%)}}{\text{The percentage of macromolecular complex of copper(II) in the presence of chelator (HSA-Cu\%)}}$

$F = \frac{\text{Moles of Cu(II) bound to HSA (per mole of HSA) in the presence of chelating agents}}{\text{Moles of Cu(II) bound to HSA (per mole of HSA) in the absent of chelating agents}}$

(2) HSA 结合铜 (II) 量的测定——用与 (1) 类似的方法及条件可测定每摩尔 HSA 结合铜 (II) 量, 凝胶色谱法结果见图 2。用与 (1) 的类似方法可求得每摩尔 HSA 结合铜 (II) 的摩尔量为 1.04 (mole/mole)。

结合 (1) 和 (2) 的结果可进一步求得表征螯合剂活动化能力的参数,  $F$  值 (见表 1):

$$F = \frac{\text{有螯合剂存在时, 每摩尔HSA结合Cu (II) 量 (mole)}}{\text{无螯合剂存在时, 每摩尔HSA结合Cu (II) 摩尔数 (1.04mole/mole)}}$$

## 讨 论

由表 1 可见, 按螯合剂的竞争能力 ( $F$  值) 的大小排列有如下顺序:

Trien > DTPA > EDTA > EGTA > NTA > IDA

这一顺序与金属螯合物条件稳定常数的大小顺序基本一致 (见表 2)。只有 Trien 反常, 其表现的竞争能力比 DTPA 和 EDTA 还强。另外, 从  $F$  值的大小看, EDTA 的竞争能力似乎明显低于 DTPA 及 Trien, 虽然它们的条件稳定常数比较接近。

表 2 螯合剂与金属铜离子(II)螯合物稳定常数

Table 2 Conditional Stability Constants of Various Chelators with Copper(II)

chelator	temp. (°C)	medium	logarithm of constant	logarithm of conditional constant (pH = 7.73)
DTPA	25	0.1mol · l <sup>-1</sup> KNO <sub>3</sub>	21.1	17.06
EGTA	25	0.3mol · l <sup>-1</sup> NaClO <sub>4</sub>	16.77	13.53
EDTA	25	0.1mol · l <sup>-1</sup> KNO <sub>3</sub>	18.87	16.04
Trien	25	0.1mol · l <sup>-1</sup> KCl	18.8	15.46
NTA	25	0.1mol · l <sup>-1</sup> NaClO <sub>4</sub>	13.60	11.32
IDA	30	0.1mol · l <sup>-1</sup> KCl	10.40	8.04

\* taken from: IUPAC Stability Constant of Metal-ion Complex: Part B in 1978 and Section II in 1964, edited by D.D.Perrin and Arthur E. Martel, respectively.

按照  $F$  值定义<sup>(1)</sup>, 对于竞争反应:



应有下式成立 (忽略游离金属 [M] 和三元配合物 [PML]):

$$F = \frac{C_M - [ML]}{C_M} \tag{2}$$

式中  $M$  代表金属,  $P$  和  $L$  分别表示大分子蛋白质和小分子螯合剂, 若假设:  $C_M = [ML] + [MP]$  (3)

$$\beta'_{ML} = [ML] / [M][L] \quad , \quad \beta'_{MP} = [MP] / [M][P] \tag{4}$$

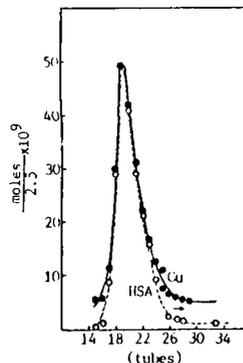


图 2 HSA+Cu 体系的凝胶色谱图

Fig.2 Gel chromatogram of the system HSA+Cu(II)

式中  $\beta'_{ML}$  和  $\beta'_{MP}$  分别为小分子及大分子金属配合物的条件稳定常数, 将 (3)、(4) 式代入 (2) 整理得:

$$\frac{1}{F} - 1 = \frac{\beta'_{ML}[L]'}{\beta'_{MP}[P]'} \quad (5)$$

若令  $f = \frac{1}{F} - 1$ , 则  $f = \beta'_{ML}[L]' / \beta'_{MP}[P]'$ , 这里,  $f$  值实际上表示了整合剂存在时金属配合物的浓度与大分子金属配合物的浓度之比 ( $f = [ML] / [MP]$ ), 由 (4) 式:

$$\frac{\beta'_{ML}}{\beta'_{MP}} = \frac{[ML][P]'}{[MP][L]'} \quad (6)$$

如果我们暂假设, 在实际反应中, 反应 (1) 的副反应 (如, 配体 L 的加质子反应) 的影响可忽略, 应有  $[ML] \approx [P]'$ ;  $[MP] \approx [L]'$  成立, 代入 (6) 式:

$$\frac{\beta'_{ML}}{\beta'_{MP}} = \frac{[ML][P]'}{[MP][L]'} \approx \left( \frac{[P]'}{[L]'} \right)^2 \quad (7)$$

若引入校正系数  $\delta$ , 使  $[L]' / [P]' = (\beta'_{MP} / \beta'_{ML})^{\frac{1}{2} \cdot \delta}$ , 代入 (5) 式, 得:

$$f = \left( \frac{\beta'_{ML}}{\beta'_{MP}} \right)^{\left(1 - \frac{1}{2} \cdot \delta\right)} \quad (8)$$

由上式可见, 如考虑对同一个 MP 而言, 不同整合剂参与的竞争反应达平衡时, 其相应的校正系数  $\delta$  之间相差不大, 则  $\log f$  值应与各金属配合物的条件稳定常数 ( $\beta'_{ML}$ ) 的对数值之间有线性关系。校正系数  $\delta$  实际上反映了副反应的影响。值得注意的是, 在前面的处理中没有考虑大分子本身的特殊性可能带来的影响, 对相同类型的整合剂来说, 如果某种整合剂的竞争能力 (按  $f$  值计) 偏离与  $\beta'_{ML}$  之间应有的线性关系, 则或许可以推断该竞争反应可能受大分子特殊性的影响较大。除热力学因素外, 这种特殊性还可能与反应的动力学因素有关。

图 3 显示了几种整合剂的  $\log f$  与  $\log \beta'_{ML}$  之间的关系。整合剂 IDA、NTA、EGTA 和 EDTA 的  $\log f$  与条件稳定常数有明显的线性关系。而 DTPA 和 Trien 有不同程度的偏离。这一结果与临床上治疗 Wilson 病时整合剂的促排效果是一致的<sup>(5)</sup>。

Trien 和 DTPA 的反常似乎提示: 它们与其他几种整合剂相比, 在反应的竞争过程中其表现有所区别, 即反应机理不同。动力学的研究表明: 竞争反应中普遍涉及三元配合物的形成, 其中 DTPA 在反应机理上似乎区别于 EGTA, NTA 和 IDA<sup>(6)</sup>。这一结果与热力学的研究结果相吻合。图 4 比较了几种竞争体系中用  $F$  值表示的竞争参数与整合剂条件稳定常数的关系, Cd (II) 及 Ni (II) 体系的  $F$  值和  $\log \beta'_{ML}$  见文献<sup>(1,4)</sup>。由图中可见, 对不同竞争体系而言, 都应有如图中的曲线型式。如果事实如此, 那么用图 4 观察竞争能力与  $\log \beta'_{ML}$  的关系似乎应比图 3 更好, 因为前者不需要使 (8) 式成立的假设 ( $\delta$  相差不大)。同样, 由图 4 也可看到某些整合剂的偏离。关于 Trien 和 DTPA 的偏离也许可以解释为: 整合剂分子都含有较多的可配位氮原子, 而 Cu (II) 在 HSA 上的配位原子也是氮原子<sup>(7)</sup>, 由于结合在 HSA 上的 Cu (II) 的特殊配位环境, 使竞争中含有更多可配位 N 的整合剂更容易夺取 HSA 上的 Cu (II)。



## STUDIES OF MOBILIZING POWER OF CHELATING AGENTS TOWARD HUMAN SERUM ALBUMIN BOUND COPPER(II)

Gao Liming Li Rongchang Wang Kui

*(Department of Inorganic Chemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083)*

The mobilization of human serum albumin (HSA) bound Cu(II) with chelating agents was studied by means of gel chromatography. The mobilizing power is expressed in terms of the ratio between protein-bound metal in presence and absence of chelators. Thus the sequences of mobilizing power were determined as follows:

Trien > DTPA > EDTA > EGTA > NTA > IDA

A linear relation between the mobilizing power and conditional stabilities of the chelates except Trien-Cu(II) and DTPA-Cu(II) has been observed. It has been suggested that the abnormality of Trien and DTPA was related to the complicated reaction course involving the mechanisms of forming ternary complex.

**Keywords:** human serum albumin copper chelator mobilization