

Cu, Zn-SOD 酶模型配合物催化 O₂⁻ 歧化作用的研究

陈东 杭庆伟 刘之俊 唐雯霞 戴安邦

(南京大学配位化学研究所, 南京 210008)

(中科院北京生物物理所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100080)

为了解 Cu, Zn-SOD 酶中 Cu 周围环境对催化 O₂⁻ 歧化作用活性的影响, 本文用 NBT 法测定了 Cu, Zn-SOD 酶及一系列咪唑桥异核模型配合物催化 O₂⁻ 歧化作用的活性, 并用 ESR 方法监测了其中一个配合物与 O₂⁻ 作用的中间过程。结果表明, 具有平面四方构型或轴向有弱配位 H₂O 或 ClO₄⁻ 基团的四方锥构型的 Cu²⁺ 配合物具有较高活性, 说明配合物催化歧化 O₂⁻ 过程中, Cu²⁺ 可能首先以轴向与 O₂⁻ 配位, 形成 Cu²⁺-O₂⁻ 中间化合物, 紧接着 Cu²⁺ 被还原成 Cu⁺。

关键词: Cu, Zn-SOD 酶 模型化合物 活性 机理

超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, 简称 SOD)在生物体中起着催化超氧离子自由基(O₂⁻)歧化生成 O₂ 和 H₂O₂ 的作用⁽¹⁾。由于 SOD 能消除 O₂⁻, 它在防御氧自由基的毒性, 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, 越来越受到人们的重视⁽²⁾。

X-射线结构分析表明在 Cu, Zn-SOD 的活性中心, Cu²⁺ 离子被四个组氨酸残基 His-44, 46, 61, 118 咪唑环上的 N 原子及一个 H₂O 分子的氧配位构成扭曲的四方锥构型, 而 Zn²⁺ 离子被 His-61, 69, 78 咪唑环上的 N 原子和 Asp81 上的一个氧原子配位形成近似的四面体结构。His-61 的咪唑环起着“桥”的作用将 Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 连接起来⁽³⁾。进一步研究还表明 Cu, Zn-SOD 活性中心中催化 O₂⁻ 的歧化是发生在 Cu²⁺ 一侧。用化学方法除去酶分子中 Zn²⁺, 而保留酶分子原有环境中的 Cu²⁺, 则酶仍有较高活性, 但以 Ag⁺ 替代酶分子中 Cu²⁺, 同时用 Cu²⁺ 置换酶分子中 Zn²⁺, 即 Cu²⁺ 换到 Zn²⁺ 的位置, 酶就失去全部活性⁽²⁾, 这表明酶分子中 Cu²⁺ 所处的环境对酶的活性有重要影响。但是 O₂⁻ 如何与 Cu, Zn-SOD 中的 Cu²⁺ 作用而发生歧化, 其中间过程是怎样的, 人们还不清楚, 正进行着多方面的研究。

本实验室已经合成及表征了具有 Cu, Zn-SOD 酶活性中心类似结构的一系列酶的模型化合物^(4,5)。本文通过测定 Cu, Zn-SOD 及一系列模型配合物催化 O₂⁻ 歧化的活性及一个配合物与 O₂⁻ 作用的中间过程, 研究了模型化合物及酶中 Cu 周围的配位环境, 配位原子种类与其催化 O₂⁻ 歧化活性间的关系, 研究了 O₂⁻ 与 Cu, Zn-SOD 中 Cu²⁺ 作用的可能过程, 得到了有意义的结果。

实验与结果

一.试剂 磷酸二氢钾, 磷酸氢二钾为分析纯; 二甲亚砜 (DMSO), 甲醇为分析纯, 使用前经

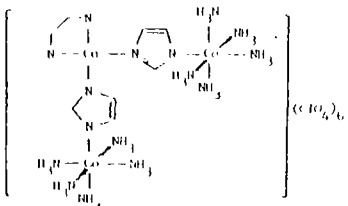
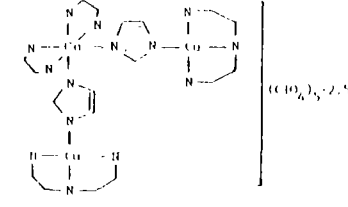
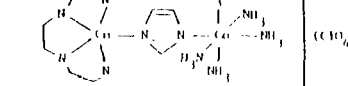
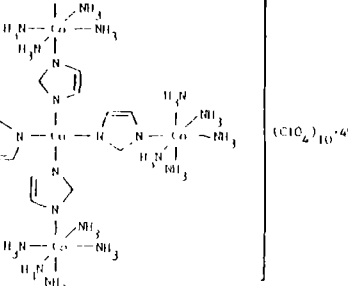
重蒸除水。核黄素、蛋氨酸, NBT (硝基四氮唑兰) 均为生化试剂; Cu, Zn-SOD 酶由军事医学科学院提供, 比活力为 3000 单位 / mg。模型化合物都按文献方法合成, 并经元素分析证明纯度符合要求^[4,5]。

表 1 在 pH=8.8 用 NBT 方法测定得到的咪唑桥联配合物及 Cu,Zn-SOD 活性

Table 1 Activity of Imidazole Bridged Cu Complexes and Cu,Zn-SOD

Determined by NBT Method at pH = 8.8

compounds	structures	$I_{50\%}$ (μM , Cu)	relative activity (%)
Cu, Zn-SOD		0.011	100
[trien Zn im Co(NH ₃) ₃](ClO ₄) ₄		no activity	0
{(NH ₃) ₃ Co im Ni(en) ₂ im Co(NH ₃) ₃ }(ClO ₄) ₆ • H ₂ O		no activity	0
[dien Cu im Co(NH ₃) ₃](ClO ₄) ₄		0.37	3.0
[dien Cu im Rh(NH ₃) ₃](ClO ₄) ₄ • H ₂ O		0.42	2.6
[ida Cu im Co(NH ₃) ₃](ClO ₄) ₄ • H ₂ O		0.42	2.6

$[(NH_3)_3Co(im)Cu(en)imCo(NH_3)_3](ClO_4)_6$		0.37	3.0
$[(dien)Cu(im)Co(en)_2(im)Cu(dien)](ClO_4)_5 \cdot 2.5H_2O$		0.45	2.4
$[trien)Cu(im)Co(NH_3)_3](ClO_4)_4$		6.0	0.18
$[Cu\{im)Co(NH_3)_3\}_4](ClO_4)_{10} \cdot 4H_2O$		0.37	3.0

二.方法与结果 活性测定是用核黄素-蛋氨酸光照法^[6,7]进行的。考虑到配合物的稳定性,将体系的 pH 值由原来的 7.8 改成 8.8,对比实验表明在两种 pH 值条件下测得的 Cu, Zn-SOD 活性一致。活性测定的具体过程是用空气饱和的二次蒸馏水配制 pH 为 8.8 的 0.05mol/l 磷酸盐缓冲溶液,并以其为溶剂配制含 $3.3 \times 10^{-6}\text{mol/l}$ 核黄素, 0.01mol/l 蛋氨酸, $4.6 \times 10^{-5}\text{mol/l}$ NBT 及不同浓度 SOD 或模拟物的溶液 25ml。在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温槽中避光恒温 20 分钟后,用恒定的日光灯光线在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温箱中进行光照,2.5 分钟内每隔 0.5 分钟取出 2ml 溶液用 721 分光光度计在 560nm 波长下测定溶液的消光值。将每种浓度下消光随时间的变化值线性回归,可得到一条直线,直线的斜率为每分钟消光度的变化值 ($\Delta A/\text{分}$)。当溶液中 SOD 或模拟物的浓度为零时测定得到的 $\Delta A/\text{分}$ 为 $\Delta A_0/\text{分}$,当 SOD 或模拟物的浓度为 M 时测定得到 $\Delta A_m/\text{分}$ 。用 $\frac{\Delta A_0/\text{分} - \Delta A_m/\text{分}}{\Delta A_0/\text{分}} \times 100\%$ 可求出 SOD 或模拟物在浓度为 M 时对 NBT 与 O_2^- 作用的抑制百分数。用浓度对抑制百分数作图可求得抑制百分数为 50% 时的 SOD 或模拟物的浓度称为一个活性单位,比较 SOD 和模拟物在一个活性单位时的浓度可得出模拟物催化 O_2^- 歧化的活性大小。所得结果列于表 1。

图 1 73K 含 1:3 核黄素, 蛋氨酸的 $[\text{dien Cu im Co}(\text{NH}_3)_5](\text{ClO}_4)_4$ ESR 谱

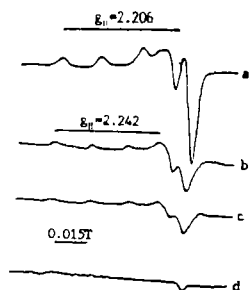


Fig. 1 ESR spectra of $[\text{dien Cu im Co}(\text{NH}_3)_5](\text{ClO}_4)_4$ containing

1:3 riboflavin and methionine at 73K

a) no illumination, gain: 6.3×10^4

b) illumination time: 3min.,

gain: 1.25×10^5

c) illumination time: 5min.,

gain: 1.25×10^5

d) illumination time: 7min.,

gain: 3.3×10^5

O_2 与 Cu^{2+} 的作用过程用 ESR 方法鉴别。由于 O_2 在水溶液中的寿命很短, 不利于 ESR 研究, 改成用有机溶剂(5:1 DMSO 与甲醇的混合溶液)配制核黄素和蛋氨酸的饱和溶液, 再按 1:3 的比例将它们混合。混合溶液经紫外线照射 20 分钟后 ESR 测定表明在 $g=2.000$ 处有一个自由基的共振吸收峰, 参照文献[8]所做的试验表明该自由基即为 O_2 自由基。在 1 份 1:3 核黄素和蛋氨酸混合有机溶剂中加入一定量的配合物 $[\text{dien Cu im Co}(\text{NH}_3)_5](\text{ClO}_4)_4$ 使溶液中模拟物的浓度在 5 mmol/l 左右。溶液装到石英毛细管中用紫外线照射, 于低温 73K 测定得到不同照射时间的 ESR 谱(图 1)。ESR 用 Bruker 200D-SRC 型谱仪测定。

讨 论

从表 1 可见, 含 Zn-Co, Ni-Co 的咪唑桥异多核配合物均无催化 O_2 歧化的活性, 含 Cu^{2+} 咪唑桥的异核配合物都有一定的活性, 这表明含 Cu^{2+} 桥联配合物的活性是配合物中的 Cu^{2+} 与 O_2 作用引起的。当 Cu 具有类似于 Cu, Zn-SOD 酶活性中心中 Cu 的配位环境, 即 Cu 具有平面正方配位构型及轴向有弱配位水分子或高氯酸根的四方锥配位构型时配合物有较高及相近的催化 O_2 歧化的活性, 其值约为 Cu, Zn-SOD 活性的 2.4~4.5%, 但活性大小与 Cu^{2+} 的配位原子种类(N 或 O) 无关。当 Cu^{2+} 周围为 N_5 四方锥或三角双锥配位构型的 $[\text{trien Cu im Co}(\text{NH}_3)_5](\text{ClO}_4)_4$ 的活性远比前者为低, 其值仅为 Cu, Zn-SOD 酶活性的 0.18%。这可能是由于 Cu, Zn-SOD 酶和模型配合物催化歧化 O_2 时, O_2 首先和酶及模型配合物中的 Cu^{2+} 以轴向配位, 形成 $\text{Cu}^{2+}-\text{O}_2$ 的中间化合物。由于 4 配位 Cu^{2+} 或轴向有弱配位基团的 5 配位 Cu^{2+} 与 Cu, Zn-SOD 中 Cu 周围环境类似易与 O_2 结合, 或其中弱配位水分子及其他配位基团易被 O_2 取代, 可形成 $\text{Cu}^{2+}-\text{O}_2$ 中间化合物。如果 Cu^{2+} 是与 5 个强配体 N 原子配位, 轴向 N 原子与 Cu 结合较强, 不易为 O_2 取代, 从而造成其催化歧化 O_2 的活性大为降低。以上结果也说明, 当 Cu, Zn-SOD 酶中, Cu 被 Ag 取代, Cu 又取代 Zn 并占据 Zn 的位置时使酶失去活性的原因, 并非由 Cu, Zn 周围配位原子的不同(Cu 与 ON_4 配位, Zn 与 ON_3 配位), 更主要的可能是由于 Cu, Zn 周围空间构型的不同, 当 Cu 占据 Zn 的位置, 并有四面体空间构型时不利于 O_2 以轴向与 Cu 结合。

从 73K 不同光照时间含 1:3 核黄素, 蛋氨酸的 $[\text{dien Cu im Co}(\text{NH}_3)_5](\text{ClO}_4)_4$ 的 ESR 谱(图 1) 可以看到两个现象: 照射后模型配合物的 g_{11} 比不照射时的 g_{11} 值增大; 随着照射时间的增加 Cu^{2+} 的信号减弱, 最终消失。光照后模型配合物的 g_{11} 增大可能是 O_2 在轴向与 Cu^{2+} 配

位, 造成赤道平面的 Cu-N 键减弱造成的⁽⁹⁾, 这与前面活性测定结果, 即有 $Cu^{2+}-O_2^-$ 中间化合物形成相一致。照射时间增加 Cu^{2+} 的信号减弱至消失, 说明模型配合物中的 Cu^{2+} 已被 O_2^- 还原成 Cu^+ , 这表明模型配合物与 O_2^- 的作用类似于 Cu, Zn-SOD 与 O_2^- 的作用存在着还原的过程。进一步光照产生黄褐色沉淀, 被认为是 Cu^+ 的配合物不溶于有机溶剂产生的。

参 考 文 献

- (1) McCord, J.M., Fridovich, L., *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049(1969).
- (2) 李益新, 生物化学与生物物理进展, **3**, 15(1985).
- (3) Tainer, J.A. et al., *J. Mol. Biol.*, **160**, 181(1982).
- (4) 陈东、唐雯霞、戴安邦, 化学学报, **48**, 547(1990).
- (5) 刘之俊、陈东、唐雯霞, 无机化学学报, **6**, 198(1990).
- (6) Beauchamp, C., Fridovich, I., *Anal. Biochem.*, **44**, 276(1971).
- (7) 沈孟长、陈晓青、罗勤慧, 生物化学与生物物理进展, **4**, 39(1987).
- (8) Valentine, J.S., Curtis, A.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 224(1975).
- (9) Campbell, J.M., *Inorg. Chim. Acta*, **10**, 69(1974).

STUDY OF THE CATALYTIC ACTIVITY OF THE MODEL COMPLEXES OF Cu,Zn-SOD IN O_2^- DISPROPORTIONATION

Chen Dong Han Qinwei Liu Zhijun Tang Wenxia Dai Anbang

(Coordination Chemistry Institute, Nanjing University, Nanjing 210008)

(Biomacro Molecule Laboratory, Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100080)

In order to elucidate the relationship between the structure of active site and the activity of Cu,Zn-SOD, the catalytic activity of the model complexes of Cu,Zn-SOD in disproportionation of O_2^- was determined by NBT method at pH = 8.8. The results indicate the complexes with Cu in N_4 or N_2O_2 planar square of square pyramid with weak bonding H_2O or ClO_4 in the axial position have higher activity of O_2^- disproportionation. This is possibly because in the catalytic process O_2^- attaches itself to the Cu atom from the axial direction or replaces the weakly bound H_2O or ClO_4 in the axial position with the formation of a $Cu-O_2^-$ intermediate complex.

Keywords: Cu,Zn-SOD model complex activity mechanism