

# 铁(III)离子在 ATP 与去铁转铁蛋白之间交换动力学的研究

王者鹏\* 赵明 王夔

(北京医科大学药学院, 北京 100083)

使用分光光度法研究了 Fe(III)离子在去铁转铁蛋白(apoTf)与 ATP 之间的交换动力学, 得到反应的动力学参数及反应速率表达式, 并提出了反应机理。

关键词: 铁传递蛋白 去铁传递蛋白 ATP 铁(III) 动力学

## 引言

铁(III)在小分子配体与去铁转铁蛋白(apoTf)之间的转移反应是铁代谢中的关键问题, 因而一直受到人们的重视。1967年 Bates<sup>(1,2)</sup>等分别研究了 Fe(III)在柠檬酸、EDTA 及 NTA 与去铁转铁蛋白(apoTf)之间的交换反应发现, Fe(III)从小分子配体向去铁转铁蛋白转移是通过形成中间体配合物的形式完成的。近来 Cowart 等研究了 Fe(III)在焦磷酸<sup>(3)</sup>及乙酰氧肟酸<sup>(4)</sup>与转铁蛋白之间的交换反应, 证明形成转铁蛋白, 小分子配体及碳酸根的四元中间配合物, 然后解离掉小分子配体后形成 Fe(III)-apoTf-CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>三元配合物。在这一过程中伴有转铁蛋白的构象变化。

ATP 是存在于体内的一种铁配合剂, 它在铁代谢过程中起着重要作用, ATP 可能通过加快 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 交换而使结合在 apoTf 上的铁活化<sup>(5)</sup>, 有利于转铁蛋白释放铁; ATP 还可能使结合在其他蛋白上的铁向转铁蛋白上转移<sup>(6)</sup>, 有利于转铁蛋白结合铁。所以研究 Fe(III)离子在 ATP 与 apoTf 之间的交换动力学规律, 对于搞清铁在人体内的代谢途径, 指导合成生物利用度高的铁制剂是有意义的, 为此, 我们用光度法研究了 Fe(III)离子在 ATP 与 apoTf 之间的交换反应动力学, 得到了动力学参数及反应速率表达式, 并提出了反应机理。

## 试剂与仪器

血清组份 Cohn IV(北京红十字血液中心)。DEAE Sephadex A<sub>50</sub> 及 Na<sub>2</sub>ATP(不少于 99%, Sigma), 其他试剂均为分析纯试剂。光度法研究用岛津 UV-260 型分光光度计进行。实验体系用 tris · HCl 缓冲溶液维持 pH = 7.4。

FeCl<sub>3</sub> 溶液用 SnCl<sub>2</sub>-K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 法标定。ATP 浓度用紫外吸收法( $\lambda_{\max} = 259\text{nm}$ ,  $\epsilon = 1.54 \times 10^3$ )确定。

Fe(III)NTA 配合物溶液的配制: 在 NTA 二钠盐溶液中滴加等摩尔的 FeCl<sub>3</sub> 溶液, 并不断搅拌。然后用新配制的饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液调 pH 为 7.4, 用 0.005mol · l<sup>-1</sup> 的 tris · HCl 缓

本文于1989年9月17日收到。

卫生部资助项目。

\* 本文为王者鹏硕士论文一部分。

冲溶液定容至浓度为  $1.84 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 。该配合物室温下易聚合，所以要使用前临时配制。

Fe(III)ATP 配合物溶液的配制：在  $\text{Na}_2\text{ATP}$  溶液中，滴加  $\text{FeCl}_3$  溶液，并不断搅拌，使 Fe/ATP 摩尔比为 1:4，然后调 pH 为 7.4 的 tris·HCl 缓冲溶液定容，配成  $1.84 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  相对于铁溶液。该配合物溶液也要使用前临时配制。

## 实验方法与结果

用分光光度法研究 Fe(III)在 ATP 与 apoTf 之间交换反应的动力学的依据是，随着铁交换反应的进行，反应终产物 Fe apoTf  $\text{CO}_3$  的最大吸收峰强度随时间而增大。由吸光度随时间的变化求得动力学参数，并推断反应机理。

1. 血清转铁蛋白的提取及纯制：按文献方法<sup>[7]</sup>自血清 Cohn IV 组份分离含铁的转铁蛋白，纯度为 99%。含铁转铁蛋白再用  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  EDTA-醋酸盐缓冲溶液(pH5.2)透析去铁，得去铁转铁蛋白(含量不低于 95%)。最后用 Fe(III) NTA 光度滴定法测量去铁转铁蛋白的浓度。

2. 测量波长的选定：在恒温( $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ )条件下，以  $0.005 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  tris·HCl(pH7.4)缓冲溶液为对照，测定含铁转铁蛋白(Tf)和去铁转铁蛋白(apoTf)的可见光谱。含铁转铁蛋白(Tf)在波长 465nm 处有一特征吸收，而去铁转铁蛋白(apoTf)在 465nm 处吸收很弱，所以实验中选用 465nm 做为测量波长<sup>[1]</sup>。

3. 反应总级数的测定：Fe(III)-ATP 配合物(浓度  $7.34 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ，Fe:ATP 摩尔比为 1:3)和去铁转铁蛋白( $3.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )在过量  $\text{NaHCO}_3$ (浓度为  $8.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )存在下反应，用  $0.005 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  tris·HCl 缓冲溶液维持 pH7.4，反应在恒温( $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ )条件下进行。通过监测 465nm 吸光度随时间的变化(图 1)，并由吸光度数据求得不同时刻未反应组分的分数  $Re$ ：

$$Re = \frac{A_m - A_t}{A_m - A_o}$$

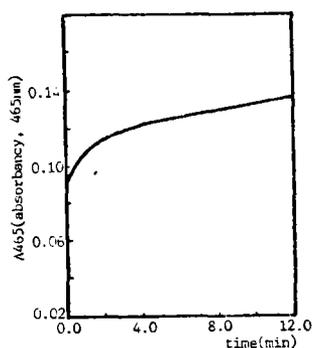


图 1 Fe(III)交换过程中 465nm 吸光度随时间的变化

Fig.1 Relationship between the changes of absorption spectra and time

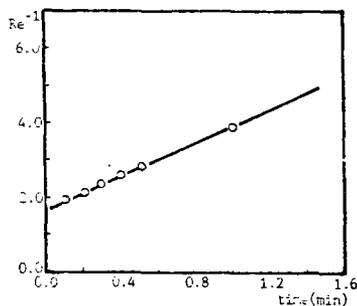


图 2 Fe(ATP)配合物与 apoTf 的二级反应示意图

Fig.2 Second order reaction

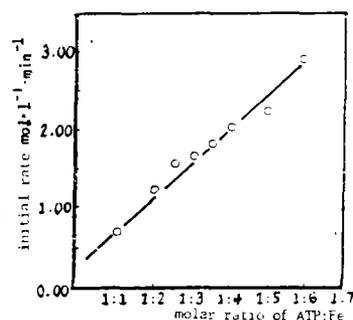


图 3 Fe(III)交换反应的速率与 Fe/ATP 摩尔比的关系

Fig.3 Relationship between initial rate and the molar ratio of ATP:Fe

其中  $A_m$  为反应达到平衡时的吸光度,  $A_0$  为反应开始时的吸光度.

以  $\frac{1}{Re}$  对时间  $t$  做图得直线(图 2), 由此求得反应总级数为 2.

4. ATP/Fe 摩尔比对反应初速率的影响 按不同 ATP/Fe 摩尔比配制的 Fe(III)ATP 配合物(对铁均为  $9.68 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) 分别与去铁转铁蛋白( $5.50 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) 反应, 在相同反应条件下, 测定吸光度随时间的变化, 并由此获得反应初速率(转铁蛋白分子量按 78500 计算, 摩尔吸光系数为  $4475 \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ ). 以初速率对 Fe/ATP 摩尔比做图得图 3 直线, 可见 Fe/ATP 摩尔比越小, 反应速度越大.

5. apoTf 浓度对反应初速率的影响 为了进一步阐明铁在 ATP 与去铁转铁蛋白间的交换机理, 我们测定了 apoTf 浓度对铁交换速率的影响. 在过量  $\text{NaHCO}_3$  ( $5.3 \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  存在下, 保持 Fe(III)ATP 浓度 (Fe:ATP 摩尔比为 1:4, 铁浓度为  $8.36 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) 恒定, 改变 apoTf 的浓度 ( $2.00 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  到  $9.00 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), 由于 apoTf 浓度较高时反应太快, 降低温度可减慢反应速率, 所以反应在  $15.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$  下进行, 用  $0.005 \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  tris · HCl 维持 pH7.4. 由吸光度随时间的变化, 求得每一 apoTf 所对应的反应的初速率  $V_0$ ,  $V_0$  与 apoTf 浓度呈双曲线关系. (图 4)

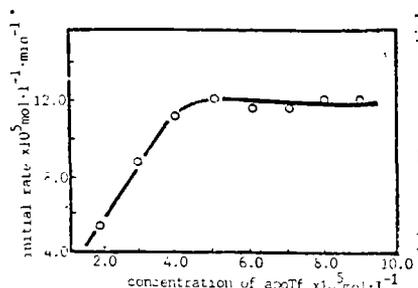


图 4 反应初速率与 apoTf 浓度的关系  
Fig.4 Relationship between the initial rate and the concentration of apoTf

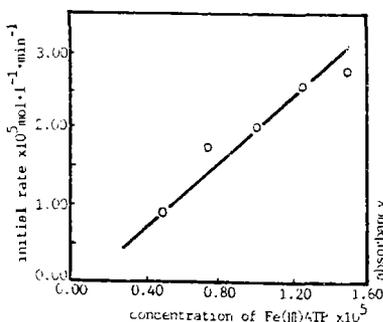


图 5 反应初速度与 Fe(III)ATP 浓度的关系  
Fig.5 Relationship between the initial rate and the concentration of ATP

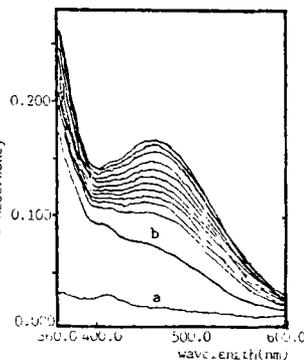


图 6 Fe(III)由 ATP 向 apoTf 转移过程中的光谱变化  
Fig.6 Change of the absorption spectra during the process of ferric exchange

6. Fe(III)ATP 配合物的浓度对反应初速率的影响 固定去铁转铁蛋白(apoTf)浓度为  $1.25 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , 改变 Fe(III)ATP(Fe:ATP 摩尔比为 1:3)浓度(从  $0.5 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  到  $1.5 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), 在与 (5) 相同的条件下使 Fe(III)ATP 与 apoTf 发生反应, 并求得每一 Fe(III)ATP 浓度所对应的反应初速率  $V_0$ ,  $V_0$  与 Fe(III)ATP 浓度呈图 5 所示的线性关系.

7. Fe(III)由 ATP 向 apoTf 转移过程中的光谱变化 为了确定铁在从 Fe(III)ATP 向 apoTf 上转移过程中是否形成中间四元配合物, 在恒温 ( $15.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ) pH7.4 及过量  $\text{NaHCO}_3$  存在下 ( $2.44 \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), 记录 Fe(III)ATP(浓度为  $8.98 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) 与 apoTf( $4.72 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) 反应过程中的光谱变化(图 6). 图 6 中 a 光谱是 apoTf 加入  $\text{NaHCO}_3$  后的光谱, b 是加入 Fe(III)ATP 5 秒后记录的吸收光谱. 以后每隔 50 秒记录一次. 加入 Fe

(III)ATP 后 50 秒光谱最大吸收峰在 450nm 处, 以后逐渐红移。300 秒后, 光谱最大吸收峰红移到 463nm。

## 讨 论

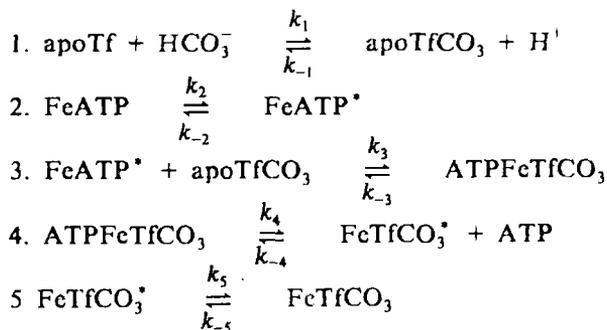
### 1. Fe(III)转移反应的双阶段性与中间活性配合物的出现

Fe(III)ATP 与 apoTf 反应过程中表征 Tf 浓度的 465nm 吸光度随时间的变化见图 1。可见开始时吸光度变化很快, 1 分钟后即转平缓达到最大吸光度值。可以估计 Fe(III)从 ATP 向 apoTf 转移反应为一双阶段反应, 这与 Fe(III)从焦磷酸、乙酰氧肟酸及柠檬酸向 apoTf 转移反应情况相似。

反应曲线图 1 的双阶段性, 图 4 所示的反应初速度与 apoTf 浓度的双曲线关系, 以及图 5 所表示的反应初速度与 Fe(III)ATP 浓度呈线性变化, 这些事实提示, 在 Fe(III)ATP 配合物溶液中, 可能存在一种活性中间物种, 该物种能与 apoTf 迅速反应, 生成在 465nm 处有特征吸收的 FeTfCO<sub>3</sub>ATP 四元配合物, 称之为活化配合物, 这种活化配合物与非活化配合物平衡存在。可以求得 Fe(III)ATP 配合物溶液中活化配合物的含量为 49.6%。

### 2. Fe(III)从 ATP 向 apoTf 转移的反应机理

反应初速度与 ATP/Fe 值呈线性关系, 说明反应不可能是完全的解离机理。此反应与 Fe(III)的焦磷酸(PYR)及乙酰氧肟酸(AHA)配合物与去铁转铁蛋白的反应不同, 这两个反应均按解离机理进行, 且随着 PYR/Fe 以及 AHA/Fe 摩尔比的增加, 反应初速度先增大后减小。反应的总级数为二级而不是一级, 这一事实说明反应不会象 Fe(III)一柠檬酸那样以从聚合态变为单核态为限速步骤。增大 apoTf 浓度可显著增大吸光度变化值  $A_1$ , 说明 Fe(III)ATP 也不是直接参与反应的物种, 否则反应不会表现出双阶段性。根据以上分析提出以下反应机理:



\* 表示该物种的另一种构象形式或活化形式。

去铁转铁蛋白最显著的特点之一是在与铁结合时必须同时与 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 或 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 阴离子结合。去铁转铁蛋白首先和 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 反应, 生成更具有亲核特性的形式 TfCO<sub>3</sub>, 并放出氢离子 (1)<sup>(8)</sup>。机理 (2) 是活化配合物与非活化配合物的平衡。图 4 中 Fe(III)交换速度对 apoTf 浓度的双曲线关系以及 Fe(III)交换反应的双阶段性都支持有活化形式的 Fe(III)ATP 配合物存在这一结论。

机理(3)是活化形式的 FeATP\* 与具有亲核特性的 TfCO<sub>3</sub> 发生的亲核加成反应, 此步反应为快反应, 反应后生成了一个在 465nm 处有特征吸收的四元混合配体配合物的中间体。四元

配合物  $\text{ATPFcTfCO}_3$  是一种不稳定的中间体, 解离后生成  $\text{FcTfCO}_3$  (4), 最后经构象调整过程生成终产物  $\text{FcTfCO}_3$  (5)。机理 (4) (5) 可从微观可逆原理推出。

本实验中没有直接证明该四元配合物的存在, 从图 6 中  $\text{Fe(III)ATP}$  与 apoTf 反应光谱随时间变化看, 在反应后 50 秒钟时最大吸收峰在 450nm 处, 而反应 300 秒后, 最大吸收峰在 450nm 处, 提示在铁转移过程中可能有一中间产物生成。这一现象与 Bates 对  $\text{Fe(III)}$  乙酰氧肟酸与 apoTf 的反应的研究结果相似。

用  $\text{Fe(III)ATP}^*$  稳态法处理上述机理可得到如下速度方程式

$$\text{速度} = \frac{k_1[\text{HCO}_3^-][\text{apoTf}][\text{FeATP}]}{k_2[\text{ATP}][\text{H}^+] + k_3[\text{apoTf}][\text{HCO}_3^-]}$$

$$\text{其中 } k_1 = k_5 k_4 k_3 k_2 / k_{-4} \cdot k_{-3} \quad k_{FS_2} = k_{-2} \quad k_3 = k_3 k_1 / k_{-1}$$

该速度方程中  $\text{Fe(III)}$  转移反应速度与  $\text{Fe(III)ATP}$  呈度呈线性关系, 与 apoTf 浓度呈双曲线关系, 均与实验结果一致。

### 参 考 文 献

- (1) Bates, G.W. et al., *J. Biol. Chem.*, **242**(12), 2810 (1967).
- (2) Bates, G.W. et al., *J. Biol. Chem.*, **242**(12), 2816 (1967).
- (3) Corwart, R. E. et al., *J. Biol. Chem.*, **461**(10), 4607 (1986).
- (4) Corwart, R. E. et al., *J. Biol. Chem.*, **257**(3), 7560 (1982).
- (5) Egyed, A., *Biochim. Biophys. Acta*, **411**, 394 (1975).
- (6) Roberts, R. C. et al., *J. Biol. Chem.*, **241** (2), 4907 (1966).
- (7) Kailis, S. G. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **464**, 3989 (1977).
- (8) Bates, G. W., *Biochemistry and Physiology of Iron*, (P. Saltman and J. Hegnauer eds) pp.3-18, Elsevier / Morth-Holland, New York.

## KINETICS OF THE EXCHANGE OF IRON(III) BETWEEN TRANSFERRIN AND IRON(III) COMPLEX OF ATP

Wang Zhepeng    Zhao Ming    Wang Kui

(School of Pharmaceutical Sciences, Beijing Medical University, Beijing 100083)

By means of spectrophotometry, the kinetics of the exchange of iron(III) between transferrin and ferric complex of ATP investigated. The kinetic parameters and the expression of reactive velocity obtained and a mechanism provided.

**Keywords:** transferrin    apotransferrin    ATP    iron(III)    kinetics