

Cu, Zn-SOD 酶模型化合物 催化 O_2^- 歧化作用的研究

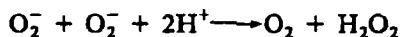
毛宗万 杭庆伟 唐雯霞*

(南京大学配位化学国家重点实验室, 配位化学研究所, 南京 210093)

为了解 Cu, Zn-SOD 酶结构和功能关系, 尤其是 Cu 周围配位构型对催化 O_2^- 歧化活性的影响, 本文用 NBT 法测定了 Cu, Zn-SOD 酶和两个 Cu-im-Zn 模型配合物及相应单核 Cu(II) 配合物催化 O_2^- 歧化的活性, 结果表明不同咪唑桥联方式和不同配位构型的化合物催化 O_2^- 歧化的活性明显不同, 其中以咪唑桥在四方锥底平面位置的 $[(dtma)Cu(im)Zn(dtma)ClO_4 \cdot 2.5H_2O]$ 及其相应单核 Cu(II) 化合物比对应的咪唑桥在四方锥锥顶位置的 $[(trien)Cu(im)Zn(trien)](ClO_4)_3 \cdot H_2O$ 及其有关化合物有更高的催化活性。

关键词: Cu, Zn-SOD 酶 模型化合物 活性 机理

铜锌超氧化物歧化酶(Cu, Zn-SOD)能高速有效地催化超氧离子自由基 O_2^- 的歧化:



以清除对生物机体有害的超氧离子自由基 O_2^- , 从而在防御自由基的细胞毒性, 抗辐射损伤, 预防衰老及预防肿瘤发生和炎症等方面起重要作用⁽¹⁾。X-射线衍射单晶结构分析⁽²⁾表明牛红细胞 Cu, Zn-SOD 酶活性中心 Cu 原子分别与来自四个组氨酸残基 His-44、His-46、His-61 和 His-118 咪唑环上的 N 原子配位, 另外一个水分子的 O 原子在轴向与 Cu 原子弱配位形成一个畸变的四方锥构型, Zn 原子与三个组氨酸残基 His-61、His-69 和 His-78 的 N 原子和一个天门冬氨酸残基 Asp-81 上的羧基 O 原子配位构成近似四面体构型, 其中位于 Cu 四方锥配位平面的 His-61 的去质子咪唑连接 Cu 和 Zn 原子形成咪唑桥。由于其独特的生物功能和结构, 超氧化物歧化酶及模拟研究愈来愈受到人们的重视⁽³⁾。但是其分子量大, 研究其活性中心十分困难。

本实验室已合成和表征了具有 Cu, Zn-SOD 酶活性中心类似结构的模型化合物, $[(dtma)Cu(im)Zn(dtma)]ClO_4 \cdot 2.5H_2O$ 和 $[(trien)Cu(im)Zn(trien)](ClO_4)_3 \cdot H_2O$, (dtma = 二乙烯三胺-N'-乙酸根和 trien = 三乙撑四胺)及系列配合物^(4,5), 并用 X-射线衍射单晶结构分析测定了它们的结构。在这两个 Cu-im-Zn 化合物中 Cu(II) 离子均为 5 配位, 畸变四方锥构型, 但是咪唑桥联方式不同。在 $[(dtma)Cu(im)Zn(dtma)]ClO_4 \cdot 2.5H_2O$ 中, 桥基咪唑位于 Cu(II) 的畸变四方锥构型底平面位置, 而在 $[(trien)Cu(im)Zn(trien)](ClO_4)_3 \cdot H_2O$ 中, 桥基咪

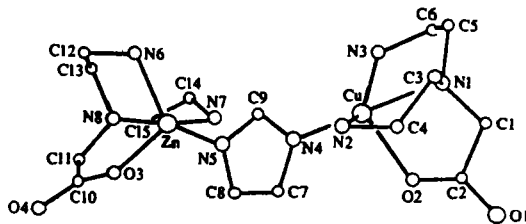
收稿日期: 1994-09-24。

国家自然科学基金资助项目。

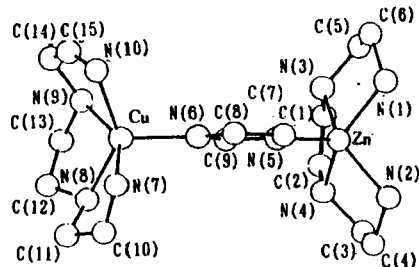
* 通讯联系人。

第一作者: 毛宗万, 男, 27 岁, 博士, 从事生物无机化学研究。

唑位于 Cu(II) 的畸变四方锥锥顶位置, 前者 Cu(II) 配位构型最接近 Cu, Zn-SOD 活性中心结构。本文通过测定 Cu, Zn-SOD 酶和两个 Cu-im-Zn 模型配合物及其系列含 Cu(II) 配合物催化 O₂⁻ 歧化的活性, 详细地讨论了模型化合物中咪唑桥联方式和配位构型对催化 O₂⁻ 歧化活性的影响, 得到了有意义的结果。



[(dtma)Cu(im)Zn(dtma)]²⁺ 阳离子结构



[(trien)Cu(im)Zn(trien)]³⁺ 阳离子结构

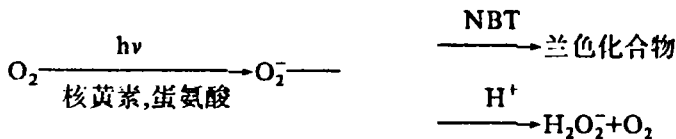
实 验 与 结 果

一.试剂: 磷酸二氢钾, 磷酸氢二钾为分析纯; 核黄素、蛋氨酸和硝基四氮唑兰(NBT)为生物试剂; Cu, Zn-SOD 酶由军事医学科学院提供, 比活力为 3000 单位 / mg, 模型化合物按文献方法合成^(4,5), 并经元素分析证明纯度符合要求。

二.活性测定:

1.基本原理:

核黄素-蛋氨酸光照法测定配合物催化 O₂⁻ 歧化活性的基本原理是^(6,8):



如果溶液中不存在 SOD 或模型物, O₂⁻ 在光照和核黄素及蛋氨酸存在下所产生的 O₂⁻ 主要与 NBT(硝基四氮唑兰)反应生成兰色化合物(λ_{max} = 560nm)。当溶液中有 SOD 或模型物存在, O₂⁻ 就会部分被催化生成 H₂O₂ 和 O₂, 与 NBT 反应生成的兰色化合物的量就会减少, 因此可通过 λ = 560nm 处吸光度随时间的变化来测定 SOD 和模型物催化 O₂⁻ 歧化的活性。

2.测定方法

考虑到咪唑桥联配合物在 pH ≈ 10 时咪唑桥可能断裂⁽⁴⁾, 我们在 pH = 7.8 和 pH = 10.5 分别测定了配合物的催化 O₂⁻ 歧化的活性。具体做法如下: 用空气饱和的二次蒸馏水配制 pH = 7.8 和 pH = 10.5 的 0.05mol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲溶液, 并以它为溶剂分别配制 3.3 × 10⁻⁶mol · L⁻¹ 核黄素, 0.01mol · L⁻¹ 蛋氨酸, 4.6 × 10⁻⁵mol · L⁻¹ NBT 溶液。依次移取上述溶液各 5ml, 加到各种不同浓度的 SOD 或模型物溶液中, 并稀释至 25ml, 在 30 ± 1℃ 的恒温槽中进行光照, 每隔 0.5 分钟取出 2ml 溶液用 721 型分光光度计在 560nm 波长下测定溶液的消光值。

3. 数据处理

对某一浓度下消光度随时间变化的实验数据经线性拟合所得直线斜率，即单位时间吸光度的变化值 $\Delta A / \Delta t_0$ (图 1) 当溶液中 SOD 或模型物浓度为零时测定得到的 $\Delta A / \Delta t$ 为 $(\Delta A / \Delta t)_0$ ，当溶液中 SOD 或模型物浓度为 m 时测定得到的 $\Delta A / \Delta t$ 为 $(\Delta A / \Delta t)_m$ ，由下式：

$$\text{Inhibition\%} = \frac{(\Delta A / \Delta t)_0 - (\Delta A / \Delta t)_m}{(\Delta A / \Delta t)_0} \times 100\% \quad (1)$$

可求出 SOD 或模型物在该浓度下的抑制百分数，用浓度对抑制百分数作图得图 2。从此图上可求得抑制百分数为 50% 时的 SOD 或模型物的浓度，即 1 个活性单位的浓度。通过比较 1 个活性单位时的浓度可以看出模型物催化 O_2^- 歧化的活性大小。其他含 Cu(II) 配合物在不同 pH 条件时的活性测定数据也按同样方法处理，所得结果列于表 1。

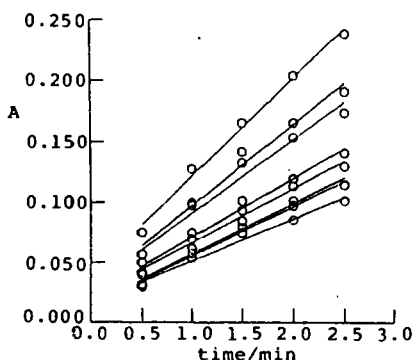


图1 [(dtma)Cu(im)Zn(dtma)]ClO₄ · 2.5H₂O 配合物在 pH = 10.5 时不同浓度的消光值随时间的变化

Fig.1 Absorbances of various concentrations of [(dtma)Cu(im)Zn(dtma)]ClO₄ · 2.5H₂O as a function of time at pH = 10.5

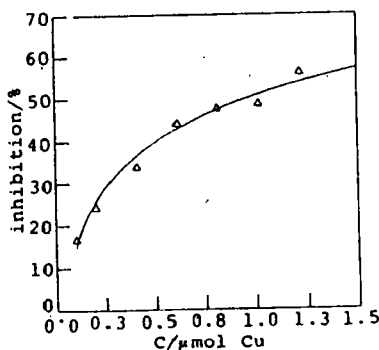
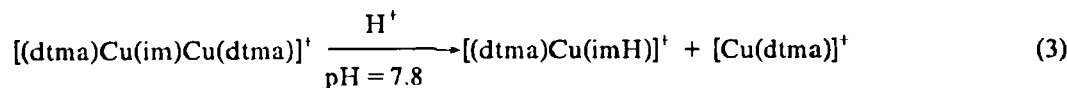
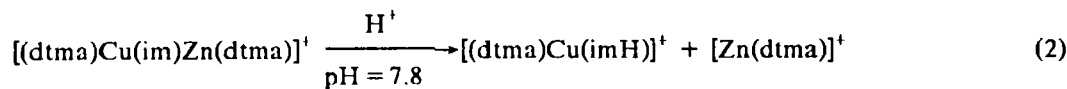


图2 [(dtma)Cu(im)Zn(dtma)]ClO₄ · 2.5H₂O 配合物在 pH = 10.5 时的抑制率与其起始百分浓度的关系

Fig.2 Relationship between the inhibition(%) and initial concentration of [(dtma)Cu(im)Zn(dtma)]ClO₄ · 2.5H₂O at pH = 10.5

结果与讨论

从表 1 可见，在 pH = 7.8 时，以 dtma 为配体的 Cu(II) 配合物催化 O_2^- 歧化的活性是相近的，其单位 SOD 活性所需浓度均在 0.41–0.42 μmol Cu 范围内，在此 pH 条件，由早期研究可知双核配合物的咪唑桥已发生断裂^(4,6)



在该 pH 条件下配合物主要以单核形式存在，即双核配合物的表观活性实际上是其相应单核配合物活性的加和。研究亦表明 [Cu(dtma)(imH)]⁺ 在 pH = 7.8 的溶液中是稳定存在的，但是

定的。考虑到 tricen 和 dtma 与 Cu(II) 的不同配位方式, dtma 为三脚架配体, 其单核 Cu(II) 配合物或咪唑桥联 Cu-im-Zn 双核配合物被第一分子 O_2^- 还原时, 咪唑或咪唑桥在 Cu 侧断裂, 位于 dtma 三脚架角顶的 N_3O 原子与 Cu(I) 的四面体构型相匹配, 有利于 Cu(I) 中间体的形成, 而 tricen 配体为直链型结构, 其四个 N 原子易在同一平面与 Cu(II) 离子配位, 当被 O_2^- 还原时, 平面构型不利于 Cu(I) 中间体的生成, 需要扭曲其骨架再与 Cu(I) 的四面体构型相匹配, 因而 $[Cu(tricen)]^{2+}$, $[Cu(tricen)(imH)]^{2+}$ 及 $[(tricen)Cu(im)Zn(tricen)]^{3+}$ 的催化 O_2^- 歧化反应的活性均比相应的 dtma 配合物为低, 即 Cu(II) 配位构型最接近 Cu, Zn-SOD 活性中心结构的模型化合物的 SOD 活性最高。

参 考 文 献

- [1] Lewin, B., Genes, John Wiley and Sons, New York, p.236-257(1983).
- [2] Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Bccm, K. M. et al, *J. Mol. Biol.*, **160**, 181(1982).
- [3] Bertini, I., Banci, L., Piccioli, M., *Coord. Chem. Rev.*, **100**, 67(1990).
- [4] Mao, Z. W., Chen, D., Tang, W. X. et al, *Polyhedron*, **11**, 191(1992).
- [5] Mao, Z. W., Yu, K. B., Chen, D. et al, *Inorg. Chem.*, **32**, 3104(1993).
- [6] Beauchamp, C., Fridovich, I. *Anal. Biochem.*, **44**, 276(1971).
- [7] 沈孟长、陈晓青、罗勤慧, 生物化学和生物物理进展, **4**, 39(1987).
- [8] 陈 东、杭庆伟、刘之俊等, 无机化学学报, **8**, 17(1992).

STUDY OF THE CATALYTIC ACTIVITIES OF THE MODEL COMPOUNDS FOR Cu,Zn-SOD IN O_2^- DISPROPORTIONATION

Mao Zongwan Hang Qinwei Tang Wenxia

(Coordination Chemistry State Key Laboratory, Coordination Chemistry Institute,
Nanjing University, Nanjing 210093)

In order to elucidate the relationship between the structure and function of the active center of Cu, Zn-SOD, the biological activity catalyzing disproportionation of O_2^- of two new model compounds of the Cu, Zn-SOD, $[(dtma)Cu(im)Zn(dtma)]ClO_4 \cdot 2.5H_2O$ and $[(tricen)Cu(im)Zn(tricen)](ClO_4)_3 \cdot H_2O$, and a series of related complexes were determined by NBT method at pH=7.8 and pH=10.5, respectively. The results indicate the magnitude of the activities is strongly dependent upon imidazolate-bridged modes and the coordination geometries of Cu(II) in these complexes. The catalytic activity of $[(dtma)Cu(im)Zn(dtma)]ClO_4 \cdot 2.5H_2O$, in which the bridging imidazolate occupied the plane position of the distorted tetragonal pyramid, is much higher than that of $[(tricen)Cu(im)Zn(tricen)](ClO_4)_3 \cdot H_2O$, in which the bridging imidazolate occupies the apical position of the distorted tetragonal pyramid.

Keywords: Cu, Zn-SOD enzyme model compound activity mechanism