

稀土离子和钙调蛋白对乳酸脱氢酶活性的影响

李伟国 卢振伟 赵大庆* 倪嘉缙

(中国科学院长春应用化学研究所稀土化学与物理开放实验室, 长春 130022)

分别研究了三价稀土离子、稀土离子和钙调蛋白(CaM)的复合物以及作为稀土离子配体的二乙三胺五乙酸(DTPA)及其衍生物二乙三胺五乙酸-双二甲酰胺(DTPA-BDMA)和二乙三胺五乙酸-双(异烟肼)(DTPA-BIN)对乳酸脱氢酶(LDH)活性的影响。结果表明稀土离子浓度小于 $3\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对酶活性具有轻微的激活作用,离子浓度增大到 $6\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后则开始表现出抑制作用;钙调蛋白可以缓解这种抑制作用;二乙三胺五乙酸及其衍生物在浓度超过 $5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对酶活性均有抑制,这种抑制作用在加入外源的钙调蛋白后也得到缓解。

关键词: 乳酸脱氢酶 钙调蛋白 稀土离子 二乙三胺五乙酸
分类号: O614.33

稀土微肥由于具有对农作物的增产作用,已经在我国得到广泛的应用。随着稀土在农业、畜牧业和医药领域的大量使用,稀土离子不可避免地会随食物链进入到人体,因此稀土离子与生物体的相互作用也日益受到人们的关注。由于生物体系的复杂性,稀土离子与它们相互作用的过程也是相当复杂的,作用机理也不甚清楚,有关稀土进入生物体内是否有毒仍然存在争议。有文献^[1]报道,稀土离子可以和生物体内的一些酶系相互作用,影响着它们的活性和生物体的代谢过程。

钙调蛋白(CaM)是广泛存在于真核细胞中的一种多功能的调节因子,它通过生物体内的钙离子介导参与许多的细胞代谢调控过程,在细胞代谢过程中发挥着重要的作用,调节着近三十余种酶的活性(如环核苷酸磷酸二酯酶,腺苷酸环化酶等)^[2]。乳酸脱氢酶(LDH)是生物体糖代谢过程中的一种重要酶系,文献^[3,4]曾经报道钙调蛋白对它具有一定程度的激活作用。本文选取乳酸脱氢酶作为研究对象,考察了稀土离子以及稀土离子取代后的钙调蛋白对它活性的影响,同时还研究了作为稀土离子配体的二乙三胺五乙酸及其衍生物对LDH酶活的影响,初步探讨了它们作用的机理。

1 实验部分

1.1 材料和仪器

二乙基氨基乙基-纤维素离子交换树脂(DEAE-52)为Whatman公司产品,苯基-琼脂糖凝胶购自Pharmacia公司,乙二醇-双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA)为Sigma公司产品;丙酮酸钠,还原型辅酶NADH购自B.M.公司。二乙三胺五乙酸(DTPA)为北京化工厂产品(分析纯),二乙三胺五乙酸-双二甲酰胺(DTPA-BDMA)和二乙三胺五乙酸-双(异烟肼)(DTPA-BIN)由

收稿日期 2001-06-04。收修改稿日期: 2001-07-11。

国家自然科学基金资助项目(No. 29890280)。

* 通讯联系人。E-mail: dqzhao@ns.ciac.jl.cn

第一作者 李伟国,男,26岁,博士研究生,研究方向:生物无机化学。

长春应化所冯江华博士馈赠。稀土氧化物(La_2O_3 , Eu_2O_3 , Dy_2O_3 , Yb_2O_3 , 纯度 99.99%)购自珠江冶炼厂, 使用时用浓盐酸溶解, 配成 pH 为 5~6 的溶液, 用标准 EDTA 溶液滴定测得其准确浓度。乳酸脱氢酶(2500U)购自 Sigma 公司, 其它试剂均为国产分析纯。

T-124 型高速冷冻离心机, UV-922 型紫外-可见分光光度计(瑞士 Contron 公司), Cole-parmer 酸度计, HPLC 层析系统(瑞典 Pharmacia 公司), 冷冻干燥系统(美国 Labconco 公司), 超滤膜(Spectrum 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 钙调蛋白的分离纯化

CaM 参照文献^[5]的方法分别用 DEAE-52 阴离子交换层析和苯基-琼脂糖疏水亲和层析两步柱层析法从牛脑中分离纯化得到, 产物经 SDS-PAGE 电泳结果证实为一条带, 分子量为 17kDa。CaM 的脱钙采用超滤法: 3.0mg CaM 溶于 5mL Tris-HCl 缓冲液($50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.50, 含 $2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EGTA)中, 离心除去不溶物, 然后转入 10mL 的超滤杯中, 于 1.5atm 的条件下用截留分子量为 1000 的超滤膜超滤浓缩至 1mL, 补加 5mL 缓冲液, 继续超滤, 如此反复三次, 再换用 5mL 二次去离子水超滤浓缩, 反复四次。残留的钙离子含量用原子吸收光谱测定, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白, 用 Lowry 法^[6]测蛋白浓度。最后将脱钙的钙调蛋白(apoCaM)冻干保存。

1.2.2 乳酸脱氢酶活性测定

LDH 活性测定参照 Worthington 法^[7], 以丙酮酸作为底物, 在辅酶 NADH 存在的条件下, LDH 将丙酮酸还原成乳酸, 同时将还原型的辅酶 NADH 转化为氧化型的辅酶 NAD。反应总体积为 1mL, 缓冲液为 $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl(pH 7.5)。测定时将稀释 5000 倍的酶液和稀土离子于 37℃ 下预保温 5min, 然后加入到底物中混合均匀, 最后加入 NADH 启动反应, 37℃ 条件下反应, 同时测定体系在 340nm 处的吸光度下降值, 每隔 15 秒读取一个数据, 共连续测 1.5min。酶活力定义为每分钟吸光度下降 0.15 所需的酶量为一个酶活力单位。

2 结果与讨论

2.1 钙调蛋白的分离纯化和表征

CaM 是一种耐热性较好的酸性蛋白(pI 4.0), 在脑组织中分布最为丰富。牛脑经缓冲液匀浆和提取后, 分别经过 3min 的热处理(90℃), 50% 饱和硫酸铵沉淀, 可以除去大部分的杂蛋白, 最后用等电点沉淀离心分离后, 得到 CaM 的粗产品, 该粗产品再经过 DEAE-52 阴离子交换和苯基-琼脂糖疏水亲和层析两步柱层析法进一步纯化。图 1 给出了 CaM 分别在 DEAE-52 柱(a)和苯基-琼脂糖柱(b)上的洗脱曲线。由洗脱曲线可以看出, 经过热处理和硫酸铵沉淀后, 杂蛋白的洗脱峰减少, 有利于提高 CaM 的纯度。合并洗脱下来的 CaM, 用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定其纯度和分子量, 结果如图 2 所示。CaM 在电泳图上只显示出一条带, 纯度大于 95%, 分子量约为 17 kDa, 与理论值相符合。

2.2 稀土离子对 LDH 活性的影响

LDH 是一组含锌的金属酶, 其活性受到金属离子的调控^[8]。图 3 给出了 LDH 的活性随稀土离子浓度变化的结果。作为对照, 同时测定了相应浓度下的锌及钙离子对酶活的影响。由图中结果可以看出, 当离子浓度小于 $3\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 稀土离子以及锌和钙离子对 LDH 均有轻微的激活作用, 当离子浓度升高到 $6\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后, 稀土离子则开始表现出抑制作用, 离子浓度继

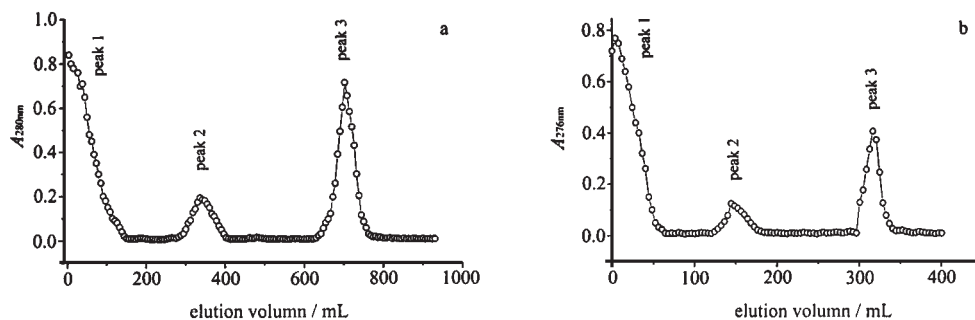


图 1 CaM 在 DEAE-52 柱(1.5 × 35cm, a)和苯基 - 琼脂糖柱(1.5 × 16cm, b)上的洗脱曲线
峰 1 是用缓冲液平衡得到的洗脱峰, 峰 2 是杂蛋白的洗脱峰, 峰 3 为 CaM 洗脱峰

Fig. 1 Chromatograms of CaM purification by DEAE-52(1.5 × 35cm, a) and by phenyl-sepharose(1.5 × 16cm, b) columns. Peak 1 corresponding to unbinding proteins, peak 2 corresponding to impurity proteins, and peak 3 containing purified CaM

续增大到 $80\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时几乎完全抑制它的活性, 这一结果与汪勋清等^[9]用单扫伏安法所得到的结果相一致。与稀土离子不同的是, 高浓度的 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 则维持着对 LDH 的激活作用, 这说明二价的 Ca^{2+} 可以取代 LDH 活性中心的 Zn^{2+} 而保持着它的活性, 三价的稀土离子在较低浓度时也可以取代酶分子活性中心的 Zn^{2+} 离子, 发挥着和 Zn^{2+} 相类似的作用。继续增大稀土离子的浓度后, 则由于其携带着较高的电荷和具有较高的离子势, 它们除了与活性中心的配体结合以外, 在酶分子上可能还有一些非特异性的结合位点, 当它们结合在这些非特异性的位点后会引起酶分子较大的构象变化, 进而影响到酶与底物的作用, 结果表现出抑制酶的活性。另外在该体系中补加 $300\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Zn^{2+} 或 Ca^{2+} 后仍然不能缓解这种抑制作用, 表明稀土离子对 LDH 酶活的抑制是一种竞争性的取代抑制作用。

2.3 稀土离子和钙调蛋白对 LDH 活性的影响

CaM 是一种多功能调节蛋白, 它通过如下的机理来调节靶酶的活性: CaM 首先与 Ca^{2+} 结合, 诱导出自身的构象变化, 暴露出肽链表面的疏水基团, 它再与靶酶结合, 将靶酶活性中心的抑制肽段移位, 暴露出靶酶的活性中心, 从而提高靶酶的活性。李晓东^[2]和杜国忠^[3]曾先后报道了 CaM 对乳酸脱氢酶的活性也具有促进作用, 动力学实验结果证实这种促进作用是一种非竞争性的激活作用, 我们在实验过程中也观察到了类似的现象, 表明 CaM 与 LDH 的作用过程也符合它调控靶酶的作用机理。为了考察稀土离子与

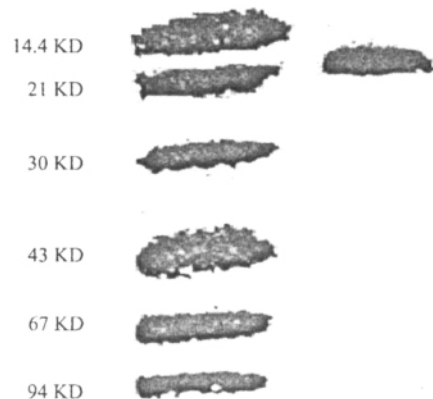


图 2 CaM 的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 2 SDS-PAGE result of purified bovine CaM

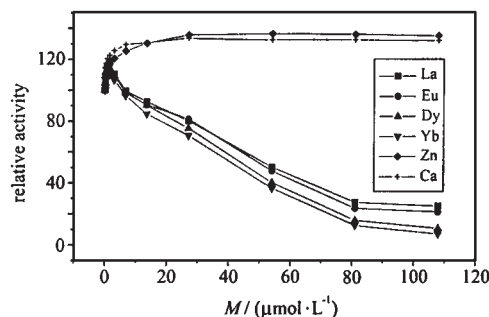


图 3 金属离子对 LDH 活性的影响

Fig. 3 Effects of metal ions on the activity of LDH

CaM 作用后对其靶酶调控作用的影响, 我们进一步研究了稀土离子与 apoCaM 结合后对 LDH 酶活的影响, 所得到的结果如图 4 所示。结果表明, 和稀土离子直接与 LDH 作用相类似的是, 在离子浓度小于 $3\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 稀土离子与 CaM 结合后同样能够激活 LDH, 但与稀土离子不同的是, 当离子浓度在 $3 \sim 30\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围之间, 尽管稀土离子和 CaM 的复合物对 LDH 的激活程度有所下降, 但仍然要高于 LDH 的基础活性 (没有金属离子和 CaM 时的活性)。由于在 CaM 上含有金属离子的结合位点, 它可以与体系中的稀土离子结合, 诱导出与钙离子相类似的构象变化, 进一步与 LDH 作用后表现出促进 LDH 的活性。这说明 CaM 与稀土离子结合后可以部分地缓解稀土离子对 LDH 酶活的抑制程度, 起到了一种类似金属解毒剂的作用, 这与 CaM 在其它重金属离子中毒机制研究中所得到的结论是相一致的^[10]。高浓度的稀土离子则由于可以直接与 LDH 作用而抑制其活性。

2.4 DTPA 及其衍生物对 LDH 酶活抑制作用

DTPA 是一种含氮的多元羧酸, 可以作为金属离子的螯合剂与它们形成配合物。其中 Gd 与 DTPA 形成的配合物由于具有良好的稳定性和弛豫性能已经作为核磁造影剂在医学检验中得到了广泛的应用。在比较自由稀土离子与稀土配合物对 LDH 影响的实验中, 我们发现当稀土离子与 DTPA 形成的配合物在浓度为 $20\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对酶活性表现出很强的抑制作用, 其抑制程度甚至比同浓度的自由稀土离子对酶活的抑制程度还要大, 这提示我们 DTPA 有可能直接与 LDH 发生了作用。为了进一步证实这种推论, 我们考察了不同浓度的 DTPA 及其衍生物对酶活的影响, 结果如图 5 所示。当 DTPA 的浓度在 $3\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下时, 其对 LDH 酶活的影响不明显, 可是当浓度继续增大到 $6\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时则表现出较强的抑制作用, 浓度继续升高到 $25\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时几乎完全抑制了 LDH 的活性。其它两种衍生物也有类似的作用, 但抑制程度要小于 DTPA 的抑制作用, 这一现象目前还没有类似的报道。DTPA 系列是一种较强的金属离子络合剂, 但在上述体系中加入过量的 Ca^{2+} 或 Zn^{2+} 离子后 (见 2.5), DTPA 仍然表现出抑制 LDH 的活性, 显然 DTPA 对酶活性的抑制作用不是因为它们络合了酶活性中心的金属离子所致, 而是因为它们与酶分子发生了直接的作用, 改变了酶分子的构象, 进而影响到酶与底物的结合, 从而表现出抑制酶的活性。

2.5 钙调蛋白和 DTPA 及其衍生物对 LDH 酶活的影响

文献和我们的实验都已证实 CaM 对 LDH 的酶活具有有一定程度的激活作用, 为了进一

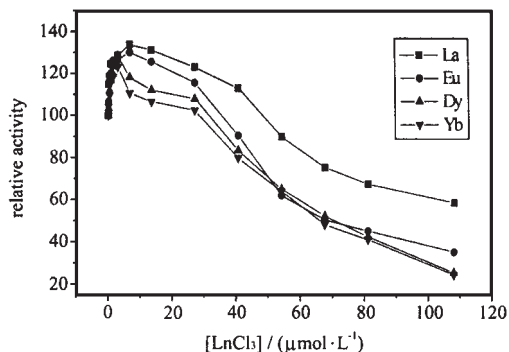


图 4 稀土离子和 CaM 的复合物对 LDH 活性的影响
Fig. 4 Effects of the complexes of CaM with rare earth ions on the activity of LDH

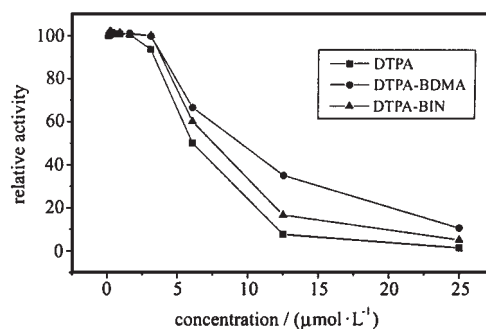


图 5 DTPA 及其衍生物对 LDH 的抑制作用
Fig. 5 Inhibitory effects of DTPA and its derivatives on the activity of LDH

步证实这一结论, 我们还考察了 CaM 和 DTPA 对 LDH 酶活的影响。在 DTPA 与 LDH 的体系中加入 $100\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ca^{2+} , DTPA 仍然表现出对 LDH 的抑制作用, 说明 DTPA 与 LDH 的作用部位远离其活性中心, 它对 LDH 的抑制作用不能通过加入过量的金属离子来缓解。有趣的是, 在上述体系中加入 CaM 后, LDH 的活性却表现出明显的提高 (见表 1)。13.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DTPA 与 LDH 作用后, 其活性仅为基础活性的 3.5%, 加入 $100\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+} 后活性没有明显变化, 但在此基础上加入 0.36 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CaM 后, 其活性则提高到 57.9%。DTPA-BDMA 和 DTPA-BIN 两种衍生物的体系也有类似的现象, 在加入 CaM 后其活性分别由 11.5% 和 17.6% 提高到 101.4% 和 109.6%。这一结果证实了 CaM 对 LDH 的酶活的确具有激活作用。外源 CaM 的加入可以缓解 DTPA 对 LDH 的抑制作用, 其原因可能在于 CaM 与 LDH 活性部位的肽段作用后, 诱导酶分子活性中心的构象变化, 将酶与底物结合的部位重新暴露出来, 有利于酶和底物的结合, 这一结果同时还说明 DTPA 以及 CaM 与 LDH 作用时, 其结合位点不在同一部位, DTPA 与 LDH 的结合位点远离其活性中心, 这一结论与上述实验结果也是相符合的。

表 1 CaM 和 DTPA 及其衍生物对 LDH 活性的影响

Table 1 Effects of CaM on the Activity of LDH Inhibited by DTPA or its Derivatives

assay conditions	relative activity / %		
	DTPA	DTPA-BDMA	DTPA-BIN
without Ca^{2+} or CaM	3.5	11.5	17.6
with Ca^{2+}	4.3	12.4	16.7
with Ca^{2+} and CaM	57.9	101.4	109.6

*The concentrations of DTPA and its derivatives are both 13.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, concentration of Ca^{2+} or CaM is 100 and 0.36 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively.

参 考 文 献

- [1] LI Xin-Min(李新民), Ni Jia-Zuan(倪嘉纘), WANG Ping-Yuan(王平原) et al *Shengwu Huaxue Zazhi(Chinese Biochemical Journal)*, **1995**, **11**(3), 281.
- [2] Hans J. V., Zhang M. J. *Mol. Cellular Biochem.*, **1995**, 149 ~ 150, 3.
- [3] LI Xiao-Dong(李晓东), ZHANG Ting-Fang(张庭芳) *Shengwu Huaxue Zazhi(Chinese Biochemical Journal)*, **1993**, **9**(3), 381.
- [4] DU Guo-Zhong(杜国忠), ZHAO Bao-Cang(赵宝昌) *Shengwu Huaxue Zazhi(Chinese Biochemical Journal)*, **1997**, **13**(1), 122.
- [5] Gopalakrishna R., Anderson W. B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1982**, **104**(2), 830.
- [6] Lowry O., Rosebroug N. J., Farr A. L. et al *J. Biol. Chem.*, **1951**, **193**(1), 265.
- [7] Stellmach B., Translated by QIAN Jia-Yuan(钱嘉渊) *Methods for Measurement of Enzyme(酶的测定方法)*, Beijing: China Light Industry Press, **1992**, p204.
- [8] Ochiai EI-I., Translated by LUO Jin-Xin(罗锦新), ZHANG Nai-Zheng(张乃正), CHEN Han-Wen(陈汉文) *Bioinorganic Chemistry an Introduction(生物无机化学导论)*, Beijing: Chemical Industry Press, **1987**, p366.
- [9] WANG Xun-Qing(汪勋清), GAO Xiao-Xia(高小霞) *Beijing Daxue Xuebao Ziran Kexue Ban(Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinesis)*, **1997**, **33**(2), 147.
- [10] XU Guo-Gang(徐国刚) *Weisheng Dulixue Zazhi(Journal Health Toxicology)*, **1994**, **8**(1), 45.

Effects of Rare Earth Ions and Calmodulin on the Activity of Lactate Dehydrogenase

LI Wei-Guo LU Zhen-Wei ZHAO Da-Qing* NI Jia-Zuan

(*Key Laboratory of Rare Earth Chemistry and Physics, Changchun Institute of Applied Chemistry,
Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022*)

In this paper, the effects of rare earth ions (La^{3+} , Eu^{3+} , Dy^{3+} , Yb^{3+}) and their complexes with calmodulin on the activity of lactate dehydrogenase (LDH) were investigated. The results reveal that whether binding with calmodulin or not, rare earth ions show a minor activation effects on LDH when their concentrations are less than $3\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, but indicate some strong inhibitory effects on LDH activity when the concentrations are above $5\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Calmodulin, which is a calcium-dependent regulator, can stimulate LDH activity and release the inhibitory effects of rare earth ion. Diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) and its derivatives bisdimethylamide-diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA-BDMA), bisisonicotinyl-diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA-BIN), which are often used as ligands to metal ions, inhibit LDH activity when their concentrations are above $5\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Calmodulin can also release their inhibitory effects at the same time.

Keywords: lactate dehydrogenase calmodulin rare earth ions
diethylenetriamine pentaacetic acid