

金属离子对过亚硝酸根损伤酪氨酸的影响

张 伟 罗云敬* 王云海 钟儒刚

(北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100022)

关键词: 过亚硝酸根; *L*-酪氨酸; 3-硝基酪氨酸; 二聚酪氨酸; 金属离子

中图分类号: O611.3; O613.61 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2006)06-1113-05

Influence of Metallic Ions on Tyrosine Modification by Peroxynitrite

ZHANG Wei LUO Yun-Jing* WANG Yun-Hai ZHONG Ru-Gang

(College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022)

Abstract: $\text{NO}^\cdot$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ combine each other to form peroxynitrite (ONOO^-) in vivo. Peroxynitrite is very cytotoxic, and it damages many biomolecules. 3-nitrotyrosine and dityrosine are two main products from the reaction of ONOO^- and tyrosine. Lots of metallic ions in vivo influence the modification of tyrosine by peroxynitrite. UV-Vis and Fluorescence spectrophotometer were used to study the catalysis and inhibition of metallic ions on the production of 3-nitrotyrosine and dityrosine in vitro. Present results showed that Co(II) , Cu(II) and Mn(II) enhance the production of 3-nitrotyrosine, and among them Co(II) and Mn(II) have been reported rarely before about it. In addition, Mn(II) inhibits the production of dityrosine to a certain extent.

Key words: peroxynitrite; *L*-tyrosine; 3-nitrotyrosine; dityrosine; metallic ions

0 引言

过亚硝酸根(ONOO^-)是活性很高的生物小分子,在体内可损伤酪氨酸、色氨酸、半胱氨酸等多种氨基酸,产生多种损伤产物^[1]。其中过亚硝酸根对酪氨酸(Tyr)的损伤常常被作为体内存在过亚硝酸根的证据^[2],它的损伤产物 3-硝基酪氨酸已被证实和心血管疾病^[3]、风湿性关节炎^[4]等都有着密切的联系,因此对酪氨酸损伤的研究尤为重要。过亚硝酸根在生理条件下损伤酪氨酸产生两种主要损伤产物,即 3-硝基酪氨酸(3-NT)和二聚酪氨酸(Dityr)^[5]。

生物体内存在多种必需微量金属元素,它们决定着多种生物学过程。研究这些金属离子在过亚硝

酸根损伤氨基酸尤其是酪氨酸过程中的作用是非常重要的。铜离子和铁离子在这方面的研究曾被报道过^[6-8],但其参与机理还不清楚,对其他金属离子的研究则鲜有报道。基于此种现状,本文选择几种体内常见的金属离子进行了研究,在体外比较了这些金属离子对过亚硝酸根分解的影响。我们还研究了没有其他物质参与时,不同反应物浓度对两种损伤产物的影响。在此基础上筛选、研究了多种金属离子对此反应的影响,并探讨了其影响机理。

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

主要试剂:*L*-酪氨酸购自北京化学试剂总公司,

收稿日期:2006-01-09。收修改稿日期:2006-03-21。

北京市科技新星资助项目(No.2003B05)、北京市自然科学基金(No.2052004)和教育归国人员启动基金资助项目(No.00099)。

*通讯联系人。E-mail:luoyj@bjut.edu.cn

第一作者:张 伟,男,27岁,博士研究生;研究方向:分子毒理学。

其他试剂均为国产分析纯试剂。实验用水为二次去离子水。ONOO⁻为本实验室采用 Rao M.Uppu 等人提出的亚硝酸异戊酯和过氧化氢反应的方法合成^[9]。制成的产物置于-20 ℃冰箱冷冻保存。在每次实验前,测定其在 302 nm 处的吸光度,并根据此波长下的摩尔吸收系数 $\varepsilon_{302\text{ nm}}=1\ 670\ \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 确定其浓度^[9]。

主要仪器:U-3010 型紫外-可见分光光度计(日本日立公司),F-4500 型荧光分光光度计(日本日立公司)。

1.2 过亚硝酸根分解实验

过亚硝酸根分解实验在碱性条件下进行。将 $0.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ONOO⁻溶于 4 mL、 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 中,加入 $20\ \mu\text{L}$ 、 $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的金属盐水溶液,搅拌均匀。其在 302 nm 处吸光度的变化用紫外-可见分光光度计记录。计算出每种金属离子加入 10 min 后未分解的 ONOO⁻占初始浓度的百分比 ($\frac{C_{10\text{ min}}}{C_0}\times 100\%$)。

1.3 过亚硝酸根对酪氨酸的损伤实验

过亚硝酸根对酪氨酸的损伤实验在生理 pH 值 (7.4) 下进行。将酪氨酸和金属盐溶于 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液或 $0.2\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲溶液中,加入 ONOO⁻溶液,在漩涡振荡器上迅速混匀,25 ℃ 水浴中反应 30 min。所有实验中,pH 值变化均不超过 0.1。3-NT 用紫外-可见分光光度计测定,测定前用 $5\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调节每个样品的 pH 值至 10~11。以未加入 ONOO⁻的空白溶液为参比,根据其在 428 nm 处的吸光度值 ($\varepsilon_{428\text{ nm}}=4\ 400\ \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)^[4] 计算 3-NT 的浓度。Dityr 用荧光分光光度计检测,测定每一样品在激发波长为 320 nm,发射波长为 410 nm 处^[10,11] 的荧光值,以未加入 ONOO⁻的空白溶液为参比,每个样品的相对荧光值为 $F'=F_{\text{sample}}-F_{\text{reference}}$ 。加入金属离子后,计算其荧光强度变化的百分比 ($\Delta F'/F'_{\text{control}}\%$) ($=\frac{F'_{\text{control}}-F'_{\text{sample}}}{F'_{\text{control}}}\times 100\%$),以此来衡量金属离子对 Dityr 生成量的影响。作为对照,我们也做了过亚硝酸根分解后的空白实验,证明过亚硝酸根分解后的产物并不能对本实验造成干扰。

2 结果与讨论

2.1 金属离子对过亚硝酸根分解的影响

因为 ONOO⁻在碱性条件下相当稳定^[12],所以我们在该条件下加入金属离子并观察其对 ONOO⁻分

解的影响。由表 1 可以看出,Cu(II)和 Co(II)能够较为明显地催化 ONOO⁻分解。其中尤以 Cu(II)的催化能力最为显著,且催化能力与配位的阴离子关系不大,10 min 后 2 种 Cu(II)盐分别催化 ONOO⁻分解后仅剩 40.1%和 41.7%。另外,加入了 Co(II)的样品中 ONOO⁻仅剩 83.5%,而没有金属离子的空白液中却还有 98.5%的 ONOO⁻没有分解。可见,在本实验条件下,Mg(II)、Ca(II)、Zn(II)、Mn(II)和 Ni(II)对 ONOO⁻分解无明显影响,Cu(II)和 Co(II)可不同程度地催化 ONOO⁻分解。

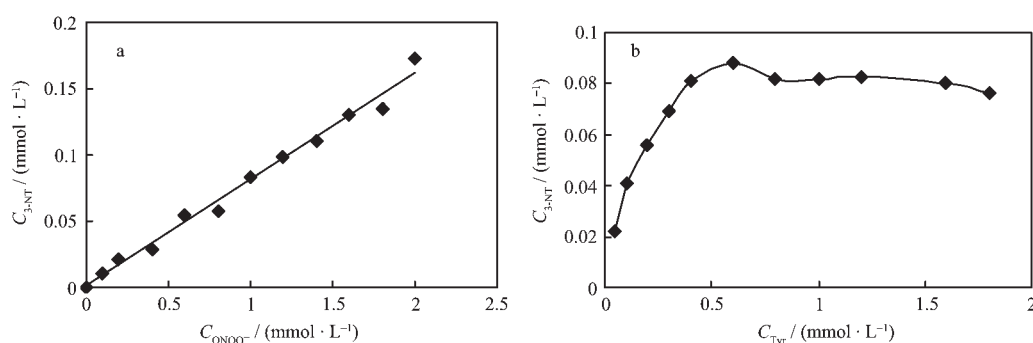
表 1 碱性溶液中金属离子对过亚硝酸根分解的影响

Table 1 Influence of metallic salts on the decay of ONOO⁻ in alkaline solution

Metallic salt	$C_{10\text{ min}} / C_0 / \%$
—	98.5
MgCl ₂	98.2
CaCl ₂	99.2
CuSO ₄	40.1
Cu(NO ₃) ₂	41.7
ZnSO ₄	98.6
MnCl ₂	98.5
NiCl ₂	96.6
CoCl ₂	83.5

2.2 反应物浓度变化对两种产物的影响

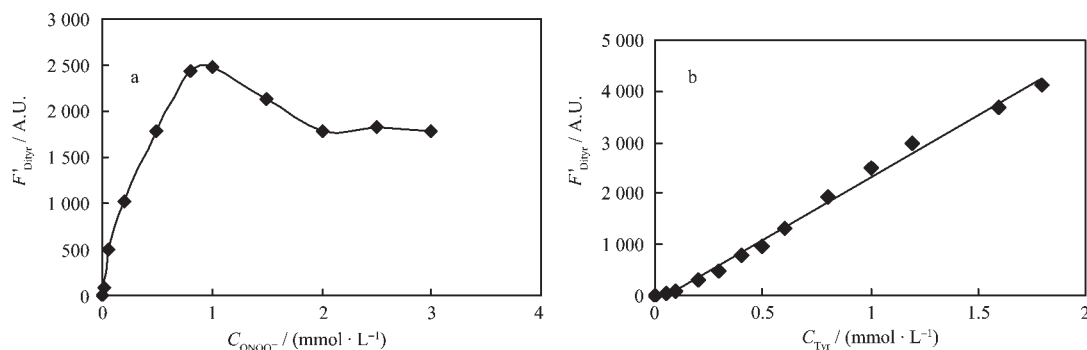
在没有金属离子参与时,不同起始反应浓度的反应物对两种损伤产物的影响如图 1、图 2 所示。我们可以看出,随着 ONOO⁻浓度和酪氨酸浓度的增加,3-NT 和 Dityr 这两种产物变化的趋势刚好相反。3-NT 随着 ONOO⁻浓度的增加不断增加,却随着酪氨酸浓度的增加先增加,在酪氨酸为 $0.6\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大值,然后稍有减少并逐渐稳定。而 Dityr 则随着 ONOO⁻浓度的增大先增加,ONOO⁻浓度为 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右时达到最大值,然后稍有下降并趋于稳定,却随着酪氨酸浓度的增加不断增加。在生理条件下,过亚硝酸根是通过自由基机理损伤酪氨酸的^[1],我们的实验结果(图 1 和图 2)可以比较好地用此机理来解释。自由基机理认为 3-NT 来自于 Tyr[•]与 NO₂[•]的结合 ($k=3\times 10^9\ \text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$)^[1],Dityr 则来自于 2 个 Tyr[•]的结合 ($k=4.5\times 10^8\ \text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$)^[1]。从反应速度上看,来源于 ONOO⁻的 NO₂[•]与来源于酪氨酸的 Tyr[•]在争夺另 1 个 Tyr[•]时存在竞争。因此,酪氨酸浓度一定,ONOO⁻浓度不断增加有利于 3-NT 的生成,反之则有利于 Dityr 的生成,这与我们的实验结果相



The final concentration of Tyr in a is $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, and the final concentration of ONOO^- in b is $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The buffers are $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ potassium phosphate, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTPA at $\text{pH}=7.4$ and 25°C . Results are expressed as the mean from at least four determinations.

图 1 不同 ONOO^- 浓度(a)与不同 Tyr 浓度(b)对 3-NT 生成量的影响

Fig.1 Change of production of 3-NT with different concentrations of ONOO^- (a) or Tyr (b)



The final concentration of Tyr in a is $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, and the final concentration of ONOO^- in b is $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The buffers are $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTPA at $\text{pH}=7.4$ and 25°C . Results are expressed as the mean from at least four determinations.

图 2 不同 ONOO^- 浓度(a)与不同 Tyr 浓度(b)对 Dityr 生成量的影响

Fig.2 Change of production of Dityr with different concentrations of ONOO^- (a) or Tyr (b)

符。根据图 1 和图 2,我们选取 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酪氨酸和 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过亚硝酸根作为研究金属离子对两种产物影响时的起始反应浓度。

2.3 不同金属离子对两种产物的影响

首先,我们初步筛选了对两种产物有影响的金属离子,结果如表 2 所示。可见, Mn(II) 、 Cu(II) 和 Co(II)

对 3-NT 的生成具有明显的催化作用,而 Mn(II) 又可抑制 Dityr 的生成。对照表 1 我们还可以看出,在这 3 种离子中,除 Mn(II) 外,其余 2 种都可以催化 ONOO^- 分解。

然后,我们比较了不同浓度的 Mn(II) 、 Cu(II) 和 Co(II) 对 2 种产物的影响,结果见图 3 和图 4(同时选

表 2 $\text{pH}=7.4$ 时金属离子对两种损伤产物的影响

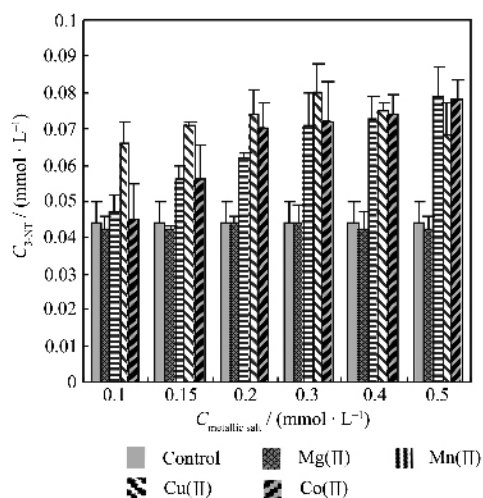
Table 2 Influence of metallic salts on the two products at $\text{pH}=7.4$

Products	Metallic salt ($0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)							
	Control	MgCl_2	MnCl_2	CaCl_2	ZnSO_4	CuSO_4	CoCl_2	NiCl_2
$C_{3\text{-NT}} / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	0.044	0.046	0.072	0.041	0.047	0.077	0.070	0.052
F_{Dityr}^* (Relative fluorescence)	2 688	2 660	1 716	2 294	2 584	—	—	—

Note: The final concentration of Tyr or ONOO^- is $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The buffers are $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, at $\text{pH}=7.4$ and 25°C . Results are expressed as the mean from at least four determinations.

Ni(II) , Cu(II) and Co(II) can quench the fluorescence of dityr(data not shown), so we didn't study the influence of these three metallic ions on the production of dityr.

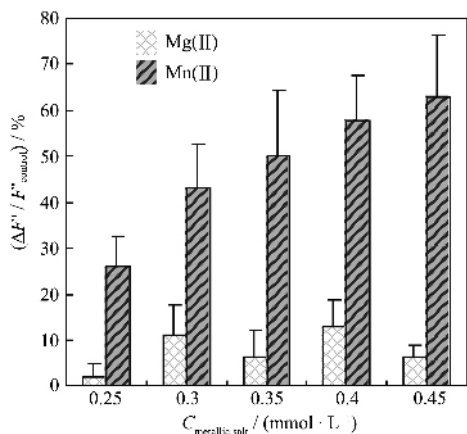
取加入不同浓度 Mg(II) 的样品作为对照)。我们可以看出,随着金属离子浓度的增加, Co(II) 对于 3-NT 的催化能力逐渐增强,当浓度大于 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后渐趋稳定,3-NT 的量达到 $0.070 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (比空白样品增加了 59%)。Mn(II)的催化能力也是随着其浓度的增加先增大,当浓度大于 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后其催化能



The final concentration of Tyr or ONOO^- is $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The buffers are $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, at $\text{pH}=7.4$ and 25°C . Results are expressed as mean $\pm$ STD from at least four determinations.

图 3 不同浓度金属离子对 3-NT 生成量的影响

Fig.3 Influence of different concentrations of metallic ions on the production of 3-NT



The final concentration of Tyr or ONOO^- is $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The buffers are $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, at $\text{pH}=7.4$ and 25°C . Results are expressed as mean $\pm$ STD from at least four determinations.

图 4 不同浓度金属离子对 Dityr 生成量的影响

Fig.4 Influence of different concentrations of metallic ions on the production of Dityr

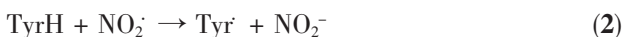
力逐渐稳定,3-NT 的量达到 $0.071 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (比空白样品增加了 61%)。而 Cu(II) 则在 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最大催化效果,此时 3-NT 的量升至 $0.080 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (比空白样品增加了 82%),然后 3-NT 的量稍有下降趋于稳定。并且,与 Co(II) 和 Mn(II) 比起来, Cu(II) 在更小的浓度 ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 时就开始出现显著的催化能力。另外,随着 Mn(II) 浓度的增加,Dityr 的生成量不断减少。当 Mn(II) 浓度从 $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 升至 $0.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,Dityr 的减少量从 26% 增加到了 63%。然而, Mg(II) 无论对 3-NT 还是 Dityr 都没有明显的作用。

2.4 催化机理的研究

没有金属离子参与时,生理条件下 ONOO^- 是通过自由基机理^[1](式 1~6)损伤酪氨酸的。



$$k=0.9 \text{ s}^{-1}$$



$$k=3.2 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$$



$$k=1.4 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$$



$$k=3 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$$



$$k=1.8 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$$



$$k=4.5 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$$

金属离子参与时 ONOO^- 诱导各种反应的机理目前还不清楚。有文献曾经推测过 Cu(II) 通过与 ONOO^- 形成配合物来改变反应过程,影响反应结果^[13-15]。但也有观点认为在 Cu(II) 催化的 ONOO^- 的反应中,仍然有自由基的参与^[5]。为了进一步研究金属离子催化的机理,我们设计了向反应体系中加羟自由基捕获剂乙醇的实验。没有金属离子参与时, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇使 3-NT 和 Dityr 的生成量分别减少了 50% 和 18%。金属离子存在时的结果见表 3,可见,羟自由基捕获剂对 Cu(II) 的催化效果有明显影响,而对 Co(II) 和 Mn(II) 却无明显影响。因此我们认为 Cu(II) 的催化机理与羟自由基有直接关系,而 Co(II) 和 Mn(II) 的催化并不是通过自由基机理进行的。

Houghton 等人曾报道过 Co(II) 可以催化过氧化氢物(ROOH)分解^[16],并认为 Co(II) 是通过与 ROOH 形成配合物中间体催化其分解的。我们推测 Co(II) 和 Mn(II) 也是通过形成某种配合物来影响 ONOO^- 的各

表 3 乙醇对金属离子催化效果的影响
Table 3 Influence of ethanol on the catalyzing effect of metallic salts

Increase of production of 3-NT than control	Metallic salt		
	CoCl ₂	CuSO ₄	MnCl ₂
Control + 0.3 mmol·L ⁻¹ metallic salt	59%	82%	61%
Control + 0.3 mmol·L ⁻¹ metallic salt + 100 mmol·L ⁻¹ EtOH	54%	14%	69%

种反应。但是在 ONOO⁻溶液中加入 Co(II)和 Mn(II)后,对其进行紫外及可见区的全波长扫描,没有检测到任何配合物的存在。并且,利用此方法,我们也没有发现 Co(II)和 Mn(II)使酪氨酸本身在紫外区的吸收光谱图有任何改变。然而我们注意到文献报道过铁、锰卟啉可通过与 ONOO⁻形成高价态金属中间体影响多种反应,并且这些中间体都是瞬间存在的^[17]。钴卟啉和铁、锰卟啉相似,其中心金属具有可变的价态,可被氧化成高价态中间体,并且在近期的研究中,我们还首次发现钴卟啉也可影响 ONOO⁻的多种性质。因此,结合实验现象和文献报道我们认为,在 Co(II)和 Mn(II)参与的 ONOO⁻损伤酪氨酸的过程中,也有瞬时中间体的存在,但由于存在时间极短,很难被捕获到。

在本文中,我们首次提出除了铜和铁外,钴离子和锰离子也可以对过亚硝酸根损伤酪氨酸的程度产生影响,并对其影响机理进行了探讨。而镁、钙、锌、镍这些体内也很重要的金属离子对此反应则没有明显的作用。最近 Kohnen 等人还发现 Cu(II)、Mn(II)、Ni(II)和 Co(II)都对 ONOO⁻与抗氧化剂丙泊酚反应后氧化产物的生成具有催化作用^[15]。钴和锰是体内必需的金属元素,但是过多的钴会引起红细胞增多症和甲状腺肿大等作用,锰过多可以干扰其他微量元素的吸收。现在我们可以推测,除了上述各种作用外,过多的钴和锰还有可能在体内对 ONOO⁻的细胞毒性产生影响。

参考文献:

- [1] Alvarez B, Radi R. *Amino Acids*, **2003**,**25**:295~311
- [2] Pietraforte D, Salzano A, Marino G, et al. *Amino Acids*, **2003**,**25**:341~350
- [3] Turko V, Murad F. *Pharmacological Reviews*, **2002**,**54**:619~634
- [4] Stan A, Ischiropoulos G. *Free Rad. Res.*, **2000**,**24**:541~581
- [5] Vliet A, Eiserich J, O'Neill C, et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1995**,**319**(2):341~349
- [6] Merrih S, Padmaja S, Koppenol W. *Chem. Res. Toxicol*, **1996**,**9**:232~240
- [7] LIAO Li-Fu(廖力夫), HE Yu-Yuan(何玉媛), LIU Chuan-Xiang(刘传湘). *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan (Progress in Biochemistry and Biophysics)*, **1997**,**24**(5):450~453
- [8] Beckman J, Ischiropoulos H, Zhu L, et al. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1992**,**298**:438~445
- [9] Rao M, William U, Pryor A. *Anal. Biochem.*, **1996**,**236**:242~249
- [10]Liang J, Liu Z, Cai R. *Analytica Chimica Acta*, **2004**,**530**:317~324
- [11]Malencik D, Anderson S. *Amino Acids*, **2003**,**25**:233~247
- [12]Gilbert G, Balavoine A, Yurii V, et al. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **1997**,**1**(6):507~521
- [13]Hughes M, Nicklin H. *J. Chem. Soc. (A)*, **1970**:925~928
- [14]Ajilouni A, Gould E. *Inorg. Chem.*, **1997**,**36**:362~365
- [15]Kohnen S, Hausiak E, Mouithys A, et al. *Nitric Oxide*, **2005**,**12**:252~260
- [16]Houghton R, Rice C. *Polyhedron*, **1996**,**15**:1893~1897
- [17]Crow J. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1999**,**371**:41~52