

2-(二(2-氨基乙基)氨基)乙醇 Pd^{II}配合物与小肽的相互作用

洪 瑾^{1,2} 焦 阳¹ 张峻峰³ 何卫江^{*,1}

(¹ 南京大学化学化工学院, 配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

(² 中国药科大学基础部无机教研室, 南京 210009)

(³ 南京大学生命科学学院生化系, 南京 210093)

摘要: 本文采用电喷雾质谱研究了带羟乙基侧臂二乙烯三胺 Pd^{II}配合物分别与含有硫原子侧链或咪唑侧链的二肽 Met-Ala、乙酰化三肽 AcGHG 和 AcGHL, 十一肽 Mp-11 和三十肽氧化胰岛素 B 链的相互作用, 发现该配合物能较好地结合这些多肽, 但未能促使它们发生水解反应。比较相应铜配合物及二乙烯三胺铜配合物的切割性能, 提示羟乙基侧臂单独难以实现相邻肽键的切割, 高配位数金属中心对肽键羰基的活化与羟基的协同进攻是该类配合物切割多肽的可能机制。研究可为人工金属肽酶的发展提供新的设计战略。

关键词: 多肽; 电喷雾质谱; Pd^{II}配合物

中图分类号: O657.6

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2009)12-2105-08

Intermolecular Interaction between Pd^{II} Complex of 2-(Bis(2-aminoethyl)amino)ethanol and Met, His or Cys-containing Peptides

HONG Jin^{1,2} JIAO Yang¹ ZHANG Jun-Feng³ HE Wei-Jiang^{*,1}

(¹State Key Laboratory of Coordination Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093)

(²Inorganic Chemistry Department, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

(³Department of Biochemistry, School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract: ESI-MS spectroscopic study on the incubated mixture of Pd^{II} complex of 2-[bis(2-aminoethyl)amino] ethanol (L) and Met-, His- or Cys-containing peptides shows that this Pd^{II} complex can bind effectively with these peptides. However, there is no promoted peptide cleavage induced by the complex. The positive peptide cleavage promoted by complex, Cu^{II}L and the negative response of Cu^{II}/dien complex suggest the merely hydroxy pendant in complex have no ability to attack the peptide bond. The synergic carbonyl activation by metal coordination is essential for the cleavage of peptide bond promoted by Cu^{II}L. The current study should be helpful for the future design of artificial metallo-peptidase.

Key words: peptides; electrospray ionization mass spectrometry; palladium

近年来,过渡金属配合物作为“无机蛋白水解酶”选择性水解切割多肽和蛋白中的肽键日益成为生物无机化学领域中的一个研究热点。所采用的过渡金属配合物包括 Co^{II,III} [1,2], Fe^{III} [3,4], Zn^{II} [5,6], Cu^{II} [7-9], Pd^{II} [10-12] 和 Pt^{II} [13,14] 等配合物。其中对 Pd^{II} 和 Pt^{II} 配合

物的研究较多,切割效率也比较高。研究表明 Pd^{II} 配合物可在微酸性溶液中促进肽键的切割,其切割位点总发生在组氨酸和蛋氨酸残基上游的第二个肽键,即序列 X-Y-His-Z 和 X-Y-Met-Z 中的 X-Y 键 [15,16]。而 Pt^{II} 配合物在微酸性溶液中的切割位点总

收稿日期:2009-06-17。收修改稿日期:2009-09-01。

国家自然科学基金资助项目(No.20871066, BK2009227)。

*通讯联系人。E-mail: hewei69@nju.edu.cn

第一作者:洪瑾,女,30岁,讲师;研究方向:生物无机化学。

在蛋氨酸下游的第一个肽键,即肽键 Met-Z^[17,18]。目前的多数研究认为,金属配合物促进肽键水解一般分两步进行:首先,金属中心通过配位作用结合在多肽及蛋白的特定氨基酸侧链上,然后通过金属中心的配位水或金属中心活化肽键羰基氧促进外部水进攻或前两种机理的共同作用促使结合位点周围的肽键断裂^[9]。金属中心与蛋白或多肽侧链的结合一般是通过与蛋氨酸(Met)或半胱氨酸(Cys)中的 S 原子或组氨酸(His)的咪唑环中的 N 原子的配位作用实现。显然金属配合物与多肽或蛋白的结合性能对肽键的断裂非常关键,因此研究相关金属配合物与多肽或蛋白的相互作用具有重要意义。

Kostic 等人的研究表明[Pt(dien)(H₂O)]²⁺(dien:二乙烯三胺)无切割活性,他们认为这是由于 Pt^{II} 在与氨基酸残基配位后已经达到配位饱和,不再有活化的进攻基团^[15]。朱龙根等研究发现利用比二乙烯三胺多一个羟乙基侧臂的三脚架多胺 2-(二(2-氨基乙基)氨基)乙醇(L)形成的 Cu^{II} 配合物(CuL)可以选择性地高效切割马心肌红蛋白^[9]。切割可能是通过配合物 Cu^{II} 中心与组氨酸的咪唑 N 及上/下游相邻的酰胺 N 形成五配位结构,未参与配位的羟乙基侧臂作为亲核进攻基团促进水解肽键(图 1 I);也可能是通过 Cu^{II} 中心进一步与羰基氧配位形成六配位结构实现

肽键活化,随后羟乙基侧臂或一个外界水分子(图 1 II) 作为进攻基团实现肽键的水解。不管是何种途径,羟乙基侧臂在水解过程中都具有重要的作用。比较这两个配合物的切割性能,搞清配体 L 相应钯配合物的多肽结合和切割性能的研究具有现实意义,并为探究上述切割的真实途径提供帮助。由于 Pd^{II} 配合物只有四配位的形式,结合氨基酸残基后就不能实现所谓的羰基活化过程,利用该配合物与多肽的相互作用一方面可以考察羟乙基侧臂的切割活性;另一方面根据 Pd^{II} 中心与 Met、His 和 Cys 等氨基酸残基的选择性结合性能^[8,20,21],分别选取具有可与 Pd^{II} 配位的含硫侧链的二肽 Met-Ala 和十一

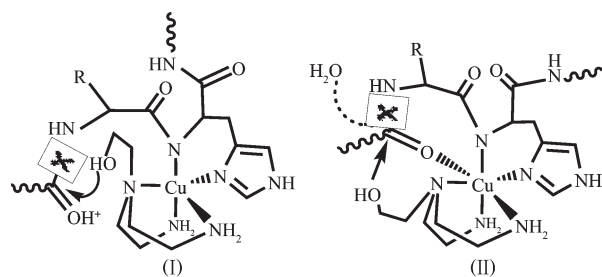


图 1 带羟乙基侧臂 Cu^{II} 配合物 CuL 水解肽键的可能机理

Fig.1 Proposed mechanism of peptide cleavage promoted by complex CuL

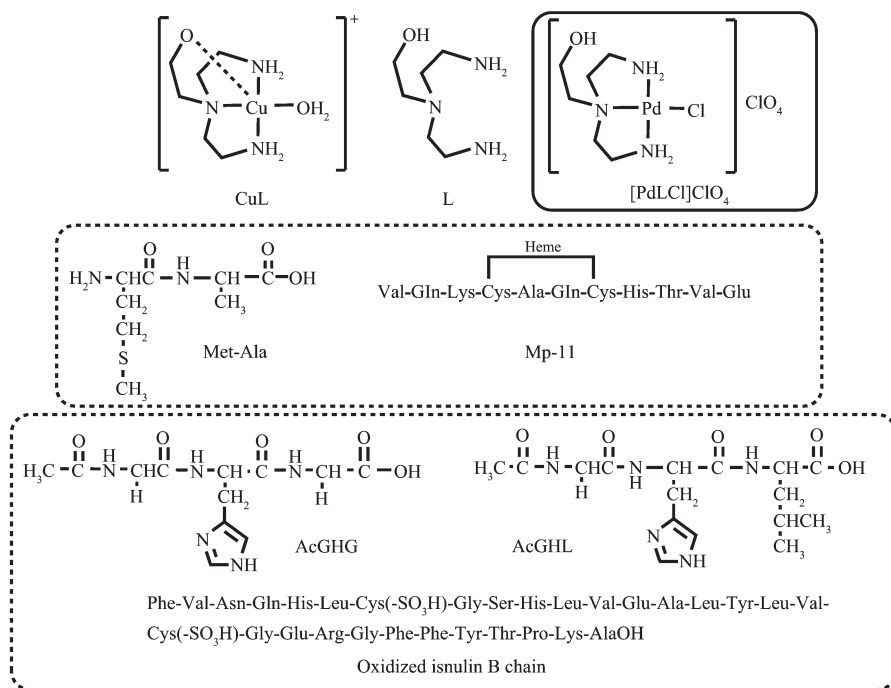


图 2 多肽及配合物的结构式

Fig.2 Chemical structures of peptides and [PdLCl]ClO₄

肽 Mp-11 和具有可与 Pd^{II}配位的含咪唑侧链的乙酰化三肽 AcGHG 和 AcGHL 和三十肽氧化胰岛素 B 链为研究对象 (图 2), 考察不同的肽链结合位点 (Met/Cys 和 His) 以及肽链的长短 (二肽、三肽、十一肽和三十肽) 对结合和切割反应的影响。研究的方法为电喷雾质谱跟踪, 该方法已在金属配合物与多肽相互作用及切割研究中被证实为有效的研究手段, 在相应研究中已被广泛使用^[7,9,20,22,23]。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

Met-Ala、Mp-11、氧化胰岛素 B 链均购自 Sigma 公司。AcGHG、AcGHL 由上海再创生物技术有限公司合成。电喷雾质谱 (ESI-MS) 的测量在 Finnigan-MAT LCQ 离子阱质谱仪上以正离子测量模式完成。通过高分辨扫描 (zoom scan) 方式可以清晰显示含金属主要物种的同位素分布, 便于峰的指认。质谱信号的同位素分布的拟合使用 IsoPro 3.0 软件完成。元素分析 (C、H、N) 使用 Perkin-Elmer 240 元素分析仪测定。核磁共振氢谱在 Bruker DRX-500 核磁共振仪上测定, D₂O 为溶剂。所有溶液的 pH 值用 Sartorius pH 计测量, 并用 pH 4.00、6.86 和 9.18 的标准缓冲溶液定标。2-[2-(2-氨基乙基)氨基]乙醇(L)^[24]按照文献方法合成, ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ /ppm 3.61(t, $J=6.3$ Hz, 2H, OCH₂), 2.65(t, $J=7.0$ Hz, 4H, NH₂CH₂), 2.60(t, $J=6.3$ Hz, 2H, OCH₂CH₂), 2.51(t, $J=7$ Hz, 4H, NCH₂)。所有溶液以二次蒸馏水配制。

1.2 配合物 [PdLCl]ClO₄ 的合成

称取 0.088 g (0.5 mmol) PdCl₂ 于圆底烧瓶中, 加入 10 mL 甲醇; 称取配体 L 0.074 g (0.5 mmol) 于烧杯中, 加入 5 mL 甲醇溶解, 将配体滴入 PdCl₂ 溶液中, 50 °C 磁力搅拌下反应 24 h, 过滤, 在滤液中加入饱和 NaClO₄ 溶液至产生淡黄色沉淀, 过滤沉淀, 滤饼以无水乙醇洗涤, 干燥。产率: 50%。¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ /ppm 3.96(t, $J=5$ Hz, 2H, OCH₂), 3.59(t, $J=5$ Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.54 (td, $J_1=13$ Hz, $J_2=5$ Hz, 2H, NH₂CH₂^a), 3.36(td, $J_1=13.5$ Hz, $J_2=3.5$ Hz, 2H, NH₂CH₂^b), 3.03~2.96(m, 4H, NCH₂^a and NCH₂^b)。元素分析实验值(%): C 18.59, H 4.48, N 10.76; 计算值(%): C 18.62, H 4.41, N 10.81。电喷雾质谱 (正电荷模式): m/z 290.2, [M-ClO₄]⁺。

1.3 [PdL(H₂O)]²⁺ 溶液与多肽的反应

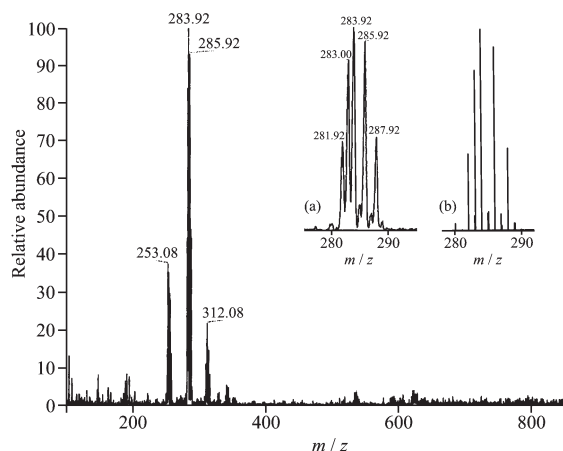
配合物是在脱氯之后与多肽作用的。脱氯时将

(PdLCl)ClO₄ 与等当量的 AgBF₄ 水溶液混和, 避光下搅拌 4 h。离心除去白色沉淀, 即得到 100 mmol·L⁻¹ 的 [PdL(H₂O)]²⁺ 溶液。将 [PdL(H₂O)]²⁺ 与一定浓度的多肽按一定物质的量比混合并在 50 °C 下保温。pH 值均为混合后直接测量, 配合物与肽的作用通过 ESI-MS 跟踪检测。

2 结果与讨论

2.1 配合物及多肽的质谱检测

本研究首先利用 ESI-MS 技术对所使用多肽和配合物本身进行了检测。配合物本身的电喷雾质谱只显示一个单电荷质谱峰, m/z 290.2, 可指认为 [Pd+L+Cl]⁺。配合物脱氯溶液的电喷雾质谱图如图 3 所示, 主要的信号峰为 m/z 283.92, 253.08 及 312.08。这些信号峰的同位素分布类型分别与 IsoPro 3.0 软件给出的 [Pd+L+CH₃OH-H]⁺, [Pd+L-H]⁺ 和 [Pd+L+CH₃COO]⁺ 的拟合图基本一致, 因此可以分别指认为这几个物种。根据检测中所使用的流动相 (甲醇/水: 50/50, V/V, 水中含有微量醋酸), 配合物脱氯后的水溶液中主要物种应为 [Pd+L+OH₂]²⁺。



(a) Determined isotopic distribution pattern (IDP) of peak at m/z 283.92; (b) Simulated IDP of [Pd+L+CH₃OH-H]⁺ given by IsoPro 3.0

图 3 [PdL(H₂O)]²⁺ 溶液的电喷雾质谱图

Fig.3 ESI-MS spectrum of [PdL(H₂O)]²⁺ solution

对多肽的检测结果显示它们在质谱中均出现了特征的质荷比信号。其中 Met-Ala、AcGHG 和 AcGHL 分别显示单电荷信号: 221.2 [Met-Ala+H]⁺、312.2 [AcGHG+H]⁺ 和 368.2 [AcGHL+H]⁺。较大的肽段则显示了多电荷信号: Mp-11 信号为 621.2 和 931.1 可以分别指认为 [Mp-11+3H]³⁺ 和 [Mp-11+2H]²⁺; 氧化胰岛素 B 链 (B) 的信号分别为 875.1、1166.4 和 1748.7, 可指认为 [B+4H]⁴⁺、[B+3H]³⁺ 和 [B+2H]²⁺。多

肽及配合物溶液的质谱检测为进一步指认它们之间相互作用后的质谱信号提供了基础。

配合物的核磁共振氢谱(图 4)表明配体中二乙烯三胺部分的两组亚甲基质子在配位以后不仅化学位移明显向低场移动,而且每组的 2 个质子不再等价,具有不同的化学位移,而羟乙基侧臂的两组亚甲基质子仅发生了化学位移的增大,未观察到同一亚甲基质子的不等价。这表明仅有 3 个氮原子参与了金属配位,羟臂处于自由状态。结合配合物本身和除氯后的质谱信号,我们推测该配合物的结构如图 2 中所示。

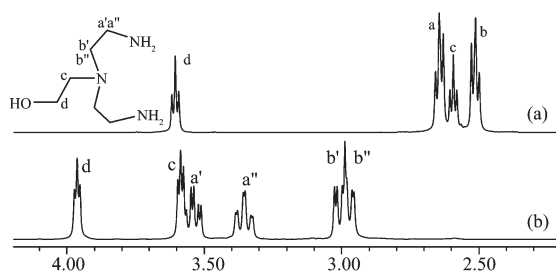
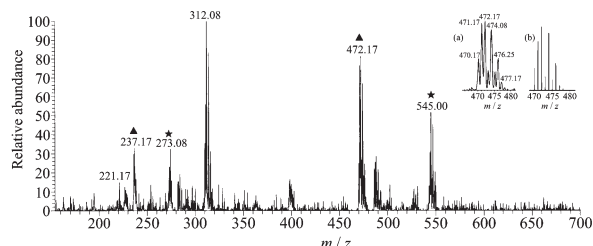


图 4 配体 L(a)和配合物 $[\text{PdLCl}]\text{ClO}_4$ (b)的核磁共振氢谱

Fig.4 ^1H NMR spectra of ligand L (a) and complex $[\text{PdLCl}]\text{ClO}_4$

2.2 Pd^{II} 配合物与二肽 Met-Ala 的相互作用

将 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二肽 Met-Ala 与该 Pd^{II} 配合物以物质的量比 1:1 混合 (pH 2.85), 50°C 温育 6 d, 过程中以 ESI-MS 对溶液进行跟踪检测(图 5)。结果表明除二肽 Met-Ala 的特征信号峰(m/z 221.17)以及原 $[\text{PdL}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ 溶液信号峰(m/z 312.08)以外, 出现 2 组新峰: 第 1 组为 m/z 472.17 和 m/z 237.17, 经同位素分布拟合可分别指认为 $[\text{PdL}+(\text{Met-Ala})-\text{H}]^+$ 和 $[\text{PdL}+(\text{Met-Ala})]^{2+}$ 。这 2 个信号实际上对应着同一物种的单电荷和双电荷峰; 第 2 组为 m/z 545.00 和 m/z



Signals marked with $\blacktriangle$ and $\star$ are new signals appeared after mixing. Inset (a): the IDP of signal 472.17, inset (b): the simulated IDP of $[\text{PdL}+(\text{Met-Ala})-\text{H}]^+$

图 5 Met-Ala 与 $[\text{PdL}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ 按 1:1 混合温育 6 d (50°C , pH 2.85) 的质谱图

Fig.5 ESI-MS spectrum of a incubated mixed solution of Met-Ala and $[\text{PdL}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (1:1, pH 2.85, 50°C , 6 d)

273.08, 可指认为 $[\text{PdL}+(\text{Met-Ala})-\text{H}+4\text{H}_2\text{O}]^+$ 和 $[\text{PdL}+(\text{Met-Ala})+4\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, 实际上是前一物种四水合物的单电荷和双电荷峰。插图(a)和(b)是对 m/z 472.17 峰的高分辨扫描图和同位素分布拟合图。在整个温育过程中, 结合峰的增强仅在前 1 h 可以观察到, 随后的温育没有强度变化, 该结果显示该 Pd^{II} 配合物可与二肽 Met-Ala 迅速结合。在 6 d 温育过程中未产生切割碎片峰, 表明配合物的结合未导致后续的切割反应。根据二价钯的配位性能, Pd^{II} 应与二肽中 Met 的 S 原子配位^[25]。

2.3 Pd^{II} 配合物与十一肽 Mp-11 的相互作用

正如前面所述, 一些钯配合物的切割位点并不一定在结合的特定氨基酸下游的第一个肽键, 质谱跟踪未发现切割尚不能说明该配合物无肽键切割性能。进一步我们利用具有 2 个 Cys 的十一肽 Mp-11 来研究该 Pd^{II} 配合物对含 Cys 肽的结合与切割性能。将 Mp-11 ($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与该 Pd^{II} 配合物以物质的量比 1:2 混合 (pH 3.80) 后在 50°C 下温育。ESI-MS 跟踪反应发现温育 1 h 后除 Mp-11 及原 $[\text{PdL}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ 溶液信号峰以外, 在 m/z 704.92 及 m/z 1056.42 出现 2 个新峰。经同位素分布模式的拟合可以分别指认为结合一个 Pd^{II} 中心的 $[\text{Mp-11}+\text{PdL}+\text{H}]^{3+}$ 和 $[\text{Mp-11}+\text{PdL}]^{2+}$ 。继续温育, 这 2 个峰不断加强, 但无新峰出现。温育 5 h 后, 在 m/z 788.92 及 m/z 1183.33 出现了 2 个新峰, 分别可指认为结合 2 个 Pd^{II} 中心的 $[\text{Mp-11}+2\text{PdL}-\text{H}]^{3+}$ 和 $[\text{Mp-11}+2\text{PdL}-2\text{H}]^{2+}$ 。继续温育 24 h, 这 2 个信号达到最大, 但不再有新峰产生。这说明 Mp-11 中有 Pd^{II} 的 2 个结合位点并有着不同的结合速率。先前的研究已经证实其他 Pd^{II} 配合物优先选择与 Mp-11 中的 Cys7 配位, 然后是 Cys4^[18]。对于本文所用的配合物来说, 可能存在类似的结合情形。图 6(A)所示为 Mp-11 与 Pd^{II} 配合物温育 8 d 后的电喷雾质谱图。此时除结合峰外未发现游离 Mp-11 的信号峰, 同时也未发现切割碎片峰。图中其它一些峰可指认为先前的物种结合一些溶剂分子或 Na 离子的信号峰: m/z 717.75, $[\text{Mp-11}+\text{PdL}+\text{H}+2\text{H}_2\text{O}]^{3+}$; m/z 1067.83, $[\text{Mp-11}+\text{PdL}+\text{Na}-\text{H}]^{2+}$; m/z 1078.25, $[\text{Mp-11}+\text{PdL}+2\text{Na}-2\text{H}]^{2+}$ 。图 6(B)是对主要物种的高分辨扫描图和同位素拟合图。

这一结果显示含半胱氨酸的 Mp-11 可与 Pd^{II} 配合物完全结合。根据肽的结构和 Pd^{II} 的配位特点, 结合位点应是半胱氨酸的 S 原子^[18,23], 但不排除与第二个结合位点是组氨酸的可能性。但不管结合的

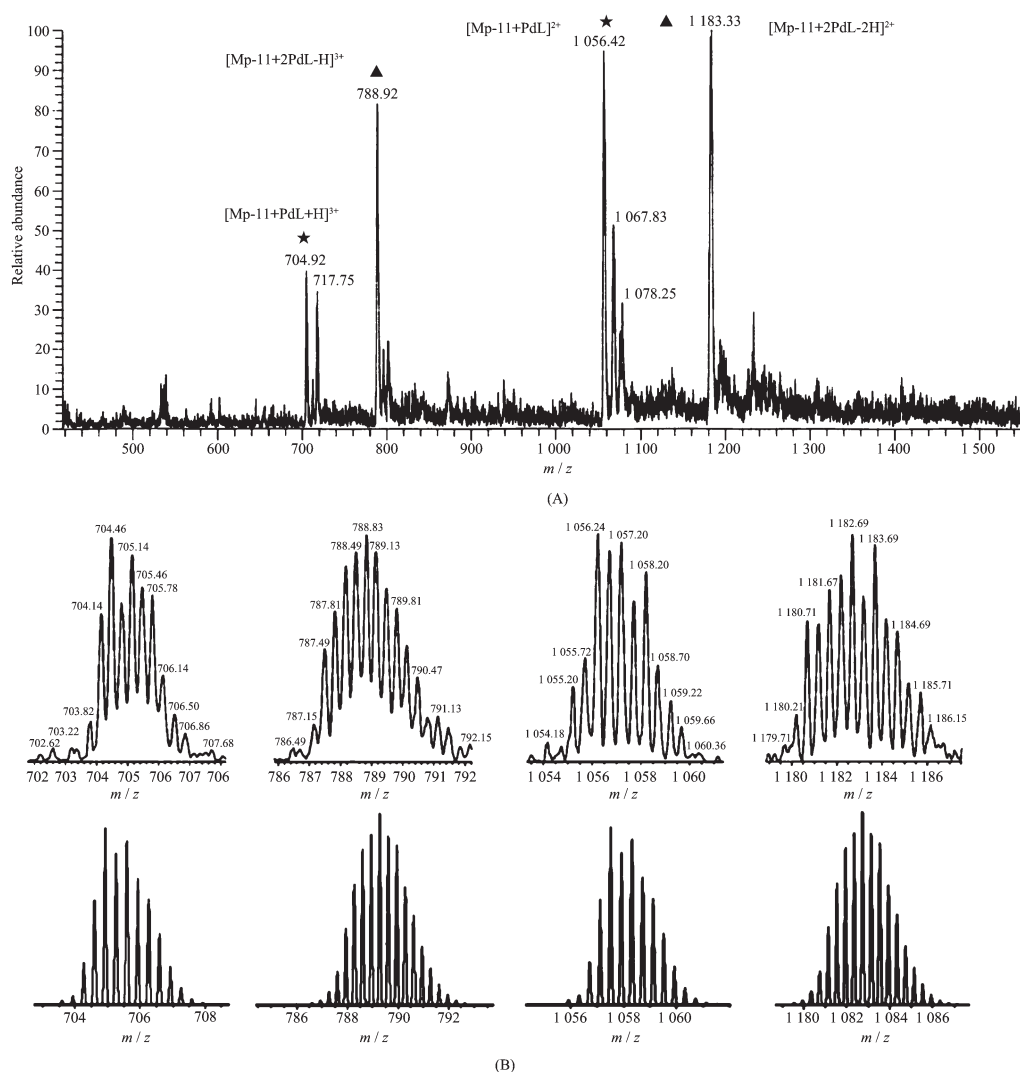


图 6 (A) Mp-11 与 $[\text{PdL}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ 按 1:2 混合 (pH 3.80) 50 °C 温育 8 d 后的质谱图, (B) 主要信号峰的高分辨扫描图 (上) 和相应 IsoPro 3.0 拟合的同位素分布图 (下)

Fig.6 (A) ESI mass spectrum of a mixed solution of Mp-11 with $[\text{PdL}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ in a molar ratio of 1:2 (pH 3.80) after 8 days of incubation at 50 °C, (B) Zoom scan spectra of the main signals in (A) (upper row) and the simulated IDPs of $[\text{Mp-11+PdL+H}]^{3+}$, $[\text{Mp-11+2PdL-H}]^{3+}$, $[\text{Mp-11+PdL}]^{2+}$ and $[\text{Mp-11+2PdL-2H}]^{2+}$ (lower row)

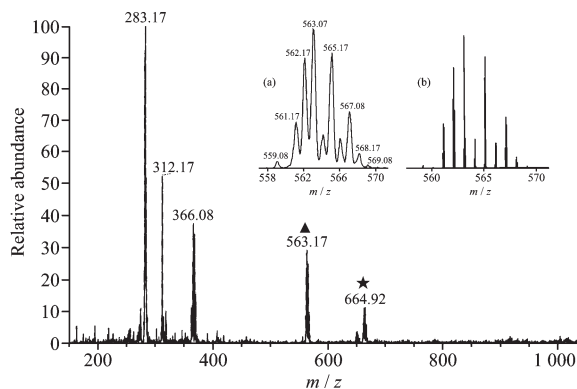
位点是 Cys 还是 His 侧链, 结合的 Pd^{II}配合物均未能水解切割 MP-11。显然与含硫侧链的结合后, 不管这些含硫氨基酸的位置和肽链的长短, 该 Pd^{II}配合物均没有切割性能。

2.4 Pd^{II}L 配合物与三肽 AcGHG, AcGHL 的相互作用

进一步研究了该 Pd^{II}配合物与两种含有组氨酸的三肽的作用。将 10 mmol · L⁻¹ 三肽 AcGHG, AcGHL 与 Pd^{II}配合物以物质的量比 1:1 混合 (pH 2.70), 并在 50 °C 下温育 6 d, 同样利用电喷雾质谱进行跟踪。混合后质谱图中很快就出现了三肽和配合物以外的新峰。图 7 所示 Pd^{II}配合物与 AcGHG

相互作用的电喷雾质谱图。除三肽 AcGHG 信号峰 (m/z 312.17) 及原 $[\text{PdL}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ 溶液信号峰 (m/z 283.17) 以外, m/z 366.08 可指认为 $[\text{Pd+L+CH}_3\text{COO}^-+3\text{H}_2\text{O}]^+$ 。Pd^{II} 与 AcGHG 的结合峰出现在 m/z 563.17 和 664.92, 分别可指认为 $[\text{AcGHG+PdL-H}]^+$ 和 $[\text{AcGHG+PdL+ClO}_4]^-$ 。插图 (a) 和 (b) 是对 m/z 563.17 峰的高分辨扫描图和同位素分布拟合图。跟踪过程发现, 新的结合峰出现较快, 并且在 5 h 以达到平衡。继续温育 6 d 并未发现任何切割的碎片峰。该 Pd^{II}配合物与 AcGHL 的相互作用与 AcGHG 类似。质谱图中除三肽 AcGHL 信号峰 (m/z 368.17) 及原 $[\text{PdL}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ 溶液信号峰 (m/z 312.08) 以外, 出现了可指认为

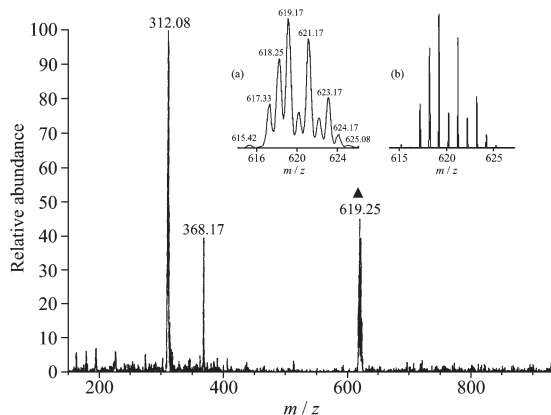
$[\text{AcGHL}+\text{PdL-H}]^+$ 的 m/z 619.25 峰(图 8)。插图(a)和(b)是对 m/z 619.35 峰的高分辨扫描图和同位素拟合图。在利用 ESI-MS 跟踪反应、温育 6 d 的过程中,除结合峰不断增大外,未产生切割碎片峰。结合峰的增大同样在前 5 h 即已完成。



Inset (a): the determined IDP of signal 563.17, inset (b): the simulated IDP of $[\text{AcGHG}+\text{PdL-H}]^+$

图 7 AcGHG 与 $[\text{PdL}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ 按 1:1 混合(pH 2.7), 50 °C 温育 6 d 后的质谱图

Fig.7 ESI-MS spectrum of the mixed solution of AcGHG and $[\text{PdL}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (1:1, pH 2.7,) after 6 day incubation at 50 °C



Inset (a): the IDP of signal 619.25, inset (b): the simulated IDP of $[\text{AcGHL}+\text{PdL-H}]^+$

图 8 AcGHL 与 $[\text{PdL}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ 按 1:1 混合(pH 2.70), 50 °C 温育 6 d 后的质谱图

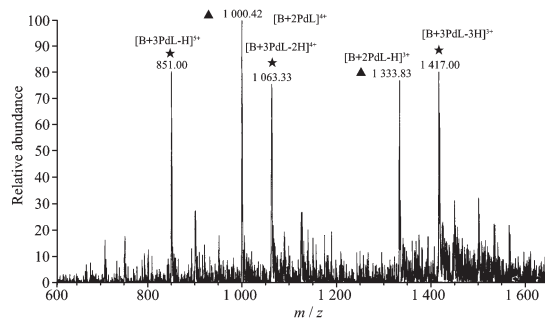
Fig.8 ESI-MS spectrum of the mixed solution of AcGHL and $[\text{PdL}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (1:1, pH 2.70) after 6-day of incubation at 50 °C

这些结果显示该 Pd^{II} 配合物与 AcGHG 及 AcGHL 均可实现有效结合, 根据三肽的结构以及 Pd^{II} 的配位性能可以推测结合位点应是组氨酸的咪唑环 N^3 原子^[26]。前 5 h 结合峰不断增强的现象表明该配合物与组氨酸咪唑侧链的结合并没有与蛋氨

酸硫醚侧链结合迅速。同时三肽中组氨酸下游氨基酸的大小对其与该 Pd^{II} 配合物的结合性能没有明显的影响。检测过程中未发现任何水解切割导致的碎片。该结果表明不管是结合态的还是非结合态的配合物都没有切割该三肽的能力。必须指出的是由于与 AcGHG 结合温育过程中未观察到 $[\text{GHG}+\text{PdL}]$ 相关的质谱信号, 被指认为 $[\text{Pd}+\text{L}+\text{CH}_3\text{COO}^-+3\text{H}_2\text{O}]^+$ 的质谱峰 m/z 366.08 的形成可能与流动相中添加的少量醋酸有关, 而不是切断了三肽氮端的乙酰基。事实上在类似的与 AcGHL 温育过程根本未观察到相应的质谱峰。

2.5 Pd^{II} 配合物与三十肽氧化胰岛素 B 链(B)的相互作用

该 Pd^{II} 配合物与含组氨酸的小肽仅发生结合而未引起相应的切割。为研究链长的影响, 进一步选取了含 30 个氨基酸的氧化胰岛素 B 链作为该配合物的作用对象。氧化胰岛素 B 链中的 Cys 已被氧化, 不再具有 Pd^{II} 配位能力。但链中的 2 个组氨酸将是潜在的 Pd^{II} 结合位点。将 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氧化胰岛素 B 链与 Pd^{II} 配合物以物质的量比 1:3 混合 (pH 3.66) 后在 50 °C 下温育, 随后用 ESI-MS 跟踪反应。温育 1 h 后, 除氧化胰岛素 B 链及原 $[\text{PdL}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ 溶液信号峰以外, 质谱图中在 m/z 1000.42 及 m/z 1333.83 出现 2 个新峰, 分别可指认为结合 2 个 Pd^{II} 中心的 $[\text{B}+2\text{PdL}]^{4+}$ 和 $[\text{B}+2\text{PdL-H}]^{3+}$ 。温育 4 h 后, 在 m/z 851.00, m/z 1063.33 及 m/z 1417.00 分别出现了结合 3 个 Pd^{II} 中心的 $[\text{B}+3\text{PdL-H}]^{5+}$, $[\text{B}+3\text{PdL-2H}]^{4+}$ 和 $[\text{B}+3\text{PdL-3H}]^{3+}$ 。对这些信号峰分别进行高分辨扫描时, 从其间同位素分布可以判断结合峰的价态。继续温育 24 h, 无新峰产生。图 9 所示氧化胰岛素 B



链与 Pd^{II}配合物温育 8 d 后的电喷雾质谱图。图中未发现胰岛素 B 链的游离峰,也未发现新的结合峰。结合的位点由以前的研究推测应是氮端的苯丙氨酸的氨基,组氨酸 5 和组氨酸 10 的咪唑^[27]。由于始终未发现切割导致的碎片峰,所以不管 Pd^{II}配合物结合在其中哪个位点,结合的配合物均无法导致肽链的切割。

2.6 2-[2-(2-氨基乙基)氨基]乙醇金属配合物的肽键切割性能

以 2-[2-(2-氨基乙基)氨基]乙醇形成带羟乙基侧臂的 Pd^{II}配合物可与含 Met、His、Cys 的小肽形成有效结合,但是不管是二肽还是较长的三十肽均未导致有效切割,说明单独的羟乙基侧臂不具有切割活性,这与肽链的结合位点以及肽链的长短都无关系。先前的研究表明带羟乙基侧臂的二乙烯三胺 Cu^{II}配合物能够水解切割氧化胰岛素 B 链,而无侧臂的二乙烯三胺 Cu^{II}配合物却无切割活性^[27],即羟乙基侧臂促进肽键的切割。本研究表明仅有四配位一种配位方式的 Pd^{II}形成的带羟臂配合物不具有肽链的切割性能,即羟臂本身难以实现对肽键的有效进攻。这暗示 Cu^I 实现肽键的切割同样难以通过羟臂单独完成。正是由于 Cu^{II} 的六配位方式使得 Cu^{II} 可进一步通过配位方式活化肽键的羰基,有利于羟基的协同进攻实现了肽键的断裂(切割机制 II,见图 1)。肽键活化是发生切割反应的“启动子”,本研究中的 Pd^{II}配合物因为配位数较低,四配位即饱和,在与氨基酸残基配位后无法活化酰胺键,不具有羰基活化和羟基进攻的协同效应,难以进行切割(图 10)。

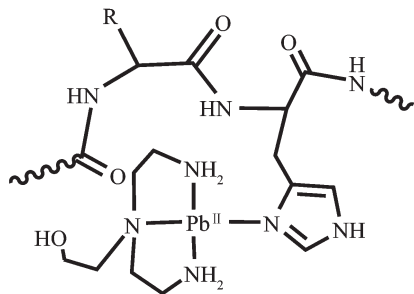


图 10 配合物 Pd^{II}L 与含组氨酸肽链结合的可能形式

Fig.10 Proposed binding mode of Pd^{II}L to histidine-containing peptides

3 结 论

本文合成了带羟乙基侧臂二乙烯三胺 Pd^{II}配合物,并利用电喷雾质谱研究了其与含 Met、His 及 Cys 的二肽、三肽、十一肽和三十肽的相互作用,发

现该配合物能较好的结合这些多肽,但未能促使它们发生水解反应,说明在多肽的水解中,单独的羟乙基侧臂不能作为进攻基团水解肽键,这与肽链的结合位点以及肽链的长短均无关系。研究提示带羟乙基侧臂金属配合物水解肽键可能是通过金属中心对羰基氧的配位活化与羟乙基侧臂的亲核进攻间的协同促进效应实现肽键的断裂。该研究也为具有协同肽键切割功能的高效人工金属蛋白酶的设计提供了新思路。

参考文献:

- [1] Buckingham D A. *Met. Ions Biol. Syst.*, **2001**,**38**:43~102
- [2] Chae P S, Kim M S, Lee S D, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, **127**:2396~2397
- [3] Pan Q H, Jiang W, Liu C L, et al. *Inorg. Chem. Commun.*, **2006**,**45**:490~492
- [4] Pan Q H, Jiang W, Liu C L, et al. *Chin. Sci. Bull.*, **2005**,**50**: 1869~1873
- [5] Yashiro M, Sonobe Y, Takarada T, et al. *Org. Biomol. Chem.*, **2003**,**1**:629~632
- [6] JIANG Jiang(蒋 疆), MEI Yu-Hua(梅毓华), ZHU Long-Gen(朱龙根), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2007**,**23**(6):948~956
- [7] Zhang L, Mei Y H, Zhu L G, et al. *Inorg. Chem.*, **2003**,**42**: 492~498
- [8] Luo X M, He W J, Zhu L G, et al. *Chin. J. Chem.*, **2000**,**18**: 855~862
- [9] JIANG Jiang(蒋 疆), ZHAO Chun-Mei(赵春梅), ZHU Long-Gen(朱龙根), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2007**,**23**(2):243~252
- [10] Milovic N M, Kostic N M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**,**125**:781~788
- [11] Yang G S, Tang H W, Zhu L G, et al. *Inorg. Chem. Commun.*, **2005**,**8**:862~865
- [12] WEI Hua(魏 华), HE Wei-Jiang(何卫江), ZHU Long-Gen(朱龙根), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2000**,**16**(4):653~657
- [13] Yoo S H, Lee B J, Kim H S J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, **127**:9593~9602
- [14] Dutca L M, Ko K S, Kostic N M, et al. *Inorg. Chem.*, **2005**, **44**:5141~5146
- [15] Milovic N M, Dutca L M, Kostic N M, et al. *Inorg. Chem.*, **2003**,**42**:4036~4045
- [16] Stofregen S A, Griffin A K K, Kostic N M. *Inorg. Chem.*, **2005**,**44**:8899~8907
- [17] Milovic N M, Dutca L M, Kostic N M. *Chem. Eur. J.*, **2003**,

- 9:5097~5106
- [18]Milovic N M, Badjic J D, Kostic N M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**,**126**:696~697
- [19]Chin J. *Acc. Chem. Res.*, **1991**,**24**:145~152
- [20]Sun X J, Jin C, Zhu L G, et al. *Inorg. Chem.*, **2004**,**43**:290~296
- [21]Zhu L G, Kostic N M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**,**115**:4566~4570
- [22]Miao R, Yang G S, Zhu L G, et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2005**,**19**:1031~1040
- [23]Hong J, Miao Y, Zhu L G, et al. *J. Mass Spectrom.*, **2005**,**40**:91~99
- [24]Bobylev V A, Chechik V D. *Zh. Obshch. Khim.*, **1990**,**60**:2721~2725
- [25]Theodorou V, Photaki I, Hadjiliadis N, et al. *Inorg. Chim. Acta*, **1982**,**60**:1~8
- [26]Kralingen C G, Reedijk J. *Inorg. Chim. Acta*, **1978**,**30**:171~177
- [27]Hong J, Miao R, Zhu L G, et al. *J. Mass Spectrom.*, **2006**,**41**:1061~1072