

细胞色素 C 与 NO 的反应机制

唐 乾^{1,2} 史珊珊^{1,2} 曹洪玉^{1,2} 郭相金² 张 涛¹ 郑学仿^{*,1,2}

(¹ 大连大学生命科学与技术学院, 大连 116622)

(² 辽宁省生物有机化学重点实验室, 大连大学, 大连 116622)

摘要: 细胞色素 C (Cytochrome C, Cyt C) 与 NO (由 NO 供体药物 proliNONOate 提供) 之间的反应已在电化学和医疗方面受到重视, 而直接与 NO 气体作用尚未得到关注; 且前者主要是从 Q 带进行分析的, Soret 带未提及。本文采用紫外-可见(UV-Vis)吸收光谱、电子顺磁共振(EPR)光谱、紫外可见时间过程光谱以及同步荧光光谱等方法同时分析了其 Soret 带与 Q 带的变化, 探讨了不同价态的 Cyt C 与 NO 气体结合及解离反应的过程。结果表明: Cyt C 与 NO 相互作用时, 无论是高铁细胞色素 C (ferric cytochrome C, Fe(III)-Cyt C) 还是亚铁细胞色素 C (ferrous cytochrome C, Fe(II)-Cyt C), 反应产物都是细胞色素 C 配合物 (Cyt C-NO); Fe(II)-Cyt C 先被 NO 氧化生成 Fe(III)-Cyt C, 之后再与 NO 结合生成 Cyt C-NO, Fe(III)-Cyt C 则直接与 NO 结合生成 Cyt C-NO。Cyt C-NO 是一种不稳定的配合物, 当通入少量 NO 时 Cyt C-NO 很快解离生成 Fe(III)-Cyt C, 其解离速率为 $(0.005\ 07 \pm 0.001)\ \text{s}^{-1}$, 是与供体药物结合所形成配合物解离速率的十分之一; NO 过量时, 生成的 Cyt C-NO 不会再发生解离。对实验结果分析, 得出 Cyt C 与 NO 配位反应机制为溶液中的 NO 进入 Heme 腔内, Fe-S 断裂, Fe-N 间形成新的配位键, NO 气体可以直接与 Cyt C 反应, 生成的配合物比供体药物稳定, 同时 Soret 带具有明显变化。这对于利用 NO 来缓解细胞内的氧化压以及利用 NO 检测细胞内呼吸类酶的变化, 进而检测细胞凋亡具有重要意义。

关键词: 细胞色素 C; NO 气体; 光谱法; 配位反应; 解离

中图分类号: O629.73; Q518.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2015)08-1511-09

DOI: 10.11862/CJIC.2015.216

Reaction Mechanism of Cytochrome C with NO

TANG Qian^{1,2} SHI Shan-Shan^{1,2} CAO Hong-Yu^{1,2} GUO Xiang-Jin² ZHANG Tao¹ ZHENG Xue-Fang^{*,1,2}

(¹ College of Life Science and Biotechnology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

(² Liaoning Key Laboratory of Bio-organic Chemistry, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

Abstract: The research of cytochrome C (Cyt C) reacting with NO donor drugs (proliNONOate) has been focused on electrochemistry and medical treatment, while the study about reacting with NO gas is ignored. The previous study usually concentrated on Q band changes, but the Soret band was hardly mentioned. In this paper, we studied the reaction of two states of Cyt C with NO gas and the dissociation process by Soret band and Q band spectra, using ultraviolet-visible absorption spectra, electron paramagnetic resonance (EPR) spectra, ultraviolet-visible time course absorption spectra and synchronous fluorescence. The spectroscopic data showed that, ferric cytochrome C (Fe(III)-Cyt C) and ferrous cytochrome C (Fe(II)-Cyt C) could react with NO to convert to cytochrome C coordination compound (Cyt C-NO) with different mechanisms. Fe(II)-Cyt C reacting with NO generated Fe(III)-Cyt C firstly, then it combined with NO, while Fe(III)-Cyt C can combine with NO directly. However, Cyt C-NO is not a stable coordinated macromolecule. With a small amount of NO bubbled into the sample, Cyt C-NO dissociated rapidly with rate constant value of $(0.005\ 07 \pm 0.001)\ \text{s}^{-1}$, which is one-tenth of Cyt C-NO with NO donor drugs; while under excessive NO gas condition, the dissociation process was prevented. According to the experimental

收稿日期: 2014-09-05。收修改稿日期: 2015-05-07。

国家自然科学基金 (No.21271036, 20871024); 辽宁省教育厅科学技术研究 (No.L2013470, L2013471) 资助项目。

*通讯联系人。E-mail: dlxfzheng@126.com

data, the coordination mechanism of the reaction between Cyt C and NO is that gas molecule gets access into the cavity of Heme, making the separation of Fe-S and the formation of Fe-N. Cyt C can react with NO gas directly, the Cyt C-NO is more stable than that reacted with NO donor drugs, and the Soret band have an obvious change. These results will be significant for us to remit the oxidative stress in cells and detect the respiratory enzymes change which could monitor the cell apoptosis and some diseases by NO.

Key words: cytochrome c; nitric oxide; spectrometry; coordination reaction; dissociation

0 引言

血红素蛋白与生物活性小分子的配位反应广泛存在于生命体中,例如二价血红素铁蛋白可逆结合氧气来完成储存和运输氧气^[1-3]功能,二价和三价血红素蛋白均可与信使分子 NO 配位^[4-5]完成各种生理功能,因此,血红素蛋白与生物活性小分子的配位反应研究备受关注。细胞色素 C(Cyt C)是 C 型血红素蛋白,在呼吸链中将电子由复合物 III(细胞色素 bc₁ 复合物)传递到复合物 IV(细胞色素 C 氧化酶)^[6],使氧气还原为水^[7]。最近发现 Cyt C 与细胞程序性死亡^[8]、细胞氧化压力、亚硝基硫醇的形成^[9]、过氧硝酸盐作用的靶向物质、脂肪酸酰胺的生物合成等有关。另外 Cyt C 还具有亚硝酸还原酶活性,在低氧和硝酸压力下生成五配位 Cyt C,使其具有明显的亚硝酸还原酶活性,可以将亚硝酸盐还原生成 NO,后者作为细胞凋亡的信号分子^[10]。

NO 分子一直受到高度关注,是许多生物系统中关键性细胞信号分子,控制和调节各种不同生理过程,包括控制血压,松弛肌肉,血小板聚集,神经递质传递,免疫反应等^[11]。NO 作为一个活性配体,既可以与高铁血红素结合也可以与亚铁血红素结合,氧合血红蛋白与 NO 结合可以形成亚硝基硫醇化合物,氧合亚铁肌红蛋白与 NO 反应生成氧合高铁肌红蛋白与硝酸盐^[12-14]。Kruqlik 等^[15]利用皮秒时间分辨拉曼光谱和飞秒吸收光谱研究了 NO 与肌红蛋白反应对血红素辅基结构的影响,发现 NO 与肌红蛋白的结合会抑制其血红素辅基结构的变化,而当 NO 光解后其血红素辅基又会由平坦结构恢复至圆顶形结构。

Sharper 等^[16]已报道 Cyt C 与 NO 之间的相互作用情况,研究了在生理条件下 NO 在线粒体内的代谢机制,线粒体内过多的 NO 可以与膜蛋白反应,从而抑制其与细胞色素 C 氧化酶结合,破坏呼吸作

用,生成的 NO-与氧气结合会生成过氧硝酸盐;2011 年,Silkstone 等^[17]发现 NO 与 Cyt C 反应时 NO 先与 O₂ 反应生成 NO²⁺,然后 Fe(II)-Cyt C 再与之反应生成 Fe(III)-Cyt C 和 NO²⁻,最后生成 Cyt C-NO。而当 NO 加入野生型高铁细胞色素 C(Fe(III)-Cyt C)中时,也可以快速的形成 Cyt C-NO 配合物^[18],心磷脂可以使 Cyt C 中的血红素铁由六配位变成五配位,形成与高铁肌红蛋白类似的结构^[19-21],五配位的 Cyt C 可以与 NO 反应,其反应机制与高铁肌红蛋白相似。

以上研究均是用 NO 供体药物(proliNONOate)代替 NO 进行实验,而直接与 NO 气体的反应尚未受到关注。而且其研究主要集中在 Q 带,关于 Soret 带的变化未提及,根据 Gouterman 的四轨道模型,Cyt C 分子 Soret 带是由卟啉中的电子跃迁产生的,其归属与 $\pi-\pi^*$ 跃迁的第二激发态,对于检测血红素卟啉的变化具有重要意义。本文通过 UV-Vis 吸收光谱、电子顺磁共振光谱、紫外可见时间过程光谱、同步荧光光谱等技术同时从 Soret 带及 Q 带研究了不同价态的 Cyt C 与 NO 的结合与解离反应,发现六配位的 Cyt C 可直接与 NO 气体反应,其反应产物为 Cyt C-NO。根据实验数据我们从分子水平上分析了 Cyt C 与 NO 的配位反应机理。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

马心细胞色素 C(Cyt C)样品(美国 Sigma 公司, >99%),使用时用 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲溶液(PB 缓冲液)配制成浓度为 1×10⁻⁵ mol·L⁻¹ 的溶液(避光 4 °C 保存并尽快用于实验);连二亚硫酸钠(0.5 mol·L⁻¹);过氧化氢(0.01 mol·L⁻¹, H₂O₂);亚硝酸钠(5 mol·L⁻¹, 上海生物工程公司);浓硝酸 (HNO₃)(稀释为 0.01、0.025、0.05、0.1、0.16、0.2、0.5、1.15 mol·L⁻¹);均为国产分析纯;实验用水均为超纯水。NO 气体(大连光辉气体有限公司,高纯一氧化氮,>99%)。

V-560 型 UV-Vis 分光光度计(日本 Jasco 公司)、FP-6500 型荧光分光光度计(日本 Jasco 公司)、电子顺磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司)、F-12 型制冷和加热循环器(德国 Julabo 公司)、实验室 pH 计(PHSJ-4A, 上海雷磁分析仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 Fe(III)-Cyt C 与 Fe(II)-Cyt C 的制备

野生型细胞色素 C(Cyt C)用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PB 缓冲液配制成 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品溶液,取 2 mL Cyt C 溶液于比色皿内,用微量注射器逐次加入定量的 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的连二亚硫酸钠溶液(制备亚铁细胞色素 C,实验过程通 N_2 30 min,将其 O_2 排出),过量的连二亚硫酸钠对亚硝酸盐没有影响^[22],同时检测其紫外吸收光谱(415、520 及 549 nm 处的吸收强度)^[23]。测定条件:狭缝宽度为 2 nm,扫描波长为 220~700 nm,扫描速率为 $400 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$,响应时间中等。同样的方法用 H_2O_2 制备高铁细胞色素 C(检测其在 409、530 nm 处的紫外吸收光谱)^[23]。

1.2.2 样品前期处理

将 Cyt C 溶解在磷酸盐缓冲液中,蛋白的最终浓度达到 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;取样品分别通入 NO,通气速率为每分钟 100 个气泡,时间为 2 min;Fe(III)-Cyt C 与 Fe(II)-Cyt C 处理同上,所得样品用于 UV-Vis 吸收光谱、时间过程光谱和同步荧光光谱测定。

将 Cyt C 溶解在磷酸盐缓冲液中,终浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;分别制备没有通入 NO 气体、通入 NO 气体 1 min、通入 NO 气体 2 min、以及通入 NO 气体 2 min 后放置 30 min 的样品各 200 μL 放置在液氮中,所得样品用于电子顺磁共振谱测定。

1.2.3 UV-Vis 吸收光谱

将已处理的 Cyt C(WT)、Fe(III)-Cyt C 和 Fe(II)-Cyt C 样品置于 1 cm 石英比色皿中进行测定,测定条件为:狭缝宽度为 2 nm,扫描波长范围 220~700 nm,扫描速率 $400 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$,响应时间中等。

1.2.4 紫外可见时间过程光谱

将已处理的 Cyt C(WT)、Fe(III)-Cyt C 和 Fe(II)-Cyt C 样品置于 1 cm 石英比色皿中进行测定,测定条件为:狭缝宽度为 2 nm,固定波长为 416、562 nm,灵敏度高,响应时间为 2 s。

1.2.5 同步荧光光谱

将已处理的 Cyt C(WT)、Fe(III)-Cyt C 和 Fe(II)-Cyt C 样品置于 1 cm 石英比色皿中进行测定,测定条件为:激发狭缝与发射狭缝分别为 3 和 5 nm,扫描速

率为 $500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$,响应时间为 0.5 s,检测器灵敏度为中等,控制温度为 $(20 \pm 0.01)^\circ\text{C}$ 。

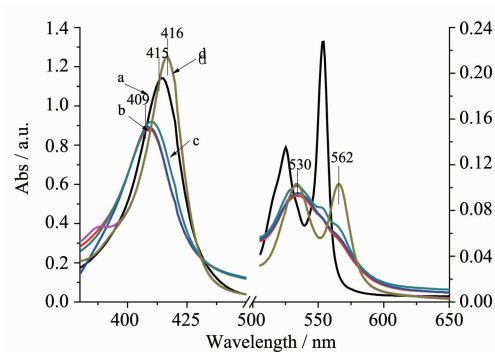
1.2.6 电子顺磁共振谱

将液氮中的样品管垂直放入凹槽内使其底部与里面的基架接触再进行检测,测定条件为:9.33 GHz,6-G,10.2 mW,时间常量 40.96 ms,扫描速度 83.97 s,扫描范围 2 900~3 900 G,温度 100 K,扫描次数 20 次。

2 结果与讨论

2.1 Fe(II)-Cyt C 与 NO 的反应过程

Fe(II)-Cyt C 在 415 nm (Soret 带)、520、549 nm(Q 带)和 314 nm(δ 带)处有最大吸收峰^[22],而光谱检测得到 Cyt C 在 360 nm (δ 带)、409.5 nm (Soret 带)、522.5、527.5 和 549 nm(Q 带)处均有吸收峰,说明 Cyt C 同时存在氧化态与还原态,实验所用 Fe(II)-Cyt C(全部排出 O_2)由连二亚硫酸钠还原得到。向 Fe(II)-Cyt C 溶液中通入不同量的 NO 气体,随着气体量增加,Fe(II)-Cyt C 样品的 UV-Vis 吸收光谱变化如图 1 所示。由图 1 可知,在 415 nm 处 Soret 吸收带先蓝移到 409 nm,随着 NO 继续增加又红移到 416 nm;520 nm 处 Q 带红移到 530 nm,同时 549 nm 处特征吸收峰消失,在 562 nm 出现新的特征吸收峰,其 Q 带的变化与 Sharpe 等^[16]报道的 Fe(III)-Cyt C 与 NO 结合的吸收光谱相同,同时 Soret 带也出现了其特征吸收峰。NO 进入溶液中暂以 NO 分子形式存在,具有较强的氧化性,而 Fe(II)-Cyt C 本身具有还原性,直接被氧化生成 Fe(III)-Cyt C,使得 415 nm 处 Soret 吸收带蓝移到 409、520 nm 处 Q 带红移到 530、549 nm 处特征峰消失,同时产生 NO^- ,此时停止通 NO,放置



Time of bubbling NO: a: 0 min, b: 1 min, c: 1.5 min, d: 2 min

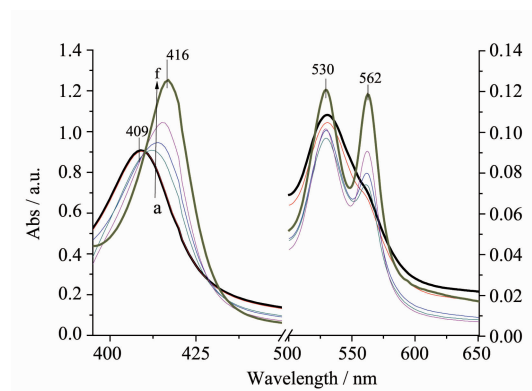
图 1 Fe(II)-Cyt C 与 NO 反应的紫外吸收光谱

Fig.1 UV-Vis absorbance spectra of the reaction of Fe(II)-Cyt C with NO

一段时间后其光谱没有变化,继续通 NO,NO 进入溶液中以 NO⁻ 存在,具有较强的亲电作用,改变了血红素周围微环境,使得 Fe-S 变弱,NO 进攻 Fe-S,N 取代 S 与 Fe 配位,生成 Cyt C-NO,因此 Soret 的峰红移到 416 nm、Q 带在 562 nm 处出现新的特征吸收峰。在整个反应过程中,Fe(II)-Cyt C 直接生成 Fe(III)-Cyt C,其不能与 NO 反应生成配合物,与 Fe(III)-Cyt C 反应的 NO 为通入的过量的 NO,因此只有 Fe(III)-Cyt C 可以与 NO 进行配位反应。

2.2 Fe(III)-Cyt C 与 NO 的反应过程

Fe(III)-Cyt C 溶液在 409 nm (Soret 带)、529 nm(Q 带)和 360 nm(δ 带)处有特征吸收峰^[22],实验所用 Fe(III)-Cyt C 是由 H₂O₂ 氧化得到。由图 2 可知,Fe(III)-Cyt C 与 NO 反应的最终现象与 Fe(II)-Cyt C 相同,Soret 带峰红移到 416 nm、Q 带在 562 nm 处出现新的特征吸收峰,生成的都是 Cyt C-NO。上述结果表明,NO 主要是与 Fe(III)-Cyt C 结合,Fe(III)-Cyt C 中血红素铁是六配位结构,其第 6 个是与甲硫氨酸(Met)的硫形成配位键,NO 进入溶液中以 NO⁻ 存在,具有较强的亲电作用,改变了血红素周围微环境,使得 Fe-S 变弱,NO 进攻 Fe-S,N 取代 S 与 Fe 配位,生成 Cyt C-NO,但该类化合物并不稳定^[24],其受到 NO 浓度的调节,在 695 nm 处小的吸收峰是 Met80 与血红素 Heme 中心三价铁的电荷转移峰,即 Met80 与血红素 Heme 配位的特征峰^[25-26],图 3 为 Cyt C 通 NO 前后 Met80 与血红素 Heme 配位的特征吸收峰,由图 3 可知,在没有通气前 Cyt C 在 695 nm 处有明显的特征吸收峰,通入 NO 后 695 nm 处吸收峰消失。由此可知,NO 进入 Cyt C 溶液后,Met80 与血



Time of bubbling NO: a~f : 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 min

图 2 Fe(III)-Cyt C 与 NO 反应的紫外吸收光谱

Fig.2 UV-Vis absorbance spectra of the reaction of Fe(III)-Cyt C with NO

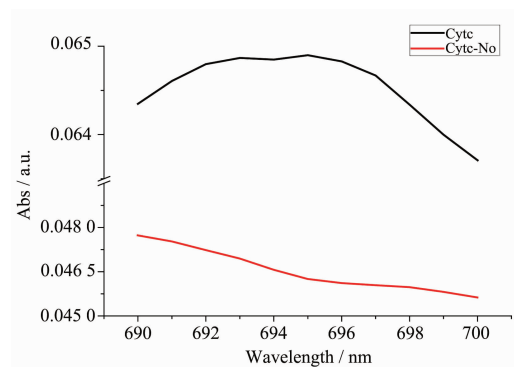
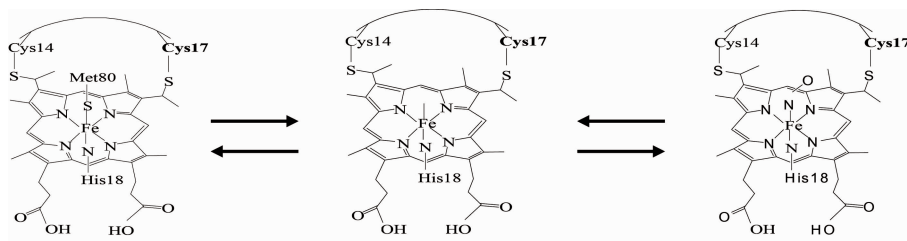


图 3 Cyt C 中 Fe-S 键的紫外吸收光谱变化

Fig.3 UV-Vis absorbance spectra changes of Fe-S in Cyt C

素 Heme 中心铁不再配位,铁周围电子分布发生变化,溶液中 NO 易进入 Heme 腔内,与 Fe 形成新的配位键如图示 1 所示。在整个反应过程中生成的 Cyt C-NO 中 Cyt C 均是以 Fe(III)-Cyt C 存在。



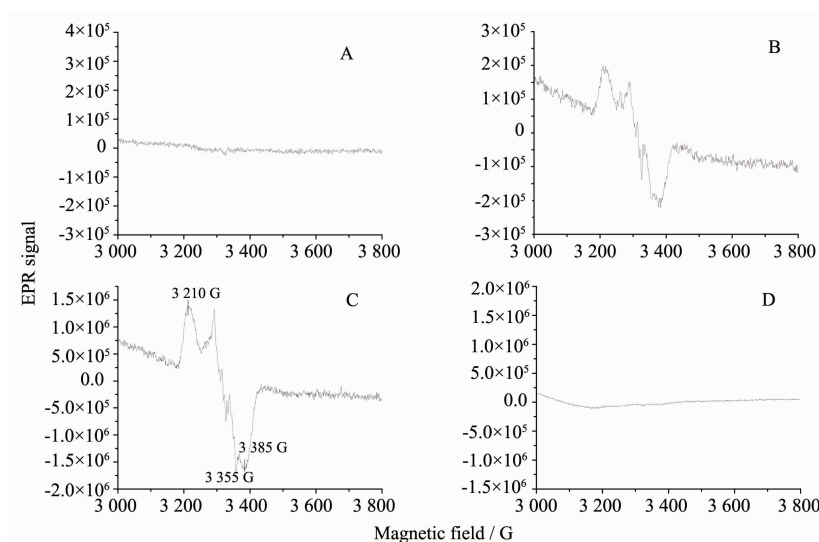
图式 1 细胞色素 C 中 Fe-S 的变化过程

Scheme 1 Course of the changes about Fe-S in Cyt c

2.3 Cyt C 与 NO 相互作用的电子顺磁共振谱

EPR 是由不配对电子的磁矩发源的一种磁共振技术,可用于从定性和定量方面检测物质原子或分子中所含的不配对电子,并探索其周围环境的结构特性^[27]。Cyt C 与 NO 相互作用的电子顺磁共振谱

如图 4 所示,图 4A 为 Cyt C 中没有通入 NO 时的 EPR 谱,其没有顺磁信号产生,图 4B/C 是通入 NO 的量逐渐增多的 EPR 谱,其中图 B 通气 1 min,图 C 通气 2 min,在 3 210、3 355 和 3 385G 有明显的顺磁信号产生,说明 Cyt C 中的血红素 Fe 在与 NO 进



A: Cyt C solution without NO gas; B: Cyt C solution with 1 min of aerating NO; C: Cyt C solution with 2 min of aerating NO; D: the dissociation process of C after 30 min standing

图 4 Cyt C 与不同量 NO 相互作用及解离的电子顺磁共振光谱

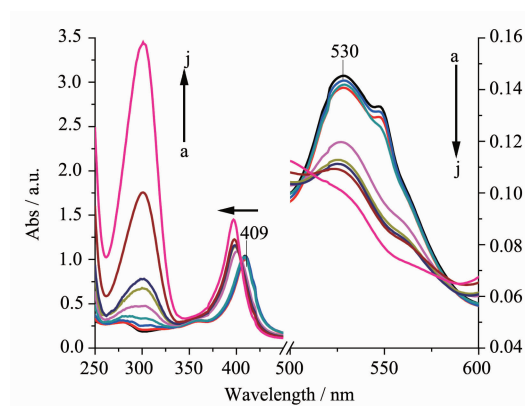
Fig.4 Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectra of Cyt *c* reacting with different amounts of NO and their dissociation process

行配位反应过程中生成了新的配合物,图 4D 为图 4C 放置长时间(30 min)后测得的 EPR 谱,其产生的顺磁信号消失。这与 Basu 等^[10]所得的结果相同, Cyt C 中通入 NO 气体后与之反应生成新的配合物,然而 Basu^[10]、Kapralov 等^[28]认为只有加入脂质体或心磷脂等能够使其由六配位变成五配位结构的物质后 Cyt C 才可以与 NO 反应,本实验证明在没有加入其它物质的情况下, Cyt C 可以直接与 NO 进行配位反应,生成一种不稳定的配合物 Cyt C-NO,其会发生解离,这与紫外、荧光中通少量 NO 气体所得实验结论是一致的。

2.4 硝酸(HNO₃)及亚硝酸钠(NaNO₂)对 Cyt C 的影响

NO 通入 Cyt C 溶液时,会有部分被氧化生成 NO₂⁻,进入溶液后,NO₂⁻继续被氧化生成 NO₃⁻^[29],在没有进行排氧的 Cyt C 溶液中 NO 会被氧化,溶液中存在 NO₃⁻、NO₂⁻、H⁺ 离子均有可能与 Cyt C 进行反应,为排除这些离子的影响,本文进行了不同浓度的 HNO₃ 以及不同 pH 的 NaNO₂ 与 Cyt C 反应的实验。

图 5 中,随 HNO₃ 浓度的增加, Cyt *c* 在 409 nm 处 Soret 带吸收波长逐渐蓝移且吸收强度增大,530 nm 处 Q 带吸收峰变化不明显,549 nm 处特征峰逐渐消失,但随着 HNO₃ 浓度的继续增加,其 Q 带的所有特征吸收峰消失,且吸收强度下降,同时在 300 nm 处出现了 NO₃⁻ 的特征吸收峰^[30],由以上结果可



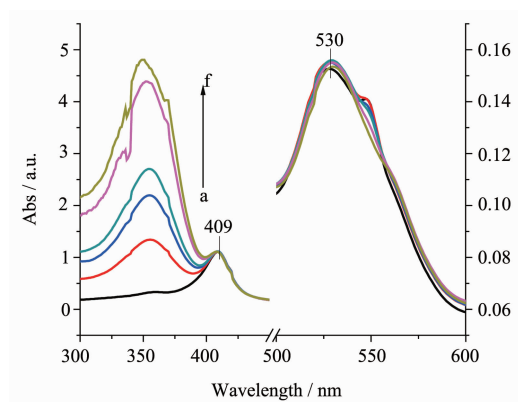
Concentrations of HNO₃ a~j: 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.16, 0.2, 0.5, 1.15 mol·L⁻¹

图 5 Cyt C 与不同浓度的 HNO₃ 相互作用的紫外吸收光谱

Fig.5 UV-Vis absorbance spectra of Cyt C interacted with different concentrations of HNO₃

知,低浓度 HNO₃ 可以将还原态的 Cyt C 氧化,高浓度的 HNO₃ 会破坏 Cyt C 的结构,而不会与之发生配位反应, HNO₃ 本身既是一种强酸又是强氧化剂,因此一开始当 HNO₃ 浓度很低时对 Cyt C 的影响较小,只是将其中还原态 Cyt C 氧化,随着 HNO₃ 浓度的增加, Cyt C 结构逐渐被破坏,血红素中卟啉环暴露,因此 Soret 带的吸收波长发生蓝移,同时强度增大, Q 带特征吸收峰消失。

Cyt C 与 NaNO₂ 相互作用的光谱如图 6 所示,



Concentration of NaNO_2 : a~f: 0, 0.033 1, 0.065 8, 0.098 0, 0.129 9, 0.161 3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 6 Cyt C 中加入不同量 NaNO_2 后的紫外吸收光谱变化

Fig.6 UV-Vis absorbance spectra changes of Cyt C with different amount of NaNO_2

随 NaNO_2 量的增加, Soret 带的特征吸收峰基本没有变化, Q 带 530 nm 处的吸收强度有微弱变化, 而 549 nm 处特征峰消失, 所以 NaNO_2 只是将 Cyt C 溶液中还原态 Cyt C 氧化, 而没有与之发生配位反应, 已有文献报道, Cyt C 本身具有亚硝酸还原酶活性^[10], 因此 NaNO_2 与 Cyt C 之间只是发生了氧化还原反应, 并没有发生配位反应。实验中所用的 NaNO_2 的浓度为 0.03~0.17 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 此处只列出 pH=7.4 的光谱图, pH=3、5.8 的结果与之相同未列出。因此 NO_3^- 和 NO_2^- 不会影响 Cyt C 与 NO 的反应。

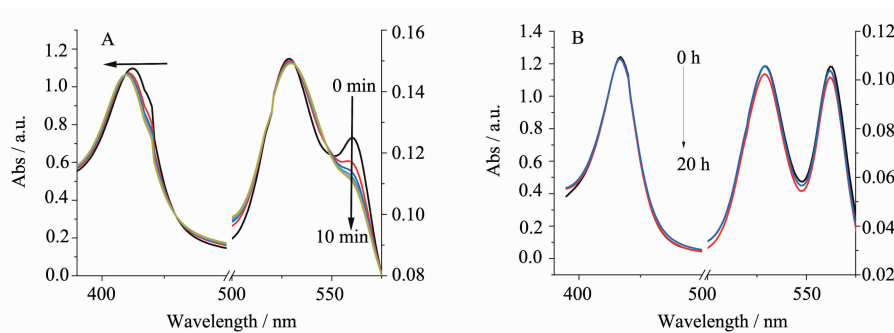
2.5 细胞色素 C-NO 配合物(Cyt C-NO)的解离

通入一定量 NO 气体后, Fe(III)-Cyt C 和 Fe(II)-Cyt C 均会生成 Cyt C-NO, 在 416 nm(Soret 带)、530 nm、562 nm(Q 带)出现特征吸收峰, 由于生成的配合

物并不稳定, 随时间延长逐渐发生解离, 由图 7A 可知随时间变化 Cyt C-NO 逐渐解离为 Fe(III)-Cyt C 。Orrii 等^[31]已经证明当 pH 值在 8~10 之间时, Fe(II)-Cyt C 与 NO 反应生成 Fe(III)-Cyt C-NO 后先被还原为 Fe(II)-Cyt C-NO 和 NO^+ , 最终解离为 Fe(III)-Cyt C 与 NO^+ 。图 7A 为通 NO 1.5 min, 在 10 min 内的解离光谱, 随时间增加 Q 带 562 nm 处的吸收峰逐渐消失, 529 nm 峰位置红移到 530 nm, Soret 带由 413 nm 下降并蓝移到 409 nm。图 7B 为通气 2.5 min, 4 h 及 20 h 后的解离光谱, 随时间变化光谱基本没有发生变化。Cyt C 与 NO 反应主要是在 Fe(III)-Cyt C 下进行, 与 NO 结合后生成 Cyt C-NO, 不稳定而自身发生解离, 生成 Fe(III)-Cyt C , 可以调节生物体内 NO 的量, 而当通 NO 过量时, 溶液中的 NO^- 过量, 生成大量的 NO^- , 破坏该反应的平衡, 使得反应生成的 Fe(III)-Cyt C-NO 不变, 因此当通入过量 NO 时, Cyt C-NO 未发生解离。图 8 A1、A2 为通 NO 2 min 后 Cyt C-NO 在 Soret 带 416 nm 以及 Q 带 562 nm 处时间变化的光谱图, 图 8B1、B2 为通 NO 2.5 min 后 Cyt C-NO 在 Soret 带 416 nm 以及 Q 带 562 nm 处的时间变化的光谱图。由图可知当通入的 NO 气体较少时, Cyt C 与 NO 之间的反应是一个可逆的过程, Cyt C 与 NO 的反应产物随时间逐渐解离, 一定时间以后达到稳定(500~1 000 s 内), 说明反应所生成的 Cyt C-NO 是一种不稳定的配合物, NO 过量时, Cyt C-NO 不再发生解离。因此适当浓度的 NO 对调节 Cyt C 的生理作用非常重要。

对 Cyt C-NO 的时间解离曲线进行拟合发现该曲线符合方程(1), 结果如表 1 所示:

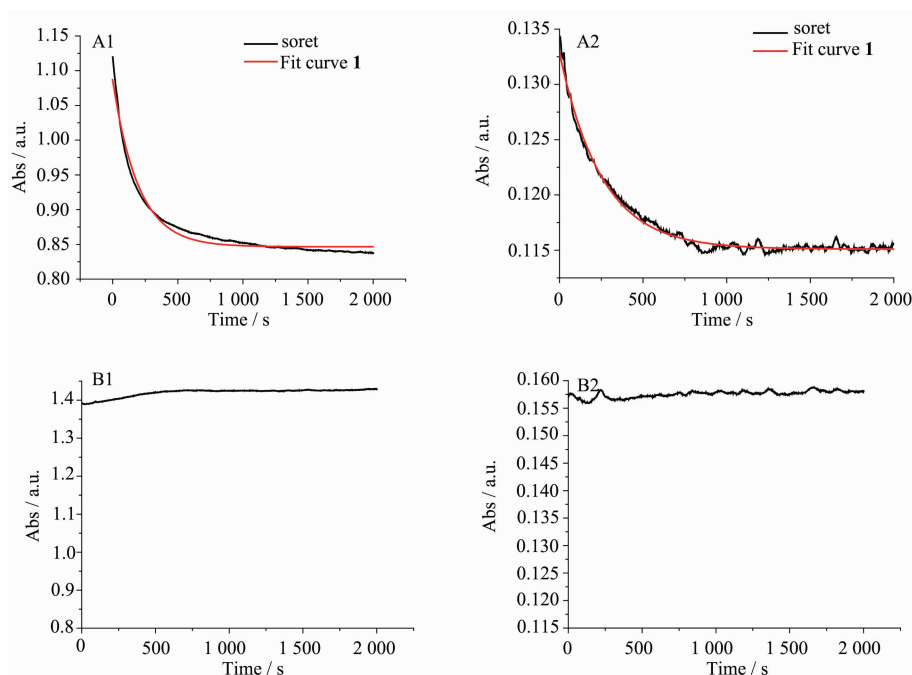
$$y = A \exp(-kt) + y_0 \quad (1)$$



A: Dissociation spectra of Cyt C-NO complex, aerating NO for 1.5 min and detecting for 10 min; B: the dissociation spectra of Cyt C-NO complex, aerating NO for 2.5 min and detecting for 20 h

图 7 通不同量 NO 的 Cyt C-NO 随时间的解离光谱

Fig.7 Dissociation spectra of Cyt C-NO with different amounts of NO by time



A1/A2: time course spectra of Soret band (461 nm) and Q band (562 nm) aerating NO for 2 min and detecting for 30 min; B1/B2: The time course spectra of Soret band(461 nm) and Q band(562 nm) aerating NO for 2.5 min and detecting for 30 min

图 8 通不同量 NO 的 Cyt C-NO 的时间过程光谱

Fig.8 Time course spectra of Cyt C-NO with different amounts of NO

表 1 Cyt C-NO 的解离速率常数及相关参数

Table 1 Dissociation rate constants and the related parameters of Cyt C-NO

	Soret band	Q band
k	0.005 07	0.003 97
y_0	0.846 54	0.115 1
A	0.240 6	0.017 74
R^2	0.978 26	0.990 2

其中 y 为固定波长下的紫外吸收强度, t 为反应时间, A 为振幅, k 为解离速率常数, y_0 为截距。因此随时间变化 Cyt C-NO 的解离过程属于一级反应, Soret 带的 k 值为 $0.005\ 07\ \text{s}^{-1}$, Q 带的 k 值为 $0.003\ 97\ \text{s}^{-1}$, 两谱峰所计算的 k 值接近, 其相关系数 R 分别为 0.978 26、0.990 2, 均接近 1, 排除实验中一些外界因素的影响, 结果在误差允许范围内, 说明 Cyt C-NO 的解离曲线符合上述方程。而其解离速率较供体药物 ($(0.087 \pm 0.054)\ \text{s}^{-1}$) 慢, 仅是其十分之一, 说明 NO 气体与 Cyt C 形成的配合物更稳定。而改变外界条件, 如离子强度、温度、pH 值、缓冲溶液、粘性剂以及光照等, 均会影响 Cyt C 与 NO 的结合及解离速率。随离子强度增大, 其反应速率下降; 温度、pH 变化会影响 Cyt C 的二级结构^[32], 从而影响 NO

与 Cyt C 的结合速率; 而光照会促进 Cyt C-NO 解离等, 其具体影响机制, 在今后的文章中会有详细阐述。

2.6 Cyt C 与 NO 反应的同步荧光光谱

Cyt C 分子含有 1 个色氨酸残基和 4 个酪氨酸残基, 选择合适的 $\Delta\lambda$ 可得到酪氨酸和色氨酸残基的特征性同步荧光光谱^[33], $\Delta\lambda=20\ \text{nm}$ 时, Cyt C 的荧光光谱只出现酪氨酸的荧光峰, $\Delta\lambda=80\ \text{nm}$ 或 $60\ \text{nm}$ 时只出现色氨酸的荧光峰^[34], 本实验通过对比发现在 $\Delta\lambda=60\ \text{nm}$ 时得到的荧光图谱较明显, 因此实验中色氨酸的同步荧光光谱均是在 $\Delta\lambda=60\ \text{nm}$ 的条件下得到的。Cyt C 酪氨酸与色氨酸的同步荧光光谱如图 9A/B。由图 9A 可知, Cyt C 在 305 和 460 nm 有明显的荧光峰, 305 nm 是其酪氨酸的同步荧光峰, 而 460 nm 处是其卟啉环的同步荧光峰。随 NO

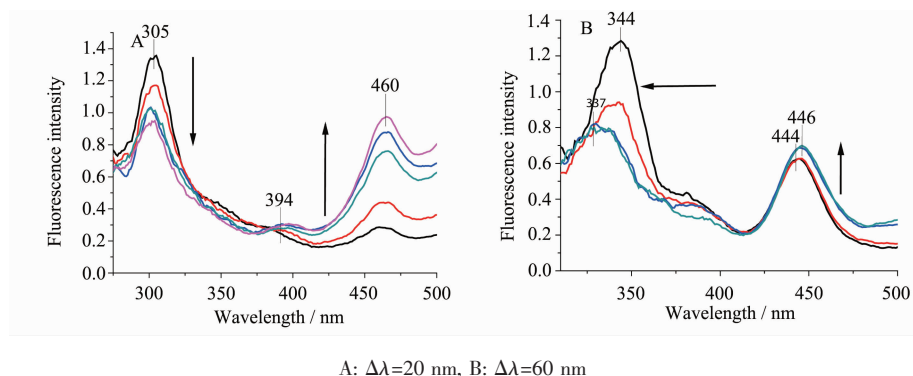
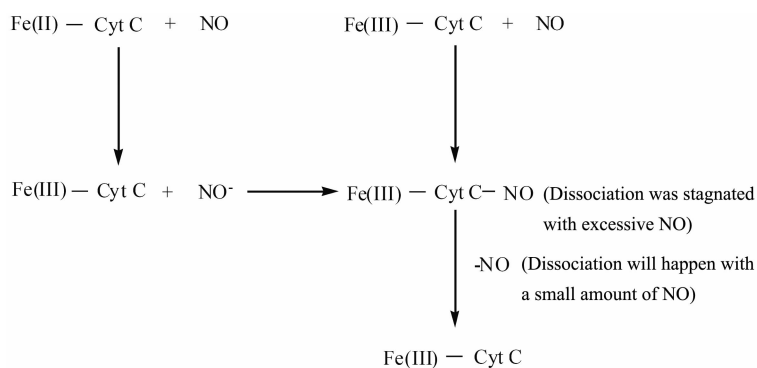
A: $\Delta\lambda=20$ nm, B: $\Delta\lambda=60$ nm

图 9 Cyt C 的同步荧光光谱

Fig.9 Synchronous fluorescence spectra of Cyt C



图示 2 Cyt C 与 NO 的反应过程

Scheme 2 Reaction course of Cyt C with NO

通入量的增加,305 nm 处的荧光峰强度逐渐下降,460 nm 处的强度逐渐上升,同时在 394 nm 附近出现了一个新的荧光峰。Cyt C 中的血红素卟啉环上的 Fe 原子与 Met80 中的 S 和 His 中的 N 相连接,它的血红素基团由数个赖氨酸残基形成环状,这些赖氨酸的 ϵ -氨基带有正电荷,对其侧链中的酪氨酸造成荧光猝灭,而且酪氨酸 67 苯环上的羟基被认为同 Met80 的 S 有氢键形成,对维持 Met80 与 Heme 的配位起着重要的作用^[35],当 NO 进入 Cyt C 溶液后破坏了 Heme 所在腔的极性环境,Met80 与 Heme 相连的铁硫键断裂,使得 Heme 暴露程度增加,促进酪氨酸的荧光猝灭,因此随着 NO 量增加使得酪氨酸在 305 nm 处的荧光强度逐渐减小,而 460 nm 处荧光强度逐渐增大,这与前面紫外吸收光谱中 Soret 带变化一致,新荧光峰的出现与前面 Q 带变化一致。由图 9B 可知,Cyt C 在 344 和 444 nm 处有荧光峰,344 nm 是其色氨酸的同步荧光峰,444 nm 处是其卟啉环的同步荧光峰。随 NO 的通入,344 nm 处发射波长蓝移至 337 nm,且强度下降,而 444 nm 红移

到 446 nm 强度上升。Cyt C 中只含有一个色氨酸残基,位于第 59 位,并以氢键方式与血红素相键合,因而色氨酸残基的最大发射峰的位移直接反映了血红素对溶剂的暴露程度,当 NO 通入 Cyt C 溶液后,与其相互作用,改变了其周围环境,Cyt C 中血红素暴露程度增强,色氨酸残基最大发射峰发生蓝移,而 444 nm 处发射峰也与前文中紫外吸收光谱中的 Soret 带变化是一致的。酪氨酸与色氨酸的同步荧光光谱的变化说明 Cyt C 与 NO 进行了配位反应。

3 结 论

本文采用光谱法研究不同价态 Cyt C 与 NO 气体之间的相互作用,其可能存在的配位有 3 种:(1) NO 进攻铁硫键,使其断裂后,与之结合生成 Cyt C-NO;(2) NO 进入溶液后生成硝酸根离子,再与 Cyt C 结合,生成 Cyt C-NO₂;(3) NO 进入溶液后生成亚硝酸根离子(NO₂⁻),再与 Cyt C 结合生成 Cyt C-NO;最终通过实验证明只能是第一种途径,结果同时显示 NO 气体与供药物的反应过程基本相同:Fe(II)-Cyt C

与 NO 反应先生成 Fe(III)-Cyt C,之后再与 NO 反应生成 Fe(III)-Cyt C-NO, Fe(III)-Cyt C-NO 在没有其他还原剂存在的条件下,会逐步解离为 Fe(III)-Cyt C。NO 气体可以直接与 Cyt C 结合,所生成的配合物解离速率仅是供体药物的十分之一,对于有效的利用 NO 具有重要的参考意义。NO 过量会破坏溶液的平衡使反应向生成 Fe(III)-Cyt C-NO 方向进行,不再发生解离。Cyt C 与 NO 之间的具体配位反应机制为:NO 进入溶液以 NO[•]形式存在,使 Cyt C 周围的微环境发生变化,进入到 Heme 腔中改变其电子分布,增大了 Met80 与 Heme 之间的距离,使其相互作用减弱, Met 与 Heme 之间的配位键改变,分子间发生重排,其中心 Fe 与 NO 形成新配位键,但所形成的 Fe-N 键不稳定,当 NO 量较少时,随时间变化又会断裂,再次生成五配位 Fe,可以与溶液中的自由基结合,最终达到一个平衡,当不断通入 NO 时,所形成的配位键不再发生断裂,破坏了其达到的平衡。呼吸作用在人类生命活动中必不可少,NO 气体无色无味的,容易被吸入,通过研究该反应机制,为今后研究其它血红素类蛋白与 NO 及其它气体(CO)之间的相互作用提供参考依据,同时在医学上治疗 NO 中毒以及合理利用 NO 提供支持。

参考文献:

- [1] Wittenberg B. *J. Physiol. Rev.*, **1970**,**50**(4):559-636
- [2] Hills B A. *Science*, **1973**,**182**(4114):823-825
- [3] Cassina A M, Hodara R, Souza J M, et al. *J. Biol. Chem.*, **2000**,**275**(28):21409-21415
- [4] Soldatova A V, Ibrahim M, Olson J S, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**,**132**(13):4614-4625
- [5] Rong Z, Cooper C E. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2013**,**789**:361-368
- [6] Larson S K, Dwyer D S, Lo H H, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2006**,**342**(3):991-995
- [7] Godoy L C, Munoz-Pinedo C, Castro L, et al. *PNAS USA*, **2009**,**106**(8):2653-2658
- [8] Kanokwiroon K, Chatpun S. *J. Asian Trans. Sci.*, **2014**,**8**(2): 100-104
- [9] Basu S, Keszler A, Azarova N A, et al. *Free Radical Biol. Med.*, **2010**,**48**(2):255-263
- [10] Basu S, Azarova N A, Font M D, et al. *J. Biol. Chem.*, **2008**,**283**(47):32590-32597
- [11] Jaeheung Park T L, Manho L. *J. Phys. Chem. B*, **2013**: 12039-12050
- [12] Herold S, Exner M, Nauser T. *Biochemistry*, **2001**,**40**(11): 3385-3395
- [13] Yukl E T, Vries S, Moënne-Loccoz P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**,**131**(21):7234-7235
- [14] Gow A J, Luchsinger B P, Pawloski J R, et al. *PNAS USA*, **1999**,**96**(16):9027-9032
- [15] Kruglik S G, Yoo B K, Franzen S, et al. *PNAS USA*, **2010**, **107**(31):13678-13683
- [16] Sharpe M A, Cooper C E. *Biochem. J.*, **1998**,**332**(1):9-19
- [17] Silkstone R S, Mason M G, Nicholls P, et al. *Radical Bio. Med.*, **2012**,**52**(1):80-87
- [18] Kim J, Park J, Lee T, et al. *J. Phy. Chem. B*, **2012**,**116**(46): 13663-13671
- [19] Jitkaew S, Witasp E, Zhang S, et al. *J. Leukocyte Biol.*, **2009**,**85**(3):427-437
- [20] Kagan V E, Bayir A, Bayir H, et al. *Mol. Nutr. Food. Res.*, **2009**,**53**(1):104-114
- [21] Kagan V E, Bayir H A, Belikova N A, et al. *Free Radical Biol. Med.*, **2009**,**46**(11):1439-1453
- [22] Grubina R, Basu S, Tiso M, et al. *J. Biol. Chem.*, **2008**,**283** (6):3628-3638
- [23] Margoliash E, Frohwirt N. *J. Biochem.*, **1959**,**71**(3):570-572
- [24] Zhao X J, Sampath V, Caughey W S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**,**204**(2):537-543
- [25] Gray A L, Raphael A L. *Proc. Struct. Funct. Genet.*, **1989**,**6** (3):338-340
- [26] Stellwagen E, Cass R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1974**,**60**(1):371-375
- [27] WANG Cui-Ping(王翠平), YE Liu(叶柳), XIE Jian-An(谢建安), et al. *Res. Explor. Lab.*(实验室研究与探索), **2013**,**32**(5):5-7
- [28] Kapralov A A, Kurnikov I V, Vlasova I I, et al. *Biochem.*, **2007**,**49**(46):14232-14244
- [29] Smagghe B J, Trent J T, et al. *PLoS One*, **2008**,**3**(4):1-10
- [30] Jayakumari N R, Reghuvaran A C, et al. *Biol. Chem.*, **2014**, **08**(2):35-44
- [31] Orii Y, Shimada H. *J. Biochem.*, **1978**,**84**(6):1543-1552
- [32] Balakrishnan G, Hu Y, Oyerinde O F, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**,**129**(3):504-505
- [33] JIAN Ju(剑菊), QU Xiao-Gang(曲小刚), LU Tian-Hong(陆天红), et al. *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报), **1995**,**16**(8): 1270-1274
- [34] George T, Doreen W S, English A M, et al. *Biochemistry*, **1998**,**37**(7):2004-2016
- [35] Takano T, Dickerson R E. *J. Mol. Biol.*, **1981**,**153**(1):95-115