

研究论文

兔肝金属硫蛋白稀水溶液的 γ 辐解

方兴旺 魏根栓 吴季兰

(北京大学技术物理系, 北京 100871)

摘要 研究了氧和剂量率对兔肝金属硫蛋白(MT-I)稀水溶液 γ 辐解的影响。水辐解产生的OH自由基主要进攻MT-I中半胱氨酸残基上的巯基,使巯基与金属离子间的配位键破坏,造成部分金属离子解离,并形成二硫键。而二硫键的形成主要发生在分子内部,其G值将为分子间二硫键G值的5倍。 N_2O 饱和与 N_2 饱和时MT-I稀水溶液辐解,巯基损失G值分别为7.0与4.2, O_2 饱和时有一较短的链反应。辐解形成的二硫键能定量地被还原型谷胱甘肽还原。同时对MT-I稀水溶液 γ 辐解机理进行了讨论,并求得了辐解时的物料平衡。

关键词 金属硫蛋白(MT-I), 辐解, 二硫键, 辐射效应

金属硫蛋白(Metallothionein, 简称MT)是一类富含巯基和金属的低分子量蛋白质,广泛存在于哺乳动物及高等植物中。自1957年Margoshes和Vallee^[1]首次发现MT以来,虽然人们对它已作了大量研究,但其生理功能尚无定论。由于MT富含巯基,人们推测MT可能参与机体内的抗辐射保护过程,在清除自由基和修复辐射损伤方面起重要作用^[2]。研究表明,X射线或 γ 射线辐照均能导致体内MT浓度的明显升高^[3,4];MT能修复DNA损伤^[5],抑制OH自由基引起的DNA降解^[6],利用竞争动力学方法求得 $k_{MT/OH} = 10^{12} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{MT/O_2^-} = 5 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ^[7]。这为MT的抗辐射功能提供了很好的佐证,但MT清除自由基、形成辐解产物的机理尚不清楚。本工作通过对MT-I稀水溶液 γ 辐解产物的分析,对MT-I清除自由基的机理进行研究。

1 材料与方 法

1.1 材料

兔肝MT-I从皮下注射 $CdCl_2$ 诱导过的家兔肝脏中分离纯化得到^[8],所得产品为HPLC纯,金属含量测定表明每分子蛋白中含5个Cd分子和2个Zn分子。配制水溶液时均用三级蒸馏水,第二级和第三级蒸馏时分别加入碱性高锰酸钾和酸性重铬酸钾。所用下列化学试剂: K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、5,5'-二硫双-2-硝基苯甲酸 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB)、乙二胺四乙酸 ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA)、胍 Guanidine、 $CdCl_2$ 、 H_2O_2 、邻苯二甲酸氢钾、磷酸钼铵、KI等均为AR级。所用 N_2O 、 N_2 为高纯气体, O_2 为普通纯气体。

1.2 辐照及检测

所有样品在辐照前均通气(N_2O 、 N_2 或 O_2) 30 min后封管。辐照在北京大学技术物理系小钴源室完成,吸收剂量用 $FeSO_4$ 剂量计标定, $G(F^{3+})_{O_2}$ 取值15.5。辐照引起的巯基损失用Ellman试剂[(其组成为 $5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ DTNB- $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ EDTA- $6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Guanidine- $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 磷酸盐缓冲液(pH7.3)]测定^[9]。测量时取0.4—1.0 ml待测液(巯基总量不超过 $0.5 \mu\text{mol}$),

收稿日期: 初稿 1994-04-04, 修改稿 1994-06-29

加 20 μl $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{HCl}$ 、200 μl $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{EDTA}$ 去除金属离子, 再加入 5 ml $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.3)和 0.2 ml Ellman 试剂, 并用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS 稀释至 10.0 ml, 于 412 nm 处测定反应后溶液的吸光值, $\varepsilon_{412\text{nm}}$ 取 $13600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ 。 H_2O_2 测定用比色法^[10]: 1–2 ml 样品溶液, 加 1.0 ml B 液(2 g 邻苯二甲酸氢钾溶于 100 ml 三蒸水即得)、1.0 ml A 液(每 100 ml 中含 7 g KI、0.2 g NaOH 和 0.2 g 磷钨酸铵), 用水稀释至 5.0 ml, 测定 $A_{350\text{nm}}$, $\varepsilon_{350} = 2.3 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ 。 Cd 与 Zn 用原子吸收分光光度法(AAS)测定, 仪器为 Hitachi-180-80。MT-I 水溶液辐照后分子间聚合形成二聚体的产额由 HPLC 法测定, 仪器为 Hitachi-Merck HPLC, 分析柱为 Ultropac-TSK G 2000 SW(7.5 mm ID $\times$ 30.0 cm L), 分析柱前加保护柱 Ultropac-TSK Precolumn SW (7.5 mm ID $\times$ 7.5 cm L), 进样体积 20 μl , 洗脱液为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 7.0), 流速 1.0 ml/min, 220 nm 处检测。

2 结果与讨论

2.1 MT-I 与 H_2O_2 的反应

在碱性条件下, H_2O_2 与半胱氨酸(简记为 CySH)有如下反应:



反应(1)经历两个步骤^[11]:



反应(1b)很快, 反应(1a)是决速步, $k_{1a} = 12.4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ 。每分子 MT 中有 20 个半胱氨酸残基, 而且全部去质子化, 因此在 MT 稀水溶液的辐射化学中类似反应可能存在, 而且可能显得比较重要:



式中 RS^- 表示 MT。因此有必要测定 k_{2a} 。

用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ PBS (pH 8.0) 作溶剂, 溶解一定量的 MT-I, 用 Ellman 试剂测定巯基浓度后用 PBS 稀释至巯基浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (A 液)。取 0.3 ml 30% H_2O_2 用三级蒸馏水稀释至 100 ml, 用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液测定其浓度后稀释至 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (B 液)。取 10.0 ml A

液, 5.0 ml B 液, 加入 25 ml 容量瓶中, 用 PBS 定容至 25 ml 刻度线, 室温(20 $^\circ\text{C}$)下反应, 每隔一定时间取出 1.00 ml 反应液用 Ellman 试剂测定 SH 浓度随时间的变化, 得到图 1。

从图 1 可以看到巯基浓度随时间下降, 说明该实验条件下 MT-I 与 H_2O_2 反应。假定反应机理同 CySH 与 H_2O_2 反应时一样, 即按反应(2a)和(2b)进行, 且(2a)为决速步, 则有

$$d[\text{RS}^-]/dt = k_{2a}[\text{RS}^-][\text{H}_2\text{O}_2] \quad (I)$$

本实验中反应刚开始时 $[\text{RS}^-]_0 = 2[\text{H}_2\text{O}_2]_0$, 由于反应按(2a)和(2b)进行, 每分子 H_2O_2 反应的结果消耗两分子的 RS^- , 因此反应的任何时刻都有 $[\text{RS}^-]_t = 2[\text{H}_2\text{O}_2]_t$, 代入(I)式, 得

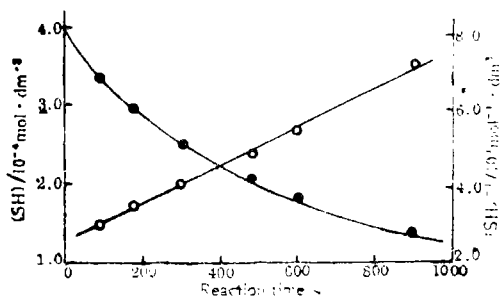


Fig. 1 Kinetic plots of MT-I— H_2O_2 reaction

$[\text{MT-I}]_0 = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (i. e.

$[\text{RS}^-] = 4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$,

$[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$,

pH = 8.0, T = 293 K

(●) $[\text{SH}]$ (○) $1/[\text{SH}]$

$d[\text{RS}^-]/dt = \frac{1}{2}k_{2a}[\text{RS}^-]^2$, 从 $0 \rightarrow t$ 作定积分得 $1/[\text{RS}^-]_t = 1/[\text{RS}^-]_0 + \frac{1}{2}k_{2a}t \dots \dots (\text{II})$ 。即

$1/[\text{RS}^-]_t - t$ 成直线关系, 这与实验结果相符 (因 MT-I 中 20 个巯基全部去质子化, 所以测得的 $[\text{SH}]$ 即为 $[\text{RS}^-]$), 说明上面的假设是合理的。由图 1 中直线斜率可求得 $k_{2a} = 10 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$, 这与 k_{1a} 值很接近, 进一步说明 H_2O_2 与 MT-I 反应的机理可能和 H_2O_2 与 CySH 反应时完全相同。

辐解后的 MT-I 稀水溶液经两种不同方式去除 MT-I 后再测定 H_2O_2 含量, 以消除巯基对测定的影响: ① 经 Sephadex G-25 脱盐柱除去蛋白组分; ② 加入 5 倍体积的无水乙醇使蛋白成分变性沉淀并经超速离心除去。实验结果表明, 无论是 N_2O 饱和还是 O_2 饱和, 辐解液经上述两种途径消除巯基影响后仍检测不出 H_2O_2 , 而以标准 H_2O_2 水溶液作相同处理后用相同方法 (比色法) 测定的结果表明, 两种方式处理后 H_2O_2 回收率均在 95% 以上, 说明两种处理方法均不导致 H_2O_2 的明显损失。因此可以认为 MT-I 稀水溶液 γ 辐解稳定产物中没有 H_2O_2 。

MT-I 稀水溶液中 $[\text{RS}^-]$ 约为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 由于 H_2O_2 生成量小 (例如 $D = 100 \text{ Gy}$, 若 $G(\text{H}_2\text{O}_2) \leq 10$, 则 $[\text{H}_2\text{O}_2] \leq 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 而巯基减少控制在 10% 左右, 因此反应 (2a) 可以看作准一级反应, 这时 H_2O_2 的半衰期 $t_{1/2} = \ln 2 / ([\text{RS}^-]_0 \cdot k_{2a}) = 0.69 / (1.0 \times 10^{-3} \cdot 10) = 69 (\text{s})$ 。这表明辐解过程中生成的 H_2O_2 在辐解产物分析之前已全部与 MT-I 反应完了, 因此在辐解产物分析时测不出 H_2O_2 是合理的。

2.2 γ 辐解时巯基减少与二聚体形成

MT-I 溶于 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ PBS}$ ($\text{pH } 8.0$) 中, Ellman 试剂测定巯基浓度为 $1.21 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 即 MT-I 浓度为 $6.06 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 。分析结果表明通气过程不会造成巯基减少, 也没有二聚体形成, 而辐解则会导致巯基的减少和二聚体的形成。各种条件下 MT-I 的 PBS 辐解后产物分析结果列于表 1。表中 $G_{-\text{SH}}$ 和 $G_{(\text{MT-I})_2}$ 分别表示巯基减少和二聚体生成的 G 值。巯基减少时形成二硫键, 而 $G_{-\text{SH}}$ 比 $G_{(\text{MT-I})_2}$ 大很多, 说明二硫键的形成主要发生在分子内部, 而形成分子间二硫键产生二聚体的份额很小。这可能是由于 MT-I 分子内部有 20 个巯基, 且它们相互靠近, 因此二硫键更容易在同一分子内形成。

Tab 1. G Values of radiolytic products after γ -radiolysis of MT-I in phosphate buffer solution pH 8.0, $[\text{MT-I}]_0 = 6.06 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

		Dose rate/ $\text{Gy} \cdot \text{s}^{-1}$									
		0.103			0.174			0.292		0.805	
		30.9 Gy	61.8 Gy	92.7 Gy	52.2 Gy	104 Gy	157 Gy	87.6 Gy	175 Gy	263 Gy	242 Gy
Bubbled with N_2	$G_{-\text{SH}}$	4.3	4.0	4.1	4.2	4.2	4.4	4.6	4.4	3.9	—
	$G_{(\text{MT-I})_2}$	0.33	0.31	0.31	0.34	0.31	0.34	0.35	0.31	0.29	—
Bubbled with N_2O	$G_{-\text{SH}}$	7.2	6.9	6.8	7.1	6.5	7.0	7.3	7.0	7.4	—
	$G_{(\text{MT-I})_2}$	0.75	0.61	0.69	0.67	0.67	0.60	0.70	0.63	0.69	—
Bubbled with O_2	$G_{-\text{SH}}$	16.7	15.5	15.9	14.5	13.8	14.0	12.8	13.3	12.9	11.9
	$G_{(\text{MT-I})_2}$	0.55	0.60	0.53	0.50	0.57	0.61	0.62	0.55	0.56	—

从表 1 可以看出无论是通 N_2 、 N_2O 还是 O_2 , $G_{(\text{MT-I})_2}$ 值均不随剂量率的变化而变化, 且数值很小。在通 N_2 或 N_2O 后辐照时, $G_{-\text{SH}}$ 值与剂量率变化无关, 而通 O_2 后辐照时, $G_{-\text{SH}}$ 值随剂量率的增大而减小。作 $G_{-\text{SH}} - [\text{Dose Rate}]^{-1/2}$ 图, 得到图 2。从图 2 可以看出, O_2 饱和时辐解 MT-I 稀水溶液, $G_{-\text{SH}}$ 与 $[\text{Dose Rate}]^{-1/2}$ 成线性关系, 说明巯基减少有一个链过程, 但直线

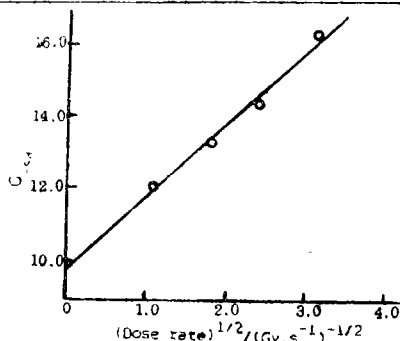


Fig.2 The relationship between dose rate and G_{SH} in O_2 -saturated MT-I phosphate buffer solution $[MT-I] = 6.06 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{pH} = 8.0$, $T = 293 \text{ K}$

斜率很小,说明反应链较短。当直线外推到剂量率无穷大时,有 $G_{SH} = 9.7$ 。

2.3 γ 辐解时 MT-I 中螯合金属离子的解离

辐照后的样品经 Sephacryl S-100 HR 填充柱常规液相色谱分离,得到“单体”和二聚体(“单体”包括未受辐射损伤的单分子 MT-I 以及损伤仅发生在分子内部、形成分子内二硫键的单分子,因它们分子量很接近,无法在排阻色谱上分开)。用 AAS 法测定其中金属离子含量时,发现辐解主要造成 Zn^{2+} 的解离,二聚体中几乎不含 Zn^{2+} ,分离出的单体中 Zn^{2+} 的含量亦大大减少,而 Cd^{2+} 的损失很少。在分离

所得盐峰中也只能检测到 Zn^{2+} 。例如, $6.06 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ MT-I O_2 饱和 104 Gy 辐照前后金属离子分布情况如表 2 所示。

Tab 2. Effect of irradiation on metal ion content (mol/mol protein) in O_2 -saturated MT-I $[MT-I]_0 = 6.06 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, dose = 104 Gy (dose rate = 0.17 Gy/s)

	In monomers		In dimers	
	Zn	Cd	Zn	Cd
Before irradiation	1.9	5.0	—	—
After irradiation	0.9	4.3	0.05	12.5

MT-I 对 Cd^{2+} 的螯合能力比 Zn^{2+} 大 10000 倍^[12], 因此 MT-I 辐解时首先解离 β 结构域中的 Zn^{2+} (MT-I 中 2 个 Zn^{2+} 全在 β 结构域中^[1]), 又由于 MT-I 各结构域在螯合金属离子时有协同效应^[13], 因此 β 结构域中某巯基的损伤会导致该结构域中螯合的 3 个金属离子 (2 个 Zn^{2+} 和 1 个 Cd^{2+}) 全部解离, 因此辐解形成的二聚体中几乎不含 Zn^{2+} 。释放出的 Cd^{2+} 可以与未受损伤的 β 结构域中的 Zn^{2+} 发生交换, 这可能是盐峰中检测不到 Cd 的主要原因。

2.4 二硫键还原

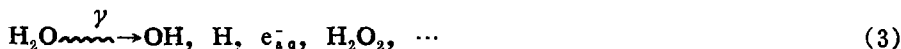
MT-I 水溶液 γ 辐解后经 Sephacryl S-100 HR 填充柱分离, 收集 MT 单分子峰以后的流分, 用 Ellman 试剂检测不到其中有巯基存在, 说明辐解过程并不导致 MT 肽链的断裂。因此 MT-I γ 辐解损伤主要是分子内及分子间二硫键的形成和金属离子的解离, 这与文献报道结果相符^[7]。

室温下向 1.0 ml MT-I 辐解液中加入 0.3 mg 还原型谷胱甘肽 (GSH), 2 h 后用 HPLC 分析, 发现辐解形成的二聚体被完全还原成单体。还原后的 MT-I 经 Sephadex G-25 脱盐柱除去 GSH 及 GSSG 后用 Ellman 试剂测巯基含量, 结果表明所有辐解中形成的二硫键全部被还原成巯基, 还原后的 MT-I 每分子仍含 20 个巯基。还原后的 MT-I 用过量 $CdCl_2$ -EDTA 或 $ZnCl_2$ -EDTA 处理 ($\text{pH} 7.0$, 30°C , 4 h) 后测定 Cd 或 Zn 含量, 结果表明每分子辐照后还原的 MT-I 仍能与 7 个 Cd^{2+} 或 Zn^{2+} 结合, 这进一步说明 MT-I 辐解损伤仅发生在二硫键形成水平上, 而不影响 MT-I 的三级结构。

3 MT-I 稀水溶液 γ 辐解机理及物料平衡

研究中曾用脉冲辐解技术证实了 MT-I 辐解时与半胱氨酸辐解一样, 有 $RSS^{\cdot-}R$ 络阴离子

由基的形成与衰减^[14], 2.1 中结果表明 MT-I 同 H_2O_2 反应时与半胱氨酸遵从相同的机理, 因此推测 MT-I 中半胱氨酸残基是辐解最敏感部位。参照半胱氨酸的辐解机理^[15], 推测 MT-I 辐解机理大致如下:



中性和弱碱性时主要活性粒子产额为: $G_{\text{OH}} = 2.80$, $G_{\text{e}_{\text{aq}}^-} = 2.75$, $G_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0.73$

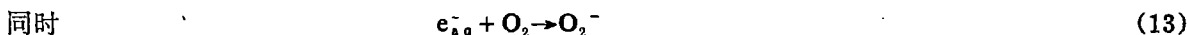


通 N_2 时, $\text{RSS}^- \text{R}$ 按反应(6)的逆过程衰减, 因此 $G_{-\text{SH}} = G_{\text{OH}} + 2 G_{\text{H}_2\text{O}_2} = 2.80 + 2 \times 0.73 = 4.26$, 与实验值 4.2 相符。 N_2O 饱和时 $\text{N}_2\text{O} + \text{e}_{\text{aq}}^- \rightarrow \text{OH} + \text{N}_2 + \text{OH}^- \quad (8)$

而 $\text{RSS}^- \text{R}$ 仍按反应(6)的逆过程衰减, 因此有 $G_{-\text{SH}} = G_{\text{OH}} + G_{\text{e}_{\text{aq}}^-} + 2 G_{\text{H}_2\text{O}_2} = 2.80 + 2.75 + 2 \times 0.73 = 7.01$, 与实验值 7.0 相符。 O_2 饱和时^[16]



反应(9)和(10)构成链反应, 使 $G_{-\text{SH}}$ 升高。由于反应(6)、(7)与反应(9)竞争, 且 H^+ 浓度很小, 因此反应链较短。当剂量率无穷大时, 由于 $\text{RS} \cdot$ 的浓度很大, RS^- 局部浓度非常大(每分子内有 20 个 RS^-), 因此在 $\text{RS} \cdot$ 衰减的反应(6)、(7)和(9)三条途径中反应(9)的份额很小, 可以忽略链反应, 这时由于 $\text{RSS}^- \text{R}$ 按下式衰减: $\text{RSS}^- \text{R} + \text{O}_2 \rightarrow \text{RSSR} + \text{O}_2^- \quad (12)$



因此每个 OH 消耗 2 个巯基, 每个 e_{aq}^- 消耗一个巯基, 每个 H_2O_2 消耗两个巯基, 因此 $G_{-\text{SH}} = 2 G_{\text{OH}} + G_{\text{e}_{\text{aq}}^-} + 2 G_{\text{H}_2\text{O}_2} = 2 \times 2.80 + 2.75 + 2 \times 0.73 = 10.08$, 这与实验值 9.7 基本相符。通 N_2 或 N_2O 时, 由于反应(6)生成的 $\text{RSS}^- \text{R}$ 按反应(6)的逆过程衰减, 因此二硫键的形成来源于反应(7)和(2 b)。反应(7)中当两个 $\text{RS} \cdot$ 处于同一个 MT 分子中时形成分子内二硫键, 只有当两个 $\text{RS} \cdot$ 处于不同 MT 分子中时才形成分子间二硫键, 同时产生 MT 的二聚体。由于一个 MT 分子中有 20 个巯基, 分子内部巯基浓度非常高, 因此 $\text{RS} \cdot$ 与同一分子内的 $\text{RS} \cdot$ 反应的机会更多些, 而与其他分子中的 $\text{RS} \cdot$ 反应的机会很少, 所以反应(7)主要生成分子内二硫键。同样, 反应(2 b)中 RSOH 更倾向于与其所在分子中的其他 RS^- 基因反应而生成分子内二硫键。所以通 N_2 或 N_2O 时, $G_{(\text{MT-I})_2}$ 都很小。通 O_2 时除反应(7)和(2 b)外, 反应(6)和(11)的结果亦形成二硫键。与反应(7)和(2 b)一样, 由于 MT 中局部巯基浓度极高, 反应(6)和(11)亦主要形成分子内二硫键。因此, O_2 饱和时, $G_{(\text{MT-I})_2}$ 也很小。这与实验结果是相一致的。

O_2 饱和时由于反应(9)和(10)构成链反应, 使 $G_{-\text{SH}}$ 随剂量率的增大而减少。链反应产生的 RSOOH 通过反应(11)生成二硫键。因 MT 分子内巯基局部浓度很大, 反应(11)主要形成分子内二硫键, 对二聚体的形成贡献很小。由于反应链很短, 且链反应生成的 RSOOH 形成分子间二硫键产生二聚体的机会很少, 因此链反应的存在对 $G_{(\text{MT-I})_2}$ 几乎没有影响, 这正是实验中观测到

的现象, 即 $G_{(MT-I)_2}$ 基本不随剂量率而变。

4 小 结

首次对 MT 清除自由基、形成辐解产物的机理进行了研究, 测定了主要辐解产物的 G 值, 得到了各种条件下辐解时的物料平衡。实验结果表明, 辐解时二硫键的形成主要发生在分子内部, 二聚体 G 值很小; O_2 饱和时辐解, 有一较短的链反应存在, 使 G_{-SH} 随剂量率增加而减小, 但二聚体 G 值不随剂量率而变。由于 MT-I 对 Zn^{2+} 的螯合能力比对 Cd^{2+} 的螯合能力弱得多, 辐解中形成的活性粒子 (OH 与 H_2O_2) 主要进攻 $Zn-S$ 配位键, 造成 Zn^{2+} 的解离; MT-I 辐解后能被还原型谷胱甘肽还原, 还原后的 MT-I 与未辐解 MT-I 具有相同的螯合金属离子的能力, 进一步证实了 Thornalley 等的实验结果^[7]。第一次测定了 MT-I 与 H_2O_2 反应的速率常数, pH 8.0, 20℃ 时 $k_2 = 10 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ (MT-I 浓度用 $-SH$ 浓度表示)。

参 考 文 献

- 1 Margoshes M, Vallee B L. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79: 4813
- 2 Karin M. Cell, 1985, 41: 9
- 3 Shiraishi N, Aono K. Biryō Kinzoku Taishō, 1989, 17: 117
- 4 潘爱华, 张瑞均, 茹炳根. 生物物理与生物化学进展, 1989, 16: 48
- 5 Okumato D S, Bohr V A. Nucleic Acids Res., 1987, 15: 10021
- 6 Abel J, de Ruiter N. Toxicol. Lett., 1989, 47: 191
- 7 Thornalley P J, Vasak M. Biochem. Biophys. Acta, 1985, 827: 36
- 8 Tsunoo H, Kino K, Nakajima H et al. J. Biol. Chem., 1978, 253: 4172
- 9 Ellman G L. Arch. Biochem. Biophys., 1959, 82: 70
- 10 Frew J E, Jones P, Scholes G. Anal. Chim. Acta, 1983, 155: 139
- 11 Barton J P, Packer J E, Sims R J. J. Chem. Soc., 1973, 43: 1547
- 12 Vasak M, Kagi J H R, Sigel M. Metal Ions in Biological Systems (vol. New York, Marcel Dekker, Inc., 1983, 15: 213-273
- 13 Byrd J, Winge D R. Arch. Biochem. Biophys., 1986, 250: 233
- 14 方兴旺, 李凤梅, 吴季兰等. 物理化学学报, 1993 (in press)
- 15 Barton J P, Packer J E. Int. J. Radiat. Phys. Chem., 1970, 2: 159
- 16 Lal M. Radiat. Eff., 1974, 22: 49

⁶⁰Co γ-RADIOLYSIS OF DILUTED MT-I AQUEOUS SOLUTION

Fang Xingwang Wei Genshuan Wu Jilan

(Department of Technical Physics, Peking University, Beijing 100871)

ABSTRACT Effects of O_2 and dose rate on the radiolysis of rabbit hepatic metallothionein-I (MT-I) in phosphate buffer solution at pH 8.0 have been studied. Active species (OH and H_2O_2) formed under irradiation principally attack the $Zn-S$ bonds in the β -domain of MT-I and as a result, give birth to disulfide bonds, and the formation of disulfide bonds mainly occurs intramolecularly. The radiolysis of N_2 - or N_2O -saturated MT-I solutions resulted in sulfhydryl-group-decrease with $G_{-SH} = 4.2$ and 7.2 respectively, whereas G values of dimer ($G_{(MT-I)_2}$) were only 0.32 and 0.67. A short chain-reaction exists in the decrease of sulfhydryl groups when O_2 -saturated MT-I was irradiated, but it contributed little to $G_{(MT-I)_2}$. However, the damaged MT-I can be repaired completely by reduced glutathione. The reaction between H_2O_2 and MT-I also was investigated, and $k_2 = 10 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ for $RS^-(MT-I) + H_2O_2 \rightarrow RSOH + OH^-$ was obtained. Furthermore, the radiolysis mechanism of MT-I was discussed on the basis of above mentioned results and good material balances were achieved.

KEYWORDS Metallothionein, Radiolysis, Disulfide bond, Radiation effects