

研究报告

人胎盘膜铁蛋白同类型双亚基功能、
铁核结构和释放铁动力学研究罗联忠^{1,2} 金宏伟¹ 蔡宗菁³ 黄河清^{*1,2}(厦门大学生命科学学院生物化学与生物技术学系¹, 近海海洋环境科学国家重点实验室², 厦门 361005)³(香港浸会大学化学系, 香港)

摘要 以人胎盘组织为实验材料,小批量制备电泳纯人胎盘膜铁蛋白 (HPMF),对其结构与功能进行研究。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 技术揭示,HPMF 蛋白壳由分子量分别为 15 kDa (MF₁₅) 和 20 kDa (MF₂₀) 的亚基组成,其中 MF₁₅ 蛋白含量约为 MF₂₀ 的 3 倍。经肽质量指纹图谱 (PMF) 技术鉴定,发现 HPMF 的 MF₁₅ 和 MF₂₀ 亚基与人铁蛋白 (HF) L 亚基均具有较高的同源性,提出 HPMF 由单类型但分子量不同的双亚基组成的新观点。在选用基质辅助电离激光解吸飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 技术直接分析 HPMF 亚基稳定性过程中,获得 5 个质荷比 (*m/z*) 值为 5071.25, 9962.51, 15131.55 (MF₁₅), 19936.40 (MF₂₀) 和 20147.61 的特征质谱峰,其对应的亚基分子式分别为 [MF₁₅]³⁺, [MF₂₀]²⁺, [MF₁₅]⁺, [MF₂₀]⁺ 和 [MF₂₀+Fe]⁺。ICP-MS 分析发现,HPMF 铁核中的铁和无机磷酸盐 (P_i) 含量仅为 85Fe³⁺/HPMF 和 15P_i/HPMF,其中 Fe³⁺/P_i 比值约为 5.72,明显低于绝大多数哺乳动物铁蛋白,但却高于细菌铁蛋白 (BF)。在释放铁动力学方面,HPMF 以一级反应动力学途径释放完整铁核中的铁量,其释放时间约需 750 min,其释放铁的速率慢于马脾铁蛋白 (HSF) 和猪胰铁蛋白 (PPF) (约 60 min)。根据 HPMF 完全不同于大部分哺乳动物、植物和细菌铁蛋白的新颖结构与功能,提出 HPMF 在母体和胎儿之间中起着释放、储存和转运铁的复合生理功能的铁转运模型。

关键词 人胎盘膜铁蛋白; 单类型亚基; 亚基作用; 铁转运模型; 结构与功能

1 引言

铁蛋白 (Ferritin) 的分子均由蛋白壳、铁核和 3 种不同分子结构且横跨蛋白壳的隧道组成^[1,2],其中铁核被球状蛋白壳紧密包裹于全蛋白的中心区域,铁核由数千铁离子和数百无机磷酸盐组成^[3,4]。多数哺乳动物铁蛋白的蛋白壳均有 24 个 H 和 L 亚基^[5,6],两种亚基在结构与功能上存在差异,H 亚基是负责结合 Fe²⁺、催化铁氧化,并将铁储存在结晶核中;而 L 亚基是负责提供酸性残基以促进铁核形成,加速铁核长大^[6,7]。细菌铁蛋白 (Bacterial ferritin, BF) 和鲨鱼肝铁蛋白 (Ferritin of shark liver, SLF) 的蛋白壳却均由单类型亚基组成^[8-10],但如何利用单类型亚基调控铁蛋白的生理功能尚未清楚。隧道结构是由不同或相同的亚基堆积而成,是构成铁代谢和储存等的通道^[11]。铁蛋白释放铁的速率和反应动力学级数转换与蛋白壳自身产生的柔性调节幅度和速率有关^[12,13]。如果适当增加铁释放反应介质的 pH 值,减缓释放铁的速率,使蛋白壳调整速率和释放铁的速率同步时,铁蛋白能以一级反应动力学途径释放铁,不出现反应级数和释放铁速率转换现象。

同一组织来源的铁蛋白的亚基组成类型与结构存在差异,这可能与它们特殊的生理功能有关^[14,15]。胎盘是胎儿和母体进行物质交换的重要器官,当母体和胎儿血型不同时,胎盘既要隔离不同血型的血液,还要作为营养与代谢物质交换的通道,起到分离膜和通道的作用。胎盘组织实际上是一种高效分离与通道的膜组织,具有特殊的物质选择、传递机制。本研究以人胎盘为实验材料,小批量制备 HPMF,选用 MALDI-TOF MS、SDS-PAGE 和 PMF 技术研究 HPMF 结构和亚基类型;采用 ICP-MS 和动力

2010-03-17 收稿; 2010-09-12 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 30870515) 和 973 项目 (No. 2010CB12640) 资助

*E-mail: hqh@xmu.edu.cn

© Editorial Office of Chinese Journal of Analytical Chemistry. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

学方法^[9], 研究 HPMF 铁核组成和释放铁的动力学过程, 了解 HPMF 的结构与功能, 以推测其在胎盘转运铁离子过程中的作用和机制。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

REFLEX III 型 MALDI-TOF 质谱仪(德国 Bruker 公司); JEGM-2010 型透射电镜(日本 JEOL 公司); ICP-MS(加拿大 PE 公司); Cary 50 bio 型紫外可见分光光度计(美国瓦里安公司); 蛋白质分离纯化系统(美国 GE 公司); DYCZ-24DN 和 DYCZ-24A 电泳槽、DYY-6C 电泳仪(北京六一仪器厂); DEAE 52 阴离子交换柱(美国 GE 公司); 高速组织匀浆机(美国 Waring 公司); Fezone 18 冻干机(美国 Labconco 公司); Gel Doc 2000 凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司); 超纯水制备系统(美国 Millipore 公司)。

三氟乙酸(TFA)、乙腈(HPLC 级 德国 Merck 公司); 胰蛋白酶(V5111, Promega 公司); 基质 α -氰-4-羟肉桂酸(HCCA)、基质芥子酸(SA)(美国 ICN 生物医学公司)。马脾铁蛋白(HSF)、二流苏糖醇(DTT)、丙烯酰胺、*N,N*-亚甲基双丙烯酰胺、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)等试剂均购至美国 Sigma 公司。

2.2 HPMF 的分离纯化

取健康孕妇正常分娩后的胎盘, 立即冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。实验前用室温水浴迅速解冻, 清洗干净, 剪切成约 20 g 的小块, 去除血液及凝块。取 100 g 胎盘组织, 加入 250 mL 组织匀浆缓冲液(50 mmol/L *N*-(2-羟乙基)哌嗪-*N'*-2-乙烷磺酸(HEPES), 100 mmol/L KCl, 2 g/L 大豆胰蛋白酶抑制剂, 50 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF), pH 7.4), 以 25000 r/min 高速匀浆 3 次, 每次 5 min。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以 15000 g 离心匀浆液 30 min, 取上清液。沉淀按同样的方法匀浆、离心、收集上清液。合并两次上清液, 温育、离子交换色谱和电泳纯化等操作参考文献[9, 16]的方法进行。

2.3 HPMF 电泳特征及亚基类型分析

将蛋白样品与天然样品缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 0.05% 溴酚兰, 10% 蔗糖, pH 6.7) 以 1:4 (V/V) 混合后, 在 Tris-甘氨酸电泳缓冲液(250 mmol/L Glycine, 25 mmol/L Tris, pH 8.8) 体系中, 进行天然聚丙烯酰胺凝胶(PAGE_N) (3% 浓缩胶, pH 6.7)、15% 分离胶(pH 8.9) 电泳分离, 银染检测蛋白条带, 分析全蛋白电泳特征。

将蛋白样品以 1:4 (V/V) 与 SDS 样品缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 6.7) 2.5% SDS, 0.1% β -巯基乙醇, 0.05% 溴酚兰, 10% 蔗糖) 混合, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min, 离心后, 取上清液, 在 Tris-甘氨酸电泳缓冲液(250 mmol/L Glycine, 25 mmol/L Tris, 0.1% SDS, pH 8.8) 体系中, 进行 SDS-PAGE (3% 浓缩胶, pH 6.7、15% 分离胶, pH 8.9) 电泳, 银染检测蛋白质条带。

染色后的胶片均用 BIO-RAD Gel Doc 凝胶成像系统拍照保存, 并用仪器自带的 Quantity One 软件对各蛋白条带进行光密度积分测量, 计算各蛋白条带相对含量。

2.4 PMF 技术鉴定铁蛋白亚基类型

从 SDS-PAGE 凝胶中分离出各蛋白条带, 参照文献[17, 18]的方法进行肽指纹图谱分析。各亚基对应的 PMF 数据用 MASCOT 软件(<http://www.matrixscience.com>) 在 NCBI 和 SWISS-Port 数据库上进行检索比对。检索参数设置如下: 物种分类设为人类; 消化酶类设为胰酶; 设置半胱氨酸烷基化和甲硫氨酸氧化为固定修饰; 丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸磷酸化设为可变修饰; 最多允许漏切一个位点, 允许质量误差设为 100×10^{-6} ; 显著可信的 ($p < 0.05$) 蛋白鉴定得分为 56^[19]。

2.5 质谱分析 HPMF 亚基解离特征

将蛋白样品与 SA 饱和基质溶液(乙腈-超纯水 6:4 V/V) 混合后, 加入 TFA 至终浓度为 0.1%, 将过量 HCCA 经超声促溶 10 min, 离心后取上清液, 按等体积混合, 取 $1\text{ }\mu\text{L}$ 直接点样于样品靶上, 室温下自然干燥后, 将样品靶放入质谱仪靶箱内, 设置氮激光器紫外波长为 377 nm, 激光电压为 2800 V, 激光强度为 40~50, 正离子电源, DE(Delayed extraction) 线性模式进行检测, 延迟时间为 550 ns, 分子量检测范围 3000~30000 Da。

2.6 透射电镜观察与分析

取蛋白样品 20 μL (100 μg) 滴加到透射电镜专用的 200 目铜网上, 吸附 20 min, 用 2% 磷钨酸负染 10 min, 室温避光干燥 120 min。在 120 kV、5 ~ 10 万放大倍数下观察铁蛋白分子结构并拍照记录。随机测量 100 个蛋白分子的蛋白壳和铁核直径, 以 100 nm 电镜标尺为参照计算实际分子尺寸, SPSS 12.0 对数据进行统计分析。

2.7 ICP-MS 测定 HPMF 的铁磷含量

取 100 μL 充分超滤除盐的蛋白样品, 加入 4900 μL 高纯度浓 HNO_3 , 180 $^\circ\text{C}$ 微波消解 30 min 后, 取适量消解液稀释到 2%, 同时制备 2% HNO_3 溶液为空白对照。用 2% HNO_3 制备铁和磷元素的标准溶液。ICP-MS 测定各待测样品的铁和磷的浓度, 每测定一个样品之前, 用 2% HNO_3 溶液清洗进样管 1 min, 每个样品测定 3 次, 每次读取 5 个数据点, 取平均值。

2.8 铁释放动力学分析

将 1790 μL 抗坏血酸饱和溶液、200 μL α' -联吡啶饱和溶液、10 μL (30 μg) 充分超滤除盐的蛋白样品, 顺序加入已充满高纯氮气的厌氧比色杯中, 迅速混合均匀, 立即用紫外可见分光光度计测定铁释放规律。检测波长设为 520 nm, 每隔 1 min 测定一次吸收值, 直到吸收值趋于平稳。同时, 制备 2.0, 4.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0, 18.0, 和 20.0 mg/L 的 Fe^{2+} 标准液, 以上相同体系测定 520 nm 的吸收值, 制备 Fe^{2+} 浓度标准曲线。通过标准曲线计算各时间点每分子铁蛋白释放铁离子累积量。铁蛋白释放铁动力学曲线和模式的计算参照文献 [20]。

3 结果与讨论

3.1 HPMF 透射电子显微镜图

铁蛋白由蛋白壳(直径为 11 ~ 13 nm)、铁核(4 ~ 6 nm)和横跨蛋白壳(0.4 ~ 0.7 nm)的物质交换隧道组成, 其中铁蛋白位于蛋白壳的中心区域, 具有高电子密度特征, 使铁蛋白在透射电子显微镜下, 显示出铁蛋白的分子结构的基本特征, 并一直作为鉴定铁蛋白的主要依据。图 1A 和图 1B 分别是 HPMF 和 HSF 的透射电子显微镜图谱, 可以清楚看出, HPMF 和 HSF 均显示相同的分子结构特征, 即铁核(深色黑球)位于蛋白壳(高亮白色环状)中心区域中, 这与文献 [1 ~ 4] 报道的铁蛋白的 TEM 图一致。比较分析发现, 图 1B 中的绝大多数铁蛋白铁核之间的黑色着色度极为相似, 说明 HSF 铁核中的含铁量很接近; 图 1A 中多数 HPMF 铁核显示的黑色着色度明显低于 HSF, 仅有少部分 HPMF 与 HSF 的铁核含铁量较为接近。这些差异现象说明, 在 HPMF 样品中, 蛋白壳包裹着至少两种含铁量明显不同的铁核, 其中含铁量低的 HPMF 占大多数。进一步比较分析发现, HPMF 的蛋白壳和铁核直径均显著小于 HSF, 测定结果见表 1。从表 1 可见, 无论 HSF 的蛋白壳和铁核的分子直径均大于 HPMF, 这说明 HSF 铁核含铁和无机磷酸盐的量明显高于 HPMF。为了证实此点, 采用 ICP-MS 技术分别测定 HPMF 和 HSF 铁核的元素组成, 发现 HPMF 含铁量很低, 只有 $(84.8 \pm 7.4) \text{Fe}^{3+}/\text{HPMF}$, 其含铁量仅为 HSF ($(2055.7 \pm 13.7) \text{Fe}^{3+}/\text{HSP}$) 约 1/24, 可以认为 HPMF 储存铁能力和数量很有限。此外, HPMF 铁核中的 $\text{Fe}^{3+}/\text{P}_i$ ($85\text{Fe}^{3+}/15\text{P}_i$) 比值为 5.72 ± 0.32 , 低于由 H 和 L 亚基组成的 HSF 铁核的 $\text{Fe}^{3+}/\text{P}_i$ ($2055\text{Fe}^{3+}/227\text{P}_i$) 比值 (9.07 ± 0.44), 但却高于由单类型亚基且高无机磷酸盐组成的细菌铁蛋白铁核的 $\text{Fe}^{3+}/\text{P}_i$ ($2000\text{Fe}^{3+}/1667\text{P}_i$) 的比值 (1.2) [12]。推断这些异常的铁核组成, 尤其是无机磷酸盐, 很可能与 HPMF 的特殊亚基类型组成及其复杂的生理功能有关, 它不仅具备由双类型亚基组成的 HSF 的特点, 同时含有类似单类型亚基组成的 BF 的特性。

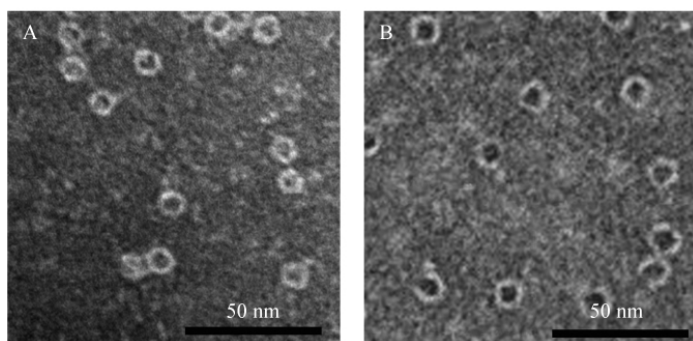


图1 铁蛋白透射电子显微镜图

Fig.1 Transmission electron microscopic map of ferritin

A: Membrane ferritin of human placenta (HPMF); B: Horse spleen ferritin (HSF).

4) $\text{Fe}^{3+}/\text{HPMF}$, 其含铁量仅为 HSF ($(2055.7 \pm 13.7) \text{Fe}^{3+}/\text{HSP}$) 约 1/24, 可以认为 HPMF 储存铁能力和数量很有限。此外, HPMF 铁核中的 $\text{Fe}^{3+}/\text{P}_i$ ($85\text{Fe}^{3+}/15\text{P}_i$) 比值为 5.72 ± 0.32 , 低于由 H 和 L 亚基组成的 HSF 铁核的 $\text{Fe}^{3+}/\text{P}_i$ ($2055\text{Fe}^{3+}/227\text{P}_i$) 比值 (9.07 ± 0.44), 但却高于由单类型亚基且高无机磷酸盐组成的细菌铁蛋白铁核的 $\text{Fe}^{3+}/\text{P}_i$ ($2000\text{Fe}^{3+}/1667\text{P}_i$) 的比值 (1.2) [12]。推断这些异常的铁核组成, 尤其是无机磷酸盐, 很可能与 HPMF 的特殊亚基类型组成及其复杂的生理功能有关, 它不仅具备由双类型亚基组成的 HSF 的特点, 同时含有类似单类型亚基组成的 BF 的特性。

表 1 铁蛋白蛋白壳和铁核分子尺寸

Table 1 Molecular size of both shell and iron core in ferritin

铁蛋白 Ferritin	蛋白壳分子直径 Molecular diameter of shell (nm)	铁核分子直径 Molecular diameter of core (nm)	核与蛋白壳直径比 Ratio of core to shell
HSF	11.09 ± 0.79	5.53 ± 0.89	0.471 ± 0.063
HPMF	9.41 ± 0.59*	4.77 ± 0.36*	0.480 ± 0.036

* : 极显著差异 (Significant difference)。

3.2 HPMF 亚基的类型 (SDS-PAGE 方法)

近期的研究已指出,PSF、HSF 和鲑鱼肝铁蛋白 (Liver ferritin of *dasyatis akajei*, DALF) 均由 H 和 L 亚基组成^[4],而 SLF 却有单类型亚基组成。参考本课题组已建立的 SDS-PAGE 方法研究 HPMF 的亚基类型,获得小批量制备 HPMF 的天然 PAGE 图谱(图 2B) 和其 SDS-PAGE 亚基类型图谱(图 2A)。从图 2B 可见,HPMF 和 HSF 均呈现出单一电泳条带,而且两者的电泳迁移率相似。此实验结果说明提取的 HPMF 和 HSF 样品已达到电泳纯,且蛋白质分子量比较接近。但从图 2A 却发现,HPMF 和 HSF 呈现明显不同类型的亚基,HSF 呈现出 3 条亚基蛋白质条带,其分子量约为 21 kDa (H 亚基),19 kDa (L 亚基) 和 15 kDa (Segment subunit, S 亚基),其中 S 亚基含量高于 H 亚基,但却明显低于 L 亚基。值得注意的是,HSF 样品中 S 亚基是否归属于 HSF 的新亚基类型或属于 H 或 L 亚基的降解产物,尚不清楚。进一步分析发现,HPMF 呈现两条亚基蛋白质带,其分子量约为 20 和 15 kDa,分别称为 MF₂₀ 和 MF₁₅ 亚基。根据 Quantity One 软件对各蛋白条带的光密度积分测算, MF₁₅ 亚基蛋白含量约为 MF₂₀ 亚基的 3 倍。同样, MF₁₅ 亚基是 MF₂₀ 的分解产物还是独立的亚基,至今尚不清楚,必须采用其它分析技术进一步佐证,这对揭示和理解 HPMF 结构与功能极为重要。

3.3 HPMF 亚基类型 (MALDI-TOF MS 技术)

在自然界中,绝大多数铁蛋白均由 24 个亚基且以高对称方式堆积成含有空腔结构的蛋白壳,该异常的分子结构使铁蛋白表现较强的热和极端 pH 稳定性,即在 pH 2 ~ 10、水温低于 75 °C 和高盐浓度条件下不变性^[21],但在混有有机溶剂乙腈或丙酮条件下,细菌铁蛋白和海兔肝铁蛋白亚基将产生解离现象,但没有发现有分子量约 15 kDa 的 S 亚基或亚基的分解产物^[8, 22]。在有机化合物芥子酸(基质)辅助下和三氟乙酸作用下,来自 MALDI-TOF 质谱仪的激光能解离 BF 和 ALF 蛋白壳中部分不稳定的亚基为亚基离子,但供质谱分析未发现 S 亚基。选用类似的 MALDI-TOF 质谱技术直接测定 HPMF 亚基类型和亚基之间的相互作用强度(图 3)。由图 3 可见,来自 HPMF 的 5 个特征质谱峰分别为 m/z 5071.25, 9962.51, 15131.55 (MF₁₅), 19936.40 (MF₂₀) 和 20147.61。此外, MF₁₅ 对应的质谱峰绝对强度

小于 MF₂₀ 亚基。借鉴图 2 结果,对图 3 中的质谱峰(从左到右)进行比对分析,初步推测它们对应的亚基分子式为 $[MF_{15}]^{3+}$, $[MF_{20}]^{2+}$, $[MF_{15}]^{+}$, $[MF_{20}]^{+}$ 和 $[MF_{20+Fe}]^{+}$ 。在解离成亚基离子的过程中,亚基可能带有少量的铁离子,直接影响亚基离子化数量,从而降低质谱的绝对信号强度。大量实验已证实,多数哺乳动物铁蛋白的蛋白壳均由 24 个 H 和 L 亚基组成,两种亚基之间的相互作用类型有 H-H、L-H 和 L-L, H/L 亚基比值直接反映蛋白壳中 H 和 L 含量的差异^[2, 9]。图 2 表明,HPMF 中的 $[MF_{15}]^{+}$ 亚基的蛋白含量明显高于 $[MF_{20}]^{+}$ 亚基,但图 3 中所显示的 $[MF_{15}]^{3+}$ 和 $[MF_{15}]^{+}$ 对应质谱峰的绝对强度总

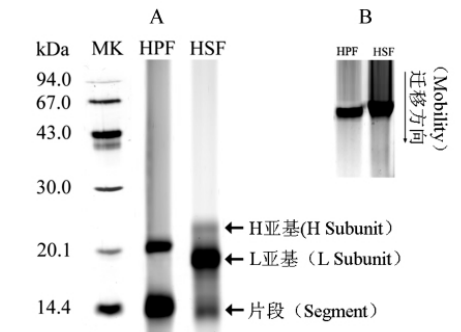
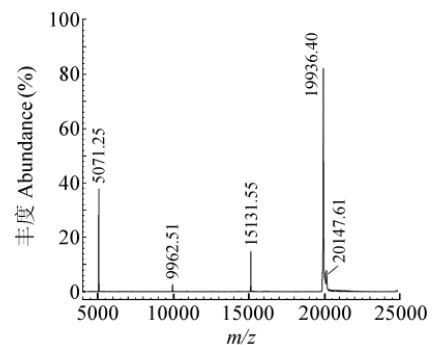
图 2 铁蛋白 PAGE_N和 SDS-PAGE 图谱Fig. 2 Ferritin map separated with both PAGE_N and SDS-PAGE methodsA: SDS-PAGE; B: PAGE_N.

图 3 HPMF 亚基质谱图

Fig. 3 Mass spectrum of subunits in membrane ferritin of human placenta (HPMF)

和明显低于 $[MF_{20}]^{2+}$, $[MF_{20}]^+$ 和 $[MF_{20+Fe}]^+$ 亚基, 即 $[MF_{15}]^+$ 亚基离子化且能够被质谱检测的相对数量偏少。如果没有 Fe^{3+} 干扰, 其 $[MF_{20}]^+$ 亚基质荷比的绝对强度总和将更高。这说明在 HPMF 蛋白壳亚基中, $[MF_{15}]-[MF_{15}]$ 和 $[MF_{15}]-[M_{20}]$ 相互作用强度大于 $[MF_{20}]-[MF_{20}]$ 不易被解离成亚基离子, 只有部分的 $[MF_{20}]-[MF_{20}]$ 和少量 $[MF_{20}]-[MF_{15}]$ 亚基被解离且转换成亚基离子, 被质谱检测到。图 2 表明, HSF 的 L 亚基蛋白质含量明显高于 H 亚基, 但获得质谱图中的 L 亚基质谱峰的绝对强度仅为 H 亚基的 5% 或更低, 未发现 S 亚基质谱峰^[8,9]。这说明了 HSF 亚基中的 L-L 和 L-H 的相互作用强度同样明显高于 H-H 亚基, 不易解离成亚基离子, 产生的 L 亚基质谱峰强度极低, 不易被检测。不同来源铁蛋白的蛋白壳中的 H 和 L 亚基含量可能不同, 亚基组成和亚基之间的相互作用强度的差异化与铁蛋白在不同生物组织中执行不同的释放和储存铁的速率有关, 也与机体各组织对铁的供给速率的不同需求有关。不同来源的铁蛋白, 不仅亚基类型不一样, 其亚基的一级结构也存在明显差异, 从而引起亚基之间相互作用强度的不同。采用 MALDI-TOF 质谱技术研究蛋白质不同或相同亚基之间的相互作用强度仍然是一项挑战性工作, 是否具有特殊性或广谱性, 还有待于进一步佐证。

为进一步证实 HPMF 中的 $[MF_{15}]$ 亚基是属于 L 或 H 亚基类型, 采用 PMF 技术对 SDS-PAGE 分离的 $[MF_{15}]$ 和 $[MF_{20}]$ 对应蛋白条带进行鉴定, 获得肽质量指纹图谱(图 4)。从图 4 可直观看出, $[MF_{15}]$ 和 $[MF_{20}]$ 亚基所显示的肽质量质谱峰的数目和对应质荷比值很相似, 只有少量的细微差别。经相关数据库检索和比对分析后, 发现这两种亚基均与人铁蛋白 L 亚基具有较高的同源性, HPMF 中的 $[MF_{15}]$ 亚基实际上是不完整的 $[MF_{20}]$ 亚基, 即称为小 $[MF_{20}]$ 亚基。针对此鉴定结果, 推断 HPMF 由单类型但分子量不同的亚基组成, 其中 $[MF_{15}]$ 亚基数比例较高, 并有可能影响铁蛋白的生理功能。HPMF 铁核的铁和无机磷酸盐含量极低, 可能与 HPMF 亚基主要由 $[MF_{15}]$ 构成有关。释放铁动力学研究将有助于了解 HPMF 亚基结构与功能。

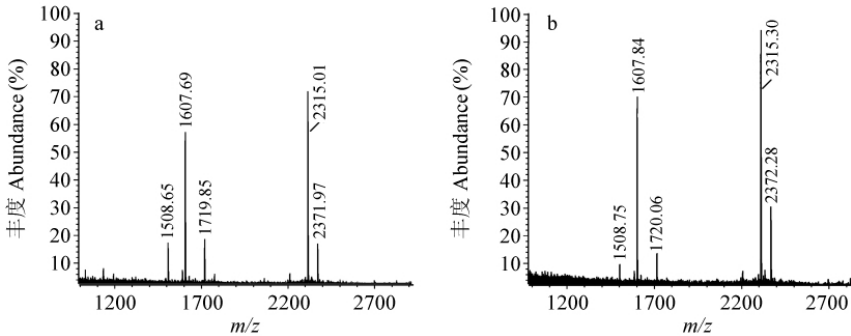


图 4 HPMF 亚基肽质量指纹图谱

Fig. 4 Peptide mass fingerprinting (PMF) of HPMF subunits

a $[MF_{20}]$ 亚基 ($[MF_{20}]$ subunit); b $[MF_{15}]$ 亚基 ($[MF_{15}]$ subunit)。

3.4 释放铁动力学研究

近期研究表明, 无论是由单类型组成的 BF 和 SLF, 还是由 H 和 L 亚基双类型组成的 HSF 和 PSF, 它们的铁核含铁量均大于 $1600 Fe^{3+}/\text{Ferritin}$, 释放铁的全过程均呈现不同速率变化的复杂动力学过程和不同反应动力学级数, 其主要原因在于铁蛋白释放铁过程受蛋白壳亚基之间柔性调控的幅度和速率有关, 但与铁蛋白亚基类型无关。当蛋白壳调节速率和释放铁的速率不协调时, 释放铁的速率将受到影响。当略增加反应介质的 pH (pH 8.0) 时, 能够使释放铁的速率与蛋白壳柔性调控幅度始终保持一致, 不再发生释放铁速率的转换和形成两种不同动力学级数, 铁蛋白释放铁的全过程遵循一级反应动力学途径^[13,22]。

图 5A 是在生理 pH 条件下 HPMF 释放铁的全过程。反应时间约为 750 min, HPMF 平均释放 Fe^{3+} 的速率为 0.113/min, 比 PSF 快速释放铁阶段的速率 (500/min) 慢数千倍, 比 PSF 慢速释放 Fe^{3+} 的速率 (11/min) 慢近百倍。根据铁蛋白铁核中磷铁比例的变化, 铁核可明显的分为铁核表层和铁核内层, 释放铁核表层的铁的速率明显大于铁核内层。HPMF 释放铁的速率极慢的原因在于含铁量少且多数络合

在蛋白壳空腔的亚基上,使释放铁的过程中受到蛋白壳亚基柔性调节速率的限制。此外,HPMF 蛋白壳亚基主要由 $[MF_{15}]$ 亚基组成,其蛋白壳亚基柔性调节速率慢于 L 亚基,因此形成极慢的释放铁动力学全过程。参考图 5A 的结果,并代入一级动力学作图,可获得图 5B。从图 5B 可见,释放铁的速率未出现转折现象,遵循一级反应动力学过程,即 HPMF 以一级反应动力学途径释放铁核中的铁,不产生反应级数转换,释放铁的全过程受该蛋白的蛋白壳调控^[8, 22],此新颖的释放铁全过程不同于其它铁蛋白。推测这种慢速释放铁方式可能与胎儿从胎盘中接受铁离子的特殊途径有关。

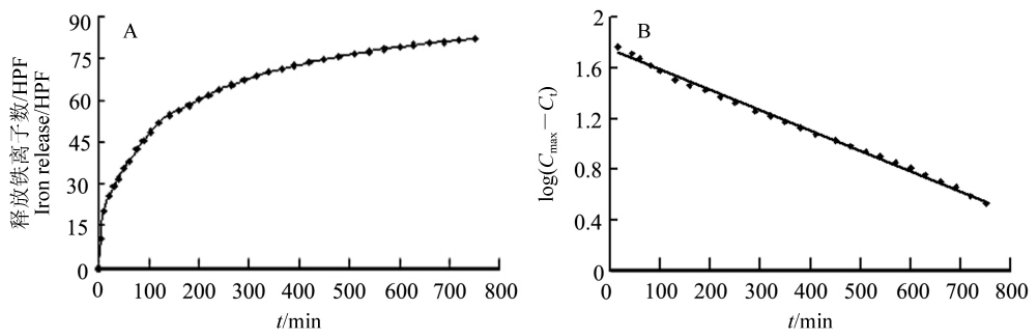


图 5 HPMF 释放铁的动力学过程

Fig. 5 Kinetic process of iron release in HPMF

A. HPMF 释放铁的全过程 (Process of iron release in HPMF); B. 参考图 5A 结果,以一级反应动力学方式作图 (Plot of $\log(C_{\max} - C_t)$ against reaction time as determined in Fig. 5A)。

3.5 人胎盘膜铁蛋白参与转铁的模式

缺铁性贫血是最常见的营养缺陷性疾病之一,母体提供充足的铁源给胎儿是确保胎儿健康发育,减少产生畸形和死亡率的关键因素之一。大量研究发现,在胎盘微绒毛膜上存在大量的转铁蛋白受体 (Transferrin receptor, TfR) 和铁蛋白受体 (Ferritin receptor, FnR) 等铁代谢相关蛋白。胎盘铁转运是一个相当复杂的过程,主要包括铁从母体血液循环转入到胎盘和从胎盘转出到胎儿血液循环,此过程涉及了铁的转入和转出机制。随着对肠道铁代谢研究的深入,一些参与铁代谢的重要蛋白质陆续被发现,包括铁调节蛋白 (Iron regulation protein, IRP)、铁蛋白、转铁蛋白和膜铁转运蛋白 1 (Ferroportin 1, FPN1) 等。研究表明,胎盘从母体血液中吸收铁离子主要通过转铁蛋白及其受体介导的内吞途径,和透过铁蛋白及其受体介导的内吞途径。但胎盘与胎儿之间铁转运途径、机理和是否含有铁离子通道结构等均不清楚。

建立在前人有关胎盘转运铁的机理和本研究有关 HPMF 理化特性研究的基础上,本研究提出 HPMF 在胎盘中参与转运铁和储存铁途径的工作模型 (见图 6),具体机理和途径如下:

(1) 实验步骤 A ~ F: 母体血液中的游离铁络合于转铁蛋白 (Tf) 上; 转铁蛋白被胎盘基底膜上的转铁蛋白受体识别; 通过形成内吞小体的方式,将含铁转铁蛋白运入膜内,质子泵将 H^+ 泵入内吞小体,降低其 pH 值,导致转铁蛋白释放铁离子,同时 Fe^{3+} 被还原为 Fe^{2+} ,在二价金属转运体 (Divalent metal transporter, DMT) 的作用下将 Fe^{2+} 释放到合体滋养层细胞中,脱铁的转铁蛋白 (Apo-Tf) 又被受体送回母体血液中,继续下一轮运铁^[23]。(2) 实验步骤 G ~ I: 胎盘合体滋养层细胞中的膜铁蛋白 (HPMF) 负责储存过剩的 Fe^{3+} ,并利用 MF_{20} (类似人铁蛋白 L 亚基结构) 亚基识别绒毛膜母体侧的膜铁蛋白受体,由铁蛋白受体负责把铁蛋白转运入膜细胞内。(3) 实验步骤 J ~ L: 绒毛膜细胞中携铁的膜铁蛋白 (HPMF) 通过其 $M15$ 亚基与绒毛膜细胞胎儿侧上的铁蛋白受体识别结合,在膜铁转运蛋白复合体和铁释放蛋白复合体 (Hephaestin 蛋白, Ceruloplasmin 蛋白, Ferroportin1 蛋白, DMT 蛋白等组成)^[24] 的协助下,释放铁离子到胎儿血循环中,并将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} (这可能由 Hephaestin 蛋白或 Ceruloplasmin 蛋白完成),与胎儿血循环中的转铁蛋白络合,由转铁蛋白负责转运铁给胎儿组织或细胞,合成含铁的酶蛋白。(4) 实验步骤 M ~ N: 已释放铁的膜铁蛋白 (HPMF) 再次返回到合体滋养层细胞中,并为下次储存铁和转运铁做准备。

根据上述的从母体到胎儿之间转运铁模型与途径的描述,推测 HPMF 蛋白壳由 MF_{15} 和 MF_{20} 组成,

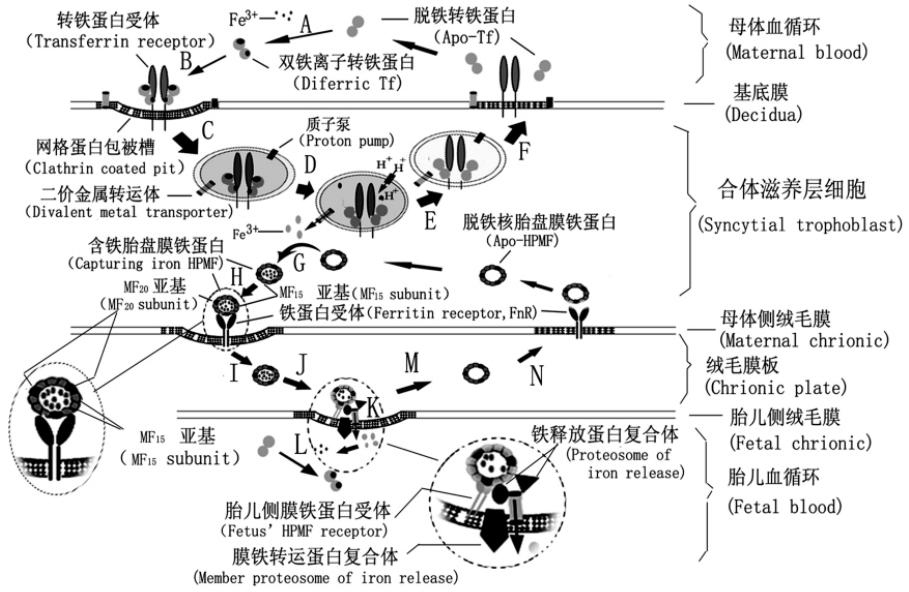


图 6 胎盘转运铁机理的模型

Fig. 6 A model of mechanism of transporting iron from mother to fetus

它的重要生理功能在于识别来自胎盘母体侧与胎儿侧的铁蛋白受体,使铁转运从母体输送给胎儿过程中不出现差错,正确地实施输铁途径。HPMF 不仅起到储存和释放铁的作用,同时也参与了母体和胎儿之间的铁转运,推测是胎盘铁离子通道的关键蛋白质。MF₁₅不仅是 HPMF 主要且必须的亚基类型,在转运铁给胎儿方面起着比 MF₂₀亚基更重要的作用。

References

- Hamburger A E , West Jr A P , Hamburger Z A , Hamburger P , Bjorkman P J. *J. Mol. Biol.* , **2005** , 349(2) : 558 ~ 569
- Suryakala S , Deshpande V. *Veterinary Res. Comm.* , **1999** , 23(3) : 165 ~ 181
- Huang H Q , Cao T M , Lin Q M. *Environ. Sci. Technol.* , **2004** , 38(8) : 2476 ~ 2481
- HUANG He-Qing , HU Xiao-Hui , FANG Xue-Ping , CAO Ting-Ming , KONG Bo(黄河清 , 胡晓慧 , 方雪萍 , 曹庭明 , 孔波) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2009** , 37(5) : 631 ~ 635
- Li C R , Hu X S , Zhao G H. *Biochimie.* , **2009** , 91(2) : 230 ~ 239
- Hempstead P D , Yewdall S J , Ferrie A R , Lawson D M , Artumiuk P J , Rice D W , Ford G C , Harrison P M. *J. Mol. Biol.* , **1997** , 268(2) : 424 ~ 448
- Cho K J , Shin H J , Lee J H , Kim K J , Park S S , Lee Y , Lee C , Park S S , Kim K H. *J. Mol. Biol.* , **2009** , 390(3) : 83 ~ 98
- HUANG Lin , CHEN Xu , LUO Lian-Zhong , LIN Qing , HUANG He-Qing (黄琳 , 陈旭 , 罗联忠 , 林青 , 黄河清) , *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2008** , 36(8) : 1045 ~ 1050
- CHEN Ping , HUANG He-Qing , LIN Qing-Mei , CHEN Xu , HUANG Hui-Ying(陈平 , 黄河清 , 林庆梅 , 陈旭 , 黄慧英) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2007** , 35(5) : 667 ~ 671
- HU Ju , LIAO Xia-Yun , DENG Jian-Jun , HU Xiao-Song , ZHAO Guang-Hua (胡菊 , 廖夏云 , 邓建军 , 胡小松 , 赵广华) . *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报) , **2009** , 30(10) : 2003 ~ 2008
- Harrison P M , Arosio P. *Biochim. Biophys. Acta* , **1996** , 1275(3) : 161 ~ 203
- Richard T D , Pitts K R , Watt G D. *J. Inorg. Biochem.* , **1996** , 61(1) : 1 ~ 13
- Kong B , Huang H Q , Lin Q M , Kim Q S , Cai Z , Cao T M , Miao H , Luo D M. *J. Prot. Chem.* , **2003** , 22(1) : 62 ~ 70
- Ahmad S , Kitchin K T , Cullen W R. *Toxicol. Letters* , **2002** , 133(1) : 47 ~ 57
- Dong X P , Cgen X , Mills E , Delling M , Wang F , Kurz T , Xu H. *Nature* . **2008** , 455(7215) : 992 ~ 996
- Kong B , Huang H Q , Lin Q M , Cai Z , Chen P. *Applied Biochem. Biotechnol.* , **2005** , 126(2) : 133 ~ 148
- Natarajan S , Xu C P , Caperna T J , Garrett W M. *Anal. Biochem.* , **2005** , 342(2) : 214 ~ 220

- 18 Distler A M , Kerner J , Peterman S M , Hoppel C L. *Anal. Biochem.* , **2006** , 356(1) : 18 ~ 29
- 19 Shen W Y , Liu H , Yu N Y. *J. Proteome Res.* , **2007** , 6(12) : 4737 ~ 4748
- 20 Huang H Q , Lin Q M , Kong B , Zeng R Y , Qiao Y H , Chen C H , Zhang F Z , Xu L S. *J. Protein Chem.* , **1999** , 18(4) : 497 ~ 504
- 21 Stiefel E I , Watt G D. *Nature* , **1979** , 279(5708) : 81 ~ 83
- 22 HUANG Lin , CHEN Xu , LIN Qing , ZHU Bin-Lin , HUANG He-Qing (黄琳 , 陈旭 , 林青 , 朱斌琳 , 黄河清) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2007** , 35(12) : 1745 ~ 1750
- 23 Bastin J , Drakesmith H , Rees M. , Sargent I. *Br. J. Haematol.* , **2006** , 134 (5) : 532 ~ 543
- 24 Vulpe C D , Kuo Y M , Murphy T L. *Nat. Genet.* , **1999** , 21(2) : 195 ~ 199

Functions of Double Subunits of a Type , Structure of Iron Core , and Kinetics of Iron Release from Membrane Ferritin of Human Placenta

LUO Lian-Zhong^{1 2} , JIN Hong-Wei¹ , CAI Zong-Wei³ , HUANG He-Qing^{* 1 2}

¹(Department of Biochemistry and Biotechnology , School of Life Science , Xiamen University , 361005)

²(State Key Laboratory of Marine Environmental Science , Xiamen University , Xiamen 361005)

³(Department of Chemistry , Hong Kong Baptist University , Hong Kong)

Abstract As an experimental material of human placental tissue , membrane ferritin of human placenta (HPMF) with electrophoresis purity was prepared in batch. SDS-PAGE approach reveals that the protein shell consists of double subunits of a type in HPMF , which the molecular weights of both subunits were calculated to be approximately 15 and 20 kDa respectively , named MF₁₅ and MF₂₀. In addition , the protein content of MF₁₅ is about three times more than that of M₂₀ in SDS-PAGE gel. Using the approach of peptide mass fingerprinting (PMF) , both MF₁₅ and MF₂₀ subunits were identified to show the high homology with reference to L subunit of human ferritin , pointing out that HPMF was a novel ferritin of two subunits involving in single type and different molecular weight. Using a matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry to investigate the subunit-stability of HPMF , five mass peaks corresponding ratio (*m/z*) of mass to charge such as 5071. 25 , 9962. 51 , 15131. 55 (MF₁₅) , 19936. 40 (MF₂₀) and 20147. 61 were indicated to have five subunit formula of [MF₁₅]³⁺ , [MF₂₀]²⁺ , [MF₁₅]⁺ , [MF₂₀]⁺ and [MF_{20+Fe}]⁺ , respectively. Using inductively coupled plasma-mass spectrometry to analyze the elemental composition of HPMF , only 85 Fe³⁺ and 15 inorganic phosphate (P_i) in the iron core of per molecular of HPMF were found , which was significantly lower than that of most mammal ferritins , but higher than that of bacterial ferritin (BF) . Kinetic studies showed that iron release from the complete HPMF followed the law with first-order reaction , which also differed from that with two different rates in mammal ferritins. In addition , the time of the iron release completely needed about 750 min in human placental membrane ferritin (HPMF) , which was longer than 60 min in both horse spleen ferritin (HSF) and pig pancreatic ferritin (PPF) . Accordingly , based on the difference of structure and function among HPMF , mammalian ferritins , plant ferritins , and BF , we proposed M₁₅ and M₂₀ subunit play different role in iron transporting from maternal blood to fetal blood.

Keywords Human placental member ferritin; Single subunit type; Subunit function; Iron transporting model; Structure and function

(Received 17 March 2010; accepted 12 September 2010)