

中国生物无机化学 十年进展

王夔 韩万书 主编

高等教育出版社

(京)112 号

图书在版编目(CIP)数据

中国生物无机化学十年进展/王夔,韩万书主编.-北京:高等教育出版社,1997.8

ISBN 7-04-006288-7

I.中… II.①王… ②韩… III.生物化学:无机化学-进展 IV.Q5

中国版本图书馆CIP数据核字(97)第08923号

*

高等教育出版社出版

北京沙滩后街55号

邮政编码:100009 传真:64014048 电话:64054588

新华书店总店北京发行所发行

印刷厂印装

*

开本 850×1168 1/32 印张 7.375 字数 190 000

19 年 月第 版 19 年 月第 次印刷

印数 0001—

定价 20.00 元

凡购买高等教育出版社的图书,如有缺页、倒页、脱页等质量问题者,请与当地图书销售部门联系调换

版权所有,不得翻印

责任编辑	耿承延
封面设计	李卫青
责任绘图	吴文信
版式设计	杨凤玲
责任校对	李 陶
责任印制	

目 录

前言

1. 金属离子(配合物)与生物分子的作用	(1)
1.1 顺铂抗癌作用的化学基础	(1)
1.2 稀土元素生物无机化学	(19)
1.3 分子识别与离子探针	(32)
1.4 金属离子与大分子结合引起的后续效应	(45)
1.5 生物大分子参与的配体竞争金属离子的反应	(52)
1.6 金属催化大分子断裂	(64)
2. 金属蛋白与金属酶	(75)
2.1 细胞色素	(75)
2.2 金属硫蛋白	(95)
2.3 金属酶的化学模拟	(110)
2.4 酶的修饰及固定化	(122)
2.5 硒蛋白及硒多糖	(129)
2.6 金属辅酶	(136)
3. 金属离子与细胞相互作用	(149)
3.1 仿生膜的生物无机化学	(149)
3.2 细胞对重金属配合物的摄入	(162)
3.3 金属离子与细胞骨架蛋白的作用及其对细胞骨架的影响 ...	(175)
3.4 金属离子与细胞的相互作用(总结)	(183)
4. 其它	(193)
4.1 生物矿化	(193)
4.2 环境生物无机化学	(209)
5. 展望	(219)
附:国家自然科学基金资助的生物无机化学项目(1986—1996)	
.....	(223)

前 言

国家自然科学基金委员会已成立十周年,在自然科学基金支持下,无机化学学科的重要新兴分支学科“生物无机化学”获得了100多个项目的资助,取得了一些有份量的研究成果,培养了一批中青年人才。为了反映、展示、交流本分支学科取得的成绩,促进其更快的发展,特邀部分参加研究工作的科学家撰写了这本《中国生物无机化学十年进展》。

《进展》不只是简单的成果汇报,也不是一般的生物无机化学教科书,它是以自然科学基金资助项目研究成果为主的综述性著作,其中包括了当今本分支学科发展现状与趋势的简要叙述。从整体上力求其内容既有创新性,又有知识性。

无机化学与生命科学的深入交叉产生了生物无机化学,这是当前十分活跃的分支学科,其基金项目数量约占无机化学项目总数的三分之一。从近几年的项目立项情况看,学术思想及研究方法的创新性有明显提高;有关生物功能大分子的研究内容有所增加;加强了分子水平及细胞水平的研究;一些项目进入了应用性探索研究。这说明,我国生物无机化学正在向深层次发展。但是,我们也应注意到尚有不少方面与国际水平有差距。生物无机化学的研究应该更上一层楼。最关键的是提高选择课题的质量,提出新颖的课题,突出创新性,减少跟踪,避免低水平重复。创新是基金项目的灵魂,也是检验资助成败的首要标准。

愿本《进展》的出版能促进我国生物无机化学的深入发展,鼓励创新项目的提出,获得高层次的研究成果,逐渐形成我国的研究

优势与特色,为无机化学乃至整个化学科学的发展作出贡献。

国家自然科学基金委员会化学科学部

韩万书

1997 年 4 月

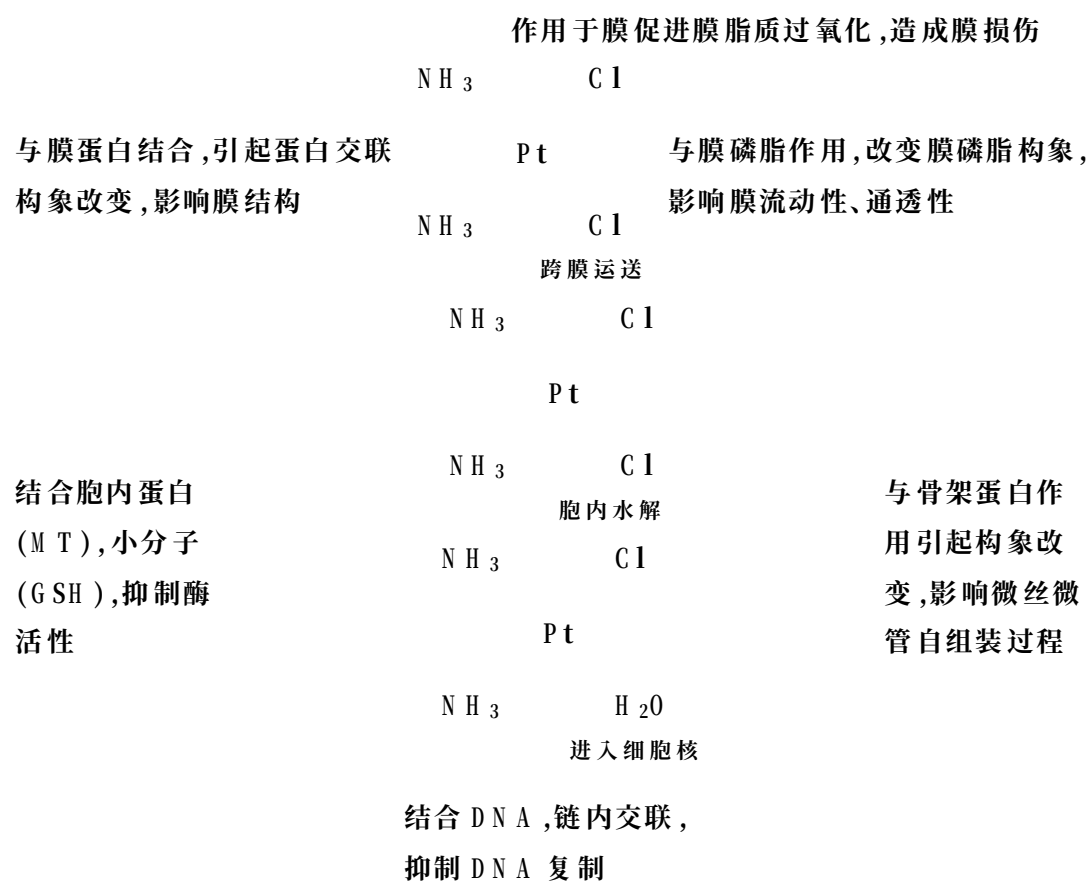
1. 金属离子(配合物)与生物分子的作用

1.1 顺铂抗癌作用的化学基础

近年来,人们开始注意到虽然 DNA 是顺铂的关键靶分子,但不是唯一靶分子。早在 10 年前 Slater^[1]曾提出要注意顺铂对细胞膜及膜结合酶的影响,而 Sorenson 等^[2]的实验结果也提示了顺铂与 DNA 以外靶分子的反应对杀伤细胞的作用。用 $0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的顺铂处理 CHO/UV 41 细胞株 2 h 后发现 50% 的细胞死亡,但是当增加顺铂浓度到 $0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 处理 12 h 后仍然观察不到对 DNA 合成的抑制作用发生。这一实验表明顺铂在造成细胞死亡和 DNA 合成抑制之间不是简单的关系。尽管目前我们还不能分辨顺铂与 DNA 以外靶分子作用对于抗癌活性、毒性以及耐药性各方面的分别贡献如何,但是不能忽视这些靶分子的存在。

王夔曾提出金属-细胞相互作用的多靶模型^[3],这一概念的建立主要受益于对顺铂与细胞相互作用的多方面性的启发,也为后来更多的实验事实支持。由于铂具有一般金属的属性(能发生配体取代、氧化还原反应和静电相互作用),因此从细胞表面到细胞内存在有多种能与之作用的生物分子。当它向细胞进攻时,从接近细胞表面到深入染色体过程中必然与多种可与之作用的生物分子相遇,而细胞对铂配合物的反应是一系列化学事件的总体表现。细胞中的蛋白质、膜蛋白及磷脂都有可能成为靶分子。根据我国生物无机化学家近 10 年的研究,可以把顺铂药物与细胞的相互作用以

下图表示。



近年来北京医科大学天然药物和仿生药物国家重点实验室在铂配合物与细胞膜、膜磷脂、膜蛋白及肌动蛋白作用方面,南京大学配位化学国家重点实验室在顺铂和金属硫蛋白的体内外作用以及顺铂和核酸组成物及多聚核苷酸作用方面做了系统工作,分别取得有意义的新结果。

1.1.1.1 铂配合物与细胞膜磷脂和蛋白的相互作用

(1) 铂配合物与膜蛋白及磷脂结合的比较

王夔等用实验证实了细胞膜是细胞外金属配合物进攻的前沿,膜结合分子如磷脂和蛋白是首先受到攻击的靶分子,金属离子与膜分子的结合是首先发生的事件^[4]。当顺铂进攻细胞时,在膜上结合的可能位点及键合方式如表 1.1- 1 所示。

表 1.1- 1 细胞膜上潜在的金属结合位点及键合方式

靶分子	结合位点	键合性质
磷 脂	$-\text{NMe}_3^+ - \text{PO}_4^-$ $-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_3^+$	静电作用 配位作用
膜蛋白	$-\text{SH}$, $-\text{SCH}_3$, $-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_2$ $-\text{CONH}_2$	共价和配位结合
糖	$-\text{OH}$	配位结合
胆固醇	$-\text{OH}$	配位结合

以红细胞为模型膜的研究结果表明顺铂与膜结合,24 h 后结合达到平衡^[5]。测得顺铂与膜蛋白结合常数为 $10^4 \text{ L/mol} \sim 10^6 \text{ L/mol}$ (两类结合部位),而与脂质体的结合常数只有 10^2 L/mol 。用荧光淬灭方法比较结合常数,说明膜蛋白的结合常数明显大于 DPPC 脂质体的结合常数。因此认为铂配合物优先与膜蛋白结合^[4]。顺铂与小鼠艾氏腹水癌细胞和白血病细胞质膜的结合常数分别为 $K_1 = 1.35 \times 10^5 \text{ L/mol}$, $K_2 = 2.5 \times 10^3 \text{ L/mol}$ ^[6] 和 $K_1 = 3.20 \times 10^6 \text{ L/mol}$, $K_2 = 1.39 \times 10^5 \text{ L/mol}$ 。与红细胞膜相近,说明铂主要与膜蛋白结合。

(2) 以膜结合蛋白为靶分子

在顺铂与膜作用过程中,最重要的事件是与膜蛋白作用。铂化合物与蛋白质结合最直接、最明显的证据是膜巯基含量的降低^[5,7]。红细胞膜蛋白的巯基能够淬灭醋酸汞荧光素的荧光,顺铂可以减小淬灭作用,且顺铂浓度越高,淬灭作用越弱,说明顺铂存在下膜蛋白的自由巯基数下降。顺铂对人红细胞和癌细胞膜内源荧光的淬灭作用表明顺铂导致膜蛋白的构象改变和荧光基团向水环境暴露。通过测定加入顺铂后马来酰亚胺自旋标记红细胞血影的 ESR 谱计算强弱固定化比值(S/W)随时间和浓度的变化,显示构象变化是一个复杂的慢过程。在顺铂结合的初期,强弱固定化比值很快增加,巯基运动受到限制,之后强弱固定化比值下降,深埋

的巯基暴露。然而,反铂的作用使强弱固定化比值从一开始就下降。这两个异构体的影响趋势相反,影响程度也不同。CD 谱也反映出顺铂对膜蛋白构象的影响,使膜蛋白 α 螺旋含量改变。已有文献报导当顺铂及其水解产物进攻线粒体膜时,同样表现为巯基含量的降低,随后钙离子的摄入下降^[8]。

(3) 以磷脂为靶分子

从热力学看,似乎磷脂不是铂配合物的主要靶分子,但铂与磷脂的结合所引起的作用不可忽视。在细胞中它可能引起后续变化而被放大、延续。

王夔等用¹H NMR 研究了水铂在氘代氯仿溶液与 DPPC 脂质体的相互作用^[4],结果表明水铂(顺 DAP)与 DPPC 结合引起构象改变。从 NMR 谱可见在顺 DAP 作用下 NMe₃⁺ 的相对化学位移由 3.416 移至 3.279 并加宽。此外,可见—CH₂CO—峰由四重峰变为三重峰,这些特征说明铂与磷脂头基结合。通过¹³C NMR 谱的变化可以推断磷酸甘油片段由旁式构象向反式构象转变。在 25℃~65℃条件下,DPPC 脂质体的¹H NMR 弛豫曲线显示铂引起脂质体的构象改变过程。由弛豫时间 T₁ 可看出铂很快结合到磷脂的头基上诱导构象变化,然后缓慢向内传递。虽然对头基的影响可以恢复,但对脂链的影响可持续较长时间。

虽然上述结果支持铂与磷脂的结合引起膜结构改变,但在真实的细胞膜上,铂和磷脂的相互作用由于蛋白质参与竞争变得更加复杂。在这种条件下,铂是否能与磷脂头基结合,并引起构象和结构改变是值得探讨的问题。

人红细胞膜磷脂与顺铂反应的红外光谱表明,在 4℃反应 2.5 h 后,IR 谱中 1056 cm⁻¹ 的强峰移动并分裂成 1055 cm⁻¹ 和 1030 cm⁻¹ 的双峰,另外在 953 cm⁻¹ 处出现新的较弱吸收带,它可以被指派为 Pt—O—P 键的形成。当温育时间超过 12 h 以后,所有顺铂引起的膜磷脂 IR 光谱改变都消失,即恢复到无铂时的状态。由于 1056 cm⁻¹ 峰是膜磷脂极性头基的 P—O 或 P—O—C 键

伸缩振动引起的,顺铂使此峰改变表明铂最初与磷脂的磷酸基团结合,产生的影响能够慢慢恢复。值得注意的是顺二溴二氨合铂(II),顺二碘二氨合铂(II)和反二氯二氨合铂(II)与红细胞膜作用 12 h 以后所产生的影响不能恢复,在 953 cm^{-1} 的峰不消失反而加强。这些结果说明顺铂与磷脂的结合比其它的铂配合物弱,可能由于较高的氯离子浓度抑制了顺铂的作用。

红细胞磷膜脂 ^{31}P NMR (37°C) 谱包含了 3 个峰: A ($\delta=3.1077$); B ($\delta=10.7719$) 和一低场的肩峰 C。B 和 C 峰对应于各向异性的成分,而 A 是各向同性成分。顺铂作用后短时间内导致 A 和 B 的高场位移以及 C 峰的消失,同时峰高比 h_A/h_B 也降低。但随反应时间延长到 12 h 后, C 峰又重新出现,同时 A 和 B 峰恢复到原来状态。以上结果说明顺铂与磷脂相互作用可引起膜结构由脂双层结构向六角形结构转变,但这种变化是暂时的,可恢复的^[9]。

顺铂与膜磷脂的结合是一个过程,在这个过程中铂化合物被传递而透入膜内部。通过测定脂肪酸链上不同部位的流动性,可看出顺铂诱导的磷脂的构象变化和运动状态变化。用在脂肪酸碳链上不同位置有氮氧自由基的标记物(5D S, 7D S, 12D S 和 16D S) 标记磷脂的不同深度,用 ESR 方法测定顺铂作用后各种标记物信号随时间的改变以推测顺铂由外向内进入脂双层的过程中对磷脂流动性的影响。其结果说明顺铂首先结合于头基,接着进入浅层的磷脂链,使该区域的磷脂流动性下降,继而铂转向双分子层较深的部位。所有的扰动在几小时内可恢复,顺铂从膜表面到疏水区的移动是空间有序的,同时进入双分子层的深度越深,影响越不明显^[15]。

(4) 顺铂与膜作用对膜结构和功能影响

卢景芬等的自旋标记 ESR 结果表明铂配合物的结合引起磷脂相变温度升高。在磷脂双分子的浅表层相变温度与对照组相近,而深层则明显高于对照组。相变温度改变的同时,反映脂肪酸链运动状态的膜流动性指标序参数也发生相应的变化,即铂化合物结

合导致相变温度提高,序参数值增大,膜流动性下降。苏雅娴等通过荧光漂白的方法发现艾氏腹水肝癌细胞用顺铂类似物二氯二甲基多巴胺合铂处理后,膜磷脂的侧向扩散增强和恢复率降低,表明铂结合后磷脂分子扩散难度增加^[4]。膜流动性改变是铂结合膜磷脂和蛋白的总结果,由于水解的顺铂更容易与磷脂和蛋白反应,因此一般顺 D A P 影响较大^[15]。

重金属的毒性常常表现在影响细胞对小分子和离子的通透性上。与之相似,顺铂的结合也可导致膜通透性改变。有人以蛙皮做为模型研究顺铂对氯化钠和尿素传输的影响,结果表明顺铂提高了粘膜表面的通透性。也有文献报导随着顺铂浓度的增加,培养人 N H K 3025 细胞的质膜呈现可逆的电渗透性。

卢景芬等用不同长链自旋标记物标记在膜的不同深度,测定了细胞外抗坏血酸阴离子进膜后引起标记物 E S R 信号随时间的改变,从而确定铂配合物在时间和空间坐标上对膜通透性影响的表现。结果表明顺铂、反铂和顺 D A P 都增加膜对小分子和离子的通透性。顺 D A P 影响最大,因为它对膜磷脂和蛋白的反应性较强,其次是反铂,相对来说顺铂影响较小^[10]。

铂作用于膜引起膜改变的另一问题是造成膜的脂质过氧化。一般认为顺铂通过自由基机理造成膜损伤,其根据是顺铂能增加脂质过氧化产物丙二醛浓度,对氨基马尿酸的积累以及超氧化物歧化酶活性和维生素 E 的作用受到抑制等,但没有关于活性氧自由基产生的直接证据。最近,卢景芬等通过自旋捕获 E S R 研究给出了顺铂及其类似物促进兔肝微粒体产生自由基的有力证据,使用自旋捕获剂(4P O B N)捕捉到了脂自由基 L ·。在所研究的化合物中,反铂和顺 D A P 的作用较显著。说明促进自由基产生的程度与化合物的反应活性有关。同时实验中也发现铂结合引起兔肝微粒体脂质过氧化产物丙二醛的水平与自由基 L · 改变相一致^[15]。

1.1.2 顺铂及其类似物与肌动蛋白的相互作用

微丝微管是细胞骨架的重要成分。活细胞靠其骨架维持正常的功能,使细胞保持一个完整的系统。外源性物质的进攻往往可以扰乱骨架系统,有时对细胞的伤害是致命的。由于某些抗癌药物如长春新碱、紫杉醇等的靶分子与微管蛋白有关,因此关于铂化合物与微管蛋白作用已有许多报导,而对微丝与铂化合物作用在早期研究工作不多。直到 Kopfer-Maier^[11]报道了他们的细胞显微镜的研究结果,证实了铂化合物进攻细胞微丝系统。近年来,王夔等在这方面工作主要集中于研究铂化合物对微丝肌动蛋白构象及自缔合过程的影响。

(1) 铂配合物同 G - 肌动蛋白的作用及后续变化

G - 肌动蛋白单体通过自缔合形成 F - 肌动蛋白是肌肉纤维及细胞内微丝装配的重要过程。

用 NPM 标记 G - 肌动蛋白测定荧光强度随 PtCl_4^{2-} / 肌动蛋白摩尔比(R)的改变,发现当 $R < 25$ 时, PtCl_4^{2-} 优先与含巯基团结合。测得这种高亲和部位数 $n_1 = 30$, 表观结合常数 $K_1 = 1.0 \times 10^7 \text{ L/mol}^{[12]}$ 。进一步对 PtCl_4^{2-} , 顺铂和顺 DAP 同 G - 肌动蛋白结合后引起的构象改变研究,发现 PtCl_4^{2-} 使蛋白的 α 螺旋含量减少,蛋白质构象改变趋于松散,从而暴露新的结合位点。而顺铂和顺 DAP 的作用与之不同,它们使蛋白结构变得紧密,没有呈现新位点的暴露^[13]。实验表明在铂化合物作用下 G - 肌动蛋白的二级结构遭到破坏,构象改变,不适于单体-单体间相互作用和自缔合过程的需要。用浊度和粘度法进一步确证铂结合抑制 G - 肌动蛋白的正常缔合,另一方面也造成 G - 肌动蛋白的单体和缔合碎片非正常聚集和交联。

对 G - 肌动蛋白 - Mg^{2+} , K^+ - ATP 体系的量热法研究也提供证据说明铂化合物抑制缔合^[14]。相关的二元体系(肌动蛋白 - Mg^{2+} , 肌动蛋白 - 顺 DAP 和肌动蛋白 - 顺铂)的热效应随时间

出现一放热峰和一吸热峰。吸热反应归属于 G - 肌动蛋白的自身缔合,当然也不能完全排除构象的改变。最初的放热峰被认为是金属结合、构象改变以及当顺铂存在时水解的总结果。吸热峰的 ΔH_2 值与 G - 肌动蛋白自身缔合有关,它随顺铂浓度增加而降低,这是顺铂抑制 G - 肌动蛋白缔合的根据。在反铂情况下, ΔH_2 值随铂浓度增加下降得更迅速。

用准弹性激光光散射测定了肌动蛋白聚合过程中聚合产物尺寸分布随时间的变化。如果在聚合物中 ATP 浓度足够大时,聚合物的平均长度随时间持续增加,表现正常缔合;但在 ATP 不足时聚合出现‘分叉’现象,由一个聚合物群变成两个,但经一定时间后又复回到一个聚合物群,可是平均尺寸与原来的不同。据信这一过程即为长度调整过程。顺铂、反铂存在时一方面使聚合物不稳定,促进“分叉”,减小聚合物尺寸;而另一方面又使聚合物交联、聚集在一起^[15]。

(2) 铂配合物与 F - 肌动蛋白的作用和后续变化

为确证电镜下观察到的顺铂造成的微丝系统的紊乱与顺铂 - F - 肌动蛋白结合有关,研究了几种铂化合物与 F - 肌动蛋白的键合方式。顺铂与 F - 肌动蛋白结合后,除了两个 NH_3 仍与铂配位外,还有巯基和硫醚的 S, NH_2R 和 OR 基团可能与铂配位,但构型仍呈平面四方形。用 FT - Ram an 光谱证明有 $Pt-S$ 键存在。 $Pt-S$ 键振动的出现伴随着 $C-S$ 键强度的增加,并与顺铂浓度呈现依赖关系。在反铂作用下也可观察到同样现象。而且在反铂体系中还看到 $Pt-N$ 伸缩振动峰,并随铂浓度增加。顺铂、反铂都使酰胺带增强,而以顺铂的效果更为明显。由此可推断,二者引起的 F - 肌动蛋白构象变化可能不同。用 CD、浊度法和 ESR 研究上述体系,结果表明顺铂与 F - 肌动蛋白形成 $Pt-S$ 键,导致明显的蛋白构象变化和 F - 肌动蛋白缓慢解聚。反铂对结合蛋白中的 S - 给体亲和性较顺铂小,而结合 N - 给体大,反铂引起的 F - 肌动蛋白解聚明显地比顺铂快^[16]。

总结现有的铂化合物与细胞膜及骨架肌动蛋白作用的结果,可以看到铂与膜磷脂和蛋白结合引起构象和膜结构的改变,加重膜脂质过氧化,导致膜通透性增加和流动性下降。铂化合物进攻肌动蛋白也开始于结合作用,进而使蛋白交联,蛋白构象改变,不利于单体的正常自身缔合。这些都可能是铂造成细胞损伤的重要原因。

1.1.3 顺、反铂及有关配合物与金属硫蛋白在体内外的作用

如上所述,顺铂是一种广泛使用的抗癌药物。它对人的泌尿生殖系统癌、头颈部恶性肿瘤、以及小细胞肺癌甚至骨癌均有显著疗效。但是,由于与其使用剂量相关的毒副作用(尤其肾毒性),以及长期使用后产生的抗药性影响了它的使用。最近,已有报告指出,用铋盐诱导体内金属硫蛋白(MT)的合成,可降低使用顺铂引起的毒副作用,而不影响其抗癌活性^[17]。其机理可能和体内MT与顺铂作用有关,但其真正的原理尚不清楚。另一方面,长期服用顺铂导致机体产生抗药性。已有证据表明肿瘤中MT基因的过度表达和顺铂抗药性相关。转染人MT-ⅡA基因的癌细胞中,MT及MT mRNA含量和顺铂抗药性成正相关;小鼠肿瘤中MT的含量亦和其对顺铂的抗药性正相关^[18]。上述研究均表明顺铂和MT的作用可能是产生抗药性的一个重要因素。

为了阐明MT在降低顺铂肾毒性和产生抗药性的机理,对顺、反铂诱导MT的体内合成以及铂配合物和MT在体外作用机理的研究,近年来受到了生物无机化学界的重视。

(1) 顺铂及有关化合物与MT在体内作用的研究——铂化金属硫蛋白的纯化及表征

在顺、反铂诱导铂化MT体内合成方面,文献报导了不同的结果。Zelazowski(1984)给家兔隔天一次分别腹腔注射顺铂($2\text{ mg/kg} \times 4$)和反铂($4\text{ mg/kg} \times 4$),发现均有一定量的铂结合在肝、肾MT流出部分中,用Cd先诱导再用药可使MT部分含Pt

量增加^[19]。但 Cacini(1991)的研究得到了相反结果^[20]。当用 6 mg/kg 和 1 mg/kg 顺铂处理时,发现肾、肝的 MT 含量不变且不含铂,铂主要结合在分子量及低分子量蛋白部分。为澄清上述问题,张保林等仔细研究了 K_2PtCl_4 , 顺 DAP ($\text{DAP} = [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$) 和反 DAP 诱导兔肝、肾合成 MT 的情况^[21]。每组家兔三只,连续十天的药物注射剂量分别为:

K_2PtCl_4	10	10	10	10	15	15	20	20	25	25	(mg(Pt)/kg)
顺 DAP	0.2	0.2	0.4	0.8	2	4	4	4	4	4	(mg(Pt)/kg)
反 DAP	0.2	0.2	0.4	0.8	2	4	4	4	4	4	(mg(Pt)/kg)

累计剂量均远超过其半致死量。此外为提高动物体内 MT 水平,还先用 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 预处理,再分别注射顺 DAP 和反 DAP,剂量均为:2,4,4,8(mg(Pt)/kg),以后按提取 MT 的通常方法,从兔肾中分离 MT。结果表明,在空白对照的兔肝、肾流出图中,只有分子量及低分子量峰,在 40~60 流出部分无 MT 峰出现。但注射 K_2PtCl_4 的兔肝、肾流出曲线中 40~60 间均出现 MT 峰,且铂在 MT 组分中亦有一定程度富集,表明 K_2PtCl_4 能诱导兔肝、肾中 MT 的合成,并且生成的 MT 中含有 Pt。注射顺 DAP 能诱导兔肝而不能诱导兔肾中生成 MT,而反 DAP 却不能诱导兔肝肾的 MT 合成。为表征所形成的铂化金属硫蛋白,用常规方法分离并收集含铂 MT 组分,再经 DEAE 柱分离出相应的 MT₂ 组分,经超滤,冷冻干燥得纯的铂化金属硫蛋白。经测定蛋白中 SH,Zn,Pt 含量依次为 18.5 ± 2.0 ;5~4.5;2~1.8,氨基酸组分分析和 MT 的组分相符,表明所得 MT 组分为 $\text{Zn}_5\text{Pt}_2\text{MT}$ 。用 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 预处理家兔,再分别用顺 DAP 和反 DAP 处理,可增加铂化金属硫蛋白的形成,但蛋白中 Zn,Pt 含量比大体保持不变。从上述结果可得出顺铂能诱导兔肾生成 $\text{Zn}_5\text{Pt}_2\text{MT}$ 的明确结论。表明 MT 具有使顺铂肾毒性降低的作用。

(2) 顺铂及有关化合物与 M T 的体外作用

有关 Pt(II) 配合物与 M T 的体外作用, Bonger(1988, 1991) 最先通过体外重组, 测得了铂和 M T 结合时的摩尔比为 7: 1, Pattanaik (1992) 报导了顺铂和鼠肝 Zn₇M T 的作用的初步动力学, 但所得 Pt 与 M T 摩尔比为 10: 1。为了解顺铂及有关化合物和 M T 作用的机理, 张保林用质子竞争分光光度法及 Cd 离子选择电极法测得 Pt₇M T 的结合常数为 $2.3 \times 10^{23} \text{ L/mol}$, 比 Zn₇M T 及 Cd₇M T 分别高 2 和 7 数量级^[22]。其次, 通过吸收光谱和 CD 谱监测, 研究了顺铂、反铂、K₂PtCl₄ 及其水合取代物在不同温度、不同 pH 和不同反应物浓度下和 Zn₇M T 及 apoM T 的反应动力学, 确定了铂(II)配合物和 Zn₇M T 及 apoM T 的反应分为三个不同的速率阶段。其中顺铂和反铂的 K_I 近似相等, 但反铂的 K_{II}, K_{III} 分别为顺铂相应值的三倍。顺 DAP 和反 DAP 的 K_I 有所增加, 而 K_{II}, K_{III} 和顺铂、反铂相近。此外升高温度, 将使反应速率 K_I, K_{II} 升高, 但 K_{III} 不变。反应 pH 在 8~6 范围 K_I, K_{II}, K_{III} 值不变, 但 pH 降到 5 时, K_I 明显增大, K_{II}, K_{III} 保持未变。改变顺铂的浓度使 K_I 增大, 而 K_{II}, K_{III} 基本保持不变。上述结果表明, 初始反应速率 K_I 和 Pt(II) 的存在形式及有效浓度有强烈依赖关系, 但由于 K_I 和 K_{II} 大于顺铂和反铂的水解速度, 因此, K_I 并非为水解控制步骤。考虑到由于顺铂及其有关化合物的各种形式的水解产物均能直接和含 S 配体结合, 因此和 M T 中 S 结合的不一定是它们的最活泼的状态。各种形式的 Pt 化合物和 M T 直接结合可能是影响 K_I 的主要因素。此外, 随 Pt(II) 与 apoM T 作用的 K_I 大于与 Zn₇M T 的相应值, 表明 S—Zn 键解离对初始速率起重要作用^[23, 24]。

因此, 可认为反应的第一步包括在溶液中的各种形式的配合物, 快速扩散到 Zn—S 簇部位, 其中最活跃的状态 (cis- [Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺, cis- [Pt(NH₃)₂(H₂O)(OH)]⁺) 与 M T 的较为松弛的 β 结构域发生作用。第二步相当于其它较不活跃的状态