

溶菌酶与硅灰石类粉尘中活性物质的反应行为研究(I) ——样品中活性 SiO_3^{2-} 与溶菌酶的作用机理

白进伟, 迟燕华, 庄稼, 董发勤

(西南科技大学 材料科学与工程学院 化学与生物工程系, 四川 绵阳 621010)

摘要: 对 3 个不同地区的硅灰石类粉尘做了 XRF 分析及其与溶菌酶(Lys) 的反应实验, 结果显示 Lys 与样品中的活性物质进行了反应。模拟样品中元素离子与 Lys 反应的 UV-Vis 和荧光光谱分析表明, 37 °C 下 Lys 与样品中的元素离子 SiO_3^{2-} 作用最明显, 表现在紫外区吸收峰红移 10 nm, 吸光度增大, 荧光区 λ_{em} 440 nm 处荧光强度增强, 荧光峰红移 20 nm。同时, 对其反应机理和结合位点进行了探讨。

关键词: 溶菌酶; 硅灰石类粉尘; UV-Vis 光谱; 荧光光谱

中图分类号: P578.953; Q55

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2005)02-0151-04

A Study of the reaction between active substances in silica fiber dusts and lysozyme(I): The reaction mechanism between SiO_3^{2-} ion and lysozyme in samples

BAI Jin_wei, CHI Yan_hua, ZHUANG Jia and DONG Fa_qin

(College of Material Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

Abstract: Fiber dusts of three different areas were analyzed by XRF, and the reaction between samples and lysozyme was conducted. The results show that lysozyme reacted with the active substances in the samples. The study of simulated ions reveals that the reaction between lysozyme and element ions SiO_3^{2-} in the samples was most prominent at 37 °C. In UV-Vis spectra the absorption was strengthened and the maximum absorption peak red shifted 10 nm. In fluorescent spectra the maximum fluorescence intensity appeared at λ_{em} 440 nm and the fluorescence peak red shifted 20 nm. The reacting mechanism and combining sites are also discussed in this paper.

Key words: lysozyme; silica fiber dusts; UV-Vis spectrum; fluorescence spectrum

矿物粉尘被人体吸入后可引发肺部疾病, 如尘肺(硅肺是其中之一)和癌症。1987年, IARC(国际癌症研究委员会)审定了对人类肯定有致癌作用的化学物质, 其中包括的天然矿物石棉、毛沸石及纤维状滑石、石英、硅灰石、海泡石、水镁石等被列为潜在致癌物或具有较强的生物活性。20世纪80年代以前, 有关矿物纤维生物活性的实验研究主要是动物实验, 近年来已深入到细胞学及分子生物学领域

(Guthrie *et al.*, 1993)。酶是由活细胞产生的、具有高度催化效能和高度特异性的一类特殊蛋白质——生物催化剂, 在食品工业、环境工程、临床医学上有广泛的应用。作为一种存在于人体正常体液及组织中的非特异性免疫因素, Lys 具有多种药理作用, 有抗菌、抗病毒的功效(朱奇等, 1998)。粉尘进入人体后, 机体内部会以各种方式处理和清除这些尘粒, 如运移、沉淀、溶解、包埋和吞噬等等, 人体体

收稿日期: 2004-09-14; 修订日期: 2004-12-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(400720201); 教育部科学技术研究重点项目(02126); 四川省教育厅自然科学基金资助项目(2002C04)

作者简介: 白进伟(1966-), 男, 副教授, 主要从事生物大分子结构特性及生物酶在环境协调材料中的应用, E-mail: mybaijinwei@eyou.com。

液是粉尘主要的运移、沉淀和溶解介质(董发勤等, 2000)。Lys 易与有些过渡金属元素膜形成亲和配体(李静等, 1999)。因此, 研究 Lys 与矿物粉尘中活性物质的反应行为对降解矿物粉尘微粒毒性和临床医学有现实意义, 这方面工作尚未见系统报道。笔者针对 37℃下 Lys 与矿物粉尘微粒的反应行为用紫外、荧光手段进行了研究, 发现矿物粉尘微粒中的活性硅离子与 Lys 进行了明显反应, 并生成了相应的物质。

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

主要仪器有自动 X 射线荧光光谱分析仪 (PW1404 型, 荷兰 Philips 公司)、Cary_100 (美国 Varian 公司)、荧光分光光度计 (岛津 RF_540, 日本)、酸度计 (Thermo orion, 美国)、QTHZQ_C 空气浴恒温振荡器 (上海琪特分析仪器有限公司) 和 1810B 型自动双重蒸馏器 (上海仪器厂)。主要试剂有: Lys (生化试剂, 比活 10 000 U/mg, 分子量 14 300, 中科院上海生化所东风生化技术公司) 1 mg/mL 水溶液、 Fe^{3+} [AR 级 $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 配置] 1 mg/mL、 Al^{3+} [AR 级 $\text{Al}(\text{Ac})_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 配置] 1 mg/mL、 Ca^{2+} (AR 级 CaCl_2 配置) 1 mg/mL、 Mg^{2+} (AR 级 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 配置) 1 mg/mL、 SiO_3^{2-} (AR 级 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 配置) 1 mg/mL、 Zn^{2+} [AR 级 $\text{Zn}(\text{Ac})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 配置] 1 mg/mL、 Pb^{2+} [AR 级 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 配置] 1 mg/mL 和 Ba^{2+} (AR 级 BaCl_2 配置) 1 mg/mL。矿物粉尘采自青海西宁市

南川东路汽车一厂院内户外(编号 F₁₈)、四川双马水泥厂平台上距烟囱 500~100 m 处(编号 F₂₀)、山西运城盐湖南风化工厂废旧仓库平台(编号 F₂₃)。所用水均为二蒸水。

1.2 实验方法

1.2.1 Lys 与样品的反应

称取 F₁₈、F₂₀、F₂₃ 样品各 5.000 g 分别置于 3 只洁净的具塞玻璃锥形瓶中, 再各加 100.00 mL Lys (1 mg/mL) 水溶液, 盖好瓶塞放入 37℃恒温空气浴振荡器中振荡反应 1 h 后过滤, 滤液分别收集于 3 只洁净的 100 mL 容量瓶中。各取上述溶液 10.0 mL 分别加入 3 只洁净的 25 mL 容量瓶中以二蒸水定容, 并以二蒸水为参比, Lys 为空白, 1 cm 石英比色皿进行紫外光谱测量。

1.2.2 Lys 与主要元素模拟离子的反应

在一系列洁净的 25 mL 容量瓶中分别加入 1.0 mL Lys 水溶液、0.1 mL 离子试液、1.0 mL Lys+0.1 mL 离子试液, 用二蒸水定容。37℃恒温空气浴振荡器中振荡反应 10 min, 测 pH 值, 以二蒸水为参比, 1 cm 石英比色皿进行紫外、荧光光谱测量。

2 结果与讨论

2.1 粉尘样品的化学成分分析

用于 XRF 分析的样品采用洗铸法制成, 所用熔剂为 $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (47%)、 Li_2O_3 (37%)、 Li_2O_3 (16%) 的混合物。分析结果见表 1、表 2。从表 1 可以看出, 3 个不同样品中的 SiO_2 含量都较高, 差别较大, Al_2O_3 、 Fe_2O_3 、 CaO 次之, 差别较小。其他元素含量很低。样品成分与硅灰石相似, 属硅灰石范围。

表 1 粉尘样品的常量元素含量

w_B/%

Table 1 Content of normal elements in dusts

	SiO_2	TiO_2	Al_2O_3	Fe_2O_3	MnO	CaO	MgO	Na_2O	K_2O	P_2O_5	Los	Sum
F ₁₈	54.77	0.52	10.52	4.58	0.09	10.09	2.79	1.40	1.92	0.19	13.58	100.44
F ₂₀	59.69	0.53	10.64	4.03	0.08	8.24	2.41	1.90	2.21	0.17	10.44	100.34
F ₂₃	48.45	0.63	11.70	4.77	0.09	9.54	< 0.02	4.19	2.19	0.52	17.46	99.54

表 2 粉尘样品的微量元素含量

mg/L

Table 2 Content of trace elements in dusts

	Se	V	Cr	Ce	Zn^{2+}	Nb	Zn^{1+}	Y^{3+}	Sn^{3+}	Rb^{3+}	Pb^{2+}	Ba^{2+}	$\text{H}_2\text{O}/\%$
F ₁₈	10.5	68.8	96.5	2.0	180.7	7.3	174.4	4.2	348.3	36.1	42.6	604.3	0.8
F ₂₀	11.5	79.3	45.5	17.5	157.6	14.5	227.3	20.1	365.4	102.2	13.3	557.0	0.9
F ₂₃	22.6	79.1	69.9	16.8	396.0	10.5	176.0	33.8	379.0	92.1	205.0	1 610.0	3.7

注: 分析数据原单位为%, 为了便于比较换算为 ppm, ppm 再换算为 mg/L; 分析单位: 加拿大 Laurentian 大学实验中心。

从表 2 可以看出, 这些不同样品的微量元素中 Ba 含量较高, Zn、Pb 次之, 其他元素含量很低。

2.2 Lys 与样品的反应

取样品 F₁₈、F₂₀、F₂₃ 与 Lys 反应后的溶液 (pH 为 Lys: 5.46、Lys_F₁₈: 5.38、Lys_F₂₀: 5.44、Lys_F₂₃: 5.42) 分别进行了 UV-Vis 光谱测量, 结果见图 1。

从图 1 可以看出, Lys_F₁₈、Lys_F₂₀、Lys_F₂₃ 的吸收光谱与 Lys 对比度较大, 在 190.0~250 nm 范围内, 吸光度都增大, 吸收峰发生了红移。其中 Lys_F₂₀ 吸收峰红移约 15 nm, Lys_F₁₈ 和 Lys_F₂₃ 吸收峰红移约 10 nm。这种现象说明 Lys 与样品中的某一元素离子或多个元素离子发生了结合反应, 生成了新的物质。

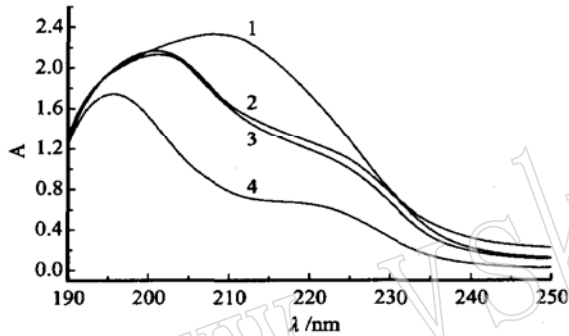


图 1 样品与溶菌酶作用的吸收光谱
Fig. 1 Absorption spectrum of Lys_sample reaction
1—Lys_F₂₀; 2—Lys_F₂₃; 3—Lys_F₁₈; 4—Lys

2.3 Lys 与主要元素模拟离子的反应

取 SiO₃²⁻、Fe³⁺、Pb²⁺、Al³⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Ba²⁺ 试液, 对这些离子、Lys 及这些离子与 Lys 的反应液 (37℃ 反应 10 min) 在 pH 5.46、λ_{ex} 360 nm 下分别进行了 UV-Vis、荧光光谱测量, 发现 Fe³⁺、Pb²⁺ 与 Lys 有较明显地反应。这是因为 Fe³⁺、Pb²⁺ 与 Lys 中的 O、N、S 形成六配位的亲和吸附。其余离子与 Lys 的反应从光谱图上看与 Lys 的光谱图没有多大变化, 这是因为在一些蛋白中, 金属离子似乎仅起结构支撑作用, 有些金属离子, 如 Ca²⁺ 及 Zn²⁺ 是光谱惰性的, 因而不易对它们形成的结构做出观察 (杨频等, 2002); SiO₃²⁻ 与 Lys 的反应最明显, 而且 SiO₃²⁻ 与 Lys 反应后其 UV-Vis 吸收光谱与粉尘样品和 Lys 反应后的光谱基本一致。实验结果说明, 此粉尘样品中与生物大分子作用的主要是 SiO₃²⁻, 其次是 Fe³⁺、Pb²⁺ (这部分工作正在深入研究之中, 待后续报道), 不排除其余离子也参与了反应。

2.4 样品中的活性 SiO₃²⁻ 与 Lys 的结合位点

2.4.1 Lys 与样品中模拟活性 SiO₃²⁻ 反应的紫外光谱表征

以二蒸水为参比, 对 SiO₃²⁻ 试液、Lys 溶液、Lys 与 SiO₃²⁻ 反应后的溶液 (pH = 5.55) 分别进行了 UV-Vis 光谱测量, 结果见图 2。从图 2 可以看出,

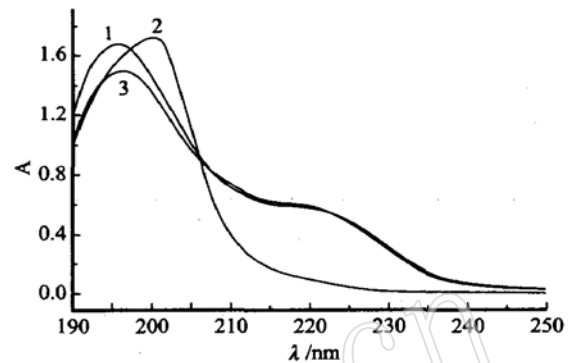
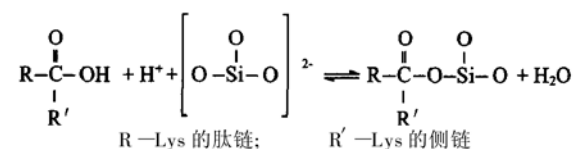


图 2 溶菌酶与 SiO₃²⁻ 作用的吸收光谱
Fig. 2 Absorption spectrum of Lys_SiO₃²⁻ reaction
1—Lys; 2—Lys_SiO₃²⁻; 3—SiO₃²⁻

SiO₃²⁻ 在 λ₉₇ 处有一吸收峰; Lys 在 λ₉₅ 处有一吸收峰, 这是 Lys 在紫外区的特征吸收峰; 当向 Lys 中加入 SiO₃²⁻ 后, 在 λ₂₀₅ 处有一吸收峰, 与 Lys 比较吸收峰红移约 10 nm, 而在 210~235 nm 处吸光度明显降低, 说明 Lys 与 SiO₃²⁻ 结合形成了新的物质。反应机理可能是: 在 pH 5.55 的水体系中 α-氨基以阳离子形式存在 (杨频等, 2002), Lys 分子中 α-氨基多以氨基酸残基多肽链的形式存在, 只有少数如色氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸这样带有两个氨基的氨基酸, 一个氨基形成肽链, 另一个侧链上的氨基带一氢离子正电荷, 负电性较强的 SiO₃²⁻ 易在 Lys 分子位于表面的 α-氨基进行静电吸附。另外, 在 Lys 分子直肽链 C-末端的羧基和主要键位于谷氨酸 (第 35 位) 侧链上的羧基及天门冬氨酸 (第 52 位) 侧链上的羧基失去羟基 (OH⁻) 结合 SiO₃²⁻ 形成 —COOSiO— 结构, 从而产生了 n-π* 电子跃迁, 表现为 205 nm 处出现吸收峰的光谱特征。主要反应式为:



2.4.2 Lys 与样品中模拟活性 SiO₃²⁻ 反应的荧光光谱表征

以二蒸水为参比,对 SiO_3^{2-} 试液、Lys 溶液、Lys 与 SiO_3^{2-} 反应后的溶液($\text{pH}=5.55$, λ_{ex} 为 360 nm) 分别进行了荧光光谱测量,结果见图3。从图3可以看

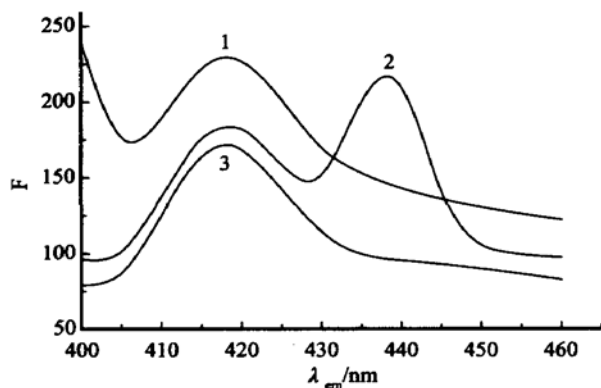
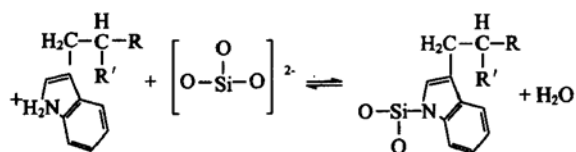


图3 溶菌酶与 SiO_3^{2-} 作用的荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence spectrum of Lys- SiO_3^{2-} reaction

1-Lys; 2-Lys- SiO_3^{2-} ; 3- SiO_3^{2-}

出: SiO_3^{2-} 在 $\lambda_{\text{em}} 420 \text{ nm}$ 处有一荧光峰,这是 SiO_3^{2-} 在水溶液中硅氧四面体的荧光特征; Lys 在 $\lambda_{\text{em}} 420 \text{ nm}$ 处有一荧光峰,这是 Lys 中色氨酸残基的内源荧光探针荧光特征(郇远等, 1997); 当向 Lys 中加入 SiO_3^{2-} 后,在 $\lambda_{\text{em}} 420 \text{ nm}$ 处的荧光强度降低,而在 $\lambda_{\text{em}} 437 \text{ nm}$ 处的荧光强度增强且出现第 2 荧光峰,与 Lys 比较荧光峰红移 20 nm。这是因为在 $\text{pH} 5.55$ 的水体系中, Lys 色氨酸五元环上的氨基带有一氢离子正电荷,结合 SiO_3^{2-} 后, Lys 色氨酸残基的微环境发生了变化,说明 SiO_3^{2-} 和 Lys 形成了一种新的物质,主要反应式为:



R-Lys 的肽链,色氨酸羧基一侧;

R'-Lys 的侧链,色氨酸氨基一侧

3 结论

通过 Lys 与样品的反应实验及 Lys 与样品中主要活性元素离子 SiO_3^{2-} 的模拟研究证明,在 37°C 、 $\text{pH} 5.38\sim 5.55$ 的水体系中, Lys 与硅灰石类矿物粉尘中的活性离子 SiO_3^{2-} 有很明显的反应,且生成了相应的物质。这一结论有望在生物酶降解纤维矿物粉尘的毒理研究中得到进一步应用。

Reference

- DONG Faqing, LI Guowu, HUO Jichuan, et al. 2000. Dissolving action of fiber dusts in the Gamble solution[J]. Acta Petrologica et Mineralogica, 19(3): 199~205 (in Chinese with English abstract).
- LI Jing, CHEN Huanlin and CHAI Hong. 1999. The adsorption performance between pincers / affinity membrane of different metals and lysozyme[J]. Chem. J. Chinese Universities, 20(8): 1322~1327(in chinese).
- Ggathrie G D and Mossman B T. 1993. Health effects of mineral dusts [A]. Reviews in Mineralogy, 28[C]. Mineralogical Society of America, 185~225.
- YAN Yuan, LIU Tao and HUANG Jianfeng. 1997. Study on the fluorescence spectrum of in the solution[J]. Acta Chimica Sinica, 55(12): 1214~1218 (in Chinese).
- Zhu Qi and A Yan. 1998. Lysozyme and their application[J]. Bulletin of Biology, 33(10): 9~10 (in Chinese).

附中文参考文献

- 董发勤, 李国武, 霍冀川, 等. 2000. 纤维矿物粉尘在 Gamble 溶液中的溶解行为[J]. 岩石矿物学杂志, 19(3): 199~205.
- 李静, 陈欢林, 柴红. 1999. 不同金属螯合、亲和膜对溶菌酶的吸附行为[J]. 高等学校化学学报, 20(8): 1322~1327.
- 郇远, 刘韬, 黄坚峰. 1997. 溶液中溶菌酶的荧光光谱研究[J]. 化学学报, 55(12): 1214~1218.
- 杨频, 高飞. 2002. 生物无机化学原理[M]. 北京: 科学出版社, 21, 145.
- 朱奇, 阿彦. 1998. 溶菌酶及其应用[J]. 生物学通报, 33(10): 9~10.