

• 研究简报 •

镓转铁蛋白与 HL60 细胞的结合

李英奇 刘斌 赵春贵 杨斌盛*

(山西大学分子科学研究所 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

摘要 用 ^{125}I 示踪法测定了不同形式的镓转铁蛋白($\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf}$, $\text{Ga}_2\text{-Tf}$, $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf-Fe}_\text{N}$)与 HL60 细胞的结合作用. 结果表明 0 °C、pH=7.4 时 $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf}$, $\text{Ga}_2\text{-Tf}$ 和 $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf-Fe}_\text{N}$ 均与细胞膜结合, 表观结合常数分别为 $(1.2 \pm 0.14) \times 10^8$, $(1.1 \pm 0.19) \times 10^8$ 和 $(1.8 \pm 0.42) \times 10^8$ L/mol; 同时测定了 ^{125}I 标记的脱铁转铁蛋白(apoTf)与 HL60 细胞的表观结合常数为 $(0.97 \pm 0.20) \times 10^8$ L/mol; HL60 细胞的平均受体数为 $(4.8 \pm 0.11) \times 10^5$. 通过体外研究表明, 不同形式的镓转铁蛋白与受体的结合能力次序为 $\text{apoTf} \approx \text{Ga}_\text{C}\text{-Tf} \approx \text{Ga}_2\text{-Tf} < \text{Ga}_\text{C}\text{-Tf-Fe}_\text{N}$.

关键词 转铁蛋白; 镓(III); ^{125}I 示踪法; HL60 细胞

Binding of Gallium-Containing Transferrin to HL60 Cells

LI, Ying-Qi LIU, Bin ZHAO, Chun-Gui YANG, Bin-Sheng*

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract The interaction of ^{125}I -labelled various species of transferrin including $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf}$, $\text{Ga}_2\text{-Tf}$ and $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf-Fe}_\text{N}$ with HL60 cells was investigated. The results showed that the proteins bound to membrane of cells at pH=7.4 and 0 °C. The association constants were $(1.2 \pm 0.14) \times 10^8$, $(1.1 \pm 0.19) \times 10^8$ and $(1.8 \pm 0.42) \times 10^8$ L/mol for $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf}$, $\text{Ga}_2\text{-Tf}$ and $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf-Fe}_\text{N}$, respectively. At the same time, the association constant for ^{125}I -labelled apotransferrin was $(0.97 \pm 0.20) \times 10^8$ L/mol. There were about $(4.8 \pm 0.11) \times 10^5$ transferrin receptors per cell surface. *In vitro* studies indicated that complexes of Ga and transferrin bind to transferrin receptor with the order of $\text{apoTf} \approx \text{Ga}_\text{C}\text{-Tf} \approx \text{Ga}_2\text{-Tf} < \text{Ga}_\text{C}\text{-Tf-Fe}_\text{N}$ in terms of their association constants.

Keywords transferrin; gallium(III); ^{125}I -labeling; HL60 cells

人血清转铁蛋白(hTf)是由一条多肽链折叠而成两个铁结合部位的金属蛋白, 承担铁的跨膜转运. 在血浆中以多种形态存在, 即脱铁(apoTf)、C-端单铁转铁蛋白($\text{Fe}_\text{C}\text{-Tf}$)、N-端单铁转铁蛋白($\text{Fe}_\text{N}\text{-Tf}$)、双铁转铁蛋白($\text{Fe}_2\text{-Tf}$). 生理条件下, 人血清转铁蛋白金属离子结合部位仅有 30%由铁(III)所占据^[1]. 因此, 人血清转铁蛋白可与进入血清的其它金属离子结合并将其转运^[2~5]. 在转铁蛋白受体介导下, 铁(III)通过转铁蛋白转运进入细胞, 且不同形式的转铁蛋白与细胞表面受体结合的能力

有所不同, 如在 pH 7.4 的体系中, 其结合能力依次为 $\text{apoTf} < \text{Fe}_\text{C}\text{-Tf} \approx \text{Fe}_\text{N}\text{-Tf} < \text{Fe}_2\text{-Tf}$ ^[1].

目前临床已采用 Ga 进行肿瘤治疗, 这就为 ^{67}Ga 的临床应用提供更为广阔的前景^[6]. 镓与转铁蛋白的亲合力与铁相近, 它也是结合在转铁蛋白铁的特异性结合位点上. 血液中的镓与转铁蛋白紧密结合, 它主要通过转铁蛋白受体的途径转运^[7]. 研究已经发现转铁蛋白受体的表达和 ^{67}Ga 的分布具有极好的相关性. 高浓度镓在肿瘤组织中的分布是 ^{67}Ga 用于成像诊断恶性组织的基础. 当

* E-mail: yangbs@sxu.edu.cn

Received October 17, 2005; revised March 7, 2006; accepted May 24, 2006.

国家自然科学基金(Nos. 20071022, 20371031)、山西省自然科学基金(No. 20051006)和山西大学校青年基金(No. 2006008)资助项目.

转铁蛋白减少或被铁和其它金属离子饱和时, 镓也可通过非转铁蛋白依赖的机理进入肿瘤和其它细胞^[8,9], 因此在治疗过程中无疑会带来毒副作用; 而采用传统治疗癌症的放疗和化疗方法, 对病情缓解率很低, 如果利用“生物导弹”——转铁蛋白将镓定向输送到病变部位, 就可能达到既攻克病魔又减少毒副作用的目的. 双镓转铁蛋白($\text{Ga}_2\text{-Tf}$)是通过受体介导的内吞机制进入细胞, 但未见关于其它形式的镓转铁蛋白跨膜机制研究的报道. 本文以 HL60 细胞为模型, 利用 ^{125}I 标记转铁蛋白, 采用对比法观察了不同形式的镓转铁蛋白与 HL60 细胞的结合能力.

1 实验部分

1.1 材料与仪器

人血清脱铁转铁蛋白、Hepes 均为 Sigma 公司产品; Na^{125}I (13539 MBq/mL), NEN 公司产品; HL60 细胞由山西医科大学第二附属医院提供; RPMI1640 细胞培养剂, Gibco BRL 产品; 氯胺 T, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 等为分析纯. HH6003 型 γ 放射免疫分析仪, 中国仪器设备公司产品.

1.2 实验方法

脱铁转铁蛋白的纯化及标记按文献[2]进行; GaCl_3 储备溶液的制备按文献[10]方法.

碘化镓转铁蛋白的配制: Harris 等^[11]使用紫外差光谱方法, 当 HCO_3^- 作伴阴离子时, 用镓来滴定脱铁转铁蛋白、单铁转铁蛋白(apoTf , $\text{Fe}_\text{C}\text{-Tf}$, $\text{Fe}_\text{N}\text{-Tf}$), 通过斜率比较得出镓(III)优先结合于转铁蛋白的 C-端^[11]; 通过 Modkf 程序得到镓与蛋白的两个金属结合位点的条件稳定常数且 $K_\text{C}/K_\text{N} > 9$, 所以当镓与蛋白的摩尔比小于等于 1 时导致镓结合到蛋白的强结合部位 C-端. 为此按照 1 : 0.8 摩尔比向 $^{125}\text{I}\text{-apoTf}$ 溶液滴加 Ga^{3+} 溶液并在空气中反应 30 min, 配制 $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf}$ 溶液; 按照 1 : 1.8 摩尔比向 $^{125}\text{I}\text{-apoTf}$ 溶液滴加 Ga^{3+} 溶液并在空气中反应 30 min, 配制 $\text{Ga}_2\text{-Tf}$ 溶液. 当 $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 与转铁蛋白作用时, 优先占据转铁蛋白的 N-端^[12], 且由于 Fe^{3+} 与该蛋白强的键合 ($\lg K_\text{C} = 21.4$, $\lg K_\text{N} = 20.3$), 因此当镓滴定单铁转铁蛋白时并不能置换 Fe^{3+} , 所以按照 1 : 0.8 摩尔比向 $^{125}\text{I}\text{-apoTf}$ 溶液滴加 Fe^{2+} 溶液并在空气中反应 30 min 配制成 $^{125}\text{I}\text{-apoTf-Fe}_\text{N}$ 溶液, 然后按照 1 : 0.8 摩尔比向 $^{125}\text{I}\text{-apoTf-Fe}_\text{N}$ 溶液滴加 Ga^{3+} 溶液并在空气中反应 30 min, 配制 $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf-Fe}_\text{N}$ 溶液.

在本实验中是以大气中的 CO_2 溶于溶液中形成的 HCO_3^- (其浓度为 0.14 mmol/L) 为伴阴离子的^[13].

细胞结合实验: 将 HL60 细胞用含有谷氨酰胺和

10% 小牛血清的 RPMI1640 细胞培养液在 37 °C、含有 5% 的二氧化碳培养箱培养 24 h 后收集细胞, 用台盼蓝染色并进行细胞记数, 细胞活率达 99% 以上. 将上述细胞液(约 10^7 个细胞/mL)和分别加入不同浓度碘化镓转铁蛋白的 Eppendorf 管均置于 0 °C 冰水浴中, 恒温后向各 Eppendorf 管加入相同量的细胞液, 用旋涡混合器振荡并在 0 °C 冰水浴中反应 15 min 后, 在 Eppendorf 离心机上以 $1500 \times g$ 分离细胞, 用离心法在 0 °C 下使用 1 mL 生理缓冲溶液(140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl_2 , 5.5 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L Hepes, pH=7.4)洗涤(每次洗涤时间为 5 min)两次, 在 HH6003 型 γ 放射免疫分析仪上测定细胞的 CPM (Counting Per Minute, 每分钟的放射性计数)值(测定 3 次取平均值).

2 结果与讨论

当转铁蛋白与细胞悬液混合时转铁蛋白与细胞表面的转铁蛋白受体特异性结合形成复合物, 该结合过程在 0 °C 便可发生, 不需要代谢能. 在相同细胞浓度下, 细胞表面结合的转铁蛋白随加入的转铁蛋白浓度的增加而增加. 图 1 是 HL60 细胞结合的 $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf}$ 的 CPM 值随 $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf}$ 浓度的变化曲线.

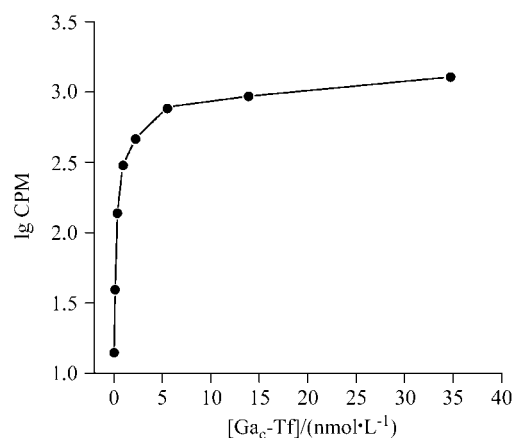


图 1 CPM 值随 $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf}$ 浓度变化的曲线

Figure 1 The variation of CPM with the concentration of $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf}$

由图 1 可见, 在低浓度时, HL60 细胞结合的 $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf}$ 的量随 $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf}$ 浓度的递增而急剧增加; 当 $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf}$ 浓度较大时, HL60 细胞结合的 $\text{Ga}_\text{C}\text{-Tf}$ 的量缓慢增加.

设每个 HL60 细胞有 n 个转铁蛋白受体(R), R 与转铁蛋白(L)的结合反应如下.



其中 K_A 为转铁蛋白与受体结合的平衡常数. 设细胞的总浓度为 c_t (nmol/L), 则受体的总浓度为 nc_t . 根据化学平衡得:

$$\frac{L_B/c_t}{L_F} = K_A \left(n - \frac{L_B}{c_t} \right) \quad (2)$$

其中 L_B 为与受体结合的转铁蛋白浓度, L_F 为游离转铁蛋白的浓度. 令 HL60 细胞的转铁蛋白平均结合部位数为 $\mu = L_B/c_t$, 则

$$\mu/L_F = K_A(n - \mu) \quad (3)$$

由(3)式可见 μ/L_F 与 μ 呈线性关系, 将 μ/L_F 对 μ 作图, 由直线的斜率和截距可得 K_A 和 n . 当转铁蛋白分别为 ^{125}I -apoTf, $\text{Ga}_C\text{-Tf}$, $\text{Ga}_2\text{-Tf}$ 和 $\text{Ga}_C\text{-Tf-Fe}_N$ 时所得 Scatchard 图如图 2(a)~(d)所示. 由图 2 直线的斜率和截距可得 ^{125}I -apoTf, $\text{Ga}_C\text{-Tf}$, $\text{Ga}_2\text{-Tf}$ 和 $\text{Ga}_C\text{-Tf-Fe}_N$ 与 HL60 细胞结合的表现结合常数分别为 $(0.97 \pm 0.20) \times 10^8$, $(1.2 \pm 0.14) \times 10^8$, $(1.1 \pm 0.19) \times 10^8$ 和 $(1.8 \pm 0.42) \times 10^8$ L/mol. 经数据分析可得, 不同形式的镓转铁蛋白均与细胞表面受体结合, 而且 apoTf, $\text{Ga}_C\text{-Tf}$, $\text{Ga}_2\text{-Tf}$ 与受体的结合能力基本相同.

HL60 细胞的平均受体数为 $(4.8 \pm 0.11) \times 10^5$.

在生理条件下, 人血清转铁蛋白金属离子结合部位仅有 30% 由铁(III)所占据^[1], 因此推论各种形式的镓转铁蛋白在血液中是存在的. 在脱铁转铁蛋白与铁(III)结合的过程中, 蛋白质的构象由“敞开”型转变为“闭合”型, 而后者有利于与转铁蛋白受体结合^[2]. 镓(III)与转铁蛋白结合后, 引起转铁蛋白构象变化很小^[4], 由此很易推测 apoTf, $\text{Ga}_C\text{-Tf}$ 与 $\text{Ga}_2\text{-Tf}$ 结合到转铁蛋白受体上的能力应是相似的, 这与我们计算的表现结合常数结果是一致的; 而 $\text{Ga}_C\text{-Tf-Fe}_N$ 结合到转铁蛋白受体上的表现结合常数略大, 这可能与铁(III)占据转铁蛋白 N-端有关. 通过体外研究表明其结合能力次序为 $\text{apoTf} \approx \text{Ga}_C\text{-Tf} \approx \text{Ga}_2\text{-Tf} < \text{Ga}_C\text{-Tf-Fe}_N$, 由此可得结合的亲和力与转铁蛋白结合镓的程度无关. 当转铁蛋白减少或被铁和其它金属离子饱和时, 利用转铁蛋白与转铁蛋白受体转运途径, 根据需要将镓与转铁蛋白配制成各种形式的配合物进行静脉注射, 进而特异性地将镓转运至转铁蛋白受体过度表达的部位, 抑制肿瘤细胞对铁的吸收以治疗恶性肿瘤, 减少毒副作用, 对镓转铁蛋白抗癌药物在临床上的应用提供理论依据.

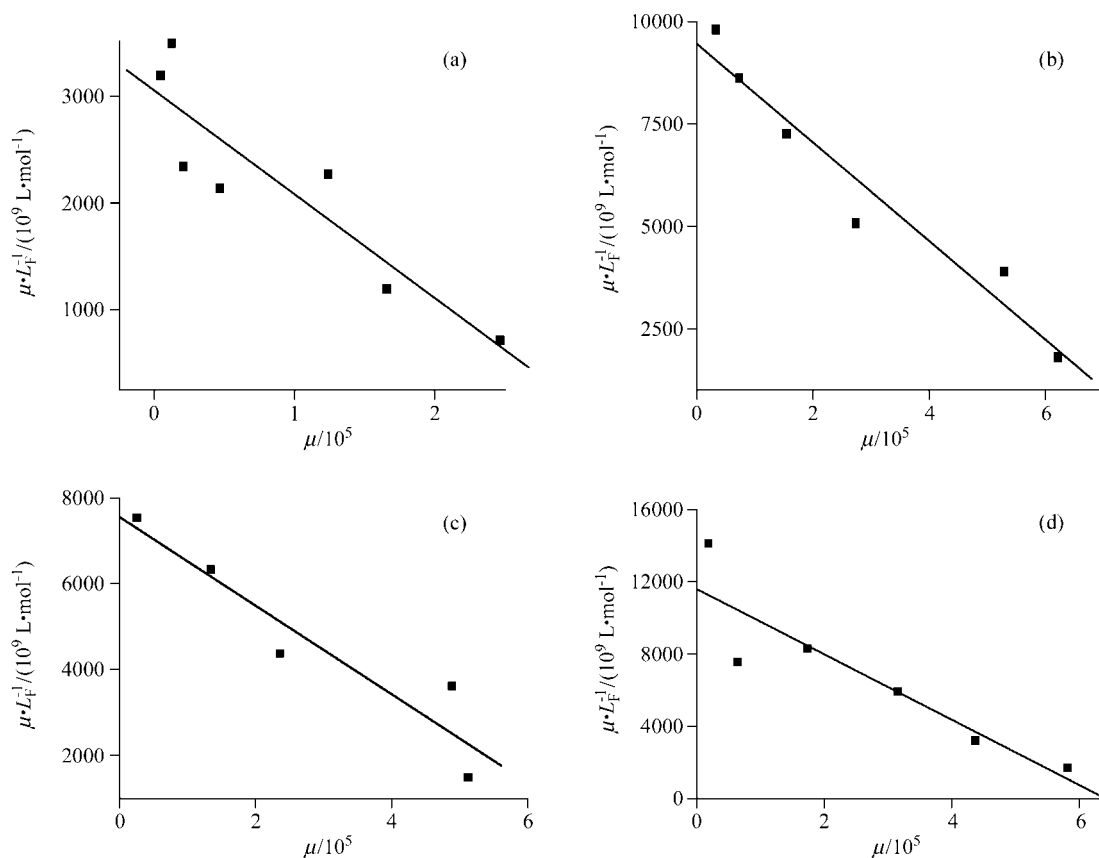


图 2 碘标记的转铁蛋白与 HL60 细胞结合的 Scatchard 图

Figure 2 Scatchard plots for the binding of ^{125}I labeled human transferrin to HL60 cells

(a) ^{125}I -apoTf; (b) $\text{Ga}_C\text{-Tf}$; (c) $\text{Ga}_2\text{-Tf}$; (d) $\text{Ga}_C\text{-Tf-Fe}_N$

References

- 1 Young, S. P.; Bomford, A.; Williams, R. *Biochem. J.* **1984**, *219*, 505.
- 2 Zhao, C.-G.; Yang, B.-S.; Zhang, W.; Bai, H.-J.; Liu, W. *Chin. Sci. Bull.* **2003**, *48*, 127.
- 3 Li, Y.-Q.; Yang, B.-S. *Chin. J. Chem.* **2004**, *22*, 1153.
- 4 Du, X.-L.; Wang, K.; Ke, Y.; Yuan, L.; Li, R.-C.; Chang, Y.-Z.; Ho, K. P.; Qian, Z.-M. *J. Cell Physiol.* **2004**, *201*, 45.
- 5 Bai, H.-J.; Liu, W.; Yang, B.-S. *Acta Chim. Sinica* **2002**, *60*, 1253 (in Chinese).
(白海静, 刘文, 杨斌盛, 化学学报, **2002**, *60*, 1253.)
- 6 Qian, Z.-M.; Li, H.-Y.; Sun, H.-Z.; Ho, K. P. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 561.
- 7 Chitambar, C. R.; Zivkovic-Gilgenbach, Z. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 1484.
- 8 Chitambar, C. R.; Zivkovic-Gilgenbach, Z. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 3929.
- 9 Weiner, R. E.; Avis, I.; Neumann, R. D.; Mulshine, J. L. *J. Cell Biochem.* **1996**, *24*, 276.
- 10 Li, Y.-Q.; Qiao, Q.-R.; Yang, X.-J.; Yang, B.-S. *Chin. J. Chem.* **2005**, *23*, 1361.
- 11 Harris, W. R.; Wang, Z.-P.; Brook, C.; Yang, B.-S.; Islam, A. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 5880.
- 12 Sun, H.; Li, H.; Sadler, P. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2817.
- 13 Harris, W. R.; Pecoraro, V. L. *Biochemistry* **1983**, *22*, 292.
- 14 Weiner, R. E. *Nucl. Med. Biol.* **1996**, *23*, 745.

(A0510171 CHENG, B.; ZHENG, G. C.)