

## 异常血红蛋白HbQueens及Hb广州—杭州的携氧功能 及78—180K的穆斯堡尔谱测定

廉英<sup>1\*</sup> 任邦哲<sup>1</sup> 曾玄圣<sup>2</sup>

(广州暨南大学 1. 医学院 2. 物理系, 广州 510632)

**摘要** 本实验通过对HbQueens[ $\alpha_{34}B_{15}Leu \rightarrow Arg$ ]及Hb广州—杭州[ $\alpha_{64}E_{13}Asp \rightarrow Gly$ ]的氧亲合力及它们在78—180K范围的穆斯堡尔谱测定, 得到氧亲合力大小顺序为HbQueens>Hb广州—杭州>HbA, 由穆斯堡尔谱结果的计算所得的结构参数表明中心 $Fe^{2+}$ 与卟啉环平面的距离为HbQueens<Hb广州—杭州<HbA, 说明Hb的 $Fe^{2+}$ 与卟啉环平面的距离愈小, 其氧亲合力愈高。

**关键词:** 异常血红蛋白; 氧平衡; 穆斯堡尔谱

利用变温穆斯堡尔谱探测Hb内 $Fe^{2+}$ 的立体结构参数与其氧亲合力的关系已有报道。Huynh<sup>[1]</sup>对脱氧HbA四聚体及其分离亚基进行测定, 未发现差异。Trautwein<sup>[2]</sup>却在实验误差较小的情况下发现了明显差异。1976年Eicher<sup>[3]</sup>还发现肌红蛋白(Mb)及Hb的穆斯堡尔参数明显不同, 他的计算数据表明: Mb  $Fe^{2+}$ 与卟啉平面的距离比Hb的小。后来还有异常Hb定温的穆斯堡尔谱测定<sup>[4]</sup>, 发现有衍生物峰, 但变温穆斯堡尔谱的研究未获成功<sup>[5]</sup>。我们在前文中<sup>[4]</sup>对Hb琼海作了穆斯堡尔谱的定性研究。本实验通过对HbQueens<sup>[6]</sup>、Hb广州—杭州<sup>[7]</sup>进行携氧功能, 以及在78—180K温度范围内它们的穆斯堡尔研究, 以探测氧亲合力与 $Fe^{2+}$ 微环境的关系。

### 材料与方 法

#### 一、氧平衡实验<sup>[4]</sup>

#### 二、穆斯堡尔谱实验

1. 样品制备与测定: 异常Hb在4℃下经DEAE-Sephadex A<sub>50</sub>柱纯化后, 对pH7.4 tris缓冲液(0.05mol/L tris-HCl, 0.1mol/L NaCl, 4℃)透析。然后在透析袋中用聚乙二醇吸收法浓缩至 $4.65 \times 10^{-3}$ mol/L Hb, 用 $Na_2S_2O_4$ 作脱氧剂制成脱氧样品, 样品于液N<sub>2</sub>中保存备用。然后进行78—180K范围的穆斯堡尔谱测定<sup>[8]</sup>。以 $\alpha$ -Fe标定速度, 据峰面积算得百分

\* 现通讯处为该校生物系 收稿日期: 1991-02-20, 修回日期: 1991-10-15

含量。

2. 计算结构参数：根据配体场理论和  $\Delta E_Q$  在不同温度下实验值的拟合，得到  $Hb \times Fe^{2+}$  的 3d 价电子在  $C_{4v}$  对称性时的三个低层电子能级  $E_1, E_2, E_3$  与反键单 3d 电子的能隙  $\epsilon_1, \epsilon_2, \epsilon_3$  [8, 9]，通过  $\epsilon_1, \epsilon_2, \epsilon_3$  与  $Fe^{2+}$  的空间结构参数的关系得到  $b, C_o, C$  值 [3]， $b$  为卟啉环平面与  $Fe^{2+}$  的距离， $C_o$  为  $F_8$  组氨酸咪唑氮原子与  $Fe^{2+}$  的距离， $C$  为卟啉环四个吡咯氮原子与  $Fe^{2+}$  的距离。

## 结 果

Table 1 及 Fig. 1 表明，HbQueens 氧平衡曲线明显左移，Hb 广州-杭州(HbGH) 的氧平衡曲线左移程度较 HbQueens 略小，说明氧亲和力的大小顺序为 HbQueens > Hb 广州 > HbA。

Table 2 及 Fig. 2 表明，纯化及浓缩后的  $HbO_2$ Queens 及  $HbO_2$ GH 分别形成了一些变性衍生物， $HbO_2$ Queens 形成 14.83% 的血色原及 2.1% 脱氧型 HbQueens， $HbO_2$ GH 形成了 12% 的类铁蛋白。

从 Table 3 中可见，HbQueens、HbGH 及 HbA 的  $\Delta E_Q$  与 T 的关系各不相同。它们的  $\Delta E_Q$  随温度升高而下降的速率是 HbQueens > HbGH > HbA。而 HbGH 与 HbA 的同质异能移  $\delta$  均分布于  $\delta$  随温度变化的直线周围(见前文 [8] Fig. 2)，即 HbGH 有正常的  $\delta$  值。而 HbQueens 的  $\delta$  值在低温区较大。

从 Table 4 中得到  $Fe^{2+}$  与卟啉环平面距离( $b$ )的大小为 HbA > Hb 广州 > HbQueens。

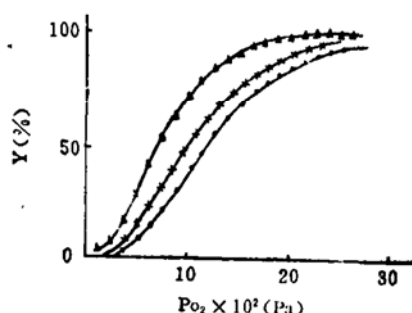


Fig. 1 The oxygen equilibrium curves for purified HbA, HbGuangzhou-Hangzhou and HbQueens.

▲ HbQueens  
× HbGH  
• HbA

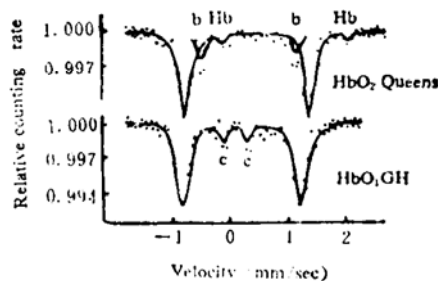


Fig. 2 Mössbauer spectra of purified  $HbO_2$ Queens and  $HbO_2$ Guangzhou-Hangzhou

Table 1 Oxygen equilibria of purified HbA, HbQueens and HbGuangzhou-Hangzhou (0.05mol/L tris-HCl buffer (0.1mol/L NaCl) pH7.2 (37°C),  $1.55 \times 10^{-5}$ mol/L Hb, 37°C)

	HbA	HbGH	HbQueens
$P_{50} \times 10^2$ (Pa)	12.84	10.89	7.09
n	2.75	2.70	2.78

**Table 2** Mössbauer parameters of purified HbO<sub>2</sub> Queens and HbO<sub>2</sub> Guangzhou-Hangzhou at 78K

subspectra	HbO <sub>2</sub> Queens*			HbO <sub>2</sub> GH*		
	$\delta$ (mm/s)	$\Delta EQ$ (mm/s)	%	$\delta$ (mm/s)	$\Delta EQ$ (mm/s)	%
HbO <sub>2</sub>	0.286	2.198	83.1	0.258	2.084	88
Hb	0.971	2.195	2.1			
b	0.283	1.590	14.83			
c				0.120	0.533	12

\* The estimated errors for  $\Delta EQ$ ,  $\delta$  are  $\pm 0.006$

**Table 3** Mössbauer parameters of deoxygenated HbQueens, HbGH, HbA (mm/s)

Absorber Temperature (K)	HbQueens		HbGH		HbA	
	$\delta$	$\Delta EQ$	$\delta$	$\Delta EQ$	$\delta$	$\Delta EQ$
78	0.993 $\pm 0.007$	2.434	0.899 $\pm 0.016$	2.356	0.911 $\pm 0.001$	2.250
90	0.991 $\pm 0.016$	2.314	0.916 $\pm 0.020$	2.270	0.929 $\pm 0.008$	2.220
112	0.960 $\pm 0.020$	2.141	0.898 $\pm 0.015$	2.170	0.918 $\pm 0.006$	2.160
123	0.935 $\pm 0.014$	2.150	0.899 $\pm 0.013$	2.138	0.909 $\pm 0.003$	2.140
136	0.923 $\pm 0.010$	2.025	0.910 $\pm 0.010$	2.126	0.899 $\pm 0.003$	2.135
180	0.910 $\pm 0.010$	1.940	0.902 $\pm 0.010$	1.912	0.905 $\pm 0.003$	1.985

**Table 4** The parameters about Fe<sup>2+</sup> of Hb

Parameter	HbA	HbGH	HbQueens
E <sub>1</sub> (cm <sup>-1</sup> )	28.000 $\pm$ 0.000	28.004 $\pm$ 0.000	28.000 $\pm$ 0.001
E <sub>2</sub> (cm <sup>-1</sup> )	1997.970 $\pm$ 0.119	1296.890 $\pm$ 0.092	850.025 $\pm$ 0.224
E <sub>3</sub> (cm <sup>-1</sup> )	-140.000 $\pm$ 0.001	-119.999 $\pm$ 0.001	-110.000 $\pm$ 0.003
$\epsilon_1$ (cm <sup>-1</sup> )	28.000 $\pm$ 0.000	28.004 $\pm$ 0.000	28.000 $\pm$ 0.001
$\epsilon_2$ (cm <sup>-1</sup> )	9887.026 $\pm$ 0.119	8596.837 $\pm$ 0.092	8096.094 $\pm$ 0.224
$\epsilon_3$ (cm <sup>-1</sup> )	15874.165 $\pm$ 0.119	16610.728 $\pm$ 0.092	17080.247 $\pm$ 0.224
b $\times 10^{-10}$ (m)	0.488 $\pm$ 0.001	0.441 $\pm$ 0.001	0.410 $\pm$ 0.001
C <sub>0</sub> $\times 10^{-10}$ (m)	1.976 $\pm$ 0.002	2.062 $\pm$ 0.002	2.139 $\pm$ 0.002
C $\times 10^{-10}$ (m)	2.078 $\pm$ 0.002	2.068 $\pm$ 0.002	2.061 $\pm$ 0.002

## 讨 论

实验结果证明，Hb Queens 与 Hb GH 的氧亲和力均比 HbA 的高。穆斯堡尔谱结果则显

示出 Hb Queens 较易形成血色原一类变性化合物, Hb GH 则易形成类铁蛋白。Hb Queens 的变异点在  $\alpha_1\beta_1$  面上, 为  $[\alpha_{34}(\beta_{15})\text{Leu}\rightarrow\text{Arg}]$ 。HbA 结构中,  $\alpha\beta_{15}$  Leu 与  $\beta\text{H}_1$  Thr 及  $\beta\text{H}_2$  Pro 在空间位置上接近, 它们之间以疏水键相连相当稳定。然而 Hb Queens 中  $\alpha\beta_{15}$  Leu $\rightarrow$ Arg, 故在疏水区引进了具有较大侧链的正电荷, 影响了  $\alpha_1-\beta_1$  面的稳定性, 同时  $\alpha\beta_{15}$  Arg 与同链  $\alpha\beta_{12}$  的 Arg 侧链方向一致, 相互排斥使 B 螺旋段稳定性下降, 这两个因素均促使 T 构象转向 R 型, 导致 Hb Queens 氧亲合力升高。由于  $\alpha_1-\beta_1$  面及 B 螺旋段的稳定性降低, 由肽链传递, 波及到 E 螺旋段使它摆动,  $\text{E}_7$  趋向  $\text{Fe}^{2+}$  配位, 故形成血色原。出现在脱氧 Hb 处的一对峰, 可能是 HbQueens 未完全氧合的结果。

Hb GH 是  $\alpha_{64}(\text{E}_{13})\text{Asp}\rightarrow\text{Gly}$ , 在 HbA 结构中,  $\alpha\text{E}_{13}$  Asp 与同链  $\text{E}_{16}$  Thr 空间位置相近, Asp 的羰基与 Thr 的羟基可能形成氢键, 而 Asp 所带负电荷则与水分子结合<sup>[7, 10]</sup>两者都能使 E 螺旋结构稳定, 阻止  $\text{O}_2$  进入血红素腔。但在 HbGH 中  $\text{E}_{13}\text{Asp}\rightarrow\text{Gly}$ , 上述两种稳定作用均消失, 使 E 螺旋不稳定, 血红素口袋容易张开, 氧亲合力必然升高。同时也可使血红素易脱出, 故在穆谱中可见到有类铁蛋白化合物出现。

实验结果表明, 氧亲合力大小顺序为; Hb Queens > HbGH > HbA, 而  $\text{Fe}^{2+}$  与卟啉环的距离则为; HbQueens < Hb 广州 < HbA, 事实说明异常 Hb 中某个氨基酸的变化可影响 Hb 四聚体的稳定性, 使 T 型易向 R 型转化, 同时也影响到中心  $\text{Fe}^{2+}$  的空间立体结构及配体场, 缩短  $\text{Fe}^{2+}$  与卟啉环平面的距离, 因而导致氧亲合力升高。这正符合 Perutz 的学说<sup>[10]</sup>。

根据 Herber 模型<sup>[11]</sup>,  $\text{Fe}^{2+}$  的  $\delta$  值是所有配体各部分同质异能移 P. I. S. 之和。上述变构较大地使 Hb Queens 中  $\text{Fe}^{2+}$  与血红素中四个吡咯氮之间的键距(C)缩短。而  $\text{Fe}^{2+}$  与  $\text{F}_8$  His N, 的键距( $\text{C}_0$ )则增长, 且这后者的变化较前者约大一个数量级以上<sup>[3]</sup>, 故 Hb Queens 有较大的  $\delta$  值。又因为 Hb Queens 的构象改变影响到晶格结构, 致使无反冲系数随温度改变较大, 使 Hb Queens 的  $\delta$  随温度的变化有异于 HbA。

由此可见, Hb 一级结构的变化, 导致它的立体构型及中心  $\text{Fe}^{2+}$  的立体结构的改变, 最终影响了它的氧亲合力。

## 参 考 文 献

- 1 Huynh B H, et al. *J Chem Phys*, 1974, 61 (9) :3750
- 2 Trautwein A, et al. *J Phys Colloq* 37(n12) Suppl, 1976, c6-191
- 3 Eicher H, et al. *J Chem Phys*, 1976, 64(4),1446
- 4 廉英, 等. 生物化学杂志, 1992, 8(4):414
- 5 Bill E, et al. *Proc Intern Conf on Appl Moss effect*, 1982:648
- 6 林光雄. 暨南大学医学院科研论文摘要汇编, 1983-1984; 29
- 7 刘普, 等. 生物化学杂志, 1989, 5(3):260
- 8 廉英, 等. 生物化学杂志, 1992, 8(4):498
- 9 Eicher H, et al. *J Chem Phys*, 1969, 50(6):2540
- 10 Perutz M F. *Br Med Bull*, 1976, 32:195
- 11 Herber R, et al. *Inorg Chem*, 1964, 3:101

## **The Oxygen Equilibrium and Mössbauer Spectra (78K-180K) of Hb Queens and Hb Guangzhou-Hangzhou**

Lian, Ying<sup>1</sup>    P. C. Jen<sup>1</sup>    Zeng, Xuan-sheng<sup>2</sup>

*(Jinan University, Guangzhou 1, Medical college, 2, Department of Physics, Guangzhou 510632)*

**Abstract** The Mössbauer spectra (from 78K to 180K) and oxygen affinity of Hb Queens and Hb Guangzhou-Hangzhou were measured. It was found that the order of magnitude of oxygen affinity was as follow, HbQueens > HbGH > HbA. The result; calculated from Mössbauer spectra showed that the distance (b) from Fe<sup>2+</sup> to the heme plane was in the following order: HbQueens < HbGH < HbA. It showed that the smaller was the b value of the Hb, the greater was the oxygen affinity.

**Key words;** Abnormal hemoglobin, Mössbauer spectrum, Oxygen equilibrium