科学通报
第41卷 第14期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1996年7月

铁离子对肌动蛋白聚合的影响

张法浩 邓欣荣 许善锦 王 夔
(北京医科大学药学院,北京 100083)

关键词 铁离子 肌动蛋白 聚合

肌动蛋白(Actin)是细胞骨架蛋白之一. 在一定的条件下其球状单体(G-actin)可以聚合为丝状聚合体(F-actin). 细胞的形态学变化及游动性与此特性有关. 已经证明一些金属离子(如 K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+})在 ATP 存在下可引发肌动蛋白的聚合[1]. 我们曾报告 Fe(Ⅱ)离子可引起体外培养的软骨细胞形态发生明显变化,并伴有细胞功能的变化[2]. 用鬼笔环肽标记方法观察到 Fe(Ⅱ)作用于细胞骨架,使细胞骨架微丝系统发生了解组与重组[3]. 为了进一步研究 Fe(Ⅱ)离子与细胞微丝的相互作用,探讨软骨细胞形态与功能之间的关系. 本文利用从兔腿肌肉分离纯化的肌动蛋白,研究了 Fe(Ⅱ)离子对肌动蛋白聚合过程的影响.

1 材料和方法

1.1 试剂

三磷酸腺苷(ATP)购自 Sigma 公司,叠氮化钠(NaN_3)和三羟甲基氨基甲烷(Tris)为进口分装试剂;其余均为国产分析纯试剂.

1.2 肌动蛋白的分离与纯化

参照文献[4]方法由兔腿肌肉分离提取丙酮干粉(-15℃可保存数月). 取一定量丙酮干粉经离心、盐析及透析等步骤分离并纯化得 G-actin. G-actin 溶解在缓冲溶液 G(2 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mmol/L ATP, 0.5 mmol/L 二巯基乙醇, 1.5 mmol/L NaN_3, pH=8.0)中在 4℃下放置两周无明显聚合. 由紫外分光光度法(A_{290})确定 G-actin 含量.

1.3 F-actin 含量测定

F-actin 为肌动蛋白的聚合体,因此可产生较强的光散射,本文用荧光计(RF-540 岛津)在 350nm 处测定 90°散射光强度(I/%)的结果与经典粘度法结果相比,表明,肌动蛋白溶液的 90°散射光强度与 F-actin 浓度呈正相关,并且简便,灵敏.

1.3.1 肌动蛋白聚合动力学分析 取 3.0 mL G-actin 溶液(含 3 μmol/L Actin, 1.0 mmol/L ATP, 0.10 mol/L KCl, pH=6.0)于荧光计比色池中,加入 100 μL 一定浓度的 $FeSO_4$ 溶液后,在 25℃下测定溶液散射光强度随时间的变化. 另外,在含 12 μmol/L G-actin 的溶液中加入 80 μL 2.5μ mol/L F-actin 后,重复上述实验.

1.3.2 F-actin 解聚合动力学分析 在 24 μmol/L G-actin 的溶液中分别加入含不同比例的 $MgCl_2$ 和 $FeSO_4$ 的高离子强度混合溶液,在 25℃下放置过夜,使 G-actin 完全转变为 F-actin.

1995-09-05 收稿, 1996-01-18 收修改稿

用缓冲溶液G将生成的F-actin样品稀释10倍(此时聚合体应解聚合)后,立即测定稀释溶液的散射光强度变化.

1.3.3 肌动蛋白聚合临界浓度测定 在十份不同浓度(0.1～1.0 μmol/L)的G-actin溶液(0.2 mmol/L ATP, 0.75 mmol/L NaN_3 pH=6.0)中加入一定浓度的 $FeSO_4$ 溶液,在25℃下温育24 h后测定溶液散射光强度.

2 结果与讨论

2.1 Fe(Ⅱ)对肌动蛋白聚合-解聚平衡的影响

图1是G-actin在Fe(Ⅱ)离子存在下的聚合动力学曲线. 可见,在未加Fe(Ⅱ)离子的情况下,在实验条件和时间内G-actin并没有发生明显的聚合. 而在G-actin中加入少量Fe(Ⅱ)离子后,发生了明显的聚合,并随Fe(Ⅱ)离子浓度的增加,这种聚合的速度和程度都有不同的提高.

图2是在不同离子条件下缔合的F-actin解聚合曲线. 可见由2.0mmol/L $MgCl_2$ 单独存在下而缔合的F-actin在稀释后可很快地发生解聚合,但是如果加入Fe(Ⅱ)离子后,其F-actin的解聚合性质受到了抑制,并且Fe(Ⅱ)离子浓度愈大,F-actin愈不易解聚合.

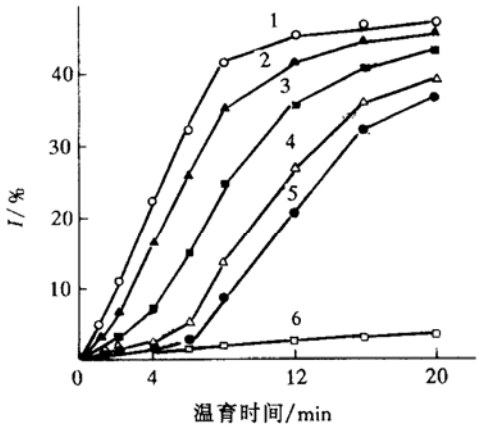

图1 G-actin聚合曲线

在G-actin溶液中分别加入:

1——0.30 mmol/LFe(Ⅱ),2——0.25 mmol/LFe(Ⅱ),

3——0.20 mmol/LFe(Ⅱ),4——0.15 mmol/LFe(Ⅱ),

5——0.10 mmol/LFe(Ⅱ),6——0.00 mmol/LFe(Ⅱ)

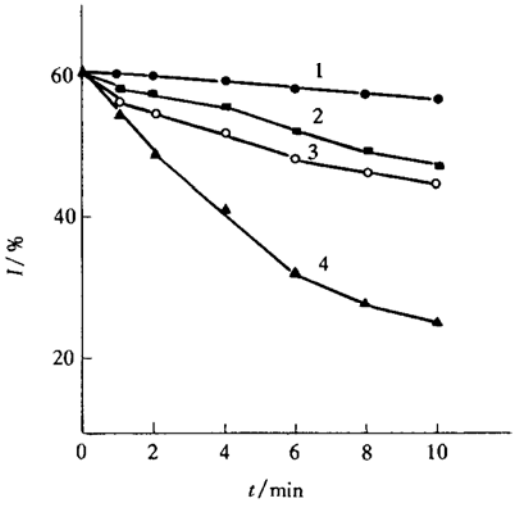

图2 F-actin解聚合曲线

G-actin在下列条件下聚合:

1——0.20 mmol/LFe(Ⅱ)+1.80 mmol/L $MgCl_2$,

2——0.15 mmol/LFe(Ⅱ)+1.85 mmol/L $MgCl_2$,

3——0.10 mmol/LFe(Ⅱ)+1.90 mmol/L $MgCl_2$,

4——2.0 mmol/L $MgCl_2$

以上实验结果表明Fe(Ⅱ)离子不但引发和促进了肌动蛋白的聚合,并且还增强了聚合体的稳定性,使其不易解聚合. 单体肌动蛋白与聚合体肌动蛋白的相互转化特性是真核细胞中肌动蛋白生物活性的基础,根据细胞的不同游动功能可随时改变聚合和解聚合的平衡点,以达合适的聚合度和丝状体长度. 因此,如果有Fe(Ⅱ)离子存在,有可能破坏了肌动蛋白的聚合-解聚合平衡,导致细胞微丝系统和细胞形态的异常变化,并且这种变化可能还是不可逆的. 应该引起注意.

2.2　Fe(Ⅱ)存在下肌动蛋白聚合动力学参数

肌动蛋白聚合过程应包括活化、成核和生长几个阶段，一般认为在正常情况下，成核是限速步骤．为了研究 Fe(Ⅱ)对肌动蛋白聚合的作用机理，本文还分别测定了加入 F-actin 作为晶种情况下的 G-actin 聚合曲线，G-actin 聚合迟滞时间及 G-actin 聚合临界浓度测定曲线(图 3、图 4、图 5 分别是当 Fe(Ⅱ)离子浓度为 0.20 mol/L 时的典型曲线，其它浓度时的曲线未列出)．

由图 3 可见，在加入 F-actin 作为晶种后其曲线形状与图 1 有显著不同，在 150 s 内基本上为一直线．由于已与活化、成核无关，因此直线斜率可用来表示聚合体生长速率(R)．结果(见表 1)表明肌动蛋白聚合体生长初速度并不受 Fe(Ⅱ)浓度改变的影响．由图 4 和图 5 方法分别求出的聚合迟滞时间(t_D)及 G-actin 聚合临界浓度(C_c)也分别列入表 1．

可见，聚合迟滞时间与加入体系的 Fe(Ⅱ)离子有关，Fe(Ⅱ)离子浓度愈大，迟滞时间愈短．由于迟滞时间表示了活化和成核的难易，因此，Fe(Ⅱ)离子可能是通过促进成核而影响肌动蛋白的

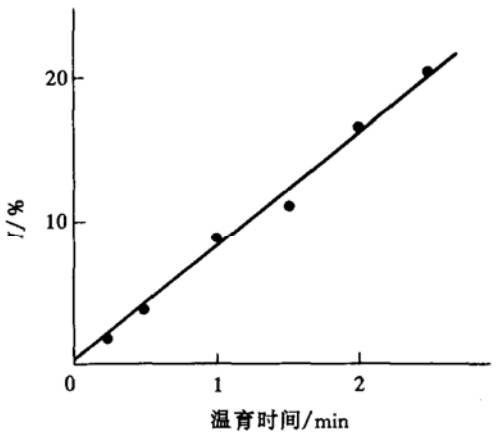

图 3　加入 F-actin 为晶种时的 G-actin 聚合曲线

表 1　肌动蛋白缔合动力学参数

Fe(Ⅱ)浓度 /m mol·L^{-1}	t_D /min	R /μmol·L^{-1}·min^{-1}	C_c /μmol·L^{-1}
0.10	6.0	4.8	0.62
0.15	4.1	5.0	0.50
0.20	2.7	5.1	0.45
0.25	1.6	5.0	0.41
0.30	0.5	5.2	0.36

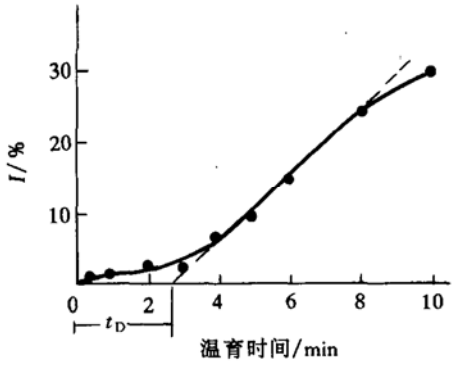

图 4　迟滞时间测定曲线

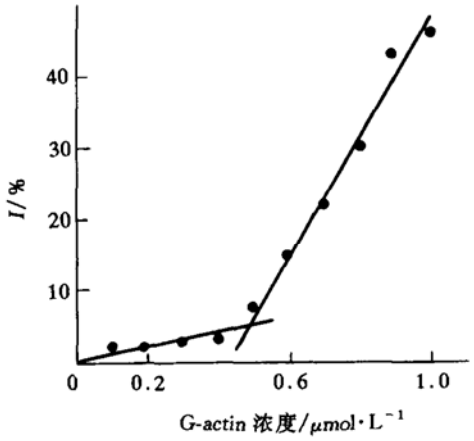

图 5　临界浓度测定曲线

聚合. 另外, G-actin 聚合临界浓度也支持上述观点.

本文结果表明 Fe(Ⅱ)离子可通过引发成核来促进肌动蛋白的聚合, 并伴有稳定聚合体的作用. Fe(Ⅱ)是否与肌动蛋白发生了结合, 结合部位在何处, 怎样的结合方式, 肌蛋蛋白构象有无变化等问题有待进一步的研究.

参 考 文 献

1 Frieden C. The Mg^{2+}-induced conformation change in rabbit skeletal muscle G-actin. J Biol Chem, 1982, 257: 2 882～2 886

2 张法浩, 许善锦, 王 婺. 自由基对软骨细胞的损伤作用. 北京医科大学学报, 1989, 21: 293～495

3 陈瑞新, 许善锦, 赵 翀等. 腐植酸与 Fe(Ⅱ)-EDTA 对体外培养的鸡胚软骨细胞合成分泌胶原蛋白类型及细胞骨架的影响. 科学通报, 1995, 40(10): 1 809～1 811

4 Pardee J D, Spudich J A. Purification of muscle actin. Methods Enzymol, 1982, 83: 164～181