

铁蛋白铁氧化沉淀机理的研究进展

胡菊, 邓建军, 李朝睿, 胡小松, 赵广华*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:铁素的缺乏严重影响着全球近一半人的健康,传统的补铁制剂由于会对人体产生副作用逐渐被禁止使用,因此,寻找安全、高效的补铁制剂势在必行。铁蛋白是广泛存在于生物体中的一种铁贮藏蛋白,它具有去除铁的毒性以及调节铁代谢平衡的双重功能。研究表明,铁蛋白具有良好的补铁活性,所以它可以作为加工原料被开发成补铁型功能食品,为此,对铁蛋白理化性质及其生物学功能的阐明就显得尤为重要。目前,有关铁蛋白的基础研究主要集中于铁蛋白的铁氧化沉淀和还原释放机理的研究,相对于后者而言,铁蛋白铁氧化沉淀机理的研究比较清楚。本文综述了国内外有关铁蛋白铁氧化沉淀机理的研究进展,以期以后新型补铁功能食品的开发提供理论依据。

关键词:铁,铁蛋白,铁氧化沉淀机理,功能食品

Research progress in mechanism of iron oxidative deposition in ferritin

HU Ju, DENG Jian-jun, LI Chao-rui, HU Xiao-song, ZHAO Guang-hua*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Iron deficiency is a problem that has seriously impacted on nearly half of global human health. The traditional preparation of iron supplementation has been gradually prohibited as a result of side effects on human beings. Therefore, it is imperative to look for a safe and efficient preparation of iron supplementation. Ferritin is a class of iron storage protein presented in all living organisms and serves the dual function of iron detoxification and iron metabolism. Research indicated that ferritin had a good iron activity, and it could be developed into iron functional food as raw materials. For this reason, it is important to clarify the physical and chemical properties of ferritin and its biological function. At present, the basic research focused on the mechanism of iron oxidative deposition and reductive release in ferritin. Compared with the latter, the iron oxidative deposition mechanism is more clearly. In this paper, the research progress about the iron oxidative deposition mechanism were summarize, in order to provide a theoretical basis for the development of new type iron functional food.

Key words: iron; ferritin; iron oxidative deposition mechanism; functional food

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)12-0436-04

铁的缺乏是一个全球性的问题,据世界卫生组织 2005 年统计数据表明,全球大约有 35 亿人缺铁,其中大多数是妇女和儿童,缺铁已经成为第九类健康风险因素。因此,改善铁素营养状况,是世界也是我国迫切需要解决的问题。传统的补血铁制剂主要是二价的非血红素铁(如:硫酸亚铁、有机酸亚铁盐类等),由于这些补铁剂具有副作用并且铁的吸收效率不高,导致补铁效果不理想^[1];另一方面,如果体内铁等金属离子过多,则会诱发体内产生大量自由基,从而破坏机体组织,损害心脏、大脑等器官,增加罹患癌症的风险。因此,寻找一种安全、高效的补铁制剂势在必行。然而,天然存在于生物体中的铁蛋白的发现给了我们极大的启示,由于它不仅能够贮藏大量的铁(每分子铁蛋白最多可容纳 4500 个 Fe

(III),而且可以调节细胞内铁的动态平衡,所以我们预想如果将铁蛋白开发成功能性食品,不仅可以起到补铁作用,而且可以防止由于体内铁素过多而引起的中毒。已经证明无论植物铁蛋白还是动物铁蛋白都具有和硫酸亚铁相同的补铁效果^[2],所以将铁蛋白开发成功能食品的想法是可行的。另外,从植物体中提取天然补铁的活性物质用来开发功能食品也代表了未来新型补铁制剂研发的一种趋势。由于对铁蛋白理化性质及其生物学功能的阐明直接关系到未来功能食品的开发,因此,对于其基础研究就显得尤为重要。而铁氧化沉淀机理是铁蛋白基础领域研究非常重要的一个方面,因此综述了国内外有关铁蛋白铁氧化沉淀机理的研究现状。

1 铁蛋白的结构与功能

1.1 铁与铁蛋白

铁是生物体生长发育必需的营养元素之一。铁可以形成血红素(heme)、铁硫原子簇(iron-sulfur

收稿日期:2009-01-13 * 通讯联系人

作者简介:胡菊(1984-),女,硕士,研究方向:蛋白质化学。

clusters) 以及其它一些非血红素铁化合物,这使得它在光合作用、呼吸作用、生物固氮、蛋白质和核酸的合成等诸多生理代谢过程中扮演着举足轻重的角色^[3]。同时,铁在生物体内也具有毒性,Fe(II)很容易与过氧化氢(氧分子不完全还原的产物)通过 Fenton 反应生成羟基自由基,此外,通过铁催化的 Haber-Weiss 反应也可以生成羟基自由基以及过氧离子自由基。这些自由基反应性极强,极易导致 DNA、蛋白质及细胞膜的破坏;Fe(II)的氧化产物-Fe(III)离子很容易水解生成氢氧化铁沉淀,使得铁的生物利用度下降。如何平衡生物体内铁的功能与毒性一直是动物、植物以及微生物生理生化研究中所面临的问题,而生物体内的铁蛋白(ferritin)的出现使得这一问题迎刃而解^[4]。目前,有关铁蛋白方面的研究已经涉及到了生物学、医学、营养学等诸多领域。

1.2 铁蛋白共有的结构特点及其功能

铁蛋白广泛存在于动物、植物和微生物的细胞中。在进化中,铁蛋白结构比较保守,它是一类通常由 24 个亚基组成的中空球状分子,内外直径分别约为 8、12.5nm。铁蛋白的亚基主要包括两种类型:即 H(重链)和 L(轻链)型,每个亚基包括 5 个 α 螺旋,即从 N 端起形成 4 个 α 螺旋(A、B、C、D),C 末端由第五个较短 α 螺旋(E)构成^[3,5]。24 个亚基构成一个呈 432 点对称的菱形十二面体蛋白质外壳。在该十二面体上沿二、三、四重旋转轴分别为由铁蛋白亚基与亚基之间组成的 12 个 2 倍轴通道、8 个 3 倍轴通道和 6 个 4 倍轴通道(图 1),负责铁蛋白与外部环境的物质交换^[6]。当细胞内 Fe(II)浓度高时,铁蛋白催化 Fe(II)被氧气分子氧化的反应,并把生成的 Fe(III)储藏于其内部空腔而没有将产物释放到溶液中,1 分子铁蛋白可最多储存 4500 个 Fe(III),这个特点是铁蛋白与其它蛋白明显的不同之处;当细胞需要铁时[Fe(II)浓度低时],铁蛋白在还原剂的帮助下将 Fe(III)还原为 Fe(II),使得铁从其内部释放出来供其它代谢所利用,所以铁蛋白在细胞内具有去除 Fe(II)的毒性以及调节铁代谢平衡的双重作用。

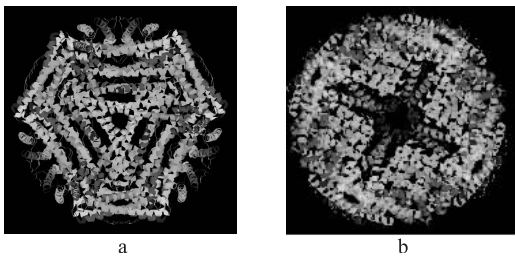


图 1 铁蛋白的结构
a:3 倍轴通道;b:4 倍轴通道。

1.3 不同来源铁蛋白亚基结构及其功能比较

组成哺乳动物铁蛋白的 24 个亚基通常包括 H(重链,分子量约为 21kDa)和 L(轻链,分子量约为 19.5kDa)两种类型,H 型和 L 型亚基的氨基酸序列具有 55% 的相似度^[7]。这两种亚基的功能截然不同,这与它们的结构密切相关。H 型亚基包含一个

亚铁氧化中心(ferroxidase site),这个中心负责亚铁离子的快速氧化。L 型亚基缺乏这个活性中心,但是它含有一个成核中心(nucleation site),可能与铁核的形成有关。另外,H 型铁蛋白还可以抑制 Fenton 反应的发生。H 型和 L 型两种亚基的比例与不同组织器官密切相关,例如:心脏和脑由于铁代谢旺盛而富含 H 型亚基,肝脏和脾脏由于主要用于铁的长期储藏而富含 L 型亚基^[6,8-9]。在牛蛙等两栖动物红细胞中,铁蛋白除了具有与哺乳动物类似的 H 型和 L 型亚基外,还存在一种包含一个亚铁氧化中心的 M(medium)型亚基或叫做类 H 型亚基,三种亚基可以形成杂合体铁蛋白^[10]。

植物铁蛋白与哺乳动物铁蛋白的结构明显不同,它只含有 H 型亚基。如成熟的豌豆铁蛋白的 H 型亚基的分子量通常为 28kDa,明显比动物的铁蛋白大。这主要是因为它比动物铁蛋白亚基多 1 段 EP(extension peptide)肽链,它的功能目前还不清楚^[11]。另外,大豆铁蛋白也具有与豌豆铁蛋白相似的结构^[12]。细菌如大肠杆菌 *E. coli* 中除含有 ferritinA、ferritinB 两类铁蛋白外,还有一种细菌铁蛋白(bacterioferritins)。它不仅具有亚铁氧化中心,而且含有一个 b 族亚铁血红素。这个亚铁血红素基团位于铁蛋白两个亚基之间并与之构成一个二聚体。血红素四个配位键以及各个单体由甲硫氨酸提供的一个轴向配位键形成血红素铁。细菌铁蛋白也可以抑制 Fenton 反应的发生^[13]。但为什么大肠杆菌 *E. coli* 含有三种类型的铁蛋白,到目前为止尚不清楚。

1.4 亚铁氧化中心结构

亚铁氧化中心直接关系到铁蛋白铁的快速氧化,所以下主要阐述亚铁氧化中心的结构特点:亚铁氧化中心位于四个 α 螺旋束中心,是由 7 个非常保守的氨基酸构成的两个铁离子结合位点。它们分别是 1 个组氨酸、4 个谷氨酸、1 个谷氨酰胺以及 1 个酪氨酸。如图 2 所示,人的 H 型亚基的亚铁氧化中心由螺旋 A 的 Glu27 和螺旋 B 上 His65 形成 A 位点,螺旋 A 的 Tyr34,螺旋 C 的 Glu107,螺旋 B 的 Glu61 组成 B 位点,螺旋 D 的 Gln141 和螺旋 B 的 Glu61 分别通过氢键和配位键将 A 位点与 B 位点相连。

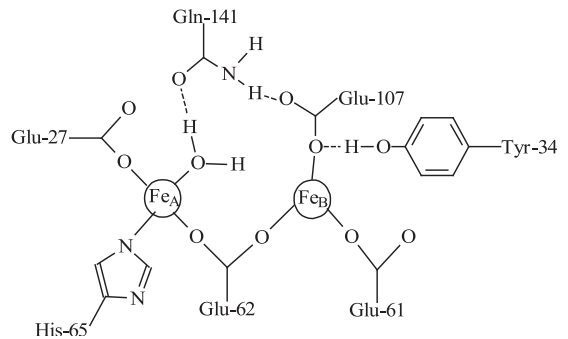


图 2 人重组重链铁蛋白亚铁氧化中心

与动物 H 型或类 H 型亚基亚铁氧化中心不同,细菌 FerritinA 的亚铁氧化中心除具有 A、B 两个铁离子位点外,还有一个毗邻的附加 C 位点。肠杆菌铁蛋白 A 亚基 C 位点在铁蛋白壳内壁,由 Glu49、

Glu126、Glu129、Glu130 四个残基组成(图3)。C 位点通过 Glu 130 残基的羧酸酯键与 B 位点桥接。与 A、B 位点不同,C 位点结合亚铁离子并不是亚铁离子快速氧化的必要条件^[14]。

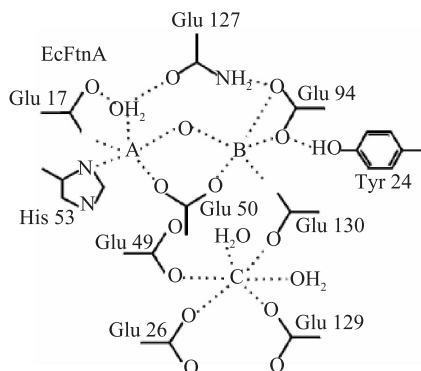
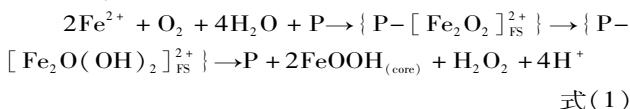


图3 大肠杆菌铁蛋白 A 亚基亚铁氧化中心

2 铁蛋白铁氧化沉淀机理

铁蛋白将如此多的 Fe(II) 氧化并储藏在其内部是一个非常有趣的生物矿化 (mineralization) 现象,关于 Fe(II) 在铁蛋白中的氧化沉淀机理也是国际生物无机化学领域的研究热点,但目前所进行的研究主要集中于重组的人重链铁蛋白 (recombinant human H-chain ferritin, HuHF)、马脾铁蛋白 (Horse spleen ferritin, HoSF) 以及重组的牛蛙 M 或 H 型铁蛋白 (recombinant bullfrog M or H-chain ferritin, BfMF or BfHF)。对以上铁蛋白铁氧化沉淀机理的研究发现以下三种途径:

第一条途径:当加入 Fe(II) 的量 $\leq 2\text{Fe(II)}/\text{H-chain}$ 时,反应机理如下^[15-20]:



P 代表没有结合铁的亚铁氧化还原中心,它位于 H 型或类 H 型亚基中。从式(1)可知,首先在铁蛋白的 H 型或类 H 型亚基的亚铁氧化中心,两个 Fe(II) 被一个氧分子氧化生成一分子过氧桥连的三价双铁中间体 ($\mu-1,2$ -peroxodiiron (III) intermediate), 该中间体在可见区在 650nm 有最大吸收,对于 HuHF 在 50ms 时达到最大吸收;该化合物不稳定,迅速分解为氧桥连的三价双铁配合物 ($\mu-1,2$ -oxodiiron (III) complex);并最终分解为单核的 Fe(III) 化合物,从亚铁氧化中心转移至铁蛋白腔内,同时,在这一过程中还伴随有 1 分子 H_2O_2 以及 4 个 H^+ 的释放。

第二条途径:当加入 Fe(II) 的量 $> 10\text{Fe(II)}/\text{H-chain}$ 时,铁的氧化主要在铁核上进行,这时矿化机理扮演主要角色。按照这个机理 1 个氧分子可以氧化 4 个 Fe(II),但没有 H_2O_2 的生成,反应方程式如下:



Zhao 等利用紫外可见停流技术 (UV-visible stopped-flow) 对 HuHF 的研究表明,当一次加入的 Fe(II) 的量 $> 48\text{Fe(II)}/\text{protein}$ 时,过氧桥连的三价双铁中间体同样可以形成,但随着一次加入的铁离子的量从 100、200、500 到 800 Fe(II)/铁蛋白,过氧

桥连的三价双铁中间体在 650nm 呈现出非凡的生成和分解动力学曲线^[15,21],如图 4 所示。

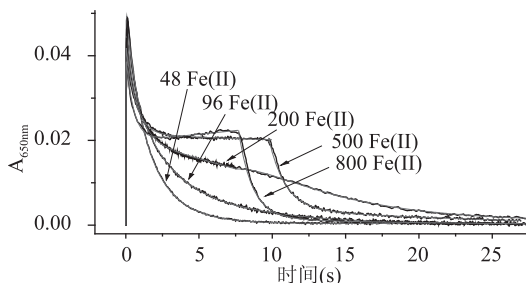
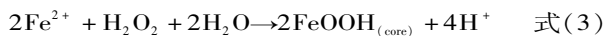


图4 人类铁蛋白 H 型亚基铁氧化动力学曲线

从图 4 可以看出,当加入 48 Fe(II)/铁蛋白 (即 2 Fe(II)/H-chain) 时,过氧桥连的三价双铁中间体生成后迅速分解,但随着加入铁的量增加,特别当增加到 500 和 800 Fe(II)/铁蛋白时,动力学曲线出现一个平台,表明这个中间体的生成速度与衰减速度相等,预示着铁蛋白的亚铁氧化中心始终都起着催化作用。这个结论得到其它光谱学以及物理化学实验结果的证实^[10]。因此,当加入 Fe(II) 的量多时,蛋白催化与矿化机理同时并存,但是随着加入量的逐渐增加,矿化机理所起的作用也随之增加。

第三条途径:最近的研究表明,当加入 Fe(II) 的量多时除了以上这两条铁氧化途径外还存在另外一个去毒反应^[10],即铁氧化沉淀的第三条途径,如反应式(3)所示:



从反应式(3)可以看出,虽然它的反应物与 Fenton 反应相同,但产物却大不相同,反应并没有产生羟基自由基,因此,通过该反应,铁蛋白不但可以去除 Fe(II) 的毒性,同时还可以消除过氧化氢的毒性,更加证实了哺乳动物铁蛋白在细胞内具有去毒功能。相同的去毒反应在大肠杆菌的 Dps 蛋白 (具有 12 个亚基组成的内空的球状分子,也有亚铁氧化中心) 中同样存在,这与 Dps 蛋白对 DNA 的保护的生物学功能相吻合^[22]。Zhao 等^[23] 利用 EPR 顺磁旋诱捕技术在无氧条件下监测 Fe(II) 与过氧化氢反应羟基自由基状况,发现当人重组 H 型亚基铁蛋白存在时,羧基自由基生成得到极大抑制,直接证实哺乳动物铁蛋白具有祛毒功能。

综上所述,Fe(II) 在铁蛋白中氧化沉淀至少存在以上三种途径 (反应式 1、2、3),各种反应途径所占比例跟亚铁离子的量以及 H 型与 L 型亚基在铁蛋白中的比例有关。当亚铁离子含量较高时以矿化机理为主,但亚铁氧化反应途径及去毒反应途径也同时存在;并且 H 型亚基与 L 型亚基在铁氧化过程中存在协同作用。

3 展望

目前,关于铁蛋白的研究主要集中于动物铁蛋白的铁氧化沉淀机理以及它的去毒功能研究较多,而对于广泛存在的植物铁蛋白研究甚少。由于植物铁蛋白的调控方式、结构、存在部位等与动物铁蛋白明显不同,因此植物铁蛋白有可能有着其独特的理化性质及其生物学功能,这也是以后研究的一个热

点问题。一方面,存在于细胞质体的植物铁蛋白在种子的形成、叶片的衰老以及种子的萌发等生理代谢中扮演着维持铁素动态平衡的作用。那么,是否植物铁蛋白有着与动物铁蛋白相同的铁氧化沉淀机理?是否植物铁蛋白也具有去除毒的功能?以及EP在植物铁蛋白铁氧化沉淀中的作用等都是未来很有趣的研究方向;另一方面,从铁蛋白功能食品开发的角度来说,与动物铁蛋白相比,植物铁蛋白来源更加丰富,而且以绿色植物为原料开发的功能产品具有安全、健康、环保等优点越来越受到消费者的青睐,所以对植物铁蛋白的研究以及开发利用显得十分重要。

参考文献

- [1] Theil E C. Iron, Ferritin, and Nutrition [J]. *Annu Rev Nutr*, 2004, 24: 327-343.
- [2] Davila-Hicks P, Theil E C, Lonnerdal B. Iron in ferritin or in salts (ferrous sulfate) is equally bioavailable in nonanemic women [J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 80: 936-940.
- [3] Harrison P M, Arosio P. Ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation [J]. *Biochim Biophys Acta Bio-Energ*, 1996, 1275: 161-203.
- [4] Grady J K, Chen Y, Chasteen N D, et al. Hydroxyl radical production during oxidative deposition of iron in ferritin [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264: 20224-20229.
- [5] Masuda T, Goto F, Yoshihara T. A novel plant ferritin subunit from soybean that is related to a mechanism in iron release [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 19575-19579.
- [6] Chasteen N D, Harrison P M. Mineralization in ferritin: An efficient means of iron storage [J]. *J Struct Biol*, 1999, 126: 182-194.
- [7] Zhao G, Arosio P, Chasteen N D. Iron (II) and Hydrogen Peroxide Detoxification by H-chain ferritin [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(10): 3429-3436.
- [8] Zamocky M, Koller. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis [J]. *Prog Biophys Mol Bio*, 1999, 72: 19-66.
- [9] Crichton R R, Herbas A, Chavez-Alba O, et al. Identification of catalytic residues involved in iron uptake by L-chain ferritins [J]. *J Biol Inorg Chem*, 1996, 1: 567-574.
- [10] Carrondo M A. Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint [J]. *EMBO J*, 2003, 22: 1959-1968.
- [11] Ragland M, Briat J F, Gagnon J, et al. Evidence for conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265: 18339-18344.
- [12] Lescure A, Massenet O, Briat. Purification and characterization of an iron-induced ferritin from soybean (*Glycine max*) cell suspensions [J]. *Biochem J*, 1990, 272: 147-150.
- [13] Macedo S, et al. The nature of the di-iron site in the bacterioferritin from *Desulfovibrio desulfuricans* [J]. *Nat Struct Biol*, 2003, 10: 285-290.
- [14] Stillman T J, Connolly P P, Latimer C L, et al. Insights into the effects on metal binding of the systematic substitution of five key glutamate ligands in the ferritin of *Escherichia coli*. [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 26275-26286.
- [15] Zhao G, Bou-Abdallah F, Arosio P, et al. Multiple pathways for mineral core formation in mammalian apoferritin, the role of hydrogen peroxide [J]. *Biochemistry*, 2003, 42: 3142-3150.
- [16] Bou-Abdallah F, Papaefthymiou G, Scheswohl D S, et al. μ -1,2-peroxo-bridged di-iron (III) dimer formation in human H-chain ferritin [J]. *Biochem J*, 2002, 364: 57-63.
- [17] Zhao G, Su M, Chasteen N D. μ -1,2-Peroxo diferric complex formation in horse spleen ferritin, a mixed H/L-subunit heteropolymer [J]. *J Mol Biol*, 2005, 352: 467-477.
- [18] Pereira A S, Small W, Krebs C, et al. Direct spectroscopic and kinetic evidence for the involvement of a peroxodiferric intermediate during the ferroxidase reaction in fast ferritin mineralization [J]. *Biochemistry*, 1998, 37: 9871-9876.
- [18] Hwang J, Krebs C, Huynh B H, et al. A short Fe-Fe distance in peroxodiferric ferritin: control of Fe substrate versus cofactor decay [J]. *Science*, 2000, 287: 122-125.
- [20] Zhao G, Bou-Abdallah F, Yang X, et al. Is hydrogen peroxide produced during iron (II) oxidation in mammalian apoferritins? [J]. *Biochemistry*, 2001, 40: 10832-10838.
- [21] Bou-Abdallah F, Zhao G, Mayne H R, et al. Origin of the unusual kinetics of iron deposition in human H-chain ferritin [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 3885-3893.
- [22] Zhao G, Ceci P, Ilari A, et al. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells: a ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 27689-27696.
- [23] Zhao G, Arosio P, Chasteen N D. Iron (II) and Hydrogen Peroxide Detoxification by Human H-Chain Ferritin, an EPR Spin-Trapping Study [J]. *Biochemistry*, 2006, 45: 3429-3436.
- [23] 邵辉,王春满,孙艳波.再制干酪制造方法的研究[J].农产品加工,2007(8):72-73.
- [24] Lee S K, Buwalda R J, Euston S R, et al. Changes in the rheology and microstructure of processed cheese during cooking [J]. *Lebensm Wiss Technol*, 2003, 36: 339-345.
- [25] 王建鑫,孙忠伟,杨晓波,等.涂抹型再制干酪的研究[J].中国乳业,2005(2):47-49.

(上接第 435 页)

review [J]. *Food Microstruct*, 1985(4): 297-312.

[20] 顾敏锋,张国农,吕兵.从质构角度优化涂抹再制干酪的工艺参数 [J]. *中国乳品工业*, 2005, 33(4): 20-23.

[21] 张国农,顾敏锋,李彦荣,等.工艺参数对再制干酪的质构和流变性质的影响 [J]. *中国乳品工业*, 2006, 34(10): 9-13.

[22] 王亚威,邵辉,鲁慧峰,等.再制干酪的研究 [J]. *中国乳品工业*, 2003, 31(5): 26-28.