

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160392

## 重组大豆铁蛋白受食源活性小分子诱导的还原释放性质

刘玉茜<sup>1</sup>, 杨瑞<sup>1,2</sup>, 张志平<sup>3</sup>, 吴丹丹<sup>1</sup>, 唐禹馨<sup>1</sup>, 徐晶晶<sup>1</sup>, 周中凯<sup>1,2</sup>

(1. 食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457;  
2. 天津科技大学新农村发展研究院, 天津 300457; 3. 广东环境保护工程职业学院, 佛山 528216)

**摘要:** 以提取纯化后的重组 rH-2 铁蛋白为原料, 利用食源活性小分子表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、维生素 C( $V_C$ )、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH) 3 种还原成分, 研究食品多组分子对铁的还原释放的影响, 并对其作用机理进行了初步探讨. 结果表明: 供试的 3 种物质都能诱导铁的还原释放. 其中, 在装载相同  $Fe^{2+}$  浓度的情况下, 随着还原剂浓度的升高,  $V_C$  和 EGCG 诱导的  $Fe^{2+}$  还原释放速率呈上升趋势, 且  $V_C$  相对于 EGCG 诱导的还原释放速率更大. 由  $V_C$ 、EGCG 和 NADH 诱导铁蛋白还原释放的比较分析得知:  $V_C$  诱导的还原释放整体吸光度上升速率最快, 持续时间最长; NADH 诱导的还原释放整体吸光度上升速率最慢, 持续时间最短.

**关键词:** 铁蛋白; 还原释放;  $V_C$ ; EGCG; NADH

中图分类号: Q518.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2018)05-0014-06

## Iron Release Properties of Recombinant Soybean Ferritin Induced by Active Molecule from Food Resources

LIU Yuqian<sup>1</sup>, YANG Rui<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhiping<sup>3</sup>, WU Dandan<sup>1</sup>, TANG Yuxin<sup>1</sup>,  
XU Jingjing<sup>1</sup>, ZHOU Zhongkai<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. The New Rural Development Research Institute, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 3. Guangdong Polytechnic of Environmental Protection Engineering, Foshan 528216, China)

**Abstract:** Taking the purified recombinant rH-2 protein as materials, the effect of food multicomponent molecules, including EGCG,  $V_C$  and NADH, on the iron release of rH-2 was studied, and the mechanism was preliminarily discussed. The results showed that three substances for trial can induce iron release. The release rate of  $Fe^{2+}$  induced by  $V_C$  and EGCG increased as the reducing agent concentration increased in the same loading of  $Fe^{2+}$  concentration conditions, and the release rate induced by  $V_C$  was greater than that by EGCG. In addition, a comparative analysis showed that the highest release rate of  $Fe^{2+}$  was induced by  $V_C$ , as compared with EGCG and NADH, and its release process lasted longer, while NADH led to the slowest release rate with the shortest duration.

**Key words:** ferritin; reduction and release;  $V_C$ ; EGCG; NADH

铁蛋白是广泛存在于生命体内的一种贮铁关键蛋白质<sup>[1]</sup>. 典型的铁蛋白分子是由 24 个亚基组成的中空球状分子<sup>[2]</sup>, 每两个亚基反向平行形成一组, 再由这 12 组亚基对构成一个近似正八面体, 成 4-3-2 重轴对称的球状分子<sup>[3]</sup>. 一分子铁蛋白包括 12 个二

重轴通道、8 个三重轴通道和 6 个四重轴通道<sup>[4]</sup>(图 1). 这些通道负责铁蛋白与外界环境的物质交换, 是铁蛋白内部与外部离子进出铁蛋白的必经之路, 起着沟通铁蛋白内部空腔与外部环境的作用<sup>[5]</sup>.

铁蛋白的铁还原释放现象是指当细胞需要铁时

收稿日期: 2016-12-01; 修回日期: 2017-06-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31501489); 天津市自然科学基金资助项目(16JCQNJC14500)

作者简介: 刘玉茜(1990—), 女, 山东泰安人, 博士研究生; 通信作者: 周中凯, 教授, z Zhou@tust.edu.cn

( $\text{Fe}^{2+}$ 浓度低),铁蛋白在还原剂的帮助下将储存于铁蛋白内部空腔内的  $\text{Fe}^{3+}$ 还原为  $\text{Fe}^{2+}$ ,使铁释放出来并转移到铁蛋白外部供机体利用的过程,释放的快慢与还原剂的浓度、蛋白的种类以及溶液 pH 有很大关系<sup>[6]</sup>.研究铁蛋白的铁还原释放是了解铁蛋白铁代谢途径及其机理的重要手段之一,同时也为了进一步阐明铁蛋白的性质,为开发新型天然补铁功能产品提供良好的基础资料.目前,对于铁蛋白的铁吸收途径研究比较清楚,由于铁蛋白的铁释放过程比较复杂,无法采用简单动力学公式阐明铁还原释放全过程及其规律<sup>[7]</sup>,因而相关的研究进展报道并不多.

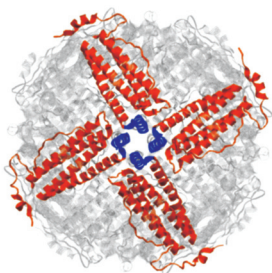


图1 铁蛋白壳状结构图  
Fig. 1 Ferritin structure

本实验中利用食源活性小分子表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、维生素 C( $\text{V}_C$ )、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)3种还原成分,研究食品多组分分子对铁还原释放的影响.其中:EGCG是从绿茶中提取出的一种抗氧化极强的多酚类物质. $\text{V}_C$ 是食品工业中非常常用的活性组分,是一种高活性物质和抗氧化剂,能使难以吸收的三价铁还原为易吸收的二价铁,促进了铁的吸收.实验中另一种原料 NADH 为还原态,具有将三价铁还原为二价铁的性质<sup>[8]</sup>.这3种成分均为还原性分子,但是其相对分子质量大小和性质各不相同,它们对铁还原释放的影响非常值得研究.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

重组 H-2 亚基铁蛋白(rH-2)大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)表达菌株(菌液,实验室保存);胰蛋白胨、酵母抽提物,上海富雪生物科技有限公司;NaCl、NaOH,天津市科密欧化学试剂有限公司;HCl、乙二胺四乙酸(EDTA)、 $\text{NaN}_3$ ,天津市风船化学试剂科技有限公司;过硫酸铵,天津市北方天

医化学试剂厂;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、考马斯亮蓝 R-250、硫酸亚铁( $\text{FeSO}_4$ )、金属螯合剂菲洛嗪(Ferrozine)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、维生素 C( $\text{V}_C$ )、NADH、氨卡青霉素(AMP)、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)(分析纯)、蛋白 marker(分析纯)、牛血清白蛋白(BSA)(分析纯)、福林酚,北京索莱宝科技有限公司;溴酚蓝、四甲基乙二胺(TEMED),上海北诺生物科技有限公司; $\beta$ -巯基乙醇,美国 Amresco 公司;丙烯葡聚糖凝胶 Sephacryl S-300(分析纯),江西丰临医用器械有限公司;硫酸铵(分析纯),天津市光复科技发展有限公司;其他试剂为国产分析纯.

TGL-16A 型医用离心机,长沙平凡仪器仪表有限公司;K36616D 型微量移液器,德国 Eppendorf 公司;DYY-2C 型电泳槽,北京市六一仪器厂;EMS-19 型磁力搅拌器,天津市欧诺仪器仪表有限公司;SCIENTZ-D 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;GZX-9146MBE 型电热鼓风干燥箱、DV-908 型立式压力蒸汽灭菌器,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;SIM-F140AY65-PC 型制冰机,松下电器产业株式会社;BS-100A 型自动部分收集器,上海青浦沪西仪器厂;89090A 型紫外分光光度计,Agilent 公司.

### 1.2 重组 H-2 亚基铁蛋白(rH-2)的制备与纯化

#### 1.2.1 rH-2 的制备

rH-2 的制备在 Masuda 等<sup>[9]</sup>的方法上稍作修改.将含有 rH-2 目的基因表达载体的大肠杆菌(*E. coli*)接种至含  $50 \mu\text{g/mL}$  AMP 的 LB 培养基,  $37^\circ\text{C}$  培养.当细菌细胞浓度达到  $A_{600} = 0.6$  时,加入工作浓度为  $100 \mu\text{mol/L}$  的 IPTG 诱导目的蛋白表达,  $37^\circ\text{C}$  摇床培养  $12 \sim 14 \text{ h}$ ;  $4^\circ\text{C}$ 、 $10\ 278 \text{ r/min}$  离心  $15 \text{ min}$ ,取沉淀.将收集得到的沉淀菌体悬浮于纯净水中,将菌体进行超声破碎  $20 \text{ min}$ ,超声时间为  $2 \text{ s}$ ,工作间隔为  $2.5 \text{ s}$ .超声后菌液  $4^\circ\text{C}$ 、 $10\ 000 \text{ g}$  离心  $15 \text{ min}$ ,收集上清液于  $50^\circ\text{C}$  水浴加热  $10 \text{ min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ 、 $10\ 278 \text{ r/min}$  再次离心  $15 \text{ min}$ ,取上清液.在上清液中加入 40% 硫酸铵盐析沉淀,在  $4^\circ\text{C}$  层析柜中静置过夜.  $4^\circ\text{C}$ 、 $10\ 278 \text{ r/min}$  离心  $15 \text{ min}$ ,收集沉淀,将沉淀用缓冲液( $20 \text{ mmol/L}$  Tris-HCl, pH 8.0,  $100 \text{ mmol/L}$  NaCl)进行复溶即可得到 rH-2 粗蛋白.使用 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5,  $20 \text{ mmol/L}$ )透析 rH-2 粗蛋白,每隔  $6 \text{ h}$  换一次缓冲液,透析 3 次除去硫酸铵.最后将透析后得到的蛋白溶液用  $0.22 \mu\text{m}$  水系膜过滤.

### 1.2.2 rH-2 的纯化与表征

将粗蛋白进行凝胶柱层析,上样前均需过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜.用含 0.15 mol/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)平衡 Sephacryl S-300 柱,待凝胶柱平衡后,取样品上样后再洗脱,流量为 0.5 mL/min,每管 5 mL 收集样品,并用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测蛋白纯度.蛋白纯化过程均在 4  $^{\circ}\text{C}$  下低温操作.最后将纯化的 rH-2 蛋白超滤浓缩后置于 4  $^{\circ}\text{C}$  备用.

参照 Laemmli<sup>[10]</sup>方法,采用 SDS-PAGE 电泳测定分离纯化后的 rH-2 的纯度.其中 SDS-PAGE 电泳蛋白质 marker 相对分子质量:磷酸化酶 B  $9.74 \times 10^4$ ,牛血清清蛋白  $6.62 \times 10^4$ ,兔肌动蛋白  $4.30 \times 10^4$ ,牛碳酸酐酶  $3.10 \times 10^4$ ,胰酶抑制剂  $2.01 \times 10^4$ ,溶菌酶  $1.44 \times 10^4$ .凝胶为 4%~20% 梯度胶,胶板大小为 80 mm(W)  $\times$  73 mm(H)  $\times$  0.75 mm(T).每孔点样 10  $\mu\text{L}$ ,marker 6  $\mu\text{L}$ .电泳在 17 mA 恒流下进行,电泳完成后用考马斯亮蓝 R-250 进行染色.

### 1.2.3 rH-2 铁蛋白浓度的测定

蛋白浓度测定参照 Lowry 法<sup>[11]</sup>,以牛血清蛋白(BSA)作标准曲线.

标准曲线的绘制:取 6 支 1.5 mL 离心管,编号后分别加入 0、20、40、60、80、100  $\mu\text{L}$  0.5 mg/mL BSA,用蒸馏水补足 400  $\mu\text{L}$ ,使每管蛋白含量分别为 0、10、20、30、40、50  $\mu\text{g}$ ,每支离心管中加入 400  $\mu\text{L}$  标准蛋白工作液,剧烈震荡后静置 10 min.继续加入 20% 福林酚 200  $\mu\text{L}$ ,立即混匀,室温下静置 30 min.用石英比色皿测定 750 nm 处吸光度  $A_{750}$ ,以蛋白浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,其方程为  $y = 0.009x + 0.0958$ ,  $R^2 = 0.9787$ .

样品测定:根据溶液蛋白浓度的高低,选择合适的加样量,每样作 3 个平行.用超纯水补足 400  $\mu\text{L}$ .后续处理同上述标准曲线的绘制.根据吸光度对照标准曲线,得出比色液中蛋白质含量.

### 1.3 rH-2 铁蛋白还原释放动力学测定

菲洛嗪是一种螯合剂,当其遇到  $\text{Fe}^{2+}$  时,相互结合形成螯合物  $[\text{Fe}(\text{ferrozine})_3]^{2+}$ ,这种螯合物在 562 nm 波长处有紫外吸收,其紫外吸收强度可以间接判断  $\text{Fe}^{2+}$  的释放量<sup>[12]</sup>.反应在 25  $^{\circ}\text{C}$  下进行,以不加还原剂的体系作为空白对照.

$\text{FeSO}_4$  溶液的配制:用浓硫酸配制 50 mL pH 2.0 的酸化水.称取 0.0834 g  $\text{FeSO}_4$  溶于酸化水中,定容,配制成 50 mL 浓度为 6 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$  母液,摇匀后避光保存.

螯合剂溶液的配制:称取 0.04924 g 菲洛嗪溶于 1 mL 的蒸馏水中,配制成 0.1 mol/L 的菲洛嗪母液,摇匀后避光保存.

在 rH-2 的提取过程中,从大肠杆菌生长和表达的培养基至蛋白的提取纯化过程都没有铁离子的加入,所以制备出来的铁蛋白是不含铁的空蛋白<sup>[9]</sup>.因此,参照文献[13]报道的方法先将纯化得到的 rH-2 制备成含铁的铁蛋白,然后再对制备的 rH-2 含铁铁蛋白进行还原释放动力学测定<sup>[14]</sup>.

#### 1.3.1 EGCG 对铁蛋白还原释放的影响

取 4 支 1.5 mL 的离心管,分别加入 1 mL 浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$  的铁蛋白溶液,再分别加入不同体积的浓度为 6 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$  溶液,使  $\text{Fe}^{2+}$  与铁蛋白的终浓度比分别为 600 : 1、400 : 1、200 : 1、100 : 1,避光摇匀,静置 10 min 后加入浓度为 0.1 mol/L 的菲洛嗪溶液 10  $\mu\text{L}$ ,充分摇匀后,加入比色皿中.再加入相同体积的浓度为 1.0 mmol/L 的 EGCG 溶液,使得 EGCG 与铁蛋白浓度比均为 220 : 1,在 25  $^{\circ}\text{C}$ 、562 nm 下进行测定,观察紫外强度随时间的变化,每个样本运行 1800 s,循环时间 0.5 s.

分别固定  $\text{Fe}^{2+}$  与铁蛋白的浓度比为 600 : 1,加入浓度为 0.1 mol/L 的菲洛嗪溶液 10  $\mu\text{L}$ ,充分摇匀后,加入比色皿中.再加入不同体积的浓度为 1.0 mmol/L 的 EGCG 溶液,使得 EGCG 与铁蛋白的终浓度比分别为 20 : 1、60 : 1、100 : 1、140 : 1、180 : 1、220 : 1、260 : 1.在 25  $^{\circ}\text{C}$ 、562 nm 处进行测定,观察紫外强度随时间的变化,每个样本运行 1800 s,循环时间 0.5 s.

#### 1.3.2 $V_C$ 对铁蛋白还原释放的影响

依照 1.3.1 节相同的操作方法进行实验,观察  $V_C$  对铁蛋白还原释放的影响.

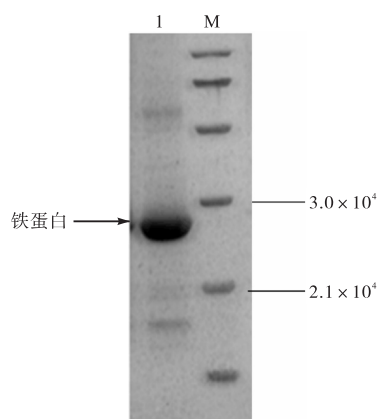
#### 1.3.3 NADH 对铁蛋白还原释放的影响

实验操作方法同 1.3.1 节,观察 NADH 对铁蛋白还原释放的影响.

## 2 结果与讨论

### 2.1 rH-2 的制备与表征

将纯化后的蛋白通过 SDS-PAGE 进行纯度鉴定和亚基相对分子质量确定,结果如图 2 所示. SDS-PAGE 电泳图表明纯化后的 rH-2 在  $2.8 \times 10^4$  处呈现单一条带,与文献[15]报道相符.虽然纯化后的 rH-2 有少量的杂带,但其纯度符合实验要求.



M. 蛋白 marker; 1. 铁蛋白

图2 rH-2的SDS-PAGE电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE of rH-2

## 2.2 EGCG 诱导铁蛋白还原释放

铁蛋白的三重轴通道具有亚铁氧化酶活性位点,外源添加的  $\text{Fe}^{2+}$  在氧气存在的情况下会被该活性位点中心氧化成  $\text{Fe}^{3+}$  并储藏在铁蛋白内部<sup>[1,4]</sup>, 该结论已被广泛报道. 在还原剂(如  $\text{V}_\text{C}$ 、EGCG)的存在下,在植物铁蛋白内储存在铁蛋白内部的  $\text{Fe}^{3+}$  能通过四重轴通道被还原释放出铁蛋白<sup>[16]</sup>. EGCG 诱导铁蛋白还原释放变化曲线如图 3 所示.

当还原剂 EGCG 与铁蛋白浓度比为 220 : 1 时(图 3(a)),且  $\text{Fe}^{2+}$  与铁蛋白浓度比为 100 : 1 时,随着时间的推移,吸光度逐渐增加,但是相同的时间范围内,其增加程度逐渐降低,表明  $\text{Fe}^{2+}$  释放速率降低. 同时,随着  $\text{Fe}^{2+}$  与铁蛋白浓度比的递增,吸光度增加速率也呈递增趋势,其原因可能是 EGCG 具有很强的还原性,且可以直接进入铁蛋白内腔,使铁核中  $\text{Fe}^{3+}$  还原成  $\text{Fe}^{2+}$  并释放出来<sup>[16]</sup>,而且随着  $\text{Fe}^{2+}$  与铁蛋白浓度比的增加,在相同浓度的还原剂 EGCG 存在条件下,有更多的  $\text{Fe}^{3+}$  被还原成  $\text{Fe}^{2+}$ ,因此吸光度值越来越大.

当  $\text{Fe}^{2+}$  与铁蛋白浓度比为 600 : 1 时(图 3(b)),随着 EGCG 与铁蛋白浓度比的增加,吸光度在相同的时间范围内,增加程度呈上升趋势,表明  $\text{Fe}^{2+}$  释放速率升高. 其原因可能是由于 EGCG 分子质量相对较小,可以通过四重轴通道直接进入铁蛋白内腔<sup>[17-18]</sup>,加之具有很强的还原性,所以随着 EGCG 浓度的增加,被还原释放出的  $\text{Fe}^{2+}$  也增加,从而导致吸光度越来越大, $\text{Fe}^{2+}$  释放的速率也递增. EGCG 诱导铁蛋白还原释放的研究表明,铁蛋白中铁的释放速率同时受  $\text{Fe}^{2+}$  装载量和还原剂 EGCG 浓度的影响,并且与这两种影响因素成正比关系.

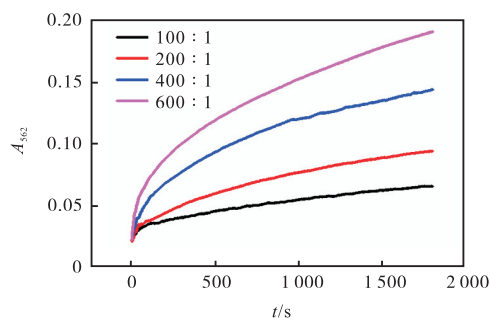
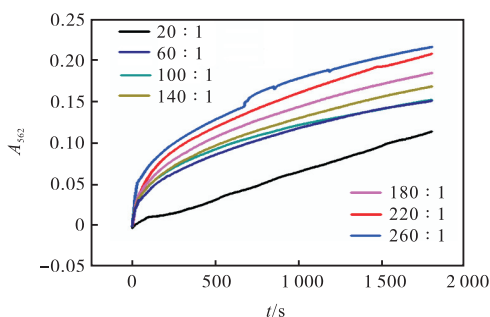
(a) EGCG 与铁蛋白浓度比为 220 : 1 时,不同  $\text{Fe}^{2+}$  装载量的还原释放变化(b)  $\text{Fe}^{2+}$  与铁蛋白浓度比为 600 : 1 时,不同浓度 EGCG 诱导还原释放变化

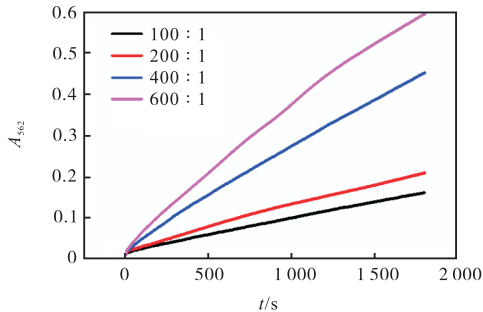
图3 EGCG 诱导铁蛋白还原释放变化曲线图

Fig. 3 EGCG induced changes in the reduction and release of ferritin

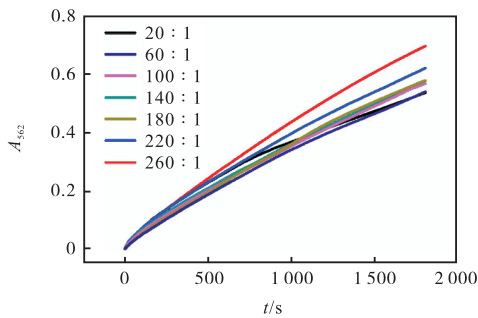
## 2.3 $\text{V}_\text{C}$ 诱导铁蛋白还原释放

$\text{V}_\text{C}$  诱导铁蛋白还原释放变化曲线如图 4 所示. 图 4(a)表明:当还原剂  $\text{V}_\text{C}$  与铁蛋白浓度比为 220 : 1、 $\text{Fe}^{2+}$  与铁蛋白浓度比为 100 : 1 时,吸光度随着时间的增加而逐渐增加,但在相同的时间范围内,增加程度逐渐降低,表明  $\text{Fe}^{2+}$  释放速率降低. 同时,随着  $\text{Fe}^{2+}$  与铁蛋白浓度比的递增,吸光度增加速率也呈递增趋势. 其原因可能是  $\text{V}_\text{C}$  具有很强的还原性,能进入铁蛋白内腔<sup>[19]</sup>,将铁核中  $\text{Fe}^{3+}$  还原成  $\text{Fe}^{2+}$  并释放出来,且在相同浓度的还原剂  $\text{V}_\text{C}$  存在条件下,随着  $\text{Fe}^{2+}$  浓度的增加,有更多的  $\text{Fe}^{3+}$  被还原成  $\text{Fe}^{2+}$ ,从而吸光度越来越大. 图 4(b)表明:当  $\text{Fe}^{2+}$  与铁蛋白浓度比为 600 : 1、 $\text{V}_\text{C}$  与铁蛋白浓度比为 20 : 1 时,随着时间的推移,吸光度逐渐增加,但是相同的时间范围内,其增加程度逐渐降低,表明  $\text{Fe}^{2+}$  释放速率降低. 同时,随着  $\text{V}_\text{C}$  与铁蛋白浓度比的增加,相同的时间范围内,其增加程度逐渐上升,表明  $\text{Fe}^{2+}$  释放速率升高. 其原因可能是由于  $\text{V}_\text{C}$  相对分子质量相对较小,可以通过四重轴通道直接进入铁蛋白内腔,加之具有很强的还原性,所以随着  $\text{V}_\text{C}$  浓度的增加,被还原释放出的  $\text{Fe}^{2+}$  也增加,从而导致吸光度越来越大,

Fe<sup>2+</sup>释放的速率也递增<sup>[19]</sup>. 因此, 得出与 2.2 节类似的结论, 除 Fe<sup>2+</sup>装载量外, 还原剂 V<sub>C</sub> 浓度也影响铁的释放速率, 且与这种影响因素也成正比关系.



(a) V<sub>C</sub>与铁蛋白浓度为 220 : 1 时, 不同 Fe<sup>2+</sup>装载量的还原释放变化



(b) Fe<sup>2+</sup>与铁蛋白浓度为 600 : 1 时, 不同浓度的 V<sub>C</sub> 诱导还原释放变化

图 4 V<sub>C</sub>诱导铁蛋白还原释放变化曲线图

Fig. 4 V<sub>C</sub> induced changes in the reduction and release of ferritin

### 2.4 NADH 诱导铁蛋白还原释放

Fe<sup>2+</sup>与铁蛋白浓度为600 : 1 时, 铁蛋白受不同浓度的 NADH 诱导还原释放变化曲线如图 5 所示.

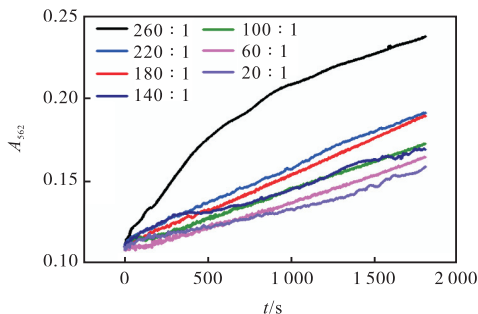


图 5 Fe<sup>2+</sup>与铁蛋白浓度为 600 : 1 时, 铁蛋白受不同浓度的 NADH 诱导还原释放变化曲线图

Fig. 5 Reduction and release curves of ferritin induced by different concentrations of NADH when Fe<sup>2+</sup>/ferritin = 600 : 1

当 Fe<sup>2+</sup>与铁蛋白浓度为 600 : 1、NADH 与铁蛋白浓度为 20 : 1 时, 随着时间的推移, 吸光度逐渐增加, 但是相同的时间范围内, 其增加程度逐渐降低, 表明 Fe<sup>2+</sup>释放速率降低. 同时, 随着 NADH 与铁蛋白浓度比的增加, 相同的时间范围内, 其增加程度逐渐上升, 表明 Fe<sup>2+</sup>释放速率升高. 其可能的原因是由于 NADH 具有很强的还原性, 本身的分子质量相对比较大, 不能直接进入铁蛋白内腔, 但能在铁蛋白表面进行相互作用, 从而产生能量振动转移, 使铁核中 Fe<sup>3+</sup>还原成 Fe<sup>2+</sup>并释放出来, 所以随着时间的增加, 吸光度逐渐增大. 随着 NADH 浓度的增加, 被还原释放出的 Fe<sup>2+</sup>也增加, 从而导致吸光度越来越大, Fe<sup>2+</sup>释放的速率也递增<sup>[19]</sup>.

### 2.5 V<sub>C</sub>、EGCG 和 NADH 诱导铁蛋白还原释放的比较分析

铁蛋白受 V<sub>C</sub>、EGCG、NADH 诱导还原释放变化曲线对比结果如图 6 所示. 当 Fe<sup>2+</sup>与铁蛋白浓度为 600 : 1, V<sub>C</sub>、EGCG、NADH 与铁蛋白浓度比均为 220 : 1 时, 随着时间的增加, 吸光度均逐渐增加, 吸光度上升斜率逐渐降低, 但是 EGCG、V<sub>C</sub> 和 NADH 还原释放 Fe<sup>2+</sup>的速率并不相同. V<sub>C</sub> 诱导的还原释放整体吸光度上升最快, 持续时间最长, NADH 诱导的还原释放整体吸光度上升最慢, 持续时间最短. 其可能原因是: 由于 EGCG 和 V<sub>C</sub> 都是相对分子质量较小并且还原性很强的活性物质, 均可以进入铁蛋白内腔; 但不同的是, 由于 EGCG 的还原性比 V<sub>C</sub> 更大, 所以在反应初期, EGCG 诱导的还原释放速率比 V<sub>C</sub> 高. 但是, 因为 V<sub>C</sub> 的相对分子质量比 EGCG 更小, V<sub>C</sub> 比 EGCG 更容易进入铁蛋白内腔, 随着反应时间增加, 铁蛋白空腔内的 V<sub>C</sub> 浓度增加比 EGCG 大, 从而导致 V<sub>C</sub> 诱导的还原释放速率持续增加时间比 EGCG 长.

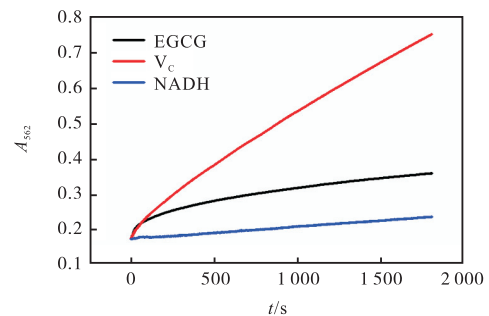


图 6 铁蛋白受 V<sub>C</sub>、EGCG、NADH 诱导还原释放变化曲线对比图

Fig. 6 Contrast of reduction and release of ferritin induced by V<sub>C</sub>, EGCG and NADH

然而,NADH 相对分子质量相对比较大,不可以直接进入铁蛋白内腔,只能与铁蛋白表面进行相互作用并结合为复合物,从而产生能量振动转移,使铁核中  $\text{Fe}^{3+}$ 还原成  $\text{Fe}^{2+}$ 并释放出来.这说明 NADH 诱导的铁还原释放是通过蛋白壳上的电子传递链进行的,并推断该电子传递链存在于四重轴通道上<sup>[19]</sup>.由于能量振动转移过程需要时间,所以使得  $\text{Fe}^{3+}$ 还原成  $\text{Fe}^{2+}$ 的速率相对 EGCG 和  $\text{V}_C$ 减小.

### 3 结 论

EGCG、 $\text{V}_C$  和 NADH 这 3 种食源还原成分都能诱导重组铁蛋白 rH-2 中铁的还原释放.其中:随着  $\text{Fe}^{2+}$ 与铁蛋白浓度比的递增, $\text{V}_C$  和 EGCG 对铁的还原释放呈递增趋势,并且  $\text{V}_C$  和 EGCG 在装载相同  $\text{Fe}^{2+}$ 浓度的情况下,随着还原剂浓度的升高,其诱导的还原释放速率也上升, $\text{V}_C$  相对于 EGCG 诱导的还原释放速率更大,持续时间更长.NADH 诱导的还原释放整体吸光度上升速率最慢,持续时间最短.该研究对于提高铁蛋白-食源组分相互作用的认识具有重要意义,同时也可开发基于铁蛋白的产品提供理论参考.

#### 参考文献:

- [ 1 ] 吕晨艳.大豆铁蛋白吸收铁的途径及体外细胞吸收研究[D].北京:中国农业大学,2015.
- [ 2 ] 李美良,蒲彪,赵广华.铁蛋白:一种新型矿质元素营养强化剂载体[J].食品科学,2014,35(13):326-333.
- [ 3 ] 赵广华,云少君.植物铁蛋白结构、性质及其在纳米材料制备中的应用[J].山西大学学报:自然科学版,2012,35(2):285-292.
- [ 4 ] 云少君,赵广华.植物铁代谢及植物铁蛋白结构与功能研究进展[J].生命科学,2012,24(8):809-815.
- [ 5 ] 杨秀丽,张拓,李美良,等.植物铁蛋白——新型的补铁功能因子[J].食品科技,2010,35(7):76-80.
- [ 6 ] Chasteen N D, Harrison P M. Mineralization in ferritin: An efficient means of iron storage[J]. Journal of Structural Biology, 1999, 126(3): 186-194.
- [ 7 ] Richards T D, Pits K R, Watt G D. A kinetic study of iron release from *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 1996, 61(1): 1-13.
- [ 8 ] Li M, Zhang T, Yang H, et al. A novel calcium supplement prepared by phytoferritin nanocages protects against absorption inhibitors through a unique pathway [J]. Bone, 2014, 64(7): 115-123.
- [ 9 ] Masuda T, Goto F, Yoshihara T, et al. The universal mechanism for iron translocation to the ferroxidase site in ferritin, which is mediated by the well conserved transit site[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 400(1): 94-99.
- [ 10 ] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [ 11 ] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagents[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275.
- [ 12 ] 杨瑞.多聚赖氨酸诱导大豆种子铁蛋白一维二维自组装机理研究[D].北京:中国农业大学,2014.
- [ 13 ] Lee H J, Hong J K, Goo H C, et al. Improved blood compatibility and decreased VSMC proliferation of surface-modified metal grafted with sulfonated PEG or heparin[J]. Journal of Biomaterials Science, 2002, 13(8): 939-952.
- [ 14 ] Hynes M J, Coinceanainn M Ó. Investigation of the release of iron from ferritin by naturally occurring antioxidants[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2002, 90(1/2): 18-21.
- [ 15 ] Zhang T, Lü C, Chen L, et al. Encapsulation of anthocyanin molecules within a ferritin nanocage increases their stability and cell uptake efficiency[J]. Food Research International, 2014, 62(8): 183-192.
- [ 16 ] Masuda T, Goto F, Yoshihara T. A novel plant ferritin subunit from soybean that is related to a mechanism in iron release[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(22): 19575-19579.
- [ 17 ] Ji X, Huang L, Lin Q, et al. Characteristics and kinetics of iron release from the ferritin under the EGCG reduction[J]. Biological Trace Element Research, 2012, 146(1): 134-140.
- [ 18 ] Yang R, Zhou Z, Sun G, et al. Ferritin, a novel vehicle for iron supplementation and food nutritional factors encapsulation[J]. Trends in Food Science and Technology, 2015, 44(2): 189-200.
- [ 19 ] Lü C, Bai Y, Yang S, et al. NADH induces iron release from pea seed ferritin: A model for interaction between coenzyme and protein components in foodstuffs[J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 3851-3858.

责任编辑:郎婧