



磁场对血红蛋白氧合速率的影响*

刘 颜^{1,2)} 方彦雯³⁾ 张 欣²⁾ 谢 灿^{1,2)**}⁽¹⁾ 安徽医科大学生命科学院, 合肥 230032; ⁽²⁾ 中国科学院合肥物质科学研究院强磁场科学中心, 合肥 230031;⁽³⁾ 和也健康科技有限公司和也智慧健康研究院, 湖州 313300)

摘要 **目的** 血红蛋白是高等动物体内运输氧气的载体蛋白, 本工作拟探究磁场对血红蛋白氧合的影响, 并比较人和牦牛血红蛋白在磁场下氧合的差异。**方法** 构建人和牦牛血红蛋白的重组表达纯化系统; 分别将人和牦牛脱氧血红蛋白置于地磁场或外加磁场下, 通过收集紫外可见光谱数据, 计算氧合血红蛋白、脱氧血红蛋白和高铁血红蛋白3种组分的浓度和比例, 分析磁场对血红蛋白氧合速率的影响; 使用超导量子干涉磁测量系统SQUID对人氧合血红蛋白和人脱氧血红蛋白进行磁性测量, 探讨磁场影响血红蛋白氧合速率的可能机制。**结果** 利用大肠杆菌原核表达系统成功表达并纯化得到了人和牦牛的血红蛋白样品。发现牦牛血红蛋白比人血红蛋白的氧合速率更快, 外加0.3 T静磁场显著提高了血红蛋白的氧合速率, 且牦牛血红蛋白比人血红蛋白对磁场更为敏感。**结论** 本研究成功表达和纯化了人和牦牛血红蛋白, 发现磁场促进了血红蛋白的氧合过程。磁场对血红蛋白氧合速率的影响可能与血红蛋白本身的磁学性质有关。这些发现为未来使用外加磁场作为辅助手段改善低氧症状提供了理论支撑, 有望在临床中发挥作用。

关键词 血红蛋白, 磁场, 人血红蛋白, 牦牛血红蛋白, 氧合速率**中图分类号** Q7**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0035

血红蛋白是高等动物体内运输氧气的载体蛋白, 主要存在于红细胞内, 由两个相同的 α 珠蛋白和 β 珠蛋白亚基组成^[1]。血红蛋白分子中负责结合氧气的铁通常以还原的 Fe^{2+} 状态存在。然而, 当血红蛋白分子氧化形成高铁血红蛋白时, 铁的价态变为 Fe^{3+} , 导致其失去结合氧气的能力^[2]。血红蛋白的变构效应是其调节氧气运输和释放的重要机制, 已有研究表明血红蛋白存在两种主要的构象状态: 松弛状态(R态)和紧张状态(T态)^[3-4]。虽然氧气与R态或T态的血红蛋白均能结合, 但其与R态的亲合力明显高于T态, 同时氧气的结合稳定了R态, 因此R态是氧合血红蛋白的主要构象。在缺氧时, T态比R态更为稳定, 所以T态是脱氧血红蛋白的主要构象。

血红蛋白的氧亲和力受到多种因素的影响, 除了氧气浓度(氧分压)之外, 温度和pH值等均能影响血红蛋白的氧亲和力。比如说, 温度升高会导致分子振动加剧, 且氧气与血红蛋白的结合是放热的过程, 因此氧亲和力随着温度的升高而降低^[5]。血液的pH值主要由 CO_2 和 HCO_3^- 的浓度决定, 酸

性环境中血红蛋白的氧亲和力下降, 而碱性环境中氧亲和力则增强。

早在20世纪初, 脱氧血红蛋白的顺磁性, 氧合血红蛋白和碳单氧血红蛋白的抗磁性已得到证实^[6]。也有研究表明, 外磁场可以影响血液流速^[7-8], 但外加磁场是否影响血红蛋白的氧亲和力则尚不明确。本文对这一问题进行了初步的研究, 选取了人源血红蛋白和牦牛(yak)血红蛋白为研究对象, 构建了重组蛋白表达纯化系统, 探究磁场对血红蛋白氧合速率的影响。

本研究除人源血红蛋白外, 还选取了牦牛的血红蛋白作为对比。牦牛是一种独特而稀有的牛种, 主要分布在海拔2 000~5 500 m的青藏高原及其周围的高山和亚高山地区^[9]。由于对低氧环境的适应(牦牛栖息地的氧含量仅为海平面氧含量的1/3~1/2), 牦牛不仅有较高的血红蛋白含量, 还表现出

* 中国科学院合肥物质科学研究院院长基金(Y96XC11131)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 18600081469, E-mail: canxie@hmfl.ac.cn

收稿日期: 2024-01-26, 接受日期: 2024-03-28

较强的血红蛋白氧亲和力^[10-12]。基于此, 本研究选择牦牛血红蛋白作为人源血红蛋白的参照, 探索两者在磁场作用下氧合速率方面的差异。

1 材料与方法

1.1 质粒构建

人 α 珠蛋白(P69905.2)与 β 珠蛋白(P68871.2)及牦牛 $\alpha 2$ 珠蛋白(1004268B)与 $\beta 2$ 珠蛋白(0711214A)的序列来源于NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库。使用核糖体结合位点(ribosome-binding site, RBS)序列将 α 珠蛋白与 β 珠蛋白进行串联连接, 并在一个质粒上同时表达, 连接序列(GAGCTCCTACATGGAGATTA ACTCAATCTAGAGGGTATTAATAATGTATCGCTTAAATAAGGAGGAATAACAT)从以往文献中获取^[13]。血红蛋白序列由生工生物技术(上海)有限公司合成。在人 β 珠蛋白链和牦牛 β 珠蛋白链的碳末段分别添加了His-tag和Strep-tag序列。

1.2 实验仪器与设备

超微量分光光度计NanoDrop(Thermo Fisher Scientific, 美国), 电子顺磁共振波谱仪(Bruker, 美国), 超导量子干涉仪(superconducting quantum interference device, SQUID)MPMS3(Quantum Design, 美国), 蛋白质层析纯化仪器AKTA pure(Cytiva, 美国), 冷冻离心机(Thermo Fisher Scientific, 美国), 超声波细胞破碎仪(宁波新芝, 中国), 电子天平(良平仪器, 中国), -80°C 超低温冷冻冰箱(海尔生物, 中国)。

1.3 蛋白质表达与纯化

血红蛋白在大肠杆菌菌株BL21(DE3)中表达。选择异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG, 上海阿拉丁, 中国)浓度梯度, 诱导血红蛋白在大肠杆菌中的表达。用IPTG在 30°C (303K)下过夜诱导蛋白质表达。离心收集细菌细胞, 在裂解缓冲液(50 mmol/L 磷酸缓冲液(以下简称PB), 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑(imidazole), pH 7.4)中重悬, 在冰上超声裂解。然后 4°C , 17 500 r/min离心30 min后, 收集上清, 装入Ni-NTA亲和层析柱(QIAGEN, 德国)。用15柱体积(CV)的洗涤缓冲液(50 mmol/L PB, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L imidazole, pH 7.4)洗涤亲和柱, 去除未结合蛋白质。洗涤步骤完成后, 用洗脱缓冲

液(50 mmol/L PB, 150 mmol/L NaCl, 200 mmol/L imidazole, pH 7.4)从Ni-NTA亲和层析柱中洗脱蛋白质。纯化过程中, 所有缓冲液中均加入终浓度为3 mmol/L的抗坏血酸(上海阿拉丁, 中国)。使用凝胶过滤层析进一步纯化目的蛋白质, 缓冲液为PBS缓冲液(50 mmol/L PB, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4)。使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)验证目的蛋白质的纯度和分子量。PageRuler Prestained Protein Ladder(Thermo Scientific, 产品编号26616)被用作所有SDS-PAGE的分子量标准。

1.4 氧合血红蛋白、脱氧血红蛋白和高铁血红蛋白的吸收光谱

上述纯化得到的血红蛋白保存在PBS缓冲液中, 主要成分为氧合血红蛋白。通过加入连二亚硫酸钠^[14](Sigma, 德国), 将氧合血红蛋白转化为脱氧状态。将过量的铁氰化钾加入血红蛋白后, 用Sephadex G-25色谱柱除去, 制备高铁血红蛋白。使用NanoDrop分光光度计在室温下扫描氧合血红蛋白、脱氧血红蛋白和高铁血红蛋白的紫外-可见(UV-Vis)光谱。

1.5 电子顺磁共振(EPR)测量

使用配备有Oxford ESR-910液氮低温恒温器的EMX plus 10/12光谱仪记录X波段($\sim 9.6\text{ GHz}$)EPR光谱。简单地说, 将200 μL 纯化蛋白与50 μL 甘油混合在PBS缓冲液中。将氧合、脱氧和氧化蛋白样品转移到石英EPR管(Wilmad, 707-SQ-250 M)中, 并在液氮中冷冻。在10K时监测EPR信号, 微波频率为9.40 GHz, 微波功率为2 mW, 调制幅值为2.0 G。电子顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)实验在中国科学院强磁场实验室的稳态强磁场设施上进行操作。

1.6 氧合速率分析

本研究设计了一个磁场装置为血红蛋白样品处理提供水平磁场(图1)。在样品槽两侧安装两块钕铁硼磁铁($3.2\text{ cm}\times 5\text{ cm}\times 6\text{ cm}$), 样品槽大小为 $2\text{ cm}\times 2\text{ cm}\times 6\text{ cm}$ 。样品槽中心位置(也即蛋白质样品放置处)用磁通门计(Lake Shore 410)测得的磁场强度为0.3 T。对照组(Sham)实验使用与上述类似的装置, 但样品槽两侧磁铁被替换为无磁性的铝块(Al6061), 对照组中样品槽中心位置(也即蛋白质样品放置处)用磁通门计测得的磁场强度与地磁场强度近似, 为50 μT , 即 $5\times 10^{-5}\text{ T}$ 。

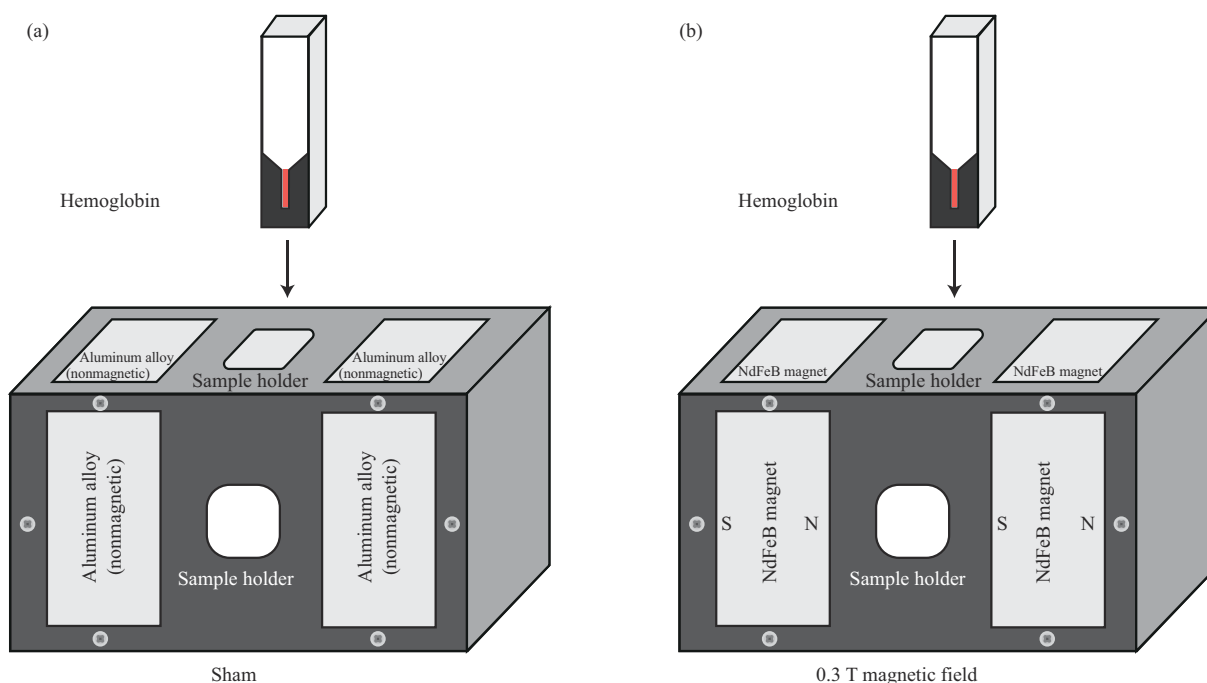


Fig. 1 A schematic representation of the experimental setup

- (a) Illustration of purified hemoglobin exposed to geomagnetic field, and a pair of nonmagnetic aluminum alloys was used as control (Sham).
(b) Illustration of purified hemoglobin exposed to 0.3 T external magnetic field provided by a pair of permanent magnets.

纯化后的血红蛋白用PBS缓冲液透析，调整其终浓度为0.032 mmol/L。在厌氧工作站中将1 ml 血红蛋白溶液与200 μ l 0.78 mmol/L 连二亚硫酸钠溶液充分混合，将所得混合液分装到100 μ l 比色皿中并盖好盖子，然后从厌氧工作站中取出，分别放入上述磁场装置或者对照装置，测试外加磁场对血红蛋白氧合速率的影响。每组测试为6个样品（浓度相同）同时进行，分成两组：3个样本磁场处理，3个样品无外加磁场（标记为Sham）。将样品放入装置前的紫外可见光谱结果记为0 min，放入样品槽后，每10 min测试1次紫外可见光谱，直到光谱不再发生变化为止。

1.7 磁性测量

共有4个样品，其中蛋白质样品包括氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白，缓冲液样品包括PBS缓冲液和在PBS缓冲液中添加连二亚硫酸钠。使用MPMS-3型SQUID，在温度范围（2~300K）下对100 μ l 样品进行磁测量，施加的磁场强度为 ± 10 mT。减去缓冲液背景后，得到蛋白质的MT曲线（也即磁化强度（ M ）随施加温度（ T ）的变化曲线）。

2 结 果

2.1 人血红蛋白和牦牛血红蛋白在大肠杆菌中的成功表达

以往研究表明，使用RBS序列串联 α 珠蛋白和 β 珠蛋白是一种有效且成熟的重组血红蛋白表达的方法^[15]（图2a）。在本研究中，选择了pET系列质粒作为载体，其中pET28a(+)使用噬菌体T7启动子表达人 α 和 β 珠蛋白，pET32a(+)质粒则表达牦牛血红蛋白（图2b）。这两种质粒的基本结构相似，包括启动子和多克隆位点等，唯一的区别在于抗性基因不同。基于T7启动子的载体（例如pET系列载体）与BL21(DE3)受体细胞具有最佳的相容性，因此本研究选择BL21(DE3)作为表达细胞。

温度是影响外源蛋白在大肠杆菌中表达的一个关键因素。尽管大肠杆菌生长的最佳温度通常在37~39°C之间，但高温可能会导致包涵体的形成，包涵体是错误折叠的蛋白质聚集体。因此，本研究测试和比较了4种不同温度（20°C、25°C、30°C、37°C）下血红蛋白的表达水平^[16]。结果显示，血红蛋白在30°C表达水平最佳。另外，诱导剂的浓度也是影响血红蛋白表达的关键因素。过高的

IPTG 有细胞毒性并可能导致外源蛋白的过度表达导致包涵体的形成, 减少可溶性蛋白质的数量。本研究还测试了不同 IPTG 浓度对血红蛋白诱导表达的影响, 发现在 1 mmol/L 的 IPTG 浓度时, 可溶性的血红蛋白达到最大表达量^[17]。

抗坏血酸是一种抗氧化剂, 在缓冲液中保持还原环境, 有助于保持血红蛋白结构的稳定性。本研究参考已有报道, 在血红蛋白纯化过程的所有缓冲液中均加入了终浓度为 3 mmol/L 的抗坏血酸^[18]。

亲和纯化后, 使用色谱柱 (Superdex™ 75 Increase 10/300 GL) 进行凝胶过滤层析进一步纯化血红蛋白, 得到纯度较高的血红蛋白 (图 2c, d)。人 α 珠蛋白和 β 珠蛋白的分子质量分别约为 15.7 ku 和 17.1 ku。而牦牛 α 珠蛋白和 β 珠蛋白的分子质量分别约为 15.1 ku 和 17.3 ku。15% 的 SDS-PAGE 结果显示, 纯化产物中同时存在 α 珠蛋白和 β 珠蛋白的条带, 两者比例接近, 符合复合物中 α 与 β 亚基之间的比例, 也与以往的报道一致^[19]。

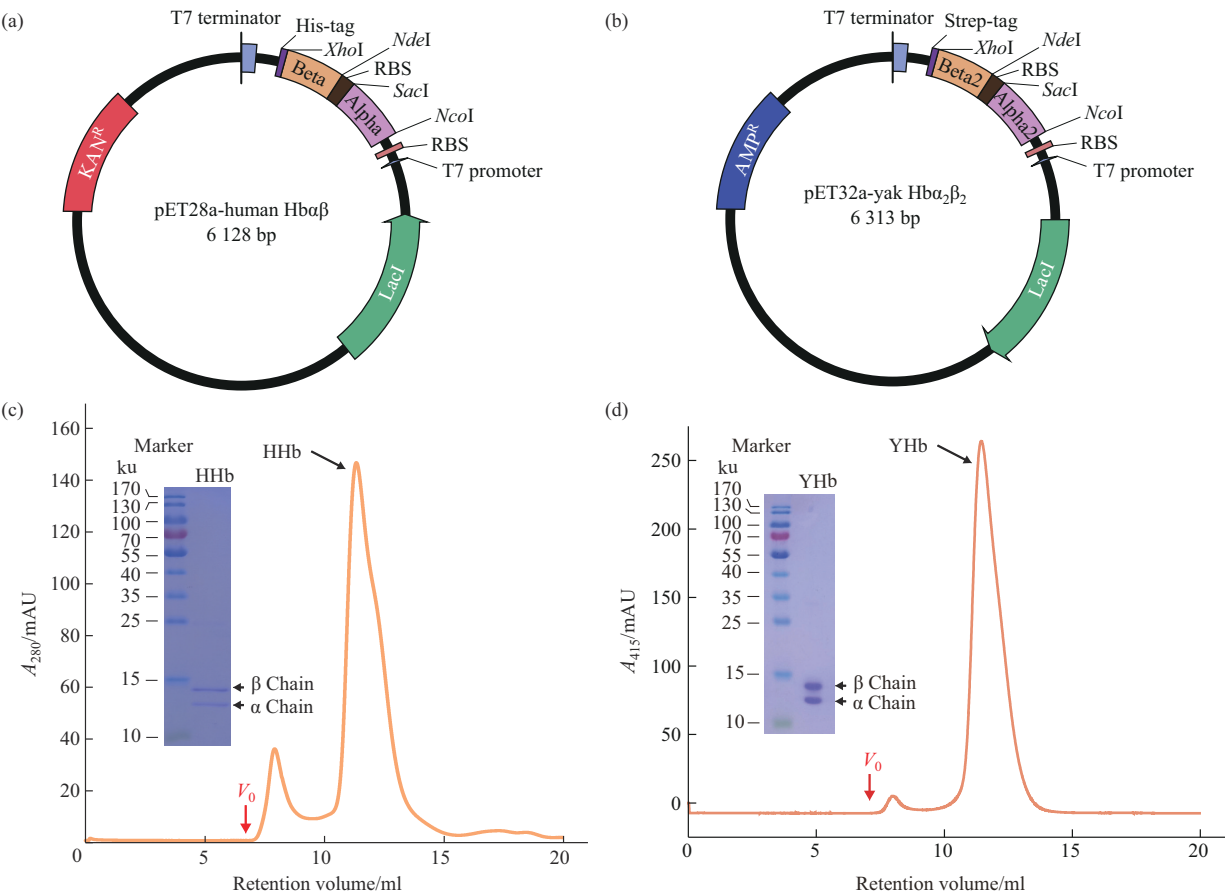


Fig. 2 Expression and purification of human and yak hemoglobin

(a) Schematic representation of the pET28a expression vector for human hemoglobin, containing a cassette of tandemly arrayed α - and β -globin genes with a Shine-Dalgarno ribosomal binding site as a spacer DNA. The cleavage sites of restriction enzymes are labeled. (b) Schematic representation of the pET32a expression vector for yak hemoglobin, containing a cassette of tandemly arrayed α - and β -globin genes with a Shine-Dalgarno ribosomal binding site as a spacer DNA. The cleavage sites of restriction enzymes are labeled. (c) Gel filtration chromatography of purified human hemoglobin, and SDS-PAGE verification of purified human hemoglobin was shown as inset. (d) Gel filtration chromatography of purified yak hemoglobin, and SDS-PAGE verification of purified yak hemoglobin was shown as inset.

2.2 脱氧血红蛋白和高铁血红蛋白的制备

氧合血红蛋白在可见光谱范围内具有两个主要的吸收峰, 分别位于 541 nm 和 576 nm 波长处, 而

脱氧血红蛋白只在波长为 560 nm 处有一个特征峰。此外, 高铁血红蛋白在波长 630 nm 处存在特征吸收峰。根据 UV-Vis 光谱测量纯化的血红蛋白

(PBS, pH 7.4) 的吸收峰 (541 nm 和 576 nm), 初步判断纯化血红蛋白的主要组分为氧合血红蛋白。通过血红蛋白混合物分析方程计算发现^[20], 血红蛋白溶液中除了主要组分氧合血红蛋白之外, 还同时存在少量的脱氧血红蛋白和高铁血红蛋白 (图 3a, b)。因此, 纯化得到的血红蛋白在溶液同时包含了这 3 种成分。在脱氧血红蛋白的制备过程中, 通过连二亚硫酸钠的加入, 根据脱氧血红蛋白的特征吸收峰 (560 nm) 判断, 氧合血红蛋白已经被还原成脱氧血红蛋白。然而, 人血红蛋白在加入还原剂后, 在 630 nm 处存在一个肩峰, 表明在加入还原剂后, 除了脱氧血红蛋白的形成之外, 还有小部分血红蛋白转变为高铁血红蛋白。可能原因是连

二亚硫酸钠水溶液性质不稳定, 导致在氧气存在条件下产生了高铁血红蛋白。与人血红蛋白不同, 牦牛血红蛋白在加入还原剂后, 630 nm 处的峰并不明显, 说明了牦牛血红蛋白和人血红蛋白在生化性质上和对氧化还原条件的敏感性的差异 (图 3a, b)。当脱氧血红蛋白在空气中暴露一段时间后, 因为空气中氧气的存在, 会逐渐形成氧合血红蛋白 (图 3a, b)。综上所述, 通过对人工制备的重组血红蛋白的氧化和还原实验的结果分析表明, 无论是人重组血红蛋白还是牦牛重组血红蛋白, 都可以在 3 种状态间转变, 与天然血红蛋白一样, 具有类似的生化和生理功能。

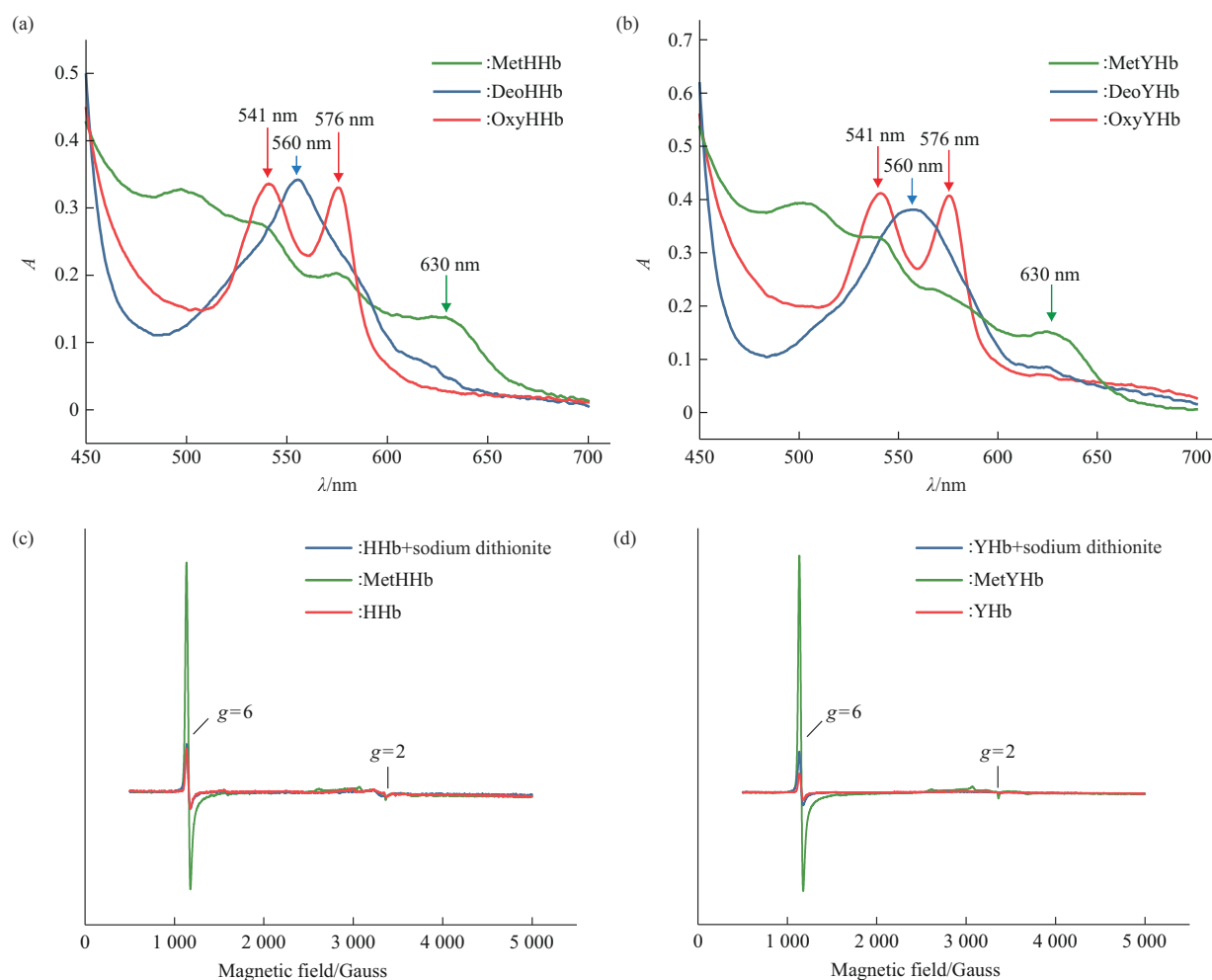


Fig. 3 UV-Vis spectra and EPR of hemoglobin

(a) UV-Vis spectra of human oxyhemoglobin (OxyHHb, red), deoxyhemoglobin (DeoHHb, blue) and methemoglobin (MetHHb, green). (b) UV-Vis spectra of yak oxyhemoglobin (OxyYHb, red), deoxyhemoglobin (DeoYHb, blue) and methemoglobin (MetYHb, green). (c) X-band electron paramagnetic resonance (EPR) spectra of human hemoglobin with different states, showing the heme signal of methemoglobin at $g=6$ and the signal of free radical at $g=2$. Spectra were recorded at 10 K. (d) X-band electron paramagnetic resonance (EPR) spectra of yak hemoglobin with different states, showing the heme signal of methemoglobin at $g=6$ and the signal of free radical at $g=2$. Spectra were recorded at 10 K.

2.3 血红蛋白的电子顺磁共振 (EPR) 谱

正常功能的Fe²⁺血红蛋白为d6体系, 没有EPR谱^[21]。氧合血红蛋白和碳单氧血红蛋白是低自旋配合物, 具有抗磁性, 而高自旋脱氧血红蛋白由于未成对电子数量是偶数且弛豫时间短而具有EPR沉默。EPR可以用于检测和分析血红蛋白氧化时形成的Fe³⁺血红蛋白(d5)^[22]。然而, 由于铁的弛豫时间很短, 必须在低温下才能检测EPR光谱^[23]。实验结果表明, 人工制备的重组高铁血红蛋白的EPR谱图与天然血红蛋白一致^[24](图3c, d)。然而如前所述, 因为空气中氧气的存在, 纯化的血红蛋白和加入还原剂的血红蛋白中也检测到了微弱的EPR信号, 表明血红蛋白中可能存在少量的高铁血红蛋白(图3c, d)。还原剂对牦牛血红蛋白向高铁血红蛋白的转化的效果相似。不同之处在于, 牦牛血红蛋白的氧合血红蛋白EPR信号(红色线)弱于加入还原剂的血红蛋白(蓝色线, 图3d), 说明牦牛血红蛋白在纯化过程中能够有效抵御空气中氧气的氧化, 表现出较好的稳定性。

2.4 磁场对人血红蛋白氧合的影响

为了探究外加磁场对血红蛋白氧合速率的影响, 以人血红蛋白为例, 将脱氧血红蛋白从厌氧工作站中取出(记为0 min), 分别在有外加磁场(0.3 T)和无外加磁场(Sham)的条件下与空气接触发生氧合反应, 每隔10 min检测1次UV-vis光谱, 连续记录整个反应过程的光谱变化, 直至光谱不再变化表明反应完成。考虑到高铁血红蛋白具有pH值敏感性, 实验过程中确保实验用的溶液pH值为7.4。取每隔20 min的UV-Vis光谱作图, 比较有外加磁场下的氧合速率(图4)。从图4可以看出, 对照组样本(图4a)和加磁组样本(图4b)的UV-Vis图都呈现出从单峰到双峰的转变, 但在这个转变过程中, 加磁样本的氧合速率明显比对照样本更快。在对照组中, 在120 min时才出现双峰, 但在加磁组中, 在60~80 min时, 双峰就已经出现。这种变化的差异表明, 当磁场存在时, 血红蛋白的氧合速率有显著提高。

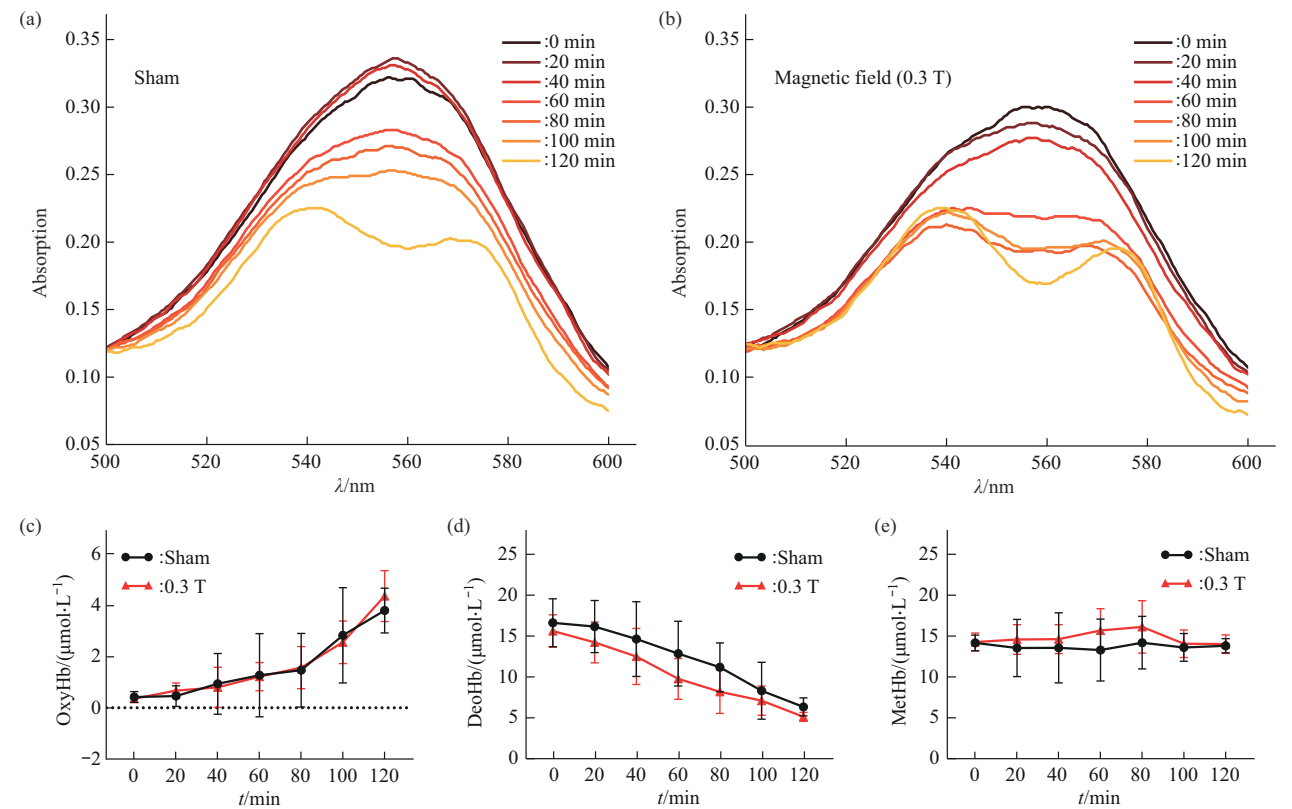


Fig. 4 External magnetic field facilitates human hemoglobin oxygenation

(a, b) The human hemoglobin oxygenation process recorded by UV-Vis spectra every 10 min under geomagnetic field (Sham) or 0.3 T external magnetic field. (c) The concentration changes of human oxyhemoglobin (oxyHb) during oxygenation process. (d) The concentration changes of human deoxyhemoglobin (deoxyHb) during oxygenation process. (e) The concentration changes of human methemoglobin (methHb) during oxygenation process. *n*=3.

因为所有分光光度法测定血红蛋白及衍生物的方法都依赖于朗伯比尔定律, 并可以根据血红蛋白混合物方程来计算单个组分的含量^[20]。为了更加精细地定量在这一过程中的血红蛋白各组分的变化规律, 我们依据血红蛋白混合方程计算了每个时间点的氧合血红蛋白、脱氧血红蛋白和高铁血红蛋白的血红素浓度, 并对有无磁场下的氧合过程进行比较研究(图4c~e)。当暴露在空气中时, 脱氧血红蛋白与氧气发生反应并被氧化, 脱氧血红蛋白的血红素浓度不断降低, 在外加磁场存在条件下, 脱氧血红蛋白的转化速率加快(图4d)。在加磁组和对照组中, 氧合血红蛋白的血红素浓度基本相同(图4c)。至于高铁血红蛋白血红素浓度方面, 在整个反应过程中, 加磁组相较于对照组保持较高的浓度(图4e)。在加磁组和Sham组之间的样本之间的比对有些不具备显著性, 可能原因是不同批次的纯化血红蛋白样品差别比较大, 血红蛋白样品中3种组分的含量不同造成的。

2.5 磁场对牦牛血红蛋白氧合的影响

我们也利用纯化的牦牛血红蛋白做了同样的测

试, 方法如前所述。首先需要指出的是, 牦牛血红蛋白的整体氧合速率在相同条件下远高于人血红蛋白。相比于人血红蛋白需要大约120 min才能完成氧合反应(图4a, b), 而牦牛血红蛋白的氧合大约在60 min内即可完成(图5a, b)。这一差别反映了牦牛在高原低氧环境下的适应性。

在整个牦牛血红蛋白氧合过程中, 加磁组(图5b)的UV-Vis光谱变化比对照组(图5a)明显加快。在30 min后, 加磁组的UV-vis光谱出现了明显的双峰(图5b), 而对照组在50 min后才慢慢出现双峰(图5a)。同样, 依据血红蛋白混合方程计算了每个时间点的牦牛氧合血红蛋白、脱氧血红蛋白和高铁血红蛋白的血红素浓度。在与空气接触20~30 min之间, 加磁组的牦牛氧合血红蛋白浓度出现了显著的上升趋势, 而对照组的增长速度较慢(图5c)。与此一致, 加磁组的牦牛脱氧血红蛋白的浓度也在20~30 min之间, 出现了显著的下降趋势, 而对照组的下降速度则相对缓慢得多(图5d)。加磁组的高铁血红蛋白也比对照组略高(图5e)。有意思的是, 牦牛氧合血红蛋白和脱氧血红

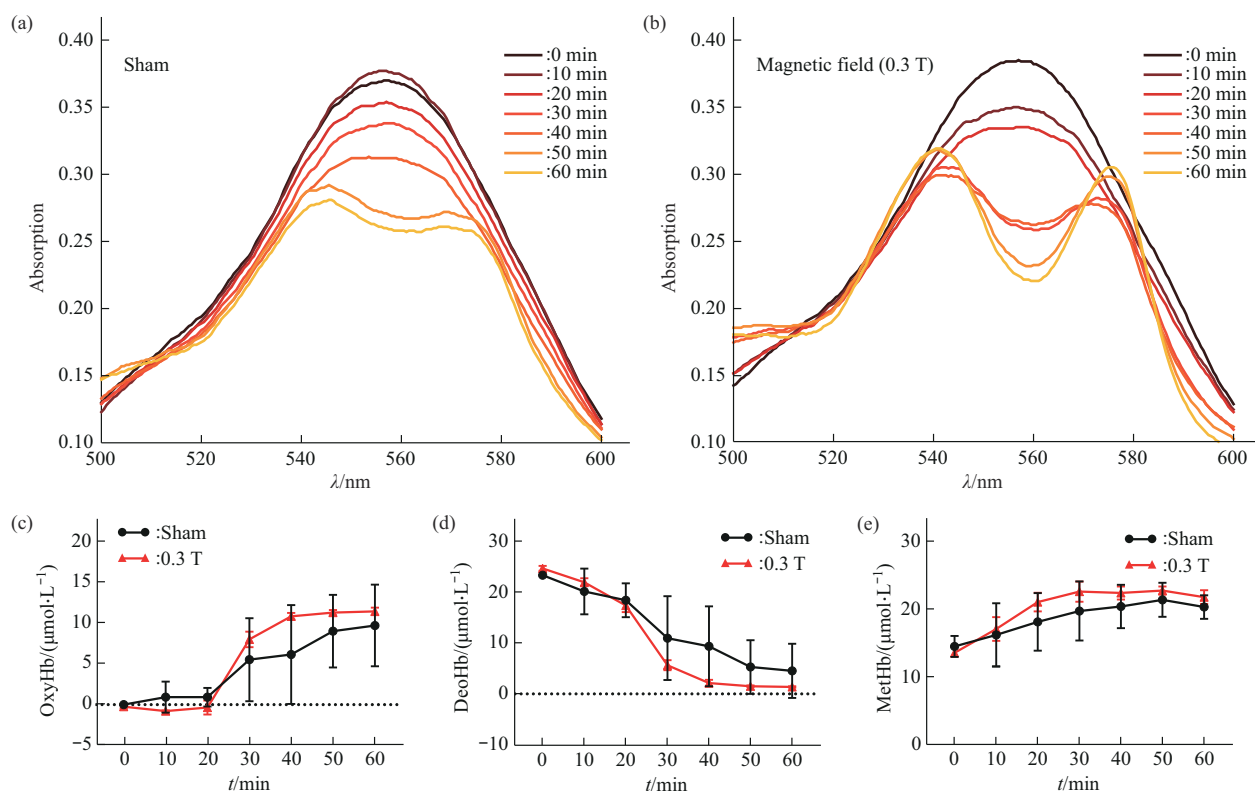


Fig. 5 External magnetic field facilitates yak hemoglobin oxygenation

(a, b) The yak hemoglobin oxygenation process recorded by UV-Vis spectra every 10 min under geomagnetic field (Sham) or 0.3 T external magnetic field. (c) The concentration changes of yak oxyhemoglobin (oxyYHB) during oxygenation process. (d) The concentration changes of yak deoxyhemoglobin (deoxyYHB) during oxygenation process. (e) The concentration changes of yak methemoglobin (metYHB) during oxygenation process. $n=3$.

蛋白的浓度变化均呈现“s”型曲线,但上升和下降趋势相反(图5c, d),这一特征只在牦牛血红蛋白中观察到,而人血红蛋白的实验中则没有观察到类似现象,反映了两者氧合速率和动力学的显著差异。

2.6 人氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白的磁性

上述实验表明磁场可以显著影响血红蛋白氧合速率,这一现象有可能和血红蛋白独特的磁学性质相关。1936年,鲍林首次用磁天平法证实了脱氧血红蛋白的顺磁性和氧合血红蛋白的抗磁性^[6],其后也有报道表明脱氧血红蛋白呈现顺磁性^[25]。为了验证重组表达纯化的血红蛋白是否具有和天然血红蛋白类似的磁性,我们使用超导量子干涉仪SQUID对重组人氧合血红蛋白和人脱氧血红蛋白的磁学性质进行了研究。在100 mT下进行磁性测量,并收集数据来生成温度依赖的磁化强度曲线(MT曲线),进而比较氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白的磁性(图6)。磁化率等于磁化强度和磁场强度的比值。随着温度的降低,人氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白的磁化强度均增加,而脱氧血红蛋白的顺磁性增加更快,符合居里定律的磁化率与温度呈反比关系。因为氧合血红蛋白表现为抗磁性,之所以随着温度的降低磁化率增加逐渐变为顺磁性,可能是因为样品中含有少量顺磁性的高铁血红蛋白存在的原因,这一点与之前的EPR测试的结果一致(图3c)。

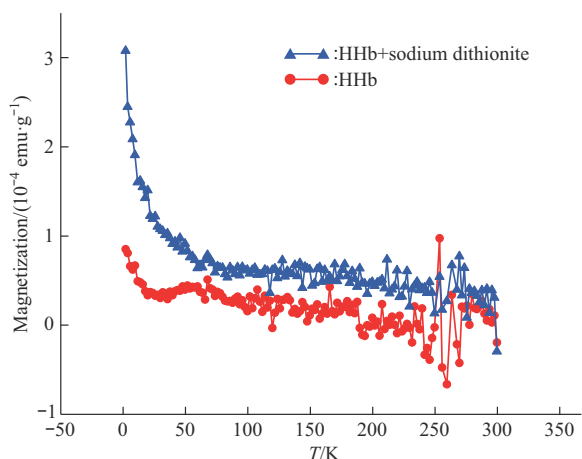


Fig. 6 Temperature-dependent magnetization curves (MT) of human oxyhemoglobin (red) and deoxyhemoglobin (blue) at 100 mT

3 讨论

血液的主要成分是血浆和血细胞,在人体的生命活动中发挥着关键作用,同时也是重要的医疗资源。然而由于输血需求量的不断增加及血液储备不足等问题,血液供需关系一直处于紧张的状态。因此,人们一直都迫切地寻找一种安全有效的血液替代品,可以发挥与血液相似的功能。目前,血液代用品的种类包括血红蛋白氧载体(hemoglobin-based oxygen carriers, HBOCs)、合成血红素类等。血红蛋白氧载体具有更好的潜力,它的种类大致可以概括为聚合血红蛋白^[26]、基因调控的血红蛋白^[27]以及聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)化的血红蛋白^[28]。而人类红细胞、牛红细胞和重组血红蛋白是红细胞最主要的3个来源^[29-30]。其中,人类红细胞主要用于临床用血,牛血红蛋白和人血红蛋白毕竟存在蛋白序列和三维结构的差异,而且牛血红蛋白可能携带朊病毒,这会导致克雅氏病的产生^[31-32]。重组血红蛋白能减少输血感染的风险,因此,重组血红蛋白潜力最大。

重组DNA技术的进步促使了用于合成重组血红蛋白(recombinant hemoglobin, rHb)的多种技术的发展,原核表达系统已经能够很好地表达重组血红蛋白。酵母表达系统也曾被用于生产血红蛋白^[33],不过它表达的可溶性蛋白太少,于是被逐渐抛弃。原核表达系统可以表达高达30%的可溶性蛋白^[34],然而通过原核表达体系来获取纯化的重组血红蛋白,也存在成本高昂的缺点,在未来仍是一个需要解决的问题。

牦牛无论是血液中红细胞的大小还是血红蛋白的含量,亦或是血红蛋白氧亲和力都远远高于黄牛^[11]。本研究以人和牦牛血红蛋白为研究对象,建立了人和牦牛血红蛋白的重组表达和纯化体系。重组血红蛋白的获得使得在体外用纯化的血红蛋白对其氧合速率进行研究成为可能还可以研究磁场对氧合速率的影响。本研究发现0.3 T的静磁场条件促进了血红蛋白的氧合反应,这是首次在纯化的血红蛋白中观察到的磁场的生物学效应。未来需要进一步系统地测试不同的磁场参数对这一反应的影响,比如说不同的磁场强度或磁场类型,包括均匀稳态磁场和梯度磁场等。通过对不同参数的磁场对血红蛋白氧合速率的影响,有望总结和发现一些规

律性的特征,对于分子机理的阐明将有重要意义。

不管是人血红蛋白还是牦牛血红蛋白,磁场均能促进他们的氧合速率,并且这种磁效应在牦牛血红蛋白的氧合反应中更为显著。我们推测这一现象可能与血红蛋白固有的磁学性质有关。以往的文献报道过脱氧血红蛋白的顺磁性和氧合血红蛋白的抗磁性特征,但对于纯化的重组血红蛋白的磁学性质尚未有报道。本研究使用先进的检测装置超导量子干涉仪对重组血红蛋白的磁性进行了初步的测量。超导量子干涉仪的灵敏度比传统磁力计高几个数量级,其灵敏度可达 10^{-8} emu,主要用于超精细磁性测量^[35-36]。实验检测出氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白均有顺磁性存在,且脱氧血红蛋白的顺磁性强于氧合血红蛋白。重组的脱氧血红蛋白的顺磁性天然脱氧血红蛋白的顺磁性报道一致。但我们的测试中并没有检测到重组的氧合血红蛋白的抗磁性,这可能有多种原因,可能是氧合血红蛋白中存在少量的高铁血红蛋白从而导致的顺磁性,这与我们的EPR结果一致;当然也可能是本研究测试手段灵敏度的提高,或者重组蛋白与天然蛋白之间的细微差异所导致。在未来的研究中可以尝试其他真核表达体系获取重组血红蛋白,或以天然血红蛋白样品作为对照,对其磁学性质进行更加系统和精细的研究。

对于磁场影响血红蛋白氧合速率的分子机制研究,在未来还可以通过定点突变技术对血红蛋白特定氨基酸位点进行突变来研究不同血红蛋白突变体的磁场效应的差异,或者通过对牦牛等物种和人血红蛋白序列比对研究不同序列的血红蛋白的磁场效应的差异,也可以通过分子动力学模拟等方法探究血红蛋白结构改变后对磁场效应的影响。机制的阐明有助于人工设计对磁场更敏感的血红蛋白,未来在临床应用中发挥作用。

4 结 论

本研究成功建立了人和牦牛血红蛋白的重组表达和纯化体系,得到了纯度较高的重组血红蛋白。发现牦牛血红蛋白的氧合速率远高于人血红蛋白,为牦牛在高原低氧环境下的适应性提供了解释。同时探究了0.3 T的静磁场对血红蛋白氧合速率的影响,发现磁场能促进人和牦牛血红蛋白的氧合速率,且对牦牛血红蛋白的氧合速率的促进作用更为显著。这些发现为未来使用外加磁场作为辅助手段改善低氧症状提供了理论支撑,有望在临床中发挥

作用。

参 考 文 献

- [1] Perutz M F, Rossmann M G, Cullis A F, *et al.* Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å. resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, 1960, **185**(4711): 416-422
- [2] Wright R O, Lewander W J, Woolf A D. Methemoglobinemia: etiology, pharmacology, and clinical management. *Ann Emerg Med*, 1999, **34**(5): 646-656
- [3] Perutz M F. Stereochemical mechanism of cooperative effects in haemoglobin. *Biochimie*, 1972, **54**(5): 587-588
- [4] Perutz M F, Wilkinson A J, Paoli M, *et al.* The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1998, **27**: 1-34
- [5] Barcroft J, King W O. The effect of temperature on the dissociation curve of blood. *J Physiol*, 1909, **39**(5): 374-384
- [6] Pauling L, Coryell C D. The magnetic properties and structure of hemoglobin, oxyhemoglobin and carbonmonoxyhemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1936, **22**(4): 210-216
- [7] Okano H, Ohkubo C. Modulatory effects of static magnetic fields on blood pressure in rabbits. *Bioelectromagnetics*, 2001, **22**(6): 408-418
- [8] Morris C, Skalak T. Static magnetic fields alter arteriolar tone *in vivo*. *Bioelectromagnetics*, 2005, **26**(1): 1-9
- [9] Ayalew W, Chu M, Liang C, *et al.* Adaptation mechanisms of yak (*Bos grunniens*) to high-altitude environmental stress. *Animals*, 2021, **11**(8): 2344
- [10] Ding X Z, Liang C N, Guo X, *et al.* Physiological insight into the high-altitude adaptations in domesticated yaks (*Bos grunniens*) along the Qinghai-Tibetan Plateau altitudinal gradient. *Livest Sci*, 2014, **162**: 233-239
- [11] Guan J, Long K, Ma J, *et al.* Comparative analysis of the microRNA transcriptome between yak and cattle provides insight into high-altitude adaptation. *PeerJ*, 2017, **5**: e3959
- [12] Han X T, Han X T, Xie A Y, *et al.* Effects of high altitude and season on fasting heat production in the yak *Bos grunniens* or *Poephagus grunniens*. *Br J Nutr*, 2002, **88**(2): 189-197
- [13] Hoffman S J, Looker D L, Roehrich J M, *et al.* Expression of fully functional tetrameric human hemoglobin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**(21): 8521-8525
- [14] Weigand M R H, Gómez-Pastora J, Kim J, *et al.* Magnetophoretic and spectral characterization of oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin: chemical versus enzymatic processes. *PLoS One*, 2021, **16**(9): e0257061
- [15] Natarajan C, Jiang X, Fago A, *et al.* Expression and purification of recombinant hemoglobin in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2011, **6**(5): e20176
- [16] Weickert M J, Pagratis M, Curry S R, *et al.* Stabilization of apoglobin by low temperature increases yield of soluble recombinant hemoglobin in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(11): 4313-4320

- [17] Ramos C, Pietri R, Lorenzo W, *et al.* Recombinant hemoglobin II from *Lucina pectinata*: a large-scale method for hemeprotein expression in *E. coli*. *Protein J*, 2010, **29**(2): 143-151
- [18] Su X, Guo S, Huang X, *et al.* Control of oxidative reactions of hemoglobin in the design of blood substitutes: role of the Vc, NAC, TEMPO and their reductant system. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2014, **42**(4): 222-228
- [19] Shen T J, Ho N T, Zou M, *et al.* Production of human normal adult and fetal hemoglobins in *Escherichia coli*. *Protein Eng*, 1997, **10**(9): 1085-1097
- [20] Benesch R E, Benesch R, Yung S. Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Anal Biochem*, 1973, **55**(1): 245-248
- [21] Peisach J, Blumberg W E, Wittenberg B A, *et al.* Hemoglobin A: an electron paramagnetic resonance study of the effects of interchain contacts on the heme symmetry of high-spin and low-spin derivatives of ferric alpha chains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1969, **63**(3): 934-939
- [22] Levy A, Kuppusamy P, Rifkind J M. Multiple heme pocket subconformations of methemoglobin associated with distal histidine interactions. *Biochemistry*, 1990, **29**(40): 9311-9316
- [23] Svistunenko D A, Sharpe M A, Nicholls P, *et al.* The pH dependence of naturally occurring low-spin forms of methaemoglobin and metmyoglobin: an EPR study. *Biochem J*, 2000, **351**(Pt 3): 595-605
- [24] Svistunenko D A, Sharpe M A, Nicholls P, *et al.* A new method for quantitation of spin concentration by EPR spectroscopy: application to methemoglobin and metmyoglobin. *J Magn Reson*, 2000, **142**(2): 266-275
- [25] Mayda S, Kandemir Z, Bulut N, *et al.* Magnetic mechanism for the biological functioning of hemoglobin. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 8569
- [26] Nagai K, Thøgersen H C. Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, 1987, **153**: 461-481
- [27] Varnado C L, Mollan T L, Birukou I, *et al.* Development of recombinant hemoglobin-based oxygen carriers. *Antioxid Redox Signal*, 2013, **18**(17): 2314-2328
- [28] Conover C D, Malatesta P, Lejeune L, *et al.* The effects of hemodilution with polyethylene glycol bovine hemoglobin (PEG-Hb) in a conscious porcine model. *J Investig Med*, 1996, **44**(5): 238-246
- [29] Goodnough L T, Brecher M E, Kanter M H, *et al.* Transfusion medicine. First of two parts—blood transfusion. *N Engl J Med*, 1999, **340**(6): 438-447
- [30] Stowell C P, Levin J, Spiess B D, *et al.* Progress in the development of RBC substitutes. *Transfusion*, 2001, **41**(2): 287-299
- [31] Sanders K E, Ackers G, Sligar S. Engineering and design of blood substitutes. *Curr Opin Struct Biol*, 1996, **6**(4): 534-540
- [32] Chang T M. Future prospects for artificial blood. *Trends Biotechnol*, 1999, **17**(2): 61-67
- [33] Inagaki K, Inagaki J, Dumoulin A, *et al.* Expression and properties of recombinant HbA2 ($\alpha 2\delta 2$) and hybrids containing δ - β sequences. *J Protein Chem*, 2000, **19**(8): 649-662
- [34] Weickert M J, Pagratis M, Glascock C B, *et al.* A mutation that improves soluble recombinant hemoglobin accumulation in *Escherichia coli* in heme excess. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(2): 640-647
- [35] Roth B J. Biomagnetism: the first sixty years. *Sensors (Basel)*, 2023, **23**(9): 4218
- [36] Lewis M J. Biomagnetism: a new tool in sport and exercise science. *J Sports Sci*, 2003, **21**(10): 793-802

The Magnetic Field Effects on The Oxygenation Rate of Recombinant Hemoglobin*

LIU Yan^{1,2)}, FANG Yan-Wen³⁾, ZHANG Xin²⁾, XIE Can^{1,2)**}

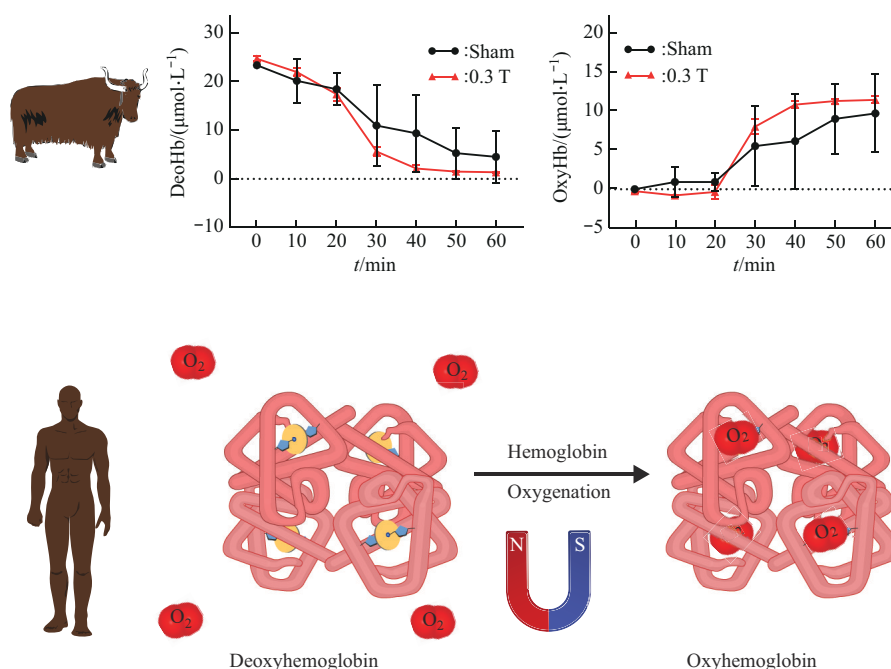
⁽¹⁾College of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

⁽²⁾High Magnetic Field Laboratory, Hefei Institute of Physical Sciences, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

⁽³⁾Heye Health Industrial Research Institute of Heye Health Technology Co., Ltd., Huzhou 313300, China)

Graphical abstract

External static magnetic field facilitates hemoglobin oxygenation



Abstract Objective Hemoglobin is the iron-containing protein in the red blood cells of many animals. The primary function of hemoglobin is to transport oxygen from lung to tissues. It is composed of two identical α -globin subunits and two identical β -globin subunits. Hemoglobin has unique magnetic properties. The paramagnetism of deoxyhemoglobin, and the diamagnetism of oxyhemoglobin and carboxyhaemoglobin have been reported previously. Studies have also shown that external magnetic field affected blood flow rate, but whether magnetic field may affect the oxygenation rate of hemoglobin remains unknown. Here in this study, we are aiming to address this question with recombinant hemoglobin. Human hemoglobin and yak hemoglobin were

* This work was supported by a grant from President's Fund of Hefei Institute of Physical Sciences, Chinese Academy of Sciences (Y96XC11131).

** Corresponding author.

Tel: 86-18600081469, E-mail: canxie@hmfl.ac.cn

Received: January 26, 2024 Accepted: March 28, 2024

selected as the research objects, and a recombinant protein expression and purification system was established to explore the magnetic field effects on the oxygenation rate of hemoglobin, as well as the differences in the oxygenation rate between human hemoglobin and yak hemoglobin under external magnetic field. **Methods** The recombinant expression and purification system of human and yak hemoglobin was established. The recombinant hemoglobin expression was further optimized and appropriated inducing temperature and IPTG concentration were screened. Recombinant human hemoglobin and yak hemoglobin were purified to homogeneity by affinity chromatography and further by size-exclusion chromatography. SDS-PAGE was used to validate the purification, and UV-Vis spectrum and EPR were used to characterize the biochemical properties of recombinant hemoglobin. Deoxyhemoglobin of human and yak were placed under 0.3 T external magnetic field to test the magnetic field effects on oxygenation rate, and geomagnetic field condition was used as a sham control. The UV-Vis spectrum data were measured every 10 min, and the concentration and proportion of oxygenated hemoglobin, deoxyhemoglobin and methemoglobin were calculated to analyze the effects of magnetic field on the oxygenation rate of hemoglobin. The magnetic properties of human oxygenated hemoglobin and human deoxygenated hemoglobin have been measured by SQUID, a superconducting quantum interference magnetic measurement system. Three biological replications were performed for each experiment. The possible mechanism of the effect of magnetic field on the oxygenation rate of hemoglobin has been investigated and discussed. **Results** Human and yak hemoglobin were successfully expressed and purified by *E. coli* prokaryotic expression system. The optimal expression temperature was 30°C, and the most suitable IPTG concentration was 1 mmol/L. EPR results suggested that trace amount of methemoglobin existed both in the purified human hemoglobin and yak hemoglobin proteins. The oxygenation rate of yak hemoglobin appeared to be faster than that of human hemoglobin, and the additional magnetic field treatment significantly increased the oxygenation rate of both human and yak hemoglobin, and yak hemoglobin was more sensitive to magnetic field than human hemoglobin. The paramagnetism of deoxyhemoglobin was verified by SQUID measurement. However, the diamagnetism of oxygenated hemoglobin remains uncertain, probably due to the presence of trace amount of methemoglobin in the sample of oxygenated hemoglobin, which was consistent with EPR results. **Conclusion** In this study, human and yak hemoglobin were successfully expressed and purified. The purified hemoglobin proteins have similar function and conformational states as native protein. External static magnetic field facilitates hemoglobin oxygenation, and yak hemoglobin seems more sensitive to magnetic field compared with human hemoglobin. These findings provide theoretical basis for the potential applications of applying magnetic field to improve hypoxia symptoms in clinical practice in the future.

Key words hemoglobin, magnetic field, human hemoglobin, yak hemoglobin, oxygenation rate

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0035