DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.12.011
第26卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 12
1058 2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)12-1058-03

梭曼、沙林对鸭血清丁酰胆碱酯酶的动力学研究

吴方晖[1],高 川[1],张 靖[1],宋云扬[1],王惠芳[1],李艳军[1],董兆君[2] ([1]北京药物化学研究所,北京 102205;[2]第三军医大学预防医学系军事毒理学研究室,重庆 400038)

提 要:目的 从酶反应动力学方面揭示梭曼、沙林对丁酰胆碱酯酶的毒性强弱,比较两者对丁酰胆碱酯酶的抑制强度。方法 通过改进的Ellman法验测定了鸭血清丁酰胆碱酯酶的k_m值,以及梭曼、沙林对该酶抑制反应的解离常数k_d、膦酰化常数k_2和抑制速率常数k_i值。结果 虽然梭曼和沙林在可逆的酶-抑制剂反应过程中反应速度相差不大,但梭曼对该酶的亲和力与抑制能力均比沙林强。结论 这可能是梭曼毒性大于沙林的一个重要因素。

关键词:梭曼;沙林;丁酰胆碱酯酶
中图法分类号:R556.1;R996 文献标识码:A

Kinetic study of the inhibition of duck serum butyrylcholinesterase by soman and sarin

WU Fang-hui[1], GAO Chuan[1], ZHANG Jing[1], SONG Yun-yang[1], WANG Hui-fang[1], LI Yan-jun[1], DONG Zhao-jun[2]([1]Beijing Research Institute of Pharmacochemistry, Beijing 102205; [2]Department of Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the toxicity of soman and sarin to butyrylcholinesterase and to compare the intensity of their inhibitory effect on butyrylcholinesterase. **Methods** k_m value of the duck serum butyrylcholinesterase was detected by modified Ellman method. The dissociation (k_d), phosphorylation (k_2), and biomolecular reaction (k_i) constants were determined for the inhibitory kinetics of soman and sarin. **Results** Under the experiment conditions, the k_m value of cholinesterase was 1.44×10^{-5} mol/L. The k_d values of soman and sarin to cholinesterase were 0.88×10^{-8} mol/L and 1.87×10^{-8} mol/L. The k_2 values were 9.89/min and 11.70/min. **Conclusion** Although there is little difference between the reactive velocities of soman and sarin when the reversible enzyme-inhibitor complex is transformed to covalence phosphonylated-enzyme, the affinity and inhibitory capacity of soman are higher than those of sarin. This may be the reason why the toxicity of soman is higher than that of sarin.

Key words: soman; sarin; butyrylcholinesterase

梭曼、沙林是G类毒剂的典型代表,这两种毒剂的毒性很强,其共同特点是对胆碱酯酶都有很强的抑制作用[1,2],但二者又不完全相同。过去人们对梭曼、沙林的毒性、毒理研究得较多,而对其对胆碱酯酶抑制作用动力学研究得较少,且结果差异较大,为了对这一问题有一个明确的认识并为有机磷化合物的评价和防护提供有效的依据,我们研究和探讨了梭曼和沙林对胆碱酯酶抑制作用动力学。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

梭曼、沙林,纯度98%以上,鸭血清丁酰胆碱酯酶,本所纯化,DTNB(5,5-双-硫代-双-2-硝基苯甲酸),Sigma公司产品。碘化硫代丁酰胆碱、半胱氨酸等为市售分析纯试剂。

紫外-可见光分光光度计,日立340型。

1.2 实验方法

1.2.1 胆碱酯酶活性测定

1.2.1.1 正常酶活性测定 用Ellman法[3],经适当修改。两只比色杯(参比、样品各一)。中各加入0.2 mol/L pH为7.2的磷酸缓冲液0.5 ml,4 mmol/L碘化硫代丁酰胆碱溶液1 ml,0.2%的DTNB溶液1 ml,蒸馏水0.2 ml,参比杯中再加入0.25%的阿拉伯胶溶液0.5 ml。两杯同时放入30 ℃恒温比色槽中,孵温5 min,用注射器吸取0.5 ml酶液,通过橡胶隔膜注入样品杯中,酶反应立即开始,记录2 min的A_{412}变化值。

1.2.1.2 中毒酶活性测定 基本条件同上。只是样品杯中用0.2 ml所需浓度的梭曼或沙林溶液代替蒸馏水,以A_{412}对时间作图。

在底物存在下,酶与抑制剂的反应模式为[4]:

$$E + PX + S \underset{k_{-1}+k_{-2}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \begin{cases} EPX \xrightarrow{k_2} EP + X \\ ES \xrightarrow{k'_2} E + 产物 \end{cases}$$

作者简介:吴方晖(1970-),男,湖北省武汉市人,硕士,助理研究员,主要从事分子生物学方面的研究。电话:(010)66758323,E-mail:wufanghui2003@yahoo.com.cn

收稿日期:2004-02-13;修回日期:2004-05-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

其中, E 为酶, PX 是带脱离基团 X 的梭曼或沙林, S 为底物, EPX 为可逆性酶—抑制剂复合物, EP 是共价结合的膦酰化酶。由此可推导出抑制剂与胆碱酯酶反应的解离常数(k_d), 膦酰化常数(k_2)和抑制速率常数(k_i), 即:

$$k_d=\frac{k_m\cdot[PX]}{(k_m+[S])\cdot(v_c/v_0-1)}$$

$$k_2=\frac{\Delta 1nv}{\Delta t}\left(\frac{k_d}{[PX]\cdot(1-Q)}+1\right)\times 60$$

$$k_i=\frac{k_2}{k_d}$$

其中, k_m 为酶对底物水解反应的米氏常数, [PX] 为抑制剂反应浓度, [S] 为底物反应浓度, v_c 为未被抑制的酶的反应速度, v_0 为被抑制酶零时反应速度, Δlnv 为被抑制酶瞬时反应速度, Δt 为被抑制酶反应时间, 1—Q 为 $k_m/(k_m+[S])$。

1.2.2　k_m 值的测定

将半胱氨酸作为标准样品与 DTNB 反应, 以半胱氨酸量对反应产物 A_{412}作出标准曲线, 在本实验条件下, 半胱氨酸浓度与反应产物 A_{412}呈直线关系。以碘化硫代丁酰胆碱为底物, 同样, 用 DTNB 法测出不同底物浓度下的酶反应速度。底物水解量可由半胱氨酸标准曲线求出。采用 Lineweaver-Burk 的双倒数法作图求出 k_m 值。

2　结果

2.1　鸭血清　酰胆碱酯酶的 k_m 值

将鸭血清丁酰胆碱酯酶对碘化硫代丁酰胆碱水解的实验数据以 1/v 对 1/[S] 作图, 结果见图 1。

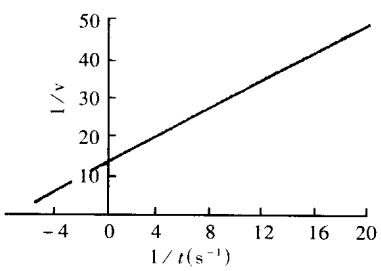


图 1　鸭血清丁酰胆碱酯酶与碘化硫代丁酰胆碱反应的 k_m 值

Fig 1　The k_m value for the interaction of duck sera BuChE with AchI

其直线回归方程为 y= 13.144 82+ 0.000 24x (r= 0.999 62), 从中可以算出 k_m 值为 1.44×10^{-5} ml/ L。

2.2　梭曼、沙林对鸭血清　酰胆碱酯酶的抑制作用

在本实验条件下, 鸭血清丁酰胆碱酯酶对底物的水解反应速度曲线见图 2。

由图 2 可见, 在 2 min 内, 随着反应时间延长, A_{412}不断增加, 反应时间与 A_{412}值呈直线关系, 在 2 min 内所测得的反应速度为酶反应初速度, v_c= 0.003 58 s^{-1}(每秒的 A_{412}值)。

图 3a, b 为梭曼、沙林抑制作用下鸭血清丁酰胆酯酶的反应曲线。

由图 3 可见, 酶被梭曼、沙林抑制后, 酶活性大大降低, 在最初反应时间内(< 10 s), 反应时间与 A_{412}值呈直线关系, 而后 A_{412}值上升减慢, 反应速度降低, 40 ~ 50 s 后, A_{412}值增加趋于零, 这和一般不可逆抑制剂对酶的作用特点是一致的。

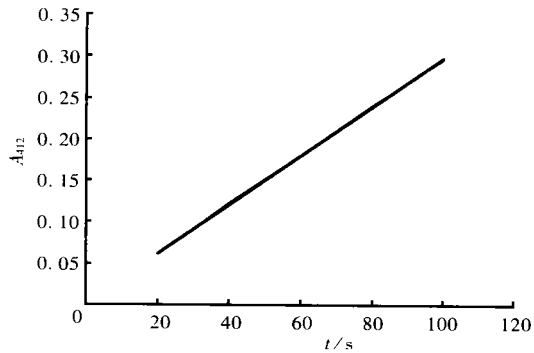
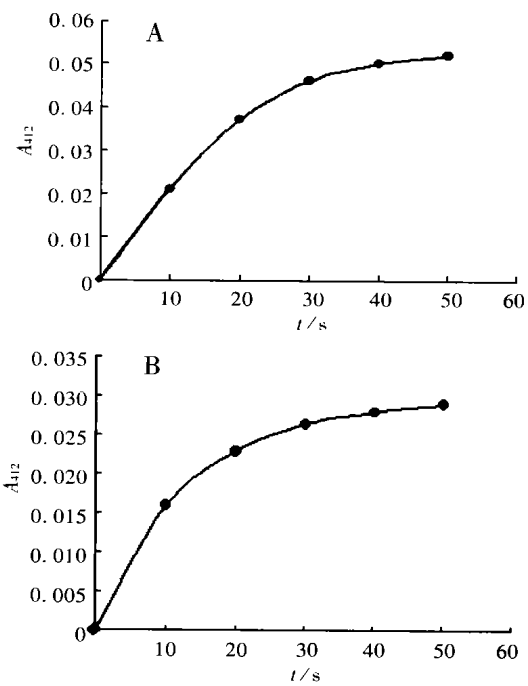


图 2　鸭血清丁酰胆碱酯酶催化底物水解反应速度曲线

Fig 2　The curve of catalysised hydrolytic velocity on duck sera butyrylcholinesterase



A: Soman; B: Sarin

图 3　酶反应速度曲线

Fig 3　Plot of reaction velocities for the inhibition of butyrycholinesterase

为了求出酶被梭曼、沙林抑制中的反应速度, 可先在图 3a, b 曲线上各点做切线, 求出相应各点的瞬时反应速度 v_t, 见表 1。

在图 3 可见在反应开始后 20 s 内, 速度和时间几乎成正比, 以表 1 中的数据作图可以得出酶被梭曼抑制的零时反应速度 v_0 为 0.002 56 s^{-1}, 酶被沙林抑制的零时反应速度 v_0 为 0.002 04 s^{-1}。

根据以上所得数据, 按照上述公式, 可分别算出梭曼、沙林对酶抑制的反应速率常数 k_2, 列于表 2。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 梭曼、沙林抑制下酶在不同时间的瞬时速度

Tab 1 Instantaneous velocity of butyrylcholinesterase inhibited by soman or sarin

	$A_{412}(s^{-1})$					
	5	10	15	20	25	30
Soman	0.002 07	0.001 58	0.001 28	0.001 04	0.000 822	0.000 648
Sarin	0.001 45	0.000 820	0.000 555	0.000 384	0.000 266	0.000 179

表 2 梭曼、沙林对鸭血清丁酰胆碱酯酶动力学常数

Tab 2 Kinetic constants for inhibition of BuChE by soman and sarin

Kinetic constant	$k_d\times10^{-7}(mol\cdot L^{-1})$	$k_2(min^{-1})$	$k_i\times10^7(mol^{-1}\cdot L\cdot min^{-1})$
Soman	0.88	9.89	11.20
Sarin	1.87	11.70	6.27

从表 2 可见，梭曼、沙林对鸭血清丁酰胆碱酯酶的抑制作用均比较强，其 k_i 值分别为 $11.20\times10^7\ mol^{-1}\cdot L\cdot min^{-1}$ 和 $6.27\times10^7\ mol^{-1}\cdot L\cdot min^{-1}$；梭曼、沙林对鸭血清丁酰胆碱酯酶的 k_d 值分别为 $0.88\times10^{-8}\ mol\cdot L^{-1}$ 和 $1.87\times10^{-8}\ mol\cdot L^{-1}$，由 k_d-k_i 值可以看出，梭曼与该酶的亲和力比沙林大，抑制能力强；梭曼、沙林对鸭血清丁酰胆碱酯酶作用的 k_2 值分别为 $9.89\ min^{-1}$ 和 $11.70\ min^{-1}$，说明梭曼、沙林在由可逆性酶－抑制剂复合物转化为共价结合的膦酰化酶时，其反应速度相差不大，但由于梭曼与酶的亲和力强，故梭曼毒性大于沙林。

3 讨论

胆碱酯酶是一类催化酰基胆碱水解的酶类。体内的胆碱酯酶可分为两类[5]：①真性胆碱酯酶，即乙酰胆碱酯酶(AchE)。②假性胆碱酯酶，或称丁酰胆碱酯酶(BuChE)。前者大量存在于中枢神经系统、神经肌肉接头和红细胞中。后者主要分别于细胞髓鞘、胶质细胞、血浆、肝脏及肠黏膜等部位。

乙酰胆碱酯酶在乙酰胆碱的代谢和保持体内胆碱能神经的正常功能中有主要生理作用。神经递质乙酰胆碱在与受体结合后，必须立即被受体附近的乙酰胆碱酯酶催化分解成乙酸和胆碱，而有机磷毒剂可以竞争性结合于胆碱酯酶的活性中心，造成乙酰胆碱在体内储积，引起机体痉挛、瘫痪以致死亡。存在于血清中的丁酰胆碱酯酶与乙酰胆碱酯酶水解底物相似，也可以和有机磷毒物结合[6]。最近的研究结果表明丁酰胆碱酯酶在体内可以预防有机磷中毒，这一发现引起人们极大的兴趣。本次实验中测得的梭曼、沙林对鸭血清丁酰胆碱酯酶的 k_i 值分别为 $0.88\times10^{-8}\ mol\cdot L^{-1}$ 和 $1.87\times10^{-8}\ mol\cdot L^{-1}$，说明底物与酶结合得相当牢固，解离很慢，因此血清中的丁酰胆碱酯酶对进入机体的有机磷毒剂有很强的中和作用，一定程度上阻止了有机磷进入中枢神经系统，因此实践中在有机磷中毒时，可以通过注射丁酰胆碱酯酶来保护机体[7,8]。

乙酰胆碱酯酶催化水解乙酰胆碱速度很快，但催化丁酰胆碱水解速度极慢，不能水解苯酰胆碱，这是由于乙酰胆碱酯酶活性中心包含一个催化部位和一个带负电荷的结合部位，该空间构象与极性的乙酰胆碱正好相配[5]。丁酰胆碱酯酶缺乏带负电荷的结合部位，其催化底物水解的速度顺序为：丁酰胆碱＞丙酰胆碱＞乙酰胆碱[9]，因此推测丁酰胆碱酯酶在反应开始阶段底物与酶结合不是以静电吸附为主，而是主要依靠疏水作用和分子间作用力，结合能力与底物分子量大小和侧链疏水性有关，我们从测得的梭曼、沙林同丁酰胆碱酯酶的动力学常数可以得出相似结论，本实验中侧链基团大的梭曼 k_d 值较沙林小，说明梭曼与该酶的亲和力较沙林大，符合以上推论。

乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶的活性中心都能被有机磷毒剂竞争性结合上去，从而抑制胆碱酯酶的正常生理功能[10]。本实验测得梭曼和沙林的抑制常数 k_i 值分别为 $11.20\times10^7\ mol^{-1}\cdot L\cdot min^{-1}$、$6.27\times10^7\ mol^{-1}\cdot L\cdot min^{-1}$，从 k_i 值看二者对丁酰胆碱酯酶抑制作用都很强，而梭曼对该酶抑制作用更强，这些与梭曼、沙林对试验动物整体毒性试验及体外对乙酰胆碱酯酶抑制实验(I_{50})结果是一致的[11,12]。

参考文献：

[1] Baigar B. Present views on toxidynamics of soman poisoning[J]. Acta Medica(Hradec Kralove), 1996, 39(3): 101－105.

[2] Conn C A, Dokladny K, Genache M. Effects of Sarin on temperature and activity of rats as a model for gulf war syndrome neuroregulatory functions [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2002, 184(2): 77－81.

[3] Ellman C L, Courtney K D, Featherston R M, *et al*. A new and rapid colorimetric de-termination of acetylcholinesterase activity[J]. Biochem Pharmacol, 1961, 7(1): 88－95.

[4] Hart C J, O' Brien R D. Recording spectrophotometric method for determination of dissociation and phosphorylation constant for the inhibition of acetylcholinesterase by organophosphates in the presence of substrate[J]. Biochemistry, 1973, 12(15): 2940－2945.

[5] 方允中，陈能乾编. 医学酶学[M]. 北京：人民卫生出版社，1984. 251－259.

[6] Nicolet Y, Lockridge O and Masson P, *et al*. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products[J]. J Biol Chem, 2003, 278(42): 41141－41147.

[7] Allon N, Raveh L, Gilat E, *et al*. Prophylaxis against soman inhalation toxicity in guinea pigs by pretreatment alone with human serum butyrylcholinesterase[J]. Toxicol Sci, 1998, 43(2): 121－128.

[8] Broomfield C A, Maxwell D M, Solana R P, *et al*. Protection by Butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1991, 259(2): 633－638.

[9] Masson P, Fortier P L and Albaret C, *et al*. Aging of di-isopropyl-phosphorylated Human Butyrylcholinesterase[J]. Biochem J, 1997, 327(pt2): 601－607.

[10] Cokugras A N. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance[J]. Turk J Biochem, 2003, 28(2): 54－61.

[11] 陈久祯，王慧芳，李艳军，等. 梭曼和沙林对电鳐电器官乙酰胆碱酯酶抑制作用动力学[J]. 中国生物化学与分子生物学报，1998, 14(6): 790－792.

[12] Cabal J, Kassa J, Patocka J. Inhibition of plasma cholinesterase by o-alkylfluorophonates[J]. Collection of Czechoslovak chemical communications, 1997, 62(3): 521－526.

(编辑 汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net