

- 1994; 21: 98
- 5 Zaks A, Klibanov A M. J Biol Chem, 1988; 263: 8017
 - 6 Halling P J. Trends Biotechnol, 1989; 7: 500
 - 7 Halling P J. Biotechnol Tech, 1992; 6: 271
 - 8 Yang Z, Robb D A. Biotechnol Tech, 1993; 7: 37
 - 9 Laane C, Boeren S, Vos K *et al.* Biotechnol Bioeng, 1987; 30: 81
 - 10 Yang Z, Robb D A, Halling P J. In: Tramper J *et al.* eds. Biocatalysis in non-conventional media, Amsterdam: Elsevier, 1992; 585
 - 11 Yang Z, Robb D A. Biotechnol Bioeng, 1994; 43: 365
 - 12 Zaks A, Klibanov A M. Science, 1984; 224: 1249
 - 13 Yang Z, Robb D A. Enzyme Microb Technol, 1993; 15: 1030
 - 14 Kazandjian R Z, Klibanov A M. J Am Chem Soc, 1985; 107: 5448
 - 15 Yang Z, Robb D A. Biochem Soc Trans, 1991; 20: 13S

Tyrosinase Activity in Organic Media. Yang Zhen. D. A. ROBB (*Department of Bioscience and Biotechnology, University of Strathclyde,*

U. K.)

Abstract The activity of mushroom tyrosinase catalyzing the conversion of *o*-diphenols to *o*-quinones in organic solvents has been investigated with addition of different amounts of water and at various temperatures. The results have shown that tyrosinase possesses high activity in organic media, the enzyme activity is mainly controlled by the water activity in the reaction system, and it can increase with the increase of reaction temperature as long as the amount of water bound to the enzyme molecule is properly controlled. Salt hydrates are effective for such control in nearly non-aqueous conditions.

Key words enzyme activity, organic media, thermodynamic water activity, tyrosinase

不同有机磷酸酯磷酰化乙酰胆碱酯酶 活性中心的构象差异

罗春元 李志秀 夏叔泉 孙曼霖 杨进生

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 通过观察 2 位肟化合物 HI-6 和 HGG-42 及它们的 4 位肟异构体对不同有机磷毒剂抑制的 AChE 的重活化作用发现塔崩、梭曼、沙林等有机磷毒剂磷酰化的 AChE 活性中心的构象可能存在着明显差异; 又从变构剂 C₁₀ 和丙吡啶对 TMB₁ 重活化这几种毒剂磷酰化 AChE 的影响中证实塔崩磷酰化 AChE 活性中心构象与沙林、梭曼和 VX 3 种毒剂磷酰化的 AChE 明显不同。

关键词 AChE, 构象, 有机磷毒剂, 重活化, 变构剂

有机磷毒剂对乙酰胆碱酯酶 (AChE) 不可逆性抑制是它们的主要中毒机理, 不同毒剂主要通过 AChE 活性中心的丝氨酸羟基发生磷酰化反应而使酶失去活力。重活化药物是含有亲核性进攻基团的化合物, 它们通过带负电性的亲核基团对磷酰化酶的毒剂残基磷原子的

亲核进攻而恢复酶活力。目前, 肟类药物 2-PAM、LüH6 和 HI-6 等都是高效重活化剂, 它们在有机磷毒剂及农药中毒的救治中具有十分重要的意义。但是, 人们发现: 不同药物对不

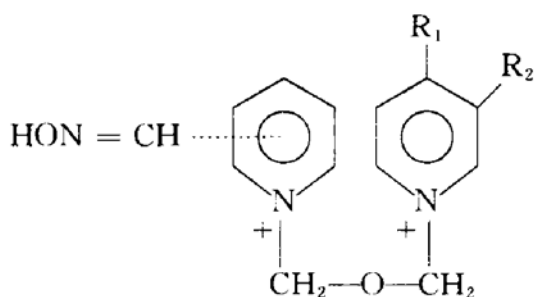
同种类的毒剂如沙林(Sarin), 梭曼(Soman)和塔崩(Tabun)等所抑制 AChE 的重活化作用却存在很大的差异^[1,2]. 梭曼磷酰化 AChE 由于老化(即磷酰化残基的脱烷基化)迅速而阻碍了药物的重活化作用. 然而, 不同药物对于未老化的梭曼磷酰化酶的作用仍存在非常显著的差异^[2]. 而对于塔崩磷酰化 AChE, 虽然其老化非常缓慢, 但许多对沙林, 梭曼和 VX 磷酰化酶均非常有效的 H 系列重活化剂, 如 HI-6 和 HGG-42 等对塔崩磷酰化酶却没有任何重活化作用^[3,4]. 因此, 除了老化因素外, 尚有别的因素明显影响了药物对这些磷酰化 AChE 的重活化作用.

80 年代后期, Löffler 合成了一种 H 系列化合物 HLö-7. 发现它不但对梭曼抑制的 AChE 有较强的重活化作用, 而且对塔崩抑制的 AChE 也有较明显的重活化作用^[5]. HLö-7 与 HI-6 的结构差异之处仅为含胍基的吡啶环上再引入一个 4 位胍基, 这提示, 所引入的 4

位胍基可能在重活化塔崩磷酰化 AChE 时发挥了主要作用, 而重活化梭曼磷酰化酶则主要是 2 位胍基起作用. 为了证实这一推论, 我们合成 H 系列胍类 HI-6 和 HGG-42 以及它们的 4 位胍基异构体, 对它们重活化不同毒剂磷酰化 AChE 的作用进行了比较, 并且还利用 AChE 变构剂 C₁₀ (Decamethonium) 和丙吡啶(Propidium) 对药物重活化作用的影响, 对药物构效关系研究中所表明的磷酰化酶构象存在的差异进行了进一步的探讨.

1 材料与方法

硫代乙酰胆碱(ATCh)和 DTNB 均为 Fluka 公司产品, Propidium 和 Decamethonium 均为 Sigma 公司产品. TMB₄ 及有机磷毒剂沙林、梭曼、塔崩和 VX (1% 的丙二醇溶液) 由本所提供. HI-6 和 HGG-42 及它们的 4 位胍基异构体由我们实验室自己合成, 其结构式如下:



HI-6: 胍基 2 位, $R_1 = \text{CONH}_2$, $R_2 = \text{H}$

HI-6 的 4 位胍基异构体: 胍基 4 位, $R_1 = \text{CONH}_2$, $R_2 = \text{H}$

HGG-42: 胍基 2 位, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CO}-\text{C}_6\text{H}_{11}$

HGG-42 的 4 位胍基异构体: 胍基 4 位, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CO}-\text{C}_6\text{H}_{11}$

AChE 酶源为人红细胞悬液: 健康人的新鲜血液以 pH 7.2 的等渗磷酸盐缓冲液制成 1 : 60 (V/V) 的红细胞悬液. AChE 活力按微量 Ellman 法测定^[6], 并将酶与底物的反应改在 1.5ml eppendorf 氏管内进行, 离心后吸取上清液于 96 孔板上显色. 塔崩、沙林和 VX 磷酰化 AChE 的制备为分别以终浓度为 100、10 和 5nmol/L 的毒剂溶液与人红细胞于 37℃ 孵温 30min, 然后以 pH 7.2 的等渗磷酸盐缓冲液洗涤红细胞 3 次除去残余毒剂. 为延缓磷酰化 AChE 的老化速度, 梭曼磷酰化酶的制备为以终浓度为 100nmol/L 的梭曼于冰浴中与人红

细胞作用 10min, 然后以等渗磷酸盐缓冲液于低温条件下(4℃)洗涤 3 次以除去残余的梭曼. 药物重活化反应均于 37℃ 下进行 30min, 然后再以等渗磷酸盐缓冲液洗涤 3 次红细胞以除去残余的药物, 最后测定 AChE 活力以计算重活化率.

2 结 果

2.1 H 系药物的体外重活化作用比较

2.1.1 对沙林和 VX 磷酰化 AChE 的重活化作用 在 10μmol/L 浓度下, HI-6 和 HGG-42 及它们的 4 位胍基异构体对沙林和 VX 磷酰化

AChE 均有非常明显的重活化作用. 其中 HI-6 对沙林磷酸化酶的重活化显著大于其 4 位肟异构体, 而 HGG-42 则显著小于其 4 位肟异构体; 它们对 VX 磷酸化 AChE 的作用也基本与对沙林磷酸化酶相似 (表 1).

表 1 H 系列肟异构体对沙林和 VX 磷酸化 AChE 的重活化作用

药物	重活化率/%	
	沙林	VX
HI-6	87±8(6)	64±9(6)
HI-6 的 4 位肟异构体	60±11(6) ¹⁾	49±12(5) ²⁾
HGG-42	38±4(6)	22±4(6)
HGG-42 的 4 位肟异构体	53±4(6) ³⁾	46±6(6) ³⁾

药物浓度均为 10μmol/L, 括号内数字为 *n*: 1) 与 2); 与 HI-6 比, $P<0.001$, $P<0.05$; 3); 与 HGG-42 比, $P<0.001$.

2.1.2 对塔崩磷酸化 AChE 的重活化作用

这几种 H 系肟对塔崩磷酸化 AChE 的重活化作用要弱得多, 只有 1mmol/L 药物浓度下, 才可见到两个 4 位肟异构体对塔崩磷酸化酶有显著重活化作用, 但 HI-6 和 HGG-42 仍无任何重活化作用 (表 2).

表 2 H 系列肟异构体对塔崩磷酸化 AChE 的重活化作用

药 物	<i>n</i>	重活化率/%
HI-6	3	2±1
HI-6 的 4 位肟异构体	5	45±2 ¹⁾
HGG-42	6	1±1
HGG-42 的 4 位肟异构体	5	28±4 ²⁾

药物浓度均为 1mmol/L; 1); 与 HI-6 比, $P<0.001$; 2); 与 HGG-42 比, $P<0.001$.

2.1.3 对梭曼磷酸化 AChE 的重活化作用

由于梭曼磷酸化 AChE 在体外的老化极为迅速, 在加入药物进行重活化的同时, 梭曼磷酸化酶也迅速老化而不能被药物重活化. 因此, 在 37℃ 条件下, 药物作用 30min 所测得的结果实际上是药物在此条件下的最大重活化率.

结果表明, 这些药物对梭曼磷酸化 AChE 的重活化作用与它们对塔崩磷酸化酶的作用相反, 只有 1mmol/L 的 HI-6 和 HGG-42 有较明显的重活化作用, 它们的 4 位肟异构体重活化作用基本消失或完全消失 (表 3).

表 3 H 系列肟异构体对梭曼磷酸化 AChE 的重活化作用

药 物	<i>n</i>	最大重活化率/%
HI-6	4	35±3
HI-6 的 4 位肟异构体	4	0 ¹⁾
HGG-42	4	22±2
HGG-42 的 4 位肟异构体	4	4±2 ²⁾

药物浓度均为 1mmol/L; 1); 与 HI-6, $P<0.001$; 2); 与 HGG-42 比, $P<0.001$.

2.2 变构剂对药物重活化作用的影响

Harris 等发现, AChE 变构剂如 C₁₀ 和 SAD-128 当与重活化药物 TMB₄ 和 LūH6 等共同孵温时, 可显著增强这些重活化剂对沙林和梭曼磷酸化 AChE 的重活化作用, 并认为变构剂的作用主要是通过改变酶的构象从而有利于重活化剂对磷酸化残基的进攻^[7]. 然而以上实验结果证实, 梭曼、塔崩、沙林和 VX 这几种毒剂磷酸化 AChE 对重活化药物的结构分别有不同的要求, 这表明这些磷酸化酶活性中心的构象可能不同. 因此, 变构剂对药物重活化这几种磷酸化酶的影响也不可能不一样. 为此, 以下选择了两类变构剂对此进行了探讨.

2.2.1 C₁₀ 对 TMB₄ 重活化作用的影响 C₁₀ 是一种双向结合于 AChE 的变构剂, 它的两个季铵头的一端可与酶的活性中心区域结合, 另一端与酶的外周部位结合^[8]. 结果 C₁₀ 能显著增强 TMB₄ 对沙林、梭曼和 VX 磷酸化 AChE 的重活化作用. 然而, 它却明显降低 TMB₄ 对塔崩磷酸化 AChE 的重活化作用 (图 1). 这一结果表明, 塔崩磷酸化酶活性中心的构象与前三者明显不同.

2.2.2 丙吡啶对 TMB₄ 重活化作用的影响 丙吡啶是一种仅结合于 AChE 外周部位的变

构剂^[8]. 结果表明, 它对 TMB₄ 重活化作用的影响与 C₁₀ 不同, 对药物重活化沙林、梭曼和 VX 磷酰化 AChE 均没有明显影响, 但是, 它对 TMB₄ 重活化塔崩磷酰化酶则仍有显著地降低作用 (图 2). 这也表明后者活性中心的构象与前三者不同.

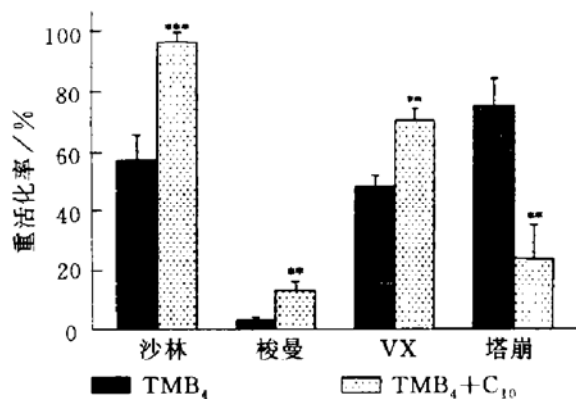


图 1 C₁₀对 TMB₄ 重活化作用的影响

C₁₀的终浓度均为 1mmol/L; TMB₄ 重活化沙林、梭曼、VX 和塔崩磷酰化酶的终浓度分别为 0.02、1、0.01 和 0.1mmol/L ($P < 0.01$).

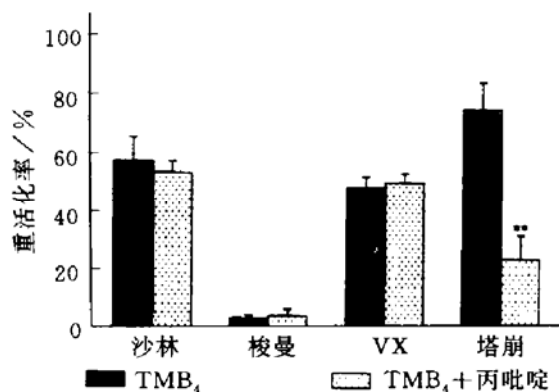


图 2 丙吡啶对 TMB₄ 重活化作用的影响

丙吡啶的终浓度均为 0.1mmol/L; TMB₄ 重活化沙林、梭曼、VX 和塔崩磷酰化酶的终浓度分别为 0.02、1、0.01 和 0.1mmol/L ($P < 0.01$).

3 讨 论

药物对磷酰化 AChE 的重活化作用实质上是一种亲核进攻反应. 药物的重活化作用大小受多种因素的影响, 如药物进攻基团的亲核性和 pK_a 的大小、药物与酶的亲和力、药物的

疏水性及电子效应、磷酰化酶的老化、残存于反应液中的毒剂及药物与毒剂反应生成磷酰化肟对已被重活化的酶重新抑制、肟类药物对 Ellman 反应底物的直接分解等都可影响重活化实验结果^[9-12], 体内实验的结果将更加复杂. 因此, 本实验采用人红细胞进行体外重活化方法, 以尽量减少体内复杂因素的干扰. 并在 AChE 被毒剂抑制完成后, 多次以缓冲液洗涤红细胞以除去残存的毒剂; 在重活化反应完成后, 又反复洗涤红细胞以排除剩余的药物带来的干扰. 在此条件下, 所测得的重活化结果能较确切地代表药物本身的重活化能力. 本实验中所设计的 H 系肟类化合物除肟基在吡啶环上的取代位置分别在 2 位和 4 位以外, 其余均完全一致, 因此, 排除了许多结构因素的影响, 这样, 药物重活化作用的变化就可能直接反映了磷酰化 AChE 活性中心空间结构的差异.

70 年代以来, HI-6 的发现是寻找治疗难防难治的神经性毒剂梭曼的一个重要进展, 但是人们却无法解释 HI-6 等对梭曼磷酰化 AChE 有很强作用的 H 系列化合物, 为何对塔崩磷酰化 AChE 却无任何重活化作用^[3,4]. 本实验结果证实, HI-6 和 HGG-42 之所以不能重活化塔崩磷酰化酶, 主要是由于它们的肟基位置不合适所致, 因为其 4 位肟异构体对塔崩磷酰化酶均有一定重活化作用 (表 2). 这也解释了 HLo-7 之所以对梭曼和塔崩磷酰化酶均有一定重活化作用, 是因为其吡啶环上的 2 位和 4 位肟基能分别对这两种磷酰化残基进行有效攻击, 即 2 位肟进攻梭曼磷酰化残基, 4 位肟进攻塔崩磷酰化残基. 对于沙林和 VX 磷酰化残基, 则 2 位肟基或 4 位肟基均能有效的攻击, 因此以上观察的所有化合物都有较强的重活化作用 (见表 1). 这种现象表明, 梭曼磷酰化残基与塔崩磷酰化残基在酶活性中心的空间构象存在差异. 而沙林和 VX 磷酰化酶的构象又可能与上述两者不同, 因为它们对药物的结构要求也不同于前二者.

为进一步证实药物结构变化所反映出来的

磷酸化酶之间的构象差异, 本实验又观察了酶的变构剂对药物重活化不同磷酸化 AChE 的影响. 结果不论是对酶的外周部位和活性中心均有作用的变构剂 C_{10} , 还是仅结合于外周部位的变构剂丙吡啶, 对 TMB_4 重活化塔崩磷酸化酶的影响均明显不同于它们对 TMB_4 重活化沙林、梭曼和 VX 三种毒剂磷酸化酶的影响 (图 1, 2). 这一结果进一步表明, 塔崩磷酸化 AChE 与其余三种磷酸化 AChE 之间存在着明显的构象差异. 但药物构效关系实验结果所提示的梭曼磷酸化酶与沙林、VX 磷酸化酶之间的差异在变构剂实验中未能观察到不同的变化.

不同磷酸化 AChE 活性中心的构象差异的形成机制尚不清楚. 可能是由于毒剂的磷酸基上的取代基不同, 因此, 在与酶反应时除与活性中心丝氨酸羟基连接之外, 其它基团与酶活性中心附近的相互作用不同所造成的. 焦克芳等^[13]近年来对重活化理论的探讨认为药物在重活化时与酶活性中心附近一芳香区的相互作用明显影响了药物的重活化效率. 梭曼、塔崩分子中的磷酸基上取代基有可能与酶活性中心附近的不同结构发生相互作用, 从而使它们在酶活性中心的取向不同, 这样, 对重活化药物的结构分别具有不同的要求. 1991 年, Sussman 等^[14]对 AChE 空间结构的 X 线衍射结果表明, 酶活性中心附近有众多的芳香氨基酸残基, 它们可能通过多种不同方式与底物, 激动剂或抑制剂相互作用. 因此不同结构的有机磷毒剂在与 AChE 发生磷酸化反应时, 也可能发生不同的相互作用. 以上 H 系药物两个吡啶环之间的桥链为三个原子, 而当缩短为一个原子时, 对梭曼磷酸化 AChE 有较好重活化作用的 MMB4 则是一个 4 位肟基化合物, 正好比 HI-6 的肟基向前移了两个碳原子, 而它的桥链为三个原子的同系物 TMB_4 则对梭曼磷酸化酶没有明显重活化作用^[15], 但沙林和 VX 磷酸化酶则未见这种现象. 这提示, 双吡啶肟类化合物对梭曼磷酸化酶进行重活化作用时主要依靠第二个季铵吡啶环与酶活性部位发生

相互作用, 而第一个季铵吡啶环则不起明显作用. 因此, 这一情况下的进攻距离应由第二个季铵吡啶环来决定. 产生这种现象的原因可能是梭曼磷酸化酶的活性中心与第一个季铵吡啶环相互作用的区域被占据或位置发生了改变. 塔崩残基由于其与酶活性中心附近的相互作用可能与梭曼残基不同, 因此, 磷酸化酶活性中心的构象及对药物结构的要求也不同于前者.

总之, 本文从药物结构变化与重活化效价的关系中观察到, 不同有机磷毒剂磷酸化的 AChE 活性中心的构象可能存在着明显的差别. 其中, 塔崩磷酸化酶与其它三种毒剂磷酸化酶的差异得到了变构剂实验的进一步支持. 这种现象差异的探索, 不但能较好地解释许多重活化剂如 TMB_4 , HI-6, HGG-42 及 HI-6-7 等的作用特点, 也为今后寻找效价高, 对多种毒剂均有效的重活化剂开辟了一条新的途径.

参 考 文 献

- 1 Clement T G, Shiloff J D, Gennings C. Arch Toxicol, 1987; **61**: 70
- 2 罗春元, 孙曼霁, 杨进生. 军事医学科学院院刊, 1993; **17** (3): 166
- 3 De Jong L P A, Worling G Z. Biochem Pharmacol, 1984; **33**: 1119
- 4 Cerkovic S, Cvetkovic M, Jandric D *et al.* Fundam Appl Toxicol, 1984; **4**: s116
- 5 De Jong L P A, Verhagen M A M, Langenberg J P *et al.* Biochem Pharmacol, 1989; **38** (4): 633
- 6 董立春. 军事医学科学院院刊, 1987; **11** (6): 480
- 7 Harris L W, Heyl W C, Stitcher D L *et al.* Biochem Pharmacol, 1978; **27**: 757
- 8 Taylor P, Lappi S. Biochemistry, 1975; **14** (9): 1989
- 9 Mager P P, Gupta S D A S. Pharmazie, 1982; **37**: 607
- 10 SU C T, Wang P H, Liu R F *et al.* Fundam Appl Toxicol, 1986; **6**: 506
- 11 Bedford C D, Harris R N, Howd R A *et al.* J Med Chem, 1984; **27**: 1413
- 12 Harvey B, Scott R P, Sellers D J *et al.* Biochem Pharmacol, 1986; **35**: 737
- 13 焦克芳, 李 松, 陈邦华. 中国科学 B 辑, 1993; **23** (10): 1063
- 14 Sussman T L, Harel M, Frolova F *et al.* Science, 1991; **253**: 872

15 Harris L W, Anderson D R, Lennox W J *et al.* *Biochem Pharmacol*, 1990; **40** (12): 2677

Evidences of Conformational Difference in the Active Centre of Phosphorylated Acetylcholinesterases. Luo Chunyuan, Li Zhixiu, Xia Shuquan, Sun Manji, Yang Jinsheng (*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract The striking distinctions of oximes, such as 2-PAM, LüH6, TMB₄ and HI-6, in reactivating sarin-, soman-, tabun- and VX- phosphorylated acetylcholinesterase (AChE) imply that there are factors which hinder phosphorylated enzymes from being re-activated by some oximes before aging. To investigate this problem, a comparison of *in vitro* reactivation of these phosphorylated enzymes by H series oximes, HI-6, HGG-42 and their 4-oxime isomers, was made. Results showed that, in tabun experiments, although there was no reactivation by the two 2-oximes (HI-6 and HGG-42), 28%—45% reactivations were observed by their 4-oxime isomers.

In soman case the results were opposite. HI-6 and HGG-42 showed remarkable reactivation, but their 4-oxime isomers were ineffective. For sarin- and VX- phosphorylated AChE, all oximes showed high effectiveness. These results indicated that there are conformational differences among the active centre of the above phosphorylated enzymes. The influences of AChE allosteric agents showed that C₁₀ significantly increased the effects of TMB₄ in sarin, soman and VX experiments, however, it reduced the effect of TMB₄ significantly in the tabun case. Propidium has no influence on the reactivation of sarin, soman- and VX- phosphorylated AChE, but it significantly reduced the effect of TMB₄ on reactivating tabun-phosphorylated enzyme. These results confirmed that the conformation in the active centre of tabun-phosphorylated enzyme is obviously different from that of sarin-, soman- and VX- phosphorylated enzymes.

Key words AChE, conformation, organophosphate agent, reactivation, allosteric agent

胃癌和非癌病变 ras P²¹表达的定量研究*

左连富 胡俊兰 刘江惠 郭建文 高国栋

(河北省肿瘤医院, 石家庄 050011)

齐凤英

(河北医学院病理解剖组, 石家庄 050017)

摘要 应用流式细胞术对胃癌和胃粘膜的非癌病变组织细胞 ras 癌基因蛋白产物 P²¹表达进行了定量研究, 并探讨了 ras P²¹表达与 DNA 倍体与增殖指数的关系。结果表明, 胃癌 P²¹表达量明显高于非癌病变组织的表达量。胃粘膜非癌病变组织中, 胃癌前病变组织 P²¹表达量明显高于慢性萎缩性胃炎组织的表达量, 并发现 P²¹蛋白的表达量与胃癌和癌前病变组织学分级、DNA 倍体、增殖指数密切相关。

关键词 胃, 癌和癌前病变, ras P²¹, 流式细胞术