

有机磷毒剂——梭曼的水解酶

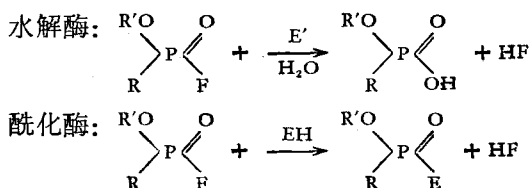
肖美珍 刘昌玲 张翰 王文香 王国庆 周延冲

(军事医学科学院, 药理毒理研究所, 北京)

一、前 言

1946年 Mazur, A^[1];首先发现兔血清中含有水解有机磷毒剂 DFP, E600 的酶, 称 A-酯酶。1953年 Aldridge, W. N^[2]; 1954年 Augustinsson, K. B^[3]; 等人报告兔血清可水解 DFP, E600, 塔崩 (Tabun), 其水解塔崩的酶活力比其他动物高 16 倍。Zech, R; 和 Wigand, K. D.^[4] 用凝胶过滤和等电聚焦分离了大肠杆菌中的有机磷化合物的解毒酶, 发现大肠杆菌中 E600 水解酶 (Paraoxonase) 和 DFP 水解酶 (DFPase) 是两个不重叠的峰。1976年 Munnecke,^[5] D. M 用假单胞菌、黄单胞菌等数种混合菌株消除环境中的有机磷农药的污染, 结果证明混合菌株胞内酶对七种有机磷化合物水解比化学水解快其中对 E₆₀₀ 要快 525 倍。1967年 Hoskin, F. C. G^[6] 报告乌贼鱼的 (*Loligo pealii*) 轴突有高浓度的水解酶。1972年^[7] 他用硫酸铵和 DEAE 纤维素层析将乌贼鱼神经节酶纯化 1300 倍。但有关梭曼 (Soman) 水解酶的报道甚少。我们发现蟾蜍血清、兔血清、及从猪肝分离的 A-酯酶都能较好的水解梭曼。由于 G 类毒剂 (系指毒剂分子中含有 P-F 键者) 水解酶常和对毒剂敏感的其他酯酶同时存在, 而与毒剂反应后的产物相同, 因而必须将磷酰化酶和毒剂水解酶加以区分, 其反应通式如下:

水解酶与酰化酶与毒剂反应的通式为:



这两种反应的最终产物虽有相似之处, 但其反应历程却有本质上的差异。酶的催化反应可加快产物的生成速度, 而其本身在反应前后没有结构和性质上的改变, 而酰化反应是每一个毒剂分子和酶分子的活性中心之间的共价结合, 不能反复作用。所以可用酶与底物反应的特征, 以反复中毒的方法加以区分。

我们选用糜蛋白酶和胆碱酯酶作为梭曼中毒可酰化酶的代表并和毒剂水解酶做一比较, 结果说明哺乳动物和细菌中均有梭曼水解酶存在, 从而决定寻找米氏常数较小, 水解效率更高的 G 类毒剂水解酶。

本文用四种方法^[8]同时证明哺乳动物兔血清, 猪肝 A-酯酶, 两栖类蟾蜍血清和细菌大肠杆菌胞内酶与梭曼的反应是催化水解, 而糜蛋白酶, 胆碱酯酶和梭曼的反应为磷酰化反应。

二、材料与方 法

1. 酶源 猪肝粗制剂进一步提纯的 A-酯酶, 兔血清, 大肠杆菌菌体胞内酶, 蟾蜍血清, 糜蛋白酶, 胆碱酯酶。

2. 分离方法 用等电聚焦电泳分离猪肝 A-酯酶, 选用载体为两性电解质 (Ampholine), pH3—10, 电极液 1 M H₂SO₄, 2 M NaOH, 聚焦体积为 110 毫升, 电压 700 伏特, 电泳 48 小时, 20℃ 水冷却, 酶用量为 70% 饱和度硫酸铵划分的 50 毫克猪肝冻干粉。结果 A-酯酶比活力 b₃₀ 为 2500 (底物为梭曼), B-酯酶活力为 55 毫克邻-硝基苯酚/毫克蛋白质 (底物为邻-硝基苯酚丁酯)。A-酯酶等电点为 pH4.6, 5.2, B-酯酶为 4.2, 4.5 (图 1)。另用葡聚糖凝胶 G-75 同样分得两个峰。A-酯酶比活力 b₃₀ 为

2988, B-酯酶为 32 毫克邻-硝基苯酚/毫克蛋白质。

3. 酶蛋白含量测定 用 Folin-酚试剂法; 紫外光谱法。

4. 酶活力测定用四种方法

(1) 固相酶法 用溴化氰活化的琼脂糖凝胶做成兔血清固相酶, 再用梭曼将其中的丁酰胆碱酯酶、B-酯酶活力抑制后, 洗去游离的梭曼。用此固相酶和梭曼反应, 用华氏呼吸检压法测定其水解梭曼的酶活力。实验流程如下:

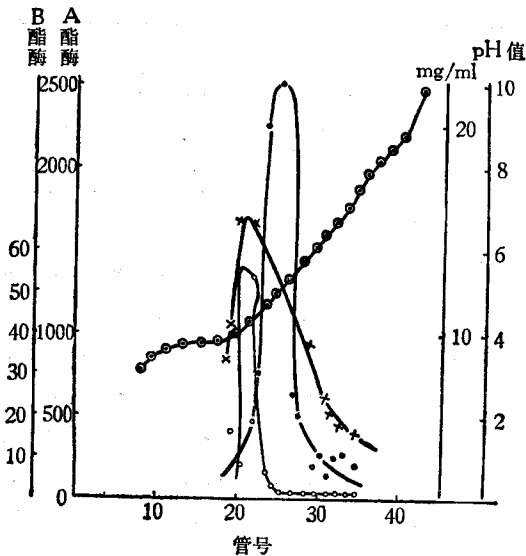
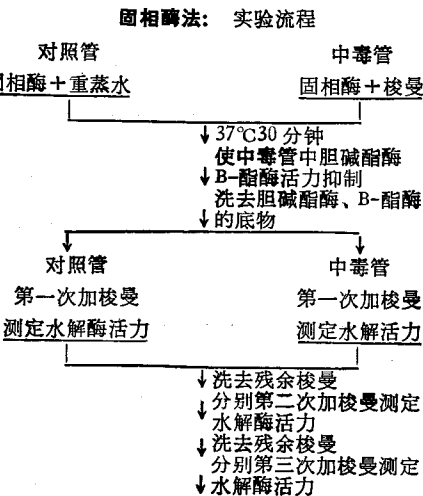


图 1 等电聚焦电泳分离 A、B 酯酶

●—● A-酯酶活力 (CO₂ 微升数/毫克蛋白质)
○—○ β-酯酶活力(邻-硝基苯酚毫克数/毫克蛋白质)
×—× 蛋白质浓度 mg/ml ○—○ pH 值

(2) 凝胶过滤法 选用葡聚糖凝胶 G200, 柱长 14 厘米, 直径 1.1 厘米, 用 0.9% NaCl 平衡柱, 取兔血清先用梭曼将其中胆碱酯酶, B-酯酶活力抑制, 上柱除去十分子的残余毒剂, 用 0.38M 蔗糖做洗脱液, 收集蛋白部分, 用华氏呼吸检压法测定梭曼水解酶活力。

(3) 氟电极法 用氟电极测定毒剂水解产物 F 离子, 以毫伏数代表酶活力。

(4) 电位自动滴定法 2D₂ 型电位自动滴定计, 用标准氢氧化钠滴定梭曼水解产物 PMP (Pinacolyl Methyl phosphonic acid) 和 HF 的总酸度。

三、结 果

1. 固相酶法 兔血清固相酶经梭曼处理后, 其中的丁酰胆碱酯酶、B-酯酶活力 90% 以上已被抑制。(表 1) 取此固相酶加梭曼测定水

表 1 兔血清固相酶经梭曼中毒后丁酰胆碱酯酶、B-酯酶活力

样 品	丁酰胆碱酯酶		B-酯酶	
	含量	相对百分率	含量	相对百分率
正常兔血清	7	100	23	100
中毒兔血清	0.5	7	2	9

注: 1. 酶含量为每毫克蛋白的含量;
2. 丁酰胆碱酯酶活力测定按 DTNB 法;
3. B-酯酶底物为磷-硝基苯酚丁酯。

解酶活力。转入小沙芯管中, 用冰水反复冲洗除尽残余的梭曼及反应体系, 然后再转入华氏反应瓶中, 第二次再加入梭曼测定酶活力。结果证明将胆碱酯酶及 B-酯酶抑制后, 第三次加入梭曼仍可水解, 酶活力和对照管相近, 说明系兔血清的水解酶作用(图 2)。

2. 凝胶过滤法 结果和固相酶法完全一致, 经处理后的兔血清其梭曼水解酶活力和正常兔血清一致, 而马血清、猪脑匀浆、糜蛋白酶的活力很低。(图 3)

3. 氟电极法 当反复加入梭曼时, 兔血清

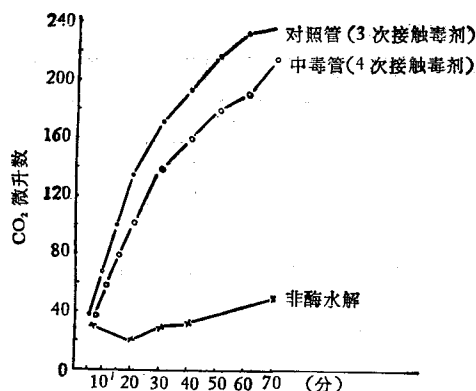


图2 兔血清固相酶水解梭曼的作用

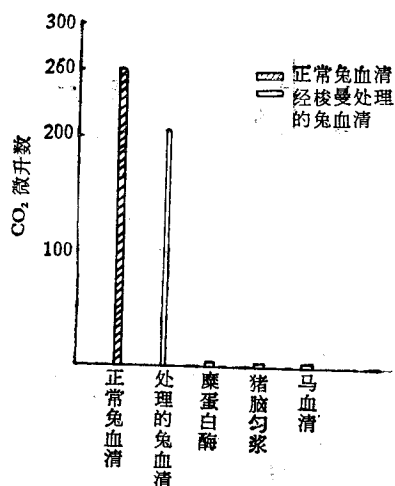


图3 兔血清及几种酰化酶与梭曼作用的比较

注 酶: 1mg 蛋白质 梭曼: 终浓度 $3.8 \times 10^{-3} M$ 。

仍可水解梭曼,其酶活力曲线呈梯形,而糜蛋白酶、乙酰胆碱酯酶等可酰化酶和梭曼反应呈一低水平线,并且不能反复作用。(图4)

4. 电位自动滴定法 以重复中毒的方式,每隔 40 分钟加一次梭曼,共加三次。含水解酶

的蟾蜍血清、兔血清与梭曼反应时,酶活力呈梯形曲线,其中 A-酶的活力于第三次加入毒剂时仍可大幅度的上升,而糜蛋白酶则毫无水解梭曼的能力(图5)。再观察酶与梭曼在 $37^{\circ}C$ 反应 10 分钟的初速度。蟾蜍血清,兔血清和 A-酯

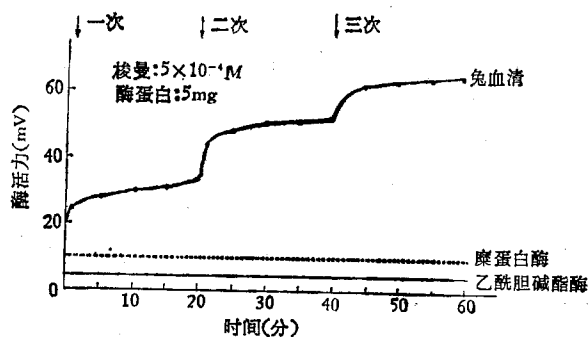


图4 兔血清对梭曼的水解作用

酶 10 分钟水解梭曼的速度比非酶对照快,其中 A-酯酶要比非酶快 160 倍,而糜蛋白酶或电鳐胆碱酯酶和非酶水平相近(表2)。用此方法我们发现^[9]经超声波粉碎后的大肠杆菌菌体 1.1102, 1.1040 的胞内酶亦含有梭曼水解酶。(表3)

表2 A-酯酶等几种水解酶及酰化酶与梭曼作用的初速度比较

酶	水解毒剂 (毫克)	比 值 (非酶:酶)
毒剂对照	0.12	1
糜蛋白酶	0.20	2
电鳐胆碱酯酶	0.00	0
蟾蜍血清	0.94	8
兔血清	1.97	15
A-酯酶	19.60	160

注: 酶自身对照(-),酶加热(-);酶 5mg, 梭曼: 终浓度 $2.5 \times 10^{-3} M$ 。以上采用电位滴定法。

四、讨 论

1. 用固相酶、凝胶过滤、电位自动滴定及氟

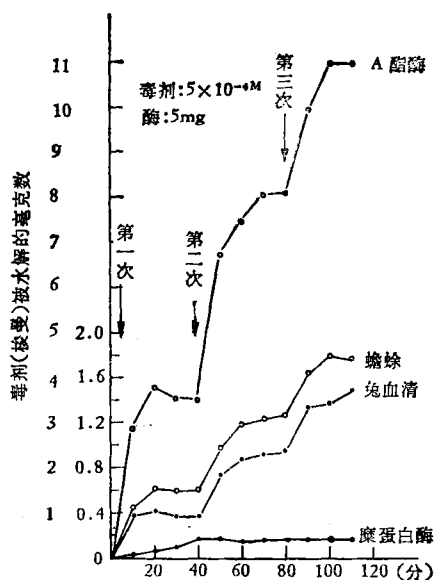


图5 几种毒剂水解酶对梭曼重复中毒的活力曲线

表3 大肠杆菌 1.1040、1.1102 对梭曼重复水解的作用

梭曼加入次数及 反应时间(分)	水解梭曼 %	
	大 肠 杆 菌	
	1.1040	1.1102
第一次		
10	67	86
20	71	96
30	81	100
40	81	100
第二次		
10	132	170
20	142	205
30	163	200
40	163	200
第三次		
10	210	256
20	226	273
30	239	281
40	...	295

注: 电位滴定法 梭曼终浓度 $5 \times 10^{-4} M$, 0.91mg 梭曼
完全水解 消耗 5.0mM NaOH 2.44ml 为 100%

离子微电极等四种方法, 证明有机磷毒剂水解酶在自然界是存在的, 不仅存在哺乳动物脏器和血清中, 而且在两栖类动物和微生物细菌中亦有这类酶。因此进一步寻找含量丰富水解效率高、新酶源, 研究其催化机理, 酶化学, 及生物学效应对我们深入了解有机磷中毒的代谢及解毒过程具有重要的理论价值。

2. 当前酶蛋白日益应用于工业, 临床^[10], 用酶来纠正酶的缺陷病也取得了一定进展。酶也可从微生物中获得。近年来, 人们正在研究将酶嵌入脂质体的人工膜中, 这样, 人体细胞就能不把酶当成异物加以水解或排除。如果能将含量丰富的水解酶经高度纯化后, 应用于临床实践是有现实意义的。

本文于 1981 年在南宁全国第四次生化会议报告。本工作承中国科学院微生物所菌种保管室及何忠效同志及本院马立人、孙曼弄、王宝珍、王兴娟等同志的帮助, 在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Mazur, A.: *J. Biol. Chem.*, 164: 291, 1946.
- [2] Aldridge, W. N.: *B. J.* 53, 110, 1953.
- [3] Augustinsson, K. B. et al.: *Acta Chem. Scand.*, 8, 753, 1954.
- [4] Zech, R. et al.: *Experientia* Vol. 31 Fasc 1—6 p 157, 1975.
- [5] Munnecke, D. M.: *Applied & Environmental Microbiology*, Vol. 32, 7, 1976.
- [6] Hoskin, F. C. G. et al.: *Structure and reaction of DFP Sensitive enzyme* p. 105, 1967.
- [7] Hoskin, F. C. G. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 150(2): 548, 1972.
- [8] 肖美珍等: 《军事医学科学院院刊》增刊, P. 144, 1980.
- [9] 肖美珍等: 《药理毒理研究所科研工作年报》1980(一)
- [10] Journ Arehart-Treichel.: *Science news*, 114, 58, 1978.

〔本文于1983年1月15日收到〕