

果表明,在含有 CL 的体系中,用 DPPC (二棕榈酰磷脂酰胆碱)代替 DMPC 具有相类似的效果,而改变 CL 的克分子比,在 CL 小于 10mol% 或大于 80mol% 的条件下将难以得到这类结构。各种二价阳离子在这一体系中都有类似作用,但效率不同。膜间接触不仅可由 Ca^{2+} 引起,在某些情况下,表面活性物质也有类似作用,在广泛研究的基础上将得出相应的结论。

其次,人工膜中所见到的这类现象是否在活体中间同样存在,这一问题的研究困难得多,但这是必要的一步。

管状脂质体与螺旋状脂质体的表面积远大于同分子数的球状脂质体,利用这一性质将有利于某些涉及表面作用的问题的研究,例如融合与相互作用,特别是利用脂质体载带药物的问题等。开展这类研究有可能在实践中提供有益的途径。

上面所提到的只是作者本人所见到的近年来在研究生物膜脂方面的新问题。实际关于膜脂的研究不止于此,但重视膜脂研究则是近年来的一种趋势。

[本文于 1981 年 11 月 19 日收到]

单加氧酶细胞色素 P-450 及其模拟

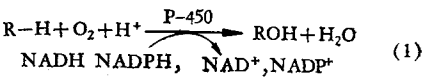
吴 越 张岱山

(中国科学院长春应用化学研究所)

一、细胞色素 P-450^[1,2]

生命有机体中的许多代谢过程与氧化反应和电子转移过程有密切联系。在具有转化底物能力的血红素蛋白中,细胞色素 P-450 意义特别重大,它能催化各种有机物和分子氧之间称之为混合功能氧化的化学反应,诸如,芳族化合物、脂族化合物及其侧链的羟基化,烯烃的环氧

化,氧化脱 (N-)、(O-) 烃,氧化脱氨基等。这些反应中的每个底物分子所需的二个外加电子系由还原的菸酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 及其磷酸衍生物 (NADPH, 辅酶 II) 提供:



1. 来历、组成和性质 细胞色素 P-450 广

表 1 一些 P-450 体系的来历、组成和性质

来 历	电子授体	电子转移体系		底 物
		黄素蛋白	第二组份	
鼠、兔	NADPH	NADPH-P-450 还原酶	卵 磷 脂	药 物
牛 (肾上腺)	NADPH	肾上腺素还原酶	肾上腺素 (非血红素铁蛋白)	甾族化合物的 β -11 位
假单胞 菌	NADH	假单胞氧还蛋白还原酶	假单胞氧还蛋白	萜酮的 5-exo 位
大孢子 杆菌	NADPH	大孢子氧还蛋白还原酶	大孢子氧还蛋白	甾类化合物的 β -15 位
念珠菌	NADPH	NADPH 特殊还原酶	(脂 类)	烷 烃
变性念珠菌	NADPH	NADPH 特殊还原酶	磷 脂	烷烃,脂肪酸的 ω -位

泛分布于哺乳动物、植物以及微生物中,可从肝微粒体、肾上腺和各种酵母菌株中提取。所有 P-450 酶都含有一个电子转移组份和所谓的末端氧化酶,不论在什么情况下,末端氧化酶均为一铁卟啉 X-蛋白质络合物,仅蛋白质部位的结构有所不同。通常起生理电子授体作用的都是 NADH 和 NADHP,而电子转移蛋白质则是专一的碎片(表 1)。一种 P-450 体系的结构及其电子转移途径如图 1 所示。

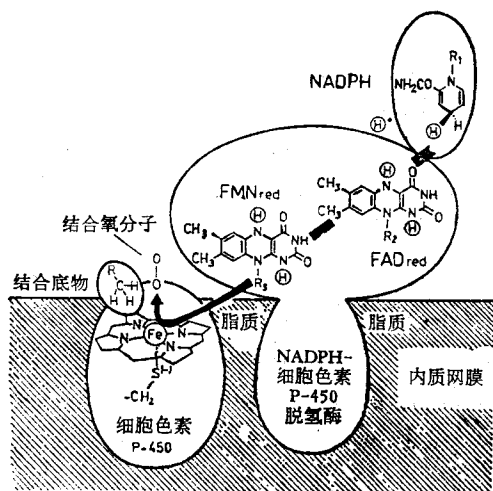


图 1 由肝微粒体所得 P-450 体系的结构

(黑箭头表示电子从 NADPH 流向结合氧)。R₁—核糖(磷酸),—核糖(磷酸)腺嘌呤,R₂—核糖醇(磷酸),—核糖(腺嘌呤);R₃—磷酸核糖醇;FMN—黄素单核苷酸。

2. 作用机理 图 2 是根据现代概念给出的由 P-450 催化的羟基化反应的机理: 反应从底

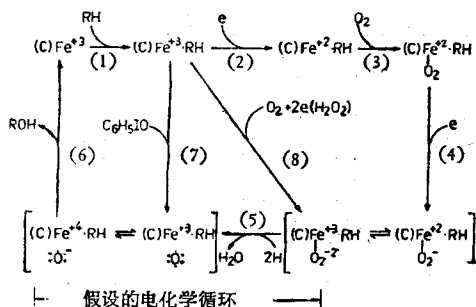


图 2 由细胞色素 P-450 催化的羟基化机理

物 RH 和末端氧化酶结合开始[图 2(1)],尽管铁卟啉没有直接参与血红素蛋白—底物之间的反应,但是已引起低自旋向高自旋方向的自旋

位移,自旋平衡的位移程度取决于结合底物的结构^[3],充分说明卟啉铁的电子构型受蛋白质微小变化,它们之间相互作用的影响十分敏感。下一步是通过还原酶蛋白从 NADH 或 NADPH 向铁转移一个电子,使 Fe³⁺-原卟啉还原成 Fe²⁺-原卟啉[图 2(2)]。实验说明,这次还原是由和蛋白质结合的底物控制的^[4]。这时,通过吸收分子氧,形成由亚铁-P-450-底物-O₂ 组成的三元络合物[图 2(3)],然后再插入第二个电子并形成超氧络合物或过氧络合物[图 2(4)]。此后,即发生结合底物 RH 的羟基化作用,最后这一步很可能分成几步进行:首先生成活性的氧原子络合物 (Fe-O)³⁺ [图 2(5)],然后再把氧原子转移至底物[图 2(6)]。

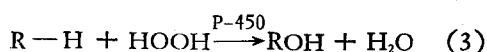
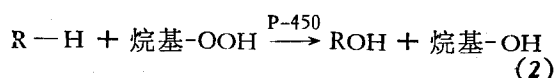
近几年来,在底物羟基化过程中,把 P-450-原子氧络合物当作真正活性中间体的假定,通过在 P-450 存在下,由 NaClO₂、NaIO₄^[5]以及亚碘酰苯^[6]生成和生理 P-450 体系相同的产物虽已得到了进一步的证实[图 2(7)](表 2),但羟基化机理还不十分清楚,真正起羟基化作用的活性氧的形式仍是一个尚待探索的问题^[7]。

表 2 黄体酮在细胞色素 P-450 催化下为 NADPH/O₂、NaIO₄ 以及 NaClO₂ 的羟基化

产 物	反应速度 (n · mol/mg-蛋白质 · 分)		
	NADPH/O ₂	NaIO ₄	NaClO ₂
6β-OH	0.05	1.76	0.20
7β-OH	0.06	0.26	0.06
21α-OH	0.70	4.90	0.53

总反应 (1) 在无酶情况下需要的活化能约为 100—110 千卡/克分子,但是,为 P-450 催化的反应,活化能只需 9—17 千卡/克分子。这可能是由于 O₂ 或底物的离解热在酶的诱发下明显降低了的关系。以往得到的实验数据支持了图 2 所示的反应循环,该图说明,被酶活化的是和铁结合的氧,而不是底物。

3. 与过氧化物有关的催化作用^[8] P-450 不仅能作为单加氧酶使分子氧活化,而且还能催化以有机物作为底物的各种过氧化氢和 H₂O₂ 羟基化的反应(2)、(3):



把和 NADPH 有关的反应(1)和与过氧化物有关的反应(2)、(3)相比较,可以看出,它们之间有许多共同的特点,其中活性氧相同的形式为:

(1) 生成相同的反应产物(苯胺转化成对胺酚、甾族化合物在相同的位置上羟基化)(表3);

(2) 同一底物的转换数类似;

(3) 用 EPR 研究未检测出自由基。

表 3 在鼠肝微粒体存在下,睾酮和黄体酮为 NADPH/O₂ 和异丙苯过氧化氢的羟基化^[9]

甾类化合物	产 物	反应速度 ($n \cdot \text{mol} / \text{mg} \cdot \text{蛋白质} \cdot \text{分}$)	
		NADPH/O ₂	过氧化氢 异丙苯
睾酮	6 β -OH	0.74	1.22
	7 β -OH	0.34	0.25
	16 α -OH	0.16	0.17
	总	1.24	1.64
黄体酮	2 α -OH	0.23	0.12
	6 β -OH	0.47	0.48
	7 α -OH	0	0
	15 α -OH	0	0
	15 β -OH	0	0.14
	16 α -OH	0.41	0.26
	总	1.11	1.00

所以,在借过氧化物支持的反应(2)、(3)中,就可以假定反应循环(图2)缩短了,这时,将直接生成“P-450-过氧化氢络合物”,不再需要外供电子[图2(8)]。

二、单加氧酶细胞色素 P-450 的模拟^[7,10]

单加氧酶细胞色素 P-450 专一的羟基化功能,在底物转化以及分析的实际应用中是很吸引人的。但是 P-450 很不稳定,制备困难,价格昂贵,所以目前尚难于广泛利用。为了解决

上述问题,正从以下三方面进行工作:

1. 把微粒体或由微粒体提取的组份固载化,使酶体系稳定 目前,主要是通过化学途径和高分子载体共价偶联,或者和多功能试剂共价交联;另外,也有用物理方法通过吸附在高分子载体上,或者,截留在胶体、空心纤维和胶囊中。P-450 固载化后的羟基化活性,在数小时或数天后即有所下降,为实用目的,还需要进一步改善固载化的方法,提高酶的稳定性。

2. 用简单方法取代电子授主和电子转移组份。 当底物在 P-450 催化下连续转化时,需要通过化学、电化学或酶的途径提供电子。目前以电化学方法最引人注意,途径有三: a) 使 NADPH 连续再生, b) 在电极上使还原酶或 P-450 的辅基分别直接或间接还原, c) 将共底物氧直接还原成 O₂⁻ 或 H₂O₂, 从实用观点看,方法 c) 和生理体系相比无疑是前进了一步。这是因为此法既不需要供电子的辅因子,因而没有使辅因子连续还原的问题,同时,又不需要转移电子的蛋白质,而且,氧又比别的有机过氧化物价格便宜。

3. 制备和 P-450 类似的化合物,包括铁卟啉的络合物,对 P-450 进行模拟。 这个工作几乎从细胞色素 P-450 一发现即已开始,至目前为止已提出不少体系(见表4)。这些体系都能催化芳烃、烷烃的羟基化和烯烃的环氧化反应,这是很吸引人的,因为由芳烃、烷烃、烯烃制取大宗石油化工产品,酚、醇以及环氧化物,都需在苛刻和复杂的工艺条件下才能实现。如果这种模拟体系研究成功,不仅可为这一酶促过程提供合成药物,而且还可为在温和条件下生产上述产品提供新的催化体系。由表4可见,模拟体系已由简单分子组成的多组份体系,逐渐转向单一的、结构上和 P-450 更加类似的体系。一种由咪唑的铁卟啉络合物和聚甲基丙烯酸共价结合的模拟体系,如下式所示:

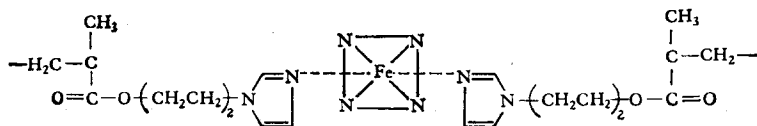
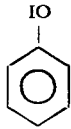


图 3

表 4 细胞色素 P-450 的各种模拟体系

体系名称	模拟体系组成				文献
	活性物质	电子授主	共底物	底物	
生物	小白兔肝微粒体 血红素+硫代水杨酸	NADPH —	O ₂ O ₂	正戊烷、苯胺等 环己烯	[11]
Udenfriend	Fe ⁺⁺ 或 Fe ⁺⁺⁺ 加 EDTA	抗坏血酸、嘧啶四氢嘧啶	O ₂	乙酰替苯胺氮(杂)萘、环己烷	[7]
Ulrich	Cu ⁺ 、Fe ⁺⁺ 、Ti ⁺⁺⁺ 、Sn ⁺⁺ 、V ⁺⁺ 加 EDTA 或巯基苯甲酸	—	O ₂	甲苯、苯甲醚、环己烷、氟化苯	[7]
Hamilton	Fe ⁺⁺ + 邻苯=酚	—	H ₂ O ₂	卤化苯	[7]
大环配位体	Co ⁺⁺ -Schiff-碱	—	O ₂	酚、烷基酚	[12]
	铁卟啉衍生物	—	O ₂ , 	—C—H $\text{C}=\text{C}$	[13]
	酞菁铁	抗坏血酸	O ₂	苯	[14]

在相同条件下,几乎具有同微粒体相同数量级的活性(表5)^[15]。说明通过模拟这条途径,解决细胞色素P-450的实际应用问题是最有希望的。尽管如此,由于各种模拟体系的组成不同,其作用机理既可能类似于P-450的羟基化机理,也可能和P-450与过氧化物有关的机理相同。下面分别对各种模拟体系的作用机理作一概要介绍,以便在此基础上进一步发展和完善P-450的模拟。

(1) Udenfriend 体系 这个体系的特点是: H₂O₂ 并非反应中间产物,所以羟化剂既非

表 5 细胞色素 P-450 和固载铁卟啉络合催化剂对和过氧化氢有关的底物的转化

底物	活性催化体系 ⁽¹⁾	转换数 ($n \text{ mol 产物} / n \text{ mol} \cdot \text{Fe} \cdot \text{分}$)	K_m $n \text{ mol}$	$V_{\text{最大}}$
苯胺	固载铁卟啉络合物	0.08	0.9	1.6
	兔肝微粒体	0.23	1.4	2.1
甲基苯异丙基苯胺	固载铁卟啉络合物	0.5	2.0	49
	兔肝微粒体	2.8	3.2	98
二甲基苯胺 ⁽²⁾	固载铁卟啉络合物	0.04	0.5	0.9
	兔肝微粒体	0.5	3.1	7.0

(1) 活性催化体系=1 μ M, H₂O₂ = 0.8mM, 底物=0.8 mM, pH7.4;

(2) 去甲基化反应的反应速度。

OH[·]、也非 HOO[·]。当在亲电子和自由基二种反应中只能生成邻、对位产物的取代芳烃(例如苯甲醚)羟基化时,常常能得到间位产物;卤代芳烃羟基化时,常常发生脱卤作用和生成小量的卤代酚,主要产物却是邻苯二酚和对苯二酚等等。这些结果不得不假设为芳烃开始反应时生成了某种中间体,而后再转化成产物的。

如果这个体系的反应机理和P-450羟基化机理一样(图2),那末,可信的中间体应是芳烃的氧化物。但是,在芳烃氧化物重排成酚时,应能观察到 NIH 位移,然而这在这个体系中只有很小一部分。另外,间位苯甲醚酚也不象从苯甲醚的任何氧化物转化而来。因为根据这一机理将发生如下的反应:

在中性和酸性条件下,从芳烃氧化物获得酚时,首先生成碳鎓离子,而其中(4c)和(4d)是最稳定的。所以,芳烃氧化物不象是这个体系羟基化时的中间体。

那么,这个体系中的氧化剂、羟基化时的中间体又是什么呢?有人把由铁(II)、抗坏血酸和氧组成的络合物(5a)当作氧化剂。羟基化时,由此络合物向底物转移一个三重态氧原子,先形成一种中间体——产物的三重态前身

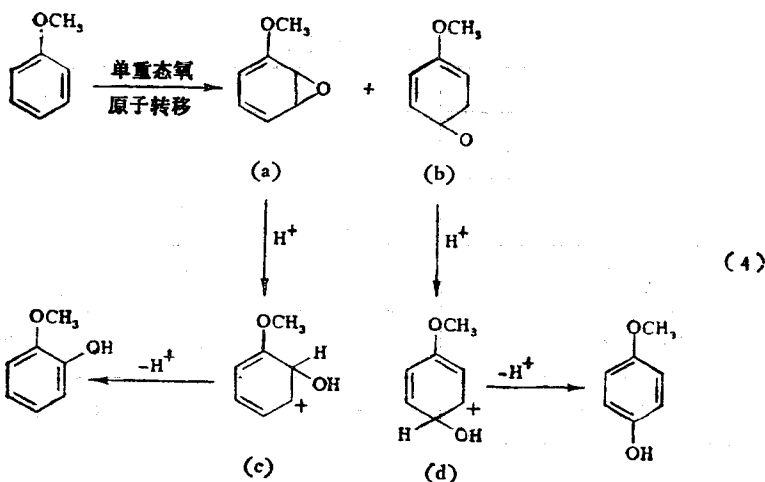


图 4

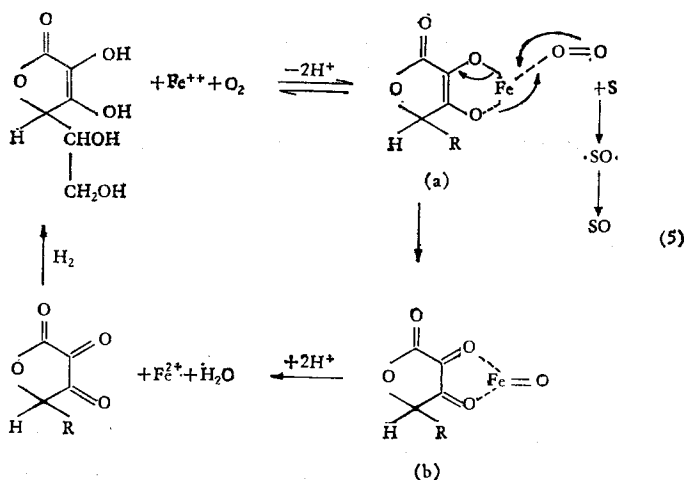


图 5

($\cdot\text{SO}\cdot$),而后再通过自旋倒转和相继的反应,最后转化成能检测到的单重态产物(SO):

在苯甲醚羟基化反应中,中间体(图 6)在间位上进攻,要比在邻、对位上有利得多。

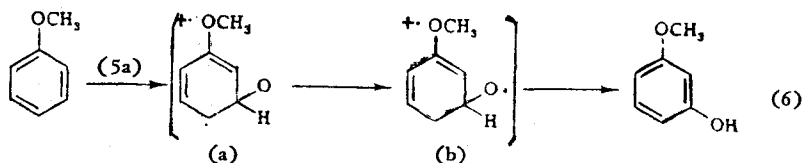


图 6

因为, (6a)、(6b) 是许多可能的共振结构中仅有的二种, 它们经过自旋倒转有希望生成间位苯甲醚酚(6c)。对这个机理, 自然会问为什么由 (5a) 转移的是一个三重态氧而不是一个单重态氧呢? 这是根据自旋守恒原理, (5a) 和

底物(S——单重态)的不成对电子总数, 应和产物 (5b) 及 ($\cdot\text{SO}\cdot$) 上的总数相等, 而最稳定的 (5b) 要比络合物 (5a) 少二个不成对电子提出的。根据这一原理, 如果生成的 O_2 -络合物和产物, 稍不同于 (5a) 和 (5b), 例如在细胞色素

P-450 的情况下,当然也可能直接转移一个单重态氧原子,形成如图 2 所示的反应循环。所以, Udenfriend 体系的总反应和 P-450 的稍有不同,这可能和形成的中间络合物不同,因此,自旋状态的相对稳定性不同有关。

(2) Ulrich 体系 上述机理的基本特点是氧和过渡金属离子络合,而后再从还原剂取得二个电子。Ulrich 等人根据这点,探讨了由低价过渡金属同时担负起还原剂的可能性。他们发现,许多低价过渡金属离子,诸如, Fe(II)、

Cu(I)、Ti(III)、V(II) 以及 Sn(II) 等,确实能使芳族化合物直接为氧羟基化。在深入研究 Sn(II)-HPO₄²⁻-O₂ 和 Fe(II)-2-巯基苯甲酸-O₂ 等二个体系对芳族化合物和烷烃的羟基化后指出,这个体系和 Udenfriend 的有类似的特点:在芳族化合物羟基化时,产物中含有相对高的间位产物;反应证明是通过三重态氧原子的转移进行的等等。认为由氧和双核(或多核)金属离子化合物组成的络合物可能是反应的羟化剂。以 Cu(I) 为例,可用下式加以说明:

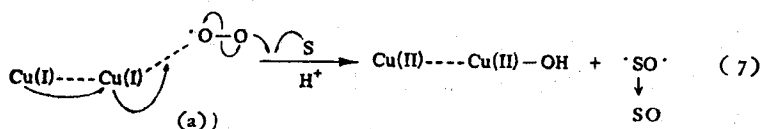


图 7

从 (7a) 向底物 S 转移一个氧原子是可能的,只要这二个金属离子为某种桥联基团相结合,而后的一个分子轨道又同时和二金属离子的相重叠,这样,每个金属离子就能够同步地各为一个电子所氧化。

(3) Hamilton 体系 上面介绍的二种化学模拟体系,均具有和生物氧化相似的优点,即氧化剂均为氧。然而,氧本身并不直接和底物反应,反应物往往是氧的某种还原形式。从机理研究看,有意义的应是那些和不活性底物直接

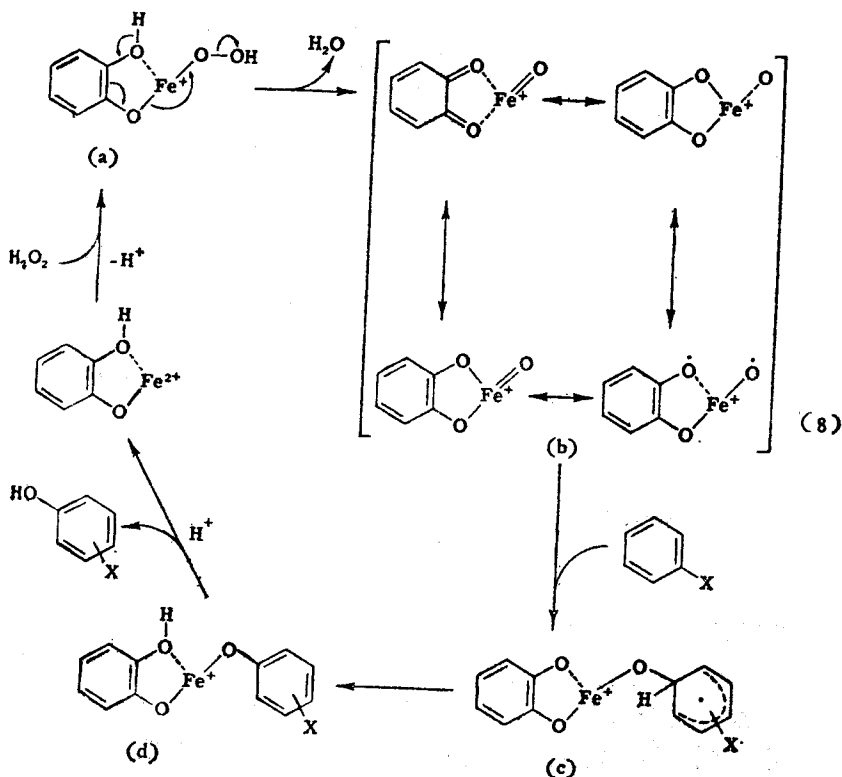


图 8

作用的氧种。根据这一想法, Hamilton 提出了由 Fe^{3+} 、苯二酚和 H_2O_2 组成的模拟体系(图 8), 通过对芳烃羟基化的详细动力学和产物分布的研究, 认为羟基化试剂可能是一种共振稳定的中间体 (8b)。这个机理使人相信, 水分子是从邻苯二酚、 Fe^{3+} 和氧组成的络合物(8a)中失去的。这一结论的另一些证明是: 这一体系的氧化剂的性质不同于任何已知的 ($\text{HO}^\bullet$ 或 $\text{HOO}^\bullet$ 自由基); 形成氧化剂是本反应的速度控制步骤; 同时, 只有具有氧化一还原性能的二酚类才能作为催化剂, 如果用非氧化一还原配位体取代, 反应就不进行。在和芳族化合物反应时, (8b) 起着自由基的作用, 首先生成 (8c), 而后通过转移一个电子和质子形成产物酚和催化剂邻苯二酚的 Fe^{3+} 络合物 (8d)。当然, 根据这个机理, 不会发生 NIH 位移。同时, 中间体 (8b) 可能就是过氧化氢酶化合物 I 的模型物, 所以, 这一体系实际上就是对 P-450 与过氧化物有关的酶催化体系的模拟。

(4) 大环配位体体系 近几年来, 由于大环配位体(卟啉、酞菁、Schiff-碱)金属络合物的合成取得了重大进展, 对 P-450 的模拟, 也逐渐由简单分子组成的体系, 转移到以大环配位体金属络合物为主的体系。加上研究方法上的改进, 工作取得了相当进展。不仅使模拟体系接近于生理的 P-450, 而且, 对 P-450 的作用机理, 还提供了不少新的信息。

首先这个体系可大大提高羟基化的活性^[1]。根据作者的实验结果, 认为这是由于大环配位体无论在电子因素方面, 还是在几何因素方面, 都优于其他体系中所用小分子配位体。同时, 实验数据还证明, 在反应中, 由金属卟啉或金属酞菁及第五配位体形成中间络合物, 是羟基化十分重要的步骤。

近来, 在一些实验室中, 在这类体系上研究了简单含氧化合物(例如, 亚碘酞苯)对有机化合物的羟基化反应, 认定最可能的羟基化机理, 是通过形成大环化合物的氧化物进行的(图9), 即:

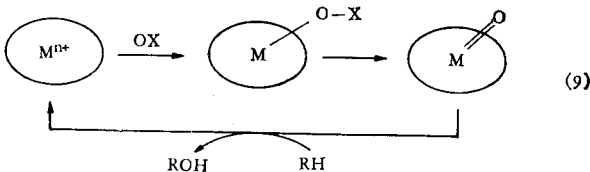


图 9

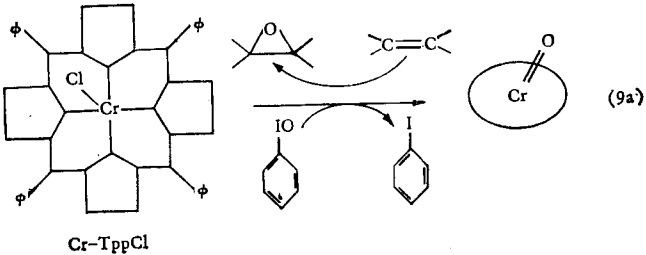


图 9a

例如, 烯烃在四苯基 (ϕ) 氯化卟啉铬(III) (Cr-Tpp-Cl) 上用亚碘酞苯环氧化时, 证明中间化合物是铬的氧化物(图 9a)。

这一结果表明, 这个催化体系对烃类氧化的机理, 与细胞色素 P-450 的完全一样。

参 考 文 献

[1] B. W. Griffin, et al.: *The porphyrins*, D. Dolphin (ed.) Vol. 7. Acad. Press, New York. San Francisco, London. 1979.
[2] M. J. Coon, et al.: *Metal Ion Activation of*

- Dioxygen*, T. G. Spiro (ed.) John Wiley & Sons. New York, 1980.
- [3] H. Rein, et al.: *Acta Biol. Med., German*, **38**, 187, 1979.
- [4] T. Matsubara, et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 463, 1976.
- [5] E. G. Hrycay, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 209, 1975.
- [6] F. Lichtenberger, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 939, 1976.
- [7] G. A. Hamilton *Molecular Mechanisms of oxygen Activation*, O. Hayaishi (ed.) Acad. Press. New York, London, 1974.
- [8] P. Mohr, et al.: *Pharmazie*, **33**, 415, 1978.
- [9] E. G. Hrycay, et al.: *Eur. J. Biochem.*, **61**, 43, 1976.
- [10] 吴越,《化学通报》**8**,486,1981.
- [11] A. A. Akhrem, et al.: *React. Kinet. Catal. Lett.*, **8**(3), 339, 1978.
- [12] A. Nishinaga et al.: *J. Mol. Catal.*, **179**, 1980.
- [13] J. T. Groves, et al.: *J. Mol. Catal.*, **7**, 169, 1980.
- [14] 张岱山, 硕士论文, 中国科学院长春应用化学研究所, 1980.
- [15] P. Mohr, et al.: *Acta Biol. Med., German*, **38**, 495, 1979.

[本文于1982年6月1日收到]

人的变异胰岛素分子

——糖尿病 的 分子病

王 志 珍

(中国科学院生物物理研究所)

一、糖尿病 的 分子病

谈到生物大分子结构与功能关系时,人们往往会提及很经典的一个例子,就是50年代初发现的镰刀状红血球贫血——异常血红蛋白造成的分子病,由146个氨基酸组成的血红蛋白分子的 β 亚基中,仅仅一个氨基酸的变化(谷氨酸被缬氨酸取代)就造成了致命的恶性贫血症。人类在长期的自然进化中所选择的蛋白质分子的结构是多么严格精确!在糖尿病中也发现了分子病,其中最典型的、研究得最深入的是1975年美国科罗拉多大学医学系J. Olefsky医生领导的小组发现的一例异常糖尿病^[1]。他们从病人体内取出的仅仅3.1克胰脏组织中分离到的胰岛素完成了它的氨基酸组成分析,受体结合能力和生物活力测定以及正常胰岛素和变异胰岛素的分离等一系列研究,最后确定其病因是由于体内60%的胰岛素发生了变异,即在胰岛素分子B链C端第24位或第25位的Phe被Leu取代。这是第一次从人体中分离到的变异胰岛素, Olefsky 因此获得1980年美国糖

尿病协会一年一度颁发给在胰岛素和糖尿病研究中最出色的四十岁以下的青年科学家的Lilly奖。

在临床上表现为对内源的或注入体内的外源胰岛素失去正常反应的症状称为胰岛素抵抗症(Insulin resistance),它会引起严重的糖尿病,此时血液中的胰岛素浓度可能达到很高。引起这种抗性的原因有二种:一种是胰岛素靶细胞异常,包括靶细胞上受体数目降低,或者胰岛素和受体结合后的一系列反应中某些步骤的损伤而致细胞效应降低;另一种是体内循环系统中存在胰岛素的拮抗物,如胰岛素抗体,胰岛素受体的抗体^[2]以及与胰岛素有相反调节功能的激素(如可的松、生长激素、胰高血糖素)的浓度升高。Olefsky发现的这例异常糖尿病表现有严重的血液胰岛素升高,饥饿时血液胰岛素高达70—120 μ U/ml(正常5—24 μ U/ml)。血糖>200mg/100ml(正常80—120mg/100ml),但其他症状则与任何典型的胰岛素抵抗症不符。患者血液中胰岛素原/胰岛素的比例正常,说明体内生物合成胰岛素的过程正常。血液不含上