

King-Altman 作图法对酶可逆抑制反应动力学的应用

杨明莉 任建敏[#]

(重庆大学化学化工学院应用化学系 重庆 400044 [#]中国人民解放军第三军医大学检验系 重庆 300038)

摘 要 本文用 King-Altman 作图法推导了可逆抑制酶促单底物反应动力学方程,并借助于部分可逆抑制单底物酶促反应动力学方程对完全与部分的竞争性抑制作用(PC 与 FC)、完全与部分非竞争性抑制作用(FNC 与 PNC)、完全与部分反竞争性抑制作用(FUC 与 PUC)及完全与部分混合抑制作用(FM 与 PM)的动力学机理与特点进行了讨论。

关键词 化学动力学 催化 酶 抑制

Application of King-Altman Plot in the Kinetics for the Reversibly Inhibited Enzyme-catalyzed Reaction

YANG MingLi, REN Jianmin[#]

(Department of Applied Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044

[#]Department of Clinical Experiment, The Third Military Medical College, Chongqing 400038)

Abstract With the King-Altman plot, the kinetics equation of a single substrate enzyme-catalyzed reaction inhibited by a reversible inhibitor was attained. With the help of the general kinetics equation from enzyme-catalyzed reaction obeying partially reversible inhibiting mechanism, the reaction mechanisms and the characteristics for partially and fully competitive inhibition, partially and fully noncompetitive inhibition, partially and fully uncompetitive inhibition were discussed.

Key words Chemical kinetics, Catalysis, Enzyme, Inhibition

抑制剂通过影响酶-底物络合物的形成或酶-产物络合物的分解来降低酶的催化活性。生物按反馈调节机制以维持细胞内环境的相对稳定性和对环境的适应性,是生物利用抑制作用实现代谢调节的一种精巧的平衡控制手段。通过药物方式人为增减生物固有的抑制剂的水平可在一定程度上控制代谢进行的程度,达到药物治疗、研究代谢机制、阐明毒理、药理和病理的目的。对抑制作用的研究还可为酶活力与酶活性位点化学结构之间的定量关系提供线索,从而为抑制作用机理的研究提供证据。所以,抑制剂及其抑制作用的研究在生物化学、医学、药物研究、临床检测、环境监测等方面均具有十分重要的意义。抑制作用动力学特别是可逆抑制动力学的研究一直是化学动力学领域的一个热点。可逆抑制作用分为完全可逆抑制作用(fully reversible inhibition)和不完全(部分)可逆抑制作用(partially reversible inhibition)。在生物化学教材中,对可逆抑制动力学的介绍很不全面,使得这方面的教学几乎为空白,成为生物化学教学中的一种缺憾。

若某一酶促反应的机理中涉及 n 个含酶的组元,当反应达到稳态的条件下,可由稳态条件写出 n 个稳态线性方程;在反应体系酶总浓度一定的情况下,各含酶组元浓度受质量平衡方程

杨明莉 女, 38 岁, 博士生、讲师, 从事物理化学、生物化学教学与科研。

2001-01-15 收稿, 2001-06-27 修回。

的限制,最后得到 $n-1$ 个线性无关的线性方程组。解此方程组即可得到反应的动力学方程。1956 年 King 和 Altman 在矩阵理论的基础上提出的一种非常直观的图解方法即 King-Altman 作图法^[1],后又经过 Wong 和 Hanes 的改进而成为处理复杂的稳态动力学的一种简便而又可靠的工具。原则上在稳态假设的前提下,无论涉及的含酶组元有多少,均能用该法得出反应的速率方程。本文利用 King-Altman 作图法为工具,对单底物酶促反应的部分可逆抑制机理进行处理,得到单底物酶促反应部分可逆抑制反应动力学方程。在此方程基础上得到各种可逆抑制机理下酶促反应表观动力学常数的变化规律。在教学中使用不但可使学生熟悉 King-Altman 作图法处理复杂的稳态动力学的方法和步骤,而且可以更系统地研究和掌握各种可逆抑制机理下酶促反应的特征,达到对酶促反应中可逆抑制作用有较为深入了解的目的。

1 部分可逆抑制机理

当酶-底物与抑制剂生成的络合物以不高于酶-底物络合物分解的速率分解为产物的抑制作用称为部分可逆抑制作用。抑制剂影响酶促反应的部分可逆抑制机理如图 1 所示:

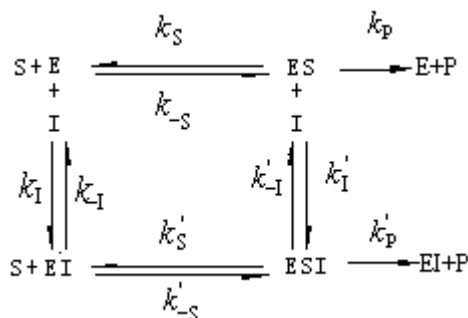


图 1 抑制剂影响酶促反应的机理

图中 E、S、I 和 P 分别代表酶、底物、可逆抑制剂和产物; ES 和 EI 分别表示酶-底物络合物和酶-抑制剂络合物; ESI 为酶、底物和抑制剂形成的三元络合物。在上述机理中,当 k'_P 为零时,即可逆抑制剂与一种形式的酶反应生成的络合物不能进一步反应分解为产物,即为完全可逆抑制作用,反之称为部分可逆抑制作用。

2 King-Altman 作图法的步骤

2.1 按已知反应机理,以各含酶组元为顶点、各反应步骤为边写出封闭的几何图形

对图 1 所示的部分可逆抑制机理,其图形如图 2 所示。

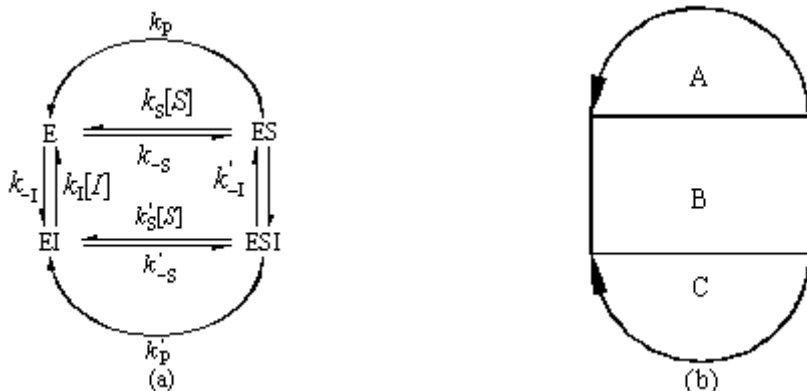


图 2 部分可逆抑制机理的几何图形

图 2 (a) 中的可逆途径与 (b) 中的线条对应; (b) 中带箭头线条代表 (a) 中的单向途径。每一个含酶组元各占据几何图形的一个角。这里含酶组元的个数 n 为 4, 几何图形的总边数 m 为 6。

2.2 写出所有不含封闭环的 $n-1=3$ 线 King-Altman 图形

$n-1$ 线图形总数为 $m! / [(n-1)! (m-n+1)!] = 20$ 。对于单环几何图形, 上述 $n-1$ 线图形总数即为有效 King-Altman 图形总数。但对于含两个或两个以上封闭环的几何图形, 则必需从上述 $n-1$ 线图形总数中除去含封闭环的 $n-1$ 线图形数。当某一封闭环所含的线条数 $r \leq n-1$ 时, 包含该封闭环的图形数的计算公式为 $(m-r)! / [(n-1-r)! (m-n+1)!]$ 。图 2 (b) 由三个封闭环 A、B 和 C 组成, 其中封闭环 B 的线条数为 $4 > n-1$, 故产生的含 3 线封闭环数为零; 而包含 A 或 C 封闭环的 3 线图形数均为 4。所以除去封闭环的 $n-1$ 线有效 King-Altman 图形数 $\pi = 20 - 2 \times 4 = 12$ 。 $n-1$ 线有效 King-Altman 图形数也可直接按下列公式算出: $\pi = abc - (l_{AB}^2 c + l_{BC}^2 a)$ 。其中, a 、 b 、 c 分别为封闭环 A、B、C 的线条数; l_{AB} 、 l_{BC} 分别为相邻封闭环 A、B 及 B、C 的共用边数。对题述反应机理, $\pi = 2 \times 4 \times 2 - (1 \times 2 + 1 \times 2) = 12$ 。即三线有效 King-Altman 图形有 12 种如表 1 所示, 表示对每一含酶组元, 其生成的可能途径有 12 条。

2.3 按各有效 King-Altman 图形写出各含酶组元的 κ 积

如 2.2 所述, 对每个含酶组元, 每个有效 King-Altman 图形都代表它的一种生成途径, 每条途径有 $n-1$ 步。 κ 积就是每种生成途径具有的 $n-1$ 个步骤的速率常数的乘积 (若某步骤涉及游离的底物产物或抑制剂, 则用该步骤反应的速率常数与游离的底物浓度 $[S]$ 、产物浓度 $[P]$ 或抑制剂浓度 $[I]$ 的乘积代替该步骤的速率常数)。各含酶组元的 κ 积如表 1 所示。

2.4 写出速率方程

按表 1 写出各含酶组元 X 的所有 κ 积之和 D_X , 从而可得到由 κ 积所表示的各含酶组元浓度 $[X]$ 之间的比例关系。X 可代表任何含酶组元 E、ES、EI 或 ESI。由此获得速率方程。

$$D_E = k_{-1}(k_{-S} + k_P)(k'_P + k'_{-S} + k'_{-1}) + k_S k'_{-1}(k_{-S} + k_P)[S] + k'_1 k'_{-1}(k'_{-S} + k'_P)[I] \quad (1)$$

$$D_{ES} = k_S k_{-1}(k'_P + k'_{-S} + k'_{-1})[S] + k'_1 k'_S k'_{-1}[S] \cdot [I] + k'_S k'_S k'_{-1}[S]^2 \quad (2)$$

$$D_{EI} = k_I(k_{-S} + k_P)(k'_P + k'_{-S} + k'_{-1})[I] + k'_1 k'_S(k'_{-S} + k'_P)[I][S] + k'_1 k'_1(k'_{-S} + k'_P)[I]^2 \quad (3)$$

$$D_{ESI} = [k'_1 k'_S(k_{-S} + k_P) + k'_1 k'_S k'_{-1}][I][S] + k'_S k'_S k'_1[I][S]^2 + k'_1 k'_S k'_1[I]^2[S] \quad (4)$$

$$D = \sum D_X = D_E + D_{ES} + D_{EI} + D_{ESI} \quad (5)$$

各含酶组元浓度与酶总浓度 $[E]_0$ 之比 $[X]/[E]_0$ 及不同含酶组元 X、Y 浓度之比 $[X]/[Y]$ 可分别用 (6) 和 (7) 式表示:

$$[X]/[E]_0 = D_X/D \quad (6)$$

$$[X]/[Y] = D_X/D_Y \quad (7)$$

可逆抑制剂作用下酶促反应速率为:

$$v_1 = k_P[ES] + k'_P[ESI] = k_P[E]_0 \left(\frac{[ES]}{[E]_0} + b \frac{[ESI]}{[E]_0} \right) = V_m \frac{[ES] + b[ESI]}{[E]_0} \quad (8)$$

其中, $V_m = k_P[E]_0$, $\beta = k'_P/k_P$ 。 $[E]_0$ 为各酶组元的总浓度, $[ES]$ 、 $[ESI]$ 分别代表含酶组元 ES

和 ESI 的浓度。将式 (6) 代入式 (8), 可得:

$$v_1 = V_m \frac{D_{ES} + bD_{ESI}}{D} \quad (9)$$

将式 (1) ~ (5) 代入式 (9), 即可得部分抑制剂作用下的酶促反应动力学一般方程。从式 (1) ~ (5) 可以看出: 动力学方程含有关于抑制剂和底物浓度平方项的项: $[I]^2$ 、 $[S]^2$ 、 $[I]^2[S]$ 、 $[S]^2[I]$, 所以, 得到的双倒数曲线应为非线性。但由于实验发现^[2]双倒数曲线几乎均为近似直线。也就是说: 稳态处理得到的动力学方程作出的双倒数曲线, 其非线性通常可忽略不计。可在一定条件下使含平方项的项小到可忽略不计的程度。这样式 (9) 可简化为按拟平衡假设处理得到的动力学方程:

$$v_1 = \frac{V_m (1 + b [I]/K'_I)}{K_m (1 + [I]/K'_I) + [S]} [S] \quad (10)$$

只是式中 $K_m = (k_{-S} + k_P) / k_S$, 而不是 $K_m = k_{-S} / k_S = K_S$ 。 $K_I = k_{-I} / k_1$, $K'_I = k_{-I} / k'_1$ 。将式(10)与无抑制剂时的单底物酶促反应的动力学方程——Michealis-Menten 方程相比较, 可得:

$$V_{m,1} = V_m \frac{1 + b [I]/K'_I}{1 + [I]/K'_I}, \quad K_{m,1} = K_m \frac{1 + [I]/K'_I}{1 + [I]/K'_I} \quad (11)$$

表 1 各酶组元的 K 积

编号	King-Altman 图形	K 积			
		E	ES	EI	ESI
1		0	0	0	0
2		$k'_S k_{-I} k_P [S]$	0	0	0
3		0	0	$k'_P k'_1 k_S [S][I]$	0
4		$k'_I k'_P k_{-I} [I]$	0	$k_1 k'_I k'_P [I]^2$	0
5		$k_{-I} k_{-I} k_P$	0	$k_1 k_{-I} k_P [I]$	0
6		$k_{-I} k'_P k_P$	0	$k_1 k'_P k_P [I]$	0
7		$k'_P k_{-S} k_{-I}$	$k'_P k_{-I} k_S [S]$	$k'_P k_{-S} k_1 [I]$	0
8		$k'_{-S} k_{-I} k_P$	0	$k'_{-S} k_1 k_P [I]$	$k'_S k_1 k_P [S][I]$
9		$k'_S k_{-I} k_{-S} [S]$	$k'_S k_{-I} k_S [S]^2$	$k'_{-S} k'_1 k_S [S][I]$	$k'_S k'_1 k_S [I][S]^2$
10		$k'_{-S} k'_1 k_{-I} [I]$	$k'_S k_{-I} k_S [I][S]$	$k_{-S} k'_1 k_1 [I]^2$	$k'_S k'_1 k_1 [I]^2 [S]$
11		$k_{-S} k_{-I} k_{-I}$	$k_{-I} k_{-I} k_S [S]$	$k_{-S} k_{-I} k_1 [I]$	$k_S k'_1 k_{-I} [I][S]$
12		$k'_{-S} k_{-S} k_{-I}$	$k'_{-S} k_{-I} k_S [S]$	$k'_{-S} k_1 k_{-S} [I]$	$k'_S k'_1 k_{-S} [I][S]$

3 讨论

3.1 部分可逆抑制动力学方程

当 $\beta \neq 0$, 即 $k'_p \neq 0$ 时, $V_{m,I}$ 、 $K_{m,I}$ 的表达式如式 (11) 所示。按照抑制作用的含义, 显然 $k'_p \leq k_p$, 或者 $\beta \leq 1$ 。按 β 的取值的不同及 K'_I 和 K_I 的相对大小, 部分可逆抑制作用可分为部分竞争性抑制作用 (PC)、部分非竞争性抑制作用 (PNC)、部分反竞争性抑制作用 (PUC) 和部分混合抑制作用 (PM)。

当 $\beta=1$ 时, 为部分竞争性抑制作用 (PC)。此时 $V_{m,I}=V_m$, $K_{m,I}=K_m(1+[I]/K_I)/(1+[I]/K'_I)$ 。即部分竞争性抑制作用的特点是 $V_{m,I}$ 不变, $K_{m,I}$ 发生变化。进一步当 K'_I 和 K_I 相等时 $K_{m,I}$ 也不发生变化。

当 $\beta \neq 1$ 时, $V_{m,I}$ 、 $K_{m,I}$ 的表达式如式 (11) 所示。可分为下面几种情况讨论:

(1) $K'_I=K_I$ 时, $V_{m,I}=V_m(1+\beta[I]/K'_I)/(1+[I]/K'_I)$, $K_{m,I}=K_m$ 。此为部分非竞争性抑制作用 (PNC) 的情况。其特点为 $V_{m,I}$ 发生变化, $K_{m,I}$ 不变。

(2) $K'_I \neq K_I$ 时, 为部分混合抑制作用 (PM) 的情况。此时, $V_{m,I}$ 、 $K_{m,I}$ 的表达式如式 (11) 所示。进一步, 当 $K_I \rightarrow \infty$ 时, $V_{m,I}=V_m(1+\beta[I]/K'_I)/(1+[I]/K'_I)$, $K_{m,I}=K_m(1+[I]/K'_I)$ 。

(3) $K'_I < K_I$ 的程度与 $k'_p < k_p$ 的程度相当, 即 $\beta=k'_p/k_p=K'_I/K_I < 1$ 时, 为部分反竞争性抑制作用 (PUC), 有 $V_{m,I}=V_m(1+[I]/K_I)/(1+[I]/K'_I)$, $K_{m,I}=K_m(1+[I]/K_I)/(1+[I]/K'_I)$ 。即 $V_{m,I}$ 和 $K_{m,I}$ 均要发生变化, 只是变化的程度相同。

由此可见, 部分可逆抑制作用的共同特征是当 $[I] \rightarrow \infty$ 时, $V_{m,I} \neq 0$ 。

3.2 完全可逆抑制动力学

在完全抑制作用的情况下, $\beta=0$, $k'_p=0$ 。按 K'_I 和 K_I 的相对大小, 完全抑制作用可分为完全竞争性抑制作用 (FC)、完全非竞争性抑制作用 (FNC)、完全反竞争性抑制作用 (FUC) 和完全混合抑制作用 (FM)。

$K'_I \neq K_I$ 时, 为完全混合抑制作用 (FM)。 $V_{m,I}=V_m/(1+[I]/K'_I)$, $K_{m,I}=K_m(1+[I]/K_I)/(1+[I]/K'_I)$, $V_{m,I}$ 减少, $K_{m,I}$ 也发生变化。

(1) $K'_I \rightarrow \infty$ 时, 即 $k'_p/k_p \rightarrow \infty$, ESI 不能生成, 相应 $K'_S \rightarrow \infty$ 。这时为完全竞争性抑制作用 (FC), 其特点为: $V_{m,I}=V_m$, $K_{m,I}=K_m(1+[I]/K_I)$, 即 $V_{m,I}$ 不变, $K_{m,I}$ 增大。

(2) $K_I \rightarrow \infty$ 时, 即 $k_p/k'_p \rightarrow \infty$, EI 不能生成, 相应 $K_S \rightarrow \infty$ 。这时为完全反竞争性抑制作用 (FUC), 其特点为: $V_{m,I}=V_m/(1+[I]/K'_I)$, $K_{m,I}=K_m/(1+[I]/K'_I)$ 。即 $V_{m,I}$ 、 $K_{m,I}$ 均减小。

$K'_I=K_I$ 时, 为完全非竞争性抑制作用 (FNC): $V_{m,I}=V_m/(1+[I]/K_I)$, $K_{m,I}=K_m$, $V_{m,I}$ 减少, $K_{m,I}$ 不变。

可见对完全抑制作用, 除完全竞争性抑制作用 (FC) 之外, 对完全非竞争性抑制作用 (FNC)、完全反竞争性抑制作用 (FUC) 和完全混合抑制作用 (FM), 当 $[I] \rightarrow \infty$ 时, 均有 $V_{m,I} \rightarrow 0$ 。

3.3 无抑制剂时的动力学方程

当 $[I]=0$ 时, 为无抑制剂的情形。此时, 式 (10) 还原为 Michealis-Menten 方程:

$$v_i = v = V_m [S] / (K_m + [S])$$

参考文献

- [1] King E L, Altman C. J Phys Chem, 1956, 60: 1375~1378.
- [2] Gelpi J L, Aviles J J, Busquets M et al. J Chem Edu, 1993, 70(10): 805~816.