

生物化学中酶促“不可逆”反应及其相关问题辨析

马新雨^{1,§}, 王志鹏^{1,4,§,*}, 田杰³, 蒋振雄³, 姜汉杰⁴, 孙鹤⁵, 周青璇⁶, 王鑫^{2,*}

¹ Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station, TX 77840, USA

² Department of Microbiology, Miami University, Oxford, OH 45056, USA

³ Department of Biology, Texas A&M University, College Station, TX 77840, USA

⁴ Division of Genetics, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital; Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

⁵ 南方科技大学化学系, 广东 深圳 518055

⁶ Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge; Department of Medicine, Harvard Medical School; Renal Division, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA 02142, USA

摘要: 在生物化学教学和研究中, 一些酶促反应被归类为不可逆反应。然而, 此处的“不可逆”与物理化学中的“不可逆”有所不同, 这一表述本身常导致学生的困惑。不仅如此, “不可逆”的实际含义及其衍生的观念可能进一步使学生产生很多对基本生化反应过程的严重误解。本文以物理化学所定义的“不可逆”为准, 重新讨论生物化学中所指“不可逆”的准确含义, 并举例讨论了包括“速控步”“限速酶”“高能磷酸键”在内的若干因生物化学中“不可逆”的不准确定义造成的认知误区。

关键词: 酶促反应; 可逆反应; 化学平衡

中图分类号: G64; O6

Discussion on the Definition of “Irreversible” Reactions and Its Related Concepts in Biochemistry

MA Xinyu^{1,§}, WANG Zhipeng A.^{1,4,§,*}, TIAN Jie³, JIANG Zhenxiong³, JIANG Hanjie⁴, SUN He⁵, ZHOU Qingxuan⁶, WANG Xin^{2,*}

¹ Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station, TX 77840, USA.

² Department of Microbiology, Miami University, Oxford, OH 45056, USA.

³ Department of Biology, Texas A&M University, College Station, TX 77840, USA.

⁴ Division of Genetics, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital; Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA.

⁵ Department of Chemistry, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, Guangdong Province, P. R. China.

⁶ Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge; Department of Medicine, Harvard Medical School; Renal Division, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA 02142, USA.

Abstract: Some of the enzyme catalysis reactions were classified as irreversible in the biochemistry education and research. However, it is worth noting that the “irreversibility” defined in biochemistry is different from what is referred in physical chemistry, which often confuses students. Consequently, the essence of irreversibility and its derivative

收稿: 2018-06-15; 录用: 2018-07-17; 网络发表: 2018-09-05

*通讯作者, Email: wzpchem1991@gmail.com; xwang@tamu.edu

§同等贡献

may mislead students to a fallacious understanding towards the reaction process of biochemical reactions. This manuscript anew discusses the precise definition of “irreversible” reactions in biochemistry based on the standard definition of “irreversibility” given in physical chemistry, and we further use several terms and examples including rate limiting step, rate limiting enzyme, and high-energy phosphate bond to identify and correct misunderstandings caused by inaccurate definition of irreversibility.

Key Words: Enzyme catalysis; Reversible reaction; Chemical equilibrium

化学反应的可逆性是一个热力学和动力学非常基本的概念,指一个反应既可以向正向进行也可以向逆向进行。若一个可逆反应发生在一个封闭体系中,那么最终这个体系会达到一个平衡状态。在这个状态下,可逆反应的正反应与逆反应速率相等,因而宏观上体系中的各组分浓度保持一致^[1]。在继续深入讨论之前,一个很重要的问题就是判断哪些反应是可逆的。在物理化学中,反应的微观本质被通常认为是体系中分子相互接触与碰撞。当相互碰撞的两个或多个分子能量足够大,且碰撞方向适当,足以引发化学键的断裂,那么化学反应就会发生^[2]。“碰撞理论”对化学反应的微观解释并没有强调反应物或产物分子的绝对概念。即对于一个反应而言,反应物分子之间相互碰撞可以产生产物分子;同样地,产物分子之间碰撞,只要满足能量条件,也可以产生反应物分子。由此可得,只要体系处于均相,体系中各种不同分子均匀混合且有机会相互碰撞,则反应都应该是可逆的,只是对于不同的反应而言其可逆程度有着巨大的区别。总而言之,除了极少数的一些特例外^[3],化学反应在一定条件下一般都存在相应的反应平衡。

在生物化学中,绝大多数酶促反应都是发生在溶液相中的均相反应。因此,这些反应从物理化学本质上看都理应是可逆反应。然而,在生物化学家和生物化学教材对很多生化反应进行描述的时候,“不可逆反应”却十分频繁地出现^[4],尤其是大多数的国内生物化学专业教材。典型者如糖酵解的第一步葡萄糖磷酸化^[5],脂肪酸活化的第一步^[6],尿素循环中形成氨甲酰磷酸^[7]等等。很明显,此处的“不可逆反应”一词与物理化学中所定义的“不可逆”是有不同的。而这种教科书中描述的区别可能直接导致学生在生化反应学习过程中产生一些对“不可逆”这一概念的理解误区,并影响一些相关概念如“速控步”“限速酶”“高能磷酸键”等的认知^[8]。这种误解不仅仅对基础教学不利,还会直接危害到学生今后的深入研究与应用过程^[9]。

本文正是针对生物化学教学和相关教材中广泛使用的“不可逆”一词入手,分析其表达的核心实质,比较其与物理化学的区别,并讨论其衍生的一些相关内容和概念^[10]。本文从物理有机化学的角度出发,重新梳理一遍生物化学中的“不可逆”反应的概念。作为一种生物化学教学的探索,希望为生命科学相关专业基础课程教学提供有益的参考^[11]。

1 生物化学中“不可逆”反应的来源

生物体与物理化学中理想的孤立反应体系的区别在于其是一个复杂、多元、开放的系统,每时每刻都在进行着种类繁多的新陈代谢过程,并与环境进行物质与能量交换^[12]。在生物体中,每种物质都是庞大而复杂的代谢网络中的一部分,没有哪种物质能孤立地存在于这个网络之外。故而,对于特定的反应,我们不必去思考是否存在平衡,更需要考虑的是实际上能否达到平衡^[13]。

设想一个简单的可逆反应 A 在酶的催化下转化为 B,其反应的吉布斯自由能变并不太大,因而其反应的平衡常数的数量级总体而言不会与 1 相差太远。在某一条件下,正反应方向上的反应商(Q)如果远低于反应平衡常数,则正反应速率高于逆反应,净反应向正反应方向进行。但生物体内各物质的浓度并不是一定的,而是通常在一定的范围内不断波动。假定生物体内某种调节作用发生时,A 的浓度受到影响而急剧下降,或者伴随反应的进行大部分 A 都转化为 B,正反应的反应商 Q 可能因此而高于反应平衡常数,从而使正反应速率低于逆反应速率,净反应向逆反应方向进行,从而实现了净反应物质流向上的“可逆”。

仍然以此简单模型反应为例,物质 B 作为此反应的生成物的同时,也可能正在作为其他反应的反应物快速消耗,或者被某种转运系统快速地从反应发生的区域转运出去。这样便使得物质 B 的浓度总是被维持在一个较低的水平,使得正反应的反应商几乎总是低于反应的平衡常数(图 1a)。即便 B 的浓度仍然可能会受到其他调节作用的影响而波动,但其波动范围不足以达到逆转反应商的水平。B 在这种情况下就像一种瞬时存在的不稳定中间体,如同物理化学动力学中对中间产物采取的“稳态假设”。在这种条件下,净反应总是朝正反应方向进行。于是这样的宏观状态看起来就是反应总在消耗 A 而制造 B,也就成了生物化学上的“不可逆”。显而易见,这里的“不可逆”仅仅是因为在具体条件下反应物和生成物的浓度范围无法使反应达到平衡状态,跟反应本身的物理化学属性并没有关系。

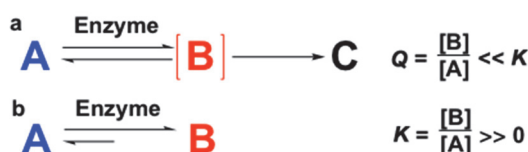


图 1 使得反应从宏观上看似“不可逆”的两种可能情况

(a) 第一类基于产物不断被移走的“不可逆”反应; (b) 第二类基于反应本身趋势很大的“不可逆”反应

还有另外一种使得反应看似“不可逆”的情况。如果某平衡反应的吉布斯自由能变远小于零,则其平衡常数也会很大,反应朝正向进行的趋势很大,宏观上也是 A 不断转化为 B(图 1b)。但也不是说反应就是绝对“不可逆”的,因为一直都有 B 分子在转化为 A,只是宏观上观察不到罢了。对于这种反应,如果要使得净反应向逆向进行,即反应商要超过平衡常数,则意味着需要生成物的浓度远高于反应物的浓度,这样的高浓度在生物体稳态的内环境中难以达到,所以净反应的逆向进行几乎不会发生。

综上所述,生物化学领域在描述一个生化反应时所使用的“不可逆”是指,在一定条件下(生理条件下),某一个反应的正反应速率总是大于逆反应速率,因此表现上的净反应只朝反应的正方向发生,而不会朝逆方向发生。这样的“不可逆”反应实际上指的是一个发生在特定生物体系下的可逆反应由于反应环境的限制使得其正反应的反应商总是高于反应平衡常数的一种情形^[14]。其着眼于宏观上整个体系中净反应进行的方向,或者说是物质流动的方向,而不像物理化学上那样着眼于微观层面的某一些分子的反应方向^[15]。生物体中的这些“不可逆”反应通常都是生物体对其内部各种物质浓度的调节所维持的,一旦这种调节失控,原来的“不可逆”反应也一样可能达到平衡,甚至逆向进行。这同样也是由于生物体系中客观条件的限制使得平衡状态无法达到所导致的,用反应的“不可逆性”这样一种属性上的描述来解释这些现象也是欠妥的^[16]。

2 典型“不可逆”反应的案例分析

生物化学中一个“不可逆”反应大量集中出现的代谢过程便是糖酵解和三羧酸循环^[17]。这两个代谢过程均为生物体用于进行氧化供能的过程,需要将反应物中储存的化学能释放出来,因而不可避免地会涉及到吉布斯自由能变较大的反应步骤,自然便容易产生在生物化学角度上的“不可逆”反应。这与前文对生物化学中“不可逆”反应的物理化学本质的分析也是吻合的。下面我们将以糖酵解中的 6-磷酸果糖的磷酸化为例,通过计算重新看待这个反应的“不可逆”性并简要讨论其他相关问题。

2.1 6-磷酸果糖的磷酸化——“不可逆”反应

6-磷酸果糖(1, 图 2)的磷酸化生成 1,6-二磷酸果糖(2, 图 2)是糖酵解的第三步反应,也是糖酵解中的关键调控的步骤之一。该反应的 $\Delta_r G'^0 = -14.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。其平衡常数为 $K' = 3 \times 10^2$ 。上述数值

是在生理标准条件下(25 °C 或 298 K, pH 为 7, 各反应物浓度均为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)计算而得^[18]。显然, 这些物质在真实细胞内的浓度是远远不可能有这么高的。根据骨骼肌细胞中糖酵解的各种代谢产物的浓度计算^[19], 该反应的反应商仅为 10^{-3} 数量级, 比反应的平衡常数低了 5 个数量级。在这样的条件下, 该反应一定总是朝向生成 1,6-二磷酸果糖的方向进行, 从宏观上看来, 便就是“不可逆”反应了(图 2)。

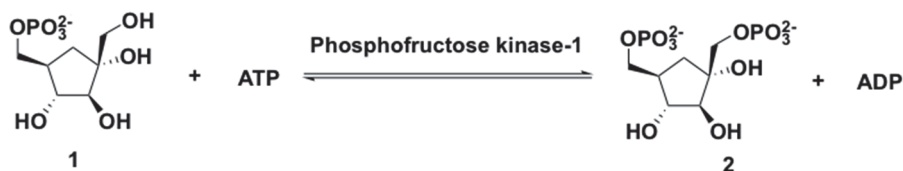


图 2 6-磷酸果糖在磷酸果糖激酶 1 的催化下被 ATP 磷酸化生成 1,6-二磷酸果糖

从另一个方面思考, 假如此反应真的趋于平衡, 对于细胞而言是十分荒谬的。如果 6-磷酸果糖、ATP 和 ADP 的浓度都保持在细胞内的正常水平内, 那么为了使该反应达到接近平衡的状态, 也即要使反应商接近平衡常数, 则需要使 1,6-二磷酸果糖的浓度达到约 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水平, 这么高的浓度会产生巨大的渗透压而使细胞破裂。故而这种情况在正常细胞中不会发生。这有力说明了维持该反应在细胞的“不可逆”性的重要因素就在于对反应物和产物浓度的控制与调节, 使之总是远离化学平衡。

2.2 1,6-二磷酸果糖水解——“不可逆”反应的逆转

上文提到的“不可逆”反应属于第二类, 即本身具有极高的正向反应倾向, 宏观上反应只能正向进行。那么这样的反应是否真的只能正向进行呢? 考虑到糖异生是糖酵解逆向代谢的路径。因此, 糖异生中大多数步骤就是糖酵解中相应步骤的逆反应。我们就还是以第三步反应为例来探讨。由前文分析, 由于细胞内相关物质浓度的原因, 糖酵解中的第三个反应显而易见远远偏离平衡, 因而在宏观的净反应方向上几乎不能被逆转。如果仍然还是采用相同的反应, 期待通过其他酶的帮助来使得反应能够在宏观上逆向进行是不可能的。唯一的方法便是采用不同的反应机理利用化学平衡移动的原理来绕过这一问题。

以 1,6-二磷酸果糖的水解为例, 与 6-磷酸果糖在 ATP 帮助下磷酸化不同, 1,6-二磷酸果糖(2, 图 3)只是用水作为反应物将磷酸基团水解即可生成 6-磷酸果糖(1, 图 3)。该反应的吉布斯自由能变 $\Delta_r G'^0 = -16.3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 平衡常数为 $K' = 7 \times 10^2$ 。同样以骨骼肌细胞中的代谢产物浓度计算得到此反应的反应商为 1.5×10^2 左右^[20], 低于反应平衡常数, 但也并没有相差太多, 因而此反应在细胞中是以一种比较接近平衡的状态进行(图 3)^[21]。

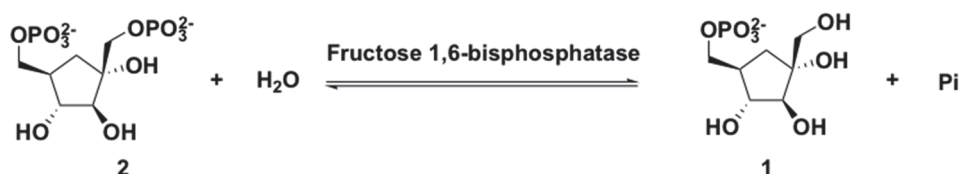


图 3 1,6-二磷酸果糖的水解

由此反应可以看出, 其核心问题是 ATP 的参与辅助了正向过程, 利用“高能磷酸键”断裂形成磷酸糖酯键的巨大放能来推动反应进行。其直接的逆反应需要磷酸化 ADP 产生 ATP, 显然是无法实现的。但是利用这磷酸糖酯键的水解形成无机磷酸却再一次形成放能过程。

2.3 “可逆”反应的表示

由于糖酵解中 1,6-二磷酸果糖的形成与糖异生中 1,6-二磷酸果糖的水解实际上是采用了两种不

同的反应路径,因而这两者已不是一个互为“正逆反应”的关系了,只是宏观上我们所关心的两个分子看似分别出现在反应的两侧。然而一些教材在其示意图中仍然使用“双向箭头”的形式表示这些反应,且在箭头上下分别标注不同的酶(图 4a)。这种表示方式是很不恰当的,其最核心的问题便是这种表示方式仍然在暗示这两个反应其实是一个可逆反应的两个方向。这导致学生产生“正逆反应由两种完全不同的酶催化”的误解,与事实完全矛盾。这样的例子还有很多,糖酵解中葡萄糖的磷酸化与糖异生中 6-磷酸葡萄糖的水解也是如此。

本文认为更好的表示方法是分别使用两组可逆箭头分别表示两条反应路径,两种不同的可逆酶促反应,包含各自不同的过渡态,及不同的酶结合的中间体(图 4b)。虽然从主要产物的角度考虑的确实现了互相转化,但是在加入对于辅因子的考虑后则是完全不同的酶促反应过程。这样一来明晰了这两者的关系,二来也明确指出这些反应的本质仍然是可逆的,只是在生理条件下被限制了其宏观的可逆性。进一步说,正是由于正逆反应中的某个方向从化学平衡上不利,所以该偶联酶促反应才更加重要,也就成为生物学家所谓某代谢路径上的“速控步”;对应的酶直接决定反应的走向,也就成为了“限速酶”。

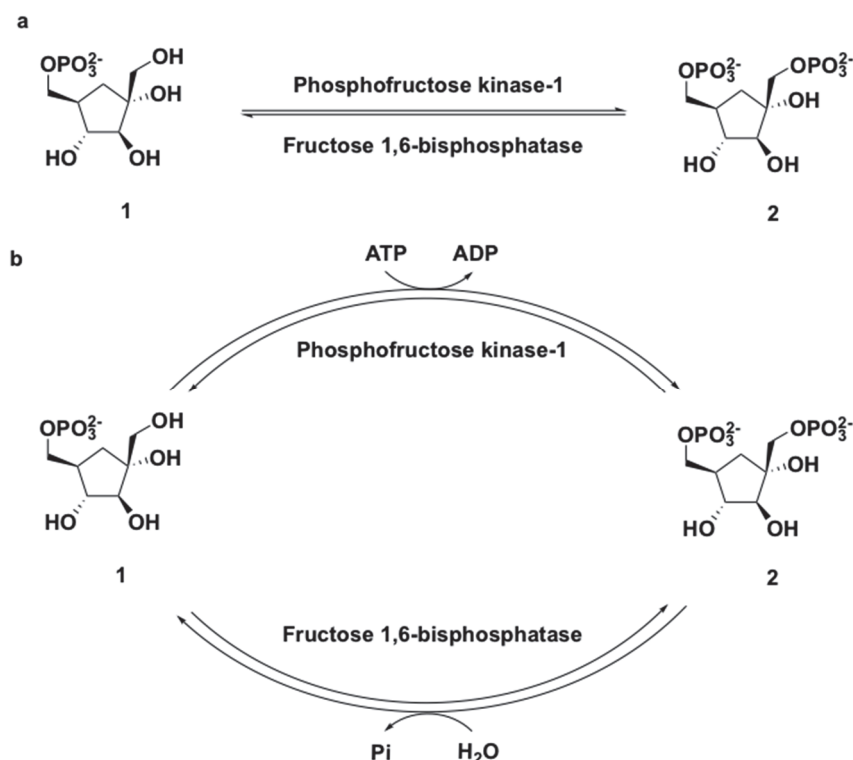


图 4 对 1,6-二磷酸果糖的形成与水解“可逆”反应的两种表示方式

(a) 不恰当的单路径方式; (b) 更严谨的两条路径表达方式

3 意义与启示

在举例分析后,本文希望对两个方面问题进行总结,探讨其对相关专业生物化学教学的启示与反思。

3.1 重识“不可逆”与“可逆”反应

同样都被称为“不可逆”反应,这一概念在物理化学和生物化学这两大学科中所表达意思的巨大差别会经常给学生很大的困惑与误解。尤其是在教学中,很多对物理化学基本原理理解不够透彻的学生很容易会对生物化学中的“不可逆”反应产生认识上的错误。此外,在一些跨领域的研究中,

研究者由于对两种“不可逆”反应的概念理解的不明晰,也会导致错误。

类似地,同样被称为“可逆”反应的反应在生物化学中可以说具有双重含义。一方面,其可以指代物理化学中反应的可逆,及反应物和产物完全逆转;另一方面,其也可以指代人们所关心的主要的反应物与产物的逆转。重新辨析生物化学中的“不可逆”与“可逆”的概念对于深入理解很多生物体内的化学反应的本质有着重要的意义^[22]。

3.2 “高能磷酸键”的推波助澜

生化反应发生的环境不是封闭体系,能量和物质都在频繁地与外界环境发生交换,很多反应虽然会达到稳态,即各物质浓度保持基本恒定,但这并非反应的平衡态,反应仍然在一直进行着。这种非平衡态的维持对细胞十分重要。正因为这些反应处于非平衡态,所以它们才有继续进行的动力。很多辅因子正是起到这个“推波助澜”的作用。例如最为常见的 ATP 水解,正因为其吉布斯自由能变很大,正常条件下该反应总是极大地偏离平衡,该反应才能为其他与之偶联的反应提供能量^[23,24]。

值得一提的是,关于所谓“高能磷酸键”也是一个常给人误导的称呼,似乎意味着这 β - γ 磷酸基团间的共价键包含巨大的能量。实际上化学键的断裂一定是一个吸热的过程,在封闭体系中并不能自发进行。而脱去的 γ 磷酸基团可以进一步与水分子或者底物氧原子形成强烈的 P—O 共价键放出更多的能量,不仅抵消了 β - γ 磷酸基团间 P—O 共价键断裂所吸收的能量,还能变相将底物转化为高能化合物,进而推动底物的进一步代谢过程,这在糖酵解的前两步葡萄糖“动员”过程中均有体现^[25]。另一方面,在糖酵解中磷酸烯醇式丙酮酸就是一种具有比 ATP 更加高能 P—O 共价键的化合物,可以将 ADP 磷酸化形成 ATP。这种不稳定的 P—O 共价键转换为较为稳定的 P—O 共价键就是底物水平磷酸化的本质^[26]。这对于深入挖掘教学内容并加深学生融会贯通的能力极为有帮助。

4 结论与展望

生物化学中的“不可逆”反应,其“不可逆”性体现在宏观上净反应方向不改变,物质流向不改变,而并不是指反应本质上的不可逆。因而,对这种反应的更为确切的描述应该是远离化学平衡状态的可逆反应。由此可见,生物化学上的“不可逆”是一个在很强限制条件(例如生理条件)下的概念。并且其探讨的可逆性也仅仅是反应在表观上的物质流向,而并不涉及反应实质,因此与物理化学中的“不可逆”实际上是完全不同的概念。这两种不同的概念由于使用相同的术语进行描述,很容易发生理解上的错误^[27]。

本文从分析生物化学中“不可逆”反应一词表达的实质出发,介绍了生物化学教材中广泛使用的“不可逆”一词的来源,并讨论了一些衍生内容和概念。除了对“速控步”“限速酶”“高能磷酸键”等词语进行解读,对于一些反应正逆过程上下分别标注两种截然不同的酶的书写方式,本文也提出了一种新的表述建议。期望对生命科学教学与科研有所帮助^[28]。

致谢:感谢 Texas A&M University 博士生 Erol Can Vatansever 参与讨论,以及博士生许兵、缙允梓、杨慧娟等对写作的建议。

参 考 文 献

- [1] 武汉大学,吉林大学,等校编. 无机化学. 曹锡章,宋天佑,王杏乔,修订. 第3版. 北京:高等教育出版社,1994.
- [2] 傅献彩. 物理化学. 第5版. 北京:高等教育出版社,2005.
- [3] 高盘良. 大学化学, 2012, 27 (2), 69.
- [4] 姚文兵. 生物化学. 第8版. 北京:人民卫生出版社,2016: 181.
- [5] 修志龙,李晓辉,李春. 生物化学. 第2版. 北京:化学工业出版社,2017: 184.
- [6] 王镜岩,朱胜庚,徐长法. 生物化学教程. 第4版. 北京:高等教育出版社,2008: 402.

- [7] 姚文兵, 杨红. 生物化学. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 296.
- [8] 张楚富, 程汉华, 刘德立. 生物化学原理. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2011.
- [9] 王志鹏, 邓耿. 生命的化学, **2015**, 35 (5), 691.
- [10] 王志鹏. 化学教育, **2017**, 38 (16), 19.
- [11] 王志鹏. 大学化学, **2017**, 32 (6), 86.
- [12] 王志鹏, 邱天, 袁金颖. 化学教育, **2016**, 37 (6), 1.
- [13] 郑艺, 王志鹏, 王鑫, 黄炎和, 林金石. 中国科学C辑: 生命科学, **2017**, 47, 262.
- [14] Bergethon, P. R. *The Physical Basis of Biochemistry*; Springer Verlag: New York, 1998.
- [15] 周公度. 结构与物性: 化学原理的应用. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- [16] 王志鹏, 冯天师, 崔丽嘉, 石玉洁, 沙耀武. 中国科学C辑: 生命科学, **2013**, 43 (9), 778.
- [17] 贾弘禔, 冯作化. 生物化学与分子生物学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 165.
- [18] Nelson, D.; Cox, M. *Lehninger Principle of Biochemistry*, 4th ed.; W. H. Freeman and Company: New York, United States, 2005.
- [19] Srivastava, D. K.; Bernhard, S. A. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1987**, 16, 175.
- [20] Veech, R. L.; Lawson, J. W. R.; Cornell, N. W.; Krebs, H. A. *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 6538.
- [21] Frey, P. A.; Arabshahi, A. *Biochemistry* **1995**, 34, 11307.
- [22] 王志鹏, 邓耿. 大学化学, **2016**, 31 (4), 39.
- [23] 梁妍钰, 王志鹏. 大学化学, **2017**, 32 (2), 89.
- [24] Hanson, R. W. *Biochem. Educ.* **1989**, 17, 86.
- [25] Alberty, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1207, 1.
- [26] Westheimer, F. H. *Science* **1987**, 235, 1173.
- [27] 徐光宪. 大学化学, **2003**, 18 (1), 1.
- [28] 王志鹏, 程农壹, 梁妍钰, 马新雨. 大学化学, **2017**, 32 (12), 41.