

研究工作

S-甲基二硫代胍基甲酸的西夫碱合铜所修饰的 双层脂膜上的电子传递*

邵子厚

余宝元

朱德煦

(南京大学配位化学研究所)

(南京大学化学系)

(南京大学生物化学系)

提 要

用合成的 S-甲基二硫代胍基甲酸的西夫碱合铜来修饰双层脂膜, 研究了脂膜两侧界面上的氧化还原反应, 并对该配合物的抗菌作用作了一些解释。

近年来, 人们发现由一些含硫、氮作为给体原子的配体及其所形成的配合物具有不同程度的抗菌、抗病毒的能力^[1-3]。其中, 由二硫代胍基甲酸酯衍生而得的西夫碱, 它们的立体化学颇为有趣, 该分子中仅仅 β -氮原子可与金属配位, 而 α -氮原子则无此能力, 但分子中的硫原子则具有与金属离子形成共价键的倾向, 并在固态和溶液状态之间存在着硫酮和硫醇的互变异构平衡。由它们所形成的 Si, Sn, Cu 等配合物皆有抗革蓝氏阳性和革蓝氏阴性菌的活性^[4,5]。

一般认为这些配体及配合物所具有的抗菌、抗病毒的功能, 可能是由于分子中的 β -氮原子和硫酮的硫原子可以和细菌或病毒的细胞膜结合, 从而阻碍乃至丧失了细胞膜的正常功能。然而, 当这些配合物进入细胞膜以后, 究竟怎样改变了细胞膜的性质, 则缺少有力的佐证。

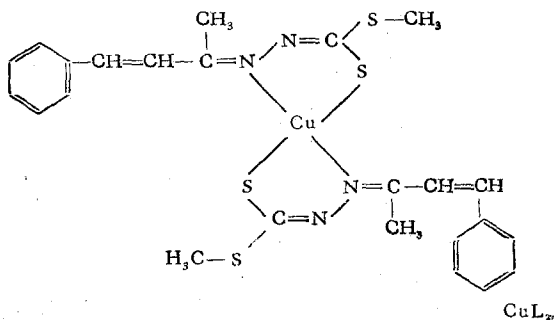
双层脂膜 (Bilayer Lipid Membrane, BLM) 作为研究生物膜的一种模型^[6,7], 为研究这个问题提供了一种途径。这是因为各种抗菌、抗病毒的化合物不仅对活细胞产生影响, 而且也会使人造的双层脂膜的结构与电性质发生改变, 其中包括在膜界面上发生的电子传递过程的变化。1984 年, H. Ti. Tien 首次将循环伏安法

用于双层脂膜体系中的电子过程的研究, 得到了不少有意义的结果^[8-11]。但迄今为止, 采用具有生物活性的金属配合物作为膜修饰物的研究尚不多见, 本文用合成的 S-甲基二硫代胍基甲酸的西夫碱合铜来修饰双层脂膜, 研究了脂膜两侧界面上的氧化还原反应, 并对该配合物的抗菌作用作了一些解释。

实 验 部 分

1. 配合物的制备和性质

S-甲基二硫代胍基甲酸酯和亚苄基丙酮所形成的西夫碱 (L) 及其铜的配合物 (CuL_2) 的制备是参照文献^[5,12]中所述方法进行的。并对铜配合物作了元素分析, 电导、磁化率、红外特征频率、可见最大吸收以及在室温下的顺磁共振谱的测定。



* 国家科学基金资助项目。

配合物 CuL_2 为深绿色晶体, 熔点 159°C , 在室温下的磁化率 $\mu_{\text{eff}} = 1.76 \text{ B. M.}$, 并在 620 nm 处有一较强的吸收峰。红外光谱的测定表明, 配体 L 在 $1057, 3140$ 和 1483 cm^{-1} 处呈现谱峰, 它们分别归属于 $\nu_{\text{C}=\text{S}}, \nu_{\text{N}-\text{H}}$ 和 $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ 振动, 而在 CuL_2 中, $\nu_{\text{C}=\text{S}}$ 和 $\nu_{\text{N}-\text{H}}$ 振动消失, 却在 1040 cm^{-1} 处出现了属于 $\nu_{\text{C}-\text{S}}$ 的新峰, 这是由于配体中的 $-\text{NH}-\text{C}=\text{S}$ 基团转为一 $\text{N}=\text{C}-\text{SH}$ 基团, 并与 $\text{Cu}(\text{II})$ 配位所造成的结果。另外, 由于 $\text{Cu}-\text{N}$ 的形成, 减弱了 $\text{C}=\text{N}$ 键强, 导致了 $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ 振动从 1483 cm^{-1} 移至 1457 cm^{-1} 。

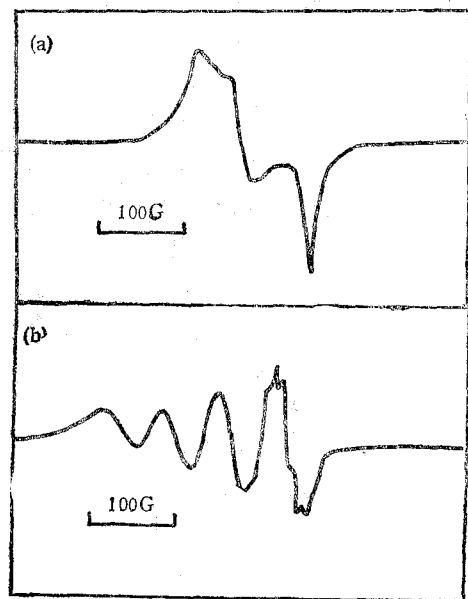


图1 配合物 CuL_2 的顺磁共振谱

图 1a, b 分别为室温时的顺磁共振粉末光谱和在 CH_2Cl_2 中的谱图。在图 1a 中, 因其 $g_x = 2.040, g_y = 2.020, g_z = 1.976$, 表明 $\text{Cu}(\text{II})$ 的配位环境为菱形平面结构; 而在图 1b 中, 因电子和核之间的偶极相互作用, 在 Cu 和 N 核之间发生超精细分裂, 图中出现的氮的五条超精细谱线, 进一步表明氮原子直接配位于 $\text{Cu}(\text{II})$ 上^[13]。

2. 双层脂膜体系

双层脂膜是在一个聚四氟乙烯杯上的小孔 (直径约 1.0 mm) 中, 按文献 [6, 7] 中所述的方

法制得, 膜的形成过程可用一架低倍显微镜来观察。成膜溶液是先用十二烷和丁醇 (3:1) 组成的混合溶剂制得含 2% 卵磷脂的溶液, 然后, 取出 10 毫升此溶液, 于其中滴加适量 CHCl_3 , 再以铜配合物 CuL_2 饱和后, 放置冰箱中备用。

由于膜电流甚小 (约 10^{-9} A), 无论采用双电极或三电极体系所得到的循环伏安图差异不大^[14], 故本实验中采用双电极, 即在膜两侧的溶液中分别插入一根 232 型饱和甘汞电极 (上海电光器件厂), 并使其与 XJP-82 (B) 型新极谱仪 (江苏电分析仪器厂) 和 LZ3-100 型函数记录仪 (上海大华仪表厂) 相连。实验中所用的化学试剂均为分析纯, 所有溶液均用石英亚沸蒸馏器 (上海玻璃仪器二厂) 中的二次蒸馏水配制。

结果与讨论

一个未经修饰的双层脂膜的物化性质十分类似于一个厚度约为 5 nm 的液态碳氢化物薄层。这种液晶结构的双层脂膜, 实质上是一种很好的绝缘体, 其电阻高达 $10^8-10^9 \Omega \text{ cm}^2$, 故不能作为工作电极使用。但若用碘、二茂铁、TCNQ (7, 7' 8, 8'-四氰基对醌二甲烷) 和 TTF (四硫杂富瓦烯) 等电子受体或电子给体来修饰它的话, 膜的电性质则会明显地改变^[5]。

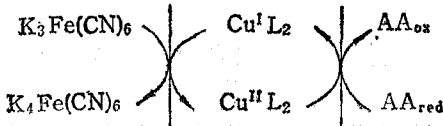
用具有抗革兰氏阴性菌能力的配合物 CuL_2 来修饰双层脂膜, 不仅可作为研究抗菌作用的一个模型, 而且从所得到的循环伏安图中获得有关脂膜界面上电子传递和氧化还原反应方面的信息。

为此, 我们先在 $0.1 \text{ mol/L KCl} \parallel \text{BLM} \parallel 0.1 \text{ mol/L KCl}$ 的体系中, 获得了未经修饰的双层脂膜的循环伏安图, 接着, 又在 $0.1 \text{ mol/L KCl} \parallel \text{CuL}_2\text{-BLM} \parallel 0.1 \text{ mol/L KCl}$ 的体系中, 在相同的扫描范围和速度下, 获得了修饰后的双层脂膜的循环伏安图, 除了膜电流值稍高以外, 图形仍然未变。有趣的是, 若仅在膜内侧溶液中加入 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 或仅在膜外侧溶液中加入抗坏血酸时, 所得到的循环伏安图依然没有明显改变, 只有当被 CuL_2 修饰的双

层脂膜的内侧与外侧分别存在 $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 和抗坏血酸时,膜电阻方会迅速下降, $I-V$ 曲线亦从线性转为非线性并在 $+150\text{ mV}$ 和 -100 mV 处呈现一对峰,对应的电流为 $I_a = 1.40 \times 10^{-3}\text{ A}$, 而 $I_c = 1.0 \times 10^{-3}\text{ A}$ 。

我们所观察到的这种现象与 H. Ti. Tien 在 TCNQ 修饰的双层脂膜中所发现的现象是完全一致的^[11]。这就是说,在 CuL_2 修饰的双层脂膜体系中,在与抗坏血酸溶液接触的界面上发生了氧化作用,而在膜的另一界面上则发生铁氰化钾还原为亚铁氰化钾的反应(图 2),电子可能是通过嵌在膜内的 CuL_2 来传递的^[12]。实验表明,若在 CuL_2 的 95% 乙醇溶液中加入适量的抗坏血酸时,溶液的颜色会迅速地从蓝绿色变为淡黄色,原在 620 nm 处的吸收峰也随之而消失,这表明 CuL_2 中的铜离子的价态发生了改变。

因此,我们认为在 $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ $\parallel$ CuL_2 -BLM $\parallel$ 抗坏血酸的体系中,在脂膜界面上可能发生了氧化还原的偶联反应:



其中, AA_{ox} 和 AA_{red} 分别为氧化型和还原型

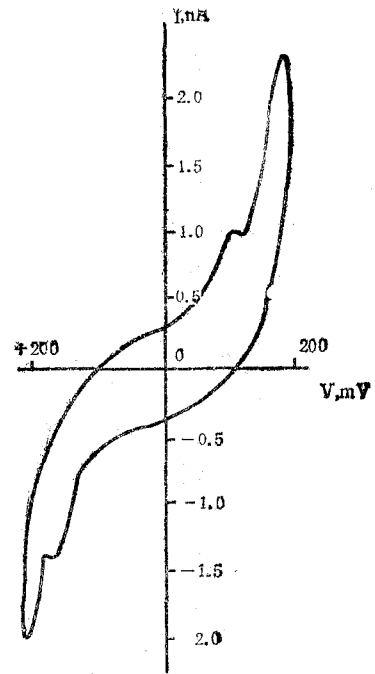


图 2 CuL_2 修饰的双层脂膜在 0.1 mol/L KCl 中的循环伏安图

内侧溶液中含有 $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$, 外侧溶液中含有抗坏血酸

的抗坏血酸。

在膜外侧界面上,由于抗坏血酸极易氧化,它作为一个还原剂可使 CuL_2 中的 $Cu(II)$ 还原为 $Cu(I)$: $\frac{1}{2} AA_{red} + Cu^{II}L_2 \rightleftharpoons \frac{1}{2} AA_{ox} +$

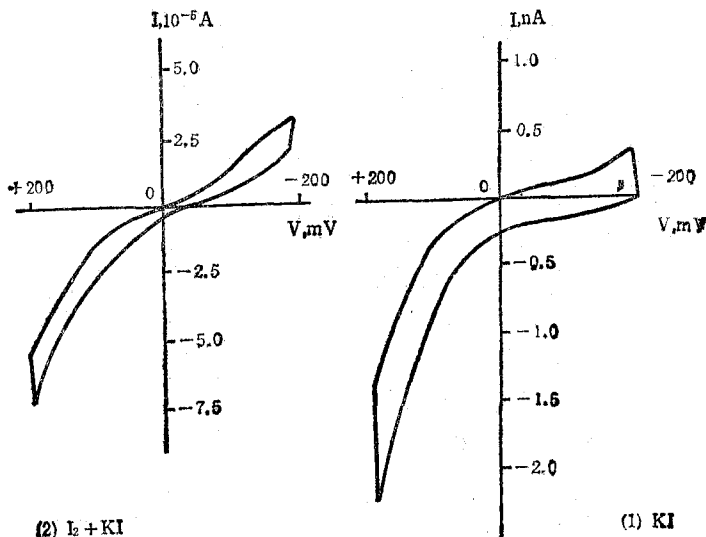


图 3 CuL_2 修饰的双层脂膜在 0.1 mol/L KCl 中的循环伏安图

内侧溶液中含有 $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$, 外侧溶液中含有 $KI(1)$ 和 $I_2 + KI(2)$

$\text{Cu}^{\text{I}}\text{L}_2 + \text{H}^+$,而在膜内侧界面上,由于铁氰化钾易还原为亚铁氰化钾,又使 CuL_2 中铜的价态从 I 价变为 II 价: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + \text{Cu}^{\text{I}}\text{L}_2 \rightleftharpoons [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} + \text{Cu}^{\text{II}}\text{L}_2$

为了进一步证实 CuL_2 -BLM 具有类似于金属电极的性质,又做了另外两个实验,即当膜内侧溶液中含有 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 时,分别将 KI 或 I_2 -KI 放入膜外侧溶液中,在相同的扫描条件下,亦能得到相应的循环伏安图。一般而言, I^- 和 I_3^- 的氧化还原电位是相同的,对这两个体系而言,理应获得大致相同的图谱,但因碘本身极易渗入脂膜中,它是一个典型的修饰物^[6],在膜外侧溶液中含有 I_2 -KI 的情况下,双层脂膜实际上受到 CuL_2 和 I_2 的修饰,导致所得到的循环伏安图有所不同(图 3)。

综上所述,双层脂膜经 CuL_2 修饰以后,当脂膜两侧溶液中存在着合适的氧化还原物质时,在膜的界面上会发生氧化还原的偶联反应,导致了膜电阻的降低,并产生跨膜的电子传递。故当这类对革蓝氏阴性菌有抗菌能力的配合物与细菌接触时,由于 CuL_2 的脂溶性,较易进入细胞膜,改变了它的电学性质,从而扰乱或阻碍了细菌细胞膜的正常功能,特别是那些与电子

传递密切相关的生化过程。

参 考 文 献

- [1] Bathistochi, C. et al.: *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1971, 33, 3815.
- [2] Ali, M. A. et al.: *Inorg. Chim. Acta*, 1971, 5, 493.
- [3] В. П. Лигвинов, др.: *Изв. А. Н. СССР. Сер. Хим.*, 1980, 8, 1774.
- [4] Saxena, A. K. et al.: *Synth. React. Inorg. Met-Org. Chem.*, 1980, 10, 117.
- [5] Dashora, R. et al.: *Synth. React. Inorg. Met-Org. Chem.*, 1983, 13, 209.
- [6] Tien, H. Ti.: *Bilayer Lipid Membranes (BLM): Theory and Practice*, Marcel Dekker, Inc, New York, 1974, 672.
- [7] Ivanov, I.: *Thin Liquid Films*, Marcel Dekker, Inc, New York, 1986, 285—287.
- [8] Kutnik, J. et al.: *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1985, 11, 317.
- [9] Tien, H. Ti.: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1985, 13, 299.
- [10] Tien, H. Ti.: *J. Phys. Chem.*, 1984, 88, 3172.
- [11] Tien, H. Ti. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 119, 372.
- [12] Sandstrom, J.: *Acta Chim. Scand.*, 1963, 17, 937.
- [13] Yokoi, H. et al.: *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1968, 41, 2835.
- [14] Tien, H. Ti. et al.: *Photobiophys. Photobiophys.*, 1986, 7, 319.

[本文于1988年7月26日收到]

(上接第 346 页)

化,第一种可以被螯合剂逆转,第二种不能。

Mn^{2+} 是和 Ni^{2+} 竞争地结合在钙调神经磷酸酶的相同位点上,一种金属离子结合上去后,另一种就不能再结合了。这可能是由于一种离子的结合使酶变成和那种离子具有高亲和的形式,也可能是因为每一种阳离子专一性地诱导了不同的构象状态。这种假说最令人信服的证据是运用了对 B 亚基专一性的单克隆抗体^[20]。这种单克隆抗体能抑制 Ni^{2+} 激活酶,但不能抑制 Mn^{2+} 激活酶,这也进一步说明了 B 亚基在酶的 Ni^{2+} 诱导活性表达中是起了关键作用的。

参 考 文 献

- [1] Wang, J. H. et al.: *J. B. C.*, 1977, 252, 4175.
- [2] Klee, C. B. et al.: *Biochemistry*, 1978, 17, 120.

- [3] Cheung, W. Y. et al.: *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 1978, 9, 233.
- [4] Klee, C. B. et al.: *PNAS*, 1979, 76, 6270.
- [5] Stewart, A. A. et al.: *FEBS Letters*, 1982, 137, 80.
- [6] Ingebritsen, T. S. et al.: *EJB*, 1983, 132, 263.
- [7] Wolf, J. H. et al.: *PNAS*, 1980, 77, 5852.
- [8] Tallant, E. A. et al.: *Biochemistry*, 1983, 22, 3630.
- [9] Matsui, H. et al.: *Brain Research*, 1987, 402, 193.
- [10] Pallen, C. J. et al.: *J. B. C.*, 1983, 258, 8550.
- [11] Aitken, A. et al.: *EJB*, 1984, 139, 663.
- [12] Gupta, R. C. et al.: *Can. J. Pharmacol.*, 1985, 6.
- [13] Manalan, A. S. et al.: *Biochemistry*, 1987, 26, 1382.
- [14] Winkler, M. A. et al.: *J. B. C.*, 1987, 262, 15466.
- [15] Wei, Q. et al.: *J. B. C.*, 1988, 263, 19541.
- [16] Jackson, A. E. et al.: *J. B. C.*, 1986, 261, 12232.
- [17] Blumenthal, D. K. et al.: *J. B. C.*, 1986, 261, 8140.
- [18] Aswad, D. W. et al.: *J. B. C.*, 1981, 256, 3487.
- [19] Walans, S. I. et al.: *J. Neurosci.*, 1984, 4, 84.
- [20] Pallen, C. J. et al.: *J. B. C.*, 1984, 259, 6134.
- [21] Wei, Q. et al.: in press.
- [22] Matsui, H. et al.: *J. B. C.*, 1985, 260, 4174.

[本文于1988年6月23日收到]