

超氧化物歧化酶在以促进剂修饰的金电极上的电化学行为

吴霞琴* 孟晓云 王浙苏 章宗壤

(上海师范大学化学系 上海 200234)

摘要 应用循环伏安法探索了超氧化物歧化酶在 L-半胱氨酸、组氨酸和精氨酸等氨基酸修饰的金丝电极上的电化学行为. 实验结果表明, L-半胱氨酸是超氧化物歧化酶的有效促进剂. 组氨酸和精氨酸则对超氧化物歧化酶氧化过程显示了不同程度的促进作用. 此外, 还讨论了 4,4-二巯基联吡啶对超氧化物歧化酶电子传递过程的促进作用.

关键词 超氧化物歧化酶, 促进剂, 氨基酸, 4,4-二巯基联吡啶, 循环伏安法

由于超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, 简称 SOD)能消除人体内的活性氧自由基, 具有抵御和治疗自身免疫性疾病、某些心血管疾病、预防衰老等方面的重要生理功能, 因而早已引起了国内外生物、医学工作者的极大兴趣. 我国学者也从临床医学和生物化学等方面开始了探索, 八十年代末起研究报导逐渐增多^[1~3], 但国内外学者关于 SOD 电化学行为方面的研究则报道较少. 这是因为 SOD 和其它生物活性大分子一样, 其在常规金属电极上的电化学活性较小, 电子传递速度极其缓慢, 因而采用常规的电化学方法难以进行其电子传递过程的研究.

本研究小组应用循环伏安法已分别探索了牛红细胞铜、锌-超氧化物歧化酶(Cu, Zn-SOD, 以下简称 SOD)在玻碳、铂、银和金电极上的电化学行为. 结果表明, 唯有在如金微盘电极和薄层电池金微网栅电极等特殊电极上, 方可测得准可逆的循环伏安曲线^[5~6].

本文探索了 L-半胱氨酸(Cysteine)、组氨酸(Histidine)、精氨酸(Arginine)等氨基酸和 4,4-二巯基联吡啶(4,4-Dithiodi pyridine, 以下简称 PySSPy)作 SOD 电子反应促进剂的可能性, 着重探讨了 SOD 在不同浓度的氨基酸、以及在不同的实验条件下修饰促进剂的金丝电极上的电化学反应过程. 同时讨论了 PySSPy 对不同生物活性分子的促进机制. 期望通过这方面的基础研究, 能为更深入的 SOD 应用性研究提供某些理论依据.

1 实验部分

1.1 试剂

牛红细胞铜-锌 SOD(比活力为 8 000 U/mg, 上海华东理工大学); L-半胱氨酸、组氨酸和

本文 1999-05-23 收到, 1999-07-13 收到修改稿; 上海市科委自然科学基金和上海市教委科学技术发展基金资助项目

* 通讯联系人

精氨酸(上海东风生化技术公司). PySSPy 购自日本 Nacalai Tesque 株式会社. 其它试剂均为分析纯. 研究溶液均用二次蒸馏水配制. 背景溶液是含 $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{NaClO}_4$ 的磷酸盐缓冲溶液 ($\text{pH} = 7$).

1.2 电化学测量

循环伏安测量在 M173 恒电位仪和 M175 信号发生器 (EG&G PARC) 上进行, 循环伏安曲线用 M RE0089 X-Y 记录仪 (EG&G PARC) 记录.

以金丝电极 ($\phi 1 \times 3 \text{ mm}$) 为工作电极. 电极表面先用金相砂纸抛光, 超声清洗 5 min 左右, 再于 $0.3 \text{ mol L}^{-1} \text{HNO}_3$ 溶液中进行电化学处理, 即在 $-0.2 \sim 1.3 \text{ V}$ (vs. SCE) 的电位范围内连续循环扫描, 直至记录的循环伏安扫描曲线重复. 铂片作对电极. 饱和甘汞电极用作参比电极. 实验在 20°C 左右的室温下进行.

1.3 电极的修饰

将已经预处理过的金电极置于一定浓度的氨基酸溶液中浸泡一段时间使其充分吸附; 或进一步在一定的电位范围内循环伏安扫描十圈后取出, 用二次蒸馏水冲洗、晾干备用.

2 结果与讨论

2.1 氨基酸对 SOD 电子迁移过程的促进作用

(1) 组氨酸和精氨酸作 SOD 促进剂的探索

在 1 mmol L^{-1} 的组氨酸溶液中, 采用了实验部分叙述的方法先对金丝电极进行修饰. 以组氨酸修饰的电极对 SOD 的电子传递过程有所促进, 其循环伏安曲线如图 1a 所示. 由于修饰于电极上的组氨酸与溶液中的 SOD 发生相互作用, 致使 SOD 在电极上的电子传递更加容易, 从而在循环伏安曲线上显示出相应的氧化峰与还原峰. 如图可见, 该氧化电流峰明显大于还原电流峰. 况且, 实验中还发现, 此氧化/还原峰电流均随着该电极在组氨酸溶液中浸渍时间的延长而增大, 但 E_p 却趋向于减小, 即显示出近乎可逆的电化学行为^[7], 同时浸渍时间的延长对组氨酸在金丝电极上的修饰也有影响, 即可改善对 SOD 电子传递过程的促进作用.

图 1b 为精氨酸修饰电极的循环伏安曲线, 相应的峰电流很微弱, 表明精氨酸对 SOD 的电子传递过程并无明显的促进作用.

已有文献报道, 在 SOD 溶液中加入适量组氨酸以后会形成 CuL_2 络合物, 从而改变酶的活性^[8]. 据此可以推测, 修饰于电极表面的组氨酸

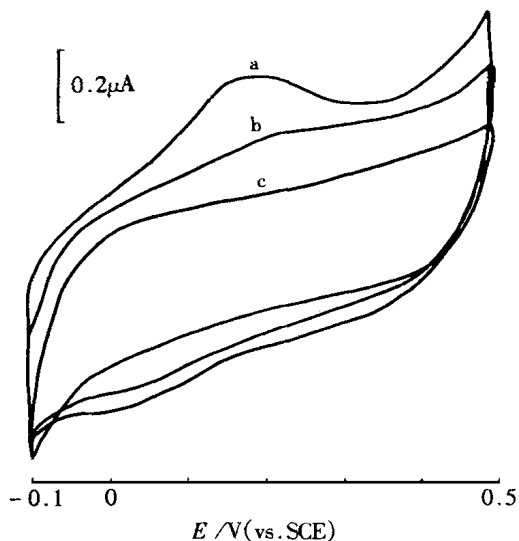


图 1 SOD 在组氨酸 (1 mmol L^{-1}) (a)、精氨酸 (1 mmol L^{-1}) (b) 修饰的和裸露 (c) 的金丝电极上的循环伏安曲线

Fig. 1 Cyclic voltammograms of SOD (0.26 mmol L^{-1}) at the histidine (1 mmol L^{-1}) (a) and the arginine (1 mmol L^{-1}) (b) modified gold wire electrode and at bare gold wire electrode (c). Scan rate: 10 mV s^{-1}

也可以与溶液中的 SOD 形成 CuL_2 络合物,使 SOD 的电子传递反应易于进行,从而可清楚观察到循环伏安图上的氧化还原峰。

(2) L-半胱氨酸作 SOD 促进剂的探索

作者注意到巯基与金电极表面具有强烈的键合作用,并考察了 L-半胱氨酸对 SOD 电化学反应的促进作用。

实验结果表明,只要保证 L-半胱氨酸在金丝电极上充分吸附,就能明显地改善 SOD 与金电极之间的电子传递速度。图 2 是经 L-半胱氨酸修饰的金电极上测得的 SOD 循环伏安曲线。曲线 a 和 b 分别是循环扫描一圈和扫描十五圈时记录的伏安图。显然,在峰电流随循环扫描次数的增大的同时,其可逆性也得到改善。又当电极修饰时,如果延长其在 L-半胱氨酸中的浸渍时间、或将修饰了 L-半胱氨酸的金丝电极先在缓冲溶液中循环扫描十圈,之后再测定 SOD 的循环伏安曲线也同样出现上述现象,第一圈扫描和第十圈的扫描曲线确有很大差别。这一现象似可说明,除了 L-半胱氨酸分子中一端的巯基与金电极发生很好的键合作用外,面向溶液的一端有可能在电位的作用下对 SOD 的结构产生影响,把它与 SOD 以及金电极之间的电子传递微环境调节到最佳位置,从而使 SOD 的电极反应更加容易进行。进一步的实验结果表明,只有在预先修饰了 L-半胱氨酸的电极上,而且必须在 SOD 溶液中才会产生这样的效果。

图 3 是图 2 电极达到稳定(即十几次循环扫描)以后,改变不同的扫描速度测得的循环伏安曲线,其氧化、还原峰电流之比接近 1,且峰电流与扫描速度的平方根成直线关系。据此,仍可认为 SOD 在电极上的反应是一准可逆过程。根据 Nicholson 关于电极反应动力学的计算公式^[9]得到的扩散系数为 $4.93 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$;速度常数为 $5.56 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。

在 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-半胱氨酸中进行修饰的金丝电极上测得的 SOD 循环伏安曲线也有类似于上述图 2,图 3 的现象。但在较稀的半胱氨酸溶液中修饰的电极,其 SOD 的峰电流明显小于较高浓度溶液中修饰的电极(见图 4)。

2.2 PySSPy 对 SOD 电子传递促进作用的探索

当金丝电极在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PySSPy 溶液中进行修饰,循环扫描 10 圈后,测得的 SOD 的循环伏安曲线表明,若扫描速度较慢时(10 mV/s),该电极反应是一个近乎准可逆的、受扩散

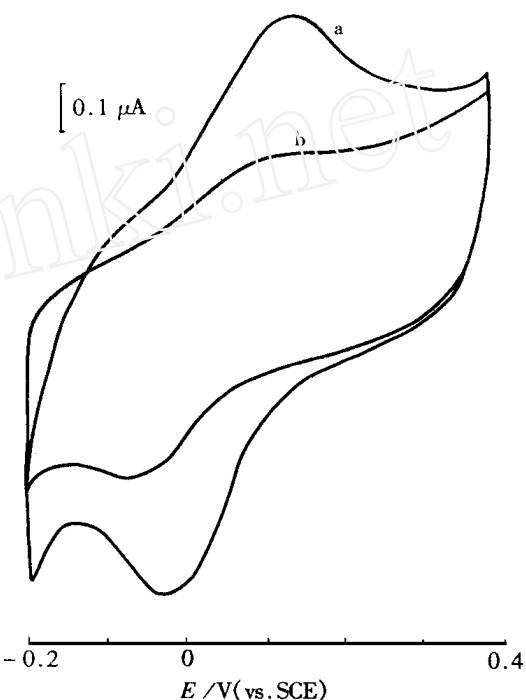


图 2 SOD 在 L-半胱氨酸($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)修饰的金丝电极上 SOD($0.26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的循环伏安曲线

Fig. 2 Cyclic voltammograms (a: first cycle; b: 15th cycle) of SOD ($0.26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) at L-cysteine modified gold electrode. Concentration of L-cysteine modifying solution $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Scan rate: $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

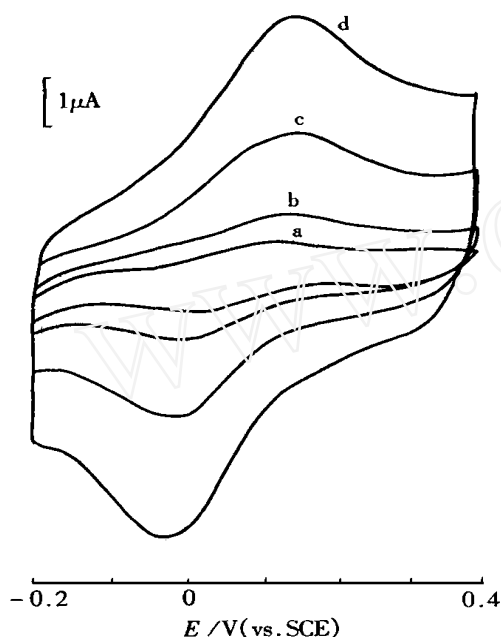


图 3 不同扫描速度下 SOD ($0.26 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在 L-半胱氨酸 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 修饰的金丝电极上的循环伏安曲线

Fig. 3 Cyclic voltammograms of SOD ($0.26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) with various scan rate at L-Cystine modified gold wire electrode. Concentration of L-Cystine modifying Solution: $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Scan rate/ $\text{mV} \cdot \text{S}^{-1}$: (a) 10; (b) 20; (c) 50; (d) 100.

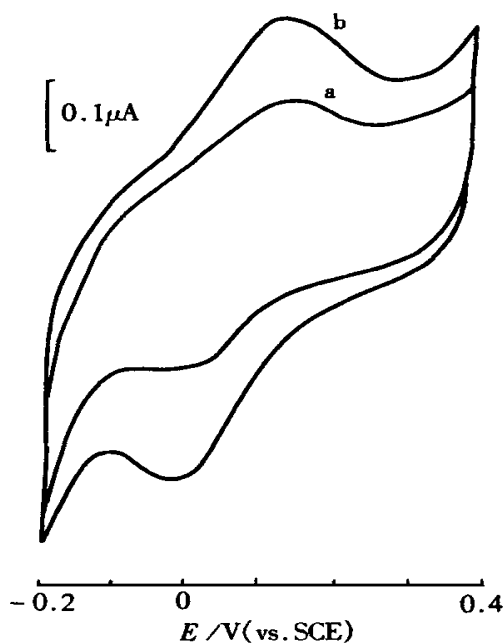


图 4 SOD 在以不同浓度 L-半胱氨酸进行修饰的金丝电极上的循环伏安曲线

Fig. 4 Cyclic voltammograms of SOD ($0.26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) at L-cystine modified gold wire electrodes with various concentration of modifying solution (a: $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; b: $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). Scan rate: $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

控制的电极过程,氧化/还原峰电流之比等于 1, E_p 约为 100 mV (图 5 曲线 a). 而当扫描速度加大时 (50 mV/s), 氧化还原峰的对称性变差 (图 5 曲线 b).

图 6 则是未经修饰的金电极在含 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PySSPy 的 SOD ($0.26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液中测得的循环伏安曲线. 如图, 在第一圈扫描图线上未见有氧化还原电流峰 (图 6a). 但当连续扫描至十二圈时, 则出现一弱的还原电流峰 (图 6b). 可以认为这是由于在扫描的初始阶段, SOD 分子于金电极上的吸附力强于 PySSPy 所致. 随着扫描的连续进行, PySSPy 依靠自己的竞争吸附能力将部分 SOD 从电极上取代下来, 从而可使循环伏安曲线上出现弱的还原电流峰.

以上实验结果表明, 只有预先用电化学方法将 PySSPy 修饰到电极上才能使 PySSPy 对 SOD 的电子传递起到良好的促进作用. 这与以 PySSPy 作细胞色素 C (Cytochrome c, 简称 Cyt. c) 的促进剂有所不同. 后者无论促进剂是存在于溶液中, 还是先修饰到电极上, 都能起到加速细胞色素 C 的电化学反应^[10~11]. 究其原因可能是 SOD 与 Cyt. c 两者结构上的区别. SOD 分

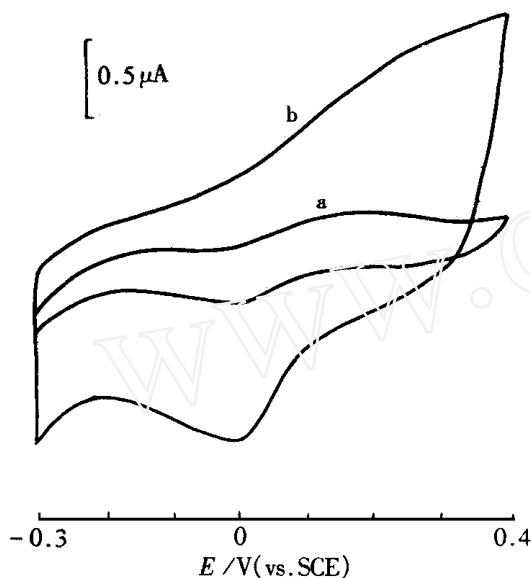


图5 SOD在PySSPy修饰的金丝电极上的循环伏安曲线

Fig. 5 Cyclic voltammograms of SOD (0.26 mmol. L⁻¹) at PySSPy (0.1 mmol. L⁻¹) modified gold wire electrode. Scan rate/ mV · s⁻¹ (a) 10; (b) 50.

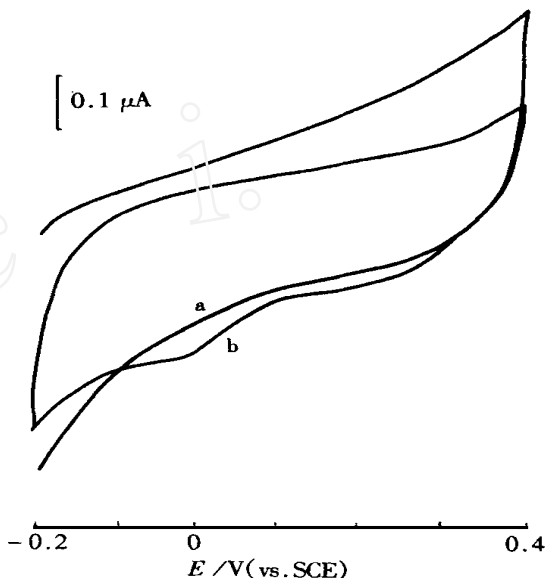


图6 含PySSPy的SOD溶液中的循环伏安曲线

Fig. 6 Cyclic voltammograms of SOD (0.26 mmol. L⁻¹) contained PySSPy (0.1 mmol. L⁻¹) at gold wire electrode with 10 mV · s⁻¹ scan rate. (a) First cycle; (b) 12th cycle

子呈椭圆球状口袋形,其中起活性作用的Cu()离子位于口袋的底部^[12].造成SOD分子内存在着一个狭长的活性通道,电子必须通过很长的距离才能到达活性中心,这种长程电子传递的速率是很慢的^[13].因而在对SOD这样的电子传递通道比较长的生物活性分子进行电化学行为研究时,不能仅仅依靠促进剂在电极表面的吸附来改变双电层界面结构,以达到促进生物分子与电极之间的电子传递.更重要的思路或许是,如何寻找或设计一种既能在电极上有强吸附,又能伸入到SOD这类生物分子电荷传递通道深处的物质.

3 结 论

某些氨基酸在适当的实验条件下对SOD的电子传递过程具有促进作用.其中,以L-半胱氨酸为最佳;而组氨酸则对SOD在电极上氧化过程的促进作用比较明显;精氨酸显示了微弱的促进作用.这三种氨基酸的促进效果之所以不同,主要是与它们本身结构的差异及其与SOD、金电极之间的相互作用有关.实验结果表明,L-半胱氨酸在电极上吸附以后还需在电位作用下、不断调整其在电极上的存在状态,才能对SOD电子传递过程发挥最佳的促进作用.

PySSPy虽然对SOD显示某种程度的促进作用,但必须事先用电化学方法将其修饰到金电极上.从初步的实验结果看,PySSPy对Cyt. c和SOD的促进效果以及促进机制存在明显不同,其主要原因可能即在这两种生物活性分子与PySSPy的相互作用有所差异所致.

作者准备应用共焦显微拉曼光谱仪和电化学测量仪器相结合的原位测试技术以及电化学

石英晶体微天平技术就上述存在的问题作深入的研究,以便提供更翔实、可靠的理论依据.

The Electrochemical Behaviors of Superoxide Dismutase at Promoter-Modified Gold Electrode

Wu Xiaqin * Meng Xiaoyun Wang Zhesu Zhang Zongrang

Dept of Chem, Shanghai Normal Univ, Shanghai 200234

Abstract The electron-transfer process of superoxide dismutase was investigated by cyclic voltammetry at the 4,4'-dithiodipyridine, L-cysteine, histidine and arginine modified gold wire electrodes respectively. The quasi-reversible behavior was observed at L-cysteine modified gold electrode. An irreversible electrochemical behavior has been observed at histidine modified gold wire electrode.

Key words Superoxide dismutase, Amino acids, 4,4'-Dithiodipyridine, Cyclic voltammetry, Promoter

References

- 1 李文杰. 超氧化物歧化酶在治疗超氧阴离子自由基所引起的疾病及抗衰老上的应用. 中国药理学杂志, 1989, 24(7): 397
- 2 袁勤生. 超氧化物歧化酶的研究现状及应用前景. 中国药理学杂志, 1991, 26(8): 456
- 3 袁勤生. SOD 的研究进展. 中国药理学杂志, 1995, 24(7): 387
- 4 韩吉林, 陈洪渊, 钱雯, 金生浩. 天然铜-锌超氧化物歧化酶的电化学行为研究. 高等学校化学学报, 1994, 15(12): 1778
- 5 吴霞琴, 许兵, 刘倩, 孟晓云, 章宗穰. 超氧化物歧化酶的循环伏安行为. 上海师范大学学报, 1997, 26(4): 43
- 6 吴霞琴, 刘倩, 许兵, 孟晓云, 章宗穰. SOD 在金微网栅电极上的电化学行为. 电化学, 1997, 3(2): 136
- 7 Wu Xiaqin, Meng Xiaoyun, Wang Zhesu, Zhang Zongrang. Study on direct electrochemical reaction of superoxide dismutase. Bioelectrochem. Bioenerg., 1999, 48(1): 227
- 8 胡皆汉, 舒占永. 铜、锌超氧化物歧化酶活性中心铜与组氨酸的相互作用. 中国科学(B 辑), 1993, 23: 793
- 9 R S Nicholson. Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics. Anal. Chem., 1965, 37(11): 1351
- 10 Isao Taniguchi, Kenji Toyosawa, Hiroko Yamaguchi, Kasuo Yasukouchi. Voltammetric response of horse heart cytochrome c at a gold electrode in presence of sulfur bridged bipyridines. J. Electroanal. Chem., 1982, 140: 187
- 11 吴霞琴, 市村彰男, 葛瑾, 章宗穰. 细胞色素 C 的薄层光谱电化学研究. 高等学校化学学报, 1991, 12(11): 1529
- 12 John A, Tainer, Elizabeth D, Getzoff, Jane S, Richardson et al. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. Nature, 1983, 306: 284
- 13 C S St Clair, H B Gray, J S Valentine. Spectroelectrochemistry of copper-zinc superoxide dismutase. Inorganic Chemistry, 1992, 31: 925