

文章编号: 1674-8085(2015)02-0020-05

槲皮素镧配合物对 *S.Pombe* 细胞生长代谢热动力学的影响

蒋建宏^{1,2}, 周菊峰², 胡钞粟², 肖碧源², 肖圣雄^{1,2}, *李强国^{1,2}

(1. 湘南稀贵金属化合物及其应用湖南省重点实验室, 湖南, 郴州 423043; 2. 湘南学院化学与生命科学系, 湖南, 郴州 423043)

摘 要: 采用八通道微量热法探讨槲皮素镧配合物对粟酒裂殖酵母细胞生长代谢热动力学的影响。测定在槲皮素镧配合物作用下 *S.Pombe* 细胞的生长代谢产热曲线, 并研究其生长速率常数 (k)、最大发热功率 ($p_{\max}$)、达最大发热功率时间 ($t_{\max}$) 和抑制率 (I) 等热动力学参数。微量热结果表明: 随着槲皮素镧配合物浓度 c 的增大, 最大发热功率 $p_{\max}$ 和速率常数 k 减小; 达最大发热功率时间 $t_{\max}$ 和抑制率 I 增大。研究表明槲皮素镧配合物对粟酒裂殖酵母细胞生长代谢产生了抑制作用。

关键词: 槲皮素镧配合物; 微量热法; 粟酒裂殖酵母细胞

中图分类号: O642/R962

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2015.02.006

THERMODYNAMIC EFFECT OF THE QUERCETIN LANTHANUM COMPLEXES ON PROLIFERATION OF *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE* CELLS

JIANG Jian-hong^{1,2}, ZHOU Ju-feng², HU Chao-su², XIAO Bi-yuan², XIAO Sheng-xiong^{1,2}, *LI Qiang-guo^{1,2}

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Xiangnan Rare-Precious Metals Compounds Research and Application, Chenzhou, Hunan 423043, China;

2. Department of Chemistry and Life Sciences, Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423043, China)

Abstract: To study the thermodynamic effect of the quercetin lanthanum complexes on proliferation of *Schizosaccharomyces pombe* cells, eight channels microcalorimetry was performed to determine the heat production curve of cell proliferation and metabolism after the quercetin lanthanum complexes was added, and thermodynamic parameters such as growth and metabolism rate constant (k), the maximum heating power ($p_{\max}$), the max heating power time ($t_{\max}$) and inhibition rate (I) were also investigated. The microcalorimetric results showed that the maximum heating power $p_{\max}$ and rate constant k decreased but the max heating power time $t_{\max}$ and inhibition rate I enlarged with the increasement of concentration c of quercetin lanthanum complexes. It could be concluded that quercetin lanthanum complexes inhibited the cell growth and metabolism of *S. pombe*.

Key words: quercetin lanthanum complexes; microcalorimetry; *Schizosaccharomyces pombe* cell

收稿日期: 2014-11-20; 修改日期: 2015-02-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(21273190); 湖南省科技计划项目(2013FJ3033; 2012TP4021-6; 2010FJ3053); 湘南学院科研基金项目(2013YJ36; 2014XJ52); 湘南学院大学生研究性学习和创新性实验计划项目(校发[2013]15 号); 湘南学院大学生科研课题项目(校发[2014]10 号)

作者简介: 蒋建宏(1984-), 男, 湖南邵阳人, 助教, 硕士, 主要从事生物热化学研究(E-mail:jiangjianhong927@163.com);

周菊峰(1963-), 男, 湖南邵阳人, 副教授, 主要从事生物热化学研究(E-mail:hnsd333@126.com);

胡钞粟(1991-), 女, 湖南益阳人, 湘南学院化学与生命科学系应用化学专业 2011 级本科生(E-mail:huchaosu@163.com);

肖碧源(1994-), 女, 湖南邵阳人, 湘南学院化学与生命科学系应用化学专业 2012 级本科生(E-mail:1586769784@qq.com);

肖圣雄(1975-), 男, 湖南郴州人, 副教授, 硕士, 主要从事热化学研究(E-mail:54xsx@163.com);

*李强国(1963-), 男, 湖南郴州人, 二级教授, 主要从事生物热化学研究(E-mail:liqiangguo@163.com).

稀土金属具有抗炎、杀菌、镇痛、治烧伤等生物活性^[1], 稀土配合物的合成主要是将具有特定生物活性的配体与稀土离子配合, 以达到具有更好的生物活性的目的。研究表明: 当金属元素与活性有机配体反应形成配合物后, 其配合物往往具有一些新的独特的生理生化功能, 因而稀土配合物在生命过程中起着十分重要的作用^[2], 因此, 研究稀土配合物的生物活性具有重要意义。

槲皮素是一种多羟基黄酮类化合物, 化学名为 3,3',4',5,7- 五羟基黄酮。槲皮素不仅在自然界中广泛分布, 其药理作用也很广泛, 它不仅具有抗氧化及清除自由基的作用, 还具有抗癌、抗炎、抗菌、抗病毒、降糖降压、免疫调节及心血管保护等作用^[3]。同时槲皮素分子具有较高的超离域度, 完整的大 π 键共轭体系, 含有多个配位基团, 其中的氧原子具有强配位能力, 其空间结构也利于配合物的形成^[4], 所以槲皮素可作为稀土金属离子的良好螯合配体。利用槲皮素特殊的药理作用以及与金属离子之间的协同效应, 可使合成的新配合物不仅具有更高的清除超氧阴离子自由基能力、提高抗肿瘤活性, 同时还可降低毒副作用。镧是稀土元素之一, 与槲皮素配位形成的配合物, 可改善槲皮素的生物活性^[5]。这对寻找新型、高效、低毒的活性配合物具有指导价值。

粟酒裂殖酵母细胞是一个良好的表达高等真核生物基因的系统, 在某些方面粟酒裂殖酵母细胞与高等动物有一定的相似性^[6], 许多有关人体细胞的研究成果都是首先通过研究酵母细胞发现的。当细胞生长代谢过程受到药物作用时, 其代谢产热功率发生改变, 而 TAM air 八通道生物活性检测系统可以准确的检测到生物代谢过程所产生的热量。通过微量热法所测得的代谢热量, 可以了解药物对细胞生长代谢的作用。因此, 以粟酒裂殖酵母细胞作为实验材料, 探讨槲皮素稀土配合物对粟酒裂殖酵母细胞生长的影响, 可为槲皮素稀土配合物的活性研究提供理论基础, 具有较好的研究价值。

1 实验部分

1.1 实验仪器与试剂

1.1.1 仪器

尼高力 Avatar360 傅里叶红外光谱仪; S7-401 型定时电动搅拌器 (山东华鲁电热仪器有限公司); 鼓风干燥箱 (北京朝阳区来广营医疗器械厂); 3116-2/3239 TAM Air 八通道热导式等温微量热仪 (瑞典 Thermometric AB 公司); WL-160A- CO₂ 细胞培养箱 (上海峰宇生物科技有限公司)。

1.1.2 试剂

槲皮素 (国药集团化学试剂有限公司); 无水氯化镧 (国药集团化学试剂有限公司); 无水乙醇 (沈阳化学试剂厂, 分析纯); 其他试剂均为分析纯; 实验用水为三重蒸馏水。

1.1.3 菌种

粟酒裂殖酵母细胞 (Schizosaccharomyces pombe, *S.Pombe*) 微生物研究所菌种保存中心。YES 培养基: 酵母粉 5.000 g; 葡萄糖 30.000 g; 亮氨酸 0.225 g; 腺嘌呤 0.225 g; 赖氨酸 0.225 g; 尿嘧啶 0.225 g; 组氨酸 0.225 g; 三重蒸馏水 1000 mL。振荡使其充分混匀后, 分装于 4 个已灭菌干燥的 250 mL 锥形瓶中, 用牛皮纸包好, 于 121 °C 下灭菌备用。

1.2 实验方法

1.2.1 槲皮素镧配合物的合成

槲皮素镧配合物是由笔者依据有关文献^[7]将槲皮素与无水氯化镧反应人工合成。将 0.3 mmol 槲皮素用一定量无水乙醇热溶解, 待完全溶解后, 加入装有回流装置三颈瓶中, 在 80 °C 水浴中加热搅拌, 以乙醇钠调节 pH 至 9.0, 再加入 0.1 mmol 氯化镧的乙醇溶液, 加热回流, 使其反应 5 h, 冷却, 放置过夜, 抽滤、洗涤、干燥, 得棕黄色固体。经红外光谱分析, 合成的槲皮素镧配合物 [LaL₃·6H₂O, L=槲皮素] 与文献相同。

1.2.2 槲皮素镧配合物对粟酒裂殖酵母细胞的影响

槲皮素镧配合物对粟酒裂殖酵母细胞的抑制生长作用由微量热法测定^[8]。准备 8 个已灭菌干燥的安培瓶, 每个安培瓶中精密加入 5 mL 培养液, 每个安培瓶按实验要求加入一定量的槲皮素镧配合物溶液, 然后再加入 10 μ L 培养好的粟酒裂殖酵母细胞, 编号, 压盖密封。将编号的安培瓶依次放入八通道微量热仪中, 进行数据采集, 连续记录粟酒裂殖酵母细胞生长代谢热功率曲线。

1.3 实验结果

1.3.1 粟酒裂殖酵母的生长产热曲线

在32 ℃条件下，粟酒裂殖酵母细胞正常生长热谱曲线如图1所示。由图可知，粟酒裂殖酵母细胞随着槲皮素铜配合物浓度的增加，最大产热功率逐渐降低，说明槲皮素铜配合物使粟酒裂殖酵母细胞生长产生了变化。

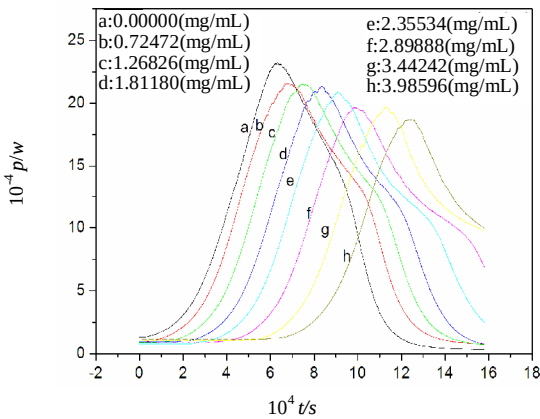


图1 在不同浓度槲皮素铜配合物作用下粟酒裂殖酵母细胞的产热曲线

Fig.1 Power-time curves for the growth of *S.Pombe* affected by $C_{15}H_{10}O_6 \cdot La$

表 1 在 32 ℃时裂殖酵母细胞在不同浓度的槲皮素铜配合物作用下生长期的热动力学参数

Table 1 Thermokinetic parameters of the growth of *S.Pombe* affected by different concentrations of $C_{15}H_{10}O_6 \cdot La$ at 32 ℃

Drug	$c(mg \cdot mL^{-1})$	$k(s^{-1})$	$p_{max}(w)$	$t_{max}(s)$	$I(\%)$
$C_{15}H_{10}O_6 \cdot La$	0.00000	6.23070×10^{-5}	0.00232	63336.63	0.000
	0.72472	6.20447×10^{-5}	0.00216	68371.325	0.421
	1.26826	6.12980×10^{-5}	0.00215	74862.350	1.619
	1.81180	6.08827×10^{-5}	0.00214	83532.270	2.286
	2.35534	6.06654×10^{-5}	0.00209	90843.304	2.635
	2.89888	6.02605×10^{-5}	0.00196	98344.432	3.285
	3.44242	5.94739×10^{-5}	0.00197	113224.76	4.547
	3.98596	5.92735×10^{-5}	0.00187	125130.31	4.869

1.3.3 生长速率常数 k 与药物浓度 c 的关系

由槲皮素铜配合物对粟酒裂殖酵母细胞影响的热谱图，可计算出在不同浓度槲皮素铜配合物作用下，粟酒裂殖酵母细胞的生长速率常数 k 。以粟酒裂殖酵母细胞的生长速率 k 对配合物浓度 c 进行 Logistic 曲线拟合（图 2），得以下方程：

$$k = 4.69731 \times 10^{-5} + \frac{1.53654 \times 10^{-5}}{1 + (c/12.04564)^{1.24073}},$$

(3)

$R = 0.9708$ 。

1.3.2 粟酒裂殖酵母细胞生长期热动力学参数的计算

从生长代谢的产热曲线可以看出，粟酒裂殖酵母细胞的生长包括停滞期、指数生长期、稳定期和衰减期等阶段。在细菌生长的指数生长期^[9]内细菌的数量按指数规律增长，其数学表达式为

$$\ln p_t = \ln p_0 - kt_0 + kt \tag{1}$$

式中： t 为指数生长期开始后的某一时间， t_0 为生长期开始的时间， p_t 是粟酒裂殖酵母细胞在 t 时刻的热输出功率， k 是粟酒裂殖酵母细胞在指定条件下的生长速率常数（见表 1）。

为了便于讨论，定义药物对细菌生长代谢过程的抑制率为

$$I = (k_0 - k_c)/k_0 \times 100\% \tag{2}$$

式中 k_0 为细菌未受到药物作用时生长代谢的速率常数， k_c 为细菌受到浓度为 c 的药物作用时的速率常数。根据以上定义，我们计算了粟酒裂殖酵母细胞在不同浓度的药物作用下的抑制率 I （见表 1）。

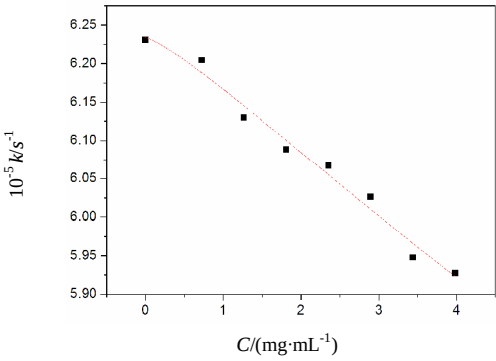


图 2 粟酒裂殖酵母细胞生长代谢速率常数 k 与配合物浓度 c 的关系

Fig.2 Rate constants of growth of *S.Pombe* with concentration of $C_{15}H_{10}O_6 \cdot La$

由表 1 和图 2 可得出, 在实验浓度范围内, 逐量增加槲皮素铜配合物浓度, 粟酒裂殖酵母细胞生长速率常数 k 逐渐变小。说明在该实验浓度范围内, 槲皮素铜配合物不同程度的抑制了粟酒裂殖酵母细胞生长代谢, 且随着槲皮素铜配合物浓度的增加, 对粟酒裂殖酵母细胞生长代谢的抑制作用也越明显。

1.3.4 最大发热功率 P_{max} 与浓度 c 的关系

粟酒裂殖酵母细胞的最大发热功率 P_{max} 与浓度 c 的关系如图 3 所示。由表 1 和图 3 可得出, 在实验浓度范围内, 随着槲皮素铜配合物浓度的不断增加, 粟酒裂殖酵母细胞最大发热功率 P_{max} 逐渐变小。说明槲皮素铜配合物影响了粟酒裂殖酵母细胞的生长代谢, 导致发热功率 P_{max} 的改变。以 P_{max} 与浓度 c 进行 Logistic 曲线拟合 (图 3), 得方程如下:

$$p_{max} = -17.88859 + \frac{17.88859}{1 + (c / 553966.06447)^{0.90278}},$$

R = 0.88933. (4)

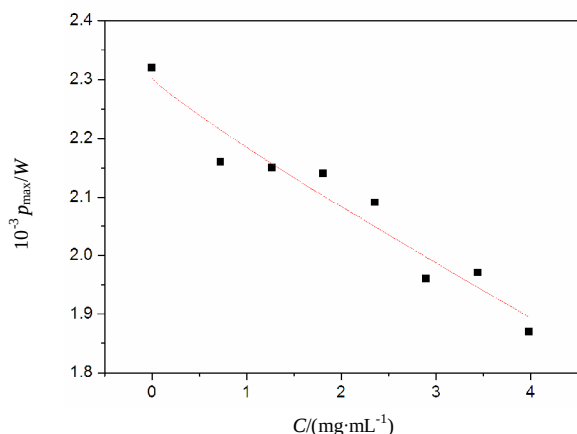


图 3 粟酒裂殖酵母细胞生长代谢最大热功率 p_{max} 与配合物浓度 c 的关系

Fig.3 The max heating power of *S.Pombe* with concentration of $C_{15}H_{10}O_6 \cdot La$

1.3.5 达最大功率时间 t_{max} 与浓度 c 的关系

粟酒裂殖酵母细胞达最大功率时间 t_{max} 与浓度 c 的关系如图 4 所示。由表 1 和图 4 可得出, 在实验浓度范围内, 随着槲皮素铜配合物浓度的递增, 粟酒裂殖酵母细胞达到最大功率的时间逐渐增长。说明槲皮素铜配合物浓度越大, 对粟酒裂殖酵母细胞的抑制作用越明显。以达最大功率时间 t_{max} 与浓度 c 进行 Logistic 曲线拟合 (图 4), 得方程如下:

$$t_{max} = 5.28475 \times 10^8 - \frac{5.28411085 \times 10^8}{1 + (c / 1457.73257)^{1.53708}},$$

R = 0.99377. (5)

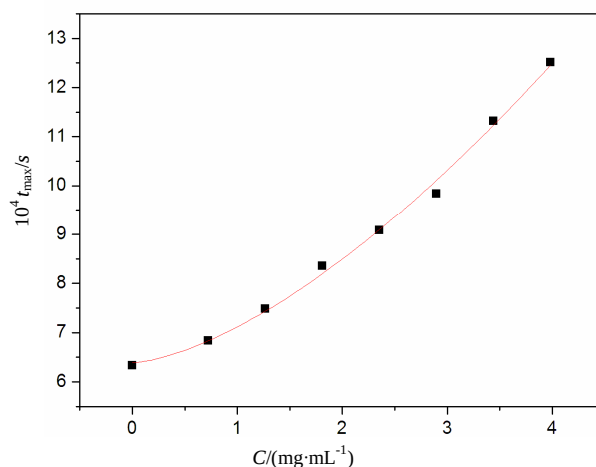


图 4 达最大功率时间 t_{max} 与配合物浓度 c 的关系

Fig.4 t_{max} of the max heating power of *S.Pombe* with concentration of $C_{15}H_{10}O_6 \cdot La$

1.3.6 抑制率 I 与浓度 c 的关系

粟酒裂殖酵母细胞生长期的抑制率 I 与浓度 c 的关系如图 5 所示。由表 1 和图 5 可见, 在实验浓度范围内, 随着配合物浓度的不断增加, 抑制率 I 逐渐增大。说明配合物对粟酒裂殖酵母细胞的抑制作用随药物浓度的增加而增强。以抑制率 I 与浓度 c 进行 Logistic 曲线拟合 (图 5), 得方程如下:

$$I = 24.56775 - \frac{24.61835}{1 + (c / 12.01976)^{1.24114}},$$

R = 0.9708 (6)

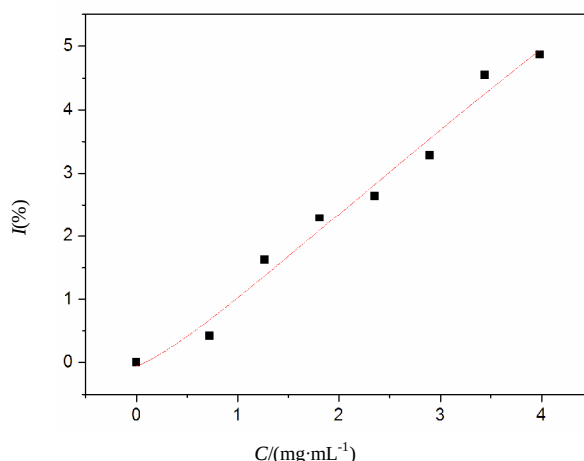


图 5 粟酒裂殖酵母细胞生长代谢抑制率 I 与配合物浓度 c 的关系

Fig.5 Inhibitive ration of *S.Pombe* with concentration of $C_{15}H_{10}O_6 \cdot La$

2 结论

微量热法测定结果表明:槲皮素和氯化镧单独使用时对粟酒裂殖酵母细胞作用的效果不明显,但槲皮素镧配合物对粟酒裂殖酵母细胞作用相对较强,且在实验浓度范围($0.00\sim 3.99\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)内,随着配合物浓度的增加,槲皮素镧配合物对粟酒裂殖酵母细胞生长产生的抑制作用增强,其作用机理还有待今后进一步研究。

参考文献:

- [1] 张金超,杨梦苏.稀土配合物药物研究进展[J].稀有金属,2005,29(6):919-926.
 - [2] 陈爱美,施庆珊,欧阳友生.稀土抗菌效应及应用的研究进展[J].微生物学通报,2009,36(1):90-96.
 - [3] 唐丽君,陈翔,仇佩虹.黄酮类金属配合物的研究进展[J].广东微量元素科学,2008,15(12):6-13.
 - [4] 渠文涛,朱玮,翟广玉,等.槲皮素衍生物的合成及生物活性研究进展[J].化学研究,2012,23(4):101-110.
 - [5] 王俊杰,赫春香.槲皮素-锆配合物的合成及清除氧自由基活性的研究[J].高师理科学刊,2010,30(1):71-74.
 - [6] 岳强,周惠,粟酒裂殖酵母——一种良好的真核模式生物(II)[J].韶关学院学报,2003,3(24):99-102.
 - [7] 董树国,王晓丽,槲皮素-镧配合物的合成与光谱表征[J].吉林医药学院学报,2010,31(1):11-13.
 - [8] 曹慧,李东亮,于游,等.双(三环己基锡)丁二酸酯的合成、晶体结构和抑菌性质[J].井冈山大学学报:自然科学版,2012,33(4):30-33.
 - [9] 肖圣雄,李强国,李旭,等.镧配合物的热化学及其对酵母菌作用的热动力学研究[J].中国科学:化学,2010:1422-1429.
-
- (上接第 14 页)
- [3] Brida G, Castelletto S, Novero C, et al. Quantum-efficiency measurement of photodetectors by means of correlated photons[J]. JOSA B, 1999, 16(10): 1623-1627.
 - [4] Lan Xinju. Lase Technology [M]. Wuhan: HuaZhong University of Science and Technology Press, 1995: 199-228(in Chinese).
 - [5] Castelletto S, Degiovanni I P, Schettini V, et al. Optimizing single-Photon-source heralding efficiency and detection efficiency metrology an 1550nm using periodically poled lithium biobate[J]. Metrologia, 2006, 43(2): S56-S60.
 - [6] Odate S, Yoshizawa A, Fukuda D, et al. Quantum efficiency measurements by bidirectional coincidence counting of correlated photon pairs[J]. Optics letters, 2007, 32(21): 3176-3178.
 - [7] Brida G, Genovese M, Monticone E, et al. Experimental sub-shot noise quantum imaging versus differential classical imaging[C]. Quantum, Nano and Micro Technologies, 2010. ICQNM'10. Fourth International Conference on. IEEE, 2010: 71-76.
 - [8] Avella A, Brida G, Degiovanni I P, et al. Self consistent, absolute calibration technique for photon number resolving detectors[J]. Optics express, 2011, 19(23): 23249-23257.
 - [9] Peřina Jr J, Haderka O, Allevi A, et al. Absolute calibration of photon-number-resolving detectors with an analog output using twin beams[J]. Applied Physics Letters, 2014, 104(4): 041113.