

细胞动力学研究*

VIII. Na_2SeO_3 对黑根菌作用特征

颜承农** 刘 义 屈松生 陈春英 徐辉碧

(武汉大学化学系, 武汉 430072) (华中理工大学化学系, 武汉 430074)

关键词: 微量热法, 硒, 黑根菌, 热动力学

硒是生命必须的微量元素之一, 它在生物体内作用的广泛性越来越被人们所重视^[1]. 目前, 已研究了硒对细胞膜的作用^[2]及硒酶和泛醌等有机大分子的领域. 而用微量热法研究硒的生物效应, 尚未见报导.

许多研究表明, 硒浓度过小会引起动物许多组织器官损伤^[2], 但硒浓度过大又将引起机体中毒. 硒浓度在 $0.1\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 以下对人和温血动物有益, 在 $0.1\text{--}0.8\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时对红细胞膜的结构和功能是必须的^[3]. 硒的抗病毒抗癌活性也相当明显, 因此, 研究硒的生物效应等具有重要意义.

我们采用微量热法测定了 Na_2SeO_3 对黑根菌作用的产热曲线, 根据产热曲线求算了黑根菌生长的速率常数, 得到了速率常数随 Na_2SeO_3 浓度变化的关系, 对于了解硒对细胞作用的热动力学特征等具有一定意义.

1 材料与方法

1.1 仪器

实验采用瑞典产 LKB-2277 生物活性检测系统, 该仪器热稳定性好, 温度可稳定在 $\pm 1 \times 10^{-4}$ °C, 恒温工作范围在 20 ~ 80 °C. 热功率最小检测极限为 $0.12\mu\text{W}$, 24 小时内基线漂移为 $0.2\mu\text{W}$. 有关仪器结构、原理及操作详见文献^[4,5], 实验时系统控温于 25 °C.

1.2 材料

黑根菌 (CCTCC AF93157), 由武汉大学典型培养物保藏中心提供.

培养基为马铃薯、葡萄糖培养基 (PDA medium). 取去皮马铃薯 200g, 切成小块, 加水 1000mL 煮沸 30min, 滤去马铃薯块, 将滤液补充至 1000mL, 加葡萄糖 20g, 溶化后分装, 120 °C 灭菌 30min. 冰箱中放置备用.

Na_2SeO_3 为分析纯, 配制溶液用二次无菌蒸馏水.

1.3 方法

本实验采用停流法检测. 测定前分别用 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$, $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{HCl}$, 75% (V/V) 乙醇溶液和无菌水清洗管道和流通池, 待仪器基线稳定后, 用蠕动泵 (LKB 2132 microperpex peristaltic

1996-09-16 收到初稿, 1996-11-08 收到修改稿. 联系人: 屈松生. * 国家自然科学基金和高等学校博士点专项基金资助项目. ** 现在荆州师专化学系工作.

pump) 以 $50\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速将菌液和 Na_2SeO_3 混合液泵入微量热计中, 当样品充满流通池 (约 0.6mL) 后停泵, 记录仪自动跟踪记录流动池内菌生长的产热曲线 ($P-t$ 曲线), 当记录笔回基线后, 实验结束。

Na_2SeO_3 按实验要求配制成溶液后, 加入到接种了菌的溶液中, 菌接种量为 $2\times 10^6\text{cells}/\text{mL}$ 。

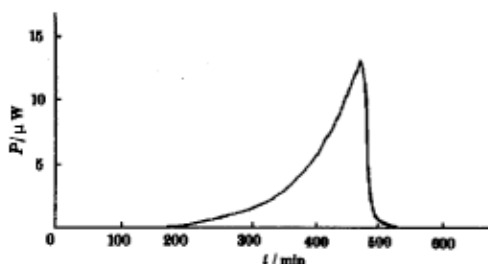


图 1 25 °C 时黑根菌生长产热曲线
Fig.1 Thermogenetic curve of *Rhizopus nigrocans* growth at 25 °C

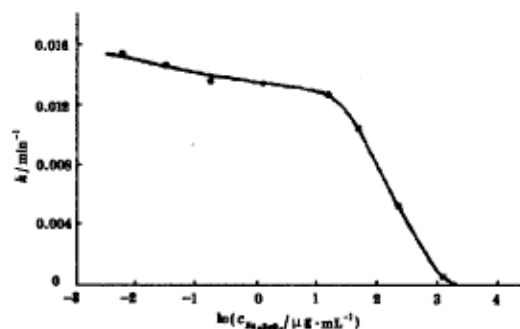


图 2 生长速率常数与浓度关系
Fig.2 The relationship between growth rate constants and concentration of Na_2SeO_3

2 结果与讨论

2.1 黑根菌生长产热曲线

在 298K 、停流法测定了黑根菌生长产热曲线 (如图 1 所示)。同时测定了其在 Na_2SeO_3 作用下的生长产热曲线, 在相同的实验条件下, 其结果有非常好的重现性。

2.2 黑根菌生长速率常数

在细胞的对数生长期中, 有^[4]:

$$P_t = P_0 \exp(kt)$$

或

$$\ln P_t = \ln P_0 + kt \quad (1)$$

将产热曲线上指数生长期的 P_t 、 t 值代入 (1) 式中, 用计算机进行线性拟合得到了黑根菌生长速率常数 k (见表 1)。在不同浓度 Na_2SeO_3 作用下的生长速率常数 k (见表 2)。

表 1 黑根菌生长速率常数

Table 1 Rate constants of *Rhizopus nigrocans* growth

Exp.	1	2	3	4	5	6
k/min^{-1}	0.01395	0.01340	0.01349	0.01500	0.01321	0.01207
R	0.99713	0.99786	0.99656	0.99721	0.99558	0.99868

由表 1 可得 $\bar{k} = 0.01352 \pm 0.00087\text{min}^{-1}$, 可见其结果有非常好的重现性。同时由 $t_G = (\ln 2)/k$ 可得到不同条件下的细胞传代时间。黑根菌在不同浓度 Na_2SeO_3 作用下的生长速率常数 k 、传代时间 t_G 和生长期的最大发热功率 P_{\max} 如表 2 所示。

表 2 黑根菌在不同浓度 Na_2SeO_3 作用下的生长速率常数 k 和传代时间

Table 2 Rate constants, generation time and P_{\max} of *Rhizopus nigrocanis* growth under the action of different concentration of Na_2SeO_3

$c/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0	0.1	0.2	0.4	1.0	3.0	5.0	10.0	20.0
k/min^{-1}	0.01352	0.01564	0.01480	0.01401	0.01378	0.01303	0.01064	0.00531	0.00105
t_G/min	51.3	44.3	46.8	49.5	50.3	53.2	65.1	130.5	660.1
$P_{\max}/\mu\text{W}$	11.5	12.5	11.5	11.2	11.0	10.8	8.5	6.0	2.5

2.3 P_{\max} 与生长速率常数 k 的关系

由表 2 可见, 随着细胞生长速率的下降, 细胞的传代时间 t_G 增长, 生长期的最大发热功率 P_{\max} 减小. 以 P_{\max} 对 k 进行线性拟合, 则得 P_{\max} 与 k 的关系式为

$$P_{\max} = 1.98 + 663.26k \quad R = 0.9938 \quad (2)$$

由 (2) 式可见, P_{\max} 与 k 具有较好的线性关系.

2.4 k 与 c 之间的关系

以 k 对 $\ln c_{\text{Na}_2\text{SeO}_3}$ 作图 (如图 2 所示), 由图 2 可见, k 与 c 之间的关系符合对数正态分布特征, 根据文献 [6], 我们可以得到:

$$k = B_1 \cdot \exp[-B_2(c + B_3)^2] \quad (3)$$

其中 B_1 、 B_2 、 B_3 为常数, c 为 Na_2SeO_3 浓度.

对 (3) 式取对数得:

$$\ln k = \ln B_1 - B_2(c + B_3)^2 \quad (4)$$

(4) 式为一线性化方程式. 将表 2 中的 k 和 c 代入 (3) 式中, 用计算机进行循环计算和拟合, 从而求得 $\ln B_1 = -3.322$, $B_2 = 0.003608$, $B_3 = 8.60$, 相关系数 $R = 0.9986$. 则 $k \sim c$ 关系式为

$$\ln k = -3.322 - 0.003608(c + 8.60)^2 \quad (5)$$

$\ln k$ 对 $(c + B_3)^2$ 作图, 为一条相关性较好的直线.

2.5 硒作用探讨

实验结果表明, Na_2SeO_3 在低浓度时对黑根菌的生长代谢有促进作用, 高浓度时有抑制作用, 与文献 [3,6] 中报道的规律相符合. 这可能是因为低浓度下, Se 主要用于维持细胞的完整性, 作用于微生物体内的必需酶, 并促进辅酶 Q 及细胞的 DNA 和 RNA 的生物合成, 这样硒就成为细胞正常生长并保持其活性的必需微量元素. 而在高浓度下, 则主要表现为毒性作用, 这可能是因而硒与生物大分子的巯基作用, 使巯基过度氧化形成 $-\text{S}-\text{Se}-\text{S}-$ 键, 致使蛋白质破坏而失去活性 [7], 从而抑制了细胞的正常分裂和增殖, 细胞的生长速率下降. 当硒浓度为 $1 \sim 5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时, 将导致红细胞溶血 [3]. 这对揭示硒的生物效应以及毒理学等均有重要意义.

微量热法对研究药理学和毒理学等均可提供可靠的信息, 这将会成为药理学和毒理学中重要的研究工具.

参 考 文 献

- 1 王远亮. 生物化学与生物物理进展, 1987, (6):28
- 2 沃维汉, 杨福愉. 中国科学 B 辑, 1986, (4):401
- 3 杨 剑, 杨福愉. 生物化学杂志, 1990, 6(2): 141
- 4 Xie Changli, Tang Houkuan, Song Zhaohua, et al. *Thermochimica Acta*, 1988, 123:33
- 5 谢昌礼, 徐桂端, 屈松生. 物理化学学报, 1986, 2(4): 363
- 6 王 静, 陈出新, 陶 澍. 生态学报, 1992, 12(3): 201
- 7 Bhuyan K C, et al. in *Selenium in Biology and Medicine*. Spallholz J E, Martin J L, Ganther H E, eds., Westport: AVI Publishing Co., 1980. 403

Studies on Cell Kinetics

VIII. Characteristics of the Action of Na_2SeO_3 on *Rhizopus Nigrocans*

Yan Chennong Liu Yi Qu Songsheng

(Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072)

Chen Chungying Xu Huibi

(Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

Abstract The Characteristics of the action of Na_2SeO_3 on *Rhizopus nigrocans* has been studied by means of microcalorimetry, the relationship between growth rate constants and the concentration of Na_2SeO_3 is

$$k = 0.03608\exp[-0.003608(c + 8.60)^2]$$

It was found that Na_2SeO_3 of low concentration has promoting action on the growth of *Rhizopus nigrocans* cells, and high concentration of Na_2SeO_3 has inhibitory action. The study has provided a lot of information on the bioeffect of selenium and the research of toxicology.

Keywords: Microcalorimetric method, Selenium, *Rhizopus nigrocans*, Thermokinetics