

## 肉桂醛对烟曲霉细胞壁合成关键基因 FKS 表达的影响

方建茹<sup>1</sup>, 谢小梅<sup>2</sup>, 牛 锋<sup>1\*</sup>

1. 石药集团恩必普药业有限公司, 河北 石家庄 052160
2. 江西中医学院, 江西 南昌 330004

**摘要:** **目的** 探讨肉桂醛抗烟曲霉的作用机制。**方法** 采用固体插片培养法培养烟曲霉, 定时取样品于光学显微镜下动态观察烟曲霉生长情况, 以 RT-PCR 检测在肉桂醛作用下烟曲霉 FKS 基因表达的变化。**结果** 以肉桂醛 0.025 μg/mL 作用后, 烟曲霉生长显著迟缓, 分生孢子头稀疏; 烟曲霉 FKS 基因的表达受到抑制, 但随培养时间的延长, 该抑制作用减弱。**结论** 肉桂醛通过抑制细胞壁主要多糖合成的关键基因 FKS 表达, 使烟曲霉细胞壁失去正常生理结构, 细胞生长、繁殖被抑制, 从而达到抗烟曲霉的目的。

**关键词:** 肉桂醛; 抗真菌; 烟曲霉; 细胞壁; FKS 基因

**中图分类号:** R978.5; R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2011)05 - 0389 - 04

## Effects of cinnamaldehyde on key gene FKS gene expression in cell wall biosynthesis of *Aspergillus fumigatus*

FANG Jian-ru<sup>1</sup>, XIE Xiao-mei<sup>2</sup>, NIU Feng<sup>1</sup>

1. Shijiazhuang Pharma Group, NBP Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 052160, China
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

**Abstract: Objective** To discover the anti-aspergilli mechanism of cinnamaldehyde on *Aspergillus fumigatus*. **Method** Using Czepak's solid petri dish containing glass coverslip, its growth and propagation were observed timely by light microscope, RT-PCR was performed to detect the effect of cinnamaldehyde on gene expressions of FKS. **Results** *A. fumigatus* treated by cinnamaldehyde at concentration of 0.025 μg/mL showed obviously slow growth rate and markedly reduced conidial head produced; cinnamaldehyde could inhibit the gene expressions of FKS, and this effect became weaker over incubation time. **Conclusion** Cinnamaldehyde could inhibit the gene expression of key gene FKS and damage the cell wall structure, which and would be one of its anti-aspergilli mechanism.

**Key words:** cinnamaldehyde; antifungal; *Aspergillus fumigatus* Fres.; cell wall; FKS gene

肉桂醛属萜类化合物, 是肉桂的主要活性成分, 已应用于食品防腐和香料生产等领域, 具有良好的广谱抗真菌作用。烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* Fres. 是自然界普遍存在的丝状真菌, 系重要的条件致病菌。近年来, 随着抗生素、抗肿瘤药物、糖皮质激素的广泛应用, 器官和骨髓移植、介入疗法等新型诊治技术的发展以及恶性血液病、艾滋病等免疫受损人群的扩大, 由烟曲霉引起的系统性感染的发病率不断上升, 成为白血病和骨髓移植等免疫受损重症患者死亡的主要原因<sup>[1-4]</sup>。

烟曲霉细胞壁主要成分为  $\alpha$  和  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖及几丁质组成的多糖链。 $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖构成了

支撑细胞强度和形状的支架, 其由  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖合成酶且以尿苷二磷酸葡萄糖为底物催化生成。FKS 是  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖合成的必需基因, 同时也是烟曲霉生存的必需基因, 它的正常表达对于真菌维持正常细胞壁结构和生命活动有决定性意义。本实验观察了肉桂醛对烟曲霉细胞壁 FKS 基因表达的影响, 从分子生物学角度探讨了肉桂醛抗真菌机制。

### 1 仪器与材料

#### 1.1 仪器

PTC—200 梯度热循环仪, 美国伯乐公司; Sigma 2K—15 高速冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; FR—200 复日凝胶图象分析系统, 上海复日科技有

收稿日期: 2011-05-13

作者简介: 方建茹, 硕士, 工程师, 研究方向为中药与微生物。E-mail: feixue200091@hotmail.com

\*通讯作者 牛 锋 E-mail: niufeng@nbp.com.cn

限公司; DYY—III—5 型稳压稳流型电泳仪, 北京市六一仪器厂。

## 1.2 菌株、药品与试剂

烟曲霉 CCCC MID A.1, 购自中国医学真菌中心。肉桂醛, 上海双喜香料制剂厂生产, 批号 20020401, 质量分数  $\geq 95\%$ 。异硫氰酸胍、溴化乙锭、 $\beta$ -巯基乙醇、RT-PCR 试剂、TaKaRa RNA PCR (AMV) 试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司产品; DNA 酶 I, Promega 公司产品。Marker DL2000, 片段长度分别为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp。

PCR 引物合成参照 GenBank 中  $\beta$ -tublin、FKS 基因序列设计上、下游引物。 $\beta$ -tublin 基因, GenBank 序列号为 AF132222, 正向引物: 5' TACAATGGCTC CTCCGATCT 3', 反向引物: 5'AGATCAACCAGG ACGGCA 3', PCR 产物长度为 96 bp。FKS 基因 genebank 序列号为 AFU79728, 正向引物: 5'ATGGGCAGGCTTACTATGAC 3', 反向引物: 5'GT AACTGGGGTTGATGCT 3', PCR 产物长度为 411 bp。

## 2 方法与结果

### 2.1 对烟曲霉生长的影响

烟曲霉培养采用蔡氏固体培养基。培养基由  $\text{NaNO}_3$  3.0 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 g、KCl 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g、蔗糖 30.0 g 组成, 加 1 000 mL 蒸馏水溶解, 调 pH 值至 5.5~5.6, 培养基温度 26.5  $^\circ\text{C}$ , 高压灭菌后 4  $^\circ\text{C}$  保存。

在含有 0.025  $\mu\text{g}/\text{mL}$  肉桂醛 (0.5 倍最低抑菌质量浓度<sup>[5]</sup>) 的蔡氏固体培养基中均匀涂布烟曲霉孢子悬液 (终浓度  $1 \times 10^4/\text{mL}$ ), 将无菌盖玻片以约 30 $^\circ$  斜插在培养基中, 26.5  $^\circ\text{C}$  恒温静置培养, 每隔一定时间取盖玻片置光镜下观察烟曲霉的生长情况。以不加药物的培养基作对照。结果显示, 与对照组比较, 肉桂醛作用 46 h, 烟曲霉分生孢子未见萌发; 57 h 时偶见短促芽管; 72 h 时菌丝稀疏、分支很少; 86 h 时菌丝体不发达, 无顶囊生成; 用药 6~7 d 后, 烟曲霉菌苔稀薄, 特征性烟绿色色素减少。结果表明肉桂醛可显著抑制烟曲霉的生长繁殖过程, 见图 1。

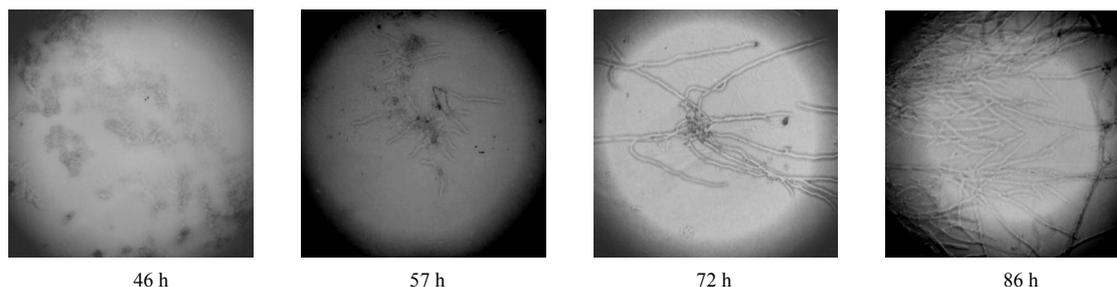


图 1 肉桂醛作用不同时间对烟曲霉生长的影响

Fig. 1 *A. fumigatus* growth after treatment with cinnamaldehyde in different time

### 2.2 对烟曲霉细胞壁 FKS 基因表达的影响

**2.2.1 菌丝体的制备** 给药组无菌蔡氏液体培养基 (200 mL) 中加入肉桂醛, 使药物质量浓度为 0.025  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 再分别向给药组及对照组的培养基中加入  $1 \times 10^6/\text{mL}$  烟曲霉孢子悬液 2 mL, 26.5  $^\circ\text{C}$  静置培养, 于培养第 3、6、7 天同一时间点收集给药组及对照组的菌丝体。

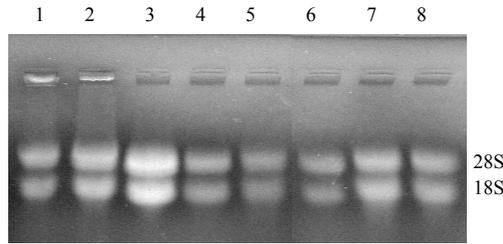
**2.2.2 烟曲霉总 RNA 纯度的测定** 烟曲霉总 RNA 的提取采用异硫氰酸胍改进法<sup>[6]</sup>。取 RNA 样品 5  $\mu\text{L}$  置微量比色皿, 加入 RNase-free 水 95  $\mu\text{L}$ , 以 RNase-free 水作对照, 分别在 230、260、280 nm 处测定样品的吸光度 ( $A$ ) 值。通过计算  $A_{260}/A_{280}$ 、 $A_{260}/A_{230}$  确定总 RNA 纯度。凝胶电泳结果显示, 各个泳道 28S rRNA 和 18S rRNA 两条带基本清晰,

28S rRNA 条带的亮度约为 18S rRNA 条带的 2 倍, 表明总 RNA 分子完整、无降解, 见图 2。

用药前后烟曲霉总 RNA 的纯度测定结果显示, 样品的  $A_{260}/A_{280}$  为 1.8~2.0, 说明样品无蛋白质污染, 无抽提液成分残留;  $A_{260}/A_{230} > 2.0$  说明无小分子或盐等杂质干扰存在。

**2.2.3 cDNA 合成** 按 TaKaRa RNA PCR(AMV)试剂盒使用说明进行操作。引物选择 Oligo-dT-Adaptor Primer, 反应总体积为 20  $\mu\text{L}$ 。

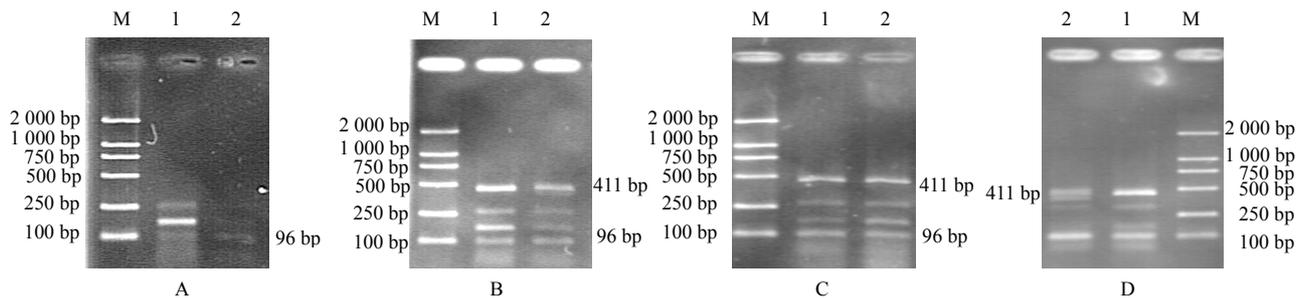
**2.2.4 目的基因扩增方法** 以  $\beta$ -tublin 基因作为内参, 向每一 PCR 反应管中分别加入  $\beta$ -tublin 基因及 FKS 基因的引物进行 PCR, 实验重复 3 次。PCR 扩增程序: 94  $^\circ\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^\circ\text{C}$  变性 30 s, 59  $^\circ\text{C}$  退火 30 s, 72  $^\circ\text{C}$  延伸 60 s, 共 35 个循环; 72  $^\circ\text{C}$  延



1-作用 7 d 2-作用 6 d 3-作用 4 d 4-作用 3 d 5~8-对照组烟曲霉分别培养 7、6、4、3 d

1-treated 7 d 2- treated 6 d 3- treated 4 d 4- treated 3 d 5-8-*A. fumigatus* in control group cultured for 7, 6, 4, and 3 d respectively

图 2 肉桂醛作用前后烟曲霉总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图  
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of total RNA from *A. fumigatus* treated by cinnamaldehyde



A-作用 3 d 后的  $\beta$ -tublin 基因 B-作用 7 d 后的 FKS 基因 C-作用 6 d 后的 FKS 基因 D-作用 3 d 后的 FKS 基因 M-marker DL2000 1-对照组 2-肉桂醛组

A- $\beta$ -tublin gene after 3-day treatment B-FKS gene after 6-day treatment C-FKS gene after 7-day treatment D-FKS gene after 3-day treatment M-marker DL2000 1-control group 2- cinnamaldehyde group

图 3 肉桂醛作用不同时间后烟曲霉基因 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products for FKS gene of *A. fumigatus* treated by cinnamaldehyde for different time

显著性 ( $P < 0.01$ ), 表明肉桂醛 0.025  $\mu\text{g/mL}$  可显著抑制烟曲霉 FKS 基因的转录; 作用 6、7 d, 给药组 FKS 基因的 mRNA 表达量虽降低, 但与对照组比较差异无显著性, 推测可能与肉桂醛的挥发性性质有关。结果见表 1。

### 3 讨论

烟曲霉细胞壁葡聚糖合成的关键酶是  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖合成酶复合体, 由催化亚基 Fksp 和调节亚基 Rhop 组成, 其中的 Fksp 以 UDP 葡萄糖为底物合成  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖,  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖的编码基因 FKS 是烟曲霉生存和细胞壁  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖合成的必需基因<sup>[7]</sup>。Beauvais 等<sup>[8]</sup>克隆了烟曲霉 FKS 及 RHO 基因, 序列分析显示 FKS 编码的跨膜蛋白 Fksp 与酵母和构巢曲霉的 Fks 蛋白高度同源。

目前已有很多技术用于检测细胞基因表达, 包括原位杂交、RNA 印迹法、RT-PCR、核糖核酸

伸 10 min。目的基因 PCR 优化退火温度为 59.0 $^{\circ}\text{C}$ 。  
2.2.5 PCR 产物的半定量 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳。电泳条件: 120 mV, 33 min。电泳后凝胶于溴化乙锭溶液中染色 5~10 min, 条带直接经凝胶图像分析系统进行灰度扫描。 $\beta$ -tublin 作为内参以监控 RNA 使用量, 消除不同样品之间的误差。以目的条带的积分密度值与同时扩增的  $\beta$ -tublin 条带的积分密度值的比值进行半定量分析。 $t$  检验法进行组间比较。结果见图 3

由电泳图谱可知, 扩增条带与预先设计的一致。条带经凝胶图像分析系统进行灰度扫描, 结果显示以肉桂醛 0.025  $\mu\text{g/mL}$  作用 3 d, 烟曲霉 FKS 基因的 mRNA 表达量降低, 与对照组比较差异具有非常

表 1 肉桂醛对烟曲霉 FKS mRNA 表达的影响

Table 1 Effect of cinnamaldehyde on FKS mRNA expressions of *A. fumigatus*

组别	FKS/ $\beta$ -tublin		
	作用 3 d	作用 6 d	作用 7 d
对照	1.654 $\pm$ 0.050	2.746 $\pm$ 0.981	1.749 $\pm$ 0.511
肉桂醛	0.852 $\pm$ 0.020**	1.134 $\pm$ 0.531	0.677 $\pm$ 0.297

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group

酶保护分析等, 其中 RT-PCR 的敏感性最强, 应用最广泛。本实验采用基因内跨内含子的引物, 验证无内源性 DNA 污染; 采用内源参比基因进行 PCR 定量可消除不同样本间的操作差异, 结果更具有可比性。采用 RT-PCR 技术检测了经肉桂醛作用后, 烟曲霉细胞壁主要多糖合成的关键基因 FKS mRNA 的表达情况, 结果显示肉桂醛可显著抑制烟

曲霉 FKS 基因的转录。由于 FKS 基因转录产物的减少, 致使 FKS 基因的表达产物  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖合成酶减少, 从而导致细胞壁  $\beta$ -(1,3)-D-葡聚糖合成的减少, 使烟曲霉失去完整的细胞壁骨架, 细胞壁功能受损, 细胞无法维持正常的形态和功能, 从而发挥药物的抗真菌作用。

#### 参考文献

- [1] Warnock D W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections [J]. *Med Mycol*, 2007, 48(1): 1-12.
- [2] 谢小梅, 龙 凯, 方建茹. 肉桂醛和柠檬醛对烟曲霉细胞膜中麦角甾醇生物合成的影响 [J]. *中草药*, 2006, 37(4): 530-532.
- [3] 谢小梅, 龙 凯, 许 杨, 等. 肉桂醛和柠檬醛对黄曲霉及烟曲霉细胞膜 DNA 与 RNA 的影响 [J]. *中草药*, 2006, 36(4): 558-560.
- [4] 谢小梅, 张文平, 付颖瑗, 等. 肉桂醛与柠檬醛抗烟曲霉作用机制研究 [J]. *中草药*, 2004, 35(4): 430-432.
- [5] 谢小梅, 许 杨. 微量液基稀释法测定中药活性成分的体外抗曲霉菌活性 [J]. *微生物学通报*, 2003, 30(6): 89-92.
- [6] 方建茹, 谢小梅. 改进异硫氰酸/酚/氯仿一步法制备烟曲霉总 RNA [J]. *江西中医学院学报*, 2005, 17(3): 67-68.
- [7] Firon A, Beauvais A, Latgé J P, *et al*. Characterization of essential genes by parasexual genetics in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: Impact of genomic rearrangements associated with electroporation of DNA [J]. *Genetics*, 2002, 161(3): 1077-1087.
- [8] Beauvais A, Bruneau J M. Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus* [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183(7): 2273-2279.

### 欢迎订阅 *Chinese Herbal Medicines* (CHM, 中草药英文版)

我国第一份中药专业的英文期刊——*Chinese Herbal Medicines* (CHM, 中草药英文版) 经国家新闻出版总署(新出综合[2008]1343号文件)批准, 国内统一连续出版号为: CN12—1410/R, 已于 2009 年 10 月正式创刊。

CHM 由天津药物研究院和中国医学科学院药用植物研究所主办, 天津中草药杂志社出版。中国工程院院士、中国医学科学院药用植物研究所名誉所长肖培根教授担任主编; 中国工程院院士、天津药物研究院刘昌孝研究员, 天津药物研究院院长汤立达研究员, 中国医学科学院药用植物研究所所长陈士林研究员共同担任副主编; 天津药物研究院医药信息中心主任、《中草药》杂志执行主编陈常青研究员担任编辑部主任。

**办刊宗旨** 以高起点、国际化为特点, 继承和发扬祖国医药学遗产, 报道和反映中草药研究最新进展, 宣扬我国中草药的传统特色, 加强与世界各国在传统药物研究的经验交流, 在中医和西医、传统与现代、东方与西方之间架起一座理解和沟通的桥梁, 促进中药现代化、国际化。

**主要栏目** 综述与述评、论著、简报、文摘、信息和国际动态、人物介绍、来信、书评等栏目。

**读者对象** 国内外从事中医药研究、管理、监督、检验和临床的专业技术人员。

CHM 邀请相关领域的院士和国内外知名专家加盟, 组建一支国际化、高水平、精干的编委会队伍(第一届编辑委员会由 49 位专家组成, 其中院士 10 名, 国外编委 19 名)。吸引国内外高质量的稿件, 提高期刊的学术质量; 坚持按照国际标准编排, 加强刊物规范化和标准化, 充分利用计算机、网络技术和英语, 加强与国际知名科技期刊的交流合作; 充分发挥中医药特色, 争取在较短时间内进入国际最著名的检索系统——美国科学引文索引(SCI), 把 CHM 办成国际知名期刊之一。

欢迎广大作者踊跃投稿! 欢迎广大读者积极订阅!

#### *Chinese Herbal Medicines* 编辑部

##### 天津编辑部

地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号

邮编: 300193

E-mail: chm@tiprpress.com

Tel: (022)27474913

Fax: (022)23006821

Website: www.tiprpress.com

##### 北京编辑部

地址: 北京市海淀区马连洼北路 151 号

邮编: 100193

E-mail: bjchm@tiprpress.com

Tel: (010)57833035

Fax: (010)57833035

Website: www.tiprpress.com