

肉桂醛与柠檬醛抗曲霉菌作用机制的研究

谢小梅¹, 张文平², 付颖瑗², 许 杨^{1*}

(1. 南昌大学中德联合研究院 教育部食品科学重点实验室, 江西 南昌 330047; 2. 江西医学院, 江西 南昌 330006)

曲霉菌是深部真菌感染的常见病原菌。由于真菌对现有临床使用药物具有抗药性以及药物存在不良反应, 人们一直在寻找高效低毒的抗真菌药物。中药副作用小, 来源广, 价格低廉, 较少出现耐药等, 使研究开发抗真菌中药具备良好前景。目前对中药的抗真菌作用研究大多停留在从中药中分离抗真菌活性成分, 对其机制较少涉及, 特别是抗曲霉菌作用机制报道甚少。本研究采用扫描电镜及同位素标记技术, 探讨具有良好抗曲霉菌作用的中药活性成分肉桂醛与柠檬醛的抗真菌机制, 为开发和研制更理想的抗真菌药物提供有益的线索和理论依据。

1 材料

1.1 实验菌株: 烟曲霉菌 (CCCCM ID A 1)、黄曲霉菌 (CCCCM ID A 2) 标准株, 购自中国医学科学院皮肤病研究所真菌室中国医学真菌中心 (南京)。

1.2 药物与试剂: 肉桂醛 (cinnamaldehyde) 购自上海双喜香料制剂厂 (批号 20020401), 柠檬醛 (citral) 德国进口 (批号 002489 S20085632)。同位素标记前体 (甲基-³H) 胸腺嘧啶核苷 (³H-TdR, 浓度: 3.7×10^7 Bq/mL, 放射性活度: 1.11×10^{12} Bq/mmol), L-³H 尿嘧啶核苷 (³H-UdR, 浓度: 3.7×10^7 Bq/mL, 放射性活度: 6.66×10^{11} Bq/mmol), L-(4, 5-³H) 亮氨酸 (浓度: 1.85×10^7 Bq/mL, 放射性活度: 2.22×10^{12} Bq/mmol), 由中国科学院上海核技术开发公司提供。蔡氏培养液^[1]。其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器: 真菌培养箱, 紫外分光光度计, 酶标仪, ZT—II 型多头细胞样品收集器, FJ—2101G 双道液体闪烁计数器, S—570 型日立扫描电镜等。

2 方法

2.1 菌液制备: 将菌株接种于蔡氏斜面, 26℃ 培养至快速生长早期, 活化 2 次, 此时菌苔覆盖斜面, 加入蔡氏培养液, 吸管吹打菌落使孢子游离于培养液中, 用 5 层纱布滤过, 滤液经血细胞计数板计数及紫外分光光度计测定, 调整孢子浓度为 1×10^6 /mL。

2.2 最低抑菌浓度 (MIC) 测定: 参照文献^[2]用微

量液基稀释法分别测定肉桂醛和柠檬醛对黄曲霉菌、烟曲霉菌的 MIC。

2.3 扫描电镜标本的制备: 分别用 $1/2$ MIC, $1/4$ MIC, $1/8$ MIC 的肉桂醛和柠檬醛作用于快速生长期菌, 于作用后第 4 天取标本, 若是液体培养则滤过菌丝并用生理盐水冲洗; 若是固体培养则取 1 cm^3 琼脂块。将标本浸入 3% 戊二醛中, 4℃ 固定至少 2 h, 丙酮逐级脱水, 醋酸异戊脂置换, 临界点干燥, 金属镀膜置扫描电镜下观察。

2.4 同位素前体掺入实验^[3]: 以 ³H-TdR, ³H-UdR, ³H-亮氨酸分别作掺入前体进行同位素掺入实验。分别以 $1/2$ MIC, MIC, 2 MIC 肉桂醛和柠檬醛作用于快速生长期的黄曲霉菌、烟曲霉菌, 测定两者对黄曲霉菌、烟曲霉菌 DNA、RNA、蛋白质生物合成的影响。在经氯仿和紫外线照射灭菌的 96 孔平底细胞培养板中依次加入含不同浓度药物的蔡氏培养液 180.0 μL (对照组不加药物, 用生理盐水代替)、2.1 项制备的菌液 2.0 μL 及 20 μL 同位素前体物质 (终浓度分别为: ³H-TdR 为 1.11×10^5 Bq/mL, ³H-UdR 和 ³H-亮氨酸 1.85×10^4 Bq/mL), 26.5℃ 静置培养 48 h。培养液用 49 型玻璃纤维滤纸在多头细胞收集仪收获, 80℃ 干燥 2 h。将收获培养液的 49 型玻璃纤维滤纸置于液体闪烁瓶中, 加闪烁液浸泡过夜。次日, 闪烁瓶置于 β 液体闪烁计数仪中检测, 计数每分钟脉冲数 (cpm)。

2.5 实验设计及统计学处理: 同位素掺入实验分别设 3 个不同浓度药物组和一个生理盐水对照组, 每组设 6 个平行孔。实验结果 cpm 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并计算各种同位素掺入抑制率。实验重复 3 次。

$$\text{掺入抑制率} = \frac{\text{对照组 cpm} - \text{试验组 cpm}}{\text{对照组 cpm}} \times 100\%$$

3 结果

3.1 MIC 测定: 肉桂醛对黄曲霉菌、烟曲霉菌的 MIC 分别为 0.100, 0.050 $\mu\text{g/mL}$; 柠檬醛对黄曲霉菌、烟曲霉菌的 MIC 分别为 2.600, 0.650 $\mu\text{g/mL}$ 。

收稿日期: 2003-08-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30160099)

作者简介: 谢小梅 (1964—), 女, 博士研究生, 教授, 研究方向为中药与微生物。Tel: (0791) 8181400 E-mail: 1990xxm@sohu.com

参考郑玮清等^[4]方法,判定肉桂醛和柠檬醛有良好的体外抗曲霉菌活性。

3.2 扫描电镜观察: 用药前黄曲霉菌菌丝饱满,舒展; 分生孢子梗壁极粗糙, 表面遍布颗粒状突起; 分生孢子形态大小均匀, 表面粗糙。用药后菌丝扭曲, 欲折; 分生孢子梗萎缩, 表面光滑; 分生孢子形态不

一, 表面变平坦并有黏连趋势。液体培养鲜有分生孢子头。用药前烟曲霉菌菌丝柔软, 饱满; 分生孢子梗壁光滑; 分生孢子形态大小均一, 表面有颗粒状突起或细刺。用药后菌丝扭曲, 折断; 分生孢子梗萎缩; 分生孢子形态不一, 皱缩, 表面变平坦 (图略)。

3.3 同位素前体掺入实验结果: 见表 1, 2。

表 1 肉桂醛和柠檬醛对烟曲霉菌生物合成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effects of cinnamaldehyde and citral on biosynthesis of *Aspergillus fumigatus* ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组 别	药物浓度	³ H-TdR		³ H-U dR		³ H-亮氨酸	
		cpm	抑制率/%	cpm	抑制率/%	cpm	抑制率/%
对照	-	1 838 ± 142	-	8 778 ± 729	-	6 950 ± 618	-
柠檬醛	2 M IC	115 ± 23* * #	93.7	133 ± 53* *	98.5	263 ± 112* * #	96.1
	M IC	196 ± 22* *	78.4	238 ± 75*	97.3	1 566 ± 739* *	77.5
	1/2 M IC	983 ± 80* * #	46.5	3 845 ± 748* * #	56.1	4 338 ± 476* * #	37.6
肉桂醛	2 M IC	163 ± 59* * #	91.3	183 ± 101* *	97.9	165 ± 65* * #	97.6
	M IC	315 ± 99* *	82.9	383 ± 165* *	95.6	1 228 ± 103* *	82.3
	1/2 M IC	962 ± 210* * #	47.4	3 837 ± 480* * #	56.3	3 577 ± 516* * #	48.5

与对照组比较: * * $P < 0.01$; 与自身 M IC 剂量组比较: # # $P < 0.01$

* * $P < 0.01$ vs control group; # # $P < 0.01$ vs M IC dosage in the same group

表 2 肉桂醛和柠檬醛对黄曲霉菌生物合成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effects of cinnamaldehyde and citral on biosynthesis of *Aspergillus flavus* ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组 别	药物浓度	³ H-TdR		³ H-U dR		³ H-亮氨酸	
		cpm	抑制率/%	cpm	抑制率/%	cpm	抑制率/%
对照	-	1 658 ± 102	-	7 897 ± 777	-	6 088 ± 527	-
柠檬醛	2 M IC	157 ± 24* * #	90.5	173 ± 26* *	97.8	113 ± 32* * #	98.1
	M IC	341 ± 108* *	79.4	221 ± 91* *	97.2	1 350 ± 189* *	77.8
	1/2 M IC	1 143 ± 121* * #	31.0	4 586 ± 416* * #	41.9	4 117 ± 652* * #	32.3
肉桂醛	2 M IC	112 ± 13* * #	93.2	168 ± 57* *	97.9	203 ± 59* * #	96.7
	M IC	368 ± 64* *	77.8	502 ± 90* *	93.6	1 333 ± 170* *	78.0
	1/2 M IC	1 090 ± 141* * #	34.2	4 591 ± 719* * #	42.0	3 643 ± 471* * #	40.1

与对照组比较: * * $P < 0.01$; 与自身 M IC 剂量组比较: # # $P < 0.01$

* * $P < 0.01$ vs control group; # # $P < 0.01$ vs M IC dosage in the same group

4 讨论

肉桂醛和柠檬醛分别是肉桂、山苍子的主要活性成分, 研究表明它们具有良好的广谱抗真菌作用^[5], 本实验首次应用同位素标记法结合扫描电镜研究它们的抗曲霉菌作用机制。扫描电镜观察发现, 经药物作用后的曲霉菌形态发生一系列变化, 说明药物可能破坏细胞壁、细胞膜结构^[6], 并抑制分生孢子的形成。一旦胞壁、胞膜被破坏, 真菌细胞就不能维持细胞固有形态, 胞内外物质交换受阻, 结合于胞膜上的各种酶不能正常发挥作用, 导致菌细胞对营养物质吸收降低、生物大分子合成受阻^[7]。结合同位素标记掺入实验结果也证实了这一点。TdR、U dR 和亮氨酸分别作为 DNA、RNA、蛋白质生物合成的前体物质, 以其同位素标记物进行同位素掺入实验, 可充分反映真菌生物大分子的合成代谢情况。将同位素掺入实验应用于中药活性成分的抗曲霉菌作用

机制研究尚属首次。掺入实验结果表明: 肉桂醛和柠檬醛对 3 种标记前体的掺入均具有显著的抑制作用 ($P < 0.01$), 且随药物浓度的升高对标记前体掺入抑制率也升高。当药物浓度为 M IC 时, 3 种标记前体物中, 对 ³H-U dR 的掺入抑制率最高, 达 90% 以上, 对 ³H-TdR 和 ³H-亮氨酸的掺入抑制率在 77% ~ 83%。上述结果提示肉桂醛和柠檬醛的抗菌机制可能是通过影响曲霉菌的 DNA、RNA 和蛋白质的合成而表现抗菌效应。该结果与文献报道相一致^[7,8], 但由于蛋白质和核酸为生物细胞的共有成分, 且各种真菌在结构和化学组成方面仍有较大差异, 因此认为肉桂醛和柠檬醛强大的抗曲霉菌作用可能存在其他更广泛的抗菌作用机制。

References

- [1] Chen S P. *Fungal Infection* (真菌感染学) [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Publishing House, 2000.
- [2] Xie X M, Xu Y, Fu Y Y. *In vitro* anti-*Aspergillus* activity study of active ingredients of Chinese herbs by broth microdilution

- lution testing [J]. *Microbiol* (微生物学通报), 2003, 30(6): 89-92.
- [3] Federica M, Franca R, Stephen P, *et al*. A spirochlorine: a highly selective and potent inhibitor of fungal protein synthesis [J]. *Antibiot*, 1999, 52(3): 311-318.
- [4] Zheng W Q, Wang W L, Li R Y, *et al*. Study of antifungal susceptibility of six drugs against *Aspergilli* by broth microdilution [J]. *Chin J Med Lab Sci* (中华医学检验杂志), 1999, 22(6): 377-378.
- [5] Zhou Y, Tao J D, Zhang J J. Study on antifungal role by *L. istea Cubeba* and its primary component—the citral [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1984, 4(9): 558-559.
- [6] Zhang W J. Ultra structure observation of *Aspergillus flavus* and anti-*A. flavus* effect of cinnamaldehyde [J]. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报), 1995, 27(5): 374.
- [7] Luo M, Jiang L K, Wu Z J. Preliminary study on citral impairs the *Aspergillus flavus* membrane [J]. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2001, 41(6): 723-729.
- [8] Xia Z D, Yang J X, Li P T. Study of antifungal mechanism of *L. istea Cubeba* oil in *Candida albicans* [J]. *Bull Hunan Med Univ* (湖南医科大学学报), 1995, 20(2): 107-108.

银杏叶提取物新配方对大鼠高脂血症形成的影响

魏建明¹, 顾振纶², 谢梅林²

(1. 复旦大学附属金山医院 心内科, 上海 200540; 2. 苏州大学医学院 药理教研室, 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007)

血脂异常在动脉粥样硬化 (AS) 的发生发展及其引起的心血管疾病中起着非常重要的作用, 高脂血症与 AS、冠心病 (CHD) 的关系密切, 降低血脂能够预防心血管疾病的发生, 从而降低死亡率^[1]。因此, 采用降脂疗法防治 AS 及 CHD 的研究受到医药工作者的广泛关注。银杏叶提取物新配方 (GBENP) 是由银杏总黄酮和银杏内酯组成的制剂。本实验拟对 GBENP 预防高脂血症形成进行研究。

1 材料

1.1 受试药物: 银杏叶提取物新配方 (GBENP) 为棕黄色粉剂, 含银杏总黄酮 50%, 银杏内酯 25%, 批号 20009020, 由上海理工大学张立国教授提供。力平脂 (Lipanthyl): 200 mg/粒, 法国科尼大药厂产品, 进口许可证号 X970304, 批号 298702/98。

1.2 试剂与仪器: 胆固醇, 南京生物化学制药厂产品。猪油, 市售自制。3 号胆盐, 进口分装品 (Oxoid), 批号 F990702。甲基硫氧嘧啶, 国营武进县制药厂产品, 批号 990615。聚山梨酯 80, 宜兴市亚盛化工厂, 批号 990920。丙二醇, 中国上海星联化工厂, 批号 000025。血清总胆固醇 (TC), 甘油三酯 (TG) 和高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-c) 测定试剂盒, 均由温州东瓯生物工程公司提供, 批号分别为 200046029, 200038001 和 200032008。apoA I 和 apoB 测定试剂盒, 由上海玉兰生物技术研究所提供, 批号 20A ug00。721 型分光光度计和 752C 型紫外分光光度计, 均为上海第三分析仪器厂产品。高速台式离心机 (TGL-16G) 上海医用分析仪器厂制造。

1.3 实验动物: SD 大鼠 60 只, 雄性, 体重 (179 ±

11) g, 苏州大学医学院实验动物中心提供, 合格证: 苏州 (环) 98008, 苏动 (质) 98018。

2 方法

2.1 高脂大鼠模型制备^[2]和分组: 取雄性大鼠 60 只, 实验室适应性饲养一周后, 随机分成 6 组, 每组 10 只: 正常对照组、高脂模型组、力平脂组 (25 mg/kg)、GBENP 小、中、大剂量组 (20, 40, 80 mg/kg)。各组均以 10 mL/kg 体积于每天上午 9:00~10:00 给药。正常对照组和高脂模型组给予等体积的蒸馏水。除正常对照组外, 其余各组大鼠于每天下午同时以 10 mL/kg 体积 ig 脂肪乳剂 (内含胆固醇 8%, 猪油 15%, 3 号胆盐 2%, 甲基硫氧嘧啶 0.2%, 丙二醇 20%, 聚山梨酯 80 16%), 连续 28 d, 实验第 29 天, 各组大鼠在禁食 15 h 后用戊巴比妥钠 45 mg/kg ip 麻醉, 由腹主动脉取血, 分离血清后分别测定血清 TC、TG 和 HDL-c, apoA I, apoB, 计算 LDL-c (LDL-c = TC - 1/2.2 TG - HDL-c); 同时取大鼠肝脏, 10% 甲醛溶液固定后进行病理检查, 观察肝脏脂肪变性程度: “-”表示肝细胞内无或偶见脂肪空泡; “+”表示部分肝细胞内见脂肪小空泡; “++”表示弥漫性肝细胞内见散在脂肪小空泡; “+++”表示弥漫性肝细胞内充满脂肪小空泡。

2.2 血清脂质测定: 按试剂盒方法测定, 血清 TC 用胆固醇氧化酶-PA P 法测定, TG 采用磷酸甘油氧化酶-PA P 法测定, HDL-c 采用磷钨酸镁 (PTA-Mg²⁺) 沉淀法测定, apoA I 和 apoB 采用免疫比浊法测定。

2.3 数据处理: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验。