

肉桂醛和柠檬醛对黄曲霉及烟曲霉细胞 DNA 与 RNA 的影响

谢小梅¹, 龙 凯², 许 杨¹, 方建茹²

(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. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 研究肉桂醛、柠檬醛对黄曲霉和烟曲霉细胞 DNA、RNA 水平的影响, 以期阐明其抗真菌的作用机制。方法 黄曲霉、烟曲霉接种在含有不同浓度药物的蔡氏固体培养基中, 同时设不加药物为空白对照, 置 26.5 °C 恒温培养 3~6 d, 将对照组和用药组真菌细胞进行激光扫描共聚焦显微镜观察并作细胞扫描图像分析, 以对 DNA、RNA 进行定量和定位观察。结果 用药组 DNA、RNA 水平发生不同变化, 出现多核分生孢子。结论 肉桂醛、柠檬醛直接或间接影响了真菌细胞遗传物质的正常合成, 以至不能完成正常细胞周期, 影响分生孢子梗的正常分化, 从而抑制真菌生长、繁殖。

关键词:肉桂醛; 柠檬醛; 黄曲霉; 烟曲霉; DNA; RNA; 激光扫描共聚焦显微镜

中图分类号:R286.85

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)04-0558-03

Effect of cinnamaldehyde and citral on DNA and RNA in *Aspergillus flavus* and *A. fumigatus* cells

XIE Xiao-mei¹, LONG Kai², XU Yang¹, FANG Jian-ru²

(1. The Key Laboratory of Food Science of MOE, Jiangxi-OAI Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of cinnamaldehyde and citral on DNA and RNA of *Aspergillus flavus* and *A. fumigatus* cells and their mechanisms. **Methods** *A. flavus* and *A. fumigatus* were incubated on Czapek's agar plate (treated with cinnamaldehyde and citral at different concentrations) at 26.5 °C for 3—6 d. The normal and treated cells were observed by laser scanning confocal microscope (LSCM) and image analysis to describe the DNA and RNA levels by quantity and localization. **Results** DNA and RNA levels were changed greatly and multinucleate coniospores appeared in the treated cells. **Conclusion** Cinnamaldehyde and citral have directly or indirectly interfered the conventional synthesis of fungal hereditary DNA and RNA and normal differentiation of conidiophore in *A. flavus* and *A. fumigatus*, thus inhibiting the normal cell cycle and the growth and propagation of fungi.

Key words: cinnamaldehyde; citral; *Aspergillus flavus* Link; *A. fumigatus* Fres.; DNA; RNA; laser scanning confocal microscope (LSCM)

深部曲霉菌感染已成为免疫功能低下患者的主要死亡原因, 抗生素及化学合成药物的疗效不满意。肉桂醛、柠檬醛有良好的抗曲霉菌作用^[1], 探讨它们的抗曲霉菌机制对开发和研制新型抗真菌药物有重要的理论和实践意义。本实验利用激光扫描共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscope, LSCM), 获取了吖啶橙 (acridine orange, AO) 染色后的单细胞或细胞群的 DNA、RNA 等细胞特异结构的清晰荧光图像; 并结合图像分析仪, 对其图像平均荧光强度进行自动测定。细胞群体经染色后, 由于每个细胞结合的染料与 DNA、RNA 水平成正比, 所以每个细胞受激发射的特异性荧光强度与它的 DNA、RNA 水平成正比。因此将 LSCM 与图

像分析相结合可对细胞进行 DNA、RNA 的定量、定位分析。本实验首次将 LSCM 用于研究肉桂醛、柠檬醛对曲霉菌细胞 DNA、RNA 水平的影响, 以期发现药物作用的靶点, 为进一步探索肉桂醛和柠檬醛抗曲霉菌机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株: 均为标准株, 烟曲霉菌 (CCCCMID A1)、黄曲霉菌 (CCCCMID A2), 购自中国医学真菌中心 (南京)。

1.2 药物与试剂: 肉桂醛 (cinnamaldehyde) 购自上海双喜香料制剂厂, 纯度 > 95%, 批号 20020401; 柠檬醛 (citral) 德国进口, 纯度 > 98%, 批号 002489 S20085632; 酮康唑 (每片 200 mg, 批号 030418108)

收稿日期: 2004-07-29

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, 教授, 研究方向为中药与微生物。Tel: (0791) 7118937 E-mail: 1990xxm@sohu.com

为西安杨森制药有限公司生产;蔡氏培养液^[2];吖啶橙 (Sigma 公司);其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器:MRC—1024 型激光扫描共聚焦显微镜,共聚焦系统由 Bio-Rad 公司提供的软件控制,配置 Zeiss 显微镜。真菌培养箱,紫外分光光度计。

1.4 方法

1.4.1 菌液的制备:将试验菌株接种于蔡氏斜面,26℃ 培养至快速生长早期,活化 2 次,此时菌落覆盖斜面,加入蔡氏液体,用吸管吹打菌落使孢子游离于培养液中,用 500 目无菌尼龙网滤过,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。

1.4.2 药液的制备^[1,3]:将研成细粉的酮康唑溶于二甲基亚砜,使其质量浓度为 40 mg/mL。于无菌、直径为 15 cm 的平皿内分别加入柠檬醛 9.16、6.11 μ L,肉桂醛 6.36、7.62 μ L,酮康唑 4、50 μ L,将冷却至 50℃ 左右的蔡氏固体培养基 50 mL 迅速倒入上述平皿内,混匀(药物终质量浓度分别为:柠檬醛 0.16、0.11 μ g/mL;肉桂醛 0.13、0.16 μ g/mL;酮康唑 3.2、40 μ g/mL),待其凝固。

1.4.3 激光扫描共聚焦显微镜观察:将 1.4.1 制备的菌液接种在 1.4.2 制备的含有不同质量浓度药物的蔡氏固体培养基中(孢子终浓度为 1×10^4 /mL),同时设不加药物为空白对照,置 26.5℃ 恒温培养 3~6 d,PBS 洗脱平皿上的孢子,用 500 目无菌尼龙网滤过,滤液 5 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,用 PBS 将细胞悬起,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL。取细胞悬液 1 mL,加 0.5% AO 20 μ L,30℃ 作用 30 min,5 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,PBS 洗去多余染料(洗涤 4~5 次,至上清液透明),弃去上清液,制成细胞悬液,吸取细胞悬液 1 滴置载玻片上,用激光扫描共聚焦显微镜观察。实验重复 2 次。仪器相关参数为:Kr/Ar 激光器,Laser power 30%,激发光为波长 488 nm 的激光;发射波长检测滤镜为 LP580,522/35;油镜 $\times 40$ 。

1.4.4 细胞扫描图像分析:将 LSCM 获取的荧光图像通过联网送入图像分析仪,每组随机选取不同视野的细胞共计 100 个以上,存图,用图像分析软件进行荧光强度分析。细胞内 DNA 呈绿色荧光, RNA 呈红色荧光,橙黄色荧光为 DNA 和 RNA 双色荧光的结合。

1.4.5 数据处理:荧光强度以荧光像素的 ($\bar{x} \pm s$) 表示, *t* 检验法进行两组间均数的显著性检验。

2 结果

2.1 黄曲霉细胞扫描图像分析:对照组和酮康唑 (3.2 μ g/mL) 处理组黄曲霉细胞核内橙红色荧光分布均匀,核圆形且大小均一;肉桂醛 (0.13 μ g/mL)、柠檬醛 (0.16 μ g/mL) 作用后核内橙红色荧光分布不均匀,以绿色荧光为主,核形态、大小不一,可见多核细胞。对照组和酮康唑 (3.2 μ g/mL) 处理组黄曲霉孢子细胞核绿色荧光分布均匀;肉桂醛 (0.13 μ g/mL)、柠檬醛 (0.16 μ g/mL) 作用后可见多核细胞,肉桂醛作用后绿色荧光增强 ($P < 0.05$),柠檬醛作用后绿色荧光减弱 ($P < 0.05$)。肉桂醛、柠檬醛作用后红色荧光均减弱 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 药物处理后黄曲霉细胞内 DNA 和 RNA 水平 ($n = 2$)

Table 1 DNA and RNA levels in <i>A. flavus</i> cell treated by drugs ($n = 2$)			
组别	终质量浓度/ (μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	DNA (荧光像素)	RNA (荧光像素)
柠檬醛	0.16	163 $\pm$ 40*	34 $\pm$ 7*
肉桂醛	0.13	231 $\pm$ 39*	47 $\pm$ 16*
酮康唑	3.2	202 $\pm$ 58	69 $\pm$ 26
对照	—	199 $\pm$ 40	75 $\pm$ 26

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

2.2 烟曲霉细胞扫描图像分析:对照组烟曲霉细胞核内橙黄色荧光分布均匀,胞质可见较强的红色荧光;肉桂醛 (0.16 μ g/mL) 作用后细胞核内橙黄色荧光明显减弱,核形态、大小不一;柠檬醛 (0.11 μ g/mL)、酮康唑 (40 μ g/mL) 作用后细胞核内橙黄色荧光分布均匀,未见胞质红色荧光。肉桂醛作用后绿色荧光减弱 ($P < 0.05$);柠檬醛、酮康唑作用后绿色荧光增强 ($P < 0.05$)。肉桂醛、柠檬醛、酮康唑作用后红色荧光均减弱 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 药物处理后烟曲霉细胞内 DNA 和 RNA 水平 ($n = 2$)

Table 2 DNA and RNA levels in <i>A. fumigatus</i> cell treated by drugs ($n = 2$)			
组别	终质量浓度/ (μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	DNA (荧光像素)	RNA (荧光像素)
柠檬醛	0.11	204 $\pm$ 31*	59 $\pm$ 10*
肉桂醛	0.16	83 $\pm$ 15*	38 $\pm$ 4*
酮康唑	40	204 $\pm$ 25*	66 $\pm$ 10*
对照	—	165 $\pm$ 42	81 $\pm$ 8

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

3 讨论

肉桂醛、柠檬醛是肉桂、山苍子油的主要成分,两者已分别用于化工、食品、粮食防腐和医疗卫生。实验表明,它们具有良好的抗曲霉菌作用。但对它们的抗曲霉菌机制报道极少。张文娟用透射电镜观察了肉桂醛对黄曲霉的超微结构变化,认为肉桂醛可能通过破坏真菌细胞壁,使药物渗入细胞内,破坏细

胞器而起强大的杀菌作用^[4]。罗曼等对柠檬醛抑制黄曲霉生长的相关机制进行了研究,结果认为柠檬醛可以改变黄曲霉细胞质膜的选择通透性、破坏线粒体结构、与DNA相互作用,使DNA链断裂^[5~7]。

电镜对细胞的分析仅处于细胞形态、结构的描述,无法确定细胞内DNA、RNA水平,而应用分子生物学技术对DNA、RNA分析是以细胞提取物进行研究,已不能反映细胞内DNA、RNA定量和定位的内在联系。激光扫描共聚焦显微镜则可直接对单个细胞的DNA、RNA进行定量和定位观察,本实验首次报道了用激光扫描共聚焦显微镜研究肉桂醛、柠檬醛对烟曲霉、黄曲霉DNA、RNA的影响,结果表明:与阴性对照组相比,肉桂醛、柠檬醛作用黄曲霉后,视野中有大量多核细胞,肉桂醛处理黄曲霉后DNA水平增加,而柠檬醛作用后DNA水平减少;酮康唑作用黄曲霉后,DNA、RNA水平不变;肉桂醛作用烟曲霉后DNA水平减少,而柠檬醛、酮康唑作用后DNA水平增加;药物作用于烟曲霉、黄曲霉后RNA均减少(除酮康唑作用黄曲霉外)。

烟曲霉、黄曲霉归类于半知菌亚门丝孢纲丝孢目丛梗孢科曲霉属。在它们的正常生长繁殖过程中,当分生孢子被接种在适宜培养基上培养一定时间后,孢子萌发产生一短的芽管,芽管以顶端生长方式延长并产生分枝,期间细胞核分裂,核迁移至延长的菌丝内,每隔一定间距形成一横隔,将菌丝分隔成一个个小室。分生孢子梗则从特化了的厚壁而膨大的菌丝细胞垂直生出,其顶部膨大为可孕性的顶囊,顶囊表面产生小梗,单核的分生孢子自小梗顶端以向基式生成法的方式产生^[2,8,9]。构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 基因突变体研究已证明,至少有50多个基因调控着核分裂、核迁移、胞质分裂和横隔形成^[10,11]。本实验中肉桂醛、柠檬醛作用黄曲霉后分生孢子出现多核现象,可能是由于药物影响了黄曲霉分生孢子梗在分化过程中核迁移、胞质分裂和横隔形成的协调进行从而影响黄曲霉的繁殖。肉桂醛处理黄曲霉及柠檬醛处理烟曲霉后DNA水平增加,可能是由于药物直接干扰了DNA的正常合成,使细胞周期在G₂期到M期重复复制。而肉桂醛作用烟曲霉、柠檬醛作用黄曲霉后,其DNA水平明显减少,细胞核模糊不清,说明药物直接作用靶位即便不是DNA,也间接干扰了DNA正常合成或导致细胞周期停滞在G₁期。药物作用后(除酮康唑作用黄曲霉外),烟曲霉、黄曲霉RNA水平均减少,可能是由于药物抑制RNA合成或加速RNA降解,RNA

代谢的异常,最终导致蛋白质代谢异常。罗曼发现柠檬醛作用黄曲霉后,以NADP⁺为辅酶测定苹果酸脱氢酶(MDH)活力降低,推测MDH活力的降低将导致细胞内NADPH还原力的减少,推断还原力的减少抑制四氢叶酸(FH₄)的合成而间接影响核酸合成^[6]。同位素标记试验也表明肉桂醛、柠檬醛作用黄曲霉、烟曲霉后³H-TdR,³H-UdR,³H-亮氨酸的摄入较对照组减少,以³H-UdR减少更明显^[3],这与本实验结果一致。本实验中以酮康唑作阳性对照,其作用靶位是羊毛甾醇14 α -去甲基化酶,该酶是真菌细胞膜必需成分麦角甾醇生物合成过程中的一个关键酶,实验中酮康唑作用黄曲霉后DNA、RNA水平不变,而作用烟曲霉后DNA水平增加、RNA水平减少,说明酮康唑的作用靶位除细胞膜外,也干扰了遗传物质的正常合成^[12]。

本实验结果表明不同药物作用于黄曲霉、烟曲霉,对DNA的影响不一,说明药物结构不同,作用机制不同,不同菌种对药物的反应也不同,也说明中药活性成分抗曲霉菌机制是复杂的、多方面的,本室正在从不同层面研究肉桂醛、柠檬醛的抗曲霉菌作用机制。

References:

- [1] Xie X M, Xu Y, Fu Y Y. *In vitro* anti-aspergilli activity study of active ingredients of Chinese herbs by broth microdilution testing [J]. *Microbiology* (微生物学通报), 2003 (6): 112-115.
- [2] Chen S P. *Fungal Infection* (真菌感染学) [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 2000.
- [3] Xie X M, Zhang W P, Fu Y Y, et al. Study on antifungal mechanism of cinnamaldehyde and citral in *Aspergilli* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(4): 430-432.
- [4] Zhang W J. Ultrastructure 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.
- [5] 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.
- [6] Luo M, Jiang L K. Study on biochemical mechanism of citral damage to the *Aspergillus flavus*'s mitochondria [J]. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2002, 42(2): 226-231.
- [7] Luo M, Huang Y X, Jiang L K, et al. Study on quantitative test on the DNA of damage of *Aspergillus flavus* caused by citral with a comet analysis system [J]. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2002, 42(3): 341-347.
- [8] Xing L J, Li M C. *General Mycology* (普通真菌学) [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999.
- [9] Michelle M, Taylor I. Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation [J]. *Microbiology*, 2002, 13: 110-118.
- [10] Doonan J H. Cell division in *Aspergillus* [J]. *J Cell Sci*, 1992, 103: 599-611.
- [11] Patrick J W, Michelle M. *Aspergillus nidulans* septin AspB plays pre- and postmitotic role in septum, branch, and conidiophore development [J]. *Mol Biol cell*, 2002, 13: 110-118.
- [12] Gan Y, Lü D. The antifungal mechanism of drugs [J]. *World Notes—Antibiotics* (国外医药·抗生素分册), 1998, 19(6): 460-465.