

改进 Propy 法测定柠檬醛损伤黄曲霉质膜中共轭双烯和丙二醛及作用机制研究

罗 曼¹, 蒋立科²

(1. 暨南大学生命科学学院 生物医学工程系, 广东 广州 510632; 2. 安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036)

柠檬醛是从山鸡椒 *Lindera cubeba* (Lour.) Pers. 中蒸馏得到的香精油单体, 具有强烈抑制致肝癌的黄曲霉生长的特性, 作用于黄曲霉孢子和菌丝体细胞后, 能够抑制黄曲霉生长, 破坏质膜, 改变质膜的选择性通透性, 使原生质渗出^[1~3]。不饱和脂肪酸过氧化产生 ESR (electron spin resonance) 信号, 并能产生对 DNA 的损伤, 而饱和脂肪酸则无此信号^[4]。但这些现象只能说明柠檬醛对膜损伤的直接原因, 若要了解内在根源首先必须通过对膜的脂质过氧化的一级产物共轭双烯测定后, 方可确定柠檬醛是否诱发自由基而破坏膜。本实验通过改进 Propy 法测定构成质膜不饱和和脂质成分的共轭双烯和丙二醛变化, 阐明柠檬醛损伤质膜的机制, 为绿色香料在粮油饲料、水产品等防腐保鲜及临床皮肤疾病、白血病等疾病防治上提供参考。

1 材料与方法

以黄曲霉 *Aspergillus flavus* 为实验菌株; 将从山鸡椒蒸馏出的香精油经精馏获得含 96.7% 柠檬醛的精油进行抑菌实验; Bruker 型波谱仪, OFT-2 型荧光光度计, 显微多维分光光度系统装置, Philips 电子显微镜。

2 方法

2.1 共轭双烯的测定^[4,5]: 培养黄曲霉并收集孢子 1.0 g, 然后将收集的黄曲霉孢子分别以梯度浓度柠檬醛(用含 1% 异丁醇的 pH 7.2 PBS 缓冲液配制成柠檬醛质量浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL)对所收集的孢子进行毒化, 3 h 后 3 000 r/min 离心 10 min, 收集孢子, 毒化后的每种孢子样品均分成两份: 一份留作测定共轭双烯, 另一份留作测定丙二醛。将毒化后的黄曲霉孢子用液氮破碎, 并用 5 mL PBS 缓冲液分二次转移至试管中, 加入 5 mL 0.5% PBS 摇匀, 测定共轭双烯的量。

2.2 丙二醛的测定: 将收集的孢子破碎, 制备提取

液, 加 5 mL 0.5% TBA, 按照试剂盒规定的方法测定 MDA; 同时对样品进行固定、制片、电镜观察。

2.3 数据处理: 所测定结果用 $\bar{x} \pm x$ 表示, 最后进行方差分析。

2.4 膜损伤的测定^[6]: 采用细胞波动分解模型法在多维显微、分光光度系统上测定。

3 结果与讨论

3.1 黄曲霉孢子中共轭双烯的测定结果: 黄曲霉孢子经不同质量浓度柠檬醛毒化后, 双键双烯的量的测定结果见表 1。结果表明, 与对照组相比, 不同质量浓度的柠檬醛在同一时间毒化, 黄曲霉孢子内共轭双烯的量均有变化, 并与柠檬醛的质量浓度呈对应关系, 即柠檬醛毒化质量浓度越高, 共轭双烯的量越高, 说明这种损伤所引起脂质过氧化物增多, 若不及时进行消除, 即殃及孢子内大分子拥挤环境的改变, 导致膜的损伤, 如细胞壁破裂、成片脱落、结构疏松(图 1、2)和线粒体的增生融合(图 3)。

表 1 柠檬醛损伤黄曲霉孢子内的共轭双烯

Table 1 Conjugated dienes *A. flavus* spores damaged by different consistence citral

分组	共轭双烯/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	分组	共轭双烯/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
0.0	0.550 $\pm$ 0.007	1.5	6.590 $\pm$ 0.002*
0.5	0.559 $\pm$ 0.013*	2.0	0.617 $\pm$ 0.013*
1.0	6.572 $\pm$ 0.016*		

与对照组比较: * $P < 0.01$

* $P < 0.01$ vs control group



对照组 10 mg/ml 20 mg/ml 30 mg/ml 50 mg/ml

图 1 显微镜下柠檬醛对黄曲霉孢子表面结构的影响

Fig. 1 Effects of citral on surface structure of *A. flavus* spores under microscope

3.2 黄曲霉孢子中 MDA 的测定: 通过柠檬醛毒化

收稿日期: 2006-12-21

基金项目: 国家发改委、农业部中试项目(农计函[2004]514)

作者简介: 罗 曼, 教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向为生物物理化学。Tel: (020) 85220469 E-mail: txiong@jnu.edu.cn

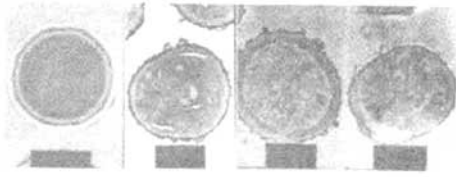


图 2 透射电镜下柠檬醛对黄曲霉孢子超微结构影响
Fig. 2 Ultrastructure of *A. flavus* spores under TEM



图 3 扫描电镜下柠檬醛引起黄曲霉细胞线粒体增生
Fig. 3 Mitochondria hyperplasia of *A. flavus*
Induced by citral under TEM

后,在孢子内产生脂质过氧化物 MDA,再经与硫代巴比妥反应,生成红色物质。经测定试验组的 MDA 的量均比对照组要高(表 2),但是试验组胞外液 MDA 的量要比胞内液高出几倍到几十倍,这可能与质膜上无自由基清除系统有关。与对照组相比,试验组脂质过氧化自由基产生量明显增高。清楚地表明了柠檬醛不仅在损伤细胞质膜的跨膜渗入过程中引发了自由基的产生(即不饱和脂肪酸发生过氧化并进入细胞),然后通过多种途径进一步导致新自由基的产生及由之而诱发自由基级联放大效应。与此同时也表明试验组细胞膜损伤的分子机制,是自由基诱发的膜脂质过氧化加剧及线粒体因存在自由基清除系统及因该系统抵御柠檬醛的侵入而增生、融合增强了对自由基清除能力,从而减少胞内自由基量。从另一方面看,MDA 的增加,反映柠檬醛通过对膜上饱和脂肪酸的作用,诱发膜脂饱和脂肪酸产生自由基,不仅损伤膜的结构,改变膜的流动性,而且进入原生质中,引发了胞内与对照组所不同的其他一系列效应。这种效应如线粒体的清除自由基能力的减弱,而所减弱的程度与柠檬醛剂量相关。一旦线粒体对自由基清除能力完全丧失,则该孢子或细胞即死亡。因此,认为柠檬醛是产生脂质过氧化的引发物,很可能与该醛上的反式-CHO 相关。

3.3 弹性膜量发生不可逆增加:弹性膜量表示膜在吸收物质时收缩与伸展的能力。在外界因素影响下,膜量越大表明收缩性与伸展性之间可恢复能力减小,意味着机械强度增大,吸收转运能力减弱,反之下降。膜弹性膜量测定表明实验组与对照组相比,弯曲膜量和剪切膜量分别呈不可逆性提高 2 000 倍和 160 倍。从本实验结果进一步所提示抑菌药物对病原体膜上饱和脂肪酸的作用是首选的目标之

一,或者是靶部位,也提示临床药物的设计,首先考虑的是当药物与细胞作用时,能否对细胞质膜产生作用,如果无任何作用则可通过对使用药物引入能产生过氧化的基团(如- $\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{O}$),使其是否引发一系列的连锁反应,若能使细胞质膜的物理属性发生不可逆的转变,继之失去选择性通透性,从而改变胞内大分子拥挤环境,则该抗菌药物有效。

表 2 黄曲霉受柠檬醛毒化后细胞内外 MDA 量的变化
Table 2 MDA Quality change of internal and external cell by citral contamination

柠檬醛/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	MDA/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	细胞外液	细胞内液
0.0	1.963 2	1.010 8
0.5	28.163 3	1.475 5
1.0	71.807 6	2.023 9
1.5	7.930 0	2.245 4
2.0	10.388 7	2.648 7

综上所述,柠檬醛对黄曲霉孢子萌发、生长的抑制作用是在于该醛诱发了黄曲霉孢子质膜的脂蛋白上饱和脂肪酸过氧化,从而使共轭双键发生重新排列而形成脂质过氧化物的一级产物,释放出 ESR 信号。最终产生诸如小分子的产物丙二醛,该类小分子化合物进入细胞原生质中,能引起细胞多种生理功能的改变,近年通过慧星电泳^[7],定量地研究了该醛对 DNA 的损伤,其机制很可能是柠檬醛引起膜上饱和脂肪酸的邻近共轭双键(亚甲基)形成过氧自由基之故,从而通过改变膜的板状流动性而导致膜的选择性渗透性的丧失或减弱,干扰了正常的新陈代谢,影响孢子的萌发和菌丝体的生长。

References:

- [1] Jiang L K, Tao W P, Zhang J S. A preliminary study on natural antimolsd in storages [J]. *Nat Prod Res Dev*, 1996, 8(4): 105-109.
- [2] Luo M, Jiang L K, Wu Z J. Preliminary study on citral impaired the *Aspergillus flavus* membrane [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2001, 41(6): 724-729.
- [3] Luo M, Jiang L K, Zou G L. Study on physical mechanism of citral damage the *Aspergillus flavus*'s membrane [J]. *J Wuhan Univ Nat* (武汉大学学报:自然科学版), 2002, 48(2): 217-222.
- [4] Luo M, Huang Y X, Jiang L K, et al. Study on morphological change of *Aspergillus flavus* damaged by citral with a multi-channel micro-spectrophotometer system [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2003, 43(3): 400-406.
- [5] Li X J. Effects of *Hedysarum sikkimense* soup on contain of conjugate double alkenes and ingredients od red cells lipids of rats with diabetes [J]. *Med J Liaoning* (辽宁医学), 1999, 13(1): 26-28.
- [6] Strey H, Petersen M, Sackmann E. Measurement of membrane elasticity by Filker Eigenmode decomposition [J]. *J Biophys*, 1995, 69: 478-488.
- [7] Luo M, Jiang L K, Zou G L. The mechanism of loss of germination ability of *Aspergillus flavus* spore with citral [J]. *Chin J Biochem Molec Biol*, 2002, 48(2): 217-222.