

微量抗肿瘤成分^[2]。今后通过对滇重楼多种活性成分之间的合理配伍及对单体皂苷的结构改造,可望得到高效低毒的抗肿瘤新药。

参考文献:

- [1] 武珊珊, 高文远, 段宏泉, 等. 重楼化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(3): 344-347.
- [2] 王羽, 张艳军, 高文远, 等. 滇重楼的活性抗肿瘤成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1425-1428.
- [3] 王艳霞, 李惠芬. 重楼抗肿瘤作用研究 [J]. 中草药, 2005,

36(4): 628-630.

- [4] Jenny Y N, Rose C Y, Suen Y K, et al. Polyphyllin D is a potent apoptosis inducer in drug resistant Hep G2 cells [J]. *Cancer Lett*, 2005, 217: 203-211.
- [5] Lee M S, Judy Chan Y W, Kong S K, et al. Effects of polyphyllin D, a steroidal saponin in *Paris polyphylla*, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4: 1248-1254.
- [6] Jing C, Mingjie L, Zhao W, et al. Apoptosis Induced by Dioscin in Hela Cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(2): 193-196.

柠檬醛对小鼠侵袭性肺曲霉病的作用

罗闯丹¹, 杨芬¹, 施旻¹, 刘金辉², 谢小梅^{1*}

(1. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004;

2. 南昌大学医学院 微生物学教研室, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 研究中药活性成分柠檬醛对实验小鼠侵袭性肺曲霉病 (IPA) 的作用。方法 小鼠随机分成正常组, 正常 + 接种烟曲霉菌组, IPA 模型组, IPA + 不同剂量 (高、中、低 3 个剂量) 柠檬醛给药组及阳性对照组。建立 IPA 模型后, ip 给药不同剂量柠檬醛, 阳性对照组 ig 酮康唑, 连续 7 d, 第 8 天处死各组小鼠, 分别取肺、脾、肝、肾组织行烟曲霉菌培养和观察病理损伤; 同时另取各用药组和 IPA 模型组 15 只小鼠做生存实验。结果 中、高剂量柠檬醛治疗的 IPA 小鼠各脏器烟曲霉菌落数均低于 IPA 模型小鼠, 且烟灰色素明显减少; 病理结果显示 IPA 模型小鼠肺组织可见大量菌丝, 炎症细胞浸润, 病理损伤明显; 中、高剂量柠檬醛组肺组织未见菌丝。生存试验表明柠檬醛中、高剂量组小鼠的生存率和生存质量明显优于未用药组。结论 柠檬醛可缓解 IPA 小鼠的肺组织病理损伤, 明显减缓 IPA 的发展。

关键词: 柠檬醛; 侵袭性肺曲霉病; 烟曲霉菌

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)03-0428-03

侵袭性肺曲霉病 (invasive pulmonary aspergillosis, IPA) 是免疫力低下患者感染烟曲霉菌的常见类型, 预后差, 死亡率高达 80%~90%^[1~3]。目前临床应用的抗深部真菌感染药物主要有两大类: 多烯类与唑类药物, 均作用于真菌的细胞质膜, 且多数因不良反应大、抗菌谱窄、价格昂贵和易产生耐药等原因, 临床应用受到了限制。从 20 世纪 20 年代开始, 人们便开始从中药中寻找抗真菌药物, 至今已发现 300 余种具有抗真菌活性的中药。柠檬醛是中药山苍子^[4]的主要成分, 属萜类化合物, 本实验室研究发现柠檬醛能够在体外有效抑制烟曲霉菌^[4], 但未见柠檬醛对体内感染烟曲霉菌的作用报道。本研究拟通过建立小鼠 IPA 模型, 观察柠檬醛对 IPA 小鼠的影响, 从而探讨柠檬醛的体内抗烟曲霉菌作用。

1 材料

1.1 动物: 清洁级昆明种小鼠, 雄性, 20~22 g, 由

江西中医学院清洁级动物中心提供。

1.2 菌株: 烟曲霉菌 (为临床分离株, 编号为 3910) 购于中国医学真菌保藏中心 (南京)。

1.3 药物与试剂: 柠檬醛, 德国进口, 批号 002489-S20085623, 质量分数 > 98%; 环磷酰胺 (CTX), 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 06060521; 酮康唑 (TCZ, 200 g/每片), 西安杨森制药有限公司, 批号 060421199; 培养基为蔡氏培养基^[5]。

2 方法

2.1 动物分组: 小鼠随机分成 7 组: ①正常对照组 ($n=5$): 正常健康小鼠; ②正常 + 接种烟曲霉菌组 ($n=5$): 未免疫抑制但接种烟曲霉菌的小鼠; ③IPA 小鼠组 ($n=10$): 免疫抑制并接种烟曲霉菌的小鼠; ④~⑥柠檬醛低、中、高剂量 (6.5、13、26 $\mu\text{g/kg}$) 治疗组 ($n=10$), 造 IPA 模型, 给予柠檬醛; ⑦阳性对照组 ($n=10$): 造 IPA 模型, 给予酮康唑。

* 收稿日期: 2008-10-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30560147); 江西省自然科学基金资助项目 (0540111); 江西省教育厅基金资助项目

作者简介: 罗闯丹 (1981—), 女, 山东济南人, 助教, 硕士, 研究方向为中药与微生物。

Tel: (0791) 7118707 E-mail: meimeitu@sina.com

* 通讯作者 谢小梅 Tel: (0791) 7118707 E-mail: 1990xxm@sohu.com

刘金辉 Tel: (0791) 6360572 E-mail: jinhui2003@yahoo.com.cn

2.2 IPA 小鼠模型的建立:制备烟曲霉孢子悬液^[6], 浓度调整为 1×10^7 / mL。造模动物感染前 2 d, 连续 ip CTX 200 mg/ (kg · d)。乙醚麻醉小鼠, 加样枪吸取孢子悬液 50 μ L, 滴入鼻孔, 使之被动吸入肺部。

2.3 给药方法:接种烟曲霉孢子后立即给药。柠檬醛用药组 ip 给药, 给药体积 0.2 mL/10 g; 阳性对照组 ig 酮康唑 30 mg/ (kg · d), 1 次/d, 连续 7 d。未给药组 ig 等体积蒸馏水。

2.4 小鼠组织烟曲霉体外培养:给药 7 d 后处死小鼠, 取右肺组织、部分肝组织、脾组织及肾组织培养, 其中各组织均定量匀浆, 均匀涂布接种于蔡氏培养基, 26.5 $^{\circ}$ C 培养 7 d, 计数烟曲霉菌菌落。

2.5 小鼠组织病理学分析:左肺组织、部分肝组织及肾组织用 4% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片, 常规 HE 染色, 显微镜下观察病理组织切片。

2.6 生存实验:按上述方法, 重新制备 ③、④、⑤、⑥和 ⑦组各 15 只小鼠进行生存实验。从接种烟曲霉菌开始连续观察 4 周, 观察小鼠一般情况和生存情况的变化。

2.7 数据处理:所有数据用 SPSS 统计分析软件处理, 计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差检验法进行组间差异显著性分析。

3 结果

3.1 小鼠组织烟曲霉菌体外培养:经计数与统计分析, 正常 + 接种烟曲霉菌组与 IPA 模型组肺组织和肝组织的烟曲霉菌落数存在显著性差异, 结果见表 1。表明本研究成功建立了 IPA 小鼠模型。

3.2 柠檬醛体内抗烟曲霉效果:与 IPA 模型组相比, 3 种不同剂量柠檬醛治疗组的小鼠肺组织、肝组织的菌落数均减少, 中、高剂量组肺组织和肝组织的菌落数低于 IPA 模型组 ($P < 0.05$), 且烟灰色色素明显减少; 与阳性对照组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。表明适当剂量的柠檬醛在小鼠体内具有抑制烟曲霉繁殖的效果。其效果与常用抗真菌药物酮康唑相当。结果见表 1 和图 1。

表 1 各组小鼠肺、肝、脾、肾组织烟曲霉菌落数比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 1 Comparison of *Aspergillus fumigatus* number in tissues of lung, liver, spleen, and kidney in mice in every group ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/ (μ g · kg ⁻¹)	菌落数/(个 · mL ⁻¹)			
		肺	肝	脾	肾
正常 + 接种烟曲霉菌	-	9 $\pm$ 0 *	3 $\pm$ 1 *	5 $\pm$ 3	7 $\pm$ 4
IPA	-	102 $\pm$ 14	56 $\pm$ 9	13 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1
柠檬醛	6.5	78 $\pm$ 7	46 $\pm$ 3	39 $\pm$ 2	8 $\pm$ 1
	13	16 $\pm$ 1 *	24 $\pm$ 2 *	5 $\pm$ 1	15 $\pm$ 1
	26	19 $\pm$ 1 *	16 $\pm$ 2 *	5 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1
酮康唑	30 000	25 $\pm$ 2 *	17 $\pm$ 1 *	9 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1

与 IPA 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs IPA group

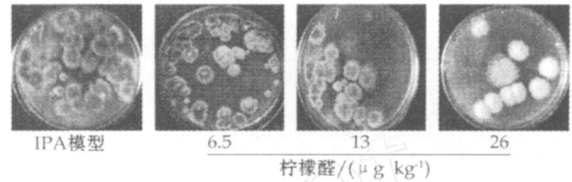
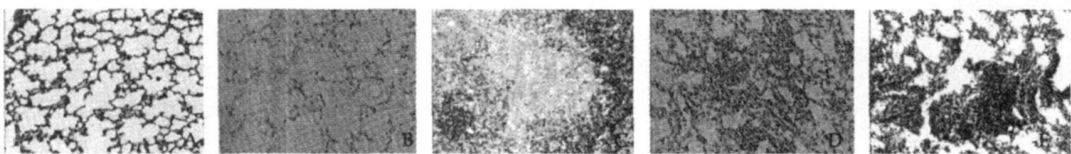


图 1 用药后各组小鼠肺组织烟曲霉菌培养

Fig. 1 Culture of *Aspergillus fumigatus* in lung tissue of mice in every group after treatment

3.3 组织病理改变情况:正常 + 接种烟曲霉菌组的肺组织基本正常。IPA 模型组:肺内支气管上皮坏死, 并有大量菌丝生长; 肝细胞脂肪变性, 小叶中央区细胞萎缩; 肾脏充血, 肾小囊腔消失。柠檬醛低剂量治疗组:肺组织灶状炎症细胞浸润, 未见菌丝; 肝脏充血; 肾脏未见异常。柠檬醛中、高剂量治疗组:镜下见肺组织未见菌丝, 仅有灶状炎细胞浸润; 肝脏充血, 巨噬细胞增生, 有小灶淋巴细胞浸润; 肾脏未见明显病变。阳性对照组:镜下见肺组织部分肺泡塌陷, 充血明显; 肝脏见肝细胞水肿明显; 肾脏切片示有轻度水肿现象。结果表明 IPA 小鼠肺组织有菌丝生长, 肝、脾、肾组织均有病理损伤; 柠檬醛给药后, 小鼠肺组织未见有菌丝生长, 肝、脾、肾组织的病理损伤均有不同程度的好转, 尤其以柠檬醛中、高剂量组明显; 阳性对照药物酮康唑能抑制菌丝在肺组织的生长, 但导致肺、肝和肾等器官病理损伤明显, 说明其对这些器官的毒性较大。结果见图 2 和 3。



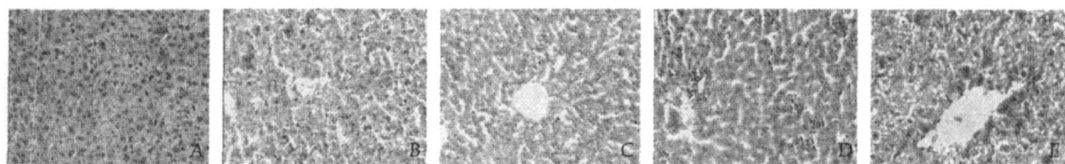
A-正常对照组 B-正常 + 接种烟曲霉菌组 C-IPA 模型组 D-IPA 小鼠 + 柠檬醛高剂量治疗组 E-阳性对照组

A-normal control group B-normal mice infected with *Aspergillus fumigatus* group C-IPA model group

D-IPA mice treated with citral of high dose group E-positive control group

图 2 肺组织病理改变观察 (HE 染色)

Fig. 2 Observation of pathologic changes of lung tissue (HE staining)



A-正常对照组 B-正常+接种烟曲霉菌组 C-IPA 模型组 D-IPA 小鼠+柠檬醛高剂量治疗组 E-阳性对照组

A-normal control group B-normal mice infected with *Aspergillus fumigatus* group C-IPA model group

D-IPA mice treated with citral of high dose group E-positive control group

图 3 肝组织病理改变观察 (HE 染色)

Fig. 3 Observation of pathologic changes of liver tissue (HE staining)

3. 4 生存实验:生存实验观察发现 IPA 小鼠及低剂量柠檬醛治疗的小鼠生存率最低,中剂量柠檬醛治疗的小鼠生存率最高,高剂量柠檬醛剂量组与阳性对照组的小鼠生存率相当。结果见表 2。

表 2 各组小鼠生存率比较

Table 2 Comparison of Survival rates of mice in every group

组别	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	生存数/只	死亡数/只	合计/只	生存率/%
IPA	-	4	11	15	26.7
柠檬醛	6.5	4	11	15	26.7
	13	9	6	15	60.0
	26	7	8	15	46.7
酮康唑	30.000	7	8	15	46.7

4 讨论

曲霉菌以腐物寄生的形式广泛存在于自然环境,为条件致病菌,其 80%~90% 的感染为烟曲霉菌所致。烟曲霉菌以分生孢子繁殖并传播。经呼吸道入侵宿主呼吸系统的分生孢子,主要影响免疫受损人群引起致死性的侵袭性肺曲霉病 (IPA)。IPA 以菌丝侵入及组织破坏为主要特征,菌丝在肺内增殖和侵入血管,导致坏死性血管炎,造成血栓或菌栓,引起咯血和血行播散,在脑、肝、肾、心脏等脏器产生曲霉感染。病理表现主要为急性坏死性出血性肺炎、炎性浸润、化脓,进而形成肉芽肿。

山苍子为樟科植物的成熟果实,药理实验表明山苍子的主要成分柠檬醛具有多种药效,如增加离体兔心冠脉血流量、保护心肌缺血再灌注损伤、抗室性心律失常、降低血小板表面活性、抑制血栓形成及抗菌消炎的作用^[7]。谢小梅等^[8]用微量液基稀释法测定出柠檬醛体外抗烟曲霉菌的 MIC 为 0.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并通过同位素标记法显示柠檬醛的抗菌机制部分可能是通过影响烟曲霉的 DNA、RNA 和蛋白质

的合成而发挥抗菌效应。在此基础上,以柠檬醛体外的最低抑菌浓度为中间剂量观察了柠檬醛的 3 个不同剂量对小鼠 IPA 模型的影响。研究结果显示,中、高剂量的柠檬醛能够有效阻止烟曲霉孢子在肺组织的萌发和菌丝生长,改善 IPA 模型小鼠各器官的病理损伤,使其趋于正常,并且提高小鼠的生存率,柠檬醛不仅减少了小鼠脏器的烟曲霉菌数量,且烟灰色色素明显减弱,已证明烟灰色色素和烟曲霉毒力密切相关^[9]。本实验结果表明柠檬醛对 IPA 的发生、发展有较好的阻止和缓解作用,这为中药活性成分柠檬醛用于临床治疗 IPA 提供了实验数据。

参考文献:

- [1] Singh N, Paterson D L. *Aspergillus* infections in transplant recipients [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(1): 44-69.
- [2] Marr K A, Carter R A, Crippa F, et al. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients [J]. *Clin Infect Dis*, 2002, 34: 909-917.
- [3] Herbrecht R, Denning D W, Patterson T F, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347: 408-415.
- [4] 龙凯, 谢小梅, 方建茹, 等. 肉桂醛、柠檬醛对烟曲霉色素及关键基因 *alb1* mRNA 表达的影响 [J]. *微生物学通报*, 2007, 34(3): 541-544.
- [5] 陈世平. 真菌感染学 [M]. 沈阳: 辽宁科技出版社, 2000.
- [6] 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 DNA 与 RNA 的影响 [J]. *中草药*, 2005, 36(4): 558-560.
- [7] 殷志勇, 王秋娟, 贾莹. 山苍子水提物柠檬醛抗哮喘作用的实验研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2006, 11(2): 197-201.
- [8] 谢小梅, 许杨, 傅颖媛. 微量液基稀释法测定中药活性成分的体外抗曲霉活性 [J]. *微生物学通报*, 2003, 30(6): 89-92.
- [9] Langfelder K, Jahn B, Gehringer H, et al. Identification of a polyketide synthase gene (*pksP*) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence [J]. *Med Microbiol Immunol*, 1998, 187: 79-89.