

肉桂醛、柠檬醛对烟曲霉色素及关键基因 *alb1* mRNA 表达的影响*

龙 凯¹ 谢小梅^{2**} 方建如² 旷雅舒³

(江西中医学院药理学系 南昌 330004) (江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004)

(南昌大学生命科学院 南昌 330047)

摘要 研究了肉桂醛、柠檬醛对烟曲霉色素及其关键基因 *alb1* mRNA 表达的影响。结果表明随着肉桂醛、柠檬醛浓度的增加,菌苔逐渐变稀、薄且烟绿色色素逐渐变淡,甚至白化,肉桂醛、柠檬醛对 *alb1* 基因 mRNA 表达有明显抑制作用,随着药物浓度的降低这种抑制作用亦相应呈现不同程度的减弱,肉桂醛、柠檬醛可能通过抑制 *alb1* mRNA 的表达导致烟曲霉缺失烟绿色色素。

关键词 肉桂醛 柠檬醛 烟曲霉色素, RT-PCR

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:10253-2654(2007)03-0541-04

The Influence of Cinnamaldehyde and Citral on the Pigment and the mRNA Expression of *alb1* Gene of *Aspergillus fumigatus**

LONG Kai¹ XIE Xiao-Mei^{2**} FANG Jian-Ru² KUANG Ya-Shu³

(The Department of Pharmacy of Jiangxi Chinese Medical University, Nanchang 330004)

(Key Laboratory of Modern Preparation of TCM of Ministry of Education, Jiangxi Chinese Medical University, Nanchang 330004)

(College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract The influence of the active ingredients of citral and cinn on the pigment and the mRNA expressions of *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus* were studied. Results indicated that in Czapek's solid culture medium, the higher the concentration of ingredient was, the thinner the lawn would be, and the pigment became lighter and lighter gradually, even white; citral and cinn could obviously repress the expressions of *alb1* gene and this effect was weakened by lower concentrations. The two can availably suppress the mRNA expression of *alb1* gene which is essential for the biosynthesis of *Aspergillus fumigatus*'s pigment.

Key words Cinnamaldehyde, Citral, *Aspergillus fumigatus*, Pigment, RT-PCR

烟曲霉菌广泛存在于自然界,通过高度分散的分生孢子繁殖并传播,经呼吸道侵入宿主呼吸系统,主要影响免疫受损人群,引起致死性的侵袭性曲霉感染,是重要的条件致病真菌^[1]。目前临床用于治疗曲霉感染的化学类药物极为有限,且多数毒副作用大、易产生耐药等。从上世纪 20 年代开始现已发现许多中药有抗真菌活性,但对中药活性成分抗曲霉作用的深入研究极少。本实验室从 2001 年开始便开展了中药活性成分的抗曲霉作用及机理研究。

柠檬醛、肉桂醛分别是中药肉桂和山苍子的主

要成分。谢小梅等^[2]实验表明二者具有良好的抗曲霉菌作用。烟曲霉色素存在细胞壁上且是目前已明确的关键毒力因子。该两种药物是否影响烟曲霉色素形成?本实验分别从宏观和基因转录水平研究了肉桂醛、柠檬醛对烟曲霉色素的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 烟曲霉菌株 :CCCMIDA.1 购自中国医学真菌中心(南京)。

1.1.2 药物 :肉桂醛(cinnamaldehyde, cinn.)中国上

* 国家自然科学基金资助项目(No. 30160099)

** 通讯作者 Tel: 0791-7118707, E-mail: 1990xxm@sohu.com

收稿日期:2006-09-29,修回日期:2007-03-02

海双喜香料制剂厂(生产批号:20020401,纯度>95%),比重1.047~1.051;柠檬醛(citral)德国进口(批号:002489 S20085632,纯度>98%),比重0.887~0.889。

1.1.3 培养基 Czapak's 培养基按文献[3]配制。

1.1.4 RNA 提取及 RT-PCR 试剂^[4]:TaKaRa RNA PCR Ki(AMV)试剂盒,为宝生物工程公司产品;DNA 酶 I 为 Promega 公司产品;Marker DL2000 片段长度分别 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp 宝生物工程公司生产。PCR 引物:上海生物工程技术公司。

1.1.5 仪器:MJ-160 霉菌培养箱, ultrospec4300 紫外/可见分光光度计, PTC-200 梯度热循环仪;SIGMA2K-15 高速冷冻离心机;FR-200 复日凝胶图象分析系统, DYY-III-5 型稳压稳流型电泳仪等。

1.2 方法

1.2.1 菌液制备:见参考文献[5]。

1.2.2 固体培养基上观察不同浓度药物对烟曲霉色素的影响:参考文献[5]在冷却至 50℃ 左右的蔡氏固体培养液中分别加入不同剂量的药物,混匀后迅速倒入直径为 15cm 的平皿内,使药物终浓度分别为:柠檬醛, 0.16μg/mL, 0.11μg/mL, 0.08μg/mL, 0μg/mL;肉桂醛, 0.24μg/mL, 0.16μg/mL, 0.08μg/mL, 0μg/mL, 培养基凝固后,将制备的孢子悬液均匀涂布于含不同浓度药物的蔡氏培养皿中(孢子终浓度为 10⁴ 个/mL),同时设不加药物的为空白对照组。置 26.5℃ 真菌培养箱中恒温静止培养 4d~7d,观察烟曲霉的生长情况。

1.2.3 用药前后烟曲霉总 RNA 的提取:见文献[4, 6]。(1)烟曲霉总 RNA 的提取:采用异硫氰酸胍改进法。(2)RNA 完整性测定:甲醛变性凝胶电泳。(3)总 RNA 纯度测定:分别测定样品在 230nm, 260nm, 280nm 处的 OD 值,通过计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值,确定总 RNA 的产量和纯度。

1.2.4 烟曲霉总 RNA 的 RT-PCR

(1)cDNA 合成:按 TaKaRa RNA PCR Ki(AMV)试剂盒使用说明进行,样品反转录重复 3 次,反转录物-80℃ 保存备用。

(2)目的基因 PCR 扩增:PCR 引物合成参照 genbank 中 β-tublin、alb1 的基因序列,应用 Primer Premier6.0 分子生物学软件分别设计上、下游引物。

β-tublin gene GenBank 序列号:AF132222,PCR 产物长度为 96bp; alb1 gene Gen Bank 序列号:AF025541, PCR 产物长度为 461bp。以 β-tublin gene 作为内参。PCR 反应管中分别加入 β-tublin gene 及待测目的基因引物进行 PCR,实验重复 3 次。

(3)PCR 产物的半定量:PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳。电泳后凝胶于 EB 溶液中染色,条带直接经凝胶图象分析系统进行灰度扫描。β-tublin 作为内参,目的条带的积分密度值与同时扩增的 β-tublin 条带的积分密度值的比值进行半定量分析。

1.2.5 统计学处理 结果以均数±标准差表示。应用 SPSS9.0 统计分析软件进行数据处理。

2 结果

2.1 固体培养基上两种药物对烟曲霉色素的影响

结果显示随着肉桂醛、柠檬醛浓度的增加,菌苔逐渐变稀薄,色素逐渐变淡。见图 1、图 2。

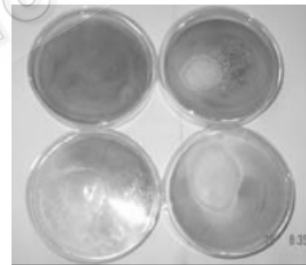


图 1 不同浓度柠檬醛对烟曲霉菌色素形成的影响
柠檬醛浓度分别为 0.16μg/mL, 0.11μg/mL, 0.08μg/mL, 0μg/mL, 培养条件 26.5℃ 培养 6d

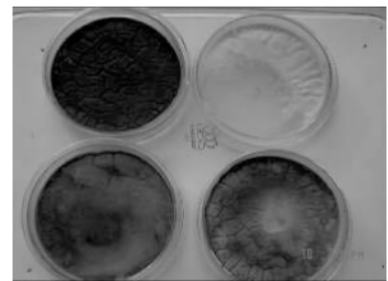


图 2 不同浓度肉桂醛对烟曲霉菌色素形成的影响
肉桂醛浓度分别为 0.24μg/mL, 0.16μg/mL, 0.08μg/mL, 0μg/mL, 培养条件 26.5℃ 培养 6d

2.2 用药前后烟曲霉总 RNA 的完整性和纯度

2.2.1 用药前后烟曲霉总 RNA 的完整性:甲醛变性凝胶电泳测定 RNA 完整性,结果见图 3。凝胶电泳结果显示,除少数条带模糊拖尾外,大多数泳道的 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰,28S rRNA 条带

亮度约为 18S rRNA 条带亮度的 2 倍 ,表明总 RNA 分子完整、无降解。

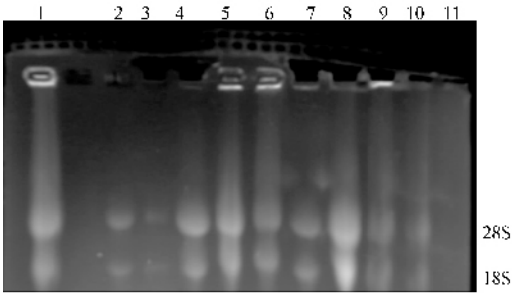


图 3 烟曲霉总 RNA 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳图
1 未用药组烟曲霉, 3 柠檬醛浓度 0.07 μ g/mL, 6 柠檬醛浓度 0.035 μ g/mL, 7 柠檬醛浓度 0.02 μ g/mL(培养 10d) 4 柠檬醛浓度 0.035 μ g/mL, 8 柠檬醛浓度 0.02 μ g/mL(培养 6d), 5 柠檬醛浓度 0.035 μ g/mL 9 柠檬醛浓度 0.02 μ g/mL(培养 7d)

2.2.2 用药前后烟曲霉总 RNA 的纯度 :将提取的烟曲霉总 RNA 经一定比例稀释后 ,置紫外分光光度扫描仪上扫描。测定样品在 230nm、260nm、280nm 处的 OD 值 ,得到 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 比值 ,图略。结果显示 :样品 OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.8 ~ 2.0 ,说明样品无蛋白质污染 ,无抽提液成分残留 ; $OD_{260}/OD_{230} > 2.0$,说明无小分子或盐等干扰杂质存在^[6]。

2.3 肉桂醛、柠檬醛处理前后烟曲霉总 RNA 的 RT-PCR

选取总 RNA 纯度及完整性好的样品进行反转录合成 cDNA ,用 *alb1* 基因的特异性引物以 cDNA 为模板分别进行 PCR 扩增 ,同时以 β -tublin gene 为内参 (用药前后 β -tublin gene 的 RT-PCR 结果表明 β -tublin gene 的转录不受药物影响)。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳 ,电泳图谱扩增条带与预先设计一致 (结果见图 4、图 5 ,条带经凝胶图象分析系统进行灰度扫描 ,以目的条带的积分密度值与同时扩增的 β -tublin gene 条带积分密度值的比值进行半定量分析 ,组间比较用 *t* 检验 ,结果见表 1。

结果表明 :肉桂醛(0.025 μ g/mL)作用 3d、6d、7d 后 ,烟曲霉 *alb1* 基因的 mRNA 表达均较未用药组降低 ,差异有极显著性意义($p < 0.01$) ;柠檬醛在低浓度(0.02 μ g/mL)作用 6d 后 ,对烟曲霉 *alb1* 基因的 mRNA 表达无抑制($p > 0.05$) ;较高浓度(0.035 μ g/mL、0.07 μ g/mL)作用 7d、10d 后 ,烟曲霉 *alb1* 基因的 mRNA 表达量较未用药组降低 ,差异有极显著性

意义($p < 0.01$)。

表 1 不同浓度肉桂醛、柠檬醛作用不同时间后烟曲霉 *alb1* 基因的 mRNA 表达情况

药物	浓度 (μ g/mL)	时间 (d)	组别	
			未用药组	用药组
肉桂醛	0.025	3	2.651 \pm 0.001	0.339 \pm 0.03 *
		6	2.705 \pm 0.006	1.897 \pm 0.02 *
		7	0.518 \pm 0.02	0.329 \pm 0.001 *
柠檬醛	0.02	6	2.705 \pm 0.006	1.709 \pm 1.06 * *
		7	0.518 \pm 0.02	0 *
	0.35	10	4.07 \pm 0.212	1.502 \pm 0.159 *
		10	4.07 \pm 0.212	0 *

注 :与相应的未用药组比较 , * $p < 0.01$; * * $p > 0.05$

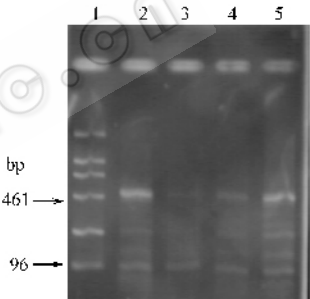


图 4 肉桂醛与柠檬醛作用 6d 后烟曲霉 *alb1* 基因 RT-PCR 产物电泳图

1 marker DL2000 , 2 未用药组 , 3 柠檬醛(0.035 μ g/mL) , 4 肉桂醛 (0.025 μ g/mL) 5 柠檬醛(0.02 μ g/mL)

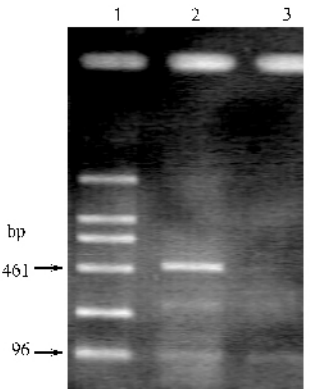


图 5 肉桂醛(0.025 μ g/mL)作用 3d 后烟曲霉 *alb1* 基因 RT-PCR 产物电泳图。1 markerDL2000 , 2 未用药组 , 3 用药组

3 讨论

目前临床应用的抗真菌药主要有两大类:多烯类与唑类药物,均作用于真菌细胞膜,因其毒副作用大、抗菌谱窄、易产生耐药等原因,在临床上应用受到限制。细胞壁是真菌细胞特有的,为其生存必需,有固定细胞外形和保护细胞等多种生理功能。而哺乳动物没有细胞壁,作用于真菌细胞壁的药物可以选择性的作用于真菌而对人类几乎没有毒性,近年来真菌细胞壁已经成为了新的抗真菌的靶点。中药因来源广泛、毒性小,本实验室研究表明肉桂醛和柠檬醛具有良好的广谱抗真菌作用,并已分别从细胞水平、分子水平和基因转录水平探讨了肉桂醛、柠檬醛抗烟曲霉、黄曲霉的部分作用机理,认为肉桂醛、柠檬醛抗曲霉菌作用机理复杂且多方面。

Varanasi 在研究活力康唑(voriconazole, VCZ)抑制曲霉菌分生孢子形成的实验中发现,黄曲霉、烟曲霉菌的色素仅局限在分生孢子上,VCZ在低浓度($0.125\mu\text{g/mL}$)时,对烟曲霉、黄曲霉菌丝生长几乎无抑制作用,但完全抑制了分生孢子的形成而产生了白色的菌苔,该实验同时还发现,其它的唑类药物或多烯类药物,在相同浓度时对菌丝有很强的抑制作用,但对分生孢子形成的抑制作用却很小,因此 Varanasi 认为药物抑制分生孢子的形成并不是因为它们抑制了菌丝的形成^[7]。

烟曲霉分生孢子的色素和毒力密切相关,烟曲霉色素阻碍了哺乳动物宿主防御系统,从而使其在宿主体内得以生存引发疾病。资料表明烟曲霉菌 *alb1* 基因的缺失致使分生孢子白化,扫描电镜见 $\Delta alb1$ 株分生孢子表面修饰性棘状突起消失而呈现光滑表面,对鼠模型毒力显著减弱,小鼠死亡率明显降低,存活时间显著延长,体外实验中孢子分散

能力降低但疏水性并未改变,与补体 C3 结合能力增加,更容易被人体嗜中性粒细胞吞噬;而回复突变株的表型和对鼠模型的毒力均得到还原^[8]。

Tsai 已经克隆出烟曲霉中调控烟灰色色素生物合成的由 6 个基因组成的一个 19kb 的基因簇,其中 *alb1*, *arp1* 是关键基因。这些基因并非烟曲霉生存的必需基因,但与烟曲霉致病力高度相关^[9]。因而本实验选择了色素合成的关键基因 *alb1*,用 RT-PCR 方法检测其用药前后 *alb1* mRNA 的表达差异,进一步从基因转录水平探讨柠檬醛、肉桂醛对烟曲霉色素合成的影响。本研究结果表明:与未用药组比较,肉桂醛、柠檬醛作用后烟曲霉菌苔稀薄,特征性烟绿色色素减少甚至缺失;柠檬醛、肉桂醛均可抑制烟曲霉色素合成的关键基因 *alb1* mRNA 的表达,烟曲霉缺失烟绿色色素可能与 *alb1* mRNA 的表达抑制有关。已证明烟曲霉 *alb1* 基因与毒力高度相关,本实验将为肉桂醛、柠檬醛应用于临床治疗烟曲霉感染提供强有力的依据。

参考文献

- [1] Latge' J P. Clin Microbiol 1999, Rev12 310~315.
- [2] 谢小梅,付颖媛,许 杨. 2003, 30(6) 89~91.
- [3] 陈世平. 真菌感染学. 沈阳:辽宁科学技术出版社, 2002, pp. 538~539.
- [4] 方建茹,谢小梅. 江西医学院学报 2005, 17(3) 67~68.
- [5] 谢小梅,龙 凯,许 杨,等. 中草药 2005, 36(4) 558~560.
- [6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第2版. 北京:中国协和医科大学出版社, 1999, pp. 61~69.
- [7] Varanasi NL, Baskaran I, Alangaden GJ, et al. International Journal of Antimicrobial Agents 2004, 23(1) 72~79.
- [8] Langfelder K, Jahn B, Gehringer H, et al. Med Microbiol Immunol 1998, 187: 79~89.
- [9] Tsai HF, Wheeler MH, Chang YC, et al. J Bacteriol 1999, 181(20): 6469~6477.

欢迎订阅《微生物学通报》杂志