

柠檬醛损伤黄曲霉线粒体生化机理的研究*

罗 曼^{1,2} 蒋立科^{1**}

(¹ 安徽农业大学生物工程系 合肥 230036)(² 武汉大学生命科学院 武汉 430072)

摘 要 应用生物化学方法并结合扫描电镜,研究柠檬醛掺入黄曲霉细胞,并通过损伤线粒体(Mt),导致抑制其生长的机理。结果表明,在药物致敏浓度时,菌丝体经该醛作用后,胞内 Mt 呈不规则增多,氧化还原反应系统受到破坏,与对照组相比,柠檬醛组的琥珀酸脱氢酶(Succinate Dehydrogenase,SDH)苹果酸脱氢酶(Malate Dehydrogenase,MDH)活性分别呈不可逆下降 27.1%和 24.2%。随着药物浓度的升高,SDH、MDH 的活性直至消失;以琥珀酸、 α -酮戊二酸和丙酮酸为底物时,线粒体呼吸速率分别下降 24.1%、14.3%和 36.1%,提示柠檬醛能使菌丝体 DNA、RNA、脂类和蛋白质等生物合成受到抑制,促进细胞死亡。

关键词: 柠檬醛,黄曲霉,线粒体,生化机理

中图分类号:Q939.11 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)02-0226-06

与山苍籽油比较,单体柠檬醛具有较强的抗菌作用^[1],能有效地改变细菌细胞壁和质膜结构^[2],而抑制细菌的生长。但抑制细菌生长的机理是多方面的,其中对产能的线粒体损伤不可忽视。对山苍籽油单体柠檬醛通过破坏黄曲霉线粒体(Pl mitochondria,Mt)氧化还原系统抑制其生长的机理尚无报道。即使最近 Virginia G de Billerbeck^[3]等人报道了香茅油对黑曲霉(*Aspergillum niger*)生长和形态的作用,但只是报道了该香精油复合成分对黑曲霉的宏观影响。本文选择黄曲霉(*Aspergillus flavus*)作为研究对象,通过与对照组比较,对试验菌苹果酸脱氢酶(Malate Dehydrogenase,MDH)和琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase,SDH)的活性进行测定,并以琥珀酸(succinate)、 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate)和丙酮酸(pyruvate)作为测定耗氧率变化试验的底物,研究该类萜芳香醛通过损伤黄曲霉 Mt 而抑制菌丝体生长和孢子萌发的机理,为柠檬醛开发应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

黄曲霉(*A. flavus*)由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。

1.2 仪器

Beckman DV-7 分光光度计,OLYMPUS 显微镜,日立 SCK-20BC 高速冷冻离心机,Philips LX-20 型扫描电子显微镜。

* 国家档案局资助项目(题号 903-保-02)

** 联系人

作者简介:罗 曼(1963-),女,副教授,博士,研究方向:生物化学与分子生物学。

收稿日期 2001-06-05,修回日期 2001-08-26

1.3 试剂

柠檬醛、L-苹果酸、 NAD^+ 、 NADP^+ 、ATP、ADP、考马斯亮蓝 G-250(Coomassie brilliant blue G-250)、HEPES 试剂(N-2-hydroxyethylpiperazine- N^1 -2-ethanesulfonic acid ,HEPES) 以上试剂均由 Sigma 公司进口分装) ,BSA(bovine serum albumin ,系德国 Bioring 公司产品) ,其他试剂为国产品。

1.4 扫描电镜观察柠檬醛对黄曲霉线粒体形态的影响

参照 Robertson 等^[5]方法 ,取培养 48h 对照组和柠檬醛组菌丝体各 1.0g ,用液态氮破碎 ,加入提取液(20mmol/L HEPES-Tris 缓冲液 ,pH7.2 ,内含 250mmol/L 甘露醇 ,10mmol/L KCl 5mmol/L EDTA 20mmol/L MgCl_2) ,充分搅匀 ,用 120 目尼龙布过滤 ,取滤液于 4℃、4000r/min 离心 10min ,取清液于 16000r/min 离心 15min ,取沉淀 ,用上述提取液悬浮介质并洗涤 Mt ,将上述所取得线粒体经酒精梯度脱水 ,再经醋酸异戊酯脱水 ,真空干燥并喷金于扫描电镜下观察。

1.5 柠檬醛对黄曲霉菌丝体细胞 Mt 氧化还原酶类的抑制作用

1.5.1 对 SDH 活性的影响 ①制备 Mt :方法同 1.4 节。②检测酶活性 :参照北京大学生理教研室方法^[6] ,取三次平行试验平均值。③测定 Mt 制品中蛋白质含量 :吸取 Mt 悬浮液 0.1mL 稀释 20 倍 ,分别于 280nm 和 260nm 测定光吸收值 ,根据以下公式计算毫克 Mt 悬浮液的蛋白质含量 :蛋白质浓度 = $1.55A_{280} - 0.76A_{260}$ (mg/mL)

1.5.2 对 MDH 活性的影响 ①制备酶液 :取经 48h 培养的对照组和柠檬醛组黄曲霉菌丝体细胞各 1.0g ,分别用液氮破碎 ,加 6mL 20mmol/L HEPES-Tris 缓冲液(pH8.9 内含 4.5mmol/L MgCl_2)浸提 10min ,用 240 目尼龙布过滤 ,滤液于 2℃用 14000r/min 离心 15min ,取清液置冰箱中备用。②测酶活性 :取 2.0mL 3.6mmol/L NADP^+ (将 NADP^+ 溶于 1.5.2 节之①的缓冲液) 和 0.25mL 酶液于试管内 ,28℃预热 5 ~ 10min 后转移到比色杯中 ,加 0.25mL 的 250mmol/L L-苹果酸 ,混匀使其反应并记时。测定反应体系于 339nm 下吸收值的变化 ,每 30s 读数值一次 ,共 3min ,记录测定值。取另一支试管用 0.25mL 水代替酶提取液作空白对照 ,其它操作同前。

用 2.0mL 3.6mmol/L NAD^+ (将 NAD^+ 溶于 1.5.2 之①的缓冲液) 替代上面的 NADP^+ ,方法同上 ,测定以 NAD^+ 为辅酶时黄曲霉菌丝体细胞质内 MDH 还原速率。

1.6 对线粒体呼吸速率的影响

1.6.1 Mt 呼吸率变化的测定 :采用张龙翔等人的方法^[7]测定黄曲霉菌丝体细胞 Mt 对以 0.2mol/L α -酮戊二酸和 0.2mol/L 丙酮酸为底物的呼吸率。

1.6.2 蛋白质含量测定 :以 BSA 为标准蛋白质 ,按文献^[4] 4 进行测定。

2 结果

2.1 线粒体被柠檬醛损伤后的扫描电镜观察

该醛的抗霉及药物敏感试验表明有明显杀抑菌效果^[4]。在研究其抗黄曲霉机理过程中 ,提取的线粒体在扫描电镜下 ,对照组线粒体表面呈规则的褶皱 ,电子密度均匀一致 ,形状规则 ,形态丰满 ,结构完整 ,柠檬醛组线粒体发生不规则增加 ,形状不规则 ,结构无序 ,表面粗糙 (图 1)。

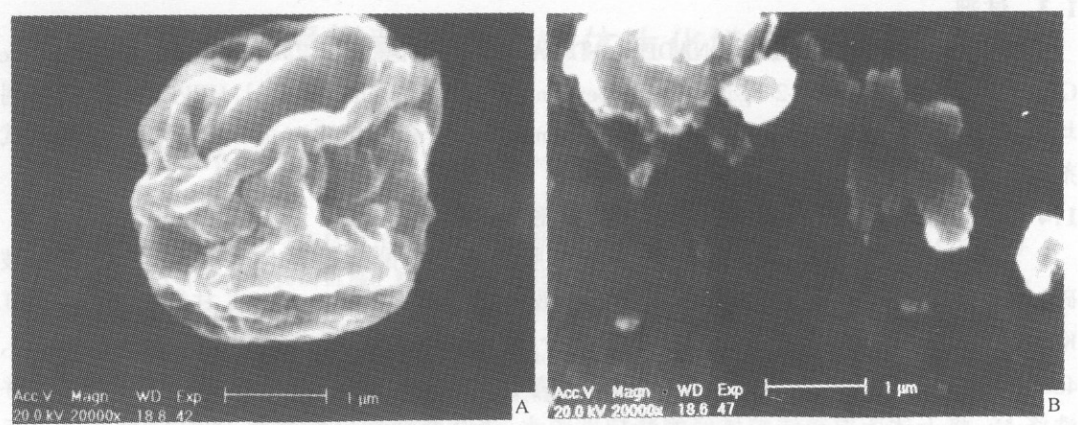


图 1 柠檬醛对黄曲霉细胞线粒体的影响
Fig.1 The effect of citral on motchondria shape of *Aspergillus flavus*
A. Control; B. Citral.

2.2 柠檬醛对脱氢酶活性的影响

2.2.1 柠檬醛对 SDH 的影响:表 1 表明该醛为最低抑制浓度 (minimal inhibitory consis-
tence, MIC) 时,SDH 平均比活较对照组降低了 27.1%。

表 1 柠檬醛对 SDH 活力的影响

Table 1 The effect of citral on catalytic activity of succinate dehydrogenase

Test item	Control group			Average	Citral group			Average
	1	2	3		1	2	3	
$A_{invalidity}$	0.3684	0.3593	0.3631	0.3636	0.3937	0.3860	0.3904	0.3900
A_{normal}	0.2931	0.2833	0.2903	0.2889	0.3454	0.3348	0.3408	0.3403
ΔA_{600}	0.0753	0.0760	0.0728	0.0747	0.0483	0.0512	0.0496	0.0497
Protein content/mg	0.0803				0.0733			
Specific activity $I/(U \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1})$	93.77	94.65	90.66	93.03	65.89	69.85	67.67	67.80

Note:The enzymic activity unit is defined as the 0.01 optical density decreased; specific activity $(U \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}) = A_{600nm} / (0.01Pt)$; $\Delta A_{600nm} = A_{invalidity} - A_{normal}$.

2.2.2 柠檬醛对 MDH 的影响:表 2、表 3 分别表明柠檬醛组以 L-苹果酸为底物时, $NADP^{+}$ 和 NAD^{+} 为辅酶的两种 MDH 的平均比活均较小。

表 2 表明,以 $NADP^{+}$ 为辅酶时,对照组 MDH 的平均比活为 $5.55U \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$,而柠
檬醛组 MDH 的平均比活为 $3.93U \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$,较对照组降低了 29.2%。

表 3 表明,以 NAD^{+} 为辅酶时,对照组平均比活为 $4.95U \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$,而柠檬醛组平
均比活为 $4.00U \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$,较对照组降低了 19.2%。

2.3 对 Mt 呼吸速率的影响

以琥珀酸、 α -酮戊二酸及丙酮酸为底物,分别测定 Mt 的耗氧量和呼吸速率综合于表
4。结果表明,与对照组相比,柠檬醛组的 Mt 耗氧量及呼吸速率均随时间延续而明显降

低 ,揭示线粒体形态结构的损伤直接降低其呼吸作用。

表 2 柠檬醛对胞液内 MDH 活力的影响(以 NADP⁺ 为辅酶)

Table 2 The effect of citral on catalytic activity of malate dehydrogenase in *Aspergillus flavus* mycelial cell cytoplasm(with NAD⁺ as coenzyme)

Test item	Control group			Average	Citral group			Average
	1	2	3		1	2	3	
A _{0.5}	0.232	0.231	0.229	0.239	0.253	0.229	0.234	0.246
A _{1.0}	0.240	0.240	0.237	0.231	0.261	0.237	0.241	0.239
ΔA _{340nm}	0.008	0.009	0.08	0.008	0.008	0.008	0.007	0.008
Protein content/mg	0.300				0.300			
Specific activity (U·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	5.33	6.00	5.33	5.55	4.10	4.10	3.59	3.93

Note :K = $\frac{\Delta A_{340}}{0.01 \times Pt}$ K ;Enzymic activity(U·mg⁻¹protein·min⁻¹) ,the enzymic activity unit is defined as the 0.01 optical increase per miniter P :The protein quantity in reaction system(mg) t :Reaction time(min).

表 3 柠檬醛对 MDH 活力的影响(以 NAD⁺ 为辅酶)

Table 3 The effect of citral on the activity of malate dehydrogenase(with NAD⁺ as coenzyme)

Test item	Control group			Average	Citral group			Average
	1	2	3		1	2	3	
A _{0.5}	0.360	0.353	0.342	0.352	0.359	0.357	0.356	0.391
A _{1.0}	0.352	0.345	0.335	0.344	0.353	0.351	0.351	0.352
ΔA ₃₄₀	0.007	0.008	0.008	0.008	0.006	0.006	0.006	0.006
Protein content/mg	0.310				0.303			
Specific activity (U·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	4.71	5.23	4.90	0.495	4.22	4.03	3.76	4.00

Note :K = $\frac{\Delta A_{340nm}}{0.01 \times Pt}$ K ;Enzymic activity cni(U·mg⁻¹protein·min⁻¹) ,the enzymic activity unit is defined as the 0.01 optical desity increase per miniter P :The protein quantity in reaction system(mg) t :Reaction time(min).

表 4 柠檬醛对以琥珀酸、α-酮戊二酸和丙酮酸为底物的 Mt 呼吸速率影响

Table 4 The effect of citral on motichondria respiration speed with succinate α-ketoglutarate and pyruvate as substrate

Test item	Time/min	Succinate		α-ketoglutarate		Pyruvate	
		Control	Citral	Control	Citral	Control	Citral
Oxygen consumption /μLO ₂ ·mg ⁻¹	10	65.14	49.38	52.62	45.09	65.41	41.77
	20	93.71	67.89	78.80	58.68	93.82	61.05
	30	111.64	84.87	87.46	71.32	111.22	76.82
	40	126.05	96.99	92.11	76.87	126.21	87.94
Mt respiration speed /μLO ₂ ·mg ⁻¹ ·min ⁻¹	10	6.51	4.94	5.26	4.51	6.54	4.18
	20	4.69	3.40	3.94	2.93	4.69	3.05
	30	3.72	2.83	2.92	2.38	3.71	2.56
	40	3.15	2.42	2.30	1.92	3.16	2.20

2.3.1 琥珀酸为底物的 Mt 呼吸速率 :当反应 30min 时 ,柠檬醛组每毫克 Mt 所耗氧量为 $84.87\mu\text{L}$,与对照组 $111.64\mu\text{L}$ 相比 ,降低 24.2% ;当反应 10min 时 ,柠檬醛组耗氧速率为 $4.94\mu\text{LO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,较对照组 $6.51\mu\text{LO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 降低 24.1%。

2.3.2 α -酮戊二酸为底物的 Mt 呼吸速率 :当反应 30min 时 ,柠檬醛组每毫克 Mt 平均耗氧量为 $71.32\mu\text{LO}_2$,而对照组为 $87.46\mu\text{LO}_2$ 表明前者较后者降低 18.5% ,当反应 10min 时 ,则柠檬醛组的呼吸速率为 $4.51\mu\text{LO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,而对照组为 $5.26\mu\text{LO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,前者较后者降低 14.3%。

2.3.3 丙酮酸为底物的 Mt 呼吸速率 :当反应 30min 时 ,柠檬醛组每毫克 Mt 平均耗氧量为 $76.82\mu\text{L}$ 对照组为 $111.22\mu\text{L}$,前者较后者降低 30.9% ;当反应 10min 时 ,柠檬醛组呼吸速率为 $4.18\mu\text{LO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,对照组为 $6.54\mu\text{LO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 前者较后者降低 36.1%。

3 讨论

柠檬醛有顺式和反式两种构型 ,无论反式还是顺式单独作用都失去抗菌功能^[8]。柠檬醛所表现出的抗菌作用除了文献 3 所叙述的作用外 ,还通过扩大黄曲霉菌丝体细胞壁和质膜通道 ,使其渗入细胞壁和质膜 ,失去膜吸收周围物质的选择性等途径损伤 Mt 结构、破坏 Mt 氧化还原系统、降低耗氧量和呼吸速率而抑制菌丝体的生长 ,从而发挥抗霉作用。因而其抗菌的分子机理复杂多样 ,可视为两种构型组份的共同作用。

通过扫描电镜 ,观察到柠檬醛组菌丝体细胞 Mt 不仅出现不规则增生 ,且形态结构出现明显变化 ,电子呼吸链被阻断而使能量转化中止 ,这可能与该醛有较好脂溶性 ,破坏了线粒体脂质分子结构有关 ,导致氧化还原酶类活性降低。

无论是以 NADP^+ 还是 NAD^+ 为辅酶 ,MDH 活力都较对照组低。对于以 NADP^+ 为辅酶 ,MDH 活力的降低导致菌丝体细胞内 NADPH 还原力的减少 ,从而降低细胞内生物合成速率 ,其中磷脂合成速率的降低造成质膜上磷脂较正常生长的细胞少 ,影响膜的稳定性及质膜上依赖于糖和磷脂的酶类活性下降 ,甚至丧失 ,对核酸的合成速率是通过 $[\text{NAPH} + \text{H}^+]$ 的减少抑制了 FH_4 的合成而被间接控制的。而 NAD^+ 为辅酶的 MDH 活力降低 ,则影响 ATP 的合成。

呼吸作用是大多数微生物的 Mt 将生物氧化过程中 ,脱下的氢所释放出的电子通过一系列电子传递体最终交给电子受体氧的过程 ,同时将电子跃迁过程中所释放出的能量与 ATP 形成相偶联 ,生成的 ATP 用作各种需能的生命活动。与对照组比较 ,以琥珀酸、苹果酸、丙酮酸和 α -酮戊二酸为底物测定柠檬醛组 Mt 呼吸率 ,发现柠檬醛组 Mt 的呼吸率明显低于对照组 ,表明柠檬醛具有干扰 σ 电子传递、质子运输 ,从而影响菌丝体细胞内 Mt 呼吸的作用 ,与 Kwobloch^[9]所提出“ 香精油内的类萜化合物降低生物膜稳定性 ,从而干扰能量代谢酶促反应的观点 ”相符合。表明 Mt 形态及数量的变化可能与 Mt 底物水平呼吸速率降低相关。

柠檬醛既有与 Mt 膜磷脂分子作用的疏水端 ,又有与 Mt 膜酶蛋白极性基团结合的亲水端 ,并可进入基质 ,改变膜流动性 ,破坏线粒体结构 ,使那些依赖于亲水或疏水基团才能发挥作用的酶类失去活性 ,从而降低线粒体的耗氧量和呼吸速率 ,减少能量的合成和利

用 ,同时还通过降低 NADPH 合成量而减少还原力 ,不可逆地抑制核酸、蛋白质、脂类及糖的合成 ,而导致细胞死亡 ,或降低 ATP 合成量影响氧化磷酸化。因而柠檬醛对线粒体的破坏作用是多方面的 ,尽管如此 ,但主要是通过破坏其线粒体结构所致。

综上所述 ,该醛是抗黄曲霉良好药物 ,为其该醛的开发为应用提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] 周 勇 ,陶君娣 ,张家俊 . 中西医结合杂志 ,1984 ,**4** (9) 558 ~ 559 .
- [2] 周 坚 ,李沛涛 . 湖南医科大学学报 ,1992 ,**17** (4) 329 ~ 332 .
- [3] G de Billerbeck V ,G Rougues C ,Bessiere J M , et al . J Microbiology ,2001 ,**47** (1) 9 ~ 17 .
- [4] 罗 曼 ,蒋立科 . 微生物学报 ,2001 ,**41** (6) 723 ~ 730 .
- [5] Bradford M . Anal Biochem ,1976 ,**72** 248 ~ 254 .
- [6] 北京大学生理教研室 . 植物生理实验技术 . 北京 :北京大学出版社 ,1983 . 34 ~ 37 .
- [7] 张龙翔 ,张庭芳 ,李令媛 . 生化实验方法和技术 . 北京 :高等教育出版社 ,1997 . 407 ~ 413 .
- [8] Irtys R , Yorifuji T , Takeda N , et al . Agric Biol Chem ,1984 ,**48** (12) 2923 ~ 2925 .
- [9] Knobloch K ,Pauli A ,Iberl B , et al . J Essent Oil Res ,1989 ,**1** (3) 119 ~ 128 .

Study on Biochemical Mechanism of Citral Damage to the *A. flavus* 's Mitochondria

Luo Man^{1 2} , Jiang Like^{1*}

(¹ Department of Biological Engineering , Anhui Agricultural University , Hefei 230036 , China)

(² College of Life Sciences , Wuhan University , Wuhan 430072 , China)

Abstract : Adopted biochemical method and combined with Scanning Electron Microscope (SEM) to observe , study the inhibition-growth mechanism to *A. flavus* when citral was permeated to the cell and damaged mitochondria , the result suggested that the mitochondria changed in many kinds of un-rule shape and the oxidation-reduction system was destroyed , when the citral reached at the level of anaphylactic consistency to *A. flavus* . Compared with the control group , activities of MDH and SDH in experimental group non-reversibly decreased 27.1% and 23.8% respectively , and grandully lost . When respectively used the succinate , pyruvate and α -ketoglutarate as substrates , the respiration speed of mitochondria separately decreased 24.1% , 36.1% , 14.3% . It suggested that the citral could inhibit the biosynthesis of the mycelial DNA , RNA , lipid and protein , so promoted to dath .

Key words : Citral , *Aspergillus flavus* , Mitochondria , Biochemical mechanism

* Corresponding author