

柠檬醛胁迫环境下黄曲霉线粒体的畸变

罗 曼¹ 蒋立科² 戴向荣²

(¹暨南大学生物医学工程研究所 广州 510632)

(²安徽农业大学生命科学院 合肥 230036)

摘 要 通过对黄曲霉细胞受柠檬醛损伤后线粒体形态畸变的透射电镜观察,发现柠檬醛所产生胁迫环境影响线粒体 DNA 复制系统,产生增生变异的巨型线粒体而与之应答。丙二醛法测定黄曲霉细胞内自由基,结果表明药物进入细胞后还通过诱发自由基使线粒体损伤,致使氧化还原系统及细胞能量代谢途径受到影响。

关键词: 柠檬醛; 黄曲霉; 线粒体畸变

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)06-1011-03

黄曲霉毒素是一类剧毒性毒素,可使人类和多种动物诱发实质性肝癌,这是目前已发现的最强化学致癌物,比二甲基亚硝胺诱发肝癌能力大 75 倍,毒性比砒霜高 68 倍,比氰化钾高 10 倍^[1],对人和家畜的生命安全威胁较大。它是由 3 种曲霉^[2,3]:黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)和集蜂曲霉(*Aspergillus nomius*)所产的次生代谢产物。其毒素污染花生、花生油、玉米、大米、面粉、坚果、棉籽、牛奶、奶粉、干咸鱼等^[4,5]。对于黄曲霉毒素污染问题,早在 20 世纪 40 年代就引起了国际性组织如 FAU, UNDP 和 WHO 以及各国政府的高度重视,是世界各国食品检验和进出口检验的重要指标,并规定了食品中黄曲霉毒素含量的标准。1946 年以来,欧美国家一直将解决抑制黄曲霉生长蔓延作为食品生产加工中一个刻不容缓的问题。因此,一些国家对控制黄曲霉生长问题的研究始终没有停止过,并采取许多相应的物理、化学方法抑制黄曲霉生长和降低毒素分泌量。但对通过外界因素影响细胞以线粒体为中心的能量代谢系统结构而达到控制毒素合成和分泌的研究直到 2002 年才有报道^[6,7],即柠檬醛等药物进入黄曲霉细胞质使线粒体形态畸变、导致氧化还原系统生理功能的紊乱,耗氧率及呼吸速率的降低,以致控制黄曲霉生长。近期,又相继对其这个结果采用透射电镜对线粒体在胁迫环境下超微结构是否发生变化进行了观察,初步实现了掌握控制细胞分泌该毒素量的途径。本文就其线粒体在柠檬醛胁迫环境下观察到的结果(即线粒体增多、定向聚集及数个染色体融合成一条巨型线粒体)进行分析,表明柠檬醛能通过破坏线粒体结构,削弱毒素合成所需的氧化胁迫效应,为药物抗黄曲霉提供直接依据。

1 材料和方法

1.1 材料

黄曲霉(*Aspergillus flavus*, Jink)从花生及食物中分离,柠檬醛购自 Sigma 公司。

1.2 菌物培养

将菌物培养于含 1.8mg/mL 柠檬醛的 PDA 培养基上,于

28℃培养 48h,取出用 0.1mol/L Tris-HCl(pH6.8)缓冲液洗涤所培养的菌物。菌物的细胞处理参照文献[8]。

1.3 电镜样品制备和观察

参照文献[9]方法进行。

1.4 柠檬醛诱发自由基的测定

参照文献[10]方法测定。

2 结果

黄曲霉中线粒体类似于其他种类的真核细胞,其形态为粒状或棒状,在电镜下类似倒荸荠形,其长度约 2.5μm,底部直径 0.6μm,顶部为 0.2μm。在柠檬醛的胁迫环境下,菌丝体细胞内线粒体形态、数量均发生显著变化,孢子中的线粒体由荸荠形转变为蝶状、亚铃状。

2.1 明显的聚集性

与对照组相比,在柠檬醛最低浓度的培养基中培养时,柠檬醛通过改变膜的选择性通透性后而进入细胞的原生质中,破坏黄曲霉细胞内线粒体的分布状态,像其他细胞器一样,增生的线粒体为避免“胁迫”环境,由紧贴细胞膜向核靠近并围绕在核的周围,随核的迁移,趋向于新生细胞的“安全”端(图 1、2)。表明柠檬醛渗入细胞后,首先改变细胞内大分子拥挤环境,使分子之间有限的空间发生显著扰动;其次是 pH3.7 的柠檬醛导致细胞内 pH 的改变,从而改变细胞质中某些大分子活性中心构件上侧链基团带电状态而使其构型构象变化,产生活性和粘度的降低,并使细胞内大分子失去正常情况下的存在状态。无论是横切面还是纵切面的观察都表现出线粒体发生明显聚集现象,这也表明线粒体氧化还原系统的结构对耗氧率和呼吸率降低的信息作出了积极的回应。

2.2 线粒体数量显著增加,形态呈多样性

与对照组相比,处于胁迫环境下的每个孢子细胞或菌丝体细胞中线粒体仅 2~3 个,而试验组中,每个细胞中的线粒体增至 7~8 个,甚至更多,说明黄曲霉细胞为抗衡恶化的环境而通过增加线粒体数量的方式提高总体耗氧率和呼吸速

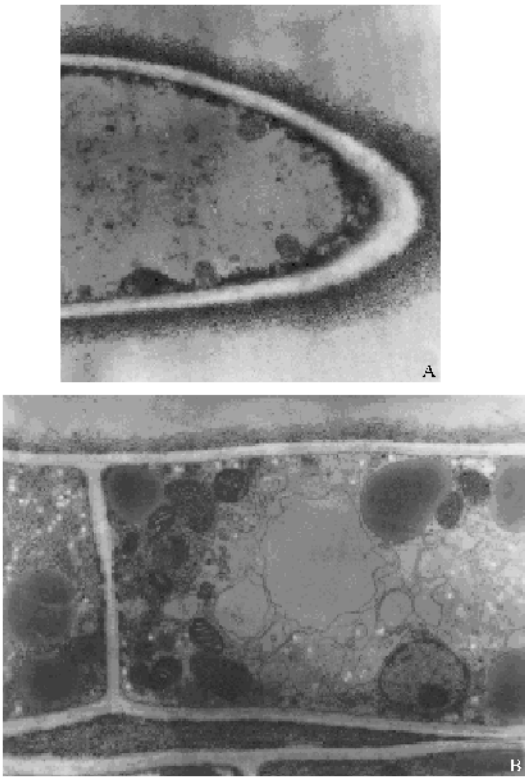


图 1 柠檬醛改变细胞大分子拥挤环境

Fig.1 Citral change the endocellular crowding circumstance. A :Control group ;B :Test group.

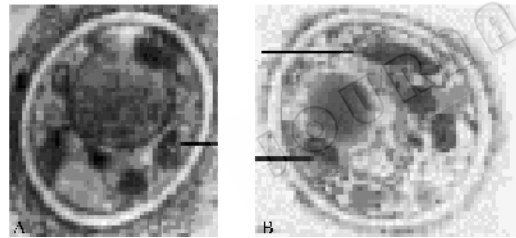


图 2 柠檬醛孢子体切片的电镜观察

Fig.2 Observation on the spore surface in the electron microscope. A : Control group ; B : Test group.

率、增强新陈代谢的强度 ,从而建立新适应性氧化还原状态 ;另一方面推测可能是柠檬醛使核 DNA 上控制线粒体自主性的相关基因受到损伤 ,从而使线粒体 DNA 自主性复制途径加强而出现紊乱。

2.3 出现巨大线粒体

通常情况下线粒体呈杆形、颗粒形或船形。表面有许多由内膜折叠成峭的栅栏状物 ,这些栅栏状物之间的间隙似乎有透明状物 ,使其不呈凹陷。而试验组则明显不同 ,通过相互靠近而融合成巨大线粒体(图 3)。尽管这些巨型线粒体还保留着各个线粒体的界限 ,但已不明显并基本融合在一起 ,与大豆中的巨型线粒体迥然不同^[10]。本项研究中黄曲霉线粒体融合而成巨型线粒体是因胁迫环境的影响 ,而大豆中巨型线粒体的形成则是随着侵染细胞的发育过程而使各线粒体凹陷部分不断向外扩张的结果。

2.4 柠檬醛诱发细胞内自由基破坏线粒体

经测定表明 ,试验组的 MDA(nmol/mL)为 1.23nmol/mL ,

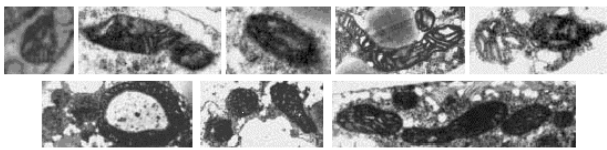


图 3 柠檬醛对线粒体形态和数量影响的透射电镜观察

Fig.3 Observation on the effects of citral on mitochondrion shape and quantity in transmission electron microscope.

对照组却为 0.82nmol/mL(图 1 表 1) ,其 MDH 高出 50% ,但尚未检验出细胞表面 MDA ,这可能与黄曲霉孢子表面具有不同于动物细胞膜结构成份有关。与对照组相比 ,试验组细胞内超氧自由基含量明显升高。表明柠檬醛在损伤膜的过程中有自由基产生 ,而其进入细胞后则显著地增强了细胞对自由基的清除能力。与此同时 ,也表明细胞受自由基攻击较对照组强 ,因而使膜失去了对物质吸收的选择性通透性。由自由基诱发的 4 个反应表明 ,黄曲霉细胞线粒体被柠檬醛所损伤。而细胞内自由基的存在 ,也进一步说明柠檬醛越膜进入了原生质。经柠檬醛毒化后 ,再加维生素 E 或茶多酚等自由基清除剂于培养基中 ,试图对其予以清除 ,但也未能排除该醛的影响 ,其 MDA 含量仍维持原有水平 ,而加入 10 μ g SOD/L 时却被清除。

表 1 柠檬醛毒化后黄曲霉孢子细胞内外丙二醛含量变化

Citral (μ g/mL)	MDA(μ g/mL)	
	Extracellular	Endocellular
0.0	1.9632	1.0108
0.5	28.1633	1.4755
1.0	71.8076	2.0239
1.5	7.9300	2.2454
2.0	10.3887	2.6487

3 讨论

从上述观察到的结果可以看出 ,在正常状态下 ,线粒体形态较规则 ,基本上呈颗粒状或倒荸荠形 ,一当柠檬醛渗入细胞并使其内环境发生改变时 ,则线粒体不仅数量激增 ,而且其形态出现多样化(如叶片状、棒状、鞋状、手榴弹状、丝瓜状和花生状等) ,甚至出现蛇状的巨型线粒体包围核 ,表明了细胞对胁迫环境的响应。

罗曼^[11](2002 年)等报道 ,黄曲霉孢子受柠檬醛损伤后丧失萌发力的机制时 ,通过彗星电泳发现其核尾部出现多处损伤 ,据此曾怀疑孢子不能萌发是因相关酶的基因被破坏所致。我们对其氧化还原系统的核心即线粒体超微结构进一步进行电镜观察分析 ,发现线粒体出现增生、形态畸型并出现巨型线粒体 ,推测有两种可能 ,一种可能是柠檬醛进入细胞后线粒体自身因抗御环境变化 ,而使线粒体 DNA 合成酶活性升高 ,不仅因柠檬醛结合于 α (鸟嘌呤)上使 DNA 合成发生差错 ,而且发生超度合成 ;另一种可能是核 DNA 中控制线粒体 DNA 表达的基因发生不可修复的损伤 ,而导致对线粒体 DNA 半自主复制失去控制。透射电镜观察表明 ,线粒体产生畸变与核的彗星尾 DNA 损伤遥相呼应 ,这蕴含着核

DNA 相关部位损伤后,对线粒体半自主性复制失去调控,最终使线粒体数量增加,而融合则是临近的增生线粒体相互连结在一起,这可由图 3 中线粒体有 V 凹陷而显示出来。

巨型线粒体上有 1~2 个成对的 V 型凹陷,凹陷处有多层膜。我们推测这可能是由 2~3 条线粒体相互融合后留下的痕迹。因线粒体相互融合是在细胞的不同时相发生,因而其融合先后不同步,融合而产生的凹陷的深度也各有差异,常随融合后时间的延长,沉积物增加而变得越来越浅,直至最后的消失。显然这种线粒体的融合不是发育过程中产生的,而是柠檬醛所形成的胁迫环境产生的结果。

线粒体既是氧自由基产生的重要场所,也是氧化损伤的主要靶细胞器^[12],由电镜观察及对自由基捕获测定表明,黄曲霉存在抗柠檬醛的呼吸,这种线粒体增生、畸变和数个线粒体的融合是自身适应外界环境变化的一种调节机制^[13]。但是线粒体的这种损伤并不随柠檬醛抑制的撤消和添加自由基清除剂而恢复,确能随 SOD 的加入而消除,这表明了柠檬醛既诱发自由基,又能通过线粒体的增生和融合削弱氧化胁迫效应,从而使黄曲霉毒素合成的启动被抑制。

综上所述,对于线粒体增生、畸变及相互融合,表明黄曲霉细胞与胁迫环境变化之间有着相互对应关系,但与大量根瘤菌内形成巨型线粒体并无联系,其机制也截然不同,只不过是一种偶然的联系,彼此之间无比较意义。尽管这种融合是属于胁迫环境产生的结果,但可推测这个现象的产生似乎是细胞通过改善或加强三羧酸循环而加速对营养物质的分解,增加能量来源,满足受损伤细胞对能量需要而设计。

参 考 文 献

[1] Bhat RV. Risk to human health associated with consumption of groundnut contaminated with aflatoxin. *Proceeding of International*

Workshop, 1987, **21**:19-30.

- [2] Shotwell OL. Chemical Survey Methods for Mycotoxins. In: Cole R J. Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxin. New York: Academic Press, 1986, 52-87.
- [3] Ahmed NE, Youns YME, Malik KM. *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin contamination of groundnut. *Proceeding of the International Workshop*, 1987, **10**:6-9.
- [4] 梁炫强,潘瑞炽,宾全华.影响花生收获前黄曲霉感染因素的研究概况.中国油料作物学报,2000,22(4):77-80.
- [5] 孟昭赫,张国柱,宋苗菊.真菌毒素研究进展.北京:人民卫生出版社,1979.
- [6] 傅爱根,罗广华,王爱国.活性氧在植物抗病中的作用.热带植物学报,2000,8(1):63-69.
- [7] 罗 曼,蒋立科,吴子健.柠檬醛对黄曲霉质膜损伤机制的初步研究.微生物学报,2001,41(6):723-731.
- [8] 罗 曼,蒋立科.柠檬醛损伤黄曲霉线粒体生化机理的研究.微生物学报,2002,42(2):226-231.
- [9] 蒋立科,宋祥芬,齐跃敏.中华鳖血细胞结构及功能的初步研究.动物学报,1996,42(3):327-329.
- [10] 朱广廉等编.植物生理学实验.北京:北京大学出版社,1990,245-248.
- [11] 韩善华,郑国锴.巨型线粒体形成机理.大豆科学,1994,13(1):27-29.
- [12] 罗 曼,蒋立科,邹国林.柠檬醛致黄曲霉孢子丧失萌发力机制的研究.中国生物化学与分子生物学报,2002,18(2):227-233.
- [13] 邱小忠,陈 璠,周 玫.陈尔茨海默病与线粒体 DNA 变化的氧应激.中华神经科杂志,2000(33):45-48.
- [14] Kring's M, Stone A, Schmitz RW, et al. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, 1997, **90**(1):19-30.

Mitochondria aberration of *Aspergillus flavus* under citral stress circumstance

LUO Man^{1*}, JIANG Li-ke², DAI Xiang-rong²

(¹ Institute of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

(² College of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract Observation of mitochondrion in *Aspergillus flavus* damaged by citral under uransmission electron microscope, it was found that mitochondria had changes on number increase and shape aberrance as hyperplasia or hypertrophy, which resulted from the DNA replication system in mitochondria was damaged by citral. From the data that free radical in *A. flavus* which were determined by MDA method, it was showed that citral damaged mitochondria via induced free radical, which affected oxidation-reduction system and energy metabolism.

Keywords: Citral; *Aspergillus flavus*; Mitochondria aberrance

* Corresponding author. Tel: 86-20-38316391; E-mail: xionggu@jnu.edu.cn

Received 27 February 2006/Accepted 24 March 2006/Revised 11 May 2006