

蒜头中活性物质对白色念珠菌的抑制作用 及其机理研究

孟 松, 胡胜标, 谢伟岸, 丁学知, 孙运军, 夏立秋*

(湖南师范大学生命科学学院, 湖南省微生物学与生物技术高校重点实验室, 湖南 长沙 410081)

摘 要 蒜头(*Allium chinense*)活性物质对白色念珠菌(*Candida albicans*)的生长有较强的抑制作用,其活性物质洗脱液的最低抑菌浓度(MIC)值为0.2%(V/V);用蒜头活性物质洗脱液处理白色念珠菌可导致细胞内OD_{260nm}物质泄漏,且呈浓度和时间依赖性;蒜头活性物质洗脱液可抑制白色念珠菌培养基的酸化,对细胞活性的影响也呈浓度和时间依赖性;通过红光图谱发现,蒜头活性物质破坏了白色念珠菌细胞壁 β -(1-3)-D葡聚糖的糖苷键而改变了细胞壁结构。
关键词 蒜头;活性物质;抗真菌;细胞通透性;培养基酸化; β -(1-3)-D葡聚糖

Antifungal Effects and Mechanism of Bioactive Components of *Allium chinense* on *Candida albicans*

MENG Song, HU Sheng-biao, XIE Wei-an, DING Xue-zhi, SUN Yun-jun, XIA Li-qiu*

(College of Life Science, Hunan Normal University, Microbiology and Biotechnology Key Lab Hunan Province University, Changsha 410081, China)

Abstract: The bioactive components of *Allium chinense* inhibited multiplication of *Candida albicans* and its minimal inhibiting concentrations(MIC) was 0.2%(V/V). The leakage of 260nm absorbing materials was increased in a dose-dependent manner after *C.albicans* treated by the bioactive components. The bioactive components inhibited glucose-induced acidification of the medium and increased Methylene Blue staining, also in a dose-dependent manner. The structure of β -(1-3)-D-glucan, which is a main composition of *C.albicans* cell wall, was changed by the bioactive components, analyzing by FT-Infrared spectrometer.

Key words *Allium chinense* bioactive components antifungal cell permeability medium acidification

β -(1-3)-D-glucan

中图分类号 Q939

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)09-0119-05

百合科葱属(*Allium*)植物蒜头(*Allium chinense*)、大蒜(*Allium sativum* L)和洋葱(*Allium cepa* L)等中含有抗菌

活性物质,被称为天然抗生素^[1,2]。本实验室已从蒜头中分离了抗菌活性物质,其主要成分是甲基烯丙基硫化

收稿日期 2005-03-11

*通讯作者

基金项目:湖南省科技厅重点攻关项目(03SSY3107)

作者简介:孟松(1971-),男,硕士研究生,从事应用微生物学方向的研究。

- [4] 刘秀芳,王修垣,野油菜黄单胞菌生产黄单胞菌多糖的适宜条件[J].微生物学报,1993,33(1):40-47.
- [5] Kawahara H, Obata H. Production of xanthan gum and ice nucleating material from whey by *Xanthomonas campestris* pv. *Translucens*[J]. Microbiol Biotechnol, 1998, 49: 353-358.
- [6] Michiko Watanabe, Jun Watanabe, Takahiro Makino, et al.

- Isolation and cultivation of a novel ice nucleation-active strain of *Xanthomonas campestris*[J]. Biosci Biotech Biochem, 1993, 57(6): 994-995.
- [7] Michiko Watanabe, Jun Watanabe, Yasuyuki Michigami. Enhancing effect of 4-hydroxy-3-nitrophenyl acetic acid on transcription of the ice nucleation-active gene of *Xanthomonas campestris* [J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(12): 2269-2270.

物, 抑菌实验发现其对多种细菌和真菌的生长有抑制作用^[3], 其中对白色念珠菌(*Candida albicans*)的抑制作用具有很好的效果。

白色念珠菌是一种人类常见的条件致病真菌, 寄生在人体粘膜表面, 正常情况下不引起病症, 但在人体免疫力低下或免疫系统遭到破坏时, 白色念珠菌能够引起皮肤、呼吸道、消化道、生殖系统等严重感染, 甚至危及生命, 临床上称为念珠菌病^[4]。

目前临床使用的抗真菌药物中多烯类药物毒性较大, 而唑类药物仅有抑菌作用而无杀菌活性^[5], 临床使用都不够理想。本文较为深入地研究了蒜头活性成分对白色念珠菌的抑制作用及其机理, 为研究开发天然的抗真菌药物资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 鲜蒜头(*Allium chinense*) 湖南湘阴蒜头出口基地提供。

1.1.2 菌株与培养基

白色念珠菌(*Candida albicans*)由中南大学湘雅医学院夏忠弟教授惠赠; 培养基为沙保氏培养基(4%葡萄糖, 1%蛋白胨, m/V), YPD培养基(2%葡萄糖, 2%蛋白胨, 1%酵母提取物, m/V)。

1.1.3 试剂

Sephadex G-25凝胶 Phamacia公司 蛋白胨 上海东海制药厂; 亚甲基蓝 Sigma公司; 葡萄糖、氢氧化钠等其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.4 主要仪器

NEXVS670傅立叶变换红光谱仪 美国; 紫外/可见分光光度计 Lambda40 美国PE公司; HD-97-1紫外监测仪 上海康华生化仪器厂; SBS-100部分收集器 上海沪西分析仪器厂; LGJ0.5冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂; HZQ-Q恒温培养箱 东联电子技术开发有限公司; BH-2显微镜 OLYMPUS公司。

1.2 方法

1.2.1 蒜头中活性物质的分离

按柏建山^[1]报道的方法分离蒜头中的活性物质, 分离后将洗脱液OD_{237nm}值调至2.000备用。

1.2.2 蒜头活性物质对白色念珠菌的最低抑菌浓度(MIC)的测定

分别向10ml沙保氏培养基中分别加入0、10、20、40、60、80μl蒜头洗脱液, 然后各接入活化的白色念珠菌1ml, 在37℃、180r/min培养24h后分别测菌液OD_{600nm}值。

1.2.3 蒜头活性物质对白色念珠菌细胞通透性的影响

将培养18h后的白色念珠菌6000r/min离心10min收集菌体, PBS洗三次。用含0.001% Tween80的PBS悬浮细胞, 菌体浓度调至10⁹cfu/ml。

向悬浮细胞中分别加入0、0.1%、0.2%、0.5%(V/V)蒜头洗脱液, 37℃、180r/min培养, 分别于0、1、2、4、6h取样, 6000r/min离心后测上清液OD_{260nm}值。

1.2.4 蒜头活性物质对白色念珠菌培养基酸化的影响

按1.2.3的方法收集菌体。用无菌水悬浮细胞, 菌体浓度调至10⁹cfu/ml。

在一组含0.01%Tween80(V/V)的10%(m/V)的葡萄糖溶液中加入蒜头洗脱液0.2%(V/V), 另一组不加蒜头洗脱液做对照。

将上述无菌水悬浮的菌体在37℃培养箱中放置5min, 然后向两组葡萄糖溶液(30ml)中各加入菌液1ml, 分别于0、10、20、30、40、50、60min时测溶液的pH值。重复三次实验。

1.2.5 蒜头活性物质对白色念珠菌细胞活性的影响

将收集的菌体, 用无菌水悬浮, 菌体浓度调至10⁷cfu/ml。向10ml无菌水中分别加入蒜头洗脱液0、10、20、50μl, 再各接入无菌水悬浮的菌液1ml, 37℃、180r/min培养。分别于0、1、2、4、6h取样。

每份样取80μl与20μl 0.05%(m/V)亚甲基蓝溶液混合, 5min后用血球计数器计算一个连续视野中100各细胞中被染色的细胞数。重复三次实验。

1.2.6 蒜头活性物质对白色念珠菌细胞壁葡聚糖合成的影响

用一组YPD培养基加入0.1%(V/V)蒜头洗脱液, 另一组做对照, 各接入活化后的白色念珠菌, 30℃、180r/min培养24h, 然后将菌于121℃、20min灭活, 6000r/min离心10min收集菌体, 用PBS洗两次, 无菌水洗一次, 冻干, 称重。

按文献^[6]报道的方法提取细胞壁β-(1-3)-D葡聚糖, 称重并按“葡聚糖/细胞干重”计算提取率。将提取的β-(1-3)-D葡聚糖用KBr压片做红外光谱。

2 结果与分析

2.1 蒜头活性物质对白色念珠菌的最低抑菌浓度(MIC)

图1所示, 随着蒜头活性物质洗脱液含量的增加, 其对白色念珠菌的生长抑制能力也逐渐加大, 当洗脱液的含量大于0.2%时, 白色念珠菌的生长被完全抑制, 可见, 蒜头活性物质洗脱液对白色念珠菌的MIC值为0.2%(V/V)。

2.2 蒜头活性物质对白色念珠菌细胞通透性的影响

用0、0.1%、0.2%、0.5%蒜头洗脱液分别处理白

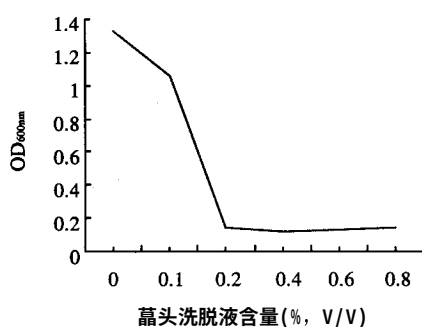


图1 蒜头活性物质洗脱液对白色念珠菌的MIC值测定

Fig.1 The MIC of bioactive components of *Allium chinense* on *Candida albicans*

色念珠菌1h后, 上清液OD_{260nm}值分别是0.0495、0.0835、0.0725、0.1205, 处理4h后分别增至0.0735、0.1025、0.1230、0.1635。可见, 蒜头活性物质导致白色念珠菌OD_{260nm}特征吸收值物质的泄露, 且呈时间和浓度依赖性(图2)。

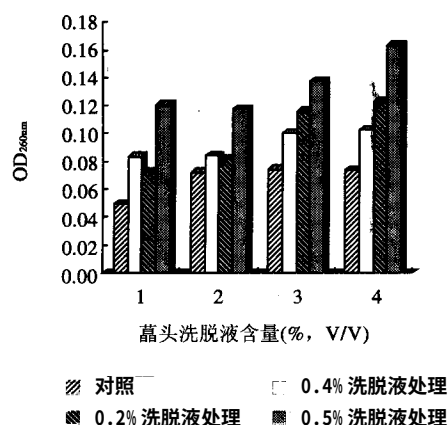


图2 蒜头洗脱液对白色念珠菌细胞通透性的影响

Fig.2 The influence of bioactive components of *Allium chinense* on cell permeability of *Candida albicans*

2.3 蒜头活性物质对白色念珠菌培养基酸化的影响

加入了蒜头洗脱液的葡萄糖溶液的pH值经过1h后由pH6.259下降至pH4.775, 而未加蒜头洗脱液的葡萄糖溶液的pH值经过1h后由pH6.315下降至pH3.750。可见蒜头活性物质对白色念珠菌以葡萄糖为碳源的培养基酸化有抑制作用(图3)。

2.4 蒜头活性物质对白色念珠菌细胞活性的影响

用0、0.1%、0.2%、0.5%蒜头洗脱液分别处理白色念珠菌1h后, 被亚甲基蓝染色的细胞分别为4.5%、14%、15.5%、23.5%, 6h后分别增至28.5%、27%、65.5%、97%。可见, 蒜头活性物质抑制白色念珠菌细胞的活性, 且呈时间和浓度依赖性(表1)。

2.5 蒜头活性物质对白色念珠菌细胞壁β-(1-3)-D葡聚糖合成的影响

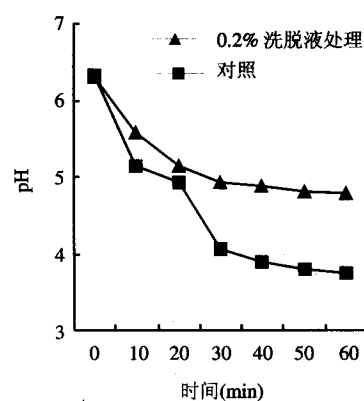


图3 蒜头洗脱液抑制白色念珠菌培养基酸化

Fig.3 The bioactive components of *Allium chinense* inhibit the medium acidification of *Candida albicans*

表1 蒜头洗脱液对白色念珠菌细胞活性的影响

Table 1 The effect of cell activity of bioactive components on *Candida albicans*

时间 (h)	每100个细胞中被染色的细胞数			
	对照	0.1% 洗脱液处理	0.2% 洗脱液处理	0.5% 洗脱液处理
0	1.5±0.5	2.0±1.0	2.5±0.5	1.5±0.5
1	4.5±0.5	14.0±2.0	15.5±3.5	23.5±1.5
2	17.5±2.5	34.5±4.5	46.0±4.0	41.0±15.0
4	11.0±2.0	40.0±10.0	83.5±3.5	85.5±4.5
6	28.5±3.5	27.0±8.0	65.5±11.5	97.0±3.0

用1%(V/V)蒜头洗脱液处理的白色念珠菌和对照菌的细胞壁葡聚糖的提取率分别为17.71%和18.27%, 无显著差异, 说明蒜头中活性物质对白色念珠菌细胞壁β-(1-3)-D葡聚糖的合成量无明显影响。

红外光谱显示从处理菌所提取的β-(1-3)-D葡聚糖与对照菌的比较, 1700cm⁻¹处的“C=O”震动吸收峰和2900cm⁻¹处“C—H”震动吸收峰增加, 而850cm⁻¹处表征糖苷键的谱带吸收值有所降低, 其他基团吸收峰无明显变化(图4、图5, 图中箭头所指为差异峰)。说明蒜头洗脱液中的活性物质改变了白色念珠菌细胞壁上β-(1-3)-D葡聚糖结构。

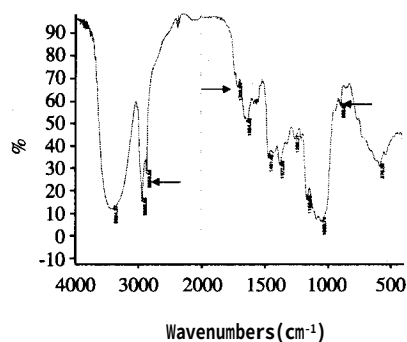


图4 白色念珠菌细胞壁β-(1-3)-D葡聚糖的红外光谱

Fig.4 Infrared spectrum of β-(1-3)-D-glucan of *Candida albicans*

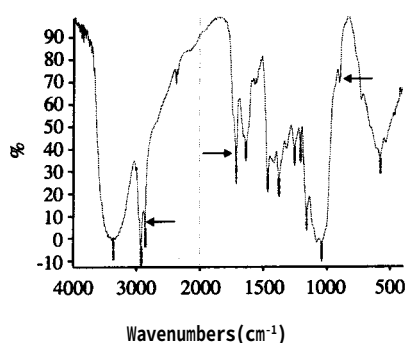


图5 用0.1%(V/V) 藟头洗脱液处理的白色念珠菌细胞壁 β -(1-3)-D葡聚糖的红外光谱

Fig.5 Infrared spectrum of β -(1-3)-D-glucan of *Candida albicans* after treated by 0.1% bioactive components

3 讨论

3.1 藟头中活性物质对白色念珠菌的抑制

藟头活性物质对啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的生长也有较强的抑制作用^[3], 本研究发现其对条件致病真菌白色念珠菌的抑制, 显示出利用藟头开发天然抗真菌药物成为可能。目前化学合成的抗真菌药物的作用靶位主要是细胞壁, 而藟头活性物质正是通过改变细胞壁的结构从而抑制白色念珠菌的生长。这种抑制作用与藟头中的甲基烯丙基二硫化物(Propenyl methyl disulfide)等有机硫化物有密切关系。

3.2 藟头活性物质对白色念珠菌细胞通透性及细胞活性的影响

藟头中抑菌活性物质主要是甲基烯丙基二硫化物, 其中反-甲基烯丙基二硫化物占7.83%, 顺-甲基烯丙基二硫化物占14.69%^[1]。抗真菌药物丙烯胺类化合物可抑制真菌角鲨烯环氧化酶(EC1.14.99.7, SE), 丙烯胺分子中的反式双键和一端的烷基对该作用起到至关重要的作用^[7]。另有报道大蒜中的有机硫化物如二烯丙基二硫化物(Diallyl sulfide, DADS)、二烯丙基三硫化物(Diallyl trisulfide, DATS)对人类角鲨烯环氧化酶有抑制作用^[8]。白色念珠菌中也存在角鲨烯环氧化酶, 其作用是催化角鲨烯生成环角鲨烯, 后者进一步生成细胞膜上的成分麦角固醇。因此, 藟头中的甲基烯丙基二硫化物可能对白色念珠菌的角鲨烯环氧化酶起抑制作用, 从而阻断了由角鲨烯合成麦角固醇的过程, 造成角鲨烯在细胞内积累和细胞膜上麦角固醇的缺乏。角鲨烯在细胞内积累可导致细胞死亡, 而麦角固醇的缺乏则导致细胞膜不完整, 使胞内重要物质泄漏^[9], 生理代谢受阻甚至死亡。

柏建山、夏立秋^[10]等在研究藟头活性物质的抑癌作用时发现其对一些含巯基的酶的活性有抑制作用。用藟头活性物质处理后白色念珠菌细胞的活性降低和葡萄糖的利用率下降, 可能与细胞内相关的含巯基酶的活性下

降有关。

3.3 藟头活性物质对白色念珠菌细胞壁结构的影响

β -(1-3)-D葡聚糖是白色念珠菌的细胞壁组成的主要成分, 结构异常会导致其细胞破裂。红外光谱显示处理菌 β -(1-3)-D葡聚糖结构中“C=O”和“C—H”键有所增多, 糖苷键有所减少, 较为合理的解释是部分糖苷键断裂形成“C=O”和“C—H”键, 或者被处理后的菌体在生长时葡聚糖分子结构中糖苷键合成受阻, 形成结构不完整的葡聚糖分子(图6)。糖苷键的减少会降低葡聚糖的交联程度, 导致白色念珠菌的细胞壁结构异常, 细胞脆弱, 容易破裂。Georgo padakou NH 等也报道了类似的研究结果^[11]。

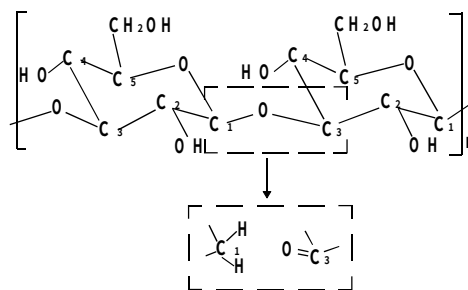


图6 β -(1-3)-D葡聚糖结构的可能变化
Fig.6 The possibly change of structure of β -(1-3)-D-glucan

另外, 促有丝分裂源活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联途径存在于所有真核生物中, 而且从酵母到哺乳动物细胞高度保守, 对胁迫、饥饿等胞外信号作出应答、调控细胞分裂周期^[12]、维持细胞的完整性等方面起着重要作用^[13]。在DADS的抑癌研究中发现DADS处理癌细胞后, Erk1/Erk2等MAPK蛋白的磷酸化水平下降^[14], Ras蛋白的表达量也有降低^[15], 细胞周期蛋白p34受到抑制^[16], 从而抑制癌细胞的增殖。在酵母细胞中存在有与哺乳动物细胞高度同源的MAPK蛋白^[17]。藟头中的甲基烯丙基二硫化物通过对作用MAPK蛋白而抑制白色念珠菌的生长和破坏其细胞结构的完整性值得深入研究。

参考文献:

- [1] 柏建山, 夏立秋, 等. 藟头中抗菌抑癌活性成分的气相色谱-质谱分析及其机理的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 146.
- [2] Vallig, Giardina EGV. Benefits, adverse effects and drug inter-actions of herbal therapies with cardiovascular effects [J]. J Am Coll Cardiol, 2002, (3): 1083.
- [3] 柏建山. 葱属植物—藟头中抗菌抑癌活性成分的分离纯化、鉴定及功能研究[D]. 湖南师范大学硕士学位论文, 2004.

琥珀酰化度大小对改性小麦面筋蛋白性质影响的研究

钟昔阳^{1,2}, 姜绍通^{1,2}, 孙汉巨^{1,2}, 潘丽军^{1,2}, 陈国强¹

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

2. 教育部农产品生物化工重点实验室, 安徽 合肥 230069)

摘 要: 本文采用琥珀酸酐对小麦面筋蛋白进行酰化改性, 讨论了琥珀酰化度大小对面筋蛋白的溶解性、乳化性、乳化稳定性、起泡性和起泡稳定性影响, 并对最佳改性条件下改性小麦面筋蛋白进行了在面条加工中的应用研究。结果表明: 琥珀酰化度为 66.1% 时改性效果最好, 改性面筋蛋白的溶解度、乳化及乳化稳定性、起泡及起泡稳定性分别为 5.09mg/ml, 56.8%, 56.4%, 44.8%, 25%; 利用最佳改性条件下的琥珀酰化面筋蛋白生产面条, 面条的综合性能均比未改性的面筋蛋白品质高。

关键词: 小麦面筋蛋白; 琥珀酰化; 改性; 面条

Research of the Influence of the Extent of Succinylation on Wheat Gluten Modified by Succinic Anhydride

ZHONG Xi-yang^{1,2}, JIANG Shao-tong^{1,2}, SUN Han-ju^{1,2}, PAN Li-jun^{1,2}, CHEN Guo-qiang¹

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

2. The key Laboratory of Agricultural Production Biochemistry, Ministry of Education, Hefei 230069, China)

收稿日期: 2005-07-01

基金项目: 安徽省“十五”科技攻关项目(04013021)

作者简介: 钟昔阳(1973-), 男, 博士生, 主要从事农产品加工方面的研究。

- [4] Odds F C Candida, Candidosis. A Review and Bibliography [M]. London: Bailliere Tindal, 1988.
- [5] Neely M N, Ghannoum M A. The exciting future of therapy [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000, 19(12): 897.
- [6] 胡晓忠, 冯万祥. 用酸碱法从面包酵母中提取 β -(1-3)-D 葡聚糖[J]. 工业微生物, 2000, 30(1): 28.
- [7] 徐铮, 姜远英. 麦角甾醇生物合成途径中的抗真菌药作用靶酶[J]. 国外医药抗生素分册, 2001, 22(5): 193.
- [8] Nisha Gupta, Todd D Porter. Garlic and Garlic-Derived Compounds Inhibit Human Squalene Monooxygenase[J]. Nutr, 2001, 131: 1662.
- [9] 彭剑, 龚炳永. 角鲨烯环氧化酶抑制剂的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 1998, 19(3): 177.
- [10] 孙运军, 柏建山, 夏立秋, 等. 蒜头中抗菌活性成分的抑癌作用及机理研究[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 295.
- [11] Georgopadakou NH. Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on β -1,3-glucan synthase inhibitors[J]. Expert Opin Investigating Drugs, 2001, 10(2): 269.
- [12] 周志琦, 刘强. 真核生物的MAPK级联信号传递途径[J]. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(6): 496.
- [13] 何秀萍, 张博润. 酵母菌细胞完整性信号途径极上游调控因子的研究[J]. 微生物学报, 2002, 42(3): 384.
- [14] 凌晖, 苏琦. DADS诱导人胃癌细胞分化作用中ERK/AP-1通路的改变[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(11): 1235.
- [15] Shivendra V Singh, Rajiv R Mohan. Novel Anti-Carcinogenic Activity of an Organo-sulfide from Garlic: Inhibition of H-RAS Oncogene Transformed Tumor Growth in Vivo by Diallyl Disulfide Is Associated with Inhibition of p21H-ras Processing[J]. Biochemical and biophysical research communications, 1996, 225: 660.
- [16] Lynn M Knowles, John A Milner. Diallyl disulfide inhibits p34cdc2 kinase activity through changes in complex formation and phosphorylation[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(6): 1129.
- [17] Francesc Posas, Mutsuhiro Takekawa, Haruo Saito. Signal transduction by MAP Kinase cascades in budding yeast[J]. Current Opinion in Microbiology, 1998, (1): 175.