

· 论 著 ·

灵芝提取物对耻垢分枝杆菌 GlmU 基因表达的影响*

王开金, 胡少婷, 易敏, 李升锦[△]

(重庆医科大学附属第二医院呼吸内科 400010)

摘要:目的 研究灵芝水提取物、灵芝三萜对耻垢分枝杆菌(M. S-155)增殖曲线、GlmU 基因表达、细胞壁结构的影响。方法 将 6×10^7 M. S-155 接种用含有 $500 \mu\text{g/mL}$ 灵芝水提取物、灵芝三萜的 LB 培养基培养耻垢分枝杆菌作为实验组, 6×10^7 M. S-155 单独培养作为对照, 取不同时间 A600 值绘制耻垢分枝杆菌增殖曲线, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及蛋白免疫印迹(Western blotting)检测 GlmU 蛋白表达情况, 透射电子显微镜(TEM)观察细胞壁的形态变化。结果 增殖曲线说明灵芝水提取物、灵芝三萜对耻垢分枝杆菌生长明显抑制, 对应 A600 值组间有差异($P < 0.05$), 而同等剂量的灵芝三萜抑菌能力更强; SDS-PAGE 及 Western blotting 检测到相对分子质量 51.5×10^3 蛋白处蛋白实验组明显变暗($P < 0.05$); 用 TEM 观察其对耻垢分枝杆菌细胞壁结构的影响, 实验组 M. S-155 经灵芝三萜处理后的耻垢分枝杆菌的细胞壁明显膨胀、变形。结论 灵芝水提取物、灵芝三萜对 M. S-155 有明显的抑制作用, 而其作用位点很可能就是抑制了 GlmU 基因的体外表达, 灵芝提取物不但能够抑制 M. S-155 增殖而且能够影响细胞壁功能, 为进一步研究灵芝应用价值奠定了基础。

关键词:灵芝; 耻垢分枝杆菌; GlmU 基因; 细菌壁

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.16.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)16-1809-03

The influence of ganoderma extract on mycobacterium smegmatis GlmU gene expression*

Wang Kaijin, Hu Shaoting, Yi Min, Li Shengjin[△]

(Department of Respiratory, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To research the influence of Ganoderma lucidum water extract, Ganoderma Triterpene on the growth curve of M. smegmatis(M. S-155), the expression of GlmU gene and the cell wall structure. **Methods** Culture inoculated with 6×10^7 M. S-155 LB medium containing $500 \mu\text{g/mL}$ Ganoderma lucidum water extract of Ganoderma lucidum triterpenes Mycobacterium smegmatis as the experimental group, 6×10^7 M. S-155 cultured alone as the control group, draw the growth curve of Mycobacterium smegmatis in different time of A600 values, detect the expression of GlmU protein by SDS-PAGE and Western blotting, and observe of the morphological changes of the cell wall by transmission electron microscopy(TEM). **Results** The growth curve showed Ganoderma lucidum water extract, Ganoderma lucidum restrained the growth of Mycobacterium smegmatis significantly between groups in different A600 values($P < 0.05$), while the stronger antibacterial activity of the same dose of Ganoderma Triterpene; SDS-PAGE and Western detected the expression of GlmU gene product decreasing significantly in the experimental group($P < 0.05$); and using TEM to observe its Mycobacterium smegmatis cell wall structure, the experimental group M. S-155 with Ganoderma lucidum from three after the treatment of Mycobacterium smegmatis cell wall was significantly expanded, deformation. **Conclusion** Ganoderma lucidum extract, Ganoderma lucidum from three to M. S-155 was inhibited, while its site of action is likely to be the inhibition of GlmU gene expression in vitro, Ganoderma lucidum extract not only can suppress M. S-155 proliferation lont also can affect the cell wall function, For the further study of Ganoderma lucidum value laid certain foundation.

Key words: ganoderma lucidum; mycobacterium smegmatis; GlmU gene; bacterial wall

结核病是世界上病死率最高的感染性疾病之一, 全球约有 1/3 的人受到结核菌感染威胁^[1-2]。近年来, 由于耐药结核分枝杆菌的增多、人类免疫缺陷性疾病、乙型病毒性肝炎等疾病发病率的上升等原因, 结核病有卷土重来的趋势, 其发病率及病死率明显上升^[3]。目前, 药物的耐药率逐年上升, 进一步给结核病的治疗带来难度。然而近年来, 中草药在对结核病的治疗中日益得到重视, 其中已经有研究表明灵芝水提取物、灵芝三萜等物质能够抑制体外结核分枝杆菌(mycobacterium tuberculosis, MTB)的生长, 而 GlmU 基因在 MTB 细胞壁生成过程中起重要作用。因 MTB 生长缓慢、有致病性、传染性等缺

点, 对实验研究带来了一定的难度, 所以, 实验采用在进化上亲缘关系很近的耻垢分枝杆菌(mycobacterium smegmatis mc2155, M. S-155)作为研究对象^[4-5], 研究发现灵芝的有效成分能够抑制 M. S-155 的体外生长^[6], 而其作用靶点是否为 GlmU 基因, 另外灵芝的有效成分对 GlmU 蛋白表达及细胞壁结构和功能是否有影响, 目前尚无研究。本研究旨在探索灵芝水提取物、灵芝三萜对耻垢分枝杆菌生长曲线、GlmU 基因的表达活性及对细胞壁结构和功能影响。

1 材料与方法

1.1 材料 M. S-155(重庆医科大学附属第一医院实验研究

* 基金项目: 重庆市自然科学基金计划资助项目(CSTC, 2009BB5403)。 作者简介: 王开金(1985~), 硕士在读, 主要从事结核病的研究。

[△] 通讯作者, Tel: 13983971969; E-mail: lsj1025@163.com。

中心保存和提供);结核患者血清(重庆医科大学附属第二医院呼吸内科);LB培养基、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)配胶试剂盒(碧云天公司);羊抗人 IgG 二抗(北京中杉公司);DAB 显像试剂;PVDF 膜;蛋白 marker;蛋白上清 buffer;分枝杆菌裂解液、溶菌酶。灵芝水提取物、灵芝三萜(上海众华生物公司提取);乙酰乙酸、三氯甲烷。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将含有不含任何药物的 6×10^7 M. S-155 菌落单独培养作为对照组,将含有 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的灵芝水提取物、灵芝三萜作 6×10^7 M. S-155 菌落进行培养为实验组。

1.2.2 灵芝水提取物、灵芝三萜对 M. S-155 增殖曲线的影响

从平板上挑取 6×10^7 M. S-155 菌落分别接种于不含药物、含有灵芝水提取物、灵芝三萜($500 \mu\text{g}/\text{mL}$)的卡那霉素抗性的 LB 肉汤培养基中,于 37°C 、 $250 \text{ r}/\text{min}$ 震荡培养,分别于第 1、2、3、4、5 和 6 天在两组中各取 $200 \mu\text{L}$ 菌液测量 A600 值,根据所测值绘制增殖曲线。

1.2.3 灵芝水提取物、灵芝三萜对 GlmU 蛋白表达的影响 按上述方法分组,培养 6 d 后分组离心收集菌液。菌液以裂解液、溶菌酶、 1% (v/v) Triton-X100 重悬, 37.5°C 温育 40 min,再超声破碎后加入等量上样缓冲液, 100°C 煮 15 min。配制 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,将收集的菌液蛋白离心后取上清液进行 SDS-PAGE 电泳,电泳之后用 R-250 考马斯亮蓝染色 35 min,脱色液脱色过夜后观察不同组 GlmU 蛋白表达情况。采用半干电转移方式将蛋白条带转印至 PVDF 膜上,封闭后以 $1:100$ 稀释的结核患者血清作为一抗, $1:5000$ 稀释的过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 为二抗,用 DAB 显色观察并分析蛋白条带。

1.2.4 TEM 观察菌体的细胞壁结构 将 6×10^7 M. S-155 菌体接种到含有 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 灵芝水提取物、灵芝三萜的卡那霉素抗性的 LB 肉汤培养基中培养 48 h, M. S-155 单独培养作为对照, 40 g 离心 10 min ,弃上清液,收集菌体,用 $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ 的 PBS 液重悬洗涤细胞,离心,重复操作 3 次。将 $2 \text{ mL } 2.5\%$ 的戊二醛加入细胞沉淀, 4.5°C 放置过夜, 1% 的四氧化锇固定, PBS 液再次洗涤,再用不同浓度的乙醛脱水、醋酸双氧钨染色 45 min ,双蒸水洗脱 60 次,柠檬酸铅处理 20 min ,环氧树脂包埋、超薄切片后透射电镜下观察细胞的超微结构变化,尤其是细胞壁的变化。

1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 灵芝水提取物、灵芝三萜对 M. S-155 增殖曲线的影响 给予灵芝水提取物、灵芝三萜干预的 M. S-155 与未干预对照组 M. S-155 的增殖受到明显抑制,在 24 h 进入对数生长期后 A600 值明显下降($P < 0.05$),见图 1。

2.2 GlmU 蛋白在对照组 M. S-155 中的表达 51.5×10^3 ^[7-8] 处可表达 1 条明显的条带,灵芝水提取物、灵芝三萜干预组 51.5×10^3 条带表达减弱($n=6, P < 0.05$),见图 2。

2.3 灵芝水提取物、灵芝三萜处理后的 M. S-155 细胞形态学改变 灵芝水提取物、灵芝三萜处理 M. S-155 菌液 24 h 后,收集细菌。TEM 观察结果:作为对照培养的 M. S-155 细胞壁完

整,厚薄均匀,细胞质均匀、致密;而经过灵芝水提取物变化不大,使用灵芝三萜处理的 M. S-155 细胞壁膨出、变厚、变形等形态学变化,胞质也出现疏密不等的现象,见图 3。

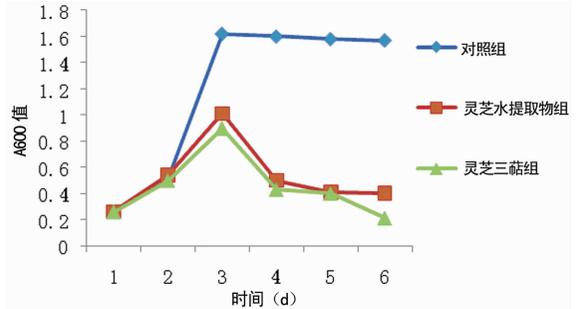
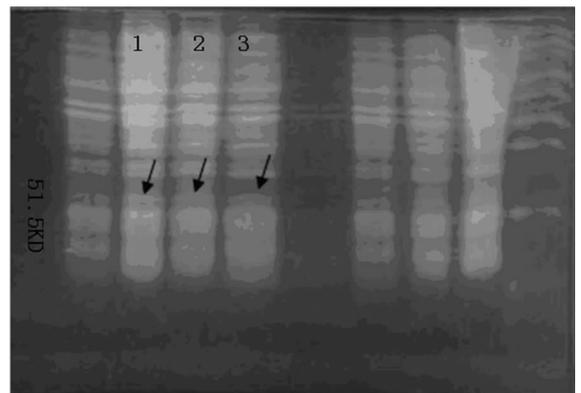
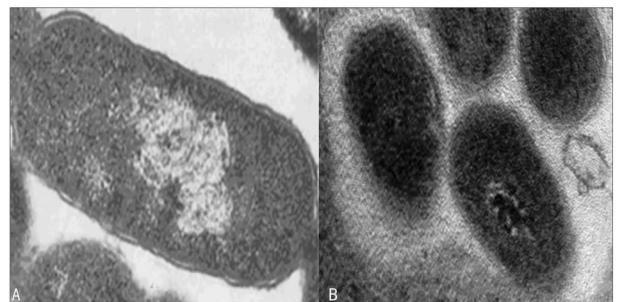


图 1 耻垢分枝杆菌增殖曲线



1:对照组;2:灵芝水提取物组;3:灵芝三萜组。

图 2 药物对 GlmU 蛋白的影响



A:对照组;B:灵芝三萜组。

图 3 灵芝三萜处理的 M. S-155 细胞壁的印象学表现

3 讨论

全球约 $1/3$ 的人受到 MTB 感染的威胁,而 MTB 细胞壁为含有高分子量的脂肪酸、脂质、蛋白质及多糖类组成的复合成分,与 MTB 致病力、免疫反应有关。在人体内,脂质能引起单核细胞、上皮样细胞及淋巴细胞浸润而形成结核结节;蛋白质可引起过敏反应,中性粒细胞及单核细胞浸润;多糖类则参与如凝集反应等免疫反应^[9-10]。因此,如果能够抑制致病 MTB 细胞壁在体内的合成,不但能够抑制 MTB 在体内的繁殖,而且能够明显减弱 MTB 在体内的致病力。

在 MTB 细胞壁合成过程中, GlmU 蛋白起着不容忽视的作用, GlmU 蛋白为分枝杆菌的 GlmU 基因编码的产物,是一种双功能酶,在 N-乙酰-氨基葡萄糖(N-acetyl-D-glucosamine, GicNAc)的活性前体 UDP-N-乙酰葡萄糖胺(UDP-GicNAc)的合成过程中起催化作用:(1)1-磷酸-葡萄糖胺被 GlmU 蛋白的

乙酰基转移酶活性催化生成 1-磷酸-N-乙酰葡萄糖胺。(2)1-磷酸-N-乙酰葡萄糖胺在 GlmU 的尿嘧啶转移酶活性催化下生成终产物 UDP-GlcNAc^[11-12],而 GlcNAc 不但是 MTB 在体内参与免疫反应的多糖类物质,还是 MTB 细胞壁中肽聚糖和 GlcNAc-鼠李二糖的连接物,因此其重要性不言而喻。

但是,由于 MTB 的传染性、致病性及生长周期长等特点,给实验研究带来了一定难度。然而,由于 M. S-155 和 MTB 同属于分枝杆菌属,在进化上亲缘关系很近,尤其是 GlmU 基因,序列相似性比对结果显示这两种菌株间的相同的序列为 74%^[13],另外,在 M. S-155 与 MTB 还有另一个重要的性质,二者具有相似的细胞壁,而现有的抑制或者杀死 MTB 的药物多以细胞壁为作用靶点^[14-15]。因此,本研究中应用无致病性、无传染性、生长较快的 M. S-155 代替具有传染性、致病性、生长缓慢的 MTB。

本实验研究发现灵芝水提取物、灵芝三萜能够明显改变 M. S-155 增殖曲线的增殖特点,抑制 M. S-155 体外生长,从而证明其菌均有抑制 M. S-155 作用,尤其在对数生长期影响最为明显,而其抑制 M. S-155 的机制,通过 SDS-PAG、Western blotting 可以看到,灵芝水提取物、灵芝三萜干预的两个实验组,在 51.5×10^3 蛋白条带不显示,而 51.5×10^3 为 GlmU 基因表达产物,证明 M. S-155 GlmU 基因受了抑制,灵芝水提取物、灵芝三萜很有可能是体外通过抑制 GlmU 基因的表达,抑制 GlmU 蛋白的合成,从而抑制 1-磷酸-葡萄糖胺生成 1-磷酸-N-乙酰葡萄糖胺及 1-磷酸-N-乙酰葡萄糖胺在 GlmU 的尿嘧啶转移酶活性催化下生成终产物 UDP-GlcNAc,从而减少 UDP-GlcNAc 的合成,从而减少肽聚糖和 GlcNAc-鼠李二糖的连接物,达到抑制 MTB 细胞壁合成的作用,从而抑制了 MTB 的增殖。同时 TEM 观察结果证实灵芝水提取物、灵芝三萜通过以上两种途径,抑制细胞壁的合成,使细胞壁膨胀、变形,从而改变细胞壁的功能,最终抑制 MTB 的增殖及致病性,可能是因为灵芝水提取物抑制作用较灵芝三萜弱,故 TEM 下观察,细胞壁变化与对照组变化不大。对于灵芝水提取物、灵芝三萜在体内的有效剂量、作用机制、是否存在其他的作用机制,尚需后续研究加以阐明。

参考文献:

[1] Lin MY, Geluk A, Smith SG, et al. Lack of immune responses to Mycobacterium tuberculosis DosR regulon proteins following Mycobacterium bovis BCG vaccination [J]. Infect Immun Epub, 2007, 75(27):3523-3530.

[2] Bryk R, Lima CD, Erdjument Bromage H. Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein [J]. Science, 2002, 295(7):1073-1077.

[3] Leonardi R, Chohnan S, Zhang YM, et al. A pantothenate kinase from Staphylococcus aureus refractory to feedback

regulation by coenzyme A [J]. J Biol Chem, 2005, 280(25):3314-3322.

- [4] Brennan PJ, Crick DC. The cell-wall core of Mycobacterium tuberculosis in the context of drug discovery [J]. Curr Top Med Chem, 2007, 7(5):475-488.
- [5] Qu H, Xin Y, Dong X, et al. An emlA gene encoding d-glucose-1-phosphate thymidyltransferase is essential for mycobacterial growth [J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 275(2):237-243.
- [6] 秦莲花, 王洁, 杨华. 灵芝对结核分支杆菌体外抑菌作用的研 [J]. 同济大学学报, 2009, 4(1):17-20.
- [7] 张文利, 申慧, 辛毅, 等. 耻垢分支杆菌 glmU 基因克隆、表达及多克隆抗体的制备 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 20(6):601-603.
- [8] 申慧. 抗耻垢分支杆菌 GlmU 蛋白抗体的制备及 glmU 反义 RNA 表达的检测 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 20(1):18-21.
- [9] Bange FC, Collins FM, Wr J. Survival of mice infected with Mycobacterium smegmatis large DNA fragments from Mycobacterium tuberculosis [J]. Tuber Lung Dis, 1999, 79(3):171-180.
- [10] Olsen LR, Roderick SL. Structure of the E. coli GlmU pyrophosphorylase and acetyltransferase active sites [J]. Biochemistry, 2009, 40(17):1913-1921.
- [11] Mengin-Lecreulx D, Vanheijenoot J. Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase activities of E. coli; characterization of the glmU gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis [J]. J Bacteriol, 1994, 176(18):5788-5795.
- [12] Alsteens D, Verbelen C, Dague E, et al. Organization of the mycobacterial cell wall; a nanoscale view [J]. Pflugers Arch, 2007, 28(1):16-18.
- [13] Li W, Xin Y, McNeil MR, et al. rmlB and rmlC gene are essential for growth of mycobacteria [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 342(1):170-178.
- [14] Li W, Xin Y, McNeil MR, et al. rmlB and rmlC genes are essential for growth of mycobacteria [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(1):170-178.
- [15] Qu H, Xin Y, Dong X, et al. An rmlA gene encoding d-glucose-1-phosphate thymidyltransferase is essential for mycobacterial growth [J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 275(2):237-243.