

洋葱中黄酮类化合物对结核分枝杆菌影响的实验研究

王丽丽¹, 石磊², 范大鹏¹, 李召东¹

1. 杭州市红十字会医院检验科, 浙江 杭州 310003; 2. 浙江省肿瘤医院化疗科, 浙江 杭州 310022

【摘要】目的: 研究洋葱中黄酮类化合物对结核分枝杆菌的影响, 探讨其治疗结核的作用机制。**方法:** 以结核分枝杆菌标准菌株 (H37RV) 为对照, 临床结核分枝杆菌为研究对象, 采用分格平板琼脂比例法观察 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同浓度洋葱黄酮类化合物、一线抗结核药物利福平 (REP)、异烟肼 (INH)、链霉素 (SM) 和乙胺丁醇 (EMB) 对结核分枝杆菌的抑菌作用。小鼠腹腔巨噬细胞与结核分枝杆菌共同孵育后, 给予细胞不同浓度洋葱黄酮类化合物和 INH 药物干预, 细胞实验分组为对照组、INH 组、28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组、140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组、280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组、560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组, 给药结束后, ELISA 法检测细胞培养液中细胞因子水平, RT-PCR 法检测巨噬细胞吞噬的结核分枝杆菌 DNA 水平。**结果:** 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组敏感率高于各一线抗结核药物 ($P < 0.05$), 故后续选择 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮进行研究。280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮联合 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ REP、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ INH、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SM 和 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EMB 的敏感率均显著高于各单个抗结核药物, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较, INH 组、140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组、280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组、560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高, 巨噬细胞吞噬的结核分枝杆菌 DNA 扩增 Ct 值较低, DNA 拷贝数较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 INH 组比较, 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组、560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高, 巨噬细胞吞噬的结核分枝杆菌 DNA 扩增 Ct 值较低, DNA 拷贝数较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组比较, 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组、560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高, 巨噬细胞吞噬的结核分枝杆菌 DNA 扩增 Ct 值较低, DNA 拷贝数较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 洋葱黄酮类化合物体外可抑制结核分枝杆菌, 与各单个抗结核药物具有协同抑菌作用, 促进巨噬细胞释放 IFN- γ 、IL-1 β 和 IL-6 细胞因子, 提高巨噬细胞吞噬能力, 且呈剂量依赖性。

【关键词】 洋葱黄酮; 结核分枝杆菌; 抑菌作用; 细胞因子; 细胞实验

【中图分类号】 R285.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 0256-7415 (2017) 09-0008-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.09.003

Onion Flavonoids Can Inhibit Mycobacterium Tuberculosis

WANG Lili, SHI Lei, FAN Dapeng, LI Zhaodong

Abstract: **Objective:** To study the effect of onion flavonoids on Mycobacterium tuberculosis, and to discuss the mechanism of onion flavonoids for tuberculosis. **Methods:** Selected the standard strain of Mycobacterium tuberculosis (H37RV) as control and the clinical Mycobacterium tuberculosis as study object. Applied scale division plate agar proportion method to observe the bacteriostasis of Mycobacterium tuberculosis of 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ onion flavonoids and of the first-line anti-tuberculosis drugs such as rifampicin (REP), isonicotinyhydrazide (INH), streptomycin (SM), and ethambutol (EMB). After being cultivated together, mouse peritoneal macrophage and Mycobacterium tuberculosis were given intervened of onion flavonoids and INH of different dosages. The cell experiment was conducted among the control group, INH group, 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ onion flavonoids group, 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ onion flavonoids group, 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ onion flavonoids group, and 560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ onion flavonoids group. After medication, applied the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the cytokine level in cell culture fluid, and employed reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) method to determine the DNA level of mycobacterium tuberculosis devoured by macrophage. **Results:** The sensitive rate in 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ onion flavonoids group was higher than those of the other first-line anti-tuberculosis drugs ($P < 0.05$), and thus 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ onion flavonoids was selected as the object for further study. The sensitive rate of 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ onion flavonoids combined with 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ REP, 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ INH, 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SM and 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EMB was evidently higher than that of single anti-tuberculosis drug, differences being significant ($P < 0.05$). Comparing with those in the control group, in INH group, 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ onion flavonoids

【收稿日期】 2017-04-24

【基金项目】 浙江省杭州市科委引导项目 (2014YD12)

【作者简介】 王丽丽 (1981-), 女, 主管检验师, 研究方向: 临床检验诊断学。

group, 280 $\mu\text{g/mL}$ onion flavonoids group and 560 $\mu\text{g/mL}$ onion flavonoids group, levels of interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) were obviously increased; the DNA amplification of Ct values of mycobacterium tuberculosis devoured by macrophage was lower, while DNA copy numbers were more, differences being significant ($P < 0.05$). Comparing with those in INH group, in 280 $\mu\text{g/mL}$ onion flavonoids group and 560 $\mu\text{g/mL}$ onion flavonoids group, levels of IFN- γ , IL-1 β and IL-6 were significantly risen; the DNA amplification of Ct values of mycobacterium tuberculosis devoured by macrophage were lower, while DNA copy numbers were more, differences being significant ($P < 0.05$). Comparing with those in 140 $\mu\text{g/mL}$ onion flavonoids group, in 280 $\mu\text{g/mL}$ onion flavonoids group and 560 $\mu\text{g/mL}$ onion flavonoids group, levels of IFN- γ , IL-1 β and IL-6 were significantly risen; the DNA amplification of Ct values of mycobacterium tuberculosis devoured by macrophage was lower, while DNA copy numbers were more, differences being significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Onion flavonoids can inhibit Mycobacterium tuberculosis and has synergistic bacteriostasis with single anti-tuberculosis drug. It can promote macrophage to release cytokine such as IFN- γ , IL-1 β and IL-6 and enhance the phagocytic function of macrophage with a dose-dependent manner.

Keywords: Onion flavonoids; Mycobacterium tuberculosis; Bacteriostasis; Cytokine; Cell experiment

我国是全球结核病流行严重的国家, 结核病主要由结核分枝杆菌引起, 是影响患者健康和生活的重大传染病。结核分枝杆菌能够侵犯肺脏等器官, 具有较强的传染性^[1-2]。利福平(REP)、异烟肼(INH)、链霉素(SM)、乙胺丁醇(EMB)等为结核病一线抗结核药物, 规范的治疗对大多数患者具有较好疗效^[3-4]。由于结核分枝杆菌具有变异性、抵抗力强、抗酸性等特性, 容易发生耐药问题, 多重耐药结核分枝杆菌感染率高达5.9%, 极大增加了结核病的治疗难度^[5]。因此, 寻找抗结核分枝杆菌药物成为亟待解决的问题。中药治疗肺结核历史悠久, 临床疗效可靠, 洋葱具有抗菌、抗癌、抗氧化、抗血小板聚集等多种生物学活性, 研究发现洋葱对多重耐药结核分枝杆菌具有抗菌活性, 但其作用机制尚不明确^[6-7]。本研究通过研究洋葱中黄酮类化合物对结核分枝杆菌的影响, 探讨其治疗结核的作用机制, 为临床治疗提供参考。

1 材料与与方法

1.1 菌株、试剂与仪器 对照标准菌株: 结核分枝杆菌标准菌株(H37RV)购于北京市结核与胸部肿瘤研究所; 研究菌株: 56株结核分枝杆菌为本实验室分离的临床菌株; 小鼠腹腔巨噬细胞按照文献^[8]方法提取于昆明小鼠, 昆明小鼠6只, 体重18~22g, 雌雄各半, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司(SCXK(京)2011-0011)。

试剂: 洋葱黄酮类化合物采用乙醇回流法提取, 经大孔吸附树脂分离纯化; 利福平(REP)、异烟肼(INH)、链霉素(SM)和乙胺丁醇(EMB)均购于美国Sigma公司, 纯度均大于98.0%。7H10琼脂、OADC营养液及RPMI-1640培养基购于美国BD公司, 干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白介素-6(IL-6)ELISA试剂盒购于南京建成生物科技公司, 结核分枝杆菌基因(TB-SA)RT-PCR试剂盒购于上海派普泰克生物制剂有限公司。

仪器: 细胞培养板(上海朗晟生物科技有限公司), AHWS-150L恒温恒湿培养箱(常州爱华仪器制造有限公司), 13R离心机(力康集团力新仪器(上海)有限公司), Biotek aQuant型全自动酶标仪(上海坤肯生物化工有限公司), LightCycler480 II RT-PCR(瑞士罗氏公司)。

1.2 试药的配制 采用无菌生理盐水配制浓度为28 $\mu\text{g/mL}$ 、140 $\mu\text{g/mL}$ 、280 $\mu\text{g/mL}$ 、560 $\mu\text{g/mL}$ 的洋葱黄酮溶液, 浓度为1.0 $\mu\text{g/mL}$ REP、2.0 $\mu\text{g/mL}$ INH、2.0 $\mu\text{g/mL}$ SM和5.0 $\mu\text{g/mL}$ EMB一线抗结核药物溶液。900 mL 7H10琼脂高压后冷却至约50 $^{\circ}\text{C}$, 加入100 mL OADC营养液, 得培养基溶液。

1.3 分格平板琼脂比例法^[9] 按照每格10 mL培养基加入分格板内, 每格分别滴加1 mL的洋葱黄酮溶液和抗结核药物溶液, 对照组培养格滴加1 mL无菌生理盐水。选取培养的研究菌株和对照标准菌株, 采用0.5%无菌吐温80生理盐水溶解稀释, 配成1 mg/mL的混悬液, 采用10倍比稀释, 浓度为 10^{-4} mg/mL。采用标准接种环分别取0.01 mL菌液, 分别接种到含洋葱黄酮溶液和抗结核药物溶液培养基, 接种菌液分散于培养基上。将接种后的培养基置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养28天, 对照培养基菌体不繁殖需重新进行试验, 对照培养基菌体繁殖良好后, 进行药物敏感性检测。根据对照培养基菌体菌落计数, 计算耐药性, 耐药性=(含药培养基菌落数/对照培养基菌落数) $\times 100\%$ 。耐药性 $\geq 0.1\%$ 为耐药, 耐药性 $< 1.0\%$ 为敏感。

1.4 协同抑菌试验 根据1.3的试验结果, 选取280 $\mu\text{g/mL}$ 的洋葱黄酮溶液, 分别与1.0 $\mu\text{g/mL}$ REP、2.0 $\mu\text{g/mL}$ INH、2.0 $\mu\text{g/mL}$ SM和5.0 $\mu\text{g/mL}$ EMB抗结核药物溶液组合, 配置成含洋葱黄酮和REP、INH、SM和EMB药物平板, 按照步骤1.3方法检测耐药性。

1.5 细胞培养 以5%淀粉肉汤刺激诱导昆明小鼠产生炎症性腹腔巨噬细胞, 分离获取小鼠腹腔巨噬细胞, 在含有10%小

牛血清的 RPMI-1640 培养液中培养。将浓度为 1×10^9 个/L 的小鼠腹腔巨噬细胞按照 500 μ L/孔接种于 48 孔板, 分别加入 500 μ L 含 100 mL/L FBS 的 RPMI-1640 培养基和 500 μ L 的 H37RV 菌株 (1×10^{10} 个/L), 分为对照组、INH 组、28 μ g/mL 洋葱黄酮组、140 μ g/mL 洋葱黄酮组、280 μ g/mL 洋葱黄酮组、560 μ g/mL 洋葱黄酮组, 对照组加入 100 μ L 无菌生理盐水, INH 组加入 100 μ L 的 2.0 μ g/mL INH 溶液, 洋葱黄酮各剂量组分别加入 100 μ L 的 28 μ g/mL、140 μ g/mL、280 μ g/mL、560 μ g/mL 的洋葱黄酮溶液, 每组设 6 个复孔; 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱培养 5 h 后检测。

1.6 ELISA 法检测细胞因子水平 收集细胞培养上清液, 采用 ELISA 法检测细胞培养液中 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 细胞因子水平, 严格按照试剂盒步骤进行操作。

1.7 RT-PCR 法检测结核分枝杆菌 DNA 水平 以 RPMI-1640 洗涤细胞 3 次, 清除游离结核分枝杆菌, 加入 TB-SA 提取液裂解 RNA, 孵育 30 min, 13 000 g 离心 10 min, 取 0.2 μ L 上清液, 置微量反应管中, 加入 17.8 μ L 反应液、0.2 μ L Taq 酶、0.03 μ L 尿嘧啶-N-糖基保护液, 摇匀, 采用 RT-PCR 法检测巨噬细胞吞噬的结核分枝杆菌 DNA 水平, 严格按照检测试剂盒操作, 以 DNA 扩增 Ct 值及拷贝数表示, 拷贝数用对数表示。RT-PCR 是以 mRNA 为模板逆转录成 cDNA 进行扩增反应, 检测结核分枝杆菌基因表达。

1.8 统计学方法 采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用独立样本 *t* 检验, 敏感率以百分率 (%) 表示, 采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 各组敏感率比较 见表 1。与 1.0 μ g/mL REP 组比较, 28 μ g/mL 洋葱黄酮组菌株的敏感率较低, 280 μ g/mL 洋葱黄酮组、560 μ g/mL 洋葱黄酮组菌株的敏感率较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 280 μ g/mL 洋葱黄酮组比较, 1.0 μ g/mL REP 组、2.0 μ g/mL INH 组、2.0 μ g/mL SM 组、5.0 μ g/mL EMB 组、28 μ g/mL 洋葱黄酮组、140 μ g/mL 洋葱黄酮组菌株的敏感率较低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 280 μ g/mL 洋葱黄酮组与 560 μ g/mL 洋葱黄酮组敏感率无差异 ($P > 0.05$), 故后续选择 280 μ g/mL 洋葱黄酮进行研究。

2.2 各组协同用药敏感率比较 见表 2。280 μ g/mL 洋葱黄酮联合 1.0 μ g/mL REP、2.0 μ g/mL INH、2.0 μ g/mL SM 和 5.0 μ g/mL EMB 的敏感率均显著高于各单个抗结核药物, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 各组细胞因子水平比较 见表 3。与对照组比较, INH 组、140 μ g/mL 洋葱黄酮组、280 μ g/mL 洋葱黄酮组、560 μ g/mL 洋葱黄酮组 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 INH 组比较, 280 μ g/mL 洋葱黄酮组、560 μ g/mL 洋葱黄酮组 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高, 28 μ g/mL 洋葱黄酮组 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 水平显

著较低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 140 μ g/mL 洋葱黄酮组比较, 280 μ g/mL 洋葱黄酮组、560 μ g/mL 洋葱黄酮组 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 各组敏感率比较

组别	菌株数(n)	敏感率%(n)
1.0 μ g/mL REP 组	56	44.64(25) ^②
2.0 μ g/mL INH 组	56	39.29(22) ^②
2.0 μ g/mL SM 组	56	46.43(26) ^②
5.0 μ g/mL EMB 组	56	42.86(24) ^②
28 μ g/mL 洋葱黄酮组	56	21.43(12) ^{①②}
140 μ g/mL 洋葱黄酮组	56	46.43(26) ^②
280 μ g/mL 洋葱黄酮组	56	83.93(47) ^①
560 μ g/mL 洋葱黄酮组	56	92.86(52) ^①

与 1.0 μ g/mL REP 组比较, ① $P < 0.05$; 与 280 μ g/mL 洋葱黄酮组比较, ② $P < 0.05$

表 2 各组协同用药敏感率比较

组别	菌株数(n)	敏感率%(n)
1.0 μ g/mL REP	56	44.64(25)
280 μ g/mL 洋葱黄酮 + 1.0 μ g/mL REP	56	83.93(47) ^①
2.0 μ g/mL INH	56	39.29(22)
280 μ g/mL 洋葱黄酮 + 2.0 μ g/mL INH	56	91.07(51) ^①
2.0 μ g/mL SM	56	46.43(26)
280 μ g/mL 洋葱黄酮 + 2.0 μ g/mL SM	56	94.64(53) ^①
5.0 μ g/mL EMB	56	42.86(24)
280 μ g/mL 洋葱黄酮 + 5.0 μ g/mL EMB	56	80.36(45) ^①

与各单个抗结核药物比较, ① $P < 0.05$

表 3 各组细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$) μ g/ μ L

组别	n	IFN- γ	IL-1 β	IL-6
对照组	6	11.35 \pm 1.37	7.62 \pm 0.91	15.27 \pm 1.34
INH 组	6	41.26 \pm 5.13 ^①	26.85 \pm 2.12 ^①	38.94 \pm 3.12 ^①
28 μ g/mL 洋葱黄酮组	6	12.17 \pm 1.26 ^②	8.43 \pm 0.95 ^②	14.69 \pm 1.42 ^②
140 μ g/mL 洋葱黄酮组	6	40.74 \pm 4.87 ^①	27.41 \pm 2.22 ^①	40.13 \pm 3.41 ^①
280 μ g/mL 洋葱黄酮组	6	70.16 \pm 6.32 ^{①②③}	39.04 \pm 3.12 ^{①②③}	78.73 \pm 5.64 ^{①②③}
560 μ g/mL 洋葱黄酮组	6	73.51 \pm 6.24 ^{①②③}	40.67 \pm 3.52 ^{①②③}	81.07 \pm 6.01 ^{①②③}

与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与 INH 组比较, ② $P < 0.05$; 与 140 μ g/mL 洋葱黄酮组比较, ③ $P < 0.05$

2.4 各组 DNA 扩增 Ct 值及拷贝数比较 见表 4。与对照组比较, INH 组、140 μ g/mL 洋葱黄酮组、280 μ g/mL 洋葱黄酮组、560 μ g/mL 洋葱黄酮组巨噬细胞吞噬的结核分枝杆菌 DNA 扩增 Ct 值较低, DNA 拷贝数较高, 差异均统计学意义 ($P < 0.05$)。与 INH 组比较, 280 μ g/mL 洋葱黄酮组、560 μ g/mL 洋葱黄酮组巨噬细胞吞噬的结核分枝杆菌 DNA 扩增 Ct

值较低, DNA 拷贝数较高, 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组巨噬细胞吞噬的结核分枝杆菌 DNA 扩增 Ct 值较高, DNA 拷贝数较低, 差异均统计学意义 ($P < 0.05$)。与 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组比较, 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组、560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组巨噬细胞吞噬的结核分枝杆菌 DNA 扩增 Ct 值较低, DNA 拷贝数较高, 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组巨噬细胞吞噬的结核分枝杆菌 DNA 扩增 Ct 值较高, DNA 拷贝数较低, 差异均统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 4 各组 DNA 扩增 Ct 值及拷贝数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Ct 值	DNA 拷贝数
对照组	29.14 \pm 0.89	4.03 \pm 0.22
INH 组	24.13 \pm 0.58 ^①	8.14 \pm 0.52 ^①
28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组	28.57 \pm 0.82 ^{②③}	4.22 \pm 0.27 ^{②③}
140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组	24.74 \pm 0.69 ^①	8.25 \pm 0.56 ^①
280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组	16.97 \pm 0.53 ^{①②③}	11.08 \pm 0.71 ^{①②③}
560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组	17.16 \pm 0.51 ^{①②③}	11.42 \pm 0.74 ^{①②③}

与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与 INH 组比较, ② $P < 0.05$; 与 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组比较, ③ $P < 0.05$

3 讨论

结核病耐药是结核治疗的难点, 因为患者病史较长, 免疫力低下, 反复发作, 导致结核分枝杆菌长期存活, 用药不规范或剂量不足, 或因药物不良反应中断或更改治疗等, 病情迁延不愈及耐药性增加, 耐药结核菌株流行, 威胁全球公共卫生安全^[10]。对于耐药结核菌株, 一线抗结核 INH、REP 等药物疗效欠佳, 长期服药可增加毒副作用, 寻找抗结核分枝杆菌敏感药物成为结核病防治的难点。许多中药可增加营养和免疫力, 提高患者免疫水平和细胞吞噬功能, 对结核病具有良好防治作用, 为结核病新药研发提供了思路^[11-12]。洋葱黄酮为百合科葱属植物, 是一种常见的保健食品, 具有发散风寒、解毒杀虫等功效, 主要含有黄酮类化合物, 具有抑菌、抗癌、抑制脑神经元细胞凋亡、抗氧化、降糖降脂等作用^[13-14]。黄酮类化合物作为一类重要的植物多酚类物质, 具有广泛的抗菌、消炎、抗自由基等活性^[15], 但洋葱黄酮类化合物对结核分枝杆菌的研究较少。

本研究以分离的 56 株结核分枝杆菌临床菌株为对象, 结核分枝杆菌标准菌株(H37RV)为对照, 以药物敏感率反映抑菌能力, 结果发现, 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮敏感率较低, 而 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮敏感率较高, 具有较强的抑菌作用, 因此选择 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮进行研究。进一步研究发现, 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮联合 REP、INH、SM 和 EMB 的敏感率均显著升高 ($P < 0.05$), 说明联合洋葱黄酮后抗结核药物的敏感性增加, 洋葱黄酮化合物联合一线抗结核药物具有良好协同增效效应。因结核分枝杆菌为胞内致病菌, 巨噬细胞是其主要的宿主细胞, 巨噬细胞通过细胞凋亡识别、吞噬结核杆菌, 其吞噬功能能够反映其清除结核分枝杆菌的能力^[16-18]。

本研究进一步将小鼠腹腔巨噬细胞与结核分枝杆菌共同培养, 结果发现, 与对照组比较, INH 组、140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组、280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组、560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组巨噬细胞吞噬的结核分枝杆菌 DNA 扩增 Ct 值较低, DNA 拷贝数较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 INH 组比较, 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组、560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组巨噬细胞吞噬的结核分枝杆菌 DNA 扩增 Ct 值较低, DNA 拷贝数较高; 与 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组比较, 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组、560 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洋葱黄酮组巨噬细胞吞噬的结核分枝杆菌 DNA 扩增 Ct 值较低, DNA 拷贝数较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明随着洋葱黄酮浓度的增加, 其巨噬细胞吞噬能力增强, 巨噬细胞吞噬的结合分枝杆菌增加, 可能与洋葱黄酮的抗炎抗氧化能力有关, 洋葱黄酮具有较强的还原力, 可清除结核分枝杆菌超氧阴离子自由基和羟自由基。

综上所述, 洋葱黄酮类化合物体外可抑制结核分枝杆菌, 与各个抗结核药物具有协同抑菌作用, 促进巨噬细胞释放 IFN- γ 、IL-1 β 和 IL-6 细胞因子, 提高巨噬细胞吞噬能力, 且呈剂量依赖性, 洋葱黄酮类化合物联合抗结核药物可增强临床疗效。

[参考文献]

- [1] 王黎霞, 成诗明, 陈明亭, 等. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485-508.
- [2] 白雪娟, 吴雪琼. 结核分枝杆菌潜伏感染相关抗原的研究进展[J]. 中国防痨杂志, 2014, 36(3): 204-210.
- [3] Stein CM, Baker AR. Tuberculosis as a complex trait: impact of genetic epidemiological study design [J]. Mamm Genome, 2011, 22(1): 91-99.
- [4] 王黎霞. 中国结核病防治工作现状分析[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(4): 413-414.
- [5] Pu X, Zhou Q, He Q, et al. A posterior versus anterior surgical approach in combination with debridement, interbody autografting and instrumentation for thoracic and lumbar tuberculosis [J]. Int Orthop, 2012, 36(2): 307-313.
- [6] 谢彦, 崔丽平, 曹允洁, 等. 洋葱类黄酮化合物提取方法及药理活性研究进展[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(2): 233-236.
- [7] 贾楠, 赵二芳, 范建凤, 等. 洋葱黄酮超声波辅助提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2015, 36(2): 62-65, 70.
- [8] 张淑莉, 张琪, 景晓红. 小鼠腹腔巨噬细胞的提取与鉴定[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(2): 174-175.
- [9] 方玉才, 孙谦, 张艳, 等. 分格平板分枝杆菌药敏培养

- 基在结核分枝杆菌药敏检测中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(17): 3917-3919.
- [10] 初乃惠. 应重视耐药结核病的规范化诊治[J]. 中国临床医生, 2013, 41(3): 1-3.
- [11] 陈丹, 刘光陵, 吴雪琼. 具有抗结核作用中药及其成分研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(1): 128-131.
- [12] 李思阳, 季兴跃, 李卓荣. 抗结核中药有效成分研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(10): 725-729.
- [13] 郝风芹, 李娜. 洋葱总黄酮对糖尿病大鼠丙二醛与超氧化物歧化酶的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(9): 838-840.
- [14] 李敏, 何阳. 洋葱中黄酮类物质的提取及抗氧化作用研究[J]. 光谱实验室, 2013, 30(6): 2951-2954.
- [15] 邵世峰, 刘雪萍, 孙婉蓉, 等. 黄芩苷对结核分枝杆菌抑菌作用的初步研究[J]. 天津医药, 2012, 40(8): 763-765.
- [16] Gan H, Lee J, Ren F, et al. Mycobacterium tuberculosis bLocks crossLinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence[J]. Nat Immunol, 2008, 9(10): 1189-1197.
- [17] 刘艳华, 王若, 俞珊, 等. 活动性肺结核患者单核来源巨噬细胞极化能力的研究[J]. 国际呼吸杂志, 2016, 36(24): 1841-1845.
- [18] 陈吉, 殷玉和, 李玲玲, 等. 合成多肽对结核分枝杆菌的胞内抑制作用[J]. 生物技术通报, 2016, 32(4): 222-227.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

四妙散调节软骨细胞凋亡与自噬治疗 膝骨关节炎大鼠的实验研究

沈金明, 封蕾, 陈杰, 吴煜, 于建农

浙江中医药大学附属第一医院骨伤科, 浙江 杭州 310018

[摘要] 目的: 通过膝骨关节炎大鼠模型研究四妙散调节软骨细胞凋亡与自噬治疗膝骨关节炎(KOA)大鼠的作用机制。方法: 8周龄SD大鼠27只, 随机分为正常对照组、KOA模型组、四妙散组, KOA模型组和四妙散组采用前交叉韧带切除法制作KOA模型, 手术6周后四妙散组以四妙散药液灌胃, 正常对照组和KOA模型组以生理盐水灌胃。连续灌胃4周后取膝关节软骨组织, 采用Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术测定凋亡细胞所占比例, 采用荧光定量PCR检测关节软骨组织中凋亡和自噬相关基因表达水平。结果: 与正常对照组比较, KOA模型组大鼠关节软骨细胞凋亡率显著升高, 关节软骨细胞中凋亡相关蛋白Fadd、Casp3的表达显著升高, 自噬相关蛋白LC3的表达显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与KOA模型组比较, 四妙散组大鼠关节软骨细胞凋亡率显著降低, 关节软骨细胞中凋亡相关蛋白Fadd、Casp3的表达显著降低, 自噬相关蛋白LC3的表达显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 软骨细胞凋亡是KOA发病中的重要因素, 该凋亡可能通过FADD-CASP3途径发挥作用。软骨细胞自噬作用的激活可抑制细胞凋亡, 可能是延缓及控制KOA进展的一个新机制, 四妙散可能通过该机制发挥治疗作用。

[关键词] 四妙散; 膝骨关节炎; 细胞凋亡; FAS相关死亡结构域蛋白(Fadd); 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Casp3); 自噬相关基因Beclin 1(Becln 1); 微管相关蛋白1轻链3(LC3); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R684.3; R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 09-0012-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.09.004

[收稿日期] 2017-03-03

[基金项目] 浙江省中医药科技计划项目(2017ZQ013); 浙江省医药卫生科技项目(2017KY501); 浙江中医药大学科研基金项目(2015ZY15)

[作者简介] 沈金明(1980-), 男, 主治医师, 研究方向: 骨关节炎的发病机理及诊治。