

· 论 著 ·

黄芩苷体内抑制结核分枝杆菌的机制研究

赵丰权¹, 戴建义¹, 李君桦¹, 蔡玉伟¹, 董培红²

1.温州市中心医院感染科, 浙江 温州 325000; 2.温州医科大学附属第一医院

摘要: **目的** 研究黄芩苷体内抑制结核分枝杆菌的作用机制, 为耐药结核病治疗提供依据。**方法** 取40只雄性昆明小鼠, 尾静脉注射耐异烟肼结核分枝杆菌构建动物模型, 按不同治疗方法分别纳入结核组、异烟肼组、NF- κ B抑制组和黄芩苷组, 每组10只, 建模后第8d采集肺组织和心脏外周血, 采用HE染色观察肺的形态变化, 采用抗酸染色镜检和定量PCR法检测肺组织内结核分枝杆菌数, 采用免疫组化检测肺组织中巨噬细胞数, 采用流式细胞学检测单核/巨噬细胞NF- κ B和TLR4的表达。**结果** 黄芩苷组小鼠体重高于结核组、异烟肼组和NF- κ B抑制组 ($P < 0.05$); 黄芩苷组小鼠单核/巨噬细胞NF- κ B和TLR4平均荧光强度分别为 448.21 ± 30.61 和 401.01 ± 34.58 , 均高于结核组和异烟肼组 ($P < 0.05$); 结核组、异烟肼组和NF- κ B抑制组均可观察到典型的结核慢性肉芽肿性病变, 而黄芩苷组未见典型的结核病变; 黄芩苷组小鼠肺组织内结核分枝杆菌数、CD68⁺巨噬细胞数均少于结核组、异烟肼组和NF- κ B抑制组 ($P < 0.05$)。**结论** 黄芩苷可通过调控巨噬细胞NF- κ B和TLR4的表达起到抗结核作用, 但加用NF- κ B抑制剂后会明显削弱黄芩苷的抗结核作用。

关键词: 结核分枝杆菌; 黄芩苷; 巨噬细胞; NF- κ B; TLR4

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087 (2019) 10-0998-04

Baicalin inhibit *Mycobacterium tuberculosis in vivo* by regulating the expression of Toll like receptor 4 and nuclear factor κ B

ZHAO Feng-quan*, DAI Jian-yi, LI Jun-hua, CAI Yu-wei, DONG Pei-hong

*Department of Infectious Disease, Wenzhou Central Hospital, Wenzhou, Zhejiang 325000, China

Abstract: Objective To study the mechanism of baicalin in inhibiting *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and to provide reference for drug-resistant tuberculosis treatment. **Methods** Forty male Kunming mice were injected isoniazid-resistant MTB into their tail veins to build models of infection. They were evenly divided into MTB group, isophosiazone group, NF- κ B inhibition group and baicalicin group according to treatment. The lung tissue and peripheral blood of the mice were collected on the 8th day after modeling. The morphological changes of the lungs were observed by HE staining. The number of MTB in lung tissue was detected by acid-fast staining and quantitative PCR. The number of macrophage in lung tissue was detected by immunohistochemistry. The expression of NF- κ B and TLR4 in monocytes/macrophages were detected by flow cytometry. **Results** The average weight of mice in the baicalicin group was significantly higher than that in the MTB group, the isophosiazone group and the NF- κ B inhibition group ($P < 0.05$). The average fluorescence intensity of NF- κ B and TLR4 in monocytes/macrophages in the baicalicin group were 448.21 ± 30.61 and 401.01 ± 34.58 , which were significantly higher than those in the MTB group and the isophosiazone group ($P < 0.05$). Typical tuberculous chronic granulomatous lesions were observed in the MTB group, isophosiazone group and NF- κ B inhibition group, except the baicalin group. The mean number of MTB and CD68⁺ macrophages in lung tissue of mice in the baicalin group were significantly less than that in the MTB group, the isophosiazone group and the NF- κ B inhibition group ($P < 0.05$). **Conclusion** Baicalin achieves an anti-tuberculosis effect by regulating the expression of NF- κ B and TLR4 in macrophages, which can be weakened by adding NF- κ B inhibitor.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; Baicalin; Macrophage; NF- κ B; TLR4

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2019.10.006

作者简介: 赵丰权, 本科, 医师, 主要从事肺结核、肝炎和艾滋病等感染性疾病的临床和基础研究工作

通信作者: 赵丰权, E-mail: zzzou@yeah.net

肺结核是由结核分枝杆菌引起的肺部慢性感染性疾病,是我国居民死亡的主要原因之一,随着生活水平的提高和防治手段的规范化,结核病的发病率和死亡率逐年下降^[1]。然而,多重耐药结核分枝杆菌的出现,以及部分中晚期结核患者无法耐受抗结核药物,使很多患者得不到有效治疗,因此开发新的抗结核药物具有十分重要的临床意义^[2]。黄芩苷是一种从黄芩中提取的黄酮类化合物,对糖尿病、银屑病和恶性肿瘤等疾病具有很好的治疗效果^[3-5]。有研究发现黄芩苷具有良好的抗结核作用,但这些研究均为体外试验,且只从某一个方面探讨黄芩苷的作用^[6-8]。为进一步明确黄芩苷抑制结核分枝杆菌生长的作用和机制,本研究采用耐异烟肼结核分枝杆菌菌株构建结核小鼠模型,研究黄芩苷在小鼠体内的抗结核作用及机制,为耐药结核病治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 40只雄性昆明小鼠(KM小鼠),体重约20g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。实验动物生产许可证号:SCXK(京)2018-0041。

1.2 主要仪器与试剂 黄芩苷、10%福尔马林、3%过氧化氢、吡咯烷二硫代氨基甲酸盐、HE染色试剂和NF- κ B抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(均购自美国Sigma公司);DAB显色试剂、羊血清工作液(均购自北京中杉金桥生物公司);CD68-PE、NF- κ B-APC和TLR4-FITC流式细胞学抗体(均购自美国BD公司)。

1.3 建立动物模型 根据文献[9]构建耐异烟肼结核小鼠模型,小鼠尾静脉注射耐异烟肼结核分枝杆菌(浓度为1mg/mL),每只0.1mL,肺组织内抗酸染色和定量PCR均检测到结核分枝杆菌则认为模型构建成功。根据治疗方法不同,40只建模成功小鼠随机分成4组,每组10只,结核组不进行任何治疗或处理;异烟肼组腹腔注射80mg/kg异烟肼治疗;黄芩苷组腹腔注射80mg/kg黄芩苷治疗^[10];NF- κ B抑制组腹腔注射80mg/kg黄芩苷和10mg/kg NF- κ B抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐。除结核组外均为一次腹腔注射给药量。小鼠按组分别置于P3实验室鼠笼中饲养,给予温度24℃、相对湿度50%的稳定环境,充足的食物和水。

1.4 组织取材和结核分枝杆菌检测 接种结核分枝杆菌后第8d采用颈椎脱臼法处死小鼠,分离出肺,采用10%福尔马林固定2h,石蜡切片,一部分切片进行HE染色,观察肺组织的基本形态;另一部分切

片进行抗酸染色镜检并采用定量PCR法检测肺组织内结核分枝杆菌数目。

1.5 免疫组化检测 各组肺组织切片脱蜡后,加入3%过氧化氢,孵育0.5h,PBS清洗3次,羊血清工作液封闭0.5h,加入CD68第一抗体,4℃冰箱过夜,加入辣根过氧化物酶标记,37℃烤箱中孵育0.5h,加入DAB显色试剂,PBS清洗3次后,二甲苯透明,封片后置于显微镜下观察。

1.6 流式细胞学检测 收集各组小鼠心脏外周血,淋巴细胞分离液分离出单个核细胞,PBS清洗3次后,加入CD68-PE、NF- κ B-APC和TLR4-FITC流式细胞学抗体,室温孵育20min后,PBS清洗3次,用流式细胞仪检测CD68⁺单核/巨噬细胞上NF- κ B和TLR4的表达。

1.7 统计分析 采用SPSS 19.0软件统计分析。定量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)描述,组间比较采用单因素方差分析,黄芩苷组分别与其他组两两比较采用Dunnett-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组小鼠体重比较 接种结核分枝杆菌后第8d,结核组、异烟肼组、NF- κ B抑制组和黄芩苷组小鼠体重差异有统计学意义($P < 0.05$);两两比较结果显示,黄芩苷组小鼠体重高于结核组、异烟肼组和NF- κ B抑制组($t=4.002$ 、 4.456 、 3.349 ,均 $P < 0.001$)。见表1。

2.2 3组小鼠单核/巨噬细胞NF- κ B和TLR4比较 接种结核分枝杆菌后第8d,结核组、异烟肼组、黄芩苷组小鼠CD68⁺单核/巨噬细胞NF- κ B和TLR4荧光强度差异均有统计学意义($P < 0.05$);两两比较结果显示,黄芩苷组小鼠NF- κ B、TLR4荧光强度均高于结核组($t_{NF-\kappa B}=5.001$ 、 $t_{TLR4}=4.331$,均 $P < 0.001$)和异烟肼组($t_{NF-\kappa B}=5.117$ 、 $t_{TLR4}=4.843$,均 $P < 0.001$)。见表1。

2.3 4组小鼠结核治疗效果比较 小鼠肺组织HE染色结果显示,结核组、异烟肼组和NF- κ B抑制组均可观察到典型的结核慢性肉芽肿性病变,而黄芩苷组未见典型的结核病变。

4组小鼠肺组织内结核分枝杆菌数差异有统计学意义($P < 0.05$);两两比较结果显示,黄芩苷组小鼠肺组织内结核分枝杆菌数少于结核组、异烟肼组和NF- κ B抑制组($t=4.215$ 、 5.594 、 2.547 ,均 $P < 0.001$)。见表1。

2.4 小鼠肺组织内巨噬细胞数比较 4组小鼠肺组

织内 CD68⁺ 巨噬细胞数差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 两两比较结果显示, 黄芩苷组 CD68⁺ 巨噬细

胞数少于结核组、异烟肼组、NF- κ B 抑制组 ($t=3.348、7.568、5.501$, 均 $P < 0.001$)。见表 1。

表 1 小鼠体重、免疫和结核治疗效果相关指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	体重 (g)	NF- κ B 荧光强度	TLR4 荧光强度	结核分枝杆菌数目 (个/mm ²)	巨噬细胞数目 (个/mm ²)
结核组 (n=10)	21.42 ± 1.21	160.15 ± 26.75	224.24 ± 21.72	7.67 ± 1.38	78.00 ± 5.84
异烟肼组 (n=10)	20.77 ± 1.16	232.32 ± 21.01	272.32 ± 29.19	9.00 ± 1.34	101.50 ± 7.92
NF- κ B 抑制组 (n=10)	23.77 ± 0.64			3.83 ± 0.87	44.67 ± 3.42
黄芩苷组 (n=10)	27.42 ± 0.88	448.21 ± 30.61	401.01 ± 34.58	1.18 ± 0.40	18.17 ± 3.39
F 值	5.067	13.906	11.273	7.461	3.617
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

3 讨论

研究结果显示, 黄芩苷在体内具有很好的抗结核作用, 包括直接杀伤和调节免疫力作用^[11]。黄芩苷组小鼠单核/巨噬细胞 NF- κ B 和 TLR4 平均荧光强度分别为 448.21 ± 30.61 和 401.01 ± 34.58, 均明显高于结核组; 小鼠肺组织 HE 染色结果显示, 结核组、异烟肼组和 NF- κ B 抑制组均可观测到典型的结核慢性肉芽肿性病变, 而黄芩苷组基本观测不到典型的结核病变, 与肖红侠等^[12] 研究结果相似。已有研究发现黄芩苷在体外能够直接抑制结核分枝杆菌的增殖和菌落形成, 但对机体内正常的组织细胞没有明显的损伤作用, 与目前常用的结核治疗药物有明显区别^[12]。

免疫力低下是结核感染和疾病进展的重要原因, 结核感染和结核治疗药物的使用可引起患者免疫力进一步低下, 进而陷入恶性循环, 最终导致治疗效果差, 甚至死亡。因此, 增强患者的免疫力对于结核患者具有十分重要的临床意义。大量的研究发现黄芩苷能够调控机体免疫力, 在肿瘤、自身免疫性疾病和慢性代谢病治疗中具有很好的效果^[13-15]。本研究结果显示, 黄芩苷组肺组织内巨噬细胞表面 NF- κ B 和 TLR4 表达均高于结核组和异烟肼组。当结核分枝杆菌进入机体后, 可触发机体的非特异性防御反应, 巨噬细胞浸润, 以受体结合的方式吞噬结核分枝杆菌^[16-17]。巨噬细胞可产生活性氧中间体和活性氮中间体, 对吞噬的结核分枝杆菌具有很强的杀伤作用^[18]。而结核分枝杆菌能够通过脂阿拉伯甘露糖和 Caspase 酶等机制逃避巨噬细胞的损伤, 在机体免疫力低下时大量繁殖, 引起患者出现结核症状和病理改变^[19-20]。黄芩苷能够促进巨噬细胞表面 NF- κ B 和 TLR4 的表达, 增加巨噬细胞对结核的杀伤作用, 削弱结核分枝杆菌的逃避机制。

综上所述, 黄芩苷通过调控巨噬细胞 NF- κ B 和 TLR4 的表达, 达到抗结核作用。在本实验过程中, 黄芩苷的用量主要通过查阅文献, 并未考量量效关系, 在后续的实验中将探索黄芩苷的用量与结核小鼠模型中巨噬细胞 NF- κ B 和 TLR4 关系, 通过量效关系研究为耐药结核病的治疗提供新的靶点。

参考文献

- [1] MARAIS B J, SINTCHENKO V. Epidemic spread of multidrug-resistant tuberculosis in China [J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2017, 17 (3): 238-239.
- [2] SHAH N S, AULD S C, BRUST J C M, et al. Transmission of extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa [J]. *New England Journal of Medicine*, 2017, 376 (3): 243.
- [3] WANG P, CAO Y, YU J, et al. Baicalin alleviates ischemia-induced memory impairment by inhibiting the phosphorylation of CaMKII in hippocampus [J]. *Brain Research*, 2016, 1642: 95-103.
- [4] ZHU W, JIN Z, YU J, et al. Baicalin ameliorates experimental inflammatory bowel disease through polarization of macrophages to an M2 phenotype. [J]. *International Immunopharmacology*, 2016, 35: 119-126.
- [5] LIU J, WEI Y, LUO Q, et al. Baicalin attenuates inflammation in mice with OVA-induced asthma by inhibiting NF- κ B and suppressing CCR7/CCL19/CCL21 [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2016, 38 (5): 1541-1548.
- [6] 吴正吉, 张渝成, 吴蕊鑫, 等. 黄芩苷对耐药结核鼠 VEGF、MMP-9 表达及对血清炎症因子的影响 [J]. *中国地方病防治杂志*, 2016, 31 (3): 339-340.
- [7] 吴燕燕, 王易, 王莉新. 黄芩苷对结核分枝杆菌作用下 TLR2-MyD88 信号通路的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2011, 27 (8): 714-717.
- [8] 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.
- [9] 王燕平, 叶品良, 张传涛, 等. 肺癆康对耐药烟肼肺结核小鼠