

大蓟抗结核杆菌的活性成分及作用机制研究

万成杰¹, 张春菁¹, 谢宗会¹, 杨再昌^{1,2*}

1. 贵州大学药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州医科大学, 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550014

摘要: **目的** 从大蓟根中分离抗结核杆菌活性成分, 并初步探讨其抗结核杆菌的作用机制。**方法** 采用活性跟踪分离方法, 从大蓟根中分离抗结核杆菌活性成分, 运用棋盘试验法研究大蓟活性成分与异烟肼、利福平和吡嗪酰胺的联合抗菌作用, 运用分子对接软件初步探讨活性单体成分与 KatG 酶的亲和力, 采用 qRT-PCR 法考察活性化合物干预结核分枝杆菌后 KatG 酶基因的相对转录量, 采用紫外分光光度法测定 KatG 酶的活力, 采用扫描电镜观察结核杆菌的形态。**结果** 从大蓟根分离得到具有抗结核杆菌活性的化合物 HP01, 鉴定为槲皮素。槲皮素抑制结核杆菌的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 值为 160 $\mu\text{g/mL}$ 。槲皮素与吡嗪酰胺存在相加作用, 与异烟肼、利福平无拮抗作用。分子对接显示, 槲皮素与 KatG 酶具有较强的亲和力。酶活力测试结果表明槲皮素对结核杆菌 KatG 酶具有抑制作用。结核杆菌被槲皮素处理后其 KatG 基因转录出现明显的补偿上调。扫描电镜结果显示, 槲皮素能破坏结核杆菌细胞壁。**结论** 大蓟抗结核杆菌的活性成分为槲皮素, 槲皮素能够抑制结核杆菌 KatG 酶活性, 导致结核杆菌结构破坏, 从而杀死结核杆菌。在设计新的抗结核组合用药方案时, 可以考虑加入槲皮素。

关键词: 大蓟; 结核杆菌; 活性成分; 作用机制; KatG 酶; 槲皮素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)21-6561-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.014

Component with activity against *Mycobacterium tuberculosis* from *Cirsium japonicum* and its anti-*M. tuberculosis* mechanism

WAN Cheng-jie¹, ZHANG Chun-jing¹, XIE Zong-hui¹, YANG Zai-chang^{1,2}

1. School of Pharmaceutical Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China

2. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China

Abstract: **Objective** To isolate the anti-*Mycobacterium tuberculosis* active components from roots of *Cirsium japonicum*, and preliminarily explore the anti-*M. tuberculosis* mechanism. **Methods** Using bioassay-guided isolation method to isolate active molecules against *M. tuberculosis* from roots of *C. japonicum*. The checkerboard test was used to study the synergic effects of active ingredients with isoniazid, rifampicin and pyrazinamide. Using molecular docking software to preliminarily explore the affinity between active monomer and KatG. qRT-PCR was used to study the relative transcription of *KatG* gene after the active compound interfered with *M. tuberculosis*. KatG activity was determined by ultraviolet spectrophotometry. Scanning electron microscope was used to observe the morphology of *M. tuberculosis*. **Results** Compound HP01 with anti-*M. tuberculosis* activity was isolated from roots of *C. japonicum*, and was identified as quercetin. Quercetin inhibited *M. tuberculosis* with a MIC value of 160 $\mu\text{g/mL}$. Quercetin had an additive effect with pyrazinamide, but had no antagonistic effect with isoniazid and rifampicin. Molecular docking showed that quercetin had a strong affinity with KatG. The enzyme activity test showed that quercetin had an inhibitory effect on KatG of *M. tuberculosis*. After *M. tuberculosis* was treated with quercetin, the transcription of *KatG* gene showed a compensatory up-regulation. Scanning electron microscopy showed that quercetin could destroy the cell wall of *M. tuberculosis*. **Conclusion** The active component of *C. japonicum* against *M. tuberculosis* was quercetin. Quercetin could kill *M. tuberculosis* by inhibiting KatG of

收稿日期: 2021-05-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82060635); 国家自然科学基金资助项目 (81760629); 贵州省社会发展科技攻关项目 (SY 字[2013]3058号); “国重室开放课题”及“黔科合平台人才” ([2017]5101)

作者简介: 万成杰 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为抗结核分枝杆菌化合物。E-mail: 1536590611@qq.com

*通信作者: 杨再昌, 男, 教授, 博士, 硕士生导师。Tel: (0851)8308717 E-mail: yangzaichangzm@163.com

M. tuberculosis and causing structural damage. When designing a new anti-tuberculosis combination regimen, quercetin can be considered.

Key words: *Cirsium japonicum* DC.; *Mycobacterium tuberculosis*; active component; mechanism of action; KatG; quercetin

结核病是由结核分枝杆菌引起的重大传染病之一,以潜伏期长、易复发为主要特征,主要通过呼吸道进行传播,可侵犯全身各器官,以肺结核最为常见。据 2020 年 WHO《全球结核病报告》数据显示,2019 年全球结核潜伏感染人群约为 20 亿,约有 1000 万人罹患结核病。中国是结核病高负担国家之一,耐利福平结核病患者数量居全球第 2 位(6.5 万,占全球 14%),耐药菌流行使我国结核病的防控变得更为复杂。发现新药是控制结核病的有效手段之一。

大蓟为菊科植物大蓟 *Cirsium japonicum* Fisch. DC. 的干燥地上部分或根,在我国大部分地区均有分布^[1-2]。据报道,大蓟具有抗菌、降血压、抗肿瘤、抗糖尿病、抗骨质疏松、杀线虫等多种药理活性^[3-8],在《唐本草》《本草新编》《滇南本草》《本草通玄》等中医药古籍中均有记载。《十药神书》是我国现存最早的结核病治疗专著,作者为元代的葛可久,结核在中国古代称为癆瘵、鬼疰、尸疰、癆病等。《十药神书》介绍了 10 个治疗结核的方剂,第 1 个叫“十灰散”,该方由大蓟、小蓟、荷叶、扁柏叶、茅根、茜草根、山梔、大黄、牡丹皮、棕榈皮 10 味药组成。此外《滇南本草》记载,大蓟“散癆瘵结核,治结核于项左右”。基于古代典籍、现代研究报道^[9]和本课题组的前期研究结果^[10],对大蓟根的抗结核杆菌活性进行了体外研究。

采用活性跟踪分离法,从大蓟根分离纯化活性化合物,并鉴定活性单体成分的结构为槲皮素;研究活性单体成分与异烟肼、利福平和吡嗪酰胺的联合抗菌作用;通过扫描电镜、分子对接、qRT-PCR、酶活力测定等,初步揭示活性单体成分的抗结核杆菌机制。本研究为大蓟的临床应用提供了科学依据,为研发新型抗结核杆菌药物提供了新的思路。

1 材料

1.1 药材

大蓟根挖采自贵阳市南明区永乐乡鱼梁河谷,经贵州大学药学院杨再昌教授鉴定为菊科植物大蓟 *C. japonicum* Fisch. DC. 的根。

1.2 药品与试剂

Middle brook 7H9 培养基购自美国 Sigma 公司;

薄层硅胶板 GF₂₅₄ 和 200~300 目硅胶购自青岛海洋化工集团公司;改良罗氏培养基基础够自上海博微生物科技有限公司;甲醇、二氯甲烷、醋酸乙酯、石油醚等均为国产分析纯。

1.3 仪器

StepOne 型 qRT-PCR 仪(美国 ABI 公司);微量分光光度计(美林恒通仪器有限公司);凝胶成像系统(上海复日科技有限公司);电泳仪(北京六一生物科技有限公司);紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司)。

2 方法

2.1 大蓟根抗结核杆菌成分的活性跟踪分离

2.1.1 大蓟根的提取与萃取分段 将大蓟根(10 kg)洗净切碎后,自然晾干,粉碎。分批用 80%乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,滤过,合并提取液,用旋转蒸发仪进行减压浓缩,将浓缩液水浴蒸干,得到乙醇提取物浸膏。将乙醇提取物浸膏溶于适量 10%乙醇溶液中,依次用石油醚、醋酸乙酯反复萃取至无色,浓缩得到石油醚萃取物(92 g)、醋酸乙酯萃取物(110 g)和水相剩余部分(245 g)。采用刃天青显色法^[11],对大蓟提取物的不同萃取部位进行活性跟踪,发现醋酸乙酯萃取物抗结核杆菌活性最强,因此将醋酸乙酯萃取部位视为有效部位。

2.1.2 大蓟醋酸乙酯部位抗结核杆菌的活性跟踪分离 采用正相硅胶柱色谱对醋酸乙酯萃取物进行分离,流动相为石油醚-醋酸乙酯(10:1、8:1、6:1、4:1、2:1、1:1),梯度洗脱,得到 6 个组分,分别为 F1(3.5 g)、F2(4.6 g)、F3(7.2 g)、F4(8.6 g)、F5(7.4 g)和 F6(12.2 g),活性跟踪发现有效组分为 F5。将 F5 经硅胶柱色谱继续梯度洗脱,洗脱剂为石油醚-醋酸乙酯,洗脱液按薄层色谱结果进行合并,最终共得到 4 个亚组分,分别为 Fr1(1.4 g)、Fr2(1.7 g)、Fr3(1.2 g)、Fr4(0.7 g)。活性跟踪表明有效组分为 Fr2,Fr2 经硅胶柱色谱及制备薄层色谱分离纯化,得到单体化合物 HP01(200 mg)。

2.2 抗结核杆菌活性测试

2.2.1 H37Rv 菌悬液的制备 从改良罗氏培养基中取新鲜分枝杆菌(H37Rv)培养物约 10 mg,加入到 4 mL 7H9 培养基中研磨,菌悬液调整至麦氏

管 1.0 的浊度, 于 4 °C 保存备用。

2.2.2 Middle brook 7H9 培养基的制备 精确称定 Middle brook 7H9 培养基 4.7 g, 加入 1 L 水、2 mL 甘油, 搅拌溶解, 混合均匀, 分装于 150 mm×15 mm 的玻璃试管中, 每管总体积 2 mL。

2.2.3 样本溶液的制备 样本均用二甲基亚砜 (DMSO) 制成母液, 采用二倍稀释法, 用 Middle brook 7H9 培养基配制成系列浓度 (DMSO 的终浓度 <5%), 每个浓度平行制备 3 管, 阳性对照组为含有 1 µg/mL 异烟肼的培养基, 阴性对照组为不加药物但含 5% DMSO 的培养基。

2.2.4 活性测试 将制备好的含药试管置于 121 °C 高压灭菌锅灭菌 30 min, 冷却至 25 °C, 每管分别接种 20 µL H37Rv 菌悬液, 置于 37 °C 的恒温培养箱中培养 7 d, 然后加入 15 µL 0.01% 刃天青染色液, 摇匀后将其置于 37 °C 的恒温培养箱中, 培养期间每半小时观察 1 次, 并做好相应的记录, 当发现阴性对照组溶液变红, 而阳性对照组未变色时, 培养结束, 观察并记录实验结果。样本的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 值定义为培养基保持蓝色的最小浓度。

2.3 HP01 与异烟肼、利福平、吡嗪酰胺联合抗菌实验

采用棋盘试验法, 按照文献方法^[12]操作, 采用联合抑菌指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI) 判断结果: $FICI \leq 0.5$, 协同作用; $0.5 < FICI \leq 1$, 相加作用; $1 < FICI \leq 2$, 无关作用; $FICI > 2$, 拮抗作用。

2.4 HP01 与结核杆菌 KatG 酶的分子对接

2.4.1 小分子配体的准备 预试验时, 发现 HP01 对结核杆菌 KatG 具有抑制作用, 因此, 进行分子对接研究。使用 ChemDraw Professional 15.0 软件绘制配体小分子 HP01 的结构式, 然后将其二维结构转化为三维结构, 将三维结构拷贝到 Discovery Studio 2016 软件中, 通过该软件进行加氢、去除重复链、产生异构体、互变异构体和三维构象, 最后加 CHARMM 力场进行能量最优化。

2.4.2 KatG 蛋白的准备 从 RCSB PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 中检索并下载结核杆菌 KatG 蛋白晶体结构, 并对其进行删除水分子、去除原配体、加氢等预处理。

2.4.3 分子对接 将准备好的受体蛋白与小分子配体导入到 Discovery Studio 2016 软件中, 点击

Receptor-Ligand Interaction/Dock Ligands, 点击 Lib Dock 进行分子对接, 设置对接参数为 Conformation Method: BEST, Docking Preferences: High Quality, 其余参数均为默认值, 参数设置完成后点击 Run 进行分子对接, 对接完成后, LibDock Score 由高到低依次排列, 对打分结果进行分析。

2.5 HP01 对结核杆菌 KatG 酶的抑制活性

取新鲜培养的结核杆菌约 100 mg 加入离心管中, 向其中加入 4 mL 溶菌酶溶液 (用 0.05 mol/L PBS 液配制, pH 7.2), 混匀, 多次搅拌后离心, 上清液即为粗酶液。实验在试管中进行, 调整酶液吸光度 (A_{240}) 至 0.5, 用酶液调零。对照组: 酶液 3 mL, PBS 溶液 1 mL; 加药组: 酶液 3 mL, 含药 (HP01) PBS 溶液 1 mL, HP01 的终质量浓度为 160 µg/mL (MIC)。对照组、加药组均放置于 25 °C 水浴中, 2 h 后, 同时加入过氧化氢溶液 (终浓度为 20 µmol/L), 2 min 后, 立即测定 A_{240} 值, 计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{加药}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{对照}}$$

2.6 HP01 对 KatG 基因转录的影响

2.6.1 样品制备 分别用 80、160 µg/mL HP01 处理结核杆菌, 阴性对照组为不含药的 7H9 培养基, 相同条件下培养 48 h, 离心后取沉淀部分提取 RNA。

2.6.2 设计与合成引物 在 NCBI GenBank 数据库中查找有关结核杆菌 H37Rv 菌株中 KatG 基因序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计实验所需要的引物, 并由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 内参基因为 16S。引物序列: 16S 上游引物 338F-5'ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3', 下游引物 518R-5'ATTACCGCGGCTGCTGG-3'; katG 上游引物 5'-GAGCAACACCCACCCATTACA-3', 下游引物 5'-GTTTTGGTGCAGTACCTTCAGATT-3'。

2.6.3 RNA 抽取及检测 按 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (B511321) 说明书提取总 RNA, 用微量分光光度计检测 RNA 浓度。

2.6.4 cDNA 模板的合成 按照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (6210A) 进行第一链 cDNA 的合成, -20 °C 保存。

2.6.5 qRT-PCR 检测 qRT-PCR 反应按照 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (B511321) 说明书进行。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。

2.7 HP01 对结核杆菌的形态学干预

结核杆菌分别培养在 HP01 质量浓度为 160、320、640 µg/mL 的 7H9 培养基中, 并设置阴性对照

组, 37 ℃培养 48 h 后离心, 取沉渣制样, 用扫描电子显微镜 (SEM) 观察。

3 结果

3.1 不同萃取部位的活性跟踪

采用刃天青显色法, 对大蓟乙醇提取物的不同萃取部位进行活性测试, 醋酸乙酯萃取物的 MIC 值为 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其余部位 MIC 值应大于 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$

(表 1)。可见醋酸乙酯萃取物是抗结核杆菌的有效部位。醋酸乙酯萃取部位通过硅胶柱色谱分离, 得到 6 个组分 F1~F6, 活性测试结果见表 2, 可以确定 F5 为有效组分。对 F5 的 4 个亚组分 Fr1~Fr4 进行活性跟踪, 确定 Fr2 为活性亚组分, 对 Fr2 进一步纯化, 得到化合物 HP01, 化合物 HP01 抗结核杆菌的 MIC 值为 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 大蓟不同萃取部位的抗结核杆菌活性

Table 1 Activity of different extractions of *C. japonicum* against *M. tuberculosis*

组别	活性跟踪结果			
	80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	640 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
石油醚萃取物	—	—	—	—
醋酸乙酯萃取物	—	—	—	—
萃取后剩余物	—	—	—	—
阴性对照		—		
阳性对照		+		

“+”表示有活性, “—”表示无活性, 表 2 同

“+” means active, “—” means inactive, same as table 2

表 2 大蓟醋酸乙酯萃取部位的活性跟踪

Table 2 Activity tracking of ethyl acetate fraction of *C. japonicum*

组别	活性跟踪结果		
	80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
F1	—	—	—
F2	—	—	—
F3	—	—	—
F4	—	—	—
F5	—	+	+
F6	—	—	—
阴性对照		—	
阳性对照		+	

3.2 结构鉴定

化合物 HP01: 黄色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ : 6.89 (1H, s, H-2'), 7.62 (1H, d, $J = 44$ Hz, H-6'), 7.73 (1H, d, $J = 44$ Hz, H-5'), 6.38 (1H, s, H-8), 6.18 (1H, s, H-6), 12.26 (1H, s, OH-5), 10.26 (1H, s, OH-7), 9.32 (1H, s, OH-3), 9.09 (1H, s, OH-4'), 8.63 (1H, s, OH-3'); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD) δ : 175.9 (C-4), 164.2 (C-7), 161.1 (C-5), 156.8 (C-9), 147.4 (C-2), 146.6 (C-4'), 144.8 (C-3'), 135.8 (C-3), 122.8 (C-1'), 120.3 (C-6'), 114.8 (C-5'), 114.6 (C-2'), 103.1 (C-10), 97.8 (C-6), 93.0 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定 HP01 为槲皮素 (图 1)。

3.3 HP01 与异烟肼、利福平、吡嗪酰胺联合抗菌实验结果

按照棋盘实验方法, 评价 HP01 与一线抗结核

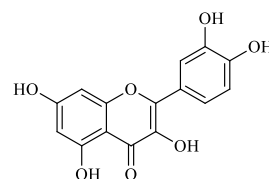


图 1 HP01 的结构

Fig. 1 Structure of HP01

药物的协同作用, 结果见表 3。HP01 与吡嗪酰胺存在相加作用, 可以降低吡嗪酰胺的 MIC 值 4 倍, HP01 不影响异烟肼、利福平的抗结核杆菌活性。可见 HP01 与异烟肼、利福平不存在拮抗作用, 能增强吡嗪酰胺的抗结核杆菌作用, 具有与一线药物组合治疗结核病的潜质。

3.4 分子对接结果

从化合物 HP01 与受体蛋白 KatG 对接后的二维图 (图 2) 可以看到, 化合物 HP01 能够与 KatG 很好地结合, 化合物 HP01 与 KatG 的氨基酸残基 GLY32、GLU195、GLN36 形成氢键, 与 LYS46 形成 Pi-Cation 相互作用, 与 GLN36 形成 1 个 Pi-Sigma 吸引作用 (图 3), 打分结果为 107.93, 这些作用力稳定了复合物构象, 推测受体蛋白 KatG 可能是化合物 HP01 的作用靶点。

3.5 化合物 HP01 对结核杆菌 KatG 酶的干预作用

对照组 A_{240} 为 0.517 ± 0.014 , HP01 组 A_{240} 为 0.554 ± 0.012 , 表明化合物 HP01 对结核杆菌 KatG 酶存在抑制作用。尽管抑制率仅为 7.2%, 但是足以

表 3 HP01 与异烟肼、利福平、吡嗪酰胺的联合抗菌试验

Table 3 HP01 combination with INH, RIF and PZA against *M. tuberculosis*

菌株	药物	MIC($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		FICI	结果
		单独用药	联合用药		
H37Rv	吡嗪酰胺	120	30	0.75	相加作用
	HP01	160	80		
H37Rv	异烟肼	0.26	0.26	2.00	无关作用
	HP01	160	160		
H37Rv	利福平	0.40	0.40	2.00	无关作用
	HP01	160	160		

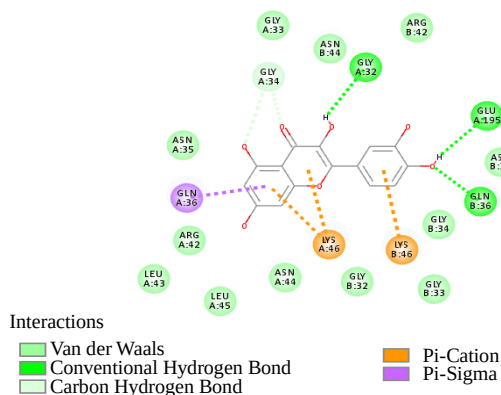


图 2 化合物 HP01 与 KatG 的相互作用二维图

Fig. 2 Two-dimensional image of interactions between compound HP01 and KatG

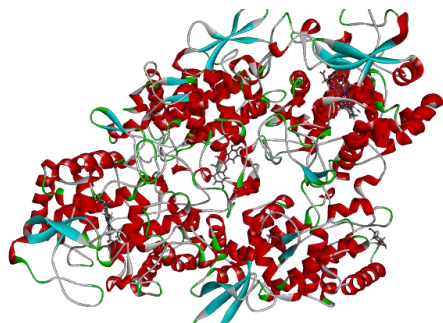


图 3 化合物 HP01 与 KatG 的相互作用三维图

Fig. 3 Three-dimensional image of interactions between compound HP01 and KatG

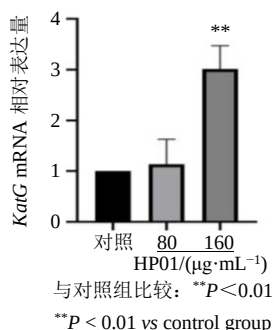


图 4 化合物 HP01 干预后 KatG 基因表达量的变化

Fig. 4 Expression changes of KatG gene after intervention of compound HP01

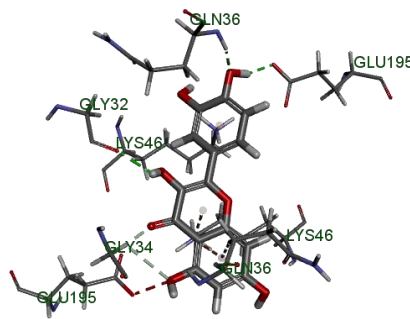
导致结核杆菌内的 H_2O_2 大量累积, 从而对结核杆菌生命力产生影响, 并最终导致结核杆菌死亡。

3.6 KatG 基因相对定量结果

如图 4 所示, 与对照组相比, 经化合物 HP01 ($160 \mu\text{g/mL}$) 处理后 KatG 基因相对表达量明显上调 ($P<0.01$), 呈剂量相关性。可见 HP01 抑制结核杆菌 KatG 后, 结核杆菌 KatG 基因出现明显的补偿表达。

3.7 HP01 对结核杆菌形态学的影响

如图 5 所示, 阴性对照组结核杆菌形态结构完整、轮廓清晰, 呈短棒状、细长略带弯曲。经 HP01 处理后, 结核杆菌菌体变成球状、变形、菌体破裂。可见化合物 HP01 能破坏结核杆菌的细胞壁或细胞



膜结构, 从而导致结核杆菌死亡。

4 讨论

结核病至今仍是全球十大致死原因之一, 尤其是耐药结核杆菌逐渐增多, 使结核病的防控形势更加严峻。吡嗪酰胺是缩短结核治疗时间、降低结核病复发率的关键药物, 但是吡嗪酰胺肝毒性大, 由于耐吡嗪酰胺菌株较多, 临床上普遍大剂量使用吡嗪酰胺, 这使得吡嗪酰胺的毒性问题更加突出^[14-15]。因此, 寻找能增强吡嗪酰胺药效、减少其用量的药物对结核病治疗具有重大意义^[16]。

本研究从大蓟跟踪分离出抗结核杆菌活性分子,

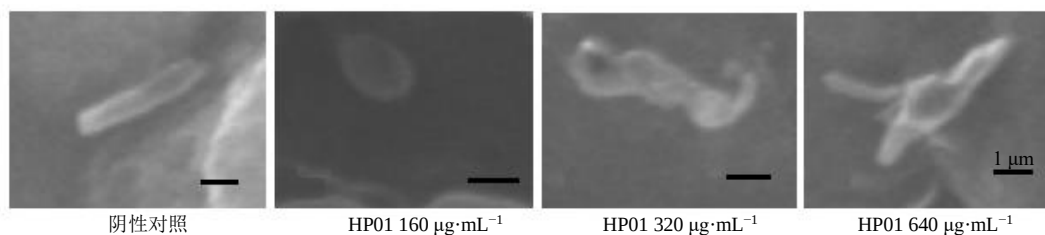


图 5 结核杆菌的扫描电镜结果

Fig. 5 Scanning electron microscope results of *M. tuberculosis*

鉴定为槲皮素，槲皮素单独使用，在体外抑制结核杆菌的 MIC 值较高 (160 µg/mL)，但是联合抗菌实验证实，槲皮素能增强吡嗪酰胺的抗结核杆菌作用，并且与异烟肼、利福平无拮抗作用，槲皮素的这一特征为设计新型抗结核联合用药方案提供了参考。

槲皮素能够抑制结核杆菌 KatG 酶，该酶主要负责清除菌体内的 H₂O₂，H₂O₂ 是重要的氧自由基，可破坏结核杆菌的大分子^[17]，抑制 KatG 酶将导致结核杆菌细胞内 H₂O₂ 过度累积，使结核杆菌的重要结构比如细胞壁被破坏，产生杀菌作用。为了进一步证实槲皮素的抗菌机制，采用分子对接模拟发现槲皮素与 KatG 酶存在较强的亲和力。用槲皮素处理结核杆菌后，KatG 基因转录出现补偿性上调，呈剂量相关性。这些结果提示，槲皮素通过抑制结核杆菌 KatG 酶，造成细胞内 H₂O₂ 累积，产生结构破坏，从而杀死结核杆菌。扫描电镜结果显示，经槲皮素处理后，结核杆菌出现体积膨大、形状变化和菌体破裂等变化，表明细胞壁被破坏，这些变化可能是由于细胞内 H₂O₂ 过度累积引起。有待采用 X 射线衍射技术，证实槲皮素与 KatG 酶形成复合物。

大蓟是常用中草药，《十药神书》明确大蓟可用于癆病治疗，本研究证实，大蓟的槲皮素成分具有抗结核杆菌活性。槲皮素是存在于多种植物中的一种黄酮类化合物，具有广泛的生物学活性^[18-20]，本研究提示槲皮素抗结核杆菌的活性不算很强，使用槲皮素分子原型用于结核病治疗缺乏临床可行性，但是槲皮素可能是通过抑制 KatG 酶而发挥抗结核杆菌作用，其作用机制较为新颖，因此，下一步拟对槲皮素进行结构修饰，合成抗结核杆菌活性更强、具有成药性的分子，并结合动物感染模型进行体内药效验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 植飞, 孔令义, 彭司勋. 中药大蓟的化学及药理研究进

展 [J]. 中草药, 2001, 32(7): 664-667.

[2] 符玲, 龚千锋, 钟凌云. 大蓟的研究进展综述 [J]. 江西中医药, 2003, 34(10): 42-43.

[3] 叶莉, 杨凤琴, 梁军, 等. 宁夏大蓟提取物不同极性部位对 4 种念珠菌的体外抑菌活性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 222-223.

[4] 王振平, 毕佳, 陈忠科. 大蓟水煎剂治疗小鼠高血压的研究 [J]. 山东大学学报: 理学版, 2011, 46(7): 7-10.

[5] 王振飞, 李煜, 戴宝贞, 等. 大蓟对 5 种癌细胞抑制作用的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(4): 761-762.

[6] Yin J, Heo S I, Wang M H. Antioxidant and antidiabetic activities of extracts from *Cirsium japonicum* roots [J]. *Nutr Res Pract*, 2008, 2(4): 247-251.

[7] Kim Y O, Jin S K, Sang W L, et al. Osteoprotective effect of extract from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* in ovariectomized rats [J]. *Korean Soc Med Crop Sci*, 2015, 23(1): 1-7.

[8] Kawazu K, Nishii Y, Nakajima S. Studies on naturally occurring nematocidal substances. 2. Two nematocidal substances from roots of *Cirsium japonicum* [J]. *Agric Biol Chem*, 1980, 44(4): 903-906.

[9] 李武, 汪燕, 艾雪峰. 大蓟提取物联合抗生素对分枝杆菌的协同抗菌作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(12): 2087-2091.

[10] 韩立芬, 宋善敏, 邓伟, 等. 体外评价 29 种中药的抗结核分枝杆菌活性 [J]. 药物化学, 2017, 5(3): 39-44.

[11] Palomino J C, Martin A, Camacho M, et al. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(8): 2720-2722.

[12] Caleffi-Ferracioli K R, Maltempe F G, Siqueira V L, et al. Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2013, 93(6): 660-663.

[13] Ternai B, Markham K R, Stanley R, et al. Carbon-13 NMR studies of flavonoids [J]. *Tetrahedron*, 1978, 32(5): 565-569.

[14] Whitfield M G, Soeters H M, Warren R M, et al. A global

- perspective on pyrazinamide resistance: Systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133869.
- [15] Robinson H J, Siegel H, Pietrowski J J. Toxicity of pyrazinamide [J]. *Am Rev Tuberc*, 1954, 70(3): 423-429.
- [16] Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: A review [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2003, 7(1): 6-21.
- [17] Ng V H, Cox J S, Sousa A O, *et al.* Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: Countering the phagocyte oxidative burst [J]. *Mol Microbiol*, 2004, 52(5): 1291-1302.
- [18] 杨扬, 郭举. 具有抗肿瘤活性的槲皮素衍生物研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(6): 1468-1475.
- [19] Wang S, Yao J, Zhou B, *et al.* Bacteriostatic effect of quercetin as an antibiotic alternative *in vivo* and its antibacterial mechanism *in vitro* [J]. *J Food Prot*, 2018, 81(1): 68-78.
- [20] 崔山凤. 槲皮素的研究进展 [J]. *西北药学杂志*, 2006, 21(6): 279-281.

[责任编辑 李亚楠]