

大蒜新素体内外抑制小鼠巨细胞病毒感染诱导的 调节性 T 细胞扩增实验研究

李亚男, 舒赛男, 王 慧, 刘兴楼, 董永绥, 方 峰*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 儿科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 在体内外水平研究大蒜新素对小鼠巨细胞病毒 (murine cytomegalovirus, MCMV) 感染导致调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 异常扩增的抑制作用。方法 72 只 MCMV 感染小鼠随机分为安慰剂组和大蒜新素治疗组; 并设 72 只同期模拟感染小鼠为对照, 随机分为模拟感染对照组和大蒜新素对照组。分别于大蒜新素处理后 1、7、14、28、60、120 d 处死小鼠, 获得脾细胞待测。采用 Western blotting 法检测脾细胞中 Foxp3 的蛋白表达强度; 流式细胞术分析 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞在脾细胞中所占比率的变化。采用小鼠胚胎成纤维细胞对大蒜新素的最大耐受浓度处理 MCMV 感染的胚胎成纤维细胞 3 d 后, 采用 Real-time PCR 法和 Western blotting 法分别检测 T 细胞中 Foxp3 mRNA 和蛋白的表达水平。结果 整体研究发现, 大蒜新素对正常小鼠脾细胞中 Foxp3 蛋白表达和 Treg 细胞比率均无显著影响; 但是在 MCMV 感染小鼠, 大蒜新素可在感染慢性期显著减少 Foxp3 蛋白表达强度、降低调节性 T 细胞比率。体外细胞模型发现, 最大耐受浓度的大蒜新素加入共培养体系后可部分拮抗 MCMV 诱导的 Foxp3 基因和蛋白表达上调。结论 大蒜新素在体内外均可显著纠正 MCMV 感染导致的 Treg 异常扩增。大蒜新素通过影响 Treg 增殖进而增强抗病毒免疫而有利于机体清除 CMV 病毒, 可能是大蒜新素诱导抗 CMV 免疫的另一重要机制。

关键词: 大蒜新素; 巨细胞病毒; 调节性 T 细胞; 扩增

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)09-1493-05

In vivo and in vitro inhibition of allitridin on regulatory T cells amplification induced by murine cytomegalovirus

LI Ya-nan, SHU Sai-nan, WANG Hui, LIU Xing-lou, DONG Yong-sui, FANG Feng

(Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of allitridin on regulatory T cells (Treg) amplification induced by murine cytomegalovirus (MCMV) *in vivo* and *in vitro*. **Methods** Seventy two MCMV infected mice were randomly divided into two groups, allitridin-treated group and placebo-treated group. Another 72 simulated-infection mice served as controls and were randomly divided into allitridin-treated control and simulated-infection control. The mice were sacrificed for collection splenocytes at day 1, 7, 14, 28, 60, and 120 after treatment. The protein expression of Foxp3 and the proportion of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs in splenocytes were measured by Western blotting and flow cytometry (FCM), respectively. Maximum tolerance concentration (MTC) allitridin was added to the mouse embryo fibroblasts (MEF) and MCMV co-culture system. After 3 d, changes of Foxp3 mRNA and protein expression were measured by real-time PCR and Western blotting, respectively. **Results** *In vivo*, allitridin had no influence to the Foxp3 expression and Treg proportion of uninfected mice, but could notably down-regulate those of infected mice during chronic infection period. *In vitro*, the treatment of MTC allitridin could partly block MCMV induction of Foxp3 mRNA and protein expression. **Conclusion** Allitridin could partly retrieve MCMV induced Treg expansion and Treg-mediated anti-MCMV immunosuppression no matter *in vivo* or *in vitro*. By using this strategy, allitridin could enhance the specific cellular immune responses against cytomegalovirus (CMV) and be favourable for clearance of CMV viruses from host, suggesting another key mechanism of allitridin's against CMV.

Key words: allitridin; cytomegalovirus (CMV); regulatory T cells (Treg); amplification

* 收稿日期: 2010-01-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572345)

作者简介: 李亚男 (1978—), 女, 山东莱西人, 博士, 主治医师, 主要研究小儿感染性疾病。

Tel: (0431) 82217545 E-mail: lyanan2008@sina.com

* 通讯作者 方 峰 E-mail: ffang@tjh.tjmu.edu.cn

巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 感染在人群中普遍存在, 在绝大多数免疫正常个体, CMV 通常呈隐性或无症状感染, 但是在免疫功能不全人群 (如婴幼儿和免疫缺陷患者), 原发或继发的 CMV 感染常可导致严重疾病。因而引起人们对 CMV 防治研究的日益重视。然而, 目前已通过 FDA 认证可供临床选用的抗 CMV 药物仅有更昔洛韦、膦甲酸、西多福韦和福米韦生 4 种^[1], 这些药物均可抑制病毒 DNA 聚合酶, 具有明确抗病毒作用, 但是对骨髓和肾脏均有较大毒副作用, 且停药后容易反弹, 并会诱导耐药性毒株的产生。因此, 研制新型抗 CMV 药物, 尤其是通过调节机体特异性免疫功能而发挥抗病毒效应的中药制剂具有重要的理论和实用价值。大蒜新素是从大蒜中提取的有效成分, 具有卓越的解毒、抗病毒、提高机体免疫功能等功效, 并且不良反应轻微^[2-3]。作为免疫调节剂, 大蒜新素具有促进淋巴细胞增殖、加强巨噬细胞吞噬功能、增强特异性细胞免疫应答等功效^[4-5]。在抗 CMV 感染方面, 国内早在 20 世纪 90 年代就有大蒜新素具有抗 CMV 功效的报道。并有研究证实, 运用大蒜新素治疗骨髓移植后 CMV 肺炎能显著降低患者病死率^[6]。前期研究也发现, 大蒜新素具有直接杀 CMV 病毒和增强抗病毒免疫的双重功效, 其中 CMV 诱导调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 扩增是其逃避特异性抗病毒免疫的一个重要机制^[7]。为探讨大蒜新素是否可通过影响 Treg 的增殖和功能效应而在诱导机体抗 CMV 免疫机制中发挥作用, 本研究在体内外水平研究大蒜新素对小鼠巨细胞病毒 (MCMV) 诱导的 Treg 功能效应的影响。

1 材料

1.1 动物: 健康纯系 BALB/c 小鼠 144 只, 雌性, 4 周龄, 体质量 10~12 g, 购自湖北省医学科学院纯种动物室, 饲养于同济医院动物室洁净层柜内, 实验前适应饲养 3 d, 每天 12 h 光照时间, 自由取食饮水。

1.2 病毒: MCMV Smith 株由美国德克萨斯大学健康卫生中心惠赠。在 BALB/c 小鼠唾液腺中传毒增殖, 收获病毒用于本实验, 经蚀斑形成实验测定收获病毒株的平均感染性滴度为 1.0×10^6 PFU/mL。

1.3 药物: 大蒜素注射液 (即大蒜新素) 为上海禾丰制药有限公司生产, 剂型 2 mL/支, 15 mg/mL, 批号: 010501。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 大蒜新素应用剂量的确定: 大蒜新素在成人的应用剂量为 90~150 mg/d, 依中剂量 (120 mg/d) 计算出小鼠用药的一般剂量为 25 mg/(kg·d)。

2.1.2 MCMV 感染小鼠模型的建立和实验分组: 参照文献方法^[8]建立全身 MCMV 感染小鼠模型。72 只 MCMV 感染小鼠随机分为 2 组, 36 只在接种 MCMV Smith 株后 24 h 开始 ip 一般剂量 (0.2 mL) 大蒜新素, 每天 1 次, 作为大蒜新素治疗组; 36 只 MCMV 感染小鼠 ip 生理盐水 (0.2 mL) 作为安慰剂组; 另设正常 BALB/c 小鼠 72 只, 接种与病毒等量的正常唾液腺匀浆, 不接种病毒, 36 只在 24 h 后开始 ip 生理盐水 (0.2 mL), 每天 1 次, 作为模拟感染对照组; 另外 36 只在 24 h 后开始 ip 一般剂量 (0.2 mL) 大蒜新素, 每天 1 次, 作为大蒜新素对照组; 各组分别于治疗后 1、7、14、28、60、120 d 随机处死 6 只小鼠, 无菌分离小鼠脾脏, 常规制备混合脾细胞悬液。

2.1.3 Western blotting 法检测 Foxp3 蛋白水平: 悬浮缓冲液提取细胞总蛋白, Bradford 法测蛋白浓度。蛋白质上样后经 10% 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 半干电转印于硝酸纤维素膜上; 室温封闭 1 h; 用 1:100 羊抗鼠 Foxp3 多克隆一抗 (美国 Santa Cruz 公司) 和 1:300 β -actin 多克隆一抗 (美国 Santa Cruz 公司) 4℃ 孵育 24 h; 洗膜; 加入 1:800 标记有辣根过氧化物酶的兔抗羊二抗 (美国 Santa Cruz 公司) 室温孵育 2 h; 洗膜; ECL 发光法显影。采用 HMIAS-2000 型全自动医学彩色图像分析系统分析测定各目的条带的积分吸光度值。被检测蛋白 Foxp3 相对分子质量为 49~55, β -actin 为 42。结果处理: 以 β -actin 条带为内参照进行蛋白上样量的校正, 以目的条带的积分吸光度/ β -actin 条带的积分吸光度进行半定量分析。

2.1.4 流式细胞术检测 $CD4^+ CD25^+ Foxp3P^+$ 细胞比率: 每个样本取 2×10^6 个 T 细胞进行荧光标记; 加入 PE-CD4 抗体和 FITC-CD25 抗体 (美国 Ebioscience 公司) 各 1 μ L, 4℃ 避光孵育 20 min, 设同型无关抗体作为阴性对照; 预冷 Staining buffer (美国 Ebioscience 公司) 洗涤细胞 2 次, 1 mL Fixation buffer (美国 Ebioscience 公司) 重悬细胞, 4℃ 避光孵育 30 min; 离心倒上清, Permeabilizing buffer (美国 Ebioscience 公司) 洗涤细胞; 加入

PE-cy5 标记的抗 Foxp3 抗体 (美国 Ebioscience 公司) 5 μ L, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 min, 设同型无关抗体作为阴性对照; Permeabilizing buffer 洗涤细胞, 重悬于 450 μ L Staining buffer, 上流式细胞仪检测; 依照公式 $T_{reg} = CD4^{+} CD25^{+} \times Foxp3^{+}$, 计算 $CD4^{+} CD25^{+} Foxp3^{+} T_{reg}$ 在 T 细胞中的比率。

2.2 体外实验

2.2.1 细胞纯化与培养: 胚胎成纤维细胞的原代和传代培养: 乙醚麻醉 BALB/c 新生小鼠, 75% 乙醇消毒, 无菌分离肺组织并剪切成 1 mm³ 大小, 0.2% 胰蛋白酶消化, 调节细胞密度至 5×10^5 /mL, 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养箱生长。细胞经传代培养后, 第 4、5 代用于实验。Treg 纯化和分离: 眼球摘除法处死 4 周龄 BALB/c 小鼠, 无菌分离脾脏, 参照文献方法^[9] 用尼龙毛柱法分离纯化得到 T 淋巴细胞, 经流式细胞仪 (美国 BD 公司) 检测, CD3 阳性细胞率 > 90%。采用 MACS Treg Isolation Kit (德国 Miltenyi Biotec 公司) 获得 $CD4^{+} CD25^{+} T_{reg}$ 和不含 Treg 的 T 淋巴细胞 (T cell depletion of Treg, T_{depl reg}), 操作按照说明书进行。经流式细胞术检测, $CD4^{+} CD25^{+} T_{reg} > 95\%$ 。

2.2.2 大蒜新素在细胞水平应用剂量的确定: 采用 MTT 比色法找出胚胎成纤维细胞对大蒜新素的最大耐受浓度。

2.2.3 细胞模型建立与分组: 首先用 MCMV 感染胚胎成纤维细胞 (感染复数为 1.0) 与 T 淋巴细胞共培养 (1:10); 大蒜新素处理组此时加入 MTC 浓度的大蒜新素, 安慰剂组加入等体积 PBS 溶液。共培养 3 d 后, 分别收获 T 细胞、培养上清和胚胎成纤维细胞待测。T_{depl reg} 与正常胚胎成纤维细胞共培养, 记作 T_{depl reg}-MEFs, 作为正常对照; 含 20% Treg 的 T 淋巴细胞 (T cells containing Treg, T_{cont reg}) 和 MEF 共培养, 记作 T_{cont reg}-MEFs, 加入大蒜新素处理, 另设安慰剂组和大蒜新素处理亚组; 共培养 T_{cont reg} 和 MCMV 感染的 MEF (MEF_{MCMV}), 记作 T_{cont reg}-MEF_{MCMV}, 另设安慰剂组和大蒜新素处理亚组。

2.2.4 Western blotting 检测 Foxp3 蛋白水平: 方法同 2.1.3 项。

2.2.5 RT-PCR 方法检测 T 细胞中 Foxp3 mRNA 表达: 采用 SYBRgreen RT-PCR 法。用 Trizol (美国 Invitrogen 公司) 提取脾细胞总 RNA, 检测 RNA 纯度在 1.76~1.82; 按 M-MLV 酶 (美国 Promega 公司) 说明书操作。每份样本同时定量检

测目的基因和内参 GAPDH 基因, 各设 3 复管。引物序列如下, Foxp3: S 5'-CTTATCCGATGGG-CATCCTGGAAG-3', A 5'-TTCCAGGTGGCGG-GGTGTTTCTG-3' (产物 112 bp); GAPDH: S 5'-GCACAGTCAAGGCCGAGAA-3', A 5'-CCT-CACCCCATTTGATGTTAGTG-3' (产物 96 bp)。反应体系: 样本 cDNA 2 μ L, 上、下游引物 (10 pmol) 各 0.4 μ L, real-time master mix (日本 Toyobo 公司) 10 μ L, 总体积 20 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 58 $^{\circ}$ C (57 $^{\circ}$ C), 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s, 共 40 个循环。

2.3 统计学处理: 所有实验重复 3 次。数据用 SPSS 11.0 统计软件处理, 计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间各对应指标差异用方差分析。

3 结果

3.1 整体实验研究大蒜新素对 MCMV 感染小鼠 Foxp3 表达的影响

3.1.1 大蒜新素对 Foxp3 蛋白表达的影响: 大蒜新素对正常小鼠脾细胞中的 Foxp3 蛋白表达强度无明显影响; 但可在感染慢性期显著减少 MCMV 感染小鼠脾细胞中的 Foxp3 蛋白表达, 在治疗后 60~120 d 将 Foxp3 蛋白表达强度低于安慰剂组水平 ($P < 0.05$), 并在 120 d 左右基本恢复至正常对照组水平 ($P > 0.05$, 图 1)。

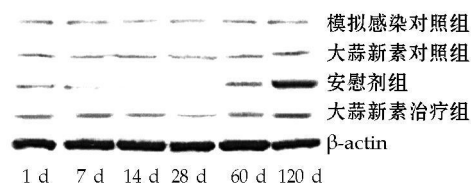


图 1 Foxp3 的蛋白表达

Fig.1 Protein expression of Foxp3

3.1.2 大蒜新素对 Treg 细胞比率的影响: 如表 1 所示, 大蒜新素对正常小鼠的 $CD4^{+} CD25^{+} Foxp3^{+}$ 细胞比率无明显影响, 却可在感染慢性期显著下调由 MCMV 感染所致的 Treg 扩增, 使 $CD4^{+} CD25^{+} Foxp3^{+}$ 细胞比率在大蒜新素治疗 60~120 d 以后显著低于安慰剂组水平, 表现出与 Foxp3 相似的变化趋势。

3.2 大蒜新素体外干预实验

3.2.1 最大耐受质量浓度测定结果: 高浓度的大蒜新素对胚胎成纤维细胞表现出一定的直接细胞毒作用, 使用 MTT 法, 测得胚胎成纤维细胞对大蒜新素的最大耐受质量浓度为 9.83 μ g/mL。

3.2.2 大蒜新素对 Foxp3 表达的影响: 大蒜新素

对 $T_{conTreg}$ -MEFs 体系中 Foxp3 的 mRNA 表达无影响,但在 $T_{conTreg}$ -MEF_{MCMV} 共培养体系中添加大蒜新素则可显著下调 Foxp3 基因和蛋白的表达。见

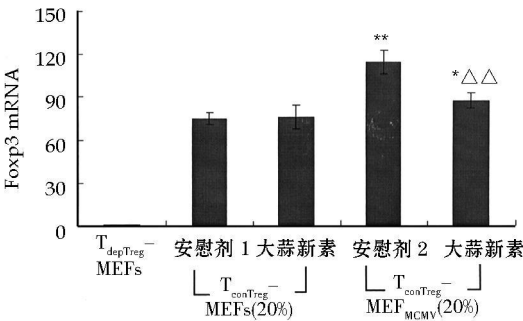
表 1 大蒜新素对 MCMV 感染小鼠 Treg 细胞比率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of allitridin on proportion of Treg in MCMV infected mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组 别	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Fox p3 ⁺ / %					
	1 d	7 d	14 d	28 d	60 d	120 d
模拟感染对照组	2 48±0 31	2 63±0 45	2 77±0 39	2 78±0 29	2 69±0 12	2 55±0 23
大蒜新素对照组	2 54±0 37	2 50±0 41	2 38±0 33	2 56±0 45	2 41±0 32	2 45±0 43
安慰剂组	2 61±0 25	2 46±0 19	1 75±0 23*	1 46±0 27**	4 51±0 24*	5 52±0 77* *
大蒜新素治疗组	2 69±0 45	3 16±0 62	2 18±0 44	1 92±0 42	2 59±0 53△△	2 37±0 49△△

与模拟感染对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与安慰剂组比较: △△ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs simulated infection control group; △△ $P < 0.01$ vs placebo-treated group



与安慰剂 1 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

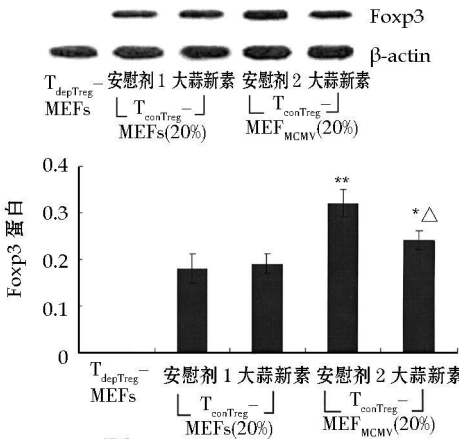
与安慰剂 2 比较: △△ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs placebo 1

△△ $P < 0.01$ vs placebo 2

图 2 大蒜新素对 Foxp3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effect of allitridin on mRNA expression of Foxp3 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与安慰剂 1 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与安慰剂 2 比较: △ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs placebo 1

△ $P < 0.05$ vs placebo 2

图 3 大蒜新素对 Foxp3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Effect of allitridin on protein expression of Foxp3 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

图 2 和 3。

4 讨论

尽管 CMV 是弱致病因子,但其仍是宫内感染

后、听力损伤等的重要原因。同时,CMV 又是引起免疫抑制个体发生严重疾病和增加病死率的重要病因之一。近年来,随着器官移植数量和 AIDS 发病率的增加,CMV 相关疾病的防治成为新的抗病毒研究热点。中药单剂大蒜新素作为一种价格低廉、安全用效的新型抗病毒药物,日益受到关注。

CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞是近年来才被生物医学界逐渐接受和认可的独立 T 细胞功能亚群,而 Foxp3 表达与否是 Treg 表型和功能的决定性因素^[1011]。目前认为,病毒感染中发生的 Treg 扩增活化是机体为避免过度免疫反应而形成的一种免疫保护机制,然而这一效应同时也会导致病毒的慢性持续性感染。研究表明,MCMV 在体内外均可显著诱导 Treg 扩增;扩增的 Treg 可抑制各效应性 T 细胞亚群的分化和功能发挥;从而创造了一个使病毒能够持续存在的有利免疫环境,这可能是 CMV 逃避宿主免疫、实现持续或慢性感染的重要机制之一。

大蒜新素为大蒜提取物,又名大蒜素。本研究室从 1998 年至今对大蒜新素抗 CMV 感染机制进行的系列研究发现,大蒜新素对 HCMV 表达有明显抑制作用^[12];体外实验证实,大蒜新素可干预病毒对感染细胞凋亡和细胞周期进程的影响^[13],最终造成不利于 CMV 复制的细胞微环境;此外,大蒜新素还具有免疫调节作用,可诱导或增强宿主的抗病毒细胞免疫功能^[14]。基于大蒜新素具有免疫调节作用和直接抗 CMV 效应,结合前期研究关于 Treg 在 CMV 感染机制中发挥免疫抑制作用的研究结果,推测大蒜新素可能通过影响 Treg 途径来增强机体抗 CMV 免疫应答。

本研究在整体实验中发现,大蒜新素对正常小鼠脾细胞的 Foxp3 蛋白表达和调节性 T 细胞比率无显著影响,却可在感染慢性期显著纠正 MCMV 感染所致的调节性 T 细胞异常增殖活化,

使 Foxp3 蛋白表达和调节性 T 细胞比率基本降至正常水平。这充分提示大蒜新素可能通过作用于 Treg 环节逆转 CMV 感染所致的抗病毒免疫功能低下, 尤其可能在 CMV 慢性持续性感染中发挥促进抗病毒免疫的效应。依据前期的研究结果^[15], 选取 Treg 抑制效应较强的细胞模型, 即添加 Treg 比率为 20% 的共培养体系进行体外大蒜新素干预实验。结果显示, 大蒜新素可显著抑制 Treg 特异性转录因子 Foxp3 基因表达, 正如前文分析的, Foxp3 是 Treg 增殖活化的关键因子, Foxp3 表达减少意味着 MCMV 感染诱导的 Treg 扩增受到抑制。由此, 在体内外水平证实大蒜新素可显著纠正 MCMV 感染导致的 Treg 异常扩增。这可能是大蒜新素诱导抗 CMV 免疫的另一重要机制。

参考文献:

- [1] Biron K K. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases [J]. *Antiv Res*, 2006, 71(23): 154-163
- [2] Miron T, Rabinkov A, Mirelman D, *et al.* The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipids membranes may contribute to its biological activity [J]. *Biochi Biophys Acta*, 2000, 1463(1): 29-30
- [3] 刘志峰, 方 峰, 董永绥, 等. 大蒜新素预防和治疗鼠巨细胞病毒性肝炎的实验研究 [J]. *中草药*, 2003, 34(6): 529-532
- [4] Lamm D L, Riggs D R. Enhanced immunocompetence by garlic: role in bladder cancer and other malignancies [J]. *J Nutr*, 2001, 131(3): 1067-1070
- [5] Ghazanfari T, Hassan Z M, Ebtekar M, *et al.* Garlic induces a shift in cytokine pattern in leishmania major-infected BALB/c mice [J]. *Scand J Immunol*, 2000, 52(5): 491-495
- [6] 郭乃槐, 陆道培, 周桂珍, 等. 大蒜提取物体外抑制巨细胞病毒的研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, 5(1): 71-79.
- [7] 李亚男, 方 峰, 甄 宏, 等. MCMV 感染鼠胚成纤维细胞对共培养调节性 T 细胞增殖和活化的影响 [J]. *中华传染病杂志*, 2008, 26(11): 641-646
- [8] 徐 翼, 方 峰, 董永绥, 等. 大蒜新素对 MCMV 感染小鼠转录因子 T-bet 和 GATA-3 基因表达的影响 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 24(12): 950-954
- [9] Gunzer M, Weishaupt C, Planelles L, *et al.* Two-step negative enrichment of CD4+ and CD8+ T cells from murine spleen via nylon wool adherence and an optimized antibody cocktail [J]. *J Immunol Methods*, 2001, 258(1-2): 55-63
- [10] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 [J]. *Science*, 2003, 299(5609): 1057-1061
- [11] Fontenot J D, Gavin M A, Rudensky A Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(4): 330-336
- [12] Fang F, Li H, Cui W, *et al.* Treatment of hepatitis caused by cytomegalovirus with allitridin injection: an experimented study [J]. *J Tongji Med Univ*, 1999, 19(4): 271-274.
- [13] 聂兴草, 方 峰, 李 红, 等. 大蒜新素对人巨细胞病毒感染的人胚肺成纤维细胞凋亡的影响 [J]. *中草药*, 2004, 35(9): 1015-1018
- [14] Xu Y, Fang F, Xiang Z D, *et al.* The effects of allitridin on the expression of transcription factor T-bet/GATA-3 in mice infected by murine cytomegalovirus [J]. *J Microbiol Immunol*, 2004, 2(2): 106-110
- [15] 李亚男, 方 峰, 甄 宏, 等. CD4+ CD25+ 调节性 T 细胞抑制效应性 T 细胞在 MCMV 感染中的免疫作用 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2008, 28(3): 234-238

大豆异黄酮对前列腺增生大鼠生长因子及受体的影响

任国峰, 汤 凌, 杨爱青, 姜伟伟, 黄忆明*
(中南大学公共卫生学院 营养与食品卫生学系, 湖南 长沙 410078)

摘要:目的 研究大豆异黄酮对前列腺增生大鼠模型的抑制作用及生长因子调控机制。方法 采用 sc 睾酮法诱导大鼠前列腺增生。大鼠随机分为对照、模型组、大豆异黄酮 (60、120、240 mg/kg) 组; ig 给药 4 周后处死大鼠, 测定大鼠前列腺湿质量、前列腺指数, 酶联免疫法测定血清胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、表皮生长因子 (EGF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、转化生长因子-β (TGF-β) 水平, 免疫组化法检测表皮生长因子受体 (EGF-R) 表达的变化情况。结果 模型组大鼠前列腺湿质量明显增加, 前列腺指数明显增加。与模型组相比, 大豆异黄酮各组前列腺湿质量和前列腺指数明显下降, 血清 IGF-1、EGF、VEGF 和 bFGF 水平均显著降低, 血清 TGF-β 水平显著提高, 前列腺上皮组织 EGF-R 表达显著下降, 以 120 mg/kg 大豆异黄酮组效果最为明显。结论 大豆异黄酮具有较好的抑制前列腺增生的作用, 可能与其降低 IGF-1、EGF、VEGF 和 bFGF 水平, 提高 TGF-β 水平, 下调 EGF-R 表达有关。

关键词:大豆异黄酮; 前列腺增生; 胰岛素样生长因子-1 (IGF-1); 表皮生长因子 (EGF); 血管内皮生长因子 (VEGF); 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF); 转化生长因子 (TGF-β); 表皮生长因子受体 (EGF-R)

中图分类号: R281.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)09-1497-05

* 收稿日期: 2009-10-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500407)

作者简介: 任国峰 (1973—), 男, 山西省忻州市人, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为植物提取物及其功效活性。

Tel: (0731) 84805464 Fax: (0731) 84805452 E-mail: rgf3824@163.com