

槲皮素改善大鼠铜绿假单胞菌肺感染

王培媛¹, 方泓^{2*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属龙华医院中医预防保健科, 上海 200032)

摘要: 目的 研究槲皮素改善大鼠铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 肺感染。方法 40只SPF级SD大鼠随机分为5组, 每组8只, 分别为正常组、铜绿假单胞菌感染组、槲皮素组、左氧氟沙星组、左氧氟沙星联用槲皮素组(联用组), 大鼠麻醉后支气管注入铜绿假单胞菌。观察大鼠肺组织病理变化, 检测肺组织IL-4、IFN- γ 细胞因子含量, 转录因子T-bet、Gata-3的变化; 用RT-PCR半定量法检测IL-4、IFN- γ 、T-bet、Gata-3 mRNA的表达。**结果** 槲皮素组、左氧氟沙星组及联用组肺组织IL-4含量, IL-4、Gata-3 mRNA水平均较铜绿假单胞菌感染组降低, 而IFN- γ 、T-bet mRNA水平较铜绿假单胞菌感染组升高。**结论** 槲皮素及左氧氟沙星能诱导大鼠机体由Th2型向Th1型分化, 但两者之间无协同作用。

关键词: 槲皮素; 铜绿假单胞菌; 肺感染; T-bet; Gata-3; IL-4; IFN- γ

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)09-1777-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.004

Quercetin improves *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung infection in rats

WANG Pei-yuan¹, FANG Hong^{2*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Department of Preventive Care of TCM, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT: AIM To study the improvement of quercetin on *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung infection in rats. **METHODS** Forty SPF SD rats were randomly divided into five groups, eight rats in each group: normal group, *P. aeruginosa* infection group, quercetin group, levofloxacin group, levofloxacin combined with quercetin group (combined group), the rats were anesthetized and then injected with *P. aeruginosa* in bronchus. The pathological changes of lung tissue in rats were observed, the contents of IL-4 and IFN- γ cytokines, changes of transcription factors T-bet and Gata-3 in lung tissue were detected, and then semi-quantitative RT-PCR was used for the detection of IL-4, IFN- γ , T-bet and Gata-3 mRNA expressions. **RESULTS** The content of IL-4, levels of IL-4 and Gata-3 mRNA in lung tissue in the quercetin group, the levofloxacin group and the combined group were lower than those in the *P. aeruginosa* infection group, but the opposite was true in the levels of IFN- γ and T-bet mRNA. **CONCLUSION** Quercetin and levofloxacin can induce the differentiation from type Th2 to type Th1 for rat organism, but there is no synergistic effect between them.

KEY WORDS: quercetin; *Pseudomonas aeruginosa*; lung infection; T-bet; Gata-3; IL-4; IFN- γ

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 是临床常见的天然和获得性耐药的革兰氏阴性杆菌, 是免疫受损患者肺部感染的常见原因, 尤其是烧伤病人、老年性肺炎^[1], 一旦机体肺部感染PA, 临床反复发作, 并且迁延难治。目前, 国内外对PA的研究主要集中在抗生素和新型疫苗开发上。

PA肺部感染后, 诱导机体启动一个独特的免疫反应, 在人类和小鼠的研究中发现^[2], PA肺部感染与Th2细胞免疫优势应答相关, 而Th1反应伴随着更好的肺功能; 慢性PA肺部感染小鼠模型^[3]表明, Th1免疫反应应答增强有助于清除细菌, 减轻肺部炎症, 并与Th2反应的小鼠相比有更好的生

收稿日期: 2017-04-20

作者简介: 王培媛, 硕士生, 研究方向为中医内科。E-mail: 15800862281@163.com

* 通信作者: 方泓, 科室主任, 从事中医药防治呼吸系统疾病研究。E-mail: 15000297742@163.com

存。因此, T 细胞调节免疫应答与 PA 肺部感染有关。

槲皮素是一类天然存在的黄酮类化合物, 普遍存在于各种蔬菜中, 并在多种中草药中分布, 具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗病毒、抗气道过敏、抗氧化自由基等多种药理作用^[4-6]。本实验通过建立大鼠 PA 肺部感染模型, 观察槲皮素对 PA 肺炎的病理变化、肺组织中相关细胞因子的表达以及相关基因的改变, 探讨其免疫调节机制, 为临床治疗 PA 肺部感染提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂 铜绿假单胞菌 PA27853。槲皮素购买于中国食品药品检定研究院(规格 100 mg/支, 货号 100081-201509); 左氧氟沙星注射液(可乐必妥, 100 mL, 0.5 g/瓶); RIPA 裂解液(碧云天生物公司, 货号 P0013B); PMSF(碧云天生物公司, 货号 ST506); BCA 试剂盒(碧云天生物公司, 货号 P0010); T-BET 抗体(美国 Abcam 公司, 货号 AB91103); Gata-3 抗体(美国 Thermo 公司, 货号 RC232329); GAPDH 抗体(碧云天生物公司, 货号 AG019-1); ECL 发光液(德国 Millipore 公司, 货号 WSKLS0100); Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司, 货号 15596-026); One-step PCR 试剂盒(日本 Takara 公司, 货号 PR064A); 引物及探针由上海铂尚生物技术有限公司合成。

1.2 仪器 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司, 6840); 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司, 5415R); Western blot 电泳和转膜系统(美国 Bio-Rad 公司); ODYSSEY 双色红外激光成像系统(美国 Li-Cor 公司); 核酸蛋白测定仪(德国耶拿 Scandrop2000); 荧光定量 PCR 仪(美国 Lifetech 公司, viia-7)。

1.3 大鼠分组与模型制作 动物分组: 健康雄性清洁级 SD 大鼠 40 只, 体质量 160 ~ 200 g (上海市公共卫生临床中心动物中心提供), 随机分为 5 组, 分别是正常组、铜绿假单胞菌感染组(感染组)、槲皮素组、左氧氟沙星组、槲皮素 + 左氧氟沙星组(联用组)。

动物模型制作: 大鼠称重, 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔(ip)麻醉, 1 mL 注射器联结 8 号灌胃针支气管, 注入绿脓杆菌混悬液(10^9 /mL, 0.1 mL)。

给药方法: 第 1 天, 动物模型制作。第 2 天, 腹腔注射(ip)给药, 正常组 0.9% NaCl (1 mL/kg),

感染组 0.9% NaCl (1 mL/kg), 槲皮素组 8 mg/kg, 左氧氟沙星组 5 mg/kg, 槲皮素 8 mg/kg + 左氧氟沙星 5 mg/kg 组, 每日 1 次(qd), 共 2 周。

1.4 样本采集 2 周后, 大鼠称重, 麻醉, 取肺脏, 处死。

1.5 检测指标

1.5.1 肺部组织病理观察 对各组大鼠左侧肺脏组织进行甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 镜下观察。

1.5.2 肺组织内 IL-4、IFN- γ 水平检测 取 0.1 g 肺脏组织, 冰上组织研磨, 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g 离心 15 min 取上清, BCA 试剂盒测定组织匀浆液蛋白浓度。取各组匀浆液适当稀释, 并对 IL-4、IFN- γ 标准品倍比稀释, 参照 ELISA 试剂盒说明进行操作, 酶标仪在 450 nm 波长测定各组吸光度 D_{450} , 制作标准曲线, 计算样本中细胞因子 IL-4、IFN- γ 质量浓度。

1.5.3 转录因子 T-bet、Gata-3 含有量的表达 取 0.1 g 肺脏组织, 加入蛋白裂解液, 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g 离心 15 min 取上清, 提取组织中的总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度。上述样品加入相应体积 loading buffer 缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 每孔取 100 μ g 总蛋白样品, 经 10% SDS-PAGE 电泳分离, 转膜, 封闭, 加入一抗稀释液 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜, 加入相应二抗稀释液室温孵育 1.5 h、洗膜, 采用 ECL 发光液显色, ODYSSEY 双色红外激光成像系统照相记录, 运用 Image J 软件进行分析。

1.5.4 T-bet、Gata-3、IL-4 及 IFN- γ 基因水平的表达 取 0.1 g 肺脏组织, 然后按照 TRIzol 试剂提取总 RNA, 在 Scandrop 核酸蛋白测定仪上测定样本 RNA 的浓度及纯度, 当 $1.8 < D_{260}/D_{280} < 2.0$ 时, 可用于实验。根据 One-Step PrimerScript RT-PCR kit 说明书, 反应体系为 20 μ L: ExTaqHS 0.4 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μ L, ROX Reference Dye II 0.4 μ L, 2 \times One Step RT-PCR Buffer III 10 μ L, 模板 RNA 2 μ L, 特异性上反向引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, 探针(5 μ mol/L) 0.8 μ L, 补加 RNase Free dH₂O 至 20 μ L。扩增程序: 42 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 57 $^{\circ}$ C 31 s, 40 个循环, 引物及探针序列见表 1。每个样本、基因重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 T-bet、Gata-3、IL-4 及 IFN- γ 基因的相对表达水平, 以 β -actin mRNA 作为内参。

表 1 RT-PCR 引物序列
Tab. 1 Primer sequences of RT-PCR

| 基因 | 引物/探针 | 序列 |
|----------------|-------|-------------------------------------|
| <i>β-actin</i> | 探针 | 5'-ACGGCTCCCTCATGCCATCCTGCGT-3' |
| | 正向引物 | 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTATGA-3' |
| | 反向引物 | 5'-CATCGGAACCGCTCATTGCCGATAG-3' |
| <i>T-bet</i> | 探针 | 5'-CCTCTGGCTCACCGTCAATTCACCTCC-3' |
| | 正向引物 | 5'-TGGCAGAGGAAGTTTCATTGG-3' |
| | 反向引物 | 5'-AAGGTAAAGATGTGAGTGTTAGCAC-3' |
| <i>Gata-3</i> | 探针 | 5'-CGGCTTCATCCTCTTCTCTGGCTGCG-3' |
| | 正向引物 | 5'-GGGCCTCTGTCCGTCTACC-3' |
| | 反向引物 | 5'-TGGGTGGTGGGCTGAA-3' |
| <i>IL-4</i> | 探针 | 5'-ACGGCAACAAGGAACACCACGGAGAA-3' |
| | 正向引物 | 5'-CATGCACCGAGATGTTTGTACC-3' |
| | 反向引物 | 5'-AGTGTGTGAGCGTGGACTC-3' |
| <i>IFN-γ</i> | 探针 | 5'-TGAACAACCCACAGATCCAGCACAAAAGC-3' |
| | 正向引物 | 5'-CATGAGCATCGCCAAGTTCC-3' |
| | 反向引物 | 5'-TTCCGCTTCTTAGGCTAGATTC-3' |

1.6 统计学方法 实验数据采用 GraphPad Prism 软件处理, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间两两比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 肺部病理组织变化 见图 1。正常组大鼠气

道结构完整, 细胞排列整齐, 无充血和渗出; 模型组细胞排列紊乱, 组织水肿, 气道与肺泡内有大量红细胞渗出和中性粒细胞浸润; 槲皮素组、左氧氟沙星组、联用组肺组织红细胞不同程度地减少, 炎症细胞渗出减轻。

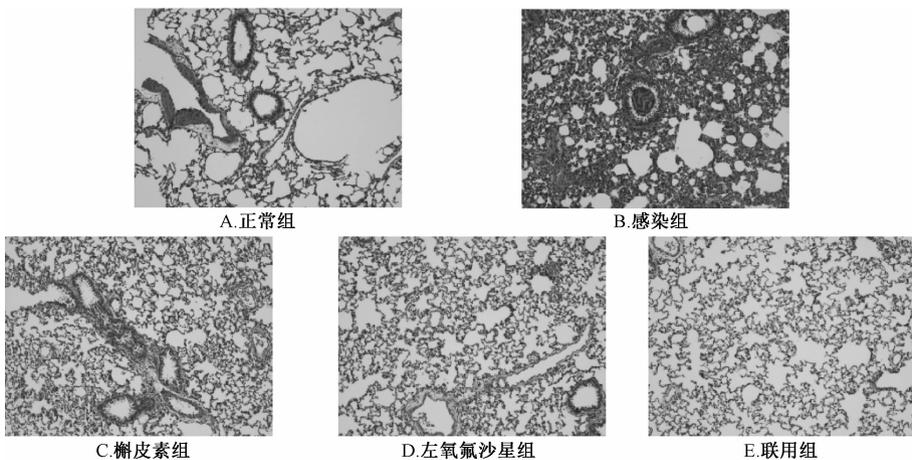


图 1 PA 肺部感染 2 周后大鼠肺脏病理改变 (HE 染色, ×100)

Fig. 1 Pathological changes of lung in rats after PA infection for two weeks (HE staining, ×100)

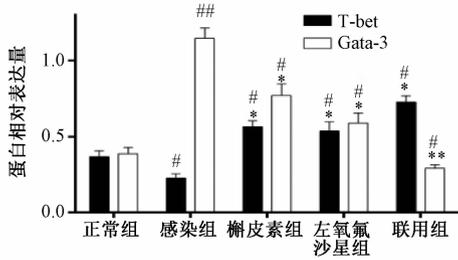
2.2 肺组织内 IL-4、IFN- γ 细胞因子检测 见表 2。与正常组相比, 感染组肺内 IL-4 水平明显升高 ($P < 0.05$), IFN- γ 水平明显降低 ($P < 0.01$); 与感染组相比, 槲皮素组、左氧氟沙星组及联用组 IL-4 水平均有明显下降 ($P < 0.05$), IFN- γ 水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 正向转录因子 T-bet、Gata-3 含有量的测定 见图 2。与正常组比较, 感染组正向转录因子 T-bet 表达明显下降 ($P < 0.05$), Gata-3 表达明显升高

表 2 PA 感染 2 周后大鼠肺部细胞因子 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)
Tab. 2 Pulmonary cytokines in rats after PA infection for two weeks ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | IL-4/(pg·mg ⁻¹) | IFN- γ /(pg·mg ⁻¹) |
|--------|-----------------------------|---------------------------------------|
| 正常组 | 10.92 ± 1.396 * | 229.2 ± 27.82 ** |
| 感染组 | 23.61 ± 3.819 # | 61.17 ± 8.947 ## |
| 槲皮素组 | 11.20 ± 1.068 * | 105.5 ± 13.98 ** |
| 左氧氟沙星组 | 10.74 ± 0.768 * | 177.6 ± 32.07 ** |
| 联用组 | 10.27 ± 1.284 * | 131.8 ± 8.630 ** |

注: 与感染组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与正常组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

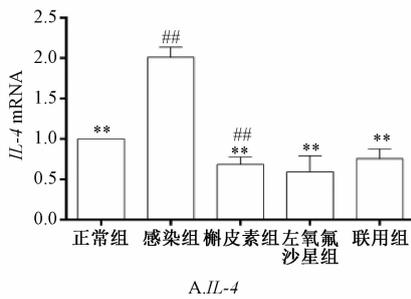


注：与感染组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与正常组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

图2 PA感染2周后大鼠T-bet和Gata-3表达

Fig. 2 Expressions of T-bet and Gata-3 in rats after PA infection for two weeks

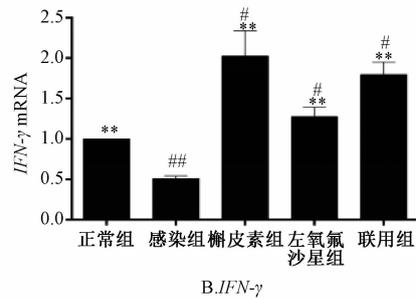
($P < 0.01$)；与感染组比较，槲皮素组、左氧氟沙星组以及联用组 T-bet 水平均有明显升高 ($P < 0.05$)，



Gata-3 水平均有明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。此外，3 组药物干预组的 T-bet 表达较正常组均有明显升高 ($P < 0.05$)，Gata-3 表达均有明显下降 ($P < 0.05$)。

2.4 大鼠肺部 T-bet、Gata-3、IL-4 及 IFN- γ 基因水平的表达

2.4.1 IL-4 及 IFN- γ 见图3。与正常组比较，感染组 IFN- γ mRNA 表达水平明显下降 ($P < 0.01$)、IL-4 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。同时，与感染组比较，槲皮素组、左氧氟沙星组以及联用组 IFN- γ mRNA 水平明显升高 ($P < 0.01$)、IL-4 mRNA 水平明显降低 ($P < 0.01$)。此外，3 组药物干预组的 IFN- γ mRNA 表达较正常组均有明显升高 ($P < 0.05$)。



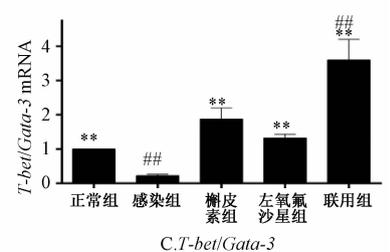
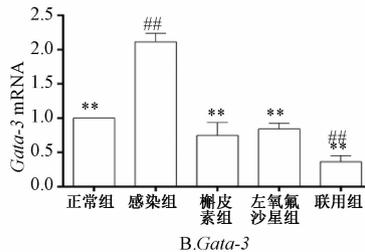
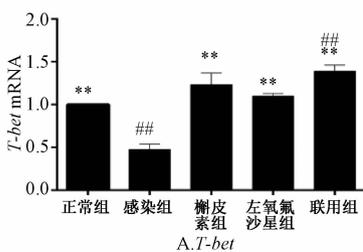
注：与感染组比较，** $P < 0.01$ ；与正常组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

图3 PA感染2周后大鼠IL-4、IFN- γ mRNA表达

Fig. 3 mRNA expressions of IL-4 and IFN- γ in rats after PA infection for two weeks

2.4.2 T-bet 及 Gata-3 见图4。与正常组比较，感染组 T-bet mRNA 表达水平明显下降 ($P < 0.01$)，Gata-3 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$)，T-bet/Gata-3 mRNA 比值显著下降 ($P <$

0.01)；与感染组比较，槲皮素组、左氧氟沙星组以及联用组 T-bet mRNA 水平明显升高 ($P < 0.01$)，Gata-3 mRNA 水平明显降低 ($P < 0.01$)，T-bet/Gata-3 mRNA 比值明显升高 ($P < 0.01$)。



注：与感染组比较，** $P < 0.01$ ；与正常组比较，## $P < 0.01$

图4 PA感染2周后大鼠T-bet、Gata-3 mRNA表达

Fig. 4 mRNA expressions of T-bet and Gata-3 in rats after PA infection for two weeks

3 讨论

机体的初始 T 细胞根据功能可分为 Th1 和 Th2 2 个亚群，两者具有重要的免疫调节功能。Th1 细胞产生 IFN- γ 和 IL-12，参与细胞免疫；Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13，参与体液免疫，

两者是由初始型 CD4⁺ 细胞分化，需要特异性转录因子的活性，包括 T-bet 和 Gata-3。T-bet 是 T-box 家族的一员，为 Th1 细胞分化关键转录因子，其表达与 IFN- γ 的表达密切相关，特别是在原发性 Th0 细胞分化上调 Th1 途径，T-bet 诱导初始型 CD4⁺ T

细胞产生大量的 IFN- γ ，由 Th1 细胞产生 IFN- γ 激活 STAT1（信号转导与转录激活因子），反过来又进一步促进 T-bet 表达，形成 T-bet 和 IFN- γ 的正反馈调节环，后者起着关键的作用，激活巨噬细胞和细胞毒性 T 细胞以清除病原体，因此，Th1 细胞的关键特征是 T-bet 及 IFN- γ ；Gata-3 是具有锌指结构的 GATA 家族中的成员，已被确定为调节 Th2 细胞的关键转录因子，Th2 细胞分泌 IL-4，IL-4 通过激活 STAT6 的方式诱导内源性 Gata-3 的产生，由此成为 Th2 定向分化的正反馈途径。现已证实^[2]，PA 肺部感染疾病呈现为 Th2 型细胞漂移，若增强 Th1 应答，纠正 Th1/Th2 分化失衡，将有助于改善肺组织炎症，减轻肺损伤。

槲皮素是一类广泛存在于中草药中的黄酮类化合物，具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、抗过敏、抗氧化等多种生物及药用活性，在抗肿瘤、抗过敏等方面已得到广泛认证。而最新的研究证实^[7]，黄酮类化合物具有显著的免疫调节活性，低浓度下可以诱导 Th1 型细胞因子 IFN- γ 的表达。已有研究证实^[8]，槲皮素差异性调节正常人外周血单核细胞 Th1 细胞因子（IFN- γ ）和 Th2 细胞因子（IL-4）基因的表达，具有免疫刺激作用，诱导 Th1 细胞因子 IFN- γ ，抑制 Th2 细胞因子 IL-4。同时体内实验^[9]证实，在小鼠哮喘模型中，8、16 mg/kg 槲皮素均能够调节 Th1/Th2 细胞平衡，通过抑制 Gata-3 表达来增加 T-bet 表达，改变 Th1/Th2 极化，从而降低气道变应性炎症和气道高反应性。左氧氟沙星是喹诺酮类药物中的一种，抗菌作用强，临床对克雷伯杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、肺炎链球菌等有较强的抑制作用，通过抑制细菌 DNA 解旋酶的活性阻止其合成和复制，从而导致其死亡。相关研究^[10]表明，左氧氟沙星联合头孢克肟治疗老年肺炎可以提高临床疗效，左氧氟沙星对对照组和两药联用组治疗后，血清中反应蛋白 CRP、肿瘤坏死因子 TNF- α 、IL-4 等水平均显著下降。同时，还有研究证实^[11]，左氧氟沙星治疗呼吸道合胞病毒感染的哮喘患儿时，血液中 IL-4、转化性生长因子（TGF） β_1 较治疗前明显降低，而 IFN- γ 水平明显升高。

本实验通过支气管注入建造铜绿假单胞菌肺部感染模型，发现感染 2 周后，肺组织镜下观察到大量炎症反应，肺部 IFN- γ 炎症因子检出率较正常组明显降低，IL-4 显著升高，而且转录因子 T-bet 表达较正常组下降，Gata-3 升高，同时 T-bet/Gata-3

mRNA 的比值降低，进一步证实了 PA 肺部感染以 Th2 免疫应答优势为主。左氧氟沙星对 PA 敏感率较高，未出现严重的多重耐药性，因此可以用于 PA 肺部感染的临床治疗。槲皮素、左氧氟沙星给药 2 周后，大鼠肺组织大体病理明显改善，炎症反应减轻，提示两者能够减轻肺组织的病理损伤，肺内 IFN- γ 较感染组升高，IL-4 降低，转录因子 T-bet 升高，Gata-3 明显下降，T-bet/Gata-3 mRNA 的比值升高，这些结果提示槲皮素、左氧氟沙星可以干预细胞分化的上游环节，选择性地调控 T-bet 和 Gata-3 的表达，诱导 Th1 细胞因子 IFN- γ 分泌增加，抑制 Th2 细胞因子 IL-4 分泌减少，增强 Th1 分化，从而促使大鼠机体 Th1/Th2 动态平衡。值得注意的是，T-bet 和 Gata-3 作分别作为 Th1 和 Th2 分化的重要转录因子，两者相互调节，相互抑制，相较于单一 Th1 型、Th2 型细胞因子或 T-bet、Gata-3 转录因子的水平，T-bet/Gata-3 的比值能更客观地反应 Th1/Th2 分化^[12]，因此，本实验不仅检测了 IL-4、IFN- γ 、T-bet、Gata-3 mRNA 相对表达水平，同时也进一步测定了 T-bet/Gata-3 mRNA 的比值。本实验的主要目的是证实槲皮素能够调节大鼠机体 Th1/Th2 细胞分化失衡，同时探索槲皮素联用左氧氟沙星对铜绿假单胞菌肺部感染的治疗效果，结果发现两药联用亦能增强 Th1 相关因子表达，减弱 Th2 相关因子表达，从而减轻肺部炎症变化，但较左氧氟沙星单独用药无明显差异，故槲皮素联用左氧氟沙星无协同作用。

槲皮素被认为是最活跃的黄酮类化合物，在许多药用植物中的含量很高。本研究结果再次证实，它能够介导铜绿假单胞菌肺部感染的大鼠免疫反应，调控 Th1/Th2 细胞分化失衡，调节 T-bet 和 Gata-3 转录因子水平表达，诱导 IFN- γ 细胞因子分泌增多，抑制 IL-4 分泌减少。因此，该成分为临床铜绿假单胞菌肺部感染耐药提供了新的方向 and 选择。

参考文献：

- [1] Azzopardi E A, Azzopardi E, Camilleri L, et al. Gram negative wound infection in hospitalised adult burn patients—systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95042.
- [2] Hartl D, Griese M, Kappler M, et al. Pulmonary T (H) 2 response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients with cystic fibrosis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(1): 204-211.
- [3] Moser C, Jensen P O, Kobayashi O, et al. Improved outcome of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is associated

with induction of a Th1-dominated cytokine response[J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 127(2): 206-213.

[4] Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin[J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(2): 315-325.

[5] Boots A W, Haenen G R, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 585(2-3): 325-337.

[6] Boots A W, Wilms L C, Swennen E L R, et al. *In vitro* and *ex vivo* anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers [J]. *Nutrition*, 2008, 24(7-8): 703-710.

[7] Farhadi L, Mohammadimotlagh H R, Seyfi P, et al. Low concentrations of flavonoid-rich fraction of shallot extract induce delayed-type hypersensitivity and TH1 cytokine IFN γ expression in BALB/c mice[J]. *Int J Mol Cell Med*, 2014, 3(1): 16-25.

[8] Nair M P, Kandaswami C, Mahajan S, et al. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN- γ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1593(1): 29-36.

[9] Park H J, Lee C M, Jung I D, et al. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(3): 261-267.

[10] 朱亚虹, 唐晓英. 头孢克肟联合左氧氟沙星治疗老年肺炎的疗效观察[J]. *现代药物与临床*, 2015, 30(10): 1229-1233.

[11] 陆庆. 左氧氟沙星联合阿奇霉素治疗呼吸道合胞病毒感染 30 例[J]. *中国药业*, 2013, 22(23): 70-72.

[12] Chakir H, Wang H, Lefebvre D E, et al. T-bet/Gata-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of Gata-3 [J]. *J Immunol Methods*, 2003, 278(1-2): 157-169.

补肾活血方对卵巢早衰小鼠颗粒细胞 TGF- β 1、TGF- β RII、Smad2/3 表达的影响

刘慧萍, 曾柳庭, 胡立娟, 王灿, 杨凯麟, 张国民*
(湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

摘要: 目的 探索补肾活血方(紫石英、补骨脂、菟丝子等)对免疫性卵巢早衰(POF)小鼠卵泡壁颗粒细胞转化生长因子(TGF)- β 1、TGF- β RII、Smad2/3 蛋白表达的影响。方法 Balb/c 雌性小鼠皮下多点注射小鼠透明带 3 建立免疫性 POF 模型, POF 小鼠分成模型组, 阳性组(戊酸雌二醇)和补肾活血方低、中、高剂量组。干预 30 d 后, 卵巢组织作苏木精-伊红(HE)染色, 免疫组化法与蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测卵泡壁颗粒细胞和卵巢组织 TGF- β 1、TGF- β RII、Smad2/3 的蛋白表达。结果 与模型组相比, 补肾活血方各剂量组、阳性组卵巢成熟卵泡数目明显增多, 闭锁卵泡数目减少。卵泡壁颗粒细胞和卵巢组织 TGF- β 1、TGF- β RII、Smad2/3 蛋白表达在补肾活血方各剂量组、阳性组中明显高于在模型组中($P < 0.05$)。结论 补肾活血方能通过上调颗粒细胞 TGF- β 1、TGF- β RII、Smad2/3 的蛋白表达改善卵巢功能。

关键词: 补肾活血方; 卵巢早衰; 卵泡壁颗粒细胞; TGF- β 1; TGF- β RII; Smad2/3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)09-1782-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.005

Effects of Bushen Huoxue Recipe on the expressions of TGF- β 1, TGF- β RII and Smad2/3 in granulosa cells in mice with premature ovarian failure

LIU Hui-ping, ZENG Liu-ting, HU Li-juan, WANG Can, YANG Kai-lin, ZHANG Guo-min*
(Human University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: AIM To explore the effects of Bushen Huoxue Recipe (*Fluoritum*, *Psoraleae Fructus*, *Cuscutae*

收稿日期: 2016-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(81303123); 湖南省教育厅创新平台项目(15K090); 湖南省重点实验室开放基金(2014XNFZ06); 湖南省大学生创新项目(2016-281); 国家级大学生创新项目(201510541002)

作者简介: 刘慧萍(1979—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事女性内分泌疾病病机研究

*通信作者: 张国民(1974—), 男, 教授, 硕士生导师, 从事内分泌疾病病机研究。E-mail: 1074983953@qq.com