

# 大蒜素对小鼠脾细胞雌激素和雄激素受体影响的实验研究

刘灵燕, 董 群\*

皖南医学院微生物学与免疫学教研室, 芜湖 241002

**摘要:** 本研究旨在探讨大蒜素对小鼠脾细胞雌激素和雄激素受体的影响。将健康 ICR 清洁小鼠, 按性别随机分成三组实验组和三组对照组。实验组分别连续灌服大蒜素 14、21 和 28 d, 对照组同期分别灌服等量生理盐水。采用 RT-PCR 法检测雌性各组小鼠脾细胞雌激素受体 (ER $\alpha$  和 ER $\beta$ ) 的 mRNA 表达水平和雄性各组小鼠脾细胞雄激素受体 (AR) 的 mRNA 水平。实验结果显示, 雌性小鼠连续灌服大蒜素第 14 和 21 d 时实验组 ER $\alpha$  mRNA 表达水平明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 第 14 d 时 ER $\beta$  mRNA 表达水平明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。雄性小鼠连续灌服大蒜素第 14、21 和 28 d 时实验组 AR mRNA 表达水平均明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。综上提示大蒜素可增强小鼠脾细胞雌激素受体 (ER $\alpha$  和 ER $\beta$ ) 和雄激素受体 (AR) mRNA 的表达水平。

**关键词:** 大蒜素; 雌激素受体; 雄激素受体

中图分类号: R392

文献标识码: A

## Effects of Allicin on Estrogen and Androgen Receptors of Spleen Cells of Mice

LIU Ling-yan, DONG Qun\*

Department of Microbiology and Immunology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**Abstract:** The aim of this study was to observe the effects of allicin on estrogen and androgen receptors of mice spleen cells. Healthy clean ICR mice were randomly divided into three experimental groups and three control groups. Experimental groups were consecutively fed with allicin for 14, 21 and 28 days, respectively, whereas the control groups were administered with saline over the corresponding period. RT-PCR was used to detect the mRNA expression of the estrogen receptor (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) in spleen cells of female mice and the androgen receptor (AR) in spleen cells of male mice. The mRNA expression levels of ER $\alpha$  mRNA in 14 and 21 days allicin groups, the ER $\beta$  mRNA expression levels in 14 days allicin group were significantly higher than those of the control group ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression levels of AR were raised in experimental male mice as compared with the control group ( $P < 0.05$ ). Hence, it was concluded that allicin enhanced mRNA expression levels of estrogen receptor (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and androgen receptor (AR) in mouse spleen cells.

**Key words:** allicin; estrogen receptor; androgen receptor

大蒜 (Garlic) 作为调味品在民间广泛应用, 现代科学证明大蒜具有多种有益健康的生物活性: 抗氧化、抗细菌、抗寄生虫、抗肿瘤、降低血脂和抑制血小板聚集等<sup>[1-3]</sup>。大蒜素是大蒜中的主要生物活性成分, 其化学名称为二烯丙基三硫化物。神经系统、内分泌系统和免疫系统是机体的三大调节系统, 这三大系统看似独立, 实际上是一个有着广泛联系的有机整体, 三者之间相互交织、相互协调、相互影响, 构成一个神经-内分泌-免疫网络<sup>[4]</sup>。大蒜素对免疫

系统影响的研究较多, 但是关于大蒜素对神经内分泌系统的影响报道甚少。本实验室研究发现大蒜素可上调小鼠 ACTH 和 CORT 的表达<sup>[5]</sup>, 在此基础上本实验通过给青年小鼠灌服大蒜素后, 观察小鼠脾细胞上雌激素受体 (ER $\alpha$  和 ER $\beta$ ) 和雄激素受体 (AR) mRNA 的表达水平变化情况, 来探讨大蒜素对内分泌系统的调节作用。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

ICR 清洁雄性和雌性小鼠 (批号为 SCXK 苏 2007-0001), 体重为 18 ~ 20 g, 6 周龄, 由扬州大学比较医学中心提供。

## 1.2 实验药物

大蒜素胶囊,由江苏正大清江制药有限公司生产(批号为H32025683),规格:20 mg/粒。

## 1.3 试剂

总 RNA 抽提试剂, cDNA 第一链合成试剂盒, PCR 试剂, 购自北京天根公司; AR、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、GAPDH 上下游引物, 由南京金斯瑞设计; 琼脂糖(加拿大 BIO BASIC INC. 公司); 氯仿(上海博河精细化学有限公司); 异丙醇无锡市展望化工试剂有限公司; 无水乙醇(天津市东丽区季明庄工业园区)等。

## 1.4 主要仪器

PCR 扩增仪(英国 Techne 公司); 电泳仪(Bio Rad 公司); Gel Doc1000 凝胶成像系统(Bio Rad 公司); 高速冷冻离心机(上海良平仪器仪表有限公司); 生物安全柜(ESCO 公司); -80 °C 冰箱(中科美菱公司); 冰箱(无锡松下冷机有限公司)等。

# 2 实验方法

## 2.1 实验动物分组

将实验动物按性别随机分成 3 组实验组和 3 组对照组。

## 2.2 灌服大蒜素

大蒜素对小鼠用药的一般剂量为 25 mg/kg · d<sup>[6]</sup>, 0.4 mL/只。实验组小鼠每只分别灌服大蒜素 0.4 mL × 14 d(25 mg/kg)、0.4 mL × 21 d、0.4 mL × 28 d, 对照组同期分别灌服等体积的生理盐水。

## 2.3 取标本

小鼠处死后, 无菌取脾, 于 4 °C 预冷的生理盐水漂洗除去血液后, 用滤纸吸干多余水分, 称取约 50 mg 脾组织加入到 1 mL TRIZOL 总 RNA 提取试剂中, 置 -80 °C 冰箱保存。

## 2.4 脾细胞 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 和 AR mRNA 表达水平的检测

### 2.4.1 小鼠脾细胞总 RNA 的提取

将已加有 TRIZOL 的脾组织充分匀浆, 然后倒入 1.5 mL 无菌无 RNA 酶的离心管中, 12000 rpm, 4 °C, 离心 10 min, 吸取上清于另一干净离心管中, 弃沉淀; 加入 200  $\mu$ L 氯仿, 剧烈震荡 1 min, 室温静置 15 min, 12000 rpm, 4 °C, 离心 10 min, 用微量加样器取上清液, 转移至另一个无菌无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管内; 每管加入 500  $\mu$ L 异丙醇, 混匀, 12000

rpm, 4 °C, 离心 10 min, 弃上清液; 加入 75% 乙醇(DEPC 水配制) 1 mL, 轻轻转动洗涤离心管, 12000 rpm, 4 °C, 离心 10 min, 尽量弃上清; 室温晾干 5 min; 加入 30  $\mu$ L DEPC 水溶解沉淀, 充分混匀, 低速简短离心使沉淀沉降; 于 -20 °C 保存。

### 2.4.2 cDNA 合成(逆转录)

反应总体积(20  $\mu$ L): 先取 2  $\mu$ L 模板 RNA、2  $\mu$ L Oligo(dT)<sub>15</sub>(10  $\mu$ M) 引物、2  $\mu$ L dNTP(2.5 mM)、8.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 72 °C 反应 5 min 后迅速置于冰上放置 2 min, 然后逐一加入以下成分: 4  $\mu$ L 5 $\times$  逆转录缓冲液、0.5  $\mu$ L RNA 酶抑制剂(2 U)、1  $\mu$ L M-MLV(200 U)。42 °C 反应 50 min, 95 °C 反应 5 min 灭活反转录酶。逆转录产物(cDNA)于 -20 °C 保存。

### 2.4.3 引物的设计与合成

小鼠 ER $\alpha$  基因上游引物序列: 5'-CGCCTTCTA-CAGGTCTAAT-3',

下游引物序列: 5'-GGTTCTTGTCAATGGTGC-3';

小鼠 ER $\beta$  基因上游引物序列: 5'-CTTGGT-CACGTACCCCTTAC-3',

下游引物序列: 5'-GTATCGCGTCACTTTCCTTT-3';

小鼠 AR 基因上游引物序列: 5'-CCATCCAA-GACCTATCGAGG-3',

下游引物序列: 5'-TGAGTCATCCTGATCTG-GAG-3';

小鼠内参 GAPDH 上游引物序列: 5'-AGGCCG-GTGCTGAGTATGTC-3',

下游引物序列: 5'-TGCCTGCTTCACCACCTTCT-3'。

引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。ER $\alpha$  扩增产物片段大小为 257bp, ER $\beta$  为 245bp, AR 为 369 bp, GAPDH 为 530 bp。

### 2.4.4 PCR 扩增

PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 模板 cDNA 2  $\mu$ L, 2 $\times$  Taq PCR MasterMix(内含 0.1 U Taq Polymerase/ $\mu$ L, 500  $\mu$ M dNTP, 20 mM Tris-HCL(pH 8.3), 100 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>), 上、下游引物(10  $\mu$ M) 各 0.5  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 25  $\mu$ L。反应条件: 94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s, 55 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 共 35 个循

环;最后 72 °C ,10 min。PCR 产物于-20 °C 保存。取 10 μL PCR 产物加样,进行 2% 琼脂糖凝胶电泳(用 2000 bp PCR marker 作为分子大小参照物,100 V 稳压电泳 40 min),紫外灯下观察结果。经凝胶分析系统 Quantity One 扫描后,以 GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物作为内参照,测定 RT-PCR 产物进行 Adj. Vol. 值(即为减去背景色后的条带光强度值),进行目的基因扩增片段与对照基因扩增片段 Adj. Vol. 值的比较<sup>[7]</sup>。以目的基因的 cDNA 与 GAPDH 的 cDNA 灰度扫描值的比值代表其最终受体的 mRNA 表达水平。

### 2.5 统计分析

所有测定结果用均数标准差(s)表示。两组间同一时点各对应指标的比较采用 SPSS13.0 软件进行 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 实验结果

### 3.1 大蒜素对雌性小鼠脾细胞 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ mRNA 表达水平的影响

如图 1、2 结果显示,与同一时点对照组相比,灌服 14 d 和 21 d 时,雌性小鼠脾细胞 ER $\alpha$  mRNA 表达水平明显增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );灌服 14 d 时,雌性小鼠脾细胞 ER $\beta$  mRNA 表达水平明显增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );灌服 28 d 时,实验组小鼠脾细胞 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  mRNA 表达水平

变化不明显,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );随灌服时间的延长,ER $\alpha$  mRNA 水平有上升趋势。各雌性小鼠脾细胞 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  mRNA 与 GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图见图 3~6。

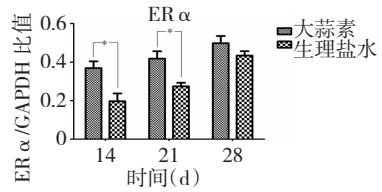


图 1 雌性小鼠脾细胞 ER $\alpha$  mRNA 表达水平

Fig. 1 ER $\alpha$  mRNA expression level in the spleen cells of female mouse

\* 表示同一时点与对照组比较  $P < 0.05$ 。

\* indicates compared with the control group of the same timing,  $P < 0.05$ .

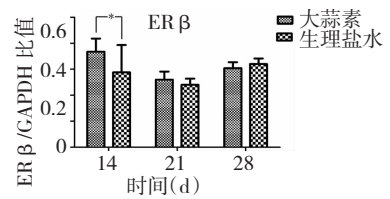


图 2 雌性小鼠脾细胞 ER $\beta$  mRNA 表达水平

Fig. 2 ER $\beta$  mRNA expression level in the spleen cells of female mouse

\* 表示同一时点与对照组比较  $P < 0.05$ 。

\* indicates compared with the control group of the same timing,  $P < 0.05$ .

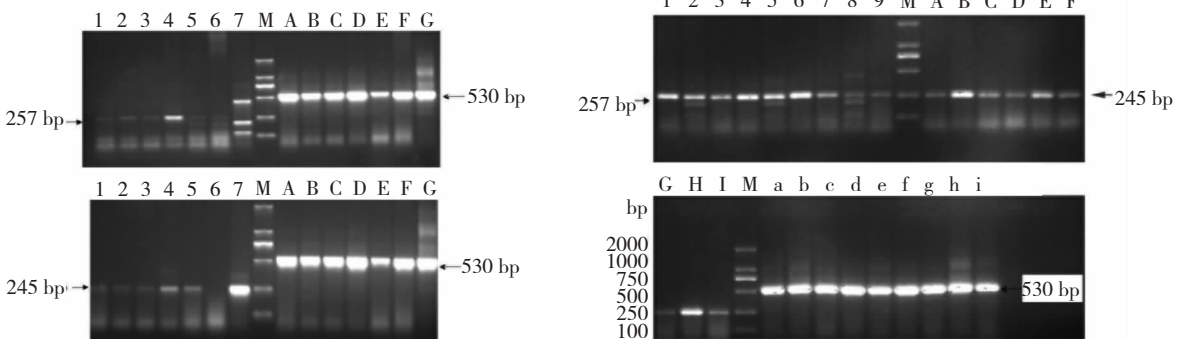


图 3 14 d 雌性对照组和实验组小鼠 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 3 Electropherograms of RT-PCR products of ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、GAPDH mRNA in 14 d female control and experimental groups

左上 (Upper-left) 1-7: Control mice 1-7, ER $\alpha$ ; A-G: Control mice 1-7, GAPDH

左下 (Lower-left) 1-7: Control mice 1-7, ER $\alpha$ ; A-G: Control mice 1-7, GAPDH

右图 (Right) 1-9: Experimental mice 1-9 ER $\alpha$ ; A-I: Experimental mice ER $\beta$ ; a-i: Experimental mice 1-9, GAPDH

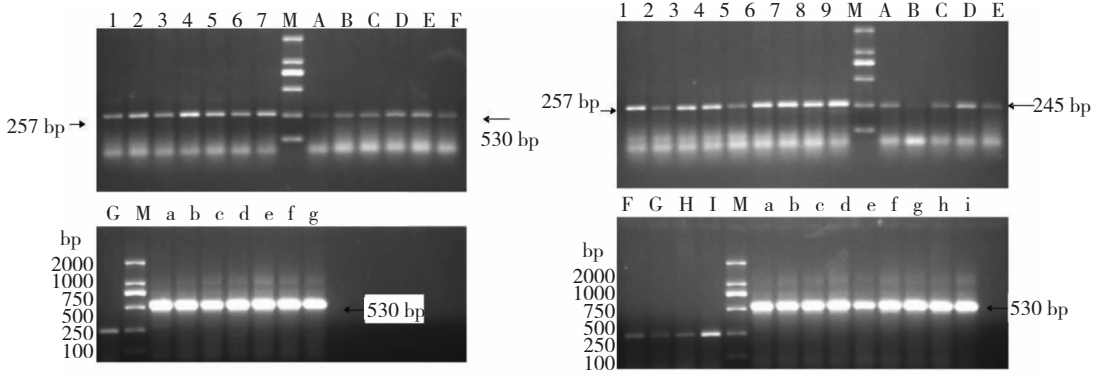


图 4 21 d 雌性对照组和实验组小鼠 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 4 Electropherograms of RT-PCR products of ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GAPDH mRNA in 21 d female control and experimental groups

左图(Left)1-7:Control mice 1-7 ER $\alpha$ ; A-G:Control mice 1-7 ER $\beta$ ; a-g:Control mice 1-7 GAPDH

右图(Right)1-9:Experimental mice 1-9 ER $\alpha$ ; A-I:Experimental mice 1-9 ER $\beta$ ; a-i:Experimental mice 1-9 GAPDH

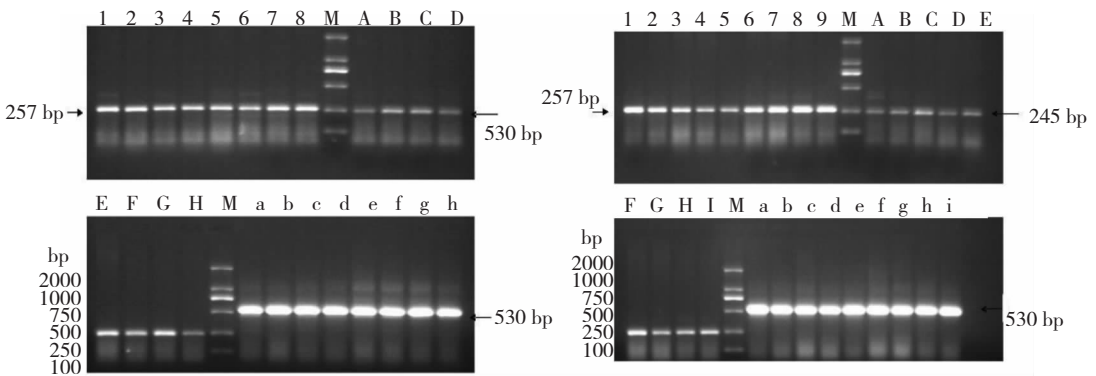


图 5 28 d 雌性对照组和实验组小鼠 ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 5 Electropherograms of RT-PCR products of ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GAPDH mRNA in 28 d female control and experimental groups

左图(Left)1-8:Control mice1-8 ER $\alpha$ ; A-H:Control mice1-8 ER $\beta$ ; a-h:Control mice1-8 GAPDH

右图(Right)1-9:Experimental mice1-9 ER $\alpha$ ; A-I:Experimental mice1-9 ER $\beta$ ; a-i:Experimental mice1-9 GAPDH

### 3.2 大蒜素对雄性小鼠脾细胞 AR mRNA 表达水平的影响:

如图 6 显示,与同一时点对照组相比,灌服大蒜素 14、21 和 28 d 时,实验组小鼠脾细胞 AR mRNA 表达水平明显增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。随灌服时间的延长,小鼠脾细胞 AR mRNA 表达水平有下降趋势。各雄性小鼠脾细胞 AR mRNA 与 GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图见图 7~9。

## 4 讨论

雌激素、雄激素属于类固醇激素,广泛存在于人体各个组织器官,在发育和维持身体正常机能方面发挥着重要作用。雌激素只有与雌激素受体结合(雄激素只有与雄激素受体结合)才能发挥作用,雌

激素受体可分为经典受体(主要包括 ER $\alpha$  和 ER $\beta$ )和膜受体(membrane ER, mER)。雄激素受体也可分为经典受体(AR)和膜受体(membrane AR, mAR)。经典的 ER、AR 属于核受体超家族,该家族成员在结构和功能上具有一定的相似性。

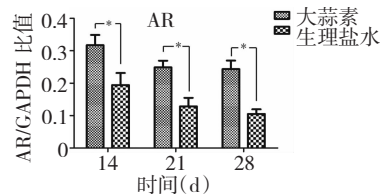


图 6 雄性小鼠脾细胞 AR mRNA 表达水平

Fig. 6 AR mRNA expression level in the spleen cells of male mouse

\* 表示同一时点与对照组比较  $P < 0.05$ 。

\* indicates compared with the control group of the same timing,  $P < 0.05$ .

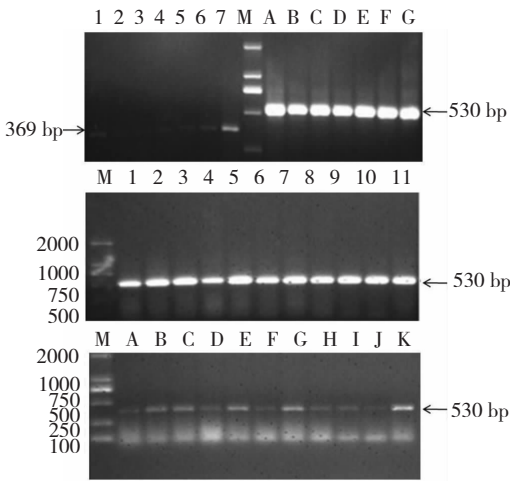


图7 14 d 雄性对照组和实验组 AR、GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 7 Electropherograms of RT-PCR products of AR and GAPDH mRNA in 14 days male control and experimental groups

上图(Upper)1-7: Control mice1-7, AR; A-G; Control mice1-7, GAPDH  
中图(Middle)1-11; Experimental mice1-11, GAPDH;  
下图(Lower) A-K; Experimental mice1-11, AR

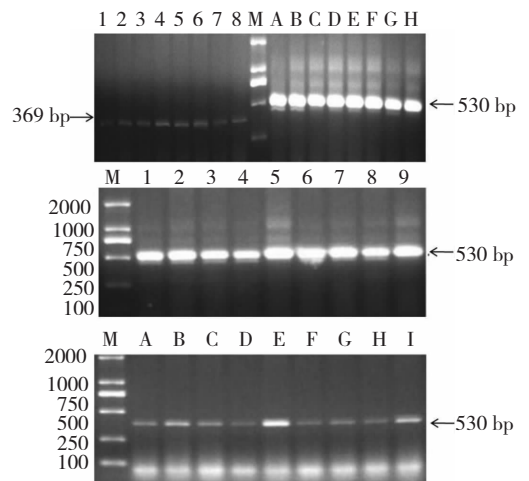


图9 28d 雄性对照组和实验组 AR、GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 9 Electropherograms of RT-PCR products of AR and GAPDH mRNA in 28 days male control and experimental groups

上图(Upper)1-8: Control mice1-8, AR; A-H; Control mice1-8, GAPDH  
中图(Middle)1-9; Experimental mice1-9, GAPDH;  
下图(Lower) A-I; Experimental mice1-9, AR

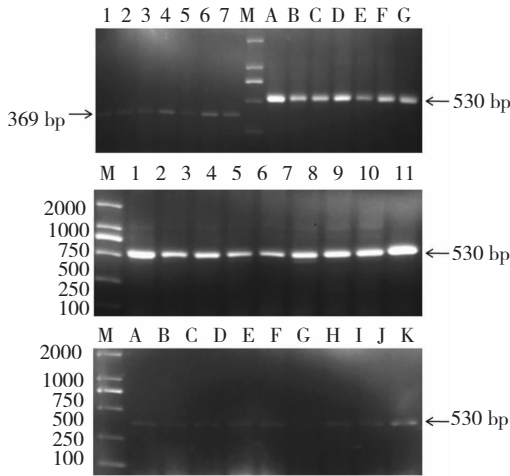


图8 21 d 雄性对照组和实验组 AR、GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 8 Electropherograms of RT-PCR products of AR and GAPDH mRNA in 21 days male control and experimental groups

上图(Upper)1-7: Control mice1-7, AR; A-G; Control mice1-7, GAPDH  
中图(Middle)1-11; Experimental mice1-11, GAPDH;  
下图(Lower) A-K; Experimental mice1-11, AR

近年的研究发现, ER $\alpha$ 、ER $\beta$  和 AR 广泛存在于机体多处免疫组织中, 如骨髓组织、胸腺组织, 非胸腺淋巴样组织、内分泌系统和中枢神经系统以及具有重要调节功能的下丘脑腹侧核, 但其表达量在不同免疫细胞甚至在细胞的不同分化阶段均有所不同。越来越多的证据表明, 雌激素和雄激素参与免疫系统的调节, 在机体免疫功能和免疫介导性疾病中起重要作用。例如, 免疫反应的性别差异、去势后免疫应答的改变、免疫器官和细胞上存在性激素受体以及自身免疫性疾病发病的性别差异等。国内外研究发现, 在小鼠脾细胞和人类 T 淋巴细胞等多种免疫细胞上均有 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  和 AR 的表达, 且国外文献还报道在创伤出血、自身免疫性疾病(如红斑狼疮)的 T 淋巴细胞上 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  的表达与 T 细胞功能有关。研究发现更年期综合症患者外周血白细胞 ER 含量明显降低, 使机体免疫力低下, 而血管中 ER 数目减少是绝经前女性冠心病易患因素之一。这些都表明 ER、AR 与免疫系统存在紧密联系, 但是雌激素、雄激素作用于免疫系统哪些基因及其作用方式、与之相互作用的组织细胞特异性因子、下游调控的目的基因等问题还有待进一步研究。研究雄

激素受体、雌激素受体与免疫系统的关系将有助于了解免疫系统的发育机制、免疫老化机制及自身免疫性疾病的发生机制,并对雌、雄激素在免疫调节方面的应用前景提供一定科研基础。

本实验通过给小鼠灌服大蒜素后,用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测小鼠脾细胞上ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 和AR mRNA的表达水平。实验发现,小鼠脾细胞上有ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 和AR的表达,这与Benten<sup>[8]</sup>和Pieta<sup>[9]</sup>的研究结果一致。实验结果显示,大蒜素可以提高小鼠脾细胞上ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 和AR mRNA的表达水平。提高脾细胞上ER、AR mRNA的表达水平,可以增强E-ER、A-AR生物学效应,提高雌激素、雄激素对免疫系统的调节作用。目前关于大蒜素对雌激素、雄激素受体影响的研究较少,Stan<sup>[10]</sup>研究发现,大蒜素可以降低小鼠前列腺癌细胞上AR的表达水平,这与本实验结论不一致,推测可能是由于在本实验中采用的是脾细胞,以及大蒜素是作用在正常小鼠体内,而不是病理状态等因素造成。本实验首次研究大蒜素对正常小鼠脾细胞ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 和AR mRNA表达水平的调节作用,提示大蒜素可以通过内分泌系统对免疫系统进行调节。

#### 参考文献

- 1 Fujisawa H, Watanabe K, Suma K, *et al.* Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73:1948-1955.
- 2 Miron T, Mironchik M, Mirelman D, *et al.* Inhibition of tumor

growth by a novel approach: in situ allicin generation using targeted alliinase delivery. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2:1295-1301.

- 3 Sher A, Fakhar-ul-Mahmood M, Shah SN, *et al.* Effect of garlic extract on blood glucose level and lipid profile in normal and alloxan diabetic rabbits. *Adv Clin Exp Med*, 2012, 21:705-711.
- 4 Besedovsky HO. Changes in blood hormones during the immune response. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1988, 15:466-471.
- 5 Lv YN(吕亚囡), Dong Q(董群). Effects of garlic on plasma ACTH and CORT of mice. *Acta Acade Med Wannan* (皖南医学院学报), 2012, 31(2):89-91.
- 6 Xu SY(徐叔云), Bian RL(卞如濂), Chen X(陈修). *Pharmacology Experiment Method* (药理学实验方法学). Beijing: People's Medical Publishing House, 1991. 178-179.
- 7 Li TC(李铁臣), Zhu YL(朱延龄), Gong L(宫磊), *et al.* Expression of ING4 gene in human glioma. *J Prac Med* (实用医学杂志), 2008, 24:1508-1510.
- 8 Benten WP, Stelkaan C, Wunderlich F. B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol. *Steroids*, 2002, 67:647-654.
- 9 Pieta A, Maj T, Chelmońska-Soyta A. The influence of mating on estrogen receptor alpha protein level in spleen and uterine macrophages in female mice. *Reprod Biol*, 2009, 9:225-240.
- 10 Stan SD, Singh SV. Transcriptional repression and inhibition of nuclear translocation of androgen receptor by diallyl trisulfide in human prostate cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2009, 15:4895-4903.