

# 金草片对子宫肌瘤模型大鼠子宫组织 一氧化氮合酶表达的影响

李建荣<sup>1,2\*</sup>, 吴兰生<sup>1</sup>, 张广平<sup>1</sup>, 仝燕<sup>1</sup>, 王锦玉<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 澳门科技大学药物及健康应用研究所, 澳门)

**[摘要]** 目的: 探讨金草片对子宫肌瘤模型大鼠子宫组织一氧化氮合酶(NOS)表达的影响, 及该模型与临床发病机理的相关性。方法: 以雌激素和雌、孕激素肌肉注射造成大鼠子宫肌瘤模型, 测定子宫组织的总型 NOS 和诱导型 NOS(iNOS)的水平; 用放射配体结合分析法测定子宫组织雌激素受体(ER)水平; 用放射免疫法测定血清雌二醇(E<sub>2</sub>)和孕酮(P)水平。结果: 模型组大鼠子宫组织总型 NOS 和诱导型 iNOS 表达均明显增强, E<sub>2</sub>、ER 和 P 水平升高; P 水平与 NOS 表达相关, 与 iNOS 表达不直接相关。金草片组可明显降低子宫组织 NOS、iNOS 和 ER 表达, 降低血清 E<sub>2</sub> 和 P 水平, 与模型组比较差异显著。结论: 金草片可抑制子宫肌瘤模型大鼠子宫组织 NOS 表达, 其作用可能是该品种治疗子宫肌瘤的作用机理之一。

**[关键词]** 金草片; 大鼠子宫肌瘤模型; 一氧化氮合酶; 雌激素; 孕激素

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)05-0040-03

## Effects of Jincao Tablet on Expression of Nitric Oxide Synthase in the Model of Uterine Leiomyoma in Rat

LI Jian-rong<sup>1,2\*</sup>, WU Lan-sheng<sup>1</sup>, ZHANG Guang-ping<sup>1</sup>, TONG Yan<sup>1</sup>, WANG Jin-yu<sup>1</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Institute for Applied Research in Medicine and Health Macao University of Science and Technology, Macao, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate effects of Jincao tablet on expression of nitric oxide synthase in the model of uterine leiomyoma in rat and the relationship between the model and pathogenesis. **Method:** Rats were injected with diethyl stilbestrol and progesterone respectively. The expression of NOS and iNOS in uterine leiomyoma tissue were measured by kit; the levels of ER in uterine leiomyoma tissue was assayed by radioligand combination assay; the levels of E<sub>2</sub> and P in serum was determined by radioimmunity. **Result:** Compared with normal group, the levels of and NOS, iNOS, ER, E<sub>2</sub> and P of model group were significantly decreased. The levels of P were related to NOS and were not related to iNOS. Jincao tablet group was obviously different from model group. **Conclusion:** Jincao tablet could improved the levels of immune function of the model of uterine leiomyoma in rat, and it might be played a role in the pathogenesis of leiomyoma.

**[Key words]** Jincao Tablet; the model of hystero myoma in rat; NOS; E<sub>2</sub>; progesterone

金草片具有清热解毒和消癥散结的功效, 临床

用于治疗子宫肌瘤。子宫肌瘤的发病机理较复杂, 与多种因素的影响有关, 临床研究结果表明, NOS (一氧化氮合酶) 水平与子宫肌瘤的生长有关<sup>[1]</sup>, 但 NOS 对子宫肌瘤模型动物肌瘤生长的影响未见报道, 本文报道金草片对子宫肌瘤模型大鼠子宫组织 NOS 表达的影响, 同时探讨其与雌、孕激素的关系, 为该品种的临床应用和该模型与临床发病机理的相

**[收稿日期]** 2007-01-07

**[基金项目]** 科技部创新药物和中药现代化项目  
(2002AA2Z3225)

**[通讯作者]** \* 李建荣, Tel: (010) 64056575; E-mail: JrongLiem@sina.com

关性研究提供试验依据。

### 1 材料

**1.1 药物与试剂** 金草片提取物,由筋骨草提取,每克提取物含乙酰哈巴昔 25 mg,由本所制剂室提供,批号:031125;桂枝茯苓丸,成都金鼎药业有限公司生产,批号:020227,用前加蒸馏水溶解配制。苯甲酸雌二醇注射液,1 mg/mL,上海第九制药厂生产,批号:20021102;黄体酮注射液,20 mg/mL,上海通用药业有限公司生产,批号 030601;考马斯亮兰蛋白测定试剂盒,南京建成生物工程研究所,生产批号:20031210;一氧化氮合酶(NOS)测定试剂盒(分型),南京建成生物工程研究所,生产批号 20031210。

**1.2 动物** 大鼠,SD 种,SPF 级,雌性,体重 200~250 g,购自北京维通利华实验动物有限公司,合格证号:SCXK(京)2002~0003。

**1.3 仪器** DFM-96 型 16 管放射免疫  $r$  计数器:合肥核仪器厂制造;紫外双波长扫描分光光度仪,UV-3000,日本岛津产品。

### 2 方法

取成年雌性未孕大鼠,随机分为正常对照组、模型 1 组、模型 2 组、桂枝茯苓丸组、金草片大、中、小剂量组,每组 10 只。模型 1 组仅注射 3 个月雌激素。模型 2 组及给药各组按照下述方法复制子宫肌瘤模型<sup>[2]</sup>。除正常对照组外均肌肉注射苯甲酸雌二醇,0.2 mg/只,3 次/w,连续注射 3 个月,于造模 3 个月后加黄体酮 1.5 mg/只肌注,2 次/w,连续注射 1 个月。造模 1 个月后给药组按照表 1 剂量灌胃给药,给药体积均为 1 mL/100 g,连续给药 3 个月。造模 4 个月后,各组大鼠以 3% 戊巴比妥腹腔注射麻醉(1 mL/kg),称重,腹主动脉取血,离心,取血清,按照放射免试剂盒方法测 E<sub>2</sub>(雌二醇)和 P(孕酮)水平;取大鼠子宫剥离脂肪后称重,将子宫用眼科小剪子剪碎,称取剪碎的子宫组织加 9 倍生理盐水,在电动匀浆机中制成匀浆,3 500 r/min 离心 15 min,取上清液分别按照试剂盒方法,测定吸光度值,计算 NOS(一氧化氮合酶)水平和蛋白含量;用放射配体结合分析法<sup>[3]</sup>测定子宫组织的 ER(雌激素受体)水平。

蛋白含量测定计算公式:

$$\text{蛋白含量(g/L)} = [\text{测定管 OD 值} / \text{标准管 OD 值}] \times \text{标准管浓度(g/L)}$$

一氧化氮合酶(NOS)计算公式:

$$\text{总 NOS 活力(U/mL)}$$

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{总 NOS 测定管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}}{\text{呈色物纳摩尔消光系数}} \times \\ &\quad \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量}} \times \frac{1}{\text{比色光径} \times \text{反应时间}} \div \\ &\quad \text{蛋白含量(mgprot/L)} \\ &\quad \text{iNOS 活力(U/mL)} \\ &= \frac{\text{iNOS 测定管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}}{\text{呈色物纳摩尔消光系数}} \times \\ &\quad \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量}} \times \frac{1}{\text{比色光径} \times \text{反应时间}} \div \\ &\quad \text{蛋白含量(mgprot/L)} \end{aligned}$$

### 3 结果

**3.1 对子宫肌瘤模型大鼠子宫组织 NOS 表达的影响** 与正常对照组比较,模型 1 组大鼠子宫组织中诱导型 iNOS 表达增强,但总型 NOS 表达无显著性增强,模型 2 组大鼠子宫组织中总型 NOS 和诱导型 iNOS 表达均明显增强;与模型 1 组比较,给药大、中剂量组大鼠子宫组织中诱导型 iNOS 表达明显减弱;与模型 2 组比较,给药大、中剂量组大鼠子宫组织总型 NOS 表达明显减弱,诱导型 iNOS 表达明显减弱,其它各剂量组均无显著性差异。见表 1。

表 1 对子宫肌瘤模型大鼠子宫组织 NOS 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量 (g 提取物/kg)	总型 NOS 活力 (U/mgprot)	诱导型 iNOS 活力 (U/mgprot)
正常组	—	0.475 ± 0.152	0.071 ± 0.029
模型 1 组(E <sub>2</sub> )	—	0.943 ± 0.309	0.126 ± 0.048 <sup>1)</sup>
模型 2 组(E <sub>2</sub> + P)	—	1.079 ± 0.317 <sup>1)</sup>	0.171 ± 0.121 <sup>1)</sup>
桂枝茯苓丸组(E <sub>2</sub> + P)	2.25(丸重)	0.848 ± 0.247	0.099 ± 0.063
金草片组(E <sub>2</sub> + P)	0.04	0.766 ± 0.129 <sup>3)</sup>	0.079 ± 0.021 <sup>2,3)</sup>
金草片组(E <sub>2</sub> + P)	0.02	0.804 ± 0.134 <sup>3)</sup>	0.094 ± 0.030
金草片组(E <sub>2</sub> + P)	0.01	0.867 ± 0.251	0.110 ± 0.061

注:组间  $t$  检验:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型 1 组比较:<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型 2 组比较:<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ (下同)。

**3.2 对子宫肌瘤模型大鼠血清 E<sub>2</sub>、P 及子宫组织 ER 水平的影响** 与正常对照组比较,模型 1、2 组大鼠血清的 E<sub>2</sub> 水平均明显升高,模型 2 组大鼠的 P 和 ER 水平明显升高,模型 1 组大鼠的 P 和 ER 水平未见明显升高;与模型 2 组比较,给药 3 个剂量组大鼠的 E<sub>2</sub> 水平和 P 水平均明显降低,给药大、中剂量组大鼠的 ER 水平明显降低;与模型 1 组比较,给药大剂量组大鼠的 E<sub>2</sub> 水平明显降低,其它剂量组未见显著性差异。见表 2。

表 2 对子宫肌瘤模型大鼠血清 E<sub>2</sub>、P 和子宫 ER 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量(g 提取物/kg)	ER( pmol·gprot <sup>-1</sup> )	E <sub>2</sub> ( pg·mL <sup>-1</sup> )	P( ng·mL <sup>-1</sup> )
正常组	—	44.46 ± 19.65	34.74 ± 11.84	54.05 ± 10.14
模型 1 组(E <sub>2</sub> )	—	41.49 ± 21.09	56.41 ± 17.55 <sup>1)</sup>	44.07 ± 14.08
模型 2 组(E <sub>2</sub> + P)	—	66.26 ± 18.01 <sup>1)</sup>	65.15 ± 19.45 <sup>1)</sup>	69.89 ± 15.97 <sup>1)</sup>
桂枝茯苓丸组(E <sub>2</sub> + P)	2.25(丸重)	62.71 ± 10.22 <sup>2)</sup>	35.17 ± 5.28 <sup>2,3)</sup>	51.69 ± 10.13 <sup>3)</sup>
金草片组(E <sub>2</sub> + P)	0.04	44.38 ± 21.03 <sup>3)</sup>	41.85 ± 9.79 <sup>2,3)</sup>	41.80 ± 13.96 <sup>3)</sup>
金草片组(E <sub>2</sub> + P)	0.02	39.4 ± 14.38 <sup>3)</sup>	44.64 ± 6.87 <sup>3)</sup>	42.45 ± 9.40 <sup>3)</sup>
金草片组(E <sub>2</sub> + P)	0.01	50.07 ± 18.09	44.34 ± 13.22 <sup>3)</sup>	44.91 ± 16.33 <sup>3)</sup>

#### 4 讨论

NOS 与子宫肌瘤生长的关系 NO(一氧化氮)具有广泛的生物活性,在人和动物各组织中均参与许多不同的生理过程,同时也参与肿瘤在内的病理过程<sup>[4]</sup>。近期的临床研究证实,NO 含量增多可能是子宫肌瘤发生、发展过程中的一个重要环节。子宫肌瘤组织中 NOS 表达明显高于周围肌层组织,肌瘤组织中动脉平均直径大于肌层组织,NO 通过扩张血管,增强子宫肌瘤组织血液供应,促使肌瘤细胞的生长<sup>[1,5]</sup>。NOS 是催化内源性 NO 生物合成的唯一限速酶,通过测定 NOS 活性可间接反映组织中 NO 的含量。NOS 主要存在两种类型的同工酶,即 cNOS(结构型)和 iNOS(诱导型)。cNOS 为细胞本身固有,在生理条件下受钙-钙调蛋白系统调节,合成少量 NO,发挥调节血管口径、通透性,传递细胞信息等作用。iNOS 主要存在于巨噬细胞内,合成大量 NO,不依赖钙,具有杀菌、抗病毒和杀伤肿瘤细胞的活性,但 NO 浓度过高又可损伤 DNA 并导致基因突变和癌变。

本研究结果显示,模型 1 组和模型 2 组两种造模方法所致子宫肌瘤模型大鼠子宫组织的 iNOS 表达均明显高于正常组,证实子宫肌瘤模型大鼠子宫组织 NOS 表达增高的现象与临床子宫肌瘤患者相同。金草片可抑制模型大鼠 iNOS 表达的增高。

NOS 与雌孕激素的关系 子宫肌瘤是卵巢甾体激素依赖性肿瘤,孕激素在肌瘤发展中与雌激素具有同样重要的作用。雌激素即能促进自身受体的生成,也能促进孕激素受体的生成,雌激素与其受体结合可促进子宫肌细胞的增殖,又在孕激素作用下分化最终导致子宫瘤样增生<sup>[6]</sup>。但有研究报道,子宫肌瘤组织中 NOS 活性与 ER, PR 均明显高于周围肌层组织,且 NOS 活性与 ER 表达呈正相关,与 PR 无关<sup>[1]</sup>。

本研究结果显示,肌注雌激素所致子宫肌瘤模型 1 组和肌注雌、孕激素所致子宫肌瘤模型 2 组大鼠子宫组织的 iNOS 表达均明显高于正常组,模型 1 组大鼠子宫组织的 iNOS 表达虽弱于模型 2 组,但与模型 2 组比无显著性差异,提示模型大鼠子宫组织的 iNOS 表达与 P 水平不直接相关,该结果与上述临床报道相近。但肌注雌、孕激素的模型 2 组大鼠子宫组织的总型 NOS 表达明显增高,仅肌注雌激素的模型 1 组大鼠子宫组织的总型 NOS 表达与正常组比较未见明显增高,提示模型大鼠子宫组织总型 NOS 表达与 P 水平有关,ER 与 P 水平相关。金草片对模型大鼠总型 NOS 表达和 E<sub>2</sub>、ER 水平升高均显示明显的抑制作用。

#### [参考文献]

- [ 1 ] 沈美娟,施瑾,任晓冰,等. 一氧化氮合成酶在子宫肌瘤的表达及与性激素的关系[J]. 中国肿瘤, 2001, 10(10): 613.
- [ 2 ] Fujii S, Nakashima N, Okamura H, et al. Progesterone-induced smooth muscle-like cells in the subperitoneal modules produced by estrogen. Experimental approach to leiomyomatosis peritonealis disseminata [J]. Am J Obstet Gynecol, 1981, 139(2): 164-172.
- [ 3 ] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 上册. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 566.
- [ 4 ] Thomsen LL, Lawton FC, Knowles RC, et al. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer [J]. Cancer Res, 1994, 54(5): 1352.
- [ 5 ] 陈芳兰,王丽京,王静兰,等. 一氧化氮合成酶在子宫肌瘤中的表达及意义[J]. 兰州医学院学报, 2002, 28(3): 5.
- [ 6 ] 姜卫国. 黄体酮在子宫肌瘤发生机理中的重要作用[J]. 国外医学妇产科学分册, 1996, 23(2): 95-96.