

# 三七有效成分对子宫内细胞培养液 TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 含量的影响\*

尤昭玲 付灵梅 谭朝阳 游 慧  
(湖南中医学院中西医结合系, 长沙 410007)

**摘要:**目的: 利用细菌脂多糖(LPS)诱导正常子宫内细胞, 导致细胞发生炎症反应的体外细胞模型, 研究三七不同有效成分干预炎症细胞模型后, 其细胞培养液中白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量的变化。方法: 比较不同浓度的三七有效成分对正常子宫内细胞生长的抑制率, 筛选最佳浓度的三七有效成分干预炎症子宫内细胞模型, 测定其两个时间段(48h、72h)的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的浓度。结果: 1. 通过对三七有效成分 5 个梯度剂量进行剂量筛选, 采用四氮唑蓝(MTT)法测定发现, 符合药物对细胞的抑制率(IR)  $\leq 10\%$  的为三七有效成分第 3 组(三七皂苷 0.0408mg/mL+三七氨酸 0.002mg/mL)。2. 3 个药物干预组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  浓度都明显低于同时段的模型组( $P < 0.01$ )。但是与正常对照组相比, 两时段的三七皂苷组和三七氨酸组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的浓度含量还是明显高于正常对照组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而三七复方组与正常对照组比较无明显差异。结论: 1. 三七有效成分的剂量筛选的第 3 组(三七皂苷 0.0408mg/mL+三七氨酸 0.002mg/mL)可作为干预炎症子宫内细胞模型的三七复方的药物浓度, 干预的时间及用量的量化, 为进一步的实验研究提供了必要的基础。2. 三七的各有效成分可不同程度地抑制炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的分泌。

**关键词:** 三七有效成分; 子宫内细胞; 细菌脂多糖; TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$

**中图分类号:** R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2005)02-0039-04

炎症因素所致的子宫异常出血是中西医妇产科临床常见病症, 如急慢性盆腔炎、子宫内膜炎、宫内节育器或药流人流后出血、产后出血及恶露不绝等均与炎症有直接或较密切关系。迄今有关子宫内出血、止血修复的研究尚不深入, 而炎症所致子宫出血及炎症、止血、修复的有关机理研究, 目前报道也较少。西医对异常子宫出血治疗是治标难治本, 且有一定的副作用; 传统中医药对妇产科“血证”治疗效果显著、颇具特色。三七是化瘀止血名药, 在妇产科“血证”中尤为常用, 但其“化瘀止血”的作用途径仍不清楚。在利用前期的 LPS 诱导子宫内细胞的炎症模型等实验研究的基础上, 对炎症细胞模型施加三七有效成分, 从与子宫内局部炎症-凝血网络相关的细胞因子的分泌来探讨三七有效成分影响子宫内止血与修复的机制。

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂及仪器** 造模剂, LPS(SIGMA 公司 0127: B8), 溶于 DMEM/F-12(含 10% 胎牛血清)的培

养液中, 用 0.22 $\mu$ m 滤膜加压过滤除菌, 置 4 $^{\circ}$ C 过夜备用。干预药物, 三七用乙醇渗液提取, 醇提液回收乙醇, 过大孔树脂柱, 分离得总皂苷, 剩余液过离子交换柱, 分离三七氨酸。三七皂苷和三七氨酸的比例按照生药三七中两者的比例(三七皂苷 8%、三七氨酸 0.4%)配制, 由本实验室分离制备。溶于 DMEM/F-12(含 10% 胎牛血清)培养液中, 用 0.22 $\mu$ m 滤膜加压过滤除菌, 置 4 $^{\circ}$ C 过夜备用。DMEM/F-12 培养基(GIBCO 产品, 加入青霉素 100U/mL, 链霉素 100U/mL, 肝素 50mg/mL)、胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)、胰蛋白酶(上海生工)、配制成 0.25% 浓度后 4 $^{\circ}$ C 冷藏过夜)、乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA, 上海生工)、四氮唑蓝(MTT, 上海生工)、二甲基亚砷(DMSO, 上海生工)。

主要仪器设备 CO<sub>2</sub> 培养箱(德国贺利氏 Heracell)、超净工作台(苏州 SW-CJ-2FD)、倒置显微镜(重庆光学仪器厂)、酶标仪(芬兰 Labsystem MK3)、荧光显微镜(江南光学仪器厂)。

检测药盒 人白介素-1 $\beta$  定量 EIA 试剂盒、人 TNF- $\alpha$  定量 EIA 试剂盒(上海森雄)。

**1.2 标本来源及子宫内细胞的培养方法** 组织标本均来自于门诊刮宫病人, 患者年龄 18~45 岁, 3

收稿日期: 2004-03-12

基金项目: 国家自然科学基金资助课题(C30271633)

通讯作者: 尤昭玲, Tel: (0731) 5381004, E-mail: flm1208@163.com

个月内未服用任何激素类药物,如避孕药、氟灭酸等影响内分泌的药物。刮取月经周期 7~14d 的子宫腔前、后壁正常内膜各 2 条。全过程均在无菌条件下完成,标本在 30min 内低温转送到实验室进行处理。选取刮取子宫内内膜送病检正常者的组织进行实验。

**培养方法** 参照文献[1]用 0.25% 的胰蛋白酶 2~3mL,置 37℃ 恒温水浴箱中振荡消化 10min 后,加入 DMEM/F-12(含 10% 胎牛血清)终止消化。反复吹打未消化的组织块,经台盼蓝染色证明活细胞数大于 90%,并调整细胞密度为  $1 \times 10^5$ /mL,吸出细胞悬液放入培养瓶,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。传代后的细胞接种于 96 孔培养板中,待细胞重新长满汇合后,用于以下实验。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 三七有效成分的剂量确定筛选实验** 选取 96 孔培养板中处于对数生长期的细胞,参照临床药物血浆峰值浓度文献[2]选用三七生药浓度中值为 0.510mg/mL,分为 6 组(5 个不同浓度的中药组,浓度分别为中药 1 组,三七皂苷 0.0102mg/mL+ 三七氨酸 0.0005mg/mL; 中药 2 组,三七皂苷 0.0204mg/mL+ 三七氨酸 0.001mg/mL 中药 3 组三七皂苷 0.0408mg/mL + 三七氨酸 0.002mg/mL; 中药 4 组,三七皂苷 0.0816mg/mL+ 三七氨酸 0.004mg/mL; 中药 5 组,三七皂苷 0.1632mg/mL+ 三七氨酸 0.008mg/mL 和 1 个空白对照组,每组 3 个孔。中药组每孔加药 100μL 各个浓度的三七氨酸和三七皂苷的混合液,空白组加 100μL 的 DMEM/F-12(含 10% 胎牛血清)培养液,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48h。每孔加入 5mg/mL 的 MTT 20μL,继续温育 4h。吸去培养液,加入含 100μL 的 DMSO,震荡 5min,使微小黑色结晶溶解,形成均匀蓝紫色溶液。用酶标仪测定吸光度(A),测定波长 570nm,以不加细胞的孔调零,计算药物对细胞的抑制率(IR ≤ 10%),确定三七有效成分的最佳浓度。同时进行形态学观察。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组吸光度} - \text{实验组吸光度}}{\text{对照组吸光度}} \times 100\%$$

**1.3.2 炎症模型的药物干预实验** 将接种于 96 孔培养板中处于对数生长期的细胞,随机分为 5 组,设正常对照组、模型组、三七皂苷组、三七氨酸组、三七复方组,每组 3 个样本。根据施加药物三七皂苷和三七氨酸的细胞毒试验所确定的浓度给各组施加药物。各组换液后添加药物,空白对照组添加等量的 DMEM/F-12(含 10% 胎牛血清)。三七皂苷组、三七氨酸组、三七复方组分别同时加入 100μg/mL LPS 和

各组的干预药物,收集 48、72h 两个时间段的细胞培养液,1000rpm 离心 10min,取培养上清液进行 IL-1β、TNF-α 的检测。同时每个时间段用倒置相差显微镜进行各组细胞的形态学观察。

**1.4 培养液中的 IL-1β 和 TNF-α 的测定** 采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法。用抗人 IL-1β 或 TNF-α 单抗包被于酶标板上,标准品和样品中的 IL-1β 或 TNF-α 与单抗结合,加入生物素化的抗人 IL-1β 或 TNF-α 抗体,形成免疫复合物连接在板上,辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合,加入酶底物 OPD,出现黄色,加终止液硫酸,颜色变深,在 492nm 处测 OD 值,IL-1β 或 TNF-α 浓度与 OD 值成正比,通过绘制标准曲线求出标本中 IL-1β、或 TNF-α 的浓度。

**1.5 统计学处理** 所有数据均用 SPSS10.0 软件包进行处理,方差齐用方差分析,两两比较用 q 检验,方差不齐用秩和检验。

## 2 结果

**2.1 三七有效成分的剂量确定筛选实验** 干预药物三七有效成分剂量筛选的 MTT 实验发现,从中药 1 组的浓度起即有作用,呈浓度依赖性,从中药 3 组开始作用更加明显。IR ≤ 10% 约为中药 3 组的浓度见表 1,所以最后选取的最佳浓度为中药 3 组的浓度,其浓度为三七皂苷 0.0408mg/mL+ 三七氨酸 0.002mg/mL。形态学观察发现:中药 4 组与空白对照组相比,细胞形态不规则,细胞间的连接不紧密,部分细胞飘浮死亡,仍贴壁的细胞中部分出现大量的空泡、脂肪体及其他颗粒物质,线粒体肿胀,溶酶体数目增多见图 1。中药 5 组细胞大量崩解死亡见图 2,其余各组形态正常。

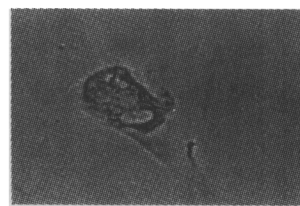


图 1 中药 4 组细胞形态

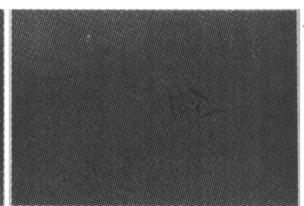


图 2 中药 5 组细胞形态

表 1 三七有效成分对正常子宫内膜细胞生长的抑制作用

组别	样本数	$\bar{x} \pm s$	抑制率(%)
空白对照组	5	0.558 ± 0.004	—
中药 1 组	5	0.550 ± 0.010	1.43
中药 2 组	5	0.535 ± 0.009	4.12
中药 3 组	5	0.507 ± 0.007 <sup>1)</sup>	9.14
中药 4 组	5	0.410 ± 0.018 <sup>1)</sup>	26.5
中药 5 组	5	0.280 ± 0.024 <sup>1)</sup>	49.8

注:与空白对照组相比较<sup>1)</sup> P < 0.01。

**2.2 炎症模型的药物干预实验** 由表 2、表 3 可知 3 个药物干预组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  浓度都明显低于同时段的模型组 ( $P < 0.01$ )。但是与正常对照组相比, 两时段的三七皂苷组和三七氨酸组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的浓度含量还是明显高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而三七复方组的含量与正常对照组比较差异无明显统计学意义。

**表 2** 三七有效成分对人子宫内膜细胞培养液 TNF- $\alpha$  含量的影响  
(pg/mL,  $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组 别	时 段	
	48h	72h
模型组	204.00 $\pm$ 47.94 <sup>1, 2, 5)</sup>	281.51 $\pm$ 18.23 <sup>3, 5)</sup>
三七皂苷组	104.67 $\pm$ 9.09 <sup>2, 3)</sup>	115.11 $\pm$ 8.99 <sup>2, 5)</sup>
三七氨酸组	146.26 $\pm$ 11.22 <sup>2, 3, 5)</sup>	141.25 $\pm$ 29.52 <sup>2, 3, 5)</sup>
三七复方组	79.69 $\pm$ 11.70 <sup>2)</sup>	89.14 $\pm$ 7.57 <sup>2, 4)</sup>
正常对照组	63.55 $\pm$ 14.72 <sup>2)</sup>	64.83 $\pm$ 12.99 <sup>2)</sup>

注: 48h 与 72h 时间段相比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;

与模型组同时段相比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;

与三七复方组同时段相比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;

与正常对照组时段相比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>5)</sup>  $P < 0.01$ 。

**表 3** 三七有效成分对人子宫内膜细胞培养液  
IL-1 $\beta$  含量的影响 (pg/mL,  $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组 别	时 段	
	48h	72h
模型组	1031.62 $\pm$ 54.52 <sup>5, 6)</sup>	1334.64 $\pm$ 82.86 <sup>5, 6)</sup>
三七皂苷组	669.68 $\pm$ 61.66 <sup>3)</sup>	780.61 $\pm$ 93.46 <sup>3, 4, 6)</sup>
三七氨酸组	730.56 $\pm$ 33.65 <sup>3, 4, 6)</sup>	770.39 $\pm$ 15.14 <sup>3, 4, 6)</sup>
三七复方组	631.52 $\pm$ 64.20 <sup>3)</sup>	654.83 $\pm$ 39.63 <sup>3)</sup>
正常对照组	589.26 $\pm$ 17.67 <sup>3)</sup>	597.76 $\pm$ 7.85 <sup>3)</sup>

注: 48h 与 72h 时间段相比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;

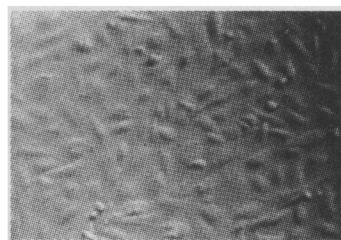
与模型组同时段相比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;

与三七复方组同时段相比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>5)</sup>  $P < 0.01$ ;

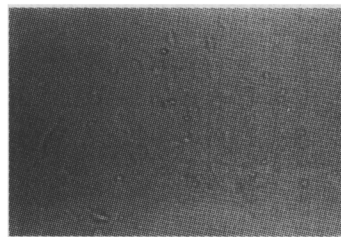
与正常对照组同时段相比较<sup>6)</sup>  $P < 0.01$ 。

实验分两个时间段对细胞形态进行观察, 48h 段正常对照组细胞接种后, 经过贴壁、伸展、分裂增殖, 布满整个培养板的孔底。细胞形态正常, 生长良好。间质细胞形态呈梭形, 平行排列成束生长, 上皮细胞形态类似蝌蚪形, 形成漩涡状排列, 细胞间连接紧密见图 3。经 LPS 作用后的模型组较多的细胞仍维持正常外观, 少数细胞形态发生变化。倒置相差显微镜和普通显微镜下主要表现为少数细胞收缩成圆形固缩状, 细胞间隙稍增宽, 有少部分细胞发生脱落并出现异常颗粒见图 4。三七复方组 48h 时间段, 细胞形态基本正常, 生长状况良好, 与正常对照组无明显差异, 仍紧密镶嵌排列见图 5; 而三七总苷组有少量细胞脱落, 大部分细胞形态规则, 细胞连接紧密, 细胞核及细胞轮廓尚清楚见图 6; 三七氨酸组细

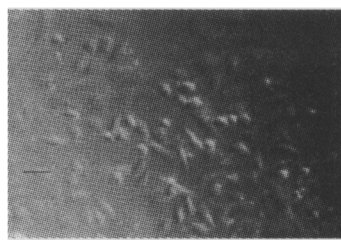
胞拉长, 细胞间隙明显增宽, 但细胞及核边界尚清晰见图 7。



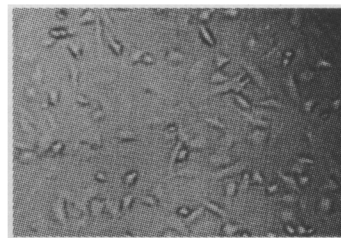
**图 3** 正常子宫内膜细胞



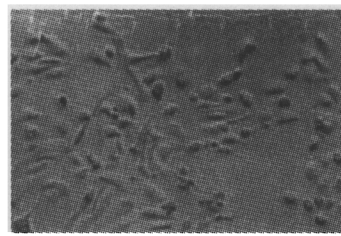
**图 4** LPS 处理 48h 子宫内膜细胞



**图 5** 三七复方组 + LPS



**图 6** 三七总苷 + LPS



**图 7** 三七氨酸 + LPS 48h

72h 后再次在显微镜下观察, 正常对照组细胞分裂增殖, 数目明显增多。细胞形态正常, 生长良好见图 8。而 LPS 模型组的细胞形态发生显著变化。镜下观察发现较多的细胞发生严重的收缩, 细胞连接消失, 间隙较前大大增宽, 细胞脱落数目增加, 大量飘浮死亡。胞浆中出现大量的空泡和脂肪体, 溶酶体增多。并有大部分上皮细胞失去原有的形态,

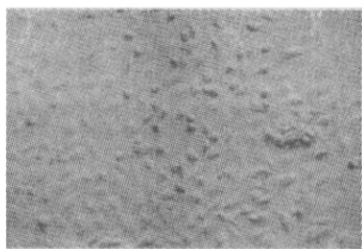


图 8 正常 72h

细胞纵轴拉长,横轴缩短,表现为成纤维细胞型外观见图 9。三七复方组镜下观察,较 48h 和正常对照组相比,细胞间隙稍增宽,偶见少数细胞收缩成圆形,多数细胞形态基本规则见图 10。三七总苷组培养液中可见少量飘浮死亡的细胞,细胞连接欠紧密,形态基本正常见图 11。三七氨酸组脱落细胞数目增加,可见飘浮死亡的细胞。细胞形态发生改变,出现胞浆空泡、坏死或碎裂。细胞核细胞边界不清晰,胞浆内出现异常颗粒见图 12。

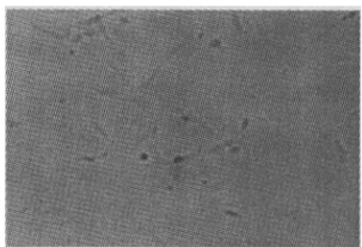


图 9 LPS 处理 72h

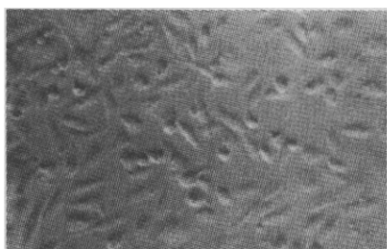


图 10 三七复方 + LPS 处理 72h

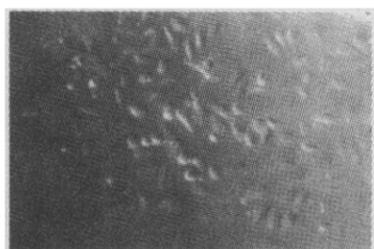


图 11 三七总苷 + LPS 处理 72h

### 3 讨论

子宫内膜发生细菌或非细菌性炎症时,子宫内膜微血管痉挛、血栓形成,进而内膜崩解而形成出血,这一现象与中医对“血瘀”的认识相吻合。

三七味甘,性平,有活血化瘀,行气止痛之功,适用于血瘀疼痛,跌打损伤等。

近年研究认为三七总皂苷(PNS)对多种实验性

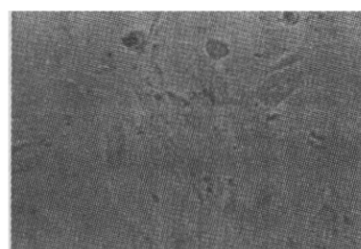


图 12 三七氨酸 + LPS 72h

炎症模型具有良好抗炎活性,PNS 对某些真菌有较强的抑制作用,对金黄色葡萄球菌,大肠杆菌等也有一定的抑制作用<sup>[3]</sup>,其抗炎机制与抑制炎症渗出液中的 TNF、NO 有关<sup>[4-6]</sup>;三七氨酸则具有诱导血小板释放止血和凝血活性物质的作用,从而发挥其止血功能<sup>[7]</sup>。

结果显示三七复方组、三七总苷组和三七氨酸组都能不同程度抑制炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的分泌,但在降低培养液中炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  浓度的幅度上,三七复方组(含三七总苷和三七氨酸)最为明显,而三七总苷明显强于三七氨酸。实验证明三七总苷是三七中主要的抗炎成分,它通过降低细胞分泌炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ ,从而达到抑制炎症的进一步发展。三七氨酸抑制 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的作用低于三七总苷,在三七抗炎作用中起到辅佐三七总苷的作用。所以联合应用三七总苷和三七氨酸降低炎症细胞因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的幅度最为明显,几乎接近正常对照组。但是三七总苷和三七氨酸影响细胞炎症因子 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  分泌的具体途径还有待进一步的研究。

### 参考文献:

- [1] 蒋洲梅,黄玉珠,洪淡华.人子宫内膜细胞培养及形态学观察[J].生殖与避孕,1994,14(4):271-274.
- [2] 成海,熊磊,刘平等.MTT法观察三七总苷对NIH/3T3成纤维细胞毒性作用与增殖的影响[J].中国中西医结合脾胃杂志,1999,7(4):203-205.
- [3] 李丽莹,武景凤,王美村.三七临床应用及作用机制的探讨[J].黑龙江医学,2001,25(11):842-843.
- [4] 李淑慧,李晓辉,楚延.三七总皂苷抗炎作用机制的实验研究[J].中草药,2000,31(9):676.
- [5] 王训立,周建华,范春梅.季节性变化对雌性恒河猴生殖功能的影响[J].中国实验动物学报,2002,10(1):20-26.
- [6] 孟凡,素娟.月经出血模式的分析方法[J].中国计划生育学杂志,1998,6(8):383-384.
- [7] 李广勋.中药药理毒理与临床[M].天津:科技翻译出版公司出版,1992.228-231.