

• 药理 •

# 三七复合有效成分对恒河猴细菌感染性子官出血模型内膜组织一氧化氮及一氧化氮合酶的影响

尤昭玲<sup>1</sup>, 马红霞<sup>2</sup>, 王若光<sup>1</sup>, 谈诊如<sup>1</sup>, 林洁<sup>1</sup>, 余建<sup>1</sup>

(1 湖南中医学院, 湖南长沙 410007; 2 广州中医药大学, 广东广州 510407)

**摘要:**目的: 探讨一氧化氮(NO)及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在炎性子官出血中的作用及三七复合有效成分的影响。方法: 选择月经正常雌性育龄恒河猴 11 只, 随机分为中药组(三七复合有效成分)4 只、模型组 4 只及正常对照组 3 只。应用化学比色法检测三组子官内膜中一氧化氮及一氧化氮合酶的活性, 用免疫组化法检测三组子官内膜中一氧化氮合酶(iNOS)蛋白的表达水平。结果: 中药组与模型组比较, 子官内膜 NO、iNOS 的活性及 iNOS 蛋白表达水平明显降低, 差异有显著性,  $P < 0.01$ ; 结论: NO 可能参与了炎性子官出血的发病机制, 三七减少炎性子官出血的机制可能与调节 NO、iNOS 的活性及 iNOS 蛋白表达水平有关。

**关键词:** 子官出血; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 三七; 恒河猴

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)05-0018-03

## Influence of Two Kinds of Active Components from *Panax Notoginseng* on NO and iNOS in Inflammatory Metrorrhagia

### Model of *Macaca mulatta*

YOU Zhao-ling<sup>1</sup>, MA Hong-xia<sup>2</sup>, WANG Ruo-guang<sup>1</sup>,  
TAN Zhen-ru<sup>1</sup>, LIN Jie<sup>1</sup>, YU Jian<sup>1</sup>

(1 Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

2 Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**Abstract: Objective:** To explore the influence of two kinds of active components from *Panax notoginseng* on NO and iNOS on inflammatory Metrorrhagia model of *Macaca mulatta*. **Methods:** Eleven normal menorrhoea adult Rhesus monkeys were choosed as research object, and were divided into model group (four), TCM group (four) and Control group (three) at random. Colorimetric method were performed to estimate the activity of NO and iNOS in of model group, TCM group and normal control group, the immunohistochemical S-p were performed to estimate the express level of iNOS in the endometrium of the three groups. **Result:** Compared to the model group, the activity of No and iNOS and the express level of iNOS in the endometrium of TCM gorup was obviously weaker, which are similar to that of the normal group. **Conclusion:** NO may be involved in the pathogenesis of inflammatory Metrorrhagia. Two kinds of active components from *Panax notoginseng* reduce inflammatory Metrorrhagia by regulating the activities of NO and iNOS and the express level of iNOS in the endometrium.

**Key words:** Metrorrhagia; NO; iNOS; *Panax notoginseng*; *Macaca mulatta*

炎症因素所致的子官异常出血是中西医妇产科临床常见病症, 如急慢性盆腔炎、子官内膜炎、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的关系。西医对子官异常

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。三七为传统中药中化瘀止血的名药, 有“止血圣药”之称, 多数临床资料证实三七治疗子官出血疗效确切, 但其治疗的机制仍未清楚。近年的研究结果提示, NO 可通过促进子官内膜血管扩张, 血管通透性增加引起月经过多<sup>[1,2]</sup>。NOS 是 NO 合成的唯一限速酶,

收稿日期: 2003-09-11

基金项目: 国家自然科学基金(30271633)、湖南省社会发展重大项目(01SSY1002-4)

测定组织中 NOS 活性及其蛋白质的表达,可反应局部组织器官的 NO 合成量<sup>[3]</sup>。本研究采用宫腔直接细菌接种建立恒河猴子宫炎性出血模型,通过观察该模型子宫内膜局部 NO、iNOS 活性和 iNOS 蛋白表达水平的变化及三七复合有效成分的影响,旨在探讨三七复合有效成分对子宫炎性出血的作用,从而为以后防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 选择生殖季节期月经正常的雌性育龄 11 只,体重  $5.5 \pm 1.8\text{kg}(\bar{x} \pm s)$ ,由军事医学科学院实验动物中心提供,动物质量合格证号为 99001。单笼(80cm × 90cm × 100cm)饲养,猴舍通风良好,自然光照,每天喂军事医学科科学院研制的标准颗粒饲料和时令瓜果,自由进水。用随机数字表法将上述恒河猴分为三七复合有效成分组 4 只、模型组 4 只、正常对照组 3 只。

**1.2 恒河猴细菌感染性子宫出血模型的制作<sup>[10]</sup>** 模型组和三七复合有效成分组的恒河猴在月经第 3d,用眠乃宁注射液(0.02mL/kg)肌注全麻后置于手术台上,常规铺巾消毒后行宫腔细菌接种术,先用大号卵圆钳窥开阴道,暴露宫颈,宫颈钳钳夹宫颈下唇将子宫向外牵拉,然后用腰穿针绕过宫颈突起到达宫颈内口,将准备好的混合菌液 0.5mL(致病性大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、消化链球菌浓度均为  $10^9\text{CFU/mL}$ ,分别取 0.1mL, 0.1mL, 0.3mL)推注入宫腔,宫腔细菌接种后第 5d 行宫颈分泌物的细菌培养鉴定,继而连续观察 3 个月经周期经量、经期等的变化,于第四个月经周期分泌晚期取子宫内膜标本。

**1.3 观察药物制备及给药方法** 三七(Panax notoginseng,药材购于云南文山)经粉碎后,用乙醇渗漉提取,醇提液回收乙醇,过大孔树脂柱,分离得总皂苷,纯度达 99%,剩余液过离子交换柱,分离三七氨酸,纯度达 96%,提取分离的三七总皂苷和三七氨酸按原生药比例配成含三七总皂苷 15.36mg/mL 和三七酸 0.768mg/mL 的混合液。三七复合有效成分组从宫腔细菌接种后的第一个月经周期开始,于经前 2d 开始喂服,连服 7d 为一疗程,共喂服三个月经周期。模型组及正常组在相同时间给予等体积生理盐水。

**1.4 检测性周期的方法<sup>[4]</sup>** 性激素内分泌检测和观察性皮肤的方法了解性周期时相。

**1.5 子宫内膜标本的采集** 三组均在第 4 个月经周期(从采集经血标本的第一个月经周期算起)的分

泌晚期取子宫内膜标本。因恒河猴的子宫颈结构呈 Z 形,颈管内有两个突起,故将刮匙从阴道进入子宫颈操作较困难。本实验经腹部行部分子宫切除术,沿冠状面切开离体子宫,用眼科剪分离子宫前后壁内膜,置液氮中保存。

**1.6 NO 和 iNOS 活性检测** NO 和 NOS 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。取子宫内膜组织匀浆液,采用化学比色法检测,仪器为分光光度计,540nm 波长测定 A 值。NO 和 iNOS 结果分别以  $\mu\text{mol/g}$  和 U/mg 表示。

**1.7 iNOS 免疫组化测定** 采用免疫组化链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶染色法(S-P 免疫组化法)。标本从液氮中取出,复温到  $-20^\circ\text{C}$ ,OCT 包埋,恒冷切片(英国 SHANDON, AS620E)连续制备厚 3 $\mu\text{m}$  的冰冻切片,室温干燥后  $4^\circ\text{C}$  丙酮固定 10min。iNOS 的一抗为兔抗人的多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司的产品)。S-P 免疫组化法试剂盒购自北京中山生物技术有限公司,一抗用 PBS 稀释,染色步骤参照说明书进行。PBS 代替一抗作阴性对照。

结果分析使用 BST-20-M 全自动图像分析系统(英国),每张切片于  $10 \times 40$  放大倍数下进行,随机取上下左右中 5 个视野,自动检测免疫反应产物阳性信号光密度面积(占当时视野面积的百分比),取其均值,以任意单位(AU)表示。

**1.8 统计学方法** 按 SPSS10.0 统计软件包对数据进行处理,两样本均数比较用 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 NO 的释放和 iNOS 活性观察** 三七复合有效成分中药组与模型组相比,子宫内膜 NO 的分泌及 iNOS 活性明显降低,差异有显著性;与正常组比较无显著性差别(见表 1)。

表 1 三组子宫内膜 NO 释放和 iNOS 活性的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	NO( $\mu\text{mol/g}$ )	iNOS(U/mg)
模型组	4	$17.49 \pm 2.716$	$21.24 \pm 4.605$
中药组	4	$12.97 \pm 0.870^{1,2}$	$14.86 \pm 1.778^{1,2}$
正常组	3	$11.41 \pm 0.654$	$13.083 \pm 0.102$

注:与模型组比较 1)  $P < 0.01$ ; 2) 与正常组比较,  $P > 0.05$ 。(下同)

**2.2 免疫组化测定结果** 三组子宫内膜腺上皮、血管内皮及间质均表达 iNOS,三七复合有效成分中药组与模型组比较,子宫内膜 iNOS 的表达水平明显降低,差异有显著性,与正常组比较无显著性差别(见表 2)。

表 2 三组子宫内膜 iNOS 表达的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	iNOS 阳性 OD 值(%)
模型组	4	30.955 ± 1.588
中药组	4	15.3 ± 0.814
正常组	3	14.36 ± 0.07

### 3 讨论

一氧化氮(NO)作为 80 年代以来新发现的信息分子,已被证实参与了人体众多的生理、病理过程。在人子宫内膜也发现产生 NO 的酶类,提示 NO 可能参与子宫内膜功能活动的局部调节。有研究表明,NO 不但可能参与了内膜局部血流量的调节,也可能通过自分泌或旁分泌方式对子宫螺旋动脉及子宫内膜结构的重塑起作用,NO 使血管舒张及通透性升高<sup>[9]</sup>,并与局部免疫损害或慢性炎症等病理过程有关<sup>[5]</sup>。NO 在体内由一族一氧化氮合酶(NOS)催化 L-精氨酸(L-Arg)合成。根据 NOS 特性及基因定位将 NOS 分为两大类,即原生型 NOS(cNOS)和诱生型 NOS(iNOS)。cNOS 又包括神经原型 NOS(nNOS)和内皮细胞型 NOS(eNOS)。cNOS 持续表达于特定的细胞,iNOS 主要在细胞因子及内外毒素等诱导下,由某些细胞生成。子宫内膜组织主要表达内皮型及诱导型一氧化氮合酶(eNOS,iNOS)<sup>[9]</sup>。由于 iNOS 所产生 NO 的量较 cNOS 所产生 NO 的量多,且炎症时细胞因子大量分泌可诱导 iNOS 的表达,故本研究用 iNOS 来反应 NO 的合成量。本研究通过宫腔直接细菌接种建立恒河猴子宫炎性出血模型,观察该模型子宫内膜局部 NO、iNOS 的活性及 iNOS 蛋白表达水平的变化,发现恒河猴子宫炎性出血模型组内膜中 NO、iNOS 的活性及 iNOS 蛋白质表达水平明显高于正常对照组,差异有显著性。由此推测:子宫内膜局部炎症时,细菌内外毒素及炎性细胞因子均可诱导子宫内膜细胞及巨噬细胞表达大量 iNOS,iNOS 催化 L-精氨酸生成大量一氧化氮(NO),NO 通过促进子宫内膜血管扩张,血管通透性增加而引起月经过多。

三七是我国名贵的中药材,具有化瘀止血、活血定痛的功效,被誉为血症良药,有“止血圣药”之称,从本世纪 30 年代起,人们对三七的化学成分进行了大量的研究,三七含三七皂甙,黄酮苷,氨基酸,槲皮素,槲皮苷等,对三七的药理活性成分的研究主要集中在三七皂甙成分和氨基酸<sup>[6]</sup>。三七氨酸目前认为

是三七止血作用的活性成分;三七总皂甙目前药理作用具有抗炎、抗氧化、抗自由基损伤、改善微循环、阻抑动脉粥样硬化等作用,近年研究认为其对多种实验性炎症模型具有良好抗炎活性,其抗炎机制与抑制炎症渗出液中的 TNF、NO 有关<sup>[7,8]</sup>。多数临床资料证实三七治疗异常子宫出血疗效确切,但其治疗的机制仍未清楚。本研究从 NO、iNOS 活性及 iNOS 蛋白质水平改变的角度,探讨三七复合有效成分对恒河猴子宫炎性出血的影响,发现三七复方有效成分能抑制子宫内膜组织 NO 的分泌,同时降低 iNOS 的活性及蛋白质表达水平,与文献报道相符<sup>[7,8]</sup>。说明三七复方有效成分可能通过降低炎性子宫出血内膜组织中 iNOS 的活性及蛋白质表达水平而抑制 NO 的分泌,以调节子宫内膜血管的舒缩状态而起到减少子宫出血的作用。

### 参考文献:

- [1] 许爱菊.带铜 T 型宫内节育器致月经过多妇女经血 NO 含量的测定[J].中国卫生检验杂志,1999,9(4):封 2.
- [2] 尤昭玲,付灵梅,雷磊.宫环止血片对置铜宫内节育器家兔子宫匀浆中一氧化氮及一氧化氮合酶的影响[J].湖南中医学院学报,2001,21(4):12-14.
- [3] Culotta E, Koshland DE Jr. Nitric oxide: The molecule of the year[J]. Science, 1992, 258: 1862-1865.
- [4] 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.
- [5] 蒋波,楚正绪.一氧化氮与炎症[J].国外医学·生理、病理科学与临床分册,1998,18(1):44-47.41.
- [6] 黄永焯,王宁生.三七及其制剂中化学成分分析方法概述[J].中药新药与临床药理,2002,13(3):194-197.
- [7] 李晓辉,李淑慧.三七总皂苷对 TNF、NO 含量的影响及其机制研究[J].中草药,1999,30(7):514-517.
- [8] 罗中华,蔡绍丽,陈保斌,等.三七皂苷对烫伤小鼠巨噬细胞产生 NO 和 TNF 的作用[J].第三军医大学学报,2001,23(6):664-666.
- [9] 黄睿.一氧化氮与子宫内膜[J].国外医学妇产科分册,2000,27(4):199-201.
- [10] 尤昭玲,马红霞,陈俊明,等.恒河猴细菌感染性子宫出血模型的建立[J].中国比较医学杂志,2003,13(5):310-312.