

• 药理 •

# 三七复合有效成分对恒河猴细菌感染性子宫出血模型内膜组织 t-pA 活性及 PAI-1mRNA 表达的影响

马红霞<sup>1</sup>, 尤昭玲<sup>2</sup>, 王若光<sup>2</sup>, 黄洁明<sup>1</sup>, 余建<sup>2</sup>, 刘玉兰<sup>2</sup>

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

**摘要:** 目的: 探讨 t-pA 及 PAI-1 在炎性子宫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。运用原位杂交法检测细菌感染性子宫出血模型组、三七复合有效成分中药组及正常对照组恒河猴子宫内膜组织中 PAI-1mRNA 的表达, 运用发色底物法检测三组内膜组织中 t-pA 的活性。结果: 三七复合有效成分组子宫内膜间质、子宫血管内皮细胞及平滑肌细胞胞浆中 PAI-1mRNA 的表达明显高于模型组, t-pA 活性明显降低, 差异显著, 与正常组比较没有差别; 结论: 炎症因素导致的子宫出血与 t-pA 活性增高有关, 三七复合有效成分减少炎性子宫出血的作用可能与其调节子宫内膜局部 t-pA 和 PAI-1 的平衡有关。

**关键词:** 子宫出血; 纤溶活性; 子宫内膜炎; 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)04-0023-03

## Influences of Two kinds of Active Components from *Panax Notoginseng* on t-pA and PAI-1 in Inflammatory Metrorrhagia Model of *Macaca Mulatta*

MA Hong-xia, YOU Zhao-ling, WANG Ruo-guang, HUANG Jie-ming, YU-Jian, LIU Yu-luan

(1 Guang Zhou tradition Chinese medicine University, Guang Zhou 510007, China;

2 Hunan Chinese medical college, Changsha 410007, China)

**Abstract:** Objective: To explore the role of t-pA, PAI-1 in inflammatory Metrorrhagia and the influence of two kinds of active components on them. Methods: Eleven normal menorrhoea adult Rhesus monkeys are choosed as research object, which are divided into four model groups, four TCM group and three Control group at random. The hybridization in situ was performed to estimate the express of PAI-1mRNA in the endometrium of model group, TCM group and normal control group, while spectrophotometric assay was performed to estimate the t-pA activity in three groups. Result: The PAI-1mRNA expression in endometrium of TCM group Was higher than that of model group ( $P < 0.05$ ), and was of no difference with normal group. The t-pA activity in endometrium of TCM group was significantly decreased than that of model group, and was of no difference with normal group. Conclusion: The increase of t-pA activity may have relation to inflammatory Metrorrhagia, and two kinds of active components from *Panax notoginseng* reduce inflammatory Metrorrhagia by regulating balance of t-pA and PAI-1.

**Key words:** Metrorrhagia; Fibinolytic activity; Endometritis; *Panax notoginseng*; *Macaca mulatta*

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证, 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的关系。西医对子宫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(三七皂甙、三七氨酸为其主要药理活性成分)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宫出血疗效确切, 但其治疗的机制仍未清楚。有研究表明, 子宫内膜的止血机理取决于凝血和纤溶系统的平衡。而影响纤溶活性的主要因素是 PA 和 PAI-1 的动态平衡<sup>[1]</sup>。本研究采用宫腔直接细菌接种建立恒河猴子宫炎性出

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)

血模型, 通过观察该模型子宫内膜局部 t-pA 活性与 PAF-1mRNA 表达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实验依据。

### 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恒河猴 11 只, 体重  $5.5 \pm 1.8\text{kg} (x \pm s)$ , 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随机分为模型组 4 只、三七复合有效成分中药组 4 只及正常对照组 3 只。

**1.2 恒河猴细菌感染性子官出血模型的制作<sup>[9]</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  $10^9$  CUF/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, 继而连续观察三个月经周期经量、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甙和三七氨酸按原生药比例配成含三七总皂甙 15.36mg/ml 和三七氨酸 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, 每次 5ml, 每天一次, 连服 7d 为一疗程, 共喂服三个月经周期。正常组、模型组在相同时间喂服等体积生理盐水。

**1.4 检测性周期的方法<sup>[2]</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** 三组均在第四个月经周期 (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 原位杂交** 液氮存放的子宫内膜组织做冰冻切片, 切片厚 10 $\mu$ m, 4% 多聚甲醛/0.1MPBS (1/1000DEPC) 固定 20min。PAF-1mRNA 原位杂交检测试剂盒购自博士德公司, 主要步骤如下: 3% 甲醇 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温 30min; 3% 柠檬酸稀释的胃蛋白酶 37℃ 消化 2min; 1% 多聚甲醛/0.1M PBS (1/1000DEPC) 室温后固定 10min; 加入预杂交 39℃ 4h; 加入 20 $\mu$ MPAF-1mRNA 探针杂交液 39℃ 杂交过夜; 梯度 SSC 杂交后洗涤; 加入封闭液 37℃ 30min; 加入生物素化鼠抗地高辛 37℃ 60min; 加入 SABC37℃ 20min; 加入生物素化过氧化物酶 37℃ 20min; DAB 显色 10min, 封片。预杂交液代替杂交液作阴性对照。

结果分析使用 BST-20-M 全自动图像分析系统 (英国), 每个标书连续切片后随机选取 6 张切片, 每张切片于 10 × 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 (arbitrary unite, AU) 表示。

**1.7 t-pA 活性测定** 制备组织匀浆, 离心取上清, 用发色底物法检测 t-pA 活性, 试剂盒购自福建太阳公司、上海亚都医学生物技术经营部。

### 2 结果

**2.1 子宫内膜组织 PAF-1 的基因表达** 原位杂交实验结果显示, 子宫内膜组织中 PAF-1mRNA 主要分布在间质细胞, 血管内皮细胞、平滑肌细胞。腺上皮细胞未检测到。三七复合有效成分组与模型组比较, PAF-1mRNA 含量明显增加, 有显著性差异, 与正常组比较无明显差别,  $P > 0.05$  (见表 1)。

表 1 三组子宫内膜 PAF-1mRNA 表达的比较 ( $x \pm s$ )

组别	例数	PAF-1mRNA 阳性 OD 值 (%)
模型组	4	5.860 ± 2.742
中药组	4	10.847 ± 1.476*
正常组	3	10.531 ± 1.719*

注: 与模型组比较, \*  $P < 0.01$ , (下同)

**2.2 子宫内膜组织 t-pA 活性观察** 三七复合有效成分中药组与模型组比较, 子宫内膜 t-pA 活性明显降低, 差异有显著性,  $P < 0.01$ , 与正常组比较无显著性差别,  $P > 0.05$  (见表 2)。

表 2 三组子宫内膜 t-pA 活性的比较 ( $x \pm s$ )

组别	例数	tPa (× 10 <sup>-5</sup> U/L)
模型组	4	8.36 ± 0.344
中药组	4	3.71 ± 0.432*
正常组	3	3.38 ± 0.763*

### 3 讨论

纤溶酶原激活剂(PA)是一类丝氨酸蛋白酶,能使纤溶酶原转化成纤溶酶,并能分解细胞外基质(ECM);纤溶酶原激活剂抑制物(PAF-1)为丝氨酸蛋白酶抑制物超家族成员,对PA起抑制作用<sup>[3]</sup>。有研究表明,子宫内膜的止血机理取决于凝血和纤溶系统的平衡<sup>[1]</sup>,而影响纤溶活性的主要因素是PA和PAF-1的动态平衡。Rybo等报告,原发性月经过多(经量>80ml),其子宫内膜中纤溶活性高于月经正常妇女,且经量与纤溶活性之间存在正相关<sup>[4]</sup>。子宫内膜炎症反应时,粒细胞和单核/巨噬细胞(MF)活性及数量显著增加,二者可合成并释放t-PA,t-PA使纤溶酶原转变成纤溶酶,后者能直接分解细胞外基质(ECM)及激活基质金属蛋白酶(MMPs)等水解酶类,以促进经血纤溶及子宫内膜崩溃而不规则脱落,致月经量多和迁延不愈的<sup>[3]</sup>。本研究表明,恒河猴细菌感染性子宫出血模型组子宫内膜t-PA的活性明显高于正常对照组,PAF-1mRNA的表达明显低于对照组,差异有极显著性, $P < 0.01$ ,说明子宫内膜纤溶酶原激活剂增加可能与子宫炎性出血有关。多数资料认为,PAF-1是一种高度调控的蛋白,不能在胞内贮存,其胞外半衰期仅10min,因此调控主要发生在转录水平<sup>[8]</sup>。这是本研究检测PAF-1mRNA表达的依据。Casslen等证明<sup>[5]</sup>,正常子宫内膜间质细胞和血管内皮细胞、平滑肌细胞皆可表达t-PA及PAF-1,本文的原位杂交实验也证明是此点。

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>[5]</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>[6,7]</sup>。多数临床资料证实三七治疗子宫出血疗效确切,但其治疗的机制仍未清楚。本研究从重要纤溶因子t-PA,PAF-1改变的角度,探讨三七复合有效成分对炎性子宫出血的影响,发现三七复方有效成分能降低炎性出血内膜组织中t-PA的活性及提高PAF-1mRNA的表达。提示三七复方有效成分可能通过调节t-PA和PAF-1平衡而起到减少子宫出血的作用。

### 参考文献:

- [1] Casslén B, Astedt B. Progress in contraceptive delivery systems[J]. *Biochemical aspects*. 1980, 3(1): 93-101.
- [2] 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*[J]. 2002, 10(1): 20-26.
- [3] 黄丽丽,妇产科领域纤酶原激活剂及其抑制物的研究[J]. *国外医学妇产科学分册*. 1998, 25(3): 261-264.
- [4] Rybo G. Plasminogen activators in the concentration of plasminogen actvators during the menstrual cycle and its relation to menstrual blood loss[J]. *Acta Obstet Gynecol*, 1996, 45: 97.
- [5] 黄永悼,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.
- [6] 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): 676-678.
- [7] 李晓辉,李淑慧. 三七总皂苷对TNF、NO含量的影响及机制研究[J]. *中草药*, 1999, 30(7): 514-517.
- [8] 朱广瑾,武文心,段岩平等. 预处理对大鼠缺血冠脉组织t-PA、PAF-1基因表达的影响[J]. *中国医学科学院学报*, 1997, (5): 319-324.
- [9] 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.