

三七有效部位对全周期外源性雌激素干预大鼠子宫内膜 TF、TFPI-2 表达的影响

刘东平^{1,2} 徐海燕^{1,3} 李琳¹ 贺巍巍¹ 颜小俊¹ 肖瑞飞¹ 王若光¹

摘要 **目的** 探讨三七皂苷、三七黄酮、三七氨酸及其混合物对全周期持续外源性雌激素干预下的未成年大鼠子宫内膜组织因子 (TF)、组织因子途径抑制物 2 (TFPI-2) 表达的影响。**方法** 将 160 只雌性未成年大鼠随机分成空白组 (40 只) 和模型组 (120 只), 空白组给予生理盐水灌胃 3 周, 模型组给予戊酸雌二醇悬液灌胃 3 周。在全周期 (3 周) 干预后, 将无性周期大鼠随机分成 6 组, 即模型组、连续雌激素组、三七皂苷组、三七黄酮组、三七氨酸组、三七有效部位混合组。并分别给予生理盐水、雌激素、三七皂苷、三七黄酮、三七氨酸、三七有效部位混合物, 连续灌胃 2 周。2 周后检测子宫内膜中 TF、TFPI-2 及 TF、TFPI-2 mRNA 表达的水平。**结果** 与空白组比较, 模型组 TF、TF mRNA 阳性表达增高, TFPI-2、TFPI-2 mRNA 阳性表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 第 5 周末, 与模型组比较, 雌激素组的 TF、TF mRNA 表达增高, TFPI-2、TFPI-2 mRNA 表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组和雌激素组比较, 三七皂苷组、三七黄酮组、三七氨酸组、三七混合组 TF、TF mRNA 阳性表达均降低, TFPI-2、TFPI-2 mRNA 阳性表达均增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与三七皂苷组比较, 三七混合组 TFPI-2、TFPI-2 mRNA 阳性表达增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与三七黄酮组比较, 三七皂苷组、三七混合组 TF、TF mRNA 表达降低; 三七混合组 TFPI-2 阳性表达增高, 差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 三七有效部位可降低全周期持续外源性雌激素干预大鼠子宫内膜 TF 表达, 升高 TFPI-2 表达, 其可能机制是通过抑制 TF, 阻断凝血系统激活, 减少炎症反应, 而达到活血止血的目的; 同时, 可能加强子宫内膜细胞外基质, 维持子宫内膜稳定性, 而减少内膜崩解出血, 有利于内膜修复、重塑作用。

关键词 三七皂苷; 三七黄酮; 三七氨酸; 组织因子; 组织因子途径抑制物 2

Effects of Effective Fractions of *Panax Notoginseng* on the Expression of TF and TFPI-2 in Rat Endometrium with Whole Cycle Exogenous Estrogen Intervention LIU Dong-ping^{1,2}, XU Hai-yan^{1,3}, LI Lin¹, HE Wei-wei¹, YAN Xiao-jun¹, XIAO Rui-fei¹, and WANG Ruo-guang¹ 1 Department of Gynecology and Obstetrics, College of Integrative Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410208); 2 Department of Gynecology, Second Clinical Medical College, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi (712046); 3 Department of Gynecology, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha (410006)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of notoginsenoside, *Panax notoginseng* flavonoids (PNF), *Panax notoginseng* acid (PNA), and their mixtures on the expressions of tissue factor (TF) and tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI-2) in rat endometrium with whole cycle exogenous estrogen intervention. **Methods** Totally 160 female impuberty rats were randomly divided into the blank group ($n = 40$) and the model group ($n = 120$). Rats in the blank group were administered with normal saline by gastrogavage for 3 weeks, while those in the model group were administered with estradiol valerate suspension. The two interventions lasted for 3 consecutive weeks. After 3 weeks of intervention, rats with asexual cy-

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.30271633); 陕西中医药大学自然科学基金 (No.2015PY15)

作者单位: 1. 湖南中医药大学中西医结合学院妇产科 (长沙 410208); 2. 陕西中医药大学第二临床医学院妇科 (陕西咸阳 712046); 3. 湖南省中医药研究院科技处 (长沙 410006)

通讯作者: 王若光, Tel: 0731-84134238, E-mail: ldp2006@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.02.0215

cle were randomly divided into six groups, i.e., the model group, the continuous estrogen group, the Notoginsenoside group, the PNF group, the PNA group, the mixture group. Rats in the model group, the continuous estrogen group, the Notoginsenoside group, the PNF group, the PNA group, the mixture group were respectively administered with normal saline, estrogen, notoginsenoside, PNF, PNA, and mixture of effective *Panax notoginseng* fractions by gastrogavage for 2 successive weeks. Expression levels of TF, TFPI-2, TF mRNA, and TFPI-2 mRNA in the endometrium were detected 2 weeks later. Results Compared with the blank group, positive expressions of TF and TF mRNA increased, and positive expressions of TFPI-2 and TFPI-2 mRNA decreased in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the expressions of TF and TF mRNA significantly increased, the expressions of TFPI-2 and TFPI-2 mRNA significantly decreased in the estrogen group at the end of the 5th week ($P < 0.01$). Compared with the model group and the estrogen group, positive expressions of TF and TF mRNA significantly decreased, positive expressions of TFPI-2 and TFPI-2 mRNA significantly increased in the Notoginsenoside group, the PNF group, the PNA group, the mixture group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the Notoginsenoside group, positive expressions of TFPI-2 and TFPI-2 mRNA significantly increased in the mixture group ($P < 0.05$). Compared with the PNF group, the expressions of TF and TF mRNA significantly decreased in the Notoginsenoside group and the mixture group ($P < 0.01$); positive expressions of TFPI-2 increased in the mixture group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusions The effective fractions of *Panax notoginseng* could decrease the expression of TF and increase the expression of TFPI-2 in rat endometrium with whole cycle exogenous estrogen intervention. They activated blood circulation and arrested bleeding possibly through inhibiting TF, blocking activation of coagulation system, and reducing inflammatory response. Meanwhile, it also could strengthen endometrial extracellular matrix, maintain the endometrial stability, thereby reducing endometrial disintegration and bleeding, and being beneficial for endometrium repairing and remodeling.

KEYWORDS notoginsenoside; *Panax notoginseng* flavonoids; *Panax notoginseng* acid; tissue factor; tissue factor pathway inhibitor 2

功能失调性子宫出血 (dysfunctional uterine bleeding, DUB), 简称“功血”, 是妇科常见病、多发病。其中分为排卵性和无排卵性两类, 其中无排卵性功血约占 70% ~ 80%^[1]。无排卵性功血是单一雌激素刺激导致子宫内膜增生, 血管、腺体、间质发育不同步, 子宫内膜末梢循环瘀滞, 导致内膜易崩解出血, 血液不循常道, 溢于脉外, 常称为“离经之血”、“衄血”、“瘀血”。目前有关无排卵性功血出血、止血、修复的分子机制尚不清楚。无排卵性功血是在激素调节下, 子宫内膜局部细胞因子发生改变的结果^[2]。许多研究表明, 体内存在一个炎症—凝血网络^[3,4], 月经是一种炎症反应, 在无排卵性功血中凝血因子的表达如何, 目前国内文献尚未见报道。由于无排卵性功血大鼠模型与单一大量雌激素刺激的未成年大鼠子宫内膜持续增生相一致, 笔者采用中医历代沿用有效的方药, “止血圣药”三七, 主要从纤溶、凝血因子、细胞外基质等方面研究全周期外源性雌激素作用下未成年雌性大鼠模型的子宫内膜凝血因子、细胞因子的调控变化, 观察三七皂苷、三七黄酮、三七氨酸及其混合物对子宫内膜

稳定性及止血修复机制, 分析无排卵性功血的子宫内膜炎症反应、止血修复机制及传统止血圣药三七的有效成分 (三七皂苷、三七黄酮、三七氨酸) 在止血修复机制之间的相互作用。

材料与方法

1 动物 健康雌性 SD 大鼠 160 只, SPF 级, 鼠龄 4 周左右, 体重 (70 ± 10) g, 由中国湖南斯莱克景达实验动物中心提供 [合格证号: SCXK (湘) 2009 - 0004]。饲养于室温 (25 ± 2) °C, 12 h 明暗交替, 相对湿度 (50 ± 15) % 环境下。正常摄食饮水。动物实验过程均遵守赫尔辛基宣言以及湖南中医药大学关于动物实验的相关规定。

2 药物 戊酸雌二醇 (1 mg/片, 拜耳医药保健有限公司广州分公司分包装, 批号: J20080036)。三七皂苷 (SQ110119, 含量 80.12%) 及三七黄酮 (SF110307, 含量 40.26%) 由陕西森弗生物技术有限公司提供。三七氨酸 (含量 89.99%) 由湖南中医药大学药学院提供。

3 试剂及仪器 组织因子途径抑制物(TFPI-2)一抗(购于北京博奥森生物技术有限公司,批号:BA2344)、组织因子(TF)一抗(购于北京博奥森生物技术有限公司,批号:bs-1918R)。二抗 PV-9000 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。免疫组化染色试剂盒、DEPC、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。Tissue factor 原位杂交检测试剂盒(编号:MK3023)、TFPI-2 原位杂交检测试剂盒(编号:MK2679-r)购自武汉博士德生物工程有限公司。其他化学试剂耗材均由湖南省长沙市丽欣医药公司化学试剂批发站提供。JY3002 型电子天平(上海天平仪器厂)、AO 820 切片机(美国生物仪器公司)、TP-B 摊片机(天津市久圣医疗仪器公司)、DNP-9162 电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)、Motic 显微摄像系统图像分析仪(麦克奥迪实业集团公司)。

4 动物分组、模型制备、干预方法 采用随机数字表法,将 160 只雌性未成年大鼠按 1:3 比例随机分成空白组(40 只)和模型组(120 只),空白组给予生理盐水灌胃 3 周,模型组给予同体积的外源性雌激素悬液(戊酸雌二醇 0.167 mg/mL)灌胃 2 周后,连续镜检观察模型组大鼠阴道脱落上皮细胞涂片、巴氏染色 1 周,剔除角化率呈周期性变化大鼠。每组每周末处死 8 只大鼠。在全周期(3 周)持续外源性雌激素干预后,对无性周期大鼠,随机分成 6 组,即模型组、雌激素组、三七皂苷组、三七黄酮组、三七氨基酸组、三七部位混合组(简称三七混合组),每组 16 只。从第 4 周开始空白组和模型组给予生理盐水灌胃 2 周,雌激素组给予同体积的外源性雌激素(0.167 mg/mL),三七皂苷组、三七黄酮组、三七氨基酸组、三七混合组给予相应的三七皂苷(10.421 mg/mL)、三七黄酮(0.414 mg/mL)、三七氨基酸(0.835 mg/mL)、三七有效部位混合(11.67 mg/mL),每组每周末处死 8 只大鼠。

5 检测指标及方法

5.1 免疫组化检测子宫内膜中 TF、TFPI-2 蛋白表达 石蜡切片厚度 5 μm ,裱于用 APES 处理过的载玻片上,置 45 $^{\circ}\text{C}$ 温箱烤片 24 h。切片常规脱蜡,3% H_2O_2 室温处理 10 min,蒸馏水洗涤 5 min $\times$ 2 次;热修复抗原 8 min, PBS 洗 5 min $\times$ 3 次;滴加封闭用正常山羊血清工作液,孵育 10 min,倾去,勿洗;滴加适当比例稀释的兔抗大鼠一抗(比例为 1:200),置湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBS 洗涤 3 min $\times$ 3 次;滴加生物素化山羊抗兔二抗工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, PBS 洗涤 3 min $\times$ 3 次;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min; PBS 洗涤 3 min $\times$ 3 次; DAB

显色,自来水冲洗;苏木素复染核,酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光镜下观察。使用图像分析软件 Image-pro plus 6.0,取累积光密度做统计分析。

5.2 原位杂交技术检测子宫内膜中 TF、TFPI-2 mRNA 表达 各组织器官 4% 多聚甲醛(内含 1/1 000 DEPC 水)中固定 4 h,标本取出后,经梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋并切片(厚度 5 μm)。用 1/1 000 DEPC 水处理,采用多聚赖氨酸处理,60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱烤片 24 h。切片经常规脱蜡至水,3% H_2O_2 室温处理 10 min,蒸馏水洗涤 3 次;滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶(1 mL 3% 柠檬酸加 2 滴浓缩型胃蛋白酶,混匀),37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 10 min, PBS 洗 5 min $\times$ 3 次。蒸馏水洗 1 次;湿盒准备一干的杂交盒底部加 20% 甘油 20 mL 以保持湿度。每张切片滴加 20 μL 预杂交液。置恒温箱 42 $^{\circ}\text{C}$ 2 h。吸取多余液体,不洗;每张切片滴加 20 μL 杂交液,用杂交专用盖玻片盖在切片上。恒温箱 42 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;揭掉盖玻片,37 $^{\circ}\text{C}$ 水温 SSC 洗涤,甩去多余液体,不洗;滴加生物素化鼠抗地高辛:37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, PBS 洗涤 5 min $\times$ 4 次;滴加 SABC:37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, PBS 洗涤 5 min $\times$ 3 次;滴加生物素化过氧化物酶:37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, PBS 洗涤 5 min $\times$ 4 次; DAB 显色 5 min,自来水冲洗;苏木素复染核,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光镜下观察。使用图像分析软件 Image-pro plus 6.0,取累积光密度做统计分析。

6 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,方差不齐时采用非参数秩和检验,先用 Kruskal-Wallis H 检验比较总差异,再用 Mann-Whitney U 进行组间比较。计数资料采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组大鼠 1、2、3 周子宫内膜组织 TF、TFPI-2 蛋白表达的比较(表 1) TF 主要表达于大鼠子宫内膜基质细胞胞浆和部分胞核,血管内皮细胞胞浆,上皮细胞胞浆表达少。TFPI-2 主要表达于大鼠子宫内膜上皮细胞胞浆,腺上皮细胞胞浆、基质细胞胞浆及部分血管内皮细胞胞浆。与空白组同期比较,模型组 TF 阳性表达增高,TFPI-2 阳性表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2 各组大鼠 4、5 周子宫内膜组织 TF、TFPI-2 蛋白表达的比较(表 2) 第 5 周末,与空白组比较,模型组 TF 阳性表达增高,TFPI-2 表达降低,差异有统计学

表 1 两组大鼠 1、2、3 周子宫内膜组织 TF、TFPI-2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TF 蛋白			TFPI-2 蛋白		
		1W	2W	3W	1W	2W	3W
空白	8	2 120.42 ± 134.11	2 080.32 ± 136.95	2 250.62 ± 184.74	6 792.21 ± 194.69	5 801.42 ± 208.87	5 915.10 ± 507.69
模型	8	2 614.59 ± 162.37 *	2 844.43 ± 242.49 *	3 536.8 ± 475.07 *	5 762.40 ± 389.59 *	5 041.80 ± 621.00 *	4 466.94 ± 682.21 *

注:与空白组同期比较, *P < 0.05

意义($P < 0.01$);与模型组比较,雌激素组的 TF 表达增高,TFPI-2 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,三七皂苷组、三七黄酮组、三七氨基酸组、三七混合组 TF 阳性表达降低,TFPI-2 阳性表达增高,差异亦有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);与雌激素组比较,三七皂苷组、三七黄酮组、三七氨基酸组、三七混合组 TF 表达降低,TFPI-2 表达增高,差异均有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);与三七皂苷组比较,三七混合组 TFPI-2 阳性表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与三七黄酮组比较,三七皂苷组、三七混合组 TF 表达降低,三七混合组 TFPI-2 阳性表达增高,差异亦有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠 4、5 周子宫内膜组织 TF、TFPI-2 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	TF 蛋白	TFPI-2 蛋白
空白	8	4W	2 135.61 ± 147.11	5 830.16 ± 728.06
		5W	2 139.40 ± 192.06	5 977.70 ± 827.41
模型	8	4W	3 500.74 ± 327.79 *	3 869.37 ± 427.83 *
		5W	3 520.89 ± 362.15 *	3 686.82 ± 371.24 *
雌激素	8	4W	3 676.99 ± 100.27	3 161.41 ± 259.55 Δ
		5W	4 128.85 ± 106.91 $\Delta\Delta$	2 495.68 ± 164.25 $\Delta\Delta$
三七皂苷	8	4W	3 011.20 ± 319.37 $\Delta\Delta\Delta\bullet$	3 901.37 ± 170.36 $\Delta\Delta$
		5W	2 506.70 ± 128.16 $\Delta\Delta\Delta\Delta\bullet\bullet$	4 614.25 ± 320.84 $\Delta\Delta\Delta$
三七黄酮	8	4W	3 450.12 ± 287.25	3 777.32 ± 167.32 Δ
		5W	2 973.06 ± 168.01 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	4 452.15 ± 212.05 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
三七氨酸	8	4W	3 383.43 ± 222.45	4 584.96 ± 379.31 $\Delta\Delta\Delta\bullet$
		5W	3 170.19 ± 261.7 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	5 095.25 ± 118.80 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$
三七混合	8	4W	3 001.17 ± 258.56 $\Delta\Delta\Delta\Delta\bullet$	4 577.99 ± 56.35 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\bullet$
		5W	2 332.71 ± 189.28 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\bullet\bullet$	5 817.26 ± 569.45 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\bullet$

注:与空白组同期比较, *P < 0.01;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$;与雌激素组同期比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$;与三七皂苷组同期比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$;与三七黄酮组同期比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$;与三七氨酸组同期比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$ 。

3 两组大鼠 1、2、3 周子宫内膜组织 TF、TFPI-2 mRNA 表达的比较(表 3) 与空白组比较,第 1、2、3 周模型组 TF mRNA 阳性表达均增高,TFPI-2 mRNA 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

4 两组大鼠 4、5 周子宫内膜组织 TF、TFPI-2 mRNA 表达比较(表 4) 第 5 周末,与空白组比较,模型组的 TF mRNA 阳性表达增高,TFPI-2 mRNA 阳性表达降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,雌激素组的 TF mRNA 表达增高,TFPI-2 mRNA 降低;三七皂苷组、三七黄酮组、三七氨基酸组、三七混合组 TF mRNA 阳性表达降低,TFPI-2 mRNA 阳性表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);与雌激素组比较,三七皂苷组、三七黄酮组、三七氨基酸组、三七混合组 TF mRNA 阳性表达降低,TFPI-2 mRNA 阳性表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);与三七皂苷组比较,三七氨基酸组、三七混合组 TFPI-2 mRNA 阳性表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与三七黄酮组比较,三七皂苷组、三七混合组 TF mRNA 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

TF 和 TFPI 为凝血因子, 20 世纪 90 年代出现的 TFP 学说^[5-7], 使许多凝血现象得到了合理的解释^[8], 而 TFPI 的发现,使人们对 TF 和 FVII 在启动血液凝固中的作用受到重视。TF mRNA 主要表达在大鼠子宫内膜的基质细胞胞浆,腺上皮细胞核和胞浆,内膜上皮细胞胞浆少量表达。TFPI-2 mRNA 主要表达在大鼠子宫内膜的基质细胞胞浆和内膜上皮细胞胞核,腺上皮细胞胞浆及部分细胞核。

表 3 两组大鼠 1、2、3 周子宫内膜组织 TF mRNA、TFPI-2 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TF mRNA			TFPI-2 mRNA		
		1W	2W	3W	1W	2W	3W
空白	8	714.56 ± 60.38	764.70 ± 109.96	740.63 ± 88.38	789.99 ± 34.95	802.05 ± 39.59	807.40 ± 50.25
模型	8	893.96 ± 67.41 *	958.12 ± 55.75 *	1074.80 ± 107.67 **	682.69 ± 61.18 *	672.20 ± 44.03 *	602.76 ± 72.38 **

注:与空白组同期比较, *P < 0.05, **P < 0.01

表 4 两组大鼠 4、5 周子宫内膜组织 TF mRNA、TFPI-2 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	TF mRNA	TFPI-2 mRNA
空白	8	4W	791.75 ± 49.98	853.99 ± 60.52
		5W	806.71 ± 59.36	814.95 ± 71.54
模型	8	4W	1 074.44 ± 139.85 *	488.07 ± 49.20 *
		5W	1 074.96 ± 107.64 *	461.47 ± 51.64 *
雌激素	8	4W	1 166.82 ± 106.23	444.49 ± 27.49
		5W	1 260.29 ± 89.82 $\Delta\Delta$	354.11 ± 51.42 $\Delta\Delta$
三七皂苷	8	4W	1 008.31 ± 107.90	624.47 ± 82.90 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
		5W	791.65 ± 60.55 $\Delta\Delta\Delta\Delta\bullet$	702.20 ± 91.27 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
三七黄酮	8	4W	1 030.65 ± 99.44	628.52 ± 52.1 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
		5W	967.64 ± 47.83 $\Delta\Delta\Delta$	707.04 ± 90.83 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
三七氨酸	8	4W	1 006.16 ± 85.08	747.25 ± 80.59 $\Delta\Delta\Delta\Delta\circ$
		5W	811.08 ± 63.62 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	752.35 ± 48.35 $\Delta\Delta\Delta\Delta\circ$
三七混合	8	4W	905.25 ± 125.01 $\Delta\Delta$	733.81 ± 62.03 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
		5W	769.73 ± 69.20 $\Delta\Delta\Delta\Delta\bullet$	765.93 ± 42.48 $\Delta\Delta\Delta\Delta\circ$

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与雌激素组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与三七皂苷组比较, $\circ P < 0.05$, $\circ\circ P < 0.01$;与三七黄酮组比较, $\bullet P < 0.05$, $\bullet\bullet P < 0.01$

本研究通过外源性雌激素刺激未成年大鼠,观察子宫局部 TF mRNA 及蛋白表达情况,发现模型组子宫内膜中 TF mRNA 表达明显高于空白组,雌激素组 TF mRNA 表达明显高于模型组。由此推测,在全周期大量雌激素刺激下,大鼠子宫内膜发生启动凝血—炎症网络,内膜炎症浸润,循环障碍,血栓瘀滞,易诱发出血,TF 可能参与了子宫出血的发生。提示通过抑制 TF 表达,从而减少炎症反应,并间接降低前列腺素的合成和释放,提高溶酶体酶稳定性。而第 5 周结果显示,三七皂苷组、三七黄酮、三七氨酸、三七混合组 TF、TF mRNA 表达较模型组和雌激素组降低;三七皂苷组、三七混合组 TF、TF mRNA 表达较黄酮组降低;说明三七有效部位,三七皂苷、三七氨酸,三七黄酮可能通过下调 TF mRNA 及蛋白质表达水平,阻断炎症凝血网络,而产生止血、抗炎的作用。因此,通过降低 TF 分泌,抑制炎症—凝血网络进一步发展,纤溶增高,恢复凝血与抗凝血之间的动态平衡,是三七有效部位防治子宫出血的疗效途径之一,其相关机制仍需进一步研究。这可能是三七有效部位相互协调作用防治无排卵性子宫出血的疗效途径之一。

TFPI 是 TF 的生理性抑制物,是一类含 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制物家族蛋白^[9]。在无排卵性功血中,以大量雌激素刺激下,子宫内膜细胞外基质的稳定性差,易发生出血。由于 TFPI-2 参与主动凝血,又参

与细胞外基质的,说明 TFPI-2 主要参与了抑制细胞外基质(ECM)的降解和重塑,对凝血作用弱。本研究中,三七氨酸与三七有效部位混合物能增高由雌激素刺激引起的 TFPI-2 蛋白及 TFPI-2 mRNA 表达水平。这说明三七有效部位的止血修复机制之一,是通过增加 TFPI-2,加强内膜 ECM 而实现的,减少止血,有利于内膜修复,达到重塑目的。提示可能对维持血管壁的完整性及调节内膜不至于发生异常出血有作用。一方面防止血管基底膜的降解,减少血管通透性,维持血管完整性,同时可阻止炎性细胞的浸润,避免发生异常出血;另一方面防止子宫内膜基质水解导致内膜剥脱,有利于子宫内膜的修复。

参 考 文 献

[1] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:2394.

[2] Taylor RN, Lebovic DI, Hornung D, et al. Endocrine and paracrine regulation of endometrial angiogenesis[J]. Annals New York Academy Sci, 2001, 943(1): 109–121.

[3] Strukova S. Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis [J]. Front Biosci, 2006, 11(1): 59–80.

[4] Minors DS. Haemostasis, blood platelets and coagulation [J]. Anaesthesia Intens Care Med, 2007, 8(5): 214–216.

[5] Sierko E, Zawadzki RJ, Wojtukiewicz MZ. Tissue factor pathway inhibitors[J]. Pol Merkuriusz Lek, 2002, 13(73): 6669.

[6] Mann KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation[J]. Thrombosis Haemostasis, 1999, 82(2): 165–174.

[7] Eigenbrot C. Structure, function, and activation of coagulation factor VII [J]. Curr Protein Peptide Sci, 2002, 3(3): 287–299.

[8] Gailani D, Broze GJ. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation [J]. Science, 1991, 253(5022): 909–912.

[9] Price GC, Thompson SA, Kam PCA. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor[J]. Anaesthesia, 2004, 59(5): 483–492.

(收稿:2015-07-08 修回:2016-11-16)