

15-甲基前列腺素 $F_{2\alpha}$ 对兔子宫孕酮受体和雌二醇受体的作用

褚云鸿 周美华 李全 赵志芳 (上海第一医学院药理研究室, 上海 200032)

提要 15-Me-PGF $_{2\alpha}$ 能增高假孕兔和幼兔子宫 P-R 数, 使假孕兔子宫 P-R 增高的程度比幼兔为强. 对 E-R 数和二种受体的 K_a 值都没有明显影响. 15-Me-PGF $_{2\alpha}$ 使假孕兔血浆孕酮浓度明显降低, 但并不增加子宫的自发收缩活动. 实验结果提示: 15-Me-PGF $_{2\alpha}$ 的溶黄体作用减弱了孕酮对孕酮受体的自身限制作用, 可能是它增高子宫 P-R 的重要机制, 但此外也有直接作用的参与. 子宫 P-R 数可能在调节子宫自发收缩活动中起一定作用.

关键词 15-甲基前列腺素 $F_{2\alpha}$; 孕酮受体; 雌二醇受体; 结合常数; 亲和力

15-甲基前列腺素 $F_{2\alpha}$ (15-Me-PGF $_{2\alpha}$) 有较强的溶黄体作用和兴奋子宫作用⁽¹⁾. 已知子宫活动受体内激素的调节, 而激素的作用不仅取决于激素本身在血中的浓度, 也与靶器官中

激素受体的量有关. 15-Me-PGF $_{2\alpha}$ 能使妊娠兔血中孕酮浓度迅速下降⁽²⁾, 也能激发子宫的自发收缩⁽³⁾. 但是 15-Me-PGF $_{2\alpha}$ 对子宫激素受体的影响及其与子宫自发活动间的关系迄今未见报道, 我们采用假孕兔和序贯注射雌二醇和孕酮的幼兔, 观察 15-Me-PGF $_{2\alpha}$ 对子宫孕酮受体(简称 P-R)和雌二醇受体(简称 E-R)的影响, 并同时观察子宫活动和血浆孕酮浓度的变化, 以探讨子宫 P-R 和 E-R 在 15-Me-PGF $_{2\alpha}$ 作用下有那些改变; 这些改变与血浆孕酮浓度间的关系以及对子宫活动的影响.

1981年2月9日收稿 1982年5月3日修回

材 料 和 方 法

动物实验

1. 假孕兔实验 取体重 2.4-2.6 kg 的♀兔 iv HCG 500 U 产生假孕. 于假孕第 7 d 将兔分成 2 组: 11 兔各 iv 15-Me-PGF_{2α} 0.4 mg/kg bid, 12 兔各 iv 生理盐水 0.4 ml/kg bid. 第 1 次 iv 后 24 h 取血供测定孕酮. 击头放血处死, 取出子宫, 剥去附着的脂肪, 一侧子宫角制成匀浆供受体测定, 另一侧子宫角置于培养液中供作离体子宫实验.

2. 幼兔实验 取体重 0.7-0.9 kg 的幼♀兔 10 只, sc 苯甲酸雌二醇 5 μg/kg qd × 12 d, 第 8 d 起同时 sc 孕酮 0.2 mg/kg qd × 5 d. 最后 1 次 sc 后将兔平均分为两组, 以下处理均与假孕兔组同.

受体测定

1. 子宫胞质液(cytosol)及核混悬液制备 全部操作在 0-4°C 下进行. 将子宫称重, 按 1:2(w:v) 加缓冲液 A(Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 1 mM, 二巯基乙醇 1 mM, 蔗糖 250 mM, NaN₂ 0.01%, pH 7.8), 在玻璃匀浆器中匀浆, 匀浆液经离心(800 × g) 10 min, 倒出上清液用缓冲液 B(Tris-HCl 20 mM, EDTA-Na 3 mM, 二巯基乙醇 1 mM, NaN₂ 0.01%, pH 7.8) 1:1 稀释后再离心(105000 × g) 60 min. 所得上清液即为胞质液. 第一次离心所得的沉淀用缓冲液 C(Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 3 mM, KCl 10 mM, 二巯基乙醇 1 mM, 蔗糖 250 mM, NaN₂ 0.01%, pH 7.8) 混悬, 经 50 目铜丝网过滤. 离心后加缓冲液 C 洗 2 次, 最后沉淀物加缓冲液 C 适量混匀即为核混悬液.

2. 胞质液的 P-R 和 E-R 测定⁽⁴⁾

2.1 P-R 测定 [1,2-6,7-³H]孕酮(简称 [³H]P)比放射性 80 Ci/mmol, 由上海原子核所提供, 取胞质液 200 μl 于 4 只试管中, 按表 1 加入反应液. 试管在 4°C 放置 3 h 后, 加葡聚糖 0.05% 和活性炭 0.5% 混合液 300 μl 每

Table 1. Assay of progesterone receptor and estradiol receptor in cytosol fractions

	1,2 Total binding tube	3,4 Nonspecific binding tube
Progesterone receptor		
Uterine cytosol	200 μl	200 μl
[³ H]P 0.4 μM	10	10
Progesterone 100 μM	0	10
Cortisol 100 μM	10	10
Buffer D (buffer B containing 60% glycerol)	80	70
Estradiol receptor		
Uterine cytosol	200 μl	200 μl
[³ H]E 0.4 μM	10	10
Estradiol 100 μM	0	10
Buffer B	90	80

10 min 振摇一次共 3 次后离心. 吸取上清液 0.4 ml 放入含有 6 ml 闪烁液的杯中测定. 特异性结合 = 总结合管的 cpm - 非特异结合管的 cpm. 根据特异结合 cpm 计算出结合孕酮的量, 以 fmol/mg 蛋白表示孕酮受体的量.

测定 P-R 的结合常数(K_a)的操作与测定 P-R 的步骤相同. [³H]P 在 0.05-0.8 μM 之间取 5 个浓度, 非特异结合管的孕酮浓度也按 [³H]P 相应增加 500 倍. 参照 Scatchard plot 电脑计算, 所得直线的斜率即 K_a, 每组做 2-5 只兔, K_a 为几次实验值的 $\bar{x} \pm SD$.

2.2 E-R 测定 [6,7-³H]雌二醇(简称 [³H]E)比放射性为 37 Ci/mmol, 由中国科学院上海生物化学研究所提供. 取试管 4 只各加入胞质液 200 μl, 按表 1 加入反应液, 试管于 23°C 水浴中放 3 h 后置于冰浴中, 加入葡聚糖-活性炭混合液 300 μl 每 10 min 振摇 1 次, 共 3 次后离心. 吸取上清液 0.4 ml 于含 6 ml 闪烁液的杯中测定, 计算方法同 P-R

E-R 的 K_a 测定步骤与 P-R 测定步骤相同. [³H]E 在 0.05-0.8 μM 之间取 5 个浓度, 非特异结合管的雌二醇按 [³H]E 的浓度相应增加 500 倍. 参照 Scatchard Plot 电脑计算求得 K_a.

2.3 细胞核 P-R 和 E-R 测定⁽⁵⁾

2.3.1 细胞核 P-R 测定 取试管 4 只各加核混悬液 200 μ l 及 [3 H]P 0.4 μ M, 2 只非特异结合管加孕酮 100 μ M. 各管均加缓冲液 F (含 30% 甘油的缓冲液 C 至 300 μ l 3 h 0 $^{\circ}$ C 放 3 h. 加含 1% Triton \times 100 的缓冲液 F 1 ml 离心 10 min. 倒去上清液, 再用缓冲液 F 将沉淀洗 3 次. 沉淀加无水乙醇 0.5 ml 25 $^{\circ}$ C 下放 30 min, 然后移入含 6 ml 闪烁液的杯中测定, 以 fmol/mg DNA 表示 P-R 量.

2.3.2 细胞核 E-R 测定 取试管 4 只各加入核混悬液 200 μ l 及 [3 H]E 0.4 μ M, 2 只非特异结合管加入雌二醇, 100 μ M 各管均加缓冲液 C 至 300 μ l, 于 23 $^{\circ}$ C 水浴中放 3 h 再放于 0 $^{\circ}$ C 冷却, 以下操作与细胞核 P-R 测定相同.

2.4 蛋白和 DNA 测定 胞质液蛋白含量按 Lowry 氏法⁽⁷⁾测定, 细胞核 DNA 含量按 Burton 氏法⁽⁸⁾测定.

血浆孕酮浓度测定 用放射免疫测定法⁽⁶⁾以 11- α 羟孕酮丁二酸酐牛血清蛋白作为抗原, 对兔进行免疫, 抗血清最终稀释浓度为 1:7500.

离体子宫实验 子宫角 (约 15 mm 长) 悬吊于浴槽中, 营养液 (NaCl 0.9%, KCl 0.42%, CaCl₂ 0.006%, NaHCO₃ 0.05% glucose 0.05%) 50 ml, 通 O₂, 液温 37 $^{\circ}$ C, 子宫收缩用杠杆描记于纹纸鼓上. 先描记子宫的自发收缩活动, 然后加入 15-Me-PGF_{2 α} , 测定引起子宫兴奋的最低阈剂量.

结 果

假孕兔第 8 d 子宫胞质液 P-R 量 对照组为 48 \pm (SD) 40 fmol/mg 蛋白, 15-Me-PGF_{2 α} 组为 121 \pm 54 fmol/mg 蛋白. 子宫细胞核的 P-R 量, 对照组为 82 \pm 86 fmol/mg DNA, 15-Me-PGF_{2 α} 组为 164 \pm 101 fmol/mg DNA. 两组间胞质液和细胞核的 P-R 量均有显著差别, 表明 15-Me-PGF_{2 α} 能使假孕兔子胞质液和细胞核的 P-R 量明显升高. 对

对照组 P-R 的 $K_a = 1.01 \pm 0.23$ nM, 15-Me-PGF_{2 α} 组的 $K_a = 1.26 \pm 0.39$ nM, 二组间无显著差别, 说明 15-Me-PGF_{2 α} 对孕酮和子宫胞质液 P-R 的亲和力没有明显影响. 序贯注射雌二醇和孕酮的幼兔子胞质液 P-R 对照组为 97 \pm 3 fmol/mg 蛋白, 15-Me-PGF_{2 α} 组为 128 \pm 13 fmol/mg 蛋白, 与对照组比较有显著差别. 表明在该实验条件下 15-Me-PGF_{2 α} 仍有使子宫胞质液 P-R 升高的作用. 比较 15-Me-PGF_{2 α} 对上述二种不同条件下子宫胞质液 P-R 的作用, 在假孕兔给药组 P-R 为对照组的 250%, 在幼兔给药组 P-R 为对照组的 132%, 二组间差别显著. 说明 15-Me-PGF_{2 α} 使子宫胞质液 P-R 增加的作用在假孕兔组比幼兔组为强 (表 2、图 1).

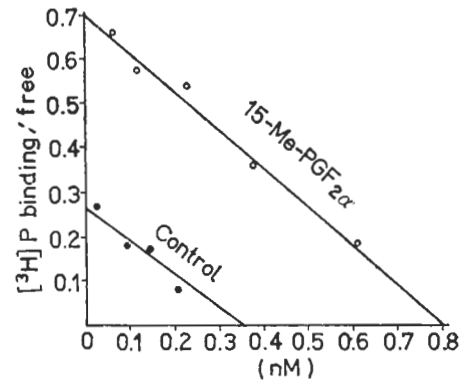


Fig 1. Scatchard plot of progesterone (P) binding in progesterone receptor

对子宫 E-R 的影响 假孕第 8 d 子宫胞质液的 E-R 量, 对照组为 180 \pm 32 fmol/mg 蛋白, 15-Me-PGF_{2 α} 组为 153 \pm 58 fmol/mg 蛋白. 子宫细胞核的 E-R 对照组和 15-Me-PGF_{2 α} 组分别为 1156 \pm 668 fmol/mg DNA 和 893 \pm 574 fmol/mg DNA, 两组间无显著差别. 对照组子宫胞质液 E-R 的 $K_a = 3.02 \pm 0.74$ nM 15-Me-PGF_{2 α} 组 $K_a = 3.54 \pm 0.62$ nM. 在序贯注射雌二醇和孕酮的幼兔子胞质液 E-R, 对照组为 702 \pm 44 fmol/mg 蛋白, 15-Me-PGF_{2 α} 组为 878 \pm 278 fmol/mg 蛋白, 两组间无明显差异. 以上结果说明 15-Me-PGF_{2 α} 对子宫 E-R 不论在假孕组和幼兔组均无明显影

Table 2. Action of 15-methyl-PGF_{2α} on progesterone receptor and estradiol receptor of rabbit uteri. $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$

Rabbits	N	Progesterone receptor		Estrogen receptor		
		Cytosol fmol/mg protein	Nuclear fmol/mg DNA	Cytosol fmol/mg protein	Nuclear fmol/mg DNA	
Pseudopregnant	Control	12	48 ± 40	82 ± 86	180 ± 32	1156 ± 668
	15-Methyl-PGF _{2α}	11	121 ± 54**	164 ± 101**	153 ± 58*	893 ± 574*
Immature	Control	5	97 ± 3		702 ± 44	
	15-Methyl-PGF _{2α}	5	128 ± 13**		877 ± 278*	

响,对雌二醇和子宫胞质液 E-R 的亲合力也无明显影响。

对血浆孕酮浓度的影响 兔假孕第 8 d 血浆孕酮浓度对照组和 15-Me-PGF_{2α} 组分别为 7.4 ± 2.8 和 1.3 ± 1.9 ng/ml, 两组间有显著差别,表明 15-Me-PGF_{2α} 对假孕兔有明显的溶黄体作用。

对离体子宫活动的影响 假孕第 8 d 兔离体子宫实验,对照组 6 只子宫中仅 1 只有明显的自发节律收缩,其余 5 只子宫均无明显自发收缩活动,引起子宫兴奋反应的 15-Me-PGF_{2α} 最低阈浓度为 10-100 ng/ml,15-Me-PGF_{2α} 组 6 只兔的离体子宫除 1 只外也均无明显自发收缩,引起子宫兴奋反应的 15-Me-PGF_{2α} 最低阈浓度为 1-100 ng/ml,二组间无显著差异($P > 0.05$)。

讨 论

子宫中 P-R 的量受血中雌二醇和孕酮浓度的调节,给去卵巢豚鼠 sc 雌二醇使子宫胞质液 P-R 增高,sc 孕酮能使已升高的 P-R 下降,这被认为是孕酮对 P-R 的一种自身限制作用⁽⁹⁾。本实验观察到 15-Me-PGF_{2α} 对假孕兔有溶黄体作用,iv 后 24 h 血浆孕酮浓度明显下降,同时伴有子宫 P-R 升高,对孕酮和 P-R 的亲合力无明显影响,因此,15-Me-PGF_{2α} 使子宫 P-R 升高可能与血浆孕酮浓度降低减弱了孕酮对子宫 P-R 的自身限制作用有关,给幼兔外源性雌二醇和孕酮,以形成体内稳定的激素水平,此时 15-Me-PGF_{2α} 仍有明显增高子宫胞质液 P-R 的作用,但增加的

程度远比对假孕兔为弱,这表明 15-Me-PGF_{2α} 使子宫 P-R 增高的机制,除由于其溶黄体作用削弱了孕酮对子宫 P-R 的自身限制作用外,尚有直接作用的参与。

妊娠子宫处于低水平不规则的活动状态,对催产素和前列腺素的反应性很低,经手术摘除卵巢和一侧胎盘脱位后,血中孕酮浓度明显降低,子宫对催产素的敏感性也相应提高,故认为孕酮对子宫活动有阻抑作用⁽¹⁰⁾。

束怀德等⁽³⁾报道 iv 15-Me-PGF_{2α} 对各期妊娠兔在位子宫即刻作用不明显,但经 24-48 h 后子宫自发活动大大增加,对催产素和前列腺素的反应明显增强,他们支持子宫孕酮阻抑学说,本文报道假孕兔第 8 d 的血浆孕酮浓度,与 Baldwin 等报道孕兔第 8 d 的浓度⁽¹¹⁾相似,子宫活动也处于低水平,几无自发节律收缩,iv 15-Me-PGF_{2α} 24 h 后血浆孕酮浓度显著降低,但子宫自发活动并无明显增加,对 15-Me-PGF_{2α} 的反应性也未见明显改变,妊娠子宫的活动除受血中激素水平的调节外,尚受到胎儿胎盘功能状态的影响,可能由于我们采用假孕兔避免了药物对胎儿胎盘的作用间接地影响子宫的活动,因此得到了与束怀德等不同的结果, Fuchs⁽¹²⁾报告孕酮能明显增加去卵巢大鼠子宫对 PGF_{2α} 的反应性,孕酮也能使大鼠子宫胞质液 P-R 量减少, Hai⁽⁹⁾观察到大鼠临产时子宫活动增加,此时子宫细胞核 P-R 急剧下降,他认为产前子宫孕酮阻抑作用的去除是由于子宫细胞核 P-R 下降,我们观察到 iv 15-Me-PGF_{2α} 后虽然血中孕酮浓度

明显下降, 但此时子宫细胞内 P-R 明显增高, 子宫活动仍处于低水平。我们设想子宫细胞 P-R 增高可能与子宫仍处于阻抑状态有关。实验结果提示子宫细胞的 P-R 可能参于子宫活动的调节。

参 考 文 献

- 1 上海第一医学院药理教研组. 中华医学杂志 1978 年 5 月; 58(5):265
- 2 上海第一医学院药理教研组. 生理学报 1978 年 4 月; 30(2):135
- 3 束怀德、魏 湘、励福娣、杨藻宸. 动物学报 1978 年 12 月; 24(2):307
- 4 Bayaed F, Danelaus S, Bobel P, Baulieu E.

Acta Pharmacologica Sinica 1982 Dec; 3 (4) : 256—260

ACTION OF 15-METHYL-PROSTAGLANDIN F_{2α} ON PROGESTERONE RECEPTORS AND ESTRADIOL RECEPTORS IN RABBIT UTERUS

CHU Yun-hong, ZHOU Mei-hua, LI Quan, ZHAO Zi-fang

(Department of Pharmacology, Shanghai First Medical College, Shanghai 200032)

ABSTRACT 15-Methyl-PGF_{2α} iv to pseudo-pregnant and immature rabbits increased the amount of progesterone receptors (P-R) in uteri. The increase of P-R in pseudopregnant uteri was more marked than that in immature uteri. But no striking change of estradiol receptors and of K_a of both receptors was observed. Injection of 15-methyl-PGF_{2α} to pseudo-pregnant rabbits decreased the plasma progesterone level, but did not enhance

- J Clin Endocrinol Metab* 1978 Apr; 46(4):635
- 5 Anderson J, Clark M, Peck JEJ. *Biochem J* 1972 Mar; 126(3):561
 - 6 Thorneychot LH, Stone SC. *Contraception* 1972 Feb; 5(2):129
 - 7 Lowry OH, Rosebrough J, Farr AL, Randall RJ. *J Biol Chem* 1951 Feb 193(2):265
 - 8 Burton K. *Biochem J* 1956 Feb; 62(2):315
 - 9 Hai MT, Logeat F, Warenbourg M, Milgrom E. *Ann NY Acad Sci* 1977 Mar; 286:199
 - 10 Csapo AI Takeda H. *Am J Obstet Gynecol* 1965 Feb; 9(2):221
 - 11 Baldwin DM, Stabenfeldt GH. *Biol Reprod* 1974 May; 10(5):495
 - 12 Fuch AR. *Am J Obstet Gynecol* 1974 Aug; 118(8):1098

the spontaneous contraction of uteri.

It is suggested that 1) The mechanism of the increase of P-R in uterus is mediated mainly through the luteolytic action of 15-methyl-PGF_{2α}; 2) The P-R in uterus plays a role in regulation of uterine contraction.

KEY WORDS 15-methyl-prostaglandin F_{2α}; progesterone receptor; estradiol receptor; association constant; affinity