

五种孕酮衍生物对孕激素受体的亲和性

姚连生 周建樑 (中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

提要 用 $[^3\text{H}]\text{R}5020$ 作配基, 蔗糖密度梯度超离心方法, 测定和分离了兔子宫内膜的孕激素受体。在低盐浓度下该受体是7S分子, 其 K_d 为0.34 nM, 对 $[^3\text{H}]\text{R}5020$ 有很高的亲和性。利用与 $[^3\text{H}]\text{R}5020$ 竞争

性结合受体的作用, 测定了5种孕酮衍生物结合受体的相对亲和性, 其顺序为甲地孕酮>炔诺酮>孕素I号>孕酮>炔羟雄烯异噁唑。孕素I号是我国自行设计合成的避孕药, 它能与 $[^3\text{H}]\text{R}5020$ 竞争孕激素受体, 但不与雌激素受体结合。

1982年8月27日收稿 1983年7月22日修回

关键词 孕激素受体; 雌激素受体; 甲地孕醇-

3-环戊烷丙酸酯；甲地孕酮；炔诺酮；炔羟雄烯异噁唑；竞争性结合；相对亲和性

甾体激素的生理效应，不仅与血浆激素水平有关，而且与靶组织中受体蛋白的结合能力有关，也即激素的生物活性与激素对受体的亲和性之间存在一定的相关性。常用避孕药是雌激素或孕酮的衍生物，研究避孕药与受体的作用，对于了解药物作用机理和筛选新药有一定意义。本文通过5种孕酮衍生物与 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 竞争兔子宫内膜孕激素受体的作用，测定了它们结合受体的相对亲和性，并用蔗糖密度梯度超离心技术分析了我 国避孕新药甲地孕酮-3-环戊烷丙酸酯(孕素1号)与受体的结合作用。对其抗生育作用进行了讨论。

材料与方 法

药品及试剂 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ (80 Ci/mmol)及 R5020(17,21-dimethyl-19-nor-4,9-pregnadiene-3,20-dione)由美国加利福尼亚大学圣地亚哥医学院薛人望博士惠赠。使用前经硅胶薄层层析(TLC)纯化，(溶剂系统：苯：醋酸乙酯=7:3)。 $[^3\text{H}]\text{雌二醇}$ ($[^3\text{H}]\text{E}_2$ 38 Ci/mmol)，本实验室合成。孕酮、孕素1号、炔诺酮、甲地孕酮、炔羟雄烯异噁唑由上海第十二制药厂刘其明工程师提供，TLC鉴定为一个层析点，其他试剂见前文⁽¹⁾。

兔子宫内膜胞质液冻干粉的制备 兔子宫内膜胞质液按前文⁽¹⁾制备，将胞质液分装在安瓿瓶中，每文1 ml，立即置于干冰中冻结，送我所东风试剂厂冻干。冻干粉封口后在-20℃中保存，使用时加1 ml重蒸水溶解，即为兔子宫内膜胞质液，其结合 $[^3\text{H}]\text{E}_2$ 能力在二个月内变化不大⁽²⁾。本实验或用新鲜制备的胞质液，或用冻干粉，对实验结果没有影响。

孕酮衍生物对孕激素受体的竞争性结合 用无水乙醇将各孕酮衍生物配成一定浓度的溶液，再进行适当稀释。每管加入不同浓度的竞争剂5 μl，胞质液200 μl，混匀，使它们的最终浓度在0.5-10000 nM范围内，用5 μl乙醇

代替竞争剂作对照(即总结合)，4℃温育2 h后，加5 μl $[^3\text{H}]\text{R5020}$ ，其最终浓度为2.2 nM，混匀后4-6℃放置16-18 h，加100 μl DCC悬浮液处理10 min，离心(2000×g,10 min)，取200 μl上清液加到10 ml混合闪烁液中，在YSJ-80型液闪测量仪上测定放射性，用外道比法校正。以加有比 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 过量200倍的R5020测定管的放射性作为非专一性结合。每管的放射性减去非专一性结合，即为该管竞争剂浓度下结合 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 的量，与对照管相比，便可得到不同浓度竞争剂存在下孕激素受体结合 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 的%。将结合%对竞争剂浓度的对数值作图，得每种配基的竞争曲线，由此求得降低50%结合 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 所需要的浓度，并计算该化合物结合孕激素受体的相对亲和性。

蔗糖密度梯度超离心分析 操作技术基本上如前报道⁽¹⁾。10-30%蔗糖密度梯度制备在塑料离心管(5 PA)内，每管5 ml。兔子宫内膜胞质液1.5 ml加乳酸脱氢酶(LDH，本所东风厂)1 mg，溶解后，取400 μl分别与 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 以及在相同 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 浓度下加有过量R5020或孕素1号或孕酮的溶液0℃温育4 h，取200 μl铺在梯度上离心(Hitachi RP65-T, RPS-65T rotor, 257600×g, 4℃, 16 h)。铺样后余下的反应液分别取100 μl(或50 μl)测上样的总放射性，以计算离心后放射性回收，其回收率一般在85%以上。离心结束，分部收集蔗糖梯度溶液，每离心管收集35±2份，每份取10 μl测LDH活力，以确定记号蛋白移动的距离，然后加入7 ml混合闪烁液测放射性，将放射性对分部收集各管的顺序作图，得孕激素受体的沉降图谱。反应系统中 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 和R5020分别改用 $[^3\text{H}]\text{E}_2$ 和DES，就可获得雌激素受体的沉降图谱。

孕激素受体的饱和分析 先将兔子宫内膜胞质液在10-30%蔗糖密度梯度溶液上超离心分离，根据孕激素受体的沉降图谱，把相应于受体部位的分部收集各管合并。取二列试管分别加入不同量的 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 乙醇溶液，在一列

试管中同时加入比 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 过量100倍的 R5020 ,减压除去乙醇溶剂,然后每管加200 μl 合并液,在微量混合器上混匀,0 $^{\circ}\text{C}$ 放置16-18 h,各管分别加100 μl DCC悬浮液,摇匀,冰浴放置10 min,离心(2000 $\times g$,15 min),取200 μl 上清液测放射性.将各管的结合量对 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 量作图,得饱和曲线,通过Scatchard作图分析,求得孕激素受体的解离常数(Kd)及 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 结合量.

结果与讨论

兔子宫内膜孕激素受体的性质 图1是兔子宫内膜胞质液的超离心图谱,孕激素受体与 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 的结合峰比LDH沉降稍慢,在7 S左右,与文献⁽³⁾报道一致. R5020 是一种合成的孕激素,比孕酮对受体有更强的专一性⁽⁴⁾.孕酮在与受体结合的同时还可与子宫胞质液中类皮质激素结合蛋白(CBG-like protein)或血清中的皮质激素结合蛋白(CBG)结合⁽⁵⁾,所以若用 $[^3\text{H}]\text{孕酮}$ 作配基时,在沉降图谱上除了7 S分子外,往往还有4 S峰出现,且随着配基浓度增加而更显著⁽⁶⁾.为了进一步鉴定孕激素受体的性质,我们进行了饱和分析,图2是孕激素受体结合 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 的典型饱和曲线,根据其专一性结合所作的Scatchard图分析,它的Kd为0.34 nM,结合量为2.1 pmol/mg protein,符合甾体激素受体的一般特征.我们曾用胞质液或其稀释液与相同浓度的配基反应,由于系

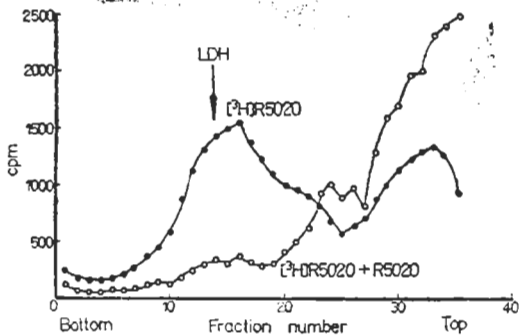


Fig 1. Sedimentation pattern of progesterone receptors in rabbit endometrial cytosol.

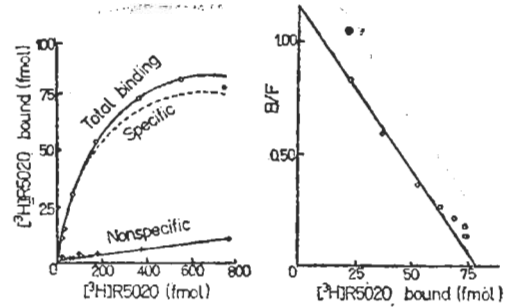


Fig 2. Saturation (left) and Scatchard analysis (right) of ultracentrifugally isolated progesterone receptors of rabbit endometrium in the presence of nonspecific binding. Specific binding is determined by subtracting nonspecific binding from total binding. The data from specific binding is used for construction of Scatchard plot.

统中非专一性结合过高,不能达到饱和结合.经超离心分离后的受体系统,非专一性结合已大为降低,根据每mg蛋白结合量与从图1计算胞质液的结合量(66 fmol/mg protein)相比,超离心分离已使受体纯化了32倍左右.

孕酮衍生物竞争孕激素受体的作用 表1显示5种化合物竞争50%孕激素受体与 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 结合作用所需要的浓度.在一定的受体和 $[^3\text{H}]\text{R5020}$ 浓度下,其数值愈小,说明该化合物对受体的亲和性愈大,若把孕酮竞争50%结合作用的浓度规定为100,其他各化合物的浓度与其比较所得的数值叫相对亲和性(relative binding affinity, RBA)⁽¹¹⁾,用以说明该化合物与受体亲和性的相对大小.由表1可知,在测定的5种化合物中,其相对亲和性为:甲地孕酮>炔诺酮>孕素I号>孕酮>炔羟雄烯异吡唑,其中甲地孕酮及炔诺酮的亲性和比孕酮强得多,孕素I号的相对亲和性亦高于孕酮.利用竞争性蛋白结合技术研究子宫孕激素受体结合配基的专一性,虽然有许多报道^(3,7,8),但Kontula等认为不同种属子宫孕激素受体对配基的专一性是不同的,因此孕酮类药物的生物活性对不同动物有着很大差异.可是兔子宫与人子宫的孕激素受体结合配基的专一性非常相似,用兔子宫孕激素受体来评价孕酮衍生物

Tab 1. Ligand binding specificity of the progesterone receptors

Compounds	Concentrations to inhibit 50% of [^3H]R5020 binding to receptors (nM)	Relative binding affinity
Progesterone	125	100
Progesterin I	71	176
Norethindrone	21	595
Megestrol acetate	14	893
Danazol	2600	5

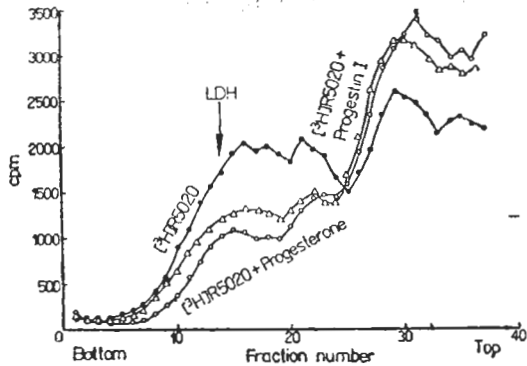


Fig 3. Sucrose density gradient analysis of the competitive inhibition of progestin I and progesterone.

的生物活性, 比较适用于人类⁽³⁾。孕素 I 号是我国自行设计合成的避孕药⁽⁹⁾, 甲地孕酮和炔诺酮是目前常用避孕药的主要成份, 它们对兔子官孕激素受体的亲和性都大于孕酮, 因此其抗生育作用也许与孕酮竞争受体有关。炔羟雄烯异啞唑用于性早熟和子宫内膜组织异位的治疗, 它对受体的亲和性虽然不及孕酮, 但在较高药物剂量下其结合受体的作用还是很显著的, 而且这种结合的复合物对染色质模板没有活化作用, 从而表现抗孕激素的效应⁽¹⁰⁾。

孕素 I 号与受体相互作用的超离心分析

图 3 是孕素 I 号和孕酮与 [^3H]R5020 竞争孕激素受体的蔗糖密度梯度超离心图谱。从图上可以看到 7 S 的孕激素受体可被这二化合物所竞争, 但不完全。反应系统中它们的浓度均比 [^3H]R5020 过量 100 倍左右, 若与图 1 中 R5020 仅比标记物过量 33 倍左右就能使受体几乎全被竞争相比, 孕素 I 号和孕酮的竞争能

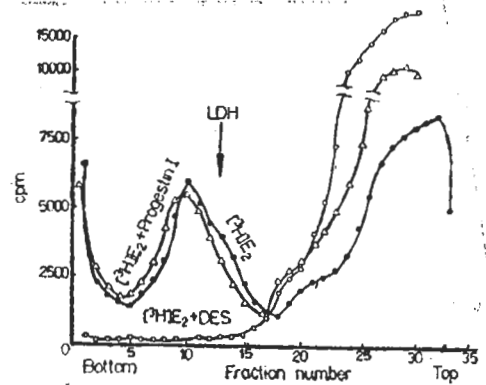


Fig 4. Sucrose density gradient analysis of progesterin I competed with [^3H]E₂ for rabbit endometrial estrogen receptors.

力是较弱的。另外在图上还可看到该二化合物竞争孕激素受体的作用相似, 与它们相对亲和力相近的结果是一致的。图 4 是孕素 I 号与雌激素受体相互作用的超离心图谱, 图上受 DES 竞争的 8 S [^3H]E₂ 结合峰不能被孕素 I 号所竞争。用竞争性结合法测定, 孕素 I 号浓度比 [^3H]E₂ 高 2000 倍的情况下亦无作用。因此孕素 I 号与雌激素受体没有结合作用。

参 考 文 献

- 1 姚连生、周建樑. 生物化学与生物物理学报 1983; 15:201
- 2 季钟煜、黄均蓉、姚连生. 同上 1984; 16:197
- 3 Kontula K, Jänne O, Vihko R, Jager E, Visser J, Zeelen F. *Acta Endocrinol* 1975; 78:574
- 4 Philibert D, Raynaud J-P. *Steroids* 1973; 22:89
- 5 Follow K. Oestradiol and progesterone in normal and abnormal human uterine tissue. In: Fotherby K, Pal SB, eds. *Hormones in normal and abnormal human tissues*; vol 1. NY; de Gruyter 1981:376
- 6 Faber LE, Sandmann ML, Stavely HE. *Endocrinology* 1973; 93:74
- 7 Kontula K, Jänne O, Rajakoski E, Tanhuanpää E, Vihko R. *J Steroid Biochem* 1974; 5:39
- 8 McGuire JL, Bariso CD, Shroft AP. *Biochemistry* 1974; 13:319
- 9 陈惠玲、姚连生、华培杨. 生物化学与生物物理学报 1981; 13:125
- 10 Teruhiko T, Yousuke O, Hiroji O. *Acta*

Endocrinol 1978; 88:190

11 Leavitt WW, Chen TJ, Do YS, Carlton BD, Allen TC. Biology of progesterone receptors. In:

O'Malley BW, Birnbaumer L, eds. *Receptors and hormone action*; vol 2, NY: Academic Press, 1978:168

Acta Pharmacologica Sinica 1984 Jun; 5 (2) : 105-109

AFFINITIES OF FIVE PROGESTIN DERIVATIVES FOR PROGESTERONE RECEPTORS

YAO Lian-sheng, ZHOU Jian-liang (*Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031*)

ABSTRACT The progesterone receptors in rabbit endometrium were studied by sucrose density gradient ultracentrifugation using [³H]R5020 as a ligand. The receptors subsided at about 7 S in a low salt medium with a K_d of 0.34 nM as determined by saturation analysis and Scatchard plot. The progesterone receptors had a high affinity for [³H]R5020. The relative binding affinities of 5 progestin derivatives for the receptors were determined by competitive binding assay and shown to be in the following order: megestrol acetate > norethindrone > progestin I (megestrol 3-cyclopentyl propionate,

a contraceptive designed and synthesized in China) > progesterone > danazol. The analysis of sucrose density gradient ultracentrifugation revealed that progestin I inhibited the binding of [³H]R5020 to progesterone receptors but did not compete with [³H]E₂ for estrogen receptors.

KEY WORDS progesterone receptors; estrogen receptors; megestrol-3-cyclopentyl propionate; megestrol acetate; norethindrone; danazol; competitive binding; relative binding affinity