

5 α -双氢炔诺酮的抗孕激素作用

褚云鸿 李全 赵志芳 周一平* 曹德承**
(上海第一医学院 药理研究室, 上海 200032)

提要 5 α -双氢炔诺酮(5 α -DNE)与孕酮受体(P-R)的相对结合亲和力为20.8, 在大鼠有抗早孕作用。以幼兔子宫内膜碳酸酐酶活性和胞浆雌激素受体含量为指标, 证明5 α -DNE有孕激素和抗孕激素活性。5 α -DNE能与孕酮竞争胞浆P-R, 其与P-R结合形成的复合物能向细胞核内转移。5 α -DNE抑制孕酮与P-R的结合和向核内转移可能与其孕激素和抗孕激素活性有关。

关键词 5 α -双氢炔诺酮; 孕酮受体; 雌激素受体; 相对结合亲和力; 抗孕激素活性

孕酮在人和多种动物早期妊娠中起重要作用, 孕酮水平降低可导致妊娠中止。降低血中孕酮水平, 诱导月经来潮的药物可作为每月1次的催经止孕药。如前列腺素衍生物⁽¹⁾、7 α -甲基睾酮衍生物⁽²⁾等。但尚有疗效差和副作用多等问题。研究在靶器官受体水平拮抗孕酮的药物, 有可能找到新型抗早孕药。5 α -双氢炔诺酮能与孕酮受体结合, 具有抗孕激素作用⁽³⁾。本文研究其抗孕激素活性, 并对其作用机制和应用于抗早孕的可能性进行探讨。

材料和方法

[1,2,6,7-³H]孕酮简称[³H]P, 比放射性80 Ci/mmol, 由上海原子核研究所提供。[1,2-³H]雌二醇简称[³H]E, 比放射性35 Ci/mmol, 由中国科学院上海生物化学研究所提供。5 α -双氢炔诺酮(5 α -dihydronorethisterone)由湖北省医药工业研究所合成。三烯高诺酮(13-ethyl-17-hydroxy-18,19 dinor-17 α -pregna-4,9,11-

triene-20-yn-3-one, R 2323)由中国科学院上海有机化学研究所提供。7 α -甲(17 β -hydroxy-7 α -methylandrost-5-en-3-one, RMI 12936)由上海12制药厂提供。

孕酮受体(P-R)相对结合亲和力(relative binding affinity, RBA) 按Reel测定法及计算方法⁽³⁾, [³H]P为13.2 nM, 甾体化合物浓度为6 nM-20 μ M。

孕激素和抗孕激素作用 取体重0.9 \pm SD 0.1 kg ♀幼兔24只, 分为4组, 各组给药顺序和剂量如表2所示。于末次给药后24 h 放血处死。部分子宫用缓冲液A 30制成匀浆供受体测定用, 其余则剖开子宫腔, 以滤纸吸干后剪下子宫内膜, 称重后置于匀浆管内加入适量生理盐水制成匀浆, 800 \times g离心10 min, 取出上清液测定碳酸酐酶活性⁽⁷⁾。孕酮受体和雌激素受体均采用放射配体受体结合测定法⁽⁴⁾。蛋白含量以Lowry氏法⁽⁶⁾测定, 受体含量以fmol/mg蛋白表示。

子宫胞质液P-R向核内转移

1. 在体实验 取体重100 \pm 12 g的幼♀大鼠, sc雌二醇10 μ g/d \times 3 d。末次注射24 h后, 将大鼠分为2组, 一组sc孕酮2 mg/kg, 另一组sc 5 α -DNE 4 mg/kg。二组均于sc前及sc后2, 6和24 h分别断头处死6鼠, 取出子宫, 用缓冲液A 30制成匀浆供胞质液和核P-R测定。

2. 试管内测定 取去卵巢15 d后的兔子官制成胞浆和核混悬液, 于一系列试管中加入胞浆1 ml和12 nM[³H]P。将试管分为3排, 第一排不加非标记甾体, 第二排加入6 μ M的孕酮, 第三排加入9 μ M 5 α -DNE。在冰浴中放

1983年1月17日收稿 1984年11月20日修回

* 武汉医药工业研究院药理室

** 镇江医学专科学校药理学室

16-18 h 后加入 DCC 1 ml, 摇匀后放置 10 min, 800 × g 离心 10 min。吸取上清液 0.5 ml 于二甲苯闪烁液中, 另取 0.5 ml 加入一系列已放好 0.5 ml 核混悬液的试管中。摇匀置于 25°C 水浴中保温 1 h, 800 × g 离心 10 min。将细胞核用 1% Triton TG 缓冲液洗 1 次, 再用 TG 缓冲液洗 2 次, 上清液弃去, 加入无水乙醇 0.5 ml, 30°C 保温 30 min 转移入二甲苯闪烁液中测定放射活性。

抗早孕作用 取成年大鼠, ♀♂为 2:1 合笼, 每日上午作阴道涂片, 发现精子为妊娠 d 1。于妊娠 d 7-9 每日 sc 5α-DNE 4 mg/kg, 对照组 sc 花生油 1 ml/kg。于 d 13 解剖, 观察子宫内胚胎情况。

结 果

子宫胞质液 P-R 的 RBA 孕酮, 5α-DNE, R 2323 和 7α-甲等对 P-R 的竞争结合曲线如(图 1)。以孕酮与 P-R 的 RBA 为 100, 则 5α-DNE, R 2323 和 7α-甲的 RBA 分别为 20.8, 37.7 和 0.65。

子宫内膜碳酸酐酶活性, P-R 和 E-R 含量 实验各组所得数据及经相互作用的方差分析结果(表 2)可见:

1. 子宫内膜碳酸酐酶的活性以酶单位表示, 雌二醇 + 5α-DNE 组为 102 ± 46 酶单位, 比单用雌二醇组 37 ± 9 酶单位明显为高, 但比

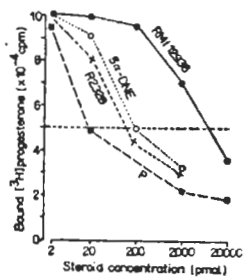


Fig 1. Relative binding affinities of R-2323, 5α-DNE and RMI 12936 for rabbit uterine progesterone receptors. The horizontal dashed line is the 50% inhibition level.

雌二醇 + 孕酮组 320 ± 49 酶单位明显为低。而雌二醇 + 5α-DNE + 孕酮组为 108 ± 36 酶单位也比雌二醇 + 孕酮组明显为低。

2. 子宫胞质液 E-R 含量 雌二醇 + 5α-DNE 组为 194 ± 34 fmol/mg 蛋白, 比雌二醇组 305 ± 61 fmol/mg 蛋白明显降低, 但比雌二醇 + 孕酮组 39 ± 17 fmol/mg 蛋白明显为高。而雌二醇 + 5α-DNE + 孕酮组为 283 ± 50 fmol/mg 蛋白也比雌二醇 + 孕酮组显著增高。

3. 子宫胞质液 P-R 含量 雌二醇 + 5α-DNE 组为 132 ± 12 fmol/mg 蛋白, 与雌二醇组 167 ± 37 fmol/mg 蛋白比较无明显差异, 但比雌二醇 + 孕酮组 97 ± 13 fmol/mg 蛋白明显为高。雌二醇 + 5α-DNE + 孕酮组为 184 ± 13 fmol/mg 蛋白也比雌二醇 + 孕酮组明显为高。

大鼠子宫胞质液 P-R 向核内转移 实验结果见(图 2)。从图中可见给药前胞质液 P-R 为 15 ± 7 fmol/mg 蛋白, 核 P-R 为 6.6 ± 2.8 fmol/mg 蛋白。sc 孕酮后 2, 6 和 24 h, 胞质液 P-R 分别为 6.6 ± 3.3, 11 ± 3, 14 ± 2 fmol/mg 蛋白, 核 P-R 分别为 13 ± 6, 9 ± 4 和 1.8 ± 1.5 fmol/mg 蛋白, 与用药前比较, 给孕酮后 2 h 胞质液 P-R 明显降低, 核 P-R 明显增高, 于给药后 24 h 核 P-R 降低到低于用药前水平。sc 5α-DNE 后 2, 6 和 24 h 胞质液 P-R 分别为 17 ± 9, 19 ± 9, 25 ± 7 fmol/mg 蛋白, 核 P-R 分别为 11 ± 2, 3.8 ± 2.9, 1.9 ± 1.7 fmol/mg 蛋白。与用药前比较, 给药后 2 h 核 P-R 明显增高, 给药后 24 h 胞质液 P-R 增高和核 P-R 降

Tab 1. Relative binding affinities of 3 antiprogestogens for rabbit uterine progesterone receptors

| Compounds | Affinities |
|---|------------|
| Progesterone | 100, 100 |
| 5α-dihydrorethisterone(5α-DNE) | 22.5, 19.1 |
| 17β-hydroxy-7α-methylandro- 5-en-3-one | 0.63, 0.67 |
| R 2323 | 39.0, 36.4 |

Tab 2. Progesterational and antiprogesterational activity of 5 α -DNE. $\bar{x} \pm SD$

| Group | Schedule | on day (sc) | Carbonic anhydrase activity (units) | Receptors (fmol/mg protein) | |
|-------|-------------------------|----------------|--|-----------------------------|---------------|
| | | | | Estrogen | Progesterone |
| A | Estradiol 5 μ g/kg | 1-7 | 36 \pm 9 | 305 \pm 61 | 161 \pm 7 |
| | 0.5 μ g/kg | 8-11 | | | |
| B | Estradiol 5 μ g/kg | 1-7 | 320 \pm 9* | 39 \pm 17* | 97 \pm 13* |
| | Progesterone 2 mg/kg | 8-11 | | | |
| C | Estradiol 5 μ g/kg | 1-7 | 102 \pm 46*† | 194 \pm 34* | 132 \pm 12† |
| | 5 α -DNE 4 mg/kg | 8-11 | | | |
| D | Estradiol 5 μ g/kg | 1-7 | 108 \pm 36† | 283 \pm 50† | 184 \pm 13† |
| | Progesterone 2 mg/kg | 8-11 | | | |
| | 5 α -DNE 4 mg/kg | 8-11 | | | |

$p < 0.05$, * compared with Group A †: compared with Group B

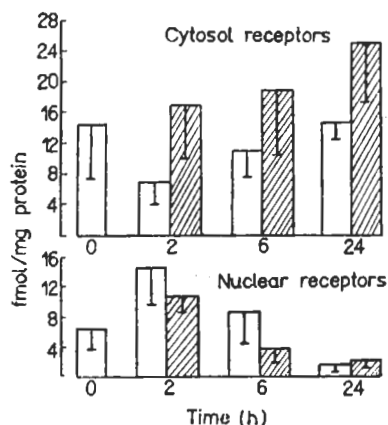


Fig 2. Effects of progesterone and 5 α -DNE on cytosol and nuclear progesterone receptors on d 3. Immature rats sc 10 μ g estradiol for 3 d, and sc either progesterone. (\square) or 5 α -DNE (▨) on d 3. The quantity of P-R was determined 2, 6, and 24 h after sc.

低均显著。

对 ^3H P与胞浆P-R结合和核转移的影响 实验结果见(图3)。从图中可见 ^3H P组、孕酮组和5 α -DNE组 ^3H P与胞浆P-R结合量分别为 38 ± 4 , 12.8 ± 1.2 和 $13.9 \pm 1.5 \times 10^3$ cpm。向核中转移的量分别为 10.2 ± 1.6 , 4.4 ± 1.5 和 $4.3 \pm 0.7 \times 10^3$ cpm。孕酮组、5 α -DNE组与 ^3H P组比较均有显著差别,提示5 α -DNE有竞争P-R和抑制 ^3H P向核内转移的作用。

抗早孕作用 5 α -DNE组8鼠全部终止妊娠,子宫内胚胎已吸收,对照组除1鼠未孕外,其余9鼠均妊娠,子宫中有活胎 13 ± 2 只,这表明5 α -DNE有较强的抗早孕作用。

讨 论

Reel等曾设计一套筛选在受体部位竞争性拮抗孕激素类药物的方案,求与P-R结合的RBA是筛选试验的第一步⁽³⁾,以此方法测定了多种抗孕激素类药物的BRA.R 2323为 41.5 ± 2.8 , 7 α -甲为 0.79 ± 0.08 ,与我们所得的结果相似,而5 α -DNE为 5.3 ± 0.32 ,比我们所得的RBA值为低。

兔子子宫内膜碳酸酐酶活性对孕酮反应灵敏,专一性强,操作简便,5 α -DNE能明显增高

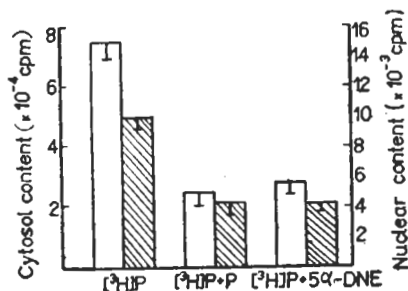


Fig 3. Nuclear uptake of the uterine cytoplasmic [^3H] progesterone receptor complex of the ovariectomized rabbit for 1 h at 25 $^{\circ}\text{C}$. Cytosol content(\square), nuclear content(▨),

幼兔子宫内膜碳酸酐酶的活性,但比孕酮为弱,当5 α -DNE与孕酮合并应用,子宫内膜碳酸酐酶的活性比孕酮组显著为低,表明5 α -DNE具有孕激素和抗孕激素活性。

孕酮能拮抗雌激素促进E-R合成的作用,E-R降低的程度与孕酮剂量相平行⁽⁸⁾,5 α -DNE有拮抗雌二醇使幼兔子宫E-R增高作用,当5 α -DNE与孕酮合用时使E-R下降的程度明显低于孕酮组,这与子宫内膜碳酸酐酶活性的实验结果相一致,也证实5 α -DNE具有孕激素和抗孕激素作用。

孕酮能使子宫P-R降低,认为是加速P-R降解⁽⁹⁾,但关于抗孕激素药物对P-R含量有什么影响,迄今未见报道。5 α -DNE对子宫P-R含量无明显影响,但却拮抗孕酮使子宫P-R含量降低。这个作用的意义及机制有待研究。

大鼠sc孕酮后2h子宫胞质液P-R含量降低,而核P-R的含量升高。试管内实验也说明孕酮与胞质液P-R结合后向核内转移。sc5 α -DNE后2h,子宫细胞核P-R明显升高。在试管内5 α -DNE与孕酮竞争P-R,抑制孕酮与P-R结合,减少孕酮P-R复合物向细胞核内转移。以上结果提示5 α -DNE也能与胞质液P-R结合形成5 α -DNE和P-R的复合物并转移到细胞核中,表现出一定孕激素的活性。

但同时它拮抗了孕酮和P-R的结合,使核内孕酮和P-R的复合物减少,这可能与5 α -DNE抗孕激素活性有关。

5 α -DNE具有微弱的雌激素活性⁽³⁾,用药后24h子宫胞质液P-R比用药前明显增高,可能与此有关。

孕酮对维持大鼠妊娠起重要作用,给早孕大鼠注射有明显抗孕激素作用剂量的5 α -DNE,能完全终止大鼠妊娠,提示5 α -DNE有较强的抗早孕作用。

参 考 文 献

- 1 Karium SMM, Hillier K. *Med Proc* 1975; 2:63
- 2 周美华、李全、包亚敏、林加宝、褚云鸿. *药学报* 1981; 16:8
- 3 Reel JR, Humphrey RR, Shin Y, et al. *Fertil Steril* 1979; 30:552
- 4 Chen TJ, Lesvitt WW. *Endocrinology* 1979; 104:1588
- 5 褚云鸿、周美华、李全、包亚敏. *生殖与避孕* 1982; 2:37
- 6 Lowry CH, Resebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *J Biol Chem* 1951; 193:265
- 7 Miyake T. Assay of progesterone. In: Dorfman RI, ed. *Methods in hormone research*; vol 2. 1st ed. NY: Academic Press, 1962; 141
- 8 Clark JH, Hauch AJW, Peck EJ. *Ann NY Acad Sci* 1977; 286:161
- 9 Yu Hai MT, Logeat F, Warembourg M, Milgrom E. *Ibid* 1977; 286:199

Acta Pharmacologica Sinica 1985 Jun; 6 (2) : 125-129

ANTIPROGESTATIONAL ACTION OF 5 α -DIHYDRONORETHISTER-ONE

CHU Yun-hong, LI Quan, ZHAO Zi-fang, ZHOU Yi-ping, CAO De-chen

(Dept Pharmacology, Shanghai First Medical College, Shanghai 200032)

ABSTRACT Relative binding affinities(RBA) of 5 α -dihydroneorethisterone (5 α -DNE), R2323 and 17 β -hydroxy-7 α -methylandrosterone-5-en-3-

one for rabbit uterine progesterone receptors (p-R) were found to be 20.8, 37.7 and 0.65, respectively. Results obtained from the endome-

trial carbonic anhydrase test and uterine cytoplasmic estrogen receptors (E-R) estimation of immature rabbits showed that 5α -DNE had progestational and a marked antiprogestational activity. 5α -DNE abolished the uterine cytoplasmic P-R decreasing action of progesterone, but did not overcome the uterine cytoplasmic P-R increasing action of estradiol. 5α -DNE 4 mg/kg sc on d 7-9 of pregnancy in rats exerted a full antifertility effect. After progesterone 2 mg/kg the number of uterine cytoplasmic P-R decreased to approximately half of the initial value within 2 h, thereafter gradually returned to the original value at 24 h. But there was no

apparent change in the uterine cytoplasmic P-R at 2 h after 5α -DNE 4 mg/kg. The uterine nuclear P-R of both groups increased to a peak in 2 h, and then decreased to the control value in 6 h. 5α -DNE bound to cytoplasmic P-R and competed for progesterone binding sites. Because of the competitive antagonism at the uterine progesterone receptor level and its antiprogestational activity, 5α -DNE might be developed as a contraceptive agent.

KEY WORDS 5α -dihydronorethindrone; progesterone receptors; estrogen receptors; relative binding affinity; antiprogestational activity

* * *

* * *