

炔诺酮脲在兔的抗孕激素作用

高小玲¹、李敦周 (同济医科大学计划生育研究所, 汉口 430033)

提要 用活性炭吸附法测得兔子官胞浆内与 $[^3\text{H}]$ 孕酮结合的成分为孕激素受体, $K_A=0.73\pm 0.07\text{ nM}$; 还测定了炔诺酮脲(NETO)与炔诺酮(NET)对该受体的相对结合亲和力, 其顺序为 $\text{NET} > \text{孕酮} > \text{NETO}$; 两者对孕酮与其受体的结合起竞争性抑制作用。在 McPhail 试验中, 两者都有孕激素活性, NETO 尚有明显的抗孕激素活性, 提示 NET C₃ 位脲化后抗孕激素活性增强。

关键词 炔诺酮脲; 炔诺酮; 孕酮受体; 抗孕激素活性

孕酮是哺乳动物受精卵着床及维持早孕所必需的, 对抗其作用可能导致抗着床抗早孕。甾体酮脲类化合物具有抗生育活性⁽¹⁾, 炔诺酮脲(NETO)对啮齿类动物具有抗着床及抗孕激素活性⁽²⁾; 它可抑制大鼠卵巢合成孕酮(未发表资料)。本文测定了NETO对孕酮受体的相对结合亲和力(RBA), 对孕酮与其受体结合的影响, 在体内的孕激素、抗孕激素活性; 并与NET进行比较。

材 料 和 方 法

试剂 $[^3\text{H}]$ 孕酮(35.5 TBq/mmol), 活性炭与右旋糖酐-T 70 为 WHO 放免药箱配套试剂, $[^3\text{H}]$ 孕酮使用前经 Sephadex LH₂₀ 柱层析纯化, 雌二醇-17 β 系 Sigma 产品, 睾酮系 Aldrich 产品, 二硫苏糖醇(DTT)系 Serva Feinbiochemica Heidelberg 产品, 明胶为瑞士 Fluka 产品, 其他试剂均为 CP 或 AR 的国产品, NETO 与 NET 由湖北省医药工业研究所提供。

缓冲液及其他 TE 缓冲液: 10 mM Tris,

1.5 mM EDTA, pH 7.4; TED 缓冲液: 10 mM Tris, 1.5 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7.4; TEDGM 缓冲液: 10 mM Tris, 1.5 mM EDTA, 2 mM DTT, 20 mM 钼酸钠, 10% 甘油, pH 7.4; 活性炭混悬液: 0.5% 活性炭, 0.05% 右旋糖酐, 0.1% 明胶, 用 TE 缓冲液配制。闪烁液, 5 g PPO 溶于 1 L 甲苯中。

胞浆液制备 未成熟♀兔, 体重 0.9-1.1 kg, 每兔 sc E₂-17 β (溶于麻油), 10 $\mu\text{g}/0.5\text{ ml}/\text{d} \times 5\text{ d}$, d 6 耳 iv 空气处死, 剪下子宫及一小块肝、肾及脾, 除尽周围脂肪及结缔组织, 用冰冷的 TE 缓冲液洗净, 吸干水分后置于干冰中, 子宫按 1:8(w/v), 其他组织按 1:4(w/v)加 TEDGM 缓冲液匀浆, 在 0 $^{\circ}\text{C}$ 4000 $\times g$ 离心 15 min, 上清液再于 0 $^{\circ}\text{C}$, 164 000 $\times g$ 离心 90 min, 上清液存于 -40 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

胞浆孕激素受体测定 取 200 μl 稀释胞浆液(蛋白质 1-2 mg/ml), 加 $[^3\text{H}]$ 孕酮及 400 倍过量的皮质醇以除去可能存在的皮质素结合蛋白。在有或无过量的非标记孕酮或其他甾体化合物存在下, 于 0-4 $^{\circ}\text{C}$ 冷育 2 h, 加 200 μl 活性炭混悬液分离结合与未结合的标记激素。静置 10 min 后于 0 $^{\circ}\text{C}$ 下 2500 $\times g$ 离心 10 min, 取上清液 100 μl 加入 10 ml 闪烁液内, 放置过夜, 在液闪计数器(LKB 1215 RACKBETA)上测定, 非特异性结合按文献(3)法校正, 并根据 Scatchard 图计算离解常数及结合位点数。

孕激素及抗孕激素活性测定 按文献(4)法, 选未成熟♀兔 51 只, 体重 0.7-1.0 kg, 随机分为 11 组, sc E₂-17 β 5 $\mu\text{g}/\text{d} \times 6\text{ d}$, 从 d 7 起, 其中 3 组分别 sc 孕酮, NETO 或 NET(溶于麻油), 剂量为 0.2 mg/d $\times 5\text{ d}$, 另外 3 组 sc NETO, 剂量分别为 0.2, 0.4, 0.8 mg/d, 同

时 sc 孕酮 0.2 mg/d × 5 d; 余 5 组 sc NET 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 及 3.2 mg/d, 同时 sc 孕酮 0.2 mg/d × 5 d, d 12 上午耳 iv 空气处死, 从每侧子宫角取下一段, 于 Bouin 氏液中固定, 用石蜡包埋切片, HE 染色, 按文献(4)分级标准确定子宫内膜增生指数。

胞浆液蛋白测定 按文献(5)法。

结 果

饱和分析及组织特异性 取子宫、肝、脾及肾等组织的稀释胞浆液 200 μl, 加入 [³H]孕酮(终浓度为 0.4–6 nM)和 400 倍过量皮质醇。在有或无过量的非标记孕酮的条件下测定胞浆内与 [³H]孕酮相结合的位点数及亲和力。结果证实兔子胞浆里与 [³H]孕酮结合的成分为孕酮受体, $K_d = 0.73 \pm 0.07$ nM; 可被饱和(图 1), 结合量为 494 ± 262 fmol/mg 蛋白, 孕酮的非靶组织肝脏胞浆内仅有少量与 [³H]孕酮结合的成分, 但结合激素与游离激素之比和结合激素的浓度之间无关($r < 0.4$)。在肾和脾胞浆里未测到特异性结合物。

竞争分析 于子宫胞浆液 200 μl 中加入

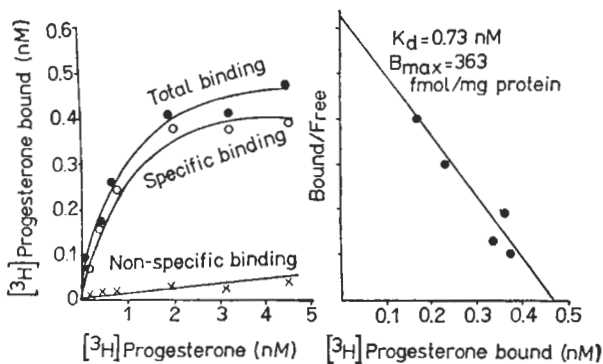


Fig 1. Saturation (left) and Scatchard analysis (right) of [³H] progesterone binding to uterine cytosol receptors. Cytosols prepared from estrogen primed immature rabbits were incubated at 0–4°C for 2 h, with [³H] progesterone (cortisol added to prevent binding to cortisol binding globulin) in the presence/absence of excess of radioinert progesterone.

[³H]孕酮(终浓度 0.6 nM), 加 400 倍过量的皮质醇, 分别加入非标记孕酮、睾酮、E₂-17β、皮质醇、NETO 及 NET 作竞争分析。结果表明, 非标记孕酮与 [³H]孕酮竞争兔子胞浆孕酮受体作用最强, 而睾酮、E₂-17β 及皮质醇表现极弱的竞争性(图 2, 表 1)。以孕酮 RBA 为 100, 睾酮、E₂-17β 及皮质醇的 RBA 等于或小于 0.1%。说明兔子胞浆里与 [³H]孕酮结合的成分具有甾体化物的特异性。

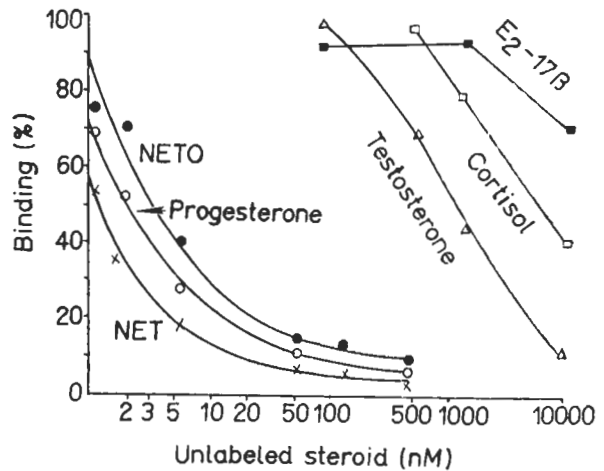


Fig 2. Competition of norethindrone-oxime, norethindrone, testosterone, estradiol-17β and cortisol for the uterine cytosol receptors. Cytosol, prepared from estradiol-primed immature rabbits, were incubated at 0–4°C for 2 h with [³H]progesterone 0.6 nM, 400-fold excess of cortisol and competing steroids.

Tab 1. Relative binding affinity of norethindrone-oxime (NETO), norethindrone (NET), testosterone, E₂-17β and cortisol for progesterone receptors of rabbit uterine cytosol. (4 assays/group)

Steroids	Concn for inhibiting 50% binding of [³ H]progesterone to receptors (nM)	Relative binding affinity (%) ($\bar{x} \pm SD$)
Progesterone	2.34	100
NET	1.13	208 ± 23
NETO	3.14	75 ± 8
Testosterone	2220	0.1
Cortisol	5500	<0.1
E ₂ -17β	Undetermined	<0.01

竞争分析的结果表明 NETO 与兔子子宫胞浆孕酮受体的 RBA 比孕酮小, 而 NET 则比孕酮大(图 2, 表 1)。

NETO 与 NET 对 ^3H 孕酮与孕酮受体结合的竞争性抑制分析 于子宫稀释胞浆液 200 μl 中, 加入 400 倍过量的皮质醇, 加 ^3H 孕酮(终浓度为 0.4–6 nM), 加 NETO 或 NET (终浓度为 10 nM), 作竞争性抑制分析, 所得结果按 Lineweaver & Burk 法作图, 求出抑制常数 $K_i = i \times K_d / (K_p - K_d)$, i 为抑制物浓度, K_d 为孕酮-受体复合物的离解常数, K_p 为抑制物存在时的孕酮-受体复合物离解常数⁽⁶⁾。

结果表明, 抑制物 NETO 和 NET 对兔子子宫胞浆孕酮受体与孕酮结合的影响为竞争性抑制⁽⁷⁾(图 3)。如图 3 所示, 三条直线在 Y 轴上的截距相同, 可见受体最高结合容量不变。而在 X 轴上的截距各不相同, 说明抑制物影响孕酮与受体结合的亲和力, 在有抑制物存在时孕酮受体的亲和力变小(K_d 增大)。NETO 和 NET 的抑制常数分别为 7 ± 5 nM 和 1.6 ± 0.8 nM。

NETO 及 NET 的孕激素和抗孕激素活性 (McPhail 试验) 结果见表 2 和图 4, 可见受

试药 NETO 和 NET 都具有孕激素活性, 但两者均较孕酮稍弱(图 4 A–C)。NETO 尚有明显的抗孕激素活性, 当孕酮总量为 1mg, NETO 总量也为 1 mg 时, 未表现拮抗作用, NETO 增至 2 mg, 表现出拮抗作用(图 4 D)。增至 4 mg 时, 抗孕激素活性明显增强(图 4 E)。而 NET 总量增至 16 mg, 仍无明显抗孕激素作用(图 4 F); 仅 8 mg 组中 1/6 兔表现抗孕激素活性, 子宫内膜增殖指数为 1.5。

Tab 2. Progestational and anti-progestational activities of norethindrone-oxime and norethindrone. Rabbits were primed sc with $\text{E}_2-17\beta$ 5 $\mu\text{g}/\text{d} \times 6\text{d}$.

Group	Immature rabbits	Subcutaneous dose (mg)	McPhail index
		NETO NET P	
A	5		3.6 \pm 0.2
B	5	1	2.9 \pm 0.4
C	4		2.9 \pm 0.5
D	5	1	3.5 \pm 0
E	5	1	3.5 \pm 0
F	4	2	2.8 \pm 0.9
G	4	4	1.4 \pm 0.5
H	4	2	3.6 \pm 0.3
I	3	4	3.5 \pm 0
J	6	8	3.2 \pm 0.6
K	6	16	3.3 \pm 0.5

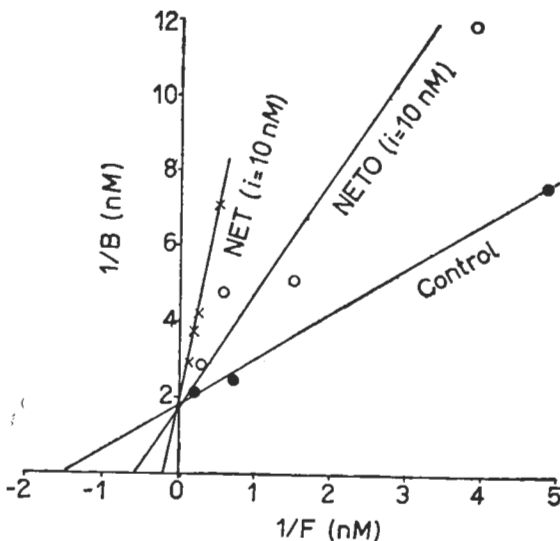


Fig 3. Double reciprocal plot of effects of NETO and NET on ^3H progesterone-receptor binding in rabbit uterine cytosol. i = inhibitor concentration.

讨 论

本实验测得兔子子宫胞浆内与 ^3H 孕酮结合的成分符合孕激素受体的一般特征。Reel 等报道 NETO 的 RBA 约为 NET 的 $1/2$ ⁽⁸⁾。我们的结果约为 $1/3$, 两者对孕酮受体结合的影响均为竞争性抑制, 表明它们只影响孕酮与受体的亲和性, 不改变受体的量和受体蛋白的特性。NETO 的 RBA 比 NET 小, 说明它与受体形成的复合物更易离解, 我们测得 NET 的 K_i 值与文献报告 2.3 nM⁽⁹⁾ 基本接近, 尚未见 NETO 对孕酮与其受体结合的影响及 NETO K_i 值的报道。

McPhail 试验表明, NETO 和 NET 都有孕激素活性, NETO 有抗孕激素活性, 而 NET 的作用则不明显, Reel 等报告 NET 用量达 80 mg

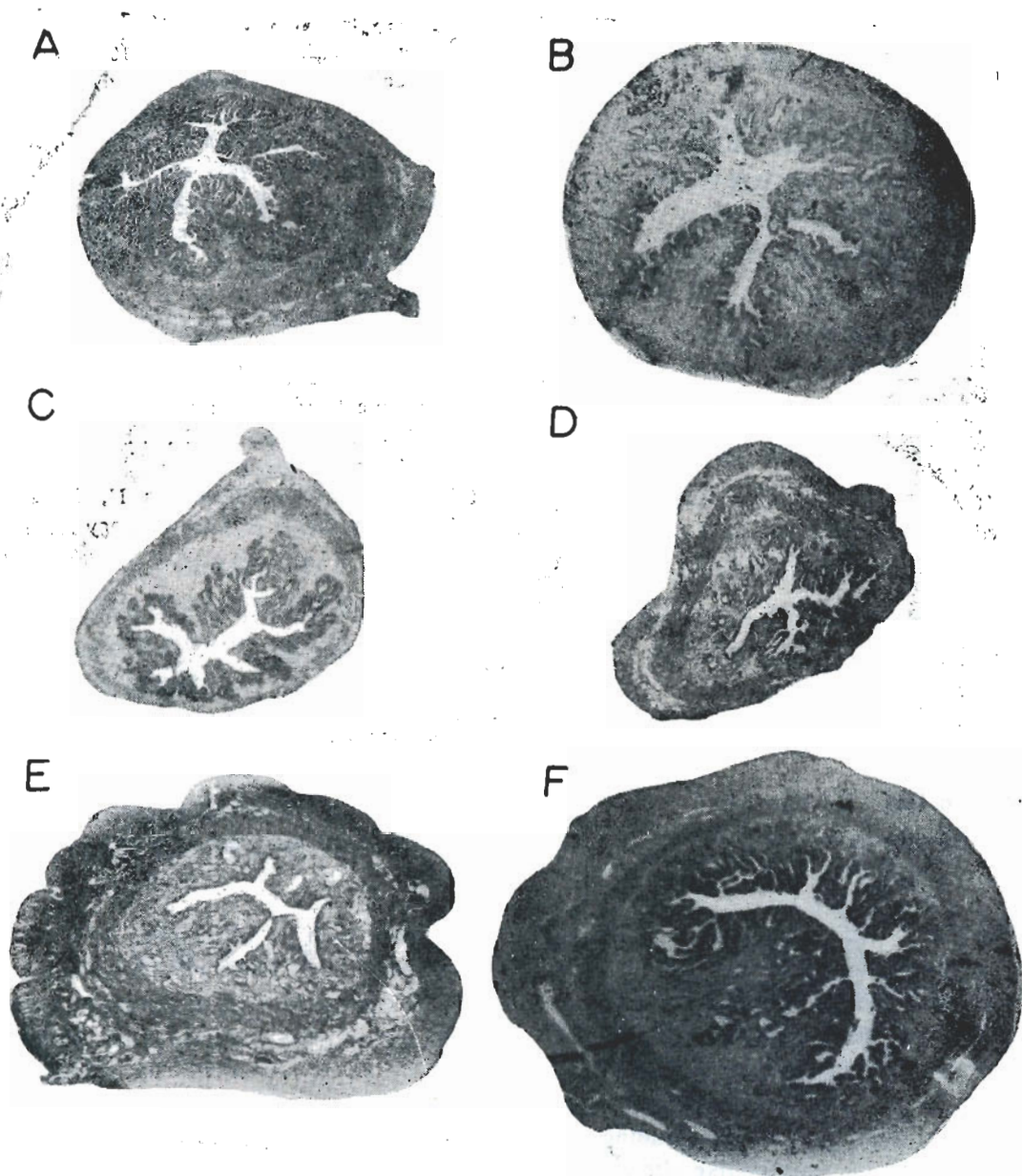


Fig 4. Progestational and anti-progestational action of norethindrone-oxime and norethindrone (Mc-Phail test). All drugs were injected sc (doses see Tab 2). $\times 20$

(为孕酮的 100 倍)才表现抗孕激素作用⁽⁶⁾。由此看出 NETO 的抗孕激素活性比 NET 强。提示 NET 的 C₃ 位酮基脲化后, 抗孕激素活性明显提高。

已有实验证明 NETO 抑制大鼠卵巢内孕酮的生物合成(未发表资料), 但在 McPhail 试验中采用的是♀幼兔, NETO 的抗孕激素活性

表现为对抗外源性孕酮的作用, 因此不可能是抑制孕酮的生物合成, 必有其他作用环节。妊娠大鼠给 NETO 后, 20 α -双氢孕酮的水平并不上升(未发表资料), 说明 NETO 不促进孕酮代谢。NETO 与孕酮竞争受体, 应该看成是其抗孕激素作用的另一环节。虽然 NETO 抗孕激素活性比 NET 强, 而对孕酮受体的 RBA 较 NET

弱, 两者之间似乎存在矛盾, 但药物的体内作用与离体试验下所得的 RBA 之间, 不一定呈平行关系。

NETO 有雌激素活性, 而雌激素是有抗孕激素作用的, NETO 的抗孕激素活性是否与它自身的雌激素活性有关, 有待研究。若确系雌激素所致, 则其抗孕激素活性为非特异性作用。

致谢 本研究得到联合国世界卫生组织人类生殖规划处资助。湖北省医药工业研究所提供炔诺酮与炔诺酮。

参 考 文 献

- 1 Shroff AP, Harper CH, Allen GO, Blye RP. *J Med Chem* 1973; 16 : 113
- 2 周子清、李梧君、李敦周、吴熙瑞. 生殖与避孕

- 1981; 1 : 24
- 3 Rosenthal HE. *Anal Biochem* 1967; 20 : 525
- 4 McPhail MH. *J Physiol* (Lond) 1934; 83: 145
- 5 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 6 Smith EL, Hill RL, Lehman IR, Lefkowitz RJ, Handler P, White A. *Principles of biochemistry*. 7th ed. NY: McGraw-Hill, 1983; 184-9
- 7 Clark JH, Peck EJ. Steroid hormone receptors. In: O'Malley BM, Birnbaumer L, eds. *Receptors and hormone action*; vol 1. 1st ed. NY: Academic Press, 1977 : 383-410
- 8 Reel JR, Humphrey PR, Shin YH, et al. *Fertil Steril* 1979; 31 : 552
- 9 Tamaya T, Nioka S, Furuta N, Shimura T, Takano N, Okada H. *Endocrinology* 1977; 100: 1579

Acta Pharmacologica Sinica 1986 May; 7 (3) : 260-264

Anti-progestational action of norethindrone-oxime in rabbits

GAO Xiao-ling, LI Dun-zhou

(Family Planning Research Institute, Tong Ji Medical University, Hankou 430033)

ABSTRACT Relative binding affinities (RBA) of norethindrone-oxime (NETO) and norethindrone (NET) measured by dextran-coated charcoal adsorption were in the following order: NET > progesterone > NETO.

Both NETO and NET exhibited a competitive inhibition with the binding of progesterone on its receptor-like sites.

In addition, NETO possessed a significant anti-progestational action, while NET did

not show such an effect even at a dose as high as 16 mg. These results indicated that NETO antagonized progesterone at receptor level and it was assumed that oximation of NET at C₃ increased its antiprogestational activity.

KEY WORDS norethindrone-oxime; norethindrone; progesterone receptors; anti-progestational activity