

棉酚乙酸-聚维酮共沉淀物的体外杀精作用

李祥兴、葛仁山¹、张寅恭、石其贤 (浙江医学研究院, 杭州 310007)

提要 本文比较了棉酚乙酸及其与聚维酮(PVP)共沉淀物(GPC)的体外杀精作用,证明棉酚乙酸和 PVP 1:15(wt/wt)制成的 GPC 优于棉酚乙酸。其中豚鼠和犬精子较敏感,大鼠次之,金仓鼠、小鼠和人精子相对不敏感。但 GPC 体外杀精作用尚不及外用烷苯聚醚醚薄膜和醋酸苯汞片。因此, GPC 作为外用避孕药仍须改进。

关键词 棉酚乙酸; 聚维酮(聚乙烯吡咯烷酮); 共沉淀物; 杀精子剂

棉酚对离体大鼠⁽¹⁾、人^(2,3)、猪⁽⁴⁾、猴⁽⁵⁾精子均有杀灭作用; 非杀精剂量的棉酚可抑制精子获能⁽⁶⁾; 棉酚亦可阻止人精子的体外受精⁽⁷⁾。上述结果为棉酚作为阴道避孕药提供了实验依据。用猴评价棉酚作为阴道避孕剂的可能性⁽⁸⁾, 以性交后试验法(PTCs)在妇女身上试验棉酚的杀精效果⁽⁹⁾, 结果提示, 棉酚有希望作为阴

道避孕药。

本文报道了棉酚乙酸及其与 PVP 的共沉淀物(gossypol-PVP coprecipitate, GPC)对人和各种动物精子的体外杀精效果和种族差异。

材料与方 法

棉酚乙酸(gossypol acetic acid, GA), 熔点 178-9°C, 含量 97.41%, 用时先用少量无水乙醇溶解, 再加精子培养液, 于玛瑙研钵中研磨溶解。乙醇用量不超过 1%。

聚维酮(povidone, polyvidone, PVP) BDH, M: 35 000。外用烷醇避孕薄膜系天津市健民制药厂产品, 每张薄膜含烷苯氧聚乙氧乙醇 50 mg。外用避孕片系广州光华制药厂产品, 每片含醋酸苯汞 1.6 mg 和硼酸 20 mg。

棉酚-PVP 共沉淀物的制备: 按共沉淀法⁽²⁾稍加改良。取 1 g 棉酚乙酸, 用约 12 ml 乙醚混悬, 再以甲醇稀释至含棉酚 1%, 呈澄

1985年7月25日收稿 1985年9月30日修回

¹ 浙江医科大学药系 1981届实习生

清的溶液。另取 PVP 15 g。用 15 ml 甲醇溶解，然后将两种溶液混合，倾入旋转真空蒸发器中，35℃真空抽干，-20℃保存备用。

GPC，避孕薄膜和外用避孕片均于使用前加一定量的相应精子培养液溶解，并稀释至所需浓度。各种精子培养液系按人、小鼠、大鼠和豚鼠精子获能培养液(但不含 BSA)，而金仓鼠和犬系采用改良的 Tyrode's 液(100 ml 含 5.5 mM 葡萄糖、10.0 mM 乳酸钠和 1.0 mM 丙酮酸钠)。

动物由本院动物所供应。动物精子取自附睾尾部和输精管，置于相应精子培养液中，记录精子活力和精子数，调节至约 10^7 细胞/ml。有生育力的男子精液由浙江医科大学附属第一医院馈赠，待精液液化后使用原精液(精子数为 $6.4\sim 7.3 \times 10^7$ 细胞/ml，活力 $> 83\%$)。每次数据均使用不同的动物和人精液标本。重复 3-5 次。

评价体外杀精效果按文献⁽¹⁰⁾的方法稍加改进。即 1 份精液加 1 份杀精药液，在小试管内用加样器抽取 5 次(约 5 s)，混匀后立即置载玻片上显微镜下观察($\times 100$)，分别记录 20 s 内和 3 min 内杀死精子所需的药物浓度。

结果与讨论

不同配比 GPC 的溶解度及其对小鼠的杀精试验 分别求出能使上述制剂 100 mg/ml 完全溶解所需的时间。GPC 的水溶解度优于棉酚，溶液呈金黄色透明。棉酚与 PVP 以不同比例制成 GPC，溶解速率随 PVP 含量而增加，此结果与文献报道类似⁽¹¹⁾。其中以 1:15 和 1:30 溶解速率较快，全部溶解 GPC 100 mg/ml 需时分别为 12 和 10 min，而 1:10 和 1:15 则分别为 15 和 30 min。杀精效果以 1:10 和 1:15 为佳(图 1)，但溶解度 1:10 不如 1:15，因此我们采用以 1:15 的制剂。PVP > 200 mg/ml 对所试精子均无杀精作用。

GPC 对人及动物体外杀精效力的评价 棉酚与 GPC 对人和各种动物体外杀精的效果

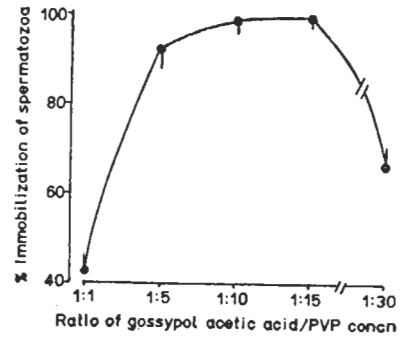


Fig 1. Antimotility effect of various ratios by gossypol acetic acid-polyvidone coprecipitate on mouse sperms. Each value represents 3 mice. Sperm count $\times 10^7$ cells/ml. Sperm motility $> 95\%$. $\bar{x} \pm SD$

列于表 1。从表 1 可见，棉酚和 GPC 对人、豚鼠和犬等动物的精子均有体外杀灭作用，但各种动物精子的敏感程度不同。以 GPC 20 s 内即可使精子全部杀灭的棉酚浓度看，人、金仓鼠和小鼠的耐受性最强(8.9 mg/ml)；其次为大鼠(6.7 mg/ml)；最敏感的是豚鼠和犬(3.3 mg/ml)。文献报道 ig 棉酚对小鼠和兔不敏感，我们亦证明 ig 棉酚对金仓鼠不敏感(未发表资料)。棉酚乙酸的体外杀精作用与 GPC 相比约相差 1.7-16.9 倍以上，其中尤以人精子相差最大。如棉酚乙酸 20 s 内杀精需 GA > 150 mg/ml，而 GPC 只需 GA 8.9 mg/ml，两者相比 GA 浓度相差 16.9 倍以上。棉酚乙酸和棉酚分别与 PVP 制成的共沉淀物，其体外杀精效果基本一致。两者 20 s 内和 3 min 内对人精子的杀精浓度均分别为 133.3 和 50 mg/ml。

本结果与文献^(2,3,5)报道基本一致，即以较低浓度的棉酚(见表 1)制成的 GPC 便可收到良好的杀精效果，主要是由于 GPC 增加了棉酚的溶解度所致。不同的是，无论在 20 s 内或 3 min 内杀精的 GPC 浓度，在各种动物精子中都比文献⁽²⁾所用剂量稍高，这种差别可能是由于动物来源，PVP 分子量和方法不同有关。

Tab 1. Antimotility effect *in vitro* of gossypol acetic acid (GA), GA-PVP coprecipitate (GPC), phenyl mercuric acetate (PMA) and nonoxynol-9. mg of GA in parentheses. n=3-5.

	GA (mg/ml)		GPC (1:15, mg/ml)		PMA (mg/ml)		Nonoxynol-9 (mg/ml)	
	20 s	3 min	20 s	3 min	20 s	3 min	20 s	3 min
Human	>150	150	133.3 (8.9)	50 (3.3)	0.8	0.4	0.5	0.3
			100* (6.7)	50* (3.3)			0.3*	0.1*
Mouse	15	10	133.3 (8.9)	100 (6.7)			0.3	0.2
Syrian hamster	20	10	133.3 (8.9)	41.7 (2.7)			0.3	0.1
Rat	15	10	100 (6.7)	80 (5.3)				
Guinea pig	20	17.5	50 (3.3)	25 (1.7)	0.4	0.1	0.2	0.1
Dog	10	1.3	50 (3.3)	41.7 (2.7)	0.2	0.1	0.3	0.1

* Determined by the method of Sander and Cramer (1941).

GPC 与外用避孕薄膜和避孕片杀精效果的比较 结果见表 1。避孕薄膜和片对人精子的杀精浓度为 0.3-0.8 mg/ml, 可在 20 s 内使全部精子失活。反之, GPC 需 6.7-8.9 mg/ml 棉酚才能完全灭活人的精子, 可见外用薄膜和片剂的杀精有效药物浓度较 GPC 小 11.1-22.3 倍(即杀精作用前者比后者大 11.1-22.3 倍)。尽管前者的杀精效力远大于后者, 但兔 ip 壬苯昔醇(nonoxynol-9)可对肝脏产生毒性, 阴道用药能被阴道广泛吸收⁽¹²⁾。可见目前市售的外用避孕薄膜, 因有一定的副作用而影响使用。

我们曾以 GPC 100 mg/ml 给 2 只兔滴眼, 24 h 内未见刺激作用。也曾以 GPC ig 大鼠, 观察到其抗生育作用有效剂量明显降低。因此, 以棉酚与 PVP 制成一定比例的共沉淀物, 可以增加溶解度, 减少用量, 提高杀精作用, 从而有可能降低棉酚的毒性。另一方面, 棉酚是天然产品, 并可抑制某些阴道病毒⁽⁹⁾和杀灭阴道淋球菌⁽¹³⁾, 因而较外用杀精药具有明显的优点, 值得进一步研究。

致谢 本研究得到浙江省卫生厅和美国洛氏基金会部分资助。

参 考 文 献

- 1 张寅恭、石其贤。棉酚对雄性大鼠的抗生育作用。浙江医学 1980; 2: 8
- 2 Waller DP, Zaneveld LJD, Fong HHS. *In vitro* spermicidal activity of gossypol. *Contraception* 1980; 22: 183
- 3 Pösö H, Wichmann K, Janne J, Luukkainen T. Gossypol, a powerful inhibitor of human spermatozoal metabolism. *Lancet* 1980; 1: 885
- 4 Tso WW, Lee CS. Effects of gossypol on boar spermatozoa *in vitro*. *Arch Androl* 1981; 7: 85
- 5 Kim IC, Waller DP, Marcelle GB, et al. Comparative *in vitro* spermicidal effect of (+)-gossypol, (±)-gossypol, (-)-gossypol and gossypolone. *Contraception* 1984; 30: 253
- 6 Shi QX, Friend DS. Gossypol-induced inhibition of guinea pig sperm capacitation *in vitro*. *Biol Reprod* 1983; 29: 1027
- 7 Kennedy WP, Van Der Ven HH, Straus JW,

- et al.* Gossypol inhibition of acrosin and proacrosin and oocyte penetration by human spermatozoa. *Ibid* 1983; 29 : 999
- 8 Cameron SM, Waller DP, Zaneveld LJD. Vaginal spermicidal activity of gossypol in the *Macaca arctoides*. *Fertil Steril* 1982; 37 : 273
 - 9 Ratsula K, Haukkamaa M, Wichmann K, Luukkainen T. Vaginal contraception with gossypol: A clinical study. *Contraception* 1983; 27 : 571
 - 10 Sander FV, Cramer SD. A practical method for testing the spermicidal action of contraceptives. *Human Fertil* 1941; 6 : 134
 - 11 顾忠伟、江越、冯新德。棉酚的高分子化合物的研究。I 聚乙烯吡咯烷酮——棉酚复合物的合成及其抗生育作用。男性生育调节学术交流会。南京。1984 Dec.
 - 12 Chvapil M, Eskelson CD, Droegemueller W. New data on the pharmacokinetics of nonoxynol-9. In: Zatuchni GI, Sobrero AJ, Speidel JJ, Sciarra JJ, eds. *Vaginal contraception: Proceedings of an international workshop on new developments in vaginal contraception*, Guatemala City. Hagerstown MD: Harper & Row, 1979: 165-74
 - 13 Wichmann K, Vaheri A, Luukkainen T. Inhibiting herpes simplex virus type 2 infection in human epithelial cells by gossypol, a potent spermicidal and contraceptive agent. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 142: 593

Acta Pharmacologica Sinica 1986 Sep, 7 (5) : 453-456

Spermicidal effects *in vitro* of gossypol acetic acid-povidone coprecipitate¹

LI Xiang-xin, GE Ren-shan, ZHANG Yin-gong, SHI Qi-xian
(Zhejiang Academy of Medicine, Hangzhou 310007)

ABSTRACT The spermicidal activities *in vitro* of gossypol acetic acid (GA), GA-polyvinylpyrrolidone (PVP) coprecipitate (GPC), phenyl mercuric acetate (PMA) and nonoxynol-9 on spermatozoa of human, hamster, mouse, rat, guinea pig and dog were determined by Sander and Cramer's method (1941). The coprecipitate used in the study was GPC, GA-PVP (M, 35 000) (1/15, wt/wt) and its solubility in saline increased with increasing amount of PVP. PVP alone did not decrease spermatozoa motility for all species tested. GA 150 mg/ml did not inhibit human spermatozoa motility in 20 s. In contrast to the PVP and GA, GPC was actively spermicidal. GPC (50 mg/ml for guinea pig and dog spermatozoa, 133.3 mg/ml for mouse, hamster and

human spermatozoa) were required to immobilize these spermatozoa within 20 s. Guinea pig and dog seemed to be the sensitive species to GPC. These results were similar to those obtained by Waller *et al* (1980). Pösö *et al* (1980) and Kim *et al* (1984). PMA and nonoxynol-9 exhibited spermicidal activity 11-22 time higher than that of GPC, but irritation of the latter to mucus is smaller than both of the formers.

KEY WORDS gossypol acetic acid; povidone (polyvidone); coprecipitate; spermaticidal agents

¹Supported in part by grants from the Rockefeller Foundation and Provincial Health Bureau of Zhejiang.