

Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265

13 Schneider WC. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In : Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods of enzymology*; vol 3.

1957: 680-684

14 Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 1970; 227: 680

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 May; 11 (3) : 268-271

棉酚衍生物和类似物的抗生育作用¹

王文华²、于宗瀚³、蔡 鸣、徐小梅⁴、吴国沛

(南京药物研究所, 南京 210009; ³中国科学院上海生理研究所, 上海 200031, 中国)

Antifertility actions of gossypol derivatives and analogues¹

WANG Wen-Hua², Yu Zong-Han³, CAI Ming, XU Xiao-Mei⁴, WU Guo-Pei (*Nanjing Institute of Materia Medica, Nanjing 210009; ³Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*)

ABSTRACT This paper report the results of 32 gossypol derivatives and analogues. Among 12 compounds screened by oral administration to ♂ rats, only dipotassium gossypolate (NC030) exhibited an antifertility activity similar to gossypol. Among 24 compounds screened by injecting into pouches of cauda epididymides of rats, 10 exhibited spermicidal activities.

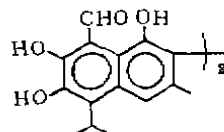
KEY WORDS gossypol; epididymis; antispermato-genic agents

摘要 本文报告了 32 个棉酚衍生物和类似物的抗生育作用研究结果。在 12 个经 ♂ 大鼠口服筛选的化合物中, 仅棉酚二钾(NC030)有同棉酚相类似的抗生育

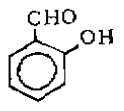
活性。在 24 个经注射到大鼠附睾尾囊的化合物中, 10 个有杀精子活性。

关键词 棉酚; 附睾; 抗精子发生剂

棉酚(gossypol)为我国首创的男性避孕药。70 年代初期, 我国进行了棉酚分子结构改造⁽¹⁻⁴⁾。证明棉酚分子中的醛基和酚羟基是保持其口服抗生精活性所必须的基团⁽²⁾。因此, 我们从保留棉酚活性基团, 简化棉酚分子骨架入手, 合成了苯、萘、联苯、联萘、酚醛类和有关化合物, 以及一些棉酚衍生物, 其中 12 个进行了 ♂ 大鼠口服筛选⁽⁵⁾。棉酚和有关化合物以外途径给药的研究也有报道⁽⁶⁻⁸⁾, 本文采用大鼠附睾尾囊注射法⁽⁹⁾又筛选了 24 个化合物。



Gossypol



Salicylaldehyde

MATERIALS

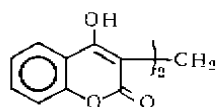
32 种棉酚衍生物、酚醛类和有关化合物均由南京药物研究所药物合成室提供, 全部化合物均经元素分析和熔点测定, 新化合物还经 IR 和¹HNMR 测定确证结构, 供实验用。

Received 1988 Nov 4 Accepted 1989 Dec 22
¹ Part of this paper was reported on the Symposium in Fertility Regulation in Male (1984, Nanjing) and on the International Symposium on Recent Advances in Fertility Regulation (1986, Hangzhou), China.
² Now in *Nanjing Contemporary Polytechnic Institute, Nanjing 210016, China*
⁴ *The Hospital of Jiangsu Province Government Office, Nanjing 210024, China*

Tab 1. Antifertility test of 2% gossypol derivatives and analogues by injection into pouches of cauda epididymes of rats.

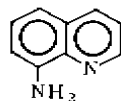
Code number	Substituents	Substituents								Rate with all sperms dead R ₉ / Total rats	
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈		
NC005		CHO	OH	OMe						4 / 4	
NC011		PhCO	OH		OH					4 / 4	
NC012		CHO	OH		OH					4 / 4	
NC033		CHO		OH	OH					.	
NC064		CHO	OMe							4 / 4	
NC002			OH						OH	4 / 4	
NC014		CHO	OH							4 / 4	
NC025		CHO	OH					OH	OH	4 / 4	
NC044			CHO	OH							4 / 4
NC052			OH	CHO				OH	OH		0 / 4
NC055			OMe	CHO				OMe	OMe		0 / 4
NC056			CHO			OH		OH	OH		0 / 4
NC057			CHO			OMe		OMe	OMe		0 / 4
NC058				CO ₂ H		OH		PhCH ₂ O	OMe		0 / 4
NC019			CHO	OH	OMe		CHO	OH	OMe		0 / 3
NC020				CHO		OH	OMe	CHO		OMe	OH
NC022			CHO	OH	OH		CHO	OH	OH		4 / 4*
NC037			CHO	OH			CHO	OH			1 / 4
NC062			CHO		OH	OH	CHO		OMe	OH	0 / 3
NC024				CHO	OH				CHO	OH	3 / 3*
NC036		OH	OH	CHO			OH	OH	CHO	3 / 4	
NC053		OH			OH	CHO	OH		OH	1 / 4	
NC015			O-CO	OMe	OMe	NO ₂				.	
NC029		OH	CH ₂ =	OH	OH					.	
NC030		OH	CHO	OK	OH					**	
NC031			OH	CH=	OK	OH					.
NC032			OH	NOH							.
NC040			OH	CN	OMe	OMe					.
NC041			OH	CH=N-O							.
NC042		OH	CHO	OH	OMe					1 / 3*	
NC042		O=	CHO	OH	OMe	O=		quinone		0 / 3*	

NC034



NC066

0/4



I gossypol

4/4

Control

0/4

* Rats oral ineffective. ** Rats oral as effective as gossypol.

*** Rats oral uncertain.

Wister 大鼠, ♂, 体重 $332 \pm SD 27$ g, 本所繁殖, 待试化合物均用 1% 羧甲基纤维素 (CMC) 或加适量 Tween-80 配成所需浓度, 供 ig 用。

在大鼠附睾尾囊注药法中, 待试化合物溶于冷餐油, 配成 2% 浓度, 经超声波处理备用。

METHODS AND RESULTS

12 种棉酚衍生物和类似物的 ♂ 大鼠灌胃抗生精活性 全部化合物均先用 ♂ 小鼠测定口服急性粗略的 LD_{50} 值, 并以此值的 1/20 或 1/10 作为大鼠每日剂量。对照组灌服同量 1% CMC 溶液。将 ♂ 大鼠随机分为对照组、棉酚 $15 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 组和服药组, 每组 5-6 只, 均每日晨空腹 ig 药物一次, 每周用药 6 d, 于每周用药的第一天称体重一次, 连续用药 6 wk, 停药 1-3 d 后剖验⁽¹⁰⁾, 判定附睾尾部精子活动率和畸形率。实验结果表明, 在这 12 种化合物中, 只有棉酚-7,7'-二钾 (NC030) 有与棉酚相似的口服抗生精活性。这可能是因本品抵胃后, 酸化释出棉酚而发挥药效。其余化合物对生精作用均无明显的影响。同时还对

服药组大鼠睾丸重量与对照组进行了比较, 无显著差异。

NC029 $300 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 和 NC032 $250 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 做过交配试验, 于服药后 38 d 与正常 ♀ 鼠按 1:1 合笼 6 d, 结果无明显的抗生育作用。另取睾丸称重后, 用 Bouin 氏液固定, 常规制片, HE 染色, 用光学显微镜检查药物 NC001-NC020 对睾丸生精细胞形态学的影响, 结果均未见各级生精细胞明显异常。

前曾报道, ♂ 大鼠口服棉酚二胍二钾-6,6',7,7'-四甲醚 (NC007) 精子畸形率达 46%⁽⁵⁾。但此后复筛时将样品进一步精制, 并将精制品和杂质分别进行了 ♂ 大鼠口服筛选, 结果二者均未能产生异常的精子畸形率和活动率, 表明 NC007 并无口服抗生精活性。

24 种棉酚衍生物和类似物的 ♂ 大鼠附睾尾囊法的杀精子作用 将大鼠用戊巴比妥钠 $40 \text{ mg}/\text{kg}$, ip 麻醉, 手术分离左右两侧附睾, 分别将附睾两端用线结扎, 左侧注入冷餐油 0.05 ml (对照), 右侧注入 2% 待试化合物冷餐油 0.05 ml, 然后缝合创口。2 d 后杀死大鼠, 取出尾囊, 取其不同部位的组织, 用生理盐水

稀释, 镜检精子存活情况, 结果见 Tab 1. 24 种化合物的实验结果表明, 10 种有杀精子活性.

DISCUSSION

在我们筛选过的棉酚衍生物中, 仅棉酚二钾(NC030)有口服抗生精活性, 这与文献^(2,3)一致. 近十多年来的研究表明, 仅棉酚酸复合物⁽¹⁾和棉酚 PVP 复合物^(11,12)有抗生精活性. 我们改变棉酚醛基, 合成棉酚 Schiff 碱或其脞类; 改变棉酚羟基, 合成棉酚醚类、酯类、棉酚醚类和去异丙基棉酚. 经大鼠口服均无抗生精作用, 此与文献^(2,4,13)一致. 由此可见, 棉酚分子结构的特异性高, 这给棉酚分子结构改造、寻找高效低毒化合物带来了很大困难.

大鼠附睾尾囊注药法⁽⁹⁾筛选有效和无效的化合物中均有邻位酚醛, 因样品类型较少, 未找出构效规律. 研究药物杀精作用时, 本法实验周期短, 体内、外结果有良好的一致性, 如棉酚. 而水杨醛用本法有杀精作用, 但 ig 时却无抗生精作用, 与棉酚合用有拮抗抑精作用⁽¹⁰⁾, 两种给药途径结果不一. 此外, 溶解度低的药物可能出现阴性结果, 因此本法有待改进. 但本法仍可能是寻找口服以外途径给药⁽⁷⁾和缓解剂型男用节育药⁽¹⁴⁾的有效手段.

ACKNOWLEDGMENTS 吴松云副研究员协助辜丸组织形态观察; 郑锦海和潘玉英同志参加部分工作.

REFERENCES

- 1 National Coordinating Group on Male Antifertility Agents. Gossypol — a new antifertility agent for males. *Chin Med J* 1978; 4 : 417
- 2 Wang YE, Luo YD, Tang XC. Studies on the antifertility effects of cottonseed meal and gossypol. *Acta Pharm Sin* 1979; 14 : 662

- 3 石朝周、丁惟培、余铭清、吴熙瑞. 棉酚镁的制备及抑精、毒性研究. *武汉医学院学报* 1981; 10(4) : 6
- 4 Huang JX, Zhao SX, Gu ZP, Zhu YQ, Ji RY. Synthesis of gossypol derivatives and their antifertility action. *Reprod Contracep* 1986; 6 : 48
- 5 Wu GP, Wang WH, Ying HQ, Yan ZL. A preliminary report on the synthesis and screening of gossypol derivatives and analogues — an attempt to simplify the gossypol molecule. In: Gao YS & Huang L, eds. *Recent advances in synthetic chemistry for fertility regulating agents*. Shanghai Editorial office of *Reproduction and Contraception*. 1983; 71-77
- 6 Wu GP, Hou JY. A survey of investigations in chemistry and applications of gossypol and its derivatives. *Org Chem* 1985; (3) : 193
- 7 Wu GP. Studies on gossypol and related compounds as contraceptives and drugs for gynaecological diseases. *Reprod Contracep* 1988; 8(1) : 3
- 8 Gu ZP. A glimpse of studies of gossypol in foreign countries. *Ibid* 1983; 3(1) : 8
- 9 Yu ZH. Spermaticidal action of some fat-soluble chelating agents in pouches of caudae epididymides in rats. *Acta Pharmacol Sin* 1982; 3 : 260
- 10 Wang WH, Xu XM, Cai M. Influence of salicylaldehyde and its analogues on the antispermatic effect of gossypol. *Acta Pharm Sin* 1985; 20 : 392
- 11 Gu ZW, Jiang Y, Feng XD. Studies on the formation and antifertility effect of poly(vinyl-pyrrolidone)-gossypol complex. *Kexue Tongbao* 1984; 29 : 1561
- 12 Wang Y, Shi XQ, Sun YB. Antifertility effect of polyvinylpyrrolidone-gossypol and gossypol in male rats. *Contraception* 1985; 32 : 651
- 13 Hoffer AP, Agarwal A, Meltzer P, Naqvi R, Matlin SA. Antifertility, spermicidal and ultrastructural effects of gossypol and derivatives administered orally and by intratesticular injections. *Ibid* 1988; 37 : 301
- 14 Wang GY, Wang WH, Zhou ZH. Drug carrier: Studies on liposome of gossypol. *Chin Pharm Bull* 1981; 16 : 187