

RU-486 和双炔失碳酯合并用药的抗生育作用

沈佩娟、钱耀贤、徐瑞英、沈其晟、刘桂明、林中明
(上海市计划生育科学研究所, 上海 200032, 中国)

Antifertility effects of RU-486 in combination with anordrin in rats

SHEN Pei-Juan, QIAN Yao-Xian, XU Rui-Ying, SHEN Qi-Cheng, LIU Gui-Ming,
LIN Zhong-Ming

(Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT RU-486 and anordrin suspended or dissolved in tea seed oil, alone or in combination, were given orally to rats on d 6-8 or d 11-13 of pregnancy, respectively. Complete interruption of early pregnancy was obtained after RU-486 at 8 mg/kg alone or 2.5 mg/kg combined with anordrin 2 mg/kg when given on d 6-8 of pregnancy. A complete mid-trimester abortion was obtained after RU-486 10 mg/kg alone or 4 mg/kg combined with anordrin 3 mg/kg when given on d 11-13 of pregnancy. Results obtained from the endometrial transformation test, the uteri cytoplasmic progesterone receptor estimation in immature rabbits, the deciduoma-inhibited test in pseudopregnant rats and the serum progesterone level in pregnant rats showed that RU-486 in combination with anordrin did not possess progestational, but rather marked antiprogestational activities. Since anordrin is relatively easy to obtain in China, RU-486 combined with anordrin may be ready to be used clinically as an effective oral antifertility agent.

KEY WORDS RU-486, anordrin: female contraceptive agents: decidua: progesterone receptors: drug combinations

摘要 RU-486 和双炔失碳酯合并用药后, 其对大鼠抗早孕的有效剂量从单独给药时的 8 mg/kg 降为 2.5 mg/kg, 抗中孕时从 10 mg/kg 降为 4 mg/kg, 显示两种药物具有显著的协同作用。RU-486 和双炔失碳酯合并用药能抑制假孕大鼠蜕膜瘤的生长, 抑制幼兔子子宫内膜增生, 使妊娠大鼠的血浆孕酮水平下降, 但与 RU-486 单独用药时无显著性差异。

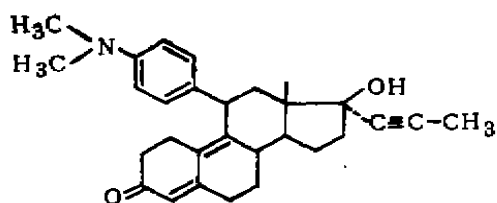
关键词 RU-486, 双炔失碳酯; 女用避孕药; 蜕膜; 孕激素受体; 合并用药

RU-486 (17 β -羟-11 β -4-二甲胺苯基-17 α -1-丙炔基雌甾-4, 9-双烯-3-酮) 是由法国 Roussel-Uclaf 公司首先合成的一种孕激素拮抗剂, 已经成功地应用于临床试验⁽¹⁾。它主要作用于子宫内膜或蜕膜细胞, 且作用专一, 主要与孕酮竞争结合胞浆孕酮受体, 从而阻滞孕酮活性, 中断妊娠⁽²⁾。现有的临床资料表明, 单独使用 RU-486 抗早孕的剂量较大(≥ 800 mg) 且完全流产率仅达 60-70%, 如与前列腺素(噻普酮)合用则抗早孕完全流产率可达 95%, 但其剂量没有显著下降⁽³⁾。双炔失碳酯(anordrin) 为国内自制的探亲避孕药, 在动物身上有一定的雌激素和抗雌激素活性^(4,5)。为此我们提出 RU-486 和 anordrin 合并用药的设想。本文对 RU-486 和 anordrin 合并用药的抗生育作用及其作用机理进行了初步的探讨。

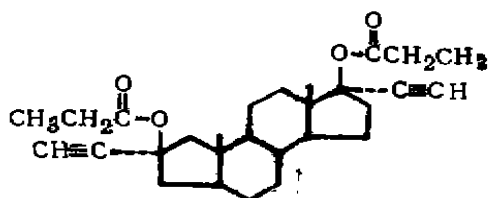
MATERIALS

RU-486 及 anordrin 由本所化学合成室李

Received 1988 Aug 20 Accepted 1988 Dec 13



RU-486



Anordrin

瑞麟等合成. RU-486 纯度为 99%, mp 194-6°C; Anordrin 纯度 98% 以上, mp 153-5°C. [³H]雌二醇 (3.7 TBq/mmol), [³H]R-5020 (3.12 TBq/mmol) 为美国 New England Nuclear (Du Pont Company) 产品.

孕酮放射免疫药箱由世界卫生组织提供.

实验动物采用 Sprague-Dawley 大鼠及新西兰种幼兔.

RU-486, anordrin 雌二醇和孕酮均溶解于茶籽油中.

METHODS AND RESULTS

RU-486 与 anordrin 合并用药的抗早孕及抗中孕试验 成年大鼠, 体重 $220 \pm SD 17$ g, 按 1 ♂ 2 ♀ 合笼交配, 每天 8:00 作阴道涂片, 发现精子者为受精阳性, 认作妊娠第一天 (d_1). 将妊娠大鼠随机分成对照组及不同剂量的单独给药组和合并用药组, 每组 8-10 只. 抗早孕组大鼠于妊娠 d_6-d_8 ig 给药, 抗中孕组于妊娠 $d_{11}-d_{13}$ ig 给药, 对照组 ig 茶籽油. 大鼠于妊娠 d_{16} 颈椎脱位处死, 检查妊娠情况, 记录胎仔数和着床点, 以观察药物的抗生育作用. 实验结果见 Tab 1. 在抗早孕试验中, RU-486 单独给药的剂量为 2.5 mg/kg 时, 抗早孕有效率仅为 12.5%, 剂量为 8 mg/kg 时抗早孕有效率方达 100%. Anordrin 单独给药的剂量为

2 mg/kg 时, 抗早孕有效率为 0%, 剂量增至 10 mg/kg 时有效率方达 100%, 而 RU-486 2.5 mg/kg 和 anordrin 2 mg/kg 合并用药时, 即能完全阻断大鼠的早期妊娠. 说明合并用药时的有效剂量低于单独用药时的有效剂量. 同样, 在抗中孕试验中, RU-486 单独给药 4 mg/kg 时, 抗中孕有效率仅为 10%, 达 10 mg/kg 时为 100%; anordrin 单独给药 3 mg/kg 时, 抗中孕有效率为 0%, 达 15 mg/kg 时也仅为 33%. 而两者合并用药时, RU-486 为 4 mg/kg, anordrin 为 3 mg/kg 即能完全阻断大鼠的中期妊娠, 说明合并用药后抗中孕的有效剂量也下降.

合并用药对蜕膜瘤形成的影响 成年 ♂ 大鼠 20 只, 体重 272 ± 28 g. 实验期间每天用 5 mg/kg 的氯丙二醇连续 ig, 使其具有交配功能而无生育能力. 给药后 d_6 与 40 只成年 ♀ 大鼠 (体重 192 ± 22 g) 合笼, 在 ♀ 鼠的阴道涂片上发现精子时算作假孕 d_1 , 于假孕 d_5 对 ♀ 鼠的一侧子宫进行机械外伤性刺激. 实验分对照组、anordrin 2 mg/kg 组、RU 486 2.5 mg/kg 组和 anordrin 2 mg/kg 合并 RU-486 2.5 mg/kg 组, 每组 5 只大鼠, 于假孕 d_5-d_6 ig 给药, 停药后 2 d 解剖, 观察蜕膜瘤发育情况, 称取两侧子宫的湿重. 结果见 Tab 2. 3 个给药组在所给剂量下, 都能抑制假孕大鼠蜕膜瘤的形成. 各给药组创伤侧子宫湿重与对照组创伤侧相比, 均有显著性差异. 合并用药组创伤侧子宫湿重与 RU-486 单独给药组创伤侧子宫湿重相比无显著性差异, 但与 anordrin 单独用

Tab 2. Decidua-inhibited effect of RU-486 and anordrin. $n = 5$, $\bar{x} \pm SD$. ** $P > 0.05$ vs control, †† $P < 0.05$ vs anordrin alone.

RU-486 mg/(kg·d)	Anordrin mg/(kg·d)	Uteri weight (g)	
		Control side	Damaged side
0	0	0.32 ± 0.19	1.6 ± 0.4
2.5	0	0.32 ± 0.11	$0.46 \pm 0.14^{**}$
0	2.0	0.17 ± 0.06	$0.21 \pm 0.08^{**}$
2.5	2.0	0.16 ± 0.02	$0.18 \pm 0.02^{**††}$

Tab 1. Antifertility effects of RU-486 and anordrin in rats. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$.

Group	RU-486 (mg/kg qd)	Anordrin	Medication on	Animals		Fetuses	
				Dosed	Pregnant	Alive	Dead
1	—	—	d ₆₋₈	10	10	117	0
2	1.5	2.0	d ₆₋₈	10	5*	37**	29
3	2.5	1.0	d ₆₋₈	10	6*	61*	1
4	2.5	2.0	d ₆₋₈	10	0***	0***	0
5	2.5	—	d ₆₋₈	8	7*	63*	0
6	8.0	—	d ₆₋₈	10	0***	0***	0
7	—	2.0	d ₆₋₈	8	8*	70*	0
8	—	10.0	d ₆₋₈	10	0***	0***	0
9	—	—	d ₁₁₋₁₃	10	10	108	0
10	4.0	3.0	d ₁₁₋₁₃	10	0***	0***	0
11	5.0	2.0	d ₁₁₋₁₃	10	2***	3***	0
12	5.0	—	d ₁₁₋₁₃	10	5*	40**	43
13	10.0	—	d ₁₁₋₁₃	10	0***	0***	0
14	—	3.0	d ₁₁₋₁₃	10	9*	90*	0
15	—	15.0	d ₁₁₋₁₃	9	6*	61*	39

药组有显著差异。

合并用药的孕激素和抗孕激素作用 幼兔♀兔 32 只, 体重 0.8 ± 0.1 kg. 于 d_{1-d}, sc 雌二醇 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ qd 随机分为 8 组. d_{6-d} 各组给药顺序和剂量如表 3 所示, 末次给药后 24 h 放血处死. 部分子宫作组织学检查, 观察药物对子宫内膜的影响, 余下的子宫用 TEGS 缓冲液 (Tris-HCl 10 mol/L, EDTA 1.5 mol/L, 巯基乙醇 2 mmol/L, 30% 甘油, pH 7.4 制成) 子宫胞浆液供受体测定用, 孕酮受体用放射配体受体结合法⁽⁷⁾测定. 蛋白含量用比色法⁽⁸⁾测定. 取胞质 200 μl 于含 R-5020 2 nmol/L 的 4 只试管中, 其中 2 只为总结合管, 另 2 只非特异性结合管同时加入 100 倍过量的 R-5020, 0°C 孵育 3 h 后, 加入 200 μl DCC 混悬液 (0.5% 活性炭和 0.05% 葡聚糖混悬于 TEGS 缓冲液中, 混匀, 于 4°C 放置 5 min. 然后 $3000 \times g$ 离心 30 min. 吸 200 μl 上清液加入到含 8 ml 甲苯闪烁液的计数杯中测定, 计算特异性结合的孕酮量, 以 fmol/mg 蛋白表示孕酮受体的量. 同法, 取 200 μl 上清液加入含 R-5020 1-12 nmol/L 的各反应管中, 非特异性结合管则相应加 100 倍过量的 R-5020. 用 Scatchard 法计算 R-5020 与子宫胞浆孕酮受体的解离常数⁽⁹⁾.

1 合并用药对子宫内膜转化的影响 幼兔子宫内膜组织学检查结果用 McPhail 分级指数表示. 结果表明 RU-486 和 anordrin 本身都没有孕激素活性, 但有拮抗黄体酮的作用. 两者合并用药时, 不表现孕激素活性, 其拮抗黄体酮的作用与 RU-486 和 anordrin 单独使用时无显著性差异.

2 子宫胞浆液孕激素受体含量 孕酮能使子宫孕酮-受体复合物 (P-R) 含量降低, 认为是加速 P-R 降解. 实验结果表明 RU-486 和 anordrin 本身没有孕激素作用, 与 17β 雌二醇组相比, 它的孕酮受体含量无显著变化. 两者合并用药时, 也不呈现子宫 P-R 降低的现象. 但 RU-486 和 anordrin 不论是单独使用或合并用药时, 都能拮抗孕酮使子宫 P-R 降低的作用, 合并用药与单独用药时的拮抗作用相比无显著性差异.

对妊娠大鼠血浆孕酮水平的影响 取成年 Sprague-Dawley 妊娠大鼠, 随机分成对照组, RU-486 组, RU-486 合并 anordrin 组, 每组 6 只. 于妊娠 d_{6-d} ig 给药, 从交配后 d₁ 起每隔 2 d 抽血一次, 血样在 20°C 保留 4-6 h, 然后 $1500 \times g$ 离心 20 min. 所得血清于 -20°C 保存, 用 RIA 法一次测定所有样品的孕酮含量.

Tab 3. Antiprogesterational activity of RU-486 and anordrin (Ano). Pro: progesterone. n = 4, $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$ vs estradiol (Est) alone.

Group	Schedule	On day	McPhail grade	Progesterone receptor (fmol/mg protein)
Est	5 μ g/kg 0.5 μ g/kg sc	d ₁₋₇ d ₈₋₁₁	0.5 \pm 0.2	146 \pm 47
Est Pro	5 μ g/kg sc 0.2 mg/kg sc	d ₁₋₇ d ₈₋₁₁	3.8 \pm 0.2	107 \pm 17**
Est RU-486	5 μ g/kg sc 3 mg/kg po	d ₁₋₇ d ₈₋₁₁	0.5 \pm 0.3	158 \pm 21*
Est Ano	5 μ g/kg sc 2 mg/kg ig	d ₁₋₇ d ₈₋₁₁	0.8 \pm 0.3	136 \pm 12*
Est Pro RU-486	5 μ g/kg sc 0.2 mg/kg sc 3 mg/kg ig	d ₁₋₇ d ₈₋₁₁ d ₈₋₁₁	2.5 \pm 0.4	135 \pm 29*
Est Pro Ano	5 μ g/kg sc 0.2 mg/kg sc 2 mg/kg ig	d ₁₋₇ d ₈₋₁₁ d ₈₋₁₁	2.0 \pm 0.3	128 \pm 22*
Est RU-486 Ano	5 μ g/kg sc 3 mg/kg ig 2 mg/kg ig	d ₁₋₇ d ₈₋₁₁ d ₈₋₁₁	0.5 \pm 0.1	151 \pm 26*
Est Pro RU-486 Ano	5 μ g/kg sc 0.2 mg/kg sc 3 mg/kg ig 2 mg/kg ig	d ₁₋₇ d ₈₋₁₁ d ₈₋₁₁ d ₈₋₁₁	1.5 \pm 0.4	137 \pm 36*

标准曲线及血样浓度用 logit 作图法计算。血浆孕酮含量用 nmol/L 表示，结果如 Fig 1 所示。给药后，对照组血浆孕酮水平持续上升至 365 nmol/L，而 RU-486 组和 RU-486 合并 anordrin 组于 d₇ 后，血浆孕酮水平分别逐渐下降至 65 和 151 nmol/L，两给药组 d₁₃ 和 d₁₆ 血浆孕酮水平与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。

毒性试验 成年 Sprague-Dawley 大鼠 8 只，连续 6 d ig 给药 RU-486 2.5 mg/kg 和 anordrin 2 mg/kg。于给药前、后分别取血，计数每 mm³ 的红、白血细胞数和血红蛋白含量，同时测定血清尿素氮和 GPT 值，停药后处死大鼠，肉眼观察心、肝、脾、肺、肾、子宫、肾上腺，并对上述器官作组织切片，用光镜检查组织学变化。结果所查器官无组织学的药理损害，红、白血细胞计数及肝、肾功能

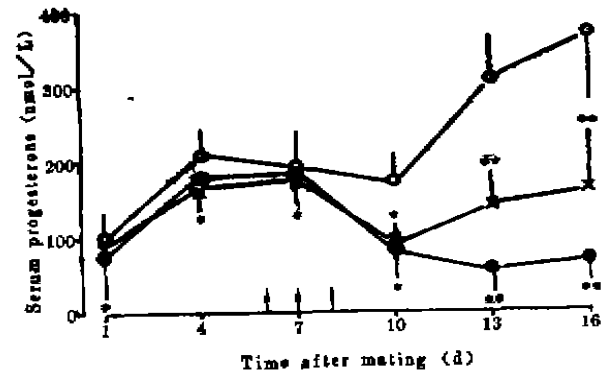


Fig 1. Serum progesterone levels in different groups of pregnant rats. The drugs were orally given (\uparrow) at the antifertility effective doses (\bullet RU-486 3 mg/kg or \times RU-486 2.5 mg/kg + Anordrin 2 mg/kg daily) on d₆₋₈ after mating. n = 6, $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$ vs control (\circ).

Tab 4. Effects of RU-486 2.5 mg/kg and anordrin 2 mg/kg on function of some organs in rats. n = 8, $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$ vs before medication.

Parameter	Before	After
SGPT (unit)	51.0 \pm 7.7	48.0 \pm 7.8*
Urea nitrogen (mg%)	21.3 \pm 3.1	22.6 \pm 3.5*
RBC (10 ⁶ /mm ³)	4.4 \pm 0.7	4.5 \pm 0.4*
WBC (10 ³ /mm ³)	15.3 \pm 3.7	12.2 \pm 1.8*
Hb (g%)	13.9 \pm 2.0	14.0 \pm 1.3*

给药前后也均在正常值范围内 (Tab 4)。

DISCUSSION

RU-486 和 anordrin 合并用药后有显著的抗生育协同作用，与单独用药相比，有效剂量显著下降。

黄体酮对维持假孕大鼠蜕膜瘤的形成及幼兔子宫内膜转化有重要作用。合并用药能抑制假孕大鼠蜕膜瘤的形成，拮抗黄体酮使幼兔子宫内膜的转化，并使妊娠大鼠血浆黄体酮水平下降，说明 RU-486 和 anordrin 合并用药后，仍可能通过抗黄体酮的途径发挥抗生育效应。

Anordrin 在动物身上有一定的雌激素活性和抗雌激素活性^(4,5)。RU-486 除了能与孕酮竞争结合胞浆孕酮受体外,还能增加子宫的肌收缩和对前列腺素的敏感性,提示 RU-486 和 anordrin 合并用药后,可能从不同环节阻断妊娠,加速流产。

由于 RU-486 和 anordrin 合并用药后,抗早孕和抗中孕的有效剂量明显下降,且在所用的剂量范围内无明显的毒副反应,本文的实验数据可为临床合并应用 RU-486 和 anordrin 提供线索和借鉴。

REFERENCES

- 1 Baulieu E-E. RU486 : An antiprogesterin steroid with contraceptive activity in women. In: Baulieu E-E, Segal SJ, eds. *The antiprogesterin steroid RU486 and human fertility control*. 1st ed. NY: Plenum Press, 1985: 1-25
- 2 Moguilewsky M, Philibert D. Biochemical profile of RU486. *Ibid* 1985: 87-97
- 3 Baulieu E-E, Ulmann A. RU486 (Mifepristone): clinical update. *Ibid* 1985:347
- 4 Ku CP, Chu MK, Chiang HC, Chao SH, Pang TW, Tsou K. Pharmacological studies of a contraceptive drug anordrin. *Sci Sin* 1975; 18 : 262
- 5 Mehta RR, Jenco JM, Chatterton RT Jr. Antiestrogenic and antifertility action of anordrin (2, 17-diethynyl-A-nor-5-androstane-2, 17-diol 2, 17-dipropionate). *Steroids* 1981; 38 : 679
- 6 Lu RF, Zou K. Experimental pharmacologic studies on the male antifertility agent-chlorohydrin and its analogues. *Acta Pharm Sin* 1979; 14 : 402
- 7 Bayard F, Damilano S, Robel P, Baulieu E-E. Cytoplasmic and nuclear estradiol and progesterone receptors in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 46 : 635
- 8 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 9 Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 1949; 51 : 660
- 10 Lefebvre Y. Effects of RU486 on cervical ripening. *Adv Contracept* 1988; 4 : 2

Instructions to authors

Please read *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10 : 1-6
Ann Intern Med 1988; 108 : 258-65
Br Med J 1988; 298 (6619) : 401-5

作者注意

本刊的《投稿须知》刊载在本刊 1989, 10 (1):1-6. 作者投稿、修稿时务请认真阅读并遵循其中各项规定,以减少退修次数,缩短刊登周期。