

7 O'Dea JPK, Wieland RG, Hallberg MC, Larena L, Zorn EM, Genuth SM. Effect of dietary weight loss on sex steroid binding, sex steroids, and gonadotropins in obese postmenopausal women. *J Lab Clin Med* 1979; 93: 1004

8 Song S, Zheng SH, Chen JK. Effects of

norethindrone visiting pool on serum levels of sex hormone binding globulin and ceruloplasmin in women. *Acta Pharmacol Sin* 1986; 7: 75

9 Fotherby K, Koetsawang S. Metabolism of injectable formulations of contraceptive steroids in obese and thin women. *Contraception* 1982; 26: 51

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1991 Mar; 12 (2) : 187-190

土荆皮甲酸和乙酸的内分泌活性和它们对性激素、前列腺素、子宫、胎儿的影响

王伟成、游根梯、蒋秀娟、陆荣发、顾芝萍 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国)

Endocrine activity of pseudolaric acids A and B and their effects on sex hormones, prostaglandins, uteri, and fetuses

WANG Wei-Cheng, YOU Gen-Di, JIANG Xiu-Juan, LU Rong-Fa, GU Zhi-Ping (*Shanghai Institute of Materia Medica, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*)

ABSTRACT Two novel diterpendoids, pseudolaric acids A and B (PA, PB) first isolated from the root of *Pseudolarix kaempferi* Gorden in China, have been reported to possess significant antifertile activities in rats, hamsters, rabbits, and dogs. The present study demonstrated that neither PA nor PB had estrogenic and antiestrogenic activities, they also did not inhibit deciduous formation. When an effective dose of PB 30 mg · kg⁻¹ was given on d 6 of pregnancy and the hormonal determinations were done on d 8 and d 12 of pregnancy, the progesterone, estradiol and prostaglandins E, F levels in plasma and the uterine prostaglandine E, F levels were not significantly reduced vs those of the control rats. The human uterus was used as the experimental material *in vitro*. PA and PB 200 μg · ml⁻¹ cultural medium (McCoy's 5a medium) damaged only a part of the decidual and trophoblast cells. In partially depolarized isolated uterine smooth muscles of early pregnant rats, PA and PB caused a decline in the

contractile tension. A low dose of PB 2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ was given ig on d 6-12 of pregnancy in rats caused the body weight and the length of fetuses and the placental weight value significantly lower than those of the control. Thus, ischemia due to the vasoconstrictor effect is probably of great, and sometimes of supreme, importance.

KEY WORDS pseudolaric acid; female contraceptive agents; progesterone; estradiol; prostaglandins; decidua; trophoblast

提要 土荆皮甲酸和乙酸(pseudolaric acids A, B; PA, PB)无雌激素和抗雌激素样活性,也无抗黄体酮活性,给药后妊娠大鼠血中孕酮值的下降是在胚胎死亡后发生的,培养液中含 200 μg · ml⁻¹ 的 PA 和 PB 不能完全杀伤离体培养的人的蜕膜及绒毛细胞。PA 和 PB 可使妊娠大鼠的离体子宫肌张力弛缓。在大鼠妊娠的 6-12 d 连续给 PB 2 mg · kg⁻¹ 使子鼠的体重,身长及胎盘的重量明显地小于正常组。

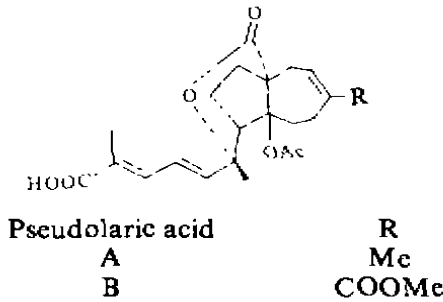
关键词 土荆皮酸; 女性避孕药; 黄体酮; 雌二醇; 前列腺素; 蜕膜; 滋养层

土荆皮甲酸和乙酸(pseudolaric acids A, B 简称 PA 和 PB 是从金钱松(*Pseudolarix kaempferi* Gorden)根皮中分离纯化的一类新型二萜类化合物⁽¹⁾, 它们对大鼠, 仓鼠, 兔及狗都有明显的抗生育作用^(2,3)。本文试通过测定 PA 和 PB 的内分泌活性, 检测化合物对体内甾

Received 1990 May 8

Accepted 1990 Dec 12

体激素及 PGE 和 PGF 的影响, 对离体培养的人的蜕膜, 滋养层细胞和对妊娠大鼠离体子宫肌张力的作用, 以及对胎儿的影响等几个方面来探索这两个化合物抗生育作用的机制。



MATERIALS

PA 和 PB 由中科院上海药物研究所植物化学研究室提取, 纯度 96.5% 混悬于 1% 羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC). 孕酮(progesterone), 雌二醇(estradiol)放射免疫药箱由 WHO 提供. PGE 和 PGF 放射免疫药箱由中国科学院北京动物研究所提供。

K⁺-Krebs' 溶液(KCl 28, NaCl 95, CaCl₂ 2.0, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, glucose 10 mmol · L⁻¹).

Wistar 大鼠和杂种小鼠由中国科学院上海分院动物中心提供。

METHODS AND RESULTS

雌激素活性实验 用体重 48.2 ± SD 1.6 g 的幼年♀大鼠, 分为 CMC 1% 乙炔雌二醇(Ethynylestradiol, EE)及 PA 和 PB 各 2 个抗生育有效剂量组 qd × 3 d 每组 10 只, 停药后 24 h 解剖, 称子宫重量, 求其与体重的比值, 并观察用药后阴道口的开闭情况, 结果(Tab 1)表明 EE 的 2 个剂量组大鼠的子宫重量有显著增加(P < 0.01)而 PA 与 PB 的 2 个剂量组与 CMC 组相比, 子宫重量无明显差别(P > 0.05)。

抗雌激素活性实验 用未成年♀小鼠 8.5 ± SD 0.5 g 分成 salad oil 组, EE 及 EE+PA 和

Tab 1. Estrogenic activity of pseudolaric acids A and B given by gavage for 3 d in immature (19-20 d) rats. n=7, $\bar{x} \pm SD$, *P > 0.05, ***P < 0.01 vs CMC 1%.

Drug	Dose (mg · kg ⁻¹)	Uterine weight /	
		Body weight (mg · kg ⁻¹)	Number of rats with vagina opened with cornified epithelial cells
CMC	0.2 ml	0.89 ± 0.1	0
EE	0.125	2.13 ± 0.2***	7
	0.25	2.57 ± 0.23***	7
PA	30	0.75 ± 0.1*	0
	60	0.88 ± 0.1*	0
PB	20	0.89 ± 0.1*	0
	40	0.86 ± 0.13*	0

EE+PB 两个剂量组, 每组 10 只小鼠, 连续 sc 给药 3 d, 停药后 24 h 解剖, 称子宫重量, 用 t 检验比较各组的子宫重量. Tab 2 表明 PA 或 PB 皆不能对抗 EE 所引起的子宫增重(P > 0.05).

Tab 2. Antiestrogenic activity of pseudolaric acids A and B in immature mice. n=10, $\bar{x} \pm SD$, *P > 0.05 vs EE, ***P < 0.01 vs salad oil.

Drug	Route	Dose (mg · kg ⁻¹)	Uterine wt (mg) / Body wt (g)
Salad oil	sc	0.2 ml	1.0 ± 0.3
EE	sc	0.1	3.0 ± 0.8***
PA	ig	30	1.1 ± 0.3*
PB	ig	20	0.96 ± 0.19*
EE + PA	sc + ig	0.1 + 20	3.0 ± 0.2*
EE + PA	sc + ig	0.1 + 30	3.1 ± 0.5*
EE + PB	sc + ig	0.1 + 10	3.0 ± 0.3*
EE + PB	sc + ig	0.1 + 20	3.0 ± 0.6*

抗黄体酮活性实验 用成年♂大鼠, ig 氯丙二醇 5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ × 5 d 使其具有交配功能, 但不能生育后代⁽⁴⁾在给药的 d 5, 将其与成年♀鼠合笼, 在阴道涂片上发现精子时为假孕 d 1, 取假孕♀鼠 36 只, 在假孕 d 4 对其一侧子宫角进行机械外伤性刺激, 使其产生蜕膜瘤反应, 同时将假孕大鼠分为三组, 每组 10 只, 对

照组 ig 1% CMC 0.5 ml, 给药组 ig PB 30 mg · kg⁻¹ 连续 3 d, 在假孕的 d 9 解剖, 分别称子宫角重量(Tab 3)给药组与对照组相比, 无差别($P > 0.05$), 说明 PB 没有抑制蜕膜瘤的作用。

Tab 3. Effect of pseudolaric acid B on decidualoma formation in pseudopregnant rats. PB was given on d 4, 5, 6 of pseudopregnancy. $n=12$, $\bar{x} \pm SD$, * $P > 0.05$ vs control.

Treatment	Dose (mg · kg ⁻¹)	Wt of uterine horn (mg)	
		Non-traumatized	Traumatized
Control	-	48 ± 5	515 ± 76
PB	10	46 ± 6	548 ± 103*
	20	50 ± 4	532 ± 94*

对妊娠大鼠血中孕酮及雌二醇水平的影响
实验分对照及给药组, 每组 10 只妊娠大鼠, 给药组在妊娠的 d 6 单次 ig PB 30 mg · kg⁻¹, 二组皆于妊娠的 d 8 和 d 12 取血, 测血中孕酮及雌二醇值。Tab 4 说明给药组在 d 8 及 d 12 血浆孕酮及雌二醇值与对照组相比, 无显著差异。

对妊娠大鼠血浆, 子宫及小肠的 PGE 和 PGF 的影响
取妊娠 d 6 的大鼠 40 只, 对照组 ig CMC 1% 0.5 ml, 给药组 ig PB 30 mg · kg⁻¹, 各组均于妊娠的 d 8 和 d 12 解剖, 取血, 子宫及小肠。将取出的血液, 立即注入放在 4℃ 冰浴中的含有 EDTA 和 Indomethacin 试

Tab 4. Effects of pseudolaric acid B on serum progesterone and estradiol in pregnant rats. PB was given on d 6 of pregnancy. $n=10$, $\bar{x} \pm SD$, * $P > 0.05$ vs control.

		Day of pregnancy	
		8	12
Progesterone (nmol · L ⁻¹)	Control	270 ± 150	345 ± 158
	Treated	259 ± 105*	332 ± 206*
Estradiol (pmol · L ⁻¹)	Control	125 ± 25	138 ± 18
	Treated	139 ± 25*	169 ± 13*

管中, 使 Indomethacin 5 μg · ml⁻¹ 和 EDTA 10 mg · ml⁻¹。取出的子宫及小肠组织, 快速冰冻, 取冰冻组织 100 mg 在冰浴中匀浆, 用无水乙酸乙酯提取, 上硅胶柱层析, 经苯, 乙酸乙酯, 甲醇等不同比例的溶剂系统洗脱, 分离出 PGE 和 PGF。Tab 5 说明用疗效剂量的 PB 对妊娠 d 8 和 d 12 大鼠血浆及子宫的 PGE 和 PGF 无显著影响($P > 0.05$), 而用药后小肠的 PGE 和 PGF 都较对照组为高($P < 0.01$)。

对早孕大鼠离体子宫肌张力的影响
用妊娠 d 6 大鼠, 脱颈椎处死, 取近卵巢端子宫段 1.5 cm 立即移入容积为 15 ml 的水浴管中, 内容 10 ml K⁺-Kreds' 一端固定于管底, 另一端与张力换能器相连, 用 XWT-204 型台式自动平衡记录仪, 记录张力变化, 水浴温度 32 ±

Tab 5. Effects of ig pseudolaric acid B on prostaglandins E and F concentrations of plasma, uterine and small intestine in pregnant rats. PB was given on d 6 of pregnancy. $n=8$, $\bar{x} \pm SD$, * $P > 0.05$, ** $P > 0.05$, *** $P > 0.01$ vs control.

	Group	PGE (ng · ml ⁻¹)		PGF (ng · ml ⁻¹)	
		d 8	d 12	d 8	d 12
Blood	control	0.7 ± 0.4	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.9
	treated	0.9 ± 0.5*	1.0 ± 0.5*	1.1 ± 1.0*	1.1 ± 0.9*
Uterine	control	PGE (ng · 100 mg ⁻¹)		PGF (ng · 100 mg ⁻¹)	
	treated	1.3 ± 0.5	1.0 ± 0.6	1.2 ± 0.9	1.4 ± 1.0
Small intestine	control	0.8 ± 0.3*	0.8 ± 0.3*	1.3 ± 1.0	1.4 ± 1.0*
	treated	1.2 ± 0.6	1.5 ± 0.7	1.3 ± 1.1	1.4 ± 1.1
		4.4 ± 1.7**	3.9 ± 1.9***	3.4 ± 2.0*	3.7 ± 0.9*

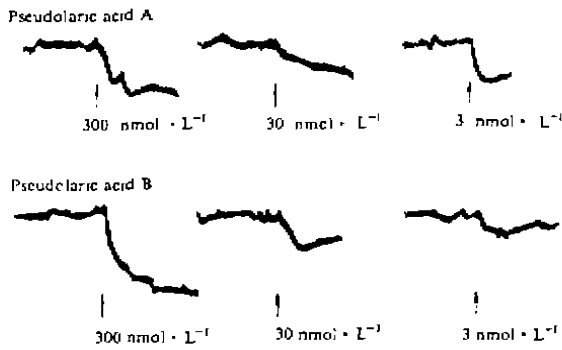


Fig 1. The relaxed effects of pseudolaric acids A and B on isolated uteri in early pregnant rats.

0.5℃, 持续通 95% O₂ + 5% CO₂ 调节基线张力在 0.8 g. Fig 1 说明 PA 和 PB 在 3-300 nmol · L⁻¹ 使早孕大鼠离体子宫肌张力弛缓.

对离体培养的人的蜕膜及绒毛细胞的影响用早孕 6-8 wk 人工流产的蜕膜及绒毛为材料, 蜕膜及绒毛细胞培养方法见⁽⁵⁾. 在培养的 d 2 给药, 观察 72 h - 96 h 的蜕膜及绒毛细胞变化, 结果显示 200 μg · ml⁻¹ 培养液的 PA 和 PB 可使部分的蜕膜及绒毛细胞固缩, 细胞内出现空泡等变化.

致畸试验 用小于疗效剂量的阈下剂量在大鼠妊娠的 6-12 d 连续给药, 观察到母鼠产下的仔鼠无畸形发生, 但仔鼠的体重, 身长及胎盘的重量均明显地小于正常对照组(Tab 6).

Tab 6. Effect of ig pseudolaric acid B 2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ for d 6-12 of pregnancy on fetus and placenta in rats. n=54, $\bar{x} \pm SD$, ***P>0.01 vs control.

	Control	Treated
Fetal wt (g)	4.2 ± 0.3	2.9 ± 0.4***
Fetal length (cm)	3.90 ± 0.2	3.10 ± 0.2***
Placental wt (g)	0.73 ± 0.15	0.29 ± 0.05***

DISCUSSION

本实验证明了 PA 和 PB 不具有雌激素和抗雌激素活性, 亦无抗黄体酮活性, 在大鼠妊

娠后 d 6 给予疗效剂量的 PB, 检查妊娠 d 8 和 d 12 血中孕酮和雌二醇含量没有下降, 显然 PB 的抗生育作用并非通过影响卵巢的功能. 用离体的人的蜕膜及绒毛细胞培养, 当 PA 或 PB 在培养液中的浓度达 200 μg · kg⁻¹ 时, 只能杀伤部分的蜕膜及绒毛细胞, 说明其抗生育作用部位也并非在蜕膜及滋养层细胞. PA 和 PB 在 3-300 nmol · L⁻¹ 可使早孕大鼠离体子宫的肌张力弛缓, 这正如 Tab 5 所示的结果相一致, 即 PB 在给药后, 妊娠大鼠血浆及子宫的 PGE 和 PGF 含量没有变化, 说明了药物使子宫肌张力弛缓与之无关, 也证明了 PA 和 PB 的抗生育作用环节不在上述的这些环节, 但是 PB 引起的小肠的 PGE 和 PGF 含量的显著增加, 却用来解释 PB 所致的胃肠道毒性作用, 如呕吐, 胃肠道出血等. 用小于疗效剂量的阈下剂量 2 mg · kg⁻¹ 的 PB, 在大鼠妊娠的 d 6-12 连续给药, 检查足日产下的仔鼠, 无畸形发生, 但仔鼠的体重, 身长及胎盘的重量均明显地小于正常对照组, 提示药物可能作用于母体血管系统, 使子宫的微血管收缩, 血流量减少, 而影响了母体对胚胎的血液供给, 这种对微血管的收缩作用, 在大剂量时, 可导致胚胎的死亡.

REFERENCES

- 1 Zhou BN, Ying BP, Song GQ, Chen ZX, Han J, Yan YF. Pseudolaric acids from *Pseudolarix kaempferi*. *Planta Med* 1983; 47 : 35
- 2 Wang WC, Lu RF, Zhao SX, Zhu YZ. Antifertility effect of pseudolaric acid B. *Acta Pharmacol Sin* 1982; 3 : 188
- 3 Wang WC, Lu RF, Zhao SX, Gu ZP. Antifertility effects and toxicity of pseudolaric acid A. *Reprod Contracep* 1989; 9 (1) : 34
- 4 Ericsson RJ, Youngdale GA. Male antifertility compounds: Structure and activity relationships of U-5897, U-15, 646 and related substances. *J Reprod Fert* 1970; 21 : 263
- 5 Lu SS, Sheng JY, Zhao JX. The human decidual cell *in vitro*. *Reprod Contracep* 1980; (12): 53