

雌二醇衍生物: 子宫增重雌活性和子宫胞质液受体亲和力的关系

汤仲明 陈美云 张全 (军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100800)

提要 比较了雌二醇 (E_2) 及其 19 个衍生物与家兔子宫胞液受体结合的亲和力和化合物对幼♀小鼠子宫的增重作用。15 个化合物(75%)整体中促子宫增重作用与离体中受体亲和力并行。甾体和受体的结合取决于甾体 A 环的芳香性; 是否存在 3 和 17 β 位羟基功能团; B 和 C 环的反式构型以及 11 位的疏水性。除 17 α 乙炔取代外, 任何结构或立体改变均使化合物与受体的亲和力降低。

关键词 雌二醇衍生物; 构效关系; 雌性活性; 胞液雌激素受体

雌激素和其靶器官胞浆受体 (ER) 的结合是激素引起生物学作用的重要环节之一⁽¹⁾。激素和受体的相互作用表现出高度的亲和性和特异性, 可在离体简单体系中显示出来, 所以很适宜进行构效关系的研究。本文利用氚标记雌二醇 ($[^3H]E_2$) 和家兔胞液 ER 的结合为实验模型, 研究非放射性雌二醇 (E_2) 及其衍生物对上述结合反应的竞争性抑制作用, 并与衍生物在整体给药时对小鼠子宫增重的雌性活性作用进行比较, 企图了解雌激素类药物和 ER 结合的构效关系, 以及这种结合与整体生物学作用的关系。

材料和方 法

$[^3H]E_2$ 由中国科学院上海生物化学研究所合成, 38 Ci/mmol 经薄层和 Sephadex LH₂₀ 柱层析检查, 放射性纯度分别为 98% 和 95%。

非放射性竞争性抑制剂如表 1 所示, 其中 E_1 , E_2 为 Rossel 厂产品, 睾酮、皮质酮和考的松 Organon 产; 雌二醇衍生物由本所马成禹、童曾寿、甘贵之, 北京医学院药理学系凌仰之、谭家益, 和上海十二制药厂合成提供。多数化合物经元素分析、质谱、核磁和红外分析鉴定。

ER 的制备 ♀家兔, 体重 $2.5 \pm (SD) 0.3$

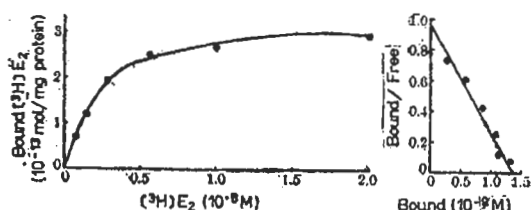


Fig 1. Binding curve and Scatchard plot of $[^3H]$ estradiol to cytosol estrogen receptor, $K_a = 1.4 \times 10^9 M^{-1}$

kg, 乙醚麻醉下切除双侧卵巢, 一周后活杀取子宫, 在 $4^\circ C$ 制成匀浆 (TED 缓冲液), 取 $105,000 \times g$ 离心 1 h 的上清液, 封存安瓿内于液氮中保存备用。根据 Scatchard 推导的函数用最小二乘法计算 K_a , 8 次实验结果: $K_a = 1.3 \pm 0.5 \times 10^9 M^{-1}$; 结合部位 757-211 fmol/mg 蛋白 (见图 1)。

竞争性试验 0.19 ml 反应体系中含上述胞液 40 μl (蛋白约 0.28 mg), $[^3H]E_2$ 约 10 nCi, 不同量的非放射性竞争性抑制剂 (一般为 5-8 个浓度), 将反应液混匀, 于 $4^\circ C$ 放置 20 h。加入右旋糖酐活性碳吸附剂 0.5 ml, 震荡, 离心, 取上清液, 置于 POPOP-TP 二甲苯闪烁液 8 ml 中, 震荡淬取, 放置过夜后在 LKB RackBeta II 型液闪仪测定其放射性。所测得的 $[^3H]E_2$ 为与 ER 结合的放射性, 当无竞争性抑制剂时, 结合的 $[^3H]E_2$ 为 B_0 ; 有竞争剂和 $[^3H]E_2$ 竞争受体时, 则结合量降低为 B, 故

结合率 (p) = $\frac{\text{有抑制剂时结合的 } [^3H]E_2 \text{ 量 (B)}}{\text{无抑制剂时结合的 } [^3H]E_2 \text{ 量 (B}_0)}$

将抑制剂的克分子浓度的负对数与抑制率作图

可得到抑制曲线, 纵座标转换为 $\log\left(\frac{p}{1-p}\right)$

呈直线关系 (见图 2), 即为 Hill plot。用最小二乘法拟合直线回归方程可计算 $[I]_{50}$, 其定义是当 $[^3H]E_2$ 和 ER 的结合率被抑制至 50%

($p=0.50$)时的抑制剂的克分子浓度。 $\log\left(\frac{1}{[I]_{50}}\right)$ 则为抑制指数,化合物抑制指数相差1,表示达到50%抑制所需的抑制剂浓度相差10倍,以此作为抑制活力的量度。从直线回归方程可以计算95%可信限,其计算方法为 $x \pm t \cdot [SE(x)]$ 文中 x 为抑制剂克分子浓度倒数的对数即; $\log\left(\frac{1}{[I]_{50}}\right)$ 其中 $SE(x)$ 为标准误差 $SE(x) = \left| \frac{s}{b} \right| \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}}$, x_i 和 x 分别为各点(i)的抑制剂浓度 $\log\left(\frac{1}{[I]}\right)$;
 $s = \sqrt{\frac{(Y_i - \hat{Y})^2}{(N-2)}}$, N 为测定的浓度点数, b 为回归方程的斜率, Y 为 $\log\left(\frac{p}{1-p}\right)$ 其中 Y_i 为观测值, \hat{Y}_i 为估算值, t 为自由度为 $N-2$ 时的 t 值。此外我们曾对 E_2 进行10次测定,其 $\log\left(\frac{1}{[I]_{50}}\right)$ 为 8.67 ± 0.21 ,实验误差与从曲线估算相近。

雌性活性试验 ♀小鼠,日龄20—22d,随机分组,各组5只。药物溶于医用花生油,sc剂量0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500 μ g/鼠, qd \times 3d, 对照给油。小鼠于d4活杀。对照组子宫重量为 16.1 ± 4.8 mg($n=42$); 将给药组子宫平均值减去同批对照组子宫平均值与剂量的mole数的负对数作图可以得到一条剂量反应曲线。人为地规定子宫净增值为20mg所对应的药量为有效药量(ED)以便进行比较 $\log\left(\frac{1}{ED}\right)$ 为雌活性指数。根据对部分药物重复试验结果,表明雌活性指数是比较稳定与灵敏的指标,如化合物17不同时间的三批实验分别为9.40, 9.42和9.40。故活性相差一个对数单位(剂量相差10倍)可以认为活性有明显差别⁽²⁾。

结 果

甾体结构与竞争性抑制活性的关系 表1

按化合物抑制活性数值大小顺序排列,发现:

1. 活性和甾核结构有关 抑制作用强的

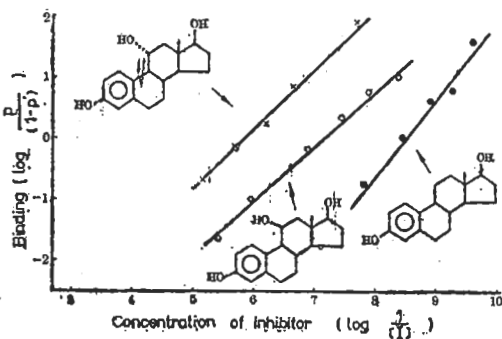


Fig 2. Competitive inhibition of $[^3H]$ estradiol binding to receptor by non-radioactive inhibitors. Binding ratio (p) = Bound $[^3H]E_2$ in system with inhibitor / Bound $[^3H]E_2$ in system without inhibitor

化合物都是1,3,5(10)雌三烯的衍生物。在试验浓度范围内未见睾酮(化合物23)和考的松(化合物24)的抑制作用。皮质酮(化合物16)的活性为 E_2 的1/800; 18甲雌甾衍生物(化合物20)活性极弱。然而1,3,5(10)雌三烯母核(化合物18)作用极弱,说明必须有活性基团才有活性。

2. 3和17 β 羟基是两个必需的活性基团,雌甾引入17 β 羟基后(化合物14),活性增强5倍;再引入3位羟基形成天然雌激素 E_2 (化合物1),活性再增强300倍,是被试化合物中抑制活性最强者。非甾体雌激素己烯雌酚(化合物5),具有立体结构近似的两个羟基,亦有强抑制活性。3位酚羟基似乎比17 β 羟基更重要,因3羟基环戊醚化(化合物13和17),或甲醚化(化合物21)均使活性急剧减弱,11 β 羟基改为羰基(化合物1和4)活性仅减低一半,或无大变化(化合物10和11比较)。

3. 甾核其它部位的取代可影响活性 2位甲基取代后活性降低约35倍;16 α 羟基取代(化合物6和3),或16位脞基取代(化合物10和11),或16 β 甲基取代(化合物21)均使活性明显降低。但17 α 乙炔基取代的作用则不同, E_3 (化合物6); 17 α 乙炔取代后活性增加(化合物3); E_2 17 α 乙炔取代后活性数值略见下降,但无统计意义(化合物2)。

4. 立体结构和活性有密切关系 同样都

Tab 1. Comparison of affinity to receptors and estrogenicity of estradiol derivatives. Affinity to receptors: $\log [p/(1-p)]$. Estrogenicity: $\log (1/ED)$

| No. | Compound | Structure | Affinity to receptor | Estrogenicity |
|-----|---|-----------|----------------------|---------------|
| 1 | Estradiol-3, 17 β (E ₂) | | 8.67 ± 0.16 | 10.35 |
| 2 | 17 α -ethynylestradiol-3, 17 β | | 8.54 ± 0.43 | 10.45 |
| 3 | 17 α -ethynylestriol-3, 16 α , 17 β | | 8.30 ± 0.36 | 9.51 |
| 4 | Estrone(E ₁) | | 8.18 ± 0.20 | 9.33 |
| 5 | Diethylstilbestol (DES) | | 8.12 ± 0.11 | — |
| 6 | Estriol-3, 16 α , 17 β (E ₃) | | 7.90 ± 0.26 | 7.96 |
| 7 | 11 β -methoxy-estradiol-3, 17 β | | 7.89 ± 0.21 | 10.58 |
| 8 | 11 β -hydroxyl-estradiol-3, 17 β | | 7.22 ± 0.11 | 7.86 |
| 9 | 2-methyl-estradiol-3, 17 β | | 6.97 ± 0.14 | 9.02 |
| 10 | 16-oximido-estrone | | 6.97 ± 0.17 | 7.41 |
| 11 | 16-oximido-estradiol-3, 17 β | | 6.79 ± 0.66 | 7.52 |
| 12 | 11 α -methoxy-estradiol-3, 17 β | | 6.72 ± 0.26 | 6.18 |
| 13 | 3-cyclopentyloxy-estriol-3, 16 α , 17 β | | 6.42 ± 0.21 | 9.35 |
| 14 | 1,3,5(10)estriene-17 β -ol | | 6.05 ± 0.33 | 8.33 |
| 15 | 11 α -hydroxyl-estradiol-3, 17 β | | 5.94 ± 0.32 | <6.0 |

| | | | | |
|----|--|--|-----------------|-----------------|
| 16 | corticosterone | | 5.66 ± 0.36 | < 6.0 |
| 17 | 3-cyclopentyloxy-estrien-17 β -ol | | 5.52 ± 0.65 | 9.42 ± 0.06 |
| 18 | 1,3,5(10)estriene | | 5.37 ± 0.13 | 7.29 |
| 19 | 11 α -methoxy-9 β -hydrogen-estradiol-3, 17 β | | 5.15 ± 0.50 | 7.18 |
| 20 | 11 α -methoxy-18-methyl-estradiol-3, 17 β | | 4.80 ± 0.25 | < 6.0 |
| 21 | 3-methoxy-16 β -methyl-estra-1, 3, 5(10)-trien-17-ol | | 4.41 ± 1.03 | < 6.0 |
| 22 | A-nor-androstane-2 α ,17 α -diethynyl-2 β , 17 β -dipropionate | | < 6.16 | 8.60 |
| 23 | Testosterone | | < 4.68 | < 6.0 |
| 24 | Cortisone | | < 4.81 | < 6.0 |

* The 95% confidence limits are obtained by multiplying the respective estimated errors by the appropriate value of Student's *t* for *n*-2 degrees of freedom.

是11位羟基或甲氧基取代， α 位取代异构体的活性比 β 取代异构体的活性弱10倍以上，表现出 β 效应。

B和C两环的构型对活性也有明显影响。9 β 氢11 α 甲氧基雌二醇(化合物19)，其B、C两环为顺式构型，活性比反式构型的异构体(化合物12)弱40倍，表明天然雌激素的B、C两环的反式构型更有利于和ER结合。

5. 疏水性效应 比较11位取代的5个化合物(即化合物1, 7, 12, 8, 16)的活性和层析参数 R_F 值的关系。板层在同一块硅胶板上展开，展开剂为丙酮:苯(2:8)，其 R_F 值分别为0.56, 0.40, 0.27, 0.097, 0.05,其顺序和抑制活性大致相符，相关系数 $r = 0.88, p < 0.05$ 。结果表明11位引入OH使亲水性增强，活性

减弱，羟基甲醚化后，虽位阻增大，但亲脂性增强，活性仍增强。提示配基与ER的相互作用与局部的疏水性作用有关。

离体亲和力活性与整体雌活性的比较 大多数(75%)衍生物在离体试验中和受体结合的亲和力强弱顺序和衍生物在整体皮下给药时对子宫增重的雌活性顺序是一致的，虽然两者的实验条件是根本不同的。然而必须着重指出两者仍有一些明显的差别。

3羟基的环戊醚化在离体使活性明显降低，但整体给药时，甚至有增强雌活性作用。

离体实验时11- β 羟基的甲醚化(化合物7和8)增强抑制活性约4倍，但整体实验时，后者的雌活性比前者强2000倍。

B和C两环顺式结构的化合物19,在体外

试验时较反式构型异构体弱 43 倍,但整体给药时活性增强 10 倍。

讨 论

本研究中 75% 的雌二醇衍生物在离体中与子宫胞液 ER 的亲力和整体实验中对子宫增重作用的强弱顺序一致,及天然 E_2 活性最强等事实和其它研究^(5,6)都表明雌激素特有的雌活性作用,与化合物和胞浆受体的结合有关。然而因为亲和力试验可在体外简单系统中定量研究,因而在构效关系研究中有特别重要意义。

$[^3H]E_2$ 和 ER 有高度的亲和力,平衡结合常数 K_a 约为 $10^9-10^{10} M^{-1}$ 。当反应系统中存在竞争性抑制剂时,抑制剂 I 与 $[^3H]E_2$ 竞争数量有限的受体结合部位,使与受体结合的 $[^3H]E_2$ 量减少,抑制曲线取决于抑制剂和 ER 的亲和力即抑制剂和受体结合的常数 K_i 及抑制剂的浓度。 $[I]_0$ 是和 K_i 有关的参数,故可作为抑制剂与受体亲和力的量度⁽³⁾。

实验结果表明甾体与 ER 的亲和力与化合物的结构密切相关。细微变化可使亲和力相差达千倍,表现出高度的专一性,即配基和 ER 上的结合部位分子微细结构和理化性质的严格匹配。其中涉及立体、电性和疏水性等多方面的相互作用。其具体特点包括:平面芳香性 A 环; B、C 两环反式构型; 3 和 17 β 位游离活性羟基; 11 位的疏水性结合; β 效应和其它各部位的匹配。因为雌甾类相对而言属于刚性化合物,而 ER 是由-S-S-键相连折叠的蛋白大分子。因此推测甾体小分子和受体蛋白大分子的相互作用时可能是涉及分子整个立体结构, A 环平面结构,甾体的 β 面, 3 和 17 β 活性基团和 11 位疏水作用的多点结合,而猜想受体上的结合部位可能是受体表面的某个深沟,甚至是囊状的结构。

本研究中有 5 个衍生物的整体活性和离体亲和力不一致。其中某些可能和代谢、转运、分布等因素有关,例如 3 环戊醚 E_2 (化合物 17)

在离体的亲和力,因 3 位活性羟基被环戊醚化而明显降低,但我们发现在体内可去环戊醚,生成和受体有高亲和力的 E_2 ,在整体给药后在血液和组织均可测到 E_2 浓度的增高,从而可以解释离体和整体活性的差异;由于 3-环戊醚 17 α 乙炔雌二醇在体内也可代谢生成炔雌醇⁽⁴⁾,从而推测化合物 13 也可能存在类似的代谢途径。关于 17 β 甲氧基 E_2 (化合物 7) 本实验也观察到和 Raynaud 等相似的结果,他们还发现此衍生物在血浆中与血浆性激素结合球蛋白 (SHBG) 结合力低,游离药物浓度较 E_2 高,代谢速率较 E_2 慢,越过细胞膜的能力较 E_2 强,从而最终产生较强的整体雌活性作用⁽⁶⁾。

因为整体中药物的生物学作用是一个极复杂的过程,除了药代动力学的影响外,还有其它因子。配基和受体形成复合物仅是多个重要环节中的一环,激素的作用还取决于复合物的活化,转入细胞核和接受物 (acceptor) 结合以及启动随后一系列复杂的生化过程,最后才导致宏观的子宫增重效应。各衍生物对这个复杂过程的作用还知道很少,尚需研究。

致谢 得到中国科学院生物化学研究所张友端和景沛教授的支持和帮助

参 考 文 献

- 1 姚连生. 生物化学与生物物理进展 1981 年 1 月, (1): 11
- 2 汤仲明、吴加金、毛效求、陈美云、黎耀明. 药学报 1980 年 7 月, 15(7): 410
- 3 Levitzki A. Quantitative aspects of ligand binding to receptors. In: Schulster D, Levitzki A, eds. *Cellular receptor for hormones and neurotransmitters*. 1st ed. NY: Wiley, 1980: 10-28
- 4 Cargill DI, Steinetz BG, Gosnell E, Beach VL, Meli A, Fujimoto GJ, Reynolds BM. *J Clin Endocrinol Metab* 1969 Jul; 29 (7): 1051
- 5 Raynaud J-P, Bouton M-M, Gallet-Bourquin D, Philibert D, Tournemine C, Azadian-Boulnef G. *Mol Pharmacol* 1973 Jul; 9 (4): 520
- 6 Barkova TI, Chernyaev GA, Ananchenko SN, Sorokina IB, Mataradze GD, Rozen VB. Estradiol analogs: Relationship between estrogenic activity and affinity to cytosol and nuclear receptors of

rabbit uterus. In: Vassilevapopova JG, Jensen EV, eds. *Biophysical and biochemical information*

transfer in recognition. 1st ed. NY: Plenum Press' 1979:207-15

Acta Pharmacologica Sinica 1983 Sep; 4 (3) : 186-191

ESTRADIOL DERIVATIVES: RELATIONSHIP BETWEEN UTEROTROPIC ACTIVITY AND AFFINITY TO CYTOSOL RECEPTOR

TANG Zhong-ming, CHEN Mei-yun, ZHANG Quan

(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800*)

ABSTRACT The affinities of estradiol and its 19 derivatives to cytosol receptors of rabbit uterus *in vitro* were studied by measuring their abilities to inhibit the binding of [³H]estradiol to the receptors with reference to their uterotrophic activities in premature mice. The uterotrophic activities of 15 estradiol analogs *in vivo* were roughly parallel to their affinities to the receptors *in vitro*. The binding of steroids with receptors was dependent upon the aromatic character of the ring A of the steroid structure,

the presence of 3 and 17 β -hydroxyl functional group, the trans-configuration of B and C rings, and the hydrophobic characteristics at 11 position of steroid molecule. Any structural or steric changes except 17 α -ethynyl substitution resulted in a decrease of steroid affinity to the receptors.

KEY WORDS estradiol derivatives; structure-activity relationship; estrogenic activity; cytosol estrogen receptors