动物学报 47(4):412～418, 2001
Acta Zoologica Sinica

米非司酮对离体大鼠垂体细胞促黄体激素分泌的影响及其机制*

朱四军[①②] 庄临之[①] 谢衷明[②] 徐一树[①] 赵白鸽[②]**

(① 中国科学院动物研究所，北京 100080)

(②上海市计划生育科学研究所，上海 200032)

摘 要 本实验应用垂体细胞体外培养模型，观察了米非司酮（MP）对 GnRH、高浓度细胞外 K^+ （$[K^+]_e$）和蛋白激酶 C 激活剂 PMA 诱导的 LH 分泌的影响。结果证实 MP 可以剂量和时间依赖方式抑制 GnRH 诱导的 LH 分泌，并可拮抗 P 调节 GnRH 诱导的 LH 分泌效应。同时发现 10^{-7}mol/L MP 短时间处理 4 h 能抑制 60 mmol/L KCl 和 10^{-8} mol/L PMA 诱导的 LH 分泌，而 10^{-7} mol/L P 短时间处理则起促进作用。当处理时间延长为 52 h 时，P 对 60 mmol/L KCl 和 10^{-8} mol/L PMA 诱导的 LH 分泌无明显作用，P 也仅对 60 mmol/L KCl 刺激的 LH 分泌起抑制作用，但不影响 10^{-8} mol/L PMA 诱导的 LH 分泌。当 P 和 MP 同时处理时，则 MP 可逆转 P 对高 $[K^+]_e$和 PMA 诱导的 LH 分泌的调节作用，表明 MP 影响 GnRH 诱导的 LH 分泌的机制可能与 MP 影响电压依赖性钙离子通道和 PKC 的活性有关。

关键词 大鼠 垂体细胞 米非司酮 孕酮 促黄体激素 电压依赖性钙离子通道 钾离子 蛋白激酶 C

米非司酮（MP）作为一种有效的流产药物已广为人们所知。近年来发现 MP 应用于育龄妇女具有抑制卵泡发育、延迟排卵、溶解黄体及诱导月经等作用，使其有望发展成为一种有效的避孕药而应用于生育调控（Baulieu *et al*., 1993）。除了对卵巢及子宫内膜的直接作用外，整体动物实验（南震宇等，1992）和应用垂体细胞体外培养模型（Wolf *et al*., 1989）已证实 MP 也能直接作用于垂体影响促性腺激素释放激素（GnRH）诱导的促卵泡激素（FSH）、促黄体激素（LH）分泌，但不影响 FSH、LH 的基础分泌水平，然而有关其作用机制至今仍未得到阐明。

已有文献报道，雌二醇（E_2）、孕酮（P）调节促性腺细胞对 GnRH 的反应性，其机制除与调节 GnRH 受体表达有关外（McArdle *et al*., 1992; Emons *et al*., 1992），也涉及 GnRH 受体信号转导过程中的某些环节，如细胞内 Ca^{2+} 反应，蛋白激酶 C（PKC），电压依赖性 Ca^{2+} 通道（VSCC）及磷酸肌醇系统的代谢等（McArdle *et al*., 1992; Emons *et al*., 1992; Drouva *et al*., 1990）。本文采用培养的雌性成年大鼠垂体前叶细胞为模型，观察了 MP 对 GnRH、细胞外高浓度 K^+ （$[K^+]_e$）和 PKC 激活剂 Phorbol 12-myristate-13-acetate（PMA）诱导的 LH 分泌的影响，以探讨 MP 影响垂体 LH 分泌是否与 VSCC 及 PKC 有关。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雌性 SD 大鼠，体重 200～250 g，均购自中国科学院动物研究所实验动物室。

1.2 试剂

雌二醇、孕酮、GnRH、PMA 和 *DNase* Ⅰ 为 Sigma 公司产品；F12 和 DMEM 培养基购自 Gibco 公司；胎牛血清由中国医学科学院天津血液学研究所生产；胶原酶和透明质酸酶 Boeh-ringer-Mannheim 公司产品；$Na^{125}I$ 购自 Du Pont 公司；米非司酮由上海市计划生育科学研究所药物合成室研制；碘标用羊 LH（oLH）由上海市计划生育科学研究所生殖生物学室制备；oLH 标准品、兔抗 oLH 抗血清、羊抗兔 IgG 血清由中国科学院动物研究所内分泌室制备。

1999-08-20 收稿，2000-04-06 修回

* 中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室资助项目

** 通讯作者 E-mail: zaobaige@public.east.cn.net

第一作者简介 朱四军，男，29，硕士。研究方向：神经生殖内分泌。E-mail: sijunzhu@students.uiuc.edu

1.3 实验方法

1.3.1 垂体前叶细胞培养及药物处理 大鼠垂体前叶细胞培养参考 Vale 等 (1972) 的方法并作适当改进。简述之，断头取出垂体前叶，尽可能剪碎，然后用 0.25%胶原酶 + 0.1%透明质酸酶 + 10 μg/ml *DNase* Ⅰ于 37℃消化 60～75 min，未消化组织加新鲜酶液继续消化 30～45 min，直至组织块完全分散成单个细胞或小细胞团。细胞按 2.5×10^5 个/ml/孔接种于 24 孔培养板。培养液为 Ham F12 + DMEM (dubecco modified eagle median) 1∶1 (简称 FD 培养液)，外加 10%活性炭处理过的胎牛血清。细胞置于含 95%空气、5%CO_2、饱和湿度、37℃培养箱中，培养 3 天后，加药处理。当 MP 和 P 进行短时间 (4 h) 处理时，细胞先用 3×10^{-9} mol/L E_2 处理 52 h，期间最后 4 h 在培养液中加入 10^{-7} mol/L MP 或 10^{-7} mol/L P 或 10^{-7} mol/L MP + 10^{-7} mol/L P。在长时间处理组中，10^{-7} mol/L MP 或 10^{-7} mol/L P 或 10^{-7} mol/L MP + 10^{-7} mol/L P 与 3×10^{-9} mol/L E_2 同时处理 52 h。对照组用 3×10^{-9} mol/L E_2 处理 52 h，在培养结束前再加入 10^{-9} mol/L GnRH 或 10^{-8} mol/L PMA 或 60 m mol/L K^+ 刺激 3 h，收集培养液，存于 −20 ℃待测 LH。各实验均重复 2～3 次，每次每个处理组样本数为 4 孔。

1.3.2 LH 放射免疫测定 培养液中 LH 含量测定采用中国科学院动物研究所内分泌室制备的羊 LH (oLH) 放免试剂。兔抗羊 LH 抗血清 1∶15 000 稀释，羊抗兔 IgG 1∶3.5 稀释，^{125}I-oLH 每管 17 000 cpm 左右、灵敏度为 0.125～32 ng。

1.3.3 数据处理 以所测得的对照组平均值为 100%，其它处理组与其相比较，以 0 百分数表示各处理组培养液中 LH 相对含量。数据用平均数 ± 标准误表示。Students *t* 检验比较各组间差异的显著性，$P<0.05$ 为差异显著。

2 结 果

2.1 垂体前叶细胞对 GnRH 的反应

在垂体细胞培养 3 天后，用不同浓度 (10^{-11} − 10^{-6} mol/L) 的 GnRH 激发 3 h，LH 分泌呈典型的剂量反应曲线 (图 1)。在 10^{-10} mol/L 时 GnRH 即能明显促进 LH 的分泌；随 GnRH 剂量的增加，LH 分泌量也随之上升，GnRH 浓度为 10^{-7} mol/L 时，分泌达最高，为对照组的 325.2 ± 45.9%。当 GnRH 浓度增高至 10^{-6} mol/L 时，LH 分泌则开始下降，但仍然明显高于对照组。

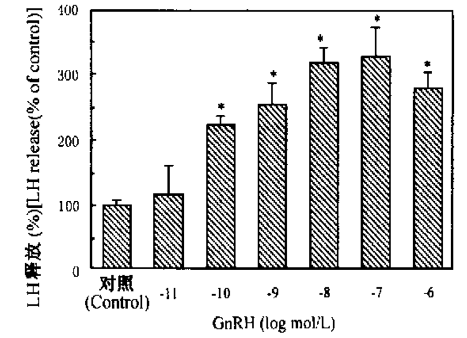

图 1 GnRH 激发大鼠垂体细胞 LH 分泌的量效关系

Fig.1 Dose-effect of GnRH on LH release by rat pituitary cells

* $P<0.05$ 与对照组比较 (Compared with control)

2.2 米非司酮对 GnRH 诱导 LH 分泌的影响

MP 对 GnRH 诱导 LH 分泌的影响因其处理时间而异。短时间处理 4 h，在 10^{-9} mol/L − 10^{-5} mol/L 范围内 MP 均可明显抑制 GnRH 激发的 LH 分泌，但量效关系不明显 (图 2)。当处理时间延长至 52 h，只有在浓度达到 10^{-5} mol/L 时，才出现显著的抑制效应 (图 3)。

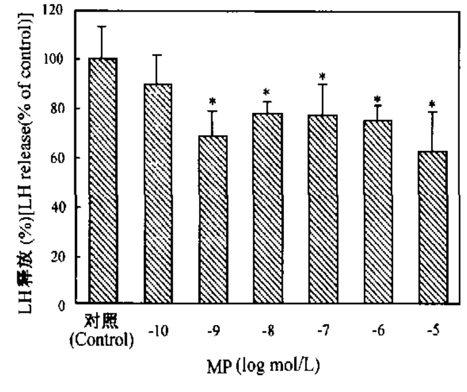

图 2 MP 短时间处理抑制 GnRH 诱导的 LH 分泌的量效关系

Fig.2 The effect of long-term MP treatment on GnRH-induced LH release by rat pituitary cells

* $P<0.05$ 与对照组比较 (Compared with control)

2.3 米非司酮对孕酮调节 LH 分泌效应的影响

如图 4 所示，P 能双向调节体外培养的垂体细胞对 GnRH 的反应性。用 P 处理 4 h 可使 GnRH 诱导的 LH 分泌增加至 121.9%，而长时间处理 (52 h) 则可使 LH 分泌减少 21.6%。当 MP 与 P

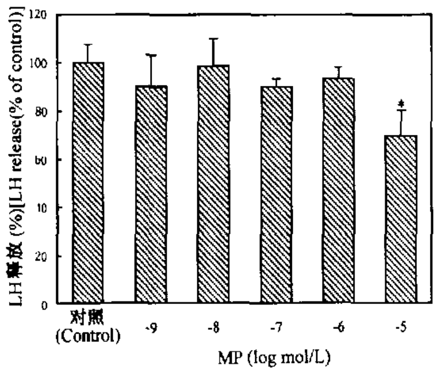

图 3 长时间 MP 处理 GnRH 诱导 LH 分泌的影响

Fig.3 The effect of long-term MP treatment on GnRH-induced LH release by rat pituitary cell

* $P<0.05$ 与对照组比较（Compared with control）

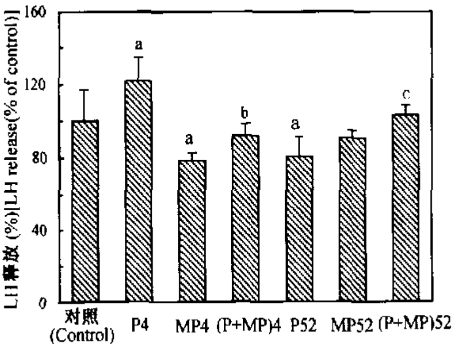

图 4 MP 对孕酮调节 GnRH 诱导 LH 分泌作用的逆转

Fig.4 Reversal by MP of the progesterone action on GnRH-induced LH release *in rat pituitary cells*

a：$P<0.05$ 与对照组比较（Compared with control）

b：$P<0.05$ 与 P4 组比较（Compared with control）

c：$P<0.05$ 与 P52 组比较（Compared with control）

同时处理时，MP 可逆转 P 的这种双向调节作用。

2.4 米非司酮对高 K^+ 激发 LH 分泌的影响

已知细胞外高浓度 K^+（$[K^+]_e$）能激活垂体细胞膜上的电压依赖性 Ca^{2+} 通道（VSCC）而触发 LH 分泌。为了探讨 MP 影响 GnRH 诱导 LH 分泌的机制是否与 VSCC 有关，实验进一步观察了 MP 对 60 mmol/L KCl 激发 LH 分泌的影响。从图 5 可以看出，MP 处理 4 h 可显著抑制高 $[K^+]_e$ 诱导的 LH 分泌，但处理 52 h 者则无明显作用。与 MP 的作用相反，P 短时间处理可显著增加高 $[K^+]_e$ 诱导的 LH 分泌，而长时间处理却表现为抑制效应。当 P 与 MP 同时处理时，P 的增强和抑制效应均被 MP 所拮抗。

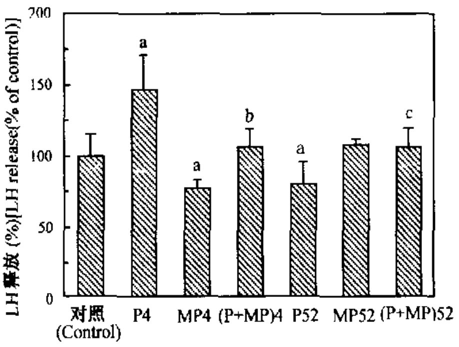

图 5 MP 和孕酮对高 $[K^+]_e$ 诱导 LH 分泌的影响

Fig.5 Effects of MP and progesterone on high $[K^+]_e$-induced LH release by rat pituitary cell

a：$P<0.05$ 与对照组比较（Compared with control）

b：$P<0.05$ 与 P4 组比较（Compared with control）

c：$P<0.05$ 与 P52 组比较（Compared with control）

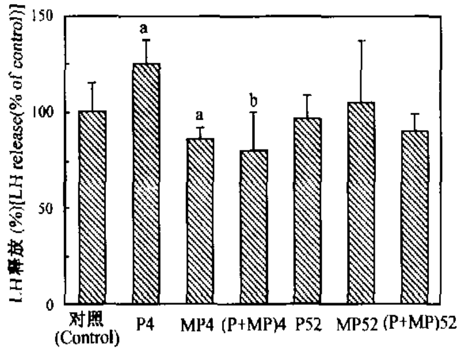

图 6 MP 和孕酮对 PMA 诱导 LH 分泌的影响

Fig.6 Effects of MP and progesterone on high PMA-induced LH release by rat pituitary cell

a：$P<0.05$ 与对照组比较（Compared with control）

b：$P<0.05$ 与 P4 组比较（Compared with control）

2.5 米非司酮对 PMA 刺激 LH 分泌的影响

图 6 显示细胞经 MP 处理 4 h 可在一定程度上抑制 PMA 诱导的 LH 分泌，而短时间处理 P 则促进 PMA 诱导 LH 分泌，若将 P 与 MP 同时处理 4 h，MP 可拮抗 P 的促进作用。但长时间处理时，不论是 MP、P 还是 MP + P，对 PMA 诱导 LH 分泌均无显著影响。

3 讨 论

实验所用分离和培养的成年雌性大鼠垂体细胞能稳定的对外源 GnRH 的刺激产生反应，而且呈现明显的剂量依赖关系，10^{-8}～10^{-7} mol/L GnRH 可使 LH 分泌量增加 3 倍左右，当最高剂量（10^{-6} mol/L）时 LH 分泌呈现下降趋势，表明培养的细胞具有正常的 LH 分泌功能。

临床研究表明，MP 应用于正常月经周期妇女，能抑制卵泡期（Permezel *et al*., 1989）或黄体期（Garzo *et al*., 1988）LH 的分泌，或延迟 LH 峰的出现（Batista *et al*., 1992），继而影响到卵巢功能。MP 影响垂体 LH 分泌，除与下丘脑 GnRH 合成和分泌受 MP 抑制（Sanchez-Criado *et al*., 1994）有关外，文献中曾报道（Ortmann *et al*., 1989）在有和无 E_2 维持的垂体细胞中，MP 只有在高达 10^{-5} mol/L 的浓度时才表现出抑制效应。但本实验结果不但证实了 MP 能直接减少垂体细胞由 GnRH 诱导的 LH 分泌，且起效剂量低而反应剂量范围广（10^{-9}～10^{-5} mol/L），不过这种抑制作用只有在短时间（4 h）处理时才比较明显，而长时间（52 h）处理时，只有在 10^{-5} mol/L 时表现出抑制作用，表明 MP 的作用依赖于 E_2 诱导的孕酮受体（PR）的表达（实验所用的垂体细胞均经 E_2 处理 52 h）；而在 MP 处理 24～52 h 后，可能使 PR 下调，从而使垂体细胞对 MP 的敏感性降低。Turgeon 等（1999）曾报道 P 具有抑制其受体的作用，而 MP 可呈现微弱孕激素激动剂的作用。至于为何 MP 抑制 GnRH 诱导的 LH 分泌不呈现典型的剂量依赖关系，尚难解释，在一些文章中也观察到类似的情况（Ortmann *et al*., 1989）。

MP 对 GnRH 诱导培养的垂体细胞 LH 分泌的影响以及拮抗 P 调节 GnRH 诱导的 LH 分泌的作用，在一定程度上可以解释临床观察到的 MP 在月经周期不同阶段对 LH 分泌的影响。如 MP 降低 GnRH 诱导 E_2 预处理的垂体细胞 LH 的分泌类似于卵泡中晚期服用 MP 后 LH 分泌受抑制的现象，此时血液中 E_2 处于高水平（Permezel *et al*., 1989）；而 MP 拮抗短时间处理 P 促进 GnRH 诱导的 LH 分泌的作用可以在某种程度上解释 MP 延迟 LH 峰出现的机制（Batista *et al*., 1992）。但 MP 拮抗长时间处理 P 抑制 GnRH 诱导的 LH 分泌的作用则难以解释育龄妇女在黄体期服用 MP 后 LH 的分泌进一步受抑制的现象（Garzo *et al*., 1988），其原因可能是 MP 对 LH 分泌的影响是对下丘脑和垂体综合作用的结果。

Kiesel（1993）认为 GnRH 诱导垂体 LH 的分泌主要由胞浆内 Ca^{2+} 所介导。GnRH 与受体结合后，一方面经磷酸肌醇系统动员钙库内 Ca^{2+} 释放，另一方面激活细胞膜上 VSCC 而促使细胞外 Ca^{2+} 内流，从而使胞浆内 Ca^{2+} 浓度（$[Ca^{2+}]_i$）升高。促性腺细胞内的分泌囊泡经 Ca^{2+} 介导与质膜融合而释放 LH。此外，GnRH 与受体结合可激活 PKC，PKC 通过调节 GnRH 诱导的钙离子信号而间接影响 LH 分泌。

已有报道 P 具有双向调节大鼠促性腺细胞的 VSCC 活性（Ortmann *et al*., 1994），在子宫平滑肌细胞（Perusquia *et al*., 1994）和人精子（Yang *et al*., 1994）中也观察到 MP 具有抑制 Ca^{2+} 内流的作用。为探讨 MP 影响 GnRH 诱导的 LH 分泌是否也与膜上 VSCC 有关，实验观察了 MP 对高 $[K^+]_e$ 刺激的 LH 分泌的影响。已知高 $[K^+]_e$ 刺激 LH 分泌是由于高 $[K^+]_e$ 的去极化作用激活了 VSCC 而使 Ca^{2+} 内流的结果，本实验发现短时间处理 MP 能降低高 $[K^+]_e$ 刺激的 LH 分泌，表明 MP 影响 GnRH 诱导的 LH 分泌的机制之一是 MP 抑制了促性腺细胞膜上 VSCC 活性。VSCC 包括 L 型（双氢砒啶敏感型）和 T 型（非双氢砒啶敏感型）2 种（Tsien *et al*., 1990），由于高 $[K^+]_e$ 激活 VSCC 并不具有特异性，究竟 MP 作用于 VSCC 的哪一种亚型，需要进一步深入研究。

由于在 GnRH 诱导 LH 分泌过程中，PKC 具有重要的调节作用（Kiesel, 1993），包括对 VSCC 进行了磷酸化修饰而使 VSCC 活化。Ortmann 等（1994）与 Drouva 等（1990）曾报道 E_2 和 P 的反馈调节作用也与 PKC 有关。为进一步探讨 MP 影响 GnRH 诱导的 LH 分泌机制，我们还观察了 MP 对 PKC 激活剂 PMA 激发 LH 分泌的影响。实验结果表明：细胞经短时间 MP 处理能抑制 PMA 刺激的 LH 分泌，并能拮抗短时间 P 处理对 PMA 诱导 LH 分泌的促进作用。提示 MP 影响 GnRH 诱导 LH 分泌的另一机制可能是抑制了 PKC 的活性。但 MP 对促性腺细胞 PKC 活性和胞浆 Ca^{2+} 的影响可能并不相互关联，就如在精子中 P 可以同时刺激 Ca^{2+} 内流和 PKC 活性。有文献报道 P 刺激 Ca^{2+} 内流并不依赖于 PKC 的激活（Bonaccorski *et al*., 1998），而可能与 P 介导的 Cl^- 外流有关（Meizel *et al*., 1997）。

MP对促性腺细胞VSCC和PKC的影响提示其作用并不是由经典的位于核内的P受体介导。对精子（Blackmore *et al.*，1991）和颗粒细胞（Machelon *et al.*，1996）的研究表明，在细胞表面存在P受体，P与其受体结合后，除激活VSCC和PKC外，还使细胞内三磷酸肌醇（IP_3）增加而动员Ca^{2+}库内Ca^{2+}的释放，并且不受霍乱毒素的影响；而MP对Ca^{2+}内流和内Ca^{2+}动员均起抑制作用。提示细胞表面P受体可能与霍乱毒素非敏感性G蛋白偶连。由此推测在促性腺细胞膜上可能也存在着类似的P受体，但目前尚未见报道。

由于GnRH诱导LH分泌是一个复杂的过程，介导LH分泌的Ca^{2+}不仅包括经膜上钙通道内流的Ca^{2+}，也包括由IP3介导的从钙库释放的Ca^{2+}；而且GnRH诱导LH分泌还有不依赖于Ca^{2+}的途径，如经花生四烯酸及其代谢产物介导的LH分泌（Kiesel，1993），并且也受P的调节（Ortmann *et al.*，1992）。因而MP对VSCC和PKC活性的影响只是MP影响GnRH诱导LH分泌的部分机制。除了这些受体后环节外，MP也可能与P一样经调节促性腺细胞GnRH受体的表达而影响LH的分泌（Emons *et al.*，1992）。因而要完全阐明MP的作用机制还需进行很多的工作。

致谢 米非司酮由上海市计划生育研究所李瑞麟研究员提供，实验中得到罗淑宜老师的帮助，特此一并致谢。

参 考 文 献（References）

Batista, M. C., T. P. Cartledge, A. W. Zellner, L. K. Nieman, G. R. Merriam and D. L. Loriaux 1992 Evidence for a critical role of progesterone in the regulation of the midcycle gonadotropin surge and ovulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74**: 565～570.

Baulieu, E. E. 1993 Clinical Application of Mifepristone RU486 and other Antiprogestins. *In*: Donaldson, M. S. *et al.* ed. *RU486-A Decade on Today and Tomorrow*. Washington D. C.: National Academy Press, 71～120.

Blackmore, P. F., J. Neulen, F. Lattanzio and S. J. Beebe 1991 Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J. Biol. Chem.* **266**: 18 655～18 659.

Bonaccorski, L., C. Krausz, P. Pecchioli, G. Forti and E. Baldi 1998 Progesterone-stimulated intracellular calcium increase in human spermatozoa is protein kinase C-independent. *Mol. Hum. Reprod.* **4**: 259～268.

Drouva, S. V., I. Gorenne, E. Laolante, E. Rerat, A. Enjalbert and C. Kordon 1990 Estradiol modulates protein kinase C activity in the rat pituitary *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* **126**: 536～544.

Emons, G., E. U. Frevert, O. Ortmann, U. Fingscheidt, R. Sturm, L. Kiesel and R. Knuppen 1989 Studies on the subcellular mechanisms mediating the negative estradiol effect on GnRH-induced LH release by rat pituitary cells in culture. *Acta Endocrinol.* (*Copenh*) **121**: 350～360.

Emons, G., J. Nill, R. Sturm and O. Ortmann 1992 Effects of progesterone on gonadotropin-releasing hormone receptor concentration in cultured estrogen-primed female rat pituitary cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **42**: 831～839.

Garzo, B. G., J. Liu, A. Ulmann, E. E. Baulieu and S. S. Yen 1988 Effects of an antiprogesterone (RU486) on the hypothalamic-hypophyseal-ovarian-endometrial axis during the luteal phase of the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **66**: 508～517.

Kiesel, L. 1993 Molecular mechanisms of gonadotrophin releasing hormone-stimulated gonadotrophin secretion. *Hum. Reprod.* **8** (**Suppl 7**): 23～28.

Machelon, V., F. Nome, B. Grosse and M. Leiberherr 1996 Progesterone triggers rapid transmembrane calcium influx and/or calcium mobilization from endoplasmic reticulum, via a pertusis insensitive G-protein in granulosa cells in relation to luteinization process. *J. Cell Biochem.* **61**: 619～628.

McArdle C. A., E. Schomerus, I. Groner and A. Poch 1992 Estradiol regulates gonadotropin-releasing hormone receptor number, growth and inositol phosphate production in αT3-1 cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **87**: 95～103.

Meizel, S., K. O. Turner and R. Nuccitelli 1997 Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* **182**: 677～685.

Nan, Z. Y., W. Y. Lu, W. M. She and C. M. Hsieh 1992 Effect of RU486 on anterior pituitary responsiveness to GnRH in female rats. *Reprod. Contracep.* **12**: 19～23. [南震宇、陆文燕、余微明、谢衷明 1992 RU486处理后大鼠垂体前叶对GnRH反应的影响. 生殖与避孕 **12**: 19～23.]

Ortmann, O., G. Emons, R. Knuppen and K. J. Catt 1989 Inhibitory effects of the antiprogestin, RU486, on progesterone actions and luteinizing hormone secretion in pituitary gonadotrophs. *J. Steroid Biochem.* **32**: 291～297.

Ortmann, O., K. Johannsem, R. Knuppen and G. Emons 1992 Acute effects of oestradiol and progesterone on melittin- and gonadotrophin-releasing hormone-induced LH secretion. *J. Endocrinol.* **132**: 251～259.

Ortmann, O., F. Merelli, S. S. Stojilkovic, K. Schulz, G. Emons and K J. Catt 1994 Modulation of calcium signaling and LH secretion by progesterone in pituitary gonadotrophs and clonal pituitary cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **48**: 47~54.

Permezel, J. M., E. A. Lenton, I. Roberts and I. D. Cooke 1989 Acute effects of progesterone and the antiprogestin RU486 on gonadotropin secretion in the follicular phase of the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **68**: 960~965.

Perusquia, M and C. Kubli-Garfias 1994 Progesterone-like relaxant effect of RU486 in the rat myometrium. *Life Sci.* **54**: 1 501~1 506.

Sanchez-Criado, J. E., G. Hernandez, C. Bellido, D. Gonzaler, M. Tebar, M. A. Diaz-Cruz and R. Alonso 1994 Periovulatory LHRH, LH and FSH secretion in cyclic rats trested with RU486: effects of exogenous LHRH and LHRH antagonist on LH and FSH secretion at early oestrus. *J. Endocrinol.* **141**: 7~11.

Tsien, R. W. and R. Y. Tsien 1990 Calcium channels, stores, and oscillations. *Ann. Rev. Cell Biol.* **6**: 715~760.

Turgeon, J. L., S. M. Van Patten, G. Shyamala and D. W. Waring 1999 Steroid regulation of progesterone receptor expression in cultured rat gonadotrops. *Endocrinology* **140**: 2 318~2 325.

Vale, W., G. Grant, M. Amoss, R. Blackwell and R. Guillemen 1972 Culture of enzymatically dispersed anterior pituitary cells: functional validation of a method. *Endocrinology* **91**: 562~566.

Wolf, J. P., D. R. Danforth, A. Ulmann, E. E. Baulieu and G. D. Hodgen 1989 Contraceptive potential of RU486 by ovulation inhibition. Ⅲ. Suppression of pituitary gonadotropin secretion *in vitro*. *Contraception* **40**: 185~193.

Yang, J., C. Serres, D. Philibert, P. Robel, E. E. Baulieu and P. Jouannet 1944 Progesterone and RU486: opposing effects on human sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 529~533.

外 文 摘 要 (Abstract)

EFFECT OF MIFEPRISTONE ON GONADOTROPIN SECRETION AND ITS MECHANISM IN CULTURED PITUITARY CELLS*

ZHU Si-Jun①② ZHUANG Lin-Zhi① XIE Zhong-Ming②
XU Yi-Shu① ZHAO Bai-Ge②**

(① *Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080, *China*)
(② *Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai* 200032, *China*)

Clinical research has observed that Mifepristone (MP) could decrease gonadotropin secretion when it was administrated to the woman with normal menstrual cycle, whereas its undelying mechanisms are poorly understood. In this study, the action of MP on GnRH-, high extracellular K^+ ($[K^+]_e$)-, Phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA)-induced LH release in cultured rat anterior pituitary cells was investigated. The anterior pituitaries of the female mature Sprague Dawley rats were dissociated with 0.25% collagenase, 0.1% hyaluronadase and 10 μg *DNase* Ⅰ according to the method from Vale. Isolated pituitary cells were cultured with Ham F12 and Dulbecco modified Eagle Medium 1∶1 supplemented with charcoal treated fetal calf serum for three days and then exposed with MP or/and hormones. In short term treatment groups (4-hour treatment), cells were exposed in 3×10^{-9} mol/L estaradiol (E_2) for 52 hours first and then 10^{-7} mol/L MP or 10^{-7} mol/L progesterone (P) or 10^{-7} mol/L MP + 10^{-7} mol/L P was added in the medium at the last 4 hours of culture. In long term treatment groups, cells were exposed in 3×10^{-9} mol/L E_2 semitaneously with either MP or P or MP + P for 52 hours and then treated with 10^{-9}mol/L GnRH or 10^{-8} mol/L PMA or 60 mmol/L K^+ for another 3 hours. The collected media were stored at −20℃ for luteinizing hormone (LH) radioimmunoassay. The results demonstrated that MP could inhibit GnRH-induced LH secretion in a dose- and time-dependent manner and also antagonized the regulatory effect of P on GnRH-induced LH secretion. Further studies showed that 4 hours treatment

* This work was supported by the State Key Laboratory of Reproductive Biology

** Corresponding author E-mail: zhaobaige@public.east.cn.net

of MP could decrease KCl and PMA stimulated LH release and in contrary, P augmented KCl and PMA stimulated LH release. In the long term treatment groups, neither KCl nor PMA induced LH secretion was influenced by P, but P could inhibit the KCl stimulated LH secretion. When MP was treated concomitant with P, both stimulatory and inhibitory effects of P on the high $[K^+]_e$ and PMA induced LH secretion were reversed by MP ($P<0.05$). These data indicate that the mechanisms of the MP action on GnRH-induced LH secretion probably through both the modulation of voltage sensitive Ca^{2+} channels (VSCC) and PKC activity.

Key words Rat, Pituitary cell, Mifepristone, Progesterone, Luteinizing hormone, Voltage sensitive calcium channel, K^+, Protein kinase C