

雌酮和 16,17-吡唑雌酮对大鼠子宫雌激素受体的作用

王迺功 李和平 张均田

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

提要 16, 17-吡唑雌酮(16,17-PES)是一个以雌酮为母体而合成的雌酮衍生物。前曾报道, 它的雌激素样活性仅为雌酮的 1/3 或 1/15, 但却具有与雌酮相同的降血脂作用。本研究用大鼠重复了雌激素活性的测定, 获得与过去相似的结果。同时证明, 它们的雌激素活性与子宫雌激素受体浓度之间存在着平行关系, 即经雌酮和 16,17-PES 处理的动物, 无论按每个子宫所含受体数目或每 mg 蛋白所含受体浓度, 前者均显著高于后者。但体外试验表明, 二者取代³H-雌二醇与雌激素受体结合的竞争曲线几乎完全重叠, 说明二者对受体的亲和力是相等的。大鼠注射同一剂量的雌酮和 16,17-PES 后, 它们在子宫内的分布量分别为 69.0 和 38.4 $\mu\text{g/g}$, 这一结果可用来解释二者雌激素活性的差异, 也可解释子宫受体数目的差异。油水分布系数的测定未能说明雌酮和 16,17-PES 在子宫分布量的不同。

关键词 雌酮; 16,17-吡唑雌酮; 雌激素活性; 雌激素受体

雌激素可用于治疗高脂血症, 但因其性激素作用, 限制了它在临床上的用途⁽¹⁾。数年前, 我们曾用饲喂高胆固醇引起高脂血症的大鼠做为模型, 对一系列雌酮衍生物的降血脂作用和雌激素样活性进行了研究, 发现 16,17-PES 有与雌酮相同的降血脂作用, 而其雌激素样作用仅为雌酮的 1/3 或 1/15⁽²⁾。应如何解释这两种化合物雌激素活性的差异? 我们对两种化合物在子宫内的分布及对雌激素受体的影响进行了研究, 现报道如下。

材 料 和 方 法

1. 实验动物

实验所用为雌性大鼠, 成年鼠体重 200~240g, 幼鼠体重 100~150g。做体内受体试验时, 于实验前 7 天切除双侧卵巢, 实验前 3 天每天皮下注射雌酮或 16,17-PES 一次, 剂量分别为 0.2, 0.5 和 1.0 $\mu\text{g/kg}$; 做体外竞争受体试验时, 将动物断颈处死, 取出子宫供受体分析。

2. 胞浆制备

取大鼠子宫, 剪开, 去除宫腔液, 置盛有 2ml (Tris 10 mM, EDTA 1.5 mM, DTT 1 mM, pH 7.4) 缓冲液中, 用 Polytron (set 7) 制匀浆 2 次, 每次 10 s, 加 TED 缓冲液至 5 ml, 2000 r/min 离心 10 min, 倾出上清液, 再经 24000 $\times g$ 超速离心 20 min, 收集上清液, 即胞浆受体液。全部操作在 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。

3. 受体分析⁽³⁾

将 250 μl 受体液, 50 μl ³H-雌二醇 (终浓度 20 nM) 混合, 非特异性结合管投入己烯雌酚

(终浓度 $2\mu\text{M}$)，体外受体竞争实验则投入不同浓度的雌酮或 17,16-PES，总反应体积均为 $350\mu\text{l}$ 。各浓度均做三管平行测定。反应液置冰浴 5 min 后放入 30°C 水浴 30 min，取出后再置冰浴 5 min 以终止反应，立即加入活性炭/葡聚糖悬浮液，将游离 ^3H -雌二醇吸附，结合 ^3H -雌二醇经 2300 r/min 离心后存在于上清液中，倾出后加甲苯闪烁液放置 24 h，用 Beckman LS-9800 液体闪烁测定仪测比放射性。总结管减去非特异性结合管的 DPM 即得特异性结合的 DPM。

按 Lowry 法⁽⁴⁾测定受体液蛋白含量。

4. 子宫内雌酮和 16,17-PES 含量的测定

将 4 只已切除双侧卵巢的雌大鼠分成两组，一组 (2 只) 皮下注射雌酮 1.5 mg/kg ，另一组 (2 只) 则注射 17,16-PES 1.5 mg/kg ，连续 3 天，末次给药后次日处死动物，取出子宫，剪碎，匀浆，离心，取出上清液，加 80% 酒精洗 2 次，将酒精减压蒸馏至干，加石油醚溶解沉淀物，置水浴中蒸发，最后加入正丁醇，在 281 nm 下测紫外吸收强度。

5. 油水分布系数测定⁽⁵⁾

用辛醇溶解雌酮和 16,17-PES 使成 $40\mu\text{g/ml}$ ，分别测其紫外吸收强度。另取 0.5 ml 浓度为 1 mg/ml 的辛醇液加入 200 ml 水中，在分液漏斗中振摇 20 分钟，离心，取 0.2 ml 上清液，加辛醇至 5 ml ，测紫外吸收强度。从前后紫外吸收峰的克分子吸收系数之差即可求出油水分布系数。

结 果

(一) 雌酮和 16,17-PES 对大鼠子宫雌激素受体的作用

1. 体内试验—对雌激素受体数目的影响 由图 1、2 可见，经雌酮处理的幼年大鼠，其子宫所含雌激素受体数随雌酮剂量的递增而有明显增加，按受体数/子宫或受体数/mg 蛋白表示均得相同结果；相反，经 16,17-PES 处理的大鼠，其子宫受体浓度处于低水平，随药物剂量的增加，受体数略有增加或变化不大。用成年大鼠做试验所得结果与幼年大鼠极其相似。

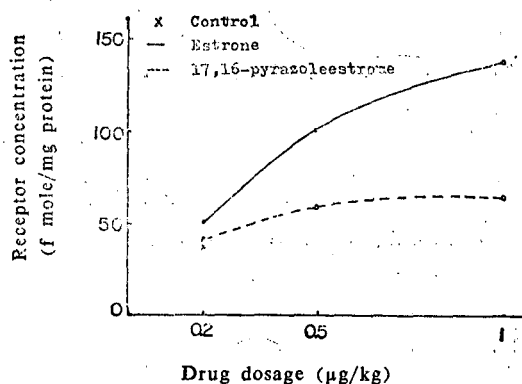


Fig 1. Effects of estrone and 16, 17-pyrazole-estrone on estrógen receptor concentration of uterus in rats

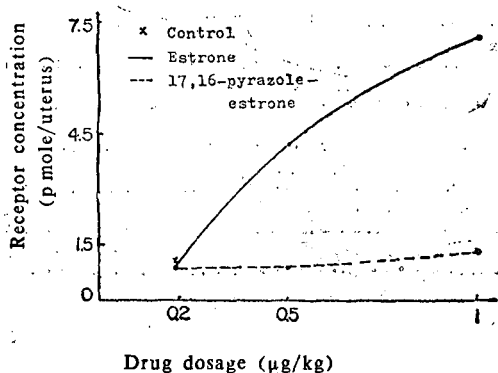


Fig 2. Effects of estron and 16, 17-pyrazole-estrone on estrogen receptor concentration of uterus in rats

2. 体外试验—对雌激素受体亲和力的测定 将雌酮和 16,17-PES 分别与放射配基 ^3H -雌二醇及大鼠子宫胞浆一起温孵，得两化合物取代 ^3H -雌二醇与雌激素受体结合的竞争曲

线。由图 3 可以看出, 随两个被试物浓度的增加, 与受体结合的 ^3H -雌二醇逐渐为该化合物所取代, 但两个化合物的竞争曲线几乎完全重叠, 从竞争曲线求得的 IC_{50} 也十分接近, 说明雌酮和 16,17-PES 对雌激素受体有相等的亲和力。

(二) 雌酮和 16, 17-PES 对大鼠子宫重量的影响

上述经注射雌酮和 16,17-PES 的大鼠, 取其子宫称重, 可以评价两个化合物的雌激素活性。从图 4 可见, 随着雌酮剂量的增加, 子宫重量也相应增加; 但 16,17-PES 在所给剂量范围内并不促进子宫增重, 说明它的雌激素活性很弱。将图 4 跟图 1,2 对比观察, 可见子宫重量也即雌激素活性与子宫受体数目之间具有明显的相关性。

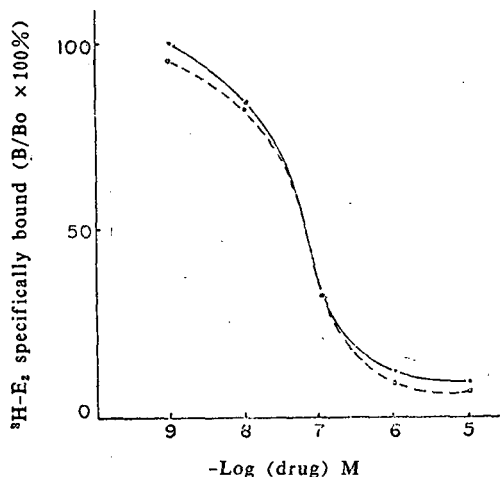


Fig 3. Competition of estrone (—) and 16, 17-pyrazoleestrone (---) with ^3H -E₂ for specific binding to estrogen receptors of rat uterus. The IC_{50} of estrone and 16,17-pyrazoleestrone were 0.16×10^{-7} and 0.13×10^{-7} respectively

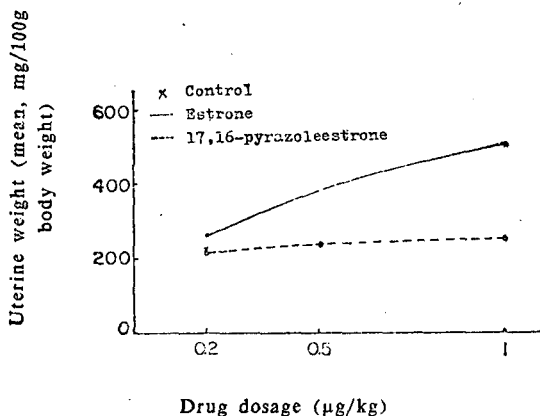


Fig 4. Effects of estrone and 16,17-pyrazoleestrone by SC. administration on uterine weight in female rats

(三) 雌酮和 16, 17-PES 在大鼠子宫内的分布

给去卵巢大鼠分别注射同等剂量的雌酮和 16,17-PES, 连续 3 天, 然后取动物子宫, 测被试物在子宫内的分布量。结果如下: 雌酮组为 69.3(59.6, 78.9) $\mu\text{g/g}$; 16,17-PES 组为 38.4(30.9, 45.9) $\mu\text{g/g}$ 。后者在子宫内的分布明显低于前者。

(四) 雌酮和 16, 17-PES 油水分布系数的测定

将雌酮和 16,17-PES 溶于辛醇中, 辛醇与水之比为 1:400, 充分振摇, 使待试物向水相分配。测定分配前后紫外吸收峰的克分子吸收系数, 求得雌酮和 16, 17-PES 油水分布系数分别为 3.20 和 9.25, 前者的亲水性比后者稍大。

讨 论

激素活性测定表明, 雌酮的雌激素活性比 16,17-PES 至少强数倍以上, 与本文作者过去的实验结果相似。本研究还表明, 雌激素活性与雌激素受体水平之间有平行关系, 即随着雌激素活性的加强, 雌激素受体水平也相应增加。16,17-PES 的雌激素活性弱, 故用此化合物处理的大鼠, 其子宫所含受体数目也少。大鼠皮下注射两种化合物后, 二者在子宫内的分布有明显的差别, 16, 17-PES 的含量只有雌酮含量的 55.6%。这一结果可用来解释二者之所

以存在雌激素活性和雌激素受体数目的明显差异。因为当子宫内的雌激素浓度在一定范围内，雌激素受体随激素浓度的增加而增加已是公认的事实⁽⁶⁾。

药物从注射部位进入血液中，再通过转运到达靶器官受许多因素的影响⁽⁷⁾。本研究测定了雌酮和 16,17-PES 的油水分布系数，试图说明二者在子宫内分布上的差异。实际结果是，雌酮的亲脂性反稍小于 16,17-PES。看来，这两种化合物在靶器官内分布量的多少，非由于脂溶性的差别所造成。药物的首次通过作用和药物与血浆蛋白的结合等等，都将影响药物在体循环的量及其分布和转运速度，这些均有待以后去研究阐明。

参 考 文 献

1. Needleman P and Johnson Jr EM. Vasodilators and the treatment of angina. in: Goodman LS and Gilman A. ed. *Pharmacological Basis of Therapeutics*. 6th ed. New York: Macmillan publishing Co, 1980:819~833.
2. 刘耕陶等. 16,17-吡唑雌酮对大鼠、鸡等实验性高脂血症及动脉粥样硬化的影响. *生理学报* 1983;35:94.
3. Katzenellenbogen JA, et al. Studies on the uterine, cytoplasmic estrogen binding protein. Thermal stability and ligand dissociation rate. An assay of empty and filled sites by exchange. *Biochemistry* 1973; 12:4091.
4. Lowry OH, et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265.
5. Purell WP, et al. Strategy of drug design: *A guide to the biological activity*. New York: John Wiley & Sons, 1973:126.
6. Anderson JN, et al. Nuclear receptor-estrogen complex relationship between concentration and early uterotrophic response. *Endocrinology* 1973;92:1488.
7. 李端、苏成业. 药物的吸收、分布、排泄和代谢. 徐叔云等主编. 临床药理学上册. 第 1 版. 上海:上海科学技术出版社, 1982:47~66.

EFFECTS OF ESTRONE AND 16, 17-PYRAZOLEESTRONE ON ESTROGEN RECEPTOR OF RAT UTERUS

WANG Nai-Gong, LI He-Ping and ZHANG Jun-Tian

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

ABSTRACT 16,17-Pyrazoleestrone is a derivative of estrone. Experiments showed that the estrogenic activity of 16,17-pyrazoleestrone was weaker than that of estrone. When a series of doses were used, estrone simultaneously increased uterine weight and estrogen receptor concentration, while 16,17-pyrazoleestrone exhibited no significant influence on both parameters in rats. In *in vitro* studies, however, the affinity of these compounds for estrogen receptor was found to be very similar. Since estrogen was shown to have higher distribution in rat uterus, the conclusion was then made that the difference of uterine estrogen receptor concentration between the rats treated with estrone and 16,17-pyrazoleestrone may be attributed to the difference in distribution in uterus.

Key words Estrone; 16,17-pyrazoleestrone; Estrogenic activity; Estrogen receptor