

盐酸苯乙哌啶和 *dl*-15 甲基 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 甲酯对大鼠卵巢黄体细胞的影响

王迺功 关慕贞 左晓春

(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

提要 盐酸苯乙哌啶 (R1132) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 *dl*-15 甲基 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 甲酯 (PG05) 5 或 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 在体外能明显抑制黄体细胞对 hCG 的反应性, 使孕酮分泌下降。假孕大鼠 po R1132 10 mg/kg 或 sc PG05 5.1 mg/kg 不影响卵巢孕酮分泌, 合并给药后却能使其降低。R1132 无抗孕酮作用。卵巢分泌孕酮减少可能是抗早孕的主要原因。假孕大鼠 po R1132 50 mg/kg 或 sc PG05 0.5 mg/kg 可抑制卵巢腺苷环化酶的活性。该酶可能是 R1132 或 PG05 在大鼠抗早孕作用的重要靶酶。

关键词 盐酸苯乙哌啶; *dl*-15 甲基 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 甲酯; 黄体细胞; 腺苷环化酶

dl-15 甲基 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 甲酯 (PG05) 阴道栓剂临床用于终止早期妊娠⁽¹⁾。盐酸苯乙哌啶 (R1132) 为已知止泻剂⁽²⁾, 能明显对抗 PG05 引起的腹泻, 提高其抗早孕效果。妊娠大鼠 po R1132, 合并 sc PG05, 证明两药抗早孕有协同作用⁽³⁾。本文研究了两药对大鼠卵巢黄体细胞的影响, 以阐明药物的协同作用机理。

材 料

药品和试剂 PG05 由本所合成室提供。R1132 为江苏省武进县制药厂产品。PMSG (孕马血清促性腺激素, 1000 IU/瓶) 长春生物制品研究所提供。hCG (人绒毛膜促性腺激素, 10000 IU/瓶) 和胶原酶 (II 型) 皆为美国 Sigma 产品。M199 培养基购自美国 GIBCO。

动物 Wistar 雌性大鼠, 幼鼠体重 50 ~ 60 g, 成年为 200 ~ 250 g, 均购自中国医学科学院动物中心。

方 法 和 结 果

一. R1132 和 PG05 对大鼠黄体细胞体外分泌孕酮的影响

幼大鼠 sc PMSG 50 IU/只, 56 h 后 sc hCG 25 IU/只, 造成假孕。其后 d7 处死动物, 取出卵巢, 剪碎 1 mm³ 大小, 放入含 0.2% 胶原酶的 M199 培养基内, 37℃ 水浴温孵 15 min 分散黄体细胞, 细胞悬液通过 100 目尼龙网过滤后 800 r/min 离心 5 min。细胞沉淀用新鲜 M199 培养基洗涤 2 次, 最后细胞混悬于含 2% 小牛血清 M199 培养基内。以血球计数盘计数细胞, 调整细胞浓度至 10⁶/ml 左右。

每组 5 支温孵管, 每管含细胞悬液 0.9 ml, 药物溶液 0.1 ml, 终体积 1 ml。对照管加入空白溶液补足 1 ml。温孵管置 37 °C 水浴, 通以 95% O₂/5% CO₂ 震荡培养 3 h。2000 r/min 离心 10 min, 测上清液孕酮含量⁽⁴⁾。

由表 1 可见, R1132 10 或 20 $\mu\text{g/ml}$ 及 PG05 5 或 10 $\mu\text{g/ml}$ 不影响体外培养黄体细胞孕酮的基础分泌。给以 hCG 1 IU/ml, 能显著地刺激黄体细胞分泌孕酮, 比基础水平增加 3~8 倍。R1132 10 $\mu\text{g/ml}$ 和 PG05 5 或 10 $\mu\text{g/ml}$, 皆能明显降低黄体细胞对 hCG 的反应性, 孕酮的分泌受到明显抑制 ($P < 0.05$ 或 0.01)。

Tab 1. Effect of diphenoxylate (R1132) and *dl*-15-methyl-PGF_{2 α} -methyl ester (PG05) on progesterone production by rat luteal cells *in vitro* ($n = 5, \bar{x} \pm \text{SD}$)

Treatment	Progesterone (ng/10 cells)
Basal	5.16 \pm 0.28
R1132 10 $\mu\text{g/ml}$	5.30 \pm 0.39
R1132 20 $\mu\text{g/ml}$	5.10 \pm 0.19
Basal	12.4 \pm 2.3
PG05 5 $\mu\text{g/ml}$	11.6 \pm 2.3
PG05 10 $\mu\text{g/ml}$	11.9 \pm 1.7
hCG 1 IU/ml	46.86 \pm 1.55
hCG 1 IU/ml R1132 10 $\mu\text{g/ml}$	38.50 \pm 1.49**
hCG 1 IU/ml	49.8 \pm 4.9
hCG 1 IU/ml PG05 5 $\mu\text{g/ml}$	34.8 \pm 2.3*
hCG 1 IU/ml PG05 10 $\mu\text{g/ml}$	25.0 \pm 3.5**

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

二. 合并应用 R1132 和 PG05 对假孕大鼠卵巢分泌孕酮的影响

按上法建立假孕大鼠模型, 于假孕 d 1~5, 大鼠每日 sc PG05 0.1 mg/kg 或 po R1132 10 mg/kg; 或两药以同样剂量合并应用。于假孕 d 6 取出双侧卵巢, 置 1 ml M199 含 2% 小牛血清培养基内, 37 °C 温孵 3 h, 测培养基内孕酮水平。

结果发现假孕大鼠 po R1132 或 sc PG05, 其卵巢分泌孕酮的水平 and 对照组皆无明显差异。然而两药以同样剂量合并应用, 则卵巢的孕酮分泌受到明显抑制 ($P < 0.01$) (见表 2)。

Tab 2. Effect of combined use of PG05 with R1132 on progesterone production in pseudopregnant rat ovary ($n = 5, \bar{x} \pm \text{SD}$)

Treatment (mg/kg \times 5 d)	Ovary weight (mg/100 g body wt)	Progesterone (ng/mg ovary)
Control	127.3 \pm 16.1	1.59 \pm 0.14
R1132 10	131.9 \pm 5.2	1.36 \pm 0.09
PG05 0.1	120.6 \pm 14.1	1.21 \pm 0.14
R1132 10+ PG05 0.1	144.3 \pm 8.9	0.83 \pm 0.17*

* $P < 0.01$

三. R1132 和 PG05 对假孕大鼠卵巢腺苷环化酶 (AC) 活性的影响

按上法建立假孕大鼠模型, 于假孕 d 1 ~ 3, 大鼠每日 sc PG05 0.5 mg/kg 或 po R1132 50 mg/kg。末次给药 24 h 后, 摘取双侧卵巢, 每克重加 3 ml Tris 缓冲液 (Tris 5 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, 蔗糖 75 mmol/L, pH 7.4) 作匀浆, 4 °C 5000 r/min 离心 15 min。上清液用于 AC 活性的测定。结果以 pmol cAMP/(mg 蛋白·min) 之数值表示。

由表 3 可见, 假孕大鼠皮下注射 PG05 或口服 R1132, 卵巢 AC 活性均受到明显抑制 ($P < 0.01$)。

Tab 3. Effect of PG05 and R1132 on adenylate cyclase (AC) activity of pseudopregnant rat ovary (n = 5, $\bar{x} \pm SD$)

Treatment (mg/kg × 3 d)	AC activity pmol cAMP/(mg protein · min)
Control	3.55 ± 0.39
PG05 0.5	1.88 ± 0.14*
R1132 50	1.39 ± 0.05*

* $P < 0.01$

四. R1132 对大鼠子宫蜕膜瘤的影响

成年雌性大鼠去卵巢 1 wk 后 sc 雌二醇 1 μ g/只 × 4 d, 再 sc 孕酮 1 mg/只 × 9 d。于注射孕酮 d 4 乙醚麻醉, 行一侧子宫腔内穿线术。术后第 d 2 分两组, 给药组 po R1132 50 mg/kg × 5 d, 于末次给药后 24 h 处死动物, 称量子宫蜕膜瘤的重量。结果发现对照组蜕膜瘤重 103.9 ± 12.8 mg/100 g 体重, 给药组为 140.2 ± 28.6 mg/100 g 体重 ($P > 0.01$), 说明大剂量的 R1132 也无抗孕酮样活性。

讨 论

临床试用证明, PG05 抗早孕效果肯定, 而且安全。但是单独应用 PG05 栓剂的流产效果还不够高, 完全流产率仅为 48.1%, 流产失败的妇女仍需手术流产。提高 PG05 的流产成功率是一个重要的研究课题。临床应用和动物实验均证明 R1132 不仅能对抗 PG05 引起的腹泻, 还提高 PG05 的抗早孕作用。

R1132 和 PG05 均能抑制体外黄体细胞对 hCG 的反应性, 使孕酮分泌降低。R1132 10 mg/kg 或 PG05 0.1 mg/kg 体内单独给药为抗早孕无效剂量, 也不降低卵巢孕酮的分泌。然而两药合并应用却能降低卵巢孕酮的分泌。早期妊娠的维持需依赖于孕酮的存在, R1132 不具有对抗孕酮活性的作用。显然孕酮分泌的减少可能是药物抗早孕作用的主要原因。R1132 50 mg/kg 或 PG05 0.5 mg/kg 单独应用为抗早孕有效剂量⁽²⁾。该剂量可抑制卵巢腺苷环化酶的活性, 导致孕酮合成的下降。该酶可能是 R1132 和 PG05 在大鼠抗早孕作用的重要靶酶。

参 考 文 献

1. 范光升, 等. 国产 dl-15 甲基 PGF₂ 甲酯阴道栓终止早中期妊娠的临床观察, 中国医学科学院学报 1989; 9:65.
2. Jaffe JH. Narcotic analgesics. In: Goodman LS and Gilman A, eds. The *Pharmacological Basis of Therapeutics*. 4th ed.

New York: MacMillan, 1971: 258.

3. 王迺功, 等. *dl*-15 甲基前列腺素 $F_{2\alpha}$ 甲酯合并应用盐酸苯乙哌啶在大鼠抗早孕作用的研究. 中国医学科学院学报 1989; 9:414.
4. Sufi SB, et al. *Programme for the Provision of Matched Assay Reagents for the Radioimmunoassay of Hormones in Reproductive Physiology*. 6th ed. Geneva: WHO, 1982:67.
5. Wang NG, et al. Effects of gossypol acetic acid on rat luteal cells *in vitro*. *Ethnopharmacology*. 1987; 20:45.

EFFECTS OF DIPHENOXYLATE HYDROCHLORIDE AND *dl*-15 METHYL PROSTAGLANDIN $F_{2\alpha}$ METHYL ESTER ON RAT LUTEAL CELLS

NG Wang, MZ Guan and XC Zuo

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050*)

ABSTRACT Diphenoxylate hydrochloride (R1132) at concentrations of 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ or *dl*-15 methyl-PGF $_{2\alpha}$ methyl ester (PG05) at levels of 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ was shown to have no effect on progesterone secretion by luteal cells *in vitro* in the absence of hCG. A marked increase in progesterone level was elicited by hCG as high as 3 ~ 8 fold the original value. The steroidogenic response of luteal cells to hCG was inhibited by R1132 and PG05. R1132 at a daily dose of 10 mg/kg or PG05 at a daily dose of 0.1 mg/kg for 5 days showed no obvious effect on ovary progesterone secretion in pseudopregnant rat. However, treatment with R1132 10 mg/kg plus PG05 0.1 mg/kg resulted in a decrease in the progesterone production of ovary *in vitro*. R1132 and PG05 at doses of 50 mg/kg and 0.5 mg/kg, respectively, exhibited an inhibitory effect on the adenylate cyclase activity.

Key words Diphenoxylate hydrochloride; *dl*-15 Methyl -PGF $_{2\alpha}$ -methyl ester; Luteal cells; Adenylate cyclase