

· 实验研究 ·

咖啡酸对雌、孕激素受体作用的探讨

中国药科大学药理教研室 郑玉群* 周曙 李耐三 沈子龙 徐蔽本

提 要 本文采用放射受体结合法测定了咖啡酸及其主要代谢产物阿魏酸、间羟苯丙烯酸对家兔子宫胞浆孕酮受体的亲和力, IC_{50} 分别为1.4、1.6和2.0mM。咖啡酸不影响假孕小鼠子宫对 $[^3H]$ 孕酮和 $[^3H]$ 雌二醇的摄取。提示咖啡酸抗早孕抑制孕激素作用并非由于竞争结合孕酮受体或减少甾体激素受体含量所致。

咖啡酸(Caffeic acid, CFA)广泛存在于升麻、木贼、苎麻、茵陈蒿等植物中^[1]。已发现其具有升白、利胆、止血、抗生育等多种药理作用^[2]。CFA 抗生育作用具有严格的立体特异性, 且与抑制孕激素活性有关^[3]。因为竞争结合靶组织孕酮受体, 或减少受体含量均可导致孕激素活性下降, 故本文从受体角度探讨 CFA 抗生育作用机理。

实验材料

CFA 无锡第六制药厂提供; $[1, 2, 6, 7-^3H]$ 孕酮 (82 Ci/mmol) 上海原子核研究所, (简称 $[^3H]P$); $[6, 7-^3H]$ 雌二醇 (38 Ci/mmol), 上海原子核研究所, (简称 $[^3H]E$); 孕酮、17 β -雌二醇 (生化试剂), 上海试剂二厂, 其余试剂均为分析纯。

昆明种小鼠体重 $26 \pm SD1g$ 由南京市药品检验所供给, 自由饮水, 喂以固体平衡饲料, 控制室温18—20℃。雌性青紫兰家兔体重1.5—2.0kg 由本校动物房供给。

方法与结果

一、CFA 对家兔子宫胞浆孕酮受体的竞争性抑制

未成熟雌兔10只, 每日颈部皮下注射17 β 雌二醇10 μg /兔, 连续5天, 末次注射后

3小时, 在乙醚麻醉下颈动脉放血处死, 立即取出子宫冲洗修剪, 称重。剪碎后置于全玻璃匀浆管中, 按1:5 (W/V) 加入匀浆缓冲液, (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM EDTA, 30% 甘油, 3 mM NaN_2 , 1 mM DTT, pH 7.4), 在4℃制成匀浆, 取 $40\,000 \times g$ 离心1小时的上清液按文献方法^[4,6] 测定 CFA 及其主要代谢产物对子宫胞浆孕酮受体的抑制作用。反应体系中含上述胞液200 μl (含500 μg 蛋白质), 10 μM 氢化可的松10 μl , 不同浓度的非放射性竞争性抑制剂50 μl , 用缓冲液调整体积至290 μl , 充分混匀后, 在0℃温育30分钟, 加入 $[^3H]P$ 10 μl (约 2×10^4 dpm), 混匀后于0℃温育120分钟, 加入右旋糖酐—活性碳吸附液200 μl , 0℃震荡5分钟, 3000 rpm离心10分钟, 取200 μl 上清液, 置于 PPO-POPOP 二甲苯闪烁液5 ml 中, 震荡萃取, 过夜后测定其放射性。所测得的 $[^3H]P$ 为与孕激素受体结合的放射性, 当无竞争性抑制剂时, 结合的 $[^3H]P$ 为 B_0 , 有竞争剂和 $[^3H]P$ 竞争受体时, 则结合量降低为 B , 故

$$\text{结合率}(P) = \frac{\text{有抑制剂时结合的 } [^3H]P \text{ 量}(B)}{\text{无抑制剂时结合的 } [^3H]P \text{ 量}(B_0)}$$

* 现在南京医学院药理教研室

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 Logit 即 $\text{Log}\left(\frac{p}{1-p}\right)$ 是直线关系,即为 Hill plot。用最小二乘法拟合直线回归方程可计算 IC_{50} ,其定义是 $[^3\text{H}]\text{P}$ 和孕酮受体的结合率被抑制至 50% ($p = 0.50$) 时的抑制剂的克分子浓度。

10 次不同实验结果测得孕酮的 IC_{50} 为 $7.0 \pm 0.5 \text{ nM}$, 而 CFA 为 $1.4 \pm 0.2 \text{ mM}$,

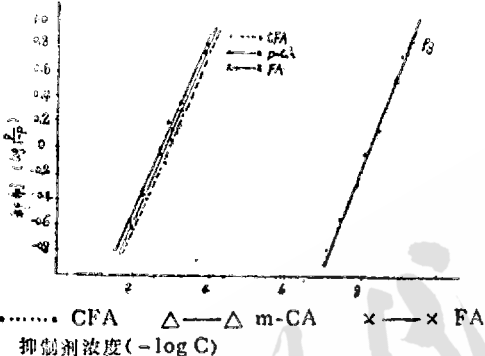


图 1 药物对 $[^3\text{H}]\text{P}$ 与兔子子宫孕酮受体结合的竞争性抑制的 Hill 作用

结合率 $(P) = \frac{\text{有抑制剂的结合的 } [^3\text{H}]\text{P 量}(B)}{\text{无抑制剂时结合的 } [^3\text{H}]\text{P 量}(B_0)}$

表 1 咖啡酸对假孕小鼠子宫 ^3H 甾体摄取的影响

P, 孕酮; CFA, 咖啡酸; m-CA, 间羟基苯丙烯酸; FA, 阿魏酸

组别	药 物	给 药 日 期	剂 量 (mg/kg)	子 宫 放 射 性 (dpm/mg 湿组织)
1	1%阿拉伯胶	假孕 6,7,8 天	等 容 量	13.7 ± 2.3
2	咖 啡 酸	同 上	10, bid	$13.5 \pm 1.8^*$
3	1%阿拉伯胶	同 上	等 容 量	8.6 ± 1.0
4	咖 啡 酸	同 上	10, bid	$8.5 \pm 1.2^*$

* 与相应对照组比 $P > 0.05$ 。数值为 $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 13$ 。1, 2 组给以 $[^3\text{H}]\text{P}$, 3, 4 组给以 $[^3\text{H}]\text{E}$, 解剖前 4 小时皮下注射 37 kBq/鼠。

讨 论

$[^3\text{H}]\text{P}$ 和孕酮受体有高度的亲和力,平衡结合常数 K_a 约为 10^{-9} M^{-1} 。当反应系统中存在竞争性抑制剂时,抑制剂与 $[^3\text{H}]\text{P}$ 竞争数量有限的受体结合部位,使与受体结合的 $[^3\text{H}]\text{P}$ 量减少,抑制曲线取决于抑制剂与孕

CFA 的主要代谢产物阿魏酸、间羟基苯丙烯酸分别为 1.6 ± 0.1 和 $2.0 \pm 0.1 \text{ mM}$ 。与孕酮相比 CFA 及其主要代谢产物与孕酮受体的亲和力相差二十万倍(图 1)。

二、CFA 对假孕小鼠子宫 ^3H 甾体摄取的影响

成熟雌鼠与结扎输精管的雄小鼠按 2:1 合笼,每日晨检查阴栓,以发现阴栓为假孕第 1 天。假孕小鼠 52 只随机分为 4 组,(1)、(3)组为对照组,给以等体积的 1% 阿拉伯胶,(2)、(4)组为给药组,于假孕 6、7、8 天每天两次口服抗早孕有效量的 CFA 10 mg/kg。假孕第 9 天皮下注射 37 kBq 氚标甾体,(1)、(2)组给以 $[^3\text{H}]\text{P}$, (3)、(4)组给 $^3\text{H-E}$,注射后 4 小时处死小鼠,割取子宫,修剪并吸去血液,称取 0.1 g 左右组织,消化处理后测定子宫组织放射性^[6](见表 1)。

表中可见给以 CFA 子宫放射性与正常对照组相比没有显著差异,提示 CFA 不影响假孕小鼠子宫对 ^3H 甾体的摄取。

酮受体的亲和力即抑制剂和受体结合常数 K 及抑制剂的浓度。 IC_{50} 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^[7]。实验结果表明 CFA 及其主要代谢物与孕酮受体亲和力极低,与孕酮相比差约二十万倍,因此 CFA 的抗孕激素作用并非由于与孕酮竞争孕酮受体引起的。

参 考 文 献

靶组织对甾体激素的摄取与该种激素受体数量有关^[3], Davis 证实了妊娠子宫对外源性孕酮的摄取及内源性孕酮的含量与子宫孕酮受体数目基本一致^[9], 因此子宫对甾体激素的摄取可间接地反映激素受体的含量。实验表明 CFA 对假孕小鼠子宫 [³H]P 和 [³H]E 的摄取均无显著影响, 提示 CFA 不影响子宫孕激素、雌激素受体的含量, 因此抗孕激素作用并非由于甾体激素受体含量的下降。其抗孕激素作用机理有待进一步研究。

致谢: 本工作得到中科院动物研究所邹继超、刘以训研究员的帮助。

- [1] 胡润生等, 药学报 7:289, 1965
- [2] 郑玉群等, 现代应用药学 4(1):46, 1987
- [3] 郑玉群等, 中国药理学报 3(3):250, 1987
- [4] Verma u et al: J Steroid Biochem 14: 733, 1981
- [5] Korenman SG: Steroids 13(2):163, 1969
- [6] Duncan GW et al: J Reprod Fert (Suppl) 4:15, 1968
- [7] 汤仲明等, 中国药理学报 4(3):186, 1983
- [8] Lawson DEW et al: J Biol Chem 239: 3226, 1964
- [9] Davis J et al: Endocrinology 90:507, 1972

Research of effects of Caffeic Acid on Estrogen and Progesterone Receptors in animals

Zheng Yuqun*, Zhou Su, Li Neshan, Shen Zilong, Xu Fuben

(Dept. of pharmacology, Chinese Pharmaceutical University, Nanking)

ABSTRACT

Previous study has shown the interceptive effect of caffeic acid (CFA) in early pregnant mice. The present investigation provides further evidence for the mechanism of such effect. The uptake of ³H-estrodial and ³H-progesterone by uterus of 9-day pseudopregnant mice in vitro was not changed by CFA. The binding affinity of the drug and its two main metabolites, ferulic acid and m-coumaric acid to a cytosol progesterone receptor in rabbit uterus in vitro are very low, IC₅₀ being 1.4, 1.6, 2.0mM respectively, which are about 200 000 times lower than that of progesterone. The above observations suggest that the inhibition of progesterone activity was neither due to the specific binding of CFA and its main metabolites to the progesterone receptors nor decrease in the number of steroid receptors.

*. Now in Dept Pharmacology, Nanjing Medical College.