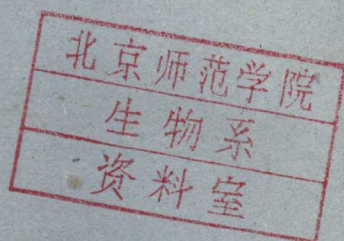


生殖生理研究资料汇编(2)

—第一次全国生殖生物学学术讨论会交流资料



北京医学院生理教研组
消化、生殖生理研究室

1980, 11,

目 录

- 1、促黄体素释放激素类似物抗早孕机理的分析。·····
- 2、利血平对大剂量LH—RH类似物终止妊娠的拮抗作用
- 3、大鼠胚胎对子宫摄取孕酮的调节·····
- 4、几种抗早孕药物对卵巢孕酮含量和分泌的影响·····
- 5、血中孕酮水平与早孕维持的关系·····
- 6、人妊娠黄体雌激素，孕激素及其受体含量的研究·····
- 7、雌二醇放射免疫测定法的建立·····

促黄体素释放激素类似物对卵巢

孕酮合成及子宫蜕膜反应的影响

生理教研组消化生殖生理研究室 李伟雄、袁其晓、曾陶陶。
北京医学院 组织胚胎教研组计划生育研究组、孙敏芝、傅爱华

近几年在动物实验中发现,大剂量的促黄体素释放激素(LH-RH)及其高活性类似物能抑制生殖系统的机能,并且有抗生育作用。我们实验室曾报导,给大鼠大剂量使用一种LH-RH的高活性类似物([D-Ala²-des-GlyNH₂¹⁰]-LH-RH-ethylamide)具有明显的抗孕作用⁽¹⁾。尽管许多研究者对于大剂量LH-RH抑制生殖系统及抗早孕作用的机理进行过研究,但目前尚无一致的认识。最近,Nilius等⁽²⁾报告,给月经规律的妇女使用另一种LH-RH的高活性类似物([D-Ser(TBO⁶)-EA¹⁰]-LH-RH),能有效地抑制排卵。从而提示,LH-RH或其高活性类似物似可能用于避孕。分析LH-RH,及其高活性类似物在动物抗早孕作用的机理,不仅有助于深入理解LH-RH在体内的作用,还将为临床探讨使用LH-RH抗早孕提供理论根据。因此,我们在假孕和蜕膜反应的大鼠研究了大剂量LH-RH类似物对于卵巢 $\Delta^5-3\beta$ -羟甾脱氢酶,血清孕酮及蜕膜反应的作用。

材料及方法

本工作系用180—200克的雌性大白鼠进行实验。整个实验期间饲养于空调室,喂以固定平衡饲料,自由饮水,并维持每天人工控制光照14小时,黑暗10小时,室温18—20℃。

假孕、蜕膜反应的形成 每晨查阴道涂片，在观察2个规则的动情周期后，于第3个周期开始造成假孕和蜕膜反应。其基本方法为，在动情间期的第1天，即阴道涂片刚出现白血球时，皮下注射利血平（2毫克/公斤体重）以造成假孕，这一天算作假孕的第一天。假孕第四天中午，在乙醚麻醉下开腹，暴露双侧子宫角，按De Fco⁽⁸⁾的方法稍加改良，用自制蜕膜针刮双侧子宫的对系膜面，形成蜕膜⁽⁸⁾。手术后，将动物随机分成几组，分别给予不同处理（表1）。

各组动物分别于预定的时间处死。处死前，在乙醚浅麻醉下，用玻璃毛细管自球后静脉丛取血，凝固后，分离出血清，密封贮存于冰盒中，待测定孕酮。动物处死后，立即取下卵巢及双侧子宫，测定卵巢 $\Delta^5-3\beta$ -羟甾脱氢酶活性及子宫蜕膜反应。

(一) 卵巢 $\Delta^5-3\beta$ -羟甾脱氢酶活性的测定

测定 $\Delta^5-3\beta$ -羟甾脱氢酶的组织化学方法，我们是以 Wattenberg⁽⁴⁾的方法⁽⁴⁾为基础，并吸取了 Levy⁽⁵⁾ 和 Deane⁽⁵⁾ 以及 Hoyer⁽⁶⁾ 等人方法的优点来进行的。将取下的卵巢先放在用磷酸缓冲液配成的1%多聚甲醛溶液中固定30分钟，然后投入于冰中冻结，并立即移入-20℃恒低温切片机上切片，厚10微米。将同天的对照组和实验组的切片裱在同一张盖玻片上。使切片在室温干燥5分钟后，放入孵化液中孵化1小时（染色方法的对照片在没有去氢表雄酮的孵化液中孵化）孵化后，将切片放在含有50%乙醇和10%多聚甲醛各一分的固定液中固定30分钟。用甘油明胶封固，在显微镜下观察。卵巢孵化液配方为：

去氢表雄酮（DHA）0.2毫克

二甲基甲酰胺（DMF）0.2毫升

磷酸缓冲液 0.1 M, pH 7.1-7.4 0.5毫升

蒸馏水

1.3 毫升

硝基四氮唑盐 (Nitro-BT) 1 毫克 / 1 毫升, 2.0 毫升辅酶
辅酶 I (DPN) 1.6 毫升。

(二) 血清孕酮测定 取 0.1 毫升血清。用石油醚提取后, 用我们实验室自制的抗孕酮—11 α 琥珀酰牛血清白蛋白做为抗体, 利用放射免疫测定法进行血清孕酮测定。详细测定方法见另文。本工作所用³H孕酮为上海原子核研究所产品, 比活性 78 居里 / 毫克分子。

(三) 子宫及蜕膜的测定 取下子宫后, 除去周围的系膜及脂肪组织, 肉眼观察子宫蜕膜反应的情况, 然后用精确到 1 毫克的扭力天平分别称子宫全重及蜕膜重, 部分子宫用 10% 福尔马林固定后, 切片, H、E 染色做显微镜下观察。

本工作所用的 LH—RH 类似物系上海生物化学研究所合成的第 6 位为 D 构型丙氨酸取代, 第 10 位去甘氨酸的 LH—RH 的乙酰酰胺衍生物, 其结构为: 焦谷、组、色、丝、酪、D—丙、白、精、脯。乙酰胺。该类似物的作用与 LH—RH 相仿, 其促使动物分泌 LH 和 FSH, 以及诱导排卵的能力均大大超过 LH—RH。实验时溶于生理盐水中, 每鼠每次皮下注射 200 微克 (0.2 毫升)。对照组注射等量生理盐水。

实 验 结 果

一、LH—RH类似物对卵巢黄体 $\Delta^5-3\beta$ 羟甾脱氢酶的影响。

为用组织化学方法显示黄体 $\Delta^5-3\beta$ 羟甾脱氢酶的活性所用的动物数为：假孕第6天，实验组9只，对照组8只；假孕第8天，实验组11只，对照组6只；假孕第9天，实验组13只，对照组8只。

肉眼观察，假孕第6、8、9天所取实验组卵巢的黄体大小均较同天对照组小。

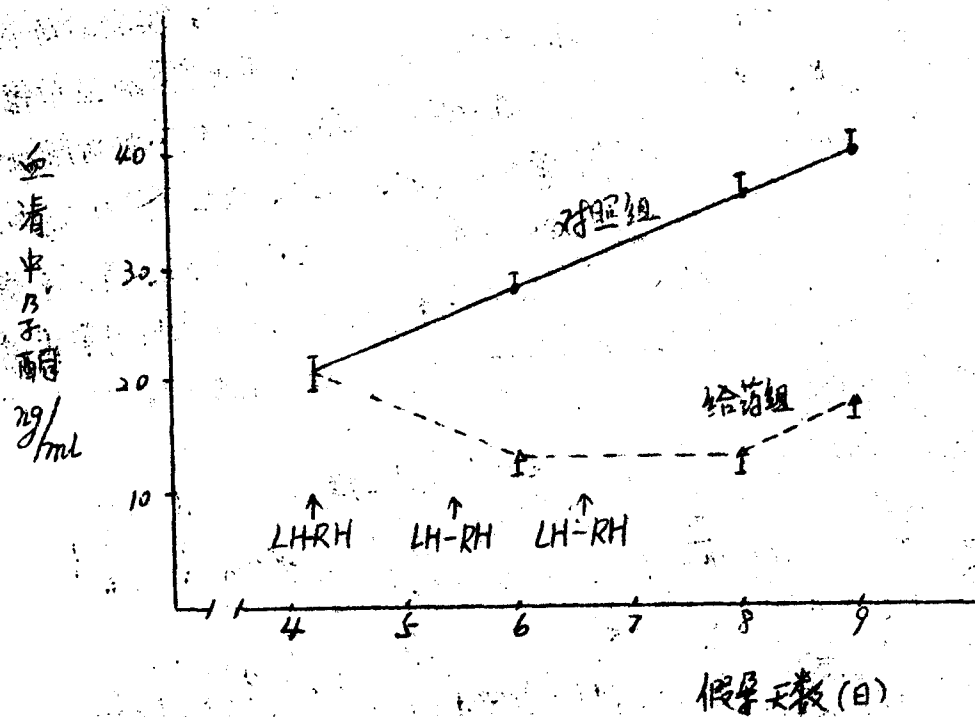
显微镜下观察，对照组动物，无论是假孕第6、8或9天，黄体酶活性反应均很强，颜色深，黄体细胞排列紧密，成索成团，高倍镜下细胞呈多边形，有一圆形的核位于细胞中央，因无酶的活性，故成空白区，胞质内充满了细小均匀的酶活性反应颗粒，呈深兰色，表示合成孕酮的功能活跃；实验组动物，假孕第6天，有的动物酶活性反应降低，有的降低不明显，未能得出肯定的结论；假孕第8天以及第9天（除13只动物中有4只不明显外），酶活性反应均有较明显下降，整个黄体色较浅。高倍下黄体的部分黄体细胞质内虽亦有细小均匀的酶活性反应颗粒，但数量较对照组少；而部分细胞胞质内酶活性反应颗粒极少或全无，表示合成孕酮的功能较对照组降低（图1高倍观）。染色方法的对照片均不能显示酶活性反应。

二、LH—RH类似物对血清孕酮水平的影响

从表2，图2所示可以看出，在假孕、蜕膜反应的大鼠，随假孕天数增加，其血清孕酮水平逐步升高。而于假孕第4、5、6天注射大剂量LH—RH类似物的动物，其血清孕酮水平于第8天开始即明显低于对照组（ $P < 0.05$ ），假孕第9天时，两组血清孕酮水平仍有明显差异（ $P < 0.05$ ）。这一结果说明，大剂量的LH—RH类似物能明显地降低血清孕酮水平。

表2、大剂量LH—RH类似物对假孕大白鼠血中孕酮水平的影响

处死天数	动物数	对照组 ng/ml	动物数	给药组 ng/ml
4天	5	15.46 ± 1.72	5	15.46 ± 1.72
6天	6	25.20 ± 0.59	6	12.40 ± 2.08
8天	6	34.7 ± 1.54	8	11.9 ± 2.35
9天	6	40.5 ± 4.0	7	16.0 ± 1.81

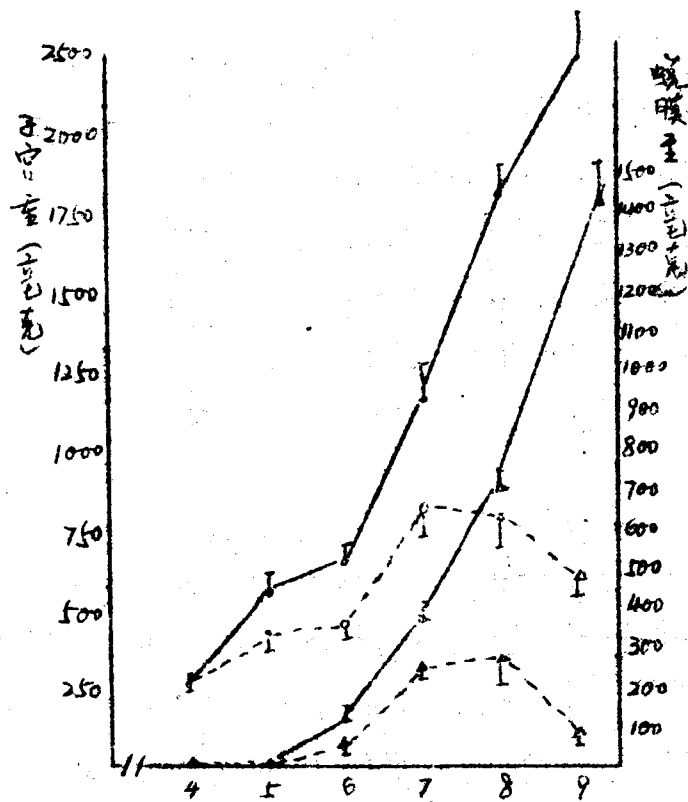


三、LH—RH类似物对蜕膜反应的影响

从表1, 图3所示可以看出, 随假孕日增加, 对照动物的子宫重及蜕膜重均逐步增加。但是, 于假孕第4、5、6天注射大剂量LH—RH类似物的动物, 其子宫重及蜕膜重均低于对照组, 假孕第8天时, 两组之间即具有明显差异 ($P < 0.01$)。肉眼可见, 实验组动物的蜕膜明显坏死, 于假孕第9天时, 大部分蜕膜常常坏死液化。显微镜下观察, 假孕第8、9天对照组子宫壁较实验组厚, 高倍镜下见对照组子宫内膜呈现明显的蜕膜反应, 有许多胞体大、核大、核仁明显的蜕膜细胞, 并见到不少有丝分裂象。但是, 实验组蜕膜已处于变性、坏死、脱落的过程中, 未见蜕膜细胞或仅局部地区见到残留的少量蜕膜细胞 (图4)。这一结果说明, 大剂量的LH—RH类似物能明显地抑制子宫蜕膜反应。

表1 大剂量LH—RH类似物对蜕膜反应的影响

		处死日期	动物数	子宫重(毫克)	蜕膜重(毫克)
对照组	天起每天皮下注射 盐水	假孕第四天	5	259.8±17.8	0
		假孕第五天	5	554.0±54.3	0
		假孕第六天	8	630.2±73.5	120.3±14.0
		假孕第七天	6	1148.3±104.9	368.5±53.6
		假孕第八天	9	1847.5±105.3	684.5±40.6
		假孕第九天	10	2487.8±179.9	1430.5±98.1
实验组	天起每天皮下注射 LH—RH	假孕第四天	5	259.8±17.8	0
		假孕第五天	5	407.6±43.2	0
		假孕第六天	8	442.0±44.0	67.3±15.6
		假孕第七天	6	834.1±124.8	246.5±29.5
		假孕第八天	11	812.7±139.8	269.3±90.0
		假孕第九天	22	597.2±59.0	81.1±23.3



- 对照组子宫重
- - -○- - 给药组子宫重
- ▲— 对照组蜕膜重
- - -△- - 给药组蜕膜重

处死的天数 (天)

四 外源性孕酮可以拮抗LH—RH类似物抑制蜕膜反应的作用
 为了研究LH—RH类似物对于蜕膜反应的抑制作用是否由于血

血清孕酮下降的结果, 我们又在5只大鼠, 观察了注射外源性孕酮对LH—RH类似物抑制蜕膜反应作用的影响。在假孕第4—6天注射LH—RH类似物的同时, 于第4—8天皮下注射孕酮(每鼠5.5毫克, 0.25毫升), 第9天处死。

结果看到, 在注射LH—RH类似物同时注射孕酮的动物, 其平均子宫重(2138.4 ± 636.7 毫克)及蜕膜重(1251.6 ± 580.0 毫克), 均与对照组无明显差异($P > 0.05$), 但与单纯注射LH—RH类似物的实验组则具有明显差异($P < 0.01$)。这说明, 外源性孕酮可以拮抗LH—RH类似物对蜕膜反应的抑制作用。

讨 论

妊娠维持的机理十分复杂, 目前并未完全弄清。但一般认为, 卵巢黄体通过分泌孕酮在妊娠, 特别是早期妊娠的维持中具有重要作用。已知子宫的蜕膜反应是受卵巢黄体控制的, 蜕膜在维持妊娠中的重要性也已被许多实验所证实。动物实验证明, 某些药物如麦角毒, 前列腺素等的抗生育作用似都与它们对蜕膜反应的抑制作用有关。我们实验室曾证明, 雪莲抑制蜕膜反应的作用可能是它导致早期流产的主要机理之一。此外, Yoshinaga 曾看到给妊娠大鼠注射兔的抗鼠蜕膜血清可导致流产, 这进一步证实了蜕膜完整对早孕维持的重要性。为了阐明大剂量LH—RH及其高活性类似物终止妊娠作用是否也系通过影响卵巢黄体及蜕膜反应这一环节, 我们利用大鼠假孕、蜕膜反应这样一个动物模型, 观察了大剂量LH—RH类似物的作用。结果清楚地表明, 在假孕4、5、6天皮下注射大剂量的LH—RH类似物, 能明显地抑制子宫

蜕膜反应。这提示,抑制蜕膜反应可能也是大剂量LH—RH类似物抗生育作用的机理之一。我们同时观察到,注射大剂量的LH—RH类似物可以明显地降低血清孕酮水平并抑制卵巢 $\Delta^5-3\beta$ —羟甾脱氢酶的活性,因为该酶是孕酮生物合成过程所必需的。由于它的存在才能使孕烯醇酮氧化而转变为具有生物活性的孕酮,因此, $\Delta^5-3\beta$ 羟甾脱氢酶活性的强弱可以代表黄体合成孕酮功能的高、低。在我们实验中,观察到绝大多数实验组动物卵巢黄体细胞内该酶的活性明显下降,这提示,大剂量LH—RH类似物系通过抑制卵巢黄体细胞合成孕酮的功能,从而使血清孕酮水平下降。补充外源性孕酮可以拮抗大剂量LH—RH类似物对蜕膜反应的抑制作用,则说明血清孕酮水平下降与蜕膜反应的抑制密切相关。我们的观察提示,大剂量LH—RH类似物很可能是通过抑制卵巢黄体功能及蜕膜反应这一环节而达抗生育作用,也就是说,大剂量的LH—RH类似物可能通过抑制卵巢 $\Delta^5-3\beta$ 羟甾脱氢酶的活性,从而减少卵巢孕酮的合成,使血中孕酮水平下降,由于一定水平的孕酮对蜕膜反应的维持是必需的,当孕酮下降至某一水平后,蜕膜由于缺乏孕酮而产生坏死和液化,从而不可避免地导致流产。

近年来,一些工作者报告⁽¹⁰⁻¹²⁾,大剂量的LH—RH或其高活性类似物对生殖系统的抑制作用伴有卵巢或睾丸上促性腺激素(LH, FSH)受体含量的明显下降,并提出LH—RH及其类似物的抗生育作用是通过引起内源性促性腺激素的大量释放,从而抑制卵巢的促性腺激素受体和降低黄体机能来中介的。虽然我们的工作尚不能阐明大剂量LH—RH类似物对卵巢的这种抑制作用究竟是通过下丘脑—垂体—卵巢轴系的影响,还是大剂量LH—RH类似物对卵巢具有直接抑制作用。但是,据我们以前的实验看到,除垂体外,卵巢也能选择

性地摄取外源注入的LH-RH⁽¹³⁾。而 Heber 等^(14, 15)也证明大鼠的卵巢、睾丸、肝、肾等垂体外组织上也存在LH-RH的受体。这均提示，LH-RH有可能具有垂体外直接作用。当然，为了确证LH-RH直接作用于卵巢，从而抑制其机能的可能性，尚需进一步的深入研究。

LH-RH是体内的一种天然存在的激素。动物实验证明，LH-RH及其高活性类似物，当大剂量应用时，能抑制生殖系统的机能，甚至具有抗生育作用，而且LH-RH的生物活性（诱导排卵作用）越强其抗生育作用也随之加强。最近某些临床研究又证明，LH-RH及某些LH-RH的类似物能有效地抑制妇女排卵，若在正常妇女的排卵后注射，可引起黄体期缩短，并提出，LH-RH在正常妇女也具有溶黄体作用，并可能提供一种接近生理的控制黄体期长短和月经来潮时间的方法⁽¹⁶⁾。我们的实验证明，大剂量的LH-RH类似物能抑制卵巢 $\Delta^5, 3\beta$ -羟甾脱氢酶的活性和子宫的蜕膜反应。显然，如果LH-RH及其类似物在妇女也有类似作用的话，那么它将很可能提供一种接近生理的抗早孕途径。动物实验的结果给我们以启示，应该尽快地在临床探讨LH-RH及其类似物的抗早孕作用。

摘 要

本工作观察了大剂量LH—RH类似物对假孕、蜕膜反应大鼠的卵巢 $\Delta 5-3\beta$ -羟甾脱氢酶, 血清孕酮以及子宫蜕膜反应的影响。于假孕第4天开始, 每鼠每天皮下注射200微克的LH—RH类似物, 对照组注射等量生理盐水。分别于假孕第4天到第9天, 每天处死一批动物。结果表明, 大剂量的LH—RH类似物明显地抑制卵巢 $\Delta 5-3\beta$ -羟甾脱氢酶的活性, 使血清孕酮下降, 并引起蜕膜反应的明显抑制。若同时皮下注射5毫克孕酮可以完全对抗LH—RH类似物对蜕膜反应的抑制作用。这提示大剂量的LH—RH类似物有可能是通过抑制卵巢孕酮合成及蜕膜反应而达其抗生育作用。

参 考 文 献

1. 袁其晓、樊庆华：促黄体素释放激素类似物对大鼠和小鼠妊娠的影响 生理学报 1978, 30, 99-104
2. Nillius, S.J; Bergquist, C; Wide, L.: Inhibition of ovulation in women by chronic treatment with a stimulatory LHR analogue—A new approach to birth control?
Contraception: 1978, 17, 537-545.
3. De Feo, V. J.: Temporal aspect of uterine sensitivity in the pseudopregnant or pregnant rat. Endocrinology, 1963, 72, 305-316.
4. Wattenberg, L.W.: Microscopic histochemical demonstration of steroid -3 -ol dehydrogenase in tissue section. J. Histochem. & Cytochem, 1958, 6, 225-232.
5. Levy, H, Deane, H. W. and Rubin, B. C.: Visualization of steroid -3 -ol- dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. Endocrinology, 1959, 65, 932-943.
6. Hyer, P. E. and Anderson, H.: Histochemistry of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in rat ovary. I. A methodological study. Histochemistry; 1977, 51, 167-193.
7. 李伟雄、袁其晓：孕酮的放射免疫测定法的建立。核医学论文集 295-307
8. 北京医学院基础部生理教研组生殖生理研究组：中药雪莲终生妊娠机理的分析，1雪莲对大鼠蜕膜反应的影响
北京医学院学报, 1976, 4, 230-233.
9. Yoshinaga, K: Rabbit antiserum to rat deciduoma. Biol. Reprod. 1972, 6, 51-57.

10. Kledzik, G. S.; Cusan, L.; Auclair, C.; Kelly, P. A.; Labrie, F.: Inhibitory effect of a luteinizing hormone (LH)-releasing hormone against on rat ovarian LH and follicle-stimulating hormone receptor levels during pregnancy. *Fertil Steril*; 1978, 29, 560-564.
11. Auclair, C.; Kelly, P. A.; Labrie, F.; Coy, D.H.; Shally, A. V.: Inhibition of testicular luteinizing hormone-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun*; 1977, 76, 855-862.
12. Catt, K. J.; Baukl, A. J.; Davies, T. F.; Dufan, M. L.: Luteinizing hormone-releasing hormone-induced regulation of gonadotropin and prolactin receptors in the rat testis. *Endocrinology*; 1979, 104, 17-25.
13. 袁其晓、李伟雄：放射性碘标记的大剂量的促黄体素释放激素在大鼠体内的分布。
生理学报；1978, 30, 105-110
14. Marshall, J.C.; Shakespear, P.A.; Odell, W. D.: LH-RH-pituitary plasma membrane binding: The presence of specific binding sites in other tissues. *Clinical Endocr.* 1976, 5, 671-677.
15. Heber D: Marshall, J. C. and Odell, W. D.: Luteinizing hormone-releasing hormone receptor: Identification, specificity and quantitation, in nonpituitary tissues. *Fertil Steril*; (Abstract) 1977, 28, 346.
16. Lemay, A.; Labrie, F.; Ferland, L.; Baybaud, J-P.: possible luteolytic effects of luteinizing hormone-releasing hormone in normal women. *Fertil Steril*; 1979, 31, 29-34.

大鼠胚胎对子宫孕酮摄取的调节

张志文* 刘素芝** 李伟

指导：王志均教授

早在本世纪初就发现：切除孕兔双侧卵巢不可避免地会引起流产⁽¹⁾。而给这样处理的动物补充一定数量的孕酮，妊娠就能正常进行；同样给妊娠动物点滴孕酮抗体使血中孕酮下降，当降低到一定临界水平后妊娠也必将终止⁽²⁻³⁾。在哺乳动物当中，迄今为止尚未发现缺乏孕酮而妊娠能正常进行的动物。这些都表明在妊娠的维持中孕酮起着重要的、决定性的作用。

近十几年来大量的工作表明：孕卵具有内分泌的功能，可通过其分泌的一些化学物质将自己的存在通知母体，在这些物质的作用下，母体的内分泌功能发生一系列变化，其中最显著的就是母体黄体转化成妊娠黄体并分泌大量孕酮。除此之外，胚胎对其生长发育的场所——子宫的功能，是否也有局部作用呢？这方面的报导很少。

WAITER等⁽⁴⁾观察到胚胎可抑制子宫PGF₂的分泌，最近MICHAEL⁽⁵⁾在单侧妊娠的猪发现：孕侧和非孕侧的子宫分泌蛋白，不论在数量上和种类上都有明显的差别。那么胚胎除了通过正体作用使母体血液及子宫孕酮含量提高以外，是否也能局部作用于子宫而调节其对孕酮的摄取呢？这是一个有趣也是一个重要的问题，为此我们进行了下面的实验。

*北京医学院生理教研组消化生理研究室研究生。

**沈阳妇婴医院进修医师。

实验材料和方法

~1~