

棉酚作为安全有效和可逆男用节育药的一线新曙光 ——低剂量棉酚组合甾体激素用药抗生育作用

薛社普[△]

(中国医学科学院 中国协和医科大学 基础医学研究所细胞生物学, 北京 100005)

摘要 介绍和评述本期2篇研究论文所取得的进展。该研究针对影响棉酚成为广泛应用的男性节育药的可逆性不育和低血钾症副作用,采用一种新的用药方案,即以低剂量棉酚($12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)合并甾体激素(甲基睾丸素 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和炔雌醇 $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)服药6周,作为起始剂量,然后,用同上单独低剂量棉酚作为维持剂量,连服12周。结果可见服药大鼠在6周内附睾精子被杀伤而起效不育。维持量可维持不育,未见产生不可逆性不育和血钾水平异常现象,脏器组织正常。停药6周后全部恢复生育力。男性志愿者服低剂量棉酚(15 mg/d)后在12周达到不育,改服维持量(10 mg/d)44周可维持不育并未出现低血钾症;停药10周后,生育力和所导致的组蛋白-精核蛋白取代反应(HPRR)异常现象全部恢复。这些结果为组织进行低剂量棉酚合并甾体激素的临床新用药方案的试用及其作为安全可逆男用节育药的可能性提供了前景。

关键词 棉酚 男用节育药 低血钾 不可逆性不育

中图分类号 R979.2.1

A Beam of Dawn Light of Study on Gossypol as a Safe, Effective, and Reversible Male Antifertility Contraceptive —— Evaluation of the Studies by Using Low Dose Gossypol Combined with Steroid Hormone for Male Contraception

Xue Shepu[△]

(Department of Cell Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China)

The present paper is an evaluation of the studies of two articles published in this issue of the journal which adopted a new regimen of low dose gossypol ($12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) combined with steroid hormones (methyltestosterone $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and ethinyl estradiol $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for 6 weeks as initial dose, and a similar low dose gossypol alone for 12 weeks as maintenance dose. Results showed that the dosage regimen could damage the epididymal sperms and onset of antifertility within 6 weeks in male rats, and prevent the incidence of the side effect of irreversible azoospermia. There was no adverse effect in viscera tissues, and the infertility could be reversible in about 6 weeks following withdrawal of gossypol. Male volunteers taking low dose gossypol (15 mg/d) could induce antifertility within 12 weeks, then followed by a maintenance dose of gossypol (10 mg/d) for 44 weeks. All of them remained infertile, and without developing hypokalemia and irreversible azoospermia. The fertility and the inducing abnormal histone-to-protamine replacement reaction as well as alteration of nuclear basic proteins could be recovered 10 weeks after withdrawal of drug treatment. These results provide a new approach for using the new regimen in clinical trial and a new prospect of gossypol as a potential male contraceptive.

Key words gossypol; male contraceptive; hypokalemia; irreversible infertility

Acta Acad Med Sin. 2000, 22(3): 211~213

经过 20 世纪 50 多年的努力,到目前为止国际上还没有一种安全有效和可逆的理想男用避孕药提供临床应用。上世纪 60 年代,我国科学工作者从棉酚中分离出一种含二萜酚化物的棉酚,经过精制成为醋酸棉酚、甲酸棉酚和棉酚 3 种制剂,在多种动物实验和临床试用中证明具有明确的抗精子发生作用^[1-3]。随后对其抗生育作用环节、机制、体内代谢、毒性毒理及临床效应等进行了全国性多学科中心协作,包括 14 个省市超过万例的广泛和系统研究^[1-5]。据 8806 例自愿服药者的临床试用总结,每日口服 20 mg 棉酚片剂,一般 75 天起效达到不育指标(精子计数在 400 万/ml 以下),总有效率为 99.89%^[1-5]。起效后改服维持量(50 mg/周)可维持避孕效果。这些结果迅速在全球计划生育与生殖生物学界引起了强烈反应,在 WHO 和美国人口委员会的推动下,美、欧、亚洲各国纷纷开展了对棉酚研究的热潮,举行国际性棉酚学术会议和科研交流合作。从 70 年代末期至 80 年代中期,我国首创的棉酚成为当时牵动国际男性生育科研的领头课题。各国学者的科研工作完全证实了中国学者的实验结果,并一致认为棉酚有别于当时国际研究中具有一定毒副作用的抗代谢类和甾体激素类节育药物,而是既能抑制精子发生和运动活性,又能在抗生育剂量下不影响正常睾酮水平和性功能的一种新型男用避孕药^[3],是第一个经过万例临床试用的最有希望的男用避孕药,甚至被誉为男性避孕研究史上的里程碑。然而随着自愿服药者服药时间的延长(最长服药者达 6 年),体内积累量的增加,个体体质差异以及对药物代谢反应的不同,少数服药者出现了两种严重的毒副作用——低血钾症。在 8806 例中的 0.75% 和不可逆性不育(9.9%)^[5]。低血钾症是指因血清 K^+ 水平异常下降(4 mmol/L 以下)而出现疲乏、肌无力,甚至软瘫,其患者遍及除山东省以外的其余 13 个省市地区,发病机制未明。当时既无低血钾动物模型可供研究,亦缺乏预防措施,占上风的意见认为是棉酚损伤肾脏某些酶系导致肾性失钾的结果^[6]。也有人认为与肾脏中 11β -羟甾体脱氢酶先天性缺失有关^[16];另有人则从流行病学调查低血钾在我国的发生背景和根据山东省 3 千多例自愿服药者无一低血钾患者,论证低血钾可能是个体体质差、营养不良、劳动过度等综合因素所致结果而与棉酚无关^[17]。不可逆性不育是指服药者停药后长期不能恢复精子发生而停留在无精或少精水平。跟踪调查表明,服棉酚总量 1.5~2 g 为起效和维持不育的必需量,半数服药超过 6 g 以上者的精子计数未恢复至

正常水平。在 2 067 例服药者中,于停药 1~4.5 年内有 205 例精液检查为无精的不可逆不育患者(占 9.92%)^[5]。显然,上述两种毒副作用成为棉酚被排除作为男用避孕药推广应用的主要原因^[14-16]。在 1986 年于武汉召开的有 WHO 和美国人口委员会众多专家参加的国际棉酚学术会议上,对棉酚的上述毒副作用进行了讨论,会后我国有关部门和 WHO 作出中止支持将棉酚作为男用避孕药的有组织的临床试用和基础研究的决定。然而当时国内外同行对棉酚与毒副作用的直接关系,尤其对棉酚的命运得到如此消极的对待有不同意见和看法,所以希望弄清毒副作用发生机制和克服这些毒性而进行病因调查、病例追踪、改良剂型、拆分棉酚化学结构、降减棉酚剂量和与甾体激素组合用药等研究仍在国内、外少数科研机构中坚持进行。美国人口委员会支持的科研(包括基础和临床研究)从未间断过。针对棉酚上述毒副作用坚持工作的研究,近年来终于取得了可喜的进展。本文对本期发表的曹慧、费仁平等和王岚、叶惟三等两篇论文所取得的结果予以补充和评述。

为探索安全、有效和可逆的男性节育药,曹、叶两实验室均对目前在国际上已进入临床研究阶段的我国棉酚和 WHO 主持的雄激素作为抗生育避孕药的可行性进行了动物实验和临床研究。到目前为止,无论是棉酚或甾体激素类药物单独用药均存在一定的毒副作用。抗生育剂量棉酚(20 mg/d)可能与不可逆性不育和低血钾症有关,而降低棉酚剂量单独使用虽可避免相应毒副作用的出现,但起效期相对延长至 6 个月^[18]。雄激素单独使用(肌注)或与孕激素合并使用亦可达到不育目的,但会引起局部疼痛,睾丸萎缩,乳房增大,骨质代谢不良,心血管堵塞,高密度脂蛋白下降和影响性功能等毒副作用^[14,15]。曹、叶两实验室均对低剂量棉酚和甾体激素单独或合并用药分别进行过探索性比较实验^[18-20]。在对其利弊有一定认识的基础上设计了实验方案。王岚、叶惟三等在题为“合并应用甾体激素与低剂量棉酚对雄性大鼠抗生育效果及其作用机制”的论文中,针对低血钾症采取了有节育效应的低剂量棉酚($12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和针对不可逆性不育合并使用了甲基睾丸素($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和炔雌醇($100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)作为保护精原细胞免遭棉酚损伤的措施在大鼠进行实验研究。利用激素与棉酚的不同位点作用于精子精过程,起效快而对睾丸组织无严重损伤,对脏器无毒副作用。重点突出以附睾精子为低剂量棉酚的靶细胞,以激素作为必要的保护

精原细胞的辅助手段,从而克服了上述毒副作用的发生,取得了符合避孕孕要求的安全有效的可逆的理想结果。组合用药发挥了棉酚和激素优势互补的作用,其优点是:(1)可迅速抑制和杀伤附睾中精子的成熟和活力,使精子数量在 6 周内下降至零而立即起效,改变了一般单独棉酚低剂量对睾丸生精活动轻微而致起效过程时间过长(6 个月)的缺点;(2)利用外源激素对腺垂体性腺激素的抑制作用而使睾丸生精活动后期阶段受阻,但保持早期精原细胞增殖活动不受损伤的可逆性;(3)达到抗生育起效指标后改为单独棉酚的维持剂量($12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),可维持抗生育效应对睾丸无严重损伤,合笼母鼠无一怀孕;(4)停药后 6 周一般可完全恢复生育力,所产仔鼠发育正常;(5)对垂体内腺轴系未见不良影响,T、LH 和 FSH 激素水平保持在正常范围内,以上结果表明组合用药方案设计合理,基本克服了低血钾症和不可逆性不育这两个棉酚严重毒副作用。当然动物实验有其局限性,有待于下一阶段曹、叶两个实验室以临床为主的合作科研验证。可喜的是曹坚实验室已在低剂量棉酚和雄激素的单独使用方面,以及男性不育研究领域做了大量工作^[16-18],积累了丰富的经验,而北京协和医院泌尿科一直是美国人口委员会资助的棉酚临床研究的一个合作点,资料齐全。曹、叶两实验室合作,基础结合临床,预期将为棉酚作为男用避孕药用于临床实验作出贡献。曹坚、费仁仁等在题为“服用低剂量醋酸棉酚对正常男性精子碱性核蛋白的影响”的论文中除证明服用低剂量醋酸棉酚(15 mg/d)的 15 例男性在 12 周达到不育,起效后改服维持量棉酚(10 mg/d),至 44 周可维持不育和不出现低血钾症外,还证明低剂量棉酚可导致组蛋白-精核蛋白取代反应(histone-to-protamine replacement reaction, HPRR)异常,出现组蛋白残留量(TH/TP 值)过多和精核蛋白 HP2 及 HP3 蛋白缺失的不育病例,但停药后 10 周这种精核蛋白缺失恢复正常。提示 HPRR 和精核蛋白比例异常或缺失可以作为评价精子生育力和诊断不育患者的有效指标。上述实验表明低剂量棉酚可对 HPRR 产生一定的阻断作用,是棉酚导致不育的分子作用机制之一。但所引致的改变是可逆的,停药 10 周后可以恢复。以上两篇论文提示的组合用药及低剂量棉酚方案为棉酚作为安全有效及可逆男用避孕药的临床应用前景显示出新的曙光。本文抛砖引玉,希望得到同行的关注和寄希望于有关领导的支持并组织深入研究以作出评估,使这一中国首创的男用避孕药恢复青春,发挥其应有的作用。

参考文献

- 男用避孕药全国协作组. 一种新的男性避孕药——棉酚. 中华医学杂志, 1978, (8): 435-438
- Xue SP. Studies on the antifertility effect of gossypol, a new contraceptive for males. In: Chang CF, Griffail D, Woolman A, eds. Recent advances in fertility regulation. Geneva: ATAR SA, 1980. 122-146
- 薛杜晋, 周增辉, 吴燕婉, 等. ^{14}C -醋酸棉酚在大鼠体内药动物学研究 I. 实验生物学报, 1979, 12(3): 179-196
- 薛杜晋, 周增辉, 吴燕婉, 等. ^{14}C -醋酸棉酚在大鼠体内药动物学研究 I. 实验生物学报, 1979, 12(1): 275-287
- 薛杜晋, 宗书东, 苏树芸, 等. 棉酚对大鼠抗精子发生作用的细胞学、放射自显影及超微结构的观察. 中国科学, 1979, 9: 915-928
- Liu GZ, Lyle KC, Cao J, et al. Trial of gossypol as a male contraceptive. In: Segal SJ, eds. Gossypol. New York: Plenum Press, 1985. 9-16
- Xue SP. Gossypol contraception and mechanism of action. In: Loh T, Hafez ES, eds. Male fertility and its regulation. Boston: Mtp Press Limited, 1983. 155-174
- Qian SZ. Gossypol-hypokalemia interrelationship. Int J Androl, 1985, 8: 313-324
- Liu GZ, Segal SJ. Introduction and history of gossypol. In: Segal SJ, eds. Gossypol. New York: Plenum Press, 1985. 1-7
- Sang GW. Inhibitory effects of gossypol on corticosteroid 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase from guinea pig kidney: a possible mechanism for causing hypokalemia. J Steroid Biochem Mol Biol, 1991, 39: 169-175
- Yu ZH, Chan HC. Gossypol and hypokalemia: a critical review. Adv Contracep Deliv Syst, 1994, 10: 23-33
- Wates GMH, Wang C, Griffin PJ. Gossypol: reasons for its failure to be accepted as a safe, reversible male antifertility drug. Int J Androl, 1988, 21: 8-12
- 顾芝萍, 章仁安, 王益鑫, 等. 低剂量棉酚男性避孕效果和副作用的临床观察. 生殖与避孕, 1994, 14(1): 13-18
- 许 烨, 顾芝萍, 钱绍楨, 等. 十一酸睾酮与棉酚合用对雄性大鼠生育力的影响. 生殖与避孕, 1993, 13(4): 272-276
- 钱绍楨, 许 烨, 查树伟. 男性避孕药近年来研究进展. 中国男性学杂志, 1999, 13(1): 3-7
- 曹 坚, 袁久洪, 金 伟, 等. 庚酸睾酮用于男性抗生育的临床研究. 中华医学杂志, 1996, 76(3): 335-337
- 曹 坚, 刘国振. 棉酚抗生育作用可逆性影响因素分析. 中国医学科学院学报, 1983, 5(4): 227-230
- 曹 坚. 男性生育调节的回顾与展望. 中华泌尿外科杂志, 1992, 13(1): 73-74
- 叶惟三, 但 凌, 薛杜晋, 等. 睾丸酮、雌二醇和棉酚合并用药的雄性抗生育作用及安全性的研究. 药理学报, 1996, 31(4): 313-316
- 叶惟三. 应用黄体激素保护睾丸功能免受化学损伤. 中国医学科学院学报, 1995, 17: 204

合并应用甾体激素与低剂量棉酚对雄性大鼠的抗生育效果及其作用机制[△]

王岚 叶维三^{*} 刘霄 郭燕

(中国医学科学院 中国协和医科大学 基础医学研究所组织胚胎教研室, 北京 100005)

摘要 目的 论证甾体激素与低剂量棉酚组合用药的雄性抗生育作用的可行性及其作用机制 方法 用低剂量棉酚 12 mg/(kg·d), 甲基睾丸素 20 mg/(kg·d), 炔雌醇 100 μg/(kg·d) 喂服 Wistar 大鼠 6 周, 部分取材, 开始合笼; 继续用棉酚 12 mg/(kg·d) 维持 12 周, 部分取材; 余下大鼠停药, 观察恢复情况。取材做大鼠睾丸精子计数、精子活动度、睾丸切片的形态学观察等。结果 用药 6 周大鼠的生育过程受到不完全抑制, 附睾精子全部失去活力。用药 6—12 周大鼠的曲细精管 I—II 期数比例 (9.3±3.4)% 比对照组 (26.8±1.7)% 显著下降; III 期数比例 (36.7±5.0)% 比对照组 (24.5±2.7)% 显著上升; IV—X 期数比例 (3.6±0.6)% 比对照组 (6.0±0.4)% 显著下降。附睾精子全部失去活力。结论 甾体激素与低剂量棉酚从不同的作用位点共同作用于生精过程, 在短时间内完全可以达到抗生育效果; 低剂量棉酚长期作用, 不仅在附睾行使其抗生育功能, 还影响生精过程产生精子的质量。此雄性抗生育作用具有可逆性。

关键词 甾体激素 低剂量棉酚 雄性抗生育作用

中图分类号 R979.21

Combined Use of Steroid Hormone and Low Dose Gossypol for Antifertility and its Mechanism in Rats[△]

Wang Lan Ye Weisan^{*} Liu Xiao Guo Yan

(Department of Histology and Embryology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China)

Objective To study the feasibility and the morphological mechanism of combined use of steroid hormone (methyltestosterone and ethinyl estradiol) and low dose gossypol for antifertility in adult Wistar rats. **Methods** We used methyltestosterone 20 mg/(kg·d), ethinyl estradiol 100 μg/(kg·d), and gossypol 12 mg/(kg·d) to feed male rats for 6 weeks via gastric intubation to induce infertility, then used gossypol 12 mg/(kg·d) alone for another 12 weeks to maintain infertility. Testicular sperm counts, cauda epididymal sperm motility, and sperm silver staining were used to determine infertility and morphology of sperm at the end of the two phases. Testicular morphology of the rats was observed from HE and PAS staining of paraffin sections. F1 generation of the rats would be examined in a series of behavioral tests after their 6-week recovery periods. **Results** There was no substantial change in testicular sperm counts of drugs-treated rats both for 6 weeks and 6 plus 12 weeks compared with that of control. But cauda epididymal sperm motility of drugs-treated rats went down to zero at the end of two phases. The result of sperm silver staining showed that epididymal sperm were all deleterious of either segregation of sperm nucha from sperm head, or separation in annular granule of sperm tail. The observation of testicular morphology suggested that spermatogenesis is only partially affected. The ratios of

△国家自然科学基金(39670763)和卫生部科学研究基金(96-1-074)资助 Supported by the National Natural Sciences Foundation of China(39670763) and Scientific Research Fund of Ministry of Public Health(96-1-074); *Corresponding author Tel.: 010-63296461, Fax: 010-65210729, E-mail: yeweisan@ cast. cn, net