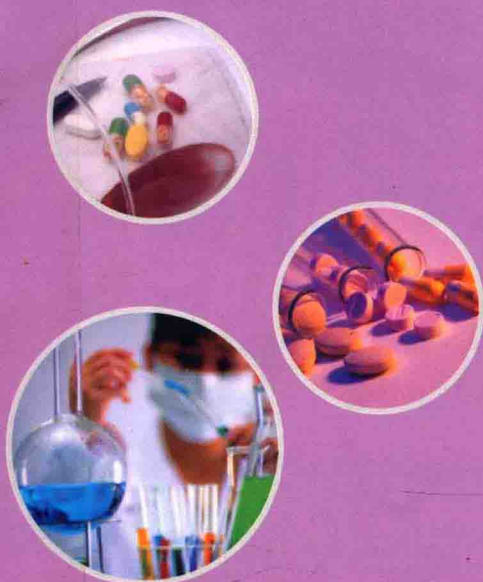


致力于人类的生殖健康



葛店人福



创新
紫韵

复方米非司酮片
Compound Mifepristone

临床手册



湖北葛店人福药业有限责任公司
HUBEI GEDIAN HUMANWELL PHARMACEUTICAL CO.,LTD.



前言

当前世界人口已超过60亿,人口控制已成为世界瞩目的世纪难题之一,发展安全有效、先进实用的避孕节育新技术、新产品,以满足不同人群、不同层次的避孕用药的个性化要求,是近年来国内外避孕节育技术发展的总趋势。

(一)、抗早孕药物的研究

自第一个孕激素受体拮抗剂——米非司酮问世,并开发出米非司酮与前列腺素药物的复合序贯用药方案后,以简单易行、副反应轻微为特点的药物流产方法替代对身体有较大伤害的传统机械吸宫或刮宫法终止早孕的革命性变革终于成为现实。药物流产方法已为广大育龄妇女选用,年用药人数达1700万人次。但现行的药物流产方法仍存在着一些不足的地方,其一是单方的剂量偏大,为25mg/片,共6片,米非司酮总量为150mg;二是单方的服药方法较烦琐,患者自己在家服用易因晚服、漏服而导致不完全流产或流产完全失败;三是由于米非司酮同时具有较强的抗糖皮质激素活性和肝肾毒性,因而易产生与之相关的副反应,有可能会严重的危害到妇女的身心健康。为减少以上副反应的发生,缩短出血时间,提高完全流产率,人们试图寻找一种新的药物,以改善药物流产的现状^[1]。

(二)、复方米非司酮(Compound Mifepristone)的研究

双炔失碳酯(Anordrin, AF-53)是我国自行研制的甾体类抗雌激素。早在70年代,它就作为探亲避孕药使用,房事后口服7.5mg,其避孕效果在6056个月经周期中达99.5%。试验显示该药物能明显降低生物体内的孕激素受体水平,而显示较强溶黄体活性^[2]。

96年,上海计划生育研究所中国工程院院士李瑞麟教授为进一步降低药物流产中米非司酮的使用剂量,减少米非司酮的肝脏毒性副反应,做了大量的动物实验。在此基础上,李院士发现双炔失碳酯与米非司酮有良好的协同作用。在两药单独使用无效剂量(米非司酮3.2mg/kg,双炔失碳酯0.8mg/kg)下,合并单次使用,可达100%抗早孕活性^[3]。

与中国工程院院士、药物制剂国家工程研究中心主任候惠民教授共同研究,将两种药物制成了复方制剂,并对制剂采用了新型固体分散技术,改善了药物在体内的吸收,提高了药物的生物利用度。现在复方米非司酮已获国家专利保护,专利公开号为CN1111512,并被列为“九五”国家科技攻关项目^[3]。

复方米非司酮于1999年获准进入临床试验,临床研究结果显示,60mg米非司酮配伍10mg双炔失碳酯在保持了常规150mg米非司酮同等的临床应用疗效的同时,成功地大幅降低了米非司酮用量,减少了副作用。

本手册编写受到华中科技大学同济医学院计划生育研究所吴熙瑞教授和药学院吕子敏教授的帮助,特此致谢!



目录 contents

前 言

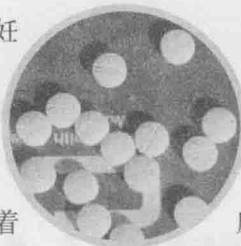
一、药物机理·····	1
二、复方米非司酮片的简介·····	2
1、组成·····	2
2、名称·····	2
3、适应症·····	2
4、服用方法·····	3
5、药代动力学·····	3
6、禁忌症·····	3
7、不良反应·····	3
三、复方米非司酮片的临床前资料·····	3
四、复方米非司酮片的临床研究资料·····	4
1、一期临床资料·····	4
2、二、三期临床资料·····	4
相关论文·····	7
1、复方米非司酮对人早孕蜕膜组织雌孕激素受体的影响·····	8
2、复方米非司酮和米非司酮诱导流产时出血量及临床作用的比较研究···	17
3、复方米非司酮对人早孕绒毛和蜕膜组织结构和分泌功能的影响·····	23



一、药物机理

复方米非司酮片临床手册

米非司酮 (Mifepristone), 是在受体水平的人工合成的抗孕激素, 具有抗受精卵着床、诱导月经及促进宫颈成熟的作用, 其抗早孕的机理主要是通过竞争内膜 (蜕膜) 的孕酮受体, 阻断早孕赖以维持的孕激素的生物学作用, 从而引起蜕膜变性坏死, 继发绒毛组织变性坏死, 内源性的前列腺素释放, 促使LH下降, 黄体溶解, 从而使依赖黄体发育的胚囊坏死产生流产。米非司酮主要是在子宫内膜, 代替天然孕酮, 占有内膜细胞孕酮受体, 从而起到阻止妊娠发展的作用。同时通过减弱孕酮的安宫作用, 使子宫处于兴奋状态; 刺激内源性前列腺素的释放, 引起子宫胶原蛋白分解, 以诱发宫缩增强并软化宫颈, 从而促进流产; 并可明显提高妊娠子宫对外源性前列腺素的敏感性, 故与米孕子宫自发收缩的频率和幅度, 使已剥离的胚囊自宫内排出^[4]。



双炔失碳酯 (Anordrin, AF-53) 是孕激素活性的甾体类激素, 有明显抗着

一种具有弱的雌激素活性和较强的抗雌、床和抗早孕作用, 在体内主要发挥其较强的

抗雌、孕激素作用, 具有很高的抗生育效果。它主要作用于下丘脑—垂体—性腺轴系以及性激素作用的靶器官, 如子宫内膜、宫颈等环节, 在抗生育过程中主要作用于以下四个环节^[5]:

1、对下丘脑—垂体—性腺轴系的抑制作用。

合成激素避孕药大剂量时对下丘脑—垂体产生负反馈的抑制作用, 使黄体生成素释放激素的分泌受抑制, 加之激素避孕药对垂体前叶的直接作用, 使之分泌的促滤泡素和黄体生成素相应降低, 最终导致卵泡发育不良, 以及相应低水平雌激素所引致缺乏垂体黄体生成素的刺激, 因而排卵受到抑制。

2、改变子宫内膜使受精卵不利于着床。

由于排卵受抑制, 且无黄体形成, 孕酮水平很低, 子宫内膜失去周期性变化; 另一方面在合成孕激素作用下, 子宫内膜腺体发育受到抑制, 间质细胞呈蜕膜样变化, 促进子宫内膜早衰。

3、双炔失碳酯直接作用于卵巢。

直接作用于卵巢, 抑制卵泡的发育成熟, 抑制卵巢内雌、孕激素的合成与分泌, 使黄体早衰或发育受到抑制, 产生溶黄体的作用。

4、改变输卵管上皮及其蠕动。

甾体避孕药对输卵管蠕动的影响可因剂量的大小而不同。大剂量用药, 输卵管蠕动增加, 可使受精卵过早进入宫腔, 因与子宫内膜不同步而不能着床; 低剂量孕激素可使卵子运动过缓。

动物实验证实, 双炔失碳酯与米非司酮有协同抗早孕作用, 无效量的双炔失碳酯和无效量的米非司酮合用, 即可起到很好的抗孕作用。两药合用妊娠终止率为100%时, 双炔失碳酯和米非司酮所用剂量仅为其单独抗早孕达到同样效果时所用剂量的40%。由此可见, 双炔失碳酯和米非司酮合并用于抗早孕, 可大大降低两药用药剂量^[6]。



二、复方米非司酮片的简介

1、组成

每片含米非司酮30mg，双炔失碳酯5mg

2、名称

米非司酮

英文名: Mifepristone

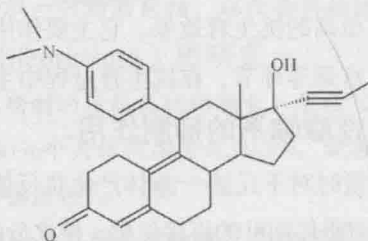
汉语拼音: Mifeisitong

化学名: 11β -[4-(N,N-二甲胺基)苯基]- 17β -羟基- 17α -(1-丙炔基)-雌甾-4,9-二烯-3-酮。

化学结构式如下:

分子式: $C_{29}H_{35}NO_2$

分子量: 429.61



双炔失碳酯

英文名: Anordrin

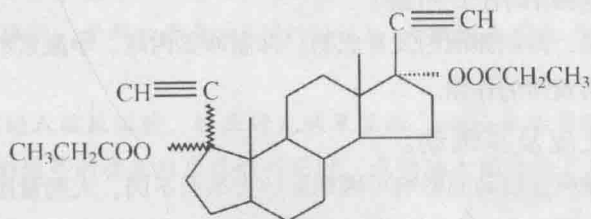
汉语拼音: Shuangqueshitanzhi

化学名: 2α , 17α -双乙炔基, A-环失碳雄甾烷, 2β , 17β -双羟基双丙酸酯。

化学结构式如下:

分子式: $C_{28}H_{38}O_4$

分子量: 438.61



3、适应症

本品与米索前列醇片序贯合并使用,可用于终止停经49天内的早期妊娠。并且较单方米非司酮片疗效更显著,且副作用明显减少、安全可靠,且完全流产率高达98%以上。



4、服用方法

口服，服药后禁食1小时。每天1次，1次1片，连服2天。第3天晨到医院空腹冷水服用米索前列醇片3片，并留院观察6小时。

5、药代动力学

本品中米非司酮经胃肠道快速吸收，导致血浆药物浓度在服后15分钟迅速升高，服药后1小时内血浆药物浓度达峰值。然后血浆药物浓度迅速下降，血浆半衰期约为20小时。其代谢物主要自胆汁由粪便排泄，很小部分（小于10%）代谢产物同尿排出。

6、禁忌症

带宫内节育器妊娠或宫外孕者，肝肾功能衰竭，青光眼以及严重贫血者禁用。

7、不良反应

可能会出现轻度恶心、呕吐、头晕、乏力和下腹痛等不适感。偶可出现皮疹。服用米索前列醇后少有腹痛，部分妇女可发生呕吐、腹泻，少数有潮红、手足发痒、发麻。

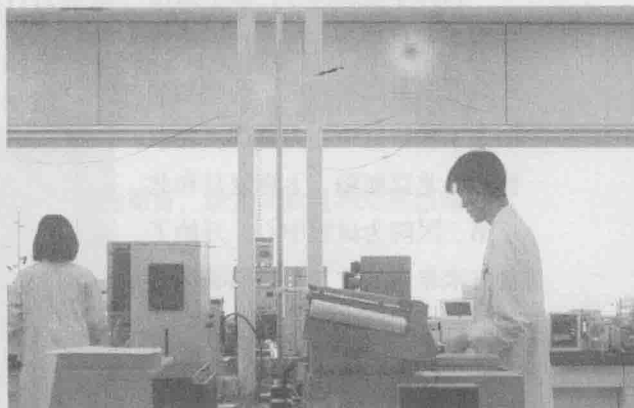
三、复方米非司酮片的临床前资料

据报道，在观察比较复方米非司酮片与单方米非司酮片两种药物终止早孕后发现：1、米非司酮与双炔失碳酯合用时，其终止大鼠早孕作用的效果显著提高；2、单独使用米非司酮、双炔失碳酯终止大鼠早孕ED₅₀的剂量均要大于复方米非司酮；3、复方米非司酮与米索前列醇序贯给药终止早孕的剂量较之单方同等条件下的剂量有较大幅度的降低。结果显示米非司酮与双炔失碳酯对终止大鼠与猕猴早孕均有强协同作用。

复方米非司酮4，20，40mg/kg（约相当于临床量2.6，13，26倍）连续给药3天对小鼠眼球、瞳孔、毛发，以及对小鼠协调运动，翻正反射等一般行为均无影响，说明该药物对神经系统无影响。

复方米非司酮4，30，60mg/kg（约相当于临床量2.6，20，40倍）对Beagle犬的血压，心率、心律，心电图以及呼吸均无明显变化，证明该药该剂量对心血管系统以及呼吸系统无明显影响。

复方米非司酮4，20，40mg/kg（约相当于临床量2.6，13，26倍）连服3天对大鼠排尿量，尿中K⁺、Na⁺、Cl⁻、Ca²⁺无机磷和血清中甘油三酯，总胆固醇，高密度脂蛋白均无影响。在急性慢性毒性实验中，各种动物对药物的耐受性都良好，药物无致突变性能，无致畸作用。





四、复方米非司酮片的临床研究资料

1、一期临床资料

临床研究结果表明,日1次、分2天服用复方米非司酮片,妇女对药物耐受良好,服药后心、肝、肾、代谢等重要机能无明显变化。

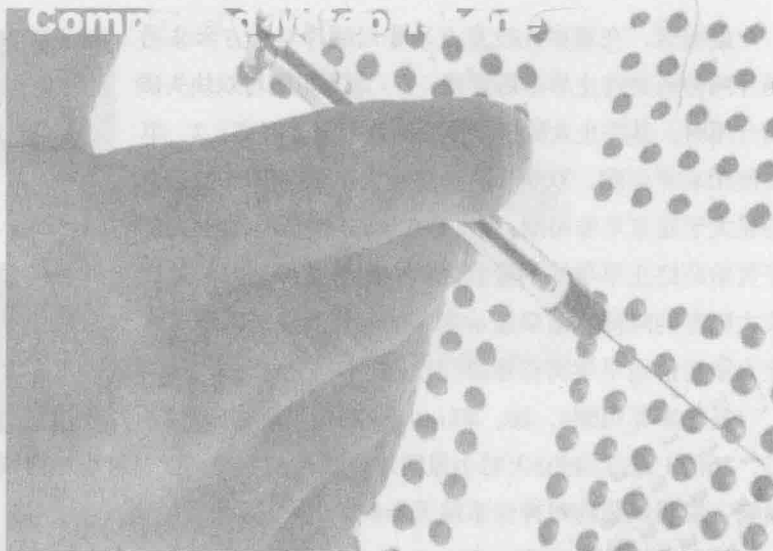
值得注意的是,复方米非司酮片试验对象完全流产率明显高于单方,流产后出血时间及出血量比单方要少,且其恶心、呕吐、下腹疼痛等副反应与单方相比无明显差异。

其中,更令人重视的是,有专家报道:复方米非司酮片在受体水平有拮抗孕激素和糖皮质激素的效应,对抗孕激素作用与单方相比,虽无很明显的差异,但其抗糖皮质激素的活性较单方相比明显降低,因此复方米非司酮片不仅降低了单方对肝脏的毒性副反应,还较大幅度地提高了妇女身体的免疫力,有利于妇女流产后身体的恢复。

2、二期、三期临床资料

1999年至2000年,以上海市计划生育科学研究所、计划生育药具国家重点实验室、药物制剂国家工程研究中心为总部,北京协和、北京朝阳、上海复旦和北京第三医院为试验中心,开始了复方米非司酮片二、三期临床试验。

由复方米非司酮片临床前动物试验不同剂量配伍的临床预试验和临床基础研究中预试验的初步结果,发现复方米非司酮片6:1



(即米非司酮30mg,双炔失碳酯5mg)具有完全流产率95%左右和出血较少的趋势,进入与单方米非司酮片对比性临床试验。现按照国家药品监督管理局新药临床批件1999 XL0090号文件设计临床试验方案,以进一步确定疗效和安全性。自1999年10月到2000年6月在4个中心进行临床试验,现将临床资料总结如下:



（一）、设计和方法

1、剂量分组

- （1）复方米非司酮片6：1组（米非司酮30mg，双炔失碳酯5mg），1日1片，共2片。
- （2）单方米非司酮片150mg（25mg/片，6片），日1次3片，共2次。

以上各组均于第3天加服米索前列醇600 μ g，如4-6小时未见胎囊排出，可再加服米索前列醇400 μ g。

2、随机方法：采用多中心随机双盲双模拟2：1对比性研究。

- （1）例数：456例，其中试验组304例，对照组152例；每个中心分别为76例和38例；
- （2）多中心：共4个中心，北京协和医院，北京朝阳医院，北大三院和复旦医学院妇产科医院；
- （3）随机：各中心按区组随机表转换成序号后分配试验或对照药，接纳研究对象，由于复方米非司酮片（大片）和单方米非司酮片（小片）剂型不一，为此，采用复方米非司酮片（大片）加3小片安慰剂，共4片；单方米非司酮片为3小片，加安慰剂一大片，并按双盲法要求做到外包装完全一致。

（二）、药物

所有药物全部由研制单位免费提供，并保证质量，有药检证明。

（三）、统计和数据处理

- 1、数据记录与校对：在盲状态下完成的病历的记录表，先出各中心组长校对数据后，寄课题组长进行复核，发现问题及时查询更正后，将所有表格分批寄给统计单位。记录数据由两人双遍输入和复核。所有原始记录卡及参与分析各类数据都妥为保存。
- 2、在校对数据无误后，锁入录入数据。由课题组长和统计单位共同揭盲，录入试验组和对照组编号，以供分析比较。
- 3、软件应用：所有资料应用SAS6.12软件进行分析。
- 4、数据分析：汇总资料按以下规定的统计方法对疗效及安全性作出判断：
 - （1）凡数据为连续量（定量数据），正态检验符合后，试验组和对照组的平行比较用成组T检验（group t-test）；数据不符合正态分布，应用非参数统计方法（non-parametric method）。
 - （2）凡数据为定性资料，用校正的 χ^2 检验，病例书少不足以应用校正的 χ^2 检验时，用精确概率法（Fisher's exact method）。
 - （3）凡数据为分级（无、轻度、中度、重度），用校正的秩和检验（Wilcoxon rank sum test）。
 - （4）凡数据为多组间比较，定量资料用方差分析，严重偏离正态的用非参数方法，定性资料应用多组的 χ^2 检验。
 - （5）对于副反应列出试验组与对照组的副反应发生对照表，计算发生频率及统计检验两组的差异性。



(四)、结果

1、四个中心试验组和对照组对象服用药品后身体耐受情况。

早孕反应		耐受情况	
		试验组	对照组
恶心	无	21.05%	31.58%
	轻	76.32%	63.16%
	重	2.63%	5.26%
呕吐	无	75%	65.79%
	轻	25%	31.58%
	重	0%	2.63%
头晕	无	96.05%	94.74%
下腹疼痛	无	92.11%	89.47%
	轻	7.89%	10.53%

上述数据说明,在服用复方米非司酮片或单方后,两组均有程度不同的恶心、呕吐、头晕、下腹疼痛,其中实验组的恶心、呕吐等副反应的程度要低于对照组。这证明复方米非司酮片对早孕妇女的副作用较单方要小,能减轻早孕妇女的痛苦。

2、四个中心试验组和对照组对象服用药品后完全流产率,出血量,转经天数以及平均行经天数等情况。

用药后情况		试验组	对照组
流产率	完全流产率	98.68%	92.06%
	不完全流产率	1.32%	5.97%
	失败率	0%	1.97%
出血量	无	28.95%	31.58%
	少	63.16%	47.79%
	差不多	6.57%	15.37%
	多	1.32%	5.26%
转经天数(天)		39.64	36.76
平均行经天数(天)		6.21	7.92

从上表数据中,早孕妇女在服用复方米非司酮片或单方后效果比较,可以看出复方米非司酮片的完全流产率比单方明显提高,且失败率要低于单方;而两者在出血的量上,复方米非司酮片出血量与单方相比较少,平均行经天数也比单方要短。根据试验结果看来,早孕妇女服用复方米非司酮片后,



流产效果要比单方明显要好。这样,不仅能够减轻了对象的负担,更能减少对象身体所受的损害,有利于对象流产后的恢复。

综上所述,复方米非司酮片与国内现有的单方米非司酮片相比:

- (1) 剂量下降了60%,且疗效比单方米非司酮片要好;
- (2) 由于剂量减少,其相应的副作用也显著降低,并减少了抗糖皮质激素的活性和肝功能的下降的毒副作用;
- (3) 它仅2片,1天1片,服药更加简便,避免漏服;
- (4) 本产品采用新型的分散技术,更易于吸收。

参 考 文 献

[1] 21世纪中国计划生育/生殖健康产业论坛:陈海林研究员谈国内外避孕节育技术发展产业化前景。

中国人口网→人口论坛→专题讨论。 [Http://www.chinapop.gov.cn/rklt/zttl/t20040326_1735.htm](http://www.chinapop.gov.cn/rklt/zttl/t20040326_1735.htm).

登陆时间:2004年8月29日

[2] 金力,沈维达,孙志达.复方米非司酮对人体早孕蜕膜组织雌孕激素受体的影响.生殖与避孕,

2000,20卷4期:202-208 Reproduction&Contraception (2000) 20(4); 202-208.

[3] 中国人口网。 [Http://www.chinapop.gov.cn/zttp/zhrk4/lirl.htm](http://www.chinapop.gov.cn/zttp/zhrk4/lirl.htm).

登陆时间:2004年9月2日

[4] 人民健康网→避孕与流产→药物流产。

[Http://www.wsjk.com.cn/gb/paper146/1/class014600007/hwz116291.htm](http://www.wsjk.com.cn/gb/paper146/1/class014600007/hwz116291.htm).

登陆时间:2004年9月4日

[5] 樊瑞芹,于伎荣,张婉萍.复方米非司酮和米非司酮诱导流产时出血量及临床作用的比较研究.河

北医药,2003 12,25卷12期. Hebei Medical Journal, Dec 2003, Vol 25, No.12.

[6] 刘芳,于俊荣,李杰.复方米非司酮对人早孕绒毛和蜕膜组织结构和分泌功能的影响.生殖与避

孕.21卷.第5期. Vor.21, No. 5 2001年10月 Oct. 2001.

附录:

相关论文



生殖与避孕(2000)20卷4期202-208页 Reproduction & Contraception(2000)20(4):202-208

· 论 著 ·

复方米非司酮对人早孕蜕膜组织雌孕激素受体的影响

金力 沈维雄 孙志达 范光升 乌毓明 王寒正*

(中国医药科学院北京协和医科大学北京协和医院妇产科, 北京, 100730)

(*上海计划生育科学研究所分子生物学实验室, 上海, 200032)

观察服用复方米非司酮片(米非司酮+AF-53)后早孕妇女蜕膜组织雌孕激素受体的变化。60名孕6-7周的妇女被随机分为6组, A组:对照组; B组:米非司酮40mg/次; C组:米非司酮75mg/次; D组:复方米非司酮1片(米非司酮20mg+AF-53 5mg); E组:复方米非司酮1片(米非司酮30mg+AF-53 5mg); F组:复方米非司酮1片(米非司酮40mg+AF-53 5mg)。以上各服药组, 均为上述剂量每日1次, 连服2日。服药48h后手术终止妊娠, 取蜕膜组织, 放射性配体结合试验测定其胞浆、胞核雌、孕激素受体浓度。结果显示: 复方米非司酮各配伍组均显著降低孕激素受体(PR), 升高雌激素受体(ER), 改变ER/PR, 促进流产发生。E组使胞浆雌激素受体(EcR)显著高于其它各用药组, 可能有利于流产后雌激素尽快作用于ER, 促进内膜恢复。结论提示复方米非司酮中米非司酮与AF-53配伍具有协同作用, 改变了雌孕激素受体比例, 促进流产的发生, E组有利于子宫内膜的恢复。

关键词: 米非司酮; 双炔失碳酯; 雌激素受体; 孕激素受体; 蜕膜

米非司酮(Mifepristone), 是通过与孕激素竞争受体, 阻断早孕赖以维持的孕激素的生物学作用⁽¹⁾。目前在我国, 米非司酮与前列腺素类似物配伍终止早孕的剂量为150-200mg, 抗早孕的有效率为92-94%, 因剂量较大, 有一定的副作用, 特别是药物流产后造成蜕膜、绒毛组织的残留以及药物本身的抗内膜增殖作用等引起的阴道出血时间长、量多等副反应, 严重危害了妇女身心健康。为了减少以上副反应的发生, 缩短阴道出血时间, 提高完全流产率, 人们试图寻找一种最佳配伍, 改善药物流产的现状。

双炔失碳酯(Anordrin, AF-53), 是一种甾体类激素, 具有弱雌激素活性, 和较强的抗雌激素活性⁽²⁾。早在70年代, 它作为一种探亲避孕药, 房事后口服7.5mg, 其避孕效果在6056个月经周期中达99.5%⁽³⁾。

上海计划生育研究所和上海现代制药有限公司研制的新型抗早孕药物复方米非司酮中米非司酮减量的同时加用了AF-53, 由于二者作用机制不同, 联合应用是否改变了雌孕激素受体水平, 是否能从受体水平发挥协同作用, 本试验对服用不同配比组复方米非司酮药物的早孕妇女蜕膜组织, 采用经典的放射性配体结合试验(DCC法)来测定复方米非司酮作用后蜕膜雌孕激素受体变化。



材料与方法

一、病例选择

- 1、选择标准 选择孕周 ≤ 49 d早孕妇女, 年龄38岁以下, 身体健康, 要求终止妊娠, 无服药禁忌并志愿服用不同配比药物者, 在服药48h后行人工流产终止妊娠, 取其蜕膜组织(肉眼及病理证实)。
- 2、标本处理 将上述新鲜蜕膜组织用冰生理盐水洗涤去掉血块、粘液等, 立即放入液氮中保存。

二、药物

米非司酮片及不同配比复方米非司酮片由上海市计划生育科学研究所和上海现代制药有限公司研制, 李瑞麟院士提供。

三、试验分组

共60例对象, 分6组, 每组10例。A组: 对照组; B组: 米非司酮40mg; C组: 米非司酮75mg; D组: 复方米非司酮片4: 1(米非司酮20mg: 双炔失碳酯5mg); E组: 复方米非司酮片6: 1(米非司酮30mg: 双炔失碳酯5mg); F组: 复方米非司酮片8: 1(米非司酮40mg: 双炔失碳酯5mg)。以上各服药组, 均为上述剂量每日1次, 连服2日。

四、主要化学药品

(一) 同位素

[2-、4-、6-、 7^3 H]-oestradiol: 比放86 Ci/mmol, 放射惰性雌二醇
由R5020由Du Pont Boston MA 公司生产。

[17- α -METHYL-3H-progesterone](R5020): 比放85Ci/mmol。放射惰性R5020由Du Pont Boston MA 公司生产。

(二) 主要试剂配制

- 1、TED 缓冲液 10 mmol/L Tris-HCl, 1.5 mmol/L EDTA, 1mmol/L DTT, 10%的甘油, 20mmol/L 钼酸钠, pH 7.4。

- 2、TDB 缓冲液 10 mmol/L Tris, 1mmol/L DTT, pH 7.6。

- 3、TDBK8 缓冲液 10mmol/L Tris, 0.8mmol/L KCl, 1mmol/L DTT, pH 7.6。

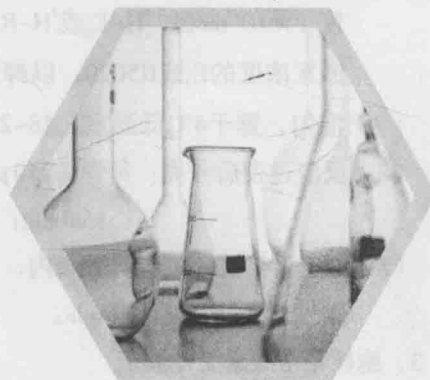
- 4、N1 缓冲液 1mmol/L KH_2PO_4 , 0.32mol/L 蔗糖, 3mol/L MgCl_2 , 0.25% Triton $\times 100$, pH 6.5。

- 5、N2 缓冲液 1mmol/L KH_2PO_4 , 0.32mol/L 蔗糖, 3mmol/L MgCl_2 , pH 6.8。

- 6、N3 缓冲液 1mmol/L KH_2PO_4 , 1.5mmol/L 蔗糖, 1mmol/L MgCl_2 , pH 7.0。

- 7、DDC液 0.5%活性炭, 0.05%葡聚糖, 0.2%白明胶。

- 8、闪烁液 PPO 0.6% 6.8g, POPOP 0.08%, 0.9g, 二氧六环1000ml, 乙二醇22ml, 甲醇114ml, 奈68g。





五、测定方法

采用放射性配体结合试验-葡聚糖包裹活性炭液吸附试验(DCC法)。

(一)测定原理

在一定条件下,以氘标记的雌、孕激素为配体,与雌、孕激素受体结合,并以葡聚糖包裹活性炭液吸附游离的甾体激素,用液闪法测定与受体结合的标记激素含量,以激素与受体结合的动力学方法计算受体含量。

(二)具体方法

全过程均在0-4℃下进行。

1、制备上清液

(1)制备匀浆:称湿重600mg组织,剪成碎块,用Soniprep 150 超声匀浆器、1:5(W:V)TED缓冲液3ml、2:1000(W:V)PMSF 6μl冰上匀浆6次,每次5s,间隔30s;

(2)离心:匀浆液以2000×g,离心15min,沉淀部分用于核受体测定(-80℃冻存),上清部分离心15000r/min, 1h,上清部分用于胞浆受体测定及DNA或蛋白定量;

2、胞浆雌孕激素受体测定

(1)上述上清液各取1.25 ml分装于两组Eppendorf试管内,一组用于雌激素受体测定,另一组加入2:1000(W:V)考松2.5μl用于孕激素受体测定;

(2)取两列试管(每列均为双管),第一列为结合管,分别加入匀浆上清200μl,反应浓度 1×10^{-7} mol/L $^3\text{H-E}_2$ 或 $^3\text{H-R5020}$ 50μl,以测定其总结合量;第二列试管加入1000倍于标记激素浓度的 E_2 或R5020,以抑制标记激素与受体的结合,测定非特异结合;

(3)混匀,置于4℃低温室,18-20 h;

(4)反应过夜后分离:每管加250μl DDC液,混匀,静置30min后,3000r/min于Beckman离心机离心15min/g;

(5)取上清液250μl置计数瓶内,加5ml闪烁液,混匀,37℃温箱内温育2h后,以β液体闪烁计数器测定其每分钟计数cpm。

3、胞核雌孕激素受体测定

(1)前次2000×g离心后用于核受体测定的沉淀部分,悬浮于1:5(W:V)2ml N1缓冲液中,混匀,离心3000×g, 5min;

(2)去上清,沉淀加N2缓冲液1:5(W:V)2ml,混匀,离心3000×g, 5min,重复该步骤一次;

(3)去上清,沉淀加0.4ml N2缓冲液,2.2ml N3缓冲液,混匀后,离心15000×g, 30min;

(4)去上清,管壁擦干,加1ml TDB缓冲液,混匀后加1ml TD-BK8缓冲液1ml,混匀,冰浴30 min后,离心15000r/min, 20min;

(5)取上清,用于雌、孕激素受体测定以及DNA或蛋白定量;

(6)总结合及非特异结合测定方法同步骤(2)-(5)。



(三) 结果处理

以各管的总结量减去相应管内的非特异结合量，即为各管的特异结合量，计算受体含量时，考虑机器的计数效率、放射性配体比放射性以及放化纯度等。受体含量计算公式如下⁽⁴⁾：

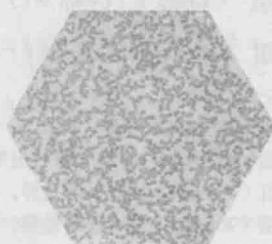
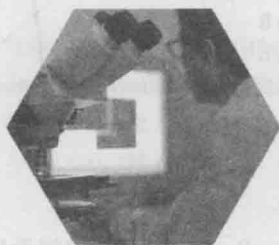
$$\text{受体含量 (nmol/mgDNA)} = \frac{\text{样品SB (cpm)}}{\text{计数效率} \times \text{放化纯度} \times \text{比放射性} \times \text{受体DNA含量} \times 2.2 \times 10^3}$$

六、结果处理

以各管的总结量减去相应管内的非特异结合量，即为各管的特异结合量，计算受体含量时，考虑机器的计数效率、放射性配体比放射性以及放化纯度等⁽⁴⁾。

七、统计学处理

采用t检验作显著性检验。



结 果

一、对孕激素受体的影响

(一) 胞浆孕激素受体 (PcR)

- 1、单用米非司酮的40mg、75mg组与对照组相比，显著降低PcR， $P < 0.05$ ；但40mg与75mg两组之间无显著差别， $P > 0.05$ ；
- 2、复方米非司酮的三个配伍组与对照组及c组相比，显著降低PcR， $P < 0.01$ ；D组则为差异， $P < 0.05$ ；
- 3、复方米非司酮E组、F组与单用的B组相比，PcR显著降低， $P < 0.05$ ；而D组与单用的B组相比，无显著差异， $P > 0.05$ ；
- 4、复方米非司酮各配伍组之间对PcR影响无显著差异， $P > 0.05$ ，见表1。

表1 蜕膜组织孕激素受体浓度 $\bar{x} \pm s$ (fmol/mg DNA)*Table 1 Progesterone receptor concentrations ($\bar{x} \pm s$) in decidua (fmol/mg DNA)

分 组 Group	例数 No. of cases	细胞核 Nuclei	细胞浆 Cytosol
A组对照组 Group A (untreated group)	10	777.3 $\pm$ 101.2	3217.1 $\pm$ 1324.7
B组 40mg组 Group B (Group 40 mg)	10	900.6 $\pm$ 362.5	1700.6 $\pm$ 818.2 ^a
C组 75mg组 Group C (Group 75 mg)	10	1087.8 $\pm$ 202.6 ^a	2077.6 $\pm$ 647.1 ^a
D组 4:1组 Group D (Group 4:1)	10	415.8 $\pm$ 125.5 ^{abc}	1214.9 $\pm$ 865.3 ^{ad}
E组 6:1组 Group E (Group 6:1)	10	796.8 $\pm$ 152.9 ^{bd}	981.1 $\pm$ 332.6 ^{acd}
F组 8:1组 Group F (Group 8:1)	10	540.4 $\pm$ 136.7 ^{abc}	915.8 $\pm$ 406.9 ^{acd}

注: a: 与对照组比有显著差异, $P < 0.05$; $P < 0.01$ (Group B, C $P < 0.05$) for differences from control

b: 与D组(4:1组)、F组(8:1组)比有显著差异, $P < 0.01$; $P < 0.01$ for difference from group D, F

c: 与B组(40mg组)比有显著差异, $P < 0.05$; $P < 0.05$ for the differences from the group B

d: 与C组(75mg组)比有显著差异, $P < 0.01$; $P < 0.01$ for the differences from the group C

e: 与B组(40mg组)比有显著差异, $P < 0.01$, (F组 $P < 0.05$); $P < 0.01$ (group F $P < 0.05$) for the differences from the group B

(二) 胞核孕激素受体(PnR)

各组胞核孕激素受体测定结果见表1。

- 1、复方米非司酮D组、F组与A组及B组相比, PnR显著降低, $P < 0.01$, $P < 0.05$; 而6:1组无显著差异, $P > 0.05$ 。
- 2、复方米非司酮各配伍组之间, E组与D组、F组相比, PnR显著升高, $P < 0.01$ 。
- 3、复方米非司酮的三个配伍组与C组相比, PnR显著降低, $P < 0.01$ 。
- 4、单用米非司酮的C组与A组相比, PnR显著升高, $P < 0.01$ 。

二、对雌激素受体的影响

(一) 脑浆雌激素受体(EcR)

- 1、单用米非司酮组与对照组相比, 对EcR无显著影响, 复方米非司酮三个配伍组EcR有升高的趋势, 但与对照组比无显著差异, $P > 0.05$ 。
- 2、复方米非司酮各组与40mg, 75mg组相比, E组EcR显著升高, $P < 0.01$ 。
- 3、复方米非司酮各配伍组中E组使EcR升高的程度, 显著高于D组、F组, $P < 0.05$, 见表2。

(二) 胞核雌激素受体(EnR)

- 1、单用米非司酮的75mg组与对照组及4mg组相比, EnR显著升高, $P < 0.05$, 而40mg组对EnR无显著影响。



2、复方米非司酮F组与对照组相比，EnR显著升高， $P < 0.05$ ；而各配伍组之间相比，对EnR无显著影响， $P > 0.05$ ，见表2。

表2 蜕膜组织雌激素受体浓度 $\bar{x} \pm s$ (fmol/mg DNA)

Table 2 Oestrogen receptor concentrations ($\bar{x} \pm s$) in decidua (fmol/mg DNA)

分 组	Group	例数 No.of cases	细胞核 Nuclei	细胞浆 Cytosol
A组对照组	Group A (untreated group)	10	70.7 ± 61.5	928.7 ± 626.8
B组 40mg组	Group B (Group 40 mg)	10	78.4 ± 52.5	474.7 ± 260.8
C组 75mg组	Group C (Group 75 mg)	10	162.7 ± 95.7^a	471.2 ± 213.0
D组 4:1组	Group D (Group 4:1)	10	134.2 ± 165.3	657.5 ± 186.8
E组 6:1组	Group E (Group 6:1)	10	171.3 ± 144.5	1093.9 ± 514.7^{cd}
F组 8:1组	Group F (Group 8:1)	10	252.3 ± 239.4^b	504.9 ± 325.3

注：a：与A组（对照组）及B组（40mg组）有显著差异， $P < 0.05$ ； $P < 0.05$ for the differences from group A and group B

b：与A组（对照组）比有显著差异， $P < 0.05$ ； $P < 0.05$ for difference from group A

c：与B组（40mg组）、C组（75mg组）比有显著差异， $P < 0.01$ ； $P < 0.01$ for the differences from group B and group C

d：与D组（4：1组）、F组（8：1组）有显著差异， $P < 0.05$ ； $P < 0.05$ for the differences from group D and group F

讨 论

一、复方米非司酮有效地降低孕激素受体浓度

（一）减量的米非司酮与AF-53配伍显著降低孕激素受体浓度

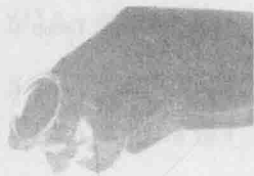
由试验结果知，复方米非司酮各配伍组，均显著降低了PcR浓度，而复方米非司酮各配组中米非司酮的总剂量分别为40mg、60mg、80mg，低于单方组，但降低PR的能力却强于单方组，尤以E组，F组显著，而三个配伍组之间却无明显差异，也即三组复方米非司酮均能显著降低PR，与1993年Zaytseva⁽⁵⁾等以及1992年Shi⁽⁶⁾等结果一致，表明：AF-53与减量的米非司酮配伍具有协同作用，大幅度降低了PR。



(二) 孕激素受体是二者协同作用的关键

动物试验表明^(7, 8)：50%有效剂量的米非司酮与50%有效剂量的AF-53配伍终止了所有的大鼠妊娠，即米非司酮与AF-53联合应用比单独应用更有效。仓鼠服用4倍于大鼠有效剂量的米非司酮也不能终止妊娠，原因是由于米非司酮在这类动物中并不能与孕激素受体结合；同样，AF-53即使以很高剂量也不能终止妊娠⁽⁷⁾。这些表明孕激素受体是米非司酮与AF-53发挥协同作用的先决条件。Wang⁽⁸⁾等动物试验表明，AF-53与低剂量米非司酮联合应用，可显著降低早孕小鼠孕激素水平，而雌激素无论单独或联合应用，对孕激素无影响。其他文献也表明了AF-53在孕激素的合成上有抑制作用。这种抑制作用可能是由于AF-53的主要代谢产物AF-45的抗雌激素作用间接地抑制了PR的合成，而AF-53本身与PR无亲和力⁽⁹⁾。

以上说明了AF-53与减量的米非司酮配伍确实存在一种协同作用，它不仅能够有效降低孕激素受体浓度，而且还能降低孕激素水平，而孕激素受体是二者协同作用的关键。



二、复方米非司酮升高了雌激素受体浓度

(一) 对胞核雌激素受体的影响

AF-53为具有弱雌激素活性的抗雌激素。AF-53与雌二醇能明显增加子宫核EnR的含量，但对胞浆EcR的作用则不同，雌二醇使胞浆EcR提高两倍，而AF-53却对胞浆受体作用不明显⁽⁹⁾。

最近研究表明抗孕激素在一定条件下有作用于子宫内膜的抗雌激素作用，米非司酮削弱了雌激素的子宫内膜增殖作用，并有剂量依赖性⁽¹⁰⁾。米非司酮配伍低剂量前列腺素类似物终止早孕时，米非司酮减缓了雌激素依赖的内膜增殖作用⁽¹¹⁾。由于米非司酮及其代谢产物均无与ER结合能力，所以这种作用被称为非竞争性抗雌激素作用⁽¹²⁾。这种抗内膜增殖作用的抗雌激素作用，与孕激素引起的ER减少机制不同，并没有使ER减少，相反，这种治疗后内膜的ER特别是EnR却显著增加，并有剂量依赖性⁽¹³⁾。这就使得胞核中ER过度表达，但却无能力激活能使内膜增殖的受体后作用机制，与长时间用过量雌激素治疗情况相仿，使雌激素的内膜增殖作用减弱，内膜萎缩或仅轻度增生⁽¹⁰⁾。

鉴于以上，米非司酮与AF-53均具有抗雌激素活性，对胞核EnR应表现出较强的协同作用。从试验结果看，F组与40mg组米非司酮剂量相同，但40mg组对EnR无影响，而F组与75mg组一样，却使EnR显著升高，表明了AF-53在这一比例中表现出较强的抗雌激素活性。Zaytseva⁽⁵⁾等的研究指出：蜕膜ER浓度在服用米非司酮600mg或3×25mg，36h后升高，可能系由于服用米非司酮后解除了孕激素对ER的抑制作用。已表明孕激素可引起EnR的减少⁽¹⁴⁾。而米非司酮可逆转孕激素的这种抑制作用，提高EnR水平^(15, 16)。