

实用生物化学

下 册

人 民 卫 生 出 版 社

实用生物化学

下 册

(第 十 三 版)

著者: P. B. 霍 克 B. L. 欧 塞 W. H. 苏穆森

译者: 中山医学院生物化学教研组

許鵬程	龔蘭貞	徐曉利
关惠連	伍云香	簡仕廉
邓文英	梁淑芬	馬潤泉
刘时中	盧济生	陈历昌
庄 詠 济		

总校: 龔蘭貞 許鵬程

人 民 卫 生 出 版 社

一九六一年·北京

第二十六章 激 素

內分泌器官或內分泌腺体(圖201)是一种特殊的組織,其功用在于分泌某种特殊化学物質,称之为激素。激素随血液循环运送到体内各部分。某些組織受其影响之后,發生特殊变化,能增强、減弱或改变組織的生長、代謝及生理活动等。因此,激素能將机体所有机能加以調节;同时激素本身也有它的代謝轉变。

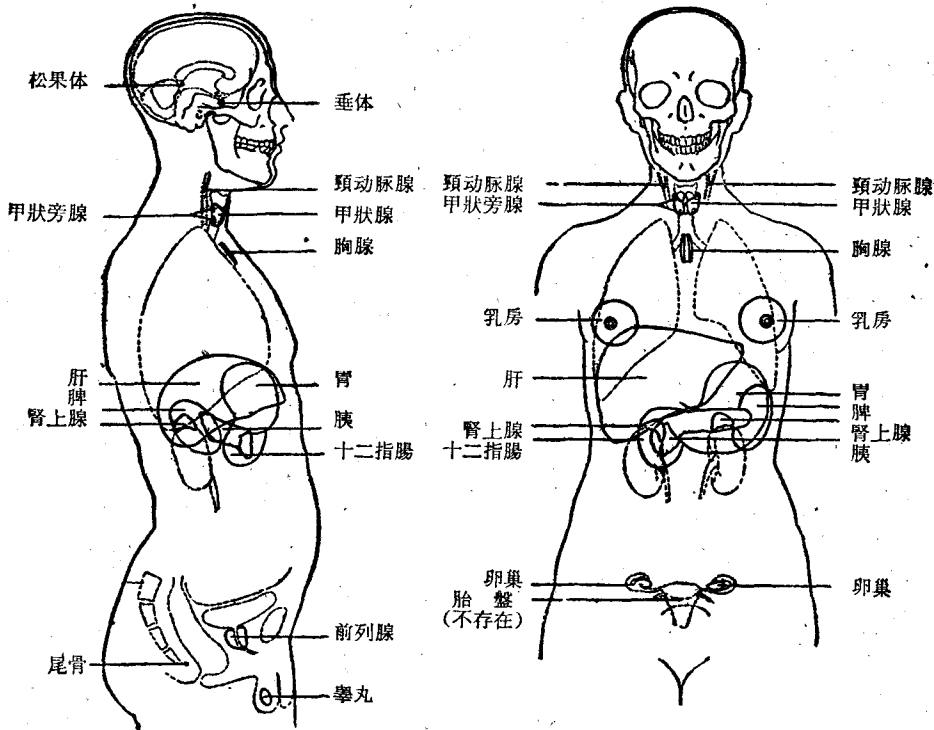


圖 201 內分泌系統示意圖

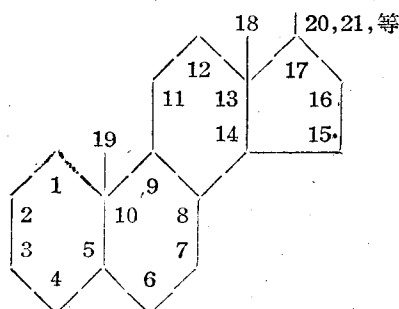
例如它可以部分或完全被氧化或还原;这些已被認出的轉变后的产物与未經变化的激素,可由尿或胆汁排出。

內分泌器官的分泌活动,經常改变。如489頁圖表所示,性腺、肾上腺皮質与甲状腺的形态構造和內分泌活动等,受腦下垂体前叶所产生的各种激素所控制,而腦下垂体前叶也能分泌一些直接作用于非內分泌組織的構造与功能的激素。反过来,腦下垂体前叶也部分地(直接或間接)受性腺、甲状腺等所产生的激素的濃度所管制,同时也受神經系統直接管制。同样,腦下垂体后叶与肾上腺髓質亦直接受神經調节。至于胰腺、甲状旁腺和其它激素的可能来源的分泌活动,到底是受什么管制,則尚未完全明了。从圖表可以看出,一个單独器官或代謝过程,往往可能受不只一种激素的影响,亦可能受激素以外的其它因素的影响。

从各种不同种属的动物所得到的激素,在化学构造上没有显著的不同,因此从动物内分泌器官所获得的提取物,往往可用以治疗人类因内分泌腺体活动不足而引起的各种疾病;但用人工合成的,与天然激素相同或相似的制品,其价格较为低廉。在医疗上,因内分泌腺体活动机能过盛而引起的疾病(例如在内分泌细胞中长出肿瘤)往往应用外科手术可将其不正常的组织切除;或有时亦可选用某些抑制药或用 X-射线照射而进行治疗。按照它们的化学性质,激素可以分为两大类。第一类是含氮的化合物,其包括范围很广,简单者如肾上腺素之类的含氮硷性化合物;复杂者有构造未详的高分子量蛋白质等。第二类是成分较为一致的固醇类激素。

性腺与肾上腺皮质的固醇类激素

固醇类与固醇类激素的一般化学 固醇类物质的饱和碳环的基本构型如式 I:



固醇类的碳环基本构型 (I)

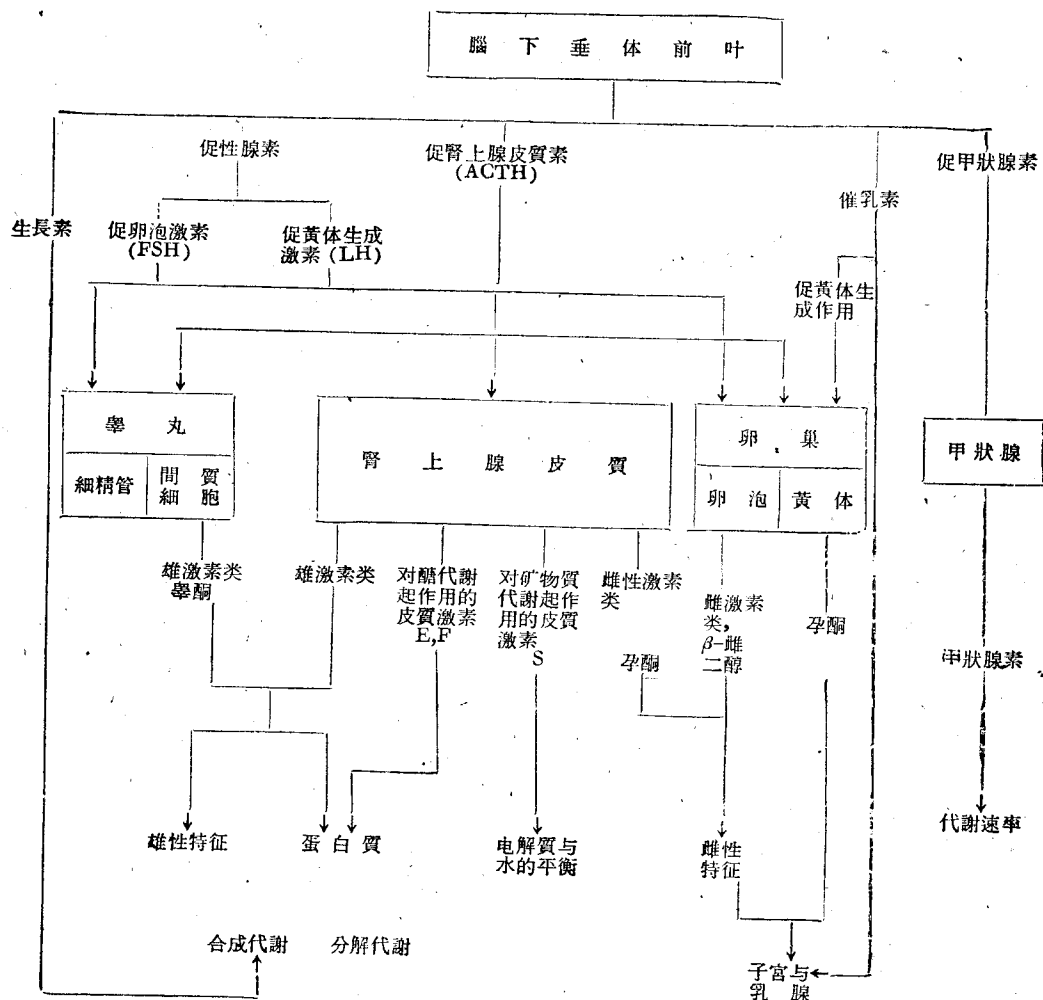
根据在 C_{17} 上的取代基(R)的化学性质,固醇类可分为下列五类:

- (1) 固醇类,如胆固醇与麦角固醇, R 为 8 个或 9 个碳原子的脂肪族支链。
- (2) 胆汁酸, R 为末端带有羟基的 5 个碳的支链。
- (3) 强心糖苷配基,是刺激心脏的糖苷,是毒毛旋花子、毛地黄等的分解产物,在 C_{17} 处有一个内酯环取代。
- (4) 皂角苷配基,是植物皂角苷的衍生物, R 属于硫醚类的化合物。
- (5) 固醇类激素,在 C_{17} 处有一个酮基或羟基(雄激素类与雌激素类),或一个被取代的二碳支链(孕酮与肾上腺皮质激素类)。

所有固醇类激素在 C_3 处都有酚基或酮基,在后页列出了一些主要的固醇类激素的分子式,并用箭头指出它们在体内是如何失去活性和如何排出的代谢途径。卵巢卵泡的各种激素(雌激素类),在 A 环处都有一个芳香族核(苯核)。睾丸、黄体与肾上腺皮质的激素,在 A 环中均有一个 α - β 不饱和的酮基;若这个基被饱和,则生理活性完全消失。这是睾丸、黄体与肾上腺皮质等激素在体内失去活性的一般机制;这些激素经过还原以后,它的第 3 与第 5 位的碳原子便变成不对称碳,因此每种激素都可能有四种完全被还原的几何异构体。酮基经过还原(氢化)以后便成为羟基,羟基能以 C_{10} 的甲基为定位而排列成顺式或反式两种。顺式与反式的表异构体,可以分别用 α 与 β 字冠表示,习惯上也有用虚线 and 实线来表示两种立体构造式[可以比较雄素酮(III)与异雄素酮(IV)]。3(β)-羟基-固醇类能与毛地黄皂苷(由毛地黄所得的皂角苷)生成微溶于水的加合化合物;但 3(β)-

羟基固酮类的表异构体(3(α)-化合物)则没有这样的作用。若以氢原子导入 C_5 中,使 4:5 或 5:6 的双键饱和,亦能产生以 C_{10} 的甲基为定位而生成的顺式或反式化合物;因此在平面构造式中,亦可分别用实线或虚线表示[比较雄素酮(III)与表-5 异雄素酮(V)];属于这种类型(C_5 处导入氢的)的异构体,一共有两对化合物。第一对是含有 19 个碳原子的饱和碳氢化合物的固醇类激素,即雄素烷(反式)与表胆烷(顺式)。第二对是含有 21 个碳原子的激素,即孕烷(顺式)与别孕烷(反式)。

合成固醇类化合物的整个步骤,已经能够通过一系列复杂反应而得到成功,但这些反应在工业上还不能用上。固醇类激素是由降解天然存在的动植物固醇类而制成。Diosgenin 是一种从墨西哥薯蓣中所提取得的一种皂角苷基,它能转变为妊娠激素(XIII)与去氧皮质固酮(XIV),而且又能进一步转变为睾酮(II)与雌素酮(VIII)。胆固醇也可以衍生上述的四种激素,但其结果较不满意。胆汁酸,特别是去氧胆汁酸,可以作为部分合成在 C_{11} 处带有氧的肾上腺皮质激素的物质;属于 C_{11} 处带有氧的激素有可狄松(XV)、皮质固酮

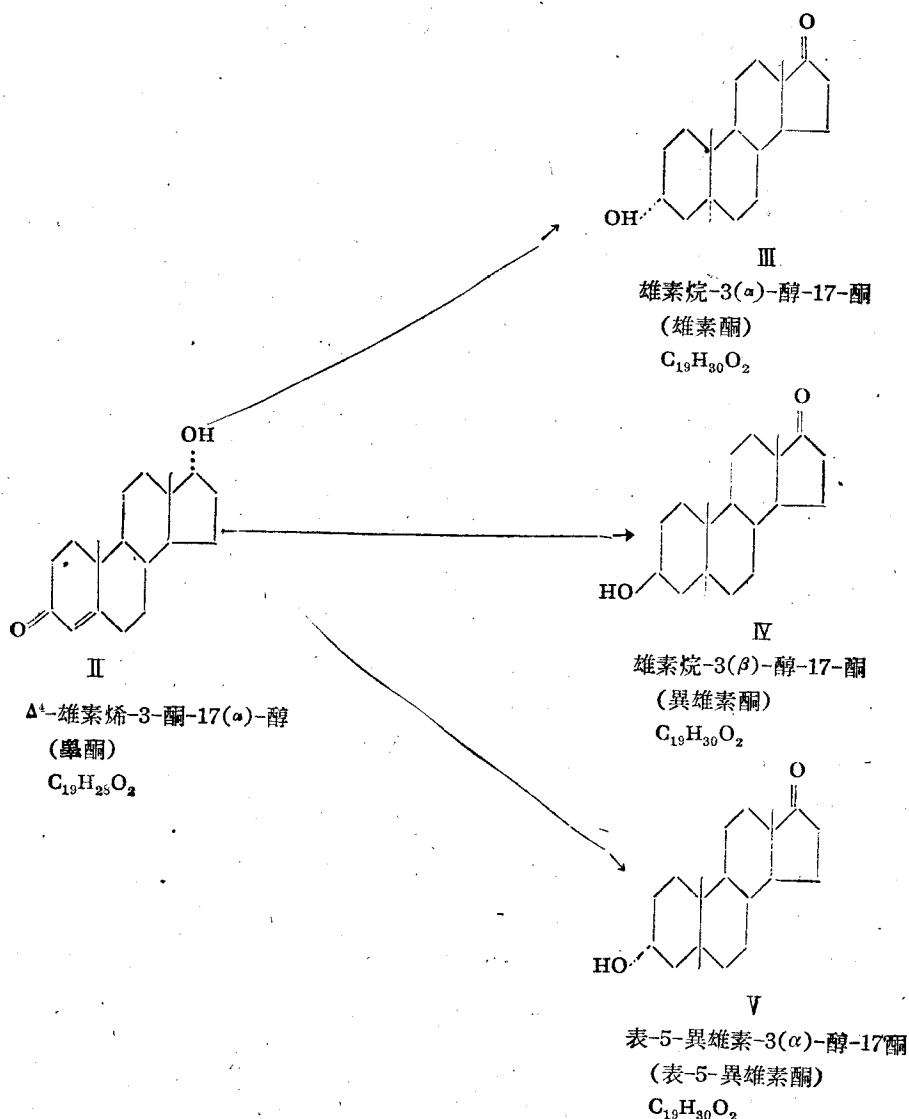


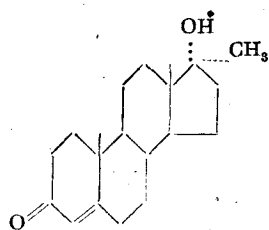
(Ⅻ)与化合物 F (Ⅷ)等。某些微生物对引导羟基至 C₁₁ 处有高度的特異作用，故在工業上用以制备皮質激素。用同位素做研究指出，体内所有固醇类激素和胆固醇均能从乙酸合成。

固醇类激素，一般不溶于水，但溶于脂肪溶剂如乙醚、丙酮、乙醇及植物油中；体内服用时，多用植物油为溶剂。这些激素口服时活性較低，故一般多用肌肉注射。固醇类激素的酯，例如乙酸鹽、丙酸鹽和苯甲酸鹽等，因其吸收与利用的时间較長，而且它的生理作用亦較为持久，故在治疗上的价值大于自由的固醇类激素。固醇类激素及其分解产物，一般均与醋酐或硫酸結合成为水溶性的化合物，而后随尿液排出体外。

固醇类激素及其有关物質的構造式 下表列出每种激素的化学名称，在括弧内写上它們的通用名称，又用箭头表示它們在体内的代謝途徑。

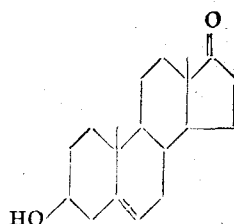
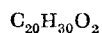
雄激素类与尿中17-羧固醇类





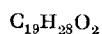
VII

17(β)-甲基-Δ⁴-雄烯-3-酮-17(α)-醇
(甲基睾酮)

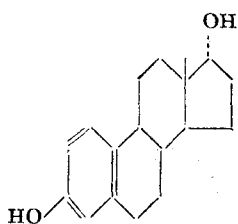


VI

Δ⁵-雄烯-3-酮-17-醇
(脱氢睾酮)

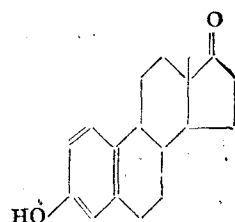
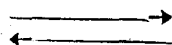
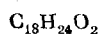


雌 激 素 类



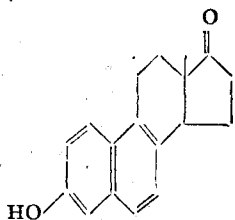
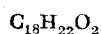
VIII

Δ^{1,3,5}-雌三烯-3,17(α)-二醇
(β-雌二醇)



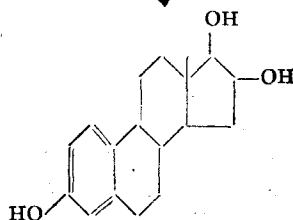
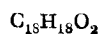
IX

Δ^{1,3,5}-雌三烯-3-醇-17-酮
(雌素酮)



XI

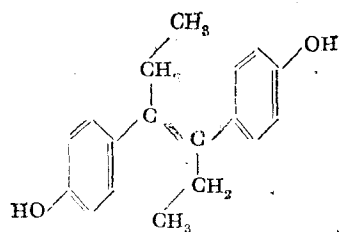
Δ^{1,3,5,10,6,9}-雌五烯-3-醇-17-酮
(烯雌马性素)



X

Δ^{1,3,5}-雌三烯-3,16,17-三醇
(雌三醇)





XII

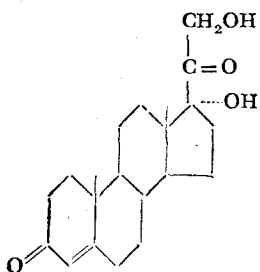
反式-3,4 (二-对-羟基苯) -己烯-3

(己烯雌酚蓉)

$C_{18}H_{20}O_2$

肾上腺皮质激素类激素

矿物质肾上腺皮质激素类



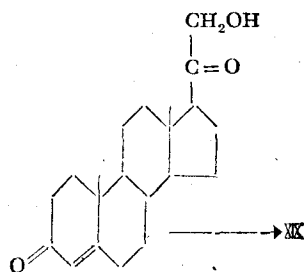
XIII

Δ^4 -妊娠烷-3,20-二酮-17(α),21-二醇

(17-羟基去氧肾上腺皮质激素)

(化合物 S)

$C_{21}H_{30}O_4$



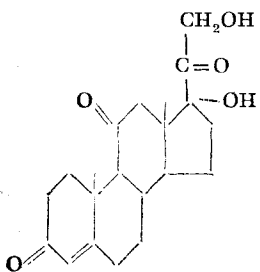
XIV

Δ^4 -孕烯-3,20-二酮-21-醇

(去氧肾上腺皮质激素)

$C_{21}H_{28}O_3$

葡萄糖肾上腺皮质激素类



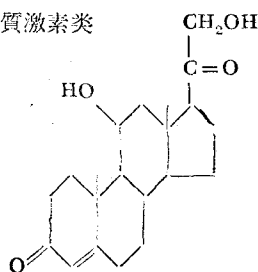
XV

Δ^4 -妊娠烷-3,11,20-三酮-17(α),21-二醇

(17-羟基-11-脱氧肾上腺皮质激素)

(可狄松, 化合物 E)

$C_{21}H_{28}O_5$

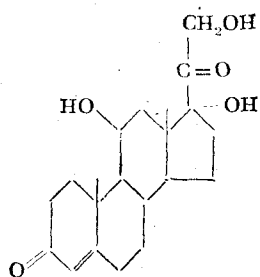


XVI

Δ^4 -孕烯-3,20-二酮-11,20,二醇

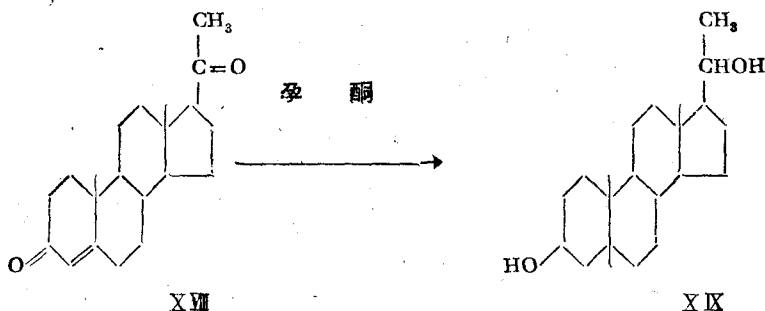
(肾上腺皮质激素, 化合物 B)

$C_{21}H_{30}O_4$



XVII

Δ^4 -孕烯-3,20-二醇-11(β),-17(α)-21-三醇
(11-二氢肾上腺皮质激素, 17-羟肾上腺皮质激素)
(化合物 F)
 $C_{21}H_{30}O_5$



XVIII

XIX

Δ^4 -孕烯-3,20-二酮
(孕酮)
 $C_{21}H_{30}O_2$

孕烯-3(α),20(α)-二醇
(孕二醇)
 $C_{21}H_{30}O_2$

睾 丸

将睾丸除去,能引起附精囊、前列腺和男性生殖系统的其它附属器官萎缩。如在性成熟期之前施行手术,则效果更为显著。这是因为不能分泌雄激素,〔例如雷狄(Leydig)氏(或间质)细胞不能分泌睾酮所致〕。雄激素能使阉割动物如鼠或小鼠的已萎缩组织恢复,故测定时,恒以其引起阉鸡鸡冠的增大程度而判定。

睾酮(II)是从睾丸组织所分离出的主要雄性激素。在男人体内的代谢过程中,睾酮是被还原成雄烯酮(III)、异雄烯酮(IV)与表-5 异雄烯酮(V)等化合物,这些物质均可从尿液中排出(见 497 页的 17-氢固醇类)。人工合成的甲基睾酮,不存在于自然界内,但因它口服时活性很高,故在医疗上广泛利用。

雄性激素的国际标准单位相当于 0.1 毫克纯的雄烯酮的活性。若用阉鸡鸡冠的生长方法作为各种雄性激素的比较作用,则睾酮的功效相当于雄烯酮的 6 倍,异雄烯酮相当于雄烯酮的 1/7 倍,但表-5 异雄烯酮实际上是等于无活性的化合物。若采用胃肠道外给药法,则甲基睾酮与睾酮的活性相等。若口服则甲基睾酮的活性较从胃肠道外给予低约 2-4 倍,较口服睾酮时的活性大约 20 倍。

卵 巢

雌性附屬性器官的發育, 虽不像雄性的那样决定于激素刺激; 但若摘除卵巢則引起子宮、陰道、乳腺等萎縮; 摘除禽类的卵巢, 也能使其羽毛發生萎縮变化。大多数哺乳动物, 由卵巢(特别是囊狀卵泡)所产生的雌激素, 其濃度只有在动情期或剛进行交配时才最大。在齧齿动物的动情期内, 陰道壁有角化細胞剝离在陰道內。若以雌激素物質給与閹割的动物, 亦有同样的反应; 雌激素的生物分析法就是以此作为根据。

哺乳动物排卵后, 破裂的囊狀卵泡即轉变为黄体而产生孕酮。孕酮的主要功用是使子宮粘膜供胚胎植入。孕酮的生物檢定法, 是基于它能使未成熟的兔子(或閹割而在試驗前事先給予雌激素使其敏感的兔子)的子宮粘膜中能产生妊娠性的腺体增殖。在妊娠的早期, 黄体开始損坏, 当受精卵植入与妊娠时, 黄体的活动期間因此延長。在人类的妊娠后期, 胎盤可以产生雌激素与孕酮, 共同催促乳腺發育。

主要的雌激素有 β -雌二醇(Ⅷ)、雌酮(Ⅸ)与雌三醇(Ⅹ)等, 它們的相对活性比例約为 10:1:1 或更低, 但这样的活性比例, 根据不同的測定方法, 可以有很大的变化。在这三种激素中, 只有前两种是已知存在于卵泡液中。其中 β -雌二醇的生理活性, 佔整个卵泡液中的生理活性的 90%, 因此 β -雌二醇是主要的卵巢卵泡激素。 β -雌二醇和雌素酮在动物器官內可以互相轉变, 因为当給予二者中的任何一种时, 它們都能引起另一种的排出。雌三醇只有在孕妇尿液或人类胎盤中分离出, 故認為胎盤是产生雌三醇的主要場所。妊娠时雌激素的排出量(圖 202) 随胎盤的成長而激增, 分娩前的水平是每晝夜約 12~24 毫克, 其中雌三醇是雌激素的主要产物(約佔总量的 90%), 此外亦有相当数量的雌素酮和微量的 β -雌素二醇。从孕妇尿中分离出的結合雌素三醇, 已被認出是一种 16-或 17- 一葡萄糖苷酸。在整个的正常月經週期中, 尿中雌激素的含量甚低, 每晝夜最高約为 0.08 毫克。用生物檢驗法發現在排卵期前后, 有两个高峰, 但在月經期間則排出最少。在非妊娠

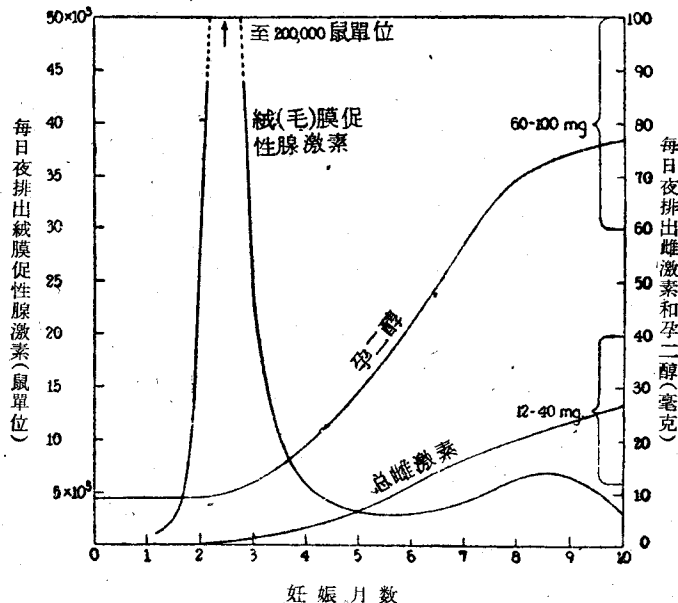


圖 202 妊娠期内性激素及其代謝物从尿中排出量的变化

期所排出的雌激素的化学本質,現尚未經分离确定,但根据層析試驗結果,指出三者均有排出。

在牝馬的整个妊娠期中,尿中排出最多的是雌素酮。牝馬沒有雌三醇的生成,但有大量的在A、B环中含有不飽和鍵的雌激素类排出;其中最多的是烯雌馬性素(XI)。

很多种人工合成的二苯乙烯衍生物,具有显著的雌激素功效,但它們不是固醇类化合物,亦不存在于天然界中。其中最重要的是二乙基二羟萘(XII),它与其他同类化合物一样,口服时,其活性远較自由的天然雌激素大。在孕妇与孕馬尿液中的水溶性結合型雌激素类,分別主要是雌三醇葡萄糖苷酸与雌素酮硫酸鹽,后面这两种激素,口服也同样生效。

雌激素的国际單位是定为具有0.1微克的雌素酮活性。但因各种雌激素在体内活动的時間性与週期性不同,故很难做出适当的比較,因此尚有一种 β -雌二醇-3-一苯甲酸鹽的輔助标准。此标准的活性是相当于0.1微克的 β -雌二醇-3-一苯甲酸鹽。

孕酮是由卵巢的黃体产生,它是在月經週期的排卵后开始分泌的,以后在整个妊娠过程中,黃体与胎盤均能分泌更大量的孕酮。男性与女性的肾上腺皮質也能制造微量孕酮。孕酮(XIII)的主要代謝物是无活性的孕二醇(XIV),后者与葡萄糖醛酸結合而从尿排出,因此測定尿中孕二醇葡萄糖苷酸鈉的含量,是測定黃体功能的有效指数。孕二醇的排出,約在排卵后1~2日开始,并在子宮出血前1~3天停止。在整个正常的月經週期中,約排出40~55毫克。若总排出量显著下降,或排泄期縮短,即表示受孕后的發展不良,或植入時間过短,不能支持孕卵在子宮内膜生長。从受精以至妊娠之末期(为期約经历3~4月)。尿中孕二醇保留在月經週期中的黃体期的最高水平綫上(每晝夜約5~10毫克),俟后随着胎盤生長而迅速上升,至分娩前,每日約排出60~100毫克(圖202)。如在妊娠期前三分之一段時間內,尿中孕二醇显著下降,即表示黃体机能不足,或胎盤發育速度不及正常;这两种現象,不論哪一种都可能引起流产。男性尿或处在月經週期的卵泡期中的女性尿,每晝夜也有約0.2毫克的殘余孕二醇效价;这些孕二醇是假定来自肾上腺皮質。孕酮的国际單位是規定为含有1毫克純孕酮結晶的活性。

肾上腺皮質

肾上腺有两种紧密毗連的不同組織。一种是能分泌肾上腺素与正肾上腺素,由交感神經系統所衍生的髓質;另一种是較大的周圍組織,在胚胎学上与性腺有关的皮質。动物的肾上腺皮質若被摘除或破坏,則不能繼續生存。在死亡前,动物体内有大量鈉离子由尿液排出,并有大量鉀离子在体内积聚,致使細胞外液容积减少、血液粘滯、血液循环不暢、腎功能發生障碍等,在此情况下若給予低鉀而添有鈉鹽的食物,对动物可有所帮助。此外,摘除或破坏皮質組織,也能使組織蛋白質破坏而产生成醣氨基酸的作用减少。故当飢餓时,糖元貯存量迅速减少,且产生低血糖現象,同时抵抗酷热、酷冷、感染、毒性葯物,外伤、疲倦与各种应急能力也大为降低。在患阿狄森氏病时,皮質組織逐漸被破坏,其特征是軟弱無力、消瘦、低血压、皮膚有色素沉积,并常有低血糖現象等,但对生命的最大威胁,却是电解質代謝的紊乱(例如在去肾上腺的犬中)。

从皮質的抽提物中,已分离成結晶状态的类固醇約有30种,其中生理活性很小的佔大多数,其余尚含有前面已經討論过的、存量甚少的雌素酮(XI)、孕酮(XIII)等,也有一些

是具有雄激素活性的物質，例如雄素二醇、雄素酮与 17-羟孕酮等，但最重要的是六种能有效地矯正摘除腎上腺后所产生的特殊效应的化合物。舍利 (Selye) 氏称这些化合物为腎上腺皮質激素。在化学本質上，这六种激素都是屬於孕烯-3,20-二酮-21 醇的衍生物。腎上腺含有一些酶系統，其作用在于使氧原子进入固醇核的 11、17 与 21 三个位置，例如在灌注或培养試驗中，腎上腺組織能迅速將孕酮(ⅩⅢ)轉变为化合物 F(ⅩⅣ)、E(ⅩⅤ)和 B(ⅩⅥ)等。脫氧腎上腺皮質固酮(ⅩⅦ)在腎上腺皮質中含量極少，但在市面可以很容易买到，故医葯上已广泛应用，特别是它的 21-乙酸鹽(DCA)。此物对矯正鉀鈉代謝不平衡功效很大，因此对維持摘除腎上腺后的狗或对阿狄森氏病患者的生命有很大的效用，故又称为矿物皮質激素。另一方面，可狄松(17-羟-11-去氫腎上腺皮質固酮，即肯多(Kendall)氏的“化合物 E”(ⅩⅤ)与氫-可狄松(17-羟腎上腺皮質固酮，肯多氏的“化合物 F”(ⅩⅣ)，对醣和蛋白質代謝能起显著作用，但对鉀鈉代謝則变化無常。在医葯上应用它們以調節醣代謝，故又可称为醣皮質激素。腎上腺皮質固酮与 11-脫氫腎上腺皮質固酮兼有葡糖皮質激素与矿物皮質激素的作用(在醣皮質激素的第 11 碳位置上必帶有氧)，但兩種作用的效力都不很大。應該着重指出，在皮質抽提物中，尚另有一些能維持生命活力的矿物皮質激素存在。这些化合物(“無定形部分”)較葡糖皮質激素更易溶于水，但尚未被結晶或鑑定。葡糖皮質激素的生物分析法是基于这些激素能增强摘除腎上腺鼠对寒冷的抵抗力或恢复其肝糖元水平。矿物皮質激素的分析法，是基于这些激素有維持生命的能力，或基于它們对調節鉀鈉代謝的功效。

腎上腺皮質的構造与分泌活动受腦下垂体前叶的促腎上腺皮質激素(ACTH)管制。摘除腦下垂体后，則皮質(特別是內層)萎縮，应急能力减弱，糖元貯存减少。所有这些現象，都說明醣皮質激素的产生缺乏。大鼠注射一次 ACTH 以后，則其皮質中的胆固醇及抗坏血酸迅速消耗[这是施亞氏(Sayers)分析法的根据]，皮質体积暂时增加，皮質激素的合成与分泌增加，主要有 17-羟腎上腺皮質固酮(即化合物 F)。施用一些恰当的迫害手段，如短期暴露于冷处，或注射稍低于致死量的腎上腺素，亦能使腦下垂体前叶产生 ACTH，因而得到相同的后果。在人体方面，注射或分泌 ACTH 或醣皮質激素时，均有下列的現象出現：(1)血液中的嗜伊紅白血球与淋巴球数目减少，(2)含氮廢物的(特別是尿酸)排出增加，(3)用化学分析法或生物分析法分析尿液，發現腎上腺皮質激素的排出增加(但这只能代表实际所分泌的激素，或代表注射入体内的皮質激素的一小部分)，17-氧固醇类的排出亦增加。ACTH 与化合物 E 和化合物 F，对消灭風湿性关节炎和許多其它疾病的症狀，已証实有很大的疗效，尤其是对疼痛的消失及使病人感觉健康的作用最为显著。長期的每日应用少量可狄松作治疗，可能亦有效。但若長期給以过量的皮質素，則能引起庫兴(Cushing)氏征候羣，使身体逐漸趋向肥胖、高血压、骨質疎松与心理紊乱等。在有糖尿傾向的病人中，这种庫兴氏病的症狀可能还会加重。肺結核、胃溃疡与糖尿病等病患者禁用大剂量的可狄松。庫兴氏病的症狀是由于醣皮質激素产生过多所引起。从前舍利(Selye)氏对矿物皮質激素产生过多与膠原病(風湿性关节炎、結节性动脉外膜炎等)間的因果关系，曾拟定了一个概念。但这个概念，現在的科学家，对它表示怀疑，并成为当前引人注目的研究課題。腎上腺雄激素产生过多，能增加蛋白質的合成作用，并使肌肉發達，引起腎上腺(性)性征異常症(男性現象、妇女多毛症或早熟的男性化)，和尿中 17-氧固醇排出增加等。

17- 氧固 醇 类

人尿中含有一些属于中性的或酚类的固醇类衍生物,这些化合物在 C_{17} 处都带有酮基。属于前面一类的称做“17-氧固醇类”。这类化合物,主要者有雄激素(Ⅲ)、表-5 异雄素酮(Ⅴ)、异雄激素(Ⅳ)及去氢异雄激素(Ⅵ)等,它们都是一些肾上腺皮质固醇类的排泄物,其中前两种的一部分来自睾丸。因此测定 17- 氧固醇类的排出量,是测定睾丸与肾上腺皮质的活性的一种生物化学的指标。

20~40 岁的正常男人,每晝夜約排出 15 毫克 17- 氧固醇;同等年龄的正常女人,每晝夜約排出 10 毫克。8 岁以下的小孩,每晝夜約排出 1 毫克,但从 8 岁起便逐步增加,最后达到成年人的数值。同样,在老年人中亦发现显著减少。男人去生殖腺后,17- 氧固醇类的排出量,平均减少 10~15 毫克,但女人去生殖腺后,并没有这样的现象发生。因此得出一个结论,即有 10 毫克的 17- 氧固醇是来自肾上腺皮质,而另有 5 毫克则来自睾丸。至于人类的卵巢则并不是中性 17-氧固醇类的来源。

睾丸、肾上腺皮质及脑下垂体的疾病,能严重影响 17-氧固醇类的排出。在类无睾(阉人)征中,尿中所排出的 17-氧固醇的数值变化颇大,可由正常值低至用外科手术摘除生殖腺后的数值(10毫克)。在罕见的睾丸间质细胞瘤中,每晝夜排出量可达 800 毫克。在阿狄森氏病的男性患者中,排出量可降至 1.2~6.4 毫克(这是从睾丸所排出的激素);但患同样病的女性则没有 17-氧固醇类产生。在有库兴氏症候群而与肾上腺皮质癌无关的病例中,17-氧固醇类的排出量正常或稍有增加(10~30毫克);若伴有皮质癌,则情况复杂而排出量显著增加(40~288毫克)。同样,在肾上腺(性)性征异常症中,若为单纯性皮质增生,则 17-氧固醇的排出,只有中度增加(约 100 毫克左右);若为皮质癌,则一般增加较为显著(接近 100~250 毫克);故这两种情况,可以借尿中 17-氧固醇类的排出量而加以区别。另一方面,患皮质癌时,尿中 3(β)-羟-17-氧固醇类(主要是去氢异雄激素)与 3(α)-羟-17-氧固醇类的比例亦显著增加,故测定这两种化合物的比例(β : α),可以区别皮质癌与皮质增生;正常人与皮质增生者的 β : α 比值是 1:9,但皮质癌的 β : α 比值可增至约 1:1。在全脑下垂体机能减退症中,所有垂体前叶的激素的产量不足,17-氧固醇类的排出也很低(0~3毫克)。

固醇类激素实验

1. 尿液雌激素的分配与定量。原理 此测定法包括:(1)水解尿液中的水溶性结合物;(2)抽提固醇类的部分和应用它们在溶媒间的分配作用而进行分离;(3)用比色法(见实验 3)或生物测定法(见实验 4)测定各部分的雌激素含量。若雌激素排出量小于每升尿含 1.5 毫克左右时,不宜用比色法测定。例如正常人的尿液或妊娠期前四个月所排出的尿液,此法即不适用。

操作 巴-柏(Baclman 和 Pettit)二氏法。取孕妇尿 100 毫升,用盐酸调节至 pH2(以麝蓝作指示剂)。加浓盐酸 5 毫升,回流煮沸一小时。将水解后的尿液冷却,用蒸馏水稀释至 100 毫升,以不含过氧化物的乙醚抽提三次,第一次用 200 毫升,第二、第三次用 100 毫升。将前三次的乙醚抽提液混合后用 8 毫升 9% NaHCO_3 溶液洗涤,弃去 NaHCO_3 液,将乙醚蒸发至干。以 1 毫升乙醇(不超过 0.5 毫升)将残渣溶解,用苯稀释至 35 毫升。

用 9% 无水碳酸钠溶液将苯溶液中的雌三醇及其它酚类和酸类等物质抽提三次,第一次用 35 毫升,第二、第三次各用 17.5 毫升。再用蒸馏水 3.5 毫升抽提一次,将抽提液混合,并用盐酸调节至 pH6 以

下。用乙醚將雌三醇提取(每次用乙醚 40 毫升,共抽提三次),用 9%NaHCO₃ 溶液 12 毫升洗滌,蒸發至干。用乙醇 0.5 毫升將殘渣溶解并再加入苯 50 毫升,再用 9%NaHCO₃ 溶液 1 毫升洗滌,并用水連續抽提三次,每次用 50 毫升。將三次的水抽提液混合,在真空中干燥,即得 出含雌三醇 50%以上(以重量計算)的 T 部分。

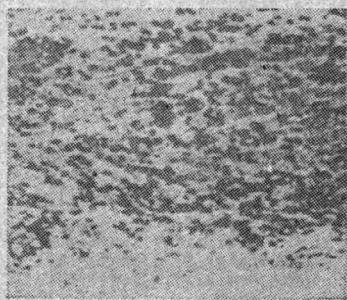


圖 203 間(动)情期塗片:粘連的白血球塊(×40)。

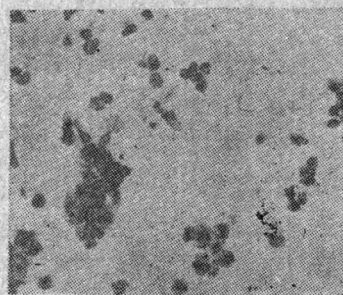


圖 204 动情前期塗片:主要为有核的上皮細胞,偶有白血球(×40),第一次注射后 35~40 小时出現。

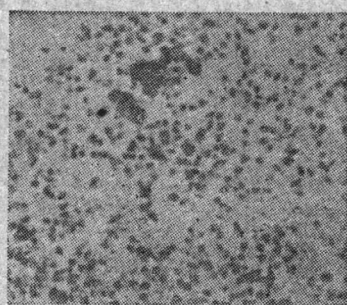


圖 205 动情期塗片:無核角化上皮鱗片(×40),此类型一般是在第一次注射后 48 小时内出現,是对抽提物呈現阳性反应的标准。



圖 206 动情期塗片阶段中的扁平角化細胞(×250),用伊紅染色,这些細胞現出鮮紅色。虽然原来核的位置尚可見,但已無嗜鹼的染色反应。

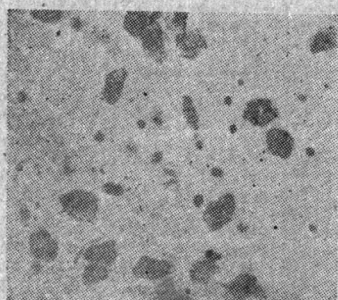


圖 207 白血球浸潤的早期(动情后期)(×40)只有少数有核的上皮細胞。

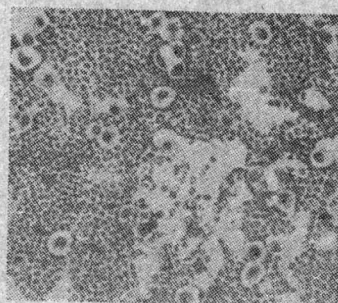


圖 208 动情后期的晚期(×40)有很多白血球和一些角質化的鱗片(在圖中央)与很多有核的上皮細胞。

圖 203~208 去卵巢鼠的人工动情期的陰道塗片

第一次所得出的苯溶液(35 毫升), 內含有雌酮和雌二醇。將此苯溶液用 45% H_2SO_4 (以容量計算) 10 毫升洗滌一次, 再用水洗滌二次, 每次用水 20 毫升, 然后用 1N NaOH 抽提四次(每次用 35 毫升)。將鹼抽提液混合, 用 HCl 調節至酸性, 再用苯抽提三次, 第一次用 225 毫升, 第二、第三次各用 125 毫升。將苯抽提液混合并濃縮至約 50 毫升, 繼用 45% H_2SO_4 12 毫升洗滌一次, 再用 9% Na_2CO_3 25 毫升洗滌兩次, 又用水 25 毫升洗兩次, 最后蒸發至干(這就是 OD 部分)。

T 与 OD 部分均已相当純粹, 可采用比色法进行測定(見實驗 3)。如要分別測定雌酮和雌二醇, 可在測定前先用耶拉(Girard's)氏試劑●將 OD 部分分成帶酮基(雌酮)与不帶酮基的(雌二醇)两部分, 然后再作測定。

2. 由孕婦尿中分离雌三醇結晶 用苯处理妊娠后期的尿液的 T 部分, 可以得出相当純的雌三醇結晶。为了要达到这个目的, 實驗时可取 500(或 500 以上)毫升尿液, 并按比例地增加所应用的試剂用量。

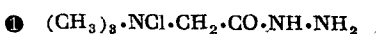
3. 雌激素的古柏(Kober)氏顏色反应 將样本放于試管中蒸發至干, 加入 2 毫升以等分子量混合的硫酸, 与隣位及对位两种苯磺酸的混合液。放在 100°C 加热 10 分鐘, 随即放入冰中冷却, 逐漸便有紅色出現。

4. 雌激素的生物試法 將年齡尚小的成年雌鼠或小白鼠的卵巢切除。如果卵巢全部被切除, 則在一週內的陰道塗片中, 只發現有白血球。塗片的制取, 可用自制的橡皮头小吸管, 吸上一滴生理鹽水將陰道冲洗, 或用湿润棉花纏繞在白金絲上, 然后将白金絲插入陰道內, 向陰道塗抹; 將陰道的冲洗液或塗抹液塗抹在潔淨的显微鏡玻片上, 不需固定或染色。向动物注入每剂 0.5 毫升的雌激素油溶液, 或溶于微硷性的 10% 乙醇溶液中的雌激素, 共三次, 每次相隔的注射時間至少要有六小时。注射后第二、第三及第四天均应作陰道塗片检查。白血球几乎完全消失, 而出現一些有角化的鱗狀細胞, 和仍含有細胞核的上皮細胞。此法必需使用大量的动物, 和事先确定动物对晶体雌激素的敏感性后, 才能用作定量測定。动物对此激素的反应可以受 ①动物的种屬; ②所使用的剂量多少与所使用的溶媒; ③測驗的次数和其他很多因素的影响。見圖 203~208。

5. 尿中孕二醇葡萄糖醛酸鈉的測定 凡宁(Venning)氏法。收集尿液并加三甲酚 4~5 滴作防腐劑, 在抽提前, 尿液宜存放冷处, 借以避免水解。非妊娠期需收集 48 小时的尿液样本, 早期妊娠需收集 24 小时的尿液样本, 妊娠后期需用一天之中的部分尿液样本。

用正丁醇將尿液抽提三次(每升尿液第一次用 200 毫升, 第二次用 100 毫升, 第三次用 50 毫升等)。抽提时只宜輕輕地搖动(20~25 次), 避免乳化。將丁醇抽提液混合(放在分液漏斗內)并大力搖动, 放置一小时, 將底部的尿液棄去, 將丁醇放在蒸餾瓶中减压蒸發至將近干涸。用 0.1N NaOH 60 毫升將殘渣溶解, 再用丁醇抽提三次(60 毫升, 20 毫升, 10 毫升), 將混合的丁醇抽提液用 5 毫升水洗滌兩次, 在减压下蒸發至干。准确地用 5 毫升水將殘渣溶解, 以少量丙酮把它多次冲洗, 移入 125 毫升錐形瓶內, 移液时用丙酮洗送, 再加丙酮至 100 毫升, 在冰箱內放置过夜, 得出孕二醇葡萄糖醛酸鹽沉淀, 用抽气法將大部分的上层丙酮吸去(要避免攪起沉淀)。將余下的混合液移入 50 毫升离心管內, 离心 10 分鐘。小心傾去剩下的丙酮, 將粗的孕二醇酯再溶于水中, 繼續用沉淀法再加提純。水的用量依沉淀的重量而决定, 若其量少于 5 毫克, 用水 2 毫升; 5~10 毫克用 3 毫升; 10 毫克以上的用 5 毫升。將水加入原来的錐形瓶內, 把粘附于瓶壁的沉淀溶解, 然后移入盛有沉淀的离心管中。將离心管加溫, 并用抽气法將所含內容物瀝入原来的錐形瓶中。以少量丙酮洗滌离心管兩次, 洗出的丙酮亦瀝入錐形瓶中, 繼用丙酮加至 100 毫升。放置冰箱內 12 小时后, 按前述步驟同样抽气瀝过及离心將丙酮除去。將沉淀溶于 10 毫升热的 95% 乙醚中, 用抽气過濾法, 瀝入已知重量的燒杯內(30 毫升容量的)。用热乙醇將錐形瓶、离心管及濾紙洗滌二次。待溶液在水浴上蒸發至干后, 測定該沉淀物的重量。

計算 孕二醇葡萄糖醛酸鈉的回收百分数, 决定于所含的孕二醇葡萄糖醛酸鈉的数量与在进行第二次沉淀时所用的水的容量。因此計算时必需引用一个校正因数(見下表)。在孕二醇葡萄糖醛酸鈉中,



含有孕二醇 61.7%。

$$\text{一晝夜內所排出的孕二醇毫克数} = \frac{\text{沉淀物重} \times 0.617 \times 24 \text{小时尿量} \times 100}{\text{回收百分数} \times \text{抽提时的容积}}$$

最后所得沉淀物的熔点必須每次測定,孕二醇葡萄糖醛酸鈉在 273°C 溶解同时伴有气体放出。

沉淀物的重量 (毫克)	回 收 百 分 数		
	水 2 毫升	水 3 毫升	水 5 毫升
2	0~60*	—	—
3~4	50~67*	—	—
5~8	70~75*	79	—
9~10	—	82	75
11~12	—	85	78
13~15	—	—	81
16~18	—	—	83
19~25	—	—	85

* 近似值

6. 肾上腺皮質提取物的制备。賈-顧 (Cartland 和 Kuizenga) 二氏法 將整个的牛肾上腺切碎, 用 99% 丙酮抽提(每公斤肾上腺用 2.5 升)繼用 80% 丙酮再抽提。把提取液混合, 過濾, 減压濃縮(低于 45°C)至丙酮除去。用石油醚抽提所余下的水溶性殘渣二次, 目的是除去無活性的脂肪。用二氯乙炔抽提两次(每公斤腺体每次用 400 毫升)。二氯乙炔能將肾上腺皮質激素抽出, 但都不能將肾上腺素及磷脂类提取, 將二氯乙炔可溶部分冷却至 -15°C, 將冰塊及固体物質濾去。減压除去二氯乙炔, 并用乙醇溶解所余殘渣。加等容量石油醚混合之; 加水使乙醇稀釋至 90%; 这样便能使一些石油醚浮于上层, 用分液漏斗將石油醚分离, 棄去石油醚。再將乙醇先后稀釋二次(第一次稀釋至 80%, 第二次稀釋至 70%), 把每次所分离的石油醚棄去。減压蒸餾, 使乙醇在 45° 以下除去。將所得的膠狀溶液, 用水稀釋至相当于每毫升溶液中含有腺体 40 克, 并加酒精至 10% 以作防腐劑, 再加入 NaCl 使其成为 0.9% NaCl 溶液。將最后得出的溶液過濾, 并用貝克斐 (Berkefeld) 過濾法进行消毒, 然后盛于已灭菌的安瓿中, 放入冰箱中保藏。

7. 皮質激素类的化学測定。原理 上述数种比色法均基于側鏈上 C₂₀-C₂₁ 处具有酮基, 而不是基于环狀構造上的功能基。肾上腺皮質激素的分析法是根据以下原理: (1) 將磷酸鹽还原成鉍藍; (2) 將二价銅离子还原成一价銅离子; (3) 用过碘酸將第 21 位的碳原子氧化, 使其成为甲醛放出, 然后与 4,5-二羟基, -2,7-萘二磺酸起作用。这些方法可用以測定 24 小时尿液中的全部排出量, 及測定“还原型固醇类”和“生成甲醛的固醇类”的效价。所有这些測定法均包括具有活性的皮質激素, 和具有同样反应而沒有生理活性的許多其它代谢产物在內。因此, 由化学測定法所測得的数值 (正常人每日約 1~2 毫克) 均远高于葡萄糖皮質激素的效价。

8. 用肝糖元沉积法作葡萄糖皮質激素及尿中皮質激素的生物測定。凡-卡-貝 (Venning, Kazmin 及 Bell) 三氏法 本法适用于晶体皮質激素或尿液中提取物的測定。用皮質素 (XV) 作参考标准, 規定以 1 微克皮質素的生物学活性作为一个糖元生成單位, 以測定未知抽提物中的活性。

操作 含有正常效价或低效价的尿液, 宜用 48 小时的尿样。用鹽酸調节至 pH2, 用二氯乙炔或氯仿抽提 3~4 次。如有乳狀液出現, 經离心后即行消失。將澄清的抽提液在減压下(水浴溫度不可超过 55°C)蒸干。將殘渣溶解于 30 毫升氯仿中, 用冷的 0.1N NaOH 5 毫升抽提三次, 再用水 5 毫升抽提三次。再用氯仿將这些洗滌液抽提, 將氯仿抽提液混合, 待蒸發至 1~2 毫升时移入試管内。最后通入氮气并蒸發至干。將干的殘渣妥为貯存, 以供測定之用。

測定时选用 20~25 克重的雄性小白鼠, 于切除肾上腺前两天停止供給平衡食料, 而換以含有 26%

蛋白質及 52% 醋的麦哥林 (Mc Collum) 氏哺乳期食物。按通常从腰部作切口的方法將腎上腺切除。手术后，將小白鼠放在 76°F 的恒温室或恒温箱內。手术后第一天給予麦哥林氏食料，并在飲水中补加 NaCl (0.9%) 及葡萄糖 (5%)。以后在整个試驗期中都不加葡萄糖，而只在飼料中添加食鹽。至手术后第三天的下午五时不給食料，使小鼠飢餓至翌日早晨。手术后第四天不給飲水，并在上午 9:15 开始注射；將被試样品溶解在含有 5% 葡萄糖和 10% 乙醇的溶液內。每次皮下注射 0.2 毫升；至 10:00, 10:45, 11:30, 下午 12:30, 1:30, 和 2:30 繼續分別注射一次，总共注射七次。这样每只小白鼠总共接受了 1.4 毫升的提取液和 70 毫克葡萄糖。下午 3:30 称小白鼠的体重并用安密妥鈉 (1.8% 溶液 0.2 毫升) 麻醉。將肝臟迅速取出并投入盛有热的 30% KOH 液 4 毫升的 15 毫升刻度离心管內。將离心管放在沸水浴中加热并經常搖动，直至所有組織都溶于溶液中为止。加 1.2 体积的 95% 乙醇將醣元沉淀。將管再加热，至管內混合物刚开始沸腾为止，或在冰浴中冷却，离心。傾去上层液，并將离心管倒置，使管中液体尽量流出。用乙醇 0.5 毫升洗管壁并按上法將管中液体倒尽。最后將离心管放在热水浴中加热数分鐘，以驅除最后的一点点乙醇。

按下法將醣元水解：加 1N H_2SO_4 5 毫升于离心管內，將管放于高压灭菌器中，在 15 磅压力下加热 15 分鐘。用顧 (Good) 氏法或納 (Nelson) 氏比色法測定葡萄糖。以每 100 克小白鼠体重所含的肝葡萄糖的毫克数来表示醣元含量。

每一个分析必需用 6~8 只小白鼠。如試样是男性尿液，則每只小白鼠用相当于六小时的尿液，如果是醣元活性低的正常女性尿液，則每只小白鼠用相当于 8 小时的尿液。

用这个方法所測出的数值是：正常男人每 24 小时排出 0.04~0.085 毫克，正常女人每 24 小时排出 0.025~0.065 毫克 (按可狄松計算)。

9. 尿液中中性 17-氧固醇的測定。原理 用酸將尿液水解，以便將其中所含的水溶性固醇类結合物与固醇类分开，然后用乙醚抽提。再將帶酚基和帶酸基的不純物除去后，用亲麦曼 (Zimmermann) 反应測定中性殘渣中的 17-氧固醇含量，这个方法的反应包括了具有活性的 17-酮基与間-二硝基苯的偶联，生成有色的复合物。用光电比色計測定在光譜的綠色帶 (520 毫微米) 的强度，并与已知量的純晶体 17-氧固醇所显的顏色作比較。

尿液中的非特殊性的色素元对本測定法有干扰作用，但因这些色素元主要是不含酮基的物質，而且在光譜的紫色帶 (420 毫微米) 和綠色帶 (520 毫微米) 中均有吸收光的能力，故为了避免这些物質的干扰作用，在測定时可以只取用尿液中帶酮基的中性部分，或者应用一个校正因数，即將測得的结果减去其他色素元所产生的顏色。

操作 收集 24 小时的尿液样本，量其容量。取 100 毫升的尿液，加濃鹽酸 15 毫升。將鹽酸尿液混合物迴流 15 分鐘，随即冷却，用 30 毫升新鮮的重蒸餾的乙醚抽提四次。將乙醚抽提液混合，用 2N NaOH 洗滌四次 (每次用 15 毫升)，再用水洗滌二次。蒸發除去乙醚，用 10 毫升不含酮的乙醇將中性殘渣溶解。在显色及比色时必须采用精选过的比色管。按下列順序將各种溶液加入測定管內，随加随搖：尿液提取物 0.2 毫升，2% 純的間-二硝基苯酒精液 (新鮮制备) 0.2 毫升，5N KOH (最純的电解質級的規格) 水溶液 0.2 毫升。对照管亦用同样方法处理，但以乙醇 0.2 毫升代替尿液提取物 0.2 毫升。將两管一同放在 $25 \pm 0.5^\circ C$ 的暗处保温 105 分鐘。于每管中各加入 80% 乙醇 15 毫升，混合后，在合适的光电比色計中測定每管顏色强度。为了校正試剂本身所显的微弱顏色，可先將对照管放入仪器內，加上 520 毫微米濾光板，然后將仪器調節至光密度等于 0 (透光度 100%)。將对照管取出，换上測定管，記下其光密度讀数，參看純的雄酮的校正曲綫，得出該样本中 17-氧固醇含量的毫克数。

計算

$$24 \text{ 小时排出的 } 17\text{-氧固醇的毫克数} = \frac{\text{測得的毫克数} \times 24 \text{ 小时尿量}}{2}$$

如需应用一些因素以校正具有干扰作用的色素元时，应同时讀取在 420 毫微米的讀数。

如欲分別測定 3 (α)-和 3 (β)-羟-17-氧固醇，在測定前要先用毛地黃皂苷將两者分离。