

内部资料

1973—1975
研究工作成果汇编
(二)

上海实验生物研究所

1977年

目 录

实践是科学理论发展的真正源泉——天花粉蛋白引产研究的体会	第二研究室	(1)
天花粉蛋白引产原理的探讨	第二研究室	(4)
天花粉蛋白的纯化及其性质的初步研究	王亚辉 凌骏芳 朱隆训	(13)
^{131}I 标记天花粉粗提物在孕妇体内的分布与 排泄	曹梅讯 梁素香 罗荣生 何其久 史爱兰 金毓翠	(20)
用放射自显术研究天花粉蛋白在体内的定位	高慧 周筱刚	(24)
荧光标记抗体追踪天花粉蛋白引产作用部位的研究	徐国江 蒋琬素 陈元凤 黄妙宝	(29)
天花粉蛋白引起猕猴胎盘绒毛损伤的研究	王应天 朱瑞明 黄家洪 徐国江	(35)
天花粉蛋白引产前后血清 HCG 含量的 变化	左嘉客 刘世范 刘建西 上海第一医学院华山医院	(44)
用天花粉粗提物中期引产的妇女尿中孕二醇和雌三醇的 变化	蒋天骥, 高翥, 周冠中 朱岩平 蔡仕萍	(49)
天花粉蛋白对体外培养人胎盘绒毛滋养层细胞影响的 研究	熊用周 潘平 徐绍嫣, 张珏 王亚辉 左嘉客 顾正	(59)
天花粉蛋白引产和内源前列腺素的关系的初步研究	朱岩平 蔡仕萍	(65)
免疫抑制和天花粉蛋白终止妊娠作用的初步研究	熊用周, 张珏 徐绍嫣 潘平 王亚辉	(71)
醋酸诺醇环戊烷丙酸酯避孕原理和安全性问题的实验研究	第二研究室	(75)
6,7- ^3H -醋酸诺醇-3 β -1'- ^{14}C -环戊烷丙酸酯的合成	张秉钧, 罗荣生 赵夏令 张雨龙	(80)
6,7- ^3H -醋酸诺醇环戊烷丙酸酯在动物体内的分布与 排泄	高慧 曹梅讯, 罗荣生, 梁素香 周筱刚 孔祥仙	(89)
长期注射醋酸诺醇环戊烷丙酸酯对雌性猕猴生殖系统的 影响	邓民任, 朱光, 莫慧英 姚今吾 王一平	(95)
猕猴(<i>Macaca mutatta</i>) 月经周期尿中雌激素排泄量的荧光测定和长效避孕针醋酸诺 醇环戊烷丙酸酯对它的影响	蔡仕萍 周冠中 蒋天骥	(104)
妇女肌肉注射醋酸诺醇环戊烷丙酸酯后尿中雌激素和孕二醇的测定	第二研究室	(109)
长期注射醋酸诺醇环戊烷丙酸酯对小鼠肿瘤发生的 影响	曾弥白 张果 吕淑霞 邓民任 戚爱光 吴筱兰	(118)
18-甲基炔诺酮对金黄田鼠精子在雌性生殖道中的 影响	曾弥白 赵季英 吕淑霞 戚爱光 盛洁漪 吴筱兰	(123)
18-甲基炔诺酮对金黄田鼠宫颈上皮细胞超微形态的影响	曾弥白 吴筱兰	(127)
18-甲基炔诺酮对金黄田鼠宫颈上皮酸性粘多糖的分泌的影响	张果 吕淑霞 朱庆瑞	(129)
棉酚抗生育作用的研究 I. 附睾结扎的实验分析	戴荣禧 董蓉花	(132)
棉酚抗生育作用的研究 II. 棉酚抗生育的作用部位的电子显微镜观察	戴荣禧 庞诗宜 刘正廉	(137)
棉酚抗生育作用的研究 III. 大白鼠灌服棉酚后血液和有关脏器中棉酚含量的		

测定	柯一保 林心楷 林秀媛 章月华 马玉珍 郁素娥 丁溶	(141)
在毛主席革命路线指引下开展放射免疫分析工作	第二研究室 华山医院同位素室	(152)
人绒毛膜促性腺激素(HCG)的放射免疫测定法	左嘉客 刘世范 刘莲英 顾正	(155)
尿中雌激素的荧光测定	第二研究室	(165)
荧光抗体技术的原理、方法和应用	陈元凤 徐国江 黄妙宝 蒋琬素	(174)
人胎盘绒毛滋养层细胞的培养方法简介	熊用周 潘平 徐绍嫣 张珏	(182)

实践是科学理论发展的真正源泉

——天花粉蛋白引产研究的体会

第二研究室

无产阶级文化大革命以来,广大革命科技人员遵照毛主席的教导,实行科学研究为无产阶级政治服务,为工农兵服务,与生产劳动相结合的方针,在广泛联系实际的基础上提高,无论在理论上和解决重大实际问题上都取得了丰硕的成果。天花粉蛋白中期妊娠引产的成功及其作用原理的阐明,就是贯彻执行这一方针的结果。

引产中药“天花粉针剂”是中西医结合的产物,是贯彻党的革命卫生路线的成果。远在明代李时珍《本草纲目》中,虽已记载天花粉有“通月水”,治“胞衣不下”的功用,但应用于中期妊娠引产还是近十多年前,从民间流传的外用引产药发掘出来的。无产阶级文化大革命期间,武汉和南京地区的广大医务人员和科技人员,遵照毛主席关于“中国医药学是一个伟大的宝库,应该努力发掘,加以提高”的教导,从包含七味生药的原复方中,筛选出天花粉和牙皂两味,并经初步提取,制成阴道用胶囊或片剂,简称“天牙散”或“天皂合剂”。上海医务人员和科技人员学习武汉和南京的先进经验,于1967年开展临床和科研工作,肯定了“天皂合剂”的引产效果,但也发现存在一定的问题,特别是严重的过敏和毒性反应。

为了解决用药的安全问题,使这一祖国医药学的宝贵遗产能更好地为人民服务,上海成立了工人、医务人员和科研人员三结合的“天皂合剂会战组”。大胆创新,对原来的“天皂合剂”进行了成份、剂型及给药途径的

改革,制成单味注射用“天花粉针剂”,去掉有毒的牙皂,从阴道给药改为肌肉注射,减少和稳定了给药剂量,并制订了皮试及试探剂量的使用方法,以防止过敏反应,从而提高了用药安全性,扩大了临床使用范围。由于降低了毒性,减轻了副反应,终于得以在临床推广应用,为工农兵服务,使祖国医药学这一宝贵遗产大放异彩。从外用复方,改为单味注射用“天花粉针剂”是天花粉蛋白中期引产成功的关键性突破,这正是在各级党组织领导下,实行三结合,大搞群众运动的胜利果实。从1971年临床试用以来,几年广泛的临床实践证明,“天花粉针剂”与目前国内外其他中期妊娠引产方法相比较,具备有效率高,比较安全和药源广等优点。同时,还适用于死胎和过期流产的引产。此外,对宫外孕、葡萄胎、恶性葡萄胎有独特的疗效,对绒毛膜上皮癌也有一定的疗效。在计划生育工作中,以及对增生性滋养层细胞疾病的治疗中都发挥了一定的作用,受到工农群众的欢迎。临床丰富的实践经验,向理论研究提出了一系列新的课题。天花粉蛋白引产的作用原理及有效成分的提纯,成了实践上迫切需要解决的问题。

“感觉只解决现象问题,理论才解决本质问题。这些问题的解决,一点也不能离开实践。”天花粉蛋白引产作用原理及其有效成分的纯化,是进一步提高和扩大天花粉蛋白临床应用的前提。只有掌握了天花粉蛋白引产的规律,完成从“必然王国”到“自由王国”的

飞跃,临床实践才能获得更大的自由。为此,1973年在上级党委和所党总支的领导和支持下,我们研究室承担了天花粉蛋白引产作用原理的研究任务。通过所内外广泛的协作,发挥研究室原有各课题组的技术专长,通力合作,在较短的时间内,基本上阐明了天花粉蛋白引产的作用原理。

临床对天花粉蛋白引产时,流产胎盘的病理学观察,发现胎盘绒毛有广泛的变性坏死,绒毛间隙有血纤蛋白沉着和血管阻塞等现象。天花粉蛋白对多种增生性滋养层细胞疾病都有显著疗效,也似乎提示它可能专一地作用于滋养层细胞。然而,关于天花粉蛋白引产作用原理却存在分歧的意见。有人主张天花粉蛋白直接损伤胎盘滋养层细胞,并有一定的专一性。另一些人则认为天花粉蛋白对滋养层细胞没有专一性,绒毛坏死是血流障碍的结果。此外,还有人认为天花粉蛋白有很强的抗原性,可能通过免疫损伤机制起作用。“研究任何过程,如果是存在着两个以上矛盾的复杂过程的话,就要用全力找出它的主要矛盾。捉住了这个主要矛盾,一切问题就迎刃而解了。”我们通过对临床积累的大量资料,和引产的复杂过程的矛盾分析,抓住了解决引产机理的关键是在于弄清楚天花粉蛋白作用的原初部位和原发的病理变化,以及有无细胞专一性。其次,才是胎盘的原初损伤如何发动宫缩而导致流产。在这一思想指引下,我们进行了利用同位素标记和荧光抗体示踪技术追踪天花粉蛋白在体内的分布,天花粉蛋白对胎盘的形态和功能损伤的早期动态过程的观察,并在离体培养的人滋养层细胞上加以验证,以及抑制前列腺素合成对流产的影响等方面的系统研究,通过整体和离体多方面实验结果的分析,互相印证,阐明了天花粉蛋白引产的作用原理:天花粉蛋白能专一地作用于胎盘的滋养层细胞,造成形态和功能的损伤,破坏了母体和胎儿之间的内分泌关系和代谢物的交换,并可能通

过尚未弄清楚的机制,引起前列腺素的增加,发动宫缩而导致流产。

“理论的基础是实践,又反过来为实践服务。”对天花粉蛋白作用的原初部位及其细胞学专一性的认识,说明了它对宫外孕、葡萄胎和恶性葡萄胎有独特的疗效,以及对绒癌有一定疗效的原因。同时,在理论上还进一步提出了天花粉蛋白作用专一性的细胞学和分子机制的问题。对这些问题的深入研究,对于寻找有细胞学专一性的抗癌新药将会有所启发。天花粉蛋白既然能选择地损伤滋养层细胞,这启示我们,只要这种细胞开始出现活动的时期,天花粉蛋白就有可能发挥其抗生育的作用。这也就为天花粉蛋白应用于抗早孕提供了理论依据。另一方面,天花粉蛋白对胎盘的原初损伤如何影响前列腺素合成增加而发动宫缩,还涉及到分娩的激素控制机制的问题。这也是一个目前人类生殖生理学中还在争论而未解决的重要理论问题。对这一问题深入研究对于探讨抗早孕,以及缩短天花粉中期引产过程是有重要意义的。此外,天花粉蛋白的纯化还为研究它的结构与其生物学和免疫功能的关系准备了条件。这些研究对于从根本上了解天花粉蛋白对细胞作用的机制,以及克服天花粉蛋白过敏问题都是极其重要的。总之,天花粉蛋白是从民间中草药发掘出来的国际上第一个植物蛋白性的中期引产和抗滋养层细胞肿瘤的药物。天花粉蛋白的作用原理初步阐明和有效成分的纯化,在实践上为提高和扩大天花粉蛋白的临床应用和探讨抗早孕的可能性提供了依据,并对寻找有细胞学专一性的抗癌药物有所启发。同时,在理论上还为进一步研究天花粉蛋白作用的细胞学和分子机制开辟了广阔的前景。

“通过实践而发现真理,又通过实践而证实真理和发展真理。”天花粉从民间偏方到引产有效蛋白质成分的提纯,从临床应用成功到引产原理的初步阐明,正是沿着“实践——

理论——实践”这一认识过程逐步发展深化的。

从天花粉蛋白引产研究工作中，我们还深刻地体会到，实践是科学理论发展的真正源泉。自然科学理论只有沿着“实践——理论——实践”的认识论路线前进才是一条有无限光明前途的康庄大道。对于为社会主义革命和建设而去探索自然科学理论，党和人民总是给以满腔热忱的鼓励和支持的。

我们决心要在毛主席革命路线指引下，坚定不移地沿着科学研究为无产阶级政治服务，为工农兵服务，与生产劳动相结合的道路继续走下去，发扬“可上九天揽月，可下五洋捉鳖”的革命精神，勇于实践，敢于攀登科学高峰，为更好地整理提高我国医学的宝贵遗产，走出我国自己的发展科学的道路，为社会主义革命和社会主义建设作出更大的贡献。

(1975年)

天花粉蛋白引产原理的探讨*

第二研究室

天花粉粗提物是从葫芦科植物栝楼(*Trichosanthes kirilowii* Maxim.)的根提取出的中期引产药物。远在明代李时珍《本草纲目》中已记载有“通月水”,治“胞衣不下”的功用(李时珍,1596)。民间流传为外用“引产药”。无产阶级文化大革命期间,武汉、南京和上海等地区的广大工人、医务和科研人员,遵循毛主席关于“中国医学是一个伟大宝库,应当努力发掘,加以提高”的教导,对原来包含七味中药的复方,去粗取精,整理提高,改制为单味注射用天花粉针剂,使更加安全有效。通过鉴定,证明“天花粉针剂”对中期妊娠有很好的引产效果,有效率达96%左右。和目前国内外其他中期妊娠引产方法相比较,具有效率高,安全和药源广等优点。同时,还适用于死胎和过期流产的引产。此外,对宫外孕、葡萄胎、恶性葡萄胎有独特的疗效,对绒毛膜上皮癌也有一定的疗效(上海市天花粉科研协作组,1976)。但其引产作用原理还不甚清楚。

我室在1973年开始这方面的研究后,通过所内外广泛的协作,在天花粉粗提物引产有效成分的纯化,体内分布和作用部位,对胎盘形态和内分泌功能的影响等方面进行了探讨,初步阐明了天花粉蛋白引产的作用原理。现将主要的实验结果,简略地综合报告如下,供进一步研讨。

一、天花粉蛋白的纯化和性质

中药“天花粉”是指栝楼的根。按《本草纲目》,栝楼“其根作粉,洁白如雪,故谓之天

花粉”(李时珍,1596)。现在所用的天花粉粗提物是从新鲜栝楼根榨出液,滤去淀粉后,经丙酮沉淀,进一步分离纯化,得到的蛋白质性药物。临床“注射用天花粉”为天花粉粗提物的无菌冷冻干燥制剂,是含有四、五种以上蛋白质的混合物。经透析和丙酮分级沉淀法进一步提纯的“纯制天花粉”,有效成分的含量显著提高,仍含有三个抗原成分。

天花粉粗提物引产有效成分的提纯及其分子性质的了解,对于研究其作用原理是非常需要的。为此,我们和中国科学院上海有机化学研究所共同提纯了天花粉粗提物的引产有效成分,并对其性质作了初步的研究。

天花粉粗提物有很强的抗原性。供制作针剂的原料(天花粉粗提物),在免疫电泳上呈现五条弧线,聚丙烯酰胺凝胶电泳上可分出七条带。从针剂原料,经过两次CM-葡聚糖凝胶C-50柱层析,可以得到在免疫化学上纯一的引产有效成分;它在凝胶电泳上相当于一主要带,还夹杂有极微量的另一个杂质成分。从天花粉粗提物纯化的引产有效成分,用怀孕10天的小鼠作引产生物学活力测定时,0.05毫克有效。其他成分没有引产生物学活力。用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳法,估计其分子量约为18,000,等电点聚焦法测定其等电点为9.4,初步分析可能含糖。总之,天花粉粗提物的引产有效成分是一个分子量不大的碱性蛋白,并可能含糖。我们建议称为“天花粉蛋白”(trichosanthin)。分子的这些特性,对于了解其作用的细胞专一性

* 刊登在《动物学报》,1976年6月第22卷第2期。

是很有意义的。此外,有效成分的提纯也有利于减少异蛋白的副作用。

二、天花粉蛋白的作用部位及对胎盘形态和功能的损伤

对天花粉粗提物引产时流产出胎盘的病理学观察,发现胎盘绒毛有广泛的变性坏死,绒毛间隙有血纤维蛋白沉着和血流阻塞等现象。根据这些现象,关于天花粉蛋白引产作用原理曾经提出过几个可能的假说:(1)直接损伤胎盘的滋养层细胞,并有一定的专一性;(2)对滋养层细胞没有专一性,绒毛的坏死是血流障碍的结果;(3)天花粉蛋白有强的抗原性,可能通过免疫学损伤机制起作用。对于这几个假说,需要进一步实验加以分析检验,而关键又在于弄清楚天花粉蛋白的原初作用部位和原发的病理变化,以及有无专一性。

1. 天花粉蛋白的原初作用部位

天花粉蛋白这样一个分子量不大的蛋白分子,进入体内后的分布如何,能不能通过胎盘屏障,直接作用于胎盘,还是胎儿,这是首先需要解决的问题。

和上海第二医学院瑞金医院合作,初步观察和比较了不同途径给药时,碘¹³¹天花粉粗提物在引产妇女体内放射性的分布和排泄情况,发现静脉滴注时,排泄最快。肌肉注射时,药物从注射局部缓慢释放,因而可以维持较长时间的药效。很有意义的是羊膜腔内注射时,羊水内直到分娩时还保持很高的放射强度,而全身其他器官和尿液内却非常低。这提示天花粉蛋白至多只能缓慢地透过羊膜和胎盘屏障。这也许可以解释为什么羊膜腔注射时,全身性副反应比肌肉注射要小。对于有某些禁忌症(如肝、肾等疾病)而又必须引产的妇女,羊膜腔注射可能是较适宜的给药方式。

小鼠和人类胎盘同属于绒毛血窦型,在结构的细节上仍有明显不同的地方(Enders,

1965)。为了取材方便起见,我们选用怀孕第10天的小鼠作为中期引产的动物材料(这也是目前天花粉粗提物药理检验采用的),用间接荧光标记抗体法(Kawamura, 1969),追踪了给药后不同时间,“纯制天花粉”抗原分布的动态。结果观察到,皮下注射“纯制天花粉”0.2毫克后30分钟,胎盘海绵区血管附近的滋养层细胞和蜕膜细胞,最先出现专一的荧光,然后逐渐向胎盘深部扩展,迷路区滋养层细胞要在注射后2小时才出现荧光。以后,这两区域的荧光强度,随时间的增加而加强(表1)。荧光分布限于细胞质内,细胞核没有荧光。胎儿组织,除胎儿红血球外,没有观察到荧光。值得注意,胎儿红血球(有细胞核)有荧光,而母体成熟的红血球却没有。这似乎提示“纯制天花粉”和某些细胞有一定的结合专一性。然而,蜕膜细胞,以及母体的肾和子宫组织也有荧光分布。目前使用的抗“纯制天花粉”血清还不是单一的抗天花粉蛋白抗体,还包含着非有效成分抗原的抗体。这些组织出现荧光,是由于天花粉蛋白本身和细胞的结合专一性不强,还是由于和其他抗原成分的抗体相结合的缘故,还不能断定。

表1 孕鼠注射“纯制天花粉”抗原后不同时间专一荧光分布的变化

实验组别		荧光强度	抗体部位	胎 盘		胎儿组织**
				基蜕膜细胞和海绵区滋养层细胞	迷路区滋养层细胞	
对 照 组			—	—	—	
实验组*	1小时	++	—	—		
	2小时	+ ~ ++	—	—		
	8小时	+++	—	—		
	12小时	+++	++ ~ +++	—		
	15小时	+++	+++	—		
	24小时	++ ~ +++	+++	—		

* 每只孕鼠腹部皮下注射“纯制天花粉”0.2毫克/0.2毫升生理水。

** 在高剂量的实验组(“纯制天花粉”2毫克/0.2毫升,尾静脉注射),胎儿红血球呈现专一的荧光。

对同一组标本作病理组织学观察,发现注射16小时后,胎盘滋养层细胞已开始变性坏死,大约就在这以前不久,胎儿可能由于红血球破坏,停止心跳,而陷于死亡。蜕膜细胞,以及母体的肾脏和子宫组织,虽也有荧光分布,但不能找到细胞形态损伤^①。这说明天花粉蛋白即使和细胞结合的专一性不高,而天花粉蛋白对细胞的损伤作用仍然是相当专一的。

总之,这些实验结果证实天花粉蛋白中期引产直接作用于胎盘,除胎儿红血球外,其他胎儿组织并不和天花粉蛋白结合。天花粉蛋白的原初作用部位主要是胎盘的滋养层细胞,并可能表现一定的细胞专一性。对这些有参考价值的结果,最好在更接近人类的灵长动物上,加以验证。

2. 对猕猴胎盘绒毛的形态损伤

临床对天花粉粗提物引产时,流产胎盘的病理学观察,积累了许多有价值的资料(上海市天花粉科研协作组,1976)。然而流产时所取得的胎盘材料,接受药物作用已经历几天的时间,所看到的各种显著的变化,恐怕已是病变的结果。因而对这些结果的解释,也难免有不一致的地方。为了探索注射天花粉粗提物后,最初出现的、原发的和关键的病理变化,我们系统地观察了天花粉蛋白对猕猴胎盘绒毛形态损伤的早期过程。

猕猴(*Macaca mulatta*)胎盘的形态构造和人类十分相似。中期妊娠的猕猴,肌肉注射“纯制天花粉”2毫克,经历99.5小时便发生流产。对13只孕猴在注射药物后不同时间剖腹取材,供组织学观察,结果发现注射后11~48小时内,胎盘绒毛已发生程度不等的变化,损伤轻重大致与时间长短有关。取材最早的标本(11~14小时)上,绒毛合体滋养层细胞已出现明显病变。据此推测最初病变应发生在更早的时间。综合对许多个胎盘形态变化比较分析的结果,天花粉蛋白引起的胎盘病变发展进程大致可如下述:最早可

观察到的变化是绒毛合体滋养层细胞的细胞质变性,空泡化。有的绒毛边缘突出网泡状“芽体”。由于这些“芽体”脱落的结果,绒毛间隙内便出现许多网泡。不久,有些合胞体的细胞核开始固缩。继之,合体滋养层的细胞质空泡化更加广泛,并出现白血球浸润,细胞核固缩。更进一步的发展,空泡合并和细胞质边缘区域剥离,导致合体滋养层细胞质的崩解。核固缩更严重,向内簇集。由于细胞质崩解,大量网泡和细胞质碎片充斥在绒毛间隙,引起凝血,造成血纤蛋白沉着和血流堵塞。由于循环障碍,胎盘母面基蜕膜区和滋养壳区,子宫螺旋动脉因而膨大,以致怒张。一旦出现循环障碍,又可能反转回来阻碍绒毛的营养供应,加速其坏死。由此可见,绒毛合体滋养层的损伤是原发性的,也是关键的。随后才出现血流障碍和大量组织坏死。血流障碍是继发的,促进绒毛病变发展的因素。值得注意的,在24小时合体滋养层细胞已出现严重损伤的绒毛,其细胞滋养层细胞(朗罕氏细胞)及间质细胞仍完好无损。即使在48小时胎盘出现严重坏死的例子,蜕膜细胞以及滋养壳的细胞尚未出现病变。总之,所有这些事实证实天花粉蛋白作用的关键是损伤胎盘绒毛合体滋养层细胞。并且这种损伤作用的专一性,似乎和滋养层细胞的分化程度有关系,分化高的合体滋养层敏感,而细胞滋养层不敏感。这是特别值得注意的地方。

3. 对引产妇女胎盘内分泌功能的损伤

现在已明确绒毛的合体滋养层细胞是由细胞滋养层细胞分化而来的,后者是不断分裂、生长的干细胞,而前者是执行功能的细胞(Billington, 1971)。几乎现在已知的几种与胎盘有关的激素,无论蛋白质激素(如HCG、HCS),或甾体激素(如孕酮、雌三醇)全是合胞体分泌的。其中雌激素的前体物虽

^① 与中期妊娠不同,早期妊娠(5天)的小鼠,注射天花粉粗提物后15小时,蜕膜细胞有广泛的坏死,胚锥区域滋养层巨细胞也有部分坏死。

主要来源于胎儿肾上腺,也要再经胎盘改造成雌三醇,才分泌出来(Diczfalussy, 1974)。另一方面,临床上发现先兆流产时,这些激素往往下降到极低的水平(Van Leusden, 1972)。因此,测量妇女用天花粉粗提物引产过程中,这些激素的早期变化,就可能反映胎盘绒毛合体滋养层细胞的功能状态。显然,这些资料是用通常的形态学方法无法从人体上得到的。

绒毛膜促性腺激素(HCG)是人类胎盘重要的激素。以此作为胎盘功能指标,用双抗体放射免疫法(上海实验生物研究所等, 1975),测定了天花粉粗提物中期引产妇女血清内HCG水平的变化,发现无论肌肉或羊膜腔内注射天花粉粗提物①后数小时内,血清中HCG含量迅速降低,24小时已低于原有水平的一半,注射后第三天已接近一般自发性流产的临界水平,随后几天,或迟或早,就发生流产。值得注意的,虽然注射相同剂量的药物后24小时,血清HCG已迅速下降,但各受测妇女的下降率并不相同,有的快些,有的慢些。这些激素水平的差异和天花粉粗提物引产所需时间长短有无关联呢?对8例资料的统计分析,表明HCG含量的下降率和诱发流产所需天数之间并无相关性(相关系数 $r=0.679$)。其次,肌肉注射时引产时间较长(平均约6天),羊膜腔注射较短(平均约4天)。然而,在两者HCG的变化并没有多大的不同。这点在讨论激素变化和流产的关系时还要谈到。顺便提及,绒毛病人用天花粉粗提物治疗时,血清HCG也同样迅速下降。为了了解更早期激素变化动态的细节,又对5例中期妊娠妇女肌肉注射天花粉粗提物6~8毫克后24小时内各时相血清HCG含量作了测定,其中3例在最初开始下降后,12小时又出现反跳现象,含量暂时回升,然后又直线下降。用气相层析法测定天花粉粗提物引产妇女尿内孕二醇和雌三醇含量变化的初步结果,也发现大致和HCG

平行的变动趋势(上海实验生物研究所第二研究室,1976)。这些甾体激素下降的快慢和分娩的早迟之间,同样找不到相关的迹象。

总之,这些实验结果一致地证实天花粉蛋白进入人体后,能迅速地作用于胎盘的合体滋养层细胞,损伤其内分泌功能。这种损伤作用甚至在注射后4小时从血清HCG开始下降,就表现出来了。特别值得注意的,血清HCG含量变化的显著特点是在最初下降之后,又出现一个短暂的回升相。和胎盘有关的甾体激素(孕二醇)也表现出在第一天升高,然后降低的趋势。这一现象也许可以从前述猕猴胎盘绒毛早期形态损伤时,合体滋养层细胞细胞质的崩解,得到解释。可以假定合体细胞细胞质崩解时,将贮存的激素一齐释放出来,因而造成短暂的回升。在绒毛病人化学治疗时,也有人(Bagshawe, 1974)观察到HCG,尤其是癌胚性抗原(CEA),在最初下降后也有明显的反跳。该文作者并认为是细胞受到药物作用濒于死亡前,大量释放激素和抗原的结果。如果这种解释是对的,就可以推测相当于这种功能变化的形态变化——合体滋养层细胞的崩解,在人体上同样可能在12小时以前就发生了。于是在人体上无法用形态学方法观察到的现象,用生物化学方法就可以使其显现出来了。

4. 对离体培养的人滋养层细胞的作用

根据上述各方面在整体上的实验分析,天花粉蛋白作用的关键集中到胎盘滋养层细胞上了,并且有理由认为天花粉蛋白可能直接损伤滋养层细胞,并有一定的专一性。为了检验这一结论和进一步探讨天花粉蛋白损伤的细胞学机制,我们又进行了天花粉蛋白对离体培养的人滋养层细胞内分泌功能和形态影响的研究。

用放射免疫法测定HCG的结果,中期胎盘培养3天后的培养液中HCG累积含量

① 肌肉注射剂量为6~8毫克,羊膜腔内注射剂量为12.5毫克。

达到 40 毫微克/毫升。在总量为 3 毫升的培养液中,加入“纯制天花粉”10 微克后,培养细胞的内分泌功能就受到明显的抑制。在开始 4 小时,培养液内 HCG 含量还略有上升,而 24 小时后,就几乎处于完全抑制状态。与此相反,对照组在换培养液后 3 天内,HCG 分泌不断增加,累积含量与换培养液前 3 天的累积含量大致相同。对离体培养的早期胎盘(妊娠 2 月以内)的实验,也得到同样的结果。

在形态上,培养的滋养层细胞经天花粉蛋白处理后,不论早期或中期胎盘,都可以看到和功能损伤相对应的形态损伤。培养的滋养层细胞的细胞核固缩,碎裂而至结构消失。细胞质变性出现空泡,崩解为嗜伊红的小球,分散在坏死细胞周围。由于这种变化的结果,加“纯制天花粉”后 3 天,整个培养物的生长晕细胞从玻片上解体脱落,只残留下一些原来细胞的痕迹,而对照组的培养物,生长正常,生长晕继续扩大。

总之,离体实验得到的结果,更加强了整体实验得出的结论,清楚地证明了天花粉蛋白对人的滋养层细胞有直接损伤作用。对其他种类的培养细胞,如人体羊膜细胞和肝癌细胞,初步观察到“纯制天花粉”的剂量在 3 毫升培养液中,即使增加到 100 微克,仍然没有损伤作用,而对于滋养层细胞,1 微克就有明显的损伤作用。这清楚地表明天花粉蛋白的损伤作用有一定的细胞专一性。天花粉蛋白对细胞损伤的机制和专一性问题,值得进一步深入地研究。

综合整体和离体各方面的实验结果,互相印证,可以得出结论:天花粉蛋白的原初作用部位是胎盘,而不是胎儿;并能专一地和直接地作用于胎盘滋养层细胞,造成形态和功能的损伤。胎盘绒毛合体滋养层细胞的变性坏死是原发的、关键的、而循环障碍是继发的。一旦出现血流障碍,又可能反过来加速绒毛的坏死。如此交互作用,胎盘坏死面积

愈来愈大,程度愈来愈深。反映在功能方面,胎盘激素水平迅速降低到先兆流产的临界水平之下。上海市天花粉科研协作组对天花粉粗提物中期引产胎盘的病理观察,发现胎盘绒毛滋养层细胞有广泛的凝固性坏死。同时,根据对死胎胎盘,母体螺旋动脉的变化,以及羊膜腔内和肌肉注射天花粉粗提物时胎盘绒毛病变部位不同,前者主要限于绒毛膜板下,后者主要在基蜕膜上,也就是首先和天花粉蛋白接触的地方,从而推论天花粉粗提物引起的胎盘绒毛的坏死是和药物直接“接触”的结果,而不是通过胎儿或母体血管作用的结果。我们的实验有力地证实了天花粉粗提物直接作用于滋养层细胞的论断。

最后,还要提到天花粉蛋白引产和免疫反应的问题。天花粉蛋白有很强的抗原性。天花粉蛋白引产是否可能通过免疫损伤机制起作用呢?这需要用实验加以检验。已知非那根对体液抗体和延缓型过敏反应有显著的抑制作用(Gudson, 1972)。在怀孕 10 天的小鼠上进行的实验表明非那根能抑制天花粉粗提物引起的过敏反应,而对胎儿没有不良影响。在天花粉粗提物引起的过敏反应被注射非那根抑制的条件下,天花粉粗提物仍能终止妊娠,从而排除了免疫反应参与引产的可能性。实际上,离体培养实验已经表明天花粉蛋白对滋养层细胞的损伤是直接的,无需通过免疫损伤机制起作用。总之,天花粉粗提物引起的过敏反应是蛋白质性药物的副作用,而和引产本身无关。临床上用抗过敏药物,如长效促皮质激素来克服这些副反应时,并不会影响其引产效果。

三、胎盘损伤和流产

上述实验分析,证明天花粉蛋白直接作用于胎盘滋养层细胞,造成形态和功能损伤,这是原发的和关键的变化。然而,还必须注意到,只有当这些变化导致发动宫缩等一系

列分娩活动时,才能将胎儿、胎盘排出,完成流产。天花粉蛋白引产过程实际上应包括胎盘的原初损伤和宫缩的发动这两个步骤。因此,关于天花粉蛋白引产原理的假说,还要能说明胎盘的原初损伤如何导致流产时,才能认为是比较全面的,更符合实际的。

按照生殖生理学新近的看法,胎儿、胎盘和母体作为一个功能上统一的整体,在维持正常妊娠和控制分娩中起作用。一般认为,分娩的发动是在胎儿的垂体-肾上腺系统的控制下,引起胎盘内分泌功能的变化,结果孕酮分泌降低,雌激素升高,并假定由此诱发胎盘(蜕膜)内,前列腺素的大量合成和释放,从而发动宫缩,导致分娩(Liggins, 1973; Heap, 1972)。目前有证据提示人胎儿垂体-肾上腺系统在控制分娩发动中同样起主导作用。然而,对于激素如何控制发动宫缩,还不清楚。临产妇女是否出现孕酮显著下降和雌激素显著升高的现象,迄今尚无定论。虽然如此,人类正常分娩和流产时,都观察到血流和羊水中前列腺素确有明显的升高。同时,临床上也证明注射前列腺素($F_{2\alpha}$)有刺激宫缩,引起流产的作用(Karim, 1969)。在用高渗盐水引产时,还发现引产妇女羊水中前列腺素($F_{2\alpha}$)逐渐增高,这种增高的快慢似乎和胎儿产出的快慢有些关系(Gustavii 等, 1972)。总之,在人类分娩和流产过程中,前列腺素和宫缩发动肯定有直接的关系,虽然引起它释放的机制还不清楚。

已知怀孕大鼠用阿斯匹林,氨基比林等药物抑制前列腺素合成时,就会延迟或阻止分娩(Aiken, 1972)。为了了解天花粉蛋白引产和前列腺素之间的关系,在晚期妊娠小鼠(怀孕 17 天)上进行了抑制前列腺素对天花粉引产的影响的实验。需要说明的,与中期妊娠(怀孕 10 天)小鼠的反应不同,晚期妊娠小鼠注射“纯制天花粉”0.3 毫克后,平均 20.5 小时都发生流产,并且产下的全是活仔,而不是像中期妊娠那样死在子宫内。如

对怀孕 17 天母鼠注射 3 毫克阿斯匹林或氨基比林和 0.3 毫克“纯制天花粉”的混合溶液,不能推迟流产时间,表明这些抗炎症药物本身并不能直接对抗天花粉蛋白作用的效果。如在怀孕第 15 至 18 天时,每日喂阿斯匹林或氨基比林(5 毫克)抑制前列腺素合成,在怀孕第 17 天时注射“纯制天花粉”,结果流产就被显著地延迟(70~80 小时),甚至胎儿不能产出,而死在子宫内。这说明天花粉蛋白引产过程中,可能需要前列腺素参与宫缩的发动。如果前列腺素合成受到抑制,分娩就被延迟,甚至胎儿虽死,也不能娩出。依据这一实验,推测在人体上也可能存在类似的情况。于是天花粉蛋白引产的宫缩发动问题,便归结到天花粉蛋白引起的胎盘原初损伤是否可能引起,又如何引起前列腺素合成的增加这样一个问题上了。由于对人正常分娩的激素控制还不清楚,对于这一复杂问题的回答,还受到很大的限制。目前我们还只能从胎盘内分泌功能损伤和形态损伤两方面作一些初步的讨论。

先谈内分泌变化。天花粉蛋白引产时,已经观察到 HCG 和孕酮等这些胎盘激素迅速下降到先兆流产水平以下。胎盘滋养层细胞的这种内分泌功能损伤是否就足以引起前列腺素增加,发动宫缩,导致流产呢?这还有待于对引产过程中,前列腺素和胎盘激素的相关变化的深入研究。然而,从前节的初步分析看来,这些激素下降的快慢和流产早迟之间,找不到相关的迹象。这似乎提示,很可能和自发性流产一样,这些激素的下降只是胎盘损伤程度的反映,而很难说是发动流产的直接原因。实际上,胎盘滋养层细胞的功能是多方面的,除产生激素外,还担任维持母体和胎儿之间气体和代谢物的交换等重要功能。一旦这些细胞受到实质性损伤时,必然造成多方面的功能损伤,而所观测到的激素水平的变化,只不过是其中的一种表现。当然,这些激素的变化也可能是参与引起流产

的一个因素——如孕酮的降低可能增加子宫平滑肌对前列腺素反应的敏感性,但不是引起流产的唯一因素。因此,还应从其他方面找原因。

于是,我们便应考虑胎盘坏死和流产的关系。已如前述,由于天花粉蛋白引起胎盘形态和功能严重损伤的结果,破坏了母体和胎儿之间正常的内分泌关系和代谢物的交换,造成胎儿死亡。肌肉注射天花粉粗提物时,尤其如此。众所周知,胎儿死亡(死胎)不一定引起流产——实际上,现在天花粉粗提物正成功地用于死胎的引产。这是因为死胎的胎盘绒毛的内循环,虽因胎儿死亡而陷于停顿,但绒毛间隙的母体循环仍然畅通,绒毛仍然可能得到营养供应,继续存活。既然胎儿死亡不是流产的必要条件,剩下的问题就是胎盘本身的坏死和流产的关系了。有人在孕猴胎盘上作实验,如将脐带进入胎盘的部分血管结扎,并不出现流产;但如将副胎盘在原位剥离,则48小时内必定流产(Myers等,1968)。由此可见,即使部分胎盘血流不通,并不流产,而副胎盘受到破坏,即发动流产。所以,胎儿死亡并不是流产的必要条件,而胎盘坏死或遭到破坏倒是有重要关系的。已知组织损伤过程中,可能释放某些因子引起炎症反应和前列腺素的释放(Vane, 1972)。天花粉粗提物引产时胎盘出现广泛坏死,假定因而可能产生大量前列腺素,发动宫缩,导致流产。这种假设是否正确还需要进一步用实验验证。尽管对引起前列腺素合成和释放的机制尚属推测,胎盘的坏死和丧失功能必然导致流产,却是肯定无疑的。根据上述的分析,可以认为胎盘的实质性损伤,包括形态和功能两方面,才是天花粉蛋白引产的主要原因。正是在这种意义上,或许我们可以形象地说,天花粉蛋白的引产作用信当于胎盘的“化学切除”。

总结我们在整体和离体上各方面的实验结果,以及对临床病理现象的分析,天花粉蛋

白引产原理可归结如下:

(1) 天花粉蛋白直接作用在胎盘的滋养层细胞,并有一定的细胞专一性;

(2) 天花粉蛋白能选择地使胎盘绒毛合体滋养层细胞变性坏死,解体的细胞碎片留在血窦中,引起凝血,造成循环障碍和进一步的大量组织坏死。胎盘绒毛坏死是原发的,循环障碍是继发的;

(3) 胎盘绒毛的损伤反映在功能方面,HCG和甾体激素迅速下降到先兆流产的临界水平以下。

由于胎盘形态和功能严重损伤的结果,破坏了母体和胎儿之间正常的内分泌关系和代谢物的交换,并假定可能通过尚未弄清楚的机制,引起前列腺素合成的增加,发动宫缩而导致流产。

四、引产原理和临床应用的前景

“通过实践而发现真理,又通过实践而证实真理和发展真理。”天花粉粗提物从民间偏方到有效蛋白质成分的纯化,从临床观察到引产原理的初步阐明,正是遵循着这一认识发展过程。目前对于天花粉蛋白引产原理的认识还是初步的,不完全的,还需要结合临床实践,在以下两方面深入研究,加以提高。

首先是天花粉蛋白作用的细胞专一性和损伤机制问题。天花粉蛋白能直接作用于滋养层细胞,并有一定的细胞专一性。这也就说明了天花粉蛋白对宫外孕、葡萄胎和恶性葡萄胎有独特的疗效,以及对绒毛膜上皮癌有一定疗效的原因。天花粉蛋白之所以不影响骨髓造血机能,因而比其他抗癌药物优越的地方,也就在于它有一定的细胞专一性。同时,天花粉蛋白对滋养层细胞作用专一性似乎和细胞分化程度有关系,分化程度高的合体滋养层细胞敏感,而分化程度低的朗罕氏细胞不敏感。临床绒癌治疗得到的初步印象,

对恶性程度高的绒癌细胞似乎效果差一些。这是不是同样和细胞分化程度有关系呢？这是一个涉及到天花粉蛋白作用专一性和细胞分化程度关系的，需要深入研究的问题。

已知滋养层细胞的生物学特点是细胞表面有一层带负电性的唾液粘蛋白(Bradbury, 1969)。天花粉蛋白是一个碱性蛋白质，在体内生理环境下带正电性。分子的这种性质是否和细胞专一性有关，是可以考虑的。

其次，某些植物毒蛋白，如蓖麻毒蛋白和相思子毒蛋白对肿瘤细胞有一定的专一作用。这些分子是由两条肽链组成的。目前已证明它们对细胞作用的专一性是由B链(糖多肽)和细胞表面特殊受体(半乳糖残基)之间专一亲合性决定的，而其毒性作用，则是由另一条肽链(A链)决定的(Olsnes等, 1974)。天花粉蛋白也是一个可能含糖的植物毒蛋白(虽然它只由一条肽链组成)，它对正常和恶性滋养层细胞的作用专一性与其分子结构特性的关系，是否和这些植物毒蛋白的作用机制有某些相似的地方，是一个值得深入研究的问题。这些研究的意义也许将超出引产原理的范围，对于寻找有细胞专一性的抗癌新药，也是有所启发的。

另一方面，天花粉蛋白引产原理的初步阐明还在理论上提供了探索抗早孕的依据。既然天花粉蛋白能专一地作用于合体滋养层细胞¹，理论上，只要能测出这些细胞有功能活动的时期，天花粉蛋白就有可能发挥其抗生育的作用。目前用最新方法，在受孕后6~8天就可以从血清中测到HCG(Saxena等, 1974)。然而临床上试探用天花粉粗提物抗早孕却遇到实际的困难。因为抗早孕要获得成功，不只要破坏孕体，而且还要将其顺利地排出。这在早期妊娠时往往会遇到障碍。所以，除了考虑破坏孕体，还应考虑发动宫缩的问题。如前所述，目前我们对于天花粉蛋白对滋养层细胞的损伤如何引起宫缩的发动，还不清楚。不过，我们推测这可能是通过

前列腺素的释放起作用的。因此，将天花粉粗提物和前列腺素或其他能兴奋子宫收缩的药物配合使用，可能有助于这一问题的解决。在这方面应用中草药，同样是大有可为的。目前天花粉蛋白在中期妊娠引产时，引产时间较长的缺点，也可能通过同样的途径来克服。

总之，天花粉蛋白是从中草药发掘出来的一个植物蛋白性的中期引产和抗增生性滋养层细胞疾病的药物。天花粉蛋白作用原理的初步阐明和有效成分的纯化，在实践上为提高和扩大天花粉粗提物的应用，探讨抗早孕的可能性提供了依据，并对寻找有细胞专一性的抗癌药物有所启发。同时，在理论上为研究天花粉蛋白作用的细胞学和分子机制准备了条件。天花粉蛋白的分子结构和功能(生物学活性和抗原性)关系的研究，可能有助于从根本上解决天花粉蛋白过敏问题。天花粉蛋白中期妊娠引产以及抗滋养层细胞肿瘤研究的成功，是贯彻毛主席革命卫生路线和中西医结合方针的结果。它再次证明了祖国“医药学是一个伟大的宝库”，在计划生育方面，中草药研究同样是大有可为的。同时，还证明了只有在广泛联系实际的基础上，理论研究才能获得新的生命力。我们应当和有关工作者一道密切联系临床实际，提高和扩大天花粉蛋白的应用，使我国历史上人民自己创造的宝贵遗产，更好地为人民服务。

(1975年)

参 考 资 料

- 上海市天花粉科研协作组 1976 200例天花粉针剂中期妊娠引产分析。中华医学杂志:1976年;56(4):215~217。
- 上海实验生物研究所、上海第一医学院华山医院 1975 绒毛膜促性腺激素的放射免疫测定。生物化学与生物物理进展(1):31。
- 王亚辉等 1976 天花粉蛋白的纯化及其性质的初步研究。动物学报 22(2):137~143。
- 李时珍(明) 1596 本草纲目。卷十八草部:1018页。人

1) 在怀孕6天的小鼠，天花粉蛋白还能作用于早期蜕膜细胞。人类是否同样如此，尚不清楚。

民卫生出版社。

- Aiken, J. W., 1972 Asperin and indomethacin prolong parturition in rats: evidence that prostaglandins contribute to expulsion of foetus. *Nature*. **240**: 21.
- Bagshawe, K. D., 1974 Tumour-associated antigens. *Brit. Med. Bull.* **30**: 68.
- Billington, W. D., 1971 Biology of the trophoblast. In: "Adv. Reprod Physiol." **5**: 17, ed. M. W. H. Bishop, Logos Press.
- Bradbury, S., W. D. Billington, D. R. S. Kirby, and E. A. Williams, 1969 Surface mucin of human trophoblast. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **104**: 416.
- Diczfalusy, E. 1974 Endocrine functions of the human foetus and placenta. *Amer. J. Obstet. Gynec.* **119**: 419.
- Enders, A. C. 1965 A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas. *Amer. J. Anat.* **116**: 29.
- Gudson, J.P., V. L. Moore, Q. N. Myrvik, and P. A. Holyfield, 1972 Promethazine-HCl as an immunosuppressant. *J. Immunol.* **108**: 1340.
- Gustavii, B., and K. Green, 1972 Release of prostaglandin $F_{2\alpha}$ following injection of hypertonic saline for therapeutic abortion: A preliminary study. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* **114**: 1039.
- Heap, R. B. 1972 In: "Reproduction in mammals. Book 3. Hormones in reproduction", ed. Austin, C. R. and Short, R. V., Cambridge Univ. Press.
- Karim, S. M. M. et al. 1969 Induction of labour with prostaglandin $F_{2\alpha}$. *J. Obstet. Gynecol., Br. Commonw.* **76**: 769.
- Kawamura, A. 1969 Fluorescent antibody techniques and their application. Univ. Tokyo Press.
- Leusden, Van H. A. 1972 Hormonal changes in pathological pregnancy. *Vitamins and Hormones*. **30**: 282.
- Liggins, G. C. et al. 1973 The mechanism of initiation of parturition in the ewe. *Progr. Hormone Res.* **29**: 111.
- Myers, R. E., and T. Fujikura, 1968 Placental changes after experimental abruption placentae and foetal vessel ligation of rhesus monkey placenta. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* **100**: 846.
- Olsnes, S., K. Refsnes, and A. Pihl, 1974 Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. *Nature* **249**: 627.
- Saxena, B. B., S. Hasan, F. Haour, and M. Schmidt-Gollwitzer 1974 Radioreceptor assay of human chorionic gonadotropin: detection of early pregnancy. *Science* **184**: 793.
- Vane, J. R. 1972 Prostaglandins in the inflammatory response. In: "Inflammatory mechanism and control", ed. Lepow, J. H., and P. A. Ward. Academic Press.

天花粉蛋白的纯化及其性质的初步研究*

王亚辉 凌骏芳 朱隆训

(第二研究室)

天花粉粗提物是从葫芦科植物栝楼(*Trichosanthes kirilowii* Maxim)根提取出的蛋白质性的药物,对中期妊娠有很好的引产效果,并且对宫外孕、葡萄胎、恶性葡萄胎有独特的疗效,对绒癌也有一定的疗效(上海市天花粉科研协作组,1976)。临床注射用“天花粉”是含有4、5种以上蛋白质的混合物。经透析和丙酮分级沉淀方法,初步提纯的“纯制天花粉”,引产有效成分含量大大提高了,但还含有三个抗原成分。

天花粉蛋白引产原理的研究,需要高度纯化的引产有效成分作为抗原。为此,我们进一步提纯了天花粉粗提物的引产有效成分,并对其生物活性、抗原性及一些理化性

质进行了初步的分析和鉴定。结果报告如下:

一、初步分离实验

供进一步提纯的原料是中国科学院上海有机化学研究所提供的丙酮分级沉淀的天花粉粗提物。它的主要成分在自由电泳场中(巴比妥缓冲液, pH 8.5, $\mu = 0.1$),向阴极移动。这提示可能是等电点偏碱性的蛋白质。根据 Lampson 和 Tytell(1965),偏碱性蛋白质混合物在 CM-Sephadex C-50 柱上,用 0.1M 磷酸缓冲液 pH 梯度洗脱时,各蛋白质成分的洗脱 pH 为其等电点的函数。因此,我们

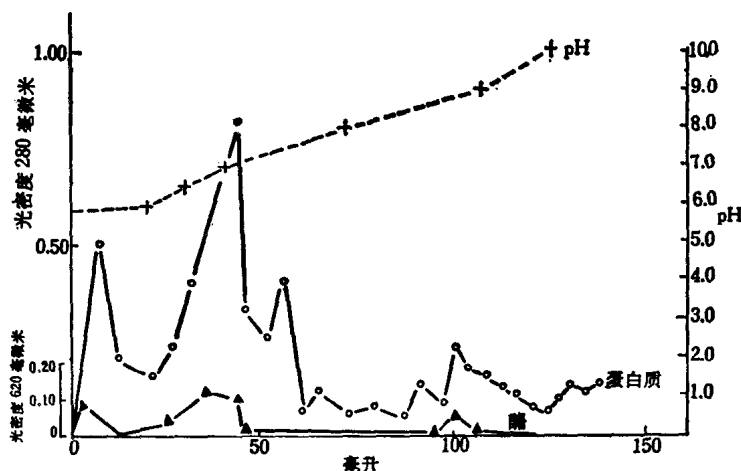


图1 天花粉粗提物之pH梯度分离

样品:天花粉粗提物(有机 DP-14)20毫克。

层析条件: CM-Sephadex C-50,柱长12厘米,直径1.3厘米,流速2~3毫升/小时;0.1M磷酸缓冲液pH
梯度洗脱(从pH6.0开始,每加5毫升缓冲液增加0.2 pH单位,循序递增,直到pH10.0为止)

+ - - - +收集的每管洗脱液测定的pH; O — O 蛋白质; ▲ — ▲ 糖。

*刊登在《动物学报》,1975年6月22卷第2期。

采用 CM-Sephadex C-50 柱层析, 用 0.1M 磷酸缓冲液 pH 梯度洗脱(pH6.0~10.0, 每次加 5 毫升缓冲液, 增加 0.2pH 单位, 如此逐次增加) 的方法, 进行天花粉粗提物的初步分离实验, 作为下一步分离纯化的依据。

pH 梯度洗脱过程中, 随 pH 的递增, 分离出 4 个成分(CM-I, CM-II, CM-III, CM-IV)。用蒽酮法测总糖量, CM-I, CM-II, CM-

IV 含糖, CM-III 不含糖(图 1)。用怀孕 12 天小鼠终止妊娠的方法, 对这些成分的生物活性鉴定的结果证明: CM-II 为引产有效成分(0.2 毫克有效, 31/35 胎儿死亡), CM-I 在剂量为 0.2 毫克时无效, 加大剂量至 0.4 毫克始有效; CM-III, CM-IV 均无生物活性(表 1)。因此, 根据这些初步结果推测, CM-II 可能是有效成分, 并且可能用不同 pH 分段洗脱的方法和其他无效成分分离。

表1 天花粉粗提物初步分离各组生物活性的鉴定

部 分	产量*(毫克)	剂 量			
		0.1 毫克	0.2 毫克	0.25毫克	0.4 毫克
CM-I	3.6				3/3(37/38)**
CM-II	7.8	2/5(27/59)	4/4(31/35)		
CM-III	1.6			0/2(0/20)	
CM-IV	2.2			0/2(1/21)	

* 天花粉上柱量为20毫克, 层析得到的各组成分冰干后的产量, 共计15.2毫克, 回收率约75%;

** 有胎儿死亡之母鼠数/母鼠总数(胎儿死亡数/胎儿总数)。

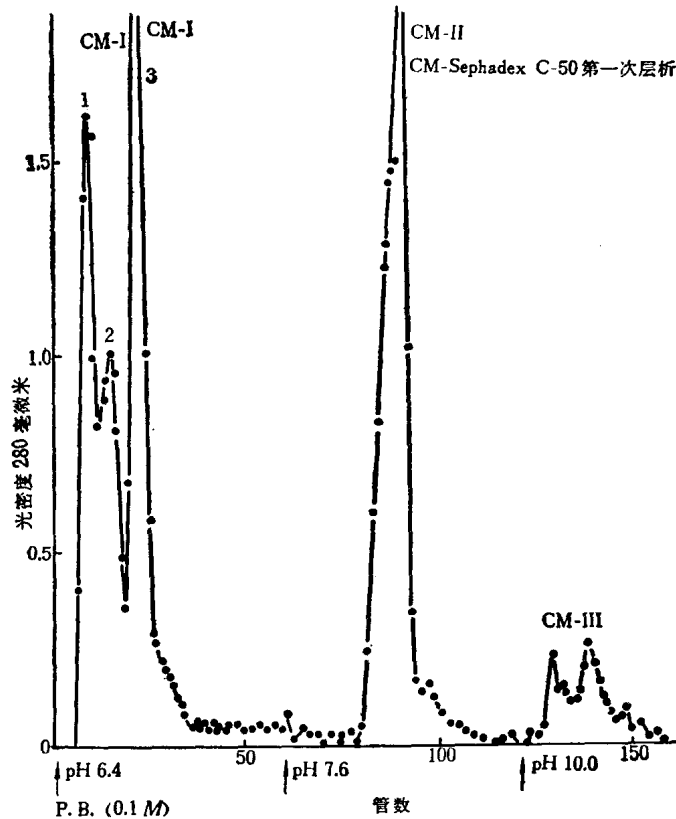


图 2 天花粉各成分的层析分离

样品: 1克(有机730304);

层析条件: CM-SephadexC-50柱(2.3×50厘米), 不同pH磷酸缓冲液分段洗脱得到有效成分CM-II。