

# 青蒿化学成份及其与青蒿素伍用 对鼠疟的药效学研究<sup>\*</sup>

纪晓光<sup>1</sup> 孙雅洁<sup>1</sup> 王京燕<sup>1\*\*</sup> 杨 岚<sup>2</sup> 屠呦呦<sup>2</sup>

(1. 军事医学科学院微生物流行病研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**摘要** 实验采用鼠疟模型及Peters 4天抑制试验法, 对从青蒿中分离得到的主要化学成份及其与青蒿素伍用进行了药效学评价。结果显示, 青蒿素(QHS)的ED<sub>50</sub>和ED<sub>90</sub>分别为(10.2±1.3) mg/kg/d和(29.0±2.7) mg/kg/d。将青蒿素、青蒿酸、青蒿乙素、东莨菪内酯按1:1:1:1混合得到QHH, 其ED<sub>50</sub>和ED<sub>90</sub>分别为(12.6±1.1) mg/kg/d和(47.0±5.7) mg/kg/d。青蒿酸(QHA)、青蒿乙素(QHB)、东莨菪内酯(QHC)、青蒿黄酮1(QHD)、青蒿黄酮2(QHE) 5种成份对鼠疟均有不同程度的抑制作用, 但剂量高达500 mg/kg/d时, 抑制率最高也仅达到59%, 远低于QHS的疗效。将分离的5种成份分别与QHS的半数有效剂量配伍进行药效测定, 仅QHC的高剂量组显示一定的协同作用, 其他各个组均未显示增效。QHH中QHS仅占1/4, 但对鼠疟药效测定的结果ED<sub>50</sub>和ED<sub>90</sub>的值与QHS相近, 提示QHA、QHB、QHC混合成份对QHS有一定的协同作用。因此, 传统中药青蒿对疟疾的疗效是由以青蒿素为主的多组份共同作用的结果。

**关键词** 抗疟药; 青蒿素; 青蒿; 伯氏疟原虫; 药效学

疟疾是除艾滋病以外世界上有明显上升趋势的传染病, 自上世纪60年代泰柬边界首次报道出现抗氯喹恶性疟原虫后, 抗性迅速蔓延, 且呈多药抗性(Wernsdorfer, 1994), 疟疾治疗面临的严峻问题是抗药性问题。上世纪70年代初, 中国中医科学院中药研究所从中药青蒿 *Artemisia annua* 中发现了全新结构的抗疟活性成份青蒿素(Qinghaosu, QHS)(屠呦呦等, 1981), 由此国内外相继将青蒿素及其衍生物研制成新一代抗疟药, 解决了全球棘手的抗药性恶性疟治疗问题, 目前该类药物是唯一没有报道产生抗性的抗疟药。中国中医科学院中药所在对青蒿的抗疟活性成份研究过程中发现, 青蒿素并非青蒿中发挥抗疟作用的唯一成份, 青蒿中其他成份的作用还有待研究。为此, 本课题开展了从青蒿中寻找其他抗疟活性成份或对青蒿素有增效作用成份的研究, 本文报道了用鼠疟模型对青蒿中分离得到的主要化学成份及其与青蒿素伍用进行的药效学评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 疟原虫与试验动物

伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*) K173株, 1983年由英国伦敦卫生与热带医学院医学原虫系引进, 本实验室低温冷冻和血传交替进行保种。瑞士种昆明远交系小鼠, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 雄性、体重18~22g。

### 1.2 受试药物

中国中医科学院中药研究所提供的青蒿中分离得到的化合物, 分别为青蒿酸(QHA)、青蒿乙素(QHB)、东莨菪内酯(QHC)、青蒿黄酮1(QHD)、青蒿黄酮2(QHE)。将青蒿素、青蒿酸、青蒿乙素、东莨菪内酯按1:1:1:1混合, 得到QHH。青蒿素(QHS), 由四川三奇制药厂提供, 批号060812。

### 1.3 试验方法

采用Peters 4天抑制试验法(Peters, 1965),

收稿日期: 2008-04-14

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30572319)

\*\* 通讯作者: E-mail: wangjy@icbmi.ac.cn

小鼠腹腔接种  $1 \times 10^7$  个被寄生红细胞，接种原虫后 D<sub>0</sub>~D<sub>3</sub> 连续给药 4 天，小鼠每天灌胃给药 1 次，每次给药体积 0.2 mL，D<sub>4</sub> 每组动物定量取血混合，涂制薄血膜，甲醇固定，Gemsal 染色，镜检疟原虫。每次试验均分不同剂量的给药组和不给药对照组，每组 10 只小鼠。按公式计算原虫抑制率：
$$\text{原虫抑制率} = \frac{\text{对照组原虫寄生率} - \text{给药组原虫寄生率}}{\text{给药组原虫寄生率}} \times 100\%$$

半数有效剂量 (ED<sub>50</sub>) 及 90% 有效剂量 (ED<sub>90</sub>) 采用对数-概率单位直线回归法计算。

## 2 结果

### 2.1 青蒿化学成份对鼠疟的药效测定

首先对 QHS 和 QHH 在鼠疟模型上进行了药效测定，结果见表 1 和表 2。本次试验测定的 QHS 的 ED<sub>50</sub> 和 ED<sub>90</sub> 剂量与以往测定的结果基本一致 (丁德本等, 1994)。QHH 是由青蒿素、青蒿酸、青蒿乙素、东莨菪内酯按 1:1:1:1 混合而得，在同等剂量下 QHH 中青蒿素仅含 1/4，但从表 1 的结果看 QHH 的药效与青蒿素大致相当。提示，此青蒿成份混合物 (QHH) 具有很好的抗疟作用。

对从青蒿中分离的 QHA、QHB、QHC、

QHD、QHE 分别在鼠疟模型上进行了药效测定，结果见表 3。可以看到这几个成份剂量达 500.00 mg/kg/d 时抑制率最高为 59.0%。当剂量提高到 1000.00 mg/kg/d 时，除 QHC 的抑制率为 70.5% 外，其他几个成份的抑制率均没有超过 50% (结果未列出)，药效均不及 QHS 和 QHH。

表 1 QHS 和 QHH 对鼠疟的药效测定

Tab.1 Therapeutic effect of QHS and QHH on *P. berghei* (n=2,  $\bar{x} \pm s$ )

药物剂量 Dosage (mg/kg/d)	抑制率 Inhibition ratio (%)	
	QHS	QHH
100.00	99.7±0.1	98.5±0.7
50.00	98.6±1.3	88.6±1.5
25.00	78.9±6.8	72.4±1.7
12.50	58.3±4.1	46.6±3.6
6.25	31.4±15.8	29.5±3.7

QHS: 青蒿素; QHH: 青蒿素:青蒿酸:青蒿乙素:东莨菪内酯=1:1:1:1. 表 2 同。

QHS: Qinghaosu; QHH: Qinghaosu:Qinghao acid:Qinghao B: Scopoletin=1:1:1:1. The same as Tab.2.

表 2 QHS 和 QHH 对鼠疟的有效剂量

Tab.2 Effective dose of QHS and QHH on *P. berghei* (n=2,  $\bar{x} \pm s$ )

药物剂量 Dosage (mg/kg/d)	QHS	QHH
ED <sub>50</sub>	10.2±1.3	12.6±1.1
ED <sub>90</sub>	29.0±2.7	47.0±5.7

表 3 青蒿不同成份对鼠疟的药效测定

Tab.3 Therapeutic effect of different ingredients of *Artemisia auuna* L. on *P. berghei* (n=2,  $\bar{x} \pm s$ )

药物剂量 Dosage (mg/kg/d)	平均抑制率 Average inhibition ratio (%)				
	QHA	QHB	QHC	QHD	QHE
500.00	45.6±5.9	57.6±8.3	59.0±1.12	39.7±6.08	42.2±2.3
250.00	39.5±2.8	45.1±9.7	33.1±0.35	35.8±1.91	36.2±2.5
125.00	35.3±1.3	38.4±9.7	18.1±0.74	31.7±6.44	29.3±0.1

QHA: 青蒿酸 Qinghao acid; QHB: 青蒿乙素 Qinghao B; QHC: 东莨菪内酯 Scopoletin; QHD: 青蒿黄酮 1 Casticin; QHE: 青蒿黄酮 2 Chrysosplenol D

表 4 青蒿不同成份与 QHS 配伍的药效测定

Tab.4 Therapeutic effect of different ingredients of *A. auuna* and QHS combinations on *P. berghei* (n=2,  $\bar{x} \pm s$ )

药物剂量* Dosage (mg/kg/d)	平均抑制率 Average inhibition ratio (%)				
	QHA	QHB	QHC	QHD	QHE
500.00+10.00	47.5±2.8	59.6±0.9	78.0±7.61	50.8±3.7	44.0±5.9
250.00+10.00	38.2±0.9	51.3±3.0	44.0±3.46	37.3±0.9	39.0±1.6
125.00+10.00	28.4±0.2	27.4±1.6	43.8±2.6	19.6±1.2	22.0±10.5

\*表中的剂量分别为 500.00、250.00 和 125.00 mg/kg/d 的 QHA、QHB、QHC、QHD 和 QHE 加 10.00 mg/kg/d 的 QHS。

\*The dosages in the table are QHA, QHB, QHC, QHD and QHE at 500.00, 250.00 and 125.00 mg/kg/d, respectively with QHS at 10.00 mg/kg/d.

## 2.2 与青蒿素配伍的药效测定

将青蒿的几个成份分别与 QHS 配伍, 以观察是否有增效作用。选择 QHS 的半数有效剂量, 即 10.00 mg/kg/d, 分别与 QHA、QHB、QHC、QHD 和 QHE 的 500.00、250.00 和 125.00 mg/kg/d 配伍进行药效测定, 结果见表 4。

## 3 讨论

从青蒿中分离得到的 5 个主要成份中, QHA 和 QHB 为倍半萜类化合物, QHC 为香豆素类化合物, QHD 和 QHE 为黄酮类化合物, 均未见有抗疟活性的报道。本实验显示该 5 种成份对鼠疟均有不同程度的抑制作用, 但剂量高达 500.00 mg/kg/d 时, 抑制率最高也仅达到 59.0%, 远低于 QHS 的疗效。将分离的 5 种成份分别与 QHS 的半数有效剂量配伍, 仅 QHC 的高剂量组显示一定的作用, 其他各个组均未显示协同。表 4 中虽然有的剂量组抑制率高于表 3, 但实际上并没有明显的协同作用。因为 QHS 在 10.00 mg/kg/d 时抑制率即可达到 50% 左右, 如有增效作用抑制率应超过 50%。相反, 在有些剂量组中与 10.00 mg/kg/d 的 QHS 配伍后反而抑制率还低于 50%。在配伍试验中仅 QHC 的高剂量组相对有一定的协同作用, 500.00 mg/kg/d 的 QHC 抑制率为 59.0%, 加 10.00 mg/kg 的 QHS 抑制率达到 78.0%。

我们曾建立了 QHA、QHB、QHS 和 QHC 的含量测定方法, 并对不同产地的青蒿进行测定。结果显示, 不同产地青蒿中 QHA、QHB、QHS 的含量差异很大, 特别是 QHS 含量高的青蒿 QHA 和 QHB 的含量很低。为了探讨青蒿中非青蒿素成份的抗疟活性, 选择 QHA、QHB、QHS、QHC

(1:1:1:1) 的混合物 QHH 做鼠疟药效观察并与 QHS 对比, QHH 中各成份的含量比接近于北方部分地区产青蒿素含量较低的青蒿。实验结果显示, QHH 中 QHS 仅占 1/4, 但对鼠疟的药效测定结果 ED<sub>50</sub> 和 ED<sub>90</sub> 的值 QHH 与 QHS 相近, 提示 QHA、QHB、QHC 混合成份对 QHS 有一定的协同作用。初步证明, 传统中药青蒿对疟疾的疗效是由以青蒿素为主的多组份共同作用的结果。

已知青蒿素及其衍生物蒿甲醚、青蒿琥酯、双氢青蒿素均属于倍半萜类, 结构式中都有过氧桥, 研究显示过氧桥是青蒿素类药物抗疟活性的必需结构, 认为红细胞中的血红素或铁催化结构式中的过氧桥产生自由基, 自由基使红细胞内疟原虫蛋白烷基化而杀死疟原虫 (Meshnick, 1994)。QHA、QHB 虽为倍半萜但不含过氧基团, QHC 则为香豆素类化合物, 因此 QHH 对疟原虫的作用机制可能与青蒿素不完全相同。青蒿及青蒿素类抗疟药的合理应用以及作用机制还需要进一步深入研究。

## 参考文献

- 丁德本, 杨俊德, 高徐生, 等. 1994. 青蒿素、蒿甲醚、青蒿琥酯对伯氏鼠疟原虫的疗效及杀虫速度比较研究. 军事医学科学院院刊, 18 (4): 245-248.
- 屠呦呦, 倪慕云, 钟裕蓉, 等. 1981. 中药青蒿化学成分的研究 I. 药学学报, 16 (5): 366-370.
- 屠呦呦, 倪慕云, 钟裕蓉, 等. 1981. 中药青蒿的化学成分和青蒿素衍生物的研究 (简报), 中药通报, 6 (2): 31.
- Meshnick, S. R. 1994 The mode of action of anti malarial endoperoxides. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88 (Suppl. 1): 31-32.
- Peters, W. 1965 Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. *Exp. Parasitol.*, 17: 80.
- Wernsdorfer, W. H. 1994 Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Tropica*, 56 (2-3): 143.

STUDIES ON THE ANTI MALARIAL ACTIVITIES OF DIFFERENT INGREDIENTS  
OF *ARTEMISIA ANNUA* L. AND THE COMBINATIONS  
WITH QHS ON *PLASMODIUM BERGHEI*

JI Xiao-Guang<sup>1</sup> SUN Ya-Jie<sup>1</sup> WANG Jing-Yan<sup>1\*</sup> YANG Lan<sup>2</sup> TU You-You<sup>2</sup>

(1. Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, State Key Laboratory of Pathogen and Bioresecurity, Beijing 100071, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**Abstract** Peters 4d inhibition test were used to determine the anti malarial activity of different ingredients of *Artemisia annua* L. and their combinations with Qinghaosu (QHS) on *P. berghei*. The ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub> of QHS are (10.2±1.3) and (29.0±2.7) mg/kg/d respectively; and those of QHH (Qinghaosu : Qinghao acid : Qinghao B : Scopoletin =1:1:1:1) are (12.6±1.1) and (47.0±5.7) mg/kg/d respectively. Qinghao acid (QHA), Qinghao B (QHB), Scopoletin (QHC), Casticin (QHD) and Chrysosplenol D (QHE) had some anti malarial activities on *P. berghei*. Even when the dosage was up to 500 mg/kg/d, the maximal inhibition rate was only 59%, which is less active than QHS. Therapeutic effect of different ingredients of *A. annua* and QHS combinations on *P. berghei* appeared synergistic effects only with high dosage of QHC. Although QHS only accounts for 1/4 in QHH, QHH and QHS have similar anti malarial activity. The results revealed that the mixture of QHA, QHB and QHC enhanced the anti malarial activity of QHS on *P. berghei*. It was proved that the anti malarial activity of QHS primarily together with other ingredients of *A. annua* is the result of the anti malarial activity on *P. berghei* of *A. annua* in the study.

**Key words** Anti malarials; Qinghaosu; *Artemisia annua* L.; *Plasmodium berghei*; Pharmacodynamics

\* Author for correspondence