

实验研究

青蒿素对氯喹引起的色素凝集的影响

中医研究院中药研究所药理室 叶祖光

指导老师:李泽琳

无论在体外试验中还是在体内试验中,红内期伯氏鼠疟原虫(*P. berghei*)在氯喹的作用下,最早出现的形态学变化是疟原虫的色素凝集,在电镜下观察,这种色素凝集就是疟原虫体内自噬泡的形成过程^(1,2)。这显然和氯喹的抗疟作用机制密切相关。Warhurst等人深入地研究了氯喹引起色素凝集(CIPC, Chloroquine-induced pigment clumping)这一现象,并认为这是由于氯喹作用于疟原虫色素凝集受体的结果⁽³⁾。不仅如此,他们把CIPC发展为一种抗疟研究的手段,相继建立了体内和体外两种试验方法⁽⁴⁻⁶⁾,而且利用CIPC方法对许多已知抗疟药的作用方式进行了试验研究。根据抗疟药本身有无引起色素凝集的作用及其对氯喹引起的色素凝集的影响情况,可以将抗疟药分为四大类^(7,8):(1)阿的平和4-氨基喹啉类,它们也能象氯喹一样地和疟原虫色素凝集受体结合,从而引起红内期伯氏鼠疟的色素凝集,这提示它们和氯喹有着共同的原发抗疟作用部位;(2)奎宁及奎宁类抗疟药,它们本身并无色素凝集作用,但却能够竞争性地抑制CIPC,这说明它们和氯喹相互竞争同一作用场所——色素凝集受体,但由于它们和色素凝集受体的结合程度和具体形式与氯喹的不尽相同,故其本身并不引起色素凝集,表明奎宁类抗疟药和氯喹具有共同的原发抗疟作用部位;(3)此类抗疟药可能包括8-氨基喹啉化合物,它们本身并不引起色素凝集,但能非竞争性地抑制CIPC,这表明它们并没有作用于色素凝集受体,换言之,它们的原发抗疟作用部位与氯喹的完全不同;(4)叶酸代谢拮抗剂,它们本身没有引起色素凝集作用,而且对CIPC又无抑制作用,这是由于它们的原发抗疟作用部位与氯喹的截然不同,亦即它们不能和色素凝集受体结合,而且它们所干扰的叶酸代谢至少在一定期间内对色素凝集过程毫无影响。

青蒿素是问世不久的新型抗疟药,它对血内无性体疟原虫显示有良好的抗疟活性,在临床治疗中,发现

它具有奏效快、毒性低等优点^(9,10),但目前对其抗疟作用机理的了解较少,因而有必要利用CIPC方法来观察青蒿素本身有无色素凝集作用以及有无抑制CIPC作用,如果它能够抑制CIPC,那么这种抑制作用是竞争性还是非竞争性的,从而明确青蒿素的原发抗疟作用部位及抗疟作用方式是否和氯喹的相同。

材料与方法

一、体外试验:

(一)小白鼠腹腔接种一定量的伯氏鼠疟感染的鼠血,接种后第3天取尾血涂片镜检,选择原虫感染率约为15%的小白鼠供试验用。

(二)按下列方法配制培养基:将日本生产的“199”培养基干粉0.99克,溶于94毫升高压消毒的双蒸水中,加入10%葡萄糖溶液2毫升、5%碳酸氢钠溶液4毫升和胎牛血清11毫升。将装有培养基溶液的容器放入蜡烛缸内(真空干燥器内有一白蜡烛),点燃蜡烛,盖严盖子,待蜡烛熄灭后,立即关闭蜡烛缸盖子上的活塞开关,然后放置37℃恒温箱中平衡半小时,使pH为7.2~7.4。取出培养基溶液,分装到直径为6厘米的培养皿中,每个培养皿中加入培养基溶液3.8~3.9毫升,然后再放入蜡烛缸内,操作法同上,在37℃恒温箱中平衡预热15分钟。

(三)用采心血方法收集感染疟原虫的鼠血,并以50~100单位/毫升血的肝素抗凝,在每个盛有培养基的培养皿中加入0.1毫升感染血,混匀。

(四)立即加入各试药溶液或生理盐水0.1毫升,然后放入蜡烛缸内,操作同上,放入37℃恒温箱中。

(五)如果试验目的是要观察各试药本身有无色素凝集作用,则在试药作用80分钟后取出培养皿,用吸管吸掉培养皿中的上清液,然后取1小滴血涂薄片;如果试验目的是要观察各试药有无抑制CIPC作用,则当试药作用15分钟后,再加入一定量的氯喹,然后再

置入 37℃ 恒温箱内, 作用 80 分钟后, 同上法取血涂薄片。

(六) 薄血片不需要固定染色, 直接在油镜下观察, 连续计数 50 个含有色素的疟原虫, 计算出色素凝集率(%)。根据 Warhurst 等人的标准⁽⁶⁾, 将疟原虫的色素依据其数量多少分为三类: (1) 色素细小呈粉末状, 在一个疟原虫内的数量为 22~52 个; (2) 色素较大呈颗粒状, 在一个疟原虫内的数量为 6~23 个; (3) 色素凝集呈大团块状, 一个疟原虫内的数量为 1~4 个。本试验只计数含有凝集块的疟原虫在全部含有色素的疟原虫中所占有的百分率, 亦即色素凝集率(%)。每个试药的色素凝集率要用各自的实际凝集率减去生理盐水对照的凝集率后所得的校正值来表示, 当色素凝集率超过 10% 时才有意义。每个试药对 CIPC 的抑制率(%)可按下列公式取得:

$$100 - \left[\frac{(\text{试药} + \text{氯喹}) \text{的凝集率校正值}(\%) \times 100}{\text{单用氯喹的凝集率校正值}(\%)} \right]$$

二、体内试验:

(一) 色素凝集试验: 腹腔给药前涂薄血片作为自身对照, 给药后 80 分钟涂血片, 镜检计算色素凝集率。

(二) 抑制 CIPC 试验: 给药前涂血片作为自身对照, 腹腔注入试药或生理盐水后 60 分钟涂血片, 镜检各试药有无色素凝集作用; 随后立即再给每只小鼠腹腔注入 80 毫克/公斤的氯喹, 在氯喹作用 80 分钟后涂血片检查。

体内试验的小白鼠接种感染伯氏鼠疟以及血片的镜检和结果的表示都同于体外试验。此外, 体外试验所用的器皿都经洗液洗涤并高压消毒, 整个试验过程均在无菌操作条件下进行。由于疟原虫在体外培养的时间较短, 故无菌条件的要求并不严格。在试验中, 每一试药的样品要用两个培养皿或两只小鼠分做两份进行试验, 试验结果取其平均值, 试验要重复 1~2 次。

结 果

一、氯喹:

(一) 体内试验: 氯喹引起的色素凝集的对数剂量——反应曲线呈 S 形 (图 1), 当剂量大于 1.25 毫克/公斤时, 曲线陡然上升; 当氯喹的剂量增至 5.0 毫克/公斤时, 便可引起最高色素凝集率。氯喹引起色素凝集率的半数效量 (CD₅₀) 为 1.80±1.12 毫克/公斤。

(二) 体外试验: 从氯喹引起的色素凝集的对数

剂量——反应曲线中 (图 2) 可以看到, 当剂量超过 1.25×10^{-8} 克分子浓度 (M) 时, 色素凝集率大幅度增加; 当氯喹的剂量为 2×10^{-7} M 时便可引起最高色素凝集率; 但当剂量超过 10^{-4} M 时, 氯喹又开始抑制自

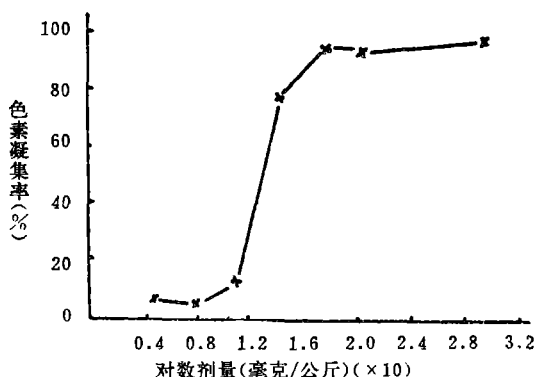


图 1 氯喹引起色素凝集的剂量——反应曲线 (体内试验)

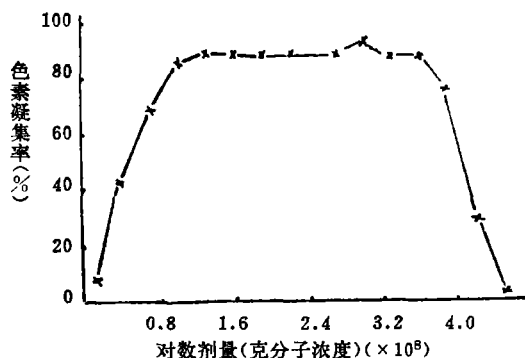


图 2 氯喹引起色素凝集的剂量——反应曲线 (体外试验)

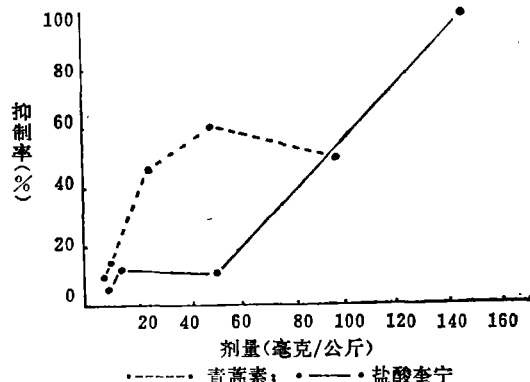


图 3 青蒿素及盐酸奎宁抑制 CIPC 的剂量——反应曲线 (体内试验)

身的色素凝集,故剂量——反应曲线迅速下降。氯喹引起色素凝集率的 CD_{50} 为 $2.88 \pm 0.03 \times 10^{-8}M$ 。

二、盐酸奎宁:

从附表中可以看出,在体内和体外试验中,盐酸奎宁都没有引起色素凝集作用,但却能抑制CIPC。在体内试验中,150毫克/公斤剂量的盐酸奎宁能够完全抑制剂量为80毫克/公斤的氯喹所引起的色素凝集(图3)。在体外试验中, $10^{-5}M$ 的盐酸奎宁则能完全抑制 $10^{-8}M$ 氯喹所引起的色素凝集(图4)。此外,从图5~8中可以发现,盐酸奎宁作用后的CIPC对数剂量——反应曲线和单用氯喹的CIPC对数剂量——反应曲线的形状基本相同,而且两者相应的回归直线的斜率,经统计学处理没有显著性差别,这表明盐酸奎宁抑制CIPC的作用是竞争性的。

附表 青蒿素等在体内、外试验中的色素凝集率比较

药 物	体 内 试 验				体 外 试 验			
	剂量 (毫克/公斤)	色素凝集率 (%)			剂 量 (克分子浓度)	色素凝集率 (%)		
		药前	药后 80分钟	校正 值*		药后 80分钟	校正 值**	
生理盐水		6	8	2		6		
吐温水		7	6	-1		6	0	
氯 喹	80	6	95	89	10^{-8}	92	86	
青 蒿 素	50	5	6	1	10^{-5}	9	3	
青 蒿 素	150	6	6	0	10^{-4}	5	-1	
青 蒿 素	450	6	8	2	10^{-3}	6	0	
盐酸奎宁	50	7	6	-1	10^{-6}	8	2	
盐酸奎宁	150	4	7	3	10^{-5}	6	0	

* 体内试验色素凝集率校正值=药后值-药前值

** 体外试验色素凝集率校正值=试药值-生理盐水值

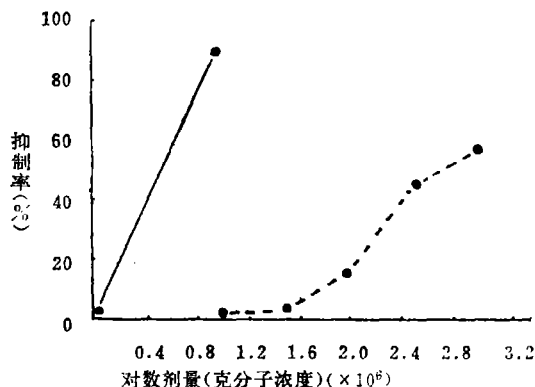


图4 青蒿素及盐酸奎宁抑制CIPC的对数剂量——反应曲线 (体外试验)

三、青蒿素:

青蒿素本身没有引起色素凝集作用,在体内试验中,青蒿素的剂量用至450毫克/公斤,在体外试验中最大剂量用至 $10^{-8}M$,均没有引起色素凝集(附表)。在体内试验和体外试验中,青蒿素都具有抑制CIPC作用,但最高抑制率为50~60%(图3、4),因而青蒿素抑制CIPC的作用是不完全的,引起最大抑制率的剂量为25~50毫克/公斤(体内试验)(图3), $3.2 \times 10^{-4} \sim 10^{-8}M$ (体外试验)(图4)。如图6、8所示,青蒿素作用后的CIPC对数剂量——反应的回归直线斜率分别为1.16(体内试验)和1.21(体外试验);而相应的

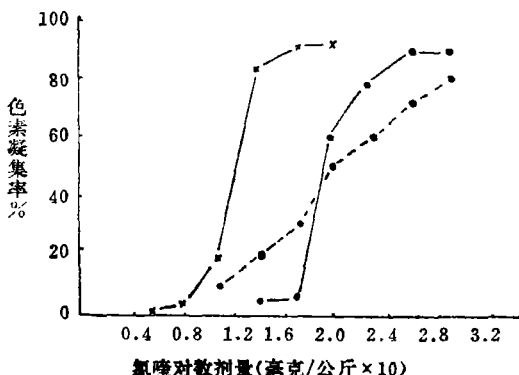


图5 青蒿素及盐酸奎宁对CIPC剂量——反应曲线的影响 (体内试验)

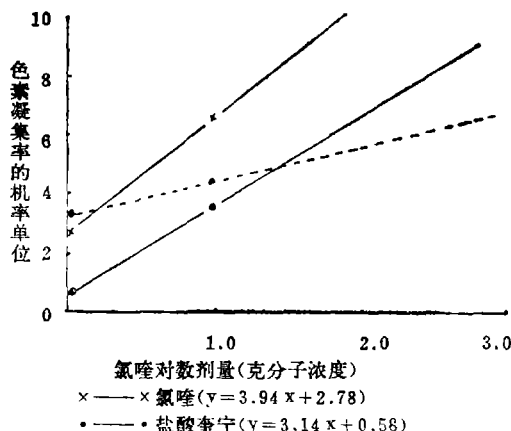


图6 青蒿素及盐酸奎宁对CIPC剂量——反应回归直线的影响 (体内试验)

单用氯喹的CIPC对数剂量——反应的回归直线斜率却分别为3.94(体内试验)和3.84(体外试验)。两者斜率间经统计学处理有显著性差异($P < 0.05$)，这表明青蒿素作用后的CIPC回归直线和单用氯喹的回归直线之间并不平行，同时也表明，青蒿素是非竞争性地抑制CIPC。青蒿素抑制CIPC的时间过程表明，在体内试验中，服用氯喹前40分钟给小鼠腹腔注入青蒿素150毫克/公斤，其抑制CIPC的作用明显减弱(图9)；在体外试验中，当青蒿素和氯喹同时加入培养皿中时，青蒿素的抑制率便显著下降(图10)。

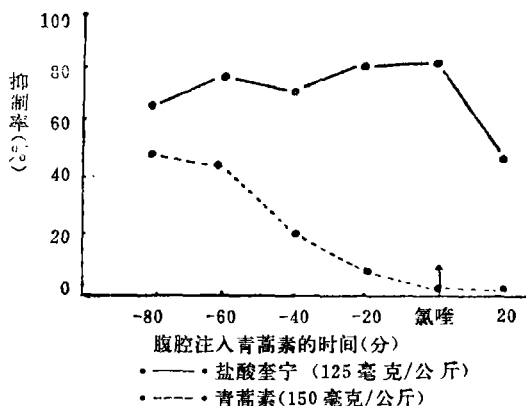
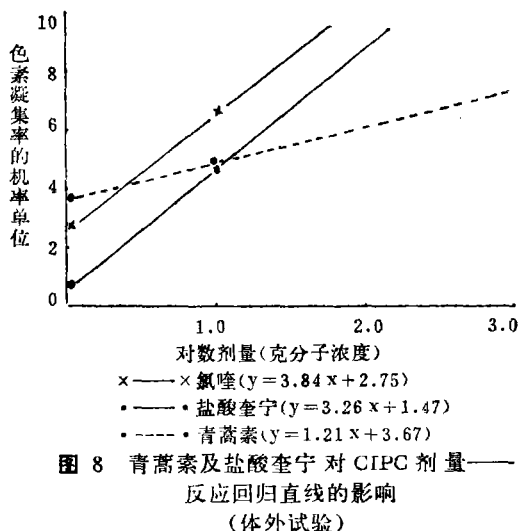
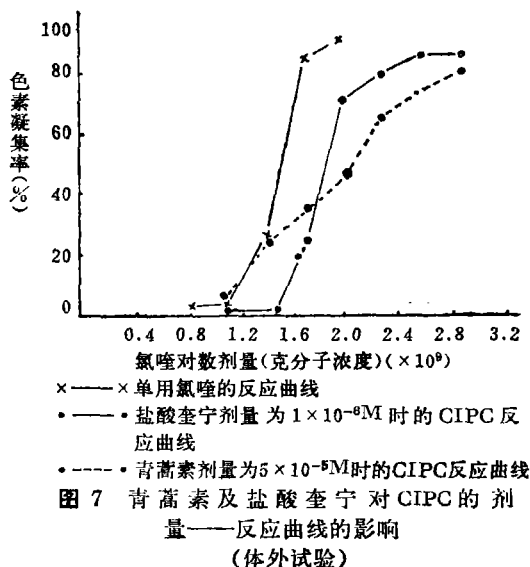


图9 青蒿素抑制CIPC的时间过程(体内试验)

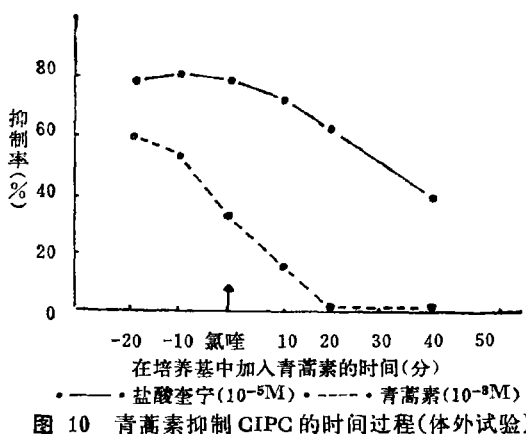


图10 青蒿素抑制CIPC的时间过程(体外试验)

讨 论

本试验所采用的体内试验与 Warhurst 等报道的方法相同^(4,5)，而体外试验则与 Warhurst 等⁽⁶⁾报道的方法有两点不同：(1) 我们用蜡烛缸静止培养方法造成含有一定比例的 CO_2 混合气体，而没有用专门供给含有 5% CO_2 混合气体的设备；(2) 用蜡烛缸静止培养方法^(11,12)代替 12 转/小时连续转动的培养装置。

在体外试验中，氯喹引起色素凝集的 CD_{50} 为 $2.88 \pm 0.03 \times 10^{-6} \text{M}$ ，它接近于文献中所报道的结果 ($2.0 \times 10^{-6} \text{M}$)⁽¹⁴⁾；而当氯喹的剂量增加到一定水平时，它又有抑制自身的色素凝集作用(图2)，这可能是高浓度的氯喹抑制疟原虫线粒体呼吸的结果⁽¹⁸⁾。此外， 10^{-5}M 盐酸奎宁基本能完全抑制 10^{-6}M 氯喹所引起的色素凝集(图4)，而且盐酸奎宁抑制CIPC是竞争性的抑制作用(图7、8)。从图10盐酸奎宁抑制CIPC的时间过程来看，只是当氯喹作用40分钟后再

加入盐酸奎宁,其抑制 CIPC 的作用才明显减弱。上述有关氯喹和盐酸奎宁的试验结果均与文献中所报道的结果相类似^(8,14)。

氯喹引起的色素凝集(CIPC)过程⁽¹⁸⁾大致如下:氯喹首先经过“高亲和力受体”^(15,16)的主动转运,被摄取吸收进入疟原虫体内,然后再作用于疟原虫线粒体,在氯喹的作用下,线粒体发生某种变化的信息,经某一中介物传递给胞核,使疟原虫的胞核合成含有某种信息的 mRNA, mRNA 再进入胞浆,在核蛋白体中控制合成某种特定蛋白质,进而形成大量的自噬泡——引起色素凝集。已有试验证明^(6,18,17,18)整个 CIPC 过程是一个需要有蛋白合成代谢和核酸合成代谢参与并且需要能量的过程。如果药物能够作用于整个色素凝集受体,就可以引起疟原虫的色素凝集。也有试验证明,奎宁类抗疟药可以作用于“高亲和力受体”,从而竞争性地抑制氯喹的摄取吸收⁽¹⁰⁾。此外,既然 CIPC 是个需要蛋白合成、核酸合成和能量代谢参与的合成过程,那么某些抗核酸药物(放线菌素 D)、蛋白合成抑制剂(嘌呤霉素)以及能量代谢抑制剂(鱼藤酮)⁽¹⁷⁾,虽然它们没有作用在色素凝集受体上,但仍具有抑制 CIPC 的作用,而且属于非竞争性的抑制作用。

无论在体外试验中还是在体内试验中,青蒿素本身没有引起色素凝集作用(附表),但能够不完全地抑制 CIPC,最大抑制率仅为 50~60%(图 3、4)。此外,青蒿素抑制 CIPC 是非竞争性的抑制作用,从图 5~8 可以看到,青蒿素作用后的 CIPC 对数剂量——反应曲线的形状及相应的回归直线斜率与单用氯喹的对照比较,两者明显不同。一般认为凡能引起色素凝集或竞争性抑制 CIPC 的药物均能作用于色素凝集受体⁽⁹⁾,显然青蒿素并非如此,它既不能象氯喹那样作用于色素凝集受体引起色素凝集,又不能象奎宁那样和氯喹相互竞争共同的色素凝集受体,从而竞争地抑制 CIPC,这表明青蒿素的原发抗疟作用部位及其抗疟作用方式与氯喹相比迥然不同。已有人利用电镜观察青蒿素对红内期伯氏鼠疟超微结构的影响^(9,10),结果表明青蒿素的作用部位和氯喹的明显不同,前者主要造成疟原虫膜系结构的损伤,后者则是引起色素凝集——自噬泡的形成。由此可见,青蒿素的有关色素凝集试验的结果和电镜下所观察到的结果是相吻合的。青蒿素之所以能够有效地治疗感染抗氯喹株恶性疟的患者,可能就在于它的抗疟作用方式不同于氯喹。

青蒿素能够非竞争性地抑制 CIPC,这显然和干扰叶酸代谢的抗疟药不同,因为磺胺和乙胺嘧啶等叶酸代谢拮抗剂对 CIPC 毫无影响⁽⁹⁾,因此,青蒿素的

原发抗疟作用方式也不同于叶酸代谢拮抗剂。已有试验证明⁽²¹⁾,青蒿素的抗疟活性不为大量的对氨基苯甲酸(PABA)和叶酸所拮抗,因而可以认为青蒿素主要不是通过干扰疟原虫的叶酸代谢而发挥抗疟作用的。根据上述色素凝集试验结果,我们只能指明青蒿素的主要抗疟作用方式不同于氯喹、奎宁和叶酸代谢拮抗剂,但却不能指明青蒿素的具体抗疟作用部位及作用方式。为此,尚须进行深入的试验研究工作,以期对青蒿素的抗疟作用原理有更进一步的了解。

CIPC 过程可以分为两个阶段,即氯喹的摄取吸收阶段和色素凝集阶段。蛋白合成抑制剂和抗核酸药物主要是作用于 CIPC 过程的后期——色素凝集阶段⁽⁶⁾,因为在氯喹作用 30 分钟后(此时氯喹已被摄取吸收并作用于色素凝集受体),再加入这些化合物,它们仍有明显地抑制 CIPC 作用。青蒿素抑制 CIPC 的时间过程表明,在体内试验中,当由服用氯喹前 60 分钟缩短到 40 分钟给小鼠注入青蒿素时,其抑制 CIPC 的作用明显减弱(图 9);在体外试验中,当同时加入青蒿素和氯喹时,则青蒿素抑制 CIPC 的作用也明显减弱(图 10)。因此可以设想,青蒿素可能和那些蛋白抑制剂或抗核酸药物不同,它不是作用于 CIPC 过程的色素凝集阶段,而可能是作用于 CIPC 的早期——氯喹的摄取吸收阶段。摄取吸收氯喹的“高亲和力受体”在转运氯喹进入虫体胞浆过程中起着关键作用,一般认为它可能分布在疟原虫的某些膜系结构上^(8,10),而青蒿素对疟原虫超微结构的损伤恰恰是在膜系结构。例如疟原虫的表膜、食泡膜和线粒体膜等都出现膜肿胀、膜间隙增宽以及呈螺纹膜样变形。疟原虫表膜和食泡膜等膜系结构的病理变化很可能会影响膜对氯喹的通透性,进而妨碍氯喹的摄取吸收。因此,一旦氯喹的摄取吸收过程完毕,并进入虫体作用于色素凝集受体,那么再用青蒿素,则不能抑制 CIPC。为了证实上述设想,有必要进一步研究青蒿素对氯喹的摄取吸收过程的影响,以获得直接的试验根据。

比较青蒿素在体内和体外有关色素凝集试验中的结果,就会发现青蒿素无论在体内试验中还是在体外试验中,都没有色素凝集作用,同时青蒿素抑制 CIPC 的作用均是不完全的,而且都是非竞争性的。这提示青蒿素本身可能就是在体内发挥抗疟活性的有效构形。实验证明青蒿素在体外试验中也具有良好的抗疟活性⁽⁹⁾,而且也有人发现青蒿素在体内的若干代谢物完全丧失抗疟活性⁽²²⁾。所有这些结果都支持青蒿素是发挥抗疟作用的有效构形。

(下转第48页)

即或采用也应当慎重。

(三) 动脉部位刺络极宜谨慎, 切忌刺中动脉, 古人有“冲阳血出投幽冥”(《针灸大成卷四·禁针穴歌》)之戒, 《素问·刺禁论》有具体的论述, 可参看。

七、讨 论

(一) 经脉贵乎通畅, 营卫贵乎调和。《灵枢·本藏》云: “血和则经脉流行, 营复阴阳, 筋骨劲强, 关节清利矣。卫气和则分肉解利, 皮肤调柔, 腠理致密矣。”《针灸大成卷二·标幽赋杨氏注解》说: “人之气血凝滞而不通, 犹水之凝滞而不通也。水之不通, 决之使流于湖海; 气血不通, 针之使周于经脉。”刺络是在皮肤浅表络脉上刺之出血, 它能直接祛除局部瘀阻, 恢复经脉的畅通, 所谓“血去则经隧通矣”(《素问·三部九候论》王冰注), 从而可以理解“疏其血气, 令其调达”(《素问·至真要大论》)的治疗意义。

(二) 《素问·刺腰痛论》有刺太阳“春无见血”, 刺少阳“夏无见血”, 刺阳明“秋无见血”, 刺少阴“春无见血, 出血太多, 不可复也”的记载。这是根据四时五行衰旺以及脏腑相配的理论而提出来的, 王冰在这篇里注释的很清楚, “太阳合肾, 肾王于冬, 水衰于春, 故春无见血也”等等。临床上可供参考, 不必拘泥。笔者认为《内经》的旨意是经脉盛满, “气盛血聚者, 宜石而泻之”(《素问·病能论》), 而经脉衰竭, 气弱血虚之时则不宜见血, 这与实泻虚补的治疗原则是一致的。

(三) 关于六经气血多少的问题, 《灵枢·五音五

味》、《灵枢·九针论》、《素问·血气形志篇》说法不一, 历来争议纷纭, 未曾取得统一, 当另作专文探讨, 此处不多累赘。但其在临床上的指导意义却不容忽视。笔者认为刺血以多血多气之经, 多血少气之经宜之。从刺血的部位来看, 也以太阳、厥阴、阳明为多。如暴发性火眼, 临床上常选用足太阳经穴攒竹、肝俞, 足阳明经穴头维, 经外奇穴鱼腰、太阳、内迎香等部位点刺出血, 而眼区附近的手足少阳经穴丝竹空、瞳子髎等处则很少刺血。《针灸大成卷九·眼目》指出: “故出血者, 宜太阳阳明, 盖此二经, 血多故也; 少阳一经, 不宜出血, 血少故也。刺太阳阳明出血则目愈明, 刺少阳出血则目愈昏。”

(四) 《素问·缪刺论》云: “因视其皮部有血络者尽取之。”刺血与放血, 虽然都是刺“血络”出血以愈病, 但刺血是“治其孙络血”, 实际上是刺破体表的小毛细血管, 取血量较少, 点滴如珠即可。孙络遍布全身, 因此全身所有俞穴和局部病灶, 只要是适宜刺血的部位, 都可以点刺取血, 如头痛点刺百会, 咽喉疼痛点刺少商, 外感发热点刺大椎, 丹毒采用“豹文刺”取血等等。放血是“刺络脉者, 必刺其结上甚血者”(《灵枢·经脉》), 实际上是刺破那些大一点的肉眼能观察到的毛细血管及浅表的小静脉, 取血量较多, 临床上多在舌下“青筋”, 耳间“青脉”, 曲泽及委中四畔“紫脉”放血, 使流出较多的“恶血”, 如《灵枢·五邪》说: “取血脉以散恶血, 取耳间青脉, 以去其掣。”《灵枢·禁服》说: “泻其血络, 血尽不殆矣。”对重舌、闪腰、脊强、霍乱吐泻等病证有效。

(上接第66页)

参 考 文 献

- (1) Warhurst DC, et al: Nature 214:935, 1967.
- (2) Macomber PB, et al: Nature 214:937, 1967.
- (3) Warhurst DC, et al: Proc Helmin Soc Wash 39:271, 1972.
- (4) Warhurst DC, et al: Life Sci 11, 10:755, 1971.
- (5) Warhurst DC, et al: Life Sci 11, 10:761, 1971.
- (6) Warhurst DC, et al: Ann Trop Med Parasitol 68:265, 1974.
- (7) Warhurst DC, et al: Trans R Soc Trop Med Hyg 66:5, 1972.
- (8) Peters W: Adv Parasitol 12:69, 1974.
- (9) 中医研究院中药所药理室: 新医药学杂志(1):23, 1979.
- (10) 青蒿素抗疟协作组: 中华医学杂志(英文版) 92:811, 1979.
- (11) 陈正仁等: 中华医学杂志(英文版) 93:31, 1980.

- (12) 高敏新等: 微生物学报 19:88, 1979.
- (13) Warhurst DC, et al: Ann Trop Med Parasitol 72:203, 1978.
- (14) Warhurst DC, et al: Biochem Pharmacol 24:2047, 1975.
- (15) Fitch CD: Proc Natl Acad Sci 64:1181, 1969.
- (16) Fitch CD, et al: Proc Helmin Soc Wash 39:265, 1972.
- (17) Warhurst DC: 11th. Symp Brit Soc Parasitol 11, Pt. 1973.
- (18) Warhurst DC, et al: Trans R Soc Trop Med Hyg 67:26, 1973.
- (19) Kramer PA, et al: Biochem Pharmacol 20:1619, 1971.
- (20) 广东海南青蒿素抗疟临床研究协作组: 新医药学杂志(1):12, 1979.
- (21) 赵一等: 中医杂志(11):58, 1979.
- (22) 朱大元等: 药理学报 15:509, 1980.