

实验研究

青蒿素的免疫作用和抗病毒作用

钱瑞生 李柱良 余建良 马道军

青蒿素是中药青蒿的常见品种黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 的抗疟有效成分, 是治疗疟疾尤其是脑型疟疾和抗氯喹恶性疟疾的速效、低毒药物⁽¹⁾。也有报告用青蒿素或青蒿制剂治疗红斑性狼疮⁽²⁾、血吸虫病^(3,4)及慢性支气管炎⁽⁵⁾, 并对流行性感冒、普通感冒、上呼吸道感染、支气管炎的发热病人有效^(6,7)。为了探讨青蒿素对不同疾病的共同治疗机理, 1979年我们进行了中草药免疫促进剂和免疫抑制剂的筛选, 首次发现青蒿素具有免疫抑制作用。现将青蒿素的免疫作用和抗病毒作用的初步实验结果报告如下。

材料和方法

青蒿素制剂是由山东省中医药研究所供给的青蒿素油混悬和水混悬两种注射剂, 每毫升注射剂含青蒿素 150 毫克。试验方法如下:

一、小鼠足垫试验

杂系小鼠 14~18 克, 雌雄各半, 随机分为免疫群与正常(不免疫)群, 每群又分为青蒿素、环磷酰胺及生理盐水三组。青蒿素组与生理盐水对照组于致敏前 2 天、致敏同时及致敏后 3 天, 每天腹腔注射青蒿素油混悬剂 450 毫克/公斤或生理盐水 0.1 毫升, 每天 1 次, 连续 6 次。环磷酰胺组于致敏前 2 天, 每天腹腔注射环磷酰胺 150 毫克/公斤, 每天 1 次, 共 2 次。实验方法基本按 Lagrange 氏报道的方法进行⁽⁸⁾。免疫群各组于首次给药后第 3 天, 取 0.05 毫升新鲜绵羊血 (含红细胞 10^6 个), 注入小鼠右后足垫皮下进行致敏。于致敏后 5 天, 先用镀铬游标卡尺测量小鼠左后足垫厚度, 然后将新鲜绵羊血 0.01 毫升 (含红细胞 10^6 个) 注入小鼠左后足垫皮下进行攻击, 24 小时后以固定人员再用镀铬游标卡尺在上述固定部位测量左后足垫厚度, 比较攻击前后足垫厚度之差, 求平均值。

二、淋巴细胞转化试验

取豚鼠心血, 肝素 (25 单位/毫升) 抗凝。1640 培

养液内加青霉素 100 单位/毫升、链霉素 100 微克/毫升, pH 7.4。测试时取抗凝血 0.2 毫升, 加入 1640 培养液 2 毫升。实验分青蒿素油混悬组、青蒿素水混悬组及环磷酰胺组。青蒿素两组分 0.56、2.80 及 5.60 毫克/毫升三种剂量, 环磷酰胺分 0.1、0.5 及 1.0 毫克/毫升三种剂量, 同时与阳性对照 (加 PHA 50 微克/毫升, 广州市医药工业研究所出品) 和阴性对照 (不加青蒿素, 也不加 PHA) 相比较。37℃ 温箱孵育 72 小时, 离心, 涂片, 染色, 镜检 200 个淋巴细胞, 计算淋巴细胞转化率⁽⁹⁾。

三、免疫特异玫瑰花试验

取 18~22 克杂系和 615 纯系小鼠 (由中山医学院微生物教研室供给, 自行繁殖), 同性别, 随机分为青蒿素组、环磷酰胺组和生理盐水对照组, 每组 5~10 只。三组动物分别腹腔注射青蒿素 (300~600 毫克/公斤/日)、环磷酰胺 (200 毫克/公斤/日) 和生理盐水 0.2~0.5 毫升, 每天 1 次, 连续 7 天。于注射药物的第 4 天, 各组小鼠均腹腔注射新鲜绵羊血 0.2 毫升 (含红细胞 4×10^8), 4 天后 (即停药后次日) 杀鼠取脾, 将同一组的鼠脾混合研碎, 制成均匀悬液, 计数脾细胞数, 并稀释成 1000 万/毫升。取此液 0.1 毫升, 加绵羊红细胞悬液 (2.4 亿/毫升) 0.1 毫升及经绵羊红细胞吸收过的小牛血清 0.1 毫升, 加入试管内, 以 800 转/分离心 5 分钟, 1% 甲苯胺蓝染色, 以双盲法计数每百万脾细胞中的玫瑰花结数⁽¹⁰⁾。

四、溶血空斑试验

取上述脾细胞悬液 (100 万/毫升) 1 毫升, 绵羊红细胞悬液 (20 亿/毫升) 1 毫升, 加入试管内摇匀。于每管 5 毫升琼脂糖液内加入此混合细胞液 0.2 毫升, 充分摇匀后倒入平皿, 混匀。冷凝, 37℃ 孵育 1 小时后加补体 1 毫升, 铺匀。再于 37℃ 孵育 30 分钟, 双盲法计数空斑数, 算得每百万脾细胞中溶血空斑数⁽¹¹⁾。

五、抗流感病毒试验

实验按中国医学科学院药物研究所报道的方法进

行⁽¹²⁾。毒株为由广东省卫生防疫站供给的流行性感冒病毒A₃型京科79-2株,接种于10日胚龄的鸡胚尿囊,常规传代7次,收尿囊液,选血凝效价为1:320者保存于冰箱的冰盒内。

1. 测定病毒的半数感染稀释度:将待测之病毒液用pH 7.2缓冲盐水作 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 稀释,加青霉素500单位/毫升和链霉素500微克/毫升,置冰箱(4℃)中30分钟。于每只10日龄健康来亨鸡胚尿囊腔内注入一个稀释度病毒液0.2毫升,每种稀释度种胚3个,封口,在35~36℃的温度中孵育48小时后,转入冰箱内过夜,收集尿液作血凝试验,3只鸡胚中有2只被病毒感染者为该组病毒量的半数感染稀释度。

2. 测定青蒿素对鸡胚的无毒反应界限:将青蒿素分成不同剂量组,每组3个鸡胚,取不同量药液分别注入10日龄健康来亨鸡胚尿囊腔内,观察12天,以存活3天以上的最小稀释度为鸡胚对青蒿素的最大耐受量。

3. 青蒿素对病毒的抑杀试验:实验分青蒿素组与生理盐水对照组,青蒿素组又分为三个剂量,每个剂量同时用三种稀释度的病毒感染鸡胚,每个稀释度种3个鸡胚。实验时,先将青蒿素水混悬液注入10日龄鸡胚尿囊腔内,于37℃孵育30分钟,然后把已准备好的不同稀释度的病毒液(加青霉素500单位/毫升和链霉素500微克/毫升后放冰箱作用30分钟)0.2毫升注入尿囊腔内,置35~36℃孵育48小时,取出,放冰箱过夜后,收集尿液,作血凝试验。结果阴性者取尿液,种鸡胚,作盲传试验以确定其抑杀性质。对照组分病毒对照组与半数感染稀释度测定组(只加病毒,不加青蒿素)和药物对照组(只加青蒿素,不加病毒)。

结 果

一、青蒿素对细胞免疫的影响

1. 对小鼠迟发型变态反应的影响:在以绵羊红细胞为抗原的小鼠足垫试验中,免疫群各区间足垫反应强度有显著差异,反映了青蒿素油混悬剂对小鼠迟发型变态反应有明显影响,但其作用逊于环磷酰胺($P<0.05$)。正常群(不免疫)各区间足垫反应强度无明显差异,正常群青蒿素组与免疫群青蒿素组间足垫反应强度则有非常显著的差异($P<0.001$),反映青蒿素具有细胞免疫佐剂的作用(表1)。

2. 对淋巴细胞转化率的影响:如表2所示,与对照组相比较,青蒿素能明显提高淋巴细胞转化率。

表 1 青蒿素油混悬剂和环磷酰胺对小鼠足垫试验的影响

药 物 (毫克/公斤/日)	攻市前后足垫厚度差值(毫米)	
	免 疫 群 均差±标准误(鼠数)	正 常 群 均差±标准误(鼠数)
青 蒿 素 (450)	0.36±0.05(8)* [△]	0.06±0.04 (8)
环磷酰胺 (150)	0.65±0.12(5)**	0.26±0 (2)
生 理 盐 水	0.18±0.06(5)	0.20±0.07 (5)

* 与本群生理盐水组相比, $P<0.05$

** 与本群生理盐水组相比, $P<0.01$

[△] 与正常群青蒿素组相比, $P<0.001$

表 2 青蒿素和环磷酰胺对淋巴细胞转化率(%)的影响

药 物	实 验 组			对 照 组	
	小剂量	中剂量	大剂量	阳性对照	阴性对照
青蒿素油混悬注射剂	12	36	50	49	0
青蒿素油混悬注射剂	14	30	42	43	0
青蒿素水混悬注射剂	13	—	—	49	0
青蒿素水混悬注射剂	12	—	—	43	0
环 磷 酰 胺	24	—	—	43	0

注:(1)表内数字为淋巴细胞转化率(%),“—”表示溶血;(2)实验组用药剂量分为小剂量、中剂量、大剂量三种,青蒿素制剂(油剂和水剂)分别为0.56、2.80、5.60毫克/毫升,环磷酰胺分别为0.1、0.5、1.0毫克/毫升;(3)阳性对照组加PHA 50微克/毫升,阴性对照组不加青蒿素,也不加PHA。

二、青蒿素对体液免疫的影响

青蒿素,不论油混悬或水混悬注射剂,剂量300毫克/公斤/日,均能使初次免疫杂系小鼠脾细胞中免疫特异玫瑰花结数和溶血空斑数显著减少,反映了青蒿素对抗原结合细胞和抗体形成细胞具有非常显著的抑制作用,其抑制作用和环磷酰胺结果相一致,但抑制程度不及环磷酰胺(表3)。

观察青蒿素油混悬注射剂不同剂量对纯系小鼠脾脏抗体形成细胞的影响,其结果与杂系小鼠相一致,当青蒿素油剂剂量为0、300、450、600毫克/公斤/日时,溶血空斑数分别为 7044 ± 246 (5只)、 2906 ± 330 (5只)、 990 ± 125 (5只)、 807 ± 146 (5只)/ 10^6 脾细胞数,显示出青蒿素对初次免疫小鼠抗体形成细胞的抑制效果随剂量增大而增强($F=162.5$, $P<0.01$)

三、青蒿素的抗流感病毒效果

当流感病毒A₃型京科79-2株血凝效价为1:320,半数感染稀释度为 10^{-8} 时,青蒿素水混悬剂1.8毫克/胚(约相当于90毫克/公斤),对病毒稀释度 10^{-7} 有明

表3 青蒿素和环磷酰胺对免疫细胞的影响

药 物 (毫克/公斤/日)	鼠数	玫瑰花结数 均值±标准误	溶血空斑数 均值±标准误
青蒿素油剂(300)	5	1500±100*	480±35*
生 理 盐 水	5	3300±145	2833±172
青蒿素油剂(300)	5	1579±96*	1061±95*
生 理 盐 水	5	5053±342	2221±209
青蒿素水剂(300)	5	9030±339*	6356±89*
生 理 盐 水	5	20100±731	16268±89
青蒿素油剂(600)	10	2760±198*	38±1*
环 磷 酰 胺(200)	10	505±105 [△] *	13±5 [△] *
生 理 盐 水	10	18155±156	841±54

* 与生理盐水组相比, $P<0.001$ [△] 与青蒿素油剂组相比, $P<0.001$

显的抗病毒作用, 10^{-6} 及 $10^{-6.5}$ 时, 其血凝效价亦较对照组减少 8~64 倍。增加青蒿素的剂量(3.6 毫克及 5.4 毫克/胚, 即相当于 180 毫克及 270 毫克/公斤), 对病毒稀释度 10^{-6} ~ 10^{-7} 有非常显著的抗病毒作用(表4)。实验重复4次, 结果一致。通过青蒿素组阴性鸡胚尿囊液的盲传试验, 结果认为青蒿素的作用性质为抑制, 而非杀灭。

表4 青蒿素对不同稀释度的流感病毒
的抑制作用

药 物 (毫克/ 胚)	10^{-6}			$10^{-6.5}$			10^{-7}		
	鸡胚 数	感染 数	血凝 滴度	鸡胚 数	感染 数	血凝 滴度	鸡胚 数	感染 数	血凝 滴度
青蒿素水 剂(1.8)	3	2	1:5	3	2	1:40	3	0	—
青蒿素水 剂(3.6)	3	0	—	3	0	—	3	0	—
青蒿素水 剂(5.4)	3	0	—	3	0	—	3	0	—
病毒对照	3	3	1:320	3	3	1:320	3	3	1:320

讨 论

一般认为中药补益药与机体的免疫功能关系较为密切, 清热药与机体的免疫功能影响不大。青蒿是一种清热解暑药, 其对免疫功能的影响未见文献报道。最近四川省中药研究所臧其中等报告, 青蒿素在动物试验中对⁵¹Cr标记红细胞在血液中的廓清速度、肝脾网状内皮系统吞噬功能及³H-胸腺嘧啶掺入淋巴细胞等与对照比较无明显影响⁽¹⁸⁾。本文用四项免疫指标在动物机体内外进行多次观察, 初步认为青蒿素的免疫作用与环磷酰胺有某些相似之处, 可能是一种免疫调

剂。Lagrange氏等报告环磷酰胺对B细胞的相对选择性抑制作用, 可促使T细胞功能增强⁽¹⁴⁾。环磷酰胺具有抑制体液免疫, 同时又能增强细胞免疫的功效⁽¹⁵⁾。本实验结果表明, 环磷酰胺在小鼠体内具有明显的体液免疫抑制作用; 对正常小鼠迟发型变态反应无明显影响, 而对免疫小鼠却具有明显的细胞免疫佐剂作用。青蒿素具有体液免疫抑制和细胞免疫促进作用, 推测青蒿素作为免疫佐剂可能具有免疫调节作用。这在扩大青蒿素的临床应用范围上具有重要意义。青蒿素对淋巴细胞各亚型的选择作用和调节作用有待进一步研究, 以便更好地指导临床实践。

青蒿素是我国医药学宝库中发掘出来的一种新型抗疟药, 主要作用于疟原虫红内期, 作用部位是疟原虫滋养体的膜系结构, 干扰表膜一线粒体功能, 从而起到杀灭疟原虫的作用⁽¹⁾。从本实验结果看, 青蒿素除对疟原虫有直接杀灭作用外, 还有显著抑制体液免疫和促进细胞免疫的作用。多年来, 对脑型疟疾的发病机理说法很多, 如“栓塞”说、弥漫性血管内凝血、缺氧性缺氧症、“炎症”说等等, 迄无定论。最近的研究表明脑型疟疾与异常免疫反应有关, 动物试验也证明免疫反应与脑症状有密切联系。疟疾的自身免疫问题已引起人们重视⁽¹⁶⁾。在伯氏鼠疟的感染实验中, 表现出环磷酰胺对免疫复合物的明显抑制效果⁽¹⁷⁾。有人认为由疟原虫有丝分裂原的刺激而致IgM大量增生, 与抑制性T细胞缺乏有关⁽¹⁸⁾。推测脑型疟疾的发病是否由于抑制性T细胞减少或功能不足, 导致自身抗体和免疫复合物的产生而引起? 青蒿素在救治脑型疟疾的过程中, 除直接杀灭疟原虫外, 是否亦有加强抑制性T细胞功能这个因素在起作用? 青蒿素治疗红斑性狼疮的机理是否亦与此相类似? 均有待临床和实验室进一步探讨。

青蒿素具有抗流感病毒作用, 迄今未见文献报道, 对其它病毒的作用如何还有待进一步研究。从对流行性感冒、普通感冒、上呼吸道感染和慢性气管炎的临床报道分析, 与本实验结果似有某些联系。至于青蒿素对机体的免疫作用与抗流感病毒作用之间是否有关联? 是否有干扰素在起作用? 值得探讨。

小 结

用小鼠足垫试验、淋巴细胞转化试验、免疫特异玫瑰花试验和溶血空斑试验等四项免疫指标观察青蒿素的免疫作用, 发现青蒿素对体液免疫有明显的抑制作用, 对细胞免疫有促进作用, 可能具有免疫调节作用。在鸡胚感染试验中显示青蒿素有抗流感病毒作用。

参 考 文 献

- (1) 青蒿研究协作组: 药学通报 14(2):49, 1979。
- (2) 庄国康等: 新医学杂志 (6):39, 1979。
- (3) 陈德基等: 中华医学杂志 60(7):422, 1980。
- (4) 乐文菊等: 药学通报 15(4):38, 1980。
- (5) 厦门市医药研究所等: 福建医药杂志(1):22, 1979。
- (6) 建设机床厂医院及邮电部第九研究所医务室: 青蒿上清片对高热退热疗效观察。内部资料, 1978。
- (7) 中国人民解放军第47医院内二科: 青蒿上清片退热作用临床观察 30 例小结。内部资料, 1979。
- (8) Lagrange PH, et al: J Exp Med 139(3):528, 1974。
- (9) 沈阳医学院附属第二医院: 用细胞免疫反应筛选“免疫激发型”中草药的初步尝试。内部资料, 1975。
- (10) 北京医学院基础部微生物教研组: 北京医学院学报 (3): 156, 1978。
- (11) 李占荣: 测定抗体形成细胞的方法-溶血空斑试验, 免

- 疫学讲义(内部资料)1975。
- (12) 中国医学科学院药物研究所: 中草药有效成分的研究(第二分册), 药物筛选方法, 第 81 页, 人民卫生出版社, 1972。
- (13) 臧其中等: 青蒿素对机体免疫功能的影响。内部资料, 1980。
- (14) Lagrange PH, et al: J Exp Med 139(6):1529, 1974。
- (15) Report of WHO Scientific group: Cell-mediated immunity and resistance to infection. WHO Technical Report Series, No 519, 1973。
- (16) 任道性: 中华内科杂志 17(4):302, 1978。
- (17) Sutjanjo Endardjo, et al: J Trop Med Hyg 81 (2):25-31, 1978。
- (18) Malaria and Immunology, Lancet 2(8097):974, 1978。

在试验过程中荷蒙谢少文教授给予指导和帮助, 许广深、周润娟、李水晶、叶继英等同志参加部分技术工作, 一并致谢。

白 花 丹 引 产 导 致 严 重 反 应 报 道

上海第二医学院附属新华医院中医内科 孙佛全 张树一

我院自 1980 年 6 月~9 月收治 4 例自行用中药引产, 导致严重反应的患者。现举例报道如下。

花××, 女, 25 岁, 住院号 160843, 入院日期 1980 年 9 月 19 日。患者未婚先孕, 停经 2 个多月。9 月 16 日将自购草药“降生草”塞入阴道, 自行引产。当日下午起即有阴道流血和少腹疼痛。翌晨, 高热 40℃, 伴有呕吐、咽痛等症状。经××街道医院治疗后, 症状无明显好转。9 月 19 日晨突然昏厥 10 余分钟, 急送我院就诊, 测体温 36.6℃, 血压 52/46 毫米汞柱, 心率 150 次/分, 律齐, 神经系统检查阴性。验血白细胞 15600, 中性 96%, 淋巴 4%, 以中毒性休克原因待查收入病房。入院后, 经抗感染、抗休克、补充血容量、纠正酸中毒等措施进行积极抢救, 症状未见缓解。追问病史, 有中药堕胎史, 故请妇产科急会诊。妇科检查: 宫体增大如 50⁺天大小, 羊红细胞凝集抑制试验尿 HCG 稀释定量 5000 单位/升(大于 1250 单位/升为阳性), 诊断为早孕, 并排除了宫外孕。9 月 20 日在纠正休克、心衰后进行刮宫术, 从宫体内钳出腐烂带有臭味组织约 15 毫升, 胚胎 5 毫升。细菌培养有副大肠杆菌生长。术后, 症状好转, 于 10 月 14 日痊愈出院。出院诊断: 中药堕胎, 宫腔感染, 感染性休克。

患者使用的“降生草”, 经询问系托人从福建购买, 经我们与福州医药采购供应站联系, 核实为“白花丹”(Plumbago zeylanica L.), 又名野苣荬, 药用全草及根。性味辛苦涩、温、有毒。有祛风, 散瘀, 解毒, 杀虫之效。一般用于风湿病关节疼痛, 血瘀闭经, 跌打损伤, 肿毒恶疮, 疥癣等病。解放前后, 福建地区民间曾用作引产, 将其全草或根放入阴道中 2~3 小时就能引产, 但因出血量大, 而且 30% 伴有严重反应, 故从未推广应用。其提取物中含有鞣松素(plumbagin), 动物实验鞣松素小量对离体子宫兴奋, 中量先兴奋后麻痹, 大量则一开始即呈麻痹作用。对妊娠子宫特别敏感, 对妊娠大鼠腹腔注射可导致胎儿死亡及续发性卵巢功能紊乱。中毒剂量时可致中枢神经系统麻痹, 呼吸抑制, 血压下降及心搏停止。白花丹的毒性大, 应用要慎重, 更不可冒然用于引产, 以防引起严重并发症。我院收治的 4 例中, 就有 1 例经抢救无效而死亡。上海中医研究所把鞣松素钠以宫腔给药的方法, 试用于 7 例病人, 其病理变化与本例者相同, 胎盘组织有变性和坏死, 但不排出体外。中毒后, 如出现麻痹可给樟脑及强心兴奋剂, 静脉滴注葡萄糖盐水等对症治疗。近来, 有违法私售用于堕胎者, 往往发生严重反应, 导致生命危险, 应引起重视。