

青蒿素及其衍生物的抗疟机理

军事医学科学院微生物流行病学研究所(北京 100071)

王京燕*

摘要 通过电子显微镜的研究证实,青蒿素类药物主要作用于疟原虫的膜系结构,不同剂量的药物仅有作用速度的差异,没有作用部位及特点的差别。该类药物经体内代谢可产生氧自由基,其抗疟作用有赖于宿主体内抗氧化剂维生素E的水平;该类药物与原虫内的氯化高铁血红素(hemin)反应,导致副产物活性氧的产生及氧的损害。

青蒿素是从中药菊科植物黄花蒿中分离出的一个具有过氧基因的新型倍半萜内酯。是与已知抗疟药完全不同的新型化合物。大量的药理及临床研究证明青蒿素是优于氯喹的抗疟新药。它具有高效、速效、低毒等特点,由于其化学结构与已知的抗疟药截然不同,因此推测其在抗疟作用机理上也有所不同。早在1979年^[1]就有报道青蒿素的抗疟作用与疟原虫体内叶酸代谢的关系不大,不同于乙氨嘧啶、氯胍、磺胺与磺类等药物。用大量的对氨基苯甲酸和叶酸均不能拮抗青蒿素的抗疟作用。因此说明青蒿素可能不是通过干扰叶酸代谢而发挥作用的。1981年^[2]又有人利用色素凝集试验证明青蒿素的抗疟作用部位不同于氯喹。作者详细做了氯喹和青蒿素对色素凝集的影响,氯喹使色素凝集率达90%以上,而青蒿素则不到10%。有关该类药物的抗疟机理已有不少报道,概述如下。

1 对疟原虫膜系统的影响

1979年^[3]中医研究院在研究青蒿素对小鼠疟原虫红内期超微结构的影响时,首先发现该药主要作用于疟原虫的膜系结构。其中包括食物泡膜、限制膜、线粒体膜和核膜均出现肿胀且膜间隙增宽。不同剂量的青蒿素仅有作用速度的差异,没有作用部位及特点的差别。提出青蒿素对疟原虫的作用原发部位是表膜。由于作用于食物泡膜,从而阻断了摄取营养的最早阶段,使疟原虫较快产生氨基酸饥饿,迅速形成自噬泡,并不断排出虫体外,使疟原虫损失大量胞浆直至死亡。李锐等^[4]又报道了青蒿酯钠对猴疟原虫超微结构的影响。青蒿酯钠静脉注射后,猴疟原虫形态迅速变化至膜系破裂。药物注射2h后疟原虫表膜、食物泡膜、线粒体膜均出现肿胀,自噬泡较多,6h膜系肿胀,界限不清,染色质集聚,7h膜系肿胀明显,核膜界限不清,自噬泡大量出现,核糖体消失,出现膜系破裂。叶祖光等^[5]又在体外培养的人恶性疟原虫中也看到类似的形态学变化。在青蒿素的作用下,恶性疟原虫的核膜和限制膜的间隙明显水肿并增宽以及内质网呈囊泡状肿胀。所有这些变化在用药后1~4h便已出现,其中尤以核膜的损伤为最甚。接着他们又应用扫描电镜技术观察了青蒿素对小鼠正常红细胞和感染红细胞以及游离的疟原虫的表面结构的作用^[6]。结果发现即使青蒿素作用24h,感染小鼠的红细胞表面结构也未见异常改变。提示青蒿素具有选择性较好的药理特点,可以在不损害红细胞的情况下,有效地杀伤其中的疟原虫。

Ellis等^[7]给感染鼠皮下注射单剂青蒿素10mg/kg,用药后30min就看见了原虫限制膜和其它膜的变化,同时也看到核糖体和内质网的改变。作者在体外培养的恶性疟原虫中加入^[3H]-双氢青蒿素,作用1h后,经放射自显影观察,凡在感染疟原虫的红细胞内都见有^[3H]-双氢青蒿素标记的银颗粒出现,且均较为一致地定位于原虫的限制膜及消化泡的膜内。而未感染的红细胞内,则未见有银颗粒出现。作者认为核糖体及内质网形态学的变化与原虫体内

*Address: Wang Jingyan, Institute of Microbiology and Epidemiology, Military Academy of Medical Sciences, Beijing

蛋白质合成受抑有关。 $[^3\text{H}]$ -双氢青蒿素定位于原虫膜上的事实,说明原虫膜的完整性改变可能发生在早期蛋白质合成的抑制之前。

可以看到,青蒿素不论作用于鼠疟原虫,猴疟原虫还是人恶性疟原虫,其超微结构的变化均主要表现在原虫的膜系结构。李锐等^[4]认为疟原虫的表膜具有细胞色素氧化酶,该类药物抗疟机理就是通过还原青蒿素抑制细胞色素氧化酶,从而达到抑制疟原虫表膜,阻断以宿主红细胞胞浆为营养的供给,造成原虫死亡。

2 氧对其抗疟作用的影响

由于青蒿素及其衍生物的化学结构中都含有过氧桥,并有实验证明该类化合物如失去过氧桥则也失去抗疟作用^[8]。因此,有人就设想青蒿素类抗疟药的抗疟作用是否与氧有关。Krungkrai^[9]测定了3种不同的氧压对青蒿素抗疟活性的影响。结果表明,在恶性疟原虫的体外培养中,青蒿素对原虫的作用有赖于氧压。当氧分压分别为3%、17%、30%时,青蒿素的 EC_{50} 值分别为0.28、0.20、0.054nmol/L,可见随着氧压的增高,青蒿素的抗疟作用也随之增强。当青蒿琥酯与咪康唑(miconazole可提高感染红细胞的氧压)伍用时具有明显增效作用。青蒿琥酯与氧化剂阿霉素伍用也可明显增强对培养的恶性疟原虫的抗疟作用。相反,青蒿素与具有减弱氧压作用的二硫苏糖醇(DTT)或 α -维生素E合用,对体外培养的恶性疟原虫的抗疟作用明显减弱。同样,过氧化氢酶也可降低青蒿素的抗疟作用。根据以上现象,作者认为青蒿素和青蒿琥酯有提高感染红细胞氧压的作用。已知过氧桥是该药抗疟所必需的,而感染红细胞浓缩 $[^3\text{H}]$ -青蒿素的量要比未感染红细胞大150倍以上^[10]。事实上早有报道^[11~15],很多疟原虫包括人恶性疟原虫对 O_2 的伤害是敏感的。原虫在3% O_2 环境下生长明显好于17%和21%的 O_2 环境。另有报道,给感染文氏疟原虫的小鼠注射四氧嘧啶后,高原虫血症可迅速消失^[16]。作者认为此作用可能是由四氧嘧啶与5-羟基巴比妥酸之间的氧化还原循环所生成的反应型氧(可能是羟基)而引起。为确定游离氧根对疟原虫的影响,给感染鼠注射少量能直接分解产生游离氧根的有机过氧化氢,叔-丁基过氧化氢,结果可治愈使小鼠致死的疟原虫感染。文氏疟原虫和恶性疟原虫体外试验表明,当其宿主红细胞置于游离氧根发生剂时,这2种原虫都可被杀死。青蒿素具有倍半萜内酯类的结构,由于它的过氧桥降解,释放出游离氧根,从而迅速产生抗疟作用。

3 抗氧化剂对青蒿素抗疟作用的影响

青蒿素的抗疟作用是否与活性氧有关,通过调节宿主血浆自由基清除剂—维生素E的水平可得到证实。Ager^[17]通过调节饮食维生素E的含量将小鼠分成血浆维生素E缺乏,正常和升高3组,此时再接种约氏疟原虫。接种后 D_3 — D_6 连续3天口服青蒿素,剂量为0、4、16和64mg/kg 4组, D_6 涂片。结果发现不管哪种饮食,青蒿素为0的原虫寄生率均在25%左右,青蒿素为64mg/kg的原虫寄生率均 $<1\%$ 。而青蒿素为4或16mg/kg时,缺乏维生素E组的小鼠原虫寄生率仅为另2组的1/2。作者对给16mg/kg青蒿素的3组动物继续观察了60d的存活率,维生素E缺乏、正常、升高各组动物60d的存活率分别为88%、13%和0%。上述实验结果表明,青蒿素的治疗作用与小鼠体内血浆维生素E水平的高低有着密切关系。维生素E缺乏时可明显提高青蒿素的疗效。Levander^[18]也证实小鼠血浆维生素E缺乏可提高青蒿素抗约氏疟原虫的作用。同时他发现维生素E缺乏并补充5%鱼肝油的饮食有着很强的抗疟作用,并观察到鱼肝油本身在没有青蒿素时也有抗疟作用。早在1957年Godfrey^[19]就发现小鼠饮食中含有5.5%鱼肝油则可抑制伯氏疟原虫在其体内的繁殖,而用奶油、橄榄油代替鱼肝油对疟原虫生长则无任何影响。当小鼠饮食中存在足够量的水溶性维生素时,维生素E可完全

对抗鱼肝油对疟原虫的抑制作用。鱼肝油为什么有抗疟作用，而维生素E又为什么能对其抗作用呢？作者认为鱼肝油的不饱和脂肪酸通过宿主氧化成过氧化物，这些过氧化物产生一个对伯氏疟原虫有害的过氧化状态的内环境，从而杀死疟原虫。而维生素E通过它的抗氧化特性可防止过氧化物的产生，从而对抗了鱼肝油的抗疟作用。Levander^[20]又进一步证明了高度不饱和脂肪酸可被结合到宿主红细胞和（或）原虫的膜上，在维生素E缺乏时，这些膜对过氧化的攻击十分脆弱而造成原虫的死亡。由此可见，体内过氧化物含量的升高对疟原虫的生长极为不利。青蒿素及其衍生物化学结构的特点是结构式中都含有过氧桥。有报道^[21]，大鼠静脉注射单剂青蒿酯钠30min后，取肝肠组织进行电子自旋共振波谱法（ESR）测定，在谱线上可见一个大的自由基信号并可引发脂质过氧化，使用抗氧化剂维生素E可抑制上述现象。据此作者认为，青蒿酯钠的主要毒性作用机理之一可能是该药在代谢过程中产生的自由基攻击不饱和脂肪酸，引起脂质过氧化，导致细胞膜结构的损伤和细胞功能的紊乱。虽然这是毒性试验的数据，但也不能排除其抗疟作用与此有关。蔺福宝等^[22]关于青蒿酯钠抗疟机理一文中提到，青蒿酯钠可使红细胞中 O_2^- 和 H_2O_2 等活性氧的浓度升高，并能增加红细胞膜的脂质过氧化。青蒿酯钠使感染红细胞的活性氧增加和膜脂质过氧化程度均比未感染红细胞显著。这样一方面可直接杀伤疟原虫，另一方面可氧化红细胞膜不饱和脂肪酸产生丙二醛（MDA）等产物，这些产物有很高的反应活性，可交联脂质和蛋白，它们既可直接作用于疟原虫也可使红细胞损伤，破溶而导致疟原虫死亡。

4 对蛋白合成的影响

青蒿素是否对疟原虫的蛋白合成有影响？Gu等^[23]以 $[^3H]$ -异亮氨酸掺入为指标观察了青蒿素及其衍生物对体外培养的恶性疟原虫蛋白合成的影响。结果发现，在加药后不到1h即可明显抑制 $[^3H]$ -异亮氨酸的掺入。异亮氨酸是疟原虫感染红细胞蛋白合成的主要外源性氨基酸。因此，它的掺入可作为蛋白合成作用的一个观察指标。在相同条件下，青蒿素类药物抑制 $[^3H]$ -次黄嘌呤掺入核酸，需作用2h，且抑制作用较弱。因此认为，青蒿素类药物的抑制蛋白合成作用是直接的而不是通过抑制核酸代谢而继发的。

5 与氯化高铁血红素（hemin）形成加合物

疟原虫进行蛋白生物合成所需的氨基酸主要来自3个途径，其中之一就是利用宿主血红蛋白分解后释放的氨基酸。红细胞内的游离氨基酸不多，血红蛋白就是疟原虫最丰富的氨基酸储备。原虫摄入血红蛋白，在食物泡中血红蛋白被酸性内肽酶和氨基肽酶所消化。血红蛋白水解产生游离氨基酸被原虫利用，同时也产生大量的hemin。Steven等^[24]发现青蒿素与hemin反应生成一个表现分子量为914的加合物。该加合物与由原虫所形成的加合物在色谱上、溶解性和电泳上都是一致的。加合物本身对疟原虫并无毒性，但当在反应中加入红细胞膜时则出现了蛋白硫醇的氧化。因此作者认为青蒿素与原虫内的hemin反应导致副产物活性氧的产生及氧的损害是这类药物的抗疟机理。Steven^[25]又进一步提出hemin可催化青蒿素不可逆地分解为有机自由基，并通过电化学和分子模型的研究所证实。这种有机自由基可以使蛋白质和hemin烷基化并可氧化脂质和蛋白质。上述现象可以解释为什么感染疟原虫的红细胞内青蒿素的浓度要远远高于正常红细胞。疟原虫内环境大量的hemin可能是药物选择性毒性的原因。青蒿素及其衍生物对产生疟色素的红内期原虫有效，但不能杀灭不产生色素的肝内期和蚊内期原虫以及成熟配子体，其原因之一就是hemin起了关键作用。

综上所述，青蒿素类药物的抗疟机理之一是与活性氧有关。活性氧的产生导致原虫膜系统的损害，从而原虫代谢功能紊乱直至死亡。

致谢：本文由王明道审校。

参 考 文 献

- 1 赵一,等. 中医杂志, 1979, 20(11): 58
- 2 叶祖光,等. 中医杂志, 1971, 22(4): 62
- 3 中医研究院中药研究所药理研究室. 新医药杂志, 1979(1): 23
- 4 李锐,等. 中草药, 1981, 12(4): 31
- 5 叶祖光,等. 中医杂志, 1982, 23(4): 65
- 6 叶祖光,等. 寄生虫学与寄生虫病杂志, 1986, 4(4): 260
- 7 Ellis D S, et al. Ann Tro Med & Parasitol, 1985, 79(4): 367
- 8 朱大元,等. 药学报, 1980, 15(8): 509
- 9 Krungkrai S R, et al. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1987, 81: 710
- 10 Gu H M, et al. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1984, 78(2): 265
- 11 Scheihei L W, et al. Exp Parasitol, 1979, 47(4): 410
- 12 Allison A C, et al. Lancet, 1982, 2: 1431
- 13 Clark I A, et al. Infect & Immunity, 1983, 39(1): 1
- 14 Ockenhouse C F et al. J Immunol, 1984, 133(3): 1601
- 15 Wozencraft A O, et al. Infect & Immunity, 1984, 43: 664
- 16 Clark I A, et al. Lancet, 1983, 1: 234
- 17 Ager A L, et al. Fed Proc, 1987, 46(4): 1163
- 18 Levander O A, et al. Am J Clin Nutr, 1989, 50: 346
- 19 Gadfrey D G, et al. Exp Parasitol, 1957, 6: 555
- 20 Levander O A, et al. Exp Parasitol, 1990, 70(3): 323
- 21 靳永刚,等. 中国药理学与毒理学杂志, 1989, 3(2): 138
- 22 蔺福宝,等. 中国医学科学院学报, 1989, 11(8): 180
- 23 Gu H M, et al. Biochem Pharmacol, 1983, 32(17): 2463
- 24 Steven R M, et al. Molec & Biochem Parasitol, 1991(49): 181
- 25 Steven R M. Artemisinin-the Role of Hemin in Its Mechanism of Action (mos 12-2) In: XIIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Thailand Abstracts, 1992, 1: 86

(1993-08-06 收稿)

(上接第160页)

- 7 叶元康. 蚌埠医学院学报, 1990, 15(2): 82
- 8 耿雅江. 医学研究通讯, 1990, 19(7): 5
- 9 陈静波. 中国药理学通报, 1991, 7(2): 88
- 10 Adoga G L, et al. Biochem Biophys Res Commun, 1987, 142: 1046
- 11 食品、药品、化妆品 (SP18): 9
- 12 高玉民. 国外医学—中医中药分册, 1993, 15(1): 1
- 13 You W C, et al. J Natl Cancer Inst, 1989, 81(2): 162
- 14 鄢章安. 益寿保健信息, 1989, 6: 25
- 15 纪玉兰. 医学科研通讯, 1987, 16(18): 229
- 16 林毅宏. 福建中医药, 1986, 71(6): 55
- 17 王美玲. 肿瘤, 1990, 9(10): 223
- 18 郭乃槐等. 北京医科大学学报, 1990, 22(2): 152

(1993-06-22 收稿)

(上接164页)

从以上理化性质及光谱数据推定Lp-I为act-eoside。

致谢：紫外光谱和红外光谱由我所分析

室测定，核磁共振谱由昆明植物研究所代测，质谱由上海医药工业研究院代测。实验材料由云南永善县土特食品厂提供。

参 考 文 献

- 1 Steinegger E, et al. Pharm Acta Helv, 1959, 34: 585
- 2 Karrer W. Konstitution und Vorkommen der Organischen Pflanzenstoffe, Birkhauser Verlag 1976. 274
- 3 CA, 1953, 47: 12527
- 4 Kudo K, et al. Plant Med, 1980, 40: 250
- 5 Endo K, et al. Heterocycles, 1982, 19: 261
- 6 Sato T, et al. Yakugaku Zasshi, 1985, 105(12): 1131
- 7 Kimura Y, et al. Plant Med, 1987, 53: 148
- 8 Imakura Y, et al. Phytochemistry, 1985, 24: 139

(1992-08-18 收稿
1993-01-10 修回)