

常山碱盐灌胃给药抗疟药效及急性毒性

李健^{1,2}, 杜江¹, 马丽娜^{2,3*}, 代宝强², 李春², 杨依霏², 李思迪², 张广平², 叶祖光^{2*}

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
3. 中国中医科学院 博士后科研流动站, 北京 100700)

[摘要] 目的:研究常山碱盐(dichroa alkali salt, DAS)抗疟药效及急性毒性作用,了解DAS作为抗疟药的成药性。方法:采用腹腔接种伯氏疟原虫制备鼠疟感染模型,进行体内抗疟药效评价(灌胃给药,每天1次,连续4d),动态采集尾静脉血,涂片并吉姆萨染色,镜下观察疟疾小鼠疟原虫的转阴及复燃情况,计算转阴率和复燃率,并计算半数有效剂量(50% effective dose, ED₅₀)。采用ICR小鼠对DAS进行急性毒性实验,观察小鼠一般状态,腹泻及死亡情况,计算半数腹泻剂量(50% diarrhea dose, DD₅₀)和半数致死剂量(50% lethal dose, LD₅₀),苏木精-伊红(HE)染色观察主要脏器的组织病理学变化。结果:鼠疟体内实验发现,DAS在较低剂量即可使感染小鼠全部转阴,但不能有效抗复燃,ED₅₀为0.6 mg·kg⁻¹,95%置信区间为0.5~0.7 mg·kg⁻¹。小鼠急性毒性研究发现,给予DAS后,动物活动减少、行为倦怠,毛色无光、畏冷、进食、饮水欠佳,轻者腹泻、重者便血甚至死亡;DD₅₀为7.9 mg·kg⁻¹,95%置信区间为6.3~10.0 mg·kg⁻¹,LD₅₀为10.8 mg·kg⁻¹,95%置信区间为8.5~13.8 mg·kg⁻¹;大体解剖发现,给药组小鼠胃明显膨大,脾脏、盲肠萎缩,肠道内容物呈泔水样变化;HE染色发现不同剂量组肝脏、脾脏、胃和盲肠出现了不同程度的病理组织学损伤。以DD₅₀和LD₅₀为指标,计算DAS的治疗指数(therapeutic index, TI)分别为13.17,18.00。结论:DAS在较低剂量即可使感染疟原虫的模型小鼠全部转阴,但是毒性大,安全窗窄。

[关键词] 常山碱盐; 抗疟药效; 急性毒性; 治疗指数

[中图分类号] R22;R242;R285.5;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0141-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181213

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180327.1305.009.html>

[网络出版时间] 2018-03-27 13:59

Anti-malarial Efficacy and Acute Toxicity of Dichroa Alkali Salt by Intragastric Administration

LI Jian^{1,2}, DU Jiang¹, MA Li-na^{2,3*}, DAI Bao-qiang², LI Chun², YANG Yi-fei²,
LI Si-di², ZHANG Guang-ping², YE Zu-guang^{2*}

(1. Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China; 3. Post-doctoral Scientific Research Center, China
Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To understand the druggability of dichroa alkali salt (DAS) as an antimalarial drug by investigating its antimalarial efficacy and toxicity characteristics. **Method:** The animal models of malaria were established by inoculating strains of the parasite in an antimalarial experiment *in vivo*. The model mice received drugs by intragastric administration, once daily, for 4 d. Blood from the caudal vein was dynamically collected for blood smear. Giemsa staining assay was used to observe the negative conversion and revival of parasite

[收稿日期] 20171221(004)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09501004-003-002);北京市自然科学基金项目(7174327)

[第一作者] 李健,硕士,从事中药药理与毒理学研究,E-mail: yinyue56@126.com

[通信作者] * 叶祖光,研究员,从事中药药理与毒理学研究,Tel: 010-84252805,E-mail: yezuguang@sina.com;

* 马丽娜,博士,助理研究员,从事中药药理与毒理学研究,E-mail: malina8512@163.com

under a microscope in each group. Finally, negative conversion ratio, anti-revival ratio, and 50% effective dose (ED_{50}) were calculated. ICR mice were used to study the acute toxicity of DAS, observe their general state, diarrhea and death. 50% diarrhea dose (DD_{50}) and 50% lethal dose (LD_{50}) were calculated, while hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes of the main organs. **Result:** The antimalarial experimental results showed that DAS was effective in antimalarial treatment at a lower dose, with an ED_{50} of $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and a 95% confidence interval of 0.5 to $0.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, but no obvious effect was observed in anti-revival. The acute toxicity experiment of mice showed that after DAS was given, the mice activities were decreased, the behavior was sluggish, and the hair color was dull; the mice were in fear of cold, with poor food and water intake. Diarrhea was found in the mice with mild toxic degree, and hematochezia and death were even found in those with severe toxic degree; DD_{50} was $7.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, with 95% confidence interval of 6.3-10.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; LD_{50} was $10.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, with 95% confidence interval of 8.5-13.8 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The general anatomy results showed that the stomach of mice in treatment group was obviously extended, with atrophy in spleen and cecum, and swill like changes in intestinal contents. HE staining showed that the liver, spleen, stomach and cecum had different degrees of histopathological injury. With DD_{50} and LD_{50} as the indicators, the therapeutic index (TI) of DAS was calculated as 13.17 and 18.00 respectively. **Conclusion:** DAS is effective but toxic for malaria at an even lower dose, with narrow safe dose window.

[**Key words**] dichroa alkali salt; antimalarial action; acute toxicity; therapeutic index

疟疾一直以来是全球关注的重要公共卫生问题。据世界卫生组织《2017年世界疟疾报告》显示,2016年全球疟疾病例数比2015年增加了500万,死亡数量约为44万,与前一年类似。这意味着全球疟疾防控工作有所停滞。尤其令人担忧的是人恶性疟不仅对一线用药氯喹等喹啉类抗疟药产生了耐药性,而且对目前常用的青蒿素类抗疟药亦出现了耐药病例报道。因此,亟需研发结构新颖的新一代抗疟药物。

常山为虎耳草科植物常山 *Dichroa febrifuga* 的干燥根,性味苦、辛、寒,功能截疟、祛痰,《神农本草经》记载:“主伤寒寒热、温疟鬼毒、胸中痰结、吐逆”,《药性本草》曰:“治诸疟,吐痰涎。”传统临床常用于治疗寒热往来之间日疟、恶性疟、新旧疟等各种疟疾及老痰积饮等证。现代研究亦证实,常山具有抗阿米巴原虫、抗钩端螺旋体、抗病毒、抗肿瘤、抗心律失常、降压、催吐以及兴奋子宫平滑肌等多种药理作用,临床上主要用于治疗疟疾、鸡球虫、蓝氏贾第鞭毛虫病等寄生虫类疾病^[1-4]。但是由于其毒副作用较大,且常山致胃肠道毒性的机制尚不明确^[5],严重制约了常山的成药性发展。

早在1960年代,老一辈药理学家张昌绍先生和化学家赵承嘏先生已经对常山抗疟的有效成分及药理作用进行了较系统的研究^[6-9],分离出了常山抗疟的有效成分常山碱,但是囿于其严重的毒副作用,至今仍未成药。课题组在前期研究中,发现常山碱

在水溶液中不稳定,因此在结构优化的基础上,对化学性质更稳定的常山碱盐(DAS),试图从抗疟药效和急性毒性两方面,系统研究常山抗疟有效成分的毒效情况,了解常山抗疟作用特点及毒性特征,明确其安全范围,为后期常山药材的进一步开发利用提供参考。

1 材料

1.1 药物 常山药材购自禹州中药材市场,经中国中医科学院中药研究所叶祖光研究员鉴定为虎耳草科植物常山 *D. ferifuga* 的干燥根。常山碱盐制备,常山药材,70%乙醇回流提取,三氯甲烷萃取,浸膏经反复硅胶柱色谱,得常山总碱,之后溶于无水乙醇,通入盐酸气体得沉淀物,重结晶后得常山碱盐样品,纯度 > 98%。

1.2 动物 SPF级昆明种小鼠,雌雄各半,体质量18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2012-0001。SPF级ICR小鼠,雌雄各半,体质量18~22 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2014-0006。饲养于中国中医科学院中药研究所SPF动物房,屏障系统,人工光照,12 h明暗周期,温度控制在20~26℃,相对湿度控制在40%~70%,换气次数不少于15次/h。适应环境3 d后开始实验。研究方案符合中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会批准(编号20162009)。

1.3 试剂 萨基姆染液(珠海贝索公司,批号

416016); 甲醇(国药集团北京化学试剂有限公司, 批号 T20140224, 分析纯); 香柏油(国药集团有限公司, 批号 20140915); 甲醛、乙醇、二甲苯(北京化工厂, 批号分别为 20160410, 20160617, 20161816); 苏木精-伊红染液(雷根生物有限公司, 批号 1027B16); 生理盐水(山东华鲁制药有限公司, 批号 13116040408)。

1.4 仪器 XS105DU 型分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司), CT06037 型涡旋混合器(美国赛洛捷克公司), LYMPUSBX51 型显微镜(日本 Olympus 公司), MICROM HMS740 型全自动染色机(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 DAS 抗疟药效实验

2.1.1 疟原虫模型制备 眼眶静脉丛采集感染伯氏疟原虫 *Plasmodium berghei* 的昆明小鼠血液, 用生理盐水配制成每 1 mL 含 5 000 万个感染疟原虫红细胞的接种溶液; 每只小鼠腹腔接种 0.2 mL, 制备小鼠疟原虫感染模型^[10]。

2.1.2 抗疟药效实验 DAS 抗疟实验分为模型组, DAS (0.47, 0.59, 0.74, 0.92, 1.15, 1.44, 1.80 mg·kg⁻¹) 组, 每组 10 只。采用 Peter² 4 d 给药法进行抗疟药效评价^[11]。具体操作流程, 接种小鼠, 当日按体质量随机分组, 灌胃给药, 每日 1 次, 连续 4 d, 模型组给予等体积蒸馏水, 给药体积 20 mL·kg⁻¹, 末次给药后 24 h 尾部取血、涂片、吉姆萨染色, 镜下观察各组疟原虫的转阴及复燃情况, 计算转阴率及抗复燃率。

2.2 DAS 急性毒性实验 ICR 小鼠, 雌雄各半, 按体质量随机分为 7 组, 每组 10 只, 分别为正常组, DAS 4.88, 5.74, 6.75, 7.95, 9.35, 11.0 mg·kg⁻¹ 组, 单次灌胃给药, 给药前禁食 14 h, 给药体积 20 mL·kg⁻¹, 正常组给予等体积蒸馏水。实验过程中为方便观察小鼠腹泻情况, 把小鼠置于垫有滤纸的鼠笼内, 每天观察并记录小鼠的毛色、精神、腹泻、及死亡情况, 连续 14 d, 分别计算小鼠的半数腹泻剂量 (DD₅₀) 和半数致死剂量 (LD₅₀)。实验过程中, 对于死亡小鼠, 立刻进行大体解剖, 并对异常器官进行组织病理学染色观察; 实验结束后, 处死全部小鼠, 迅速摘取肝、胃、小肠和大肠等组织, 肉眼观察各组组织器官的形态变化, 并进行组织病理染色观察。以 DD₅₀/ED₅₀ 或 LD₅₀/ED₅₀ 计算治疗指数 (TI)。

2.3 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 20.0 软件对各组数据进行单因素方差分析,

进行组间比较; 采用 Bliss 法计算被测物的 ED₅₀, DD₅₀, LD₅₀ 及 95% 置信区间^[12]。以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

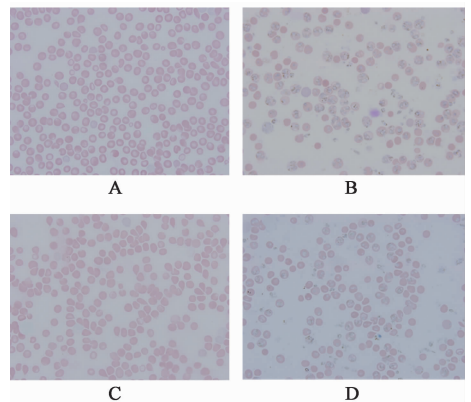
3 结果

3.1 DAS 抗疟药效 DAS 连续 4 d 灌胃, 抗疟作用呈明显剂量依赖关系, 随着 DAS 给药剂量增加, 小鼠疟原虫转阴率逐渐增加。在 DAS 1.44 mg·kg⁻¹ 时疟原虫转阴率即达到 100%, 采用 Bliss 法计算半数转阴率 ED₅₀ 为 0.6 mg·kg⁻¹, 95% 置信区间为 0.5 ~ 0.7 mg·kg⁻¹。见表 1。虽然 DAS 在较低剂量即可使感染疟原虫的小鼠全部转阴, 但是在实验剂量范围内未见明显抗复燃效果。见图 1。

表 1 DAS 连续 4 d 灌胃对小鼠抗疟药效的影响

Table 1 Antimalarial effects of DAS on mouse by gavage for four days %

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | 转阴率 | 抗复燃率 |
|-----|------------------------|-----|------|
| 空白 | - | 0 | 0 |
| DAS | 0.47 | 20 | 0 |
| | 0.59 | 50 | 0 |
| | 0.74 | 70 | 0 |
| | 0.92 | 80 | 0 |
| | 1.15 | 80 | 0 |
| | 1.44 | 100 | 0 |
| | 1.80 | 100 | 0 |



A. 正常组; B. 模型组; C. 转阴组; D. 复燃组

图 1 DAS 连续 4 d 灌胃给药对小鼠抗疟作用的影响 (MGG, ×1 000)

Fig. 1 Antimalarial effects of DAS on mouse by gavage for four days (MGG, ×1 000)

3.2 DAS 对小鼠急性毒性的影响

3.2.1 一般状态观察 在 14 d 实验期间, 空白组小鼠活泼好动, 毛色光亮, 进食饮水均正常, 未见

粪尿的异常改变。DAS 给药组,不同剂量组动物均出现活动减少、行为倦怠,毛色无光、稀松、掉毛,畏冷、蜷缩成团,腹泻,进食、饮水欠佳,严重者可见便血及后肢抽搐、站立不稳。

3.2.2 体质量变化 与空白组比较,DAS 给药组雌性和雄性小鼠体质量,药后均出现明显下降,小鼠体质量在药后第 1 天下降最为明显 ($P < 0.01$),在药后第 3 天体质量有所恢复,但是 DAS 7.95 ~ 9.35 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组小鼠体质量仍有明显差异 ($P < 0.05$)。见表 2,3。随着时间的延迟,给药组未死亡

小鼠各不良体征呈好转趋势,体质量逐渐恢复正常、精神好转、毛发渐恢复光泽,腹泻现象亦消失。

3.2.3 腹泻现象 不同剂量 DAS 给药组小鼠在药后 2 ~ 4 h 相继出现不同程度的水样腹泻现象,在药后第 1 天小鼠腹泻率及腹泻程度均达高峰,随后逐渐减轻,药后第 3 天仅见高剂量组小鼠出现轻度腹泻(表 4),观察发现腹泻严重的小鼠,后期会出现便血现象,随之死亡。采用 Bliss 法计算 DAS 给药后 DD_{50} 为 7.9 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,95% 置信区间为 6.3 ~ 10.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

表 2 DAS 单次灌胃给药对雄性小鼠急性毒性体质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of DAS by single gavage on acute toxicity body mass in male mice($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 给药当天 | 药后 1 d | 3 d | 5 d | 7 d | 11 d | 14 d |
|-----|--------------------------------------|--------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 空白 | - | 19.70 ± 0.52 | 23.14 ± 0.70 | 26.14 ± 0.99 | 28.86 ± 1.00 | 32.04 ± 1.14 | 35.30 ± 1.23 | 38.02 ± 1.88 |
| DAS | 4.88 | 19.82 ± 1.16 | 18.46 ± 1.17 ²⁾ | 25.14 ± 1.99 | 29.08 ± 1.90 | 30.84 ± 2.01 | 35.70 ± 1.98 | 37.82 ± 1.99 |
| | 5.74 | 19.86 ± 0.89 | 18.74 ± 0.79 ²⁾ | 23.40 ± 4.28 | 25.65 ± 5.59 | 27.94 ± 6.59 | 35.63 ± 2.95 | 39.08 ± 2.38 |
| | 6.75 | 19.74 ± 1.04 | 18.16 ± 0.86 ²⁾ | 22.48 ± 2.62 | 26.62 ± 2.32 | 30.82 ± 2.04 | 35.20 ± 1.6 | 38.42 ± 2.01 |
| | 7.95 | 19.82 ± 1.26 | 18.10 ± 0.71 ²⁾ | 19.52 ± 3.07 ¹⁾ | 23.70 ± 4.46 ³⁾ | 26.85 ± 3.81 | 32.28 ± 3.15 | 35.30 ± 3.05 |
| | 9.35 | 19.82 ± 0.89 | 17.65 ± 0.83 ²⁾ | 18.03 ± 3.83 ^{2,4)} | 26.00 ± 2.26 | 29.15 ± 2.76 | 33.80 ± 5.23 | 36.95 ± 4.6 |
| | 11.00 | 20.04 ± 1.02 | 17.90 ± 0.57 ²⁾ | 24.60 ⁵⁾ | 26.5 ⁵⁾ | 27.8 ⁵⁾ | 31.3 ⁵⁾ | 35.5 ⁵⁾ |

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;³⁾ . $n = 4$;⁴⁾ . $n = 3$;⁵⁾ . $n \leq 3$,未进行统计分析(表 3 同)。

表 3 DAS 单次灌胃给药对雌性小鼠急性毒性体质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of DAS by single gavage on acute toxicity body mass in female mice($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 给药当天 | 药后 1 d | 3 d | 5 d | 7 d | 11 d | 14 d |
|-----|--------------------------------------|--------------|----------------------------|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 空白 | - | 18.34 ± 0.54 | 21.08 ± 0.83 | 23.56 ± 0.77 | 25.98 ± 0.80 | 27.44 ± 1.05 | 29.96 ± 1.20 | 32.34 ± 1.25 |
| DAS | 4.88 | 18.18 ± 0.73 | 17.52 ± 0.73 ²⁾ | 23.54 ± 2.88 | 26.62 ± 2.73 | 27.80 ± 2.37 | 31.58 ± 3.01 | 32.90 ± 2.36 |
| | 5.74 | 18.08 ± 0.79 | 17.28 ± 1.00 ²⁾ | 21.20 ± 3.48 | 25.30 ± 2.29 | 27.56 ± 1.24 | 30.06 ± 1.43 | 31.08 ± 1.71 |
| | 6.75 | 18.24 ± 1.14 | 17.06 ± 1.03 ²⁾ | 18.62 ± 3.08 ³⁾ | 24.58 ± 1.34 | 26.38 ± 0.68 | 28.93 ± 1.34 | 29.38 ± 1.33 |
| | 7.95 | 18.06 ± 1.00 | 17.18 ± 1.16 ²⁾ | 17.73 ± 3.04 ^{2,3)} | 23.58 ± 2.41 | 26.58 ± 1.34 | 29.53 ± 1.71 | 31.43 ± 1.48 |
| | 9.35 | 18.38 ± 1.26 | 17.58 ± 1.15 ²⁾ | 17.68 ± 3.15 ^{2,3)} | 21.93 ± 3.61 | 24.33 ± 1.54 | 28.25 ± 2.31 | 30.20 ± 2.02 |
| | 11.00 | 18.20 ± 0.88 | 17.00 ± 0.93 ²⁾ | 17.28 ± 3.05 ^{2,3)} | 23.85 ± 2.05 | 25.70 ± 2.69 | 28.60 ± 3.11 | 30.55 ± 2.76 |

3.2.4 死亡情况 DAS 不同剂量组小鼠随着腹泻率的增加,死亡率也逐渐增加。给药后第 2 天小鼠开始出现死亡情况,比腹泻现象滞后 1 d,DAS 11 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组小鼠死亡主要集中在药后第 2,3 天,其他组在药后第 3 天达到死亡高峰,随后死亡率显著下降(表 5)。解剖发现,与空白组相比,DAS 不同剂量组小鼠胃膨大且内容物未见消化,但胃以下肠道内容物呈稀泔水样;肠道分别出现不同程度的水肿、充血,严重者出现黏膜损伤及出血点;肉眼可见脾和盲肠明显萎缩、肝脏和肾脏呈土黄色。采用 Bliss 法计算,DAS 给药后 LD_{50} 为 10.8 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,95% 置信区间为 8.5 ~ 13.8 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

束后小鼠主要脏器的组织病理观察,发现 DAS 给药组,心、肾、肺、十二指肠、空肠和结肠未见明显组织病理损伤,但是不同剂量组肝脏、脾脏、胃和盲肠出现了明显病理变化(图 2)。与空白组比较,DAS 给药组小鼠肝脏出现肝细胞肿胀、变性,胞浆淡染、稀疏,细胞核大小不一,染色质紧贴核膜;小鼠脾脏出现脾小体中度萎缩,红髓髓索细胞成分减少;小鼠胃损伤主要在前胃,可见前胃黏膜中度到重度萎缩、变薄、坏死灶形成;小鼠盲肠出现明显萎缩,镜检发现盲肠黏膜表面坏死脱落,出现小溃疡,溃疡表面坏死炎症发生。

3.3 治疗指数计算 治疗指数反映药物的安全性,其比值越大,安全性越高,以感染疟原虫小鼠的转阴

表 4 DAS 单次灌胃对小鼠腹泻的影响

Table 4 Effect of DAS by single gavage on diarrhea in mice

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | 药后 1 d /例 | 2 d /例 | 3 d /例 | 4 d /例 | 5 d /例 | 腹泻率 /% |
|-----|----------------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 空白 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4.88 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| DAS | 5.74 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 |
| | 6.75 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 50 |
| | 7.95 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 |
| | 9.35 | 3 | 1 | 2 | 0 | 0 | 60 |
| | 11.00 | 4 | 3 | 1 | 0 | 0 | 80 |

注: n = 10, 雌雄各半, 连续观察 14 d (表 5 同); 仅记录当天新发生腹泻的动物只数。

表 5 DAS 单次灌胃给药小鼠死亡情况

Table 5 Effect of DAS by single gavage on death in mice

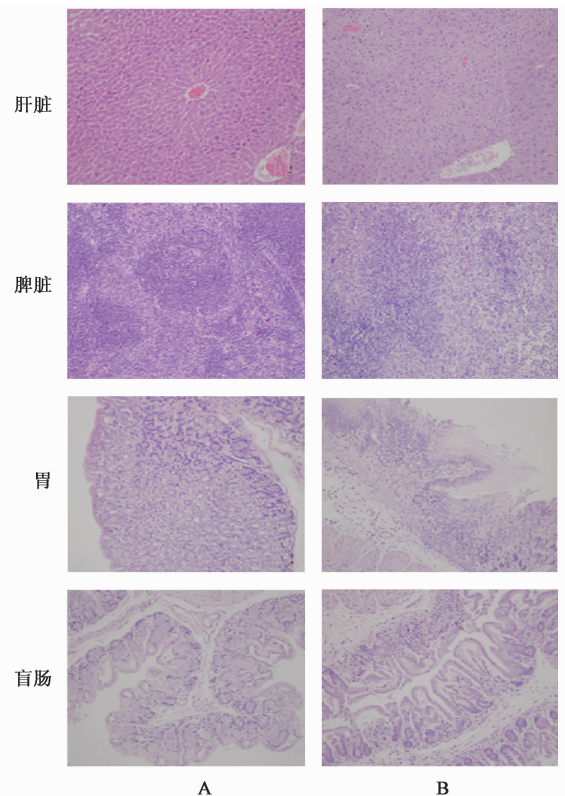
| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | 药后 1 d /例 | 2 d /例 | 3 d /例 | 4 d /例 | 5 d /例 | 9 d /例 | 死亡率 /% |
|-----|----------------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 空白 | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DAS | 4.88 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5.74 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 20 |
| | 6.75 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| | 7.95 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 20 |
| | 9.35 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 40 |
| | 11.00 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 70 |

率作为 DAS 抗疟药效指标计算 DAS 的 ED₅₀, 以腹泻率和死亡率为指标分别计算 DAS 的半数中毒剂量和半数死亡剂量, 则 DAS 的治疗指数分别以腹泻率为指标计算, DD₅₀/ED₅₀ = 7.9/0.6 = 13.17, 以死亡率为指标计算, LD₅₀/ED₅₀ = 10.8/0.6 = 18.00。

4 讨论

近年来随着青蒿素类抗疟药耐药病例的报道, 亟需开发新一代结构迥异的抗疟药, 而常山碱正是结构完全不同于青蒿素类过氧化物的喹啉酮类化合物, 且其抗疟药效明确, 非常值得开发。因此, 本课题组在前人工作基础上, 再次系统评价了常山碱的抗疟药效, 发现常山碱在水溶液中不稳定, 因此本课题组通过成盐的方式, 在保证其化学稳定性的同时, 对其抗疟药效和毒性作用, 进行了系统考察, 以了解 DAS 的成药性, 为其进一步研究指明方向。

采用小鼠伯氏疟原虫体内模型, 研究发现 DAS 半数转阴率为 0.6 mg·kg⁻¹。从转阴剂量来看, 常山抗疟的有效剂量低于青蒿素和奎宁类化合物^[13-14]。且有报道证明常山提取物对抗氯喹株鼠疟原虫和人恶性疟原虫均有明显效果^[15], 提示常山有进一步开发成药的价值。研究发现虽然小剂量



A. 空白组; B. DAS 组

图 2 DAS 单次灌胃给药对小鼠不同组织损伤的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of DAS by single gavage on different tissue injuries of mice (HE, ×200)

DAS 即可使感染疟原虫的小鼠转阴, 但是却不能有效抗复燃。给予 DAS 转阴后的小鼠在 1 周内即出现复燃现象, 2 周后转阴小鼠全部复燃, 这可能是由于 DAS 半衰期短, 消除快, 使其在体内作用时间短, 从而不能有效抗复燃。另一方面, 由于 DAS 安全窗窄、毒性大, 不能像青蒿素类化合物一样, 通过增大给药剂量发挥其抗复燃作用^[16-17]。基于此, 课题组后期将结合 DAS 药代动力学特点, 拟采用脂质体、微乳等缓控释技术, 减慢 DAS 体内释放速率, 延缓体内有效浓度持续作用时间, 以期实现增效减毒的目的。

通过急性毒性实验研究, 发现 DAS 的毒性特点主要有①药后小鼠腹鼓如球, 剖检发现, 与正常组比, 给药组小鼠普遍出现胃膨大现象, 提示 DAS 可能对胃功能有损伤, 延迟了胃排空, 病理组织观察发现小鼠前胃黏膜出现不同程度损伤、甚至坏死, 这可能是造成其胃膨大的主要原因。②给药小鼠胃内容物正常, 但是整个肠道内容物呈稀泔水样; 肉眼可见盲肠严重萎缩, 病理观察发现盲肠黏膜表面坏死脱落, 出现小溃疡, 溃疡表面坏死炎症发生, 但未见其他肠段有明显的病理组织学变化。文献调研发现,

毒性物质可直接作用于肠道黏膜,或通过血液循环作用于肠嗜铬细胞使其释放神经递质,作用于腹腔迷走传入神经末梢的相关受体,从而引起呕吐^[18]。在迷走背核复合体中存在大量可能在呕吐机制中扮演重要角色的神经递质受体,如神经激肽-1 受体^[19],5-羟色胺 3 受体^[20],多巴胺受体^[21],可分别与相应神经递质结合,刺激迷走神经,最终作用于呕吐中枢,从而引起呕吐或腹泻现象。结合张昌绍前辈课题组鸽子和犬手术模型实验结果^[8-9],提示 DAS 可能是通过直接刺激肠道嗜铬细胞,分泌神经递质,诱发的呕吐现象,但是具体的作用机制还需进一步研究证实。③给药组小鼠,随着给药剂量增加,腹泻程度和腹泻率随之增加,死亡情况滞后于腹泻情况且随着腹泻率增加而增加。观察发现给药后小鼠先出现腹泻情况,严重者出现便血现象,随后死亡,但是具体致死原因还有待进一步探究。

治疗指数是评价药物成药性的一个重要指标。治疗指数越大,表示有效剂量与中毒剂量间距越大,越安全。DAS 的治疗指数小,安全窗窄,是限制其临床广泛使用和制约其开发应用的一个重要原因。前人研究发现常山碱的呕吐机制跟单纯中枢性催吐药阿扑吗啡和物理刺激性硫酸铜呕吐机制均不完全一样^[6-7],但是直到现在其呕吐机制仍不甚明了,其呕吐副作用仍未完全克服。本研究中通过小鼠急性毒性实验发现,DAS 不仅具有呕吐、腹泻等副作用,还有其他毒性症状,但是这些症状是原发性的,还是继发性的,尚未知晓,后期拟结合毒代动力学对其组织分布特点及代谢产物进行分析,同时借助细胞生物学和分子生物学手段,针对不同系统的损伤特点,从分子、细胞、器官和整体动物水平对其毒理机制进行深入系统的研究,以期明确 DAS 引发呕吐的作用机制及致死的原因,从而针对性地拮抗其毒性作用,为常山成药性开发提供科学依据。

[参考文献]

[1] 张昌绍,周廷冲. 国产抗疟药材之研究(一)常山(临床实验报告)[J]. 上海中医药杂志,1955(8):29.
[2] 程学铭,张伯镛. 常山初步临床研究报告(一)常山治疗初步研究报告[R]. 北京:中央政治学校特效药研究所,1945:41-45.
[3] 陈方之,熊俊英,朱祖慈. 常山初步临床研究报告(二)常山治疗初步研究报告[R]. 北京:中央政治学校特效药研究所,1945:47-106.
[4] 王进英,傅丰永,张昌绍. 国产抗疟药常山之研究(初步报告二)化学治疗实验[J]. 中华医学杂志,1945

(31):159-174.
[5] 高淦纹. 有毒中药临床精要[M]. 北京:学苑出版社,2000:196-198.
[6] 赵承瑕,张昌绍,傅丰永,等. 常山之抗疟成分—常山碱[J]. 科学,1947,29(2):49.
[7] Henderson F G, Rose C L, Harris P N, et al. Gamma-dichroine, the antimalarial alkaloid of chang shan [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1949, 95(2): 191-200.
[8] 江文德,张昌绍,杨藻宸. 常山碱催吐作用的研究—I. 常山碱对鸽催吐作用的机制[J]. 上海第一医学院学报,1957(3):253-258.
[9] 江文德. 常山碱对狗催吐作用的机制[J]. 生理学报,1961,24(Z1):180-186.
[10] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,1991:1317.
[11] Peters W. Drug resistance in plasmodium berghei vinckeet lips, 1948 Chloroquine resistance [J]. Experiment Parasitol, 1965, 17(1): 80-89.
[12] 熊浩明,魏柏青,魏荣杰等. 用 SPSS 软件计算鼠疫菌半数致死量(LD₅₀)[J]. 中国人兽共患病杂志学报,2013,29(11):1127-1130.
[13] 中医研究院中药研究所药理研究室. 青蒿的药理研究[J]. 新医药学杂志,1979(1):23-33.
[14] China cooperative research group on Qinghaosu and its derivatives as antimalarials. Antimalarial efficacy and mode of action of Qinghaosu and its derivatives in experimental models[J]. J Tradit Chinese Med, 1982, 2(1): 17-24.
[15] 赵灿熙. 常山提取物对氯喹敏感株和抗氯喹株鼠疫原虫的效应观察[J]. 同济医科大学学报,1986(2):129-132.
[16] 叶祖光. 青蒿素类抗疟药研究二十年[J]. 国外医学·中医中药分册,1995,17(5):3-7.
[17] 薛宝云,叶祖光,戴宝强,等. 青蒿素与磺胺类药物合并用药抗疟作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,1998,4(3):19-21.
[18] Kovac A L. Mechanisms of nausea and vomiting [M]. New York:Cambridge University Press, 2016: 13.
[19] Saito R, Takano Y, Kamiya H. Roles of substance P and NK1 receptor in the brainstem in the development of emesis[J]. J Pharmacol Sci, 2003, 91(2): 87-94.
[20] Gan T J. Selective serotonin 5-HT₃ receptor antagonists for postoperative nausea and vomiting: are they all the same? [J]. CNS Drugs, 2005, 19(3): 225-238.
[21] Sharkey K A, Cristino L, Oland L D, et al. Arvanil, anandamide and N-arachidonoyl-dopamine (NADA) inhibit emesis through cannabinoid CB1 and vanilloid TRPV1 receptors in the ferret [J]. Eur J Neurosci, 2007, 25(9): 2773-2782.

[责任编辑 张丰丰]