

青蒿总香豆素抗热应激作用及其机理的研究

闫 寒¹, 李爱媛², 赵 一², 林启云², 李沧海¹

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700; 2. 广西中医学院, 广西 南宁 530001)

[摘要] 目的: 研究青蒿抗热应激作用及其机理。方法: 利用高温高湿环境造成家兔热应激模型, 观察青蒿总香豆素对家兔肛温上升及血液、肺组织磷脂酶 A₂ 活性和循环内皮细胞数目的变化, 并测定其对脑、心脏、肾组织钠泵活性及小鼠抗脑缺氧能力的影响。结果: 青蒿总香豆素可明显降低热应激家兔体温上升速度, 并伴随血清、肺组织磷脂酶 A₂ 活性降低, 循环内皮细胞减少, 显著抑制脑、心、肾组织钠泵活性, 延长断头小鼠张口喘气时间几近 1 倍。结论: 香豆素部位可能是青蒿祛暑功效的活性成分群之一。

[关键词] 黄花蒿; 香豆素; 热应激; 磷脂酶 A₂; 钠泵; 循环内皮细胞

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)12-0098-03

Studies on Anti-heat-stress Activity and Its Mechanisms of Total Coumarins from *Artemisia annua*

YAN Han¹, LI Ai-yuan², ZHAO Yi², LIN Qi-yun², LI Cang-hai^{1*}

(1. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the Anti-heat-stress activity and related mechanisms of total coumarins(TCs) from *Artemisia annua*. **Methods:** Heat stress rabbit model caused by high temperature and high humidity was used and rectal temperature (Tr) responses, PLA₂ activity in blood and lung, circulating endothelial cells (CECs) were measured, moreover, Na⁺, K⁺-ATPase activity in brain, kidney and heart in rabbits was assayed, gasping time after decapitation in mice was observed after treatment of total coumarins(TCs) from *Artemisia annua*. **Results:** Administration of TCs reduced the rise of rectal temperature and CECs in heat stress rabbits, inhibited the activity of the PLA₂ and Na⁺, K⁺-ATPase, increased the gasping time in mice. **Conclusion:** Coumarins are one of anti-heat-stress active fractions in *Artemisia annua*.

[Key words] *Artemisia annua* L.; coumarins; heat stress; phosphatidase A₂; Na⁺, K⁺-ATPase; Circulating endothelial cells

青蒿(Herba Artemisiae Annuae), 味苦性寒, “专解骨蒸劳热, 尤能泄暑热之火”, 为中医清虚热去暑

热常用中药。然而关于其清热祛暑的有效成分尚不清楚, 相关机理研究报道也很少。我们课题组在发现青蒿总香豆素及其中成分葑蓉亭具有解热作用后^[1-2], 又研究了青蒿总香豆素对热应激动物模型体温的影响, 并分析了其作用机制, 现报道如下。

1 材料

1.1 动物 日本大耳白家兔(2.5±0.5) kg, 雌雄兼用; 雄性 KM 小鼠(20±2) g, 均由广西中医学院实验动物中心提供, 合格证号: 桂医动字第 11004 号。

[收稿日期] 2009-08-21

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划项目
(2006CB504701); 北京市自然科学基金
(7073094)

[通讯作者] * 李沧海, Tel: (010) 64014411-2228; E-mail: leechhn@yahoo.com.cn

环境及实验操作适应、防污染措施参考文献进行^[3]。

1.2 药物与试剂 青蒿总香豆素(total coumarins, TCs)提取、制剂配制参见文献^[2]; Ouabain、BSA、Tris-HCl 为 Serva 产品; ADP Na₂、ATPN₂ 为 Sigma 产品; 脱氧胆酸钠为 Fluka 产品; 其他试剂均为市售分析纯。

1.3 主要仪器 RY-A 型热原测试仪(四川省绵阳医用电子仪器厂); 721 型分光光度仪(上海第三分析仪器厂); BH-2 型显微镜(日本 Olympus 产品); 761 电热恒温恒湿培养箱(南宁市医疗器械修配厂); YQ-3 型电动匀浆机(江苏省江阴周庄科研器械厂); TGL 16G 型高速离心机(上海医用分析仪器厂)。

2 方法

2.1 热应激家兔模型分组及给药 参考文献复制家兔热射病病理模型^[4], 简述之, 32 只家兔按体重、基础体温均分至 4 组, 分别为正常组(Ctr)、模型组(HS)、总香豆素小剂量组(30 mg·kg⁻¹, TCs-l)和大剂量组(60 mg·kg⁻¹, TCs-h), HS、TCs-l 和 TCs-h 3 组动物在 ip 药物或溶媒后, 置于恒温恒湿箱中, 干球温度(40.0±0.5)℃, 湿球温度(34±0.5)℃, 而 Ctr 组置于正常温湿条件, 其他操作同 HS 组, 以热原仪测定肛温, 待热应激动物体温升至 42℃后维持至 80 min, 3% 戊巴比妥钠 iv 麻醉, 心脏穿刺取血分装(3 mL 静置离心分离血清进行 PLA₂ 活性测定, 4.5 mL 加入 0.5 mL 3.8% 枸橼酸钠抗凝用于循环内皮细胞计数)^[5-6], 同时取右肺中叶, 测定 PLA₂ 活性。

2.2 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性测定 参照文献进行^[5]。

2.3 小鼠耐缺氧实验 参照文献进行试验^[7]。

2.4 统计学处理 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组均数差异比较采用 *t* 检验, 多组均数间差异比较采用 ANOVA。

3 结果

3.1 青蒿总香豆素对热射病模型家兔体温上升的影响 结果见表 1, 家兔在人工高温高湿环境中, 肛温开始缓慢升高, 20 min 后快速上升, 40 min 后上升速度减缓, 青蒿总香豆素小剂量可显著延迟到达 42℃时间(T_{42℃}), 减小肛温上升速度(T_{rr}); 但大剂量虽然也有上述作用, 但较之小剂量作用反而减弱。

3.2 青蒿总香豆素对热应激家兔血清及肺组织 PLA₂ 活性的影响 结果见图 1, 热应激家兔血清及肺组织 PLA₂ 活性均较之正常组显著升高, 青蒿总香豆素大、小剂量组均可显著降低模型家兔血清及肺

组织 PLA₂ 活性。

表 1 热应激家兔肛温到达 42℃平均时间(T_{42℃})及体温上升速度(T_{rr})(n=6)

groups	Dose (mg·kg ⁻¹)	T _{42℃} (min)	T _{rr} (°C·min ⁻¹)
Ctrl	—	38.28±2.98	0.0667±0.0116
TCs(l)	30	63.66±3.56 ¹⁾	0.0374±0.0085 ¹⁾
TCs(h)	60	49.30±1.87 ^{1,2)}	0.0545±0.0106 ^{1,2)}

注: 与 Ctr 组比较¹⁾ P<0.01; 与 TCs(l) 组比较²⁾ P<0.01(下同)

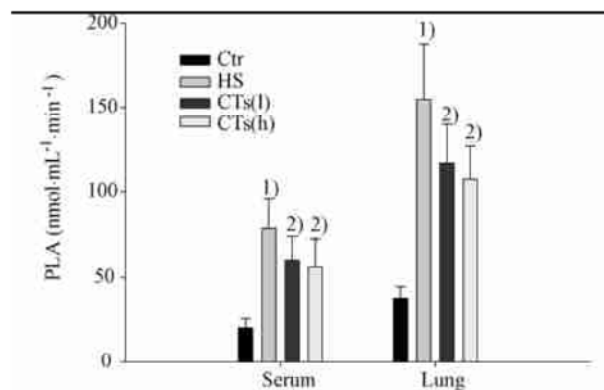


图 1 热应激家兔血清及肺组织中 PLA₂ 活性变化及青蒿总香豆素的影响(n=6)

3.3 青蒿总香豆素对热应激家兔循环内皮细胞数目的影响 结果见表 2, 经 Giemsa 染色可见热应激家兔循环内皮细胞(CEC)数目明显增加, ip 青蒿总香豆素能抑制 CEC 升高, 但大剂量似乎有回升现象。

表 2 青蒿总香豆素对热应激家兔循环内皮细胞数的影响(n=6)

groups	dose(mg·kg ⁻¹)	CEC(cell·0.9 μL ⁻¹)
Ctrl	—	3.19±1.14
HS	—	6.86±2.28 ¹⁾
TCs(l)	30	4.31±1.79 ²⁾
TCs(h)	60	5.24±2.37 ²⁾

3.4 青蒿总香豆素对家兔脑、肾、心脏钠泵活性的影响 结果如图 2 所示, 青蒿总香豆素对家兔脑、肾、心脏钠泵活性均有明显的抑制作用, 且呈剂量依赖。小剂量不如哇巴因, 但大剂量与哇巴因作用强度相当。

3.5 耐急性脑缺氧实验 结果如表 3 所示, 青蒿总香豆素 ip 能非常显著地延长小鼠断头喘气时间(gasping time), 并呈剂量依赖相关, 大剂量组是正常组的 2 倍多。

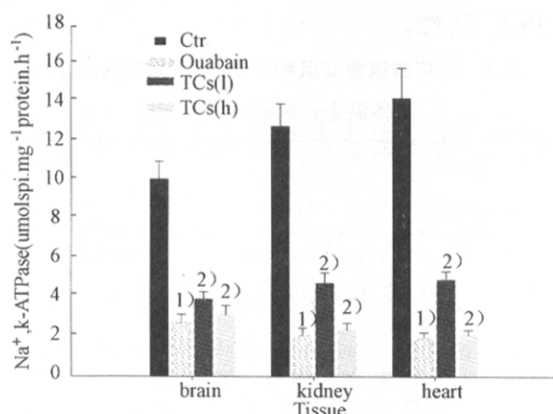


图 2 青蒿总香豆素对家兔脑、肾、心脏钠泵活性的影响 (n = 6)

注:与 Ctr 组比较¹⁾ P < 0.01;与 ouabain 组比较²⁾ P < 0.01

表 3 青蒿总香豆素对小鼠断头张口喘气时间的影响 (n = 10)

groups	dose(mg·kg ⁻¹)	gaspings time(s)
Ctr	—	18.4 ± 1.63
TCs(l)	75	32.13 ± 4.23 ¹⁾
TCs(h)	150	41.71 ± 4.19 ¹⁾²⁾

4 讨论

中暑是急性热疾患(heat illness)的一种,是由于身体热负荷超过机体散热能力,导致机体体温恶性升高,病理机制主要涉及到体温调节失控,肠道内毒素移位(入血)、血中细胞因子水平升高,血管内皮细胞损伤、线粒体损伤及自由基产生增加等,目前除降温外尚无良好的药物治疗方法^[8]。

香豆素类成分具有抗炎、抗凝血、扩张血管、镇静、降温等药理作用^[9],在证实青蒿总香豆素具有解热降温作用后^[1],我们利用家兔热射病模型进行了抗热应激作用及其机理的探索研究,结果显示青蒿总香豆素可以明显延缓高温高湿环境所致家兔肛温快速上升,降低循环血中内皮细胞数目,抑制血中及肺组织磷脂酶 A₂ 的活性,并可明显抑制钠泵活性,显著增强小鼠耐脑缺氧能力。其中降低体温或者抑制体温恶性升高,至今仍然是治疗热射病的首选措施^[8];抑制 PLA₂ 活性不仅可以减轻细胞膜、组织(如血管上皮)以及重要器官(如肺)的损伤,也可从上游抑制炎症介质的合成(如前列腺素和白三烯等)^[10],从循环中内皮细胞显著减少也可从一方面证实该效应,这种药理作用可能正是 PLA₂ 抑制剂阿的平预防中暑的重要机制之一;抑制钠泵活性,可以从减少热

量生成,抑制自由基产生,减轻能量耗竭等方面减缓病情^[11],这也从本实验中青蒿总香豆素可以显著延长断头小鼠张口呼吸次数的结果得到进一步印证。综上所述,青蒿总香豆素可以从多个方面抑制热应激病理发展,无疑可以减轻中暑等热疾患的病情,因此我们初步推断,青蒿内香豆素成分可能是青蒿清热解暑的活性部位之一,这已经被我们组的后续研究结果初步证实^[12]。

【参考文献】

- [1] 宫毓静,闫寒,李爱媛,等.香豆素解热作用及其机理初步研究[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(12):49-52.
- [2] 杨柯,曾春晖.莨菪亭解热作用机理实验研究[J].2006,3(3):24-27.
- [3] 李沧海,霍海如,周军,等.桂枝汤对发热及低体温大鼠下丘脑 15-羟基前列腺素脱氢酶活性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2003,9(1):27-30.
- [4] 张枫桐,甄洪钧,邱仞之,等.家兔热射病的实验研究[J].中国病理生理杂志,1996,12(4):406-410.
- [5] 陈思锋,吴中立.体液和组织 PLA₂ 简便快速测定方法[J].第二军医大学学报,1989,10:254-256.
- [6] 杨映波,王正国,刘怀琼,等.血循环中内皮细胞数量变化意义的初探[J].第三军医大学学报,12(3):209-211.
- [7] 陈奇.中药药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,1988:573.
- [8] Bouchama A, Knochel J P. Heat stroke[J]. N Engl J Med, 346(25): 1978-1988.
- [9] Hoult J R, Paya M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential [J]. Gen. Pharmac, 1996, 27(4): 713-722.
- [10] Roberts G T, Ghebeh H, Chishti M A, et al. Microvascular Injury, Thrombosis, Inflammation, and Apoptosis in the Pathogenesis of Heatstroke: A Study in Baboon Model [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(6): 1130-1136.
- [11] Lin M T, Lin S Z. Cerebral ischemia is the main cause for the onset of heat stroke syndrome in rabbits [J]. Experientia, 1992, 48(3): 225-227.
- [12] 刘建军,杨柯,曾春晖,等.莨菪亭祛暑功效及其机制的实验研究[J].环球中医药,2009,2(1):55-58.