

青蒿总香豆素解热作用及其机理初步研究

宫毓静¹, 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: 研究青蒿总香豆素解热(降温)作用并探讨其作用机理。方法: 从黄花蒿中提取总香豆素, 利用内生致热原性家兔发热模型, 观察青蒿总香豆素对发热家兔体温的影响并测定脑脊液、血清中前列腺素 E₂ (PGE₂)、环单磷酸腺苷(cAMP)水平以及肝脏、腓肠肌钠泵活性。结果: 青蒿总香豆素可以显著降低正常及发热家兔体温, 抑制肝脏、腓肠肌组织钠泵活性, 降低发热家兔血液及脑脊液 PGE₂ 水平, 对血液及脑脊液 cAMP 水平变化无明显影响。结论: 香豆素成分可能是青蒿解热降温的有效部位, 其作用机制与抑制钠泵活性及降低中枢 PGE₂ 水平有关。

[关键词] 黄花蒿; 香豆素; 发热; 前列腺素 E₂; 环单磷酸腺苷; 钠泵

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)12-0049-04

Preliminary Studies on Antipyretic Activity and Its Mechanisms of Total Coumarins from *Artemisia annua*

GONG Yu-ting¹, 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 antipyretic activity and related mechanisms of total coumarins (TCs) from *Artemisia annua*. **Methods:** Total coumarins were extracted from *Artemisia annua* using Späth method, rectal temperature (Tr) responses were observed in both normothermia and fever rabbits induced by endogenous pyrogens after intraperitoneal treatment of TCs, the concentration of cAMP and PGE₂ in either serum or cerebrospinal fluid of fever rabbits was measured by RIA, and Na⁺, K⁺-ATPase activity in liver and gastrocnemius was assayed. **Results:** Administration of TCs reduced Tr in both normothermia and fever rabbits, inhibited the rise of PGE₂ in either serum or cerebrospinal fluid from fever rabbits, decreased the Na⁺, K⁺-ATPase activity in both liver and gastrocnemius. **Conclusion:** Coumarins are antipyretic fraction in *Artemisia annua*, and the inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity and reduction in central PGE₂ level may contribute to this activity.

[Key words] *Artemisia annua* L.; coumarins; fever; PGE₂; cAMP; Na⁺, K⁺-ATPase

青蒿, 具清热、祛暑、除蒸、截疟等功效, 临床上用于治疗阴虚发热, 暑热外感, 疟疾, 湿热黄疸诸

症^[1]。自 20 世纪 60 年代我国学者提取并发现抗疟新药青蒿素以来, 研究多集中在该类成分抗疟抗癌等方面, 其解热作用方面研究相对较少, 鉴于青蒿素类成分并不具有直接的解热作用, 迄今青蒿清热祛暑成分尚不清楚, 作用机理也远未阐明^[2]。进一步研究其解热物质基础和作用机理, 对于指导临床用药以及综合利用青蒿资源均具有重要的意义。根据黄花蒿所含有效部位及其活性特点, 我们提取了青

[收稿日期] 2008-07-21

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

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

蒿总香豆素并进行了解热效用及初步机理探讨, 现报道如下。

1 材料

1.1 动物 日本大耳白家兔(2.5 ± 0.4) kg, 雌雄兼用, 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。实验前适应环境 3 d, 单笼饲养, 自由饮水, 以热源仪测温探头插入直肠 7 cm 测试 3 次取均值作为基础体温(波动超过 0.5 °C 者舍弃), 取基础体温(39.0 ± 0.5) °C 家兔用于实验。防污染措施参照文献^[3]。

1.2 试药 黄花蒿, 采集于南宁市郊青秀山, 经广西中医学院生药室何报作教授鉴定为菊科植物黄花蒿(*Artemisia annua* L.), 阴干, 经 Späth 法提取总香豆素(Total coumarins, TCs, 得率 0.12%), 紫外分光光度法测定含量以茛菪亭计在 91.3% 以上。TCs 以适量醇溶液(醇-丙二醇-甘油, 1:1:1, V:V) 溶解, 加入注射用生理盐水配制成 3% 的溶液(W:V, 其中混合醇体积分数为 15%), 37 °C 温浴备用, 经简化机率单位法测定小鼠 ip LD₅₀ 为(568 ± 156) mg · kg⁻¹; cAMP 及 PGE₂ 放射免疫药盒购自中国医学科学院基础研究所; 复方氨基比林注射液(IAC, 每毫升含氨基比林 50 mg, 安替比林 20 mg, 巴比妥 9 mg) 为广西南宁制药厂生产; 大肠杆菌内毒素(E Coli O₁₁₁ B₄, LPS), 购自中国生物制品检定所; 哇巴因(Ouabain)、PPO, BSA, Tris-HCl 为 Serva 产品, EDTA, ATP Na₂ 为 Sigma 产品, POPOP 为 Fluka 产品, 其他试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器 RY-A 型热原测试仪(四川省绵阳医用电子仪器厂); UV-160A 可见紫外分光光度仪(日本岛津); LSC1 液体闪烁谱仪(英国核电子仪器公司); 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)。

表 1 青蒿总香豆素对正常及发热家兔体温的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 1 Effects of TCs on rectal temperature in normothermia and fever rabbits($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Dose (mg · kg ⁻¹)	ΔT_r at different time point(min/°C)						ΔT_{max} (°C)	TRI _{5.0} (°C · hr)	
		0	30	60	120	180	240			300
Control	—	0.03 ± 0.08	0.14 ± 0.10	0.08 ± 0.07	0.03 ± 0.14	-0.06 ± 0.18	-0.11 ± 0.08	-0.03 ± 0.13	0.18 ± 0.14	-0.08 ± 0.10
CTs-l	30	0.06 ± 0.06	-0.90 ± 0.34 ²⁾	-1.08 ± 0.29 ²⁾	-0.91 ± 0.25 ²⁾	-0.48 ± 0.19 ²⁾	-0.31 ± 0.15 ²⁾	-0.25 ± 0.12 ²⁾	-1.11 ± 0.28 ²⁾	-2.96 ± 0.77 ²⁾
CTs-h	60	0.07 ± 0.10	-1.60 ± 0.52 ²⁾	-1.69 ± 0.45 ²⁾	-1.48 ± 0.49 ²⁾	-1.06 ± 0.37 ²⁾	-0.75 ± 0.22 ²⁾	-0.34 ± 0.15 ²⁾	-1.71 ± 0.47 ²⁾	-5.30 ± 0.33 ²⁾
EP	—	0.01 ± 0.08	0.56 ± 0.24 ²⁾	1.01 ± 0.37 ²⁾	0.46 ± 0.19 ²⁾	0.27 ± 0.20 ¹⁾	0.10 ± 0.12 ²⁾	0.07 ± 0.19	1.04 ± 0.33 ²⁾	1.71 ± 0.38 ²⁾
EP-CTs-l	30	0.02 ± 0.04	-0.29 ± 0.27 ⁴⁾	-0.22 ± 0.31 ⁴⁾	-0.18 ± 0.23 ⁴⁾	-0.24 ± 0.26 ³⁾	-0.16 ± 0.21	-0.14 ± 0.18	-0.29 ± 0.27 ⁴⁾	-0.68 ± 0.31 ⁴⁾
EP-CTs-h	60	0.05 ± 0.11	-0.78 ± 0.34 ⁴⁾	-0.85 ± 0.28 ⁴⁾	-0.71 ± 0.31 ⁴⁾	-0.48 ± 0.39 ⁴⁾	-0.34 ± 0.19 ⁴⁾	-0.27 ± 0.10 ³⁾	-0.87 ± 0.30 ⁴⁾	-2.32 ± 0.55 ⁴⁾
EP-IAC	70	0.03 ± 0.04	0.26 ± 0.14 ⁴⁾	0.34 ± 0.31 ⁴⁾	0.19 ± 0.28 ⁴⁾	0.08 ± 0.19 ³⁾	-0.05 ± 0.13	-0.08 ± 0.10	0.37 ± 0.29 ⁴⁾	0.54 ± 0.26 ⁴⁾

Notes: Compared with Control group ¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; Compared with EP group ³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01

2 方法

2.1 发热模型及分组给药 内生致热原(endogenous pyrogens, EP) 参考文献制备^[4]。将 42 只家兔按体重及基础体温随机均分为 7 组: 空白对照(Control), 青蒿总香豆素低剂量组(30 mg · kg⁻¹, TCs-l) 及高剂量组(60 mg · kg⁻¹, TCs-h), 模型组(EP), 大小剂量治疗组(30 mg · kg⁻¹, EP-TCs-l; 60 mg · kg⁻¹, EP-TCs-h) 及复方氨基比林治疗组(1 mL · kg⁻¹, iv, EP-IAC)。TCs ip, 对照组给以溶媒, 30 min 后, iv EP 诱导发热(其他组给予注射用生理盐水), 描计体温曲线。

2.2 血清及脑脊液 cAMP 及 PGE₂ 测定 操作同 2.1, 注射 EP 后 1 h, 将 Control, EP, EP-TCs-l, EP-TCs-h, EP-IAC 组家兔以 3% 戊巴比妥钠麻醉, 心脏及延髓池穿刺分别抽取血液及脑脊液, 按放免药盒说明书操作测定 cAMP 及 PGE₂。同时取肝脏及腓肠肌适量, 用于 Na⁺, K⁺ - ATP 酶活性测定。

2.3 Na⁺, K⁺ - ATP 酶活性测定 参照文献进行^[5]。

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 对发热及正常家兔体温的影响 各组家兔肛温变化(ΔT_r) 及最大值(ΔT_{max}) 及 5 h 体温反应指数(TRI_{5.0}) 结果见表 1。从表中可以看出, 青蒿总香豆素 ip 能显著降低正常家兔体温(最低可达基础体温下 2 °C 左右), 且与剂量成正相关, 用药后约 30 min 即达最低点, 维持 90~ 100 min, 开始缓慢回升, 大剂量可维持 5 h 以上。对于内生致热原诱导的发热也具有明显的抑制作用, 并可使发热家兔体温降至正常体温以下, 体温反应曲线呈负向弧线, 解热作用与剂量正相关, 且大剂量组优于复方氨基比林组。

3.2 对发热家兔血清及脑脊液 cAMP 和 PGE₂ 水平的影 响 结果见表 2, EP 性发热家兔血液中 cAMP 及 PGE₂ 均有轻微升高, 青蒿总香豆素及复方氨基比林可以拮抗血液 PGE₂ 浓度的升高, 并降至正常水平以下, 但对 cAMP 无明显影响; 而脑脊液中两者浓度

表 2 青蒿总香豆素对发热家兔血清及脑脊液 cAMP 和 PGE₂ 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 2 Effects of TCs on the cAMP and PGE₂ contents in serum and c. s. f. in fever rabbits($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Groups	Dose (mg·kg ⁻¹)	cAMP (pmol·mL ⁻¹)		PGE ₂ (pg·mL ⁻¹)	
		serum	c. s. f.	serum	c. s. f.
Contra	—	49.13 ± 8.41	34.44 ± 8.73	1145.64 ± 154.83	902.79 ± 170.22
EP	—	57.69 ± 12.73	56.09 ± 14.47	1292.45 ± 222.35	1859.66 ± 204.03
EP-CTs-l	30	55.28 ± 9.86	49.93 ± 10.37	1134.90 ± 170.69	1605.26 ± 126.97 ²⁾
EP-CTs-h	60	49.85 ± 10.15	45.66 ± 11.08	1003.43 ± 156.20 ¹⁾	1289.47 ± 222.71 ²⁾
EP-IAC	70	53.46 ± 8.75	47.80 ± 13.51	810.91 ± 137.04 ¹⁾	897.37 ± 91.74 ²⁾

Notes: Compared with EP group ¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01

3.3 对肝脏及腓肠肌组织 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响 结果见下图。从图中可以看出, 青蒿总香豆素对肝脏及腓肠肌组织钠泵活性均具有明显抑制作用, 抑制率均达 60% 以上, 其中高浓度组的抑制率和 Ouabain 组差异不具显著性 (P > 0.05)。

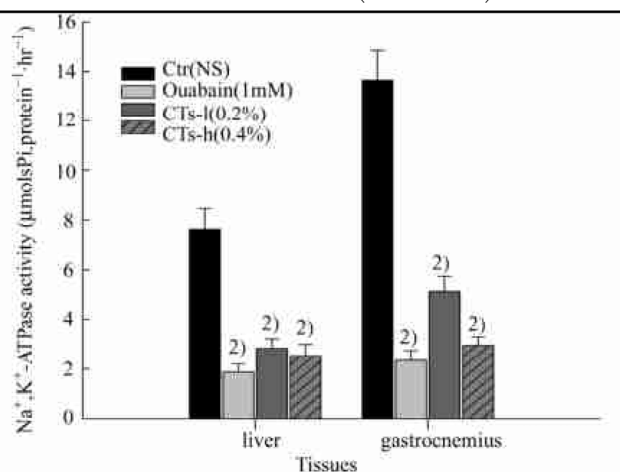


图 1 青蒿总香豆素对家兔肝脏和腓肠肌组织 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响

Fig. 1 Effects of TCs on the Na⁺, K⁺-ATPase activity in rabbit liver and gastrocnemius($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Notes: Compared with Contral group, ²⁾ P < 0.01

4 讨论

本实验结果显示, 青蒿总香豆素腹腔注射可使正常家兔降低 1~ 2 °C, 这除与香豆素类成分中枢抑制作用有关, 推测 TCs 可能对基础代谢或机体产热某些环节有抑制作用, 肝脏钠泵活性测试结果证实了这种推测, 因为在静息状态, 维持机体体温的热量产生主要依赖于肝脏等内脏器官, 而这些器官耗能

较之正常对照组均有较大幅度的提高 (163% 和 206%), 注射青蒿总香豆素及复方氨基比林均能显著对抗 PGE₂ 的这种变化, 甚或降至正常水平, 但以作用强度而言, 前者不及后者; 对于 EP 引起的脑脊液 cAMP 水平升高, CTs 似无抑制作用。

产热则主要依赖于钠泵^[6]。这与黄黎等报道的青蒿乙酸乙酯及正丁醇提取部位的解热降温特点类似^[7], 同时也得到我们课题组的进一步验证^[8-9]。青蒿总香豆素对 Na⁺, K⁺-ATP 酶的显著抑制作用, 一方面可以解释青蒿临床治疗不明原因发热及暑热有效的原因, 另一方面也可阐释其作为清虚热要药的科学依据, 因为近代研究结果显示阴阳亏虚与钠泵活性有关, 而阴虚内热是 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性异常升高的一种表现^[10]。

在解热实验中, 我们使用家兔内生致热原诱导发热, 具有广泛的代表性。对比青蒿总香豆素的降温和解热的体温反应曲线, 两者形态类似, 后者似乎是在前者的基础上向上漂移, 但在发热峰值附近出现近似平台区, 这提示青蒿总香豆素确实可以抑制 EP 性发热, 尤其是发热高峰期, 但总体看来, 似乎降温作用构成了发热动物体温下降的关键因素。青蒿总香豆素显著抑制肌肉钠泵活性可能与解热及降温作用均有关, 因为发热动物体温上升相的主要产热来源来自肌肉。而中枢尤其是体温中枢区域的 PGE₂ 升高是发热所必须的^[11], 青蒿拮抗 EP 性发热家兔脑脊液 PGE₂ 水平的升高甚至降至正常水平以下, 是其解热作用机制之一, 同时提示该香豆素成分不仅可以抑制 PGE₂ 诱导性合成酶 (cPLA₂-COX₂) 系统, 也可能抑制结构性 COX₁ 酶系统, 甚至对上游环节具有抑制作用^[12]。我们课题组发现青蒿总香豆素对磷脂酶 A₂ 具有明显的抑制作用支持上述提示 (另文发表)。

综上所述,青蒿总香豆素具有明显的降温与解热作用,可能是其临床治疗阴虚发热,暑热外感以及不明原因热的有效部位,其作用机制与抑制 Na^+ , K^+ -ATP 酶及降低中枢发热介质 PGE_2 有关。

[参考文献]

- [1] 胡世林. 青蒿的本草考证[J]. 亚太传统医药, 2006, 1: 28-30.
- [2] 李沧海, 林启云, 赵 一. 青蒿解热成分研究概况[J]. 广西中医药, 1997, 20 (5): 53-54.
- [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] Crawford IL. Effects of central administration of probenecid on fevers produced by leukocytactic pyrogen and PGE_2 in the rabbit[J]. J Physiol, 1979, 287: 519-533.
- [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学[M]. 第三版, 北京: 人民卫生出版社, 2002. 521-523.

- [6] Faramarz IB. Thyroid Thermogenesis: Regulation of (Na^+ , K^+)-Adenosine Triphosphatase and Active Na, K Transport [J]. American Zoologist, 1988 28(2): 363-371.
- [7] 黄 黎, 刘菊福, 刘林祥, 等. 中药青蒿的解热抗炎作用[J]. 中国中药杂志, 1993, 18(1): 44-48, 63, 64.
- [8] 杨 柯, 林启云, 赵 一, 等. 东莨菪素对家兔体温的影响[J]. 广西中医药, 2005, 28 (1): 62.
- [9] 杨 柯, 曾春晖. 莨菪亭解热作用机理实验研究[J]. 2006, 3(3): 24-27.
- [10] 查良伦, 沈自尹, 陈锐群, 等. 肾阳虚与红细胞钠泵活性[J]. 中西医结合杂志, 1985, 5(7): 416-417.
- [11] Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, *et al.* Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP_3 [J]. Nature, 1998, 395 (6699): 281-284.
- [12] Li S, Wang Y, Matsumura K, *et al.* The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2 $^{-/-}$, but not in cyclooxygenase-1 $^{-/-}$ mice[J]. Brain Res, 1999, 825 (1- 2): 86-94.