

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201806013

引文格式: 肖朝江, 沈怡, 徐伟, 等. 30种滇西植物 β -羟高铁血红素形成抑制活性[J]. 广西植物, 2019, 39(7): 863–872.
XIAO CJ, SHEN Y, XU W, et al. β -hematin formation inhibition activity of thirty plants from West Yunnan [J]. *Guihaia*, 2019, 39(7): 863–872.

30种滇西植物 β -羟高铁血红素形成抑制活性

肖朝江^{1,2}, 沈怡², 徐伟², 刘子琦², 彭俊霖², 张小东², 董相^{1,2}, 姜北^{1,2*}

(1. 大理大学 药物研究所, 云南 大理 671000; 2. 大理大学 药学与化学学院, 云南 大理 671000)

摘要: 疟疾是严重危害人类健康的寄生虫病之一, 据世界卫生组织报道每年有数十万人因疟疾而死亡, 我国疟疾防治工作虽然取得了长足发展, 但在中国云南边境地区和中国西藏林芝地区本地疟疾病例依然存在, 再加上西藏自治区和云南省地理位置特殊, 与周边疟疾高发的国家接壤, 边民来往十分频繁, 传染源输入无法杜绝。为了发现植物来源的新型抗疟疾天然产物, 该研究依次用 75% 乙醇和蒸馏水对 30 种滇西植物进行回流提取, 并采用 β -羟高铁血红素形成抑制实验对这些样品进行抗疟活性筛选。结果表明: 在供试的 30 种植物中, 玉叶金花、回心草以及云南甘草等 19 种植物粗提物具有不同程度的 β -羟高铁血红素形成抑制活性, 具有抗疟活性的植物种类涉及 17 个科、19 个属。其中, 虾子花、东方紫金牛、姜花水提物以及反瓣老鹤草地部分醇提物的活性较好, 其 IC_{50} 值分别为 796.0、951.0、1 033.0、1 388.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 值得进一步深入研究。虾子花、东方紫金牛的 HPLC 分析结果显示, 其活性成分应为酚性成分。

关键词: 滇西, 植物, 抗疟活性, β -羟高铁血红素形成抑制实验, HPLC

中图分类号: Q946, R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2019)07-0863-10

β -hematin formation inhibition activity of thirty plants from West Yunnan

XIAO Chaojiang^{1,2}, SHEN Yi², XU Wei², LIU Ziqi², PENG Junlin²,
ZHANG Xiaodong², DONG Xiang^{1,2}, JIANG Bei^{1,2*}

(1. *Institute of Materia Medica, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China*; 2. *College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China*)

Abstract: Malaria is a parasitic disease that seriously endangers human health. According to the world health organization, hundreds of thousands of people died due to malaria each year. Although the prevention and treatment of malaria in China has made great progress, the local malaria cases still exist in the border areas of Yunnan and Nyingchi of Tibet, China. In addition to the special geographical locations of Tibet and Yunnan, China shares borders with neighboring countries with high incidence of malaria, and the border residents have frequent contacts, so the source of infection cannot be eliminated. Therefore, the situation of malaria prevention and control in China is still not optimistic. To explore

收稿日期: 2018-10-22

基金项目: 国家自然科学基金(81460532) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (81460532)].

作者简介: 肖朝江(1986-), 男, 湖南株洲人, 博士, 讲师, 主要从事药用植物来源的次生代谢产物与活性研究, (E-mail) xiaochao-jiang@yeah.net.

*通信作者: 姜北, 博士, 教授, 主要从事天然药物与民族医药研究, (E-mail) jiangbei@dali.edu.cn.

the novel antimalarial natural products from plant, thirty plants from West Yunnan were extracted by reflux method with 75% ethanol and water, successively. Then the antimalarial activities of the samples were tested by β -hematin formation inhibition assay. As a result, *Mussaenda pubescens*, *Rhodobryum roseum*, *Glycyrrhiza pallidiflora* and other 19 testing samples showed β -hematin formation inhibition activity in different degrees, which came from 17 families and 19 genera. Among the active samples, the water extracts of *Woodfordia fruticosa*, *Ardisia elliptica* and *Hedychium coronarium*, as well as the ethanol extract of *Geranium refractum*, showed significant inhibition activities with the IC_{50} values of 796.0, 951.0, 1 033.0, 1 388.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. HPLC analysis of *Woodfordia fruticosa* and *Ardisia elliptica* indicated that their active components should be phenolic constituents.

Key words: West Yunnan, plants, anti-malarial activity, β -hematin formation inhibition assay, HPLC

疟疾是一种由疟原虫引起的严重危害人类健康的疾病之一。据世界卫生组织(WHO)统计,全世界 91 个疟疾流行国家和地区 2016 年共有 2.16 亿疟疾病例,因疟疾死亡人数达 44.5 万。其中,90%的疟疾病例和 91%的死亡病例发生在撒哈拉以南的非洲地区,7%的疟疾病例和 6%的死亡病例发生在东南亚地区(World Health Organization, 2017a)。另外,2014 年全球疟疾病例为 2.1 亿例,2015 年为 2.11 亿例,2016 年为 2.16 亿例,明显呈现逐年上升的趋势(World Health Organization, 2017a)。在我国,经过几代人的努力,从建国初期疟疾发病人数高达 3 000 万例到 2016 年的 3 321 例来看,我国疟疾防治工作取得了显著成效(张丽等, 2017)。虽然我国疟疾防治工作取得了长足发展,并且 2016 年 99.9%的疟疾病例为境外输入性病例,但在云南边境地区和西藏林芝地区本地疟疾病例依然存在(张丽等, 2017)。加上中国的西藏自治区和云南省地理位置特殊,与印度、尼泊尔、缅甸和越南等周边疟疾高发的南亚、东南亚国家接壤,边民来往十分频繁,传染源输入无法杜绝。因此,我国疟疾防控形势依然不容乐观。

目前,临床用于治疗疟疾的药物主要为奎宁和青蒿素两类(World Health Organization, 2010, 2015)。由于长期使用氯喹和青蒿素,其疟原虫抗药株已逐步显现(Imwong et al., 2017; Price et al., 2014; World Health Organization, 2017b)。因此,研发新一代抗疟药物对疟原虫病防治工作意义重大。研究发现,游离血红素对疟原虫有毒性,疟原虫通过将血红素转换成疟原虫色素(β -羟高铁血红素)的方式解毒(Orjih et al., 1981; Pagola et

al., 2000; Slater et al., 1991)。与此同时,奎宁等红内期抗疟药可与血红素络合从而抑制 β -羟高铁血红素形成,成为红内期抗疟药物的作用靶点之一(Chong & Sullivan Jr, 2003)。因此,本研究采用 β -羟高铁血红素形成抑制实验对 30 种滇西植物进行抗疟活性筛选,并对活性较好的植物样品进行初步的 HPLC 分析,以期能发现若干种活性较强的植物,为寻找和开发继奎宁、青蒿素之后的第三代植物来源的新型抗疟天然产物奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试剂和仪器

试剂:氯高铁血红素、氯喹二磷酸盐、HEPES 均购于美国 Sigma 公司;吡啶、冰醋酸均购于上海申博化工有限公司;乙酸钠购于国药集团化学试剂有限公司;二甲基亚砷购于天津化学试剂有限公司;色谱甲醇购于 Fisher Chemical 公司;HPLC 用水为市售娃哈哈矿泉水。

仪器:BioTek Synergy HT 多功能酶标仪为美国 BioTek 仪器公司生产;MCO-18AIC CO_2 培养箱为日本三洋公司生产;AL204 电子天平为梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产;EYELA FDU-2100 冷冻干燥机为日本东京理化器械株式会社生产;RE-5205 旋转蒸发器为上海亚荣生化仪器厂生产;Agilent 1260 高效液相色谱仪为美国安捷伦科技有限公司生产。

1.2 植物样品

30 种植物样品(表 1)均于 2013 年采自滇西地区,由大理大学药学与化学学院生药教研室张

表 1 抗疟活性筛选供试植物及其粗提物提取率

Table 1 Species and extracting rate of screened plants for anti-malarial activity

植物名 Plant name	科名 Family name	属名 Generic name	供试部位 Tested parts	提取率 Extraction ratio (%)	
				乙醇 Ethanol	水 Water
西南委陵菜 <i>Potentilla lineata</i>	蔷薇科 Rosaceae	委陵菜属 <i>Potentilla</i>	地上 Overground	21.0	4.0
			地下 Underground	35.8	2.5
反瓣老鹳草 <i>Geranium refractum</i>	牻牛儿苗科 Geraniaceae	老鹳草属 <i>Geranium</i>	地上 Overground	37.3	4.6
			地下 Underground	25.6	5.9
拔毒散 <i>Sida szechuensis</i>	锦葵科 Malvaceae	黄花稔属 <i>Sida</i>	全株 Whole	22.8	9.2
高河菜 <i>Megacarpaea delavayi</i>	十字花科 Cruciferae	高河菜属 <i>Megacarpaea</i>	地上 Overground	39.0	8.0
滇黄芩 <i>Scutellaria amoena</i>	唇形科 Labiatae	黄芩属 <i>Scutellaria</i>	地上 Overground	36.9	3.4
			地下 Underground	32.3	7.1
土香薷 <i>Origanum vulgare</i>	唇形科 Labiatae	牛至属 <i>Origanum</i>	全株 Whole	18.6	4.4
广防风 <i>Epimeredi indica</i>	唇形科 Labiatae	广防风属 <i>Epimeredi</i>	全株 Whole	29.9	1.7
曲苞芋 <i>Remusatia pumila</i>	天南星科 Araceae	曲苞芋属 <i>Remusatia</i>	全株 Whole	14.3	5.7
接骨木 <i>Sambucus williamsii</i>	忍冬科 Caprifoliaceae	接骨木属 <i>Sambucus</i>	地上 Overground	16.7	6.1
云南贯众 <i>Cyrtomium yunnanense</i>	鳞毛蕨科 Dryopteridaceae	贯众属 <i>Cyrtomium</i>	地下 Underground	8.8	2.9
四翅月见草 <i>Oenothera tetraptera</i>	柳叶菜科 Onagraceae	月见草属 <i>Oenothera</i>	全株 Whole	19.4	8.3
蓝花野茼蒿 <i>Crassocephalum rubens</i>	菊科 Compositae	野茼蒿属 <i>Crassocephalum</i>	全株 Whole	22.7	5.5
苣荬菜 <i>Sonchus brachyotus</i>	菊科 Compositae	苦苣菜属 <i>Sonchus</i>	全株 Whole	21.4	7.7
挖耳草 <i>Carpesium nepalense</i>	菊科 Compositae	天名精属 <i>Carpesium</i>	全株 Whole	20.7	5.8
灯盏细辛 <i>Erigeron breviscapus</i>	菊科 Compositae	飞蓬属 <i>Erigeron</i>	全株 Whole	28.0	4.6
一枝箭 <i>Crepis naptifera</i>	菊科 Compositae	还阳参属 <i>Crepis</i>	全株 Whole	28.2	6.8
玉叶金花 <i>Mussaenda pubescens</i>	茜草科 Rubiaceae	玉叶金花属 <i>Mussaenda</i>	地上 Overground	11.5	3.8
木芙蓉 <i>Hibiscus mutabilis</i>	锦葵科 Malvaceae	木槿属 <i>Hibiscus</i>	地上 Overground	15.5	7.6
回心草 <i>Rhodobryum roseum</i>	真藓科 Bryacea	大叶藓属 <i>Rhodobryum</i>	全株 Whole	10.7	2.1
瑞香狼毒 <i>Stellera chamaejasme</i>	瑞香科 Thymelaeaceae	狼毒属 <i>Stellera</i>	全株 Whole	24.0	5.0
大理山梗菜 <i>Lobelia taliensis</i>	桔梗科 Campanulaceae	半边莲属 <i>Lobelia</i>	全株 Whole	20.8	4.5
刺天茄 <i>Solanum indicum</i>	茄科 Solanaceae	茄属 <i>Solanum</i>	全株 Whole	12.9	4.7
龙葵 <i>S. nigrum</i>	茄科 Solanaceae	茄属 <i>Solanum</i>	全株 Whole	24.8	6.3
鞍叶羊蹄甲 <i>Bauhinia brachycarpa</i>	云实科 Caesalpiniaceae	羊蹄甲属 <i>Bauhinia</i>	地上 Overground	13.8	2.2
心瓣蝇子草 <i>Silene cardiopetala</i>	石竹科 Caryophyllaceae	蝇子草属 <i>Silene</i>	全株 Whole	20.2	6.3
小苞黄芪 <i>Astragalus prattii</i> var. <i>prattii</i>	豆科 Leguminosae	黄芪属 <i>Astragalus</i>	全株 Whole	23.0	3.0
姜花 <i>Hedychium coronarium</i>	姜科 Zingiberaceae	姜花属 <i>Hedychium</i>	全株 Whole	12.5	2.0
云南甘草 <i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	豆科 Leguminosae	甘草属 <i>Glycyrrhiza</i>	地上 Overground	15.0	2.5
虾子花 <i>Woodfordia fruticosa</i>	千屈菜科 Lythraceae	虾子花属 <i>Woodfordia</i>	地上 Overground	11.7	4.2
东方紫金牛 <i>Ardisia elliptica</i>	紫金牛科 Myrsinaceae	紫金牛属 <i>Ardisia</i>	地上 Overground	14.8	3.6

德全博士鉴定,植物标本均存放于大理大学药学与化学学院姜北教授研究组。

1.3 植物提取物的制备

取约 50 g 干燥的植物样品粉碎,依次用 75%

乙醇、蒸馏水热回流提取。处理过程:(1)用 75% 乙醇回流提取 3 次(每次 250 mL),将 3 次提取的溶液合并后在 50 °C 下用旋转蒸发器除去大部分溶剂,之后转移至冷冻干燥机上充分干燥。(2)经 75%乙

表 2 30 种供试植物 β -羟高铁血红素形成抑制活性筛选结果
Table 2 β -Hematin formation inhibition activity of thirty screened plants ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

样品名 Sample name	粗提物 Crude extract	不同浓度植物样品的 β -羟高铁血红素形成抑制率 Inhibition rates of β -hematin formation in screened samples with different concentrations (%)					IC ₅₀ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
		1 388.9	277.8	55.6	11.1	2.2	
氯喹二磷酸盐 Chloroquine diphosphate salt	—	84.7 \pm 3.6	88.2 \pm 3.1	88.4 \pm 5.3	1.5 \pm 3.4	-2.1 \pm 1.1	34.6 \pm 1.6
西南委陵菜 (地上) <i>Potentilla lineata</i> (Overground)	醇提物 Ethanol extract	-2.3 \pm 1.8	-13.2 \pm 1.9	-11.4 \pm 3.5	0.6 \pm 5.8	0.8 \pm 3.8	无活性 Inactive
	水提物 Water extract	6.6 \pm 5.0	-11.7 \pm 0.3	-4.3 \pm 0.6	-0.9 \pm 0.4	2.5 \pm 2.3	>1 388.9
西南委陵菜 (地下) <i>P. lineata</i> (Underground)	醇提物 Ethanol extract	14.1 \pm 3.4	-6.7 \pm 1.0	2.2 \pm 0.8	2.7 \pm 0.1	-1.0 \pm 2.7	>1 388.9
	水提物 Water extract	2.1 \pm 1.0	-12.1 \pm 1.6	-1.7 \pm 2.0	-6.6 \pm 0.4	-0.1 \pm 2.6	无活性 Inactive
反瓣老鹳草 (地上) <i>Geranium refractum</i> (Overground)	醇提物 Ethanol extract	-22.5 \pm 0.9	-22.2 \pm 1.7	-7.9 \pm 5.3	0.1 \pm 5.8	9.6 \pm 8.7	无活性 Inactive
	水提物 Water extract	15.0 \pm 5.9	-24.5 \pm 1.3	-14.1 \pm 1.3	-2.6 \pm 2.5	1.2 \pm 0.2	>1 388.9
反瓣老鹳草 (地下) <i>G. refractum</i> (Underground)	醇提物 Ethanol extract	49.5 \pm 3.8	39.2 \pm 5.4	25.2 \pm 5.7	3.6 \pm 3.2	-7.0 \pm 3.4	1 388.9
	水提物 Water extract	48.9 \pm 1.9	15.4 \pm 5.1	16.6 \pm 1.2	9.0 \pm 0.2	7.5 \pm 18.2	>1 388.9
拔毒散 <i>Sida szechuensis</i>	醇提物 Ethanol extract	20.6 \pm 4.4	22.7 \pm 4.2	12.0 \pm 1.6	15.1 \pm 8.2	40.0 \pm 3.3	>1 388.9
	水提物 Water extract	24.6 \pm 3.3	28.7 \pm 4.7	17.3 \pm 4.1	23.5 \pm 4.2	13.4 \pm 1.3	>1 388.9
高河菜 <i>Megacarpaea delavayi</i>	醇提物 Ethanol extract	27.2 \pm 4.4	41.2 \pm 5.5	14.4 \pm 5.7	19.1 \pm 3.9	11.5 \pm 1.6	>1 388.9
	水提物 Water extract	5.6 \pm 10.2	0.6 \pm 4.3	11.7 \pm 5.7	0.1 \pm 6.1	9.9 \pm 4.3	>1 388.9
滇黄芩 (地上) <i>Scutellaria amoena</i> (Overground)	醇提物 Ethanol extract	36.0 \pm 1.9	12.6 \pm 8.9	5.3 \pm 13.0	27.4 \pm 2.3	12.3 \pm 6.6	>1 388.9
	水提物 Water extract	11.2 \pm 12.7	6.8 \pm 0.4	1.5 \pm 9.6	2.7 \pm 3.6	-0.7 \pm 2.9	>1 388.9
滇黄芩 (地下) <i>S. amoena</i> (Underground)	醇提物 Ethanol extract	16.2 \pm 6.0	-4.5 \pm 6.6	13.8 \pm 7.8	25.6 \pm 2.3	13.5 \pm 6.8	>1 388.9
	水提物 Water extract	-2.4 \pm 1.4	1.2 \pm 1.3	6.3 \pm 7.7	6.1 \pm 0.5	10.4 \pm 9.8	无活性 Inactive
土香薷 <i>Origanum vulgare</i>	醇提物 Ethanol extract	-3.0 \pm 3.6	-4.2 \pm 1.5	1.3 \pm 1.7	8.4 \pm 0.8	8.1 \pm 3.5	无活性 Inactive
	水提物 Water extract	22.0 \pm 1.9	-4.9 \pm 0.8	-2.7 \pm 1.4	2.2 \pm 1.0	6.9 \pm 3.5	>1 388.9
广防风 <i>Epimeredi indica</i>	醇提物 Ethanol extract	-5.8 \pm 1.8	-11.1 \pm 1.3	-6.1 \pm 1.2	4.6 \pm 0.3	8.6 \pm 1.9	无活性 Inactive
	水提物 Water extract	-1.4 \pm 2.0	-6.6 \pm 2.1	2.3 \pm 1.8	8.3 \pm 2.1	13.3 \pm 0.3	无活性 Inactive
曲苞芋 <i>Remusatia pumila</i>	醇提物 Ethanol extract	-2.9 \pm 0.2	-10.5 \pm 0.6	-10.7 \pm 0.6	-4.3 \pm 1.3	0.0 \pm 1.7	无活性 Inactive
	水提物 Water extract	19.0 \pm 3.3	9.8 \pm 1.3	7.5 \pm 4.4	3.6 \pm 0.5	0.9 \pm 2.4	>1 388.9
接骨木 <i>Sambucus williamsii</i>	醇提物 Ethanol extract	-3.6 \pm 3.8	-8.0 \pm 2.3	-2.1 \pm 0.4	4.0 \pm 1.8	0.5 \pm 5.6	无活性 Inactive
	水提物 Water extract	11.3 \pm 3.1	-6.6 \pm 2.7	-5.6 \pm 6.0	-0.4 \pm 4.8	1.7 \pm 2.1	>1 388.9
云南贯众 <i>Cyrtomium yunnanense</i>	醇提物 Ethanol extract	0.6 \pm 0.9	-15.6 \pm 1.2	-8.4 \pm 1.1	6.5 \pm 2.9	9.4 \pm 1.8	无活性 Inactive

续表 2

样品名 Sample name	粗提物 Crude extract	不同浓度植物样品的 β -羟高铁血红素形成抑制率 Inhibition rates of β -hematin formation in screened samples with different concentrations (%)					IC ₅₀ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
		1 388.9	277.8	55.6	11.1	2.2	
四翅月见草 <i>Oenothera tetraptera</i>	水提物 Water extract	10.8 ± 3.8	2.5 ± 2.4	2.7 ± 1.7	7.4 ± 3.0	8.8 ± 5.8	>1 388.9
	醇提物 Ethanol extract	-11.4 ± 2.2	-16.5 ± 0.5	-15.0 ± 1.6	-3.7 ± 2.8	2.5 ± 4.0	无活性 Inactive
蓝花野苘蒿 <i>Crassocephalum rubens</i>	水提物 Water extract	20.8 ± 4.8	-14.1 ± 0.4	-8.6 ± 3.7	-3.5 ± 4.5	0.6 ± 2.4	>1 388.9
	醇提物 Ethanol extract	-6.9 ± 2.8	-15.8 ± 0.6	-11.0 ± 3.9	-3.3 ± 0.0	-0.3 ± 3.1	无活性 Inactive
苣荬菜 <i>Sonchus brachyotus</i>	水提物 Water extract	-5.1 ± 1.2	1.2 ± 2.3	6.2 ± 1.9	4.8 ± 1.2	6.2 ± 2.7	无活性 Inactive
	醇提物 Ethanol extract	-12.4 ± 1.6	-17.8 ± 0.4	-13.0 ± 0.8	-9.5 ± 1.2	-7.1 ± 5.0	无活性 Inactive
挖耳草 <i>Carpesium nepalense</i>	水提物 Water extract	-9.9 ± 0.3	-12.1 ± 0.2	-7.1 ± 1.6	-7.6 ± 0.4	-6.0 ± 1.1	无活性 Inactive
	醇提物 Ethanol extract	-14.3 ± 1.1	-15.4 ± 0.9	-9.7 ± 3.3	-4.8 ± 1.5	0.4 ± 2.6	无活性 Inactive
灯盏细辛 <i>Erigeron breviscapus</i>	水提物 Water extract	-9.7 ± 0.3	-7.2 ± 2.1	-2.2 ± 2.4	-1.8 ± 2.2	-1.8 ± 2.7	无活性 Inactive
	醇提物 Ethanol extract	-6.1 ± 5.2	-8.2 ± 2.2	-0.5 ± 1.4	9.3 ± 4.6	3.4 ± 0.3	无活性 Inactive
一枝箭 <i>Crepis napifera</i>	水提物 Water extract	-9.7 ± 0.5	-2.1 ± 1.7	6.2 ± 2.3	13.7 ± 1.6	5.8 ± 0.1	无活性 Inactive
	醇提物 Ethanol extract	-8.4 ± 3.9	-11.2 ± 1.0	-2.3 ± 5.1	13.7 ± 3.4	13.4 ± 0.3	无活性 Inactive
玉叶金花 <i>Mussaenda pubescens</i>	水提物 Water extract	3.6 ± 1.4	5.8 ± 1.8	13.7 ± 2.1	10.1 ± 4.2	12.5 ± 1.0	无活性 Inactive
	醇提物 Ethanol extract	-5.7 ± 0.8	-14.9 ± 1.3	-5.2 ± 0.4	6.2 ± 1.5	7.4 ± 4.2	无活性 Inactive
木芙蓉 <i>Hibiscus mutabilis</i>	水提物 Water extract	45.9 ± 0.9	-3.3 ± 2.7	-1.8 ± 3.0	-0.8 ± 5.4	1.2 ± 0.7	>1 388.9
	醇提物 Ethanol extract	-11.5 ± 0.6	-15.4 ± 1.5	-7.5 ± 0.9	1.6 ± 1.5	1.7 ± 0.6	无活性 Inactive
回心草 <i>Rhodobryum roseum</i>	水提物 Water extract	25.8 ± 6.3	-4.0 ± 2.9	2.3 ± 2.1	3.7 ± 2.1	5.6 ± 1.8	>1 388.9
	醇提物 Ethanol extract	-11.9 ± 1.0	-16.3 ± 0.8	-16.6 ± 0.7	-5.5 ± 1.8	-0.4 ± 1.6	无活性 Inactive
瑞香狼毒 <i>Stellera chamaejasme</i>	水提物 Water extract	41.5 ± 2.7	-5.4 ± 0.5	0.3 ± 1.6	6.8 ± 1.5	5.4 ± 2.3	>1 388.9
	醇提物 Ethanol extract	25.2 ± 3.3	24.6 ± 1.9	-0.9 ± 0.8	3.2 ± 3.0	3.7 ± 2.2	>1 388.9
大理山梗菜 <i>Lobelia taliensis</i>	水提物 Water extract	-3.8 ± 2.5	-0.9 ± 3.3	5.2 ± 0.4	8.7 ± 3.4	5.9 ± 4.6	无活性 Inactive
	醇提物 Ethanol extract	-11.4 ± 0.7	-14.2 ± 1.1	-3.2 ± 2.5	8.2 ± 2.5	7.8 ± 0.7	无活性 Inactive
刺天茄 <i>Solanum indicum</i>	水提物 Water extract	-6.4 ± 0.4	2.9 ± 1.0	1.7 ± 0.5	6.9 ± 1.2	5.8 ± 0.8	无活性 Inactive
	醇提物 Ethanol extract	-6.9 ± 1.9	-15.4 ± 1.8	-11.5 ± 0.3	0.3 ± 1.4	9.6 ± 2.6	无活性 Inactive
龙葵 <i>S. nigrum</i>	水提物 Water extract	-4.2 ± 1.8	-10.8 ± 2.0	-0.8 ± 3.2	7.6 ± 5.6	6.3 ± 4.2	无活性 Inactive
	醇提物 Ethanol extract	-7.0 ± 2.4	-11.0 ± 3.8	5.1 ± 3.3	15.6 ± 0.1	17.0 ± 2.1	无活性 Inactive
	水提物 Water extract	-13.8 ± 0.6	-4.5 ± 2.6	0.1 ± 0.1	11.0 ± 1.1	13.1 ± 1.7	无活性 Inactive

续表 2

样品名 Sample name	粗提物 Crude extract	不同浓度植物样品的 β -羟高铁血红素形成抑制率 Inhibition rates of β -hematin formation in screened samples with different concentrations (%)					IC_{50} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
		1 388.9	277.8	55.6	11.1	2.2	
鞍叶羊蹄甲 <i>Bauhinia brachycarpa</i>	醇提物 Ethanol extract	-13.3 ± 1.9	-18.3 ± 1.1	-6.5 ± 1.6	7.9 ± 2.8	14.8 ± 0.7	无活性 Inactive
	水提物 Water extract	-11.3 ± 1.5	-4.7 ± 3.0	5.2 ± 3.3	10.3 ± 1.4	11.2 ± 4.1	无活性 Inactive
心瓣蝇子草 <i>Silene cardiopetala</i>	醇提物 Ethanol extract	-9.7 ± 1.0	-11.5 ± 1.5	-15.9 ± 0.9	-8.3 ± 2.2	-7.0 ± 2.1	无活性 Inactive
	水提物 Water extract	-8.6 ± 1.1	-6.9 ± 2.1	-2.8 ± 1.0	-2.5 ± 1.3	-1.2 ± 5.1	无活性 Inactive
小苞黄芪 <i>Astragalus prattii</i> var. <i>prattii</i>	醇提物 Ethanol extract	42.1 ± 0.7	9.6 ± 3.9	-8.9 ± 1.9	-1.8 ± 0.9	1.4 ± 0.3	>1 388.9
	水提物 Water extract	36.7 ± 2.1	4.1 ± 0.2	5.2 ± 1.5	5.5 ± 0.9	6.0 ± 1.2	>1 388.9
	醇提物 Ethanol extract	38.3 ± 13.9	10.4 ± 3.8	7.0 ± 3.0	5.2 ± 4.0	4.8 ± 4.7	>1 388.9
姜花 <i>Hedychium coronarium</i>	水提物 Water extract	64.2 ± 2.9	23.9 ± 2.0	6.5 ± 1.9	3.0 ± 2.7	2.1 ± 4.2	1 033.0
	醇提物 Ethanol extract	43.2 ± 3.9	-18.8 ± 0.3	-11.8 ± 3.3	-3.3 ± 0.7	-1.7 ± 2.9	>1 388.9
云南甘草 <i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	水提物 Water extract	-7.9 ± 1.8	-15.3 ± 0.7	-9.0 ± 3.3	-0.6 ± 1.0	-1.4 ± 1.0	无活性 Inactive
	醇提物 Ethanol extract	0.36±0.62	-5.21±0.30	-5.06±4.18	-0.21±3.88	4.05±3.28	无活性 Inactive
虾子花 <i>Woodfordia fruticosa</i>	水提物 Water extract	89.63±4.59	-4.74±0.82	1.00±1.91	1.42±1.56	-2.62±1.47	796.0
	醇提物 Ethanol extract	-0.92±0.85	46.79±3.48	-1.80±1.10	7.79±3.73	2.67±1.13	无活性 Inactive
东方紫金牛 <i>Ardisia elliptica</i>	水提物 Water extract	74.04±5.74	63.10±3.16	-1.13±3.07	1.97±3.46	-0.16±2.89	951.0

醇提取过的植物残渣继续用蒸馏水回流提取 3 次,合并提取液蒸馏近干,之后转移至冷冻干燥机上充分干燥。(3)精密称取上述植物提取物浸膏干粉 5.0 mg,以 1 mL 蒸馏水溶解得相应溶液,之后用水按比例(1:4)稀释成系列浓度溶液备用。植物提取率以冻干粉重量除以提取植物样品干重后乘以 100% 计算。

1.4 β -羟高铁血红素形成抑制实验

参照肖朝江等(2014)对 30 种滇西植物进行 β -羟高铁血红素形成抑制活性测试的方法。将 50 μL 不同浓度的供试样品和 50 μL 氯高铁血红素储备液(1.0 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$,溶解于 DMSO 中)混合于 96 孔板中,一式 3 份;同时,设置蒸馏水阴性对照和氯喹二磷酸盐阳性对照。之后每孔加入 80 μL 的醋酸盐缓冲液(4 $\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 5.0),置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 5 h;取出待室温后,每孔加入 100

μL 30% (v/v) 的吡啶-HEPES 溶液(20 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 7.5)使微孔板中固体混悬;室温放置待未反应的羟高铁血红素溶解完全后,从每孔中精密移取 50 μL 上清液至另一 96 孔板中,之后均以 200 μL 上述吡啶-HEPES 溶液稀释,并于 405 nm 波长处测定吸光值。由羟高铁血红素标准曲线得出未反应的羟高铁血红素的浓度,从而计算出供试品对 β -羟高铁血红素形成的抑制浓度(以 IC_{50} 表示)。

1.5 HPLC 分析方法

色谱柱为 phenomenex C_{18} (250 $\text{mm} \times 4.60 \text{ mm}$, 5 μm),检测波长 220 nm,体积流量 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 20 μL ,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。虾子花提取物洗脱程序:水(A)-甲醇(B):0~40 min,0%~35% B;40~50 min,35%~70% B;50~60 min,70%~100% B;60~70 min,100% B。东方紫金牛提取物洗脱程

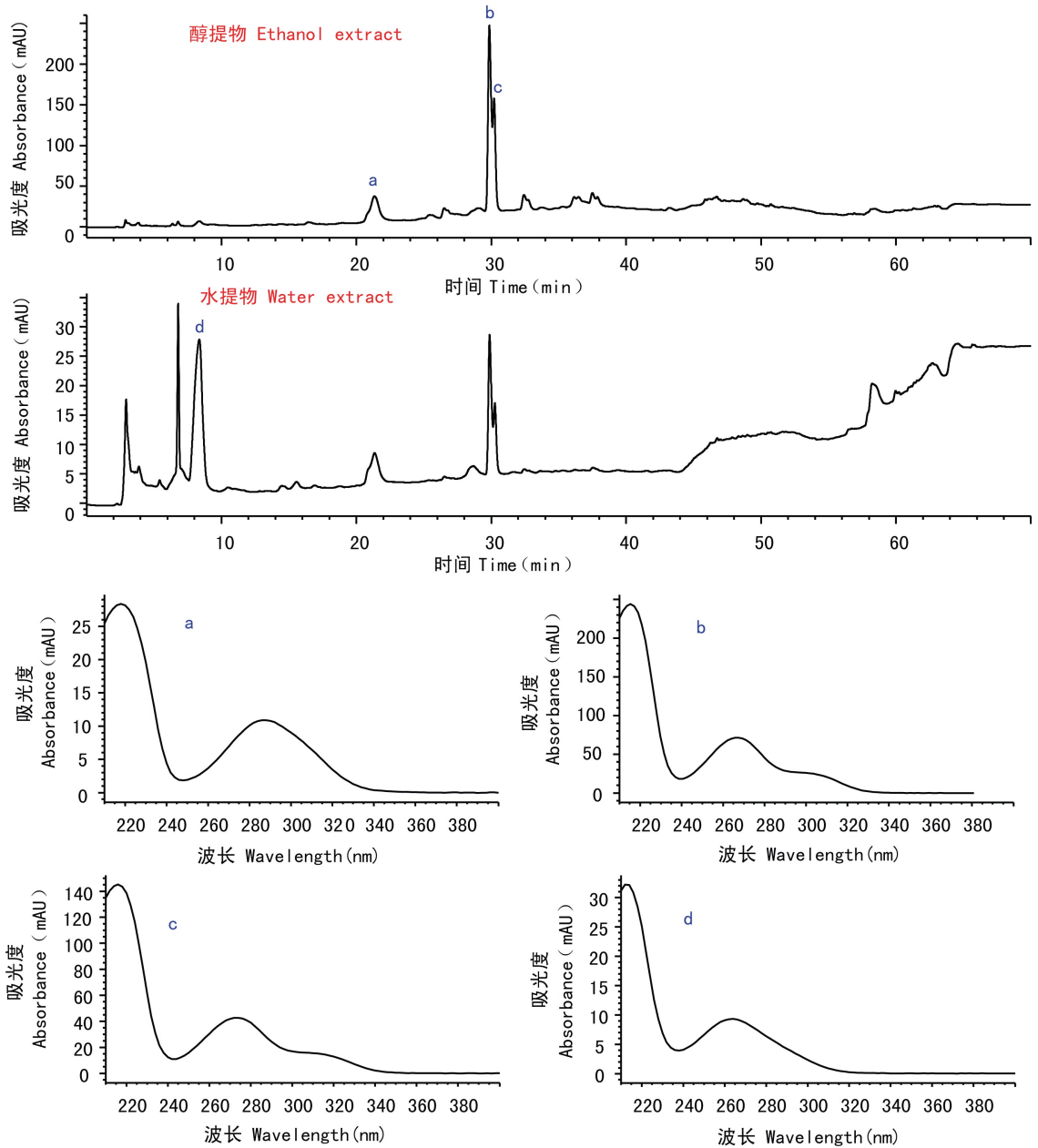


图 1 虾子花醇提物和水提物的 HPLC 分析结果

Fig. 1 HPLC results of ethanol and water extracts of *Woodfordia fruticosa*

序:水(A)-甲醇(B);0~30 min,0%~25% B;30~40 min,25%~50% B;40~50 min,50%~60% B;50~60 min,60%~100% B。

2 结果与分析

热回流提取实验(表 1)表明,30 种滇西产植

物 75%乙醇的平均提取率为 21.7%,最高为 39.0% (高河菜);水的平均提取率为 5.1%,最高为 9.2% (拔毒散)。

抗疟活性筛选结果(表 2)表明,30 种滇西植物中虾子花、东方紫金牛、姜花、反瓣老鹳草、拔毒散、高河菜、滇黄芩、土香薷、曲苞芋、接骨木、云南贯众、四翅月见草、西南委陵菜、玉叶金花、木芙

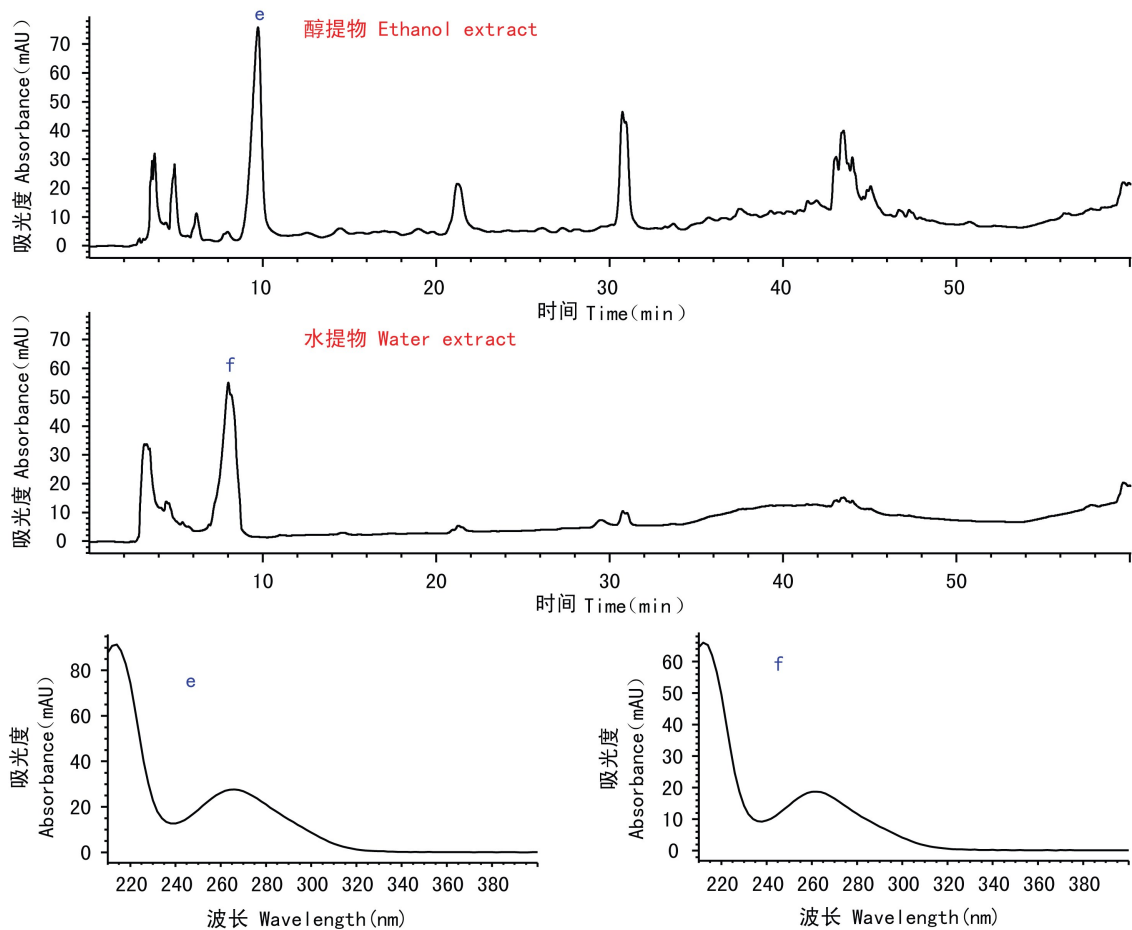


图 2 东方紫金牛醇提物和水提物的 HPLC 分析结果

Fig. 2 HPLC results of ethanol and water extracts of *Ardisia elliptica*

蓉、回心草、瑞香狼毒、小苞黄芪和云南甘草 19 种植物具有不同程度的 β -羟高铁血红素形成抑制活性。其中, 虾子花、东方紫金牛、姜花水提物以及反瓣老鹳草地下部分醇提物的活性较好, 其 IC_{50} 值分别为 796.0、951.0、1 033.0、1 388.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。此外, 本实验筛选出来的活性植物涉及千屈菜科、紫金牛科、牻牛儿苗科等 17 个科, 虾子花属、老鹳草属等 19 个属。

运用 SPSS 统计软件 (版本 19.0) 进行两独立样本均数比较的 t 检验, 玉叶金花和回心草水提物以及云南甘草醇提物与阳性对照氯喹二磷酸盐对 β -羟高铁血红素形成抑制活性差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

两种活性较好的植物样品虾子花、东方紫金

牛乙醇提取物、水提物的 HPLC 分析结果如图 1 和图 2 所示。根据图 1 和图 2 两个样品谱图中主要成分 a-f 峰的相关在线 UV 谱图, 其为酚性成分的可能性极大, 这与两种植物化学成分的研究报道结果相一致 (Das et al., 2007; Mishra & Aeri, 2017; Okuda et al., 2006)。同时, 鉴于两种植物样品水提物表现出较好的活性, d、f 两个峰应为其重要的活性成分, 值得注意。

3 讨论

随着疟原虫对奎宁类和青蒿素类抗疟药物耐药性的发现 (Imwong et al., 2017; Price et al., 2014; World Health Organization, 2017b), 研发全

新的抗疟药物已刻不容缓。目前,抗疟药物的研发主要通过活性先导化合物进行结构修饰,或者合成其结构类似的衍生物的方式进行(Jampilek, 2017; Vangapandu et al., 2007)。虽然这种研发模式有一定的效果,但由于人工合成的化合物往往具有较大的毒副作用或与先导化合物具有相似作用机制而容易产生耐药性等因素,致使最终能应用于临床的抗疟药物寥寥无几。尽管近些年来抗疟疫苗已问世,但要应用到临床还需要很长一段时间(Birkett et al., 2013; Matuschewski, 2017)。此外,一些植物来源的非奎宁类和青蒿素类天然产物陆续被发现具有抗疟疾活性(Kayser et al., 2002; Mojab, 2012; Pohlit et al., 2013; Xu & Pieters, 2013),且目前所筛选的植物种类与浩瀚的植物种类相比仅冰山一角。因此有理由相信,从植物中寻找、发现抗疟药物的可能性非常大,其前景必定广阔。

β -羟高铁血红素形成抑制活性很可能具有化学结构、官能团类型的选择关联性,羟基尤其是酚羟基为 β -羟高铁血红素形成抑制实验的主要活性基团(肖朝江等, 2016)。近年来有研究显示,含有多个酚羟基的黄酮类成分芹菜素具有显著的体内抗疟活性,其体内抑制伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*)的活性在 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ 时可达 70%,效果十分显著(Amiri et al., 2018);本研究对芹菜素的研究结果表明,该化合物抑制 β -羟高铁血红素形成的活性十分显著,其 IC_{50} 达到 $168 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,从一个侧面反映了 β -羟高铁血红素形成抑制活性与酚羟基以及体内抗疟活性之间的内在联系,对本研究中活性最好的两种植物样品的 HPLC 分析结果显示,其主成分均应是酚性成分,这进一步印证了上述联系,值得深入研究。

分析本研究结果发现,供试的 30 种植物中有 19 个植物具有不同程度的 β -羟高铁血红素形成抑制活性,显示出潜在的抗疟活性。这些活性植物醇提物的 β -羟高铁血红素形成抑制活性总体弱于相应水提物的活性,提示抗疟活性较好的化合物可能为水溶性的、极性偏大的物质。本研究 30 种供试植物涵盖了 21 个科 29 个属,在植物科属分类范畴方面跨度较大,具有较高的代表性。所筛

选出来的活性植物涉及 17 个科、19 个属,进一步证实了从天然产物中发现奎宁、青蒿素等抗疟药物的合理性,以及今后从中发现新型抗疟先导化合物的可行性。因此,本研究为寻找、开发植物来源的新型抗疟天然产物奠定了一定的基础,并在一定程度上为进一步研究上述供试植物提供了参考。

参考文献:

- AMIRI M, NOURIAN A, KHOSHKAM M, et al., 2018. Apigenin inhibits growth of the *Plasmodium berghei* and disrupts some metabolic pathways in mice [J]. *Phytother Res*, 32(9): 1795–1802.
- BIRKETT AJ, MOORTHY VS, LOUCQ C, et al., 2013. Malaria vaccine R & D in the decade of vaccines: Breakthroughs, challenges and opportunities [J]. *Vaccine*, 31(Suppl. 2): B233–B243.
- CHONG CR, SULLIVAN JR DJ, 2003. Inhibition of heme crystal growth by antimalarials and other compounds: Implications for drug discovery [J]. *Biochem Pharmacol*, 66(11): 2201–2212.
- DAS P K, GOSWAMI S, CHINNIAH A, et al., 2007. *Woodfordia fruticosa*: Traditional uses and recent findings [J]. *J Ethnopharmacol*, 110(2): 189–199.
- IMWONG M, SUWANNASIN K, KUNASOL C, et al., 2017. The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: A molecular epidemiology observational study [J]. *Lancet Infect Dis*, 17(5): 491–497.
- JAMPILEK J, 2017. Design of antimalarial agents based on natural products [J]. *Curr Org Chem*, 21(18): 1824–1846.
- KAYSER O, KIDERLEN AF, CROFT SL, 2002. Natural products as potential antiparasitic drugs [J]. *Stud Nat Prod Chem*, 26(Part G): 779–848.
- MATUSCHEWSKI K, 2017. Vaccines against malaria—still a long way to go [J]. *Febs J*, 284(16): 2560–2568.
- MISHRA S, AERI V, 2017. Biotransformation of lignan glycoside to its aglycone by *Woodfordia fruticosa* flowers: Quantification of compounds using a validated HPTLC method [J]. *Pharm Biol*, 55(1): 360.
- MOJAB F, 2012. Antimalarial natural products: A review [J]. *Avicenna J Phytomed*, 2(2): 52–62.
- OKUDA T, YOSHIDA T, HATANO T, et al., 2006. Fractionation of pharmacologically active plant polyphenols by centrifugal partition chromatography [J]. *J Liq Chromatogr*, 13(18): 3637–3650.

- ORJIH A, BANYAL H, CHEVLI R, et al., 1981. Hemin lyses malaria parasites [J]. *Science*, 214(4521): 667-669.
- PAGOLA S, STEPHENS PW, BOHLE DS, et al., 2000. The structure of malaria pigment β -haematin [J]. *Nature*, 404(6775): 307-310.
- POHLIT AM, LIMA RBS, FRAUSIN G, et al., 2013. Amazonian plant natural products: Perspectives for discovery of new antimalarial drug leads [J]. *Molecules*, 18(8): 9219-9240.
- PRICE RN, VON SEIDLEIN L, VALECHA N, et al., 2014. Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: A systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 14(10): 982-991.
- SLATER AFG, SWIGGARD WJ, ORTON BR, et al., 1991. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(2): 325-329.
- VANGAPANDU S, JAIN M, KAUR K, et al., 2007. Recent advances in antimalarial drug development [J]. *Med Res Rev*, 27(1): 65-107.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. Guidelines for the treatment of malaria: 2nd ed [S]. Geneva: World Health Organization.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015. Guidelines for the treatment of malaria: 3rd ed [S]. Geneva: World Health Organization.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017a. World Malaria Report 2017 [R]. Geneva: World Health Organization.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017b. Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance [R]. Geneva: World Health Organization.
- XIAO CJ, DONG X, HAN BY, et al., 2016. Antimalarial activity of *Isodon yuennanensis* [J]. *Chin Pharm J*, 51(8): 612-615. [肖朝江, 董相, 韩冰洋, 等, 2016. 药用植物不育红抗疟活性研究 [J]. *中国药理学杂志*, 51(8): 612-615.]
- XIAO CJ, XU W, LIU ZQ, et al., 2014. Evaluation of the antimalarial activity of 25 herbal medicines from West Yunnan [J]. *J Pathog Biol*, 9(6): 542-545. [肖朝江, 徐伟, 刘子琦, 等, 2014. 滇西地区 25 种药用植物抗疟活性研究 [J]. *中国病原生物学杂志*, 9(6): 542-545.]
- XU YJ, PIETERS L, 2013. Recent developments in antimalarial natural products isolated from medicinal plants [J]. *Mini-Rev Med Chem*, 13(7): 1056-1072.
- ZHANG L, FENG J, ZHANG SS, et al., 2017. Malaria situation in the People's Republic of China in 2016 [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis Dec*, 35(6): 515-519. [张丽, 丰俊, 张少森, 等, 2017. 2016 年全国疟疾疫情分析 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 35(6): 515-519.]