

文章编号:1000-7423(2001)-06-0363-04

# 疟原虫食物泡:抗疟药的靶点

翟自立 伍卫平

中图分类号:R382.31

文献标识码:A

疟疾是当今严重危及人类健康的一种寄生虫病。在其它一些寄生虫病流行基本得到控制甚至消灭时,疟疾流行却难以有效遏制,其部分原因是,一些传统抗疟药物的化学结构相似,作用机制相仿,易使疟原虫产生交叉抗药性。因此发展新型结构且作用机制有别于传统药物的新药是十分必要的。而探讨现用药物的作用机制,研究疟原虫的基础代谢和生化过程,从中发掘分子靶,可能对基于分子靶设计新药具有指导意义。

疟原虫主要依靠消化包括血红蛋白在内的红细胞胞质获得营养。血红蛋白被吞入虫体后,在酸性食物泡内被降解为肽段和游离氨基酸,并释放出血红素。血红素进一步聚合成疟色素,期间释放出痕量元素铁,铁为原虫合成铁蛋白所用。由此可见,食物泡是疟原虫游离氨基酸和铁供给的重要场所。有学者指出,一些抗疟药物的作用机制与抑制血红蛋白降解或破坏血红素解毒机制有关,并认为发生于食物泡内的上述生物化学反应是设计抗疟新药的靶之一。本文就有关这方面的研究进展作一综述。

## 1 抑制血红蛋白降解

已有的资料表明,喹啉类和青蒿素类抗疟药物具有抑制疟原虫血红蛋白酶的作用<sup>[1,2]</sup>。该酶为血红蛋白降解的催化剂,一旦被抑制,将导致血红蛋白降解及其后续加工过程中断,进而引起虫体营养“饥饿”而发育停止,甚至死亡。鉴于血红蛋白酶的重要作用,对疟原虫血红蛋白酶的生物学特性及其与宿主差异的研究受到广泛关注,希冀找到选择性作用于疟原虫而对宿主细胞无害的抑制剂,以便开发新一代高效低毒的抗疟药物。目前已发现的疟原虫血红蛋白酶有两类,即半胱氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶,后者又有 plasmepsin I 和 plasmepsin II 两种形式。半胱氨酸蛋白酶可能参与解离血红蛋白四聚体

及从珠蛋白中释放血红素,两种天冬氨酸蛋白酶负责将血红蛋白切割成寡肽,寡肽进一步在食物泡或胞质中被其它肽酶裂解成游离氨基酸<sup>[3,5]</sup>。

E-64、氟甲酮化合物及乙烯砷类化合物等均是半胱氨酸蛋白酶的特异性抑制剂,体外实验显示它们均有抗疟作用,结果导致疟原虫食物泡内积聚大量的珠蛋白,虫体停止发育<sup>[1,6]</sup>。动物实验示氟甲酮化合物对鼠疟有效<sup>[7]</sup>。抑胃酶肽为天冬氨酸蛋白酶的强抑制剂,体外具有明显抗疟效果<sup>[1,2]</sup>,若与 E-64 联合使用,抗疟效果更佳<sup>[2]</sup>。目前对疟原虫血红蛋白酶抑制剂的筛选还处于起始阶段,上述选用的几种抑制剂对宿主的血红蛋白酶亦有一定的影响,但由于对疟原虫的 3 种血红蛋白酶基因进行了克隆,经与人体细胞相应酶的氨基酸序列分析比较,发现同源性较低,因此利用获得的重组蛋白,筛选出特异性抑制疟原虫血红蛋白酶的化合物仍是可能的。

## 2 抑制疟色素形成

作为血红蛋白降解的副产物,血红素是生物体内很强的脂质过氧化反应的催化剂,对生物膜具有损伤作用,并可抑制多种酶活性,如蛋白水解酶等。可以推测,疟原虫既消化血红蛋白,又免遭血红素的毒性,其食物泡内必定存在血红素解毒机制<sup>[8]</sup>。疟原虫本身可从头合成血红素,因此不需要血红蛋白降解产生的血红素<sup>[9]</sup>。体外实验证明,血红素可通过酶催化或非酶系统聚合成无毒的复合物疟色素<sup>[10,11]</sup>,但在正常生理条件下,疟原虫可能主要通过酶催化机制清除血红素<sup>[12]</sup>。疟色素由血红素单体组成,临近的两个血红素通过铁-羧基键连接在一起<sup>[13]</sup>。最近有学者认为,疟原虫体内的一部分游离血红素亦可经由降解机制清除<sup>[14]</sup>。

氯喹为目前常用的抗疟药物之一,就对其作用机制认识而言,它似乎对虫体食物泡内的血红蛋白降解及组成成分具有广泛的影响。氯喹集中于酸性

作者单位:中国预防医学科学院寄生虫病研究所,上海 200025

食物泡内,除抑制半胱氨酸蛋白酶活性外,还可抑制血红蛋白降解和铁释放、血红素依赖的蛋白质合成以及血红素聚合反应等等<sup>[10,15]</sup>。对无论是血红素聚合酶催化的或是自发的、人工的或是天然的血红素聚合反应,氯喹均有明显的抑制作用,且氯喹对血红素聚合的抑制强度与其抗疟活性之间具有直接的联系<sup>[15]</sup>。氯喹对血红素有强的亲和力,两者反应形成加合物可终止疟色素链的延伸,这可能是氯喹阻断疟色素形成的重要原因<sup>[16]</sup>。奎宁和甲氟喹等其它喹啉类抗疟药物的杀虫机制可能与氯喹相似。

青蒿素及其衍生物是与喹啉类化合物化学结构截然不同的抗疟药,它们除通过增加氧张力杀虫外,亦有抑制疟色素形成的作用,且较氯喹强烈和迅速。此外,青蒿素还能与疟色素发生共价结合,并可能通过分子重排使疟色素的铁-羧基键断裂,释放出游离的血红素<sup>[2]</sup>。

### 3 增加氧张力

疟原虫具备完整的抗氧化系统,使其免受宿主免疫细胞、红细胞及虫体本身在消化血红蛋白过程中产生的氧自由基攻击。抗氧化系统中,超氧化物歧化酶清除超氧阴离子,过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶等清除过氧化氢,谷胱甘肽-S-转移酶参与清除亲电子化合物外,亦有清除过氧化氢的功能。由于疟原虫对氧张力较宿主敏感,理论上,对疟原虫增强氧张力和/或抑制虫体的抗氧化自我保护机制,均可达到杀灭虫体的目的,因此,超氧化物歧化酶<sup>[17]</sup>、谷胱甘肽还原酶<sup>[18]</sup>及谷胱甘肽过氧化物酶<sup>[19]</sup>等抗氧化酶被认为是设计抗疟新药的潜在靶分子,并初步观察了一些酶抑制剂的抗疟作用。

青蒿素及其衍生物的抗疟作用与增加疟原虫的氧张力有关。实验证实,它们与自由基引发剂和抗氧化酶抑制剂具有协同抗疟作用,而自由基清除剂或抗氧化剂则能降低其抗疟作用<sup>[20]</sup>。铁螯合剂拮抗青蒿素类药物的抗疟作用,表明该类药物的杀虫过程中须有铁的参与<sup>[21]</sup>。血红素能与青蒿素类药物共价结合,并使其分子内过氧桥裂解,产生氧自由基,进而生成一系列亲电子化合物,氧化和烷化虫体膜蛋白、引发脂类过氧化<sup>[22-24]</sup>。显然,青蒿素类药物的代谢产物在破坏虫体生物膜之前,须越过虫体抗氧化防御系统这道关。事实上,青蒿素类药物对许多蛋白酶具有烷化作用<sup>[2]</sup>,其中可能包括一些重要的抗氧化酶。

青蒿素类抗疟药已投入使用十余年,迄今尚未

见有明显抗药性出现,故而青蒿素类药物的独特化学结构及抗疟作用机制引起一些学者的关注。近年来,一方面,基于青蒿素类药物的基本结构,制备了第二代分子内过氧化物即三噁烷类和四噁烷类化合物,实验证明它们具有与青蒿素类药物相似的作用机制,且显示出很强的抗疟活性。须指出的是,两代化合物均须要一个分子内过氧桥结构,失去该结构,也就失去了药理活性<sup>[25]</sup>。另一方面,根据青蒿素类药物的铁依赖自由基生成的作用机制,建立了体外抗疟化合物的筛选系统,并发现 radicicol、heptelidic acid、nanaomycin A 等十余种微生物代谢物有效。用于动物模型,亦得到满意效果。实验证实,这类微生物代谢物的抗疟机制与青蒿素类药物的相似,也就是铁介导生成自由基烷化剂。与青蒿素类药物有所不同的是,它们不携带过氧桥结构<sup>[26]</sup>。

### 4 螯合铁

红内期疟原虫需铁合成含铁蛋白。铁蛋白参与虫体的生化代谢过程,如 DNA 合成、CO<sub>2</sub> 固定、血红素合成、线粒体电子传递等等。疟原虫可利用的铁可能来源于多个方面,但愈来愈多的证据表明,原虫主要依靠血红蛋白和红细胞胞质供给游离铁<sup>[27]</sup>。鉴于铁为疟原虫所必需,运用铁螯合剂螯合疟原虫体内的铁,使其含铁蛋白的合成受阻,进而抑制 DNA 合成等一系列生化代谢和生理功能,最终起到中止虫体生长、繁殖的作用。这就是寻找铁螯合剂抗疟新药的基本设想。

目前已筛选出一些有效的铁螯合剂。根据螯合铁的价态,大致可将铁螯合剂分为三价铁螯合剂和二价铁螯合剂两大类。三价铁螯合剂又包括羟肟酸盐类 (hydroxamate)<sup>[28]</sup>、catecholamide<sup>[29]</sup>、dihydroxycoumarin<sup>[30]</sup>、acylhydrazone<sup>[31]</sup>、aminothiol<sup>[32]</sup>等数类化合物。这些化合物的作用机制可能是通过螯合虫体内的游离铁,造成虫的“铁饥饿”,或螯合核糖核苷酸还原酶、 $\sigma$ -氨基乙酰丙酸合成酶等含铁酶的铁,使酶生物活性丧失,并最终导致虫体的生化代谢障碍。三价铁螯合剂亦可与虫体的铜、锌、钙等其它必需金属离子结合,但它们之间的亲和力较与铁的低约一至数个数量级。二价铁螯合剂包括一些芳香族和二吡啶基的金属螯合剂,其抗疟机制与三价铁螯合剂有所不同,它们首先于胞外与铁形成复合物,再渗透入红细胞和虫体内诱发自由基介导的生物学效应,进而引起虫的死亡<sup>[33]</sup>。无论是三价,或是二价铁螯合剂,螯合剂与铁的相互作

用是其抗疟活性的基础。

氧卟酸盐类铁螯合剂去铁胺已应用于临床治疗铁过剩患者达 20 余年,效果好、毒性低,因此在所筛选的铁螯合剂中,以对去铁胺抗疟观察居多。去铁胺虽对红外期和红内期疟原虫均有效,但比较而言,对晚期滋养和早期裂殖体的作用较好。去铁胺抗疟表现出期的特异性系与通过各期虫膜的能力不同有关。总之,去铁胺有一个明显的缺陷,即膜通透性差。为保证获得满意的疗效和预防作用,用药量较大,随之而来的是宿主暴露该药不良反应的危险性大。目前已对去铁胺的结构稍作改进,合成了多种去铁胺的 N-端衍生物,即将疏水性基团结合在去铁胺的 N 端,这样既保留母体化合物对三价铁的结合力,又提高了膜通透性<sup>[28]</sup>。去铁胺与其甲基邻氨基苯甲酸衍生物的 IC<sub>50</sub> 分别为 21 和 4 μmol/L,且该衍生物选择性作用于疟原虫,而对宿主细胞毒性较低。去铁胺的一些不足限制了其临床应用于治疗疟疾,但去铁胺的衍生物或其它某些铁螯合剂可能具有一定的应用前景。

#### 参 考 文 献

- [1] Rosenthal PJ. *Plasmodium falciparum*: effects of proteinase inhibitors on globin hydrolysis by cultured malaria parasites. *Exp Parasitol*, 1995, 80: 272 - 281.
- [2] Pandey AV, Tekwani BL, Singh RL, et al. Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and hemodetoxification systems in malarial parasite. *J Biol Chem*, 1999, 274: 19383 - 19388.
- [3] Kamchonwongpaisan S, Sarnoff E, Meshnick SR. Identification of hemoglobin degradation products in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 1997, 86: 179 - 186.
- [4] Westling J, Cipullo P, Hung SH, et al. Active site specificity of plasmepsin II. *Protein Sci*, 1999, 8: 2001 - 2009.
- [5] Kolakovich KA, Gluzman IY, Duffin KL, et al. Generation of hemoglobin peptides in the acidic digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* implicates peptide transport in amino acid production. *Mol Biochem Parasitol*, 1997, 87: 123 - 135.
- [6] Rosenthal PJ, Olson JE, Lee GK, et al. Antimalarial effects of vinyl sulfone cysteine proteinase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40: 1600 - 1603.
- [7] Rosenthal PJ, Lee GK, Smith RE. Inhibition of a *Plasmodium falciparum* cysteine proteinase cures murine malaria. *J Clin Invest*, 1993, 91: 1052 - 1056.
- [8] Taramelli D, Monti D, Basilico N, et al. A fine balance between oxidised and reduced haem controls the survival of intraerythrocytic plasmodia. *Parasitologia*, 1999, 41: 205 - 208.
- [9] Padmanaban G, Ranganathan PN. Heme metabolism of *Plasmodium* is a major antimalarial target. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 268: 665 - 668.
- [10] Egan TJ, Mavuso WW, Ross DC, et al. Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. *J Inorg Biochem*, 1997, 68: 137 - 145.
- [11] Dorn A, Vippagunta SR, Maule H, et al. An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. *Biochem Pharmacol*, 1998, 55: 727 - 736.
- [12] Pandey AV, Singh N, Tekwani BL, et al. Assay of beta-haematin formation by malaria parasite. *J Pharm Biomed Anal*, 1999, 20: 203 - 207.
- [13] Pagola S, Stephens PW, Böhle DS, et al. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature*, 2000, 404: 307 - 310.
- [14] Loria P, Miller S, Foley M, et al. Inhibition of the peroxidation degradation of heme as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochem J*, 1999, 339: 363 - 370.
- [15] Raynes K. Bisquinoline antimalarials: their role in malaria chemotherapy. *Int J Parasitol*, 1999, 29: 367 - 379.
- [16] Vippagunta SR, Dorn A, Ridley RG, et al. Characterization of chloroquine-haematin mu-oxo dimer binding by isothermal titration calorimetry. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1475: 133 - 140.
- [17] Becuwe P, Gratcapuche S, Fourmaux MN, et al. Characterization of iron-dependent endogenous superoxide dismutase of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 1996, 76: 125 - 134.
- [18] Gilberger TW, Schirmer RH, Walter RD, et al. Deletion of the parasite-specific insertions and mutation of the catalytic triad in glutathione reductase from chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* 3D7. *Mol Biochem Parasitol*, 2000, 107: 169 - 179.
- [19] Gamain B, Langsley G, Fourmaux MN, et al. Molecular characterization of the glutathione peroxidase gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 1996, 78: 237 - 248.
- [20] Senok AC, Nelson EAS, Li K, et al. Thalassaemia trait, red blood cell age and oxidant stress: effects on *Plasmodium falciparum* growth and sensitivity to artemisinin. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1997, 91: 585 - 589.
- [21] Meshnick SR, Yang YZ, Lima V, et al. Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37: 1108 - 1114.
- [22] Kapetanaki S, Varotsis C. Ferryl-oxo heme intermediate in the antimalarial mode of action of artemisinin. *FEBS Lett*, 2000, 474: 238 - 241.
- [23] Asawamahsakda W, Benakis A, Meshnick SR. The interaction of artemisinin with red cell membranes. *J Lab Clin Med*, 1994, 125: 757 - 762.
- [24] Berman PA, Adams PA. Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes. *Free Radic Biol Med*, 1997, 22: 1283 - 1288.
- [25] Meshnick SR, Jefford CW, Posner GH, et al. Second-generation antimalarial endoperoxides. *Parasitol Today*, 1996, 12: 79 - 82.
- [26] Tanaka Y, Kamei K, Otaguro K, et al. Heme-dependent radical

generation: possible involvement in antimalarial action of non peroxide microbial metabolites, nanaomycin A and radicicol. J Antibiot, 1999, 52:880-888.

[27] Cababehik ZI, Glickstein H, Golenser J, et al. Iron chelators: mode of action as antimalarials. Acta Haematol, 1996, 95:70-77.

[28] Glickstein H, Breuer B, Loyevsky M, et al. Differential cytotoxicity of iron chelators on malaria-infected cells versus mammalian cells. Blood, 1996, 87:4871-4878.

[29] Pradines B, Ramiandrasoa F, Basco LK, et al. *In vitro* activities of novel catecholate siderophores against *Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40:2094-2098.

[30] Yang Y, Ranz A, Pan HZ, et al. Daphnetin: a novel antimalarial agent with *in vitro* and *in vivo* activity. Am J Trop Med

Hyg, 1992, 46:15-20.

[31] Tsafack A, Loyevsky M, Ponka P, et al. Mode of action of iron (III) chelators as antimalarials. IV. Potentiation of desferal action by benzoyl and isonicotinoyl hydrazone derivatives. J Lab Clin Med, 1996, 127:574-582.

[32] Loyevsky M, John C, Zaloujnyi I, et al. Arimothiol multidentate chelators as antimalarials. Biochem Pharmacol, 1997, 54:451-458.

[33] Van Zyl RL, Havlik I, Monteagudo FSE. The combined effect of iron chelators and classical antimalarials on the *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum*. J Antimicrob Chemother, 1992, 30:273-278.

(收稿日期:2000-12-15 编辑:吐兆农)

## 【消息】

文章编号:1000-7423(2001)-06-0366-01

### 上海市寄生虫学会 2001 年会

上海市寄生虫学会 2001 年会于 2001 年 11 月 7 日至 8 日在上海市松江区召开。年会主题是:研讨上海市寄生虫病防治、科研及教育工作进展。出席会议的有中国预防医学科学院寄生虫病研究所、第二军医大学、复旦大学医学院、复旦大学附属华山医院、交通大学农学院、上海中医药大学、上海市疾病预防控制中心及松江、闵行、浦东新区、崇明、奉贤等区疾病预防控制中心共 12 个单位 41 位科研、教学及疾病防治第一线的卫生工作人员。学会理事长冯正研究员致开幕词,中国预防医学科学院寄生虫病研究所和松江区疾病预防控制中心领导分别作了讲话,宋关鸿、黄德生副理事长及石尧忠理事分别主持会议。

大会收到学术论文和工作报告共 25 篇,已汇编为论文摘要集。会议分大会专题报告和圆桌讨论两部分。与会的理事和会员分别传达了“世界卫生大会关于血吸虫和土源性蠕虫感染的决议”,作了“上海市四所医院食源性寄生虫病住院病例调查”、“我国大陆主要蚊种唾腺蛋白 IgE 亲和成分的初步分析”、“全球气候变暖对血吸虫病传播的潜在影响”、“重组疟疾疫苗融合蛋白的研究进展”、“上海市郊人群土源性线虫感染与蔬菜、土壤虫卵污染情况调查”等学术报告,充分反映了上海市近年来寄生虫病的流行状况、防治和科研成果。对出现的新情况新变化也进行了热点讨论。

改革开放以来,上海市经济建设迅速发展,人民生活水平不断提高,寄生虫病防治研究人员多年来坚持不懈地努力,使寄生虫病防治研究工作取得了很大进展。与此同时,由于人们生活习惯及饮食方式的变化,城市建设和旅游业的迅速发展,流动人口急剧上升,使食源性寄生虫病(如并殖吸虫病、囊尾蚴病和姜片吸虫病等)、免疫缺陷和免疫力低

下人群的机会性寄生虫感染(如弓形虫等)和输入性寄生虫病(血吸虫病、疟疾和肠道寄生虫病等)有上升的趋势。与会者认为应该引起寄生虫病防治研究及有关领导部门的足够重视。

一年一度的年会为大家提供了相互交流的好机会。会议讨论热烈,一致认为,上海作为国际化大都市,不仅在经济和城市建设方面迅速发展,同时对寄生虫病的防治研究也应尽快地向国际大都市应有的水平迈进。会议提到“十五”期间卫生部对于寄生虫病的防治工作给予了高度重视,这对上海乃至全国的寄生虫病防治和科研机构无疑是一次难得的机遇。会议建议上海市应加强寄生虫病科研院所、医学院校和基层防疫部门的合作,加快高新技术应用步伐,迅速将科研成果转化为生产力,并在实际工作中得到充分的运用;科研与教学信息互通,使新一代医学生接受到最新的寄生虫病学知识;加强基层医务人员有关寄生虫病的基础知识和检验技能的培训;通过各种媒体大力开展健康教育宣传工作,提高市民的自我保护意识;加强流动人口的管理工作,做好食源性寄生虫病、机会性寄生虫感染和输入性寄生虫病的控制和防治工作,争取在“十五”期间努力使本市的寄生虫病感染率有更大幅度的下降。

最后,冯正理事长总结了 2001 年的学会工作,介绍了近期寄生虫病领域的几件大事。与会者一致认为大会开得十分成功,达到预期目的,促进学术交流而且增进上海市寄生虫病科研教育和防治人员的相互了解,会议对上海市的寄生虫病防治、研究和教育工作充满信心。

(盛慧锋)