

青蒿素在原虫病治疗中的作用及机理研究进展

杨桂连, 石昊林, 王春风*

(吉林农业大学动物科学技术学院, 吉林省动物微生态制剂工程研究中心, 长春 130118)

[收稿日期] 2016-12-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 04-0060-00 [中图分类号] S859.79

[摘要] 原虫是一种单细胞真核生物, 整个虫体由一个细胞构成, 可以寄生在机体的腔道、体液、组织或细胞内。原虫病严重危害人类健康和养殖业发展。目前, 广泛使用的化学药物治疗会产生耐药性、药物残留和毒副作用等弊端。青蒿素作为一种从植物黄花蒿中提取的天然物质, 对多种原虫具有治疗作用, 与化学药物相比更加安全、廉价甚至更高效。本文对青蒿素在原虫病治疗中的作用和机理进行综述, 旨在为其应用于原虫病治疗提供理论依据。

[关键词] 青蒿素; 作用机理; 利什曼原虫; 艾美尔球虫; 弓形虫; 疟原虫

Research Progress on Therapeutic Effect and Mechanism of Artemisinin against Protozoan Infection

YANG Gui-lian, SHI Hao-lin, WANG Chun-feng*

(College of Animal Science and Technology, Jilin Provincial Engineering Research Center of Animal probiotics, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Protozoan is a monoplast eukaryon. The whole polypide consists of only one cell. Protozoa could live in the cavity, humor, tissue or cells of the livestock. Nowadays, there are few kinds of protozosis jeopardizing human health and animal farming industry. However, medicines have lose their potency over time due to the development of resistance, drug remnants and side effects. Artemisinin is extracted from *Artemisia annual*. Compared with traditional medicine, it is safer, cheaper and more efficient. In this review, we demonstrated the mechanism of artemisinin treatment of protozosis, the purpose is to provide some theoretical basis in use of artemisinin treatment of protozosis.

Key words: artemisinin; mechanism; *Leishmania*; *Eimeria tenella*; *Toxoplasma gondii*; *Plasmodium*

二十世纪七十年代, 中国人发现了青蒿素, 由于青蒿素具有高效的抗疟作用, 很快引起了全世界的关注^[1]。青蒿素是来自菊科草本植物黄花蒿中

提取的的一种倍半萜内酯类化合物。其衍生物包括双氢青蒿素、青蒿琥酯、蒿甲醚、蒿乙醚等, 都具有抗疟、抗寄生虫等作用。目前, 青蒿素已经在全

基金项目: 国家“863”计划项目(2013AA102806); 国家自然科学基金项目(31272552, 31272541, 31672528); 吉林省科技发展计划项目(20160519011JH); 吉林省产业创新专项资金项目(2016C063)

作者简介: 杨桂连, 副教授, 从事动物寄生虫免疫防治方面研究; 石昊林, 与杨桂连为共同第一作者。

通讯作者: 王春风。E-mail: wangchunfeng@jlau.edu.cn

世界得到广泛的使用,最主要应用于非洲及东南亚的一些国家^[2]。如今,人们发现青蒿素的功效已经不局限于抗疟,大量研究表明青蒿素具有对抗多种寄生虫、抗纤维化、对抗肿瘤等重要的作用,但其药理作用机制的研究还并不完善^[3]。本文介绍了青蒿素及其衍生物在原虫病治疗上的作用及机理研究进展,为使用青蒿素治疗原虫病,以及其它寄生虫病提供参考。

1 青蒿素及其衍生物的化学特性

含有过氧桥键是青蒿素及其衍生物的共同特征^[4]。通常情况下,青蒿素的脂溶性和水溶性都很差。然而,青蒿素中 10 位碳上的羰基还原得到衍生物双氢青蒿素具有良好的水溶性^[5]。通过向双氢青蒿素加入氨基、羰基、硫羰基或苯环等取代基可以合成醚类衍生物,例如最早合成的脂溶性醚类衍生物蒿甲醚和蒿乙醚。药理学研究表明,大部分醚类衍生物具有良好的抗疟能力,并且在机体内半衰期较长。酯类衍生物是双氢青蒿素的 10 位碳上的 O-H 键被酯基取代生成的衍生物。酯类衍生物中的青蒿琥酯是最早发现的水溶性青蒿素衍生物,在临床应用上具有速效和低副作用的特点^[6]。

2 青蒿素治疗原虫病的作用机制

2.1 青蒿素及其衍生物的过氧桥键裂解反应 青蒿素是一种含过氧桥键的特殊倍半萜内酯。这种过氧桥键是其可以有效对抗原虫感染的重要因素之一。在机体中二价铁离子影响下,青蒿素中的过氧桥键逐渐断裂,两个氧原子与铁离子以共价键方式结合,产生不稳定的络合物^[7]。铁元素在青蒿素抗疟研究中具有重要的作用^[8]。络合产物在外界条件刺激下裂解,并使铁离子发生迁移,最终脱去铁离子,形成两个氧自由基从而起到抑杀原虫的作用^[9-11]。同时,血红素中的亚铁离子与青蒿素反应会生成碳自由基中间体,碳自由基会导致血红素烷基化和谷胱甘肽的烷基化^[12-13],基于这种烷基化的特性,人们合成了一种新化合物-Trioxaquines, Chandan 等^[14]应用这种物质对抗疟原虫的实验表明,青蒿素的烷基化作用对疟原虫的杀伤效果十分显著。Carmony 等通过荧光技术来测定用青蒿素处

理被恶性疟原虫感染的红细胞。结果发现,在使用青蒿素治疗处于红细胞内期的疟原虫细胞膜迅速被氧化,与未使用青蒿治疗相比疟原虫数量大量减少。当使用醚类取代其过氧桥键后,其对抗疟原虫能力显著降低。证明了青蒿素及其衍生物中的过氧桥键在对抗疟原虫时起到了至关重要的作用。并且青蒿素能够破坏红细胞内期的虫体细胞膜,使原虫的活力下降,有效的控制寄生虫感染具有抑杀原虫的作用^[15-16]。

2.2 青蒿素及其衍生物恢复一氧化氮的生成能力

大量研究表明,巨噬细胞分泌的一氧化氮(NO)可以对多种原虫起到抑杀作用。如利什曼原虫、弓形虫、疟原虫、隐孢子虫等。无论是在体内还是体外试验都证明了通过刺激巨噬细胞增强 NO 生成能力后可以有效的对抗弓形虫的感染,并且抑制弓形虫在细胞内的增值^[16]。巨噬细胞是利什曼原虫的主要寄生细胞,利什曼原虫入侵机体后会严重的破坏巨噬细胞活性,从而破坏其分泌 NO 能力^[17]。Evans 的试验发现,在使用一氧化氮合成酶抑制剂抑制 NO 的生成后,机体几乎不能控制利什曼原虫在体内的感染,寄生虫数目显著增多^[18]。通过刺激巨噬细胞使其产生 NO 增加后,NO 会介导巨噬细胞对利什曼原虫的细胞毒作用,从而有效的抑杀寄生虫^[19],证明了 NO 在对抗原虫感染中起到了重要的作用。Rupashree 等人使用青蒿素治疗人工感染利什曼原虫的 BALB/c 小鼠,在未治疗的受感染小鼠中发现,巨噬细胞 NO 的生成量显著降低了。当使用青蒿素作用被感染的小鼠时,巨噬细胞 NO 的生成量被显著地提高了,甚至与正常状态未感染未治疗的小鼠相比 NO 的含量增加了 1.3 倍,并且青蒿素可以很有效的控制利什曼原虫的感染。这说明青蒿素能通过恢复甚至提高被感染巨噬细胞的 NO 产生量,从而可以对入侵巨噬细胞的利什曼原虫起到显著地杀伤作用^[20]。

2.3 青蒿素及其衍生物调控钙离子浓度 弓形虫、隐孢子虫和疟原虫等寄生虫侵袭宿主细胞依赖于虫体顶端微线体蛋白的分泌,并受到钙离子浓度的影响^[21]。例如在弓形虫体内最主要就是依靠肌

质内质网 Ca^{2+} -APT 酶 (SERCA) 来调节 Ca^{2+} 浓度, 从而影响微线体蛋白的分泌作用。研究表明对于 Ca^{2+} 和相关蛋白激酶的调控可以影响弓形虫速殖子的滑行运动、入侵宿主细胞和逃离作用。虽然其 Ca^{2+} 信号通路和相关蛋白激酶的作用机制是十分复杂的, 但在弓形虫整个生活史中起到了至关重要的作用, 所以控制宿主细胞对 Ca^{2+} 的通透性也是宿主抵抗弓形虫的一种重要手段^[22]。

Nagamune 等^[23]研究发现, 青蒿素及其衍生物可以通过抑制 SERCA 的 Ca^{2+} -ATP 酶的活性来破坏虫体细胞内 Ca^{2+} 的动态平衡, 作用类似于毒胡萝卜素, 通过抑制 SERCA 从而有效的起到抑杀弓形虫的作用。在使用传统化学药物例如磺胺嘧啶和乙胺嘧啶治疗弓形虫时会产生明显的副作用, 然而使用青蒿素替代化学药物治疗弓形虫感染是一个安全有效的手段^[24]。

Emilio 等^[25]使用青蒿素对人工感染的柔嫩艾美尔球虫雏鸡进行治疗。探讨青蒿素控制 SERCA 的表达量对球虫产生的影响。通过流式细胞技术和免疫荧光技术检测, 结果表明在使用青蒿素治疗被球虫感染的鸡中的 SERCA 的表达量显著降低, 同时卵囊也显著减少。这是由于卵囊壁的形成是一种钙依赖性机制, 受到 SERCA 的影响, 由于青蒿素的作用使被球虫感染的鸡中 SERCA 降低, 导致卵囊发育异常甚至导致卵囊的死亡。发育异常的卵囊即使被鸡排出, 也丧失孢子化能力, 起到了控制球虫继续传播的重要作用^[26]。

2.4 青蒿素及其衍生物调节 Th1、Th2 免疫应答平衡 寄生虫侵袭宿主后, 随着寄生虫在体内感染的阶段不同, 会对机体产生不同的刺激从而诱导机体产生多种细胞因子, 引起免疫系统发生复杂的免疫应答。其中辅助性 T 细胞 (Th 细胞) 在机体对抗寄生虫感染免疫中起到关键作用。Th 细胞分为两个不同亚群 Th1 和 Th2。Th1 可以分泌 IL-2 和 IFN- γ , 促进细胞免疫反应; Th2 可以分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10, 增强体液免疫反应。IFN- γ 和 IL-2 主要诱导 Th1 细胞分化, IL-4 和 IL-5 主要诱导 Th2 细胞分化^[27-29]。

在利什曼原虫感染的研究中发现, 在感染期间, 机体免疫反应从细胞免疫反应向体液免疫反应倾斜, 这也成为了寄生虫能够在细胞内持续的存活关键^[30]。Halder 等^[31]使用青蒿素治疗利什曼原虫感染的 BALB/c 小鼠, 通过检测 Th 细胞产生的细胞因子变化来说明 Th1 和 Th2 表达水平的变化。实验发现, 小鼠在感染利什曼原虫后与未感染小鼠比较 IFN- γ 和 IL-2 的表达水平显著降低了, 而 IL-4 和 IL-10 的表达无明显变化。在使用青蒿素治疗感染小鼠后, 可明显提升 IFN- γ 和 IL-2 的表达水平, 并且治疗效果超过葡萄糖酸锑。实验证明, 青蒿素可以通过促进 IFN- γ 和 IL-2 表达水平升高, 诱导 Th1 细胞分化, 使机体不平衡的细胞免疫与体液免疫重新达到平衡, 起到控制并杀死寄生虫的作用。同时青蒿素可通过调节 Th17 细胞的细胞因子 IL-17、IL-25 与 Treg 细胞的细胞因子 IL-10、IL-35 之间的平衡, 来纠正 Th17/Treg 细胞的免疫失衡^[32]。

3 青蒿素及其衍生物耐药机制

由于青蒿素及其衍生物具有高效抗疟、加工简单、成本低廉等优点, 被长期广泛应用于临床治疗。在临床上长期、大量、持续的治疗过程中, 逐渐产生了耐药性^[33]。研究表明, 在长期地药物压力下一些恶性疟原虫对青蒿素及其衍生物敏感性逐渐降低, 如果去除药物压力, 耐药株对青蒿素及其衍生物的敏感性也逐渐恢复^[34]。这说明青蒿素及其衍生物的耐药性产生与长期连续的药物使用密切相关。大量研究表明, 长期药物压力会导致相应基因表达发生改变, 引起作用靶蛋白表达量发生变化等结果。

Li 等^[35]研究表明, 机体电子传递的变化会影响机体对青蒿素的敏感性。如果电子传递发生改变引起了电势下降会抑制机体线粒体功能。研究表明线粒体破坏会导致编码线粒体脱氢酶 NDE1 或 NDI1 的缺失。这些酶的缺会使机体对青蒿素敏感性减低。Krishna 等^[36]从恶性疟患者病例中发现, PfATP6 基因序列的第 769 位的丝氨酸突变为天冬酰胺 (S769N), 突变出现对蒿甲醚耐药现象。不仅是在宿主中基因突变会引起机体对青蒿素及其衍生物敏感性发生变化, 在疟原虫的遗传过程中

某些基因的突变也会影响其对青蒿素及其衍生物的敏感性。如与疟原虫抗药性产生密切相关的恶性疟原虫多药抗性基因(Plasmodium falciparum multi-drug resistance gene sequence,简称 pfmdr1)、恶性疟原虫氯喹抗性性转运蛋白(Plasmodium falciparum chloroquine resistant transporter,简称 pfert)的基因序列的变化可能会导致膜转运蛋白的改变,从而使药物外排增多,使其无法实施有效的抗疟作用而产生耐药性^[37-38]。

青蒿素是一种天然植物提取物,在抗疟方面相对于传统抗疟药物不易产生耐药性。但是随着青蒿素的普遍使用,在泰柬边境地区已出现了青蒿素耐药性的现象,并且体外药物敏感性监测检测时也发现恶性疟原虫野外分离株的敏感性有降低的现象^[39-40]。同样,在中国的云南、海南等疟疾高发并应用青蒿素类抗疟药较久的地区,恶性疟原虫的敏感性呈缓慢下降的趋势^[41]。因此,研究青蒿素及其衍生物耐药性的产生机制并加以解决对防治疟原虫病有重要意义。

4 结 论

青蒿素作为一种高效的抗疟药物已经广泛的应用于全世界。它除了在抗疟原虫的应用上有显著的效果之外,青蒿素及其衍生物也被发现在对抗其它原虫,例如利什曼原虫、阿米巴、锥虫、球虫等也是十分有效的。有研究发现青蒿素的一种衍生物,蒿乙醚可以针对影响宿主中枢神经系统的原虫感染例如弓形虫、棘阿米巴虫、锥虫,在治疗上的效果十分显著,对于这些类似疾病的治疗与研究具有极大的潜力^[42]。

现在,原虫病的治疗还面临和许多难题,例如常用的抗原虫药物在应用中都有很大的局限性,它们都普遍具有严重的副作用,且长期使用会产生耐药性。利什曼原虫和锥虫经过长期传统药物治疗已经出现耐药性,对临床治疗带来巨大的挑战,至今也没有一个安全高效的治疗牛新孢子虫病和贾第鞭毛虫病的特效药物。青蒿素的化学特性以及青蒿素对抗原虫病机制的研究已取得一定成果。使用青蒿素及其衍生物进行治疗,相对传统药物治

疗手段,具有毒副作用低、无耐药性、成本低廉等优点。无论是单独使用还是与其他药物联合使用都为治疗原虫病提供了一个新的方式。

参考文献:

- [1] 黎润红,饶毅,张大庆. “523 任务”与青蒿素发现的历史探究[J]. 自然辩证法通讯. 2013(01):107-123.
- [2] 管惟滨. 以科学发展观看青蒿素(黄蒿素)的由来与发展[J]. 热带病与寄生虫学. 2013(02):63-67.
- [3] 谭涛,秦宗会,谭蓉. 青蒿素类药物的药理作用研究进展[J]. 中国药业. 2009(03):63-64.
- [4] Chaturvedi D, Goswami A, Saikia P P, *et al.* Artemisinin and its derivatives; a novel class of anti-malarial and anti-cancer agents [J]. ChemInform, 2010, 41(22): 435-54.
- [5] SU X Zh, Miller L H. Science China Life Sciences[J], 2015, 58(11): 1175-1179.
- [6] 尹纪业,王和枚,丁日高. 青蒿素及其衍生物毒理学研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志. 2014(02):309-314.
- [7] Gutteridge J M C, Halliwell B. Iron toxicity and oxygen radicals [J], Baillière S Clinical Haematology, 1989, 2(2): 195-256.
- [8] Sun C, Li J, Zhou B. Mechanism of action of artemisinins: along unsettled challenge [J]. Sci Sin Vitae[J]. 2012, 42: 345-354.
- [9] Accardo A, Laurent S A, Mazarguil H, *et al.* Interaction of iron (II)-heme and artemisinin with a peptide mimic of Plasmodium falciparum HRP-II[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2007, 101(11 - 12): 1739-1747.
- [10] Zhang S, Gerhard G S. Heme activates artemisinin more efficiently than hemin, inorganic iron, or hemoglobin [J]. Bioorganic& Medicinal Chemistry, 2008, 16(16): 7853-7861.
- [11] Singh C, Malik H, Puri S K. Synthesis and antimalarial activity of a new series of trioxaquinones Original Research Article Bioorganic& Medicinal Chemistry [J], Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, 12(5): 1177-1182.
- [12] Robert A, Meunier B. Is alkylation the main mechanism of action of the antimalarial drug artemisinin? [J]. ChemInform, 1998, 27(39): 273-274.
- [13] Robert A, Coppel Y, Meunier B. Alkylation of heme by the antimalarial drug artemisinin [J]. Chemical Communications, 2002, 5(5): 414-415.
- [14] Hartwig C L, Rosenthal A S, Angelo J D, *et al.* Accumulation of artemisinin trioxane derivatives within neutral lipids of Plasmodium falciparum malaria parasites is endoperoxide - dependent [J]. Biochemical Pharmacology, 2009, 77(3): 322-336.

- [15] 王洪荣, 秦 韬, 王 超. 青蒿素对山羊瘤胃发酵和微生物氮素微循环的影响[J]. 中国农业科学, 2014, 47(24): 4904-4914.
- [16] 郭宗儒. 青蒿素类抗疟药的研制[J]. 药理学, 2016, 51(1): 157-164.
- [17] Chao C C, Anderson W R, Hu S, *et al.* Activated microglia inhibit multiplication of *Toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism[J]. Clinical Immunology & Immunopathology, 1993, 67(2): 178-83.
- [18] Rodrigues I A, Mazotto A M, Cardoso V, *et al.* Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response[J]. Mediators of Inflammation, 2015(3): 1-12.
- [19] Evans T G, Thai L, Granger D L, *et al.* Effect of *in vivo* inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis[J]. Journal of Immunology, 1993, 151(2): 907-915.
- [20] Nemati S, Nahrevanian H, Haniloo A, *et al.* Investigation on nitric oxide and C-reactive protein involvement in anti-leishmanial effects of artemisinin and glucantim on cutaneous leishmaniasis[J]. Advanced Studies in Biology, 2013(5): 27-36.
- [21] Sen R, Chatterjee M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis [J]. Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & phytopharmacology, 2011, 18(12): 1056-1069.
- [22] Carruthers V B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*[J]. Acta Tropica, 2002, 81(2): 111-122.
- [23] Lovett J L, Sibley L D. Intracellular calcium stores in *Toxoplasma gondii* govern invasion of host cells[J]. Journal of Cell Science, 2003, 116(116): 3009-3016.
- [24] Nagamune K, Beatty W L, Sibley L D. Artemisinin induces calcium-dependent protein secretion in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*[J]. Eukaryotic Cell, 2007, 6(11): 2147-2156.
- [25] Masters P A, O'Bryan T A, Zurlo J, *et al.* Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited [J]. Archives of Internal Medicine, 2003, 63(4): 402-410.
- [26] Hovnanian A. SERCA pumps and human diseases [J]. Sub-cellular biochemistry, 2007, 45: 337-363.
- [27] Del C E, Gallego M, Francesch M, *et al.* Effect of artemisinin on oocyst wall formation and sporulation during *Eimeria tenella* infection [J]. Parasitology International, 2010, 59(4): 506-511.
- [28] 杨辉亮, 刘芃芃, 贺 超, 等. 青蒿素及其衍生物的抗炎作用及机制研究[J]. 四川生理科学杂志, 2014(03): 309-314.
- [29] 李 覃, 陈 虹, 梅 昕, 等. 青蒿素的免疫抑制作用及其调控机制研究[J]. 中国药理学通报, 2011(06): 848-854.
- [30] 刘 平. 细胞因子与利什曼原虫感染[J]. 国外医学(免疫学分册), 2005(08): 253-256.
- [31] Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2007, 51(2): 229-242.
- [32] 赵 娟. 青蒿素对支气管哮喘患者外周血 Th17/Treg 细胞因子的影响.[D] 山西: 山西医科大学, 2016: 1-24.
- [33] Teuscher F, Gatton M L, Chen N, *et al.* Artemisinin-induced dormancy in *Plasmodium falciparum*: duration, recovery rates, and implications in treatment failure[J]. Infect Dis, 2010, 202(9): 1362-1368.
- [34] 刺德全, 荆瑞君, 张春勇, 等. 我国恶性疟原虫对抗疟药敏感性的现状[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1996, 14(1): 37.
- [35] Li W, Mo W, Shen D, *et al.* Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in the action of artemisinin [J]. PLoS Genet, 2005, 1(3): 36.
- [36] Krishna S, Woodrow C J, Staines H M, *et al.* Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of *in vitro* resistance [J]. Trends in Molecular Medicine, 2006, 12(5): 200-205.
- [37] Halder A K, Banerjee S, Naskar K, *et al.* Sub-optimal dose of sodium antimony gluconate (SAG)-diperoxovanadate combination clears organ parasites from BALB/c mice infected with antimony resistant *Leishmania donovani* by expanding antileishmanial T-cell repertoire and increasing IFN- γ to IL-10 ratio[J]. Experimental Parasitology, 2009, 122(2): 145-154.
- [38] Jung M, Kim H, Nam K Y, *et al.* Three-dimensional structure of *Plasmodium falciparum* Ca²⁺-ATPase (PfATP6) and docking of artemisinin derivatives to PfATP6 [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 15(12): 2994-2997.
- [39] Zhang H, Lin H, Jiao X, *et al.* Transferrin-mediated fullerene nanoparticles as Fe²⁺-dependent drug vehicles for synergistic antitumor efficacy[J]. Biomaterials, 2015(37): 353-366.
- [40] 杨恒林. 东南亚某些地区恶性疟原虫对青蒿素类药物的敏感性监测与临床研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1997, 10(1): 55-57.
- [41] 杨恒林, 刘德全, 黄开国. 云南省恶性疟原虫对青蒿素类药物及云南省恶性疟原虫对青蒿素类药物及咯萘啶与氯喹敏感性的体外测定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, 15(5): 292-296.
- [42] Ni Loo C S, Kei Lam N S, Yu D, *et al.* Artemisinin and its derivatives in treating protozoan infections beyond malaria [J]. Pharmacological research, 2016(11): 17-73.