青蒿素作用机制之谜

钟梦娇, 周兵*

清华大学生命科学学院, 生物膜国家重点实验室, 北京 100084

* 联系人, E-mail: zhoubing@mail.tsinghua.edu.cn

2017-02-20 收稿, 2017-03-08 修回, 2017-03-09 接受, 2017-05-04 网络版发表

摘要 青蒿素类药物是抗疟神药, 同时也发现还有其他生物活性, 但研究者对其作用机制一直存在争论. 一般认为, 青蒿素的过氧桥是其发挥功能必不可少的基团. 青蒿素的作用分为两步: 首先被激活, 打开内氧键, 然后破坏细胞功能. 但在具体作用方式上没有定论, 引起青蒿素的激活是铁、血红素还是其他如线粒体内某个未知的因子? 青蒿素激活后是破坏血红素代谢还是靶向某个特异蛋白还是相对无选择地靶向一系列蛋白? 作用部位是液泡还是线粒体? 本文将针对青蒿素的作用机制研究现状进行综述.

关键词 青蒿素, 血红素, 铁, 线粒体, 激活

2015年, 中国中医科学院女药学家屠呦呦荣获诺贝尔生理学或医学奖, 成为首位荣获诺贝尔科学奖的中国大陆本土科学家, 这无疑给了国内以及青蒿素领域的科学家极大鼓励. 疟疾是一种世界范围内危害严重的传染性疾病, 通过疟原虫经由按蚊叮咬传播而感染人体; 仅2015年估计就有2.14亿疟疾病例, 其中, 88%疟疾病例和91%死亡发生在非洲区域^[1], 对妇女和儿童, 尤其是5岁以下儿童的威胁巨大, 约每2 min就有一个儿童因为疟疾死亡^[1].

青蒿素的发现源于20世纪六七十年代中国政府以及当时一批科学家的努力. 1967年5月23日, “5·23”计划正式开始实施, 在全国范围内找寻可以对抗耐氯喹的恶性疟疾新药. 科研工作者从历代医籍、本草、民间方药入手, 搜集多种药方, 经历数次实验尝试, 1971年发现青蒿乙醚提取物对疟原虫有100%抑制率, 并在1972年从该有效部分中分离得到抗疟有效单体, 命名为青蒿素. 青蒿素作为一种抗疟药物, 可以直接杀灭红细胞内的疟原虫, 快速高效且低毒, 缺点是水溶性差、半衰期短、复燃率高. 近来, 研究发现, 使用单方青蒿素的某些地区疟原虫对青蒿素敏感度下

降^[2], 这意味着疟原虫有开始出现抗药性的可能. 因此, 世界卫生组织(World Health Organization, WHO)开始全面禁止使用单方青蒿素, 改用青蒿素的联合疗法(artemisinin combination therapy, ACT).

青蒿素在具有抗疟作用的同时, 在抑制肿瘤、抗病毒、抗真菌、免疫调节等方面也有相关作用, 但其在生物体内如何起作用一直困惑着科学家, 多年来争论颇多. 青蒿素是如何抗疟的? 其他作用如抑制肿瘤的机制是否和抗疟一样? 本文将对青蒿素的作用机理现状进行综述.

1 青蒿素特性简介

青蒿素是一种具有双氧键的倍半萜内酯化合物, 分子式为 $C_{15}H_{22}O_5$, 为无色的针状晶体, 可溶于乙醇、乙醚, 几乎不溶于水. 科学家在对其结构的研究过程中, 合成并筛选了一些青蒿素衍生物(图1), 如二氢青蒿素、青蒿琥酯、蒿甲醚等, 这些衍生物中, 有些在抗疟活性上优于青蒿素. 近年来发现, 一些骨架上差别很大的二代青蒿素衍生物, 同样拥有优越的

引用格式: 钟梦娇, 周兵. 青蒿素作用机制之谜. 科学通报, 2017, 62: 1938–1947

Zhong M J, Zhou B. How does artemisinin act inside a cell (in Chinese)? Chin Sci Bull, 2017, 62: 1938–1947, doi: 10.1360/N972017-00194

图1 青蒿素及其常见衍生物的结构

Figure 1 Structure of artemisinin and its analogues

抗疟活性，所有有抗疟活性的衍生物均含有过氧键^[3-6]，过氧键是青蒿素活性所必需的，没有过氧键的青蒿素类似物没有显著生物活性。

2 疟原虫对青蒿素的抗药性

青蒿素机制研究的困难是没有真正抗药株的出现，理论上如果知道了抗药突变，青蒿素的作用研究或许就有了突破口。2006年，在柬埔寨地区首次发现恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)出现所谓的青蒿素抗性^[7]，并于2008年被报道^[8]，其临床表现为疟疾病人接受青蒿素治疗后出现虫体清除率下降；随后，东南亚其他地区陆续出现类似的青蒿素抗性虫株^[9,10]，并有进一步扩散的趋势。通过48 h标准体外微量法测定青蒿素敏感性，发现抗性虫株和敏感虫株的半抑制浓度(IC₅₀)并无显著性差异^[11,12]。通过0~3 h (3 h处理，然后洗去药物)环状体生存实验(RSA_{0-3 h})发现，抗性虫株环期0~3 h对青蒿素的敏感性明显低于敏感虫株^[13,14]。因此，这种所谓的抗药性其实是某个特定时期对短时间药物处理的抗性，应该更准确地称为疟原虫清除速率降低而不是真正意义上的对青蒿素抗药。

研究者通过对抗性虫株和敏感虫株进行测序和基因组分析发现，青蒿素抗性可能与13号染色体相关^[15,16]。随后通过对青蒿素敏感株进行为期5年的药物筛选实验，得到RSA_{0-3 h}疟原虫存活率提高的F32-ART5虫株，对其进行全基因组测序发现，K13蛋白存在M476I的突变^[17]。此外，在柬埔寨地区发现从

原虫清除率下降的病人体内分离得到的虫株同样存在K13基因突变，且突变率最高的为C580Y^[17]，随后利用CRISPR/Cas9系统和锌指核糖核酸酶对K13基因进行定点突变的实验也证实了该基因突变确可引起原虫清除率的下降^[18,19]。目前大量研究表明，K13基因的突变与体内青蒿素敏感性相关，因此该基因可能成为疟原虫清除率相关的分子标记。但是也有研究表明，非洲地区携带野生型和K13突变体虫株的病人有相同的原虫清除率^[20,21]。有研究者认为，抗性虫株是由于疟原虫对外界应激能力提高而导致原虫清除率下降^[22]，而非特异针对青蒿素的作用。经青蒿素处理后的疟原虫出现生长延缓和泛素化蛋白积累，抗性虫株环状体发育停滞，移除药物后重新恢复发育。这可能是由于较低水平的泛素化蛋白延缓了细胞死亡启动，增加了细胞的应激能力^[23]。

青蒿素抗性虫株的出现引发了人们的关注，也是对疟疾防控的巨大挑战，因此WHO制定了全球遏制青蒿素抗性的规划(global plan for artemisinin resistance containment, GPARC)，加强抗药性的监测。实验发现，延长给药时间可明显提高青蒿素抗性虫株的抑制效率^[9]；由于青蒿素衍生物OZ439相比于青蒿素具有更长的半衰期，因此更适用于K13突变株的治疗^[23]。通过监测青蒿素抗性虫株的发生以及对其进行有效的治疗有望阻止进一步的扩散，减轻其对人类健康和经济发展的危害。但这些报道只是关于疟原虫清除率的降低或减缓，并不是真正意义上的抗性株，很可能只是虫株对胁迫的一种普遍反映，因此

对青蒿素作用机制的研究可能不会产生关键的作用。

3 青蒿素抗疟作用机制

如上所述,青蒿素作用需要双氧桥,一般认为需要先激活,再发挥作用。青蒿素作用有很高的特异性:对疟原虫高度有效而对哺乳细胞几乎没有副作用。这种作用特异性来源有两类理论解释:一类认为特异性主要来源于特异激活,如疟原虫里的血红素(heme)、二价铁离子能更多地激活青蒿素,或疟原虫线粒体某一物质能特异激活青蒿素;另一类主要来源于特异靶点,即青蒿素能特异作用于疟原虫的血红素、蛋白质或线粒体。从众多抗疟活性超氧化物结构来看,它们结构各异,很难想象青蒿素能够依赖于空间构象和某一个蛋白质特异结合,因此更倾向于青蒿素作用特异性初始来源于激活的特异性(图2)。

3.1 铁与血红素对青蒿素的激活

青蒿素作为一线抗疟药,其结构特点一直是人们关注的重点,无可争议的证据表明,双氧桥对于青蒿素的作用必不可少,脱氧青蒿素不能抑制疟原虫的生长。双氧桥化学性质活泼,可以与铁发生Fenton反应生成羟自由基,对细胞产生强烈毒性。同样,青蒿素的双氧桥通过类似反应,生成相应的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)。这也是早期人们对青蒿素作用机理的初步认识。

体外化学实验发现,青蒿素的双氧桥与二价铁

图2 已提出的青蒿素作用模型。青蒿素作用分为两步,第一步是被激活(activation),在这过程中青蒿素内双氧键得以打开,这一步主要有两派学说:被铁离子或者血红素激活和被线粒体某种物质激活;第二步是靶向,主要有3种模型:一是破坏血红素代谢,二是靶向某种特异蛋白或者一系列非特异蛋白,三是靶向线粒体膜。ART: 青蒿素; ART*: 激活的青蒿素

Figure 2 Proposed biologic models of artemisinin's action. The action of artemisinin can be divided into two steps. At the first step the endoperoxidic bond of artemisinin is opened and the drug is activated. Two main schools of thought try to explain this action: iron/heme or something in the mitochondrion activates this process. At the second step the activated artemisinin exerts its damages. There are three main models proposing different targets, i.e., (i) heme metabolism, (ii) some specific protein or a set of relatively nonspecific proteins, and (iii) mitochondrial membrane. ART: artemisinin; ART*: activated artemisinin

发生反应,形成氧正中心的活性物质,进而转变成碳正中心,推测体内通过类似途径再去烷基化细胞生物大分子^[24],破坏相应生理过程。因为疟原虫在降解红细胞内血红蛋白时,会释放大量血红素^[25],铁含量可能会发生改变,由此推论可能导致更多青蒿素被激活。一些研究者发现,去铁胺(deferoxamine, DFO)可以明显拮抗青蒿素的抗疟作用^[26-28],DFO是一种三价铁离子专一性螯合剂,对二价铁离子基本没反应,也无法螯合血红素中的铁;青蒿素与三价铁几乎不反应或反应很弱。猜测可能当DFO与一些游离的三价铁离子螯合后,铁离子间动态平衡会被破坏,从而引起二价铁离子水平的变化,进而影响青蒿素的激活。

虽然有体内外实验提示铁可能是激活青蒿素的分子,细胞内自由铁离子含量受到严格调控,基本没有游离铁离子在胞浆中,那不禁会思考激活青蒿素的铁来自哪里?也有报道DFO或外加亚铁离子不会影响青蒿素与蛋白质的共价作用,而同时补加高铁血红素(hemin)和相应的还原剂增加了青蒿素与蛋白质的共价结合^[29]。那么是不是和青蒿素反应的铁来源于血红素呢?

疟原虫作为一种寄生生物,生命活动所需的氮源和碳源绝大部分来自于寄主。在疟原虫的生活史中,它会将红细胞中的血红蛋白吞噬到食物泡中,水解成氨基酸,合成自身所需要的蛋白质及其他物质。伴随这一过程,会产生大量对细胞有毒的血红素,疟原虫将此类有毒物质进一步聚合结晶形成疟色素(hemozoin)。研究者认为,这一与哺乳动物细胞迥异的代谢方式可能介导青蒿素的抗疟作用,这似乎与血红素激活青蒿素这一理论不谋而合。体外实验发现,青蒿素可以与血红素反应形成青蒿素和血红素的聚合物^[30],且反应较与高铁血红素、铁的反应更高效;在半胱氨酸等还原剂存在的情况下高铁血红素可以激活青蒿素,反应产物中可以检测到青蒿素-血红素的共价聚合物^[31]。近年来也有一部分科学家的体内实验支持这一理论。当用具有抗疟作用的青蒿素衍生物处理体外培养的疟原虫后,利用点击反应(click-chemistry reaction),发现很多蛋白质和青蒿素发生共价作用。外加血红素和高铁血红素可以显著增加青蒿素与蛋白质的相互作用,而外加铁离子和DFO对此过程没有影响。同时在疟原虫感染血细胞的各个时期中加入一种丝氨酸蛋白酶抑制剂(*N*-acetyl-Leu-Leu-norleucinal, ALLN),阻碍血红蛋白的水解,

发现仅在滋养体和配子体时期观察到青蒿素和蛋白质的相互作用被抑制,对环期的疟原虫没有影响;当用血红素合成抑制剂琥珀酰丙酮(succinylacetone, SA)抑制环期疟原虫血红素的合成时,青蒿素与蛋白质的共价作用被显著抑制,推论在滋养体和配子体时期激活青蒿素的血红素主要来自于血红蛋白的降解,在环期主要来源于血红素的合成途径^[29]。也有文章提出相反观点,他们发现,同等浓度下DFO可以影响青蒿素与蛋白质的共价作用^[32]。Klonis等人^[33]发现,敲除Falcipain-2 (FP-2)蛋白的疟原虫在滋养体中期用青蒿素处理2 h后洗掉青蒿素继续培养,突变虫对青蒿素的敏感性变低,Falcipain-2属于参与疟原虫血红蛋白降解途径中的半胱氨酸水解酶类,当细胞内没有此类蛋白时,血红蛋白水解受阻。认为抑制血红蛋白水解过程导致血红素含量降低,减少青蒿素的激活,致使其敏感性降低。另有实验发现,抑制血红蛋白水解过程不会引起青蒿素敏感性显著变化。Lin等人^[34]发现,敲除血红蛋白水解过程中的天冬氨酸水解酶、半胱氨酸水解酶导致疟原虫体内食物泡发生肿胀、血红蛋白积累、血红素水平降低、疟色素形成减少,但是并未发现这种转基因虫对青蒿素的敏感性发生变化。这两项研究报道的敏感性差异可能由于实验室过程中给药时期不一致,不同时期疟原虫的生存环境、代谢状态不同,这些都可能影响青蒿素的敏感性;除此以外,FP-2敲除后,血红蛋白水解过程受影响,出现少量血红蛋白聚集,但血红素含量不一定会像想象的那样降低,Klonis等人^[33]的研究也没有检测FP-2敲除后血红素含量的变化。

尽管较多体外实验证明青蒿素可以和血红素发生反应,也在体内检测出青蒿素与血红素的共价复合物^[35],但具体青蒿素在体内被血红素激活的过程特别是亚细胞位置还不知道。有文献报道,青蒿素对疟色素的形成并没有影响^[36],不禁让人思考青蒿素是否作用于液泡影响血红素代谢?青蒿素和血红素作用形成的共价化合物是否足以导致其无法进行正常生命活动?还是只是一种与青蒿素发生的副反应?因此,青蒿素发挥其真正功能的体内激活过程并不能确定。

3.2 线粒体激活理论

线粒体激活理论起初证据来自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的研究。当酿酒酵母在发

酵培养基(六碳糖)上生长时,能量代谢可以采用无氧呼吸的发酵方式,这时线粒体呼吸产能不是必需的;而当酵母在非发酵培养基上生长时,酵母细胞必须采用有氧呼吸,利用线粒体电子传递链代谢供能。实验发现,当生长在非发酵培养基上时,酵母细胞对青蒿素较为敏感,而在发酵型培养基时敏感性大大降低^[37]。这种巨大差别提示青蒿素作用与线粒体功能有关。青蒿素处理酵母细胞,发现酵母线粒体发生去极化,在疟原虫细胞内得到同样结果,并且这种去极化过程在早期是可逆的:洗去青蒿素,膜电势恢复。这提示青蒿素使膜电势去极化不是次级反应。利用提纯的线粒体证实青蒿素能快速直接使得线粒体去极化,线粒体呼吸不受抑制,进一步确认了线粒体在青蒿素抑疟上的直接作用。有趣的是,哺乳类线粒体对青蒿素没有反应^[38],即使青蒿素浓度提高10~100倍也无济于事。

毫无疑问,疟原虫线粒体本身能激活青蒿素使其发挥去极化作用。那在酵母或疟原虫线粒体内是什么激活了青蒿素呢?有间接证据提示,激活也许和电子传递链有关。在酵母中,NADH脱氢酶NDI1和NDE1蛋白是电子传递链上复合物I的功能同源物,其作用是接受NADH的电子,并将电子传递给泛醌。实验发现,敲除NDI1的酵母在非发酵培养基上对青蒿素显示部分抗性,而过表达NDI1蛋白,酵母细胞表现出对青蒿素更敏感的表型^[37];同时药物DPI与青蒿素具有拮抗效应,DPI是NADH脱氢酶的抑制剂,抑制NADH脱氢酶活性,从而导致青蒿素的作用受到影响,进一步说明青蒿素的作用与线粒体有关^[38]。可能电子传递链(electron transport chain, ETC)的电子像漏给氧气生成超氧那样激活了青蒿素?这还未知。实际上,虽然能基本肯定疟原虫线粒体和酵母线粒体能够特异激活青蒿素,但是否是ETC激活了青蒿素还不能完全确认,需要更加直接的证据。

4 青蒿素的作用靶点理论

4.1 血红素

根据分子运动的特性,被血红素激活后的青蒿素优先对其附近分子产生破坏作用。有部分研究者认为,青蒿素被特异性激活后可能没有太严格的选择,随意对附近众多生物大分子产生破坏作用,因此有很多(至少100种以上蛋白质)作用靶点^[29]。也有人

认为用来激活青蒿素的血红素也是其关键靶点,激活后的青蒿素烷基化血红素,或产生毒性或使得血红素形成疟色素的解毒过程受到影响.通过核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术,科学家发现,体外实验中,在还原剂存在的情况下,青蒿素可使高铁血红素发生烷基化,形成共价复合物^[39].体外实验中化学合成的血红素-青蒿素共价化合物可以抑制血红素的聚集作用,导致毒性血红素的释放^[40].电子显微镜观察发现,青蒿素处理的疟原虫食物泡膜受损,血红素外泄,同时青蒿素衍生物引起疟原虫内吞泡发生聚集^[41].有一些科学家在感染疟疾的小鼠(*Mus musculus*)尿液和脾脏中发现青蒿素和血红素的共价复合物,而未感染的小鼠没有发现这类复合物^[36].

4.2 特异蛋白质作为靶点

蛋白质作为生命活动的执行者,蛋白质受影响直接导致一些生命活动受影响.如上所述,有研究者认为青蒿素激活后也许没有太多选择性,有很多个作用靶点.近来有数篇文章证实青蒿素激活后确实可以与疟原虫体内多种蛋白质结合.但也有研究者认为,青蒿素作为一种选择性很强的抗疟药物,激活后也应该有特异性蛋白质靶点.

(i) PI3K. PI3K是疟原虫细胞内可以催化肌醇磷酸化形成磷酸肌醇的激酶.实验发现,二氢青蒿素作为一种抗疟药物可以抑制PI3K的活性,减少PI3P的产生,通过相应电脑计算发现,二氢青蒿素结构与PI3K疏水区域有着高度互补性,可以与PI3K的D1889羟基、Y1915的内半缩醛氧相结合,从而提高二氢青蒿素的药效,仅在纳摩尔级别就可以抑制PI3K的活性,达到抗疟的目的.近年来发现,在青蒿素敏感性降低的疟原虫中有PfKelch13突变,这种突变导致青蒿素处理后疟原虫清除时间延长^[17].发生PfKelch13突变的虫株内,由于蛋白酶体途径的蛋白质降解过程受阻,PI3K的表达水平也会有所提升,PI3P的含量会较野生型高出2~3倍,从而导致这段时期的疟原虫对青蒿素的敏感性降低,出现抗性虫株.所以认为在环期刚开始的5 h内,疟原虫对青蒿素极为敏感,且作用靶点为PI3K^[42].问题是发生PfKelch13突变的疟原虫虽然虫清除时间延长,但体外培养时对青蒿素敏感性并没有明显改变^[20,21].这种清除时间的延长有可能是虫子进入类似休眠(dormancy)的反应,从而对很多胁迫不敏感,和青蒿素作用无直接

关系.这也解释了PfKelch13突变的疟原虫体外培养并不一定伴随着青蒿素抗药性的改变.总而言之,PI3K可能与PfKelch13引起的抵抗胁迫有关,和青蒿素的特异作用可能无关.

(ii) PfATP6. Eckstein-Ludwig等人^[28]通过比较青蒿素化学结构,发现其与毒胡萝卜素有类似之处,都是倍半萜类化合物.毒胡萝卜素是SERCA型钙调蛋白的专一性抑制剂,PfATP6是疟原虫细胞内唯一SERCA型钙调蛋白,用来调节细胞内的钙稳态,因此假设青蒿素能专一性地抑制PfATP6的活性,达到抑制疟原虫生长的目的.在爪蟾(*Xenopus laevis*)的卵细胞中异源表达PfATP6,提取出卵细胞的内质网膜,体外检测PfATP6的活性变化,发现青蒿素可以专一性抑制其活性,并且青蒿素和毒胡萝卜素在抑疟上具有拮抗效应.将带有荧光标记的青蒿素衍生物和毒胡萝卜素与疟原虫进行共培养,发现青蒿素可以使毒胡萝卜素的荧光信号减弱,反之亦然.同时荧光信号定位于内质网而不是食物泡.除此以外,DFO预处理细胞后,青蒿素的荧光信号可以被洗掉,而天冬氨酸蛋白水解酶抑制剂Ro40-4388对荧光信号没有影响.所以认为铁离子而非血红素激活了青蒿素,激活后的青蒿素专一性抑制PfATP6,达到抗疟的目的.

PfATP6的靶点理论一经出炉引起热议,既有支持者,又有反对者.一些体外数据说明,PfATP6某些位点的突变可以导致青蒿素无法抑制其活性^[43].但是值得注意的是,文章中提到青蒿素抑制PfATP6活性所用的浓度为1 $\mu\text{mol L}^{-1}$,远高于青蒿素抑制疟原虫的 IC_{50} .更让人不解的是,有些抑疟青蒿素衍生物并不能抑制PfATP6的活性,这些类似物均含抗疟活性基团过氧键^[44].除此以外,三维模拟PfATP6结构时,发现青蒿素通过疏水相互作用与其结合,而将过氧键暴露在外^[45],这种相互作用依赖于青蒿素的疏水骨架,而非过氧键,提示青蒿素如果抑制PfATP6,是因为其骨架结构而非过氧键. PfATP6作为内质网上钙调蛋白,其主要功能是调节细胞内钙平衡.有报道称毒胡萝卜素作为内质网蛋白抑制剂可以使内质网形态发生变化,青蒿素同样作为PfATP6的抑制剂并不能使内质网在形态上发生改变^[41].后续研究者也未重复出毒胡萝卜素与青蒿素在抑制疟原虫生长上具有拮抗效应^[46].因此这种理论尽管在发表后的数年间有很大影响,一度成为青蒿素作用机制的主流,但近来逐渐被摒弃.

4.3 线粒体作为靶点

按照线粒体理论, 疟原虫线粒体激活青蒿素, 青蒿素作用于其周围, 使得只有那些能特异激活青蒿素的线粒体去极化, 因此线粒体特异被损伤的原因来源于(secondary to)其线粒体的特异激活。换言之, 线粒体理论的关键是青蒿素被疟原虫线粒体特异激活, 激活的青蒿素对线粒体产生损害。线粒体是生物体的能量供应站, 也是物质代谢包括铁硫合成的重要场所。虽然疟原虫作为寄生生物, 其物质和能量的自身供给会有一些弱化, 但依然发现线粒体对于疟原虫是必需的。有研究显示, 青蒿素处理疟原虫后, 其线粒体形态会发生肿胀^[47]; 阿托伐醌作为一种呼吸复合物Ⅲ的抑制剂可以阻断呼吸链上的电子传递, 杀死疟原虫, 进而被用作抗疟药物, 其 IC_{50} 仅为 1 nmol L^{-1} ^[48]。提取酵母线粒体进行体外实验发现, 青蒿素可以降低线粒体膜电势, 处以青蒿素的线粒体ROS水平剧烈上升, 而脱氧青蒿素与线粒体共孵育, 并未看到这种现象。提取疟原虫线粒体发现有同样现象。更值得一提的是, 青蒿素无法降低哺乳类细胞线粒体的膜电势^[38]。虽然有科学家在研究青蒿素衍生物对肿瘤细胞抑制时提出线粒体的功能受损不是青蒿素作用的早期事件, 而是细胞产生的应激反应^[41]。但是提纯的酵母和疟原虫线粒体可以和青蒿素直接快速反应, 说明这种现象在酵母和疟原虫不是次级事件(secondary event)。利用全细胞观察也发现, 青蒿素处理能够在数秒之内去极化疟原虫线粒体^[38], 也支持了线粒体去极化是抗疟的初级事件(primary event)。事实上, 青蒿素确实不能在功能上对提纯的哺乳细胞线粒体发生实质性的破坏, 在抑制肿瘤细胞过程中线粒体的功能受损可能确实不是青蒿素作用的早期事件, 而是细胞产生的应激反应(如凋亡)。

因此, 有比较充分的证据证明, 青蒿素能直接作用于疟原虫和酵母线粒体, 即使在很低的浓度下也能即刻让线粒体膜去极化, 但线粒体是否一定就是青蒿素作用的主要或唯一靶细胞器呢? 也许青蒿素可以作用于几个地方? 现在还不能做出定论。

5 青蒿素与癌症及其他疾病

近年来发现, 青蒿素这种一线抗疟药物在抑制癌细胞生长上也可能有一定疗效。有研究发现, 青蒿素及其衍生物对多种体外培养的肿瘤细胞有抑制作

用, 同时具有细胞特异性, 对非肿瘤细胞的毒杀作用较小, 对一些耐药肿瘤细胞也出现抑制作用。这些特性及其较小的毒副作用使得青蒿素类药物得到关注。在抑制癌细胞生长上, 青蒿素的过氧键也是不可或缺的。研究发现, 缺失过氧键虽然不能使其完全丧失抑癌活性, 但其对癌细胞的毒性显著下降^[49]。这似乎说明青蒿素在抑疟和抑癌两大作用上有相通之处, 也有其特殊性。

目前关于青蒿素及其衍生物抗癌作用机制有以下认识: 氧化损伤反应、抑制肿瘤细胞周期^[50]、诱导细胞凋亡^[51]、抑制肿瘤新生血管生成^[52]。与青蒿素抑疟作用类似, 青蒿素抑制癌细胞生长时, 铁和血红素预处理某些肿瘤细胞^[53-55], 发现其抑癌活性可以提升100倍, 加入SA或敲除合成血红素通路中的关键反应酶, 青蒿素衍生物的毒性被显著抑制。与此相符, 铁螯合剂DFO拮抗其抑癌活性。在肿瘤细胞中, 涉及氧化还原反应相关酶的表达量也较普通细胞低, 如过氧化氢酶、超氧化物歧化酶等^[56]。青蒿素作为一种过氧化物, 被激活后其本身就是一种ROS, 同时激活后的青蒿素也可刺激细胞产生更多的ROS, 对肿瘤细胞造成进一步的损伤, 使其对青蒿素更为敏感。简而言之, 在抑制肿瘤的过程中, 铁或血红素可能激活了青蒿素, 造成大规模无选择性的(promiscuous)自由基损伤, 从而杀伤了肿瘤细胞。这方面证据较为令人信服。

近期, *Cell*上的一篇文章表明青蒿素在Ⅰ型糖尿病上有作用^[57], 实验发现, 蒿甲醚使Arx蛋白在胞质中积累, 充足的Arx蛋白引起胰腺内 α 细胞转变为 β 样细胞; Ⅰ型糖尿病病人胰腺内 β 细胞功能丧失, 无法合成胰岛素, 从而使得蒿甲醚在治疗糖尿病可能有作用, 但青蒿素类药物真正用于临床来治疗糖尿病还是漫长的过程, 也存在很多不确定性。

青蒿素类衍生物在抗炎症和免疫疾病方面的治疗上也有一定作用。有报道称, 青蒿素类衍生物SM934可以延长患有红斑狼疮的小鼠(MRL/lpr)寿命^[58]。红斑狼疮(lupus erythematosus, LE)是一种慢性多系统损害的自身免疫疾病, 目前还没有疗效较好的药物。Wu等人^[59]发现, 喂以SM934的小鼠肾损伤减轻, 尿液中蛋白含量减少、氮元素含量下降, 效应B细胞数量减少, 抗核抗体减少。目前科学家对其参与免疫疾病方面的分子和生化机制还不甚了解。

青蒿素用于疟疾的治疗上已经有很长一段历史,

图3 (网络版彩色)青蒿素在酵母中的作用模型. 青蒿素进入酵母细胞后,与血红素反应,产生一些非特异的破坏作用.在线粒体内,其激活途径还未知,有可能被线粒体呼吸链的电子所激活,激活后的青蒿素使得线粒体功能丧失,同时产生ROS,抑制或杀死细胞

Figure 3 (Color online) Action model of artemisinin in *S. cerevisiae*. After artemisinin gets into yeast cells, it reacts with heme and generates nonspecific damages. Inside mitochondria the activation process is not yet clear. One possibility is that the mitochondrial electron transport chain might activate artemisinin. The activated artemisinin disrupts mitochondrial functions, accompanied with ROS production, inhibiting or killing the cells

同样不能被忽略的是青蒿素在血吸虫的治疗上也有很好的疗效. 1982年第一篇此类文章报道,感染血吸虫的小鼠口服或皮下注射蒿甲醚悬液后,体内血吸虫数量均显著减少^[60]. 1989年, Xiao和Catto^[61]从体内、体外以及组织病理学方面对蒿甲醚抑制各阶段血吸虫的特征进行了较为详尽的研究. 后续各类文章和临床实验肯定了青蒿素类药物可以抑制并杀死血吸虫.

6 利用酵母作为模式生物了解青蒿素的生物活性

综上所述,青蒿素作用复杂,可能有多种不同的生物作用方式,抑制不同类型细胞可能采用不同的机制. 目前,青蒿素在分子细胞水平作用特性上的研

究不多. 本课题组十多年来利用酵母这种简单的模式生物初步探索青蒿素作用机制(图3),再到疟原虫体内进行验证,从而希望将青蒿素作用机理阐述清楚. 在酵母模型中,发现青蒿素进入细胞后发生血红素介导的反应,这一过程消耗大量的青蒿素,同时产生一些自由基. 这些自由基的作用并不特异,需要较大的量才能杀死细胞或对细胞生长产生抑制^[62]. 降低血红素可以提高青蒿素线粒体抑制效率几十倍^[63],使得100 nmol/L以下的青蒿素就可以明显抑制酵母的线粒体功能,从而抑制酵母细胞生长. 本课题组将在疟原虫体内进行进一步验证并修正理论,期望在共同努力下,青蒿素这一神奇抗疟药物的神秘面纱在不远的将来被揭开.

致谢 感谢清华大学生命科学学院生物膜国家重点实验室孙辰、朱攀在写作中提出的许多宝贵意见.

参考文献

- 1 World Health Organization (WHO). World Malaria Report. Geneva: World Health Organization, 2015
- 2 Duffy P E, Sibley C H. Are we losing artemisinin combination therapy already? *Lancet*, 2005, 366: 1908–1909
- 3 O'Neill P M, Searle N L, Kan K W, et al. Novel, potent, semisynthetic antimalarial carba analogues of the first-generation 1,2,4-trioxaneartemether. *J Med Chem*, 1999, 42: 5487–5493
- 4 Posner G H, Parker M H, Northrop J, et al. Orally active, hydrolytically stable, semisynthetic, antimalarial trioxanes in the artemisinin-family. *J Med Chem*, 1999, 42: 300–304
- 5 Ma J, Weiss E, Kyle D E, et al. Acid catalyzed Michael additions to artemisitene. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, 10: 1601–1603
- 6 O'Neill P M, Rawe S L, Borstnik K, et al. Enantiomeric 1,2,4-trioxanes display equivalent *in vitro* antimalarial activity versus *Plasmodium falciparum* malaria parasites: Implications for the molecular mechanism of action of the artemisinins. *Chembiochem*, 2005, 6: 2048–2054

- 7 World Health Organization (WHO). Status Report on Artemisinin Resistance. Geneva: World Health Organization, 2014
- 8 Noedl H, Se Y, Schaecker K, et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med*, 2008, 359: 2619–2620
- 9 Ashley E A, Dhorda M, Fairhurst R M, et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*, 2014, 371: 411–423
- 10 Committee WHOMPA Secretariat. Malaria policy advisory committee to the WHO: Conclusions and recommendations of eighth biannual meeting (September 2015). *Malar J*, 2016, 15: 117
- 11 Amaratunga C, Sreng S, Suon S, et al. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Pursat Province western Cambodia: A parasite clearance rate study. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12: 820–822
- 12 Pyae P A, Standwell N, Kasia S, et al. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: A longitudinal study. *Lancet*, 2012, 379: 1960–1966
- 13 Amaratunga C, Witkowski B, Khim N, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14: 450–451
- 14 Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: *In-vitro* and *ex-vivo* drug-response studies. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13: 1043–1049
- 15 Takala-Harrison S, Clark T G, Jacob C G, et al. Genetic loci associated with delayed clearance of *Plasmodium falciparum*, following artemisinin treatment, in Southeast Asia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 240–245
- 16 Cheeseman I H, Miller B A, Nair S, et al. A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria. *Science*, 2012, 336: 79–82
- 17 Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 2014, 505: 50–55
- 18 Straimer J, Gnädig N F, Witkowski B, et al. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science*, 2015, 347: 428–431
- 19 Ghorbal M, Gorman M, Macpherson C R, et al. Genome editing in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 819–821
- 20 Cooper R A, Conrad M D, Watson Q D, et al. Lack of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* in Uganda based on parasitological and molecular assays. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59: 5061–5064
- 21 Taylor S M, Parobek C M, Deconti D K, et al. Absence of putative artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in sub-Saharan Africa: A molecular epidemiologic study. *J Infect Dis*, 2015, 211: 680–688
- 22 Dogovski C, Xie S C, Burgio G, et al. Targeting the cell stress response of *Plasmodium falciparum* to overcome artemisinin resistance. *PLoS Biol*, 2015, 13: e1002132
- 23 Yang T, Xie S C, Cao P, et al. Comparison of the exposure time dependence of the activities of synthetic ozonide antimalarials and dihydroartemisinin against K13 wild-type and mutant *Plasmodium falciparum* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60: 4501–4510
- 24 Posner G H, Chang H O. Regiospecifically oxygen-18 labeled 1,2,4-trioxane: A simple chemical model system to probe the mechanism(s) for the antimalarial activity of artemisinin (qinghaosu). *J Am Chem Soc*, 2002, 114: 8328–8329
- 25 Slater A F. Malaria pigment. *Exp Parasitol*, 1992, 74: 362–365
- 26 Liu Y, Cui K, Lu W, et al. Synthesis and antimalarial activity of novel dihydro-artemisinin derivatives. *Molecules*, 2011, 16: 4527–4538
- 27 Stocks P A, Bray P G, Barton V E, et al. Evidence for a common non-heme chelatable-iron-dependent activation mechanism for semisynthetic and synthetic endoperoxide antimalarial drugs. *Angew Chem*, 2007, 46: 6278–6283
- 28 Eckstein-Ludwig U, Webb R J, Van Goethem I D, et al. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 2003, 424: 957–961
- 29 Wang J, Zhang C J, Ni C W, et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun*, 2015, 6: 10111
- 30 Meshnick S R, Thomas A, Ranz A, et al. Artemisinin (qinghaosu): The role of intracellular heme in its mechanism of antimalarial action. *Mol Biochem Parasitol*, 1991, 49: 181–189
- 31 Zhang S, Gerhard G S. Heme activates artemisinin more efficiently than heme, inorganic iron, or hemoglobin. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 7853–7861
- 32 Ismail H M, Barton V, Phanchana M, et al. Artemisinin activity-based probes identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* 3D7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 2080–2085
- 33 Klonis N, Crespoortiz M P, Bottova I, et al. Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 11405–11410
- 34 Lin J W, Spaccapelo R, Schwarzer E, et al. Replication of *Plasmodium* in reticulocytes can occur without hemozoin formation, resulting in chloroquine resistance. *J Exp Med*, 2015, 212: 893–903

- 35 Robert A, Benoit-Vical F, Claparols C, et al. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 13676–13680
- 36 Haynes R K, Monti D, Taramelli D, et al. Artemisinin antimalarials do not inhibit hemozoin formation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47: 1175
- 37 Li W, Mo W, Shen D, et al. Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in the action of artemisinin. *PLoS Genet*, 2005, 1: 36
- 38 Wang J, Huang L, Li J, et al. Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation. *PLoS One*, 2010, 5: e9582
- 39 Robert A, Coppel Y, Meunier B. Alkylation of heme by the antimalarial drug artemisinin. *Chem Commun*, 2002, 5: 414–415
- 40 Loup C, Lelievre J, Benoit-Vical F, et al. Trioxaquines and heme-artemisinin adducts inhibit the *in vitro* formation of hemozoin better than chloroquine. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 3768–3770
- 41 Crespo M D P, Avery T D, Hanssen E, et al. Artemisinin and a series of novel endoperoxide antimalarials exert early effects on digestive vacuole morphology. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52: 98–109
- 42 Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, et al. A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 2015, 520: 683–687
- 43 Uhlemann A C, Cameron A, Eckstein-Ludwig U, et al. A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12: 628–629
- 44 Jefford C W. New developments in synthetic peroxidic drugs as artemisinin mimics. *Drug Discov Today*, 2007, 12: 487–495
- 45 Jung M, Kim H, Nam K Y, et al. Three-dimensional structure of *Plasmodium falciparum*, Ca^{2+} -ATPase (PfATP6) and docking of artemisinin derivatives to PfATP6. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15: 2994–2997
- 46 Garah B E, Dr J L S, Dr F C, et al. Docking studies of structurally diverse antimalarial drugs targeting PfATP6: No correlation between *in silico* binding affinity and *in vitro* antimalarial activity. *Chem Med Chem*, 2009, 4: 1469–1479
- 47 Maeno Y, Toyoshima T, Fujioka H, et al. Morphologic effects of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, 1993, 49: 485–491
- 48 Srivastava I K, Rottenberg H, Vaidya A B. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J Biol Chem*, 1997, 272: 3961–3966
- 49 Beekman A C, Wierenga P K, Woerdenbag H J, et al. Artemisinin-derived sesquiterpene lactones as potential antitumour compounds: Cytotoxic action against bone marrow and tumour cells. *Planta Med*, 1998, 64: 615–619
- 50 Zhao Y, Jiang W, Li B, et al. Artesunate enhances radiosensitivity of human non-small cell lung cancer A549 cells via increasing NO production to induce cell cycle arrest at G2/M phase. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11: 2039–2046
- 51 Gao N, Budhraj A, Cheng S, et al. Interruption of the MEK/ERK signaling cascade promotes dihydroartemisinin-induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Apoptosis*, 2011, 16: 511–523
- 52 Zhou H J, Wang W Q, Wu G D, et al. Artesunate inhibits angiogenesis and downregulates vascular endothelial growth factor expression in chronic myeloid leukemia K562 cells. *Vascul Pharmacol*, 2007, 47: 131–138
- 53 Zhang S, Gerhard G S. Heme mediates cytotoxicity from artemisinin and serves as a general anti-proliferation target. *PLoS One*, 2009, 4: e7472
- 54 Berger T G, Dieckmann D, Efferth T, et al. Artesunate in the treatment of metastatic uveal melanoma—first experiences. *Oncol Rep*, 2005, 14: 1599–1603
- 55 Hamacherbrady A, Stein H A, Turschner S, et al. Artesunate activates mitochondrial apoptosis in breast cancer cells via iron-catalyzed lysosomal reactive oxygen species production. *J Biol Chem*, 2011, 286: 6587–6601
- 56 Bostwick D G, Alexander E E, Singh R, et al. Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer*, 2000, 89: 123–134
- 57 Li J, Casteels T, Frogne T, et al. Artemisinins target GABAA receptor signaling and impair α cell identity. *Cell*, 2016, 168: 86–100
- 58 Hou L F, He S J, Li X, et al. Oral administration of artemisinin analog SM934 ameliorates lupus syndromes in MRL/*lpr* mice by inhibiting Th1 and Th17 cell responses. *Arth Rheum*, 2011, 63: 2445–2455
- 59 Wu Y, He S, Bai B, et al. Therapeutic effects of the artemisinin analog SM934 on lupus-prone MRL/LPR mice via inhibition of TLR-triggered B-cell activation and plasma cell formation. *Mol Immunol*, 2016, 13: 379–390
- 60 Le W J, You J Q, Yang Y Q, et al. Studies on the efficacy of artemether in experimental schistosomiasis. *Acta Pharm Sin*, 1982, 17: 187–193
- 61 Xiao S H, Catto B A. *In vitro* and *in vivo* studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989, 33: 1557–1562
- 62 Sun C, Zhou B. The molecular and cellular action properties of artemisinins: What has yeast told us? *Microb Cell*, 2016, 3: 196–205
- 63 Sun C, Li J, Yu C, et al. Two distinct and competitive pathways confer the cellcidal actions of artemisinins. *Microb Cell*, 2015, 2: 14–25

Summary for “青蒿素作用机制之谜”

How does artemisinin act inside a cell?

ZHONG MengJiao & ZHOU Bing*

State Key Laboratory of Membrane Biology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

* Corresponding author, E-mail: zhoubing@mail.tsinghua.edu.cn

Artemisinins are a set of miraculous antimalarial drugs. In addition to their potent antimalarial activities, artemisinins are found to possess some other biological properties such as cancer inhibition. The biological mechanism of artemisinin has long been controversial. However, it is generally believed that the endoperoxidic bond within artemisinin is key to its functions. The action of artemisinin is a two-step process: artemisinin first has to be activated by a reductive process to unleash the killing power of the endoperoxidic bond, and then exerts its actions. Nevertheless, the details of these processes are unclear and hotly debated. What molecules provide the necessary reduction force to activate artemisinin? Is it iron, heme or an uncertain component such as electron transport chain in the mitochondrial membrane? Evidences exist for all these possibilities, but none is conclusive. After artemisinin is activated, does it target a specific protein/biological process, or relatively non-specifically many proteins/biological processes? Does it affect vacuole or mitochondria or some other organelles? Heme/iron-mediated artemisinins activation has been widely reported and well supported by many pieces of research evidences, and almost certainly exist in many types of cells. Direct mitochondrial membrane depolarization has also been detected in Baker's yeast and malarial parasites, but not in mammalian cells. This review is intended to summarize our current understanding of the action mechanism of artemisinin. It appears that artemisinin is associated with various biological properties, and depending on the cell types, one action might be more predominant than the others. This is further supported by the observation that the potencies of artemisinin derivatives are often not well correlated in different types of action assays. The critical issue in the future is to reveal more of the biological properties of artemisinins and pinpoint which property is more functionally relevant under a particular setting of biological action.

artemisinin, heme, iron, mitochondria, activation

doi: 10.1360/N972017-00194