中国科学: 生命科学 2012 年 第 42 卷 第 5 期: 345 ~ 354
SCIENTIA SINICA Vitae www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

评 述

# 青蒿素类药物的作用机制: 一个长久未决的基础研究挑战

孙辰, 李坚, 周兵*

清华大学生命科学学院, 生物膜与膜生物国家重点实验室, 北京 100084
* 联系人, E-mail: zhoubing@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2012-04-20; 接受日期: 2012-04-24
doi: 10.1360/052012-168

**摘要** 青蒿素是中国自主研制的抗疟良药, 高效、低毒, 许多基于青蒿素研发的衍生物具有良好的抗疟效果, 近年来已成为抗疟的一线药物, 受到世界医疗卫生界的充分肯定. 虽然青蒿素结构奇特, 抑疟效果显著, 但 40 年来其生物作用机制之谜一直未被彻底破解. 针对青蒿素类药物的作用机制, 提出了不同的假说, 如血红素参与青蒿素的激活并被烷基化从而起到抑疟作用, 线粒体参与青蒿素的激活和作用过程, 某些特定的蛋白是青蒿素作用靶点等. 除抑疟外, 青蒿素类药物在杀灭其他种类寄生虫、抑制某些癌症细胞以及抗病毒、治疗类风湿等方面也有一定作用. 本文将对青蒿素类药物作用机制的研究进行综述及展望, 包括抗疟疾过程中的药物激活、作用靶点以及简要的青蒿素抑制肿瘤细胞作用机制, 以期为今后的研究提供帮助.

**关键词**
青蒿素
作用机制
血红素
线粒体

2011 年 9 月, 中国中医科学院科学家屠呦呦获得美国拉斯克临床医学奖, 以表彰她在抗疟药物青蒿素(artemisinin)开发过程中的贡献. 一时间, 疟疾和抗疟良药青蒿素成为国人关注的焦点. 疟疾是严重影响人体健康的传染性疾病, 尤其在非洲、南亚、东南亚及南美洲大陆的热带亚热带地区发病严重. 世界卫生组织统计报告显示, 疟疾 2010 年发病人数为 2.16 亿, 造成约 65.5 万人死亡, 其中 86%的受害者是 5 岁以下儿童[1].

青蒿素的发现是中国 20 世纪 70 年代“中国疟疾防治药物研究工作协作项目”(又称“523”科研项目)中的一项重要成果, 中国科学家们的协作研发为世界人民抗击疟疾做出了重要贡献. 青蒿素对红内期疟原虫有直接杀灭作用, 快速高效且毒性低, 缺点是半衰期比较短, 单独使用再燃率较高. 其他治疗疟疾的药物, 如氯喹、甲氟喹和奎宁等均出现了抗药株, 而青蒿素类药物自投入使用以来, 除在柬埔寨地区出现青蒿琥酯对疟原虫清除效率降低的病例(体外实验并没有出现类似的延缓现象)[2], 尚无确证的青蒿素类药物抗性疟原虫出现. 为防止将来青蒿素抗性菌株的出现, 世界卫生组织颁布了 “青蒿素联合疗法”(artemisinin combination therapy, ACT).

除治疗疟疾的良好效果外, 青蒿素在杀灭其他种类寄生虫, 抑制某些癌症细胞以及抗病毒、治疗类风湿等方面也有一定作用. 青蒿素的治疗效果举世瞩目, 但其作用机制至今仍是一个谜, 也是一个长期

英文引用格式: Sun C, Li J, Zhou B. Mechanism of action of artemisinins: a long unsettled challenge. SCIENTIA SINICA Vitae, 2012, 42: 345–354, doi: 10.1360/052012-168

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

存在争议的话题. 本文将对青蒿素作用机制的研究现状进行综述.

## 1 青蒿素简介

青蒿素, 一种具有过氧桥的倍半萜内酯类化合物, 分子式 $C_{15}H_{22}O_5$, 分子量 282.33, 无色针状晶体(图 1A). 它是从菊科植物黄花蒿中分离到的[3]. 中国科学家在获取青蒿素并确定其结构后[4], 就展开了对其衍生物构效关系的研究, 合成并筛选了它的衍生物, 如二氢青蒿素、醚类、羧酸酯类和碳酸酯类等. 这些衍生物的抗疟活性大多强于青蒿素, 其中青蒿琥酯水剂和蒿甲醚油针剂在 1987 年被批准生产.

在氯喹、奎宁等抗疟药物不断出现耐药株的时候, 青蒿素的良好抗疟效果引起了世界范围的关注, 对于青蒿素作用机制的研究也随之展开. 基于青蒿素结构中的过氧桥或 1, 2, 4-三噁烷环(1, 2, 4-trioxane), 设计并合成了一系列化合物[5~9], 其中一部分在药效和稳定性方面都较青蒿素有明显的提高, 且部分化合物的分子骨架与青蒿素截然不同(图 1B~D). 这些分子的共同特点是具有双氧桥, 加之双氧桥本身化学性质比较活跃, 是已知的自由基来源之一, 消除双氧桥化合物随之失活, 因而目前认为, 青蒿素结构中的双氧桥是关键的药效团, 是其发挥作用必不可少的重要组分, 可能在抗疟疾过程中发生了氧化还原反应产生自由基, 从而破坏疟原虫的生长, 实现对疟疾的控制.

## 2 青蒿素抗疟作用机制

破解青蒿素作用机制不仅可以加深人们对这种药物的认识, 而且对于其正确使用, 如增效、防止抗疟株的产生, 以及新型抗疟药物的设计都有重要意义.

目前提出的青蒿素作用机制假说基本涉及两个方面: 青蒿素的激活和青蒿素的作用靶点.

### 2.1 青蒿素的激活

(1) 铁参与青蒿素的激活. 青蒿素抗疟研究中, 铁是大家关注的焦点之一. 目前, 一种比较普遍的观点是青蒿素的激活是通过含铁的途径进行的. 通过监测青蒿素产生自由基的过程认为, 铁在青蒿素抗疟过程中发挥了重要作用. 通过电子顺磁共振技术

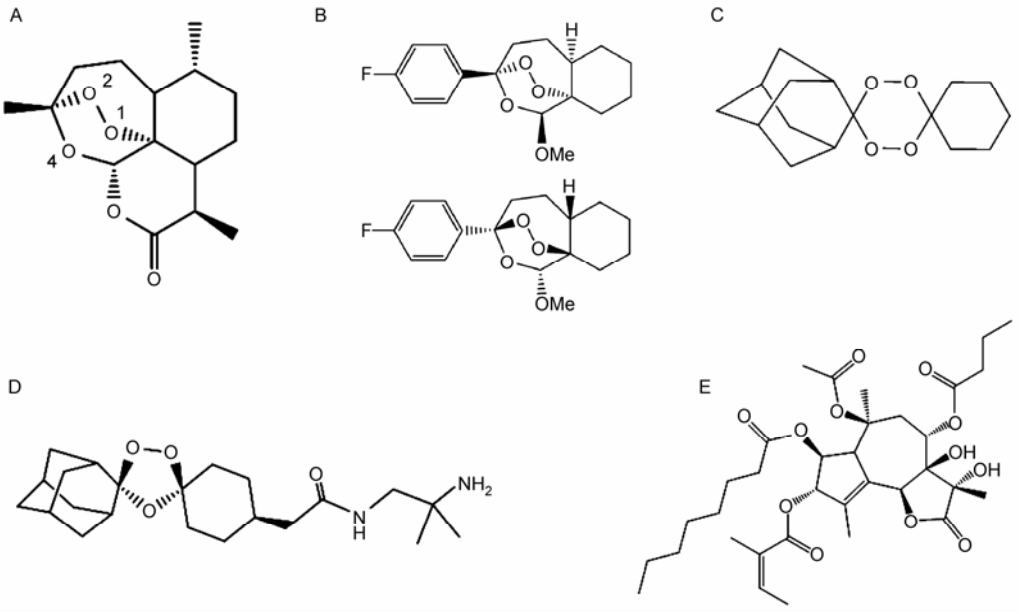



**图 1 青蒿素及数种类似物化学结构式**

A: 青蒿素; B: 青蒿素类似物对映异构体, 两者有同等抑疟效果; C: 一种基于青蒿素过氧桥结构衍生的四噁烷(tetraoxane); D: OZ277, 一种合成的化合物, 在体外实验中具有更好的抗疟效果和更强的化学稳定性[10]; E: 毒胡萝卜素(thapsigargin), 被认为和青蒿素有一定的结构相似, 但应注意到它不含有关键的双氧桥基团



?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(EPR)及捕获剂 DMPO 进一步揭示了二者之间的关系: 青蒿素通过一个依赖于铁的通路产生自由基[11]. 如果在反应体系中加入吡哆醛苯甲酰腙(pyridoxal benzoylhydrazone) 和去铁酮 (1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one)这两种疏水性铁螯合剂, 青蒿素及其衍生物的抑疟效果将减弱. 去铁敏(desferrioxamine), 另一种铁螯合剂, 也降低了青蒿素的作用[12]. Wu 等人[13]发现, 青蒿素在亚铁离子存在下可以与半胱氨酸作用, 得到胱氨酸及一种新的重排产物. 青蒿素分子中的过氧桥结构是其发挥作用的关键药效团. 在青蒿素激活过程中, 关于如何打开过氧桥有两种假说, 一种是通过铁参与还原, 均裂过氧桥产生氧中心自由基进而重排形成碳中心自由基[14~16], 另一种观点是铁起到类似路易斯酸(lewis acid)的作用, 不对称断裂过氧桥, 分子离子化, 之后再借助铁或者非过氧化的氧进行后续反应[17~20], 认为这样的方式所需能量更低、更稳定, 且有可能在该过程中产生能对细胞造成损害的活性氧自由基.

(2) 血红素(heme)参与青蒿素的激活. 疟原虫在传播繁殖过程中有两个寄主, 一个是人体, 另一个是按蚊. 在人体内为无性繁殖. 其长梭形的孢子在肝细胞内形成裂殖体, 成熟后会涨破肝细胞进入血液, 侵入红细胞中增殖. 它们依靠摄取红细胞内的血红蛋白做为自身氨基酸合成的来源, 该过程会产生对虫体不利的分解产物血红素, 血红素形成三价铁二聚体(hematin), 疟原虫体内存在一种机制可以将其转化成没有细胞毒性的色素颗粒(hemozoin)累积于细胞质内, 即疟色素.

有研究表明, 非血红素的铁[11,21]和血红素中的铁[22]均能与青蒿素作用. 两种观点都有相关实验数据支持: 对于前者, 实验将一种特异螯合非血红素来源的铁离子螯合剂与青蒿素偶联之后与未经修饰的青蒿素一同进行抑疟实验, 发现两者具有拮抗作用[23], 表明非血红素来源的铁对青蒿素有重要作用; 而另一部分学者发现, 从用青蒿素处理的恶性疟原虫菌株中可以分离到血红素(heme)与青蒿素的复合物[24], 还有体外实验发现, 将青蒿素与不同形式的铁, 包括血红素、二价铁离子、脱氧的和氧化的血红蛋白在相同的条件下进行反应, 血红素与青蒿素反应的效率远高于其他含铁分子[12], 表明血红素对于激活青蒿素起关键作用. 疟原虫寄生于血红细胞中, 血红素来源丰富. 目前, 究竟是自由铁还是血红素的铁激活青蒿素还存在争议.

(3) 线粒体参与青蒿素的激活. 模式生物是研究药物分子机制的有力工具, 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为经典模式生物之一, 被用于青蒿素类药物作用机制的探索. 通常情况下, 酿酒酵母主要依赖糖酵解途径, 在发酵型培养基(如以葡萄糖为碳源)上的生长状况更好, 此类型的生长过程不需要线粒体供能, 而当非发酵型碳源(如以甘油或乙醇作为碳源)出现时, 它们的生长必须依赖于线粒体.

研究发现, 青蒿素可以抑制酿酒酵母菌在非发酵培养基上的生长, 但是基本不能抑制在发酵培养基上的生长. 这种现象暗示了青蒿素与线粒体的紧密联系[25]. 通过筛选得到了 *NDI1*, *NDE1* 的突变株, 发现其具有青蒿素抗性. *NDI1* 和 *NDE1* 是编码酿酒酵母线粒体电子传递链中 NADH 脱氢酶的基因, 这两个基因在恶性疟原虫中存在同源序列, 而哺乳动物中不存在. 哺乳动物线粒体内与这一结构发挥相似功能的是由多个亚基组成的呼吸链复合物Ⅰ. 实验表明, 当敲除 *NDE1* 或 *NDI1* 基因时, 可以观察到酵母菌对青蒿素的耐受性增强, 敏感性降低; 过量表达则可增强敏感性. 线粒体呼吸链抑制剂 DPI(NADH 脱氢酶抑制剂)的加入可以减缓酵母菌细胞和疟原虫细胞对青蒿素的代谢[26], 减弱疟原虫和酵母菌对青蒿素的敏感性. 基于这一模型, 推测青蒿素的还原激活(获得电子)是通过线粒体的还原物, 且很可能是通过获得电子传递链中的电子完成的. 呼吸链在电子传递过程中有时会发生电子泄漏, 电子被 $O_2$ 获得进而产生自由基, 而青蒿素恰好又是一种过氧化合物. 另值得一提的是, 线粒体特别是呼吸链有丰富的铁以及血红素.

(4) 其他观点. 对于铁参与激活青蒿素这一理论, 也有部分研究者持不同意见, 如 Haynes 等人[27]在寻找新型青蒿素衍生物过程中发现, 有两种青蒿素烷氨基衍生物表现出了比青蒿素更好的抗疟作用, 但是其和铁的作用微弱. 此外, 对其他一些可以介导反应形成过氧化物并作为自由基来源的分子也有研究和报道[19]. 在这些假说中, 异源分解过氧桥先于重排发生, 导致了破坏细胞大分子的羟基自由基的生成. 另有报道也反驳了铁在青蒿素中的作用, 同时提出由二价铁介导的碳自由基的形成不是青蒿素发挥抗疟作用的原因[17].

近来有报道认为, 青蒿素抑制疟疾的活性需要



?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

血红蛋白的消化和吸收, 当抑制了血红蛋白酶的活性, 干扰血红蛋白降解通路或者直接从培养基中去除红细胞裂解产物, 都可以显著减弱青蒿素的抑疟活性[28].

综合上述观点, 有一些问题还存在争议, 例如, 若铁确实参与了青蒿素的作用过程, 那么铁在体内的作用是直接的还是间接的, 是以何种形式、在哪一阶段、以何种机制参与反应等. 一种相对被认可的结论是活性氧自由基(ROS)的产生是对细胞造成损伤的重要原因之一. 因此也可以存在这样的假设, 认为可能是青蒿素激活产生少量的 ROS, 这些 ROS 与铁相互作用, 扰乱了铁平衡, 又激化了更多 ROS 的生成, 从而对细胞造成损伤. 有关青蒿素激活的各种观点假说还需更多体内实验进行探究.

### 2.2 青蒿素类药物的作用靶点

嵌入在青蒿素倍半烯萜内酯骨架中的双氧桥对青蒿素抗疟有着至关重要的作用是进行机制研究的最初线索, 而自由基的生成与双氧桥的断裂有着密切的关系. 早在 20 世纪 80 年代末期, 自由基在青蒿素类药物中的作用就得到了实验的证实[29]. 研究发现, 在体外实验中, 自由基清除剂可以拮抗青蒿素类药物的抗疟活性, 同时自由基生成剂能增强其抗疟作用. 相关的体内实验也证实了这一关系[30,31]. 然而, 青蒿素的作用又与通常意义上引起损伤的典型氧化剂不同. 由于青蒿素的一个分子一次反应只能产生一个自由基, 实验观察到的内源性氧化产物只在较高的药物施用浓度下才能被观察到[32,33], 而实际杀灭疟原虫时青蒿素的用量很低, 在 nmol/L 级, 所以青蒿素应存在着其特殊的作用方式.

(1) 血红素的烷基化. 不少研究认为, 血红素既是激活青蒿素类药物的裂解还原激活剂, 又是其发挥作用的重要靶标, 青蒿素对血红素的修饰、烷基化是杀灭疟原虫的原因. 早期的血红素模型中青蒿素的作用机制与奎宁相仿, 都是作用于液泡, 通过影响血红素的脱毒来抑制青蒿素. 这一观点有一些相关实验支持, 如当 $^{14}C$ 标记的青蒿素加入被红细胞侵染的恶性疟原虫时, 辐射剂量测量显示疟色素中有大量青蒿素. 通过高效液相色谱, 可以在试管中分离血红素-青蒿素复合物[34], 说明两者之间有生理联系. 青蒿素抑制液泡中蛋白水解酶的活性, 体内和体外实验都表明青蒿素可以与血红素结合[35]. 推测认为, 青蒿素的抗疟作用可能是由烷基化血红素产生的疟色素引起的, 也可能是由于形成了一种还原性更强的环境导致的[36]. 在被感染的小鼠中也观察到了烷基化的血红素[37,38]. 体外实验中化学合成血红素-青蒿素复合物能抑制血红素聚合过程, 导致毒性血红素的释放和疟原虫的死亡[39,40]. 一些青蒿素的衍生物虽可以与卟啉产生碳自由基, 但不能发生烷基化反应, 经过检测发现这些衍生物也没有抗疟活性. 研究还发现, 合成的有抑疟活性的 1,2,4-三噁烷衍生物能与卟啉发生反应[41]. 由此认为, 烷基化血红素是发挥抗疟活性的重要因素.

然而, 另一些实验结果和血红素理论有一定冲突. 例如, 红细胞内的疟原虫实验发现, 青蒿素的施用没有减少疟色素的含量[42], 表明青蒿素通过抑制疟色素的形成发挥作用的结论有待修正. 随后研究发现, 10-脱氧二氢青蒿素是一种有效的抗疟药物, 但是并不抑制疟色素的形成[43]. 也有研究发现, 水解稳定、血红素惰性的化合物仍然具有很好的抗疟特性[27]. 此外, Ro40-4388, 一种限制血红素降解第一步反应的蛋白酶抑制剂, 与氯喹有拮抗作用, 与青蒿素既无拮抗作用也没有协同作用, 提示血红素对于青蒿素的抗疟作用不是必需的[12]. 最近, 在 CO 环境下进行了青蒿素抗疟作用检测, 实验依据 CO 会与血红素结合, 形成羰基血红蛋白(CO-Hb-Fe(Ⅱ))或 CO-heme-Fe(Ⅱ), 可能会掩盖青蒿素与血红素的作用. 结果显示, 在 CO 环境下, 青蒿素效果好, 而血红素惰性的青蒿素衍生物效果下降, 说明 Hb-Fe(Ⅱ)或 heme-Fe(Ⅱ)没有参与青蒿素抗疟作用[44]. 因而对于血红素理论的修正观点认为, 血红素只是一种激活剂, 不是重要的靶标[45], 除了激活以外, 血红素可能与青蒿素的降解有关而不是增强它的功能.

(2) 蛋白靶点理论. 青蒿素的一个鲜明特点就是对疟原虫有强烈的特异性而对人不产生副作用, 这使得人们推测青蒿素可能会在疟原虫体内特异激活, 或者疟原虫体内存在着对青蒿素的特异性靶标. 对于大部分药物来说, 都存在着较为专一和特异的靶标.

(ⅰ) PfATP6 靶点理论. 这一靶点理论曾风靡一时, 源自于 2003 年 *Nature* 上的一篇文章, 提出青蒿素特异地抑制恶性疟原虫的肌浆内质网钙 ATP 酶(PfATP6)[12]. 作者认为, 青蒿素与毒胡萝卜素在结构上有一定相似性(图 1), 而后者能特异性结合并抑制



?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

肌浆内质网钙 ATP 酶(SERCA). 为了探究青蒿素与疟原虫 SERCA 间的关系, 以及在扼杀疟原虫过程中发挥的作用, 将 PfATP6 在非洲爪蟾卵母细胞中进行了表达. 结果发现, 青蒿素对 PfATP6 具有强大且特异的抑制效果. 因此, 提出青蒿素结合 PfATP6 发挥功能的理论. 后续研究发现, 当 PfATP6 263 位亮氨酸和对应的哺乳动物 SERCA 255 位的谷氨酸进行互换, 它们的抑制效果也随之改变[46]. 一时间, PfATP6 理论备受关注.

但是, 近年来一些与此相仿的嵌合实验, 针对一系列抗疟药, 包括青蒿素及其衍生物、奎宁类药物和其他一些过氧化物与毒胡萝卜素结合, 实验结果没有发现上述关系[47]. 值得注意的是, 某些原来用于支持这一学说的实验不能被重复[48,49]. 青蒿素结构中的过氧桥对抗疟作用的发挥有重要意义, PfATP6 模型认为, 青蒿素与毒胡萝卜素作用相似, 都是作用在疟原虫的肌浆内质网钙 ATP 酶上并最终导致疟原虫死亡. 但是, 毒胡萝卜素并没有过氧桥结构. 另外, 构效研究结果表明, 许多结构不相同的衍生物都展现出了抗疟活性, 但是对于 PfATP6 的结合似乎更依赖于分子骨架而非过氧桥, 对于结构千差万别的各种衍生物分子而言, 如何统一青蒿素类药物的抗疟机制非常困难. 最近, 青蒿素与毒胡萝卜素之间的结构相似性也受到了质疑, 认为这两种分子结构相似度极有限[50]. 有研究报道, 在疟原虫体内将野生型 *PfATP6* 基因分别替换成含有 L263E, S769N 的突变型, 用青蒿素及衍生物处理后并未观察到明显的 IC50 变化[51,52], 这对 PfATP6 靶点理论构成强烈的冲击. 在酵母菌中异源表达 PfATP6 并进行纯化后, 发现其与毒胡萝卜素的亲和性较低, 而与环匹阿尼酸(cyclopiazonic acid)的亲和性较高, 同时也未观察到青蒿素对它的抑制作用. 其他类似的研究也支持这一结果[47,53]. 总之, 这个理论不再被看好, 人们认为, PfATP6 即使可以作为其他药物的靶标, 也不太可能是青蒿素的作用靶点[54].

(ⅱ) 其他蛋白靶点理论. 除了 PfATP6 靶点理论, 还有研究提出了其他一些蛋白, 被认为可能是青蒿素的作用靶标, 但目前证据较少, 说服力比较薄弱. 其中包括转译控制肿瘤蛋白(TCTP)、消化泡上的膜转运蛋白 PfMDR1、PfCRT、半胱氨酸蛋白酶家族成员 falcipain-2、消化泡里的疟原虫富组氨酸蛋白 PfHRP Ⅱ、嘌呤核苷磷酸化酶(PfPNP)、肽脱甲酰基化酶(PfPDF)和核糖-5-磷酸异构酶(PfRpiA)等. 近来有研究报道, 在坦桑尼亚实地考察各种抗药性改变的菌株中, Pfcrt 76 位和 Pfmdr1 86 位, Pfdhfr 的 51, 59 和 108 位有部分病例存在突变, 但是 PfATP6 的 263 和 769 位都没有发现突变[55]. 另外, 这些在疟原虫中预测的青蒿素作用靶点, 如 PfATP6, TCTP, PGH1 在酵母菌中都有类似物, 敲除酵母菌中编码这些蛋白的同源基因并检测这些菌株对青蒿素的敏感性, 结果发现除 *mdl2Δ*和 *pmr1Δ*在非发酵培养基中不能正常生长、不能检测青蒿素敏感性以外, 其他的菌株都没有表现出比野生型对照更敏感的表型; 进而在酵母菌中过表达 *MDL2* 和 *PMR1* 基因, 菌株也没有表现出对青蒿素的抗性, 推测这些靶点在青蒿素抑疟过程中可能不是唯一的或者不是发挥主要作用的[56].

(3) 线粒体模型. 疟原虫的生长需要有功能的线粒体. 加入阿托伐醌(Atovaquone)(一种抗疟药物), 能抑制呼吸链复合物Ⅲ的活性, 破坏疟原虫线粒体功能从而导致虫体死亡, 达到抑疟效果[57]. 在建立了用酵母菌进行青蒿素作用机制研究的模型后, 实验发现, 青蒿素可以直接作用于疟原虫线粒体[58]. 青蒿素的加入可以诱导疟原虫和酵母菌的线粒体肿胀, 产生大量的 ROS, 引起线粒体的去极化和膜电势降低, 损害线粒体功能, 但青蒿素对鼠肝细胞的线粒体就没有这样的作用. 当加入 ROS 清除剂, 如 DPPD、依达拉奉(edaravone)时, 青蒿素的抗疟和去极化作用能被拮抗, 其他一些 ROS 清除剂, 如二硫苏糖醇(dithiothreitol)、α-生育酚(alpha-tocopherol)与青蒿素的拮抗作用也有报道[29]. 另外, 采用两种不同的线粒体通透性转移孔抑制剂均可以拮抗青蒿素的抑疟效果[59]. 根据线粒体模型, 青蒿素可能不是直接作用于某一个蛋白而使线粒体失活, 而可能是通过激活产生 ROS 或更多非特异破坏性自由基对细胞造成伤害, 也有可能涉及多个代谢通路, 但目前对其具体的作用过程尚不清楚, 还需更多的实验进行探索.

也有研究对线粒体模型表示质疑[60]. 使用过氧化物处理红内期疟原虫后, 未观察到线粒体形态上的明显变化[61]. 当用荧光染料 LysoSensor Blue 和 Rhodamine 123 分别标记食物泡和线粒体时, 可以在 4 h 后观察到青蒿素对食物泡的破坏, 但线粒体没有变化, 从而认为线粒体丧失功能并不是青蒿素类药物发挥作用的早期事件. 但是, 也有较早期的报道称, 对感染了帕氏鼠疟原虫的小鼠施用[3H]-二氢青蒿素,



?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

可以在 30 min 时观察到线粒体的膨大[62]. 另有报道, 线粒体形态上的变化是早期事件[63,64]. 出现这些不同的结果可能是实验灵敏度的差别所致, 显微镜下形态学上没有检测到明显的线粒体变化并不能说明其功能没有发生变化.

(4) 其他假说. 正如很多寄生虫一样, 疟原虫体存在着较丰富的还原型谷胱甘肽(GSH), 当虫体食物泡分解血红蛋白时, GSH 能够帮助虫体清除代谢过程中产生的过氧化物和自由基, 实现解毒功能[65]. Wang 和 Wu[66]分离得到了青蒿素与 GSH 在少量 Fe 催化下的复合物, 该发现对研究青蒿素的抗疟机制有提示作用. 此外, 还有一些研究认为青蒿素作用影响了疟原虫膜的合成、辅酶 A 的功能、抑制细胞色素酶等, 但是支持这些猜测的实验数据相对较少.

## 3 青蒿素类药物的抗肿瘤作用

近年来, 有关青蒿素类药物抗肿瘤的研究日益增多. 青蒿素类药物不仅在疟疾治疗方面效果显著, 还可以在体外选择性地抑制多种肿瘤细胞, 如白血病、结肠癌、鼻咽癌和宫颈癌细胞等, 对黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌等也有一定的抑制作用, 毒副作用较小[67], 且与经典的化疗药物无交叉耐药性. 因而, 有关青蒿素类药物的抗肿瘤机制的研究以及基于此开发抗肿瘤新药成为青蒿素研究的热点.

青蒿素及其衍生物可以在一定程度上抑制肿瘤细胞的增殖. 目前, 提出的抗肿瘤机制主要有: ① 与铁反应产生自由基, 发生烷基化等导致细胞毒性; ② 诱导细胞凋亡[68]; ③ 损伤肿瘤细胞线粒体; ④ 调控肿瘤相关基因的表达量[69]; ⑤ 延迟或抑制细胞周期, 影响肿瘤细胞的 DNA 合成[70]; ⑥ 影响免疫系统[71]; ⑦ 抑制肿瘤新生血管的生成[72]等. 当然, 这一过程也有可能是多环节、多通路的, 青蒿素类药物究竟是如何作用于肿瘤细胞仍需更多的研究和探索, 特别是青蒿素抑制肿瘤细胞和抑制疟原虫是否通过同一机制仍不清楚.

在青蒿素抗疟机制的研究中, 有观点认为铁参与了青蒿素的激活和作用过程, 因而也有研究认为, 肿瘤细胞中也存在类似的作用过程, 即铁(尤其是 $Fe^{2+}$)能与青蒿素及其衍生物作用活化双氧桥, 产生 ROS 或发生烷基化作用, 从而破坏细胞功能, 抑制细胞的生长, 同时由于肿瘤细胞中的铁含量高于正常细胞, 因而还可以解释青蒿素类药物对肿瘤细胞的选择性抑制. 实验显示, 肿瘤细胞表面的铁转运蛋白和其受体(transferrin receptor)比正常细胞高出数倍[73]. 有研究认为, 青蒿素类药物与铁相互作用是其抑制肿瘤细胞的上游和关键步骤, 肿瘤细胞的代谢较正常细胞旺盛, 这一过程需要较多的铁, 尤其是二价铁的参与. 实验发现, 青蒿素在有转铁蛋白的条件下对白血病细胞具有更好的选择性[74]; 胞内的 heme 可以介导青蒿素的细胞毒性, 增加 heme 合成的前体物质会增强青蒿素作用, 而添加抑制剂干扰 heme 合成通路则会降低细胞毒性, 若添加非血红素的铁则可通过参与血红素合成过程增强青蒿素的作用[75,76]; 研究显示, 线粒体的呼吸活性对青蒿素类药物的细胞毒性的发挥起关键作用, 当使用 HeLa $\rho^0$ 细胞(没有线粒体 DNA 的 HeLa 细胞)时, 青蒿琥酯对细胞的抑制作用和细胞毒性会减弱很多[76].

## 4 总结

上述各种观点和假说表明, 青蒿素类药物的作用机制相当复杂, 可能涉及不同的作用分子, 这些作用有可能协同也可能竞争/拮抗. 随着研究手段的不断发展, 寻找易于操作的、接近于体内环境下疟原虫的生物模型, 如酵母菌模型等, 减少体内体外实验结果不一致的现象, 抑或直接针对疟原虫进行更多分子水平上的操作等, 将有助于推进对青蒿素类药物抗疟作用机制的研究. 对已经提出的模型之间的生理学联系, 还需进一步探索. 尽管, 目前青蒿素仍在抗疟一线发挥着关键的作用, 但人们已经意识到青蒿素抗性病原株出现的风险在日益提高. 破解青蒿素类药物的抗疟机制, 将对新药设计研发和人们的健康有重要意义.

## 参考文献

1 World Health Organization. World Malaria Report: 2011. XI. Switzerland: WHO Press, 2011

2 Dondorp A M, Nosten F, Yi P, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. N Engl J Med, 2009, 361: 455–467

3 青蒿素结构研究协作组. 一种新型的倍半萜内酯——青蒿素. 科学通报, 1977, 3: 142



?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

4 刘静明, 倪慕云, 樊菊芬, 等. 青蒿素(Arteannuin)的结构和反应. 化学学报, 1979, 37: 129–143
5 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-trioxane artemether. J Med Chem, 1999, 42: 5487–5493
6 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
7 Ma J, Weiss E, Kyle D E, et al. Acid catalyzed Michael additions to artemisitene. Bioorg Med Chem Lett, 2000, 10: 1601–1603
8 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. Chem Bio Chem, 2005, 6: 2048–2054
9 Liu Y, Cui K, Lu W, et al. Synthesis and antimalarial activity of novel dihydro-artemisinin derivatives. Molecules (Basel, Switzerland), 2011, 16: 4527–4538
10 Vennerstrom J L, Arbe-Barnes S, Brun R, et al. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. Nature, 2004, 430: 900–904
11 Meshnick S R, Yang Y Z, Lima V, et al. Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). Antimicrob Agents Chemother, 1993, 37: 1108–1114
12 Eckstein-Ludwig U, Webb R J, Van Goethem I D, et al. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. Nature, 2003, 424: 957–961
13 Wu Y, Yue Z Y, Wu Y L. Interaction of qinghaosu (artemisinin) with cysteine sulfhydryl mediated by traces of non-heme iron. Angew Chem Int Ed Engl, 1999, 38: 2580–2582
14 Posner G H, Oh C H, Wang D, et al. Mechanism-based design, synthesis, and *in vitro* antimalarial testing of new 4-methylated trioxanes structurally related to artemisinin: the importance of a carbon-centered radical for antimalarial activity. J Med Chem, 1994, 37: 1256–1258
15 Butler A R, Gilbert B C, Hulme P, et al. EPR evidence for the involvement of free radicals in the iron-catalysed decomposition of qinghaosu (artemisinin) and some derivatives; antimalarial action of some polycyclic endoperoxides. Free Radical Res, 1998, 28: 471–476
16 Jefford C W, Vicente M G H, Jacquier Y, et al. The Deoxygenation and isomerization of artemisinin and artemether and their relevance to antimalarial action. Helv Chim Acta, 1996, 79: 1475–1487
17 Haynes R K, Chan W C, Lung C M, et al. The $Fe^{2+}$-mediated decomposition, PfATP6 binding, and antimalarial activities of artemisone and other artemisinins: the unlikelihood of C-centered radicals as bioactive intermediates. Chem Med Chem, 2007, 2: 1480–1497
18 O'Neill P M, Bishop L P, Searle N L, et al. Biomimetic Fe(II)-mediated degradation of arteflene (Ro-42-1611). The first EPR spin-trapping evidence for the previously postulated secondary carbon-centered cyclohexyl radical. J Org Chem, 2000, 65: 1578–1582
19 Haynes R K, Vonwiller S C. The behaviour of qinghaosu (artemisinin) in the presence of non-heme iron(II) and (III). Tetrahedron Lett, 1996, 37: 257–260
20 Wu W M, Wu Y k, Wu Y L, et al. Unified mechanistic framework for the Fe(II)-induced cleavage of Qinghaosu and derivatives/analogues. The first spin-trapping evidence for the previously postulated secondary C-4 radical. J Am Chem Soc, 1998, 120: 3316–3325
21 Golenser J, Domb A, Leshem B, et al. Iron chelators as drugs against malaria pose a potential risk. Redox Rep, 2003, 8: 268–271
22 Hong Y L, Yang Y Z, Meshnick S R. The interaction of artemisinin with malarial hemozoin. Mol Biochem Parasitol, 1994, 63: 121–128
23 Efferth T. Willmar schwabe award 2006: antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin—from bench to bedside. Planta Med, 2007, 73: 299–309
24 Meshnick S R, Thomas A, Ranz A, et al. Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular hemin in its mechanism of antimalarial action. Mol Biochem Parasitol, 1991, 49: 181–189
25 Li W, Mo W, Shen D, et al. Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in action of artemisinin. PLoS Genet, 2005, 1: e36
26 王娟, 周兵. 线粒体呼吸链抑制剂对青蒿素代谢速率的影响. 清华大学学报(自然科学版), 2010, 50: 944–946
27 Haynes R K, Ho W Y, Chan H W, et al. Highly antimalaria-active artemisinin derivatives: biological activity does not correlate with chemical reactivity. Angew Chem Int Ed Engl, 2004, 43: 1381–1385
28 Klonis N, Crespo-Ortiz 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
29 Krungkrai S R, Yuthavong Y. The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1987, 81: 710–714
30 Levander O A, Ager A L Jr, Morris V C, et al. Qinghaosu, dietary vitamin E, selenium, and cod-liver oil: effect on the susceptibility of mice to the malarial parasite *Plasmodium yoelii*. Am J Clin Nutr, 1989, 50: 346–352
31 Senok A C, Nelson E A, Li K, et al. Thalassaemia trait, red blood cell age and oxidant stress: effect on *Plasmodium falciparum* growth and




?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

sensitivity to artemisinin. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1997, 91: 585–589
32 Scott M D, Meshnick S R, Williams R A, et al. Qinghaosu-mediated oxidation in normal and abnormal erythrocytes. J Lab Clin Med, 1989, 114: 401–406
33 Berman P A, Adams P A. Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes. Free Radic Biol Med, 1997, 22: 1283–1288
34 Robert A, Coppel Y, Meunier B. Alkylation of heme by the antimalarial drug artemisinin. Chem Commun(Camb), 2002: 414–415
35 Pandey A V, Tekwani B L, Singh R L, et al. Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malarial parasite. J Biol Chem, 1999, 274: 19383–19388
36 Kannan R, Kumar K, Sahal D, et al. Reaction of artemisinin with haemoglobin: implications for antimalarial activity. Biochem J, 2005, 385: 409–418
37 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
38 Meunier B, Robert A. Heme as trigger and target for trioxane-containing antimalarial drugs. Acc Chem Res, 2010, 43: 1444–1451
39 Kannan R, Sahal D, Chauhan V S. Heme-artemisinin adducts are crucial mediators of the ability of artemisinin to inhibit heme polymerization. Chem Biol, 2002, 9: 321–332
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 Cazelles J, Robert A, Meunier B. Alkylating capacity and reaction products of antimalarial trioxanes after activation by a heme model. J Org Chem, 2002, 67: 609–619
42 Asawamahasakda W, Ittarat I, Chang C C, et al. Effects of antimalarials and protease inhibitors on plasmodial hemozoin production. Mol Biochem Parasitol, 1994, 67: 183–191
43 Haynes R K, Monti D, Taramelli D, et al. Artemisinin antimalarials do not inhibit hemozoin formation. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47: 1175
44 Coghi P, Basilico N, Taramelli D, et al. Interaction of artemisinins with oxyhemoglobin Hb-FeII, Hb-FeII, carboxyHb-FeII, heme-FeII, and carboxyheme FeII: significance for mode of action and implications for therapy of cerebral malaria. Chem Med Chem, 2009, 4: 2045–2053
45 Meshnick S R. Artemisinin and heme. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47: 2712; author reply 2712–2713
46 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
47 Garah F B, Stigliani J L, Cosledan F, 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
48 Jambou R, Legrand E, Niang M, et al. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to *in-vitro* artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. Lancet, 2005, 366: 1960–1963
49 Cojean S, Hubert V, Le Bras J, et al. Resistance to dihydroartemisinin. Emerg Infect Dis, 2006, 12: 1798–1799
50 Jefford C W. New developments in synthetic peroxidic drugs as artemisinin mimics. Drug Discov Today, 2007, 12: 487–495
51 Valderramos S G, Scanfeld D, Uhlemann A C, et al. Investigations into the role of the Plasmodium falciparum SERCA (PfATP6) L263E mutation in artemisinin action and resistance. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54: 3842–3852
52 Cui L, Wang Z, Jiang H, et al. Lack of association of the S769N mutation in plasmodium falciparum SERCA (PfATP6) with resistance to artemisinins. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56: 2546–2552
53 Cardi D, Pozza A, Arnou B, et al. Purified E255L mutant SERCA1a and purified PfATP6 are sensitive to SERCA-type inhibitors but insensitive to artemisinins. J Biol Chem, 2010, 285: 26406–26416
54 Arnou B, Montigny C, Morth J P, et al. The Plasmodium falciparum Ca($2^+$)-ATPase PfATP6: insensitive to artemisinin, but a potential drug target. Biochem Soc Trans, 2011, 39: 823–831
55 Kamugisha E, Jing S, Minde M, et al. Efficacy of artemether-lumefantrine in treatment of malaria among under-fives and prevalence of drug resistance markers in Igombe-Mwanza, north-western Tanzania. Malar J, 2012, 11: 58
56 黄倩, 周兵. 酵母菌中青蒿素作用靶点的探索. 清华大学学报(自然科学版), 2008, 48: 408–411
57 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
58 Wang J, Huang L, Li J, et al. Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation. PLoS One, 2010, 5: e9582
59 王娟, 黄丽英, 龙伊成, 等. 线粒体通透性转移孔与青蒿素抗疟机制研究. 现代生物医学进展, 2009, 9: 4006–4009



?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

60 del Pilar Crespo M, 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
61 Afonso A, Hunt P, Cheesman S, et al. Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes atp6 (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum $Ca^{2+}$ ATPase), tctp, mdr1, and cg10. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50: 480–489
62 Ellis D S, Li Z L, Gu H M, et al. The chemotherapy of rodent malaria, XXXIX. Ultrastructural changes following treatment with artemisinine of *Plasmodium berghei* infection in mice, with observations of the localization of [3H]-dihydroartemisinine in *P. falciparum in vitro*. Ann Trop Med Parasit, 1985, 79: 367–374
63 Maeno Y, Toyoshima T, Fujioka H, et al. Morphologic effects of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg, 1993, 49: 485–491
64 Kawai S, Kano S, Suzuki M. Morphologic effects of artemether on *Plasmodium falciparum* in *Aotus trivirgatus*. Am J Trop Med Hyg, 1993, 49: 812–818
65 Linares G E, Rodriguez J B. Current status and progresses made in malaria chemotherapy. Curr Med Chem, 14: 289–314
66 Wang D Y, Wu Y L. A possible antimalarial action mode of qinghaosu (artemisinin) series compounds. Alkylation of reduced glutathione by C-centered primary radicals produced from antimalarial compound qinghaosu and 12-(2,4-dimethoxyphenyl)-12-deoxoqinghaosu. Chem Commun, 2000, 2193–2194
67 Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, et al. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. Int J Oncol, 2001, 18: 767–773
68 Gao N, Budhraja 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
69 Efferth T, Olbrich A, Bauer R. mRNA expression profiles for the response of human tumor cell lines to the antimalarial drugs artesunate, arteether, and artemether. Biochem Pharmacol, 2002, 64: 617–623
70 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
71 Noori S, Hassan Z M. Dihydroartemisinin shift the immune response towards Th1, inhibit the tumor growth *in vitro* and *in vivo*. Cell Immunol, 2011, 271: 67–72
72 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
73 Efferth T, Benakis A, Romero M R, et al. Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron. Free Radic Biol Med, 2004, 37: 998–1009
74 Lai H, Sasaki T, Singh N P, et al. Effects of artemisinin-tagged holotransferrin on cancer cells. Life Sci, 2005, 76: 1267–1279
75 Zhang S, Gerhard G S. Heme mediates cytotoxicity from artemisinin and serves as a general anti-proliferation target. PLoS One, 2009, 4: e7472
76 Mercer A E, Copple I M, Maggs J L, et al. The role of heme and the mitochondrion in the chemical and molecular mechanisms of mammalian cell death induced by the artemisinin antimalarials. J Biol Chem, 2011, 286: 987–996



?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

# Mechanism of Action of Artemisinins: a Long Unsettled Challenge

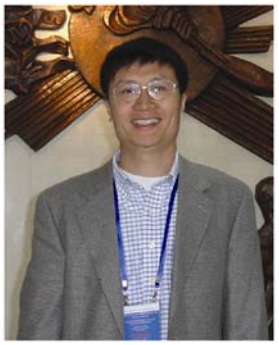
SUN Chen, LI Jian & ZHOU Bing

*State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China*

Artemisinin, discovered by Chinese scientists in the early 1970s, is an effective antimalarial drug with low toxicity. Artemisinins (artemisinin and its derivatives) remain as the gold standard in combating ever increasing drug-resistant malaria. Although intensive efforts have been devoted to explore the mode of action of this class of drugs, its exact mechanism remains an enigma. Many hypotheses have been proposed, such as iron and heme model, mitochondria model, PfATP6 model, and so forth. Recent studies have demonstrated that artemisinin and its analogs also possess potent inhibitory activities on some other parasites, cancer, virus and rheumatism. The aim of this review is to provide a mechanistic overview of the action of artemisinins.

**artemisinin, mechanism, heme, mitochondria**

doi: 10.1360/052012-168



**周兵**, 教授, 博士生导师. 1987年毕业于复旦大学, 1988年通过CUSBEA项目留学美国伊利诺伊大学香槟分校(University of Illinois, Urbana-Champaign), 1989~1995年就读于加州大学伯克利分校, 获得分子细胞学博士学位, 2002年于加州大学旧金山医学院完成博士后学习, 同年入选"百人计划"被引进清华大学生命科学学院任职. 2006 年获得国家杰出青年科学基金资助. 现从事青蒿素作用机理以及微量金属元素代谢/功能的研究.

本文为 *Science China Life Sciences* CUSBEA article series 专栏特邀文章.

**——编者注**



?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net