

文章编号: 1000-7423(2006)-03-0179-04

【论著】

瑞香素对恶性疟原虫细胞色素 C 氧化酶及核糖核酸还原酶活性的影响

黄芳¹, 汤林华^{1*}, 陈博², 倪奕昌¹, 王琴美¹

【摘要】 目的 体外测定瑞香素对恶性疟原虫细胞色素 C 氧化酶(COX)及核糖核酸还原酶(RNR)活性的影响。方法 Trager & Jensen 法体外培养恶性疟原虫 FCC1/HN 分离株, 超声波破碎恶性疟原虫提取总蛋白, 用紫外分光光度计检测瑞香素与瑞香素-Fe 复合物在不同作用时间和不同作用浓度对恶性疟原虫 COX 活性的影响, 以电子自旋共振法检测瑞香素与瑞香素-Fe 复合物作用 1、2、3 和 4 h 后, 恶性疟原虫酪氨酸(Tyr)自由基的量以反映恶性疟原虫 RNR 的活性。结果 体外同步培养的恶性疟原虫经瑞香素(100 μmol/L)作用 2、4、8 和 12 h 后, COX 活性分别被抑制了 0%、6%、73%和 80%; 在瑞香素浓度为 0.1、1、100 和 1 000 μmol/L, 作用 6 h 后, COX 活性分别被抑制 3%、31%、53%和 84%; 而瑞香素-Fe 复合物对 COX 的影响几乎消失。经瑞香素(100 μmol/L)作用 1、2、3 和 4 h 后 RNR 活性分别被抑制 7%、51%、69%和 75%; 在瑞香素浓度为 0.1、1、100 和 1 000 μmol/L, 作用 6 h 后, RNR 活性分别被抑制 3%、31%、58%和 93%; 而瑞香素-Fe 复合物作用 6 h 后 RNR 活性分别被抑制 8%、6%、11%和 9%。结论 在体外瑞香素可显著降低恶性疟原虫的细胞色素 C 氧化酶(COX)及核糖核酸还原酶(RNR)活性。

【关键词】 瑞香素; 恶性疟原虫; 细胞色素 C 氧化酶; 核糖核酸还原酶

中图分类号: R382.312

文献标识码: A

In Vitro Effect of Daphnetin on Cytochrome C Oxidase and Ribonucleotide Reductase of *Plasmodium falciparum*

HUANG Fang¹, TANG Lin-hua^{1*}, CHEN Bo², NI Yi-chang¹, WANG Qin-mei¹

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Department of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 **Objective** To test the *in vitro* effect of daphnetin on cytochrome C oxidase (COX) and ribonucleotide reductase (RNR) activity of *Plasmodium falciparum*. **Methods** *P. falciparum* (FCC1/HN) was cultured *in vitro* using the method of Trager and Jensen. The effect of daphnetin and daphnetin-Fe complex on COX and RNR activity of *P. falciparum* was tested by ultraviolet spectrophotometer and electron spin resonance (ESR) respectively. **Result** The parasites synchronized with sorbitol *in vitro* was treated by daphnetin and daphnetin-Fe complex. The inhibition level of the COX activity by daphnetin after being treated for 2, 4, 8 and 12 h were 0.6%, 73% and 80% respectively and the inhibition level by daphnetin at different concentrations (0.1, 1, 100 and 1 mmol/L) for 6h was 3%, 31%, 53% and 84%, respectively. No considerable effect was observed on the COX activity of *P. falciparum* treated with daphnetin-Fe complex. The tyrosyl free radical was tested to reflect the RNR activity of *P. falciparum* at various times by ESR. The inhibition level by daphnetin for 1, 2, 3 and 4 h were 7%, 51%, 69% and 75% respectively, while the values treated by daphnetin-Fe complex were 8%, 6%, 11% and 9% respectively. The inhibition level by daphnetin at different concentrations (0.1, 1, 100 and 1 mmol/L) for 6 h was 3%, 31%, 58% and 93% respectively and while the values treated by daphnetin-Fe complex were 8%, 6%, 11% and 9%. **Conclusion** Daphnetin significantly reduces the COX and RNR activities of *Plasmodium falciparum in vitro*.

【Key words】 Daphnetin; *Plasmodium falciparum*; Cytochrome C oxidase (COX); Ribonucleotide reductase (RNR)

* Corresponding author, E-mail: ipdtlh@sh163.net

疟疾是一种全球性危害人类健康的重要寄生虫病。据统计，全球约有 40% 的人口遭受疟疾威胁，每年临床病例数为 2.5~3 亿，其中死亡人数为 150~270 万^[1]。研制新型抗疟药对于防治疟疾具有重要的意义。铁螯合剂作为一种新型的抗疟化合物，其抗疟作用已得到验证。瑞香素是一种中草药提取物，属于弱铁螯合剂。目前研究发现，1~10 μmol/L 瑞香素体外试验对恶性疟原虫的杀裂殖体活性与同剂量的氯喹相似，而在感染伯氏疟原虫 (ANKI 株) 的小鼠中瑞香素灌胃或腹腔注射均与氯喹灌胃有相似的抗疟效果，瑞香素抗疟作用与其铁螯合能力有密切关系^[2-4]。为进一步了解瑞香素的抗疟机制，寻找瑞香素抗疟作用的分子靶标，本文探讨瑞香素在体外对恶性疟原虫细胞色素 C 氧化酶 (COX) 及核糖核酸还原酶 (RNR) 活性的影响。

材料与方法

1 药物

瑞香素(批号: 05020204)吉林西点制药厂生产, 细胞色素 C 氧化酶试剂盒购自美国 Sigma 公司, 硫酸亚铁铵 (FAS) 购自上海化学试剂公司。按参考文献 [5] 方法制备瑞香素-Fe 复合物。

2 恶性疟原虫的培养

按文献 [6] 方法建立恶性疟原虫 (FCC1/HN 株) 体外培养体系。疟原虫的完全培养基为含 25 mmol/L 二羟乙基呱嗪乙烷磺酸 (HEPES)、23.8 mmol/L NaHCO₃、50 mg/L 庆大霉素及 10% 兔血清 (上海复旦悦达生物科技公司) 的 RPMI1640 (美国 Gibco 公司)。O 型红细胞 (购自上海血液中心) 用完全培养基稀释至红细胞比容为 5%，培养条件为 37℃、5% CO₂、5% O₂ 及 90% N₂，生长稳定后，参考文献 [7] 用 5% 甘露醇进行同步化处理，一个裂殖体增殖周期后 (约 48 h) 再次用 5% 甘露醇处理，同步化后继续培养至成熟裂殖体期。以镜检法调整最终的红细胞比容为 5%，原虫血症为 3%。

3 恶性疟原虫总蛋白的提取

将培养箱中的培养物 1 000×g 离心 5 min，去上清，加入 10 倍体积的 0.015% 皂素溶液，37℃ 孵育 15 min，不停搅拌，3 000×g 离心 10 min 后，所得疟原虫再以 Hanks 液 (含 0.14 g CaCl₂、0.4 g KCl、0.06 g KH₂PO₄、0.10 g MgCl₂·6H₂O、0.10 g MgSO₄·7H₂O、8.0 g NaCl、0.35 g NaHCO₃、0.09 g Na₂HPO₄·7H₂O、1.0 g D-葡萄糖，1 ml 0.1% 酚红) 洗 3 次，超声波匀浆破碎疟原虫，

4℃ 10 000×g 离心 20 min，上清液为恶性疟原虫总蛋白裂解液。

4 测定 COX 的活性

在培养基中分别加入 0.1、1、100 和 1 mmol/L 的瑞香素及瑞香素-Fe 复合物，每个剂量组设 3 个平行对照，在自动恒温培养箱 (3366S/N33378-407，日本) 中培养 6 h，分别测定 COX 的活性。此外，在培养基中加入 100 μmol/L 的瑞香素，分别在自动恒温培养箱中培养 2、4、8 和 12 h 后，用紫外分光光度仪 (DU650，德国 Beckman 公司) 测定吸光度 (A₅₅₀ 值)，得到各样品的 COX 活性值 (U/ml)。

5 测定 RNR 的活性

参照文献 [8] 用电子自旋共振 (electron spin revolve, ESR) 法 (ER200 D-SRC, 德国 Bruker 公司) 分别测定瑞香素与瑞香素-Fe 复合物在不同时间和不同浓度时恶性疟原虫 RNR 上 B₂ 蛋白中 Tyr 自由基的量来反映 RNR 的活性^[9]。在培养基中分别加入 0.1、1、100 和 1 000 μmol/L 的瑞香素及瑞香素-Fe 复合物，在自动恒温培养箱中培养 6 h 测定 RNR 的活性；此外在培养基中加入 100 μmol/L 的瑞香素在自动恒温培养箱中培养 1、2、3 和 4 h 后分别测定 Tyr 自由基的量。

结果

1 COX 的活性

经瑞香素 (100 μmol/L) 和瑞香素-Fe 复合物作用 2、4、8 和 12 h 后恶性疟原虫 COX 活性分别被抑制了 0%、6%、73% 和 80%，而且作用 5 h 后 COX 活性开始明显降低，至 11 h 达到最低点 (图 1) (n=

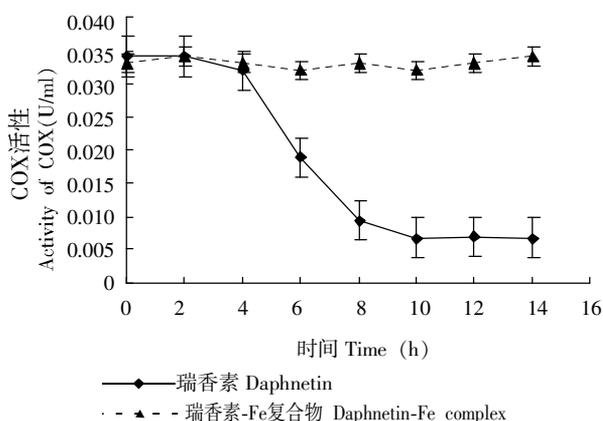


图1 瑞香素和瑞香素-Fe复合物不同作用时间对恶性疟原虫COX活性的影响

Fig.1 Cytochrome C oxidase activities of *P. falciparum* treated by daphnetin and daphnetin-Fe complex at different time

3, $P < 0.01$); 在瑞香素浓度为 0.1、1、100 与 1 000 $\mu\text{mol/L}$, 作用 6 h 后, COX 活性分别被抑制了 3%、31%、53%和 84% ($n=3$), 其活性随着瑞香素浓度的增高呈线性降低 (图 2); 而当瑞香素的铁螯合能力被饱和后, 恶性疟原虫 COX 活性几乎未受影响, 剂量反应曲线基本呈水平状 ($n=3$)。

($n=3$); 在瑞香素浓度分别为 0.1、1、100 与 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时, 作用 6 h 后, RNR 活性分别被抑制 97%、69%、42%和 7%; 其 RNR 的活性随着瑞香素浓度的增高而降低, 但并非呈线性 (图 4)。当瑞香素铁螯合能力被饱和后, 恶性疟原虫 RNR 活性几乎未受影响 ($n=3$, $P > 0.05$)。

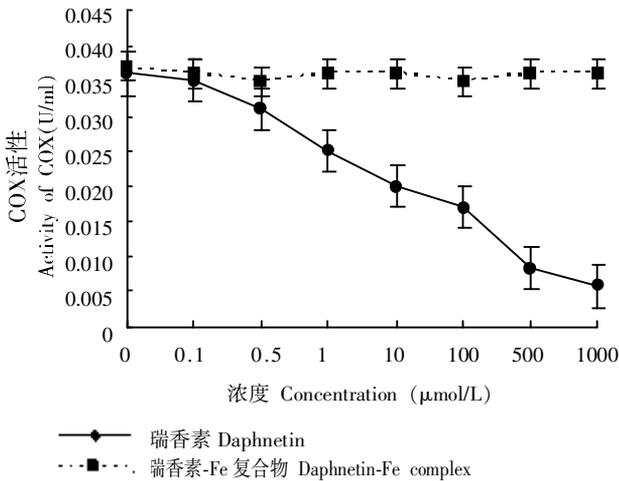


图2 不同浓度瑞香素和瑞香素-Fe复合物作用6 h后对恶性疟原虫COX活性的影响
Fig.2 Cytochrome C oxidase activities of *P. falciparum* treated for 6 h by daphnetin and daphnetin-Fe complex at different concentrations

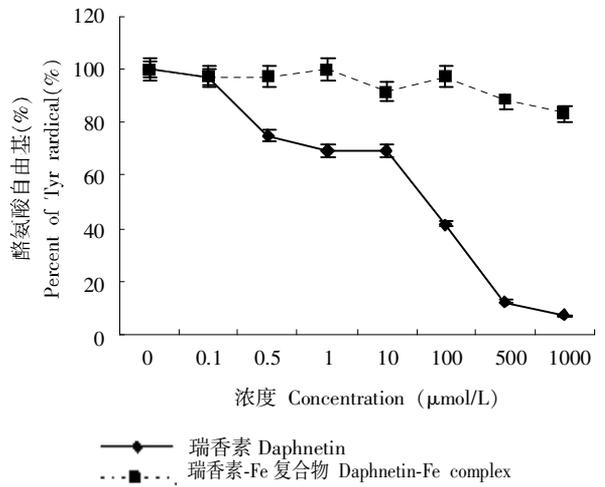


图4 经不同浓度瑞香素和瑞香素-Fe复合物作用后恶性疟原虫Tyr自由基的量
Fig.4 The remaining tyrosyl free radical in *P. falciparum* after treatment of daphnetin and daphnetin-Fe complex at different concentrations

2 RNR的活性

经瑞香素 (100 $\mu\text{mol/L}$) 作用 1、2、3 和 4 h 后, RNR 活性分别被抑制 7%、51%、69%和 75%, 而且作用 2 h 后, RNR 活性开始明显降低 ($n=3$, $P < 0.01$), 至 4 h 后, RNR 的活性仅为对照组的 25%; 经瑞香素-Fe 复合物作用 1、2、3 和 4 h 后 RNR 活性分别被抑制 8%、6%、11%和 9%, 基本呈水平趋势 (图 3)

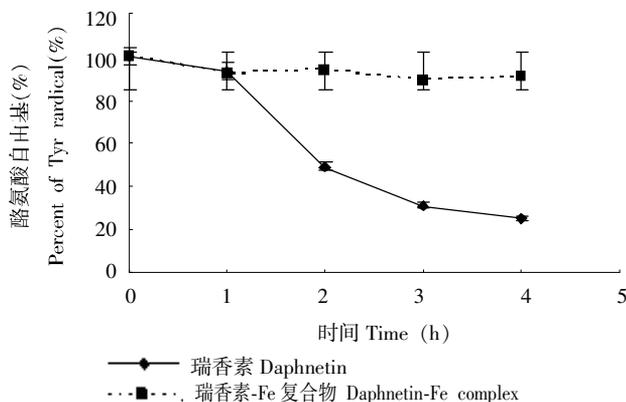


图3 瑞香素和瑞香素-Fe复合物不同作用时间后对恶性疟原虫Tyr自由基的量
Fig. 3 The remaining tyrosyl free radical in *P. falciparum* after treatment of daphnetin and daphnetin-Fe complex

讨 论

瑞香素的抗疟作用已经得到证明, 在体内、体外均具有杀疟原虫裂殖体活性, 作为一类全新结构、全新机制抗疟药的先导化合物, 其抗疟机制及药物作用的靶分子尚不清楚, 通过对其作用靶分子的研究, 可为针对分子靶标的抗疟新药设计以及开发新一类高效低毒的抗疟药提供科学依据。一般认为铁是红内期疟原虫生长所必需的, 直接影响 DNA 合成、能量代谢、线粒体的功能、电子传递等一系列重要生命活动。瑞香素作为一种弱铁螯合剂, 可能影响若干以铁为活化中心的具有重要生命功能的酶蛋白。红内期疟原虫需要铁来合成某些具有重要生命功能的含铁蛋白, 如 COX 和 RNR, 前者是线粒体呼吸链电子传递的终末复合物, 定位于线粒体内膜上, 参与有氧代谢, 是线粒体能量代谢的标志酶之一^[10]。后者是 DNA 合成酶系的重要分子和 DNA 合成的限速酶, 能催化二磷酸核糖核酸还原成二磷酸脱氧核糖核酸 (dNDP), 后者是 DNA 合成的前体^[11]。本文探讨了瑞香素在体外对恶性疟原虫需要铁来合成的具有重要生命功能的 COX 和以铁为活化中心的具有重要生命功能的 RNR

活性的影响。

红内期疟原虫 DNA 的合成与复制主要发生在滋养体阶段, 本实验结果表明, 恶性疟原虫在瑞香素浓度为 100 μmol/L 环境中, 2 h 后 RNR 的活性开始受到抑制, 至 4 h 时 RNR 的活性相当于对照组的 25%, 而 COX 的活性在瑞香素作用 5 h 后开始受到抑制, 至 11 h 达到最低点, 相当于对照组的 20%; 在不同的瑞香素浓度下, 同样作用 6 h 后, RNR 的活性在瑞香素 0.5 ~10 μmol/L 浓度范围内变化不大, 而 COX 的活性在该浓度范围内基本呈线性降低; 当其铁螯合能力被饱和后, 瑞香素对恶性疟原虫 RNR 和 COX 活性的影响几乎消失, 进一步提示瑞香素的抗疟作用与其铁螯合能力有关。在相同瑞香素浓度作用下, RNR 活性首先受到抑制, 而 COX 受抑制程度较晚, 提示两者都是瑞香素抗疟作用的靶分子, 但瑞香素对两种酶的影响机制不同。

瑞香素对恶性疟原虫 RNR 的影响是直接作用于 RNR 的 B₂ 蛋白的铁核中心, 或是螯合了细胞内铁池内的铁阻碍了原 B₂ 蛋白转化为活性 B₂ 蛋白^[12]; 对 COX 的影响是否是通过螯合细胞内铁池内的铁而阻断线粒体呼吸链的电子传递, 尚须进一步研究论证。

致谢 感谢复旦大学生命科学学院遗传系黄亮先生所给予的实验技术帮助, 及上海血液中心姚坚华先生提供的协助。

参 考 文 献

[1] Greenwood B, Mutabingwa T. Malaria in 2002 [J]. Nature,

2002, 415: 670-672.

[2] Yang YZ, Ranz A, Pan HZ, et al. Daphnetin: a novel antimalarial agent with *in vitro* and *in vivo* activity [J]. Am J Trop Med Hyg, 1992, 46: 15-20.

[3] Wang QM, Ni YC, Xu SH, et al. The schizontocidal activity of daphnetin against malaria parasites *in vitro* and *in vivo* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2000, 18: 204-206. (in Chinese) (王琴美, 倪奕昌, 徐月琴, 等. 瑞香素杀疟原虫裂殖体的作用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18: 204-206.)

[4] Mu LY, Wang QM, Ni YC. Effect of daphnetin on SOD activity and DNA synthesis of *Plasmodium falciparum* *in vitro* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2003, 21: 157-159. (in Chinese) (牟凌云, 王琴美, 倪奕昌. 瑞香素对体外培养恶性疟原虫超氧化物歧化酶活性及 DNA 合成的影响 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21: 157-159.)

[5] Mu LY, Wang QM, Ni YC. *In vitro* antimalarial effect of daphnetin relating to its iron-chelating activity [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2002, 20: 83-85. (in Chinese) (牟凌云, 王琴美, 倪奕昌. 瑞香素体外抗疟作用与其铁螯合能力的关系 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20: 83-85.)

[6] Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture [J]. Science, 1976, 193: 673-675.

[7] Lambros C, Vanderberg J. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture [J]. J Parasitol, 1979, 65: 418-420.

[8] Yvonne KH, William EA, Lawrence DH. Effect on ribonucleotide reductase of novel lipophilic iron chelators: the desferri-exochelins [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315: 595-598.

[9] Graslund A, Ehrenberg A, Thelander L. Characterization of the free radical of mammalian ribonucleotide reductase [J]. J Biol Chem, 1982, 257: 5711-5715.

[10] Ingram GM, Kinnaird JH. Ribonucleotide reductase: a new target for anti-parasite therapies [J]. Parasitol Today, 1999, 15: 338-342.

[11] Ostermeier C, Iwata S, Michel H. Cytochrome C oxidase [J]. Curr Opin Struct Biol, 1996, 6: 460-466.

[12] Moormann AM, Hossler PA, Meshnick SR. Deferoxamine effect on *Plasmodium falciparum* gene expression [J]. Mol Biochem Parasitol, 1999, 98: 279-283.

(收稿日期: 2006-01-15 编辑: 盛慧锋)

(上接第 165 页)

村人。患者曾在云南务工 4 年余, 2004 年 10 月到盈江县苏典乡做汽车修理工。于 2005 年 5 月 11 日从云南回到户籍所在地, 因淋雨后出现发热、头昏、乏力, 遂于 12 日上午到青神县中医院就诊, 经血检: 未见疟原虫, 遂按一般感冒进行输液治疗。13 日患者呕吐 1 次。14 日早上 9:15 患者出现昏迷, 即送县人民医院诊治, 入院前 10 min 已出现神志不清。入院后查体: 体温 39.8℃、血压 130/80 mmHg、脉搏 112 次/min, 呼吸 32 次/min, 急性危重病容, 神志不清, 呈浅昏迷状, 口唇、面色紫绀。辅助检查: 白细胞 13.9×10⁹/L, 红细胞 5.37×10¹²/L, 血红蛋白(HGB)151 g/L, 血小板(PCT)133×10⁹/L。于 10:20 病情突然恶化, 经抢救无效死亡。死亡后(10:40)血检报告: 疑为恶性疟, 因患者急性死亡, 未进行抗疟治疗。对县医院保留血片复查: 恶性疟原虫阳性, 原虫密度较高, 以大滋养体为主。

讨论

上述 4 例恶性疟死亡患者均为青壮年男性, 进入疫区前均未服用预防性抗疟药, 且当地居室简陋, 卫生状况与居住条件极差, 无任何防蚊设备。在疫区滞留 2 d 至数月不等, 从发病到死亡约 4~9 d。4 例患者从入院到死亡时间分别为 3 d、5 d、4 d 和 1 h。均于死亡前数小时或死后才明确诊断为恶性疟。

4 例患者临床症状不尽相同, 但均有发烧、寒战和头痛等症状。患者入院时均未及时查出疟原虫, 未进行正规抗疟治疗就死亡。未及时诊断和治疗是导致输入性恶性疟死亡的主要原因。建议: 各级医疗机构医务人员, 对来自恶性疟流行区的发热病人, 应引起高度警惕, 在血检阴性情况下, 根据临床症状不能排除恶性疟感染的可能时, 仍应及时进行抗疟治疗, 可避免出现死亡。

(收稿日期: 2005-06-13 编辑: 伯韦)