

文章编号:1002-2694(2011)11-0072-04

环孢素 A 抗寄生虫的作用^{*}

胡奇丰,柳建发,蒋雯雯,周 飞

中图分类号:R53 文献标识码:A

环孢素 A(CsA)是一种环状十一氨基多肽,具有强效的免疫抑制作用。1978 年英国首次将 CsA 应用于临床肾移植,此后 CsA 又用于肝、心、肺、胰腺、骨髓等器官的移植,均取得令人满意的效果,明显提高病人的生存率。众多文献报道,CsA 对人和动物寄生虫都有着良好的预防和治疗作用。初步研究显示,CsA 有抗疟原虫、血吸虫、绦虫和线虫等多种寄生虫的作用,但是 CsA 的抗虫机制目前尚不明确。在本文中,我们试图详细描述目前 CsA 的抗寄生虫作用。

1 CsA 抗原虫的作用

1.1 利什曼原虫 Behforouz 等研究了 CsA 和它的类似物 B-5-49 在体内外对利什曼原虫的作用。在体外,两种药物在剂量大于 25mg/mL 时对利什曼原虫具有显著的毒性作用。使用 CsA 进行预防性治疗,在感染后未形成皮肤溃疡前连续 7d 给药,可在 10d 到 2 周之间观察到,大多数小鼠只有一些脚垫肿胀。这些小鼠显示出持续的迟发型过敏反应(DTH),并能进一步抵抗利什曼原虫感染。使用 B-5-49 进行预防性治疗也能在一定程度上增加对硕大利什曼原虫感染的抵抗力。在体内,CsA 没有显示出对利什曼原虫感染直接的毒性和抑制性作用,可能以调节诱导机体对寄生虫产生免疫应答的方式起作用。CsA 产生免疫抑制作用首先要和亲环蛋白(Cyp)结合,在细胞内形成 CsA-Cyp 复合物从而抑制钙调磷酸酶活性和信号转导元件。先前报道 CsA 能有效抑制体内外利什曼原虫的感染,但对细胞外生长的利什曼原虫本身没有影响。利什曼原虫在体外对 CsA 的抵抗力是缺乏形成钙调磷酸酶复合物所致^[1]。结构改变了的环孢素结合蛋白与 CsA 的低亲和力也被认为是出现抵抗力的原因^[2]。在宿主和寄生虫之间相互作用中,通过分析亲环蛋白的功能来检测 CsA 的抗利什曼原虫的活性。在硕大利什曼原虫感染的巨噬细胞内,CsA 的杀虫作

用被亲环蛋白所介导。从利什曼原虫中提纯到两种亲环蛋白。虽然这两种亲环蛋白的酶活性被 CsA 所抑制,但是用 CsA 预处理的利什曼原虫,结果并没有减少巨噬细胞的感染。亲环蛋白可能是作为一种感染增强剂。因此,宿主细胞的亲环蛋白主要参与巨噬细胞内利什曼原虫的复制。无鞭毛体与宿主细胞亲环蛋白相互作用是细胞内利什曼原虫复制机制的重要部分。可以认为亲环蛋白直接涉及细胞内寄生虫生存方式^[3]。虽然 CsA 可以抑制大多数寄生虫增殖,但不是所有的虫体都对其敏感的。杜氏利什曼原虫对 CsA 的不敏感是由于在虫体细胞质中缺少 CsA 结合蛋白。位于分泌途径的具有结合细胞膜蛋白功能的 LdCyP 可能在这种起作用。CsA 减少细胞感染率呈剂量依赖方式。一氧化氮被认为是巨噬细胞抗利什曼原虫作用的一种关键性分子。实验证明,CsA 抗利什曼原虫的效应机制和巨噬细胞激活因子无关^[4]。

1.2 疟原虫 免疫抑制剂 CsA 可以在体内外抑制疟原虫生长,但它的抗虫机制却不清楚。CsA 的作用被认为是该药与亲环蛋白结合产生一种复合物,从而抑制钙调磷酸酶活性的结果。钙调磷酸酶对疟原虫生理活动有重要意义。从恶性疟原虫寄生的红细胞浆提取物中纯化出两种主要的蛋白磷酸酶(PP),其中一种就是钙调磷酸酶。钙调磷酸酶活性被 CsA 强烈地特异地抑制,这种情况只存在于野生型的恶性疟原虫中,而不存在于突变型中。这种非竞争性抑制为寄生虫对环孢素类的敏感性问题提供了一种可能的解释^[5]。CsA 可在红细胞中沉积,而疟原虫在红细胞内生长发育。CsA 及其衍生物像氯喹一样,在体内抑制伯氏疟原虫,在体外抑制恶性疟原虫。但是它们不能抑制红外期和配子体期。在体内最小作用剂量为 10mg/kg,连续使用 2 d。在体外则需要 10mg/mL 以上。CsA 选择性的抑制恶性疟原虫的无性生殖阶段且减少感染性。合用 CsA 和格列德霉素对抑制疟原虫在红细胞中的生长显示出协同作用^[6]。Gavigan 等^[7]认为 P-糖蛋白同系物可能是抗疟原虫靶位。他们证明 P-糖蛋白同系物序列多态性可改变疟原虫对 CsA 的敏感度。

* 浙江省科技厅基金(2009F8003);浙江省教育厅基金(Y200803083)

通讯作者:柳建发,Email:liujianfa@nbu.edu.cn

作者单位:浙江宁波大学医学院,宁波 315211

而这种蛋白过表达的菌株对药物敏感性低。但是未能查明药物和蛋白的直接相互作用。

1.3 锥虫 CsA 在克氏锥虫锥鞭毛体期具有体外活性,但不能预防锥虫的感染^[8]。在受到克氏锥虫慢性感染的小鼠中,白细胞和淋巴细胞总数明显升高,药物治疗后血液中白细胞和淋巴细胞总数明显降低^[9]。克氏锥虫亲环蛋白基因家族有 15 种旁系同源物,在一定条件下,可用亲和层析来分离这些基因产物。进一步研究其中编码亲环蛋白亚型的 7 种鞭毛体 cDNA 克隆,发现这些基因散布在锥虫基因组中。而在无鞭毛体和锥鞭毛体的 mRNA 中也发现了这些基因。作者认为 CsA 及其无免疫抑制性的衍生物绑定这些亲环蛋白是 CsA 杀虫作用的重要机制^[10]。

1.4 溶组织内阿米巴 CsA 可通过阻碍钙调磷酸酶和 P-糖蛋白的活性来抑制原虫寄生虫的增殖。无免疫抑制性的 CsA 类似物 PSC-833 可与 P-糖蛋白结合但不影响钙调磷酸酶的功能,使用后发现其不能抑制阿米巴滋养体的增值。实验证明钙调磷酸酶的活性抑制更可能是 CsA 抑制阿米巴增值的方式^[11]。对阿米巴性肝脓肿的动物实验显示,在早期由于组织损伤会出现急性炎症,经 CsA 治疗后在 72 h 后抑制组织损伤,并且很多受到保护的寄生虫簇团很少或没有白细胞涌人,在晚期几乎没有组织损伤出现。使用免疫抑制药他克莫司也观察到同样的结果^[12]。

1.5 弓形虫 有研究表明,专性细胞内寄生虫刚地弓形虫对 CsA 敏感。CsA 延长了弓形虫在肺部的滞留时间,但对虫荷数没有明显影响^[13]。作者测定了弓形虫对 26 种保留了母本复合物活性的 CsA 衍生物的敏感性。找到了一种复合物(SDZ 215-918),是对寄生虫的侵入和复制特别有效的抑制剂。动力学研究显示它的活性启动快并且是可逆的,在一定剂量下不影响宿主细胞蛋白合成或者细胞分裂。SDZ 215-918 直接作用于寄生虫,抑制大分子合成和入侵而减少虫体的运动性。SDZ 215-918 不与亲环蛋白结合,而是一种哺乳动物 P-糖蛋白的强效抑制剂。P-糖蛋白及其相关的运输器在弓形虫生物学方面起到了关键作用,可能成为一种抗寄生虫复合物的新靶点。动物实验显示,SDZ 215-918 在体内抑制寄生虫生长,与其有关的 CsA 可能发展成适合临床应用的药物^[14]。

1.6 隐孢子虫 在体外短期培养中,环孢素及其非免疫抑制性衍生物显示出有效的抑制细胞内寄生虫即隐孢子虫的生长,并且抑制孢子体的侵入。两种

衍生物 SDZ PSC-833 和 SDZ 033-243 具有显著的抑制隐孢子虫作用。它们与亲环蛋白的结合很弱,肽基脯氨酰顺反异构酶是主要的作用靶位。环孢素类药物没有显著的增敏性^[15]。

1.7 艾美球虫 CsA 是特异性 T 细胞免疫抑制药。T 淋巴细胞涉及参与球虫感染的宿主免疫应答作用。Kogut 等测定了 CsA 的免疫抑制活性。结果显示,在艾美球虫感染早期抑制非特异性宿主的 T 淋巴细胞活性,寄生虫能在细胞内完全生长。说明 T 淋巴细胞可能通过淋巴因子介导的机制阻止球虫生长。EtCYP89 是球虫的一种亲环蛋白,在球虫的整个生长阶段都有表达,可与 CsA 相结合^[16]。

1.8 环形泰勒虫 通过璃眼蜱传播的泰勒虫孢子体侵入牛淋巴细胞,随后产生裂殖体。CsA 可抑制感染细胞中的裂体生殖,呈药物剂量依赖方式。感染泰勒虫细胞表达白细胞介素 2 受体。用放射性同位素示踪标记的重组人白细胞介素 2 结合感染细胞发现,经 CsA 处理后只有部分细胞被抑制。CsA 对虫体没有毒性,细胞中仍含有裂殖体,表面没有出现形态学异常^[17]。

1.9 肠脑炎微孢子虫 肠脑炎微孢子虫属于微孢子纲,可引起免疫功能不全的宿主发生胃肠型感染。作者建立了胃肠型感染的免疫抑制动物模型。在免疫功能正常组中产生的特异性 IgG 抗体明显高于免疫抑制实验组中受感染的老鼠的。在受感染的老鼠中,除了小肠,并没有在别的组织中发现有寄生虫。然而,免疫抑制组中受感染的老鼠的排泄物和十二指肠液中的孢子排出较多。在鼠类动物模型中,由环孢素 A 引起的免疫抑制反应并没有阻止寄生虫的传播,但是加快了孢子的排出并减少了 IgG 抗体的产生^[18]。

2 CsA 抗蠕虫的作用

2.1 线虫 亲环蛋白是一种蛋白质家族,可抑制肽基脯氨酰顺反异构酶活性,以及在不同程度上结合免疫抑制剂 CsA。Page 等^[19]从马来丝虫中分离出一个 cDNA 克隆,该克隆编码了一种新的亲环蛋白。这个基因拥有一个和原亲环蛋白基因相似的 N 末端区和一个亲水性的 C 末端区。这种新的蛋白在大肠杆菌中过表达且具有肽基脯氨酰顺反异构酶活性。在高度保守的 CsA 结合位点基因,一个组氨酸代替了色氨酸。这说明了马来丝虫的亲环蛋白与来自自然杀伤细胞,植物和 40kDa 的 CsA 结合蛋白有紧密联系。马来丝虫对 CsA 抗寄生虫作用的抵抗力可能跟对此药亲和力相对较低的亲环蛋白的存在有关^[20]。扫描电镜下观察旋毛虫发现,在 CsA

处理之后成虫体表组织损坏,外层起皱脱落,特别是皮下毛孔之间出现增厚和不规则排列。CsA 对虫体表皮的破坏应该和其作用机制有重要联系。

2.2 吸虫 CsA 直接作用于曼氏血吸虫的早期,干扰虫体代谢。Khattab 等^[21]认为, CsA 对曼氏血吸虫的致死效应不是通过直接抑制亲环蛋白酶活性产生的,而是可能通过抑制钙调蛋白的磷酸酶活性来实现的^[22]。单独使用 CsA 可减少虫荷数并优先作用于雌虫,单独使用抗血清对虫荷数没有影响,两者共同使用则可更显著地减少虫荷数。CsA 可导致虫体表面损坏和显示特异性抗原^[23]。在曼氏血吸虫中存在着一种 NF-AT 样式的转录因子。这是一种对 CsA 敏感的蛋白家族。它可能的作用与调节宿主体内寄生虫的生长和生存有关。它具有编码 Sm28GST 蛋白的功能。CsA 处理曼氏血吸虫幼虫抑制 Sm28GST 蛋白表达,这为了解 CsA 抗血吸虫作用提供了一种新的视野^[24]。

2.3 绦虫 CsA 对小口膜壳绦虫的抗虫活性表现为,显著的抑制虫体生长,减慢转移到胆管的速度,限制寄生虫的生存。使用 CsA 后虫体在形态学上出现显著的改变。虫体表面形成突起,节片肿胀。CsA 使虫体表面细胞膜渗透性改变,但机制还未被阐明。CsA 在体内扰乱绦虫表皮的正常功能,使摄取葡萄糖的机制受损。小口膜壳绦虫拥有两种具有异构酶活性的亲环蛋白亚型。寄生虫亲环蛋白的存在和功能与 CsA 的抗虫作用有紧密联系^[25]。亲环蛋白与 CsA 结合成一种复合物可抑制钙调磷酸酶活性,但不涉及抑制信号转导途径。已知 CsA 引起的虫体损坏和药物结合蛋白有关。CsA 及其类似物都在体外能引起寄生虫表面和线粒体的损坏^[26]。感染微小膜壳绦虫后连续 5 d 给药,每天 100mg/kg,可有效抑制虫卵发育成似囊尾蚴,只有少数个体能够发育成熟^[27-28]。使用 CsA 显示出 T 细胞依赖机制,包括柱状细胞的增殖和活化^[29]。可变的柱状细胞在确定胃肠道寄生虫的位置时具有潜在的重要作用。

3 结语

CsA 既可作为抗寄生虫药又可作为免疫抑制剂。体内用药的结果根据相对感染的治疗时间、给药的途径、剂量而呈现不同。CsA 结合蛋白在抗寄生虫方面有重要作用。没有免疫抑制力的环孢素类衍生物在某些寄生虫病上有很大的临床应用潜力^[30]。进一步研究确定这些药物的作用位点,也许可以发展成为一种新的抗寄生虫化疗药。

参 考 文 献:

- [1]Rascher C,Pahl A,Pecht A,et al. Leishmania major parasites express cyclophilin isoforms with an unusual interaction with calcineurin[J]. Biochem J,1998,334 (3):659-667.
- [2]Dutta M,Delhi P,Sinha KM,et al. Lack of abundance of cytoplasmic cyclosporin A-binding protein renders free-living Leishmania donovani resistant to cyclosporin A[J]. J Biol Chem,2001,276(22):19294-19300.
- [3]Hoerauf A,Rascher C,Bang R,et al. Host-cell cyclophilin is important for the intracellular replication of Leishmania major[J]. Mol Microbiol,1997,24(2):421-429.
- [4]Meissner U,Jüttner S,Röllinghoff M,et al. Cyclosporin A-mediated killing of Leishmania major by macrophages is independent of reactive nitrogen and endogenous TNF-alpha and is not inhibited by IL-10 and 13[J]. Parasitol Res,2003,89(3):221-227.
- [5]Dobson S,May T,Berriman M,et al. Characterization of protein Ser/Thr phosphatases of the malaria parasite, Plasmodium falciparum: inhibition of the parasitic calcineurin by cyclophilin-cyclosporin complex [J]. Mol Biochem Parasitol,1999,99 (2):167-181.
- [6]Kumar R,Musiyenko A,Barik S. Plasmodium falciparum calcineurin and its association with heat shock protein 90; mechanisms for the antimalarial activity of cyclosporin A and synergism with geldanamycin[J]. Mol Biochem Parasitol,2005,141(1):29-37.
- [7]Gavigan CS,Shen M,Machado SG,et al. Influence of the Plasmodium falciparum P-glycoprotein homologue 1 (pfmdr1 gene product) on the antimalarial action of cyclosporin[J]. J Antimicrob Chemother,2007,59(2):197-203.
- [8]Amato Neto V,Pasternak J,de Souza ER,et al. Evaluation of the eventual activity of cyclosporin A in preventing the transmission, by blood transfusion, of *Trypanosoma cruzi* infection[J]. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo,1997,52(4):195-196.
- [9]Andrade SG,Carneiro Filho A,de Souza,et al. Influence of treatment with immuno-suppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* [J]. Int J Exp Pathol,1997,78 (6):391-399.
- [10]Potenza M, Galat A, Minning TA, et al. Analysis of the *Trypanosoma cruzi* cyclophilin gene family and identification of Cyclosporin A binding proteins[J]. Parasitology,2006,132(6):867-882.
- [11]Carrero JC,Lugo H,Pérez DG,et al. Cyclosporin A inhibits calcineurin (phosphatase 2B) and P-glycoprotein activity in Entamoeba histolytica[J]. Int J Parasitol,2004,34(9):1091-1097.
- [12]Olivos-García A,Carrero JC,Ramos E,et al. Late experimental amebic liver abscess in hamster is inhibited by cyclosporine and N-acetylcysteine[J]. Exp Mol Pathol,2007,82(3):310-315.
- [13]Sumyuen MH,Garin YJ,Derouin F .Effect of immunosuppressive drug regimens on acute and chronic murine toxoplasmosis [J]. Parasitol Res,1996,82(8):681-686.
- [14]Silverman JA,Hayes ML,Luft BJ,et al. Characterization of anti-Toxoplasma activity of SDZ 215-918,a cyclosporin derivative lacking immunosuppressive and peptidyl-prolyl-isomerase-inhibiting activity:possible role of a P glycoprotein in Toxoplas-

- ma physiology [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41 (9):1859-1866.
- [15]Perkins ME, Wu TW, Le Blancq SM. Cyclosporin analogs inhibit in vitro growth of *Cryptosporidium parvum* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(4):843-848.
- [16]Hosse RJ, Krücke J, Bierbaum S, et al. *Eimeria tenella*: genomic organization and expression of an 89kDa cyclophilin [J]. *Exp Parasitol*, 2008, 118(2):275-279.
- [17]Ahmed JS, Rintelen M, Hartwig H, et al. Effect of cyclosporin A on the proliferation of bovine lymphocytes to concanavalin A and on the growth of *Theileria annulata*-infected bovine cells [J]. *Trop Med Parasitol*, 1991, 42(4):375-380.
- [18]Galván AL, Agudelo Sdel P, Restrepo JG, et al. Cyclosporine A effect in mice C57BL/6 infected with *Encephalitozoon intestinalis* [J]. *Biomedica*, 2006, 26(1):126-137.
- [19]Page AP, Landry D, Wilson GG, et al. Molecular characterization of a cyclosporin A-insensitive cyclophilin from the parasitic nematode *Brugia malayi* [J]. *Biochemistry*, 1995, 34 (36): 11545-11550.
- [20]Ellis PJ, Carlow CK, Ma D, Ma D, et al. Crystal structure of the complex of *Brugia malayi* cyclophilin and cyclosporin A [J]. *Biochemistry*, 2000, 39(3):592-598.
- [21]Khattab A, Pica-Mattoccia L, Klinkert MQ, et al. Cyclosporins; lack of correlation between antischistosomal properties and inhibition of cyclophilin isomerase activity [J]. *Exp Parasitol*, 1998, 90(1):103-109.
- [22]Khattab A, Pica-Mattoccia L, Wenger R, et al. Assay of *Schistosoma mansoni* Colcineurin Phosphatases Activity and Assessment of its role in parasite survival [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1999, 99:269-273.
- [23]Millership JJ, Chappell LH, Fallon PG. Synergistic action of cyclosporin A and polyspecific rabbit anti-sera against murine *Schistosoma mansoni* [J]. *Parasite Immunol*, 1996, 18 (2): 71-77.
- [24]Serra EC, Lardans V, Dissous C. Identification of NF-AT-like transcription factor in *Schistosoma mansoni*: its possible involvement in the antiparasitic action of cyclosporin A [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1999, 101(1-2):33-41.
- [25]Roberts HC, Sternberg JM, Chappell LH. *Hymenolepis diminuta* and *H. microstoma*; uptake of cyclosporin A and drug binding to parasite cyclophilins [J]. *Parasitology*, 1995, 111(5):591-597.
- [26]Roberts HC, Sternberg JM, Chappell LH. Characterization of calcineurin from *Hymenolepis microstoma* and *H. diminuta* and its interaction with cyclosporin A [J]. *Parasitology*, 1997, 114(3):279-283.
- [27]McLauchlan PE, Roberts HC, Chappell LH. Mode of action of cyclosporin A against *Hymenolepis microstoma* (Cestoda); relationship between cyclophilin binding and drug-induced damage [J]. *Parasitology*, 2000, 121(6):661-670.
- [28]Matsuura K, Nakamura F, Abe M, et al. Immunosuppressive and antiparasitic effects of cyclosporin A on *Hymenolepis nana* infection in mice [J]. *Int J Parasitol*, 1998, 28(4):579-588.
- [29]McLauchlan PE, Roberts HC, Loxton NJ, et al. Mucosal mast cell responses and release of mast cell protease-I in infections of mice with *Hymenolepis diminuta* and *H. microstoma*; modulation by cyclosporin A [J]. *Parasite Immunol*, 1999, 21 (3): 151-161.
- [30]Bell A, Roberts HC, Chappell LH. The antiparasite effects of cyclosporin A: possible drug targets and clinical applications [J]. *Gen Pharmacol*, 1996, 27(6):963-971.

收稿日期:2010-08-13;修回日期:2010-10-16

(上接第 71 页)

- [19]Maa T C. The genus *Ornithoica* Rondani(Diptera: Hippoboscidae) [J]. *Pacific Insects Monograph*, 1966, 10:10-124.
- [20]Maa T C. On the Genus *Pseudolynchia* Bequaert(Diptera: Hippoboscidae) [J]. *Pacific Insects Monograph*, 1966, 10:125-138.
- [21]Maa T C. A synopsis of Diptera pupipara of Japan [J]. *Pacific Insects*, 1967, 9(4):727-760.
- [22]Maa T C. Notes on the Hippoboscidae II(Diptera) [J]. *Pacific Insects Monograph*, 1969, 20:237-260.
- [23]Maa T C. A revised checklist and concise host index of Hippoboscidae (Diptera) [J]. *Pacific Insects Monograph*, 1969, 20: 261-299.
- [24]Maa T C. Synopsis of the genera *Ornithophila* and *Ornithoctona* with remarks on their habitat diversification (Diptera: Hippoboscidae) [J]. *Pacific Insects Monograph*, 1969, 20: 1-23.
- [25]Maa T C. Revision of *Icosta* (*Lynchia* auctt) with erection of a related genus *Phthona* (Diptera: Hippoboscidae) [J]. *Pacific Insects monograph*, 1969, 20:25-203.
- [26]Maa T C. Studies in Hippoboscidae (Diptera: Hippoboscidae) [J]. *Pacific Insects monograph*, 1969, 20:205-236.
- [27]Maa T C. Studies in Hippoboscidae (Diptera) [J]. Part 2. A revised checklist and concise host index of Hippoboscidae (Diptera) [J]. *Pacific Insects monograph*, 1969, 20:261-299.
- [28]Maa T C. The identity and type host of *Strebla molossa* Giglioli [J]. *Pacific Insects*, 1969, 11(2):495-496.
- [29]Maa T C. Review of the Streblidae (Diptera) parasitic on megachiropteran bats [J]. *Pacific Insects Monograph*, 1971, 28: 213-243.
- [30]Sato M, Mogi M. Records of some blood-sucking flies from birds and bats of Japan (Diptera: Hippoboscidae, Nycteribiidae and Streblidae) [J]. *Rishiri Studies*, 2008, 27: 41-48.
- [31]Scott H, Sharp D. On certain Nycteribiid, with descriptions of two new species from Formosa [J]. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 1908, 56: 359-370.

收稿日期:2010-10-09;修回日期:2010-12-03