

余志会, 方肆云, 孙铭飞, 戚南山, 刘文俊, 李娟, 胡俊菁, 廖申权. 寄生原虫嘌呤磷酸核糖转移酶研究进展 [J]. 广东农业科学, 2023, 50 (8): 163–172.

寄生原虫嘌呤磷酸核糖转移酶研究进展

余志会^{1,2}, 方肆云³, 孙铭飞¹, 戚南山¹, 刘文俊², 李娟¹, 胡俊菁¹, 廖申权¹

(1. 广东省农业科学院动物卫生研究所 / 农业农村部禽流感等家禽重大疫病防控重点实验室 / 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室, 广东 广州 510640; 2. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东 广州 510225; 3. 温氏食品集团股份有限公司, 广东 云浮 527400)

摘 要: 寄生原虫是一类单细胞寄生性原虫, 包括利什曼原虫 (*Leishmania* spp.)、锥虫 (*Trypanosoma* spp.)、疟原虫 (*Plasmodium* spp.)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、隐孢子虫 (*Cryptosporidium* spp.) 和艾美耳球虫 (*Eimeria* spp.) 等, 可引起严重危害人类与动物健康以及对养殖业造成巨大经济损失的原虫病。寄生虫入侵宿主后的发育和繁殖需要大量的嘌呤核苷酸, 相应的嘌呤碱基在嘌呤磷酸核糖转移酶的催化下生成对应的嘌呤核苷酸。嘌呤磷酸核糖转移酶是一类参与嘌呤核苷酸补救合成的重要代谢酶, 广泛存在于寄生原虫中。寄生原虫的嘌呤磷酸核糖转移酶主要包括腺嘌呤磷酸核糖转移酶和次黄嘌呤–鸟嘌呤–黄嘌呤磷酸核糖转移酶, 两者在寄生原虫中分别催化腺嘌呤核苷酸、次黄嘌呤核苷酸、鸟嘌呤核苷酸和黄嘌呤核苷酸合成, 从而参与寄生原虫的多个生化代谢过程, 不仅为寄生原虫核酸生物合成等提供前体物质, 还为虫体提供通用能量载体。由于寄生原虫的嘌呤补救途径明显区别于宿主的从头合成途径, 且嘌呤磷酸核糖转移酶是寄生原虫嘌呤补救途径的关键酶, 因而近年来寄生原虫嘌呤磷酸核糖转移酶成为抗原虫药物候选靶标的研究热点, 以寄生原虫嘌呤磷酸核糖转移酶为潜在靶标, 特异性筛选、设计抑制剂, 并开发抗寄生原虫药物取得重要进展。以利什曼原虫、锥虫、疟原虫和弓形虫的嘌呤磷酸核糖转移酶为重点, 综述寄生原虫嘌呤磷酸核糖转移酶的基本特征、生物学功能、抑制剂筛选与应用的研究进展, 以为抗寄生原虫药物靶标研究与新型抑制剂筛选提供参考。

关键词: 寄生原虫; 腺嘌呤磷酸核糖转移酶; 次黄嘌呤–鸟嘌呤–黄嘌呤磷酸核糖转移酶; 嘌呤核苷酸; 药物靶标; 抑制剂

中图分类号: S855.9

文献标志码: A

文章编号: 1004–874X (2023) 08–0163–10

Research Advances in Purine Phosphoribosyltransferases of Protozoan Parasites

YU Zhihui^{1,2}, FANG Siyun³, SUN Mingfei¹, QI Nanshan¹, LIU Wenjun²,

LI Juan¹, HU Junjing¹, LIAO Shenquan¹

(1. Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Avian Influenza and Other Major Poultry Diseases Prevention and Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Guangdong Key Laboratory of Livestock Disease Prevention, Guangzhou 510640, China; 2. College of Animal Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 3. Wen's Foodstuffs Group Co., Ltd., Yunfu 527400, China)

Abstract: Parasitic protozoa are single-celled organisms that have adapted to live in cells of humans and animals. The

收稿日期: 2023–06–03

基金项目: 广东省农业科学院科技创新战略专项资金 (高水平农科院建设) (XTXM202202, 202122TD); 广东省基础与应用基础研究基金 (2021A1515012401, 2021A1515010521)

作者简介: 余志会 (1996—), 男, 在读硕士生, 研究方向为鸡球虫生化代谢, E-mail: 1090023510@qq.com

通信作者: 廖申权 (1981—), 女, 博士, 研究员, 研究方向为鸡球虫生化代谢, E-mail: lsq6969@163.com

protozoan parasites include *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp., and *Eimeria* spp., which can cause protozoal diseases that seriously endanger human and animal health and cause huge economic losses in the livestock industry. Parasite development and reproduction after invasion of the host require a large number of purine nucleotides, and the corresponding purine bases are catalyzed by purine phosphoribosyl transferase to generate the corresponding purine nucleotides. Purine phosphoribosyltransferases (PPRT) are important metabolic enzymes involved in the ribophosphorylation of purine bases and are present in many protozoan parasites. Adenine phosphoribosyltransferase (APRT) and hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase (HGXPRT) belong to PPRT. APRT and HGXPRT convert adenine, hypoxanthine, guanine, and xanthine into adenosine-5'-monophosphate (AMP), inosine-5'-monophosphate (IMP), guanosine-5'-monophosphate (GMP), and xanthosine-5'-monophosphate (XMP), respectively. Purine nucleotides are involved in many functions as components of DNA and RNA, as enzyme cofactors in metabolic pathways, as sources of energy in protozoan parasites. Purine phosphoribosyltransferases are key enzyme in the purine salvage pathway of parasitic protozoa, which is significantly different from the *de novo* synthesis pathway of the host. In recent years, purine phosphoribosyltransferases have become the interesting research hotspot as an antiparasitic drug candidates target, with major progress in the screening of compounds against protozoan parasites. This review focuses on the basic characteristics, biological functions, inhibitors screening and application of purine phosphoribosyltransferases in parasitic protozoa of *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Plasmodium* spp., and *Toxoplasma gondii*, so as to provide reference for the research of drug targets and the screening of new inhibitors against parasitic protozoa.

Key words: protozoan parasites; adenine phosphoribosyltransferase; hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase; purine nucleotide; drug target; inhibitors

寄生原虫是一类单细胞真核生物, 包括利什曼原虫 (*Leishmania* spp.)、锥虫 (*Trypanosoma* spp.)、疟原虫 (*Plasmodium* spp.)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、隐孢子虫 (*Cryptosporidium* spp.) 和艾美耳球虫 (*Eimeria* spp.) 等, 所引起的寄生原虫病严重危害人类与动物健康, 并造成严重的经济损失^[1-4]。嘌呤碱基是核苷酸合成的前体, 在细胞分裂、生长、信号转导、能量代谢和维生素合成等多种生理过程中都具有重要作用。寄生原虫的入侵、发育和繁殖需要大量的嘌呤核苷酸, 嘌呤核苷酸参与细胞和寄生原虫的多个生化过程, 在生物体和寄生原虫中发挥重要作用, 如核苷酸为核酸生物合成提供前体物质, ATP 为通用能量载体, 核苷酸衍生物为多个生物合成反应提供重要前体物质^[5]。生物体内, 细胞可以通过从头合成和补救途径两种不同方式合成嘌呤核苷酸, 以从头合成途径为主; 但寄生原虫只能利用补救途径合成嘌呤核苷酸, 通过从宿主细胞摄取核酸分解产生的核苷和碱基在磷酸核糖转移酶 (Phosphoribosyltransferase, PRT) 作用下合成嘌呤核苷酸^[6-8]。寄生原虫参与嘌呤核苷酸合成的主要为腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (Adenine phosphoribosyltransferase, APRT) 和 6-

氧代嘌呤核糖转移酶 (6-oxopurine phosphoribosyltransferase), 后者在大多数寄生原虫中以次黄嘌呤-鸟嘌呤-黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (Hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase, HGXPRT) 形式存在。腺嘌呤在 APRT 的催化作用下转化为嘌呤核苷酸; 次黄嘌呤、鸟嘌呤和黄嘌呤在 HGXPRT 的催化作用下分别转化为次黄嘌呤核苷酸、鸟嘌呤核苷酸和黄嘌呤核苷酸, 其中 5-磷酸核糖焦磷酸 (Phosphoribosylpyrophosphate, PRPP) 是嘌呤补救途径的主要底物。寄生原虫的生长发育需要大量的嘌呤核苷酸, APRT 和 HGXPRT 作为虫体嘌呤补救途径关键酶, 在寄生原虫嘌呤补救生物合成及生长发育过程中起重要作用^[9-12]。由于寄生原虫的嘌呤补救途径明显区别于宿主的从头合成途径, 因而原虫嘌呤补救途径关键酶成为抗原虫药物靶标研究的热点之一, 为抗寄生原虫药物研发提供了新思路。近年来, 越来越多的研究关注寄生原虫嘌呤磷酸核糖转移酶的生物学特征与功能, 并以其为药物靶点进行抑制剂筛选研究^[8,13]。本文就寄生原虫嘌呤磷酸核糖转移酶的基本特征、生物学功能及其抑制剂研发等研究进展作一综述, 以期为抗原虫药靶发现与抗原虫药物研制

提供新的思路与理论依据。

1 寄生原虫 PRT 的基本特征

1.1 寄生原虫 HGXPRT 的基本特征

寄生原虫普遍存在 HGXPRT。研究显示,杜氏利什曼原虫 (*L. donovani*) 的嘌呤磷酸核糖转移酶包括次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, LdHGPRT) 和黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (Xanthine phosphoribosyltransferase, LdXPRT) 两个成员,其中 LdHGPRT 由 211 个氨基酸残基组成,相对分子量为 23.6 kD; LdXPRT 由 241 个氨基酸残基组成,相对分子量为 26 kD,两者氨基酸序列同源性达 33%^[14]。Zarella-boitz 等^[15]发现, LdHGPRT 和 LdXPRT 的羧基端均存在由 1 个三肽分子组成的过氧化物酶体转导肽,两者均定位于利什曼原虫的糖酵解酶体,其中糖酵解酶体为动基体目寄生原虫所特有的微体,含有糖酵解反应的大多数酶。研究表明, LdHGPRT 中保守的 Ser-Tyr 氨基酸残基是该蛋白家族的特征,对于嘌呤核苷酸的磷酸核糖化至关重要^[16]。

布氏锥虫 (*T. brucei*) 嘌呤磷酸核糖转移酶由 TbHGPRT-I、TbHGPRT-II 和 TbHGXPRT 共 3 个同工酶组成。Dolezelova 等^[17]研究发现, TbHGPRT-I 和 TbHGPRT-II 均由 210 个氨基酸组成,两者同源性高达 98%; TbHGXPRT 由 234 个氨基酸组成,与 TbHGPRT-I 和 TbHGPRT-II 的同源性仅为 56%。随后研究发现 TbHGPRT-I、TbHGPRT-II 和 TbHGXPRT 均以同源二聚体形式发挥作用^[18]。Vidhya 等^[19]发现 TbHGPRT-II 和 TbHGXPRT 定位于糖酵解酶体,而 TbHGPRT-I 定位于细胞质。对虫体不同时期表达量差异分析发现, TbHGPRT-I 和 TbHGXPRT 在前循环型和血流型虫体中表达水平一致,而 TbHGPRT-II 仅在前循环型虫体中表达^[18]。研究显示,克氏锥虫 (*T. cruzi*) 嘌呤磷酸核糖转移酶存在 TcA、TcB、TcC 和 TcD 等 4 种亚型,其中 TcA 与 TcC 均由 221 个氨基酸组成,属于 TcHGPRTs; TcB 与 TcD 均由 231 个氨基酸组成,属于 TcHGXPRTs; TcHGPRTs 和 TcHGXPRTs 氨基酸序列同源性达 35%^[20]。研究发现, TcHGPRTs 主要在急性期的血流型虫体中表达,而 TcHGXPRTs 主要在急性期发展至脑炎期的虫体中表达,以维持虫体在脑

组织中持续感染^[21]。

恶性疟原虫 (*P. falciparum*) 次黄嘌呤-鸟嘌呤-黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (PfHGXPRT) 由 231 个氨基酸组成,相对分子量为 26.2 kD; 间日疟原虫 (*P. vivax*) 次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (PvHGPRT) 由 233 个氨基酸组成,相对分子量为 27.8 kD; PfHGXPRT 与 PvHGPRT 氨基酸序列的同源性达 77%^[22-23],两者在低离子浓度和高离子浓度下分别以同型四聚体和二聚体形式存在。研究发现疟原虫 HGXPRT 蛋白极不稳定,导致疟原虫 HGXPRT 的重组、表达、纯化和晶体培养均不易实现,目前已解析 PfHGXPRT 与底物次黄嘌呤的共结晶,以及 PfHGXPRT 与抑制剂 ImmucillinHP 复合物的晶体结构,发现 PfHGXPRT 每个亚基由 6 个 α 螺旋与 11 个 β 折叠组成,其中 46~149 氨基酸处于蛋白质核心区^[24]。

刚地弓形虫 (*T. gondii*) 6-氧代嘌呤核糖转移酶存在 TgHGXPRT-I 和 TgHGXPRT-II 两种亚型。研究发现,编码这两种同工酶的为同一个基因 *Tghgxpirt*,其完整的编码阅读框为 840 bp。 *Tghgxpirt* 基因转录、翻译后,通过不同的剪接方式形成两种不同的 cDNA,从而形成 TgHGXPRT-I 和 TgHGXPRT-II 两种亚型。其中 TgHGXPRT-I 由 230 个氨基酸组成,相对分子量为 26.7 kD; TgHGXPRT-II 由 279 个氨基酸组成,与前者相比,仅在羧基端多 49 个氨基酸,相对分子量为 31.8 kD^[25]。Chaudhary 等^[26]发现 TgHGXPRT-I 定位于虫体细胞质, TgHGXPRT-II 定位于内膜复合物,该复合物为顶复门寄生原虫细胞质膜内独特的膜细胞器。

1.2 寄生原虫 APRT 的基本特征

杜氏利什曼原虫腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (LdAPRT) 由 237 个氨基酸残基组成,相对分子量为 26.2 kD^[27],定位于虫体细胞质^[15]。Phillips 等^[28]解析了 LdAPRT 与底物腺嘌呤、产物 AMP,以及硫酸盐和柠檬酸盐离子等结合的晶体结构,发现 LdAPRT 属于 I 型磷酸核糖转移酶,与该家族其他 PRT 的晶核结构相似,包含由 13 个氨基酸残基组成的 PRPP 核糖环结合的结构域,但在底物腺嘌呤结合的结构域存在差异;利什曼原虫 APRT 羧基端均存在延伸结构,以组成二聚体的接合面,且 APRT 活性位点由二聚体的两个亚基共同组成,推测利什曼原虫 APRT 二聚体结

构对其催化活性至关重要。

布氏锥虫腺嘌呤磷酸核糖转移酶由 TbAPRT1 和 TbAPRT2 两个成员组成，在布氏锥虫基因组数据库中可注释到 *Tbaprt1* 和 *Tbaprt2* 两个基因，TbAPRT1 和 TbAPRT2 氨基酸序列的同源性仅为 22%，TbAPRT1 和 TbAPRT2 与 LdAPRT 氨基酸序列的相似性分别为 52% 和 27%；序列比对分析发现，TbAPRT1 属于 I 型磷酸核糖转移酶，而 TbAPRT2 与乳清酸磷酸核糖转移酶（Orotate phosphoribosyl- transferase, OPRT）具有结构相似的活性中心^[29-30]。研究发现，TbAPRT1 定位于细胞质，在血流型和前循环型锥虫中均有表达；TbAPRT2 定位于糖酵解酶体，仅在前循环型锥虫中表达^[29]。目前仍未发现疟原虫与弓形虫存在 APRT，推测可能存在同工酶或代偿路径。

2 寄生原虫 PRT 的生物学功能

2.1 寄生原虫 HGXPRT 的生物学功能

杜氏利什曼原虫利用 LdHGPRT 和 LdXPRT 两种酶催化不同的 6- 氧代嘌呤底物，其中 LdHGPRT 催化底物次黄嘌呤和鸟嘌呤，而 LdXPRT 具有特殊的底物特异性，可催化黄嘌呤、次黄嘌呤和鸟嘌呤 3 种底物，黄嘌呤是 LdXPRT 的最适底物（表 1）^[14]。Patel 等^[31] 进一步分析 LdXPRT 底物特异性机制，发现 LdXPRT

（I209V）突变体对黄嘌呤的亲和力降低，突变后的催化功能类似 HGXPRT，提示 I209 为 LdXPRT 底物特异性的关键位点。早期研究尝试构建杜氏利什曼原虫 *Δhgpri/Δxpri* 双缺失突变株，但均未成功，提示 LdHGPRT 和 LdXPRT 可能在利什曼原虫嘌呤核苷酸合成中起重要作用^[14,32]。随后 Boitz 等^[33] 构建了条件性杜氏利什曼原虫 *Δhgpri/Δxpri* 双缺失突变株，证实 LdHGPRT 和 LdXPRT 在虫体嘌呤核苷酸合成中均发挥关键作用。已有研究发现，黄嘌呤磷酸核糖转移酶（Xanthine phosphoribosyltransferase, XPRT）只存在利什曼原虫以及一些特定真菌和细菌中，哺乳动物缺乏 XPRT^[34]，因而 LdXPRT 作为抗利什曼原虫药物靶点研究备受关注。

研究发现布氏锥虫嘌呤磷酸核糖转移酶存在 TbHGPRT- I、TbHGPRT- II 和 TbHGXPRT 亚型，每种亚型对 6- 氧代嘌呤的亲和力存在差异，TbHGPRT- I 和 TbHGPRT- II 可以利用次黄嘌呤和鸟嘌呤，对黄嘌呤无催化活性；TbHGXPRT 可以催化次黄嘌呤、鸟嘌呤和黄嘌呤 3 种底物，且对 3 种底物的催化效率相近（表 1）^[18]。Dolezelova 等^[17] 利用 RNAi 技术将 *Tbhgpri- I*、*Tbhgpri- II* 和 *Tbhgxprt* 基因同时表达沉默，发现 TbHGPRT- I、TbHGPRT- II 和 TbHGXPRT 对感染期布氏锥虫的生存至关重要。克氏锥虫

表 1 寄生原虫 6- 氧代嘌呤磷酸核糖转移酶动力学常数
Table 1 Kinetic constants of the 6-oxopurine phosphoribosyltransferases of protozoan parasites

酶 Enzyme	次黄嘌呤 Hypoxanthine			鸟嘌呤 Guanine			黄嘌呤 Xanthine			参考文献 Reference
	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{L}/\mu\text{mol}\cdot\text{s}$)	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{L}/\mu\text{mol}\cdot\text{s}$)	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{L}/\mu\text{mol}\cdot\text{s}$)	
LdHGPRT	6.1 ± 1.0	8.54 ± 0.82	1.4	5.1 ± 0.8	41.27 ± 1.8	8.09	—	—	—	[16]
LdXPRT	204.2 ± 54.67	1.1 ± 0.093	0.0053	103.7 ± 15.24	0.455 ± 0.042	0.0043	8.9 ± 1.5	1.8 ± 0.041	0.2022	[31]
TbrHGPRT	5.5 ± 0.3	17.1 ± 0.3	3.1	2.3 ± 0.4	23.8 ± 0.3	10.3	221 ± 39	0.36 ± 0.06	0.002	[18]
TbrHGXPRT	17.3 ± 3.8	1.2 ± 0.3	0.06	13.0 ± 2.1	0.6 ± 0.2	0.04	2.8 ± 0.4	1.6 ± 0.2	0.6	[18]
TbbHGPRT-I	13.7 ± 2.9	0.26	0.18	15.9 ± 4.8	0.38	0.02	—	—	—	[17]
TbbHGPRT-II	4.2 ± 0.9	0.03	0.007	7.1 ± 1.8	0.05	0.007	—	—	—	[17]
TbbHGXPRT	30.6 ± 7.8	2.4	0.08	32 ± 4.8	1.36	0.04	31.9 ± 7.5	3.66	0.11	[17]
TeA (HGPRT)	13 ± 4	32 ± 1	2.46	19 ± 1	32 ± 1	1.7	160 ± 40	0.005	0.00003	[35]
TeB (HGXPRT)	13 ± 2	1.2 ± 0.1	0.092	72 ± 3	0.63 ± 0.02	0.00875	4.2 ± 0.3	0.97 ± 0.04	0.23	[35]
TeC (HGPRT)	14 ± 2	35 ± 2	2.5	14 ± 1	30 ± 1	2.14	150 ± 10	0.008	0.00005	[35]
TeD (HGXPRT)	150 ± 30	1.1 ± 0.1	0.007	45 ± 4	0.3 ± 0.01	0.0067	4.2 ± 0.3	0.97 ± 0.04	0.23	[35]
PvHGXPRT	0.93 ± 0.12	0.74 ± 0.01	0.8	1.9 ± 0.4	1.7 ± 0.03	0.9	—	—	—	[23]
PHGXPRT	<1	1.42	1.42	1.5	1.06	0.71	146.37	2.84	0.02	[36]
TgHGXPRT-I	1.6 ± 0.6	7.59	4.63	2.1 ± 0.7	12.7	6.02	14.4 ± 1.7	31.0	2.15	[25]
TgHGXPRT-II	1.4 ± 0.2	1.74	1.20	11.8 ± 1.4	2.46	0.207	16.2 ± 1.1	6.86	0.424	[25]
HuHGPRT	3.4 ± 1.0	5.2 ± 0.4	1.5	1.9 ± 0.4	8.2 ± 0.6	4.3	—	—	—	[18]

TcHGPRT 包括 TcA 和 TcC 两个亚型, 可以催化底物次黄嘌呤和鸟嘌呤, 几乎不能利用黄嘌呤; TcHGXPRT 包括 TcB 和 TcD 两个亚型, 可以利用次黄嘌呤、鸟嘌呤和黄嘌呤 3 种底物, 对黄嘌呤的亲和力高^[35]。由于克氏锥虫嘌呤磷酸核糖转移酶存在 4 种亚型, 因此以该酶为潜在药物靶标筛选出的抑制剂需同时抑制 TcHGPRT 和 TcHGXPRT 活性, 这些结果可为后续抑制剂筛选研究提供基础。

恶性疟原虫 PfHGXPRT 可以利用次黄嘌呤、鸟嘌呤和黄嘌呤 3 种底物, 其中鸟嘌呤为最适底物; 而间日疟原虫 PvHGPRT 只能利用次黄嘌呤和鸟嘌呤, 不能催化黄嘌呤合成嘌呤核苷酸^[36], 推测 PfHGXPRT 与 PvHGPRT 对黄嘌呤催化活性的差异可能与恶性疟原虫更易于从按蚊体内摄取高浓度黄嘌呤相关。研究表明, PfHGXPRT 的酶活性需要低浓度 PRPP 与次黄嘌呤进行活化, 其最佳活化条件为: PfHGXPRT 浓度为 37 $\mu\text{mol/L}$, PfHGXPRT 与底物 PRPP 和次黄嘌呤的比值为 1 : 7.4 : 2.2, 活化后的 PfHGXPRT 最大反应速率可达 8.37 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, 是未活化酶的 10.8 倍, 推测活化过程与 PfHGXPRT 聚合为具有更高活性的四聚体相关; 然而高浓度的底物可以抑制 PfHGXPRT 酶活性, 推测可能是高浓度底物 PRPP 或次黄嘌呤与 PfHGXPRT 紧密结合从而抑制产物的生成^[37], 这些结果提示最佳的 PfHGXPRT 酶活性反应体系是体外评价抑制剂效果时需考虑的重要因素。

刚地弓形虫 6- 氧代嘌呤核糖转移酶的 TgHGXPRT- I 和 TgHGXPRT- II 两种亚型均以四聚体存在且均具有催化活性, TgHGXPRT- II 与底物亲和力较 TgHGXPRT- I 弱, 其中 II 型对鸟嘌呤的 K_m 值较 I 型高 6 倍^[25]。根据已有研究结果, 仅在弓形虫中发现同一基因编码的两个亚型磷酸核糖转移酶, 且两个亚型均能维持虫体的繁殖与发育, 具体机制仍不清晰, 但推测两种功能性亚型磷酸核糖转移酶与弓形虫广泛的寄生宿主特性相关, 可以有助于弓形虫在不同宿主中利用摄取或转运的嘌呤进行嘌呤核苷酸合成^[26]。

2.2 寄生原虫 APRT 的生物学功能

杜氏利什曼原虫腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (LdAPRT) 可利用腺嘌呤和 PRPP, 其对腺嘌呤和 PRPP 的 K_m 值分别为 2.3、25.1 $\mu\text{mol/L}$ ^[27]。

Boitz 等^[38]构建杜氏利什曼原虫 $\Delta aprt$ 缺失突变株, 发现杜氏利什曼原虫前鞭毛体 $\Delta aprt$ 缺失株在腺嘌呤底物环境中不能存活, 在腺苷环境中存活率降低 50%; 杜氏利什曼原虫无鞭毛体 $\Delta aprt$ 缺失株可以在腺嘌呤环境中存活; $\Delta aprt$ 缺失株也可以感染巨噬细胞, 提示虫体可以从宿主细胞摄取多种腺苷来源, 利用其他补救途径进行嘌呤核苷酸合成。此外, 利什曼原虫不仅利用 APRT 合成嘌呤核苷酸, 还可以利用腺苷激酶 (Adenosine kinase, AK) 合成 AMP, 以及利用腺嘌呤氨基水解酶 (Adenine aminohydrolase, AAH) 生成次黄嘌呤, 再经 HGPRT 催化生成 IMP, 进而通过腺苷琥珀酸合成酶、腺苷琥珀酸裂解酶生成 AMP^[39]。利用代谢流分析发现, 利什曼原虫主要运用腺嘌呤转化为次黄嘌呤, 再生成 IMP, 进而转化为 AMP 进行嘌呤核苷酸合成, 因此推测利什曼原虫腺嘌呤氨基水解酶在嘌呤核苷酸合成中起重要作用^[40]。

布氏锥虫 APRT 存在 TbAPRT1 和 TbAPRT2 两种同工酶: TbAPRT1 具有催化活性, 对腺嘌呤的 K_m 值为 3.7 $\mu\text{mol/L}$; 而 TbAPRT2 对腺嘌呤的 K_m 值为 253 $\mu\text{mol/L}$, 与 TbAPRT1 相比, 被认为几乎无催化活性^[30]。序列比对分析发现, TbAPRT1 属于 I 型磷酸核糖转移酶, 而 TbAPRT2 与乳清酸磷酸核糖转移酶 (Orotate phosphoribosyl-transferase, OPRT) 具有结构相似的活性中心, 推测 TbAPRT2 作用的底物可能是乳清酸。研究提示 TbAPRT1 为布氏锥虫功能性的磷酸核糖转移酶。

弓形虫、疟原虫和隐孢子虫等不存在 APRT 酶催化活性, 并且在基因组数据库中也未能注释到 *aprt* 基因^[41]。研究发现弓形虫和隐孢子虫利用腺苷激酶催化腺苷 ATP 磷酸化生成 AMP^[42]。疟原虫缺失 AK 和 APRT, 利用腺苷脱氨酶 (Adenosine deaminase, ADA) 水解腺苷脱氨产生次黄苷, 再通过嘌呤核苷磷酸化酶 (Purine nucleoside phosphorylase, PNP) 作用生成次黄嘌呤^[43]。寄生原虫因其寄生的宿主环境各有不同, 可能导致各原虫的嘌呤补救途径有所不同。

3 寄生原虫 PRT 的应用研究

目前, 以寄生原虫嘌呤磷酸核糖转移酶为潜在靶点的抑制剂研究较为广泛。研究结果显示, 嘌呤基杂环化合物和核苷类似物等与嘌呤磷酸核糖转移酶的底物结构相似, 因此在抗利什曼原虫、

锥虫、疟原虫和弓形虫等的先导化合物研究中取得重要进展。

3.1 嘌呤基杂环化合物

嘌呤基杂环化合物可抑制 6- 氧代 PRT 活性，并且在体外能有效抑制寄生原虫繁殖。6- 巯基嘌呤、6- 硫鸟嘌呤、6- 氯嘌呤和 8- 氮鸟嘌呤等能抑制 PfHGXPRT 酶活性，半数抑制浓度 (IC₅₀)

为 1.3~67 μmol/L；这些抑制剂也可以体外抑制恶性疟原虫的繁殖，IC₅₀ 值为 2~18 μmol/L^[44-45]。研究发现，别嘌呤和硫唑嘌呤可以抑制体外利什曼原虫繁殖，对杜氏利什曼原虫的 IC₅₀ 值为 1.9~17 μmol/L，对婴儿利什曼原虫的 IC₅₀ 值为 0.6~2.8 μmol/L（表 2）^[46]。已有研究发现嘌呤基杂环化合物中别嘌呤的抗原虫活性较好。

表 2 寄生原虫嘌呤磷酸核糖转移酶的活性抑制剂
Table 2 Inhibitors against purine phosphoribosyltransferases of protozoan parasites

抑制剂 Inhibitor	靶标 Target	酶半数抑制浓度 Enzyme IC ₅₀ (μmol/L)	虫种 Species	寄生虫半数抑制浓度 Parasite IC ₅₀ (μmol/L)	参考文献 Reference
6- 巯基嘌呤 6-Mercaptopurine	PfHGXPRT	1.3 ± 0.3	恶性疟原虫	2	[44]
6- 硫鸟嘌呤 6-Thioguanine	PfHGXPRT	21.3 ± 6	恶性疟原虫	10	[45]
6- 氯嘌呤 6-Chloroguanine	PfHGXPRT	67 ± 36	恶性疟原虫	10	[45]
8- 氮鸟嘌呤 8-Azaguanine	PfHGXPRT	6.6 ± 1.9	恶性疟原虫	18	[45]
别嘌呤 Allopurinol	LdHGPRT	ND	杜氏利什曼原虫	17.0 ± 0.7	[46]
	LiHGPRT	ND	婴儿利什曼原虫	0.6 ± 0.3	[46]
硫唑嘌呤 Azathioprine	LdHGPRT	ND	杜氏利什曼原虫	1.9 ± 0.7	[46]
	LiHGPRT	ND	婴儿利什曼原虫	2.8 ± 1.4	[46]
硝基苄硫肌苷 Nitrobenzylthioinosine	TgHGXPRT	ND	刚地弓形虫	10	[47]
四酰胺苯丙氨酸 Tetra-(ethyl L-phenylalanine) tetraamide	PfHGXPRT	0.007	恶性疟原虫	11.7 ± 3.2	[48]
Immucillin-H	PfHGXPRT	1 ± 0.3	恶性疟原虫	—	[49]
	TcHGPRT	180 ± 30	克氏锥虫	—	[50]
Immucillin-G	PfHGXPRT	14 ± 2	恶性疟原虫	—	[50]
	TcHGPRT	1160 ± 390	克氏锥虫	—	[50]
AIP-2	PfHGXPRT	0.01	恶性疟原虫	2.5 ± 0.2	[51]
AIP-3	PfHGXPRT	0.00065	恶性疟原虫	1.9 ± 0.1	[51]
Guanine cyclic-(R)-HPMP	PfHGXPRT	1 ± 0.2	恶性疟原虫	46	[52]
Guanine-PME	PfHGXPRT	1.6 ± 0.2	恶性疟原虫	14	[53]
ANP-2h	TbrAPRT1	0.57 ± 0.07	布氏锥虫	—	[54]
ANP-2i	TbrAPRT1	0.39 ± 0.01	布氏锥虫	—	[55]

3.2 核苷类似物

核苷及核苷类似物是嘌呤磷酸核糖转移酶的天然底物，核苷类似物等抑制剂的设计成为抑制剂开发的有效策略之一。硝基苄硫肌苷是 TgHGXPRT 的竞争性抑制剂，其对 TgHGXPRT 的 IC₅₀ 值为 10 μmol/L，对宿主细胞没有明显毒性，高剂量（100 μmol/L）对未感染的宿主细胞没有显著的毒性作用^[47]。Keough 等^[48]发现，四酰胺苯丙氨酸对 PfHGXPRT 的 IC₅₀ 值为 7 nmol/L，其抑制活性较嘌呤基杂环类似物强。Immucillin 也是一类核苷类似物，Immucillin-H 和 Immucillin-G 能抑制 PfHGXPRT 和 TcHGPRT 活性，其中对 PfHGXPRT 的抑制活性比 TcHGPRT

强^[20, 49]，但未见 Immucillin 对恶性疟原虫和克氏锥虫体外繁殖抑制效果的报道。Hazleton 等^[50]发现，非环化 Immucillin 类似物（Acyclic immucillin phosphonate, AIP）可以有效抑制 6- 氧代 PRT 活性，其中衍生物 AIP-2 和 AIP-3 对 PfHGXPRT 的抑制活性 Ki 值分别为 10、0.65 nmol/L，具有很强的抑制活性；对体外恶性疟原虫繁殖的 IC₅₀ 值分别为 2.5、1.9 μmol/L。此外，非环化核苷类似物（acyclic nucleoside phosphonates, ANP）也具有抑制活性，利用分子对接等分析发现，ANP 衍生物不仅对 6- 氧代嘌呤磷酸核糖转移酶具有抑制活性，而且能抑制 APRT 活性，其中衍生物 ANP-2h 和 ANP-2i 对 TbrAPRT1 的抑制活性 Ki 值分别为 0.57、

0.39 $\mu\text{mol/L}$ [51-53]; 2 (磷酸乙氧基) 乙鸟嘌呤、2 (磷酸乙氧基) 乙次黄嘌呤、Guanine cyclic-(R)-HPMP 和 Guanine-PME 对 PfHGXPRT 的抑制活性 K_i 值分别为 0.1、0.3、1.0、1.6 $\mu\text{mol/L}$ (表 2) [54-57]。

3.3 其他抑制剂

异乙酸酯和醋酸熊果酸可以抑制 PfHGXPRT 活性, 且抑制作用呈量效关系, 两者均对 PfHGXPRT 表现出较强的亲和力, 解离常数分别为 0.0833、2.8396 $\mu\text{mol/L}$, 被认为是具有潜力的抗疟药物 [55]。研究发现楝科植物提取物对利什曼原虫 APRT 具有抑制作用, 其中青花菜根、叶甲醇提取物分别使 APRT 的比活性降低 84.5% 和 80.1%; 红果菜果、枝、叶甲醇提取物分别使 APRT 的比活性降低 78.7%、90.8% 和 90.3%。在芸香科植物提取物中发现 3 个呋喃喹诺酮类生物碱, 可使 APRT 的比活性降低 90.7% [58]。楝科植物提取物和呋喃喹诺酮类生物碱均具有酶抑制作用, 这些化合物的抗利什曼原虫效果仍有待进一步开展体内外试验验证 [59]。

4 展望

寄生原虫感染引起利什曼原虫病、锥虫病、疟原虫病、弓形虫病和鸡球虫病等, 不仅对畜牧业造成严重的经济损失, 而且严重威胁人类健康 [60-62]。目前, 寄生原虫病的防治仍主要依赖抗原虫药物, 随着抗原虫药物的长期、广泛应用, 寄生原虫对药物的抗药性日益严重, 已有抗原虫药物的毒副作用等严重限制了药物的临床应用, 因而筛选新的抗原虫药物靶标并研制新型抗原虫药物成为当务之急。嘌呤核苷酸具有重要的生物学功能, 在寄生原虫的入侵、发育和繁殖等多个阶段需要大量的嘌呤核苷酸。宿主主要采用从头途径合成嘌呤核苷酸, 然而, 原虫缺乏嘌呤从头合成途径, 完全依赖补救途径进行嘌呤核苷酸的生物合成, 寄生原虫与宿主的嘌呤代谢机制存在的明显差异使得寄生原虫嘌呤补救途径关键酶次黄嘌呤-鸟嘌呤-黄嘌呤磷酸核糖转移酶和腺嘌呤磷酸核糖转移酶成为备受关注的抗原虫药物靶标。近年来, 应用生物化学、药物化学、基因编辑技术等, 揭示了利什曼原虫、锥虫、疟原虫和弓形虫等寄生原虫嘌呤代谢机制、嘌呤代谢关键酶特征与生物学功能, 并在此基础上针对嘌呤代谢关键酶次黄嘌呤-鸟嘌呤-黄嘌呤磷酸核糖

转移酶和腺嘌呤磷酸核糖转移酶筛选特异性抑制剂, 通过体内外验证试验发现了一系列具有良好抗原虫活性的先导化合物。目前, 计算机辅助药物设计在抗病毒、抗肿瘤药物的研发中取得重要进展, 极大推进了扎那米韦、伊马替尼等药物的研发效率并成功上市 [63]。随着计算机辅助药物设计方法逐步成熟, 在药物研发中发挥越来越重要的作用, 日益成为新药研究的核心技术之一。因而, 在前期基于寄生原虫嘌呤磷酸核糖转移酶 (APRT 和 HGXPRT) 筛选出系列先导化合物的基础上, 进一步解析寄生原虫嘌呤磷酸核糖转移酶的分子结构, 明晰药靶与配体的作用机制, 利用计算机辅助虚拟筛选技术进行高通量筛选特异、高效、安全的活性抑制剂, 并开展体内外试验验证抑制剂的抗原虫活性, 从而筛选出更高效安全的抗寄生原虫先导化合物, 这将为基于嘌呤磷酸核糖转移酶为药物靶标的抗原虫新药研发提供新思路。

参考文献 (References):

- [1] 邓敏儿, 李娜, 郭亚琼, 冯耀宇, 肖立华. CRISPR/Cas9 系统在寄生原虫基因编辑中的应用 [J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(1): 69-79. DOI:10.11843/j.issn.0366-6964.2023.01.007.
- [2] DENG M E, LI N, GUO Y Q, FENG Y Y, XIAO L H. Application of CRISPR/Cas9 system on gene editing of parasitic protozoa [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(1):69-79. DOI:10.11843/j.issn.0366-6964.2023.01.007.
- [3] KOURBELI V, CHONTZOPOULOU E, MOSCHOVOU K, PAVLOS D, MAVROMOUSTAKOS T, PAPANASTASIOU I P. An overview on target-based drug design against kinetoplastid protozoan infections: human african trypanosomiasis, chagas disease and leishmaniasis [J]. *Molecules*, 2021, 26(15):4629. DOI:10.3390/molecules26154629.
- [4] 熊杰, 陈建平, 陈晓光, 陈瑛, 冯耀宇, 高凤, 高珊, 顾福康, 黄兵, 梁爱华, 龙红岸, 赖德华, 伦照荣, 缪炜, 倪兵, 邱子健, 邵晨, 汪建国, 文建凡, 徐奎栋, 余育和, 张龙现, 张西臣, 赵元君, 宋微波. 进展中的原生动物学研究: 热点领域与新格局 [J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(10):1301-1322. DOI:10.1360/SSV-2019-0127.
- [5] XIONG J, CHEN J P, CHEN X G, CHEN Y, FENG Y Y, GAO F, GAO S, GU F K, HUANG B, LIANG A H, LONG H A, LAI D H, LUN Z R, MIAO W, NI B, QIU Z J, SHAO C, WANG J G, WEN J F, XU K D, YU Y H, ZHANG L X, ZHANG X C, ZHAO Y J, SONG W B. Progress of protozoological studies in China: Hot spots and new patterns [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2019, 49(10):1301-1322. DOI:10.1360/SSV-2019-0127.
- [6] RANGEL G W, LLINÁS M. Re-envisioning anti-apicomplexan parasite drug discovery approaches [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11:691121. DOI: 10.3389/fcimb.2021.691121.
- [7] YANG Y, TANG T, LI X, MICHEL T, LING L, HUANG Z, MULAKA

- M, WU Y, GAO H, WANG L, ZHOU J, MEUNIER B, KE H, JIANG L, RAO Y. Design, synthesis, and biological evaluation of multiple targeting antimalarials [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2021, 11(9):2900–2913. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.05.008.
- [6] OWOLOYE A, ENEJOH O A, AKANBI O M, BANKOLE O M. Molecular docking analysis of *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase towards the design of effective inhibitors [J]. *Bioinformation*, 2020, 16(9): 672–678. DOI: 10.6026/97320630016672.
- [7] BARNADAS-CARCELLER B, MARTINEZ-PEINADO N, GOMEZ L C, ROS-LUCAS A, GABALDON-FIGUEIRA J C, DIAZ-MOCHON J J, GASCON J, MOLINA I J, PINEDA DE LAS INFANTAS Y V M J, ALONSO-PADILLA J. Identification of compounds with activity against *Trypanosoma cruzi* within a collection of synthetic nucleoside analogs [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12:1067461. DOI: 10.3389/fcimb.2022.1067461.
- [8] PARIHAR P S, PRATAP J V. The *L. donovani* Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPR) oligomer is distinct from the human homolog [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 532(4):499–504. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.08.052.
- [9] CASSERA M B, ZHANG Y, HAZLETON K Z, SCHRAMM V L. Purine and pyrimidine pathways as targets in *Plasmodium falciparum* [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2011, 11(16):2103–2115. DOI: 10.2174/156802611796575948.
- [10] 山丹, 刘群. 顶复门原虫嘌呤代谢研究进展 [J]. 中国兽医杂志, 2012, 48(7):54–57.
- SHAN D, LIU Q. Research advances in purine phosphoribosyltransferases of Apicomplexa [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2012, 48(7):54–57.
- [11] 王冰. 恶性疟原虫次黄嘌呤 – 鸟嘌呤 – 黄嘌呤磷酸核糖转移酶细胞免疫保护作用的研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2006.
- WANG B. Evaluation of cell-mediated protective immunity to hypoxanthine guanine xanthine phosphoribosyl transferase (HGXPRT) of *Plasmodium falciparum* [D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2006.
- [12] 余莉. 利用RNA干扰技术双通道抑制弓形虫嘌呤补救合成途径 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2008.
- YU L. Dual inhibition of purine salvage pathways using RNA interference technology in *Toxoplasma gondii* [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2008.
- [13] GRUBE C D, GILL C P, ROY H. Development of a continuous assay for high throughput screening to identify inhibitors of the purine salvage pathway in *Plasmodium falciparum* [J]. *SLAS Discovery*, 2022, 27(2):114–120. DOI: 10.1016/j.slasd.2021.12.002.
- [14] JARDIM A, BERGESON S E, SHIH S, CARTER N, LUCAS R W, MERLIN G, MYLER P J, STUART K, ULLMAN B. Xanthine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*. Molecular cloning, biochemical characterization, and genetic analysis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(48): 34403–34410. DOI: 10.1074/jbc.274.48.34403.
- [15] ZARELLA-BOITZ J M, RAGER N, JARDIM A, ULLMAN B. Subcellular localization of adenine and xanthine phosphoribosyl transferases in *Leishmania donovani* [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2004, 134(1): 43–51. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2003.08.016.
- [16] JARDIM A, ULLMAN B. The conserved serine-tyrosine dipeptide in *Leishmania donovani* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase is essential for catalytic activity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(14): 8967–8973. DOI: 10.1074/jbc.272.14.8967.
- [17] DOLEZELOVA E, TERAN D, GAHURA O, KOTRBOVA Z, PROCHAZKOVA M, KEOUGH D, SPACEK P, HOCKOVA D, GUDDAT L, ZIKOVA A. Evaluation of the *Trypanosoma brucei* 6-oxopurine salvage pathway as a potential target for drug discovery [J]. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2018, 12(2): e0006301. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006301.
- [18] TERAN D, DOLEZELOVA E, KEOUGH D T, HOCKOVA D, ZIKOVA A, GUDDAT L W. Crystal structures of *Trypanosoma brucei* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase in complex with IMP, GMP and XMP [J]. *FEBS Journal*, 2019, 286(23): 4721–4736. DOI: 10.1111/febs.14987.
- [19] VIDHYA V M, PONNURAJ K. Structure-based virtual screening and computational study towards identification of novel inhibitors of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase of *Trypanosoma cruzi* [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2021, 122(11):1701–1714. DOI: 10.1002/jcb.30122.
- [20] GLOCKZIN K, KOSTOMIRIS D, MINNOW Y V, SUTHAGAR K, CLINCH K, GAI S, BUCKLER J N, SCHRAMM V L, TYLER P C, MEEK T D. Kinetic characterization and inhibition of *Trypanosoma cruzi* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases [J]. *Biochemistry*, 2022, 61(19): 2088–2105. DOI: 10.1021/acs.biochem.2c00312.
- [21] ROJO G, PÉLISSIER F, SANDOVAL-RODRIGUEZ A, BACIGALUPO A, GARCÍA V, PINTO R, ORTIZ S, BOTTO-MAHAN C, CATTAN P E, SOLARI A. Organs infected with *Trypanosoma cruzi* and DTU identification in the naturally infected rodent *Octodon degus* [J]. *Experimental Parasitology*, 2020, 215:107931. DOI: 10.1016/j.exppara.2020.107931.
- [22] SARKAR D, GHOSH I, DATTA S. Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphorybosyltransferase: role of histidine residue in substrate selectivity [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2004, 137(2):267–276. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2004.05.014.
- [23] KEOUGH D T, HOCKOVÁ D, KREČMEROVÁ M, ČESNEK M, HOLÝ A, NAESENS L, BRERETON I M, WINZOR D J, DE JERSEY J, GUDDAT L W. *Plasmodium vivax* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: a target for anti-malarial chemotherapy [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2010, 173(2): 165–169. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2010.05.018.
- [24] MINNOW Y V T, SUTHAGAR K, CLINCH K, DUCATI R G, GHOSH A, BUCKLER J N, HARIJAN R K, CAHILL S M, TYLER P C, SCHRAMM V L. Inhibition and mechanism of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase [J]. *ACS Chemical Biology*, 2022, 17(12):3407–3419. DOI: 10.1021/acschembio.2c00546.
- [25] WHITE E L, ROSS L J, DAVIS R L, ZYWNO-VAN GINKEL S,

- VASANTHAKUMAR G, BORHANI D W. The two *Toxoplasma gondii* hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase isozymes form heterotetramers [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(25): 19218–19223. DOI: 10.1074/jbc.M908879199.
- [26] CHAUDHARY K, DARLING J A, FOHL L M, SULLIVAN W J, DONALD R G, PFEFFERKORN E R, ULLMAN B, ROOS D S. Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(30): 31221–31227. DOI: 10.1074/jbc.M404232200.
- [27] BASHOR C, DENU J M, BRENNAN R G, ULLMAN B. Kinetic mechanism of adenine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani* [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(12):4020–4031. DOI: 10.1021/bi0158730.
- [28] PHILLIPS C L, ULLMAN B, BRENNAN R G, HILL C P. Crystal structures of adenine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani* [J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18(13): 3533–3545. DOI: 10.1093/emboj/18.13.3533.
- [29] LUSCHER A, LAMPREA–BURGUNDER E, GRAF F E, DE KONING H P, MASER P. *Trypanosoma brucei* adenine–phosphoribosyltransferases mediate adenine salvage and aminopurinol susceptibility but not adenine toxicity [J]. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2014, 4(1): 55–63. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2013.12.001.
- [30] GLOCKZIN K, MEEK T D, KATZFUSS A. Characterization of adenine phosphoribosyltransferase (APRT) activity in *Trypanosoma brucei*: Only one of the two isoforms is kinetically active [J]. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2022, 16(2): e0009926. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009926.
- [31] PATEL B, PATEL D, PAPPACHAN A. Ile209 of *Leishmania donovani* xanthine phosphoribosyltransferase plays a key role in determining its purine base specificity [J]. *FEBS Letters*, 2021, 595(16): 2169–2182. DOI: 10.1002/1873–3468.14162.
- [32] HWANG H Y, ULLMAN B. Genetic analysis of purine metabolism in *Leishmania donovani* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(31): 19488–19496. DOI: 10.1074/jbc.272.31.19488.
- [33] BOITZ J M, ULLMAN B. A conditional mutant deficient in hypoxanthine–guanine phosphoribosyl–transferase and xanthine phosphoribosyltransferase validates the purine salvage pathway of *Leishmania donovani* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(23): 16084–16089. DOI: 10.1074/jbc.M600188200.
- [34] PATEL B, PATEL D, PARMAR K, CHAUHAN R, SINGH D D, PAPPACHAN A. *L. donovani* XPRT: Molecular characterization and evaluation of inhibitors [J]. *Biochimica et Biophysica Acta: Proteins and Proteomics*, 2018, 1866(3): 426–441. DOI: 10.1016/j.bbapap.2017.12.002.
- [35] GLOCKZIN K, MENEELY K M, HUGHES R, MAATOUK S W, PIÑA G E, SUTHAGAR K, CLINCH K, BUCKLER J N, LAMB A L, TYLER P C, MEEK T D, KATZFUSS A. Kinetic and structural characterization of *Trypanosoma cruzi* hypoxanthine–guanine–xanthine phosphoribosyltransferases and repurposing of transition-state analogue inhibitors [J]. *Biochemistry*, 2023, 62(14):2182–2201. DOI: 10.1021/acs.biochem.3c00116.
- [36] SUJAY SUBBAYYA I N, SUKUMARAN S, SHIVASHANKAR K, BALARAM H. Unusual substrate specificity of a chimeric hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase containing segments from the *Plasmodium falciparum* and human enzymes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 272(2): 596–602. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2816.
- [37] ROY S, NAGAPPA L K, PRAHLADARAO V S, BALARAM H. Kinetic mechanism of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine–guanine–xanthine phosphoribosyltransferase [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2015, 204(2): 111–120. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2016.02.006.
- [38] BOITZ J M, ULLMAN B. Adenine and adenosine salvage in *Leishmania donovani* [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2013, 190(2): 51–55. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2013.06.005.
- [39] BOITZ J M, ULLMAN B, JARDIM A, CARTER N S. Purine salvage in *Leishmania*: complex or simple by design? [J]. *Trends in Parasitology*, 2012, 28(8): 345–352. DOI: 10.1016/j.pt.2012.05.005.
- [40] MARTIN J L, YATES P A, SOYSA R, ALFARO J F, YANG F, BURNUM–JOHNSON K E, PETYUK V A, WEITZ K K, CAMP D G, SMITH R D, WILMARTH P A, DAVID L L, RAMASAMY G, MYLER P J, CARTER N S. Metabolic reprogramming during purine stress in the protozoan pathogen *Leishmania donovani* [J]. *PLOS Pathogens*, 2014, 10(2): e1003938. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003938.
- [41] FOX B A, BZIK D J. Biochemistry and metabolism of *Toxoplasma gondii*: Purine and pyrimidine acquisition in *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa//*Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan—perspectives and methods [M]. Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020:397–449. DOI: 10.1016/B978–0–12–815041–2.00009–8.
- [42] KOUNI M H E. Adenosine metabolism in *Toxoplasma gondii* potential targets for chemotherapy [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2007, 13(6): 581–597. DOI: 10.2174/138161207780162836.
- [43] JARUWAT A, RIANGRUNGROJ P, UBONPRASERT S, SAE–UENG U, KUAPRASERT B, YUTHAVONG Y, LEARTSAKULPANICH U, CHITNUMSUB P. Crystal structure of *Plasmodium falciparum* adenosine deaminase reveals a novel binding pocket for inosine [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019, 667:6–13. DOI: 10.1016/j.abb.2019.04.002.
- [44] KLEJCH T, KEOUGH D T, KING G, DOLEŽELOVÁ E, ČESNEK M, BUDĚŠÍNSKÝ M, ZÍKOVÁ A, JANEBA Z, GUDDAT L W, HOCKOVÁ D. Stereo–defined acyclic nucleoside phosphonates are selective and potent inhibitors of parasite 6–oxopurine phosphoribosyltransferases [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 65(5):4030–4057. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c01881.
- [45] KEOUGH D T, SKINNER–ADAMS T, JONES M K, NG A–L, BRERETON I M, GUDDAT L W, DE JERSEY J. Lead compounds for antimalarial chemotherapy: purine base analogs discriminate between human and *P. falciparum* 6–oxopurine phosphoribosyltransferases [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49(25): 7479–7486. DOI: 10.1021/jm061012j.
- [46] AZZOZ S, LAWTON P. *In vitro* effects of purine and pyrimidine analogues on *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* promastigotes and intracellular amastigotes [J]. *Acta Parasitologica*, 2017, 62(3): 582–588. DOI: 10.1515/ap–2017–0070.
- [47] EL KOUNI M H, GUARCELLO V, AL SAFARJALANI O N, NAGUIB

- F N. Metabolism and selective toxicity of 6-nitrobenzylthioinosine in *Toxoplasma gondii* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999;43(10):2437–2443. DOI:10.1128/AAC.43.10.2437.
- [48] KEOUGH D T, REJMAN D, POHL R, ZBORNÍKOVÁ E, HOCKOVÁ D, CROLL T, EDSTEIN M D, BIRRELL G W, CHAVCHICH M, NAESENS L M J, PIERENS G K, BRERETON I M, GUDDAT L W. Design of *Plasmodium vivax* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase inhibitors as potential antimalarial therapeutics [J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(1): 82–90. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00916.
- [49] EVANS G B, TYLER P C, Schramm V L. Immucillins in infectious diseases [J]. *ACS Infectious Diseases*, 2018, 4(2):107–117. DOI: 10.1021/acsinfectdis.7b00172.
- [50] HAZLETON K Z, HO M C, CASSERA M B, CLINCH K, CRUMP D R, ROSARIO JR I, MERINO E F, ALMO S C, TYLER P C, SCHRAMM V L. Acyclic immucillin phosphonates: second-generation inhibitors of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase [J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(6): 721–730. DOI: 10.1016/j.chembiol.2012.04.012.
- [51] KEOUGH D T, HOCKOVÁ D, HOLY A, NAESENS L M, SKINNER-ADAMS T S, JERSEY J D, GUDDAT L W. Inhibition of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase by acyclic nucleoside phosphonates: a new class of antimalarial therapeutics [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 52(14): 4391–4399. DOI: 10.1021/jm900267n.
- [52] DOLEZÉLOVA E, KLEJCH T, SPACEK P, SLAPNICKOVÁ M, GUDDAT L, HOCKOVÁ D, ZIKOVÁ A. Acyclic nucleoside phosphonates with adenine nucleobase inhibit *Trypanosoma brucei* adenine phosphoribosyltransferase *in vitro* [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 13317. DOI: 10.1038/s41598-021-91747-6.
- [53] KALCIC F, FRYDRYCH J, DOLEZÉLOVA E, SLAPNICKOVÁ M, PACHL P, SLAVETINSKA L P, DRACINSKY M, HOCKOVÁ D, ZIKOVÁ A, JANEBA Z. C1'-Branched acyclic nucleoside phosphonates mimicking adenosine monophosphate: Potent inhibitors of *Trypanosoma brucei* adenine phosphoribosyltransferase [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 225:113798. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113798.
- [54] KLEJCH T, KEOUGH D T, CHAVCHICH M, TRAVIS J, SKACEL J, POHL R, JANEBA Z, EDSTEIN M D, AVERY V M, GUDDAT L W, HOCKOVÁ D. Sulfide, sulfoxide and sulfone bridged acyclic nucleoside phosphonates as inhibitors of the *Plasmodium falciparum* and human 6-oxopurine phosphoribosyltransferases: Synthesis and evaluation [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 183: 111667. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111667.
- [55] OPOKU F, GOVENDER P P, POOE O J, SIMELANE M B C. Evaluating iso-mukaadial acetate and ursolic acid acetate as *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase inhibitors [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12):861. DOI: 10.3390/biom9120861.
- [56] MOHAMED B S, NGUYEN M C, WEIN S, UTTARO J P, ROBERT X, VIOLOT S, BALLUT L, JUGNARAIN V, MATHÉ C, CERDAN R, AGHAJARI N, PEYROTTE S. Purine containing carbonucleoside phosphonate analogues as novel chemotype for *Plasmodium falciparum* inhibition [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, 258:115581. DOI: 10.1016/j.ejmech.2023.115581.
- [57] CHEVIET T, LEFEBVRE-TOURNIER I, WEIN S, PEYROTTE S. *Plasmodium* purine metabolism and its inhibition by nucleoside and nucleotide analogues [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 62(18):8365–8391. DOI: 10.1021/acscimedchem.9b00182.
- [58] AMBROZIN A R, LEITE A C, SILVA M, VIEIRA P C, FERNANDES J B, THIEMANN O H, DA SILVA M F, OLIVA G. Screening of *Leishmania* APRT enzyme inhibitors [J]. *Pharmazie*, 2005, 60(10):781–784. PMID: 16259128.
- [59] Soni M, Pratap JV. Development of novel anti-Leishmanials: The case for structure-based approaches [J]. *Pathogens*, 2022, 11(8):950. DOI: 10.3390/pathogens11080950.
- [60] 李结, 路鹏云. 广东农垦规模化猪场寄生虫流行病学调查 [J]. 广东农业科学, 2017, 44(5):132–136. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2017.05.021.
- LI J, LU P Y. Survey of parasites infection in pigs of intensive farms in Guangdong state farms [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2017,44(5):132–136. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2017.05.021.
- [61] 李娟, 廖申权, 赵爽, 戚南山, 吕敏娜, 吴彩艳, 林栩慧, 蔡海明, 胡俊菁, 张健骅, 谢明权, 孙铭飞. 重要食源性寄生虫流行新特点及防控策略 [J]. 广东农业科学, 2021,48(3):123–132. DOI: 10.16768/j.issn.1004-874X.2021.03.015.
- LI J, LIAO S Q, ZHAO S, QI N S, LYU M N, WU C Y, LIN X H, CAI H M, HU J J, ZHANG J F, XIE M Q, SUN M F. New epidemic characteristics and control strategies of important food-borne parasites [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2021, 48(3):123–132. DOI: 10.16768/j.issn.1004-874X.2021.03.015.
- [62] 廖申权, 戚南山, 吕敏娜, 吴彩艳, 李娟, 蔡海明, 林栩慧, 胡俊菁, 于林增, 张健骅, 谢明权, 孙铭飞. 鸡球虫病流行病学、防治药物与疫苗研究进展 [J]. 广东农业科学, 2020,47(11):171–181. DOI: 10.16768/j.issn.1004-874X.2020.11.019.
- LIAO S Q, QI N S, LYU M N, WU C Y, LI J, CAI H M, LIN X H, HU J J, YU L Z, ZHANG J F, XIE M Q, SUN M F. Research progress in the epidemiology, anticoccidial drugs and vaccines of avian coccidiosis [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2020, 47(11):171–181. DOI: 10.16768/j.issn.1004-874X.2020.11.019.
- [63] ECE A. Computer-aided drug design [J]. *BMC Chemistry*, 2023, 17:26–28. DOI:10.1186/s13065-023-00939-w.

(责任编辑 崔建勋)