

四氧嘧啶和 5,6-二氨基-2,4-二羟基嘧啶 对伯氏疟原虫的抗疟作用

黄左娥、常惠玲、吴克英、王聚君 (中国预防医学科学院寄生虫病研究所, 上海 200025)

Acta Pharmacologica Sinica 1989 Mar; 10(2): 181-184

Antimalarial action of alloxan and 5,6-diamino-2,4-dihydroxy-pyrimidine in *Plasmodium berghei*

HUANG Zuo-Yue, CHANG Hui-Ling, WU Ke-Yin, WANG Ju-Jun,
(Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine, Shanghai 200025)

Abstract Three hours after iv administration of alloxan and 5,6-diamino-2,4-dihydroxy-pyrimidine to mice infected with chloroquine-sensitive (CS) and chloroquine-resistant (CR) strains of *Plasmodium berghei*, the 2 compounds showed remarkable antimalarial actions. Parasitemia in CS and CR infected mice were reduced by about 50%. Slight hemolysis was seen in mice treated with alloxan but not in mice treated with 5,6-diamino-2,4-dihydro-pyrimidine. Alloxan did not inhibit glutathione reductase activity and no alloxan-glutathione complex was produced. No relationship between the antimalarial effects of alloxan and hemolysis or GSH content were found. It is suggested that the antimalarial effects of the two agents may be due to the inhibition of dihydro-orotic acid dehydrogenase.

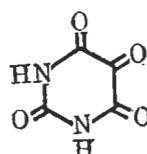
Key words alloxan; 5,6-diamino-2,4-dihydroxy-pyrimidine; chloroquine; *Plasmodium berghei*; hemolysis; glutathione reductase; antimalarials

提要 用四氧嘧啶和 5,6-二氨基-2,4-二羟基嘧啶分别 iv 治疗伯氏疟原虫氯喹敏感株(CS)和抗性株(CR)感染小鼠, 3 h 后, 感染率均下降约 50%。前者有 20-30% 溶血, 后者无。四氧嘧啶不抑制 CS 中谷胱甘肽还原酶。两株疟原虫中亦未见有四氧嘧啶-谷胱甘肽复合物。故其抗疟机理似与溶血和 GSH 量无关。

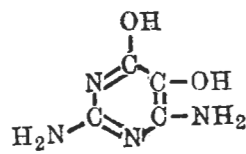
有可能是抑制了二氢乳酸脱氢酶。

关键词 四氧嘧啶; 5,6-二氨基-2,4-二羟基嘧啶; 氯喹; 伯氏疟原虫; 溶血; 谷胱甘肽还原酶; 抗疟药

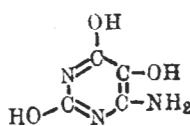
四氧嘧啶(alloxan)对鼠疟有迅速的抗疟效果^(1,2), 但它又有溶血现象。本文研究其抗疟作用是否因溶血所致, 若否, 则可利用其抗疟机理寻找与它有类似特性的化合物, 保留其抗疟作用, 弃去溶血作用。有报道⁽³⁾从蚕豆中分离的嘧啶类化合物 divicin 和 isouramil 都具有溶血及与谷胱甘肽(GSH)生成结合物和通过氧化-还原产生新生氧或羟基的特性。如果四氧嘧啶的抗疟作用与此机理有关, 那么具有此特性的化合物亦应该具有抗疟作用。为此选择了与上述两个化合物结构相似的 5,6-二氨基-2,4-二羟基嘧啶(5,6-diamino-2,4-dihydroxy-pyrimidine)观察其抗疟作用。



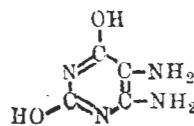
Alloxan



Divicin



Isouramil



5,6-Diamino-2,4-dihydroxy-pyrimidine

Materials and methods

伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*)印度株和经培育的抗氯喹株, (抗性强度>62倍)由本所病原生物研究室提供, 四氧嘧啶, 5, 6-二氨基 2,4-二羟基嘧啶, 谷胱甘肽还原型(GSH)和氧化型(GSSG), 辅酶 II 还原型(NADPH)以及环亮氨酸均为 Sigma 产品, 氯喹(上海第十四制药厂); 青蒿素(云南药物所提供), 咯萘啶(本所药物化学研究室合成), 磺基纤维素(Serva)。

抗疟作用和溶血率 18-22 g 昆明系 ♀ 小鼠(本所实验动物室提供), 分别 ip 伯氏疟原虫氯喹敏感株(CS)和抗氯喹株(CR)感染血 0.2 ml 约 10^7 感染细胞。前者于感染后 3 d(约 25% 感染率), 后者于感染后 5 d(约 18% 感染率), 于尾静脉取血涂片。再用含 0.2 ml 肝素-磷酸缓冲液的注射器自心脏取血 0.2 ml, 然后自尾 iv 四氧嘧啶或 5, 6-二氨基 2, 4-二羟基嘧啶(150 mg/kg) 0.2 ml, 3 h 后用同法取血涂片和抽取心血, 血片经吉氏染色后镜检, 以给药前后的感染率变化表示抗疟效果, 血样用光谱分析法 480-680 nm 测定(Hitachi 100-40)和扫描 270-650 nm 光谱(Beckman Du-6 B), 溶血率计算, 取给药前的血样 0.2 ml 加入 3.8 ml 生理盐水(A), 另取 0.2 ml 加入等容量 2.5% 皂素 37°C, 10 min, 使完全溶血, 再加入 3.6 ml 生理盐水(B)。取给药后的血样 0.2 ml, 加入 3.8 ml 生理盐水(C)三个样品经光谱测定后, 以 575 nm 峰值为标准, 计算同一鼠的 A/B 与 C/B 的 % 以示给药前后的溶血率。

谷胱甘肽还原酶(GR)的制备和活力测定 CS 和 CR 感染鼠在平均感染率达约 40% 时, 一组给药(Tab 2), 所用剂量的依据为能引起 CS 超微结构变化, 感染率和精脉下降 50% 的水平。一组为不给药对照。在指定的时间, 二组同时眼眶取血, 经碘化乙基纤维素-葡聚糖凝胶 G-25 柱, 除去白细胞⁽⁶⁾, 反复冻融 3 次获得游离疟原虫, 超声破疟原虫作为 GR 酶液, 反应系

统总体积为 1.5 ml (pH 7.1-7.3), 内含 GSSG 1, NADPH 0.1, KCl 10, NaCl 10, $MgCl_2$ 10 mmol/L⁽⁶⁾及 GR 酶液 0.2 ml 测 340 nm 吸收率。酶活力以氧化 1 nmol NADPH/(mg 蛋白质·min)为一个酶单位·蛋白质用比色法⁽⁷⁾测定。

Results

正常、CS 和 CR 感染小鼠的血红蛋白(Hb)光谱 三者经皂素处理后于 541 和 575 nm 均具有二个典型的 Hb 双峰。四氧嘧啶 iv 后 3 h, 峰型不变, 另在 305 nm 处未见有四氧嘧啶-谷胱甘肽结合物的高峰。以 CS 感染小鼠表示四氧嘧啶治疗前后的 Hb 光谱(Fig 1)。

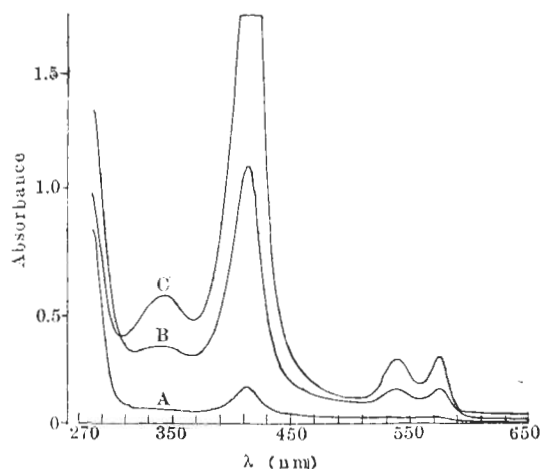


Fig 1. Spectra of released hemoglobin. A) Before treatment; B) 3 h after iv alloxan 150 mg/kg; C) Before treatment, hemolysed by saponin (1:4 dilution).

四氧嘧啶和 5, 6-二氨基 2, 4-二羟基嘧啶的抗疟作用和溶血率 正常 CS, 和 CR 感染的小鼠分别 iv 四氧嘧啶 150 mg/kg, 3 h 后, 感染率分别下降 47 和 50%, 正常与感染小鼠给药后均有溶血, 3 者溶血率相近。iv 5, 6-二氨基 2, 4-二羟基嘧啶后 3 h, CS 和 CR 感染率亦分别下降 47 和 41%, 但无明显溶血现象(Tab 1)。抗疟效果可以持续到给药后 24 h, 使感染率继续下降到约 38%。

Tab 1. Parasitemia and hemolytic effects of alloxan (iv 150 mg/kg) and 5,6-diamino-2,4-dihydroxyl-pyrimidine (DDPM, iv 150 mg/kg) in mice infected by chloroquine-sensitive (CS) and chloroquine-resistant (CR) strains of *Plasmodium berghei*. Number of mice in parentheses. * $P>0.05$, *** $P<0.01$.

	Alloxan		DDPM	
	Before	3 h After	Before	3 h After
Parasitemia (%)				
CS	26±8 (21)	14±4*** (17)	23±5 (19)	12±6*** (16)
CR	19±5 (16)	10±3*** (14)	14±4 (16)	8±3*** (15)
Hemolysis (%)				
Control	-	23±10 (7)	-	-
CS	3±1 (21)	21±10*** (17)	4.8±2.3 (19)	4.1±2.1* (16)
CR	8±4 (16)	32±13*** (12)	3.6±2 (8)	4.4±2.5* (8)

四氧嘧啶及其它抗疟药对疟原虫 GR 活力的影响 四氧嘧啶、环亮氨酸不能降低两个株疟原虫的 GR 活力。青蒿素及咯萘啶对 CS 疟原虫中的 GR 活力有抑制作用,但对 GR 疟原虫无影响。而氯喹对 CS 和 CR 疟原虫中的 GR 活力都可抑制,且酶活力下降的幅度亦相同 (Tab 2)。

Discussion

给 CS 和 CR 感染鼠 iv 四氧嘧啶 30 min 后,即可显示明显的抗疟效果。给四氧嘧啶后的正常小鼠和 CS, CR 感染小鼠都有 20-30% 的溶血率,而经 5,6-二氨基 2,4-二羟基嘧啶治疗后则无明显溶血现象,但是两者均有抗疟作用,故其抗疟机理与溶血似无关。

不少报道认为四氧嘧啶的抗疟机理为 5-羟基巴比妥酸与四氧嘧啶间之循环的氧化-还原而生成 H_2O_2 或其它氧自由基,使疟原虫的还原型谷胱甘肽 (GSH) 量减低⁽⁸⁾,但是本文扫描 270-650 nm 光谱中 305 nm 处未见有四氧嘧啶-谷胱甘肽的结合峰。观察了它对两个株感染的红细胞中的 GSH 量的影响,其结果与

Tab 2. Effects of 5 antimalarial drugs on activity of glutathion reductase (GR) in mice infected by CS and CR strains of *P. berghei*. Number of samples in the parentheses, each sample (4 mice) determined in duplicate. * $P>0.05$, *** $P<0.01$.

Drug (mg/kg)	Time (h)	Activity ($\bar{x} \pm SD$) 1 nmol NADPH/(mg protein·min)	
		CS	CR
Alloxan (iv)			
0		5.1±1.8(5)	—
50	1	5.2±1.5(10)*	—
Cyclo-leucine (ig)			
0		6.3±1.4(4)	—
80×2	40	7.5±1.3(8)*	—
Artemisinin (ig)			
0		8.3±1.1(6)	6.5±0.3(4)
100	10	4.4±1.2(11)***	6.7±1.2(9)*
Pyronaridine(ig)			
0		9.8±0.1(4)	7.3±1.1(4)
6	3	4.0±1.2(10)***	6.9±1.2(10)*
Chloroquine (ip)			
0		7.9±1.2(7)	9.5±1.3(5)
5	2	3.6±1.1(10)***	3.8±1.8(5)***

文献 (1) 相一致,无明显下降,进而证明了它对两个株的 GR 活力亦无抑制作用。因此四氧嘧啶的抗疟机理似亦与 GSH 量无关。已知乙胺嘧啶的抗疟机理是抑制了疟原虫的二氢叶酸还原酶⁽⁹⁾。而四氧嘧啶与 5,6-二氨基 2,4-二羟基嘧啶都是嘧啶结构,故其抗疟作用,可能是与嘧啶结构有关。但是如此迅速的抗疟作用仅以抑制二氢叶酸还原酶是难以出现的。Krooth⁽¹⁰⁾报道疟原虫具有嘧啶自身合成途径的酶系,巴比妥酸可以抑制其中的二氢乳清酸脱氢酶。而四氧嘧啶还原后产生的 5-羟基巴比妥酸以及 5,6-二氨基 2,4-二羟基嘧啶和巴比妥酸的结构是相类似的, Jaffe⁽¹¹⁾报道了疟原虫中的二氢乳清酸脱氢酶可与细胞色素呼吸链中的泛醌相连,将电子直接供给呼吸链。故四氧嘧啶和 5,6-二氨基 2,4-二羟基嘧啶的抗疟作用有可能通过抑制二氢乳清酸脱氢酶而影响呼吸;报道中提示疟原虫的泛醌和哺乳类有异,攻击此点有可能作为药物的靶点。因此为发掘新抗疟药对嘧啶类化合物作进一步研究是值得的,此外,青蒿素、咯萘啶、氯喹都能显

著地抑制 CS 疟原虫中的 GR 活力, 它与抗疟作用的关系尚待研究。

致谢 本所中心仪器室王鸣杰同志进行光谱扫描测定

References

- 1 Pollack S, George JN, Crosby WH. Effects of agents simulating the abnormalities of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cell on *Plasmodium berghei* malaria. *Nature* 1966; 210 : 33
- 2 Clark IA, Hunt NH. Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasite death in malaria. *Infect Immun* 1983; 39 : 1
- 3 Arese P. Favism—a natural model for the study of hemolytic mechanism. *Rev Pure Appl Pharmacol Sci* 1982; 3 : 155
- 4 Gu HM, Warhurst DC, Peters W. Hemolysis induced by artemisinin and its derivatives *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin* 1986; 7 : 269
- 5 Huang ZY, Fu XL, Wu KY, Wang JJ.

- Effects of chloroquine on polyamines and nucleic acid of malaria parasites. *Acta Pharmacol Sin* 1987; 8 : 63
- 6 Bhatia A, Charet P. Action de la chloroquine sur le métabolisme du glutathion chez l'hématie parasitée par *Plasmodium berghei*. *Ann Parasitol Hum Comp* 1984; 59 : 317
 - 7 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
 - 8 Clark IA, Cowden WB, Butcher GA. Free oxygen radical generators as antimalarial drugs. *Lancet* 1983; 1 : 234
 - 9 Report of a WHO scientific group. Chemotherapy and drug resistance. *WHO Tech Rep Ser* 1987; 743 : 135
 - 10 Krooth RS, Wu KD, Ma R. Dihydroorotic acid dehydrogenase; introduction into erythrocyte by the malaria parasite. *Science* 1969; 164 : 1073
 - 11 Jaffe JJ, Gutteridge WE. Purine and pyrimidine metabolism in protozoa. *Actual Protozool* 1974; 1 : 23