

吡喹酮对日本血吸虫摄入与释放5-羟色胺的作用

肖树华 邵葆若 王翠英 郭惠芳 焦佩英 哈淑华

(中国医学科学院寄生虫病研究所, 上海)

提要 用体内、体外方法观察了吡喹酮对血吸虫摄入与释放5-羟色胺的作用。根据试验结果分析, 认为由于吡喹酮不增加虫体的内源性5-羟色胺含量, 亦不增强其对外源性5-羟色胺的摄入, 故吡喹酮对血吸虫的兴奋与挛缩作用可能并非通过5-羟色胺。

感染家兔体内的合抱日本血吸虫5-羟色胺含量为 $1.59 \pm 0.44 \mu\text{g/g}$ 湿重; 雌、雄虫的则分别为 1.08 ± 0.11 和 $2.28 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$ 湿重。感染小鼠体内的合抱血吸虫5-羟色胺含量为 $1.14 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$ 湿重。血吸虫的内源性5-羟色胺相当稳定, 在体外培养6小时后未见明显减少。培养液中的5-羟色胺浓度高达 $5 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 时, 血吸虫对5-羟色胺始有较明显的摄入, 且摄入后易于释放。

近年来, 有关血吸虫神经生理研究的结果表明, 曼氏血吸虫体内含有三种神经介质, 即抑制血吸虫活动的乙酰胆碱、兴奋血吸虫活动的5-羟色胺以及松弛虫的纵肌而使虫体伸长的去甲肾上腺素^(1~3)。日本血吸虫除含有这三种神经介质外, 尚查见多巴胺⁽³⁾, 其生理功能与去甲肾上腺素相同。由于血吸虫的正常生理活动有赖于上述神经介质的协调作用, 故药物对这些神经介质及有关酶的影响, 必然引起虫的活动功能紊乱。一般认为, 在抗曼氏血吸虫药物中, 副玫瑰苯胺、敌百虫和羟萘酮均系通过干扰虫的乙酰胆碱酯酶, 乙酰胆碱受体或5-羟色胺而起作用^(4~7)。体外试验证明, 血吸虫经吡喹酮作用时, 最先的明显反应为活动兴奋⁽⁸⁾。为了解其发生机理是否与5-羟色胺有关, 乃进行了实验观察。

方 法

(一) 血吸虫

1. 体外培养试验

家兔于接种日本血吸虫尾蚴1,500~2,000条后5~6周解剖, 自其体内取合抱的雌、雄虫, 置于盛有小牛血清-台氏液(1:1)的改良卡氏瓶中, 然后根据试验要求, 或直接进行培养, 或于加入不同浓度的5-羟色胺及其它药物后培养1~6小时。每毫升培养液含青霉素与链霉素各500单位。每一卡氏瓶的容量为8 ml, 培养合抱血吸虫30~40对。培养的温度为36~37°C。

当培养终止时, 迅速将培养液吸去, 注入冰冷的台氏液洗涤3次, 然后用滤纸将虫吸干, 称取湿重, 测定5-羟色胺含量。

2. 体内试验

小鼠于感染100~120条日本血吸虫尾蚴后4~5周, 一次灌胃吡喹酮悬液500 mg/kg, 4及24小时解剖, 用含肝素的冰冷台氏液灌注肝脏取虫, 经用台氏液洗涤3次后, 或直接测定其5-羟色胺含量, 或进行上述体外培养试验后再行测定。

(二) 5-羟色胺的测定

按 Gurzon法⁽⁹⁾测定血吸虫的5-羟色胺,所用的仪器为Hitachi MPF-4型荧光分光光度计。用此法测定5-羟色胺浓度为0.04~0.64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,荧光强度成直线;将一定量的5-羟色胺加至血吸虫匀浆中作提取回收试验,回收率为92.3~101%。

试验结果

(一) 正常日本血吸虫的5-羟色胺含量

寄生在家兔体内的虫龄为5~6周的合抱雌、雄虫的5-羟色胺含量为 $1.59 \pm 0.44 \mu\text{g}/\text{g}$ 湿重(13次试验)。将雌、雄虫分别测定时,前者为 $1.08 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{g}$ 湿重(6次试验),后者为 $2.28 \pm 0.23 \mu\text{g}/\text{g}$ 湿重(6次试验)。

(二) 正常日本血吸虫对5-羟色胺的摄入

当培养液中的5-羟色胺浓度低于 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 时,血吸虫的5-羟色胺含量无明显变化,虫体的活动亦无明显兴奋。浓度为 $1 \sim 2 \times 10^{-4} \text{M}$ 时,虫体于培养1小时后的含量略有升高,但继续培养2~4小时,则未见有明显增加。浓度增至 $0.5 \sim 1 \times 10^{-3} \text{M}$ 时,两性血吸虫摄入5-羟色胺的量,于培养1~4小时内持续增高,两次试验的结果相仿(图1)。

(三) 正常日本血吸虫对5-羟色胺的释放

1. 内源性5-羟色胺

自感染兔体内取出的合抱雌、雄虫,立即或经体外培养2~6小时后测定其5-羟色胺含量,未见有明显变化(表1)。

表1 日本血吸虫在小牛血清-台化液(1:1)中培养不同时间后的5-羟色胺含量

培 养 时 间 (hr)	血 吸 虫 5-羟 色 胺 含 量* ($\mu\text{g}/\text{g}$ 湿重,均值 \pm 标准误)
0	1.41 ± 0.10 (4)
2	1.34 ± 0.09 (4)
4	1.37 ± 0.18 (3)
6	1.45 ± 0.12 (4)

* 每组40对合抱血吸虫;
()为试验次数。

2. 外源性5-羟色胺

取合抱的血吸虫,以40对和30对为一组,分别于用含5-羟色胺 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 和 $1 \times 10^{-3} \text{M}$ 的培养液培养2小时后,将培养液吸去,用冰冷的台氏液洗涤3次,再注入不含5-羟色胺

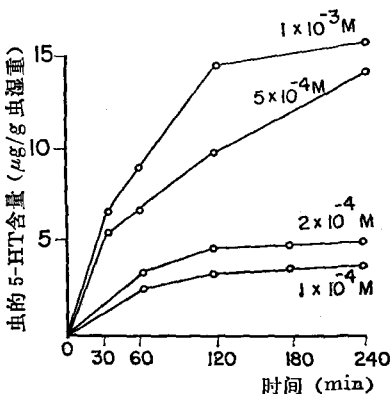


图1 日本血吸虫外源性5-HT的摄入

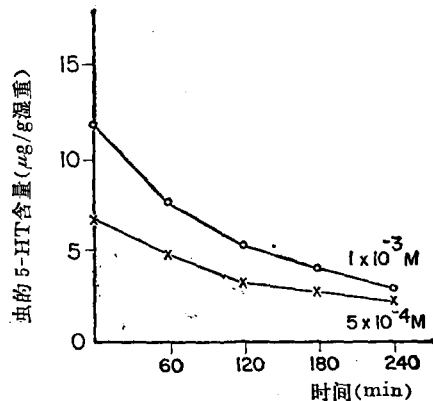


图2 日本血吸虫对摄入的5-HT的释放

的小牛血清-台氏液, 继续培养 1~4 小时, 然后测定虫的 5-羟色胺含量。试验共进行 3 次。结果, 在上述条件下, 日本血吸虫对摄入的 5-羟色胺的释放作用迅速, 4 小时后, 绝大部分已被释放 (图 2)。

(四) 吡嗪酮对日本血吸虫摄入与释放 5-羟色胺的影响

1. 体外试验(表 2)

(1) 对血吸虫内源性 5-羟色胺的释放作用 两性血吸虫用含吡嗪酮 $3.2 \times 10^{-6} \sim 3.2 \times 10^{-5} M$ 的培养液培养 4 小时后, 其体内的 5-羟色胺含量与对照组的相近, 差别不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 吡嗪酮对体外培养的日本血吸虫摄入与释放 5-羟色胺的影响

吡嗪酮浓度 (M)	血吸虫内源性 5-羟色胺的含量* ($\mu g/g$ 湿重, 均值 \pm 标准误)	血吸虫对外源性 5-羟色胺的摄入量** ($\mu g/g$ 湿重, 均值 \pm 标准误)	血吸虫摄入的外源性 5-羟色胺释放后的残留量*** ($\mu g/g$ 湿重, 均值 \pm 标准误)
0	1.42 \pm 0.07 (5)	8.90 \pm 1.19 (6)	5.30 \pm 0.63 (5)
1.6×10^{-8}		6.49 \pm 1.40 (5)	
1.6×10^{-7}	1.53 \pm 0.07 (5)	7.42 \pm 1.10 (6)	5.34 \pm 0.80 (5)
3.2×10^{-6}	1.28 \pm 0.09 (5)	5.50 \pm 0.74 (6)	5.69 \pm 0.89 (5)
3.2×10^{-5}	1.21 \pm 0.12 (5)	5.50 \pm 0.60 (6)	6.56 \pm 1.51 (4)

* 血吸虫用含不同浓度吡嗪酮的培养液培养 4 小时, 每组 40 对合抱虫;

** 血吸虫先用含不同浓度吡嗪酮的培养液培养 1 小时, 然后加入 $5 \times 10^{-4} M$ 的 5-羟色胺, 继续培养 2 小时, 每组 40 对合抱虫;

*** 血吸虫先用含 $1 \times 10^{-8} M$ 的 5-羟色胺培养 1 小时, 然后移去 5-羟色胺, 用含不同浓度吡嗪酮的培养液继续培养 1 小时, 每组 30 对合抱虫;

() 为试验次数。

(2) 对血吸虫摄入外源性 5-羟色胺的影响 血吸虫先用含不同浓度吡嗪酮的培养液培养 1 小时, 然后加入 5-羟色胺, 最终浓度为 $5 \times 10^{-4} M$, 继续培养 2 小时后, 测定虫的 5-羟色胺含量。结果, 吡嗪酮的浓度为 $3.2 \times 10^{-6} \sim 3.2 \times 10^{-5} M$ 时, 血吸虫摄入的 5-羟色胺量较对照组的显著为少 ($P < 0.05$)。

(3) 对血吸虫摄入的外源性 5-羟色胺的释放作用 血吸虫先与含 5-羟色胺 $1 \times 10^{-3} M$ 的培养液接触 1 小时, 然后吸去含 5-羟色胺的培养液, 用含不同浓度的吡嗪酮继续培养 1 小时, 观察 5-羟色胺的释放量。结果, 未见吡嗪酮对血吸虫摄入的 5-羟色胺的释放有明显的影响。

2. 体内试验(表 3)

表 3 感染小鼠一次口服吡嗪酮 500 mg/kg 4 及 24 小时后血吸虫在体外摄入与释放 5-羟色胺的量

给药后时间 (小时)	血吸虫 5-羟色胺的含量 ($\mu g/g$ 湿重, 均值 \pm 标准误)	血吸虫对外源性 5-羟色胺的摄入量* ($\mu g/g$ 湿重, 均值 \pm 标准误)	血吸虫摄入的外源性 5-羟色胺释放后的残留量** ($\mu g/g$ 湿重, 均值 \pm 标准误)
4	1.12 \pm 0.08 (9)	9.86 \pm 0.47 (7)	5.28 \pm 0.56 (4)
24	0.89 \pm 0.06 (9)	10.40 \pm 1.36 (7)	—
对照	1.14 \pm 0.1 (9)	10.44 \pm 1.14 (8)	3.88 \pm 0.21 (4)

* 血吸虫用含 5-羟色胺 $1 \times 10^{-3} M$ 的培养液培养 1 小时, 每组 30 对雌雄虫;

** 血吸虫先用含 5-羟色胺 $1 \times 10^{-3} M$ 的培养液培养 1 小时, 然后移去 5-羟色胺, 用不含 5-羟色胺的培养液继续培养 1 小时, 每组 30 对雌雄虫。

() 为试验次数。

感染小鼠一次口服吡喹酮 500 mg/kg 后 4 小时解剖, 虫的 5-羟色胺含量与对照组相仿, 若 24 小时解剖, 则较对照组的显著为少 ($P < 0.05$)。取上述二组虫用含 5-羟色胺 $1 \times 10^{-3} M$ 的培养液培养 1 小时, 其摄入的 5-羟色胺量与对照组相似, 但给药 4 小时组的血吸虫释放其摄入的外源性 5-羟色胺后的残留量, 较对照组的显著为高 ($P < 0.05$)。

讨 论

Baker 等在观察乙酰胆碱对曼氏血吸虫的作用时, 发现 5-羟色胺具有兴奋曼氏血吸虫的作用⁽¹⁾。其后, 经 Bennett 等^(10~12)、Tomosky 等⁽²⁾ 和 Chou 等⁽³⁾ 证实寄生人体的三种血吸虫均含有 5-羟色胺, 并根据其生理功能, 认为 5-羟色胺即系兴奋血吸虫活动的神经介质。同时指出, 虽然 5-羟色胺在日本血吸虫体内的分布与曼氏血吸虫的相仿, 但日本血吸虫的含量较低, 且无储存 5-羟色胺的结构。我们用 Gurzon 法测得的日本血吸虫合抱雌、雄虫的 5-羟色胺含量与 Chou 等⁽³⁾ 用 Synder 法所测得的相仿, 但取自小鼠体内的日本血吸虫的含量, 较取自家兔的显著为低, 这种现象亦存在于取自不同宿主的曼氏血吸虫中⁽¹²⁾, 并认为主要与宿主血液的 5-羟色胺含量有关。

日本血吸虫摄入外源性 5-羟色胺所需的 5-羟色胺最佳浓度为 $5 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-3} M$, 较曼氏血吸虫所需的 $2 \times 10^{-5} M$ 为高, 同时, 在此较低浓度下, 5-羟色胺对日本血吸虫只有微弱的兴奋作用。这表明 5-羟色胺的生理功能在不同虫种间可能存在着差异。

在探讨吡喹酮对日本血吸虫的 5-羟色胺的作用时, 观察到体外培养的血吸虫在药物持续作用下, 其内源性的 5-羟色胺无明显变化, 对外源性 5-羟色胺的摄入则有明显抑制, 但对已摄入的 5-羟色胺的释放则无明显影响。另一方面, 经吡喹酮作用 24 小时的小鼠体内的血吸虫的内源性 5-羟色胺明显减少, 但对外源性 5-羟色胺的摄入无明显影响, 而对摄入的外源性 5-羟色胺的释放则有明显的抑制。这种差异可能是虫体在体内与体外受药物作用条件不同的缘故。即使这样, 由于体内、体外的血吸虫经吡喹酮作用后, 其 5-羟色胺含量未见有明显增加, 亦未能增加对外源性 5-羟色胺的摄入, 故吡喹酮对血吸虫的兴奋与牵缩, 可能不是通过 5-羟色胺起作用。

参 考 文 献

1. Barker L R, et al: The possible role of acetylcholine in *Schistosoma mansoni*. *Br J Pharmacol Chemother* 28:656, 1966
2. Tomosky T K, et al: Tryptaminergic and dopaminergic responses of *Schistosoma mansoni*. *J Pharmacol Exp Ther* 190:260, 1974
3. Chou T-CT, et al: Occurrence and concentration of biogenic amines in trematodes. *J Parasitol* 58:1098, 1972
4. Bueding E, et al: Some physiological biochemical and morphologic effects of tris (p-aminophenyl) carbonium salt (TAC) on *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 16:500, 1967
5. Bueding E, et al: Inhibition by metrifonate and dichlorvos of cholinesterases in schistosomes. *Br J Pharmacol Chemother* 48:480, 1972
6. Chou T-CT, et al: Effect of hycanthone and of two of its analogs on levels and uptake of 5-hydroxytryptamine in *Schistosoma mansoni*. *J Pharmacol Exp Ther* 186:408, 1973
7. Senft A W, et al: *Hycanthone effects on schistosomes and its likely mode of action*, p619, Van den Bossche ed, c Janssen Research Foundation, Published by Elsevier/North-Holland Biochemical Press-Amsterdam, 1976
8. 肖树华等: 吡喹酮对日本血吸虫的作用方式. *中国药理学报* 1:58, 1980
9. Curzon G, et al: Rapid method for the determination of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in small regions of rat brain. *Br J Pharmacol* 39:654, 1970
10. Bennett J, et al: Occurrence and levels of 5-hydroxytryptamine in *Schistosoma mansoni*. *Mol*

Pharmac 5:542, 1969

11. Bennett J, et al: Localization of biogenic amines in *Schistosoma mansoni*. *Comp Biochem Physiol* 39A:859, 1971
12. Bennett J, et al: Uptake of 5-hydroxytryptamine by *Schistosoma mansoni*. *Mol Pharmac* 9:311, 1973

THE EFFECT OF PYQUITON ON THE UPTAKE AND RELEASE OF 5-HYDROXYTRYPTAMINE IN *SCHISTOSOMA JAPONICUM*

Xiao Shuhua, Shao Baoruo, Wang Guiying, Guo Huifang,

Jiao Peiying and Ha Shuhua

(*Institute of Parasitic Diseases, Academy of Medical Sciences, Shanghai*)

ABSTRACT

It was found by *in vitro* and *in vivo* tests, that pyquiton neither increased the endogenous 5-hydroxytryptamine (5-HT) concentration of the worms nor did it increase the uptake of exogenous 5-HT. It was suggested, therefore, that 5-HT might not play an important role in the stimulation and spasmodic contraction of the worms induced by pyquiton.

The 5-HT concentration of male and female *Schistosoma japonicum* was 2.28 ± 0.23 and 1.08 ± 0.11 $\mu\text{g/g}$ (wet weight) respectively, while that of the paired worms, 1.59 ± 0.44 $\mu\text{g/g}$ (wet weight). The endogenous 5-HT level of schistosomes was rather stable and no apparent change was observed after the worms were maintained in culture medium for 6 hours. When schistosomes were incubated in the medium containing a high concentration of 5-HT (5×10^{-4} M or 1×10^{-3} M) for 4 hours, the amount of 5-HT removed by the worms was significant. However, the 5-HT take up by the worms was released promptly after transferred to a 5-HT-free medium.