

肝片形吸虫体内 5-羟色胺的生成与降解¹

诸葛荣华、戎耀方 (南京农业大学药理教研室, 南京 210014)

提要 用 HPLC 和 [³H]TRP、[³H]5-HTP 及 [³H]5-HT 示踪技术, 确认肝片形吸虫体内存在 5-HT 和其前体 5-HTP、TRP 以及其降解产物 5-HIAA。其生物合成和生物降解的途径与哺乳动物相似。其酶的特性与哺乳动物相应的酶存在异同性。虫体内 5-HT 的来源除合成外, 还能从周围环境中摄取。5-HT 拮抗药赛庚啶能抑制虫体对外界 5-HT 的摄取。

关键词 生物合成; 生物降解; 血清素; 肝片吸虫; 色氨酸; 5-羟色氨酸; 5-羟吲哚乙酸; 赛庚啶

5-羟色胺(5-HT)对肝片形吸虫(*Fasciola hepatica*)和其他某些扁形蠕虫有强大的兴奋作用^(1,2), 通过检测已确认了在数种扁形蠕虫体内有它的存在⁽³⁻⁵⁾, 可能是这些蠕虫体内一个兴奋性递质。由于荧光光度法检测检样的结果与标准品有差异, 对肝片形吸虫体内是否确实存在 5-HT 有不同的看法^(4,6)。本实验应用 HPLC 和核素示踪的技术以确证肝片形吸虫体内是否存在 5-HT 及其生成和降解的系统, 从而确认它为该虫的一个神经递质。

材 料 和 方 法

肝片形吸虫的采集与培养 采集和保存的方法均与前文⁽¹⁾相同。供测定用的虫体, 用蒸馏水冲洗数次, 用滤纸吸干, 称重, 放于低温冰箱(-30℃)中保存或立即供测定。供培养的虫体先放在 Rohrbacher 氏培养液中平衡培养 5 min, 再移至分别含不同药物或 ³H 标记的 5-HT 及其前体的培养液中培养一定时间取出, 用蒸馏水冲洗数次, 置于甲酸 0.01 mol/L 溶液中 5-10 min, 滤纸吸干以后的步骤与上相同。每次检测都取 15 条以上的吸虫, 分 4 次或 4 次以上测定。

试剂与药物 5-羟色胺硫酸肌酐, 上海化学试剂商店; 5-羟色氨酸(5-HTP), 美国 Koch-Lights 药厂; 色氨酸(TRP), 美国 L Light 公司; 5-羟吲哚乙酸(5-HIAA), 瑞士 Fluka AG 公司; 对氯苯丙氨酸(PCPA), 英国 Koch-Lights 药厂; 异丙异烟肼(IPR), 美国 Sigma 公司; 反苯环丙胺(TCPA), 美国 Sigma 公司; 赛庚啶, 美国 Sigma 公司。[³H]TRP (96.2 GBq/

1987年5月6日收稿 1987年11月23日接受

¹国家自然科学基金资助的课题 № 3870467

mmol); [^3H] 5-HTP (196.1 GBq/mmol); [^3H]5-HT (11.1 GBq/mmol)均由中国科学院原子能研究所供给。

色谱系统 高效液相色谱仪为 Waters 公司 244 型, 由 510 型泵, U6K 通用进样器, Wisp 710 B 自动进样器, μ -Bondapak C_{18} 反相层析柱 (100 \times 8 mm i.d.), Lambda-max 481 型液相色谱紫外检测器(选择 254 nm 或 275 nm 为工作波长)和 M 730 型数据处理机所组成。洗脱液为含 PICB₇ 5.5 mmol/L 和 30% 甲醇的醋酸/醋酸钠 0.01 mol/L 缓冲液(pH 3.7), 在临用前经 DOA-VBO-BN 型真空泵脱气, 过滤。在进样量 20 ml, 流速 2 ml/min, 柱压 1.4 MPa, 灵敏度 0.005 AUBS 和室温(24 $^{\circ}\text{C}$)条件下检测。

5-HT、TRP、5-HTP 和 5-HIAA 检样的定量测定 先将虫体解冻, 放在玻璃匀浆器中, 加 3 倍于虫体重量(g)的含 NaHSO_3 0.4 mmol/L 的甲酸 0.01 mol/L 溶液, 制成匀浆。在日立 ScR20BC 超速离心机 4 $^{\circ}\text{C}$ 21 000 $\times g$ 离心 15 min, 取其上清液。取 0.5 ml 上清液于试管中真空干燥, 加入 50 μl 洗脱液, 注入层析柱。流出液经反相离子对色谱分离, 紫外分光光度自动检测, 得色谱图, 并由数据处理机提供检样各峰的峰面积。将峰面积代入事先做好的各种化合物的标准曲线的回归方程, 除以回收率(范围为: 5-HT 和 TRP 80-85%, 5-HTP 84-88%, 5-HIAA 82-86%), 校正浓缩倍数, 最后换算成各种化合物的含量, 即为检样的定量。

[^3H]5-HT 的生成与降解 将上述经平衡培养的肝片形吸虫移入分别含 [^3H]TRP 1.9 $\mu\text{mol/L}$, [^3H]5-HTP 0.38 $\mu\text{mol/L}$ 或 [^3H]5-HT 6.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 Rohrbacher 氏液, 再分别加无标记的 TRP、5-HTP 和 5-HT 补充使总浓度均成为 10 $\mu\text{mol/L}$, 在此培养液中继续培养 3, 6, 12 h, 然后同前, 经匀浆、离心和色谱分离, 在仪器收集口按峰收集流动液入相应的闪烁瓶内。每一瓶加 6 ml 闪烁液(含 0.5% PPO 和 0.04% POPOP 的二甲苯 2 : Triton X-100 1),

在 40 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中加温 0.5-1 h, 冷却后在 Beckman-LS 9800 型液闪计数器上测定各瓶的峰放射强度。组织中总放射强度的测定: 取同一样品的匀浆液 0.2 ml 加入闪烁瓶内, 再加 0.2 ml 60% 高氯酸和 0.6 ml 3% 双氧水, 在 75-80 $^{\circ}\text{C}$ 下消化 0.5 h, 冷却后再加入 7 ml 闪烁液(除不含 POPOP 外, 余同前), 按上述方法作液闪测定。峰放射百分比(%) = 峰放射强度(dpm/g)/总放射强度(dpm/g)。

5-HT 的摄取试验 将平衡培养后的吸虫移入含 [^3H]5-HT 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 的培养液或移入除 [^3H]5-HT 外再加有赛庚啶 100 $\mu\text{mol/L}$ 的培养液内培养 75 min, 再经冲洗, 吸干, 将全虫或沿腹吸盘下剪断而分成“头”、“尾”两部分, 分别称重和匀浆。按上述测总放射强度同样的步骤进行液闪测定。

结 果

5-HT 及其有关化合物的定量 肝片形吸虫 HPLC 色谱图中有 4 个峰与标准物峰的 Rt 值相当(图 1), 将工作波长从 254 nm 调至 275 nm, 两者的 Rt 值均未发生变化; 确证在虫体内存在 5-HT、5-HTP、5-HIAA 和 TRP。它们的含量见表 1。在实验中也发现, 虫体 5-HT 和 5-HTP 含量随培养时间的延长而下降, 到 6 h 5-HT 和 5-HTP 的量分别下降到 $0.82 \pm \text{SD}$ 0.17 $\mu\text{g/g}$ 湿重和 $1.32 \pm 0.26 \mu\text{g/g}$ 湿重, 只相当于正常测定量的 66.6% 和 28.5%。如果在培养液中加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-HTP, 培养 6 h, 虫体 5-HT 的含量则有非常显著的增加 ($1.89 \pm 0.30 \mu\text{g/g}$ 湿重), 但加 TRP 当其浓度达 500 $\mu\text{mol/L}$ 时则能阻止 5-HT 的下降而维持在 $1.08 \pm 0.24 \mu\text{g/g}$ 湿重的水平(图 2)。

[^3H]TRP、[^3H]5-HTP 和 [^3H]5-HT 的代谢 将吸虫在含 [^3H]TRP 的培养液中培养 3、6 和 12 h, 其甲酸提取物经分离和放射测定, 表明有不同强度的放射性参入 5-HT、5-HTP 和 5-HIAA, 结果列于表 2。将吸虫在含 [^3H]5-HTP 的培养液中培养 3、6 和 12 h, 其提

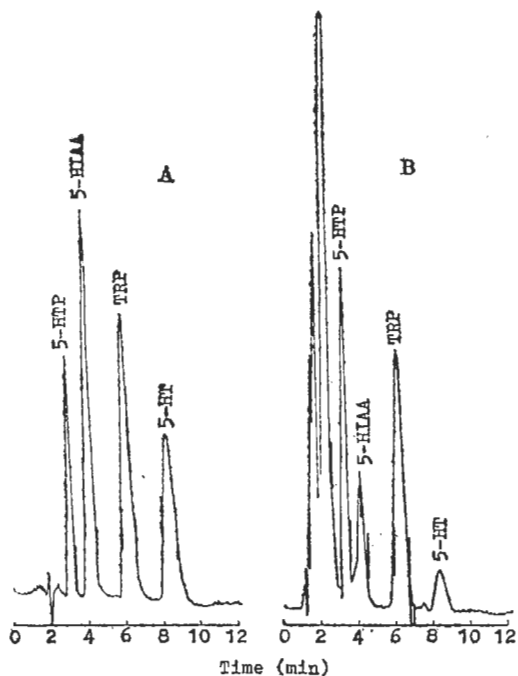


Fig 1. A) Standard chromatograms of tryptophan (TRP), 5-hydroxytryptophan (5-HTP), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and serotonin (5-HT). B) Typical chromatogram of the extracted product of *F hepatica* separated by reverse-phase ion-pair HPLC.

取物经分离和测定，有不同强度的放射性参入 5-HT 和 5-HIAA，其结果列于表 2。将吸虫直接在加有 [^3H]5-HT 的培养液中培养 3、6 和 12 h，同样分别有 10.2%、9% 和 11% 的放射性参入 5-HIAA。

对氯苯丙氨酸、异丙异烟肼、反苯环丙胺和赛庚啉对虫体内 5-HT 含量的影响 将吸虫

Tab 1. Levels of 5-HT and its related compounds in *F hepatica*. n=4, $\bar{x}\pm\text{SD}$ ($\mu\text{g/g}$ wet weight). * $p>0.05$, ** $p<0.05$ vs whole fluke

Fluke	Whole	Heads	Tails
TRP	7.2 ± 0.5	$7.2\pm 0.6^*$	$7.2\pm 0.4^*$
5-HTP	4.6 ± 0.7	$4.9\pm 0.8^*$	$4.5\pm 0.7^*$
5-HT	1.23 ± 0.21	$1.42\pm 0.23^{**}$	$1.21\pm 0.19^*$
5-HIAA	1.51 ± 0.16	$1.72\pm 0.21^{**}$	$1.64\pm 0.18^*$

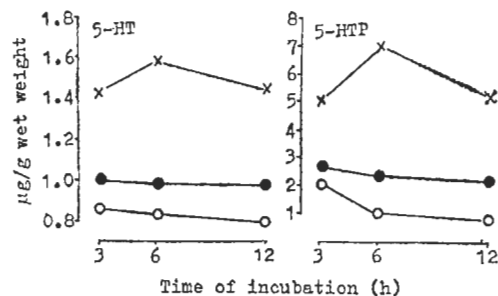


Fig 2. The levels of 5-HT and 5-HTP in the tissue of *F hepatica* after incubation for 3, 6 and 12 h in the absence (\circ , n=6) or presence of tryptophan 500 $\mu\text{mol/L}$ (\bullet , n=4) or 5-hydroxytryptophan 100 $\mu\text{mol/L}$ (\times , n=4).

分别放在加有上述各药 (100 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液中培养 6 h，用 HPLC 对 5-HT 等的含量进行测定。色氨酸羟化酶抑制剂 PCPA 不改变虫体内 5-HTP 等化合物的含量。单胺氧化酶抑制剂 IPR 和 TCPA，前者可增加虫体 5-HT 的含量，减少 5-HIAA 的含量，而后者对虫体内 5-HT 和 5-HIAA 含量的影响在统计学上没有

Tab 2. Metabolism of [^3H]tryptophan (A) and [^3H] 5-hydroxytryptophan (B) by intact *F hepatica* after 3, 6 and 12 h incubation. n=4, $\bar{x}\pm\text{SD}$. * $p>0.05$, ** $p<0.05$, *** $p<0.01$ vs 3 h

Compounds	3 h		6 h		12 h		
	dpm/g	% [†]	dpm/g	%	dpm/g	%	
A	5-HT	36 ± 9	2.2	$39\pm 11^*$	2.4	$38\pm 11^*$	2.3
	5-HTP	121 ± 36	7.3	$130\pm 42^*$	8.0	$134\pm 41^*$	8.2
	5-HIAA	23 ± 8	1.4	$49\pm 14^{**}$	3.0	$81\pm 27^{***}$	5.1
	TRP	1411 ± 288	85.4	$1330\pm 302^{**}$	81.4	$1307\pm 260^{**}$	80.3
B	5-HT	123 ± 27	11.3	$130\pm 34^*$	12.0	$150\pm 48^{**}$	14.0
	5-HIAA	28 ± 11	2.6	$38\pm 14^*$	3.5	$44\pm 16^{**}$	4.1
	5-HTP	851 ± 226	78.0	$812\pm 189^{**}$	75.0	$784\pm 180^{***}$	73.1

[†] % of total radioactivity recovered in flukes

Tab 3. Effect of enzyme inhibitors and antagonists on 5-HT (100 μ mol/L) and its related compounds levels in *F. hepatica*, 6 h incubation. $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs control

Group (100 μ mol/L)	μ g/g wet weight			
	5-HT	5-HTP	TRP	5-HIAA
Control	0.84 \pm 0.14	1.36 \pm 0.25	5.00 \pm 0.75	0.49 \pm 0.14
p-Chlorophenylalanine	0.67 \pm 0.22*	1.21 \pm 0.20*	5.32 \pm 0.74*	0.44 \pm 0.06*
Iproniazid	1.16 \pm 0.24**	1.31 \pm 0.30*	4.93 \pm 0.66*	0.29 \pm 0.04**
Tranlycypamine	0.89 \pm 0.17*	1.32 \pm 0.24*	5.61 \pm 0.70*	0.49 \pm 0.13*
Serotonin	5.75 \pm 0.92***	3.82 \pm 0.76***	5.22 \pm 0.71*	1.50 \pm 0.23***
Cyproheptadine	0.94 \pm 0.32*	1.13 \pm 0.63*	5.67 \pm 0.48*	0.53 \pm 0.24*

显著差异。由于本实验室没有特异的脱羧酶抑制剂，就采用在培养液中加高浓度底物 5-HT (100 μ mol/L) 抑制脱羧酶的方法，结果 5-HTP 的含量有非常显著的增加。5-HT 拮抗药赛庚啶对虫体 5-HT 及其有关化合物的含量没有显著影响(表 3)。

赛庚啶对虫体摄取外源性 5-HT 的影响

经 [3 H]5-HT 培养的全虫或其头部、尾部的匀浆，经过 4 次测定，其放射性强度分别为 1268 \pm 352, 1414 \pm 380 和 984 \pm 261 dpm/g 湿重，说明肝片形吸虫有摄取周围环境中 [3 H]5-HT 的能力，头部摄取的量多于尾部。加赛庚啶和 [3 H]5-HT 培养的全虫，头部和尾部的匀浆所测出的放射性均低于不加赛庚啶的虫体，分别为 491 \pm 115, 326 \pm 75 和 513 \pm 186 dpm/g 湿重，只相当于前者的 1/2.58, 1/4.33 和 1/1.92。这表明赛庚啶有抑制虫体摄取 5-HT 的作用，头部抑制的程度高于尾部。

讨 论

用 HPLC 反相离子对色谱法证明了吸虫体内存在 5-HT 和 5-HTP 等物质。5-HT 的含量高于用荧光法⁽³⁾或其他方法⁽²⁾测得的量。其原因可能是 5-HT 在荧光法繁复的提取过程中有所损失或虫体处理的时间延续较久而使 5-HT 下降所致。与曼氏血吸虫⁽⁷⁾相类似，肝片形吸虫 5-HT 的含量头部略高于尾部，这或许是由于头部富含神经组织的缘故。

核素示踪显示了肝片形吸虫具有与哺乳动物相似的 5-HT 合成系统，即 TRP 经 TRP 羟

化酶羟基化而转变成 5-HTP，进而再被芳香氨基酸脱羧酶脱羧而生成 5-HT。肝片形吸虫体内是否存在 TRP 的羟基化过程是个悬而未决的问题^(2,3,8)，本实验用核素示踪技术确证了虫体能将 TRP 羟基化，转化为 5-HT。其原因可能是其 TRP 羟化酶与哺乳动物的酶⁽⁹⁾相似，活性很低，促使 TRP 转化成 5-HT 的量仅占 TRP 总量的 2% 左右，用荧光或色谱的方法可能较难显示出来。肝片形吸虫 TRP 羟化酶的性质与哺乳动物的酶又稍有差异，PCPA 是后者酶的有效抑制剂，但不抑制虫体 TRP 羟化酶⁽³⁾。

肝片形吸虫体内的 5-HT 既能自身合成，也能从外界环境摄取。实验揭示，吸虫在不含 TRP 或 5-HTP 的培养液中培养时，5-HT 和 5-HTP 的含量随时间的延长而下降，但如在培养液中加入 TRP 或 5-HTP，则能阻止 5-HT 的下降(图 2)。这说明 5-HT 的内源性合成对维持虫体 5-HT 的稳定是必需的。由于在实验中 [3 H]TRP 参入虫体的量只占 TRP 总量的 2%，目前还难于断定内源合成和外界摄取在生理情况下何者占主导地位。

肝片形吸虫在含 [3 H]TRP、 3 H]5-HTP 和 [3 H]5-HT 的培养液中培养，均有 [3 H]5-HIAA 产生，且其量随时间而增多。它是由 5-HT 经单胺氧化酶(MAO)氧化脱胺的途径而生成。其依据是 MAO 抑制剂 IPR 能减少 5-HIAA 的含量而使 5-HT 积聚。另一哺乳动物 MAO 抑制剂 TCPA 对 5-HT 和 5-HIAA 的量均无影响，这又反映两者的 MAO 的性质存在着差

异。5-HT 拮抗药赛庚啶除能阻断 5-HT 对虫体的兴奋作用⁽¹⁾外, 还能抑制虫体对周围环境 5-HT 的摄取, 但不干扰虫体 5-HT 的生物合成和生物降解。

参 考 文 献

- 1 戎耀方、沈丽琳、赵桂芳. 肝片形吸虫与鸡蛔虫对某些神经递质及药物的反应的比较. 畜牧兽医学报 1984; 15 : 137
- 2 Mansour TE. Pharmacology and biochemistry of parasitic helminthes. In: Garattini S, Shore PA, ed. *Advance in pharmacology and chemotherapeutics*; vol 3. NY: Academic Press, 1964 : 129-65
- 3 王 强、戎耀方. 牛肝片形吸虫体内 5-HT 样物质的研究. 南京农业大学学报 1987; (3) : 103
- 4 Chou TCT, Bennett JL, Bueding E. Occurrence

- and concentrations of biogenic amines in trematodes. *J Parasitol* 1972; 58 : 1098
- 5 Hariri M. Occurrence and concentration of biogenic amines in *Mesocestoides corti* (Cestoda). *Ibid* 1974; 60 : 737
 - 6 Andreini GC, Beretta C, Faustini R, Gallina G. Spectrofluorometric and chromatographic characterization of a butanol extract from *Fasciola hepatica*. *Experientia* 1970; 26 : 166
 - 7 Bennett JL, Bueding E, Timms AR, Engstrom RG. Occurrence and levels of 5-hydroxytryptamine in *Schistosoma mansoni*. *Mol Pharmacol* 1969; 5 : 542
 - 8 Mansour TE, Stone DB. Biochemical effects of lysergic acid diethylamide on the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Biochem Pharmacol* 1970; 19 : 1137
 - 9 许澍淮、陈华粹. 血浆 5-羟色胺的由来及其移除与灭活. 生理科学进展 1983; 14 : 266

Acta Pharmacologica Sinica 1988 May; 9 (3) : 267-271

Biogenesis and degradation of serotonin in *Fasciola hepatica*

ZHU-GE Rong-Hua, RONG Yao-Fang

(Department of Veterinary Pharmacology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014)

ABSTRACT The biogenesis and degradation of serotonin (5-HT) in liver flukes was studied by reverse-phase ion-pair HPLC and radioisotope trace technique. The concentration of 5-HT in *F hepatica* was found to be $1.23 \pm 0.22 \mu\text{g/g}$ wet weight. Incubation of the flukes in [³H] tryptophan resulted in substantial radioactivity recovered in 5-hydroxytryptophan (5-HTP), 5-HT and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA). After 12 h incubation of the flukes in [³H]5-HTP 14% of the total radiolabel in the tissue were also found to comigrate with 5-HT and 4% with 5-HIAA. The levels of 5-HT and 5-HTP in flukes were not influenced by the tryptophan hydroxylase inhibitor *p*-chlorophenylalanine and the 5-HIAA by the monoamine oxidase inhibitor tranylcypamine, but the 5-HT were increased and the 5-HIAA decreased by another monoamine oxidase inhibitor iproniazid. These results

suggested that the enzymes which converted tryptophan to 5-HTP (TRP hydroxylase), 5-HTP to 5-HT (5-HTP decarboxylase), and 5-HT to 5-HIAA (monoamine oxidase) occurred in flukes and that the pathways of serotonin biogenesis and degradation were possibly similar to that in mammals. Some similarities and differences between the enzymes of flukes and mammals were found in the catalytic properties and enzyme-inhibitor affinities. In addition, *F hepatica* could take up 5-HT from exogenous source similar to *S mansoni* and *H diminuta* etc. Cyproheptadine, a 5-HT antagonist, could suppress the uptake of 5-HT by flukes. It is possible that the 5-HT in flukes are both endogenous and exogenous.

KEY WORDS biogenesis; biodegradation; serotonin; *Fasciola hepatica*; tryptophan; hydroxytryptophan; hydroxyindoleacetic acid; cyproheptadine