

GABA 受体拮抗剂荷包牡丹碱和 CGP52432 对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响

王林雨^{1,2}, 史雪^{1,2}, 杨跃明^{1,2}, 王雨晴^{1,2},
梁箫^{1,2}, 杨金龙^{1,2,3}, 李一峰^{1,2*}

(1. 上海海洋大学, 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

3. 南方海洋科学与工程广东省实验室, 广东广州 511458)

摘要: 为研究 GABA 及其受体拮抗剂荷包牡丹碱 (GABA_A 受体) 和 CGP52432 (GABA_B 受体) 在厚壳贻贝幼虫附着变态中的调控作用, 实验通过分析厚壳贻贝不同发育阶段幼虫转录组数据获得 GABA 受体相关蛋白基因 (*GABARAP*) 和 GABA_{B2} 受体基因 (*GABA_{B2}R*), 发现 *GABA_{B2}R* 在变态前期的眼点幼虫阶段相较于其他阶段幼体显著高表达。通过实时荧光定量 PCR 验证也得到相似的表达模式, 显示 *GABA_{B2}R* 可能参与调控厚壳贻贝幼虫变态发育。药理学实验结果显示, 10⁻⁴ mol/L GABA 对厚壳贻贝幼虫的变态具有诱导活性 (27.2%±3.0%)。在拮抗剂实验中, 10⁻⁶~10⁻⁴ mol/L 荷包牡丹碱和 CGP52432 均显著抑制了厚壳贻贝幼虫变态, 且抑制作用随浓度升高而增强。实验还发现 GABA 及其受体拮抗剂都抑制了厚壳贻贝幼虫的游泳行为。研究表明, GABA_A 或 GABA_B 受体拮抗剂均对厚壳贻贝幼虫附着变态具有抑制作用, GABA 受体可能参与调控厚壳贻贝幼虫附着变态过程。

关键词: 厚壳贻贝; GABA 受体; 幼虫; 附着变态

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

贻贝是重要的世界性养殖贝类, 2019 年我国贻贝产量达 87 万 t^[1], 是继牡蛎、蛤和扇贝后的第四大海产贝类。贝类养殖不仅满足消费者对于鲜活、优质海产品的需求, 同时对国家蓝色海洋可持续发展起着非常重要的作用。厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 作为我国贻贝养殖的主要品种之一, 在其生活史中需要经历一个不可逆的附着变态过程, 由营浮游生活的幼虫转变为底栖生活的成体^[2-3]。在人工育苗过程中经常发生幼虫在附着变态阶段的大规模死亡现象, 直接影响着贝类养殖产业^[2,4]。

查清贝类幼虫附着变态的诱导因子对于促进贝类苗种繁育具有重要作用^[5-6]。

海洋无脊椎动物幼虫的附着变态过程主要由外界环境因子和内源性因子所调控, 其内源性的神经内分泌信号通路参与了变态过程, 包括 GABA 能、肾上腺素能、胆碱能和 5-羟色胺能通路^[6-7]。许多研究表明神经递质能诱导许多海洋无脊椎动物幼虫的变态过程, 如单胺类化合物的肾上腺素、氨基酸类如 γ -氨基丁酸 (GABA) 和胆碱类如乙酰胆碱^[4,7-10]。神经递质对不同种类海洋无脊椎动物幼虫的附着变态调控也有所不同, 例如, 乙酰胆

收稿日期: 2021-11-05 修回日期: 2021-12-20

资助项目: 国家自然科学基金 (32172992); 国家重点研发计划 (2018YFD0900601); 上海市优秀学术带头人计划 (20XD1421800); 南方海洋科学与工程广东省实验室人才团队引进重大专项 (GML2019ZD0402)

第一作者: 王林雨 (照片), 从事贝类分子生物学研究, E-mail: m190100063@st.shou.edu.cn

通信作者: 李一峰, 从事海产贝类养殖学、海产贝类生理学, E-mail: yifengli@shou.edu.cn



碱能诱导厚壳贻贝和紫贻贝 (*M. edulis*) 幼虫附着变态^[10-11], 而对新西兰海神蛤 (*Panopea zelandica*)、天使之翼海鸥蛤 (*Cyrtopleura costata*) 和印度牡蛎 (*Crassostrea madrasensis*) 幼虫则没有诱导作用^[12-14]

GABA 是由谷氨酸脱羧生成的一类抑制性氨基酸类神经递质^[15], 其作用机制是通过作用于突触后膜使其超极化或增加细胞膜对氯离子的通透性等方式实现^[16]。GABA 能有效地诱导红鲍 (*Haliotis rufescens*)、地中海贻贝 (*M. galloprovincialis*)、金星斑纹蛤 (*Venerupis pullastra*)、菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)、欧洲平牡蛎 (*Ostrea edulis*) 和脉红螺 (*Rapana venosa*) 幼虫附着变态^[17-19], 而对长牡蛎 (*C. gigas*)、新西兰绿唇贻贝 (*Perna canaliculus*)、珍珠贝 (*Pteria penguin*) 和印度牡蛎幼虫则无诱导效果^[13,20-22]。在厚壳贻贝中, GABA 能有效诱导幼虫变态^[4]。本实验利用 GABA 受体拮抗剂研究 GABA 受体在厚壳贻贝幼虫附着变态中的作用, 为研究 GABA 能信号通路在厚壳贻贝幼虫附着变态中的调控机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所使用的厚壳贻贝幼虫来自浙江省嵊泗金义育苗场。暂养期间, 水温控制在 18 °C, 充气培养, 无光照, 每隔 2 天换水 1 次。幼虫每天投喂 1 次湛江等鞭金藻 (*Isochrysis zhanjiangensis*)。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

基于厚壳贻贝幼虫不同发育阶段转录组数据库 (NCBI 登录号: PRJNA689255), 筛选得到 GABA 受体相关蛋白基因 (*GABARAP*) 和 GABA_{B2} 受体基因 (*GABA_{B2}R*) 序列。使用 Primer Premier 5.0 软件设计厚壳贻贝的 *GABARAP* 和 *GABA_{B2}R* 基因引物 (表 1), 用以验证序列的正确性。使用 1.5 mL 无酶离心管收集厚壳贻贝各个发育阶段的幼虫 (每管幼虫数量: 担轮幼虫 3 000 只; D 形幼虫 2 000

只; 壳顶幼虫 1 000 只; 眼点幼虫 600 只; 稚贝 300 只), 用于总 RNA 提取, 离心管中加入 RNA Later 并于 -80 °C 保存。总 RNA 提取使用 RNAiso Plus 提取厚壳贻贝不同发育阶段幼虫的总 RNA, 通过紫外分光光度测定 RNA 纯度和浓度, 通过琼脂糖凝胶电泳分析总 RNA 完整性。采用 TaKaRa cDNA 逆转录试剂盒对总 RNA 进行逆转录, cDNA 保存于 -80 °C, 用于后续的表达分析。

1.3 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

实验依据 Li 等^[3] 所述绝对定量方法进行。利用 PCR 扩增出目的基因和基因标准品, 将标准品稀释至不同浓度 (10⁷~10¹ 拷贝/μL), 进行荧光定量 PCR 反应, 每个反应设置 2 个技术重复和 5 个生物学重复, 反应在 Light Cycler 96 System 荧光定量 PCR 仪 (罗氏, 瑞士) 进行。RT-qPCR 反应体系为 10.0 μL, 包括 5.0 μL 2×FastStart Essential DNA Green Master (罗氏, 瑞士), 0.6 μL 上下游引物 (10 μmol/L), 1.0 μL cDNA, 3.4 μL ddH₂O。RT-qPCR 为两步法扩增, 反应程序: 预变性 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 53 °C 10 s, 45 个循环。反应结束后根据标准曲线计算得到待测样本中目的基因的拷贝数。用 JMPTM 软件对数据进行显著性差异分析。

1.4 试剂配制

实验采用的诱导幼虫变态的化合物包括肾上腺素、γ-氨基丁酸 (GABA)、荷包牡丹碱和 CGP52432, 化合物信息见表 2。荷包牡丹碱 (GABA_A 受体拮抗剂) 和 CGP52432 (GABA_B 受体拮抗剂) 母液的配置需要先用二甲基亚砜 (DMSO, Sigma) 溶解, 再用高压灭菌过滤 (孔径: 0.22 μm) 海水 (Autoclaved filtered sea water, AFSW) 稀释至测试浓度。正对照为肾上腺素 (Epinephrine, EPI) 和 GABA 溶液, 肾上腺素配制需采用 1 mol/L HCl 助溶, 母液和测试溶液均在实验当天进行配制, 0.2% 和

表 1 *GABARAP* 和 *GABA_{B2}R* 基因引物序列及 RT-qPCR 扩增效率

Tab. 1 Primers and RT-qPCR efficiency of *GABARAP* and *GABA_{B2}R* genes

基因名称 gene name	引物序列 (5—3') primer sequence	目的片段/bp amplicon size	扩增效率/% efficiency	相关系数 (r ²) correlation coefficient
<i>GABARAP</i>	F: GCACCAAAGCCAGAGTAGGA	161	97	0.99
	R: GCACCTGTGGAGGGATCACG			
<i>GABA_{B2}R</i>	F: CGTCTGGGCTTTAGCACTAG	176	91	0.99
	R: CTATACGCCTTCCATCCTTG			

表 2 实验所用的化学物质、生产厂家、母液浓度以及测试液浓度

Tab. 2 Chemical compounds used in the present study and their respective manufacturers and the concentrations of stock and tested concentrations

化学物质 chemical compound	制造商 manufacturer	浓度/(mol/L) concentration			
		母液浓度 stock solution	测试浓度 test concentration		
肾上腺素 epinephrine	Sigma (St Louis, MO)	10^{-3}	—	—	10^{-4}
γ -氨基丁酸 γ -aminobutyric acid	Sigma (St Louis, MO)	10^{-3}	—	—	10^{-4}
荷包牡丹碱 bicuculline	Selleck (Texas, USA)	10^{-2}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
CGP52432	MCE (New Jersey, USA)	10^{-2}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}

注：表格中“—”表示未使用该浓度的测试液

Notes: the symbol ‘—’ indicates that chemicals of this concentration was not used

0.8% 二甲基亚砜溶液分别作为荷包牡丹碱和 CGP52432 处理组的负对照 (表 2)。

1.5 幼虫附着变态实验

幼虫附着变态实验为 96 h 持续暴露实验，各实验组均在含有 20 mL 测试溶液的塑料培养皿 (ϕ 90 mm \times 15 mm) 中进行，每个培养皿中放置 20 个眼点幼虫，设置 9 个生物学重复。在 GABA 受体抑制剂暴露实验中，眼点幼虫放入不同浓度抑制剂的培养皿中暴露 15 min，用 AFSW 冲洗 3 次，最后将幼虫转移至终浓度为 10^{-4} mol/L 的 GABA 溶液中直至 96 h。前期研究表明 10^{-4} mol/L 的 GABA 溶液是诱导厚壳贻贝眼点幼虫变态率最高的浓度。实验开始后，在显微镜下观察并记录不同时间点 (24、48、72 和 96 h) 的幼虫行为 (游泳、爬行和静止)、变态和死亡个体数。20 mL AFSW 和 20 mL DMSO 分别为实验组设置的空白对照组和负对照组，20 mL 10^{-4} mol/L 肾上腺素和 20 mL 10^{-4} mol/L GABA 作为正对照组。幼虫变态率和幼虫行为数据 (游泳、爬行、静止和死亡率) 先进行反正弦转化，之后采用 JMP™ 软件进行正态分布检验。因数据均不满足正态分布，采用 Kruskal-Wallis Test 检验进行分析。

2 结果

2.1 厚壳贻贝不同发育阶段幼虫中 GABARAP 和 GABA_{B2}R 的表达情况

厚壳贻贝不同发育阶段幼虫的转录组和 RT-qPCR 分析结果呈现出相似的表达模式 (图 1)。GABARAP 在壳顶幼虫的表达量显著低于 D 形幼虫 ($P < 0.05$, 图 1-a, c)。与壳顶幼虫相比，GABARAP

在眼点幼虫的表达量有所上升，但无显著性差异 ($P > 0.05$, 图 1-a, c)。GABA_{B2}R 在眼点幼虫的表达量显著高于其他阶段幼体 ($P < 0.05$, 图 1-b, d)。

2.2 GABA 受体拮抗剂对厚壳贻贝幼虫附着变态的影响

为验证 GABA 受体基因参与了调控幼虫附着变态，实验选用荷包牡丹碱 (GABA_A 受体拮抗剂) 和 CGP52432 (GABA_B 受体拮抗剂) 研究厚壳贻贝幼虫附着变态的影响 (图 2)。厚壳贻贝眼点幼虫经 96 h 暴露后，空白对照和负对照组中均未观察到幼虫变态。 10^{-4} mol/L 肾上腺素和 10^{-4} mol/L GABA 诱导幼虫的变态率分别为 ($51.7\% \pm 4.0\%$) 和 ($27.2\% \pm 3.0\%$) (图 2)。与对照组 10^{-4} mol/L GABA 相比，荷包牡丹碱和 CGP52432 对幼虫的变态均有显著抑制作用 ($P < 0.05$, 图 2)。荷包牡丹碱和 CGP52432 对幼虫变态的抑制作用随着浓度的升高而增强 (图 2)。 10^{-4} mol/L 荷包牡丹碱和 CGP52432 对幼虫的变态均具有显著抑制作用 ($P < 0.05$)，幼虫的变态率分别仅为 $1.1\% \pm 0.7\%$ 和 $0.6\% \pm 0.6\%$ 。

2.3 GABA 受体拮抗剂对抑制幼虫变态过程中的行为影响

结果显示，在空白对照组中，30% 以上的幼虫仍保持游动状态。在 10^{-4} mol/L 肾上腺素和 10^{-4} mol/L GABA 的诱导作用下，GABA 诱导变态的幼虫数显著低于肾上腺素处理组 ($P < 0.05$)，且除变态成为稚贝的幼虫外，大部分幼虫仍处于静止状态。经荷包牡丹碱和 CGP52432 处理后，幼虫暴露于 10^{-4} mol/L GABA 与空白和负对照组相比显著降低了游泳状态幼虫数量 ($P < 0.05$)，基本处于静止状态 (图 3)，且与 GABA 处理组相比，2 种 GABA 受体拮抗剂显著抑制了幼虫变态 ($P < 0.05$)。

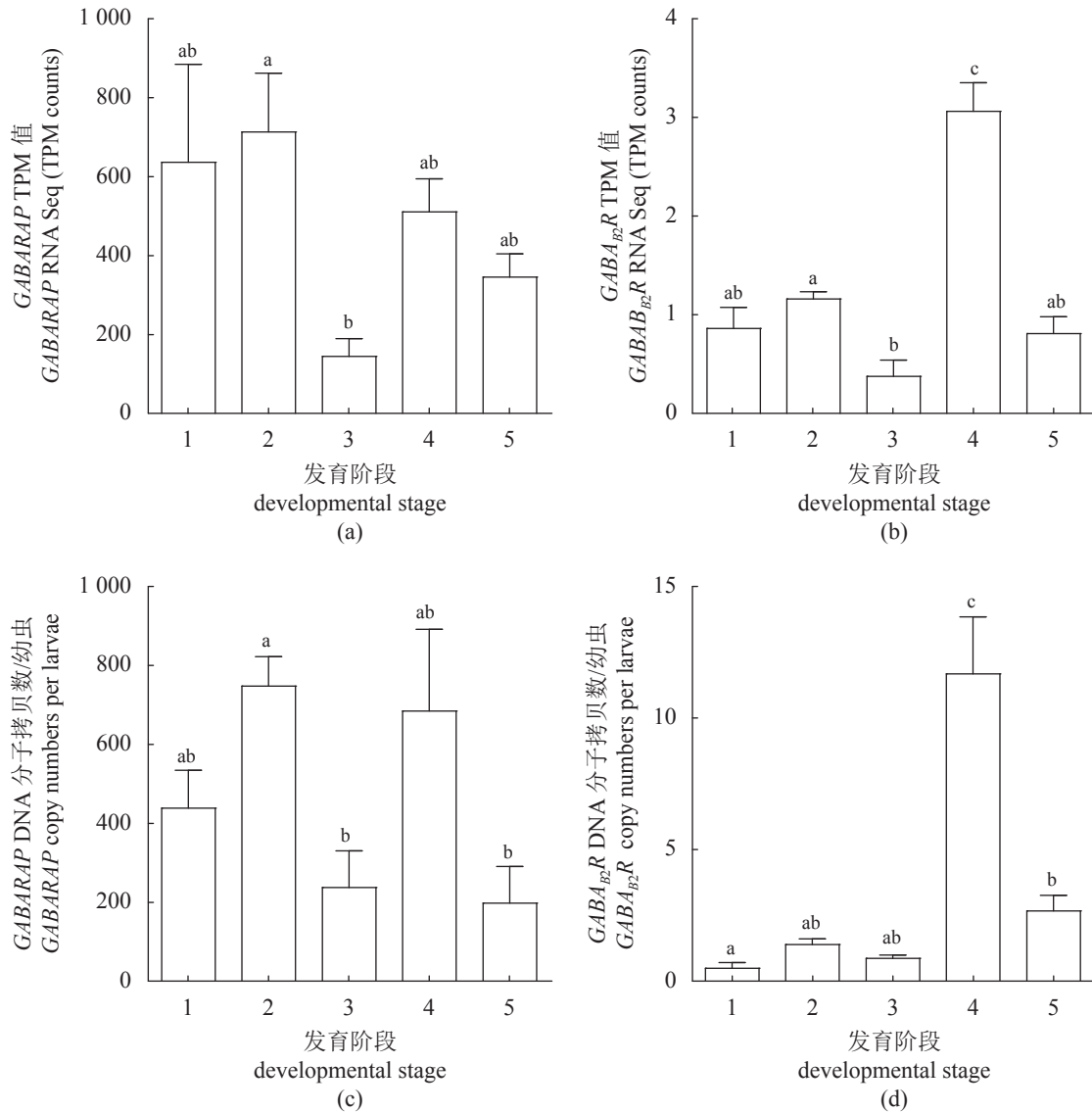


图 1 转录组 (a, b) 与 RT-qPCR (c, d) 分析厚壳贻贝 GABARAP 和 GABA_{B2}R 在不同幼体发育阶段中的表达模式

1. 担轮幼虫, 2. D 形幼虫, 3. 壳顶幼虫, 4. 眼点幼虫, 5. 稚贝。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Fig. 1 Expression analysis of GABARAP and GABA_{B2}R by transcriptome (a, b) and RT-qPCR (c, d) in different larval developmental stages of *M. coruscus*

1. trochophore, 2. D-veliger, 3. umbo, 4. pediveliger, 5. juvenile. Columns with different letters above them are significantly different ($P < 0.05$). The same below

3 讨论

海洋无脊椎动物神经系统在激活和调节幼虫的附着变态过程中扮演着重要作用^[4-5,10,23]。许多神经递质如 GABA、肾上腺素、L-多巴 (L-DOPA) 和 5-羟色胺能够有效诱导或抑制海洋无脊椎动物幼虫的变态发育, 同种化合物的诱导作用也存在种属差异^[7]。尽管这些神经递质对幼虫的变态调控已有广泛的研究, 但其调控机理仍有待研究。

GABA 作为神经系统中一种重要的抑制性神

经递质, 在脊椎动物和无脊椎动物体内起着调控神经活性的作用^[24-25]。GABA 活性是通过结合其受体来实现, 分为 GABA_A 离子型受体和 GABA_B 代谢型受体。GABA_A 受体调控氯离子通道的开启, 使细胞膜超极化, 抑制神经元兴奋^[26]。GABA_B 受体是 G 蛋白耦联受体, 通过激活第二信使产生持久而缓慢的突触抑制, 且与调控 Ca²⁺ 和 K⁺ 离子通道有关^[25]。GABA 在厚壳贻贝中能诱导幼虫变态^[4]。在其他双壳贝类中, GABA 能有效诱导红鲍、地中海贻贝、金星斑纹蛤、菲律宾蛤仔、欧洲平牡

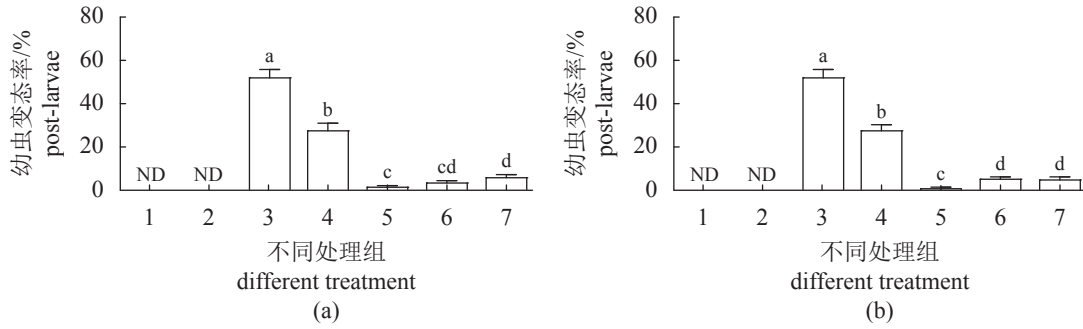


图2 GABA受体拮抗剂荷包牡丹碱(a)和CGP52432(b)对厚壳贻贝幼虫变态的影响

(a) 1. AFSW, 2. 0.2% 二甲亚砜, 3. 10⁻⁴ mol/L 肾上腺素, 4. 10⁻⁴ mol/L GABA, 5. 10⁻⁴ mol/L 荷包牡丹碱, 6. 10⁻⁵ mol/L 荷包牡丹碱, 7. 10⁻⁶ mol/L 荷包牡丹碱; (b) 1. AFSW, 2. 0.8% 二甲亚砜, 3. 10⁻⁴ mol/L 肾上腺素, 4. 10⁻⁴ mol/L GABA, 5. 10⁻⁴ mol/L CGP52432, 6. 10⁻⁵ mol/L CGP52432, 7. 10⁻⁶ mol/L CGP52432. “ND”表示该处理组的幼虫变态率为0%; 不同小写字母表示每个行为组内差异显著(P < 0.05), 下同

Fig. 2 Effect of bicuculline (a) and CGP52432 (b) on larval metamorphosis of *M. coruscus*

(a) 1. AFSW, 2. 0.2% DMSO, 3. 10⁻⁴ mol/L EPI, 4. 10⁻⁴ mol/L GABA, 5. 10⁻⁴ mol/L bicuculline, 6. 10⁻⁵ mol/L bicuculline, 7. 10⁻⁶ mol/L bicuculline; (b) 1. AFSW, 2. 0.8% DMSO, 3. 10⁻⁴ mol/L EPI, 4. 10⁻⁴ mol/L GABA, 5. 10⁻⁴ mol/L CGP52432, 6. 10⁻⁵ mol/L CGP52432, 7. 10⁻⁶ mol/L CGP52432. “ND” means no post-larvae was observed; Letters indicate significant differences between each behavior group (P < 0.05), the same below

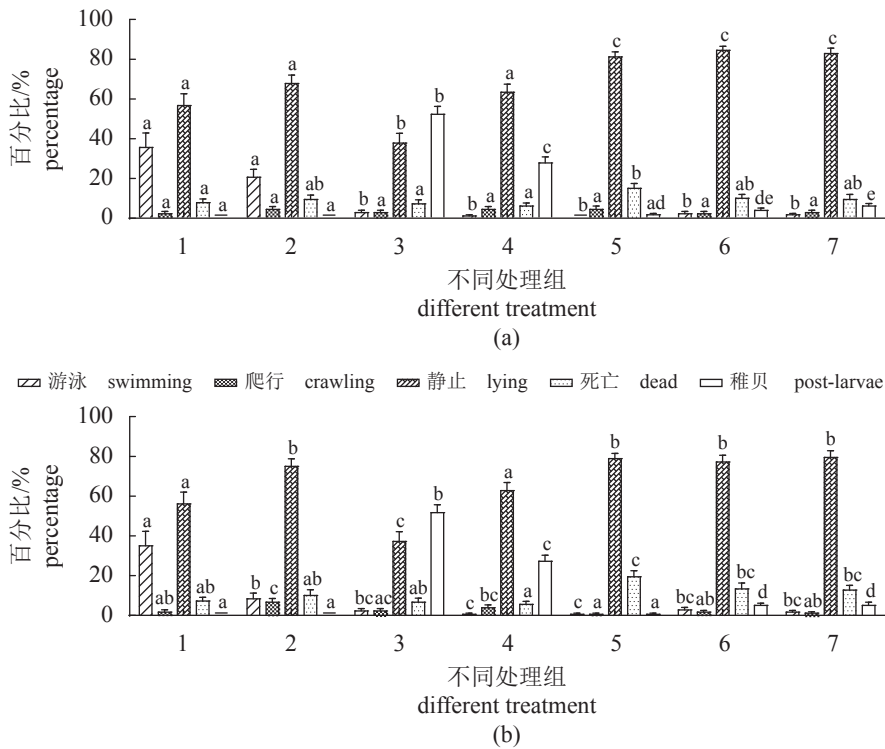


图3 GABA受体拮抗剂荷包牡丹碱(a)和CGP52432(b)对厚壳贻贝幼虫行为的影响

Fig. 3 Effect of bicuculline (a) and CGP52432 (b) on the behavior of *M. coruscus* larvae

蛎和脉红螺的幼虫变态过程^[17-19]。而GABA对长牡蛎、新西兰绿唇贻贝、珍珠贝和印度牡蛎幼虫则无诱导作用^[13,20-22]。在其他非双壳贝类中,GABA在一些物种中也发挥了诱导幼虫变态发育的作用。在玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*)中,GABA通过与GABA_B受体结合促进下游促性腺激素释放激素(GnRH)神经肽的分泌,进而触发

海鞘尾部退化等变态发育过程^[27]。相反,在星状海葵(*Nematostella vectensis*)中,利用GABA_B受体特异性激动剂巴氯芬持续性激活GABA_B受体可逆地阻止了其浮游幼虫变态成为固着珊瑚虫的过程,且GABA_B受体的激活也抑制了星状海葵的神经发生^[25]。本研究首先在厚壳贻贝不同发育阶段幼虫转录组中发现了GABARAP和GABA_{B2R}

基因, *GABARAP* 基因在担轮和 D 形幼虫表达量较高, 而壳顶幼虫期表达量降低, 表明 *GABARAP* 基因可能在早期发育阶段发挥调控器官发育的作用。 *GABA_{B2}R* 基因在眼点幼虫阶段高表达, 表明其可能在变态前期的器官发生及重塑中起着重要作用, 结合 GABA 能够有效促进厚壳贻贝幼虫变态^[4], 表明 GABA 受体基因可能参与变态发育。在本研究中, 2 种 GABA 受体拮抗剂荷包牡丹碱 (*GABA_A* 受体) 和 CGP52432 (*GABA_B* 受体) 均能有效抑制厚壳贻贝眼点幼虫的变态发育, 表明 GABA 能与其受体相结合, 参与调控幼虫变态发育过程。且无论 *GABA_A* 或 *GABA_B* 受体拮抗剂均对厚壳贻贝幼虫变态具有抑制作用, 表明 GABA 2 种受体类型都参与调控厚壳贻贝幼虫的变态过程。

海洋无脊椎动物幼虫对于化学物质诱导变态的响应是“全或无”的, 不同于变态反应, 贻贝附着行为是一种幼虫从游泳状态至附着的可逆行为反应^[5,23]。Bonar 等^[28]发现 L-DOPA 所触发的长牡蛎幼虫附着反应能够被 L-DOPA 脱羧酶抑制剂所阻断, 而多巴胺能激动剂可以激活附着行为的继续, 表明牡蛎幼虫的附着行为是由多巴胺能受体所调控。本研究发现 GABA 处理组抑制了厚壳贻贝幼虫的游泳行为。这一发现与以往的研究结果相同, Alfaro 等^[29]发现 GABA 降低了黑足鲍 (*H. iris*) 幼虫的游泳活动, 并认为这种现象与幼虫纤毛运动的减少有关。在马粪海胆 (*Hemicentrotus pulcherrimus*) 中, 荷包牡丹碱抑制了幼虫的游泳行为, 表明 GABA 能信号系统参与调控了幼虫的游泳行为^[30]。同样, GABA 对玻璃海鞘和红鲍幼虫游泳行为具有较强的抑制作用^[17,27]。在本研究中, 荷包牡丹碱和 CGP52432 处理组不仅抑制了厚壳贻贝幼虫的游泳行为, 而且与 GABA 对照组相比, 显著降低了幼虫变态率, 表明 GABA 受体拮抗剂可能抑制了 GABA 与其受体结合并启动变态信号的传导路径。然而, 关于 GABA 受体调控幼虫变态的下游调控机理仍不清楚, 需要进一步研究。

综上所述, 本研究在厚壳贻贝不同发育阶段转录组筛选得到 *GABARAP* 和 *GABA_{B2}R*, 利用药理学手段揭示了 GABA 受体参与调控厚壳贻贝幼虫附着变态过程, 为理解 GABA 信号系统调控厚壳贻贝幼虫附着变态机理提供了参考。同时, 厚壳贻贝 *GABA_B* 受体作为 G 蛋白耦联受体, 其下游分子调控机制仍有待进一步研究。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2021[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
Bureau of Fisheries, The Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2021[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021 (in Chinese).
- [2] Yang J L, Shen P J, Liang X, *et al.* Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus* in response to monospecific bacterial biofilms[J]. *Biofouling*, 2013, 29(3): 247-259.
- [3] Li Y F, Cheng Y L, Chen K, *et al.* Thyroid hormone receptor: A new player in epinephrine-induced larval metamorphosis of the hard-shelled mussel[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 287: 113347.
- [4] Yang J L, Li S H, Li Y F, *et al.* Effects of neuroactive compounds, ions and organic solvents on larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Aquaculture*, 2013, 396-399: 106-112.
- [5] 柯才焕, 冯丹青. 海洋底栖动物浮游幼体附着和变态的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(S2): 77-82.
Ke C H, Feng D Q. Researches on larval settlement and metamorphosis of marine benthos[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2006, 45(S2): 77-82 (in Chinese).
- [6] 李一峰, 杨金龙, 包卫洋, 等. 人工诱导物影响海洋无脊椎动物幼体附着变态的研究[J]. 海洋科学, 2011, 35(8): 102-107.
Li Y F, Yang J L, Bao W Y, *et al.* A review on artificial inducers influencing larval settlement and metamorphosis of marine invertebrates[J]. *Marine Sciences*, 2011, 35(8): 102-107 (in Chinese).
- [7] Joyce A, Vogeler S. Molluscan bivalve settlement and metamorphosis: Neuroendocrine inducers and morphogenetic responses[J]. *Aquaculture*, 2018, 487: 64-82.
- [8] Yang J L, Satuito C G, Bao W Y, *et al.* Induction of metamorphosis of pediveliger larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 using neuroactive compounds, KCl, NH₄Cl and organic solvents[J]. *Biofouling*, 2008, 24(6): 461-470.
- [9] Yang J L, Li W S, Liang X, *et al.* Effects of adrenoceptor compounds on larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Aquaculture*, 2014, 426-427: 282-287.
- [10] 杨金龙, 陈芋如, 郭行磐, 等. 胆碱受体化合物对厚壳贻贝幼虫变态的调控作用[J]. 水产学报, 2014, 38(12):

- 2012-2017.
Yang J L, Chen Y R, Guo X P, *et al.* Effects of cholinoceptor compounds on larval metamorphosis of the mussel *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(12): 2012-2017 (in Chinese).
- [11] Dobretsov S V, Qian P Y. Pharmacological induction of larval settlement and metamorphosis in the blue mussel *Mytilus edulis* L[J]. *Biofouling*, 2003, 19(1): 57-63.
- [12] Gustafson R G, Creswell R L, Jacobsen T R, *et al.* Larval biology and mariculture of the angelwing clam, *Cyrtopleura costata*[J]. *Aquaculture*, 1991, 95(3-4): 257-279.
- [13] Murthy P S, Venugopalan V P, Nair K V K, *et al.* Chemical cues inducing settlement and metamorphosis in the fouling oyster *Crassostrea madrasensis*[J]. *Journal of the Indian Institute of Science*, 1999, 79(6): 513-526.
- [14] Le D V, Young T, Alfaro A C, *et al.* Effect of neuroactive compounds on larval metamorphosis of New Zealand geoduck (*Panopea zelandica*)[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(6): 3080-3090.
- [15] 张涛, 杨红生, 周毅, 等. 化学物质对硬壳蛤幼虫变态的诱导[J]. *海洋科学*, 2005, 29(12): 59-67.
Zhang T, Yang H S, Zhou Y, *et al.* Induction of metamorphosis of the hard clam *Mercenaria mercenaria* larvae by chemical cues[J]. *Marine Sciences*, 2005, 29(12): 59-67 (in Chinese).
- [16] Rodríguez S R, Ojeda F P, Inestrosa N C. Settlement of benthic marine invertebrates[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1993, 97(2): 193-207.
- [17] Morse D E, Hooker N, Duncan H, *et al.* γ -aminobutyric acid, a neurotransmitter, induces planktonic abalone larvae to settle and begin metamorphosis[J]. *Science*, 1979, 204(4391): 407-410.
- [18] García-Lavandeira M, Silva A, Abad M, *et al.* Effects of GABA and epinephrine on the settlement and metamorphosis of the larvae of four species of bivalve molluscs[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 316(2): 149-156.
- [19] Yang Z P, Yu H, Yu R H, *et al.* Induced metamorphosis in larvae of the veined rapa whelk *Rapana venosa* using chemical cues[J]. *Marine Biology Research*, 2015, 11(10): 1085-1092.
- [20] Beiras R, Widdows J. Induction of metamorphosis in larvae of the oyster *Crassostrea gigas* using neuroactive compounds[J]. *Marine Biology*, 1995, 123(2): 327-334.
- [21] Young T, Alfaro A C, Robertson J. Effect of neuroactive compounds on the settlement of mussel (*Perna canaliculus*) larvae[J]. *Aquaculture*, 2011, 319(1-2): 277-283.
- [22] Wassnig M, Southgate P C. Effects of settlement cues on behaviour and substrate attachment of hatchery reared winged pearl oyster (*Pteria penguin*) larvae[J]. *Aquaculture*, 2012, 344-349: 216-222.
- [23] 柯才焕. 海产贝类幼体附着和变态的化学诱导研究进展[J]. *海洋通报*, 1993, 12(3): 107-116.
Ke C H. Advances in research on chemical induction of settlement and metamorphosis in mollusc larvae[J]. *Marine Science Bulletin*, 1993, 12(3): 107-116 (in Chinese).
- [24] 赵华颖, 章劲夫. γ -氨基丁酸及其受体的研究进展[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2012, 6(14): 4026-4028.
Zhao H Y, Zhang J F. Research progress on γ -aminobutyric acid and its receptors[J]. *Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition)*, 2012, 6(14): 4026-4028 (in Chinese).
- [25] Levy S, Brekhman V, Bakhman A, *et al.* Ectopic activation of GABA_B receptors inhibits neurogenesis and metamorphosis in the cnidarian *Nematostella vectensis*[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2021, 5(1): 111-121.
- [26] 彭思博, 陈秀梅, 王桂芹. γ -氨基丁酸的代谢及其在鱼类养殖中的应用研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2020, 56(7): 22-27.
Peng S B, Chen X M, Wang G Q. Research progress on metabolism and application of γ -aminobutyric acid in fish culture[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2020, 56(7): 22-27 (in Chinese).
- [27] Hozumi A, Matsunobu S, Mita K, *et al.* GABA-induced GnRH release triggers chordate metamorphosis[J]. *Current Biology*, 2020, 30(8): 1555-1561.
- [28] Barlow L A. Electrophysiological and behavioral responses of larvae of the red abalone (*Haliotis rufescens*) to settlement-inducing substances[J]. *Bulletin of Marine Science*, 1990, 46(2): 537-554.
- [29] Alfaro A C, Young T, Bowden K. Neurophysiological control of swimming behaviour, attachment and metamorphosis in black-footed abalone (*Haliotis iris*) larvae[J]. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2014, 48(3): 314-334.
- [30] Katow H, Abe K, Katow T, *et al.* Development of the GABA-ergic signaling system and its role in larval swimming in sea urchin[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2013, 216(9): 1704-1716.

Effects of GABA receptor antagonists bicuculline and CGP52432 on larval settlement and metamorphosis of the mussel (*Mytilus coruscus*)

WANG Linyu^{1,2}, SHI Xue^{1,2}, YANG Yueming^{1,2}, WANG Yuqing^{1,2},
LIANG Xiao^{1,2}, YANG Jinlong^{1,2,3}, LI Yifeng^{1,2*}

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Key Special Project for Introduced Talents Team of Southern Marine Science and
Engineering Guangdong Laboratory, Guangzhou 511458, China)

Abstract: γ -aminobutyric acid (GABA) is an important inhibitory neurotransmitter in the central nervous system in mammals. In marine invertebrates, GABA has been reported to induce larval settlement and metamorphosis in many species. The pharmacological experiment was conducted to study the effects of GABA and its receptor inhibitors Bicuculline (GABA_A receptor) and CGP52432 (GABA_B receptor) on larval settlement and metamorphosis of *M. coruscus*. GABA receptor-associated protein (*GABARAP*) and GABA_{B2} receptor (*GABA_{B2}R*) genes have been found in the transcriptome data of different developmental stages of *M. coruscus*. *GABA_{B2}R* was significantly highly expressed in the pediveliger stage than in other development stages. A similar expression pattern was also observed using the real-time fluorescent quantitative PCR experiment, suggesting that *GABA_{B2}R* may be involved in the larval metamorphosis. The results showed that 10^{-4} mol/L GABA induced $27.2\% \pm 3.0\%$ of the pediveliger larvae metamorphosis. Bicuculline and CGP52432 significantly inhibited larval metamorphosis compared to the control larvae. The higher concentrations of antagonists showed more pronounced effects than lower concentrations. In addition, both GABA and its receptor antagonists inhibited the swimming behavior of mussel larvae. Both GABA_A and GABA_B receptor antagonists inhibited the larval settlement and metamorphosis of *M. coruscus*, suggesting GABA receptors may be involved in mediating larval settlement and metamorphosis of *M. coruscus*. The present study contributes to further exploring the mechanism of the GABAergic signaling system regulating larval settlement and metamorphosis of *M. coruscus*.

Key words: *Mytilus coruscus*; GABA receptor; larval; settlement and metamorphosis

Corresponding author: LI Yifeng. E-mail: yifengli@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32172992); National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900601); Program of Shanghai Academic Research Leader (20XD1421800); Key Special Project for Introduced Talents Team of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (GML2019ZD0402)