

G-蛋白偶联受体与信号通路对紫贻贝幼体 附着变态的调控作用

杨美圆¹, 陈海兵¹, 黄彦超¹, 缪 栋¹, 王军琦¹, 侯英雪², 包卫洋^{1*}

(1. 扬州大学环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225127;

2. 大连鑫玉龙海洋珍品有限公司, 辽宁 大连 116023)

摘要: 为了阐明紫贻贝幼体附着变态的内在机理,在天然诱导物-微生物膜的诱导参照下,通过使用 G 蛋白偶联受体(GPCRs)和信号通路的活化剂与抑制剂初步研究了其对该物种幼体附着变态过程的调控作用。结果显示,GPCRs 活化剂 Gpp[NH]p 与抑制剂 GDP-β-S 没有诱导和抑制活性,表明可能非 GPCRs 的其他细胞反应过程参与了紫贻贝幼体的附着变态。腺苷酸环化酶/环腺苷酸(AC/cAMP)信号通路相关、理论上具有诱导活性的 6 种神经性试剂,除了磷酸二酯酶抑制剂(IBMx)外,其他在 $10^{-8} \sim 10^{-3}$ M 浓度下 48、72 h 后都没有活性,并且高浓度下表现出较高的神经性药物毒性。IBMx 仅在 10^{-4} M 浓度 72 h 后呈现出一定的诱导活性,但是与微生物膜 48 h 就具有非常高的活性相比显著性较低且时间滞后。磷脂酰肌醇/二酰基甘油/蛋白激酶(PI/DAG/PKC)信号通路相关的 2 种活化剂 48、72 h 均无诱导活性,但是其抑制剂 H-7 在 10^{-6} M 的低浓度下 48 h 后表现出显著性的抑制效果,72 h 后效果丧失,抑制浓度上升到 10^{-5} M。以上活性浓度与作用时间 2 个方面的结果表明了 PI/DAG/PKC 信号通路可能参与调控紫贻贝幼体的附着变态,而 AC/cAMP 信号通路可能作为次要通路,或是由于所用神经性试剂的毒性造成的一种实验假象。本研究有助于推进该品种的发育生物学研究以及通过切断信号通路实现生物污损防治技术的开发。

关键词: 紫贻贝; G 蛋白偶联受体; 信号通路; 幼体附着变态

中图分类号: Q 178.1; S 966.2

文献标志码: A

大多海洋无脊椎动物的生活史包含浮游幼体(亦称幼虫)阶段,其中幼体的附着变态是幼体发育的关键环节,衔接着浮游与后期附着/底栖 2 个截然不同的生活状态,并直接影响种群分布及数量变动^[1-2]。在海洋环境中,幼体的附着变态在大尺度范围上被动地受海流等物理因素的影响,但是其在小范围内是一个对附着基质的主动选择过程^[3]。微生物膜被认为是水螅虫类、多毛类以及贝类等幼体附着变态的适宜天然基质,其产生的化学信号作为外部诱导因子^[4-5]通过幼体的信号受体激活体内相关的信号通路调控幼体的附着变态^[6]。因此,系统性地阐明由微生物膜产生的

外部化学信号到内在信号通路对幼体附着变态机理,对于理解海洋化学生态学与种群动力学、以及幼体发育生物学的相关理论具有重要的意义^[4-7]。

以往的学者已经围绕微生物膜的不同性质、组成生物的种类和活性生物株产生的化学信号等进行了较详尽的研究^[4-5],而幼体附着变态内在机理的研究相对滞后。脊椎动物相关研究表明,G 蛋白偶联受体(GPCRs)是最大的细胞表面受体超家族,对许多信号起介导作用。在海洋无脊椎动物幼体附着变态的研究过程中,许多研究借鉴了已有的脊椎动物信号通路的相关成果,从神经药理学角度

收稿日期:2015-04-25 修回日期:2015-05-21

资助项目:国家自然科学基金(31201976);江苏省水产三新工程(Y2013-40、D2014-17-2);江苏省自然科学基金(BK20141276);江苏省大学生实践创新训练计划(201311117088X);扬州大学科创基金(2014CXJ032)

通信作者:包卫洋,E-mail:baoway@yzu.edu.cn

对信号受体与信号通路进行了阐明^[8-12]。通过分析 GPCRs 活化剂(例如 Gpp[NH]p)与抑制剂(例如 GDP- β -S)等添加对幼体附着变态的影响作用,证实了 GPCRs 同样起信号介导作用,例如匍茎草苔虫(*Bugula stolonifera*)、纹藤壶(*Balanus amphitrite*)、红鲍(*Haliotis rufescens*)和绿海胆(*Lytechinus pictus*)^[8-12]。通过添加与 GPCRs 相关的信号通路活化剂与抑制剂,发现腺苷酸环化酶/环腺苷酸(AC/cAMP)与磷脂酰肌醇/二酰基甘油/蛋白激酶(PI/DAG/PKC)等信号通路在幼体的附着变态中起到了调控作用,而在此过程中 cAMP、IP₃、DAG 与游离 Ca²⁺ 等作为第二信使完成了信号的传递放大功能^[8-9,11]。从神经药理学角度出发的相关研究也表明了神经系统在幼体附着变态的激活与调节过程中起了重要作用:神经递质,如肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺或 5-羟色胺等通过绑定 GPCRs 诱导了幼体附着变态^[2,6,13-14]。同时,不同种类幼体呈现出了不同的信号传导模式:太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)幼体的多巴胺行为途径和肾上腺素能形态途径双调控模式,红鲍幼体的上行调节模式(以 cAMP 和 DAG/IP₃ 分别为第二信使的形态发生途径和调控途径)^[2]。

紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)属于软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、贻贝目(Mytiloidea)、贻贝科(Mytilidae)、贻贝属(*Mytilus*),分布范围广泛,其在包含我国在内的很多国家是经济双壳贝类,同时也是联合国粮农组织推荐的主要水产养殖物种。另一方面,紫贻贝在海水人工设施、网箱等大量附着,也被称为污损生物^[15-16]。因此,阐明紫贻贝幼体的附着变态机理对该品种的增殖和防治生物污损具有很大的理论与应用价值。早期的研究表明,紫贻贝幼体附着变态受微生物膜诱导,且微生物膜中的细菌起了主导作用^[15];丝状类的海藻同样也有诱导作用^[16]。就微生物膜产生的化学诱导作用而言,可能是一种分子量小于 3 000 u 的水溶性物质与细菌胞外多糖或蛋白多糖的相乘作用^[17]。关于紫贻贝幼体附着变态的内在机理,研究发现一些神经递质类如肾上腺素,以及离子类如钙离子等人工诱导物具有很好的诱导活性,表明在人工诱导物的作用下对应的肾上腺素受体以及钙离子通道起了调控作用^[14,18]。但是,在天然诱导基质

-微生物膜存在的情况下,GPCRs 与相关的信号通路对紫贻贝幼体附着变态的调控作用没有阐明。本实验测试了 GPCRs 的活化剂和抑制剂,AC/cAMP 和 PI/DAG/PKC 信号通路的活化剂与抑制剂对幼体附着变态的影响,以期对紫贻贝幼体附着变态内在机理的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 人工授精与幼体饲养

本实验依据 Bao 等^[15]所述方法,利用温度刺激进行紫贻贝人工授精,所得 D 形幼体按照 1 个/mL 的密度以角毛藻(*Chaetoceros* sp.)为饵料饲养。饲养温度控制在 18 °C 左右,每 2 d 换水 1 次。幼体发育到壳顶期出现眼点,继续饲养 7 d 后便具有附着变态能力,可用来进行幼体附着变态实验。

1.2 微生物膜的生成

利用双面胶将 12 孔板粘贴固定在 PVC 板上,悬挂于辽宁省普兰店市皮口镇平岛周边自然海域(北纬 39°20',东经 122°20')中 2~3 周使微生物膜生成在 12 孔板内。实验前将微生物膜取出带回实验室,利用灭菌海水(sterilized seawater, SSW)轻轻冲洗微生物膜,去除微生物膜表面附着不紧密的生物。

1.3 化学试剂的配制

本次实验所使用 GPCRs 与信号通路相关的化学试剂、测试依据、对幼体附着变态的活性预测(诱导或抑制)以及测试浓度在参考 Tran 等^[19]的基础上,添加了 PI/DAG/PKC 信号通路相关的 2 种化学试剂,并将浓度范围进行了放大(表 1)。测试试剂中,与 GPCRs 相关的有 Gpp[NH]p、GDP- β -S;与 AC/cAMP 信号通路相关的有罂粟碱(papavarine)、磷酸二酯酶抑制剂(IBMx)、茶碱(theophylline)、Ro-20-1724、双丁酸环腺苷酸(db-cAMP)、毛猴素(forkolin);与 PI/DAG/PKC 信号通路相关的有佛波酯(TPA)、H-7。所有化学试剂均购自 Sigma(St Louis, Mo),对于水溶性差或者不溶于水的试剂按照试剂说明先采用 1% 的二甲基亚砜(DMSO)溶解后,再进行配制。

1.4 幼体附着变态实验

幼体附着变态实验参照 Bao 等^[15]的方法进行,在 12 孔板的每个孔中加入 2 mL 测试试剂和 8~10 个幼体,48 与 72 h 后显微镜下观察幼体的

附着变态率与死亡情况;或者在附着有微生物膜的 12 孔板中,每个孔添加 2 mL 测试试剂和 8 ~ 10 个幼体。每次实验过程中,同时以微生物膜和

SSW 作为正、负对照。幼体附着变态以面盘消失、生长出新的贝壳为标准。

表 1 GPCRs 与信号通路相关的化学试剂、测试依据、活性预测与测试浓度
Tab.1 Compounds related to GPCRs and the signal transduction pathways, test basis, predicted activity and test concentrations

化合物 compound	测试依据 test basis	活性预测 activity prediction	测试浓度 (mol/L) test concentration
Gpp[NH]p	G 蛋白活化剂	诱导	10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}
GDP- β -S	G 蛋白抑制剂	抑制	10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}
罂粟碱 papavarine	磷酸二酯酶抑制剂	诱导	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}
异丁基甲基黄嘌呤 IBMX	磷酸二酯酶抑制剂	诱导	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}
茶碱 theophylline	磷酸二酯酶抑制剂	诱导	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}
Ro-20-1724	磷酸二酯酶抑制剂	诱导	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}
双丁酸环腺苷酸 db-cAMP	胞内环磷酸腺苷促进剂	诱导	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}
毛猴素 forkolin	腺苷酸环化酶活化剂	诱导	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}
4 α -佛波醇-12,13-二丁酸 PDBu	蛋白激酶 C 活化剂	诱导	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}
佛波酯 TPA	蛋白激酶 C 活化剂	诱导	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}
H-7	蛋白激酶 A/C 抑制剂	抑制	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}

1.5 数据统计与分析

统计分析前对所有数据进行正态分布检验,如满足正态分布且方差相同,则进行单因素方差分析。如不满足正态分布,则通过 Kruskal-Wallis Test 检验进行分析。分析采用 SPSS 13.0 统计软件, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 G 蛋白活化剂与抑制剂对幼体附着变态的影响

在微生物膜单独存在的情况下,48 h 后幼体的附着变态率高达 $81.25\% \pm 6.29\%$,G 蛋白活化剂 Gpp[NH]p 在 $10^{-7} \sim 10^{-3}$ M 浓度范围内对幼体的附着变态没有诱导活性 ($P > 0.05$) (图 1-a)。微生物膜存在的情况下添加 G 蛋白的抑制剂 GDP- β -S (GDP- β -S + 微生物膜),浓度为 $10^{-7} \sim 10^{-3}$ M,48 h 后,GDP- β -S + 微生物膜的诱导活性为 $73.63\% \sim 78.75\%$,与微生物膜单独存在下的诱导活性相比没有显著变化 ($P > 0.05$) (图 1-a)。72 h 后,微生物膜单独的诱导活性升高到 $94.95\% \pm 5.89\%$,Gpp[NH]p 在 $10^{-7} \sim 10^{-3}$ M 浓度范围内诱导活性依然为零 (图 1-b)。与 48 h 的结果类似,GDP- β -S + 微生物膜的活性与微生物膜单独存在时的诱导活性相比没有显著差异 ($P > 0.05$) (图 1-b)。

2.2 AC/cAMP 信号通路活化剂与抑制剂对幼体附着变态的影响

48 h 后所采用的 4 种磷酸二酯酶抑制剂,即罂粟碱、异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX) 呤、茶碱与 Ro-20-1724 在浓度为 $10^{-8} \sim 10^{-3}$ M 范围内没有诱导活性 ($P > 0.05$) (表 2)。在同样浓度下,胞内环磷酸腺苷促进剂,即双丁酸环腺苷酸 (db-cAMP) 与腺苷酸环化酶活化剂,即毛猴素的诱导活性也是零。其中,IBMX 和 Ro-20-1724 的浓度为 10^{-3} M 时,幼体死亡率分别为 100% 和 $19.77\% \pm 0.64\%$ 。

与 48 h 的活性相同,72 h 后,这 6 种 AC/cAMP 信号通路相关的抑制剂与活化剂 (除了 IBMX) 的活性仍然为零 (表 3)。其中,罂粟碱浓度为 10^{-3} 和 10^{-4} M 时幼体死亡率分别为 $70.37\% \pm 0.71\%$ 和 $69.17\% \pm 0.58\%$; IBMX 与 Ro-20-1724 的浓度为 10^{-3} M 时死亡率均为 100%。但是,IBMX 在浓度为 10^{-4} M 时,幼体的附着变态率为 $22.5\% \pm 10.9\%$ 。此外,利用 1% 的 DMSO 进行溶解配制的试剂,对应的不同浓度 DMSO 的诱导活性为零 (数据未显示)。

2.3 PI/DAG/PKC 信号通路活化剂与抑制剂对幼体附着变态的影响

蛋白激酶 C 活化剂,4 α -佛波醇-12,13-二丁酸 (PDBu) 和佛波酯 (TPA) 在 $10^{-8} \sim 10^{-3}$ M 浓度下,幼体在 48 h 后的附着变态率为零 (图 2-

a, PDBu 与 TPA)。其中幼体在 PDBu 的 10^{-3} M 浓度下, 出现大量死亡(数据未显示)。微生物膜存在的情况下添加蛋白激酶 A/C 抑制剂 H-7(H-7 + 微生物膜), 当 H-7 浓度在 10^{-8} 和 10^{-7} M 时, 幼体的附着变态率与微生物膜单独存在时的相比没有显著变化 ($P > 0.05$)。但是, H-7 浓度在 10^{-6} M 时, H-7 + 微生物膜的活性显著下降到 $42.48\% \pm 8.67\%$ ($P < 0.05$), H-7 浓度在 $10^{-5} \sim 10^{-3}$ M 时, 活性为零(图 2-a)。其中, 10^{-3} M 浓度下, 幼体全部死亡(数据未显示)。72 h 后,

微生物膜的活性上升为 100%, H-7 + 微生物膜在 H-7 的浓度为 10^{-8} 、 10^{-7} M 时活性同样上升到 100%, 而 H-7 的浓度在 10^{-6} M 时, 活性从 48 h 后的 $42.48\% \pm 8.67\%$ 上升到 100% (图 2-b)。H-7 + 微生物膜在 H-7 的浓度为 10^{-5} M 时, 活性由 48 h 后的 0 上升到 72 h 后的 $47.78\% \pm 11.85\%$, 但是, 与微生物膜单独存在时的活性相比仍然显著性下降 ($P < 0.05$, 图 2-b)。此外, H-7 + 微生物膜中的幼体在 H-7 为 10^{-4} M 下没有死亡。

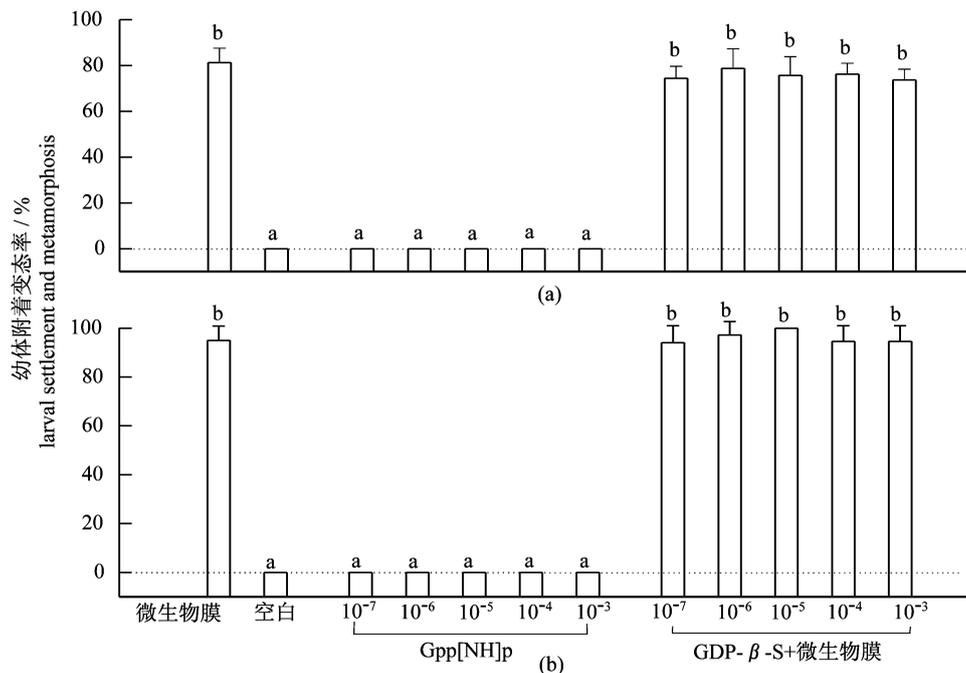


图 1 GPCRs 活化剂 Gpp[NH]p 与抑制剂 GDP- β -S 分别对幼体附着变态的诱导与抑制效果
(a) 48 h 后幼体的附着变态率; (b) 72 h 后幼体的附着变态率; 微生物膜与 SSW 分别作为正对照与空白对照

Fig. 1 Inductive effects of Gpp[NH]p (GPCRs activator) and inhibitive effects of GDP- β -S (GPCRs inhibitor) for larval settlement and metamorphosis

(a) larval settlement and metamorphosis rates after 48 h; (b) larval settlement and metamorphosis rates after 72 h; biofilms and SSW were set as positive and blank controls

表 2 AC/cAMP 信号通路活化剂 48 h 后对幼体附着变态的诱导效果

Tab. 2 Inductive effects of activators related to AC/cAMP signal pathways for larval settlement and metamorphosis after 48 h

化合物 compound	浓度/M concentration	诱导活性/% inductive activity	死亡率/% death rate
罂粟碱 papavarine	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}	各个浓度为 0	各个浓度为 0
异丁基甲基黄嘌呤 IBMX	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}	各个浓度为 0	10^{-3} M 浓度为 100 其他浓度为 0
茶碱 theophylline	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}	各个浓度为 0	各个浓度为 0
Ro-20-1724	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}	各个浓度为 0	10^{-3} M 浓度为 19.77 ± 0.64 其他浓度为 0
双丁酸环腺苷酸 db-cAMP	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}	各个浓度为 0	各个浓度为 0
毛猴素 forkolin	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}	各个浓度为 0	各个浓度为 0

表 3 AC/cAMP 信号通路活化剂 72 h 后对幼体附着变态的诱导效果
 Tab.3 Inductive effects of activators related to AC/cAMP signal pathways for larval settlement and metamorphosis after 72 h

化合物 compound	浓度/M concentration	诱导活性/% inducing activity	死亡率/% death rate
罂粟碱 papavarine	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}	各个浓度为 0	10^{-4} M 浓度为 69.17 ± 0.58 10^{-3} M 浓度为 70.37 ± 0.71 其他浓度为 0
异丁基甲基黄嘌呤 IBMX	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}	10^{-4} M 浓度为 22.5 ± 10.9 其他浓度为 0	10^{-3} M 浓度为 100 其他浓度为 0
茶碱 theophylline	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}	各个浓度为 0	各个浓度为 0
Ro-20-1724	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}	各个浓度为 0	10^{-3} M 浓度为 100 其他浓度为 0
双丁酸环腺苷酸 db-cAMP	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}	各个浓度为 0	各个浓度为 0
毛猴素 forskolin	10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3}	各个浓度为 0	各个浓度为 0

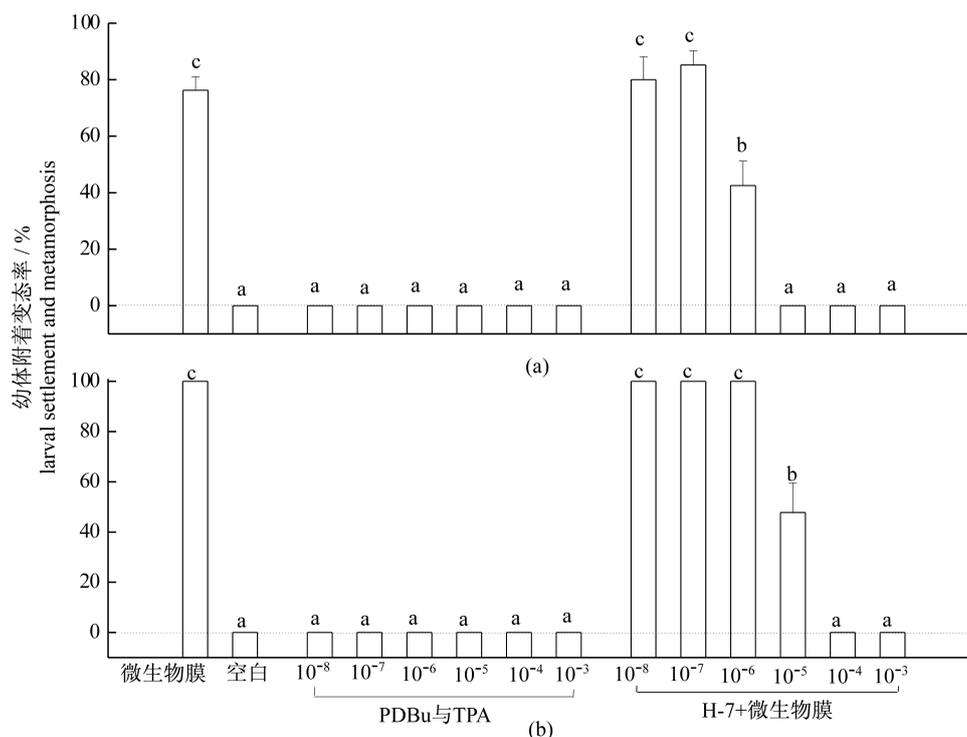


图 2 PI/DAG/PKC 信号通路活化剂 PDBu 和 TPA,抑制剂 H-7 分别对幼体附着变态的诱导与抑制效果

(a) 48 h 后幼体的附着变态率; (b) 72 h 后幼体的附着变态率; 微生物膜与 SSW 分别作为正对照与空白对照

Fig.2 Inductive effects of PDBu and TPA (PI/DAG/PKC signal pathway activators) and inhibitive effects of H-7 (PI/DAG/PKC signal pathway inhibitor) for larval settlement and metamorphosis

(a) larval settlement and metamorphosis rates after 48 h; (b) larval settlement and metamorphosis rates after 72 h; biofilms and SSW were set as positive and blank controls

3 讨论

自然环境中,海洋无脊椎动物幼体的附着变态是一个由幼体自身信号受体接受外界诱导刺激,通过体内信号通路完成附着变态调控的一系

列复杂过程^[2,4,7]。针对幼体信号受体与信号通路的内在机理已围绕不同物种开展了很多研究工作^[8-12,14,18],但是这些研究大多是直接利用离子、神经性试剂或相似物等人工诱导物进行诱导/抑制幼体的附着变态,而忽略了微生物膜等天然诱

导物的诱导机理可能会与人工诱导物有所不同。本研究采用天然微生物膜与神经性试剂结合的方法初步探讨了信号受体与信号通路的作用,为自然环境中幼体附着变态内在机理的阐明提供了有价值的信息。

本研究结果显示,GDP- β -S 对微生物膜的活性没有抑制作用,同时 Gpp[NH]p 的诱导活性为零,表明 GPCRs 可能不参与紫贻贝幼体附着变态的信号介导。这与盘管虫线虫 (*Polychaete hydroides elegans*)、鹿角杯形珊瑚 (*Pocillopora damicornis*)、夏威夷蔷薇珊瑚 (*Montipora capitata*) 等相关的报道相同,即非 GPCRs 的其他细胞反应/过程发挥了作用^[19-20]。与之不同的是,GPCRs 参与了匍茎草苔虫、纹藤壶、红鲍与绿海胆等幼体的附着变态^[8-12]。这表明海洋无脊椎动物幼体附着变态的信号受体是一个复杂的体系,而紫贻贝与红鲍同为贝类,幼体信号受体呈现截然不同的特点说明信号受体跟物种的分类没有关系。同时,以上的研究结果表明幼体的信号受体也无法根据物种的系统发生来进行分类。

以前的研究表明,AC/cAMP 以及 PI/DAG/PKC 信号通路调控了匍茎草苔虫、纹藤壶、红鲍与绿海胆等多种幼体的附着变态^[2,8-12]。就 AC/cAMP 信号通路调控而言,本研究所调查的 6 种与此通路相关、理论上能够诱导幼体附着变态的神经性试剂,除了 IBMX 之外,在 48 和 72 h 后都没有活性。并且这些试剂在较高浓度时,幼体有死亡现象,表现出了一定的神经性药物毒性。72 h 后,IBMX 仅仅在 10^{-4} M 呈现出一定的活性,但是与微生物膜的活性相比差异显著,且微生物膜在 48 h 后就呈现出非常高的活性,表明 AC/cAMP 信号通路可能参与了紫贻贝幼体附着变态的调控,但是这个信号通路不是主要的。或者是由于 IBMX 在 10^{-4} M 时具有一定的神经性药物毒性所导致的一种实验假象,因为其在 10^{-8} ~ 10^{-6} M 较低浓度范围内没有活性;这需要进一步论证。与之对应的 PI/DAG/PKC 信号通路活化剂的结果显示,2 种活化剂在 48 和 72 h 后都没有活性。但是,该通路的抑制剂在 10^{-6} M 的低浓度下,48 h 就表现出了非常显著的活性抑制效果,且这种抑制效果随着时间延长到 72 h 后,低浓度的抑制效果丧失,而抑制浓度上升到 10^{-5} M,表明 PI/DAG/PKC 信号通路起了调控作用。从活性

浓度、作用时间 2 个方面比较 AC/cAMP 与 PI/DAG/PKC 信号通路的实验结果,前者为 10^{-4} M、72 h,后者为 10^{-6} M、48 h,进一步表明了 PI/DAG/PKC 信号通路参与调控紫贻贝幼体的附着变态。

综上所述,本研究首次揭示了 GPCRs 受体与信号通路在紫贻贝幼体附着变态过程中的参与调控作用。区别于人工诱导物,实验过程中引入了天然诱导基质-微生物膜,结果初步反映了自然环境下幼体附着变态过程中的内在机理,并首次明确了 PI/DAG/PKC 信号通路的调控作用。本研究为揭示紫贻贝幼体附着变态的内在机理提供了初步证据,有助于推进该品种的发育生物学研究以及通过切断信号通路实现生物污损防治方面的开发。

参考文献:

- [1] Eckman J E. Closing the larval loop: linking larval ecology to the population dynamics of marine benthic invertebrates [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1996, 200(1-2): 207-237.
- [2] Ke C H, Feng D Q. Researches on larval settlement and metamorphosis of marine benthos [J]. *Journal of Xiamen University: Natural Science*, 2006, 45(2): 77-82. [柯才焕,冯丹青. 海洋底栖动物浮游幼体附着和变态的研究. 厦门大学学报:自然科学版, 2006, 45(2): 77-82.]
- [3] Pawlik J R. Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates [J]. *Oceanography and Marine Biology Annually Review* [J]. 1992, 30: 273-335.
- [4] Qian P Y, Lau S C K, Dahms H U, et al. Marine biofilms as mediator of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling and aquaculture [J]. *Marine Biotechnology*, 2007, 9(4): 399-410.
- [5] Hadfield M G, Paul V J. Natural chemical cues for settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae [M]//Mc Clintock J B, Baker J B. *Marine Chemical Ecology*. Boca Raton: CRC Press, 2001, 431-460.
- [6] Morse D E. Recent progress in larval settlement and metamorphosis: closing the gaps between molecular biology and ecology [J]. *Bulletin of Marine Science*, 1990, 46(2): 465-483.
- [7] Zhang T. Advancements in research of settlement and

- metamorphosis of marine invertebrate larvae. I. Impact factor [J]. *Marine Science*, 2000, 24 (1): 25 - 29. [张涛. 海洋无脊椎动物幼虫附着变态研究进展 I. 影响因子. 海洋科学, 2000, 24 (1): 25 - 29.]
- [8] Morse D E, Hooker N, Duncan H, *et al.* G γ -aminobutyric acid, a neurotransmitter, induces planktonic abalone larvae to settle and begin metamorphosis [J]. *Science*, 1979, 204 (4391): 407 - 410.
- [9] Clare A S, Thomas R F, Rittschof D. Evidence for the involvement of cyclic AMP in the pheromonal modulation of *barnacle settlement* [J]. *Journal Experiment Biology*, 1995, 198(3), 655 - 664.
- [10] Bertrand J F, Woollacott R M. G protein-linked receptors and induction of metamorphosis in *Bugula stolonifera* (Bryozoa) [J]. *Invertebrate Biology*, 2003, 122 (4): 380 - 385.
- [11] Bishop C D, Brandhorst B P. Development of nitric oxide synthase-defined neurons in the sea urchin larval ciliary band and evidence for a chemosensory function during metamorphosis [J]. *Developmental Dynamics*, 2007, 236(6): 1535 - 1546.
- [12] Amador C G, Carpizo I E, Cristino J D. Role of protein kinase C, G-Protein coupled receptors, and calcium flux during metamorphosis of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* [J]. *Biological Bulletin*, 2006, 210(2): 121 - 131.
- [13] 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. [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. 海洋科学, 2011, 35 (8): 102 - 107.]
- [14] 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.
- [15] Bao W Y, Satuito C G, Yang J L, *et al.* Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to biofilms [J]. *Marine Biology*, 2007, 150(4): 565 - 574.
- [16] Yang J L, Satuito C G, Bao W Y, *et al.* Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* on different macroalgae [J]. *Marine Biology*, 2007, 152(5): 1121 - 1132.
- [17] Bao W Y, Yang J L, Satuito C G, *et al.* Larval metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to *Alteromonas* sp. 1: evidence for two chemical cues? [J]. *Marine Biology*, 2007, 152(3): 657 - 666.
- [18] Yang J L, Li S H, Bao W Y, *et al.* Effect of different ions on larval metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46 (1): 155 - 162.
- [19] Tran C, Hadfield M G. Are g-protein-coupled receptors involved in mediating larval Settlement and metamorphosis of coral planulae? [J]. *Biological Bulletin*, 2012, 4, 222(2): 128 - 136.
- [20] Holm E R, Nedved B T, Carpizo I E, *et al.* Metamorphic-signal transduction in *Hydroides elegans* (Polychaeta: serpulidae) is not mediated by a G-protein [J]. *Biological Bulletin*, 1998, 195: 212 - 219.

Primary study on the regulation of G-protein coupled receptors and signal pathways in the larval settlement and metamorphosis of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*

YANG Meiyuan¹, CHEN Haibing¹, HUANG Yanchao¹, MIAO Dong¹, WANG Junqi¹,
HOU Yingxue², BAO Weiyang^{1*}

(1. Environmental Science and Engineering College, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China;

2. Dalian Xinyulong Seafood Limited Company, Dalian 116023, China)

Abstract: To investigate the internal mechanism of the larval settlement and metamorphosis of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*, the roles of G-protein coupled receptors (GPCRs) and signal pathways were primarily studied by using their activators and inhibitors together with the inducing control of natural inducer-biofilms. The results showed that the activator of GPCRs (Gpp[NH]p) and the inhibitor (GDP- β -S) did not have inductive and inhibitive activities, respectively. This indicated that other cellular action or processes not related to GPCRs may be involved in the larval settlement and metamorphosis of the blue mussel *M. galloprovincialis*. Six kinds of neuro-pharmaceutical agents except IBMX, which are related to the AC/cAMP pathways and theoretically have inductive activities, did not have active effects at the concentrations of 10^{-8} – 10^{-3} M after 48 and 72 h and even presented relatively high neuro-pharmaceutical toxicities. IBMX presented certain inductive activity at the concentration of 10^{-4} M after 72 h, whereas this was significantly lower and hysteretic compared to that of biofilms which had very high activity after 48 h. Two kinds of activators related to PI/DAG/PKC pathway did not have inductive activity after 48 h and 72 h, but the inhibitor, H-7 showed significant inhibitive effect at the low concentration of 10^{-6} M. This inhibitive effect of H-7 disappeared after 72 h and the inhibitive concentration increased to 10^{-5} M. By comparing the effective concentrations and time, PI/DAG/PKC signal pathway was confirmed to involve in and regulated the larval settlement and metamorphosis of *M. galloprovincialis*, whereas AC/cAMP signal pathway may be the minor pathway or just the experimental false result due to the toxicity of the agents. Moreover, the present study utilized biofilms but not artificial inducers which can demonstrate the internal mechanism of larval settlement and metamorphosis under natural conditions. This can also benefit the study of the developmental biology of this species and realize the technique development of anti-biofouling by cutting the signal pathway.

Key words: *Mytilus galloprovincialis*; G-protein coupled receptors; signal pathway; larval settlement and metamorphosis

Corresponding author: BAO Weiyang, E-mail: baowy@yzu.edu.cn