



Preliminary study on enkephalinergic
neuroendocrine-immune regulatory network in Zhikong
scallop *Chlamys farreri*

By
Ying Guo

A Dissertation/Thesis Submitted to
The University of Chinese Academy of Sciences
In partial fulfillment of the requirement
For the degree of Master of Master of Science

Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences

May, 2013

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文是在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律责任人由本人承担。

论文作者签名：郭颖

日期：2013.05.20

学位论文版权使用授权书

本人完全了解中国科学院海洋研究所有关保留、使用学位论文的规定，同意海洋研究所保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子版，允许学位论文被查阅和借阅。本人授权中国科学院海洋研究所可以将本学位论文的全部或部分内 容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存、汇编本学位论文。

(保密论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签字：郭颖

日期：2013.05.20

导师签字：[Signature]

日期：2013.5.23

致谢

本研究是在导师宋林生研究员的亲切关怀和悉心指导下完成的。从论文的选题、实验方案的设计到研究工作的开展以及论文的撰写都蕴藏着宋老师的良苦用心。宋老师学识的渊博，工作的忘我精神，科研严谨求实的态度，对科学的执着追求，和宽以待人、严于律己的品德，永远都是我工作和生活道路上的学习楷模。在此谨向宋老师致以最崇高的敬意和最诚挚的感谢！

感谢王玲玲研究员在实验思路、论文撰写和工作方法上的启迪。感谢王孟强老师和周智老师在具体实验过程中的指导和大力帮助。充满活力和温情的实验团队为我提供了良好的研究环境，衷心感谢实验室所有的兄弟姐妹们，你们的热心帮助与鼓励是我论文顺利完成的保证。

感激开放室高强老师、邓田老师、邓涪老师为本研究提供了极其便利的条件。在研究生学习期间，研究生部的屠国华书记、武伟主任、张利永副主任、靳朝辉老师、宋彩凤老师和王家栋老师给予了大量的支持和帮助，在此表示真诚的感谢。感谢一路陪我走过来的朋友们，与你们相处的点点滴滴，都将是我人生的最美好的回忆。

感谢我的家人在物质上、精神上对我一如既往的支持，对你们的爱是我奋斗下去的最大动力！

感谢国家 973、863 项目及国家自然科学基金项目对本研究提供的资助。

郭颖

二〇一三年五月于青岛

栉孔扇贝脑啡肽及其受体介导的神经内分泌免疫调节

摘要

神经肽类物质是神经内分泌免疫调节系统的重要组成成分,在神经内分泌与免疫系统的双向调节中,神经肽家族成员之一的脑啡肽因扮演着神经递质和细胞因子的双重角色而备受关注。迄今为止,关于无脊椎动物神经内分泌免疫调节系统中脑啡肽功能的相关报道还比较少。本研究通过分子生物学、分子免疫学、生物化学和细胞生物学等技术手段的应用,查明了栉孔扇贝脑啡肽及其受体的分子特征和组织分布,分析了脑啡肽及其受体在栉孔扇贝免疫应答中的响应规律,进而初步探讨了功能性的脑啡肽-脑啡肽受体通路对栉孔扇贝免疫应答的调节机制。

首先,本研究在栉孔扇贝的鳃、血淋巴细胞、肝胰腺、外套膜、肾和性腺中检测到了甲硫氨酸脑啡肽(Methionine-Enkephalin, Met-ENK)类分子。而栉孔扇贝在受到鳃弧菌刺激 24 和 48 小时后,血清中 Met-ENK 的含量与空白组相比,分别升高了 3.5 倍和 3.0 倍。栉孔扇贝血淋巴和 Met-ENK 体外孵育 1 小时后,血清中酚氧化酶(Phenoloxidase, PO)活性、肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor alpha, TNF- α)活性和抑菌活性以及血淋巴细胞的吞噬活性均显著增强,但血清中溶菌酶(Lysozyme, LYZ)活性和超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutases, SOD)活性则显著降低。

从栉孔扇贝中克隆得到了一种 Met-ENK 受体——阿片肽生长因子受体(Opioid Growth Factor Receptor, OGFR)基因 CfOGFR。其 cDNA 全长为 2381 bp,编码一条由 399 个氨基酸残基组成的多肽,在其氨基酸序列的 N 端有一个低复杂区和一个 OGFR_N 结构域。CfOGFR 的氨基酸序列与其他物种 OGFRs 氨基酸序列的相似性为 33-64%。CfOGFR 的 mRNA 在栉孔扇贝的肾脏、性腺、血淋巴细胞、外套膜、鳃、闭壳肌和肝胰腺中均有表达,其中在肝胰腺中的表达量最高。在栉孔扇贝的整个胚胎发育过程中, CfOGFR 的 mRNA 均能被检测到,其表达水平呈下降趋势。栉孔扇贝在脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)、 β -1,3-葡聚糖(β -1,3-Glucan, Glu)和 Polyinosinic-Polycytidylic acid (Poly(I:C))的分别刺激下,血淋巴细胞中 CfOGFR mRNA 的表达量均显著升高。Met-ENK 能够显著抑制转染了 pcDNA3.1(+)-CfOGFR 的 HEK293T 细胞的增殖,并且这种抑制

作用存在时间和浓度依赖性。

综上所述，功能性的脑啡肽-脑啡肽受体通路存在于栉孔扇贝神经内分泌免疫调节系统中。脑啡肽可以被病原体或病原相关分子模式（Pathogen associated molecular patterns, PAMPs）诱导，进而通过其相应受体行使免疫调节功能。对栉孔扇贝神经内分泌免疫系统中脑啡肽-脑啡肽受体通路的研究，不仅使我们对内源性阿片肽及其受体的起源和演化有了更好的了解，还使我们对神经内分泌与免疫系统的联系有了进一步认识。同时，关于该通路免疫调节作用的研究发现将为贝类养殖的病害防治提供一定理论依据。

关键词：栉孔扇贝，脑啡肽，阿片肽生长因子受体，神经内分泌，免疫应答

www.docin.com

Preliminary study on enkephalinergic neuroendocrine-immune
regulatory system in Zhikong scallop *Chlamys farreri*

Guo Ying (Marine Biology)

Directed by Prof. Linsheng Song

ABSTRACT

Neuropeptide is one of the most important components in the neuroendocrine-immune regulatory network, where enkephalins stand out for its roles both as a neurotransmitter as well as a cytokine in the two-way adjustment of this network. Currently, the research about enkephalins in the neuroendocrine-immune regulatory system mainly concentrates on vertebrates. In our study, the molecular features of methionine-enkephalin (Met-ENK) and its receptor, and their response patterns as well as immune regulation in immune response were investigated by using molecular immunology, biochemistry, cytobiology, etc. technical means to obtain a preliminary insight into the pathways of enkephalins and their receptors in scallop *Chlamys farreri*.

Apparent enkephalin-containing sections were visualized in gill, hemocytes, hepatopancreas, mantle, kidney and gonad via immunofluorescence technique, while little immunoreactivity was observed in adductor muscle. The content of Met-ENK in scallop serum was significantly up-regulated at 24 and 48 h post *Vibrio anguillarum* stimulation, 3.5-fold and 3.0-fold compared to blank group ($P < 0.05$), respectively. The bacteriostasis and phagocytosis of scallop serum were both enhanced with increasing concentrations of Met-ENK (0.1-10 μM), while the phenoloxidase (PO) activity was only enhanced by 0.1 μM Met-ENK. It has demonstrated that the lysozyme (LYZ) activity and superoxide dismutases (SOD) activity in scallop serum were both significantly down-regulated by 10 μM Met-ENK ($P < 0.05$). Met-ENK induced higher levels of TNF- α activity at the dose of 0.1 μM , 1 μM and 10 μM ($P < 0.05$), respectively, whereas there was no significant difference between them.

Opioid growth factor receptor (OGFR) was a receptor for Met-ENK and its gene was cloned and characterized from *C. farreri* (designated as CfOGFR). The complete cDNA sequence of CfOGFR was 2381 bp, whose deduced protein contained a low complexity domain and a conserved OGFR_N domain at the N-terminal. The amino acid sequence of CfOGFR shared 33-64% similarity with other OGFRs. The mRNA transcripts of CfOGFR were constitutively expressed in all the tested tissues including kidney, gonad, hemocytes, mantle, gill, adductor muscle and hepatopancreas, with the highest expression level observed in hepatopancreas. During the early embryonic development, the mRNA transcripts of CfOGFR could be detected in all the stages, where the expression level presented a downward trend as a whole. The stimulation of LPS, Glu or poly (I: C) significantly induced the expression of CfOGFR mRNA in hemocytes ($P < 0.05$). Co-IP and Western blot results revealed that the protein CfOGFR in hemocytes displayed high affinity and specificity to Met-ENK. Met-ENK was observed to inhibit the proliferation of HEK293T cells transfected with pcDNA3.1(+)-CfOGFR in a time and dosage dependent manner.

It could be implicated from all the above results that enkephalins and their receptors were present in *C. farreri*, and enkephalins could be induced by some bacteria or the pathogen associated molecular patterns (PAMPs). And then, enkephalins functioned to modulate the immune response of scallop through the opioid receptors. Characterization of enkephalins and their receptors in scallops would provide a better understanding of the origin and evolution process of endogenous opioids and their receptors, as well as the relationship between the neuroendocrine system and immune response, and the findings on its immunological activity in scallop might contribute to the health management and disease control in scallop aquaculture.

Key words: *Chlamys farreri*, Met-ENK, OGFR, Neuroendocrine, Immune response

目录

第一章 研究背景.....	1
第一节 神经内分泌免疫调节系统简介.....	1
第二节 阿片肽能神经内分泌免疫调节系统概述.....	1
一、阿片肽能神经内分泌免疫调节系统的组成.....	2
二、阿片肽能神经内分泌免疫调节系统的功能.....	4
三、阿片肽能神经内分泌免疫调节系统的作用机制.....	4
第三节 脑啡肽-脑啡肽受体通路概述.....	6
一、脑啡肽-脑啡肽受体通路的组成.....	6
二、脑啡肽-脑啡肽受体通路的功能.....	8
三、脑啡肽-脑啡肽受体通路的调控机制.....	10
第四节 无脊椎动物脑啡肽能神经内分泌免疫调节系统的研究进展.....	11
一、无脊椎动物的脑啡肽能神经内分泌系统.....	11
二、无脊椎动物中脑啡肽的免疫调节功能.....	12
第五节 本研究的主要目的及意义.....	13
第二章 实验材料与方法.....	15
第一节 实验材料.....	15
一、实验仪器设备.....	15
二、实验动物、菌株及细胞株.....	16
三、实验试剂及引物信息.....	17
第二节 实验方法.....	20
一、血淋巴细胞滴片、组织石蜡切片的制备.....	20
二、免疫荧光组化.....	20
三、鳃弧菌刺激实验.....	21
四、血淋巴上清液中 Met-ENK 和 GAPDH 浓度的测定.....	22
五、血淋巴与 Met-ENK 的孵育.....	23
六、免疫相关酶活测定.....	23
七、血淋巴细胞吞噬活性的测定.....	25
八、TNF- α 活性的测定.....	25
九、PAMPs 刺激及组织材料的收集.....	26
十、总 RNA 制备.....	27
十一、RACE 技术获得 CfOGFR 基因 cDNA 全长序列.....	27
十二、荧光实时定量 PCR.....	28
十三、目的基因的克隆测序.....	28
十四、重组质粒的构建.....	29
十五、质粒的制备.....	30
十六、蛋白的原核重组、表达、纯化及复性.....	30
十七、免疫血清的制备及鉴定.....	31
十八、Western blot.....	31
十九、免疫共沉淀 (Co-IP).....	31
二十、外源基因的瞬时转染.....	32
二十一、细胞增殖及毒性实验.....	33
二十二、数据分析方法.....	33

第三章 实验结果.....	34
第一节 栉孔扇贝中 ENK 的组织分布.....	34
第二节 鳃弧菌刺激后栉孔扇贝血清中 Met-ENK 的含量变化.....	35
第三节 血淋巴与 Met-ENK 孵育后下游免疫指标的变化.....	36
一、血淋巴上清液中的免疫相关酶活.....	36
二、Met-ENK 对血淋巴细胞吞噬活性的影响.....	39
三、Met-ENK 对血淋巴上清液中 TNF- α 活性的影响.....	40
第四节 阿片肽生长因子受体基因的克隆与 mRNA 表达规律分析.....	40
一、CfOGFR 基因的克隆.....	40
二、CfOGFR 基因的分子特征.....	40
三、CfOGFR 基因 mRNA 的表达特征.....	45
第五节 Met-ENK 与 CfOGFR 的相互作用.....	47
一、CfOGFR 的原核表达及其多克隆抗体制备.....	47
二、Met-ENK 与 CfOGFR 的特异性结合.....	49
三、Met-ENK/CfOGFR 对 HEK293T 细胞增殖的影响.....	50
第四章 分析与讨论.....	51
第一节 栉孔扇贝脑啡肽能神经内分泌系统的结构特征及功能验证.....	52
一、栉孔扇贝脑啡肽的组织分布.....	52
二、栉孔扇贝阿片肽生长因子受体基因的确定.....	53
三、栉孔扇贝阿片肽生长因子受体的功能验证.....	53
四、CfOGFR mRNA 的组织分布及其在栉孔扇贝胚胎发育过程中的时序表达.....	54
第二节 栉孔扇贝脑啡肽能神经内分泌系统参与了扇贝的免疫应答反应.....	55
第三节 脑啡肽对栉孔扇贝固有免疫应答的调节作用.....	56
第五章 结论.....	58
参考文献.....	60
作者简介及攻读学位期间发表的学术论文与研究成果.....	71

www.docin.com

第一章 研究背景

第一节 神经内分泌免疫调节系统简介

机体内环境稳态的维持建立在体内各种生理活动的动态平衡上,而这种平衡常常受到环境中各种刺激的威胁。当机体受到胁迫时,其神经系统、内分泌系统和免疫系统会被快速激活,以维持其内环境的相对稳定。已有研究表明神经内分泌和免疫系统并不是各自独立行使功能,而是通过双向调节来维持机体内环境稳态。这种相互作用的实现依赖激素、神经递质和细胞因子等信号分子及其受体的参与:免疫系统通过分泌细胞因子等激活神经内分泌系统,而被激活的神经内分泌系统则通过释放激素和神经递质等调节免疫系统的应答反应,从而构成了一个环状的神经内分泌免疫调节网络^[1,2]。

目前,关于脊椎动物神经内分泌免疫调节系统的研究已较为完善,其对免疫应答调节过程的阐述也比较系统,可简单概括如下:免疫细胞在识别外源性病原体或机体内产生的异常物质后立即激活免疫系统并启动免疫应答反应,而周围感觉神经元将被该过程中产生的免疫介质迅速激活从而启动下游效应,例如:通过诱导神经肽等递质的释放直接增强机体的免疫应答水平,以迅速杀灭病原或者将免疫信号传导至中枢神经系统(图 1.1);在病原被清除后或免疫应答水平超过一定阈值时,机体的自主神经系统或内分泌系统将在其神经中枢的调控下,释放一些可以下调机体免疫应答水平并修复免疫损伤的免疫调质,以恢复机体内稳态^[4];除此以外,为了补充机体内稳态维持过程中损耗的能量,神经内分泌系统还需对机体的能量进行重新分配^[3-5]。在神经内分泌与免疫系统的双向调节中,各系统之间精密的协调合作是非常重要的。研究显示,在免疫应答末期,如果神经内分泌系统对免疫应答的下调不足,就可能对机体造成一定的免疫损伤,导致免疫相关疾病,如系统性红斑狼疮等;而抑制性调节过高则可能削弱机体对病原体的抵御能力^[1,6]。综上所述,在神经内分泌免疫调节网络中,系统间精密的协调合作机制对机体抵御外源性病原体或维持内稳态等是十分关键的。

第二节 阿片肽能神经内分泌免疫调节系统概述

神经肽(Neuropeptide)在神经内分泌与免疫系统的双向调节中扮演着重要

角色，并具有含量低、活性高、作用复杂等特点。神经肽种类繁多，目前对其分类尚无公认的标准，其中按照结构的同源性可将其分为胰高血糖素、阿片神经肽、胃泌素等九大类^[7]。

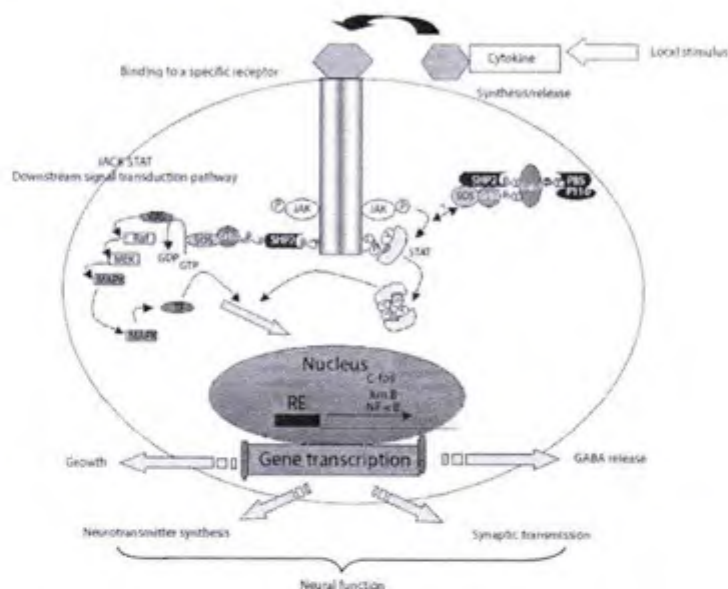


图 1.1 细胞因子激活的外周感觉神经元^[8]

Fig 1.1 The peripheral sensory neuron activated by cytokines

神经肽不仅存在于神经系统，还广泛分布于其他各系统中；部分神经肽既能以突触释放的方式实现调节作用，又能以细胞分泌的方式对邻近或较远部位的靶细胞进行调节，同时执行细胞因子、神经递质、神经调质以及神经激素等多重功能，在机体生长发育的各个阶段都起着重要的调控作用。

一、阿片肽能神经内分泌免疫调节系统的组成

阿片神经肽，又称为阿片肽，是一类具有阿片样活性的多肽物质，阿片肽及其受体已在许多动植物体内被发现。阿片肽最初作为安慰剂出现在宗教仪式上，其使用历史可追溯到公元前 300 年^[9]。19 世纪初，一种具有镇痛作用的阿片样活性物质即吗啡，从鸦片中被分离出来，并被广泛应用于各种急慢性疼痛的治疗。但由于耐药性及依赖性等问题，其应用受到了很大的限制。自从吗啡被发现后，人们就致力于其作用机制的研究，希望可以找到一种不存在耐药性和依赖性的理想镇痛药物。在对理想阿片样镇痛物质寻找的过程中，先后发现了包括 β 内啡肽 (β -Endorphin)、强啡肽 (Dynorphin) 和脑啡肽 (Enkephalin) 在内的 3 种内源

性阿片肽, 这 3 种内源性阿片肽 N 端 (N-terminus) 的 1-4 位氨基酸序列均为 Tyr-Gly-Gly-Phe^[10-14]。

与此同时, 3 种阿片肽受体, 即 μ 、 δ 和 κ 型受体被相继发现, 并因其结构具有很高的同源性而被称为经典阿片肽受体^[15, 16]。通过一系列配体结合试验, 最终发现 κ 型受体与强啡肽之间的亲和力较强, 强啡肽被认为是 κ 型受体的内源性配体; 而脑啡肽则是 δ 型受体的内源性配体。直到 1997 年才发现了 μ 型受体选择性和亲和力最高的生物活性肽, 即 μ 型受体的内源性配体, 并被命名为内吗啡肽 (Endomorphin)^[17], 其 N 端 1、4 位的氨基酸残基与前三种阿片肽的相同。

二十世纪末, 经典阿片肽受体家族的又一成员孤儿 (Orphan) 受体被发现^[18], 其蛋白结构与经典阿片肽受体的具有很高的同源性, 即有 7 个跨膜结构并与 G 蛋白偶联。随后, 孤儿受体的内源性配体孤啡肽 (Orphanin) 被发现^[19, 20], 孤啡肽与所有内源性阿片肽 N 端 2-4 位氨基酸序列一致。因此, 目前已发现的 β 内啡肽、强啡肽、内吗啡肽、孤啡肽以及脑啡肽构成了所谓的内源性阿片肽家族。

研究表明, 不仅神经细胞可以分泌阿片肽, 免疫细胞也可以分泌阿片肽。1997 年, 研究人员从大鼠的单核白细胞中发现了阿片肽的一个前体——阿黑皮素原 (Pro-Opiomelanocortin, POMC) 的 mRNA^[21]; 而 POMC 的产物如 γ 促黑色素细胞激素 (Melanocyte-Stimulating Hormone, γ MSH)、促肾上腺皮质激素 (Adrenocorticotrophic Hormone, ACTH)、 β 内啡肽以及 β 脂溶素也已在朗格汉斯细胞、角质细胞、胎盘细胞、胸腺细胞、树突状细胞、巨噬细胞和淋巴细胞里被检测到^[22]。对人和啮齿动物免疫系统中的脑啡肽前体即脑啡肽原 mRNA 的检测结果显示, 其主要存在于 CD4⁺ T 细胞、CD4⁺ 胸腺细胞、巨噬细胞、单核细胞和肥大细胞中^[23]。强啡肽 A 及其前体强啡肽原 mRNA 也均已在患腹膜炎的小鼠炎症部位的白细胞中被检测到^[24-26]。研究人员已从多种免疫细胞如小鼠的淋巴细胞以及人的单核细胞、中性粒细胞、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞中鉴定出孤啡肽及其受体基因的 mRNA^[27-29]。内吗啡肽也已在大鼠的脾、胸腺、巨噬细胞和 B 细胞以及人的脾和外周血淋巴细胞中被检测到^[30]。因此, 当炎症出现的时候, 机体的免疫细胞能够迅速活化并分泌具有免疫活性的阿片肽分子。

二、阿片肽能神经内分泌免疫调节系统的功能

已有研究证明,阿片肽在应激反应以及神经内分泌系统和免疫系统的相互作用过程中发挥着重要的调节作用^[31]。在一般适应综合症(General adaptation syndrome, GAS)形成的过程中, β 内啡肽和强啡肽 A 通过抑制促肾上腺皮质激素释放激素(Corticotropin-Releasing Hormone, CRH)的分泌,负向调控下丘脑-垂体轴的作用^[32]; β 内啡肽和强啡肽 A 还可以直接作用于肾上腺皮质,而作用的方式则取决于它们相应受体的表达情况^[33]。

阿片肽能够作为免疫系统的重要调节因子,作用于几乎所有的免疫相关细胞,并且对不同亚型细胞的作用不同。研究表明, β 内啡肽可以增强单核细胞和中性粒细胞的吞噬活性^[34],并对它们的抑菌活性和分泌活性起调节作用^[35]。另外, β 内啡肽还可以抑制炎症因子如肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor alpha, TNF- α)和白介素 8 (Interleukin 8, IL-8)的释放^[36-38]。体外实验发现, β 内啡肽可以通过激活干扰素 γ (Interferon- γ , INF- γ)、穿孔素和颗粒酶 B 来增强自然杀伤(Natural Killer, NK)细胞介导的细胞毒性作用^[39]。强啡肽类物质能够显著增强巨噬细胞的吞噬活性和肿瘤杀伤活性,提高其胞内 IL-1 和超氧化物酶的水平^[40-42]。将不同浓度(10^{-6} - 10^{-9} M)的内啡肽与大鼠覆膜的巨噬细胞孵育 12 到 24 小时后,发现其能够抑制巨噬细胞中 TNF- α 和 IL-1 β 的生成;内啡肽还可以抑制人单核白细胞内由脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导的 IL-10 和 IL-12 的生成^[43]。阿片肽类分子对粒细胞的吞噬、分泌和抑菌活性以及膜表面 CD 标记的表达和凋亡过程均有调节作用。据报道,甲硫氨酸脑啡肽(Methionine-Enkephalin, Met-ENK)、 β 内啡肽和强啡肽在低浓度时可以提高多形核白细胞中的活性氧水平,并且这种诱导作用可以被纳洛酮(Naloxone, Nal)阻断^[44-46];而在高浓度(10^{-6} - 10^{-8} M)时,能够降低中性粒细胞中 O_2^{-} 和 NO 的水平^[35]。孤啡肽能够显著刺激人外周血中多形核白细胞的趋化活性,增强小鼠炎症附近白细胞的渗透作用^[47]。

三、阿片肽能神经内分泌免疫调节系统的作用机制

经过多年的实验探索,研究人员发现阿片肽类物质行使各种生理功能主要是经由阿片肽受体介导的。研究结果显示,阿片肽受体具有与 G 蛋白偶联受体(G

protein-coupled receptor, GPCR) 相似的结构, 如图 1.2, 即每个受体内包含七个 α 螺旋组成的跨膜结构域, 其结构可分为带有糖基化修饰位点的膜外 N 端, 带有棕榈酰化修饰位点的膜内 C 端 (C-terminus), 3 个膜外环 (Loop) 和 3 个膜内环 [48]。随后, 又在阿片肽受体的第七个跨膜结构以及第三个跨膜结构和第二个膜内环的交界处分别发现一个 NPXXY motif 和一个 DRY motif, 因此, 阿片肽受体被归为 G 蛋白偶联受体超家族中的视紫红质样受体家族 [49]。

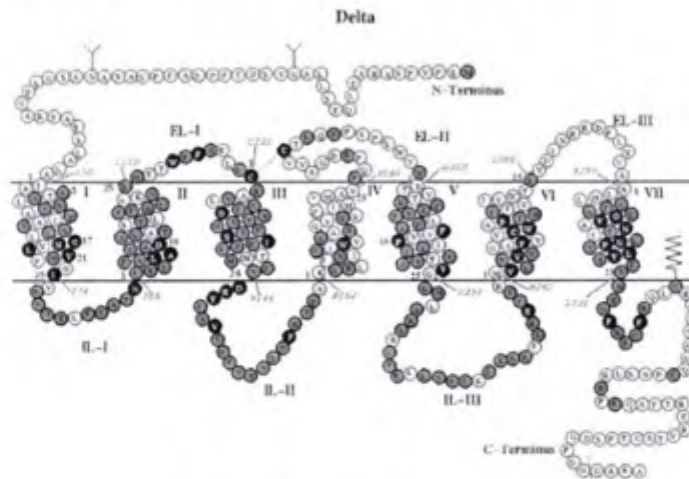


图 1.2 δ 型阿片肽受体的结构

Fig 1.2 Structure of δ opioid receptor

(from <http://www.opioid.umn.edu>), EL = Extracellular loop, IL = intracellular loop.

阿片肽类物质与阿片肽受体结合后, 下游信号的转导主要通过异源三聚体 $G_{\alpha_{i/o/s}}$ 蛋白介导 [50, 51]。 G_{α_s} 蛋白的激活将诱导腺苷酸环化酶的活性, 从而引发经典信号级联反应 AC-cAMP-PKA-CREB; 相反, $G_{\alpha_{i/o}}$ 蛋白的激活将抑制腺苷酸环化酶的活性, 使胞内 cAMP 水平下降 [52, 53]。阿片肽类物质刺激免疫细胞后, 胞内 cAMP 水平是上升还是下降取决于许多因素, 例如: 研究对象的种属或细胞系的种类、阿片肽受体表达的类型和数量、配体的浓度、刺激持续的时间以及是否有其他刺激因素存在 [54]。cAMP 含量的变化将引起某些第二信使含量的变化, 如胞浆内 Ca^{2+} 浓度的变化 [55], 进而影响一些关键元件的活性 [56-58], 激活一系列信号通路, 如 MAPK (JNK, ERK, p38) 通路, 促进炎症因子 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 等的释放 [59]。

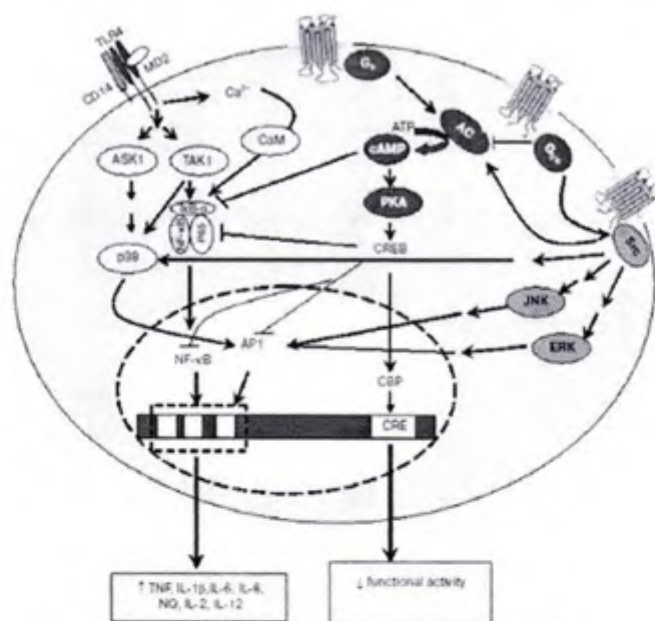
图 1.3 阿片肽受体介导的信号转导通路^[59]

Fig 1.3 The main mechanisms of intracellular signal transduction from opiate receptors.

第三节 脑啡肽-脑啡肽受体通路概述

一、脑啡肽-脑啡肽受体通路的组成

1975 年，脑啡肽分别由两组独立的研究人员发现：苏格兰的 John Hughes 和 Hans Kosterlitz 首次在猪的脑中发现了两种结构相似的五肽，当时称它们为 enkephalins^[10]；同一时间，美国的 Rabi Simantov 和 Solomon H. Snyder 在牛的脑中也发现了脑啡肽^[60]。脑啡肽属于内源性阿片肽，为五肽（YGGFX）。高等动物大脑的许多区域中均含有脑啡肽，其中纹状体中的含量最高；脑啡肽也存在于整个胃肠道中，其中结肠最低，回肠次之，而胃窦和十二指肠中的脑啡肽含量最高。天然的脑啡肽有两种，分别为甲硫氨酸脑啡肽（Met-ENK）和亮氨酸脑啡肽（Leucine-Enkephalin, Leu-ENK），两者的区别仅在于其 C 端的氨基酸残基不同，但其前体（脑啡肽原，Pro-Enkephalin）相同。

脑啡肽的结构式如下所示：

Met- ENK: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met

Leu- ENK: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

应用 Northern blot 和原位杂交技术，已在哺乳动物多种免疫细胞中检测到了脑啡肽原的 mRNA 及其衍生肽，如人 T 淋巴细胞和单核细胞，以及啮齿动物的

胚胎胸腺细胞、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞等^[61]。当机体受到外界病原体侵染时，相关细胞中脑啡肽原基因的 mRNA 表达会升高，脑啡肽原将在相关酶的作用下进行剪切生成各种活性肽。Kamphuis 等发现，人体循环单核细胞在 Th2 类细胞因子刺激下，细胞内脑啡肽原基因的 RNA 表达会升高^[61]；在注射植物血凝素后，人的淋巴细胞会迅速分泌 Synenkephalin 和它的衍生物，其衍生物可以促进白细胞的增殖^[62]；Goumon 等在牛传染性体液白细胞中检测到了脑啡肽原、神经肽 B、enkelytin 和其它脑啡肽原衍生物^[63]。脑啡肽原进行剪切的过程可简述如下（图 1.4）：激素原转化酶 2 或 3（Prohormone convertase 2 or 3, SPC2/3）作用于脑啡肽原 C 端两个相邻碱性氨基酸（Lysine-Arginine, KR）位点，生成一个含有神经肽 B 氨基酸序列的多肽；这条多肽接着被裂解为神经肽 B；神经肽 B 在血管紧张素转换酶（Angiotensin converting enzyme, ACE）和中性内肽酶（Neutral endopeptidase, NEP）的作用下被分解为一种抗菌肽 Enkelytin 或 Met-ENK Arg-Phe（Met-ENK-RF）；Enkelytin 又在 ACE 和 NEP 的作用下分解为 Met-ENK^[64]。NEP 的存在对于整个剪切过程的顺利进行是非常重要的，因为它不仅促使脑啡肽原生成活性肽类信号分子，还能够降解这些活性成分；由于这些肽酶均存在于免疫细胞中，因此免疫细胞的募集对阿片肽前体的剪切至关重要^[65, 66]。

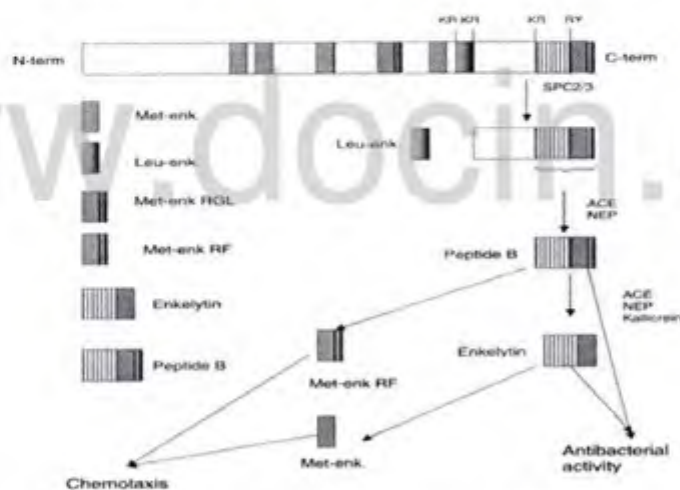


图 1.4 人脑啡肽原剪切过程简图^[64]

Fig 1.4 Putative processing scheme of human pro-enkephalin

脑啡肽对 δ 型阿片肽受体的特异性和亲和力最强，同时对 μ 型受体也有一定的亲和力^[67, 68]。研究发现，甲硫氨酸脑啡肽和亮氨酸脑啡肽对免疫细胞的活性调节具有很大的差异性，暗示着免疫细胞上存在 δ 亚型受体^[69-71]；Plotnikoff 等

认为甲硫氨酸脑啡肽对 δ_1 型受体具有较高的亲和性，而亮氨酸脑啡肽对 δ_2 型受体具有较高的亲和性，而这一猜测被后来的报道所证实^[72, 73]。脑啡肽不仅参与神经内分泌、炎症和免疫反应，还参与细胞增殖的调控过程，因此甲硫氨酸脑啡肽又被称为阿片肽生长因子 (Opioid growth factor, OGF)，而介导 OGF 对细胞增殖调控作用的 ζ 阿片肽受体，又被称为阿片肽生长因子受体 (Opioid growth factor receptor, OGFR)^[74]。OGFR 与经典阿片肽受体在功能、组织分布、亚细胞定位以及对配体选择的特异性等方面存在很大不同^[75]；分子生物学研究表明，OGFR 的基因组学和蛋白组学性质与经典阿片肽受体的存在明显差异^[76, 77]。应用一系列生物信息学软件如 ProDom、PROCITE、MOTIFS、PFAM 和 COILS 等对已有 OGFRs 的蛋白结构进行分析，除了一个核定位信号 (Nuclear localization signal, NLS) motif 外，并未发现其他与已知结构域同源的序列结构^[78]。不管脑啡肽是经由经典阿片肽受体还是阿片肽生长因子受体发挥生物学效应，这些效应均具有立体异构性并可被纳洛酮阻断^[75]。

二、脑啡肽-脑啡肽受体通路的功能

已有研究证据表明脑啡肽至少具有以下几方面的生物学功能：通过与其受体结合后降低神经细胞胞内的 cAMP 水平和 Ca^{2+} 水平，从而抑制神经传导实现镇痛功能；通过抑制 DNA 的复制以及阻止有丝分裂的发生实现抑制细胞增殖的功能；通过与免疫细胞表面的脑啡肽受体相互作用，双向调节细胞内的蛋白激酶 K、蛋白激酶 A 以及第二信使 cAMP 和 Ca^{2+} 的水平，进而影响造血细胞的生长和免疫细胞免疫调控功能的实现 (图 1.5)。

目前已经从哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类和硬骨鱼类等脊索动物中检测到了甲硫氨酸脑啡肽和阿片肽生长因子受体^[79]；而关于大鼠、小鼠和人的细胞和组织中 OGF-OGFR 通路的功能也已有许多相关报道^[80-82]。研究发现，OGF-OGFR 通路能够抑制多种癌细胞的增殖和扩散^[83]；对兔角膜上皮损伤的修复以及小鼠舌上皮细胞的更新具有重要意义^[84, 85]；研究人员在妊娠期大鼠胚胎的外胚层、中胚层和内胚层中检测到了 OGFR，发现其对胚胎器官中 DNA 的合成具有抑制作用^[86]。咪喹莫特是一种免疫反应调节因子，具有很强的抗病毒和抗肿瘤特性，研究发现，咪喹莫特是通过上调 OGFR 的表达来抑制肿瘤的生长并提高肿瘤的

免疫原性的^[87]。

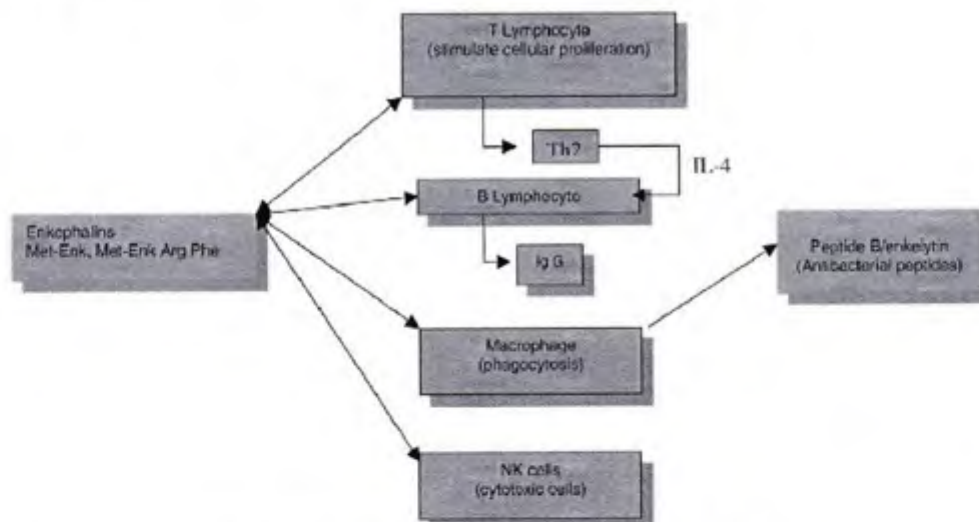


图 1.5 脊椎动物脑啡肽原生物的免疫调节作用^[64]

Fig 1.5 Modulation of immune responses by proenkephalin-derived peptides in vertebrates.

Kowalski 等发现甲硫氨酸脑啡肽可以促进 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的增殖，而亮氨酸脑啡肽的降解片段则可以促进辅助 T 细胞和毒性 T 细胞的生成^[88-90]。研究发现，甲硫氨酸脑啡肽可以增强由 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬活性^[91]；促使单核细胞、淋巴细胞和中性粒细胞朝向感染部位迁移^[90, 92]。Foris 等发现，甲硫氨酸脑啡肽在低浓度 (10^{-7} - 10^{-9} M) 时增强多形核 (Polymorphonuclear, PMN) 白细胞的抗体依赖细胞毒性 (Antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)，而在高浓度 (10^{-6} - 10^{-5} M) 时，则抑制它的抗体依赖细胞毒性^[93]。体内注射甲硫氨酸脑啡肽和它的代谢产物 Tyr-Gly-Gly 后，NK 细胞以及由分裂素诱导的 B 和 T 淋巴细胞的增殖作用明显增强，并且这种增强作用可以被纳洛酮阻断，说明这种促进作用是由阿片肽类物质介导的^[61]。另外，甲硫氨酸脑啡肽和它的类似物，如亮氨酸脑啡肽和 Met-ENK-RF，能够刺激免疫细胞中炎症因子如 IL-6 的释放，而 IL-6 则可以提高单核细胞中脑啡肽原 mRNA 的水平^[94]。许多证据表明，甲硫氨酸脑啡肽还可以促进免疫细胞中 IL-1 β 和 TNF- α 的释放^[91, 95]，因此甲硫氨酸脑啡肽被视为一种新型的细胞因子，参与免疫应答中炎症信号的传导^[96]。据报道，Met-ENK-RF 能够诱导圆形的、未活化的人粒细胞和无脊椎动物的免疫细胞变形和移动，并介导他们的趋化作用^[97]。

三、脑啡肽-脑啡肽受体通路的调控机制

通常情况下,阿片肽类分子与 μ 和 κ 型阿片肽受体的耦合将对免疫系统起抑制作用,而与 δ 型阿片肽受体的耦合将对免疫系统起激活作用^[98, 99];而通过这些受体的介导,甲硫氨酸脑啡肽可以顺利行使其神经递质和免疫调质功能^[100, 101]。当病原体侵染机体时,免疫细胞内成熟的脑啡肽原经剪切合成脑啡肽,合成的脑啡肽将诱导免疫细胞的趋化作用以及相关细胞因子的释放,而合成的神经肽 B 和 Enkephalin 则起到杀菌作用;Enkephalin 经剪切生成 Met-ENK-RF,进一步增强免疫细胞的应答反应;脑啡肽还可以通过 CD3 增强 Th2 淋巴细胞的免疫应答,促进胞内 Ca^{2+} 和 IL-4 的释放(图 1.6)^[64]。

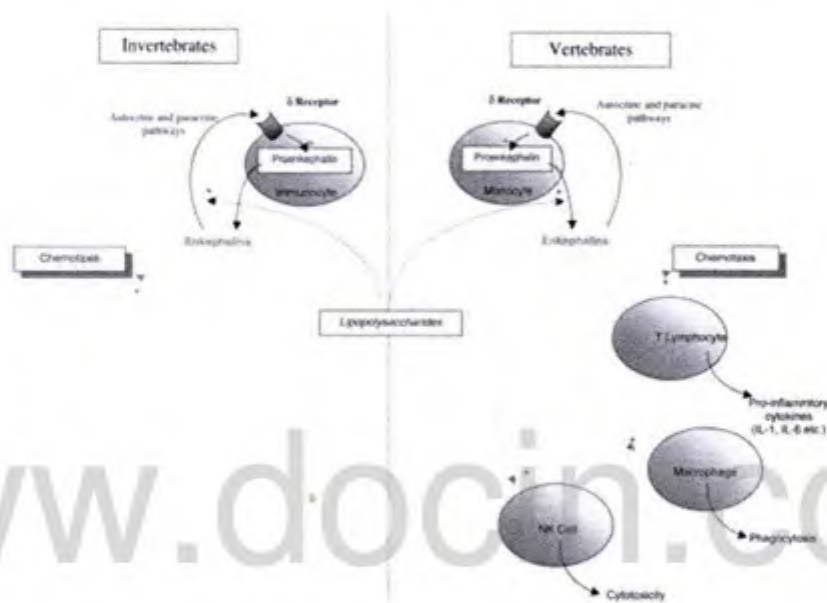


图 1.6 脑啡肽原对免疫应答的调节作用^[64]

Fig 1.6 Immune processes generated by pro-enkephalin maturation

根据已有的核质相互作用的细胞生物学和分子生物学知识以及一系列关于 OGF 的报道^[102-106], OGF-OGFR 通路的信号转导过程可简述如下(图 1.7):胞外的 OGF 主动或被动地进入细胞,并与分布在细胞核外膜上的 OGF 受体结合,形成 OGF-OGFR 复合物;OGF-OGFR 复合物从细胞核外膜上解离并聚集在核周围,OGFR 的 NLS motifs 与 Importins/Karyopherins (Kap) 结合后通过核孔复合体(Nuclear pore complex, NPC)进入核内;进入核内的 OGF-OGFR 复合物聚集在核内纤层和异染色质的外周,抑制 DNA 的复制^[78]。

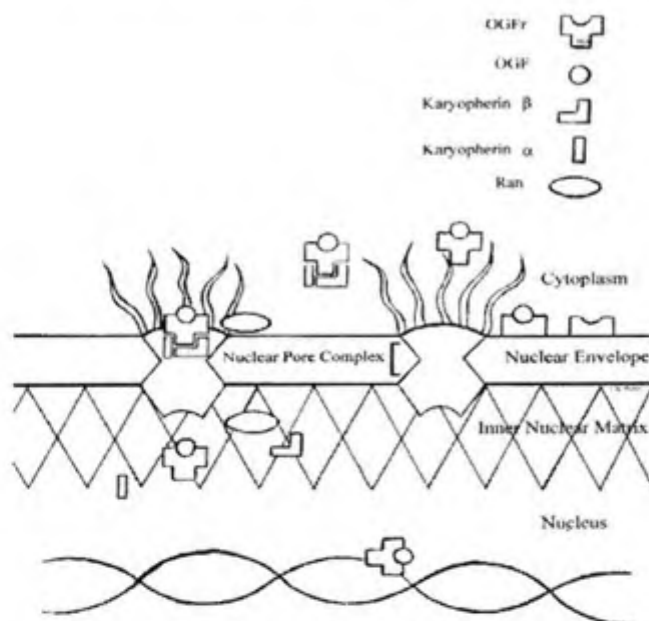


图 1.7 OGF-OGFR 信号转导通路^[78]

Fig 1.7 Model of the relationship of the OGF receptor to interaction with OGF

第四节 无脊椎动物脑啡肽能神经内分泌免疫调节系统的研究进展

一、无脊椎动物的脑啡肽能神经内分泌系统

Mixon 等用羧肽酶 B 和 TPCK-胰岛素消化处理贻贝足神经节提取物，并经高效液相色谱分离纯化后，得到 Met-ENK-RF 和 Leu-ENK 类似物，提示贻贝足神经节中脑啡肽原（Pro-Enkephalin）的存在^[107]；同时，脑啡肽原也在贻贝淋巴细胞中被检测到，其与豚鼠脑啡肽原的氨基酸序列有 50% 的同源性^[108]。Martin 等利用抗体标记技术在章鱼（*Octopus*）腔静脉中检测到了甲硫氨酸脑啡肽（Met-ENK）类似物，其结构和功能与哺乳动物脑啡肽高度相似^[109]。利用免疫荧光技术，研究人员还在散大蜗牛（*Helix aspersa*）的足和触须以及贻贝（*Mytilus edulis*）的神经节、肝胰腺和消化道中检测到了 Met-ENK 的存在^[110, 111]。利用高效液相色谱（High performance liquid chromatography, HPLC）法，Stefano 等对贻贝足神经节的酸性提取物进行分离纯化，得到 Met-ENK 和 Leu-ENK 类分子，其分子组成和结构与哺乳动物脑啡肽的相同^[112]；后续的研究表明，Met-ENK 和 Leu-ENK 分布于贻贝各神经节中^[113]。

阿片肽裂解酶在无脊椎动物中广泛分布，其对阿片肽的合成与降解起着重要作用。研究人员分别在加利福尼亚海兔（*Aplysia californica*）的心耳组织和神经

中发现了羧肽酶 E、在其脑神经节、生殖腺、血淋巴和肾中发现了一种金属酶——氨肽酶，它们分别参与了机体内阿片肽类物质的合成或降解^[114, 115]。Stefano 等还发现贝类像脊椎动物一样，体内也含有中性内肽酶（NEP），某些阿片肽在低浓度时可促进免疫活性细胞分泌 NEP，起正调节作用，但在高浓度时则起负调节作用，提示 NEP 可能是调节贝类免疫的又一途径^[116]；另外，还在贻贝淋巴中检测到了羧肽酶和氨肽酶等 Met-ENK 降解酶^[117, 118]。

Cadet 等采用探针标记和荧光实时定量 PCR 技术，检测了 μ 型受体 mRNA 在贻贝足神经节中的分布情况，发现贻贝足神经节中存在 $\mu 1$ 型受体，其与人的 $\mu 1$ 型受体氨基酸序列有 95% 的一致性^[119]。研究人员在贻贝鳃的纤毛中检测到了 $\mu 3$ 和 $\mu 4$ 两种 μ 亚型受体^[120]；在贻贝的神经组织和免疫细胞中检测到了 $\delta 1$ 和 $\delta 2$ 两种 δ 亚型受体^[92, 121]。实际上，贝龄对阿片肽受体的类型、数量和表达量也有影响，如成体贻贝阿片肽受体的表达量远低于其幼体，阿片肽与幼体贻贝的阿片肽受体亲和力更高^[122]。虽然目前关于无脊椎动物 OGRs 的报道比较少，但有研究发现，OGF 可以与金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）特异性结合，提示 OGF 和 OGR 可能出现在 2 亿年前，即细菌出现的时候^[78, 123]。

二、无脊椎动物中脑啡肽的免疫调节功能

研究发现，内源性阿片肽参与了贝类的免疫调节。将贻贝血淋巴与阿片肽或病原相关分子模式（Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs）——LPS 孵育一段时间后，血淋巴细胞开始变形并产生趋化作用，但二者激活的免疫细胞类型不同^[124]；在贻贝血淋巴与阿片肽和 LPS 的混合物孵育后，阿片肽类物质可以增强 LPS 诱导的血淋巴细胞活性^[125]。当无脊椎动物受到 LPS、细菌刺激或外科创伤时，血淋巴中的脑啡肽原将迅速进行剪切，释放 Met-ENK 和神经肽 B^[97]。据报道，Met-ENK 类物质如 DAMA（D-Ala²-D-Met⁵-Enkephalinamide）可诱导贻贝免疫细胞的活化和定向迁移、加快血淋巴细胞的粘附过程，并诱导免疫细胞和神经节释放 IL-1 而进一步增强免疫细胞的活性^[126, 127]；Leu-ENK 类似物 DALE（D-Ala²-Leu-enkephalin）可使蜗牛（*Bioniphalaria alexandrina*）免疫细胞的粘附活性增强，并上调 IL-2、TNF- α 和 INF- γ 的水平^[128]。

国内有文献报道：采用免疫组化方法在栉孔扇贝的许多神经节中检测到了

Leu-ENK 及阿片肽受体的存在^[129, 130]；另外，采用生物化学和免疫学相关技术测定了 Leu-ENK 对栉孔扇贝血淋巴细胞吞噬、包囊化、聚集和贴附能力以及血淋巴中多种自由基的影响^[131-133]；结果表明：Leu-ENK 可能通过与其血淋巴细胞表面阿片肽类受体的结合而对栉孔扇贝的免疫应答反应起着重要的调节作用。

第五节 本研究的主要目的及意义

栉孔扇贝是我国特有的贝类养殖品种，具有重要的经济价值，对我国海水养殖产业的发展具有重要意义。然而近年来病害频发，严重制约了贝类养殖业的健康可持续发展。遗憾的是，目前对水产动物疾病的防治主要依靠药物，而药物的滥用导致了病原微生物抗药性的提高，严重破坏了生态环境的平衡。要使海水养殖业摆脱病原微生物的侵扰，必须开辟新的病害防治途径。对贝类免疫防御机制的深入研究，将有助于为预防扇贝、贻贝和牡蛎等重要养殖贝类的病毒性、细菌性以及寄生虫性病害提供思路与策略；并且对探索动物神经内分泌免疫调节系统的起源和进化也具有重要参考价值。因此，迅速开展贝类神经内分泌免疫调节机制的研究是非常必要的。

本研究主要是围绕脑啡肽及其受体在神经内分泌免疫调节系统中的功能展开的。脑啡肽及其受体介导的神经内分泌免疫调节系统在脊椎动物的免疫应答反应和内稳态的维持中发挥着重要作用；而目前关于无脊椎动物中脑啡肽及其受体介导的神经内分泌免疫调节系统的研究报道却很少。根据国内外已有的相关报道及实验室现有的实验条件，本研究采用分子生物学、分子免疫学、生物化学和细胞生物学等技术手段，明确了栉孔扇贝脑啡肽及其受体的分子特征和表达调控规律，分析了脑啡肽及其受体对栉孔扇贝免疫应答的调节作用，初步探讨了栉孔扇贝中脑啡肽-脑啡肽受体通路所介导的神经内分泌免疫调节机制。

本研究的基本内容包括：

- (1) 采用免疫荧光技术检测脑啡肽在栉孔扇贝不同组织中的分布；
- (2) 检测栉孔扇贝受到鳃弧菌刺激后血淋巴中脑啡肽含量的变化；
- (3) 克隆获取栉孔扇贝阿片肽生长因子受体（以下简称 CfOGFR）的全长 cDNA 序列，并运用生物信息学软件分析 CfOGFR 的基因序列特征及其推导的蛋

白结构特征;

(4) 利用荧光实时定量 PCR (RT-PCR) 技术检测 CfOGFR 基因 mRNA 的组织分布、在早期胚胎发育过程中的时序表达以及对不同 PAMPs 的响应情况;

(5) 对 CfOGFR 基因体外重组表达, 纯化该重组蛋白 (rCfOGFR) 并制备其免疫抗血清;

(6) 利用异种细胞系和瞬时转染技术, 研究 OGF-CfOGFR 对细胞增殖的影响;

(7) 将不同浓度的脑啡肽与栉孔扇贝血淋巴孵育, 检测其免疫学指标: 吞噬能力、抑菌活性, 溶菌酶 (LYZ) 活性、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、酚氧化酶 (PO) 活性和 TNF- α 活性等的变化, 探讨脑啡肽对贝类神经内分泌系统的调节方式。

www.docin.com

第二章 实验材料与方法

第一节 实验材料

一、实验仪器设备

本实验使用的仪器设备的相关信息均列于表 2.1。

表 2.1 本研究实验需要的仪器设备信息

Table 2.1 The information of equipments needed for current research

名称	型号	制造商
Mini-PROTEAN 系统	165-8000	伯乐（中国）有限公司
基础电泳仪电源	164-5050	同上
凝胶成像系统	—	同上
酶标仪	XS2	BioTek
激光共聚焦显微镜	LSM710	Carl Zeiss
冰箱	BCD-247e	Electrolux
冷冻离心机	5415R	Eppendorf
旋涡混合仪	—	Labnet
手动切片机	RM2016	Leica
倒置显微镜	CKX41	Olympus
荧光显微镜	BX51	同上
超低温冰箱	MDF-382E	SANYO
高压灭菌锅	MLS-3780	同上
冷冻离心机	3K15	Sigma
Nanodrop 分光光度计	2000	赛默飞世尔科技（中国）有限公司
二氧化碳培养箱	3111	同上
PCR Thermal Cycler Dice	TP600G	宝日医生物技术（北京）有限公司
PCR Thermal Cycler Dice	TP650S	同上
微波炉	P70D20TJ-D3	格兰仕集团有限公司
转移脱色摇床	TS-8	其林贝尔仪器设备有限公司
超声波细胞破碎机	JY96-II	新芝生物科技股份有限公司
电热恒温震荡培养箱	QYC200	福玛实验设备有限公司
二氧化碳培养箱	HH-CP-T	同上
电脑核酸蛋白检测仪	HD-4	沪西分析仪器厂
定时数显恒流泵	HL-20	同上
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9023A	一恒科技有限公司
电热恒温培养箱	DHP-9052	同上
电热恒温水槽	DK-80	同上
单人净化工作台	SW-CJ-1D	苏州净化设备有限公司
双人净化工作台	SW-CJ-2FD	同上
离心机	H1650-W	湘仪仪器有限公司
离心机	TG16-W	同上

二、实验动物、菌株及细胞株

1. 大鼠

本研究中用于制备多克隆抗体的为 SPF 级昆明系雌性大鼠，六周左右，购自青岛市实验动物中心（即青岛市药品检验所）。

2. 栉孔扇贝

本研究中使用的栉孔扇贝主要从当地的养殖场购买，扇贝购买后需置于 18℃ 左右的过滤海水中暂养两周后方能用于实验。

3. 实验用菌株

(1) 鳃弧菌

本研究中所用鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 由中国水产科学院黄海水产研究所莫照兰研究员惠赠，最初来源为 2000 年从山东省寻山养殖鱼场濒临死亡的牙鲆中分离鉴定所得的致病株 M3^[134]。

(2) 大肠杆菌

本研究中所用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞均购自北京全式金生物技术有限公司，主要有以下三种株型（括号内为菌株货号）：Top10 (CD101)、Trans1-T1 (CD501) 和 BL21 (DE3) (CD801)，分别用于基因克隆和原核表达等实验。

4. 实验用细胞株

(1) HEK293T 细胞株

HEK293T 细胞系即人胚肾细胞系，是 HEK293 的一个衍生株，其极少表达细胞外配体所需的内生受体，且比较容易转染，是一个很常用的表达外源基因的细胞株。

本研究所用的 HEK293T 细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心（即中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库，<http://www.cellbank.org.cn/>），培养条件为 90% DMEM（高糖）+ 10% FBS，37℃，5% CO₂。

(2) L929 细胞株

L929 细胞 (ATCC No. CRL-2148) 即小鼠成纤维细胞 (Mouse Fibroblasts) 系, 因其对细胞因子 TNF- α 的毒性非常敏感而用作测定 TNF- α 的活性^[135]。

本研究所用的 L929 细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 培养条件为 90% DMEM (高糖) + 10% FBS, 37℃, 5% CO₂。

三、实验试剂及引物信息

1. 实验中用到的相关试剂

实验中使用的主要载体和试剂的相关信息见表 2.2, 未列出的基本为国产分析纯或青岛艾科宝生物科技有限公司进口分装产品。

表 2.2 实验中用到的相关试剂
Table 2.2 Brief information of reagents used in the present study

名称	货号	制造商
PageRuler Prestained Protein Ladder	SM0671	赛默飞 (中国) 有限公司
PageRuler Unstained Protein Ladder	SM0661	同上
Met-enkephalin acetate salt hydrate	M6638	Sigma
Naloxone hydrochloride dihydrate	N7758	同上
Anti-Met Enkephalin antibody	ab22620	Abcam
Met-Enkephalin - EIA Kit	S-1419	Bachem
GAPDH ELISA Kit	E91932Hu	Uscn
DMEM (High Glucose)	11965-084	LifeTech (Gibco)
Fetal Bovine Serum	10099-141	同上
Alexa Fluor 488 标记山羊抗大鼠 IgG (H+L)	A11008	LifeTech (Invitrogrm)
Lipofectamine LTX	15338-100	同上
E.Z.N.A. Plasmid mini Kit	D6942	Omega Bio-tek
Glucan from baker's yeast	G5011	Sigma-Aldrich
Lipopolysaccharides from <i>Escherichia coli</i>	L2630	同上
Peptiogylican from <i>Staphylococcus aureus</i>	77140	同上
Polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt	P1530	同上
Cloned Ribonuclease Inhibitor	D2313	宝生物工程 (大连) 有限公司
DL2000 DNA Marker	D501	同上
dNTP Mixture	D4030A	同上
rTaq	DR001BM	同上
Ex Taq	DRR100A	同上
LA Taq	DRR200A	同上
pMD 18-T Simple Vector	D103	同上

(续表 2.2)

名称	货号	制造商
SYBR Premix Ex Taq II	DRR081	宝生物工程(大连)有限公司
RNAiso Plus	D9108	同上
miniBEST Agarose Gel Purification Kit ver 3.0	DV805	同上
Wide Range DNA Marker (100-6,000)	D518A	同上
pEASY-Blunt Simple Cloning Kit	CB111	全式金生物技术有限公司
pEASY-E1 Expression Kit	CE101	同上
镍 NTA 琼脂糖凝胶 FF	CS-A01b	韦氏博慧科技有限公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	P0010	碧云天生物技术研究
总 SOD 活性检测试剂盒	S0102	同上
中性红细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒	C0013	同上
Western 及 IP 细胞裂解液	P0013	同上
WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒	C0036	同上
蛋白标准	P0007	同上
HRP 标记 Streptavidin	A0303	同上
HRP 标记山羊抗大鼠 IgG	A0192	同上
青霉素-链霉素溶液	C0222	同上
胰酶细胞消化液	C0201	同上
质粒大量抽提试剂盒	D0026	同上
溶菌酶检测试剂盒	A050	南京建成生物技术研究
MagExtractor -His-tag- Kit	NPK-700	东洋纺生物科技有限公司
T4 DNA 连接酶	M0202	纽英伦生物技术有限公司
限制性内切酶	—	同上
M-MLV Reverse Transcriptase	M1701	普洛麦格生物技术有限公司
pRL-TK	E2241	同上
RQ1 RNase-Free DNase	M6101	同上
DEPC 处理水	DD1005	生工生物工程有限公司
LB Broth	SD7002-N	同上
SOB Agar	SD7008	同上
SOC Broth	SD7009	同上
氨苄青霉素钠	A0339	同上
弗氏不完全佐剂	FB5288	同上
弗氏完全佐剂	FB5188	同上
异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)	I0487	同上
QuickAntibody-Mouse2W	KX02100431	康碧泉生物技术有限公司

2. 实验所用引物的主要信息

实验中使用的引物均委托生工生物工程(上海)技术服务有限公司合成,除接头引物纯化方式为 PAGE 级以外,其他引物的纯化方式均为 ULTRA HAP,具体信息见表 2.3。

表 2.3 实验所用引物的信息

Table 2.3 Sequence of the primers used in the experiment

引物名称	序列信息 (5'-3')	用途简述
<i>基因克隆</i>		
P1(forward)	gAC AAA TAA AAC ggg gTg AAA ACT ggg	3' Race 引物
P2(forward)	ATC TCA ACA ggT CCT ATC ATA ATT ACC	3' Race 引物
P3(forward)	gTT ggA CTT TTA Cgg TAT ggA gCT ggA	3' Race 引物
P4(forward)	ACA AAT AAA Acg ggg TgA AAA CTg ggA	3' Race 引物
P5(reverse)	gTT TTA TTT gTC CTg TTT CCT CgC TCT	5' Race 引物
P6(reverse)	CAC Acg TgC TAA ggC TTT CTT ATC TTC	5' Race 引物
P7(reverse)	TgC CTg ggT ATC CCA gTC TgT ATT gTT	5' Race 引物
P8(reverse)	TTA AAC Atg CgT TTA TTT CCA CCT CCC	5' Race 引物
P9	ggC CAC gCg TCg ACT AgT ACT17 VN	Oligo (dT)接头引物
P10	ggC CAC gCg TCg ACT AgT ACg10 HN	Oligo (dG)接头引物
P11 (forward)	ATg TCA Aag TCT AgA AAT ACA CgT AgT	序列确认引物
P12 (reverse)	TCA CAC CTg ATC gAg ACT gAA Cg	序列确认引物
<i>表达定量</i>		
P13 (forward)	ATC CTT CCT CCA TCT CgT CCT	EF1 α 定量引物
P14 (reverse)	ggC ACA gTT CCA ATA CCT CCA	EF1 α 定量引物
P15 (forward)	gTC ACA gTT CAA TAA TCT CAA CAg g	CfOGFR 定量引物
P16 (reverse)	CAA ATT CCA CAA ATg gTC gCT	CfOGFR 定量引物
<i>重组表达</i>		
P17(forward)	ggT ACC gAA ATg gCA AAg TCT AgA AAT ACA CgT AgT	CfOGFR 重组引物
P18(reverse)	gAA TTC TCA CAC CTg ATC gAg ACT gAA Cg	CfOGFR 重组引物
<i>载体引物</i>		
RV-M	gAg Cgg ATA ACA ATT TCA CAC Agg	pMD18-T 载体测序引物
M13-47	CgC CAg ggT TTT CCC AgT CAC gAC	pMD18-T 载体测序引物
T7	gTA ATA CgA CTC ACT ATA ggg C	通用载体测序引物
T7ter	TgC TAg TTA TTg CTC AgC gg	pEASY-E1 载体测序引物
M13F	TgT AAA ACg ACg gCC AgT	pEASY-Blunt 载体测序引物
M13R	CAg gAA ACA gCT ATg ACC	pEASY-Blunt 载体测序引物
BgH rev	TAg AAg gCA CAg TCg Agg C	pcDNA3.1(+)载体测序引物

第二节 实验方法

由于本研究采用的部分实验方法为本实验室已经建立、优化并广泛使用的，出于节省篇幅的需要及论文查重的要求，对此类实验方法仅作简单描述，而对本研究自行建立并使用的实验方法做详细描述。

一、血淋巴细胞滴片、组织石蜡切片的制备

1. 血淋巴细胞滴片

参照本实验室已经建立并优化的技术方法^[136]，抽取健康扇贝的血淋巴，以丙酮为固定剂，多聚赖氨酸处理的载玻片为载体，制备栉孔扇贝血淋巴细胞滴片，并于-20℃保存备用。

2. 组织石蜡切片

(1) 取健康扇贝各组织，用 Bouin 氏液（苦味酸饱和溶液：甲醛：冰醋酸=15:5:1）固定 24 小时，然后用 70% 的乙醇浸泡脱色 2 小时，反复脱色 3-4 次；

(2) 按以下步骤处理样品组织：80% 乙醇，60 分钟；95% 乙醇，60 分钟；无水乙醇，30 分钟，两次；二甲苯：无水乙醇（1:1），30 分钟；二甲苯，20 分钟；二甲苯，10 分钟；二甲苯：石蜡（1:1），30 分钟；石蜡，120 分钟。

(3) 用石蜡包埋浸蜡后的组织块；

(4) 对各组织样品进行连续切片；

(5) 在水浴中将切片摊平，使其平铺在多聚赖氨酸处理的载玻片上；

(6) 37℃ 孵育 24 小时，室温备用。

二、免疫荧光组化

1. 血淋巴细胞滴片的免疫荧光染色

(1) 取出血淋巴细胞滴片，在 0.01 M PBST 中浸洗 5 分钟，重复洗 3 次；

(2) 用组化笔划分各样本；

(3) 用胎牛血清白蛋白（BSA）封闭血淋巴细胞滴片 30 分钟；

(4) 甩去 BSA，向血淋巴细胞滴片中滴加稀释了 1000 倍的兔抗 Met/Leu-ENK 抗体，同时用健康兔血清作为阴性对照，然后将滴片置于 37℃ 湿盒中孵育 60 分

钟；

- (5) 取出血淋巴细胞滴片，0.01 M PBST 中浸洗三次，每次 5 分钟；
- (6) 每个样品滴加 20 μ L 含 1 \times 伊文斯蓝的 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔抗体 (1:1000 稀释)，37 $^{\circ}$ C 孵育 50 分钟；
- (7) 取出切片，在 0.01 M PBST 中浸洗 5 分钟，重复洗 3 次；
- (8) 50%缓冲甘油封片，荧光显微镜下观察，拍照。

2. 组织石蜡切片的免疫荧光染色

- (1) 首先按如下步骤对组织石蜡切片进行脱蜡和复水：二甲苯，10 分钟；二甲苯:无水乙醇 (1:1)，3 分钟；95%乙醇，3 分钟；80%乙醇，3 分钟；70%乙醇，3 分钟；50%乙醇，3 分钟；30%乙醇，3 分钟；蒸馏水，3 分钟。
- (2) 置于 58 $^{\circ}$ C 烘箱中 1 小时，并自然冷却；
- (3) 取各组织切片置于 0.01 M PBST 中浸洗 5 分钟；
- (4) 将切片插入切片架上并将切片架放入 250 m 盒中，朝盒内加入 200 ml 0.01 M 柠檬酸盐缓冲液；
- (5) 将 250 m 盒置于 120 $^{\circ}$ C 的高压灭菌锅中进行抗原复性 6 分钟，取出后自然冷却至室温；
- (6) 余下步骤同血淋巴细胞滴片的免疫荧光染色。

三、鳃弧菌刺激实验

从 240 只平均壳长为 55mm 的栉孔扇贝成体中，随机选取 30 只作为空白组（不做任何处理），剩下的 210 只随机等分给菌刺激组（每只扇贝注射 50 μ L 新接种的 8×10^6 CFU mL^{-1} 的鳃弧菌悬浊液）和对照组（注射等体积 PBS）。将处理过的扇贝立即放回原处并从空白组中随机取出 15 只扇贝。对于处理组的扇贝，分别在处理后 3、6、12、24 和 48 小时从每组随机取出 15 只。用 5 ml 注射器抽取扇贝的血淋巴，连续抽取三只后放入同一试管，并加入 1% EDTA 和 1% ProteoBlockTM Protease Inhibitor。混匀后立即 2000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟，留上清液用于 Met-ENK 和 GAPDH 浓度的测定。

四、血淋巴上清液中 Met-ENK 和 GAPDH 浓度的测定

1. Met-ENK 类分子浓度的测定

本研究选用 Bachem 的 Met-ENK Enzyme Immunoassay (EIA) Kit 检测鳗弧菌刺激后栉孔扇贝血淋巴上清液中 Met-ENK 的浓度。具体操作如下:

- (1) 每孔加 50 μL Met-ENK 标准品梯度溶液或血淋巴上清液至酶标板的测定孔中, 50 μL PBS 至酶标板的空白孔中;
- (2) 每孔加 25 μL 抗血清至酶标板的测定孔中, 25 μL EIA buffer 至酶标板的空白孔中, 混匀后室温孵育 1 小时;
- (3) 加 25 μL Bt-tracer 至酶标板的各孔中, 混匀后室温孵育 2 小时;
- (4) 移除酶标板中的溶液, 每孔加 300 μL EIA buffer 洗板 5 次;
- (5) 加 100 μL Streptavidin-HRP 至酶标板的各孔中, 混匀后室温孵育 1 小时;
- (6) 移出酶标板中的溶液, 每孔加 300 μL EIA buffer 洗板 5 次;
- (7) 加 100 μL TMB 溶液至酶标板的各孔中, 混匀后室温孵育 40 分钟;
- (8) 加 100 μL 2 N HCl 至酶标板的各孔中终止反应, 轻轻混匀后, 立即用酶标仪测定各孔的 OD_{450} 。

2. GAPDH 类分子浓度的测定

本研究选用 USCN 的 GAPDH ELISA Kit 测定鳗弧菌刺激后栉孔扇贝血淋巴上清液中 GAPDH 的浓度。以下为步骤的简要描述:

- (1) 将 GAPDH 标准品梯度溶液、血淋巴上清液和标准品稀释液以 100 μL 每孔分别加至酶标板的标准孔、测定孔和空白孔中, 在酶标板上加上覆膜, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 小时;
- (2) 弃去孔内液体并甩干, 每孔加检测溶液 A 工作液 100 μL , 酶标板上加上覆膜, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时;
- (3) 甩去孔内液体, 每孔用 350 μL 的洗涤液洗涤, 重复洗板三次, 最后一次洗

涤后, 要把孔内的洗涤液完全甩干;

(4) 每孔加检测溶液 B 工作液 100 μL , 酶标板加上覆膜, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 分钟;

(5) 甩去孔内液体, 洗板 5 次, 方法同步骤 3;

(6) 向酶标板中加入底物溶液后, 将酶标板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 20 分钟;

(7) 向酶标板中加入终止液, 轻轻混匀后, 立即用酶标仪测定各孔的 OD_{450} 。

五、血淋巴与 Met-ENK 的孵育

用 5ml 注射器从健康扇贝(约 30 只)的静脉窦中抽取血淋巴(每只约 0.5 ml), 并与等体积预冷的抗凝剂混合 (Alsever 溶液, pH 7.2), 通通加入到 50ml 试管中, 混合均匀后, 立即等分为 30 等份 (1 ml 每份)。将这 30 份血淋巴随即等分为 6 组, 分别作如下处理:

- 第一组 空白组
- 第二组 与 10 μL 无菌的 PBS 常温孵育
- 第三组 与 10 $\mu\text{L}10^{-5}$ M Met-ENK 常温孵育
- 第四组 与 10 $\mu\text{L}10^{-4}$ M Met-ENK 常温孵育
- 第五组 与 10 $\mu\text{L}10^{-3}$ M Met-ENK 常温孵育
- 第六组 与 10 $\mu\text{L}10^{-4}$ M Met-ENK 和 10 $\mu\text{L}10^{-3}$ M Naloxone 常温孵育

1 小时后, 将血淋巴 2000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 分钟, 上清液用于免疫相关酶活如 PO、SOD、LYZ 和抑菌活性的测定以及 TNF- α 活性的测定, 血淋巴细胞用于吞噬活性的测定。

六、免疫相关酶活测定

1. PO 活性测定

在正常情况下, 酚氧化酶和底物在动物体内中是分开存在的。L-多巴是酚氧化酶的一种底物, 样品中存在的酚氧化酶可作用于 L-多巴, 使其黑化; 样品中的酚氧化酶活性越高, 对 L-多巴的黑化作用越强, 样品的 OD 值就会越高, 因而可以用 OD 值的变化量来表示 PO 活性的大小。具体操作如下:

(1) 取 96 孔酶标板, 每孔加入 100 μL 血淋巴上清液和 50 μL 胰蛋白酶 (1mg ml^{-1}), 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 分钟;

(2) 每孔加入 50 μL L-多巴 (4 mg ml^{-1})，轻轻混匀后，立即用酶标仪测定各孔的 OD_{490} ，程序设定为每 2 分钟测 1 次，连续测 30 分钟；

(3) 求相邻时间点测定值间的斜率，取斜率最大的两个相邻时间点，求出在这两个时间点间每分钟上升的 OD 值。定义每分钟内升高 0.001OD 值为 1 个 PO 活力单位 (U)。

2. SOD 活性测定

本研究选用总 SOD 活性检测试剂盒 (WST 法) (产品编号: S0102) 测定栉孔扇贝血淋巴上清液中 SOD 的活性，具体操作步骤按说明书进行^[137]。

3. LYZ 活性测定

本研究选用比浊法 LYZ 试剂盒测定栉孔扇贝血淋巴上清液中 LYZ 的活性。具体操作如下^[137]：

- (1) 首先按照说明书的具体要求配置应用菌液和标准品应用液；
- (2) 按说明书设置操作标准管和测定管；
- (3) 混匀后测定各样品的透光率 T_{530} ，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴精确反应 30 分钟，立即取出于冰水浴中孵育 3 分钟，再次测定各样品的透光率 T_{530} 。
- (4) 溶菌酶比活力的计算：

$$\text{LYZ 活力} = \frac{\text{测定管透光率 2} - \text{测定管透光率 1}}{\text{标准管透光率 2} - \text{标准管透光率 1}} \times 200 \text{ U mL}^{-1}$$

4. 抑菌活性测定

参照 Yu 和 Yang 等^[138, 139]的方法，测定与 Met-ENK 孵育的血淋巴的上清液对大肠杆菌生长曲线的影响。具体操作如下：

- (1) 将试验用大肠杆菌培养至对数生长期，3500 g 离心 10 分钟收集菌体，PBS 洗 2 次后将其重悬于 PBS ($8 \times 10^6 \text{ CFU mL}^{-1}$)；
- (2) 将 100 μL 待测血淋巴上清液或 PBS 与 10 μL 菌液混匀后室温孵育 2 小时；

(3) 每孔加 20 μL 上述混合液以及 200 μL LB 培养基到 96 孔板中, 混匀后置于酶标仪中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12-16 小时至平台期, 期间每半小时测一次 OD_{600} 。

七、血淋巴细胞吞噬活性的测定

本研究参照 Cheng 等^[140]的方法, 选用中性红细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒测定血淋巴细胞的吞噬活性。具体操作如下:

(1) 将 20 μL 重悬于 PBS 的血淋巴细胞 (10^5 ml^{-1}) 加到 96 孔培养板中, 每孔再加入 200 μL 的细胞培养液和 20 μL 的中性红染液;

(2) 细胞培养箱内培养 2 小时后, 去除含有中性红染液的细胞培养液, 用 PBS 洗涤培养板 3 次;

(3) 加入 200 μL 中性红检测裂解液, 室温摇床上裂解 10 分钟后, 测定样品的 OD_{540} 。

八、TNF- α 活性的测定

本研究参照 Zhu 等^[135]的方法, 利用 L929 细胞毒性试验来检测 TNF- α 的活性。具体操作如下:

(1) 将 L929 细胞培养在 24 孔培养板内, 每孔加入 500 μL 细胞培养液 (10% FBS+90% DMEM 高糖培养液), 将细胞转移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养至对数生长期;

(2) 收集细胞并将其重悬于完全培养基中 ($2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$);

(3) 每孔加 100 μL 重悬细胞至 96 孔培养板内, 将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育过夜;

(4) 弃去旧的培养基, 每孔加入 10 μL 血淋巴上清液和 90 μL 完全培养基 (含有 $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ Actinomycin D), 轻轻混匀后, 将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育 20 小时;

(5) 每孔加入 20 μL CCK-8/WST-8 溶液, 轻轻混匀后, 将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中继续孵育 2 小时;

(6) 测定样品的 OD₄₅₀ 和 OD₆₉₀;

(7) TNF- α 的活力=1/(OD₄₅₀-OD₆₉₀)。

九、PAMPs 刺激及组织材料的收集

1. 栉孔扇贝的 PAMPs 刺激及其血淋巴细胞的收集

将 240 只平均壳长为 55 mm 的栉孔扇贝随机分为 6 组, 每组 40 只。分别作如下处理:

- | | |
|-----|---|
| 第一组 | 空白组 |
| 第二组 | 每只扇贝注射 50 μ L PBS |
| 第三组 | 每只扇贝注射 50 μ L LPS (0.5 mg ml ⁻¹ in PBS) |
| 第四组 | 每只扇贝注射 50 μ L PGN (0.8 mg ml ⁻¹ in PBS) |
| 第五组 | 每只扇贝注射 50 μ L Glu (1.0 mg ml ⁻¹ in PBS) |
| 第六组 | 每只扇贝注射 50 μ L Poly (I:C) (1.0 mg ml ⁻¹ in PBS) |

分别于刺激后 0、3、6、12、24 和 48 小时从每组随机取栉孔扇贝 5 只, 抽取血淋巴, 800 g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟收集血淋巴细胞, 重悬于 1 ml RNAiso plus 中, 置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

2. 栉孔扇贝组织采样

在无菌条件下, 分别采集六只健康扇贝的血淋巴、肝胰腺、肾脏、外套膜、性腺、鳃和闭壳肌组织。将血淋巴 800 g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟去上清, 将其它组织剪碎。向盛有血淋巴细胞和组织的 EP 管中加入适量 RNAiso plus, 将其置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中以用于后续 RNA 的提取。

3. 栉孔扇贝不同发育时期胚胎样品的采集

参照本实验室建立并优化的栉孔扇贝发育时期胚胎样品采集的方法^[136], 分别采集了栉孔扇贝卵细胞(O)、受精卵(F)以及二细胞期(E₂)、四细胞期(E₄)、八细胞期(E₈)、十六细胞期(E₁₆)、三十二细胞期(E₃₂)、桑葚期(M)、囊胚期(B)、原肠期(G)、担轮幼虫期(T)、D形幼虫期(D)、早期面盘幼虫期(Ev1)、晚期面盘幼虫期(Lv1)和眼点幼虫期(Ep)的胚胎, 并加入适量 RNAiso plus 后置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中以用于后续 RNA 的提取。

十、总 RNA 制备

根据本实验室优化的总 RNA 提取方法, 使用 TaKaRa RNAiso plus 试剂及经 DEPC 预处理的耗材和器皿制备样品的总 RNA, 并使用紫外分光光度计检测样本 RNA 的浓度及质量。

十一、RACE 技术获得 CfOGFR 基因 cDNA 全长序列

应用本实验室优化的 RACE 技术 (具体原理见图 2.1 和 2.2) [136, 137], 并根据已获得的 CfOGFR 的 EST 序列设计的基因特异性引物, 分别扩增基因的 3' 末端和 5' 末端。

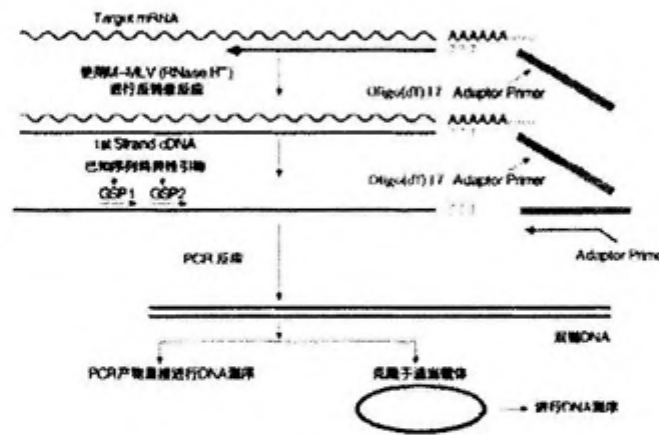


图 2.1 3' RACE 基本原理示意图

Figure 2.1 Outline of 3' RACE Technology

其基本操作如下:

- (1) 使用 Promega RQ1 RNase-Free DNase I 消化基因组 DNA;
- (2) 热变性总 RNA;
- (3) 使用 Promega M-MLV Reverse Transcriptase 反转录合成 cDNA 第一链;
- (4) 使用 TaKaRa DNA Fragment Purification Kit. ver. 3.0 纯化 cDNA 第一链;
- (5) 使用 TaKaRa TdT 酶为 cDNA 第一链 5' 端加 polyC 尾巴;
- (6) 按一般锚定 PCR 方法扩增基因的 3' 末端和 5' 末端, 并克隆测序。

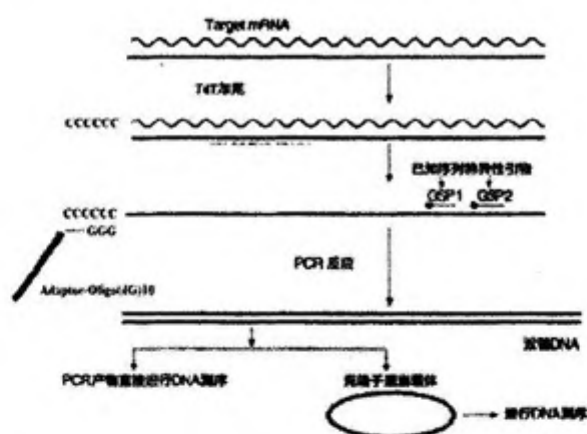


图 2.2 5' RACE 技术基本原理示意图

Figure 2.2 Outline of 5' RACE Technology

十二、荧光实时定量 PCR

根据本实验室优化的荧光实时定量 PCR 方法^[137], 使用 TaKaRa SYBR ExTaq II 试剂在 ABI PRISM 7300 Sequence Detection System 仪器上检测目的基因转录本在不同组织间的分布差异和时序表达谱, 并以 CfEF1 α 基因为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对数据进行均一化并分析基因的相对表达量。

十三、目的基因的克隆测序

(1) 根据目的基因序列设计基因特异性引物, 并按照实验需求选取包括 TaKaRa rTaq、ExTaq 及 LATaq 在内的不同 Taq 酶, 按实验室已建立的成熟方法, 以说明书所列反应体系进行 PCR 扩增;

(2) PCR 产物在含有 1% 的 GelRed 的琼脂糖凝胶中进行电泳, 待各片段分离后, 在凝胶成像系统中切取所需的目的条带;

(3) 使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extracation Kit ver. 3.0 回收目的片段;

(4) 根据片段末端性质, 将回收的目的片段连接至 pMD18-T Simple Vector (图 2.3) 等载体中;

(5) 采用热激法将连接产物转化至不同的化学感受态细胞中, 并结合 PCR 法采用适宜抗生素筛选阳性克隆并测序。

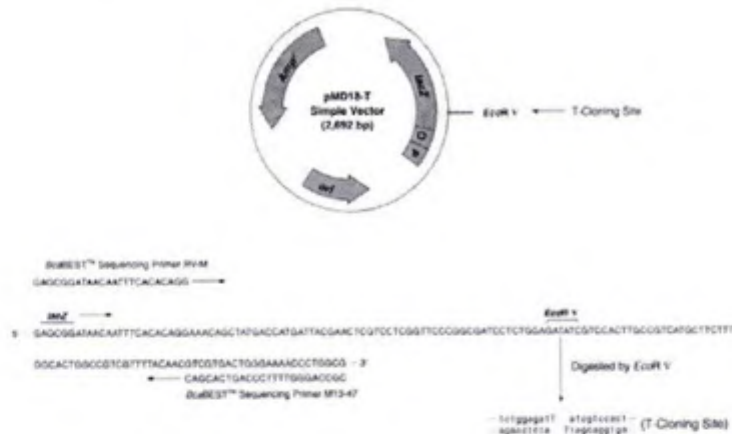


图 2.3 pMD18-T simple Vector 结构

Figure 2.3 Structure of pMD18-T simple Vector

十四、重组质粒的构建

1. 基于 TOPO 技术构建重组质粒

(1) 根据载体对 PCR 产物末端的要求，采用合适的 DNA 聚合酶扩增目的基因片段。如有非特异性扩增，则需对其进行琼脂糖凝胶电泳回收；如条带特异，则不必回收，将其按照产物长度每 1 kbp 对应 50 ng 稀释。

(2) 依次往 PCR 管中加入如下组分：

带有合适末端的 PCR 产物	约 50 ng/kbp
TOPO 型克隆或表达载体	1 μ L
DEPC 处理水	up to 5 μ L
总体积	5 μ L

(3) 轻轻混匀，22-37℃反应 5-30 分钟，冰浴终止反应。

(4) 取 5 μ L 反应产物热激法转化至 *Trans1-T1* 感受态细胞中，采用抗生素结合菌落 PCR 法筛选阳性克隆，并制备相应质粒。

2. 基于双酶切技术构建重组质粒

(1) 根据载体的多克隆位点及目的片段上的酶切位点的分布情况设计引物，使其 5' 端带有相应酶切位点，并选用合适的 DNA 聚合酶扩增目的片段。

(2) 将扩增得到的目的片段连接至合适的载体，筛选阳性克隆，提取质粒。

(3) 依次往 1.5 ml EP 管中加入如下组分，轻轻混匀，37℃孵育 3 小时至过夜。

10 × NEB Enzyme buffer	5 μL
质粒或载体	约 1 μg
内切酶 1	1 μL
内切酶 2	1 μL
100 × BSA	按需求添加
DEPC 处理水	up to 50 μL
总体积	50 μL

(4) 将线性化载体及目的片段分别进行琼脂糖凝胶电泳回收。

(5) 依次往 PCR 管中加入如下组分后，16℃连接过夜。

10× T4 ligase buffer	1 μL
线性化载体	4 μL
目的片段	4 μL
T4 ligase	1 μL
总体积	10 μL

(6) 取 5-10 μL 反应产物热激法转化至 Top10 感受态细胞中，并用菌落 PCR 法筛选阳性克隆，提取阳性克隆质粒。

十五、质粒的制备

1. 常规质粒制备

根据本实验室已有的实验方法，本研究选用 OMEGA E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit 进行质粒的常规制备，具体操作参照说明书进行^[137]。

2. 无内毒素质粒制备

本研究使用碧云天的质粒大量抽提试剂盒进行无内毒素质粒制备，具体操作按说明书进行^[137]。

十六、蛋白的原核重组、表达、纯化及复性

(1) 在对目的蛋白的稀有密码子和原核表达可溶性分析的基础上，设计引物并选取合适的载体与菌株；

(2) 选用合适的方法构建并制备重组质粒，转化至选定的菌株并筛选阳性克隆；

(3) 以 IPTG 为诱导物，诱导蛋白大量表达，并采用 SDS-PAGE 检测表达状况；

(4) 采用金属螯合亲和层析方法变性或非变性纯化带有 6×His 标签的重组蛋白；

(5) 对于变性纯化的蛋白，采用梯度尿素透析的方法将其复性；

(6)使用碧云天 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定重组蛋白及其他样品的蛋白浓度,具体操作按说明书进行。

十七、免疫血清的制备及鉴定

本研究选用六周左右的雌性昆明系 SPF 级大鼠来制备免疫血清,具体操作方法包括如下两种:

1. 基于 Gerbu 佐剂的免疫血清制备方法^[141]

(1) 将 100-200 μg 重组蛋白与 500 μL Gerbu 佐剂混合,等量注射至大鼠两条小腿的肌肉中;

(2) 一周后,再次将 100-200 μg 重组蛋白与 500 μL Gerbu 佐剂混合,等量注射至大鼠两条小腿的肌肉中;

(3) 一周后,取血,37 $^{\circ}\text{C}$ 凝结 1 小时,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜;

(4) 2,500 rpm 离心 20 分钟,上清液部分用于 Western blot 以鉴定其有效性作,其余的作为免疫血清使用。

2. 基于弗氏佐剂的免疫血清制备方法^[142]

按照本实验室已经成熟使用的实验方法^[136, 137],使用弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂乳化蛋白分批免疫大鼠,制备多克隆抗体。

十八、Western blot

参照本实验室已有的实验方法^[137],蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳,漂洗、转膜、再次漂洗后,使用含 3% BSA 的 PBST 封闭,经过与一抗、二抗分别杂交及漂洗后,使用含 0.1% DAB, 0.1% H_2O_2 的 PBST 显色,并用蒸馏水漂洗中止反应。

十九、免疫共沉淀 (Co-IP)

本研究使用免疫共沉淀 (Co-IP) 方法来检测 CfOGFR 与 Met-ENK 的结合作用,具体操作如下:

(1) 以血淋巴:抗凝剂 1:1 的比例抽取健康扇贝的血淋巴 (约 1 ml),然后加入

1/10 体积的 Met-ENK (5 mg ml^{-1}), 18°C 孵育 2 小时;

(2) 800 g , 4°C 离心 10 分钟收集血淋巴细胞, PBS 洗涤 3 次, 然后加入 1ml Western 及 IP 细胞裂解液裂解细胞;

(3) 取 1 ml 细胞裂解液, 加入 $5 \mu\text{L}$ 阴性兔血清和 $20 \mu\text{L}$ Protein G Agarose, 4°C 孵育 2 小时以去除非特异蛋白;

(4) 磁性台架分离, 取上清, 加入 $5 \mu\text{L}$ 抗 Met-ENK 的阳性兔血清, 4°C 孵育过夜;

(5) 加入 $40 \mu\text{L}$ 充分重悬的 Protein G Agarose, 4°C 孵育 2 小时;

(6) 磁性台架分离, 吸除上清, PBS 洗涤 Protein G Agarose 5 次;

(7) 用 $100 \mu\text{L}$ SDS-PAGE 上样缓冲液重悬 Protein G Agarose, 沸水浴煮 3-5 分钟, 瞬时高速离心, 取部分或全部样品采用 rCfOGFR 大鼠抗血清作为检测抗体进行 Western blot 检测。

注: 对照分别为第一步不加 Met-ENK 和第四步加阴性兔血清。

二十、外源基因的瞬时转染

本研究使用 Invitrogen 的 Lipofectamine LTX™ Reagent 将 pcDNA3.1 (+)-CfOGFR 质粒转染到 HEK293T 细胞中, 参照说明书如下进行具体操作:

(1) 转染前一天需将处于对数生长期细胞用胰酶消化并计数, 以每孔 $0.5 - 1.25 \times 10^5$ 细胞接种到 24 孔细胞培养板中, 使其在转染前的细胞覆盖率达到约 50-80%;

(2) 转染前, 更换新的完全培养基;

(3) 将质粒溶解在不含血清的 Opti-MEM I Reduced Serum Media 中, 使其浓度为 0.5 mg L^{-1} ;

(4) 向上述溶液中加入 0.75-1.75% 的 Lipofectamine LTX, 轻轻混匀, 室温静置 30 分钟;

(5) 将上述混合物 $100 \mu\text{L}$ 每孔加到细胞培养板中, 前后推动细胞培养板, 使其轻轻混匀;

(6) 将细胞转移至 37°C 5% CO_2 的细胞培养箱中继续培养 18-24 小时, 采用 Western blot 法检验转染效果并进行后续细胞增殖实验。

二十一、细胞增殖及毒性实验

WST-1 是 MTT 的一种类似物, 该试剂在存在电子耦合试剂的情况下, 可以被某些存于线粒体内的脱氢酶还原生成橙黄色的 formazan, 颜色越深代表细胞增殖越快, 颜色越浅代表细胞毒性越大。本研究使用 WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒来检测 Met-ENK 对转染了 pcDNA3.1(+)-CfOGFR 质粒的 HEK293T 细胞增殖的影响。具体操作如下:

- (1) 将转染 24 小时后的 HEK293T 细胞用胰酶消化并计数, 以每孔 10^4 细胞分别接种到两块新的 24 孔培养板中;
- (2) 对于培养板 I, 分别在接种 6、18、30 小时后加 $20 \mu\text{L}/\text{孔}$ Met-ENK 至实验孔, $20 \mu\text{L}/\text{孔}$ 的 PBS 至对照孔;
- (3) 培养板 I 在接种 42 小时后, 更换新的含 10% (v/v) WST-1 solution 的培养液, 在培养箱中再孵育 4 小时, 测定样品的 OD_{450} 和 OD_{690} ;
- (4) 对于培养板 II, 在接种 6 小时后, 分别加 5, 10 或 $20 \mu\text{L}/\text{孔}$ Met-ENK 至实验孔, 相应体积的 PBS 至对照孔;
- (5) 培养板 II 继续孵育 24 小时后, 更换新的含 10% (v/v) WST-1 solution 的培养液, 在培养箱中再孵育 4 小时, 测定样品的 OD_{450} 和 OD_{690} 。

二十二、数据分析方法

所有实验均设重复, 每种处理重复 3-5 次, 并采用 SPSS 20.0.0 软件以 S-N-K 法进行统计分析, 按 $P < 0.05$ 视为显著性差异。

第三章 实验结果

第一节 栉孔扇贝中 ENK 的组织分布

本实验利用免疫荧光技术对 Leu-ENK 和 Met-ENK 在栉孔扇贝不同组织中的分布情况进行了检测。

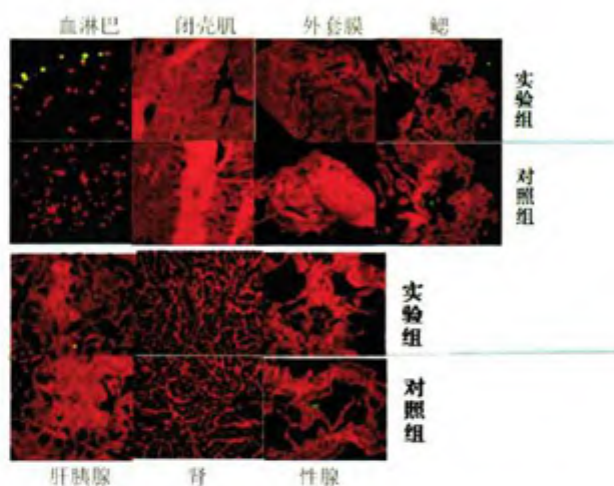


图 3.1 Leu-ENK 在栉孔扇贝组织中的分布

(其中绿色荧光信号代表检测结果为阳性，红色代表检测结果为阴性)

Fig 3.1 Tissue distribution of Leu-ENK in scallop *C. farreri*

(Green fluorescent signal represents the test result is positive, the red represents negative)

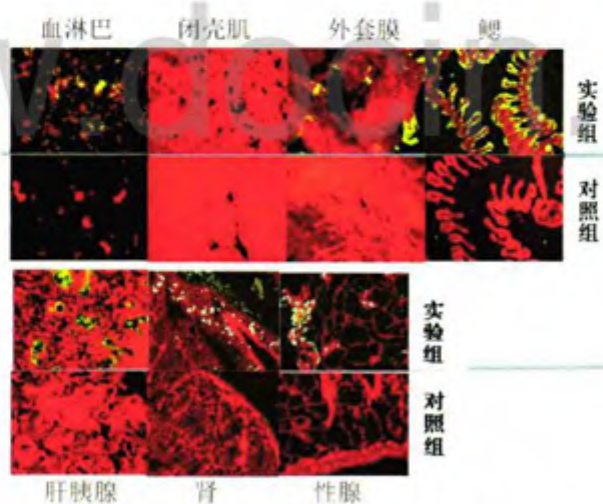


图 3.2 Met-ENK 在栉孔扇贝组织中的分布

(其中绿色荧光信号代表检测结果为阳性，红色代表检测结果为阴性)

Fig 3.2 Tissue distribution of Met-ENK in scallop *C. farreri*

(Green fluorescent signal represents the test result is positive, the red represents negative)

结果显示, Leu-ENK 只在血淋巴中被明显检测到; 而 Met-ENK 在除闭壳肌以外的 6 种组织 (血淋巴、外套膜、鳃、肝胰腺、肾和性腺) 中均能够被显著地检测到, 其中在鳃中的阳性信号最强, 其次是血淋巴、外套膜、肝胰腺、肾和性腺组织 (图 3.1 和图 3.2); 实验过程中, 采用健康兔血清的阴性对照组未检测到明显的荧光信号。因此, 本研究在后续实验中主要以 Met-ENK 及其受体为研究对象。

第二节 鳃弧菌刺激后栉孔扇贝血清中 Met-ENK 的含量变化

鳃弧菌刺激 3、6、12、24 和 48 小时后, 分别选用 Met-ENK Enzyme Immunoassay (EIA) Kit 和 GAPDH ELISA Kit 检测栉孔扇贝血清中 Met-ENK 和 GAPDH 的浓度, 用 Met-ENK 浓度与相应血清中的 GAPDH 浓度的比值来表征血清中 Met-ENK 的相对浓度。

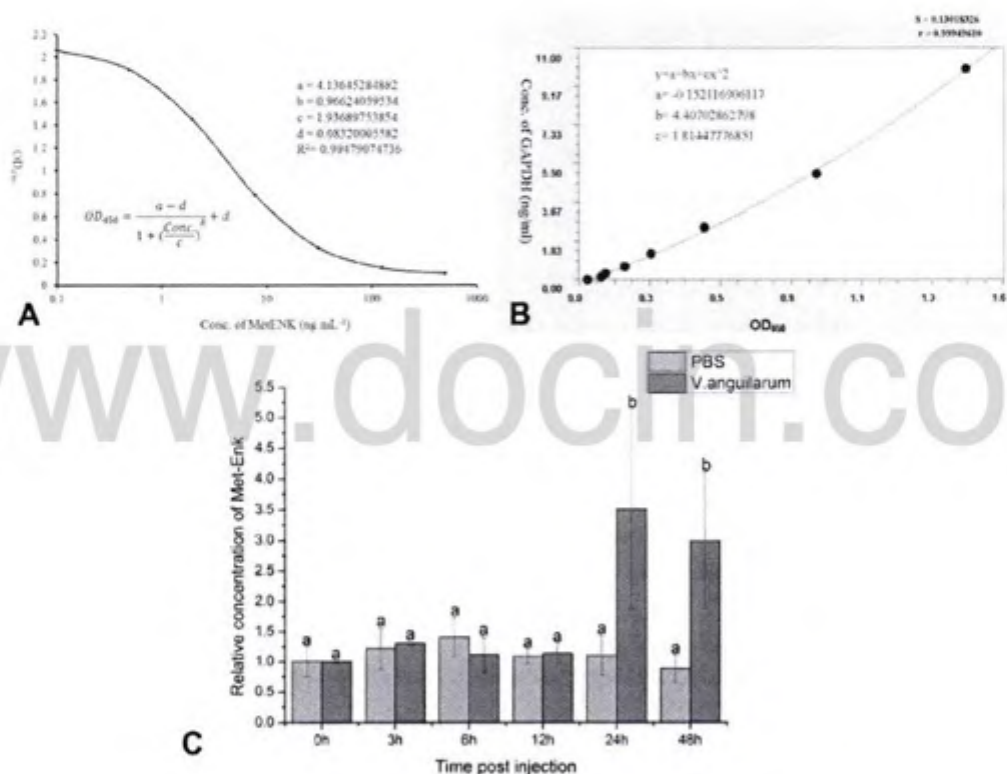


图 3.3 鳃弧菌刺激后栉孔扇贝血清中 Met-ENK 的含量变化

(A: Met-ENK 浓度的标准曲线; B: GAPDH 浓度的标准曲线)

Fig 3.3 Temporal content of Met-ENK in scallop serum post *V. anguillarum* stimulation

(A: The standard curve of Met-ENK, B: The standard curve of GAPDH)

结果显示,在鳃弧菌刺激 24 小时后,血清中 Met-ENK 的相对浓度开始迅速上升并达到峰值,为空白组的 3.5 倍 ($P < 0.05$); 鳃弧菌刺激 48 小时后 Met-ENK 的相对浓度虽有所下降但仍显著高于初始水平,为空白组的 3.0 倍 ($P < 0.05$); 在其他时间点,实验组与对照组的血淋巴上清液中 Met-ENK 的相对浓度没有显著性差异 (图 3.3)。

以上结果表明,鳃弧菌刺激能显著提高栉孔扇贝血淋巴中 Met-ENK 的含量。

第三节 血淋巴与 Met-ENK 孵育后下游免疫指标的变化

一、血淋巴上清液中的免疫相关酶活

将 Met-ENK 与栉孔扇贝血淋巴进行体外孵育 1 小时后,2000 g 4℃ 离心 10 分钟,取血淋巴上清液检测其免疫相关酶活。

1. Met-ENK 对血清中 PO 活性的影响

本研究利用酚氧化酶可使 L-多巴黑化的原理来测定样品中酚氧化酶的活性,并用 OD 值的变化量来表征 PO 活性的高低,然后以各组 OD 值的变化量与空白组的比值来表示各组的相对 PO 活性。结果显示 (图 3.4): 0.1 μM Met-ENK 可使血清中 PO 活性显著提高,为空白组的 1.09 倍 ($P < 0.05$),但与 PBS 组无显著性差异,而其他各组 (PBS、1 μM Met-ENK、10 μM Met-ENK 和 1 μM Met-ENK+10 μM Nal 组) 的 PO 活性与空白组相比无显著性差异。

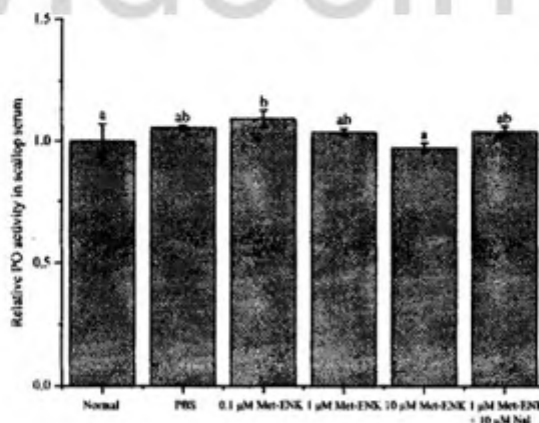


图 3.4 Met-ENK 对血清中 PO 活性的影响

Fig 3.4 The relative PO activity in scallop serum post Met-ENK stimulation

2. Met-ENK 对血清中 SOD 活性的影响

本实验选用总 SOD 活性检测试剂盒测定栉孔扇贝血清中的 SOD 活性,并以各组的测定值与空白组测定值之比表征实验结果,结果如图 3.5 所示:10 μM Met-ENK 可使血清中 SOD 活性显著下降,为空白组的 0.33 倍 ($P < 0.05$),而其他各组 (PBS、0.1 μM Met-ENK、1 μM Met-ENK 和 1 μM Met-ENK+10 μM Nal 组)的 SOD 活性与空白组相比无显著性差异。

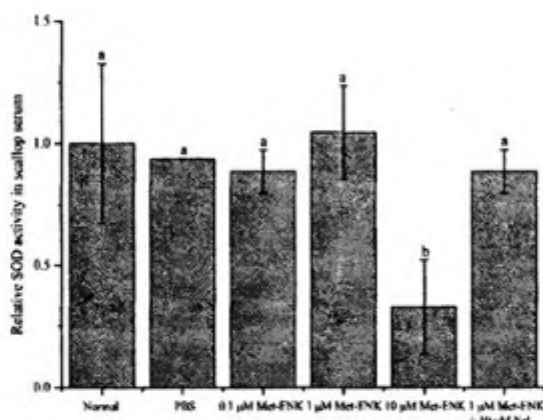


图 3.5 Met-ENK 对血清中 SOD 活性的影响

Fig 3.5 The relative SOD activity in scallop serum post Met-ENK stimulation

3. Met-ENK 对血清抑菌活性的影响

本研究检测了 Met-ENK 处理后的血淋巴上清液对大肠杆菌生长速率的影响,结果显示,实验组的血淋巴上清液能够显著抑制处于对数生长期的大肠杆菌的生长速率 (图 3.6 A)。取生长曲线对数期的一个时间点 (接种 7 小时后) 作柱状图分析,结果显示:Met-ENK 对血淋巴上清液抑菌活性的促进作用存在明显的剂量效应,其中 0.1 μM Met-ENK、1 μM Met-ENK 和 10 μM Met-ENK 组大肠杆菌的 OD_{600} 分别为空白组的 0.43、0.39 和 0.33 倍 ($P < 0.05$),而 1 μM Met-ENK+10 μM Nal 组大肠杆菌的 OD_{600} 则有所回升,为空白组的 0.46 倍,接近于 PBS 组的水平 (为空白组的 0.48 倍) (图 3.6 B)。

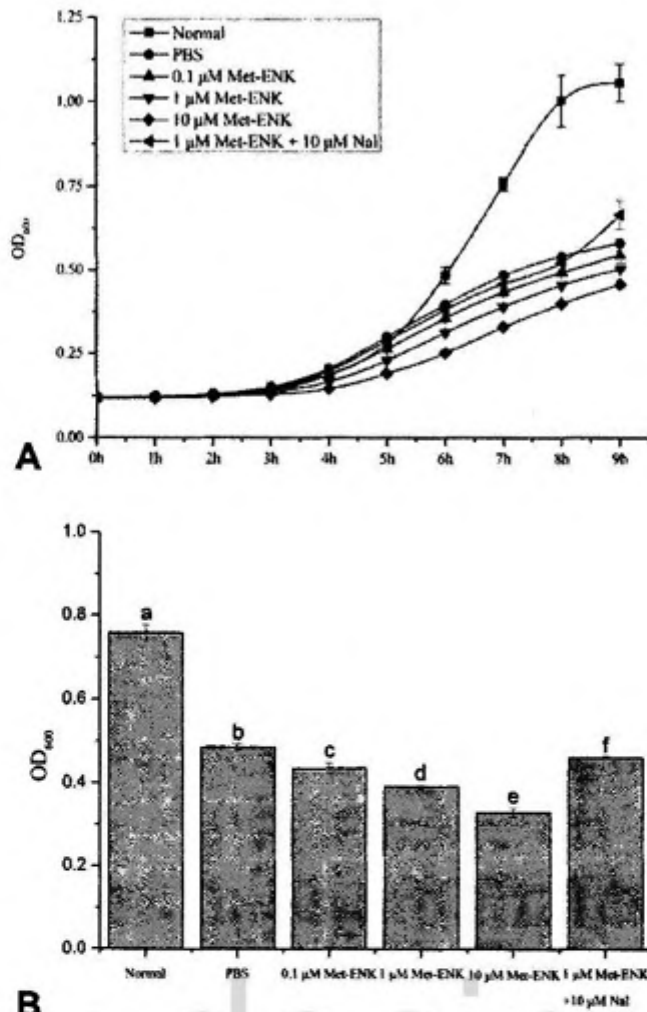


图 3.6 Met-ENK 对血清抑菌活性的影响

(A: 大肠杆菌生长曲线, B: 接种 7 小时后生长速率)

Fig 3.6 The bacteriostasis of scallop serum post Met-ENK stimulation

(A: Growth curves for *E. coli* exposed to scallop haemolymph supernate from the blank and stimulation groups. Bacterial growth was recorded as absorbance at 600 nm, B: The OD₆₀₀ value of *E. coli* in the different treatment groups at 7 h)

4. Met-ENK 对血清中 LYZ 活性的影响

本研究选用基于比浊法的 LYZ 试剂盒测定栉孔扇贝血清中 LYZ 活性的高低, 并以各组的测定值与空白组的测定值之比表征实验结果。结果显示: 只有 10 μM Met-ENK 组的 LYZ 活性水平呈显著性下降, 为空白组的 0.52 倍 ($P < 0.05$), 而其其他组 (PBS、0.1 μM Met-ENK、1 μM Met-ENK 和 1 μM Met-ENK+10 μM Nal 组) 的 LYZ 活性与空白组相比无显著差异 (图 3.7)。

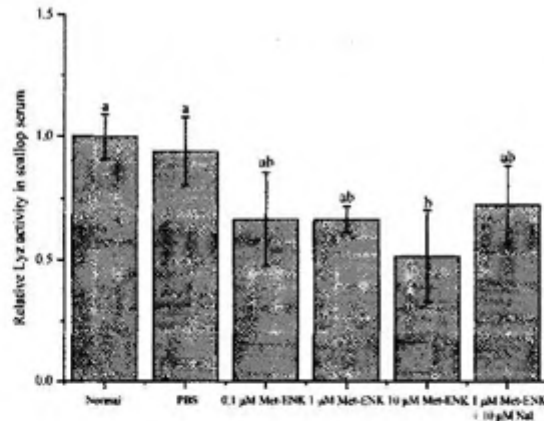


图 3.7 Met-ENK 对血清中 LYZ 活性的影响

Fig 3.7 The relative LYZ activity in scallop serum post Met-ENK stimulation

二、Met-ENK 对血淋巴细胞吞噬活性的影响

本研究选用中性红细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒检测 Met-ENK 对血淋巴细胞吞噬活性的影响，并以各组的测定值与空白组的测定值之比表征实验结果。结果显示：Met-ENK 对栉孔扇贝血淋巴细胞的吞噬活性具有促进作用，且在一定范围内，Met-ENK 的浓度越大，其促进作用越强，其中 10 μM Met-ENK 组的血淋巴细胞对中性红的吞噬能力最强，为空白组的 3.4 倍 ($P < 0.05$)，而 PBS 组和 1 μM Met-ENK+10 μM Nal 组血淋巴细胞对中性红的吞噬能力与空白组相比，未发现显著性差异（图 3.8）。

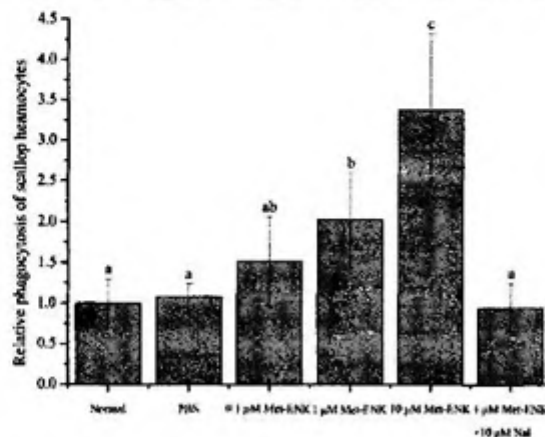


图 3.8 Met-ENK 对血淋巴细胞吞噬活性的影响

Fig 3.8 The phagocytosis of scallop haemocytes post Met-ENK stimulation

三、Met-ENK 对血淋巴上清液中 TNF- α 活性的影响

本研究选用 L929 细胞毒性实验来检测 TNF- α 的活性, 在该实验中, TNF- α 的活性越高, 对 L929 细胞的毒性越大, L929 细胞的数量就越少。结果显示: Met-ENK 对血清中 TNF- α 活性具有诱导作用, 其中 0.1 μ M Met-ENK、1 μ M Met-ENK 和 10 μ M Met-ENK 组血清中 TNF- α 活性分别为空白组的 1.26、1.30 和 1.32 倍 ($P < 0.05$), 而 1 μ M Met-ENK+10 μ M Nal 组血清中 TNF- α 活性与空白组的相比不存在显著性差异 (图 3.9)。

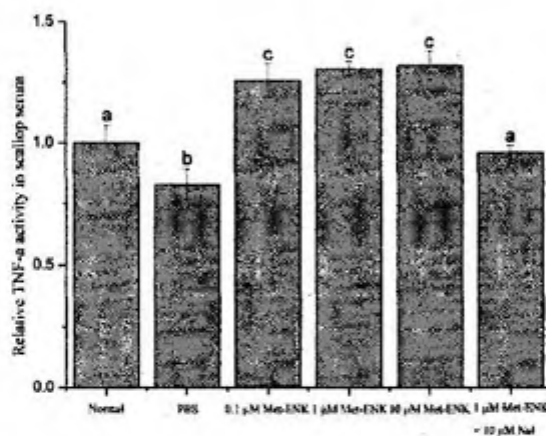


图 3.9 Met-ENK 对血清中 TNF- α 活性的影响

Fig 3.9 The relative TNF- α activity in scallop serum post Met-ENK stimulation

第四节 阿片肽生长因子受体基因的克隆与 mRNA 表达规律分析

一、CfOGFR 基因的克隆

本研究在应用 Blastx 软件分析了栉孔扇贝所有 EST 序列后, 检测到编号为 rscag0_002606 (264 bp) 的 EST 序列与已经克隆得到的脊椎动物阿片肽生长因子受体 OGFR 基因序列具有较高的同源性。根据这条 EST 序列设计了若干基因特异性引物 (P1-P12) 用于 RACE 实验, 并成功克隆获得了 CfOGFR 基因全长 cDNA 序列, 并使用 NCBI 服务器的 sequin 软件将该序列注册至 GenBank 数据库中, 登录号为 JX000476, 已公开。

二、CfOGFR 基因的分子特征

利用多种生物信息学工具, 如 Blastx、Expert Protein Analysis System、SignalP

3.0、SMART 7.0、ClustalW 2.1 和 MEGA 5.1 等软件分析了 CfOGFR 的核苷酸序列特征、氨基酸序列特征和蛋白质结构域等分子特征以及多序列比对和系统进化关系等。

CfOGFR 基因 cDNA 全长为 2361 bp，其中包括开放阅读框（Open reading frame, ORF）长度 1200 bp，5'非翻译区（Untranslated region, UTR）长度 81 bp 和 3' UTR 长度 1080 bp。CfOGFR 基因 cDNA 编码一条由 399 个氨基酸残基组成的多肽，该多肽的理论分子量为 45.98 kDa，等电点为 4.98。CfOGFR 的 cDNA 全长及推导的氨基酸序列见图 3.10。

```

1 tgggggtggccacgcgtcgactagtagtactttttttcacttccggtttcgtttttgtgctt
1 M S K S R N T R S S I P S
61 cagcgcactttaattgtgcaATGTCAAAGTCTAGAAATACACGTAGTAGTATACCTTCC
14 S S E G A V S Y K D K F K Q T K M G N S
121 TCGTCAGAAGGAGCAGTTTCTACAAGGATAAAATTAAGCAGACAAAAATGGGCAACTCT
34 E S S D E S P T Q R R R A G G G N K R M
181 GAGAGCAGTGATGAGTCGCCGACACAGAGGAGACGTGCCGGAGGTGAAATAAACGCATG
54 F K D S F F R K W S D K D T E Q Y R L G
241 TTTAAAGACAGTTTCTTTAGAAAGTGGAGTGACAAGGATACAGAAATACAGACTGGGA
74 Y P G K R D H P N Q K E N L L F Y T G Q
301 TACCCAGGCAAAAGGGACCATCCAAATCAGAAGGAAAATCTACTGTTCTACACTGGCCAG
94 M P S H P N G D Y I D N I H K K W W G D
361 ATGCCATCTACCCTAACGGAGATTACATAGATAATATACATAAGAAATGGTGGGGAGAT
114 F R L L E S H H G Y I Q W L F P I R E S
421 TTTGCTCTTCTGGAATCCCATCATGGATACATACAGTGGTTGTTTCCCATCAGAGAGTCT
134 G M N F Y S Q E L Q V H E I Q K I K E D
481 GGTATGAACCTTTATTCCAAGAGCTACAAGTCCATGAAATCCAGAAAATCAAGGAAGAT
154 K K A L A R V L T S Y K L M L D F Y G M
541 AAGAAAGCCTTAGCACGTGTGCTGACGTCGTACAAGTTAATGTTGGACTTTTACGGTATG
174 E L E S E E T G Q I K R G E N W E S Q F
601 GAGCTGGAGAGCGAGGAAACAGGACAAATAAACCGGGTGAAAATGGGAGTCACAGTTC
194 N N L N R S Y H N Y L R I T R I L K S L
661 AATAATCTCAACAGGTCCTATCATAATTACCTACGAATCACTCGGATTCTCAAGTCTCTA
214 G E F G Y E H L K R P F V E F V L Q E A
721 GGGGAGTTGGATATGAACATCTGAAGCGACCATTTGTGGAATTTGCTCCTGCAAGAGGCC
234 L E T G Q L C N V L D S C V N Y W I G T
781 TTGAAACAGGCCAGCTATGTAATGTCCTGGATAGTTGTGTGAACTATTGGATTGGGACA
254 L K D D S V R R Q L L D Y I E K V E G G
841 CTTAAAGATGACAGTGTACGCAGACAGCTGTTGGATTACATTGAAAAAGTTGAGGGTGA
274 Y V E D D S P N E N E S E M E E V K G N
901 TATGTTGAAGATGATTACCCAATGAAAATGAGTCAGAGATGGAGGAAGTAAAGGGCAAT
    
```

(图 3.10 续)

```

294 G A Q S T E K F N T S R T S K D K L S L
961 GGGGCACAATCCACCGAAAAATTTAATACGTCAAGAACATCTAAAGATAAATTAAGTTTG
314 N D S T A K T N K S P D I D V E F S D D
1021 AACGACTCTACAGCTAAACTAATAAATCCCAGATATAGATGTTGAATTTAGTGACGAT
334 S H E G E T W A K A D L L A S G D G D T
1081 TCCCATGAGGGAGAAAACGTGGGCAAAGCAGATTTACTAGCATCAGGTGACGGGGCACT
354 G N N D K C D T D V K S D P E E D K M E
1141 GGAATAATGACAAATGTGACACTGATGTGAAGAGTGATCCGGAGGAGATAAAATGGAG
374 V E D N S T E E S N P K P P T T E T Q P
1201 GTAGAGGACAACAGTACAGAAGAATCGAACCCCAAACCACCAACCCTGAAACACAACCG
394 F S L D Q V *
1261 TTCAGTCTCGATCAGGTGTGAatctcttctgggacagactaactcacatcacatgtaaca
1321 aacttttatattaacgagaacttaatgataaagttaagatttttaattgacatttta
1381 tgtgataactaaattttaatgagcaaatcatatgacaattatcaaacattcataaatca
1441 agtcttaatgaagattaatttctgctgctcctggtgtagtatcagttatcctcaactgcac
1501 attttttttagaaatatttactaaaacttgagttgcatttaaaaattctttaagaaatga
1561 cattcaaataggtataaattcatattaacatacatatgtttttatttttagaataaaa
1621 atgagcactttgaggaggagttcaacagaatttctaattggtgtttaatactgaggcttt
1681 catttaagaactttcaggacttaaaacttgataaagatgtttagaggagcttggtgaatt
1741 agaagataaagttccagcacagactcagatgaaaatatggggaattctttcacataaag
1801 atgaacgtcagagttgtttatctggcatttgtagtagatgttttagcggggtcttatatac
1861 tggggagatgaagattgaacacagaatcagataaagatgtggggaattcatttacttaa
1921 atataaacacttagagcctgtttataatgtatttctagtagggaatttcattgtagattg
1981 ttttacttcaagttatagcattttataaatcttttacttaaaaatgatgatgcgggcatta
2041 cagggaagatgctctgttgcatggtaacctaaaatgttgataatatactgatcagat
2101 gtttgaccaactgagagcaatgtggagcaagcatgatttctagaaaaatcaatactcctaa
2161 aattaagtggctttgattaaggttggttagcatttataaaataaaaatataatgaact
2221 gtgttatttacacaaaattatgaattaaacacagacagcagtgtaaacccttatatggtaa
2281 atttaggaacaaactgtacttagtagatgataactaatgtaataaaaaacaacatcaga
2341 tcactgaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

图 3.10 基因 CfOGFR 的 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

(终止密码子以星号标注；经典加尾信号 AATAAA 以粗体并阴影表示；核苷酸及氨基酸序号标在左侧；预测的 OGFR_N 结构域以下划线、低复杂区以双下划标出。)

Figure 3.10 The amino acid sequences of CfOGFR deduced from its nucleotide sequences (The asterisk (*) stands for the stop codon. The three classical polyadenylation signals are shadowed and in boldface. The amino acids and their nucleotides are numbered along the left margin. The predicted low complexity domain is double-underlined and the predicted OGFR_N domain is underlined.)

利用 SMART 软件预测推导的 CfOGFR 氨基酸序列的可能结构域。结果表明 (图 3.11)：CfOGFR 蛋白与斑马鱼、小鼠和人的 OGFR 蛋白有很高的结构相似性，在其 N 末端均有一个 OGFR_N 结构域，只是 CfOGFR 蛋白比小鼠的少了两

个 RPT 结构域，但人和斑马鱼的 OGFR 蛋白也没有 RPT 结构域；此外在其 N 末端还发现了一个低复杂区（红色标注部分）。

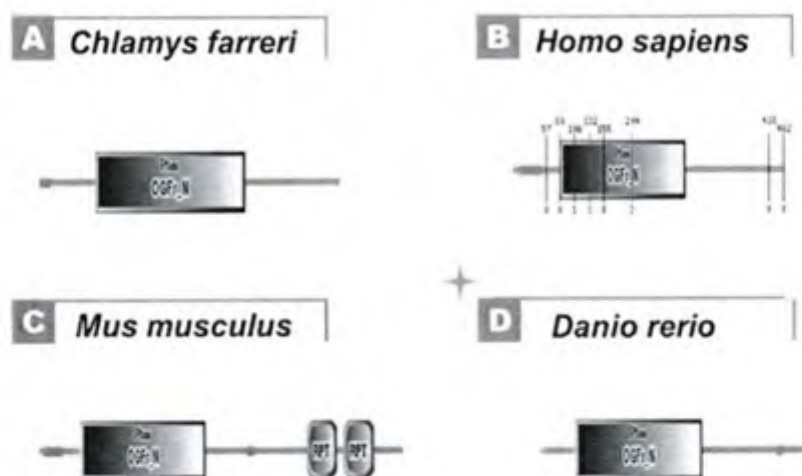


图 3.11 根据推导所得的 CfOGFR 蛋白质序列预测得到的结构域

Fig 3.11 Functional domains predicted from the deduced protein sequence of CfOGFR

将推导所得的 CfOGFR 氨基酸序列进行 Blastp 分析，发现 CfOGFR 与其他动物的 OGFRs 具有较高同源性（33-64%），其中与太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* 和林蛙 *Xenopus tropicalis* OGFRs 的相似性最高，达 63-64%。将 CfOGFR 与其它动物，包括 *Homo sapiens* (NP_031372)，*Mus musculus* (NP_113550)，*Rattus norvegicus* (NP_445792)，*Crassostrea gigas* (EKC24098)，*Danio rerio* (XP_003201204) 以及 *Tetrahymena thermophila* (XP_001027192) 等，的 OGFRs 的氨基酸序列进行多序列比对，发现其 N 末端具有高度保守性（图 3.12）。利用 MEGA 5.1 软件以 Neighbor-Joining (NJ) 方法基于 GenBank 上其他物种，包括 *Homo sapiens* (NP_031372)，*Rattus norvegicus* (NP_445792)，*Mus musculus* (NP_113550)，*Bos taurus* (NP_001070487)，*Gallus gallus* (XP_425708)，*Cricetulus griseus* (EGW11059)，*Danio rerio* (XP_003201204)，*Salmo salar* (CAJ90908)，*Taeniopygia guttata* (XP_002194613)，*Vibrio parahaemolyticus* (ZP_05121006)，*Oscillatoria sp.* (ZP_07110015)，*Pan troglodytes* (XP_001146234)，*Pseudomonas syringae pv.* (EGH82438)，*Macaca mulatta* (XP_001087181)，*Tetrahymena thermophila* (XP_001027192)，*Xenopus (Silurana) tropicalis* (NP_001090756) 以及 *Anolis carolinensis* (XP_003220721)，的 OGFRs

氨基酸序列构建了系统发生树，结果显示 CfOGFR 首先与太平洋牡蛎的 OGFR 聚成一支，再与脊椎动物和四膜虫的 OGFRs 聚成真核生物分支，而来源于细菌的 OGFRs 独立聚成一个分支（图 3.13）。

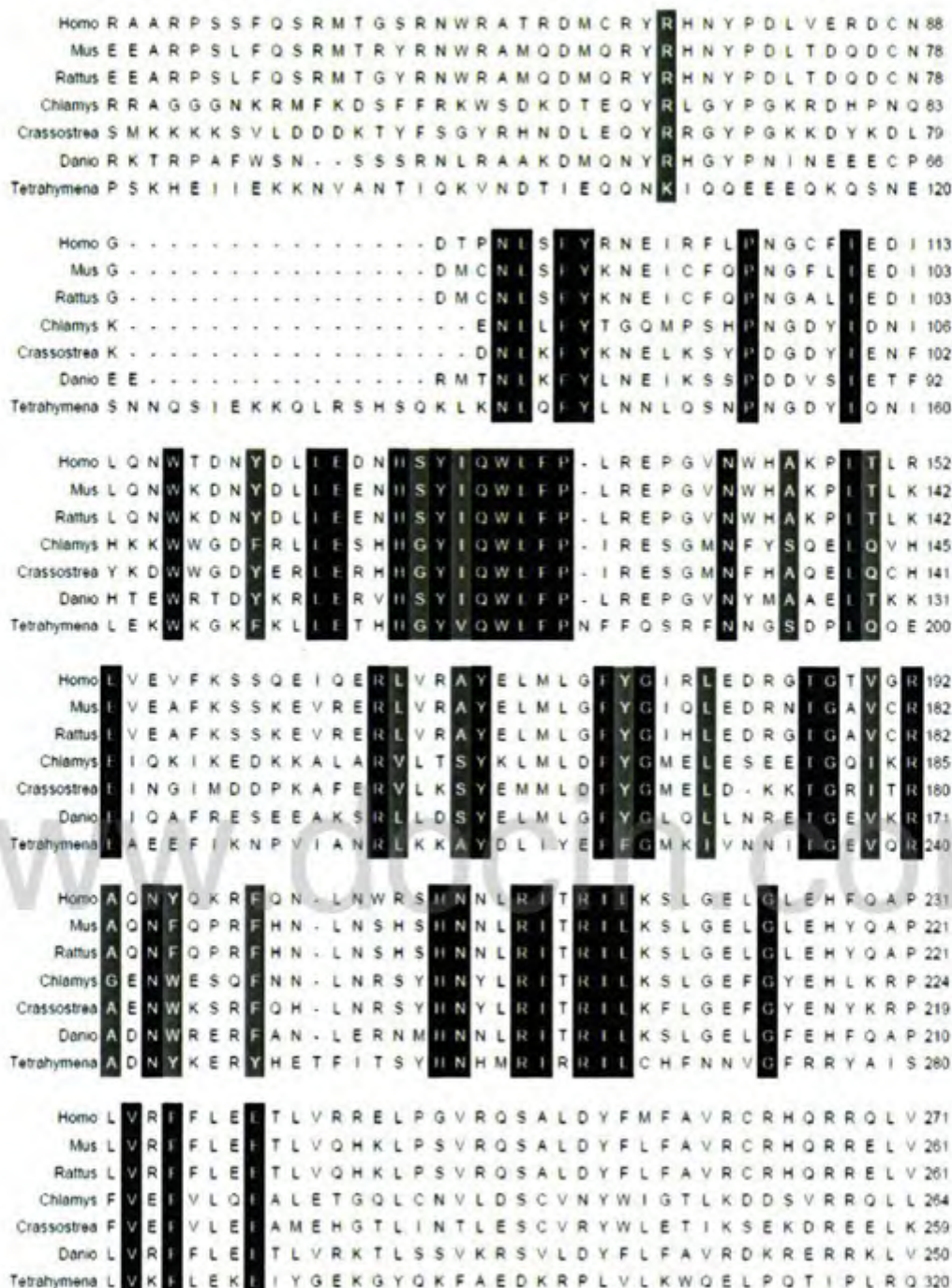


图 3.12 CfOGFR 与其他物种来源的 OGFRs 的氨基酸序列的多序列比对
Figure 3.12 Multiple sequences alignment with CfOGFR and other OGFRs from GenBank.

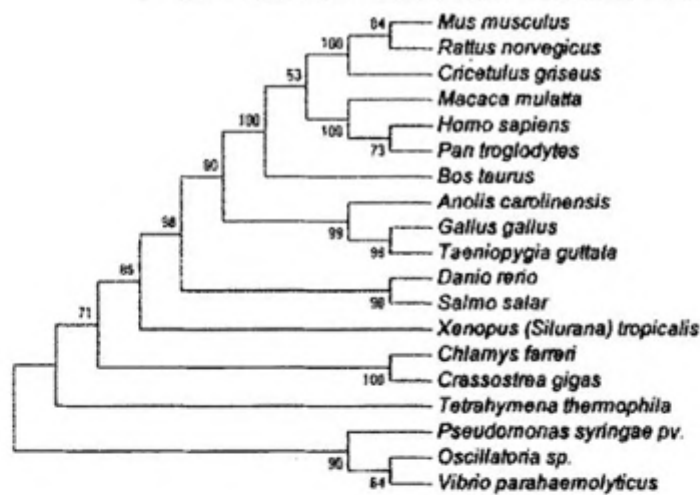


图 3.13 不同物种 OGFRs 的 NJ 系统发生树
(各节点的数值表示靴带值)

Fig 3.13 Neighbor-joining tree based on the amino acid sequences of different OGFRs.
The numbers at the forks indicate the bootstrap.

三、CfOGFR 基因 mRNA 的表达特征

1. CfOGFR 基因 mRNA 的组织分布

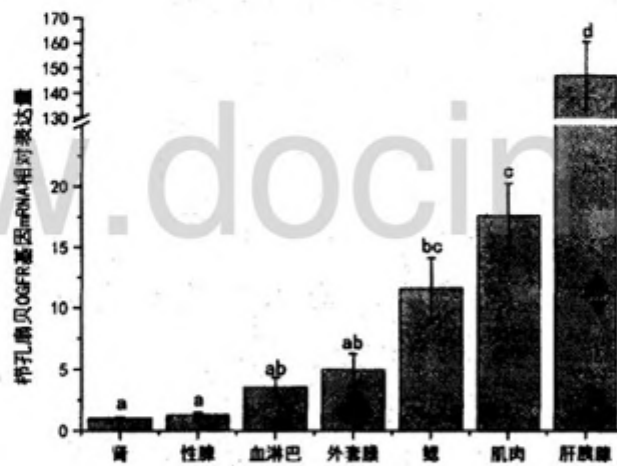


图 3.14 CfOGFR 基因 mRNA 的组织分布

Fig 3.14 Tissue distribution of the CfOGFR mRNA.

本研究采用荧光实时定量 PCR 技术检测了 CfOGFR 基因 mRNA 在栉孔扇贝肾脏、性腺、血淋巴细胞、外套膜、鳃、闭壳肌和肝胰腺等组织的表达情况，并且以肾脏中的为参照分析 CfOGFR 基因 mRNA 在这些组织中的表达情况。结果

显示: CfOGFR 基因 mRNA 在各个组织中均能被检测到, 呈组成型表达, 其中在肝胰腺中的表达量最高, 约为在肾脏中表达水平的 146.0 倍左右 ($P < 0.05$), 其次是在闭壳肌和鳃中, 分别为在肾脏中的表达水平的 17.5 倍左右和 11.5 倍左右 ($P < 0.05$), 而性腺、血淋巴细胞、外套膜中的表达水平与肾脏中的表达水平相比, 未发现显著性差异 (图 3.14)。

2. CfOGFR 基因 mRNA 在扇贝早期胚胎发育中的时序表达

本实验采用荧光实时定量 PCR 技术检测 CfOGFR 基因 mRNA 在栉孔扇贝早期胚胎发育过程中的表达情况, 其中包括卵细胞 (O)、受精卵 (F) 以及二细胞期至三十二细胞期 (E_2 — E_{32})、桑葚期 (M)、囊胚期 (B)、原肠期 (G)、担轮幼虫期 (T)、D 形幼虫期 (D)、早期面盘幼虫期 (Evl)、晚期面盘幼虫期 (Lvl) 和眼点幼虫期 (Ep) 的胚胎。结果表明: CfOGFR 基因 mRNA 在整个胚胎发育过程中均能被检测到, 其表达量在整体上呈下降趋势, 其中在受精卵和十六细胞期下降幅度最大, 分别为卵细胞表达水平的 0.64 倍和 0.05 倍 ($P < 0.05$), 并在囊胚期达到最低点, 为卵细胞表达水平的 0.016 倍 ($P < 0.05$), 随后在晚期面盘幼虫期, CfOGFR 基因 mRNA 的表达量有所回升, 为卵细胞表达水平的 0.42 倍 ($P < 0.05$) (图 3.15)。

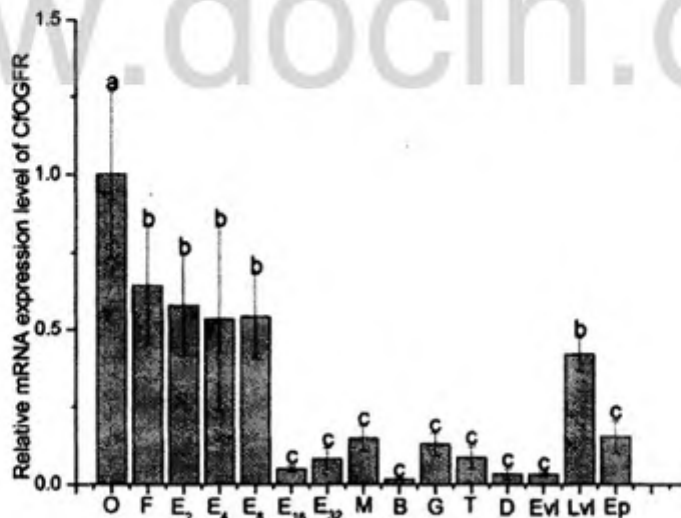


图 3.15 CfOGFR 基因 mRNA 在栉孔扇贝早期胚胎发育过程中的时序表达

Fig 3.15 Temporal expression profile of the CfOGFR mRNA in the ontogenesis of scallop.

3. CfOGFR 基因 mRNA 在扇贝受到 PAMPs 刺激后的时序表达

本研究采用荧光实时定量 PCR 技术检测栉孔扇贝分别在 4 种 PAMPs, 包括 LPS、PGN、 β -Glu 和 Poly (I:C), 的刺激下 CfOGFR 基因 mRNA 的表达规律。结果表明: 在 4 种 PAMPs 刺激下, CfOGFR 基因 mRNA 表现出不同的表达规律 (图 3.16)。在受到 LPS 和 poly (I:C) 刺激后, CfOGFR 基因 mRNA 的表达量均在 24 小时后显著上升, 并在 48 小时时达到峰值, 分别为空白组的 6.4 倍和 3.5 倍 ($P < 0.05$); 在受到 β -Glu 刺激 3 小时后, CfOGFR 基因的 mRNA 表达量显著升高, 并在 24 小时后达到峰值, 为空白组的 8.9 倍 ($P < 0.05$), 随后其表达量逐渐下调; 然而 PGN 刺激组中 CfOGFR 基因 mRNA 的表达未发生显著性变化。

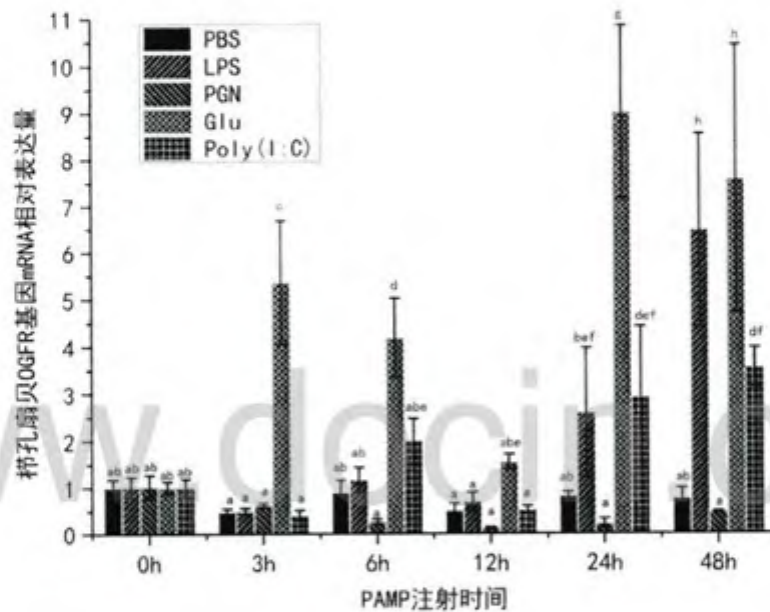


图 3.16 CfOGFR mRNA 在 4 种 PAMPs 刺激下的应答规律

Fig 3.16 The response of CfOGFR mRNA in hemocytes against PAMPs stimulation.

第五节 Met-ENK 与 CfOGFR 的相互作用

一、CfOGFR 的原核表达及其多克隆抗体制备

将编码 CfOGFR 成熟肽的 cDNA 片段即完整的 CDS, 扩增并连接至基于 T7 启动子的 TOPO 型表达载体 *pEASY-E1* 中, 并将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 诱导蛋白表达, 变性纯化重组蛋白并复性, 最后将获得的重组蛋白免

疫大鼠制备 rCfOGFR 的多克隆抗体。

1. 重组蛋白 rCfOGFR 的制备

用 IPTG 对转化了 CfOGFR-*pEASY-E1* 质粒的阳性大肠杆菌 *Transtetta* (DE3) 菌株进行诱导表达，菌液经 SDS-PAGE 分析，结果表明 CfOGFR 蛋白被成功诱导表达（图 3.17，泳道 B）。对重组蛋白进行 Ni-琼脂糖亲和层析柱变性纯化和透析复性后，得到分子量约为 52 kDa 的纯化的 rCfOGFR（图 3.17，泳道 C），而该分子量大小与预测的分子量一致。

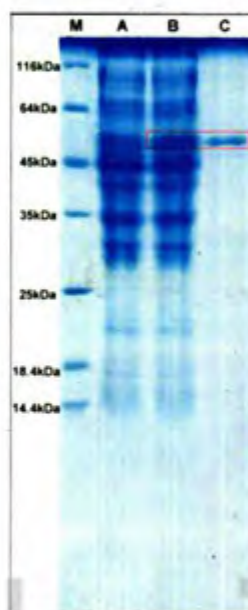


图 3.17 rCfOGFR 的 SDS-PAGE 电泳分析
(泳道 A: 未诱导的大肠杆菌菌液; 泳道 B: IPTG 诱导的大肠杆菌菌液; 泳道 C: 纯化的 rCfOGFR; 泳道 M: 蛋白分子标准)

Fig 3.17 SDS-PAGE assay of rCfOGFR

(Lane A: bacteria lysate without IPTG induction. Lane B: bacteria lysate with IPTG induction.
Lane C: purified rCfOGFR)

2. rCfOGFR 多克隆抗体的制备

本研究分别采用 Gerbu 佐剂和弗氏佐剂方法将复性的 rCfOGFR 蛋白免疫大鼠，制备 rCfOGFR 的大鼠抗血清，并使用 Western-blot 方法检测大鼠抗血清的特异性。结果显示：两种方法得到的大鼠抗血清均能与 rCfOGFR 蛋白结合，形成特异性的反应条带（图 3.18），其中用弗氏佐剂方法制备的大鼠抗血清效价更高一些；杂交结果中未发现非特异性条带，表明该抗血清特异性较高，完全能够满足后续试验的要求，同时采用健康大鼠血清作为阴性对照未检测到任何条带。

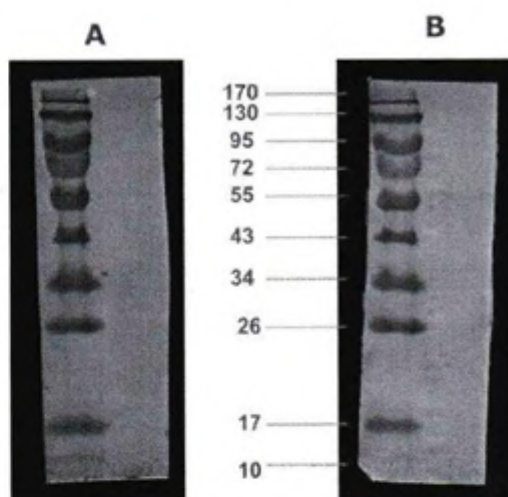


图 3.18 rCfOGFR 大鼠抗血清的 Western blot 分析

A: Gerbu 佐剂方法制备的大鼠抗血清 B: 弗氏佐剂方法制备的大鼠抗血清

Fig 3.18 Western blot assay of the rat antisera for rCfOGFR.

A:The rat antisera prepared by Gerbu's adjuvant B:The rat antisera prepared by Freund's adjuvant

二、Met-ENK 与 CfOGFR 的特异性结合

本研究采用 Co-IP 和 Western blot 方法检测了 CfOGFR 与 Met-ENK 的结合活性。



图 3.19 CfOGFR 蛋白与 Met-ENK 结合能力的 Western blot 分析

(泳道 A 和泳道 B 均为对照组, 泳道 C 为实验组)

Fig 3.19 Western blot assay for the binding ability of CfOGFR to OGF.

(Lane A:Control group A. Lane B:Control group B. Lane C:Experimental group)

检测结果显示：实验组样品可以与实验室制备的 rCfOGFR 蛋白多克隆抗体结合，形成特异性的反应条带(图 3.19)，该条带的位置与 rCfOGFR 蛋白的一致，说明血淋巴细胞中与 Met-ENK 结合的蛋白包括 CfOGFR，即 CfOGFR 蛋白可以与 Met-ENK 特异性结合。

三、Met-ENK/CfOGFR 对 HEK293T 细胞增殖的影响

本研究将 Met-ENK 与转染了 pcDNA3.1(+)-CfOGFR 质粒的 HEK293T 细胞孵育，观察 Met-ENK 对细胞增殖的影响。结果显示：与对照组相比，Met-ENK 对转染了 pcDNA3.1(+)-CfOGFR 质粒的 HEK293T 的细胞增殖具有明显的抑制作用，且这种抑制具有一定的时间和浓度依赖性，即在一定范围内，Met-ENK 的浓度越大，细胞与其孵育的时间越长，其对细胞增殖的抑制作用越大(图 3.20)。

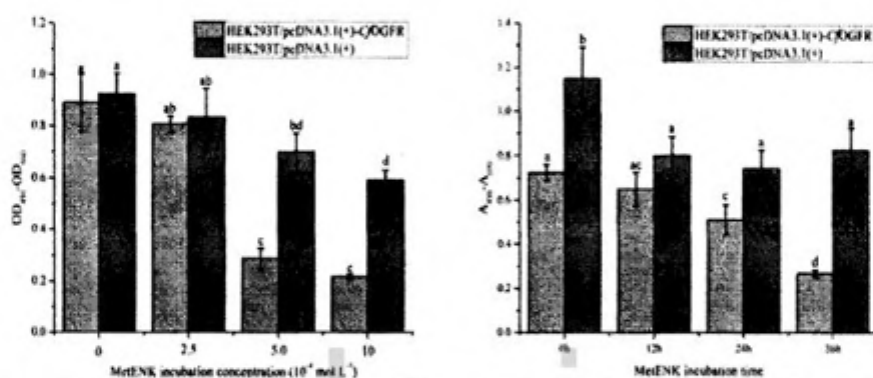


图 3.20 Met-ENK/CfOGFR 对 HEK293T 细胞增殖的影响
Fig 3.20 The influence of Met-ENK/CfOGFR on Cell proliferation.

第四章 分析与讨论

目前取得的研究结果表明,在脊椎动物中,脑啡肽不仅在神经内分泌系统中作为神经调质发挥重要作用,还能够作为免疫调质参与对免疫系统的调控。

1975年, Hughes 和 Kosterlitz 等首次分离和鉴定了两种内源性脑啡肽,并分别命名为甲硫氨酸脑啡肽 (Met-ENK) 和亮氨酸脑啡肽 (Leu-ENK)^[110]。脑啡肽的前体——脑啡肽原 (Pro-enkephalin) 的氨基酸序列中包含六个 Met-ENK 重复序列; 其中四个可经由作用于双碱性氨基酸位点的激素原转化酶 (PCs) 从脑啡肽原中释放出来, 而另外两个分别包含在一个七肽和一个八肽中, 因这两个小肽的 C 端只有一个碱性氨基酸位点, 因而无法被 PCs 识别释放出 Met-ENK。在阿片肽类物质中, 五肽 Met-ENK 和 Leu-ENK 对 δ 型阿片肽受体的亲和力最高, μ 型阿片肽受体次之, κ 型阿片肽受体最弱; 而一些含有脑啡肽序列的活性肽, 如 metorphamide (Pro-enkephalin 211-218) 和 BAM18 (Pro-enkephalin 211-228), 则对 δ 型、 μ 型和 κ 型阿片肽受体均有很高的亲和力^[143, 144]。由此可见, 脑啡肽原剪切加工的程度对所得产物的生物活性有很大的影响。

脑啡肽原及其衍生物广泛地分布于脊椎动物的脑和脊髓中。据报道, Met-ENK 和 Leu-ENK 已在纹状体 (尾壳核和伏隔核)、下丘脑、丘脑室旁、外侧膝状体、蓝斑核、海马、杏仁核、大脑皮层、终纹床核、视前区、主要优势和劣势丘、间核、黑质、桥脑、孤束核、延髓、脊髓及其神经末梢中被检测到^[145]。研究发现, 在星形胶质细胞中, 脑啡肽原的表达具有区域特异性, 并且其表达量随着年龄的增长而升高^[146-148]。另外, 脑啡肽原基因的 mRNA 在间充质衍生组织的胚胎发育过程中瞬时表达, 提示脑啡肽类物质可能参与了对组织发育的调控^[149]。

研究显示, 内源性阿片肽参与了高等动物机体内许多生理功能的调节, 其中包括: 疼痛和镇痛, 耐受性和依赖性, 学习和记忆, 饮水和进食, 酒精依赖和药物成瘾, 发育和内分泌, 神经递质的释放, 胃肠道、肾脏和肝功能, 心血管反应, 呼吸和体温调节以及免疫应答反应等^[150]。

诸多证据表明, 脑啡肽对软体动物免疫细胞的活化具有调节作用^[151, 152], 而

关于其在软体动物中神经递质的作用以及生理生化作用机制的分析也已有报道^[153, 154]。Stefano 和 Catapane 等发现, 用外源性阿片肽刺激贻贝 (*M. edulis*) 后, 将上调其中枢神经系统 (Central nervous system, CNS) 的多巴胺水平^[155]。Hancock 和 Coupar 发现, Leu-ENK 和 Met-ENK 可以抑制由穿透刺激引起的大鼠离体空肠的胆碱能收缩作用^[156]。用 Leu-ENK 刺激离体的胰腺, 可导致胰腺蛋白的分泌和淀粉酶产量的增高, 而这种刺激作用可被纳洛酮阻断^[157]。研究发现, Met-ENK 可以增强 LPS 诱导的巨噬细胞的吞噬活性^[91], 刺激单核细胞、淋巴细胞和嗜中性粒细胞朝向感染部位移动^[92]。另外, Met-ENK 还可以诱导多种炎症因子如 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的释放^[91, 95]。

本研究明确了栉孔扇贝中脑啡肽及其受体的分子特征及其在免疫应答中的响应机制, 初步阐释了脑啡肽及其受体对扇贝免疫应答的调节方式, 并尝试探讨了栉孔扇贝中功能性的脑啡肽-脑啡肽受体通路所介导的神经内分泌免疫调节机制。

第一节 栉孔扇贝脑啡肽能神经内分泌系统的结构特征及功能验证

一、栉孔扇贝脑啡肽的组织分布

目前已经在许多无脊椎动物中检测到了脑啡肽的存在, 如贻贝 (*M. edulis*)、蛞蝓 (*Limax maximus*)、淡水螺 (*Lymnaea stagnalis*)、玛瑙螺 (*Helix pomatia*) 和加利福尼亚海兔 (*A. californica*) 等^[158-161], 但这些研究主要集中在无脊椎动物的神经和消化系统, 而关于其在免疫系统中的研究则相对较少。为了明确栉孔扇贝中脑啡肽的组成及组织分布情况, 本研究采用荧光免疫组化技术检测了 Leu-ENK 和 Met-ENK 在栉孔扇贝各组织中的分布。结果显示, 只在血淋巴中检测到 Leu-ENK 阳性信号, 而 Met-ENK 在除闭壳肌以外的其他所有组织, 包括血淋巴、外套膜、鳃、肝胰腺、肾和性腺, 中均能被检测到, 并呈组成型表达; 说明栉孔扇贝中脑啡肽的主要存在形式是 Met-ENK。在该实验中, 我们用到的抗体兔抗 Met-ENK 血清和兔抗 Leu-ENK 血清的特异性非常高, 均不与其他肽类起交叉反应, 从侧面反映了栉孔扇贝中检测到的脑啡肽类物质与哺乳动物脑啡肽结构的保守性。对贻贝血淋巴中的六种活性肽进行结构分析发现, 贻贝 Met-ENK 类分子的氨基酸序列与哺乳动物 Met-ENK 的氨基酸序列完全相同, 而 γ -MSH、

α -MSH、ACTH、 β -内啡肽、 γ -促脂解素激素（LPH）类分子的氨基酸序列与哺乳动物同源物的氨基酸序列的一致性分别为 80%、85%、74%、25%和 10%^[162]。Met-ENK 结构上的保守性，提示 Met-ENK 可能是整个动物界共有的基本分子之一，因此在动物的生存和进化过程中可能扮演着关键性的角色。另外，Met-ENK 不仅分布于上述组织，还大量分布于扇贝的神经节和消化器官中^[163]。扇贝 Met-ENK 广泛的组织分布为其各种功能，如抑制细胞增殖、信号传导和调节免疫反应等，的行使奠定了良好的物质基础。

二、栉孔扇贝阿片肽生长因子受体基因的确 定

迄今为止，OGFR 基因已经在许多哺乳动物中被克隆到，例如人、大鼠和小鼠等；运用各种生物信息学软件对这些 OGFRs 的氨基酸序列进行分析，发现除两个核定位信号（NLS）外，OGFR 的氨基酸序列中不存在与已知的结构域或功能域相似的序列^[78]。本研究克隆得到的 CfOGFR 基因的 ORF 为 1200 bp，编码一条由 399 个氨基酸残基组成的多肽链。CfOGFR 的氨基酸序列与其它物种 OGFRs 的同源性为 33-64%。根据推导的 CfOGFR 氨基酸序列，利用 SMART 软件预测其结构域发现，CfOGFR 蛋白的 N 端有一个 OGFr_N 结构域，该结构对 OGFR 蛋白功能的维持非常重要；此外在 OGFr_N 结构域的上游还发现了一个低复杂区，但未在 CfOGFR 中发现哺乳动物 OGFRs 的保守序列——NLS 和不完全重复序列^[78, 79]。同样的，我们也没有在四膜虫的 OGFR 中发现 NLS 和不完全重复序列。据报道，大西洋鲑鱼 OGFR 与人 OGFR 有 62%的同源性，但在其 C 端也未发现不完全重复序列^[164]。因此我们推测，OGFR 中的 NLS 和不完全重复序列可能是在生物进化过程中逐渐形成的。

在 NJ 系统发生树中，CfOGFR 首先与太平洋牡蛎 OGFR 聚类，再与脊椎动物和四膜虫的 OGFRs 聚成真核生物分支，而细菌的 OGFRs 则独立形成一个分支。CfOGFR 与同源蛋白氨基酸序列的相似性、OGFr_N 结构域的保守性以及太平洋牡蛎 OGFR 相似的进化关系共同表明 CfOGFR 确实是 OGFR 在栉孔扇贝中的同源物。

三、栉孔扇贝阿片肽生长因子受体的功能验证

作为 Met-ENK 的受体之一，脊椎动物的 OGFR 可以与 Met-ENK 特异性结

合，并通过这种结合作用介导 Met-ENK 对细胞增殖的抑制作用^[78]。为了验证 CfOGFR 是否具有 OGFR 蛋白的典型功能，我们将编码 CfOGFR 成熟肽的 cDNA 片段进行原核表达，使用变性纯化并复性的重组蛋白 rCfOGFR 免疫大鼠制备多克隆抗体。利用 Co-IP 方法和抗 rCfOGFR 大鼠血清检测了血淋巴细胞中 CfOGFR 蛋白与 Met-ENK 的结合作用。结果表明，正常情况下 CfOGFR 蛋白存在于血淋巴细胞中，并且该蛋白可以与 Met-ENK 特异性结合。

据相关报道，人 OGFR 对细胞增殖抑制作用的实现依赖于 OGF-OGFR 复合物的核质转运，而该过程的顺利进行则与 OGFR 氨基酸序列中两个 NLS 的存在密不可分^[165]。由于在 CfOGFR 氨基酸序列中没有发现 NLS，CfOGFR 对细胞增殖的抑制作用则需要进一步的验证。因此，本研究将 Met-ENK 与转染了 pcDNA3.1(+)-CfOGFR 质粒的 HEK293T 细胞孵育，观察 Met-ENK 对细胞增殖的影响。结果显示，Met-ENK 能够显著抑制转染了 pcDNA3.1(+)-CfOGFR 质粒的 HEK293T 细胞的增殖，且这种抑制作用在一定范围内具有时间和浓度依赖性。由此可见 NLS 和不完全重复序列的缺失并未妨碍 CfOGFR 介导 Met-ENK 对细胞增殖的抑制作用；可以推测：虽然 NLS 和不完全重复序列的缺失在某种程度上降低了 CfOGFR 蛋白结构的特异性，但同时也许在一定程度促进了其功能的多样性。

综上所述，尽管 CfOGFR 蛋白与高等动物 OGFRs 在结构上存在一定的差异性，但在抑制细胞增殖的功能方面还是相似的。

四、CfOGFR mRNA 的组织分布及其在栉孔扇贝胚胎发育过程中的时序表达

为了明确栉孔扇贝中 OGFR 的分布特征，本研究检测了 CfOGFR mRNA 在各组织中的表达情况。结果表明 CfOGFR mRNA 在所有待测组织中均能够被检测到，呈组成型表达，并且在肝胰腺中的表达量最高。CfOGFR 组织分布的广泛性为其配体 Met-ENK 功能多样性的实现，如对细胞增殖、胚胎发育、细胞再生和伤口修复等的调节作用^[165-167]，奠定了物质基础。另外，由于肝胰腺是扇贝的主要免疫器官之一^[168, 169]，CfOGFR mRNA 在肝胰腺中的高表达量提示其可能参与了扇贝的免疫调节。

此外，我们还检测了 CfOGFR mRNA 在栉孔扇贝胚胎发育过程中的时序表

达。结果表明 CfOGFR mRNA 在胚胎发育各个时期均能被检测到, 其表达量在整体上呈下降趋势, 但在晚期面盘幼虫期有所回升。考虑到 CfOGFR 具有抑制细胞增殖的功能, CfOGFR mRNA 在整个胚胎发育过程中表达量的下调也许是扇贝调控自身发育的结果, 以便促进其幼虫的组织和器官发育。另外, 有报道称癌组织中 Met-ENK 和 OGFR 的表达量要低于正常组织, 推测 Met-ENK 和 OGFR 可能与癌症的发生和形成有关^[170]。因此, CfOGFR mRNA 在整个胚胎发育过程中的组成型表达对扇贝胚胎的正常发育具有重要意义。

第二节 栉孔扇贝脑啡肽能神经内分泌系统参与了扇贝的免疫应答反应

栉孔扇贝的脑啡肽能神经内分泌系统实现其免疫调节功能的前提是其组成成分存在于免疫相关组织中, 并参与机体的免疫应答反应, 具体表现为脑啡肽含量和脑啡肽受体基因表达水平的显著变化等。本研究发现脑啡肽及其受体均能在栉孔扇贝血淋巴细胞中被检测到, 结合相关研究进展, 初步证明了栉孔扇贝血淋巴中拥有脑啡肽能神经内分泌系统。由于栉孔扇贝的免疫细胞主要是循环的血淋巴细胞, 其通过吞噬、包囊、集结和氧化毒杀等作用参与免疫防御, 识别并清除病原体^[171-173], 因此, 本研究主要考察了栉孔扇贝血淋巴中脑啡肽含量和脑啡肽受体基因表达水平的变化。

据报道, 像脊椎动物一样, 当无脊椎动物受到 LPS 刺激、细菌感染或外科创伤时, 其血淋巴中 Met-ENK 的含量将明显升高^[61]; 同时, Tasiemski 等也证实了当无脊椎动物受到外源病原菌刺激时, 机体内的脑啡肽原会迅速剪切并释放出 Met-ENK^[97]。因此本研究检测了鳃弧菌刺激后栉孔扇贝血清中 Met-ENK 类分子的浓度变化, 以了解脑啡肽是否响应扇贝的免疫应答反应。结果显示, 鳃弧菌刺激 24 小时后, 血清中 Met-ENK 的浓度迅速升高并达到峰值; 鳃弧菌刺激 48 小时后 Met-ENK 的浓度虽有所降低但仍显著高于初始水平。上述结果表明, 栉孔扇贝血淋巴中的 Met-ENK 参与了栉孔扇贝对鳃弧菌刺激的免疫应答反应。据报道, 脑啡肽原衍生物如 Met-ENK 和 Peptide B 在微摩尔浓度时可以抑制细菌如藤黄微球菌和巨大芽孢杆菌的生长和增殖^[62]。因此, 当扇贝受到鳃弧菌刺激时, 其机体内原有的 Met-ENK 可立即抑制鳃弧菌的增殖以便为免疫信号的传递和脑啡肽原的剪切争取时间, 而从脑啡肽原释放出来的 Met-ENK 将进一步刺激血淋

巴细胞的趋化和吞噬作用以及经典细胞因子的分泌^[92]。

另外,我们还检测了栉孔扇贝在 4 种 PAMPs, 包括 LPS、PGN、 β -Glu 和 Poly (I:C), 刺激下血淋巴细胞中 CfOGFR mRNA 的时序表达。结果显示, CfOGFR 的 mRNA 表达水平分别在 LPS、Poly (I:C)和 β -Glu 刺激 24-48 小时、24-48 小时以及 3-48 小时后显著升高, 即这些免疫刺激能够显著上调血淋巴细胞中 CfOGFR mRNA 的表达水平, 表明栉孔扇贝在应对某些 PAMPs 刺激的过程中激活了血淋巴中脑啡肽及其受体的表达。据报道, 血淋巴细胞在识别并结合特定的病原体后将诱导细胞内一些细胞因子如 INF- γ 和 TNF- α 的分泌, 以增强免疫应答反应; 而在对基底癌细胞和角质细胞中的研究发现, INF- γ 可以通过上调 OGFR 的 mRNA 表达水平来抑制细胞的增殖^[87]。因此, 在本实验中, LPS、Poly (I:C) 和 β -Glu 在被血淋巴细胞识别并结合后可能诱导了 INF- γ 和 TNF- α 的分泌, 从而上调了 OGFR mRNA 的表达水平; 而表达上调的 OGFR 可能通过抑制免疫细胞的增殖来下调机体的免疫应答水平, 以防免疫过激。

第三节 脑啡肽对栉孔扇贝固有免疫应答的调节作用

栉孔扇贝脑啡肽能神经内分泌系统被外源免疫介质激活后, 血淋巴细胞将合成并释放 Met-ENK。据报道, 在无脊椎动物中 Met-ENK 可以诱导未活化的圆形免疫细胞变形并激活其趋化活性^[97]。酚氧化酶 (PO) 是无脊椎动物中与抗菌活性相关的黑化级联反应最后一级的酶, 是免疫反应和伤口愈合过程中的重要组成成分。超氧化物歧化酶 (SOD) 可以催化超氧阴离子和过氧化氢等过氧化物的歧化反应, 在抗氧化防御系统中发挥着重要作用^[174]。TNF- α 是动员和调节免疫应答过程的关键因子, 它通过刺激血管内皮细胞粘附因子的表达来促进炎症细胞的募集^[135]。而血淋巴的溶菌酶 (LYZ) 活性、吞噬活性以及抑菌活性则是衡量软体动物扇贝抵抗外源病原菌的重要指标。因此, 在本研究中, 我们选择这六个免疫指标作为研究对象, 并根据已有的相关报告, 分别采用浓度为 0.1 μ M、1 μ M 和 10 μ M 的 Met-ENK 来刺激栉孔扇贝血淋巴。

结果显示, Met-ENK 对栉孔扇贝血淋巴细胞的吞噬活性及相应血清的抑菌活性均具有促进作用, 且在一定范围内存在浓度依赖性; Met-ENK 只在最高浓度即 10 μ M 时对 LYZ 活性有抑制作。以上结果表明 Met-ENK 能够增强栉孔扇贝

抵御病原体侵染的能力，但可能不是通过溶菌酶途径。此外，Met-ENK 在浓度为 10 μM 时对 SOD 活性有抑制作用；0.1 μM 、1 μM 和 10 μM Met-ENK 均能够诱导 TNF- α 活性。综上所述，Met-ENK 可以在一个较宽浓度范围内双向调节栉孔扇贝的免疫应答反应，而这一结论与在脊椎动物中 Met-ENK 的研究结论基本一致，即 Met-ENK 在低浓度时可以增强免疫反应而在高浓度时则抑制免疫反应^[175]。另外本研究还发现，Met-ENK 对免疫反应的增强作用和抑制效应均可被纳洛酮阻断，说明 Met-ENK 在栉孔扇贝中免疫调节功能的实现是经由阿片肽受体介导的。

www.docin.com

第五章 结论

神经内分泌免疫调节系统对机体内环境稳态的维持具有重要意义。肽能神经系统是神经内分泌免疫调节网络的重要组成部分。脑啡肽在免疫系统与神经内分泌系统之间的双向调节过程中,扮演着神经递质和细胞因子双重角色。目前关于脑啡肽及其受体介导的神经内分泌免疫调节系统的研究主要集中于脊椎动物,而在无脊椎动物中的相关研究尚属起步阶段,还比较薄弱。栉孔扇贝是我国海水养殖的主导品种之一,在我国贝类养殖产业中发挥了重要作用,并且具有特殊的进化地位,对其免疫内分泌系统的研究有着重要意义。本研究从栉孔扇贝脑啡肽及其受体通路的组成着手,开展对栉孔扇贝脑啡肽能神经内分泌免疫调节系统的研究,取得了以下成果:

1. 明确了栉孔扇贝脑啡肽的组成及组织分布情况。脑啡肽在栉孔扇贝中的主要存在形式为 Met-ENK, Met-ENK 在除闭壳肌以外的所有被检测组织,包括血淋巴、外套膜、鳃、肝胰腺、肾脏和性腺中呈组成型表达。克隆得到了 Met-ENK 的一个受体 CfOGFR 的基因,其 cDNA 全长为 2361 bp, ORF 为 1200 bp, 编码一条由 399 个氨基酸残基组成的多肽链,在该多肽的 N 端有一个 OGFr_N 结构域。CfOGFR mRNA 在所有检测组织,包括闭壳肌、血淋巴、外套膜、鳃、肝胰腺、肾脏和性腺中以及胚胎发育过程中均呈组成型表达。利用原核表达系统体外重组 rCfOGFR 并制备了其免疫抗血清;进而应用该抗血清验证了 CfOGFR 与 Met-ENK 的特异性结合。此外,细胞毒性实验证实了 Met-ENK 能够通过 CfOGFR 抑制细胞增殖。这些结果表明脑啡肽及其受体广泛地分布于栉孔扇贝各组织中,并具有与脊椎动物同源物相似的结构和功能。

2. 发现栉孔扇贝脑啡肽及其受体参与了机体对外源病原菌或 PAMPs 的免疫应答反应。鳃弧菌刺激 24-48 小时后,血清中 Met-ENK 的含量显著升高。同时,血淋巴细胞中 CfOGFR 的 mRNA 表达水平分别在 LPS、Poly (I:C)和 β -Glu 刺激 24-48 小时、24-48 小时和 3-48 小时后显著升高。这些结果表明,栉孔扇贝在应对某些病原菌或 PAMPs 刺激的过程中激活了其血淋巴中脑啡肽及其受体系统。

3. 初步探讨了栉孔扇贝脑啡肽能神经内分泌系统的免疫调节功能。栉孔扇贝脑啡肽能神经内分泌系统被免疫刺激激活后,通过调控脑啡肽及其受体的表达

来调控免疫细胞的免疫应答能力。将不同浓度的 Met-ENK 与血淋巴细胞孵育后发现, Met-ENK 对栉孔扇贝血淋巴细胞的吞噬活性及血清的抑菌活性均具有促进作用,且存在一定的浓度依赖性,而 Met-ENK 在最高浓度即 $10\ \mu\text{M}$ 时对 LYZ 活性有抑制作用,说明 Met-ENK 可以增强栉孔扇贝抵御外源病原菌侵袭的能力,但可能不是通过溶菌酶起作用; Met-ENK 在浓度为 $10\ \mu\text{M}$ 时对 SOD 活性有抑制作用; $0.1\ \mu\text{M}$ 、 $1\ \mu\text{M}$ 和 $10\ \mu\text{M}$ Met-ENK 均能诱导 TNF- α 活性。上述这些结果表明, Met-ENK 可以在一个较宽浓度范围内双向调节栉孔扇贝的免疫应答反应,而这在某种程度上与脊椎动物中 Met-ENK 的研究结论相一致,即 Met-ENK 在低浓度时可以增强免疫反应而在高浓度时则抑制免疫反应。另外,本研究还发现,无论是 Met-ENK 对免疫反应的增强还是抑制效应均可被纳洛酮阻断,说明 Met-ENK 在栉孔扇贝中免疫调节功能的实现是通过阿片肽受体介导的。

以上结果表明,脑啡肽及其受体在栉孔扇贝各组织中广泛分布,脑啡肽可以通过神经内分泌系统来调节免疫系统的应答反应,同时也能够作为栉孔扇贝免疫系统的组成成分,直接参与机体的免疫防御反应,从而构成了结构完整、功能完备的脑啡肽能神经内分泌免疫调节系统。该系统可以被侵染栉孔扇贝的病原体激活,脑啡肽能神经内分泌系统一旦被激活就会通过与免疫细胞上的受体结合行使免疫调节功能。通过对栉孔扇贝脑啡肽能神经内分泌免疫系统的研究,不仅使我们对内源性阿片肽及其受体的起源和演化有了一个更加深入的了解,还使我们对神经内分泌系统与免疫系统的联系有了进一步认识。同时,关于该系统免疫调节作用的研究发现将为贝类养殖的病害防治提供新的理论依据和方法策略。

参考文献

1. Steinman, L., *Elaborate interactions between the immune and nervous systems*. Nature Immunology, 2004. 5(6): p. 575-581.
2. H Besedovsky, *Network of immune-neuroendocrine interactions*. Clin Exp Immunol. 1977 January; 27(1): 1-12.
3. Sternberg, E.M., *Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens*. Nature Reviews Immunology, 2006. 6(4): p. 318-328.
4. Segerstrom, S.C., *Resources, Stress, and Immunity: An Ecological Perspective on Human Psychoneuroimmunology*. Annals of Behavioral Medicine, 2010. 40(1): p. 114-125.
5. Straub, R.H., et al., *Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases*. Journal of Internal Medicine, 2010. 267(6): p. 543-560.
6. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. 454(7203): p. 428-435.
7. 陈晶 和 邱子健, *贻贝棘尾虫类催乳素的免疫细胞化学研究* 中国农学通报, 2013. 29(9): p. 159-162.
8. Straub, R.H., et al., *Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs*. Immunology Today, 1998. 19(9): p. 409-413.
9. Brownstein, M.J., *A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. 90(12): p. 5391-5393.
10. Hughes, J., et al., *Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity*. Nature, 1975. 258(5536): p. 577-579.
11. Li, C.H., et al., *Isolation, structure, synthesis and morphine-like activity of beta-endorphin from human pituitary glands*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1977. 297: p. 158-66.
12. Loh, H.H., et al., *beta-endorphin is a potent analgesic agent*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1976. 73(8): p. 2895-2898.
13. Ghazarossian, V.E., C. Chavkin, and A. Goldstein, *A specific radioimmunoassay for the novel opioid peptide dynorphin*. Life Sciences, 1980. 27(1): p. 75-86.
14. Goldstein, A. and V.E. Ghazarossian, *Immunoreactive dynorphin in pituitary and brain*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1980. 77(10): p. 6207-6210.
15. Gilbert, P.E. and W.R. Martin, *The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent, morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1976. 198(1): p. 66-82.
16. Martin, W.R., et al., *The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1976. 197(3): p. 517-532.
17. Zadina, J.E., et al., *A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor*. Nature, 1997. 386(6624): p. 499-502.
18. Lachowicz, J.E., et al., *Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor*

- related to the opiate receptor family*. *Journal of Neurochemistry*, 1995. 64(1): p. 34-40.
19. Reinscheid, R.K., et al., *A neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor*. *Science*, 1995. 270(5237): p. 792-794.
 20. Meunier, J.C., et al., *Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor*. *Nature*, 1995. 377(6549): p. 532-535.
 21. Blalock, J.E., *Proopiomelanocortin and the immune-neuroendocrine connection*, in *Cutaneous Neuroimmunomodulation: The Proopiomelanocortin System*, T.A. Luger, et al., Editors. 1999. p. 161-172.
 22. Sitte, N., et al., *Lymphocytes upregulate signal sequence-encoding proopiomelanocortin mRNA and beta-endorphin during painful inflammation in vivo*. *Journal of neuroimmunology*, 2007. 183(1-2): p. 133-145.
 23. Machelska, H. and C. Stein, *Immune mechanisms in pain control*. *Anesthesia and Analgesia*, 2002. 95(4): p. 1002-1008.
 24. Cabot, P.J., et al., *Methionine-enkephalin-and Dynorphin A-release from immune cells and control of inflammatory pain*. *Pain*, 2001. 93(3): p. 207-212.
 25. Chadzinska, M., et al., *Morphine-induced changes in the activity of proopiomelanocortin and prodynorphin systems in zymosan-induced peritonitis in mice*. *Immunology letters*, 2005. 101(2): p. 185-192.
 26. Machelska, H., *Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control*. *Neuropeptides*, 2007. 41(6): p. 355-363.
 27. Halford, W.P., B.M. Gebhardt, and D.J.J. Carr, *Functional role and sequence analysis of a lymphocyte orphan opioid receptor*. *Journal of neuroimmunology*, 1995. 59(1-2): p. 91-101.
 28. Peluso, J., et al., *Distribution of nociceptin orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells*. *Journal of neuroimmunology*, 1998. 81(1-2): p. 184-192.
 29. Pouliot, M., M.E. Fiset, and C. Gilbert, *Human neutrophils as a source of nociceptin: A novel link between pain and inflammation*. *Inflammation Research*, 2003. 52(Supplement 2): p. 116-S 116.
 30. Mousa, S.A., et al., *EXPRESSION OF ENDOMORPHIN 1 AND ENDOMORPHIN 2 IN IMMUNE CELLS AND SPINAL CORD IN A MODEL OF INFLAMMATORY PAIN*. *Society for Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary Planner*, 2002. 2002: p. Abstract No. 455.5-Abstract No. 455.5.
 31. Foradori, C.D., R.L. Goodman, and M.N. Lehman, *Distribution of preprodynorphin mRNA and dynorphin-A immunoreactivity in the sheep preoptic area and hypothalamus*. *Neuroscience*, 2005. 130(2): p. 409-418.
 32. O'Connor, T.M., D.J. O'Halloran, and F. Shanahan, *The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia*. *Qjm-Monthly Journal of the Association of Physicians*, 2000. 93(6): p. 323-333.
 33. Navolotskaya, E.V., et al., *Elucidation and characteristics of non-opioid beta-endorphin receptors in rat adrenal cortex*. *Biochemistry-Moscow*, 2004. 69(8): p. 870-875.
 34. Ichinose, M., M. Asai, and M. Sawada, *beta-Endorphin enhances phagocytosis of latex particles in mouse peritoneal macrophages*. *Scandinavian Journal of*

- Immunology, 1995. 42(3): p. 311-316.
35. Pasnik, J., et al., *Priming effect of met-enkephalin and beta-endorphin on chemiluminescence, chemotaxis and CD11b molecule expression on human neutrophils in vitro*. Immunology letters, 1999. 67(2): p. 77-83.
 36. Gein, S.V., K.G. Gorshkova, and S.P. Tendryakova, *Regulation of interleukin-1beta and interleukin-8 production by agonists of mu and delta opiate receptors in vitro*. Neuroscience and behavioral physiology, 2009. 39(6): p. 591-5.
 37. Gein, S.V., K.G. Gorshkova, and S.P. Tendryakova, *Role of beta-endorphin in the regulation of proinflammatory cytokine production by peripheral blood monocytes in vitro*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2007. 143(2): p. 214-217.
 38. Nandhra, T.S. and R.J. Carson, *beta-endorphin inhibits the production of interleukin-8 by human chorio-decidual cells in culture*. Molecular Human Reproduction, 2000. 6(6): p. 555-560.
 39. Hsueh, C.M., et al., *Expression of the conditioned NK cell activity is beta-endorphin dependent*. Brain research, 1995. 678(1-2): p. 76-82.
 40. Ichinose, M., M. Asai, and M. Sawada, *Enhancement of phagocytosis by dynorphin A in mouse peritoneal macrophages*. Journal of neuroimmunology, 1995. 60(1-2): p. 37-43.
 41. Vandenberg, P., et al., *Role of opioid peptides in the regulation of cytokine production by murine CD4+ T cells*. Cellular Immunology, 1994. 154(1): p. 109-122.
 42. Bidlack, J.M., *Detection and function of opioid receptors on cells from the immune system*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2000. 7(5): p. 719-723.
 43. Azuma, Y. and K. Ohura, *Endomorphins 1 and 2 inhibit IL-10 and IL-12 production and innate immune functions, and potentiate NF-kappa B DNA binding in THP-1 differentiated to macrophage-like cells*. Scandinavian Journal of Immunology, 2002. 56(3): p. 260-269.
 44. Menzebach, A., et al., *Effects of endogenous and synthetic opioid peptides on neutrophil function in vitro*. British Journal of Anaesthesia, 2003. 91(4): p. 546-550.
 45. Slaoui-Hasnaoui, A., et al., *Reciprocal effects between opioid peptides and human polymorphonuclear leukocytes-II. Enhancement of phorbol myristate acetate-induced respiratory burst in human polymorphonuclear leukocyte by opioid peptides previously exposed to activated oxygen species*. Biochemical Pharmacology, 1992. 43(3): p. 503-506.
 46. Pasotti, D., et al., *The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes*. Rivista europea per le scienze mediche e farmacologiche, 1993. 15(2): p. 71-81.
 47. Trombella, S., et al., *Nociceptin/orphanin FQ stimulates human monocyte chemotaxis via NOP receptor activation*. Peptides, 2005. 26(8): p. 1497-1502.
 48. Minami, M. and M. Satoh, *Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions*. Neuroscience Research, 1995. 23(2): p. 121-145.
 49. Fredriksson, R., et al., *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. Molecular Pharmacology, 2003. 63(6): p. 1256-1272.
 50. Zhao, H., H.H. Loh, and P.Y. Law, *Adenylyl cyclase superactivation induced by long-term treatment with opioid agonist is dependent on receptor localized within lipid*

- rafts and is independent of receptor internalization.* *Molecular Pharmacology*, 2006. 69(4): p. 1421-1432.
51. Kitanaka, N., et al., *Alterations in the levels of heterotrimeric G protein subunits induced by psychostimulants, opiates, barbiturates, and ethanol: Implications for drug dependence, tolerance, and withdrawal.* *Synapse*, 2008. 62(9): p. 689-699.
 52. Blume, A.J., D. Lichtstein, and G. Boone, *Coupling of opiate receptors to adenylate cyclase: requirement for Na⁺ and GTP.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979. 76(11): p. 5626-5630.
 53. Sharma, S.K., M. Nirenberg, and W.A. Klee, *Morphine Receptors as Regulators of Adenylate Cyclase Activity.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1975. 72(2): p. 590-594.
 54. Sharp, B.M. and N. Shahabi, *Dual actions of opioids on signaling in T-cells.* *Journal of neuroimmunology*, 2006. 178: p. 69-70.
 55. Hescheler, J., et al., *The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels.* *Nature*, 1987. 325(6103): p. 445-447.
 56. Mangoura, D. and G. Dawson, *Opioid peptides activate phospholipase D and protein kinase C-epsilon in chicken embryo neuron cultures.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993. 90(7): p. 2915-2919.
 57. Okajima, F., H. Tomura, and Y. Kondo, *Enkephalin activates the phospholipase C/Ca²⁺ system through cross-talk between opioid receptors and P2-purinergic or bradykinin receptors in NG 108-15 cells. A permissive role for pertussis toxin-sensitive G-proteins.* *Biochemical Journal*, 1993. 290: p. 241-247.
 58. Law, P.Y., Y.H. Wong, and H.H. Loh, *Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling.* *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2000. 40: p. 389-430.
 59. Gein, S.V. and T.A. Baeva, *Endogenous Opioid Peptides in Regulation of Innate Immunity Cell Functions.* *Biochemistry (Moscow)*, 2011. 76(3): p. 309-319.
 60. Simantov, R., et al., *Opioid peptide enkephalin: immunohistochemical mapping in rat central nervous system.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977. 74(5): p. 2167.
 61. Kamphuis, S., et al., *Role of endogenous pro-enkephalin A-derived peptides in human T cell proliferation and monocyte IL-6 production.* *Journal of neuroimmunology*, 1998. 84(1): p. 53-60.
 62. Metz-Boutigue, M.H., et al., *Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules.* *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1998. 18(2): p. 249-266.
 63. Goumon, Y., et al., *Characterization of antibacterial COOH-terminal proenkephalin-A-derived peptides (PEAP) in infectious fluids - Importance of enkelytin, the antibacterial PEAP(209-237) secreted by stimulated chromaffin cells.* *Journal of Biological Chemistry*, 1998. 273(45): p. 29847-29856.
 64. Salzet, M. and A. Tasiemski, *Involvement of pro-enkephalin-derived peptides in immunity.* *Developmental & Comparative Immunology*, 2001. 25(3): p. 177-185.
 65. Shipp, M.A., et al., *Downregulation of enkephalin-mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase 24.11.* *Nature*, 1990. 347(6291): p. 394-396.
 66. Laurent, V. and M. Salzet, *Metabolism of enkephalins in head membranes of the leech*

- Theromyzon tessulatum* by peptidases: Isolation of an enkephalin-degrading aminopeptidase. *Regulatory Peptides*, 1996. 65(2): p. 123-131.
67. Akil, H., et al., *Endogenous opioids: overview and current issues*. *Drug and Alcohol Dependence*, 1998. 51(1-2): p. 127-140.
68. Le Merrer, J., et al., *Reward Processing by the Opioid System in the Brain*. *Physiological Reviews*, 2009. 89(4): p. 1379-1412.
69. Miller, G.C., A.J. Murgo, and N.P. Plotnikoff, *Enkephalins-enhancement of active T-cell rosettes from normal volunteers*. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1984. 31(1): p. 132-137.
70. Mendelsohn, L.G., et al., *Immunoregulation by opioid peptides: I. Absence of classical opioid receptor on human mononuclear cells*. *Journal of Clinical & Laboratory Immunology*, 1985. 16(3): p. 125-129.
71. Roscetti, G., et al., *Enkephalin activity on antigen-induced proliferation of human peripheral blood mononucleate cells*. *International Journal of Immunopharmacology*, 1988. 10(7): p. 819-823.
72. Stefano, G.B., et al., *High affinity dopamine binding to mouse thymocytes and *Mytilus edulis* (Bivalvia) hemocytes*. *Journal of neuroimmunology*, 1989. 21(1): p. 67-74.
73. Bihari, B., et al., *Methionine enkephalin in the treatment of ARC*. *AIDS Weekly*, 1991. September(23): p. 216-217.
74. Zagon, I.S., S.R. Goodman, and P.J. McLaughlin, *Characterization of zeta (ζ): a new opioid receptor involved in growth*. *Brain research*, 1989. 482(2): p. 297-305.
75. Leslie, F.M., *Methods used for the study of opioid receptors*. *Pharmacological Reviews*, 1987. 39(3): p. 197-249.
76. Zagon, I.S., et al., *Cloning, sequencing, chromosomal location, and function of cDNAs encoding an opioid growth factor receptor (OGFr) in humans*. *Brain research*, 2000. 856(1-2): p. 75-83.
77. Zagon, I.S., et al., *Molecular characterization and distribution of the opioid growth factor receptor (OGFr) in mouse*. *Molecular brain research*, 2000. 84(1-2): p. 106-114.
78. Zagon, I.S., M.F. Verderame, and P.J. McLaughlin, *The biology of the opioid growth factor receptor (OGFr)*. *Brain research reviews*, 2002. 38(3): p. 351-376.
79. Zagon, I.S., et al., *Conserved expression of the opioid growth factor, [Met5]enkephalin, and the zeta (ζ) opioid receptor in vertebrate cornea*. *Brain research*, 1995. 671(1): p. 105-111.
80. Zagon, I.S., Y. Wu, and P.J. McLaughlin, *The opioid growth factor, Met(5)-enkephalin, and the zeta (Zeta) opioid receptor are present in human and mouse skin and tonically act to inhibit DNA synthesis in the epidermis*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1996. 106(3): p. 490-497.
81. Zagon, I.S., J.P. Smith, and P.J. McLaughlin, *Human pancreatic cancer cell proliferation in tissue culture is tonically inhibited by opioid growth factor*. *International Journal of Oncology*, 1999. 14(3): p. 577-584.
82. McLaughlin, P.J., R.J. Levin, and I.S. Zagon, *The opioid growth factor receptor in human head and neck squamous cell carcinoma*. *International journal of molecular medicine*, 2000. 5(2): p. 191-196.
83. Zagon, I.S., et al., *Imiquimod upregulates the opioid growth factor receptor to inhibit*

- cell proliferation independent of immune function*. Experimental biology and medicine, 2008. 233(8): p. 968-979.
84. Zagon, I.S., Y. Wu, and P.J. McLaughlin, *Opioid growth factor inhibits DNA synthesis in mouse tongue epithelium in a circadian rhythm-dependent manner*. American Journal of Physiology, 1994. 267(3): p. R645-R652.
 85. Zagon, I.S., J.W. Sassani, and P.J. McLaughlin, *Re-epithelialization of the rabbit cornea is regulated by opioid growth factor*. Brain research, 1998. 803(1-2): p. 61-68.
 86. Zagon, I.S., Y. Wu, and P.J. McLaughlin, *Opioid growth factor and organ development in rat and human embryos*. Brain research, 1999. 839(2): p. 313-322.
 87. Urosevic, M., et al., *Imiquimod treatment induces expression of opioid growth factor receptor: A novel tumor antigen induced by interferon-alpha?* Clinical cancer research, 2004. 10(15): p. 4959-4970.
 88. Kowalski, J., *Immunologic action of Met(5) enkephalin fragments*. European Journal of Pharmacology, 1998. 347(1): p. 95-99.
 89. Sizemore, R.C., et al., *Modulation of concanavalin A-induced, antigen-nonspecific regulatory cell activity by leu-enkephalin and related peptides*. Clinical Immunology and Immunopathology, 1991. 60(2): p. 310-318.
 90. Padros, M.R., et al., *Mitogenic activation of the human lymphocytes induce the release of proenkephalin derived peptides*. Life Sciences, 1989. 45(19): p. 1805-1811.
 91. Marotti, T., et al., *Modulation of lipopolysaccharide-induced production of cytokines by methionine-enkephalin*. Immunology letters, 1994. 40(1): p. 43-47.
 92. Stefano, G.B., et al., *Opioid and opiate immunoregulatory processes*. Critical Reviews in Immunology, 1996. 16(2): p. 109-144.
 93. Foris, G., et al., *Concentration-dependent effect of met-enkephalin on human polymorphonuclear leukocytes*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1987. 496: p. 151-157.
 94. Zhong, F., et al., *Methionine-enkephalin stimulates interleukin-6 mRNA expression: Human plasma levels in coronary artery bypass grafting*. International Journal of Cardiology, 1998. 64: p. S53-S59.
 95. Kowalski, J., et al., *Methionine-enkephalin and leucine-enkephalin increase interleukin 1 beta release in mixed glia cultures*. Neuropeptides, 2002. 36(6): p. 401-406.
 96. Plotnikoff, N.P., et al., *Methionine enkephalin: A new cytokine - Human studies*. Clinical Immunology and Immunopathology, 1997. 82(2): p. 93-101.
 97. Tasiemski, A., et al., *Proenkephalin A-derived peptides in invertebrate innate immune processes*. Molecular brain research, 2000. 76(2): p. 237-252.
 98. Plotnikoff, N.P., *The Ying-Yang hypothesis of opioid peptide immunomodulation*. Psychopharmacology Bulletin, 1985. 21(3): p. 489-489.
 99. Bhargava, H.N., *Opioid peptides, receptors, and immune function*. NIDA research monograph, 1990. 96: p. 220-33.
 100. Benyamin, R., et al., *Opioid Complications and Side Effects*. Pain Physician, 2008. 11(2): p. S105-S120.
 101. Bajpai, K., et al., *Immunomodulatory activity of met-enkephalin and its two potent analogs*. International Journal of Immunopharmacology, 1995. 17(3): p. 207-212.

102. Dingwall, C. and R.A. Laskey, *Nuclear targeting sequences-a consensus?* Trends in Biochemical Sciences, 1991. 16(12): p. 478-481.
103. Jans, D.A., C.Y. Xiao, and M.H.C. Lam, *Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport?* Bioessays, 2000. 22(6): p. 532-544.
104. Mattaj, I.W. and L. Englmeier, *Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase.* Annual Review of Biochemistry, 1998. 67: p. 265-306.
105. Pemberton, L.F., G. Blobel, and J.S. Rosenblum, *Transport routes through the nuclear pore complex.* Current Opinion in Cell Biology, 1998. 10(3): p. 392-399.
106. Robbins, J., et al., *Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence.* Cell, 1991. 64(3): p. 615-623.
107. Mixon, B., et al., *Presence of enkephalin precursor in molluscan neural tissue extract.* NIDA research monograph, 1986. 75: p. 255-258.
108. Salzet, M. and G.B. Stefano, *Invertebrate proenkephalin: delta opioid binding sites in leech ganglia and immunocytes.* Brain research, 1997. 768(1-2): p. 224-232.
109. Martin, R., et al., *Met-enkephalin-like immunoreactivity in a cephalopod neurohemal organ.* Neuroscience letters, 1979. 15(2-3): p. 253-257.
110. Andersen, A.C., et al., *Immunohistological detection of methionine-enkephalin-like and endorphin-like material in the digestive tract and in the nervous system of the mussel: Mytilus edulis L.* General and comparative endocrinology, 1986. 62(1): p. 111-119.
111. Marchand, C.R. and M.P. Dubois, *Immunocytochemical detection of substances related to methionine enkephalin in the tentacles and food of the snail (Helix aspersa).* Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales, 1986. 180(2): p. 184-189.
112. Stefano, G.B. and M. Leung, *Purification of opioid peptides from molluscan ganglia.* Cellular and Molecular Neurobiology, 1982. 2(4): p. 347-352.
113. Carpenter, D.O., et al., *Opioid peptides in the nervous system of Aplysia: a combined biochemical, immunocytochemical, and electrophysiological study.* Cellular and Molecular Neurobiology, 1995. 15(2): p. 239-256.
114. Fricker, L.D. and E. Herbert, *Comparison of a carboxypeptidase E-like enzyme in human, bovine, mouse, Xenopus, shark and Aplysia neural tissue.* Brain research, 1988. 453(1-2): p. 281-286.
115. Bawab, W., et al., *Identification and characterization of aminopeptidases from Aplysia californica.* Biochemical Journal, 1992. 286: p. 967-975.
116. Stefano, G.B., M.A. Shipp, and B. Scharrer, *A possible immunoregulatory function for [Met]-enkephalin-Arg6-Phe7 involving human and invertebrate granulocytes.* Journal of neuroimmunology, 1991. 31(2): p. 97-103.
117. Leung, M.K., et al., *Soluble and membrane-bound Met-enkephalin degrading peptidases in Mytilus edulis hemolymph.* Acta biologica Hungarica, 1992. 43(1-4): p. 275-280.
118. Leung, M.K., et al., *Degradation of Met-enkephalin by hemolymph peptidases in Mytilus edulis.* Cellular and Molecular Neurobiology, 1992. 12(5): p. 367-378.
119. Cadet, P. and G.B. Stefano, *Mytilus edulis pedal ganglia express mu opiate receptor*

- transcripts exhibiting high sequence identity with human neuronal mu1*. Brain research. Molecular brain research, 1999. 74(1-2): p. 242-6.
120. Cadet, P., *Nitric oxide modulates the physiological control of ciliary activity in the marine mussel Mytilus edulis via morphine: Novel mu opiate receptor splice variants*. Neuroendocrinology Letters, 2004. 25(3): p. 184-190.
 121. Stefano, G.B., P. Cadet, and B. Scharrer, *Stimulatory effects of opioid neuropeptides on locomotory activity and conformational changes in invertebrate and human immunocytes: evidence for a subtype of delta receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989. 86(16): p. 6307-6311.
 122. Chapman, A., et al., *Alterations in high-affinity binding characteristics and levels of opioids in invertebrate ganglia during aging: evidence for an opioid compensatory mechanism*. Cellular and Molecular Neurobiology, 1984. 4(2): p. 143-155.
 123. Zagon, I.S. and P.J. McLaughlin, *An opioid growth factor regulates the replication of microorganisms*. Life Sciences, 1992. 50(16): p. 1179-1187.
 124. Hughes, T.K., et al., *Lipopolysaccharide and opioids activate distinct populations of Mytilus edulis immunocytes*. Cell and Tissue Research, 1991. 264(2): p. 317-320.
 125. Stefano, G.B., et al., *Effect of prolonged exposure to morphine on responsiveness of human and invertebrate immunocytes to stimulatory molecules*. Journal of neuroimmunology, 1995. 63(2): p. 175-181.
 126. Stefano, G.B., et al., *HIV gp120 alteration of DAMA and IL-1 alpha induced chemotactic responses in human and invertebrate immunocytes*. Journal of neuroimmunology, 1993. 43(1-2): p. 177-184.
 127. Stefano, G.B., E.M. Smith, and T.K. Hughes, *Opioid induction of immunoreactive interleukin-1 in Mytilus edulis and human immunocytes: an interleukin-1-like substance in invertebrate neural tissue*. Journal of neuroimmunology, 1991. 32(1): p. 29-34.
 128. Osman, A.M., M. Gomma, and A.-H. Saad, *A possible role for an enkephalinergic system in the internal defense mechanism of Biomphalaria alexandrina exposed to Schistosoma mansoni*. Journal of the Egyptian Society of Parasitology, 2003. 33(3): p. 841-61.
 129. Liu, D. and H. Sun, *Immunohistological Detection of Leucine-Enkephalin in the Digestive System of the Scallop Chlamys farreri*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2008. 14(2): p. 137-141.
 130. Liu, D. and H. Sun, *Immunohistological detection of leucine-enkephalin and influence of leucine-enkephalin on the nitric oxide synthase activity of the scallop Chlamys farreri*. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 2008. 41(2): p. 147-154.
 131. Liu, D., *Effects of Leucine-enkephalin on catalase activity and glutathione level in haemolymph of the scallop Chlamys farreri*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2008. 14(1): p. 16-20.
 132. Liu, D., *Effects of leucine-enkephalin on alpha-naphthyl acetate esterase and myeloperoxidase activity in haemolymph of the scallop Chlamys farreri*. Journal of Biochemical Technology, 2008. 1(2): p. 45-48.
 133. Liu, D., Z. Chen, and H. Xu, *Effects of leucine-enkephalin on catalase activity and hydrogen peroxide levels in the haemolymph of the Pacific Oyster (Crassostrea gigas)*.

- Molecules, 2008. 13(4): p. 864-870.
134. Mo, Z.-l., et al., *A Vibrio anguillarum strain associated with skin ulcer on cultured flounder, Paralichthys olivaceus*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2001. 19(4): p. 319-326.
 135. Zhu, F.G. and J.S. Marshall, *CpG-containing oligodeoxynucleotides induce TNF-alpha and IL-6 production but not degranulation from murine bone marrow-derived mast cells*. Journal of Leukocyte Biology, 2001. 69(2): p. 253-262.
 136. 王孟强, 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) Toll 样受体模式识别机制研究, in 中国科学院海洋研究所2012: 青岛.
 137. 王孟强, 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) Toll 样受体信号通路免疫功能研究, in 中国科学院海洋研究所2010: 青岛.
 138. Yu, Y., et al., *A short-form C-type lectin from amphioxus acts as a direct microbial killing protein via interaction with peptidoglycan and glucan*. Journal of Immunology, 2007. 179(12): p. 8425-8434.
 139. Yang, J., et al., *Peptidoglycan recognition protein of Chlamys farreri (CfPGRP-S1) mediates immune defenses against bacterial infection*. Developmental and Comparative Immunology, 2010. 34(12): p. 1300-1307.
 140. Cheng, A., et al., *Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from Glycyrrhiza uralensis fish*. International Immunopharmacology, 2008. 8(1): p. 43-50.
 141. Grubhofer, N., *Method of preparing a synergistic immunological adjuvant formulation*, 1998, Gerbu Biotechnik GmbH. p. 4931-4931.
 142. Wang, M., et al., *A primitive Toll-like receptor signaling pathway in mollusk Zhikong scallop Chlamys farreri*. Developmental and Comparative Immunology, 2011. 35(4): p. 511-520.
 143. Hurlbut, D.E., et al., *Pharmacological properties of a proenkephalin A-derived opioid peptide: BAM 18*. European Journal of Pharmacology, 1987. 138(3): p. 359-366.
 144. Mansour, A., et al., *The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: evidence for two opioid peptide recognition cores*. Brain research, 1995. 700(1-2): p. 89-98.
 145. Akil, H., et al., *Endogenous opioids: biology and function*. Annual Review of Neuroscience, 1984. 7: p. 223-255.
 146. Spruce, B.A., et al., *A neuropeptide precursor in cerebellum: proenkephalin exists in subpopulations of both neurons and astrocytes*. EMBO Journal, 1990. 9(6): p. 1787-1795.
 147. Shinoda, H., et al., *Brain region and gene specificity of neuropeptide gene expression in cultured astrocytes*. Science, 1989. 245(4916): p. 415-417.
 148. Klein, R.S. and L.D. Fricker, *Heterogeneous expression of carboxypeptidase E and proenkephalin mRNAs by cultured astrocytes*. Brain research, 1992. 569(2): p. 300-310.
 149. Polakiewicz, R.D. and H. Rosen, *Regulated expression of proenkephalin A during ontogenic development of mesenchymal derivative tissues*. Molecular and Cellular Biology, 1990. 10(2): p. 736-742.
 150. Bodnar, R.J. and G.E. Klein, *Endogenous opiates and behavior: 2005*. Peptides, 2006.

- 27(12): p. 3391-3478.
151. Stefano, G.B. and R. Kream, *Endogenous opiates, opioids, and immune function: Evolutionary brokerage of defensive behaviors*. *Seminars in Cancer Biology*, 2008. 18(3): p. 190-198.
 152. Ottaviani, E. and A. Franchini, *Immune and neuroendocrine responses in molluscs: the role of cytokines*. *Acta biologica Hungarica*, 1995. 46(2-4): p. 341-349.
 153. Kemenes, G., K. Srozsza, and D.O. Carpenter, *Cyclic-AMP mediated excitatory responses to leucine enkephalin in Aplysia neurons*. *Journal of Experimental Biology*, 1993. 181: p. 321-328.
 154. Rozsa, K.S., et al., *Met-enkephalin and morphiceptin modulate a GABA-induced inward current in the CNS of Lymnaea stagnalis L.* *General pharmacology*, 1996. 27(8): p. 1337-45.
 155. Stefano, G.B. and E.J. Catapane, *Enkephalins increase dopamine levels in the CNS of a marine mollusc*. *Life Sciences*, 1979. 24(17): p. 1617-1621.
 156. Hancock, D.L. and I.M. Coupar, *Evidence for functional delta-opiate receptors in the rat intestine*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1994. 46(10): p. 805-808.
 157. Adeghate, E., et al., *Immunohistochemical identification and effects of atrial natriuretic peptide, pancreastatin, leucine-enkephalin, and galanin in the porcine pancreas*. *Peptides*, 1996. 17(3): p. 503-509.
 158. Elekes, K., G.B. Stefano, and D.O. Carpenter, *Enkephalin-like immunoreactive neurons in the central nervous system of gastropods (Helix pomatia, Lymnaea stagnalis, Aplysia californica): a comparative immunocytochemical study*. *Cell and Tissue Research*, 1993. 272(2): p. 329-341.
 159. Ewadinger, N.M., et al., *Identification and localization of a Met(5) -enkephalin-like peptide in the mollusc, Lymnaea stagnalis*. *Brain research*, 1996. 737(1-2): p. 1-15.
 160. King, J.A. and R.P. Millar, *Radio immunoassay of 5 methionine enkephalin sulfoxide phylogenetic and anatomical distribution*. *Peptides*, 1980. 1(3): p. 211-216.
 161. Leung, M.K. and G.B. Stefano, *Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of Mytilus edulis (Mollusca)*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984. 81(3): p. 955-958.
 162. Stefano, G.B., B. Salzet-Raveillon, and M. Salzet, *Mytilus edulis hemolymph contains pro-opiomelanocortin: LPS and morphine stimulate differential processing*. *Brain research. Molecular brain research*, 1999. 63(2): p. 340-50.
 163. Wang, Y. and H. Sun, *Immunohistochemical Identification of Met-Enkephalin in Digestive System and Its Effect on Digestive Enzyme Activities of the Scallop Chlamys farreri*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2010. 16(1): p. 31-37.
 164. Matejusova, I., et al., *Gene expression profiles of some immune relevant genes from skin of susceptible and responding Atlantic salmon (Salmo salar L.) infected with Gyrodactylus salaris (Monogenea) revealed by suppressive subtractive hybridisation*. *International Journal for Parasitology*, 2006. 36(10-11): p. 1175-1183.
 165. Cheng, F., et al., *The OGF-OGFr Axis Utilizes the p16(INK4a) and p21(WAF1/CIP1) Pathways to Restrict Normal Cell Proliferation*. *Molecular Biology of the Cell*, 2009. 20(1): p. 319-327.

166. Wu, Y., P.J. McLaughlin, and I.S. Zagon, *Ontogeny of the opioid growth factor, Met(5)-enkephalin, preproenkephalin gene expression, and the zeta opioid receptor in the developing and adult aorta of rat*. *Developmental Dynamics*, 1998. 211(4): p. 327-337.
167. Sassani, J.W., I.S. Zagon, and P.J. McLaughlin, *Opioid growth factor modulation of corneal epithelium: Uppers and downers*. *Current Eye Research*, 2003. 26(5): p. 249-262.
168. Wootton, E.C., E.A. Dyrzynda, and N.A. Ratcliffe, *Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*)*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003. 15(3): p. 195-210.
169. Zhao, J., et al., *Molecular cloning of an invertebrate goose-type lysozyme gene from *Chlamys farreri*, and lytic activity of the recombinant protein*. *Molecular Immunology*, 2007. 44(6): p. 1198-1208.
170. Fanning, J., et al., *Expression of the Opioid Growth Factor-Opioid Growth Factor Receptor Axis in Human Ovarian Cancer*. *Gynecologic Oncology*, 2011.
171. Costa, M.M., et al., *Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009. 26(3): p. 515-523.
172. Travers, M.-A., et al., *Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008. 24(4): p. 400-411.
173. Cao, A., J.-I. Ramos-Martinez, and R. Barcia, *In hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk., treatment with corticotropin or growth factors conditions catecholamine release*. *International Immunopharmacology*, 2007. 7(11): p. 1395-1402.
174. Blokhina, O., E. Virolainen, and K.V. Fagerstedt, *Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review*. *Annals of Botany*, 2003. 91(2): p. 179-194.
175. Jankovic, B.D. and J. Radulovic, *Enkephalins, brain and immunity: modulation of immune responses by methionine-enkephalin injected into the cerebral cavity*. *International Journal of Neuroscience*, 1992. 67(1-4): p. 241-270.

作者简历及攻读学位期间发表的学术论文与研究成果

作者简历:

郭颖, 女, 江苏邳州人。2010年6月毕业于中国药科大学生命科学与技术学院海洋药学专业, 获理学学士学位, 同年考入中国科学院海洋研究所攻读硕士学位。

学术成果:

Guo Ying *et al.*, 2013, An opioid growth factor receptor (OGFR) for [Met³]-enkephalin in *Chlamys farreri*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(5): 1228-1235. (SCI, IF=3.322)

www.docin.com