

海湾扇贝幼虫变态过程中体内 神经递质含量的变化*

张涛 阙华勇 杨红生¹⁾ 刘石林 何义朝 张福绥

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 采用生化方法测定了不同发育阶段及人工诱导后海湾扇贝(*Argopecten irradians*)幼虫体内去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)和5-羟色胺(5-HT)含量的变化。结果表明,海湾扇贝幼虫体内去甲肾上腺素含量在变态前后没有明显变化,变态前为2352 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 湿重,变态后为2770 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 湿重。多巴胺和5-羟色胺含量在变态前(第13天)急剧增加,比第12天的幼虫分别增加了2.8倍和4.7倍,变态后急剧下降,变态后幼苗比第13天的幼虫分别降低了25.1倍和16.4倍。海湾扇贝幼虫体内DA:NE比值和5-HT:NE比值在变态前后变化剧烈。DA:NE比值和5-HT:NE比值在变态前(第13天)急剧增加,比第12天的幼虫增加了3.0倍(DA:NE)和5.0倍(5-HT:NE);变态后急剧降低,变态后幼苗比第13天的幼虫降低了29.8倍(DA:NE)和19.5倍(5-HT:NE)。海湾扇贝幼虫经氯化钾和氯化钙诱导24h后,体内去甲肾上腺素、多巴胺和5-羟色胺以及DA:NE比值和5-HT:NE比值均有所降低。本实验的结果表明,多巴胺和5-羟色胺可能启动了海湾扇贝幼虫的变态过程。

关键词 海湾扇贝,去甲肾上腺素,多巴胺,5-羟色胺,变态

中图分类号 Q57

海洋无脊椎动物幼虫的附着变态过程受到外因和内因两方面调控,外因包括物理、化学和生物等因子,内因包括幼虫的遗传特征、年龄及幼虫的营养状况等(Hadfield, 1984),内因是决定性因素。海洋无脊椎动物幼虫的发育按是否具有附着变态能力可以分为具有附着变态能力前(Precompetent phase)和具有附着变态能力(Competent phase)两大阶段。只有当幼虫具有附着变态能力时,外界诱导因子才起作用(Pechenik, 1990; Pawlik, 1990);而当幼虫处在具有附着变态能力前这一阶段时,外界诱导因子不起作用,如果在这一阶段实施诱导物诱导,幼虫容易产生“失敏”(Desensitization)或“适应”(Habituation),即当幼虫具有附着变态能力时对诱导物也不敏感(Morse, 1984)。许多证据表明,神经系统参与了幼虫的附着变态过程(Burke, 1983; Baloun *et al.*, 1984; Yool *et al.*, 1986; Inestrosa *et al.*, 1993; Leise *et al.*, 2000),在一些贝类成体和幼虫体内曾经发现过神经递质存在,主要包括去甲肾上腺素和多巴胺等(Burke, 1983; Coon *et al.*, 1986; Pires *et al.*, 2000)。

* 国家自然科学基金资助项目“双壳贝类幼虫变态机理研究”,39970588号;国家“973”课题资助项目,G1999012012号。张涛,男,出生于1971年4月,博士,E-mail: tzhang@ms. qdio. ac. cn

1) 通讯作者,杨红生,男,出生于1964年12月,研究员,博士生导师,E-mail: lshyang@ms. qdio. ac. cn

收稿日期:2001-03-31,收修修改稿日期:2002-01-17

本研究测定了海湾扇贝幼虫不同发育阶段以及氯化钾和氯化钙诱导后体内神经递质去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺含量的变化规律,以求从神经内分泌的角度来研究海湾扇贝幼虫变态机理。

1 材料与方法

1.1 幼虫来源及实验设计

海湾扇贝(*Argopecten irradians*)幼虫取自中国科学院海洋研究所徐家麦岛实验基地。培育温度为 23℃,盐度为 32。详细培育方法参见张福绥等(1986)。

不同发育阶段幼虫:取受精后第 3 天幼虫(D形幼虫)、第 7 天幼虫(壳顶期幼虫)、第 10 天幼虫(10%眼点幼虫)、第 12 天幼虫(100%眼点幼虫)、第 13 天幼虫(100%眼点幼虫)和第 17 天幼虫(变态后幼苗),共 6 期。

人工诱导后幼虫(受精后第 12 天幼虫):用 13.42×10^{-3} mol/L 的氯化钾诱导 24h, 10×10^{-3} mol/L 的氯化钙诱导 24h,同时设 24h 对照组。

每期(处理组)幼虫分两个平行组,每个平行组取一定量幼虫,吸入 0.5ml 冻存管中,离心后除去多余水分,迅速放入液氮中保存直至测定。

1.2 神经递质的测定

(1)用吸管将样品中的水吸干,加 200 μ l 0.1mol/L 的高氯酸,匀浆,4℃条件下离心 20min(12000r/min),取上清液,再离心 10min,取上清液,置于 4℃水浴中待测。

(2)HPLC 检测:取 20 μ l 进样检测。

(3)色谱条件:色谱柱为 3.9 \times 250mm ODS 分析柱,颗粒为 10 μ m。

(4)流动相:0.15mol/L 氯酸;0.4mmol/L EDTA;3.9mmol/L CAS(D-樟脑-磺酸);10% 甲醇。用 5mol/L NaOH 调 pH 至 3.28。

(5)流速:1.0ml/min;电化学检测工作电压:0.7V;检测灵敏度:10nA。

(6)仪器:BAS 200A 电化学检测器。

(7)所得数据用 Chromgraph 软件处理。

2 结果

2.1 不同发育阶段海湾扇贝幼虫体内神经递质含量的变化

由表 1 可知,海湾扇贝幼虫不同发育阶段,特别是变态前和变态后,体内去甲肾上腺素含量没有明显变化,变态前为 2352pg/mg 湿重,变态后为 2770pg/mg 湿重。多巴胺和 5-羟色胺含量在变态前有随幼虫的发育而增加的趋势,变态前(第 13 天)急剧增加,第 13 天的幼虫比第 12 天的幼虫分别增加了 2.8 倍和 4.7 倍;变态后急剧下降,变态后幼苗比第 13 天的幼虫分别降低了 25.1 倍和 16.4 倍。

表 1 不同发育阶段海湾扇贝幼虫体内去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺含量(pg/mg 湿重)的变化

Tab.1 The changes of NE, DA and 5-HT contents(pg/mg wet weight) in bay scallop *A. irradians* larvae at different stages

| 神经递质 | 受精后发育天数(d) | | | | | |
|--------|------------|------|------|------|------|------|
| | 3 | 7 | 10 | 12 | 13 | 17 |
| 去甲肾上腺素 | 4218 | 2359 | 4362 | 2486 | 2352 | 2770 |
| 多巴胺 | 56 | 51 | 135 | 108 | 412 | 16 |
| 5-羟色胺 | 18 | 8 | 14 | 45 | 259 | 15 |

2.2 不同发育阶段海湾扇贝幼虫体内 DA: NE 比值和 5-HT: NE 比值的变化

由表 2 可知, 变态前, 海湾扇贝幼虫体内 DA: NE 比值随着幼虫的发育逐渐升高, 变态前(第 13 天)急剧增加, 由 0.043 升高到 0.175(第 13 天), 增加了 3.0 倍; 而变态后又急剧降低, 变态后幼苗(第 17 天)比第 13 天的幼虫降低了 29.8 倍, 由 0.175 降低到 0.006。5-HT: NE 比值的变化规律与 DA: NE 比值的变化规律相似。变态前急剧升高, 由 0.018 升高到 0.110(第 13 天), 增加了 5.0 倍, 变态后急剧降低, 变态后幼苗(第 17 天)比第 13 天的幼虫降低了 19.5 倍, 由 0.110 降低到 0.005。

表 2 不同发育阶段海湾扇贝幼虫体内 DA: NE 比值和 5-HT: NE 比值的变化

Tab.2 The changes of DA: NE ratio and 5-HT: NE ratio in bay scallop *A. irradians* larvae at different stages

| 项目 | 受精后发育天数(d) | | | | | |
|-------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 3 | 7 | 10 | 12 | 13 | 17 |
| DA: NE 比值 | 0.013 | 0.022 | 0.031 | 0.043 | 0.175 | 0.006 |
| 5-HT: NE 比值 | 0.004 | 0.003 | 0.003 | 0.018 | 0.110 | 0.005 |

2.3 氯化钾和氯化钙诱导后海湾扇贝幼虫体内神经递质含量的变化

由表 3 可知, 海湾扇贝幼虫经氯化钾和氯化钙诱导 24h 后, 体内去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺含量均有所降低。经氯化钾和氯化钙诱导后, 幼虫体内去甲肾上腺素含量由 2352pg/mg 湿重分别降低到 795 和 1363pg/mg 湿重; 多巴胺含量由 412pg/mg 湿重分别降低到 118 和 147pg/mg 湿重; 5-羟色胺含量由 259pg/mg 湿重分别降低到 73 和 65pg/mg 湿重。

表 3 氯化钾和氯化钙诱导后海湾扇贝幼虫体内去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺含量 (pg/mg 湿重) 的变化

Tab.3 The changes of NE, DA and 5-HT contents (pg/mg wet weight) in bay scallop *A. irradians* larvae induced by KCl and CaCl₂

| 神经递质 | 诱导物 | | |
|--------|------|-----|------|
| | 对照 | 氯化钾 | 氯化钙 |
| 去甲肾上腺素 | 2352 | 795 | 1363 |
| 多巴胺 | 412 | 118 | 147 |
| 5-羟色胺 | 259 | 73 | 65 |

2.4 氯化钾和氯化钙诱导后海湾扇贝幼虫体内 DA: NE 比值和 5-HT: NE 比值的变化

由表 4 可知, 海湾扇贝幼虫经氯化钾和氯化钙诱导 24h 后, 体内 DA: NE 比值和 5-HT: NE 比值均有所降低。DA: NE 比值由对照组的 0.175 降低到 0.149(氯化钾)和 0.107(氯化钙); 5-HT: NE 比值由对照组的 0.110 降低到 0.091(氯化钾)和 0.048(氯化钙)。

表 4 氯化钾和氯化钙诱导后海湾扇贝幼虫体内 DA: NE 比值和 5-HT: NE 比值的变化

Tab. 4 The changes of DA: NE ratio and 5-HT: NE ratio in bay scallop *A. irradians* larvae induced by KCl and CaCl₂

| 项目 | 诱导物 | | |
|-------------|-------|-------|-------|
| | 对照 | 氯化钾 | 氯化钙 |
| DA: NE 比值 | 0.175 | 0.149 | 0.107 |
| 5-HT: NE 比值 | 0.110 | 0.091 | 0.048 |

3 讨论与结语

贝类幼虫的附着变态过程受许多因素的影响(何义朝等, 1990, 1999; 柯才焕等, 1998)。许多研究表明, 神经系统参与了海洋无脊椎动物幼虫的附着变态过程。另外还发现, 肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺和 GABA 等神经递质能够诱导包括海洋贝类在内的海洋无脊椎动物幼虫的附着变态。由此可以想到, 神经系统可能分泌了神经递质而使幼虫变态, 这种设想在长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 幼虫得到了验证。Coon 等(1986)发现长牡蛎幼虫体内有去甲肾上腺素和多巴胺存在, 而且去甲肾上腺素含量随着幼虫的发育逐渐升高, 在变态前达到一个高峰, 而多巴胺含量则变化不大, 因此他们认为长牡蛎幼虫体内的去甲肾上腺素调控着幼虫的变态过程; 另外, 在腹足类 *Phestilla sibogae* 幼虫体内也发现有去甲肾上腺素和多巴胺存在(Pires *et al.*, 2000), 这是到目前为止, 本文作者仅查阅到两篇从神经内分泌的角度来研究贝类幼虫变态机理的文献。本研究采用生化方法测定了海湾扇贝幼虫不同发育阶段及用氯化钾和氯化钙诱导后体内的去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺的含量变化, 首次从神经内分泌的角度来研究海湾扇贝幼虫变态机理。结果表明, 海湾扇贝幼虫体内去甲肾上腺素含量在变态前和变态后没有明显变化, 而多巴胺和 5-羟色胺含量在变态前急剧增加, 变态后又急剧降低, 说明多巴胺和 5-羟色胺在海湾扇贝幼虫的变态过程中起着十分重要的作用, 可能是启动海湾扇贝幼虫变态过程的主要物质, 这同时也说明, 海湾扇贝和长牡蛎幼虫的变态机理是不同的。

氯化钾和氯化钙能够有效地诱导海湾扇贝幼虫变态, 对于它们的诱导机理, 作者最初认为可能是它们能够诱导幼虫体内产生神经递质, 由神经递质诱导了幼虫变态。但从本实验的结果看, 这种设想不正确, 海湾扇贝幼虫经过氯化钾和氯化钙诱导后, 体内去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺含量均有不同程度的降低。因此认为它们可能是通过其他途径诱导海湾扇贝幼虫变态, 如促进幼虫对本身所含有的去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺的利用。

由于受实验条件的限制, 本研究无法测定海湾扇贝幼虫组织内神经递质的含量, 而只能测定整个幼虫(包括贝壳和组织)体内神经递质的含量, 但也可以看出某些神经递质含量的变化规律。在本实验中, 神经递质的含量也是指单位幼虫湿重中所含有的神经递质数量, 这种表示方法可能造成一定的误差。为了减少以上误差, 作者还研究了 DA: NE 比值和 5-HT: NE 比值的变化规律。因为海湾扇贝幼虫体内去甲肾上腺素含量变化不大, DA: NE 比值和 5-HT: NE 比值的变化主要是由多巴胺和 5-羟色胺引起的, 从 DA: NE 比值和 5-HT: NE 比值的变化可以间接地看出多巴胺和 5-羟色胺的变化。从结果看, 用单位幼虫湿

重所表示的多巴胺和 5-羟色胺含量的变化规律同 DA: NE 比值和 5-HT: NE 比值的变化规律基本一致, 表明用单位幼虫湿重所表示的多巴胺和 5-羟色胺含量是可靠的。

参 考 文 献

- 何义朝, 张福绥, 1990. 盐度对海湾扇贝不同发育阶段的影响. 海洋与湖沼, 21(3): 197—204
- 何义朝, 张福绥, 李宝泉, 1999. 温度对墨西哥扇贝胚胎和幼虫发育的影响. 海洋与湖沼, 30(3): 284—289
- 张福绥, 何义朝, 刘祥生等, 1986. 海湾扇贝(*Argopecten irradians*)引种、育苗及试养. 海洋与湖沼, 17(5): 367—374
- 柯才焕, 李少菁, 李复雪等, 1998. 翡翠贻贝幼体附着和变态的离子控制. 海洋与湖沼, 29(2): 128—133
- Baloun A J, Morse D E, 1984. Ionic control of settlement and metamorphosis in larvae *Haliotis rufescens* (Gastropoda). Biol Bull, 167: 124—138
- Burke R D, 1983. Neural control of metamorphosis in *Dendroaster excentricus*. Biol Bull, 167: 176—188
- Coon S L, Bonar D B, 1986. Norepinephrine and dopamine content of larvae and spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Biol Bull, 171: 632—639
- Hadfield M G, 1984. Settlement requirements of molluscan larvae: new data on chemical and genetic roles. Aquaculture, 39: 283—298
- Inestrosa N C, Gonzalez M, Campos E O, 1993. Metamorphosis of *Concholepas concholepas* (Bruguere, 1789) induced by excess potassium. J Shellfish Res, 12(2): 337—341
- Leise E M, Hadfield M G, 2000. An inducer of molluscan metamorphosis transforms activity patterns in a larval nervous system. Biol Bull, 199: 241—250
- Morse D E, 1984. Biochemical and genetic engineering for improved production of abalones and other valuable molluscs. Aquaculture, 39: 263—282
- Pawlik J R, 1990. Natural and artificial induction of metamorphosis of *Phragmatopoma lapidosa californica* (Polychaeta: Scabellariidae) with a critical look at the effects of bioactive compounds on marine invertebrate larvae. Bull Mar Sci, 46(2): 512—536
- Pechenik J A, 1990. Delayed metamorphosis by larvae of benthic marine invertebrates: Does it occur? Is there a price to pay? Ophelia, 32(1—2): 63—94
- Pires A, Croll R P, Handfield M G, 2000. Catecholamines modulate metamorphosis in the opisthobranch gastropod *Phestilla sibogae*. Biol Bull, 198: 319—331
- Yool A J, Grau S M, Hadfield M G *et al*, 1986. Excess potassium induces larval metamorphosis in four marine invertebrate species. Biol Bull, 170: 255—266

THE CHANGES OF NEUROTRANSMITTER CONTENT DURING METAMORPHOSIS OF BAY SCALLOP *ARGOPECTEN IRRADIANS* LARVAE

ZHANG Tao, QUE Hua-Yong, YANG Hong-Sheng, LIU Shi-Lin,

HE Yi-Chao, ZHANG Fu-Sui

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract The changes of norepinephrine (NE), dopamine (DA) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in larvae of bay scallop *Argopecten irradians* at different development stages and after induced by KCl and CaCl₂ have been studied. The results show that NE levels in the corresponding larva and spat groups do not change significantly, with 2352 (pg/mg WW) (before metamorphosis, 13d) and 2770 (pg/mg WW) (spats). DA and 5-HT levels are low in young larvae, then increase with larvae developing. DA and 5-HT levels increase drastically just before metamorphosis (13d), which increase 2.8 and 4.7 times respectively compared to 12-day larvae. After metamorphosis, DA and 5-HT levels decrease drastically, which in spats following metamorphosis decrease 25.1 and 16.4 times respectively compared to 13-day larvae. The DA:NE ratio and 5-HT:NE ratio also change drastically among 12-day larvae, 13-day larvae and spats. The DA:NE ratio and 5-HT:NE ratio increase drastically just before metamorphosis, which increase 3.0 and 5.0 times, respectively, and then decrease drastically after metamorphosis. The DA:NE ratio and 5-HT:NE ratio in spats decrease 29.8 and 19.5 times compared to 13-day larvae. The NE, DA and 5-HT levels and DA:NE ratio, 5-HT:NE ratio decrease after induced by KCl and CaCl₂. The results suggest that DA and 5-HT maybe trigger the metamorphosis process of bay scallop *A. irradians*.

Key words *Argopecten irradians*, Norepinephrine, Dopamine, 5-hydroxytryptamine, Metamorphosis