

软体动物的一氧化氮及其合酶的研究进展

王晓安^① 蒋小满^① 郑哲民^②

(^①烟台师范学院生物科学与技术系 烟台 264025; ^②陕西师范大学动物研究所 西安 710062)

摘要: 一氧化氮作为一种重要的信息分子,参与调节软体动物的嗅觉、运动、取食、机体防御及学习行为。本文从生理、生化、形态定位以及信号转导几方面综述了有关软体动物一氧化氮及其合酶的最新研究进展。

关键词: 软体动物;一氧化氮;一氧化氮合酶

中图分类号: Q955, Q42 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)06-97-07

Advances in Studies on Nitric Oxide and its Synthase in Mollusc

WANG Xiao-An^① JIANG Xiao-Man^① ZHENG Zhe-Min^②

(^①Department of Biological Science and Technology, Yantai Normal University, Yantai 264025;

^②Institute of Zoology, Shaanxi Teachers University, Xi'an 710062, China)

Abstract: As an important signaling molecule, nitric oxide participates in olfactory sensation, locomotion, alimentation, defense behavior and learning activity of mollusc. In this paper, we summarized the advance of studies on nitric oxide and its synthase in mollusc from physiology, biochemistry, morphological localization and signal transduction.

Key words: Mollusc; Nitric oxide; Nitric oxide synthase

自 1980 年 Furchgott 第一次提出一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是一种内皮细胞舒血管因子以来^[1], 现已普遍认为 NO 是动物机体内重要的信使分子和效应分子。20 世纪 90 年代以来, 有关 NO 的研究取得了令人瞩目的研究成果, 并在临床上得到了初步应用。近年来 NO 的研究领域不断扩展, 研究者们对 NO 在低等动物中的作用及其演化过程也在进行深入的研究和探讨, 国内这方面的研究还很少^[2,3]。本文就近十年来有关软体动物一氧化氮信号系统的研究进展进行简要介绍。

1 软体动物一氧化氮的生物合成

1.1 软体动物一氧化氮合酶的一般性质 在高等动物机体内催化合成 NO 的酶称为一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS)。其催化 L-精氨酸氧化生成 NO 和 L-瓜氨酸, 并以还原性辅酶 (NADPH) 作为氢供体和电子供体。哺乳动物的一氧化氮合酶根据酶的细胞或组织来源不同, 将一氧化氮合酶化分为三种亚型, 即神经型 NOS (neuronal NOS, nNOS)、诱导型 NOS (inducible NOS,

iNOS)、内皮型 NOS (endothelial NOS, eNOS)。这三种亚型均为一个双区结构, C-端为还原酶区, 序列与细胞色素 P₄₅₀ 还原酶同源, 该区含有 NADPH、FAD、FMN 和钙调蛋白 (CaM) 结合位点, 可催化 NADPH 依赖的细胞色素 C 还原; N-端为氧化酶区, 该区含有血红素 (haem)、四氢叶酸 (BH₄) 和 L-精氨酸的结合位点。根据 NOS 还原区的特点, 其组织定位一般都采用 NADPH-黄递酶 (NADPH-d) 组织化学方法^[4]。

对已经测序的几种软体动物一氧化氮合酶的氨基酸序列分析发现, 其结构与脊椎动物的 nNOS 较为相似, 静水椎实螺 (*Lymnaea stagnalis*) 中枢神经系统表达的 NOS 与哺乳动物 nNOS 十分相似, 但是它包括一段由几个氨基酸组成的连续重复序列, 其它已知的 NOS 都缺

第一作者介绍 王晓安, 男, 38 岁, 副教授, 博士研究生; 研究方向: 无脊椎动物比较神经解剖学; E-mail: wangxiaocan @ 163.com。

收稿日期: 2002-12-15, 修回日期: 2003-07-10

乏这一重复序列^[5]。用鼠 nNOS 抗体免疫组织化学研究发现乌贼 (*Sepia officinalis*) 有免疫交叉反应, 用蛋白质印迹测定 *Tritonia diomedea*、无壳侧鳃属 *Pleurobranchaea californica*、海兔属 *Aplysia californica* 中枢神经系统和周围组织提取物, 其标记物的分子量介于 60 ~ 250, 不同种类、不同组织有一定差异^[6]。用 SDS 电泳测定乌贼 NOS 分子量为 150 ku^[7]。

软体动物一氧化氮合酶的活性也依赖于 Ca/CaM、NADPH 和 BH₄, 可被 NOS 的特异性抑制剂 N(G)-硝基-L-精氨酸 [N(G)-nitro-L-arginine]、N-硝基-L-精氨酸甲基酯 [N(omega)-nitro-L-arginine methylester, L-NAME]、钙调素阻断物 trifluoperazine 和 N(G)-甲基-L-精氨酸 (NG-monomethyl-L-arginine, NMMA) 抑制。但是在无壳侧鳃属的研究发现, 催化 L-精氨酸/L-瓜氨酸的转化的 NOS 却对 Ca²⁺ 不敏感、也不被 N-硝基-D-精氨酸甲基酯 (D-NAME) 所抑制, 精氨酸酶抑制剂 [L-缬氨酸和 (+)-S-2-amino-5-iodoacetamidopentanoic acid] 也不影响中枢神经系统的 L-瓜氨酸的生成。其 NOS 活性极大地依赖于一个特定片段, 似乎是一个新的、非钙离子依赖型同工酶形式^[8]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 处理田螺属 *Viviparus ater* 血细胞可使其 NOS 活性升高 2.4 倍^[9]。无壳侧鳃属和海兔属中枢神经系统 L-精氨酸/L-瓜氨酸酶促转换率为 4.0% 和 9.8%, 与大鼠脑的转换率相当。无壳侧鳃属相对较高的 NOS 活性明显不同于其它的后鳃类, 这也许与动物偶然的捕食性生活方式有关^[8]。

1.2 软体动物一氧化氮合酶的分布

1.2.1 在神经系统中的分布

用 NADPH-d 组织化学研究表明, 软体动物 (除石鳖以外) 都有特定的神经元被染色。在海若螺属 *Clione limacina*, NADPH-d 阳性细胞定位于脑神经节的内侧区, 其反应细胞胞体直径约 20 ~ 30 μm, 外周“嗅觉器官”中有一对对称性分布阳性神经元。 *Melibe leonina* 脑侧神经节中有一对左右对称分布的阳性反应细胞, 脑、足、口球神经节的神经纤维网, 以及口笠触手、嗅角感觉末梢, 脑侧神经节的阳性细胞都投射向同侧足神经节, 由于足神经节在控制运动中起着重要作用, 因此 NO 可能影响 *M. leonina* 的游泳和爬行活动。静水椎实螺 NOS 阳性细胞定位于口球神经节感觉神经元集中的取食调节区域^[10]。

NOS 免疫组织化学染色同样表明 NOS 在神经系统的广泛分布。用小鼠 NOS 抗血清免疫组织化学染色表明, 静水椎实螺中枢神经系统口球神经节和脑神经节以及食道下神经节的特定区域具有免疫阳性细胞, 某些中枢神经元胞体上也发现有免疫阳性纤维存在。NOS 免疫组织化学也证实乌贼口球叶 (摄食中枢) 低级

运动中枢、前底叶等高级运动中枢、学习中枢、视觉系统和嗅觉叶等都具有阳性反应。用 NOS 和 N-甲基-天冬氨酸受体 2/3 (NMDAR2/3) 的免疫组织化学还发现, 脑神经节腹侧面的外套-内脏叶、内脏叶以及外套膜、内脏神经有阳性反应存在^[11]。

动态研究还表明, 处于不同活动状态下的软体动物, 其神经系统中 NADPH-d 组织化学和 NOS 免疫组织化学染色阳性反应的强弱和数量有所不同。例如, 处于不活动期和活动后一天蜗牛的脑神经节的中脑和后脑有部分细胞均呈强阳性反应, 活动后 7 天的蜗牛阳性反应减弱。而口球神经节的情况正相反, 活动的蜗牛 (活动 1 天和 7 天后), 其阳性反应的强度和阳性细胞的数量较不活动期蜗牛均有增加^[12]。

1.2.2 在外周器官的分布

大蜗牛属 *Helix aspersa* 肌肉组织、消化道和生殖腺 NADPH-d 组化反应强度中等。 *C. limacina* 外周的一些非神经性分泌细胞和肾管系统中的一些细胞为 NADPH-d 阳性。 *M. leonina* 口上皮组织、阴茎套、阴茎头也都具有阳性反应存在。静水椎实螺仅有少量 NOS 免疫阳性细胞位于呼吸孔周围区域和嗅检器神经节, 唾液腺中大约有 100 个免疫阳性反应细胞。 *P. californica* 外周器官中, 嗅角有少量细胞呈阳性反应, 唾液腺和鳃的反应强烈, 咽部、口球实质和足部没有反应或仅有极少的反应存在。乌贼墨囊壁和墨囊括约肌有阳性反应存在^[11]。用组织化学、免疫组织化学和生物化学的研究还证实墨腺未成熟上皮细胞具有钙离子依赖型 NOS 存在, 说明 NO 参与头足类防御系统黑色素形成细胞的成熟和代谢活性调节^[13]。

1.2.3 胚胎发育过程中一氧化氮合酶分布的改变

对静水椎实螺胚胎期和幼虫期 NADPH-d 组织化学研究表明, NADPH-d 阳性反应结构出现于胚胎发育过程的 18% 期 (E18, 担轮期) 的一对原肾管, 尽管这些结构在变态期 (E26 = 75%) 直至孵化期仍有部分分散的细胞被染色, 但最后这些结构都发生蜕变。胚胎发育后变态期 (E25 ~ E27 = E60% ~ E80%) 的足、外套膜边缘、唇部的感觉神经元及其向中枢的投射纤维都表现 NADPH-d 活性。到孵化期 (P1 ~ P3) 后, 在咽部和食道的一些感觉神经元被染色。幼虫期的足、侧神经节的一些神经元核团呈现 NADPH-d 阳性, 脑神经节和口球神经节的少量神经元呈弱阳性反应。有时一些念珠状阳性纤维出现在围食道神经节环的神经纤维网中。这一研究结果表明静水椎实螺胚胎发育过程中 NADPH-d 活性主要参与感觉过程^[14]。 *Ilyanassa obsoleta* 发育过程中几个神经节的神经网中都有阳性反应存在, 尤其在幼体特有的顶神经节 (apical ganglion) 反应最强, 脑、足、侧神经节神经

网的阳性反应中等强弱,幼体的口神经节和肠神经节反应较弱,变态过程中略有增强。年幼的幼体具有的嗅检器神经节(osphradial ganglion)仅有很弱的反应^[15]。

2 软体动物一氧化氮的作用

2.1 一氧化氮的测定

毛细管电泳使得在单细胞水平上分析一氧化氮代谢成为可能。*P. californica* 口球神经节中 NADPH-d 阳性反应细胞 NO^{2-} 浓度为 2 mmol/L, NO^{3-} 浓度为 12 mmol/L, 而阴性细胞的 NO^{2-} 、 NO^{3-} 则检测不到。整体神经节匀浆和血淋巴中检测不到 NO^{2-} , 但是血淋巴 NO^{3-} 的水平平均为 $(1.8 \pm 0.2) \times 10^{-3}$ mmol/L, 这明显高于淡水软体动物静水椎实螺 $(3.2 \pm 0.2) \times 10^{-5}$ mmol/L, 也高于 *A. californica* $(3.6 \pm 0.7) \times 10^{-4}$ mmol/L^[16]。对 *P. californica* 和 *A. californica* 神经元 L-精氨酸、L-瓜氨酸和相关分子毛细管电泳法测定表明, 单个 NOS 阳性细胞中精氨酸水平为 6 mmol/L, 瓜氨酸水平为 4 mmol/L, 许多 NOS 阴性细胞中其水平低于监测水平(小于 1 mmol/L), 而且发现精氨酸/瓜氨酸的比率与细胞体积无关^[17]。这充分证实了在软体动物神经元中 NADPH-d 可代表一氧化氮合酶活性的观点。

用 NO 敏感电极测定表明, 海兔属在内源性 NOS 的产物 N-亚硝基-L-精氨酸(N-nitroso-L-arginine)存在时口球神经节、腹神经节的电位峰值为 -1.66 V, 在 NOS 抑制剂 NMMA 存在时其峰值减小^[18]。

2.2 一氧化氮的生理功能

2.2.1 NO/cGMP 信号转导途径

软体动物中一氧化氮生理功能的实现主要通过精氨酸-一氧化氮-cGMP 信号转导途径来实现。静水椎实螺唇部的 NOS 阳性细胞投射向中枢神经系统, 中枢神经系统表现出 NO 激活的鸟苷酸环化酶活性, 用离体的唇部-中枢神经标本研究发现, NO 猝灭剂血红蛋白、NOS 抑制剂 L-NAME 和鸟苷酸环化酶活性抑制剂次甲基蓝具有抑制作用, 而 NO 供体如 S-亚硝基-N-乙酰青霉胺(S-nitroso-N-acetylpenicillamine, SNAP)、羟氨和 cGMP、8-溴-cGMP 等则具有激活作用, 用整体实验也证实了离体实验的结论^[19]。亲核 NO 供体, 二乙氨/NO(diethylamine NO, 10 ~ 100 mmol/L)可激活 *C. limacina* 取食、运动调节环路中的神经元, cGMP 的类似物 8-溴-cGMP 可模拟 NO 的效果, 因此推测, NO 作为内源性神经递质参与动物的取食和运动行为的调节^[20]。在磷酸二酯酶抑制剂(1-methyl-3-isobutylxanthine, IBMX)存在的情况下, 用 NO 供体硝普钠(SNP)、SNAP 或者羟胺刺激 *Helix pomatia* 中枢神经系统, cGMP 水平比对照水平升高 22 ~ 27 倍, cGMP 的免疫活性主要位于被刺激神经元的轴突和胞质中, 约 80%

的 cGMP 免疫阳性细胞与 NADPH-d 共存, 有些胶质细胞和巨大神经元为 NADPH-d 阴性却表现为 cGMP 免疫阳性反应, 说明在大蜗牛属中枢神经系统中存在 NO/cGMP 途径, NO 作为信号分子参与细胞间和细胞内调节作用。在海兔属腹、侧和口球神经节的少量神经元表现出 NO 诱导的 cGMP 免疫活性, NO 可使这些神经元去极化。NO-cGMP 途径的实现依赖于 cGMP 免疫阳性神经元的离子通道, 在不同的神经元上离子通道可能不同^[21]。其伤害性感受神经元在感受伤害刺激形成的转录依赖型长程超兴奋(long-term hyperexcitability, LTH)需要 NO-cGMP-蛋白激酶 G(PKG)途径的参与^[22]。

L-谷氨酸通过 NMDA 受体-一氧化氮-cGMP 信号转导途径激活乌贼酪氨酸酶活性促进墨腺的黑色素合成, 脑神经节与谷氨酸或 NMDA 或 NO 供体[2-(N,N-diethylamino) diazenolate-2-oxide]一起孵育导致 cGMP 水平升高, 表明存在谷氨酸-一氧化氮-cGMP 信号途径。乌贼和莱氏拟乌贼(*Septoteuthis lessoniana*)的平衡囊腹鳍传入纤维同时接受 cGMP 和 cAMP 信号转导途径的调节, 其中 L-精氨酸-cGMP 是主要的抑制性途径^[23]。

2.2.2 一氧化氮的细胞生理

通过对椎实螺属、无壳侧鳃属和海兔属等软体动物的大量研究表明, 腹足类为在细胞水平上分析 NO 功能以及 NO 介导的行为分析提供了理想的模型。

大蜗牛属脑神经节与亚硝酸钠一起孵育时, 无自发神经元的发放阈(firing threshold)降低、发放频率和对刺激的反应性升高, 如果抑制 NOS 活性则具有相反的效果。用 0.01 ~ 1 mmol/L 亚硝酸钠孵育数分钟到 30 min 对细胞的去极化和兴奋性影响很小, 1 mmol/L 孵育 2 h 到数天可降低兴奋阈, 而电位的峰值、对刺激的敏感性和突触的活性都明显增加。NO 供体有类似作用, 但 NOS 抑制剂则具有相反的效果^[24]。当突触后注入钙离子螯合剂 EGTA 可完全消除突触电位, 细胞内注入氯化钙则可引起细胞兴奋性突触后电位(EPSF)的易化, NOS 抑制剂 N(G)-硝基-L-精氨酸可防止突触后诱导的易化的发生, 说明 NO 可能作为逆行信号参与突触的易化作用, 这与脊椎动物中的机制相似^[25]。

2.2.3 一氧化氮对运动的调节功能

用一氧化氮敏感电极直接测定静水椎实螺口球神经节的 NO 生成, 当唇部接受相关刺激时, 口球神经节的 NO 水平迅速升高, NO 清除剂和 NOS 抑制剂可抑制其升高。用一氧化氮供体 S-亚硝基半胱氨酸(S-NC) $(5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-3}$ mol/L)可激活其口球的取食活动并可调节口球神经节运动神经元的活性。NOS 抑制剂 NMMA $(10^{-4}$ mol/L)则可降低口球运动频率, 并且对口球运动神经元的作用与 S-

NC的作用相反。因此,中枢神经系统中的一氧化氮可作为信息分子参与取食运动模式的调节^[10]。用 H_2O_2 (0.003% ~ 0.0003%) 和 NO 供体硝普钠 (10^{-6} ~ 10^{-4} mol/L) 可增加培养细胞中的 Ca^{2+} 浓度,从而激活呼吸和取食调节网络中的神经元。一般认为一氧化氮是中枢神经系统中的一种逆行转导神经递质,但在椎实螺的研究表明,一氧化氮可作为 NOS 细胞(B2 细胞)与其下一级非 NOS 细胞(B7nor 细胞)之间的慢兴奋性递质。这两种神经元位于口球神经节,它们参与取食行为。B2 与 B7nor 细胞之间的转导可被抑制 NOS 所阻断,清除细胞间一氧化氮也可抑制它们之间的转导。对 B7nor 细胞胞体施加一氧化氮可引起与 B2 细胞激动时相似的去极化。B2 细胞和 B7nor 细胞间的慢作用可在这两种细胞的共同培养中重新建立,并且对 NOS 抑制剂和 NO 清除剂一样敏感。对细胞培养中 NO 信号的空间方位研究发现,在没有形成解剖学联系之前,突触前神经元可引起 50 μm 外的下一级神经元发生去极化电位。当细胞间的距离减少时细胞间的相互作用加强。证实了 NO 可以作为突触性和非突触性信号分子发挥作用^[26]。用 N-硝基-精氨酸 ($> 10^{-3}$) 可激活呼吸管的开启运动,S-亚硝基半胱氨酸和硝普钠 ($> 10^{-3}$) 具有双相作用:弱的短时期开启运动紧接着减弱并呈现闭合运动。因此认为,一氧化氮在腹足类软体动物的另一项生理功能便是调节呼吸过程^[27]。

2.2.4 一氧化氮与经典递质的关系

2.2.4.1 对乙酰胆碱的调节作用

双电极电压钳位技术研究发现,细胞外施加 NOS 抑制剂 NMMA、谷氨酸环化酶抑制剂(次甲基蓝),可破坏 15-HETE [15(S)-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E- eicosatetraenoic acid] 对大蜗牛属 *Helix lucorum* 乙酰胆碱节律性作用于胞体时诱发的离子内流抑制的短程及长程-潜伏的调节影响,因此推测 NO 和 cGMP 参与调节 15-HETE 对乙酰胆碱受体可塑性的作用^[28]。而 *A. californica* 口球神经节和腹神经节中,内源性 NO 参与突触效力的调节,外源性 NO 供体 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) 可降低口球神经节胆碱能神经-神经突触中突触后结构对突触前结构冲动的反应,L-精氨酸可减少口球神经节抑制性突触的乙酰胆碱释放,而增加腹神经节兴奋性突触乙酰胆碱的释放,NOS 抑制剂 N(G)-硝基-L-精氨酸和 NMMA 具有相反的作用。外源性 NO 供体 SIN-1 可模拟 L-精氨酸在两种突触的作用,NO 调节乙酰胆碱释放的两种相反机制为研究 NO 调节递质释放提供了一个很有用的模型^[18]。

2.2.4.2 对单氨基类递质的调节作用

用 NO 供体硝普钠和亚硝酸钠(SNP)以及 NOS 抑制剂(NMMA)结合电生

理研究发现,与谷氨酸一起孵育可导致细胞超极化。谷氨酸与 SNP 一起孵育则可使细胞去极化。NMMA 也可使细胞去极化,说明 NO 参与大蜗牛属脑神经节中谷氨酸诱发的抑制向兴奋转化的过程。用 0.05 ~ 0.1 mmol/L 谷氨酸可诱发大蜗牛属神经元的超极化,0.1 ~ 1 mmol/L 谷氨酸受体颞颥剂 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA) 则具有兴奋作用,说明 NO 引起的这种转化过程可能由 NMDA 型受体介导。硝普钠(SNP)和羟氨(HOA)作为 NO 的供体,可抑制海兔属多巴胺(DA)诱导的 K^+ 流,这一过程需要 cGMP 依赖型蛋白激酶参与。在海兔属口球神经节,5-HT 可以降低乙酰胆碱的释放,而一氧化氮供体 SIN-1 可大幅度降低 5-HT 的这种作用^[29]。静水椎实螺的 NOS 定位于脑神经节的 5-HT 巨大神经元^[5] 和口球神经节的 B2 运动神经元,后者并不直接参与协调取食过程,但是与取食过程中咽部和肠组织的消化有关。如果考虑到一氧化氮的扩散作用,那么当取食开始时由运动神经元释放的一氧化氮将有效地调节取食回路。在脑神经节的上唇神经、内唇神经和触手神经都具有 NOS 和 5-HT 反应纤维,这些纤维的作用还不清楚,但 NOS 阳性纤维释放的一氧化氮可能激活 5-HT 能纤维,从而影响取食的初始过程。因此,一氧化氮虽然没有直接参与椎实螺取食的神经中枢调节,但可以影响其取食行为,如取食的初始化和取食方式^[30]。

2.2.4.3 与神经肽的关系

NO 释放剂 SNAP 可降低 *Cepaea nemoralis* 内啡肽酶(SCH34826)诱导(似乎由内啡肽介导)的抗伤害感受(对 40°C 热刺激的缩足反射),NOS 抑制剂 L-NAME 则可加强。暴露在超低频磁场(15 min, 60 Hz, 141 mT)也可降低内啡肽酶诱导的抗伤害反射能力,这一作用可被 NOS 抑制剂 L-NAME 减弱、可被 SNP 加强。说明在蜗牛 NO 和 NOS 参与超低频磁场对阿片诱导的镇痛作用的抑制^[31],光照可降低这种抑制作用^[32]。贻贝属 *Mytilus edulis* 离体神经节暴露在吗啡中 24 h,可减少纳洛酮敏感型小胶质细胞的移出。当与吗啡和 NOS 抑制剂 L-NAME 共同孵育时则可增加其移出。当小胶质细胞与 L-精氨酸或超氧化物清除剂、超氧化物歧化酶共同孵育时,吗啡刺激可提高 NO 的水平^[33]。

2.2.5 一氧化氮与软体动物的防御机能

软体动物免疫细胞通过两种途径杀死细菌:细胞吞噬和一氧化氮的形成。

在哺乳动物的吞噬细胞,超氧化物和一氧化氮共同参与内在防御系统生成过亚硝酸,这是一种抵御细菌的高细胞毒性的强氧化剂。和哺乳动物一样,细胞吞噬也是软体动物自我防御系统的一个重要组成部

分。已知细胞内钙离子水平可调节无脊椎动物免疫细胞 NOS 的活性。用昆布多糖(laminarin)、脂多糖、酵母细胞(*Saccharomyces cerevisiae*)刺激贻贝属 *Mytilus galloprovincialis* 离体血细胞,可升高过氧化物和亚硝基/硝基水平,抑制 NADPH 氧化酶和一氧化氮合酶可降低亚硝基/硝基水平^[34],脂多糖处理也可使田螺属 *Viviparus ater* 的血细胞 NOS 活性升高。2-AG(2-arachidonoyl-glycerol)可引起 *Mytilus edulis* 免疫细胞释放 NO。超氧阴离子可部分抑制 L-精氨酸向 L-瓜氨酸的转化,被刺激的吞噬细胞中 NO 的形成依赖于细胞内硝基和亚硝基水平,说明一氧化氮信号通路参与软体动物的自我防御系统^[35]。研究还发现,在软体动物具有吞噬活性的血细胞中具有哺乳动物细胞因子(IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6 和 TNF- α)的免疫反应存在,这些细胞因子可影响血细胞的移动、细菌吞噬、NOS 诱导和生物胺的释放,从而参与软体动物免疫-神经内分泌应答的调节^[36]。*Planorbis corneus* 的神经胶质细胞与哺乳动物小胶质细胞相似,也有类似巨噬细胞的活性,在体外培养时,这些细胞表现出对细菌或脂多糖的吞噬特性,同时伴随 NOS 水平的升高^[37]。

一氧化氮还参与软体动物对寄生性种类的防御。腹足类软体动物 *Biomphalaria glabrata* 在抵御寄生性种类孟氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)的侵袭时,尽管不能完全抑制孢母细胞,但可以部分将其杀死。血淋巴细胞负责清除血吸虫的孢母细胞,体外研究证实 NOS 抑制剂 L-NAME 和 NO 清除剂 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide 可减少血淋巴细胞对孢母细胞的清除,用过氧化氮(ONOO-)清除剂尿酸和 deferoxamine 处理没有影响对寄生者的清除率,说明 NO 直接介导了细胞毒性。L-NAME 与过氧化氢酶同时处理时的孢母细胞死亡率比单独用 L-NAME 要减少许多,说明 NO 和 H₂O₂ 都参与了对寄生孢母细胞的清除过程^[38]。但在海兔属和无壳侧鳃属的研究发现,感染侵袭导致 NO 的过量形成也同时会损害机体的正常细胞和组织。

环境因子也可诱发软体动物释放一氧化氮参与机体应激反应,如铅离子可导致 *Mytilus edulis* 免疫细胞释放 NO 而且不受吗啡抑制。因此,NO 测定也提供了一种监测软体动物对环境因素改变诱发应激反应的高灵敏、非侵入性的手段^[39]。

2.2.6 与学习记忆的关系 一氧化氮参与软体动物的嗅觉、触觉和视觉学习记忆过程。对大蛞蝓(*Limax maximus*)一氧化氮介导的嗅觉中间神经网络研究表明,当受气味刺激时其原脑叶(陆生软体动物嗅觉的主

要中枢)的电活动与哺乳动物嗅球叶在受到气味刺激时表现出的特性相似。其前脑接受嗅觉感受的直接投射,当气体刺激时前脑场电位频率约 0.7 Hz,场电位的频率依赖于 NO 的细胞间通讯,抑制 NOS 活性可减慢其震动频率,外源性 NO 则可增加其频率^[40]。*Helix pomatia* 记忆的获得依赖于 NO,但记忆唤起和嗅觉定向则不依赖 NO^[41]。静水椎实螺长程记忆(long-term memory, LTM)的形成有赖于 NO-cGMP 信号系统的参与,其最后临界期为训练后 5 h^[42]。肌肉注射 L-精氨酸类似物 L-NAME 可阻碍真蛸(*Octopus vulgaris*)的触觉学习和视觉学习,其对映结构 D-NAME 则没有作用^[43]。

3 结束语

根据对一氧化氮及一氧化氮合酶的比较研究表明:(1)软体动物不同种类都存在一氧化氮依赖性信号通路,一氧化氮生理功能的实现主要通过 cGMP 介导;(2)一氧化氮信号分子的一个主要生理功能是反馈调节作用,可以通过对其它经典递质功能的影响而达到精细调节的目的;(3)软体动物的一氧化氮合酶存在不同的分子形式,一氧化氮合酶阳性神经元分布的总体演化趋势是由外周向中枢迁移,其分布模式在肉食性种类(主要是中枢运动神经元呈阳性反应)和植食性种类(主要是外周感觉神经细胞呈阳性反应)有明显差别,在陆生及淡水生种类和海水生种类之间也有明显差别;(4)口球神经节的一氧化氮活性主要参与取食行为的反馈调节;(5)血细胞中的一氧化氮合酶主要受外界刺激后诱导形成,其产物一氧化氮是软体动物机体防御系统的一种重要成分。

一氧化氮的重要生理功能已毋庸置疑,腹足类软体动物为在细胞水平研究 NO 及 NOS 提供了一种理想的实验模型,使得对特定神经元的功能及其在神经网络中的行为进行分析成为可能,这在高等动物复杂神经系统中是难以实现的。类软体动物由于其生态适应的巨大变异使不同的系统类群产生了广泛的适应辐射,也使其成为分析神经系统演化实验中不可替代的模型。由于一氧化氮在软体动物防御系统中的重要作用,对于经济贝类养殖中的疾病防治也有一定指导意义。因此对软体动物一氧化氮信号系统的深入研究具有重要的理论意义和实践意义。

参 考 文 献

- [1] Furchgott R F, Zawadzki J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980, 288(5789): 373 ~ 376.

- [2] 王晓安, 蒋小满, 刘新海. 东亚三角头蜗虫一氧化氮合酶的组织化学定位初步研究. 四川动物, 1999, 18(2): 51 ~ 52.
- [3] 王晓安, 郑哲民. 河北环毛蚓神经系统中一氧化氮合酶的组织化学定位. 动物学杂志, 2002, 37(2): 6 ~ 9.
- [4] 钟慈声, 孙安阳. 一氧化氮的生物医学. 上海: 上海医科大学出版社, 1997.
- [5] Korneev S A, Piper M R, Picot J, et al. Molecular characterization of NOS in a mollusc: expression in a giant modulatory neuron. *J Neurobiol*, 1998, 35(1): 65 ~ 76.
- [6] Hurst W J, Moroz L L, Gillette M U, et al. Nitric oxide synthase immunolabeling in the molluscan CNS and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 262(2): 545 ~ 548.
- [7] Di Cosmo A, Di Cristo C, Palumbo A, et al. Nitric oxide synthase (NOS) in the brain of the cephalopod *Sepia officinalis*. *J Comp Neurol*, 2000, 428(3): 411 ~ 427.
- [8] Moroz L L, Chen D, Gillette M U, et al. Nitric oxide synthase activity in the molluscan CNS. *J Neurochem*, 1996, 66(2): 873 ~ 876.
- [9] Conte A, Ottaviani E. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. *FEBS Lett*, 1995, 365(2 ~ 3): 120 ~ 124.
- [10] Moroz L L, Park J H, Winlow W. Nitric oxide activates buccal motor patterns in *Lymnaea stagnalis*. *Neuroreport*, 1993, 4(6): 643 ~ 646.
- [11] Palumbo A, Di Cosmo A, Poli A, et al. A calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase, NMDAR2/3 receptor subunits, and glutamate in the CNS of the cuttlefish *Sepia officinalis*: localization in specific neural pathways controlling the inking system. *J Neurochem*, 1999, 73(3): 1254 ~ 1263.
- [12] Pisu M B, Conforti E, Fenoglio G, et al. Nitric oxide-containing neurons in the nervous ganglia of *Helix aspersa* during rest and activity: immunocytochemical and enzyme histochemical detection. *J Comp Neurol*, 1999, 409(2): 274 ~ 284.
- [13] Palumbo A, Di Cosmo A, Gesualdo I, et al. A calcium-dependent nitric oxide synthase and NMDA R1 glutamate receptor in the ink gland of *Sepia officinalis*: a hint to a regulatory role of nitric oxide in melanogenesis? *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 235(2): 429 ~ 432.
- [14] Serfozo Z, Elekes K, Varga V. NADPH-diaphorase activity in the nervous system of the embryonic and juvenile pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Res*, 1998, 292(3): 579 ~ 586.
- [15] Lin M F, Leise E M. NADPH-diaphorase activity changes during gangliogenesis and metamorphosis in the gastropod mollusc *Ilyanassa obsoleta*. *J Comp Neurol*, 1996, 374(2): 194 ~ 203.
- [16] Cruz L, Moroz L L, Gillette R, et al. Nitrite and nitrate levels in individual molluscan neurons: single-cell capillary electrophoresis analysis. *J Neurochem*, 1997, 69(1): 110 ~ 115.
- [17] Floyd P D, Moroz L L, Gillette R, et al. Capillary electrophoresis analysis of nitric oxide synthase related metabolites in single identified neurons. *Anal Chem*, 1998, 70(11): 2243 ~ 2247.
- [18] Meulemans A, Mothet J P, Schirar A, et al. A nitric oxide synthase activity is involved in the modulation of acetylcholine release in *Aplysia* ganglion neurons: a histological, voltammetric and electrophysiological study. *Neuroscience*, 1995, 69(3): 985 ~ 995.
- [19] Elphick M R, Kemenes G, Staras K, et al. Behavioral role for nitric oxide in chemosensory activation of feeding in a mollusc. *J Neurosci*, 1995, 15(11): 7653 ~ 7664.
- [20] Moroz L L, Norekian T P, Pirtle T J, et al. Distribution of NADPH-diaphorase reactivity and effects of nitric oxide on feeding and locomotory circuitry in the pteropod mollusc, *Clio ne limacina*. *J Comp Neurol*, 2000, 427(2): 274 ~ 284.
- [21] Koh H Y, Jacklet J W. Nitric oxide induces cGMP immunoreactivity and modulates membrane conductance in identified central neurons of *Aplysia*. *Eur J Neurosci*, 2001, 13(3): 553 ~ 560.
- [22] Lewin M R, Walters E T. Cyclic GMP pathway is critical for inducing long-term sensitization of nociceptive sensory neurons. *Nat Neurosci*, 1999, 2(1): 18 ~ 23.
- [23] Tu Y, Budelmann B U. Effects of L-arginine on the afferent resting activity in the cephalopod statocyst. *Brain Res*, 1999, 845(1): 35 ~ 49.
- [24] D' yakonova T L, Reutov V P. The effects of nitrite on the excitability of brain neurons in the common snail. *Neurosci Behav Physiol*, 2000, 30(2): 179 ~ 186.
- [25] Malyshev A Y, Balaban P M. Synaptic facilitation in *Helix* neurons depends upon postsynaptic calcium and nitric oxide. *Neurosci Lett*, 1999, 261(1 ~ 2): 65 ~ 68.
- [26] Park J H, Straub V A, O'Shea M. Anterograde signaling by nitric oxide: characterization and *in vitro* reconstitution of an identified nitrenergic synapse. *J Neurosci*, 1998, 18(14): 5463 ~ 5476.
- [27] Moroz L L, Park J H. Nitric oxide modulates the central respiratory patterns in *Lymnaea stagnalis*. *J Physiol*, 1993, 473: 188.
- [28] Pivovarov A S, Egidio-Villareal W. NO synthase and guanylate

- cyclase inhibitors block modulation of the plasticity of common snail cholinergic receptors by 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid. *Neurosci Behav Physiol*, 1996, **26**(5):428 ~ 434.
- [29] Fossier P, Blanchard B, Ducrocq C, et al. Nitric oxide transforms serotonin into an inactive form and this affects neuromodulation. *Neuroscience*, 1999, **93**(2):597 ~ 603.
- [30] Sadamoto H, Hatakeyama D, Kojima S, et al. Histochemical study on the relation between NO-generative neurons and central circuitry for feeding in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci Res*, 1998, **32**(1):57 ~ 63.
- [31] Kavaliers M, Cholieris E, Prato F S, et al. Evidence for the involvement of nitric oxide and nitric oxide synthase in the modulation of opioid-induced antinociception and the inhibitory effects of exposure to 60-Hz magnetic fields in the land snail. *Brain Res*, 1998, **809**(1):50 ~ 57.
- [32] Kavaliers M, Prato F S. Light-dependent effects of magnetic fields on nitric oxide activation in the land snail. *Neuroreport*, 1999, **10**(9):1 863 ~ 1 867.
- [33] Liu Y, Shenouda D, Bilfinger T V, et al. Morphine stimulates nitric oxide release from invertebrate microglia. *Brain Res*, 1996, **722**(1 ~ 2):125 ~ 131.
- [34] Arumugam M, Romestand B, Torreilles J, et al. In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur J Cell Biol*, 2000, **79**(7):513 ~ 519.
- [35] Gourdon I, Guerin M C, Torreilles J, et al. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide*, 2001, **5**(1):1 ~ 6.
- [36] Ottaviani E, Franchini A. Immune and neuroendocrine responses in molluscs: the role of cytokines. *Acta Biol Hung*, 1995, **46**(2 ~ 4):341 ~ 349.
- [37] Sonetti D, Ottaviani E, Stefano G B. Opiate signaling regulates microglia activities in the invertebrate nervous system. *Gen Pharmacol*, 1997, **29**(1):39 ~ 47.
- [38] Hahn U K, Bender R C, Bayne C J. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol*, 2001, **87**(4):778 ~ 785.
- [39] Smith K L, Galloway T S, Depledge M H. Neuro-endocrine biomarkers of pollution-induced stress in marine invertebrates. *Sci Total Environ*, 2000, **262**(1 ~ 2):185 ~ 190.
- [40] Gelperin A, Kleinfeld D, Denk W, et al. Oscillations and gaseous oxides in invertebrate olfaction. *J Neurobiol*, 1996, **30**(1):110 ~ 122.
- [41] Teyke T. Nitric oxide, but not serotonin, is involved in acquisition of food-attraction conditioning in the snail *Helix pomatia*. *Neurosci Lett*, 1996, **206**(1):29 ~ 32.
- [42] Kemenes I, Kemenes G, Andrew R J, et al. Critical time-window for NO-cGMP-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *J Neurosci*, 2002, **22**(4):1 414 ~ 1 425.
- [43] Robertson J D, Bonaventura J, Kohn A, et al. Nitric oxide is necessary for visual learning in *Octopus vulgaris*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1996, **263**(1 377):1 739 ~ 1 743.