



基于模式动物海兔的神经肽及受体研究

张果¹, 郭施琪¹, 王慧莹¹, 李亚东¹, 蒋慧敏¹, 余可¹, 丁雪莹¹, 刘为佳¹, 许举平¹,
薛颖喻¹, 杨哲¹, 王健^{2,3*}, 周海波^{2,3*}, 景键^{1,3,4*}

1. 南京大学生命科学学院, 南京大学生命科学高等研究院, 江苏省小核酸生物学和生物技术工程研究中心, 化学生命科学合作创新中心, 脑科学研究院, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210023;

2. 南京大学电子科学与工程学院, 南京 210023;

3. 鹏程实验室, 深圳 518000;

4. Department of Neuroscience and Friedman Brain Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA

* 联系人, E-mail: wangjinju@nju.edu.cn; haibozhou@nju.edu.cn; jingj01@live.com

收稿日期: 2021-05-20; 接受日期: 2021-08-26; 网络版发表日期: 2021-12-10

国家自然科学基金(批准号: 31861143036, 62050071, 31671097)和中国博士后科学基金(批准号: 2020M671435)资助项目

摘要 神经肽广泛存在于动物的中枢神经系统和内分泌系统中, 并作为细胞间信息传导的信号分子, 在许多生理过程(如行为控制、体温调控、能量平衡、昼夜节律等)中起着重要的调控作用. 本文主要关注在中枢神经系统中, 控制特定行为的神经环路中的神经元所释放的神经肽及其功能. 由于脊椎动物的神经环路比较复杂, 在特定的系统中研究清楚所有或大部分的神经肽种类及其功能具有很大的挑战性, 因此神经科学家采用诸多无脊椎动物作为模式动物, 用来发现新颖的神经肽及其受体, 并研究这些神经肽和受体的功能. 本文概述了神经肽的基本特征、作用方式及生理功能的研究方法, 并着重对具有实验优势的软体动物——海兔的神经肽研究进展进行了综述. 强调了神经肽/受体信号系统的多样性及其研究的挑战性. 相信这些研究成果对包括哺乳动物在内的脊椎动物的神经肽功能和机制研究起到指导或借鉴作用.

关键词 神经肽, 神经肽受体, 模式动物海兔, 生理功能, 摄食, 位置移动

动物的绝大多数行为(如摄食和位置移动)均可称为动机性行为. 动机性行为的一大特征在于此类行为的发生、终止及转换, 以及进行快慢或强度, 不仅取决于外在的感觉输入, 也受动物的内在状态或动机状态(如饿或饱)调控. 动机状态可影响多种行为的表达, 例如, 饥饿状态可以促进动物对食物的搜寻和摄取, 而饱腹状态则会抑制动物对食物的搜寻和摄取. 大量现代神经科学证据提示动机状态主要是由神经调质

(如生物胺和神经肽)介导^[1-7]. 因为动物行为都受中枢神经系统的神经环路控制, 所以特定神经元释放的神经调质也是通过作用于特定神经环路的神经元来起作用的(图1). 具体讲, 在多种情况下(如在行为状态转变过程中), 神经调质作用于特定神经元的代谢型受体(如G蛋白耦联受体(G protein coupled receptor, GPCRs)), 改变环路元件的内在特性以及环路元件之间的突触联系, 从而增强/抑制行为表达或者改变行为

引用格式: 张果, 郭施琪, 王慧莹, 等. 基于模式动物海兔的神经肽及受体研究. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 387-402

Zhang G, Guo S Q, Wang H Y, et al. Functional studies on neuropeptides and receptors in model animal *Aplysia* (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 387-402, doi: 10.1360/SSV-2021-0155

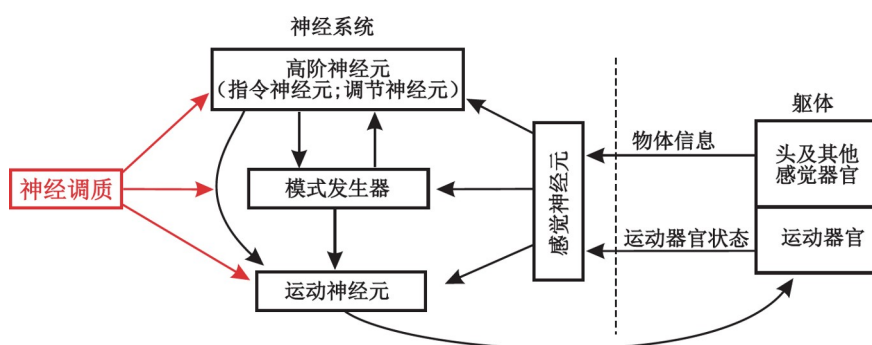


图 1 典型的运动系统示意图及神经调质的调控位点。动物躯体上的头及其他感觉器官向感觉神经元传递从环境和目标物体获得的信息, 不同的感觉信号会分别传递至高阶神经元、模式发生器和运动神经元产生作用。高阶神经元和模式发生器都能各自作用于运动神经元。不同的高阶神经元(包含指令神经元和调节神经元)向运动器官传递激发或调控行为的指令信号, 同时模式发生器则负责产生运动程序。而运动器官状态又会被反馈至感觉神经元, 再对运动网络产生调节作用。神经调质可以作用于高阶神经元、模式发生器以及运动神经元等神经系统中的多个位点。值得一提的是, 许多感觉神经元及高阶神经元和某些动物的运动神经元能释放神经调质(网络版彩图)

Figure 1 A typical schematic diagram illustrating a motor system and the regulatory sites of neuromodulators. The head and other sensory organs of one animal transmit information from the environment and goal objects to sensory neurons, and various sensory signals will be transmitted to higher-order neurons, pattern generators and motor neurons for action, respectively. Both higher-order neurons and pattern generators can independently act on motor neurons. Different higher-order neurons (including command neurons and modulatory neurons) transmit instruction signals to motor organs to elicit or regulate behavior, while pattern generators are responsible for generating motor programs. The state of motor organs will be fed back to sensory neurons and then regulate the motor network. Neuromodulators can act on multiple sites of the neural system, including higher-order neurons, pattern generators and motor neurons. Notably, many sensory neurons, higher-order neurons and some motor neurons can release neuromodulators (Color online)

输出的类型以实现行为状态的改变^[6-8]。因此, 为了研究行为是如何被调控的, 需要探究一个特定的系统中存在哪些类型的神经调质, 这些神经调质由哪些神经元释放, 以及这些神经调质是如何通过作用于特定的神经环路中的神经元从而影响不同行为的表达。神经肽作为种类最多、作用广泛且作用时间持久的一类神经调质, 一直是神经科学领域研究的重点。

1 神经肽概述

1.1 神经肽及受体的概念及发现

神经系统中神经元之间的化学突触传递由神经递质介导。一般来讲, 神经递质(neurotransmitter)包括经典的小分子神经递质以及神经调质(neuromodulator)。其中谷氨酸(glutamate)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)、乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)等小分子神经递质, 其受体主要为离子型受体, 作用较为快速; 而小分子的生物胺(5-羟色胺、多巴胺、去甲肾上腺素、组胺等)和神经肽(3个及以上的氨基酸)等神经调质, 其受体主要为代谢型受体, 比如GPCRs^[9]。由于GPCRs通常需要通过G蛋白及第二信使发挥作用, 所

以神经调质的作用缓慢而持久。神经肽, 也被称为肽类神经调质, 是神经调质中种类最多的一大类, 可由特定神经细胞(例如, 神经环路中的感觉神经元、高阶神经元及某些运动神经元(图1))分泌, 广泛参与神经元之间的信息传递。神经肽由3个或以上的氨基酸组成, 通常与小分子神经递质共同释放发挥作用。速激肽类家族的成员P物质(substance P)是第一个被发现的神神经肽, Euler和Gaddum^[10]于1931年从马的脑和小肠的粗提物粉末中首次检测到该物质能够有效地降血压和刺激肠道收缩, 但由于技术水平的限制, 直到1970年Chang和Leeman^[11]才通过凝胶过滤、离子交换层析和高电压纸电泳的方法, 从牛的下丘脑提取物中分离纯化并最终得到substance P的氨基酸序列。在GPCR的研究方面, 诺贝尔奖得主Lefkowitz及其同事^[12]最早鉴定并克隆出第一个GPCR, 即 β -肾上腺素受体。而第一个被克隆出来的神经肽GPCR是牛的神神经肽K受体(substance-K receptor, SKR)^[13]。后来随着分子生物学、基因工程技术和生物信息学的进步, 科学家们发现了越来越多的神经肽和受体。

在一个典型的运动系统里(图1), 行为的发生主要由局部神经元组成的中枢模式发生器(central pattern

generators, CPG)介导. 模式发生器通常由一部分神经元组成局部环路, 产生特定的环路元件放电时间及协调模式(如节律性神经放电模式). 构成模式发生器的神经元的突触方式主要包括神经元之间的电突触以及小分子神经递质介导的化学突触. 这些模式再通过模式发生器支配的运动神经元输出到运动器官. 模式发生器接受来自感觉神经元传导的外界物体及运动器官状态的信息, 并接受高阶神经元的调控. 实际上, 无脊椎动物和脊椎动物的许多感觉神经元及高阶神经元会通过释放神经调质来调控模式发生器及运动神经元的放电活动, 或者这些神经元之间的突触连接, 从而改变运动输出. 一些无脊椎动物(包括海兔(*Aplysia*))的运动神经元也可以通过释放神经调质来调节神经肌肉的转换(图1).

1.2 神经肽及受体的多样性

神经肽的主要特征在于其种类繁多, 这一方面, 使神经环路具有很大的可塑性, 能够产生各种各样的行为类别或形式^[2,6,7,14]; 另一方面, 也使其研究极具挑战性. 造成神经肽种类多样性的原因主要有以下三种: (i) 编码神经肽基因的多样性. 通常情况下, 无脊椎动物中一个基因只编码同源神经肽中的一种, 随着动物的进化, 在脊椎动物中, 一个基因可以编码几种同源神经肽. 例如, NPY(neuropeptide Y)神经肽家族, 在无脊椎动物(如海兔)中一个NPY基因只编码产生一种神经肽NPY; 但是在脊椎动物中一个NPY基因可以编码产生三种同源神经肽: NPY, PYY(peptide YY), PP(pancreatic polypeptide). 在哺乳动物中, NPY在中枢神经系统中表达, 诱发食欲、影响生理节律、疼痛传递和释放垂体激素, 影响血管收缩和抗焦虑; PYY在肠道内分泌细胞中表达, 抑制肠道收缩和分泌, 降低食欲; PP在胰岛细胞中表达, 和PYY具有相似的作用. 在非哺乳动物中, 有关NPY神经肽家族的作用信息较少, 大多与摄食行为相关. 由此可以看出, 编码神经肽基因的多样性会使神经肽种类和功能具有多样性^[8,15]. (ii) 神经肽前体加工方式的多样性. 动物体内的神经肽由神经肽前体经过剪切加工而成, 一个神经肽前体经过切割可以产生多种神经肽, 有些神经肽在前体中可能有两个或更多的拷贝数(图2). 一个典型的例子是海兔神经肽leucokinin前体, 其由2025个氨基酸组成, 经过质谱检测, 可以产生40种神经肽, 其中一个

神经肽在该前体中有20个拷贝^[16]. 值得一提的是, 对于许多神经肽前体, 研究者大多只关注其中拷贝数多且明显具有生物活性的少数几个神经肽, 而前体产生的其他神经肽则被认为是生物合成过程中的副产物. 然而, 有研究表明这些神经肽可能在细胞与细胞之间的信号传递过程中也发挥着重要的作用^[17]. 此外, 神经肽前体在不同的组织、细胞类型或生理状态下, 切割过程可能不同^[18]. (iii) 神经肽翻译后修饰的多样性. 神经肽前体产生的同一个神经肽, 经过不同的蛋白翻译后修饰过程(post-translational modifications, PTMs), 可能具有不同的生物活性. 大多数神经肽都需要经过PTMs, 常见的PTMs包括酰胺化^[19]、糖基化、磷酸化、二硫键的形成^[20,21]以及神经肽中一个特定氨基酸从L-型变为D-型(即含D-型氨基酸神经肽)^[22,23]等(图2).

神经肽种类多样性是其作用广泛多样的基础. 重要的是, 神经肽所作用的受体及其信号通路也具有多样性, 这种特征也对神经肽的多功能性做出了重要贡献. 具体讲, 内源性的神经肽与受体的相互作用比较复杂. 一种神经肽可能只有一个受体, 也可能有多个受体; 多种神经肽可能作用于同一受体, 也可能作用于多个不同的受体^[18]. 同时, 不同的受体可以通过至少三种G α 蛋白的不同信号通路作用于下游靶标^[9](图2).

2 神经肽的鉴定方法

神经肽种类的多样性使其鉴定相对困难. 但随着科学技术的发展, 目前可以利用生物化学方法、分子生物学方法、生物信息学方法以及质谱方法等多种方法来发现新颖的神经肽. 而在具体操作中, 则通常组合使用以上方法中的两个或多个.

早期由于技术水平的限制, 研究者通常采用生物化学的方法, 从生物组织或特定细胞中提取蛋白质, 并利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)纯化神经肽. 例如, Cropper等人^[24]从1000只海兔中分离30 g齿舌附属肌肉, 然后通过反相高效液相色谱得到神经肽myomodulin. 该方法适合研究成年动物特定细胞表达的不同神经肽, 或者研究动物在生长和发育过程中不同阶段的神经肽特征; 但缺点是需要大量的生物材料, 而且步骤较为复杂.

随着分子生物学和基因组测序技术的进步, 研究

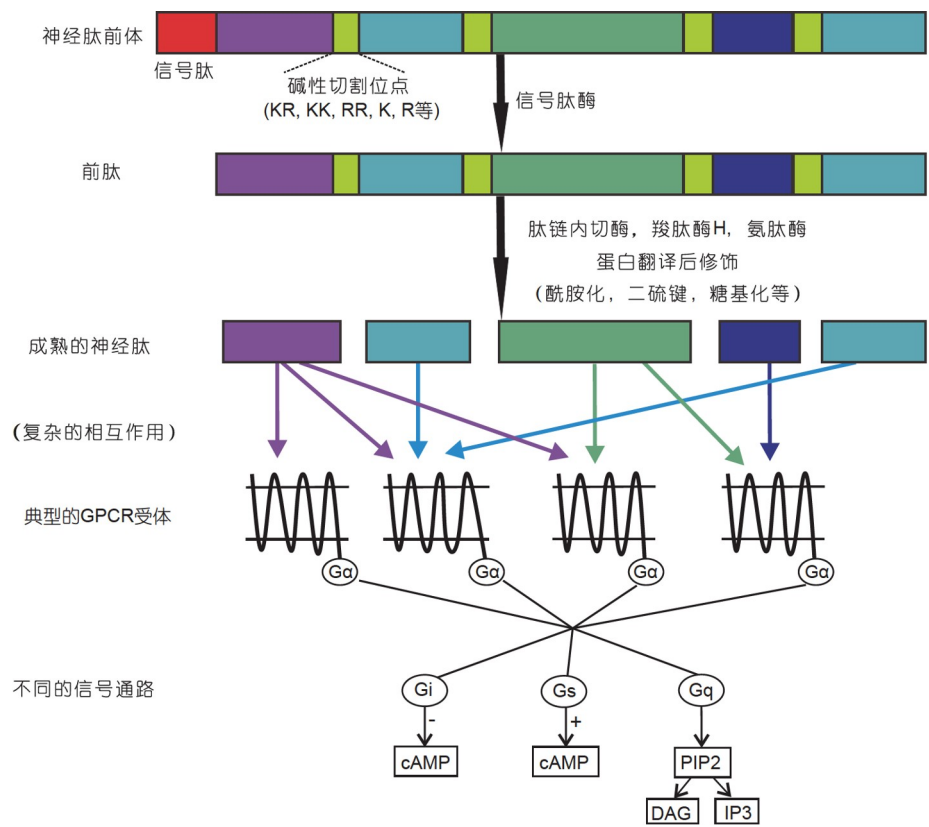


图 2 神经肽的产生过程及其作用的受体. 神经肽由神经肽前体经过信号肽的切割, 及通过识别碱性切割位点(黄色)剪切加工而成, 而有活性的神经肽通常需要经过蛋白翻译后修饰. 一个神经肽前体可以产生多个不同的神经肽(紫色、青色、绿色和蓝色表示), 同一个神经肽可能有多个拷贝数(青色标记的神经肽). 神经肽通常作用于具有7次跨膜结构域的GPCR, 激活不同类型的G α 蛋白(如Gi, Gs, Gq), 后者由不同的信号通路传递信息. 从图中可以看出, 一种神经肽可以作用于多个受体, 而一个受体也可能被多种神经肽激活

Figure 2 The generation of mature neuropeptides and the receptors that neuropeptides act on. Neuropeptides are generated from neuropeptide precursors by the removal of a signal peptide and further splicing through recognizing basic splicing sites (shown in yellow) and processing. Active neuropeptides often require post-translational modification. A single neuropeptide precursor can produce multiple neuropeptides (shown in purple, cyan, green, and blue), and the same neuropeptide may have multiple copies (cyan labeled 2 neuropeptides). Neuropeptides normally act on GPCRs, which have seven transmembrane domains, to activate different types of G α proteins (e.g., Gi, Gs, Gq). G α then transduces information through different signaling pathways. As shown in the figure, one neuropeptide can act on multiple receptors, and one receptor may be activated by multiple neuropeptides

者可以根据相近物种间同源神经肽的前体序列的相似性, 通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR), 设计引物对可能的神经肽前体进行分子克隆, 得到潜在的神经肽. 此外, 基于分子克隆的代表性差异分析法(representational difference analysis, RDA)可以用于识别特定神经元中新颖的神经肽. 其基本原理是利用两种可识别的神经元, 其中一种是非肽能的或者含有已知神经肽的神经元, 作为driver neurons; 另一种是所要研究的对象, 作为tester neurons, 根据两者cDNA的差异, 得到tester neurons中包含的特异的神经肽前体序列. 例如, Jing等人^[25]利用RDA方法发现了海

兔摄食环路中指令神经元CBI-4(cerebral-buccal interneuron-4)(图3A)中含有促咽侧体素相关神经肽(allatotropin-related peptide, ATRP). Zhang等人^[16]通过RDA方法发现了海兔神经组织中新颖的神经肽leucokinins. 该方法在脊椎动物中也有应用, 比如Dong等人^[26]通过RDA方法分析野生型小鼠和Ngn1^{-/-}缺失型小鼠背根部神经的基因组差异, 发现了与疼痛/痒觉相关的一些GPCRs. 总的来说, RDA方法对于可识别神经元中特异蛋白(包括神经肽)的发现具有很大的优势. 但是此方法一般要求细胞可识别, 并且需要合适的细胞作为driver neurons, 因此RDA方法也有一定的局限性.

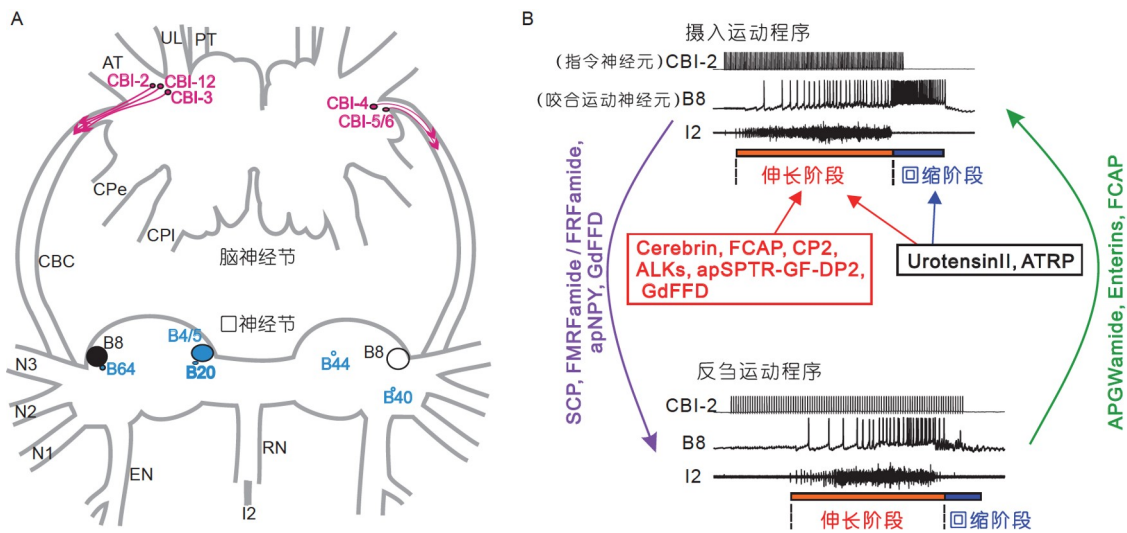


图 3 海兔的摄食神经环路及调控摄食运动程序的相关神经肽。A: 海兔中枢神经系统与摄食行为相关的可识别神经元在脑神经节(高阶神经元CBIs)及口神经节(模式发生神经元B64, B40, B20, B4/5及运动神经元B44, B8等)的位置; B: 神经肽对海兔摄食运动程序的不同调控作用。其中神经肽Cerebrin, FCAP, CP2, ALKs, apSPTR-GF-DP2, GdFFD主要作用于齿舌伸长阶段; 神经肽UrotensinII, ATRP同时作用于齿舌伸长和回缩阶段; 神经肽SCP, FMRFamide/FRFamide, apNPY, GdFFD能够使摄入运动程序转变为反刍运动程序; 而神经肽APGWamide, Enterins, FCAP能够使反刍运动程序转变为摄入运动程序

Figure 3 The *Aplysia* feeding circuit and some neuropeptides that modulate *Aplysia* feeding motor programs. A: *Aplysia* CNS controlling the feeding behavior, and locations of several identifiable neuronal elements in the cerebral (higher-order neurons, CBIs) and buccal ganglia (pattern generators B64, B40, B20, B4/5 and motor neurons B44, B8 etc.); B: different modulatory effects of neuropeptides in *Aplysia* feeding motor programs. Neuropeptides Cerebrin, FCAP, CP2, ALKs, apSPTR-GF-DP2, and GdFFD primarily modulate the protraction phase; while neuropeptides UrotensinII and ATRP act on both the protraction phase and the retraction phase. Neuropeptides SCP, FMRFamide/FRFamide, apNPY, and GdFFD can convert ingestive programs into egestive programs; however, neuropeptides APGWamide, Enterins, and FCAP can convert egestive programs into ingestive programs

此外, 基于转录组学的表达序列标签方法(expressed sequence tag, EST)和基于基因组学的生物信息学方法也有力促进了神经肽的发现。例如研究者通过EST方法发现了沙漠蝗虫中截短神经肽Neuropeptide F(truncated NPF, trNPF)^[27,28]、长红锥蝽(*Rhodnius prolixus*)神经肽Orcokinin B^[29]以及海兔SPTR家族神经肽^[30,31]等, 而线虫神经肽FMRFamide-like peptides (FLPs)^[32,33]、insulin-like peptides^[34]的发现得益于线虫基因组测序的完成。然而, 通过生物信息学方法得到的神经肽只是预测的结果, 该神经肽是否真正在动物体内表达并发挥功能, 还需要通过进一步实验验证。

综上所述, 虽然通过生物化学方法能够得到纯化的神经肽, 由分子生物学方法能检测出神经肽前体的基因序列, 采用生物信息学方法能够预测神经肽的存在, 但是神经肽前体复杂的加工过程和表达模式需要通过质谱方法的进一步确认。由于质谱方法的高分辨率, 其能够检测出神经肽的氨基酸组成, 以及几乎所有的翻译后修饰, 因此质谱方法是目前用于识别和表

征神经肽信号分子最重要的方法之一。其中基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)具有高灵敏度的特点, 被广泛用来识别微量(单个或几个神经元)的神经肽及鉴定神经肽的蛋白翻译后修饰。例如, Romanova等人^[21]利用质谱方法检测海兔神经肽apUII时, 理论上apUII m/z 为3080.7, 质谱结果显示 m/z 为3078.75, 比理论质量少了2 D, 根据apUII氨基酸残基的性质, 表明结构中存在一个二硫键。

值得一提的是, 其中一种蛋白翻译后修饰, 采用质谱方法对其检测具有一定的挑战性。具体讲, 真核生物中的蛋白质(包括神经肽)都是利用L-型氨基酸翻译, 所以在修饰前其氨基酸都是L-型。有证据表明, 在一些动物中, 某些神经肽的其中一个氨基酸(通常是N-末端的第二位)会通过翻译后修饰转化为D-型氨基酸, 即产生含D-型氨基酸神经肽^[22], 而且, 很多情况下, 含D-型氨基酸神经肽比其L-型的差向异构体的生物活性要

高. 重要的是, 含D-型氨基酸神经肽及其差向异构体的分子质量是一样的, 所以简单的质谱方法不足以识别这种修饰. Bai等人^[35]通过生物信息学比较, 并采用多种质谱方法, 在海兔摄食环路中识别了一个促进反刍运动程序的含D-型氨基酸神经肽, 而且其L-型差向异构体完全没有活性. 这项研究是第一次在一个清晰的神经环路中发现含D-型氨基酸神经肽的功能. Livnat等人^[36]进一步开发了一种系列检测方法, 这种方法可以在组织或细胞中没有偏好性地识别含D-型氨基酸神经肽. Checco等人^[37]系统地研究了含D-型氨基酸神经肽及其衍生物对其受体^[38]在神经环路中的作用. 有趣的是, Checco等人^[23]的另一项研究还发现, 先前已证明有生物活性的ATRP^[25]也存在含D-型氨基酸神经肽的差向异构体, 而且后者也具有活性. 本文涉及的主要神经肽及鉴定方法见表1.

3 神经肽的作用方式

3.1 神经肽的受体特征及鉴定方法

在所有动物神经系统的单个神经元中, 神经肽与小分子神经递质共存并释放是一种常见的现象. 它们能够通过相同或者不同的靶标(比如受体)发挥作用^[50,51]. 重要的是, 神经肽和一些小分子神经递质的受体类型通常不同^[52], 大多数神经肽的受体是代谢型受体, 即GPCRs, 作用缓慢而持久; 而小分子神经递质的受体通常是离子型受体, 作用比较快^[53].

然而, 少数神经肽的受体比较特殊, 例如, 水螅神经肽RFamides的受体是离子型受体DEG/ENaC(degenerin/epithelial Na⁺ channel), 这表明少部分神经肽也可以通过离子型受体快速传递信号^[54]. 此外, 无脊椎动物中的神经肽胰岛素, 则通过酪氨酸激酶介导的胰岛素受体传递信号^[55].

在不同动物中, 即使同源的神经肽, 其序列可能也不尽相同, 因此研究介导神经肽功能的神经肽受体, 对于物种间同源神经肽的发现具有重要的意义. 实际上, 神经肽前体序列中通常只是神经肽序列本身相对保守, 而前体中神经肽之外的序列保守性低; 而且同一种神经肽在不同物种的神经肽前体中的个数也可能不一样. 因此, 单纯通过比较神经肽前体的序列来研究不同物种间神经肽的进化关系非常困难. 相反, 神经肽受体(GPCRs)的序列在不同物种间相对保守. 最近, Jé-

kely^[56], Mirabeau和Joly^[57]通过计算方法, 结合神经肽及其已知受体的数据, 鉴定了大量的神经肽家族及其GPCRs在不同物种间的相似性及进化关系. 这样, 一些神经肽及其受体的进化关系被阐明, 比如他们的数据表明, 先前分别鉴定出来的无脊椎动物昆虫的促咽侧体素(allatotropins)(包括海兔的ATRP)^[25,58]与脊椎动物的食欲肽(orexins)^[59-61]是同源的; 脊椎动物的神经肽neuropeptide-S信号途径与甲壳纲动物的神经肽CCAP(crustacean-cardioactive peptide)信号途径相似^[53,56,57].

重要的是, 神经肽受体的鉴定对于神经肽发挥作用的分子机制研究具有关键作用^[18]. 目前常用的神经肽受体鉴定方法有以下三种. (i) 通过转录本表达识别候选受体: 首先通过检测神经肽对细胞系或生物组织是否有应答(例如cAMP积累, 钙离子流等), 筛选出可能的受体. 然后, 对神经肽有反应的组织比较受体转录本, 以获得候选受体. 接着, 在重组受体的细胞激活试验中, 对潜在受体进行鉴定. 该方法主要用于发现GPCR孤儿受体(orphan receptor). (ii) 通过高通量筛选(high-throughput screening)识别神经肽受体. 首先人工合成相关的神经肽, 然后将这些神经肽可能的受体在细胞系中表达, 进行细胞实验, 通过检测信号通路的第二信使分子(如IP₃, cAMP, Ca²⁺等)(图2)的变化情况, 鉴定是否为神经肽的受体. 该方法能够通过实验直接检测配体-受体的相互作用, 减少假阳性, 但缺点是比较耗时. (iii) 使用化学探针捕获配体-受体相互作用的方法. 将经典的亲和富集方法与共价交联结合, 用于分离神经肽的受体, 并运用质谱及分子生物学方法对分离得到的受体进行蛋白测序. 该方法没有偏好性, 使其能够发现与神经肽有相互作用的多种受体, 也因此, 基于化学捕获方法得到的受体可能存在假阳性, 需要通过后续的实验检测出具有特异性相互作用的受体^[18]. 这些进展有望为治疗人类中枢神经和内分泌系统的相关疾病提供新的靶点.

3.2 神经肽的突触作用模式

神经肽由突触前神经元释放后, 需要与神经肽受体结合, 并通过直接或间接两种方式作用于突触后神经元, 进而影响神经环路的功能. 首先, 神经肽可以通过作用于突触后神经元的胞体、轴突或树突上的受体, 改变离子通道的活性, 直接影响突触后神经元的兴

表 1 本文涉及的主要神经肽及鉴定方法

Table 1 The main neuropeptides discussed in the paper and their identification methods

神经肽种类	鉴定方法	进化特征	参考文献
substance P	生化方法提取材料, HPLC	(速激肽家族) 原口、后口动物	[10,11]
apNPY (<i>Aplysia</i> neuropeptide Y)	RP-HPLC, 质谱, 分子克隆	(神经肽Y家族) 原口、后口动物	[39]
<i>Aplysia</i> buccalin	生化方法提取材料, HPLC	原口动物(buccalin/allatostatin-A)、后口动物(galanin)	[40]
ATRP	RDA方法	原口动物(促咽侧体素家族)、后口动物(Orexin家族)	[25]
<i>Aplysia</i> Urotensin II	RDA方法	(Urotensin家族) 原口、后口动物	[21]
<i>Aplysia</i> SCP (small cardioactive peptide)	生化方法提取材料, HPLC	原口动物	[41~43]
<i>Aplysia</i> myomodulin	生化方法提取材料, HPLC	原口动物	[24]
线虫FLPs	基因组测序, 生物信息学方法	原口动物	[32,33]
<i>Aplysia</i> CP2 (cerebral peptide 2)	HPLC	原口动物	[44]
<i>Aplysia</i> APGWamide	cDNA文库筛选, 分子克隆	原口动物	[45]
<i>Aplysia</i> Enterins	生化方法提取材料, RP-HPLC, 分子克隆	原口动物	[46]
<i>Aplysia</i> cerebrin	生化方法提取材料, HPLC, 质谱	原口动物	[47]
<i>Aplysia</i> FCAP (feeding-circuit activating peptide)	HPLC, 质谱	原口动物	[48]
apSPTR-GF-DP2 (<i>Aplysia</i> SPTR-Gene Family-Derived Peptide 2)	EST方法, 质谱	原口动物	[30]
<i>Aplysia</i> FRFamide, FMRFamide	生物信息学方法, 分子克隆	原口动物	[49]
长红锥螬Orcokinin B	EST方法	原口动物	[29]
<i>Aplysia</i> GdFFD	生物信息学, 质谱	原口动物	[35]
沙漠蝗虫trNPF	EST方法	原口动物	[27]
ALKs (<i>Aplysia</i> leucokinin-like peptides)	RDA方法, 质谱	原口动物	[16]

奋性。其次, 神经肽可以通过激活突触前轴突末端的受体, 采用多种方式(例如, 改变电压门控的钙离子通道, 改变钾离子通道的电导, 改变离子通道或通道相关蛋白的磷酸化水平以及改变与囊泡移动或者膜融合相关蛋白的活性等), 使小分子神经递质, 比如兴奋性的谷氨酸或者抑制性的GABA的释放增加或减少, 间接影响突触后神经元的兴奋性^[52]。

4 神经肽生理功能的研究方法

如上所述, 神经肽及其受体的种类繁多, 作用广泛。为了研究神经肽的生理功能, 首先需要检测神经肽及其受体在中枢神经系统的分布, 然后通过功能测定来鉴定其可能具有的作用。

由于神经肽是由神经肽前体经过切割加工而成, 并通常通过蛋白翻译后修饰形成具有生物活性的神经肽(图2), 所以研究者可以通过Northern blot和原位杂交(*in situ* hybridization)的方法检测神经肽前体mRNA在中枢神经系统中的分布。其中Northern blot主要检测神经肽前体mRNA在各组织或细胞中表达量的差异^[62]。而脑片或者神经节的原位杂交主要检测神经肽前体mRNA在中枢神经系统中的位置分布^[63]。具体讲, 对于哺乳动物, 可以利用脑切片; 对于无脊椎动物, 有些神经节比较小, 可以将整体神经节用全标本包埋(whole-mount)的方法来做原位杂交。此外, 免疫组化(immunohistochemistry)常用来检测神经肽在中枢神经系统细胞中的分布, 同样地, 该方法可以针对组织切片或者整体神经节使用。通常以神经肽前体产生的可能

有活性的特定神经肽作为抗原制备相应的抗体。一般来讲, 原位杂交通常只染色阳性神经元的胞体, 而免疫组化则可染色表达神经肽的神经元的胞体及其神经纤维。

综合Northern blot、原位杂交、免疫组化等多方面的实验结果, 研究者可以判断神经肽的组织 and 细胞分布。因为神经系统中各个区域或者神经节中每个细胞或细胞簇的功能可能有所不同, 由此可以初步推测神经肽可能具有的功能。

根据神经肽的组织 and 细胞分布, 研究者可以采用行为学和离体神经环路实验等方式, 研究神经肽在行为的产生及进行中的调控功能。首先, 研究者可以通过行为学实验研究神经肽具体的生理功能。例如: Jing等人^[8]发现, 海兔神经肽apNPY主要分布在与海兔摄食行为相关的脑神经节和口神经节, 因此他们首先通过行为学实验证明apNPY对摄食行为的作用。Jing等人^[8]把金属丝电极植入整体动物, 通过记录口神经节的神经radula nerve(RN)和口神经nerve 2(N2)监测运动程序的种类, 发现随着进食的发展, 动物行为从最初的摄入变为反刍。同样, 对海兔注射apNPY后喂食食物(海藻), 发现和注射人工海水的对照组相比, 注射apNPY的海兔摄食量减少。这些实验提示apNPY可能使海兔由饥饿状态转变为饱腹状态。

通过行为学实验可以初步判断出神经肽引起动物行为的变化, 但是具体的机制仍需要在神经环路水平上研究。海兔从饥饿状态到饱腹状态的转变可能与神经网络的重置相关, Jing等人^[8]又通过神经节离体实验进一步在神经环路水平对apNPY的作用机制进行了深入研究, 结果发现apNPY能够使指令神经元CBI-2(图3A)诱发的摄入运动程序转变为反刍运动程序, 并且在细胞水平上, 能够增加与反刍相关的中间神经元B20的活性, 降低与摄入相关的中间神经元B40的活性。因此海兔由饥饿状态转变为饱腹状态是由apNPY重新配置摄食环路中的中枢模式发生元件来实现的。

总之, 研究者将行为学实验和离体神经环路实验结合, 可以在动物行为和环路机制两方面对神经肽的功能进行阐释。相较而言, 高等动物的行为较为复杂, 神经环路中的神经元较难识别。因此利用神经系统相对简单的模式动物对神经肽进行相关研究, 可以提供重要的环路及机制信息。

5 研究神经肽的常用模式动物

由于无脊椎动物的神经系统相对简单, 细胞容易识别, 能够进行精细操作; 而且, 虽然无脊椎动物神经环路相对简单, 但是具有同脊椎动物相同的主要行为类别(觅食、逃避和生殖等), 其神经环路也有相似的基本元件及功能。所以, 事实上, 目前神经肽的发现及作用机制有相当一部分来源于对无脊椎模式动物的相关研究^[6,7,64]。

例如, 随着模式动物线虫基因组测序的完成, 线虫中大量的神经肽被发现, 包括insulin-like peptides, FMRFamide, non-insulin peptides等, 其中insulin-like peptides在哺乳动物中有同源神经肽^[32,33]。研究表明, 它们在摄食、位置移动和生殖等动物行为中发挥调控作用^[65], 这对脊椎动物中相关神经肽的研究具有指导或参考作用。

另外, 昆虫类的模式动物也有一定的优势。比如神经肽leucokinin^[66]最先在蟑螂中发现。这归因于蟑螂繁殖能力强, 可以短期内获得大量可用神经组织的特点, 适合采用生物化学的方法从组织中提取并鉴定神经肽。此外, 果蝇的基因组测序也已经完成, 研究者可以利用生物信息学的方法发现大量的神经肽^[7,67], 重要的是, 还可以采用分子遗传学手段探索神经肽的信号途径及其功能, 这也使得果蝇成为研究神经肽的一种重要的优势模型动物。

此外, 甲壳纲动物(比如螃蟹及龙虾)的神经系统, 尤其是其口胃神经系统(stomatogastric nervous system, STNS)是研究神经肽的另一个优势模式系统^[6,68]。由于该系统中的口胃神经节(stomatogastric ganglion, STG)包含的神经元数目比较少(25~30个神经元), 而且成体动物STG神经元之间的突触联系已经被鉴别, 这使得甲壳纲动物STG成为研究神经肽对神经网络可塑性作用的优势模型^[2,51,69,70]。在STG中可以检测到很多神经肽, 例如, allatostatin, allatotropin, CCK(cholecystokinin), myomodulin, proctolin等。虽然甲壳纲动物STNS神经环路相对简单, 但是运动模式输出的改变也是由大量的神经肽参与调控的。这些发现极大地促进了脊椎动物神经环路的运作在细胞水平的机制研究。

接下来主要关注神经肽在另一种优势模式动物——软体动物加州海兔(*Aplysia californica*)的相关研究进展(也见第4节及第2节)。

6 软体动物海兔神经肽的研究进展

6.1 利用海兔研究神经肽的优势

近几十年来, 科学家们利用海兔作为模式动物对神经肽进行了广泛研究, 鉴别出了多种神经肽及其功能. 海兔作为模式动物研究神经肽具有以下优势: 首先, 海兔体内的神经元数量比较少, 大约20000个细胞; 其次, 神经元胞体比较大, 有些胞体的直径可达1000 μm , 易于采用生化方法或者显微操作技术分离单细胞; 此外, 海兔体内大多数神经元, 尤其是与摄食^[71]或者缩鳃反射神经环路^[72]相关的神经元已经被识别, 神经元的内在特性和神经元之间的突触联系也研究得比较透彻. 可识别的单个神经元有利于确定神经元所含有的小分子神经递质或调质(比如神经肽)以及描述这些神经递质的功能. 具体地说, 通过细胞内注射色素以及免疫组化的双染色方法, 可以识别单个神经元所含有的神经递质, 包括神经肽. 还可在离体中枢神经系统里, 用电压钳的方法来研究这些单个可识别神经元的离子电流, 这些离子电流是否被诸如神经肽的神经调质所影响, 及影响这些离子电流的信号转导通路. 重要的是, 与其他无脊椎动物一样, 海兔也具有所有动物的基本行为类型, 包括觅食、位置移动和生殖等^[73]. 目前海兔神经肽的研究进展相当一部分来自于对摄食行为调控机制的研究^[64,74].

海兔通过口器里的一个被称为齿舌(类似于舌头)的器官进行摄食, 该器官能够牢牢咬住食物, 使食物可以被摄入食道或者从口器中吐出. 海兔的摄食行为具有节律性, 每个周期都由齿舌的“伸长”(protraction)和“回缩”(retraction), 以及齿舌的“打开”和“咬合”两组动作组成. 绝大部分摄食行为都是以齿舌伸长阶段开始, 回缩阶段结束. 摄食相关的行为主要有两种类别: 即摄入和反刍. 在摄入和反刍行为中, 齿舌伸长、回缩与齿舌打开、咬合这两组运动的联合方式是不同的. 在摄入行为里, 齿舌在回缩时是咬合的, 从而摄入食物; 在反刍行为里, 齿舌在伸长时是咬合的, 从而推出食物或不能吃的物体^[75,76](图3B).

控制海兔摄食行为的摄食环路由位于脑神经节的高阶神经元(包括指令神经元)和位于口神经节的中枢模式发生器以及运动神经元组成(图3A). 摄食环路中的大多数神经元可以识别^[77-89], 而且此环路也是海兔乃至无脊椎动物中的一个研究最为透彻的复杂行

为神经环路. 研究人员一般可以通过三种实验设置研究海兔摄食环路. (i) 整体实验设置. 在该实验中动物是活体的, 研究人员通过把金属丝电极埋植在运动神经元轴突的外周神经上, 记录整体情况下运动神经元的放电模式. (ii) 半离体实验设置. 该实验保留了中枢神经系统的一部分外周系统(例如, 头部和口器), 研究人员可以通过食物诱发摄食行为的产生, 同时记录特定神经元的电活动. 该实验是整体实验设置的简化, 用于需要外界刺激诱发的摄食行为的神经环路研究. (iii) 离体实验设置. 该实验只保留海兔中枢神经系统. 在摄食行为的神经网络研究中, 可以只保留与摄食相关的脑神经节和口神经节, 通过刺激脑神经节中的指令神经元或口神经节中的CPG元件或特定神经来诱发虚拟的摄食行为(即摄食运动程序). 海兔中枢神经系统的离体实验和在体/整体实验具有相匹配的实验效果^[75,76,80,90-93], 表明在离体神经节记录到的摄食运动程序可以很好地表征整体动物的摄食行为(摄入或反刍). 所以, 当前研究人员大多采用离体实验设置, 其优点是可以同时记录多个可识别神经元及外周神经, 方便探究海兔的摄食运动程序的环路及突触机制.

为了应对外界的环境变化和内在的动机状态, 海兔摄食行为可以在两方面发生变化. 第一, 行为可以在同一类别的行为中变化. 具体讲, 海兔在发生摄入行为时, 随着时间的推移, 一些运动参数(比如运动神经元的激活水平以及齿舌伸长和收缩的持续时间)会产生变化, 从而使摄食行为速度发生变化^[94,95]; 第二, 行为可以从一种类别转变为另一种类别. 比如, 随着海兔不断摄入食物直到它最终产生饱感, 海兔的摄食行为就从早期的摄入行为逐渐转化为后期更加倾向于反刍的行为^[8]. 目前海兔体内发现的神经肽大多是对摄食行为这两方面的变化进行调控, 从而使海兔更好地适应环境并生存下去.

值得一提的是, 早期海兔摄食行为及神经肽的研究主要关注于口神经节中的运动神经元或者其支配的肌肉. 这是因为运动神经元足够大、肌肉组织也较多, 有利于通过生化(例如HPLC)的方法来识别新颖的神经肽, 比如myomodulin^[24], buccalin^[40]正是在海兔中首次发现, 然后才在其他物种中陆续发现^[53,56,57]. 这些神经肽对神经肌肉的转换起到了重要的调控作用^[64,74]. 下文主要总结神经肽在海兔中枢神经系统神经环路中

的作用及已有的机制研究(图3B)。

6.2 调控摄食行为多样性及可塑性的神经肽研究

目前在海兔神经组织中已发现多种神经肽能够通过影响摄食运动程序的两个相位的持续时间, 改变摄食周期的时间, 进而改变摄食行为的速率。例如, 神经肽CP2^[96], *cerebrin*^[47], ALKs^[16], apSPTR-GF-DP2和FCAP^[31]能够缩短齿舌伸长阶段的持续时间; 而高阶神经元CBI-4分泌的神经肽ATRP在缩短齿舌伸长阶段的持续时间的同时, 也增加齿舌回缩阶段的持续时间, 从而使CBI-4诱发的运动程序倾向吞咽^[25]; Urotensin II能够同时缩短齿舌伸长阶段和回缩阶段的持续时间, 并抑制摄食运动程序, 以促进饱腹感的产生^[21]。

神经肽大多通过作用于控制节律性行为的神经环路中的相位终止子(phase terminators)的兴奋性, 改变相位的持续时间, 进而改变一个周期的持续时间, 导致行为速度改变。由于神经环路中可能有不止一种相位终止子, 因此不同的神经肽可能特异性作用于不同的相位终止子, 从而发挥作用。目前发现海兔摄食神经环路中存在两个相位终止子B64^[78]和CBI-5/6^[97,98], 例如, Zhang等人^[16]发现海兔神经组织中的神经肽ALKs(释放的神经元还有待鉴定)和apSPTR-GF-DP2(由摄食指令神经元CBI-12释放)虽然都能够使齿舌伸长阶段的持续时间缩短, 但是ALKs通过提高相位终止子B64的兴奋性发挥作用, 而apSPTR-GF-DP2对B64的兴奋性没有显著影响^[31]。

另外, 海兔的摄食行为存在一种被称为“重复启动效应”(repetition priming)的记忆现象。重复启动效应指的是随着一个行为的不断重复, 该行为变得更加完善及有效。虽然重复启动效应在脊椎动物(包括人类)中普遍存在, 但机制不明。在海兔中, 研究人员发现在重复刺激摄食指令神经元CBI-2以诱发一系列摄食运动程序时, 咬合运动神经元B8或打开运动神经元B44的放电频率在最初几个运动程序中较低, 不能引发有效的咬合动作。然而, 随着时间的推移, 运动程序中B8/B44的放电频率逐渐增强, 直到产生正常咬合/打开动作^[99-101], 并可在CBI-2的持续刺激下一直维持下去。一系列的研究表明, 其中的一种机制可能是: CBI-2所包含的神经肽FCAP及CP2在刺激过程中不断释放, 作用到靶标细胞的GPCRs而产生的累积效应来介导重复启动效应^[99-105]。

6.3 调控摄食行为类别的神经肽研究

当动物饥饿时, 需要摄入食物; 而当动物从饥饿到饱腹的过程中或者接触到不可食用的食物时, 摄食行为通常会由摄入转变为反刍。已有研究表明, 海兔体内多种神经肽参与调控上述动机状态的变换。例如, 神经肽SCP^[43], apNPY^[8], FRFamides和FMRFamide^[49], GdFFD/GdYFD^[35,36]使摄食运动程序由摄入转变为反刍; 而神经肽APGWamide^[80,92], Enterins^[46]和FCAP^[101]使摄食运动程序由反刍转变为摄入。神经肽介导摄食行为类别的转换通常是通过使摄食环路中模式发生元件之间的突触联系发生重置或者改变中间神经元的放电活动来实现的。例如: 神经肽apNPY在使指令神经元(CBI-2)诱发的摄入运动程序转变为反刍运动程序时, 能够增加与反刍相关的模式发生元件B20的活性, 降低与摄入相关的模式发生元件B40的活性, 而这两个模式发生元件与下游运动神经元B8的突触联系不同, 因此使摄食运动程序类别发生改变^[8]; 相反, 高阶神经元CBI-3则是通过GABA和APGWamide分别快抑制B20和慢抑制B4/5, 从而抑制反刍程序, 并快兴奋B40以促进摄入运动程序^[80,92,106]。

实际上, 在脊椎动物中, 多个神经肽能在从饿到饱的动机状态的转换中释放, 以抑制摄食行为。因此这些神经肽能导致食物摄取减少及体重降低, 所以它们被称为饱食肽(satiety peptides)^[107,108]。上述在海兔中发现的多个神经肽, 包括SCP^[43], apNPY^[8], FRFamides和FMRFamide^[49], GdFFD/GdYFD^[35,36]都促进反刍运动程序, 所以, 它们可能对从饿到饱的动机状态的转换中发挥了类似的作用, 也可以称为饱食肽。这些发现也提示脊椎动物与无脊椎动物的摄食调控机制比较保守。

6.4 海兔神经肽参与多种行为的协调性表达

动机状态的变换通常伴随着多个行为的改变, 因此推测介导动机状态的神经调质(比如神经肽)可能影响多种行为而促成多个行为协调地表达。为此, 检验了三种在摄食环路中具有生物活性的神经肽对位置移动反应的作用, 发现了能引发摄食活动的神经肽FCAP^[48]对位置移动反应表现出抑制作用, 这有可能为在摄食行为进行时对位置移动所产生的抑制作用提供神经基础。在从饿到饱状态转换中具有重要作用(即

增进反刍行为)的另外两个神经肽(apNPY^[8], SCP^[43]), 表现出能够增强位置移动的作用, 这有可能为动物饱食后位置移动行为的引发提供神经基础. 后续实验正在针对这些神经肽的环路及突触机制, 和神经肽的靶标(比如受体)等方面开展. 这些研究有望使人们对拮抗行为(如食物的摄入和位置移动)间有序表达的神经机制获得全新的认识.

7 总结与展望

本文介绍了一些无脊椎动物模型系统(尤其是软体动物海兔)的神经肽及其受体的研究进展. 有趣的是, 尽管许多神经肽的研究最初开始于脊椎动物模型系统(例如, Tachykinin(速激肽)的一个成员 substance P^[10]), 但是无脊椎动物模型系统对该研究也起到了关键的推动作用, 特别是研究多种神经肽在调控行为的特定神经环路中发挥的作用. 无脊椎动物海兔的一大优势是, 可以利用环路元件清楚, 神经递质(和/或神经调质)和突触连接已知的神经环路研究神经肽的作用. 比如, 在海兔摄食系统中, 运动神经元中具有类似功能的多种神经肽在神经肌肉信息转化中的作用研究是一个典型的例子. Brezina等人^[74]的研究表明, 单个神经肽的作用不能达到多个神经肽共同产生的效应. 因此, 为了使动物适应复杂的环境, 在一个神经系统内利用多种神经调质调控运动输出是必要的. 随着控制海兔摄食行为及其他行为的中枢神经环路中越来越多的神经肽的作用被阐明, 有望对中枢神经环路中的不同神经肽如何独立或协同发挥作用产生适应性运动输出, 做出新的认识. 值得一提的是, 利用海兔这种具有实验优势的模式动物进行包括神经肽在内的神经调质的研

究, 除了有助于探究摄食、位置移动等动机性行为的产生及调控机制, 也对学习记忆^[72,109~111]、动物发育^[112,113]等多个神经科学领域的发展起到推动作用.

未来神经肽研究会更加注重将神经肽与其受体相结合起来以阐明相关科学问题, 这些研究将会更富有效. 事实上, 随着越来越多的无脊椎动物(或原口动物, 从发育的角度来讲, 原口动物包括大部分的无脊椎动物, 而后口动物包括脊椎动物和少数无脊椎动物)基因组和转录组数据的可用性和准确性的增加, 原口动物和后口动物中神经肽/受体的研究将取得巨大进展.

总之, 利用无脊椎动物作为模式系统研究神经肽既实用又有效. 同时, 这也有望推进神经肽信号系统进化的研究. 科学家通过对基因组和转录组等大量数据的分析表明有些神经肽/受体只存在于原口动物中(例如海兔的APGWamide, myomodulin, FMRFamide, SCP, Cerebrin, Enterins, FCAP, CP2, ALKs, apSPTR-GF-DP2, GdFFD等), 而有些神经肽/受体同时存在于原口动物和后口动物中(例如海兔与后口动物的UrotensinII, NPY/NPY, Allatotropin/Orexin, CCK, Tachykinin, oxytocin, Allatostatin-C/somatostatin, buccalin/Allatostatin-A等)^[56,57]. 研究只存在于原口动物的神经肽及受体有助于理解它们在进化过程中是否丢失或是转变成了其他神经肽/受体. 另外, 利用原口动物研究在原口动物和后口动物都存在神经肽/受体将有助于更好地理解这些神经肽信号系统是如何起源的, 以及其功能是如何进化的. 此外, 对原口动物与后口动物中的同源神经肽的分子和环路作用机制的研究, 将为脊椎动物中同源神经肽的研究提供指导作用, 并有望对探究与这些神经肽调控失衡引发的相关疾病(例如肥胖)的机制及治疗具有重要意义.

参考文献

- 1 Toates F M. Motivational Systems. Cambridge: Cambridge University Press, 1986
- 2 Jing J, Gillette R, Weiss K R. Evolving concepts of arousal: insights from simple model systems. *Rev Neurosci*, 2009, 20: 405–427
- 3 Gruninger T R, LeBoeuf B, Liu Y, et al. Molecular signaling involved in regulating feeding and other motivated behaviors. *Mol Neurobiol*, 2007, 35: 1–19
- 4 Krashes M J, DasGupta S, Vreede A, et al. A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in *Drosophila*. *Cell*, 2009, 139: 416–427
- 5 Root C M, Ko K I, Jafari A, et al. Presynaptic facilitation by neuropeptide signaling mediates odor-driven food search. *Cell*, 2011, 145: 133–144
- 6 Nusbaum M P, Blitz D M. Neuropeptide modulation of microcircuits. *Curr Opin Neurobiol*, 2012, 22: 592–601
- 7 Taghert P H, Nitabach M N. Peptide neuromodulation in invertebrate model systems. *Neuron*, 2012, 76: 82–97

- 8 Jing J, Vilim F S, Horn C C, et al. From hunger to satiety: reconfiguration of a feeding network by *Aplysia* neuropeptide Y. *J Neurosci*, 2007, 27: 3490–3502
- 9 Winkler L M, Lefkowitz R J. Conformational basis of G protein-coupled receptor signaling versatility. *Trends Cell Biol*, 2020, 30: 736–747
- 10 Euler U S, Gaddum J H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol*, 1931, 72: 74–87
- 11 Chang M M, Leeman S E. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *J Biol Chem*, 1970, 245: 4784–4790
- 12 Dixon R A F, Kobilka B K, Strader D J, et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, 1986, 321: 75–79
- 13 Masu Y, Nakayama K, Tamaki H, et al. cDNA eloping of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature*, 1987, 329: 836–838
- 14 Briggman K L, Kristan Jr. W B. Multifunctional pattern-generating circuits. *Annu Rev Neurosci*, 2008, 31: 271–294
- 15 Sundström G, Larsson T A, Brenner S, et al. Evolution of the neuropeptide Y family: new genes by chromosome duplications in early vertebrates and in teleost fishes. *General Comp Endocrinol*, 2008, 155: 705–716
- 16 Zhang G, Vilim F S, Liu D D, et al. Discovery of leucokinin-like neuropeptides that modulate a specific parameter of feeding motor programs in the molluscan model, *Aplysia*. *J Biol Chem*, 2017, 292: 18775–18789
- 17 Hughes J, Smith T W, Kosterlitz H W, et al. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 1975, 258: 577–579
- 18 Abid M S R, Mousavi S, Checco J W. Identifying receptors for neuropeptides and peptide hormones: challenges and recent progress. *ACS Chem Biol*, 2021, 16: 251–263
- 19 Price D A, Greenberg M J. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science*, 1977, 197: 670–671
- 20 Vaudry H, Do Rego J C, Le Mevel J C, et al. Urotensin II, from fish to human. *Ann New York Acad Sci*, 2010, 1200: 53–66
- 21 Romanova E V, Sasaki K, Alexeeva V, et al. Urotensin II in invertebrates: from structure to function in *Aplysia californica*. *PLoS ONE*, 2012, 7: e48764
- 22 Bai L, Sheeley S, Sweedler J V. Analysis of endogenous D-amino acid-containing peptides in metazoa. *Bioanal Rev*, 2009, 1: 7–24
- 23 Checco J W, Zhang G, Yuan W D, et al. *Aplysia* allatotropin-related peptide and its newly identified D-amino acid-containing epimer both activate a receptor and a neuronal target. *J Biol Chem*, 2018, 293: 16862–16873
- 24 Cropper E C, Tenenbaum R, Gawinowicz Kolks M A, et al. Myomodulin: a bioactive neuropeptide present in an identified cholinergic buccal motor neuron of *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 5483–5486
- 25 Jing J, Sweedler J V, Cropper E C, et al. Feedforward compensation mediated by the central and peripheral actions of a single neuropeptide discovered using representational difference analysis. *J Neurosci*, 2010, 30: 16545–16558
- 26 Dong X, Han S, Zylka M J, et al. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell*, 2001, 106: 619–632
- 27 Van Wielendaele P, Dillen S, Zels S, et al. Regulation of feeding by Neuropeptide F in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2013, 43: 102–114
- 28 Van Wielendaele P, Wynant N, Dillen S, et al. *In vivo* effect of Neuropeptide F on ecdysteroidogenesis in adult female desert locusts (*Schistocerca gregaria*). *J Insect Physiol*, 2013, 59: 624–630
- 29 Sterkel M, Oliveira P L, Urlaub H, et al. OKB, a novel family of brain-gut neuropeptides from insects. *Insect Biochem Mol Biol*, 2012, 42: 466–473
- 30 Moroz L L, Edwards J R, Puthanveetil S V, et al. Neuronal transcriptome of *Aplysia*: neuronal compartments and circuitry. *Cell*, 2006, 127: 1453–1467
- 31 Zhang G, Yuan W D, Vilim F S, et al. Newly identified *Aplysia* SPTR-Gene Family-Derived peptides: localization and function. *ACS Chem Neurosci*, 2018, 9: 2041–2053
- 32 Li C, Kim K, Nelson L S. FMRFamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Brain Res*, 1999, 848: 26–34
- 33 Peymen K, Watteyne J, Frooninckx L, et al. The FMRFamide-Like peptide family in nematodes. *Front Endocrinol*, 2014, 5: 90
- 34 Husson S J, Mertens I, Janssen T, et al. Neuropeptidergic signaling in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Prog Neurobiol*, 2007, 82: 33–55
- 35 Bai L, Livnat I, Romanova E V, et al. Characterization of GdFFD, a D-amino acid-containing neuropeptide that functions as an extrinsic

- modulator of the *Aplysia* feeding circuit. *J Biol Chem*, 2013, 288: 32837–32851
- 36 Livnat I, Tai H C, Jansson E T, et al. A D-amino acid-containing neuropeptide discovery funnel. *Anal Chem*, 2016, 88: 11868–11876
 - 37 Checco J W, Zhang G, Yuan W D, et al. Molecular and physiological characterization of a receptor for D-amino acid-containing neuropeptides. *ACS Chem Biol*, 2018, 13: 1343–1352
 - 38 Bauknecht P, Jékely G. Large-scale combinatorial deorphanization of *Platynereis* neuropeptide GPCRs. *Cell Rep*, 2015, 12: 684–693
 - 39 Rajpara S M, Garcia P D, Roberts R, et al. Identification and molecular cloning of a Neuropeptide Y homolog that produces prolonged inhibition in *Aplysia* neurons. *Neuron*, 1992, 9: 505–513
 - 40 Cropper E C, Miller M W, Vilim F S, et al. Buccalin is present in the cholinergic motor neuron B16 of *Aplysia* and it depresses accessory radula closer muscle contractions evoked by stimulation of B16. *Brain Res*, 1990, 512: 175–179
 - 41 Lloyd P E. Cardioactive neuropeptides in gastropods. *Fed Proc*, 1982, 41: 2948–2952
 - 42 Lloyd P E, Mahon A C, Kupfermann I, et al. Biochemical and immunocytological localization of molluscan small cardioactive peptides in the nervous system of *Aplysia californica*. *J Neurosci*, 1985, 5: 1851–1861
 - 43 Wu J S, Vilim F S, Hatcher N G, et al. Composite modulatory feedforward loop contributes to the establishment of a network state. *J Neurophysiol*, 2010, 103: 2174–2184
 - 44 Phares G A, Walent J H, Niece R L, et al. Primary structure of a new neuropeptide, cerebral peptide 2, purified from cerebral ganglia of *Aplysia*. *Biochemistry*, 1996, 35: 5921–5927
 - 45 Fan X, Croll R P, Wu B, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding the neuropeptides APGWamide and cerebral peptide 1: localization of APGWamide-like immunoreactivity in the central nervous system and male reproductive organs of *Aplysia*. *J Comp Neurol*, 1997, 387: 53–62
 - 46 Furukawa Y, Nakamaru K, Wakayama H, et al. The enterins: a novel family of neuropeptides isolated from the enteric nervous system and CNS of *Aplysia*. *J Neurosci*, 2001, 21: 8247–8261
 - 47 Li L, Floyd P D, Rubakhin S S, et al. Cerebrin prohormone processing, distribution and action in *Aplysia californica*. *J Neurochem*, 2001, 77: 1569–1580
 - 48 Sweedler J V, Li L, Rubakhin S S, et al. Identification and characterization of the feeding circuit-activating peptides, a novel neuropeptide family of *Aplysia*. *J Neurosci*, 2002, 22: 7797–7808
 - 49 Vilim F S, Sasaki K, Rybak J, et al. Distinct mechanisms produce functionally complementary actions of neuropeptides that are structurally related but derived from different precursors. *J Neurosci*, 2010, 30: 131–147
 - 50 Wood D E, Stein W, Nusbaum M P. Projection neurons with shared cotransmitters elicit different motor patterns from the same neural circuit. *J Neurosci*, 2000, 20: 8943–8953
 - 51 Nusbaum M P, Blitz D M, Marder E. Functional consequences of neuropeptide and small-molecule co-transmission. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18: 389–403
 - 52 van den Pol A N. Neuropeptide transmission in brain circuits. *Neuron*, 2012, 76: 98–115
 - 53 Elphick M R, Mirabeau O, Larhammar D. Evolution of neuropeptide signalling systems. *J Exp Biol*, 2018, 221: 151092
 - 54 Gründer S, Assmann M. Peptide-gated ion channels and the simple nervous system of *Hydra*. *J Exp Biol*, 2015, 218: 551–561
 - 55 Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, et al. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol*, 2001, 11: 213–221
 - 56 Jékely G. Global view of the evolution and diversity of metazoan neuropeptide signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 8702–8707
 - 57 Mirabeau O, Joly J S. Molecular evolution of peptidergic signaling systems in bilaterians. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: E2028–E2037
 - 58 Kataoka H, Toschi A, Li J P, et al. Identification of an allatotropin from adult manduca sexta. *Science*, 1989, 243: 1481–1483
 - 59 Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 1998, 92: 573–585
 - 60 de Lecea L, Kilduff T S, Peyron C, et al. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 322–327
 - 61 Zhang J, Li B, Yu L, et al. A role for orexin in central vestibular motor control. *Neuron*, 2011, 69: 793–804
 - 62 Hayes P C, Wolf C R, Hayes J D. Blotting techniques for the study of DNA, RNA, and proteins. *BMJ*, 1989, 299: 965–968
 - 63 Jensen E. *In situ* hybridization. *Anat Rec*, 2014, 297: 1349–1353
 - 64 Cropper E C, Jing J, Vilim F S, et al. Multifaceted expression of peptidergic modulation in the feeding system of *Aplysia*. *ACS Chem Neurosci*,

- 2018, 9: 1917–1927
- 65 Kim K, Li C. Expression and regulation of an FMRFamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol*, 2004, 475: 540–550
- 66 Nässel D R, Wu S F. Leucokinins: multifunctional neuropeptides and hormones in insects and other invertebrates. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 1531
- 67 Nässel D R. Leucokinin and associated neuropeptides regulate multiple aspects of physiology and behavior in drosophila. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 1940
- 68 Marder E, Bucher D. Understanding circuit dynamics using the stomatogastric nervous system of lobsters and crabs. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69: 291–316
- 69 Skiebe P. Neuropeptides are ubiquitous chemical mediators: using the stomatogastric nervous system as a model system. *J Exp Biol*, 2001, 204: 2035–2048
- 70 Skiebe P. Neuropeptides in the crayfish stomatogastric nervous system. *Microsc Res Tech*, 2003, 60: 302–312
- 71 Cropper E C, Friedman A K, Jing J, et al. Neuromodulation as a mechanism for the induction of repetition priming. *Curr Opin Neurobiol*, 2014, 29: 33–38
- 72 Kandel E R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 2001, 294: 1030–1038
- 73 Kandel E R. Behavioral Biology of *Aplysia*. San Francisco, CA: W.H. Freeman and Company. 1979
- 74 Brezina V, Orekhova I V, Weiss K R. Functional uncoupling of linked neurotransmitter effects by combinatorial convergence. *Science*, 1996, 273: 806–810
- 75 Morton D W, Chiel H J. The timing of activity in motor neurons that produce radula movements distinguishes ingestion from rejection in *Aplysia*. *J Comp Physiol A*, 1993, 173: 519–536
- 76 Morton D W, Chiel H J. *In vivo* buccal nerve activity that distinguishes ingestion from rejection can be used to predict behavioral transitions in *Aplysia*. *J Comp Physiol A*, 1993, 172: 17–32
- 77 Church P J, Lloyd P E. Activity of multiple identified motor neurons recorded intracellularly during evoked feedinglike motor programs in *Aplysia*. *J Neurophysiol*, 1994, 72: 1794–1809
- 78 Hurwitz I, Susswein A J. B64, a newly identified central pattern generator element producing a phase switch from protraction to retraction in buccal motor programs of *Aplysia californica*. *J Neurophysiol*, 1996, 75: 1327–1344
- 79 Hurwitz I, Kupfermann I, Susswein A J. Different roles of neurons B63 and B34 that are active during the protraction phase of buccal motor programs in *Aplysia californica*. *J Neurophysiol*, 1997, 78: 1305–1319
- 80 Jing J, Weiss K R. Neural mechanisms of motor program switching in *Aplysia*. *J Neurosci*, 2001, 21: 7349–7362
- 81 Jing J, Weiss K R. Interneuronal basis of the generation of related but distinct motor programs in *Aplysia*: implications for current neuronal models of vertebrate intralimb coordination. *J Neurosci*, 2002, 22: 6228–6238
- 82 Evans C G, Jing J, Rosen S C, et al. Regulation of spike initiation and propagation in an *Aplysia* sensory neuron: gating-in via central depolarization. *J Neurosci*, 2003, 23: 2920–2931
- 83 Hurwitz I, Kupfermann I, Weiss K R. Fast synaptic connections from CBIs to pattern-generating neurons in *Aplysia*: initiation and modification of motor programs. *J Neurophysiol*, 2003, 89: 2120–2136
- 84 Jing J, Cropper E C, Hurwitz I, et al. The construction of movement with behavior-specific and behavior-independent modules. *J Neurosci*, 2004, 24: 6315–6325
- 85 Jing J, Weiss K R. Generation of variants of a motor act in a modular and hierarchical motor network. *Curr Biol*, 2005, 15: 1712–1721
- 86 Sasaki K, Brezina V, Weiss K R, et al. Distinct inhibitory neurons exert temporally specific control over activity of a motoneuron receiving concurrent excitation and inhibition. *J Neurosci*, 2009, 29: 11732–11744
- 87 Sasaki K, Cropper E C, Weiss K R, et al. Functional differentiation of a population of electrically coupled heterogeneous elements in a microcircuit. *J Neurosci*, 2013, 33: 93–105
- 88 Wu J S, Wang N, Siniscalchi M J, et al. Complementary interactions between command-like interneurons that function to activate and specify motor programs. *J Neurosci*, 2014, 34: 6510–6521
- 89 Zhang G, Yu K, Wang T, et al. Synaptic mechanisms for motor variability in a feedforward network. *Sci Adv*, 2020, 6: eaba4856
- 90 Cropper E C, Kupfermann I, Weiss K R. Differential firing patterns of the peptide-containing cholinergic motor neurons B15 and B16 during feeding behavior in *Aplysia*. *Brain Res*, 1990, 522: 176–179

- 91 Kupfermann I, Weiss K R. Activity of an identified serotonergic neuron in free moving *Aplysia* correlates with behavioral arousal. *Brain Res*, 1982, 241: 334–337
- 92 Morgan P T, Jing J, Vilim F S, et al. Interneuronal and peptidergic control of motor pattern switching in *Aplysia*. *J Neurophysiol*, 2002, 87: 49–61
- 93 Rosen S C, Teyke T, Miller M W, et al. Identification and characterization of cerebral-to-buccal interneurons implicated in the control of motor programs associated with feeding in *Aplysia*. *J Neurosci*, 1991, 11: 3630–3655
- 94 Horn C C, Zhurov Y, Orekhova I V, et al. Cycle-to-cycle variability of neuromuscular activity in *Aplysia* feeding behavior. *J Neurophysiol*, 2004, 92: 157–180
- 95 Lum C S, Zhurov Y, Cropper E C, et al. Variability of swallowing performance in intact, freely feeding *Aplysia*. *J Neurophysiol*, 2005, 94: 2427–2446
- 96 Morgan P T, Perrins R, Lloyd P E, et al. Intrinsic and extrinsic modulation of a single central pattern generating circuit. *J Neurophysiol*, 2000, 84: 1186–1193
- 97 Perrins R, Weiss K R. A cerebral central pattern generator in *Aplysia* and its connections with buccal feeding circuitry. *J Neurosci*, 1996, 16: 7030–7045
- 98 Sasaki K, Due M R, Jing J, et al. Feeding CPG in *Aplysia* directly controls two distinct outputs of a compartmentalized interneuron that functions as a CPG element. *J Neurophysiol*, 2007, 98: 3796–3801
- 99 Proekt A, Brezina V, Weiss K R. Dynamical basis of intentions and expectations in a simple neuronal network. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 9447–9452
- 100 Proekt A, Jing J, Weiss K R. Multiple contributions of an input-representing neuron to the dynamics of the *Aplysia* feeding network. *J Neurophysiol*, 2007, 97: 3046–3056
- 101 Friedman A K, Weiss K R. Repetition priming of motoneuronal activity in a small motor network: intercellular and intracellular signaling. *J Neurosci*, 2010, 30: 8906–8919
- 102 Siniscalchi M J, Cropper E C, Jing J, et al. Repetition priming of motor activity mediated by a central pattern generator: the importance of extrinsic vs. intrinsic program initiators. *J Neurophysiol*, 2016, 116: 1821–1830
- 103 Perkins M H, Cropper E C, Weiss K R. Cellular effects of repetition priming in the *Aplysia* feeding network are suppressed during a task-switch but persist and facilitate a return to the primed state. *J Neurosci*, 2018, 38: 6475–6490
- 104 Perkins M H, Weiss K R, Cropper E C. Persistent effects of cyclic adenosine monophosphate are directly responsible for maintaining a neural network state. *Sci Rep*, 2019, 9: 9058
- 105 Cropper E C, Jing J, Vilim F S, et al. Peptide cotransmitters as dynamic, intrinsic modulators of network activity. *Front Neural Circuits*, 2018, 12: 78
- 106 Jing J, Vilim F S, Wu J S, et al. Concerted GABAergic actions of *Aplysia* feeding interneurons in motor program specification. *J Neurosci*, 2003, 23: 5283–5294
- 107 Morton G J, Cummings D E, Baskin D G, et al. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 2006, 443: 289–295
- 108 Badman M K, Flier J S. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science*, 2005, 307: 1909–1914
- 109 Schacher S, Castellucci V F, Kandel E R. cAMP evokes long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons that requires new protein synthesis. *Science*, 1988, 240: 1667–1669
- 110 Sossin W S, Schwartz J H. Selective activation of Ca(2+)-activated PKCs in *Aplysia* neurons by 5-HT. *J Neurosci*, 1992, 12: 1160–1168
- 111 Hu J Y, Wu F, Schacher S. Two signaling pathways regulate the expression and secretion of a neuropeptide required for long-term facilitation in *Aplysia*. *J Neurosci*, 2006, 26: 1026–1035
- 112 Dickinson A J, Croll R P, Voronezhskaya E E. Development of embryonic cells containing serotonin, catecholamines, and FMRFamide-related peptides in *Aplysia californica*. *Biol Bull*, 2000, 199: 305–315
- 113 Alexandrescu A, Carew T J. Specificity of synapse formation in *Aplysia*: paracrine and autocrine signaling regulates bidirectional molecular interactions between sensory and non-target motor neurons. *Sci Rep*, 2020, 10: 5222

Functional studies on neuropeptides and receptors in model animal *Aplysia*

ZHANG Guo¹, GUO ShiQi¹, WANG HuiYing¹, LI YaDong¹, JIANG HuiMin¹, YU Ke¹,
DING XueYing¹, LIU WeiJia¹, XU JuPing¹, XUE YingYu¹, YANG Zhe¹, WANG Jian^{2,3},
ZHOU HaiBo^{2,3} & JING Jian^{1,3,4}

¹ State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Institute for Brain Sciences, Collaborative Innovation Center of Chemistry for Life Sciences, Jiangsu Engineering Research Center for MicroRNA Biology and Biotechnology, Advanced Institute for Life Sciences, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China;

² School of Electronic Science and Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China;

³ Peng Cheng Laboratory, Shenzhen 518000, China;

⁴ Department of Neuroscience and Friedman Brain Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA

Neuropeptides are widely distributed in the central nervous system and the endocrine system. As signaling transduction molecules between cells, neuropeptides play important roles in regulating a variety of physiological processes, such as behavioral control, temperature regulation, energy balance, circadian rhythm. In this paper, we primarily review the discoveries and functions of neuropeptides that are released by neuronal elements in behavior-generating neural circuits in the central nervous system. Due to the complexity of neural circuits, it has been highly challenging to study all or most of the neuropeptides and their functions in a specific system in vertebrates. Consequently, many invertebrates have been used as model animals to discover novel neuropeptides and their receptors, and to study the functions of these neuropeptides and receptors. We describe the basic characteristics, modes of actions, and research approaches, particularly the progress of neuropeptide research in the experimentally-advantageous mollusc *Aplysia*. We highlight the diversity of neuropeptide/receptor signaling systems and the challenges in studying them. We believe that the findings in invertebrates will provide novel insights for the research on the functions and mechanisms of neuropeptides in vertebrates, including mammals.

neuropeptide, neuropeptide receptor, model animal *Aplysia*, physiological role, feeding, locomotion

doi: [10.1360/SSV-2021-0155](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0155)