

# 贝类等无脊椎动物脑啡肽研究进展

李 华<sup>①</sup> 孙虎山<sup>②</sup>

① 滨州学院 山东省黄河三角洲生态环境重点实验室 滨州 256603;

② 鲁东大学生命科学学院 烟台 264025

**摘要:** 贝类等许多无脊椎动物体内含有脑啡肽等阿片肽系统, 并且在生长、繁殖等生理生化过程中发挥着重要的作用。本文从脑啡肽在贝类等无脊椎动物体内的定位、分离提取、测序鉴定及其相关酶的研究等方面, 对贝类等无脊椎动物脑啡肽的研究进展进行了概述。目前来看, 脑啡肽物质在无脊椎动物中有关各种功能和机理研究仍然处于初步阶段, 对于其深层次的分子作用机理还需要作进一步的研究。

**关键词:** 贝类; 无脊椎动物; 脑啡肽; 阿片肽

**中图分类号:** Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2012)06-128-08

## Enkephalin in Mollusk and Other Invertebrates

LI Hua<sup>①</sup> SUN Hu-Shan<sup>②</sup>

① *Shandong Key Lab of Eco-environmental Science for Yellow River Delta, Binzhou University, Binzhou 256603;*

② *College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China*

**Abstract:** It has been reported that endogenous opioid system including enkephalin exists in mollusk and other invertebrates and plays an important role in their physiological and biochemical such as growth and reproduction. This review updates the research findings about enkephalin in mollusk and other invertebrates, including its location, isolation and identification, as well as its related enzymes. The functional and mechanistic research of the enkephalin in invertebrates is still at a preliminary stage and needs to be further explored.

**Key words:** Mollusk; Invertebrate; Enkephalin; Opioid

脑啡肽是内源性阿片肽系统即脑啡肽(enkephalin, ENK)、内啡呔(endorphin, END)、强啡肽(dynorphin, DYN)体系中一类重要的阿片肽, ENK系统中比较重要的有甲硫氨酸脑啡肽(methionine-enkephalin, M-ENK)、亮氨酸脑啡肽(leucine-enkephalin, L-ENK)、甲七肽和甲八肽等。1975年, Hughes等首次从猪(*Sus domesticus*)脑中分离出2种ENK, 并定出其化学结构为五肽, 即M-ENK和L-ENK, 氨基酸组成为Tyr-Gly-Gly-Phe-Met和Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu<sup>[1]</sup>。1982年, 采用分子生物学技术寻找各类内源性阿片肽的前体结构及其基因克隆取得成功, 表明脑啡肽原含263或267个氨基酸残基, 可以酶切加工出不同的ENK<sup>[2]</sup>。至

此, ENK的结构已基本搞清, 但它的合成、释放及生物活性等很多细节还有待研究。在高等动物中, ENK广泛分布于神经、消化、循环、内分泌和生殖等系统中, 目前的研究主要集中在其受体的定位、分类和分型<sup>[3-6]</sup>; 受体激动剂和拮抗剂的特异性及其应用<sup>[7]</sup>; 前体大分子的克隆和鉴定, 以及肽的生成、释放、降解和分子生物学研究<sup>[8]</sup>; 生理和药理作用及其机制, 活性检测与临床应用等方面<sup>[9]</sup>。另外, 有关受体位点

**基金项目** 山东省自然科学基金项目(No. ZR2010CM017);

**第一作者介绍** 李华, 男, 讲师; 研究方向: 海洋生物学;

E-mail: L\_hua0628@163.com。

收稿日期: 2012-05-03, 修回日期: 2012-09-16

的放大系统和作用机制的研究是当今国内外比较重要的研究课题。在 ENK 的结构确定之后,其抗血清也很快被制备成功。在功能研究方面,发现 ENK 在机体心血管系统、消化系统、神经内分泌-免疫网络、镇痛、呼吸系统、摄食、调节惊厥等方面都有着重要的作用,而对于其具体作用机制目前了解还相对较少<sup>[10]</sup>。

在无脊椎动物中,有关 ENK 等阿片肽的研究,国外已经有了比较多的报道,在贝类<sup>[11-12]</sup>、甲壳动物<sup>[13]</sup>、昆虫<sup>[14]</sup>、环节动物<sup>[15]</sup>等许多种类动物中发现了 ENK 或其类似物,并在生化与分子生物学、免疫学、生理学和进化论等领域进行了一系列研究。国内在这方面的研究报道还相对较少<sup>[10]</sup>。本文主要对国外有关贝类等无脊椎动物 ENK 研究进展作一简要概述。

## 1 无脊椎动物体内 ENK 的发现

在无脊椎动物中,ENK 等阿片肽的研究始于 20 世纪 80 年代左右,首先起始于贝类,其中研究最早、报道最多的是紫贻贝 (*Mytilus edulis*)<sup>[11]</sup>,在其他无脊椎动物中先后报道的有甲壳动物<sup>[13]</sup>、昆虫<sup>[14]</sup>、环节动物<sup>[15]</sup>、扁形动物<sup>[16]</sup>等。

早在 1979 年,Stefano 等研究发现在紫贻贝的围心腔中有 M-ENK 和 L-ENK 类物质的存在<sup>[11]</sup>。1980 年,King 等在研究 M-ENK 的系统发生学和解剖学分布时发现,淡水蜗牛 (*Cepaea nemoralis*) 的食管下神经中有 M-ENK 的存在<sup>[12]</sup>。随后 Mancillas 等证明了 L-ENK 存在于美国龙虾 (*Homarus americanus*) 体内<sup>[13]</sup>。同年,Stefano 等在马德拉蜚蠊 (*Leucophaea maderae*) 的脑神经中枢中发现有 M-ENK 的类似物 d-ALA2-甲硫氨酸脑啡肽 (d-Ala2-Met-enkephalinamide DALA),并且发现成体雌性中的 DALA 含量一般要比成体雄性多 30% 左右,同时研究表明,肽的受体只局限于神经组织中某些特定的部位<sup>[14]</sup>。1983 年 Leung 等人运用高效液相色谱技术从紫贻贝足神经节中分离并鉴定出 M-ENK 和 L-ENK<sup>[17]</sup>。1984 年,Stefano 等又从紫贻贝足神经节中提取分离出 1 种七

肽,经过氨基酸序列分析发现其主要结构与高等动物的甲七肽 (met-enkephalin-Arg6-Phe7) 一样,表明在软体动物中亦存在和高等动物中类似的甲七肽<sup>[18]</sup>。1985 年,Marino 等在螳螂 (*Squilla mantis*) 食管下神经中提取出 3 种蛋白质,经过胰岛素和羧肽酶降解后,发现某些片段有 ENK 活性,表明在节肢动物中存在 ENK 的前体,即脑啡肽原 (proenkephalin)<sup>[19]</sup>。1986 年,Davenport 等利用放射免疫技术对沙漠蝗 (*Schistocerca gregaria*) 体内的 ENK 免疫活性进行了测定,发现食管下神经和胸神经中枢中 ENK 的含量在雌雄两性之间相似,而在脑神经中枢的浓度差别较大,雌性神经组织中 ENK 的活性要比雄性大 2 倍<sup>[20]</sup>。同年 Andersen 等采用免疫荧光标记法在紫贻贝消化道上皮细胞、胰腺腺和神经节中检测到 M-ENK<sup>[21]</sup>。1993 年,Duvaux 等研究发现在人血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) 中亦存在阿片肽系统,既可进行内源性化学信号传导又可作为一种应对寄主的防御工具,在成体血吸虫的膜悬浮液中发现有阿片肽的高亲和位点,Scatchard 法分析显示在这种血吸虫中存在  $\beta$  内啡肽和 M-ENK,同时发现具有  $\delta$  受体,而放射性免疫测定表明,此动物体内亦有 M-ENK 的存在<sup>[16]</sup>。同年,Mixon 等将紫贻贝足神经节提取物经 TPCK-胰岛素和羧肽酶 B 消化处理后,采用高效液相色谱技术分离纯化,检测到 L-ENK 和 M-ENK-Arg-Phe 肽段分子,表明紫贻贝足神经节中有脑啡肽原分子,脑啡肽原分子可进一步降解为 L-ENK 和 M-ENK<sup>[22]</sup>;紫贻贝血淋巴细胞也有分子量为 26 ku 的脑啡肽原分子存在,与豚鼠 (*Cavia porcellus*) 脑啡肽原分子相比有 50% 的氨基酸序列同源性,并且紫贻贝免疫细胞中 M-ENK 和 L-ENK 的含量之比为 3 : 1<sup>[23]</sup>。脑啡肽原在激素原转换酶 (prohormone-converting enzymes, PC) 的作用下分解可产生 M-ENK<sup>[22, 24]</sup>。1996 年 Salzet 等从水蛭 (*Theromyzon tessulatum*) 脑中提取出 4 种结构与 ENK 相类似的肽,经过反相高效液相色谱纯化,4 种肽的序列通过自动降解系统、电离质谱分析技术、高效液相色谱联合洗脱技术被确

认,发现这 4 种肽大都含有 L-ENK 结构,说明 ENK 系统存在于水蛭这一古老的后生动物中<sup>[25]</sup>。另外研究发现,无脊椎动物中 ENK 的含量还有随季节变化的趋势<sup>[26]</sup>。

在大量的低等动物体内发现了 ENK 及其类似物以及它们的受体,并且研究发现 ENK 在低等动物体内大都以脑啡肽原的形式存在,在组织中经过酶的裂解进一步生成 ENK,表明无脊椎动物体内存在内源性阿片肽这一神经肽体系,并且表明 ENK 等阿片肽作为一种古老的信息分子和神经递质在生物进化过程中的保守性。

## 2 ENK 裂解酶

ENK 裂解酶可以终止 ENK 的活性,它广泛分布于无脊椎动物的各种组织内<sup>[22-24]</sup>。

ENK 酶 (enkephalinase, CD10/NEP, EC3.4.24.11),是一种含锌的金属肽酶。它是位于细胞表面的 II 型膜蛋白,含 750 个氨基酸、1 个信号肽和 2 个亲水结构域。细胞内、外片段分别含有 26 个和 700 个氨基酸,它们被含 24 个氨基酸的疏水跨膜片段分开<sup>[27]</sup>。Stefano 等发现紫贻贝免疫细胞膜上有 NEP 分子,它的特异性抑制剂为磷酸二肽 (phosphoramidon), NEP 降解神经肽的 2 种代谢产物 Phe-Met-Arg-Phe 和 Tyr-Gly-Gly 对酶活性起到反馈抑制作用,其中四肽 Phe-Met-Arg-Phe 的反馈抑制作用较强<sup>[28]</sup>。另外,紫贻贝血淋巴液中和血细胞膜上还有氨肽酶、羧肽酶等 M-ENK 降解酶<sup>[29]</sup>, M-ENK 在血淋巴液中的降解速度较快,在血细胞膜上的降解速度较慢<sup>[30]</sup>。NEP 是参与脊椎动物和无脊椎动物自身免疫的一种重要的酶,用诸如单核因子和某些神经肽作为底物激活人体或紫贻贝的免疫细胞表达 NEP,能增加其表达量,即表达上调;而当使用另外一些神经肽作为底物时,激活的免疫细胞只对高浓度的神经肽做出免疫应答,特别是用肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 处理免疫细胞之后<sup>[31]</sup>。

在加利福尼亚海兔 (*Aplysia californica*) 的心耳和神经组织中有羧肽酶 E (ENK 转换酶或羧肽酶 H),羧肽酶 E 在心耳的活性较高,表明

其可能参与了神经肽类物质的生物合成<sup>[32]</sup>。另外研究发现在这种动物的肾、生殖腺、脑神经节和血淋巴中也有氨肽酶分子,可以在 Try-Gly 结合处裂解 L-ENK,且此酶是一种金属酶<sup>[33]</sup>。随后又发现一种肽链内切酶,可以在 Gly-Phe 结合处裂解 L-ENK 或 L-ENK 类似物,通过实验证明此酶也是一种金属酶<sup>[34]</sup>。Coletti 等研究发现螯虾 (*Astacus fluviatilis*) 和美洲螯 (*Limulus polyphemus*) 血淋巴中的 ENK 及其他相关的神经肽会迅速失去活性,发现至少有 3 种酶在起作用,即氨肽酶、羧肽酶、羧氨酸-二肽酶。其对这些酶的性质进行了研究,并与脊椎动物血液中的相似酶进行了比较,发现无脊椎动物血淋巴中 ENK 等阿片肽活性很短暂,从而推测无脊椎动物肽裂解酶对肽活力的代谢阻碍作用比脊椎动物血液中肽裂解酶要强<sup>[35]</sup>。

SCH34826 在高等动物中是一种极其有效的 ENK 酶抑制剂,在哺乳动物中具有明显的止痛效果,而研究发现 SCH34826 在淡水蜗牛中亦具有止痛作用,并且这种效果受到纳络酮的阻抑,还可以被  $\delta$  阿片受体拮抗剂 ICI-174,864 完全阻断,受  $\kappa$  受体阻断剂的影响较小。这个发现表明,在脊椎动物中能抑制 ENK 酶的 SCH34826 同时亦能调节无脊椎动物 ENK 酶的活性<sup>[36]</sup>。

## 3 ENK 的阿片受体

在哺乳动物中阿片受体的发现早于阿片肽,在确定了内源性阿片肽三大系统后,把它们与其内源性受体进行了配对,发现  $\delta$  受体是 ENK 的适配受体<sup>[10]</sup>。在无脊椎动物中,阿片受体的发现亦早于阿片肽,早在 1979 年,Stefano 等人就在紫贻贝中发现了阿片受体,为在无脊椎动物体内寻找内源性阿片肽提供了实验依据<sup>[11]</sup>。研究发现贝类等无脊椎动物和高等动物一样也有 3 种阿片肽受体类型,即  $\mu$ 、 $\delta$  和  $\kappa$  受体,这 3 种受体广泛分布于无脊椎动物各种组织中,并且参与了对感觉、运动、消化和免疫等功能的调节<sup>[37-39]</sup>。 $\mu$ 、 $\delta$  和  $\kappa$  受体对贝类“痛觉”效应起重要调节作用,Thomas 等采用脉冲磁场刺激淡水蜗牛产生“无痛觉”效应, $\mu$

受体拮抗剂纳洛胍 (naloxazine) 和  $\delta$  受体拮抗剂纳曲唑-5'-异硫氰酸 (naltrindole-5'-isothiocyanate) 对这种“无痛觉”效应起拮抗作用,进一步研究表明, $\delta_1$  和  $\delta_2$  受体拮抗剂 DPDPE 和 deltorphin, [D-Ala<sup>2</sup>, Glu<sup>4</sup>] 也对这种“无痛觉”效应起拮抗作用,表明在淡水蜗牛中, $\delta$  阿片受体具有调节 ENK 的功能<sup>[39-40]</sup>。

#### 4 无脊椎动物体内 ENK 的功能

在高等动物中,发现 ENK 具有镇痛、免疫调控、抑制细胞生长等多种生理功能。M-ENK 通过与其受体结合降低神经细胞内 cAMP 水平和钙传导,抑制神经传递,从而起到镇痛作用<sup>[10]</sup>。能够与 M-ENK 结合的  $\delta$  受体、 $\mu$  受体广泛存在于免疫系统的淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、粒细胞中,M-ENK 通过与这些细胞表面的受体作用,双向调控胞内 cAMP、钙、蛋白激酶 K、蛋白激酶 A 水平<sup>[41]</sup>。而目前,关于 M-ENK 免疫调控作用机理的研究还不够深入,尚未形成统一的认识。有研究报道,M-ENK 能够双向调节免疫造血系统细胞内 cAMP、钙、蛋白激酶 C 和蛋白激酶 A 水平<sup>[42-43]</sup>。也有研究报道,M-ENK 能够提高免疫造血系统细胞内 cAMP、钙的水平<sup>[44]</sup>。

**4.1 镇痛作用** 运用夹尾刺激法刺激阿勇蛞蝓 (*Arion ater*) 能够明显延长其对于外界刺激的反应时间,而这种作用却能通过注射一定剂量的阿片抑制剂纳络酮和 ICI 174,864 而被完全阻断。通过注射  $\beta$ -内啡肽或 ENK 的类似物 DAGO 和 DADLE 也能明显产生这种“痛觉丧失”作用。刺激介导的“痛觉丧失”能够持续 30 min,而通过注射氨态酶抑制剂苯丁抑制素 (bestatin) 和 ENK 的抑制剂 N-甲基-L-苯基-L-亮氨酸能使这种作用持续 100 min<sup>[45]</sup>。

**4.2 内分泌调节作用** 早在 1979 年 Stefano 等就发现 ENK 可以增强紫贻贝中枢神经系统多巴胺的水平,但却不能增强血液中复合胺的水平,而纳络酮则能够阻断 ENK 的这种效果<sup>[11]</sup>。有关无脊椎动物 ENK 的生理作用研究在甲壳动物中报道较多,Quackenbush 等报道,

给招潮蟹 (*Uca pugilator*) 注射 M-ENK 能使其释放红色素和黑色素凝集素<sup>[46]</sup>。另外,Kulkarni 等发现 M-ENK 还能刺激这种蟹释放末梢视网膜色素形成黑暗适应激素<sup>[47]</sup>。Martinez 等报道用稳定的 M-ENK 类似物 (FK-33824) 与甲壳动物的眼柄抽提物混合注射能加强黑背地蟹 (*Gecarcinus lateralis*) 炭黑素的解离以及眼柄抽提物中红色素的凝集,而纳络酮对这种现象有抑制作用<sup>[48]</sup>。另外还有报道,M-ENK 可以调节锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 血糖含量的变化,向锯缘青蟹体内注射一定剂量的 M-ENK,可降低其肝胰腺和肌肉中糖的含量,但却会使磷酸化酶的水平升高;切除锯缘青蟹眼柄后,其葡萄糖和总糖含量降低,而肝胰腺中肝糖原含量水平则有所提高,眼柄切除后,肌肉磷酸化酶活性显著降低,表明 M-ENK 很有可能是通过调控眼柄中与产生血糖有关的激素进而调节血糖含量的<sup>[49-50]</sup>。

**4.3 生殖调控作用** ENK 类物质在甲壳类动物中起着非常重要的生殖调控作用。Reddy 等研究 ENK 在印度对虾 (*Penaeus indicus*) 生殖中的作用时发现,通过注射一定剂量的 L-ENK 能够明显提高对虾卵巢生长指数,且卵母细胞直径增大。相反,用同样的方法注射 M-ENK 则降低卵巢生长指数,且卵母细胞直径减小,说明内源性阿片肽体系参与甲壳动物的生殖调控,而研究认为 M-ENK 对于对虾性腺的这种刺激作用可能是间接的,或者是促进性腺抑制激素的释放,或者抑制性腺刺激激素的释放,或者两种作用兼而有之<sup>[51]</sup>。这个结果与 Sarojini 等认为 M-ENK 能抑制甲壳动物性腺成熟的发现相吻合<sup>[52]</sup>,类似的 M-ENK 抑制性腺发育的作用也见报道于哺乳动物<sup>[53-54]</sup>。L-ENK 对对虾性腺的催熟作用具有剂量效应,其作用机理可能是由于抑制性腺抑制激素的释放,或者是刺激性腺刺激激素的释放,或两种作用都有,抑或 L-ENK 能直接作用于卵巢。这种结果表明两种 ENK 在调控对虾卵巢发育过程中具有拮抗作用,这种激素的拮抗作用已经在甲壳动物其他器官的生理活动中得到证实,如视网膜末梢的

迁移与再生<sup>[47]</sup>。

**4.4 免疫调节作用** 早在 20 世纪 80 年代中期,就有研究表明 ENK 等阿片肽类在无脊椎动物免疫系统中发挥重要作用<sup>[15, 38]</sup>。ENK 类物质对贝类等无脊椎动物起重要的免疫调节作用, M-ENK 类似物 D-Ala<sup>2</sup>-D-Met<sup>5</sup>-enkephalinamide (DAMA) 可引起紫贻贝免疫活性细胞的构象变化、加快定向迁移和血细胞的粘附过程,可使贻贝免疫细胞活化<sup>[55]</sup>, DAMA 可以诱导贻贝神经节和免疫细胞 IL-1 的产生, IL-1 可进一步活化免疫细胞<sup>[56]</sup>。这些作用在蚯蚓 (*Lumbricus terrestris*) 中也得到了证实, 研究表明, 阿片肽浓度在  $10^{-4}$  mol/L 和  $10^{-6}$  mol/L 时, 能够显著增强蚯蚓等动物变形细胞的吞噬作用、聚集作用、构象变化以及表面颗粒化程度, 而在这个浓度范围内, M-ENK 的作用最为明显, 其次分别为 DYN、 $\beta$ -END、L-ENK, 它们的抑制剂纳洛酮对以上变化均起到抑制作用<sup>[57-58]</sup>。

Osman 等向扁卷螺 (*Biomphalaria alexandrina*) 血淋巴中加入 L-ENK 类似物 D-Ala<sup>2</sup>-Leu-enkephalin (DALE), 也可导致免疫细胞粘附、细胞活性增强, 并且发现 DALE 可以调节白细胞介素 IL-2、肿瘤坏死因子  $\gamma$ -TNF、干扰素  $\alpha$ -INF 的水平<sup>[59]</sup>。贝类体内的阿片肽类物质通过与细胞表面阿片受体结合而起作用<sup>[60]</sup>, ENK 类物质主要通过  $\delta$  受体的结合完成免疫上调作用<sup>[61]</sup>; ENK 在无脊椎动物中的免疫调节作用也往往和一些细胞因子以及其他免疫因子如一氧化氮、一氧化氮合酶、脂多糖等有重要的联系。孙虎山等分别研究了 M-ENK 和 L-ENK 对栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 的免疫调节作用, 发现在体外条件下, 较低浓度的 M-ENK 对栉孔扇贝具有免疫促进作用, 而较高浓度的 M-ENK 则具有免疫抑制作用, 体外实验中发现不同剂量的 ENK 对栉孔扇贝中的抗氧化酶体系、水解酶、一氧化氮和一氧化氮合酶以及血细胞的吞噬能力等都有显著的影响, 说明 ENK 参与了双壳贝类的免疫调节作用<sup>[62-65]</sup>。

## 5 无脊椎动物中 ENK 作用机理研究

随着研究的深入, 人们对包括 ENK 在内的

阿片肽类物质的作用机理进行了探索, ENK 等阿片肽类物质与其受体结合后可将细胞膜上 GTP 结合蛋白激活, 降低细胞内 cAMP 水平<sup>[66]</sup>。cAMP 将依赖  $Ca^{2+}$  的蛋白酶激活, 促进磷酸化反应, 激活一系列信号通路<sup>[67]</sup>。但目前有关无脊椎动物 ENK 作用机理的研究报道还相对较少, 依据高等动物中的作用机理猜测 ENK 等阿片类物质有可能通过调节 cAMP 水平对贝类等无脊椎动物进行功能调节。

近年来, 有关无脊椎动物 ENK 的研究报道相对减少, 原来从进化角度研究无脊椎动物阿片神经肽的科学工作者逐渐将更多的精力投向了高等动物中的相关研究, 但 ENK 类物质广泛分布于贝类等无脊椎动物体内, 从进化的角度说明其是一种古老而又保守的神经肽物质已成为不争的事实。研究表明, 无脊椎动物神经系统和免疫细胞甚至其他一些组织中的分泌细胞都可以分泌产生 ENK 类物质, 神经系统通过调节 ENK 以及其他阿片肽物质的生成、释放与降解, 从而使其参与无脊椎动物的各种生理调节作用。目前的研究资料表明, 在无脊椎动物乃至在高等动物中, 对于 ENK 以及其他阿片肽物质在机体中的一些分子作用机理仍然处于初始研究阶段, 还需要更加深入的探讨。

## 参 考 文 献

- [1] 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 (5536): 577 - 580.
- [2] Del F M, Levanti M C, Contini M, et al. Localization of substance P-and enkephalin-like immunoreactivity in the human paravertebral sympathetic ganglia. *Basic and Applied Histochemistry*, 1985, 29(4): 309 - 320.
- [3] Fingerman M, Hanumante M M, Kulkarni G K, et al. Localization of substance P-like, leucine-enkephalin-like, methionine-enkephalin-like, and Fmrfamide-like immunoreactivity in the eyestalk of the fiddler crab, *Uca pugnator*. *Cell Tissue Research*, 1985, 241(3): 473 - 477.
- [4] Kulmala H K. Immunocytochemical localization of enkephalin-like immunoreactivity in neurons of human hippocampal formation: effects of ageing and Alzheimer's

- disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 1985, 11(2): 105 - 115.
- [ 5 ] Nihei K, Iwanaga T. Localization of Met-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8-like immunoreactivity in the gastrointestinal tract of rat and pig. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1985, 33(10): 1001 - 1006.
- [ 6 ] Zagon I S, McLaughlin P J. Ultrastructural localization of enkephalin-like immunoreactivity in developing rat cerebellum. *Neuroscience*, 1990, 34(2): 479 - 489.
- [ 7 ] Lee Y S, Petrov R, Park C K, et al. Development of novel enkephalin analogues that have enhanced opioid activities at both mu and delta opioid receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, 50(22): 5528 - 5532.
- [ 8 ] Denning G M, Ackermann L W, Barna T J, et al. Proenkephalin expression and enkephalin release are widely observed in non-neuronal tissues. *Peptides*, 2008, 29(1): 83 - 92.
- [ 9 ] Shoblock J R, Maidment N T. Enkephalin release promotes homeostatic increases in constitutively active mu opioid receptors during morphine withdrawal. *Neuroscience*, 2007, 149(3): 642 - 649.
- [ 10 ] 谢启文. 神经肽. 上海: 复旦大学出版社, 2004: 125 - 151.
- [ 11 ] Stefano G B, Catapane E J. Enkephalins increase dopamine levels in the CNS of a marine mollusc. *Life Sciences*, 1979, 24(17): 1617 - 1621.
- [ 12 ] King J A, Millar R P. Radioimmunoassay of methionine (5)-enkephalin sulphoxide: phylogenetic and anatomical distribution. *Peptides*, 1980, 1(3): 211 - 216.
- [ 13 ] Mancillas J R, McGinty J F, Selverston A I, et al. Immunocytological localization of enkephalin and substance P in retina and eyestalk neurons of lobster. *Nature*, 1981, 293(15): 576 - 578.
- [ 14 ] Stefano G B, Scharrer B. High affinity binding of an enkephalin analog in the cerebral ganglion of the insect *Leucophaea maderae* (Blattaria). *Brain Research*, 1981, 225(1): 107 - 114.
- [ 15 ] Laurent V, Salzet M. Metabolism of enkephalins in head membranes of the leech *Theromyzon tessulatum* by peptidases: isolation of an enkephalin-degrading aminopeptidase. *Regulatory Peptides*, 1996, 65(2): 125 - 131.
- [ 16 ] Duvaux M O, Leung M K, Capron A, et al. *Schistosoma mansoni*: an enkephalinergic system that may participate in internal and host-parasite signaling. *Experimental Parasitology*, 1993, 76(1): 76 - 84.
- [ 17 ] Leung M K, Stefano G B. Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Mollusca). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, 81(3): 955 - 958.
- [ 18 ] Stefano G B, Leung M K. Presence of Met-enkephalin-Arg6-Phe7 in molluscan neural tissues. *Brain Research*, 1984, 298(2): 362 - 365.
- [ 19 ] Marino G, Palmisano A, Di Marzo V, et al. Native opioid-like peptides in *Squilla mantis* ganglia. *Peptides*, 1985, 6(Suppl 3): 403 - 406.
- [ 20 ] Davenport A P, Evans P D. Sex-related differences in the concentration of Met-enkephalin-like immunoreactivity in the nervous system of an insect, *Schistocerca gregaria*, revealed by radioimmunoassay. *Brain Research*, 1986, 383(1/2): 319 - 322.
- [ 21 ] Andersen A C, Hermite A, Ferrand R, 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*. *General and Comparative Endocrinology*, 1986, 62(1): 111 - 119.
- [ 22 ] Breslin M B, Lindberg I, Benjannet S, et al. Differential processing of proenkephalin by prohormone convertases 1 (3) and 2 and furin. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(36): 27084 - 27093.
- [ 23 ] Salzet M, Stefano G B. Invertebrate proenkephalin: delta opioid binding sites in leech ganglia and immunocytes. *Brain Research*, 1997, 768(1/2): 224 - 232.
- [ 24 ] Isaac R, Schoofs L, Williams T A, et al. A novel peptide-processing activity of insect peptidyl-dipeptidase A (angiotensin I-converting enzyme): the hydrolysis of lysyl-arginine and arginyl-arginine from the C-terminus of an insect prohormone peptide. *Biochemical Journal*, 1998, 330(1): 61 - 65.
- [ 25 ] Salzet M, Bulet P, Verger B M, et al. Isolation and structural characterization of enkephalins in the brain of the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. *FEBS Letters*, 1995, 357(2): 187 - 191.
- [ 26 ] Gutiérrez R, Asai M. IR-Met and IR-leu-enkephalin content in the periesophageal ganglia of *Helix aspersa* seasonal variations. *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1991, 100(3): 609 - 613.
- [ 27 ] 王爱民, 马春, 安丽荣. 脑啡肽酶 (neprilysin) 和阿尔茨海默病. *生命的化学*, 2001, 21(6): 510 - 520.
- [ 28 ] Stefano G B, Shipp M A, Scharrer B. A possible immunoregulatory function for [Met]-enkephalin-Arg6-Phe7 involving human and invertebrate granulocytes.

- Journal of Neuroimmunology, 1991, 31(2): 97-103.
- [29] Leung M K, Stefano G B, Jimenez L. Soluble and membrane-bound Met-enkephalin degrading peptidases in *Mytilus edulis* hemolymph. *Acta Biologica Hungarica*, 1992, 43(1/4): 275-280.
- [30] Leung M K, Le S, Houston S, et al. Degradation of Met-enkephalin by hemolymph peptidases in *Mytilus edulis*. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1992, 12(5): 367-378.
- [31] Stefano G B, Paemen L R, Hughes T K Jr. Autoimmunoregulation: differential modulation of CD10/neutral endopeptidase 24.11 by tumor necrosis factor and neuropeptides. *Journal of Neuroimmunology*, 1992, 41(1): 9-14.
- [32] Fricker L D, Herbert E. Comparison of a carboxypeptidase E-like enzyme in human, bovine, mouse, *Xenopus*, shark and *Aplysia* neural tissue. *Brain Research*, 1988, 453(1/2): 281-286.
- [33] Bawab W, Querido E, Crine P, et al. Identification and characterization of aminopeptidases from *Aplysia californica*. *Biochemical Journal*, 1992, 286(3): 967-975.
- [34] Bawab W, Aloyz R S, Crine P, et al. Identification and characterization of a neutral endopeptidase activity in *Aplysia californica*. *Biochemical Journal*, 1993, 296(2): 459-465.
- [35] Coletti M A, Matras H, Zwilling R, et al. Enkephalin-degrading activity in arthropod hemolymph. *Neuropeptides*, 1985, 6(5): 405-415.
- [36] Saksida L M, Galea L A, Kavaliers M. Antinociceptive effects of the enkephalinase inhibitor, SCH 34826, in the snail, *Cepaea nemoralis*. *Peptides*, 1993, 14(4): 763-765.
- [37] Stefano G B, Scharer B, Smith E M, et al. Opioid and opiate immunoregulatory processes. *Critical Reviews in Immunology*, 1996, 16(2): 109-144.
- [38] Stefano G B, Cadet P, Scharer B. 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*, 1989, 86(16): 6307-6311.
- [39] Thomas A W, Kavaliers M, Prato F S, et al. Pulsed magnetic field induced "analgesia" in the land snail, *Cepaea nemoralis*, and the effects of mu, delta, and kappa opioid receptor agonists/antagonists. *Peptides*, 1997, 18(5): 703-709.
- [40] Liu D W. 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): 16-20.
- [41] Martin K I, Gabrilovac J. The effect of delta-opioid agonists on intracellular calcium level in MOLT-4 T-cell line. *International Journal of Immunopathology Pharmacology*, 1999, 12(3): 113-119.
- [42] Liu X H, Huang D A, Yang F Y, et al. A new cytokine: the possible effect pathway of methionine enkephalin. *World Journal of Gastroenterology*, 2003, 9(1): 169-173.
- [43] Heagy W, Teng E, Lopez P, et al. Enkephalin receptors and receptor-mediated signal transduction in cultured human lymphocytes. *Cellular Immunology*, 1999, 191(1): 34-48.
- [44] Martin K I, Gabrilovac J. Increase of intracellular cAMP level in human peripheral blood mononuclear cells by Met-enkephalin. *Acta Pharmaceutica*, 1997, 47(1): 9-14.
- [45] Dalton L M, Widdowson P S. The involvement of opioid peptides in stress induced analgesia in the slug *Arion ater*. *Peptides*, 1989, 10(1): 9-13.
- [46] Quackenbush L S, Fingerman M. Regulation of neurohormone release in the fiddler crab, *Uca pugnator*: effects of gamma-aminobutyric acid, octopamine, Met-enkephalin, and beta-endorphin. *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1984, 79(1): 77-84.
- [47] Kulkarni G K, Fingerman M. Distal retinal pigment of the fiddler crab, *Uca pugnator*: release of the dark-adapting hormone by methionine enkephalin and FMRFamide. *Pigment Cell Research*, 1987, 1(1): 51-56.
- [48] Martinez E A, Murray M, Leung M K, et al. Evidence for dopaminergic and opioid involvement in the regulation of locomotor activity in the land crab *Gecarcinus lateralis*. *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1988, 90(1): 89-93.
- [49] Reddy P S. A neurotransmitter role for methionine-enkephalin in causing hyperglycemia in the fresh water crab *Oziotelphusa senex senex*. *Current Science*, 1999, (76): 1126-1128.
- [50] Reddy P S, Kishori B. Methionine-enkephalin induces hyperglycemia through eyestalk hormones in the estuarine crab *Scylla serrata*. *The Biological Bulletin*, 2001, 201(1): 17-25.

- [51] Reddy P S. Involvement of opioid peptides in the regulation of reproduction in the prawn *Penaeus indicus*. *Naturwissenschaften*, 2000, 87(12): 535 - 538.
- [52] Sarojini R, Nagabhushanam R, Fingerman M. *In vivo* assessment of opioid agonists and antagonists on ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1996, 115(2): 149 - 153.
- [53] Cacicedo L, Sanchez F F. Direct action of opioid peptides and naloxone on gonadotropin secretion by cultured rat anterior pituitary cells. *Life Sciences*, 1986, 38(7): 617 - 625.
- [54] Chao C C, Moss G E, Malven P V. Direct opioid regulation of pituitary release of bovine luteinizing hormone. *Life Sciences*, 1986, 39(6): 527 - 534.
- [55] Stefano G B, Smith E M, Cadet P, 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): 177 - 184.
- [56] Stefano G B, Smith E M, Hughes T K. 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): 29 - 34.
- [57] Cooper E L, Leung M K, Suzuki M M, et al. An enkephalin-like molecule in earthworm coelomic fluid modifies leukocyte behavior. *Developmental and Comparative Immunology*, 1993, 17(3): 201 - 209.
- [58] Renzelli C R, Kaloustian K V. Evidence for the involvement of opioid peptides in phagocytosis, conformation, granulation and aggregation of immunocompetent *Lumbricus terrestris* amoebocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1995, 111(2): 205 - 211.
- [59] Osman, A M, Gomma M, Saad A H. A possible role for an enkephalinergic system in the internal defense mechanism of *Biomphalaria alexandrina* exposed to *Schistosoma mansoni*. *Journal of the Egyptian Society Parasitology*, 2003, 33(3): 841 - 861.
- [60] Stefano G B, Leung M K, Zhao X H, et al. Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, 86(2): 626 - 630.
- [61] Stefano G B, Digenis A, Spector S, et al. Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90(23): 11099 - 11103.
- [62] 陈振英, 王宜艳, 孙虎山. 甲硫氨酸脑啡肽对栉孔扇贝血细胞吞噬和包裹化作用的影响. *水产科学*, 2005, 24(5): 8 - 10.
- [63] 孙虎山, 王宜艳. 甲硫氨酸脑啡肽对栉孔扇贝血淋巴中 2 种自由基的影响. *海洋通报*, 2006, 25(5): 29 - 35.
- [64] 王娜娜, 孙虎山, 王宜艳. 脑啡肽对栉孔扇贝血细胞聚集和附贴的影响. *海洋科学*, 2006, 30(9): 28 - 30.
- [65] 刘东武, 孙虎山. 亮氨酸脑啡肽对栉孔扇贝血细胞吞噬作用的影响. *湖北农业科学*, 2007, 46(2): 281 - 282.
- [66] Stefano G B, Leung M K. Purification of opioid peptides from molluscan ganglia. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1982, 2(4): 347 - 352.
- [67] Chakrabarti S, Wang L, Tang W J, et al. Chronic morphine augments adenylyl cyclase phosphorylation: relevance to altered signaling during tolerance/dependence. *Molecular Pharmacology*, 1998, 54(6): 949 - 953.