

学校编码: 10384
学号: 22320141151356

密级_____

廈門大學

硕士学位论文

内源性大麻素在翡翠贻贝 (*Perna viridis*) 附着中的作用

The role of endocannabinoids in the attachment of green mussel, *Perna viridis*

盛彦青

指导教师姓名: 柯才焕教授
冯丹青副教授
专业名称: 海洋生物学
论文提交日期: 2017年5月
论文答辩时间: 2017年5月

2017年05月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于年月日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

| | |
|---|-----------|
| 摘要..... | I |
| Abstract | III |
| 第一章 绪论 | 1 |
| 1.1 内源性大麻素系统 | 1 |
| 1.1.1 N-花生四烯酰乙醇胺 (anandamide, AEA) | 2 |
| 1.1.2 2-花生四烯酰甘油酯 (2-arachidonoylglycerol, 2-AG) | 3 |
| 1.1.3 油酰乙醇胺 (N-Oleoylethanolamide, OEA) | 4 |
| 1.1.4 棕榈酰乙醇胺 (N-Palmitoylethanolamide, PEA) | 4 |
| 1.2 大麻素受体 | 5 |
| 1.2.1 大麻素受体 1 (CB1) | 5 |
| 1.2.2 大麻素受体 2 (CB2) | 6 |
| 1.2.3 大麻素受体激动剂和拮抗剂 | 6 |
| 1.3 大麻素系统在无脊椎动物中的研究 | 7 |
| 1.3.1 无脊椎动物中的大麻素系统 | 7 |
| 1.3.2 无脊椎动物中内源性大麻素受体系统的进化..... | 10 |
| 1.4 大麻素对无脊椎动物附着作用的研究 | 12 |
| 1.5 研究内容和意义 | 13 |
| 第二章 内源性大麻素对翡翠贻贝附着的影响及其机理的探索 | 16 |
| 2.1 材料和方法 | 16 |
| 2.1.1 实验材料 | 16 |
| 2.1.2 实验试剂 | 16 |
| 2.1.3 实验方法 | 17 |
| 2.2 结果 | 21 |
| 2.2.1 内源性大麻素对翡翠贻贝附着的影响 | 21 |
| 2.2.2 大麻素激动剂对翡翠贻贝附着的影响 | 26 |
| 2.2.3 大麻素拮抗剂对翡翠贻贝附着的影响 | 29 |

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| 2.2.4 大麻素对翡翠贻贝附着蛋白表达的影响 | 32 |
| 2.3 讨论..... | 34 |
| 第三章 翡翠贻贝中内源性大麻素的提取和含量测定..... | 38 |
| 3.1 材料和方法..... | 38 |
| 3.1.1 实验仪器 | 38 |
| 3.1.2 实验所需试剂..... | 39 |
| 3.1.3 实验材料 | 39 |
| 3.1.4 实验方法 | 40 |
| 3.2 结果..... | 43 |
| 3.2.1 四种内源性大麻素在翡翠贻贝中含量的测定结果 | 43 |
| 3.2.2 花生四烯酸在不同组分翡翠贻贝中含量的测定结果 | 47 |
| 3.3 讨论..... | 50 |
| 第四章 翡翠贻贝附着的转录组学研究 | 53 |
| 4.1 材料和方法..... | 53 |
| 4.1.1 实验材料 | 53 |
| 4.1.2 总 RNA 的提取 | 53 |
| 4.1.3 DGE 建库和测序..... | 54 |
| 4.1.4 序列比对、注释和差异基因获得..... | 55 |
| 4.1.5 GO 和 KEGG 富集分析 | 56 |
| 4.1.6 荧光定量 PCR 验证 | 56 |
| 4.2 结果..... | 57 |
| 4.2.1 总 RNA 质量检测 | 57 |
| 4.2.2 测序质量评估..... | 58 |
| 4.2.3 转录本拼接 | 59 |
| 4.2.4 基因功能注释..... | 59 |
| 4.2.5 样品间 RNA-seq 相关性检查 | 64 |
| 4.2.6 基因差异表达分析..... | 65 |
| 4.2.7 荧光定量 PCR 结果 | 67 |
| 4.3 讨论..... | 68 |

| | |
|----------------------|----|
| 第五章 论文主要结论和创新点 | 72 |
| 5.1 结论 | 72 |
| 5.2 本研究的创新点 | 73 |
| 5.3 展望 | 73 |
| 参考文献 | 74 |
| 致谢 | 88 |

厦门大学博硕士论文摘要库

Content

| | |
|--|------------|
| Abstract in Chinese | I |
| Abstract in English | III |
| Chapter 1 Introduction | 1 |
| 1.1 Endocannabinoid system | 1 |
| 1.1.1 AEA..... | 2 |
| 1.1.2 2-AG..... | 3 |
| 1.1.3 OEA..... | 4 |
| 1.1.4 PEA | 4 |
| 1.2 CBR | 5 |
| 1.2.1 CBR1 | 5 |
| 1.2.2 CBR2..... | 6 |
| 1.2.3 Cannabinoid receptor agonist and antagonist | 6 |
| 1.3 The study of cannabinoid system in invertebrate | 7 |
| 1.3.1 Cannabinoid system in invertebrate | 7 |
| 1.3.2 Evolution of the endocannabinoid receptor system in invertebrate .. | 10 |
| 1.4 Study on the attachment mechanism of marine invertebrate | 12 |
| 1.5 Research content and significance | 13 |
| Chapter 2 The effect of endocannabinoid on the attachment of <i>Perna viridis</i> and its mechanism | 16 |
| 2.1 Materials and methods | 16 |
| 2.1.1 Experimental materials..... | 16 |
| 2.1.2 Experimental reagents | 16 |
| 2.1.3 Experimental methods..... | 17 |
| 2.2 Result | 21 |
| 2.2.1 Effect of endocannabinoid on the attachment of <i>Perna viridis</i> | 21 |
| 2.2.2 Effect of cannabinoid agonists on the attachment of <i>Perna viridis</i> .. | 26 |

| | | |
|--|--|-----------|
| 2.2.3 | Effect of cannabinoid antagonists on the attachment of <i>Perna viridis</i> | 29 |
| 2.2.4 | Effects of cannabinoids on the expression of adhesive proteins in <i>Perna viridis</i> | 32 |
| 2.3 | Discussion | 34 |
| Chapter 3 Extraction and determination of endocannabinoid in <i>Perna viridis</i> | | 38 |
| 3.1 | Materials and methods | 38 |
| 3.1.1 | Experimental instrument | 38 |
| 3.1.2 | Experimental reagents | 39 |
| 3.1.3 | Experimental materials | 39 |
| 3.1.4 | Experimental methods | 40 |
| 3.2 | Result | 43 |
| 3.2.1 | Determination of four endocannabinoids in <i>Perna viridis</i> | 43 |
| 3.2.2 | Determination of AA in <i>Perna viridis</i> | 47 |
| 3.3 | Discussion | 50 |
| Chapter 4 Transcriptome study on the attachment of <i>Perna viridis</i> | | 53 |
| 4.1 | Materials and methods | 53 |
| 4.1.1 | Experimental materials | 53 |
| 4.1.2 | Extraction of total RNA | 53 |
| 4.1.3 | DGE library construction and sequencing | 54 |
| 4.1.4 | Sequence alignment, annotation and different gene acquisition | 55 |
| 4.1.5 | GO and KEGG enrichment analysis | 56 |
| 4.1.6 | qPCR | 56 |
| 4.2 | Result | 57 |
| 4.2.1 | Total RNA quality detection | 57 |
| 4.2.2 | Sequencing quality assessment | 58 |
| 4.2.3 | Transcript splicing | 59 |
| 4.2.4 | Annotation | 59 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.5 RNA-seq correlation test between samples | 64 |
| 4.2.6 Differential gene expression analysis | 65 |
| 4.2.7 Result of qPCR | 67 |
| 4.3 Discussion | 68 |
| Chapter 5 Conclusion and prospects..... | 72 |
| 5.1 Conclusion..... | 72 |
| 5.2 Innovations..... | 73 |
| 5.3 Prospects..... | 73 |
| References | 74 |
| Acknowledgements..... | 88 |

摘要

大麻素是一类能够通过作用于大麻素受体, 调节神经递质释放, 从而调节神经、免疫等功能的化合物。人体内合成和分泌的一些小分子化合物也能作用于大麻素受体, 被称为内源性大麻素。在无脊椎动物中内源性大麻素已有发现。目前, 已在紫贻贝中 (*Mytilus edulis*)、淡水水螅 (*Hydra vulgaris*) 等中提取到 N-花生四烯酰乙醇胺 (anandamide, AEA)、2-花生四烯酰甘油酯 (2-arachidonoylglycerol, 2-AG) 等内源性大麻素 (Sepe et al., 1998)。并且, 在斑马贻贝 (*Dreissena polymorpha*) 中的研究表明, AEA 及其类似物能够抑制斑马贻贝的附着, 并且这个作用是可逆的, 说明内源性大麻素很可能参与斑马贻贝附着的调控 (Angarano et al., 2009)。翡翠贻贝 (*Perna viridis*) 作为我国沿海一种主要的污损贝类, 关于其附着的相关机制, 研究相对较少。本文, 根据以上研究结果, 初步探讨了内源性大麻素在翡翠贻贝附着中的作用。得到的主要结果如下:

(1) AEA、2-AG、AA 对翡翠贻贝的附着均有一定的抑制作用。它们可能参与了翡翠贻贝附着的调控。大麻素受体激动剂 AM1241、HU308 以及 MAGL 降解酶 JZL184 对翡翠贻贝的附着也有一定的抑制作用。说明 AEA、2-AG 可能是通过翡翠贻贝大麻素受体对其附着进行调控的。CB1 受体拮抗剂 SR141716A 与 AM251 对 AEA 在翡翠贻贝附着中的作用并没有明显的竞争性抑制作用, CB2 受体拮抗剂 SR144528 对 2-AG 在翡翠贻贝附着中的作用也没有明显的抑制作用。说明翡翠贻贝中虽然很可能存在大麻素受体, 但是与脊椎动物中的大麻素受体不完全相同。AEA 和 2-AG 对翡翠贻贝附着蛋白表达的影响实验结果表明, AEA 可能是通过影响了 FP1V-1 的表达, 从而抑制了翡翠贻贝的附着。2-AG 可能是通过影响了 FP1V-1、FP1V-2、FP2、FP4V-1 和 FP4V-2 的表达从而抑制了翡翠贻贝的附着。

(2) LC-MS/MS 结果表明, 翡翠贻贝中确实存在 AEA、2-AG、OEA、PEA 四种内源性大麻素。附着和不附着翡翠贻贝内源性大麻素含量对比, 结果表明不附着翡翠贻贝中 2-AG 的含量较高, 说明 2-AG 可能参与了翡翠贻贝不附着的调控。

(3) 转录组 Unigene 的注释中, 在 Nr 数据库中注释到一个 CB1 类受体。证明

翡翠贻贝中确实存在大麻素受体。附着和不附着翡翠贻贝转录组结果表明，在不附着组中 2-AG 的含量比 CON 组确实要高。对转录组进行差异表达分析，结果表明。一方面 2-AG 可能作用于突触前膜上的 TRP 离子通道，使细胞内 Ca^{2+} 浓度降低，引起 DSE 现象，导致 NO 合成受阻，从而抑制翡翠贻贝的附着。另一方面 2-AG 可能作用于线粒体膜上的 CB 受体，影响细胞内能量的代谢，从而抑制翡翠贻贝的附着。

关键词：翡翠贻贝；内源性大麻素；附着；转录组；作用机理

Abstract

Cannabinoids are compounds that modulate neurotransmitter, immune, and other functions by acting on cannabinoid receptors and modulating neurotransmitter release. Some small molecules synthesized and secreted in the body can act on cannabinoid receptors, also known as endocannabinoid. Endogenous cannabinoids have been found in invertebrates. At present, AEA, 2-AG and other endogenous cannabinoids have been extracted from *Mytilus edulis* and *Hydra vulgaris*. Moreover, studies in *Dreissena polymorpha* show that AEA and its analogues can inhibit the attachment of mussels in the *Dreissena polymorpha*, and this process is reversible. It suggests that endocannabinoids may be involved in the regulation of *Dreissena polymorpha* attachment. As one of the main fouling shellfish in the coastal area of China, the attachment mechanism of *Perna viridis* is really less studied. Based on the results of this study, the role of endocannabinoids in the attachment of *Perna viridis* was preliminarily discussed. The main results obtained are as follows:

- (1) Effects of AEA, 2-AG, OEA, PEA and AA on the adhesion of *Perna viridis* shows that AEA, 2-AG and AA had some inhibitory effects on the adhesion of *Perna viridis*. Experiments *In vitro* showed that AM1241, HU308 and 2-AG degrading enzyme inhibitor JZL184 had some inhibitory effects on the adhesion of *Perna viridis*. These results suggest that AEA and 2-AG may regulate the attachment of *Perna viridis* by cannabinoid receptors. Effect of CB1 receptor antagonist SR141716A and AM251 on AEA have no obviously competitive inhibition in the attachment of *Perna viridis*. The effects of AEA and 2-AG on the expression of adhesion proteins in *Perna viridis* showed that AEA might affect the expression of FP1V-1, which could inhibit the adhesion of *Perna viridis*. While 2-AG may affect the expression of FP1V-1, FP1V-2, FP2, FP4V-1 and FP4V-2, which could inhibit the adhesion of *Perna viridis*.
- (2) The LC-MS/MS results showed that *Perna viridis* do contain four kinds of endogenous AEA, 2-AG, OEA, PEA. Moreover, the content of 2-AG in unattached

mussels was higher than that in attached mussels, indicating that 2-AG might be involved in the regulation of unattachment in *Perna viridis*.

- (3) In the annotation of the transcriptome Unigene, a CB1-like receptor is annotated in the Nr database which proved that there are cannabinoid receptors in *Perna viridis*. The results of transcriptome showed that the content of 2-AG in unattached mussels was higher than that in attached. Differential expression analysis was performed between the two groups. The results showed that On the one hand, 2-AG may act on the TRP ion channel on the presynaptic membrane, which can reduce the concentration of Ca^{2+} in cell, cause the DSE phenomenon, and lead to the reduce of NO .While NO was reported to be involved in the attachment of Bivalves. On the other hand, 2-AG may act on the CB receptor on the mitochondrial membrane, affecting the energy metabolism in the cell, thus inhibiting the attachment of *Perna viridis*.

Key words: *Perna viridis*; endocannabinoid; attachment; transcriptome; mechanism

第一章 绪论

大麻素 (Cannabinoid) 是一类作用于大麻素受体, 调节神经递质释放, 从而产生一系列的生理药理效应的化合物 (Didier et al., 2005)。植物性大麻素中研究最多的是 Δ^9 -四氢大麻酚 (Δ^9 -tetrahydrocannabinol, Δ^9 -THC), 它具有强烈的成瘾性和麻醉性, 对疼痛调节、青光眼、哮喘、情绪调节和神经系统保护等都具有疗效, 在临床治疗上有着重要的作用。另外, 人体内合成和分泌的一些小分子化合物也能作用于大麻素受体, 被称为内源性大麻素 (endocannabinoids, eCB) (Mechoulam et al., 2000)。目前研究较多有 N-花生四烯酰乙醇胺 (anandamide, AEA)、2-花生四烯酰甘油酯 (2-arachidonoylglycerol, 2-AG) 和类内源性大麻素油酰乙醇胺 (N-Oleoylethanolamide, OEA)、棕榈酰乙醇胺 (N-Palmitoylethanolamide, PEA) 等 (Evans et al., 1992; Fu et al., 2003; Costa et al., 2008)。大麻素受体在生物体内分布十分广泛, 涵盖了神经、免疫、消化等多个系统。目前研究较多的有两种大麻素受体: 大麻素受体 I 型 (CB1) 和大麻素受体 II 型 (CB2) (Howlett et al., 2002)。内源性大麻素及其受体在许多无脊椎动物中也有发现, 并在其生物学过程中起到很重要的作用, 如降低其对外界环境变化的感应、控制生殖、影响摄食、抗炎和影响神经传递等 (Salzet & Stefano, 2002)。

1.1 内源性大麻素系统

内源性大麻素是生物体自身合成和分泌的脂类化合物, 跟外源性大麻素一样它们也能作用于 CB 受体。目前研究最多的为花生四烯酸的衍生物, 主要是 AEA 和 2-AG (Devane et al., 1992)。人体内还存在一些小分子脂类化合物, 也能起到和花生四烯酸类相似的功能, 如 OEA、PEA 等, 我们把它们称为类内源性大麻素 (Rodríguez et al, 2005)。

能水解 OEA,PEA 等多种脂肪酸酰胺 (Giang & Cravatt, 1997)。AEA 转运蛋白 (FAAH-like anandamide transporter, FLAT) 包含 512 个氨基酸, 可特异性的结合 AEA, 并将 AEA 从高浓度部位转到低浓度部位, 这种转运不需要能量, 即可从胞外转到胞内也可以从胞内转到胞外 (Fu et al., 2012)。FLAT 和 FAAH 由同一个 Faah 基因编码, 二者的氨基酸序列由很大的同源性。迄今为止, 已经发现了很多 FAAH 抑制剂, 主要分为底物类似物(如: AA5HT, Seierstad & Breitenbucher, 2009)、 α -酮杂环类(如: 花生四烯基三氟甲基酮)、氨基甲酸酯类(如: URB524, Kathuria et al., 2007) 等。目前发现的选择性 FLAT 抑制剂有 AM404 (Glaser et al, 2003)、ARN272、UCM707 (López-Rodríguez et al, 2003) 等。

1.1.2 2-花生四烯酰甘油酯 (2-arachidonoylglycerol, 2-AG)

2-AG 是体内另外一种比较重要的内源性大麻素物质, 跟 AEA 一样, 对 CB1/CB2 受体均有作用。由于 2-AG 在脑组织含量要显著高于 AEA (Mangieri & Piomelli, 2007), 而且有研究发现 2-AG 对 G 蛋白偶联受体的激动作用要强于 AEA (Lutz, 2009)。在小鼠的实验中发现, 体内的 AEA 长期缺失并不会对小鼠的正常生理功能产生影响, 但是 2-AG 的长期缺失却会小鼠一系列功能失衡。2-AG 除了在脑组织等中枢神经系统的含量较高以外, 在肝脏、肺、脾脏、肾等外周脏器中也有被检测到 (Leung et al, 2006)。

突触后神经元接受刺激后, 细胞膜上的磷脂酶 C (Phospholipase C, PLC) 被活化, 活化的 PLC 水解细胞膜上磷脂酰肌醇二磷酸酯 (Phosphatidylinositol Bisphosphate, PIP₂) 形成甘油二酯 (Diacylglycerol, DAG), DAG 可被二酰甘油酯酶 (Diacylglycerol Lipase, DAGL) 裂解产生 2-AG。2-AG 被释放到突触间隙, 引起细胞一系列反应后, 会被膜上的转运蛋白再次摄入到细胞内 (目前 2-AG 的载体蛋白研究还尚未被发现), 在单酰甘油酯酶 (Monoacylglycerol Lipase, MAGL) 的作用下发生降解, 降解产物为花生四烯酸 (Arachidonic, AA) 和甘油 (Labar G et al., 2010)。

DAGL 包括 2 种亚型, DAGL α 和 DAGL β , 二者同为丝氨酸水解酶, 并且都是跨膜蛋白, 具有 4 个跨膜区, 二者都可以水解各种二酰甘油酯 (Diacylglycerol, DG) 成为单酰甘油酯 (Mono Diacylglycerol, MG)。DAGL α 主要分布在大脑和

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库