

多巴胺神经通路及其对蜜蜂行为的影响*

李莉 刘芳 苏松坤**

(浙江大学动物科学学院 杭州 310058)

摘 要 蜜蜂复杂的社会行为受到了研究者的广泛关注,了解蜜蜂的学习、记忆、导航、信息传递等行为的神经分子基础,可对探索人类自身的脑科学和复杂社会行为的分子基础提供比较研究信息。本文综述了多巴胺的作用机制及其在蜜蜂行为中的作用,详细介绍了蜜蜂脑部的多巴胺受体,总结了蜜蜂脑部多巴胺水平的影响因子等,最后对进一步研究多巴胺神经通路对蜜蜂行为的作用及机制的前景做一展望。

关键词 蜜蜂, 行为, 多巴胺, 神经通路

Dopaminergic pathways and its effects on honeybee behaviors

LI Li LIU Fang SU Song-Kun**

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract The complex social behaviors of honeybees have attracted extensive scientific interest. The discovery of the neural and molecular basis of honeybee behaviors, such as learning, memory, navigation and so on, provide rich information with which to explore brain science and the molecular basis of complex social behaviors in human beings. This article reviews the dopamine mechanism and its roles in honeybee behaviors, describes dopamine receptors in the honeybee brain in detail, then sums up the impact factors of dopamine levels in honeybee brains. Finally, we evaluate the prospects for further study of dopaminergic pathways' effects on honeybee behaviors and the mechanism by which they achieve these effects.

Key words honeybee, behavior, dopamine, neural pathways

多巴胺(dopamine, DA)是脊椎动物和无脊椎动物神经系统中一种重要的神经递质。脊椎动物中,关于多巴胺能神经系统的研究比较深入,众多研究发现,多巴胺可以调节脑内的许多活动,如对运动的调节,对平衡、情感以及记忆等的调节,且与帕金森病存在密切关系。无脊椎动物中,对多巴胺能神经系统的研究虽不如脊椎动物的深入,但也取得了许多重大发现,如DA可影响昆虫的运动行为、昼夜节律、生长发育、性行为、内分泌及认知行为等。

多巴胺在蜜蜂中的作用及作用机制也得到了一定程度的研究,如多巴胺能神经通路参与蜜蜂昼夜节律的调节(Purnell *et al.*, 2000),控制蜜蜂的职能转变(Nomura *et al.*, 2009),调节蜜蜂生殖发育(Harano *et al.*, 2008),然而关于多巴胺对蜜

蜂的学习记忆、舞蹈行为影响的研究较少。本文对多巴胺能神经系统在蜜蜂中的研究情况进行了综述,并借鉴其在果蝇等其他昆虫中的研究,以期寻找调控蜜蜂学习记忆、舞蹈行为的神经分子机制提供新的思路。

1 蜜蜂脑部的多巴胺受体

目前,在脊椎动物中已发现5种多巴胺受体,即D1、D2、D3、D4和D5亚型,均已被克隆,并被分成2个受体亚型家族,即D1和D2家族,D1家族包括D1和D5亚型,D2家族包括D2、D3和D4亚型。D1型受体与配基结合时,可激活腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC),使环腺苷酸(cAMP)增加。D2型受体与配基结合时则抑制AC,使cAMP形成减少。

* 资助项目:现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(nycytx-43-kxj4)、浙江省自然科学基金(R3080306)。

**通讯作者, E-mail: susongkun@zju.edu.cn

收稿日期:2011-02-20,接受日期:2011-04-18

在蜜蜂体内,根据序列分析和对 cDNA 文库编码的受体的功能特征分析,2 种 D1 型的多巴胺受体已经被鉴定出来,即 *AmDOP1* 和 *AmDOP2*; Beggs 等(2005)鉴定出一种 D2 型的多巴胺受体 *AmDOP3*。通过放射性配体 [^3H]-SCH23390 和 [^3H]-spiperone 分别识别出蜜蜂脑部的 D1 型和 D2 型受体,发现两者在脑部的分布明显不同(Kokay *et al.*, 1999)。通过对比分析发现,蜜蜂中的一种多巴胺受体基因与果蝇的 D1 型受体基因具有很高的同源性,在工蜂和雄蜂脑中的蘑菇体中表达;另一种受体与脊椎动物的 D2 型受体类似,在蜜蜂脑部表达,但具体分布还不清楚。Beggs 等(2005)也对多巴胺的 3 种受体基因 *Amdop1*、*Amdop2* 和 *Amdop3* 进行了对比,发现 *Amdop3* 的表达形式与 *Amdop1* 或 *Amdop2* 不一样。通过检测蜜蜂蘑菇体中正在发育的 Kenyon 细胞内的 *Amdop1*、*Amdop2* 和 *Amdop3* 编码的 mRNAs,发现在蛹期 5 日龄,*Amdop1* 在 Kenyon 细胞的外周神经元致密区(OCCs),内部神经元致密区(ICCs)和非致密区(NCCs)都有高表达,*Amdop2* 在 OCCs 和 ICCs 两个区域也有高表达,而 *Amdop3* 在 3 个区都没有表达。对蜜蜂中脑和后脑的染色发现,*Amdop3* 的转录物在此区含量很高,要多于 *Amdop1* 和 *Amdop2* 的转录产物。通过对 3 种受体基因编码的 mRNAs 进行对比,寻找重复片段,进一步发现在脑部细胞中,D1、D2 型受体是存在相互作用的,这种相互作用也存在于蘑菇体神经元的亚细胞群中。

2 多巴胺的作用机制

昆虫体内,多巴胺的许多功能与脊椎动物是相似的,多巴胺受体不仅在结构上表现出显著的保守性,同时在功能上也体现了高度的相似性(Fryxell, 1995)。Andreic 等(2005)对黑腹果蝇的研究发现,其脑部的多巴胺系统尤其是对行为具有调节作用的多巴胺系统是保守的。目前,在蜜蜂领域,关于多巴胺的研究主要集中在多巴胺对蜜蜂某种行为或生长发育的影响,而对其作用途径尚未具体研究,但其他生物上的多巴胺研究为我们提供了很好的理论基础。

2.1 多巴胺的合成、释放与代谢

多巴胺能神经元可摄取血液中的酪氨酸,酪氨酸在胞浆内被酪氨酸羟化酶(tyrosine

hydroxylase, TH)催化成为多巴(DOPA, 主要为 L 型),再经多巴脱羧酶(DOPA decarboxylase, DDC)作用而生成多巴胺,多巴胺合成后储存在囊泡中。当多巴胺能神经元受到刺激后,多巴胺被释放到突触间隙,与受体结合。作用后期,大部分的多巴胺被突触前膜重摄取,其中一部分可被 DA 囊泡摄取再次使用,一部分则被代谢分解。少量的多巴胺被突触后膜摄取或在突触间隙内被分解。DA 的再摄取需要 DA 转运蛋白(dopamine transporter, DAT)的参与,其 cDNA 已被克隆。

多巴胺的代谢主要包括两种酶,单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)和儿茶酚氧位甲基转移酶(catechol-O-methyltransferase, COMT)。在 MAO 的作用下,多巴胺被氧化脱氢变成醛,进一步转化为酸或醇;在 COMT 的作用下,多巴胺的氧位甲基化,或者使多巴胺氧位与硫酸或葡萄糖醛酸结合形成复合物。在人体内,高香草酸是多巴胺在中枢的主要分解产物,而二羟苯乙酸(dihydroxy-phenyl acetic acid, DOPAC)是多巴胺在外周的主要代谢物(谢启文, 1999; 许绍芬, 1999)。

2.2 多巴胺的作用途径

多巴胺的作用途径在昆虫和脊椎动物体内是类似的,都是通过 G 蛋白偶联受体介导。当受体与配体结合后,通过与受体偶联的 G 蛋白的介导,使第二信使物质增多或减少,转而改变膜上的离子通道,引起膜电位发生变化。与 G 蛋白偶联受体有关的信号通路有:腺苷酸环化酶系统(AC 系统)、磷酸肌醇系统、视网膜光电信号传递系统、与嗅觉相关的信号传导系统、一氧化氮系统等,而多巴胺主要是通过腺苷酸环化酶系统产生各种生理效应(谢启文, 1999)。

当多巴胺与 D1 型受体结合后,将激活腺苷酸环化酶,引起 cAMP 含量的增加,cAMP 依赖蛋白激酶(protein kinase A, PKA)作用增强,从而引起相应的生理效应;当与 D2 型受体结合后,腺苷酸环化酶的活力受到抑制或不受影响,引起 cAMP 含量减少或无变化。现在认为,D2 受体可作用于电压依赖性的钙通道,从而抑制递质释放或产生其他效应(谢启文, 1999; 许绍芬, 1999; Blenau and Baumann, 2001)。

3 多巴胺在蜜蜂行为中的作用

脊椎动物中,多巴胺在获得奖励或躲避惩罚

的反应中起到了关键的作用。而在果蝇属中,多巴胺能的神经传递可对惩罚进行预测,能够将惩罚和条件刺激联系起来。Schwaerzel 等(2003)对果蝇的研究发现,多巴胺能神经元的突触释放的多巴胺对惩罚性学习是很重要的,但对奖励性学习没有影响。Zhang 等(2007)利用突变体果蝇研究果蝇基于价值的抉择行为及多巴胺-蘑菇体环路对其的调控机制,发现果蝇基于价值的抉择行为是需要多巴胺-蘑菇体神经环路参与的,并通过免疫染色的方法确定了多巴胺能神经突触与蘑菇体在解剖学上的关系。在对果蝇学习行为的研究中,已经通过构建突变体、活体成像、基因沉默等技术对果蝇脑部的 DA 神经系统进行了区域化,以及不同区域的功能研究,并希望今后通过研究单个 DA 神经元的活动清楚了解整个 DA 神经系统的活动,以及学习记忆行为的神经机制(Waddell, 2010),这为我们研究蜜蜂提供了很好的借鉴。

关于多巴胺对蜜蜂行为的研究较少,但可以确定的是多巴胺在蜜蜂的采集、学习记忆等行为中起着举足轻重的作用。多巴胺转运蛋白(DAT)作为多巴胺神经系统中的一种特异性蛋白,它的表达可以反映多巴胺能神经元的活动。Nomura 等(2009)鉴定了蜜蜂中 DAT 的基因 *dat* (*Amdat*),并通过逆转录的实时定量 PCR 检测了它在蜜蜂脑部的表达程度,发现 *Amdat* 在蜜蜂脑部的转录水平是随着年龄而增加的,而早熟的采集蜂比相同日龄的哺育蜂的表达水平要高,表明 *Amdat* 的表达与职能的转变有关,可见多巴胺通路的活动与蜜蜂的行为活动是相互联系的。

多巴胺与蜜蜂的学习记忆有关,章鱼胺调节得到奖励的奖励性学习(Hammer and Menzel, 1998),而多巴胺与受到惩罚的惩罚性学习有关(Vergoz *et al.*, 2007a)。Vergoz 等(2007a)通过注射章鱼胺受体拮抗剂和多巴胺受体拮抗剂,观察蜜蜂的伸刺反应的方法对蜜蜂的惩罚性学习进行了研究,发现注射了多巴胺受体拮抗剂的蜜蜂不会进行惩罚性学习,而章鱼胺对蜜蜂的惩罚性学习则不起作用。

多巴胺对蜜蜂运动行为有影响。Mustard 等(2010)向工蜂的血淋巴中注射多巴胺和多巴胺的受体拮抗剂三氟噻醇(flupenthixol),观察蜜蜂在有盖培养皿中的自由运动,结果发现实验组与对照

组的蜜蜂在行为表现上完全不同(包括行走、停止、转圈、理毛、飞行和扇翅等行为),而且行为的变化与药物的剂量和注射时间有关。为了检测多巴胺的信号通路是不是通过特定的受体起作用的,他们又用 RNA 干涉技术减少了 D1 型受体 *AmDOP2* 的表达量,发现蜜蜂在行走上所花的时间减少,而将花费更多的时间用来理毛或者停止运动。可以看出,多巴胺对蜜蜂的运动行为起着重要的调节作用。

4 蜜蜂脑部多巴胺水平的影响因子

4.1 蜂王信息素对脑内多巴胺水平的影响

蜂王信息素(queen mandibular pheromone, QMP)影响工蜂脑内多巴胺的水平,多巴胺受体基因的表达式及脑组织对多巴胺的反应(Beggs *et al.*, 2007)。Vergoz 等(2007b)研究发现,在幼年工蜂中,QMP 阻断惩罚性学习,但不影响奖励性学习。对照组的蜜蜂不接触 QMP,通过 6 h 的伸刺条件反射训练,将伸刺反应与某种气味相结合,他们学会了对厌恶气味的记忆。而用 QMP 处理过的蜜蜂对厌恶气味不能进行学习记忆。同时发现,QMP 的这种作用主要是通过高香草酸(homovanillic acid, HVA)起作用的,用 HVA 对蜜蜂进行处理,蜜蜂对厌恶气味的学习记忆会受到阻断。

4.2 日龄和 JH 对脑内多巴胺水平的影响

Harano 等(2008)检测了不同日龄雄蜂脑部的多巴胺水平,发现其与血淋巴中保幼激素的变化是一致的,DA 的浓度在羽化时最低,在 7 或 8 日龄最高。保幼激素(juvenile hormone, JH)的类似物可以增加幼年雄蜂脑部多巴胺的水平,可见 JH 可以调节 DA 的水平,通过调节 DA 水平来影响蜜蜂的生殖发育等其他生理功能。

4.3 药物处理对脑内多巴胺水平的影响

干扰 DA 合成及再摄取各步骤的药物常被用作工具药,以研究多巴胺能神经系统在各种生理功能中的作用。DA 受体的激动剂有阿朴吗啡(apomorphine)、培高利特(pergolide)、麦角腓(lergotril)等;受体拮抗剂有氟哌啶醇(haloperidol)、多潘立酮(domperidone)、舒必利(sulpiride)等。这些药物可以通过影响多巴胺与受体的结合来影响多巴胺的神经通路。不同药物

作用于不同类型的受体,妥拉唑林(tolazoline)的类似物 R(+)-SCH 23390 与 D1 型受体有很高的亲和力,但不与 D2 型受体结合。苯基甲酮类药物,如螺哌隆(spiperone)与 D2 型受体有很高的亲和力,但不与 D1 型受体结合,这样就可以选择性地用药,特异性地阻断某一受体,以研究不同的通路。 α -甲基酪氨酸可抑制 TH 的活性,从而减少 DA 合成,减弱 DA 的功能,而羟基多巴的大量投入,将损毁 DA 神经元(谢启文,1999)。蜜蜂体内蛇根碱(reserpine)可以降低生物胺的水平,并引起蜜蜂的运动障碍,而向蜜蜂大脑注射多巴胺,能修复由生物胺降低而引起的运动损伤(Menzel *et al.*, 1999)。

5 展望

目前为止,研究者已经从行为、激素及分子等不同水平对蜜蜂行为进行了研究,寻找到了与蜜蜂行为相关的某些因子,但具体的调控机制仍不清楚。前期研究认为,蜜蜂对厌恶刺激的学习和对奖励刺激的学习分别受多巴胺系统与章鱼胺系统的驱动,而果蝇中一项重要研究发现在奖励性学习和厌恶性学习中都有多巴胺受体 dDA1 的参与(Kim *et al.*, 2007),表明 DA 是很复杂地参与学习记忆的,将两套系统分离开来的模型是值得怀疑的,而之前对蜜蜂采集及跳舞等行为的研究一直集中在章鱼胺这个系统(Barron *et al.*, 2007; Giray *et al.*, 2007),关于多巴胺对蜜蜂采集行为的影响研究较少。同时,作者前期的实验结果显示,不同跳舞状态的蜜蜂脑部生物胺含量变化最大的是多巴胺。因此,我们希望从多巴胺着手,在现有理论研究的基础上,进一步研究多巴胺对蜜蜂的采集、跳舞、学习记忆等行为的作用及其机制,这将会揭示蜜蜂某些行为的神经基础,为人类深刻理解学习记忆等复杂行为提供科学依据。此外,通过对蜜蜂多巴胺通路的研究,有望能为多巴胺引起的人类帕金森病或成瘾症等提供解决方法。

参考文献(References)

Andretic R, Swinderen BV, Greenspan RJ, 2005. Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 15 (13):1165—1175.
Barron AB, Maleszka R, Vander Meer RK, Robinson GE,

2007. Octopamine modulates honey bee dance behavior. *PNAS*, 104 (5):1703—1707.
Beggs KT, Glendinning KA, Marechal NM, Vergoz V, Nakamura I, Slessor KN, Mercer AR, 2007. Queen pheromone modulates brain dopamine function in worker honey bees. *PNAS*, 104 (7):2460—2464.
Beggs KT, Hamilton IS, Kurshan PT, Mustard JA, Mercer AR, 2005. Characterization of a D2-like dopamine receptor (*AmDOP3*) in honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35:873—882.
Blenau W, Baumann A, 2001. Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 48:13—38.
Fryxell KJ, 1995. The evolutionary divergence of neurotransmitter receptors and second-messenger pathways. *J. Mol. Evol.*, 41:85—97.
Giray T, Galindo-Cardona A, Oskay D, 2007. Octopamine influences honey bee foraging preference. *J. Insect Physiol.*, 53:691—698.
Hammer M, Menzel R, 1998. Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learn. Mem.*, 5:146—156.
Harano K, Sasaki K, Nagao T, Sasaki M, 2008. Influence of age and juvenile hormone on brain dopamine level in male honeybee (*Apis mellifera*): association with reproductive maturation. *J. Insect Physiol.*, 54:848—853.
Kim YC, Lee HG, Han KA, 2007. D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila*. *J. Neurosci.*, 27 (29):7640—7647.
Kokay LC, Ebert PR, Kirchhof BS, Mercer AR, 1999. Distribution of dopamine receptors and dopamine receptor homologs in the brain of the honey bee, *Apis mellifera*. *Microsc. Res. Tech.*, 44:179—189.
Menzel R, Heyne A, Kinzel C, Gerber B, Fiala A, 1999. Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing and response-releasing functions of reward in honeybee classical conditioning. *Behav. Neurosci.*, 113 (4):744—754.
Mustard JA, Pham PM, Smith BH, 2010. Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor *AmDOP2* in the honey bee. *J. Insect Physiol.*, 56:422—430.
Nomura S, Takahashi J, Sasaki T, Yoshida T, Sasaki M, 2009. Expression of the dopamine transporter in the brain of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Appl. Entomol. Zool.*, 44

- (3):403—411.
- Purnell MT, Mitchell CJ, Taylor DJ, Kokay IC, Mercer AR, 2000. The influence of endogenous dopamine levels on the density of [3H] SCH23390 – binding sites in the brain of the honey bee, *Apis mellifera* L. . *Brain Res.* , 855:206—216.
- Schwaerzel M, Monastirioti M, Scholz H, Friggi-Grelin F, Birman S, Heisenberg M, 2003. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J. Neurosci.* , 23 (33) : 10495—10502.
- Vergoz V, Roussel E, Sandoz JC, Giurfa M, 2007a. Aversive learning in honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. *PLoS ONE*, 2 (3) :288.
- Vergoz V, Schreurs HA, Mercer AR, 2007b. Queen pheromone blocks aversive learning in young worker bees. *Science*, 317:384—386.
- Waddell S, 2010. Dopamine reveals neural circuit mechanisms of fly memory. *Trends Neurosci.* , 781:8.
- Zhang K, Guo JZ, Peng YQ, Xi W, Guo AK, 2007. Dopamine – Mushroom body circuit regulates saliency-based decision-making in *Drosophila*. *Science*, 6 (29) : 1901—1901.
- 谢启文, 1999. 现代神经内分泌学. 上海:上海医科大学出版社. 48—53.
- 许绍芬, 1999. 神经生物学. 上海:复旦大学出版社. 170—183.