

昆虫嗅觉信号神经传递途径的研究进展

游灵, 王广利, 魏洪义*

(江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 嗅觉在昆虫生命活动中起着至关重要的作用, 当昆虫触角感受到环境中气味分子后, 这些气味分子运载的信息在感觉神经元中转换成电生理信号, 经过一系列的神经传递过程传递至高级中枢进行信息处理。昆虫是研究嗅觉系统功能与发育的重要模式生物之一。本文对气味结合蛋白、嗅觉受体和触角神经叶等方面的研究进展进行了综述。

关键词: 嗅觉; 气味结合蛋白; 嗅觉受体; 触角神经叶; 神经传递

中图分类号: S433

文献标志码: A

文章编号: 2095-3704 (2012) 01-0007-05

Advances in Neuron Transferring Pathways in Insects' Olfactory Signals

YOU Ling, WANG Guang-li, WEI Hong-yi*

(College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045)

Abstracts: Olfaction plays a vital role in all aspects of their lives for insects. When the insect antennae accept odor molecules in the environment, olfaction begins with the transduction of the information carried by odor molecules into electrical signals in sensory neurons, and further processing of the odor information is done in higher centers through the neuron pathway. Insects have become one of important model organisms for the research on function and development of olfactory system. Research progresses in odorant binding proteins, olfactory receptors and antennal lobes were reviewed in this paper.

Key words: olfaction; odorant binding protein; olfactory receptor; antennal lobe; neuron pathway

嗅觉对于昆虫的生存非常重要, 在寻找食物、选择配偶、探测产卵地点、躲避天敌等活动中发挥了不可替代的作用。昆虫虽然个体较小, 但嗅觉系统极其敏锐和专一, 这使得它们能够识别环境中微量的气味物质。那么昆虫为何能精确地探测到这些气味? 这些气味信息又是如何在昆虫嗅觉器官中进行传导, 并在大脑中进行“翻译”的? 早在 1962 年, Schneider 在雄蚕蛾触角周缘受体神经上进行了电生理记录, 得到表现昆虫嗅觉系统敏感性和特异性的第一个线索, 时至今日, 尽管对昆虫嗅觉系统进行了大半个世纪的探索, 但我们目前还不能完全理解昆虫脑部是如何将环境中的气味首先“翻译”成

神经活动的。不过, 作为现代技术进步的结果, 近年来在这一领域内取得一些重要进展。本文以果蝇嗅觉系统的研究成果为基础, 结合蛾类和其它昆虫嗅觉系统, 对昆虫感受气味物质的神经传递途径的研究进展进行概述, 以期对昆虫嗅觉机理的研究提供帮助。

1 从化感器到嗅觉受体: 气味结合蛋白 (odorant binding protein, OBP)

昆虫触角上密布着具有嗅觉功能的化感器。不同昆虫具有不同的化感器类型, 形态各异的化感器在辨别气味物质上具有特异性, 例如美洲蜚蠊触角

收稿日期: 2012-03-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971909)

作者简介: 游灵, 女, 硕士生, 主要从事昆虫行为与化学生态学研究; * 通信作者: 魏洪义, 教授, 博士, E-mail: hyiwei@yahoo.com.cn。

上的毛形和锥形感器对信息素有反应。化感器表面存在着大量的孔道穿过上皮细胞, 感器内充满淋巴液。昆虫所感受到的气味物质多为脂溶性的小分子化合物, 它们通过化感器的孔道进入亲水性的淋巴液。由于这些气味物质不能直接通过淋巴液而到达嗅觉神经树突末梢, 必须依靠气味结合蛋白作介质的运输。第一个鉴定的气味结合蛋白为信息素结合蛋白, 是在多音蚕蛾 *Antheraea polyphemus* 触角毛形感器的淋巴液中用标记法首次得到证实的^[1], 后来分别在柞蚕 *A. pernyi* 和烟草天蛾中找到运输植物挥发性物质的另一类气味结合蛋白, 即普通气味结合蛋白^[2-3]。但 OBPs 确实参与嗅觉反应的第一个功能性证据来源于缺失一种称为 LUSH 的 OBPs 果蝇突变体的分析。LUSH 蛋白由 *lush* 基因编码, 由于其突变体表现型异常地被高浓度乙醇所引诱而得名。高浓度乙醇对 *lush*^{-/-} 突变体果蝇不产生驱避作用^[4]。除昆虫触角外, 在伏蝇 *Phormia regina* 味觉感器、地中海实蝇 *Ceratits capitata* 血淋巴、黄粉虫 *Tenebrio molitor* 雄性附腺和竹节虫 *Carausius morosus* 胸足中分别找到了不同的 OBPs, 并探明 OBPs 是一类分子量小、高度水溶性的酸性蛋白, 多肽链全长 140~150 个氨基酸, 相对分子量为 15-17kD, N 末端有一段 20 个左右的氨基酸组成的信号肽, 已经进行二级结构研究的几种昆虫的 OBPs 多由 α -螺旋构成^[5-6]。关于 OBPs 的功能有多种推测, 但一直没有直接的试验证据, 直到 2005 年徐平西首次证明果蝇的 OBPs76a 不是一个简单的配体运输者, 而是可以调节气味分子与神经元的相互作用, 还可能直接与受体蛋白相互作用或同气味分子一起激活受体蛋白^[7]。

2 从化感器到触角神经叶: 嗅觉受体及嗅觉受体神经元

昆虫将嗅觉刺激转变为生理信号开始于气味分子和气味受体之间的相互作用, 这些气味受体位于嗅觉感受神经元的树突膜上。嗅觉受体神经元 (olfactory receptor neuron, ORN) 起源于触角上的细胞体, 它们通过触角神经 (AN) 进入 AL。昆虫 ORN 属于双极神经元, 具有分支的树突。ORN 对气味物质 (如单个性信息素组份) 有很强的特异性反应。传统观点认为, ORN 有特异型和普通型之分, 前者例如雄蛾的性信息素特定 ORN, 后者在食物气味探

测神经元中发现。目前, 有越来越多的报道, 存在专门感受食物的 ORN、专门感受产卵地点的 ORN。因此, 很可能只有极少数的普通型 ORN 存在。

早在 20 世纪的七八十年代, 人们就认识到气味物质受体是一类膜蛋白, 位于嗅觉感觉神经元的树突膜上。后来在制备大鼠嗅觉纤毛时发现有一种活性很高的腺苷酸环化酶, 对气味十分敏感, 而且这种敏感性与 G 蛋白有密切关系^[8]。这一发现使人们意识到气味物质可能是首先作用于 G 蛋白偶联受体 (GPCR), 然后激活环腺苷酸的第二信使通路。Buch and Axel (1991) 最终从大鼠嗅觉上皮细胞中成功克隆出一个多基因家族, 它属于 7 个跨膜域 GPCR 超家族^[9], 而无脊椎动物嗅觉受体基因首先从线虫 *C. elegans* 中克隆出来^[10]。

在线虫和哺乳动物中嗅觉受体基因的发现激发了人们对昆虫嗅觉受体基因的研究。很多实验室尝试了多种方法进行同源基因的搜索, 如通过比较已经发现的受体基因同源性设计简并引物进行反转录-PCR 扩增, 或利用哺乳动物或线虫的嗅觉受体基因筛选昆虫的 cDNA 文库, 但都没有取得成功。最终通过搜索果蝇基因组数据库, 去寻找一种编码结构和已知嗅觉受体相关的蛋白质的基因, 才使得这一难题得以突破。1999 年 2 个研究小组各自独立地报道了发现编码果蝇推定的气味受体的基因。Clyne 等运用一种多变量计算机新算法, 首先发现了 2 个可能的基因, 它们编码推定的 7 个跨膜域的受体, 并特异性地表达在一个亚簇的化感细胞内^[11]。同年, Vosshall 等也找到了一种推定的嗅觉受体基因。不过他们是通过不同克隆策略 (差显克隆策略) 得到的, 设计这种克隆方法是用来鉴别稀少的 mRNA, 它们只在嗅觉器官内, 特别是在触角和下颚须内才表达的^[12]。

DOR 基因的鉴定是通过最大限度地组合不同的筛选检查和果蝇基因组 DNA 数据库分析而得到的。16 个 DOR 基因、编码近 400 个氨基酸的蛋白质, 搜索了果蝇基因组近 20% 的基因后才鉴定出来。这意味着如果搜索了全部基因组, 可以至少得到 100 个 DOR 基因。然而, 后来对真核生物的果蝇基因组的全部序列进行分析只得到了与 DORs 同源的总共 60 个基因, 这一数量比线虫和小鼠近 1 000 个可能的化学感觉受体基因要少得多^[11-12]。

令人感兴趣的是, 果蝇可能的气味受体存在高

度的多样性, 各受体之间很少有相同的序列, 与线虫、哺乳动物的嗅觉受体或其它家族的 G 蛋白偶联受体也没有相似的序列, 并且在嗅觉 cDNA 库中以极低水平出现。这就解释了早期通过基于同源性方法克隆果蝇的基因没有取得成功的原因。现在还不清楚, 为什么脊椎动物、线虫和果蝇这些不同动物的嗅觉受体很少有相同的序列。

现已报道了 2 个家族的果蝇化感受体: 果蝇嗅觉受体 (*Drosophila olfactory receptors*, DOR) [11-12] 和味觉受体 (*gustatory receptor*, GR) [13]。在触角第三节有 1 200 个嗅觉神经元, 共有 57 个 DOR, 下颚须有 120 个 ORN, 共有 56 个 GR。通过成虫原位杂交的方法, 检测出来 40 个 DOR 和 3 个 GR。剩下的或者是不能用原位杂交检测出来, 或者是只能在幼虫组织或味觉受体结构中才能表达。因此, 在成虫中表达的嗅觉受体的总数可能为 43 个。7 个表达在下颚须中的 3 个嗅觉受体, 用配对方法结合探针的原位杂交研究证实嗅觉受体没有共表达, 对触角上的嗅觉受体研究也得到类似的结果。但有一点是不同寻常的: *Or83b* 在每个 ORN 中都有表达, 因而 *Or83b* 可能是一个共受体 (*coreceptor*) [13]。

ORN 树突和细胞体在下颚须和触角第三节上的排列各不相同, 但存在重叠区域, 这意味着, 来源于某一特定位置的神经元可能只表达嗅觉受体限定的亚簇 [11-12]。这些神经元的轴突, 沿触角神经往下到大脑, 汇集在触角叶中的神经纤维球上。已找出 6 个带有报告传导基因候选的 OR 启动子, 用于分析轴突投射形式, 其中有 5 个投射到单个神经纤维球, 有 1 个投射到 2 个相近但不相邻的小型神经纤维球。在后一种情况下, 人们将很想了解, 究竟是单个 ORNs 同时投射到 2 个神经纤维球上, 还是存在 2 个亚群 (*subpopulation*), 每个亚群分别投射到一个神经纤维球。

果蝇的 *Or* 基因可分为两大类, 一类是多在嗅觉神经中表达的 *Or83b* 基因, 属非典型的气味受体 (*atypical odorant receptors*, AORs) 基因, 在不同昆虫间高度保守; 另一类只在嗅觉神经中有选择性表达, 属于传统的气味受体 (*Conventional odorant receptors*, CORs) 基因, 不同昆虫间同源性较低。对 *Or83b* 突变体进行的电生理试验表明, *Or83b* 与其它受体蛋白共同调节对所有气味分子的反应。然而, 由于目前对昆虫 *OR* 基因的研究十分有限, 加之不同

昆虫间 *COR* 基因的同源性较低, 因此, 要想明确 *OR* 基因的功能还有待于更加广泛和深入的研究。

3 从触角神经叶到蘑菇体和侧角: 触角投射神经元

昆虫脑部包含大约 105~106 个神经元。它由 3 个主要部分组成—原脑 (*protocerebrum*)、中脑 (*deutocerebrum*) 及后脑 (*tritocerebrum*), 每个部分有不同的神经网络区域。原脑内有较高级的感觉中心, 即蘑菇体 (*mushroom body*, MB), 中间复合体 (*central complex*) 与视觉及其它感觉受体相联系。原脑内有不同的神经分泌细胞, 这些神经分泌细胞位于头部和前胸的心侧体 (*corpora cardiaca*) 和咽侧体 (*corpora allata*) 内。触角中心 (即触角叶, AL) 在中脑, 神经分泌神经元和控制取食及前肠活动的神经元在后脑。大脑通过连索 (*connective*) 与食道下神经节相连接, 再与胸部和腹部神经节或腹神经索相连。

触角叶或触角神经叶 (*antennal lobe*, AL) 是昆虫中枢神经系统内的基本嗅觉中心。AL 位于昆虫的中脑, 为一个球形的组织, 由它接受嗅觉受体神经元传递过来的感觉信息。昆虫的 AL 与脊椎动物的嗅球 (*olfactory bulb*)、甲壳动物的嗅叶 (*olfactory lobe*)、软体动物的前脑 (*procerebral*) 在组织解剖、生理结构和神经组成上都具有相似的特征。和其它生物的嗅觉系统类似, 昆虫 AL 也是由所谓的神经纤维球 (*glomeruli*) 组成的, 位于受体轴突和 AL 中间神经元的突触联系处。

雄蛾 AL 内除了有雌蛾 AL 中也有的神经纤维球外, 还有一至数个扩大的神经纤维球, 而且这种神经纤维球在蜚蠊和蜜蜂中也有。这种扩大的神经纤维球在雄蛾和蜜蜂中形成了大型神经纤维球复合体 (*Macroglomerular complex*, MGC), 在蜚蠊中形成大型神经纤维球 (*Macroglomerulus*, MG), MGC 或 MG 专门接受来自对性信息素敏感 ORN 的信息。

AL 内有 3 种类型的中间神经元在神经纤维球内形成分支: 内生性 AL 神经元或内部神经元 (*intrinsic AL neuron*, *local neuron*, LN), 输出神经元或投射神经元 (*output neuron*, *projection neuron*, PN) 以及离心神经元 (*centrifugal neuron*)。大多数 AL 神经元的细胞体位于 AL 外周的许多细胞簇内。细胞簇的位置随不同种类而有差异。PN 和离心神

神经元的有些细胞体位于原脑或腹神经索。LN 和 PN 都直接接受来自嗅觉受体神经元 (ORN) 的突触输入, PN 还通过 LN 间接接受 ORN 的输入。而 ORN 所接受的突触输入来自 LN, 而不是来自 PN。离心神经元的突触联系迄今尚未研究。PN 细胞体位于 AL 的外缘, 其树突投射到单个或多个神经纤维球, 并把其活性传递到更高级的大脑中心, 其作用类似于脊椎动物的僧帽细胞 (mitral cell)。

当 PN 把嗅觉信息传递到 MB 和侧角 (lateral horn, LH) 这些更高级的大脑中心时, 这些信息是如何组织的? Laurent 及其同事对蝗虫嗅觉系统的系列研究表明, 触角叶 PN 和 LN 集合体的振荡同步化对神经信息具有过滤作用^[14-15]。他们发现嗅觉系统在高级中枢对气味的再现是分散性的和特异性的, 并且神经细胞发放的相关性非常重要^[16]。通过记录 PN 和 KC 对不同气味的反应, 发现单个的 PN 对许多不同的气味都有强烈的反应, 而且这些反应具有复杂的临时模式, 比刺激存在的时间更长, 是气味特异性的或神经元特异性的。气味激活的 PN 也对 20~30 Hz 的振动有反应。而 KC 的反应则更有选择性, 它们仅仅对少数气味有反应, 而且反应或许也比较单一, 通常就是两个动作电位。

这种差异是如何产生的呢? 试验结果表明, 气味与 KC 的适当结合会产生时间特异性的兴奋性后突触电位 (excitatory postsynaptic potential, EPSP)。这些活性大多是抑制性的, 这可能是包含 GABA 的侧角中间神经元对其的抑制作用。侧角接受来自 PN 的输入, 直接投射到蘑菇体上。侧角中间神经元也对气味有剧烈的反应, 但它们的发放往往在 PN 对 KC 兴奋性输入振荡循环的负半个周期之中, 而且 KC 的兴奋是来自 PN 的兴奋性输入和来自侧角中间神经元抑制的综合效应, 这个综合效应的体现就是 PN 振荡周期的变化^[16]。

对蜜蜂的研究结果表明, 感觉输入是在 MB 树突区域内进行组织的。MB 萼片神经网络被细分成唇区 (lip)、领区 (collar) 和基环区 (basal ring)^[17]。MB 中功能的分化在第一个蛹期明显出现, 这比 AL 中的 PN 树突分叉时间更早。并且, 对嗅觉 PN 进行逆行性标记 (anterograde labeling), 使 MB 唇中出现各种不同的着色强度, 说明不同类型的 PN 投射到不同的区域^[18-19]。这些发现与蜚蠊中的研究结果一致。蜚蠊 MB 萼片神经网络被划分为 4 个连续的

区域, 离散群体的嗅觉神经纤维球在 MB 内形成不同的特定组合, 萼片的每个区域都接收来自这些组合发出的输入信息, 也接受来自视觉神经叶及/或原脑发出的信息。

4 结语

昆虫嗅觉的研究之所以得到广泛的关注, 一是由于昆虫很适合用作嗅觉系统功能和发育的研究材料, 二是由于许多农业害虫和卫生害虫的经济和社会重要性, 而这些害虫中大多数是通过嗅觉信息找到寄主植物或人类的。研究昆虫嗅觉感受的分子基础, 将为害虫控制提供新的途径。近一二十年来, 昆虫嗅觉系统的研究取得了一批显著的成果, 如克隆出果蝇的嗅觉受体基因, 证实了不同种类昆虫中气味结合蛋白的存在、嗅觉信号的传导是由第二信使进行调节的、嗅觉刺激使神经纤维球活性呈局部气味分布型式, 不同程度地揭示了嗅觉叶和蘑菇体中的神经组织在嗅觉识别中的作用等等。同时发展了羟基脲切除等技术来研究蘑菇体在嗅觉识别、学习和记忆中的作用, 带动了如 PAL4 enhancer、钙成像等相关技术在昆虫嗅觉系统研究中的应用。

然而, 应当清醒地认识到, 目前的研究成果还远不足以对昆虫的嗅觉机理作一个完整而全面的阐述。例如还没有确切的证据来说明嗅觉信号的转导途径、也不知道果蝇可能的嗅觉受体基因与气味结合蛋白 (OBP) 之间究竟有什么样的关系, 嗅觉受体细胞表达多少个果蝇嗅觉受体基因等等。Wetzel 等 (2001) 把果蝇的 *Or43a* 基因转录到爪蛙卵母细胞 (*Xenopus oocytes*) 中, 利用双电极电压钳 (two-electrode voltage-clamp) 技术测量细胞对气味物质的反应^[20]。与表达该基因的变异株果蝇相似, 蛙卵母细胞只是对环己醇、环己酮、苯乙醛和苯甲醇产生反应, 对其它气味物质没有反应。这一结果一方面进一步证实了 *DOR* 基因的确起着编码气味受体的作用, 但另一方面说明, 在没有 OBP 参与的情况下, 蛙卵母细胞也能对气味物质产生反应。那么, OBP 在配体-受体相互关系中到底承担了什么样的作用, 它是否影响到了活体细胞中气味物质和气味受体之间的动力学或其它参数^[21]。

总之, 目前虽然在昆虫嗅觉系统的研究中还存在许多尚未解决的问题, 但近年来研究所取得的成果为解决这些问题奠定了非常良好的基础。例如,

根据果蝇嗅觉受体基因开展对某些特定基因(如 *Or43a*)进行更详细的功能研究,还可以开展这些基因的表达对昆虫行为反应影响的研究等等。并且随着嗅觉受体的分子特征及其轴突投射的描述,有关气味及其受体、表达特定受体的神经元和气味在AL中的神经纤维靶标的图谱将在几年内出现。加上果蝇、库蚊基因组这一研究利器,相信不久的将来会有一张完整的嗅觉系统图谱来描述从触角等感觉器官接收嗅觉信号开始,到肌肉等运动器官做出反应这一系列过程。

参考文献:

- [1] Vogt R G, Riddiford L M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae[J]. *Nature*, 1981, 293: 161-163.
- [2] Breer H, Krieger J, Raming K. A novel class of binding proteins in the antennae of the silkworm *Antheraea pernyi*[J]. *Insect Biochem.*, 1990, 20: 735-740.
- [3] Vogt R G, Prestwich G D, Lerner M R. Molecular cloning and sequencing of general-odorant binding proteins GOBP1 and GOBP2 from tobacco hawk moth *Manduca sexta*: comparisons with other insect OBPs and their signal peptides[J]. *J. Neurosci*, 1991, 11: 2972-2984.
- [4] Kim M S, Smith D P. The invertebrate odorant-binding protein LUSH is required for normal olfactory behavior in *Drosophila*[J]. *Chem. Senses*, 2001, 26: 195-199.
- [5] Damberger F, Nikonova L, Horst R, et al. NMR characterization of a pH-dependent equilibrium between two folded solution conformations of the pheromone-binding protein from *Bombyx mori*[J]. *Protein Sci.*, 2000, 9: 1038-1041.
- [6] Mohanty S, Zubkov S, Gronenborn A M. The solution NMR structure of *Antheraea polyphemus* PBP provides new insight into pheromone recognition by pheromone-binding proteins[J]. *J Mol Biol*, 2004, 337(2): 443-451.
- [7] Xu P X. A *Drosophila* OBP required for pheromone signaling[J]. *Science*, 2005, 310:798-799.
- [8] Pace U, Hansky E, Salomon Y, et al. Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception[J]. *Nature*, 1985, 316: 255-258.
- [9] Buch L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition[J]. *Cell*, 1991, 65: 175-187.
- [10] Troemel E R, Kimmel B E, Bargmann C I. Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*[J]. *Cell*, 1997, 91: 161-169.
- [11] Clyne P J, Warr C G, Freeman M R, et al. A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*[J]. *Neuron*, 1999, 22: 327-338.
- [12] Vosshall L B, Amrein H, Morozov P S, et al. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna[J]. *Cell*, 1999, 96: 725-736.
- [13] Scott K, Brandy R Jr, Cravchik A, et al. A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*[J]. *Cell*, 2001, 104:661-673.
- [14] Laurent G, MacLeod K, Stopfer M, et al. Spatiotemporal structure of olfactory inputs to the mushroom bodies[J]. *Learn Mem*, 1998, 5: 124-132.
- [15] MacLeod K, Backer A, Laurent G. Who reads temporal information contained across synchronized and oscillatory spike trains[J]. *Nature*, 1998, 395:693-698.
- [16] Perez-Orive J, Mazor O, Turner G C, et al. Oscillations and sparsening of odor representations in the mushroom body[J]. *Science*, 2002, 297: 359-365.
- [17] Mobbs P G. The brain of the honeybee *Apis mellifera*. 1. The connections and spatial organization of the mushroom bodies[J]. *Philos Tran R Soc London Ser B*, 1982, 298: 309-354.
- [18] Schroter U, Malun D. Formation of antennal lobe and mushroom body neuropils during metamorphosis in the honeybee, *Apis mellifera*[J]. *J Comp Neurol*, 2000, 422: 229-245.
- [19] Gronenberg W. Subdivisions of hymenopteran mushroom body calyces by their afferent supply[J]. *J Comp Neurol*, 2001, 435: 474-489.
- [20] Wetzel C H, Behrendt H J, Gisselmann G, et al. Functional expression and characterization of a *Drosophila* odorant receptor in a heterologous cell system[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 9377-9380.
- [21] Carlson J R. Functional expression of a *Drosophila* odor receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 8936-8937.