

无脊椎动物脑啡肽原研究进展

谢玮 闫冬春* (鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025)

摘要 脑啡肽原在无脊椎动物免疫神经等器官系统广泛存在, 并参与诸多免疫调节机制。综述了无脊椎动物脑啡肽原的研究现状, 并从蛋白水平上将其与脊椎动物脑啡肽原的研究进行比较分析。根据现有文献, 无脊椎动物脑啡肽原分子水平上相关的研究还比较少, 开展这一领域的研究有助于进一步了解脑啡肽原在无脊椎动物神经免疫调节中的作用, 明确其在无脊椎动物到脊椎动物的演化过程。

关键词 无脊椎动物; 脑啡肽原; 脑啡肽

中图分类号 Q955 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)07-02998-03

Progress in the Study of Invertebrate Proenkephalin

XIE Wei et al (College of Life Sciences, Ludong University, Yantai, Shandong 264025)

Abstract Proenkephalin has been found in various invertebrates tissues, especially immune and neuroendocrine systems. And it has been reported to attend various immune regulation mechanism. The research status on invertebrate proenkephalin was reviewed. And it was compared with vertebrate proenkephalin at protein level. Based on current references, few research has been done on invertebrate proenkephalin at molecular level. The research development of this field would be helpful to study the role of proenkephalin in invertebrate neuroimmunomodulation and its evolution process from invertebrate to vertebrate was confirmed.

Key words Invertebrates; Proenkephalin; Enkephalin

1 脑啡肽原的发现

阿片肽类物质有3种蛋白前体, 即脑啡肽原(Proenkephalin, PENK), 阿黑皮素原(Proopiomelanocortin, POMC), 强啡肽原(Prodynorphin, PDYN)。脑啡肽原在生物体内广泛存在, 并在组织中降解成阿片肽类参与各种生理活动的调节。阿片作为有效的镇痛药很早就为人类所利用, 而且它的成瘾性在应用于医疗之初就被人们所发现^[1]。1973年阿片受体提取成功, 揭开了阿片肽研究的序幕。Hughes在1975年首次从猪脑中提取并发现内源性阿片样物质^[2], 随后又纯化并研究确定此类阿片样物质包含2种五肽, 即甲硫氨酸脑啡肽(Methionine-enkephalin, MEK)和亮氨酸脑啡肽(Leucine-enkephalin, LEK)。内源性阿片肽类通过作用于阿片受体而参与调节生物体各种生理活动, 人们发现脑啡肽对受体有较强的选择, 从而认为脑啡肽是受体的内源性配体。

1982年, 人脑啡肽前体的核苷酸序列结构确定^[3-4]。1984年, Stefano等推测无脊椎动物中存在脑啡肽前体结构, 并证实无脊椎动物含有类似于高等生物体中的脑啡肽系统^[5-6]。之后, Marino等从无脊椎动物 *Squilla maris* 分离出脑啡肽前体即脑啡肽原^[7]。随着研究的不断拓展, 人们证实贻贝(*Mytilus edulis*)、水蛭(*T. tessulatum*)等无脊椎动物体中存在脑啡肽原分子, 并将其与脊椎动物脑啡肽原进行分析比较。

2 无脊椎动物脑啡肽原在蛋白水平上的研究

无脊椎动物脑啡肽原在蛋白水平上的研究较为深入, 主要是对贝类、昆虫以及甲壳类动物等进行研究分析。现已证实, 在无脊椎动物体内存在脑啡肽^[6], 螯虾(*Panulirus interruptus*)和淡水螯虾(*Procambarus clarkii*)小网膜细胞中发现亮啡肽的报道证实甲壳类动物体内存在阿片肽类^[8]。随后, 在招潮蟹(*Uca pugilator*)眼柄的神经内分泌细胞发现甲啡肽和亮啡肽类似化合物。但是, 关于脑啡肽前体-脑啡肽原在研究之初只是在脊椎动物方面有所报道, 比如哺乳动物^[9]、两栖动

物^[10]、肺鱼^[11]等。Kosterlitz等发现豚鼠输精管中存在receptor。

随着研究技术的发展和研究范围的延伸, 人们在无脊椎动物体内也发现一系列类似于哺乳动物阿片前体的片段^[6,12], 此外, 阿片受体也被证实存在于无脊椎动物的各种组织中^[13]。从而, 人们推测阿片前体在无脊椎动物中也存在。

经过20余年的不懈努力和探索, 脑啡肽原被成功提取并测序^[14-15]。人们发现水蛭和海产贻贝免疫细胞中存在脑啡肽原分子^[13,15]。经氨基酸序列分析比较, 水蛭脑啡肽原(15 kDa)与两栖动物非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, 30 kDa)序列相似程度为25.4%; 而贻贝脑啡肽原(26 kDa)序列与人的相似程度为39.0%, 与豚鼠脑啡肽原相比则显示更高的序列相似性(50.0%)^[15]。此外, 在无脊椎动物脑啡肽原的序列中还发现含有Met-enkephalin Arg-Gly-Leu和Met-enkephalin Arg-Phe序列, 其侧翼还带有二元氨基酸残基, 说明存在裂解位点, 这也正是哺乳动物与节肢动物、环节动物和软体动物的脑啡肽原序列的区别所在。此外, 将无脊椎动物脑啡肽原与牛脑啡肽原A(209-237)进行序列比较, 发现也含有抗菌肽enkelytin(peptide B)^[16], 同时, 人们发现此抗菌肽与哺乳动物的enkelytin序列相似程度高达98.0%。说明这些生物分子在生物进化的早期就已经在低等动物出现。

人们用放射性免疫测定和HPLC来分析判断脊椎动物脑啡肽原结构中的甲啡肽和亮啡肽的基因分布^[17-18]。脑啡肽原基因是阿片基因家族所有成员的最早起源, 所以研究脑啡肽原对于研究生物进化发展也有重要意义。哺乳动物脑啡肽原基因^[9]编码了7个阿片肽类: 4个甲啡肽, 1个亮啡肽和2个带C末端延伸序列的甲啡肽(甲啡肽RGL和甲啡肽RF), 可以看出甲啡肽和亮啡肽的比例在哺乳动物中是6:1。另外, 科学家在研究斑马鱼脑啡肽原时, 发现脑啡肽原基因只在斑马鱼脑内特异地表达, 而且斑马鱼脑啡肽原与哺乳动物脑啡肽原相似性为40.0%, 其中甲啡肽和亮啡肽的比例是5:1^[19]。而在水蛭和贻贝脑啡肽原中甲啡肽与亮啡肽的含量分别为1:2和3:1^[15]。蝶螈脑啡肽原核心序列末端不带有亮

基金项目 山东省高等学校优秀骨干教师国际合作培养项目; 鲁东大学基金项目。

作者简介 谢玮(1983-), 女, 山东烟台人, 硕士研究生, 研究方向: 动物免疫与病害。* 通讯作者, 副教授, E-mail: yandch@tom.com。

收稿日期 2008-12-17

啡肽序列,取而代之的是甲啡肽,而在哺乳动物中该位点是亮啡肽序列^[20]。有趣的是,斑马鱼的脑啡肽原核心序列末端与哺乳动物一样都是亮啡肽^[19],而澳洲肺鱼和鲨鱼在该位置上甲啡肽^[11,21]。可见,不仅甲啡肽和亮啡肽的比例在不同种生物中有所差异,不同生物体内甲啡肽和亮啡肽分布也是不同的。

至此,我们可以看出:脊椎动物和无脊椎动物都存在脑啡肽原分子,并且表现出很高的序列相似性;无脊椎动物脑啡肽原中发现甲啡肽、亮啡肽、Mt-enkephalin-Arg-Gly-Leu和Mt-enkephalin-Arg-Phe序列,它们同时也存在于哺乳动物脑啡肽原;无脊椎动物脑啡肽原也带有抗菌肽enkelytin^[15],并且与哺乳动物enkelytin序列同一性达98.0%,进一步证明这些生物分子起源于较为原始的低等生物;实验证实,水蛭神经中枢和免疫细胞中发现的1和2阿片受体也存在于人和贻贝的免疫细胞^[15];不同种生物中甲啡肽和亮啡肽的比例以及分布是不同的。此外,有研究证实在进化过程中鱼体内所出现的Mt-enkephalin-Gly-Tyr要早于四足动物中出现的Mt-enkephalin-Arg-Phe^[19]。在水蛭的免疫细胞中,人们也找到1和2阿片受体^[15],而这2种受体也被发现存在于贻贝与哺乳动物中。从而,科学家推测脑啡肽原首先起源于简单的低等动物,并在生物进化中被保留下来,其受体也一同被保留下来。研究发现无脊椎动物和哺乳动物在免疫和神经内分泌机制方面有相似性。目前,人们已经从分子水平上对脑啡肽原进行进一步的研究探索,以期在无脊椎动物方面有更进一步的突破。

3 无脊椎动物脑啡肽原的分布

1985年,Marino等在螳螂(*Squilla nartis*)食道下神经节中分馏出3种蛋白质,经过胰岛素和羧肽酶降解后,发现分子量较低($M < 1$ 万)的那一类具有脑啡肽活性,表明节肢动物中存在脑啡肽的前体即脑啡肽原^[7]。而贝类体内的脑啡肽原主要存在于神经节和免疫细胞中,它们在组织中进一步降解产生各种阿片肽,从而参与神经内分泌免疫等方面的调节。Stefano等从贻贝的足神经节中分离出甲硫氨酸-脑啡肽、亮氨酸-脑啡肽和甲硫氨酸-脑啡肽-精氨酸-苯丙氨酸并进行了测序^[5-6]。此外,对于节肢动物^[22]、环节动物^[23]、软体动物^[24]中存在的这类信号分子也已提取并作序列分析,这为无脊椎动物中存在此类分子提供了证据。

脑啡肽原在组织中可进一步降解为L-ENK和M-ENK^[25]。研究发现,贻贝的各种神经节和免疫组织中均有MENK和L-ENK分布,而MENK主要集中在足神经节和脏神经节。Mxon等利用HPLC对贻贝足神经节提取物进行分离纯化,找到亮氨酸-脑啡肽和甲硫氨酸-脑啡肽-精氨酸-苯丙氨酸等肽段分子,推测贻贝足神经节中可能存在脑啡肽前体物质^[26]。贻贝的淋巴细胞中存在脑啡肽原分子(26 kDa),并发现它与豚鼠的脑啡肽原分子具有50.0%的氨基酸序列一致性^[24]。此外,水蛭和海产贻贝的免疫细胞中也被证实存在与哺乳动物类似的脑啡肽原分子^[15]。有报道称,甲壳动物的神经组织中也存在脑啡肽^[22],脑啡肽通过眼柄影响血糖水平。从脊椎动物神经组织^[27]、内分泌腺以及免疫细胞中提取的各种肽类也都发现在无脊椎动物体内存在。

另外,阿片肽前体^[15]以及降解过程需要的酶类,如中性肽链内切酶(NEP)和血管紧张素转换酶^[14]存在于不同的免疫细胞。

至此,脑啡肽原不仅在无脊椎动物免疫神经等器官系统广泛存在,发挥着不容忽视的作用,它在脊椎动物方面的研究更是深入到基因水平。脑啡肽像游离的信号分子一样存在于无脊椎动物的不同组织,当以前体形式即脑啡肽原存在时其侧面带有氨基酸残基,说明无脊椎动物脑啡肽与哺乳动物的脑啡肽同样是脑啡肽原经过酶分解的产物^[28]。这对于进一步研究脑啡肽原在无脊椎动物体内分布和涉及的相关调节机制有重要意义。

4 脑啡肽原的相关功能

所有的生物体都有维持自身生活状态的调节机制。如果这些机制无法正常执行,就会影响到生物体的正常生理状态。近年来的研究证实,无脊椎动物在机体受到损伤后会产生抗菌肽类B肽,它可以产生免疫活性肽如Mt-enkephalin-Arg-Phe,以维护机体的正常生理活动,研究发现这种抗菌肽存在于脑啡肽原上。此外,在脑啡肽原中发现存在强抗菌活性的enkelytin,也可以促进阿片肽相关的免疫活性。现已证实水蛭和贻贝脑啡肽原上存在抗菌肽enkelytin^[15]。Stefano等推测,免疫防御和神经信号传导也许会引发脑啡肽原的降解过程,促使其释放阿片肽和enkelytin或B肽^[13,15]。这个激发释放的enkelytin会立即攻击细菌,给阿片肽的免疫激活能力的实现争取时间。在无脊椎动物(水蛭)和脊椎动物(人)的PENK中都发现存在enkelytin、B肽等抗菌肽,进一步证实神经肽的前体参与免疫应答机制^[29]的构想。

前脑啡肽原(Preproenkephalin,PPNK)是编码脑啡肽原A的基因,而脑啡肽原A是亮氨酸-脑啡肽和甲硫氨酸-脑啡肽或含有脑啡肽类蛋白质(ECP)的前体。这些肽类参与镇痛觉感知和痛觉缺失^[30],在免疫系统中发挥着重要作用,包括体外抗体应答的抑制,促进细胞增殖和趋化作用,以及细胞因子产物的调节^[31-33]。PPNK的缺失可以加快T细胞的活化进程,表明PPNK及其肽衍生物调节T细胞应答机制^[34]。

此外,甲啡肽作为神经调节素在调节无脊椎动物的血糖水平也有报道^[35]。Kishori等通过对蟹注射甲啡肽而诱发血糖水平提高,经研究发现,甲啡肽通过眼柄诱发高血糖,从而调控糖代谢^[36]。说明来源于脑啡肽原的甲啡肽在调节机体糖代谢方面起着重要的作用。据报道,对蟹注射甲啡肽还可以明显地延迟卵巢成熟。

5 小结

当前,无脊椎动物中的节肢动物^[22,37]、环节动物^[23]和软体动物(如贻贝^[6,24]、椎实螺)等中都分离出脑啡肽,而无脊椎动物脑啡肽原也陆续在神经系统和免疫细胞中发现,并研究获得脑啡肽原参与了免疫反应^[29],但对于脑啡肽原基因的克隆和性状描述仍仅限于脊椎动物,如哺乳动物^[4]、两栖动物^[20]、鱼类等。人们已经确定无脊椎动物脑啡肽与哺乳动物的脑啡肽都是脑啡肽原经过酶分解的产物,而无脊椎动物脑啡肽原的某些序列又与脊椎动物脑啡肽原存在极高的相似性(98.0%)^[16],从而推测脑啡肽原可能起源于低等动

物^[15], 猜测脑啡肽原基因是所有阿片基因家族的起源基因, 阿片基因家族在进化中发展, 研究阿片肽前体基因将有助于了解阿片肽基因家族的进化^[20]。因此, 通过研究比较脑啡肽原在脊椎动物和无脊椎动物中的空间结构、分布以及免疫机制, 可进一步充实无脊椎动物在起源与进化中的证据。

参考文献

- [1] BROWNSIEIN MJ. Brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(12): 5391 - 5393.
- [2] HUGHES J. Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine[J]. Brain Res, 1975, 88(2): 295 - 308.
- [3] NODA M, TERANISHI Y, TAKAHASHI H, et al. Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene[J]. Nature, 1982, 297(5865): 431 - 434.
- [4] COMB M, SEEBURG P H, ADELMAN J, et al. Binary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA[J]. Nature, 1982, 295(5851): 663 - 666.
- [5] STEFANO G B, LEUNG M K. Presence of met-enkephalin Arg6-Phe7 in molluscan neural tissues[J]. Brain Research, 1984, 298(2): 362 - 365.
- [6] LEUNG M K, STEFANO G B. Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Mollusca)[J]. PNAS, 1984, 81(3): 955 - 958.
- [7] MARINO G, PALMSANO A, DI MARZO V, et al. Native opioid-like peptides in *Squilla maritima* ganglia[J]. Peptides, 1985, 6(3): 403 - 406.
- [8] MANCILLAS J R, MCCOY J F, SELVERSTON A I, et al. Immunocytochemical localization of enkephalin and substance P in retina and eyestalk neurons of lobster[J]. Nature, 1981, 293(5833): 576 - 578.
- [9] NODA M, FURUTANI Y, TAKAHASHI H, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin[J]. Nature, 1982, 295(5846): 202 - 206.
- [10] MARIENS G J, HERBERT E. Polymorphism and absence of Leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in *Xenopus laevis*[J]. Nature, 1984, 310(5974): 251 - 254.
- [11] DORES R M, LEE J, SOLLARS C, et al. In the African lungfish Met-enkephalin and leu-enkephalin are derived from separate genes: cloning of a proenkephalin cDNA[J]. Neuroendocrinology, 2000, 72(4): 224 - 230.
- [12] SALZET M, VERGER BOCCQUET M E, BULET P, et al. Purification, sequence analysis, and cellular localization of a prodynorphin-derived peptide related to the alpha-Neoendorphin in the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*[J]. J Biol Chem, 1996, 271(22): 13191 - 13196.
- [13] STEFANO G B, SCHARRER B, SMITH E M, et al. Opioid and opiate immunoregulatory processes[J]. Crit Rev Immunol, 1996, 16(2): 109 - 144.
- [14] SALZET M, SALZET RAVELLON B, COCQUERELLE C, et al. Leech immunocytes contain proopiomelanocortin: nitric oxide mediates hemolymph proopiomelanocortin processing[J]. J Immunol, 1997, 159(11): 5400 - 5411.
- [15] SALZET M, STEFANO G B. Invertebrate proenkephalin: delta opioid binding sites in leech ganglia and immunocytes[J]. Brain Res, 1997, 768(1/2): 224 - 232.
- [16] GOURMON Y, STRUB J M, MONATTE M, et al. The G-protein-coupled proenkephalin A (209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity[J]. Eur J Biochem, 1996, 235(3): 516 - 525.
- [17] WANG HAIHONG, DASS CHHABIL. Characterization of bioactive peptides in bovine adrenal medulla by a combination of fast HPLC and ESI-MS[J]. Peptides, 2002, 23(12): 2143 - 2150.
- [18] IISI T L, SLUKA K A. A new electrochemical HPLC method for analysis of oocytes on full-term development after round spermatid injection[J]. Contemp Top Lab Anim Sci, 2004, 43(2): 13 - 15.
- [19] WINSTON N, JOHNSON M, HICKERING S, et al. Parthenogenetic activation and development of fresh and aged human oocytes[J]. Fertil Steril, 1991, 56(5): 904 - 912.
- [20] HORUCH T, EMUJA C, AMAUCH Y, et al. Birth of normal calves after intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes: a methodological approach[J]. Theriogenology, 2002, 57(3): 1013 - 1024.
- [21] 苟克勉, 安晓荣, 田见晖, 等. 绵羊胞内单精子注射技术[J]. 实验生物学报, 2002, 35(2): 103 - 108.
- [22] WATANABE H, FUKU Y. Effects of dithiothreitol and boar on pronuclear formation and embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in pigs[J]. Theriogenology, 2006, 65(3): 528 - 539.
- [23] 何方方, 廖瑞年, 黄顺才, 等. 比较金黄地鼠和人卵浆内单精子注射技术受精率[J]. 生殖医学杂志, 1998, 7(4): 207 - 211.
- [19] GONZALEZ N V, GONZALEZ S R, RODRIGUEZ R E. Characterization of zebrafish proenkephalin reveals novel opioid sequences[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2003, 114(1): 31 - 39.
- [20] WALTHERS E A, MOORE F L. Cloning proenkephalin from the brain of a urodele amphibian (*Taicha granulosa*) using a DOR-specific primer in a 3 RACE reaction[J]. General and Comparative Endocrinology, 2005, 142(3): 364 - 370.
- [21] SOLLARS C, DANIELSON P, JOSS J M P, et al. Deciphering the origin of Met-enkephalin and Leu-enkephalin in lobe-finned fish: cloning of Australian lungfish proenkephalin[J]. Brain Research, 2000, 874(2): 131 - 136.
- [22] LUSCHEN W, BUCK F, WILIG A, et al. Isolation, sequence analysis, and physiological properties of enkephalins in the nervous tissue of the shore crab *Carcinus maenas* L[J]. PNAS, 1991, 88(19): 8671 - 8675.
- [23] LAURENT V, SALZET M. Metabolism of enkephalins in head neurons of the leech *Theromyzon tessulatum* by peptidases: isolation of an enkephalin-degrading aminopeptidase[J]. Regul Pept, 1996, 65(2): 123 - 131.
- [24] EWALDINGER N M, RIDGWAY R L, SYED N I, et al. Identification and localization of a [Met5]-enkephalin-like peptide in the mollusc, *Lymnaea stagnalis*[J]. Brain Res, 1996, 737(1/2): 1 - 15.
- [25] HUGHES J, SMITH W, KOSIERUTZ H W, et al. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity[J]. Nature, 1975, 258(5536): 577 - 580.
- [26] MIXON B, KURUMILLA S, STEFANO G B, et al. Presence of enkephalin precursor in molluscan neural tissue extract[J]. NIDA Res Monogr, 1986, 75: 255 - 258.
- [27] STEFANO G B. Role of opioid neuropeptides in immunoregulation[J]. Prog Neurobiol, 1989, 33(2): 149 - 159.
- [28] UDENFRIEND S, KILPATRICK D L. Proenkephalin and the products of its processing: chemistry and biology[J]. The Peptides, 1984, 6: 26 - 69.
- [29] SALZET M, TASIEMSKI A. Involvement of pro-enkephalin derived peptides in immunity[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25(3): 177 - 185.
- [30] PLOINKOFF N P, FAITH R E, MURGO A J, et al. Methionine enkephalin: a new cytokine-human studies[J]. Immunopathol, 1997, 82: 93 - 101.
- [31] FORIS G, MEDGYESI G A, NAGY J T, et al. Concentration-dependent effect of met-enkephalin on human polymorphonuclear leukocytes[J]. Ann N Y Acad Sci, 1987, 496: 151 - 157.
- [32] JOHNSON H M, SMITH E M, TORRES B A, et al. Regulation of the in vitro antibody response by neuroendocrine hormones[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79: 4147 - 4171.
- [33] LINNER K M, QUIST H E, SHARP B M. Met-enkephalin-containing peptides encoded by proenkephalin mRNA expressed in activated murine thymocytes inhibit thymocyte proliferation[J]. Immunol, 1995, 154: 5049 - 5060.
- [34] HOOK S, CAMBERIS M, PROUT M, et al. Absence of preproenkephalin increases the threshold for T cell activation[J]. Neuroimmunol, 2003, 140: 61 - 68.
- [35] SREENIVASULA R P, KISHORI B. Methionine-enkephalin induces hyperglycemia through eyestalk hormones in the estuarine crab *Scylla serrata*[J]. J Biol, 2001, 201(1): 17 - 25.
- [36] KISHORI B, REDDY P S. Role of methionine-enkephalin on the regulation of carbohydrate metabolism in the rice field crab *Geinoplus senex senex*[J]. C R Biol, 2005, 328(9): 812 - 820.
- [37] ROTHE H, LUSCHEN W, ASKEN A, et al. Purified crustacean enkephalin inhibits release of hyperglycemic hormone in the crab[J]. Biochem Physiol, 1991, 99: 57 - 62.

(上接第2985页)

- [16] WINSTON N, JOHNSON M, HICKERING S, et al. Parthenogenetic activation and development of fresh and aged human oocytes[J]. Fertil Steril, 1991, 56(5): 904 - 912.
- [17] ZHANG J, WANG C W, BLASZYCKA A, et al. Electrical activation and in vitro development of human oocytes that fail to fertilize after intracytoplasmic sperm injection[J]. Fertility and Sterility, 1999, 72(3): 509 - 512.
- [18] HWANG S S, LEE E Y, YOON J T, et al. Effects of electric stimulation on bovine oocyte activation and embryo development in intracytoplasmic sperm injection procedure[J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2000, 17(6): 310 - 314.
- [19] KATO M, ISHIKAWA A, HOCH S, et al. Effect of activation regimens for rat