

文章编号: 1000-0615(2008)03-0484-08

·综述·

甲壳动物血蓝蛋白研究进展

潘鲁青, 金彩霞

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

关键词: 甲壳动物; 血蓝蛋白; 结构; 免疫学特性; 合成与代谢

中图分类号: S 917 文献标识码: A

在动物界进化过程中, 出现了 3 种重要的呼吸蛋白: 蚯蚓血红蛋白(hemerythrin)、血蓝蛋白(hemocyanin)和血红蛋白(hemoglobin)。其中蚯蚓血红蛋白是最古老的呼吸蛋白, 现存于少数较原始的海洋无脊椎动物如星虫、腕足类和部分多毛纲的环节动物中, 它的出现实现了以呼吸蛋白运载氧的形式替代了依靠气体渗透作用被动式摄取氧, 这是呼吸史上一次质的飞跃。由于蚯蚓血红蛋白不稳定, 易氧化, 后来出现的节肢动物, 以较稳定的血蓝蛋白代替了蚯蚓血红蛋白, 但是血蓝蛋白与氧的结合能力很弱, 因此在部分高等海产无脊椎动物如 ■ (Echiuroidea)、海豆芽 (*Lingula anatina*) 和脊椎动物中以高效载氧的血红蛋白替代了血蓝蛋白。这 3 种呼吸蛋白是同功非同源关系, 尤其是血蓝蛋白, 不仅在非线性分子进化中具有承上启下的重要意义, 而且至今依然是多数甲壳动物和软体动物(头足类和腹足类)的呼吸蛋白, 它在动物界中的分布范围仅次于血红蛋白。

甲壳动物血蓝蛋白约占血淋巴总蛋白的 90% 以上, 具多种生理功能^[1]。目前, 甲壳动物血蓝蛋白已成为国内外学者研究的热点领域, 本文综述了国内外甲壳动物血蓝蛋白的研究进展, 不仅对甲壳动物血蓝蛋白多功能生理特性研究提供了基础资料, 也为甲壳动物血蓝蛋白生理调控机制的研究奠定了理论基础。

1 血蓝蛋白的结构性质

典型的甲壳动物血蓝蛋白是由六个高度螺旋的体积为 10 nm × 10 nm × 10 nm、氨基酸数为 630 ~ 660、分子量为 70 ~ 80 ku 的异源亚基构成的六聚体(hexamer) (图 1-A)^[2], 六聚体中每个亚基折叠为三个结构域, 其中第一、三结构域分别为亚基蛋白的 N、C 端, 第二结构域含血蓝蛋白的活性部位, 活性部位结合有两个铜离子 CuA 和 CuB, 每个铜离子分别与蛋白质链上三个组氨酸的咪唑氮原子配位^[3], 这两个铜离子是血蓝蛋白结合一个 O₂ 分子所必需的, 因此, 传统上将构成六聚体的单个亚基称为血蓝蛋白的最小功能单位, 或称为单体。早在 80 年代, 就有学者成功分离了甲壳动物的血蓝蛋白亚基^[4], 近年有学者^[5-6]将凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 血蓝蛋白分离为分子质量为 73 ku 和 75 ku 的两种亚基(分别命名为 p73、p75)。

每个亚基的三个结构域在六聚体中有序排列, 一、三两个结构域包围围绕着活性部位所在的第二结构域(图 1-B), 活性部位被深埋于分子内部, 通常情况下只有 O₂ 等小分子物质能接近^[7], 只有在特殊情况(如发挥酚氧化酶活性)时血蓝蛋白才会暂时形成外部通向活性部位的通道。六聚体之间也具有相互的作用力, 形成六聚体低聚物,

收稿日期: 2007-10-15

资助项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划资助(NCET-06-0597)

作者简介: 潘鲁青(1966-), 男, 山东青岛人, 教授, 博士生导师, 主要从事甲壳动物生理学研究。Tel: 0532-82032963, E-mail: panlq@ouc.edu.cn

低聚物中六聚体个数因物种而变,在甲壳动物中大多数是 1~2 个^[8],而鲎科动物血蓝蛋白是由八个六聚体构成的复杂聚合物。六聚体和六聚体低聚物的比例关系不是一成不变的,低温和高 pH 条件下六聚体低聚物含量升高^[9]。

虽然血蓝蛋白在节肢动物和软体动物体内都

起运输氧的作用,但两者的血蓝蛋白结构却截然不同。从四级结构上看,节肢动物血蓝蛋白是六聚体或六聚体低聚物,而软体动物血蓝蛋白是一巨大中凹的圆柱型分子(图 1-C),两者血蓝蛋白氨基酸序列的相似性低于 10%^[10],Burmester^[11]认为两者源于不同的铜结合蛋白。

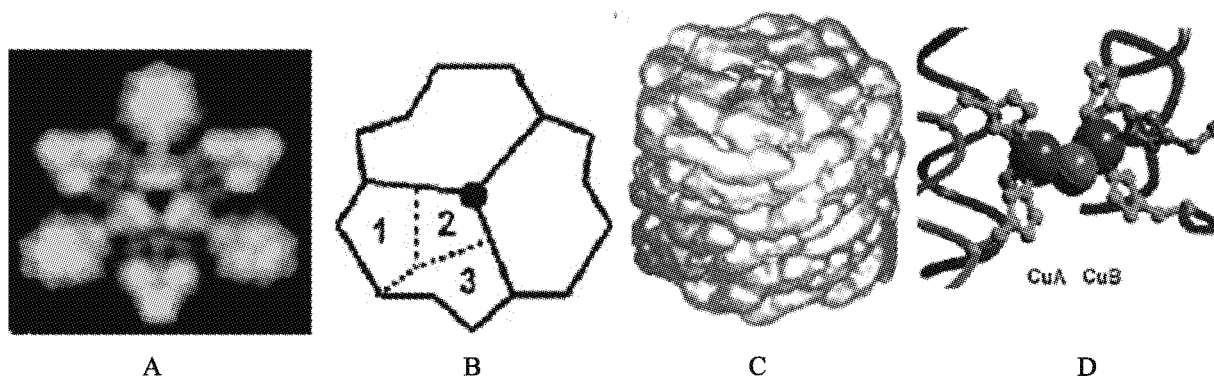


图 1 甲壳动物、软体动物血蓝蛋白的结构

Fig.1 Structure of crustacean and mollusc hemocyanins

A:甲壳动物血蓝蛋白六聚体的形状,六个花瓣状构造分别为血蓝蛋白的六个亚基(仿 Jaenicke 等^[3]);B:甲壳动物血蓝蛋白六聚体中第二结构域集中在六聚体中央区域,其它两个结构域分布在六聚体周围(仿 Jaenicke 等^[3]);C:软体动物血蓝蛋白的四级结构(仿吕宝忠等^[12]);D:美洲鲎(*Limulus polyphemus*)血蓝蛋白的活性部位(仿 Decker 等^[13]),两个蓝色的圆球体为 CuA 和 CuB,红色圆球体为氧分子,绿色片段为组氨酸,每三个组氨酸分别与一个 Cu 结合

A:View of the hemocyanins hexamer in crustacean. The six valvular structures are subunits of hemocyanins;B: The second domain of the crustacean hemocyanins hexamer lies in the middle of the hexamer, and the other two ones locate at the brim of the configuration;C: Quaternary structure of mollusc hemocyanins;D: View of the active site of *Limulus polyphemus* hemocyanins. The blue globes stand for two copper atoms CuA and CuB, the red in the middle represents a oxygen molecule, and the green chains denote histidines. Every three of them bind to one Cu ion

2 血蓝蛋白的功能特性

近年来已有研究表明血蓝蛋白除载氧外,还具有酚氧化物酶活性、抗细菌和抗病毒活性、转运金属离子^[14]、储存蛋白质、渗透压调节^[15]、作为蜕皮激素的载体^[16]、参与表皮的固化等作用,是一种多功能蛋白,而且有可能是表皮的组成成分^[17]。但另据报道血蓝蛋白所具有的众多功能中,某些可能是由于不同学者误译造成的结果^[18]。本文主要就血蓝蛋白的基本功能和近年来研究较多、普遍认同的功能特性予以阐述。

2.1 血蓝蛋白的载氧特性

血蓝蛋白最基本功能就是运输氧。当氧分压高时,活性部位的两个 Cu 以 Cu^{2+} 形式存在,结合一个 O_2 形成蓝色氧合血蓝蛋白(oxyhemocyanin)(图 1-D);氧分压低时,Cu 以 Cu^+ 形式存在, O_2 从

血蓝蛋白中解离出来,形成无色脱氧血蓝蛋白(hemocyanin)。血蓝蛋白通过这种可逆性与氧结合的方式,供给动物机体生理代谢对氧的需求,但这种可逆性结合的机理有待于深入研究。

与血红蛋白相比,血蓝蛋白与氧的结合性非常低,而且受多因素影响。Whiteley 等^[19]认为在一定范围内,血淋巴 pH 越高越有利于血蓝蛋白与氧的结合。温度对甲壳动物呼吸生理的影响也尤为显著:温度升高,水中溶解氧下降,而且血蓝蛋白构象也会发生变化,降低了与氧的结合性;另一方面温度升高,血淋巴 pH 亦会随之降低,不利于血蓝蛋白与氧的结合。此外,血淋巴中乳酸盐、尿酸盐、多巴胺、 CO_2 、无机离子等^[20-21]也会影响血蓝蛋白与氧的结合性。

甲壳动物主要通过以下途径适应溶解氧的变化:升高血淋巴 pH 或改变亚基氨基酸组成的方

式,提高血蓝蛋白与氧的结合性;另一方面通过增强气体交换或增加呼吸蛋白量来满足机体对氧的需求。Durstewitz等^[22]报道当环境中氧分压降低时,血蓝蛋白单体上的氨基酸组成会随之发生变化,以增强与氧的结合性;长期处于低溶解氧环境中的甲壳动物会启动血蓝蛋白的合成机制,如Mason等^[23]、DeFur等^[24]、Boone等^[25]分别对美洲真蟹、褐虾(*Crangon crangon*)的研究;Baden等^[26]对处于低溶氧下的挪威海螯虾(*Nephrops norvegicu*)研究发现,其血蓝蛋白有升高趋势;Brouwer等^[27]研究也发现,处于低溶氧下的小长臂虾(*Palaemonetes pugio*)血蓝蛋白合成基因表达升高。

2.2 血蓝蛋白的免疫学特性

据章跃陵等^[6]报道凡纳滨对虾在感染病原菌后,肝胰脏中 p75 和 p73 两种亚基浓度显著升高,由此推测:受到细菌攻击后,对虾血淋巴中的血蓝蛋白通过不同途径参与了机体的免疫防御,为满足机体生理功能对血蓝蛋白的需求,肝胰脏启动了血蓝蛋白的合成机制;他们进一步研究提出^[5],血蓝蛋白 75 ku 亚基与人 Ig 存在相似的抗原决定簇或高度同源的同源区域,而且可与抗人 IgG 发生明显交叉反应,认为血蓝蛋白的免疫学特性主要与该亚基有关。许多学者研究认为,血蓝蛋白可能是甲壳动物中一种新的重要免疫分子^[28-30]。

血蓝蛋白的酚氧化酶(phenoloxidase, PO)活性 酚氧化酶原(prophenoloxidase)激活系统在甲壳动物的免疫识别和防御中起着关键作用,近年的研究表明甲壳动物血蓝蛋白与酚氧化酶在物理化学性质^[31]、蛋白质一级结构和三级结构^[31]、基因序列^[32]等方面非常相似,并发现血蓝蛋白还具有类似酚氧化酶的活性。

已有研究表明在体外条件下血蓝蛋白受胰岛素、十二烷基磺酸钠、尿素和生物防御分子、血细胞成分等物质的诱导,以及在轻微水解的条件下均可表现出类似酚氧化酶的活性^[33-36]。其中十二烷基磺酸钠是最常用来激活血蓝蛋白酚氧化酶活性的物质,它在不摧毁蛋白质条件下改变血蓝蛋白构象,活性部位暴露,使酚底物能够与之结合,但随着构象的继续改变,血蓝蛋白将逐渐失去酚氧化酶活性^[37];Nagai等^[38]认为,由血细胞分泌的抗菌肽也具有两性结构,在理论上也可诱导

血蓝蛋白的酚氧化酶活性。Adachi等^[35]研究表明甲壳动物血细胞溶解产物亦可诱导血蓝蛋白的酚氧化酶免疫活性,为体内条件下血蓝蛋白向酚氧化酶活性的转化提供了科学的参考依据。无论何种方式诱导的血蓝蛋白酶活性,都是基于甲壳动物血蓝蛋白亚基 N-末端的裂解。

关于血蓝蛋白和酚氧化酶的起源关系目前主要有两个对立的观点:一是多数学者主张血蓝蛋白是由酚氧化酶演化而来^[26-27],从这一观点出发,推断甲壳动物血蓝蛋白不具备真正意义上的酚氧化酶活性,它所表现的潜在酶活性应是进化过程中酚氧化酶功能的残留;二是少数学者认为酚氧化酶源于血蓝蛋白^[32,39-40]。鉴于上述争议,有关甲壳动物血蓝蛋白与酚氧化酶之间的起源和功能转化关系尚需进一步研究。

血蓝蛋白的抗菌肽活性 抗菌肽(antibacterial peptides)是动物免疫防御系统产生的一类广谱抗菌性小分子多肽,对于缺乏免疫球蛋白介导的特异性免疫的甲壳动物来说,抗菌肽的作用更是显得至关重要。

2001年,Destoumieux等^[41]从凡纳滨对虾血浆中得到分子质量为 2.7 ku 和从细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)中得到分子质量为 7.9 ku、8.3 ku 的广谱抗真菌活性的小分子阴离子抗菌肽,通过分析发现,95%~100%氨基酸序列与各自血蓝蛋白 C-末端氨基酸序列相同,由此断定分离所得抗真菌活性多肽源自血蓝蛋白;Premruethai等^[42]对被病原菌感染的斑节对虾(*Penaeus monodon*)研究发现,血浆中有血蓝蛋白 C-末端产生的小片段,这种多肽具有广谱性抗真菌活性,能引起即时、系统的抗微生物反应;Lee等^[28]也证实血蓝蛋白可部分降解产生具有抗菌功能的多肽。血蓝蛋白抗菌肽片段由六聚体第三结构域表面裂解而来,分子结构中不包含铜离子结合位点^[37,41],由此可以确定其抗菌活性与血蓝蛋白活性部位无关。同血细胞分泌的抗菌肽不同,血蓝蛋白抗菌肽片段在生理 pH 条件下带负电荷,为阴离子抗菌肽^[43]。

另据 Zhang等^[30]报道未降解的斑节对虾血蓝蛋白本身也具有广谱性抗真菌活性,可与多种病原微生物结合,还具抗 DNA 和 RNA 病毒的特性;Decker等^[37]在总结前人对血蓝蛋白研究成果的基础上,提出血蓝蛋白抗菌肽在未被解离释放、

仍然是六聚体的一部分时,就已具备抗菌功能,也就是说血蓝蛋白本身就具抗菌功能。上述研究表明,对虾血蓝蛋白本身或部分降解产生的抗菌肽,与血细胞所合成的抗菌肽一样,在对虾的免疫防御体系中具有重要作用,因此 Destoumieux 等^[41]认为血蓝蛋白是抗真菌多肽的物质基础。

血蓝蛋白的凝集活性(agglutinative activity)

甲壳动物凝集素能使细菌、脊椎动物的红细胞等发生凝集,使其失去感染力,并促进血细胞的吞噬和识别,是甲壳动物体内的一种免疫识别因子。近年研究表明,血蓝蛋白也具有一定程度的凝集活性。

章跃陵等^[44-46]研究表明血蓝蛋白蛋白斑点的肽质量谱峰值可以与流感病毒的血凝素相匹配,提示血蓝蛋白可能具有凝集活性;凡纳滨对虾血蓝蛋白对鱼、鸡、鼠和人等 4 种脊椎动物的红细胞有显著的血细胞凝集活性,对副溶血弧菌、溶藻酸弧菌等 6 种虾类致病菌具有不同程度的凝集活性,而且同一般凝集素一样,该凝集反应可被 α -半乳糖、 α -D 葡萄糖、甘露醇和 N-乙酰神经氨酸等 4 种糖显著抑制,但其凝集活性较一般凝集素要低 1~2 个数量级^[47-48];以往 Tsing 等^[49]和 Sequeira 等^[50]研究表明:印吉单肢虾(*Sicyonia ingentis*)和日本囊对虾(*Penaeus japonicus*)血蓝蛋白显著增多的同时,体内凝集效应亦随之增强,并据此推测血蓝蛋白可能是凝集效应的主要发起者和激活者。

2.3 血蓝蛋白的其它作用

血蓝蛋白结构复杂,分子中有相当数量的金属结合位点,可作为金属离子的载体。许多学者^[51-52]研究认为,水环境中的重金属离子透过甲壳动物鳃表皮进入血淋巴,与血蓝蛋白结合后,被转移到肝胰脏,并与肝胰脏中的蛋白质(如金属硫蛋白)暂时性结合。

除金属结合位点外,血蓝蛋白还具有多种游离基团,易与一些特异分子如刀豆球蛋白 A、 γ -球蛋白和特异分子的配体连接形成复合物,再利用抗原抗体或配体受体反应使该复合物与细胞表面的特异分子起反应^[53-54]。由于血蓝蛋白分子巨大、形态规则,电镜下易于辨认,因此可通过血蓝蛋白来观察特异分子的分布。作者认为利用血蓝蛋白这方面特性,可将其作为标志物广泛用于研究特异分子的分布状况。

另外,血蓝蛋白占血淋巴蛋白的绝大部分,是

甲壳动物体内巨大的蛋白质储存库。已有报道表明^[55-57]对虾将体内富余蛋白质以血蓝蛋白形式储存,是甲壳动物储存蛋白能量的有效途径之一;Hagerman^[58]研究发现血蓝蛋白是饥饿状态下甲壳动物蛋白的提供者。

3 血蓝蛋白的合成与代谢

关于血蓝蛋白的合成,国内外已有过许多研究报告,初步明确了它在某些动物体内的合成部位,但其合成机制尚未定论。鲎血蓝蛋白在一种源自肝胰脏的胚蓝细胞(cyanoblasts)中合成^[59];头足类的章鱼(*Octopus*)、乌贼(*Sepia*)在鳃腺(gill gland)中合成血蓝蛋白;一些有肺腹足类的血蓝蛋白在 Rhogocytes 中合成^[60];十足目甲壳动物和鹦鹉螺(*Nautilus pompilius*)的血蓝蛋白则是在肝胰脏中合成^[61]。继 Gibson 等^[62]20 世纪 70 年代提出肝胰脏是甲壳动物血蓝蛋白的合成器官后,许多学者分别用氨基酸标记法^[63-64]和 Northern blotting 法^[65-66]证实了这一观点,并进一步提出肝胰脏 F-cell 是甲壳动物血蓝蛋白的合成细胞。而 Khayat 等^[67]除了在欧洲黄道蟹(*Cancer pagurus*)肝胰脏中检测到血蓝蛋白 mRNA 外,还从眼动脉周围结缔组织中提取出血蓝蛋白 mRNA。关于甲壳动物体内是否确存在其它的血蓝蛋白合成位点至今尚无定论。Markl 等^[68]研究认为,软体动物血蓝蛋白是通过细胞表面特殊的小孔和复合体释放到血淋巴中的,但目前尚无相关文章报道甲壳动物血蓝蛋白的释放途径。

不同功能的蛋白质存在(或称寿命)从几天到几个月不等,Senkbeil 等^[63]对美洲龙螯虾(*Homarus americanus*)和眼斑龙虾(*Panulirus argus*)研究表明,两者血蓝蛋白周转期分别为 25.5 和 36 d。除蛋白质自身的更新与降解外,外界环境的变化也可影响血蓝蛋白的合成与代谢。Boone 等^[25]将艾氏真蟹(*Carcinus aestuarii*)由自然海水放入 50% 的海水中后,发现体内血蓝蛋白含量明显上升;据 Siebers 等^[69]报道三叶真蟹由盐度 11 移入 38 的海水中,12 h 后血蓝蛋白含量由 $42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 降为 $28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;DeFur 等^[24]研究表明美洲真蟹体内血蓝蛋白水平与外界盐度呈负相关性;Paul 等^[31]认为甲壳动物血蓝蛋白在不同盐度下的合成代谢变化与其渗透调节过程密切相关,在高盐度下血蓝蛋白可裂解为自由氨基酸,维持血淋巴渗透压

平衡。

4 展望

综上所述,近年来对甲壳动物血蓝蛋白的研究取得一些进展,如在血蓝蛋白的结构性质、功能特性、合成和代谢等方面所取得的成果。但是血蓝蛋白作为血淋巴中一种含量极高的蛋白质,肩负多种生理功能,应尽快确立它在甲壳动物体内的生理地位,进而建立以血蓝蛋白为指标的评估甲壳动物健康的方法。作者认为今后在甲壳动物血蓝蛋白方面应重点研究的课题为:

①血蓝蛋白合成代谢的调控机制,尤其在环境变化时甲壳动物如何启动体内的血蓝蛋白合成和降解反应;

②关于血蓝蛋白的酚氧化酶活性问题,以往学者只是证实了血蓝蛋白在体外可被某些物质诱导表现酚氧化酶活性和在体内具备发挥酚氧化酶活性的条件,并无研究能明确表明体内条件下血蓝蛋白的酚氧化酶活性状况,在这一问题上还需更确凿的理论依据作为支撑;

③外界环境变化时,血蓝蛋白释放抗菌肽的调控机制以及所释放抗菌肽对机体免疫防御的贡献大小;

④血蓝蛋白的凝集活性问题仍需深入研究,这将进一步拓展和充实甲壳动物免疫学的研究。

参考文献:

- [1] Jeuniaux C. Haemolymph arthropoda [M]//Chemical Zoology Arthropoda VI. Academic Press, New York, 1971:63-118.
- [2] Burmester T. Origin and evolution of arthropod hemocyanin and related proteins[J]. J Comp Physiol, 2002, 172B:95-107.
- [3] Jaenicke E, Decker H. Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase[J]. Micron, 2004, 35: 89-90.
- [4] Bak H J, Beintema J J. *Panulirus interruptus* hemocyanin: The elucidation of the complete amino acid sequence of subunit a[J]. Eur J Biochem, 1987, 169: 333-348.
- [5] 章跃陵,刘光明,王三英,等. 南美白对虾血蓝蛋白与抗人 IgG 相互作用的研究[J]. 汕头大学学报(自然科学版), 2005, 20(2):32-36.
- [6] 章跃陵,卓奕明,朱永飞,等. 凡纳滨对虾人工感染细菌后肝胰脏中主要变化蛋白的研究[J]. 水产科学, 2005, 24(6):19-23.
- [7] Perbandt M, Guthoehrlein E W, Rypniewski W, et al. The structure of a functional unit from the wall of a gastropod hemocyanin offers a possible mechanism for cooperativity [J]. Biochemistry, 2003, 42: 6341-6346.
- [8] Yoo B S, Kim S B, Lee J H, et al. The subunit composition of *Portunus trituberculatus* hemocyanin polymers [J]. Biochem Biophys Res Comm, 1988, 153:748-752.
- [9] Decker H, Föll R. Temperature adaptation influences the aggregation state of hemocyanin from *Astacus leptodactylus* [J]. Comp Biochem Physiol, 2000, 127: 147-154.
- [10] Salvato B, Beltramini M. Hemocyanin molecular architecture: structure and reactivity of the binuclear copper-active site[J]. Life Chem Rep, 1990, 8: 1-47.
- [11] Burmester T. Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily[J]. Mol Biol Evol, 2001, 18: 184-195.
- [12] 吕宝忠,杨群. 血蓝蛋白分子的结构、分类及其在进化上的演变[J]. 自然杂志, 2003, 25(3): 180-183.
- [13] Decker H, Tuzcek F. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism[J]. Reviews, 2000: 392-397.
- [14] Jaenicke E, Föll R, Decker H. Spider hemocyanin binds ecdysone and 20-OH-ecdysone[J]. J Biol Chem, 1999, 274:34267-34271.
- [15] Paul R, Pirow R. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates[J]. Zoology, 1998, 100:319-327.
- [16] Rital A, Truchot J P. Haemolymph transport and tissue accumulation of exogenous copper in the shore crab, *Carcinus maenas* [J]. Marine Pollution Bulletin, 1996, 32(11):802-811.
- [17] Paul R, Bergner B, Pfeffer-Seidl A, et al. Gas Transport in the haemolymph of arachnids. I. Oxygen transport and the physiological role of haemocyanin[J]. J Exp Biol, 1994, 188:25-46.
- [18] Olianias A, Sanna M T, Messana I, et al. The hemocyanin of shamed crab *Calappa granulata*: structural-functional characterization [J]. J Biochem, 2006, 139: 957-966.
- [19] Whiteley N M, Taylor W, Elhaj A J. Seasonal and

- latitudinal adaptation to temperature in crustaceans[J]. *J Therm Biol*, 1997, 22(6):419 – 427.
- [20] Lallier F, Truchot J P. Modulation of haemocyanin oxygen affinity by L-lactate and urate in the prawn *Penaeus japonicus* [J]. *J Exp Biol*, 1989, 147:133 – 146.
- [21] Maria T S, Olianasa A, Castagnolab M, *et al.* Oxygen-binding modulation of hemocyanin from the slipper lobster *Scyllarides latus* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2004, 139B:261 – 268.
- [22] Durstewitz G, Terwilliger N. Northern blot analysis of the differential expression of hemocyanin subunits in various tissues and developmental stages of the Dungeness crab (*Carcinus magister*) [J]. *Physiol Zool*, 1995, 68:149.
- [23] Mason R P, Mangum C P, Godette G. The influence of inorganic ions and acclimation salinity of hemocyanin oxygen binding in the blue crab *Callinectes sapidus* [J]. *Biol Bull*, 1983, 164:104 – 123.
- [24] DeFur P L, Mangum C P, Reese J E. Respiratory responses of the blue crab *Callinectes sapidus* to long-term hypoxia [J]. *Biol Bull*, 1990, 178:46 – 54.
- [25] Boone W R, Schoffeniels E. Hemocyanin synthesis during hypo-osmotic stress in the shore crab *Carcinus maenas* (L) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1979, 63: 207 – 214.
- [26] Baden S P, Pihl L, Rosenberg R. Effects of oxygen depletion on the ecology, blood physiology and fishery of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1990, 67:141 – 155.
- [27] Brouwer M, Brown-Peterson N J, Larkin P. Molecular and whole animal responses of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, exposed to chronic hypoxia [J]. *J Exp Mar Bio Ecol*, 2007, 341:16 – 31.
- [28] Lee S Y, Lee B L, Söderhäll K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 7927 – 7933.
- [29] Pless D D, Aguilar M B, Falcon A, *et al.* Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean [J]. *Arc Biochem Biophys*, 2003, 409:402 – 410.
- [30] Zhang X B, Huang C H, Qin Q W. Antiviral properties of hemocyanin isolated from *Penaeus monodon* [J]. *Antiviral Res*, 2004, 61:93 – 99.
- [31] Paul R, Pirow R. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates [J]. *Zoology*, 1998, 100: 319 – 327.
- [32] Aspán A, Huang T S, Cerenius L, *et al.* cDNA cloning of a prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation [J]. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1995, 92:939 – 943.
- [33] Morioka C, Tachi Y, Suzuki S, *et al.* Significant enhancement of monooxygenase activity of oxygen carrier protein hemocyanin by urea [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128:6788 – 6789.
- [34] Nagai T, Kawabata S. A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 29264 – 29267.
- [35] Adachi K, Hirata T, Nishioka T, *et al.* Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2003, 134B:135 – 141.
- [36] Siddiqui N I, Préaux G, Gielens C. Intrinsic and induced odiphenoloxidase activity of β -hemocyanin of *Helix pomatia* [J]. *Micron*, 2004, 35:91 – 92.
- [37] Decker H, Jaenicke E. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28: 673 – 687.
- [38] Nagai T, Osaki T, Kawabata S. Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 27166 – 27170.
- [39] Burmester T. Evolutionary history and diversity of arthropod hemocyanins [J]. *Micron*, 2004, 35:121 – 122.
- [40] Immesberger A, Burmester T. Putative phenoloxidases in the tunicate *Cionaintesti nalis* and the origin of the arthropod hemocyanin superfamily [J]. *J Comp Physiol*, 2004, 174B(2):169 – 180.
- [41] Destoumieux D, Saulner D, Garnier J, *et al.* Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:47070 – 47077.
- [42] Premruethai S, Sirawut K, Rath P, *et al.* Immune-related genes discovery by expressed sequence tags analysis of haemocytes in the *Vibrio harvey* infected *Penaeus monodon* [C]. *World Aquac Soc*, 2002, 743.
- [43] 李雷, 王金星, 翠洁. 对虾免疫防御中的阳离子和阴离子抗菌肽 [J]. *海洋与湖沼*, 2003, 34(2): 217 – 223.
- [44] 章跃陵. 南美白对虾类 Ig 的定性、功能和免疫分子进化的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2003:72 – 77.
- [45] 章跃陵, 陈俊, 林伯坤, 等. 南美白对虾血蓝蛋白

- 血细胞凝集活性初探[J]. 汕头大学学报(自然科学版), 2005, 20(3): 48 - 53.
- [46] 章跃陵, 林伯坤, 陈俊, 等. 凡纳滨对虾血蓝蛋白的细菌凝集活性[J]. 中国水产科学, 2006, 13(6): 1006 - 1011.
- [47] Zenteno R, Vazquez L, Sierra C, *et al.* Chemical characterization of the lectin from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) by MALDI-TOF [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2000, 127: 243 - 250.
- [48] Savan R, Endo M, Sakai M. Characterization of a new C-type lectin from common carp *Cyprinus carpio* [J]. *Mol Immunol*, 2004, 41(9): 891 - 899.
- [49] Tsing A, Arcier J M, Brehelin M. Haemocytes of penaeid and palaemonid shrimps, morphology, cytochemistry and haemograms [J]. *J Invertebr Pathol*, 1989, 53: 64 - 77.
- [50] Sequeira T, Cerenius L. Flow cytometric analysis of molt-related changes in haemocyte type in male and female *Penaeus japonicus* [J]. *Biol Bull*, 1995, 189: 376 - 380.
- [51] Engel D W, Brouwer M, Allen M. Effects of molting and environmental factors on trace metal body-burdens and hemocyanin concentrations in the American lobster, *Homarus americanus* [J]. *Mar Environ Res*, 2001, 52: 257 - 269.
- [52] Martin D J, Rainbow P S. Haemocyanin and the binding of cadmium and zinc in the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas* [J]. *The Science of the Total Environ*, 1998, 214: 133 - 152.
- [53] Jan L Y, Revel J P. Haemocyanin-antibody labeling of rhodopsin in mouse retina for a scanning electron microscope study [J]. *J Supramolecular Structure*, 1975, 3: 61 - 66.
- [54] 刘黎, 王新明, 洪龙生, 等. 几种血蓝蛋白分子的电镜观察及其与另一些分子的连接[J]. 实验生物学报, 1979, 12(1): 1 - 12.
- [55] Pascual C, Sánchez A, Zenteno E, *et al.* Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2006, 251: 416 - 429.
- [56] Pascual C, Gaxiola G, Rosas C. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture condition and a comparison with other crustacean species [J]. *Mar Biol*, 2003, 142: 735 - 745.
- [57] Rosas C, Cuzon G, Gaxiola G, *et al.* An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2002, 268: 47 - 67.
- [58] Hagerman L. Haemocyanin concentration in the shrimp, *Crangon crangon* (L.) after exposure to moderate hypoxia [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1986, 85A: 721 - 724.
- [59] Fahrenbach W H. The cyanoblast: hemocyanin formation in [J]. *J Cell Biol*, 1968, 39: 445 - 453.
- [60] Haszprunar G. The molluscan rhogocyte (pore cell, blasenzelle, cellule nucale), and its significance for ideas on nephridial evolution [J]. *J Moll Stud*, 1996, 62: 185 - 211.
- [61] Ruth P, Blum W, Bille J. Immunocytochemical reaction of a haemocyanin antibody in the midgut gland of *Nautilus* (Cephalopoda, Tetrabranchiata) [J]. *Experientia*, 1996, 52: 549 - 553.
- [62] Gibson R, Barker P L. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr* [J]. *Mar Biol Annu Rev*, 1979, 17: 285 - 346.
- [63] Senkbeil E G, Wriston J C. Hemocyanin synthesis in the American lobster *Homarus americanus* [J]. *J Comp Physiol*, 1981, 68: 163 - 171.
- [64] Gellissen G, Hennecke H, Spindler K D. The site of synthesis of hemocyanin in the crayfish *Astacus leptodactylus* [J]. *Experientia*, 1991, 47(2): 194 - 195.
- [65] Spindler K D, Hennecke R G, Gellissen G. Protein production and the molting cycle in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Nordmann, 1842). II. Hemocyanin and protein synthesis in the midgut gland [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1992, 85: 248 - 253.
- [66] Sigrid A L, Samuel E J. Expression of hemocyanin and digestive enzyme messenger RNAs in the hepatopancreas of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2002, 133B: 163 - 171.
- [67] Khayat M, Funkenstein B, Tietz A, *et al.* *In vivo*, *in vitro* and cell-free synthesis of hemocyanin in the shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1995, 12(1): 31 - 38.
- [68] Markl J, Lieb B, Gebauer W, *et al.* Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanins KLH and HtH [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127: 3 - 9.
- [69] Siebers D, Lucu C, Sperling K R, *et al.* Kinetics of osmoregulation in the crab *Carcinus maenas* [J]. *Mar Biol*, 1972, 17: 291 - 303.

A review on hemocyanins of crustacean

PAN Lu-qing, JIN Cai-xia

(*The Key Laboratory of Marine Culture of Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China*)

Abstract: Crustacean, especially crabs and shrimp have become more and more important objects in world aquaculture. Hemocyanins(Hcs) are the very important chromoprotein accounting for more than 90% of all the crustacean hemolymph protein. In recent years, many investigations have been focused on Hcs. In this paper, the research advances in crustacean hemocyanins were summarized following aspects: the basic structure, property of oxygen transport, immunity, anabolism of Hcs and so on. Hcs occurs as hexamers composed of six heterogeneous monomeric subunits. Each subunit holds an active site of two coppers, which corresponds to only one oxygen molecule. Recently, researchers put forward that Hcs hold important immune functions in crustacean. Hcs may exert their defence functions at least by two ways: one way is Hcs's converting to phenoloxidase by cleavage of N-terminal sequences of Hcs; the other way is releasing antimicrobial fractions by cleavage of C-terminal of Hcs, which are broadly antimicrobial against a variety of bacteria and viruses. A new study proved that Hcs possesses the property of agglutinin with low activity, which also contributes to immunity in crustacean to a certain extent. Hcs can also serve as carriers of metal ions, storage of protein. Besides, Hcs can be used as a sign to observe the distribution of some molecules connecting with them. Hcs are synthesized in F-cell cytoplasm of the hepatopancreas. Evidence proved that ambient factors could also lead to Hcs' anabolism.

Key words: crustacean; hemocyanins; structure; immune property; anabolism