

文章编号: 1000- 0615(2006)02- 0151- 05

中华绒螯蟹眼柄神经多肽激素的分离纯化及活性鉴定

王雪惠¹, 孙金生^{1,2}, 杨卫军³

(1. 天津师范大学化学与生命科学学院, 天津 300074;

2. 天津市水产研究所, 天津 300221;

3. 浙江大学海洋学院, 浙江 杭州 310012)

摘要: 采用反相高效液相色谱技术(RP2HPLC), 首次分离、纯化了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)眼柄神经多肽激素, 获得了高血糖激素(crustacean hyperglycemic hormone, CHH)纯品。初步的生理活性鉴定结果表明, 该激素有显著的升血糖作用, 能使中华绒螯蟹血糖水平在30 min内升到最高值, 为(56.14? 10.58) mg# 100 mL⁻¹ (n=4), 比正常水平增加了(2.87? 0.73)倍, 被确定为甲壳动物高血糖激素(CHH)。CHH在窦腺(sinus gland, SG)中的含量最丰富, 占SG粗提物蛋白总量的(12.26? 2.57)%, 占SG激素总量的(52.90? 11.09)%。生化特征研究结果表明, 河蟹眼柄CHH的分子量为5.1 kD, 显著低于已知甲壳动物CHH的分子量。研究结果也为进一步研究河蟹神经多肽激素的合成和分泌及调控机制等奠定了基础。

关键词: 中华绒螯蟹; 窦腺; 神经多肽; 分离纯化; 高血糖激素

中图分类号: Q57; S917 **文献标识码:** A

Isolation and activity of a crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from *Eriocheir sinensis*

WANG Xue2hui¹, SUN Jin2sheng^{1,2}, YANG Wei2jun³

(1. College of Chemistry and Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China;

2. Tianjin Fishery Institute, Tianjin 300221, China;

3. College of Oceanology, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: The most abundant neuropeptide, crustacean hyperglycemic hormone (CHH) has been first extracted from sinus glands of *Eriocheir sinensis*, and purified to homogeneity by reverse2phase high performance liquid chromatogram (RP2HPLC). The sinus glands of *Eriocheir sinensis* are the organs to store neuropeptides, which are quite perfect to do research for the neurosecretory system of *Eriocheir sinensis*. For the crab *Eriocheir sinensis*, CHH accounts for (153.63? 32.23) ng(n=4) per SG, while the extracts of one sinus gland reach (1252.63? 298.40) ng (n=4). In crustaceans, the CHH and the structurally related peptides MIH (molt inhibiting hormone), VIH (vitellogenesis inhibiting hormone) and MOIH (mandibular organ inhibiting hormone), are classically considered as the major physiological regulators involved in the control of carbohydrate metabolism and in different functions such as molt, reproduction and hydromineral metabolism. The amino acid sequences of these neuropeptides hormones are similar to each other: they consist of 72- 78 residues with six conserved cysteine residues arranged in three disulfide bridges. CHH shows obviously hyperglycemic activity, which can make the haemolymph of the crab *Eriocheir sinensis* reach the highest level (56.14? 10.58) mg# 100 mL⁻¹ only in 30 minutes, while the CHHs from any other species that have been examined show hyperglycemic activity in about

收稿日期: 20050303

资助项目: 国家自然科学基金资助(30271019, 30571421); 天津市自然科学基金资助(05YFJMJC00100)

作者简介: 王雪惠(1979-), 女, 山东招远人, 硕士研究生, 主要从事甲壳动物内分泌学研究。Tel: 022- 88250781, E2mail: xuehw@163.com

通讯作者: 孙金生, E2mail: jsun1965@yahoo.com.cn

2 hours. The molecular weight of CHH was examined by SDS-PAGE under the indication of protein Marker (BBI, from 4.1 kD to 66 kD), the result was 5.1 kD with the use of GDS Microsoft to analyze, which is much lower than any other CHH (7-9 kD) that has already been known. In recent years, the amino acid sequences of the CHHs from many species of crustaceans have been determined, however, no sequence data for CHH from *Eriocheir sinensis* has been reported so far, and will be reported later. In this paper CHH from *Eriocheir sinensis* has been separated and its biological activity has been examined, the results of the experiment will be helpful for the further research in the synthesis and secretion of the neuropeptides, as well as have laid the foundation to determine the physiological function of other neuropeptides hormones in the sinus glands.

Key words: *Eriocheir sinensis*; sinus gland; neuropeptides; purification; CHH

甲壳动物眼柄视神经节中的X器官-窦腺(XO-organ-sinus gland system, XO-SG)复合体,类似哺乳动物的下丘脑-垂体系统,是甲壳动物重要神经内分泌器官。它合成和分泌的多种神经多肽激素,调控甲壳动物的蜕皮、性腺发育、代谢、色素反应、渗透压调节等重要生理活动^[1-4]。因此,对这一系统的研究一直是甲壳动物内分泌学的重点内容。组织、细胞学和同位素示踪观察结果表明,XO由视神经节内一群相互无连接的单轴突分泌神经细胞组成,它们的轴突末梢在血窦附近膨大形成窦腺^[2]。在XO中的神经内分泌细胞的胞体中不断合成的神经多肽激素经轴突运输到SG中储存;当受到释放信号的刺激后以胞吐作用方式释放到血淋巴中,且新合成的激素优先释放,经血淋巴运输到靶器官发挥作用^[5]。由于眼柄神经多肽激素的合成少,在SG中的含量甚微,给分离、纯化工作造成了困难,影响了神经内分泌的研究进展。自上世纪90年代初,我国开始对甲壳动物眼柄神经内分泌系统的研究,但研究工作还停留在对锯缘青蟹(*Scylla serrata*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、中国对虾(*Penaeus chinensis*)眼柄神经内分泌系统的组织学和细胞学观察^[6-9]。在生物化学和分子生物学研究方面,仅见邱高峰等^[10]、王在照等^[11]和宋霞等^[12]利用同源克隆方法进行了中国对虾和河蟹眼柄MIH编码基因的序列分析,郭豫杰等^[13]开展了河蟹MIH1融合蛋白表达的研究,未见眼柄神经多肽激素分离纯化和构造解析方面的研究报道。中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)俗称河蟹,是我国重要的经济甲壳动物之一,在其眼柄神经内分泌系统的细胞学、组织学、生理学研究的基础上,进行眼柄SG神经多肽激素的分离、纯化,获得了CHH纯品,并初步对其进行了生理活性鉴定,为进一步开展神经多肽激素的分子构造解析及合成与分泌调控机制研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 动物解剖和样品处理

实验动物为取自天津市水产研究所淡水试验场养殖1龄中华绒螯蟹。挑取健康蟹2000只,解剖眼柄,于视神经节端髓与内髓交界处背侧取出窦腺^[14]。每100只窦腺放在200 LL 0.9% NaCl中,-70℃储存,备用。参照Nagasawa等^[15]的方法处理窦腺:将窦腺溶在含0.9% NaCl的30%乙腈中,在冰浴状态下,用Mixer Pellet Pestle(Kontes NJ, USA)研磨3 min,4000 r/min离心5 min,上清用0.22 μm的一次性针头过滤器过滤,不溶物重复上述操作,将两次所得上清合在一起,即为SG粗提物,冷冻干燥,-70℃储存。

1.2 CHH的分离纯化

将冷冻干燥后的SG粗提物(100个SG)重新溶在100 LL超纯水中,参照Yang等^[16]的RP2 HPLC分离方法,用Asahi Pak ODP250(4.6 @ 150mm, Asahi Chemical Industry, Tokyo)柱子,流动相分别为经过滤脱气的0.05%三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)和含0.05% TFA的60%乙腈,采用线性梯度,60 min内乙腈浓度为0~60%,流速为1 mL/min,柱温保持40℃,225 nm检测吸收峰,手动接收峰物质,按出峰时间的先后顺序标记,冷冻干燥,-70℃保存。

1.3 SDS-PAGE测定分子量

把冷冻干燥后的峰H用超纯水重新溶解,加入等体积的上样缓冲液,沸水中煮3~5 min。采用SDS-PAGE(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)进行分子量的分析,浓缩胶和分离胶的浓度分别为5%、15%,胶的配方参阅5分子克隆第3版。所用的蛋白Marker(BM201, BBI)分子量范围是4.1~66 kD。100 V电泳40 min,175 V电泳3 h 30 min,采用考马斯亮兰R250染色法染色。

1.4 生物活性分析

分别用无菌的 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (NaCl 8 g, KCl 0.204 g, Na_2HPO_4 1.441 g, KH_2PO_4 0.244 g, 1000 mL, pH 7.3) 溶解 HPLC 分离到的峰 H 及 SG 粗提物, 用于活性鉴定, 浓度分别为 5 SG 峰 H/35 LL PBS 和 0.5 SG 粗提物/35 LL PBS。选取饥饿 2 d 的 1 龄河蟹, 把它们分成 3 组, 每组在注射前, 分别抽取 40 LL 血淋巴, 而后分别注射 35 LL PBS ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、峰 H (5 SG 峰 H/35 LL PBS) 和 SG 粗提物 (0.5 SG 粗提物/35 LL PBS), 在注射后 30 min, 1 h, 2 h, 4 h 分别抽取 40 LL 血淋巴。抽取的血淋巴均用血糖检测试剂盒处理, 摇匀, 用全自动血糖分析仪 (BiosEN 5030 German) 检测血糖水平^[17, 18]。

1.5 数据采集与处理

进行高血糖活性分析时, 分别在注射前及注射后 30 min, 1 h, 2 h, 4 h 抽取 40 LL 血淋巴, 在与血糖检测试剂充分反应后, 用全自动血糖分析仪

检测, 获得即时数据。在估算单个 SG 粗提物蛋白含量时, 用分光光度计测量了 400 个 SG 中粗提物蛋白含量 (分 4 组); 在估算分离到的各激素在每个 SG 中的含量时, 用分光光度计测量了 200 个 SG 中各激素的含量 (分 4 组)。实验中所获得结果以平均值 ± 标准误差表示, 用单因素方差分析 (one2way ANOVA) 对组间均值进行比较。

2 结果

2.1 甲壳动物高血糖激素的分离纯化

选择健康的河蟹, 在洁净条件下解剖眼柄, 完整地取出窦腺, 置于 1.5 mL Eppendorf 管中, 经研磨、离心、过滤等预处理过程制备出 4000 个 SG 的粗提物。图 1 是采用 RP2HPLC 分离河蟹 50 个 SG 的谱图, 按出峰时间的先后顺序标记吸收峰。其中 H 的峰高最高, 峰面积最大, 出峰时间在 39~40 min, 溶出时乙腈浓度为 39%~40%。

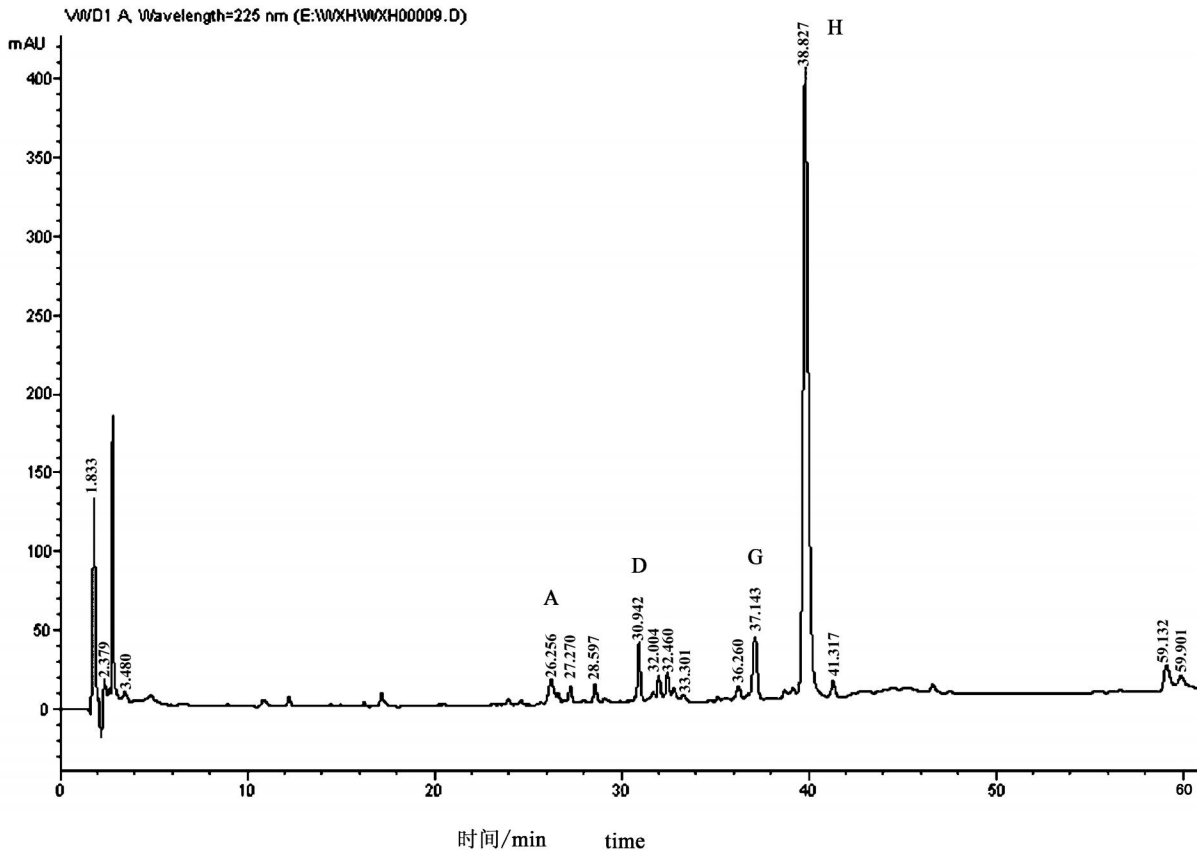


图 1 河蟹窦腺的 RP2HPLC 分离谱图

Fig. 1 Reverse2phase HPLC purification of extracts from 50 SG of *E. sinensis*

H: CHH; A, D, G: 其它 SG 神经多肽激素纯品, 有待进行功能鉴定

H: CHH; A, D, G: some other neuropeptides purified from SG, their biological activities will be identified

说明该物质在眼柄 SG 中的含量最大, 由于甲壳动物眼柄窦腺中含量最丰富的激素就是 CHH, 可初步断定 H 就是 CHH。用分光光度计测量 SG 粗提物蛋白及分离得到激素的含量时, 用经验公式: 蛋白质浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) = $1.45 @A_{280} - 0.74 @A_{260}$ 估算每个 SG 粗提物蛋白的含量以及每个 SG 中含有的分离到的各激素的质量, 经计算每个 SG 粗提物蛋白含量为(1252.63 ± 298.40) ng($n=4$), 其中激素的总量为(290.38 ± 60.92) ng($n=4$), 每个 SG 中 H 含量为(153.63 ± 32.23) ng($n=4$), 占 SG 粗提物蛋白总量的(12.26 ± 2.57)%, 占 SG 激素总量的(52.90 ± 11.09)%。同时采用 SDS-PAGE 方法测定 H 的分子量大小, 用 GDS 软件依据蛋白质分子量的对数值和其相对迁移率的线性关系测量未知蛋白的分子量, 与蛋白 Marker 相比, H 的分子量为 5.1 kD, 显著低于已知的其他 CHH 家族激素的分子量。同时分离到的几种其他神经多肽激素的理化性质及生理活性将在后续的文章中报道。

2.2 生理活性鉴定

选取饥饿 2 d 的河蟹, 分为 3 组, 在注射前分别抽取 40 μL 的血淋巴, 检测正常血糖水平为(14.52 ± 5.99) $\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ ($n=12$)。注射 35 μL PBS 后血糖水平变化不大, 以此作为对照组, 注射等体积的 H (相当于 5SG 中的含量) 后, 血糖水平会立刻升高, 在 30 min 达到最高水平, 为(56.14 ± 10.58) $\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ ($n=4$); 到 1 h 时血糖水平开始下降, 在 2 h、4 h 时回到正常水平 (图 2)。

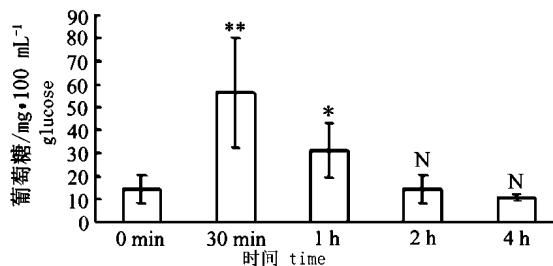


图2 葡萄糖氧化法测量河蟹注射 H 前及注射后不同时间点的血糖水平

Fig. 2 The hyperglycemic effects of H injection in *Eriocheir sinensis* analyzed by glucose oxidase method

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, N. 无显著差异

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, N. not significant

注射 0.5 SG 粗提物后, 血糖水平也立刻升高, 在 1 h 时达到最高值, 为(51.17 ± 5.53) $\text{mg}\cdot$

100mL^{-1} ($n=4$), 之后随着时间的推移, 血糖水平下降, 在 2 h 时基本回到正常水平 (图 3)。注射 PBS 后 4 h 内检测, 血糖水平基本不发生变化; 而注射 SG 和 H 后, 血糖水平迅速明显升高, 说明 SG 中有高血糖活性激素, H 就是采用 RP2HPLC 分离得到的 SG 中有高血糖活性的激素, 即高血糖激素 (CHH)。同时分离得到的其他两种神经多肽 (相当于 5 SG 中的含量) 也有一定程度的升血糖作用, 只是效果明显不如 H 显著; 而有的神经多肽根本不具有升血糖作用。

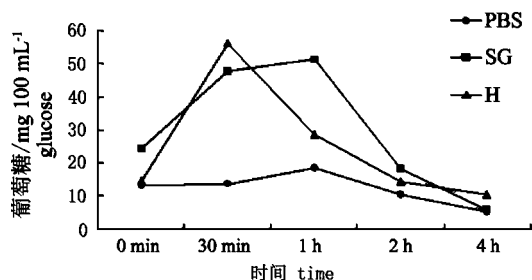


图3 河蟹分别注射 PBS、SG、H 后血糖水平随时间的变化曲线

Fig. 3 Time course profile of hyperglycemic effect following injections of PBS, SG and H in *E. sinensis*

3 讨论

甲壳动物眼柄神经多肽激素的合成和储存量极低, 要获得具有生物活性的激素纯品难度较大, 我国还未开展该方面的研究工作。我们以河蟹为实验材料, 采用反相高效液相色谱技术, 成功建立了眼柄窦腺神经多肽激素的分离、纯化体系。实验结果表明, 河蟹眼柄窦腺中神经多肽激素的含量较高, 采用 RP2HPLC 分离河蟹 50 个 SG 的谱图显示: H 在 225 nm 的 OD 值可以达到 400 mAU (图 1)。每个 SG 含 H 达(153.63 ± 32.23) ng, 从已知甲壳动物 SG 分离得到的含量最高的 CHH2 \hat{N} 仅为 $100\text{ ng}\cdot\text{SG}^{-1}$ (南非岩龙虾 *Jasus lalandii*)^[17]。河蟹眼柄窦腺高度特化, 呈扁球状, 在镜下能够被完整地解剖; 而目前采用的实验甲壳动物眼柄窦腺多呈弥散状, 取材困难, 附带了大量的肌肉组织和神经组织, 给研究工作造成困难。这提示河蟹眼柄窦腺是分离眼柄神经激素的最佳材料。

本文成功建立了中华绒螯蟹窦腺神经激素的 RP2HPLC 分离方法。采用的处理 SG 的方法能有效地去除膜蛋白, 用 Asahi Pak ODP250($4.6 @150$

mm, Asahi Chemical Industry, Tokyo) 分离柱, 在设定程序下, 能将 SG 神经多肽激素分离, 达到很高的纯度。采用该法, 分离到 SG 中含量最大的激素 H, 出峰时间在 39~40 min, 溶出时乙腈浓度为 39%~40%。甲壳动物眼柄窦腺含量最丰富的激素是 CHH, 因此 H 可以初步被确定为 CHH。预试验表明, 注射一定量的 CHH 会使甲壳动物的血糖水平升高, 并且在一定范围内, 血糖水平会随着 CHH 注射量的增大而升高, 而当 CHH 的注射量达到相当于 5 SG 中的含量时, 血糖水平升高到最高水平。河蟹在注射相当于 5 SG 含有的 H 后 30 min, 血糖水平达最高值, 为 $(56.14 \pm 10.58) \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ($n=4$) (图 2 和图 3), 比正常水平增加了 (2.87 ± 0.73) 倍, 可见 H 有显著的高血糖活性, 因此可以肯定 H 就是中华绒螯蟹窦腺高血糖激素。

本文采用 SDS-PAGE 测定 H 的分子量大小为 5.1 kD (图 4), 显著低于目前已知的甲壳动物眼柄 CHH 家族激素的分子量 (7~9 kD)。但生理活性鉴定结果表明, 神经激素 H 是中华绒螯蟹窦腺中含量最丰富, 升血糖活性最强的激素, 属于 CHH 家族神经多肽激素。它与目前已知的甲壳动物眼柄 CHH 家族激素在结构上的差异有待进一步研究。

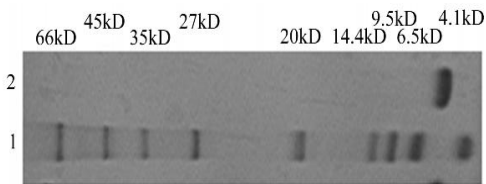


图 4 SDS-PAGE 测定 CHH 分子量的电泳谱图

Fig. 4 SDS-PAGE measuring the molecular weight of CHH purified from sinus glands of *E. sinensis*

1. BM201 蛋白质分子量标准, 2. 高血糖激素

1. BM201 protein marker, 2. CHH

浙江大学海洋学院银国利同学参与部分神经多肽的分离纯化工作, 天津师范大学化学与生命科学学院王宝峰教授对神经多肽激素的纯化工作提供了很大帮助, 在此一并致谢。

参考文献:

- [1] Cooke I M, Sullivan R E. Hormones and neurosecretion [A]. In: Bliss D E, Atwood H L, Sandeman D C, ed. The biology of crustacean neurobiology: structure and function [M]. New York: Academic Press, 1982, 3: 205- 290.
- [2] Keller R. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects [J]. *Experientia*, 1992, 48: 439- 448.
- [3] 蔡生力. 甲壳动物内分泌学研究展望 [J]. *水产学报*, 1998, 22(2): 154- 161.
- [4] Lacombe C, Greve P, Martin G. Overview on the subgrouping of the crustacean hyperglycemic hormone family [J]. *Neuropeptides*, 1999, 33: 71- 80.
- [5] Ollivaux C, Soyez D. Dynamics of biosynthesis and release of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the X2organ2sinus gland complex of the crayfish *Orconectes limosus* [J]. *The Journal of Biochemistry*, 2000, 267: 5106- 5114.
- [6] 上官步敏, 李少菁. 锯缘青蟹 X 器官神经分泌细胞的细胞学研究 [J]. *海洋学报*, 1994, 16(6): 116- 121.
- [7] 上官步敏, 李少菁. 锯缘青蟹窦腺显微和超微结构研究 [J]. *动物学报*, 1995, 41(4): 341- 346.
- [8] 姚泊. 罗氏沼虾一种有髓鞘神经纤维的电镜观察 [J]. *动物学杂志*, 1995, 30(3): 7- 9.
- [9] 康现江, 李阳. 中国对虾眼柄的神经分泌结构 [J]. *河北大学学报*, 1998, 18(1): 45- 48.
- [10] 邱高峰, 张爱萍, 楼允东. 锯缘青蟹蜕皮抑制激素 cDNA 的分子克隆及其表达分析 [J]. *水产学报*, 2003, 27(3): 207- 212.
- [11] 王在照, 焦传珍, 张晓军, 等. 中国对虾蜕皮抑制激素全长 cDNA 的克隆及序列分析 [J]. *遗传学报*, 2003, 30(2): 128- 134.
- [12] 宋霞, 周开亚, 马长艳. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 (MIH1) 基因的 cDNA 片段克隆和 Northern 印迹分析 [J]. *中国水产科学*, 2003, 10(5): 353- 358.
- [13] 郭豫杰, 周开亚, 马长艳. 中华绒螯蟹蜕皮抑制激素 1 (Ers - MIH1) - GST 融合蛋白在大肠杆菌中的表达 [J]. *中国水产科学*, 2004, 11(1): 9- 13.
- [14] 孙金生, 刘安西, 杜育哲, 等. 中华绒螯蟹窦腺的显微和超显微结构 [J]. *动物学报*, 2001, 47(1): 27- 31.
- [15] Nagasawa H, Yang W J, Shimizu H, et al. Isolation and amino acid sequence of a mol2inhibiting hormone from the America crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1996, 60(3): 554- 556.
- [16] Yang W J, Aida K, Nagasawa H. Amino acid sequences of a hyperglycaemic hormone and its related peptides from the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 1995, 135: 205- 212.
- [17] Marco H G, Brandt W, Gade G. Elucidation of the amino acid sequence of a crustacean hyperglycaemic hormone from the spiny lobster, *Jasus lalandii* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 248: 578- 583.
- [18] Pierrot C, Soyez D, Van Herp F, et al. Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab, *Pachygrapsus marmoratus* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2000, 119: 340- 350.