

甲壳类的眼柄神经激素

宋 霞 周开亚

(南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所 南京 210097)

关键词 神经肽 ;cDNA 克隆 ;眼柄 ;甲壳类

中图分类号 :Q429 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2000)04-39-05

Development of Neurohormones in the Eyestalk of Crustacea

SONG Xia ZHOU Kai-Ya

(Institute of Genetic Resources, Nanjing Normal University Nanjing 210097, China)

Key words: Neuropeptides ; cDNA cloning ; Eyestalk ; Crustacea

位于甲壳纲动物眼柄中的 X 器窦腺(X-organ sinus gland, XO-SG)复合体是甲壳类重要的神经内分泌调节系统之一,它代表了甲壳类神经内分泌产物的重要来源,在结构和功能上类似脊椎动物的下丘脑-神经垂体系统^[1,2]。用生化技术已确定 XO-SG 系统释放的产物为肽类神经激素,总称为甲壳类眼柄神经激素(或神经肽),按功能分为五大类:红色素浓缩激素(red pigment-concentrating hormone, RPCH)、色素弥散激素(pigment dispersing hormone, PDH)、甲壳类高血糖激素(crustacean hyperglycemic hormone, CHH)、蜕皮抑制激素(molt-inhibiting hormone, MIH)和性腺抑制激素(gonad-inhibiting hormone, GIH)。这些激素产生于眼柄的端髓 X 器(medulla terminalis X-organ, MT-XO)或无眼柄甲壳类前脑相应的位置,释放到窦腺,进入血淋巴系统,参与调节甲壳类许多重要的生理过程,如蜕皮、生

殖、色素移动、渗透压调节和糖代谢。

1 甲壳类眼柄神经激素及 cDNAs 克隆

近十年来,研究的热点已集中于 CHH、MIH 和 GIH^[1,2]。这 3 种激素同属于一个神经肽家族,至今仅在甲壳类中发现。CHH 的分子量约 6 000~7 000 道尔顿,主要参与血糖调节,属中期调节过程。不同种类的 CHH 具不同氨基酸组成,其功能具有物种特异性。研究已表明在一个种内可存在几种 CHH 前体,如克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、墨西哥螯虾(*Procam-*

第一作者介绍 宋霞,女,26 岁,博士研究生,研究方向:动物分子遗传学;

收稿日期:1999-12-24,修回日期:2000-04-03

barus bouvieri)、泥污鲸螯虾(*Orconectes limosus*)、美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergi*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)和日本对虾(*Penaeus japonicus*)等。在美洲螯龙虾中发现了一个神经肽同时具有蜕皮抑制和高血糖活性,并报道了其一级结构。Webster发现三叶真蟹(*Carcinus maenas*)的Y器(Y-organ)上同时出现了和MIH的膜结合受体,CHH在高剂量下能抑制三叶真蟹体外Y-器蜕皮素的分泌^[1]。说明CHH激素是多功能的。

甲壳类的生长需经过外骨骼的周期性蜕皮。这个过程受两种互为拮抗的激素调控:蜕皮素的刺激作用和MIH的抑制作用。MIH分子量在1 000~5 000道尔顿之间,通过抑制Y器蜕皮素的合成来调节蜕皮。尽管MIH详细的作用机制仍不清楚,但在螃蟹和虾中已显示MIH可能经环核苷酸途径抑制蜕皮素的产生。甲壳类动物的生殖受卵巢的GIH及脑和胸神经节的性腺刺激激素(gonad-stimulating hormone, GSH)这两种肽的调节。GIH为热稳定性产物,分子量约2 000~5 000道尔顿。在甲壳类雌性动物中GIH具有抑制卵黄发生的活性,因此也称GIH为卵黄发生抑制激素(vitellogenesis-inhibiting hormone, VIH)。在雌性,VIH和GSH直接作用于卵巢,卵巢再分泌卵巢激素。而雄性的GIH和GSH作用于雄腺。雄腺激素不仅控制雄性生殖系统的发育和维持,而且控制雌性第二性征。有报道蜕皮素可能有刺激卵黄合成的作用,至少是在端足目和等足目,然而蜕皮素在生殖中的作用还不清楚。MIH和GIH对生长和生殖的作用均属长期调控。

神经肽氨基酸序列的测定方法目前主要有二种:一种是利用Edman降解法直接测定神经肽分子中的肽段序列,通过用二套或二套以上酶解或化学裂解方法得到的肽段序列,拼接出蛋白质分子的全序列,如:墨西哥螯虾、食用黄道蟹(*Cancer pagurus*)的MIH肽^[3, 4]。另一种是根据多肽分子的cDNA序列测定,推断出蛋白质分子的序列,这已成为神经肽测定中的重要方法,因为神经肽的表达量较少,要获得多肽较为困难。

通过cDNA克隆来获得多肽序列有两种方法,第一种是筛选端髓X器cDNA文库。如:已知的部分氨基酸序列→简并寡核苷酸探针→与端髓X器cDNA文库杂交→阳性克隆测序。探针通常根据所研究的神经肽已知的部分氨基酸序列来设计,用这种方法已成功地检测到一个克隆,含有编码三叶真蟹preproCHH完整序列的cDNA片段。神经肽的氨基酸序列未知时,

则可根据其它近缘种的相同神经肽的氨基酸序列来设计,与所研究的端髓X器cDNA文库进行杂交。对阳性克隆测序,依据测得的序列设计特异性引物进行菌落PCR,分离cDNA。如根据大西洋招蟹(*Uca pugilator*)PDH部分氨基酸序列设计的简并寡核苷酸作为第一次PCR反应的引物,分离cDNAs,推导出泥污鲸螯虾、三叶真蟹和可口美青蟹(*Callinectes sapidus*)的preproPDH氨基酸序列。鉴定较大的神经激素CHH/MIH/GIH家族,往往采用另一种PCR策略。如首先合成的2个简并寡核苷酸,一个根据所研究的或近缘的已鉴定多肽N末端氨基酸序列,另一个根据该肽近C末端的氨基酸序列进行设计,以cDNA文库为模板,PCR反应产生编码多肽的cDNAs。通过这些或其它PCR策略获得的探针来筛选文库,取得了编码美洲螯龙虾preproGIH序列,可口美青蟹和美洲黄道蟹(*Cancer magister*)的MIH序列,泥污鲸螯虾以及美洲螯龙虾的CHHs序列的cDNAs^[1, 5, 6]。

第二种方法则无需构建cDNA文库或基因库,而是基于反转录PCR来获得目的基因的cDNA序列。根据食用黄道蟹和可口美青蟹MIH cDNA序列设计的5'引物靠近N末端,3'引物靠近C末端,通过RT-PCR获得了斑纹螯(*Charybdis feriatus*)的MIH cDNA序列^[7]。快速cDNA末端扩增法(rapid amplification of cDNA ends, RACE)则是分别对mRNA 3'端和5'端进行克隆测序,从而获得全长的cDNA序列。此法需预先知道基因的一段序列来设计基因特异性引物,用这种方法鉴定了编码凡纳对虾(*Penaeus vannamei*)似MIH神经肽的cDNA序列^[8]。

近年来,神经肽的研究已深入到基因水平,获得cDNA全序列和基因序列是首要的一步。基于PCR的方法克隆了编码斑纹螯MIH^[7]和刀额新对虾CHH的基因序列^[9],发现在基因组MIH为单拷贝基因编码^[7],而CHH由多拷贝基因编码^[10]。对照cDNA序列,可分析基因的结构、内元和外元的组成,为进一步了解基因在转录和翻译的调控提供依据,也为研究多肽家族的进化奠定基础。

2 眼柄前激素原一级结构的特性

2.1 促色素细胞激素(RPCH和PDH)

RPCH的结构与昆虫的脂肪酶动用激素(adipokinetic hormones, AKHs)非常类似,因此归属于所谓的AKH/RPCH肽族。与昆虫形式多样的AKH分子相比,甲壳类的RPCH似乎高度保守。在所研究的每个种中好象只存在1种RPCH形式,RPCH前体由一个

25 氨基酸的信号肽、一个 8 氨基酸的 RPCH 肽以及一个 74 氨基酸的 RPCH 前体相关肽(RPCH-precursor-related peptide, RPRP)组成。RPRP 是经过 RPCH 肽的一个二碱基切割位点分离而得。与 AKH 前激素原的结构比较,RPCH 前体在 RPCH 和 AKH 这两个神经肽相应区域具有较高的一致性,而两者的前体相关肽间一致性却低。所有前激素原的结构组织(信号肽/激素/前体相关肽)是相似的。RPRP 不保守说明它在生理上不重要。

迄今,在三叶真蟹、大西洋招蟹、美洲黄道蟹和泥污鲸蟹中各鉴定了一个 preproPDH,在可口美青蟹和凡纳对虾中发现了 2 个 preproPDH。已知的 preproPDH 结构均由一个信号肽、一个 PDH 前体相关肽(PDH precursor-related peptides, PPRP)和在 C 末端的 PDH 肽组成。比较它们的一级结构,一致性高达 51%~53%。三叶真蟹、大西洋招蟹、美洲黄道蟹、泥污鲸蟹和可口美青蟹的 PDH 肽(PDH I)仅一个氨基酸不同(D 为 E),一致性达 94%,而可口美青蟹的 PDH II 含 6 个不同氨基酸,相应的一致性为 64%。PPRPs 和信号肽一致性分别为 41% 和 42%。从几个甲壳类和两个昆虫种的 PDH 结构来看,存在一个真正的肽家族。根据所有前激素原的结构,可以得出结论:preproPDH 在甲壳类保守性高,而与其它已知肽无相似性。PPRPs 结构的一致性说明它们的保守区域在功能上的重要性,然而,必须有其它更多的甲壳类 preproPDH cDNA 数据来确认这一判断,这些数据对估计甲壳类 PDH 在 RNA 或基因水平上是否存在多种形式是必须的^[1]。

2.2 CHH/MIH/GIH 家族

CHH/MIH/GIH 家族所有激素的氨基酸残基有 71~78 个^[1,2]。比较前激素原的结构,发现都有信号肽,但只有 CHH 前激素原存在 CHH 前体相关肽(CHH-precursor-related peptide, CPRP),位于信号肽与激素之间。研究已表明在一个种内可存在几种编码 CHH 前体的 mRNA,CHH 呈多态,迄今在克氏原螯虾、墨西哥螯虾、泥污鲸蟹、美洲螯龙虾、罗氏沼虾和刀额新对虾中至少有 2 种 CHH 前体,日本对虾多至 5 种 CHH 前体。对所有前激素原进行配位比较,GIH 和 MIH 氨基酸序列一致性,与比较不同 CHHs 时的一致性类似。而 CHHs 与 MIH 和 GIH 之间的一致性程度很低(19%),聚类结果也表明它们属于 CHH/MIH/GIH 家族两个不同的亚类。在 MIH 和 GIH 前体中缺少似 CPRP 肽,因此在早期进化过程中可能是由于祖先 CHH/MIH/GIH 基因的一个缺失而分为两亚类。

3 眼柄神经激素的表达

mRNA 含量的测定是研究基因调控和基因表达的主要方法。目前,mRNA 含量的检测常用原位杂交、Southern、Northern、Northern 印迹、RNase 保护分析和反转录定量 PCR。这些方法均见于神经肽的研究中。

3.1 原位杂交定位编码甲壳类眼柄神经激素的 mRNA

采用甲壳类神经激素抗血清进行的免疫细胞化学研究已证明,RPCH、PDH、CHH 和 GIH 都是在眼柄相同区域 XO-SG 复合体里合成的。已发现美洲螯龙虾的 CHH 和 GIH 细胞共定位(cellular colocalization)于 X 器。Webster^[11]用抗十足目眼柄神经肽血清对膝壶的肽能神经元进行免疫组织化学研究,没有发现 CHH、MIH、RPCH 免疫活性的神经元,而观察到了 PDH 和 CCAP(crustacean cardioactive peptide)免疫反应的神元。这说明,低等甲壳类的神经内分泌调节可能与高等甲壳类是有所不同的。用非放射性标记的 cDNA 探针研究了激素的表达,如三叶真蟹的 RPCH、泥污鲸蟹的 PDH 和 CHH、美洲螯龙虾的 GIH 和 CHH 以及三叶真蟹的 MIH。这些研究肯定了免疫细胞化学定位的结果。此外,全量原位杂交(whole mount *in-situ* hybridization)提供了幼体时期基因表达的研究方法,运用此法研究了 MIH mRNA 在斑纹蝎幼体脑中有杂交信号,孵出前的胚胎杂交的信号弱,幼体的眼柄没有杂交信号^[7]。在刀额新对虾中眼柄直到糠虾(幼体)期才发育,全量原位杂交结果表明,MIH mRNA 只存在于幼体相应于脑的区域,糠虾幼体的眼柄没有检测到杂交信号,因此,对虾眼柄要到幼体发育后期才表达 MIH^[9]。

3.2 Northern 印迹分析编码甲壳类眼柄神经激素 mRNA 的组织分布

尽管 Northern 印迹法不如 RNase 保护分析法灵敏,但它显示了肽表达量最高的位点。这种技术成功地运用于三叶真蟹,鉴定了编码 preproPDH 的 mRNA 存在于眼柄和脑中。这些发现与较早的免疫化学研究部分一致,证明 PDH 肽能物质不仅在三叶真蟹的眼柄,而且存在于中枢神经系统。该方法还应用于确定泥污鲸蟹的 preproCHH mRNA 以及美洲螯龙虾的 preproGIH mRNA 的组织特异性表达,结果显示仅在眼柄的端髓表达。preproCHH mRNAs 在美洲螯龙虾不同组织的 Northern 印迹分析揭示了编码 CHH 的 mRNA 在腹神经节也表达。此外,在美洲螯龙虾的一些 CHH 同源体中也发现性腺刺激因子和蜕皮抑制效应。

CHHs在腹神经系统的表达也更加肯定CHH神经肽在调节性腺生长过程中具有作用。

3.3 RNase 保护分析编码甲壳类眼柄神经激素 mRNA 的量

迄今,RNase 保护已被用于检查泥污鳃螯虾眼柄中 preproCHH 基因的表达是否在 mRNA 水平调节,根据泥污鳃螯虾个体窦腺 CHH 同源体 I 和 II 水平,检测编码端髓里相同 CHH 肽的 CHH-A 和 CHH-A mRNA 水平。结果表明 mRNAs 和肽水平依个体而异,而相对 CHH-A 和 CHH-A mRNAs 的比率而言,CHH-I 和 CHH-II 肽之间的比率保持恒定。因此,De Kleijn 等推测在翻译或翻译后水平存在一个调节机制。研究表明应用 RNase 保护分析法在比较不同表达时是一种灵敏而特殊的手段^[1]。

3.4 定量 RT-PCR 鉴定甲壳类眼柄神经激素基因的瞬时表达和特异表达

Southern,Northern 杂交法分析真核生物特异核苷酸序列下限为 10^{15} 靶分子,不易检测到低丰度的 mRNA。原位杂交技术的下限虽能达到 $10 \sim 100$ 靶分子,但其技术要求高,不易大批量处理样品。定量 RT-PCR 不仅能检测到低拷贝 mRNA 分子,同时因其简便使用,已普遍用于分析 mRNA 的瞬时表达和特异表达。运用 RT-PCR 方法研究斑纹螯的 MIH,在眼柄表达量最丰,脑有低水平的表达,而肌肉、精巢、未成熟卵巢均没有表达。在蜕皮周期中,蜕皮间期、蜕皮前后期,受精卵、孵出前的胚胎、孵出的幼体、2~3 天幼体,均检测到 MIH mRNA^[7]。在刀额新对虾中,MIH 最早则在无节幼体期检测出,并且在蜕皮周期连续表达^[12]。这说明 MIH 基因在螃蟹和对虾中的表达不同。

4 结 语

甲壳类眼柄神经肽具有早已知道的很多生理功能,色素的控制、抑制蜕皮的调控、性的分化和与不同的栖息地(海水、淡水、陆地)相关的渗透压调节等。神经肽,如甲壳类高糖激素、蜕皮抑制激素和性腺抑制激素至今仅在甲壳类发现,但进一步的研究可能会在其它无脊椎动物群体中也发现这些神经肽。色素弥散激素最早是在甲壳类发现的,但最近也在昆虫中发现。已有报道,脊椎动物下丘脑神经激素对螃蟹蜕皮有不同程度的抑制作用。因此,对甲壳类神经激素的研究结果不仅可用来解释这个特殊群体的生理调节,也可用于了解神经肽和肽家族在其它动物中分布的普遍规律。需要指出的是神经肽具有作为激素,递质和调节

剂丰富的多重功能。甲壳类眼柄 XO-SG 复合体的功能被认为相当于脊椎动物的神经垂体,甲壳类已成为研究神经肽调节很好的模式动物。

大量的工作仍需要开展,还有更多的神经肽等待完全鉴定;在微量分析化学和分子生物学研究中,结合免疫化学的原理,可在 mRNA 水平和肽水平研究动物个体不同生理条件下甲壳类眼柄激素的作用;进一步用分子生物学技术在原核生物系统中产生重组甲壳类眼柄激素,可提供大量纯的神经激素;运用重组技术不仅为研究新激素的作用模式和靶位点提供手段,还可进一步研究结构/功能的关系。最后,甲壳类眼柄激素的结构和功能的知识将对人工水环境的养殖提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] De Kleijn, D. P. V., F. V. Herp. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1995, **112B** (4): 573~579.
- [2] Fingerman, M. Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective and introspective analysis. *Physiological Zoology*, 1997, **70** (3): 257~269.
- [3] Aguilar, M. B., R. Falchetti, J. Shababowitz, et al. Complete primary structure of the molt-inhibiting hormone (MIH) of the mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Peptides*, 1996, **17** (3): 367~374.
- [4] Chung, J. S., M. C. Wilkinson, S. G. Webster. Determination of the amino acid sequence of the molt-inhibiting hormone from the edible crab, *Cancer pagurus*. *Neuropeptides*, 1996, **30** (1): 95~101.
- [5] Lee, K. J., T. S. Elton, A. K. Bej et al. Molecular cloning of a cDNA encoding putative molt-inhibiting hormone from the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, **209** (3): 1 126~1 131.
- [6] Umphrey, H. R., K. J. Lee, R. D. Watson et al. Molecular cloning of a cDNA encoding molt-inhibiting hormone of the crab, *Cancer magister*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1998, **136**: 145~149.
- [7] Chan, S. M., X. G. Chen, P. L. Gu. PCR cloning and expression of the molt-inhibiting hormone gene for the crab (*Charybdis feriatus*). *Gene*, 1998, **224**: 23~33.
- [8] Sun, P. S. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Mol. Mar. Bio. Biotechnol.*, 1994, **3** (1): 1~6.
- [9] Gu, P. L., S. M. Chan. Cloning of a cDNA encoding a

putative molt-inhibiting hormone from the eyestalk of the sand shrimp *Metapenaeus ensis*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1998, **7**(3):214~220.

- [10] Gu, P. L., S. M. Chan. The shrimp hyperglycemic hormone-like neuropeptide is encoded by multiple copies of genes arranged in a cluster. *FEBS Letters*, 1998, **441**: 397~403.
- [11] Webster, S. G. Peptidergic neurons in barnacles: an im-

munohistochemical study using antisera raised against crustacean neuropeptides. *Biol. Bull.*, 1998, **195**: 282~289.

- [12] Lee, K. J., R. D. Watson, R. D. Roer. Molt-inhibiting hormone mRNA levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, **249**: 624~627.