

血蓝蛋白功能研究新进展

Advancement on the function of hemocyanin

章跃陵^{1,2}, 罗 芸², 彭宣宪²

(1. 汕头大学 理学院生物学系, 广东 汕头 515063; 2. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

中图分类号: Q71 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007)02-0077-04

血蓝蛋白是位于节肢动物和软体动物血淋巴中的含铜呼吸蛋白, 脱氧状态为无色, 结合氧状态为蓝色。业已证明, 节肢动物和软体动物的血蓝蛋白在分布、氨基酸序列和空间结构上均存在较大差异^[1]。节肢动物门血蓝蛋白主要存在于螯肢类、甲壳类、多足类和蜘蛛类中^[2], 一般由 3~8 个不同的单体组成。每个单体(由一条多肽链构成)含有 600~660 个氨基酸残基, 分子质量约为 75 ku, 6 个单体(由基因重复产生)在四级结构上联合组成 3-3 六聚体(相对分子质量约为 4.5×10^5)或以六聚体为单位再组成复合六聚体(即整数倍的六聚体)。软体动物血蓝蛋白的分布不如节肢动物的那样广泛, 仅限于腹足类和头足类, 其分子质量约为 50 ku, 由 7 或 8 个功能单位组成圆柱形结构^[3,4]。一般认为, 血蓝蛋白的主要生物学功能与机体内的输氧有关, 它与血红蛋白(hemoglobins)和蚯蚓血红蛋白(hemerythreins)并称为动物界中的 3 种呼吸蛋白^[5]。但近年来研究表明, 血蓝蛋白是一种多功能蛋白, 它不仅具有输氧功能, 而且还与能量的贮存, 渗透压的维持以及蜕皮过程的调节有关^[6,7]。特别引起学术界重视的是, 血蓝蛋白还具有酚氧化物酶活性和抗菌功能^[8], 被认为是节肢动物和软体动物中的一种重要的免疫分子。

1 血蓝蛋白的免疫学功能

1.1 血蓝蛋白的酚氧化物酶活性

1.1.1 血蓝蛋白理化性质和基因序列与酚氧化物酶具有相似性

研究证实, 血蓝蛋白与酚氧化物酶在物理化学性质等方面非常相似^[7]: 1) 它们都含有 2 个铜离子结合区域 CuA 和 CuB, 并与 6 个组氨酸连接形成活性中心; 2) 氧结合位置均在 Cu 和 $\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2$ 位。近年来, 人们发现酚氧化物酶与血蓝蛋白在蛋白质结构上同样具有明显的相似性。Aspan 等^[9]发现淡水小龙虾(*Pacifastacus leniusculus*)酚氧化物酶前体的推导氨基酸序列与蜃(*Limulus polyphemus*)血蓝蛋白 II 铜离子结合区 CuA 和 CuB 的同源性分别为 79.5% 和

60.3%。Fujimoto 等^[10]报道黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)酚氧化物酶前体的推导氨基酸序列与狼蛛(*Eurypelma californicum*)、蜃(*Limulus polyphemus*)、大螯虾(*Panulirus interruptus*)血蓝蛋白的铜离子结合区 CuA 和 CuB 同源性分别为 45%~76% 和 30%~60%。由此, Burmester 和 Immesberger^[11,12]等对血蓝蛋白的进化地位进行了分析, 结果提示, 血蓝蛋白可能是在大约 55 亿年前由酚氧化物酶进化而来。总之, 从目前所掌握的资料分析, 血蓝蛋白是一种在结构上与酚氧化物酶极其相似的蛋白, 其两者的比较研究正引起学术界的高度关注。

1.1.2 血蓝蛋白具有酚氧化物酶的酶活性

最近, 人们发现血蓝蛋白在一定的条件下也可表现出酚氧化物酶活性。Decker 等^[13]报道狼蛛的血蓝蛋白可被胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶水解转变成单酚氧化物酶和 O -双酚氧化物酶而表现出酚氧化物酶活性, 其水解部位为血蓝蛋白的 N 末端, 提示其作用机制可能是通过切除血蓝蛋白的 N 端从而为底物的结合提供更好的结合位点。

不仅如此, 现已证明血蓝蛋白不经酶切也可表现出酚氧化物酶活性。Salvato 等^[14]发现软体动物的血蓝蛋白在 pH6 时可以被诱导表现出 O -双酚氧化物酶的活性。Decker 等^[15]和 Pless 等^[16]报道蜃和狼蛛的血蓝蛋白在十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS)的诱导下可表现出 O -双酚氧化物酶活性。Jaenicke 等^[17]证实甲壳动物血蓝蛋白在 SDS 诱导下还具有儿茶酚酶活性。Nagai^[18]等发现中国蜃(*Tachypelus tridentatus*)的凝血酶能把血蓝蛋白转化成酚氧化物酶。有意思的是, 其转化机制不是依靠

收稿日期: 2004-10-09; 修回日期: 2005-06-28

基金项目: 广东省自然科学基金(博士启动基金)资助项目(04300750); 厦门市科技发展资助项目

作者简介: 章跃陵(1971-), 男, 湖南桃江人, 博士, 副教授, 从事海洋无脊椎动物分子免疫学研究, E-mail: zhangyl@stu.edu.cn

蛋白酶的酶活性,而是通过凝血酶与血蓝蛋白按一定的比例相互作用形成一个复合物得以实现(凝血酶和血蓝蛋白在质量比为1:1时达到转化平台)。Nagai等^[19]研究表明,结合角质素的鲎抗菌肽——鲎素(Tachyplesin)可以激活血蓝蛋白向酚氧化物酶的转变,当分离常数 $K_d=3.4 \times 10^6$ mol/L时两者能特异性结合,其结合位点位于鲎素的疏水面,结合骨架可能是与鲎素相互作用的角质素。一般认为,角质素既是真菌的细胞壁成分,又是节肢动物外骨骼的主要组分,而抗菌肽既可识别自身角质素的损伤部位又可识别入侵微生物(异己)的损伤部位。提示其作用机制可能为:当机体受病原微生物侵扰时,抗菌肽通过与角质素和血蓝蛋白的结合,诱导血蓝蛋白向酚氧化物酶的转变,促进病原体的清除和外骨骼创伤的愈合。Zlateva等^[20]报道 *Carcinus maenas* 的血蓝蛋白可被高氯盐诱导表现出O-双酚氧化物酶的活性。Adachi等^[21]证实血蓝蛋白可以被经 β -1,3-葡聚糖处理的血细胞成分所激活转变成类酚氧化物酶,该过程可被亮抑蛋白酶肽和E-64所阻断,提示血细胞中的丝氨酸半胱氨酸蛋白酶参与了激活过程。进一步研究表明,在还原十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)中,正常血蓝蛋白和激活的血蓝蛋白没有明显的差别,而在非还原 SDS-PAGE 中发现,正常血蓝蛋白亚基与激活的血蓝蛋白相比其低聚物位点存在几个小的共价键。由此认为,还原键的断裂如亚基间的二硫键,在该血蓝蛋白激活过程中具有重要作用。

有趣的是,研究者们发现 *Astacus leptodactylus*、*Cancer pagurus*、*Carcinus maenas*、*Palinurus elephas*、*Panulirus interruptus*、*Paralithodes camtschaticae* 的血蓝蛋白既可在胰蛋白酶又可在 SDS 诱导下表现出酚氧化物酶活性^[17],Siddiqui等^[22]还证实螺旋状的 β -血蓝蛋白及其亚基或功能单位在蛋白酶或 SDS 的诱导下均可表现出不同程度的酚氧化物酶活性。

1.1.3 血蓝蛋白具有酚氧化物酶的免疫学功能

业已证实,酚氧化物酶是一种重要的免疫分子,广泛存在于动物、植物和真菌中。它不仅参与伤口的愈合、皮肤色素的合成、果实的着色和昆虫外骨骼的骨化作用,而且具有识别和防御作用。酚氧化物酶激活后可诱导产生黑色素,黑色素及中间代谢产物醌可抑制病原体胞外蛋白和几丁质酶的活性。同时,在此过程中可产生大量活性物质,它们通过多种方式参与宿主防御反应,包括提供调理素,促进血细胞吞噬作用、包裹作用和结节的形成,介导凝集和凝固,产生杀菌物质等。从免疫功能上非常类似于高等动

物的补体系统^[23-25]。血蓝蛋白可以向酚氧化物酶转变,这说明血蓝蛋白是节肢动物和软体动物中的一种相当重要的潜在的免疫分子。

1.2 血蓝蛋白降解片段的抗菌活性

研究证实,血蓝蛋白除了具有酚氧化物酶活性外,一定条件下还可降解产生抗真菌或细菌的肽段,直接抑制微生物入侵。

Destoumieux-Garzon等^[26]从两种对虾(*Penaeus vannamei*和*Penaeus stylirostris*)的血浆中分离出3种具有抗真菌活性的多肽,分别命名为PvHCt(2.7 ku, *Penaeus vannamei*)、PsHCt 1(7.9 ku, *Penaeus stylirostris*)和PsHCt 2(8.3 ku, *Penaeus stylirostris*)。经Edman降解和质谱进一步分析,发现3种多肽与血蓝蛋白的C末端存在95%~100%的相似性,提示这些多肽可能是由血蓝蛋白剪切而来。同时,对这些血蓝蛋白来源的多肽进行酶联免疫吸附(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和免疫印迹(Western blotting)检测。结果发现,与对照组相比,微生物感染组的血浆抗真菌多肽的含量明显升高。由此认为,在细菌入侵的早期通过血蓝蛋白降解产生的抗菌肽可能是对虾抑制细菌的一种重要方式。这是血蓝蛋白具有免疫防御功能的重要证据。至于导致血蓝蛋白部分酶切的机制是否是对虾免疫反应的一部分和这个过程参与多少瞬时和系统抗菌反应,还有待进一步研究和探讨。

Lee等^[27]在淡水小龙虾*Pacifastacus leniusculus*中分离纯化出具有广泛抗菌谱的抗菌肽,命名为astacidin 1,它同样与血蓝蛋白C端具有高度的同源性。研究证实,astacidin 1能广泛抑制革兰氏阳性和阴性菌的生长,一级结构含16个氨基酸残基(FKVQNQHGVV KIFHH-COOH),不含半胱氨酸,分子质量为1.945 2 ku,在质谱中未发现与碳水化合物相连的氨基酸残基。其cDNA序列与血蓝蛋白C端完全匹配,表明它可能源于血蓝蛋白的C端部分。尤其值得一提的是,在酸性条件下血蓝蛋白可被类半胱氨酸蛋白酶水解形成astacidin 1,且该过程由LPS或葡聚糖所调控。进一步研究发现,当小龙虾被脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)或葡聚糖感染时,与体外试验相似,血淋巴中的astacidin 1含量也明显增多。由此说明,astacidin 1确实源于血蓝蛋白并具有抗菌功能。

作者^[28,29]采用免疫学、亲和蛋白质组学、基因克隆和生物信息学等现代生物学技术,对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)血清中的血蓝蛋白结构、功能和生物进化地位进行了较系统的研究,发现凡纳滨

对虾血清中的血蓝蛋白可与抗人 Ig 发生特异性的结合,其结合区域为其 Ig-like 区。进一步分析表明,其结构上不仅与高等生物的免疫分子和低等生物的识别分子同源,而且与人 Ig 在氨基酸序列中存在多个高度同源的保守 motif,是一类新发现的 IgSF 分子。体内外实验表明,血蓝蛋白具有细菌和血细胞凝集活性,可以与细菌外膜蛋白 OmpC 和 OmpX 发生特异性结合。将病原菌感染对虾,其血液中可新增与血蓝蛋白抗血清阳性,分子质量分别为 17.5、22.5 和 28.5 ku 的 3 种蛋白,初步证明其是血蓝蛋白降解产生的抗菌片段。

1.3 血蓝蛋白的抗病毒活性

Zhang 等^[30]首次证明血蓝蛋白具有非特异性抗病毒作用。作者运用亲和层析从斑节对虾(*Penaeus monodon*)血清中分离出 2 种能与白斑杆状病毒(WSSV)和虹彩病毒(SGIV)结合的多肽,分子质量分别为 73ku 和 75ku,经质谱分析鉴定为血蓝蛋白。进一步研究表明,将血蓝蛋白和病毒混合后添加到细胞培养液,培养 3 天后发现细胞只受到较轻的破坏,而不含血蓝蛋白的对照组细胞则完全裂解。但如延长培养时间,试验组细胞也相继裂解。随后选用 6 种 DNA 或 RNA 病毒(SGIV, FV3, LDV, ThRV, ABV 和 IPNV)进行分析,结果发现其半抑制浓度(EC₅₀)约为 4.56~6.64 mg/L。这些结果表明,血蓝蛋白在低浓度时是潜在的病毒抑制物,但血蓝蛋白不能完全抑制病毒的复制。

总之,血蓝蛋白的免疫防御功能是近年来无脊椎动物免疫学领域的最新发现,在免疫反应中,它不仅可表现出酚氧化酶的功能,而且可裂解产生不同分子质量大小的抗菌片段以抵御病原的入侵。虽然其免疫机理目前尚不十分明确,但随着无脊椎动物免疫机制和血蓝蛋白抗菌分子基础研究的深入,相信其确实情况必将阐明。

2 血蓝蛋白的其他功能

2.1 储存蛋白质

Paul 等^[31]发现,血蓝蛋白在不同时期输氧能力存在较大差别。在静止期氧气的消耗量低,血蓝蛋白协氧量少。在运动期(如捕食和躲避)机体由于主要消耗储存的能量,血蓝蛋白的协氧量同样不高,在从运动到静止的恢复期血蓝蛋白的协氧量却明显增加。究其原因,是由于这一时期磷酸原和糖的存储导致需氧代谢旺盛所致。然而令人不解的是,即使在恢复期还有相当多的血蓝蛋白不参与协氧,且其浓度随食物摄入量的增加而增加。为此,有的研究者提出

血蓝蛋白可能与体内蛋白的存储有关。进一步研究表明,节肢动物血蓝蛋白的氨基酸序列与烟草天蛾(*Manduca sexta*)储存蛋白(LSP)具有高度相似性(27%)。由此认为,血蓝蛋白可能还是动物体内重要的氨基酸和蛋白质的储存物。

2.2 调节蜕皮过程

研究证实,狼蛛的血蓝蛋白能与蜕皮激素相结合(其结合的质量浓度范围为 0.5~5 mmol/L)^[6],并介导蜕皮激素的转运和调节蜕皮的过程。同时,Paul 等^[32]发现狼蛛和蜚在蜕皮期(尤其是在蜕皮后期),其血淋巴蛋白浓度均有所下降。研究表明,这是由于血蓝蛋白与狼蛛表皮蛋白和蜕皮蛋白相互结合所致。进一步研究发现,血蓝蛋白亚基结构域 1 的保守性疏水口袋结构可能是与蜕皮激素相结合的区域。因此可以认为,血蓝蛋白参与了蜕皮的调节和表皮的形成。

3 研究前景和展望

近年来,随着血蓝蛋白多种功能的不断发现,特别是免疫活性的发现,血蓝蛋白的功能、作用机理、进化地位已经引起各国学者的浓厚兴趣。进一步研究血蓝蛋白功能对于丰富和发展无脊椎动物,特别是甲壳类动物生理生化和免疫系统的基础研究,探索免疫机理和有关免疫分子起源均具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] Terwilliger N B. Function adaptations of oxygen transport proteins [J]. *J Exp Biol*, 1998, 201: 1 085-1 098.
- [2] 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.
- [3] Burmester T. Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily [J]. *Mol Biol Evol*, 2001, 18: 184-195.
- [4] Van Holde K E, Miller K I, Decker H. Hemocyanins and invertebrate evolution [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (19): 15 563-15 566.
- [5] Terwilliger N B. Function adaptations of oxygen transport proteins [J]. *J Exp Biol*, 1998, 201: 1 085-1 098.
- [6] Jaenicke E, F ll R, Decker H. Spider hemocyanin binds ecdysone and 20-OH-ecdysone [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (26): 34 267-34 271.
- [7] Paul R J, Pirow R. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates [J]. *Zoology*, 1998, 100: 319-327.
- [8] Decker H, Jaenicke E. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28: 673-687.

- [9] Aspan A, Huang T S, Cerenius L, *et al.* cDNA cloning of prophenoloxidase from the fresh crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation [J]. **PNAS**, 1995, 92:939-943.
- [10] Fujimoto K, Okino N, Kawabata S, *et al.* Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenoloxidase A1 of *Drosophila melanogaster* [J]. **PNAS**, 1995, 92: 7 769-7 773.
- [11] Burmester T. Evolutionary history and diversity of arthropod hemocyanins [J]. **Micron**, 2004, 35: 121-122.
- [12] Immesberger A, Burmester T. Putative phenoloxidases in the tunicate *Ciona intestinalis* and the origin of the arthropod hemocyanin superfamily [J]. **J Comp Physiol (B)**, 2004, 174 (2): 169-180.
- [13] Decker H, Rimke T. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity [J]. **J Biol Chem**, 1998, 273: 25 889-25 892.
- [14] Decker H, Terwilliger N. Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins [J]. **J Exp Biol**, 2000, 203: 1 777-1 782.
- [15] Decker H, Ryan M, Jaenicke E, *et al.* SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister* [J]. **J Biol Chem**, 2001, 276: 17 796-17 799.
- [16] Pless D, Aguilar M, Falcon A, *et al.* Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean [J]. **Arch Biochem Biophys**, 2003, 409: 402-410.
- [17] Jaenicke E, Decker H. Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase [J]. **Micron**, 2004, 35 (1-2): 89-90.
- [18] Nagai T, Kawabata S. A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense [J]. **J Biol Chem**, 2000, 275: 29 264-29 267.
- [19] Nagai T, Osaki T, Kawabata S. Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides [J]. **J Biol Chem**, 2001, 276: 27 166-27 170.
- [20] Zlateva T, Di Muro P, Salvato B, *et al.* The α -diphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin [J]. **FEBS Lett**, 1996, 384: 251-254.
- [21] Adachi K, Hirata T, Nishioka T, *et al.* Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme [J]. **Comp Biochem Physiol (Part B)**, 2003, 134: 135-141.
- [22] Siddiqui N I, Préaux G, Gielens C. Intrinsic and induced α -diphenoloxidase activity of β -hemocyanin of *Helix pomatia* [J]. **Micron**, 2004, 35: 91-92.
- [23] Washington C, Dankert J R. Phenoloxidase specific activity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkia* [J]. **Fish Shellfish Immunol**, 1997, 7: 283-295.
- [24] S der hll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity [J]. **Curr Opin Immunol**, 1998, 10: 23-28.
- [25] Johansson M, S der hll K. The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates [J]. **Prog Mol Subcell Biol**, 1996, 15: 46-66.
- [26] Destoumieux-Garzon D, Saulnier D, Garnier J, *et al.* Crustacean immunity: Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge [J]. **J Biol Chem**, 2001, 276: 47 070-47 077.
- [27] Lee S Y, Lee B L, S der hll K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. **J Biol Chem**, 2003, 278: 7 927-7 933.
- [28] Zhang Y L, Wang S Y, Peng X X. Identification of a type of human IgG-like protein in shrimp *Penaeus vannamei* by mass spectrometry [J]. **J Exp Mar Biol Ecol**, 2004, 301: 39-54.
- [29] Zhang Y L, Wang S Y, Xu A L, *et al.* Affinity proteomic approach for identification of an IgA-like protein in *Litopenaeus vannamei* and study on its agglutination characterization [J]. **J Proteome Res**, 2006, 5:815-821.
- [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 J, Bergner B, Pfeiffer-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.

(本文编辑:张培新)