

海兔中枢神经系统多肽调控作用研究进展

Progress in regulation role of peptides of the central nervous system in *Aplysia*金宏伟^{1,3,4}, 陆永进^{1,2}, 黄河清^{1,2}

(1. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 福建省化学生物学重点实验室, 福建 厦门 361005; 3. 厦门大学 附属中山医院临床检验中心, 福建 厦门 361004; 4. 福建医科大学 厦门中山教学医院, 福建 厦门 361004)

中图分类号: Q 617 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007) 08-0091-06

海兔(*Aplysia*)属于软体动物门(Mollusca), 腹足纲(Gastropoda), 后鳃亚纲(Opisthobranchia), 海兔科(Aplysiidae)。在自然界中, 多数来源于不同品种海兔的中枢神经系统(central nervous system, CNS)均由 5 对神经节和神经连索组成, 它们分别是口腔神经节(buccal ganglion, BG)、脑神经节(cerebral ganglion, CG)、侧神经节(pleural ganglion, PLG)、足神经节(pedal ganglion, PG)和腹神经节(abdominal ganglion, AG), 其中脑神经节支配着许多感应器官, 如前触角、口腔、眼等, 并参与控制身体的运动与平衡。脑神经节、口腔神经节、侧神经节和足神经节之间均由神经连索相连接和沟通(图 1)。海兔的虹吸管一旦受到触碰后会缩回腮和虹吸管, 作出防卫姿态; 如果经过多次连续相同的刺激后, 这种防卫姿态随着刺激次数的增加而持续更久^[1]。控制腮收缩反应回路系统主要由单突触组成, 它由一个感觉神经节和与它相连接的运动神经节所组成^[2]。目前, 这个反射模型已被证实, 并已采用人工模型完成了相关机理的研究, 为研究记忆形成提供了一个理想的分析模型和奠定了良好的研究基础。软体动物中枢神经系统结构较为简单, 海兔神经节大约由 20 000 个神经细胞组成, 其神经细胞尺寸相对较大(有些直径可达 1 000 μm 以上^[3]), 借助普通显微分离技术就可以直接分离出神经细胞和细胞多肽簇, 供多肽组成、分布、结构与功能角度、神经多肽参与信号传导和行为表现研究。

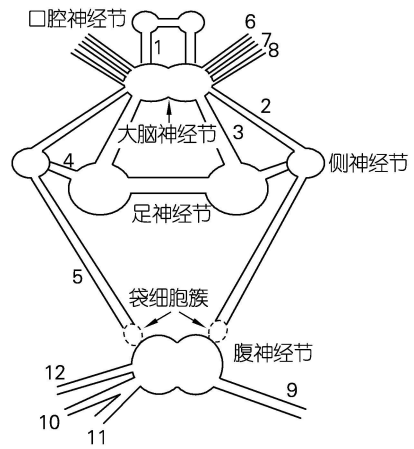


图 1 海兔中枢神经系统
1~11 为神经连索

近期, 基质辅助激光解吸离子化飞行时间(Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight, MALDI-TOF)质谱技术已经较为深入地用于分析软体动物和足类动物神经节内的功能多肽种类和结构, 表现出高灵敏度、超微量和快速等特点和优势, 它是目前研究神经多肽结构与功能的最佳分析技术之一, 所获得的研究结果对正确理解神经多肽调控行为表现的机理

收稿日期: 2005-09-30; 修回日期: 2005-12-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(30470372); 福建省自然科学基金项目(C031006)

作者简介: 金宏伟(1975-), 男, 上海人, 主管技师, 硕士, 主要从事蛋白质功能研究, E-mail: jhw@xmzsh.com; 黄河清, 通讯作者, 教授, 博士生导师, E-mail: hquang@xmu.edu.cn



起着极其重要的作用^[4-6]。作者侧重综合描述采用现代分析技术研究海兔及其他软体动物中中枢神经系统多肽组成、分布、结构及调控作用的新进展。

1 神经多肽组成与调控作用

海兔、昆虫以及扁形动物的神经细胞均是利用神经递质和神经多肽(neuro-peptide, NP)作为化学信号物质,其特性与哺乳动物很类似,例如,血吸虫渗透压调节因子(leech osmoregulatory factor, LORF)在小鼠和血吸虫中均被发现,LORF能刺激静脉血管释放一氧化氮^[7]。目前在加洲海兔(*Aplysia californica*, AC)中枢神经系统中已经发现100多种多肽化合物,其中部分多肽具有调控特定器官和组织功能的生理活性。

产卵激素(egg-laying hormone, ELH)是在海兔腹神经节中以前体多肽方式合成的,它经历了一系列剪切与加工后被输送到卵巢,刺激海兔发生产卵行为。心脏激活小肽(small cardioactive peptides, SCP_A和SCP_B)、富含组氨酸碱性多肽(histidine-rich basic peptide, HRBP)、R15 α 1、R15 α 2和NdWFamide(Asn-D-Trp-Phe-NH₂)等多肽均能刺激心跳或加强血管收缩性^[8-11],提高血液循环速度^[12],可增强海兔的运动性(如进行产卵和交配)。在海兔腹神经节处可发现NdWFamide多肽,它通过神经纤维输送到心肌及主动脉,并通过Ca²⁺离子通道调控海兔的心肌细胞,同时又受G蛋白的反馈调控^[13]。当NdWFamide完成信号传递后,在去酰胺化酶作用下,其多肽序列中的D-Trp残基变构为L-Trp,并降低了活性^[14],终止信号传递行为。神经多肽L5-67由腹神经节左上区域(left upper quadrant, LUQ)细胞合成,随后被运送到肾脏中央的上皮细胞、皮质的环形肌部分以及肾脏的毛孔周围部分^[15],主要作用是刺激环形肌的收缩,进而促进肾脏毛孔关闭^[16]。

脑肽1(cerebral peptid1, CP1)由脑神经节合成,在脑神经纤维中均有发现,其它神经节也有,但含量甚微,是一种神经递质的多肽化合物^[17]。SCPs对口腔肌肉的收缩和感觉神经元腹神经节运动神经细胞之间的突触传递具有调控作用^[18-19]。紫贻贝抑制肽类似物(*Mytilus* inhibitory peptide-related peptides, MIPs)均在海兔的神经节中发现,它们能抑制海兔食道的自主性收缩。Fujisawa和Xu^[20,21]报道,MIPs和指令神经多肽(command neuron peptides, CNPs)共同参与了海兔尾部受刺激后的收缩反应。足肽(pedal peptide, PP)在海兔足神经节中合成并通过神经纤维输送到身体各处,足肽在一定浓度时能增强足部肌肉的收缩,并加快收缩频率^[22]。钙调素

(myomodulins)能调控肌肉神经中的信号传递,使之收缩幅度增强或减弱^[23]。目前,已从腹神经节细胞簇中发现了4种神经多肽,它们分别是足肽、钙调素D、CPI和酸性多肽(Acidic peptide, AP)^[18-27]。采用免疫组化的方法发现足肽普遍存在于中枢神经系统和周围神经系统,在足神经节有大量表达。脑肽1是在海兔的脑神经节中合成,然后运输到各个神经节和神经纤维。但是并不是神经节的每个神经细胞都存在CPI,用放射同位素法发现只在腹神经节右上区域中含有CPI。尽管有关CPI所执行的生理功能尚未被阐明,但从CPI组成与分布情况分析,它很可能是一种神经递质性物质。

海兔抑制肽相关多肽(AMRPs)是由单一前体编码的多重六肽。通过比较加州海兔和黑斑海兔的AMRPs前体,发现存在着大量的特异AMRPs。比较加州海兔与黑斑海兔前大动脉AMRPs的功能后发现,AMRPs抑制了加州海兔的大动脉收缩,而在黑斑海兔中,当AMRPs的浓度提高到10⁻⁷mol/L,收缩现象仍然没有发生。说明物种之间所需要的AMRPs存在着量和分子结构上的差异性^[9,24]。

在海兔中枢神经系统发育过程中,一种生长因子对细胞分裂和分化具有促进作用,在卵和未发育成熟海兔的中枢神经系统中均发现这种生长因子(mollusk-derived growth factor, MDGF)。与人类和昆虫的生长因子相比,MDGF具有高度的保守性^[9,25]。虽然在成年海兔的中枢神经系统中没有发现MDGF,但是把解剖所得的神经节离体组织培养一段时间后,神经节就会合成MDGF。进一步的研究发现MDGF具有腺苷脱氨酶的活性,在皮摩尔级浓度时就能刺激细胞的增殖^[26]。

2 腹神经节与袋细胞多肽

早期的研究发现,海兔腹神经节(也称为脏神经节,visceral ganglion)可分泌产卵激素和释放蓝紫色墨汁物质作为防卫工具。此外,它还可以控制各个脏器的生理功能,例如呼吸、血液循环和分泌等;同时它也参与控制其他调节功能,如在防卫态过程中,调整海兔身体运动和内脏运动速率。美国加州海兔和杂斑海兔(*Aplysia juliana*, AJ)的中枢神经系统形态结构非常相似,均含有腹神经节,但厦门蓝斑背海兔(*Notarcus leachii cirrosus* Stimpson, NLCS)却缺少腹神经节^[27]。加州海兔的腹神经节结构较为简单清晰,透明的鞘膜包裹着整个神经节,鞘膜具有很好的通透性,分子质量小于300u的物质都能穿过。同位素标记技术在离体培养腹神经节时,可跟踪某些蛋白质和多肽的代谢过程。口腔神经节与腹神经节之

间的神经连索、神经纤维和其它脏器的研究已有详细报道,其相互作用的机理也得到初步的总结,如LUQ细胞的轴突通过心脏周边神经与肾脏相连^[28,29]。腹神经节含有能分泌丰富多肽的细胞簇(目前已发现800个),主要分为R3~R14和L2、6、R15两大群,它们之间的区别在于前者分泌多肽向鞘膜输送,而后者则通过轴突和神经纤维输送多肽。

目前已较为深入研究的海兔神经多肽仅有ELH、L5-67、NdW Famide和LUQIN等,其主要原因有:(1)由于海兔的递质多肽种类较多,多数多肽结构与功能尚未被阐明;(2)海兔合成和分泌的神经多肽种类与数量随着季节变化而变化;(3)部分神经多肽以前体肽的形式存在于神经节中,需要其它多肽酶参与剪切与加工后,才能转化为活性肽,典型例子有ELH和L5-67。ELH是以242个氨基酸残基的ELH前体肽形式存在于袋细胞(bag cell)中,当此前体肽发生酶解后可产生9个肽片段,如 α -bag cell peptide(α -BCP)、 β -bag cell peptide(β -BCP)、 γ -bag cell peptide(γ -BCP)、ELH等^[30]。ELH酶解产物又进一步被酰胺化,和其它肽片段被进一步酶切后,形成更多具有生物功能的肽片段(如 γ -BCP 1-7、 γ -BCP 1-8和acidic peptide等)。L5-67是由112个氨基酸残基组成前体的部分多肽,其前体在切除位于1~23的信号肽后,迅速在23和24位处发生酶解,产生89个氨基酸残基组成的中间肽。随后该中间肽的12~13位点进一步被酶解生成具有生物功能的多肽,其分子被称为LUQIN(1~12)和富含脯氨酸成熟多肽(proline-rich mature peptide) 13-89。

3 吸引素多肽调控作用

海兔具有独居生活特点,只有在产卵期间才会聚集成群^[31]。研究发现促使海兔发生聚集现象的是一种多肽物质,称为吸引素(attractin)^[32,33]。吸引素是海兔重要的肽能调控物质,它与前面所论述的神经多肽作用是不同的,主要是分泌到体外,并作用于其它海兔的神经多肽。吸引素是一种有58个氨基酸残基的水溶性多肽^[34],具有三对链内二硫键,其空间结构包含2个 α -螺旋^[35],活性部分是其前41个氨基酸残基序列。除了能吸引分散各处的海兔发生聚集之外,吸引素还能促使海兔交配。吸引素在海兔蛋白腺中合成,合成后一部分吸引素直接释放到海水中,另一部分在产卵时被卵鞘包被,并随卵带排出体外。卵带中的吸引素在随后的时间里(约30 min)被释放^[36]。通常海兔在交配前先产一批卵^[37],这样能在一定时间内增强并维持海兔周围海水中吸引素的浓度,从而增加吸引其它海兔聚集的几率。

虽然海兔卵带中的吸引素源自蛋白腺,但是从蛋白腺中分离得到的是全长吸引素多肽,在卵带中发现的吸引素只是其酶解片段。目前在卵带中已分离得到4种片段,分别是吸引素1-46、1-31、1-29和1-24^[32],这表明卵带中含有吸引素和它的酶解产物。许多研究证明信号多肽被降解是由多肽内切酶(Endopeptidase, EP)所致,在卵带中存在一种能使吸引素降解的EP。这种EP的作用不仅仅是产生吸引素的酶解片段,同时也能确保卵带在限定的时间内释放有效的吸引素片段——供海兔之间聚集成群的标志性信号。

4 产卵激素(ELH)和酸性多肽(AP)

产卵激素是一种由36个氨基酸残基构成的多肽,当它作用于卵巢和中枢神经系统时,能刺激海兔排卵和完成排卵动作^[38]。作为一种具有神经调控作用的神经多肽,其自身的合成受一系列多肽内切酶的调控。首先神经多肽以前体形式被合成,在高尔基体中由多肽酶负责进行有序的酶切^[39]。酶切后所形成的中间肽被转移到囊泡中,在那里中间肽再次经过其他多肽酶^[40-44]进一步降解和加工,于是产卵激素中间肽的C端逐步被降解和发生 α -酰胺化反应^[45],最终形成了有生物活性的产卵激素并被释放于介质中。酸性多肽(acidic peptide, AP)是口腔神经节中的多肽组成之一,其一级结构为SSGVSLLSNKGDEEQRELLKAISNLLD,含有三对Leu-Leu分子结构,分子质量为2960.3u,是产卵激素的酶解产物,但有关酸性多肽的生理功能尚未阐明。在海兔中枢神经系统中还存在着一种酶解酸性多肽中Leu-Leu酰胺键的多肽内切酶^[46-47],它能酶解酸性多肽成为SSGVSLLTSNKDDEEQRELLKAISNL和LTSNKDDEEQRELLKAISNL等片段。这一酶解过程类似于血管紧张肽内切酶酶解糖蛋白底物后释放血管紧张肽iv。

选用MALDI-TOF质谱技术研究加州海兔中枢神经系统中口腔神经节外表层酸性多肽的分解产物的情况。实验结果表明,在加州海兔口腔神经节和脑神经节外表层上,均发现了复杂的多肽种类和丰富的酸性多肽分解产物。经分析,酸性多肽被内切酶降解过程是从其一级结构的N端到C端,推测酸性多肽和其分解产物参与了信号传导反应。MALDI-TOF质谱技术是研究中枢神经系统中超微量多肽组成、种类和结构与功能的最佳分析手段^[47]。

近期,Rubakhin等^[48]采用MALDI-TOF质谱技术发现美国加州海兔中枢神经系统的腹神经节左上游出口内的袋细胞能释放出酸性多肽和它的分解产

物。Li 等^[5,6] 和 Painter 等^[31] 分别选用 HPLC 和 MALDI-TOF 质谱技术研究海兔胸膜和腹部神经节 (pleura-abdominal connection, PAC) 之间的连索内的多肽组成与结构, 同样也发现了 PAC 含有酸性多肽。然而, 至今有关酸性多肽的医学科学意义尚未明了。近期的研究进一步发现, 蓝斑背肛海兔和加州海兔的脑神经节、口腔神经节和其它神经节外表层含有微量的丰富的不同结构的多肽^[43], 具体这些多肽如何与神经节内的多肽一起联合参与调控信号传导和执行行为表现等生理活动还有待于进一步深入研究。

近十几年来, 发展痕量和超微量分析技术一直是结构生物学研究领域中最具挑战性和前瞻性的课题之一, 尤其是在多肽和酶结构分析方面。目前, 毛细管电泳仪是生物大分子微量和超微量最有效的分离系统之一, 它可在纳升级上对混合样品进行分离, 得到很纯的单一组分并可自动高效地测定 DNA 序列等生化参数。但尽管如此, 毛细管电泳分析技术仍然无法准确地预测和鉴定蛋白质和多肽等生物大分子的组成与结构。MALDI-TOF^[49] 或 ESI-Q-TOF 质谱仪检测多肽和蛋白质的灵敏度可高达 fmol 级, 测定速度快; 对样品纯度要求不高, 非常适合分析中枢神经系统中微量或超微量多肽的组成、结构、分布以及开展多肽调控作用的研究, 是目前从事神经多肽调控作用的最佳分析技术之一^[50], 并将继续为研究神经多肽调控作用发挥着极其重要的作用。

参考文献:

[1] Silva J A, Murphy G G. cAMP and memory: a seminal lesson from *Drosophila* and *Aplysia*[J]. **Brain Res Bull**, 1999, **50**(5-6): 441-442.

[2] Rayport S G, Schacher S. Synaptic plasticity in vitro: cell culture of identified *Aplysia* neurons mediating short-term habituation and sensitization[J]. **J Neurosci**, 1986, **6**(3): 759-763.

[3] Kandel E R. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses[J]. **Biosci Rep**, 2001, **21**(5): 565-611.

[4] Sweedler J V, Li L, Flody P, et al. Mass spectrometric survey of peptides in cephalopods with an emphasis on the FMRFamide related peptides[J]. **J Exp Biol**, 2000, **203**(23): 3 565-3 573.

[5] Li L, Garden R W, Romanova E V, et al. In situ sequencing of peptides from biological tissues and single cells using MALDI-PSD/CID analysis[J]. **Anal Chem**, 1999, **71**(24): 5 451-5 458.

[6] Li L, Garden R W, Sweedler J V. Single-cell MAL-

DI: a new tool for direct peptide profiling[J]. **Trends Biotechnol**, 2000, **18**(4): 151-160.

[7] Salzet M, Salzet B, Sautiere P, et al. Isolation and characterization of a leech neuropeptide in rat brains: coupling to nitric oxide release in leech, rat and human tissues[J]. **Brain Res Mol Brain Res**, 1998, **55**(1): 173-179.

[8] Morris H R, Panico M, Karplus A, et al. Elucidation by FAB-MS of the structure of a new cardioactive peptide from *Aplysia*[J]. **Nature**, 1982, **300**(5893): 643-645.

[9] Cummins S F, Nichols A, Rajarathnam K N, et al. A conserved heptapeptide sequence in the waterborne attractin pheromone stimulates mate attraction in *Aplysia*[J]. **Peptides**, 2004, **25**(2): 185-189.

[10] Susswein A J, Nagle G T. Peptide and protein pheromones in mollusks[J]. **Peptides**, 2004, **25**(9): 1 523-1 530.

[11] Morishita F, Nakanishi Y, Kaku S, et al. A novel D-amino acid-containing peptide isolated from *Aplysia* heart[J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 1997, **240**(2): 354-358.

[12] Morishita F, Minakata H, Sasaki K, et al. Distribution and function of an *Aplysia* cardioexcitatory peptide, NdWamide, in pulmonate snails[J]. **Peptides**, 2003, **24**(10): 1 533-1 544.

[13] Kanemaru K, Morishita F, Matsushima O, et al. *Aplysia* cardioactive peptide (NdWamide) enhances the L-type Ca^{2+} current of *Aplysia* ventricular myocytes[J]. **Peptides**, 2002, **23**(11): 1 991-1 998.

[14] Morishita F, Matsushima O, Furukawa Y, et al. Deamidase inactivates a D-amino acid-containing *Aplysia* neuropeptide[J]. **Peptides**, 2003, **24**(1): 45-51.

[15] Giardino N D, Aloyz R S, Zollinger M, et al. L5-67 and LUQ-1 peptide precursors of *Aplysia californica*: distribution and localization of immunoreactivity in the central nervous system and in the pericardial tissues[J]. **J Comp Neurol**, 1996, **374**(2): 30-245.

[16] Koester J, Alevizos A. Innervation of the kidney of *Aplysia* by L10, the LUQ cells, and an identified peripheral motoneuron[J]. **J Neurosci**, 1989, **9**(11): 4 078-4 088.

[17] Phares G A, Lloyd P E. Purification, primary structure, and neuronal localization of cerebral peptide 1 from *Aplysia*[J]. **Peptides**, 1996, **17**(5): 753-761.

[18] Lloyd P E, Kupfermann I, Weiss K R. Evidence for the parallel actions of a molluscan neuropeptide and serotonin in mediating arousal in *Aplysia*[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1984, **81**(9): 2 934-2 937.

- [19] Abrams T W, Castellucci V F, Camardo J S, *et al.* Two endogenous neuropeptides modulate the gill and siphon withdrawal reflex in *Aplysia* by presynaptic facilitation involving cAMP-dependent closure of a serotonin-sensitive potassium channel[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1984, **81**(24): 7956-7960.
- [20] Fujisawa Y, Furukawa Y, Ohta S, *et al.* The *Aplysia Mytilus* inhibitory peptide related peptides: identification, cloning, processing, distribution, and action[J]. **J Neurosci**, 1999, **19**(21): 9618-9634.
- [21] Xu Y, Cleary L J, Byrne J H. Identification and characterization of pleural neurons that inhibit tail sensory neurons and motor neurons in *Aplysia*: correlation with FMRFamide immunoreactivity [J]. **J Neurosci**, 1994, **14**(6): 3565-3577.
- [22] Hall J D, Lloyd P E. Involvement of pedal peptide in locomotion in *Aplysia*: modulation of foot muscle contractions[J]. **J Neurosci**, 1990, **21**(6): 858-868.
- [23] Wang Y, Price A D, Sahley L C. Identification and characterization of a myomodulin-like peptide in the leech[J]. **Peptides**, 1998, **19**(3): 487-493.
- [24] Painter D S, Chong G M, Wong A M, *et al.* Relative contributions of the egg layer and egg cordon to pheromonal attraction and the induction of mating and egg-laying behavior in *Aplysia*[J]. **Biol Bull**, 1991, **181**(1): 91-94.
- [25] Akala D B, Nagle G T. Mollusk-derived growth factor: cloning and developmental expression in the central nervous system and reproductive tract of *Aplysia* [J]. **Brain Res Mol Brain Res**, 2001, **91**(1-2): 163-168.
- [26] Akala D B, Bottenstein J E, Lee S H, *et al.* *Aplysia* mollusk-derived growth factor is a mitogen with adenosine deaminase activity and is expressed in the developing central nervous system[J]. **Brain Res Mol Brain Res**, 2003, **117**(2): 228-236.
- [27] 黄河清, Kim W S, 林庆梅. MALDI-TOF 质谱技术研究海兔神经索外表层的多肽组成[J]. **海洋科学**, 2004, **28**(5): 53-57.
- [28] Aloyz R S, DesGroseillers L. Processing of the L5-67 precursor peptide and characterization of LUQIN in the LUQ neurons[J]. **Peptides**, 1995, **16**(2): 331-338.
- [29] Skelton M E, Koester J. The morphology, innervation and neural control of the anterior arterial system of *Aplysia californica* [J]. **J Comp Physiol [A]**, 1992, **171**(2): 141-155.
- [30] Newcomb R, Fisher J M, Scheller R H. Processing of the egg-laying hormone (ELH) precursor in the bag cell neurons of *Aplysia*[J]. **J Biol Chem**, 1988, **263**(25): 12514-12521.
- [31] Painter S D, Cummins S F, Nichols A E, *et al.* Structural and functional analysis of *Aplysia* attractins, a family of water-borne protein pheromones with interspecific attractiveness[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2004, **101**(18): 6929-6933.
- [32] Painter S D, Clough B, Garden R W, *et al.* Characterization of *Aplysia* attractin, the first water-borne peptide pheromone in invertebrates [J]. **Biol Bull**, 1998, **194**(2): 120-131.
- [33] Garimella R, Xu Y, Schein C H, *et al.* NMR solution structure of attractin, a water-borne protein pheromone from the mollusk *Aplysia californica* [J]. **Biochemistry**, 2003, **42**(33): 9970-9979.
- [34] Fan X, Wu B, Nagle G T, *et al.* Molecular cloning of a cDNA encoding a potential water-borne pheromonal attractant released during *Aplysia* egg laying [J]. **Brain Res Mol Brain Res**, 1997, **48**(1): 167-170.
- [35] Schein H C, Nagle T G, Page S J, *et al.* *Aplysia* Attractin: biophysical characterization and modeling of a water-borne pheromone[J]. **Biophys J**, 2001, **81**(1): 463-472.
- [36] Painter S D, Clough B, Black S, *et al.* Behavioral characterization of attractin, a water-borne peptide pheromone in the genus *Aplysia* [J]. **Biol Bull**, 2003, **205**(1): 16-25.
- [37] Blankenship J E, Rock M K, Robbins L C, *et al.* Aspects of copulatory behavior and peptide control of egg laying in *Aplysia*[J]. **Fed Proc**, 1983, **42**(1): 96-100.
- [38] Bernheim S M, Mayeri E. Complex behavior induced by egg-laying hormone in *Aplysia*[J]. **J Comp Physiol [A]**, 1995, **176**(1): 131-136.
- [39] Chun J Y, Korner J, Kreiner T, *et al.* The function and differential sorting of a family of *Aplysia* prohormone is important because it has been shown to increase the processing enzymes [J]. **Neuron**, 1994, **12**(4): 831-844.
- [40] Nagle G T, Garcia A T, Gorham E L, *et al.* Molecular cloning and cellular localization of a furin-like prohormone convertase from the atrial gland of *Aplysia* [J]. **DNA Cell Biol**, 1995, **14**(5): 431-443.
- [41] Gorham E L, Nagle G T, Smith J S, *et al.* Molecular cloning of prohormone convertase I from the atrial gland of *Aplysia*[J]. **DNA Cell Biol**, 1996, **15**(4): 339-345.
- [42] Nagle G T, Garcia A T, Knock S L, *et al.* Molecular cloning, cDNA sequence, and localization of a prohormone convertase (PC2) from the *Aplysia* atrial

- gland[J], *DNA Cell Biol*, 1995, **14**(2): 145-154.
- [43] Ouim et T, Mammabachi A, Cloutier T, *et al.* cDNA structure and in situ localization of the *Aplysia californica* pro-hormone convertase PC2[J]. *FEBS Lett*, 1994, **337**(1): 119-121.
- [44] Juvvadi S, Fan X, Nagle G T, *et al.* Characterization of *Aplysia* carboxypeptidase E[J]. *FEBS Lett*, 1997, **408**(2): 195-200.
- [45] Fan X, Spijker S, Akalal D B, *et al.* Neuropeptide amidation: cloning of a bifunctional α -amidating enzyme from *Aplysia*[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, **82**(1-2): 25-34.
- [46] Hummon A B, Huang H Q, Kelley W P, *et al.* A novel prohormone processing site in *Aplysia californica*: the Leu-Leu rule[J]. *J Neurochem*, 2002, **82**(6): 1398-1405.
- [47] 林庆梅, 黄河清, 王群力. MALDI-TOF 质谱技术研究海兔神经节外表层酸性多肽酶解产物的分布与特性[J]. *分析测试学报*, 2003, **22**(5): 1-3.
- [48] Rubakhin S S, Page J S, Monroe B R, *et al.* Analysis of cellular release using capillary electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*, 2001, **22**(17): 3752-3758.
- [49] Huang H Q, Xiao Z Q, Lin Q M, *et al.* Characteristics of structure, composition, mass spectra, and iron release from the ferritin of shark liver (*Sphyrna zygaena*) [J]. *Biophys Chem*, 2004, **111**(3): 213-222.
- [50] 黄河清. MALDI-TOF 质谱技术分析加州海兔口腔神经节中超微量 Leu-Leu 多肽酶 [J]. *分析仪器*, 2004, **2**: 23-27.

(本文编辑: 张培新)

(上接第 87 页)

The effect of storage time and cryoprotectant concentration on sperm quality of red seabream (*Pagrus major*)

SHI Xue-hui¹, LI Jun²

(1. Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China; 2. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Apr., 3. 2007

Key words: red seabream (*Pagrus major*); cryopreservation; cryoprotectant concentration; DMSO; storage time; fertilization capacity

Abstract: The present study focused on the effects of the storage time and cryoprotectant concentration on the post-thaw sperm quality in red seabream (*Pagrus major*). The results demonstrate that cryoprotectant concentration and storage time could significantly influence the fertilization and hatching rates of post-thaw sperm. The fertilization capability of the post-thaw sperm cryopreserved with 15% DMSO for 360 d began to decrease; however, no significant difference was found among 10~60 d cryopreserved sperm. No significant differences were found among 12%~21% DMSO cryopreserved sperm for 60 d in fertilization capacity, and the fertilization rate was higher than 90%; however, the fertilization capacities of 12%, 18%, 21% DMSO cryopreserved for 360 d were reduced significantly. The effects of the storage time, and cryoprotectant concentration, and their interaction still need further study.

(本文编辑: 刘珊珊)