

# 蓝斑背肛海兔神经连索外表层超微量 多肽组成的研究

吴韩志, 黄河清\*, 叶庆华, 黄河宁\*\*

(厦门大学生命科学学院, 福建省化学生物重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 蓝斑背肛海兔 (*Notarcus leachii cirrosus* Stimpson, NLCS) 中枢神经系统缺少腹神经节. 选用基质辅助激光解吸电离化飞行时间(Matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight, MALDI-TOF) 质谱技术研究 NLCS 中枢神经系统连索外表层的超微量的多肽组成和分布时, 发现该连索外表层含有丰富的酸性多肽 (Acidic peptide, AP) 的酶解片段和其他多肽组分. 不同 NLCS 个体的中枢神经连索外表层多肽分布与组分有些差异, 推测这些神经多肽可能参与中枢神经系统的信息传导和行为的可塑性. 在不同的神经连索之间发现相同一级结构和聚合体的多肽组成, 认为这些组份以不同的形式分泌到神经节或连索外表层参与信息传导活动, 起到相似或相同的生理功能.

**关键词:** 海兔; 神经连索; 神经肽; 质谱

**中图分类号:** Q 51

**文献标识码:** A

海兔 (*Aplysia*) 中枢神经系统具有简单、易分离和细胞易定位等特点<sup>[1,2]</sup>. 在自然界中, 多数种类的海兔中枢神经系统主要由口腔神经节 (Buccal ganglion, BG)、大脑神经节 (Cerebral ganglion, CG)、胸膜与足部神经节 (Pleural/Pedal ganglion, PLG/PDG)、腹部神经节 (Abdominal ganglion, AG) 和神经元连索等部分组成<sup>[2]</sup>. 近期, Rubakhin et al. 采用 MALDI-TOF 质谱技术发现了在靠近 AG 端的胸膜和腹部神经节之间的连索 (Pleural-abdominal connective, PAC) 内的囊细胞 (Bag cell) 释放了酸性多肽 (acidic peptide, AP) 和它的酶解产物<sup>[3]</sup>. Li L 和 Floyed P D 在研究了海兔 PAC 的多肽组成和分布过程中, 也分别发现了 PAC 含有 AP 组成<sup>[1~3]</sup>. Hummon 和黄河清分别选用 HPLC 和 MALDI-TOF 质谱技术证实了海兔 BG 中含有 Leu-Leu 多肽酶, 并能酶解 AP 中的 Leu-Leu 酰氨

键, 形成不同的酶解产物<sup>[4,5]</sup>. 由于 Leu-Leu 多肽酶含量极微, 无法通过常规分离技术获得电泳纯的 Leu-Leu 多肽酶, 从而限制了对该酶的深入研究, 相关的研究也尚未见详细报道.

本文选用 MALDI-TOF 质谱技术研究 NLCS 神经连索外表层的 AP、CP1 酶解片段和多肽分布情况, 它将有助于理解中枢神经系统外表层与它紧贴的周边肌肉组织之间的信号传递和行为可塑性等生理功能, 具有一定的医学研究意义和价值.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料的获取及 NLCS 神经连索分离

蓝斑背肛海兔捕获于厦门近海区域. 每只海兔净重在 80~200 g 之间. 海兔神经连索分离前, 动物暂时喂养在 14 °C 海水人工水箱中. 取海兔 5~10 只, 根据海兔体重, 按每克换算成毫升方式, 注入约海兔体重一半体积氯化镁 (390 nmol/L) 于海兔体内. 等待几分钟后, 迅速解剖海兔, 分离出胸膜神经节与肌肉之间的神经连索, 剪取其中长约 3~5 cm 单独无分叉部分, 以及 BG 和 CG 之间的神经连索, 剔除表面附着的杂物, 置于人工海水中备用.

收稿日期: 2003-08-07

基金项目: 国家自然科学基金 (40276033) 和福建省自然科学基金 (C0310006) 资助

作者简介: 吴韩志 (1976-), 男, 硕士研究生.

\* Corresponding author,

E-mail: hqhuang@ingxian.xmu.edu.cn

\*\* 现工作单位: 三明学院化学与生物工程系.

## 1.2 PLG 与腹部肌肉之间连索外表层的多肽组份的萃取

置神经连索两端于小离心管外(避免连索内的多肽组成释放于浸泡液中造成污染), 用 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 冲洗神经连索表层多次(至少 3 次)后, 将连索中部浸泡在 200  $\mu$ L 浸泡液(含有 50% 乙腈)中, 浸泡时间为 2 h, 浸泡温度为 35  $^{\circ}$ C. 随后, 取出神经连索, 离心(12 500 r/min) 萃取 5 min, 收集上清液备用.

## 1.3 BG 和 CG 之间连索外表层的多肽组份的萃取

由于 BG 和 CG 之间的神经连索长度在 0.5~1 cm 之间, 无法采用上述方法萃取神经节外表层多肽组成, 只能采用蜡封技术, 即蘸取融化石蜡封住连索两端, 并置于 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 中荡洗 3 次. 后序处理方式同 1.2 步骤.

## 1.4 基质和样品配制及质谱测定条件

实验所需的 DHB(2, 5-二羟基苯甲酸) 基质购置于美国 ICN 生物医学公司. 采用重蒸水搅拌溶解 30 min, 配制成 DHB 饱和水溶液. 神经连索浸泡萃取液和基质溶液 ( $\varphi = 1:1$ ) 事先混合 60 s, 然后取混合液 0.8  $\mu$ L 滴在质谱仪专用样品靶上, 待样品自然干燥后, 放样品靶于质谱仪靶箱内进行分析<sup>[6,7]</sup>. 实验所需的质谱仪是德国 BRUKER 公司生产的 REFLEX ④型 MALDI-TOF 质谱仪. 脉冲氮激光(337 nm) 作为离子解吸电离源. 分析模型选用高分辨率反射模型, 加速电压控制在 20 kV. 平均每次测定样品的激光脉冲次数为 120 次<sup>[6,7]</sup>. 采用外标法标定多肽质谱峰峰位.

# 2 结果与讨论

## 2.1 NCLS 中枢神经系统示意图

表 1 PLG 与腹部肌肉之间神经连索外表层的 AP 和 CP1 酶解片段

Tab. 1 The enzymatic segments of AP 和 CP1 of connective surface between PLG and abdomen muscle

多肽种类	理论值/ $\mu$	测定值/( $m/z$ )	相对误差/%	一级结构
AP	2961.5			SSGVSLTNSNKDEEQRELLKAISNLLD
	2314.93	2315.22	0.012	LLTNSNKDEEQRELLKAISNL
	2645.33	2645.36	0.001	SGVSLTNSNKDEEQRELLKAISNL
	2330.94	4661.36	0.011	SGVSLTNSNKDEEQRELLKAI
		(二聚体)		
CP1	1314.4			FSGLMSEGSLSLEA
	909.96	907.38 + 2H <sup>+</sup>	0.063	MSEGSLSLEA

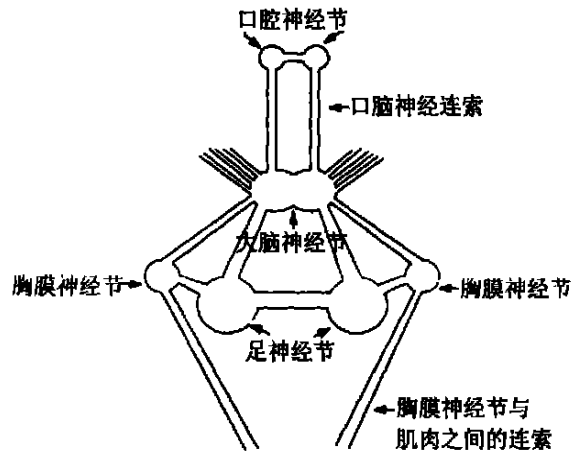


图 1 蓝斑背肛海兔中枢神经系统示意图

Fig. 1 Sketch map of central nervous system from the NCLS

图 1 是 NCLS 中枢神经系统示意图. 从图 1 可看出, NCLS 中枢神经系统中缺乏 AG, 只有两条连索分别由 PLG 连接到腹部肌肉, 这一点与其他海兔的中枢神经系统结构明显不同, 认为这两条连索可能起到调控腹部生理功能作用, 研究该连索外表层的多肽组成与分布对正确理解 NCLS 中枢神经系统整体调节作用具有重要的科学意义.

## 2.2 PLG 与腹部肌肉之间的神经连索外表层多肽组成与分布

图 2 是 PLG 与腹部肌肉之间的神经连索外表层多肽质谱图. 从图中可分析出, 神经连索外表层至少含有 15 种多肽组成. 经数据库检索和文献资料对比分析, 发现图中质谱峰所对应的  $m/z$  为 907.38、2315.22、2645.36、4661.36 与前人报道的海兔神经节内的 CP1<sup>[8]</sup> 和 AP 酶解产物<sup>[1-5]</sup> 的  $m/z$  相吻合, 其相对误差均小于 0.01%~0.1%. 参考相关的文献资料<sup>[1-5]</sup>, 作者根据图 2 显示的结果, CP1 和

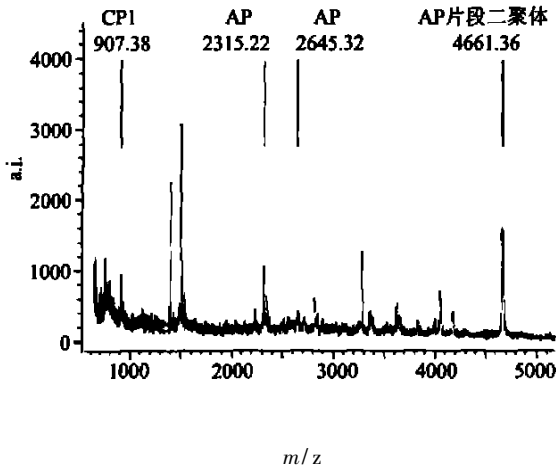


图2 PLG与腹部肌肉的神经连索外表层多肽质谱图  
Fig. 2 The MS map of neural connective between PLG and abdomen muscle

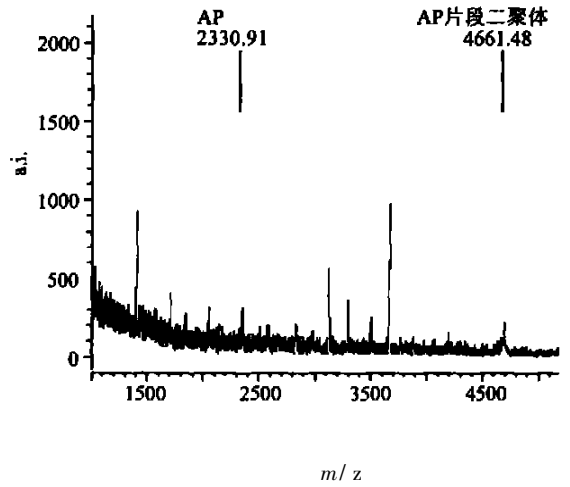


图3 在BG与CG之间,神经连索外表层多肽质谱图  
Fig. 3 Mass spectrogram of the peptide on the surface of neuronal connective between BG and CG

AP一级结构<sup>[4-6]</sup>和Paws软件分析并总结出表1结果.早期的研究已经发现了在海兔的大脑神经节、口腔神经节和囊细胞内存在CP1和AP组份及可酶解AP中Leu+Leu酰氨键的内切酶<sup>[4,8]</sup>,而作者在PLC与腹部肌肉之间的神经连索外表层上却发现了CP1、AP的酶解片段及这些片段的二聚体(表1),未发现CP1和AP组份.这一现象说明了,在神经节内的CP1和AP组份经多肽酶酶切后,其酶解片段分泌到神经连索表层上,并参与神经与肌肉之间的信息传导,替代部分腹神经节的生理功能.

亮氨酸多肽酶另一个重要作用就是清除细胞表面的多肽,阻止多肽与其受体的关联,最终达到终止多肽生理功能的效应<sup>[9]</sup>. Jacques等人在对加州海兔研究后证明了神经细胞内的胞外多肽酶在神经传导方面起着重要作用<sup>[10]</sup>.多肽组成在神经连索外表层的信号传导过程中起着重要的作用.

### 2.3 BG和CG之间神经连索外表层多肽组成与分布

从图2和图3结果可看出,两图的质谱峰峰数

约在12~14之间,多肽的种类和分布情况很相似,但组成有明显差别.按上述的计算和统计方式,可获得表2结果.表2显示了在BG和CG之间,神经连索外表层含有酸性多肽酶解片段和二聚体,但未发现含有AP的Leu+Leu酰氨键断裂的酶解产物,却发现了S-S酰氨键断裂的酶解产物,这一点与表2所显示的结果明显不同.此外,在两种神经连索外表层均含有AP酶解片段的二聚体,由一级结构SGVSLLTSNKDEEQR ELLKAI聚合而成.这种现象说明了,神经连索内的多肽组成,一旦被多肽酶酶解成各种产物,其部分短肽将会分泌到神经节或连索外表层且参与信息传导活动,同时也能借助连索为桥梁进行神经节之间的运输和传递,因而在不同的神经连索之间也能发现相同一级结构和聚合体的多肽组成(表1~2).经大量文献检索后认为相似实验结果和论点均未见详细报道.

目前,大量有关神经多肽组成与结构的研究内容均集中于神经节内,忽略神经节外和连索外表层多肽组成的结构与功能研究.由于神经节和连索外

表2 在BG和CG之间,神经连索外表层的AP酶解产物

Tab.2 The enzymatic segments of AP of connective surface between BG and CG

多肽种类	理论值/ m	测定值/ (m/z)	相对误差/ %	一级结构
AP	2961.5			SSGVSLLTSNKDEEQR ELLKAISNLLD
	2330.94	2330.91	0.012	SGVSLLTSNKDEEQR ELLKAI
	2330.94	4661.48	0.085	SGVSLLTSNKDEEQR ELLKAI
				(二聚体)

表层多肽和蛋白酶含量极微, 需要由极高灵敏度的MALDI-TOF 质谱方能胜任超微量多肽的检测与分析, 这可能与相关的研究报道甚少有着一定的关系。海兔神经节和神经连索内外多肽组成和蛋白酶均能起到重要的生理功能, 并共同参与调控信号传导和行为表达的调控作用。

### 参考文献:

- [1] Floyd P D, Li L J, Moroz T P. et al. Characterization of peptides from *Aplysia* using microbore liquid chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry guided purification[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 830: 105– 113.
- [2] Rubakhin S S, Garden R W, Fuller R R, et al. Measuring the peptides in individual organelles with mass spectrometry[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18: 172– 175.
- [3] Li L, Moroz T P, Garden R W, et al. Mass spectrometric survey of interganglionically transported peptides in *Aplysia*[J]. Peptides, 1998, 19: 1 425– 1 433.
- [4] 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. Neurochemistry, 2002, 82: 1 398– 1 405.
- [5] 黄河清. MALDI-TOF 质谱技术研究加洲海兔口腔神经节 Leu-Leu 多肽酶[J]. 分析仪器, 2004, 139( 1) : 23– 26.
- [6] 黄河清, 孔波, 林庆梅, 等. MALDI-TOF 质谱技术研究铁蛋白表层的电荷分布[J]. 生物物理学报, 2002, 18(1): 89– 103.
- [7] 黄河清, Kim Wonsunk, Miao Hai. MALDI-TOF 质谱技术研究多肽一级结构[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23: 79– 84.
- [8] Gregg A, Philip E L. Purification, primary structure, and neuronal localization of cerebral peptide 1 from *Aplysia*[J]. Peptides, 1996, 17: 753– 761.
- [9] Shailaja J, Xuemo F, Gregg T, et al. Characterization of *Aplysia californica* carboxy peptidase E[J]. FEBS Letters, 1997, 408: 195– 200.
- [10] Jacques P Z, Louise W, Wafa B, et al. Cloning and characterization of *Aplysia* neutral endopeptidase, a metallo-endopeptidase involved in the extracellular metabolism of neuropeptides in *Aplysia californica*[J]. The Journal of Neuroscience, 1999, 19( 11) : 4 280– 4 292.

## Study on Ultra Micro-dose Peptides Composition on the Surface of Nervous Connective from *Notarcus leachii cirrosus* Stimpson

WU Han-zhi, HUANG He-qing<sup>\*</sup>, YE Qing-hua, HUANG He-ning<sup>\*\*</sup>

(School of Life Sciences, The Key Lab. for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The central nervous system from the *Notarcus leachii cirrosus* Stimpson (NLCS) lacked its abdominal ganglion. MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization/ time of flight) mass spectrometry was selected to study the ultra micro-peptides compositions and distribution on the surface of central nervous connective from the NLCS, which were found to have enzymolytic produces of acidic peptide and other peptide compositions abundantly. There are discrepancy of the peptide compositions and distribution somewhat on the surface of central nervous connective from the different NLCS. It was suggested that these peptides take part in signal transduction of central nervous system and the plasticity of behavior. In addition, the same primary structure and polymer of peptides are found in different nervous connective. These compositions in different structure excrete to the surface of ganglion and nervous connective, participate in signal transduction and behave the same physiological function.

**Key words:** *Aplysia*; nervous connective; neuro-peptide; mass spectrometry