

甲壳动物促雄性腺激素研究进展

Advances in the studies of crustacean androgenic gland hormone

郭东晖, 李少菁, 林元烧

(厦门大学 海洋与环境学院, 亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005)

中图分类号: Q492

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2006) 11-0088-05

1947年 Cronin^[1]首次报道了软甲亚纲雄蓝蟹 (*Callinectes sapidus*) 具有促雄性腺 (Androgenic gland, AG), 直至 1954年 Charniaux-Cotton^[2]才第一次阐明促雄性腺在端足类跳沟虾 (*Orchestia gammarella*) 的功能, 促雄性腺可以控制雄性生殖系统的分化。半世纪的研究, 在甲壳动物促雄性腺的形态结构、发生和发育以及神经内分泌调控的方面取得了很大的进展^[3,4]。

长期以来, 由于实验手段的局限性, 研究人员主要通过传统的生理学实验如促雄性腺的切除或移植, 注射组织提取物等研究促雄性腺的功能, 但关于促雄性腺分泌的激素 (Androgenic gland hormone, AGH) 的化学性质却存在着争议。近年来, 随着反相高效液相色谱、气相色谱、质谱等化学分析方法的发展, 以及 PCR、基因克隆、重组等分子生物学方法的普遍采用, AGH 的相关报道日益增加, 作者就该领域的研究现状做一综述。

1 AGH

1.1 AGH 的化学性质

有学者认为 AGH 是类脂化合物, Berreur-Bonnenfant 等^[5]从普通滨蟹 (*Carcinus maenas*) 促雄性腺中提取的脂类化合物能够抑制跳沟虾 (*Orchestia gammarella*) 雌体卵黄发生; 随后 Férézou 等^[6]通过气相色谱-质谱鉴定出促雄性腺中脂类物质主要成分是类萜化合物法呢基丙酮 (farnesylacetone) 和六氢法呢基丙酮 (hexahydrofarnesylacetone)。体外培养普通滨蟹的雄性腺, 发现其组织能渗入乙酸或甲羟戊酸形成法呢基丙酮。这些类萜化合物能够抑制体外培

养的卵巢吸收同位素标记的亮氨酸和尿嘧啶, 虽然这两种类萜化合物对卵巢具有抑制作用, 但明显无法促使雄性化的产生^[6,7]。

与之相反, 更多研究支持 AGH 是蛋白质类化合物的观点。Katakura 等^[8]从等足类寻常球鼠妇 (*Armadillidium vulgare*) 促雄性腺中分离出一种蛋白质, 相对分子质量约为 16 000, 能促使雌性球鼠妇第一对步足雄性化。随后的研究表明, 该蛋白质不仅能促使外部特征发生雄性化转变, 而且能促使雌性个体形成精巢、贮精囊和输精管^[9]。Juchault 等^[10,11]从雌雄间体的寻常球鼠妇中提取到具水溶性、可透析、热稳定的蛋白质成分, 相对分子质量介于 1 200~8 000, 能够促使雌体雄性化, 出现雄性第二性征。Hasegawa 等^[12]用生化分析方法进一步证明了促雄性腺激素的蛋白质性质。他们从促雄性腺中提取的蛋白质化合物能使雌性球鼠妇雄性化, 而提取的类脂和固醇类物质, 则不能使雌体雄性化, 同时也证明法呢基丙酮只是一种卵巢抑制素, 并不能使卵巢转变成精巢。他们研究发现促雄性腺激素包括两种单极显性蛋白: AGH I 和 AGH II, 由 157 和 166 个氨基酸组成, 相对分子质量分别为 17 000 和 18 300, 较 Juchault 等^[10]测得的相对分子质量 (1 200~8 000) 要大。Martin 等^[13]也得到类似的结果, 但在氨基酸组成上有所不同。十足目中罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 促雄性腺中

收稿日期: 2003-09-22; 修回日期: 2003-12-18

基金项目: 福建省重中之重项目

作者简介: 郭东晖 (1973-), 福建厦门人, 讲师, 博士, 主要从事海洋浮游动物学研究, 电话: 0592-2188471, E-mail: guodh@jingxian.xmu.edu.cn

也分离到相对分子质量为 17 480 的类似物^[14,15]。通过抗 AGH 血清杂交实验显示, AGH 可能是由一相对分子质量更大、无生物活性的蛋白质前体转变而来的^[13,16]。Okuno 等^[17]利用反相高效液相色谱从寻常球鼠妇促雄性腺中分离出相对分子质量约为 11 000 ~ 13 000 的具双硫键的热稳定蛋白, 38 pg 即具促雄性活性。

1.2 AGH 的结构

Martin 等^[18]首次阐明了寻常球鼠妇 AGH 的结构, 它由 A 及 B 两条肽链组成, 前者为 29 肽, 后者为 44 肽, 链间通过两个二硫键相连, A 链和 B 链自身各还有一个二硫键, A 链 Asn¹⁸ 通过-N-糖苷键与一寡糖链相连, 寡糖链组成的不同形成不同分子质量的 AGH₁ 和 AGH₂。随后 Okuno 等^[19]的研究明确了 A 链 Cys⁹ 与 Cys¹⁷, B 链 Cys²¹ 和 Cys³⁸ 形成二硫键, A, B 链之间通过 A 链 Cys²⁶ 和 B 链 Cys²³ 以及 A 链 Cys⁸

和 B 链 Cys¹² 形成双二硫键(图 1, 仿 Okuno 等^[20]; 沈同和王镜岩^[21]); 还原羧甲基化可以使 AGH 失去活性, 表明二硫键的排列可影响 AGH 的活性^[17]。AGH 上寡糖链经气相色谱-质谱分析, 其主要成分为 N-乙酰葡萄糖胺、甘露糖和岩藻糖^[18]。杆状病毒中介的重组 AGH 其糖基结构为 (Man)₂ (GlcNAc)₂ Fuc 或 (Man)₃ (GlcNAc)₂ Fuc (图 1), 无寡糖链的 *Escherichia coli* 中介的重组 AGH (*E. coli*-rAGH) 与杆状病毒中介的重组 AGH (*Bac*-rAGH) 活性实验表明, 寡糖链对 AGH 活性的保持是必须的^[19], AGH 蛋白糖基化可能在激素分泌过程中起着稳定作用, 也可能起着生物识别位点的功能^[18]。然而也有组织学研究表明日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 和中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 促雄性腺分泌物不含多糖^[22,23]。

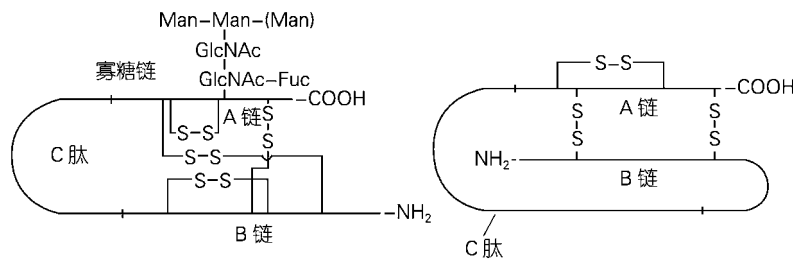


图 1 寻常球鼠妇 AGH 前体和胰岛素原结构示意图

同时 Martin 等^[18]还发现寻常球鼠妇促雄性腺中存在着分子质量比 AGH 更大的前体。AGH 前体结构上与胰岛素原相似, 由 A 链、B 链和 C 肽组成, C 肽为连接肽(含 45 ~ 46 个氨基酸), C 肽与 A 链、B 链通过典型的蛋白切点序列 (R-X-K/R-R) 连接^[20,24]; 而猪胰岛素原则由 A 链(21 肽)、B 链(30 肽)和 C 肽(29 肽)构成(图 1)。Okuno 等^[20]根据寻常球鼠妇编码 AGH 的 cDNA 基因分析表明, 在 AGH 前体 N 端延伸出一段以 Met 领先并富于疏水性氨基酸残基的 21 肽顺序, 即所谓的“信号肽”顺序, 其切点为 Ala 肽键(图 2)。按 Blobel 和 Sabatini 提出的“信号肽假设”^[25], 在核糖体上转译 AGH 蛋白质过程中, 信号肽可与内质网膜上受体识别与结合, 从而引导新生的多肽链进入内质网腔, 待肽链进入腔后即被信号肽酶切去, 切除信号肽的前体被运输至高尔基体, 贮存在储

存颗粒内, 在经特殊的蛋白质水解酶作用, 产生具有活性的 AGH 和 C 肽。

Ohira 等^[24]报道了糙皮鼠妇 (*Porcellio scaber*) 和 *Porcellio dilatatus* AGH 前体的氨基酸序列, 结果表明二者与寻常球鼠妇 AGH A 链和 B 链序列相似性高达 75% ~ 82%, 反映出 AGH 序列的保守性; 而 C 肽相似性则低于 44%, 甚至小于信号肽的序列相似性 (48% ~ 55%), 提示 C 肽或许并不具有特殊的激素功能(图 2, 引自 Ohira 等^[24])。无论是否具有寡糖链, 重组 AGH 前体均不具有 AGH 活性^[19], 提示着 AGH 前体与胰岛素原一样, 需要经过转录后加工过程, 即切除信号肽, 形成二硫键, 最后切除 C 肽或部分 C 肽。

2 AGH 的基因

Okuno 等^[20]根据 AGH 的部分氨基酸序列设计出

引物,通过反转录 PCR 扩增出编码 AGH 的 cDNA。性腺 mRNA 杂交,不与肝胰腺、贮精囊 + 输精管、同时 Northern 杂交实验表明,该 cDNA 探针仅与促雄精巢、脂肪体、中肠或卵巢 mRNA 杂交。随后,Ohira

	┌	信号肽	└	B 链		
Pos-AGH	1:MKGLLFIVSL	LCLTLHQRVW	AYQVIGMKSD	VICADIRFTV	HCICNELGLF	PTSRLSKPCP:60
Pod-AGH	1:MKGLLFIISL	LFLTLHQRVW	AYQVEGMKSD	VICADIRFTV	HCICNELGRF	PTARLTKPCP:60
Arv-AGH	1:MKGLVILVSL	MCLALYNRIC	AYQVRGMRSD	VLCGDIRFTV	QCICNELGYF	PTERLDKPCP:60
				C 肽		
	┌	┌		S_PPAKNGD	ERLEDEVSFH	SRSKPDIAFH:119
	61:WPNRGRRSAD	DEDYLFEED	DDEFFHPRAL	SRPTAAKYDD	EILEDEVSFH	SRTKRDI AFH:120
	61:WPNRERRSTD	DEDYLFEED	DDEFFHPRAL	SI PSEI EHDN	EKESDAFSIL	SRGKREIAFY:120
	61:WPNREKRSAP	EDELAFEDYE	DQDYFHPRAL			
	****			****		
		A 链				
	120:EECCNIRTEH	KCNKTTVELY	CRRYTR:145			
	121:EECCNIRTEH	KCNRTTVELY	CRRYSP:146			
	121:QECCNIRTEH	KCNRTTVSLY	ORTY--:144			
		+++				

图 2 寻常球鼠妇、糙皮鼠妇和 *P. dilatatus* AGH 前体一级结构的比较

Arv-AGH:寻常球鼠妇 AGH 前体; Pos-AGH:糙皮鼠妇 AGH 前体; Pod-AGH: *P. dilatatus* AGH 前体; *:蛋白切点序列; +:糖基化序列

等^[24]采用相同的办法,在糙皮鼠妇和 *P. dilatatus* 中也扩增出 672 bp 的 AGH 前体 cDNA 基因,该基因由 5'-非转译区(67~68 bp)、开放阅读框(435 或 438 bp)、终止子(TGA)和 3'-非转译区(166 或 164 bp)组成;在 3'-非转译区 Poly(A)上游 15bp 处存在一保守的聚腺苷酸信号(AATAAA)(图 3,引自 Ohira 等^[24])

1	GCTTCACCTATTCTCCACCACAAGGCTCCACGAGAAGAAACAAAAGTTTCTTAATAAAATTACACAAAATGAAAGGTCTCCTCTTCATAG	90
-21		M K G L L F I -15
90	TTAGCCTGCCTCTGCTTGACCCCTCCACCAGCGTGATGGGCCTACCAGGTAATAGGTATGAAATCGGATGTCATATGTCGGACATTAGGT	180
-14	V S L L C L T L H Q R V W A	Y Q V I G M K S D V I C A D I R 16
	信号肽	
181	TTACTGTGCATTGTATATGCAACGAATTAGGACTTTCCCTACGTCGAGACTTTTGAAGCCTTGCCCATGACCTAACAGGGGAAGAAGAT	270
17	F T V H C I C N E L G L F P T S R L S K P C P W P N R G	R R 46
	B 链	酶切位点
271	CTGCTGATGATGAAGATTATCTATTTGAAGAAGATGAAGACGATGAATTTTCCATCCTCGAGCCCTCAGTCCCTGCGGCTAAAAATG	360
47	S A D D E D Y L F E E D E D E F F H P R A L S P P A A K N	76
	C 肽	
361	GTGATGAGAGATTAGAAGATGAAGTTCTTTTCATAGTCGCTCGAACCGTGACATCGCCTCCACGAAGAATGTTGCAACATCGAACCG	450
77	G D E R L E D E V S F H S R S	K R D I A F H E E C C N I R T 106
	酶切位点	
451	AACATAATGCAATAAAAACAAGTGAAGTCTATTGTCGAAGATACACAGTTGAAATGGTATTAATTATGAAGACTTTTTGGCAGGAA	540
107	E H K C	N K T T V E L Y C R R Y T R * 124
	糖基化位点	A 链 终止子
541	TTTCGGAAGTCATAATCTCTTTGTTAGAACAAAATGGAATTATTTTTTATCTCTTTTCAAATAAGTTTGAAAATTGTCATTGTT	630
631	CAAACATCAAAAATTTGTTATCAATAAATAATCTTGAAGCTT(An)	672

图 3 编码糙皮鼠妇 AGH 前体的 cDNA 序列及由此推测的氨基酸序列

目前,Genbank 上 AGH 的基因序列有 4 条[AB029615 (626 bp):寻常球鼠妇,Okuno 等,1999;AB089811

(672 bp) : *P. dilatatus* ; AB089810 (672 bp) : 糙皮鼠妇, Ohira 等, 2003 ; AY169973 (639 bp) : 糙皮鼠妇, Greve 等, 未发表]。

3 AGH 基因的表达

Okuno 等^[26]最早构建含 AGH 基因的重组质粒, 并转化到 *E.coli* 中表达, *E.coli*-rAGH 产量为 3 mg/L, 重组 AGH 不具有寡糖链。利用杆状病毒载体将 AGH cDNA 转入草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞 Sf9 中表达, 其 Bac-rAGH 产量为 5 μg/mL, 重组 AGH 具有-N-糖肽键相连的寡糖链 (图 1)^[19]。上述两种重组 AGH 均不具活性, 通过赖氨酸肽链内切酶酶解, HPLC 纯化, 只有 Bac-rAGH 酶切片段 Sf-2 具有 AGH 活性, 高剂量 (25 ng) 可使寻常球鼠妇雌性雄性化, 超过正常的 AGH 剂量 (38 pg) 几个数量级。序列分析表明 Sf2 由 C 端具 Lys 残基的 B 链和带一部分 C 肽 (11 个残基) 的 A 链组成, C 肽的存在可能降低了其 AGH 活性。

4 展望

AGH 在甲壳动物性别分化和控制中起着重要的作用, 与哺乳动物类固醇性激素不同, 它属于蛋白质, 说明甲壳动物性别决定机制在动物进化中处于特殊的地位。AGH 氨基酸序列及其部分二级结构的报道, 将促进对其受体、作用方式、生物合成、分泌规律以及代谢途径等的研究, 为进一步探讨甲壳动物性别决定机制提供了新的研究途径。

由于 AGH 在结构与胰岛素相似, 可借鉴胰岛素的给药方式, 将其制成复盐或以高分子作为载体并加入保护剂和促吸收剂的微囊、微球或脂质体等饵料添加剂^[27]。然而, 甲壳动物促雄性腺中 AGH 含量少, 直接分离步骤繁琐, 难于应用到生产实践中。Okuno 等^[19]成功地通过杆状病毒将 AGH cDNA 基因导入昆虫细胞中, 并通过酶切水解, 得到具 AGH 活性的重组 AGH。因此, 应用基因工程大规模生产重组 AGH 蛋白在甲壳动物单性化养殖中具有广阔的应用前景。

必须指出的是, 以往的促雄性腺研究多在同种生物中进行, 但寻常球鼠妇与糙皮鼠妇、*P. dilatatus* 间的促雄性腺移植表明, 两种鼠妇的促雄性腺可以使寻常球鼠妇部分雄性化, 而寻常球鼠妇促雄性腺却不能促使上述两种鼠妇雄性化^[28], 因此需要考虑 AGH 活性的种特异性。

参考文献 :

- [1] Cronin L E. Anatomy and histology of the male reproduction system of *Callinectes aspidus* Rathbun[J]. *J Morphol*, 1947, 81: 209-239.
- [2] Charniaux-Cotton H. Découverte chez un Crustacé amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires males[J]. *C R Acad Sci Paris*, 1954, 239: 780-782.
- [3] 吴萍, 楼允东, 邱高峰. 甲壳动物雄性腺研究的进展[J]. 水产学报, 1999, 23(1): 77-83.
- [4] 叶海辉, 李少菁, 王桂忠. 十足目甲壳动物促雄性腺研究概述[J]. 动物学研究, 2001, 36(1): 43-47.
- [5] Berreur-Bonnenfant J, Meusy J J, Férézou J P, et al. Recherches sur la sécrétion de la glande androgène des crustacés malacostracés : purification d'une substance à activité androgène[J]. *C R Acad Sci Paris.*, 1973, 277: 971-974.
- [6] Férézou J P, Berreur-Bonnenfant J, Meusy J J, et al. 6, 10, 14-Trimethylpentadecan-2-one and 6, 10, 14-trimethyl-5-tran, 9-trans, 13 pentadecatrien-2-one from the androgenic glands of the male crab, *Carcinus maenas*[J]. *Experientia*, 1977, 33: 290.
- [7] Berreur-Bonnenfant J, Larwence F. Comparative effect of fanesylacetone on macromolecular synthesis in gonads of crustaceans[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1984, 54: 462-468.
- [8] Katakura Y, Fugimaki Y, Unno K. Partial purification and characterization of androgenic gland hormone from the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*[J]. *Annot Zoop Jpn*, 1975, 48: 203-209.
- [9] Katakura Y, Hasegawa Y. Masculinization of females of the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*, following injections of an active extract of the androgenic gland[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1983, 48: 57-62.
- [10] Juchault P, Maissiat J, Legrand J. Caractérisation chimique d'une substance ayant les effets biologiques de l'hormone androgène chez le Crustacé Isopode terrestre *Armadillidium vulgare* Latreille[J]. *C R Acad Sci Paris*, 1978, 286: 73-76.
- [11] Juchault P, Legrand J J, Maissait J. Present state of knowledge on the chemical nature of the androgenic hormone in higher crustaceans [A]. Hoffmann J, Porchet M.

- Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrates Hormones [C]. Berlin: Springer-Verlag, 1984. 155-160.
- [12] Hasegawa Y, Haino-Fukushima K, Katakura Y. Isolation and properties of androgenic gland hormone from the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*[J]. **Gen Comp Endocrinol**, 1987, 67: 101-110.
- [13] Martin G, Juchault P, Sorokine O, *et al*. Purification and characterization of androgenic hormone from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea) [J]. **Gen Comp Endocrinol**, 1990, 80: 349-354.
- [14] 颜金莲, 张菁, 陆仁厚, 等. 高效液相色谱法分离制备十足目甲壳动物 AGH 蛋白的研究[J]. 武汉大学学报, 1998, 44(6): 725-728.
- [15] 张银华, 徐盈, 张菁, 等. 罗氏沼虾中等足目 AGH 类似物的分离与鉴定[J]. 水生生物学报, 2000, 24(2): 167-171.
- [16] Hasegawa Y, Haino-Fukushima K, Katakura Y. An immunoassay for the androgenic gland hormone of the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*[J]. **Invert Reprod Develop**, 1991, 20: 59-66.
- [17] Okuno A, Hasegawa Y, Nagasawa H. Purification and properties of androgenic gland hormone from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*[J]. **Zool Sci**, 1997, 14: 837-842.
- [18] Martin G, Sorokine O, Moniatte M *et al*. The structure of a glycosylated protein hormone responsible for sex determination in the isopod, *Armadillidium vulgare*[J]. **Eur J Biochem**, 1999, 262: 727-736.
- [19] Okuno A, Hasegawa Y, Nishiyama M, *et al*. Preparation of an active recombinant peptide of crustacean androgenic gland hormone[J]. **Peptides**, 2002, 23: 567-576.
- [20] Okuno A, Hasegawa Y, Ohira T, *et al*. Characterization and cDNA cloning of androgenic gland hormone of the *Armadillidium vulgare*[J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 1999, 264: 419-423.
- [21] 沈同, 王镜岩. 生物化学(上册, 第二版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990. 135.
- [22] 吴萍, 杨立荣, 崇加荣, 等. 日本沼虾促雄腺的研究[J]. 水利渔业, 2002, 22(5): 21-23.
- [23] 邱高峰, 吴萍, 楼允东. 中华绒螯蟹促雄腺的结构与功能[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 108-112.
- [24] Ohira T, Hasegawa Y, Tominaga S, *et al*. Molecular cloning and expression analysis of cDNAs encoding androgenic gland hormone precursors from two Porcellionidae species, *Porcellio scaber* and *P. dilatatus*[J]. **Zool Sci**, 2003, 20: 75-81.
- [25] 薛岳亭. 生物活性肽——结构与功能[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 198-222.
- [26] Okuno A, Hasegawa Y, Ohira T, *et al*. Immunological identification of crustacean androgenic gland hormone, a glycopeptide[J]. **Peptides**, 2001, 22: 175-181.
- [27] 王思玲, 苏德森, 顾学裘. 口服胰岛素制剂的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(2): 143-146.
- [28] Martin G, Juchault P. Androgenic hormone specificity in terrestrial isopod (Onicidea): Systematic involvements[J]. **J Crustacean Biol**, 1999, 19: 684-689.

(本文编辑: 刘珊珊)