

质谱技术在神经多肽酶结构与功能研究中的应用

陆永进, 黄河清, 朱金勇

(厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 分子神经科学是本世纪生命科学中最具挑战性和前瞻性学科之一。信号传导与催化多肽的神经多肽酶有着密切的联系。本文以海兔等软体动物为素材, 综述近年来采用质谱和高效液相色谱技术研究中枢神经系统多肽酶结构与功能的进展。

关键词: 质谱; 高效液相色谱; 海兔; 多肽酶

中图分类号: O657. 63; Q556. 3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004- 4957(2004) 03- 0128- 04

Progress in the Study of the Structure and Function of Nerval Peptidase Using Mass Spectrometry

LU Yong_jin, HUANG He_qing, ZHU Jin_yong

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Molecular neurology is one of the most challenging frontiers in life science in this century. The signal conduction is closely related to the nerve peptidase that catalyzes the metabolism of peptide. In this review, we described the recent development of mass spectrometry techniques for the study of peptidase structure and function in the central nerve system of *Aplysia* and other mollusks.

Key words: Mass spectrometry; HPLC; *Aplysia*; Peptidase

近年来, 越来越多的科学研究发现动物表现的可塑性和行为反应与神经细胞活跃活动有关, 而这一现象又与神经系统中的多肽酶催化多肽有着更深一层的联系。这一论点和现象促使神经系统多肽酶结构与功能研究深入开展, 并逐渐成为分子神经生物学的研究热点之一。哺乳动物包括人类的中枢神经系统不仅结构相当复杂, 而且对参与神经活动的蛋白质和多肽组成和功能了解甚少, 这使得拓展动物分子神经学研究工作范围和深度难度很大。近十几年来, 在分子神经科学研究领域中, 最为热点的研究是软体动物中枢神经系统结构与功能, 许多突破性研究成果均取材于软体动物, 尤其是美国加州海兔(*Aplysia californica*)。软体动物中枢神经较为简单, 其神经节大约由 20 000 个神经细胞组成。由于许多神经细胞相对较大, 直径可达 1 000 μm 以上^[1], 借助普通显微镜技术就可以直接分离出神经细胞和多肽簇, 并很容易从形态、位置和简单生化分析技术给予识别和固定^[2], 使对蛋白酶和多肽结构研究简单化, 使各类软体动物神经细胞及多肽簇的生化特性、分子生物学和行为神经学研究更为方便和快捷。

中枢神经活动受各神经节内的多肽和蛋白酶的调控, 部分活性多肽是由多肽原经多肽酶分解而成, 即多肽酶起到限制和调控生理活动的重要作用。不少活性肽是以前体形式合成^[3, 4], 需要多肽酶加工后才形成有活性的多肽; 如加州海兔(*Aplysia californica*)腹神经节中的 α 袋细胞多肽(α bag cell peptide, BCP) 被多肽酶酶解后, 形成了生物活性更强的 $\alpha 1_8$ 和 $\alpha 1_7$ 的多肽^[5]。多肽在起着信使作用时, 其过程通常被分为 3 个阶段^[6]: (1) 多肽由某一种特定的细胞合成且被释放; (2) 多肽与靶细胞表面的接受器相互作用; (3) 多肽被降解, 并停止执行功能。一般认为, 多肽酶降解多肽是神经肽失活的一种机制^[7- 10]。由于软体动物和哺乳动物神经多肽酶在结构上有一定的相似性, 因而选择前者神经系统为多肽酶研究素材, 无论对生物演化的研究, 还是对神经系统的信号传递及生理机能的调控研究均有十分重要的科学意义。

收稿日期: 2003- 06- 03; 修回日期: 2004- 03- 05

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

作者简介: 陆永进(1978-), 男, 江苏江阴人, 硕士研究生; 黄河清, 联系人。

近年来,在软体动物中枢神经方面,多肽内切酶、羧肽酶和氨酰化酶的结构与功能研究较为频繁。这类酶共同特点是:(1)酶源:由于软体动物中枢神经组织量少,获取多肽酶量困难;(2)酶活性:这类酶作用的底物均为多肽,定量分析多肽有一定难度,况且受酶源限制,如采用常规多肽产物分析技术,难于快速准确地分析酶活性;(3)酶的纯度:由于获取酶量困难,难于采用常规的蛋白质分离纯化系统和电泳技术获取电泳纯酶蛋白,进一步开展酶蛋白结构与功能研究。随着分离与检测技术的快速发展,质谱仪和多元高效液相色谱分离(HPLC)技术已经逐渐发展成为研究中枢神经系统蛋白组、多肽库和超微量多肽酶的分析工具。前者具有高灵敏度(fmol)和高分辨率(相对误差限于 5×10^{-6})特点,而后者配置高效分离色谱柱(C_{18} 柱)和多种检测器,如两者联用,即能快速高灵敏度地检测各种超微量多肽酶的结构与功能等理化参数。

1 质谱仪特点与应用

近十年来,随着质谱仪接口、软离子源和离子检测器的改进和发展,使质谱仪相对分子质量测定范围由原来局限于数百拓宽到几十万,甚至到更高,几乎涵盖了自然界生物体中的绝大多数蛋白质的相对分子质量。这一项分析技术革新,使生命科学研究领域中呈现出一门新兴的蛋白质组学,其分析技术不但弥补现有基因组技术的许多不足之处,而且为后基因组的研究奠定良好的研究基础和拓宽研究范围。常见的软离子源有电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)^[11]和基质辅助激光解吸电离(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)^[12],适用分析范围扩展到多肽、蛋白质、核酸、络合物及其他多聚体。MALDI质谱与其它质谱技术相比,其优势在于进样分析前,样品预处理步骤简单,适合分析混合样品,并能耐受较高浓度的缓冲溶液、盐和其它非挥发性等组分。最新型的MALDI-TOF质谱仪的检测灵敏度可高达fmol(10^{-15} mol),误差小于 5×10^{-6} (w)和质量范围可高达400 ku以上,因而非常适合快速、高灵敏和高通量测定各种生物大分子的结构信息。具有MS-MS功能的液质联用仪可以做到在第一次电喷雾质谱检测之后对所感兴趣的多肽离子进行碰撞裂解进一步作MS分析,推导多肽全序列。并且测定时所需样品量少,只需10~100 nmol的多肽样品^[13]。如毛细管柱高效液相色谱技术和软离子电离质谱技术进一步结合,使得微量生物大分子的分离与测定成为可能。它们特别适用于(1)复杂环境中的物质变化;(2)产物缺乏合适的发色或荧光基团;(3)微弱的活性检测;(4)大批量样品的检测^[14]。

2 神经多肽酶的质谱分析

2.1 底物多肽的质谱分析

软体动物中枢神经系统中含有丰富的多肽酶和多肽种类。多肽形成且参与信息传导过程是先由合成细胞合成,分泌在细胞的外表面,然后运送到靶细胞,被其表面的感受器所感应,之后由多肽酶降解。Kamatani^[15]等在鉴定位于墨鱼(*Procambarus darkii*)大脑中的Orcokinin基因相关多肽时采用MALDI-TOF质谱技术直接分析墨鱼大脑切片,然后用HPLC和MS-MS联用进一步确证结论。传统的多肽检测通常需要组织匀浆、分离纯化和浓缩,这样往往因为细胞内的多肽酶释放出来而使细胞表面的多肽发生降解^[16]。MALDI-TOF质谱技术可以直接检测细胞或组织块中的多肽及多肽分解产物,从中直接获得有关多肽酶存在可能性和催化多肽的活性等信息,随后由研究者取舍后再对所感兴趣的多肽进行分离与确证。Philip D. Floyd^[2]等人采用MALDI质谱技术在研究海兔神经连索的多肽组成过程中,发现两种新的多肽质谱峰,随后经高效液相色谱(HPLC)分离和质谱鉴定这两种多肽存在的可能性。Garden^[5]等人用MALDI-TOF直接检测海兔腹神经节的袋细胞表面多肽,发现多肽内切酶酶解产卵激素(egg-laying hormone, EIH)和酸性多肽(acidic peptide, AP)两种多肽一级结构中Leu-Leu位点,形成带有Leu-位点的分解产物。Li等人^[17]在研究椎实螺(*Lymnaea*)的单个神经元多肽分布过程中,不但发现了一系列产卵激素原(egg-laying prohormone)的分解产物,而且还鉴别了两种新肽。

2.2 HPLC和质谱联用技术检测多肽酶活性

通常认为多肽的相对分子质量小于10 000 u,如选用中压电泳和柱层析技术均难于对复杂多肽

组分进行分离与检测。为了解决这个问题, Eriksson 把免疫技术与 HPLC 结合为一体, 企图提高检测灵敏度。尽管放射免疫技术易于使用, 但是有它的局限性, 具体如下: 首先, 当待测定物质结构相似时, 会发生交叉反应, 产生假阳性; 其次, 测定结果不能真实反映出多肽结构^[18]。而质谱技术不仅具有快速灵敏的特点, 而且能对酶活性进行定性分析, 从中推算多肽结构和酶切位点。虽然质谱技术在定量分析方面还存在许多缺陷, 但是一旦它与 HPLC 联用时, 不仅可实现混合多肽分离, 而且可以对多肽组分逐个进行定量分析, 是一项实用性很强的微量酶分离与活性分析技术。

Hummon^[19] 等人用 MALDI-TOF MS 技术分析口腔神经节内多肽酶的生物活性时, 发现该神经节中含有 1 种亮氨酸-亮氨酸(L-L) 多肽酶, 并能酶解 AP 中 L-L 酰氨键成为带 Leu- 位点的酶解产物。进而言之, 如选择适当多肽底物为探针, 同样可用质谱技术探讨神经节中各种超微量多肽酶存在的可能性。采用 HPLC 和四级杆飞行时间质谱(quadrapole time-of-flight mass spectrometry, Q-TOF MS) 联用就可以同时做到酶解反应产物的定性和定量, 并且实现在线检测。也可以先用 HPLC 分离再用 MALDI-TOF 质谱离线检测^[20]。

Laurent^[21] 等人在研究软体动物紫贻贝(*Mytilus edulis*) 的血管紧张肽(angiotensin) 转化酶过程中, 利用中性多肽酶(neutral endopeptidase, NEP) 和血管紧张肽转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE) 具有不同的特异性抑制这一特点, 分别在酶反应体系中分别加入高浓度的磷阿米酮(phosphoramidon) 和(S)-1-(3-巯基-2-甲基-1-氧代丙基)-L-脯氨酸(captopril) 两种抑制剂, 来区分这种酶究竟属于 NEP 类还是 ACE。Isaac^[22] 等人采用 HPLC 和 MALDI-TOF 质谱技术检测在不同种类多肽酶抑制剂存在, 昆虫神经多肽酶解速激肽类似多肽(tachykinin-related peptide, TRP) 过程, 并从抑制剂的加入和产物形成的对应关系, 判断多肽酶参与催化 TRP 的反应。在昆虫神经多肽酶的研究方面, 类似软体动物中枢神经多肽酶, 均存在分离与获取一定量多肽酶用于酶结构与功能研究的困难。目前, 一种新颖循环制备型 HPLC 可富集微量蛋白酶的同时, 进行纯化一定量目标蛋白, 以满足酶蛋白结构与功能研究。

2.3 其他多肽酶的质谱分析

质谱技术也渗透于酶与抑制剂以及酶与金属离子结合的研究领域中。早在 1995 年 Castellano^[23] 等人应用 ESI-MS 方法, 研究不同 pH 条件下 matrilysin(一种基质金属蛋白酶) 与 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 的结合状况, 同时利用 ESI-MS 方法检测到抑制剂(RS39066, $C_{2}H_{33}N_{3}O_{5}$) 与酶的结合位点。此外, Loo 等^[24] 也采用 ESI-MS 的方法研究 HIV-1 蛋白酶与它的一种抑制剂——胃蛋白酶抑制剂 A 在不同 pH 条件下的结合状况, 他们在 pH 4.7~6.9 的范围内检测到了 HIV-1 蛋白酶二聚体和胃蛋白酶抑制剂 A 形成的三元非共价键复合物。实验结果表明, 如果将电喷雾中毛细管和反电极之间的电压和锥孔电压控制在适当的范围, 蛋白质非共价键复合物就可能保持稳定, 不会被破坏^[24], 并可以被检测到。上述例子说明, 质谱技术适合于研究多肽酶抑制剂结合特征和它与金属离子结合特点, 这些结果和论点将能很好地阐明软体动物微量神经多肽酶的结构与功能, 并推动其进一步深入研究。

3 小结

根据文献报道, 目前只有 4 种软体动物中枢神经的多肽酶^[6, 25~27] 研究已经深入到了分子生物学水平, 即用基因克隆的方法来研究多肽酶, 其优点是减少微量酶分离纯化步骤。通过对所克隆的基因进行序列分析可推知酶的一级结构和亲疏水区域信息, 如比较其它物种相应酶, 就可推知它的活性区域与特征和物种在同一种多肽酶的保守性和物种的进化地位。由于神经多肽酶的克隆依赖于了解酶的部分序列和其他性质, 在采用分子免疫学研究多肽酶的分布时, 抗体的制作^[6, 27] 离不开对多肽酶 N 端或 C 端序列的信息的了解。因而完成该项研究, 微量分离技术和高灵敏的酶活性检测手段起着重要作用, 此时只有 HPLC 和质谱的联用技术才能胜任这项工作。

早期, 由于受分离和分析技术的限制, 使有关神经多肽酶的研究进展缓慢, 并一直是神经系统多肽介导的刺激信号的传递和肽能途径调控研究的瓶颈。高效液相色谱和质谱技术为微量酶的分离检测提供了强有力的手段, 因而有理由深信, 随着这两项高新技术介入酶学研究领域, 必将推动

神经多肽酶结构和功能的深入研究, 并获得更多更好的研究成果。

参考文献:

- [1] KANDEL E R. [R]. *Bioscience Report*, 2001, 21(5): 565– 611.
- [2] FLOYD P D, LI L J, MOROZ T P, *et al.* [J]. *J Chromatogr, A*, 1999, 830(1): 105– 113.
- [3] ANGERS A, ZAPPULLA J P, ZOLLINGER M, *et al.* [J]. *Comp Biochem Phys B*, 2000, 126(3): 435– 443.
- [4] EIKO I, KYOKO T K, YUKO F, *et al.* [J]. *Biochem Bioph Resw Co*, 2002, 291(5): 1187– 1193.
- [5] GARDEN R W, SHIPPY S A, LI L, *et al.* [J]. *PNAS*, 1998, 95(7): 3972– 3977.
- [6] ZAPPULLA P J, WICKHAM L, BAWAB W, *et al.* [J]. *Neuroscience*, 1999, 19(11): 4280– 4292.
- [7] MCKELVY J F, BLUMBERG S. [J]. *Ann Rev Neuroscience*, 1986, 9(1): 415– 434.
- [8] TURKNER A J. [J]. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 1990, 24(1): 467– 471.
- [9] TURKNER A J, MATSAS R, KENNY A J. [J]. *Biochem Pharmacol*, 1985, 34(9): 1347– 1356.
- [10] SARIA A, HAUSER K F, TRAUIG H H, *et al.* [J]. *Neurosci Lett*, 1997, 234(1): 27– 30.
- [11] FENN J B, MANN M, MENG C K, *et al.* [J]. *Science*, 1989, 246(4926): 64– 71.
- [12] CHAURAND P, LUETZENKIRCHEN F, SPENGLER B. [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1999, 10(2): 91– 103.
- [13] KOILI V S K, ORLANDO R. [J]. *Am Soc Mass Spectrom*, 1995, 6: 234– 241.
- [14] PREISIG C, BYNG G. [J]. *J Mol Catal B_Enzyme*, 2001, 11(4– 6): 733– 741.
- [15] YOSHIMI Y K, AKIKAZU Y. [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2000, 118(1): 161– 172.
- [16] CHIU D T, ZARE R N. [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95(7): 3338– 3340.
- [17] BEN L M van Baar. [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(2): 193– 221.
- [18] ERIKSSON U, ANDREN P E, CAPRIOLI R M, *et al.* [J]. *J Chromatogr, A*, 1996, 743(1): 213– 220.
- [19] HUMMON A B, HUANG H Q, KELLEY W P, *et al.* [J]. *J Neurochem*, 2002, 82(6): 1398– 1405.
- [20] LI Y M, BROSTIEDT P, HJERTEN S, *et al.* [J]. *J Chromatogr, B*, 1995, 664(2): 426– 430.
- [21] LAURENT V, STEFONO G, SAIZCT M. [J]. *Regul Peptides*, 1997, 69(2): 53– 61.
- [22] ISAAC R E, PARKIN E T, KEEN J N, *et al.* [J]. *Peptides*, 2002, 23(4): 725– 733.
- [23] FENG R, CASTELHANO A L, BILLEDEAU R, *et al.* [J]. *Am Soc Mass Spectrom*, 1995, 6(11): 1105– 1111.
- [24] LOO J A, HOLLER T P, FOLTIN S K, *et al.* [J]. *Proteins*, 1998, Suppl 2: 28– 37.
- [25] WICKHAM L, ZAPPULLA J P, DESGROSEILLERS L. [J]. *Com Biochem Physiol- B*, 1999, 124(4): 429– 437.
- [26] FAN X, SPIJKER S, AKALAL D G, *et al.* [J]. *Mol Brain Res*, 2000, 82: 25– 34.
- [27] JUVVADIS, FAN X, NAGLE G T, *et al.* [J]. *E FEBS Lett*, 1997, 408(2): 195– 200.

《分析测试学报》继续入选为化学类核心期刊

经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 《分析测试学报》继续入选化学类核心期刊, 并被编入《中文核心期刊要目总览》2004年版(即第四版)。该书定于2004年7月1日由北京大学出版社出版。