

水母黏蛋白(Qniumucin)的研究进展

冯金华, 刘红英, 贾高旺, 李利, 方雪丹, 王小瑞 (河北农业大学海洋学院, 河北秦皇岛 066003)

摘要 水母黏蛋白 Q-mucin(Qniumucin)是从多种水母中分离的一类新的黏蛋白的总称。与目前所发现的大多数黏蛋白相比,其具有结构更加简单且高度均质、糖链短、应用于人体不容易出现过敏反应等特点,未来在材料、医药等领域有着比较好的开发和应用前景。从 Q-mucin 的制备和结构特征等方面,总结了 Q-mucin 的研究进展,以期水母黏蛋白的进一步研究及其他黏蛋白的研究提供参考。

关键词 水母黏蛋白;重复序列;结构;开发

中图分类号 Q51 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)09-0017-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.09.005



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research Progress of Jellyfish Mucin (Qniumucin)

FENG Jin-hua, LIU Hong-ying, JIA Gao-wang et al (Ocean College of Hebei Agriculture University, Qinhuangdao, Hebei 066003)

Abstract Q-mucin is a new kind of mucin isolated from a variety of jellyfish. Compared with most of the mucins found at present, it has the characteristics of simple structure, high homogeneity, short sugar chain and less allergic reaction when applied to human body. In the future, it has good development and application prospects in materials, medicine and other fields. In terms of the preparation and structural characteristics of Q-mucin, some research progress of Q-mucin were summarized, in order to provide reference for further research of jellyfish mucin and other mucins.

Key words Q-mucin; Repetitive sequence; Structure; Development

黏蛋白特指构成生物黏液凝胶结构的一类大分子($10^5 \sim 10^7$ kDa)糖蛋白,以高度 O-糖基化和含有连续重复肽链序列为特征。黏蛋白的多肽骨架含有空间结构稳定一致的可变数目的重复序列,重复序列通过二硫键首尾相连形成,序列的中间区域含有较多的苏氨酸和丝氨酸,大量的寡糖侧链通过 O-糖肽键与苏氨酸和丝氨酸相连,使主链的中间区域具有很好的亲水性^[1]。通常,糖类占黏蛋白分子总质量 50% 以上。20 世纪 80 年代以来,已发现超过 20 种人类黏蛋白及其他一些动物及植物黏蛋白。研究发现,不同动物黏蛋白之间大的不同点主要在核心肽序列、非黏蛋白区域序列和糖链结构(糖型)。植物黏蛋白如从莲花、秋葵荚、山药中提取的黏蛋白,是由短肽链连接着长的糖链(如半乳糖和甘露聚糖)构成,而哺乳动物黏蛋白不具有这些寡糖链结构。因此将植物黏蛋白应用于人体可引起强抗原反应^[2]。

目前只有很少种类的动物黏蛋白如胃黏蛋白^[3]和下颌唾液黏蛋白^[4-5]被大量生产。胃黏蛋白产品目前仍是一种混合物,除总糖和氨基酸含量外,其他性质还不明确。下颌唾液黏蛋白包括牛、绵羊、猪下颌黏蛋白(BSM、OSM、PSM),具有非常高的均质性以及简单的主链和糖链,氨基酸序列和糖链结构已被检测,其单抗已经生产并用作癌症的标志物^[6]。从海洋生物如海星^[7]、蜗牛^[8]、乌贼^[9]等中虽提取到黏蛋白,但产品量非常有限。化学合成和蛋白质工程手段生产黏蛋白也遇到了一些问题。由于 O-糖基化是细胞系统中大量的酶和组织(如高尔基体)的相互作用形成的,所以黏蛋白立体化学特异性的问题比较难通过化学合成的方法解决。蛋白质工程手段生产黏蛋白虽然可行,但从哺乳动物宿主细胞中

表达和纯化出重组体黏蛋白的研究费用比较昂贵。因此,目前从动物或植物中提取天然黏蛋白仍是大量商业化生产黏蛋白的唯一有效途径^[6]。

海洋生物水母是腔肠动物的典型代表,在海洋中分布广泛,而且种类多、数量大^[10],近些年在很多海域都存在着水母暴发的现象。有研究发现,海洋生物水母中广泛存在一类能够在溶液中形成凝胶的属于黏蛋白家族的聚合物,被称为 qniumucin(Q-mucin)。可能是由于腔肠动物在动物演化上是真正后生动物起点的原因,与其他已发现的黏蛋白相比, Q-mucin 的结构表现出一定原始性和独特性,虽然目前对其研究还比较少,但是不论是从其结构特点考虑还是从其性质和功能考虑, Q-mucin 都有一定的开发应用前景。另外, Q-mucin 在水母中的含量丰富,是一种有着可大量制备潜力的黏蛋白。所以对 Q-mucin 的进一步研究有一定的研究价值和意义。该研究对 Q-mucin 的研究进展进行总结,以期水母黏蛋白的进一步研究及其他黏蛋白的研究提供参考。

1 Q-mucin 的制备

1.1 Q-mucin 的提取及分离 提纯生物黏液中黏蛋白的通用方法为 CsCl 密度梯度离心法,是利用黏液中糖蛋白与蛋白质、糖类及核酸的密度的不同而进行分离的一种方法,已被用于提取多种黏蛋白^[11-13]。

关于 Q-mucin 制备的报道,是以水母整体或者部分组织如生殖腺、伞部或口腕部为原料,不是以水母黏液为原料。大量的 Q-mucin 在几乎所检测的水母的每个器官被发现,推测它可能是维持生命的黏液的来源。提取分离方法为:将新鲜的或冷冻的水母样品切成小块,在低温(如 4 ℃)下,水或者水溶液(如 0.2% 的 NaCl 溶液)中浸提,使样品表面的黏蛋白溶解到溶液中;浸提液经乙醇沉淀,沉淀透析,冷冻干燥得 Q-mucin 粗品;采用阴离子交换色谱或阴离子交换静态吸附方法对粗品进行纯化,得 Q-mucin 纯品^[14-15]。据报道, Q-mucin 纯品

基金项目 河北省高等学校科学技术研究项目(yd2013030);河北省自然科学基金项目(D2014204127)。

作者简介 冯金华(1981—),女,山东泰安人,讲师,博士,从事海洋生物天然产物的制备及应用研究。

收稿日期 2019-11-05

的产量可达1%~4%干重、0.02%~0.10%湿重^[14]。目前鲜见水母黏蛋白CsCl密度梯度离心分离的报道。

采用离子交换色谱法对Q-mucin粗品进行分离时,同时检测洗脱液在280和215nm的洗脱曲线,是根据Q-mucin在280nm的吸收比较弱、在215nm的吸收比较强的特点来判断Q-mucin纯品所在洗脱峰的^[14]。

1.2 Q-mucin的电泳检测 蛋白质的定性检测主要采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法,但是SDS-PAGE电泳应用于黏蛋白检测时受到了阻碍,这主要因为黏蛋白的一些性质如一般分子量较大;在水溶液中更会发生缔合而呈现生物超分子状态;且在浓度适当时自身会形成凝胶,形成一种致密的缠绕的分子网络,使其在即使是最有渗透性的介质中运动也变得很难,因而通常情况下在聚丙烯酰胺凝胶中不能明显的迁移^[16]。在SDS-PAGE试验中,哺乳动物黏蛋白主要集中在凝胶加样口附近^[16-17]。这是黏蛋白SDS-PAGE电泳的一个特点。

另外,由于黏蛋白糖链占分子量的50%以上,使其一般缺乏明显的蛋白质染色特征,如考马斯亮蓝染色不明显,但是糖染色(一般采用PAS染色法)明显^[17]。据报道,Q-mucin的SDS-PAGE电泳的考马斯亮蓝染色或银染没有成功,也表明Q-mucin序列中缺乏对这些方法敏感的部分^[6]。

2 Q-mucin的结构特征

2.1 Q-mucin的分子量及主链结构 Q-mucin具有一个广泛分布的分子量。如越前水母(*Nemopilema nomurai*)外胚层和口腕中含有分子量分别为40和130kDa的2种黏蛋白;海月水母(*Aurelia aurita*)、水曳水母(*Chrysaora Melanaster*)、海蜇(*Rhopilema esculentae*)中层胶中分别分离到分子量为150、140和130kDa的黏蛋白^[14]。

Q-mucin具有明确的重复结构域,不存在其他额外结构域。从不同种类水母中得到的黏蛋白的主要差别不是肽部分,而是糖部分。串联重复单元N-末端打开,从N末端开始,由Val-Val-Glu-Thr-Thr-Ala-Ala-Pro和少量的Val-Ile-Glu-Thr-Thr-Ala-Ala-Pro 8个氨基酸组成,串联重复中没有丝氨酸,串联重复单元中2个苏氨酸(Thr)残基通过羟基与糖链连接,形成O-糖苷键。单个重复结构域的质量约为1200Da,包括糖部分(400Da),糖和蛋白质以大约1:2的比例分享这个质量。大多数已发现的天然黏蛋白蛋白质主链中间或两端具有与重复序列不同的其他结构域,与之相比,Q-mucin的结构更加简单且具有高度均质性,最明显的不同是Q-mucin缺乏负责黏蛋白分子低聚反应的特别的结构域如血管性血友病因子D(VWD)和半胱氨酸结构域^[18],推测可能是因为Q-mucin来源于一种更原始的生物的原因。

研究发现,Q-mucin与人体黏蛋白MUC5AC的串联重复(Thr-Thr-Ser-Thr-Thr-Ser-Ala-Pro)有4个氨基酸相同,形成了经典序列-Thr-Thr-X3-Ala-Pro-(X3是Ala或Ser),Ala-Pro部分是周期的标志;且2种黏蛋白物理性质相似,溶于水都能形成胶状溶液;推测Q-mucin也可能属于凝胶形成黏蛋白^[14]。

2.2 Q-mucin的单糖组成 Q-mucin的O-糖链的结构简单,糖链短(一般为1~3个糖),不含唾液酸(Sia)。Thr-GalNAc是Q-mucin大部分的糖肽结合位点,但除了GalNAc,从越前水母、海月水母、水曳水母、海蜇及波布水母(*Chiropsalmus quadrigatus*)不同部位提取的每一个Q-mucin中都检测到含量相对较高的Ara和Gal(含量是GalNAc的10%~70%)^[14],所以推测少量的GalNAc可能结合着其他成分。对海月水母O-糖链的结构研究较多。海月水母Q-mucin的O-糖链大部分是以3种形式存在的单糖:GalNAc、AEP-(O→6)-GalNAc(AEP为2-氨基乙基磷酸)和P-6-GalNAc,推测这3种形式可能可以通过水解相互转换^[19]。AEP-(O→6)-GalNAc也是越前水母和水曳水母Q-mucin单糖中的一种共有成分,是越前水母提取的Q-mucin的主要O-糖链结构^[14]。据推测,AEP在Q-mucin中可能是作为唾液酸的替代品,用于向糖蛋白传递电荷的类似物^[20]。

Q-mucin中的单糖组成与脊椎动物和其他动物内的黏蛋白不同,大多数已发现的天然黏蛋白的糖基具有多种成分,而在单糖组成上,一般的黏蛋白被认为是高尔基复合体合成的,糖成分只包括5种(Gal、Sia、GlcNAc、Fuc和GalNAc),而Q-mucin糖链结构简单,且没有发现唾液酸(Sia),这与从脊椎动物中提取到的黏蛋白明显不同。现有的研究还不能确定Q-mucin中检测到的除GalNAc以外的其他的糖成分来自杂质的可能性,如阿拉伯糖。

2.3 Q-mucin的结构研究方法 虽然从各种天然原料中提取黏蛋白在生物科学里已经有很长一段历史,但由于已发现黏蛋白结构的复杂性,关于黏蛋白分子水平结构研究的报道还比较少。因为低聚糖的连接和每一种单糖的性质都可以通过NMR被确定,所以NMR技术被期望给黏蛋白结构研究带来一个相当的进步,但可能是由于天然丰度的完整的黏蛋白的非均质的性质,至今只有一些结果被呈现,如绵羊下颌黏蛋白由于其相对简单的结构和短的糖链,在天然丰度下应用NMR技术已经被广泛研究^[19,21]。另外,同位素富集技术也很难适用于黏蛋白的结构研究。

在水母黏蛋白的研究中,通过几种NMR技术获得了关于Q-mucin结构的一些关键信息。Q-mucin肽主链中质子和C13的化学位移通过几种技术(包括DQF-COSY、HMQC/HSQC、HMBC、DPFGSE(双脉冲梯度自旋回波)-TOCSY)和DPFGSE-NOE的联合进行检测。Thr和GalNAc在糖支链彼此之间的连结关系用不同的NMR技术被确定:通过一个传统的HMBC测量技术发现了Thrβ碳原子相对GalNAc中H-1和那些Thr的β质子相对GalNAc的C1的小的交叉峰,表明2个Thr残基都独立地与一个GalNAc相连;DPFGSE-NOE光谱检测到来自GalNAc(1)的H-1和Thr(1)的β质子及GalNAc(2)中的H-1信号和Thr(2)的β质子之间的NOE。通过一维测量方法,DPFGSE-NOE-HSD、H-1和Thr的β质子之间的NOE进一步被发现;TOCSY也提供了关于Thr-GalNAc的局部结构的信息^[6]。通过NMR和ESI-MS/MS技术确定了海月水母Q-mucin中的AEP-(O→6)-GalNAc的结构^[6]。这

些研究表明 NMR 技术应用于分析从天然原料提取并纯化的糖蛋白包括黏蛋白的 O-糖链的结构的可能性,这将为分析其他天然丰度的更复杂的黏蛋白提供指导。

3 Q-mucin 的开发前景

在水母黏蛋白应用方面,目前只有 Q-mucin 对关节炎修复能力的研究报道^[15]。研究表明,Q-mucin 和透明质酸(HA)在体内关节炎动物模型中具有协同作用,同时,关节内注射 Q-mucin,没有出现血细胞和 C 反应蛋白水平的升高及关节肿胀、滑膜的现象,而且从沙蚕(*S. nomurai*)和海月水母中提取的水母黏蛋白表现出基本相同的治疗效果;此研究被认为有希望开发为一种软骨退变治疗的新方法^[15]。考虑到从猪胃中提取的胃黏蛋白和牛颌下腺黏蛋白的商业应用,对 Q-mucin 的各种其他应用也被期待,如作为人体黏液的替代品、药物控释的载体、人工细胞外基质的成分、抗生素、化妆品保湿剂和食物添加剂等。另外,由于 Q-mucin 如人造聚合物一样简单、均匀的结构,虽然目前它的全合成还是不能实现,但它被期待开发为一种如几丁质和壳聚糖一样的单独的材料,如将其作为制造像从高级动物中提取的黏蛋白一样复杂的黏蛋白的起始材料^[20]。同时,Q-mucin 与从昆虫、鱼和植物中提取的抗冻蛋白(AFPs)的结构具有一定相似性。人工合成的结构最简单的一个 AFP 是具有串联重复 Thr(GalNAc-Gal)-Ala 的聚合物。因此,Q-mucin 被期待具有相似的抗冻功能^[14]。

Q-mucin 普遍发现于不同种类的水母中,而且具有引人注目的高产量,且水母资源量大,而在水母暴发的季节,很多水母被作为废物处理,这些因素使得 Q-mucin 的大量天然提取是可行的,并且有利于水母资源的开发利用。同时水母黏蛋白只有很少的肽序列不同于人体黏蛋白,只有轻微的生物反应会以过敏的形式产生。这种低的潜在的生物排斥,是水母黏蛋白应用的一个优势,也明显降低了工业规模生产的风险^[14]。

Q-mucin 的结构特点与那些以前发现的如哺乳动物中的黏蛋白明显不同,推测可能是由于它来源于一种更原始物种的原因。现今的生物信息学分析表明凝胶形成的黏蛋白早期出现在后生动物进化中,建立在它们的基因出现在一个星海葵中,而星海葵和水母属于同一类刺胞动物。所以 Q-mucin 的研究也可能为生物进化的研究提供一定的依据^[22]。对 Q-mucin 进一步的研究将有助于弄清楚水母中 Q-mucin 的化学生态学功能以及对 Q-mucin 的开发和应用。

参考文献

[1] BARCHI J J, JR. Mucin-type glycopeptide structure in solution; Past, pres-

- ent, and future[J]. Biopolymers, 2013, 99(10): 713-723.
- [2] TAYOR M E, DRICKAMER K. Introduction to Glycobiology[M]. Oxford: Oxford University Press, 2006.
- [3] GLENISTER D A, SALAMON K E, SMITH K, et al. Enhanced growth of complex communities of dental plaque bacteria in mucin-limited continuous culture[J]. Microb Ecol Health Dis, 1988, 1(1): 31-38.
- [4] WU A M, CSAKO G, HEPER A. Structure, biosynthesis and function of salivary mucin[J]. Mol Cell Biochem, 1994, 137(1): 39-55.
- [5] HASHIMOTO Y, HASHIMOTO S, PIGMAN W. Purification and properties of porcine submaxillary mucin[J]. Arch Biochem Biophys, 1964, 104(2): 282-291.
- [6] UZAWA J, URAI M, BABA T, et al. NMR study on a novel mucin from jellyfish in natural abundance, Qniumucin from *Aurelia aurita* [J]. J Nat Prod, 2009, 72(5): 818-823.
- [7] ADIKWU M U, ALOZIE B U. Application of snail mucin dispersed in detarium gum gel in wound healing[J]. Sci Res Essay, 2007, 2(6): 195-198.
- [8] GRUNDY M M, MCKENZIE J D, RICHARDSON N V, et al. Product from starfish; US 6991810[P]. 2000-07-08.
- [9] KIMURA S, GOHDA T, SAKURAI Y. Characterization of nidamental mucin from Japanese common squid *Todarodes pacificus* [J]. J Tokyo Univ Fish, 2003, 89: 7-13.
- [10] 洪惠馨. 水母和海蜇[J]. 生物学通报, 2002, 37(2): 13-16.
- [11] MANTLE M, ALLEN A. Isolation and characterization of the native glycoprotein from pig small-intestinal mucus[J]. Biochem J, 1981, 195(1): 267-275.
- [12] EBRAN N, JULIEN S, ORANGE N, et al. Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: Correlation between their pore-forming properties and their antibacterial activities[J]. Biochimica et biophysica acta-biomembranes, 2000, 1467(2): 271-280.
- [13] DAVIES J R, CARLSTEDT I. Isolation of large gel-forming mucins[M]// CORFIELD A P. Methods and protocols: The mucins. Totowa; Humana Press Inc, 2000; 3-13.
- [14] MASUDA A, BABA T, DOHMAE N, et al. Mucin (Qniumucin), a glycoprotein from jellyfish, and determination of its main chain structure[J]. J Nat Prod, 2007, 70(7): 1089-1092.
- [15] OHTA N, SATO M, USHIDA K, et al. Jellyfish mucin may have potential disease-modifying effects on osteoarthritis[J]. BMC Biotechnol, 2009, 9: 1-11.
- [16] HOLDEN K G, YIM N C F, GRIGGS L J, et al. Gel electrophoresis of mucous glycoproteins. I. Effect of gel porosity [J]. Biochemistry, 1971, 10(16): 3105-3109.
- [17] HOLDEN K G, YIM N C F, GRIGGS L J, et al. Weisbach Gel electrophoresis of mucous glycoproteins. II. Effect of physical deaggregation and disulfide-bond cleavage[J]. Biochemistry, 1971, 10(16): 3110-3113.
- [18] PEREZ-VILAR J, HILL R L. The structure and assembly of secreted mucins[J]. Biol Chem, 1999, 274: 31751-31754.
- [19] CORZANA F, BUSTO J H, JIMÉNEZ-OSÉS G, et al. New insights into alpha-GalNAc-Ser motif; Influence of hydrogen bonding versus solvent interactions on the preferred conformation[J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(45): 14640-14648.
- [20] URAI M, NAKAMURA T, UZAWA J, et al. Structural analysis of O-glycans of mucin from jellyfish (*Aurelia aurita*) containing 2-aminoethylphosphate[J]. Carbohydr Res, 2009, 344: 2182-2187.
- [21] COLTART D M, ROYURU A K, WILLIAMS L J, et al. Principles of mucin architecture; Structural studies on synthetic glycopeptides bearing clustered mono-, di-, tri-, and hexasaccharide glycodomains [J]. J Am Chem Soc, 2002, 124(33): 9833-9844.
- [22] LANG T G, HANSSON G C, SAMUELSSON T. Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(41): 16209-16214.

(上接第 16 页)

- [34] EFSA. Conclusion on the peer review of imidacloprid[R]. EFSA Scientific Report, 2008; 1-120.
- [35] TENNEKES H A, SÁNCHEZ-BAYO F. The molecular basis of simple relationships between exposure concentration and toxic effects with time [J]. Toxicology, 2013, 309: 39-51.
- [36] VAN GESTEL C A M, DE LIMA E SILVA C, LAM T, et al. Multigeneration toxicity of imidacloprid and thiacloprid to *Folsomia candida* [J]. Eco-

toxicology, 2017, 26: 320-328.

- [37] ERNST G, KABOUW P, BARTH M, et al. Assessing the potential for intrinsic recovery in a Collembola two-generation study; Possible implementation in a tiered soil risk assessment approach for plant protection products[J]. Ecotoxicology, 2016, 25: 1-14.
- [38] KREUTZWEISER D P, THOMPSON D G, SCARR T A. Imidacloprid in leaves from systemically treated trees may inhibit litter breakdown by non-target invertebrates[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2009, 72: 1053-1057.