

文章编号:1000-0615(2007)04-0551-05

·研究简报·

瓶鼻海豚和糙齿海豚血清转铁蛋白的初步研究

冉春丽^{1,2}, 龙华^{3,4}, 杨健¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 中国水产科学研究院内陆渔业环境与资源重点
开放实验室, 江苏 无锡 214081; 2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

3. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 荆州 434000; 4. 武汉大学生命科学院, 湖北 武汉 430072)

关键词: 瓶鼻海豚; 糙齿海豚; 血清转铁蛋白; 多态性; 适应性

中图分类号: S 917 文献标识码: A

A preliminary study of serum transferrins in *Tursiops truncatus* and *Steno bredanensis*

RAN Chun-li^{1,2}, LONG Hua^{3,4}, YANG Jian¹

(1. Key Laboratory of Ecological Environment and Resources of Inland Fisheries,
Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China;

3. Yangtze River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China;

4. Bioscience College, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Serum transferrin (Tf) is an iron (Fe)-transporting protein with the property of reversibility in binding Fe. Cetaceans are aquatic mammals that exhibit particularly high Fe bioavailability in the body. However, little is known about serum Tf in cetaceans to date. The goal of this study was to determine the special characters of serum Tf between cetacean species and several other vertebrate groups. Zones and types of serum Tf of cetacean bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and rough-toothed dolphin (*Steno bredanensis*) were studied comparatively, for the first time, with bottom-living yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*), sharptooth catfish (*Clarias leather*), turbot (*Scophthalmus maximus*), margined bullhead (*Liobagrus marginatus*), Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*), amphibian tiger frog (*Rana tigrina*), terrestrial mice (*Mus musculus*) and human (*Homo sapiens*). Electrophoretic separation of Tf was performed using discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). An iron-specific stain method was used to identify the Tf and other Fe-binding proteins. Results suggested that the Tf zones were divided into four areas (Tf I-Tf IV). Serum Tf possessed 4-6 bands in the bottlenose dolphins and 5 Tf bands in the rough-toothed dolphin. These two Tf types in cetacean species were usually more complicated than those of human and other animals studied except for tiger frog. In addition, cetacean serum Tf distributed more widely across the serum Tf zones, and especially all serum Tf I-Tf IV zones in the bottlenose dolphin. The concentrative areas of serum Tf bands and their relative activities seemed to be different between cetaceans and other species, implying an adaptation for special water living habitats and respiratory patterns. Furthermore, although the serum Tf zone patterns among the three bottlenose dolphins were the same, the Tf bands were different from each other, suggesting the tendency of serum polymorphisms in serum Tf of the three bottlenose dolphins. Further research will be required to deepen our understanding not only of the cetacean

收稿日期: 2006-01-24

资助项目: 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室开放课题(LFB20040513)

作者简介: 冉春丽(1983-), 女, 四川遂宁人, 硕士研究生, 主要从事微量元素生物学的研究。E-mail: chaisefeye763@163.com

通讯作者: 杨 健, Tel: 0510-85557823, E-mail: jiany@ffrc.cn

serological characters on iron-binding, but also of the molecular weight, isoelectric point, amino acid component, and molecular basis of serum Tf in cetacean species.

Key words: *Tursiops truncatus*; *Steno bredanensis*; serum transferrin; polymorphism; adaptation

血清转铁蛋白(serum transferrin, Tf)是一种非血红素结合铁的 β 球蛋白^[1],其主要功能是负责机体中的 Fe^{3+} 在吸收、储存和利用部位间的传递^[2],供合成红细胞的主要成分—血红蛋白(结合和输送氧气的蛋白)和维持核糖核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase)的活性^[3]。同时, Tf是脊椎动物呼吸链中的关键因子。Tf带型分布范围的宽窄和氧利用率的高低相关^[4-5]; Tf可调节铁离子平衡、能量平衡、清除游离铁离子,具有抗菌和杀菌、细胞保护、促进细胞分化和生长作用^[6-10]。Tf结构的重要特点为:单一肽链,通常含糖基;由N端和C端两个结构域组成,两者具有较高同源性;同时不同物种间Tf也具有很大的同源性,尤其是铁结合位点附近区域和半胱氨酸的存在位点在不同脊椎动物之间非常相似;每分子可逆地结合2个 Fe^{3+} ,同时协同结合两个 CO_3^{2-} 或 HCO_3^- ^[11]。

鲸类是由偶蹄类祖先约在第三纪时再次入水进化而成的一类完全适应水生的哺乳动物^[12],分为齿鲸和须鲸两大类,有着极强的潜水能力,体内氧的利用率非常高。生物体中氧的利用方面微量元素铁起着至关重要的作用^[13]。鲸类的某些器官(如肝、肺、脾)中铁有特殊的积累,与有效地保存和利用氧以利于潜水生活有关;特别是肝脏中铁的浓度与最大潜水持续时间有显著的正相关,可以作为反映潜水能力的一项指标^[14]。可以预测鲸类的Tf将存在某些特异性以适应水体环境。然而,迄今除Gallien等^[15]报道了在真海豚(*Delphinus delphis*)、领航鲸(*Globicephala melana*)、灰海豚(*Grampus griseus*)和条纹原海豚(*Stenella styx*)测到TfA、TfB和TfAB3种Tf,官之梅等^[16]对江豚(*Neophocaena phocaenoides*)和白暨豚(*Lipotes vexillifer*)的Tf作了简单分析,Cassens等^[17]对亚马逊河豚(*Inia geoffrensis*)等6种鲸类Tf的片段进行了克隆外,国内外尚无其它有关鲸类Tf理化性质及其与别的脊椎动物类群比较的深入研究。本文首次对齿鲸类动物瓶鼻海豚(*Tursiops truncatus*)、糙齿海豚(*Steno bredanensis*)及用于比较研究的氧利用率较高的淡水水底层鱼类黄颡鱼

(*Pelteobagrus fulvidraco*)、革胡子鲶(*Clarias leather*)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)、白缘鲈(*Liobagrus marginatus*)、中华鲟(*Acipenser sinensis*),水陆两栖动物虎纹蛙(*Rana tigrina*),陆生动物小鼠(*Mus musculus*)和人(*Homo sapiens*)等10个物种的血清Tf进行了PAGE比较分析,以期了解这些水陆环境中以不同利用氧的方式生活的三大类动物体内血清Tf的特点,从而分析和归纳鲸类动物血清Tf在其生理活动方面可能的适应性,为进一步研究鲸类动物血清Tf结构和功能方面的特异性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

瓶鼻海豚LE(体长2.20 m)、LU(体长2.52 m)、BE(体长2.36 m)的血清来源于厦门海底世界的雄性成年饲养个体,糙齿海豚(体长2.10 m)的血清来源于福建漳州古雷海域搁浅个体(无性别纪录)。用于比较的黄颡鱼、革胡子鲶和大菱鲂从市场购买,均采用尾动脉取血,5000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心3 min后取上清置4 $^{\circ}C$ 冰箱备用。白缘鲈、虎纹蛙(个体A和B)、中华鲟、小鼠和人的血清均由武汉大学生命科学院分子细胞遗传学实验室提供。

1.2 方法

转铁蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)及含铁蛋白质专一染色法按龙华等^[4]的报道进行。浓缩胶浓度为3.75%,分离胶浓度为10%。电极缓冲液为Tris(0.025 $mol \cdot L^{-1}$)-甘氨酸(0.192 $mol \cdot L^{-1}$)缓冲系统(pH 8.3)。左右两侧为人标准转铁蛋白(上海东风生化试剂公司),点样量分别为5 μL 和10 μL ,其余的为鲸类及用于比较的实验动物和人的血清样本,点样量为10 μL ,与同体积样品胶混匀后上样。采用北京六一仪器公司DYCZ-21型垂直电泳槽进行电泳,浓缩胶的电压为150 V,分离胶的电压为100 V,电泳时间为6 h左右。电泳结束后用溶有少许柠檬酸铁胺的Nitroso-R液染色,出现明显的条带后,清水漂洗一次,再用脱色剂脱色至背景清晰。其中样品缓冲

液为:10 mL 水溶液中含 0.15 g Tris、0.02 g 溴酚蓝、1 mL β-巯基乙醇、2 mL 甘油, Nitroso-R 液为 100 mL 溶液中含 1.0 g 盐酸羟胺, 2.7 g 三水乙酸钠, 1.5 mL 冰乙酸和 0.5 g Nitroso-R, 脱色剂为水/甲醇/冰乙酸(体积比为 5/5/1)溶液。

2 结果

图 1 为瓶鼻海豚、糙齿海豚与其它 8 个物种的血清 PAGE 图谱的比较。哺乳动物(海豚、小鼠和人)谱带前端含有大量的小分子蛋白(白蛋

白)^[18], 两栖类的含量次之, 鱼类的含量相对最少。13 个样品的点样孔附近均有大分子蛋白(其中成带的为 sa2 球蛋白^[18-19])。

参考龙华等^[4]的研究结果和分带方法, 确定大分子和小分子蛋白间的区域为 Tf 区, 并确定了血清 Tf 带型(分为 Tf I、Tf II、Tf III 和 Tf IV 四个小区)(表 1)。带型的划分不仅有利于了解不同物种之间 Tf 表现型的种类, 而且可以有效推断和比较其 Tf 的复杂程度和活性^[4-5]。

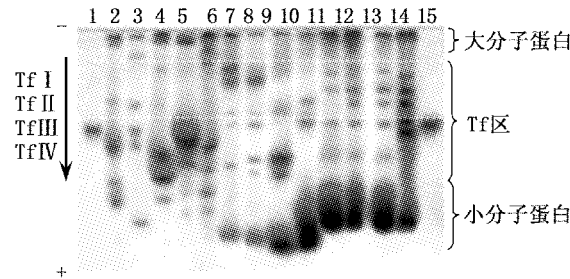


图 1 瓶鼻海豚、糙齿海豚与其它 8 个物种血清含铁蛋白质电泳 PAGE 图谱比较

Fig.1 Comparison of iron-binding proteins between cetacean *Tursiops truncatus*, *Steno bredanensis* and other 8 vertebrate species

1. 人(标准); 2. 白缘鲈; 3. 中华鲟; 4. 黄颡鱼; 5. 革胡子鲶; 6. 大菱鲆; 7. 虎纹蛙 A; 8. 虎纹蛙 B; 9. 小鼠; 10. 人; 11. 瓶鼻海豚 BE; 12. 瓶鼻海豚 LU; 13. 瓶鼻海豚 LE; 14. 糙齿海豚; 15. 人(标准); Tf I~ Tf IV 转铁蛋白带型 I~ IV

1. *Homo sapiens*; 2. *Liobagrus marginatus*; 3. *Acipenser sinensis*; 4. *Pelteobagrus fulvidraco*; 5. *Clarias leather*; 6. *Scophthalmus maximus*; 7. *Rana tigrina* (A); 8. *Rana tigrina* (B); 9. *Mus musculus*; 10. *Homo sapiens*; 11. *Tursiops truncatus* (BE); 12. *Tursiops truncatus* (LU); 13. *Tursiops truncatus* (LE); 14. *Steno bredanensis*; 15. *Homo sapiens* (standard); TfI - TfIV serum transferrin type I- IV

表 1 瓶鼻海豚、糙齿海豚与其它 8 个物种血清转铁蛋白带型

Tab.1 Summary of serum transferrin types between cetacean *Tursiops truncatus*, *Steno bredanensis* and other 8 vertebrate species

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Tf I	-	-	+	-	+	++	+	-	-	+	++	+	+
Tf II	+	+	+	-	-	-	-	+	++	++	++	++	
Tf III	-	+	-	-	-	++	++	-	+	+	+	+	++
Tf IV	+	+	++	++	++	+	++	++	-	+	+	+	-

注: 2. 白缘鲈; 3. 中华鲟; 4. 黄颡鱼; 5. 革胡子鲶; 6. 大菱鲆; 7. 虎纹蛙 A; 8. 虎纹蛙 B; 9. 小鼠; 10. 人; 11. 瓶鼻海豚 BE; 12. 瓶鼻海豚 LU; 13. 瓶鼻海豚 LE; 14. 糙齿海豚; + 表示含一条蛋白质带, ++ 表示含两条蛋白质带, - 表示无蛋白质带

Notes: 2. *Liobagrus marginatus*; 3. *Acipenser sinensis*; 4. *Pelteobagrus fulvidraco*; 5. *Clarias leather*; 6. *Scophthalmus maximus*; 7. *Rana tigrina* (A); 8. *Rana tigrina* (B); 9. *Mus musculus*; 10. *Homo sapiens*; 11. *Tursiops truncatus* (BE); 12. *Tursiops truncatus* (LU); 13. *Tursiops truncatus* (LE); 14. *Steno bredanensis*; "+" one protein band, "++" two protein bands, "-" no protein band

从图 1 和表 1 可见, 鲸类动物的 Tf 带型最为复杂。两种海豚的 Tf 条带数均较多(4~6 条)。3 头瓶鼻海豚的 Tf 覆盖所有 4 个区, I 区和 II 区显示出某些个体差异。糙齿海豚的 Tf 出现在 I ~

III 区, IV 区未能观察到。虽同为哺乳动物, 陆生的小鼠和人的 Tf 相对简单, 2~3 条带, 仅出现于两个区。前者出现在 II 和 IV 区, 而后者出现于 II 和 III 区。底层鱼类的白缘鲈、黄颡鱼、革胡子鲶、中华鲟和大菱鲆的 Tf 也比较简单, 不多于 4 条带。

虽然转铁蛋白带不一定都能在 I ~ III 区记录到,但其均明显地出现在了 IV 区。两栖动物虎纹蛙的 Tf 亦相对复杂(Tf 条带 5 条),接近于鲸类动物。其 Tf 覆盖 I、III ~ IV 区,但不出现于 II 区,显示出与鲸类动物的区别。从上可知仅鲸类动物 Tf 可以出现 I ~ IV 全部带型。

3 讨论

3.1 血清转铁蛋白带型与生理功能的关系

Tf 带型分布范围的宽窄和氧利用率的高低相关^[4-5]。从图 1 可见,鲸类动物 Tf 带型较为复杂,分布属于较宽范围,特别是瓶鼻海豚在 I ~ IV 区都有出现。Gallien 等^[15]报道了在真海豚、领航鲸、灰海豚和条纹原海豚分离到 TfA、TfB 和 TfAB,纯合子 TfA 和 TfB 具 1 条带,杂合子 TfAB 有 2 条带,均少于本研究结果。其研究方法与本研究不同,可能是导致差异的原因。他们用的是用 ⁵⁹FeCl₃ 标定血清的淀粉凝胶电泳和氨基黑染色,且没有和别的动物类群进行比较研究。鱼类的研究结果显示,种类不同其血清 Tf 区的特定位置不同,从而与不同的生存环境及生活习性相关。此外,血清 Tf 区复杂化也有助于适应不同的环境和提高氧的利用率^[5]。这些可以用来解释本研究中鲸类动物 Tf 带型的复杂性。作为潜水生活的哺乳动物,鲸类的栖息环境较本研究中的鱼类,小鼠和人类(后二者为陆生哺乳动物,空气中有大量游离氧的存在,机体较水生的动物更易获得氧)要广泛和复杂得多。瓶鼻海豚类^[20]和糙齿海豚^[21]均广泛分布在全世界温、热带海域中。血清 Tf 带型的多样性应该与其生活环境和适应潜水的呼吸方式相关。前者多出现在沿岸,后者多栖息于外海。两者血清 Tf 带型不完全相同可能与之相关。

虽然两栖动物的生境亦较鲸类动物简单,但本研究中的虎纹蛙血清 Tf 区复杂化程度却接近与鲸类,且大于鱼类。这可能与其发育和生长过程中的环境变化相关。蛙通过变态发育,由水生到陆生,适应于陆生和水生两种生活和利用氧的方式。其血清 Tf 带在 Tf III 区明显,而在 Tf II 区缺乏,可能反映了作为两栖动物的特点。这很有必要开展进一步的研究加以证实。

3.2 血清转铁蛋白含量与生理功能的关系

实验中所用人的标准血清转铁蛋白的浓度为 1%,电泳中 1 号样和 15 样均为人的标准血清转铁

蛋白,点样量分别为 5 μ L 和 10 μ L,即 15 号样的 Tf 量大于 1 号样。从图 1 可见点样量大的 15 号的条带深度和宽度大于 1 号样,说明电泳条带的深度和宽度能代表样品中 Tf 的含量。白缘鲈、黄颡鱼、革胡子鲶、大菱鲆这四种底层鱼类,虽然条带不及虎吻蛙丰富,但浓度即活性却较后者高,以适应底栖少氧的生活环境,尤其是白缘鱼为青藏高原东部地区特有的冷水性底层淡水鱼类。糙齿海豚的 Tf 条带较瓶鼻海豚深和宽,可能表明其活性高于后者。推测糙齿海豚的潜水时间可能长于瓶鼻海豚。

3.3 鲸类血清转铁蛋白的多态性

虽然三头瓶鼻海豚血清 Tf 的分区一致,但各区的 Tf 带数的分布却有个体差异(糙齿海豚只有一头个体无法研究)。这表明鲸类动物和其他哺乳动物一样也应该存在血清 Tf 的多态性。这种现象为适应外部环境的变化或不同的生长发育过程的需要奠定了基础,可以认为是一种血清 Tf 生理功能的自我保护机制^[22]。血清 Tf 的基因由复等位基因控制,且为共显性,通常根据其电泳的迁移速率用大写的英文字母对等位基因进行命名。本研究暂且将瓶鼻海豚 BE 的基因型定为 A,表型定为 AA,瓶鼻海豚 LE 的基因型定为 B,表型定为 BB,则瓶鼻海豚 LU 的表型可定为 AB(图 2)。由于有关鲸类转铁蛋白的研究较少,尚无瓶鼻海豚和糙齿海豚转铁蛋白的基因型和表现型作对照,同时本次实验海豚样品的数量较小,有关鲸类动物血清 Tf 的全部基因型和表现型的确定还有待进一步研究。

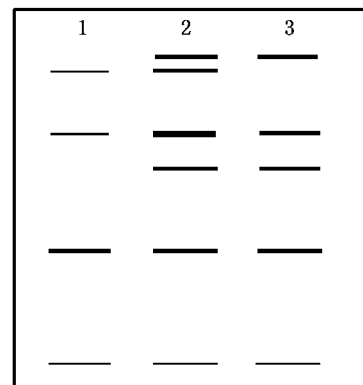


图 2 三头瓶鼻海豚血清转铁蛋白的电泳图谱示意图

Fig.2 Sketch map of serum transferrin types of three *Tursiops truncatus*

1. 瓶鼻海豚 BE; 2. 瓶鼻海豚 LU; 3. 瓶鼻海豚 LE

1. *Tursiops truncatus* BE; 2. *Tursiops truncatus* LU; 3. *Tursiops truncatus* LE

本工作是首次尝试开展鲸类动物和其它脊椎动物(偏重于水生动物)类群血清 Tf 的比较研究。通过该研究,建立了相关的研究方法,也积累了大量的经验。在此基础上,正进一步开展鲸类动物和陆生脊椎动物(特别是祖先相同的偶蹄类动物)血清 Tf 的比较;血清铁浓度、铁结合力和铁饱和度特点的调查;血清 Tf 的纯化和分子量的测定;血清 Tf 的分子基础的探索工作。所有这些研究的成果将有望全面揭示鲸类动物血清 Tf 结构和功能上的特异性,以及这些特异性的生物学意义。

厦门海底世界林玉辉馆长在提供海豚血清样本方面,中国水产科学研究院内陆渔业环境与资源实验室刘洪波同志,武汉大学研究生刘薇等在实验过程中给予了诸多帮助,在此一并表示感谢。

参考文献:

- [1] Smithies O, Hiller O. The genetic control of transferrin in human[J]. *Biochem J*, 1959, 72:121 - 126.
- [2] Welch S. A comparison of the structure and properties of serum transferrin from 17 animal species[J]. *Comp Biochem Physiol B*, 1990, 97(3):417 - 427.
- [3] Testa U. Proteins of iron metabolism[M]. Boca Raton London New York: CRC Press, 2002.
- [4] 龙 华,汤伏生,曾 勇,等. 淡水鱼类血清转铁蛋白遗传多态性研究[J]. *水产学报*, 1996, 20(2): 168 - 174.
- [5] 龙 华,刘曼西. 淡水养殖鱼类血清转铁蛋白耐低氧特性的研究[J]. *华中理工大学学报*, 2000, 28(1):85 - 88.
- [6] Aisen P, Listowsky I. Iron transport and storage proteins[J]. *An Re Biochem*, 1980, 49:357 - 393.
- [7] Stafforda J L, Belosevic M. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation [J]. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27(6 - 7):539 - 554.
- [8] Van Campenhout A, van Campenhout C M, Lagrou A L, *et al.* Transferrin modifications and lipid peroxidation: implications in diabetes mellitus[J]. *Free Radic Res*, 2003, 37(10):1069 - 1077.
- [9] Paez P M, Marta C B, Moreno M B, *et al.* Apotransferrin decreases migration and enhances differentiation of oligodendroglial progenitor cells in an *in vitro* system[J]. *Dev Neurosci*, 2002, 24(1):47 - 58.
- [10] Liu Y, Sun J, Zhang J, *et al.* Effects of transferrin on the growth and proliferation of porcine hepatocytes: a comparison with epidermal growth factor and nicotinamide[J]. *Chin Med J*, 2003, 116(8):1223 - 1227.
- [11] de Jong G, van Dijk J P, van Eijk H G. The biology of transferrin[J]. *Clin Clim Acta*, 1990, 190(1 - 2):1 - 46.
- [12] 杨 健. 鲸类的起源和进化—兼论淡水豚类的进化[J]. *生物学杂志*, 1994, 6(5):13 - 14.
- [13] Andrews N C. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models[J]. *Nat Rev Genet*, 2000, 1:208 - 217.
- [14] Yang J, Kunito T, Tanabe S, *et al.* Accumulation of iron in Dall's porpoise *Phocoenoides dalli* off the Sanriku coast of Japan[J]. *J Fish China*, 2003, 27(5): 420 - 424.
- [15] Gallien C L, Chalumeau-le-Foulogoc M T, Fine J M. Comparative study of serum proteins in four dolphin species (Cetacea-Odontocetes) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1970, 37(3):375 - 385.
- [16] 官之梅, 陈道权, 王小强. 江豚血液学的初步研究[J]. *水生生物学报*, 1989, 13(1):76 - 82.
- [17] Cassens I, Vicario S, Victor G, *et al.* Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineages[J]. *PNAS*, 2000, 97(21):11343 - 11347.
- [18] Rasmussen D I, Koehn R K. Serum transferrin polymorphism in the deer mouse[J]. *Genetics*, 1966, 54(6):1353 - 1357.
- [19] Gahne B. Studies on the inheritance of electrophoretic forms of transferrins, albumins, prealbumins and plasma esterases of horses[J]. *Genetics*, 1966, 53(4):681 - 694.
- [20] Watson-Capps J J, Mann J. The effects of aquaculture on bottlenose dolphin (*Tursiops sp.*) ranging in Shark Bay, Western Australia[J]. *Biol Conserv*, 2005, 124(4): 519 - 526.
- [21] Struntz W D, Kucklick J R, Schantz M M, *et al.* Persistent organic pollutants in rough-toothed dolphins (*Steno bredanensis*) sampled during an unusual mass stranding event[J]. *Mar Pollut Bull*, 2004, 48(1 - 2): 164 - 173.
- [22] 龙 华, 李 谷, 郑 英. 转铁蛋白研究与发展[J]. *生物工程进展*, 2001, 21(2):32 - 39.