

# 富含半胱氨酸分泌蛋白生物学功能的研究进展

刘宇<sup>1#</sup> 肖蓉<sup>1,2#</sup> 杨东辉<sup>1</sup> 刘欣<sup>1,2</sup> 李庆伟<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116081; <sup>2</sup>辽宁省生物技术与分子药物研发重点实验室, 大连 116081)

**摘要** 富含半胱氨酸分泌蛋白(cysteine-rich secretory proteins, CRISPs)包含众多不同起源的蛋白质, 其大部分成员功能未知。近年来研究发现, 哺乳动物中的CRISP家族各成员主要存在于生殖道中, 在精子的成熟、精卵融合以及免疫系统中发挥着非常重要的作用, 并且其表达水平的改变与人类多种重大疾病密切相关, 有望成为某些疾病理想的生物标记物和药物靶点; 而非哺乳动物中的CRISP家族成员则主要存在于腺体的分泌液中, 能够阻断Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>及环核苷酸门控通道, 并与炎症反应密切相关。近来, 作者所在实验室从低等无颌类脊椎动物七鳃鳗的口腔腺中分离纯化出富含半胱氨酸分泌蛋白, 其与CRISP家族成员具有较高的同源性。该文针对CRISP家族成员生物学功能的最新进展做了分析归纳, 并指出了相关研究的发展趋势。

**关键词** 富含半胱氨酸分泌蛋白; 精卵融合; 离子通道; 七鳃鳗

## The Progress of the Biological Functions of Cysteine-rich Secretory Proteins

Liu Yu<sup>1#</sup>, Xiao Rong<sup>1,2#</sup>, Yang Donghui<sup>1</sup>, Liu Xin<sup>1,2</sup>, Li Qingwei<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China; <sup>2</sup>Liaoning Provincial Key Laboratory of Biotechnology and Drug Discovery, Dalian 116081, China)

**Abstract** Cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) contain a number of different origins of proteins whose functions are mostly unknown. Recently, more and more researchers have focused on the proteins and found that CRISPs mainly exist in the reproductive tract in the mammalian, and play important roles in sperm maturation, sperm ovum fusion and immune systems. In addition, the change of the expression of CRISPs in the tissues may be related to a variety of human diseases, which may be used as the promising target for the therapeutic approach. In the non-mammals, CRISPs exist mainly in the venom, which are capable of blocking Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and cyclic nucleotide-gated channels. Besides, it is highly related to the inflammatory response. Recently, a novel cysteine-rich secretory protein was purified from the buccal gland of the lampreys (*Lampetra japonica*), and it shares high homology with the members of the CRISP superfamily. In this paper, the biological functions of CRISP family members are analyzed and summarized, and its potential development is also explored.

**Key words** cysteine-rich secretory proteins; sperm ovum fusion; ion channels; *Lampetra japonica*

### 1 引言

富含半胱氨酸分泌蛋白(cysteine-rich secretory

proteins, CRISPs)家族属于CAP蛋白超家族(CRISPs、Antigen 5 proteins、PR-1)。该家族包括大量不同起

收稿日期: 2012-10-31 接受日期: 2012-12-17

教育部新教师基金(批准号: 20112136120002)、大连市科学技术基金(批准号: 2011J21DW014)和辽宁省教育厅科学研究一般项目(批准号: L2011187)资助的课题  
\*共同第一作者。\*通讯作者。Tel/Fax: 0411-85827799, E-mail: liqw@263.net

Received: October 31, 2012 Accepted: December 17, 2012

This work was supported by the New Teacher's Fund of Ministry of Education of China (Grant No.20112136120002), Scientific and Technological Research Projects of Dalian (Grant No.2011J21DW014) and Scientific Research Fund of Liaoning Provincial Education Department (Grant No.L2011187)

\*These authors contributed equally to this work. \*Corresponding author. Tel/Fax: +86-411-85827799, E-mail: liqw@263.net

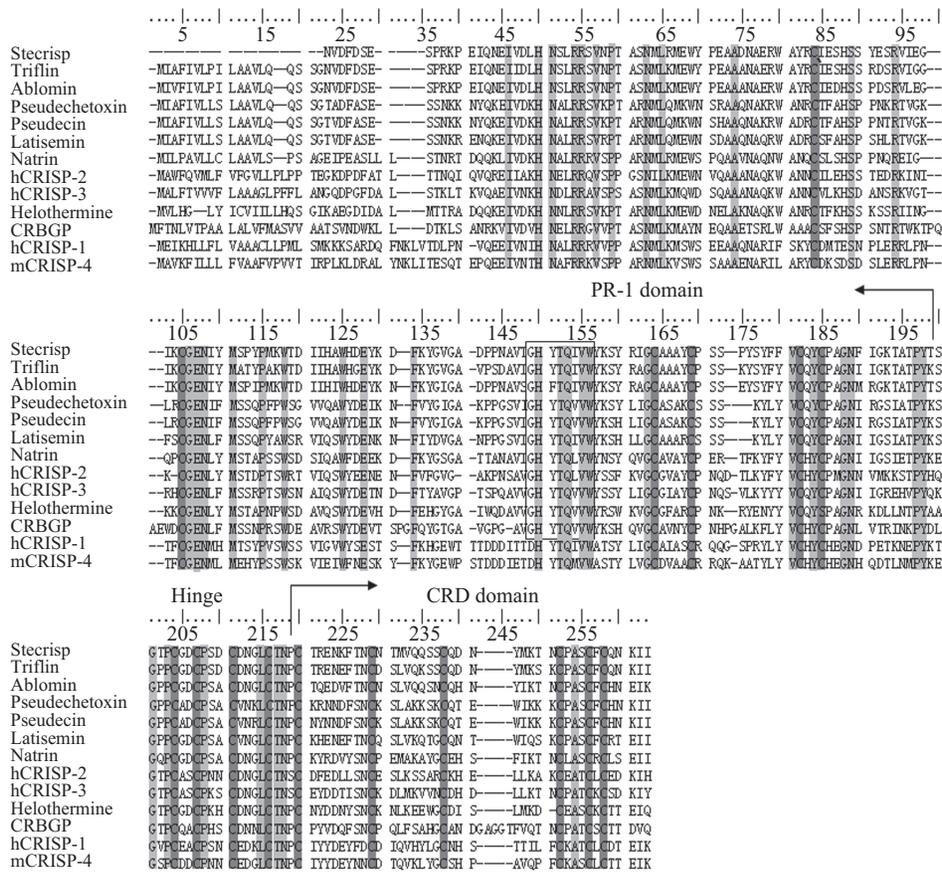
网络出版时间: 2013-03-04 15:47 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130304.1547.007.html

源和功能的单链分泌蛋白, 含有220-230个氨基酸残基<sup>[1]</sup>, 分子质量为20~30 kDa<sup>[2]</sup>。CRISPs在哺乳动物和非哺乳动物中都具有多种生物学功能。到目前为止, 关于哺乳动物CRISPs的研究比较透彻, 多与精子成熟、精卵融合以及人类多种重大疾病密切相关。而关于非哺乳动物CRISPs的研究则主要集中于离子通道和炎症反应等方面, 但具体的研究仍相对较少。本文对CRISP的研究进行了归纳总结, 为今后针对CRISP的研究提供一个新思路。

## 2 CRISP蛋白结构要点

富含半胱氨酸分泌蛋白是一类在进化上高度

保守的蛋白质(图1), 含有16个保守的半胱氨酸残基(cysteine, Cys), 可形成8对二硫键; 空间结构主要由N端的PR-1结构域(pathogenesis-related group 1 domain)、C端的CRD结构域(cysteine-rich domain)以及连接这两个结构域的一段稳定的铰链区域三部分组成(图2)<sup>[3]</sup>。其中, PR-1结构域含有3对二硫键和一段高度保守的氨基酸序列GHYTQVVW, 具有PR-1家族经典的 $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ 三明治结构。除此之外, 在 $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ 三明治立体结构附近存在很多Loop环, 推测其可能与蛋白质的相互作用密切相关。CRD结构域是CRISP家族所特有的代表性结构域, 同样含有3对二硫键。一级结构含有6个保守的Cys, 且后3个Cys严格遵守

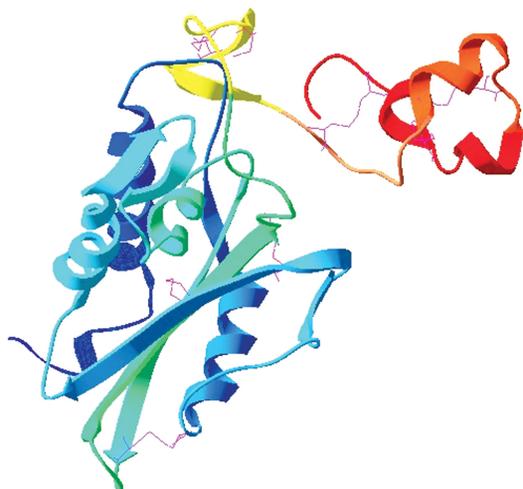


深灰色代表保守的半胱氨酸残基, 浅灰色代表其它保守的氨基酸残基, 黑框代表PR-1结构域高度保守的氨基酸残基。Stecrisp、triflin、ablomin、pseudechetoxin、pseudecin、latisemin以及natrin分别来源于竹叶青蛇(*Trimeresurus stejnegeri*)、黄绿烙铁头蛇(*Trimeresurus flavoviridis*)、蝮蛇(*Agkistrodon blomhoffi*)、澳大利亚眼镜蛇科的棕伊澳蛇(*Pseudechis australis*)、澳大利亚南部红腹伊澳蛇(*Pseudechis porphyriacus*)、半环扁尾蛇(*Laticauda semifasciata*)以及中国台湾的中华眼镜蛇(*Naja atra*)的毒腺; helothermine来源于墨西哥串珠蜥(*Heloderma horridum horridum*)的唾液腺; CRBGP来源于日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*)的口腔腺; hCRISP-1、hCRISP-2、hCRISP-3为人源CRISPs; mCRISP-4为鼠源CRISP。

The conserved cysteine residues and other conserved amino acid residues are highlighted in deep grey and light grey, respectively. The highly conserved amino acid residues in PR-1 domain are in the black box. Stecrisp, triflin, ablomin, pseudechetoxin, pseudecin, latisemin, and natrin are from the venoms of *Trimeresurus stejnegeri*, *Trimeresurus flavoviridis*, *Agkistrodon blomhoffi*, *Pseudechis australis*, *Pseudechis porphyriacus*, *Laticauda semifasciata*, *Naja atra*, respectively. Helothermine is from the salivary gland of *Heloderma horridum horridum*. CRBGP is from the buccal gland of *Lampetra japonica*. hCRISP-1, hCRISP-2, and hCRISP-3 represent CRISPs from *Homo sapiens*. mCRISP-4 represents CRISP from *Mus musculus*.

图1 CRISP家族成员氨基酸序列比对

Fig.1 The amino-acid sequence alignment of CRISP family members



蓝色部分代表PR-1结构域,红色部分代表CRD结构域,黄色部分代表铰链区(根据参考文献[3]改编)。

The PR-1 domain and CRD domain are colored mainly blue and red, respectively. The hinge region between the two domains is colored yellow (modified from reference [3]).

图2 富含半胱氨酸分泌蛋白stecrisp的空间结构

Fig.2 Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein(stecrisp)

CXXXCXC的模式。空间结构与N端的PR-1结构域分开,位于其侧面,通过铰链区与其相连。铰链区介于PR-1与CRD结构域之间,由20个氨基酸组成,含有2对二硫键,对连接PR-1结构域和CRD结构域及维持CRISP空间结构的稳定起着至关重要的作用。

### 3 哺乳动物中CRISP的生物学功能

CRISP在哺乳动物中分布比较广泛,继有学者在哺乳动物附睾中发现酸性附睾蛋白后,相继又在哺乳动物生殖系统中发现了大量CRISP成员。这些CRISPs之间序列同源性高达40%~80%,而且都分布于外分泌腺体中。依据组织特异性和序列同源性CRISPs可分为CRISP-1、CRISP-2、CRISP-3和CRISP-4四类<sup>[4]</sup>。

#### 3.1 CRISP-1

CRISP-1主要分布于睾丸中<sup>[1]</sup>,由各种哺乳动物的附睾分泌。根据所属物种的不同,CRISP-1通常在大鼠中被称为附睾蛋白(DE),在小鼠中被称为酸性附睾糖蛋白(AEG),以及在人类中被称为AEG相关蛋白(ARP)<sup>[1]</sup>。Cohen等<sup>[2]</sup>和Roberts等<sup>[5]</sup>研究发现,CRISP-1于精子获能过程中释放。在精子获能和随后诱导的精子顶体反应期间,与精子顶体区域结合的CRISP-1能够迁移到赤道部分从而参与精卵融合。

此外,也有研究报道CRISP-1首先可与精子卵透明带发生相互作用,随后通过与卵细胞补充位点的结合从而促进配子融合。但是,过量的外源CRISP-1却能够阻断精卵的结合<sup>[6]</sup>。Busso等<sup>[7]</sup>和Roberts等<sup>[8]</sup>证实,在精子获能期间CRISP-1能够抑制大鼠精子蛋白酪氨酸的磷酸化以及孕酮诱导的精子顶体反应。这意味着CRISP-1能够抑制精子获能过程,因此被视为去获能因子。进一步的研究结果表明了CRISP-1是通过具有离子通道调节活性的CRD结构域来担任去获能因子的角色的<sup>[2]</sup>。此外,Cohen等<sup>[6]</sup>研究还发现,CRISP-1对精子质膜的稳定也起着非常重要的作用。总而言之,CRISP-1在受精过程中是一种多功能蛋白,参与多种重要的生理学过程。

#### 3.2 CRISP-2

CRISP-2又称为睾丸特异精母蛋白(testis specific protein 1, TPX-1),其组织特异性很高,主要在人、大鼠和豚鼠精子的顶体和尾部表达<sup>[9-10]</sup>。近年来研究表明,精母细胞可通过表达和分泌CRISP-2,从而调节精子细胞与支持细胞(sertoli cell)的连接。Gibbs等<sup>[11-12]</sup>研究发现,CRISP-2不仅能够通过CRD结构域来调控心肌RyR(ryanodine receptor)通道的活性而引起Ca<sup>2+</sup>的变化,还能与MAP3K11(MAP kinase kinase kinase 11)修饰蛋白结合。在MAP3K11修饰蛋白的作用下,CRISP-2发生磷酸化,从而参与精子顶体发育的过程。2008年,Jamsai等<sup>[13]</sup>报道CRISP-2还可与配子发育蛋白1(gametogenetin 1, GGN1)结合形成CRISP2-GGN1复合物,该复合物在精子尾部重组和运动中也发挥着重要作用。与CRISP-1的功能相似,CRISP-2也能够参与精卵融合的过程<sup>[4]</sup>,这说明不同的CRISP也可能具有相似的功能。

#### 3.3 CRISP-3

CRISP-3又称SGP28(specific granule protein of 28 kDa),是一种特殊的、分子量为28 kDa的颗粒蛋白。CRISP-3首先是在人类中性粒细胞中发现的。Laine等<sup>[15]</sup>和Kratzschmar等<sup>[16]</sup>在人类的唾液腺、胰腺、前列腺中也发现了高表达水平的CRISP-3 mRNA,但是在附睾、卵巢、结肠中CRISP-3的表达水平则较低。此外,Bjartell等<sup>[17]</sup>在人类组织液,如唾液、汗液、血液和精浆中,也检测到了分泌的CRISP-3蛋白。近年来有研究报道,晚期前列腺癌病人在睾丸切除后血清中CRISP-3浓度下降,推测CRISP-3的表达可能与雄性激素受体功能相关。2010年,Pathak等<sup>[18]</sup>报道,CRISP-3能够与人类精浆中含有94个氨

基酸的前列腺分泌蛋白(prostate secretory protein of 94 amino acids, PSP94), 也被称为 $\beta$ -微精原蛋白( $\beta$ -microseminoprotein, MSP)发生相互作用。在前列腺肿瘤中, PSP94的表达水平表现出明显的降低, 甚至消失, 而CRISP-3的表达水平则明显增高。由于在某些病理过程中, CRISP-3的表达水平发生明显的改变, 因此可作为某些疾病的理想标记物<sup>[19]</sup>。研究发现, 在子宫内膜、肾上腺上皮癌症细胞以及慢性胰腺炎病人的胰腺细胞中, CRISP-3会有定量的过表达, 这意味着CRISP-3不仅在组织炎症和免疫应答过程中发挥重要作用, 还被认为是宫外孕、前列腺癌以及慢性胰腺炎的一种潜在生物标记物。近年来, 有文献报道, 源自中性粒细胞的CRISP-3与某些参与植物抗菌防御相关蛋白的序列同源性较高。因此, 推测其在先天免疫防御上也发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。

### 3.4 CRISP-4

CRISP-4是CRISP家族最新的成员, 主要以雄性激素依赖的方式由附睾上皮细胞分泌<sup>[20]</sup>。此外, 在其他组织, 如精囊、胸腺、脾和骨骼肌中, CRISP-4表达水平较低<sup>[21-22]</sup>。系统发育分析结果表明, 鼠源CRISP-4与人源的CRISP-1直系同源(图3)<sup>[21]</sup>。研究发现, CRISP-4在精子成熟以及精卵相互作用等方面发挥着重要作用。然而, 到目前为止CRISP-4参与配子相互作用时的具体分子作用机制还尚未见报道。近年来研究报道, 存在于人类和小鼠精子表面的瞬时受体电位M8(transient receptor potential M8, TRPM8)发生激活后能抑制由孕酮诱导的精子发生顶体反应。2011年, Gibbs等<sup>[23]</sup>通过膜片钳技术证实CRISP-4能抑制TRPM8的激活。虽然CRISP-4敲除的小鼠具有正常的交配能力且能生育, 但CRISP-4敲除小鼠的精子受孕酮诱导后发生顶体反应的能力要明显低于野生型。由于CRISP-4在男性生殖道中表达水平较高, 并且在精子成熟和受精过程中发挥着重要作用, 因此在男性不孕药的研发及不孕症

的治疗上, CRISP-4蛋白可被视为非激素男性避孕的药物靶点。

## 4 无脊椎及低等脊椎动物CRISP的生物学功能

### 4.1 蛇毒CRISP蛋白

蛇毒分泌液中富含大量CRISP蛋白, 关于CRISP蛋白作用机制及分子结构的研究多半来源于对蛇毒CRISP家族成员的研究。研究发现, 蛇毒CRISP家族成员对多种离子通道, 如 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 通道以及环核苷酸门控通道(cyclic nucleotide-gated ion channel, CNG)等具有阻断作用。

4.1.1 CNG通道阻断剂 环核苷酸门控离子(CNG)通道是非选择性的阳离子通道, 在调节视网膜光感受器和嗅觉神经元的感觉传导中发挥着重要作用。到目前为止, Yamazaki等<sup>[24]</sup>和Brown等<sup>[25]</sup>已分别从澳大利亚眼镜蛇科的棕伊澳蛇(*Pseudechis australis*)和澳大利亚南部红腹伊澳蛇(*Pseudechis porphyriacus*)的毒腺中分离出CNG通道蛋白阻断剂Pseudechetoxin(PsTx)和Pseudecin(Pdc)。其中, PsTx是眼镜蛇属中发现的第一个CRISP家族成员。序列分析结果表明, PsTx和Pdc为CRISP蛋白家族成员, 具有较高的同源性。电生理实验结果证实, PsTx和Pdc均能阻断视网膜光感受器和嗅觉神经元的感觉传导, 但是PsTx对嗅觉神经元和视网膜光感受器CNG通道的亲和力比Pdc要高出15~30倍。晶体结构分析结果显示, PsTx和Pdc蛋白PR-1结构域和CRD结构域之间凹面的氨基酸序列明显不同, 这说明结构域间凹面对PsTx和Pdc与CNG通道的结合具有重要的作用<sup>[26]</sup>。此外, PsTx和Pdc还含有一个 $\text{Na}^+$ 结合位点, 但具体功能未知, 推测其可能对高级结构的稳定具有重要作用。

4.1.2  $\text{Na}^+$ 通道阻断剂 钠离子通道是细胞质膜上的一种跨膜糖蛋白, 通常由三个亚基组成。钠离子

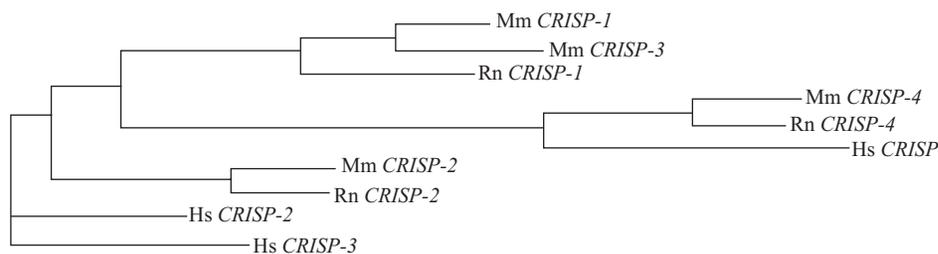


图3 大鼠(Mm)、小鼠(Rn)与人源(Hs) CRISP系统发育分析(根据参考文献[21]修改)

Fig.3 Phylogenetic analysis of the murine and human CRISP(modified from reference [21])

通道主要选择性允许 $\text{Na}^+$ 跨膜通过,其主要功能是维持细胞兴奋性及其传导,对可兴奋细胞如神经元、心肌细胞、骨骼肌细胞和内分泌细胞等在动作电位的产生和传播中发挥重要作用。2008年, Suzuki等<sup>[26]</sup>研究发现,蛇毒PsTx和蛇毒Pdc的结构中含有一个 $\text{Na}^+$ 结合位点,即Ser73、Gln74以及Ser128。但是,尚未在其它蛇毒CRISP家族成员的结构中发现 $\text{Na}^+$ 结合位点,推测可能与Gln74被其它的氨基酸残基替代有关。目前,关于 $\text{Na}^+$ 通道的报道还不够完善,有待于进一步探究。

**4.1.3  $\text{K}^+$ 通道阻断剂** 钾离子通道是生物体中最基本的功能蛋白之一,对钾离子有高度离子选择通透性,在生理过程中发挥着重要的作用。Tu等<sup>[27]</sup>从中国台湾的中华眼镜蛇(*Naja atra*)和竹叶青蛇(*Trimeresurus stejnegeri*)的毒腺中分别分离纯化出具有 $\text{K}^+$ 通道阻断功能的CRISP家族成员——natrin和stecrisp。序列分析结果表明, natrin和stecrisp的同源性较高。Natrin是由221个氨基酸构成的蛇毒蛋白,分子量为25 kDa。免疫沉淀实验结果表明, natrin可以与来自骨骼肌的兰尼碱受体1(ryanodine receptor 1, RyR1)结合<sup>[28]</sup>。此外, natrin能抑制兰尼碱与RyR1的结合,同时抑制RyR1钙通道的激活。电生理实验表明, natrin可以引起高钾诱导的离体小鼠胸主动脉的收缩,但对其基础张力没有任何影响。黄燕军等<sup>[29]</sup>研究证实, natrin能够抑制大鼠肝脏脂质过氧化作用。此外, natrin还能够诱导胃癌MGC-830细胞发生凋亡。Stecrisp也是由221个氨基酸构成,但是其表观分子量在不同条件下是有差异的。有文献报道,纯化后的stecrisp的表观分子量在变性凝胶电泳中为24 kDa,在还原状态下为28 kDa。这种差异表明, stecrisp分子中可能存在稳定结构的二硫键。与natrin的多样性功能相似, stecrisp也具有多种功能,能够在精卵融合、先天宿主免疫以及阻断离子通道等方面发挥重要作用<sup>[3]</sup>。

**4.1.4  $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻断剂** 钙离子通道广泛存在于各种生物组织的细胞膜中,参与神经递质的释放和心肌的活动等。到目前为止,已有科研团队陆续从蛇毒中分离纯化出多种具有 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻断功能的CRISP家族成员,如ablomin(*Agkistrodon blomhoffi*)、triflin(*Trimeresurus flavoviridis*)、latisemin(*Laticauda semifasciata*)、piscivorin(*Agkistrodon p. piscivorus*)、ophanin(*Ophiophagus Hannah*)以及catrin-2(*Crotalus atrox*)。序列分析结果表明,这些 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻断剂的

同源性较高,且半胱氨酸残基的位置相对保守。电生理实验结果表明,这些富含半胱氨酸分泌蛋白能够通过阻断 $\text{Ca}^{2+}$ 通道从而抑制老鼠尾部动脉平滑肌的收缩,但是对由咖啡因诱导引起的收缩则无明显抑制作用。其中,ablomin、triflin、latisemin具有较高的 $\text{Ca}^{2+}$ 通道抑制活性。

**4.1.5 炎症调节功能** 2011年, Wang等<sup>[30]</sup>研究发现, CRISP作为炎症调节因子在机体内发挥重要作用。实时定量PCR和流式细胞仪检测结果表明,来源于*Naja atra*毒腺的natrin能够以依赖硫酸乙酰肝素和 $\text{Zn}^{2+}$ 的方式,通过激活MAPK和NF- $\kappa$ B通路来诱导血管内皮细胞上黏着分子、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)以及E-选择素(E-selectin)表达水平的上调,从而达到最终促进人单核细胞U937黏附于血管内皮细胞的目的。因此, natrin作为免疫调节因子能够在伤口治愈过程中发挥重要作用。

## 4.2 Helothermine

Helothermine(HLTX)是第一个在爬行动物中发现的CRISP家族成员,主要分布于墨西哥串珠蜥蜴(*Heloderma horridum*)的唾液腺中。HLTX与其它的CRISP家族成员一样,也是单链蛋白,由223个氨基酸组成,分子量约为25 kDa,能够阻断多种离子通道,包括电压门控型 $\text{Ca}^{2+}$ 通道,电压门控型 $\text{K}^+$ 通道,以及兰尼碱受体(Ryanodine receptor, RyR)等<sup>[31]</sup>。体内实验研究表明,小鼠被持续注射HLTX后,会出现嗜睡、后肢局部瘫痪以及体温下降等症状,这表明HLTX是一个低温毒素。

## 4.3 Allurin

Allurin是通过分离纯化两栖动物——非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)卵胶膜的裂解物而得到的富含半胱氨酸蛋白家族成员,由184个氨基酸组成,分子量为21 kDa。Allurin是第一个在雌性生殖道中发现的CRISP家族成员,与哺乳动物CRISP蛋白家族具有较高的序列同源性。通常CRISP蛋白由三个结构域组成,而allurin则仅含有PR-1结构域和铰链区,缺少C末端的离子通道调节结构域<sup>[32]</sup>。Sugiyama等<sup>[33]</sup>研究发现, allurin通常以稳定的多聚体形式存在,且这种多聚体不能被SDS和 $\beta$ -巯基乙醇破坏。同哺乳动物精子结合蛋白的功能相似, allurin具有精子引诱蛋白(sperm chemoattractant protein)的功能,能够在精子发育的不同生命时期与精子结合,帮助其从一个发

育时期进入到下一个发育时期<sup>[34-35]</sup>。

#### 4.4 CRBGP(cysteine-rich buccal gland protein)

CRBGP是从日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*)口腔腺中分离纯化出的一种新型富含半胱氨酸分泌蛋白, 其因与CRISP家族成员具有高度同源性, 同样具有16个高度保守的半胱氨酸残基, 因此将其命名为富含半胱氨酸的口腔腺分泌蛋白(cysteine-rich buccal gland protein, CRBGP)。这是首次在原始无颌类脊椎动物中发现的CRISP家族成员。Xiao等<sup>[36]</sup>已经从七鳃鳗口腔腺中分离纯化出分子量为26 kDa的天然CRBGP。Chi等<sup>[37]</sup>研究发现, 七鳃鳗来源的CRBGP是Na<sup>+</sup>通道阻断剂, 能够阻断海马神经元和背根神经元的Na<sup>+</sup>电流, 降低神经元动作电位的频率和振幅, 并引起时程延长。此外, Chi等<sup>[37]</sup>发现CRBGP对海马神经元的K<sup>+</sup>通道也具有阻断作用。与此同时, Ito等<sup>[38]</sup>也发现, 来源于七鳃鳗的CRISP(CRBGP)能够抑制去极化引起的小鼠平滑肌收缩, 并且推测CRBGP对Ca<sup>2+</sup>通道也具有阻断作用。不过仍需电生理实验进一步证明。此外, CRBGP还具有免疫调节活性, 能够抑制fMLP诱导的中性粒细胞迁移。因此推测, 七鳃鳗来源的CRBGP具有多种生物学功能, 很有可能在七鳃鳗吸血食肉的过程中阻断宿主鱼体的疼痛反应以及免疫反应等。

#### 4.5 Tex31

Tex31是从软体动物——织锦芋螺(*Conus textile*)的毒液中分离纯化出的一种新型CRISP家族蛋白, 分子量约为31 kDa, 含有22个半胱氨酸, 是目前发现的CRISP家族蛋白中半胱氨酸含量最多的成员。Tex31具有类似于丝氨酸蛋白酶的蛋白水解酶活性, 能够水解加工芋螺毒腺中以前体肽形式分泌的多种神经活性肽。这些神经活性多肽经Tex31剪切去除前体肽后具有生物学活性。此外, Guo等<sup>[3]</sup>和Cohen等<sup>[4]</sup>发现, 由于Tex31的PR-1结构域中含有暴露的保守残基(His60、Glu75、Glu96和His115), 因此推测其他PR-1蛋白也可能会具有蛋白水解活性。

### 5 应用展望

CRISP蛋白家族成员在哺乳动物和非哺乳动物中组织分布比较广泛, 具有非常多样的生物学功能, 不仅在精子成熟、精卵融合、免疫防御、多种类型离子通道调控等方面都发挥着重要的作用, 还在临床疾病的检测预防以及治疗等方面也具有良好

的应用前景。此外, 由于CRISP大多通过与细胞膜上受体结合而发挥作用, 若开发为药物可避开入膜的问题。本课题组在研究最古老的脊椎动物七鳃鳗时, 发现其口腔腺中含有大量的CRISP, 能够抑制海马神经元和背根神经元的Na<sup>+</sup>电流, 以及神经元动作电位的频率<sup>[39]</sup>。因此, 推测七鳃鳗口腔腺中含有的CRISP蛋白很可能是一种局部麻醉抑制剂, 能够抑制宿主鱼体的局部疼痛反应。然而, 目前在国内关于此蛋白的功能研究还依然处于起步阶段。对七鳃鳗CRBGP生物学功能的进一步研究可为今后开发新型镇痛药物奠定重要的理论基础。

综上所述, CRISP无论是在阐明机体的生理功能, 对疾病的分析和治疗, 还是在疾病的防治中都发挥重要的作用, 对其深入的研究将具有较高的科学理论意义和应用价值。

### 参考文献 (References)

- 1 Udby L, Bjartell A, Malm J, Egesten A, Lundwall A, Cowland JB, *et al.* Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. *J Andrology* 2005; 26(3): 333-42.
- 2 Cohen DJ, Maldera JA, Vasen G, Ernesto JI, Munoz MW, Battistone MA, *et al.* Epididymal protein CRISP1 plays different roles during the fertilization process. *J Andrology* 2011; 32(6): 672-8.
- 3 Guo M, Teng M, Niu L, Liu Q, Huang Q, Hao Q. Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K<sup>+</sup> channel inhibitor-like fold. *J Biol Chem* 2005; 280(13): 12405-12.
- 4 Cohen DJ, Da Ros VG, Busso D, Ellerman DA, Maldera JA, Goldweic N, *et al.* Participation of epididymal cysteine-rich secretory proteins in sperm-egg fusion and their potential use for male fertility regulation. *Asian J Androl* 2007; 9(4): 528-32.
- 5 Roberts KP, Johnston DS, Nolan MA, Wooters JL, Waxmonsky NC, Piehl LB, *et al.* Structure and function of epididymal protein cysteine-rich secretory protein-1. *Asian J Androl* 2007; 9(4): 508-14.
- 6 Cohen DJ, Busso D, Da Ros V, Ellerman DA, Maldera JA, Goldweic N, *et al.* Participation of cysteine-rich secretory proteins (CRISP) in mammalian sperm-egg interaction. *Int J Dev Biol* 2008; 52(5/6): 737-42.
- 7 Busso D, Cohen DJ, Maldera JA, Dematteis A, Cuasnicu PS. A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: Involvement in sperm-zona pellucida interaction. *Biol Reprod* 2007; 77(5): 848-54.
- 8 Roberts KP, Wamstad JA, Ensrud KM, Hamilton DW. Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1. *Biol Reprod* 2003; 69(2): 572-81.
- 9 Busso D, Cohen D, Hayashi M, Kasahara M, Cuasnicu P. Human testicular protein TPX1/CRISP-2: Localization in spermatozoa, fate after capacitation and relevance for gamete interaction. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(4): 299-305.
- 10 Du Y, Huang X, Li J, Hu Y, Zhou Z, Sha J. Human testis specific

- protein 1 expression in human spermatogenesis and involvement in the pathogenesis of male infertility. *Fertil Steril* 2006; 85(6): 1852-4.
- 11 Gibbs GM, Bianco DM, Jamsai D, Herlihy A, Risteovski S, Aitken RJ, *et al.* Cysteine-rich secretory protein 2 binds to mitogen-activated protein kinase kinase 11 in mouse sperm. *Biol Reprod* 2007; 77(1): 108-14.
- 12 Gibbs GM, Scanlon MJ, Swarbrick J, Curtis S, Gallant E, Dulhunty AF, *et al.* The cysteine-rich secretory protein domain of Tpx-1 is related to ion channel toxins and regulates ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Biol Chem* 2006; 281(7): 4156-63.
- 13 Jamsai D, Bianco DM, Smith SJ, Merriner DJ, Ly-Huynh JD, Herlihy A, *et al.* Characterization of gametogenetin 1 (GGN1) and its potential role in male fertility through the interaction with the ion channel regulator, cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) in the sperm tail. *Reproduction* 2008; 135(6): 751-9.
- 14 Busso D, Goldweic NM, Hayashi M, Kasahara M, Cuasnic PS. Evidence for the involvement of testicular protein CRISP2 in mouse sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 2007; 76(4): 701-8.
- 15 Laine M, Porola P, Udby L, Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N, *et al.* Low salivary dehydroepiandrosterone and androgen-regulated cysteine-rich secretory protein 3 levels in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2007; 56(8): 2575-84.
- 16 Kratzschmar J, Haendler B, Eberspaecher U, Roosterman D, Donner P, Schleuning WD. The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Eur J Biochem* 2004; 236(3): 827-36.
- 17 Bjartell AS, Al-Ahmadie H, Serio AM, Eastham JA, Eggner SE, Fine SW, *et al.* Association of cysteine-rich secretory protein 3 and  $\beta$ -microseminoprotein with outcome after radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 2007; 13(14): 4130-8.
- 18 Pathak BR, Breed AA, Nakhawa VH, Jagtap DD, Mahale SD. Growth inhibition mediated by PSP94 or CRISP-3 is prostate cancer cell line specific. *Asian J Androl* 2010; 12(5): 677-89.
- 19 Bjartell A, Johansson R, Björk T, Gadaleanu V, Lundwall Å, Lilja H, *et al.* Immunohistochemical detection of cysteine-rich secretory protein 3 in tissue and in serum from men with cancer or benign enlargement of the prostate gland. *Prostate* 2006; 66(6): 591-603.
- 20 Turunen HT, Sipila P, Krutskikh A, Toivanen J, Mankonen H, Hamalainen V, *et al.* Loss of cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) leads to deficiency in sperm-zona pellucida interaction in mice. *Biol Reprod* 2012; 86(1): 11-8.
- 21 Nolan MA, Wu L, Bang HJ, Jelinsky SA, Roberts KP, Turner TT, *et al.* Identification of rat cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) as the ortholog to human CRISP1 and mouse Crisp4. *Biol Reprod* 2006; 74(5): 984-91.
- 22 Reddy T, Gibbs GM, Merriner DJ, Kerr JB, O'Bryan MK. Cysteine-rich secretory proteins are not exclusively expressed in the male reproductive tract. *Dev Dynam* 2008; 237(11): 3313-23.
- 23 Gibbs GM, Orta G, Reddy T, Koppers AJ, Martinez-Lopez P, de la Vega-Beltran JL, *et al.* Cysteine-rich secretory protein 4 is an inhibitor of transient receptor potential M8 with a role in establishing sperm function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(17): 7034-9.
- 24 Yamazaki K, Guo L, Sugahara K, Zhang C, Enzan H, Nakabeppu Y, *et al.* Identification and biochemical characterization of a novel transcription elongation factor, Elongin A3. *J Biol Chem* 2002; 277(29): 26444-51.
- 25 Brown RL, Haley TL, West KA, Crabb JW. Pseudochetoxin: A peptide blocker of cyclic nucleotide-gated ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(2): 754-9.
- 26 Suzuki N, Yamazaki Y, Brown RL, Fujimoto Z, Morita T, Mizuno H. Structures of pseudochetoxin and pseudocin, two snake-venom cysteine-rich secretory proteins that target cyclic nucleotide-gated ion channels: Implications for movement of the C-terminal cysteine-rich domain. *Acta Crystallogr D* 2008; 64(10): 1034-42.
- 27 Tu X, Wang J, Guo M, Zheng D, Teng M, Niu L, *et al.* Purification, partial characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction of two cysteine-rich secretory proteins from *Naja atra* and *Trimeresurus stejnegeri* venoms. *Acta Crystallogr D* 2004; 60(6): 1108-11.
- 28 Zhou Q, Wang QL, Meng X, Shu Y, Jiang T, Wagenknecht T, *et al.* Structural and functional characterization of ryanodine receptor-natrin toxin interaction. *Biophys J* 2008; 95(9): 4289-99.
- 29 黄燕军, 宋慧, 李福森, 李姝, 焦杨, 黄昱. 广西眼镜蛇毒中Natrin的抗脂质过氧化作用. 大众科技(Huang Yanjun, Song Hui, Li Fusen, Li Shu, Jiao Yang, Huang Yu. The anti-lipid peroxidation of Natrin from Guangxi *Cobra Venom*. *Da Zhong Ke Ji*) 2011; 10: 178-9.
- 30 Wang YL, Kuo JH, Lee SC, Liu JS, Hsieh YC, Shih YT, *et al.* Cobra CRISP functions as an inflammatory modulator via a novel Zn<sup>2+</sup>-and heparan sulfate-dependent transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 2010; 285(48): 37872-83.
- 31 Estrella A, Sanchez EE, Galan JA, Tao WA, Guerrero B, Navarrete LF, *et al.* Characterization of toxins from the broad-banded water snake *Helicops angulatus* (Linnaeus, 1758): Isolation of a cysteine-rich secretory protein, Helicopsin. *Arch Toxicol* 2011; 85(4): 305-13.
- 32 Burnett LA, Anderson DM, Rawls A, Bieber AL, Chandler DE. Mouse sperm exhibit chemotaxis to allurin, a truncated member of the cysteine-rich secretory protein family. *Dev Biol* 2011; 360(2): 318-28.
- 33 Sugiyama H, Burnett L, Xiang X, Olson J, Willis S, Miao A, *et al.* Purification and multimer formation of allurin, a sperm chemoattractant from *Xenopus laevis* egg jelly. *Mol Reprod Dev* 2009; 76(6): 527-36.
- 34 Jalkanen J, Huhtaniemi I, Poutanen M. Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): A member of the Crisp family exclusively expressed in the epididymis in an androgen-dependent manner. *Biol Reprod* 2005; 72(5): 1268-74.
- 35 Xiang X, Kittelson A, Olson J, Bieber A, Chandler D. Allurin, a 21 kD sperm chemoattractant, is rapidly released from the outermost jelly layer of the *Xenopus* egg by diffusion and medium convection. *Mol Reprod Dev* 2005; 70(3): 344-60.
- 36 Xiao R, Li QW, Perrett S, He RQ. Characterisation of the fibrinolytic properties of the buccal gland secretion from *Lampetra japonica*. *Biochimie* 2007; 89(3): 383-92.
- 37 Chi S, Xiao R, Li Q, Zhou L, He R, Qi Z. Suppression of neuronal excitability by the secretion of the lamprey (*Lampetra japonica*) provides a mechanism for its evolutionary stability. *Pflug Arch Eur J Phy* 2009; 458(3): 537-45.
- 38 Ito N, Mita M, Takahashi Y, Matsushima A, Watanabe YG, Hirano S, *et al.* Novel cysteine-rich secretory protein in the buccal gland secretion of the parasitic lamprey, *Lethenteron japonicum*. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358(1): 35-40.
- 39 Xiao R, Pang Y, Li QW. The buccal gland of *Lampetra japonica* is a source of diverse bioactive proteins. *Biochimie* 2012; 94(5): 1075-9.