

新发现的胰脏活性多肽

马建农 戚正武

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

提 要

胰脏中除了人们所熟悉的胰岛素、胰高血糖素、生长激素释放抑制因子和胰多肽外, 近几年又陆续发现了几个新的胰脏活性多肽。它们是甘丙肽 (galanin), 胰脏释放抑制因子 (pancreastatin), 胰岛淀粉样多肽 (islet amyloid polypeptide) 及胰岛素拮抗肽。本文着重介绍它们的结构与功能。对这些活性多肽的深入研究, 无疑在理论上或临床实践中均将有其重要的意义。

关键词 胰脏活性多肽, 多肽结构, 生理功能

一个世纪前, 两位德国生理学家 Von Mering & Minkowski 发现切除狗的胰腺会出现类似于人糖尿病的症状。由此, 胰腺的内分泌功能开始引起人们的重视。1916 年, Schafer 发现被称为兰氏岛的胰腺细胞可以分泌控制糖代谢的活性物质, 并称之为胰岛素。1922 年, Banting & Best 成功地从小牛胰腺中分离了胰岛素并用于糖尿病的治疗, 从而揭开了胰脏中生物活性多肽研究的序幕。

人们对胰岛素的分子结构、生物效应、结构与功能的关系以及作用机理的研究已积累了极其丰富的资料, 取得了巨大进展, 并且也推动了其它学科的发展。与胰岛素有关的工作已数次获得诺贝尔奖就是明证。在胰岛素之后, 又陆续从胰脏中发现了胰高血糖素、生长激素释放抑制因子和胰多肽。对它们的研究也已相当深入。近年来, 随着分离、分析和生物活性检测技术的突飞猛进, 在胰脏中又有不少新的活性多

对的鸟苷 (G)。这个 G 在连接反应中除去。

在上述条件下, ribozyme 合成 42 核糖核苷酸仅需要 5—60 min。这个实验的成功是在 RNA 自我复制方面的一项重大突破。它标志着在没有蛋白质(酶)的参与下, RNA 可以催化另一个 RNA 分子的合成。今后, ribozyme 如能在模拟原始环境下催化简单的活化核苷酸在模板上发生聚合反应, 则能更加使人相信 RNA 是生命起源中最古老的生物大分子。

参 考 文 献

- 1 刘望夷, 祁国荣. 见: 敖世洲等主编, 真核生物基因的结构与功能, 北京: 科学出版社, 1989; 46—94
- 2 祁国荣, 刘望夷. 见: 王德宝, 祁国荣主编, 核酸-结构, 功能与合成(下册), 北京: 科学出版社, 1987; 189—222
- 3 Kole R *et al.* *Cell*, 1980; 19: 881

- 4 Cech T R *et al.* *Cell*, 1981; 27: 487
- 5 Dahlberg AE. *Cell*, 1989; 57: 525
- 6 董焄, 刘望夷. 细胞生物学杂志, 1990; 12: 印刷中
- 7 Endo Y, Wool I G. *J Biol Chem*, 1982; 257: 9054
- 8 Endo Y *et al.* *J Biol Chem*, 1987; 262: 5908
- 9 Endo Y, Tsurugi K. *J Biol Chem*, 1987; 262: 8128
- 10 Endo Y, Tsurugi K. *J Biol Chem*, 1988; 263: 8735
- 11 顾梓伟等. 化学学报, 1984; 42: 943
- 12 Maraganore J M *et al.* *J Biol Chem*, 1987; 262: 11628
- 13 Casellas P *et al.* *Eur J Biochem*, 1988; 176: 581
- 14 Wantanabe K, Funatsu G. *Agr Biol Chem*, 1988; 52: 1067
- 15 Endo Y *et al.* *Eur J Biochem*, 1988; 171: 45
- 16 刘望夷, 王德宝. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16: 2
- 17 Jeffries A C, Symons R H. *Nucleic Acids Res*, 1989; 17: 1371
- 18 刘望夷. 生命的化学, 1989; 9: 12
- 19 Doudna J A, Szostak J W. *Nature*, 1989; 339: 519

[本文于 1990 年 4 月 16 日收到]

肽被发现,即甘丙肽(galanin)、胰脏释放抑制因子(pancreastatin)、胰岛淀粉样多肽(islet amyloid polypeptide)以及我们实验室所发现的胰岛素拮抗肽。今逐一加以介绍。

一、甘丙肽(galanin)

体内有不少活性多肽的C端羧基是以酰胺

形式存在的,此酰胺结构一般为生物活性所必需。因此,人们推测在体内凡是C端为酰胺的多肽都有其相应的生物活性。Tatemoto等用检测多肽C端的羧基为酰胺的方法,分离纯化了一系列新的活性多肽,其中包括甘丙肽^[1]。它们都以C端酰胺为特征。

甘丙肽最初是从猪的小肠中纯化得到的一

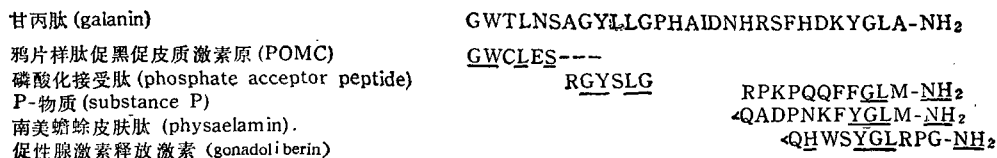


图1 甘丙肽与其它活性多肽一级结构的比较

加底线者表示和甘丙肽的对应位点相同,<Q代表焦谷酰基

个二十九肽。N端为甘氨酸残基,C端是丙氨酸酰胺^[1]。虽然对该肽在各种组织中的分布还不太清楚,但组织化学和放免测定结果都表明人和其它动物的胰脏中都含有相当可观的甘丙肽。

猪甘丙肽的一级结构已经阐明。它和某些多肽有同源序列,特别是它的C端与许多神经肽的C端有同源性(图1)^[1]。

在纯化甘丙肽的同时,Tatemoto等观察到它具有使大鼠平滑肌收缩和引起狗轻微的持续性高血糖效应^[1]。在体外培养的胰岛细胞中,甘丙肽抑制胰岛素释放的能力和所用的剂量有关;而且,当培养液所含的葡萄糖是正常生理浓度时(5.5 mmol/L),甘丙肽的抑制效应最强^[2]。但胰高血糖素的释放却不受影响^[2]。由此推测,在正常生理条件下,甘丙肽可能是胰岛β细胞释放胰岛素的调节因子。Hermansen等进一步研究了甘丙肽对离体胰岛细胞中各多肽激素释放的影响,认为甘丙肽对胰岛β、δ细胞中多肽激素的释放具有重要的生理意义,而对α细胞中胰高血糖素的释放可能并不重要^[3]。Dunning等也得到类似的结果。上述结果表明,甘丙肽可能具有调节人胰岛素释放的作用。但是,小剂量的甘丙肽对人血浆中胰岛素的水平未见有明显的影响。甘丙肽在体内的作用是

否有别于离体实验结果,尚待证实。

Yanaihara等^[4]合成了各种甘丙肽的类似物,观察它们对离体大鼠胰腺细胞中葡萄糖所诱导的胰岛素释放的影响。发现甘丙肽N端甘氨酸残基去除后,其抑制活力几乎完全丧失;但当N端残基继续减少时,却表现出与其完整分子截然相反的生物效应。这在活性多肽中是极少见的,其意义不详。

前面曾提到甘丙肽能引起大鼠平滑肌的收缩。进一步的实验表明不是所有类型的平滑肌对甘丙肽都有响应。Ekblad等^[5]观察到甘丙肽和甘丙肽(1—10)片段能直接作用人的盲肠、大鼠空肠的纵肌和大鼠子宫颈的平滑肌。这些结果表明,平滑肌受体群识别的是甘丙肽的N端部分。与之不同的是,甘丙肽又有神经多肽的作用,作用于突触前并对平滑肌进行调控。而这种作用需要有完整的分子,但也可能是分子的C端部分,因为甘丙肽(1—10)片段对此无效^[5]。甘丙肽在中枢神经系统的分布很广泛,它的C端结构与已知的某些神经肽如P-物质很相似(图1),这就不难理解它作为神经调节肽其C端部分的重要性。

甘丙肽的发现又提供了一个具有神经多肽和多肽激素双重作用的例子。这也说明神经系统与内分泌系统并不是截然分开的,而是有内

在的必然联系。追溯到进化的早期阶段，这两个系统可能有共同的起源^[6]。

二、胰脏释放抑制因子(pancreastatin)

胰脏释放抑制因子是 Tatemoto 等借化学检测手段寻找新的活性多肽的又一成果。他们从猪的胰脏中发现了另一C端酰胺类活性多肽

——胰脏释放抑制因子^[7]。它能强烈抑制因葡萄糖灌注离体大鼠胰腺所引起的胰岛素释放，对胰脏生长激素释放抑制因子(somatostatin)的释放也有抑制作用。

胰脏释放抑制因子是一个四十九肽，N端为甘氨酸残基，C端是甘氨酸酰胺(图2)^[7]。现已人工合成此肽。由于它与其它活性多肽没有明

猪胰脏释放抑制因子	GWPQAPA	MDGAGKTGAE	EAQPPEGKGA	REHSRQEEEE	E..TAGAPQG	LFRG-NH ₂	
嗜铬粒蛋白 A 的部分序列							
(猪)	PSLGKEMQR	...GWPQAPA	MDGAGKTGAE	EAQPPEGKGA	REHSRQEEEE	E..TAGAPQG	LFRGGKRGEP AQE
(人)	PSLGKKEIR	KGESRSEALA	VDGAGKPGA	EAQDPEGKGE	QEHSSQKEEE	EE,MAVVPQG	LFRGGKSGML EQE
(牛)	PSLGNKETQR	AAPGWPE...	..DGAGKMGAE	EAKPPEGKGE	WAHSRQEEEE	...MARAPQV	LFRGGKSGEP EQE
(鼠)	FYSGYKIKQK	DDGGQSESQA	VN..GKTGAS	EAVPSEGKGE	LEHSQQEEDG	EEAMAGPPQG	LFRGGKQGEL ERK

图2 猪胰脏释放抑制因子的一级结构及其和猪、人、牛、大鼠嗜铬粒蛋白A中相应序列同源性的比较
划线者表示蛋白质后加工过程中可能的酶切位点

显的同源性，曾认为该肽应归属于一个新的多肽家族。但是，不久就有两家实验室几乎同时指出猪胰脏释放抑制因子和牛嗜铬粒蛋白 A (chromogranin A) 的部分序列有高度的同源性^[8,9]。Iacangelo 等^[10]又发现它和人及鼠的嗜铬粒蛋白 A 的相应序列也有很高的同源性，同猪的嗜铬粒蛋白 A 的相应序列则完全相同(图2)。

早在二十多年前，在牛的肾上腺髓质的嗜铬粒细胞中就已经发现了嗜铬粒蛋白 A 的存在，但其功能迄今不详。它属于分泌型糖蛋白，分子量 48—50 kD，分布非常广泛。

Eiden^[8] 以及 Hutter & Benedum^[9] 不仅指出了胰脏释放抑制因子和嗜铬粒蛋白 A 之间的高度同源性，而且也指明嗜铬粒蛋白 A 中含有蛋白质后加工所需的典型信息，即活性多肽 N 端的碱性氨基酸残基和形成活性多肽 C 端酰胺时其前体中所特有的氨基酸序列：-X-Gly-Lys/Arg-Lys/Arg，X 是加工后羧基酰胺化的 C 端氨基酸残基，Gly 作为酰胺的供体；Gly 之后是成对的碱性氨基酸残基，有时则只有 Lys 或 Arg 中的一个^[11]。当然，这样的序列也未必都是蛋白质后加工的位点，实际情况要复杂得多。最新的研究结果表明，嗜铬粒蛋白 A 可以作为胰脏释放抑制因子的前体^[10]。

化学合成的胰脏释放抑制因子的 C 端肽段

14—49 及 33—49，它们同完整分子一样能有效地抑制葡萄糖引起的胰岛素的快速分泌相^[7]。这一结果表明，胰脏释放抑制因子的活性部位位于肽的 C 端。

在离体大鼠的胰腺细胞中，由葡萄糖诱导产生的胰岛素分泌呈快、慢两相。胰脏生长激素释放抑制因子的分泌过程也与之相似。胰脏释放抑制因子仅能强烈抑制胰岛素的快速分泌相而对其慢速分泌相影响甚微；它还抑制胰脏生长激素释放抑制因子的快速分泌相，但不显著。然而，当用精氨酸灌注离体大鼠的胰腺细胞时，胰岛素和胰脏生长激素释放抑制因子的快速分泌相都明显被胰脏释放抑制因子所抑制^[12]。它还能抑制由胰高血糖素、血管活性肠肽、胃抑肽及胆囊收缩素-8 诱导产生的胰岛素的分泌过程。

另有实验表明，胰脏释放抑制因子对离体大鼠脂肪细胞中葡萄糖的基础代谢有轻微的促进作用，但它却抑制胰岛素的促脂合成作用^[13]。用小白鼠做的整体实验也证实了离体实验的部分结果。胰脏释放抑制因子除了主要影响胰腺多肽激素的释放外，还影响胰岛素的生物功能。而且，它的作用也不限于胰脏。甲状旁腺细胞对胰脏释放抑制因子就比胰腺细胞敏感。

一般认为，胰岛素分泌量的绝对或相对不足是原发性糖尿病发病的基本原因。大多数糖

尿病患者缺乏葡萄糖引起的胰岛素的快速分泌相。过去曾认为,这可能是由于胰岛β细胞膜上与葡萄糖受体有关的机制发生了障碍。但是,新近发现的胰脏释放抑制因子或许能提供一个更合理的解释。因此,对胰脏释放抑制因子的深入研究,也许能为治疗糖尿病带来新的希望。

三、胰岛淀粉样多肽 (islet amyloid polypeptide, IAPP,亦称之为 amylin)

在早期的研究中,该肽一度被称为“糖尿病

相关肽”(diabetes-associated peptide 简写成 DAP)它是从胰岛素非依赖型或 II 型糖尿病患者的胰脏淀粉样沉积物中,分离纯化到的一种主要蛋白质组分^[44]。这种淀粉样沉积仅限于兰氏岛,90%以上的 II 型糖尿病患者有此特征。相反,胰岛素依赖型糖尿病患者未见类似的报道。在正常人的兰氏岛中,后来也发现有对 DAP 专一的免疫反应物质^[45]。于是,DAP 这名称被 IAPP 或 amylin 所替代。此外,在胰岛β细胞瘤患者和患糖尿病动物的胰脏淀粉样沉积物中也纯化了类似的多肽。

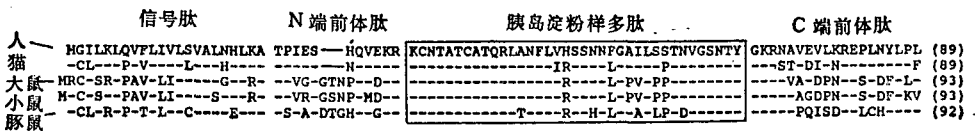


图 3 人、猫、大鼠、小鼠和豚鼠的胰岛淀粉样多肽前体一级结构比较

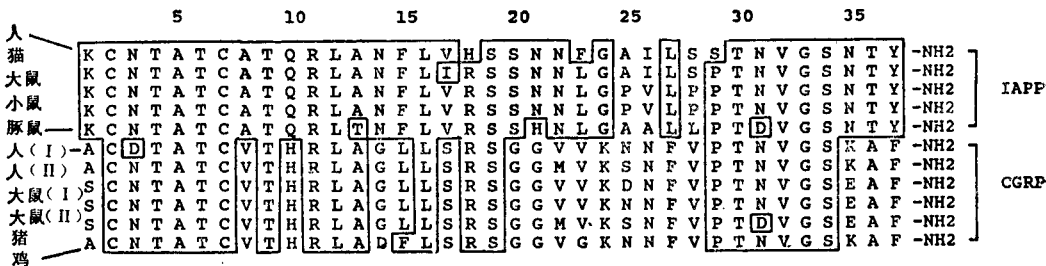


图 4 几种不同种属来源的胰岛淀粉样多肽和降钙素基因相关肽一级结构比较

IAPP: 胰岛淀粉样多肽; CGRP: 降钙素基因相关肽

应用 DNA 重组技术,已有五种哺乳类的 IAPP 的前体结构被阐明。它们的基本结构框架非常相似,都含有四个结构域:信号肽、N 端前体肽、活性多肽及 C 端前体肽(图 3)^[46]。N 端前体肽的 C 端是-Lys-Arg-, C 端前体肽的 N 端是-Gly-Lys-Arg-,这都是蛋白质后加工的典型酶切位点^[47]。五种来源的 IAPP,其 N、C 两端肽段都高度保守,保守区占整个分子的 74%。IAPP 和哺乳类及鸟类的降钙素基因相关肽(calcitonine gene related peptide 简写成 CGRP)也有很高的同源性。同 IAPP 一样, CGRP 的 N、C 两端结构也是高度保守区域(图 4)^[46]。

体外实验证实, IAPP 能明显抑制大鼠骨

骼肌中胰岛素促进葡萄糖利用和糖原合成的速度,而对离体大鼠脂肪细胞中葡萄糖的代谢几乎没有影响^[45]。IAPP 的这种选择性抑制表明,它极可能作为胰腺多肽激素调节胰岛素在其靶组织中的作用。IAPP 和胰岛素共存于胰岛β细胞的分泌颗粒中,也从侧面支持了上述观点。

和 IAPP 高度同源的 CGRP 已证实对胰腺多肽激素的释放有影响。这个刚发现不久的神经肽,除了在中枢和外周神经系统中有着广泛的分布外,它在胃肠道特别是胰脏中含量也很高。它参与机体的多种调节机制,主要是感觉和胃肠功能的调节。如前所述, IAPP 与 CGRP 在结构上非常相似。因此,它们具有某些共同

的生物效应也就不足为奇。

虽然很早就认为胰岛淀粉样沉积和糖尿病有关,但未能从分子水平上来阐述二者的相关性。II型糖尿病患者除了有胰腺兰氏岛淀粉样沉积的一般特征外,他们的血浆中胰岛素浓度正常或高于正常值;但其周围组织对胰岛素的作用都呈抗性(insulin resistance)。而且,这种抗性主要发生在胰岛素的靶组织水平上^[17]。对胰岛素抗性机理的研究和对胰岛素作用机理的研究,都是目前有关胰岛素研究的热门课题。

II型糖尿病患者的骨骼肌中,胰岛素促进的糖原合成速度的下降已被看成是造成胰岛素抗性的一个原因。IAPP可能在其中发挥着作用。IAPP也许还应包括CGRP,可望对II型糖尿病病因及发病机理的研究提供一个突破口。

四、胰岛素拮抗肽

几年前,在研究胰岛素与胰高血糖素联产工艺的过程中,我们观察到猪胰酸醇提取液中的胰岛素经CM纤维素柱分离后,其表观总活力非但不降低反而有了明显的增高(小白鼠惊厥法)。进一步的实验结果表明,这个总活力的增加与胰高血糖素的去除无关。

如人们所熟知,胰高血糖素的生物功能是促使体内血糖升高从而起到与胰岛素相拮抗的作用。二者共同调节糖的代谢,维持血糖的稳定和平衡。我们的结果提示,除了胰高血糖素在血糖水平上能与胰岛素相拮抗外,可能还存在迄今未知的能与胰岛素直接相抗衡的因子即胰岛素拮抗肽。

我们在追踪胰脏中的胰岛素拮抗肽时,胰岛素生物活力的测定除采用整体的小白鼠惊厥法外,还建立了灵敏度高的离体生物活力测定法,观察胰岛素对标记葡萄糖参入脂肪细胞后合成脂肪的影响。猪胰酸醇提取液经CM纤维素柱层析、Bio-gel P-6凝胶过滤及反相高效液相层析后,可得到单一活性峰。它对胰岛素促葡萄糖合成脂肪的活性有明显的抑制作用

并与所加的剂量呈相关性。抑制50%胰岛素活力所需的胰岛素拮抗肽约为 $1 \times 10^{-10} \text{mol/L}$,与被拮抗的胰岛素用量在同一水平上。用凝胶过滤法测定其分子量约3000,其N端是封闭的。根据上述理化特性及其生物活性,胰岛素拮抗肽与胰脏中已知的活性多肽无相似之处,因而很可能是一新的活性多肽。它的一级结构测定正在进行中。

结 束 语

近年来,从胰脏中又陆续发现了几个新的活性多肽。一级结构已经阐明的有甘丙肽、胰脏释放抑制因子和胰岛淀粉样多肽。对这些新的胰脏活性多肽的功能研究还只是开始。它们几乎都影响胰腺多肽激素的释放,而对进入循环系统中的胰岛素影响要小得多。胰岛淀粉样多肽对肌肉组织中胰岛素的作用有显著影响;而我们所纯化的胰岛素拮抗肽则明显影响胰岛素在脂肪组织中的作用。虽有报道,胰脏释放抑制因子也影响脂肪细胞中的糖代谢,但其作用要弱得多。它主要影响胰腺的内分泌功能。

Toshi & Weintraub^[18]在研究小鼠肿瘤组织和正常垂体中促甲状腺激素(TSH)的微不均一性时,发现低活性TSH是高活性TSH的拮抗剂。Sluss等^[19]报道,在猪的卵泡液中,同时含有促卵泡激素(FSH)的激动剂和拮抗剂。而且,只有FSH的激动剂有类似FSH的免疫反应活性。Dahl等^[20]在研究垂体前叶的一组FSH异构物(iso-FSH)时,首次证明血液循环系统中存在天然的抗激素(anti-hormone)。那么,胰岛素是否也有它的天然拮抗剂或抗激素呢?我们的实验结果表明,这种可能性是完全存在的。

有许多因素可以影响胰岛素的最终生物效应。这些因素大致可分为三类,分别影响胰岛素作用的三个不同阶段:(1)受体结合前,影响胰岛素的生物合成、释放及转运;(2)受体水平,影响胰岛素与受体的结合,也包括对葡萄糖转运系统的影响;(3)受体结合后过程,影响细胞内一些生化反应所涉及酶的活性等。上述胰脏

转录激活蛋白的分子结构研究进展

冯 博

(同济医科大学分子生物学研究室, 武汉 430030)

提 要

在转录激活蛋白分子中, DNA 结合区和转录激活区分别位于两个结构域中。DNA 结合区有三种基本结构, 即螺旋-转折-螺旋结构、锌指结构和亮氨酸拉链结构。DNA 结合区的结构特征决定着 DNA-蛋白质相互作用的特异性。转录激活区为带负电的亲水性 α -螺旋结构, 激活作用的强弱取决于激活区的负电性和空间结构。

关键词 转录激活蛋白, 结构, 调控

真核基因转录是按照精细的时空顺序进行的。对转录激活蛋白(transcriptional activator)的大量研究为阐明基因转录的调控机制提供了重要线索。近年来, 随着体外重组 DNA 技术的迅速发展, 大量的转录激活蛋白及其编码基

因得到分离鉴定。利用基因融合(gene fusion)等技术, 对转录激活蛋白的结构和功能进行了深入研究, 尤其在激活蛋白和 DNA 的相互作用的方式和激活蛋白的激活区结构特征的研究方面取得了令人兴奋的进展。本文试图对这一

中的活性多肽究竟影响胰岛素作用的哪一环节; 它们相互之间是否又有内在的联系; 它们与某些神经肽的关系又将如何; 凡此等等, 这一切都有待于进一步研究。胰脏中活性多肽的不断发现, 以及对它们的结构、功能和作用机理的深入研究, 无疑在理论研究和临床实践中都有其重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Tatemoto K, Rokaeus A, Jornvall H *et al.* *FEBS Lett*, 1983; 164: 124
- 2 Xiao W Fu, Sun A M. *Diabetologia*, 1987, 30(7): 521A
- 3 Hermansen K. *Diabetologia*, 1987; 30(7): 530A
- 4 Yanaihara N, Kadowaki M, Yagi N *et al.* In: Shiba T, Sakaibara S eds. *Peptide chemistry*, 1987, Osaka (Japan): Protein Research Foundation, 1988: 487—490
- 5 Ekblad E, Hakanson R, Sundler F *et al.* *Br J Pharm*, 1985; 86: 241
- 6 LeRoith D, Shiloach J, Roth J *et al.* *J Biol Chem*, 1981; 256(13): 6533
- 7 Tatemoto K, Efendic S, Mutt V *et al.* *Nature* (Lond),

- 1986; 324: 476
- 8 Eiden L E. *Nature* (Lond), 1987; 325: 301
- 9 Huttner W B, Benedum U M. *Nature* (Lond), 1987; 325: 305
- 10 Iacangelo A, Fischer-Colbrie R, Koller K J *et al.* *Endocrinology*, 1988; 122: 2339
- 11 戚正武. 生物化学杂志, 1986; 2(2): 1
- 12 Efendic S, Tatemoto K, Mutt V *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 7257
- 13 Ostenson C G, Efendic S. *Diabetologia*, 1987; 30(7): 565A
- 14 Cooper G J S, Willis A C, Clark A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 8628
- 15 Cooper G J S, Leighton B, Dimitriadis G D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 7763
- 16 Nishi M, Chan S J, Nagamatsu S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 5738
- 17 Olefsky J M. *Diabetes*, 1981; 30: 148
- 18 Joshi L R, Wintraub B D. *Endocrinology*, 1983; 113: 2145
- 19 Sulss P M, Schneyer A L, Franke M A *et al.* *Endocrinology*, 1987; 120: 1477
- 20 Dahl K D, Bicsak T A, Hsueh J W. *Science*, 1988; 239: 72

[本文于1989年11月20日收到, 1990年5月26日修回]