

促肾上腺皮质激素释放因子和促肾上腺皮质激素

邹 光 楣

(湖北省药检专科学校,武汉)

神经肽类激素的发现扩大了激素生理、生化研究范畴。1955 年 Schally 和 Gillemine 同时发现下丘脑存在促肾上腺皮质激素释放因子(CRT)。在此发现的启示下,下丘脑九种肽类激素被发现和神经内分泌器官得到确认。然而由于它的纯化和化学结构的鉴定相当困难,有一个时期关于它的研究几乎处于停滞状态。1981 年纯化的促肾上腺皮质激素释放因子的化学结构的发现为研究它的性质、功能起了巨大的推动作用。促肾上腺皮质激素释放因子和促肾上腺皮质激素(ACTH)二者之间的研究密切相关,本文试对二者的研究、进展作一综述。

一、促肾上腺皮质激素释放因子

(一) 下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子(ME-CRF)

许多学者对影响脑垂体前叶分泌 ACTH 的机理提出不同的设想。Long 认为在受侵害条件下机体先通过交感神经发出冲动,致使肾上腺髓质分泌肾上腺素,后者作用于脑垂体前叶唤起 ACTH 分泌。而 Sayer 认为任何侵害条件均可引起 ACTH 分泌,但肾上腺皮质激素可阻止其分泌。Hinsey 指出脑垂体受到一种体液因素的调节。然而自 Harris 提出门脉化学介质传递学说后,才使 Gillemine^[1]和 Schally^[2]分别从下丘脑、脑垂体以及 Porter^[3]从门脉系统中发现第一个促垂体激素释放因子,即 CRF,从而奠定了下丘脑—脑垂体—肾上腺皮质轴的调节,并扩大成下丘脑—脑垂体—边缘靶内分泌腺轴学说。在这种理论指导下,近廿年来形成了一门新的边缘学科——神经内分泌。

在化学结构尚未弄清之前,CRF 性质、功能的研究相当困难。Jones^[4]将其归因于:(1)发现具有 CRF 活性的分子多种,但它们肯定不是 CRF;(2)CRF 可能是一种性质不稳定的分子,这意味着分步纯化时易丧失生物活性;(3)CRF 的释放和应激有关,这给测定 CRF 带来困难;(4)CRF 具有种族差异。廿余年来关于 CRF 功能的研究只停留在对实验现象的解释,而且这些解释常相互矛盾。Pearlmuter 根据下丘脑提取液用柱层析分离时 CRF 出现二个峰,认为它可能是二个分子片段组成的,二个分子片段结合时表现出活性,分离时失去活性,当下丘脑分泌 CRF 时呈无活性状态,分泌后受血浆中一种辅因子的作用而表现出活性。Gillies 采用类似方法分析垂体后叶加压素(AVP)和 CRF 的特点,认为下丘脑 CRF 和 AVP 的化学性质极为相似,二者均可唤起 ACTH 的分泌,故作者推测 AVP 对 CRF 的生理功能起中间媒介作用。但是 Buckingham 在遗传性尿崩症大白鼠中发现下丘脑—脑垂体—肾上腺轴功能低下,推测 AVP 不可能是 CRF,但不排除 AVP 对该轴的影响。近来由于 CRF 化学本质的阐明以及从分子水平的研究发现 CRF 和 AVP 的确为二种不同的物质,但在体内乃由一共同的基因指导合成。

1981 年 Vale^[5]、Spiess^[6]分别用体内、体外实验方法鉴定羊下丘脑 CRF 的一级结构为 41 肽,其 N 末端为丝氨酰, C 末端为丙氨酸(见表 1^[7])。化学结构的揭示无疑是 CRF 研究的一重大突破。一年后 Kumagata^[8]分别合成 1—10, 11—19, 20—27, 28—32 和 38—41 肽片段,最

后将五个片段合成为 41 肽完整分子。随后 Shibahara^[9] 确定人下丘脑 CRF 亦为 41 肽,其中七个氨基酸残基和羊 CRF 的不同外。而 River^[10] 发现大白鼠下丘脑 CRF,也有七个氨基酸残基和羊 CRF 不同(见表 1)。

表 1 羊和大白鼠下丘脑 CRF 一级结构^[7,10]

丝-谷胺(谷)-谷-脯-脯-异亮-丝-亮-天冬-亮-苏-苯丙-组-亮-亮-精-谷-缬-亮-谷-甲硫-苏(丙)-赖(精)-丙-天冬(谷)-谷胺-亮-丙-谷胺-谷胺-丙-组-丝-天冬胺-精-赖-亮-亮(甲硫)-天冬(谷)-异亮-丙(异亮)

()号内示大白鼠不同于羊的七个氨基酸残基。

Jasuju^[11] 以克隆技术制备出 cDNA,用它转录出对应的 mRNA,通过 mRNA 翻译出 CRF 前体 (Prepro-CRF),它包括有 CRF 全部序列的氨基酸残基,只是在 N 末端加上四肽:精-赖-精-精,在 C 末端加上二肽:甘-赖。在 CRF 前体的 mRNA 核酸分子链上包括有 CRF、AVP、ACTH- β -LPH (脂解素)全部翻译密码。其密码顺序 CRF 在 148—188,AVP 在 22—30,ACTH- β -LPH 在 103—138 位置上。Robberti^[12] 从羊下丘脑 CRF 脱氨或水解处理 N 末端起始 9 肽后所剩下的 10—41 肽降解物,在体外垂体细胞培养中失去其活性,推测 1—9 氨基酸残基片段决定 CRF 的活性。

John^[13] 用合成的 41 肽 CRF 作体外实验发现对人垂体细胞分泌 ACTH 也具有促进作用。这意味着可能作为药物用于临床。纯化的 CRF 制剂为建立特异性放免测定法提供抗原。特异性放免法能准确、可靠地测定 CRF 活性,而且可简化操作步骤。Charles^[14] 利用放免法测定出各种动物下丘脑中 CRF 的含量 (pg/mg):牛为 4—10,猪为 2.5—8.5,小白鼠为 47.5—67.5,人为 2.3—20。此外还发现下丘脑以外的脑组织中也存在 CRF,其含量只有下丘脑中含量的一半。Schulte^[15] 等观察灵长目动物体内 CRF 的代谢状况,用快速授药法将 ¹²⁵I-CRF 注入体内测定其半衰期为 17.1 分;而间歇授药法,其半衰期为 198 分。而代谢清除率二种测定法相似,约为 2.23—5.08 升/公斤·天。下丘脑 CRF 的半衰期比所知下丘脑其它肽的半衰期长,代谢清

除率低,可能是由于下丘脑 CRF 和血浆蛋白易于结合,也可能因为它分布范围小,比较集中。

(二) 组织促肾上腺皮质激素释放因子 (Tissue-CRF)

下丘脑—脑垂体—肾上腺皮质轴是维持体内内环境平衡的重要调节机制。正常条件下体内通过下丘脑 CRF 调节垂体释放 ACTH,后者控制肾上腺皮质激素的分泌,动员机体处于应激状态。然而下丘脑中 CRF 含量少,作用持续时间短,长期应激必然会导致下丘脑 CRF 的耗尽。因此有人提出组织-CRF 这一机理来共同维持体内内环境平衡^[16]。六十年代初 Brodish 从动物血浆^[17]、外周组织^[18]中发现一种促垂体释放 ACTH 的物质,因分布范围、作用方式和下丘脑 CRF 完全不同,故称为组织-CRF,以区别下丘脑 CRF。目前组织-CRF 的存在已为内分泌学家们普遍承认^[16]。

Brodish^[16] 发现摘取大脑、破坏下丘脑但保留脑垂体的大白鼠体内血浆皮质酮水平急骤下降,但 60 分钟后明显上升,120 分钟达最高峰。作者认为这是组织-CRF 的作用,其作用部位为脑垂体。随后 Brodish 以损伤下丘脑、垂体切除及剖腹大白鼠制备组织-CRF 及从正常大白鼠下丘脑中制备 CRF 提取物,分别注射于大白鼠血循环中,发现下丘脑 CRF 作用快,约注射后 15 分钟血浆皮质酮上升;但维持时间短,半小时后作用减退。而组织-CRF 作用慢,约一小时后方表现作用,二小时作用达高峰;持续时间长,至少可维持五小时。作者推测组织-CRF 在血中缓慢活化后,方为垂体摄取。而下丘脑 CRF 可直接为垂体摄取、故作用快^[16]。

下丘脑 CRF 主要分布在下丘脑腹侧部,在脑组织其它部位也有分布、但水平低。组织-CRF 分布于血浆等外周组织中。

八十年代初 Brodish^[19] 将损坏下丘脑、切除垂体、剖腹的大白鼠,大剂量 ACTH (10 毫单位/日)注射,与未注射 ACTH 对照,发现大剂量 ACTH 对组织-CRF 有反馈抑制作用。故推测正常条件下组织-CRF 储存在细胞内,活性不表现,此时体内内环境依赖下丘脑—脑垂体—肾

上腺皮质轴。一旦因应激使下丘脑CRF耗尽,细胞中组织-CRF即释放到血中,可能通过垂体细胞膜受体而作用于垂体,促使ACTH分泌。而大量ACTH分泌转而对组织-CRF有抑制作用,于是此时体内处于一种应激状态下的平衡,血中ACTH、皮质激素比正常水平高。一旦应激解除,组织-CRF又以无活性状态存在于细胞中。

(三) 组织浸液活性因子

五十年代初孙家寿^[20]等在探讨组织疗法的作用机理时,发现组织浸液中存在一种刺激垂体释放ACTH的物质。随后梁、王二氏发现中枢镇静剂对此种物质有抑制作用,推测该因子的作用部位为下丘脑、称为组织浸液活性因子^[21]。研究还发现ACTH对此因子具有反馈抑制作用,而皮质激素对其活性无影响^[22]。由于组织浸液活性因子存在于机体组织中,对维持体内内环境稳定具有一定作用,其作用部位可能为下丘脑^[22],故表现出非特异性活性。现已观察到它尚可促进垂体释放甲状腺素^[23]。

组织浸液活性因子和组织-CRF的分布范围、作用相似;共同对维持ACTH分泌起一定调节作用,但作用部位各异其制备方法也不同,是二种不同的物质。

二、促肾上腺皮质激素

(一) 垂体-ACTH

ACTH由脑垂体 β 细胞分泌,为39个氨基酸残基组成的多肽开链结构。不同种属动物ACTH其1—23肽之氨基酸残基顺序相同,表明物种的亲缘关系,同时说明这部分结构是发挥功能所必需的。ACTH不稳定,在酸硷条件下易失活。血中ACTH的半衰期比ME-CRF短,约为5分钟。代谢清除率却高。传统的观点认为ACTH分泌受CRF的调控和皮质类固醇激素的反馈调节。Hale^[24]认为下丘脑调节ACTH分泌不是单一物质,而是多因素复合体。而组织-CRF和组织浸液活性因子也会直接、间接影响ACTH的分泌。

Main^[25]用电聚焦电泳,高压液相分离大

白鼠垂体前叶细胞和垂体中叶细胞所释放的ACTH,再用放射免疫法测定其磷酸化和非磷酸化的比值。发现生理条件下前叶释放ACTH其磷酸化为55%,应激时上升至80%。中叶释放ACTH正常时为50%,应激时下降至25%。应激状态下前者上升(25%),后者下降(25%)。作者认为ACTH通过磷酸化而表现生理活性,而磷酸化的部位在高尔基小体。

(二) 组织-ACTH

人们原认为ACTH仅由垂体产生,六十年代后这种观点逐渐改变了。最初有人发现体内新生物可以分泌ACTH,故称之为异位(ectopic)ACTH^[26]。后来观察到人肺癌组织也可以分泌ACTH^[27]。和CRF相似,它也广泛存在于外周组织中^[26,27]。这种存在于外周组织,不由垂体释放的ACTH叫组织-ACTH。

Yallow^[27]认为测定组织-ACTH应注意,(1)在RIA中组织-ACTH和垂体ACTH同样均有活性;(2)组织-ACTH在放射免疫受体测定中不表现或表现极低的垂体ACTH活性;(3)组织-ACTH比垂体ACTH的分子量大。作者还阐明了二者的鉴别方法。

Saito^[28]采用一种特殊制备ACTH的方法,以RIA测定各组织中组织-ACTH含量。实验操作注意事项(1)提取液于测定前调至pH=8.0、及正常渗透压(150毫渗压/升)。(2)用RIA测定时,蛋白质应限制在0.1—1.6mg内。(3)组织ACTH和¹²⁵I-ACTH一起保温48小时,其标记的激素活性不能丧失5%,并要有过量的抗体存在。(4)酶抑制剂不能降低组织-ACTH水平。(5)组织-ACTH的免疫活性可被单克隆ACTH抗体吸附。按上述要求测得组织-ACTH含量(pg/mg):脑为278.0±4,胃为59±4,肾为47±3,结肠为40±4,小肠为37±4,肝为18±2,心脏为16±3。组织-ACTH不受下丘脑CRF的调控,而且皮质激素对它无反馈抑制现象。经柱层析测定组织-ACTH出现一吸收峰,分子量为26000。洗脱该部分却不表现ACTH活性。以胰酶处理使其降解成一分子量为4500片段,于是表现出ACTH活性。推测垂体以外组织中

卡拉胶的生化特性及其应用

唐家骏

(中国科学院环境化学所, 北京)

卡拉胶 (Carrageenan) 是一种从角叉菜 (Chondrus)、沙菜 (Hypnea)、麒麟菜 (Eucheuma) 等多种红藻中提取的胞壁多糖, 由 α -D-(1 $\rightarrow$ 3)-与 β -D-(1 $\rightarrow$ 4)-交叉连接的 D-半乳糖基组成其骨架结构。根据 3-D-半乳糖基硫酸酯化的位置, 可将卡拉胶分为两类: 在 C-4 硫酸酯化的为 κ -类 (包括 κ -卡拉胶、 ι -卡拉胶、 μ -卡拉胶、 ν -卡拉胶); 在 C-2 硫酸酯化的为 λ -类 (包括 λ -卡拉胶、 θ -卡拉胶) (图 1)。 κ -卡拉胶和 ι -卡拉胶含有 3, 6-脱水-D-半乳糖因而能形成热可逆性凝胶, 其余各种卡拉胶没有内醚化, 不能形成凝胶^[2]。

在第九次国际海藻会议上报道, 世界卡拉胶年产已达 10000 吨, 利用了角叉菜 130000 吨; 估计每年工业应用可能将达 30000 吨。我国海南岛人工培植麒麟菜年产已超过 300 吨干品, 可制备卡拉胶 20 余吨。再则, 据报道仅在海南岛每年打捞密毛沙菜等四种沙菜可得干品 500—600 吨, 且在福建和广东沿海诸多地区均有这类资源可供利用。

目前工业生产和应用的主要是 κ -卡拉胶、 λ -卡拉胶和 ι -卡拉胶。天然卡拉胶中富于 κ -卡拉胶, 通过碱处理也可由 λ -卡拉胶制备 κ -卡拉胶。

广泛存在分子量大的组织-ACTH, 是分子量 4500 的 ACTH 的前体。

本文承何善述副教授指正, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Gillemine, R. and Resenberg, B.: *Endocr.*, 17: 599, 1955.
- [2] Saffran, M. and Schally, AV.: *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 33: 408, 1955.
- [3] Porter, J. C. and Jones, J. C.: *Endocr.*, 58: 62, 1956.
- [4] Jones, M. T. et al.: *Fed. Proceeding*, 36: 2104, 1977.
- [5] Vale, W. et al.: *Science*, 213: 1394, 1981.
- [6] Spiess, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 98: 6517, 1981.
- [7] Linton, E. and Lowry, P. L.: *Science*, 3, 45, 1982.
- [8] Kumagage, S. et al.: *Pept. Chem.*, 20: 101, 1982.
- [9] Shibahara, S. et al.: *EMBO. J.*, 2: 775, 1983.
- [10] Ri ver, J. et al.: *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4851, 1983.
- [11] Jasuju, F. et al.: *Nature*, 301: 537, 1983.
- [12] Robert, A. et al.: *Endocr.*, 112: 1275, 1983.
- [13] John, S. et al.: *ibid.*, 111: 1388, 1982.
- [14] Charles, S. et al.: *ibid.*, 112: 2206, 1983.
- [15] Shuite, H. M. et al.: *J. Clin. Endocr. Metab.*, 55: 1023, 1982.
- [16] Brodish, A.: *Ann. NY. Acad. Sci.*, 297: 420, 1977.
- [17] Brodish, A.: *Endocr.*, 73: 727, 1963.
- [18] Witorsch, R.J. and Brodish, A.: *Endocr.*, 90: 552, 1972.
- [19] Simposon, CW. and Brodish, A.: *Neuroendocr.*, 31: 210, 1980.
- [20] 孙家寿等: 《生理学报》, 20(4): 224, 1956.
- [21] 王巽义和梁之彦: 《生理科学会议摘要》, 1956.
- [22] 邹光楣等: 《武汉医学院学报》, 14(2): 101, 1985.
- [23] 任平等: 《武汉医学院学报》, 12(4): 321, 1984.
- [24] Hale, AC.: *J. Endocr.*, 102: R1, 1984.
- [25] Main, RE. and Eipper, BA.: *Endocr.*, 112: 1986, 1983.
- [26] Christy, N. P.: *Lancet*, 1.: 85, 1961.
- [27] Gewirtz, G. and Yallow, RS.: *J. Clin. Invest.*, 53: 1022, 1974.
- [28] Saito, E. et al.: *Endocr.*, 113: 1010, 1982.

[本文于 1985 年 9 月 13 日收到]