

生长激素释放肽的合成及促生长活性*

胡晓愚 王 勤** 王 锐 高立伟 沈剑敏 王永谦

(兰州大学生物系, 兰州 730000)

摘要 用固相多肽合成法合成了生长激素释放肽 (GHRP), 这是一种含 D-型氨基酸的外源性激素, 具有促进脑下垂体分泌生长激素功能的人工合成六肽, 其氨基酸序列为 His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂。观察了使用不同剂量的 GHRP 对不同日龄小鼠的促生长效应, 当使用最佳剂量 (1000 µg/kg) 时, 可使 25 日龄小鼠体重较对照组增加 14.8%, 同时发现鼠龄越小对 GHRP 越敏感。当使用剂量高达 10 mg/kg 时仍然安全无毒。

关键词 生长激素释放肽 (GHRP), 多肽固相法合成, 小白鼠, 促生长作用

Momany 等^[1]在研究甲硫脑啡肽时发现其含有 D-型氨基酸的类似物, 具有促进垂体分泌生长激素 (GH) 的功能。他们以此为起点, 不断进行构象设计、能量计算和活力跟踪测定, 终于找到 GHRP, 具有较高促进分泌生长激素的活力^[2]。随即引起了一批学者的关注, 他们从不同角度研究了 GHRP 的生物活性, 可归纳为:

a. GHRP 不同于 GRF (下丘脑分泌的生长激素释放因子, 44 肽), GRF 不是 GHRP 的内源性活性物质。GRF 的拮抗剂对 GHRP 不起作用, GHRP 的拮抗剂对 GRF 也不起作用^[3], GRF 与 GHRP 有协同效应^[4]。

b. GHRP 在离体和活体条件下均可特异性地促进垂体释放 GH 而不改变其他垂体激素, 如促甲状腺素 (TSH)、促黄体生成激素 (LH)、促卵泡激素 (FSH) 等的分泌^[5]。

c. GHRP 无种属特异性, 可广谱地促进牛、羊、鸡、猪、猴等动物血清 GH 含量的升高^[5], 还有人发现 GHRP 可提高奶牛的产奶量^[6], 至今尚未见到有关 GHRP 毒副作用的报道。

d. 有关 GHRP 的作用机制尚不清楚, 已知动物下丘脑和垂体上均有 GHRP 的受体^[7]。阿片试剂的阻遏剂纳洛酮对 GHRP 的活性没有影响, 而类阿片肽内啡肽与 GHRP 具有协同效应^[8]。GHRP 和 GRF 一样均可被生长激素释

放抑制因子 (SRIF) 抑制^[5]。GHRP 作用有钙依赖性, 因钙阻遏试剂 CdCl₂ 可抑制 GHRP 引起的 GH 的分泌^[9]。GHRP 对垂体细胞内 cAMP 浓度的变化没有影响^[10]。

在美国已由 SK & F 公司用 SK & F 110679 的名称向美国食品及药物管理局 (FDA) 提出新药申请。用于治疗侏儒症, 并已于 1993 年由 FDA 批准上市^[11]。

国内有关 GHRP 的研究很少, 我们实验室在国内首先合成了 GHRP, 并作了促小白鼠生长的试验。也研究了 GHRP 在免疫系统中的作用及对机体衰老过程影响的工作, 以后另文报道。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

各种保护氨基酸, Boc-L-Trp、Boc-L-His (Tos)、Boc-Lys (Cl₂Z)、Boc-D-Trp 和 Boc-D-Phe 均购自美国 Bachem 公司。二环己基碳二亚胺 (DCC), 三氯乙酸 (TFA), 三己胺 (TEA), 二氯甲烷 (DCM), 甲醇 (MeOH), 醋酸, 乙醚, 茚三酮, 茴香醚和乙酸酐等试剂皆

* 甘肃省科委科学技术攻关项目。

** 通讯联络人, 甘肃兰州大学生物系生化教研室。

收稿日期: 1994-12-12, 修回日期: 1995-03-28

购自上海化学试剂商店,规格为国产分析纯.溶剂均经重蒸馏处理.

二苯甲基氨(BHA)树脂是本实验室自制,100~200 mesh,取代值 0.5 mmol/g.

小白鼠购自兰州生物制品所,系 LIBP/1 纯系小白鼠.

氨基酸组分分析仪为日立 835-50 型,高效液相色谱仪(HPLC)为 Gilson 产品,分析柱为 ZORBAX-ODSCC-18(碳 18,反相).质谱仪为美国 HP-5988A 型色谱-质谱联用仪,核酸蛋白检测仪为 HD-76 型.

自制固相合成反应器,玻璃管直径 2 cm,长 25 cm.

1.2 生长激素释放肽(GHRP)的合成

采用 Merrifield 固相多肽合成法^[13]合成了生长激素释放肽(GHRP),其氨基酸序列为: His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂.

1.2.1 GHRP 肽-树脂的合成:取 BHA 树脂 1 g,置入自制反应器中,经 TEA 中和后加入 1 mmol Boc-L-Lys(Cl₂Z)和 2 mmol DCC,室温反应 2 h,使羧基与 BHA 树脂的氨基缩合,用 DCM 和 MeOH 反复洗涤,用乙酸酐封头后,用 33% TFA 脱除 L-Lys 的 Boc 保护基团,再用 TEA 中和,即完成接一个氨基酸,依次用 Boc-D-Phe、Boc-L-Trp、Boc-L-Ala、Boc-D-Trp、Boc-L-His 等保护氨基酸重复上述操作,即得 GHRP-BHA 树脂.

1.2.2 GHRP 粗肽的制备和纯化:将上述 GHRP-BHA 树脂置入聚四氟乙烯反应器中,加入 1 ml 茴香醚,封闭反应器,液氮冷却,抽真空后将 10 ml 液态 HF 转移到反应器中,电磁搅拌,在 -10℃ 下反应 1 h,然后真空抽除 HF,用乙醚洗涤数次后,用 10% 醋酸溶液抽提

数次,合并抽提液,减压蒸馏,将浓缩抽提液冷冻干燥后,得白色絮状固体,即为 GHRP 粗肽.将粗肽在 Sephadex G-10 柱上凝胶过滤,洗脱液为 10% 醋酸,用核酸蛋白检测仪检测,收集主要组分(第一峰),冷冻干燥后得纯品,再用制备型 HPLC 进一步纯化,C18 反相柱,洗脱剂 A: 85% MeOH, B: 0.025% TFA. 条件为:流速 1.3 ml/min,检测波长 225 nm. 冷冻干燥后即得 GHRP 精肽.

1.2.3 GHRP 精肽的理化鉴定:氨基酸组分分析由甘肃省草原生态研究所承担,质谱(MS-FAB)由兰州大学分析测试中心质谱一室完成.HPLC 纯度检测由兰大测试中心承担.

1.3 GHRP 促生长活性的试验

将三种不同日龄(15 d、25 d、35 d)的 LIBP/1 纯系小白鼠按体重调整,每种日龄分为 4 组,每组 10 只,雌雄各半,分笼饲养.平均每只体重之差不超过 1 g,调养 3 d,待小鼠适应环境后,开始进行试验.每天上午 9 时对小鼠进行腹腔注射,共 10 d,浓度分别为 100、300 和 1000 μg/kg,对照组给相同体积生理盐水.每天中午 12 时,每笼称重,计算每只平均重量.35 日龄小鼠除上述剂量外还增加了 5 和 10 mg/kg 的两个剂量,处理方法相同.

1.4 统计学处理

实验数据均以均值±标准误差($\bar{x} \pm s$)表示,并用 Studentt-test 分析.

2 结果与讨论

2.1 GHRP 的固相合成

我们用固相多肽合成法,制备 GHRP 200 mg,产率数据见表 1.

表 1 合成 GHRP 产率

种类	所用树脂			粗肽产量 /mg	精肽产量 /mg	纯度 /%	产率/%	
	取代值 /mmol · g ⁻¹	数量 /g	增重 /g				合成产率	纯品产率
BHA	0.5	1	0.4	320	200	97.7	99	57

2.2 合成 GHRP 的鉴定

我们合成的 GHRP 经 HPLC 鉴定纯度为 97.7%, 质谱法 (MS-FAB) 测定分子量, 分子离子峰 ($M^+ + 1$) 为 873, 与计算分子量 872 相符. 氨基酸组分分析的实测值与理论值极为相近: 理论值 His : Trp : Ala : Phe : Lys 为 1 : 2 : 1 : 1 : 1, 实测值为 0.96 : 2.06 : 1.05 : 0.98 : 0.97.

2.3 GHRP 的促生长活性

2.3.1 不同 GHRP 剂量对 15 日龄小鼠体重增加的变化 (表 2).

表 2 注射 GHRP 不同剂量后对 15 日龄小鼠体重的影响

组 别	开始 /g	10 d 后/g	10 d 后 增重/g	增重百 分数/%	药效因素增 重百分数/%
对照组 (生理盐水)	11.40	15.72	4.32	37.89	0
实验 1 组 (100 $\mu\text{g/kg}$)	11.24	17.00	5.76	51.25 ¹⁾	13.36
实验 2 组 (300 $\mu\text{g/kg}$)	11.01	16.91	5.90	53.58 ¹⁾	15.69
实验 3 组 (1000 $\mu\text{g/kg}$)	11.40	18.22	6.82	59.82 ¹⁾	21.93

注: ¹⁾ $P < 0.01$.

2.3.2 不同剂量 GHRP 对 25 日龄小鼠体重增加的影响 (表 3).

表 3 注射 GHRP 不同剂量后对 25 日龄小鼠体重的影响

组 别	开始 /g	10 d 后/g	10 d 后 增重/g	增重百 分数/%	药效因素增 重百分数/%
对照组 (生理盐水)	16.80	19.49	2.69	16.01	0
实验 1 组 (100 $\mu\text{g/kg}$)	16.77	19.48	2.71	16.15 ¹⁾	0.14
实验 2 组 (300 $\mu\text{g/kg}$)	16.80	20.07	3.27	19.46 ²⁾	3.45
实验 3 组 (1000 $\mu\text{g/kg}$)	16.64	21.80	5.16	31.00 ²⁾	14.99

注: ¹⁾ $P > 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$.

2.3.3 不同剂量 GHRP 对 35 日龄小鼠体重增加的影响 (表 4).

表 4 注射 GHRP 不同剂量后对 35 日龄小鼠体重的影响

组 别	开始 /g	10 d 后/g	10 d 后 增重/g	增重百 分数/%	药效因素增 重百分数/%
对照组 (生理盐水)	20.25	23.90	3.65	18.02	0
实验 1 组 (100 $\mu\text{g/kg}$)	20.00	24.15	4.15	20.75 ¹⁾	2.73
实验 2 组 (1000 $\mu\text{g/kg}$)	19.70	24.40	4.70	23.85 ²⁾	5.83
实验 3 组 (5 mg/kg)	19.30	24.05	4.75	24.61 ²⁾	6.59
实验 4 组 (10 mg/kg)	20.00	24.90	4.90	24.50 ²⁾	6.48

注: ¹⁾ $P > 0.05$; ²⁾ $P < 0.05$.

2.4 讨论

从以上实验数据可得到下列 3 点结论:

a. GHRP 确有促小白鼠生长的效应, 最佳剂量应为 1000 $\mu\text{g/kg}$; 当使用剂量为 10 mg/kg 时, 小白鼠无死亡, 无异常现象, 可以认为使用过程安全无毒.

b. 从表 2~4 可看出鼠龄越小对 GHRP 越敏感, 当剂量为 1000 $\mu\text{g/kg}$ 时, 对 15 日龄、25 日龄和 35 日龄小白鼠分别比对照增重 21.93%、14.99% 和 5.83%. 15 日龄小白鼠相当于人 3 岁, 25 日龄相当于 12 岁, 35 日龄相当于 16 岁^[12], 这些数据可作为治疗人侏儒症时参考.

c. 已证实 GHRP 是一种外源性激素, 其构效关系非常严格, 当其 N 端和 C 端的碱性氨基酸被其他氨基酸替换后, 则生物活性大为降低^[2]. 生长激素释放因子 (GRF) 不是 GHRP 的内源性激素, 它的内源性活性物质是什么有待深入研究.

致谢 本工作得到甘肃省科委部分资助, 肽的测试得到甘肃省草原生态研究所及兰州大学分

析测试中心帮助, 特此致谢.

参 考 文 献

- 1 Bowers C Y, Reynolds G A, Momany F A *et al.* *Endocrinology*, 1981; **106**: 663
- 2 Momany F A, Bowers C Y, Reynolds G A *et al.* *Endocrinology*, 1984; **114**: 1531
- 3 郭春远, 刘传弟, 盛树力等. 首都医学院学报, 1990; **11** (4): 289
- 4 Bowers C Y, Sartor A O, Reynolds G A *et al.* *Endocrinology*, 1991; **128**: 2027
- 5 Bowers C Y, Momany F A, Reynolds G A *et al.* *Endocrinology*, 1984; **114**: 1537
- 6 Croom Jr W J, Leonard E S, Barker P K *et al.* *J Anim Sci*, 1984; **59** (suppl): 109
- 7 Kandan S H, Kannappan V, Cyril Y B. *Biochem Biophys Research Commun*, 1991; **178** (1): 31
- 8 Sartor O, Bowers C Y, Reynolds G A *et al.* *Endocrinology*, 1985; **117**: 1441
- 9 Sartor O, Bowers C Y, Chang D. *Endocrinology*, 1985; **116**: 952
- 10 Cheng K, Wanda W, Chan S *et al.* *Endocrinology*, 1989; **124**: 2791
- 11 Richard F W. *Life Science*, 1990; **47**: 29
- 12 施新猷. 医学动物实验方法. 北京: 北京人民出版社, 1980: 48
- 13 中国科学院生物化学研究所多肽应用组. 中国科学, 1975;

3: 279

The Synthesis of Growth Hormone Releasing Peptide (GHRP) and Its Activity of Enhanced Growth on Mice. Hu Xiaoyu, Wang Qin, Wang Rui, Gao Liwei, Shen Jianmin, Wang Yongqian (*Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*).

Abstract Growth hormone releasing peptide (GHRP) was synthesized. It is an exogenous hormone promoting pituitary to release growth hormone. The amino acid sequence of GHRP is His-D-Trp-Ala-D-Phe-Lys-NH₂. The synthesis was carried out with SPPS and Boc strategy. The amino acid composition was found in agreement with its calculated values. The purity was 97.7%. The bioassays showed that it enhanced the growth of young mice significantly and this effect depends on the dosage of injection. GHRP is more sensitive to the younger mice.

Key words growth hormone releasing peptide (GHRP), solid phase synthesis, mice, growth enhancement

人脑神经元特异性烯醇化酶的纯化方法*

郭 健¹⁾ 张世明 周润琦²⁾ 陈石根²⁾ 韩一平

(长海医院呼吸内科, 上海 200433)

摘要 采用改良的 Grace 层析方法, 经一次 DEAE-Sephadex A50 柱层析即从人脑中纯化了神经元特异性烯醇化酶, 比活力为 92.1 U/mg, 纯化倍数为 59.4. 该酶纯化后, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一蛋白质谱带. 此外, 还测定了其部分理化性质, 其亚单位分子量为 45 000, 等电点 pI 为 4.7, 氨基酸组成分析表明其作为一种酸性蛋白质; 对 2-磷酸甘油酸的 K_m 值为 5.6×10^{-4} mol/L.

关键词 神经元特异性烯醇化酶, 纯化, 理化性质

* 国家自然科学基金资助项目. ¹⁾ 现在地址: 江苏常州 102 医院内科, 常州 213003. ²⁾ 复旦大学生物化学系, 上海 200433.

收稿日期: 1994-12-24, 修回日期: 1995-02-26