

生长激素释放因子的研究和应用

熊克勇 丁达明

(中国科学院武汉病毒研究所)

提 要

本文介绍生长激素释放因子的分子生物学研究进展,包括它们的分子结构和生物活性比较,人工产物的研制和应用,以及人的生长激素释放因子作为一种广谱促生长剂在人类和畜牧业方面有十分重要的应用价值。

关键词 生长激素释放因子,生长激素释放因子类似物,肽合成,基因工程产物

生长激素释放因子 (Growth Hormone Releasing Factor, 简称 GRF) 是人和各种动物下丘脑中的一种垂体腺活性调节物质,能刺激诱导机体释放生长激素 (GH),是近几年分离并鉴定的一种新的肽激素。

1. GRF 的发现

早在六十年代, Richlin^[1] 就提出 GRF 的存在,其后, Deuben 和 Mertes^[2] 证实 GRF 存在于下丘脑的抽提物中。很多研究人员一直试图分离这种含量极少的活性物质。然而,他们分离到的却是另外三种下丘脑释放因子,分别为促甲状腺激素释放因子 (TRF),促黄体激素释放因子 (LRF) 和促皮质激素释放因子 (CRF)。

1982年, Guillemen 等^[3] 和 Rivier 等^[4] 分别发表文章,报道他们从肢端肥大症患者的胰异位肿瘤中分离到人的 GRF,并对其进行了分析和鉴定。这两篇文章首次独立地报道了 GRF 的分离和鉴定,分析结果认为, hGRF 由 44 个氨基酸组成,有三种 N 端相同的 hGRF,即 GRF (1—37)-OH, GRF (1—40)-OH 和 GRF (1—44)-NH₂, 后者为 hGRF 的成熟形式,具有最高的释放 GH 的活性。以后众多研究人员对 hGRF 的研究都证实他们的结果是正确的,他们的工作对 GRF 的研究和应用具

有十分重要的影响。

最近几年,各国研究人员相继开展了对 GRF 的研究。除进一步研究 hGRF 以外,还研究了各种动物的 GRF,比较了各类 GRF 的一级结构^[5,6]。对 hGRF 深入研究后发现,肿瘤中分离的 GRF 与下丘脑中的 GRF 具有同样的生物活性和理化性质,二者的氨基酸顺序也完全相同^[7]。四种下丘脑释放因子 (TRF、LRF、CRF 和 GRF) 能在各自的靶细胞刺激释放相应的激素,互相间不发生交叉作用。生长激素释放抑制因子 (SRIH) 能在体内外抑制由 hGRF 诱导的 GH 分泌。此外,研究人员还用一系列分子生物学方法研制了 GRF 的人工产物,并用这些人工产物进行体内外的生物学实验,比较了各种 GRF 类似物的生物活性,并用于人体临床治疗和诊断实验,取得了极有价值的重要结果。

2. 各类 GRF 的结构和生物活性

随着分离纯化 GRF 方法的不断改进^[8],相继从不同的下丘脑中分离到各种 GRF。除 hGRF 以外,又分离到猪^[9]、牛^[10]、山羊和绵羊^[11]、鼠^[12]的 GRF (p, b, c, o, rGRF) 等(见图 1)。从图 1 中可以看出,除 rGRF 以外,其余 5 种 GRF 的组成和氨基酸顺序都十分接近,

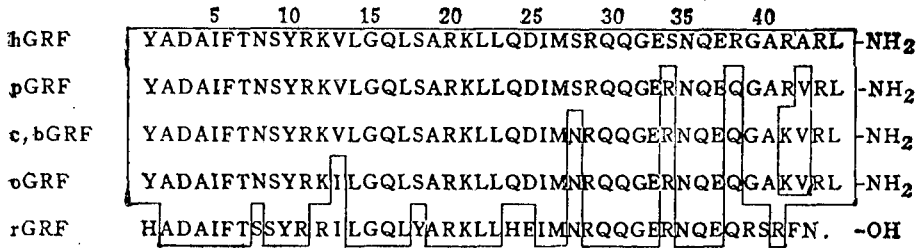


图1 已知6种 GRF 的氨基酸序列
方框之内为同源性序列

唯 rGRF 与 hGRF 只有 67% 的同源性。

Baird 等^[13]用鼠的脑垂体培养系统检测各种 GRF 的体外活性,证明这些 GRF 于该系统都有明显的生物活性,除 rGRF 以外,其它 GRF 的活性十分接近,rGRF 活性比其它 GRF 高约 4 倍,这种差别可能是培养系统与 rGRF 同源的关系。

Ling 等^[14]使 hGRF 的 C 端逐步缺失,用肽合成法合成一组 hGRF 类似物片断,用以研究 GRF 类似物结构与活性的关系。表 1 为他们研究各片断相对生物活性的结果,从中可见,hGRF 类似物的相对活性应随片断缩短而逐渐减小,C 端为氨基与 C 端为羟基的类似物相比,前者的活性比后者大一倍。hGRF 的氨基类似物,即使缩短到 29 个氨基酸,其活性仍超过 hGRF 的 1/2,但小于 19 个氨基酸时便无活性。这些结果与 Rivier 等^[4]研究的结果是一致的。但是,在 hGRF 的 N 端缺失氨基酸却会明显降低生物活性。据报道,将 hGRF 的 N 端第一氨基酸 Tyr 缺失后的类似物,其生物活性降低 1000 倍以上。

研究人员还用重组 DNA 技术取代 hGRF 个别氨基酸密码,得到改变天然 hGRF 结构的类似物,并检测了这种类似物的生物活性。Kempe 等^[15]用 Leu 取代 hGRF 的 Met²⁷,由此产生的 hGRF 类似物比天然的 hGRF 有更高的生物活性。此类研究的结果启发人们用各种分子生物学的方法修饰 hGRF,获得生产方便并具有更好活性的 hGRF 类似物。

各种动物实验的结果表明,GRF 能在各

表 1 hGRF C 端缺失类似物的相对生物活性

hGRF(1-44)NH ₂	1
hGRF(1-44)OH	0.70
hGRF(1-40)NH ₂	0.91
hGRF(1-40)OH	0.34
hGRF(1-37)NH ₂	0.50
hGRF(1-37)OH	0.27
hGRF(1-34)OH	0.23
hGRF(1-31)NH ₂	0.68
hGRF(1-31)OH	0.40
hGRF(1-30)NH ₂	0.51
hGRF(1-30)OH	0.27
hGRF(1-29)NH ₂	0.51
hGRF(1-29)OH	0.25
hGRF(1-27)NH ₂	0.12
hGRF(1-24)OH	0.0002
hGRF(1-23)NH ₂	0.0024
hGRF(1-22)NH ₂	0.00001
hGRF(1-21)NH ₂	0.000001
hGRF(1-19)NH ₂	用量达到 10 ⁻³ mol/L 仍无任何活性

(活性表示诱导 GH 释放的能力)

自的生物体内诱导 GH 的释放^[5],r、hGRF 在鼠身上的活性相同。研究人员还将 hGRF 用于牛、猪、绵羊、猴子、各种家禽、兔子、金鱼和狗等,虽然 hGRF 诱导这些动物释放 GH 所需剂量不同,但除在猴身上的活性不高以外,对其余动物都有较高的活性。因此,普遍认为 hGRF 是一种广谱促生长剂。

3. GRF 人工产物研制

天然 GRF 含量极少,分离纯化十分困难。GRF 的应用价值吸引人们开发其人工产物。一些发达国家的研究人员近几年先后开展了此项研究,并有一些 GRF 及其类似物的发明专利登记,有关的生物公司也正在开发此类产品^[16]。

目前 GRF 人工产物的研制主要采用一些分子生物学方法,可归纳为两大类:即化学合成法和基因工程法,现分述如下:

(1) 化学合成法

现在,用液相和固相肽化学合成法都可制备 GRF。英国 Salk 研究院采用固相合成法^[27],在实验室两个月可合成 100 μ g GRF 产物,其纯度达到临床标准,最初曾用这种产品来研究 GRF 的结构和生物学性质。此种方法的缺点是制备工艺复杂,不易扩大生产。

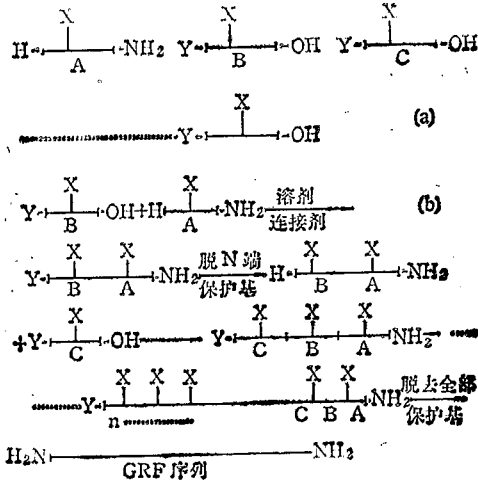


图 2 GRF 的液相合成

(a) 保护合成片断的功能侧链 (b) 将保护的片断连接成多肽,选择性地脱去 N 端保护基,以便继续连接
X——侧链保护基 Y——N 端保护基

法国 Sanofi 公司设计了一种液相合成法,首先合成一定量的小肽片段,然后将小片断逐步连接成完整的 GRF 多肽。合成粗品内含 25% 的 GRF。由于粗品中 GRF 含量高,纯化比较简单,可成批生产 95% 以上纯度的未产物 300—500 mg。图 2 为该公司液相合成的示意图,这种方法成本低,适于工业规模生产,成批产量可达几克,产品纯化采用反流分配层析或 HPLC 等一类方法,纯度可达到临床要求。此法面临的主要技术难题是如何合理选择小肽片断,以减少中间反应步骤。

(2) 基因工程法

1982 年分离鉴定 hGRF 以来,一些发达国家一直在进行用基因工程法制备 GRF 的研究。

尽管各人采用的方法和路线不尽相同,但他们共同采用的主要方法和路线可归纳如下:

根据 hGRF 的一级结构,选择合适的 DNA 密码,用化学法人工合成 GRF 基因的寡聚核苷酸片段,将这些片段拼接成完整的基因,然后将 GRF 基因克隆到适当的载体中,构建表达载体并转化到某种宿主细胞中表达。经发酵、分离纯化,化学处理等一系列后工序,最后得到纯化的 GRF 产物。

由于 GRF 并非天然基因的直接产物,而是由一个前体衍生的^[27],用微生物生产 GRF 一类的短肽具有某些特殊困难。GRF 在 *E. coli* 细胞质环境中很不稳定,极易被酶降解。为避免这些困难,现有两种方法是可行的。一种方法是将 GRF 基因融合到载体本身的某一蛋白基因中,使 GRF 以融合蛋白形式进行表达。这种融合蛋白形式表达的 GRF 短肽不会被酶降解。产物发酵后,首先分离细胞总蛋白,然后用化学法或酶法将 GRF 肽链切开,经分离纯化获得 GRF 人工产物。Kempe 等^[28]和 Engels 等^[29]就用这种方法得到了 hGRF 的类似物。Kempe 等用这种方法所获得的 GRF 类似物。[Leu²⁷, Hse⁴⁴] GRF (1—44)-NH₂ 比天然的 hGRF(1—44)-NH₂ 具有更高的活性。他们的具体做法是,首先克隆修饰的 hGRF 基因并组建成多拷贝基因,将多拷贝的 GRF 基因与载体中的 Lac Z 基因连接,转化到 *E. coli* 宿主细胞中表达,表达产物为 GRF 多肽和 β -半乳糖苷酶的融合蛋白。多拷贝的 GRF 修饰基因具有很高的表达效率。为了从融合蛋白产物中分离 GRF,在基因设计时对天然的 hGRF 氨基酸作了个别修饰,在 hGRF 之前加上一个 Met,用 Leu²⁷ 取代原序列中的 Met²⁷,将 Leu⁴⁴ 用 Met⁴⁴ 取代。这样修饰之后,所得的产物经化学处理后为 hGRF 类似物 [Leu²⁷, Hse⁴⁴] GRF(1—44)-NH₂。由于修饰后的基因两端都有 Met 密码,除去了基因中间存在的 Met 密码,融合蛋白产物纯化之后,用溴化氰在 Met 的位置切开 GRF 类似物,经纯化和化学处理得到最终产物。此外,GRF 之前的 Met 密码

还兼有起始密码的功能。

另一种方法是利用信号肽将基因产物分泌到外周胞质之间或菌体外的培养基中。Anba等^[19]就是利用 *pho S* 的分泌作用将 *pho S*-*mhGRF* 从细胞质转移到外周胞质空间的。利用酵母的 α -因子可以分泌到菌体外并能剪切为成熟分子的特点,将 *GRF* 基因连接在酵母 α -因子的启动子之后,使 *GRF* 分泌到培养基中。一旦将 *GRF*(1-44)-OH 纯化,便可用酶法或化学法使之氨化,得到高活性的 *GRF*(1-44)-NH₂。美国的 Chiron 公司已将这种方法用来生产 *GRF*, 法国的 Sanofi 公司希望用上述两种方法构建高效表达载体。

综上所述,用基因工程法生产 *GRF* 的优点是明显的,只要工艺成熟,生产成本将会比化学合成法低得多。随着 *GRF* 分子生物学的深入发展,其人工产物的开发将为应用提供丰富的材料来源。

4. *GRF* 的作用机制

GRF 的作用机制研究较多^[2],特别是体外研究获得了比较成熟的结果。在正常的垂体细胞中,*GRF* 能特异性地增加生长激素的 mRNA,这是因为它增加了 *GH* 基因的转录效率而对其它垂体激素却无影响,其直接结果便是加速了垂体的 *GH* 释放。

GRF 的体内实验认为^[17],下丘脑分泌的 *GRF* 刺激垂体前叶腺体中 *GH* 的释放,*GH* 再促使肝脏产生调节生长的物质 SMC,而 SMC 又反馈抑制 *GRF* 对垂体 *GH* 的刺激作用。实验证明,*hGRF* 可诱导很多种动物释放相应的 *GH*,这说明 *hGRF* 与受体的作用无严格的种属特异性。有关 *hGRF* 的作用机制尚待进一步深入研究。

实验还证实,肢端肿大症是由于 *GH* 的异常分泌造成的,这种异常分泌是垂体肿瘤导致的。早期在临床上就有通过除去胰异位肿瘤而成功地治愈肢端肥大症的病例。Thorner 等^[20]曾从不同国家收集到 177 份肢端肥大症病人样品,通过检测样品证实肢端肥大症绝非 *GRF* 所

致。大量的临床应用也证实 *hGRF* 对人体的应用是安全无害的。

5. *GRF* 的应用前景

1983 年以来,一些发达国家相继开展了 *GRF* 及其类似物的临床应用研究,已有上千名自愿者和 *GH* 缺陷病人参加了 *GRF* 的临床试验^[21],并取得了令人满意的效果。*GRF* 作用的特异性(刺激 *GH* 释放)和 *GH* 明确的生理作用(促进生长)使之可能很快地用于人体疾病的诊断和治疗。

给病人注射 *hGRF* 之后,可根据血清中 *GH* 的变化对 *GH* 缺陷病进行诊断^[21]。临床证实,50%—70%的侏儒症小孩注射 *hGRF* 后明显提高生长速度,*hGRF* 可治疗各种 *GH* 缺陷病症。此外,伴随生长速度减慢而产生的疾病如吸收障碍,慢性缺氧等与 *GH* 不足的疾病也可能用 *hGRF* 治疗。在蛋白代谢方面,*hGRF* 也具有潜在的应用价值,如烧伤的愈合,各种萎缩,老人骨折的愈合等也都可能用 *hGRF* 治疗。另外,*GRF* 还可能用于原生和再生性贫血,通过增加 mRNA 的合成而刺激红细胞的生成。还可用于治疗因生长激素释放抑制因子过剩而产生的肥胖症等。

由于 *hGRF* 是一种无严格种属特异性的广谱促生长剂,因此它在畜牧业方面也有很重要的应用潜力。将 *hGRF* 应用于动物的实验显示,它能加速牲畜的生长速度,增加猪的瘦肉产率,提高牛奶产量,同时也提高饲料的转化率。此外,*hGRF* 在家畜家禽饲养和渔业生产方面也有潜在的应用价值,还可用于家畜家禽的品种改良以及动物的遗传育种等方面。

目前,大量的研究结果已证实了 *GRF* 的应用价值,进一步解决应用中某些方法问题之后,它将在很多宿主身上代替 *GH* 使用,并具有很突出的优点。首先,*GH* 由 190 个氨基酸组成,而 *GRF* 只由 44 个氨基酸组成,后者便于用化学合成法和基因工程法生产人工产品;其次,*GH* 具有很强的受体特异性,而 *hGRF* 是一种

(下转第 5 页)

三、生物学意义

Nussinov 曾经用 Dickerson 规则研究了 60 种原核生物的 DNA 序列, 结果发现, 大的构象起伏刚好位于蛋白质或酶特异识别的某些 DNA 位点附近^[10]。早就发现, 蛋白质或酶可以特异地识别某些 DNA 片段, 而不能识别另一些。这是为什么? 现在, 从 DNA 双螺旋的精细结构中, 可望找到答案。众所周知, 在原核生物 DNA 转录过程中, 有一个保守的 DNA 片段, 即所谓 Pribnow 盒——TATAATG 序列, 被认为与 RNA 聚合酶和 DNA 的相互识别有关。在真核生物的转录过程中也有类似的 Hogness 盒——TATAAA (AG) 序列。如果我们把 Dickerson 规则应用到这两个特殊序列中, 就会发现螺旋扭角的最大值与最小值都出现在这两个序列之中, 而且两者紧相邻着! 可以想像, 这一局部的双螺旋结构起伏最大, 因而易于为酶所识别。如果按“钥匙与锁”模型来考察这一识别, 那么这段 DNA 序列就是一把很特殊的“钥匙”或“锁”。一般认为, 在基因调控中, 阻遏物或类似的控制蛋白质中的氨基酸可

与 DNA 双螺旋中互补碱基对边上的氮、氧原子形成氢键。既然如此, 很难想像双螺旋结构的局部起伏会不会影响这种氢键的形成。氢键的形成需要一定的距离和方位, 因此, DNA 双螺旋的局部起伏也许起着精细调节 DNA 与酶两者之间相互识别尺寸的作用。总之, 正如 Dickerson 所指出的那样: DNA 序列的信息可能贮存在它的局部精细结构之中。若果真如此, 那么 DNA 双螺旋的精细结构对生物学的重要意义, 将是不言而喻的了。

参 考 文 献

- 1 Dickerson R E, *Scientific American*, 1983; 249: 6
- 2 Shakked Z *et al. Progress in Biophysics & Mol Biol*, 1986; 47: 159
- 3 Calladine C R. *J Mol Biol*, 1982; 161: 343
- 4 Dickerson R E. *J Mol Biol*, 1983; 166: 419
- 5 Patel D J *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 3908
- 6 Clore G M *et al. J Mol Biol*, 1985; 185: 219
- 7 Zhang Chunting (张春霆)*et al. Int J Biol Macromol*, 1989; 11: 9
- 8 Tung C S *et al. J Biol Chem*, 1986; 216: 3700
- 9 Kabsch W *et al. Nucl Acids Res*, 1982; 10: 1097
- 10 Nussinov R. *J Theor Biol*. 1985; 115: 197

[本文于1988年8月8日收到]

(上接第9页)

广谱促生长剂, 开发 hGRF 产品具有事半功倍的效果。此外, 由于 hGRF 是释放 GH 的一种诱导剂, 其有效剂量比 GH 少 100 倍以上, 用少量的 hGRF 即可达到 GH 的效果。目前, 我国正在开展对 GRF 的研究, 随着对 GRF 各方面研究的不断深入, 开发和应用 GRF 产品将是指日可待的。

参 考 文 献

- 1 Reichlin S. *Endocrinol*, 1961; 69: 225
- 2 Deuben R and Meites J. *Endocrinol*, 1964; 74: 408
- 3 Guillemin R *et al. Science*, 1982; 218: 585
- 4 Rivier J *et al. Nature*, 1982; 300: 276
- 5 Wehrenberg W *et al. Hormone Res*, 1986; 24: 82
- 6 Mayo K *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 82: 63
- 7 Ling N *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; 81: 4302

- 8 Ling N *et al. Ann Rev Biochem*, 1985; 54: 403
- 9 Bohlen P *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1983; 116: 726
- 10 Esch F *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1983; 117: 772
- 11 Brazeau P *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1983; 125: 606
- 12 Bohlen P *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 125: 1005
- 13 Baird A *et al. Neuroendocrinol*, 1985; 42: 273
- 14 Ling N *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 123: 854
- 15 Kempe T *et al. Bio Tech*, 1986; 4: 565
- 16 Jamila A *et al. Gene*, 1987; 53: 219
- 17 Coude F *et al. Trends in Biotech*, 1984; 2: 83
- 18 Engels J W *et al. Protein Engineering*. 1987; 1: 3
- 19 Anba J *et al. Gene*, 1987; 53: 219
- 20 Thorner M *et al. Hormone Res*, 1986; 24: 91
- 21 Arther M *et al. Metabolic diseases and endocrine function*. Academic Press, 1985: 185

[本文于1988年10月18日收到]