人抑制素的分子结构及其生物学特性

龚守良　刘树铮
（白求恩医科大学放射生物教研室，长春）

提　要

抑制素是性腺产生的一种糖蛋白激素，由双硫键联结的两个不同的亚单位（即 α 和 β 肽链）组成，抑制垂体促性腺激素（尤其是 FSH）的产生和分泌。近年来，国外许多学者十分关注抑制素在人类生殖生理活动的重要地位，并为寻找特异性干扰精子发生和滤泡生长的节育途径，探索不育症的机理而进行深入的研究。本文简要综述人抑制素的分子结构及其生物学特性。

关键词　抑制素，分子结构，生物学特性

自从 Mottram 和 Cramer（1923 年）推测睾丸曲细精管上皮分泌一种能够影响腺垂体细胞的特殊因子，并由 McCullagh（1932 年）命名为抑制素（inhibin, IB）[1] 以来，许多研究者历经半个多世纪的努力，才对 IB 有了本质上的了解。目前认为，IB 由性腺产生，是一种糖蛋白激素，由双硫键联结的两个不同的亚单位（即 α 和 β 肽链）组成，抑制垂体促性腺激素（尤其是促滤泡激素，FSH）的产生和分泌[2]。IB-α 亚单位（IB-α）和 IB-β 亚单位（IB-β）为不同基因产物，现已提纯及克隆了大鼠[3]、猪、牛、羊和人[2]的 IB-α；IB-β 有两种，即 β_A 和 β_B，已从大鼠[3]、猪和人[2]的卵巢中分离获得，并确定了其基因序列。另外，研究者又从睾丸间质 Leydig 细胞[4]和卵巢滤泡液[5]中获得激动素（activin），并证实为 IB-β 的二聚体，即 $\beta_A\beta_A$、$\beta_B\beta_B$ 或 $\beta_A\beta_B$，亦可称为激动素 A、B 和 A-B（activin A、B 和 A-B），能够刺激培养垂体细胞释放 FSH[2,4,6]。根据 IB 的来源不同（精巢或前列腺），分为 α-IB 和 β-IB[2]。α-IB 和 β-IB 之间，或与由卵巢分离的 IB-α 和 IB-β 之间，无任何同源之处[1]。研究者还发现，IB 和激动素、转化生长因子 β（transforming growth factor-β, TGF-β）、红细胞分化因子（erythroid differentiation factor EDF）、苗勒氏抑制物（Müllerian inhibiting substance, MIS）及 decapentaplegic 基因复合体（decapentaplegic gene complex, DPP-C）等转录物质都属于同一生长和分化调节基因族[1]。

本文仅就人 IB（hIB）的分子结构及其生物学特性加以简要综述。

一、人精液抑制素样因子[7]

我们曾于 1981 年，将收集的新鲜人精液，应用醇酮方法提取，Sephadex G 100 凝胶过滤，收集三个洗脱峰的中间小峰 hP_2 具有 IB 样生物活性，抑制去势大鼠血清 FSH 水平的升高。hP_2 组分氨基酸组成为

(Arg, Trp)$_1$; (Thr, Phe, His)$_2$; (Cys, Leu, Lys)$_3$; (Ala, Tyr)$_4$; (Asp, Val)$_5$; (Ser)$_6$; (Gly, Ile)$_7$; (Glu)$_8$

hP_2 组分由氨基酸计算最小分子量为 7940 道尔顿，SDS-PAGE 所测分子量为 11500 道尔顿。所测的 hP_2 分子量与当时一些文献报告的结果互不一致，因此考虑可能与下列因素

有关：① IB 可能为不同亚单位组成的肽类多聚体；② 可能与转运蛋白结合；③ 可能存在前 IB；④ 可能有大、小分子之别。

二、人α-抑制素[8, 9]

Ramasharma 及其同事从人精浆中分离和测定具有 IB 样活性肽结构，命名为 IB 样肽 (inhibin-like peptide, ILP)，经氨基酸分析，其分子比率为(测得的一级结构为 31 肽)：

Lys_3, His_7, Asp_4, Ser_{1-2}, Glu_{2-3}, Gly_6, Ala_1, Val_2, Ile_1, Phe_1

实验结果表明，在促性腺激素释放激素 (LHRH) 诱导的培养全垂体中，ILP 可抑制 FSH 的释放，而且呈剂量依赖关系；注射给 34 日龄去势雄性大鼠，可抑制循环 FSH 水平的升高，而对 LH 水平无影响。

Yamashiro 等应用保护 ILP-(1—31) 树脂，置于肽合成仪，进行固相合成 ILP-(1—31)，并通过 HPLC 和纸电泳，获得每分子氨基酸残基值如下(括号内为理论值)：

Asp, 3.09(3); Ser, 0.89(1); Glu, 2.09(2); Gly, 4.95(5);

Ala, 1.10(1); Val, 1.70(2); Ile, 0.94(1); Phe, 1.07(1);

His, 6.80(7); Lys, 5.25(5); Arg, 3.10(3)

合成的 ILP(1—31) 与天然的比较，在体外小鼠垂体培养系统中，及在体内 LHRH 诱导未成熟大鼠 FSH 释放中，皆能抑制 FSH 的活性。将合成的 IPL 免疫兔，产生高效价的抗血清；应用合成的 [Tyr^4]-ILP 类似物作为 ^{125}I 标记配体，建立敏感的放免分析体系。[Tyr^4]-ILP 和 ILP-(9—13) 效应基本相等，而 ILP-(1—25) 和 (1—23) 活性低。显然，其抗血清识别 ILP 的C端片段。

Li 等应用抗 ILP-(1—31) 兔血清建立的放免分析，从人精浆中分离 2 个另外的肽，分别为 52 个和 92 个氨基酸肽，并命名为 α-IB-52 和 α-IB-92。氨基酸序列分析证实，α-IB-52 的N端 31 个氨基酸是 ILP (也称 α-IB-31)，α-IB-92 的C端 52 个氨基酸是 α-IB-52。下面的 α-IB-92 氨基酸序列，41—92 氨基酸残基构成 α-IB-52，41—71 残基构成 α-IB-31 (图 1)：

生物活性分析表明，在体外小鼠垂体培养系统中抑制 FSH 释放的能力，与 α-IB-31 比较，α-IB-52 为 3.4 倍，α-IB-92 则超过 40 倍以上。

α-IB-92 可通过硫酸基片段合成，首先用固相法合成三个片段，并经纯化获得 [$GlyS^{34}$]-α-IB-92-(1—34)、CF_3CO-[$GlyS^{65}$]-α-IB-92-(35—65) 和 Msc-α-IB-92-(66—92)，其中 Msc 为 2-(methylsulfonyl)-ethyloxycarbonyl，最后合成的 α-IB-92 与天然的一致，两者在 0.001 mol 剂量时都可明显地抑制 10 ng LHRH 存在的小鼠垂体分析系统中 FSH 的释放。

用 α-IB-52 免疫兔获得 1:40000 效价的抗血清，与 α-IB-31 和 α-IB-92 有交叉反应，

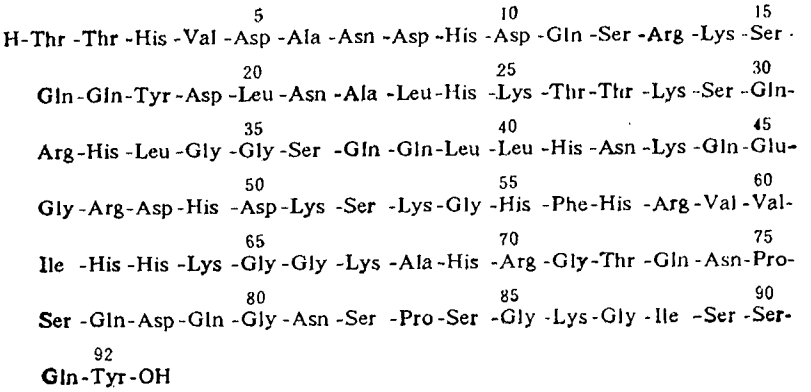

图 1

非具有同等的亲合力。应用 ^{125}I 标记的 α-IB-92 作为配体，建立特异、敏感的 α-IB 放免分析体系。通过 α-IB-92 放免分析，人血清呈剂量依赖反应，人垂体和下丘脑提取物也呈浓度依赖反应。将这些免疫反应部分进行凝胶过滤，然后经 SDS-PAGE，再将出现的几个带转移到硝化纤维素纸上，证实来自人垂体提取物的免疫物质是 α-IB-92 和 α-IB-52；来自人下丘脑提取物和血清的免疫物质是与 α-IB-92 相关的物质。用免疫细胞方法的研究证实，可在垂体前叶检出 α-IB，而在垂体后叶则否。实验表明，IB 首先结合到细胞膜上，引起细胞反应，使 FSH 分泌受抑。α-IB-92 具有结合到人和羊垂体细胞膜的能力，[^{125}I]-α-IB-92 结合到人垂体细胞膜呈浓度依赖关系，可被未标记的 IB 置换，而其置换能力也呈剂量依赖关系。这种结合是特异的，不被垂体其它激素或下丘脑肽类所置换，但 α-IB-52 和 α-IB-31 较 α-IB-92 置换能力低。所有这些资料说明，α-IB-92 结合部位是人垂体前叶细胞膜。Merchenthaler 等应用人 α-IB 的N端 1—32 片段免疫兔和羊，获得的抗血清与人、猪和大鼠 IB 存在交叉反应，免疫组织化学证实睾丸 Sertoli 细胞、卵巢颗粒细胞及胎盘绒毛细胞滋养层出现 α-IB 样免疫活性物质，说明这些组织是产生 IB 的部位。

三、人β-抑制素[1, 8]

Seidah 等报告，从人精浆中分离具有 IB 样活性的多肽，由 94 个氨基酸组成，命名为 β-1B，其氨基酸序列为(图 2)：

β-IB 有 5 个二硫键，其中 Cys-73 和

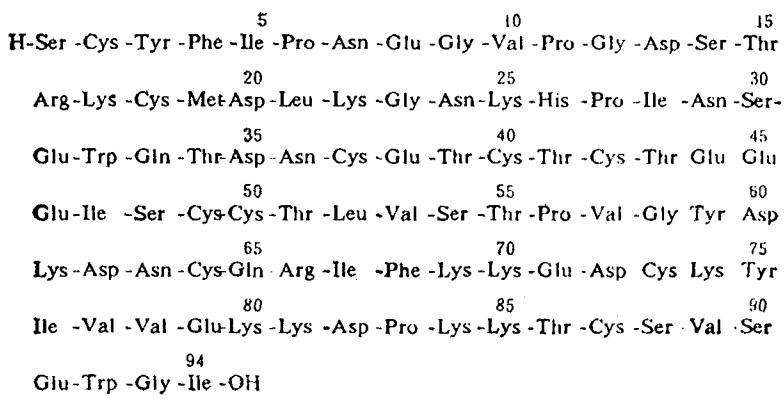

图 2

Cys-87 由二硫链联结的。后来，Arbatti 等发现 β-IB 的C端 28 个氨基酸残基具有生物活性，以克分子对克分子计，β-IB-(1—94) 和 β-IB-(67—94) 生物活性相等。10 ng β-IB可抑制体外大鼠垂体 FSH 释放，而在体内抑制雄性大鼠 FSH 释放则需 100 ng β-IB。但有人获得相反的结果，Kohan 等应用合成的 28 个氨基酸的 β-IB 或纯化的 β-IB-(1—94) 未观察到抑制体外受 LHRH 刺激的大鼠垂体细胞 FSH 的释放。另有实验证实，β-IB 与前列腺合成的包裹精子抗原、β-精原蛋白 (β-seminoprotein) 及前列腺分泌蛋白 PSP-94 具有同等生物活性。

四、人抑制素 α-和 β-亚单位

Ling 等从猪滤泡液中分离两种形式(A 和 B) 的 IB，即同一 α-亚单位和不同 β-亚单位 (β_A 和 β_B)，并证实猪滤泡液 IB(pfIB) 分子量为 32000，α-和 β-亚单位分子量分别为 18000 和 14000，弄清了两个亚单位N端 10 个氨基酸序列。Mason 等应用N端序列资料，通过克隆 cDNA，生物合成 pfIB 的 α-和 β-亚单位前体，并由 cDNA 序列，推导出 α-、β_A-和 β_B-亚单位的肽类一级结构。两种形式的

pfIB 都具有同样的生物活性，在体外抑制垂体 FSH 的分泌[11]。

后来，Mason 等从人卵巢 mRNA 获得 cDNA 文库，以 pfIB 的 α-、β_A-和 β_B-cDNA 作杂交探针，筛选 hIB 的 cDNA 克隆，然后将克隆、序列 cDNA 编码为人滤泡液 IB (hfIB) α-、β_A-和 β_B-亚单位前体。结果证实，人和猪 IB-α-亚单位前体蛋白氨基酸序列有 85% 同源性，hfIB-α 前体蛋白包含 335 个氨基酸，分泌 134 个氨基酸的成熟 hfIB-α[12]。hfIB-α N 端 26个氨基酸残基[12]与人胎盘 IB-α[13] 相同，但与 pfIB-α 的第 3 和第 26 残基不同[11]。在 hfIB-α 和 pfIB-α 保留半胱氨酸残基和 2 个糖基化部位，另外在牛 IB-α 见到 hfIB-α 序列(271—273 残基)的糖基化部位[12]。

近来，Keinan 等[5]应用猪和人卵巢 IB-α 核苷酸序列筛选人睾丸 cDNA 文库，分离获得 IB-α cDNA。人睾丸 IB-α-亚单位 (htIB-α) 前体蛋白由 366 个氨基酸组成，成熟 htIB-α 其 C 端由 134 个氨基酸组成。htIB-α 前体蛋白核苷酸和氨基酸序列[5]与人胎盘 cDNA[13] 及分离的 hIB 基因组片段[14]一致，但不同于人卵巢 IB-α 前体蛋白信号肽区的 3 个核苷酸序列及其所产生的 2 个氨基酸序列[12]。在人卵巢 IB-α 前体蛋白氨基酸序列中，信号肽第 13 和 15 位分别是缬氨酸和丝氨酸[12]，而人睾丸[5]和胎盘[13]及分离的 hIB 基因组片段[14]分别是组氨酸和半胱氨酸。htIB-α5′-未翻译区核苷酸序列[5]与人胎盘[13]一致；另外，htIB-α cDNA 在 3′-未翻译区和多嘌呤尾部所包含的完整序列[5]与人卵巢 IB[12] 相同。

实验获得的 hfIB-β_A 和-β_B 前体蛋白分别包含 398 和 359 个氨基酸，分泌成熟 hfIB-β_A 和-β_B 分别包含 116 和 115 个氨基酸。hfIB-和 pfIB-β_A 前体蛋白氨基酸序列有 92% 的同源性，其不同多发生在人序列的 245—256 氨基酸部位，此处插入另外 3 个残基；成熟 hfIB-和 pfIB-β_A 的 116 个氨基酸相同，其核苷酸序列近 90% 为同源性，多数变化发生在第 3 密码子部位。hfIB-和 pfIB-β_B 前体蛋白氨基酸序列有 98% 的同源性，成熟 hfIB-和 pfIB-β_B 含有的 115 个氨基酸仅有 1 个氨基酸不同，在 270 残基上 hfIB-β_B 序列的天门冬酰胺代替猪的丝氨酸[11,12]。

现已发现，人、猴、羊、大鼠和小鼠睾丸存在 IB-α-mRNA；在人胎盘和猪卵巢中检出的 IB-αmRNA，其分子量(约 15kb) 与灵长类和啮齿类睾丸 IB-αmRNA 相同；在成年人、羊和猴睾丸 IB-α mRNA 浓度比例为 1:1.5:0.5；人睾丸 IB-α mRNA 浓度与 40 日龄大鼠或小鼠睾丸相似，而高于人胎盘的 5—10 倍[5]；大鼠去垂体后 10 天，睾丸重和总 RNA 含量下降[15]，IB-α mRNA 也下降[5]，提示 IB-α 基因表达需要垂体激素的维持。

Meunier 等[16]证实大鼠睾丸除了颗粒细胞外，内膜细胞、间质腺细胞及黄体细胞也均存在 IB-α mRNA；不仅在成熟滤泡的颗粒细胞中，而且在各期滤泡的颗粒细胞中检出了 IB-α mRNA；在颗粒细胞和黄体 IB-β_A和-β_B mRNA，随动情周期变化而发生明显变化；在人黄体中也检出 IB-α 和-β_A mRNA[17]。Meunier 等[18]观察到，除了卵巢和睾丸以外，胎盘、垂体、肾上腺、骨髓、肾脏、脊髓和脑等部位也存在 IB-α、-β_A和-β_B 基因表达物质，而且在未成熟时含量高。由此推测，IB 可能在脑和脊髓系统发挥神经调节功能；在胎盘和垂体，可能通过外源 IB 调节，发挥旁分泌和自分泌作用；在骨髓 β_A mRNA 超过 α mRNA，因此 activinA 可能是红细胞分化的重要调节物质；在肾上腺皮质存在 IB-α mRNA，受 ACTH 调节[19]，可能发挥激素间的调节作用

研究者证实[4]，睾丸 Leydig 细胞提取物含有 IB-β mRNA，而无 IB-α mRNA，说明 Leydig 细胞存在 activin；sertoli 细胞不存在 IB-βmRNA，而含有 IB-α mRNA，说明 Sertoli 细胞不存在 activin。有人[20]将 IB cDNA 转染哺乳细胞后，加入等克分子比率 IB-α 和-β，导致 β/β 二聚物 (activin) 的形成，而 α/β 二聚物 (IB) 仅在 IB-α cDNA 转

(下转第 276 页)

明，当重建膜脂酰链长为 14 个碳原子或更短，正常的构象变化不再发生。又如二聚短杆菌肽传导通道所测得的半衰期显然取决于它掺入的双层厚度。

4. 失去双层中板 交错对插出现时，原由脂酰链末梢甲基组成的双层中板消失了。这个区域能为生物膜的多肽大侧链等提供理想环境。从非交错对插双层状态的转变，失去双层中板可能触发构型转变，因为这些被排出的肽侧链被迫寻找新的环境。

六、结　论

非交错对插双层早已被认为是膜磷脂在过量水中的一般排列结构。最近，对各种不对称磷脂的热力学、结构分析证实有交错对插双层存在，在低温时更易形成。这样，在饱和混合磷脂酰胆碱中，当两条脂酰链不对称增加时，从非交错对插到部分交错对插、到混合交错对插、到最后完全交错对插凝胶相双层排列。脂烃链的这种交错对插在其它许多双层系统也可观察到，可以认为是个普遍现象，可能具有重要的膜功能意义。

参考文献

1 Xu X, Huang C. *Biochem,* 1987; **26**: 1036
2 Xu H *et al. Biochem,* 1987; **26**: 5448
3 Xu H *et al. Biochim Biophys Acta,* 1988; **943**: 63
4 Braganza L F, Worcester D L. *Biochem,* 1986; **25**: 2591
5 McDaniel R V. *Biochim Biophys Acta,* 1984; **731**: 97
6 Tilcock C P S *et al. Biochem,* 1986; **25**: 816
7 Finegold L, Singer M A. *Biochim Biophys Acta,* 1986; **855**: 417
8 Mason T T, Huang C. *Lipids,* 1981; **16**: 604
9 Chem S C *et al. Proc Natl Acad Sci USA,* 1980; **77**: 5060
10 Wu W *et al. Biophys J,* 1985; **47**: 237
11 Hui S W *et al. Biochem,* 1984; **23**: 5570
12 Levin I W *et al. Biochem,* 1985; **24**: 6282
13 Wong R T T, Huang C. *Biochem,* 1989; **28(3)**: 1259

[本文于 1989 年 6 月 5 日收到]

（上接第 267 页）

染超过许多倍才产生。因此，α 和 β 水平比率在调节 activin 和/或 IB 可能起关键作用。在动情周期，IB-α 和-β 表达的各自独立的改变，可能是由于 IB 和 activin 两者精细地调节 FSH 释放的结果[16]。IB 和 activin 具有相反功能，在性腺和性腺以外可能以双重的调节方式而发挥作用[16]。activin 可能作为一种激素和生长/分化因子在体内产生生理效应[18]。

参考文献

1 De Jong F H. *Physiol Rev,* 1988; **68**: 555
2 Burger H G, Igarashi M. *Acta Endocr,* 1988; **118**: 159
3 Woodruff T K *et al. Mol Endocr,* 1987; **1**: 561
4 Fritz I B. *Mol Cell Endocr,* 1988; **59**: 147
5 Keinan D *et al. Mol. Endocr,* 1989; **3**: 29
6 Toebosch A M W *et al. Mol Cell Endocr,* 1988; **55**: 101
7 龚守良，刘树铮. 白求恩医科大学学报，1986; **12**:279
8 Li C H, Ramasharnia K. *Ann Rev Pharmacol,* 1987; **27**: 1
9 Yamashiro D *et al. Proc Natl Acad Sci USA,* 1984; **81**: 5399
10 Merchenthaler I *et al. Mol Cell Endocr,* 1987; **54**: 239
11 Mason A J *et al. Nature,* 1985; **318**: 659
12 Fukuda M *et al. Mol Cell Endocr,* 1986; **44**: 55
13 Mayo K E *et al. Proc Natl Acad Sci USA,* 1986; **83**: 5849
14 Stewart A G *et al. FEBS Lett,* 1986; **206**: 329
15 Chen C-LC, Madigan M B. *Endocrinology,* 1987; **121**: 590
16 Meunier H *et al. Mol Endocr,* 1988; **2**: 1352
17 Davis S R *et al. J Endocr,* 1987; **115**: R21
18 Meunier H *et al. Proc Natl Acad Sci USA,* 1988; **85**: 247
19 Crawford R J *et al. Mol Endocr,* 1987; **1**: 699
20 Hodgen G D *et al. Proceedings of CONRAD international workshop on contraceptive developments,* Norfolk VA: Jones Institute Press, 1988: 19--29

[本文于 1989 年 5 月 25 日收到]