

**New Progress in Nuclear Receptor and It Mediated Transactivation: Coactivator and Corepressor.** MU Xiao-min, LIU Yi-xun (*State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*).

**Abstract** Nuclear receptor belong to a super-family of protein. Members of this family are characterized by similar three major structure region including a highly conserved DNA binding domain. Nuclear receptor bind to specific DNA

sequence and control specific gene transcription. Recent data show that, in addition to contacting to basal transcription factors, nuclear receptor inhibit or enhance transcription by recruiting the array of coactivator or corepressor. Coactivators are necessary for the efficient transcription. CBP/P300, SRC-1 and SMRT are the main coactivators and corepressor found so far.

**Key words** nuclear receptor, transcription factor, coactivator, corepressor

## 生长激素分泌促进剂及构效关系研究进展

刘亮 来鲁华 李崇熙<sup>1)</sup>

(北京大学化学和分子工程学院, 北京 100871)

**摘要** 生长激素分泌促进剂是一类作用于垂体和下丘脑的具有专一性促生长激素释放作用的寡肽及其类似物。由于其分子质量小、活性高、可口服、作用专一而有可能成为新的生长激素治疗药物。目前已经发展了很多具有此类活性的多种结构的化合物, 如肽、环肽、肽醇及非肽类似物等。尽管这类化合物的作用机制尚未完全明确, 但已有证据表明存在新的调节生长激素分泌的途径和新的调节因子。

**关键词** 生长激素, 促生长激素释放肽, 生长激素分泌促进剂

**学科分类号** Q575

生长激素 (GH) 是脑垂体前叶细胞分泌的蛋白质激素, 主要被两个下丘脑分泌的肽类激素调控: 生长激素释放因子 (GHRF) 诱导 GH 释放, 而生长激素抑制因子 (SRIF) 抑制 GH 释放。生长激素在临床上用于治疗各种 GH 缺乏症、骨质疏松、T 细胞缺乏症等<sup>[1]</sup>。此外, 还有希望成为抗衰老药物。生长激素治疗主要通过静脉或皮下注射基因重组的人类的生长激素 (rhGH) 来进行。rhGH 使用很不方便, 还可能导致一些副作用, 如免疫反应等; 而且价格昂贵, 每个病人年平均花费需 20 000 ~ 30 000 美元。因此人们希望找到具有专一的促 GH 分泌活性, 可以口服, 易于合成的小

分子化合物。这些化合物可以提高内源性 GH 水平, 避免了外源性生长激素的使用, 价格上也有很大优势。

促生长激素释放肽 (GHRP) 是 70 年代末由 Momany 和 Bowers 等<sup>[2~4]</sup>偶然发现的一类具有专一促 GH 分泌活性的脑啡肽类似物。通过大量的结构改造工作, GHRP 的活性已有很大提高, 但口服活性不理想。为提高口服活性, 环肽和非肽类似物成为近年来研究的热点。GHRP 及其非肽类似物被统称为生长激素分泌促进剂 (growth hormone secretagogues)。

<sup>1)</sup>通讯联系人。

收稿日期: 1997-02-04, 修回日期: 1997-07-11

GHRP 先于 GHRF 被发现, 曾被认为可能是 GHRF 的类似物. 尽管后来的研究证明 GHRP 并非 GHRF 的类似物, 但作用机制的研究使人们相信体内存在着一种未知的调节 GH 分泌的因子. 最近猪和人的 GHRP 受体已被成功地表达<sup>[5]</sup>, 从而证实了这一猜测, 但 GHRP 的内源性物质还没有被发现. 临床研究<sup>[6]</sup>表明生长激素分泌促进剂可通过多种方式给药; 活性高, 最大剂量的生长激素分泌促进剂可使 GH 峰值超过最大剂量的 GHRF 达到的水平; 对年轻人、儿童及老年人均有效并且没有显著的性别差异; 副作用很微弱. 所以很有希望成为新的生长激素治疗药物.

## 1 肽类的生长激素分泌促进剂

### 1.1 GHRP-6 系列物

1977 年, Momany 等<sup>[2]</sup>发现 Met<sup>5</sup>-脑啡肽的类似物 [D-Trp<sup>2</sup>] Enk-NH<sub>2</sub> 有专一地促进 GH 分泌的活性. 针对这一特性, 他们合成了一系列化合物. 构效关系 (SAR) 分析发现 2 位 D 型氨基酸对保持活性非常重要, 而 Met<sup>5</sup> 却并非活性所必需, C 端酰胺能够显著地提高活性, 但也并非活性所必需. 1981 年, 他们把构象能计算的方法引入到新的 GHRP 设计中<sup>[3]</sup>. 对 [D-Trp<sup>2</sup>] Enk-NH<sub>2</sub> 系列物进行的构象计算和分析表明: Tyr<sup>1</sup> 的苯酚环和 D-Trp<sup>2</sup> 吡啶环的平行堆积是重要的构象特征. 通过构象计算, 活性构象模建, 序列设计, 合成, 体外测活过程的循环, 使 GHRP 的活性不断提高. 1984 年, 得到了第一个有体内活性的六肽 GHRP-6 (His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) 并搭建出了它的活性构象<sup>[4]</sup>: His<sup>1</sup> 和 D-Trp<sup>2</sup> 及 Trp<sup>4</sup> 和 D-Phe<sup>5</sup> 组成两套芳环的平行堆积; 整个肽形成环状结构, C 端酰胺的 H 和 His<sup>1</sup> 的羰基氧形成分子内氢键; Ala<sup>3</sup> 采取较为伸展的构象. GHRP-6 虽然活性很高 ( $EC_{50} = 10.3 \text{ nmol/L}$ ), 但口服活性不好, 只有静脉注射活性的 0.3%<sup>[7]</sup>.

### 1.2 GHRP-1, GHRP-2 和 Hexarelin

GHRP-1 (Ala-His-D-β-Nal-Ala-Trp-D-Phe-

Lys-NH<sub>2</sub>), GHRP-2 (D-Ala-D-β-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) 和 Hexarelin (His-D-2-Me-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) 被称为第二代的 GHRP<sup>[8]</sup>. 它们的活性比 GHRP-6 高 3~10 倍. 结构上与 GHRP-6 的最大区别在 2 位 D-Trp 被 D-β-Nal (D 型 β 萘基丙氨酸) 或 2-Me-D-Trp 替代, 说明受体可接受较大的芳香基团. GHRP-2 中用 D-Ala<sup>1</sup> 替代 His 说明 His, D-Trp 的芳环堆积并非活性必需. 由于多肽化合物固有的特性, 这三个肽的口服活性依然不高<sup>[8,9]</sup>.

### 1.3 环肽及肽醇类似物

环肽可以限制肽构象的自由度, 是研究活性构象的重要方法. 环肽也能够提高抗水解能力, 提高肽的口服活性. McDowell 首先报道了高活性的环七肽 G-7203 (表 1): 将 GHRP-2 的 D-Ala<sup>1</sup> 换成 D-Lys, 同时在 D-Phe<sup>5</sup> 和 Lys<sup>6</sup> 之间插入 Glu, 使 D-Lys 和 Glu 成键<sup>[10,11]</sup>. G-7203 的体外活性 10 倍于 GHRP-6. 改变链的长度及酰胺键的位置都会使活性降低, 说明 D-Lys<sup>1</sup> 和 Glu 形成的环会使分子产生特殊的构象而其他残基形成的环则不行, 核磁共振研究也表明 D-Lys<sup>1</sup> 和 Ala<sup>3</sup> 形成发夹转角结构, 使分子构象紧密.

Momany 曾报道四肽 Tyr-D-Trp-D-Trp-Phe-NH<sub>2</sub> 有弱的活性<sup>[3]</sup>. McDowell<sup>[10,11]</sup> 认为尽管这个四肽的活性不高, 但若其结合位点与 GHRP-6 的相同, 则它们的芳香侧链应有相同的三维排布. 按照这个设想改造的结果得到活性 30 倍于 GHRP-6 的 G-7039 (表 1). 同时, 为了进一步确定药效核心, 对 G-7039 进行了系统的简化, 以降低分子质量和分子复杂性. 去掉 C 端 Lys 的结果是仍可保留较好的体内活性, 而体外活性基本保持. 再去除 D-Phe, 则活性降低很多. 把 C 端的 D-β-Nal 还原成醇, 则体外活性又恢复到较高水平 ( $EC_{50} = 1.8 \text{ nmol/L}$ ), 但体内活性很差. 有意思的是将 D-β-Nal<sup>3</sup> 换成 D-Trp<sup>3</sup> (G-7502), 则体外活性降低而体内活性增高 10 倍 (表 1).

表 1 促生长激素释放肽类似物的结构和体外活性<sup>1)</sup>

GHRP 类似物	结构	体外活性	GHRP 类似物	结构	体外活性
L-158077		3000 <sup>[11]</sup>	G-7203		0.43 <sup>[11]</sup>
L-692429		60 <sup>[11]</sup>	G-7039		0.18 <sup>[11]</sup>
L-692585		3 <sup>[12]</sup>	G-7502		10.6 <sup>[11]</sup>
L-700653		3 <sup>[13]</sup>	L-368112		300 <sup>[15]</sup>
L-262564		50 <sup>[14]</sup>	MK-0677		1.3 <sup>[15]</sup>

<sup>1)</sup>大鼠垂体细胞实验; <sup>2)</sup>光学异构体混合物.

## 2 非肽类的生长激素分泌促进剂

由于非肽化合物有好的抗水解能力, 所以把多肽药物改造成非肽类似物是提高口服活性的重要方法. 促生长激素释放肽的非肽类似物发展很快, 已有两个系列的化合物被报道, 并有较好的体外活性和口服活性.

### 2.1 苯并氮杂萘酮系列化合物

1993 年 Smith<sup>[1]</sup>报道了 GHRP-6 的第一个非肽类似物 L-692429. 前体化合物 L-158077 (表 1) 有中等活性, 将 2'-羧基改为四唑可使活性提高 25 倍, 拆分外消旋体发现 R 型 (L-692429) 有高活性, S 型活性很低. L-692429 的构效关系 (SAR) 研究已经进行了很多, 主要集中于氨基酸侧链 R<sub>1</sub> 和 2' 位置的改造上

(图 1), 骨架中内酰胺环和联苯部分的改造也有报道<sup>[13,14,16~18]</sup>.

侧链 SAR 研究的结果显示碱性的氨基是必需的. L-692429 和 GHRP-6 的构象叠合计算结果也显示二者的氨基是重合的<sup>[12]</sup>. 氨基酸侧链 R<sub>1</sub> 的长度和构型都对活性有影响, 短链和 D 构型可保持高活性. 受体可接受一定大小的氨基取代基 R<sub>2</sub>, 如丙基, 苄基, 并且 2 (R) -羟丙基 (L-692585) 取代可使活性提高 20 倍<sup>[13,17]</sup>. 2 (R) -羟丙基的作用可能有两个: a. 与受体中新的位点结合. b. 使分子构象改变, 更适合与受体结合. 我们对这一系列化合物的三维定量构效关系 (3D-QSAR) 研究表明在此区域内强负电性的取代基对活性有利, 因此 2 (R) -羟丙基的作用是第一种解

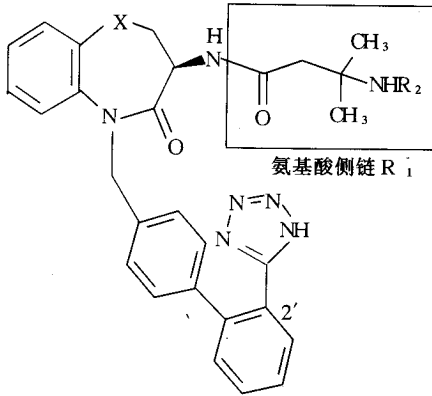
释<sup>[15]</sup>

图1 L-692429改造位点

2'-四唑基是一个两性基团, 烷基化会使其失去酸性或氢键供体的能力. 甲基和苄基等烷基化的结果也证明活性降低, 但 2-羟丙基化的结果却基本保持 L-692429 的活性. 用其他基团 (磺酰胺, 羧基, 酯基, 氰基等) 替换 2'-四唑无一例外地使活性降低<sup>[14]</sup>. de Vita 等认为成氢键的能力可能是 2' 位与受体结合的关键. 用酰胺替代四唑, 活性不变. N 取代酰胺的研究发现小的单取代基对活性无影响, 但双取代会使活性剧降, 如 N, N-二乙基酰胺的活性只有单取代物的 1/25. 证明保持 2' 上氢键供体是保持高活性的关键<sup>[16]</sup>. 不同长度的  $\omega$ -羟基烷基单取代酰胺的活性变化很有规律, 短链的取代酰胺的活性低于无取代酰胺, 但活性随链长的增长而增高. 可能短链的  $\omega$ -羟基会形成分子内氢键而使构象发生改变, 链长增加能减弱这种倾向而且可能有新的位点参与结合, 因为当链长达到 4 和 5 时活性 8 倍于无取代酰胺<sup>[16]</sup>.

2 (R) -羟丙基取代氨基酸侧链的 N (L-692585) 可使活性大幅提高, 同样 2 (R) -羟丙基可使 2'-酰胺取代物的活性提高 20 倍, 而 2 (S), 3-二羟丙基取代物 L-700653 (表 1) 活性提高更多, 并且 L-700653 口服活性比 2'-四唑类的化合物有很大提高<sup>[16]</sup>.

对内酰胺环的改造发现, 六元环和八元环

均使活性大幅降低. 用 S, O 等替代 5 位亚甲基 (图 1 中 X 位置) 仅使活性略降, 但用极性更大的羰基、砜、亚砜等替代都使活性剧降, 也可能这些基团影响了分子的构象<sup>[18]</sup>. 联苯基主要起骨架作用, 以使内酰胺部分和四唑基有正确的取向<sup>[19]</sup>. L-692429 和 GHRP-6 的构象迭合和距离比较的结果显示联苯的 C 环与 Trp<sup>4</sup> 或 D-Phe<sup>5</sup> 的侧链接近, 所以联苯基也起了疏水核心的作用<sup>[12,15]</sup>.

## 2.2 螺哌啶系列化合物<sup>[20~23]</sup>

1995 年, Smith 等采用“特征结构”方法搜寻了一类新的 GHRP 类似物. 这种方法是假定有一定特征结构的分子可以与多个受体结合, 那么对含有这种特征结构的某种受体的配体分子进行适当的改造可能得到另一种受体的激活剂或抑制剂<sup>[24]</sup>. Smith 通过筛选其他 G-蛋白偶合的受体的底物发现化合物 L-368112 (表 1) 有中等活性, 而其中的螺哌啶部分即是定义的特征结构, 因为螺哌啶结构也存在于催产素类似物及  $\sigma$  受体的配体中. 对含有螺哌啶核心结构的化合物进一步的筛选得到活性非常高的第二个前体 L-262564, 四个光学异构体的混合物的体外活性达到 50 nmol/L, 但此化合物的口服活性很差. 进一步的改造得到 MK-0677, 体外活性高达 1.3 nmol/L, 超过 L-692429 和 GHRP-6 而接近 GHRH (0.47 nmol/L) 的水平, 并且有良好的口服活性.

## 3 作用特点、机制和受体研究

GHRP 及类似物的作用特点是专一性强, 活性高, 在体内与 GHRF 有协同作用. GHRP 在体内和体外均以剂量依赖形式促进 GH 分泌, 对其他垂体激素的分泌几乎没有影响. GHRP 没有物种专一性, 对猴、猪、狗、羊、牛、大鼠甚至于鸡都有活性. GHRP 的作用可被 SRIF 抑制. GHRP 与 GHRF 在体内存在协同作用, 但对体外是否存在协同作用还有争论. GHRP 类化合物的活性很高, 譬如, 对健康的青年男子静脉注射 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的 GHRP-6,

GHRP-1, GHRP-2 和 Hexarelin 可使 GH 峰值超过最大剂量的 GHRF 可达到的水平<sup>[6]</sup>.

GHRP 在垂体细胞内信号途径与 GHRF 不同, GHRP 的作用经过了蛋白激酶 C (PKC) 的调节<sup>[25]</sup>, 但 PKC 并非唯一的信号途径. Sartor 和 Bowers 发现  $Ca^{2+}$  也参与了 GHRP 作用<sup>[26]</sup>.

GHRP 的作用特点和信号途径均显示动物体内存在另一条调节 GH 分泌的途径. 人们也在努力的寻找这个新的调节因子及其受体. 1996 年, Dean 等<sup>[27]</sup>用<sup>35</sup>S 标记的 MK-0677 在猪和大鼠的垂体前叶膜上确定了一个专一的, 具有高结合性的位点, 各种生长激素分泌促进剂与之的结合能力与它们的促 GH 分泌能力紧密相关. GHRF, SRIF, Met-Enk 等 19 个激素化合物不与<sup>35</sup>S-MK-0677 竞争结合, 说明此位点有很高的选择性. Howord 等<sup>[5]</sup>随后表达了人和猪的受体. 受体有 353 个残基, 结构预测表明含有 7 个跨膜螺旋和六个 Loop 区, 是典型的 G-蛋白偶合的受体蛋白. 受体蛋白的发现证实存在内源性的具有 GHRP 功能的分子.

#### 4 展 望

生长激素分泌促进剂由于可能成为代替生长激素的临床药物而受到越来越广泛的重视. 为了提高这类药物的口服活性, 非肽类似物将是人们研究的主要目标. 从内分泌学的角度来讲, 动物体内应该存在内源性的具有生长激素分泌促进剂作用的物质. 这个分子的结构、它的分泌源、靶部位和作用机制都是人们感兴趣的问题, 对这些问题的研究将对内分泌、神经、药物和病理等多个学科产生重要的影响.

#### 参 考 文 献

- Smith R G, Cheng K, Schoen W R *et al.* A nonpeptidyl hormone secretagogue. *Science*, 1993, **260** (5144): 1640~1643
- Bowers C Y, Momany F A, Reynold G A *et al.* Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone *in vitro*. *Endocrinology*, 1980, **106** (3): 663~667
- Momany F A, Bowers C Y, Reynold G A *et al.* Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone *in vitro*. *Endocrinology*, 1981, **108** (1): 31~39
- Momany F A, Bowers C Y, Reynold G A *et al.* Conformational energy studies and *in vitro* and *in vivo* activity data on growth hormone-releasing peptides. *Endocrinology*, 1984, **114** (5): 1531~1536
- Howard A D, Feighner S D, Cully D F *et al.* A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 1996, **273** (5277): 974~977
- Korbonits M, Grossman A B. Growth hormone-releasing peptide and its analogues-novel stimuli to growth hormone release. *Trends Endocrinol Metab*, 1995, **6** (2): 43~49
- Hartman M L, Farello G, Pezzoli S S *et al.* Oral administration of growth hormone (GH)-releasing peptide stimulates GH secretion in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, **74** (6): 1378~1384
- Bowers C Y. GH releasing peptides-structure and kinetics. *J Pedia Endo*, 1993, **6** (1): 21~31
- Ghigo E, Arvat E, Gianotti L *et al.* Growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide, after intravenous, subcutaneous, intranasal, and oral administration in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, **78** (3): 693~698
- McDowell R S, Elias K A, Stanley M S *et al.* Growth hormone secretagogues: characterization, efficacy, and minimal bioactive conformation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (24): 11165~11169
- Elias K A, Ingle G S, Burnier J P *et al.* *In vitro* characterization of four novel classes of growth hormone-releasing peptide. *Endocrinology*, 1995, **136** (12): 5694~5699
- Schoen W R, Pisano J M, Prendergast K *et al.* A novel 3-substituted benzazepinone growth hormone secretagogue (L-692429). *J Med Chem*, 1994, **37** (7): 897~906
- Schoen W R, Ok D, DeVita R J *et al.* Structure-activity relationships in the amino acid sidechain of L-692429. *Bioorg & Med Chem Lett*, 1994, **4** (9): 1117~1122
- DeVita R J, Schoen W R, Ok D *et al.* Benzolactam growth hormone secretagogues: replacements for the 2'-tetrazol moiety of L-692429. *Bioorg & Med Chem Lett*, 1994, **4** (15): 1807~1812
- 刘 亮, 王任小, 来鲁华等. 促生长激素释放素三维定量构效关系及药效团模型研究. *物理化学学报*, 1997, **13** (12): 1090~1096
- DeVita R J, Schoen W R, Fisher M H *et al.* Benzolactam growth hormone secretagogues: carboxamides as replacement for the 2'-tetrazole moiety of L-692429. *Bioorg & Med Chem Lett*, 1994, **4** (18): 2249~2254
- Ok D, Schoen W R, Hodges P *et al.* Structure-activity relationships of the non-peptidyl growth hormone secretagogues L-692429. *Bioorg & Med Chem Lett*, 1994, **4** (22): 2709~2714

- 18 DeVita R J, Schoen W R, Dolduras G A *et al.* Heterocyclic analogs of the benzolactam nucleus of the non-peptidic growth hormone secretagogue L-692429. *Bioorg & Med Chem Lett*, 1995, **5** (12): 1281~ 1286
- 19 Chu L, Mrozek H, Fisher M H *et al.* Aliphatic replacements of the biphenyl moiety of the non-peptidyl growth hormone secretagogues L-692429 and L-692585. *Bioorg & Med Chem Lett*, 1995, **5** (19): 2245~ 2250
- 20 Patchett A A, Nargund R P, Tata J R *et al.* Design and biological of L-163191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (15): 7001~ 7005
- 21 Nargund R P, Barakat K J, Cheng K *et al.* Synthesis and biological activities of camphor-based non-peptide growth hormone secretagogues. *Bioorg & Med Chem Lett*, 1996, **6** (11): 1256~ 1270
- 22 Nargund R P, Chen M-H, Johnson D B R *et al.* Peptidomimetic growth hormone secretagogues: synthesis and biological activities of analogs varied at the indole nucleus of the prototypical spiro-piperidine L-162752. *Bioorg & Med Chem Lett*, 1996, **6** (14): 1731~ 1736
- 23 Chen M-H, Steiner M G, Patchett A A *et al.* Analogs of the orally active growth hormone secretagogues L-162752. *Bioorg & Med Chem Lett*, 1996, **6** (18): 2163~ 2168
- 24 Evans B E, Rittle K E, Bock M G. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J Med Chem*, 1988, **31** (12): 2235~ 2246
- 25 Cheng K, Chan W W-S, Butler B *et al.* Evidence for a role of protein kinase-C in His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>-induced growth hormone release from rat primary pituitary cells. *Endocrinology*, 1991, **129** (6): 3337~ 3342
- 26 Sartor O, Bowers C Y, Reynolds G A *et al.* Variables determining the growth hormone response of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> in the rat. *Endocrinology*, 1985, **117** (4): 1441~ 1447
- 27 Pong S-S, Chaung L-H P, Dean D C *et al.* Identification of a new G-protein linked receptor for growth hormone secretagogues. *Molecular Endocrinology*, 1996, **10** (1): 57~ 61

**Growth Hormone Secretagogues and Their Structure-activity Relationship.** LIU Liang, LAI Lurhua, LI Chong-xi (*Department of Chemistry, Peking University, Beijing 100871, China*).

**Abstract** Growth hormone (GH) secretagogues are synthetic oligopeptides and their non-peptide mimetics which act on the pituitary and the hypothalamus to stimulate GH release. Because of their small molecular weight, high potency, oral activity and specific action, GH secretagogues can act as new agents in GH treatment. Active compounds with diverse structure, such as peptides, cyclic peptides, peptide alcohols and non-peptide mimetics have been found. Although the exact mode of action of these agents has not been fully established, they may be mimicking a new endogenous GH-releasing factor in a new pathway for the control of the release of GH.

**Key words** growth hormone, growth hormone-releasing peptide, growth hormone secretagogues

## 神经元凋亡的离体模型及其检测技术

张宁媛 朱俐 高静

(南京大学医学院, 南京 210093)

**摘要** 近年来, 随着细胞凋亡研究的深入, 神经元凋亡与神经退变病的关系愈发引人注目, 已建立多种神经元凋亡的离体模型. 多种因素如营养剥夺、自由基、谷氨酸、低钙及β-淀粉样蛋白等均可诱发神经元凋亡. 凋亡的检测, 可先从酶或蛋白质的变化判断神经元的损伤情况, 再结合形态学观察, 最后通过DNA电泳等确证.