

肌肉异位表达 pGHRH 的 两种质粒对大鼠的促生长作用*

孟庆勇¹⁾ 张雅丽²⁾ 解启发¹⁾ 巩霞¹⁾ 李宁^{1)**}

¹⁾中国农业大学生物学院生物技术国家重点实验室, 北京 100094;

²⁾中国农业大学食品学院, 北京 100094)

摘要 构建了两种猪生长激素释放激素(GHRH)的肌肉特异表达质粒 ppG-A53f-H6-GHRH (ppG-H6) 及 ppG-A53f-H4-GHRH (ppG-H4). 通过对大鼠进行肌肉注射, 并于注射后分别记录 0, 3, 7, 11, 14, 17, 20, 24, 27, 31, 34, 38 以及第 41 天的体重变化结果, 同时分析了第 20、27、34 和第 41 天的血清生长激素(GH)浓度, 以研究促生长表达质粒在动物体内的促生长作用. 通过研究表明, 外源的 GHRH 表达质粒在肌肉中获得了表达, 并使动物体内的 GH 水平维持在一个相对稳定的较高水平上, 导致的直观效果表现为: 通过肌肉注射表达质粒 ppG-H6 对大鼠的生长有促进效果, 在第 34 天的净增重显著于对照组 ((200.57±3.99) g *vs* (185.85±9.45) g, $P < 0.05$). 实验结果预示, 利用注射肌肉特异异位表达 GHRH 蛋白可能促进动物生长.

关键词 生长激素释放激素, 肌肉表达, 促生长, 质粒, 基因治疗

学科分类号 Q789

生长激素释放激素 (growth hormone releasing hormone, GHRH) 是一种蛋白类激素, 它依据动物物种的差异而有所不同. 成熟的 GHRH 一般含有 40~44 个氨基酸残基, 它是由含有 103~108 个氨基酸的前肽拼接得到的^[1~4]. GHRH 具有刺激生长激素(GH)分泌的作用, 它与生长激素抑制素 (也称生长抑素, somatostatin, SS) 抑制 GH 分泌的作用并存, 共同维持着 GH 的周期性脉冲分泌^[5].

1990 年, Wolff 等^[6]发现, 对小鼠的肌肉直接进行 DNA 注射能够使肌细胞吸收质粒 DNA 并表达新的蛋白质, 并指出这可能为发展基因疫苗及基因治疗提供新的思路. 1997 年 Draghia-Akli 等^[7]将这一理论直接转换为用于促进动物生长, 通过肌肉注射 GHRH 表达质粒实现促进猪体重增加的效果. 2004 年这一理论在羊体内也获得了较为成功的结果^[8].

本研究利用基因治疗的手段, 通过突变引导肽构建了两种猪 GHRH 的肌肉特异表达质粒 ppG-A53f-H6-GHRH (ppG-H6) 及 ppG-A53f-H4-GHRH(ppG-H4), 并注射大鼠肌肉实现了促进大鼠

体重增重的效果. 结果说明, 利用基因治疗的手段在促进动物生长研究中有极大的发展潜力, 同时该理论也将为研究分子机制提供一种快捷、方便的途径.

1 材料和方法

1.1 试剂

引物、酶、dNTP、琼脂糖等常用生化试剂购自上海生物工程公司; RT-PCR 试剂盒、T-vector 购于美国 Promega 公司; 总 RNA 提取试剂盒 TRIZOL、cDNA 合成试剂盒来自美国 GIBCOL 公司; 注射前质粒均通过德国 QIAGEN 试剂盒进行纯化和无内毒素处理; GH 浓度测定使用由美国国家糖尿病、肾病及消化道疾病研究所 (National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases,

*国家重点基础研究发展规划资助项目 (G20000161).

** 通讯联系人. Tel: 010-62731146, Fax: 010-62733904

E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn, victor.qy.meng@gmail.com

收稿日期: 2005-10-26, 接受日期: 2005-11-10

NIDDK)惠赠的 NIDDK-rGH-I-6 生长激素放射免疫检测试剂盒测定。

1.2 表达质粒构建

ppG-A53f-H6-GHRH (ppG-H6, H6) 及 ppG-A53f-H4-GHRH(ppG-H4, H4), 是在实验室构建的含有猪骨骼肌 α -肌动蛋白 5' 及 3' 调控元件的肌肉特异表达载体 ppG-A53f 的基础上, 通过分别插入人工合成的 H6 及 H4 两种 GHRH 的核心序列 (包括人生长激素 5' 非翻译区 cDNA、人 GHRH 引导肽及猪 GHRH 的 cDNA 共 278 bp) 构建完成。注射前各组质粒均通过 QIAGEN 试剂盒进行纯化和无内毒素处理。

1.3 实验动物选择与实验设计

本文使用 SPF 3 级 Wistar 实验大鼠 (购自北京维通利华实验动物技术有限公司) 在 12 h 自动控制光照的 SPF 级实验室中进行。选用断奶后 7 天, 体重在 70~100 g 的大鼠 (由于一次性大批量获得体重一致的 SPF 级大鼠非常困难, 而我们的需求量又大, 所以放宽了初始体重差。但是通过组间进行平衡, 保证了组间的平均初始重是一致的), 大鼠通过单笼饲喂的饲养方式进行试验。

实验分为 3 组进行。对照组(control): 10 只, 注射生理盐水 0.15 ml; H4 组: 20 只, 注射 2 g/L 以生理盐水溶解的 ppG-H4 质粒 0.15 ml 共计 0.3 mg; H6 组: 20 只, 注射 2 g/L 以生理盐水溶解的 ppG-H6 质粒 0.15 ml 共计 0.3 mg。注射选择在早晨大鼠第一次进食前, 各组同时开始进行。注射时固定大鼠, 不麻醉。注射部位为右后肢的股四头肌, 酒精消毒注射部位后进行注射。

1.4 体重记录

实验记录了从注射 0 天开始, 以及其后的第 3, 7, 11, 14, 17, 20, 24, 27, 31, 34, 38 和第 41 天的体重变化结果, 通过比较体重净增重评估促生长效果。

1.5 血清采集及 GH 水平分析

分别通过鼠尾离断法获得了第 20、27、34 和第 41 天的血液 1.5 ml/ 只, 并通过 4℃ 过夜静置后, 5 000 r/min 离心 10 min 的方法获得血清。GH 浓度测定使用由美国国家糖尿病、肾病及消化道疾病研究所惠赠的 NIDDK-rGH-I-6 生长激素放射免疫检测 (RIA) 试剂盒测定 (AFP-3190B, NIDDK, USA), 每样本 RIA 测定需要量为 100 μ l, 测试灵敏度为 0.1 μ g/L。批内变异系数为 1.5%, 批间变异系数为 7.9%。

1.6 数据统计分析

所有的数据均经过了 SAS (ver. 6.12, SAS Institute, Inc.) 软件的 *t*-检验分析, 并以 ($\bar{x} \pm s$) 方式表示。

2 结 果

2.1 表达质粒构建

表达质粒是在含有猪骨骼肌 α -肌动蛋白 5' (α SKP) 及 3' 调控元件 (α SK3'UTR) 的肌肉特异表达载体 (本实验室构建) 的基础上, 通过插入人工合成的猪 GHRH 的表达核心序列 (core sequence: 包括人生长激素 5' 非翻译区 cDNA、人 GHRH 引导肽及猪 GHRH 的 cDNA 共 278 bp) 完成 (图 1)。

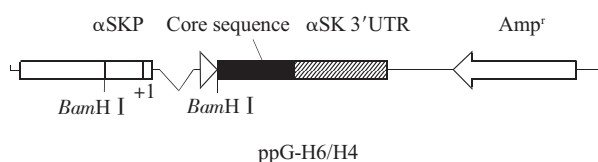


Fig. 1 Structure of GHRH expression plasmids

由于 PCR 扩增 (图 2a) 以及酶切鉴定 (图 2b) 的结果与预期相符, 并且通过分析测序结果均说明所构建的表达克隆 ppG-A53f-H6-GHRH 及 ppG-A53f-H4-GHRH 是正确的。

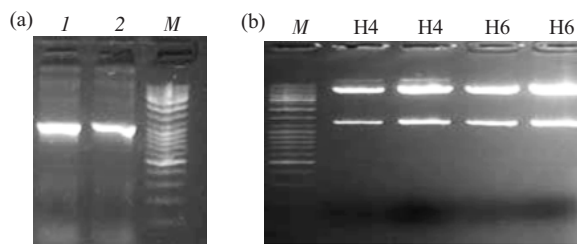


Fig. 2 Analysis of ppG-A53f-H6-GHRH and ppG-A53f-H4-GHRH (H4/H6) plasmids by PCR and restriction (a) M: 1 kb ladder; 1: PCR result of the core sequence and 3'-flanking from H4, 900 bp; 2: PCR result of the core sequence and 3'-flanking from H6, 900 bp. (b) Restriction analysis of H4 and H6 plasmid with *Xho* I, 1 265 bp was got. M: 1 kb ladder.

由于 ppG-H6 和 ppG-H4 的差别只是一个碱基的差异, 因此在 PCR 检测的表现上是一致的, 只有通过测序的方式可以确定。

图 3 所示为蛋白质表达编码区段中, 从 ATG 引导肽开始的一段包含有突变区域的核酸序列, 该突变为表达质粒 H6 与 H4 的差别点, 其他区段完

全一致. 其中载体 H6 与 H4 的主要差异表现在猪 GHRH 引导肽中第 31 位核苷酸 A→C (图 3a) 的突变所造成的第 11 位氨基酸由异亮氨酸 I (H6) 变为亮氨酸 L (H4) (图 3b). 核苷酸测序表明构建正确.

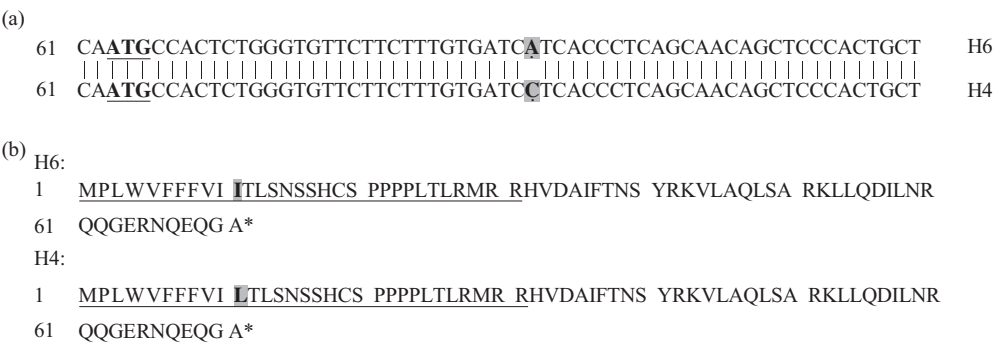


Fig. 3 Analysis of the difference in DNA and peptide sequence between ppG-A53f-H6-GHRH and ppG-A53f-H4-GHRH (H4/H6)
(a) The difference in DNA sequence between ppG-A53f-H6-GHRH and ppG-A53f-H4-GHRH (H4/H6). The A in H6 changes to the C in H4 at the same position with shadow. (b) The difference in peptide sequence between ppG-A53f-H6-GHRH and ppG-A53f-H4-GHRH(H4/H6). The sequence with underline is leader peptide. An isoleucine in H6 changes to Leucine in H4 at same position with shadow.

2.2 大鼠促生长效果体重变化分析

从注射 0 天开始后, 分别记录了第 3, 7, 11, 14, 17, 20, 24, 27, 31, 34, 38 以及第 41 天的体重变化结果, 通过比较体重净增重评估促生长效果.

从图 4 我们可以看到 ppG-H6 对大鼠增长的促进效果较 ppG-H4 明显, 特别是在第 34 天的体重净增加效果, ppG-H6 显著于对照组 ((200.57 ± 3.99) g *vs* (185.85±9.45) g) (**P* < 0.05).

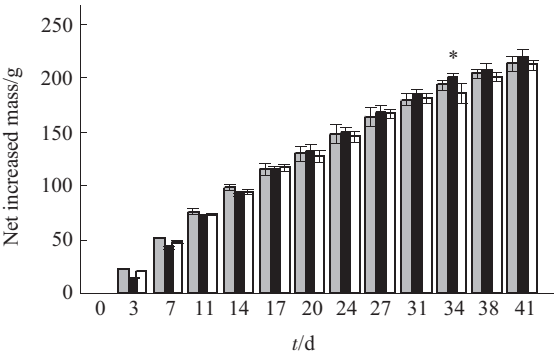


Fig. 4 The body-weight changes of rats after injection of ppG-H6 and ppG-H4
■:ppG-H4; ■: ppG-H6; □: Control. **P* < 0.05.

2.3 血清的 GH 水平分析

分别获得了第 20、27、34 和第 41 天的血清. GH 浓度通过 NIDDK-rGH-I-6 生长激素放射免疫检测试剂盒测定. 结果如图 5.

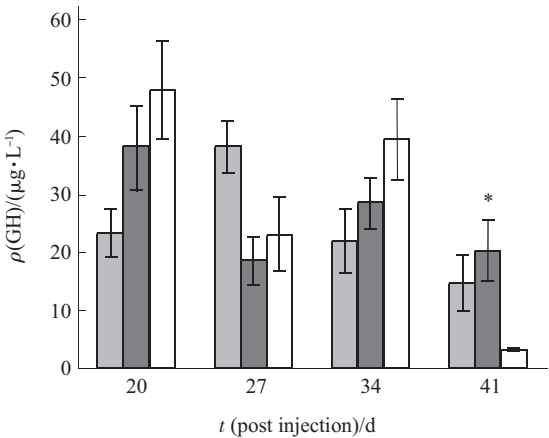


Fig. 5 The serum concentration of GH in rats treated with plasmids of ppG-H6 and ppG-H4
■: ppG-H4; ■: ppG-H6; □: Control. **P* < 0.05.

通过血清中 GH 浓度的放免分析可以看到在大鼠的生长后期, 质粒处理组的生长激素水平维持较高, 而对照组的降低很快. 相对于对照组, ppG-H6 和 ppG-H4 注射组的生长激素水平都维持在一个相对稳定的水平, 这与大鼠生长后期表现为生长速度高于对照组的结果趋势相仿. 在第 41 天, ppG-H6 和 ppG-H4 注射组的生长激素水平 ((20.02 ± 5.15) μg/L 和(14.65±4.92) μg/L)分别显著高于对照组((3.32±0.22) μg/L).

3 讨 论

借鉴人类基因治疗这种已经被认可和肯定的理论原理, 将构建的高效基因工程体细胞表达载体(DNA 物质)通过一次性注射的方式, 实现活性蛋白的动物体自身表达, 从而对动物生长、生产及肉用品质进行调理. 在国外, 该领域的研究开始相对较早, 并且获得了一些令人兴奋的结果. 在国内起步相对较晚, 因此积极开展该领域的研究对于我国畜牧业发展有重要意义.

本研究利用了猪的肌肉特异表达载体, 驱动猪的 GHRH 在肌肉内进行特异性表达. 我们知道, GHRH 是在下丘脑中进行表达的一种激素, 在自然条件下是不可能肌肉中表达的^[9]. 因此, 我们使用了含有猪的骨骼肌特异性表达调控元件构建了 GHRH 肌肉表达载体, 该表达质粒是在含有猪骨骼肌 α - 肌动蛋白 5' 及 3' 调控元件的肌肉特异表达载体(本实验室构建)的基础上, 通过插入人工合成的猪 GHRH 的表达核心序列(包括人生长激素 5' 非翻译区 cDNA、人 GHRH 引导肽及猪 GHRH 的 cDNA 共 278 bp) 完成. 正因此, 才使得在肌肉中能够进行 GHRH 的表达. 这种在肌肉细胞中产生的表达产物 GHRH, 可以分泌进入血液循环, 随后通过血液的运输到达脑垂体, 进而促进 GH 的分泌, 最终表现为提高动物的生长速度, 从而实现促进动物体生长的目的.

通过实验结果分析, 可以看到 ppG-H6 和 ppG-H4 的处理组在体重变化上都高于对照组. 可以认为通过肌肉直接注射的质粒 ppG-H6 和 ppG-H4 均可以促进实验动物的生长. 两种质粒都可以通过肌肉注射的方式在肌肉中表达, 但是质粒 ppG-H6 在对大鼠的促生长试验中, 具有较引导肽变异的质粒 L11-ppG-H4 更强地促进大鼠生长的作用. 由此也说明引导肽的 L11 突变虽然还可以表达, 但是不如原始引导肽的效果.

虽然, 从 GH 的分泌测定结果中无法直接得到与体重增加相应的信息, 但是可以看到的是 ppG-H6 组的 GH 浓度变化幅度相对较小, 特别是在后期(40 天后) 还维持一个相对高的 GH 水平, 而对照组 GH 水平下降很快. 据此推测可能是由于

质粒的缓慢表达, 导致机体内 GH 的相对稳定, 从而使得后期 ppG-H6、ppG-H4 处理组的生长速度还维持在较高水平. 相比之下, ppG-H6 处理组的生长激素水平又较 ppG-H4 组高, 相应的反应为 ppG-H6 组的体重净增加状况也优于 ppG-H4 组. 其中, ppG-H6 处理组的体重净增加效果显著于对照组((200.57 $\pm$ 3.99) g vs (185.85 $\pm$ 9.45) g)($P < 0.05$).

通过本研究结果表明, 利用注射肌肉特异的异位表达 GHRH 蛋白而实现促进动物生长是一条可能的思路, 同时也提示利用该理论还可以进行其他具有明显表现性状蛋白的研究, 为阐明分子间互作机制提供了新的研究途径.

参 考 文 献

- 1 Mayo K E, Cerelli G M, Rosenfeld M G, *et al.* Characterization of cDNA and genomic clones encoding the precursor to rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature*, 1985, **314** (6010): 464~467
- 2 Mayo K E, Godfrey P A, Suhr S T, *et al.* Growth hormone-releasing hormone: synthesis and signaling. *Recent Progress in Hormone Research*, 1995, **50**: 35~73
- 3 Frohman M A, Downs T R, Chomczynski P, *et al.* Cloning and characterization of mouse growth hormone-releasing hormone (GRH) complementary DNA: increased GRH messenger RNA levels in the growth hormone-deficient lit/lit mouse. *Mol Endocrinol*, 1989, **3** (10): 1529~1536
- 4 Suhr S T, Rahal J O, Mayo K E. Mouse growth-hormone-releasing hormone: precursor structure and expression in brain and placenta. *Mol Endocrinol*, 1989, **3** (11): 1693~1700
- 5 Tannenbaum G S, Ling N. The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology*, 1984, **115** (5): 1952~1957
- 6 Wolff J A, Malone R W, Williams P, *et al.* Direct genettransfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 1990, **247** (4949Pt1): 1465~1468
- 7 Draghia-Akli R, Li X, Schwartz R J. Enhanced growth by ectopic expression of growth hormone releasing hormone using an injectable myogenic vector. *Nat Biotechnol*, 1997, **15** (12): 1285~1289
- 8 Meng Q Y, Chen Z Q, Yu Z Q, *et al.* Increased body weight via myogenic expression of injectable growth hormone-releasing hormone (GHRH) plasmid with bupivacaine as adjuvant in sheep. *Anim. Biotechnol*, 2004, **15** (2): 175~192
- 9 Zeitler P, Stevens P, Siriwardana G. Functional GHRH receptor carboxyl terminal isoforms in normal and dwarf (dw) rats. *J Mol Endocrinology*, 1998, **21** (3): 363~371

Two Kinds of pGHRH Myogenic-expression Plasmids for Enhancing Rat Growth*

MENG Qing-Yong¹⁾, ZHANG Ya-Li²⁾, XIE Qi-Fa¹⁾, GONG Xia¹⁾, LI Ning^{1)**}

¹⁾State Key Laboratory for Agrobiotechnology, College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

²⁾College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Two kinds of ectopic expression of porcine growth hormone-releasing hormone (GHRH) plasmids, ppG-A53f-H6-GHRH (ppG-H6) and ppG-A53f-H4-GHRH (ppG-H4), were constructed by using a myogenic expression vector which has α -actin expression elements. After the animal was injected in the muscle with the two plasmids, the body-weight data at the 0 / 3/ 7/ 11/ 14/ 17/ 20/ 24/ 27/ 31/ 34/ 38/ 41st days were collected. Rat plasma from blood collected at the 20/ 27/ 34/ 41st days was made and growth hormone (GH) levels were determined by radio immunoassay (RIA). The results indicated that ppG-H6 and ppG-H4 do enhance the rat growth compared to the control, with the ppG-H6 treated group showing a more effective response. Compared with the control group, at the 34th day after injection, the weight gain of the ppG-H6 group was significant ((200.57 $\pm$ 3.99) g *vs* (185.85 $\pm$ 9.45) g, $P < 0.05$). Furthermore, the GH maintains on a stable level in group ppG-H6 and ppG-H4 compare to control by the end of experiment, which support that the injection of ppG-H6 and ppG-H4 plasmids caused the body-weight of rat increasing. The results imply that injection of ectopic expression of porcine growth hormone-releasing hormone (GHRH) plasmids is a possible way to enhancing animal growth.

Key words growth hormone-releasing hormone(GHRH), myogenic expression, enhancing growth, plasmid, gene therapy

*This work was supported by a grant from The National Basic Research Program of China (G20000161).

**Corresponding author . Tel: 86-10-62731146, Fax: 86-10-62733904, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn, victor.qy.meng@gmail.com

Received: October 26, 2005 Accepted: November 10, 2005