



## 重组生长激素释放激素GHRH的纯化及活性测定

垂体生长激素(GH)是促进机体生长发育的主要激素,它的分泌受下丘脑生长抑素和生长激素释放激素(GHRH)的调节。1982年Spiess [1]从GHRH高分泌型的胰腺瘤组织中分离纯化出人GHRH,对其序列进行了分析并表明该激素存在于丘脑下部,有三种形式:37,40,44个氨基酸残基。Nicholas等[2][3]发现人丘脑下部GHRH的氨基酸序列与猪、牛和羊的分别具有93%、89%和86%的同源性。Bower[4]发现,六肽(His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys)和两个五肽(Tyr-D-Trp-Gly-Phe-Met、Tyr-D-Phe-Gly-Phe-Met)具有生长激素释放激素的活性,并发现这些肽都有一个芳香环的特殊结构来特异性的刺激生长激素的释放。Bowers[5]研究表明大鼠的生长激素为<sup>1</sup>His-GHRH,我们认为脯氨酸残基中的四氢吡咯环与组氨酸残基中的咪唑环相似,所以用Pro在N端修饰生长激素释放激素GHRH<sub>(1-44)</sub>。其目的获得活性较高的GHRH,研究开发新的激素类药物,为临床应用[6][7]特别是在肌肉萎缩、II型糖尿病、老年睡眠等方面的治疗开拓广阔的应用前景。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

重组表达质粒由唐松山博士构建,大肠杆菌BL21(DE3)由本室保存,Triton X-100、Tris等为Sigma公司产品、SP Sephadex C-25、Sephadex G-25为Pharmacia公司产品、丙烯酰胺及甲叉双丙烯酰胺为Fluka公司产品、TEMED为Merck公司产品,人生长激素放免试剂盒由北京北方生物技术研究所提供。其余试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 融合蛋白的诱导表达

从平板上挑取含pET-28a/L-ansB-Pro-hGHRH的BL21(DE3)单菌落,接种于2 ml LB培养液中(0.1 g/L Kan)培养过夜,次日按2%比例接种新鲜LB培养液中,继续培养4 h,待D<sub>600</sub>值达0.3~0.4时加入IPTG至终浓度为1 mmol/L诱导4 h,每小时收集1.5 ml培养液,进行SDS-PAGE分析。

#### 1.3 融合蛋白的纯化

离心收集诱导表达菌体75.6 g,悬于200 ml裂解缓冲液中(100 μg/ml溶菌酶,7 μg/ml DNA酶I和1% Triton X-100),37 °C搅拌5 h,离心收集沉淀。用裂解缓冲液洗涤沉淀3次,每次200 ml,再用含有1% Triton X-100的水溶液洗涤3次,每次200 ml,最后用2 mol/L 尿素、pH8.5、50 mmol/L Tris-HCl溶液洗涤1次。每次用6 000 g离心30 min,最终的沉淀溶解在8 mol/L的尿素溶液中(尿素溶解在50 mmol/mL Tris-HCl pH 8.5中),形成终浓度为4%(w/v)的悬浮液,室温下过夜搅拌。次日缓慢加入无水乙醇至乙醇浓度达到43%,静置10 h,8 000 g离心20 min,收集上清,再加入无水乙醇至浓度达到64%, -20 °C静置过夜,8 000 g离心20 min收集沉淀的融合蛋白, -70 °C保存。细胞裂解液、提纯融合蛋白经SDS-PAGE分析。

#### 1.4 GHRH肽的分离纯化

将上述融合蛋白沉淀溶解在60 mmol/L HCl溶液至浓度为6%,50 °C保温44 h,用10%的氨水调pH9.5,6 000 g离心20 min收集上清。上清经SP Sephadex C-25色谱柱,平衡液和分段洗脱液分别为pH9.5和pH11的

氨水溶液。收集峰II经透析再上Sephadex G-25柱，用蒸馏水作洗脱液，收集峰I、峰II，最终用30%醋酸调样品pH至7.4。

### 1.5 融合蛋白和目标肽的纯度鉴定

参照文献[8]方法，12%SDS-PAGE分析表达的融合蛋白的纯度，20%SDS-PAGE分析GHRH肽的纯度。

### 1.6 GHRH相对分子质量的检测

采用电喷雾离子化质谱 (Electrospray Ionization, ESI)的方法。样品溶解在1%的冰醋酸中，直接进样至Agilent 1100 LC/MSD质谱仪，捕捉目标肽离子信号，测定GHRH的相对分子质量。

### 1.7 GHRH的活性测定

参照Bower等[9]的方法稍加修改。将GHRH加入Krebs Ringer缓冲液中作为GH刺激液，设置3个实验组，刺激液浓度分别为0.21、7.72、20.87  $\mu\text{g/ml}$ ，对照组用等体积的Krebs Ringer替代。取大鼠(200~250 g)的脑垂体保存在1 ml Krebs Ringer缓冲液中，置37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴，每5 min振摇1次，1 h后换新的缓冲液，共保温5 h，之后每小时换1次新的GH刺激液。用人生长激素放免试剂盒测定活性。

### 1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS11.0软件进行t检验，以 $P < 0.05$ 为差异具有显著意义。

## 2 结果

### 2.1 融合蛋白的诱导与表达

经1 mmol/L IPTG诱导后，融合蛋白在E. coli中得到高效表达并且以包涵体形式聚积。12% SDS-PAGE分析显示，与对照相比，出现了一条新的蛋白带(图1)。

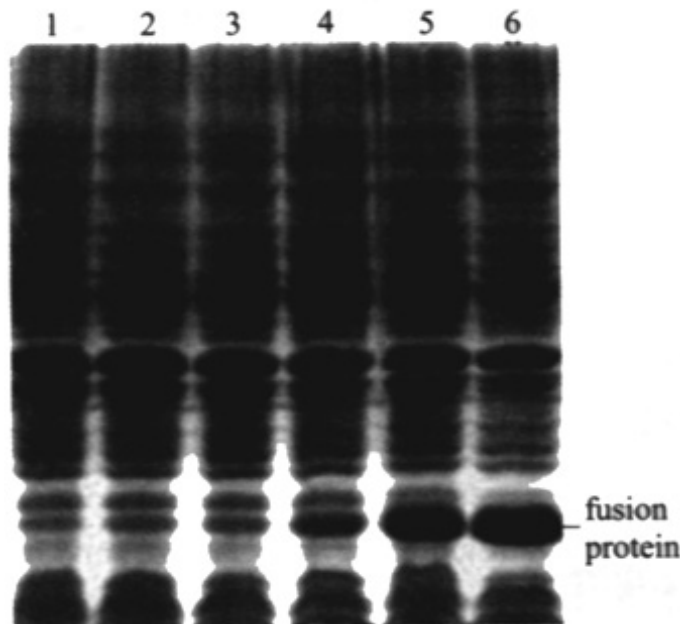


图1 融合蛋白诱导、表达的SDS-PAGE结果

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the induction and expression of the recombinant protein in E. coli

Lanes 1-3: Control; Lanes 4-6: Induction time for 1-3 h.

### 2.2 融合蛋白的纯化

细胞经破壁、洗涤、64%乙醇沉淀，获得的融合蛋白包涵体，15%SDS-PAGE结果显示，纯化的融合蛋白为单一条带(图2)。

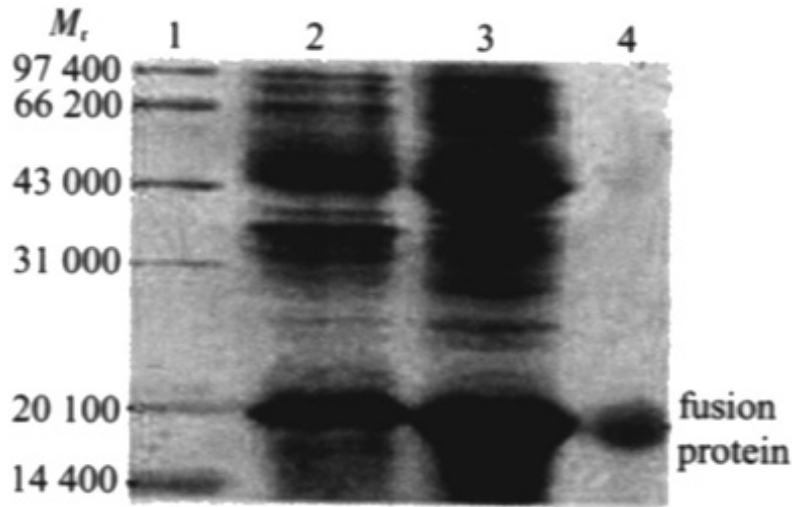


图2 融合蛋白纯化后SDS-PAGE结果

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the fusion protein in purification procedure  
 Lane1: Standard protein markers; Lane2: Recombinant bacteria; Lane 3: Crude inclusion body; Lane 4: Purified inclusion body precipitated by 64% ethanol

### 2.3 GHRH肽的纯化

2.3.1 融合蛋白的酸水解 融合蛋白在60 mmol/L盐酸溶液中，分子中的Asp-Pro肽键断裂，释放出目的肽，层析后经20%SDS-PAGE结果显示为单一条带(图3)。

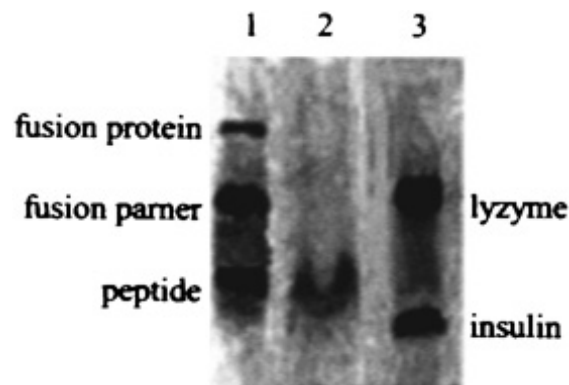


图3 GHRH纯化后SDS-PAGE结果

Fig.3 SDS-PAGE analysis (T:C=20:4.9) of the pro-growth hormone-releasing hormone peptide (Pro-hGHRH) in the purification procedure  
 Lane 1: Acid hydrolysis product; Lane 2: Pure GHRH peptide from Sephadex G-25 column chromatography; Lane 3: Protein markers (lyzyme 14 400 and insulin 5 733).

2.3.2 SP-Sephadex C-25和Sephadex G-25柱层析 酸水解液上SP-Sephadex C-25层析柱，以pH9.5的氨水为平衡液，pH11的氨水为分段洗脱液，收集2号峰(图4)；透析后再进行Sephadex G-25柱层析，以蒸馏水为流动相，收集2号峰为目的蛋白峰(图5)。

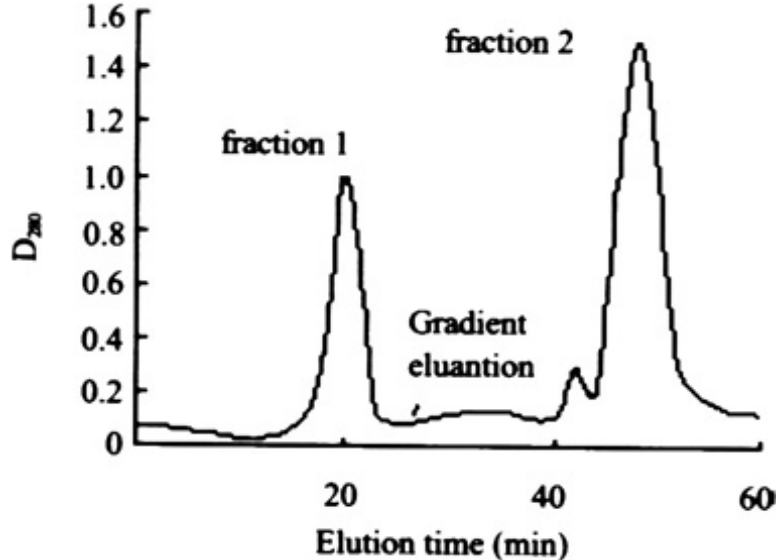


图4 酸水解液经SP-Sephadex C-25柱纯化色谱图

Fig.4 Column chromatography on SP-Sephadex C-25 of the supernatant from acid-hydrolysis

Equilibrium eluant: Ammonia water (pH 9.5; 0-25 min); Subsection gradient eluant: Ammonia water (pH 9.5; 26-60 min).

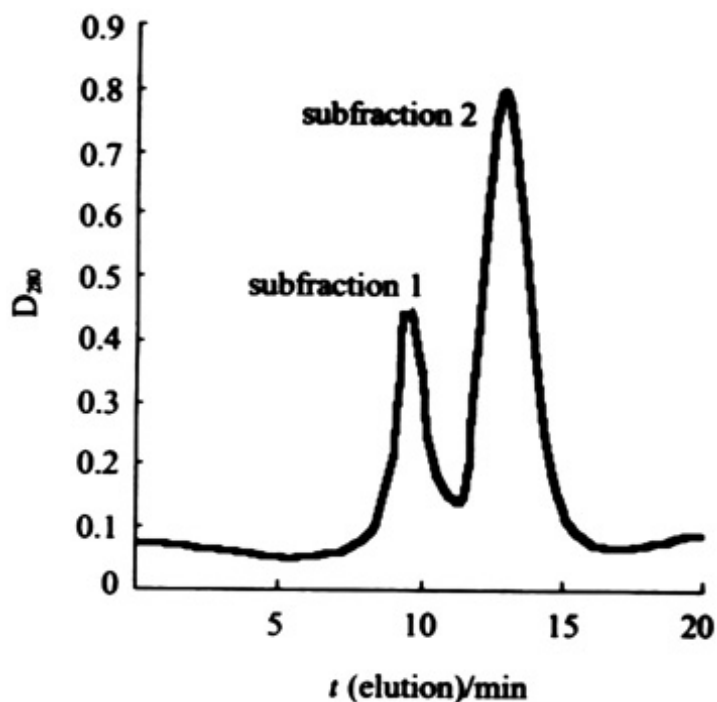


图5 SP-Sephadex C-25峰2经Sephadex G-25柱纯化色谱图

Fig.5 Column Chromatography on Sephadex G-25 of the fraction 2 of SP-Sephadex C-25 column chromatography, with water as the eluant

The effluent was monitored continuously at 280 nm and room temperature with UV detector.

2.3.3 纯化工艺的总结 经提纯，其纯化倍数为147，产量为0.68%(表1)。

表 1 纯化工艺

Tab.1 Purifying procedure

Purification procedure	Total protein (mg)	Recovery rate (%)	Purification time
Lysate of the <i>E.coli</i>	75 600	-	-
Primal inclusion body	15 700	100	1
Purified inclusion body	850	5.4	18.5
Acid hydrolyze liquid	510	3.2	30.8
G-25	106.8	0.68	147

## 2.4 GHRH相对分子质量的测定

GHRH的相对分子千周量是由电喷雾离子化质谱(ESI)测定为5 235.25。此结果与理论值一致(图6)。

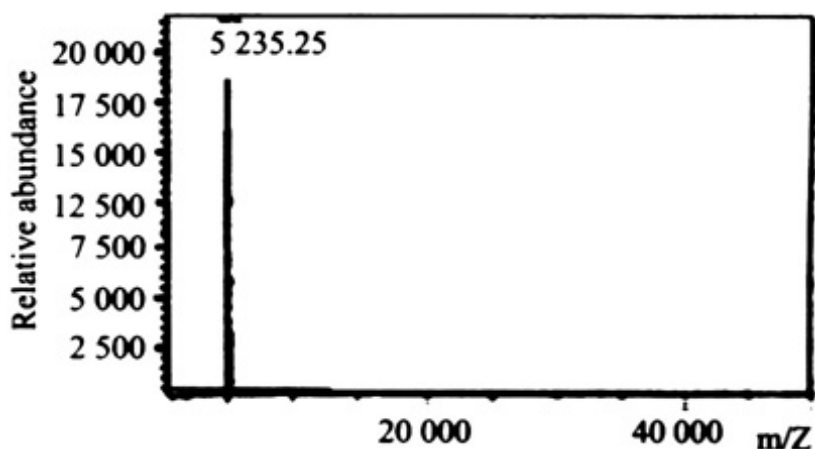


图6 GHRH电喷雾离子化质谱(ESI)图

Fig.6 ESI mass spectrum of GHRH

## 2.5 GHRH的活性测定

由表2各组数据均表明：含有GHRH多肽刺激液的实验组与空白对照之间存在显著差异( $P < 0.01$ )，并且随着剂量的增加，差异越明显。

表 2 GHRH 多肽刺激 GH 释放效应

Tab.2 *In vitro* GH releasing induced by GHRH peptide

Peptide	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	GH( $\text{ng/ml}$ , <i>Mean</i> $\pm$ <i>SD</i> )		<i>P</i>
		GHRH	Blank control	
GHRH	0.2	24.44 $\pm$ 13.81	3.05 $\pm$ 3.06	<0.01
	7.72	49.79 $\pm$ 7.62	4.68 $\pm$ 1.81	<0.01
	20.87	79.46 $\pm$ 5.66	1.22 $\pm$ 0.29	<0.01

生长激素除促进机体生长发育外，还有重要的免疫调节功能，研制开发生长激素释放激素类似物具有极大的临床使用价值。功能性GHRH至少有1~29个氨基酸残基。用化学的方法合成GHRH成本昂贵、产量低。实验结果表明，我们找到了一个高效表达GHRH的系统，有望通过基因工程方法生产GHRH，为临床应用特别是在肌肉萎缩、II型糖尿病、老年睡眠等方面的治疗开阔前景。

本实验结果显示包涵体经过多次6 000 g离心洗涤能够去除相对低分子量可溶性蛋白。用饱和度为43%的乙醇和4%湿重浓度去除高分子量杂蛋白。根据等电点(10.88)较高和凝胶柱的特性，SP-Sephadex C-25色谱柱用低浓度氨水洗脱，使纯化倍数增长到147，肽产量达0.68%，这说明该纯化方法是很有效的。

在对GHRH肽的活性研究中，由于人生长激素与大鼠生长激素具有60%同源性，我们用人生长激素抗血清试剂盒来检测大鼠生长激素释放水平。各组数据均表明：含有GHRH多肽刺激的实验组与空白对照之间存在显著差异。并且随着剂量的增加，差异越明显。这些都说明了GHRH肽段可以形成与大鼠垂体细胞膜受体相连的稳固的氢键，从而产生了高活性的生长激素释放激素效应。我们已经知道大鼠GHRH的N末端氨基酸是组氨酸，激素需要一个芳香环的特殊结构来特异性的刺激生长激素的释放。由于脯氨酸残基中的四氢吡咯环与组氨酸残基中的咪唑环相似，并且四氢吡咯中N原子的碱性大于咪唑环的，因此在GHRH的N端增加了Pro残基与受体形成了更强的氢键，从而产生更高的活性。实验数据显示N末端Pro-的延伸有着更好的作用效果。

对纯化的GHRH的体外活性实验表明GHRH能明显刺激了大鼠垂体生长激素的分泌。

虽然GHRH(1-44)和GHRH(1-29)在临床方面的应用已被证实，但仍然需要寻找更加稳定的类似物，这种类似物可以在给药剂量上减少和增强作用方面加以考虑。对血清，肝匀浆，垂体和下丘脑中酶活力检测表明GHRH(1-44)和它的一个片段在体内代谢很快，而且代谢产物无生理活性。目前，我们得到的数据并不能确定在GHRH肽的氨基酸末端加入一个脯氨酸残基是否会使活性增加。但我们预测Pro-GHRH将大大增加体内的活性。血浆中GHRH的主要水解位点在<sup>2</sup>Ala和<sup>3</sup>Asp之间，Pro-hGHRH的脯氨酸N末端的延伸将改变为<sup>2</sup>Tyr-<sup>3</sup>Ala，这可能会防Pro-GHRH被二肽酶的水解，进一步的研究有待深入。

(责任编辑：吴锦雅)

参考文献：

- [1] Spiess J, Rivier J, Thorner M, et al. Sequence analysis of a growth hormone releasing factor from a human pancreatic islet tumor[J]. *Biochemistry*, 1982, 21(24): 6037-40.
- [2] Ling N, Esch F, Bohlen P, et al. Isolation, primary structure and synthesis of human hypothalamic somatocinin: Growth hormone-releasing factor[J]. *PNAS*, 1984, 81(14): 4302-6.
- [3] Ling N, Baird A, Wehrenberg WB, et al. Synthesis and in vitro bio-activity human growth hormone analogs substituted at position-1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 122(1): 304-10.
- [4] Bowers CY, Sartor AO, Reynolds GA, et al. On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP[J]. *Endocrinology*, 1991, 128(4): 2027-35.
- [5] Bowers CY, Reynold GA, Cheng D, et al. A study on the regulation of growth hormone releasing from the pituitaries of rats in vitro[J]. *Endocrinology*, 1981, 108(3): 1071-80.
- [6] Szere day Z, Schally AV, Varga JL, et al. Antagonists of growth hormone-releasing hormone inhibit the proliferation of experimental non-small cell lung carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(22): 7913-9.
- [7] Draghia-Akli R, Hahn KA, King GK, et al. Effects of plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone in severely debilitated dogs with cancer[J]. *Mol Ther: J Am Soc Gene Thera*, 2002, 6(6): 830-6.
- [8] F. 澳斯伯, R. E. 金斯顿编著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学试验指南[M]. 北京: 科学



出版社, 1999, 333-8.

[9] Bowers CY, Reynold GA, Cheng D, et al. A study on the regulation of growth hormone releasing from the pituitaries of rats in vitro[J]. Endocrinology, 1981, 108 (3): 1071-80.

#### 参考文献:

[1] Spiess J, Rivier J, Thorner M, et al. Sequence analysis of a growth hormone releasing factor from a human pancreatic islet tumor[J]. Biochemistry, 1982, 21(24): 6037-40.

[2] Ling N, Esch F, Bohlen P, et al. Isolation, primary structure and synthesis of human hypothalamic somatocrinin: Growth hormone-releasing factor[J]. PNAS, 1984, 81(14): 4302-6.

[3] Ling N, Baird A, Wehrenberg WB, et al. Synthesis and in vitro bio- activity human growth hormone analogs substituted at position-1[J]. Biochem Biophy Res Commun, 1984, 122 (1): 304-10.

[4] Bowers CY, Sartor AO, Reynolds GA, et al. On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP[J]. Endocrinology, 1991, 128(4 ): 2027-35.

[5] Bowers CY, Reynold GA, Cheng D, et al. A study on the regulation of growth hormone releasing from the pituitaries of rats in vitro[J]. Endocrinology, 1981, 108 (3): 1071-80.

[6] Szereday Z, Schally AV, Varga JL, et al. Antagonists of growth hormone-releasing hormone inhibit the proliferation of experimental non-small cell lung carcinoma[J]. Cancer Res, 2003, 63(22): 7913- 9.

[7] Draghia-Akli R, Hahn KA, King GK, et al. Effects of plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone in severely debilitated dogs with cancer[J]. Mol Ther: J Am Soc Gene Thera, 2002, 6(6): 830-6.

[8] F. 澳斯伯, R. E. 金斯顿编著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学试验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999, 333-8.

[9] Bowers CY, Reynold GA, Cheng D, et al. A study on the regulation of growth hormone releasing from the pituitaries of rats in vitro[J]. Endocrinology, 1981, 108 (3): 1071-80.