

## 重组生长激素释放激素 GHRH 的纯化及活性测定

王晓华<sup>1</sup>, 张娜<sup>2</sup>, 张娟辉<sup>2</sup>, 邓虹珠<sup>3</sup> (<sup>1</sup> 广州医学院生物化学与分子生物学教研室, 广东 广州 510182; <sup>2</sup> 广州武警医院妇产科, 广东 广州 510507; <sup>3</sup> 第一军医大学中医系, 广东 广州 510515)

**摘要:**目的 用基因工程的方法在大肠杆菌中诱导表达重组生长激素释放激素(GHRH), 检测其生物学活性。方法 将重组表达质粒 pET-28a /L-ansB-GHRH, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), IPTG 诱导融合蛋白表达。经裂解细胞、洗涤、乙醇沉淀、酸水解、SP-Sephadex C-25 和 Sephadex G25 柱层析等方法纯化 GHRH。用人生长激素放免试剂盒检测 GHRH 多肽的活性。结果 SDS-PAGE 分析显示重组表达质粒在大肠杆菌中成功地表达了融合蛋白, 它以不溶性的包涵体形式存在, 占菌体总蛋白的 30%左右。经抽提、酸水解、层析等方法表明纯化倍数达 147 倍, 多肽收率为 0.68%。通过电喷雾质谱测得多肽的相对分子质量为 5235.25, 与理论计算值相吻合。多肽的纯度经 SDS-PAGE 测定为单一峰。GHRH 三组刺激实验组与空白对照组相比之间差异显著 ( $P < 0.01$ ), 且随着剂量增加, 差异明显增加。结论 体外重组 GHRH 多肽具有较高的生物学活性。

**关键词:** 生长激素释放激素(GHRH); 纯化; 融合蛋白; 包涵体

中图分类号: R58 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)03-0321-04

## Purification and activity assay of recombinant growth hormone-releasing hormone

WANG Xiao-hua<sup>1</sup>, ZHANG Na<sup>2</sup>, ZHANG Juan-hui<sup>2</sup>, DENG Hong-zhu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China; <sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Guangdong G Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Guangzhou 510507; <sup>3</sup>Department of Traditional Chinese Medicine, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract: Objective** To express recombinant growth hormone-releasing hormone (GHRH) peptide in *E.coli* by genetic engineering and examine its biological activity. **Method** GHRH peptide was purified to homogeneity by means of cell lysis, washing, ethanol precipitation, acid hydrolysis, SP-Sephadex C25 and Sephadex G-25 column chromatographies. **Results** SDS-PAGE showed that the recombinant plasmid pET-28a /L-ansB-GHRH in *E.coli* BL21(DE3) expressed the fusion protein under the induction with IPTG. The fusion protein was expressed in the form of inclusion body, accounting for 30% of the total bacterial protein. After the purification procedures, the peptide was purified about 147-fold with a peptide yield of 0.68%. The molecular mass of the peptide was 5 235 Da as determined by electrospray ionization (ESI) mass spectrum, in agreement with the predicted value, and SDS-PAGE presented a single peak in assessment of the purity. Experiment showed that there were significant differences in the growth hormone released by the peptide between the dose groups and the blank control group, and the differences tended to be more obvious with the increase of the doses. **Conclusion** The recombinant GHRH peptide possesses good biological activities.

**Key words:** growth hormone releasing hormone; purification; fusion protein; inclusion body

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<sup>[1]</sup>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<sup>[2,3]</sup>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<sup>[4]</sup>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<sup>[5]</sup>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<sup>[6-7]</sup>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

收稿日期: 2003-11-20

作者简介: 王晓华 (1956-), 女, 副教授, 硕士, 主要从事分子生物学及肿瘤生化研究, 电话: 020-81340212; E-mail: xh\_wang2631@sina.com

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  $D_{600}$  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  $\mu$ g/ml 溶菌酶,7  $\mu$ g/ml DNA 酶 I 和 1% Triton X-100),37  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ C 静置过夜,8 000 g 离心 20 min 收集沉淀的融合蛋白,-70  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ 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<sup>[9]</sup>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  $\mu$ 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  $^{\circ}$ C 水浴,每 5 min 振荡 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)。

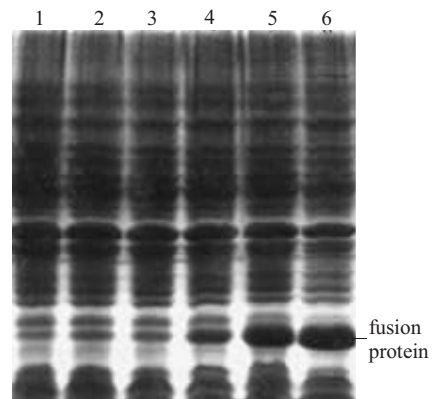


图 1 融合蛋白诱导、表达的 SDS-PAGE 结果  
Fig.1 SDS-PAGE analysis of the induction and expression of the recombinant protein in *E. coli*  
Lanes 1-3: Control; Lanes 4-6: Induction time for 1-3 h.

### 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)。

### 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)。

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)。

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)。

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)。

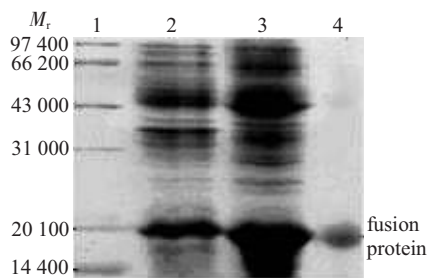


图 2 融合蛋白纯化后 SDS-PAGE 结果

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

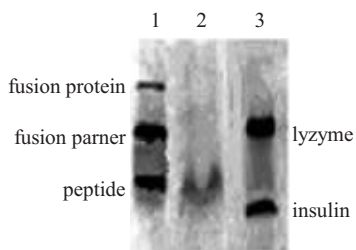


图 3 GHRH 纯化后 SDS-PAGE 结果

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).

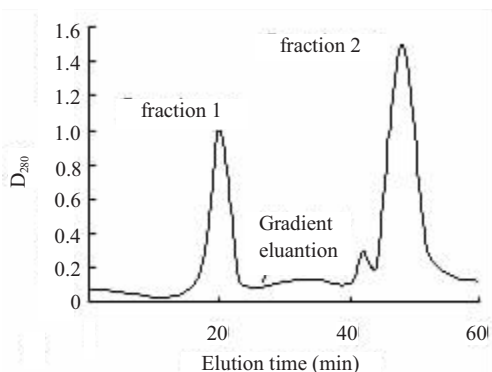


图 4 酸水解液经 SP-Sephadex C-25 柱纯化色谱图

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).

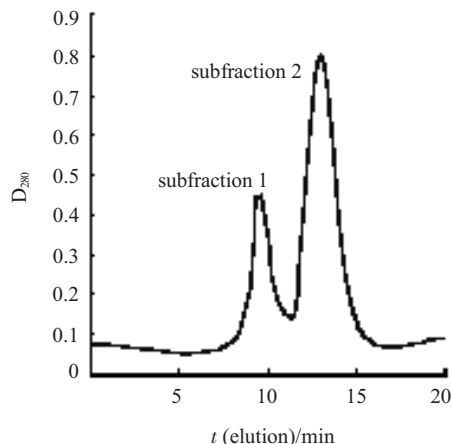


图 5 SP-Sephadex C-25 峰 2 经 Sephadex G-25 柱纯化色谱图

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.

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

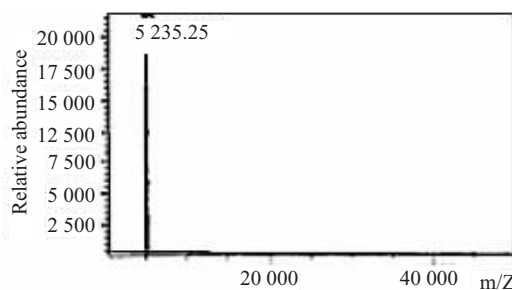


图 6 GHRH 电喷雾离子化质谱(ESI)图

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。

3 讨论

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

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( $\text{ng/ml}$ , Mean $\pm$ SD)		P
		GHRH	Blank control	
	0.2	24.44 $\pm$ 13.81	3.05 $\pm$ 3.06	<0.01
GHRH	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

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  $^2\text{Ala}$  和  $^3\text{Asp}$  之间,Pro-hGHRH 的脯氨酸 N 末端的延伸将改变为  $^2\text{Tyr}$ - $^3\text{Ala}$ ,这可能会防 Pro-GHRH 被二肽酶的水解,进一步的研究有待深入。

#### 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* bioactivity 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] 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.

(责任编辑:吴锦雅)