

# 促性腺激素释放多肽(GRP)对体外培养 小鼠垂体分泌 LH 的影响

王乃功 关慕贞 王德心 鲁桂琛

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

**提要** 合成的促性腺激素释放多肽(GRP)及其类似物 GRP~NH<sub>2</sub>, [Glu<sup>7,9,14</sup>Lys<sup>6,10</sup>]GRP(6~14), [phe<sup>14</sup>]GRP(5~14)和[phe<sup>14</sup>]GRP 浓度在 0.05 mmol·L<sup>-1</sup>时,具有刺激体外培养的小鼠垂体分泌 LH 的作用。其活性依此相当对照垂体的 115.4, 114.2, 140, 160 和 179%。小鼠于妊娠第 7~9 天或第 1~5 天,每只 sc [phe<sup>14</sup>]GRP 1 mg·d<sup>-1</sup>, 或于妊娠第 2~4 天每只 sc [phe<sup>14</sup>]GRP(5~14) 1 mg·d<sup>-1</sup>,有 40~60%的妊娠动物出现死胎。

**关键词** 促性腺激素释放多肽; 抗早孕; 抗着床; 促黄体生成激素(LH)

1987 年 CH Li 等从人的滤泡液中分离出一种 14 肽的化合物,确定了氨基酸的位置和序列。其结构与 10 肽的 LHRH 不同,体实验有促进小鼠垂体释放 LH 和 FSH 的作用,称为人滤泡促性腺激素释放多肽(hF-GRP)<sup>(1)</sup>。1988 年该组科学家合成了 6 个类似物,除[Tyr<sup>4</sup>]GRP 的促垂体分泌 LH 活性大于 GRP 外,其余活性均小于 GRP<sup>(2)</sup>。

我所合成室采用固相合成的方法,共合成 22 个类似物,发现 5 个样品具有促进小鼠垂体释放 LH 的作用,两个样品初筛实验发现对生育有影响。现将结果报告于下。

## 材 料 和 方 法

**材料** GRP 及其类似物均由本所合成室提供,GRP 氨基酸的位置和序列为:H-Thr-Asp-Thr-Ser-His-His-Asp-Glu-Asp-His-Pro-Thr-Phe-Asn-OH。MEM 培养基和 M199 培养基购自 Sigma 公司。睾酮测定箱由卫生部上海生物制品研究所提供。昆明种雄性小鼠 18~22 g,ICR 种雄性和雌性小鼠 30~33 g 均由中国医学科学院实验动物研究所提供。

### GRP 及其类似物对小鼠垂体分泌 LH 的影响

垂体培养采用 Ramasharma 等人的方法<sup>(3)</sup>。体重 20~22 g 昆明种雄性小鼠,断头处死后迅速取出垂体,置平皿内,同时加入 5 ml MEM 培养基(含 BSA 0.1%, HEPES 10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7.3),平皿置碎冰块上。将收集的垂体分装于培养管内,每管含 MEM 培养基 0.54 ml,完整无损伤的垂体 1 个。37℃水浴振荡(80 次/min)预培养 0.5 h。GRP 及其类似物溶于 MEM 培养基内,每管加入 0.06 ml,终浓度为 0.05 mmol·L<sup>-1</sup>。对照管只加 MEM 培养基。每组 3 管,继续培养 2.5 h。培养后将垂体从培养基内除去。测定培养基内 LH 的活性。

采用小鼠睾丸间质细胞培养法测定 LH 的活性<sup>(4)</sup>。在垂体温孵期间,将 30 g 左右成年雄性小鼠 5 只断颈处死,取出睾丸,剥去包膜,加 M199 培养基 30 ml,含 4% 小牛血清,置 50 ml 烧杯内,放一枚电磁棒,在电磁搅拌器上室温搅拌 15 min,100 目尼龙网过滤,滤液 130 g 离心 10 min。去上清液后,加 25 ml M199 培养基,混悬后,计数间质细胞数,将细胞浓度调整到  $10^6$ /ml。取 0.4 ml ( $4 \times 10^5$  细胞)投入上述垂体培养基内,终体积 1 ml。 $34^\circ\text{C}$  振荡培养 3 h,通以  $\text{CO}_2$  5%/  $\text{O}_2$  95% 混合气。温孵结束,采用 RIA 法测定睾酮的浓度,以睾酮的分泌量反应 LH 的活性。

### GRP 及其类似物抗早孕和抗着床实验

成年 ICR 雌性小鼠与雄小鼠合笼,出现阴栓的当天作为妊娠的第 1 天。抗早孕实验,于小鼠妊娠第 7~9 天,每只 sc GRP 或类似物,  $1 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。抗着床实验,于小鼠妊娠 2~4 d 或 1~5 d,每只 sc GRP 或类似物  $1 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。于妊娠第 14 天,解剖雌鼠,观察胚胎数。

### GRP 对小鼠间质细胞体外分泌睾酮影响

小鼠间质细胞的分离和培养同前。GRP 及其类似物加入间质细胞悬液内,浓度为  $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  培养 3 h,测定培养液的睾酮浓度。

## 结 果

由表 1 可见,GRP,GRP-NH<sub>2</sub>, [Glu<sup>7,9,14</sup>Lys<sup>6,10</sup>]GRP(6~14), [phe<sup>14</sup>]GRP(5~14)和 [phe<sup>14</sup>]GRP 等 5 个样品,浓度在  $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,具有刺激小鼠垂体分泌 LH 的作用,以对照组垂体分泌 LH 的活性为 100%,GRP 和类似物的活性分别相当对照组的 115.4, 114.2, 140, 162 和 179% ( $P < 0.05$  或  $0.02$ )。

Tab 1 Effect of GRP and its analogues ( $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) on LH production in mouse pituitary *in vitro* (n = 3)

Group	LH activity
	%
Control	100
GRP	115.4*
GRP-NH <sub>2</sub>	114.2*
[Glu <sup>7,9,14</sup> Lys <sup>6,10</sup> ]GRP(6~14)	140*
[phe <sup>14</sup> ]GRP(5~14)	162**
[phe <sup>14</sup> ]GRP	179**

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.02$  vs control.

由表 2 可见,GRP 和 GRP-NH<sub>2</sub> 没有表现出抗早孕的活性。而 [phe<sup>14</sup>]GRP 组有 60% 的动物出现胚胎死亡或吸收。

Tab 2 Effect of GRP and its analogues on early pregnancy in mice (n = 5~8)

Group	Dose (mg × d, sc)	Fetal death	Normal pregnancy
		(% of animals)	(% of animals)
Control		0	87.5
GRP	1 mg × 3	0	80
GRP-NH <sub>2</sub>	1 mg × 3	0	100
[phe <sup>14</sup> ]GRP	1 mg × 3	60*	40

\*  $P < 0.05$  vs control.

由表 3 可见, GRP 和 GRP-NH<sub>2</sub> 没有表现出抗着床的活性。[phe<sup>14</sup>]GRP 和 [phe<sup>14</sup>]GRP(5~14) 分别有 40 和 60% 的动物孕卵着床后不能正常发育, 导致胚胎缩小死亡或吸收。

**Tab 3 Anti-implantation effect of GRP and its analogues in mice (n=5~8)**

Group	Dose (mg×d, sc)	Fetal death (% of animals)	Normal pregnancy (% of animals)
Control		0	87.5
GRP	1×3	0	100
GRP-NH <sub>2</sub>	1×5	0	40
[phe <sup>14</sup> ]GRP	1×5	40*	60
[phe <sup>14</sup> ]GRP(5~14)	1×3	60*	40

\*  $P < 0.05$  vs control.

由表 4 可见, GRP-NH<sub>2</sub>, [phe<sup>14</sup>]GRP 和 [phe<sup>14</sup>]GRP(5~14), 药物浓度在 0.05 mmol·L<sup>-1</sup> 时对小鼠间质细胞分泌睾酮无明显影响。

**Tab 4 Effect of GRP analogues(0.05 mmol·L<sup>-1</sup>) on testosterone production of Leydig's cells in mice *in vitro* (n=3)**

Group	Testosterone ng·ml <sup>-1</sup> (4×10 <sup>5</sup> cells)
Control	2.84±0.60
GRP-NH <sub>2</sub>	2.44±0.24
Control	1.63±0.30
[phe <sup>14</sup> ]GRP	1.50±0.17
Control	2.04±0.23
[phe <sup>14</sup> ]GRP(5~14)	2.29±0.09

## 讨 论

卵巢滤泡分泌的 14 肽 GRP 结构完全不同于下丘脑释放的 10 肽激素 LHRH, 但都具有促垂体体外释放促性腺激素的作用<sup>(1)</sup>。人工合成的 GRP 和其类似物促小鼠垂体体外释放 LH 的作用强度不同。GRP-NH<sub>2</sub> 的作用同 GRP 但无明显差异。GRP 第 6 和 10 位氨基酸被赖氨酸取代, 第 7, 9 和 14 位氨基酸被谷氨酸取代后的 9 肽(6~14)活性比 GRP 增强 0.2 倍; 第 14 位天门冬酰氨被苯丙氨酸取代的 10 肽(5~14)和 14 肽其活性增强 0.4~0.55 倍。[phe<sup>14</sup>]GRP 和 [phe<sup>14</sup>]GRP(5~14) 对小鼠生育有影响。产生 40~60% 的动物胚胎死亡。由于 [phe<sup>14</sup>]GRP 的活性仍不十分理想, 寻找高活性的 GRP 类似物将是一个重要研究课题。

## 参 考 文 献

- 1 Li CH, et al. Gonadotropin-releasing peptide from human follicular fluid; isolation, characterization and chemical synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 959.
- 2 Ramasharma K, et al. Human follicular gonadotropin releasing peptide analogs. *Int J Pept Protein Res* 1988; **32**: 419.

- 3 Ramasharma K, et al. Effect of inhibin like factors on gonadotrophin release by the mouse pituitary *in vitro*. *Acta Endocrinol* 1981;98: 496.
- 4 Dufau ML, et al. A highly sensitive *in vitro* bioassay for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin; Testosterone production by dispersed Leydig's cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1974;39: 610.

## EFFECT OF GONADOTROPIN-RELEASING PEPTIDE (GRP) ON LH SECRETION OF MOUSE PITUITARY *IN VITRO*

NG Wang, MZ Guan, DX Wang and GS Lu

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences,  
Peking Union Medical University, Beijing 100050*)

**ABSTRACT** Synthetic GRP and its analogues, GRP-NH<sub>2</sub>, [Glu<sup>7,9,14</sup> Lys<sup>6,10</sup>] GRP (6~14), [Phe<sup>14</sup>] GRP (5~14) and [Phe<sup>14</sup>] GRP, at the concentration of 0.05 mmol · L<sup>-1</sup> were shown to have stimulatory effect on LH secretion in cultured mouse pituitary *in vitro*. The luteotropin releasing activity of GRP and its analogues was estimated to be 115.4, 114.2, 140.0, 162.0 and 179.0% of the control group, respectively. Subcutaneous administration of [Phe<sup>14</sup>] GRP on days 7~9 and 1~5 of pregnancy and [Phe<sup>14</sup>] GRP (5~14) on days 2~4 of gestation at dosage of 1 mg · d<sup>-1</sup> (each mouse) caused fetal death in 40~60% of mice.

**Key words** Gonadotropin-releasing peptide; Interruption of early pregnancy; Anti-implantation; LH