

人生长激素突变体的制备及其对受体亲和力和生物活性的研究

李伟 朱丽华 汪恩壁 徐燕萍 姜晓东 郭礼和*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 上海 200031)

摘要 本文采用 DNA 重组技术制备了三种重组人生长激素(recombinant human growth hormone, rhGH)突变体,并测定了其受体亲和力及对去垂体大鼠的促体重增加活力。实验结果显示其受体亲和力大小依次为:rhGH-E174A>rhGH-G120R>rhGH>rhGH-G120T。rhGH-G120R 和 rhGH-G120T 二种突变体相比 rhGH 来说,对去垂体大鼠促体重增加生物活性明显降低;rhGH-E174A 突变体则完全丧失生物活性。由于 rhGH-E174A 的受体亲和力高于 rhGH,表明它是一种较强的 hGH 拮抗剂,可能成为一种药物,在临床上用于治疗因 hGH 分泌过多而引起的疾病(例如巨人症,肢端肥大症等)。

关键词: 人生长激素 定点突变 拮抗剂

人生长激素(hGH)是垂体前叶分泌的一种由 191 个氨基酸残基组成的单链蛋白质激素,能调节机体的多种生理过程,除促进身材增高外,还能提高蛋白质合成水平,促进脂肪分解,调节矿物质和糖类代谢。采用重组 DNA 技术,改造 hGH 结构,获取各种 hGH 突变体,以便研究其结构与功能的关系,从而开拓 hGH 药用价值,已成为当今生物医药研究热点之一。尤其作为拮抗剂的 hGH 突变体研究更是当前 hGH 研究领域的一个重点。hGH 拮抗剂的研制为巨人症及糖尿病后期并发症的治疗提供了一条新途径。

根据已有的信号通路研究结果^[1],hGH 的生物活性是通过一分子 hGH 与两分子 hGH 受体(hGHR)结合,引起 hGH 受体二聚化,从而导致细胞内信号传递至细胞核,调节多种基因表达而实现的。若 hGH 发生突变,只能结合一分子 hGHR,细胞内信号通路就不能建立,生物活性也就不能表现。当 hGH 分子上与两个 hGHR 结合有关的关键氨基酸残基发生变化,其生物活性就可能发生改变。有的能提高对受体的亲和力,但只能结合一分子受体,不能引发受体二聚化,从而就会导致生物活性丧失。这种突变体有可能成为 hGH 受体的拮抗剂,在临床上治疗由于脑垂体 hGH 分泌过多而引起的疾病,例如巨人症或肢端肥大症。

本实验室对 hGH 基因进行了多种突变改造,在大肠杆菌内表达,并纯化了其中的三种 hGH 单突变体。本文利用受体亲和力和促去垂体大鼠体重增加法研究了这三种突变体的生物活性。

材料与amp;方法

1. hGH 突变体基因的构建及其在大肠杆菌中的表达与产物纯化

hGH-pALTER1 和 hGH-OmpA3 质粒为本实验室构建, OmpA3 表达质粒, HB101 和 BL21 表达宿主菌为本实验室保存。

下列突变引物由本实验室合成:

引物-1: (G120T) 5' G CGT TTG GAT Ggt TTC CTC TAG GTC C 3'

(小写字母为定点突变点,以下相同)

引物-2: (E174A) 5' G CAG GAA TGT CgC GAC CTT GTC C 3'

引物-3: (G120R) 5' G CGT TTG GAT GCg TTC CTC TAG GTC C 3'

定点突变是在载有人工合成 hGH 基因的 pALTER1 质粒上进行(基因序列见图 1),使用的试剂盒为 Promega 公司出品的 Altered Sites II in vitro Mutagenesis System。

编码 hGH-G120T、hGH-E174A 和 hGH-G120R 的基因片段是从 pALTER1 质粒上用 Xba I/EcoR I 双酶切下,电泳回收后分别插入 OmpA3 表达质粒 Xba I/EcoR I 切点之间,构建成三种突变体表达质粒。工程菌分别为:rhGH-G120T-OmpA3 质粒转化大肠杆菌 HB101;rhGH-E174A-OmpA3 和 rhGH-G120R-OmpA3 分别转化大肠杆菌 BL21。经过菌落筛选得到所需的三种基因工程菌,分别用下述方法获得蛋白质产物。

将 rhGH-G120T-OmpA3/HB101, hGH-E174A-OmpA3/BL21 和 hGH-G120R-OmpA3/BL21 三种单菌落分别接入含

本文 2002 年 11 月 11 日收到,11 月 26 日接受。
联系人。E-mail:lhguo@sunm.shnc.ac.cn

500ml 培养基的培养瓶内,37℃振荡7小时,然后转入10升发酵罐继续培养14小时,离心收集菌体。菌体外膜用渗透压法破碎后离心,除去沉淀,上清液经等电点沉淀,硫酸铵盐析及 Mono-Q Sepharose 离子交换柱分离纯化,分别得到三种突变体蛋白产物。突变型 rhGH 的表达与产物分离纯化工艺和天然型重组 hGH (rhGH) 的工艺相同。天然型重组 hGH 产物由本实验室制备。

2. rhGH 及三种突变体对受体亲和力的测定

rhGH 及三种突变体对受体亲和力测定方法采用与¹²⁵I-hGH 竞争孕兔肝细胞膜生长激素受体的结合能力来表示。

1) 孕兔肝细胞膜生长激素受体的制备 取怀孕25天左右孕兔肝,称重后剪碎,按每克肝重加5ml 0.3mmol/L 蔗糖水溶液的比例制备悬液。高速组织捣碎机捣碎1分钟,悬液用八层纱布过滤,滤液于4℃ 15 000g 离心20分钟,弃沉淀;上清液4℃ 15 000g 离心20分钟,弃沉淀;上清液于4℃ 100 000g 超离心90分钟,弃上清。沉淀部分按每克兔肝重加1ml 125mmol/L Tris-HCl pH7.6, 0.1% BSA, 0.6mmol/L Merthiolate, 10mmol/L CaCl₂ 溶液,用匀浆器匀浆后分装,于-80℃保存备用。

2) rhGH 及三种突变体对¹²⁵I-hGH 竞争孕兔肝细胞膜生长激素受体结合的活力测定 配制下列溶液:溶液 A: 25mmol/L Tris-HCl pH7.6; 溶液 B: 25mmol/L Tris-HCl pH7.6, 0.1% BSA, 0.6mmol/L Merthiolate, 10mmol/L CaCl₂; 溶液 C: 25mmol/L NaAc pH5.4, 0.1% BSA。

每瓶¹²⁵I-hGH (卫生部上海生物制品研究所产品)加入1.5ml 重蒸水,用溶液 A 透析过夜。将 hGH 标准品用溶液 B 稀释至 0.1IU (国际单位)/L 和 1IU/L,前者取 30、60、90μl,后者取 20、30、45、60、90 和 150μl 分别加入 9 支测定管中,然后各加入溶液 B 使体积补足至 180μl,另取一测定管加入 180μl 溶液 B。对上述各管分别加入 20μl 孕兔肝细胞膜生长激素受体和 50μl 透析过的¹²⁵I-hGH。以上各管均做复管,4℃ 保温过夜,对各管分别加入 1ml 溶液 C,混匀,终止反应。13000rpm 离心 6 分钟,弃去上清,沉淀部分进行 γ 射线计数。绘制 hGH 标准品对¹²⁵I-hGH 竞争孕兔肝细胞膜受体结合的标准抑制曲线。

将 rhGH 及三种 hGH 突变体用溶液 B 稀释至 0.5mg/L,蛋白浓度采用 Lowry 改良法测定。取 34μl 各溶液于 pH 管,分别加入溶液 B 使体积补足至 180μl,再加入 20μl 孕兔肝膜受体,50μl 透析过的¹²⁵I-hGH,混匀。以上各管均做复管。4℃ 保温过夜后各加入 1ml 溶液 C,混匀。13 000rpm 离心 6 分钟,弃去上清液,沉淀部分进行 γ 射线计数。从上述标准竞争抑制曲线图可查得 34μl 不同实验样品相对于 hGH 标准品的量,计算出每 mg 被测样品相对应的 hGH 标准品的量(比活)。

3. rhGH 及三种突变体对去垂体大鼠促体重增加的活力测定

1) 取出生 26-28 天的 100 余只雌性 SD 大鼠,体重 65-100 克,用乙醚麻醉后,按文献^[2]方法去垂体。术后大鼠置

24-26℃,于光照 14 小时和黑暗 10 小时循环的环境中分笼喂养 2 周,恢复手术造成的创伤。取体重上下不超过 5 克的大鼠(毛色正常)作为试验对象,不合格的老鼠给予丢弃。

2) 取上述合格的去垂体大鼠做实验,分为五组,每组八只,其中一组为实验对照组,每天腹腔注射等体积的生理盐水,其余四组为实验组。以生理盐水溶解 rhGH 及三种突变体,按 0.036IU 剂量每天腹腔注射,连续注射 9 天,每天定时称重。实验完毕后,进行解剖,观察垂体是否完全去除。排除有垂体残留的大鼠试验数据,只取无垂体残留的大鼠实验数据。对照组作为 100% 体重基数,对实验组大鼠体重增加绘制时间-体重曲线图。

结 果

1. rhGH 的三种突变体基因构建

天然型重组 hGH (rhGH) 已由本实验室研制,获得国家新药证书并实现了产业化(1998 年)。

本项研究是在上述工作基础上进行的。利用已构建的 rhGH 基因(编码 212 肽,其中信号肽 21 肽,其余 191 肽为天然型的 hGH),对其进行点突变,构建 rhGH 的三种突变体。

rhGH 的 DNA 序列和氨基酸序列见图 1:

```

ACG CTG GTC TAC GGC GGC TCT GAC AGC AAC GTC TAT GAC CTC CTA AAG GAC
TCG GAC CAG ATG CCG CCG AGA CTG TGG CAG ATA CTG GAG GAT TTC CTG
Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp

CTA GAG GAA GCC ATC CAA ACG CTG ATG GGG AGG CTG GAA GAT GGC ACG CCG
GAT CTC CTT CCG TAG GTT TGC GAC TAC CCG TCC GAC CTT CTA CCG TCG GGG
Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro

CGG ACT GGG CAG ATC TTC AAG GAG ACC TAC AGG AAG TTC GAC ACA AAG TCA
GCC TGA CCG GTC TAG AAG TTC CTC TGG ATG TCC TTC AAG CTG TGT TTG AGT
Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser

CAC AAC GAT GAC GCA CTA CTC AAG AAC TAC GGG CTG CTC TAC TGC TTC AGG
GTG TTG CTA CTG CGT GAT GAG TTC TTG ATG CCG GAC GAG ATG ACG AAG TCC
His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg

AAG GAC ATG GAC AAG GTC GAG ACA TTC CTG CCG ATC GTG CAG TGC CCG TCT
TTC CTG TAC CTG TTC CAG CTC TGT AAG GAC GCG TAG CAC GTC ACG CCG AGA
Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser

GTG GAG GGC AGC TGT GGC TTC TAGCTGCCC
CAC CTC CCG TCG ACA CCG AAG ATCGACGGG
Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe

```

图 1 重组人生长激素(rhGH)的部分 DNA 序列和氨基酸序列(第 100 位起)

天然产物(hGH)N 端第 120 位为甘氨酸(Gly),第 174 位为谷氨酸(Glu)。上述二种氨基酸残基突变位置在图中其下方以横线表示。引物突变位点序列(见材料与方法一节)按该密码子反义核苷酸序列设计。

rhGH-G120T 是将 hGH 第 120 位原甘氨酸残基突变成苏氨酸残基,突变引物为引物-1,突变方向为反义链;

rhGH-E174A 是将 hGH 第 174 位原谷氨酸残基突变成丙氨酸残基,突变引物为引物-2,突变方向为反义链;

rhGH-G120R 是将 hGH 第 120 位原甘氨酸残基突变成精氨酸残基,突变引物为引物-3,突变方向为反义链。

上述三种突变体的突变位点 DNA 序列利用 Pharmacia 公司 T7 Sequencing Kit 测序, 实验结果

证明三种突变体的 DNA 序列与实验设计相一致 (图 2)。

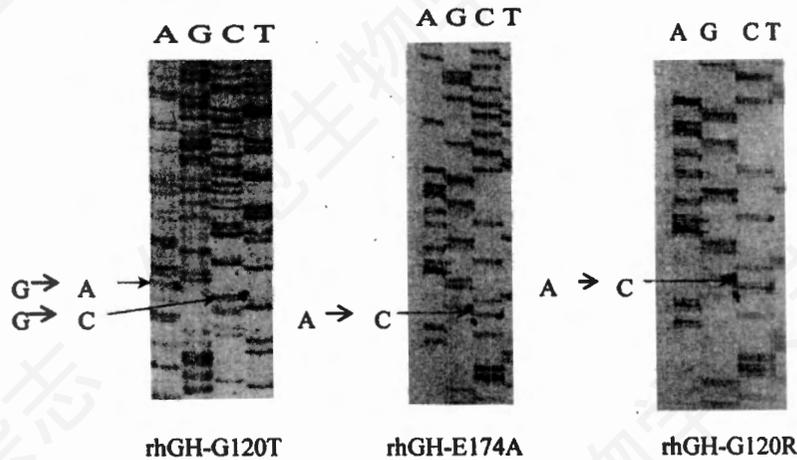


图 2 rhGH-G120T, rhGH-E174A 和 rhGH-G120R 三种突变体测序结果
其中, rhGH-G120T 由 GGC 突变为 ACC, rhGH-E174A 由 GAG 突变为 GCG, rhGH-G120R 由 GAG 突变为 GCG。

2. rhGH 三种突变体在大肠杆菌中表达和产物纯化

上述三种突变体基因分别克隆到质粒 OmpA3 的 Xba I/EorRI 位点之间, 与 rhGH 基因克隆的表达质粒完全相同, 但 rhGH-G120T 的 OmpA3 表达质粒是转化大肠杆菌 HB101, 其余两种表达质粒与 rhGH 表达质粒是转化大肠杆菌 BL21。这三种突变体工程菌的培养、发酵、产物分离纯化与 rhGH 生产工艺相同。但是 rhGH 制备是 300 立升发酵罐, 而这三种突变体制备是用 10 立升发酵罐。产物分离纯度都达到 95% 以上, 符合国家药品纯度要求。

3. rhGH 及三种 rhGH 突变体的受体亲和力测定

rhGH 及其三种突变体孕兔肝细胞膜 hGH 受体亲和力测定, 两次实验结果如下:

	第一次实验比活	第二次实验比活	平均比活(单位 IU/mg)
rhGH-G120T	1.9	1.6	1.75
rhGH-E174A	6.6	6.0	6.3
rhGH-G120R	4.3	4.9	4.6
rhGH	3.5	3.4	3.45

四种样品的受体亲和力大小顺序排列如下:

rhGH-E174A > rhGH-G120R > rhGH > rhGH-G120T

上述结果说明 rhGH-E174A 和 rhGH-G120R 对生长激素受体的亲和力强于 rhGH。

4. rhGH 与三种突变体对促去垂体大鼠体重增加的生物活性比较

注射生理盐水的对照组去垂体大鼠, 体重在九天

实验过程中几乎没有明显变化, 以此作为 100% 体重基数。实验组每只去垂体大鼠, 每天定时分别注射每种样品 0.036IU, 连续腹腔注射 9 天。rhGH 和三种突变体相对对照组体重变化的实验结果见图 3。

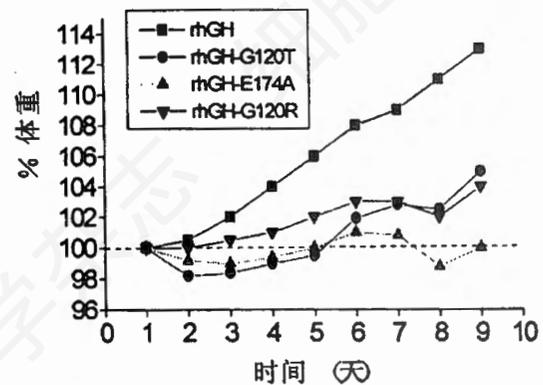


图 3 rhGH 及其三种突变产物的促去垂体大鼠体重增加活性

去垂体大鼠实验组每天分别注射 rhGH、rhGH-G120T、rhGH-E174A 和 rhGH-G120R, 连续注射 9 天, 对照组注射生理盐水。对照组九天实验体重变化趋向为零, 作为 100% 体重基数。

以大鼠第 9 次注射后 20 小时体重与第一次注射时的体重对比, 利用 Microsoft Excel 软件进行配对 t 检验, 得到结果如下: rhGH, rhGH-G120T, rhGH-G120R 均可显著地促进去垂体大鼠体重增加 ($P < 0.05$), 而 rhGH-E174A 则无促体重增加效应 ($P > 0.05$)。从图 3 可见 rhGH 对去垂体大鼠体重增加的生物活性大于 rhGH-G120T 和 rhGH-G120R。

rhGH-E174A 对受体的亲和力在上述四种化合

物中为最强,但对去垂体大鼠体重增加无生物活性。根据上述实验结果, rhGH-E174A 有可能成为 hGH 的拮抗剂,在临床上能治疗由于 hGH 分泌过多而引起的疾病(例如巨人症和肢端肥大症)。

讨 论

据文献^[1]报道, hGH 分子表面存在二个受体结合区, G120 位于 hGH 的第二个 hGHR 结合区。陈闻远等人的工作^[3]已证实 hGH-G120R 是一个很强的生长激素拮抗剂,转 rhGH-G120R 基因的小鼠表现为侏儒鼠。我们的实验结果表明,其具有一定的

促去垂体大鼠体重增加的生物活性。Agneta Mode 等 1996 年的研究^[4]和我们的研究结果基本相似。为什么陈闻远等人用此基因构建的转基因鼠却为侏儒鼠,究其原因尚不清楚,有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Cunningham B. C., et al., 1991, *Science*, **254**: 821 - 825.
- [2] Fraenkel-Conrat H., et al., 1940, *Endo*, **27**: 605 - 613.
- [3] Chen W. Y., et al., 1994, *J. Biol. Chem*, **269** (22): 15892 - 15897.
- [4] Mode A., et al., 1996, *Endo*, **137**(2): 422 - 454.

PREPARATION OF HUMAN GROWTH HORMONE MUTANTS AND STUDIES ON ITS RECEPTOR BINDING ABILITIES AND BIOLOGICAL ACTIVITIES

LI Wei ZHU Li Hua WANG En Bi XU Yan Ping JIANG Xiao Dong GUO Li He

(*Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031*)

ABSTRACT Three recombinant human growth hormone hGH mutants, rhGH-G120T, rhGH-E174A and rhGH-G120R, were constructed and expressed in *E. coli*. Their receptor binding activities were evaluated with their abilities to inhibit the binding of ¹²⁵I-hGH to growth hormone receptor on the membrane of pregnant rabbit liver cells. The results showed that the order of their receptor binding activities was: rhGH-E174A > rhGH-G120R > rhGH > rhGH-G120T. rhGH-G120T and rhGH-G120R had lower biological activities to promote the body weight gain in hypophysectomized rat than rhGH, but rhGH-E174A mutant did not have any biological activity to promote the body weight gain in hypophysectomized rat. Therefore, rhGH-E174A is likely to be a good candidate for hGH antagonist.

Key words: hGH Site-directed mutagenesis Antagonist.

血清及 BSA 对牛体外受精胚胎发育过程超微结构影响的研究

刘东军* 杨东山* 其木格** 旭日干*

(* 内蒙古大学哺乳动物繁殖生物学与生物技术教育部重点实验室 呼和浩特 010021

** 内蒙古医学院电镜中心 呼和浩特 010059)

摘 要 本研究将牛 IVF 胚胎分别在 SOF + FCS、SOF + BSA 和 SOF + PVA 三种培养系统内进行培养,然后分别取三个系统中发育到原核期、2 细胞、4 细胞、8 细胞、桑椹胚和囊胚阶段的胚胎进行透射电镜的观察,了解培养系统中血清和 BSA 的添加与否对胚胎发育过程中细胞内脂滴、细胞连接、细胞凋亡和微绒毛发育的影响。观察结果表明:各培养系统胚胎的细胞质中均存在大量的脂滴,表明外培养系统是造成脂滴积累的主要原因;血清的添加不会进一步促进脂滴的大量积累,反而可以避免多个脂滴聚合成更大的脂滴。三种培养系统条件下胚胎细胞连接无显著差异。培养系统中添加 FCS 或 BSA 时,桑椹胚期以后的胚胎细胞中存在凋亡小体,表明血清成分是引起细胞凋亡的重要原因。培养系统中血清成分的缺乏会影响胚胎表面微绒毛的发育。

关键词: 牛 IVF 胚胎 超微结构 早期发育

目前牛体外受精(in vitro fertilization, IVF)胚胎已广泛应用于畜牧业生产以及转基因动物、克隆动物等相关生物技术的研究中,但 IVF 胚胎与体内受精胚胎相比质量上还有很大差距,在形态上主要

表现在细胞坏死增多、细胞质碎片化、囊胚细胞数较

本文 2002 年 7 月 1 日收到,11 月 20 日接受。
基金项目:内蒙古自然科学基金项目资助课题(99104-2)。
E-mail: dwzx@imu.edu.cn