

生長激素釋放素在養殖魚類應用之研究

廖欽峰、鄒佩琪、吳金洌

中央研究院動物研究所

一、前言

生長激素(growth hormone或somatotropin)是腦垂體前葉(anterior pituitary)所分泌最主要的激素之一,其功能在刺激生長。

腦垂體生長激素之分泌,受下視丘(hypothalamus)所分泌之生長激素釋放素(growth hormone-releasing hormone,或somatocrinin)與生長激素釋放抑制因子(somatostatin)調控。下視丘與腦垂體之間有血管及神經纖維聯繫,下視丘所分泌之生長激素釋放素便是經由下視丘底部正中隆起(median eminence)之微血管叢運送到腦垂體前葉。

有關哺乳類生長激素釋放素之研究,始於1950年代末期,支持上述結論的證據包括:(一)、破壞下視丘與腦垂體之間的聯繫,導致生長激素之分泌下降;(二)、電刺激下視丘的腹中核(ventromedial nucleus)或下視丘底部,可增加生長激素之分泌;(三)、直接將下視丘萃取液加至腦垂體前葉培養,可促進生長激素之分泌;(四)、注射生長激素釋放素的抗體至動物體內,可抑制動物體重的增加,乃因生長激素之分泌受抑制;反之如注射生長激素釋放抑制因子的抗體至動物體內,則增加生長激素之基礎分泌量(Wehrenberg 1986);(五)、生長激素分泌過多,可引起肢端肥大症(acromegaly),而某些肢端肥大症的患者,其血漿或腦髓液含有生長激素釋放因子(releasing factor)。1983年至1985年間,利用基因選殖技術證明,生長激素釋放因子即是生長激素釋放素(Gubler et al. 1983, Mayor et al. 1983, Mayor et al. 1985, Gelato et al. 1986)。

二、哺乳類生長激素釋放素之研究

有關哺乳類生長激素釋放素之研究很多,最主要的突破之一,是1982年11月Vale與Guillemin兩個研究室分別發表兩篇有關生長激素釋放素的胺基酸序列的報告(Rivier et al. 1982, Guillemin et al. 1982)兩位肢端肥大症的患者,同時患有胰臟小島細胞腫瘤(pancreatic islet tumor),如將

此腫瘤切除，則患者血中生長激素濃度下降，而患者之症狀亦減輕；利用蛋白質化學技術，Vale與Guillemin等人，分別自患者所切除之胰臟腫瘤，純化及定出人類胰臟生長激素釋放因子之胺基酸順序(Rivier et al. 1982, Guillemin et al. 1982)。1984年，Guillemin再利用蛋白質化學技術，證明人類下視丘生長激素釋放素與人類胰臟生長激素釋放因子構造完全一樣(Ling et al. 1984)。1985年，Mayor等人利用基因選殖技術，篩選到人類與鼠類的生長激素釋放素基因(Mayor et al. 1985)。同年，Mayor與Hammer等人合作，將人類的生長激素釋放素基因轉殖於小鼠，可促使小鼠生長成倍加速，且基因轉殖的母鼠可受孕，可將人類的生長激素釋放素基因傳給後代(Hammer et al. 1985, Palmiter et al. 1985)。

目前已知的六種生長激素釋放素，都屬於哺乳類，其胺基酸序列非常類似，如下圖(圖一)：

hGRF	YADAI FTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGARARL -NH ₂	44
pGRF	YADAI FTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGERNQEQQGARVRL -NH ₂	44
c, bGRF	YADAI FTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMNRQQGERNQEQQAKVRL -NH ₂	44
oGRF	YADAI FTNSYRKILGQLSARKLLQDIMNRQQGERNQEQQAKVRL -NH ₂	44
rGRF	HADAI FTSSYRRILGQLYARKLLHEIMNRQQGERNQEQRSRFN -OH	43

圖一 Amino acid sequences of mammalian hypothalamic GRFs. h: human; p: porcine; c: caprine; b: bovine; o: ovine; r: rat. (Ling et al. 1984).

如上圖所示，哺乳類生長激素釋放素之 N 端非常相似，故推測生長激素釋放素之功能部位即位於 N 端，目前已知生長激素釋放素前面 29 個胺基酸，具有完整的生長激素釋放素 (40-42 個胺基酸) 大部份的效力 (Robberecht et al. 1985, Baird et al. 1986)。

當生長激素釋放素與其腦垂體前葉生長激素分泌細胞 (somatotroph) 膜表面之受體結合後，刺激細胞內 cAMP 合成 (Bilezikjian et al. 1983)，再刺激位於生長激素外分泌顆粒膜之 cAMP-dependent protein kinase，促進生長激素分泌到細胞外 (Lewin et al. 1983)。此種分泌機制也受鈣離子調控，因為加入鈷離子可降低生長激素釋放素之刺激作用，而鈷離子為鈣離子通道之抑制劑 (Brazeau et al. 1982, Bilezikjian et al. 1983)。

生長激素釋放素除了刺激生長激素分泌外，也刺激生長激素之合成。如將生長激素釋放素注射到體內，30 分鐘後，可增加生長激素基因表現 2.5 倍，此種增加，具有專一性，因為生長激素釋放素並不增加泌乳素之基因表現 (Gick et al. 1984)。

生長激素釋放素受體之分子結構也被證明具有 G - 蛋白偶合受體之

特性，亦即具有穿越細胞膜七次之功能區，與VIP (vasoactive intestinal peptide)受體，小腸內泌素(secretin)受體，降鈣素(calcitonin)受體，副甲狀腺素(parathyroid hormone)受體分別具有47%，42%，35%，及28%之相似性，與其他G-蛋白偶合受體相異性較大(Gaylinn et al. 1993)。

三、魚類生長激素釋放素之研究

有關魚類之生長激素釋放素之基礎研究，還很缺乏。目前已有證據顯示魚類具有生長激素釋放素類似物質。硬骨魚類，與其他脊椎動物不一樣，沒有下視丘的正中隆起之微血管叢，而是下視丘的神經分泌纖維伸展到腦垂體後葉之微血管叢，而腦垂體後葉之神經分泌纖維再伸展到腦垂體前葉；如以哺乳類生長激素釋放素與生長激素釋放抑制因子之抗體，利用免疫化學染色法，可以證明腦垂體前葉之生長激素分泌細胞有生長激素釋放素與生長激素釋放抑制因子之神經分泌纖維所分佈；而生長激素釋放素之分泌細胞主要分佈於下視丘之側節核(nucleus lateral tuberis)與視葉前核(preoptic nucleus)(Marivoet et al. 1988, Luo et al. 1989, Moons et al. 1989, Olivereau et al. 1990, Parker et al. 1990)。

1984年，Peter利用Vale供給之人類胰臟生長激素釋放因子注射到金魚體內，可促使魚血清生長激素濃度增加，但因種別特異性的關係，其效果並不是很好(Peter et al. 1984)。有關魚類生長激素釋放素之純化研究報告，始於1987年美國Salk研究所Vale博士的研究室(Vaughan et al. 1987)；1989年Ackland等人亦發表自魚腦萃取生長激素釋放素的結果(Ackland 1989)，但有關魚類之生長激素釋放素之胺基酸順序並未發表。Luo與McKeown利用Rivier與Vale等人純化之鯉魚生長激素釋放素，進行有關魚類腦垂體生長激素分泌調控之研究，他們發現：(一)、鯉魚生長激素釋放素有兩種型態，分別為29個胺基酸與45個胺基酸，而carp GRF (1-29)與carp GRF (1-45)皆可促進虹鱒腦垂體細胞生長激素之分泌，其有效半力價分別為0.388 nM與0.186 nM，但其最大效力沒有差別；而人類胰臟生長激素釋放因子對此系統並無作用(Luo et al. 1990)；(二)、鯉魚生長激素釋放素GRF (1-29)與生長激素釋放抑制因子SS-14互為非競爭性之拮抗劑(noncompetitive antagonist)，亦即GRF (1-29)與SS-14作用於不同受體(Luo et al. 1991a)；(三)、低濃度甲狀腺素與腎上腺皮質素可加強鯉魚生長激素釋放素GRF (1-29)對虹鱒腦垂體細胞生長激素分泌之刺激作用(Luo et al. 1991b)。

四、生長激素釋放素在養殖魚類應用之可行性

目前已知利用生長激素或生長激素釋放素皆可促進動物生長，但是何者為佳？根據基因轉殖小鼠的研究，生長激素釋放素可能優於生長激素。主要理由是生長激素基因轉殖母鼠，因生長激素分泌過量而不孕，而生長激素釋放素基因轉殖小鼠則無此副作用(Palmiter et al. 1985)。另一方面，已知生長激素分子比生長激素釋放素分子大四至五倍，故推測生長激素在魚類種別間之差異應大於生長激素釋放素種別間之差異，故同一種生長激素釋放素應可用於較多的魚種。第三個理由，也是因為生長激素釋放素較小，其主要功能區可能為29個胺基酸，容易利用化學合成獲得。

五、生長激素釋放素基因之合成

目前尚無魚類之生長激素釋放素胺基酸順序發表，但確實有人在定序中。故本計劃的目的在於建立小分子基因之試管內合成方法，以便當任何一種魚類之生長激素釋放素分子被定序後，便可利用此一技術加以合成。方法及結果如下：

(一)、電腦輔助設計：

利用中央研究院生物巨分子資料庫中心所設置之電腦軟體(GCG)及設備，將豬之生長激素釋放素倒譯為基因密碼序列(圖二)，並繪出可能之內在互補序列，以決定寡核苷酸之合成段落。

Porcine GHRH	M e t - A r g - A r g - T y r - A l a - A s p - A l a
Fish codon	G T - C G A - C A T - A T G - C G G - C G G - T A C - G C C - G A C - G C C -
Porcine GHRH	I l e - P h e - T h r - A s n - S e r - T y r - A r g - L y s - V a l - L e u -
Fish codon	A T C - T T C - A C C - A A C - T C C - T A C - C G C - A A G - G T G - C T G -
Porcine GHRH	G l y - G l n - L e u - S e r - A l a - A r g - L y s - L e u - L e u - G l n -
Fish codon	G G C - C A G - C T G - T C C - G C C - C G C - A A G - C T G - C T G - C A G -
Porcine GHRH	A s p - I l e - M e t - S e r - A r g - G l n - G l n - G l y - G l u - A r g -
Fish codon	G A C - A T C - A T G - T C C - C G C - C A G - C A G - G G C - G A G - C G C -
Porcine GHRH	A s n - G l n - G l u - G l n - G l y - A l a - A r g - V a l - A r g - L e u -
Fish codon	A A C - C A G - G A G - C A G - G G C - G C C - C G C - G T G - C G C - C T G -
Porcine GHRH	G l y - A r g - S T O P
Fish codon	G G C - C G C - T A G - T C G - A C -

圖二 Amino sequence of porcine GHRH and the back-translated nucleotide sequence using fish preferred codon. Additional amino acids in both N and C terminals are included for the translation starting signal, processing signal, and amidation signal.

(二)、寡核苷酸之合成：

利用中研院動物所之ABI 381A DNA合成儀，依phosphoramidite方法合成11段豬之生長激素釋放素基因片段。這11段寡核苷酸用聚丙烯醯胺電泳膠純化後，以電流濃縮儀回收之 (Abramowitz et al. 1988)。

(三)、試管內基因組合：

利用噬菌體T4多核苷酸激酶將此11段寡核苷酸之5'端磷酸化，以利基因片段之連接。再將互補之寡核苷酸兩兩黏合後，以噬菌體T4 DNA連接酶將之與載體連接，再轉殖感染大腸桿菌(TG-1)，利用細菌合成生長激素釋放素。

(四)、定序分析：

取微量生長激素釋放素作定序分析，發現只有四段基因連接至載體中，此原因正檢討中。

(五)、解決方法：

重新設計及合成長一點的寡核苷酸，即利用目前已有的儀器，合成四段約八十個核苷酸，足以構築成一生長激素釋放素基因。

六、未來研究方向

- (一)、養殖魚類生長激素釋放素之基礎研究，如生長激素釋放素之純化，定序，基因選殖，基因調控，生理功能，功能與構造關係等。
- (二)、魚類生長激素釋放素之病理研究，如以過量生長激素釋放素處理，是否產生病變等。
- (三)、魚類生長激素釋放素之基因轉殖研究，如特定組織之基因表現等；其最終目標為建立優良品種的養殖魚類(Zhang et al. 1990)。如1992年，Du等人利用“全魚類”組合之生長激素基因，轉殖於大西洋鮭魚，可促其生長增加13倍之多(Du et al. 1992)。

謝辭

本研究計劃由行政院農委會資助，計劃編號81農建-12.1-糧-67(56)，謹此誌謝。

參考文獻

- Abramowitz J, Mattera R, Liao C-F, Olate J, Perez-Ripoll E, Birnbaumer L, Codina J. 1988. Screening of cDNA libraries with oligonucleotides as applied to signal transducing G proteins, receptors and

- effectors. *J. Receptor Res.* 8: 561-588.
- Ackland JF, Wu P, Bruhn TO, Jackson IM. 1989. Partial purification and characterization of a novel growth hormone-releasing factor (GRF) from teleost brain related to the rat hypothalamic peptide. *Peptides* 1989 10: 15-19.
- Baird A, Wehrenberg WB, Ling N. 1986. Relative potencies of human, rat, bovine/caprine, porcine and ovine hypothalamic growth hormone-releasing factors to release growth hormone by the rat anterior pituitary in vitro. *Neuroendocrinology* 42: 273-276.
- Bilezikjian LM, Vale W. 1983. Stimulation of adenosine 3', 5' monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 113: 1726-1731.
- Brazeau P, Ling N, Esch F, Bohlen P, Mougin C, Guillemin R. 1982. Somatocrinin (growth hormone-releasing factor) in vitro bioactivity: Ca²⁺ involvement, cAMP mediated action and additivity of effect with PGE₂. *BBRC* 109: 588-594.
- Du SJ, Gong Z, Fletcher GL, Shears MA, King MJ, Idler DR, Hew CL. 1992. Growth enhancement in transgenic atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. *Bio/Technology* 10: 176-181.
- Gaylinn BD, Harrison JK, Zysk JR, Lyons CE, Lynch KR, Thorner MO. 1993. Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol.* 7: 77-84.
- Gelato MC, Merriam GR. 1986. Growth hormone releasing hormone. *Ann Rev Physiol* 48: 569-591.
- Gick GG, Zeytin FN, Brazeau P, Ling NC, Esch FS, Bancroft FC. 1984. Growth hormone-releasing factor regulates growth hormone mRNA in primary cultures of rat pituitary cells. *PNAS* 81: 1553-1555.
- Gubler U, Monahan JJ, Lomedico PT, Bhatt RS, Collier KJ, Hoffman BJ, Bohlen P, Esch F, Ling N, Zeytin F, Brazeau P, Poonian MS, Gage P. 1983. Cloning and sequence analysis of cDNA for the precursor of human growth hormone-releasing factor, somatocrinin. *Proc Natl Acad Sci* 80: 4311-4314.
- Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WP. 1982. Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that cause acromegaly. *Science* 218: 585-587.

- Hammer RE, Brinster RL, Palmiter RD. 1985. Use of gene transfer to increase animal growth. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 50: 379-387.
- Hammer RE, Brinster RL, Rosenfeld MG, Evans RM, Mayor KE. 1985. Expression of human growth hormone-releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth. *Nature* 315: 413-416.
- Lewin MJ, Rey-Desmars F, Ling N. 1983. Somatocrinin receptor coupled with cAMP-dependent protein kinase on anterior granule. *PNAS* 80: 6538-6541.
- Ling N, Esch F, Bohlen P, Brazeau P, Wehrenberg WB, Guillemin R. 1984. Isolation, primary structure, and synthesis of human hypothalamic somatocrinin: Growth hormone-releasing factor. *PNAS* 81: 4302.
- Luo D, McKeown BA. 1989. Immunohistochemical detection of a substance resembling growth hormone-releasing factor in the brain of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Experientia* 45: 577-580.
- Luo D, McKeown BA. 1991a. Interaction of carp growth hormone-releasing factor and somatostatin on in vitro release of growth hormone in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Neuroendocrinology* 54: 359-64.
- Luo D, McKeown BA. 1991b. The effect of thyroid hormone and glucocorticoids on carp growth hormone-releasing factor (GRF)-induced growth hormone (GH) release in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol A: Comp Physiol* 99: 621-6.
- Luo DS, McKeown BA, Rivier J, Vale W. 1990. In vitro responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) somatotrophs to carp growth hormone-releasing factor (GRF) and somatostatin. *Gen Comp Endocrinol* 80: 288-98.
- Marivoet S, Moons L, Vandesande F. 1988. Localization of growth hormone releasing factor-like immunoreactivity in the hypothalamo-hypophyseal system of the frog (*Rana temporaria*) and the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Comp Endocrinol* 72: 72-79.
- Mayor KE, Vale W, Rivier J, Rosenfeld MG, Evans RM. 1983. Expression-cloning and sequence of a cDNA encoding human growth hormone-releasing factor. *Nature* 306: 86-88.
- Mayor KE, Cerelli GM, Lebo RV, Bruce BD, Rosenfeld MG, Evans RM. 1985. Gene encoding human growth hormone-releasing factor precursor: Structure, sequence, and chromosomal assignment.

PNAS 82: 63-67.

- Moons L, Cambre M, Ollevier F, Vandesande F. 1989. Immunocytochemical demonstration of close relationships between neuropeptidergic nerve fibers and hormone-producing cell types in the adenohypophysis of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Comp Endocrinol* 73: 270-83.
- Olivereau M, Olivereau J, Vandesande F. 1990. Localization of growth hormone-releasing factor-like immunoreactivity in the hypothalamo-hypophysial system of some teleost species. *Cell Tissue Res* 259: 73-80.
- Palmiter RD, Brinster RL. 1985. Transgenic mice. *Cell* 41: 343-345.
- Parker DB, Sherwood NM. 1990. Evidence of a growth hormone-releasing hormone-like molecule in salmon brain, *Oncorhynchus keta* and *O. kisutch*. *Gen Comp Endocrinol* 79: 95-102.
- Peter RE, Nahorniak CS, Vale WW, River JE. 1984. Human pancreatic growth hormone-releasing factor (hpGRF) stimulates growth hormone release in goldfish. *J Exp Zool* 231 : 161-163.
- Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W. 1982. Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumor. *Nature* 300: 276-278.
- Robberecht P, Coy DH, Waelbroeck M, Heiman KL, de Neef P, Camus JC, Christophe J 1985 Structural requirements for the activity of rat anterior pituitary adenylate cyclase by growth hormone-releasing factor (GRF): Discovery of (N-Ac-Tyr¹, D-Arg²)-GRF(1-29)-NH₂ as a GRF antagonist on membranes. *Endocrinology* 117: 1759-1764.
- Vaughan J, Rivier J, Spiess J, Peter R, McClintock R, Karr D, Vale W. 1987. Purification of a GRF-like immunoreactive peptide from carp hypothalamus. in "The Endocrine Society 69th Annual Meeting, Program and Abstract 1987" p.50.
- Wehrenberg WB. 1986. The role of growth hormone-releasing factor and somatostatin on somatic growth in rats. *Endocrinology* 118: 489-494.
- Zhang P, Hayat M, Joyce C, Gonzalez-Villasenor, Lin CM, Dunham RA, Chen TT, Powers DA. 1990. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Mol Reprod Develop* 25: 3-13.