

- Dioxygen*, T. G. Spiro (ed.) John Wiley & Sons. New York, 1980.
- [3] H. Rein, et al.: *Acta Biol. Med., German*, **38**, 187, 1979.
- [4] T. Matsubara, et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 463, 1976.
- [5] E. G. Hrycay, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 209, 1975.
- [6] F. Lichtenberger, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 939, 1976.
- [7] G. A. Hamilton *Molecular Mechanisms of oxygen Activation*, O. Hayaishi (ed.) Acad. Press. New York, London, 1974.
- [8] P. Mohr, et al.: *Pharmazie*, **33**, 415, 1978
- [9] E. G. Hrycay, et al.: *Eur. J. Biochem.*, **61**, 43, 1976.
- [10] 吴越,《化学通报》**8**,486,1981。
- [11] A. A. Akhrem, et al.: *React. Kinet. Catal. Lett.*, **8**(3), 339, 1978.
- [12] A. Nishinaga et al.: *J. Mol. Catal.*, **179**, 1980.
- [13] J. T. Groves, et al.: *J. Mol. Catal.*, **7**, 169, 1980.
- [14] 张岱山, 硕士论文, 中国科学院长春应用化学研究所, 1980。
- [15] P. Mohr, et al.: *Acta Biol. Med., German*, **38**, 495, 1979.

[本文于1982年6月1日收到]

人的变异胰岛素分子

——糖尿病 的 分子病

王 志 珍

(中国科学院生物物理研究所)

一、糖尿病 的 分子病

谈到生物大分子结构与功能关系时,人们往往会提及很经典的一个例子,就是 50 年代初发现的镰刀状红血球贫血——异常血红蛋白造成的分子病,由 146 个氨基酸组成的血红蛋白分子的 β 亚基中,仅仅一个氨基酸的变化(谷氨酸被缬氨酸取代)就造成了致命的恶性贫血症。人类在长期的自然进化中所选择的蛋白质分子的结构是多么严格精确!在糖尿病中也发现了分子病,其中最典型的、研究得最深入的是 1975 年美国科罗拉多大学医学系 J. Olefsky 医生领导的小组发现的一例异常糖尿病^[1]。他们从病人体内取出的仅仅 3.1 克胰脏组织中分离到的胰岛素完成了它的氨基酸组成分析,受体结合能力和生物活力测定以及正常胰岛素和变异胰岛素的分离等一系列研究,最后确定其病因是由于体内 60% 的胰岛素发生了变异,即在胰岛素分子 B 链 C 端第 24 位或第 25 位的 Phe 被 Leu 取代。这是第一次从人体中分离到的变异胰岛素, Olefsky 因此获得 1980 年美国糖

尿病协会一年一度颁发给在胰岛素和糖尿病研究中最出色的四十岁以下的青年科学家的 Lilly 奖。

在临床上表现为对内源的或注入体内的外源胰岛素失去正常反应的症状称为胰岛素抵抗症 (Insulin resistance), 它会引起严重的糖尿病,此时血液中的胰岛素浓度可能达到很高。引起这种抗性的原因有二种:一种是胰岛素靶细胞异常,包括靶细胞上受体数目降低,或者胰岛素和受体结合后的一系列反应中某些步骤的损伤而致细胞效应降低;另一种是体内循环系统中存在胰岛素的拮抗物,如胰岛素抗体,胰岛素受体的抗体^[2]以及与胰岛素有相反调节功能的激素(如可的松、生长激素、胰高血糖素)的浓度升高。Olefsky 发现的这例异常糖尿病表现有严重的血液胰岛素升高,饥饿时血液胰岛素高达 70—120 μ U/ml (正常 5—24 μ U/ml)。血糖 >200mg/100ml (正常 80—120mg/100ml),但其他症状则与任何典型的胰岛素抵抗症不符。患者血液中胰岛素原/胰岛素的比例正常,说明体内生物合成胰岛素的过程正常。血液不含上

述那些胰岛素拮抗物。病人对注入体内的外源胰岛素的反应正常,血液中单核细胞上的受体数目也正常。这二点说明靶细胞系统没有损伤。但是用免疫亲和层析法从病人血液中分离到的胰岛素对 IM-9 淋巴细胞以及从大鼠附睾脂肪组织分离出来的脂肪细胞(二种常用于测定胰岛素受体结合和生物活力的细胞)的受体结合降低,对大鼠脂肪细胞葡萄糖摄取和氧化的刺激作用(常用的二种生物活力指标)也降低。这二个指标说明病人体内的循环胰岛素活力降低了。综合分析以上各项指标,应该可以排除一般的引起胰岛素抵抗症的原因,而集中怀疑病人分泌的胰岛素本身发生了变异。60 年代就曾设想过某些糖尿病是否是因为机体本身合成了结构异常的胰岛素分子。1966 年曾发现一种青春型糖尿病患者体内的循环胰岛素对从大白鼠骨骼肌分离到的胰岛素酶显示抗性,不易被它水解,很可能就是由于结构变化造成的。1967 年发现一例糖尿病患者的胰岛素,其 A 链第 2 位或第 10 位的 I leu 被 Lys 取代。但由于分离到的胰岛素量太少以及当时测定技术的限制,没有测定它的生物学性质。1976 年又发现一种有家族史的胰岛素原高血症^[3]。研究结果表明这是一种由于患者的胰岛素原发生变异而造成的分子病。在不同的家族中,变异的

表现有所不同。有的发生在 C 肽与 B 链联结的位置^[4],有的发生在 C 肽与 A 链联接的部分,65 位的 Lys 被取代^[5]。这些变异改变了它们原有的被胰岛素原酶作用的性质,使不能断裂成正常的胰岛素分子和 C 肽,从而造成异常胰岛素原中间物的积累,在 65 位 Lys 被取代的情况下,31 位 Arg 和 32 位 Arg 切去的 [X-65]胰岛素原积聚,导致胰岛素原高血症。

二、人体中变异胰岛素分子的鉴定

Olefsky 从病人身上外科摘取一块胰脏组织,除了必要的组织学检查外,仅有 3.1 克可供酸乙醇沉淀法提取胰岛素,经几步层析纯化,最后得到约 0.3 毫克纯的胰岛素,经免疫活力和凝胶电泳分析证明样品纯度好。Olefsky 进一步测定了它的受体结合和生物活力,与正常猪胰岛素相比(结合行为和生物活力完全同人胰岛素),其结合曲线的形状没有变化,但在淋巴细胞上的结合能力仅为猪胰岛素的 46%,生物活力(刺激葡萄糖传递)降到 11%,在脂肪细胞上的结合能力为 51%,生物活力 12%。病人胰岛素的生物活力明显降低,但在高浓度时,又表现出全部的活力,这说明确实是胰岛素本身的结构发生了变化,靶细胞体系并没有损伤。那么病人的胰岛素到底发生了什么样的结构变化

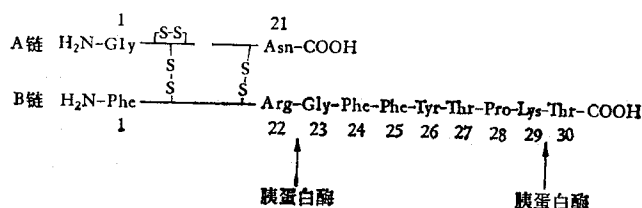


图 1 人胰岛素分子结构示意图

呢?末端分析检查只有 Phe 和 Gly,这与正常胰岛素一致。氨基酸分析表明其组成与人的胰岛素组成十分接近,只是 Phe 降低,而 Leu 有所增加,在胰岛素分子中只有 B₁、B₂₄、B₂₅ 是 Phe(图 1),既然 B₁ Phe 保持不变,Phe 的变化只可能发生在 B₂₄ 或 B₂₅ 上。很幸运,胰岛素分子 B 链 C 端刚好是容易被某些酶特异降解的部位,因此用胰蛋白酶可以特异酶解 B₂₂ Arg-

B₂₃ Gly 以及 B₂₉ Lys-B₃₀ Thr 之间的肽键,经纸电泳分离得到了预期的二个组成: B₂₃-B₂₉ 的七肽和一个残缺的胰岛素分子(des[(B₂₃-30) octapeptide]-insulin, 简称 DOI) 氨基酸组成分析表明 DOI 中只有一个 Phe,当然就是 B₁ Phe,但七肽中却缺少 0.6 个 Phe,代之出现 0.6 个 Leu。这种氨基酸的非完全取代只能用病人胰岛素中存在着“细微的不均一性”来解释,即并

不是所有的胰岛素,而只是 60% 的胰岛素发生了变异,在 24 位或 25 位上的 Phe 被 Leu 取代,其余 40% 的胰岛素还是正常的。遗憾的是,由于样品量太少,不能做氨基酸顺序测定以最终确定变异发生的位置。

为了直接证明生物活力的降低是由于变异分子造成的,需要把占 60% 的异常分子从胰岛素总体中分离出来,显然,只有一个氨基酸之差

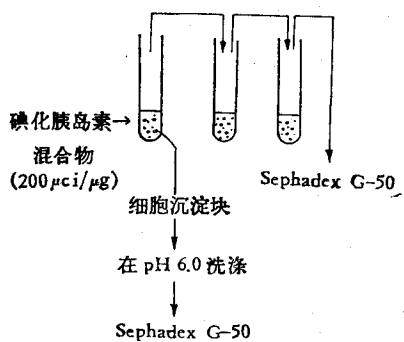


图 2 用多次重复的受体结合方法分离病人胰岛素中的正常胰岛素和变异胰岛素

的这样二种分子用生化方法分开几乎是不可能的。Olefsky 认为变异分子对受体的亲和力降低了,因此可以根据它们对受体亲和力的差异进行分离。他设计了这样的实验^[6]: (图 2) 用 IM-9 淋巴细胞与病人的胰岛素(经 ¹²⁵I 碘化)相结合,由于二种分子对受体的结合亲和力不同,离心后得到的在淋巴细胞上结合的胰岛素应该主要是亲和力较高的正常分子,而上清液应该富集变异分子。再用新鲜制备的淋巴细胞与这个上清液一起培养,经过三次这样重复的结合和离心分离,得到的上清液基本上只有变异胰岛素,而细胞沉淀块上结合的基本上是正常胰岛素。把离心收集的细胞悬浮在无胰岛素的缓冲液中,使结合的胰岛素从细胞上解离下来,经凝胶过滤和离子交换层析纯化。这二种胰岛素的凝胶过滤行为和凝胶电泳行为与正常猪胰岛素一样,但结合行为和生物活力迥然不同。

图 3 表明,在病人体内确实存在着二种胰

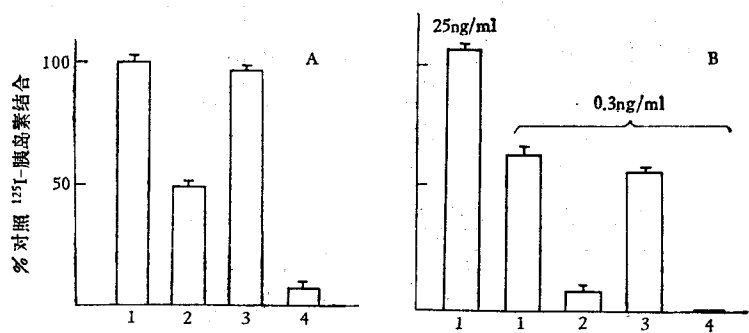


图 3 (A) 碘标记胰岛素与 IM-9 淋巴细胞的结合
(B) 胰岛素刺激大鼠脂肪细胞的葡萄糖氧化作用

(1)猪胰岛素(对照) (2)病人胰岛素 (3)从(2)分离到的正常胰岛素
(4)从(2)分离到的变异胰岛素

岛素,一种是正常胰岛素,具有与猪胰岛素几乎相同的受体结合能力和生物活力;一种是变异胰岛素,仅表现 9% 的结合能力,生物活力几乎全部丧失。仅仅 B₂₄ 或 B₂₅ Phe 被 Leu 取代造成分子的生物活力如此严重的下降,从以往大量的胰岛素分子结构与功能关系的研究资料来看是有根据的。B₂₃₋₂₆ 的氨基酸顺序 Gly-Phe-Phe-Tyr 在进化上十分保守,甚至在结构变异十分严重的豚鼠胰岛素和八目鳗(hagfish)胰岛素中也仍然保留着,在任何其他不含 Cys 的

片段中都还没有这样长的保守肽段,说明这个序列对胰岛素的功能起着十分重要的作用。确实,不论从胰岛素三维空间结构还是从 B 链 C 端化学修饰的结果来看,这一区域和胰岛素与其受体结合,胰岛素的生物功能,胰岛素的二聚化作用以及负协同效应都有密切的关系。因此这一区域尽管只有一个氨基酸发生变化,都可能造成生物活力严重下降。

另一方面,从生物测定可以看到,不论病人的胰岛素,还是从中分离到的变异胰岛素,它们

的生物活力要比受体结合能力低得多。按经典的受体理论,激素的生物活力应该与它的受体结合能力相一致的。异常胰岛素的受体结合能力仅 9%,它占全部胰岛素的 60%,因此对胰岛素总体应贡献约 6% 的结合能力,正常胰岛素则贡献 40% 的结合能力,这与实验值相符合。可是病人胰岛素的生物活力仅 12%,比计算值 40% 低得多。怎样解释这种矛盾呢? Olefsky 提出一种假设,认为变异胰岛素以某种方式抑制了正常胰岛素的生物活力。为此他们又重新把猪胰岛素或分离到的正常胰岛素(活力 100%)与分离到的变异胰岛素(几乎无活力)以等量混合,结果发现混合物的活力确下降到原来的 30—40%,但其受体结合和受体降解并不被变异胰岛素抑制。这证明了 Olefsky 的假设,并说明这种抑制作用并非直接由受体结合或受体分解作为中介因素的。后来他们还发现起抑制作用的只有 B₂₄ Leu-胰岛素。至于真正在什么环节发生了抑制作用,目前人们对此还十分无知,但至少已经认识到胰岛素与其受体的结合是发挥激素功能的第一步,结合以后还有一长串涉及到许多酶和其他各种效因子的生物事件。因此有效的结合并不一定可以激发同样有效的生物效应。胰岛素分子必须具有对受体结合必要的全部信息,还必须具有另外一套对(胰岛素-受体)复合物与生物效应子体系之间的耦合必须的信息,这可能是某些特殊的结构成分,或者是胰岛素与受体相互作用所产生的构象变化给予的新的信息。胰岛素是一种有广谱生物功能的激素,不同的功能很可能是采取不同的途径,或者说是通过结合以后的不同的生物事件来实现的。在所有这些问题没有认识清楚之前大概还不能确切地解释变异胰岛素的性质,而只能作些局部的推测。譬如根据 Kahn 曾经提出胰岛素受体的二聚化或多聚化作用可能是诱发生物功能所必须的想法,推想变异胰岛素与受体结合后便不能参与这种受体-受体的相互作用,从而抑制了生物活力。

从遗传学的观点看,病人体内的胰岛素是二个基因有几乎等位的显性表现的结果,其中

一个基因发生了变异,而且象是一种单点变异。已经发现大鼠可以分泌氨基酸组成不同的二种胰岛素,但其基因不是等位基因。那么病人的这二个胰岛素基因是否是等位基因呢?这一切推测都有待于进一步研究家族史,研究从病人体内分离出来的胰岛素基因的化学组成及其附近的 DNA 的顺序后才能验证。

三、人工半合成变异胰岛素分子的研究

为了深入研究变异分子的性质,天然的变异胰岛素的量显然是远远不敷需要的,因此,只能靠人工合成。芝加哥大学的 Tager^[7],德国羊毛研究所的 Gattner^[8],以及最近日本的 Shigeta^[9] 分别用胰蛋白酶酶促合成肽键的方法半合成了 B₂₄ 或 B₂₅ Phe 用 Leu 取代的猪胰岛素和人胰岛素。Gattner 等还合成了 B₂₄ Leu, B₂₅ Leu-胰岛素^[10],其中, B₂₄ Leu-人胰岛素的生物活力为正常人胰岛素活力的 20%, B₂₅ Leu-人胰岛素的活力为 2%。Shigeta 测得的活力则分别为 30% 和 2%。德国亚琛工大的 Wollmer 继续研究了这种合成变异胰岛素的溶液构象^[11]。英国 York 大学的 Dodson 根据已解出的猪胰岛素分子的三维结构用计算机图解法计算了 B₂₄ 或 B₂₅ Phe 被 Leu 取代可能造成的结构变化,其分析结果与 Wollmer 的 CD 谱结果相当一致^[11]。由于 B₂₅ Phe 并没有对 CD 谱作很大的贡献,它的丧失不会严重干扰 CD 谱,也不会改变分子的聚合行为。类似的在三维空间结构中, B₂₅ Phe 暴露在分子表面,在分子内部没有什么 Van de Waals 相互作用,因此为 Leu 取代后无论在分子内部,还是在二体内都不会形成新的短程作用力,所以也不影响整个分子结构。可是 B₂₄ Phe 被 Leu 取代后的情况就大大不同,由于侧链二个甲基的排布影响 B₂₄—B₂₆ 这一段 β 折叠的氢键,或者影响 B₁₅ Leu 和 B₁₆ Tyr,从而也破坏分子的二聚化和六聚化作用,这与 CD 谱上发现的干扰变化是一致的。令人惊讶的是,与天然胰岛素分子结构相差无几的 B₂₅ Leu-胰岛素反而表现极低的生物活力,仅为正常胰岛素的 2—3%,但免疫活力是正常

的。看来免疫活力并不能检测分子结构的变化。而结构发生明显变化的 B₂₄ Leu-胰岛素的活力相对高得多,约为正常胰岛素的 20—30%,这与已被公认的结构与功能应该一致的观点是相矛盾的。我们只能设想,虽然 B₂₅ Leu 不会干扰整个分子的构象,但也许 B₂₅ 位置上的苯环对于胰岛素与其受体的相互作用是必须的,因此缺乏了苯环还是影响到活力的最终表现。近年来随着对不同种族胰岛素和化学修饰胰岛素衍生物的深入研究,越来越多地发现与经典观念相矛盾的现象。例如受体结合亲和力与生物活力,整体活力与离体活力,三维空间结构与生物活力之间的不一致性,在人们对胰岛素的功能和作用机制的认识进一步提高后应该可以解释这些矛盾。

通过一例在临床上发现的特殊糖尿病而作的一系列逐步深化的生化分离分析,生物活力测定,化学合成,溶液构象研究以及三维结构推算等精细的分子生物学研究,不仅阐明了一种糖尿病中的分子病,其病因是一个氨基酸发生取代的变异胰岛素分子;而且对生物大分子结构功能关系,遗传变异,激素作用机制等重要生物学问题获得了许多新的认识。由此也说明实践能为基础理论研究提供丰富的源泉,基础理论研究可以更有力地解决实践问题。目前世界上胰岛素的研究无不与糖尿病的研究相联系,有关胰岛素研究的论文大部分发表在与糖尿病有关的学术会议和刊物上。只有这样,胰岛素的研究才有生命力,能真正为人类造福。

附:在本文脱稿后又看到德国羊毛研究所继合成二种推测的人变异胰岛素分子(B₂₄ Leu-胰岛素和 B₂₅ Leu-胰岛素)^[8]后进一步研究其生物学性质的工作^[12]。他们报道说,无论用他们自己合成的,还是用 Tager 合成的这二种变异胰岛素,都测不到对正常胰岛素生物活力的拮抗作用,相反却发现有明显的叠加作用。他

们的结论是,这二种人胰岛素衍生物在高浓度时,可以刺激完全的胰岛素生物效应,与其他胰岛素衍生物没什么不同,并不能引起糖尿病。换言之,糖尿病不是由这二种变异分子引起的。二个实验室的实验结果和结论迥然不同,甚至同一个样品在不同的实验室得到完全相反的结果,确是十分有趣的。我们自己也曾有过类似的经历,同一个胰岛素衍生物在不同的实验室中“表现”了不同的活力。我们注意到 Gattner 用的生物活力指标是胰岛素刺激大鼠脂肪细胞中的脂生成,而 Tager 是测定葡萄糖氧化。

胰岛素发挥不同的生物功能可能通过不同的途径,因此“抑制”作用在其间是否也有不同的表现。我们期待着进一步的实验数据和讨论。

参 考 文 献

- [1] Tager, H., et al.: *Nature (London)*, 281, 122, 1979.
- [2] Flier, J. S. et al.: *J. Clin. Invest.*, 58, 1442, 1976.
- [3] Gabbay, K. H. et al.: *New Engl. J. Med.*, 294, 911, 1976.
- [4] Gabbay, K. H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76, 2881, 1979.
- [5] Robbins, D. C., *Nature*, 291, 679, 1981.
- [6] Olefsky, J., *J. Biol. Chem.*, 255, 6098, 1980.
- [7] Tager, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77, 3181, 1980.
- [8] Gattner, H. G., et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 361, 1135, 1980.
- [9] Shigeta, Y., et al.: Abstract from "The International Symposium on Clinical Genetic Genesis of Diabetes Mellitus", 1982, Kove.
- [10] Jonezyk, A., et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 362, 557, 1981.
- [11] Wollmer, A., et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 362, 581, 1981.
- [12] Diaconescu, C. et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 363, 187, 1982.

[本文于1982年8月23日收到]