

重组 GIP 蛋白的原核优化表达 及其生物活性的研究 *

胡质毅^{1,2)} 龙蔡新¹⁾ 王珣章¹⁾ **

(¹⁾中山大学生命科学学院有害生物控制及资源利用国家重点实验室, 广州 510275;

²⁾广州中医药大学第一临床医学院中医内科学国家重点学科, 广州 510405)

摘要 葡萄糖依赖性促胰岛素多肽或抑胃肽 (glucose-dependent insulintropic polypeptide or gastric inhibitory peptide, GIP) 是由 42 个氨基酸组成的胃肠调节肽, 在高血糖背景下能够刺激胰岛素释放, 能够抑制胃酸分泌、促进神经细胞增生, 具有广泛的临床应用价值. 化学提取或人工合成 GIP, 成本过高, 不宜规模化生产, 故应用基因工程技术研制重组人 GIP(rhGIP) 并探讨其生物活性有积极的现实意义. 人工合成具有大肠杆菌偏爱密码子的编码 GIP 成熟肽的 cDNA 序列, 利用 pET32a(+) 系统进行原核表达; 在小规模发酵条件下, 进行优化诱导表达和目的蛋白的亲和纯化; 通过检测 SD 大鼠胃酸分泌和血糖浓度, 对纯化后的 rhGIP 进行生理活性研究; 通过形态学观察和培养液中 NO 含量测定, 检测 rhGIP 对 PC12 细胞 NO 自由基生成量的影响; 应用 A β_{25-35} 加入培养基造成 PC12 细胞神经损伤模型, 分别以高、中、低剂量 rhGIP 作用于此模型, 通过 MTT (2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 法测定 PC12 细胞的活性. 结果显示, 成功克隆了人 GIP 基因, 诱导表达的 rhGIP 占细胞总蛋白质的 35%, 部分可溶, 部分以包涵体形式存在. 经过诱导表达的重组蛋白质分子质量约为 26 ku, 与理论值相符. 纯化后的 rhGIP 具有免疫活性. 优化诱导表达条件为表达菌生长密度 A₆₀₀ 值 0.50, IPTG 浓度 0.5 mmol/L, 温度 37℃, 诱导表达时间 4 h. 裂解上清液经固定化金属亲和层析一步法层析后, 表达的水溶性 rhGIP 融合蛋白的最后得率为 1.2 mg/L 菌液, 纯度为 85%. 纯化后的 rhGIP 能够使 SD 大鼠胃液 pH 值增高, 其抑制胃酸分泌作用与生理盐水对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$), 而 rhGIP 组和标准品 GIP 组比较差异无显著性. 在高血糖背景下, 注射 rhGIP 15 min 后, 大鼠血浆血糖浓度较基础血糖显著降低 ($P < 0.05$), 30 min 时与单独注射葡萄糖的模型对照组比较, 差异无显著性, 而 rhGIP 组和标准品 GIP 组其差异不显著. 在 rhGIP 对神经细胞的营养和对 PC12 细胞免受神经损伤和缺氧损伤影响的研究中发现, 用 rhGIP 培养 PC12 细胞 32 h 后, rhGIP 组 NO 含量极显著低于正常对照组 ($P < 0.01$), 细胞存活较多, 神经突起延伸较好, 中、高剂量 rhGIP 组均较神经损伤和缺氧损伤组活性显著升高 ($P < 0.05$), 且细胞活性呈剂量依赖关系, rhGIP 组与标准品 GIP 组差异不显著, 与正常对照组亦无显著差异. 研究结果表明, 已得到高效表达的 rhGIP 融合蛋白, 该蛋白质具有免疫活性, 具有抑制胃酸分泌和降低大鼠血浆血糖浓度的生理活性, 并且对神经细胞有营养和保护作用.

关键词 抑胃肽, 葡萄糖依赖性促胰岛素多肽, 原核表达, PC12 细胞, 生物活性

学科分类号 Q81

GIP 是同一胃肠激素使用的两个名称即抑胃肽 (gastric inhibitory peptide, GIP) 和葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 (glucose-dependent insulintropic polypeptide, GIP) 的共同称谓^[1~3]. GIP 直链多肽由 42 个氨基酸组成, 既属于肠抑胃肽类激素^[4], 又属于血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP)/胰高血糖素 / 胰泌素家族^[5], 1970 年由 Brown 等^[6]首先从猪小肠提取物中分离纯化. 它主要存在于十二指肠和空肠粘膜隐窝的 K 细胞^[7~9]. 人 GIP(hGIP) 基因定位于 17 号染色体^[10]. GIP 具有抑制胃酸分泌^[2,3,11], 调节血糖^[12~17], 抑制脂肪代谢^[18]、影响骨骼肌、肝脏等对葡萄糖摄取和利用等功能^[17,19], 在

高血糖背景下, 直接作用于胰岛细胞, 刺激胰岛素释放, 被视为肠 - 胰岛素轴中调节胰岛素释放的重要因素之一^[12~17], 最新研究表明, 经化学修饰的 GIP 平台技术产生的新型分子可以帮助二型糖尿病患者更好地控制病情. 极为引人注目的是, 新近研究 GIP 多向性生理效应时发现, 它具有刺激神经

*国家自然科学基金资助项目(30572453), 世界银行贷款资助项目(129A01052), 广东省社会发展计划资助项目(2005B20301024).

** 通讯联系人. Tel: 020-84113964, 36585657

E-mail: wxz@zsu.edu.cn, princeling007@yahoo.com

收稿日期: 2006-05-11, 接受日期: 2006-06-12

细胞生长的功能, 对新神经细胞的生成起促进作用^[20], 新型重组人 GIP (novel recombinant hGIP, nrhGIP) 成为近年国际上较为活跃的研究领域, 其理论研究和医药应用价值前景诱人. 目前, 用生化分离技术直接从动物体内提纯 GIP, 产量极微, 依靠人工合成, 造价高昂, 因此, GIP 的获取来源非常有限^[20,21]. 国内对 GIP 的研究集中在探讨其人工合成方法及测定含量方面, 而原核表达蛋白质是一种得率高、经济可行的方法, 借此可得到具有生物活性的 GIP 蛋白. 因此, 本文拟在成功构建 GIP 的原核表达载体并对此质粒进行稳定性检测的基础上, 对影响表达的外源条件进行优化, 选择出适宜的表达式, 并对优化表达的高得率的 rhGIP 进行一步法亲和层析, 以获得高纯度的 rhGIP, 同时, 进一步研究其结构和功能, 了解 rhGIP 在机体正常生理调节以及病理过程中的作用, 通过这一策略, 探讨所获的 rhGIP 在基础理论研究和临床应用上的可能前景.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒. 原核表达载体 pET32a(+) 购自 Novagen 公司, 载体 pET32a(+)-GIP 由中山大学生命科学学院构建, 大肠杆菌 DE3(BL21) 由中山大学生命科学学院保存.

1.1.2 工具酶及试剂. 限制性内切酶购自 Takara 公司; IPTG、Amp⁺ 购自华美生物工程公司; 蛋白质质量标准购自华舜生物工程公司; 蛋白质纯化试剂盒为 CLONETECH 公司产品; GIP 标准品及抗体购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所; AP 标记的二抗购自华美公司; RPMI1640、胰蛋白酶、胎牛血清购自 Invitrogen 公司; PC12 细胞购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所; NO 检测试剂盒购自南京建成生物工程公司; 其他试剂均为 Sigma 公司产品.

1.1.3 实验动物. SD 大鼠, 18~22 周, 雄性, 购自广州中医药大学实验动物中心, 实验前禁食 16~24 h.

1.2 方法

1.2.1 GIP 基因序列的人工合成和序列分析. 根据大肠杆菌密码子的偏爱性设计引物, 委托大连宝生物工程公司合成纯化人 GIP cDNA 片段, 测序, 用 DNASTAR、BIOEDIT 等软件进行序列分析.

1.2.2 构建 pBluescript II SK(+)-GIP 克隆载体. 设计

上游引物: P1, 5' GGAATTCCTACGCTGAAGGT-ACTTTTAT 3', 下游引物: P2, 5' ACGCGG-TCGACGTTATTGAGTAATATTATGTT 3', 分别含有限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点, 以合成的 GIP 基因为模板. PCR 扩增, 双酶切回收目的片段. 克隆入经同样酶切的转移载体 pBluescript II SK(+) 上, 构建 pBluescript II SK(+)-GIP 克隆载体.

1.2.3 pET32a(+)-GIP 表达质粒的构建.

根据 GIP 编码序列及 PET32a(+) 载体的特点设计引物, 上游引物 P3, 5' TAGAATTCTACGCTGAAGGTACTTTTAT 3', 下游引物 P4, 5' ATGTCGACTTATTGAGTAATATTATGTT 3', 委托上海申友生物工程公司合成. 以含 GIP 基因的重组质粒 pBluescript II SK(+)-GIP 为模板, PCR 扩增并回收目的片段.

原核表达载体 PET32a(+) 载体与回收的 GIP 片段分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切, T4DNA 连接酶酶切产物, 得到重组表达质粒 pET32a(+)-GIP, 连接产物转化大肠杆菌 BL21 细胞.

1.2.4 GIP 融和蛋白优化表达及纯化.

接种含表达质粒的大肠杆菌 BL21(DE3) 单菌落于 LB/Amp⁺ (Amp 50 μ g/L) 培养液中, 37℃ 培养过夜. 以 2% 的比例, 接种上述过夜菌于新鲜的 LB/Amp 培养液中, 于 37℃ 振荡 (300 r/min) 培养 2 h 至 A_{600} 为 0.6~0.8, 然后加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 再振荡培养 3~4 h, 最后取样测 A_{600} , 离心收集菌体. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析以鉴定表达结果.

对不同温度 (25℃ 和 37℃)、 A_{600} 值 (0.50 和 1.00) 和 IPTG (0.50 和 1.00) 浓度条件下, 重组 pET32a(+)-GIP-BL21 的诱导表达和可溶性进行研究, 选出最适表达条件. 利用优选的表达条件, 大量培养表达产物, 阴性对照不加 IPTG. SDS-PAGE 检测重组蛋白质的表达情况.

超声波破碎诱导的重组蛋白, 收集上清及沉淀, 将沉淀进行洗涤、变性、复性. 上清和复性沉淀用 TALONTM Metal Affinity Resin 镍亲和层析柱纯化, 具体步骤按使用说明书进行. 收集蛋白质洗脱峰, 电泳检测重组蛋白在各洗脱峰的分布情况. 蛋白质印迹, 检测蛋白质的免疫活性, Bradford 法测定纯化物含量.

1.2.5 rhGIP 对大鼠血糖浓度和胃酸分泌的影响.

rhGIP 对大鼠血糖浓度影响的实验分 4 组, 分别为大鼠腹腔注射: 生理盐水正常对照组、50% 葡

葡萄糖模型对照组、标准品 GIP+50%葡萄糖阳性对照组和 rhGIP+50%葡萄糖组. 注射药物后, 分别于 15 min、30 min、60 min 取血, 测定血糖.

rhGIP 对大鼠胃酸分泌影响的实验分 3 组, 10%水合氯醛腹腔麻醉大鼠, 剖开腹腔, 暴露胃、小肠近端, 由口腔经食管行聚乙烯灌流管插管术, 导管插入胃底, 在胃近端固定于食管、贲门移行部. 另在胃与小肠近端移行部行“V”型切口聚乙烯胃液引流管插管术, 引流管插入幽门部固定并结扎小肠“V”型切口远端, 以 1 ml/5 min 的流速分别灌饲: 生理盐水、标准品 GIP 或 rhGIP, 收集引流液, 测定 pH 值.

1.2.6 rhGIP 对 PC12 细胞 NO 分泌的影响. 分为 5 组: 正常对照组、0.1 mmol/L 标准品 GIP 组、rhGIP 高、中、低剂量组(1 mmol/L、0.1 mmol/L、0.01 mmol/L). 每组 6 个对照, 实验重复 3 次. 24 孔细胞培养板培养 PC12 细胞 32 h, 5%CO₂, 37℃, 取培养基, 参照 NO 检测试剂盒说明书, 检测培养基中 NO 含量.

1.2.7 rhGIP 对 PC12 病理性细胞损伤的影响. A β ₂₅₋₃₅ 诱导 PC12 细胞损伤的分组同 1.2.6, 增加模型对照组, 各组均用终浓度为 30 μ mol/L 的 A β ₂₅₋₃₅ 不含血清培养基配制. 96 孔培养板培养 PC12 细胞至对数期, 模型对照组培养基换为含 30 μ mol/L A β ₂₅₋₃₅ 的不含血清培养基, 其他组中含有相应药物, 培养 30 h. MTT 法检测细胞活性.

1.2.8 统计学处理. 实验所得数据均表示为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$), 采用 SPSS 软件统计包方差分析中的 Duncan's 分析法, 检验各组间的差异显著性, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著.

2 结 果

2.1 重组表达质粒 pET32a (+) -GIP 的构建及 rhGIP 蛋白的鉴定和纯化

合成的人 GIP 基因序列, 经软件分析, 结果正确. 双酶切, 回收 140 bp 片段, 插入 pET32a 相应酶切窗口上, 构建原核表达质粒 pET32a-GIP. 测定重组质粒序列, 结果证明有 GIP 基因片段成功插入. 考虑到 PET32a(+) 的融合伴侣 C 端具有 GlySer 柔链区、6 $\times$ His 标签和 PreScission Protease 切割位点, 预测分子质量约为 20.4 ku, 人 GIP 分子质量约为 5 ku, 所以融合蛋白 PET32a(+)-GIP 分子质量约为 26 ku. 小规模表达的 SDS-PAGE 分析结果表明, 诱导后的工程菌总蛋白与诱导前的总蛋

白相比, 如图 1 所示, 出现了约 26 ku 的蛋白质带, 与预期的相同, 说明外源蛋白在宿主菌中得到了有效的表达. 对超声波裂解后得上清液经一步法亲和层析, 超声破碎上清与 Ni²⁺-Chelating Sepharose 亲和层析柱的结合特异性较强, 目的蛋白的洗脱使用 300 mmol/L 的咪唑浓度. 融合蛋白的得率皆高于 100 mg/L 菌液. 获得纯化的 rhGIP 浓度为 3.74 g/L. 免疫印迹结果(图 2)表明, 26 ku 处有特异性较好的阳性条带. 表达的水溶性重组蛋白 rhGIP 融合蛋白的最后得率为 1.2 mg/L 菌液, 纯度为 85%.

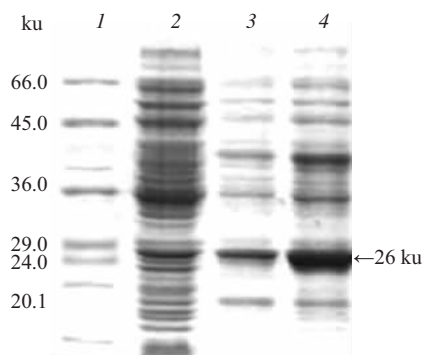


Fig. 1 Expression of the pET32a-GIP in *E. coli* strain BL21

1: Protein molecular mass marker; 2: pET32a induced by IPTG; 3: pET32a-GIP before induced by IPTG; 4: pET32a-GIP induced by IPTG.

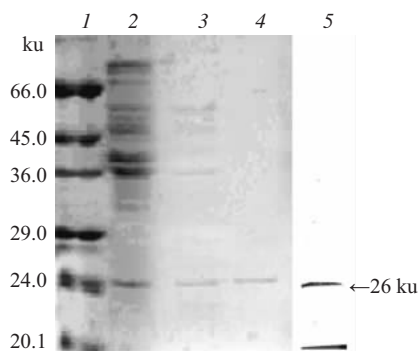


Fig. 2 Purification of the supernatant sonicated in PBS and Western blot of purified rhGIP

1: Protein molecular mass marker; 2: Total soluble protein from pET32a-GIP; 3, 4: The first and second peaks of protein eluted with 150 mmol/L imidazole; 5: Western blot of purified rhGIP.

2.2 融合蛋白诱导表达条件的优化

rhGIP 经过诱导, 在 26 ku 处有一条明显加宽的条带. rhGIP 诱导表达在 37℃ 时的表达量高于 25℃, A₆₀₀ 值为 0.50 的诱导表达量大于 A₆₀₀ 值为

0.25 的诱导表达量, IPTG 浓度对表达量无影响, 考虑到与纯化所用缓冲液的一致, 超声破碎选用 PBS 比 TBS 更适宜. 因此, pET32a(+)-GIP 的优化表达条件设定为: 工程菌生长密度 A_{600} 值为 0.50, IPTG 浓度为 0.5 mmol/L, 诱导温度为 37℃, 诱导表达时间 4 h, 超声破碎及纯化用 PBS 缓冲液, 结果如图 3 所示.

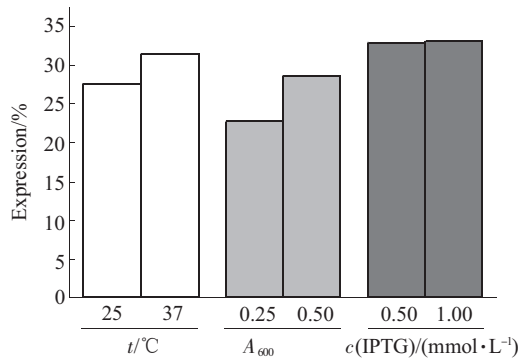


Fig. 3 Analysis of the expression of rhGIP induced by different temperature, A_{600} , concentration of IPTG

2.3 rhGIP 对大鼠胃酸分泌和血糖作用的影响

如图 4 所示, 标准品 GIP 与 rhGIP 能使大鼠胃酸酸度下降, 显著低于生理盐水对照组 ($P < 0.05$), 表现在它们的 pH 值较正常对照组显著增高, 标准品 GIP 组与 rhGIP 组对胃液酸度的影响无显著差异. 如图 5 所示, 葡萄糖模型对照组在 15 min 时, 血糖浓度较基础血糖(5.0 ± 0.5 mmol/L)有迅速升高 (11.3 ± 1.5 mmol/L), 差异显著 ($P < 0.05$), GIP 组和 rhGIP 组的血糖峰值较葡萄糖对照组显著下降 ($P < 0.05$), GIP 组和 rhGIP 组间无显著差异.

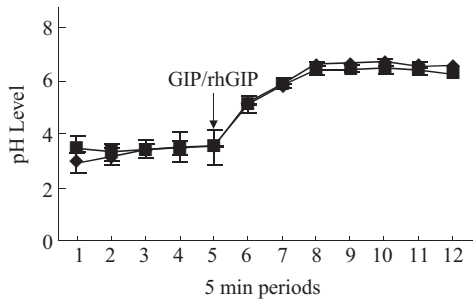


Fig. 4 The pH output from SD rat pouches in response to the infusion of GIP/rhGIP

Each point represents the mean of five experiments in each of 5 rats. The vertical bars are the standard errors of the mean. ◆◆: rhGIP; ■■: GIP.

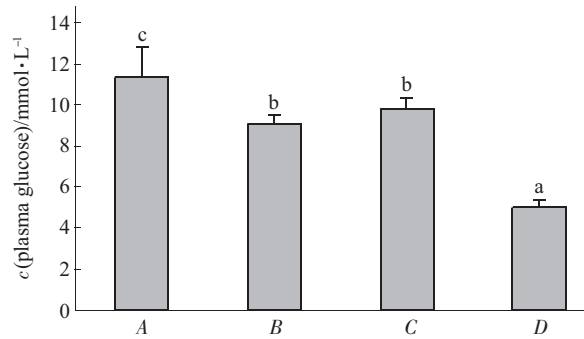


Fig. 5 Effects of rhGIP and GIP on plasma glucose homeostasis responses in SD rat after 15 min ($n = 8$)

A: Glucose model group; B: GIP control group; C: rhGIP group; D: NaCl group. Different letters a, b or c indicate significantly means ($P < 0.05$ by Duncan's test).

2.4 rhGIP 对 PC12 细胞 NO 含量的影响

如表 1 所示, 0.1~1 mmol/L rhGIP 组, NO 的含量降低, 呈剂量递减依赖. 标准品 GIP 和 rhGIP 浓度为 0.1 mmol/L 时, 较不加药组差异显著 ($P < 0.05$); 标准品 GIP 和 rhGIP 浓度为 0.01 mmol/L 时, 较不加药组差异极显著 ($P < 0.01$). rhGIP 组和标准品 GIP 组的 PC12 细胞较不加药组的细胞大, 多分枝较多, 不加药组细胞有团簇死亡现象(图 6).

Table 1 Effects of the secretion of NO of PC12 cells treated with GIP and rhGIP respectively

	$\mu\text{mol/L}$			
	1 mmol/L	0.1 mmol/L	0.01 mmol/L	0
GIP	(2.70 $\pm$ 0.55) ^c	(6.20 $\pm$ 0.76) ^b	(9.90 $\pm$ 0.55) ^a	(8.90 $\pm$ 0.32) ^a
rhGIP	(2.60 $\pm$ 0.46) ^c	(5.90 $\pm$ 0.82) ^b	(9.60 $\pm$ 0.55) ^a	(9.11 $\pm$ 0.53) ^a

The data in the figure shown as $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. The significance was identified by the different superscript a, b or c, by Duncan's test, $P < 0.05$.

2.5 rhGIP 对病理性 PC12 细胞损伤的保护作用

表 2 比较了标准品 GIP 和 rhGIP 对 $A\beta_{25-35}$ 致 PC12 细胞损伤后细胞活性. 正常对照组的 A_{570} 值与模型对照组的比较, 差异极显著 ($P < 0.01$). 当 rhGIP 为 0.01 mmol/L 时, 此时 PC12 细胞的 A_{570} 值与模型对照组的比较, 差异显著 ($P < 0.05$), 当 rhGIP 为 0.1 mmol/L 和 1 mmol/L 组与模型对照组的 A_{570} 比较, 差异极显著 ($P < 0.01$).

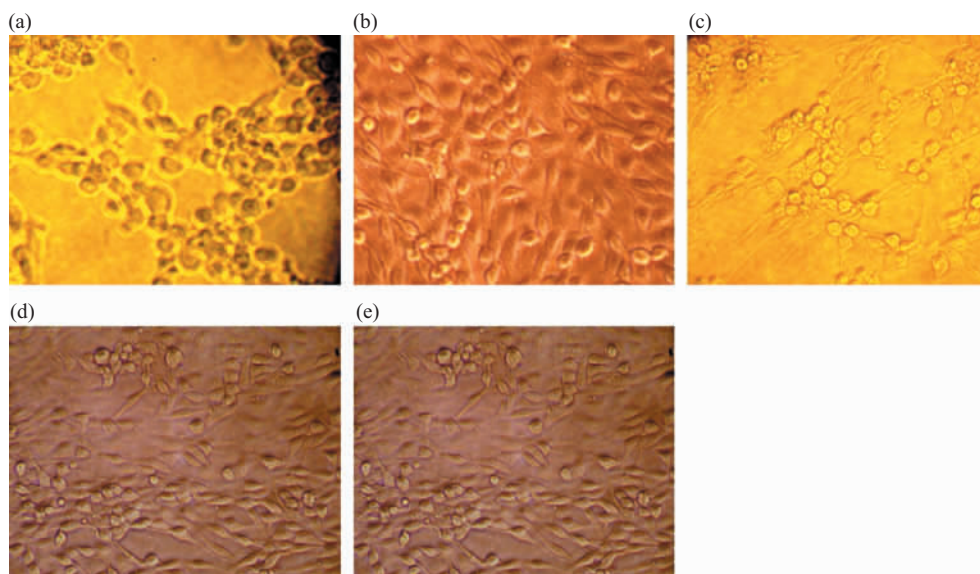


Fig. 6 Protective Effect of GIP or rhGIP on Alzheimer disease cell injury model with PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$

(a) Normal group. (b) GIP. (c) 0.01 mmol/L rhGIP. (d) 0.1 mmol/L rhGIP. (e) 1 mmol/L rhGIP.

Table 2 Effects of activity of PC12 cells injured by $A\beta_{25-35}$ and treated with GIP and rhGIP

Group	Dosage(mmol)	A_{570}
Normal		$0.264 \pm 0.012^{**}$
Model		0.110 ± 0.009
GIP	0.01	$0.198 \pm 0.007^*$
rhGIP	0.01	$0.178 \pm 0.002^*$
rhGIP	0.10	$0.225 \pm 0.003^{**}$
rhGIP	1.00	$0.245 \pm 0.006^{**}$

$\bar{x} \pm s$, $n = 6$. Compared with model group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

3 讨 论

本文采用将化学合成的 GIP 基因在原核表达载体中进行蛋白质表达, 这和国外通过多肽合成获得 GIP 多肽的方法不同. 兼顾大肠杆菌密码子的偏爱性, 在不改变编码 GIP 氨基酸序列的前提下, 对少数密码子进行调整, 以方便克隆. 采用这种方法合成一些多肽的基因是切实可行的. 采用 pET 系列工程菌高效表达带有 6 个组氨酸的 GIP 融合蛋白, 此 6 个组氨酸因为分子质量较小, 降低了对天然蛋白 GIP 构象干预作用, 同时, 又能协助外源蛋白正确折叠, 增加重组蛋白的水溶性表达. 实践证明, 这一表达策略优于国外应用温度诱导表达 pRIT2T-hGIP 的带有蛋白质 A 重组 GIP 融合蛋

白^[22]. 无论从表达目的蛋白得率上, 还是在融合蛋白的纯化上, 本研究 BL21/pET-32a-GIP 的表达效率要高于 N3830-1/pRIT2T-hGIP. 因此, 我们这一原核表达的重组 GIP 具有产量大、便于纯化、成本低等优点.

外源基因在大肠杆菌中的重组表达方式受其诱导时工程菌浓度、诱导时间、诱导温度、诱导剂的浓度等因素综合影响, 本研究利用在体外合成的人 GIP 基因, 在大肠杆菌中得到高效表达, 在此基础上, 对几个主要的培养条件进行了筛选, 进一步确定了 GIP 在大肠杆菌中最适的重组表达方式, 大量地表达目的蛋白. IPTG 诱导一定时间后, 蛋白质表达达到峰值. IPTG 在 0.25~2.00 mmol/L 范围内, 对目的蛋白的诱导表达量无明显影响, 继续诱导则易造成表达产物降解、变性或失活, 而表达产物也可对宿主造成毒害. 因此, 必须确定合适的表达时间, 才能获得最高表达活性及表达量的蛋白质. 本研究在 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 的 LB 培养基中, 37℃ 诱导培养 4 h, 可获得目的蛋白的满意表达, 为以后的大规模发酵降低成本有积极意义. 从菌液浓度为 $A_{600} = 0.2$ 开始, 已有高效表达, A_{600} 为 0.5、0.6 时达到最高, 继续增加 A_{600} 值, 表达量不再加大, 从节约成本的角度, 选用 A_{600} 为 0.2~0.6 即可. 选用低 A_{600} 值, 菌液处于对数增长期, 加入诱导剂后, 诱导过程中, 菌液浓度继续增加, 表达量

会增多, 且不会由于死亡菌体产生的物质影响其生长. 蛋白质的水溶性通过检测其在超声破碎用缓冲液上清中的含量比总菌中的融合蛋白量来衡量, 可溶性受诱导温度和诱导初始 A_{600} 值影响较大. 本研究的 rhGIP 水溶性比例较大, 有利于纯化及保存其活性. 更为重要的是, N 端融合的 6 个组氨酸可保证重组蛋白 GIP 不易被细菌蛋白酶降解, 这在随后的重组蛋白 GIP 生物学活性研究中得到了进一步证明——本研究表达的重组蛋白虽然经反复冻溶及约 1 年的长期保存, 仍然保持较高的生物学活性. 这提示 6 个组氨酸能够显著提高重组蛋白 GIP 的稳定性, 可能和 GIP 类似物的 N 端修饰蛋白一样, 具有抗血浆中蛋白酶 DPP IV 的降解作用, 从而导致 GIP 在血浆中生物半衰期由 6 h 到 24 h 的延长, 显著地提高 GIP 在体内生物作用的时效^[23,24].

在 1970 年发现 GIP 后相当长的一段时间里, 人们对 GIP 的研究大多集中于结构方面, 而功能方面则涉足不多. 但目前, 对 GIP 功能的研究已经成为一个较为活跃的研究领域, 现已发现 GIP 在调节血糖、抑制胃酸分泌、肥胖症以及老年痴呆的发病等过程中可能有重要作用, 因此 GIP 的理论研究和医药应用价值前景十分诱人. 现在认为 GIP 所属的肠调节激素家族的主要作用方式是内分泌形式, GIP 最重要的生理功能是在餐后高糖条件下促进胰腺 β 细胞分泌胰岛素, 从而保证对血糖的利用和保持血糖的稳定. 这种促分泌效应是葡萄糖依赖性的, 只在餐后高糖条件下出现, 该效应较之 GIP 抑制胃酸分泌的作用更具有生理依赖性. GIP 分泌受十二指肠的营养状态、高脂或高糖等因素影响, 它又可以影响其他激素的分泌, 其机理主要是: GIP 受体是 G 蛋白偶联受体, GIP 可通过 cAMP 升高和胞内钙离子内流增加, 促进葡萄糖依赖性胰岛素分泌.

最新的研究还表明, 经化学修饰的 GIP 平台技术产生的新型分子可以帮助 2 型糖尿病患者更好地控制病情, 新型重组人类 GIP (novel recombinant hGIP, nrhGIP) 成为近年国际研究热点. 对天然 GIP 的结构与功能关系研究表明, 适当改变 GIP 的结构, 可提高对抗糖尿病的活性. GIP 具有复杂的生物活性, 其中部分活性对于治疗糖尿病是有益的, 如对胰岛素的直接细胞活性, 脂肪代谢调节活性等. 从治疗糖尿病角度出发, 如何将 GIP 的活性提高, 制备出高活性、低毒性的新型 GIP, 是 GIP 研

究的一个重要组成部分. 尽管, 幽门螺杆菌的发现给胃病治疗带来了彻底的改观, 但仅从该方面考虑而采取的措施难以有效控制胃病的反复发作. GIP 具有较好地控制胃酸分泌作用, 并通过对其他相关激素的调控治疗消化性溃疡病. 本研究优化表达的 rhGIP 能够降低大鼠胃液酸度和降低血糖峰值, 这之前的相关研究结果一致^[12~17], 提示 rhGIP 和标准品 GIP 有相同的生理活性.

为了研究 GIP 对神经细胞的作用, 本实验选用的来自大鼠嗜铬细胞瘤细胞株的 PC12 细胞, 属神经嵴源性, 可以作为离体研究神经细胞实用性的细胞模型^[25]. 以 NO 合成的限速酶一氧化氮合酶 (NOS), 作为衡量一氧化氮(NO)这一重要的信使分子和效应分子的变化指标^[26,27]. 在 NOS 的催化下, 以 L-精氨酸和氧分子作用生成 NO, NO 再激活鸟苷酸环化酶, 使环磷酸鸟苷(cGMP)水平变化发挥其生物学效应^[27]. 本研究结果表明, GIP 和 rhGIP 均可引起 PC12 细胞的神经型一氧化氮合酶(nNOS)活性的显著变化, 提示 GIP 可以调节 PC12 细胞中 nNOS 的活性影响 NO 的生成, 发挥保护 PC12 细胞的作用.

进一步采用 β -淀粉样蛋白来研究 GIP 对 PC12 细胞的保护作用. $A\beta_{25-35}$ 是蛋白前体(β -APP)通过某种降解途径产生的, 具有神经毒性, 其在脑内沉积与 AD 形成密切相关^[28,29]. 有研究表明, GIP 能增加细胞内 cAMP 的含量^[30], cAMP 类似物双丁酰环化腺苷酸(dbutyryl cyclicAMP, dbcAMP)具有诱导 PC12 细胞突起生长的作用^[31]. 本研究发现, 给予 GIP 或 rhGIP 后, $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞突起凋亡的作用显著减少, 提示 GIP 保护 PC12 细胞免于 $A\beta_{25-35}$ 毒性损伤可能是通过 cAMP 依赖的蛋白激酶系统诱导 PC12 细胞突起生长的作用实现的.

综上所述, 本研究选择了 GIP 在原核生物中融合表达重组蛋白的策略. 对优化表达的高得率 rhGIP 进行了一步法亲和层析, 获得了纯度较高和稳定性较好的 rhGIP. 这一 rhGIP 能够降低大鼠胃液酸度和降低血糖峰值, 显示出 rhGIP 和标准品 GIP 有相同的生理活性. 同时, 本研究选择 PC12 细胞研究 rhGIP 的神经营养作用, rhGLP 对 PC12 细胞起到神经营养因子类物质的作用, 也对病理损伤的 PC12 神经细胞具有较强的修复作用, 但对于 rhGIP 对神经损伤的保护作用和机制还有待于进一步探讨.

参 考 文 献

- 1 Brown J C, Mutt V, Pederson R A. Further purification of a polypeptide demonstrating enterogastrone activity. *Journal of Physiology*, 1970, **209** (1): 57~64
- 2 Brown J C, Mutt V, Dryburgh J R. The further purification of motilin, a gastric motor activity stimulating polypeptide from the mucosa of the small intestine of hogs. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology*, 1971, **49** (5): 399~405
- 3 Pederson R A, Schubert H E, Brown J C. Gastric inhibitory polypeptide. Its physiologic release and insulinotropic action in the dog. *Diabetes*, 1975, **24** (12): 1050~1056
- 4 Brown J C, Dryburgh J R. A gastric inhibitory polypeptide. II. The complete amino acid sequence. *Canadian Journal of Biochemistry*, 1971, **49** (8): 867~872
- 5 Beck B, Max J P. Direct metabolic effects of gastric inhibitory polypeptide (GIP): dissociation at physiological levels of effects on insulin-stimulated fatty acid and glucose incorporation in rat adipose tissue. *Diabetologia*, 1986, **29** (1): 68~72
- 6 Brown J C, Pederson R A. A multiparameter study on the action of preparations containing cholecystokinin-pancreozymin. *Journal of Gastroenterology*, 1970, **5** (6): 537~541
- 7 Polak J M, Bloom S R, Kuzio M, *et al.* Cellular localization of gastric inhibitory polypeptide in the duodenum and jejunum. *Gut*, 1973, **14** (4): 284~288
- 8 Mortensen K, Christensen L L, Holst J J, *et al.* GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regul Pept*, 2003, **114** (2~3): 189~196
- 9 Mortensen K, Petersen L L, Orskov C. Colocalization of GLP-1 and GIP in human and porcine intestine. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, **921**: 469~472
- 10 Higashimoto Y, Simchock J, Liddle R A. Molecular cloning of rat glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP). *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1132** (1): 72~74
- 11 Maxwell V, Shulkes A, Brown J C, *et al.* Effect of gastric inhibitory polypeptide on pentagastrin-stimulated acid secretion in man. *Dig Dis Sci*, 1980, **25** (2): 113~116
- 12 Pederson R A, Brown J C. The insulinotropic action of gastric inhibitory polypeptide in the perfused rat pancreas. *Endocrinology*, 1976, **99** (3): 780~785
- 13 Pederson R A, Brown J C. Interaction of gastric inhibitory polypeptide, glucose, and arginine on insulin and glucagon secretion from the perfused rat pancreas. *Endocrinology*, 1978, **103** (2): 610~615
- 14 Elahi D, Andersen D K, Brown J C, *et al.* Pancreatic α - and β -cell responses to GIP infusion in normal man. *American Journal of Physiology*, 1979, **237** (2): 185~191
- 15 Morgan L M, Flatt P R, Marks V. Nutrient regulation of the entero-insular axis and insulin secretion. *Nutrition Research Review*, 1988, **156** (1): 79~97
- 16 Opara E C, Go V L W. Influence of gastric inhibitory polypeptide (GIP) and glucose on the regulation of glucagons secretion by pancreatic α -cells. *Regul Peptides*, 1991, **32**: 65~73
- 17 Schmid R, Schusdziarra V, Aulehner R, *et al.* Comparison of GLP-1 (7-36) and GIP on release of somatostatin-like immunoreactivity and insulin from the isolated rat pancreas. *Am J Physiol*, 1990, **28** (6): 280~284
- 18 Morgan L M, Flatt P R, Marks V. The metabolic role of GIP: physiology and pathology. *Biochemical Society Transactions*, 1995, **24** (2): 585~591
- 19 Wachters-Hagedoorn R E, Priebe M G, Heimweg J A, *et al.* The rate of intestinal glucose absorption is correlated with plasma glucose-dependent insulinotropic polypeptide concentrations in healthy men. *J Nutr*, 2006, **136** (6): 1511~1516
- 20 Nyberg J, Anderson M F, Meister B, *et al.* Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation. *J Neurosci*, 2005, **25** (7): 1816~1825
- 21 崔大胤, 崔恒苒, 徐明华, 等. 人抑胃肽的研究: 合成和性质. *生物化学与生物物理学报*, 1994, **26** (2): 237~241
- 22 Cui D F, Cui H R, Xu M H, *et al.* *Acta Biochemimica Biophysica Sinica*, 1994, **26** (2): 237~241
- 23 Chow B K, Morrow G W, Ho M, *et al.* Expression of recombinant human glucose-dependent insulinotropic polypeptide in *Escherichia coli* by sequence-specific proteolysis of a protein A fusion protein. *Peptides*, 1990, **11** (6): 1069~1104
- 24 O'Harte F P, Gault V A, Parker J C, *et al.* Improved stability, insulin-releasing activity and antidiabetic potential of two novel N-terminal analogues of gastric inhibitory polypeptide: N-acetyl-GIP and pGlu-GIP. *Diabetologia*, 2002, **45** (9): 1281~1291
- 25 Deacon C F, Danielsen P, Klarskov L, *et al.* Dipeptidyl peptidase IV inhibition reduces the degradation and clearance of GIP and potentiates its insulinotropic and antihyperglycaemic effects in anesthetized pigs. *Diabetes*, 2001, **50** (7): 1588~1597
- 26 Joanne M, Rirka G, Anna J, *et al.* Inositol stereoisomer stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer amyloid β -induced toxicity. *J Biol Chem*, 2000, **275** (24): 18495~18502
- 27 Leone A M, Palmer R M, Knowles R G, *et al.* Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem*, 1991, **266** (35): 237~241
- 28 Nathan C, Xie Q W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 1994, **78** (6): 915~918
- 29 Yanker B A, Lawrenle K, Dani E L, *et al.* Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid- β protein: reversal by tachykinin nruropeptide. *J Science*, 1990, **250** (4976): 279~282
- 30 Mcy P, Gitter B, Waters L, *et al.* β -amyloid peptide *in vitro* toxicity lot to variability. *J Neurobiol Aging*, 1992, **13** (5): 605~607
- 31 Creutzfeldt W. The entero-insular axis in type 2 diabetes incretins as therapeutic agents. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001, **109** (2): 288~303
- 32 Hernandez A, Kimball B, Romanchuk G, *et al.* Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide stimulates neurite growth in PC12 cells. *Peptides*, 1995, **16** (5): 927~930

Optimized Prokaryotic Expression and Bioactivities of The Recombinant Human Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*

HU Zhi-Yi^{1,2)}, LONG Qi-Xin¹⁾, WANG Xun-Zhang^{1)**}

⁽¹⁾State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Science, Zhongshan (SUN YAT-SEN) University, Guangzhou 510275, China;

⁽²⁾State Key Discipline Department of Internal Medicine, The First School of Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract GIP, the acronym from gastric inhibitory peptide or glucose-dependent insulinotropic polypeptide, which is a kind of gastrointestinal regulatory peptide composed of 42 amino acids, plays an important role in stimulating insulin releasing in the pancreas, inhibiting gastric acid secretion in the stomach, as well as inducing progenitor cell proliferation in the brain. The application of GIP is promising in clinic. It is difficult and costly to get GIP with chemical extraction method, and it can't be produced cosmically, so it is valuable and significant to produce recombinant GIP by genetics and test its bioactivity. The cDNA sequence coding for human GIP mature peptide and composing of preferred codons of *E. coli*. was synthesized, and was expressed in prokaryotic expression pET32a(+) system. The recombinant *E. coli* was fermented in a small scale and the expression condition was optimized. The expressed recombinant human GIP (rhGIP) was purified by affinity method. The bioactivity of the purified rhGIP was tested through its effect on inhibiting gastric acid secretion and decreasing blood glucose concentration in SD rats. The effect on PC12 cell producing NO free radical was assessed through morphology observation and the NO concentration test. A PC12 cell injury model was constructed by adding A β_{25-35} into the culture medium, different dose of rhGIP was added into this model, and the activity of PC12 was tested by MTT (2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) staining. The results suggest that hGIP gene is cloned successfully, the recombinant protein constitutes 35% of the total protein of the cells, some of which was soluble, while the others exist as inclusion body. The relative molecular mass of the recombinant protein is 26 ku as expected. The purified rhGIP showed immunoreactivity. The optimal condition for inducing to expression is with the cell concentration of 0.5 in A_{600} value, the IPTG concentration of 0.5 mmol/L, under 37°C and induced for 4 h. The cell lysis supernatant was purified with immobilized metal affinity chromatograph. The production of soluble rhGIP is about 1.2 mg/L culture medium, and the purity is 85%. Purified rhGIP significantly inhibited the secretion of gastric acid and raised the pH value comparing with NC group in SD rats ($P < 0.05$). There was no significant difference between the rhGIP and standard GIP group ($P > 0.05$). After injection of rhGIP for 15 min, the concentration of blood glucose in plasma decreased remarkably comparing with control group in a high blood glucose environment ($P < 0.05$). In the later 30 min, there was no remarkable difference ($P > 0.05$). Also, there was no difference between rhGIP and standard GIP group ($P > 0.05$). In the research to test the effect of rhGIP on cell nutrition and PC12 cell to avoid neural injury and anoxic injury, it was found that the level of NO was significantly decreased ($P < 0.01$), the survival rate of the PC12 cells was increased, and neurite extending was better. The activity of the high and medium rhGIP concentration group is higher than that of neural injury group and anoxic injury group ($P < 0.05$), and the activity is increased as dose-dependence. The differences among rhGIP, GIP and NC group is not remarkable ($P > 0.05$). The results showed that the rhGIP has been successfully expressed and purified and showed obvious immunoactivity. The recombinant product was shown to have a wide spectrum of biological activity, such as inhibiting gastric acid secretion in the rats stomach, decreasing the concentration of blood sugar in plasma, as well as nutrition and protection to neural cells.

Key words gastric inhibitory peptide, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, PC12 cells, prokaryotic expression, bioactivity

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30572453), World Bank (129A01052) and Guangdong Provincial Social Development Plan (2005B20301024).

**Corresponding author. Tel: 86-20-84113964, 36585657, E-mail: wxz@zsu.edu.cn, princeling007@yahoo.com

Received: May 11, 2006 Accepted: June 12, 2006