

构功能关系的一般规律。同时, BR 的质子转运机理的研究极大地丰富了我们对于离子跨膜过程的认识, 对许多离子通道和离子转运蛋白的研究具有指导意义。

参 考 文 献

- 1 Khorana H G. J Biol Chem, 1988; **263** (16): 7439
- 2 Vsevolodov N N, Dyukova J V. TIBTECH, 1994; **12** (3): 81
- 3 黄莹, 余涌, 胡坤生, 生物化学与生物物理进展, 1993; **20** (4): 263
- 4 Henderson R, Baldwin J M, Ceska T A *et al.* J Mol Biol, 1990; **213**: 899
- 5 Lozier R H, Bogomolni R A, Stoeckenius W. Biophys J, 1975; **15** (9): 955
- 6 Birge R. R. Scientific American, 1995; **272** (3): 90
- 7 Lanyi J K. Biochim Biophys Acta, 1993; **1183** (2): 241
- 8 Ames J B, Mathies R A. Biochemistry, 1990; **29**: 7181
- 9 Souvignier G, Gerwert K. Biophys J, 1992; **63**: 1393
- 10 Mathis R, Lin S W, Ames J *et al.* Ann Rev Biophys Biochem, 1991; **20**: 491
- 11 Cassim J Y. Biophys J, 1992; **63** (5): 1432
- 12 Dancshazy Zs, Tokaji Zs. Biophys J, 1993; **65**: 823
- 13 Kono M, Misra S, Ebrey T G. FEBS Lett, 1993; **331** (1~2): 31
- 14 Eisfield W, Pusch C, Stockburger M *et al.* Biochemistry, 1993; **32**: 7196
- 15 Nagle J F. Photochem Photobiology, 1991; **54** (6): 897
- 16 Jiang Q-X, Hu K-S, Shi H. Photochem Photobiol, 1994; **60** (2): 175
- 17 Heberle J, Oesterhilt D, Dencher N A. EMBOJ, 1993; **12** (10): 3721

New Progress in The Study of Bacteriorhodopsin. Jiang Qiuxing, Hu Kunsheng (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract Bacteriorhodopsin (BR) is the only protein in the purple membrane (PM) from *Halobacterium halobium*. Wild-type BR contains a single-chain polypeptide of 248 aminoacid residues and a retinal attached to Lys216 of the peptide via a schiff base, BR has the function of proton pump, Upon illumination, BR goes through a photocycle which is considered to be correlated with its proton pumping process. The good progress has been made in the study of the structure and function of BR, but the path of photocycle and mechanism of proton pump are still not clear. The progress of the structure, photocycle and proton pump of BR in recent years are briefly introduced. And the four models of the path of photocycle which are in great argument are discussed in detail.

Key words bacteriorhodopsin, structure, photocycle, proton pump

胰岛素蛋白质工程研究进展*

王琼庆 冯佑民

(中国科学院上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 近年来, 胰岛素蛋白质工程研究进展很快, 主要介绍具有临床意义的速效长效和高效胰岛素研究概况, 包括分子设计基础, 生物活性和应用前景等。此外, 还讨论了胰岛素的受体结合部位及胰岛素与其受体相互作用的研究近况。

关键词 胰岛素蛋白质工程, 速效胰岛素, 长效胰岛素, 胰岛素受体

* 本文部分内容曾在蛋白质-病毒学术讨论会上报告, 1995年9月, 无锡。

收稿日期: 1995-10-29, 修回日期: 1996-04-22

胰岛素, 作为治疗糖尿病的特效药物, 它所取得的巨大成功是医药史上划时代的奇迹之一, 而且也是蛋白质化学史上研究得最为广泛和深入的蛋白质之一. 随着 DNA 重组技术的发展, 现在人们已能大规模生产重组人胰岛素. 为了研究胰岛素结构与功能的关系和改善胰岛素的治疗学性质, 需要制备各种各样的胰岛素类似物, 而胰岛素蛋白质工程则是当前用来获得这些类似物的新技术和主要途径. 迄今, 人们已获得约 300 多种胰岛素类似物, 其中包括 70 多种不同种属动物的胰岛素, 80 多种化学合成的类似物和 150 多种基因工程突变的类似物^[1]. 在这些类似物中, 有些表现出比天然胰岛素更优越的性质, 展现出光明的临床应用前景; 有些则对阐明胰岛素的结构功能关系, 作用机制和信号转导的分子基础具有重要意义. 从临床应用角度出发, 人们主要研究和发展速效, 长效和高效胰岛素类似物; 从基础理论研究角度出发, 与胰岛素受体结合部位相关的胰岛素类似物是研究的热点. 下面主要介绍这几种类似物的进展概况.

1 速效胰岛素

1.1 主要设计原理

正常人体内胰岛素的分泌有两个层次: 一是长期的低水平释放, 血液中维持一个基础值, 以保持正常的血糖水平; 另一层次是人进食后短暂的快速高水平分泌以适应饭后快速降低血糖浓度的需要. 通常, 饭后 30~60 min 内人血中胰岛素的浓度达到高峰, 120~180 min 内恢复到基础水平. 而目前临床应用的胰岛素制剂注射 120 min 后血中才出现高峰, 并且此峰值一直持续到 180~240 min, 造成病人一段时间内因血中胰岛素浓度过低出现高血糖症状, 随后又因胰岛素浓度过高而表现为低血糖^[2]. 为了改善这种状况, 人们希望设计出速效和长效胰岛素来分别模拟正常人饭后胰岛素分泌突升的情况和胰岛素的基础水平分泌.

1.2 主要设计思路

实验表明胰岛素随着其在溶液中的浓度变

化, 可以是单体或聚合体, 浓度小于 10^{-9} mol/L 时, 主要以单体形式存在, 浓度高于 10^{-5} mol/L 时则以二聚体形式存在. 常用胰岛素制剂浓度为 10^{-3} mol/L, 此时主要为六聚体. 而胰岛素生理功能的表现, 必须从多聚体解离成单体, 因为胰岛素是以单体形式与其受体结合. 因此, 避免胰岛素形成聚合体, 是设计速效胰岛素的原则. 胰岛素晶体结构分析指出了胰岛素分子中参与二聚体和六聚体形成的主要氨基酸残基 (图 1). 基于此, 有两个获得速效胰岛素的方法: a. 在二聚体形成面上引入电荷, 使分子靠近时产生同性电荷的排斥作用, 使之不能形成二聚体. b. 在二聚体形成面上引入侧链有较大空间位阻的氨基酸残基^[2,3].

这两种方法中, 前者更有效. 几年来, 人们已得到 10 多种速效胰岛素 (表 1), 其中有以下几个被研究得较为深入的速效胰岛素.

[B9Asp, B27Glu] 人胰岛素是用第一种方法获得. 当 B9 和 B27 残基均带上同性电荷后, 它们之间的斥力阻碍了二聚体的形成, 成为单体速效胰岛素. 它的受体结合能力约为天然胰岛素的 1/5, 但它的体内生物活力接近于人胰岛素^[3,4]. Kang 等^[5]报道了在正常人和糖尿病人体内进行试验的结果, 均有明显的速效作用.

[B28Lys, B29Pro] 人胰岛素的设计与上述不同, 它是基于比较胰岛素与类胰岛素生长因子-I (IGF-I) (属于胰岛素家族) 的结构和性质而提出的. 两者具有高度的同源性和三维结构的类似性, 但 IGF-I 不形成二聚体. IGF-I 的 B 结构域 (与胰岛素 B 链相应) 中 B28-B29 氨基酸序列与胰岛素 B 链的 B28-B29 比较, 发生颠倒. 因此, 将胰岛素 B 链的 B28-B29 用 IGF-I B 结构域的相应序列代替, 获得了单体速效胰岛素, [B28Lys, B29Pro] 人胰岛素^[4,6]. 该速效胰岛素已通过临床试验, 即将推向市场.

DKP 胰岛素即 [B10Asp, B28Lys, B29Pro] 胰岛素, 除了具有 [B28Lys,

B29Pro] 胰岛素的优点外, 由于 B10Asp 突变的影响, DKP 胰岛素的生物活力比天然胰岛

素有所升高, 它的受体结合能力是猪胰岛素的^[7]两倍^[7].

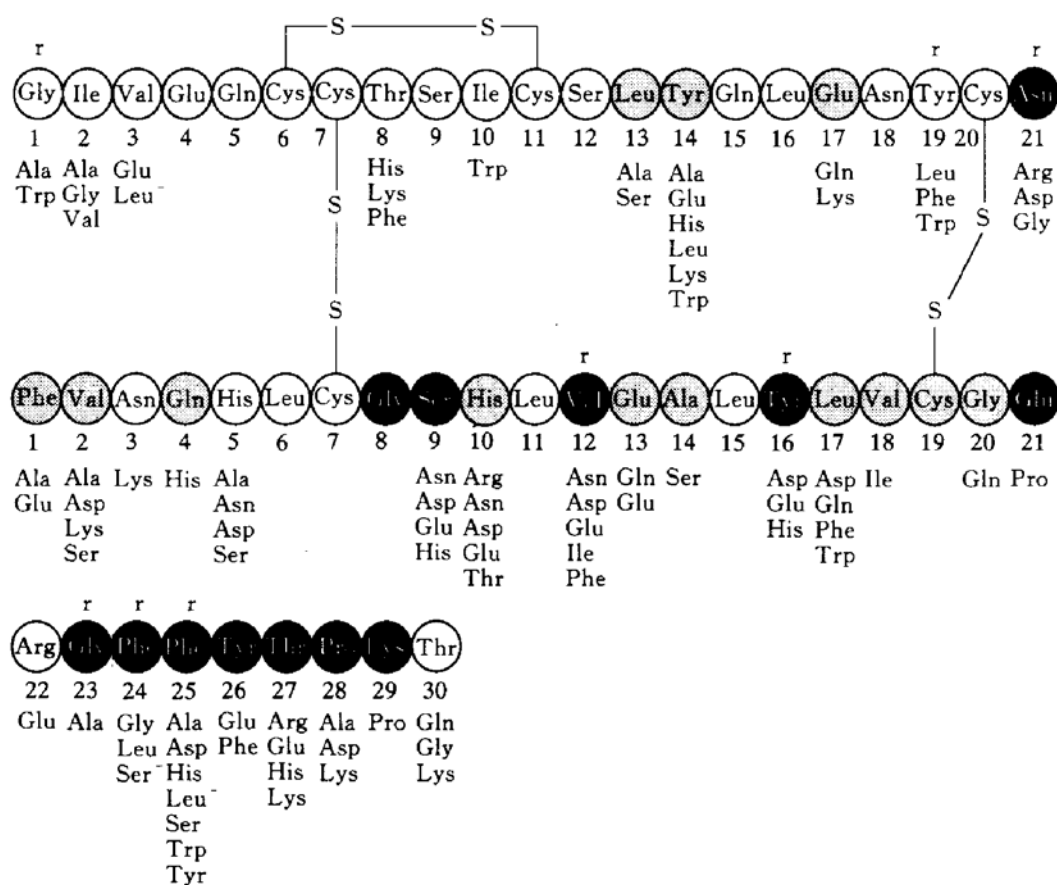


图1 人胰岛素的一级结构^[2]

其中用黑圈标出的为参与二聚体形成的残基, 用麻圈标出的为参与六聚体形成的残基, 在残基上方标有 r 者为推测的受体结合部位组成残基, 已获得的基因突变胰岛素的一部分列于残基下方, 标有 * 者为天然突变人胰岛素。

表1 一些速效胰岛素的生物活力和聚合能力^[2,6]

人胰岛素类似物	聚合态		生物活力	
	(21℃)	FFC	MBG	RBA
人胰岛素 (无 Zn^{2+})	4.4	100	100	100
[B9Asp] 胰岛素	1.1	26	79	
[B12Glu (去 B30)] 胰岛素	1.0	0.04		0.15
[B16His] 胰岛素	1.0	43		35
[B28Asp] 胰岛素	1.3	101	104	88
[B9Asp, B27Glu] 胰岛素	1.1	31	93	20
[B12Glu, B13Gln] 胰岛素	1.2	0.05		<0.05
[B16Glu, B27Glu] 胰岛素	1.1	13	55	
[B28Lys, B29Pro] 胰岛素			100	
[A3Glu, B10Glu, B22Glu] 胰岛素	1.2	0.06		
[A8His, B9Asp, B27Glu] 胰岛素	1.1	116	114	94
[A21Asp, B9Asp, B27Glu] 胰岛素	1.1	25	75	
[B10Asp, B28Lys, B29Pro] 胰岛素				200

注: FFC: 促脂肪生成活力, MBG: 降血糖活力, RBA: 受体结合能力。

2 长效胰岛素

正常人血液内胰岛素的基础水平,也是目前使用的普通胰岛素制剂所不能维持的(一次注射只有3 h左右的降血糖效果)。现在应用于临床的长效制剂均是利用锌离子或鱼精蛋白结晶的胰岛素晶体悬浮液,注射后,其溶解和扩散的速度均很慢,达到长效的结果。但是,这种悬浮液在使用时有着种种不便,如无法确定实际作用浓度等^[2],因此,发展可溶性的长效类似物便成为努力的方向。

与速效类似物相反,设计长效类似物时主要考虑提高胰岛素的自身聚合能力,使其倾向于形成多聚体。胰岛素分子的等电点为 pH 5.4,人们用蛋白质工程方法向胰岛素分子引入正电荷或消除原有负电荷以升高其等电点,使其接近于人体液 pH 值。这样得到的类似物能较好地溶解于酸性溶液,而进入人体组织后却迅速形成晶体或无定形沉淀。这些晶体或沉淀缓慢溶解成单体或二聚体进入血液,使胰岛素浓度较长时间内不会下降。表2列举了一些长效类似物及其研制策略。

表2 一些长效胰岛素的设计和效果^[2,3]

[B13Gln] 胰岛素	稳定多聚体结构	吸收速度下降 30%
[B30ThrOBu] 胰岛素	与肌肉非共价结合	$t_{50} = 10 \sim 20$ h
[B30Lys 酰胺] 胰岛素	升高等电点,形成晶体	同上
[B13Gln, B27Arg, B30Thr 酰胺] 胰岛素	同上	$t_{50} = 25.5$ h
[A21Gly, B27Arg, B30Thr 酰胺] 胰岛素	同上	$t_{50} = 35.3$ h

其中 [A21Gly, B27Arg, B30Thr 酰胺] 人胰岛素,由 Novo 研究所研制,称 Novosol Basal,是目前已知在血液中半衰期最长的一种类似物,可达 35.3 h,远远超过了现在临床使用的胰岛素不溶物制剂。Novosol Basal 已进行临床试验。它的长期效应主要在于 B 链羧端被酰胺化和 B27 位突变后均促使其等电点上升(从 pH 5.4 升至 pH 6.8),而 A21 位突变使其在酸性溶液中也不会脱酰胺,保证了它的稳定性,这样制成 pH 3.0 的可溶制剂,注射后能在生理 pH 条件下形成结晶,延缓了吸收,半衰期因而延长,有利于持续而低剂量胰岛素基础水平的维持^[8]。

半衰期均介于胰岛素和天然胰岛素原之间,有希望发展成为一种新的长效胰岛素。

3 高效胰岛素

高效胰岛素类似物的研究开展较早。如 [B10Asp] 人胰岛素于 1987 年由 Schwartz 等合成,它的体外生物活力和受体结合能力是人胰岛素的 5 倍^[10], [B10Asp (去 B26~B30) B25Tyr 酰胺] 人胰岛素是目前为止人们获得的活力最高的胰岛素类似物,它的体外活力是人胰岛素的 11.7 倍^[11]。此外, Burke 等^[10]还观察到有些突变胰岛素若再增加一个 B10His 突变为 Asp,则活力提高 2~5 倍(表3)。

此外,人们早已注意到胰岛素原在体内的半衰期比胰岛素长,但它的生物活力很低,约为胰岛素的 1/10。近来, Long 等^[9]通过基因表达得到一种新的胰岛素原,与天然产物 B-C-A 的连接方式相反,它是以 A-C-B 的顺序连接。因此,它的 A 链 N 端是自由的,而 N 端自由的 A1Gly 在胰岛素与其受体的结合中起着重要作用。A-C-B 人胰岛素原的生物活力和

虽然目前已获得一些高效胰岛素,它们的体外生物活力和受体结合能力是天然人胰岛素的几倍或十几倍,然而它们的体内活力并不比天然胰岛素高。例如 Ribel 等报道,虽然 [B10Asp] 人胰岛素的体外活力是天然产物的 5 倍,但在体内它只表现出与人胰岛素相同的活力。对这种现象的解释是:体内胰岛素的清

除是通过其受体介导的^[10], 血液中的胰岛素首先和受体结合, 然后才被降解清除掉, 换言之, 胰岛素类似物与胰岛素受体的亲和性越高, 它被清除的速度越快, 在血液循环中存留的时间越短. 因此, 虽然这些类似物具有较高的体外生物活力和受体结合能力, 但进入体内

后由于被清除的速度加快, 而表现不出高生物活力. 因此, 目前的高效胰岛素在应用方面尚未显示出优越于天然胰岛素之处. 不过 Bristow^[12]认为, 由于人体不同组织对胰岛素作用的反应不同, 因而有着不同受体结合能力的胰岛素类似物, 可能在临床有不同的特殊用途.

表 3 B10Asp 突变对胰岛素及类似物活力的影响^[10,12]

化 合 物	生 物 活 力	
	受体结合能力	促脂肪生成能力
猪胰岛素	1.0	1.0
[B10Asp] 胰岛素	5.3	4.4
[A14Trp] 胰岛素	0.4~0.6	0.4~0.6
[A14Trp, B10Asp] 胰岛素	1.2	1.0
[B5Asn] 胰岛素	0.46	0.48
[B5Asn, B10Asp] 胰岛素	1.1	1.7
[B16Phe, B26Phe] 胰岛素	0.30	0.36
[B10Asp, B16Phe, B26Phe] 胰岛素	2.2	1.7
[(去 B26~B30) B25Tyr 酰胺] 胰岛素	2.7	3.3
[B10Asp (去 B26~B30) B25Tyr 酰胺] 胰岛素	11.7	13.5

4 胰岛素分子的受体结合部位

由于胰岛素发挥其生理功能的第一步是与其在细胞膜表面的受体结合, 因此了解胰岛素分子中的受体结合部位的组成和结构, 对研究胰岛素的结构功能关系、作用机制和信号转导的分子基础是十分重要的. 70 年代初, 中国和英国的科学家们几乎同时利用 X 衍射技术解出了猪胰岛素的晶体结构, 开创了胰岛素研究的新纪元, 为人们研究胰岛素分子如何与其受体结合打下了坚实的基础. 并提出胰岛素分子的二聚体形成面很可能与它的受体结合部位部分重合, 推测胰岛素的受体结合部位主要包括 B 链 C 端的 β 转角、 β 折叠和 B9~B19 残基形成的 α 螺旋的一部分, 即主要由如下疏水残基组成: B12Val, B16Tyr, B24Phe, 和 B25Phe, 同时 A 链的 A1Gly, A19Tyr 和 A21Asn 也参与作用^[13,14]. 多年来, 人们研究

了各种胰岛素类似物, 包括化学全合成、化学和酶促半合成、化学或酶促修饰、不同种属动物和基因突变的以及胰岛素家族的其他成员 (如 IGF-I, IGF-II, 和耻骨松弛素等). 可以说, 胰岛素分子中 90% 的氨基酸残基均被修饰或取代过, 获得了大量的实验结果, 基本支持上述胰岛素受体结合部位的假设^[15~17].

但最近, Schaffer 提出在胰岛素分子上可能存在两个受体结合部位, 他比较了 A13 或 B17 被取代的胰岛素类似物分别与完整胰岛素受体 (hIR) 及其可溶性胞外结构域 (sIR) 的结合能力, 发现它们与 sIR 亲和性比 hIR 高, 表明它们参与了受体的结合. A13 和 B17 在天然人胰岛素中都是 Leu, 位于六聚体形成表面, 处于上述胰岛素受体结合部位 (他称其为经典结合部位) 的对面. 因此, Schaffer 认为胰岛素分子具有两个受体结合部位, 经典结合部位为 '结合部位 1' 而由 A13 和 B17 形成

的结合部位为“结合部位 2”(图 2)^[18]. 与此相应, Taouis 等^[19]通过研究胰岛素与野生型、Leu323 突变体和杂交分子 Leu323/ Δ 43 胰岛素受体的结合能力. 认为胰岛素受体的 α 亚基含有两个胰岛素的结合部位, 一个高亲和部位 (H), 一个低亲和部位 (L). 与胰岛素结合时, 两个 α 亚基与一个胰岛素分子结合, 一个 α 亚基贡献 H, 另一个 α 亚基贡献 L, 或相反贡献. 这与上述胰岛素分子具有两个受体的结合部位的假设相呼应.

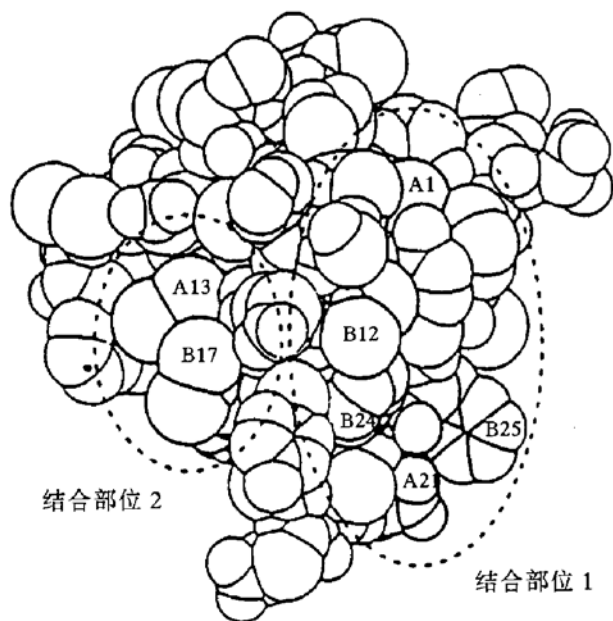


图 2 人胰岛素两个受体结合部位在分子上所处的位置

其中一部分结合部位被 B 链 C 端所掩盖.

此外, 近来通过对小胰岛素原 (mini-proinsulin) 研究, 揭示了胰岛素与受体结合时, 其 B 链 C 端 (主要是 B24~B28 β 折迭) 可能是远离 A 链 N 端, 胰岛素分子发生构象变化, A2 和 A3 残基暴露, 使胰岛素成为活化形式^[20]. 从而说明为什么以肽键连接 B29 和 A1 而形成的小胰岛素原, 其晶体结构虽与天然胰岛素完全相同, 但由于 B 链 C 端被锁定在 A 链 N 端, 而不能运动, 故失去生物活力. Hua 等^[21]用 NMR 测定了不能结晶的 B24Gly 胰岛素的溶液构象, 发现其 B 链 C 端远远离开 A 链 N 端, 且原有二级结构消失, 但它仍保留

78% 胰岛素活力. 该结果进一步支持了上述假设, 即胰岛素 B 链 C 端远离 A 链 N 端, 是其与受体结合所必需的.

综上所述, 随着胰岛素蛋白质工程的发展, 人们已经获得了大量的胰岛素类似物. 对这些类似物的研究, 加深了人们对于胰岛素结构与功能的关系以及胰岛素作用机理的了解. 同时, 人们也获得了一批速效和长效胰岛素, 它们的治疗学性质比天然胰岛素优越, 为改善糖尿病的治疗提供了光明前景. 另一方面, 由于这些类似物对于人体来说, 属于突变蛋白, 可能引起免疫反应, 某些类似物还具有较强的促生长作用. 因此, 在广泛应用于临床之前, 也需要对它们的安全性和生理反应作长时间的动物和人体试验.

参 考 文 献

- 1 Drejer K. Diabetes/Metabolism Reviews, 1992; 8 (3): 259
- 2 Brange J, Owens D R, Kang S *et al.* Diabetes Care, 1990; 13: 923
- 3 Brange J, Dodson G G, Xiao B. Curr Opin Struc Biol, 1991; 1: 934
- 4 Howey D C, Bowsher R R, Brunelle R L *et al.* Diabetes, 1994; 43: 396
- 5 Kang S, Wwens D R, Vora J D *et al.* Lancet, 1990; 335: 303
- 6 DiMarchi R D, Mayer J P, Fan L *et al.* In: Smith J A eds. Peptides-chemistry and biology. The 20th American Peptide Symposium, Boston, 1991, ESCOM, 1992: 26
- 7 Shoelson E S, Lu Z-X, Parlaunt L *et al.* Biochemistry, 1992; 31: 1757
- 8 Jorgensen S, Vaag A, Langkjaer L *et al.* Br Med J., 1989; 299: 415
- 9 Long H B, Belagaje R M, Brooke G S *et al.* In: Smith J A eds. Peptides-chemistry and biology. The 20th American Peptide Symposium, Boston, 1991, ESCOM, 1992: 93
- 10 Burke G T. Biochem Biophys Res Commun 1990; 173: 982
- 11 Ribel U. Diabetes, 1990; 39: 1033
- 12 Bristow A F. TIBTECH, 1993; 11: 301
- 13 Adams M T, Blundell T L. Nature, 1969; 224: 491
- 14 Peking Insulin Structure Research Group. Sci Sin, 1972; 15: 3
- 15 Insulin Research Group. Sci Sin, 1974; 17: 799
- 16 Pullen R A, Lindsay D G. Nature (London), 1976; 259: 369
- 17 Liang D-C Chang W-R, Zhang J-P *et al.* Science in China (B), 1992; 35: 547
- 18 Schaffer L. Eur J Biochem, 1994; 221: 1127
- 19 Taouis M, Levy-Toledano R, Roach P *et al.* J Biol Chem,

1994; 269 (21): 14912

20 Derewenda U, Derewenda Z, Dodson E T *et al.* J Mol Biol, 1991; 220: 425

21 Hua Q X, Shoelson S E, Kochoyan M *et al.* Nature, 1991; 354: 238

Progresses in the Study on Insulin Protein Engineering. Wang Qionqing, Feng Youmin (*State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract The insulin protein engineering is

quickly progressing. The recent progresses in the studies of fast-acting, slow-acting and high potent-acting insulins, including their molecular design, biological activity and clinical prospect, which were obtained by means of protein engineering are introduced. The progresses in the receptor binding sites of insulin and the intereaction of insulin with its receptor is also discussed.
Key words insulin protein engineering, fast-acting insulin, long-acting insulin, insulin receptor

从超氧化物歧化酶的分布和结构看其分子进化

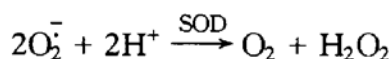
陈淮杨 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 超氧化物歧化酶(SOD)是一种催化超氧化物阴离子自由基发生歧化反应,生成氧和过氧化氢的金属酶。按其结合的金属离子,区分为Fe-SOD, Mn-SOD和CuZn-SOD三种。Fe-SOD主要存在于原核细胞中; Mn-SOD在原核和真核细胞中都存在; CuZn-SOD主要存在于真核细胞中。Fe, Mn-SOD的一级结构,空间结构及其性质很相似,来自一个共同的祖先; CuZn-SOD的结构与前两者相差较大,是在以后的发展中单独进化的。

关键词 超氧化物歧化酶, 分布, 一级结构, 空间结构, 分子进化

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, EC 1.15.1.1)是一种广泛存在于动物、植物和微生物中的金属酶^[1]。它催化超氧化物阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)发生歧化反应,从而清除 $O_2^{\cdot-}$ 。



SOD在维持生物体内超氧阴离子自由基产生与消除的动态平衡中起着重要的作用。它可以防御氧毒性,增强机体抗辐射损伤能力,还可以预防衰老,在一些疾病(如肿瘤、炎症及自身免疫疾病等)的治疗中具有良好的疗效。目前国内对SOD的研究主要集中在应用以及与应用直接相关的基础理论的研究上。

SOD已进入化妆品、食品和医药等领域。无可置疑,SOD的研究与应用,有不可估量的前景。

SOD按其结合的金属离子,可分为Fe-SOD, Mn-SOD和CuZn-SOD三种,前两者性质很相似。但在蛋白质一级结构、空间结构、分子量、光谱性质及对不同抑制剂的敏感性等方面,与后者差别较大。一般来说,Fe、Mn-SOD是原核生物酶,而CuZn-SOD是真核生物酶,由此引出了SOD进化方面的研究,一般认为Mn、Fe-SOD起源很早,来自共同的祖先,而CuZn-SOD是在以后的发展中单独进