

精氨酸修饰 FGF21 及修饰后蛋白体内稳定性和糖代谢调节作用的研究^{*#}

何 昆¹⁾ 张雅坤¹⁾ 叶贤龙¹⁾ 王文飞¹⁾ 陈 睿¹⁾ 刘铭瑶¹⁾ 冯明芳¹⁾ 许嘉玲²⁾ 李德山^{1)**}

(1) 东北农业大学生命科学学院生物制药教研室, 哈尔滨 150030)

2) 布里斯托医学与兽医学学院, 布里斯托 BS28DZ)

摘要 成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor21, FGF21) 是 2000 年发现的一个不依赖胰岛素调节血糖的细胞因子, 有望成为治疗糖尿病的候选药物.但是, 野生型 FGF21 由于半衰期较短, 在体内不稳定, 从而影响了它的成药性.为提高 FGF21 的稳定性, 本实验在 FGF21 的 C 末端添加了 2 个精氨酸 (Arginine, Arg), 命名为 FGF21-2A, 用 Compute pI/Mw 软件计算之后, 等电点 (isoelectric point, PI) 从 5.43 上升到 5.84, 随后进行了蛋白的表达、分离纯化、体内稳定性及糖代谢调节作用的研究.诱导表达后菌液的 SDS-PAGE 胶图经 BandScan5.0 分析后显示 FGF21-2A 的表达量相对于野生型 FGF21 提高了 10.6%.家兔体内半衰期检测实验结果显示 FGF21-2A 的半衰期显著延长.GOD-POD 法检测 HepG2 肝癌细胞葡萄糖吸收实验、糖尿病小鼠降血糖实验和肝糖原检测实验的结果证明, FGF21-2A 的降糖效果得到了增强, 并且持续时间相对于野生型 FGF21 显著延长.Real Time PCR 结果发现, 长期注射 FGF21-2A 显著提高了糖尿病小鼠肝脏内葡萄糖转运蛋白 (GLUT) 1 和葡萄糖激酶 (GK) 的 mRNA 的表达量, 降低了葡萄糖-6-磷酸酶 (G6P) 的 mRNA 表达量, 表明 FGF21-2A 调节糖代谢的机制与野生型 FGF21 一致.综上所述, 精氨酸修饰 FGF21 后增加了蛋白质的稳定性, 进而增加了 FGF21 对血糖的调控效果, 为糖尿病药物的发展做出了贡献.

关键词 FGF21-2A, 精氨酸, 稳定性, 生物活性

学科分类号 R963, Q816

*黑龙江省科技厅重点攻关项目 (编号: 2006G0461-00)

#东北农业大学博士启动基金项目 (合同编号: 2010RCB52)

**联系人: 电话: 0451-55190645, E-mail: deshanli@163.com

收稿日期: 2012-03-08 接受日期: 2012-06-29

成纤维细胞生长因子-21 (FGF21) 是成纤维细胞生长因子家族的一名新成员, 主要在肝脏中表达^[1]. 在 β -Klotho 的参与下^[15], FGF21 在体外能够促进 3T3-L1 脂肪细胞和人原代脂肪细胞吸收葡萄糖, 增强胰岛细胞功能. 动物实验中, FGF21 能够降低血糖、降低甘油三酯 (TG)、升高高密度胆固醇脂蛋白 (HDL)、降低低密度胆固醇脂蛋白 (LDL), 减少肝脏和血管的脂肪蓄积等效应, 并且不会产生低血糖、体重增加及水肿等常规降糖药物所带来的副作用^[3,4,13,18]. FGF21 安全、可靠、不依赖胰岛素调节血糖的特点, 使其有望成为治疗糖尿病的新型药物^[25].

目前, 国内外多家实验室和公司都对野生型 FGF21 进行了很深入的研究, 不断有文献报道 FGF21 的生物学功能及相应的机理研究, 然而, 如果能把 FGF21 发展成为临床应用药物, FGF21 的体内稳定性差的缺点势必要得到解决. 因此, 人为对野生型 FGF21 进行修饰或改造已经成为热点课题之一. 胰岛素也出现过相同情况, 野生型胰岛素由于半衰期短, 在治疗过程中需要频繁给药, 不仅给糖尿病患者带来了极大地不方便, 也增加了副作用的产生, 于是出现了鱼精蛋白锌胰岛素、甘精胰岛素、地特胰岛素等长效和超长效胰岛素类似物.

精氨酸作为一种碱性氨基酸, 在生理条件下带正电荷, 在改善酸性蛋白的稳定性方面具有广泛的应用. 甘精胰岛素通过将人胰岛素 A 链羧基端第 21 位的天冬氨酸 (Asn) 替换成甘氨酸 (Gly) 以增加六聚体的稳定性, 在 B 链羧基端第 31 位和 32 位连接了 2 个精氨酸 (Arg) 将等电点从 5.4 提高到 6.7. 经上述分子改变的胰岛素注射到皮下组织 (中性环境) 后, 可形成微沉淀物. 这种沉淀物的形成使胰岛素的分解、吸收及作用时间延长, 可持续 24h, 并且不产生明显的血浆峰值浓度, 血药浓度曲线平坦^[10,11,12]. 本研究借鉴甘精胰岛素的成功范例, 在 FGF21 的羧基端的 182 位和 183 位连接了 2 个精氨酸, 蛋白等电点从 5.43 提高到 5.87, 经稳定性实验和药效学实验证明, 改造后 FGF21 的体内稳定性和降糖作用都得到了增强, 并且延长了作用时间.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 质粒 pMD18-T-FGF21 由本实验室提供. 受体菌 E.coli 菌株 DH5a、Rosetta (DE3) 由本实验室提供. pMD18-T Simple 克隆载体购自 TaRaKa 公司, pSUMO 载体由实验室自己构建. 亲和层析柱 HisTrapTM FF crude column 和脱盐柱 HiPrepTM 26/10 Desalting 购自 GE 公司. HPLC 分子筛柱 BiosuitTM250 HR 购自 Waters 公司. 兔抗鼠 FGF-21 多克隆抗体由东北农业大学生物制药教研室制备, 经标准蛋白验证; HRP 标记的二抗为羊抗兔抗体购自 R&D 公司; 其他化学试剂为分析纯为国药集团化学试剂有限公司产品.

1.1.2 酶和主要生化试剂 Taq DNA 聚合酶、Bsa I、BamH I 购自 New England Biolabs 公司; dNTPs、T4 DNA 连接酶、IPTG (异丙基硫代- β -D-半乳糖苷)、溶菌酶和氨苄青霉素 (Amp) 均购自 TaKaRa 公司; SUMO 蛋白酶 I 由本实验室提供. DNA 回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司. 链脲佐菌素 (STZ) 购自 Sigma 公司.

1.1.3 PCR 引物和实时荧光定量 PCR 引物由 Invitrogen 公司合成.

PCR 引物: P1: 5' GGTCTCTAGGT CACCCCATCCCTGACTCCAGT

P2: 5' CGCGGATCCTTACCGCCGGGACGCATAGCTGGGGCTTCGG 3'

实时荧光定量 PCR 引物:

GLUT1 上游引物为 5'-CCATCCACCACTCAACCAC-3',

GLUT1 下游引物为 5'-GCCCAGGATCAGCATCTCAA-3';

GK 上游引物为 5'-GGAGACCAGCCCTGTTAAGCT-3',

GK 下游引物为 5'-GTCCACTGCTCCCACCAATG-3';

G6P 上游引物为 5'-TCAACCTCGTCTTCAAGTGGATT-3',

G6P 下游引物为 5'-GCTGTAGTAGTCGGTGTCCAGGA-3'.

1.1.4 健康成年昆明小鼠, 雄性, 普通级, 购于哈尔滨兽医研究所. 健康成年清洁级 db/db 雄性 2 型糖尿病小鼠, 购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物质量合格证号 SCXK (沪) 2010-0005.

1.2 等电点计算

Compute pI/Mw 是 ExPASy 网站收录的一款专业计算蛋白质 pI 值和分子量 (molecular weight, Mw) 的软件, 直接输入目的蛋白的序列到操作框, 点击计算.

1.3 原核表达载体的构建

以 P1、P2 为引物, 引物序列见 1.1.3, pMD18-T-FGF21 为载体, 扩增 FGF21 基因. 扩增获得的基因 5' 端带有 Bsa I 酶切位点, 3' 端带有 BamH I 酶切位点. PCR 产物进行胶回收并与载体 pMD18-T Simple 相连, 所得质粒经酶切鉴定正确后测序确认 2 个精氨酸是否连接到 FGF21 的羧基端. 将测序正确的 FGF21 通过 Bsa I、BamH I 构建在带有 His 标签的原核表达载体 pSUMO (pSUMO-FGF21) 上, 酶切鉴定后测序分析其正确性.

1.4 融合蛋白的表达和纯化

将含有正确序列的重组质粒 pSUMO-FGF21-2A 和 pSUMO-FGF21 转化至表达菌株 Rosetta, 转化后的单菌落接种至 20mL 的含氨苄青霉素 (100u/ml) LB 培养基中, 37℃ 培养 10h; 以 1: 100 接种于 500 mL 的含氨苄青霉素 (100u/ml) LB 培养基中, 37℃ 培养 2h, A600 为 0.3~0.4 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L 进行 30℃ 诱导, 6h 后, 取相同干重的菌体及破碎菌体后的上清和沉淀进行 12% SDS-PAGE 电泳确定融合蛋白是否可溶性表达, 并用 BandScan5.0 分析 FGF21-2A 和 FGF21 的表达水平. 菌体经超声破碎后离心, 上清液经 HisTrapTM FF crude column 亲和层析, 用杂蛋白洗脱液 (40mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 50mmol/L Na3PO4, pH7.4) 洗去杂蛋白后, 用洗脱液 (500 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Na3PO4, pH7.4) 洗脱融合蛋白, 收集洗脱的峰.

1.5 融合蛋白 SUMO-FGF21 的脱盐、酶切及成熟蛋白的回收

融合蛋白经 HiPrepTM 26/10 Desalting 脱盐后, 收集脱盐峰. 收集的融合蛋白加入 SUMO 蛋白酶 I 和终浓度 2 mmol/L 的 DTT, 4℃ 过夜切割, 再经 HisTrapTM FF crude column 收集紫外吸收峰, 12% SDS-PAGE 电泳检测, 并用 HPLC BiosuitTM250 高效分子筛柱分析成熟蛋白的纯度.

1.6 药代动力学实验

将 6 只家兔分成 2 组, 将 FGF21 和 FGF21-2A 以 0.2mg/kg 的剂量分别皮下注射家兔, 耳静脉取注射蛋白 1.5h、2h、3h、4h 和 5h 后的血液, 12000rpm, 离心 10min, 吸取血清并用 Elisa (直接法) 进行检测. 在同一 96 孔板上, 用不同浓度 (50, 5, 0.5, 0.05, 0.005ug/ml) 的野生型 FGF21 蛋白制作标准曲线, 将不同时间点取的血清包被 96 孔板过夜, 然后用鼠抗人 FGF21 抗体作为一抗 37℃ 孵育 1h, HRP 标记的羊抗鼠抗体作为二抗 37℃ 孵育 1h, 加上显色液和终止液后立即在 492nm 下检测各组样品的吸光值. 然后根据各组吸光值绘制 FGF21-2A 和 FGF21 在家兔体内的清除曲线, 得到曲线的斜率之后, 按照公式 $t_{1/2} = 0.693/k_e$ (k_e 是清除曲线的斜率) 计算 FGF21-2A 和 FGF-21 的半衰期.

1.7 HepG2 肝癌细胞糖代谢细胞模型评价蛋白生物活性

本实验通过微量化的 GOD-POD 法在细胞水平上检测培养基中的葡萄糖含量[7]. 将体外培养的 HepG2 细胞饥饿 12h, 然后分别用 1000 nmol/L FGF21 和 1000 nmol/L FGF21-2A 蛋白单独处理 HepG2 细胞, 在 24h、30h 和 36h 分别取培养上清液 2ul 放入 200ul 的葡萄糖检测液中测定葡萄糖的含量. 每组数据重复 3 次, 并用统计学分析实验结果.

1.8 体内药效学实验

糖尿病鼠模型包括实验室自己使用 STZ 注射昆明小鼠建立的 I 型糖尿病鼠和 Db/Db 小鼠自发形成的 II 型糖尿病鼠。I 型糖尿病鼠模型制备: 采用 6~8 周龄的昆明种雄性小鼠, 体重约为 25~30g; 禁食不禁水 8~12 h, 以 40mg/kg 剂量腹腔注射 STZ, 间隔 3 日重复, 注射 3 次后, 在第 10 天确认小鼠是否成模。糖尿病鼠模型建立标准: 具有糖尿病“三多一少”的症状, 如多饮、多食、多尿、体重减少; 小鼠空腹血糖值 >11.1 mmol/L。

将两种模型鼠分成三组 (STZ 鼠每组 5 只, db/db 鼠每组 4 只): 空白对照组 (0.9%生理盐水)、阳性对照组 (每天注射 0.75mg/kg FGF21) 和实验组 (每天注射 0.75mg/kg FGF21-2A)。实验开始后, 于每日上午 8 点, 通过皮下给药的方式按照不同的处理方式注射 2 种不同的动物模型。注射后每日上午 8 点检测 1 次血糖, 并观察停药后血糖变化情况。

1.9 长期注射 FGF21 蛋白后 I 型糖尿病鼠的肝糖原检测

迅速将待测模型动物处死, 取肝脏经生理盐水漂洗后用滤纸吸干, 精确称取肝脏 200mg, 加入 4ml 5% 三氯醋酸 (TCA), 每管匀浆 1min, 将匀浆液倒入离心管, 以 3000r/min 离心 15min, 将上清液转移至另一试管内。在沉淀中再加入 4ml TCA, 匀浆 1min, 再次离心 15min, 取上清液, 并与第一次离心的上清液合并, 充分混匀。取 1ml 上清液放入 10ml 离心管中 (每样品可做两平行管以保证获得可靠结果), 每管加入 95% 的乙醇 4ml, 充分混匀至两种液体间不留有界面, 室温下竖立放置过夜。沉淀完全后, 将试管于 3000r/min 离心 15min, 倒掉上清液并使试管倒立放置 10min。用 2ml 蒸馏水溶解糖原。将 10ml 蒽酮试剂加入各管并放在冷水龙头下冲凉。在所有管子都达到凉水温度后, 将其浸于沸水浴 (水浴深度略高于管子液面) 15min, 然后移到冷水浴, 冷却到室温。将管内液体移入比色管, 在 620nm 波长, 用试剂空白管调零后测定吸光度。并根据标准曲线计算出糖原含量, 根据所称取的肝脏重量换算成肝糖原含量 (以 mg/100g 肝表示), 每个样品重复至少 3 次, 并进行统计学处理。试剂空白管仅含有 2ml 蒸馏水, 标准管是 0.5mg 葡萄糖溶解在 2ml 蒸馏水中。

1.10 Real Time PCR 检测相关代谢因子

迅速将待测模型动物处死, 取肝脏经生理盐水漂洗后放置于液氮中, 然后用 Trizol 法提取肝脏总 RNA。以总 RNA 为模板, Oligo(dT)15 为引物合成相应的 cDNA。以 β -actin 的表达情况为内参, 利用实时荧光定量 PCR 方法检测模型动物肝脏内糖代谢相关因子 GLUT1、GK、G6P 的表达变化。引物序列见 1.1.3。反应体系为 20ul, 2.0ul cDNA 模板, 10.0ul SYBR Premix Ex TaqTM (2 $\times$), 0.4ul PCR 正反引物 (10 mol/L), 0.4ul ROX Reference Dye II (50 $\times$), 灭菌三蒸水补足至 20ul (内参和目的片段同批扩增)。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10s, 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 31s, 40 个循环。每次扩增均设由三蒸水代替模板的空白对照, 每个样品至少重复 3 次。使用相对定量分析方法 (2 $^{-\Delta\Delta Ct}$ 法) 对目的基因进行相对定量。

1.11 数据分析

应用 SPSS11.1 统计分析软件对结果进行处理。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 FGF21 改造及表达载体的鉴定

野生型 FGF21 片段大小为 546bp。通过下游引物引入两个 Arg, PCR 获得目的基因, 连接到 T 载体上进行扩增, 并用 Bsa I、BamH I 双切鉴定 (图 1), FGF21-2A 大小为 552bp, 将目的片段胶回收后, 连到 pSUMO 载体上, 构建表达载体 pSUMO-FGF21-2A, 测序结果 (图 2) 表明 2 个精氨酸连接正确。

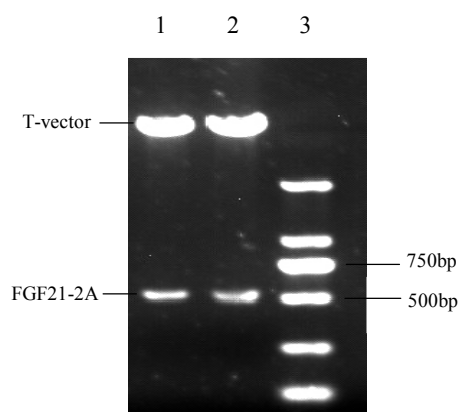


Fig.1 Agarose gel analysis of pMD18-T-FGF21-2A and pMD18-T-FGF21. 1: pMD18-T-FGF21-2A vector digest with Bsa I and BamH I ; 2: pMD18-T-FGF21 vector digest with Bsa I and BamH I . 3: DL2000 Marker.

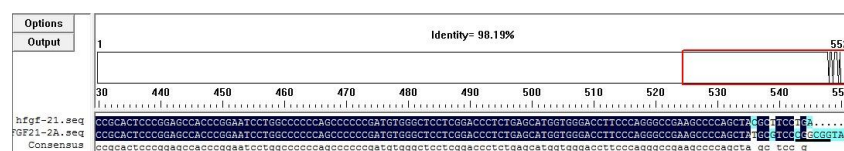


Fig.2 DNA sequence comparison between FGF21 and FGF21-2A. DNA Sequences of FGF21 and FGF21-2A were compared by DNAMAN, which showed that two arginines connected correctly.

2.2 重组质粒 pSUMO-FGF21-2A在大肠杆菌中的表达

将含有重组质粒pSUMO-FGF21-2A和pSUMO-FGF21的Rosetta菌株接种后诱导，加入IPTG，30℃诱导6h后取样电泳分析.诱导表达后菌液的SDS-PAGE胶图（图3），SUMO-FGF21-2A融合蛋白电泳带位于分子质量约为40kD处,大部分在上清中表达，并且经BandScan5.0分析后，菌量干重相同的条件下，FGF21的表达量占菌体总表达量的35.8%，而FGF21-2A占菌体总表达量的46.4%，比野生型高出10.6%。

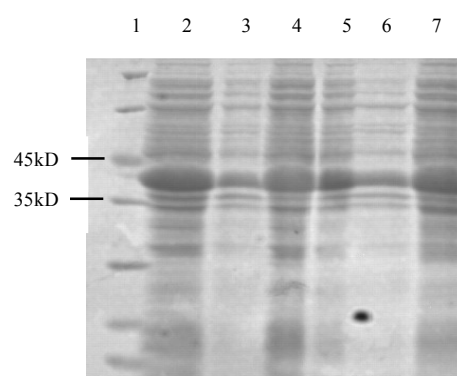


Fig.3 SDS-PAGE gel analysis of express products of fusion protein in SUMO express system. 1: Protein molecular weight marker; 2: Lysates of Rosetta cells harboring recombinant pSUMO-FGF21-2A vector after 6h induction; 3: Sediment of the lysates in lane 2; 4: Supernatants the lysates in lane 2; 5: Supernatants the lysates in lane 7; 6: Sediment of the lysates in lane 7; 7: Lysates of Rosetta cells harboring recombinant pSUMO-FGF21 vector after 6h induction.

2.3 FGF21-2A纯化及检测

收集的菌体，经超声破碎离心，上清液经HisTrapTM FF crude column亲和层析，经HiPrepTM 26/10 Desalting脱盐，收集的融合蛋白中直接加入SUMO蛋白酶 I 和终浓度为2mmol/L的DTT，30℃切割2h，再经HisTrapTM FF crude column亲和层析，在SUMO标签被切除后，FGF21-2A直接流穿.最后用12% SDS-PAGE电泳检测.如图4，切割效率可达到90%以上，且无氨基酸残基残留，纯化后的成熟蛋白分子质量大约为20kD。

所得成熟蛋白经HPLC分析后纯度达到95%以上, 如图5.

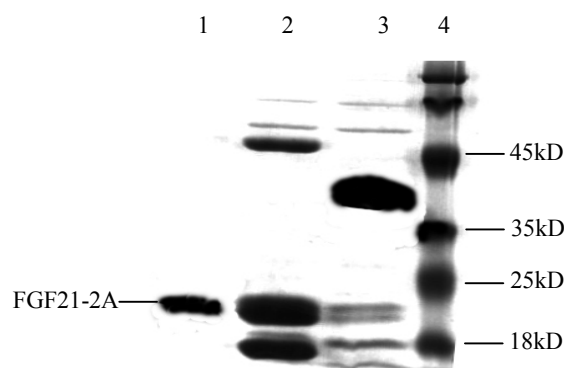


Fig.4 SDS-PAGE gel Analysis of purified FGF21-2A. 1:Mature FGF21-2A protein; 2:Cleavage products of SUMO-FGF21-2A fusion protein with SUMO protease I; 3: Purified SUMO-FGF21-2A fusion protein; 4: Protein molecular weight marker.

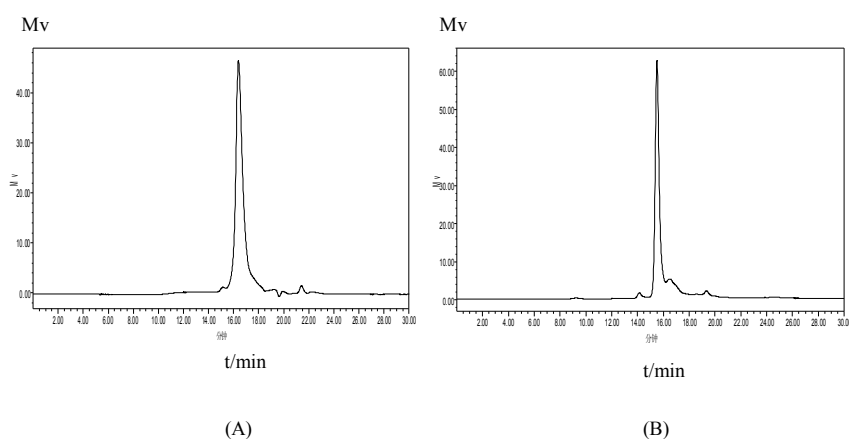


Fig.5 HPLC analysis of purified FGF21 and FGF21-2A. As seen from the chromatogram, the y-axis indicates the absorbance(280nm), while the x-axis represents elution time (min). The main peak eluted at 15.5 min. The purity of purified FGF21(A) and FGF21-2A(B) were both greater than 95%.

2.4 精氨酸修饰显著延长FGF21的半衰期 将家兔分组后, 分别皮下注射FGF21和FGF21-2A, 从耳静脉抽取各时间点的血清之后, 进行Elisa检测, 根据Elisa结果绘制清除曲线(图6), A492值越高说明血清中FGF21蛋白剩余的越多, 从2h开始, FGF21-2A的剩余量相对于野生型FGF21差异极显著.5h时, 野生型FGF21消失殆尽, 而通过标准曲线计算之后, FGF21-2A在血清内的含量为0.55ug/ml.根据 $t_{1/2} = 0.693/k_e$ 计算之后, FGF21的半衰期是35min, FGF21-2A的半衰期是103min, 说明FGF21-2A半衰期显著延长.

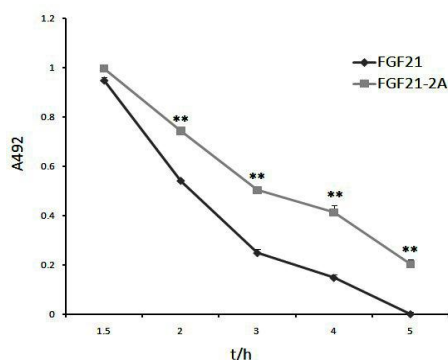


Fig.6 Pharmacokinetics studies of FGF21 and FGF21-2A in rabbit. Rabbits were injected intravenously with 0.2 mg/kg FGF21 or FGF21-2A. Blood samples were collected at various time points. The amount of rhFGF21 was measured by ELISA. A standard curve was made for each FGF21. The values (x±s) shown are the average of 3 independent measurements. **P < 0.01 (Student t test, FGF21-2A group vs FGF21 group).

2.5 FGF21-2A具有更好的调节细胞葡萄糖代谢的作用并能持续更长的时间

用1000 nmol/L 的FGF21-2A和FGF21处理细胞后,分别取24h、30h和36h细胞培养上清液2ul,放入200ul的葡萄糖检测液中测定葡萄糖的含量.细胞活性结果(图7)显示两种FGF21蛋白均能促进HepG2细胞消耗葡萄糖,经FGF21-2A处理24h后的细胞的糖吸收率是55.01%,相对于空白组提高了23.88%,经FGF21处理24h后的细胞的糖吸收率是46.91%,相对于空白组提高了15.77%, FGF21-2A的促进效果相对于FGF21差异极显著.并且随着作用时间的延长(30h, 36h), FGF21-2A效果更显著,以此推测FGF21经精氨酸修饰后生物活性与稳定性都得到了提高.

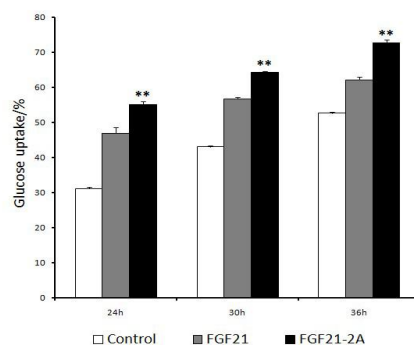


Fig.7 Effects of FGF21 and FGF21-2A on glucose uptake of HepG2 cells The glucose uptake of HepG2 cells treated with FGF21(1000nmol/L) and FGF21-2A(1000nmol/L). Control: no stimulation control. **P < 0.01 (Student t test, FGF21-2A vs FGF21).

2.6 FGF21-2A在糖尿病模型动物体内的降糖效果和长效性均优于FGF21

按方法中介绍的剂量、分组及给药方式,对两种模型鼠给药, I 型糖尿病鼠连续给药1个月, II 型糖尿病鼠则连续给药两个星期,分别检测血糖.所获得数据经统计学分析后, I 型糖尿病鼠结果(图8)显示,随着蛋白的长期注射, FGF21-2A在降血糖方面的能力相对于FGF21差异逐渐显著,给药到24天时,注射 FGF21-2A的糖尿病小鼠的血糖水平(8.42mmol/L)趋于正常组小鼠(8.40mmol/L),并且在停药后,在维持血糖水平方面,两者差异极显著; II 型糖尿病鼠结果(图9)基本上与 I 型一致,从给药第12天开始, FGF21-2A注射组小鼠血糖含量相对于FGF21注射小鼠血糖含量差异显著,并且在维持血糖水平方面差异极显著,表明无论是 I 型糖尿病小鼠还是 II 型糖尿病小鼠的药效学实验, FGF21-2A的降糖效果和长效性均优于FGF21.

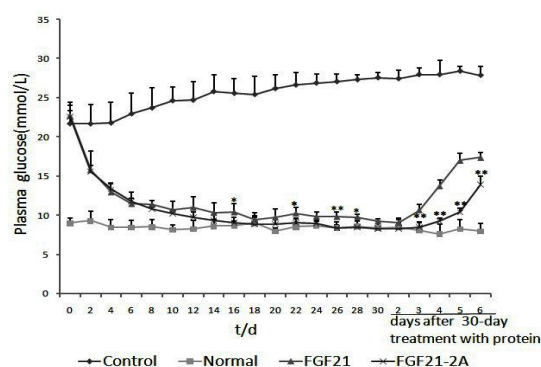


Fig.8 Anti-diabetic effects of FGF21 and FGF21-2A in type 1 diabetic mice. Diabetic mice were treated with either FGF21 or FGF21-2A at 0.75mg/kg daily for 1 month. Control: 0.9% NaCl-treated diabetic group; Normal: normal control rats. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. *P < 0.05, **P < 0.01 (Student t test, mice treated with FGF21-2A vs mice treated with FGF21).

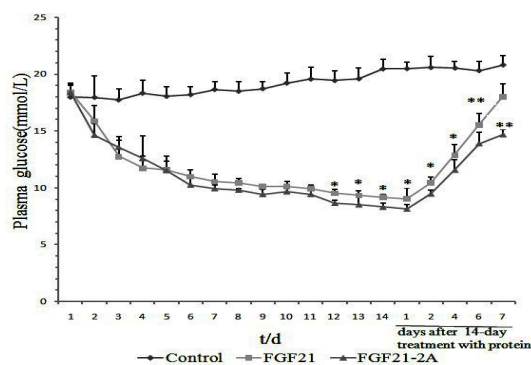


Fig.9 Anti-diabetic effects of FGF21 and FGF21-2A in type 2 diabetic mice. Diabetic mice were treated with either FGF21 or FGF21-2A at 0.75mg/kg daily for 2 weeks. Control: 0.9% NaCl-treated diabetic group. *P < 0.05, **P < 0.01 (Student t test, mice treated with FGF21-2A vs mice treated with FGF21).

2.7 FGF21-2A能更好的促进肝糖原的合成

药效学实验结束后，将实验小鼠处死，收获新鲜的肝脏，经蒽酮法检测肝糖原含量（图10），停药后，FGF21-2A注射组小鼠肝脏糖原含量为34.10mg/kg，FGF21组小鼠肝脏糖原为28.40mg/kg.结果表明，两种FGF21都能促进肝脏合成糖原，与未经任何处理的模型对照组老鼠(14.43 mg/kg)相比差异极显著，并且注射FGF21-2A组小鼠肝糖原合成量显著高于注射FGF21组，进一步证明FGF21-2A的生物学活性得到了增强。

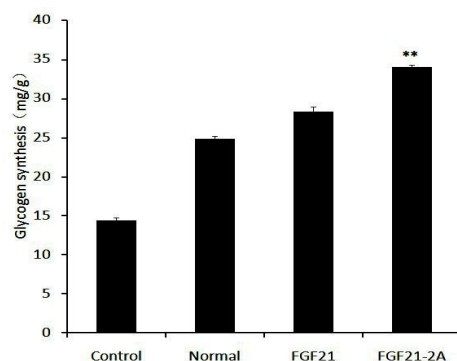
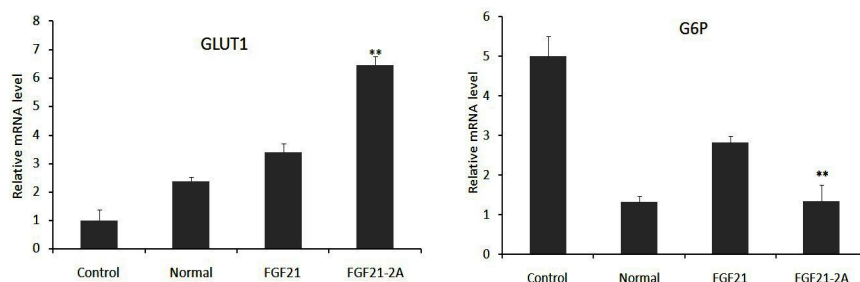


Fig.10 The glycogen synthesis of type 1 diabetic mice. Diabetic mice were treated with either FGF21 or FGF21-2A at 0.75mg/kg daily for 1 month. Control: 0.9% NaCl-treated diabetic group; Normal: normal control mice. **P < 0.01 (Student t test, mice treated with FGF21-2A vs mice treated with FGF21).

2.8 FGF21-2A对肝脏糖代谢相关因子的调节

I型糖尿病小鼠分别连续注射一个月FGF21和FGF21-2A后，处死并提取肝脏总RNA，以反转录后的cDNA为模板，用特异性引物进行实时荧光定量PCR扩增检测模型动物经不同处理后GLUT1、GK和G6P mRNA的表达变化，以生理盐水处理的模型动物为空白对照，以生理盐水处理的正常昆明小鼠为正常对照.由图11可以看出，与空白对照组相比，FGF21-2A调节糖代谢的机制与FGF21一致，显著上调了GLUT1和GK的，下调了G6P的mRNA水平.其中，注射FGF21-2A后GLUT1 mRNA的表达量增加了6.47倍，较FGF21组（3.39倍）差异极显著；G6P mRNA的表达量下降值对照组水平的0.27倍，较FGF21组（0.57倍）差异极显著。



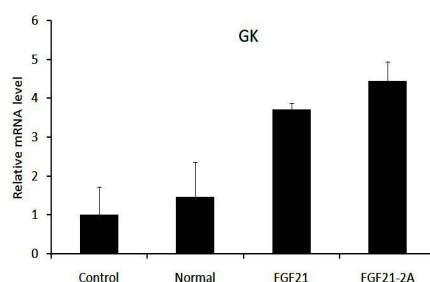


Fig.11 FGF21-2A and FGF21 modulate GLUT1, G6P and GK mRNA expression. Quantitative PCR was used to measure mRNA levels. GLUT1 and GK mRNA levels were all increased. G6P mRNA level was significantly decreased. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. $^{**}P < 0.01$ (Student t test, mice treated with FGF21-2A vs mice treated with FGF21).

3 讨论

近年来,随着生物技术的飞速发展,重组蛋白类药物已成为生物制药研发的主要方向.同传统的化学药物以及中草药相比,重组蛋白药物往往是体内正常生理活性蛋白质或者是活性蛋白的类似物,其药理活性高,安全性好,截止到目前已有几十种重组蛋白药物上市或正在进行临床研究.但是,由于蛋白多肽在血浆中半衰期较短,为了维持一定的疗效经常需要大剂量反复用药,容易增加病人的痛苦并引发一系列副作用.因此在药物研发中,研发人员往往通过蛋白的化学修饰、氨基酸突变、基因融合以及纳米颗粒包埋等方法,延长蛋白的半衰期,进而提高蛋白的生物活性.

精氨酸是一种碱性的含有胍基的极性 α 氨基酸,在生理条件下带正电荷,并且精氨酸作为亲水性的氨基酸,在蛋白形成空间结构时一般都暴露在蛋白质表面,易于被细胞膜外层带负电荷的磷酸基团捕获,进而可以帮助目的蛋白靠近和结合细胞膜^[23,24].因此FGF21融合精氨酸后可增加蛋白与细胞的结合率,促进细胞膜上FGF21受体与FGF21结合,从而提高蛋白药物疗效.此外,作为碱性氨基酸,添加精氨酸可提高酸性蛋白的等电点,有效延长酸性蛋白在体内的半衰期,达到蛋白长效性改造的目的.甘精胰岛素就是通过添加了两个精氨酸将胰岛素等电点上调至6.7,使它能够在中性环境下形成微沉淀,进而延长了胰岛素在体内的半衰期.Rosenstock J^[21]等在一项为期4周的试验中,256例1型糖尿病患者分别给予NPH胰岛素和甘精胰岛素,结果甘精胰岛素组比NPH组明显降低了空腹水平,而且甘精胰岛素组的空腹血糖水平更加稳定.Gillies^[22]等报道的4项持续28周的大型实验结果也显示,甘精胰岛素在改善1型糖尿病患者血糖控制上更加有效,并且降低了夜间低血糖的发生率.

FGF21能够独立、安全以及有效的调节生物体内血糖水平能力的发现,让我们看到了治疗由胰岛素抵抗导致引起的糖尿病的曙光^[9].但诸多前期研究表明,FGF21半衰期短,容易降解,从而影响其治疗效果.目前, Eli Lilly、Ambrx、Amgen 等公司都陆续投入到该因子的药用开发,通过对野生型FGF21进行了PEG^[19]和Fc^[20]修饰,以获得长效FGF21类似物用于后期临床研究,但迄今为止很少见在基因水平上对FGF21进行修饰的文章.而且,笔者认为,在基因水平上对FGF21的末端进行修饰是FGF21修饰策略的首选,这种方法不仅极大地减少了成本,还保证了较高的同源性.

本研究在FGF21蛋白的C端添加2个精氨酸,希望利用精氨酸的亲水性和极性来增加蛋白的稳定性,延长半衰期.结果证明,该突变蛋白获得了与预期结果.家兔半衰期试验中,修饰后的FGF21的半衰期延长至103min,是野生型FGF21的3倍左右.在细胞活性试验中, FGF21-2A在24h、30h、36h均显示出较强并且稳定的刺激HepG2吸收葡萄糖的能力,而FGF21随着时间的延长,刺激糖吸收的能力越来越弱.动物试验结果与细胞实验结果一致, FGF21-2A对糖尿病小鼠血糖代谢的调控效果更好,并且停药后能将血糖维持在较低水平.这些结果都体现了FGF21经精氨酸修饰后,生物活性和稳定性都得到了提高.当然,精氨酸是否是FGF21

在氨基酸修饰方面的最佳选择,继续添加精氨酸是否还能更好的改善FGF21的生物学功能还需要更多的后续试验来证明.需要指出的是,添加或者修改的氨基酸的数量不能太多,防止修饰后蛋白由于改动较大而具有较高的免疫原性.

本研究从肝脏来研究FGF21-2A糖代谢调节的机制是因为肝脏不仅是人体最重要的代谢器官之一,还是FGF21作用的靶器官之一^[26,27].糖原检测结果表明,FGF21-2A和FGF21长期注射模型动物均可促进动物肝脏组织糖原的合成,并且 FGF21-2A促糖原合成能力最为显著.同时,实时定量 PCR 结果表明,长期注射FGF21-2A显著提高了糖尿病小鼠肝脏内GLUT1和GK的mRNA的表达量,降低了G6P的mRNA表达量.表明FGF21-2A是通过增加葡萄糖的转运和糖酵解途径,促进肝糖原合成作用,降低糖异生的机制来调节模型动物的糖代谢.

综上所述,本研究以增加FGF21稳定性为目的,作者参考甘精胰岛素的改造方法,在FGF21的羧基端添加2个精氨酸,分别运用SUMO高效表达系统及AKTApurifier 100系统进行表达和纯化,获得了一种稳定性和生物活性都显著提高的新FGF21—FGF21-2A.

参 考 文 献

- [1] Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, *et al.* Identification of a novel FGF, FGF21, preferentially expressed in the liver [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1492: 203–206.
- [2] Kharitononkov A, Shyanova TL, Koester A, *et al.* FGF21 as a novel metabolic regulator [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 1627–1635.
- [3] Mai K, Schwarz F, Bobbert T, *et al.* Relation between fibroblast growth factor-21, adiposity, metabolism and weight reduction [J]. *Metabolism*, 2011, 60: 306–311.
- [4] Wente W, Efanov AM, Brenner M, *et al.* Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways [J]. *Diabetes*, 2006, 55: 2470–2478.
- [5] Wang HY, Xiao YC, Fu LJ, *et al.* High-level expression and purification of soluble recombinant FGF21 protein by SUMO fusion in *Escherichia coli* [J]. *BMC Biotechnol*, 2010, 10: 14.
- [6] Hou YT, Li JN, Ren GP, *et al.* Cloning, expression and glucose regulation activity of human FGF21 [J]. *Hereditas (遗传)*, 2010, 32: 583–587.
- [7] Yang GZ, Gao XP, Yan JF, *et al.* Establishment of GOD-POD assay in a minimal way and application to glucose metabolism of 3T3-L1 adipocyte and HepG2 cell in vitro [J]. *Sichuan J Anat (四川解剖学杂志)*, 2003, 11: 12–15.
- [8] Zhang HJ, Zhao JB, Li P. Progress in the study on animal model of diabetic nephropathy [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2008, 24: 845–848.
- [9] Kharitononkov A, Shanafelt AB. FGF21: a novel prospect for the treatment of metabolic diseases [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10: 359–364.
- [10] Levien TL, Baker DE, White JR, *et al.* Insulin glargine: a new basal insulin [J]. *Ann Pharmacother*, 2002, 36(6): 1019–1027.
- [11] Hirsch IB. Insulin analogues. *N Engl J Med* 2005;352:174–183.
- [12] Monami M, Marchionni N, Mannucci E. Long-acting insulin analogues vs. NPH human insulin in type 1 diabetes. A meta-analysis. *Diabetes Obes Metab* 2009;11:372–378.
- [13] Kharitononkov A, Wroblewski VJ, Koester A, Chen YF, Clutinger CK, *et al.* (2007) The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* 148: 774–781.
- [14] Goetz R, Beenken A, Ibrahimi OA, Kalinina J, Olsen SK, *et al.* (2007) Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Mol Cell Biol* 27:

3417–3428.

- [15] Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, *et al.* (2007) Beta-Klotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7432–7437.
- [16] Micanovic R, Raches DW, Dunbar JD, Driver DA, Bina HA, *et al.* (2009) Different roles of N- and C- termini in the functional activity of FGF21. *J Cell Physiol* 219: 227–234.
- [17] Yie J, Hecht R, Patel J, Stevens J, Wang W, *et al.* (2009) FGF21 N- and C-termini play different roles in receptor interaction and activation. *FEBS Lett* 583: 19–24.
- [18] Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, *et al.* (2008) Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 149: 6018–6027.
- [19] Wang ZF, Wang HY, Li XK, *et al.* A Better Anti-Diabetic Recombinant Human Fibroblast Growth Factor 21 (rhFGF21) Modified with Polyethylene Glycol. *PLoS ONE*, 2011, 06, e20669.
- [20] Yao WB, Ren GP, Li DS, *et al.* Expression and pharmacological evaluation of fusion protein FGF21-L-Fc. *Acta Pharmaceutica Sinica* 2011, 46 (7): 787–792.
- [21] Rosenstock J, Park G, Zimmerman J. Basal insulin glargine (HOE 901) versus NPH insulin in patients with type 1 diabetes on multiple daily insulin regimens. U.S. Insulin Glargine (HOE 901) Type 1 Diabetes Investigator Group [J]. *Diabetes Care*, 2000, 23(8): 1137–1142.
- [22] Gillies PS, Figgitt DP, Lamb HM. Insulin glargine [J]. *Drugs*, 2000, 59(2): 253–260.
- [23] Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol. Biol.* 5 1982, 157(1): 105–32.
- [24] Eisenberg D. Three-Dimensional structure of membrane and surface proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 7 1984, 53: 595–623.
- [25] Wang WF, Li DS, Li XK. A new insight into treatment of diabetes mellitus - fibroblast growth factor 21. [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2009, 25(4): 433–435.
- [26] Postic C, Dentin R, Girard J, *et al.* Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab*, 2004, 30(5): 398–408.
- [27] Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S. and Maratos-Flier, E. (2007) Hepatic fibroblast growth factor-21 is regulated by PPAR alpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab*, 5, 426–437.

Stability and glucose regulation of FGF21 after modified with arginines*[#]

He kun¹⁾, Zhang Ya-kun¹⁾, Ye Xian-long¹⁾, Wang Wen-fei¹⁾, Chen Rui¹⁾, Liu Ming-yao¹⁾, Feng Ming-fang¹⁾, Xu Jia-ling²⁾, Li De-shan^{1)**}

¹⁾Northeast Agricultural University, College of Life Science, Harbin 150030, China;

²⁾ Medical and Veterinary College of Bristol University, Bristol BS28DZ, United Kingdom)

Abstract Fibroblast growth factor-21(FGF21), which was discovered in 2000 as a non-insulin-dependent cytokine to regulate blood sugar, is expected to become a candidate for anti-diabetes drugs. However, the biological activity of FGF21 was influenced by its weak instability and short half-life *in vivo*. In this study, to improve the stability of FGF21 *in vivo*, we added two arginines to the C-terminus of FGF21, and named as FGF21-2A. After being calculated by the software pI/Mw, the pI of FGF21-2A reached to 5.84 from 5.43. Then we expressed and purified the mutant protein for the examination of stability and bioactivity. When we used BandsScan5.0 to analyze the supernatant of Rosetta(DE3) lysates after induction, the protein expression levels of FGF21-2A increased by 10.6%. The *in vivo* half-life time of FGF21-2A was significantly prolonged in pharmacokinetics experiment. And, compared to the wild-type FGF21, FGF21-2A not only had a better capacity of stimulating glucose uptake in 3T3-L1 cells *in vitro* and stimulating glycogen synthesis of the model mice *in vivo*, but also provided a significantly long lasting effect on reducing blood glucose in the type 1 and type 2 diabetic animals. Moreover, the results of the real-time PCR showed that, after long term treatment, FGF21-2A could increase the mRNA expression of GLUT1 and GK and reduce the mRNA expression of G6P, which suggests FGF21-2A has the same mechanism of glucose regulation with the wild-type FGF21. In conclusion, modifying FGF21 with arginines increases the protein stability, and enhances the protein bioactivity, which lays the foundation for development of drugs targeting diabetes mellitus.

Key words FGF21-2A, Arginine, Stability, Bioactivity

*This work was supported by a grant from Science and Technology Planning Program of Heilongjiang Province (2006G0461-00).

[#]PhD start fund, Northeast Agricultural University (2010RCB52)

** Corresponding author. Tel: 0451-55190645, E-mail: deshanli@163.com.