

一种人胰岛素类似物的制备、鉴定与活性研究

怀文辉 袁 华 赵 锐 茹炳根*

(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 采用 PCR 方法, 将人胰岛素分子 B 链 B10 位 His 突变为 Glu, 在 B25 和 B26 位之间插入 Glu, 构建了 [B10 Glu, B25-Glu-B26] 胰岛素原融合蛋白基因. 利用通用型质粒 pBV220 构建表达载体, 在大肠杆菌 DH5 α 中表达, 表达蛋白为包含体形式, 约占菌体总蛋白的 20% ~ 30%. 经过复性、凝胶过滤等步骤得到胰岛素原融合蛋白. 用胰蛋白酶和羧肽酶 B 酶切, 经过 DEAE 离子交换和 RP-HPLC 纯化得到胰岛素突变体类似物, 并经过质谱测定鉴定. 凝胶过滤法测定了蛋白质分子自身的缔合性质, 圆二色谱 (CD) 测定了构象的变化. 并分别测定了放免活性、受体结合活性及小白鼠低血糖惊厥实验. 结果表明, 突变体分子缔合性明显下降. 放免活性和受体结合活性分别约为标准胰岛素的 63.5% 和 114.4%, 整体活力略高于天然胰岛素.

关键词 胰岛素类似物, 单体胰岛素, 原核表达, 生物学活性

学科分类号 Q816

作为糖尿病临床治疗的特效药物, 胰岛素的临床应用已有 80 多年, 但是天然胰岛素在使用上仍存在一些缺点. 胰岛素分子是通过单体形式与受体结合表现生理活性的. 而在高于生理浓度 ($1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-8}$ mol/L) 时胰岛素分子发生自身的缔合, 形成二聚体或六聚体形式. 药用胰岛素制剂的浓度很高 (1×10^{-4} mol/L 以上), 皮下注射后, 需要一个缓慢的解离成单体分子的过程, 导致患者的血中胰岛素峰在时间上滞后于血糖峰, 出现高血糖症状^[1]. 为此人们希望设计出能模拟生理状态下餐后胰岛素分泌快速增加的胰岛素类似物, 即速效胰岛素 (以单体形式存在的胰岛素).

胰岛素分子结构与功能的大量研究为设计单体胰岛素分子提供了依据. 研究表明, 参与二聚体形成的残基包括 B 链的 α 螺旋段以及 B23 ~ B28 段残基. 其中二聚体中单体分子之间的缔合主要靠 B24Phe 和 B26Tyr 之间形成的疏水作用和氢键来维系^[2]. 另外, Zn^{2+} 与 B10His 的咪唑基形成配位键, 形成六聚体^[3]. 蛋白质工程是用来获得胰岛素类似物的主要途径, 通过这种手段人们已经获得了多种胰岛素类似物. 真正应用于临床的只有 Eli Lilly 公司的 Lispro 胰岛素类似物等几种. 胰岛素样生长因子 I (IGF-I) 与胰岛素具有高度的同源性和三维结构的类似性, 但是 IGF-I 不形成二聚体. IGF-I 分子上与胰岛素 B28Pro-B29Lys 相对应的序列为 B28 Lys-B29Pro, 即顺序颠倒, 减弱了疏水作用及氢键能量. 据此设计了 [B28 Lys, B29Pro] 胰岛素, 即 Lispro^[4]. Aspart 胰岛素即 B28Asp, 减

弱了 B28Pro 与 B23 Gly 的相互作用^[5]. 胰岛素类似物的应用仍然存在一定的危险性, 如容易引起患者低血糖症状的发生^[6]. 在某些特殊患者如孕妇中的安全性尚未证实, 由于医学等原因需要禁食的患者注射 Lispro 也必须非常谨慎. 因此有必要研制更为安全可靠的速效单体胰岛素. 我们设计了突变体 [B10Glu, B25-Glu-B26] 胰岛素原基因, 在大肠杆菌中高效表达, 并对纯化后的胰岛素类似物进行了缔合性质及生物活性的测定.

1 材料和方法

1.1 材料

宿主菌为大肠杆菌 DH5 α . 含人胰岛素原基因的质粒 pVK100 由北京大学生命科学学院胡美浩教授惠赠, 该质粒在胰岛素原的氨基端融合了 Met-Lys 两个残基, 温敏表达载体 pBV220 为本室保存. PCR 引物由上海生工公司合成, Taq 酶、限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 和 T4 DNA Ligase 均为 Promega 公司产品. 胰蛋白酶购自 Sigma 公司 (1420 BAEE U/mg), 羧肽酶 B 为本室制备 (100 HA U/mg), 天然胰岛素为 Sigma 公司产品, 蛋白质分子质量标准为中国科学院生物化学与细胞生物研究所产品, 层析柱为 Pharmacia 公司产品, 其他试剂为进口或国产分析纯或色谱纯产品.

* 通讯联系人.

Tel: 010-62751842, E-mail: Rulab@pku.edu.cn

收稿日期: 2003-05-07, 接受日期: 2003-06-12

1.2 方法

1.2.1 突变体的计算机建模分析: 利用 SGI 工作站 InsightII 软件包 (Version 95.0), 以 Protein Data Base 的胰岛素分子 PDB 文件为模板, 对突变后的分子进行同源建模, 与天然胰岛素分子进行比较分析。

1.2.2 表达载体的构建: 以含有胰岛素原基因的质粒 pVK100 为模板, 采用不对称 PCR 方法扩增得到突变体基因片段, 经过 *EcoRI*、*BamHI* 双酶切, 与经过同样酶切的 pBV220 连接, 得到重组表达质粒 pBV220-hPMUT3, 经酶切和序列测定分析加以鉴定。转化大肠杆菌 DH5 α , 试管内小量表达筛选。

1.2.3 目的蛋白的发酵表达: 挑取新转化的大肠杆菌菌落, 接种至 50 ml LB (含 50 mg/L 氨苄青霉素) 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后, 转接到 500 ml 含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 1.5 ~ 2 h, 升温至 42 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养 6 h。离心收集菌体。

1.2.4 胰岛素原类似物的变性、复性及分离纯化: 包含体的制备与变性、复性参照文献 [7]。复性液含 0.05 mol/L Gly-NaOH, 1 mmol/L GSH, 0.1 mmol/L GSSG, pH 10.5。4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢搅拌复性 24 h。以截留值为 3K 的超滤膜超滤浓缩, 缓冲液转换为 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0。用 Sephacryl S-100 柱 (60 cm $\times$ 26 mm) 凝胶过滤层析分离目的蛋白, 缓冲液为 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0。以 Sephadex G-25 柱脱盐后冻干, 缓冲液为 0.01 mol/L NH_4HCO_3 。

1.2.5 胰岛素类似物的获得与鉴定: 取一定量的胰岛素原, 按 10 g/L 溶解于 80 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6)。分别按质量比 1:1 000 和 1:400 加入胰蛋白酶和羧肽酶 B, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 30 min 后, 立即置冰上, 加入终浓度 70% 的异丙醇终止反应。DEAE-Sephrose 分离纯化目的蛋白, 平衡缓冲液为 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 洗脱缓冲液为含 0.5 mol/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)。采用 0 ~ 0.3 mol/L NaCl 的直线梯度洗脱。进一步纯化采用 RP-HPLC 方法, 层析柱为 Zorbax RP C18 (4.6 mm $\times$ 150 mm)。缓冲液 A 为含 0.1% TFA-1% 乙腈的重蒸水, 缓冲液 B 含 0.1% TFA-1% 重蒸水和 98.9% 乙腈。样品用缓冲液 A 溶解, 并用缓冲液 B (0.5 ml/min) 进行 0% ~ 60% 的线性梯度洗脱, 收集洗脱峰, 冷冻干燥。通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (胶浓度为 15%), 判断目的蛋白的洗脱峰。通过基质辅助激光解吸/飞行

时间 (MALDI-TOF) 质谱法测定分子质量。

1.2.6 胰岛素类似物分子自身缔合性质测定: 天然胰岛素及突变体胰岛素溶于 20 mmol/L 磷酸钠盐缓冲液 (pH 7.2), 浓度为 1.2 g/L (2×10^{-4} mol/L)。分子筛柱为 Superdex75 HR 10/30, 以 20 mmol/L 磷酸钠盐缓冲液 (pH 7.2) 为缓冲液, 上样量为 200 μl , 流速 0.4 ml/min, 280 nm 紫外监测, 室温操作^[8]。仪器为 ÄKTA explorer。

1.2.7 圆二色谱测定: 样品溶于 7 mmol/L 磷酸钠盐缓冲液 (pH 7.2), 远紫外圆二色谱测定样品浓度为 0.2 g/L, 扫描范围 190 ~ 250 nm, 样品池规格 1 mm。近紫外圆二色谱测定样品浓度为 3.5 g/L, 扫描范围 190 ~ 250 nm, 样品池规格 1 cm。扫描速度均为 0.5 nm/s。仪器为 JOBIN YVON-SPEX CD-6 圆二色谱仪。

1.2.8 胰岛素类似物的放免活性测定: 按胰岛素放免试剂盒说明测定。

1.2.9 胰岛素类似物的受体结合活性测定: 用人胎盘组织提取的胰岛素受体测定, 按文献 [9] 进行。

1.2.10 小白鼠低血糖惊厥实验: 整体活力按半定量小白鼠惊厥法测定^[10]。

2 结 果

2.1 突变体基因的获得与表达载体的构建

通过不对称 PCR 方法, 从 pVK100 质粒上得到胰岛素原突变体基因, 插入到表达载体 pBV220 得到重组质粒 pBV220-hPMUT3。重组质粒经过酶切及序列测定, 证明插入序列正确, 按设计引入了突变 (图 1)。

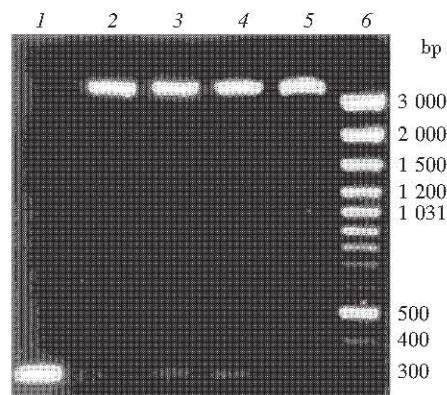


Fig. 1 Restriction analysis of recombinant plasmid

1: PCR product; 2, 3, 4: pBV220-hPMUT3 digested by *EcoRI* and *BamHI*; 5: pBV220 digested by *EcoRI* and *BamHI*; 6: standard molecular mass marker.

2.2 目的蛋白的表达

采用小试管小量表达筛选表达菌株，以 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）分析. 结果表明，在分子质量接近 10 ku 处，有一条明显不同于各对照菌样品的蛋白质条带（图 2）. 说明目的基因在受体菌中得到了高效表达，目的蛋白约占菌体总蛋白质的 20% ~30% . 表达形式为包含体.

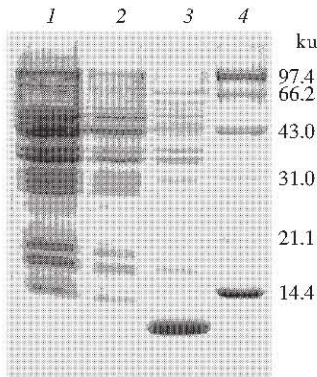


Fig.2 SDS-PAGE analysis of target protein

1: Whole cell lysates of DH5α; 2: Whole cell lysates of DH5α containing pBV220; 3: Whole cell lysates of DH5α containing pBV220-hPMUT3; 4: Protein molecular mass marker.

2.3 胰岛素原突变体蛋白的体外复性与分离纯化

复性液经超滤浓缩后，以 Sephacryl S-100 凝胶过滤层析分离纯化. 经过 15% SDS-PAGE 分析，具有单一条带，大小约 10 ku. 脱盐冻干后，经过 PAGE 检测，纯度约 90% . 摇瓶发酵每升培养液得到约 15 mg 胰岛素原突变体蛋白质.

2.4 胰岛素类似物的获得与鉴定

经过胰蛋白酶和羧肽酶B酶切后，首先用

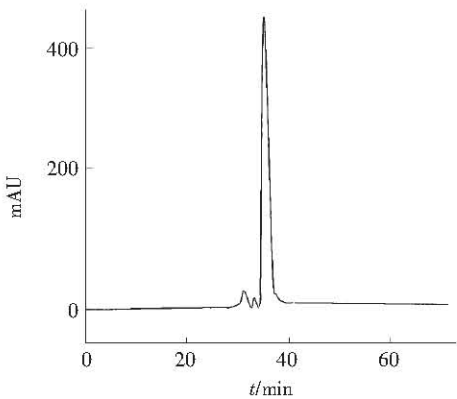


Fig.3 Purification of target protein by RP-HPLC

DEAE-Sepharose 分离纯化，收集洗脱峰，电泳检测目的蛋白峰. 再以 RP-HPLC 进一步纯化，结果见图 3，主峰蛋白质纯度约为 95% . SDS-PAGE 结果见图 4.

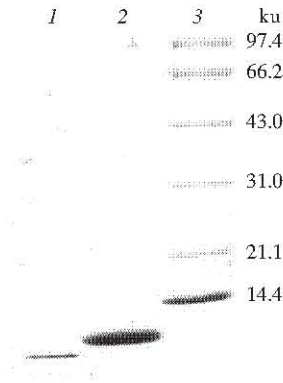


Fig.4 SDS-PAGE analysis of proteins after purification

1: Insulin analogue; 2: Proinsulin analogue; 3: Protein molecular mass marker.

2.5 纯化蛋白质的质谱鉴定

通过 MALDI-TOF 质谱分析（图 5），测得所纯化的胰岛素原类似物的相对分子质量为9 755，与

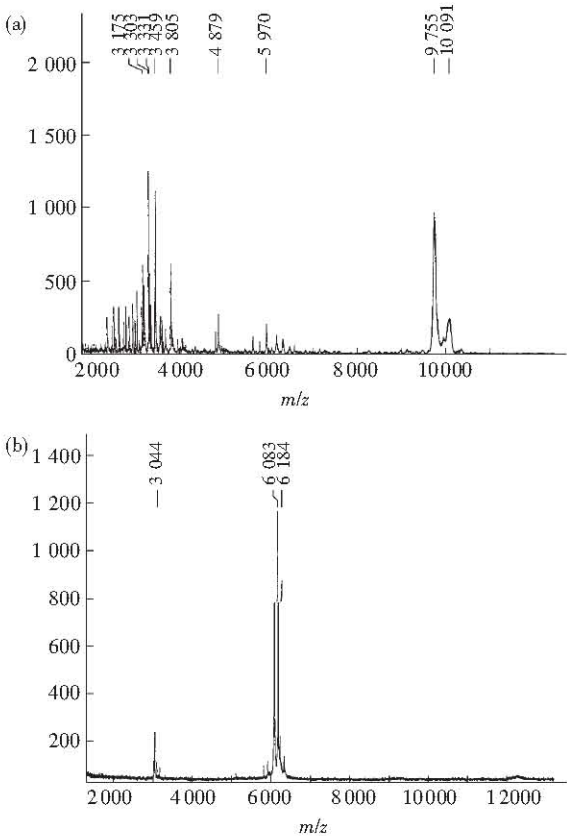


Fig.5 Results of MALDI-TOF mass spectrum

(a) Proinsulin analogue; (b) Insulin analogue.

根据氨基酸序列计算的理论值 9 770 相比, 误差为 0.15%, 在允许的误差范围内, 证明了表达产物的正确性. 突变体胰岛素原酶切后测定, 其分子质量峰值为 6 184, 与氨基端融合了 Met-Lys-的胰岛素突变体蛋白质分子理论值 6175.77 比较, 误差也为 0.15%. 没有发现切除 Met-Lys-的胰岛素突变体峰.

2.6 胰岛素类似物的自身缔合性质

采用分析型凝胶过滤方法, 对天然胰岛素及突变体胰岛素进行分析, 突变体蛋白出峰时间明显迟于天然胰岛素 (图 6). 在蛋白质浓度为 1.2 g/L (2×10^{-4} mol/L) 下, 胰岛素以二聚体或六聚体形式存在. 此结果表明, 突变体蛋白分子自身缔合性弱于天然胰岛素^[8].

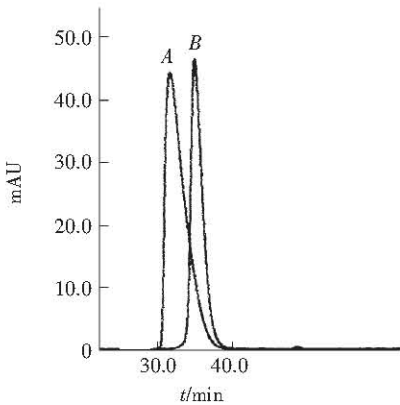


Fig. 6 FPLC profile of insulin analogue
A: Human insulin; B: Human insulin analogue.

2.7 胰岛素类似物的圆二色谱

远紫外圆二色谱 (CD) 结果如图 7 所示, 在 208 nm 和 224 nm 附近标准胰岛素分子较突变体分子向负值增大, 表明在二级构象上突变体分子 α 螺旋含量下降. 在远紫外 275 nm 波长附近, 标准胰岛素分子也较突变体分子向负值增大, 表明芳香族残基构象发生了某种变化. 这些变化趋势表明, 突变体分子的缔合性趋于下降, 这与凝胶过滤分析结果相一致^[11].

2.8 胰岛素类似物的放免活性及受体结合活性

突变体的放免活性有明显降低, 为天然胰岛素的 63.5%. 这是由于突变体分子在构象上变化而引起的 (图 8). 受体结合测定结果表明, 突变体

的受体结合能力略有增加, 为天然胰岛素的 114.4% (图 9).

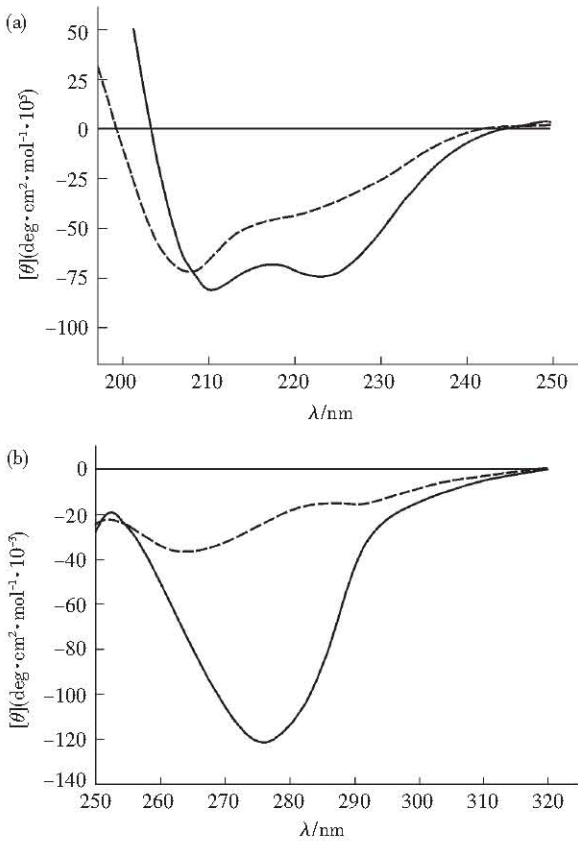


Fig. 7 Circular dichroism of human insulin and human insulin analogue
(a) Far-CD spectrum. (b) Near-CD spectrum. —: Human insulin; - - -: Human insulin analogue.

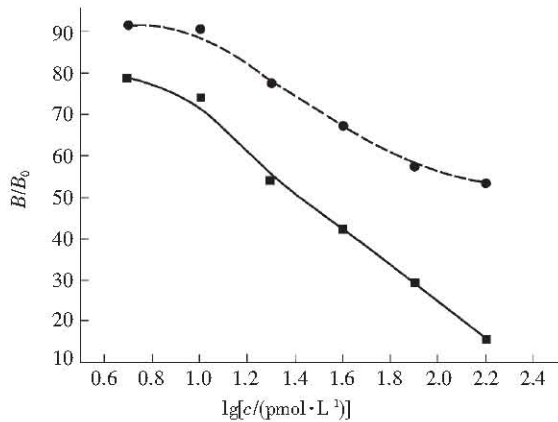


Fig. 8 RIA of human insulin and human insulin analogue
■—■: Human insulin; ●—●: Human insulin analogue.

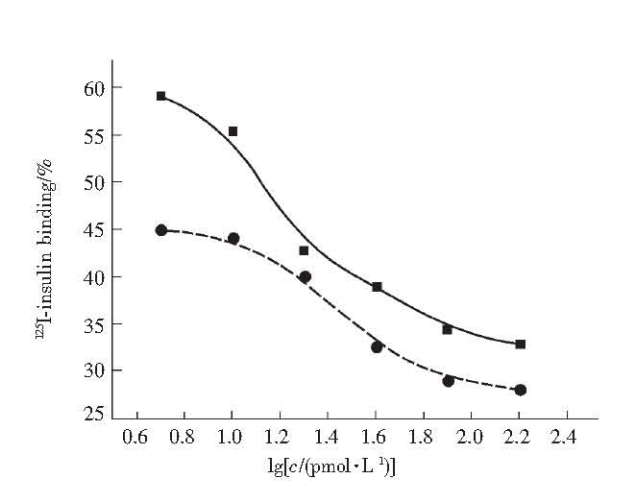


Fig. 9 Receptor binding assay of human insulin and human insulin analogue

■—■: Human insulin; ●—●: Human insulin analogue.

2.9 胰岛素类似物的整体活性

突变体胰岛素的整体活力略高于天然胰岛素(表1)。这说明:一方面,B10氨基酸残基被谷氨酸替代后,类似于引入天冬氨酸,明显提高分子的生物学活性^[12];另一方面,在B链25和26位之间引入谷氨酸突变,决定活性的局部构象可能没有受到破坏。

Table 1 Result of mouse convulsion

Sample	Dosage/ μg	Response *
Human insulin	4.0	12/12
	2.0	8/12
	1.0	1/12
[B10Glu, B25-Glu-B26]human insulin	4.0	12/12
	2.0	10/12
	1.0	2/12

* Denominator-number of mice injected; numerator-number of mice responded.

3 讨 论

胰岛素是治疗糖尿病的特效药物,自1922年以来广泛应用于临床。但是作为一种激素类药物,其作用的发挥与患者自身的生理状态之间存在明显的矛盾。研制出能快速发挥作用的短半衰期胰岛素是临床应用的需要。在国外有不少研究者致力于单体活性胰岛素的研究工作,但应用于临床的只有极少的几种,而且其安全性还有待研究。

本研究采用PCR方法在胰岛素原基因中引入突变,构建了[B10 Glu, B25-Glu-B26]胰岛素原基因,在大肠杆菌中高效表达。经过发酵表达,蛋白质的体外复性与分离纯化,得到了胰岛素类似物,并对所纯化的蛋白质进行质谱鉴定。

研究表明,参与二聚体形成的残基包括A链21, B链8, 9, 12, 16, 21, 23~29位的氨基酸残基,其中单体之间的主要作用力是B链羧基端B24Phe、B25Phe和B26Tyr三个芳香族氨基酸残基形成的疏水面上的疏水作用^[2]。另外,此疏水面之间形成的三对氢键也起到一定的作用。而B10位组氨酸残基的咪唑基,易与Zn²⁺形成配位键,促进了六聚体的形成^[3]。本研究中的突变分子,引入了B10 Glu突变,可能使六聚体形成的趋势下降。B25位与26位之间插入了Glu,干扰了原来的疏水作用,因此也降低了二聚体形成的能力。经分析性凝胶过滤法分析表明,突变体分子的出峰时间明显迟于标准胰岛素,表明其缔合性低于标准胰岛素。圆二色光谱测定结果证明了 α 螺旋含量的下降,表明突变体分子的构象没有聚合体中的构象那样紧凑。其近紫外圆二色光谱表明,突变的引入使芳香族氨基酸在分子中发生构象变化,这种变化与报道的现象相符合^[12]。上述结果表明,此突变体是一种单体胰岛素类似物。

胰岛素分子中受体结合面由B链羧基端的 β 转角、 β 折叠及B链 α 螺旋的一部分,还有A链1, 19, 21位残基共同组成。B链羧基端远离A链的氨基端,使A2和A3残基暴露,是与受体结合必需的构象变化^[13]。突变体分子放免活性较天然胰岛素分子有明显下降,表明突变的引入破坏了胰岛素抗原决定簇的构象。受体结合活性略高于天然胰岛素,动物实验结果与其趋势基本一致,表明突变没有破坏受体结合所必需的构象。

参 考 文 献

- 1 Zinman B. The physiological replacement of insulin: an elusive goal. *New Engl J Med*, 1989, **321** (6): 363~370
- 2 Blundell T, Dodson G, Hodgkin D, *et al.* Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology. *Adv Protein Chem*, 1972, **26**: 279~402
- 3 Derewenda U, Derewenda Z, Dodson E J, *et al.* Phenol stabilizes more helix in a new symmetrical zinc insulin hexamer. *Nature*, 1989, **338** (6216): 594~596
- 4 Howay D C, Bowsher R R, Brunelle R L, *et al.* [Lys (B28), Pro (B29)]-human insulin: a rapidly absorbed analogue of human insulin. *Diabetes*, 1994, **43** (3): 396~402
- 5 Kang S, Creagh F M, Peters J R. Comparison of subcutaneous

- soluble human insulin and insulin analogues on meal-related plasma glucose excursions in type I diabetic subjects. *Diabetes Care*, 1991, **14** (7): 571 ~ 577
- 6 Burge M R, Castillo K R, Schade D S. Meal composition is a determinant of lispro-induced hypoglycaemia in IDDM. *Diabetes Care*, 1997, **20** (2): 152 ~ 155
- 7 Chen J Q, Zhang H T, Hu M H, *et al.* Production of human insulin in an *E. coli* system with met-lys-proinsulin as the expressed precursor. *Appl Bioch Biotech*, 1995, **55** (1): 5 ~ 15
- 8 Chen H, Shi M, Guo Z Y, *et al.* Four new monomeric insulins obtained by alanine scanning the dimer-forming surface of the insulin molecule. *Protein Engineering*, 2000, **13** (10): 779 ~ 782
- 9 Fujita-Yamaguchi Y, Choi S Y. Purification of insulin receptor with full binding activity. *J Biol Chem*, 1983, **258** (8): 5045 ~ 5049
- 10 Liang Z H, Liu B, Tang Y H, *et al.* Protein engineering of insulin: [B9Glu, B10Asp] human insulin. *Acta Biochim Biophys Sin*, 1996, **28** (5): 447 ~ 451
- 11 David N B, Leila A A, Michael J B, *et al.* Altering the association properties of insulin by amino acid replacement. *Protein Engineering*, 1992, **5** (6): 527 ~ 533
- 12 Heinemann L, Heise T, Jorgensen L N, *et al.* Action profile of the rapidacting insulin analogue: human insulin B28Asp. *Diabet Med*, 1993, **10** (6): 535 ~ 539
- 13 Sholesun S E, Lu Z-X, Parlautan L, *et al.* Mutation at the dimer, hexamer, and receptor-binding surfaces of insulin independently affect insulin-insulin and insulin-receptor interactions. *Biochemistry*, 1992, **31** (6): 1757 ~ 1767

Preparation, Identification and Activities Research of [B10Glu, B25-Glu-B26] Human Insulin

HUAI Wen-Hui, YUAN Hua, ZHAO Rui, RU Bing-Gen*

(National Key Laboratory of Protein Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract [B10Glu, B25-Glu-B26] human proinsulin gene was obtained by asymmetry PCR and cloned into the expression vector pBV220 and expressed in *Escherichia coli* DH5 α in the form of inclusion body. The target protein was refolded *in vitro* and purified. After lysis with trypsin and carboxypeptidase B, an insulin analogue was purified by DEAE ion exchange and RP-HPLC. The product was characterized by MALDI-TOF MS. Circular dichroism spectrum was studied. The results implied the changes of the secondary structure and the association. The association of the analogue was further studied by size exclusive chromatography with a strong monomeric property. The biology activities including RIA, RBA were assayed, exhibiting 63.5% and 114.4% those of native insulin respectively. The result of mouse convulsion test indicated the insulin analogue had *in vivo* activity nearly the same as native insulin.

Key words insulin analogue, monomeric insulin, procaryotic expression, biology activity

* Corresponding author. Tel: 86-10-62751842, E-mail: Rulab@pku.edu.cn

Received: May 7, 2003 Accepted: June 12, 2003