

重组人胰岛素研究的回顾和展望

冯佑民 张友尚

(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)

胰岛素(insulin)是由 A 和 B 两条多肽链组成的蛋白质激素, A 链含 21 个氨基酸残基, B 链由 30 个氨基酸残基组成, 共有三个二硫键, 其中两个连接 A 链和 B 链, 一个在 A 链内。胰岛素是在胰岛的 β 细胞中被合成和分泌, 随血液循环到达靶组织, 通过与其专一膜受体结合表现出生理功能的。

胰岛素用于临床已有 70 多年^[1], 由于它是治疗糖尿病的特效药物和糖尿病患者人口中的比例相当高, 所以对胰岛素的需求量很大。这是促使人们不断改进老工艺和采用新的科技成果生产胰岛素的动力。DNA 重组技术的出现为胰岛素的生产开创了新的途径。第一个重组 DNA 分子^[2]报道后不久, Ullrich 等^[3], Itakura 及其同事(1978)以及 Villal-Komaroff 等(1978)就相继报道了胰岛素在大肠杆菌(*E. coli*)中的表达成功, 成为最早在微生物中被表达的哺乳动物蛋白质之一。人胰岛素是第一个被投放市场的生物工程蛋白质药物^[4]。

十多年来, 人们在胰岛素基因的制备, 表达体系的选择和改进, 表达产物的加工处理等方面进行了卓有成效的探索和研究。不仅实现了人胰岛素在微生物中的生物合成并推向市场, 而且推动和加快了其他哺乳动物蛋白质基因工程的研究进程。

一、胰岛素基因的制备

Steiner 等^[5]揭示了在体内双链的胰岛素分子是以一条肽链被合成的, A 链的 N 端和 B 链的 C 端通过被称为 C-肽的连接肽(connecting peptide)相连, 称这种形式的胰岛素为胰岛素原(proinsulin)。胰岛素原中的硫硫键配对与胰岛素相同, 两者的三维结构也非常类似。稍后, 进一步证明在胰岛素的生物合成过程中还有一个疏水的肽链与胰岛素原的 B 链 N 端相连, 这种形式的胰岛素被称为前胰岛素原(preproinsulin)^[6]。这个接在 B 链 N 端的疏水肽链是信号肽(signal peptide), 其作用是引导新合成的胰岛素原穿过内质网膜。人的前胰岛素原

是一个由 24 个氨基酸残基组成的信号肽和一个含 86 个氨基酸残基的胰岛素组成, 由 N 端至 C 端的连接顺序为 S-B-Arg-Arg-C-Lys-Arg-A, 其中 S 为信号肽, C 代表 C-肽, 由 35 个氨基酸残基组成, A 和 B 分别为胰岛素的 A 链和 B 链^[7]。这就是说, 胰岛素的生物合成过程包括前胰岛素原的 mRNA 在内质网的向质面被翻译成一条肽链的前胰岛素原, 新生的多肽链在信号肽的引导下穿过内质网膜进入内质网腔, 同时移去信号肽成为胰岛素原; 然后胰岛素原进入高尔基体, 经过折叠、硫硫配对和包装进入分泌颗粒; 最后由类似胰蛋白酶和羧肽酶 B 的专一的蛋白水解酶加工成两条链的胰岛素和

C-肽,并以等克分子释放到血液中。

由此可见从合成到成熟,胰岛素有三种存在形式:前胰岛素原(mRNA 翻译产物,含信号肽),胰岛素原(折叠后产物,缺少信号肽)和胰岛素(成熟产物,由 A、B 两条链组成,缺少 C-肽)。胰岛素存在的形式不同决定了用以表达胰岛素的基因的多样性和制备方法的不同。

1. 化学合成

随着 DNA 的化学合成和重组技术的发展,Itakura 等(1977)合成并表达了生长激素释放抑制因子的基因。这是第一个微生物中表达的化学合成的具有生物功能的多肽的基因。在此基础上,Itakura 及其同事合成了 29 个 DNA 片段,通过片段连接分别得到了人胰岛素的 A 链和 B 链基因。表达后分别得到 A 链和 B 链,然后组合成人胰岛素^[6]。

上述设计思想的基础有以下两点:第一,人工合成胰岛素的成功,说明在体外 A 链和 B 链在适当的条件下能重新组合成胰岛素(Kung Y T et al, 1965)。第二,胰岛素分子中没有甲硫氨酸和色氨酸。这样,在合成基因时就可将甲硫氨酸密码子置于每条链的 5'端,表达后可用溴化氰处理融合蛋白,顺利地切下胰岛素的 A 链和 B 链。

虽然在体外由 A、B 链重组成胰岛素的研究表明,通过还原重氧化形成的正确硫硫键配对的效率远高于理论计算(Du Y-C et al, 1961),但不能与体内蛋白质折叠中的硫硫键正确配对的效率相比。在胰岛素的生物合成中单链的胰岛素原,保证了硫硫键的正确配对。同时,胰岛素的三维结构表明,B 链的 C 端和 A 链的 N 端距离很近^[9]。以上两点为采用胰岛素原基因进行表达和在基因合成中缩短 C-肽提供了依据。基于此,相继报道了具有不同长度 C-肽的胰岛素原基因的合成。例如,Wetzel 等^[10]的‘mini-C’胰岛素原基因,其 C-肽由 6 个氨基酸残基(Arg-Arg-Gly-Ser-Lys-Arg)组成;Markussen 等^[11]合成了单链胰岛素前体

(single-chain precursor)基因,系统地改变和缩短了 C-肽。

2. 胰岛素原的 cDNA

获得胰岛素基因的另一种方法是将前胰岛素原的 mRNA 反转录成 cDNA。用这种方法首先从大鼠胰脏和胰岛瘤的 mRNA 获得大鼠前胰岛素原的 cDNA^[3]。不久,Ullrich 等^[12]和 Bell 等^[7]分别报道了人前胰岛素原 cDNA 的克隆。

二、人胰岛素在大肠杆菌中的生物合成

根据所用基因不同,用大肠杆菌生产人胰岛素有两种途径。其一是,用化学方法分别合成 A 链和 B 链编码的 DNA 片段,并在其 5'端分别加上甲硫氨酸密码子^[5]。将上述基因插入克隆载体,置于载体上色氨酸合成酶操纵子的后面。转化大肠杆菌,经过发酵,分别从细胞中分离含有 A 链和 B 链的融合蛋白,用溴化氰处理融合蛋白,裂解甲硫氨酸使 A 链和 B 链释放下来,并将其转变成稳定的 S-磺酸盐。经过纯化,在过量 A 链存在下,由 B 链和 A 链组合成人胰岛素^[13,14](图 1)。

另一途径是,在人胰岛素原基因的 5'端加上甲硫氨酸密码子,接在色氨酸合成酶基因之后,插入质粒,转化大肠杆菌^[15]。表达产生的‘色氨酸合成酶-人胰岛素原’融合蛋白沉淀于细胞浆中。从细胞中分离融合蛋白,经溴化氰裂解后得到人胰岛素原,将其转变成稳定的 S-磺酸盐型。分离纯化得到的 S-磺酸盐型人胰岛素原经变性复性和硫硫键配对,折叠成天然构象的人胰岛素原,产率可达 45%。副产物同分异构体和多聚体回收后可重复利用。具有天然构象的纯的人胰岛素原经胰蛋白酶和羧肽酶 B 处理,去除 C-肽得到结晶人胰岛素^[14,16](图 2)。

三、人胰岛素在酵母 *S. cerevisiae* 中的生物合成

上述以融合蛋白形式表达的人胰岛素的 A 链和 B 链或胰岛素原,在加工成人胰岛素的过

程中都需要若干化学处理以完成裂解, 硫硫键的形成和变性复性等。为了最大限度地减少对表达产物的化学处理, Markussen 及其同工作者和 Thim 等分别研究了用酵母 *S. cerevisiae* 分泌表达单链胰岛素前体基因。

Markussen 等^[17]采用了单碱性氨基酸 C-

肽单链胰岛素前体, 如 B(1-29)-Ser-Lys-A(1-21)、B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21)等等, 其中 A 和 B 分别代表胰岛素的 A 链和 B 链, Ser-Lys-Ala-Ala-Lys 为单碱性氨基酸 C-肽。用以在酵母中分泌表达上述单链胰岛素前体的基因包括磷酸丙糖异构酶启动子(TPI_p), 交配因子

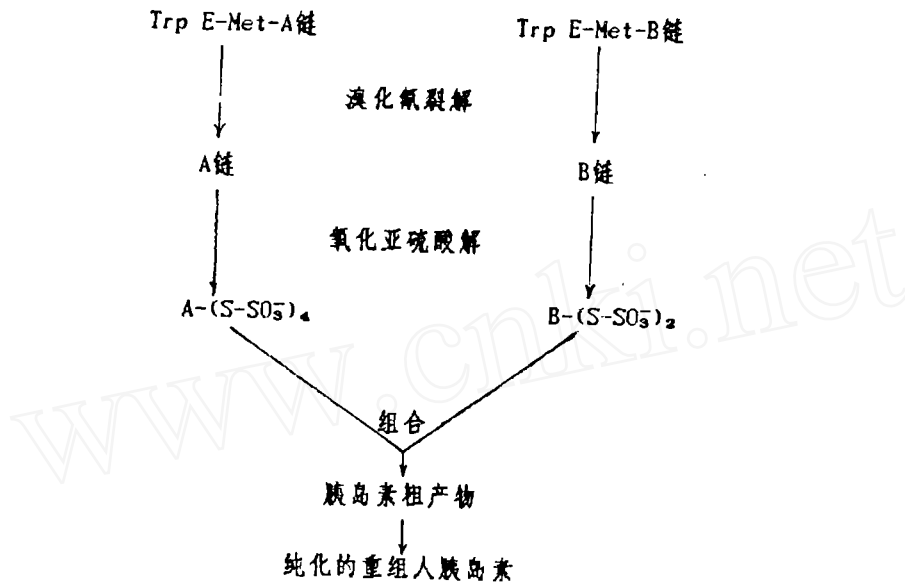


图 1 由分别克隆 A 和 B 链基因获得人胰岛素^[16]

$\alpha 1$ (MF $\alpha 1$)的信号肽, 单链胰岛素前体和磷酸丙糖异构酶的终止顺序(TPI_T)(图 3a)。这些基因不仅保证了单链胰岛素前体基因高效率转录, 而且借助信号肽将表达产物分泌到发酵液中。表达产物的分离纯化和加工过程如图 4 所示^[11, 17]。

值得指出的是, Markussen 等^[18]在将表达产物加工成人胰岛素时采用了巧妙的转肽方法。纯化的单碱性氨基酸 C-肽单链胰岛素前体, 在过量苏氨酸酯(Thr-OR)的存在下, 用胰

蛋白酶转肽获得[B30Thr·OR]人胰岛素(图 5)。用三氟乙酸脱去苏氨酸上的酯后, 得到结晶人胰岛素。

近来, 张等^[19]基于猪胰岛素通过胰蛋白酶促转肽可变为人胰岛素(Rose K et al, 1983), 人工合成了猪单链胰岛素前体(porcine insulin precursor, PIP)基因, 将其插入质粒 pVT^[20](图 3b), 转化酵母, PIP 的分泌表达量达 40—50 mg/L。表达产物经简便地分离纯化和转肽获得结晶人胰岛素。

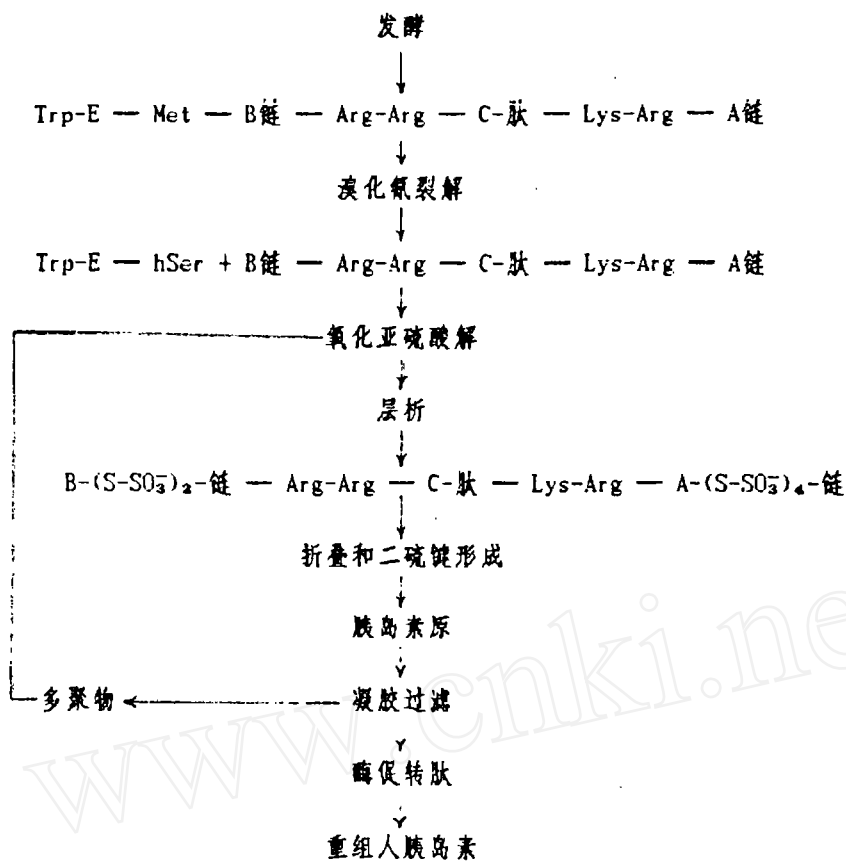


图 2 由克隆胰岛素原获得 人胰岛素^[16]

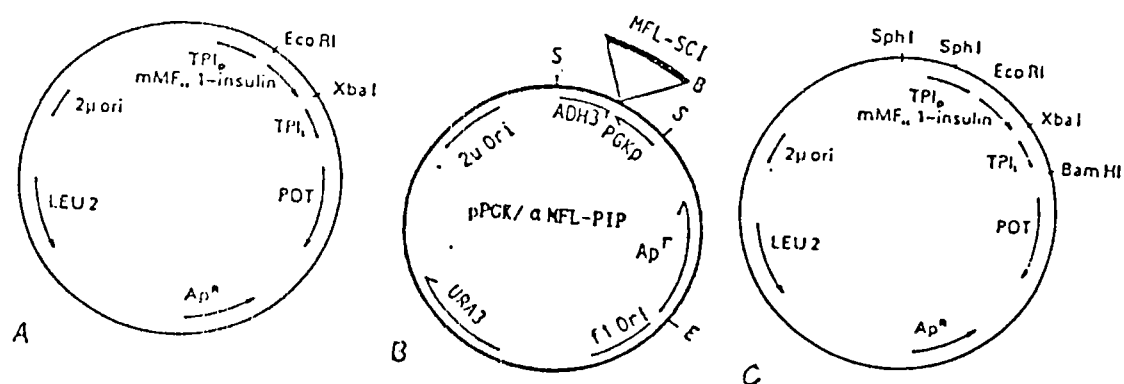


图 3 表达胰岛素前体的酵母质粒

A, 单碱性氨基酸 C-肽^[17]; B, 单碱性氨基酸 C-肽^[18]; C, 双碱性氨基酸 C-肽^[21];

酵母连续发酵
 离心去菌体
 用离子交换树脂柱吸附表达产物胰岛素前体
 解吸附
 使胰岛素前体结晶
 用阴离子交换树脂层析
 使胰岛素前体结晶
 用胰蛋白酶转肽
 在低 pH 下凝胶过滤去胰蛋白酶
 用阴离子交换树脂层析去除胰岛素前体和去 B30 胰岛素
 脱保护基
 用制备型 HPLC 纯化
 单组份人胰岛素

纯 度	
酵母蛋白 ppm	HPLC %
10,000—20,000	~90
<10	~97
<1	~99.5

图 4 酵母表达产物的分离纯化和加工^[11]

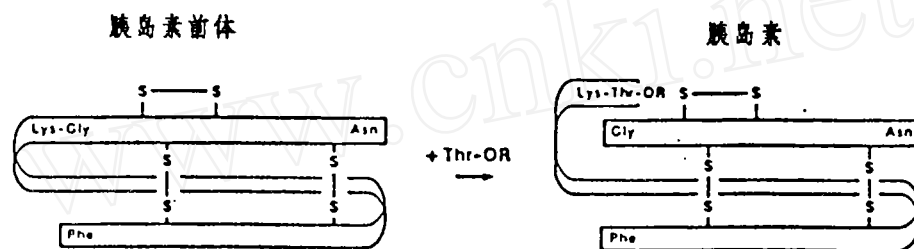


图 5 胰蛋白酶酶促转肽作用^[11]

Thim 等^[21]将单链胰岛素前体基因插入质粒 CPOT(图 3c), 也实现了人胰岛素在酵母中的分泌表达。与 Markussen 等不同的有以下两种: ①Thim 等用的是双碱性氨基酸 C-肽单链胰岛素前体, 如 B-Arg-Arg-A, B-Arg-Lys-A, B-Lys-Lys-A 等。②联合使用胰蛋白酶和羧肽酶 B, 加工纯化的单链胰岛素前体获得人胰岛素。

四、结束语

如前所述, 由于胰岛素在临床上的重要性和巨大的市场需求, 极大地吸引着人们通过 DNA 重组技术生产胰岛素。因此, 有关基因工程胰岛素的报道很多, 上面仅就一些与生产基因工程人胰岛素关系密切的报道作了简单介

绍, 有很多工作没有包括进去。例如, 除了上述的表达系统外, 也有人用信号肽将表达产物分泌到大肠杆菌的周质^[22], 还有人用枯草杆菌^[43]或酵母 *K. lactis*^[24]分泌表达单链胰岛素前体, 等等。

美国的 Eli Lilly 和丹麦的 Novo 是目前向市场供应基因工程人胰岛素的主要厂家, 他们分别研究和利用大肠杆菌和酵母生产人胰岛素。这两个系统各有利弊, 一般讲, 大肠杆菌系统表达效率高, 但后处理较难; 酵母系统表达量虽然比较低, 对表达产物的处理较简便。关键是如何扬长避短, 而扬长避短的方法是很难从公开发表的文献中找到的。但从 Eli Lilly 和

Novo 的成就,说明他们在使用自己系统方面各有千秋。总之,基因工程人胰岛素的临床应用正在迅速增加,正在取代着经典的从家畜的胰脏中提取的动物胰岛素^[25]。

人胰岛素在微生物中合成的成功,极大地促进了胰岛素蛋白质工程的研究,人们已经和正在通过分子设计研究和制造新型的胰岛素,如速效、高活力或具有特殊功能等的胰岛素。虽然尚未见很成功的报道,但这种美好的前景是能够实现的。

参考文献

- [1] Banting F G and Best C H. J. Lab. Clin. Med., 1922; 7:251.
- [2] Jackson D A, Symons R H and Berg P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1972, 69:2904.
- [3] Ullrich A, Shine J, Chirgwin J et al. Science, 1977, 196:1313.
- [4] Bienz-Tadmer B. Bio/Technology, 1993, 11:168.
- [5] Steiner D F, Cunningham D, Spigelman L. Science, 1967, 157:697
- [6] Steiner D F. Diabetes, 1977, 27(supp.1):145.
- [7] Bell G I, Swain W F, Pictet R et al. Nature, 1979, 282:525.
- [8] Goeddel D V, Kleid D G, Bolivar F et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76:106.
- [9] Blundell T, Dodson G, Hodgkin D et al. Adv. Protein Chem., 1972, 26:279.
- [10] Wetzel R, et al. Gene, 1981, 16:63.
- [11] Markussen J, et al. Peptide 1986. Berlin-New York:

Walter de Gruyter & Co., 1987:189—194.

- [12] Sures I, Goeddel D V, Gray A et al. Science, 1980, 208:57.
- [13] Chance R E, et al. Insulin, Growth Hormone and Recombinant DNA Technology. New York:Raven Press, 1981:71—86.
- [14] Burnett J P, Experimental Manipulation of Gene Expression. New York:Academic Press, 1983:259—277.
- [15] Frank B H, et al. Peptides: Synthesis-Structure-Function, Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium. Rockford, IL: Pierce Chemical Co., 1981:729—738.
- [16] Owens D R, Vora J P and Dolben J. Biotechnology of Insulin Therapy. Oxford:Blackwell, 1991:24—41
- [17] Markussen J, Hougaard P, Ribel U et al. Protein Engineering, 1987, 1:205.
- [18] Markussen J. Methods in Diabetes Research. New York:Wiley & Sons, 1984, vol 1(part A):403.
- [19] 张友尚,胡红明,蔡若蓉等. 中国科学,待发表.
- [20] Vernet T, Dignard D and Thomas D Y. Gene, 1987, 52:225.
- [21] Thim L, Hansen M T, Norris K et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83:6766.
- [22] Chan S J, Weiss J, Konrad M et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78:5401.
- [23] Efimov V A, et al. In Bayov A A (ed) Abstracts. The All Union Conference on New Directions in Biotechnology, Moscow, 1984:34—25.
- [24] 张保焰,冯佑民,张友尚. 见:中国系列化学会第一次基因结构、克隆与调控学术讨论会论文摘要. 中国系列化学会第五次基因结构、克隆与调控学术讨论会,厦门,1993:73.
- [25] Klausner A. Bio/Technology, 1993, 11:S35.

Retrospect and prospect of Recombinant Human Insulin Research

Feng Youmin Zhang Youshang

(State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

Abstract The development history of recombinant insulin research and recent progresses in the studies of recombinant human insulin were briefly reviewed.

Key words Insulin, Recombinant human insulin