

促胰岛素释放肽和 GLP-1 类似物研究进展

李宗杰¹, 车巧林¹, 杨丽萍²

(1. 南京农业大学 生命科学学院, 中国江苏 南京 210095 2. 云南省科技情报研究所, 中国云南 昆明 650051)

摘要:近年来,从细菌、真菌等低等生物和爬行类、哺乳类高等动物的体内,都发现存在着结构和功能相关、相似的促胰岛素释放肽或 GLP-1 类似物。目前国内外研究都在密切关注胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 和 GLP-1 类似物等胰高血糖素家族肽,对其进行基因工程高效表达或通过组合化学方法修饰、改造,从而设计治疗 II 型糖尿病的多肽类药物。但是,从天然生物体内,尤其是最近从两栖类动物皮肤分泌液中中和响尾蛇毒素中发现了大量能稳定促进胰岛素释放的生物活性肽,却还没有受到足够的重视,它们将很可能为筛选和开发出安全、高效、半衰期长的治疗 II 型糖尿病新药物提供全新的思路和广阔的前景。

关键词:促胰岛素释放肽;GLP-1 类似物;胰岛素释放;糖尿病

中图分类号:R977.1

文献标识码:A

文章编号:1007-7847(2006)S0-0115-08

Advances in Insulintropic Peptides and GLP-1 Analogs

LI Zong-jie¹, CHE Qiao-lin¹, YANG Li-ping²

(1. School of Biological Science, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, Jiangsu, China;

2. Yunnan Science-Technology Information Research Institute, Kunming 650051, Yunnan, China)

Abstract: Recently, large amounts of insulintropic peptides and GLP-1 analogs with similar or relating structures and functions have been found from various kinds of natural lives, ranging from simple bacterials and epiphytes to evolutionary reptiles and mammalians. Right now, the GLP-1 and some GLP-1 analogs have been focused and researched by gene engineering expression and chemistry synthesizing modification to develop new peptidal drugs to treat type 2 diabetes. However, other insulintropic peptides, especially those being found from the secretions of amphibian skins and the venoms of rattle snakes, have not been attached enough attention. Obviously, those insulintropic peptides will certainly provide novel ideas and broad prospects to explore new drugs, with security, high efficiency, and long half-life to treat type 2 diabetes.

Key words: insulintropic peptides; GLP-1 analogs; insulin releasing; diabetes

(*Life Science Research*, 2006, 10(2): 115 ~ 122)

由于胰岛素治疗糖尿病存在低血糖反应、胰岛素过敏、皮肤感染、胰岛素抗药性、胰岛素水肿、体重增加等缺点,研究开发可以克服上述缺点的口服药物就显得极为重要。而促胰岛素释放肽的

优点在于降糖作用只发生在较高血糖浓度下,从而避免了胰岛素过度分泌导致的低血糖发生,可以长期安全使用。而且,促胰岛素释放肽对磺酰脲类药物治疗失效的病人依然有效;它还能改善

收稿日期 2006-04-07;修回日期 2006-06-05

作者简介:李宗杰(1982-),男,山东临沂人,硕士研究生,主要从事促胰岛素释放肽的分离纯化研究;杨丽萍(1952-),女,云南昆明人,副研究员,通讯作者;Tel: 0871-3199717, E-mail: ynpsbi@163.com.

受体细胞对胰岛素的敏感性,有助于治疗胰岛素抗性;长期治疗还可改善病人果糖胺和糖化血红蛋白等中长期生化指标;对于肥胖引起的 II 型糖尿病,它可通过抑制胃排空作用,帮助病人控制饮食或减肥。因此研究开发含有促胰岛素释放多肽的口服药物,通过其刺激胰岛 β 细胞的再生和增殖,并促进 β 细胞分泌胰岛素已成为治疗 II 型糖尿病的主攻方向之一。

1 促胰岛素释放肽研究概况

自从 1984 年美国波士顿总医院发现人的肠道内存在一类促进胰岛素分泌的多肽—胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 以来,合成有促进胰岛素释放活性的多肽药物已成为治疗 II 型糖尿病的研究热点。

当前国内外的研究主要集中在利用现代基因工程技术和组合化学的手段改造、修饰 GLP-1、GLP-1 类似物和 GIP 等肠促胰岛素^[1] (incretin) 多肽的结构。近年来,有关学者又分别从细菌、真菌、昆虫类^[2]、鱼类^[3]、两栖类^[4-10]、爬行类^[11-13]等多种天然生物体内,发现了大量有促进胰岛素分泌活性的促胰岛素释放肽 (insulintropic peptide) 和 GLP-1 类似物。这表明博大的多物种天然生物资源库,为研究开发有促进胰岛素释放活性的多肽药物提供了重要而又广泛的来源。

2 各类促胰岛素释放肽的发现及其结构功能特点

2.1 肠促胰岛素 (incretin hormones)

经研究发现等量的口服葡萄糖与静脉输注葡萄糖相比,可以更多地促使胰岛素释放,表明口服营养物质可刺激肠源性信号,经肠道作用促进胰岛素分泌增加,而胃肠道外营养物质的吸收无此作用。1930 年 La Barre 和 Still 将粗胰泌素 (secretin) 进一步纯化后,得到了促进胰腺外分泌而不降血糖和降血糖但不促进胰腺外分泌的两个活性组分,并指明后者的降糖作用依赖于胰岛素的分泌,La Barre 将这个具有降血糖作用的活性组分称为“肠促胰岛素 (incretin)”。经研究表明肠促胰岛素中,只有胰高血糖素样肽-1 (glucagons like peptide-1, GLP-1) 和葡萄糖依赖性促胰岛素分泌多肽 (glucose-dependent insulintropic polypeptide, GIP) 两种成分的分泌活性最强。

2.1.1 葡萄糖依赖性促胰岛素分泌多肽 (GIP)

GIP 是由分布于十二指肠和空肠的 K 细胞分泌的^[14],是一个由 42 个氨基酸残基构成的多肽,其前体是含 153 个氨基酸残基的多肽,是 Brown 等 1973 年发现的第一个肠促胰岛素。不过,GIP 最初被发现具有抑制胃酸分泌活性,又被称为肠抑胃肽 (gastric inhibitor polypeptide),其肠促胰岛素活性是后来才被发现的^[15]。GIP 受体是一种 II 型 G 蛋白偶联的受体,是以胰泌素——胰高血糖素家族的肽类为配体的受体超家族的成员之一。GIP 通过与胰岛 β 细胞的相应受体相互作用,提高 cAMP 的水平,使胞内 Ca^{2+} 浓度升高,从而促进含有胰岛素的分泌小泡的胞吐作用。对胰岛 β 细胞株的研究发现,GIP 可以促进 β 细胞增生和存活,GIP 还在脂肪细胞中调节脂肪代谢,包括刺激脂蛋白酯酶活性和脂肪酸合成。可是当 GIP 用于 II 型糖尿病患者时,疗效与期望值相差甚远,所以 GIP 该如何用于治疗 II 型糖尿病还在研究中。Lauritsen 等对不同部位回肠段切除后的患者和由腹腔疾病的患者的研究表明,肠促胰岛素释放活性与 GIP 的分泌并不完全相关,这就提示小肠内必定有另外一种肠促胰岛素在同时起作用^[16]。

2.1.2 胰高血糖素样肽-1 (glucagons like peptide-1, GLP-1)

在发现 GIP 后,回肠切除和其他大量实验表明,小肠内的另外一种肠促胰岛素很可能是 GLP-1。1981~1982 年,Lund 等克隆了鲑鳊鱼 (anglerfish) 胰腺中胰高血糖素原 (preglucagon, PG) 的 cDNA,发现 PG 含两个独立的非等位基因,分别编码胰高血糖素和一个胰高血糖素相关肽 (glucagons related peptide, GRP),胰腺和肠道中都有胰高血糖素原的 mRNA 表达,因此推测 GRP 就是这个新的肠促胰岛素 GLP-1^[17]。随后,Graeme Bell 等人从仓鼠中第一次分离出了哺乳类的胰高血糖素原 cDNA,其编码 3 种胰高血糖素相关肽,即胰高血糖素和 Graeme Bell 等命名的 GLP-1 和 GLP-2。哺乳类的 cDNA 显示 GLP-1 由 37 个氨基酸残基构成,后来证实其生物活性形式是 GLP-1 (7-36)。

GLP-1 主要由分布于空肠、回肠和盲肠的神经内分泌 L 细胞分泌, GLP-1 受体在体内分布广泛,用 Northern blot 和 RNase protection analyses 方法已在胰腺、肺、胃、心脏和脑组织鉴定出 GLP-1 受体的 mRNA。GLP-1 通过胰岛 β 细胞表面的 G 蛋白偶联的 GLP-1 受体结合发挥增强胰

胰岛素释放作用,此受体属于与 G 蛋白偶联的 7 次跨膜的胰高血糖素受体家族成员。

GLP-1 能抑制胰岛 β 细胞凋亡,促进胰岛 β 细胞再生,并具有改善胰岛素敏感性,延缓胃排空,降低胰高血糖素和降低食欲等生理作用,而且在降低血糖的同时不会增加体重,是治疗 II 型糖尿病的理想药物。但是天然的 GLP-1 在体内很快就被二肽肽酶 IV (dipeptidyl peptidase IV, DPP IV) 降解, GLP-1 的半衰期仅 2 min 左右。而且降解生成的片段 GLP-1 (9-36) 是 GLP-1 受体的拮抗剂,使得 GLP-1 与其受体的亲和力降低至原来的 1%,即使有新的 GLP-1 补充,也无法发挥正常的生理作用。所以,目前研究的药物都需要采取多种措施来克服这一难题。

2.2 细菌外毒素 (bacteria exotoxin)

2.2.1 霍乱毒素 (cholera toxin)

ChTx 是一种 S 型霍乱菌弧菌 (*Vibrio cholera*) 的外毒素,是 'A-B' 寡聚型的促胰岛素释放的蛋白质毒素,其作用的分子机制已被阐明。ChTx 通过 'B' 亚基结合到细胞表面的神经节苷脂的 G_{M1} 受体上,通过硫酸减少和亚单位解离激活 'A' 亚基来完成全毒素的内化作用。1985 年, Malaisse 等人^[18]发现,将 ChTx 和大鼠胰岛细胞共培养,ChTx 可通过 ADP 核糖基化作用将 G 蛋白 α 亚单位由轻形转变成重形,使腺苷酸环化酶的亚细胞微粒片段活性和对 ATP 的敏感性增加,导致 cAMP 浓度升高,从而促进胰岛细胞的胰岛素释放。

2.2.2 百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX)

PTX 和 ChTx 相似,也是一种 'A-B' 寡聚型的促胰岛素释放的细菌蛋白质外毒素,可促进 G 蛋白 α 亚单位的 ADP 的核糖基化作用^[19]。但是,PTX 的酶促过程、G 蛋白靶位和作用结果与 ChTx 明显不同。PTX 通过 'A' 亚基催化 G 蛋白的单个 ADP 的核糖基化作用,通过细胞表面受体阻止 G 蛋白激活。PTX 的作用靶位是 G_i 和 G_o 蛋白 Mr 为 39~41 kDa 的 α 亚单位,因而 PTX 不与效应物的 G 蛋白偶联受体家族 GPCRs 偶联。PTX 和 ChTx 都可以导致 cAMP 浓度升高,但是与 ChTx 不同的是,PTX 不偶联 GPCRs 介导腺苷酸环化酶的抑制,ChTx 则直接刺激 GS 型 G 蛋白。

2.3 鹅膏菌毒素 (amanita toxins)

α - 鹅膏毒肽 (α -amanitin), 又称 α - 鹅膏蕈碱, 是条纹毒鹅膏菌 (*Amanita phalloides*) 所生成主要毒素之一,是具有双环结构的八肽毒素,误食后通

常可导致肝损伤和低血糖反应。据 Carlo 等^[20]报道,鹅膏菌毒素在体内和体外都可以促进胰岛素释放。他们对 10 例条纹毒鹅膏菌中毒的病人血清中葡萄糖、胰岛素和 C- 肽含量进行测定,发现胰岛素和 C- 肽含量明显高于对照组 ($P < 0.01$)。他们又检测了 α - 鹅膏毒肽 (α -amanitin) 对体外培养的大鼠胰岛细胞的作用,研究表明两种浓度 (5 mg/L $P < 0.02$, 50 mg/L $P < 0.01$ vs controls) 的 α - 鹅膏毒肽都可以促进胰岛素释放,尤其是浓度为 50 mg/L 的 α - 鹅膏毒肽与对照组的差别更加明显。

2.4 昆虫毒素 (insect toxins)

2.4.1 胡蜂 (wasp) 毒素——肥大细胞脱粒肽 (mastoparan)

肥大细胞脱粒肽 (mastoparan) 是一种存在于胡蜂 (*vespa*) 毒液的阳离子十四肽 (INLKALAALAKKIL), 可以刺激胰岛 β 细胞分泌胰岛素^[21], 还可以诱导肥大细胞分泌组胺。Amin 等分别研究了对两种胰岛素分泌细胞系 β TC3 和 INS-1 细胞的作用,发现 mastoparan 可以明显地促进胰岛素分泌,并证实了其促进胰岛素分泌的作用受 Rho G 蛋白亚家族,特别是 Rac 蛋白调节的。他们发现如果将 β TC3 细胞与抑制 Rho, Cdc42 和 Rac 蛋白的难育梭状杆菌毒素 B (*Clostridium difficile* toxin B) 共育,或者将 β TC3 细胞与抑制 Ras, Rap 和 Rac 蛋白的索氏梭菌毒素 (*Clostridium sordellii* toxin) 共育,将会大大减弱 mastoparan 刺激释放胰岛素的效应,说明 Rac 蛋白在 β 细胞分泌胰岛素的过程中有非常重要的调节作用。为了进一步证实上述结论,他们将 Rac (N17Rac) 在 INS-1 细胞中稳定表达,结果导致 mastoparan 刺激释放胰岛素的效应明显减弱,从而确切证明了 Rac 的调节作用。

2.4.2 黑寡妇蛛毒素—— α -latrotoxin α -LTX)

α - 黑寡妇蛛毒素 (α -latrotoxin α -LTX) 是珠腹蛛科的黑寡妇蛛 (*Latrodectus mactans*) 产生的一种神经毒素,相对分子质量为 130 kDa, 对人有剧毒。 α -LTX 可作用于各种类型的突触,对 Na^+ 和 K^+ 通道都有作用,能引起突触前膜的去极化而大量释放神经递质, Ca^{2+} 可通过 α -LTX 毒素诱导生成的离子通道流入。Lang 等^[21]以含胰岛素的高密度中心小泡 (large dense core vesicles LDCVs) 为研究模型,发现在胞外无 Ca^{2+} 条件下, α -LTX 可以明显促进 INS-1 和 MIN6 两种胰岛素细胞系分

泌胰岛素, 而对 HIT-T15 和 RINm5F 两种胰岛素细胞系的作用却不明显. α -LTX 的受体 latrophilin 是 G 蛋白偶联受体家族 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 中的一员. 据 Holz 和 Habener^[22] 研究发现, α -LTX 与胰高血糖素样肽家族在结构上有高度的同源性, 可作为 GLP-1(7-36) 受体拮抗剂而刺激胰岛细胞分泌胰岛素.

2.5 鮫鱈鱼体内的胰高血糖素样肽

Lund 等发现鮫鱈鱼 (anglerfish) 的胰高血糖素原 (PG) 的 cDNA 含有胰高血糖素相关肽 (GRP) 基因, 并推测 GRP 就是 GLP-1^[17], 已如前述. 后来有人证实^[31], 鮫鱈鱼 (anglerfish) 胰岛提取物中确实存在胰高血糖素样肽, 且是前胰高血糖素原 (pre-pro glucagon II, PG II) 的降解代谢片段. 他们将放射性同位素标记的分子质量为 2 500 ~ 8 000 Da 的多肽经不同条件下反相高效液相 (reverse phase HPLC) 纯化, 发现 aPPG-II [52-80] 和 aPPG-II [89-122] 两个降解代谢片段很容易在胰岛提取物中被纯化出来. 将这两个多肽的 13 个不同的氨基酸残基进行适当标记, 经放免法检测呈现胰高血糖素样肽免疫反应性.

2.6 两栖类动物体内的促胰岛素释放肽 (amphibian insulintropic peptides)

两栖类动物皮肤中富含多种与哺乳动物调节有关的生物活性肽, 并且具有广泛而又复杂的生物学效应. 例如铃蟾肽 (Bombesin, BN) 就是一种内分泌促进剂, 1982 年 Chtei 等^[23] 就发现 BN 注入人体内可以引起胰岛素释放. 最近, Marenah 等在多种蛙和蟾蜍的皮肤分泌液中发现大量促胰岛素释放肽, 显示两栖类动物皮肤是促胰岛素释放肽的巨大储存库.

2.6.1 滑红眼蛙 (*Agalychnis litodryas*)

Marenah 等人将电击法获得的滑红眼蛙 (*Agalychnis litodryas*)^[4] 皮肤分泌液经反相高效液相 (reverse phase HPLC) 纯化, 收集纯峰样品作用于葡萄糖敏感的 BRIN-BD11 胰岛细胞系, 发现有 20 个峰的样品有显著的促进胰岛素释放活性. 再经质谱法测定其分子质量得到 1.2, 1.3, 1.7, 1.8, 1.11, 1.12, 2.9, 2.12 八个峰的分子质量在 1 649.2 ~ 4 988.9 Da 之间, 将促进胰岛素释放活性最强的两个峰 1.7 和 2.9 进行 N 端氨基酸序列分析, 得到峰 2.9 的序列: AVWKDFLKNIGKAAGKAVLNSVDTMUNE, 为含有 28 个氨基酸残基的多肽. 经比较发现, 它与索娃叶泡蛙 (*Phyllomedusa*

sauvagioi) 皮肤抗菌肽的 75 个氨基酸残基前体 (dermaseptin BIV precursor) 有 79% 的同源性, 是一种很有研究价值的新型生物活性多肽. 索娃叶泡蛙皮肤抗菌肽 dermaseptin 是一种含 34 个氨基酸残基抗真菌肽, 能抑制烟曲霉和黑曲霉, 其 75 个氨基酸残基前体的 N 端序列很保守, C 端的序列变化决定了不同种类的抗菌肽.

2.6.2 泽鱼蛙 (*Rana palustris*)

Marenah 等仍用上述方法纯化泽鱼蛙 (*Rana palustris*)^[5] 皮肤分泌液, 并做胰岛素释放活性检测. 结果得到促胰岛素释放活性较强的 4 个峰 2.6, 3.1, 3.8, 4.3 对应生物活性多肽的分子质量分别为 8 560.4 Da, 4 919.9 Da, 2 873.5 Da, 3 848.7 Da, 然后将上述多肽样品经 Applied Biosystems 491 Procise Protein Sequencer 分析序列结构, 峰 3.8 的基本氨基酸序列被成功测出, 是一个二十七肽: ALSILRGLEKLAKMGIALTNCK-ATKKC. 有趣的是, 在 SWISSPROT FASTA 数据库中用 GCG 序列分析程序 (www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Option/gcg.html) 比较, 发现这个二十七肽正是 Basir 等 2000 年发现的抗菌 palustrin-1c. 更有意思的是, palustrin-1c 和含有二硫键的抗菌肽 brevinin-1 同是二十七肽而且含有 13 个氨基酸相同, 同源率为 48%, brevinin-1 也能刺激 BRIN-BD11 细胞释放胰岛素, 并且存在浓度依赖性.

2.6.3 多彩铃蟾 (*Bombina variegata*)

Marenah 等对多彩铃蟾 (*Bombina variegata*)^[6] 皮肤分泌液研究, 发现了多种能促胰岛素释放的活性肽, 有些可能是哺乳动物的类似物, 这就为开发治疗糖尿病的药物提供了丰富的自然资源. 他们将皮肤分泌液经过 HPLC 收集到的纯峰 21-25 样品与 BRIN-BD11 细胞共育, 发现这些样品能刺激 BRIN-BD11 细胞胰岛素释放量增大 1.5 ~ 3.5 倍. 峰 21 对应的多肽分子质量为 1 641.7 Da, 氨基酸序列为: Pyr-QRLGHQWAVGHLM, 是一种铃蟾肽 (His6 bombesin) 的类似物. 峰 22 对应的多肽分子质量为 1 662.6 Da, 氨基酸序列为: Pyr-DSFGNQWARGHFM, 与铃蟾肽的同源性为 72%. 峰 23 对应的多肽分子质量为 1 619.8 Da, 氨基酸序列为: Pyr-QRLGNQWAVGHLM, 正是一种铃蟾肽. 此外, 他们还发现了两种全新的促胰岛素释放肽: 峰 24 和 25 对应的多肽分子质量分别为 1 650.5 Da 和 2 300 Da, 氨基酸序列分别

为 :GKPFYPPPIYPEDM (GM-14)、IYNAICPCK-HCNKCKPGLLAN (IN-21)。

2.6.4 *Phyllomedusa trinitatis* 蛙

Marenah 等在 *Phyllomedusa trinitatis*^[7] 皮肤中,发现了多种能刺激 BRIN-BD11 细胞胰岛素释放量增大 1.5~2.5 倍的活性肽,用质谱法测出其中 3 个活性肽样品的分子质量分别是 2 996.4 Da, 3 379.9 Da, 和 8 326.4 Da。测得分子质量为 2 996.4 Da 的氨基酸序列 ALWKDILKN-VGKAAGKAVLNTVTDMVNQ, 比较后发现此二十八肽和索蛙叶泡蛙皮肤抗菌肽的 75 个氨基酸残基前体 (dermaseptin BIV precursor) 的 C 端有 100% 的同源性,表明此二十八肽是叶泡蛙皮肤抗菌肽 (dermaseptin) 家族的一员。

2.6.5 *Rana saharica* 蛙

Marenah 等在 *Rana saharica*^[8] 皮肤分泌液中,分离出两种能刺激 BRIN-BD11 细胞胰岛素释放量增大 1.5~3 倍的活性肽,质谱法测定分子质量分别为 1 892.6 Da 和 2 930.8 Da。Edman 降解法测得分子质量为 1 892.6 Da 的氨基酸序列为:KGAAGLLEVASCKLSKSC, Marenah 将其命名为 KC-19,比较其新异性发现 KC-19 与 Rugosin A 有 68% 的同源性。Rugosin A 是最初从粗皮蛙 (*Rana rugosa*) 皮肤分泌液中分离得到的抗菌肽,特异性地抑制革兰氏阳性菌,其抑菌活性可能与二硫键和 C 端的结构特异性有关。

2.6.6 *Agalychnis calcarifer* 蛙

Marenah 等在 *Agalychnis calcarifer*^[9] 皮肤分泌液中,发现了一种体外实验有很强的刺激胰岛素释放活性的十三肽,其分子质量为 1 653.2 Da,一级结构为:RRKPLFPLIPRPK(RK-13)。在数据库比较后,发现 RK-13 与富含脯氨酸、精氨酸的抗菌肽 PR-39 的 N 端区域有 53.8% 的同源性。经证实人工合成的 RK-13 剂量依赖性地刺激胰岛素释放。但与 PR-39 不同是,RK-13 对酵母细胞、革兰氏阴性菌和阳性菌都没有抑菌活性。

2.6.7 美洲豹纹蛙 (*Rana pipiens*) 又名豹蛙

Marenah 等在豹蛙 (*Rana pipiens*)^[10] 皮肤分泌液中,发现了一种体外实验能刺激胰岛素释放量增大 1.2~1.8 倍的二十四肽,其分子质量为 2 562.6 Da,基本氨基酸序列为:FLPIIAG-VAAKVFPKIFCAISKKC,在数据库比较后发现此二十四肽与抗菌肽 pipinin-1 有 100% 的同源性,说明发现了 pipinin-1 的促进胰岛素释放的活性。

2.7 爬行类动物毒素 (reptile venoms)

2.7.1 南美响尾蛇 (*Crotalus durissus terricus*) 蛇毒

2.7.1.1 响尾蛇胺 (Crotamine) 异构物

响尾蛇胺 (Crotamine) 是南美响尾蛇 (*Crotalus durissus terricus*) 毒液中的 4 种主要神经毒素成分之一,相对分子质量约为 4.5~5 kDa,由 42 个氨基酸残基组成,其中 6 个半胱氨酸形成二硫键。Toyama 等^[11]通过交联葡聚糖分子筛 G75 和反相高效液相 RP-HPLC 的分离方法,从南美响尾蛇 (*Crotalus durissus terricus*) 毒液中得到响尾蛇胺的两种异构物——F2 和 F3。质谱法测得 F2 和 F3 分子质量相同,为 4 882 Da。活性检测显示 F2 和 F3 都可以导致小鼠肌肉痉挛和痉挛性麻痹。低葡萄糖浓度下 (2.8~5.6 mmol glucose/L),二者都不能促进胰岛素释放;而在高葡萄糖浓度下 (16.7 mmol glucose/L),F2 可以使体外培养的胰岛的胰岛素释放量增加到 1.5~2.0 倍,而 F3 却没有促进胰岛素释放活性。Marcos 推测,F2、F3 对胰岛 β 细胞的作用机制和对骨骼肌的作用机制不同,很可能是由于 F2、F3 与胰岛 β 细胞 Na^+ 通道结合而导致。因此,F2 和 F3 可作为研究 Na^+ 通道与胰岛 β 细胞分泌胰岛素关系的重要工具。

2.7.1.2 Convulxin 相关蛋白 (Convulxin-like protein)

Convulxin 是南美响尾蛇 (*Crotalus durissus terricus*) 毒液中的另一种主要神经毒素成分,可以诱导产生惊厥反应。2001 年,Toyama 等^[12]在南美响尾蛇毒液中分离纯化出一种 Convulxin 相关蛋白 (Convulxin-like protein),其分子质量在无 DDT 时为 78 kDa;有 DDT 时为 12~13 kDa。结构分析发现其由两个不同的亚基 (α 多肽链和 β 多肽链) 组成。Edman 降解法测序发现 α 多肽链和 β 多肽链的 N 端氨基酸序列分别为 GLHCPSDWYAY-DGHCKYKIFNEEMNWED 和 GFCCPSHWSSYS-RYCYKFFSQEMNWEDA EK。通过数据库比较序列发现,Convulxin 相关蛋白与蛇毒中分离出的其它凝集素有很高的同源性 (48%~66%)。很意外的是,Convulxin 相关蛋白不具有促进红细胞凝集的活性。但 Convulxin 相关蛋白在低糖 (2.8 mmol glucose/L) 和高糖 (16.7 mmol glucose/L) 的条件下,都能明显的促进体外培养的胰岛分泌胰岛素,胰岛素释放量可达 3.2~3.75 倍。

2.7.1.3 磷脂酶 A₂ (Phospholipase A₂, PLA₂)

响尾蛇毒素 Crotoxin 是南美响尾蛇 (C.

d. Terrificus) 毒液的主要成份, 由 Crotopotin 和磷脂酶 PLA₂ 两个亚基组成, 其中 Crotopotin 可作为伴侣分子提高 PLA₂ 对神经肌肉接头的毒性. Toyama 等在南美响尾蛇毒液分离纯化出的 Crotopotin 和磷脂酶 PLA₂^[13], 都可以在低糖条件下 (2.8 mmol glucose/L) 刺激体外培养的胰岛分泌胰岛素, 而磷脂酶 PLA₂ 在高糖条件下 (16.7 mmol glucose/L) 仍可刺激体外培养的胰岛分泌胰岛素. 磷脂酶 PLA₂ 可以水解甘油三磷脂并生成自由脂肪酸, 其中包括花生四烯酸 (arachidonic acid). 经 Marcos 等研究发现, 磷脂酶 PLA₂ 促进胰岛素分泌可能与胰岛内花生四烯酸的生成量增多有关.

2.7.2 蜥蜴毒素 (lizard venom)

目前世界上只发现两种蜥蜴有毒, 均产在美国和墨西哥, 分别是珠状毒蜥 (*Heloderma horridum*) 和钝尾毒蜥 (*Heloderma suspectum*).

2.7.2.1 Exendin-4 的发现和应

Exendin-4 最初是由 Raufman 等^[24] 在钝尾毒蜥 (*Heloderma suspectum*) 中分离出的由 39 个氨基酸组成的多肽, 其氨基酸序列: HGEDGTFTSDL SKQMEEEA VRLFIEWLKN GGPSSGAPPPS. Exendin-4 是极强的 GLP-1 受体激动剂, 因此在 exendins 家族中最受研究者的关注, 而且研究进展最为迅速. 目前 Amylin 医药公司和 Eli Lilly 公司联合开发 Exendin-4 作为治疗 II 型糖尿病的药物, 又名 AC2933, 商品名为 Exenatide. Exenatide 具有促进 II 型糖尿病患者胰岛素分泌, 减缓肠道内营养素吸收, 刺激胰岛细胞的再生和增殖并控制肥胖者体重等作用, 这些突出的特性, 无疑显露出其在 II 型糖尿病治疗中的广阔前景.

2.7.2.2 Exendin-3 的发现

Exendin-3 最初是由 Raufman 等^[25] 1990 年在珠状毒蜥 (*Heloderma horridum*) 中分离出的由 39 个氨基酸组成的多肽, 其氨基酸序列为: HSDDGTFTSLSKQMEEEA VRLFIEWLKN GGPSSGAPPPS. 比较序列后发现, Exendin-3 和胰高血糖素、GLP-1、Exendin-1 (Helospctin) 以及 Exendin-2 (Helodermin) 的同源性分别为 48%、50%、32%、26%. Exendin-3 与 Exendin-4 的有 95% 的同源性, 一级结构的差别仅仅是第 2、3 个氨基酸残基不同: Ser²-Asp³ (Exendin-3); gly²-glu³ (Exendin-4). 但是, 正是由于这一小小的结构差异, 导致其生物活性和在临床研究、应用上有较大的差别. Exendin-3 促进

胰岛素释放活性不如 Exendin-4 强, 且鲜有人报道; 前者可以促进豚鼠 (guinea pig) 胰腺腺泡细胞内胰淀粉酶 amylase 释放和 cAMP 浓度增加. 但是, 考虑到 Exendin-3 与 Exendin-4 的结构高度同源性, Amylin 医药公司已经向其发明人 Dr John Eng 购买了两者的独家专利权.

2.7.2.3 Exendin-2 (Helodermin) 的发现

Helodermin 是由 Vandermeers 等^[26] 1983 年在钝尾毒蜥 (*Heloderma suspectum*) 唾液毒素中发现的, 相对分子质量为 5.9 kDa. 进一步研究得到其氨基酸序列为: HSDAIFTEEYSKLLAKLALQKYLE SILGSSTSPRPPSS, 序列比较发现其与 Exendin-4 的同源性为 20%. 活性检测发现其可促进小鼠腺泡细胞的腺苷酸环化酶的活性, 但是不能提高腺泡细胞的外分泌能力.

2.7.2.4 Exendin-1 (Helospctin I) 的发现

1984 年, Parker 等^[27] 在钝尾毒蜥 (*heloderma suspectum*) 唾液毒素中发现了 2 种 Helospctins, 分别命名为 Helospctin I 和 Helospctin II. Helospctin I 是一个由 38 氨基酸残基组成的多肽: HSDATFTA EYSKLLAKLALQKYLE SILGSSTSPRPPSS 而 Helospctin II 是缺少了第 38 个 Serine 的三十七肽. 序列比较发现 helospctin I 与 Exendin-4 的同源性为 26%. 经 Ahren^[28] 研究发现 helospctin I 可促进小鼠胰高血糖素释放, 而胰岛素释放活性却不明显.

3 胰岛素合成与分泌的机制

胰岛素在胰岛 β 细胞中合成, 其控制基因在第 11 对染色体短臂上^[29]. 在细胞核中, 第 11 对染色体短臂上的胰岛素基因区 DNA 向 mRNA 转录, mRNA 从细胞核移向细胞浆的内质网, 翻译成 110 个氨基酸残基的多肽——前胰岛素原 (preproinsulin). 前胰岛素原在粗面内质网中, 经蛋白酶水解作用切除其前肽, 生成 86 个氨基酸残基的胰岛素原 (proinsulin). 胰岛素原包装在囊泡中被运输进入高尔基体, 由蛋白酶水解生成含有 51 个氨基酸残基的胰岛素 (insulin) 和 C 肽 (connecting peptide), 共同释放进入血液中.

血糖水平是调节胰岛素分泌的最重要的因素, 当血糖水平升高时, 葡萄糖与 β 细胞表面的受体结合, 通过 G 蛋白激活腺苷酸环化酶, 使胞内 cAMP 水平升高, 从而将胞外信息传递到胞内^[30]. 通过诱发电压依赖性的 L-型 Ca²⁺ 通道开放^[31], 使大量胞外 Ca²⁺ 内流, 胞内 Ca²⁺ 浓度升高, 快速有效

的刺激胰岛素分泌囊泡的出胞作用,从而引起胰岛素的分泌。

4 GLP-1 类似物与药物开发进展

糖尿病(Diabetes Mellitus)是由遗传基因和生活环境等多种因素导致的人体内胰岛素绝对或相对缺乏,引起血中葡萄糖浓度升高,并出现多饮、多尿、多食等症状一种内分泌代谢性疾病。目前,糖尿病尚无根治的办法,治疗的研究主要集中在胰岛素治疗和口服西药治疗等方面。国内外对治疗 II 型糖尿病的促胰岛素释放多肽类药物研究主要集中在利用现代基因工程和组合化学的手段改造和修饰 GLP-1、GLP-1 类似物等多肽的结构,而且已经取得了可喜的成果。

4.1 Exenatide (Exendin-4)

又名 AC2933,是一种天然的 GLP-1 类似物,已经成为治疗肥胖型 II 型糖尿病患者的最有前景的药物,而且已经获得 FDA 批准上市。

4.2 Liraglutide

又叫 NN2211,是一种长效的酰胺化修饰的 GLP-1 类似物,由诺和诺德制药公司(Novo Nordisk)研制,II 期临床实验结果显示可以显著改善糖尿症状,且无明显毒副作用,目前正在进行 III 期临床研究。

4.3 CJC-1131

CJC-1131 是由加拿大 Conjuchem 公司研发的 GLP-1 修饰物,其 N 末端第二位的 L-Ala 被 D-Ala 取代,并在 C 末端连接了一个酰胺类化合物。可以抵抗 DDP-IV 的降解,II 期临床实验结果表明可以降低血糖水平。

4.4 ZP-10

ZP-10 是由丹麦的 Zealand 公司和法国 Sanofi-Aventis 公司联合研发的 GLP-1 受体激动剂,正处于 II 期临床实验阶段。

4.5 重组胰高血糖素样肽 (rhGLP-1)

上海华谊(集团)公司用基因工程技术来大规模生产促胰岛素分泌多肽——“谊生泰”(rhGLP-1),已经获得国家食品药品监督管理局的临床批文,在解放军总医院进行一期临床试验。

5 展望

对 GLP-1 以及 GLP-1 类似物的研究已经取得了迅速的发展,而从其它天然生物,尤其是最近从两栖类动物皮肤分泌液和响尾蛇毒等发现了大

量能稳定促进胰岛素释放的生物活性肽,还没有受到足够的重视。根据系统进化的理论,从细菌、真菌等低等生物到爬行类、哺乳类等高等动物的体内都存在的结构功能相关或相似的促胰岛素释放肽,其基因和结构的差别必然会导致生物活性和体内代谢途径的差异性和多样性。通过确定有促进胰岛素释放活性的多肽的氨基酸序列及编码基因,利用基因工程快速修饰、改造并高效表达生物活性多肽,研究多肽一级结构和功能的关系,设计治疗 II 型糖尿病的新药物,研究药物代谢动力学,再通过临床实验评估药物的安全性。从而为筛选和开发出安全、高效、半衰期长的治疗 II 型糖尿病新药物提供了广阔的前景。而且诸多来源广泛而又新异的促胰岛素释放肽,为研究生物活性肽与胰岛细胞表面相应受体相互作用的分子机制和胰岛 β 细胞分泌胰岛素的调控机制提供了方便。

参考文献(References):

- [1] HOLST J J, GROMADA J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 287: E199-206.
- [2] AMIN H R, CHEN H Q, KOWLURU A, *et al.* Mastoparan-induced insulin secretion from insulin-secreting TC3 and INS-1 cells: evidence for its regulation by Rho subfamily of G proteins[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(10): 4508-4518.
- [3] NOE B D, ANDREWS P C. Specific glucagon-related peptides isolated from anglerfish islets are metabolic cleavage products of (pre)proglucagon-II[J]. *Peptides*, 1986, 7(2): 331-336.
- [4] MARENAH L, SHAW C, ORR D F, *et al.* Isolation and characterization of an unexpected class of insulinotropic peptides in the skin of the frog *Agalychnis litodryas*[J]. *Regulatory Peptides*, 2004, 120: 33-38.
- [5] MARENAH L, FLATT R P, ORR D F, *et al.* Brevinin-1 and multiple insulin-releasing peptides in the skin of the frog *Rana palustris*[J]. *Journal of Endocrinology*, 2004, 181: 347-354.
- [6] MARENAH L, FLATT R P, ORR D F, *et al.* Skin secretion of the toad *Bombina variegata* contains multiple insulin-releasing peptides including bombesin and entirely novel insulinotropic structures[J]. *Biol Chem*, 2004, 385(3-4): 315-321.
- [7] MARENAH L, McCLEAN S, FLATT P R, *et al.* Novel insulin-releasing peptides in the skin of *Phyllomedusa trinitatis* frog include 28 amino acid peptide from dermaseptin BIV precursor[J]. *Pancreas*, 2004, 29(2): 110-115.
- [8] MARENAH L, FLATT R P, SHAW Chris, *et al.* Isolation and

- structural characterization of novel Rugosin A-like insulinotropic peptide from the skin secretions of *Rana saharica* frog[J]. Peptides, 2005, 26 : 2117-2123.
- [9] ABDEL-WAHAB Y H, MARENAH L, ORR D F, *et al.* Isolation and structural characterization of a novel 13-amino acid insulin-releasing peptide from the skin secretion of *Agalychnis calcarifer*[J]. Biol Chem, 2005 386(8):581-587.
- [10] MARENAH L, FLATT R P, ORR D F, *et al.* Characterization of naturally occurring peptides in the skin secretion of *Rana pipiens* frog reveal pipinin-1 as the novel insulin-releasing agent[J]. Peptide Res, 2005, 66 : 204-210.
- [11] TOYAMA M H, CARNEIRO E M, MARANGONI S, *et al.* Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1474 : 56-60.
- [12] TOYAMA M H, CARNEIRO E M, MARANGONI S, *et al.* Isolation and characterization of a Convulxin-like protein from *Crotalus durissus collilineatus* venom[J]. Journal of Protein Chemistry, 2001, 20(7):585-591.
- [13] NOGUEIRAAT C A, FERREIRAB F, TOYAMA M H, *et al.* Characterization of the insulinotropic action of a phospholipaseA2 isolated from *Crotalus durissus collilineatus* rattle snake venom on rat pancreatic islets[J]. Toxicon, 2005, 45: 243-248.
- [14] ALMIND K, AMBYE, PEDERSEN O, *et al.* Discovery of amino acid variants in the human glucose-dependent insulinotropic polypeptide(GIP) receptor: the impact on the pancreatic beta cell responses and functional expression studies in Chinese hamster fibroblast cells[J]. Diabetologia, 1998, 41: 1194-1198.
- [15] DUPRE J, ROSS S A, WATSON D, *et al.* Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1973, 37: 826-828.
- [16] LAURITSEN K B, MOODY A J, CHRISTENSEN K C, *et al.* Gastric inhibitory polypeptide (GIP) and insulin release after small-bowel resection in man[J]. Scand J Gastroenterol, 1980, 15: 833-884.
- [17] LUND P K, GOODMAN R H, DEE P C, *et al.* Pancreatic preproglucagon cDNA contains two glucagon-related coding sequences arranged in tandem[J]. Proc Natl Acad Sci, 1982, 79(2): 345-349.
- [18] SVOBODAM, GARCIA-MORALES P, MALAISSE W J, *et al.* Stimulation by cholera toxin of ADP-ribosylation of membrane proteins, adenylate cyclase and insulin release in pancreatic islets[J]. Cell Biochem Funct, 1985 3(1):25-32.
- [19] MALAISSE W J, SVOBODA M, DUFRANE S P, *et al.* Effect of Bordetella pertussis toxin on ADP-ribosylation of membrane proteins, adenylate cyclase activity and insulin release in rat pancreatic islets[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1984 ,124(1):190-196.
- [20] CARLO D E, MILANESI A, MARTINI C, *et al.* Effects of Amanita phalloides toxins on insulin release : *in vivo* and *in vitro* studies[J]. Arch Toxicol, 2003 ,77: 441-445.
- [21] LANG J, USHKARYOV Y, GRASSO A, *et al.* Ca²⁺-independent insulin exocytosis induced by α -latrotoxin requires latrophilin, a G protein-coupled receptor[J]. The EMBO Journal, 1998, 17(3): 648-657.
- [22] HOLZ G G, HABENER J F. Black widow spider alpha-latrotoxin: a presynaptic neurotoxin that shares structural homology with the glucagon-like peptide-1 family of insulin secretagogic hormones[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1998 , 121(2): 177-184.
- [23] CHATEI M A, JUNG R T, STEVENSON J C, *et al.* Bombesin : action on gut hormones and calcium in man[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1982, 54(5): 980-985.
- [24] WAYNE A, KLEINMAN S, LATIKA S, *et al.* Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(11): 7402-7406.
- [25] ANDREWSLL P C, WAYNE A, RAUFMAN J P, *et al.* Purification and structure of exendin-3, a new pancreatic secretagogue isolated from *heloderma horridum* venom[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(33) : 20259-20262.
- [26] VANDERMEERS A, CHRISTOPHE J. Purification of a novel pancreatic secretory factor(PSF) and a novel peptide with VIP and secretin-like properties(helodermin) from *Gila monster* venom[J]. FEBS LETTERS , 1984 , 166 (2) 273-276.
- [27] PARKER D S, RAUFMAN J P, PISANO J J, *et al.* Amino acid sequences of helospectins, new members of the glucagon superfamily, found in *gila monster* venom[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1984, 259(19): 11751-11756.
- [28] AHREN B . Effects of helospectin I on insulin and glucagon secretion in the mouse[J]. J Pharmacol, 1991, 102(4):916-918.
- [29] 姚泰. 生理学[M]. 北京 :人民卫生出版社 2003. 370-371.
- [30] ASHCROFT S J. The control of insulin release by sugars[J]. Ciba Found Symp, 1976, 41: 117-139.
- [31] MEARS D. Regulation of insulin secretion in islets of langerhans by Ca²⁺ channels[J]. J Membrane Biol, 2004 , 200 57-66.