

人胰岛素原 C 肽的表达、纯化及其细胞活性研究

田丽平¹ 张育坚¹ 李素霞^{1,2} 杨胜利¹ 龚毅^{1*}

¹(中国科学院上海生命科学研究院生物工程研究中心,上海 200233)

²(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237)

摘要 近年来研究发现人胰岛素原 C 肽(简称 C 肽)有多种生物活性,在治疗糖尿病的并发症中有潜在的应用价值。在前期研究中,完成了多拷贝串联 C 肽基因的构建和融合表达,在原核中获得了高表达。用发酵的方法大规模表达融合蛋白 C 肽(FCP),由 Ni-NTA 柱亲和纯化获得的蛋白经胰蛋白酶和羧肽酶 B 的酶解及 RP-HPLC 分离获得了纯度超过 95% 的 C 肽单体。细胞活性研究显示它对 U251、293 细胞的生长具有一定的促进作用。

关键词 C 肽, Ni-NTA 亲和纯化, 糖尿病

中图分类号 Q71 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0928-04

C 肽是胰岛素原 α 链和 β 链之间的连接肽,为 31 个氨基酸序列的单链化合物,分子量为 3021D。在胰岛 β 细胞内,胰岛素原在蛋白酶的作用下,1 分子的胰岛素原裂解成 1 分子胰岛素(INS)和 1 分子 C 肽,然后二者以等摩尔的量分泌进入门静脉。

Per Jonasson 等^[1]报道了融合蛋白一步胰蛋白酶解得 INS 和 C 肽。设计三个胰蛋白酶切位点:R、KR 和 K。胰蛋白酶切的动力学表明,单 R 位点最为有效,一步酶切三个不同的酶切位点可同时得到高回收率的目的产物。1998 年,Per Jonasson 等^[2]报道了 C 肽基因片段多聚体可提高其收率。分别将编码 1、3、7 个 C 肽基因拷贝的片段与融合血清白蛋白亲和连接。三个融合蛋白在 *E. coli* 中表达量相似,大约 50mg/L。亲和纯化融合蛋白,用胰蛋白酶 + 羧肽酶 B 酶解处理,可有效释放天然 C 肽,用质谱、RP-HPLC 和放免分析确定。三种融合蛋白的定量收率分别为 4、10、23mg/L。在此基础上,该研究小组利用热处理使表达的融合蛋白释放到培养基中,这样方便了融合蛋白 C 肽的后期纯化^[3]。我们在以前的工作中,构建了多拷贝的 C 肽基因,使其在大肠杆菌中的表达水平明显提高,产量达 70mg/L^[4]。

近年很多研究肯定 C 肽具有多种生物学作用,用 C 肽对胰岛素依赖性病人进行替代治疗已有临床报道^[5]。在治疗和预防糖尿病并发症方面,C 肽具有很重要的作用^[6],在 1 型糖尿病的病人治疗中,

C 肽可以改善血管微循环、神经、心血管病变、肾脏病变、视网膜病变。因此对 C 肽的深入研究,具有重要的理论意义和临床价值。

本文通过 15L 发酵罐高密度连续培养工程菌,大规模的表达融合蛋白 C 肽,在获得 C 肽单体的基础上,对其细胞生物活性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: HMS174(DE3), pET32a 质粒为本实验室保存; pET32a-cp3 为本实验室构建。

1.1.2 主要试剂及仪器: Ni-NTA Resin 购自博彩公司。胰蛋白酶购自 Promega, C 肽标准品和羧肽酶 B 购自 Sigma。Yeast Extract 与 Trypton 购自 OXOID 公司,其它均为分析纯试剂。

仪器: 发酵罐为自动控制的 NBS3000 (NBS, New Brunswick, 美国); Hewlett Packard 1100 HPLC (Grenoble, France); Kromasil C8 column

1.1.3 细胞及培养试剂: DMEM, 1640 培养基购自 Gibco, 人肾 293 细胞株和成神经瘤细胞株 U251 均为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 工程菌的构建: 质粒提取及转化大肠杆菌参考《分子克隆》第二版。

1.2.2 融合蛋白的发酵: 将带有三个拷贝 C 肽的质

粒 pET32a-cp3 转入 HMS174(DE3),接种于 600mL LB 中,37℃ 摇菌过夜。发酵罐中加入 8L 基料(Yeast Extract 50g, Trypton 50g, NaCl 40g, MgSO₄ 4.8g, K₂HPO₄ 70g, KH₂PO₄ 26g),灭菌后调 pH7.0,加入氨苄(100μg/mL),接种 600mL,37℃ 培养,2 mol/L NaOH/50% 甘油(并作为碳源)调节发酵过程中 pH7.0,调节搅拌器转速保持溶氧,加入消泡剂消除发酵液泡沫。当溶氧浓度停止变化时开始补料(Yeast Extract 20% 1500mL, Trypton 20% 1500mL),OD₆₀₀ = 11.5 时 1mmol/L IPTG 诱导,诱导后每隔 1h 取样,诱导 4h 后放罐。离心,收集菌体,称重。SDS-PAGE 检测表达情况。

1.2.3 Western-blot 印迹:蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,转移到 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 缓冲液(20mmol/L Tris, 150mmol/L NaCl, 0.3% Tween-20, pH7.6)封闭过夜,在一抗(兔抗人 C-肽抗血清 1:100 的比例稀释在 5% 脱脂牛奶的 TBST)中孵育 1h 后,TBST 洗 5 × 10min,二抗(碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 Ig-G 按 1:2000 稀释在 2% 脱脂牛奶的 TBST)中孵育 30min,TBST 洗 3 × 10min 次,最后 TBS 洗 1 次 5min(20mmol/L Tris, 150mmol/L NaCl, pH7.6),染色,显色。

1.2.4 融合蛋白的纯化:菌体超声,离心,取上清,加入 Ni-NTA Sepharose,同时加入少量蛋白酶抑制剂如 PMSF(0.1mmol/L),4℃ 搅拌吸附 2h 后,2 倍体积的 0~10mmol/L 咪唑梯度洗柱除去非特异性吸附的杂蛋白,流速控制在 15mL/h 左右。然后用 5 倍体积的 20mmol/L 咪唑洗脱目的蛋白,收集洗脱液。

1.2.5 融合蛋白的酶解及 C 肽单体的分离纯化:Ni-NTA 亲和层析纯化后的 FCP,经 PBS 透析,调节浓度为 1.5 mg/mL,以 1:200 (W/W)加入胰蛋白酶,1:100 (W/W)加入羧肽酶 B,37℃ 酶解。140 min 后进行 RP-HPLC 分离。洗脱条件为:10%~40% (V/V) 乙腈(含 0.1% (V/V) TFA)分级洗脱;洗脱时间,30 min;柱温:40℃;流速:1mL/min;214nm 检测,并与 C 肽标准品对照,收集 C 肽峰,冻干。

1.2.6 MTT 法检测 C 肽的细胞活性:U251 用含 10% 小牛血清的 1640 培养,293 培养在含 10% 小牛血清的 DMEM 中,培养条件为 5% CO₂,37℃。细胞按 10⁵ 个/mL 铺在 96 孔板内,100 μL 细胞悬液/孔,培养 1d 后,血清饥饿 16h,然后换含有不同浓度 C 肽的细胞培养液 200 μL/孔。对照组不加 C 肽,每一条件设 8 个重复,每 2 天换液 1 次。第 5 天后,加入

10 μL MTT/孔,孵育 2h,再加 100 μL 酸性 SDS 溶液,室温避光放置 2h。用酶标仪测定 A_{570nm} 值。实验重复 3 次。

1.2.7 统计分析:数据采用单因素方差分析,显著性设为 P < 0.05。

2 结果

2.1 工程菌的构建

质粒 pET32a-CP3 转化 HMS174(DE3)后,得到工程菌。Fig.1 是质粒 pET32a-CP3 的结构示意图,目的基因位于 T7 噬菌体启动子的下游,IPTG 诱导宿主菌含有的溶源噬菌体(DE3)上的 T7 RNA 聚合酶表达,从而启动 CP3 的转录和翻译,表达分子量为 33kD 的融合蛋白 C 肽。此外,在融合蛋白的 N 末端含有 6 × His tag,可以应用 Ni-NTA 纯化目的蛋白。

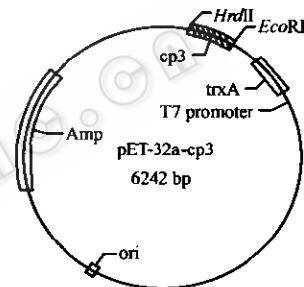


图 1 表达质粒 pET-32a-cp3 结构

Fig.1 Structure of expression plasmid with three-copy C-peptide gene

2.2 表达产物 SDS-PAGE 分析和 Western-blot 鉴定

15L 发酵罐大规模表达,共收获得到湿菌体 355g,工程菌连续培养生长曲线如 Fig.3 所示。超声破碎,离心后,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析(Fig.2)。结果显示该融合蛋白存在于上清中,融合蛋白分子量为 33kD 左右,融合蛋白表达量大约 500mg/L。灰度扫描显示该融合蛋白的表达量约占表达总蛋白的 35%。对融合蛋白的特异性表达作进一步的鉴定,采用兔抗人 C-肽抗血清为一抗,羊抗兔 Ig-G 为二抗对表达产物进行检测,得到一条特异性强的显色条带,表明该融合蛋白中含有 C 肽单体。

2.3 融合蛋白的亲纯化

将上清与 Ni-NTA Sepharose 4℃ 搅拌结合 2h 后,装柱。先用 0~10mmol/L 的梯度洗柱除去大量杂蛋白,由图上可知流穿液中几乎没有目的蛋白,然后用 20mmol/L 的咪唑洗脱目的蛋白(Fig.4)。结果显示用 0~10mmol/L 的梯度除去非特异性杂蛋白后,再

用 20mmol/L 的咪唑洗脱收集目的蛋白。该步可得融合蛋白约 200mg/L。

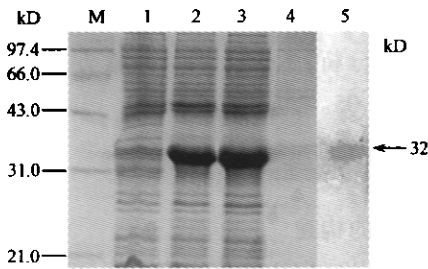


图2 FCP 的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析
Fig.2 SDS-PAGE and Western-blot analysis of FCP after fermentation

M: low range protein weight maker; 1: before induction; 2: after induction; 3: supernatant; 4: the pellet; 5: Western-blot analysis of expressed FCP

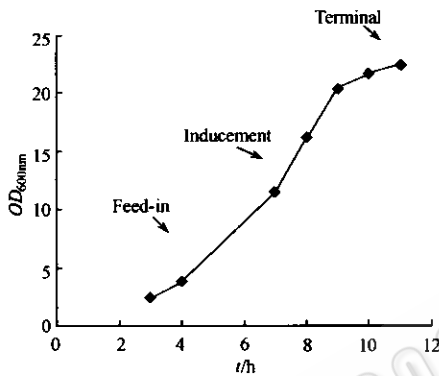


图3 FCP 的发酵曲线
Fig.3 Curve of FCP fermentation

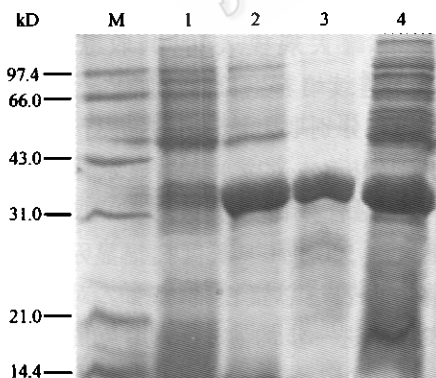


图4 FCP 经 Ni-NTA 后的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the collected fractions purified with Ni-NTA affinity column under native condition

M: protein marker; 1: the flow-through; 2: elution with buffer NTA-20 directly; 3: eluted with NTA-20 after NTA-1 to 10 gradient elution; 4: the supernatant

2.4 C 肽单体的 RP-HPLC 分离纯化

Ni-NTA 纯化后的 FCP 溶解在 PBS 缓冲液中, 调节终浓度为 1.5 mg/mL, 进行胰蛋白酶单酶切 60 min

后, 加入羧肽酶 B 进行胰蛋白酶 + 羧肽酶 B 双酶解。2h 后, 酶解完全。RP-HPLC 分离酶解反应混合物, 与 C 肽标准品相比, 重组得到的 C 肽具有相同的保留时间, 收集相应 C 肽峰, 冻干。最后可得到的 C 肽收率约为 20mg/L。

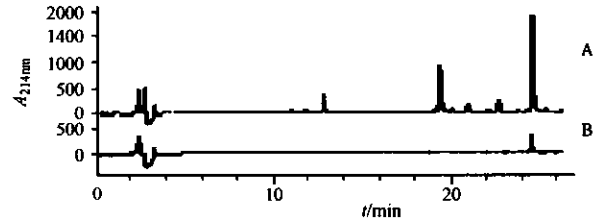


图5 C 肽的单体的 RP-HPLC 分析

Fig.5 RP-HPLC analysis of the enzymatic cleavage mixtures from fusion proteins with trypsin + carboxypeptidase B(A); B is a standard C-peptide from Sigma

2.5 C 肽对细胞生长的影响

细胞血清饥饿 16h 后, 用不同浓度的 C 肽 (0.3, 1 和 3nmol/L) 进行刺激与对照 (不加 C 肽) 相比, 生理浓度范围内的 C 肽能够最大程度刺激 U251 细胞和 293 细胞的生长 (Fig.6), 且具有时间和剂量依赖性。4d 后细胞的生长达到了最大程度, 3 nmol/L 的 C 肽显示了最强的生长促进效果。

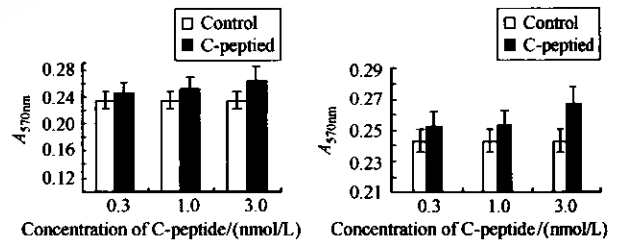


图6 C 肽对 U251(A) 和 (293) 细胞生长的影响

Fig.6 U251 (A) and 293 (B) cell growth effects of 4 days exposure of various concentrations of C-peptide (0, 0.3, 1, 3 nmol/L)

Data are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. $P < 0.05$ versus control (0 nmol/L C-peptide)

3 讨论

15L 发酵罐高密度连续补料培养融合蛋白多聚体工程菌的结果表明。菌体密度比其它工程菌较低, 这可能与菌体本身生长较慢, 且补料时间稍早, 补料过程掌握不好有关。但总的来说, 15L 发酵罐高密度连续补料培养融合蛋白多聚体工程菌还是成功的, 为 C 肽的大规模生产奠定了基础。

由于 6 \times His 中咪唑基与 Ni²⁺ 螯合而使蛋白纯化具有快速特异的优点, 我们选择了 N 端具有 6 \times

His tag 的融合蛋白表达载体 pET32a, 研究发现, 4℃ 搅拌 1~2h 可充分提高亲和柱对融合蛋白的吸附。洗脱时, 先用低浓度的咪唑梯度除去非特异性吸附的杂质蛋白, 然后再用 20mmol/L 浓度的咪唑洗脱目的蛋白, 可提高目的蛋白的纯度, 为后来进行高效的蛋白酶解反应及 C 肽单体的分离奠定了良好的基础。

3nmol/L 的 C 肽显著地促进了成神经瘤细胞 U251 和人肾细胞株 293 的生长。这可能与 C 肽能够改善糖尿病病人肾脏和神经病变有一定关系。另外 C 肽促进神经来源的细胞株的生长, 与 Li Zhen-Guo 等人^[7] 在相关方面的研究一致。

Rigler 等^[8] 在研究 C 肽与细胞间的相互作用时, 发现在低摩尔浓度下(生理浓度)它们的结合率达到饱和。我们用不同浓度的 C 肽刺激细胞, 结果显示仅在浓度为 3nmol/L 时对细胞生长促进效果最为显著($P < 0.05$)。此外我们还进一步提高 C 肽的浓度达 10nmol/L、30nmol/L, 与对照相比, 并没有发现明显的刺激效果。所以超过生理浓度的 C 肽并不能促进细胞的生长。这与 Rigler 等^[8] 的研究相一致。

总之, 对于 C 肽的研究还处于起步阶段, 其机制还未阐明。我们已得到了重组人胰岛素原 C 肽, 并检测了其细胞生物活性, 为进一步研究 C 肽的用途奠定了基础。

致 谢 本研究得到魏万贵老师、张惠堂等同志的热心帮助, 在此表示衷心的感谢。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Nilsson J, Jonasson P, Samuelsson E *et al.* Integrated production of human insulin and its C-peptide. *Journal of Biotechnology*, 1996, 48(3):241-250
- [2] Jonasson P, Nygren PA, Johansson BL *et al.* Gene fragment polymerization gives increased yields of recombinant human proinsulin C-peptide. *Gene*, 1998, 210(2):203-210
- [3] Jonasson P, Nygren PA, Jorvall H *et al.* Integrated bioprocess for production of human proinsulin C-peptide via heat release of an intracellular heptameric fusion protein. *Journal of Biotechnology*, 2000, 76(2-3):215-226
- [4] Li SX, Tian LP, Liu HF *et al.* Expression of C-peptide multiple gene copies in *Escherichia coli* and stabilities of C-peptide in aqueous solution. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2003, 35(11):986-992
- [5] Johansson BL, Kernell A, Sjöberg S *et al.* Influence of combined C-peptide and insulin administration on renal-function and metabolic control in diabetes type-1. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1993, 77(4):976-981
- [6] Ido Y, Vindigni A, Chang K *et al.* Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. *Science*, 1997, 277(5325):563-566
- [7] Li ZG, Zhang WX, Sima AAF. C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-Sy(5) y cells. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews*, 2003, 19(5):375-385
- [8] Rigler R, Pramanik A, Jonasson P *et al.* Specific binding of proinsulin C-peptide to human cell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(23):13318-13323

Expression and Purification of Proinsulin C-peptide and its Cell Bioactivity

TIAN Li-Ping¹ ZHANG Yu-Jian¹ LI Su-Xia^{1,2} YANG Sheng-Li¹ GONG Yi^{1*}

¹(Shanghai Research Centre of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China)

²(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200233, China)

Abstract Increasing evidence suggests that human C-peptide is a biologically active hormone. Recent studies have demonstrated that replacement of C-peptide to normal physiological concentrations in insulin-dependent diabetic (IDDM) patients results in decreased glomerular hyperfiltration, augmented glucose utilization and improved autonomic nervous function. Several small-scale clinical trials confirm these beneficial effects on nerve function and blood flow in other tissues. Therefore, research on C-peptide should be encouraged and accelerated. In our previous studies, a gene fragment was obtained encoding three copies of C-peptide and expressed in *E. coli* at high level in the cytoplasm. In the present study, we focus on the large-scale expression, purification and cell growth research of recombinant C-peptide. Even without optimizing conditions, the wet weight reached 35.5g/L and the fusion protein (FCP) was expressed at high level. The expressed FCP was efficiently separated from the supernatant through Ni-NTA affinity chromatography, to obtain about 200 mg/L of the FCP with 70% purity. Single C-peptide was produced by enzymatic digestion of trypsin and carboxypeptidase B through site-specific cleavage of the resulting gene products and then released. RP-HPLC analysis suggested that the recombinant C-peptide obtained is the very same with the standard C-peptide. In the later studies, we choose two kinds of cell line, U251 and 293, to testify the cell growth effects of our recombinant human C-peptide and the results suggested that C-peptide with 3 nmol/L can exert maximal effects on cell proliferation. In conclusion, the combined findings indicate that the recombinant C-peptide is a biologically active hormone. Further studies on its cell signaling should be brought to the scientific research arena.

Key words C-peptide, Ni-NTA, RP-HPLC

Received: 03-18-2004

* Corresponding author. Tel: 86-21-54971069; E-mail: yigong@srb.ac.cn