

重组 rHSA-hFGF21 融合蛋白在毕赤酵母中的表达纯化及活性分析

黄甜甜^{1,2}, 齐剑英¹, 杨刚刚¹, 叶贤龙^{1,2}

1 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453000

2 赣江中药创新中心, 江西 南昌 330000

黄甜甜, 齐剑英, 杨刚刚, 叶贤龙. 重组 rHSA-hFGF21 融合蛋白在毕赤酵母中的表达纯化及活性分析. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3419-3432.

HUANG TT, QI JY, YANG GG, YE XL. Expression, purification and bioactivity analysis of a recombinant fusion protein rHSA-hFGF21 in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3419-3432.

摘要: 人成纤维细胞生长因子 21 (human fibroblast growth factor 21, hFGF21) 已成为改善血糖和脂质代谢的候选药物, 但却存在半衰期短和易被体内代谢等缺点, 导致靶组织利用率低, 限制了其临床应用。本研究通过柔性连接肽 (GGGGS)₃ 将 hFGF21 的 N 端连接至人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 的 C 端, 经过毕赤酵母密码子优化后, 将重组基因片段 rHSA-hFGF21 连入 pPIC9k 和 pPICZαA 两种载体, 并转化到 X33、GS115 和 SMD1168 三种不同酵母菌株中。通过加压筛选得到高表达的 X33-pPIC9K-rHSA-hFGF21 工程菌株, 并优化摇瓶诱导条件如 OD 值、甲醇浓度和诱导时间进一步提高 rHSA-hFGF21 的表达效率。培养上清经中空纤维膜切向流技术粗分离、Blue 亲和层析和 Q 离子交换层析纯化获得纯度约 98.18% 的 rHSA-hFGF21 蛋白。与 hFGF21 相比, rHSA-hFGF21 具有更好的热稳定性和抗胰蛋白酶降解的能力, 其血浆半衰期也延长了约 27.6 倍; 中高浓度条件下 rHSA-hFGF21 刺激 HepG2 细胞摄取葡萄糖的能力优于 hFGF21; 在 2 型糖尿病动物中 rHSA-hFGF21 比 hFGF21 具有更好的长效降糖效果。本研究将为 FGF21 蛋白的大规模生产奠定基础。

关键词: 成纤维细胞生长因子 21 (FGF21); 人血清白蛋白 (HSA); 融合蛋白; 毕赤酵母; 糖尿病

Received: March 3, 2022; **Accepted:** April 27, 2022; **Published online:** May 5, 2022

Supported by: Natural Science Foundation of Jiangxi Province, China (20212BAB206094); Henan Youth Support Project, China (2021HYTP042); Henan Provincial Key R&D and Promotion Project (Science and Technology Research), China (212102310242)

Corresponding author: YE Xianlong. E-mail: yexianlong1988@163.com

基金项目: 江西省自然科学基金 (20212BAB206094); 河南省青年托举项目 (2021HYTP042); 河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) (212102310242)

Expression, purification and bioactivity analysis of a recombinant fusion protein rHSA-hFGF21 in *Pichia pastoris*

HUANG Tiantian^{1,2}, QI Jianying¹, YANG Ganggang¹, YE Xianlong^{1,2}

1 College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453000, Henan, China

2 Ganjiang Traditional Chinese Medicine Innovation Center, Nanchang 330000, Jiangxi, China

Abstract: Human fibroblast growth factor 21 (hFGF21) has become a candidate drug for regulating blood glucose and lipid metabolism. The poor stability and short half-life of hFGF21 resulted in low target tissue availability, which hampers its clinical application. In this study, the hFGF21 was fused with a recombinant human serum albumin (HSA), and the resulted fusion protein rHSA-hFGF21 was expressed in *Pichia pastoris*. After codon optimization, the recombinant gene fragment *rHSA-hFGF21* was inserted into two different vectors (pPIC9k and pPICZ α A) and transformed into three different strains (X33, GS115 and SMD1168), respectively. We investigated the rHSA-hFGF21 expression levels in three different strains and screened an engineered strain X33-pPIC9K-rHSA-hFGF21 with the highest expression level. To improve the production efficiency of rHSA-hFGF21, we optimized the shake flask fermentation conditions, such as the *OD* value, methanol concentration and induction time. After purification by hollow fiber membrane separation, Blue affinity chromatography and Q ion exchange chromatography, the purity of the rHSA-hFGF21 protein obtained was 98.18%. Compared to hFGF21, the biostabilities of rHSA-hFGF21, including their resistance to temperature and trypsinization were significantly enhanced, and its plasma half-life was extended by about 27.6 times. Moreover, the fusion protein rHSA-hFGF21 at medium and high concentration showed a better ability to promote glucose uptake after 24 h of stimulation *in vitro*. *In vivo* animal studies showed that rHSA-hFGF21 exhibited a better long-term hypoglycemic effect than hFGF21 in type 2 diabetic mice. Our results demonstrated a small-scale production of rHSA-hFGF21, which is important for large-scale production and clinical application in the future.

Keywords: fibroblast growth factor 21 (FGF21); human serum albumin (HSA); fusion protein; *Pichia pastoris*; diabetes

糖尿病作为一种非传染性的、慢性代谢类疾病，由多种病因综合所致。其最大的特点是慢性高血糖，并且伴随由于胰岛素分泌和/或作用缺陷而导致的糖、脂肪和蛋白质代谢紊乱^[1]。传统治疗糖尿病的药物大多依赖于胰岛素或胰岛素代谢途径中的受体蛋白^[2-3]，往往忽视了脂代谢紊乱在疾病发展中的作用，当糖尿病患者发展到晚期出现较为严重的胰岛素抵抗时，即

使加大用药量也难以发挥药物的治疗作用，反而会进一步恶化病情。因而迫切需要一种安全有效，既能调节血脂，又能改善胰岛素抵抗的综合性治疗药物。

人成纤维细胞生长因子 21 (human fibroblast growth factor 21, hFGF21) 是一种激素样蛋白，分子量为 19.5 kDa，属于 FGF 家族，不仅参与调节体内葡萄糖的稳态，可在未观察到低血糖

风险^[4]的情况下促进 3T3-L1 脂肪细胞摄取葡萄糖的能力^[5], 显著降低饮食诱导的肥胖 (diet-induced obese, DIO) 小鼠、ob/ob 和 db/db 小鼠的血糖水平; 还可通过减轻外周胰岛素抵抗发挥降糖作用, 或者作为胰岛素敏化剂以克服饮食诱导的胰岛素抗性^[6-7]; 更有研究表明 FGF21 可通过中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 调节交感神经系统使其长效发挥调节机体血糖稳定的作用^[7-9]。但是, FGF21 在体内代谢过程中易被肾小球过滤或被蛋白酶降解, 具有半衰期短和不稳定等缺点, 临床使用必须较大剂量或者高频给药才能达到预期效果。

人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 是血浆中含量最多的可溶性蛋白, 且半衰期长、无免疫原性以及组织分布广, 是天然的药物载体^[10-11]。研究表明融合人血清白蛋白可以显著地改善蛋白质药物的半衰期, 一是由于白蛋白相对分子质量为 66.5 kDa, 是肾小球滤过蛋白的上限, 有助于延缓肾脏的滤过作用^[12]; 二是白蛋白可以以 pH 依赖的方式结合新生的 Fc 受体 (FcRn), 避免了溶酶体酶的降解, 并进入再循环机制^[13-14]。有研究表明 HSA 融合后蛋白的半衰期延长了约 20 倍, 并且可以在血浆胰岛素水平无明显变化的情况下持久地分布到靶组织内^[15]。因此本研究构建并表达融合蛋白 rHSA-hFGF21 基因, 筛选获得高表达的酵母工程菌并对表达条件进行优化, 为重组蛋白 rHSA-hFGF21 的大规模生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α , 毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 菌株 X33、SMD1168 和 GS115, 表达载体 pPIC9K 和 pPICZ α A, HepG 2 细胞均为本实验室保存。hFGF21 蛋白为实验室纯化;

db/db 小鼠购自常州卡文斯实验动物有限公司; SD 大鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

胰蛋白胍、酵母提取物购于 Oxoid; 酵母表达重组人血清白蛋白 (HSA) 购于北京百奥莱博科技有限公司; 胶回收试剂盒购于 Omega 广州飞扬生物工程有限公司; 无内毒素质粒大提试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司, DP120、BCA 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; 重组 Anti-FGF21 抗体 (ab171941)、山羊抗兔 IgG H&L (ab205718) 购于 Abcam; 博来霉素 (Zeocin) 购于 Invitrogen; 遗传霉素 (G418)、低分子量预染蛋白 marker、ECL Plus 超敏发光液、考马斯亮蓝快速染色液购于北京索莱宝科技有限公司; 40Q 柱填料、AKTATM flux 6 切向膜过滤系统、AKTATM AVANT 150、750 kDa 及 10 kDa 中空纤维柱购于 GE Healthcare; Blue Bestarose FF 色谱柱填料购于上海博格隆生物技术有限公司; 葡萄糖氧化酶法测定试剂盒购于北京普利莱基因技术有限公司; 血糖仪及检测试纸购于强生医疗器材有限公司; 成纤维细胞生长因子 21 (FGF21) 检测试剂盒购于武汉云克隆科技股份有限公司; 其余试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组 rHSA-hFGF21 基因的合成和表达载体的构建

从 GenBank 上获取 HSA (gene ID: 213) 和 hFGF21 (gene ID: 26291) 的基因序列, 通过柔性连接肽 (GGGGS)₃ 将 hFGF21 的 N 端连接至 HSA 的 C 端, 经由毕赤酵母偏好性密码子优化以及 GC 含量调节后, 通过在重组基因末端引入酶切位点将其转入 pPIC9K (*Bam*H I 和 *Eco*R I)、pPICZ α A (*Bst*B I 和 *Eco*R I) 表达载体。将该重组基因命名为 rHSA-hFGF21, 重组质粒命名为

pPIC9K-rHSA-hFGF21、pPICZαA-rHSA-hFGF21, 交由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2.2 酵母的转化及重组子的筛选

用无内毒素质粒大提试剂盒从含有 pPIC9K-rHSA-hFGF21、pPICZαA-rHSA-hFGF21 质粒的 *E. coli* DH5α 中提取质粒。用 *Sal* I 酶切获取线性化质粒, 再通过凝胶回收以及离心浓缩提高线性化质粒浓度。按电压 1.5 kV、电容 25 μV、电阻 200 Ω、电击时间 4–10 ms 的条件将线性化的重组质粒电转入毕赤酵母感受态, 如表 1 所示。将 X33-pPIC9K-rHSA-hFGF21 涂布于 YPD 平板; SMD1168/GS115-pPIC9K-rHSA-hFGF21 涂布于 Sc-his 平板; X33/SMD1168/GS115-pPICZαA-rHSA-hFGF21 涂布于含 50 μg/mL Zeocin 的 YPD 平板。平板培养条件均为 30 °C, 约培养 2–3 d, 直至获得相应的重组转化子。

将长势良好的 SMD1168/GS115-pPIC9K-rHSA-hFGF21 转化子分别划线于含 1、2 和 4 mg/mL G418 的 Sc-his 平板进行加压筛选, X33/SMD1168/GS115-pPICZαA-rHSA-hFGF21 转化子分别划线于含 0.5、1.0 和 2.0 mg/mL Zeocin 的 YPD 平板进行加压筛选, 培养温度为

30 °C。从 4 mg/mL G418 和 2 mg/mL Zeocin 的加压筛选平板上挑选重组转化子 (X33-pPIC9K-rHSA-hFGF21 直接从转化平板上挑取), 用酶法提取酵母基因组 DNA 为模板, 作 PCR 鉴定 (引物序列如表 2 所示)。

1.2.3 重组转化子的诱导表达

将 1.2.2 鉴定有目的基因的重组转化子及其相应空载质粒, 接种至 YPD 培养基中过夜活化。取 100 μL 经 YPD 活化后的菌液并接种于含 10 mL BMGY 培养基的 50 mL 锥形瓶中, 30 °C、220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 2–6; 4 °C、3 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体并重悬于含 50 mL BMMY 培养基 (甲醇浓度为 0.5%, 控制菌液转入后 OD_{600} 为 1 左右) 的 250 mL 锥形瓶中, 30 °C、220 r/min 振荡培养; 每隔 24 h 加 1 次甲醇致其终浓度为 0.5%, 在诱导后 72 h 取样鉴定。12% SDS-PAGE 检测蛋白的表达情况。Image-j 1.50 处理凝胶图片, 以蛋白 marker 为 1 对上清表达量进行归一化处理, 并结合 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 计算重组蛋白表达量, 筛选出目的蛋白表达量最高的工程菌株。

表 1 本实验所构建的重组酵母菌株

Table 1 Recombinant yeast strains constructed in this study

Host strains	Recombinant plasmids	Recombinant strains
X33	pPIC9K-rHSA-hFGF21	X33-pPIC9K-rHSA-hFGF21
	pPICZαA-rHSA-hFGF21	X33-pPICZαA-rHSA-hFGF21
SMD1168	pPIC9K-rHSA-hFGF21	SMD1168-pPIC9K-rHSA-hFGF21
	pPICZαA-rHSA-hFGF21	SMD1168-pPICZαA-rHSA-hFGF21
GS115	pPIC9K-rHSA-hFGF21	GS115-pPIC9K-rHSA-hFGF21
	pPICZαA-rHSA-hFGF21	GS115pPICZαA-rHSA-hFGF21

表 2 引物序列表

Table 2 Primers used in this study

Name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
<i>rHSA-hFGF21-F</i>	GGTGGGAATACTGCTGATAGCC	22
<i>rHSA-hFGF21-R</i>	GCTGCGAGATAGGCTGATCAGG	22

1.2.4 工程菌表达条件的优化

取 1.2.3 中筛选出的高表达 rHSA-hFGF21 工程菌株进行表达条件的优化,诱导表达方法同 1.2.3。设置诱导起始菌液 OD_{600} 分别为 0.5、1.0 和 1.5;诱导的甲醇终浓度分别为 0.5%、1.0% 和 2.0% (每个实验条件下设置 3 个平行);在诱导后的 48、72 和 96 h 取样进行 SDS-PAGE 分析并计算目的蛋白的表达量,方法同 1.2.3。

1.2.5 重组蛋白的分离纯化

按 1.2.4 优化后的诱导条件对工程菌株进行诱导表达,4 °C、4 300 r/min 离心 20 min 收集上清。用 750 kDa 中空纤维柱将离心后的上清进一步进行澄清;再用 10 kDa 的中空纤维柱对上述澄清液体进行浓缩和缓冲液置换洗滤。

用缓冲液 A (50 mmol/L NaAc、pH 8.0) 平衡 Blue Bestarose FF 亲和层析柱,并将上述浓缩液进行上样,通过缓冲液 B (50 mmol/L NaAc、400 mmol/L KSCN、pH 8.0) 来洗脱融合蛋白,收集洗脱馏分即为 rHSA-hFGF21 重组蛋白;将收集到的馏分脱盐至缓冲液 C (10 mmol/L Na_3PO_4 、pH 7.2) 中;使用被缓冲液 C 平衡好的 40 Q 离子交换柱,进一步对 rHSA-hFGF21 蛋白精纯,用缓冲液 D (10 mmol/L Na_3PO_4 、1 mol/L NaCl、pH 7.2) 采用线性梯度洗脱的方式纯化,收集 5%–30% 梯度下的洗脱峰馏分。12% SDS-PAGE 电泳及 SEC-HPLC 分析蛋白纯度。

1.2.6 Western blotting 验证

纯化后的 rHSA-hFGF21 重组蛋白、hFGF21 蛋白 (实验室纯化) 及重组人血清白蛋白 HSA 进行 SDS-PAGE 电泳。按 200 mA、1.5 h 的条件进行 PVDF 的转膜操作;将 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶室温振荡封闭 1.5 h 后,用重组 Anti-FGF21 抗体 (1 : 10 000 稀释) 4 °C 振荡孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;用山羊抗兔 IgG H&L (1 : 10 000 稀释) 抗体室温振荡孵育

4 h;TBST 洗涤后加入适量 ECL Plus 超敏发光液,ChemiDoc 成像系统拍摄并保存实验结果。

1.2.7 重组蛋白的体内外稳定性分析

取 1.2.5 中纯化后 rHSA-hFGF21 重组蛋白、HSA 以及 hFGF21 蛋白,并将其调整为 0.5 mg/mL,加入胰蛋白酶使底物与酶的质量比为 50 : 1、75 : 1、100 : 1;放置于 37 °C 恒温水浴锅中,处理后 12 h 和 24 h 取样分析重组蛋白的稳定性;再取上述蛋白各 100 μ L,放置于 60 °C 恒温水浴锅中,在处理 12、24 h 取样,鉴定重组蛋白的温度稳定性。

将 8 只 8 周龄雄性 SD 大鼠预饲养一周后随机分为两组,通过背部皮下注射的方式分别对两组注射 2 mg/kg 的 rHSA-hFGF21 或 hFGF21 蛋白;在注射前及注射后 2、5、8、10、14、20、24、32、48、72 和 96 h 时颈静脉取血 300 μ L/只,每次取血后均给予每只大鼠 300 μ L 生理盐水;取血后室温静置 1 h,3 000 r/min 离心 10 min 取上清液并保存至 -80 °C 冰箱;使用 FGF21 检测试剂盒检测血液中 FGF21 含量,每个样本 3 个复孔,检测重组蛋白的体内稳定性。

1.2.8 重组蛋白细胞活性分析

生长状态良好的 HepG2 细胞用浓度为 0.25% 胰蛋白酶消化,离心后收集细胞,将细胞密度调整为 1×10^5 cell/mL 后接种至 96 孔板,每孔 200 μ L,置于 37 °C CO_2 培养箱中继续培养至细胞汇合度为 70%–80%。弃去上层培养液,PBS 洗 1 遍,加入新鲜无血清的 DMEM 高糖培养基培养细胞 12 h。用浓度为 10、100 及 1 000 nmol/L 的 rHSA-hFGF21 和 hFGF21 蛋白刺激细胞 24 h,每个浓度做 3 个复孔,同时设置空白对照孔 (不加蛋白)。使用葡萄糖氧化酶法测定试剂盒,检测培养基中葡萄糖含量,计算葡萄糖消耗率。

培养基中残留的葡萄糖含量 (nmol/L) = $0.071 \times OD$ 样品 + 0.037 1;细胞葡萄糖消耗率 (%) = $[(C_{\text{空白葡萄糖}} - C_{\text{给药葡萄糖}}) / C_{\text{空白葡萄糖}}] \times 100\%$ 。

1.2.9 重组蛋白对 db/db 小鼠长效降糖效果

将 24 只 8-10 周龄雄性 db/db 小鼠预饲养 1 周后, 根据血糖水平和体重随机分为 3 组, 每组 8 只。通过皮下注射的方式, 分别向两个治疗组小鼠注射剂量为 50 nmol/kg 的 hFGF21 或 rHSA-hFGF21 蛋白, 向 Vehicle (对照组) 注射相同体积的 0.9% NaCl 溶液。每 2 d 注射 1 次, 连续治疗 14 d。在治疗后每 2 d 及停药后第 4 天早上 8 点通过尾静脉取血监测小鼠血糖水平。

1.2.10 统计分析

所有数据均使用 SPSS 26 进行统计学分析, 组间数据采用 *t* 检验。统计学显著性定义为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 重组 rHSA-hFGF21 蛋白的诱导表达

从筛选平板上挑选阳性转化子进行甲醇诱

导表达, 其中 X33-pPIC9K-rHSA-hFGF21 系列转化子目的蛋白的表达量最高 (58.4 ± 7.7 mg/L), X33-pPICZ α A-rHSA-hFGF21 (49.4 ± 4.8 mg/L) 和 GS115-pPIC9K-rHSA-hFGF21 (46.0 ± 6.4 mg/L) 系列次之, SMD1168-pPIC9K-rHSA-hFGF21 系列相对较少 (25.5 ± 9.3 mg/L), SMD1168/GS115-pPICZ α A-rHSA-hFGF21 系列表达量几乎无法计算。因而选定 X33-pPIC9K-rHSA-hFGF21 作为工程菌株。

2.2 工程菌表达条件的优化

为了进一步提高工程菌株目的蛋白的表达量, 本实验探究了诱导时间、诱导起始菌浓度和诱导甲醇浓度对 rHSA-hFGF21 重组蛋白表达量的影响, 结果如图 1 所示, 随着诱导时间的延长, rHSA-hFGF21 蛋白的表达量逐步提升, 但 96 h 时蛋白降解严重, 因而诱导 72 h 时收集上清最为合适。甲醇浓度为 0.5% 时, rHSA-

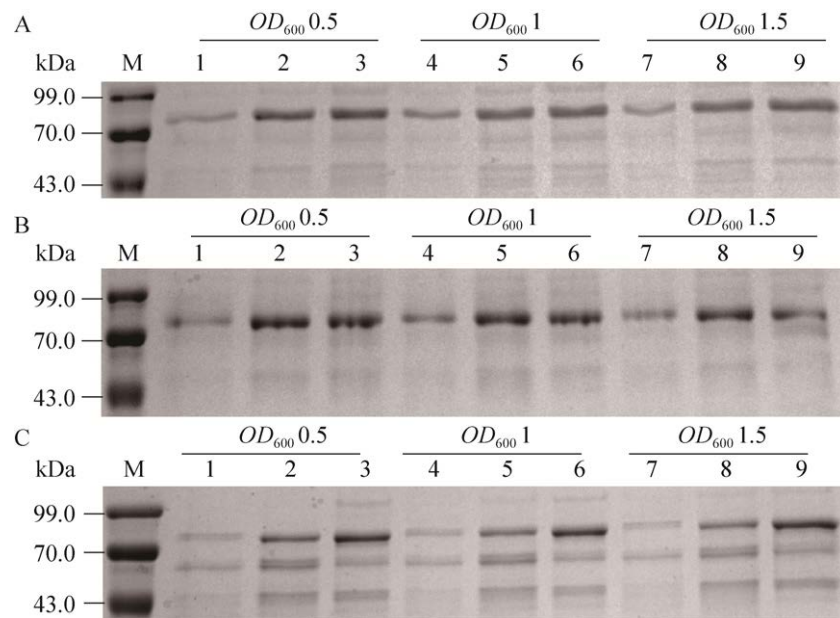


图 1 工程菌表达条件的优化

Figure 1 Optimization of expression conditions for engineered bacteria. (A-C): SDS-PAGE analysis after 48 h, 72 h and 96 h of induction. M: marker; lane 1, 4, 7: methanol concentration was 0.5%; lane 2, 5, 8: methanol concentration was 1.0%; lane 3, 6, 9: methanol concentration was 2.0%; OD_{600} 0.5, OD_{600} 1.0, OD_{600} 1.5: initial bacterial concentration at induction.

hFGF21 的表达水平最低, 当甲醇浓度为 1% 和 2% 时, rHSA-hFGF21 的表达水平相近, 考虑到高浓度甲醇对毕赤酵母细胞的毒性, 确定甲醇的最佳浓度为 1%。从表达结果可知诱导起始 OD_{600} 对 rHSA-hFGF21 的影响相对较小, 但在诱导起始 OD_{600} 为 1, 蛋白表达量较为稳定。综上所述在诱导起始 OD_{600} 为 1、诱导甲醇终浓度为 1% 及诱导 72 h 的条件下 (图 2), rHSA-hFGF21 的表达量最高, 可达到 (97.82 ± 1.03) mg/L, 因而选定该条件作为 X33-pPIC9K-rHSA-hFGF21 工程菌株的诱导条件。

2.3 重组蛋白的分离纯化及 Western blotting 验证

按照 2.2 中的优化后的条件对 X33-pPIC9K-rHSA-hFGF21 进行诱导表达, 离心收集上清液, 用中空纤维膜处理系统对上清进行澄清、浓缩及缓冲液的置换, 除去菌体、部分杂蛋白、脂质和色素等分子。经 SDS-PAGE 检测可知, 应用中空纤维柱超滤浓缩和洗滤的方法, 可以有效地降低酵母诱导表达后上清液的体积, 初步对 rHSA-hFGF21 蛋白进行富集和粗纯 (图 3)。

浓缩后的上清液经 Blue Bestarose FF 亲和层析 (图 4A) 初步纯化, 收集 rHSA-hFGF21 蛋白洗脱峰并脱盐后, 再通过 40 Q 离子交换层析 (图 4B) 进一步纯化, 收集的洗脱峰即为 rHSA-hFGF21 重组蛋白。还原和非还原性 SDS-PAGE 的结果表明 (图 5A), 纯化出的 rHSA-hFGF21 蛋白为单体结构, 还原和非还原条件下 rHSA-hFGF21 条带的位置不同, 是由于非变性蛋白存在二级及三级结构, 因而在分子量大小、染色水平上与变性蛋白存在一定差异。经 SEC-HPLC 分析可知, rHSA-hFGF21 的纯度约为 98.18%, 最终收率为 37.2%, 此时蛋白浓度为 0.94 mg/mL (图 5C)。Western blotting 实验中, 以 HSA 为阴性对照, 证明纯化后的蛋白为

rHSA-hFGF21 重组蛋白 (图 5B)。

2.4 重组蛋白的体内外稳定性分析

rHSA-hFGF21、HSA 以及 hFGF21 与胰蛋白酶以不同质量比 (50 : 1, 75 : 1 和 100 : 1) 混合孵育 12 h 和 24 h, hFGF21 蛋白孵育 12 h 就已降解完全, 而重组蛋白 rHSA-hFGF21 在与胰蛋白酶质量比为 50 : 1 的条件下孵育 24 h 后仍有 $(39.3 \pm 0.01)\%$ 的剩余 (图 6A、B), 说明与 hFGF21 相比, rHSA-hFGF21 有更好的抗胰蛋

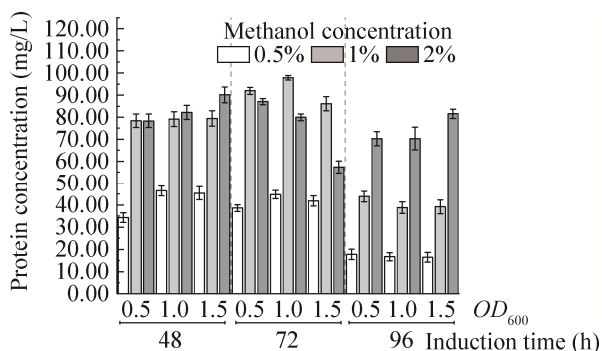


图 2 工程菌条件优化对目的蛋白表达量的影响
Figure 2 Effect of conditions optimization on the expression of target protein. The values ($x \pm s$) shown are the average of 3 independent measurements.

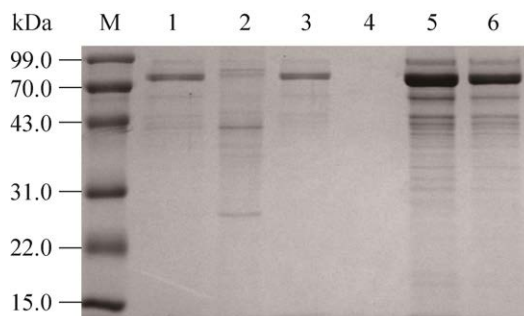


图 3 中空纤维膜过滤系统纯化 rHSA-hFGF21 的 SDS-PAGE 鉴定

Figure 3 SDS-PAGE of rHSA-hFGF21 purified by hollow fiber membrane filtration system. M: marker; 1: engineered strain induced 72 h supernatant; 2-3: 750 kDa hollow fiber column retentate and filtrate; 4-6: 10 kDa hollow fiber column retentate, filtrate and system residue.

白酶降解能力。在 60 °C 恒温孵育实验中，hFGF21 在孵育 12 h 后即出现明显弥散，而 rHSA-hFGF21 在孵育 24 h 时无明显变化 (图 6C)，

说明 rHSA-hFGF21 具有更好的温度稳定性。以上结果均表明融合 HSA 后，hFGF21 在体外的稳定性有明显提升。

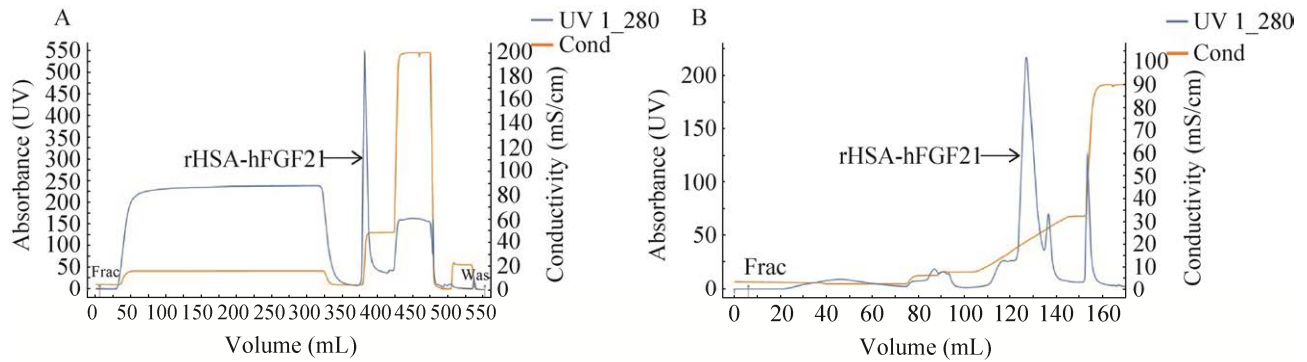


图 4 rHSA-hFGF21 的纯化分析图

Figure 4 Purification analysis chart of rHSA-hFGF21. (A) Blue Bestarose affinity chromatography results of rHSA-hFGF21. (B) 40 Q ion exchange chromatography results of rHSA-hFGF21.

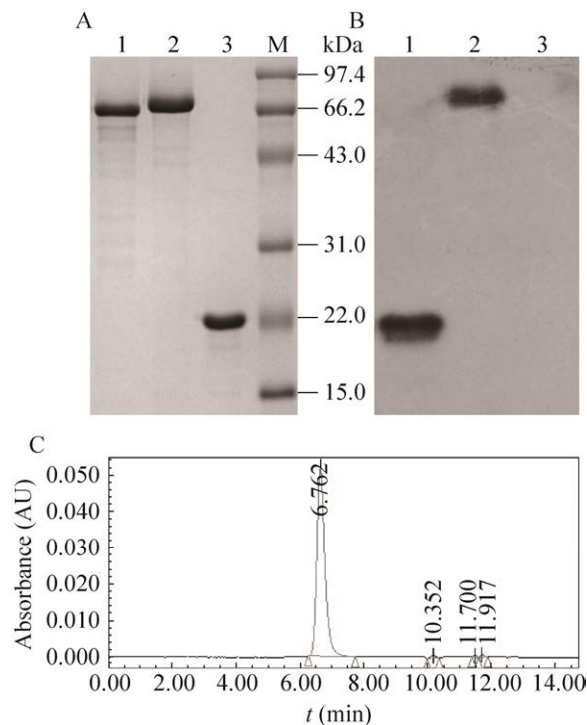


图 5 rHSA-hFGF21 的纯度和 Western blotting 分析

Figure 5 Purity and Western blotting analysis of rHSA-hFGF21. (A) SDS-PAGE analysis of reduced and non-reduced rHSA-mFGF21. M: molecular weight marker; A1: non-reduced rHSA-hFGF21; A2: reduced rHSA-hFGF21. (B) Western blotting analysis of rHSA-hFGF21. B1: hFGF21; B2: rHSA-hFGF21; B3: rHSA. (C) SEC-HPLC analysis of purified rHSA-hFGF21. The purity of rHSA-hFGF21 was evaluated by SEC-HPLC analysis using a BioCore SEC-150. As seen from the chromatogram, the y-axis indicates the absorbance, while the x-axis represents elution time (min). The purity of purified rHSA-hFGF21 was 98.18%.

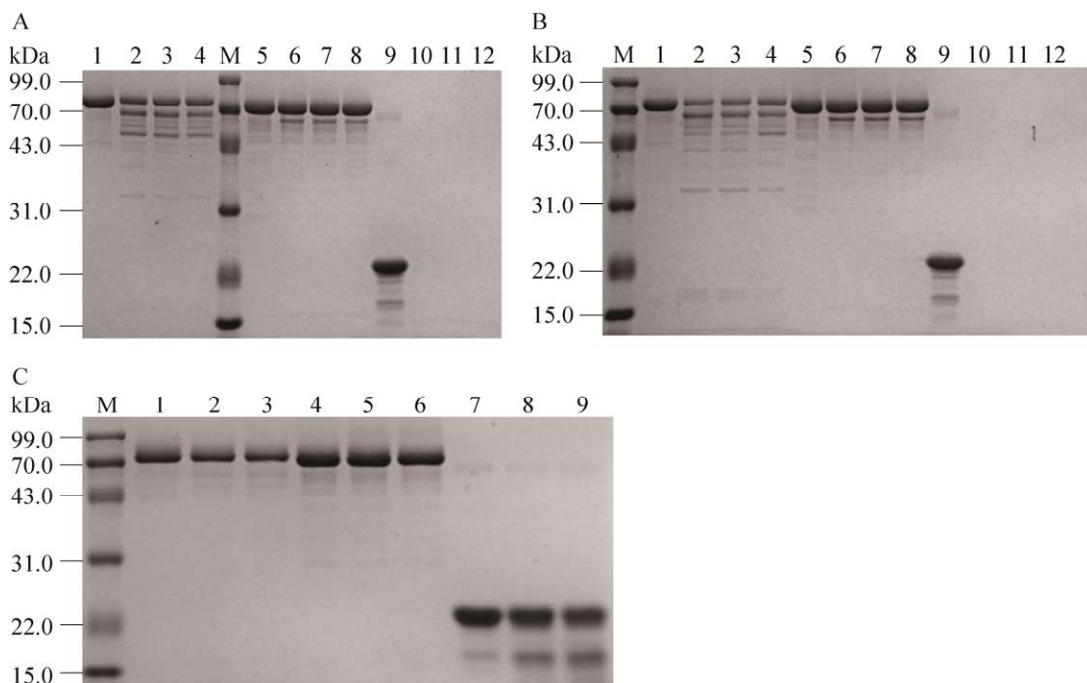


图 6 rHSA-hFGF21 的稳定性分析

Figure 6 Stability analysis of rHSA-hFGF21. (A–B): protein mixed with trypsin according to different mass ratio and incubated at 37 °C for 12 h and 24 h. M: molecular weight marker; lane 1: rHSA-hFGF21 as sample control; lane 2, 3, 4: the mass ratio of rHSA-hFGF21 to trypsin was 50:1, 75:1 and 100:1; lane 5: rHSA as sample control; lane 6, 7, 8: the mass ratio of rHSA to trypsin was 50:1, 75:1 and 100:1; lane 9, hFGF21 as sample control; lane 10, 11, 12: the mass ratio of hFGF21 to trypsin was 50:1, 75:1 and 100:1. (C) Protein incubated at 60 °C for 12 h and 24 h. M: molecular weight marker; lane 1: rHSA-hFGF21 as sample control; lane 2, 3: rHSA-hFGF21 incubated at 60 °C for 12 h and 24 h; lane 4, rHSA as sample control; lane 5, 6: rHSA incubated at 60 °C for 12 h and 24 h; lane 7, hFGF21 as sample control; lane 8, 9: hFGF21 incubated at 60 °C for 12 h and 24 h.

给 SD 大鼠皮下注射 hFGF21 和 rHSA-hFGF21 蛋白, 在不同的时间点取样, 检测血浆中 FGF21 含量, 血药浓度和时间曲线如图 7 所示。hFGF21 在血浆中的半衰期约为 0.85 h, 而 rHSA-hFGF21 蛋白的血浆清除半衰期约为 23.5 h, 其半衰期延长了约 27.6 倍。表明 hFGF21 蛋白经 HSA 融合后体内稳定性显著增加。

2.5 重组蛋白的细胞活性分析

为了检测重组蛋白 rHSA-hFGF21 的细胞活性, 本实验采用 10、100 及 1 000 nmol/L 的重组蛋白 rHSA-hFGF21 和 hFGF21 蛋白刺激饥

饿处理后的 HepG2 细胞 24 h, 通过 GOD-POD 法检测其葡萄糖吸收率。结果如图 8 所示, rHSA-hFGF21 和 hFGF21 均能促进葡萄糖吸收, 且呈现出剂量依赖性; 在 100 和 1 000 nmol/L 的蛋白刺激下, rHSA-hFGF21 蛋白的 HepG2 细胞活性显著强于 hFGF21。

2.6 rHSA-hFGF21 对 db/db 小鼠长效降糖效果研究

用 hFGF21 和 rHSA-hFGF21 蛋白分别治疗 db/db 小鼠, 每 2 d 给药一次, 连续注射 14 d, 并在停药后第 4 天检测血糖水平。治疗效果如图 9

所示, 在治疗期间, hFGF21 和 rHSA-hFGF21 蛋白均能显著降低 db/db 小鼠血糖水平, 但是 hFGF21 在治疗后第 4 天开始 db/db 小鼠血糖有逐渐回升的趋势, 而且停药 4 d 后 hFGF21 治疗组小鼠的血糖水平基本回升到了对照组的水平。

rHSA-hFGF21 治疗组的 db/db 小鼠血糖水平一直稳定维持在 6.87–8.79 mmol/L 之间, 停药 4 d 后血糖仍然能够维持在较低的水平 (9.35 mmol/L)。以上结果说明与 hFGF21 相比, rHSA-hFGF21 具有更好的长效降糖效果。

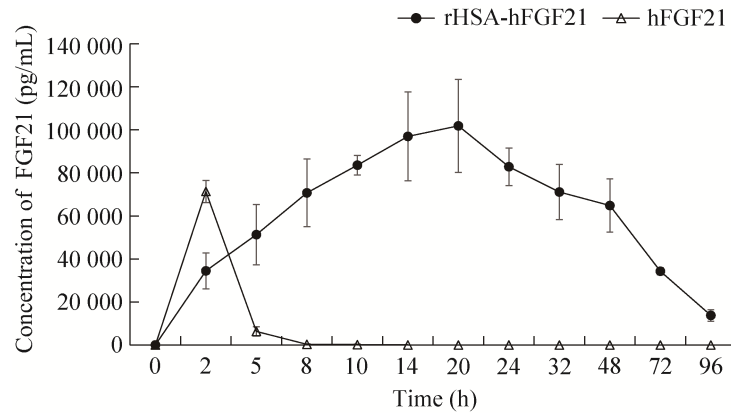


图 7 重组蛋白血药浓度-时间曲线图

Figure 7 Plasma concentration-time curve of recombinant proteins. SD rat were injected with 2 mg/kg rHSA-hFGF21 or hFGF21, before injection and at 2, 5, 8, 10, 14, 20, 24, 32, 48, 72, 96 h after injection 300 μ L/rat-time of blood from the jugular vein, and each rat was given 300 μ L of 0.9% saline after each blood collection.

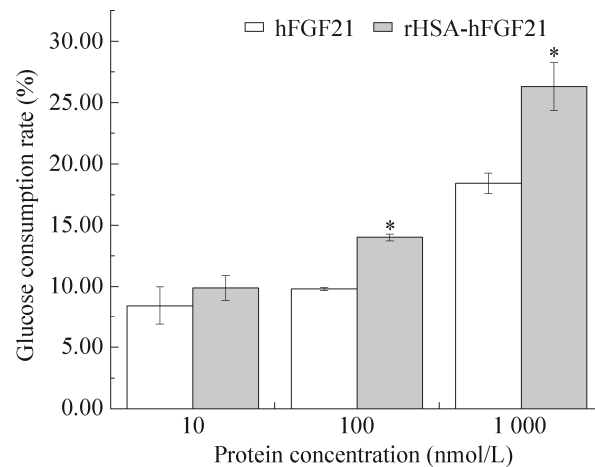


图 8 rHSA-hFGF21 的细胞活性分析

Figure 8 Cell activity analysis of rHSA-hFGF21. The cells were treated with 10, 100 or 1 000 nmol/L rHSA-hFGF21 or hFGF21. After 24 h treatment, glucose uptake by the model cells were examined using GOD-POD method. The values ($x \pm s$) shown are the average of 3 independent measurements. *: $P < 0.05$ vs. hFGF21.

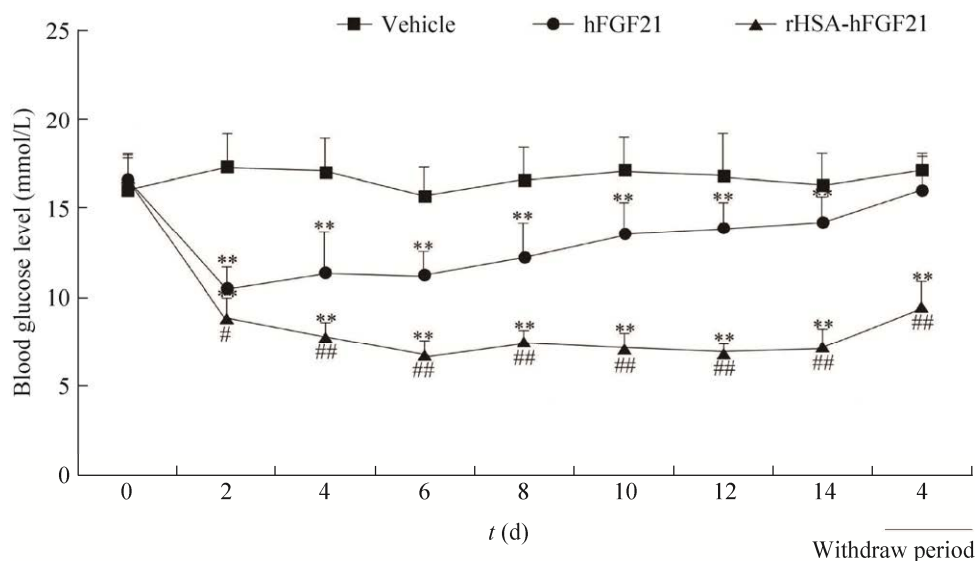


图9 db/db 小鼠长效降糖作用分析

Figure 9 Analysis of long-term hypoglycemic effect in db/db mice. db/db mice were subcutaneously injected with 50 nmol/kg rHSA-hFGF21 or hFGF21 every two days for 2 weeks. Vehicle: 0.9% saline-treated diabetic group. Plasma glucose levels were examined every two days from day 0 to 14 after the first administration and day 4 during the withdrawal periods. The values ($x \pm s$) shown are the average of 8 independent measurements. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ vs. vehicle; #: $P < 0.05$; ##: $P < 0.01$ vs. hFGF21.

3 讨论

FGF21 作为 21 世纪初新发现的 FGF 家族的成员^[16], 可在不依赖肝素的情况下, 通过 β -Klotho 依赖性的方式传递信号, 调节糖、脂及能量代谢, 改善胰岛素抵抗以及与肥胖相关的代谢紊乱性疾病^[17-18]。FGF21 不仅具有长效降糖的活性^[19-21], 还可联合胰岛素等降糖药物呈现出显著的协同作用^[5-22], 是治疗糖尿病、肥胖症和脂代谢异常的理想药物。

大肠杆菌在表达 FGF21 通常会面临靶蛋白的内含体表达以及内毒素的去除等问题, 从而导致纯化成本的增加^[5,23-25]; 毕赤酵母是目前最成功的真核表达系统之一, 其自身的分泌蛋白较少, 具有复杂的翻译后修饰且培养成本相对较低并可高密度发酵, 十分适合异源蛋白的表达^[26]。另外, 通过酵母表达重组蛋白不含有内毒素、致癌基因和病毒 DNA^[27]。本实验即通过

基因工程的方法构建了 pPIC9K-rHSA-hFGF21 和 pPICZ α A-rHSA-hFGF21 重组表达载体, 进而实现了重组 rHSA-hFGF21 蛋白在毕赤酵母中分泌表达。而本研究获得的高表达工程菌株 X33-pPIC9K-rHSA-hFGF21 是没有经过加压筛选的, 其目的蛋白的表达量要高于其他加压筛选菌株, 原因可能是 X33 作为野生型菌株与 GS115 和 SMD1168 相比, 其分泌能力、对外源蛋白的适应性以及对培养基的耐受性更强, 对养分利用率和转化效率更高, 这也表明 X33 作为野生型菌株在表达异源蛋白方面具有的部分优势^[28-30]。

甲醇浓度是影响重组蛋白表达水平的重要参数, 不仅控制着外源蛋白的表达效率更显著影响着细胞代谢的活力^[31]。有研究表明, 在合适的甲醇浓度下, 外源蛋白的转录水平是甲醇不足时的 5 倍^[32], 因此本研究对甲醇浓度进行优化, 当甲醇浓度为 0.5% 时, rHSA-hFGF21 的

表达水平最低；当甲醇浓度为 1.0% 和 2.0% 时，rHSA-hFGF21 的表达相近，考虑到高浓度甲醇对毕赤酵母细胞的毒性，确定甲醇的最佳浓度为 1%。酵母细胞的数量以及外源蛋白的降解程度与培养时间有关，这是获得高蛋白表达水平的关键因素之一^[33]。研究表明，异源蛋白表达的最佳培养时间为 72 h 至 96 h^[34]。此外，其他研究表明，较长的孵育时间可能导致表达的异源蛋白发生更多的蛋白水解消化^[35]。所以在本研究中，我们探究了 3 种培养时间（48、72 和 96 h）对蛋白表达的影响。结果表明，rHSA-hFGF21 蛋白的表达水平在 72 h 时达到最高，培养 96 h 后 rHSA-hFGF21 蛋白降解严重，这与文献报道结果一致。经条件优化后 rHSA-hFGF21 的表达量可达到 (97.8 ± 1.0) mg/L。

传统初步纯化酵母上清的方法多为热处理法、硫酸铵沉淀法或超滤浓缩^[28-29,33]，但却面临耗时长及目的蛋白损失较多等问题，难以实现规模化生产。本实验通过中空纤维膜处理系统对工程菌诱导后上清进行澄清、浓缩及缓冲液的置换，不仅发挥了其处理量大、损耗低等优势，更除去菌体、部分杂蛋白、脂质和色素等分子，降低了非特异性吸附于下游亲和层析柱上的杂蛋白，有利于目的蛋白的纯化。并通过后续的亲和层析以及离子交换层析得到了纯度为 98.18% 的蛋白。

重组蛋白在表达及纯化过程中易产生多聚体，当 HSA 多聚体蛋白制品被注入人体后可导致血液中胶体渗透压的迅速下降，进而在体内排泄加快及引发其他不利反应。而本实验的非还原性 SDS-PAGE 电泳结果表明，纯化出的 rHSA-hFGF21 蛋白为单体结构。FGF21 蛋白的稳定性及半衰期相对较短，经 HSA 融合后其体外稳定性实验表明，rHSA-hFGF21 的抗胰蛋白酶降解能力和高温条件下的稳定性显

著提升，更有利于蛋白的长期储存和运输。同时蛋白的体内稳定性分析实验也表明，与 HSA 融合后 FGF21 的半衰期延长了约 27.6 倍；在针对 db/db 小鼠的长效降糖作用研究中，hFGF21 治疗组中小鼠在治疗后第 4 天血糖即有逐渐回升的趋势，但 rHSA-hFGF21 治疗组即使停药 4 d 后其血糖仍可维持在较低的水平，表明与 hFGF21 相比 rHSA-hFGF21 具有更好的长效降糖效果。

本研究筛选了一株高表达 rHSA-hFGF21 的毕赤酵母工程菌株。通过优化发酵条件，如 OD 值、甲醇浓度和诱导时间，提高了 rHSA-hFGF21 的表达量。经两步纯化后，rHSA-hFGF21 的纯度达到 98.18%，且该方法纯化的 rHSA-hFGF21 蛋白具有良好的体外稳定性及长效降糖活性。本研究发酵及纯化工艺的建立为 rHSA-hFGF21 的大规模生产奠定了基础。

REFERENCES

- [1] 钱荣立. 关于糖尿病的新诊断标准与分型. 中国糖尿病杂志, 2000, 8(1): 5-6.
Qian RL. New diagnostic criteria and classification of diabetes. Chin J Diabetes, 2000, 8(1): 5-6 (in Chinese).
- [2] 刘永贵, 田红, 解学星, 等. 治疗 2 型糖尿病的非胰岛素类药物的研究进展. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 108-113.
Liu YG, Tian H, Xie XX, et al. Research progress in non-insulin drugs used for treating type 2 diabetes. Drugs Clin, 2013, 28(2): 108-113 (in Chinese).
- [3] 刘永贵, 解学星, 吴疆, 等. 治疗 2 型糖尿病的新靶点药物研究进展. 现代药物与临床, 2015, 30(2): 222-227.
Liu YG, Xie XX, Wu J, et al. Research progress on drugs with new targets in treatment of type 2 diabetes. Drugs Clin, 2015, 30(2): 222-227 (in Chinese).
- [4] Chavez AO, Molina-Carrion M, Abdul-Ghani MA, et al. Circulating fibroblast growth factor-21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance. Diabetes Care, 2009, 32(8): 1542-1546.

- [5] Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest*, 2005, 115(6): 1627-1635.
- [6] Berglund ED, Li CY, Bina HA, et al. Fibroblast growth factor 21 controls glycemia via regulation of hepatic glucose flux and insulin sensitivity. *Endocrinology*, 2009, 150(9): 4084-4093.
- [7] Lin ZF, Tian HS, Lam KSL, et al. Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice. *Cell Metab*, 2013, 17(5): 779-789.
- [8] Chen MZ, Chang JC, Zavala-Solorio J, et al. FGF21 mimetic antibody stimulates UCP₁-independent brown fat thermogenesis via FGFR1/ β Klotho complex in non-adipocytes. *Mol Metab*, 2017, 6(11): 1454-1467.
- [9] Talukdar S, Zhou YJ, Li DM, et al. A long-acting FGF21 molecule, PF-05231023, decreases body weight and improves lipid profile in non-human primates and type 2 diabetic subjects. *Cell Metab*, 2016, 23(3): 427-440.
- [10] Kragh-Hansen U, Chuang VTG, Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(6): 695-704.
- [11] Yang F, Zhang Y, Liang H. Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(3): 3580-3595.
- [12] Caliceti P, Veronese FM. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(10): 1261-1277.
- [13] Chaudhury C, Brooks CL, Carter DC, et al. Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction. *Biochemistry*, 2006, 45(15): 4983-4990.
- [14] Metzner HJ, Pipe SW, Weimer T, et al. Extending the pharmacokinetic half-life of coagulation factors by fusion to recombinant albumin. *Thromb Haemost*, 2013, 110(5): 931-939.
- [15] Watanabe H, Miyahisa M, Chikamatsu M, et al. Development of a long acting FGF21 analogue-albumin fusion protein and its anti-diabetic effects. *J Control Release*, 2020, 324: 522-531.
- [16] Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, et al. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1492(1): 203-206.
- [17] Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M, et al. BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(18): 7432-7437.
- [18] Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, et al. A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell*, 1997, 89(5): 693-702.
- [19] Ye XL, Qi JY, Wu Q, et al. Long-lasting hypoglycemic effect of modified FGF-21 analog with polyethylene glycol in type 1 diabetic mice and its systematic toxicity. *Eur J Pharmacol*, 2016, 781: 198-208.
- [20] Wang N, Xu TY, Zhang X, et al. Improving hyperglycemic effect of FGF-21 is associated with alleviating inflammatory state in diabetes. *Int Immunopharmacol*, 2018, 56: 301-309.
- [21] Zhao LW, Wang HY, Xie JJ, et al. Potent long-acting rhFGF21 analog for treatment of diabetic nephropathy in db/db and DIO mice. *BMC Biotechnol*, 2017, 17(1): 58.
- [22] 于丹, 孙翠羽, 孙国鹏, 等. FGF-21 与胰岛素在调节糖代谢过程中的协同作用及其机制. *药学学报*, 2014, 49(7): 977-984.
- Yu D, Sun CY, Sun GP, et al. The synergistic effect of FGF-21 and insulin on regulating glucose metabolism and its mechanism. *Acta Pharm Sin*, 2014, 49(7): 977-984 (in Chinese).
- [23] Boratyński J, Szermer-Olearnik B. Endotoxin removal from *Escherichia coli* bacterial lysate using a biphasic liquid system. *Methods Mol Biol*, 2017, 1600: 107-112.
- [24] Wang HY, Xiao YC, Fu LJ, et al. High-level expression and purification of soluble recombinant FGF21 protein by SUMO fusion in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol*, 2010, 10: 14.
- [25] 于丹, 叶贤龙, 任桂萍, 等. 提高成纤维细胞生长因子-21 产率和纯度. *生物工程学报*, 2014, 30(4): 658-668.
- Yu D, Ye XL, Ren GP, et al. Improvement of yield and purity of human fibroblast growth factor-21. *Chin J Biotech*, 2014, 30(4): 658-668 (in Chinese).
- [26] Gellissen G, Kunze G, Gaillardin C, et al. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica*-a comparison. *FEMS Yeast Res*, 2005, 5(11): 1079-1096.
- [27] Weinacker D, Rabert C, Zepeda AB, et al. Applications

- of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Braz J Microbiol*, 2014, 44(4): 1043-1048.
- [28] Thiruvengadam G, Init I, Fong MY, et al. Optimization of the expression of surface antigen SAG1/2 of *Toxoplasma gondii* in the yeast *Pichia pastoris*. *Trop Biomed*, 2011, 28(3): 506-513.
- [29] Li YY, Zhong KX, Hu AH, et al. High-level expression and characterization of a thermostable xylanase mutant from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2015, 108: 90-96.
- [30] Moukouli M, Topakas E, Christakopoulos P. Cloning and optimized expression of a GH-11 xylanase from *Fusarium oxysporum* in *Pichia pastoris*. *N Biotechnol*, 2011, 28(4): 369-374.
- [31] Wu D, Yu XW, Wang TC, et al. High yield *Rhizopus chinensis* prolipase production in *Pichia pastoris*: impact of methanol concentration. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2011, 16(2): 305-311.
- [32] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(1): 45-66.
- [33] Zhang RZ, Xu Y, Xiao R, et al. Optimized expression of (S)-carbonyl reductase in *Pichia pastoris* for efficient production of (S)-1-phenyl-1, 2-ethanediol. *J Basic Microbiol*, 2014, 54(8): 873-879.
- [34] Farsiani H, Mosavat A, Soleimanpour S, et al. Fc-based delivery system enhances immunogenicity of a tuberculosis subunit vaccine candidate consisting of the ESAT-6: CFP-10 complex. *Mol Biosyst*, 2016, 12(7): 2189-2201.
- [35] Santoso A, Herawati N, Rubiana Y. Effect of methanol induction and incubation time on expression of human erythropoietin in methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *MAKARA Technol Ser*, 2012, 16(1): 29-34.

(本文责编 陈宏宇)