

重组人球状脂联素在毕赤酵母中的表达和生物学活性分析

梅祥¹, 杜仁骞¹, 李希^{1,2}, 黄海艳^{1,2}, 于敏², 汤其群^{1,2}

1 复旦大学生物医学研究院, 上海 200032

2 复旦大学 分子医学教育部重点实验室, 上海 200032

摘要: 脂联素是一种重要的脂肪细胞因子, 而球状脂联素(脂联素的球状结构域, gapM1)有望开发为一种新药, 用来治疗 II 型糖尿病。本研究分别通过摇瓶和发酵罐培养, 用毕赤酵母工程菌进行重组人 gapM1 的表达, 并用凝胶过滤和阴离子交换进行蛋白的纯化。然后, 用高脂饲料和低剂量 STZ (链脲佐菌素)相结合的方法建立 II 型糖尿病大鼠模型, 鉴定 gapM1 的生物学活性。SDS-PAGE 结果表明 gapM1 在毕赤酵母中得到了高效表达, Western blotting 结果显示表达的蛋白为 gapM1, 并从 10 L 发酵上清中纯化得到 200 mg 纯度为 96% 的 gapM1。而制备的重组人 gapM1 能显著降低 II 型糖尿病大鼠的血糖(34.2%)、血甘油三酯(79.6%)和血总胆固醇(62.1%)水平。因此, 重组人 gapM1 在毕赤酵母中得到了成功表达, 并且通过动物模型证明其有很好的降血糖和降血脂活性。

关键词: 球状脂联素, 毕赤酵母, II 型糖尿病

Recombinant human gapM1 expressed in *Pichia pastoris* and its anti-diabetic effect

Xiang Mei¹, Renqian Du¹, Xi Li^{1,2}, Haiyan Huang^{1,2}, Min Yu², and Qiqun Tang^{1,2}

1 Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

2 Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Adiponectin is an adipokine predominantly synthesized and secreted by adipocytes in the white adipose tissue, and it can lower the blood glucose level and increase free fatty acid oxidation. In the current study, we developed the globular domain of adiponectin (gapM1) to treat type II diabetes. In both flask and fermentor, we cultivated *Pichia pastoris* expressing recombinant gapM1 and established the purification procedure by using gel filtration and anion exchange chromatography. To evaluate the biological activity of recombinant gapM1, we used rat type II diabetes model fed high-fat diet in combination with low-dose STZ (Streptozocin) induction. We purified 200 mg gapM1 with purity of 96% from 10 liters of supernatant. The recombinant gapM1 significantly lowered blood glucose (34.2%), serum triglyceride (79.6%) and total cholesterol (62.1%) in type II diabetes induced rat. Therefore, the recombinant human gapM1 is successfully expressed in *Pichia pastoris* and effectively treated type II diabetes in rat models.

Received: April 4, 2009; **Accepted:** June 29, 2009

Supported by: Cooperation Fund of Key Laboratories in Shanghai (No. 04DZ05607).

Corresponding author: Xi Li. Tel: +86-21-54237290; E-mail: lixi@shmu.edu.cn

Qiqun Tang. Tel: +86-21-54237198; E-mail: qqtang@shmu.edu.cn

上海市重点实验室合作基金(No. 04DZ05607)资助。

Keywords: gapM1, *Pichia pastoris*, type II diabetes

脂肪组织是一个能量储存组织,是甘油三酯的主要储存部位。当机体有能量需求时,该组织能够释放甘油和游离脂肪酸^[1]。但是,脂肪组织同时也是一个重要的内分泌组织,能够分泌很多重要的蛋白因子-脂肪细胞因子,如脂素^[2]、瘦素^[3]、纤溶酶原激活抑制子-1^[4]、抵抗素^[5]和肿瘤坏死因子 TNF- α ^[6]等。脂联素 (Adiponectin, Acrp30, AdipoQ, apM1 或 GBP28)是近年发现的很重要的一种脂肪细胞因子,4个研究组分别用不同的方法得到鉴定^[7-10]。它主要由 N 端的胶原样结构域和 C 端的球状结构域组成。血液中除了存在全长型脂联素,同时也存在脂联素球状结构域(gapM1)。但 gapM1 是经全长型脂联素通过蛋白酶裂解而来,还是经过全长型脂联素 mRNA 其他的剪接机制而来,这一问题尚未明确。脂联素在人或小鼠血清中能形成多种集合物形式,比如三聚体、六聚体、十二聚体或十八聚体^[11]。

血清脂联素在肥胖的动物模型或人体中水平比较低,特别当内脏有较多脂肪时^[12]。已有研究报道,用高脂饲料和低剂量 STZ 相结合的方法可以成功建立大鼠的 II 型糖尿病模型^[13]。全长脂联素具有增加胰岛素的敏感性、改善脂代谢紊乱和抗动脉粥样硬化的作用,而 gapM1 在较低剂量时就有同样的生物学效应^[14]。补充 gapM1 对于糖尿病和动脉粥样硬化可能成为一种新的治疗手段。所以,高水平表达 gapM1 对于研究其作用机制和新药的开发都是很有必要的。

最近,有研究组用原核和哺乳动物表达系统成功地表达了有活性的脂联素或其球状结构域。其中一个研究组用大肠杆菌成功表达了脂联素,然后用胰蛋白酶处理全长脂联素得到球状脂联素^[15]。另有一个研究组用哺乳动物系统成功地表达了全长脂联素^[16],但是哺乳动物表达系统比较复杂从而不易操作,并且培养基也比较昂贵。毕赤酵母表达系统是近年来建立起来的一种真核表达系统,成功地表达了大量外源重组蛋白^[17]。它既具有原核表达系统繁殖迅速、费用低廉及操作方便的特点,又具有真核表达系统能对表达的蛋白进行正确加工、折叠及适度糖基化的优点,因此已越来越广泛地用于蛋白质

的大量表达。毕赤酵母是一种能利用甲醇为其唯一碳源的酵母,在仅有甲醇存在时,会诱导其产生大量的利用甲醇的酶—醇氧化酶(AOX),因此可以以醇氧化酶基因的启动子作为外源基因表达的启动子而表达蛋白。当启动子为 PAOX1 时一般多用两步法来诱导外源蛋白的表达,即表达菌株首先在以甘油为碳源的培养基中生长,细胞大量增加而外源蛋白表达受到抑制;当甘油耗尽时,加入甲醇来诱导外源蛋白表达。

刘德国等^[18]将 gapM1 cDNA 中非毕赤酵母偏爱密码子部分同义突变为毕赤酵母偏爱的密码子,然后将突变的 gapM1 cDNA 克隆到 pPIC9K 表达质粒中,最后转化毕赤酵母表达系统,获得了高效表达人 gapM1 的多拷贝转化子。本实验室利用这个系统在毕赤酵母中已成功地表达了球状脂联素,并进行了药效学的初步研究,目前正在进行中试工艺和纯化路线的研究。而本研究用 II 型糖尿病模型进一步证明了该重组蛋白有很好地降血糖和降血脂的生物学活性。

1 材料和方法

1.1 菌株和试剂

表达 gapM1 的毕赤酵母 GS115 菌株为本实验室保存。YNB 和生物素购自 Invitrogen 公司。人脂联素多克隆抗体为 Chemicon 公司产品。填料 Q-Sepharose Fast Flow 和 Sephacryl S-100 购自 Amersham Biosciences 公司。蛋白质分子量标准 (Protein Marker)购自 Fermentas 公司。SureStepTM plus 血糖仪为强生公司产品。甘油三酯测定试剂盒购自上海名典生物工程有限公司。总胆固醇测定试剂盒购自上海荣盛生物技术有限公司。胰岛素放射免疫测定试剂盒购自北京北方生物技术研究所。STZ 为 Sigma 产品。其他试剂为分析纯。

1.2 实验动物

雄性 SD 大鼠购自上海斯莱克实验动物公司,大鼠体重在 100~120 g 之间。动物养在标准的鼠笼里(3 只/笼),控制室温为(22 \pm 2) °C,相对湿度为 55% \pm 5%,每日光照 12 h,自由摄食和饮水,所有大

鼠在进行饮食控制之前喂正常大鼠饲料。

1.3 酵母培养基

YPD 平板: 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, D-葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L。

BMGY 培养基: 酵母提取物 1%, 蛋白胨 2%, YNB 1.34%, 生物素 400 $\mu\text{g/L}$, 甘油 1%, 磷酸钾缓冲液 0.1 mol/L, pH 6.0。

BMMY 培养基: 酵母提取物 1%, 蛋白胨 2%, YNB 1.34%, 生物素 400 $\mu\text{g/L}$, 甲醇 0.5%, 磷酸钾缓冲液 0.1 mol/L, pH 6.0。

基础盐培养基(BSM): 26.7 mL/L 85%磷酸, 7.27 g/L MgSO_4 , 0.93 g/L CaSO_4 , 18.2 g/L K_2SO_4 , 4.13 g/L KOH 和 31.7 mL/L 甘油。

微量元素溶液(PTM1): 6 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g/L NaI, 3 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/L 硼酸, 0.5 g/L CoCl_2 , 20 g/L ZnCl_2 , 65 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L 生物素和 5 mL/L 硫酸。

1.4 重组 gapM1 的摇瓶表达

从 YPD 平板上挑取一个单克隆, 接种于装有 100 mL BMGY 培养基的 1 L 摇瓶中, 温度为 30 $^\circ\text{C}$, 转速为 250 r/min。培养 16~18 h 后, OD_{600} 达到 2~6 时, 3000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 然后将菌体悬浮于装有 10 mL BMMY 培养基的 100 mL 摇瓶中, 同上述条件诱导 48 h。每 24 h 补加 100% 甲醇至终浓度为 0.5%。在诱导后 0 h、3 h、12 h、18 h、24 h、36 h 和 48 h 取 0.5 mL 样品, 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清。每 24 μL 上清加 6 μL 5 \times 上样缓冲液, 进行 Tris-Tricine 电泳, 最后用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.5 重组 gapM1 的发酵表达和纯化

发酵在 30 L 的发酵罐((Bioflo 4500, New Brunswick Scientific)中进行。首先, 罐中放入 16 L 基础盐培养基, 原位高压蒸汽灭菌。通过补料泵加入氨水(氮源), 调节培养基 pH 为 5.0。接着加入微量元素溶液(4.35 mL/L) 和 2 mL 消泡剂。然后接入 800 mL 的 YPD 种子培养液, 温度维持在 29 $^\circ\text{C}$, 溶氧(DO) 保持在 20% 以上, pH 维持在 5.0。当 DO 和 pH 都出现明显升高时, 补加 50% 甘油(含 12 mL/L PTM1)。开始以 20 mL/(h \cdot L) 的速率补加甘油, 然后根据 DO 的变化调整补加甘油的速率。当 OD_{600} 达到 200 时, 停止补加甘油。待培养液中甘油被全部耗尽后(用甘

油三酯测定试剂盒测定培养液中甘油浓度), 这时 DO 和 pH 都出现明显上升, 补加 100% 甲醇(12 mL/L PTM1) 诱导表达。开始以 1 mL/(h \cdot L) 的速率补加 2 h, 让酵母逐渐适应甲醇。然后根据 DO 的变化调整补加甲醇的速率。甲醇诱导 86 h 后, 停止发酵。在诱导后 0 h、16 h、24 h、32 h、48 h、56 h、64 h、72 h 和 86 h 取 0.5 mL 样品, 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清。每 16 μL 上清加 4 μL 5 \times 上样缓冲液, 进行 Tris-Tricine 电泳, 最后用考马斯亮蓝 R-250 染色。

收样后, 4000 r/min 离心 30 min, 保留上清, 接着用截留分子量是 8 kD 的超滤膜超滤至 400 mL。超滤后的样品使用 Sephacryl S-100 柱(用 20 mmol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液(PB)平衡过)进行凝胶过滤, 用 20 mmol/L 的 PB(pH 7.4)洗脱蛋白。含有目的蛋白的流出样使用 Q Sepharose Fast Flow 柱(用 20 mmol/L pH 7.4 的 PB 平衡过)进行离子交换, 用 1 mol/L 的 NaCl 进行线性梯度洗脱。最后用 Tris-Tricine 电泳分析纯化过程中收集的样品。

1.6 Western blotting 印迹

纯化所得蛋白样品用 15% 分离胶进行 SDS-PAGE 分离, 然后用湿胶转移仪将蛋白电转到 PVDF 膜上。取出 PVDF 膜, 用封闭液(3% BSA, TTBS 配制)室温封闭 2 h。弃去封闭液, 加入 1:2000(用含 3% BSA 的 TTBS 稀释)的抗 gapM1 鼠源抗体, 室温孵育 2 h。洗涤数次之后, 加入 1:5000(用含 3% BSA 的 TTBS 稀释)的 HRP 标记的羊抗鼠二抗, 室温孵育 1 h。洗涤数次之后, ECL 发光检测。

1.7 II 型糖尿病大鼠模型的建立和生物学活性鉴定

大鼠分为 2 组, 5 只和 15 只, 分别给予正常饲料和高脂饲料。高脂饲料的组成列于表 1^[13]。3 周后, 经禁食过夜, 高脂饲料组大鼠腹腔注射 45 mg/kg STZ 的柠檬酸缓冲液(其他剂量比如 25 mg/kg、35 mg/kg 和 55 mg/kg 效果不好), 而正常饲料组大鼠腹腔注射柠檬酸缓冲液(pH 4.4, 剂量为 1 mL/kg)。在注射 STZ 前和 1 周后, 分别检测大鼠体重和相关生化参数(空腹血糖、血甘油三酯、血总胆固醇和血胰岛素)。当注射 STZ 1 周后, 满足以下 2 个条件的大鼠被认为是 II 型糖尿病造模成功大鼠: 空腹血糖 11.1 mmol/L, 空腹血胰岛素高于或相当于正常组大鼠的胰岛素水平。造模成功大鼠用于后面的药理学

实验。同时也检测大鼠的摄食量和饮水量。另外,直到实验结束 2 组大鼠分别给予不同的饲料。

糖尿病大鼠随机分为 2 组(模型对照组和实验组),每组 5 只。实验组腹腔注射含 gapM1 的生理盐水溶液(剂量为 10 mg/kg),而模型对照组给予生理盐水溶液(剂量为 2 mL/kg)。每天注射 1 次(禁食过夜),连续注射 6 d。第 7 天,大鼠取血测定相关的生化指标(空腹血糖、血甘油三酯、血总胆固醇和胰岛素)。

血糖用稳步血糖仪测定。从大鼠尾部取血,盛于含肝素(每管 20 μ L, 200 IU/mL)的 eppendorf 管中。5000 r/min 离心 5 min,取血浆。然后,用相关试剂盒检测血甘油三酯(PAP 法)和血总胆固醇(CHOD-POD 法)。剩余的血浆存于 -20°C ,用于胰岛素的放射免疫测定。

1.8 统计分析

所有结果表示为平均数 \pm 标准差。2 组的统计分析用 t 检验完成, $P < 0.05$ 时认为有统计学意义。

表 1 高脂饲料的组成

Table 1 Composition of HFD

Ingredients	Diet (g/kg)
Powdered NPD	475
Lard	200
Casein	250
Cholesterol	10
Vitamin and mineral mix	60
DL-Methionine	3
Yeast powder	1
Sodium chloride	1

2 结果

2.1 重组 gapM1 的摇瓶表达

毕赤酵母工程菌在摇瓶中用 0.5% 甲醇诱导 gapM1 基因的表达,每 24 h 补加甲醇至终浓度为 0.5%,诱导培养至 48 h。分别在诱导前、诱导 3 h、12 h、18 h、24 h、36 h 和 48 h 取样,还原性 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝 R-250 染色。如图 1 所示,在诱导后 12 h,目的蛋白(分子量在 17 kD 左右)有明显表达(Lane 4)。

2.2 重组 gapM1 的发酵表达和纯化

如图 2 所示,随着诱导时间的延长,目的蛋白

gapM1 的表达量逐渐升高,诱导 86 h 后 gapM1 表达水平达到 200 mg/L。

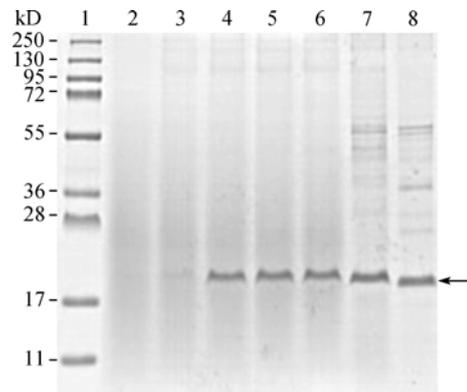


图 1 重组 gapM1 的摇瓶表达

Fig. 1 Flask expression of recombinant gapM1. 1: protein marker; 2: before induction; 3-8: methanol induction for 3 h, 12 h, 18 h, 24 h, 36 h and 48 h, respectively.

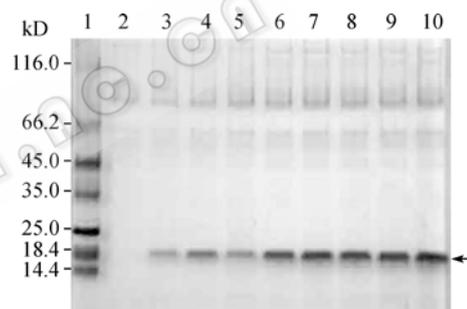


图 2 重组 gapM1 的发酵表达

Fig. 2 Large-scale expression of recombinant gapM1 by fermentation. The supernatants sampled at the time points of 0 h, 16 h, 24 h, 32 h, 48 h, 56 h, 64 h, 72 h and 86 h (Lanes 2-10) after induction were analyzed by Tris-Tricine Electrophoresis and stained with Coomassie blue R250. 1: protein marker.

诱导表达 86 h 后,离心收集培养液上清 10 L,超滤浓缩至体积 400 mL。超滤后的样品使用 Sephacryl S-100 进行凝胶过滤,用磷酸缓冲液 (20 mmol/L, pH 7.4) 洗脱得到 2 个峰。第 1 个峰大部分是杂蛋白(图 3A-2),而第 2 个峰主要是目的蛋白(Fig. 3A-3)。含有目的蛋白的流出样使用 Q Sepharose Fast Flow 进行离子交换,使用 1 mol/L 的 NaCl 进行梯度洗脱。当用低浓度盐洗脱时,大部分的目的蛋白可以洗脱下来(图 3B-3~7)。而只有在用高浓度盐洗脱时,大部分杂蛋白才可以洗脱下来(图 3B-8)。经过纯化后,可以得到 200 mg 纯度为 96% 的 gapM1。

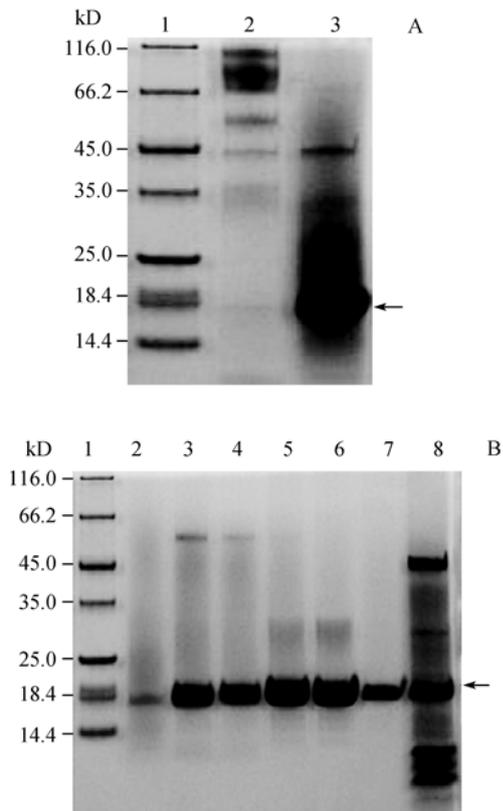


图3 重组 gapM1 的纯化

Fig. 3 Recombinant gapM1 was purified by gel filtration and ion-exchange chromatography. (A) Gel filtration. The ultrafiltered supernatants were first separated by Sephacryl S-100 (Lane 2-3). (B) Ion exchange chromatography. The pre-purified gapM1 was further purified by Q-Sepharose Fast Flow. Elution of the column could lead to two distinct fractions. The fraction containing gapM1 (Lanes 3-7) was first eluted and then the host derived proteins were eluted in the second fraction (Lane 8). 1: protein marker.

2.3 重组 gapM1 的鉴定

发酵表达和纯化后,得到了纯度较高的重组 gapM1(图 4A)。Western blotting 结果(图 4B)验证了目的蛋白具有 gapM1 的抗原性,表明已在毕赤酵母中成功地表达了重组人 gapM1。

2.4 重组 gapM1 在大鼠中的降血糖和降血脂活性

如表 2 所示,给予大鼠高脂饲料 3 周使大鼠的血糖、血甘油三酯、血总胆固醇和血胰岛素水平有显著提高($P < 0.05$, 相对于正常饲料大鼠组)。

高脂饲料饲养 3 周后腹腔注射 STZ (45 mg/kg),大鼠的血糖显著升高(表 3)。另外,大鼠的血甘油三酯和血总胆固醇也有显著升高,但血胰岛素水平显著下降(表 3),和正常组大鼠的血胰岛素水平相当。

另外,高脂组大鼠的体重也有显著下降(表 3),并且表现出多饮、多食和多尿的糖尿病症状。

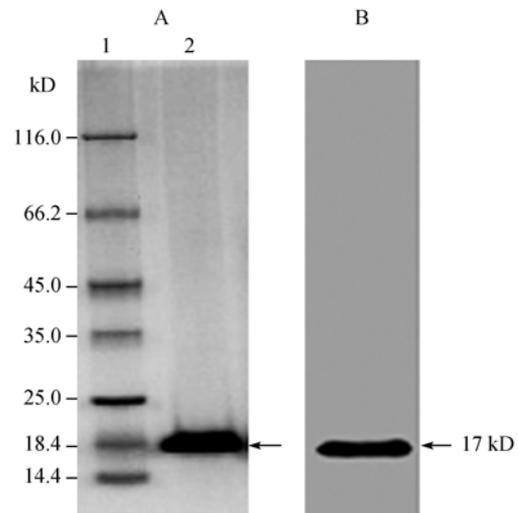


图4 SDS-PAGE 与 Western blotting 鉴定重组 gapM1 的表达

Fig. 4 Identification of recombinant gapM1 by SDS-PAGE and Western blotting analysis. (A) SDS-PAGE analysis. 1: protein marker; 2: purified gapM1. (B) Western blotting analysis of gapM1.

表 2 HFD 对于大鼠体重和生化参数的影响

Table 2 Effect of HFD on body weight and biochemical parameters in rats

Parameters	NPD-fed	HFD-fed
Body weight(g)	288.78±3.42	291.01±22.92
PGL(mmol/L)	3.86±0.29	5.12±0.19*
PTG(mmol/L)	1.02±0.52	4.89±1.09*
PTC(mmol/L)	1.67±0.06	2.78±0.41*
PI(μIU/mL)	28.09±9.14	68.89±7.81*

Values are mean±S.E.M; PGL: plasma glucose; PTG: plasma triglyceride; PTC: plasma total cholesterol; PI: plasma insulin. * $P < 0.05$ vs. NPD-fed group ($n = 15$).

表 3 STZ 和 HFD 对于大鼠体重和生化参数的影响

Table 3 Effect of STZ and HFD on body weight and biochemical parameters in rats

Parameters	NPD-fed	HFD+STZ
Body weight(g)	363.20±15.59	282.63±39.31*
PGL(mmol/L)	5.36±0.19	14.12±2.03*
PTG(mmol/L)	0.72±0.16	8.16±3.35*
PTC(mmol/L)	1.25±0.16	8.41±2.16*
PI(μIU/mL)	27.29±6.85	26.251±7.90

Values are mean±S.E.M; PGL: plasma glucose; PTG: plasma triglyceride; PTC: plasma total cholesterol; PI: plasma insulin. * $P < 0.05$ vs. NPD-fed group ($n = 10$).

与模型对照组相比,腹腔注射 gapM1 (10 mg/kg, 每天 1 次, 连续 6 d)使血糖、血甘油三酯和血总胆固醇水平有显著降低(分别为 34.2%、79.6%和 62.1%)(图 5)。表明本研究制备的人 gapM1 重组蛋白具有降低血糖和血脂的生物学活性。

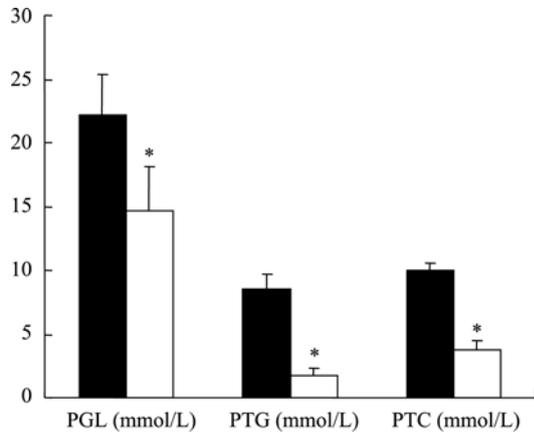


图 5 重组 gapM1 降低模型大鼠血糖和血脂水平
Fig. 5 Recombinant gapM1 reduces the level of plasma glucose, plasma triglyceride and plasma total cholesterol in rat model. Values are mean±S.E.M. * $P < 0.05$ vs. vehicle control group ($n = 5$). Legends indicate (■) vehicle and (□) gapM1. PGL: plasma glucose; PTG: plasma triglyceride; PTC: plasma total cholesterol.

3 讨论

脂联素是由脂肪细胞合成和分泌的一种脂肪细胞因子,参与调节糖和脂类的代谢。脂联素能增加肝脏和骨骼肌的胰岛素敏感性,并且能减轻动脉粥样硬化。除此之外,脂联素还有其他生物学效应,特别是能改善代谢综合征^[19]。所以,高表达脂联素或球状脂联素对于基础研究和临床应用是很有意义的。

毕赤酵母是近年来发展起来的一种表达系统,已成功表达多种外源性重组蛋白。但是,毕赤酵母表达系统也有它的缺陷。比如,它像其他表达系统一样存在着密码子偏好性。许多种外源蛋白只有在进行了密码子优化后才有高水平的表达^[20]。根据我们以前的研究,野生型的 gapM1 基因在毕赤酵母中得不到表达,用 PCR 的方法把原始密码子突变为酵母偏爱的密码子,从而使 gapM1 基因在毕赤酵母中得到了高表达^[18]。

本研究建立了大鼠的 II 型糖尿病模型,来模拟人的 II 型糖尿病的发病机理和代谢综合症。首先,高脂饲料喂养 3 周使大鼠产生了胰岛素抵抗,表现在体重增加(肥胖)、轻微高血糖、高血甘油三酯、高血总胆固醇和高胰岛素,这和人类患 II 型糖尿病之前的胰岛素抵抗症状很相似^[21]。然后,分别用不同剂量的 STZ(25、35、45、55 mg/kg)来处理大鼠以确定最佳的注射剂量。高脂饲料喂养 3 周后,腹腔注射 55 mg/kg 的 STZ 造成大鼠单纯的高血糖。另外,这些大鼠与正常组大鼠相比胰岛素水平显著降低。所以,高剂量的 STZ(55 mg/kg)使大鼠产生 I 型糖尿病的症状。另一方面,高脂饲料喂养后,腹腔注射低剂量的 STZ(25、35 mg/kg)没有产生明显的高血糖症状,所以这 2 个剂量也不合适。因此,高脂饲料和低剂量的 STZ(45 mg/kg)联合处理能够得到 II 型糖尿病大鼠模型,用来进行后面的药效学研究。

本研究建立的动物模型是为了初步评价重组人 gapM1 的药效学活性,至于药物的药物代谢和药动力学研究将委托国家临床前研究中心。而对于免疫反应的研究,将会在豚鼠中进行毒理学研究,研究结果将有后续报道。

总而言之,本研究在毕赤酵母中成功地表达了重组 gapM1,可以用来缓解糖尿病的相关症状。球状脂联素除了可以增加胰岛素的敏感性外,还有其他生物学功能。因此,下一步准备在其他的疾病动物模型中评价蛋白的生物活性。

REFERENCES

- [1] Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*, 1996, **87**: 377-389.
- [2] White RT, Damm D, Spiegelman BM, *et al.* Human adiponin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 9210-9213.
- [3] Friedman JM. Obesity in the new millennium. *Nature*, 2000, **404**: 632-634.
- [4] Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, *et al.* Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med*, 1996, **2**: 800-803.
- [5] Stepan CM, Bailey ST, Lazar MA, *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 2001, **409**: 307-312.

- [6] Hotamisligil GS. The role of TNF- α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med*, 1999, **245**: 621–625.
- [7] Scherer PE, Williams S, Fogliano MG, *et al.* A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*, 1995, **270**(45): 26746–26749.
- [8] Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose most abundant gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **221**: 286–289.
- [9] Maeda K, Okubo K, Matsubara K, *et al.* cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose most abundant gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **221**: 286–289.
- [10] Nakano Y, Tobe T, Tomita M, *et al.* Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem*, 1996, **120**: 803–812.
- [11] Tsao TS, Tomas E, Lodish HF, *et al.* Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 50810–50817.
- [12] Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrin Met*, 2002, **13**: 84–89.
- [13] Srinivasan K, Viswanad B, Ramarao P, *et al.* Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*, 2005, **52**: 313–320.
- [14] Yamauchi T, Kamon J, Kadowaki T, *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*, 2001, **7**: 941–946.
- [15] Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, *et al.* Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001: 2005–2010.
- [16] Berg AH, Combs TP, Scherer PE, *et al.* The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*, 2001, **7**: 947–953.
- [17] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, *et al.* Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, **22**: 249–270.
- [18] Liu DG, Liu HL, Tang QQ, *et al.* Functional expression of the globular domain of human adiponectin in *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **363**: 769–775.
- [19] Takashi K, Toshimasa Y. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*, 2005, **26**: 439–451.
- [20] Woo JH, Liu YY, Neville DM, *et al.* Gene optimization is necessary to express a bivalent anti-human anti-T cell immunotoxin in *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif*, 2002, **25**: 270–282.
- [21] Srinivasan K, Patole PS, Ramarao P, *et al.* Reversal of glucose intolerance by pioglitazone in high-fat diet fed rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2004, **26**: 327–333.