

酿酒酵母孢子作为 GLP-1 载体的研究

黄丹娣, 张慧杰, 闫 听, 冯诗倪, 中西秀树*, 高晓冬

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 胰高血糖素样肽-1(Glucagon-like peptide-1, GLP-1)的口服给药研究已成为目前抗糖尿病研究领域的热点之一。本文通过对 GLP-1 进行基因改造和优化,并以酿酒酵母孢子作为保护和运输载体,将 GLP-1 表达达到酿酒酵母孢子内,使 GLP-1 能在口服给药过程中抵抗胃肠道消化酶的降解以提高其生理活性。结果表明, GLP-1 被成功表达达到酿酒酵母孢子内,表达 GLP-1 的孢子经模拟肠胃液处理后与胰岛 β 细胞 MIN6 细胞共培养可显著提高 MIN6 细胞胰岛素分泌量。本研究利用酿酒酵母孢子作为载体,提高了 GLP-1 的抗酶解能力和促胰岛素活性,为进一步开发治疗糖尿病口服药物奠定了基础。

关键词: 糖尿病;胰高血糖素样肽-1;酿酒酵母;孢子;胰岛素

中图分类号: Q 782 文章编号: 1673-1689(2019)12-0039-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.12.006

Yeast Spore as Carrier for Glucagon-Like Peptide-1

HUANG Dandi, ZHANG Huijie, YAN Ting, FENG Shini, NAKANISHI Hideki*,
GAO Xiaodong

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Oral administration of GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) has attracted attention as treatment for diabetes. GLP-1 is a short peptide and secreted by L cells. GLP-1 can increase insulin release and reduce blood sugar. However, one of the major limitation of native GLP-1 is its rapid degradation by DPP-4, leading to its short half-life *in vivo*. In this study, we examine whether yeast spores were used as a carrier of GLP-1. Sporulation will happen when yeast cell face nutrient limitation, and previous work has shown that the yeast spores can hold secretory proteins in the periplasmic space of the spore wall because its outer layers work as a diffusion barrier. By being held in the spore wall, the proteins are protected from environmental stresses. Yeast spores were used as carrier to protect GLP-1 from being digested by gastric and intestine juice. The results showed that GLP-1 was successfully expressed in yeast spores. After pre-treated with simulated gastric and intestine juice, spores with GLP-1 obviously enhanced insulin secretion from MIN6 cells compared with GLP-1. Using yeast spores as carrier, the anti-protease degradation ability and insulinotropic activity of GLP-1 were significantly enhanced. Our study will lay a foundation for further

收稿日期: 2016-12-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(21576118, 31400693)。

* 通信作者: 中西秀树(1973—), 男, 博士, 教授, 主要从事酵母遗传学等方面的研究。E-mail: hideki@jiangnan.edu.cn

引用本文: 黄丹娣, 张慧杰, 闫 听, 等. 酿酒酵母孢子作为 GLP-1 载体的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(12): 39-45.

development of oral anti-diabetic drugs.

Keywords: diabetes, GLP-1, yeast, spore, insulin

糖尿病是目前危害人类健康的主要疾病之一,它是一种有遗传倾向的内分泌代谢疾病,以高血糖和高血糖继发的脂肪、蛋白质、水、电解质紊乱为特征。最新数据显示糖尿病患者的人数将在 2030 年上升到 3.6 亿^[1]。而在我国,近年来随着人们生活水平的提高,糖尿病的发病率迅速提高,患病人数已经超过了 1 亿人,其中,绝大多数为二型糖尿病患者。糖尿病可引起包括心脑血管疾病在内的多种并发症,因此,糖尿病的防治已成为人们最为关注的热点之一。

二型糖尿病又被称为非胰岛素依赖糖尿病,患者本身仍产生胰岛素,然而由于胰岛 β 细胞功能低下和胰岛素抵抗,患者对胰岛素的利用却大打折扣^[2]。目前,二型糖尿病患者的治疗手段主要包括使用胰岛素和降糖药物等。虽然这些药物能够有效降低血糖,但是也存在一些问题,例如会导致患者低血糖以及体重的增加等。此外,这些药物只能延缓病情,无法恢复胰岛 β 细胞功能,从而无法从根本上使病情得到控制。因此,开发安全有效的糖尿病治疗药物,已成为现代科学家的研究热点^[3]。

胰高血糖素样肽-1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1) 含有 37 个氨基酸,是已发现的促胰岛素分泌作用最强的肠肽类激素。GLP-1 的生物活性形式有 2 种,分别为 GLP-1(7-37)和 GLP-1 (7-36)酰胺。GLP-1 可以从多个方面发挥作用,如抑制胃排空,抑制胰高血糖素的分泌,降低血糖等^[4],并且能够恢复胰岛 β 细胞功能。更为重要的是,GLP-1 的作用具有葡萄糖浓度依赖性,仅在葡萄糖浓度较高时才发挥作用,因此不会导致由于使用过度而导致的低血糖问题。GLP-1 已成为未来治疗二型糖尿病的安全有效的多肽药物^[5]。然而天然的 GLP-1(7-36)容易被二肽基肽酶(DPP-IV)降解为无活性的 GLP-1 (9-36),且由于其相对分子质量较小从而易被肾清除,因此导致 GLP-1 在人体内半衰期不足 2 min,这大大限制了其临床应用。因此,科学家正致力于研究如何延长其在体内的半衰期从而提高其生理活性。目前的研究主要集中在以下几个方面:筛选 GLP-1 类似物,例如艾塞那肽,利拉鲁肽^[6];对天然

GLP-1 进行结构改造,如 GLP-1 的 N 端修饰、脂肪酸修饰 GLP-1 等^[7];将 GLP-1 与生物大分子蛋白偶联,如人清蛋白^[8],IgG 重链结合蛋白 IgG-Fc^[9]等,以及将 GLP-1 串联表达等,均取得了一定的效果。此外,传统的多肽类药物以及胰岛素需要注射使用,这让病人痛苦不堪。研究发现,GLP-1 可以以活性形式被肠道直接吸收进入血液,通过血液循环直接与胰岛细胞表面的 GLP-1 受体结合并最终促进胰岛素的释放^[10]。因此,若能够通过一些方法延长其在体内的半衰期,提高其利用率,并选择合适的载体构建口服 GLP-1 药物,将为有效治疗糖尿病提供更有力的方法,并具有巨大的科学意义和市场潜力^[11]。

酿酒酵母是单细胞真核生物,其完整的基因组在 1996 年便已完成测序。酿酒酵母培养简单,生长迅速,且易于进行基因改造,被最早应用于酵母基因克隆和表达宿主菌及人源化蛋白^[12]。酿酒酵母的细胞有 2 种生活形态,单倍体和二倍体。二倍体细胞可在营养匮乏的条件下减数分裂生成孢子,一个母细胞可分裂成 4 个孢子。酿酒酵母孢子易于获得,安全无毒,可以食用。酿酒酵母的孢子壁与母细胞相比有明显的不同。如图 1 所示,成熟的孢子壁从内到外分别是甘露糖层、 β -葡聚糖层、壳聚糖层和二酪氨酸层。而酿酒酵母从内到外仅有 β -葡聚糖层、甘露糖层。孢子特有的二酪氨酸层具有保护孢

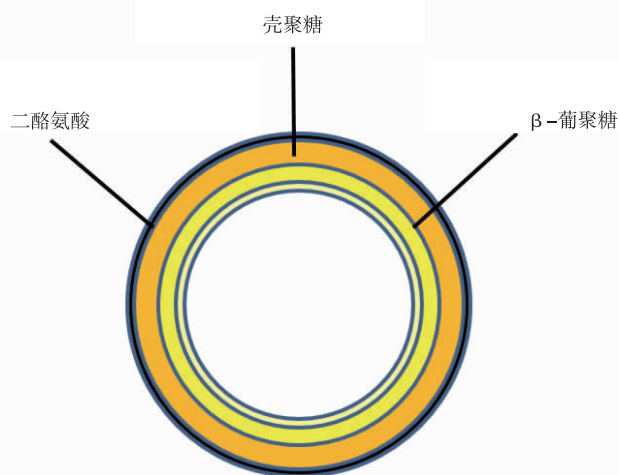


图 1 酿酒酵母孢子壁的结构

Fig. 1 Structure of yeast spore wall

子抵御外界环境压力的能力。因此,在口服过程中,孢子壁可以保护孢内表达的外源蛋白抵抗一定的蛋白酶降解及胃酸低 pH 的影响。

本研究拟利用酿酒酵母孢子构建 GLP-1 可口服给药体系。通过串联表达 GLP-1,突变 GLP-1 部分碱基等方式对 GLP-1 进行改造,并同时改造后的 GLP-1 表达达到酿酒酵母孢子内以提高 GLP-1 抗酶解能力和体内半衰期。通过模拟肠胃液处理实验,体外刺激小鼠胰岛 β 细胞分泌胰岛素等实验证实了所构建的 GLP-1 给药体系的有效性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 酿酒酵母 AN120 野生型菌株, *dit1* Δ 缺陷型菌株, 小鼠胰岛 β 细胞株 MIN6 细胞(江南大学食品学院孙佳教授馈赠), 大肠杆菌 DH5 α 。

pBlueScript II SK(+)质粒, pRS424-*TEF_{pr}* 为本实验室保存质粒, pRS424-*TEF_{pr}*-8*GLP-1-GFP 和 pRS424-*TEF_{pr}*-ss-8*GLP-1-GFP 为本研究所构建的质粒。

1.1.2 培养基 LB 培养基:酵母提取物 10 g, 胰蛋白胨 10 g, 氯化钠 10 g, 琼脂粉 20 g(固体), 加水至 1 L, 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min。

SD-Trp 培养基:无氨基酵母氮源(YNB)6.7 g, 琼脂粉 20 g(固体), 加水至 900 mL, 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min, 使用前加入 2 g 缺少色氨酸(Trp)的氨基酸粉末以及 100 mL 灭菌的 20 g/dL 的葡萄糖溶液。

YPAD 培养基:酵母提取物 10 g, 蛋白胨 20 g, 腺嘌呤 0.03 g, 琼脂粉 20 g(固体), 加水至 900 mL, 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min, 使用前加入 100 mL 灭菌的 20 g/dL 的葡萄糖溶液。

YPACe 培养基:酵母提取物 10 g, 蛋白胨 20 g, 腺嘌呤 0.03 g, 琼脂粉 20 g, 乙酸钾 20 g, 加水至 1 L, 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min。

产孢培养基:乙酸钾 20 g, 加水至 1 L, 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 大肠杆菌质粒的构建 GLP-1 的活性区域含有 36 个氨基酸, 其氨基酸序列从 NCBI 中获得, 如图 2 所示。为了防止其被二肽基肽酶(DPP-IV)和胰蛋白酶(Trypsin)降解, 我们对其非保守序列的第

2 位、第 20 位、第 28 位的氨基酸进行了修改优化, 已有文献证明这 3 个位点的改变并不影响 GLP-1 的生理活性。同时, 为了在孢子内大量表达 GLP-1 并防止 GLP-1 被降解, 将其 4 串联表达, 并在序列首尾设计了相应的酶切位点, 以方便后面的基因操作。此外, 为了防止同源重组, 对不同串联序列的一些碱基也做了微调, 整个 4*GLP-1 序列也根据酿酒酵母偏爱密码子进行了优化, 并由上海生工生物公司合成。

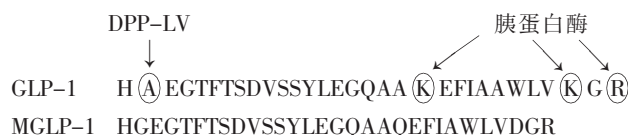


图 2 GLP-1 氨基酸序列

Fig. 2 The amino acid sequence of GLP-1

合成的 4*GLP-1 序列首尾两端各设计了 2 个酶切位点, 分别为 *Bam*H I、*Sma* I、*Eco*R I 以及 *Eco*R V。大肠杆菌质粒表达载体的构建流程如图 3 所示。由于 pRS424-*TEF_{pr}* 质粒本身有 2 个 *Eco*R V 酶切位点, 无法用于直接构建 8*GLP-1 重组质粒, 因此选择 pBlueScript II SK(+)作为出发质粒。首先为了方便检测目的蛋白的表达和定位, 以 pRS424-*TEF_{pr}*-GFP 为模板, 通过 PCR 的方法将绿色荧光蛋白 GFP 编码序列连接到载体, 分别在 5' 和 3' 端加入 *Eco*R I 以及 *Xho* I 酶切位点。引物序列如下:

上游引物:

5'-CCGGAATTCAAAGGAGAAGAAGACTTTTCAC-3'

下游引物:

5'-CCGCTCGAGTTATTTGTATAGTTCATCCATGC-3'

PCR 获得目的条带之后, 通过酶切连接的方法, 将 GFP 基因序列连接到 pBlueScript II SK(+)载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取 4-6 个单菌落于 LB-AMP 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C 摇床过夜培养, 随后通过菌液 PCR 鉴定阳性转化子, 再提取阳性转化子的质粒, 进行酶切验证。

接着为构建 pBlueScript II SK(+)-4*GLP-1-GFP, 用 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切 4*GLP-1 条带和 pBlueScript II SK(+)-GFP 重组质粒, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 于 LB-AMP 培养基挑取阳性转化子。为构建重组质粒 pBlueScript II SK(+)-8*GLP-1-GFP, 用 *Sma* I、*Eco*R V 双酶切目的条带, 用 *Sma* I 单酶切重组质粒 pBlueScript II SK(+)-4*GLP-1-

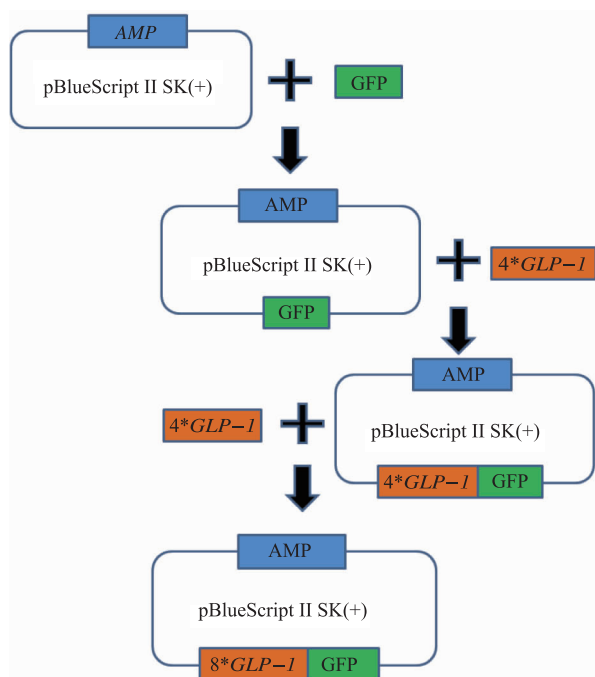


图3 质粒构建流程

Fig. 3 Construction of plasmid pBlueScript II SK (+)-8*GLP-1-GFP

GFP, 获得两端为平末端的片段, 连接转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取一定数量的单菌落进行酶切验证。并挑取阳性单菌落于 LB-AMP 液体培养基中 37 °C 过夜培养以扩增重组质粒, 重组质粒用小提质粒试剂盒提取。

1.2.2 酿酒酵母质粒表达载体的构建 为使目的蛋白能够在酿酒酵母孢子内表达, 首先, 需构建酿酒酵母转化质粒 pRS424-TEF_{pr}-8*GLP-1-GFP, 通过 BamH I、Xho I 双酶切重组质粒将 8*GLP-1-GFP 序列切下来再连接到 pRS-424-TEF_{pr} 表达载体上, 连接产物转化大肠杆菌, 为使目的蛋白 8*GLP-1 能够定位在酿酒酵母孢子壁上, 需在目的蛋白前添加信号肽序列 ss 片段。因 ss 片段大小不足 100 bp, 本文采用将 TEF 启动子与 ss 序列一同 PCR 的方法, 获得 TEF_{pr}-ss 片段以替代重组质粒上的 TEF 启动子序列。以 pRS424-TEF_{pr}-ss-3HA 为模板, 通过 PCR 的方法获得 TEF_{pr}-ss 序列, 分别在两端引入 Sac I 和 BamH I 酶切位点。引物序列如下:

上游引物:

5'-GCTGGAGCTCATAGCTTCAA-3'

下游引物:

5'-CCGGATATCGGAAACAGGATTACAG-3'

最终获得 pRS424-TEF_{pr}-8*GLP-1-GFP 以及

pRS424-TEF_{pr}-ss-8*GLP-1-GFP 重组质粒 (图 4-5), 构建好的质粒由上海生工测序。

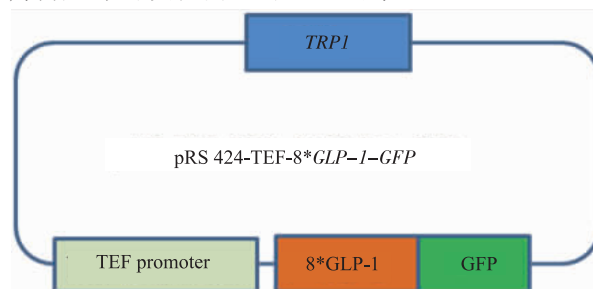


图4 pRS424-TEFpr-8*GLP-1-GFP 重组质粒

Fig. 4 Plasmid pRS424-TEFpr-8*GLP-1-GFP

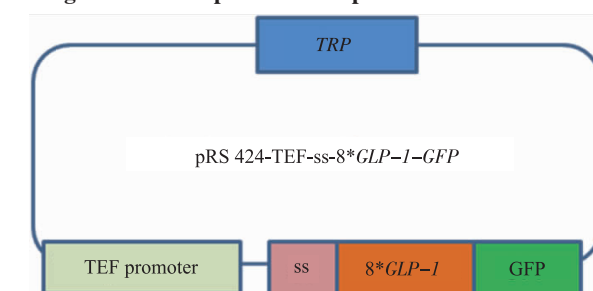


图5 pRS424-TEFpr-ss-8*GLP-1-GFP 重组质粒

Fig. 5 Plasmid pRS424-TEFpr-ss-8*GLP-1-GFP

1.2.3 GLP-1 重组蛋白在酿酒酵母孢子的表达以及孢子的纯化 将得到的重组质粒通过一步转化法转入到酿酒酵母后, 涂相应缺陷平板, 2 天后长出的单菌落即为成功转入重组质粒的酵母。挑取一个单菌落接种于 5 mL SD-Trp 培养基的试管中, 并于 30 °C、220 r/min 的摇床过夜培养。12 h 后取 1 mL 菌液转入盛有 50 mL 的 YPACe 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 30 °C、220 r/min 摇床预产孢 24 h; 6 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 用产孢培养基重悬, 并全部转入 250 mL 的三角瓶中 (无菌操作), 于 30 °C、220 r/min 摇床培养 24 h; 取 5~10 μ L 产孢培养基中的菌液, 于显微镜下观察酵母产孢情况, 正常可以看到视野中有大量四联球形态的子囊细胞。

为了使单个孢子能够从子囊孢子中释放出来, 需对重组酵母的子囊孢子进行进一步处理, 8 000 r/min 离心收集孢子, 并重悬于 2 mL 原生质体 buffer 中, 充分混匀后加入约 100 μ L 的 lyticase (1 mg/mL), 并置于 37 °C 的摇床处理 3 h, 随后超声破碎以获得单个孢子。为进一步除去孢子部分破碎的子囊壁和裂解酶, 以获得纯净的孢子。需对超声破碎的孢子进行纯化处理: 首先需配制体积分数 50%、60%、70%、80% 梯度的 Percoll 溶液, 配方如下: 5 mL Percoll、4 mL

体积分数 0.5% Triton X-100, 1 mL 2.5 mol/L 蔗糖; 6 mL Percoll, 3 mL 体积分数 0.5% Triton X-100, 1 mL 2.5 mol/L 蔗糖; 7 mL Percoll, 2 mL 体积分数 0.5% Triton X-100, 1 mL 2.5 mol/L 蔗糖; 8 mL Percoll, 1 mL 体积分数 0.5% Triton X-100, 1 mL 2.5 mol/L 蔗糖。接着将超声破壁过的孢子悬浮液用 5 mL 体积分数 0.5% Triton X-100 洗涤一遍, 并溶解在 1 mL 的体积分数 0.5% Triton X-100 中, 将体积分数 80%、70%、60%、50%梯度的Percoll 溶液各取 1 mL, 沿离心管壁缓慢依次加入 10 mL 离心管中, 最后加入 1 mL 溶解在体积分数 0.5% Triton X-100 中的孢子液; 4 ℃、15 000 r/min 离心约 30 min 后, 梯度溶液会分层, 用移液枪吸取孢子悬浮的一层于干净离心管中, 用 5 mL 0.6 mol/L NaCl 溶液洗涤 1 次; 接着用 1 mL 体积分数 0.5% Triton X-100 洗涤 2 次; 最后将纯化后的孢子置于冷冻干燥机中(-50 ℃, 72 Pa) 24 h 后取出备用。

1.2.4 GLP-1 重组蛋白的检测 为了检测目的蛋白是否成功表达, 需提取重组酵母孢子内的全蛋白进行 Western blot 检测, 具体方法为: 离心收集约 5 mL 培养基的菌体于 1.5 mL 离心管中, 用 dd 水洗 2 遍后用 500 μ L S buffer 重悬, 再加入 5 μ L 的溶壁酶(lyticase), 于 30 ℃ 酶解 30 min。离心收集沉淀并用 S buffer 洗 2 遍后, 加入 400 μ L lysis buffer 重悬, 再加入适量玻璃珠以及 4 μ L PMSF (100 mmol/L), 于冰上破碎, 具体步骤为冰上静置 1 min, 再于振荡器振荡 1 min, 如此循环 15 次后, 于 4 ℃、1 000 g 离心 10 min, 取上清液 3 000 g 离心 10 min 进一步去除细胞碎片。所得的上清液即为提取的酿酒酵母全蛋白。全蛋白用 Western blot 进一步检测目的蛋白是否表达, Anti-GFP mouse 和 Goat Anti-mouse IgG-HRP 分别作为一抗和二抗。

在 Western blot 检测到目的条带后, 通过荧光显微镜检测荧光信号来进一步确定 GLP-1 在孢子中的表达位置。首先重接种酿酒酵母并产孢, 产孢过程同上, 获得四联球孢子后, 收集约 5 mL 菌液的孢子, 并用 dd 水洗 2 遍后重悬, 调节一定的浓度, 取 5 μ L 于载玻片上, 并尽快置于荧光显微镜下, 使用 100 $\times$ 油镜观察检测 GFP 荧光信号, 获得的荧光照片由 NIS-Element AR 软件分析。

1.2.5 酿酒酵母孢子给药体系的体外活性检测 在确定目的蛋白成功表达后, 接下来要对酿酒酵母

孢子给药体系的活性进行检测。为模拟人体内部消化环境, 首先用模拟肠胃液对孢子载药体系进行处理。处理流程图如图 6 所示, 首先, 称取 10 mg 孢子粉, 溶于 10 mL 模拟胃液中, 于 37 ℃、180 r/min 摇床消化处理 2 h, 其中模拟肠胃液的配方为: 2.0 g 氯化钠、3.2 g 胃蛋白酶、7 mL HCL, 溶解于 1 L ddH₂O。随后于模拟胃液中加入 NaHCO₃ 并调节 pH 至 7.5, 再加入胰酶至终质量浓度为 10 g/L, 配制成模拟肠液, 同样于 37 ℃ 摇床处理 4 h。随后为使蛋白酶失活, 将样品置于金属浴中 100 ℃ 热处理 5 min, 然后迅速冷却至室温。离心管于 3 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液后置于真空冷冻干燥机中冻干备用。

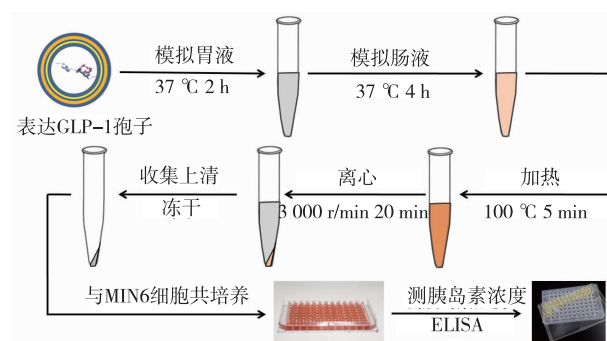


图 6 给药体系体外活性检测过程

Fig. 6 Detection of in vitro activity of the drug delivery system

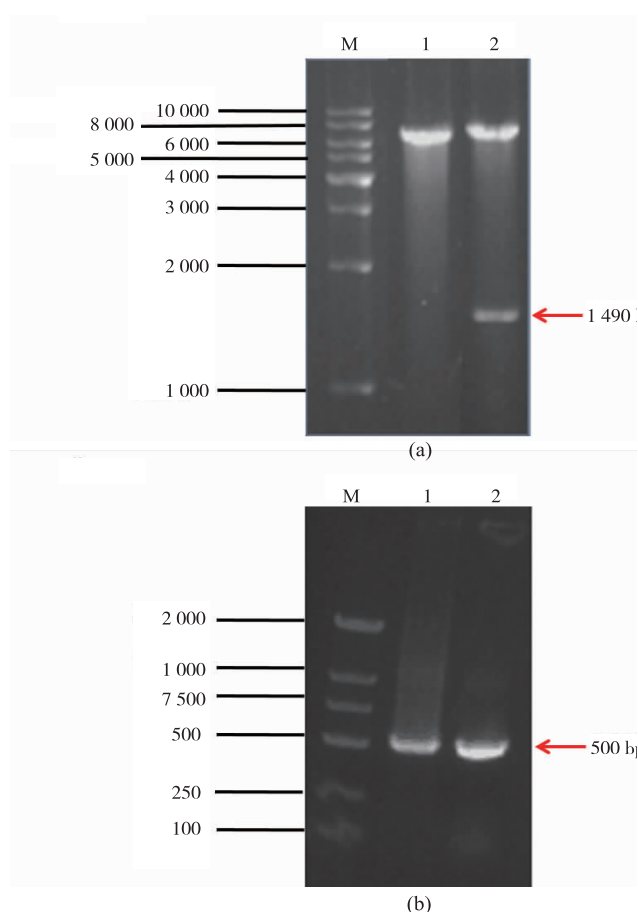
为检测经模拟肠胃液处理后的消化产物是否具有促胰岛素释放的作用, 需将冻干产物与 MIN6 细胞共培养并检测上清液中的胰岛素浓度。将 MIN6 细胞接种于 96 孔板上, 接种密度为 2×10^4 个/孔, 分为空白对照组和实验组, 每组 3 个平行样。培养 24 h 后, 取冻干的消化产物, 重悬于 100 μ L 的细胞培养基中, 再取 10 μ L 加入 96 孔板的样品孔中, 与 MIN6 细胞共培养 2 h, 随后取上清液, 并按照小鼠胰岛素 ELISA 试剂盒的操作步骤进行胰岛素水平的测定。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建

为了能够将 GLP-1 表达达到酿酒酵母内, 需要构建 pRS424-TEF_{pr}-8*GLP-1-GFP 以及 pRS424-TEF_{pr}-ss-8*GLP-1-GFP 重组质粒, 为使重组蛋白能够定位在酿酒酵母孢子壁上, 需在目的蛋白前添加信号肽序列 ss 片段。因 ss 片段大小不足 100 bp, 本文采用将 TEF 启动子与 ss 序列一同 PCR 的方法,

获得 TEF_{pr-ss} 片段以替代重组质粒上的 TEF 启动子序列。以 pRS424- TEF_{pr-ss} -3HA 为模板, 通过 PCR 的方法获得 TEF_{pr-ss} 序列, 分别在两端引入 *Sac* I 和 *Bam*H I 酶切位点。最终获得 pRS424- TEF_{pr-ss} -8*GLP-1-GFP 以及 pRS424- TEF_{pr-ss} -8*GLP-1-GFP 重组质粒, 构建好的质粒首先经过 *Sac* I 和 *Bam*H I 双酶切验证(图 7), 图 7 (a)在 2 号泳道有一条约 1 490 bp 的条带, 与序列 8*GLP-1-GFP 的长度一致。图 7 (b)亦在 500 bp(序列 TEF_{pr-ss})处检测到条带。在酶切验证后重组质粒由上海生工进行进一步的确认。



(a) M: marker; 1: pRS424- TEF_{pr} 酶切条带; 2: pRS424- TEF_{pr} -8*GLP-1-GFP 酶切条带。(b) M: marker; 1: TEF_{pr-ss} PCR 产物; 2: TEF_{pr-ss} 酶切条带

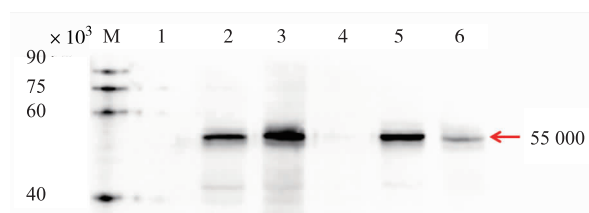
图 7 重组质粒酶切电泳

Fig. 7 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid

2.2 8*GLP-1-GFP 重组蛋白的表达

为检测目的蛋白是否成功表达, 我们将 pRS424- TEF_{pr} -8*GLP-1-GFP 和 pRS424- TEF_{pr-ss} -

8*GLP-1-GFP 重组质粒转化到酿酒酵母 AN120 野生型菌株, *dit1Δ* 缺陷型菌株内, 产孢获得相应重组酵母孢子并提取蛋白。利用 Western blot 检测目的蛋白条带, 从图 8 可看出, 在 55×10^3 (8*GLP-1-GFP) 左右有明显的条带。在野生型中, 相对于胞内表达的重组体系, 表达在孢子壁上的目的蛋白量明显较多, 可能是由于表达到孢子壁上的重组蛋白可防止被内部酶解。而在二酪氨酸缺陷型孢子中, 情况正好相反, 可能是由于其缺少最外层的二酪氨酸, 从而导致大量的重组蛋白分泌到胞外。



M: 低相对分子质量蛋白 marker; 1: AN120 孢子全蛋白质; 2: AN120 胞内表达 8*GLP-1-GFP 蛋白质; 3: AN120 胞壁表达 8*GLP-1-GFP 蛋白质; 4: *dit1Δ* 孢子全蛋白质; 5: *dit1Δ* 胞内表达 8*GLP-1-GFP 蛋白质; 6: *dit1Δ* 胞壁表达 8*GLP-1-GFP 蛋白质。

图 8 8*GLP-1-GFP 重组蛋白表达的 Western blot 验证
Fig. 8 Western blotting analysis of 8*GLP-1 expressed in yeast spore

2.3 8*GLP-1-GFP 重组蛋白的在酿酒酵母孢子的定位

我们进一步通过 GFP 的荧光定位来确定 GLP-1 在孢子中的位置。图 9 中 (b)、(e) 为胞内表达, 可以检测到明显的荧光, (c)、(f) 为孢子壁表达, 其荧光强度明显低于胞内表达, 且似乎有少量泄露到子囊壳内。荧光定位实验进一步证明了重组蛋白 8*GLP-1 被成功表达达到酿酒酵母孢子内。

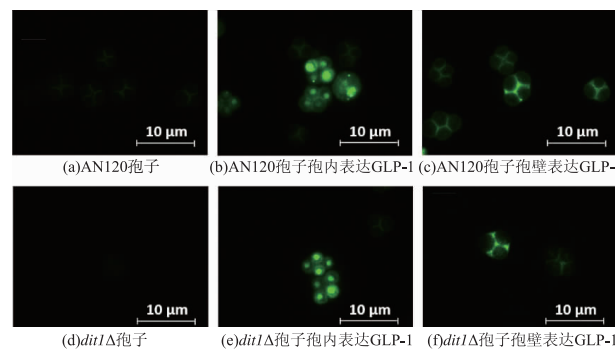
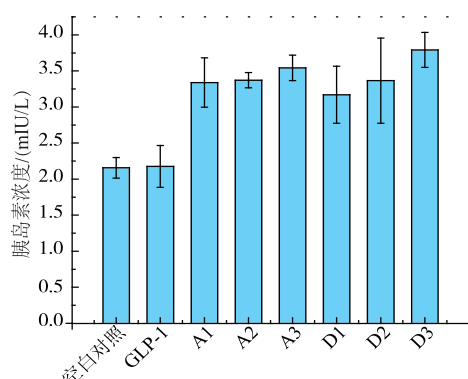


图 9 8*GLP-1-GFP 重组蛋白在孢子内的荧光定位

Fig. 9 Localization of 8*GLP-1-GFP in yeast spore

2.4 酿酒酵母孢子载药体系的体外活性检测

在确定目的蛋白成功表达后,我们进一步对酿酒酵母孢子 GLP-1 载药体系的体外活性进行检测。将经模拟肠胃液处理后的载 GLP-1 孢子与 MIN6



A1: AN120 孢子全蛋白质; A2: AN120 孢内表达 8*GLP-1-GFP 蛋白质; A3: AN120 孢壁表达 8*GLP-1-GFP 蛋白质; D1: *dit1Δ* 孢子全蛋白质; D2: *dit1Δ* 孢内表达 8*GLP-1-GFP 蛋白质; D3: *dit1Δ* 孢壁表达 8*GLP-1-GFP 蛋白质。

图 10 GLP-1 刺激 MIN6 细胞分泌胰岛素结果

Fig. 10 Insulin secretion stimulated by GLP-1

共培养,并用 ELISA 方法检测胰岛素浓度。如图 10 所示,与单纯的 GLP-1 相比,表达了 GLP-1 重组蛋白的孢子能够显著促进胰岛素的分泌,同时,孢子壁表达与胞内表达的效果差别不大。说明无论是表达到孢子壁还是表达到胞内,孢子都可以对所表达的 GLP-1 具有一定的保护作用,并提高其促胰岛素活性。

3 结 语

糖尿病作为影响现代人生命健康的一大疾病,至今仍无有效的解决方法。GLP-1 及其类似物已成为研究治疗二型糖尿病的热点。本文首先对 GLP-1 进行基因改造及串联表达,然后选择酿酒酵母孢子作为表达和运输载体构建 GLP-1 口服给药体系。本文构建了重组 GLP-1 质粒并成功在酿酒酵母孢子内表达,形成表达 8 串联 GLP-1 的酿酒酵母孢子载药体系。该体系在经过模拟肠胃液处理后能有效刺激 MIN6 细胞分泌胰岛素,证明了所构建的 GLP-1 给药体系的有效性。综上,本研究为进一步开发治疗糖尿病的口服药物提供了新的思路。

参考文献:

- [1] WILD S, ROGLIC G, GREEN A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030[J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(5): 1047-53.
- [2] REKHA M R, SHARMA C P. Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes-future perspectives[J]. *Int J Pharm*, 2013, 440(1): 48-62.
- [3] PUTNAM W, LAWSON B, BUHARIWALLA F, et al. Hypertension and type 2 diabetes: what family physicians can do to improve control of blood pressure--an observational study[J]. *BMC Family Practice*, 2011, 12(1): 564-.
- [4] HOU J, YAN R, YANG L, et al. High-level expression of fusion protein containing 10 tandem repeated GLP-1 analogs in yeast *Pichia pastoris* and its biological activity in a diabetic rat model[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(6): 1462-1469.
- [5] AHR N B. GLP-1 for type 2 diabetes[J]. *Experimental Cell Research*, 2011, 317(9): 1239-1245.
- [6] BOND A. Exenatide (Byetta) as a novel treatment option for type 2 diabetes mellitus[J]. *Proceedings*, 2006, 19: 281-284.
- [7] AGERS H, JENSEN L B, ELBR ND B, et al. The pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of NN2211, a new long-acting GLP-1 derivative, in healthy men[J]. *Diabetologia*, 2002, 45(2): 195-202.
- [8] BAGGIO L L, HUANG Q, BROWN T J, et al. A recombinant human glucagon-like peptide (GLP)-1-albumin protein (albugon) mimics peptidergic activation of GLP-1 receptor-dependent pathways coupled with satiety, gastrointestinal motility, and glucose homeostasis[J]. *Diabetes*, 2004, 53(9): 2492-2450.
- [9] SOLTANI N, KUMAR M, GLINKA Y, et al. In vivo expression of GLP-1/IgG-Fc fusion protein enhances beta-cell mass and protects against streptozotocin-induced diabetes[J]. *Gene Therapy*, 2007, 14(12): 981-988.
- [10] VON SCHOLTEN B J, HANSEN T W, GOETZE J P, et al. Glucagon-like peptide 1 receptor agonist (GLP-1 RA): long-term effect on kidney function in patients with type 2 diabetes[J]. *J Diabetes Complications*, 2015, 29(5): 670-674.
- [11] SHRESTHA N, SHAHBAZI M A, ARA JO F, et al. Multistage pH-responsive mucoadhesive nanocarriers prepared by aerosol flow reactor technology: A controlled dual protein-drug delivery system[J]. *Biomaterials*, 2015, 68: 9-20.
- [12] HAN Baoxian, GAO Xiaodong, NAKANISHI Hideki. Expression of a human mitochondrial N-acetylglucosamine Transferase in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2016, 35(9): 987-992. (in Chinese)