中 国 科 学
1987 年 12 月　　B 辑　　第 12 期

胰岛素及其类似物诱导的介体促脂肪合成和性质*

魏铁拳　　张世荣
（中国科学院动物研究所，北京）

摘　　要

本文以胰岛素、[D-Ala]^{B_0} 胰岛素和去 B_1 去五肽胰岛素（均为 11.2ng/ml）分别与猪肝膜保温，分离所得的介体组份 1（分子量约为 3700D）对大鼠脂肪细胞脂肪合成的促进作用与胰岛素及其上述类似物的直接作用相比较．结果表明，诱导的介体组份 1 对脂合成的促进作用依次为：胰岛素介体＞[D-Ala]^{B_0} 胰岛素介体＞去 B_1 去五肽胰岛素介体．这与胰岛素及上述类似物的直接作用吻合．实验还研究了该介体在酸性和中性条件下的性质，并发现该介体对链霉蛋白酶和神经氨酸苷酶敏感，提示该介体可能为一糖肽．

胰岛素介体是胰岛素与其靶细胞质膜保温后由质膜释放出的一种或数种热、酸活性稳定的低分子量肽类物质．在无细胞系统中，加入胰岛素介体可影响许多胰岛素敏感酶包括丙酮酸脱氢酶[1]、糖原合成酶磷酸酶、依赖 cAMP 的蛋白激酶[2]、低 Km 磷酸二酯酶[3]、[Ca^{2+}, Mg^{2+}] ATP 酶[4]、腺苷酸环化酶[5,11]及乙酰辅酶 A 羧化酶[6]的活性并抑制葡萄糖-6-磷酸酶的活性[7]．在完整细胞系统中，加入胰岛素介体可降低由脂解激素如胰高血糖素、儿茶酚胺类激素或激动剂如 Gpp(NH)p，NaF 等所刺激升高的 cAMP 水平，促进脂肪合成和抗脂解[8]，并对培养肝细胞胰岛素受体有下降调节作用[9]．最近我们使用 10mmol/L 的磷酸钾缓冲液（pH7.4）作为保温及层析洗脱液分离得到一分子量为 3700D 左右的肽类分子（胰岛素介体组份 1）．在完整脂肪细胞中，它能促进脂肪合成及抑制 cAMP 的形成[10]，在无细胞系统中，该介体能促进腺苷酸环化酶的活性[11]．

本实验主要检验了不同活力的胰岛素和胰岛素类似物即 [D-Ala]^{B_0} 猪胰岛素和去 B_1 去五肽猪胰岛素等诱导介体的产量和活性的关系．同时比较了我们用 10mmol/L，pH7.4 磷酸钾缓冲液为洗脱液制备得到的介体组份 1（分子量 3700D 左右）与其它实验室用 50mmol/L 甲酸为层析介质所分离的分子量为 1000—2000D[1,2,17] 的胰岛素介体的异同，并用链霉蛋白酶和神经氨酸苷酶对介体组份 1 的化学性质进行初步探讨．

本文于 1986 年 5 月 7 日收到，1986 年 10月17日收到修改稿．
* 国家自然科学基金资助项目．

一、材料和方法

1. 材料

D-[3-^{3}H] 葡萄糖，5.0Ci/mmol/L，由 Amersham 公司购得. 胶原酶、牛血清白蛋白(组份 5)、胰高血糖素、单组份猪胰岛素分别购自 Worthington, Sigma, Novo 和中国科学院上海生化试剂厂. [D-Ala]^{B_0} 猪胰岛素和去 B_1 去五肽猪胰岛素由梁栋材教授惠赠. LHRH 类似物由中国科学院上海生化研究所合成. 神经氨酸[糖]苷酶和链霉蛋白酶分别从 BDH 和 Sigma 购买.

2. 方法

(1) 胰岛素化学介体的产生

猪肝粗膜制备按 Saltile[12] 等方法制备肝在 1mmol/L $NaHCO_3$ (pH7.5) 中匀浆、过滤、离心 (20000 × g, 4℃, 30min). 所得的沉淀悬浮于同上介质，再离心 (1500 × g, 4℃, 10min). 上清液再离心 (20000 × g, 4℃, 30min). 所得沉淀悬浮于 10mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.4). 2mg/ml 蛋白含量的上述制备的肝膜，在无胰岛素或有不同浓度的胰岛素 (3.73ng/ml, 11.2ng/ml 等) 和 [D-Ala]^{B_0} 胰岛素及去 B_1 去五肽胰岛素 (均为 11.2ng/ml) 的条件下，37℃ 温育 10min. 温育后离心 (22000 × g, 4℃, 25min). 上清液在 Sephadex G-25 柱 (1 × 35cm), 4℃ 下层析. 用 10mmol/L, pH 7.4 磷酸钾缓冲液洗脱. 在用酸性体系时，将离心后上清液冻干，加入 50mmol/L 甲酸再溶回原体积或适当浓缩，后以 50mmol/L 甲酸为介质层析. 收集各洗脱组份，测定 230nm 处的光密度值，同时测定它们对脂肪细胞脂肪合成的影响. 膜蛋白含量用 Lowry 法[13]测定.

(2) 脂肪合成的测定

游离脂肪细胞的制备 150g—180g 体重的 Sprague Dowley 雄性大鼠，断头杀死，迅速取下附睾脂肪垫及肾背部脂肪. 脂肪细胞按 Rodbell 方法[14]略加改良制备.

脂肪合成按本实验室以前报道[15]方法测定.

二、结 果

1. 胰岛素、[D-Ala]^{B_0} 胰岛素和去 B_1 去五肽胰岛素及其诱导的介体组份 1 对脂合成的作用.

将各种不同浓度的胰岛素、[D-Ala]^{B_0} 胰岛素和去 B_1 去五肽胰岛素直接加入脂肪细胞保温系统中的结果表明，[3-^{3}H] 葡萄糖转化为脂肪的活力顺序为胰岛素 >[D-Ala]^{B_0} 胰岛素>去 B_1 去五肽胰岛素. 且三者均呈现剂量反应关系 (图 1). 图 1 中所示不同浓度的 [D-Ala]^{B_0} 胰岛素和去 B_1 去五肽胰岛素的促脂肪合成活力分别平均为胰岛素促脂肪合成活力的 68.4±4.3% 和 28.7±1.8%.

在肝膜中分别加入或不加 11.2ng/ml 的胰岛素，[D-Ala]^{B_0} 胰岛素和去 B_1 去五肽胰岛素 37℃ 温育 10min.离心得到的上清液以 10mmol/L 磷酸钾缓冲液经 Sephadex G-25(1 × 35cm) 柱层析分离，得到的各介体组份 1 分别加入脂肪合成测定系统中，测定结果表明 (见图 2)，介体组份 1 对脂肪合成的促进作用为胰岛素介体 >[D-Ala]^{B_0} 胰岛素介体 > 去 B_1 去五肽胰岛素介体. 且三者亦均呈现剂量反应关系. 图 2 中各不同加入量的 [D-Ala]^{B_0} 胰岛素和去

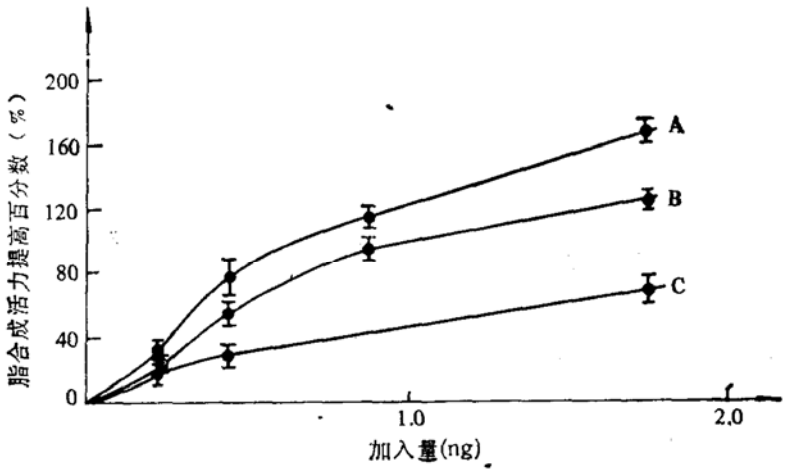

图 1　不同浓度的胰岛素、[D-Ala]^{B_0} 胰岛素和去 B_1 去五肽胰岛素的促脂合成剂量反应曲线

(在脂肪合成测定系统中，分离的脂肪细胞（10^4）悬浮在含有 5% 的牛血清白蛋白和 0.5μCi/ml[3-^{3}H]葡萄糖的 Krebs-Ringer Hepes 缓冲液中，然后分别加入图中所示浓度的胰岛素（A），[D-Ala]^{B_0} 胰岛素(B)和去 B_1 去五肽胰岛素(C). 在 37℃ 下保温 2h，加入闪烁液测定，每个点为三次测定平均值 ±S.D.)

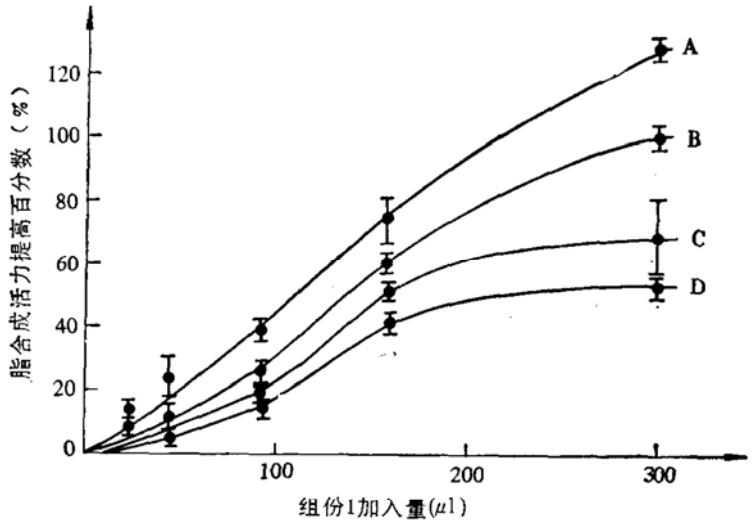

图 2　胰岛素、[D-Ala]^{B_0} 胰岛素、去 B_1 去五肽胰岛素诱导的介体组份 1 促脂肪合成剂量反应曲线

(猪肝膜(2mg/ml 蛋白含量)悬浮在 10mmol/l. pH7.4 的磷酸钾缓冲液中，分别与 11.2ng/ml 的胰岛素（A). [D-Ala]^{B_0} 胰岛素(B)，去 B_1 去五肽胰岛素(C)及不加胰岛素及类似物做对照(D).37℃，保温10min. 离心后上清冻干后用 10mmol/L pH7.4 磷酸钾溶回原来体积的 1/3，后用 Sephadex G-25 (1×35cm) 柱以 10mmol/L pH7.4 磷酸钾缓冲液为层析介质分离得到组份 1，在脂肪测定系统中加入如图所示量的各组份 1. 测定步骤如图 1 所述. 每个点为两次测定的平均值 ±S.D.)

B_1 去五肽胰岛素所诱导的介体组份的活力平均为胰岛素介体组份 1 促脂合成活力的 63.5 ± 0.6% 和 26.0±2.8%. 这与直接将胰岛素及上述两种类似物加入脂肪合成测定系统中所得结果相似. 这表明胰岛素及 [D-Ala]^{B_0} 胰岛素和去 B_1 去五肽胰岛素与肝膜上胰岛素受体结合释放出的介体组份 1 能模拟胰岛素和上述两种类似物的生理功能. 因而为胰岛素介体组份 1

是胰岛素与其靶细胞质膜作用后所产生的信使物质提供了证据.

2. 用中性磷酸钾洗脱层析和甲酸洗脱层析部分纯化胰岛素介体的比较.

在使用 10mmol/L、pH7.4 磷酸钾缓冲液为层析介质以 Sephadex G-25(1 × 35cm) 柱对与胰岛素温育得到的肝膜上清液进行部分纯化过程中，本实验室得到了一分子量为 3700D 左右的介体组份 1. 这与以前很多实验室报道[1,2,17]的胰岛素介体分子量（为 1000—2000D）不同. 因此，我们将与胰岛素（100μU/ml）保温的肝膜上清液冻干后，用 50mmol/L 甲酸溶解，以 50mmol/L 甲酸洗脱层析，在同一 Sephedex G-25 柱分离介体. 发现在 230nm 波长的紫外吸收峰值由原来的 25—26ml 组份迁移到 28ml 处(图 3). 将分离得到的各组份分别测定，脂肪

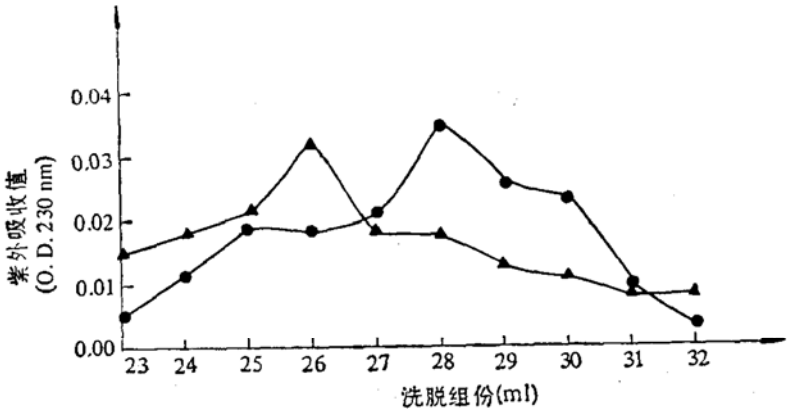

图 3 比较胰岛素处理的猪肝膜上清液经甲酸和磷酸钾缓冲液层析图谱

(猪肝颗粒性组份(即粗膜 2mg/ml 蛋白含量)与 100μU/ml 胰岛素 37℃ 保温 10min. 离心后上清冻干，用 10mmol/L pH7.4 磷酸钾缓冲液(▲—▲)或 50mmol/L 甲酸(●—●)溶至原体积的 1/3，后分别以 10mmol/L pH7.4 磷酸钾或 50mmol/L 甲酸为介质经 Sephadex G-25(1×35cm) 层析. 磷酸钾层析组份直接测230nm紫外吸收值. 50mmol/L甲酸层析组份冻干后，用 pH7.4，10mmol/L 磷酸钾溶回原来体积，测 230nm 紫外吸收值)

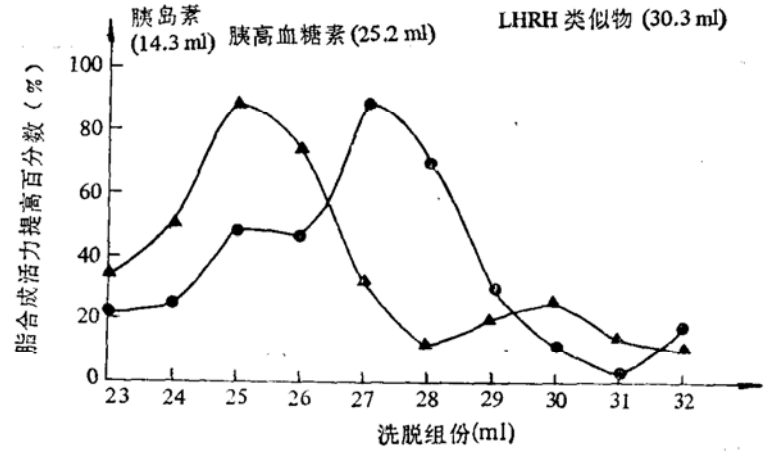

图 4 比较用甲酸和磷酸钾缓冲液层析组分的脂肪合成活力分布图

(各组份分离同图 3 所述. ▲—▲代表 pH7.4，10mmol/L 磷酸钾层析组份. ●—●代表 50mmol/L 甲酸层析组份.. 在大鼠脂肪细胞脂肪合成测定系统中，加入各组份 300μl，测定步骤按图 1 所述，胰高血糖素 Mr = 3500D. LHRH 类似物 Mr = 1006D. 胰岛素=6000D)

合成的活力分布部位也出现由 25—26ml 迁移到 27—28ml 组份的位置（图 4）. 活力峰值转移到 27—28ml 这一组份的分子量为 2000D 左右. 从图中可以看到无论是使用 10mmol/L pH7.4 的磷酸钾缓冲液还是使用 50mmol/L 甲酸为层析洗脱液，所得到的介体组份在 230nm 处紫外吸收峰值和促脂肪合成活力峰值几乎是相等的，仅仅是峰的位置发生了迁移，其含量和活性均无变化.

3. 胰岛素及其类似物诱导的介体组份 1 促脂肪合成活力与 230nm 紫外吸收的关系及化学性质.

进一步我们研究了各不同浓度的胰岛素及其类似物诱导介体组份 1 在 230nm 波长紫外吸收值与其促脂肪合成活力的关系. 结果，两者呈现了大小相一致的现象（图 5）. 将胰岛素（3.73ng/ml，11.2ng/ml），[D-Ala]^{B_0} 胰岛素（11.2ng/ml）和去 B_1 去五肽胰岛素（11.2ng/ml）与猪肝膜温育的上清液层析分离，得到的活力峰值（介体组份 1 和对照相应组份）与它们在

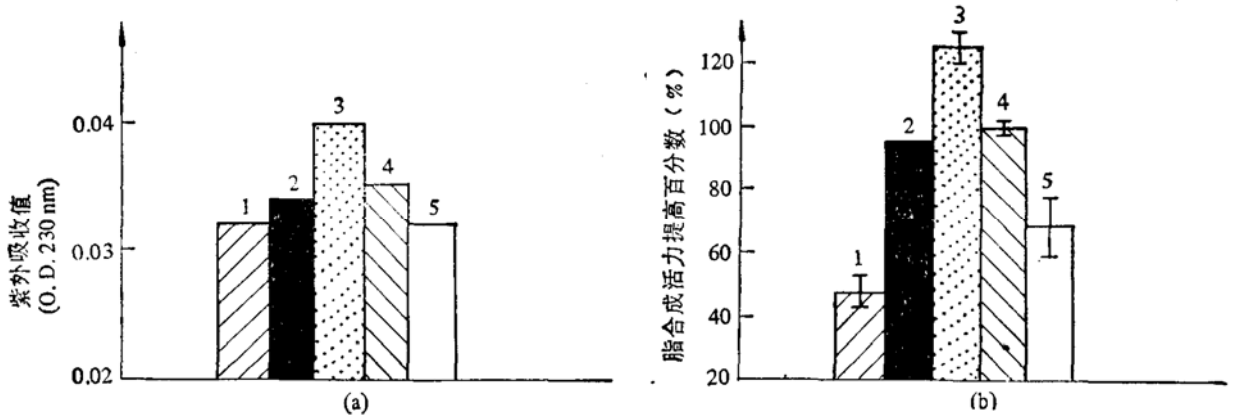

图 5　胰岛素、[D-Ala]^{B_0} 胰岛素及去 B_1 去五肽胰岛素诱导的介体组份 1 和对照相应组份的 230nm 吸收值与促脂合成活力的比较

（在肝膜保温系统中，分别加入 3.73ng/ml，11.2ng/ml 胰岛素和 11.2ng/ml 的去 B_1 去五肽胰岛素及 11.2ng/ml 的 [D-Ala]^{B_0} 胰岛素，用不加胰岛素及类似物的肝膜保温做对照. 介体组份-1 制备同图 2 所述. (a) 图为各介体组份 1 的 230nm 吸收值. 图(b)为图(a)各组份-1 的促脂肪合成活力提高百分数的二次双管测定结果的平均值 ±S.D.. 脂合成测定按图 1 所述.
1——无胰岛素及类似物，　2——3.73ng/ml 胰岛素，
3——11.2ng/ml 胰岛素，　4——11.2ng/ml [D-Ala]^{B_0} 胰岛素，
5——11.2ng/ml 去 B_1 去五肽胰岛素）

230nm 的光密度值相对应. 计算得到两者的相关系数 $r = 0.74 (n = 14, p < 0.01)$，呈正相关现象. 结果表明，组份 1 的活性与其含量呈线性关系. 含量越多，促脂肪合成活性越高. 本实验使用 300μU/ml 胰岛素能诱导出促脂合成活性最高的介体组份 1，而其在 230nm 的光密度值也最大.

使用链霉蛋白酶（pronase, 158μg/ml）和神经氨酸苷酶（Neuraminidase 500mU/ml）分别与有（300μU/ml）或无胰岛素存在下保温后分离的猪肝膜上清液，在 37℃ 下温育 20min，酶处理后的上清液立即在 Sephadex G-25 柱（1 × 35cm）分离组份 1. 结果发现介体组份 1 对神经氨酸苷酶和链霉蛋白酶敏感，和未经上述两种酶处理的介体组份 1 相比，它们的促脂合成活力下降. 与对照组未经酶处理的相应组分比较，经链霉蛋白酶处理的比未经处理的介体组份 1 促脂合成活力下降了 49.1 ± 6.3%，而神经氨酸苷酶处理的介体组份 1 的脂肪合成活性则

表 1 用神经氨[糖]酸苷酶和链霉蛋白酶消化处理后的介体组份 1 对脂肪合成的影响*

处 理	fmoles D-[3-^{3}H] 葡萄糖转化成脂肪/mg 脂肪/2h		Δ 变化 %
	对照组相应组份	胰岛素介体组份 1	
—	25.8±1.40	31.5±0.65	6.1±1.5 23.7±5.9
链霉蛋白酶 (158μg/ml)	23.0±0.74	28.7±0.53	4.3±1.0 18.8±4.3
神经氨酸苷酶 (500mU/ml)	21.5±2.56	23.8±2.81	2.2±3.2 10.4±14.9
P 值			
未处理与链霉蛋白酶处理	NS	<0.01	
未处理与神经氨酸苷酶处理	NS	<0.05	
胰岛素介体组份 1 与对照相应组份(未经酶处理)		<0.01	

* 肝细胞膜 (2mg/ml 蛋白)分别与胰岛素 (300μU/ml) 或单独在 37℃ 温育 10min，分离的上清液分别与神经氨酸苷酶 (500mU/ml) 和链霉蛋白酶 (158μg/ml) 37℃ 消化 20min，用无酶或经煮沸失活的酶的上清液作为对照，经 Sephadex G-25 柱 (1×35cm)分离介体组份 1. 脂肪合成测定见图 1 所述. 数值为 6 次实验的平均值 ±S.E.. NS 为无差异

降至对照组相应组分的水平 (表 1).

三、讨 论

很多实验室已经证实胰岛素与其靶细胞膜保温后，从膜上释放出小分子物质. 此物质在无细胞系统中影响一系列胰岛素敏感的酶，如骨胳肌中糖原合成酶[2]，脂肪细胞和肝细胞中的丙酮酸脱氢酶[1,16,6]、乙酰辅酶 A 羧化酶以及肝中低 *Km* 磷酸二酯酶[3]. 在完整脂肪细胞中和初级培养的肝细胞中，介体均能模拟胰岛素的生物学活性，如促进脂肪合成、抗脂解；使脂解激素或激动剂升高的细胞内 cAMP 水平下降以及对胰岛素受体的下降调节[8,9].

最近，胰岛素介体组份 1 (分子量 3700D 左右) 的促大白鼠脂肪细胞脂肪合成，抑制大白鼠脂肪细胞内被脂解激素或激动剂升高的 cAMP 含量，以及调节猪肝细胞膜的腺苷酸环化酶活性的功能已作了报道[11,10]. 本项研究使用了具有不同生物活力的猪胰岛素及其类似物，即 B 链 N 端加上一 D-丙氨酸残基的猪胰岛素([D-Ala]^{B_0} 胰岛素)和 B 链 N 端去掉第一个氨基酸残基，羧端去五肽的胰岛素(去 B_1 去五肽猪胰岛素)分别与肝膜温育. 所得结果表明，上述三者诱导的介体组份 1 的促脂肪合成活力顺序和三者直接作用于脂肪细胞的活力顺序是一致的. 同时也和各介体组份 1 在 230nm 紫外吸收值的大小顺序呈现一致. 即胰岛素介体 > [D-Ala]^{B_0} 胰岛素介体 > 去 B_1 去五肽胰岛素介体. 这说明在一定的胰岛素及类似物浓度下 (本实验为 11.2ng/ml)，介体组份 1 产生的量反映了激素生物活力的大小. 随着介体量的增加，介体在完整细胞中模拟胰岛素生理功能的活性也增加. 这意味着介体组份 1 能做为一种媒介来传递胰岛素在膜上与其受体结合后所释放出的化学信号. 综合上述结果和文献[11]报道中关于介体组份 1 对正常和糖尿病鼠肝膜腺苷酸环化酶的调节作用. 说明介体组份 1 可能通过质膜上腺苷酸环化酶 GTP 的调节蛋白来调节细胞的代谢过程，提示介体组份 1 很可能是胰岛素的"第二信使"物质.

很多实验室报道[1,2,17]，胰岛素与其靶细胞膜保温上清液用 50mmol/L 甲酸经 SephadexG-25

柱层析分离，得到一分子量为 1000—2000D 的介体．在无细胞系统中，该介体能调节胰岛素敏感酶的活性．本实验中，我们将中性磷酸钾缓冲液层析分离改为 50mmol/L 甲酸层析分离时，原来在中性条件下出现的介体组份 1（分子量为 3700dalton 左右）的活性和 230nm 紫外吸收峰均转移消失，而迁移到分子量为 2000D 左右的组份，迁移后的组份在 230nm 紫外吸收及促脂肪合成活性峰值几乎与原来中性层析分离得到的峰值相等．提示原组份 1 在酸性条件下可能产生解聚或分子上的糖苷键断裂，而变为更小的分子，但其活性并没有破坏．因此，本文所报道的介体组份 1 是否与文献报道的胰岛素化学介体为相同的一种物质，仍有待进一步研究确定．然而我们所用的偏中性条件所分离得到的分子量为 3700D 的胰岛素化学介体比较接近自然状态．初步实验还证明，介体组份 1 对链霉蛋白酶和神经氨酸苷酶敏感，与以前报道的胰岛素介体对胰酶[8]和神经氨酸苷酶[15]敏感，以及对神经氨酸苷酶的敏感能被 β-半乳糖苷等底物竞争性抑制等结果是一致的．因此胰岛素介体可能是一糖肽类物质．

作者对张致一、梁栋材教授对本工作的支持并惠赠胰岛素类似物，对姚文贞、朴锦华、乐云和王敬泽等同志的技术协助，在此表示感谢．

参　考　文　献

[1] Jarett, L. & Seals. J. R., *Science*, **206**(1979), 1407— 1408.
[2] Larner, J. et al., *ibid*., **206**(1979), 1408—1410.
[3] Kiechle, F. L. and Jarett, L., *FEBS. Lett*., **133**(1981), 279—282.
[4] McDonald, J. M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun*., **100**(1981), 857—864.
[5] Saltiel, A. R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*., **79**(1982), 3513—3517.
[6] Saltiel, A. R. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun*., **110**(1983), 789—795.
[17] Suzuki, S. et al., *ibid*., **118**(1984), 40—46.
[8] Zhang Shi-rong et al., *J. Biol. Chem*., **258**(1983), 6474—6476.
[9] Caro, J. F. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun*., **115**(1983), 375—382.
[10] 张世荣等，中国科学 B 辑，1987，3：265—272.
[11] Zhang Shi-rong, et al., ibid., (in press).
[12] Saltiel, A. R. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun*., **102**(1981), 1041—1047.
[13] Lowry, O. H. et al., *J. Biol. Chem*., **193**(1951), 265—275.
[14] Rodbell, M., *ibid*., **239**(1984), 375—380.
[15] 张世荣等，生物化学与生物物理学报，**19**(1987)，2：79—86.
[16] Seals, J. R. & Czech, M. P., *J. Biol. Chem*., **255**(1980), 6529—6531.
[17] Suzuki, S. et al., *Arch. Biochem. Biophys*., **235**(1984), 418—426.