

· 述评 ·

胰岛素发现 100 周年:致敬胰岛素发现艰难历程中前仆后继的拓荒者(二)

郑少雄¹ 陈雨¹ 朱铁虹² 常宝成³¹天津医科大学第二医院 300211; ²天津医科大学总医院内分泌代谢科 300050; ³天津医科大学朱宪彝纪念医院、天津市内分泌研究所、国家卫生健康委激素与发育重点实验室、天津市代谢性疾病重点实验室 300134

通信作者:郑少雄, Email:Zheng. sx888@163. com

The 100th anniversary of insulin discovery: pay homage to all the pioneers working hard in the long journey of insulin discovery (2) Zheng Shaoxiong¹, Chen Yu¹, Zhu Tiehong², Chang Baocheng³. ¹The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; ²Department of Endocrinology and Metabolism, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300050, China; ³NHC Key Laboratory of Hormones and Development, Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Chu Hsien-I Memorial Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300134, China

Corresponding author: Zheng Shaoxiong, Email:Zheng. sx888@163. com

DOI:10. 3760/cma. j. cn121383-20210802-08003

1921 年,弗雷德里克·格兰特·班廷(Frederick Grant Banting)和约翰·理查德·麦克劳德(John Rickard Macleod)发现了胰岛素,并将胰岛素成功用于人类糖尿病的治疗,开启了糖尿病药物治疗的先河。从 1921 年发现胰岛素至今,已有 100 年的历史了。1923 年诺贝尔生理医学奖获奖扣动了班廷和麦克劳德胰岛素发现之争的扳机,学界、政界纷纷站队表态,当时,班廷和查尔斯·贝斯特(Charles Herbert Best)占领了上风,詹姆斯·科力普(James Bertram Collip)和麦克劳德选择了离开,因为胰岛素发现所获得的专利、名誉基本归功于班廷和贝斯特。在加拿大的多伦多大学,已经几乎看不到麦克劳德的名字了。但是 1993 年 Bliss 发表了长达 21 页的文章《重写胰岛素的发现史》,实事求是地列举了当时大量的试验记录,科力普和麦克劳德功不可没^[1]。后来又有不少文章支持 Bliss 的论点。2010 年,Cooper 和 Ainsberg 的长篇巨著《Breakthrough, Elizabeth Huges, the Discovery of Insulin, and the Making of a Medical Miracle》出版。2011 年,谢琨将其翻译成中文出版,书名为《突破:胰岛素发现创造的医学奇迹》,时任中华医学会糖尿病分会主任委员的纪立农教授为该书中文译本作序。正如前言所说,这

并不完全是一本小说,而是作者历时 5 年,走遍各医学中心、图书馆、档案馆,走访 4 个国家,8 个州,25 个城镇所获得的资料,依据大量的历史资料和档案书写而成,他们讲的都是真实的故事,事件的经过都来自于当事人的回忆^[2]。

这 100 年中,从动物胰岛素到人胰岛素和人胰岛素类似物,可以说发生了翻天覆地的变化。胰岛素的种类越来越多,短效、中效、长效、超长效和预混等不同剂型胰岛素相继应用于临床,从基础胰岛素一次给药,到多次皮下注射和连续皮下注射,到吸入胰岛素和口服胰岛素,数不胜数。

胰岛素给药途径不断更新,从 20 世纪 60 年代大如背筐的胰岛素给予系统到现代的小如手机的全自动双激素人工胰,可以说有天壤之别。

近 40 年来,胰岛素的结构千变万化,从人胰岛素的产生,到不同种类的人胰岛素类似物,胰岛素的类型已达数十种之多,但变化的最终目的还是趋向糖尿病的精准治疗。回顾胰岛素的百年发展史,大致可以粗略分为以下 3 个阶段,动物胰岛素(1921—1981 年)、人胰岛素(1982—1999 年)和人胰岛素类似物(2000—2021 年)3 个阶段,分别代表了三代胰岛素的变迁,胰岛素百年发展详见图 1。

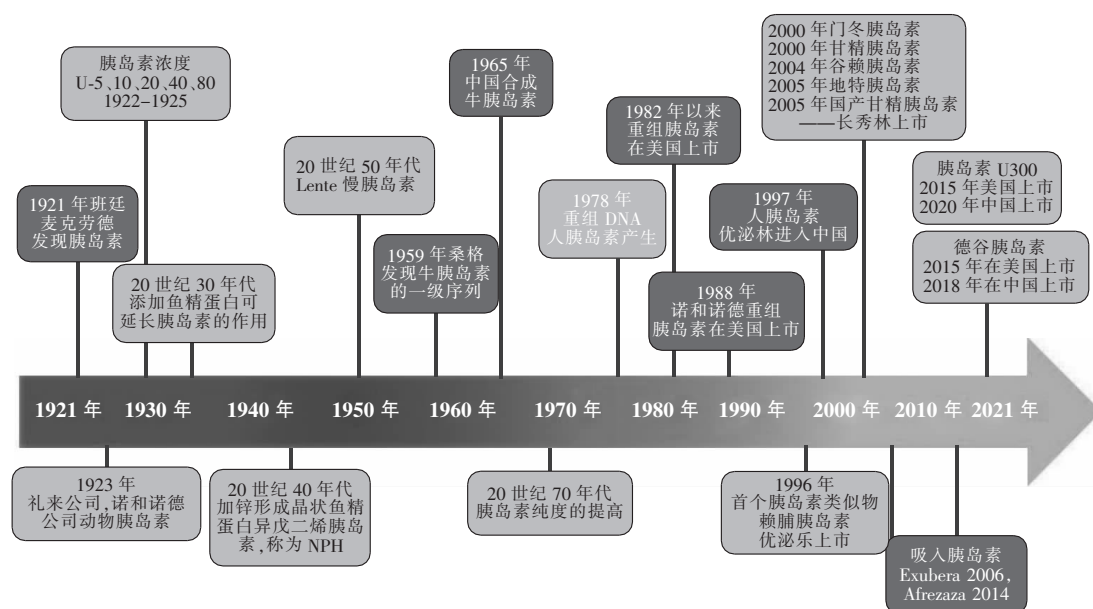


图 1 胰岛素的百年发展史:动物胰岛素-人胰岛素-人胰岛素类似物的更新换代

1 动物胰岛素时代的 60 年(1921—1981 年)

从 1921 年胰岛素发现,1923 年胰岛素正式商品供应,到 20 世纪 70 年代末 80 年代初的 60 年间,胰岛素的来源仅仅是从动物,如猪或牛的胰腺中提取。初始提取的动物胰岛素作用时间短,需要多次注射,纯度低,局部反应大。动物胰岛素与人体内源性胰岛素结构不一致,免疫原性较高,注射后可出现皮肤过敏,易诱发胰岛素抗体出现。1946 年,中性的鱼精蛋白(NPH)胰岛素(一种将鱼精蛋白和胰岛素在中性条件下等比例混合的胰岛素)开始临床应用,这种胰岛素作用时间远超动物提取胰岛素的作用时间,超过 12 h,为中效胰岛素,克服了常规胰岛素作用时间短的弊端,可以每天 2 次皮下给药。将动物胰腺中提取的胰岛素反复经过凝胶过滤/层析、沉淀、结晶等一系列纯化而得到的 C 峰胰岛素,称为“单峰胰岛素”,纯度约为 98%。单峰纯精蛋白锌猪胰岛素注射液系单峰猪胰岛素、鱼精蛋白及锌复合结晶而形成的混悬液,为长效胰岛素制剂(PZI),单峰纯精蛋白锌猪胰岛素注射液起效缓慢,持续时间长。单组分胰岛素:将单峰胰岛素再经离子交换树脂处理而取得更纯的胰岛素为单组分胰岛素,纯度在 99% 以上。动物胰岛素包括短效常规胰岛素、中效胰岛素和长效胰岛素,统称为第一代胰岛素。

从动物中提取纯化的胰岛素,对于当年无药可治的糖尿病患者,可以说是拯救了无数糖尿病患者的生命,创造了无数的奇迹,具有划时代的意义。第

一个接受动物提取胰岛素的患者,莱昂纳多·汤普森,注射麦克劳德原液之后,生存了 13 年,于 27 岁去世。班廷曾经治疗过的前美国国务卿的女儿,伊丽莎白·休斯,生了 3 个健康的孩子,连续注射胰岛素 58 年,接受了 42 000 余次胰岛素注射,1981 年死于心力衰竭。胰岛素治疗,也成就了诸多患有糖尿病的医学专家。2004 年美国糖尿病协会年会最重要的科学奖——班廷奖的获得者 Michael A. Brownlee 是一位 1 型糖尿病患者,终身使用胰岛素治疗,他在糖尿病的并发症发生的 4 个途径:己糖胺途径(hexosamine pathway)、多元醇途径(polyol pathway)、蛋白激酶 C 途径(PKC pathway)、晚期糖基化终末产物(AGE)途径(AGE precursors)的研究中做出了卓越的贡献^[4]。2016 年第 76 届美国糖尿病协会年会班廷奖的获得者 Barbara B. Kahn,在她的获奖感言中说:自幼患 1 型糖尿病,被医生告知需要终身注射胰岛素,她注射了 48 年的胰岛素,身体依然健康。Kahn 在 2 型糖尿病与肥胖的病因及其分子机制领域做出了杰出的贡献,她和她的研究团队发现了导致胰岛素抵抗的脂肪细胞分泌的视黄醇结合蛋白-4(RBP-4)及其作用机制,她是 45 岁以前获得美国糖尿病协会杰出科学成就奖的两女性之一^[5]。2016 年杰出糖尿病教育奖的获得者 Sheri R. Colberg-Ochs,4 岁患 1 型糖尿病,初始被害怕打针的母亲拒绝胰岛素注射,到 6 岁开始胰岛素治疗,胰岛素治疗 18 年,未曾有血糖监测。她一生致力于糖

尿病教育,出版专著 12 部,发表 400 多篇学术论文,在糖尿病和运动管理方面做出了杰出的贡献^[6]。

动物胰岛素的发现对人类应对糖尿病做出了不可磨灭的贡献。动物胰岛素治疗给 1 型糖尿病患者带来了生存的希望,数以万计的 1 型糖尿病患者依靠胰岛素治疗得以健康的生存。美国 Joslin 糖尿病中心为 1 型糖尿病患者设立了 50 年金奖,并将他们命名为“奖牌获得者”(Medalist),Joslin 糖尿病中心的 Yu 等收集 1 018 名 Joslin 奖牌获得者,他们被诊断为 1 型糖尿病后使用胰岛素治疗,至少存活了 50 年^[7]。但是在 20 世纪 60 年代以前的糖尿病患者(1939—1959 年),只有 38% 的女性和 34% 的男性能生存到 55 岁,充分说明不断改进的胰岛素纯度对于糖尿病患者生存的影响和重要性。

胰岛素治疗虽然挽救了无数糖尿病患者的生命,但是在美国食品与药品监督管理局(FDA)所列药物不良反应中,胰岛素却是不良反应最多的药物之一。胰岛素最为常见的不良反应是低血糖和体重增加,其次还有过敏反应等。胰岛素所致的低血糖大多与剂量调整不及时和胰岛素过量有关。但是胰岛素的不良反应也催生了药物研究者改变胰岛素的设想。

2 胰岛素结构的发现和胰岛素的合成

2.1 胰岛素结构的发现者——弗雷德里克·桑格(Frederick Sanger, 1918. 8. 13—2013. 11. 19),英国生物化学家。1955 年桑格发现蛋白质具有独特的分子结构,他成功地完成牛胰岛素 A、B 链一级结构的测定,并因此而获得 1958 年诺贝尔化学奖。1980 年,他因为开发了 DNA 测序技术,第二次获得诺贝尔化学奖。桑格发现了胰岛素的一级结构,为人胰岛素的生物合成和人胰岛素类似物的问世奠定了坚实的基础,开辟了广阔的道路。换句话说,没有胰岛素结构的发现,就不会有人胰岛素和人胰岛素类似物的诞生。医学界,特别是内分泌和糖尿病领域的精英,从国际糖尿病联盟(IDF),到美国糖尿病协会,到欧洲糖尿病研究会(EASD),对班廷奉若神明,美国糖尿病协会最重要的科学奖项为班廷奖,每年的年会,班廷不绝于口,而对默默耕耘数十年,低调至极的两次诺贝尔化学奖的得主,弗雷德里克·桑格,却少有提及,不能说不是一种悲哀。在此,我们回顾桑格的人生经历和研究成果,重新认识这位

卓越的科学家——胰岛素结构的发现者!

2.2 学不出众,性格温和,志向坚毅 桑格于 1918 年 8 月 13 日出生在英格兰格洛斯特特的一个村庄。父亲是一位医生,曾在中国传教行医;母亲来自富裕的贵族家庭。桑格 14 岁的时候,被送入了当地的贵族学校。桑格在学校表现平庸,学习成绩中等,性格内向,在学校里并不引人注目。中学时代过后,桑格来到剑桥大学圣约翰学院学习。在大学期间,桑格化学成绩不错,但数学和物理成绩不佳。在圣约翰学院,桑格偶然接触到一门当时新兴的学科——生物化学,桑格对其很感兴趣。大学毕业后,桑格继续在剑桥大学攻读生物化学专业的博士学位,1943 年完成了博士论文《赖氨酸的代谢》。毕业后桑格写信给一些高校,以谋取实验室的工作。但桑格自认为履历普通,难以获得大学教授的支持,在求职信后面加了一句“我不缺钱,工作可分文不取”。大学教授们都很欢迎免费的学生,纷纷同意他加盟。最终桑格选择了剑桥大学生物化学系,开始了他漫长的科研之旅。

2.3 十年磨剑,成果卓著,测序成功 1943 年,剑桥大学教授阿尔伯特·吉布纳尔(Albert Chibnall)邀请桑格加入了他的研究组并研究蛋白质序列。当时能获得纯品的蛋白质种类很少,而胰岛素是一种最小的蛋白质,相对分子质量 6 000,容易获得,于是锁定胰岛素作为研究对象。为了确定胰岛素的氨基酸排列,桑格整日在实验室工作,经过深入研究,他发现一种试剂即二硝基氟苯(DNFB,后人以他的名字将其命名为桑格试剂)能给蛋白质一端的氨基酸着色,然后用纸层分离法测定氨基酸,最终推断出牛胰岛素的完整序列。桑格通过破坏牛胰岛素二硫键而获得两条链,即具有酸性的 A 链和具有碱性的 B 链。1951 年,桑格首先对 B 链进行酸处理或胃蛋白酶处理,随后用电泳、离子交换层析及活性炭吸附等方法,获得含有 5~20 个氨基酸的肽段;再利用双向纸层析分离,结合氨基酸组成分析及 N 端分析,可确定短片段氨基酸顺序,最后以多个短片段序列,利用重叠法获得胰岛素 B 链氨基酸序列。1953 年,完成 A 链 21 个氨基酸的全序列测定。1955 年,桑格克服了水解过程中二硫键交换、水解酶水解后产物分离复杂等一系列难题,经过 2 年的艰苦努力,完成了二硫键位置的确定^[8]。从 1943 年桑格着手研

究胰岛素,到 1955 年解析胰岛素的精确结构,逐段分解和逐步递增,测定出胰岛素两条肽链分别含 21 个和 30 个氨基酸的排列顺序和位置,其研究跨越了 12 年。凭借桑格及其助手和学生的不懈努力与艰苦奋斗,最终完成了这一重大课题。桑格因发现这种测定胰岛素一级结构的方法而独享 1958 年的诺贝尔化学奖。

2.4 由胰岛素推断的其他蛋白质 其他蛋白质同样具有精确的氨基酸序列,这解释了不同的器官体系如何能够复制成千上万种不同的蛋白质这一重大难题,每种蛋白质都有其组成氨基酸的独特序列。1958 年诺贝尔生理学或医学奖授予约书亚·莱德伯格 (Joshua Lederberg) 和爱德华·塔图姆 (Edward Tatum),他们的研究证明,基因是提供蛋白质氨基酸排序信息的重要物质,一个基因,一种蛋白质。1962 年,桑格移师新成立的医学研究中心的分子生物学实验室 (MRC-LMB),致力于核糖核酸和脱氧核糖核酸结构的分析研究,开发新的 RNA 测序方法。他利用酶的生物活性,用生物学的处理方法,正确地确定了核糖核酸中每种碱基的排列顺序和脱氧核糖核酸中核苷酸的排列顺序。他还发展了脱氧核糖核酸的精确快速分析法。这些研究后来演变成一种新的 DNA 测序方法,他使用“加和减”的方法,随后研制出二脱氧核苷酸链终止法,后人称之为 Sanger 测序法。与此同时,通过薄板凝胶进行 DNA 电泳,改进了 DNA 片段分离的方法。桑格还扩展了他早期的重叠片段方法,通过整体概念进行蛋白质序列组装,基因组核酸测序,并通过测序连接重叠的 DNA 片段,组装更大的多核苷酸序列。他用此法于 1977 年成功地测定了细菌病毒 Φ X174 脱氧核糖核酸分子的全部共 5 386 个核苷酸的排列顺序。

瓦尔特·吉尔伯特 (Walter Gilbert),美国生物化学家,主要研究生物物理学、遗传控制机制、蛋白质与 DNA 相互关系等。他运用桑格直读法原理,独立提出测定核苷酸顺序的更简便方法——化学降解法。用化学反应把 DNA 裁剪成一系列不同长度的核苷酸片段,它们的一端相同,并标有放射性同位素,测定各片段长度和另一端最后一个核苷酸,可决定核苷酸在 DNA 相应位置上的排列顺序。把测定的所有片段拼接起来,就能知道整个 DNA 大分子结构。保罗·伯格 (Paul Berg),美国生物化学家,

1926 年 6 月 30 日出生于美国布鲁克林。伯格在 1948 年毕业于宾夕法尼亚州立学院,1952 年获西部保留地大学生物化学哲学博士学位。他曾在哥本哈根进修,后于华盛顿大学、斯坦福大学任微生物学和生物化学教授。他在研究分离基因的过程中,设计了多种方法,选定位点分裂 DNA 分子并使该分子的片段连接到病毒 DNA 或质体上,然后使 DNA 或质体进入细胞。外来 DNA 被结合到宿主细胞中去,并使宿主合成在正常情况下不能合成的蛋白质。桑格因设计出一种测定 DNA 内核苷酸排列顺序的方法而与瓦尔特·吉尔伯特、保罗·伯格共获 1980 年诺贝尔化学奖。

2.5 两次获得诺贝尔奖,世上仅 3 人 诺贝尔化学奖 2 项,全球唯一 桑格通过对越来越大的基因组进行测序证明了他的方法的威力,从 1977 年的简单细菌病毒 (5 386 个核苷酸) 开始,到 1981 年的人类细胞线粒体 DNA (16 569 个核苷酸),最后到 1982 年的复杂细菌病毒噬菌体 lambda (48 502 个核苷酸) 的基因组。相当一部分人类基因组被他开发的技术解码。在 21 世纪, Sanger 测序法逐渐被更快、更便宜的技术所取代,这种技术可以在核苷酸附着在不断增长的 DNA 链上进行检测。但 Sanger 测序法仍然是金标准。这种高度精确的技术正越来越多地应用于人类个体的基因组,甚至肿瘤内的单个细胞。桑格对生物学的影响和查尔斯·达尔文一样引人注目。在科学领域两次获得诺贝尔奖的人只有玛丽·居里 (Marie Curie, 1903 年物理学奖, 1911 年化学奖)、约翰·巴丁 (John Bardeen, 1956 年及 1972 年物理学奖) 和弗雷德里克·桑格 (1958 年及 1980 年化学奖) 3 人。两次获得化学奖的只有桑格一人。

2.6 科学巨匠,不计功名,默默耕耘,低调至极 桑格于 1954 年成为皇家学会会员 (FRS)。1963 年获得不列颠勋章 (CBE), 1981 年获得名誉勋位 (CH), 1986 年获得功绩勋章 (OM)。1983 年的某一天,桑格宣布退休,从此,他余生的大部分时间都是在自己的花园里度过的。1986 年,桑格获得英国最高荣誉“功绩勋章”,但拒绝封爵,因为不喜欢别人称自己为“爵士”。

英国的维康信托基金会 (Wellcome Trust) 和医学研究理事会 (Medical Research Council), 于 1993 年成立了桑格中心 (Sanger Centre)、桑格研究院

(Sanger Institute), 地点位于英国剑桥, 是世界上进行基因组研究的主要机构。

3 人胰岛素的概念和胰岛素的人工合成

1960 年 Nicol 和 Smith 等用经典的提取方法, 从人尸体胰脏中首次获得少量的人胰岛素。用它作化学分析, 首次得到了人胰岛素的氨基酸组成, 发现人胰岛素与动物胰岛素有差别^[9]。

中国的科学工作者经过 6 年零 9 个月的艰苦工作, 在世界上第一次用人工的方法合成了一种具有生物活性的蛋白质——牛结晶胰岛素。1965 年 9 月 17 日中国正式宣布成功合成牛胰岛素。

邹承鲁 (1923. 5. 17—2006. 11. 23), 生物化学家, 中国科学院院士。出生于山东青岛, 1945 年毕业于西南联合大学化学系, 1951 年获得英国剑桥大学生物化学博士学位, 1992 年当选为第三世界科学院院士。在胰岛素人工合成中负责 A 链及 B 链的拆合, 确定了合成路线蛋白质必需基团的化学修饰和活性丧失的定量关系公式和作图法, 被称为“邹氏公式”, 得到国际上广泛采用。邹承鲁因在胰岛素人工合成、蛋白质化学结构与功能关系等方面的贡献, 曾两获国家自然科学奖一等奖、四获国家自然科学奖二等奖。

在中国科学家第一次人工合成牛胰岛素的 9 年后, 1974 年, Sieber 用化学方法 (Sieber, 1974) 成功地合成了人胰岛素, 并作了许多研究, 但代价太高, 也只有学术价值, 没有药用的实际意义。

1969 年, 英国科学家霍奇金 (Hodgkin) 等用 X 线解析法研究胰岛素晶体的三维结构, 为研究胰岛素结构与功能间的关系打下了基础。

直到 20 世纪 80 年代基因工程/重组 DNA 技术的发展使生物合成重组人胰岛素的生产成为可能。自此, 人胰岛素突破了数量和质量的限制, 在临床得到日益广泛的应用。

1959 年, 美国科学家雅洛 (Yalow) 和伯森 (Berson) 用放射免疫分析技术测定血浆胰岛素浓度, 结果发现对胰岛素敏感的患者其血浆胰岛素水平较低, 而不敏感的患者其血浆胰岛素水平正常或增高, 他们据此提出了胰岛素抵抗的概念。雅洛因开发多肽类激素的放射免疫分析法而获得 1977 年诺贝尔生理学医学奖。胰岛素抵抗的概念是指组织细胞对胰岛素的生物调节作用不敏感或无反应。罗

莎琳·萨斯曼·雅洛 (Rosalyn Yalow) 是美国医用物理学家, 有“超级科学家”“超级母亲”和“超级妻子”之誉。她和同事研制出的“放射性免疫分析法”, 目前仍然在使用^[10]。利用这一技术能区分 1 型糖尿病和 2 型糖尿病。证实了成年糖尿病患者血浆中胰岛素并不缺少, 只因胰岛素抵抗而丧失了降血糖的效能。这一发现曾轰动美国医学界。

4 重组人胰岛素——第二代胰岛素 (1978 年—)

通过基因重组工程将携带人胰岛素基因的质粒导入酵母菌表达, 科学家们研制生产出了人胰岛素, 其氨基酸序列与人体自身分泌的胰岛素完全一致, 同时具有完好的三维空间结构, 之后通过离子交换层析和高压液相层析等分离纯化技术清除杂质, 因此, 人胰岛素在疗效和安全性等方面都体现出了明显的优势。

1973 年, 斯坦福大学的 Stanley Cohen 和加州大学旧金山分校的 Herbert Boyer 合作发表学术论文, 宣告了重组 DNA 技术的诞生和基因工程时代的到来^[11]。

1976 年, 硅谷投资家 Robert Swanson 联系 Herbert Boyer, 两者合作让基因工程这项革命性的技术发明走出实验室, 走向产业化。1978 年 8 月, David Goeddel 等利用大肠杆菌表达的 A 链和 B 链与化学制备的基因及 A + B 链结合程序合成了第一个基因重组人胰岛素, 使重组技术生产胰岛素成为可能^[12]。

人类胰岛素 A 链和 B 链的合成基因分别克隆到质粒 pBR322 中, 然后将克隆的合成基因融合到大肠杆菌 β 半乳糖苷酶基因, 经过有效的转录和翻译, 得到一个稳定的前体蛋白。由 β 半乳糖苷酶裂解获得的胰岛素肽可以通过放射免疫测定, 并且可以纯化。A 链可以完全纯化, B 链可以部分纯化。这些产物混合、降解和再氧化, 合成的胰岛素是否存在可以通过放射免疫方法检测出来。

生物合成人胰岛素问世后, 曾作过大量的药理学、药效学、免疫学及临床研究, 发现它的吸收比动物胰岛素快, 免疫原性极低, 纯度达到中组分胰岛素标准。动物胰岛素过敏发生率为 10% ~ 30%; 人胰岛素的发现解决了动物胰岛素的免疫原性问题, 减少了过敏反应, 重组人胰岛素过敏发生率约为 1%。基因工程合成人胰岛素, 是一个胰岛素发展史上巨

大的飞跃,是质的飞跃。因为与人的胰岛素结构相同,大大减少了患者的不良反应,人们再也不用依靠动物胰脏就能生产出纯净的人胰岛素了。

基因工程合成的人胰岛素,使用层析分离技术,使胰岛素溶液中的污染物浓度降到最低,使用双层析分离技术,可将杂质和污染物降低到百万分之一以下。基因工程合成的人胰岛素的胰岛素原的含量极低, $<1 \times 10^{-6}$,不含胰多肽、胰高血糖素、血管活性肠肽及生长抑素等存在于胰腺中的激素。细菌蛋白含量 $<4 \times 10^{-6}$,用放射免疫法在受药者血液中测不到相应的抗体。故生物合成人胰岛素是一种非常安全有效的药物。

5 人胰岛素类似物——第三代胰岛素(1982—2021 年)

5.1 人胰岛素类似物 有了重组 DNA 技术,人们就开始幻想是否有可能制造更多、更新、更好的胰岛素?有没有可能制造一种作用时间更长的胰岛素,使得糖尿病患者不再需要每天反复提醒自己注射胰岛素,可以一针解决 1 d 的问题,甚至可以一针解决几天、几周甚至更长时间的血糖问题?有没有可能制造一种特别短效的胰岛素,一经注射马上起效,起效之后迅速降解,应对餐后血糖的高峰?有没有可能制造一种自动的机器能够模拟胰岛 β 细胞的功能,顺应血糖水平的变化自动调节胰岛素的剂量?甚至制造出一种药片剂型的胰岛素,让糖尿病患者再也不需要面对扎针的恐惧和烦恼?基因工程使得这些美好的幻想缓慢却又坚定不移地成为现实。基因工程生产的人胰岛素,其生产可以完全摆脱对动物器官的依赖。但是还有更重要的含义,人类可以利用重组 DNA 技术,将人类胰岛素的 DNA 序列放入大肠杆菌,把细菌变成微型胰岛素工厂,人类也自然可以在这个过程中,按照人体胰岛素的需求改变人类胰岛素的 DNA 和蛋白质序列,甚至制造出性能优越、天然没有的新型胰岛素——人胰岛素类似物。

5.2 人胰岛素类似物如雨后春笋,生机无限 2000 年以后,美国礼来公司、丹麦诺和诺德公司、法国赛诺菲公司和我国的甘李药业相继生产出了多种人胰岛素类似物,短效的有赖脯胰岛素(优泌乐)、门冬胰岛素、谷赖胰岛素(艾倍德),长效的有甘精胰岛素(来得时、长秀霖)、地特胰岛素、德谷胰岛素等。

谷赖胰岛素,人胰岛素 B3 位点上的天冬氨酸为赖氨酸所置换,而 B29 位点上的赖氨酸为谷氨酸

所置换,使得谷赖胰岛素能够更快地被吸收。门冬胰岛素,由门冬氨酸替换 B28 位点的脯氨酸。赖脯胰岛素是将人胰岛素 B 链的 28、29 位的脯氨酸和赖氨酸互换而成。与人胰岛素相比,这两种起效更快,持续时间更短,可以更好地控制餐后血糖而少引起低血糖。

甘精胰岛素的结构是在人胰岛素的 A 链中,以电荷中性的甘氨酸取代第 21 位的天冬氨酸,在 B 链的氨基端增加两个精氨酸,使等电点由 5.4 提高到 6.7。同时配方中加少量锌,结构经上述修饰后,胰岛素溶液中形成的六聚体更加稳定。锌加入后在皮下易形成结晶,延缓胰岛素的解聚和吸收,持续作用 24 h,主要用于基础血糖的控制。赛诺菲公司开发的甘精胰岛素(来得时),国内的长秀霖都隶属长效人胰岛素类似物。甘精胰岛素 U300,与来得时置换位点相同,其长效机制是形成皮下储库微沉淀。地特胰岛素,去掉 B30 位点的苏氨酸,在 B29 位点链接了 14 碳脂肪酸侧链。德谷胰岛素,去掉人胰岛素 B30 位点的苏氨酸,在 B29 位的赖氨酸上通过一个 L- γ -Glu 连接子,与脂肪酸二酸侧链相连,半衰期长达 25 h。诺和诺德公司每周 1 次的超长效胰岛素 icodex 开始 3 期临床研究,该胰岛素可与白蛋白牢固、可逆结合,形成“循环储库”,半衰期长达 196 h。在 2 型糖尿病患者中,每周 1 次 icodex 胰岛素治疗具有与每日 1 次甘精胰岛素 U100 相似的降糖效果和安全性。Icodec 可能是近期基础胰岛素治疗最受期待的产品^[13]。分子工程胰岛素 icodex 在人体内达到 196 h 的血浆半衰期,适用于每周 1 次皮下给药。改变脂肪酸二酸,1,18-十八烷二酸(C18)更换为 1,20-二十烷二酸(C20)。通过 B16Tyr \rightarrow 进一步降低胰岛素受体亲和力。在 2 期临床试验中,2 型糖尿病患者接受每周 1 次的胰岛素 icodex,可获得安全有效的血糖控制,其效果可与每日 1 次的甘精胰岛素相媲美。每周 1 次皮下注射的胰岛素 icodex 是使用基础胰岛素的糖尿病患者最大的期盼^[14]。

5.3 人胰岛素类似物的安全性值得关注 胰岛素在人体内主要与胰岛素受体结合,发挥促进葡萄糖摄取等代谢效应,但同时胰岛素还能与胰岛素样生长因子-1(IGF-1)受体结合,虽然其亲和力只有 IGF-1 与 IGF-1 受体亲和力的 1/500,胰岛素与 IGF-1 受体结合,也会引起下游促有丝分裂作用。有研究

表明,高浓度胰岛素和胰岛素分子结构变化可刺激 IGF-1 受体,导致下游的促有丝分裂。胰岛素类似物分子与胰岛素受体结合时间长,解离速度慢,长期刺激也可能会促有丝分裂作用。促有丝分裂是 IGF-1 受体通路的下游作用,如果胰岛素类似物与 IGF-1 受体的亲和力强,其促有丝分裂作用也相应增强。

5.4 胰岛素 B10 的教训 胰岛素 B10 是一种经氨基酸替换得到的胰岛素类似物,最终其因为在大鼠试验中显示 52 周治疗具有呈剂量依赖性致肿瘤作用而未能应用于临床。胰岛素 B10 的分子安全性资料显示,与人胰岛素相比,胰岛素 B10 与 IGF-1 受体亲和力强 5.8 倍,有丝分裂作用增加 9.7 倍。不同胰岛素类似物促有丝分裂作用大不相同。2000 年库尔扎斯(Kurtzhals)的研究结果显示,速效胰岛素类似物门冬胰岛素和赖脯胰岛素的 IGF-1 受体亲和力和促有丝分裂能力与人胰岛素相当,该文显示它们具有与人胰岛素相同的体外安全性。地特胰岛素的 IGF-1 受体亲和力和促有丝分裂能力却低于人胰岛素^[15]。

除去皮下注射胰岛素外,一种全新的给药方式——胰岛素泵也被研制出来。和每日几次的常规注射不同,胰岛素泵始终保持和血管的连通、实时测定血糖水平,而智能胰岛素泵还可以根据血糖水平自动调节胰岛素的剂量。从某种意义上,胰岛素泵至少部分地模拟了胰岛 β 细胞对胰岛素分泌的调节作用。

6 皮下注射胰岛素以外的其他类型胰岛素

6.1 吸入胰岛素 2006 年, FDA 批准了第一个吸入胰岛素 Exubera (EXU) 上市^[16]。欧洲爱尔兰和德国等国家也上市了这种吸入胰岛素。Exubera 虽能有效控制餐后血糖,且降低糖化血红蛋白 A1c (HbA1c) 程度与皮下注射胰岛素相似,但应用后会使得咳嗽增加 3~4 倍,并导致肺功能轻度恶化,令糖尿病患者和医生都难以接受。此外,其吸入装置操作复杂,价格较贵,Exubera 被批准上市后不到 2 年即自动退市。此后多家医药公司放弃了对吸入胰岛素的研发。

2014 年 6 月 27 日 FDA 批准速效吸入型人胰岛素 Afrezza 用于成年 1 型糖尿病和 2 型糖尿病患者,但同时以加框方式提醒警惕潜在的支气管痉挛风险,并且要求生产商开展上市后研究。Afrezza 是一

种速效吸入型胰岛素,患者可在餐前使用。但 Afrezza 不能取代长效胰岛素的作用。在 1 型糖尿病患者中, Afrezza 需与长效胰岛素联合应用。另外, FDA 不推荐 Afrezza 用于治疗糖尿病酮症酸中毒,也不推荐该药在吸烟患者中使用^[17]。

6.2 口服胰岛素 2013 年,口服胰岛素 ORMD-0801 在一项涉及 269 例 2 型糖尿病患者的 II b 期临床研究中表现出良好的降糖效果以及安全性^[18]。口服胰岛素可显著改善接受皮下注射胰岛素治疗的糖尿病患者的生活质量。口服胰岛素在糖尿病治疗中有许多优点:患者依从性高,肝脏胰岛素水平快速增加,减少了外周高胰岛素血症和其他不良反应,如低血糖和体重增加等。但口服胰岛素吸收率有限,仍然是一个巨大的挑战。口服胰岛素在胃肠道中吸收的最大障碍是蛋白质水解酶的降解和缺乏转运体穿越肠上皮。已有多种口服胰岛素的策略,但成功应用于临床或商业的较少。

微粒子和纳米粒子是指粒子分别以微米和纳米测量的粒子。纳米颗粒蛋白胶囊被认为是口服胰岛素一种很有前途的选择,因为它们有能力促进胰岛素在肠内的细胞间运输。通过不同的给药系统,增加口服胰岛素的生物利用度,是口服胰岛素的关键。纳米颗粒载体系统正在努力将第一个口服胰岛素输送系统推向市场。纳米粒子和微粒子之间的大小差异对药物的装载效率、聚集、生物膜的通透性、细胞进入和组织滞留有很大的影响。已经证明微粒子给药系统有许多优点,包括对酶降解的保护,肽稳定性,位点特异性和可控的药物释放等。与纳米给药系统相比,微粒制剂可以促进口服胰岛素通过细胞旁、细胞间和淋巴途径的吸收。多层包衣、壳层自聚合、纳米复合微粒给药系统等新技术有望提高胰岛素的口服生物利用度。此类药物有可能成为首款胶囊剂型的口服胰岛素^[19]。

6.3 自动释放胰岛素系统和智能胰岛素贴片 日本名古屋大学等机构的研究人员最新发明了一种新材料,可以根据血糖值变化自动释放胰岛素,今后如能应用,糖尿病患者将不必再频繁注射胰岛素。将苯硼酸和高分子凝胶相结合,在周围环境中葡萄糖浓度降低时,这种凝胶材料的表面分子会形成薄膜状构造,在周围葡萄糖浓度升高时,表面分子构成的薄膜构造又能立即消失。研究人员将胰岛素保存于

一个导管中,导管的导流口涂上这种新型凝胶材料并植入患糖尿病的实验鼠皮下。在实验鼠血糖值升高时,涂抹了新材料的导管会自动向其体内释放胰岛素。一旦实验鼠血糖值降低,导流口就会被凝胶表面的膜状构造覆盖,从而阻止胰岛素通过。其应用前景是只需贴在皮肤上就能向体内持续释放胰岛素,其作用原理应该与《Nature》杂志发表的苯硼酸和凝胶相互作用相关。

2020 年,《Nature》子刊发表了一篇介绍“智能胰岛素贴片”研究进展的文章。“智能胰岛素贴片”的大小约相当于一元硬币,贴片上整齐排列着数百根可感知血糖水平的微小针头(长度不足 1 mm)并负载胰岛素^[20]。佩戴时,这些微小针头可穿透表皮来感知皮下组织附近的血糖水平,并自动响应发挥类似胰腺的血糖调节作用:当血糖水平升高时,其会自动释放胰岛素进入体内,起到降低血糖的作用;当血糖水平逐渐下降时,会减缓胰岛素的释放,防止低血糖的发生(图 2)。

苯硼酸可逆地结合葡萄糖分子,苯基硼与水凝胶中酸的结合使之具有独特的属性。基于苯硼酸的顺式二醇,采用微工程光学扩散器结构识别基序预先放置在水凝胶薄膜中,通过传感器透射光的传播和强度测定葡萄糖浓度的变化,是智能胰岛素释放的基础^[21]。

智能胰岛素给予系统是最具前景的胰岛素治疗系统,用于临床,尚待时日,我们当翘首以待。

7 结束语

从 1921 年班廷和麦克劳德发现胰岛素并用于

糖尿病患者的治疗,至今已经整整 100 年了。这 100 年,胰岛素制剂有了翻天覆地的变化,从当初的粗制动物胰腺提取物,到基因工程合成人胰岛素,到胰岛素的类似物,超短效、短效、中效、预混、长效,到超长效,从皮下多次注射,到连续皮下注射,到吸入胰岛素,到口服胰岛素,无不浸透着研究者的心血。他们辛勤耕耘,有的默默无闻,有的叱咤风云,有的被后人永远铭记,有的被历史埋没。本文从历史尘封、少人问津的文献中,列出那些被遗忘的、有价值的研究,深知在班廷和麦克劳德发现胰岛素的年代,已有数名科学研究者做过了和班廷一样的研究,甚至比班廷做得更多,有的研究还获得了美国的专利!但是他们没有遇到麦克劳德,没有遇到化学家科力普,他们的研究成果未能用于临床,与胰岛素的发现仅仅一步之遥。更重要的是他们没有遇到伊丽莎白·休斯这样的糖尿病患者——她的父亲是前美国国务卿查尔斯·埃文斯·休斯!当班廷申请胰岛素发现专利被美国专利局因为已经有了同样的专利而拒绝的关键时刻,查尔斯·埃文斯·休斯给美国专利局局长的一封信使专利申请获得成功!班廷和麦克劳德因为胰岛素的发现而获得 1923 年诺贝尔生理学医学奖。因为胰岛素的发现而两人获奖,班廷曾表示拒绝领取嘉奖,班廷认为麦克劳德抢夺了他和助手贝斯特的功劳,奖项不应该授予麦克劳德,应该给贝斯特,由此也开启了无休止的世纪之争,至今余波未尽。

我们再回顾两次诺贝尔化学奖得主弗雷德·桑格,他辛勤耕耘 12 年,发现了胰岛素的 A-B 双链结构,为胰岛素的合成、基因工程胰岛素的生产奠定了

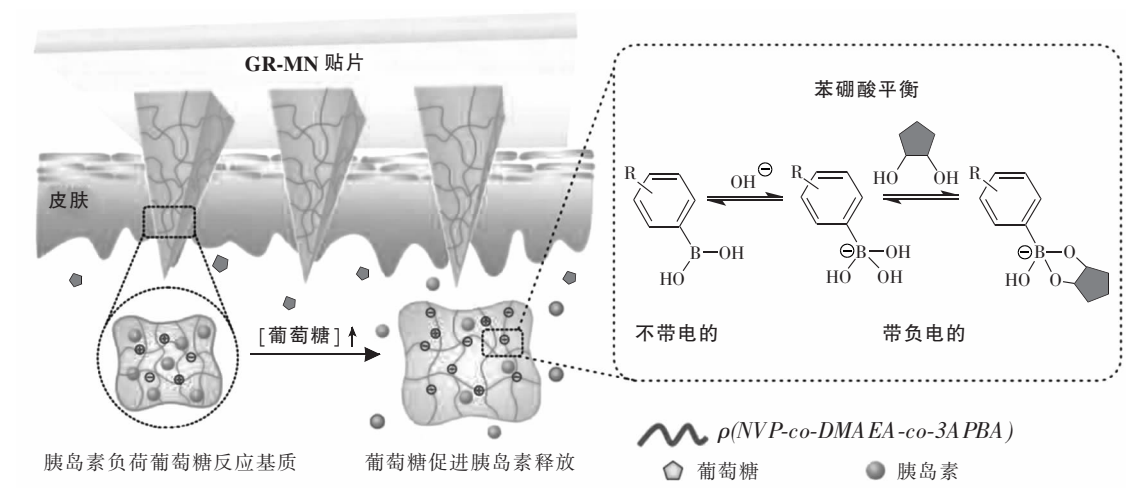


图 2 智能胰岛素贴片根据组织葡萄糖反应输送胰岛素的原理图^[20]

坚实的基础。没有他的发现,就没有后来的人胰岛素和胰岛素类似物。他的获奖,世界公认,无人与争! 22 年后,桑格又因设计出一种测定 DNA 内核苷酸排列顺序的方法而第二次获得诺贝尔化学奖。在他的家里,没有任何纪念牌匾、证书及奖状,连奖章都难觅踪迹。桑格曾说,“得到这些奖牌我很高兴,但我更为我的研究而自豪。”他说,“现在许多人搞科学就是为了得奖,但这不是我的出发点”。弗雷德·桑格是一位值得尊重、值得敬仰的科学巨匠,没有他的贡献,就没有近代胰岛素的发展! 在胰岛素诞辰百年之际,谨以此文纪念班廷和麦克劳德的卓越贡献,纪念那些名不见经传却做出贡献的研究者,更是特别纪念桑格这位科学家在胰岛素发现这一领域所做出的杰出贡献!

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 刘文静、杨洁在文章写作过程中,在文献查阅、图片制作和文字校对方面所给予的协助

参 考 文 献

- [1] Bliss M. Rewriting medical history: Charles Best and the Banting and Best myth [J]. J Hist Med Allied Sci, 1993, 48 (3): 253-274. DOI: 10. 1093/jhmas/48. 3. 253.
- [2] 西娅·库珀,亚瑟·恩斯伯格. 突破胰岛素发现创造的医学奇迹. 谢琨,译. 上海:上海人民出版社,2011.
- [3] Fralick M, Zinman B. The discovery of insulin in Toronto: beginning a 100 year journey of research and clinical achievement [J]. Diabetologia, 2021, 64 (5): 947-953. DOI: 10. 1007/s00125-020-05371-6.
- [4] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism [J]. Diabetes, 2005, 54 (6): 1615-1625. DOI: 10. 2337/diabetes.
- [5] Kahn BB. Adipose tissue, inter-organ communication, and the path to type 2 diabetes: the 2016 Banting medal for Scientific achievement lecture [J]. Diabetes, 2019, 68 (1): 3-14. DOI: 10. 2337/dbi18-0035.
- [6] Colberg-Ochs SR. From frodo to fitness: my journey as an educator and person with diabetes [J]. Diabetes Spectr, 2017, 30 (1): 58-63. DOI: 10. 2337/ds16-0079.
- [7] Yu MG, Keenan HA, Shah HS, et al. Residual β cell function and monogenic variants in long-duration type 1 diabetes patients [J]. J Clin Invest, 2019, 129 (8): 3252-3263. DOI: 10. 1172/JCI127397.
- [8] Sanger F, Thompson EO, Kitai R. The amide groups of insulin [J]. Biochem J, 1955, 59 (3): 509-518. DOI: 10. 1042/bj0590509.
- [9] Nicol DS, Smith LF. Amino-acid sequence of human insulin [J]. Nature, 1960, 187: 483-485. DOI: 10. 1038/187483a0.
- [10] Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man [J]. J Clin Invest, 1960, 39 (7): 1157-1175. DOI: 10. 1172/JCI104130.
- [11] Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973, 70 (11): 3240-3244. DOI: 10. 1073/pnas. 70. 11. 3240.
- [12] Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, et al. Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76 (1): 106-110. DOI: 10. 1073/pnas. 76. 1. 106.
- [13] Rosenstock J, Bajaj HS, Janež A, et al. Once-weekly insulin for type 2 diabetes without previous insulin treatment [J]. N Engl J Med, 2020, 383 (22): 2107-2116. DOI: 10. 1056/NEJMoa2022474.
- [14] Kjeldsen TB, Hubálek F, Hjörtinggaard CU, et al. Molecular engineering of insulin icodec, the first acylated insulin analog for once-weekly administration in humans [J]. J Med Chem, 2021, 64 (13): 8942-8950. DOI: 10. 1021/acs.jmedchem. 1c00257.
- [15] Kurtzhals P, Schäffer L, Sørensen A, et al. Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use [J]. Diabetes, 2000, 49 (6): 999-1005. DOI: 10. 2337/diabetes. 49. 6. 999.
- [16] Barnett AH, Bellary S. Inhaled human insulin (Exubera): clinical profile and patient considerations [J]. Vasc Health Risk Manag, 2007, 3 (1): 83-91.
- [17] Klonoff DC. Afrezza inhaled insulin; the fastest-acting FDA-approved insulin on the market has favorable properties [J]. J Diabetes Sci Technol, 2014, 8 (6): 1071-1073. DOI: 10. 1177/1932296814555820.
- [18] Eldor R, Arbit E, Corcos A, et al. Glucose-reducing effect of the ORMD-0801 oral insulin preparation in patients with uncontrolled type 1 diabetes: a pilot study [J]. PLoS One, 2013, 8 (4): e59524. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0059524.
- [19] Wong CY, Al-Salami H, Dass CR. Microparticles, microcapsules and microspheres: a review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin [J]. Int J Pharm, 2018, 537 (1-2): 223-244. DOI: 10. 1016/j. ijpharm. 2017. 12. 036.
- [20] Yu J, Wang J, Zhang Y, et al. Glucose-responsive insulin patch for the regulation of blood glucose in mice and minipigs [J]. Nat Biomed Eng, 2020, 4 (5): 499-506. DOI: 10. 1038/s41551-019-0508-y.
- [21] Elsherif M, Hassan MU, Yetisen AK, et al. Glucose sensing with phenylboronic acid functionalized hydrogel-based optical diffusers [J]. ACS Nano, 2018, 12 (3): 2283-2291. DOI: 10. 1021/acsnano. 7b07082.

(收稿日期: 2021-08-02)

(本文编辑: 刘欣)