

重组圆锥芋螺胰岛素 G1 的原核表达与降糖活性检测

王程, 耿泽男, 纪朋艳, 李庆华, 罗军, 李妍, 隋春红

吉林医药学院 基础医学院, 吉林 吉林 132013

王程, 耿泽男, 纪朋艳, 等. 重组圆锥芋螺胰岛素 G1 的原核表达与降糖活性检测. 生物工程学报, 2019, 35(3): 505–512.

Wang C, Geng ZN, Ji PY, et al. Prokaryotic expression and hypoglycemic activity determination of insulin G1 from *Conus geographus*. Chin J Biotech, 2019, 35(3): 505–512.

摘要: 为缩短重组胰岛素起效时间, 达到快速降低餐后血糖的作用, 以圆锥芋螺胰岛素 G1 (cI G1) 为研究对象, 参照人胰岛素原 (*hPI*) 和圆锥芋螺胰岛素 G1 原 (*cPI G1*) 基因设计重组 *cPI G1* 的核苷酸序列, 按照大肠杆菌 *Escherichia coli* 密码子使用频率进行密码子优化后构建 pET22b(+)-cPI G1 质粒, 以 *E. coli* BL21(DE3) 菌株为宿主进行原核表达, 获得重组 cPI G1 蛋白, 经胰蛋白酶切割及纯化得到重组 cI G1, 其效价为 25.9 IU/mg。空腹血糖测试 (FBGT) 和葡萄糖耐量实验 (OGTT) 表明, cI G1 可迅速降低正常和链脲佐菌素 (STZ) 致糖尿病模型小鼠的血糖, 但持续时间短, 研究结果为重组速效胰岛素的开发提供参考。

关键词: 圆锥芋螺胰岛素 G1, 原核表达, 降糖活性

Prokaryotic expression and hypoglycemic activity determination of insulin G1 from *Conus geographus*

Cheng Wang, Zenan Geng, Pengyan Ji, Qinghua Li, Jun Luo, Yan Li, and Chunhong Sui

School of Basic Medical Sciences, Jilin Medical University, Jilin 132013, Jilin, China

Abstract: Rapid reduction of postprandial blood glucose is very beneficial to diabetics. In order to shorten the onset time of recombinant insulin, the cone snail insulin G1 (cI G1) of *Conus geographus* was studied. First, the nucleotide sequence of recombinant cone snail proinsulin G1 (*cPI G1*) was designed and synthesized according to the genes of human proinsulin (*hPI*) and *cPI G1*. The codon was optimized according to *Escherichia coli* (*E. coli*) codon usage frequency. Then, the plasmid pET22b(+)-cPI G1 was constructed and the recombinant cPI G1 was expressed in *E. coli* BL21(DE3) host strain. The recombinant cPI G1 was then purified and cleaved specially by trypsin to generate the recombinant cI G1, and its potency is 25.9 IU/mg. Fasting blood glucose test (FBGT) and oral glucose tolerance test (OGTT) suggested that the recombinant cI G1 could rapidly reduce blood glucose in normal and streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice, but only for a short duration. This study provides a technical reference for the development of recombinant fast-acting insulin.

Received: July 5, 2018; **Accepted:** September 11, 2018

Supported by: Natural Science Foundation Project of Jilin Province Science and Technology Development Plan (No. 20150101131JC), Outstanding Youth Foundation Project of Jilin City Science and Technology Innovation Development Plan (No. 20166030).

Corresponding author: Chunhong Sui. Tel: +86-432-64560535; Fax: +86-432-64560460; E-mail: suichunhong@163.com

吉林省科技发展计划自然科学基金项目 (No. 20150101131JC), 吉林市科技创新发展计划杰出青年基金项目 (No. 20166030) 资助。

网络出版时间: 2018-10-18

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20181015.1457.002.html>

Keywords: cone snail insulin G1, prokaryotic expression, hypoglycemic activity

基因工程制备的重组胰岛素是糖尿病药物治疗领域的一个里程碑,应用于临床已逾 30 载,具有纯度高、不良反应少、用量少等优点^[1]。胰岛素必须以单体分子形式与受体结合才能发挥生物活性,然而在重组胰岛素的临床应用过程中,较高的血药浓度会促进胰岛素分子发生自身缔合而形成多聚体,需要经过一段时间解聚才发挥作用^[2]。因此通过分子改造,设计出在血液中以单体形式存在的速效胰岛素成为研究的重要方向之一^[3]。目前用于临床控制餐后血糖波动的速效胰岛素主要有赖脯胰岛素 (Lispro)、门冬胰岛素 (Aspart) 和赖谷胰岛素 (Glulisine),其结构改造均发生在胰岛素 B 链羧基末端,通过在聚体形成面引入相同电荷、调整分子间疏水性、改变与金属离子的结合力等方式使胰岛素单体难以聚合^[4]。2016 年,美国和澳大利亚的研究人员从海洋圆锥芋螺 *Conus geographus* 的毒液中提取出一种单体形式存在的圆锥芋螺胰岛素 G1 (Cone snail insulin G1, cI G1), 并发现其可与人胰岛素受体结合,且发挥作用的速度比人胰岛素 (Human insulin, hI) 更快,有望开发成一种超级速效胰岛素^[5]。本研究参照人胰岛素原 (Human proinsulin, hPI) 和圆锥芋螺胰岛素 G1 原 (Cone snail proinsulin G1, cPI G1) 的基因,设计适于大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 表达的重组 cPI G1 的核苷酸序列,构建 pET22b(+)-cPI G1 原核表达质粒,以 *E. coli* BL21(DE3) 作为宿主进行表达,经酶切纯化获得重组 cI G1; 随后以重组 hI 甘舒霖 50R 为对照,对等剂量重组 cI G1 作用的正常小鼠和链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 致糖尿病模型小鼠进行空腹血糖检测 (Fasting blood glucose test, FBGT) 和葡萄糖耐量测试 (Oral glucose tolerance test, OGTT), 评估重组 cI G1 的降糖作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和动物

质粒 pGH-cPI G1 由上海捷瑞生物科技公司合成, pET22b(+) 质粒购于美国 Novagen 公司。*E. coli* BL21(DE3) 菌株购于北京天根生物科技公司。近交系 C57BL 雄性小鼠,体质量 16–20 g, SPF 级,购于长春亿斯实验动物技术公司,实验动物生产使用许可证: SCXK (吉)-2011-0004。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III、核酸染料、T4 DNA 连接酶购于大连宝生物公司;质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购于美国 OMEGA 公司;β-巯基乙醇、胰蛋白酶冻干粉 (EC3.4.21.4)、链脲佐菌素购于美国 Sigma 公司;异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、三羟甲基氨基甘氨酸-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Tricine-SDS-PAGE) 凝胶制备试剂盒、镍-次氨基三乙酸 (Ni-NTA) 琼脂糖凝胶 6FF、Sephadex G-25 凝胶、透析袋 (3 500 Da) 购于北京索莱宝科技有限公司;重组人胰岛素标准品 (批号 140633-201104, 28.3 IU/mg) 购自中国药品生物制品检定所;甘舒霖 50R 混合重组人胰岛素注射液 (3 mL: 300 IU, 国药准字 S20083008) 购于通化东宝药业股份有限公司;0.9%氯化钠 (NaCl) 注射液 (100 mL: 0.9 g, 国药准字 H22025619) 购于吉林康乃尔药业有限公司;其他试剂均为国产或进口分析纯试剂。590 型血糖仪为江苏鱼跃医疗设备股份有限公司产品;LC-20AT 高效液相色谱 (HPLC) 仪为日本岛津公司产品。

1.2 方法

1.2.1 质粒的设计和构建

比对 hI 和 cI G1 氨基酸序列, 替换 cI G1 序

列中非编码和可能成为胰蛋白酶水解位点的氨基酸,参照 *hPI* 和 *cPI* 基因与 *E. coli* 优势密码子进行设计重组 *cPI G1* 核苷酸序列并合成 pGH-cPI G1 质粒。利用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切 pGH-cPI G1 质粒和 pET22b(+) 质粒。纯化回收双酶切的 cPI G1 目的片段和 pET-22b(+) 载体片段,连接酶连接后转化到 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中,涂布于含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基平板,挑选阳性菌落进行液体培养,单、双酶切后 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定重组菌,并送上海捷瑞生物科技有限公司进一步测序鉴定。

1.2.2 蛋白表达和亲和层析

将测序鉴定和理论序列相符的阳性重组菌按 1% (V/V) 接种量在 LB 液态培养基中 37 °C 摇菌培养,当光密度值 (OD_{600}) 达到 0.4–0.6 时加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L) 诱导 4 h,离心收集菌体,超纯水清洗 3 次,重悬于 5 倍菌体积的裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, pH 8.0),冰水浴超声破碎,高速离心收集上清液。按 Ni-NTA 琼脂糖凝胶 6FF 使用说明进行亲和层析 (柱尺寸: $\Phi 1.28$ cm \times 7 cm; 床体积: 5 mL; 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 280 nm),纯化蛋白冻干保存。采用 16.5% Tricine-SDS-PAGE 鉴定目的蛋白^[6]。蛋白产率 (mg/g)=纯化获得的重组 cPI G1 质量 (mg)/所用湿菌质量 (g)。

1.2.3 蛋白酶解和分子筛层析

用蛋白质折叠缓冲液 (50 mmol/L 甘氨酸, 1 mmol/L EDTA, pH 10.5, 高纯度氮气除气) 溶解重组 cPI G1,按 1.5 倍二硫键摩尔浓度加入 β -巯基乙醇诱导二硫键形成^[7],4 °C 密封孵育 12 h,1 mol/L Tris-HCl 调定 pH 8.5,与胰蛋白酶按 20 : 1 (W/W) 均匀混合,37 °C 酶切 18 h。酶切产物进行 Sephadex G-25 分子筛层析 (柱尺寸: $\Phi 1.0$ cm \times 90 cm; 床体积: 65 mL; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 280 nm),纯化蛋白冻干保存。采用 16.5%

Tricine-SDS-PAGE 鉴定目的蛋白。蛋白回收率 (%) = 酶解后获得重组 cI G1 物质的量 (mol)/酶解前重组 cPI G1 物质的量 (mol) \times 100%。

1.2.4 生物效价测定

参考《中国药典》(2015 版) HPLC 测定胰岛素生物活性的方法^[8],采用 C18 色谱柱,以 0.2 mol/L 硫酸盐缓冲液 (硫酸钠 28.4 g/L,磷酸 2.7% (V/V),乙醇胺调 pH 值至 2.3,定容至 1000 mL)-乙腈 (74 : 26) 为流动相,流速 1.0 mL/min,柱温 40 °C,波长 214 nm。以 0.01 mol/L 盐酸溶液配制 1 mg/mL 的重组人胰岛素对照品、甘舒霖 50R 和重组 cI G1,精密量取各个样品 20 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算效价。

1.2.5 动物模型建立

小鼠适应性饲养 1 周后,12 h 禁食不禁水,按 200 mg/kg 腹腔注射现配造模剂 (40 mg/mL STZ, 0.1 mol/L 柠檬酸钠, pH 4.4),60 h 后给小鼠进食,72 h 后称量小鼠体重并尾端采血检测空腹血糖值,以体重明显减轻且血糖值 ≥ 16.7 mmol/L 确定为小鼠糖尿病模型^[9]。

1.2.6 动物分组、给药和指标测定

正常小鼠和糖尿病小鼠各随机分为 3 组,每组 16 只,为正常对照组 (NC 组)、正常重组 cI G1 组 (NG 组)、正常重组 hI 组 (NH 组)、模型对照组 (MC 组)、模型重组 cI G1 组 (MG 组)、模型重组 hI 组 (MH 组)。NC 组和 MC 组注射 0.9% NaCl,剂量为 5 mL/kg; NG 组和 MG 组注射 20 μ g/mL 重组 cI G1,剂量为 100 μ g/kg (按 1 IU = 0.0347 mg hI 计算^[10]); NH 组和 MH 组注射 0.5 IU/mL 甘舒霖 50R,剂量为 2.5 IU/kg^[11]。给药方式均为背部皮下注射,剂量按小鼠体重计算。在禁食 8 h 后,各组随机选取 8 只小鼠空腹给药进行 FBGT,另外 8 只小鼠以 200 mg/mL 葡萄糖灌胃,剂量为 1 mg/kg,然后迅速给药进行 OGTT^[12]。

1.2.7 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析, 各项指标检测数据以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果与分析

2.1 重组 cPI G1 氨基酸序列的设计和质粒 pET22b(+)-cPI G1 的构建

对比 cI G1 (PDB: A chain 5JYQ_A, B chain 5JYQ_B) 和 hI (GenBank: A chain AAA72170.1, B chain AAA72171.1) 的氨基酸序列, 并进行必要的氨基酸替换 (图 1A): ①A4、B12 位点的 γ -羧基谷氨酸 (γ -carboxyglutamic acid, Gla, γ) 替换

为谷氨酸 (Glutamic acid, Glu, E); ②B5 位点的羟脯氨酸 (Hydroxyproline, Hyp, X) 替换为脯氨酸 (Proline, Pro, P); ③A9、B8 位点的精氨酸 (Arginine, Arg, R) 替换为亮氨酸 (Leucine, Leu, L); ④A18、A19、B6 位点的赖氨酸 (Lysine, Lys, K) 分别替换为 E、天冬酰胺 (Asparagine, Asn, N) 和谷氨酰胺 (Glutamine, Gln, Q), 使重组 cI G1 中均为编码氨基酸且不影响胰蛋白酶水解。参照 *hPI* (GenBank: AY899304.1) 和 *cPI* (UniProtKB/Swiss-Prot: A0A0B5AC95.1) 基因, 按照大肠杆菌偏爱密码子表, 设计重组 *cPI G1* 核苷酸序列 (图 1B), GC 含量为 46.9%, 其结构中包括: ①两

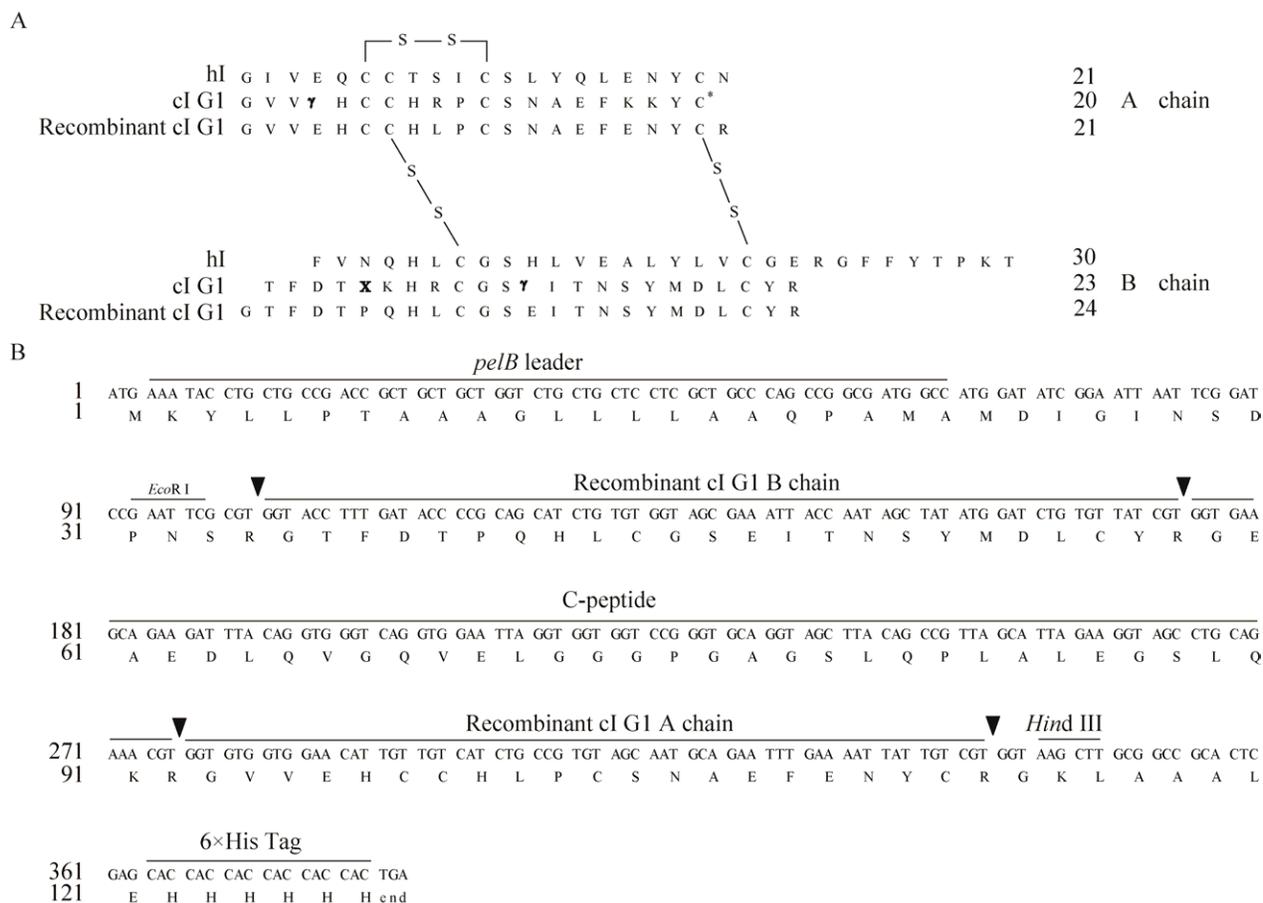


图 1 pET22b(+)-cPI G1 质粒的设计

Fig. 1 Design of the plasmid pET22b(+)-cPI G1. (A) Sequence comparison of hI, cPI G1 and recombinant cPI G1. γ : Gla; X: Hyp; *: C-terminal amidation; —s—s—: disulfide links. (B) Characterization of recombinant cPI G1 sequence. ▼: the cleavage site of trypsin.

端限制性核酸内切酶位点 *EcoR* I 和 *Hind* III; ②具有促进可溶性表达并可延长目的蛋白 10 倍半衰期的前导肽 *pelB* leader; ③重组 cI G1 A 链和 B 链及其之间的连接肽 C-peptide; ④可与二价镍离子螯合用于亲和层析的标签肽 6×His Tag; ⑤4 个可被胰蛋白酶识别的酶切位点。用 *EcoR* I 和 *Hind* III 单、双酶切鉴定构建的 pET22b(+)-cPI G1 质粒 (图 2), 其中双酶切后可见一条 250 bp 左右的条带, 和理论值大小一致, 进一步测序鉴定其核苷酸序列和理论值一致, 表明已成功构建表达 cPI G1 的原核表达载体, 可用于后续实验。

2.2 重组 cPI G1 蛋白的表达和纯化

重组菌通过 IPTG 诱导表达 (图 3), 与未诱导的重组菌对比, IPTG 诱导的重组菌在 14 kDa 左右有明显的特异性条带, 与理论分子量一致 (*pelB* leader 约 3.4 kDa, 重组 cPI G1 约 8.7 kDa, 6×His Tag 约 1.5 kDa, 共 13.6 kDa), 表明融合蛋白已经得到可溶性表达。经 Ni-NTA 亲和层析获得纯化重组 cPI G1 蛋白, 蛋白产率为 (3.9±0.7) mg/g。

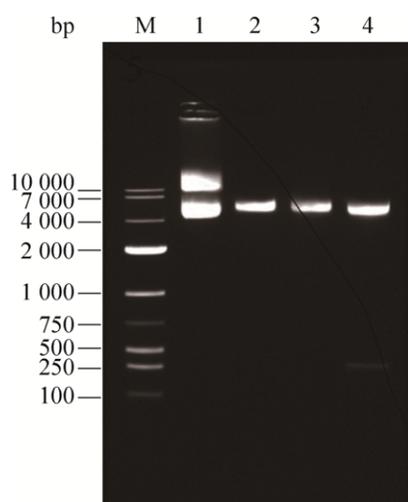


图 2 质粒 pET22b(+)-cPI G1 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the plasmid pET22b(+)-cPI G1 by double restriction enzyme. M: DNA marker; 1: pET22b(+)-cPI G1 plasmid; 2: pET22b(+)-cPI G1 plasmid digested with *EcoR* I; 3: pET22b(+)-cPI G1 plasmid digested with *Hind* III; 4: pET22b(+)-cPI G1 plasmid digested with *EcoR* I and *Hind* III.

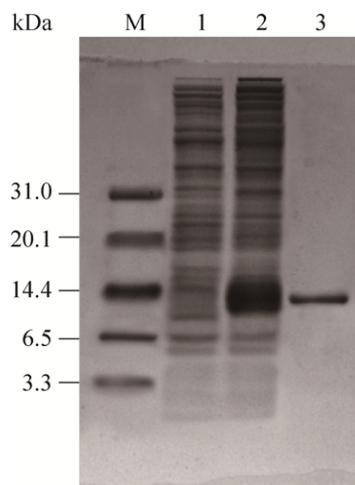


图 3 重组 cPI G1 的表达及纯化

Fig. 3 Expression and purification of recombinant cPI G1. M: ultra-low molecular weight protein marker; 1: supernatant from bacterial before induced by IPTG; 2: supernatant from bacteria induced by IPTG; 3: purified recombinant cPI G1.

2.3 重组 cPI G1 的酶解和重组 cI G1 的纯化

纯化的重组 cPI G1 蛋白经胰蛋白酶水解后用 Sephadex G-25 分子筛层析纯化 (图 4), 重组 cI G1 在 5 kDa 左右有明显的特异性条带, 与理论分子量一致 (重组 cI G1 约 5.2 kDa), 表明重组

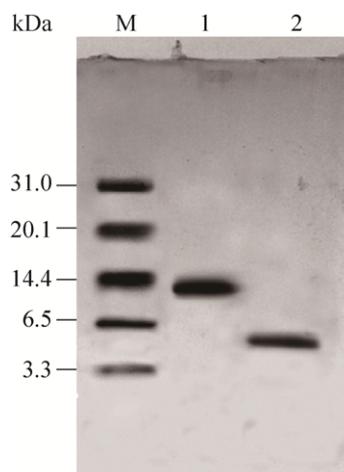


图 4 重组 cPI G1 的胰蛋白酶水解及重组 cI G1 的纯化

Fig. 4 Hydrolysis of recombinant cPI G1 by trypsin and purification of recombinant cI G1. M: ultra-low molecular weight protein marker; 1: purified recombinant cPI G1; 2: purified recombinant cI G1.

cI G1 水解成功并已经正确折叠, 蛋白回收率为 $51.9\% \pm 4.5\%$ 。

2.4 重组 cI G1 的效价

HPLC 测定相同蛋白浓度的重组人胰岛素标准品、甘舒霖 50R 和重组 cI G1, 结果显示 3 种样品的出峰时间基本一致 (图 5), 根据峰面积计算得出重组人胰岛素标准品的效价为 28.3 IU/mg, 甘舒霖 50R 的效价为 28.5 IU/mg, 重组 cI G1 的效价为 25.9 IU/mg。

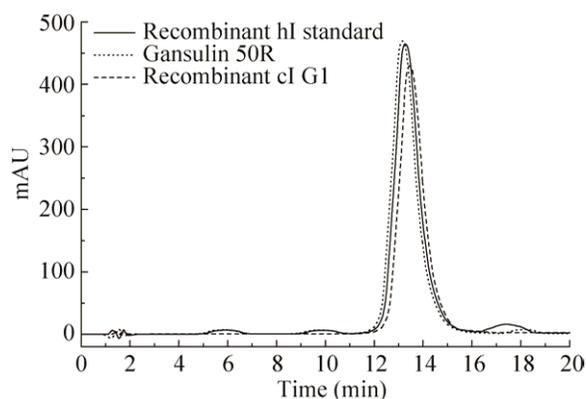


图 5 重组人胰岛素标准品、甘舒霖 50R 和重组 cI G1 的 HPLC 图谱

Fig. 5 HPLC chromatogram of recombinant human insulin standard, Gansulin 50R and recombinant cI G1.

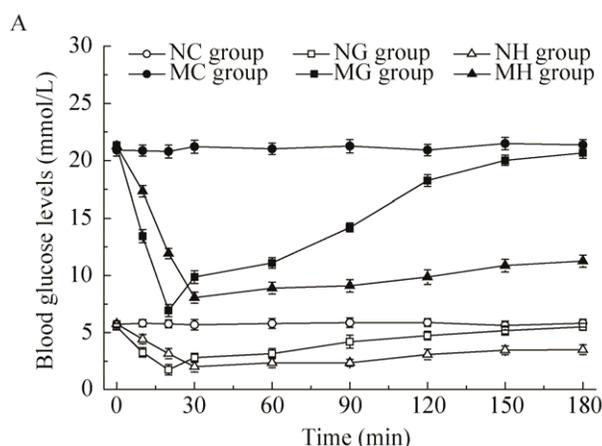
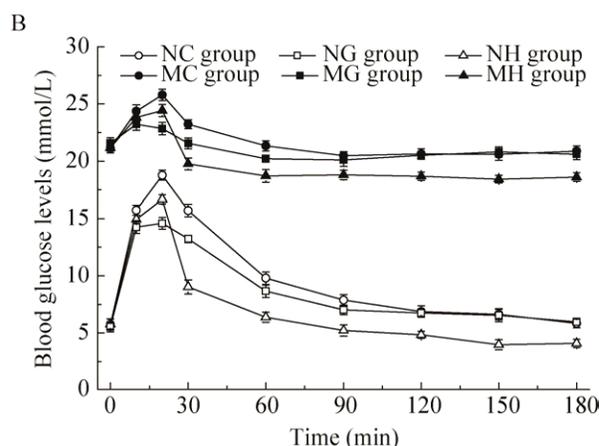


图 6 重组 cI G1 和重组 hI 对正常和糖尿病小鼠血糖的影响

Fig. 6 Effect of recombinant cI G1 and recombinant hI on blood glucose in normal and diabetic mice. (A) FBGT. (B) OGTT.

2.5 重组 cI G1 对正常和糖尿病小鼠血糖的影响

腹腔注射 STZ 的小鼠 72 h 后体重平均减轻 4.5 g, 血糖值均高于 16.7 mmol/L, 表明小鼠糖尿病模型建模成功。FBGT 结果显示, NC 组和 MC 组小鼠血糖值在 180 min 内一直保持恒定, 分别为 (5.76 ± 0.32) mmol/L 和 (21.1 ± 0.51) mmol/L; NG 组和 MG 组小鼠在注射重组 cI G1 后, 血糖值均在 20 min 时达到最低, 分别为 (1.73 ± 0.46) mmol/L 和 (6.94 ± 0.52) mmol/L, 然后随时间逐步回升, 在 150 min 后恢复到初始水平; NH 组和 MH 组小鼠在注射甘舒霖 50R 后 30 min 血糖值达到最低, 分别为 (2.03 ± 0.47) mmol/L 和 (8.07 ± 0.49) mmol/L, 随后血糖值一直控制在较低水平 (图 6A)。OGTT 结果显示, 各组小鼠在糖负荷后 20 min 时达到血糖高峰 (图 6B); 糖负荷后 NG 组和 MG 组小鼠血糖值均在 10 min 至 60 min 时间段明显降低, 在 20 min 时降低幅度最大, 分别达 (4.18 ± 0.16) mmol/L 和 (2.94 ± 0.13) mmol/L; NH 组和 MH 组小鼠均在 20 min 至 180 min 时间段降低, 在 30 min 时降低幅度最大, 分别达 (6.57 ± 0.21) mmol/L 和 (3.48 ± 0.15) mmol/L (图 6B)。



3 讨论

I 型糖尿病和 II 型糖尿病胰岛素缺乏的患者均需要胰岛素治疗,速效类胰岛素是糖尿病治疗药物研究开发的重要方向之一^[13]。本研究以单体形式存在的圆锥芋螺胰岛素 cI G1 基因设计合成了适合原核表达的重组 cPI G1 核苷酸序列,与 pET22b(+) 质粒连接后实现了重组 cPI G1 基因在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的成功表达,并通过亲和层析成功得到了重组 cPI G1 蛋白。降糖活性研究发现,重组 cI G1 具有与甘舒霖 50R 相似的降血糖功效,且发挥作用更速效,这可能由于重组 cI G1 不仅与受体的结合效率高^[5],而且短时间内单体形式存在的重组 cI G1 会比含有多聚体成分的甘舒霖 50R 具有更大的血药浓度。但重组 cI G1 作用持久性较差,其原因可能是重组 cI G1 与受体结合后迅速被胞吞^[14],血浆中胰岛素降解酶也仅切割单体胰岛素^[15],这使体内重组 cI G1 水平迅速降低而不能持久发挥作用,而甘舒霖 50R 中多聚体胰岛素的解聚过程可延长作用时间。制备的重组 cI G1 的效价较甘舒霖 50R 略低,从降糖活性的总体效果来看重组 cI G1 也不如甘舒霖 50R,其可能有如下方面原因:1) 为符合重组 cI G1 表达的要求,在设计过程中替换了部分非编码和影响酶切的氨基酸,分子结构和长度的改变可能影响其生物学活性。2) 原核表达方法简单、表达量高,但表达环境不利于蛋白二硫键的形成,且缺乏翻译后加工修饰体系^[16],尽管采用低浓度的 β -巯基乙醇促进重组 cI G1 空间构象的形成,仍达不到真核表达系统的效果。此外,与正常小鼠相比,重组 cI G1 和甘舒霖 50R 均对糖尿病模型小鼠血糖的调节更有力,这可能是由于正常小鼠对自身血糖的调节能力比糖尿病模型小鼠更强的原因。综上所述,采用生物工程方法可制备具有明确降血糖活性的重组 cI G1。然而重组 cI G1 在制备和储存时的稳定性、应用时的免疫原性以

及产生胰岛素抵抗效应等方面问题,还需要更加深入的研究。

REFERENCES

- [1] Lu P, Shen L. Thirty years of experience with recombinant human insulin—from familiarity to reliance. *Chin J Diabetes*, 2018, 26(1): 84–88 (in Chinese).
鲁平,沈丽.重组人胰岛素 30 载.中国糖尿病杂志,2018,26(1):84–88.
- [2] Gast K, Schüler A, Wolff M, et al. Rapid-acting and human insulins: hexamer dissociation kinetics upon dilution of the pharmaceutical formulation. *Pharm Res*, 2017, 34(11): 2270–2286.
- [3] Mbanya JC, Sandow J, Landgraf W, et al. Recombinant human insulin in global diabetes management—focus on clinical efficacy. *Eur Endocrinol*, 2017, 13(1): 21–25.
- [4] Bagchi K, Roy S. Sensitivity of water dynamics to biologically significant surfaces of monomeric insulin: role of topology and electrostatic interactions. *J Phys Chem B*, 2014, 118(14): 3805–3813.
- [5] Menting JG, Gajewiak J, MacRaild CA, et al. A minimized human insulin-receptor-binding motif revealed in a *Conus geographus* venom insulin. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23(10): 916–920.
- [6] Schagger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc*, 2006, 1(1): 16–22.
- [7] Castellanos-Serra LR, Hardy E, Ubieta R, et al. Expression and folding of an interleukin-2-proinsulin fusion protein and its conversion into insulin by a single step enzymatic removal of the C-peptide and the N-terminal fused sequence. *FEBS Lett*, 1996, 378(2): 171–176.
- [8] National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of Peoples Republic of China. Part 2. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 789–790 (in Chinese).
国家药典委员会.中华人民共和国药典.二部.北京:中国医药科技出版社,2015:789–790.
- [9] Zheng GJ, Ni L, Guo DJ. Expression of human insulin precursor in *Pichia pastoris* using GAP promoter and activity of expressed product. *Chin J Biol*, 2013, 26(12): 1753–1757, 1763 (in Chinese).

- 郑国君, 倪玲, 郭德军. 人胰岛素前体在毕赤酵母中的组成型表达及其活性. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(12): 1753–1757, 1763.
- [10] Elsayed AM, Khaled AH, Al Remawi MM, et al. Low molecular weight chitosan-insulin complexes solubilized in a mixture of self-assembled labrosol and plurol oleaque and their glucose reduction activity in rats. *Mar Drugs*, 2018, 16(1): 32–47.
- [11] Wu RS, Fan SJ, Mei Y, et al. The effect of blood sugar level after insulin skin-popping in mice. *Prog Mod Biomed*, 2012, 12(5): 852–855 (in Chinese).
吴润生, 范世锦, 梅赟, 等. 胰岛素小鼠皮下注射的降血糖作用研究. 现代生物医学进展, 2012, 12(5): 852–855.
- [12] Li N, Yang ZC, Jin JY, et al. Hypoglycemic effect of Long Hu Ren Dan on STZ-induced diabetic mice. *J Guangdong Pharm Univ*, 2018, 34(1): 69–72 (in Chinese).
- 李柠, 杨智承, 金家骅, 等. 龙虎人丹对链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠降糖作用研究. 广东药科大学学报, 2018, 34(1): 69–72.
- [13] Racsca PN, Meah Y, Ellis JJ, et al. Comparative effectiveness of rapid-acting insulins in adults with diabetes. *J Manag Care Spec Pharm*, 2017, 23(3): 291–298.
- [14] Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev*, 1998, 19(5): 608–624.
- [15] Tang WJ. Targeting insulin-degrading enzyme to treat type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(1): 24–34.
- [16] Li JD, Wang H. Strategies to improve the folding and modification of recombinant proteins: a review. *Chin J Biotech*, 2017, 33(4): 591–600 (in Chinese).
李家冬, 王弘. 重组蛋白正确折叠与修饰的提高策略. 生物工程学报, 2017, 33(4): 591–600.

(本文责编 郝丽芳)