

重组人甲状旁腺激素基因工程研究进展

宋佳欢, 李敏, 高金湖, 邬敏辰^{*} (江南大学医药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)是由甲状旁腺主细胞分泌的碱性单链多肽类激素。它主要调节脊椎动物体内钙和磷的代谢。目前, PTH 及其类似物已成为治疗骨质疏松症的首选药物。随着 PTH 基因序列的阐明, 通过基因工程手段获得高效、低毒、稳定的重组 PTH, 已成为研究热点。本文对 PTH 的结构功能、基因工程研究及临床应用问题进行综述。

关键词: 甲状旁腺激素; 骨质疏松; 基因工程

中图分类号: R977.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)02-0112-05

Research Advances in Genetic Engineering of Recombinant Human Parathyroid Hormone

SONG Jiahuan, LI Min, GAO Jinhu, WU Minchen^{*} (School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT: Parathyroid hormone (PTH) is an alkaline polypeptide hormone which is secreted by the parathyroid gland cell. It mainly regulates metabolism of calcium and phosphorus in vertebrates. Currently, PTH and its analogues have been exploited

基金项目: 江南大学国家大学生创新性实验计划(081029519)

作者简介: 宋佳欢, 女 Tel: (0510)85329042 E-mail: songjiahuan521@163.com

***通信作者:** 邬敏辰, 男, 博士, 教授 Tel: 13057202887

E-mail: bioch@163.com

into first-choice drugs for the treatment of osteoporosis. With the elucidation of PTH gene sequence, it has become a research hotspot to obtain recombinant PTH of high-efficiency, low-toxicity and stability by means of genetic engineering. Here we present an overview of structure function, genetic engineering research and clinical application of PTH.

KEY WORDS: parathyroid hormone; osteoporosis; genetic engineering

甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)是由甲状旁腺主细胞分泌的含84个氨基酸残基的直链多肽。人甲状旁腺激素(human parathyroid hormone, hPTH)可调节钙、磷代谢及骨转换,降血压,调节维生素D受体表达,促进维生素代谢,调节碱性磷酸酯酶的活性^[1]。随着PTH基因序列的阐明,人们对其结构功能以及应用研究正逐步展开,这为今后PTH的广泛应用提供了理论依据。

1 PTH的基因

PTH基因含有2个内含子和3个外显子,转录后经过剪接去掉相应的内含子,由外显子形成成熟的mRNA序列,经翻译形成前甲状旁腺素原(preproPTH)。第一内含子将mRNA的5'-非翻译区与剩余基因分开,第二内含子将多数编码前体“prepro”特定区域与编码成熟的PTH基因分开。hPTH基因中,第一内含子(3 400 bp)比鼠和牛的要大得多。这三个物种中第二内含子大约都为100 bp。哺乳动物的PTH基因同源性很高,其中hPTH基因序列近85%与牛相同,75%与鼠相同。但三者3'-非编码区同源性不高。人和牛PTH基因都含有2个功能性TATA转录起始位点,鼠仅有1个。这两个功能性TATA序列指导hPTH基因分别在正常的甲状旁腺细胞和甲状旁腺瘤细胞中合成hPTH转录子^[2]。

2 PTH的结构功能

1978年Keutmann等^[3]报道了hPTH的一级结构,指出hPTH是由84个氨基酸残基组成的一条多肽链分子,分子中不含半胱氨酸,故没有二硫键结构。

最初合成的产物是含115个氨基酸残基的preproPTH,经过两步切掉含31个氨基酸残基的信号肽得到成熟的PTH。第一步在粗面内质网内去掉N-端25个氨基酸残基(即pre部分),转变成甲状旁腺素原(proPTH);第二步在分泌过程中,在高尔基体内去掉N-端1个六肽(即pro部分),形成成熟的PTH^[4]。PTH的N-端1~34氨基酸残基几乎保留了完整PTH的全部生物学活性,其中N-端1~28氨基酸残基是维持生物学活性的最小单位^[5]。切除此截短多肽的N-端或C-端氨基酸残基,都会造成活性的减弱或丧失。PTH可在甲状旁腺细胞或者循环系统中被进一步切割成无活性片段。

PTH的N-端含有2个 α -螺旋,分别由第3~9氨基酸残基和第17~28氨基酸残基组成,构成两个相对独立的结构域。谷氨酸(Glu4)和精氨酸(Arg20)之间形成盐键,连接这两个结构域,盐键的破坏会导致结构域构象的变化,从而导致激素活性完全丧失。这两个螺旋所组成的结构,可参与受体结合,致使胞内cAMP合成增加,与骨的分解代谢有关。位于第30~34的氨基酸残基,参与刺激DNA的合成和软骨细胞与破骨细胞的增殖,这一功能的信号传导途径可能不依赖于cAMP。在与受体的结合过程中,这两个结构域相互作用。PTH分子的69~84区域为开环结构,围绕在53~67区域内一系列邻近转角形成的核的外周;而且,69~84区域两端关键的氨基酸残基在哺乳动物(人、牛、猪及大鼠)的PTH中完全保守;由14个连续的疏水氨基酸和分别处于子域两端的两个亲水氨基酸,组成C-端典型的疏水子域三级结构^[6]。PTH中段及羧基端构成了使细胞产生分裂及分化作用的结构域。另外,一些学者认为PTH的中段和羧基端在PTH的分泌加工过程中起重要作用。

3 PTH的基因工程研究

1925年Collip用酸水解法从牛甲状旁腺组织中分离出PTH,其后一些学者又从人、猪等生物体甲状旁腺组织提取出PTH。这种传统的方法提取效率和产量极低,限制了PTH的应用研究。据资料^[7]记载,从欧洲及北美许多医院手术切除累积的500 g甲状旁腺肿瘤组织中才能获得3.2 mg PTH。生物工程技术的兴起和发展为生物大分子在体外表达提供了可行依据,而PTH基因序列的阐明也为建立体外高效表达体系奠定了基础。

3.1 PTH基因的改造

PTH类似物包括PTH重组体、PTH突变体和PTH融合蛋白^[8]。无论是通过改造PTH自身基因序列以增强或改善生物学活性,还是在PTH基因两端连接其他基因以提高外源表达效率、提高蛋白稳定性或简化纯化步骤,研究者们利用各种生物技术手段,从诸多方面展开对于PTH的研究。

3.1.1 PTH重组体 第一种用于临床治疗骨质疏松症的hPTH的类似物是重组体rhPTH(1-34),它与

天然hPTH氨基末端34个氨基酸序列结构完全相同,能够增加骨量及改善骨微结构,降低骨折风险。已于2002年经FDA批准上市,商品名为Forteo(特立帕肽)。

Wang等^[9]在hPTH(1-34)的N末端延伸2个脯氨酸(Pro),获得的类似物Pro-Pro-hPTH(1-34),并显示了与hPTH(1-34)近似相等的生理活性与药理作用,而可切割Pro-Pro的二肽酶IV(DPP IV)能在体内迅速在N末端将其切除。由此可推测Pro-Pro-hPTH(1-34)是作为前体药物,在体内最终以hPTH(1-34)发挥其成骨作用的。

Feng等^[10]设计了hPTH(1-34)的类似物Pro-Pro-[Arg¹¹]hPTH(1-34)-Pro-Pro-Asp(hPTH'),该设计兼顾到保持hPTH(1-34)最大活性和便于纯化,将hPTH(1-34)的11位Leu替换为Arg,以改变分子的等电点;为保证在体内不被蛋白酶水解,在hPTH(1-34)的C端延伸Pro-Pro;为增强表达,他们还在C端Pro-Pro后引入Asp,将这一单体基因进行首尾串联重复形成多联体,在大肠杆菌中表达后,再经过酶解得到单体分子。研究表明,与hPTH相比,hPTH'也可以增加骨小梁的骨矿物质密度。在促进卵巢切除小鼠的骨形成和改善骨结构方面,尤其在中剂量和高剂量研究组,hPTH'显示了更好的疗效。

3.1.2 PTH突变体 为增加PTH生物学活性,Reidhaar-Olson等^[11]曾通过定点突变构建了55个hPTH(1-34)单一位点突变体。最终发现活性最高的突变体在分子上有6处发生突变(KS13, ES19, VQ21, ES22, KQ27和DN30),其活性比亲本分子高15倍。他们还发现序列中同一位点的突变体生物学效应依赖位于8位和18位是何种氨基酸。

下一代第一个已进入II期临床实验的新颖小分子PTH类似物是Zelos公司的Ostabolin-C([Leu²⁷]cyclo[Glu²²-Lys²⁶]hPTH-(1-31)NH₂),由hPTH-(1-31)NH₂开发而来^[12]。在 α -螺旋的疏水面第27位极性Lys被非极性Leu替代,两性受体结合螺旋由22位Glu和26位Lys之间的内酰胺键稳定。临床前研究表明,Ostabolin-C有效刺激腺苷酸环化酶的活性是Ostabolin的6倍,它能够更好地刺激骨小梁增长,但在治疗骨肿瘤应用中受到限制。

3.1.3 PTH融合蛋白 采用融合蛋白策略主要是提高目的蛋白的产量、改善目的蛋白的稳定性、提高蛋白药物在体内的滞留时间等。

张豪等^[13]利用重叠PCR技术构建了甲状旁腺激素和人转铁蛋白N-端半分子(TFN)的融合蛋白。Western blot分析、铁饱和实验及腺苷酸环化酶实验证明融合蛋白中的PTH具有与抗体结合能力及刺激腺苷酸环化酶活性,同时融合蛋白中的TFN具有铁饱和特性。因而TFN可望作为PTH的天然运输载体,形成具有靶向功能的蛋白复合体。

Guo等^[14]为改进纯化方法,将硫氧还蛋白(Trx)基因与hPTH(1-84)基因融合,在二者之间插入肠激酶酶切位点,通过热渗压休克纯化方式处理热稳定蛋白,结果Trx-hPTH(1-84)的纯度达73%,产量达72%。

王俊等^[15]利用基因工程手段构建了hPTH(1-84)-HSA,即将hPTH(1-84)的C-端与人血清白蛋白(HSA)的N-端融合,中间无连接肽。这一方法改变了PTH的药动学和药代学的特性,大幅度提高了相对分子量,显著延长了体内半衰期,同时还可抑制相应的免疫清除等。酶标法测定发酵上清中融合蛋白的PTH活性为318 IU·mL⁻¹。

陈静等^[16]构建了HSA-PTH(1-34)融合基因,即将HSA的C-端与hPTH(1-34)的N-端融合,转入毕赤酵母中表达。结果显示,重组毕赤酵母分泌HSA-PTH(1-34)的表达量可达400 mg·L⁻¹;目的蛋白可与抗HSA多抗、抗PTH(1-34)多抗有良好的特异性杂交反应;可激活腺苷酸环化酶,但活性低于PTH(1-34)标准品。

3.2 表达宿主的选择

3.2.1 原核表达体系 1987年Born等^[17]将prepro PTH基因导入大肠杆菌中表达,发现prepro序列不能提高PTH的分泌表达,可能是由于原核生物不能识别真核生物的prepro序列。

1988年Rabbani等^[18]利用大肠杆菌lac启动子表达人工合成的PTH基因,得到具免疫活性的PTH,但产量不高于500 μ g·L⁻¹。

1995年Paulsen等^[19]报道以最有效的细菌表达体系产生[Pro⁻¹]-hPTH(1-84)融合蛋白,经过酸水解获得hPTH。另一种策略是1994年Oshika等^[20]在大肠杆菌T7启动子的控制下表达人工合成hPTH基因,获得N-端序列完全正确的PTH,但产量很低。

2005年李健峰等^[21]从采用大肠杆菌偏爱密码子和二级结构优化角度设计并合成了PTH1-34基因序列,将PTH1-34蛋白分子与具有亲和纯化

特性的硫氧还蛋白进行融合,结果使Thioredoxin-PTH1-34融合蛋白在大肠杆菌中高效和可溶性表达。最后获得了纯度大于95%的hPTH1-34,hPTH1-34肽N-端测序和质谱分子量与天然PTH1-34一致。研究发现,hPTH1-34在体外具有刺激腺苷酸环化酶的作用。

3.2.2 真核表达体系 目前,毕赤酵母表达系统被认为是目前最有效的酵母表达系统,因此采用作为真核表达载体已受越来越多的关注。

1987年Born等^[22]在利用大肠杆菌表达不理想后,又将目光转向酵母,然而天然蛋白质在酵母细胞中表达很不稳定,另外一个问题是酵母细胞不易破碎,因此,preproPTH基因在酵母中表达产量与大肠杆菌体系相比并无明显提高。

1990年Gabrielsen^[23]等根据富含氨基酸的培养基和蛋白酶缺陷型宿主菌啤酒酵母表达系统,将酵母交配因子 α (MF α)与hPTH进行融合表达,并利用分子内潜在的KEX2识别位点切除MF α 后,获得具有生物学活性的完整的hPTH。

2004年Vad等^[24]构建了高效表达hPTH的巴斯德毕赤酵母菌株,以10 mmol·L⁻¹ EDTA的培养基添加物,与啤酒酵母蛋白质二硫化物异构酶(ScPDI)以共表达方式提高hPTH的表达量,产量达300 mg·L⁻¹。

4 PTH的临床应用问题

PTH类制剂可分为两代,第一代包括天然PTH、PTH(1-34)片段及PTH(1-38)片段,但尚无标准治疗方案;第二代是微小PTH片段,有望口服给药,某些微小PTH片段能有效刺激骨形成,促进骨吸收作用弱,具有较好的潜力。

PTH类药物是目前最有前途的骨形成促进剂,主要用于原发性骨质疏松症的防治。PTH治疗绝经后骨质疏松症的临床研究已开展35年余,能增加骨质量和骨强度,该药作为骨合成药物,为骨质疏松症患者的治疗提供了一种新选择。现已有化学合成和基因工程重组的PTH及其类似物作为治疗骨质疏松症的药物上市。

目前,骨质疏松症的病因和发病机制尚不完全明了,动物模型亦不能完全模拟病人骨质疏松症的情况,因此动物实验的药效结果只能作为参考。临床上应用该药后血中PTH浓度突然增高对患者全身的影响,以及对患者自身的PTH分泌的影响也有待进一步研究和观察^[25]。

另外,由于PTH类药物治疗骨质疏松症需要长期皮下注射,不方便治疗,据报道已有许多研究人员在研发可口服的钙敏感受体拮抗剂,能短暂地刺激甲状旁腺分泌内源性PTH,这也将是一种前景可观的抗骨质疏松药物。

REFERENCES

- [1] ZHANG Y, LI C W, ZHAO D H. The advances in study of structure-function relationship of human parathyroid hormone [J]. Lett Biotechnol (生物技术通讯), 2001, 12(3): 24-26.
- [2] SILVER J, NAVEH-MANY T, KRONENBERG H M. Principles of Bone Biology [M]. 2nd ed. San Diego: John P. Bilezikian, Lawrence Gideon Raisz, Gideon A Rodan, 2002: 407-408.
- [3] KEUTMANN H T, SAUERMM, HENDY G N, et al. Complete amino acid sequence of human parathyroid hormone [J]. Biochemistry, 1978, 17(26): 5723-5729.
- [4] CHEN J Y, CHEN X Y, SUN Z Y, et al. Expression and purification of recombinant human parathyroid hormone (1-34) in E. coli [J]. J Nanjing Univ(南京大学学报), 2004, 40(1): 58-65.
- [5] WHITFIELD J F, MORLEY P, WILLICK G E, et al. Lactam formation increases receptor binding, adenylyl cyclase stimulation and bone growth stimulation by human parathyroid hormone (hPTH)(1-28)NH₂ [J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(5): 964-970.
- [6] XIAO Y R, LIU J J. Studies on physiological function and structure-activity relationship of parathyroid hormone [J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2003, 27(4): 206-209.
- [7] LIU G A, TANG J G. Research on human parathyroid hormone [J]. Lett Biotechnol(生物技术通讯), 1998, 9(2): 145-148.
- [8] ZHANG M, WU M C, JIN J. Research advances of fusion protein of parathyroid hormone [J]. Lett Biotechnol (生物技术通报), 2009, (3): 25-28.
- [9] WANG C X, LIU J J, XIAO Y R, et al. Study on preparation and activity of a novel recombinant human parathyroid hormone (1-34) analog with N-terminal Pro-Pro extension [J]. Regul Pept, 2006, 141(1/3): 35-43.
- [10] FENG J, LIU Y H, XING Y, et al. A novel human parathyroid hormone (1-34) analog for the treatment of osteoporosis [J]. Peptides, 2009, 30(6): 1173-1180.
- [11] REIDHAAR-OLSON J F, DAVIS R M, DE SOUZA-HART J A, et al. Active variants of human parathyroid hormone (1-34) with multiple amino acid substitutions [J]. Mol Cell Endocrinol, 2000, 160(1/2): 135-147.
- [12] MORLEY P, WHITFIELD J F, WILLICK G E, et al. Parathyroid hormone: an anabolic treatment for osteoporosis [J]. Curr Pharm Des, 2001, 7(8): 671-687.
- [13] ZHANG H, LI X J, WANG D J, et al. Expression of fusion protein of parathyroid hormone and transferrin N-terminal half-molecule in Pichia pastoris [J]. Chin J Biotechnol(生物工程学报), 2005, 21(5): 804-808.
- [14] GUO Q R, WEI D Z, TONG W Y. Partial purification of human parathyroid hormone 1-84 as a thioredoxin fusion form in recombinant Escherichia coli by thermosmotic shock [J]. Protein Expr Purif, 2006, 49(1): 32-38.
- [15] WANG J, SHEN W, RAO Z M, et al. Secretory expression of the fusion protein PTH-HSA in Pichia pastoris [J]. J Chin

- Biotechnol(中国生物工程杂志), 2007, 27 (2): 14-18.
- [16] CHEN J, SUN H Y, YANG Y, et al. Construction, expression and characterization of recombinant fusion protein HSA-PTH (1-34) in *Pichia pastoris* [J]. J Zhejiang Univ: Med Sci(浙江大学学报: 医学版), 2008, 37(2): 127-133.
- [17] BORN W, FREEMAN M, HENDY G N, et al. Human preproparathyroid hormone synthesized in *Escherichia coli* is transported to the surface of the bacterial inner membrane but not processed to the mature hormone [J]. Mol Endocrinol. 1987, 1(1): 5-14.
- [18] RABBANI S A, YASUDA T, BENNETT H P, et al. Recombinant human parathyroid hormone synthesized in *Escherichia coli*, purification and characterization [J]. J Biol Chem, 1988, 263(3): 1307-1313.
- [19] PAULSEN J, OCHS D, HARDER M, et al. Large-scale preparation and biological activity of recombinant human parathyroid hormone [J]. J Biotechnol, 1995, 39(2): 129-136.
- [20] OSHIKA Y, YAMADA T, NAKAGAWA S, et al. Human parathyroid hormone: efficient synthesis in *Escherichia coli* using a synthetic gene, purification and characterization [J]. Int J Pept Protein Res, 1994, 43(5): 441-447.
- [21] LI J F, XIAO H J, JI Q Y, et al. Expression and purification of human parathyroid hormone peptide (1-34) in *Escherichia coli* [J]. J Chin Biotechnol(中国生物工程杂志), 2006, 26(3): 26-30.
- [22] BORN W, FREEMAN M, BORNSTEIN W, et al. Signal sequence of human preproparathyroid hormone is inactive in yeast [J]. J Bone Miner Res, 1987, 2(4): 353-360.
- [23] GABRIELSEN O S, REPPE S, SAETHER O, et al. Efficient secretion of human parathyroid hormone by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Gene, 1990, 90(2): 255-262.
- [24] VAD R, NAFSTAD E, DAHL L A, et al. Engineering of a *Pichia pastoris* expression system for secretion of high amounts of intact human parathyroid hormone [J]. J Biotechnol, 2005, 116(3): 251-260.
- [25] WU H. Progress on treatment of osteoporosis with recombinant human parathyroid hormones [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2006, 25(4): 302-306.

收稿日期: 2010-06-30