

# Proinsulin

徐千田

因爲今年沒有時間在生化學的課程中，講授關於胰腺內分泌和糖尿病的問題，暫且借用綠杏的園地，來介紹有關 Insulin 在生體內合成的研究近況，以補充生化內分泌的課程：

Insulin 由胰腺 Langerhans 島內的細胞合成。其化學構造，美國 Sanger 氏決定係由 A 鎖 B 鎖的結合，其胺基酸的排列，也由他以特殊的方法決定。因爲此項方法，對於近代蛋白質的構造、研究、寄與很大的希望，所以 Sanger 氏，獲得了 Nobel 獎金，這是大家所知道之事。

雖然 Insulin 的 A 鎖、B 鎖到底是以什麼順序來合成的呢？向來不太明白。不過總而言之，研究家們所提出的推想，大略可以分爲下列三種：

(1)由 oligopeptide 的聚合。(Vaughan and Antisen 於 1954 年的提議)

(2)獨立性地生成了 A 鎖和 B 鎖，然後再以 A 鎖和 B 鎖連結起來。(1965 年 Humbel 的提議)

(3)首先由已含有 A 鎖和 B 鎖的單列之 polypeptide 合成，作爲 Insulin 的前階段物質 (Precursor) (1961 年 Givol 等所提議)

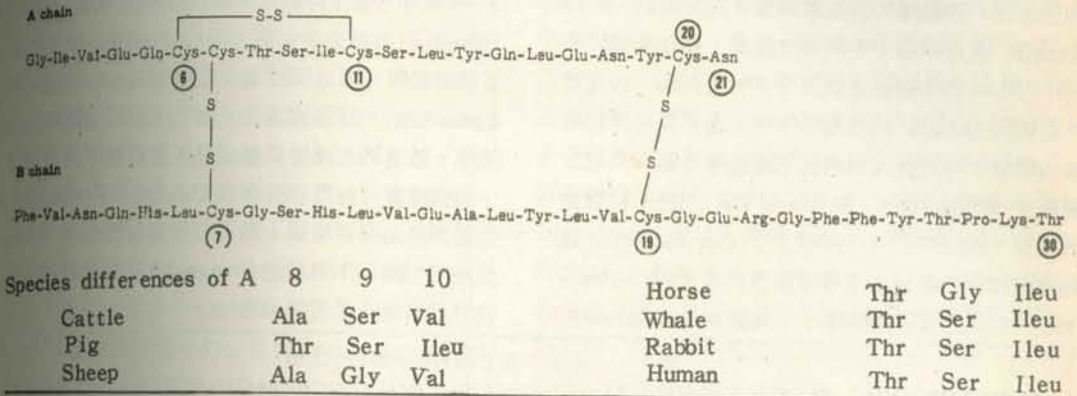
第(1)的方法，如果 Glutathion (Tripeptide 的合成)可以代表的話，那麼很大的蛋白質由這些 oligopeptide 的聚合而慢慢構成，勢需幾個酵素的參與，根本就太繁雜了。況在生體內要發生此種效力不高的方法，似不可能。就像細胞核之 Structural gene 的 DNA strand 的複本之 mRNA 板型內之 Trinucleotide codons 的線型排列爲一個模樣，蛋白質的 Polypeptide Chain，是逐步在綫狀排列中構成出來的，他已成爲決定的事實。以 Insulin 的人工化學合成的過程，及以 Dintzis 用於 Hemoglobin Chain 的生體內合成的研究方法證明 Angler fish 的胰島腺中的 Insulin 生體合成，是 A-Chain·B-Chain 同時在不同的 ribosomal 單位中進行，以後兩者再連接而成的，誠如 1965 年由 Humbel 證明這是事實。如果上面所說的蛋白質合成的現代觀念是確實的話，那麼，不得不想到 A-Chain 與 B-Chain 可能是獨立性在生體內進行合成的，但它們的有效連接情報或指示，一定是由 Polypeptide Chain 的原定構造而得來的。(Katsuyamis and Tometsko 1966)。Proinsulin 的發現動機，是由 Steiner 等的實驗而得來的。他們把

三個胰腺 Langerhans 氏島腺腫患者之腺腫組織切片，和放射性胺基酸  $^3\text{H}$ -leucine 或  $^3\text{H}$ -Phenylalanine 一起 incubate，然後用酸酒精抽出，再將抽出物以 Sephadex G-50 的 Column 作 gel 過濾，獲得了 a、b、c 三個 peak。a 分子量最大，是種種蛋白質的混合物。分子量最小的 c，決定爲純粹的放射性 Insulin，比 insulin 分子量大的 peak b 與 Insulin 抗體有相當的反應性，但這個物質假使將 -ss- 結合切斷的話，也不像 Insulin 那樣會發生 A Chain 或 B Chain。不過，一旦起了微弱的 Trypsin 作用，就可以變爲與 Insulin 相等的分子量，而且在這個時候，倘把 -ss- 結合切斷，就可能發生 A 鎖或 B 鎖了。如以強力的 Trypsin 來消化 peak b 的時候，又可能發生與 Insulin B 鎖 C-末端 B<sub>23-29</sub> 的 heptapeptide，由此觀之，peak b 就是與 Insulin 一樣，phenylalanine 爲 N 末端的單一列性胺基酸連接，可能爲 Insulin 的前驅物質。衆所週知，Insulin 的構造中的 -ss- 結合，對生理作用是非常重要的，如果 Insulin 以 cysteine 或還元性之 glutathione。把鎖間的 -ss- 結合切斷，那麼，Insulin 便立即失去其生理作用，而不能回復了。可是一旦 -ss- 結合被切斷而發生的 A-chain, B-chain 之混合物，則可能發生立體構造的大變化，亦可能以非特異的結合而構成複雜的一種重合體，正像 Ribonuclease 或 chymotrypsinogen 那樣單一連鎖 Peptide 的場合。假如鎖內的 -ss- 結合被切斷，也還可能復元，但因 activating chymotrypsinogen 分爲 3-Chain，以 Chymotrypsin 或 ribonuclease Polypeptide Chain，以選擇性化學分解之後，Polypeptide Chain 便分解而發生多數的 Chain，或立即分解而隨便重合，那時，disulfide-sulfhydryde 的交換，容易發生與 Insulin 同軌。即在 proinsulin 也是一樣的。如果單一連鎖 polypeptide 的 peak b 在 8N 尿素中還元以後，以弱鹼氧化時，還有 60-70% 的高率，可以回復其免疫學的活性。但在同一條件之下，Insulin 的復元率，僅存 1-2% 而已。

由於上述的觀察，可以推測結論，peak b 的物質，爲 Proinsulin，而像 Chymotrypsinogen 或 ribonuclease 一樣，是單一連鎖性的 Polypeptide 了。

■ Proinsulin 的化學構造 ■

要讀 Proinsulin 的化學構造之前，要先介紹 Insulin 的化學構造，大家都知道，Sanger 的報告是這樣的：



圖(1)為最近 Chance 等的報告，關於豬的 Proinsulin 之胺基酸配列，由 84 個胺基酸構成的單一一系列的胺基酸連鎖的分子量為 9000。從上面的記載，已可明白，Insulin 是由 A B 2 基之胺基酸連鎖，而由 -s s- 結合後再連結的。A 鎖 21，B 鎖 30 的分子量為 6000，所以豬的 Proinsulin 比它的 insulin 多 33 個胺基酸。Proinsulin 的 N 末端胺基酸是 Phenylalanin 所連結下來的，就是 30 個胺基酸為 Insulin 的 B 鎖，他方 Proinsulin 的 C 末端的

21 個胺基酸的配列，與 Insulin 的 A 鎖完全相同。換言之，豬的 Proinsulin，是由 Insulin 的 B 鎖開始，接過來就是 33 個的 Insulin 分子裏面所沒有的胺基酸。所謂 C - Peptide ( Connecting Peptide ) 係安插在中間再與 Insulin 的 A 鎖連結，而 A 鎖的 C 末端，則以 Asparagin 為終止。連結 Insulin A、B 鎖的 2 個鎖間的 -s s- 結合，與在 A 鎖的鎖間的一 s s- 結合已存在於 Proinsulin。因為 Proinsulin 是單一鎖的 Polypeptide，所以 3 個 -s s- 的結合

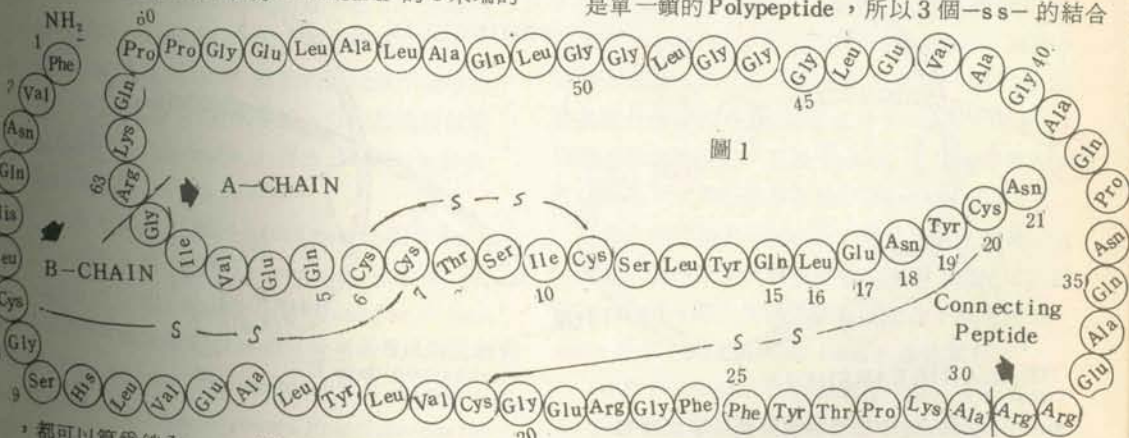


圖 1

，都可以算為鎖內 -s s- 的結合。圖(2)為 Steiner 等最近發展的牛的 Proinsulin，與前述豬的 proinsulin 一樣，同為單一連鎖的 Polypeptide。可是胺

基酸只有 81 個，比豬少了三個，為其明顯的發現。蓋因 Insulin 的 A 鎖和 B 鎖的胺基酸數，牛豬都是一樣的總共 51 個，至於所少的 3 個，是介於 A 鎖

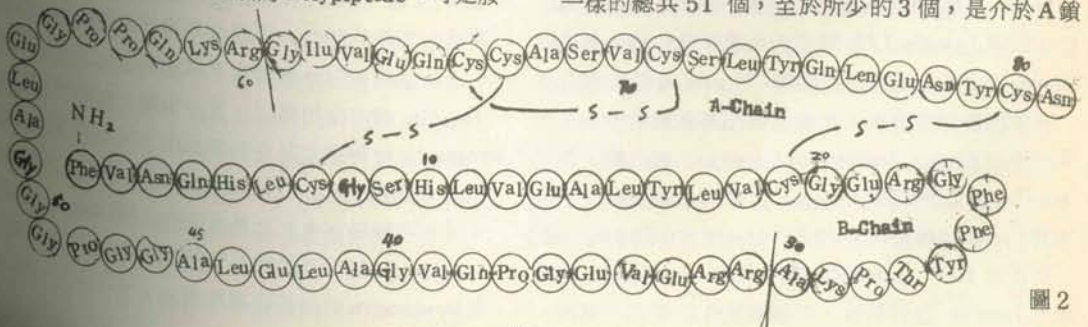


圖 2

## 綠杏16期

與B鎖之間的C-Peptide的胺基酸。再由圖(3)可見牛與豬的Proinsulin的比較，不但是牛比豬少了三個胺基酸，而對應的胺基酸則有8處的差異，即以Insulin本身來說，牛與豬的差異，只在A鎖的8, 9, 10, 的3個胺基酸而已，一般而論，各種哺乳動物的Insulin的胺基酸配列，在各種之間都非常類似，特別是人類與豬的胺基酸差異，只有B鎖最末端的第30個，即Ala與Thr而已。但種族的差異，則很明顯地只局限在C-Peptide部份，這是應該注意的事實。這種種族差異甚大的C-Peptide，則有其共通的幾點；一為構成C-Peptide的

胺基酸，均為構成Insulin的，換言之，即C-Peptide內沒有Insulin分子內沒有的胺基酸。(例如Insulin中沒有Tryptophane, Methionine, Proinsulin內也沒有)。第二為C-Peptide中沒有芳香族胺基酸。第3個特徵是在兩端有Arg-Arg, 和Lys-Arg, 就是鹽基性(鹼性)的胺基酸的二個連法，各自與B鎖的C末端及A鎖的N末端相連接。這個特徵可以表示這些是Insulin由Proinsulin將要游離出來的時候，酵素可作用的特殊地方，而且也可以暗示牛與豬的Proinsulin的分解酵素(蛋白分解酵素)是可能共通的。

圖3 豬與牛的Polypeptide的比較

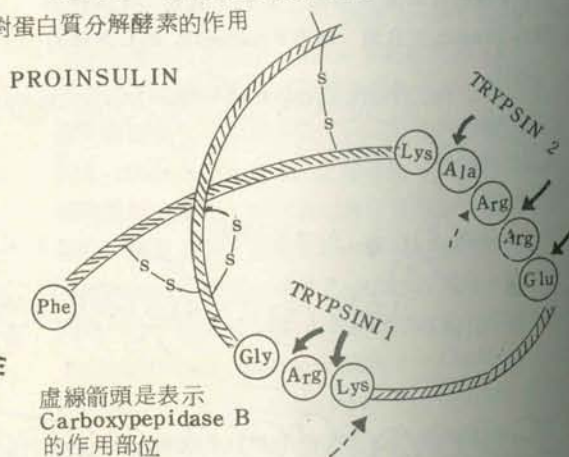
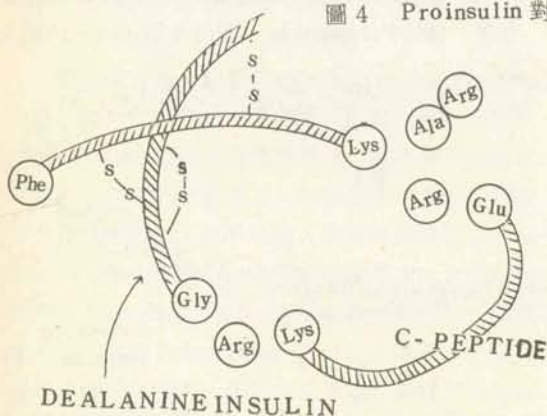
PORCINE: NH<sub>2</sub>-B-Arg-Arg-Glu-Ala-Gln-Asn-Pro-Gln-Ala-Gly-Ala-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-  
BOVINE: NH<sub>2</sub>-B-Arg-Arg-Glu-Val-Glu-Gly-Pro-Gln-Val-Gly-Ala-Leu-Glu-Leu-Ala-Gly-

### ■ Proinsulin 的分解 ■

Proinsulin以Trypsin水解時，首先與A鎖連結部份的Arg-Gly的結合可被切斷，其次就是發生B鎖C末端的Alanine所脫去的Insulin(Dealanineinsulin)(圖4)，可能有相當明顯的血糖下降作用。而Trypsin則可能作用於Lysine及Argin-

ine的Carboxyl端，所以Trypsin及其類似的酵素，可能將A鎖的N末端部份切斷(圖4)，但如上述(圖4)同時也可能將B鎖的C末端的alanine脫掉。所以這一部份的切斷，應用Carboxypeptidase B，那樣的酵素較為妥當。

圖4 Proinsulin對蛋白質分解酵素的作用



### ■ Proinsulin 的生物學活性與免疫學反應 ■

Proinsulin的生物學的活性是非常的低。譬如1mg沒有滲雜Insulin的豬的Proinsulin的純品，用Mouse的痙攣法來測定的結果，只有3個國際單位，即有Insulin 1/8程度的血糖下降作用。然In Vitro的作用，其在脂肪組織C<sup>14</sup> glucose的氧化和橫隔膜糖原合成，所促進最小有效量的作用，與對照的Single component insulin來比較，則insulin為4.2 × 10<sup>-9</sup> Molar (0.025 μg/ml)；豬的Proinsulin為2.1 × 10<sup>-8</sup> Molar (0.184 μg/ml)，兩者有10<sup>-1</sup> order的差異。然在Proinsulin所發的Insulin樣的活性，可被廣泛性的蛋白分解抑

制因子Kunitz Pancreatic Trypsin Inhibitor(KPTI)顯着地抑制可是KPTI卻不會抑制insulin的in vitro的作用。因此可推測Proinsulin本沒有生物學的活性，不過倘與這些組織接觸的時候，由於某種蛋白分解酵素系來的活性化，而發現了Insulin般的作用而已。另一方面，如果以碘化的proinsulin作靜脈注射在動物血中，又不能證明有碘化的insulin發生。所以Proinsulin轉換為insulin，並不在循環血中，而是可能在末梢組織。然在insulin分解部位的肝及腎所抽出的抽出物，又沒有Proinsulin的活性化學作用。

Proinsulin 與 insulin 的抗體，可呈相當的反應。若以免疫學的測定法與標準的 insulin 作比較時，牛的 Proinsulin 為 8—12 單位/mg，豬的 Proinsulin 為 6 單位/mg，可是 Proinsulin 的抗體，則有顯著的種族特异性，與同一動物的 Proinsulin 可能有相當的反應，但對異族動物的 Proinsulin，或不管同一種族或異族動物的 insulin 反應，則是非常的低。故這種很高的種族特异性，可能因 C-Peptide 的胺基酸種類的差異，或立體構造上的差異所得來的，亦即 Proinsulin 抗體與 insulin 的交叉免疫反應，可能是 Proinsulin 製品中混有 insulin，或被免疫動物體中的少部份 Proinsulin 轉變為 Insulin 之故。相反地，Insulin 的製品中，也可能含有少量的 Proinsulin。

■ 胰腺中 Proinsulin 生成與 Insulin 生成的關係：  
Steiner 等把 Collagenase 處理的老鼠，作游離 Langerhans 氏島 (isolated islets) 的試驗，以研究放射性的胺基酸移行於酸 alcohol 抽出物中的速度是：在短期間內的 incubation，其放射能主要攝取在 Peak b (Proinsulin)，而 insulin 的劃分內攝取為起初很少以後慢慢增加，應用此種的觀察法，可以看出 Proinsulin 的合成，在 25 分鐘內是相當的旺盛，Insulin 在 60 分鐘時僅僅開始，以後隨着時間的進度 Peak c 的放射能也漸漸地增加。這正表示 Insulin 的生成增加，可以推論放射胺基酸是先攝取於 Proinsulin，再由 Proinsulin 的合成開始而轉變為 Insulin 的過程。

Grand 和 Reid 以鬚的 Bruckman 小體作 insulin 生合成的研究，認為 Puromycin 可能阻礙 Proinsulin 的合成，但不能阻礙 Proinsulin 向 insulin 的轉變。相反地 Serine 為活性基的 Trypsin 等酵素的 Stoichiometric inhibitor NE P (O-ethyl O-P-Nitrophenylphenyl Propylphosphate) 與 Proinsulin 合成無關，但阻礙 Proinsulin 轉變的却為 insulin。

#### ■ 血中 Proinsulin ■

Proinsulin 不但藏在 Langerhans 氏島，可能一部份以原形出現於血中，有人報告，曾在血與尿中檢查出 Proinsulin。他是以正常人的血漿或尿的酸 alcohol 的抽出物，作 Gel 過濾後，可以得到與 insulin 抗體有反應的 2 個 Peak。這些 Peak 與 Insulin Proinsulin 的標準 gel 過濾像相比較：分子量小的，與 insulin 是一致；分子量大的，與 Proinsulin 也是一致。再以分子量大的部份使用人類

標準的 insulin 的免疫學測驗法，證明有 Insulin Peak 的 5—20% 的生物學活性。以上的發現，是 Rubenstein-Steiner 得來的。最近 Rath 提倡血中有 "big insulin" 之說。Roth 是將血漿直接作 Sephadex G 50 Column 的 gel 過濾後，用 Insulin 的免疫學測定法，證明 Insulin 以外尚有比 Insulin 分子量更大的 Peak，他們名之為 "Big insulin" 而普通的 insulin 他們則稱之為 "little insulin"。big insulin 的分子量為 8000—9000。雖然 Rath 和 Steiner 都說，big insulin 可能就是 Proinsulin 但兩者之間，只知道都與 insulin 抗體有交叉的免疫反應，而且分子量都比 insulin 大的事實，但兩者之間的關係，尚不太明白。

#### ■ 結 語 ■

用人類的 B-cell adenoma 與老鼠胰腺單離作 Langerhans 氏島實驗證明：insulin 是以單一連鎖 Polypeptide 的前驅物質所合成，在細胞內受蛋白質的分解酵素作用，游離 insulin 之後，由 B 細胞分泌出來，故 Insulin 的前驅物質 Proinsulin 是以 B Chain 在 N 末端開始，以 C-Peptide (約 30 胺基酸) 連結過來，以 A Chain 為終結的。其在島內的 Proinsulin 比 insulin 只在 5% 以下。而坊間的結晶性 insulin 則含有 2% 的 Proinsulin。與豬牛的 Proinsulin 中之 C-Peptide，33 中只有 22 的胺基酸是相等的，Insulin 本身 55 個中，則有 49 個胺基酸是相等的。至於 Insulin 的種族特异性，可以說是，大部份是存在於 C-Peptide 之中。

完全還原的 Proinsulin 自然地再氧化之後，可以回復自然的原性質與免疫學的反應，因此可以知道 Proinsulin 在生物體內存在的意義，是便於 insulin 分子中的 disulfide bond 的產生順利。

雖然 Proinsulin 的生物學的作用，只有 insulin 的 5% 以下，免疫學的測定 Proinsulin 和中間型，有 insulin 的 40—50% 力價，但現在已經證明 Proinsulin 存在於血液中，可以搗亂血中 insulin 的免疫學的準確定量，故今後需要發展一種免疫學的方法，來把兩者完全分開，俾使 insulin 的免疫學定量準確。由 Proinsulin 經蛋白質分解酵素後才游離 insulin 的事實，使我們想到是否先天性的 Langerhans 氏島內可能有 gene 的缺損，阻礙了 Proinsulin 轉為 insulin 的機序 (mechanism) 而發生糖尿病之可能性？是值得我們今後作進一步的研究。