

胰高血糖素样肽-1类似物活性检测的 CHO细胞模型构建

钱 凯¹ 蔡燕飞² 陈 蕴² 金 坚^{2*}

(¹江南大学生物工程学院, 无锡 214122; ²江南大学药学院, 无锡 214122)

摘要 该文构建了一种胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)类似物活性检测的细胞模型, 为GLP-1类似物的药物筛选提供了一种简单可靠的评价方法。真核表达质粒pcDNA3.1/hGLP-1R转染至中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary, CHO), 经单克隆筛选和遗传霉素(G418)压力筛选最终筛选出6株单克隆菌株。流式细胞仪检测GLP-1受体(glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R)的表达量, 最终筛选获得1株高表达的细胞模型(CHO/pcDNA3.1/hGLP-1R)。RT-PCR结果显示, 该细胞模型转录hGLP-1R基因; 流式细胞仪检测结果和激光共聚焦结果显示, 细胞模型的膜表面有hGLP-1R蛋白的表达。连续传代10次, 细胞膜表面的hGLP-1R蛋白表达没有变化。构建的细胞模型活性检测结果显示, 该细胞模型可以很好地用于GLP-1类似物的活性检测。综上所述, 该细胞模型为GLP-1类似物的活性检测建立了一种方便可靠的体外活性检测方法。

关键词 胰高血糖素样肽-1受体; 中国仓鼠卵巢细胞; 活性测定; 细胞模型

Constructed CHO Cell Model to Detect the Activity of Glucagon-like Peptide-1 Analogues

Qian Kai¹, Cai Yanfei², Chen Yun², Jin Jian^{2*}

(¹School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; ²School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract The *in vitro* activity of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue was detected in cell which stimulated the glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R). We constructed the cell model in Chinese hamster ovary (CHO) cells which could express hGLP-1R. Plasmid of pcDNA3.1/hGLP-1R was constructed, and then was transformed into CHO by electricity. Recombination CHO cell was selected, and confirmed by RT-PCR and flow cytometry. Results suggested that the cell model could not only transcript the gene of *GLP-1R* but also express the GLP-1R protein in the cell membrane. The cell model could well detect the bioactivity of GLP-1 analogue *in vitro*. We constructed a recombination CHO cell which could well be used to detect the bioactivity of GLP-1 analogue *in vitro*.

Keywords glucagon-like peptide-1 receptor; Chinese hamster ovary; bioactivity determination; cell model

胰高血糖素样肽-1受体(glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R)是G蛋白偶联受体的一种由七次跨膜结构组成的G蛋白, 主要分布于胰岛β细胞^[1]。Th-

rens于1992年首次从大鼠的胰腺细胞中克隆获得GLP-1R基因^[2]。GLP-1类似物药物通过激活GLP-1R受体, 使得胞内的腺苷酸环化酶(adenylate cyclase,

收稿日期: 2015-04-20 接受日期: 2015-07-06

国家高技术研究发展计划(863计划)(批准号: 2014AA021003)和中国科学院战略性先导科技专项(批准号: XDA01040202)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0510-85918219, E-mail: jinjian31@126.com

Received: April 20, 2015 Accepted: July 6, 2015

This work was supported by the National High-tech R&D Program of China (863 Program) (Grant No.2014AA021003) and Strategic Priority Research Program from the Chinese Academy of Sciences (Grant No.XDA01040202)

*Corresponding author. Tel: +86-510-85918219, E-mail: jinjian31@126.com

网络出版时间: 2015-08-07 15:10:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150807.1510.001.html>

AC)活化而cAMP含量升高,同时可以促进胞内Ca²⁺的上升,从而提高胰岛素基因的转录、表达和分泌。通过调节cAMP还可以调节蛋白激酶A和蛋白激酶C途径,促进β胰腺细胞的增殖和抗凋亡,同时可以与葡萄糖共同作用促进胰岛素的释放^[3]。

胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)是由小肠L细胞分泌的一种胰岛素调节激素,可以控制胰岛素和胰高血糖素的分泌^[4]。GLP-1刺激胰岛素的合成和分泌,促进胰腺β细胞的增殖,减少胃排空和降低人的食欲,可以从多方面治疗2型糖尿病患者^[5-6]。然而,天然的GLP-1(7-37)在体内被二肽基肽酶-IV(dipeptidyl peptidase-IV, DPP-IV)水解成为GLP-1(9-37)而丧失活性^[1]。因此,设计GLP-1类似物来克服酶切位点的降解和提高单体的活性显得尤为重要。已有文献报道,通过修饰酶切位点的氨基酸^[7]或进行氨基酸突变来消除DPP-IV的水解从而提高单体活性^[8];也可与其他蛋白进行融合来提高药物体内半衰期^[9]。然而,设计并合成大量GLP-1类似物,需要高效的筛选模型来筛选。细胞模型具有针对性强、所需药物剂量低和操作简单方便等特点而得到广泛应用。大鼠胰岛素瘤细胞RINm5f作为天然的细胞模型可用于检测GLP-1类似物的活性^[10],但RINm5f难以培养和生长缓慢,使其应用受到限制。因此,本文利用培养简单方便的中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary, CHO)作为受体细胞,将人源GLP-1R基因导入。筛选获得稳定表达的CHO/hGLP-1R细胞模型,为GLP-1类似物的活性检测提供可靠和简便的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、大肠杆菌DH5α由本实验室保藏。真核细胞表达质粒pcDNA3.1购自Invitrogen公司。hGLP-1R基因pCMV6/hGLP-1R(RC211333)购自Origene公司。

1.1.2 试剂与药品 艾塞那肽注射液Exendin4(Baxter Pharmaceutical Solutions LLC, American)和人血清白蛋白(上海莱士血液制品股份有限公司)购自江南大学医务室。GLP-1类似物GGH融合蛋白由江南大学生物制药与分子药理实验室制备,纯度大于95%。核酸内切酶Hind III和EcoR I、DNA marker、T4连接酶购自Thermo Scientific公司;DMEM/F12细胞培养

基(D/F12)、胎牛血清(FBS)、遗传霉素(geneticin, G418)及鲑鱼精购自Gibco公司;质粒小量抽提试剂盒、DNA胶回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;质粒中量抽提试剂盒购自于天根生化科技有限公司;Human GLP-1R Alexa Fluor 488 MAb(FAB2814G)购自R&D公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成。其余化学试剂均为国产的分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 表达质粒的构建 购自Origene公司的hGLP-1R基因质粒pCMV6/hGLP-1R(RC211333)经测序验证正确后作为PCR的模板,以(5P: TTA GCC CAA GCT TAT GGC CGG CGC CCC CGG CCC GCT G; 3P: CCG GAA TTC TCA GCT GCA GGA GGC CTG GCA AGT GGC)为引物进行PCR,获取hGLP-1R基因片段。质粒pcDNA3.1和PCR基因片段经Hind III和EcoR I双酶切后,割胶回收目的片段,再经T4连接酶12 °C连接16 h。连接好的重组质粒(pcDNA3.1/hGLP-1R)热击(42 °C, 90 s)转化到DH5α中,涂布到LB固体培养基(50 μg/mL kanamycin),37 °C培养16 h。LB固体培养基上挑选单菌落,用质粒提取试剂盒(上海生工生物工程有限公司)提取质粒,利用上述引物PCR验证。PCR验证正确的质粒送至上海生工测序,进一步验证。

1.2.2 细胞模型的构建 应用试剂盒提取重组质粒。D/F12全培养基(含10% FBS)培养CHO细胞,收集3×10⁶状态良好的细胞。PBS洗涤1次后,离心并重悬于200 μL PBS中。在2 mm的电极杯中加入200 μL的细胞重悬液、20 μg重组质粒(pcDNA3.1/hGLP-1R)和10 μg鲑鱼精,混匀后冰浴1 min。在电转仪中以160 V、15 ms电击2次。将转染后的细胞加到两个10 cm的培养皿中,并加入10 mL的D/F12全培养基,置细胞培养箱中培养(37 °C、5% CO₂)。同时,将空载质粒(pcDNA3.1)按照上述方法转染至CHO细胞中,作为阴性对照。

1.2.3 模型组细胞的筛选 转染后细胞在D/F12全培养基培养2 d后,加入G418抗生素使其终浓度为2 mg/mL,继续培养7 d。在96孔板中先加入D/F12全培养基100 μL,用10 μL移液枪挑选单克隆菌苔至96孔板,培养1 d。再换成含G418的D/F12全培养基(G418 2.0 mg/mL),于细胞培养箱中培养7 d。然后,在24孔板中加入含G418的D/F12全培养基(G418

2.0 mg/mL) 0.3 mL, 将96孔板生长良好的细胞挑选至24孔板中, 继续扩大培养4 d。生长良好的细胞转移至6孔板中培养, 消化收集细胞并用荧光抗体(FAB2814G)孵育。流式细胞仪检测细胞hGLP-1R的表达量, 筛选获得高表达hGLP-1R的细胞模型株(CHO/pcDNA3.1/hGLP-1R)。同时, 在抗生素压力下筛选获得1株对照株(CHO/pcDNA3.1)。

1.2.4 模型组细胞的流式细胞仪检测 收集待检测的模型组细胞(CHO/pcDNA3.1/hGLP-1R)、对照组细胞(CHO/pcDNA3.1)和空细胞(CHO)各 4×10^6 , PBS洗涤并离心(1 000 r/min, 5 min), 收集细胞。离心后加入1 mL(PBS+2% FBS), 孵育2 h。离心收集细胞, 加入40 μ L PBS和10 μ L抗体(anti-GLP-1R, FAB-2814G), 孵育1 h。PBS洗1次, 弃上清, 加300 μ L PBS, 制备获得检测样品。以空的CHO细胞株为对照组圈定阀门, 检测细胞的迁移率。检测的流式细胞仪为BD公司的LSR II, 检测结果用FlowJo 7.6.2软件进行数据分析。

1.2.5 模型组细胞的激光共聚焦检测 筛选获得的模型组细胞与CHO空载组细胞孵育于共聚焦小皿中。待细胞生长至40%左右, 加入4%(V/V)的多聚甲醛固定15 min。洗涤小皿后用5%BSA室温封闭2 h, 再次洗涤后再孵育荧光抗体(FAB2814G)室温封闭4 h。细胞核用4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)室温染色15 min, 洗涤后用激光共聚焦显微镜(TCS SP8, Leica)检测。

1.2.6 模型组细胞的RT-PCR 收集模型细胞 2×10^6 ,

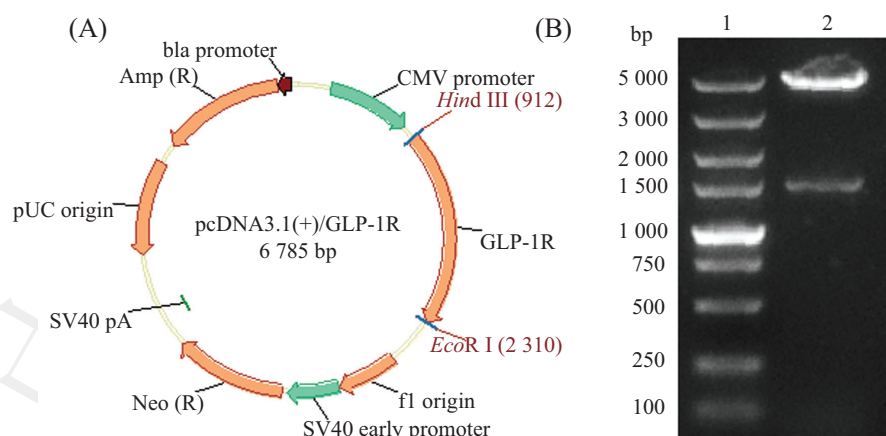
采用碧云天生物技术研究所的Trizol提取胞内的总RNA。利用Fermentas公司的Oligo dT(16 bp)和反转酶, 按照操作说明将胞内的RNA反转成cDNA。以cDNA为模板, 用TaKaRa的DNA聚合酶(PrimeSTAR, R050B)和上述引物进行PCR扩增。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性4 min; 然后, 92 $^{\circ}$ C变性15 s, 55 $^{\circ}$ C退火5 s, 72 $^{\circ}$ C扩增15 s, 31个循环; 最后, 72 $^{\circ}$ C扩增5 min。

1.2.7 模型组细胞的活性检测 筛选获得最优的细胞株, 用D/F12全培养基(含10% FBS)在T75培养瓶中培养。0.25%胰酶溶液消化细胞, 调节细胞密度为 1×10^5 /mL。每孔加入300 μ L的细胞液到24孔板中。培养至85%左右的细胞汇合度时, 吸走培养基, PBS洗涤1次。GLP-1类似物药物Exendin-4和GGH融合蛋白用空的D/F12培养基稀释, 加入300 μ L梯度稀释的药物在培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)中孵育25 min。孵育后弃药物, 加入含腺苷酸环化酶抑制剂IBMX的PBS溶液(IBMX终浓度100 μ mol/L)终止反应。并用R&D公司的cAMP检测试剂盒(KGE002B)检测细胞模型内的cAMP浓度。所有实验数据用SPSS 16.0统计软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 表达质粒pcDNA3.1/hGLP-1R的构建

购于Origene公司的hGLP-1R基因经PCR扩增后, 经双酶切与pcDNA3.1连接, 即为构建好的重组质粒(图1A)。构建好的质粒经双酶切验证与理论值相符(图1B)。重组质粒送至上海生工生物工程有限公司



A: 构建的重组质粒pcDNA3.1/hGLP-1R示意图; B: 重组质粒的Hind III和EcoR I双酶切电泳图; 泳道1: DNA marker; 泳道2: 酶切产物电泳图。

A: schematic of plasmid pcDNA3.1/hGLP-1R; B: electrophoresis map of recombinant plasmid with Hind III and EcoR I digestion; Lane 1: DNA marker; Lane 2: sample of digestion product.

图1 重组质粒pcDNA3.1/hGLP-1R的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmid pcDNA3.1/hGLP-1R

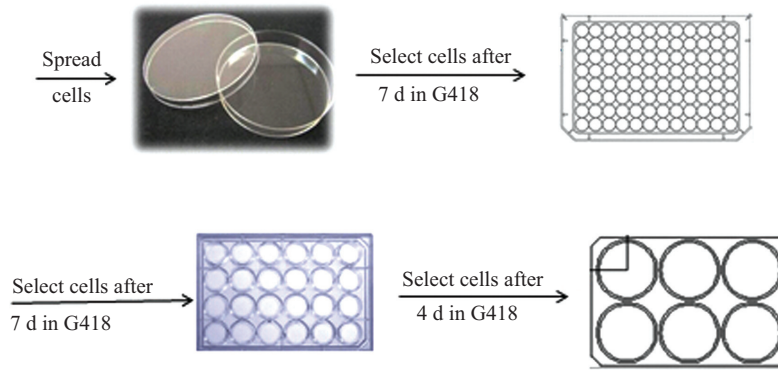
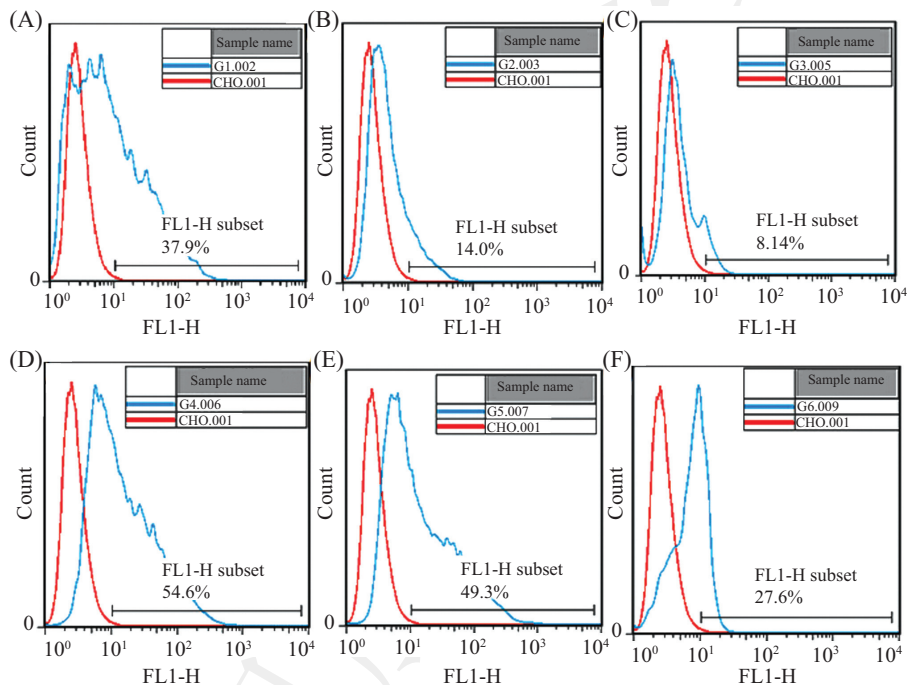


图2 重组模型细胞株的筛选流程

Fig.2 The process of screening cell model



图A~F分别是最终筛选的六株单克隆细胞株与阴性细胞对照的迁移率。6株细胞株与GLP-1R(FAB2814G)抗体孵育后用流式细胞仪检测与阴性细胞对照的细胞迁移率。

A~F showed data of the six selected monoclonal cells. Six monoclonal cells were selected and incubated with anti-GLP-1R (FAB2814G). Migration rates were detected by flow cytometry.

图3 单克隆细胞的流式细胞仪筛选

Fig.3 Monoclonal cells detected by flow cytometry

测序验证, 结果与理论序列一致(结果未给出)。

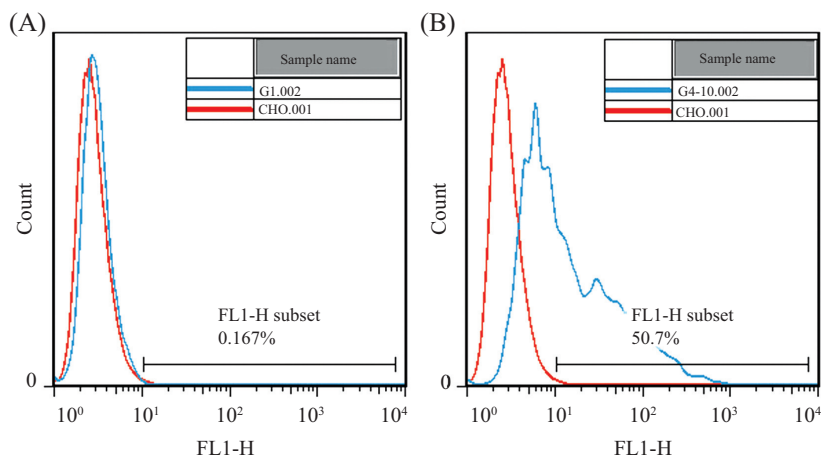
2.2 细胞模型的筛选

构建好的重组质粒电转入CHO细胞时, 加入10 μ g的鲑鱼精增加电转效率。按照图2的流程筛选细胞模型。电转的细胞铺入平皿中, 形成单独的细胞。培养7 d后, 单独的细胞生长成为单独的菌苔, 挑选48株单克隆细胞至96孔板中。继续加压培养后挑选10株生长良好的细胞至24孔板中。在24孔板中有6株长势良好的细胞, 消化并转移至6孔板中继续培养。用流式细胞仪检测重组细胞的迁移率, 可以

反映细胞中受体的表达量高低。收集这6株细胞, 流式细胞仪检测重组细胞膜表面的hGLP-1R蛋白表达(图3), 有2株的迁移率低于15%, 其余的4株迁移率均大于25%。最终将获得的迁移率为54.6%的1株细胞(图3D)用于后期研究。

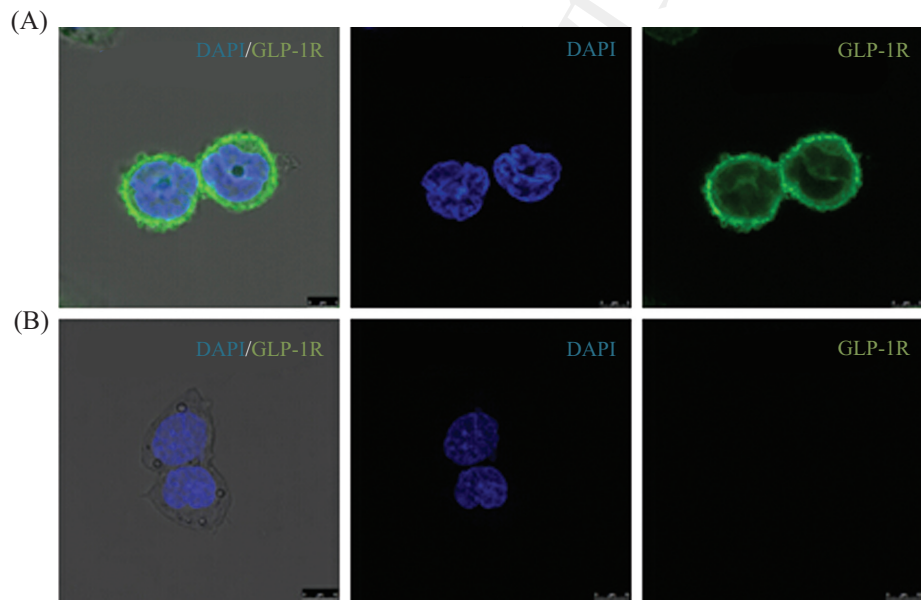
2.3 细胞模型的验证

筛选的细胞模型在含G418的培养基中连续消化分瓶培养10次。以空的CHO细胞为对照细胞, 转入空pCDNA3.1的细胞没有明显的迁移变化, 而模型细胞则有明显的迁移变化(图4A)。细胞模型的流



A: 阴性对照细胞(CHO/pcDNA3.1)的迁移率检测; B: 阳性细胞模型培养10代后的迁移率检测。
A: the migration rate of CHO/pcDNA3.1; B: the migration rate of selected cell model after cultivate ten generation.

图4 细胞模型的稳定性测定
Fig.4 The stability of cell model



A: CHO/pcDNA3.1/hGLP-1R细胞模型的激光共聚焦检测; B: CHO细胞的激光共聚焦检测。细胞与绿色荧光抗体(GLP-1R抗体, FAB2814G)孵育, 激光共聚焦下检测为绿色; 细胞与核染料DAPI孵育, 激光共聚焦下检测为蓝色。
A: laser confocal detection of CHO/pcDNA3.1/hGLP-1R cells; B: laser confocal detection of CHO cells. Cells incubated with green fluorescent anti-body (GLP-1R antibody, FAB2814G), the colour was green under laser confocal. Cells incubated with DAPI, the colour was blue under laser confocal.

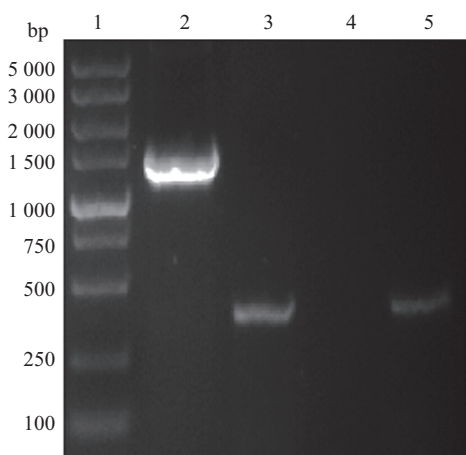
图5 两种细胞的激光共聚焦检测(1 000×)
Fig.5 Laser confocal detection for two kinds of cells (1 000×)

式结果显示, CHO细胞中有hGLP-1R蛋白的表达; 且培养10代后, 流式细胞仪检测细胞表面的hGLP-1R蛋白, 细胞迁移率为50.7%, 与第一次筛选的结果(细胞迁移率为54.6%)没有明显差异(图4B)。筛选获得的细胞模型的激光共聚焦检测显示, 导入的基因 *hGLP-1R* 有表达且表达的蛋白质都定位于细胞膜上(图5A)。提取细胞模型的RNA, 反转录PCR结果显示, *hGLP-1R* 基因在对照组细胞(CHO/pcDNA3.1)中没

有转录, 在实验细胞组(CHO/pcDNA3.1/hGLP-1R)中有转录(图6)。CHO细胞在RNA水平检测没有 *GLP-1R* 的转录(图6), 且激光共聚焦检测没有GLP-1R内源性蛋白的表达(图5B)。

2.4 细胞模型的功能检测

本实验室制备的胰高血糖素样肽-1(GLP-1)类似物药物GGH, 是两个GLP-1(A2G)突变体与人血清白蛋白(HSA)的N-端连接的融合蛋白^[11]。Exendin-4



泳道1: DNA marker; 泳道2和3: *hGLP-1R*基因和*Actin*基因在CHO/pcDNA3.1/hGLP-1R细胞中的RT-PCR检测结果; 泳道4和5: *hGLP-1R*基因和*Actin*基因在CHO/pcDNA3.1细胞中的RT-PCR检测结果。

Lane 1: DNA marker; Lane 2 and 3: RT-PCR of CHO/pcDNA3.1/hGLP-1R cell to detect *hGLP-1R* gene and *Actin* gene; Lane 4 and 5: RT-PCR of CHO/pcDNA3.1 cell to detect *hGLP-1R* gene and *Actin* gene.

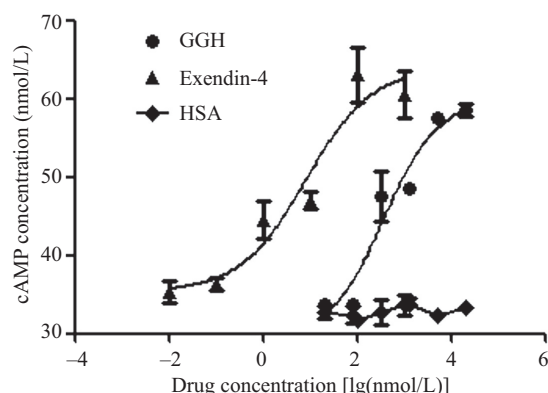
图6 反转录PCR验证图

Fig.6 Electrophoresis map of RT-PCR

为GLP-1类似物, 现为治疗2型糖尿病的药物。GGH和Exendin-4都可以与GLP-1R结合, 刺激细胞产生cAMP, 并且有明显的剂量依赖关系。在此模型检测下, 利用Prism 5软件计算GLP-1类似物的 EC_{50} 。结果显示, GGH的 EC_{50} 为456.7 nmol/L, 而Exendin-4的 EC_{50} 为7.8 nmol/L(图7)。

3 讨论

将电转的细胞铺在10 cm的平皿中培养, 加入G418抗性压力。培养2 d后有大量细胞死亡, 更换含G418的培养基。此时, 在平皿中的细胞均为单个的贴壁细胞, 继续培养5 d后, 单个的细胞生长成为肉眼可见的菌苔(在亮的灯光斜照下)。利用10 μ L的移液枪将菌苔分别挑至96孔板中。筛选获得的稳定细胞株(CHO/pcDNA3.1/hGLP-1R)可以转录*hGLP-1R*基因(图4), 也顺利地CHO的细胞膜表面表达hGLP-1R蛋白(图5)。同时, 可以很好地用于检测GLP-1类似物的活性(图6)。筛选重组细胞克隆的另一种常用方法是梯度稀释法, 主要是在抗性培养基的培养下, 选择生长条件较好的菌株。我们筛选的6株重组细胞中, 有2株的迁移率低于15%, 其余的4株迁移率均大于25%。因此, 单纯的从抗性培养基的长势较好中选择, 不能完全排除抗性基因高表达而目标基因表达不佳的情况。我们筛选菌株的策略较



梯度稀释的GLP-1类似物刺激筛选的细胞模型产生cAMP, cAMP浓度的检测用R&D的试剂盒(KGE002B)。

Gradient dilution of GLP-1 analogues stimulated intracellular cAMP in cell model, and cAMP was detected by kit (R&D, KGE002B).

图7 GLP-1类似物在细胞模型的活性检测

Fig.7 The activity of GLP-1 analogues in cell model

梯度稀释法筛选单克隆更加精确和快速^[12]。筛选获得的单克隆传代10次后, 流式细胞检测hGLP-1R的表达情况(图4B), 与第1代细胞的hGLP-1R含量相比没有明显差异, 且CHO没有内源性GLP-1受体(GLP-1R)表达(图5A), 不会对构建的模型有干扰。

GLP-1类似物的体外检测方法主要是细胞活性的检测。天然的细胞模型如小鼠胰腺瘤细胞(MIN6)和大鼠胰腺瘤细胞(RINm5f)在其细胞表面有鼠源的GLP-1R, GLP-1类似物可以和GLP-1R结合, 刺激胞内的第二信使(cAMP)上升或刺激胰岛素分泌, 通过检测cAMP或胰岛素的含量来评价GLP-1类似物的体外活性^[13]。但是, MIN6和RINm5f细胞容易凋亡, 培养难, 且50%的细胞密度传代生长到80%的汇合度至少需要4 d, 生长速度缓慢。MIN6和RINm5f作为检测模型是一种不稳定和不方便的检测方法^[13]。而人工构建的细胞模型可以导入人源的GLP-1R, 可以更加精确地反映受体与激动剂之间的相互作用^[14]。CHO细胞本身没有GLP-1R受体表达(图5B), 本文将人源的GLP-1R转入到CHO细胞中, 经稳定克隆株的筛选获得稳定的克隆株, 构建好的细胞模型检测阳性对照物(Exendin-4)的 EC_{50} 为7.8 nmol/L, 与天然细胞检测的活性类似^[10]。构建好的细胞模型(CHO/pcDNA3.1/hGLP-1R)细胞易于培养和操作, 可有效地应用于GLP-1类似物的检测和筛选。

参考文献 (References)

- 1 Donnelly D. The structure and function of the glucagon-like pep-

- tide-1 receptor and its ligands. *Br J Pharmacol* 2012; 166(1): 27-41.
- 2 Thorens B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(18): 8641-5.
- 3 Doyle ME, Egan JM. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther* 2007; 113(3): 546-93.
- 4 Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007; 132(6): 2131-57.
- 5 Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 2007; 87(4): 1409-39.
- 6 Quoyer J, Longuet C, Broca C, Linck N, Costes S, Varin E, *et al.* GLP-1 mediates antiapoptotic effect by phosphorylating bad through a beta-arrestin 1-mediated ERK1/2 activation in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 2010; 285(3): 1989-2002.
- 7 Oh JY, Lee C, Jang SH, Yoo SB, Chung HS. Novel DPP-IV-resistant analogs of GLP-1: the N-terminal extension of GLP-1 by a single amino acid. *B Kor Chem Soc* 2009; 30(10): 2471-4.
- 8 Xiao Q, Giguere J, Parisien M, Jeng W. Biological activities of glucagon-like peptide-1 analogues *in vitro* and *in vivo*. *Biochemistry* 2001; 40(9): 2860-9.
- 9 Kim JG, Baggio LL, Bridon DP, Castaigne JP, Robitaille MF, Jette L, *et al.* Development and characterization of a glucagon-like peptide 1-albumin conjugate—the ability to activate the glucagon-like peptide 1 receptor *in vivo*. *Diabetes* 2003; 52(3): 751-9.
- 10 耿 燕, 任怡琳, 许正宏, 窦文芳. 基于胞内cAMP浓度测定融合蛋白GGH活性的改良方法. *中国生物工程杂志*(Geng Yan, Ren Yilin, Xu Zhenghong, Dou Wenfang. An improved method to measure bioactivity of the fusion protein GGH based on the intracellular cAMP level. *China Biotechnology*) 2013; 33(11): 63-7.
- 11 Dou WF, Lei JY, Zhang LF, Xu ZH, Chen Y, Jin J. Expression, purification, and characterization of recombinant human serum albumin fusion protein with two human glucagon-like peptide-1 mutants in *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif* 2008; 61(1): 45-9.
- 12 朱振洪, 王同映, 黄岩山. 人GLP-1R基因转染BHK细胞及重组细胞的应用. *生物技术通报*(Zhu Zhenhong, Wang Tongying, Huang Yanshan. Construction of recombinant BHK/GLP-1R cells and its application. *Biotech B China*) 2007; 3: 118-21.
- 13 Tsuboi T, Xavier GD, Holz GG, Jouaville LS, Thomas AP, Rutter GA. Glucagon-like peptide-1 mobilizes intracellular Ca^{2+} and stimulates mitochondrial ATP synthesis in pancreatic MIN6 beta-cells. *Biochem J* 2003; 369: 287-99.
- 14 刘 珊, 谢 波, 郝素娟, 惠冕宙. 胰高血糖素样肽-1及其类似物的生物学活性测定方法. *中国生化药物杂志*(Liu Shan, Xie Bo, Hao Sujuan, Hui Xunyu. The determination method for biological activities of glucagon like peptide-1 and its derivatives. *Chin J Biological Pharms*) 2012, 33(5): 675-8.