

FGF21-L-Fc 融合蛋白表达及其降糖作用初步评价

姚文兵¹, 任桂萍¹, 韩 阳¹, 曹宏伟², 高红梅¹, 阚方明¹, 王 琪¹, 李德山^{1*}

(1. 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 成纤维细胞生长因子-21 (FGF21) 是 FGF 家族成员之一, 最近发现具有独立调节血糖的作用。为了提高 FGF21 稳定性来达到更好的药效, 通过柔性接头连接, 制备重组融合蛋白 FGF21-L-Fc, 并对其生物学活性和体内药效学进行初步研究。纯化后的 FGF21-L-Fc 融合蛋白经鉴定, 其分子量和特异性均与理论值相符。经微量化的 GOD-POD 法检测表明, FGF21-L-Fc 融合蛋白能刺激体外培养的已分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖吸收, 其葡萄糖消耗率与野生型相比有很大提高; 在 STZ 造模糖尿病小鼠体内, 其药效比野生型持续时间长。结果表明, 改造的蛋白比野生型药效更持久, 为以后 FGF21 的临床应用奠定了基础。

关键词: FGF21-L-Fc; 葡萄糖吸收; 稳定性

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 07-0787-06

Expression and pharmacological evaluation of fusion protein FGF21-L-Fc

YAO Wen-bing¹, REN Gui-ping¹, HAN Yang¹, CAO Hong-wei², GAO Hong-mei¹, KAN Fang-ming¹,
WANG Qi¹, LI De-shan^{1*}

(1. College of Life Science of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College of Life Sciences, Heilongjiang Bayi Agriculture University, Daqing 163319, China)

Abstract: FGF21 (fibroblast growth factor 21) is a recently described member of the FGF family. It has been previously demonstrated that FGF21 is a potent regulator of glucose homeostasis. To improve stability of FGF21 for better efficacy, a new form of recombinant FGF21 was generated by fusion of a full length FGF21 gene and the Fc fragment of human IgG4 with flexible linker sequence. To examine the glucose regulation activity of FGF21-L-Fc, 3T3-L1 pre-adipocytes were differentiated into adipocytes, and glucose uptake activity of FGF21-L-Fc was examined by glucose oxidase and peroxidase (GOD-POD) assay. The results showed that in comparison with wild type FGF21, FGF21-L-Fc was more potent in stimulation of glucose uptake by 3T3-L1. *In vivo* studies on the modified protein demonstrated that FGF-L-Fc had a better efficacy in lowering blood glucose of the STZ-induced diabetic animals and controlled glucose level for a longer time. The results provided a sound basis for further studies.

Key words: FGF21-L-Fc; glucose uptake; stability

成纤维细胞生长因子-21 (FGF21) 是最近发现具有调节内分泌功能的细胞因子, 主要表达于肝脏中^[1, 2]。Kharitononkov 等^[2]于 2005 年已报道, FGF21

具有独立调节血糖作用。近期研究表明: FGF21 可以不依赖胰岛素调节血糖浓度, 并且大剂量用药也不会导致低血糖, 对一些组织细胞的脂类代谢也有调节作用^[3, 4]。因此, FGF21 有可能成为治疗糖尿病的新型药物^[5, 6]。

目前, 对重组人的 FGF21 降血糖功能的研究很多, 作者实验室也做了大量研究, 虽然蛋白具有降血糖

收稿日期: 2010-12-28.

基金项目: 黑龙江省科技厅重点攻关项目 (2006G0461-00); 黑龙江省博士后科研启动资助金资助; 黑龙江省教育厅项目 (11521022).

*通讯作者 Tel: 86-451-55190645, Fax: 86-451-55103336,

E-mail: deshanli @163.com

功能,但持续时间不长。可能野生型的蛋白通过体外表达后,修饰减少,结构不稳定,相关活性减弱。因此,人为对野生型 FGF21 进行修饰或改造,也将成为热点课题之一。IgG 型免疫球蛋白的 Fc,具有许多功能,如延长半衰期、形成二聚体利于与受体结合等^[7, 8]。由于结构上的同源性, Fc 融合蛋白表现出的体外药物代谢动力学特性与同类型的人 IgG 相当。由该方法制备的一些重要细胞因子(如 IL-2)和可溶性受体(如 TNF-Rc 和 IL-5-Rc)药物,已成功使用在临床上,并用于治疗一些特定疾病如类风湿性关节炎等^[9]。因此,本研究对人的 FGF21 进行改造,与 IgG4 Fc 通过一段柔性短肽连接,构建融合蛋白 FGF21-L-Fc,使其具有 FGF21 的疗效,又有 Fc 的特性,获得一种具有稳定、持续降糖作用的新型蛋白药物(FGF21-L-Fc)。通过葡萄糖氧化酶-过氧化物酶(POD-GOD)法,在 3T3-L1 脂肪细胞模型中,对经纯化后的重组蛋白 FGF21-L-Fc 进行了生物活性鉴定;并在糖尿病模型中对其进行了药效分析。

材料与方法

质粒和菌株 人源野生型 FGF21 从人的肝脏中提取,并构建于克隆载体,质粒 pMD18-T-FGF21 由本实验室提供。受体菌 *E. coli* 菌株 DH5 α -Rosetta(含 DE3)由本实验室提供^[10]。pMD18-T Simple 克隆载体购自 TaKaRa 公司; pSUMO 表达载体购自 Life Sensors 公司。

酶和主要生化试剂 高保真 Primer star DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶、*Bsa* I、*Kpn* I 及 *Bam*H I 均购自 New England Bio Labs 公司; dNTPs、T4 DNA 连接酶、IPTG(异丙基硫代- β -D-半乳糖苷)、溶菌酶和氨苄青霉素(Amp)均购自 TaKaRa 公司; SUMO 蛋白酶 I 由本实验室提供。DNA 回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。亲和层析柱 HisTrapTM FF crude column 和脱盐柱 HiPrepTM 26/10 Desalting 购自 GE 公司;链脲佐菌素(STZ)购自 Sigma 公司;鼠抗

人 IgG Fc 和辣根过氧化物酶标记(HRP)的羊抗鼠 IgG 购自 R&D 公司。

原核表达载体 pSUMO-FGF21-L-Fc 的构建 分别以 P1、P2 为引物, pMD18-T-FGF21 为模板,扩增 FGF21-Linker 融合基因;以 P3、P4 为引物, pMD18-T-Fc 为模板,扩增 Linker-Fc 融合基因;然后通过重叠(overlap) PCR 技术,以 P1、P4 为引物, FGF21-Linker、Linker-Fc 基因为模板,采用 *Taq* DNA 聚合酶扩增 FGF21-L-Fc 融合基因。其 Linker 为 15 个氨基酸(GGGGSGGGSGGGG)的柔性多肽。融合基因 5'端带有 *Bsa* I 酶切位点,3'端带有 *Bam*H I 酶切位点。PCR 产物进行胶回收并与载体 pMD18-T Simple 相连,所得质粒经酶切鉴定正确后测序确认 FGF21-L-Fc 融合基因序列。将测序正确的 FGF21-L-Fc 通过 *Bsa* I、*Bam*H I 构建在原核表达载体 pSUMO(pSUMO-FGF21-L-Fc)上,酶切鉴定后测序分析其正确性。引物序列见图 1。

融合蛋白 SUMO-FGF21-L-Fc 的表达、纯化 将含有正确序列的重组质粒 pSUMO-FGF21-L-Fc 转化至表达菌株 Rosetta,转化后的单菌落接种至 5 mL 的含氨苄青霉素(100 μ mol·L⁻¹) LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 10 h;以 1:100 接种于 500 mL 的含氨苄青霉素(100 μ mol·L⁻¹) LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 2 h, A_{600} 为 0.3~0.4 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol·L⁻¹ 进行诱导,3 h 后,分别取诱导及未诱导菌体进行 12% SDS-PAGE 电泳并确定表达的目的蛋白占菌体总蛋白的百分比。菌体经超声破碎后离心,上清液经 HisTrapTM FF crude column 亲和层析,用杂蛋白洗脱液(40 mmol·L⁻¹ 咪唑, 300 mmol·L⁻¹ NaCl, 50 mmol·L⁻¹ Na₃PO₄, pH 8.0)洗去杂蛋白后,用洗脱液(500 mmol·L⁻¹ 咪唑, 300 mmol·L⁻¹ NaCl, 50 mmol·L⁻¹ Na₃PO₄, pH 8.0)洗脱融合蛋白,收集洗脱的峰。

融合蛋白 SUMO-FGF21-L-Fc 的脱盐、酶切及重组蛋白的纯化 融合蛋白经 HiPrepTM 26/10 Desalting 脱盐后,收集脱盐峰。收集的融合蛋白加入

P1: 5'-GGTCTCTAGGTCACCCATCCCTGACTCCAGTCCT-3'
Bsa I
 P2: 5'-CGACCCACCACCGCCGAGCCACCGCCACCGGAAGCGTAGCTGGG GCTTCGG-3'
 Part of linker Sequence of FGF21 3' terminal
 P3: 5'-GGCGGTGGTGGGTGCGGTGGCGGCGGATCTGCGGAGTCCAAATATGGTCCCCCAT-3'
 Part of linker Sequence of Fc 5' terminal
 P4: 5'-CGGGATCCTCAACCCAGAGACAGGGAGAGGCT-3'
*Bam*H I

Figure 1 Primer sequence of overlap PCR

SUMO 蛋白酶 I 和终浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DTT, 30°C 切割 2 h, 再经 HisTrapTM FF crude column, 收集紫外吸收峰, 15% SDS-PAGE 电泳检测。

融合蛋白 FGF21-L-Fc 的免疫活性检测 采用一抗为鼠抗人 IgG Fc 的抗体, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠抗体。将构建的 FGF21-L-Fc 重组蛋白进行蛋白质印迹分析。首先将样品进行 15% SDS-PAGE, 转移至硝酸纤维素膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭, 然后将膜用相应一抗 ($1:5\,000$ 稀释) 4°C 孵育过夜 (约 12 h), 二抗 ($1:10\,000$ 稀释) 室温孵育 2 h 后, 洗涤, 加入化学发光底物 Super Signal 检测试剂 (Pierce), 暗室 X 光片暗匣曝光、显影。

融合蛋白 FGF21-L-Fc 对 3T3-L1 脂肪细胞糖代谢作用的测定 将已分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞^[11] 饥饿 12 h, 用 $1\,000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 人源野生型的 FGF21 和 $1\,000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 改造的 FGF21-L-Fc 蛋白单独处理细胞, 在 4、8、20、24、30 和 34 h 分别取培养上清液 $2 \mu\text{L}$ 放入 $200 \mu\text{L}$ 的葡萄糖检测液中测定葡萄糖的含量^[12]。每组数据至少重复 3 次, 并运用统计学分析实验结果。

体内药效初步检测 糖尿病鼠模型制备: 采用 6~8 周龄的昆明种雄性小鼠, 体重约为 25~30 g; 使用高脂高糖饲料喂养 3 周以后, 禁食不禁水 8~12 h, 以 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射 STZ, 连续注射 3 次, 间隔 3 天, 10 天后确认糖尿病鼠模型^[13]。

糖尿病鼠模型建立标准: 具有糖尿病“三多一少”的症状, 如多饮、多食、多尿、体重减少; 空腹小鼠血糖值 $>11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

给药检测: 给药方式为腹腔注射; 给药时间为上午餐后大约 9 点整; 共分为 4 组: 阴性对照组 (0.9% 生理盐水)、阳性对照组 (胰岛素 4 u)、FGF21 组 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 FGF21-L-Fc 组 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组各 10 只小鼠。实验使用血糖仪, 通过尾部取血 $10 \mu\text{L}$ 并测定血糖值; 注射前测定血糖值, 注射后每隔 1 h 测定血糖值。运用 Excel 710 进行统计学分析, 两组间计量数据比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析。

结果

1 FGF21-L-Fc 融合基因及表达载体的鉴定

用重叠 PCR 方法成功构建 FGF21-L-Fc 融合基因, 测序结果表明, 融合基因序列与设计一致, 其中 FGF21 基因长 543 bp, 编码 181 个氨基酸, Linker 基因长 30 bp, 编码 15 个氨基酸 (GGGSGGGSGGGGS),

Fc 基因长 687 bp, 编码 229 个氨基酸, 将融合基因连入表达载体构建重组质粒 pSUMO-FGF21-L-Fc。pSUMO 载体是本实验室通过同尾酶改造所得, 质粒 pSUMO-FGF21-L-Fc 不能通过引入的酶切位点鉴定, 所以本实验采用了序列 FGF21-L-Fc 上游 60 bp 处酶切位点 *Kpn* I 和下游引入酶切位点 *Bam*H I 双酶切鉴定质粒 pMD18-T-FGF21-L-Fc 和 pSUMO-FGF21-L-Fc, 得到同样大小为 1 297 bp 的目的片段、2 752 bp 的 T 载体片段和 5 783 bp 的 SUMO 载体片段。酶切鉴定表明, 本实验成功克隆了 FGF21-L-Fc 融合基因 (图 2)。

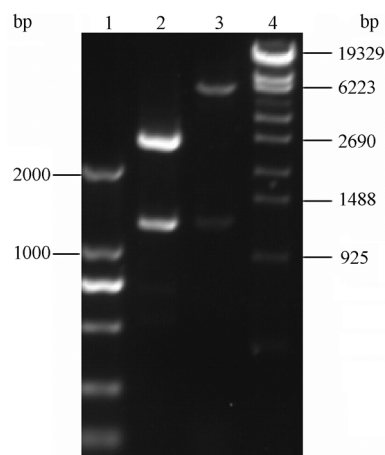


Figure 2 Analysis of recombinant vector. 1, 4: DNA marker; 2: pMD18-T-FGF21-L-Fc digest with *Kpn* I /*Bam*H I; 3: pSUMO-FGF21-L-Fc digest with *Kpn* I /*Bam*H I

2 预期构建的融合蛋白模型和预测融合蛋白三维立体结构

由 Fc 结构域特性推测融合蛋白 FGF21-L-Fc 形成稳定的 Y 型结构 (图 3A)。通过网上同源建模软件 (CPH models 3.0 Server) 预测, 融合蛋白 FGF21-L-Fc 的两部分形成各自独立结构, 且 FGF21 仍然保持了 FGF 家族的三叶草模型结构, 因此不会影响改造后的 FGF21 的生物功能, 说明本设计方案合理可行 (图 3B)。

3 重组质粒 pSUMO-FGF21-L-Fc 在大肠杆菌中的表达

将含有重组质粒 pSUMO-FGF21-L-Fc 的 Rosetta 菌株接种后诱导, 加入 IPTG 诱导 3 h 后取样电泳分析。阳性诱导菌株的表达蛋白薄层扫描图分析结果显示, 融合蛋白占总菌体蛋白量的 80%, 且为可溶性蛋白, SUMO-FGF21-L-Fc 融合蛋白电泳带位于分子量约为 66 kD 处 (图 4)。

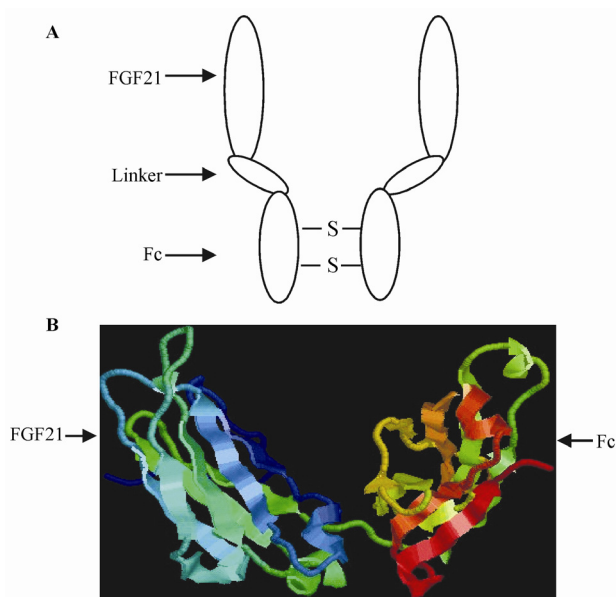


Figure 3 FGF21-L-Fc structure sketch map (A) and three-dimensional structure of FGF21-L-Fc (B)

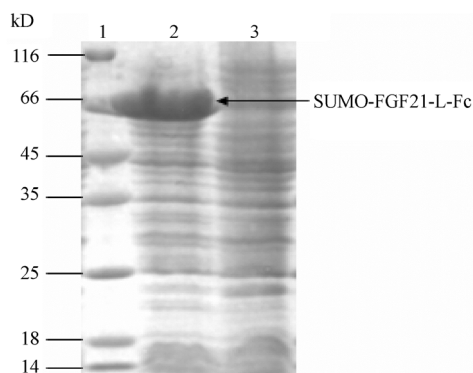


Figure 4 Analysis of express products of fusion protein in SUMO express system. 1: Protein molecular weight marker; 2: Lysates of Rosetta cells harboring recombinant SUMO expression vector 3 h after IPTG induction; 3: Lysates of Rosetta cells harboring recombinant SUMO expression vector without IPTG induction

4 SUMO-FGF21-L-Fc 纯化、酶切和重组蛋白 FGF21-L-Fc 纯化及检测

收集的菌体,经超声破碎离心,上清液通过 AKTApurifier 100, 经 HisTrapTM FF crude column 亲和层析, 经 HiPrepTM 26/10 Desalting 脱盐, 收集的融合蛋白中直接加入 SUMO 蛋白酶 I 和终浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DTT, 30°C 切割 2 h, 再经 HisTrapTM FF crude column 亲和层析, 收集流穿液, 即为重组 FGF21-L-Fc, 15% SDS-PAGE 电泳检测 (图 5)。酶切效率较高, 1U 蛋白酶可以切 $50 \mu\text{g}$ 融合蛋白 (整个体系中含 $65.5 \mu\text{g}$ 融合蛋白), 切割效率可达到 80% 左右, 且无氨基酸残基残留。纯化后的成熟融合蛋白分子质量为 46 kD, 纯度达到 98% 以上 (图 5)。

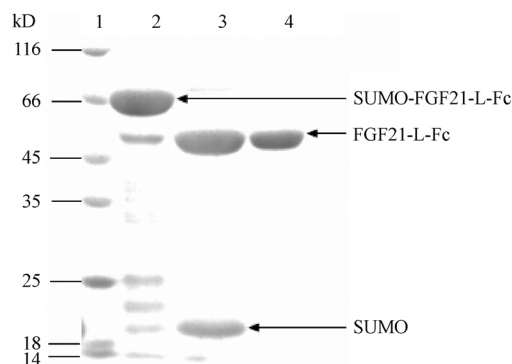


Figure 5 Analysis of purified FGF21-L-Fc by SDS-PAGE. 1: Unstained protein molecular weight Marker; 2: Purified SUMO-FGF21-L-Fc fusion protein; 3: Cleavage products of SUMO-FGF21-L-Fc fusion protein with SUMO protease I; 4: Mature FGF21-L-Fc protein

5 Western blotting 检测

纯化后的融合蛋白 FGF21-L-Fc 和蛋白 FGF21, 通过抗人 IgG Fc 抗体进行检测, 由图 6 可见, 在泳道 3 的 21 kD 处没有条带, 但在泳道 2 的大约 66 kD 处出现一条清晰的蛋白条带。

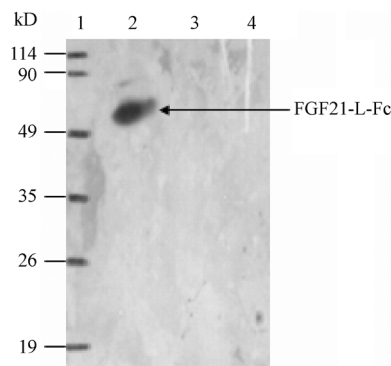


Figure 6 Western blotting analysis of FGF21-L-Fc and FGF21. 1: Prestained protein molecular weight marker; 2: FGF21-L-Fc; 3: FGF21; 4: BSA

6 体外活性检测

利用本实验室所建立的平台: FGF21 促进已分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞对葡萄糖的吸收, 通过微量化的 GOD-POD 法在细胞水平上检测培养基中的葡萄糖含量^[14]。任桂萍等^[11]实验证明, 随着 FGF21 成熟蛋白浓度的增加, 细胞葡萄糖消耗率显著增加, 呈剂量依赖关系, 浓度为 $1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 葡萄糖利用率最高。因此, 本实验分别用 $1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素, $1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FGF21, $1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 融合 FGF21-L-Fc 蛋白处理已分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞, 在 4、8、16、24、30 和 34 h 分别取样检测。结果 (图 7) 可见, 胰岛素处理的细胞有糖代谢作用, 与未经处理的

空白对照组比较差异显著。FGF21 和 FGF21-L-Fc 都能促进脂肪细胞消耗葡萄糖,随着作用时间的延长,后者促进细胞利用葡萄糖效率比前者高。在处理 16 h 后,经 FGF21-L-Fc 处理的脂肪细胞与经 FGF21 处理的细胞相比,葡萄糖利用率显著增加,且该作用能持续到 30 h。结果表明,FGF21-L-Fc 促进细胞对葡萄糖吸收时间更长,效果更显著。因此,推测融合 FGF21-L-Fc 比野生型 FGF21 更稳定。

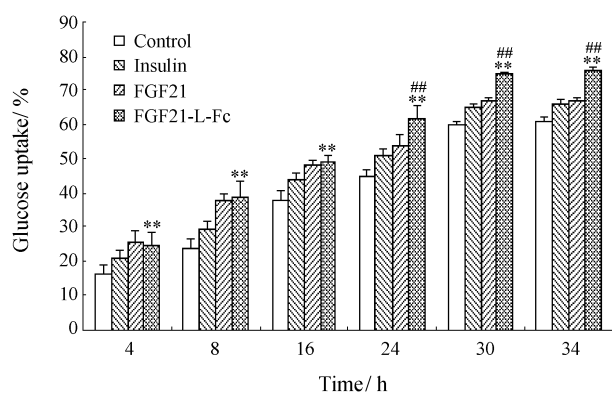


Figure 7 The glucose uptake of 3T3-L1 adipocytes treated with insulin ($1\ 000\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), FGF21 ($1\ 000\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) and FGF21-L-Fc ($1\ 000\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$). The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. ** $P < 0.01$ vs no stimulation control; ## $P < 0.01$ vs FGF21 stimulation cells

7 体内药效初步检测

通过 STZ 和高脂高糖成功建立糖尿病小鼠模型,测其空腹血糖值大于 $11.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,视为糖尿病小鼠模型^[15]。结果(图 8)表明:胰岛素具有快速降糖作用,但持续时间短;融合蛋白 FGF21-L-Fc 比野生型 FGF21 稳定,作用时间持久。

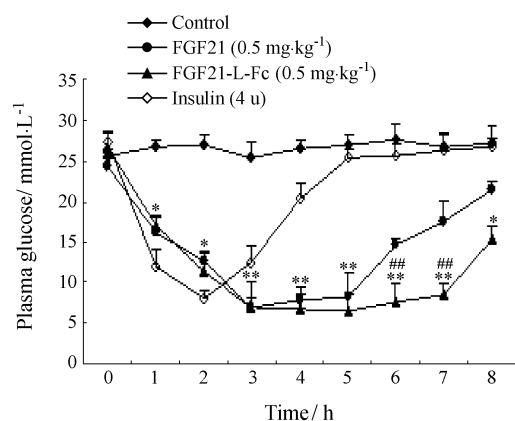


Figure 8 Analysis of pharmacokinetic efficacy *in vivo*. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. $n = 10$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; ## $P < 0.01$ vs FGF21

讨论

FGF21 是 FGF 家族的新成员,具有调节血糖和血脂的作用,已成为糖尿病研究领域的新亮点^[16]。作者前期研究表明,FGF21 体外不稳定,容易降解,从而影响其生物活性及药效。此外,大多数基因工程蛋白药物存在半衰期短、生物利用度低等问题,从某些方面来说影响、限制了其临床应用。目前,Eli Lilly、Ambrx、Amgen 等公司对野生型 FGF21 的糖代谢、脂代谢等方面进行了大量的研究。尽管临床前的动物实验文献较多^[2, 3],但迄今为止很少见关于野生型 FGF21 改造方面的报道。本研究将 FGF21 与人免疫球蛋白的 Fc 片段相融合,目的在于增加 FGF21 的稳定性和调节血糖作用。

已有许多文献报道,将 IgG 的 Fc 段与其他蛋白质连接而形成融合蛋白,近年来 Ig 分子 Fc 片段被更广泛应用于药物蛋白的融合表达^[17]。Fc 段融合蛋白具有许多特性,如重组蛋白的半衰期更长^[18, 19];Fc 段亲和层析,方便进行纯化;Fc 段配套的产品,方便进行检测;Fc 结构域,可以通过形成二聚体分子提高融合蛋白与受体或配体结合的能力^[20, 21]。人 IgG 有 4 种亚型,即 IgG1、2、3 和 4,4 种亚型的 Fc 生物学效应有所不同^[22]。本研究所构建的融合蛋白利用 IgG4 的 Fc,主要原因是其引起细胞免疫反应最低。所以,本研究选用 IgG4 的 Fc 片段与 FGF21 通过一段柔性短肽连接形成融合蛋白 FGF21-L-Fc 应最安全。此 linker 也是疏水性短肽的人工接头 (Gly_4Ser_1)₃,为 15 个氨基酸的多肽接头序列,具有良好的折叠性和柔顺性,也具有足够的长度,不会形成空间位阻,以保证表达的二聚体蛋白拥有各自独特的功能。

Mohammadi 等^[23]于 2005 年对 FGF21 作用机制进行初步研究,推测 FGF21 是以二聚体的形式与受体结合。本研究成功构建融合蛋白 FGF21-L-Fc,形成稳定的抗体 Y 型结构,并推测与受体结合形成稳定 FGF/受体复合物的结构。融合蛋白 FGF21-L-Fc 通过 pSUMO 载体成功表达,纯化后的蛋白分别通过促进已分化成熟 3T3-L1 脂肪细胞的糖吸收实验和降低 STZ 糖尿病模型动物的血糖实验来检测其生物学活性。细胞糖吸收实验结果表明,融合蛋白 FGF21-L-Fc 与野生型蛋白 FGF21 相比,16 h 后更能有效促进葡萄糖吸收,推测其稳定性更好;STZ 糖尿病模型鼠的降血糖实验结果表明,与对照组相比,融合蛋白和野生型蛋白均能降低血糖,且融合蛋白作用时间延长。因此,推断融合蛋白 FGF21-L-Fc 形成了稳定的 Y 型结构,且二聚体形式有利于与其受体结合。

本文是首次报道, 利用免疫球蛋白 Fc 段, 对成纤维生长因子 (FGF21) 进行改造, 并成功构建了融合蛋白 FGF21-L-Fc。实验结果表明: 与野生型相比, 其稳定性增强, 药效持久。为 FGF21 的临床应用奠定了基础。

References

- [1] Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, et al. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1492: 203-206.
- [2] Kharitononkov A, Shiyanova TL, Koester A, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 1627-1635.
- [3] Kharitononkov A, Wroblewski VJ, Koester A, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-221 [J]. *Endocrinology*, 2007, 148: 774-781.
- [4] Mai K, Schwarz F, Bobbert T, et al. Relation between fibroblast growth factor-21, adiposity, metabolism and weight reduction [J]. *Metabolism*, 2011, 60: 306-311.
- [5] Wente W, Efanov AM, Brenner M, et al. Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways [J]. *Diabetes*, 2006, 55: 2470-2478.
- [6] Wang HY, Xiao YC, Fu LJ, et al. High-level expression and purification of soluble recombinant FGF21 protein by SUMO fusion in *Escherichia coli* [J]. *BMC Biotechnol*, 2010, 10: 14.
- [7] Petkova SB, Akilesh S, Sproule TJ, et al. Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease [J]. *Int Immunol*, 2006, 18: 1759-1769.
- [8] Jones TD, Hanlon M, Smith BJ, et al. The development of a modified human IFN- α 2b linked to the Fc portion of human IgG1 as a novel potential therapeutic for the treatment of hepatitis C virus infection [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2004, 24: 560-572.
- [9] Zhang Y, Gao K, Han CM, et al. Study on methods and requirements for quality control of recombinant human tumor necrosis factor receptor Fc fusion protein [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2003, 38: 165-168.
- [10] Hou YT, Li JN, Ren GP, et al. Cloning, expression and glucose regulation activity of human FGF-21 [J]. *Hereditas* (遗传), 2010, 32: 583-587.
- [11] Ren GP, Hou YT, Jiang YY, et al. Efficient expression of soluble human FGF-21 and its glucose regulation activity [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2009, 44: 548-552.
- [12] Yang GZ, Gao XP, Yan JF, et al. Establishment of GOD-POD assay in a minimal way and application to glucose metabolism of 3T3-L1 adipocyte and HepG2 cell *in vitro* [J]. *Sichuan J Anat* (四川解剖学杂志), 2003, 11: 12-15.
- [13] Wang HY. Establishment of the Animal Model of Type 2 Diabetes (2 型糖尿病动物模型的建立) [D]. Changchun: Jilin University, 2007.
- [14] Jiang YY, Liu MY, Ren GP, et al. Cloning, expression and purification of mouse fibroblast growth factor-21 and its function in adipocyte glucose metabolism [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2009, 36: 157-164.
- [15] Zhang HJ, Zhao JB, Li P. Progress in the study on animal model of diabetic nephropathy [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2008, 24: 845-848.
- [16] Kharitononkov A, Shanafelt AB. FGF21: a novel prospect for the treatment of metabolic diseases [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10: 359-364.
- [17] Rapaka RR, Goetzman ES, Zheng M, et al. Enhanced defense against *Pneumocystis carinii* mediated by a novel dectin-1 receptor Fc fusion protein [J]. *J Immunol*, 2007, 178: 3702-3712.
- [18] Greten TF, Korangy F, Neumann G, et al. Peptide-beta2-microglobulin-MHC fusion molecules bind antigen-specific T cells and can be used for multivalent MHC-Ig complexes [J]. *J Immunol Methods*, 2002, 271: 125-135.
- [19] Casares S, Zong CS, Radu DL, et al. Antigen-specific signaling by a soluble, dimeric peptide/major histocompatibility complex class II/Fc chimera leading to T helper cell type 2 differentiation [J]. *J Exp Med*, 1999, 190: 543-553.
- [20] Calmels B, Paul S, Ziller C, et al. Secretomeres as a new tool for the monitoring of CTL responses [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54: 548-556.
- [21] Carey B, DeLay M, Strasser JE, et al. A soluble divalent class I MHC/IgG1 fusion protein activates CD8⁺T cells *in vivo* [J]. *Clin Immunol*, 2005, 116: 65-76.
- [22] Romi F, Skeie GO, Vedeler C, et al. Complement activation by titin and ryanodine receptor autoantibodies in myasthenia gravis. A study of IgG subclasses and clinical correlations [J]. *J Neuroimmunol*, 2000, 111: 169-176.
- [23] Mohammadi M, Olsen SK, Goetz R. A protein canyon in the FGF-FGF receptor dimer selects from an à la carte menu of heparan sulfate motifs [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2005, 15: 506-516.