



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108210913 A

(43)申请公布日 2018.06.29

(21)申请号 201710466262.0

(22)申请日 2017.06.19

(66)本国优先权数据

201611162269.5 2016.12.15 CN

(71)申请人 深圳瑞健生命科学研究院有限公司

地址 518020 广东省深圳市罗湖区田贝三路12号510室

(72)发明人 李季男

(74)专利代理机构 北京彩和律师事务所 11688

代理人 张红春

(51)Int.Cl.

A61K 38/48(2006.01)

A61P 5/50(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书43页

序列表19页 附图13页

(54)发明名称

一种促进胰岛素受体底物-2表达的方法

(57)摘要

本发明涉及一种促进胰岛素受体底物-2表达的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原,同时本发明涉及用于促进胰岛素受体底物-2表达的药物。

1. 一种促进糖尿病受试者胰岛素受体底物2 (IRS-2) 的表达的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。
2. 一种促进糖尿病受试者胰岛素分泌的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。
3. 权利要求2的方法,其中所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物2 (IRS-2) 表达。
4. 一种减少受试者胰岛β细胞凋亡的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。
5. 权利要求4的方法,其中所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物2 (IRS-2) 的表达。
6. 一种促进受试者胰岛β细胞损伤修复的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。
7. 权利要求6的方法,其中所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物2 (IRS-2) 表达。
8. 权利要求2-7任一项的方法,其中所述纤溶酶原还促进受试者多向核转录因子NF-κB 的表达。
9. 一种促进糖尿病受试者胰岛β细胞功能修复的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原,其中所述纤溶酶原通过促进胰岛炎症的修复和减少胰岛β细胞凋亡促进糖尿病受试者胰岛β细胞功能修复。
10. 权利要求9的方法,其中所述纤溶酶原促进细胞因子TNF-α、多向核转录因子NF-κB 和胰岛素受体底物2 (IRS-2) 的表达。

## 一种促进胰岛素受体底物-2表达的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种促进胰岛素受体底物-2表达的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原,同时本发明涉及用于促进胰岛素受体底物-2表达的药品。

### 背景技术

[0002] 糖尿病(diabetes mellitus,DM)是一种常见的具有遗传倾向的葡萄糖代谢异常和内分泌障碍性疾病,是由绝对性或相对性胰岛素分泌不足所引起。2015年,全世界有4.15亿糖尿病患者,预计到2040年,糖尿病患者人数将达到6.42亿<sup>[1]</sup>。糖尿病是严重危害人类健康的重大疾病之一。

[0003] 糖尿病的主要表现为糖代谢异常以及脂肪、蛋白质等物质的代谢紊乱,而长期的高血糖状态会导致严重的糖尿病并发症,包括微血管并发症、糖尿病肾病、糖尿病心肌病、糖尿病神经系统病变、糖尿病皮肤病变和糖尿病合并感染等。其中糖尿病肾病以及糖尿病神经系统病变对患者生活质量影响巨大,危害严重。

[0004] 临床上常见的糖尿病可以分为四种类型:1型糖尿病(type 1diabetes, T1DM)、2型糖尿病(type 2diabetes, T2DM)、妊娠期糖尿病、特殊类型糖尿病。其中,以T1DM和T2DM患者最为多见,妊娠期糖尿病和特殊类型糖尿病患者相对较少。

[0005] T1DM被认为与遗传因素、环境因素(如病毒感染、致糖尿病化学物质、饮食因素)和自身免疫因素相关。研究表明,T1DM相关的基因位点至少有17个,定位在不同的染色体。环境因素方面,对T1DM发病有影响的环境因素包括病毒感染、致糖尿病化学物质及饮食因素,其中病毒因素最为重要。目前已经发现腮腺炎、风疹病毒、巨细胞病毒等与T1DM发病有关。其机制在于病毒可以直接破坏胰岛β细胞,并在病毒损伤胰岛β细胞后激发自身免疫反应进一步损伤胰岛β细胞。致糖尿病的化学物质如四氧嘧啶、链脲佐菌素(STZ)、喷他脒等作用于胰岛β细胞,导致胰岛β细胞的破坏。自身免疫因素包括体液免疫和细胞免疫。体液免疫表现为患者血液循环中存在多种抗胰岛β细胞的自身抗体。细胞免疫主要表现为在胰岛炎症浸润细胞和胰岛β细胞表面可以观察到HLA-DA抗原的异常表达和IL-2受体与胰岛细胞表面HLA-1类抗原的过度表达,而外周血的CD4+/CD8+比例,以及IL-1、TNF-α、INF-γ水平升高。这些因素导致的病理变化集中于胰岛β细胞破坏,使得体内胰岛素水平绝对降低,引起T1DM,因此T1DM被考虑是一种自身免疫性疾病。

[0006] T2DM是一种多基因遗传性疾病,一般认为它的发生是多源性的,其中环境因素和遗传因素共同作用导致胰岛素抵抗,表现为相同水平浓度的胰岛素因为机体的抵抗作用而无法起到正常水平的作用。而机体为了达到正常血糖水平,将会过量分泌胰岛素以缓解胰岛素使用的“低效”状态,长此以往对胰岛β细胞的要求越来越高,最终导致胰岛β细胞“过度工作”而自身损伤,进展为胰岛素绝对缺乏。

[0007] DM的发病机制

[0008] DM发病机制复杂,主要与家族遗传倾向、种族异质性、胰岛素受体缺陷、胰岛素受体底物损伤、蛋白酪氨酸磷酸酶相关基因上调、过度免疫炎症反应、脂毒性、氧化应激、及

线粒体损伤等相关<sup>[2-3]</sup>。

#### [0009] 1. 游离脂肪酸

[0010] 游离脂肪酸水平升高既是胰岛素抵抗的发病原因之一,也是胰岛素抵抗状态的重要特征之一。在遗传因素或环境因素的作用下,血液中的游离脂肪酸水平升高,当超过脂肪组织的存储能力就会导致胰岛素抵抗的发生。研究显示,长期的高脂饮食将会导致胰岛β细胞发生功能异常,这是因为高脂饮食除了引发外周胰岛素抵抗还会使腹腔脂肪含量升高和胰岛素抑制脂肪分解能力降低,从而促使游离脂肪酸含量升高,继而抑制胰岛素受体及其底物IRS-1、IRS-2的酪氨酸位点磷酸化,抑制P13K的活性,导致胰岛素信号转导通路受阻形成胰岛素抵抗。

#### [0011] 2. 炎症反应

##### [0012] 1) 炎症与胰岛素抵抗

[0013] T2DM是一种轻度非特异性炎症性疾病。近年来的研究显示,炎症导致胰岛素抵抗的主要机制是炎症因子与胰岛素受体底物的信号转导出现交叉,一方面非特异性炎症产生的炎症因子对IRS/PI3K信号通路出现了阻碍作用,而另一方面炎症因子激活的一系列激酶会诱导IRS的丝、苏氨酸位点的磷酸化从而对正常的酪氨酸磷酸化产生阻碍,最终使得胰岛素信号转导能力下降诱发胰岛素抵抗<sup>[2-3]</sup>。

[0014] 在靶细胞中,胰岛素与其受体结合能激活受体,之后细胞内的信号转导通路产生一系列细胞内转导分子与酶促级联反应完成信号在胞内的逐级传递并放大,信号最后传至靶器官而产生一系列的生物学效应。信号转导通路主要有两条,一个是IRS-1-PI3K-PKB/AKT途径,另一个是丝裂原活化蛋白激酶(Shc/Raf/MAPK)途径。在第一条通路中,首先是在外源性胰岛素和/或葡萄糖刺激下发生胰岛素与其受体结合,从而激活了受体的内源性酪氨酸激酶。激活的酪氨酸激酶在实现自身的磷酸化的同时诱导了胰岛素受体底物IRS的酪氨酸位点磷酸化。活化的IRS迁移至细胞膜上,通过磷酸酪氨酸结合域(PTB)将磷酸酪氨酸锚定在IRS酪氨酸激酶上,酪氨酸磷酸化的IRS通过其SH2结构域招募到PI3K的调节亚单位P85。P85与磷酸肌醇的3磷酸分子结合,将磷脂酰肌醇一磷酸(PIP)转化为磷脂酰肌醇二磷酸(PIP2)及磷脂酰肌醇三磷酸(PIP3),它们是胰岛素和其他生长因子的第二信使,是下游信号分子磷酸肌醇依赖的蛋白激酶-1(PDK1)和(或)蛋白激酶c(PKC)的某一亚型的锚定位点。PDK1可以激活蛋白激酶B(PKB,也称为Akt)和某一非典型PKC亚型。激活的PKB一边通过丝/苏氨酸磷酸化让糖原合成激酶-3(GSK3)失活,另一方面激活哺乳动物的雷帕霉素靶点(mTOR)蛋白激酶,从而诱导其下游70ku-S6激酶(p70S6K)磷酸化激活。mTOR蛋白激酶可作为“ATP感受器”,激活p70s6K而不需要通过Ca<sup>2+</sup>/cAMP,实现控制蛋白的合成、加强基因的转录、促使胰岛β细胞肥大及其他生物效应。PKB可以直接诱导某些转录因子丝/苏氨酸磷酸化促进细胞有丝分裂的发生<sup>[4-5]</sup>。在第二条通路中,Ras的激活可通过两条通路实现。1)活化的胰岛素受体激活IRS-2蛋白,而IRS-2蛋白可将信号传递给适配蛋白生长因子受体结合蛋白2(Grb2),再与信号蛋白GDP/GTP交换因子(mSOS)相互作用进而能活化失活的Ras-GDP转变成的Ras-GT从而实现激活Ras。胰岛素受体直接作用使信号蛋白Shc的酪氨酸磷酸化,然后Shc与Grb2结合经mSOS途径激活Ras。激活的Ras-GTP招募Raf丝氨酸激酶,依次使MAPK激酶、MAPK磷酸化。激活的MAPK可激活其他蛋白激酶参与诱导基因转录、调控细胞凋亡等过程<sup>[6]</sup>。

[0015] 目前已证实IRS-1的丝氨酸残基可被多种炎症激酶磷酸化,如c-Jun氨基末端激酶(JNK)、I $\kappa$ B激酶 $\beta$ (I $\kappa$ B $\beta$ )和蛋白激酶C(PKC)- $\theta$ 。放射免疫分析法显示丝氨酸307位点是JNK磷酸化IRS-1的主要位点,它的突变会使JNK诱导的IRS-1磷酸化和TNF对胰岛素引起的IRS-1酪氨酸磷酸化的抑制作用消失。JNK通过磷酸化IRS-1的丝氨酸307,减少了胰岛素受体底物酪氨酸磷酸化,抑制胰岛素信号的转导<sup>[7]</sup>。Hiorsumi等发现饮食型肥胖鼠和ob/ob鼠的肝脏、肌肉、脂肪组织中JNK活性显著升高。基因敲除(JNK1-/-)能够使饮食诱型肥胖鼠胰岛素抵抗现象减弱,缓解ob/ob鼠的肥胖、高血糖和高胰岛素血症。肥胖鼠肝脏组织IRS-1丝氨酸307位点的磷酸化水平比瘦鼠高,可是在基因敲除(JNK1-/-)的肥胖鼠中并未见升高,可见IRS-1的丝氨酸307位点是JNK在体内作用的靶点<sup>[1,8]</sup>。研究显示TNF $\alpha$ 刺激诱导肝细胞胰岛素抵抗的模型中,JNK抑制剂可以完全阻断丝氨酸307的磷酸化。I $\kappa$ B $\beta$ 可通过至少两个途径影响胰岛素信号传导,可以是直接诱导IRS-1的Ser307位点磷酸化,也可以通过I $\kappa$ B的磷酸化,进而活化NF- $\kappa$ B,通过刺激多种炎症因子的表达间接引发胰岛素抵抗。

[0016] 炎症反应是感染、组织损伤和应激反应后人体免疫系统对抗这些损伤的防御性反应,同时也是糖尿病、心血管疾病和肿瘤的病因或发病机制。

[0017] 早在1993年,Hotmamisligil等<sup>[9]</sup>通过动物实验证明,胰岛素抵抗的肥胖大鼠其脂肪组织中促炎性细胞因子、TNF- $\alpha$ 水平高。从此,众多研究者开始探讨炎症与肥胖、胰岛素抵抗之间的关系,并探究其分子发病机制。2006年Hotmamisligil<sup>[10]</sup>第一次提出代谢性炎症(metabolic inflammation)这一新的医学定义,强调这种低度、慢性的全身炎症主要是由多余的营养物质和代谢物质导致的。代谢性炎症可能存在与典型炎症相类似的分子与信号的传导通路,与既往我们所认识的典型炎症不同的是,代谢性炎症并不存在红、肿、热、痛和功能障碍的症状。正常情况下,机体内环境处于稳态水平,炎症和代谢各自及相互之间均保持一种动态平衡状态。当机体发生代谢紊乱时,打破了机体这种平衡状态,引起免疫系统的失衡,激发炎症信号传导通路,促使机体释放一系列炎症因子,某些炎症因子甚至放大自身炎症反应,形成炎症瀑布效应,进一步使机体发生胰岛素抵抗,从而导致代谢综合征的发生。

[0018] 研究证明TNF- $\alpha$ 与代谢综合征有密切关系。TNF又叫恶液质素,主要由活化的巨噬细胞、自然杀伤(NK)细胞及T淋巴细胞产生,把由巨噬细胞产生分泌的TNF称为TNF- $\alpha$ ,把由T淋巴细胞产生分泌的淋巴毒素叫做TNF- $\beta$ 。TNF- $\alpha$ 的生物学活性占TNF总活性的70%~95%,因此目前经常涉及的TNF大多指的是TNF- $\alpha$ 。经过多年的研究探讨,目前已明确TNF- $\alpha$ 与胰岛素抵抗、自身免疫性疾病、肿瘤、慢性乙型肝炎等多种疾病有关。在胰岛素抵抗的发生发展过程中TNF- $\alpha$ 起到至关重要的作用。Swaroop等<sup>[11]</sup>通过检测50例T2DM患者的血清TNF- $\alpha$ 水平,得出T2DM患者TNF- $\alpha$ 水平升高,并且与BMI、空腹胰岛素水平以及稳态模型胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)显著相关,提示TNF- $\alpha$ 在T2DM发病机制中起重要作用。还有研究指出,TNF- $\alpha$ 可以使胰岛素受体的磷酸化受到抑制,当胰岛素受体的磷酸化受到抑制时可以减少葡萄糖转运蛋白的基因表达,从而使脂蛋白脂酶的活性降低,最终可以造成脂肪的分解<sup>[12]</sup>。

[0019] 2) 炎症与胰岛 $\beta$ 细胞的凋亡

[0020] 慢性低度炎症反应与胰岛 $\beta$ 细胞功能障碍密切相关。 $\beta$ 细胞数量减少导致的胰岛 $\beta$ 细胞功能障碍是T2DM发病的另一重要原因,而 $\beta$ 细胞的凋亡又是 $\beta$ 细胞数量减少最重要的

原因。由于遗传或饮食的原因,T2DM患者易发生胰岛素抵抗,患者血糖升高,高血糖状态又能促进IL-6产生,IL-6不仅可以减少GLUT4表达,降低脂肪细胞对葡萄糖的转运,阻碍糖原合成,降低胰岛素的敏感性;同时也可以促进胰岛细胞分泌IL-6,造成恶性循环。高血糖诱导IL-1 $\beta$ 大量产生,通过激活NF- $\kappa$ B、MAPK、Fas、NO等通路导致胰岛细胞凋亡,多种炎症通路相互交叉促进,加剧了胰岛细胞的凋亡,最终导致胰岛功能的衰竭<sup>[13]</sup>。此外,IL-1 $\beta$ 还可以介导白细胞间的相互作用,并与其他细胞因子如IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 等相互影响制约,在 $\beta$ 细胞损伤过程中起着重要的作用。T2DM的血脂异常会引起激素类物质如瘦素和IL-6水平增加。瘦素可增加IL-1 $\beta$ 的释放来诱导 $\beta$ 细胞凋亡,还可负相调控胰岛素的分泌<sup>[14]</sup>。ROS除导致胰岛素抵抗外,对于胰岛 $\beta$ 细胞的损伤也有作用,氧化应激状态下,胰岛素基因转录因子的表达以及胰岛素结合位点明显减少,从而影响胰岛素的产生及分泌。其他脂肪细胞因子如TNF- $\alpha$ 和瘦素也能降低 $\beta$ 细胞的功能<sup>[15]</sup>。这些细胞因子的联合作用,对胰岛 $\beta$ 细胞功能造成更明显的损伤。此外,部分炎症因子还可作用于胰岛素受体底物2的关键部位,使其丝氨酸/苏氨酸磷酸化,导致胰岛素受体底物2的降解加快,促进胰岛 $\beta$ 细胞的凋亡。

### [0021] 3.氧化应激

[0022] 研究表明,氧化应激是引起T2DM的发生及发展的重要因素。氧化应激是指活性氧(reactive oxygen species,ROS)和活性氮(reactive nitrogen species,RNS)的产生与机体内抗氧化防御系统的清除之间失衡,导致ROS和RNS产生过多,造成机体组织细胞及蛋白和核酸等生物大分子损伤<sup>[13]</sup>。高血糖是产生氧化应激的主要原因,其通过线粒体电子传递链<sup>[14]</sup>、葡萄糖自氧化和多元醇通路等途径<sup>[15]</sup>增加机体内的ROS与RNS含量,其中线粒体电子传递链是产生ROS的主要途径。线粒体电子传递链主要涉及酶复合物I~IV、细胞色素c和辅酶Q,在酶复合物I和III中会持续产生少量的超氧产物,包括超氧阴离子,过氧化氢和羟基自由基,而超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶会将超氧产物催化转化成氧气和水。但在肥胖或高血糖条件下,超氧产物会大幅增加,当超氧产物的产生速率超过其移除速率时即会产生氧化应激。

[0023] 多项研究<sup>[16-18]</sup>表明,ROS可直接损伤 $\beta$ 细胞,特别是破坏细胞线粒体结构,促进 $\beta$ 细胞凋亡;ROS还可通过影响胰岛素信号转导通路间接抑制 $\beta$ 细胞功能,如激活核转录因子 $\kappa$ B(nuclear transcription factor $\kappa$ B,NF- $\kappa$ B)信号通路,引起 $\beta$ 细胞炎症反应;抑制胰十二指肠同源盒因子1(pancreatic and duodenal homeobox 1,PDX-1)的核质易位,抑制线粒体能量代谢,减少胰岛素合成与分泌等。氧化应激通过NF- $\kappa$ B通路引起 $\beta$ 细胞损伤NF- $\kappa$ B为p50和RelA两个亚基组成的二聚体,在静息细胞中,与抑制蛋白I $\kappa$ B结合,以无活性的三聚体形式存在于胞浆中,主要参与细胞对应激、细胞因子、自由基及细菌病毒等刺激的应答及瞬时调控基因表达等<sup>[19]</sup>。研究表明,高血糖诱导生成的ROS会通过扰乱细胞内信号转导激活NF- $\kappa$ B,诱导 $\beta$ 细胞损伤<sup>[20]</sup>。Mariappan等<sup>[21]</sup>用吡咯烷二硫代氨基甲酸(PDTC)抑制肥胖db/db小鼠体内NF- $\kappa$ B表达,发现氧化应激对小鼠 $\beta$ 细胞线粒体的损伤程度明显减轻;Hofmann等<sup>[22]</sup>利用抗氧化药物 $\alpha$ -硫辛酸对糖尿病患者进行治疗,发现患者体内NF- $\kappa$ B活性显著降低,患者病情也有改善;Eldor等<sup>[23]</sup>利用转基因技术特异性地抑制小鼠NF- $\kappa$ B的表达,明显降低了STZ诱导后小鼠的糖尿病发病率。

[0024] NF- $\kappa$ B作为一种多向核转录因子,激活后参与细胞增殖、细胞凋亡及炎症和免疫等多种基因的调节<sup>[24]</sup>。在糖尿病机体中,NF- $\kappa$ B通过调控细胞因子和趋化因子的基因表

达,如IL-1(interleukin-1)和MCP-1(monocyte/macrophage chemoattractant protein-1)因子等,引起胰岛白细胞增多,导致 $\beta$ 细胞损伤<sup>[25]</sup>。另外NF- $\kappa$ B调控的许多基因产物如肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ )等又会进一步激活NF- $\kappa$ B,加重 $\beta$ 细胞损伤<sup>[26]</sup>。

[0025] Mahadev等<sup>[27]</sup>研究显示,ROS对胰岛素信号传导有调控作用,且这种作用有多面性。在胰岛素刺激下,机体会通过Nox(NADPH oxidase)依赖机制快速产生微量的ROS,后者作为第二信使,主要通过氧化作用抑制PTP1B的活性促进胰岛素级联反应<sup>[28]</sup>,而用DPI(diphenyleneiodonium)抑制Nox后,胰岛素刺激的胰岛素受体(insulin receptor,InsR)与胰岛素受体底物(insulin receptor substrate,IRS)磷酸化下降48%<sup>[29]</sup>。Loh等<sup>[30]</sup>的研究显示生理性ROS可促进机体对胰岛素的敏感性。虽然在生理状态下,由胰岛素刺激产生的微量ROS会促进胰岛素的作用,但是长期高血糖会使机体通过线粒体途径产生大量ROS<sup>[31]</sup>,引起胰岛素抵抗。

[0026] InsR和IRS是胰岛素信号传导通路中重要的信号元件:前者是胰岛素信号传导的起始元件,而IRS是前者与通路下游元件的连接桥梁。大量研究表明,氧化应激可通过多个途径干扰InsR和IRS的磷酸化反应,阻碍胰岛素信号传导。IKK是NF- $\kappa$ B的抑制亚基I $\kappa$ B的激活剂,在ROS刺激下IKK可作为InsR和IRS的丝氨酸/苏氨酸磷酸化激酶,促使InsR和IRS发生丝氨酸磷酸化,正常的酪氨酸磷酸化受抑制,阻碍胰岛素信号传导<sup>[32]</sup>。Brownlee<sup>[33]</sup>研究显示,IKK可直接磷酸化IRS 307位的丝氨酸残基,导致IRS正常的酪氨酸磷酸化减弱,阻碍InsR与IRS的结合,从而引起胰岛素抵抗。

[0027] 除IKK外,MAPK家族中的多个成员对InsR和IRS也有影响。JNK、细胞外调节蛋白激酶(extracellularregulated protein kinases,ERK)和p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)是MAPK家族成员,具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性,在受到氧化应激、细胞因子和G-蛋白偶联受体激动剂等作用下可被激活。多项研究表明,JNK、ERK和p38MAPK的激活会加重InsR和IRS的丝氨酸/苏氨酸磷酸化程度,使InsR与IRS之间的蛋白结合能力及IRS活化下游含有SH-2结构域的信号分子的能力降低<sup>[34-36]</sup>。

[0028] 糖尿病高糖状态所致的氧化应激是多种慢性并发症形成的关键原因之一,也是诱发DNA损伤的重要因素<sup>[37]</sup>。糖尿病发生时,细胞外液可见持续高糖。在该状态下,线粒体电子传递链产生的电子明显增多,产生过多ROS,造成细胞内环境和脂质、蛋白质和DNA等生物大分子损伤。机体在有氧代谢途径中产生的活性氧作为一种突变诱导剂,可将DNA链上的鸟嘌呤氧化为8-羟基鸟嘌呤(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine,8-OHdG)。在DNA复制过程中,8-OHdG易与腺嘌呤错配,导致G:C到T:A颠换突变,形成DNA损伤。此外,ROS还会引起其他形式的DNA损伤,包括DNA链断裂、DNA位点突变、DNA双链畸变和原癌基因与肿瘤抑制基因突变等。同时,DNA损伤也可能加剧ROS及氧化应激过程,如DNA损伤可通过H2AX-还原型辅酶II氧化酶1(Nox1)/Rac1通路诱导ROS产生。ROS进一步促使大量Ca<sup>2+</sup>进入线粒体,引起细胞坏死和凋亡,或直接损伤线粒体,引起线粒体功能障碍,进而损伤胰岛 $\beta$ 细胞,加剧糖尿病的病理过程<sup>[38]</sup>。

[0029] ROS除导致胰岛素抵抗外,对于胰岛 $\beta$ 细胞的损伤也有作用,氧化应激状态下,胰岛素基因转录因子的表达以及胰岛素结合位点明显减少,从而影响胰岛素的产生及分泌。其他脂肪细胞因子如TNF- $\alpha$ 也能降低 $\beta$ 细胞的功能<sup>[15]</sup>。这些细胞因子的联合作用,对胰岛 $\beta$

细胞功能造成更明显的损伤。此外,部分炎症因子还可作用于胰岛素受体底物2的关键部位,使其丝氨酸/苏氨酸磷酸化,导致胰岛素受体底物2的降解加快,促进胰岛β细胞的凋亡。

[0030] 从以上可见,氧化应激在糖尿病发生和发展过程中的作用十分复杂。ROS除直接损伤胰岛β细胞外,还可作为信号分子激活一些应激敏感通路,调节相关因子的表达,引起β细胞凋亡或坏死,抑制胰岛素分泌,诱发胰岛素抵抗,最终引发或加重糖尿病。

[0031] DM的治疗

[0032] 糖尿病通常采用药物治疗,传统的药物治疗包括胰岛素类药物和口服类降糖药物。

[0033] 胰岛素早期主要是从猪牛等动物的胰脏中提取而来,在人体应用后会发生明显的过敏反应。20世纪90年越来越成熟,使得胰岛素类似物逐渐应用起来,这种胰岛素能明显改变传统类胰岛素的药代动力学,有着低血糖发生率低、起效快、作用持久等优势。目前,随着胰岛素制剂探索的不断深入,一些口服胰岛素制剂已步入试验阶段,但因为技术上的困难,至今尚无有效的口服制剂应用在临床。

[0034] 传统口服类降糖药物较多,常见的有如下几种:(1)双胍类如二甲双胍。二甲双胍有良好的心血管保护作用,降糖效果也不错,目前已有多个国家将其作为一线药物治疗T2DM。(2)磺脲类:磺脲类属于一种胰岛素促泌剂,刺激胰岛β细胞,使其分泌出胰岛素,达到改善血糖水平的效果。目前,我国允许上市的该类胰岛素主要有格列美脲、格列本脲、格列吡嗪、格列齐特、格列喹酮等,不过从一些研究中显示若长期服用该类药物可能会造成降糖效果失败,极易发生低血糖与体质量增加等并发症。(3)噻唑烷二酮(thiazolidinedione compounds, TZD)类:1999年FDA将罗格列酮与吡格列酮批准用在T2DM中,前者可能加重心脏病风险,为此之后被限制作为二线治疗药物使用,同时禁用于心衰病症。2013年6月FDA对罗格列酮进行重新审核,指出该药物可继续用于临床,甚至放松或完全解除此药及其复方制剂的应用。(4)α-糖苷酶抑制剂:这类胰岛素会抑制小肠黏膜上皮细胞的糖苷酶,进而缓解碳水化合物的吸收作用,导致餐后血糖水平降低。此类药物常用的有伏格列波糖、阿卡波糖及米格列醇等。

[0035] 现阶段治疗糖尿病的药物主要为传统抗糖尿病药物,包括磺酰脲类、格列奈类、双胍类、噻唑烷二酮类(thiazolidinediones, TZD)、α-葡萄糖苷酶抑制剂及胰岛素等,这些药物均存在不同程度的不良反应,如引发低血糖、胃肠道不适、肥胖等。随着对糖尿病基础理论研究的深入,为了避免传统降糖药物的副作用、对胰岛β细胞带来保护作用,人们也在积极地寻找新的糖尿病治疗靶点。目前发现与糖尿病发病机制相关的靶点主要包括胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)、二肽基肽酶-4(dipeptide peptidase-4, DPP-4)、钠-葡萄糖共转运蛋白-2(sodium-glucose cotransporter-2, SGLT-2)、糖原合酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3, GSK-3)、蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphates, PTP)、葡萄糖激酶(glucokinase, GK)等。其中基于调整胰高血糖素的药物如胰高血糖素样肽-1(glucagon like peptide-1, GLP-1)类似物、GLP-1受体激动剂及二肽基肽酶-4(dipeptidyl peptidase-4, DPP-4)抑制剂被认为可有效维持血糖稳态、改善β细胞功能、延缓糖尿病发展,甚至逆转糖尿病病程。

[0036] 对于糖尿病目前尚没有一种有效的药物或手段能完全治愈,目前的药物治疗集



中在通过控制血糖在一定的范围降低并延缓并发症的发生。随着对糖尿病发病机制更深入、全面的了解,对于糖尿病的治疗药物研究,也从对传统机制的药物研究过渡到对新靶点和新作用机制的药物研究,其中有些已上市,如GLP-1受体激动剂、DPP-4抑制剂及SGLT-2抑制剂等,还有一些药物处在临床或临床前研究阶段,如GPR119受体激动剂、11 $\beta$ -HSD1抑制剂、PTP1B抑制剂及GK激动剂等,其疗效和安全性还有待进一步临床验证。尽管近年来新靶点抗糖尿病药物的出现为DM治疗提供了更多的选择,但由于糖尿病的发病机制复杂,涉及的激素、酶和受体众多,新药物研究领域还存在诸如单靶点药物作用范围较窄、降糖作用较弱、作用于全身系统引起不良反应等问题均有待于进一步研究。因此,人们需要寻找可作用于糖尿病发病机制诸多方面的、更加有效的治疗药物。

[0037] 本发明发现纤溶酶原能够减轻糖尿病实验小鼠胰腺组织的损伤、控制炎症、减少胰岛 $\beta$ 细胞凋亡、修复胰腺组织、恢复胰岛 $\beta$ 细胞的分泌功能、降低血糖,是一种有望成为全面针对糖尿病发病机制诸多方面的全新药物。

#### [0038] 发明简述

[0039] 本发明包括下述各项:

[0040] 1. 一种促进糖尿病受试者胰岛素受体底物2 (IRS-2) 的表达的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

[0041] 2. 一种促进糖尿病受试者胰岛素分泌的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

[0042] 3. 项2的方法,其中所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物2 (IRS-2) 表达。

[0043] 4. 一种减少受试者胰岛 $\beta$ 细胞凋亡的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

[0044] 5. 项4的方法,其中所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物2 (IRS-2) 的表达。

[0045] 6. 一种促进受试者胰岛 $\beta$ 细胞损伤修复的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

[0046] 7. 项6的方法,其中所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物2 (IRS-2) 表达。

[0047] 8. 项2-7任一项的方法,其中所述纤溶酶原还促进受试者多向核转录因子NF- $\kappa$ B的表达。

[0048] 9. 一种促进糖尿病受试者胰岛 $\beta$ 细胞功能修复的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原,其中所述纤溶酶原通过促进胰岛炎症的修复和减少胰岛 $\beta$ 细胞凋亡促进糖尿病受试者胰岛 $\beta$ 细胞功能修复。

[0049] 10. 项9的方法,其中所述纤溶酶原促进细胞因子TNF- $\alpha$ 、多向核转录因子NF- $\kappa$ B和胰岛素受体底物2 (IRS-2) 的表达。

[0050] 11. 一种降低糖尿病受试者血糖的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

[0051] 12. 项11的方法,其中所述血糖选自如下的一项或多项:血清葡萄糖水平、血清果糖胺水平、血清糖化血红蛋白水平。

[0052] 13. 项12的方法,其中所述血糖为血清葡萄糖水平。

[0053] 14. 项11-13任一项的方法,其中所述糖尿病为T1DM或T2DM。

[0054] 15. 一种提高糖尿病受试者糖耐量的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。

[0055] 16. 项15的方法,其中所述糖尿病为T2DM。

[0056] 17. 一种促进糖尿病受试者餐后血糖下降的方法,包括给药受试者有效量的纤溶

酶原。

[0057] 18. 项17的方法,其中所述纤溶酶原在受试者餐前30分钟至1.5小时 给予。

[0058] 19. 项18的方法,其中所述纤溶酶原在受试者餐前30分钟至1小时给 予。

[0059] 20. 一种促进糖尿病受试者对葡萄糖的利用的方法,包括给药受试者有 效量的纤溶酶原。

[0060] 21. 一种促进糖尿病受试者胰岛素分泌的方法,包括给药受试者有效量 的纤溶酶原。

[0061] 22. 项21的方法,其中所述纤溶酶原还促进糖尿病受试者胰岛素的表 达。

[0062] 23. 项21或22的方法,其中所述糖尿病为T1DM或T2DM。

[0063] 24. 项20-23任一项的方法,其中所述纤溶酶原促进糖尿病受试者进食 后的胰岛 素分泌。

[0064] 25. 项20-23任一项的方法,其中所述纤溶酶原促进糖尿病受试者禁食 状态下的 胰岛素分泌。

[0065] 26. 项20-25任一项的方法,其中所述纤溶酶原促进糖尿病受试者应答 血糖升高 刺激的胰岛素分泌,使血糖恢复到正常或接近正常水平。

[0066] 27. 项21-26任一项的方法,其中所述纤溶酶原在促进所述胰岛素表达 和/或分泌 的同时,降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌。

[0067] 28. 项27的方法,其中所述纤溶酶原通过促进所述胰岛素表达和/或分 泌的同时, 降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌,实现使受试者血糖回 复到正常或接近正常水 平。

[0068] 29. 项1-28任一项的方法,其中所述纤溶酶原可与一种或多种其它药物 或治疗方 法联用。

[0069] 30. 项29的方法,其中所述纤溶酶原可与一种或多种选自如下的药物 联用:抗糖 尿病药物、抗心脑血管疾病药物、抗血栓药物、抗高血压药 物,抗血脂药物、抗凝药物、抗感 染药物。

[0070] 31. 项1-30任一项的方法,其中所述纤溶酶原与序列2、6、8、10或 12具有至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序 列同一性,并且仍然具有纤溶酶 原活性。

[0071] 32. 项1-31任一项的方法,所述纤溶酶原是在序列2、6、8、10或12 的基础上,添加、 删除和/或取代1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、 1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1- 15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1 个氨基酸,并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。

[0072] 33. 项1-32任一项的方法,所述纤溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并 且仍然具 有纤溶酶原活性的蛋白质。

[0073] 34. 项1-33任一项的方法,所述纤溶酶原选自Glu-纤溶酶原、Lys-纤溶 酶原、小纤 溶酶原、微纤溶酶原、delta-纤溶酶原或它们的保留纤溶酶原活 性的变体。

[0074] 35. 项1-34任一项的方法,所述纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原、或 其仍然 保留纤溶酶原活性的变体或片段。

[0075] 36. 项1-34任一项的方法,所述纤溶酶原为来自灵长类动物或啮齿类动 物的人纤 溶酶原直向同系物或其仍然保留纤溶酶原活性的变体或片段。

- [0076] 37. 项1-36任一项的方法,所述纤溶酶原的氨基酸如序列2、6、8、10 或12所示。
- [0077] 38. 项1-37任一项的方法,其中所述纤溶酶原是人天然纤溶酶原。
- [0078] 39. 项1-38任一项的方法,其中所述受试者是人。
- [0079] 40. 项1-39任一项的方法,其中所述受试者缺乏或缺失纤溶酶原。
- [0080] 41. 项1-40任一项的方法,所述缺乏或缺失是先天的、继发的和/或局部的。
- [0081] 42. 一种用于项1-41任一项的方法的纤溶酶原。
- [0082] 43. 一种药物组合物,其包含药学上可接受的载剂和用于项1-41中任一项所述方法的纤溶酶原。
- [0083] 44. 一种预防性或治疗性试剂盒,其包含:(i) 用于项1-41中任一项所述方法的纤溶酶原和(ii) 用于递送所述纤溶酶原至所述受试者的构件(means)。
- [0084] 45. 根据项44所述的试剂盒,其中所述构件为注射器或小瓶。
- [0085] 46. 项44或45的试剂盒,其还包含标签或使用说明书,该标签或使用说明书指示将所述纤溶酶原授予所述受试者以实施项1-41中任一项所述方法。
- [0086] 47. 一种制品,其包含:
- [0087] 含有标签的容器;和
- [0088] 包含(i) 用于项1-41中任一项所述方法的纤溶酶原或包含纤溶酶原的药物组合物,其中所述标签指示将所述纤溶酶原或组合物授予所述受试者以实施项1-41中任一项所述方法。
- [0089] 48. 项44-46中任一项的试剂盒或项47的制品,还包含另外的一个或多个构件或容器,该构件或容器中含有其他药物。
- [0090] 49. 项48的试剂盒或制品,其中所述其他药物选自下组:抗糖尿病药物、抗心脑血管疾病药物、抗血栓药物、抗高血压药物,抗血脂药物、抗凝药物、抗感染药物。
- [0091] 一方面,本发明涉及一种预防和治疗糖尿病的方法,包括给药受试者有效量的纤维蛋白溶酶原或纤溶酶。
- [0092] 另一方面,本发明涉及一种降低糖尿病受试者血糖的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于降低糖尿病受试者血糖的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备降低糖尿病受试者血糖的药物的用途。此外,本发明还涉及用于降低糖尿病受试者血糖的纤溶酶原。在一些实施方案中,所述血糖选自如下的一项或多项:血清葡萄糖水平、血清果糖胺水平、血清糖化血红蛋白水平。在另一些实施方案中,所述血糖为血清葡萄糖水平。在上述实施方案中,所述糖尿病为T1DM或T2DM。
- [0093] 另一方面,本发明涉及一种提高糖尿病受试者糖耐量的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于提高糖尿病受试者糖耐量的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备提高糖尿病受试者糖耐量的药物的用途。此外,本发明还涉及用于提高糖尿病受试者糖耐量的纤溶酶原。在一些实施方案中,所述糖尿病为T2DM。
- [0094] 一方面,本发明涉及一种促进糖尿病受试者餐后血糖下降的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于促进糖尿病受试者餐后血糖下降的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者餐后血糖下降的药物的用途。此外,本发明还涉及用于促进糖尿病受试者餐后血糖下降的纤溶酶原。在一些实施方案中,所述纤溶酶原在受试者餐前30分钟至1.5小时给予。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原

在受试者餐前30分钟至1小时给予。

[0095] 一方面,本发明涉及一种促进糖尿病受试者对葡萄糖的利用的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于促进糖尿病受试者对葡萄糖的利用的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者对葡萄糖的利用的药物的用途。此外,本发明还涉及用于促进糖尿病受试者对葡萄糖的利用的纤溶酶原。另一方面,本发明涉及一种促进糖尿病受试者胰岛素分泌的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。在一些实施方案中,所述纤溶酶原还促进糖尿病受试者胰岛素的表达。在上述实施方案中,所述糖尿病为T1DM或T2DM。在一些实施方案中,所述纤溶酶原促进糖尿病受试者进食后的胰岛素分泌。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原促进糖尿病受试者禁食状态下的胰岛素分泌。在一些实施方案中,所述纤溶酶原促进糖尿病受试者应答血糖升高刺激的胰岛素分泌,使血糖恢复到正常或接近正常水平。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原在促进所述胰岛素表达和/或分泌的同时,降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌,具体地,所述纤溶酶原通过促进所述胰岛素表达和/或分泌的同时,降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌,实现使受试者血糖恢复到正常或接近正常水平。

[0096] 一方面,本发明涉及一种降低糖尿病受试者胰高血糖素分泌的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于降低糖尿病受试者胰高血糖素分泌的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备降低糖尿病受试者胰高血糖素分泌的药物的用途。此外,本发明还涉及用于降低糖尿病受试者胰高血糖素分泌的纤溶酶原。在一些实施方案中,所述纤溶酶原还降低糖尿病受试者胰高血糖素的表达。在上述实施方案中,所述糖尿病为T1DM或T2DM。在一些实施方案中,所述纤溶酶原降低糖尿病受试者进食后的胰高血糖素分泌。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原降低糖尿病受试者禁食状态下的胰高血糖素分泌。在一些实施方案中,所述纤溶酶原在糖尿病受试者血糖升高状态下降低胰高血糖素的分泌,使血糖恢复到正常或接近正常水平。在一些实施方案中,所述纤溶酶原在糖尿病受试者血糖升高状态下降低胰高血糖素的分泌,使血糖恢复到正常或接近正常水平。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原在降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌的同时,促进所述胰岛素表达和/或分泌,具体地,所述纤溶酶原通过降低受试者胰高血糖素的表达和/或分泌的同时,促进所述胰岛素表达和/或分泌,实现使受试者血糖恢复到正常或接近正常水平。在上述实施方案中,所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物2 (IRS-2) 的表达。

[0097] 一方面,本发明涉及一种促进糖尿病受试者胰岛细胞损伤修复的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于促进糖尿病受试者胰岛细胞损伤修复的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者胰岛细胞损伤修复的药物的用途。此外,本发明还涉及用于促进糖尿病受试者胰岛细胞损伤修复的纤溶酶原。在一些实施方案中,所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物2 (IRS-2) 的表达。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原促进细胞因子TNF- $\alpha$ 的表达。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原促进受试者多向核转录因子NF- $\kappa$ B的表达。在一些实施方案中,所述胰岛细胞损伤为选自下述的一种或多种:胰岛 $\beta$ 细胞合成和分泌胰岛素的功能损伤、胰岛组织结构损伤、胰岛胶原沉积、胰岛的纤维化、胰岛细胞凋亡和胰岛分泌胰高血糖素、胰岛素的平衡紊乱、胰岛分泌胰高血糖素和胰岛素的水平不能与受试者血糖水平相适应。在一些实施方案中,所述纤溶酶原使所述糖尿病受试者胰高血糖素分泌减少,胰岛素分泌增加,具体地,所述胰岛胰高

血糖素和胰岛素分泌的正常平衡得到修复。

[0098] 另一方面,本发明涉及一种保护受试者胰岛的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于保护受试者胰岛的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备保护受试者胰岛的药物的用途。此外,本发明还涉及用于保护受试者胰岛的纤溶酶原。在一些实施方案中,所述纤溶酶原减少胰岛胶原沉积。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原减轻胰岛的纤维化。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原减轻胰岛细胞凋亡。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原促进胰岛胰岛素受体底物2 (IRS-2) 的表达。在一些实施方案中,所述纤溶酶原促进胰岛炎症的修复。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原促进细胞因子TNF- $\alpha$ 的表达。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原促进受试者多向核转录因子NF- $\kappa$ B的表达。在上述实施方案中,所述受试者为糖尿病患者,具体地,所述糖尿病患者为T1DM或T2DM。在一些实施方案中,所述T1DM受试者为PLG活性正常或PLG活性受损受试者。

[0099] 另一方面,本发明涉及一种促进糖尿病受试者胰岛炎症修复的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于促进糖尿病受试者胰岛炎症修复的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者胰岛炎症修复的药物的用途。此外,本发明还涉及促进糖尿病受试者胰岛炎症修复的纤溶酶原。在一些实施方案中,所述纤溶酶原促进细胞因子TNF- $\alpha$ 的表达。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原促进受试者多向核转录因子NF- $\kappa$ B的表达。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原减少胰岛胶原沉积。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原减轻胰岛的纤维化。在另一些实施方案中,所述纤溶酶原抑制胰岛细胞凋亡。在上述实施方案中,所述糖尿病患者为T1DM或T2DM,具体地,所述T1DM受试者为PLG活性正常或PLG活性受损受试者。

[0100] 一方面,本发明涉及一种促进糖尿病受试者细胞因子TNF- $\alpha$ 表达的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于促进糖尿病受试者细胞因子TNF- $\alpha$ 表达的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者细胞因子TNF- $\alpha$ 表达的药物的用途。此外,本发明还涉及用于促进糖尿病受试者细胞因子TNF- $\alpha$ 表达的纤溶酶原。

[0101] 另一方面,本发明涉及促进糖尿病受试者多向核转录因子NF- $\kappa$ B表达的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于促进糖尿病受试者多向核转录因子NF- $\kappa$ B表达的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者多向核转录因子NF- $\kappa$ B表达的药物的用途。

[0102] 另一方面,本发明涉及一种促进胰岛胰岛素受体底物2 (IRS-2) 表达的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于促进胰岛胰岛素受体底物2 (IRS-2) 表达的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进胰岛胰岛素受体底物2 (IRS-2) 表达的药物的用途。此外,本发明还涉及用于促进胰岛胰岛素受体底物2 (IRS-2) 表达的纤溶酶原。

[0103] 另一方面,本发明涉及一种促进糖尿病受试者胰岛素分泌的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原促进胰岛素受体底物2 (IRS-2) 的表达。本发明还涉及纤溶酶原用于促进糖尿病受试者胰岛素分泌的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者胰岛素分泌的药物的用途。此外,本发明还涉及用于促进糖尿病受试者胰岛素分泌的纤溶酶原。

[0104] 另一方面,本发明涉及一种促进糖尿病受试者胰岛β细胞数量增加的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于促进糖尿病受试者胰岛β细胞数量增加的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进糖尿病受试者胰岛β细胞数量增加的药物的用途。此外,本发明还涉及用于促进糖尿病受试者胰岛β细胞数量增加的纤溶酶原。在一些实施方案中,所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物2 (IRS-2) 表达。

[0105] 另一方面,本发明涉及一种减少胰岛β细胞凋亡的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于减少胰岛β细胞凋亡的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备减少胰岛β细胞凋亡的药物的用途。此外,本发明还涉及用于减少胰岛β细胞凋亡的纤溶酶原。在一些实施方案中,所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物2 (IRS-2) 表达。

[0106] 另一方面,本发明涉及一种促进胰岛β细胞损伤修复的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于促进胰岛β细胞损伤修复的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进胰岛β细胞损伤修复的药物的用途。本发明还涉及用于促进胰岛β细胞损伤修复的纤溶酶原。在一些实施方案中,所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物2 (IRS-2) 表达。

[0107] 另一方面,本发明涉及一种促进胰岛β细胞功能恢复的方法,包括给药受试者有效量的纤溶酶原。本发明还涉及纤溶酶原用于促进胰岛β细胞功能恢复的用途。本发明还涉及纤溶酶原用于制备促进胰岛β细胞功能恢复的药物的用途。此外,本发明还涉及用于促进胰岛β细胞功能恢复的纤溶酶原。在一些实施方案中,所述纤溶酶原促进胰岛素受体底物2 (IRS-2) 表达。

[0108] 在上述实施方案中,所述纤溶酶原可与一种或多种其它药物或治疗方法联用。具体地,所述纤溶酶原可与一种或多种选自如下的药物联用:抗糖尿病药物、抗心脑血管疾病药物、抗血栓药物、抗高血压药物,抗血脂药物、抗凝药物、抗感染药物。

[0109] 在上述实施方案中,所述纤溶酶原与序列2、6、8、10或12具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,并且仍然具有纤溶酶原活性。

[0110] 在上述实施方案中,所述纤溶酶原的氨基酸如序列2、6、8、10或12所示。在一些实施方案中,所述纤溶酶原是在序列2、6、8、10或12的基础上,添加、删除和/或取代1-100、1-90、1-80、1-70、1-60、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2、1个氨基酸,并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。

[0111] 在上述实施方案中,所述纤溶酶原是包含纤溶酶原活性片段、并且仍然具有纤溶酶原活性的蛋白质。具体地,所述纤溶酶原选自Glu-纤溶酶原、Lys-纤溶酶原、小纤溶酶原、微纤溶酶原、delta-纤溶酶原或它们的保留纤溶酶原活性的变体。

[0112] 在上述实施方案中,纤溶酶原为天然或合成的人纤溶酶原、或其仍然保留纤溶酶原活性的变体或片段。在一些实施方案中,所述纤溶酶原为来自灵长类动物或啮齿类动物的人纤溶酶原直向同系物或其仍然保留纤溶酶原活性的变体或片段。例如,来自灵长类动物或啮齿类动物的纤维蛋白溶酶原直向同系物,例如来自大猩猩,恒河猴、鼠、牛、马,狗的纤维蛋白溶酶原直向同系物。最优选,本发明的纤维蛋白溶酶原的氨基酸序列如序列2、6、8、10或12所示。

[0113] 在上述实施方案中,所述受试者是人。在一些实施方案中,其中所述受试者缺乏或缺失纤溶酶原。具体地,所述缺乏或缺失是先天的、继发的和/或局部的。

[0114] 在一个实施方案中,所述纤维蛋白溶酶原通过全身或局部给药,优选通过以下途径施用:表面、静脉内、肌内、皮下、吸入、椎管内、局部注射、关节内注射或通过直肠。在一个实施方案中,所述局部给药为直接向骨质疏松区域给药,例如通过敷料,导管等方式来进行。

[0115] 在一个实施方案中,所述纤溶酶原与适当的多肽载体或稳定剂组合施用。在一个实施方案中,所述纤溶酶原以每天0.0001-2000mg/kg、0.001-800mg/kg、0.01-600mg/kg、0.1-400mg/kg、1-200mg/kg、1-100mg/kg、10-100mg/kg(以每公斤体重计算)或0.0001-2000mg/cm<sup>2</sup>、0.001-800mg/cm<sup>2</sup>、0.01-600mg/cm<sup>2</sup>、0.1-400mg/cm<sup>2</sup>、1-200mg/cm<sup>2</sup>、1-100mg/cm<sup>2</sup>、10-100mg/cm<sup>2</sup>(以每平方厘米体表面积计算)的剂量施用,优选至少重复一次,优选至少每天施用。在局部施用的情况下,上述剂量还可以根据情况进一步调整。一方面,本发明涉及一种药物组合物,其包含药学上可接受的载剂和用于本发明所述方法的纤溶酶原。

[0116] 另一方面,本发明涉及一种预防性或治疗性试剂盒,其包含:(i)用于本发明所述方法的纤溶酶原和(ii)用于递送所述纤溶酶原至所述受试者的构件(means),具体地,所述构件为注射器或小瓶。在一些实施方案中,所述试剂盒还包含标签或使用说明书,该标签或使用说明书指示将所述纤溶酶原投予所述受试者以实施本发明所述的方法。

[0117] 另一方面,本发明还涉及一种制品,其包含:含有标签的容器;和(i)用于本发明所述方法的纤溶酶原或包含纤溶酶原的药物组合物,其中所述标签指示将所述纤溶酶原或组合物投予所述受试者以实施本发明所述方法。

[0118] 在上述实施方案中,所述试剂盒或制品还包含另外的一个或多个构件或容器,该构件或容器中含有其他药物。在一些实施方案中,所述其他药物选自下组:抗糖尿病药物、抗心脑血管疾病药物、抗血栓药物、抗高血压药物,抗血脂药物、抗凝药物、抗感染药物。

#### [0119] 发明详述

[0120] “糖尿病”是由遗传因素、免疫功能紊乱、微生物感染及其毒素、自由基毒素、精神因素等等各种致病因子作用于机体导致胰岛功能减退、胰岛素抵抗等而引发的糖、蛋白质、脂肪、水和电解质等一系列代谢紊乱综合征,临床上以高血糖为主要特点。

[0121] “糖尿病并发症”是由糖尿病过程中血糖控制不良导致的身体其他器官或组织的损害或功能障碍,其中包括肝脏、肾脏、心脏、视网膜、神经系统的损害或功能障碍等。据世界卫生组织统计,糖尿病并发症高达100多种,是目前已知并发症最多的一种疾病。

[0122] “胰岛素抵抗”是指各种原因使胰岛素促进葡萄糖摄取和利用的效率下降,机体代偿性的分泌过多胰岛素产生高胰岛素血症,以维持血糖的稳定。

[0123] “纤溶酶”是存在于血液中的一种非常重要的酶,其能够降解纤维蛋白多聚体。

[0124] “纤溶酶原(plasminogen,plg)”是纤溶酶的酶原形式,根据swiss prot中的序列,按含有信号肽的天然人源plasminogen氨基酸序列(序列4)计算由810个氨基酸组成,分子量约为90kD,主要在肝脏中合成并能够在血液中循环的糖蛋白,编码该氨基酸序列的cDNA序列如序列3所示。全长的PLG包含七个结构域:位于C末端的丝氨酸蛋白酶结构域、N末端的Pan Apple(PAp)结构域以及5个Kringle结构域(Kringle1-5)。参照swiss prot中的序列,其信号肽包括残基Met1-Gly19,PAp包括残基Glu20-Val98,Kringle1包括残基Cys103-Cys181,Kringle2包括残基Glu184-Cys262,Kringle3包括残基Cys275-Cys352,Kringle4包括残基Cys377-Cys454,Kringle5包括残基Cys481-Cys560。根据NCBI数据,丝

氨酸蛋白酶域包括 残基Val581-Arg804。

[0125] Glu-纤溶酶原是天然全长的纤溶酶原,由791个氨基酸组成(不含有 19个氨基酸的信号肽),编码该序列的cDNA序列如序列1所示,其氨基酸序列如序列2所示。在体内,还存在一种是从Glu-纤溶酶原的第76-77 位氨基酸处水解从而形成的Lys-纤溶酶原,如序列6所示,编码该氨基酸 序列的cDNA序列如序列5所示。 $\delta$ -plasminogen ( $\delta$ -plasminogen)是全长纤溶 酶原缺失了Kringle2-Kringle5结构的片段,仅含有Kringle1和丝氨酸蛋白 酶域<sup>[39,40]</sup>,有文献报道了 $\delta$ -plasminogen的氨基酸序列(序列8)<sup>[40]</sup>,编码 该氨基酸序列的 cDNA序列如序列7。Mini-plasminogen由Kringle5和丝氨 酸蛋白酶域组成,有文献报道其 包括残基Val1443-Asn791(以不含有信号肽 的Glu-plg序列的Glu残基为起始氨基酸)<sup>[41]</sup>, 其氨基酸序列如序列10所 示,编码该氨基酸序列的cDNA序列如序列9所示。而Micro- plasminogen 仅含有丝氨酸蛋白酶结构域,有文献报道其氨基酸序列包括残基Ala543- Asn791(以不含有信号肽的Glu-plg序列的Glu残基为起始氨基酸)<sup>[42]</sup>,也 有专利 CN102154253A报道其序列包括残基Lys531-Asn791(以不含有信号 肽的Glu-plg序列的Glu 残基为起始氨基酸),本专利序列参考专利 CN102154253A,其氨基酸序列如序列12所示,编 码该氨基酸序列的 cDNA序列如序列11所示。

[0126] 本发明的“纤溶酶”与“纤维蛋白溶酶”、“纤维蛋白溶解酶”可互换使用,含义相 同;“纤溶酶原”与“纤维蛋白溶酶原”、“纤维蛋白溶解酶原”可互换使 用,含义相同。

[0127] 在本申请中,所述纤溶酶原“缺乏”的含义为受试者体内纤溶酶原的 含量或活性 比正常人低,低至足以影响所述受试者的正常生理功能;所述 纤溶酶原“缺失”的含义为受 试者体内纤溶酶原的含量或活性显著低于正 常人,甚至活性或表达极微,只有通过外源提 供才能维持正常生理功能。

[0128] 本领域技术人员可以理解,本发明纤溶酶原的所有技术方案适用于纤 溶酶,因 此,本发明描述的技术方案涵盖了纤溶酶原和纤溶酶。

[0129] 在本发明的实施方案中,“衰老”和“早衰”可以互换使用,表示同样的含 义。

[0130] 在循环过程中,纤溶酶原采用封闭的非活性构象,但当结合至血栓或 细胞表面 时,在PLG激活剂(plasminogen activator,PA)的介导下,其转变 为呈开放性构象的活性 PLM。具有活性的PLM可进一步将纤维蛋白凝块 水解为纤维蛋白降解产物和D-二聚体,进 而溶解血栓。其中PLG的PAp 结构域包含维持纤溶酶原处于非活性封闭构象的重要决定簇,而 KR结构 域则能够与存在于受体和底物上的赖氨酸残基结合。已知多种能够作为 PLG激活 剂的酶,包括:组织纤溶酶原激活剂(tPA)、尿激酶纤溶酶原激活 剂(uPA)、激肽释放酶和凝 血因子XII(哈格曼因子)等。

[0131] “纤溶酶原活性片段”是指在纤溶酶原蛋白中,能够与底物中的靶序列 结合并发 挥蛋白水解功能的活性片段。本发明涉及纤溶酶原的技术方案涵 盖了用纤溶酶原活性片 段代替纤溶酶原的技术方案。本发明所述的纤溶酶 原活性片段为包含纤溶酶原的丝氨酸 蛋白酶结构域的蛋白质,优选,本发 明所述的纤溶酶原活性片段包含序列14、与序列14具 有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同源性的氨基酸序列的蛋白质。因此,本发 明所述的纤溶酶原包括含有该纤溶酶原活性片段、并且仍然保持该纤溶酶 原活性的蛋白。

[0132] 目前,对于血液中纤维蛋白溶酶原及其活性测定方法包括:对组织纤 维蛋白溶酶 原激活剂活性的检测(t-PAA)、血浆组织纤维蛋白溶酶原激活剂 抗原的检测(t-PAAg)、对



血浆组织纤溶酶原活性的检测 (pIlgA)、血浆组织纤溶酶原抗原的检测 (pIlgAg)、血浆组织纤维蛋白溶酶原激活剂抑制物活性的检测、血浆组织纤维蛋白溶酶原激活剂抑制物抗原的检测、血浆纤维蛋白溶酶-抗纤维蛋白溶酶复合物检测 (PAP)。其中最常用的检测方法为发色底物法:向受检血浆中加链激酶 (SK) 和发色底物,受检血浆中的PLG在SK 的作用下,转变成PLM,后者作用于发色底物,随后用分光光度计测定,吸光度增加与纤维蛋白溶酶原活性成正比。此外也可采用免疫化学法、凝胶电泳、免疫比浊法、放射免疫扩散法等对血液中的纤维蛋白溶酶原活性进行测定。

[0133] “直系同源物或直系同系物 (ortholog)”指不同物种之间的同源物,既包括蛋白同源物也包括DNA同源物,也称为直向同源物、垂直同源物。其具体指不同物种中由同一祖先基因进化而来的蛋白或基因。本发明的纤溶酶原包括人的天然纤溶酶原,还包括来源于不同物种的、具有纤溶酶原活性的纤溶酶原直系同源物或直系同系物。

[0134] “保守取代变体”是指其中一个给定的氨基酸残基改变但不改变蛋白质或酶的整体构象和功能,这包括但不限于以相似特性(如酸性,碱性,疏水性,等)的氨基酸取代亲本蛋白质中氨基酸序列中的氨基酸。具有类似性质的氨基酸是众所周知的。例如,精氨酸、组氨酸和赖氨酸是亲水性的碱性氨基酸并可以互换。同样,异亮氨酸是疏水氨基酸,则可被亮氨酸,蛋氨酸或缬氨酸替换。因此,相似功能的两个蛋白或氨基酸序列的相似性可能会不同。例如,基于MEGALIGN算法的70%至99%的相似度(同一性)。“保守取代变体”还包括通过BLAST或FASTA算法确定具有60%以上的氨基酸同一性的多肽或酶,若能达75%以上更好,最好能达85%以上,甚至达90%以上为最佳,并且与天然或亲本蛋白质或酶相比具有相同或基本相似的性质或功能。

[0135] “分离的”纤溶酶原是指从其天然环境分离和/或回收的纤溶酶原蛋白。在一些实施方案中,所述纤溶酶原会纯化(1)至大于90%、大于95%、或大于98%的纯度(按重量计),如通过Lowry法所确定的,例如超过99%(按重量计), (2)至足以通过使用旋转杯序列分析仪获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)至同质性,该同质性是通过使用考马斯蓝或银染在还原性或非还原性条件下的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)确定的。分离的纤溶酶原也包括通过生物工程技术从重组细胞制备,并通过至少一个纯化步骤分离的纤溶酶原。

[0136] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指任何长度的氨基酸的聚合形式,其可以包括遗传编码的和非遗传编码的氨基酸,化学或生物化学修饰的或衍生化的氨基酸,和具有经修饰的肽主链的多肽。该术语包括融合蛋白,包括但不限于具有异源氨基酸序列的融合蛋白,具有异源和同源前导序列(具有或没有N端甲硫氨酸残基)的融合物;等等。

[0137] 关于参照多肽序列的“氨基酸序列同一性百分数(%)”定义为在必要时引入缺口以实现最大百分比序列同一性后,且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时,候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以以本领域技术范围内的多种方式实现,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megaalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员能决定用于比对序列的适宜参数,包括对所比较序列全长实现最大对比需要的任何算法。然而,为了本发明的目的,氨基酸序列同一性百分数值是使用序列比较计算机程序

ALIGN-2产生的。

[0138] 在采用ALIGN-2来比较氨基酸序列的情况中,给定氨基酸序列A相对于给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(或者可表述为具有或包含相对于、与、或针对给定氨基酸序列B的某一%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A)如下计算:

[0139] 分数 $X/Y$ 乘100

[0140] 其中X是由序列比对程序ALIGN-2在该程序的A和B比对中评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,且其中Y是B中的氨基酸残基的总数。应当领会,在氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不相等的情况下,A相对于B的%氨基酸序列同一性会不等于B相对于A的%氨基酸序列同一性。除非另有明确说明,本文中使用的所有%氨基酸序列同一性值都是依照上一段所述,使用ALIGN-2计算机程序获得的。

[0141] 如本文中使用的,术语“治疗”和“预防”指获得期望的药理和/或生理效果。所述效果可以是完全或部分预防疾病或其症状,和/或部分或完全治愈疾病和/或其症状,并且包括:(a)预防疾病在受试者体内发生,所述受试者可以具有疾病的素因,但是尚未诊断为具有疾病;(b)抑制疾病,即阻滞其形成;和(c)减轻疾病和/或其症状,即引起疾病和/或其症状消退。

[0142] 术语“个体”、“受试者”和“患者”在本文中可互换使用,指哺乳动物,包括但不限于鼠(大鼠,小鼠)、非人灵长类、人、犬、猫、有蹄动物(例如马、牛、绵羊、猪、山羊)等。

[0143] “治疗有效量”或“有效量”指在对哺乳动物或其它受试者施用以治疗疾病时足以实现对疾病的所述预防和/或治疗的纤溶酶原的量。“治疗有效量”会根据所使用的纤溶酶原、要治疗的受试者的疾病和/或其症状的严重程度以及年龄、体重等而变化。

[0144] 2. 本发明纤溶酶原的制备

[0145] 纤溶酶原可以从自然界分离并纯化用于进一步的治疗用途,也可以通过标准的化学肽合成技术来合成。当通过化学合成多肽时,可以经液相或固相进行合成。固相多肽合成(SPPS)(其中将序列的C末端氨基酸附接于不溶性支持物,接着序贯添加序列中剩余的氨基酸)是适合纤溶酶原化学合成的方法。各种形式的SPPS,诸如Fmoc和Boc可用于合成纤溶酶原。用于固相合成的技术描述于Barany和Solid-Phase Peptide Synthesis;第3-284页于The Peptides:Analysis,Synthesis,Biology.第2卷:Special Methods in Peptide Synthesis,Part A.,Merrifield,等J.Am.Chem.Soc.,85:2149-2156(1963);Stewart等,Solid Phase Peptide Synthesis,2nd ed.Pierce Chem.Co.,Rockford, Ill.(1984);和Ganesan A.2006Mini Rev.Med Chem.6:3-10和Camarero JA等2005Protein Pept Lett.12:723-8中。简言之,用其上构建有肽链的功能性单元处理小的不溶性多孔珠。在偶联/去保护的重复循环后,将附接的固相游离N末端胺与单个受N保护的氨基酸单元偶联。然后,将此单元去保护,露出可以与别的氨基酸附接的新的N末端胺。肽保持固定在固相上,之后将其切掉。

[0146] 可以使用标准重组方法来生产本发明的纤溶酶原。例如,将编码纤溶酶原的核酸插入表达载体中,使其与表达载体中的调控序列可操作连接。表达调控序列包括但不限于启动子(例如天然关联的或异源的启动子)、信号序列、增强子元件、和转录终止序列。表达调控可以是载体中的真核启动子系统,所述载体能够转化或转染真核宿主细胞(例如COS或CHO细胞)。一旦将载体掺入合适的宿主中,在适合于核苷酸序列的高水平表达及纤溶酶

原的收集和纯化的条件下维持宿主。

[0147] 合适的表达载体通常在宿主生物体中作为附加体或作为宿主染色体 DNA 的整合部分复制。通常,表达载体含有选择标志物(例如氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性 or 新霉素抗性)以有助于对外源期望的 DNA 序列转化的那些细胞进行检测。

[0148] 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 是可以用于克隆主题抗体编码多核苷酸的原核宿主细胞的例子。适合于使用的其它微生物宿主包括杆菌,诸如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和其它肠杆菌科 (*enterobacteriaceae*), 诸如沙门氏菌属 (*Salmonella*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、和各种假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 物种。在这些原核宿主中,也可以生成表达载体,其通常会含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如复制起点)。另外,会存在许多公知的启动子,诸如乳糖启动子系统,色氨酸 (*trp*) 启动子系统,  $\beta$ -内酰胺酶启动子系统,或来自噬菌体  $\lambda$  的启动子系统。启动子通常会控制表达,任选在操纵基因序列的情况下,并且具有核糖体结合位点序列等,以启动并完成转录和翻译。

[0149] 其他微生物,诸如酵母也可用于表达。酵母(例如酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)) 和毕赤酵母 (*Pichia*) 是合适的酵母宿主细胞的例子,其中合适的载体根据需要具有表达控制序列(例如启动子)、复制起点、终止序列等。典型的启动子包含 3-磷酸甘油酸激酶和其它糖分解酶。诱导型酵母启动子特别包括来自醇脱氢酶、异细胞色素 C、和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

[0150] 在微生物外,哺乳动物细胞(例如在体外细胞培养物中培养的哺乳动物细胞)也可以用于表达本发明的纤溶酶原。参见 Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)。合适的哺乳动物宿主细胞包括 CHO 细胞系、各种 Cos 细胞系、HeLa 细胞、骨髓瘤细胞系、和经转化的 B 细胞或杂交瘤。用于这些细胞的表达载体可以包含表达控制序列,如复制起点,启动子和增强子 (Queen 等, *ImmnoI. Rev.* 89: 49 (1986)), 以及必需的加工信息位点,诸如核糖体结合位点, RNA 剪接位点,多聚腺苷酸化位点,和转录终止子序列。合适的表达控制序列的例子是白免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等衍生的启动子。参见 Co 等, *J. Immunol.* 148: 1149 (1992)。

[0151] 一旦合成(化学或重组方式),可以依照本领域的标准规程,包括硫酸铵沉淀,亲和柱,柱层析,高效液相层析 (HPLC), 凝胶电泳等来纯化本发明所述的纤溶酶原。该纤溶酶原是基本上纯的,例如至少约 80% 至 85% 纯的,至少约 85% 至 90% 纯的,至少约 90% 至 95% 纯的,或 98% 至 99% 纯的或更纯的,例如不含污染物,所述污染物如细胞碎片,除主题抗体以外的大分子,等等。

[0152] 3. 药物配制剂

[0153] 可以通过将具有所需纯度的纤溶酶原与可选的药用载体,赋形剂,或稳定剂 (Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16 版, Osol, A. ed. (1980)) 混合形成冻干制剂或水溶液制备治疗配制剂。可接受的载体、赋形剂、稳定剂在所用剂量及浓度下对受者无毒性,并包括缓冲剂例如磷酸盐,柠檬酸盐及其它有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化己烷双胺;氯化苄烷铵 (*benzalkonium chloride*)), 苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;烷基对羟基苯甲酸酯如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;间甲酚;低分子量多肽(少于约 10 个残基);蛋

白质如血清白蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸,谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖及其它碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖、或糊精;螯合剂如EDTA;糖类如蔗糖、甘露醇、岩藻糖或山梨醇;成盐反离子如钠;金属复合物(例如锌-蛋白复合物);和/或非离子表面活性剂,例如TWEENTM, PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。优选冻干的抗-VEGF抗体配制剂在WO 97/04801中描述,其包含在本文中作为参考。

[0154] 本发明的配制剂也可含有需治疗的具体病症所需的一种以上的活性化合物,优选活性互补并且相互之间没有副作用的那些。例如,抗高血压的药物,抗心律失常的药物,治疗糖尿病的药物等。

[0155] 本发明的纤溶酶原可包裹在通过诸如凝聚技术或界面聚合而制备的微胶囊中,例如,可置入在胶质药物传送系统(例如,脂质体,白蛋白微球,微乳剂,纳米颗粒和纳米胶囊)中或置入粗滴乳状液中的羟甲基纤维素或凝胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中。这些技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A.Ed. (1980)。

[0156] 用于体内给药的本发明的纤溶酶原必需是无菌的。这可以通过在冷冻干燥和重新配制之前或之后通过除菌滤膜过滤而轻易实现。

[0157] 本发明的纤溶酶原可制备缓释制剂。缓释制剂的适当实例包括具有一定形状且含有糖蛋白的固体疏水聚合物半通透基质,例如膜或微胶囊。缓释基质实例包括聚酯、水凝胶(如聚(2-羟基乙基-异丁烯酸酯)(Langer等, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981); Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982))或聚(乙烯醇),聚交酯(美国专利3773919, EP 58,481), L-谷氨酸与D-乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman,等, Biopolymers 22:547 (1983)),不可降解的乙烯-乙酸酯(ethylene-vinyl acetate)(Langer,等, 出处同上),或可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如Lupron DepotTM(由乳酸-羟基乙酸共聚物和亮氨酸脯氨酸(leuprolide)乙酸酯组成的可注射的微球体),以及聚D-(-)-3-羟丁酸。聚合物如乙烯-乙酸酯和乳酸-羟基乙酸能持续释放分子100天以上,而一些水凝胶释放蛋白的时间却较短。可以根据相关机理来设计使蛋白稳定的合理策略。例如,如果发现凝聚的机理是通过硫代二硫键互换而形成分子间S-S键,则可通过修饰巯基残基、从酸性溶液中冻干、控制湿度、采用合适的添加剂、和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定。

[0158] 4. 给药和剂量

[0159] 可以通过不同方式,例如通过静脉内,腹膜内,皮下,颅内,鞘内,动脉内(例如经由颈动脉),肌内,鼻内,表面或皮内施用或脊髓或脑投递来实现本发明药物组合物的施用。气溶胶制剂如鼻喷雾制剂包含活性剂的纯化的水性或其它溶液及防腐剂和等渗剂。将此类制剂调节至与鼻粘膜相容的pH和等渗状态。

[0160] 在一些情况中,可以以下方式修饰或配制本发明的纤溶酶原药物组合物,从而提供其穿过血脑屏障的能力。

[0161] 用于胃肠外施用的制备物包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳剂。非水性溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油,和可注射有机酯,如油酸乙酯。水性载体包括水、醇性/水性溶液、乳剂或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。胃肠外媒介物包含氯化钠

溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、或固定油。静脉内媒介物包含液体和营养补充物、电解质补充物,等等。也可以存在防腐剂和其他添加剂,诸如例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、和惰性气体,等等。

[0162] 在一些实施方案中,本发明的纤溶酶原与促进穿过血脑屏障的药剂配制在一起。在一些情况中,本发明的纤溶酶原直接或经接头与促进穿过血脑屏障的载体分子、肽或蛋白质融合。在一些实施方案中,本发明的纤溶酶原与结合内源血脑屏障(BBB)受体的多肽融合。连接纤溶酶原与结合内源BBB受体的多肽,促进穿过BBB。结合内源BBB受体的合适的多肽包括抗体,例如单克隆抗体,或其抗原结合片段,其特异性结合内源BBB受体。合适的内源BBB受体包括但不限于胰岛素受。在一些情况中,抗体是囊封于脂质体中的。参见例如美国专利公开文本No.2009/0156498。

[0163] 医务人员会基于各种临床因素确定剂量方案。如医学领域中公知的,任一患者的剂量取决于多种因素,包括患者的体型、体表面积、年龄、要施用的具体化合物、性别、施用次数和路径、总体健康、和同时施用的其它药物。本发明包含纤溶酶原的药物组合物的剂量范围可以例如为例如每天约0.0001至2000mg/kg,或约0.001至500mg/kg(例如0.02mg/kg,0.25 mg/kg,0.5mg/kg,0.75mg/kg,10mg/kg,50mg/kg等等)受试者体重。例如,剂量可以是1mg/kg体重或50mg/kg体重或在1-50mg/kg的范围,或至少1mg/kg。高于或低于此例示性范围的剂量也涵盖在内,特别是考虑到上述的因素。上述范围中的中间剂量也包含在本发明的范围内。受试者可以每天、隔天、每周或根据通过经验分析确定的任何其它日程表施用此类剂量。例示性的剂量日程表包括连续几天1-10mg/kg。在本发明的药物施用过程中需要实时评估、定期评估血栓和血栓相关疾病的治疗效果和安全性。

[0164] 5. 治疗效力和治疗安全性

[0165] 本发明的一个实施方案涉及使用纤溶酶原治疗受试者后,对治疗效力和治疗安全性的判断。常用的骨质疏松症治疗效果监测与评估内容包括随访(不良反应、规范服药、基础措施以及骨折风险因子再评估等),新发骨折评估(临床骨折、身高降低和影像学检查)、骨密度(bone mineral density, BMD)测量和骨转换生化标志物(bone turnover markers, BTM)检测,以及基于这些数据的综合再评估等。其中BMD是目前应用最广泛的疗效监测和评估方法。例如,可以通过双能X线骨密度仪(dual energy X-ray absorptiometry, DXA)、定量CT(quantitative computed tomography, QCT)、单光子吸收测定法(SPA)、或超声波测定法来测量BMD。治疗开始后可每年检测1次BMD,在BMD达到稳定后可以适当延长间隔,例如2年监测1次。针对BTM,目前在血清学指标中较多使用的骨形成指标是血清1型原胶原N端前肽(procollagen type 1n-terminal propeptide, PINP),骨吸收指标是血清1型原胶原C末端肽(serum C-terminal telopeptide, S-CTX)。可根据研究进展,适时调整更合理的检测指标。应在开始治疗前检测基线值,应用促形成药物治疗后3个月、应用抑制吸收药物治疗后3~6个月时进行检测。BTM能够提供骨骼的动态信息,在作用和功能上独立于BMD,同时也与BMD成为互为补充的监测手段,二者结合起来具有更高的临床价值。一般地,如果治疗后BMD上升或稳定,BTM有预期变化,同时治疗期间无骨折发生,可认为治疗反应良好。此外,本发明还涉及使用纤溶酶原及其变体对受试者进行治疗过程中和治疗后,所述该治疗方案安全性的判断,包括但不限于对药物在受试者体内的血清半衰期、治疗半衰期、半数中毒量(TD50)、半数致死量(LD50)进行统计,或对在治疗

过程中或治疗后发生的各种不良事件如过敏反应进行观察。

#### [0166] 6. 制品或药盒

[0167] 本发明的一个实施方案涉及一种制品或药盒,其包含本发明纤溶酶原。所述制品优选包括一个容器,标签或包装插页。适当的容器有瓶子,小瓶,注射器等。容器可由各种材料如玻璃或塑料制成。所述容器含有组合物,所述组合物可有效治疗本发明的疾病或病症并具有无菌入口(例如所述容器可为静脉内溶液包或小瓶,其含有可被皮下注射针穿透的塞子的)。所述组合物中至少一种活性剂为纤溶酶原。所述容器上或所附的标签说明所述组合物用于治疗本发明所述衰老或衰老相关病症。所述制品可进一步包含含有可药用缓冲液的第二容器,诸如磷酸盐缓冲的盐水,林格氏溶液以及葡萄糖溶液。其可进一步包含从商业和使用者的角度来看所需的其它物质,包括其它缓冲液,稀释剂,过滤物,针和注射器。此外,所述制品包含带有使用说明书的包装插页,包括例如指示所述组合物的使用者将纤溶酶原组合物以及治疗伴随的疾病的其它药物给药患者。

#### [0168] 附图简述

[0169] 图1 18周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后胰岛IRS-2免疫组化观察结果。A为正常对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组,D为定量分析结果。结果显示,给溶媒PBS对照组小鼠胰岛IRS-2阳性表达(箭头标识)明显少于给纤溶酶原组,且统计差异极显著(\*\*表示 $P<0.01$ );给纤溶酶原组IRS-2表达水平较给溶媒PBS组更接近正常对照组小鼠。说明纤溶酶原能有效增加胰岛细胞IRS-2的表达,改善胰岛素信号转导,减少糖尿病小鼠胰岛 $\beta$ 细胞损伤。

[0170] 图2 24-25周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原10、31天后血糖检测结果。结果显示,给纤溶酶原组小鼠的血糖明显低于给溶媒PBS对照组,且统计差异显著(\*表示 $P<0.05$ ,\*\*表示 $P<0.01$ )。此外,随着给药时间的延长,给溶媒PBS对照组小鼠血糖有升高趋势,而给纤溶酶原组血糖逐渐降低。说明纤溶酶原具有降血糖的作用。

[0171] 图3给予纤溶酶原对糖尿病鼠血清果糖胺浓度的影响。检测结果显示,给予纤溶酶原后血清果糖胺的浓度明显降低,与给药前相比,统计差异极显著(\*\*表示 $P<0.01$ )。说明纤溶酶原能显著降低糖尿病小鼠的血糖。

[0172] 图4 26周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后血浆糖化血红蛋白检测结果。结果显示,给纤溶酶原组小鼠糖化血红蛋白的OD值明显低于给溶媒PBS对照组,且统计差异极显著(\*\*表示 $P<0.01$ )。说明纤溶酶原具有降低糖尿病小鼠血糖的作用。

[0173] 图5 26周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原10天后IPGTT检测结果。结果显示,腹腔注射葡萄糖后,给纤溶酶原组小鼠血糖水平低于给溶媒PBS对照组,且与给溶媒PBS对照组相比给纤溶酶原组糖耐受曲线更加接近正常小鼠组。说明纤溶酶原能明显改善糖尿病小鼠糖耐受能力。

[0174] 图6T1DM模型PLG活性正常小鼠给予纤溶酶原10天后禁食后血糖检测结果。结果显示,给溶媒PBS对照组小鼠血糖明显高于给纤溶酶原组,且统计差异极显著(\*\*表示 $P<0.001$ )。说明纤溶酶原能显著降低PLG活性正常小鼠在T1DM模型中的血糖水平。

[0175] 图7T1DM模型PLG活性正常小鼠给予纤溶酶原28天后IPGTT检测结果。结果显示,给溶媒PBS对照组小鼠注射葡萄糖后血糖浓度明显高于给纤溶酶原组,且与给溶媒PBS对照组相比给纤溶酶原组糖耐受曲线更加接近正常小鼠。说明纤溶酶原能提高PLG活性正常

小鼠在T1DM模型中的糖耐受能力。

[0176] 图8 26周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后血清胰岛素检测结果。结果显示,给纤溶酶原组血清胰岛素水平明显高于给溶媒PBS对照组,且统计差异显著(\*表示 $P<0.05$ )。说明纤溶酶原能有效促进胰岛素的分泌。

[0177] 图9 24-25周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原31天后胰脏的HE染色图片及胰岛面积比。A、B为给溶媒PBS对照组,C、D为给纤溶酶原组,E为胰岛面积定量分析结果。结果显示,给溶媒PBS对照组大部分的胰岛发生萎缩,萎缩的胰岛细胞被腺泡(↓标示)所代替,胰岛边缘的腺泡增生,致胰岛与腺泡之间分界不清;给纤溶酶原组大部分的胰岛较之于对照组面积大,且胰岛内未有腺泡增生,只有少数的胰岛内残存有少量的腺泡,胰岛与腺泡之间边界清晰。比较给纤溶酶原组和对照组的胰岛占胰腺的面积比发现,给药组比对照组大近乎一倍。说明纤溶酶原能促进24-25周龄糖尿病小鼠胰岛损伤的修复,从而通过修复损伤的胰岛治疗糖尿病。

[0178] 图10 24-25周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原31天后胰岛天狼星红染色观察结果。A为给溶媒PBS对照组,B为给纤溶酶原组,C为定量分析结果。结果显示,给纤溶酶原组小鼠胰岛胶原沉积(箭头标识)明显少于给溶媒PBS对照组,且统计差异显著(\*表示 $P<0.05$ )。说明纤溶酶原能改善糖尿病动物胰岛的纤维化。

[0179] 图11 24-25周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原31天后胰岛Caspase-3免疫组化染色观察结果。A为给溶媒PBS对照组,B为给纤溶酶原组。结果显示,给纤溶酶原组Caspase-3的表达(箭头标识)明显低于给溶媒PBS对照组。说明纤溶酶原能减少胰岛细胞的凋亡,保护糖尿病小鼠胰脏组织。

[0180] 图12 18周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后胰岛胰岛素免疫组化染色结果。A为给溶媒PBS对照组,B为给纤溶酶原组,C为定量分析结果。结果显示,给纤溶酶原组胰岛素的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组,且统计差异接近显著( $P=0.15$ )。说明纤溶酶原能够促进胰岛功能修复,促进胰岛素的产生和分泌。

[0181] 图13 24-25周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后胰岛的胰岛素免疫组化染色观察结果。A为给溶媒PBS对照组,B为给纤溶酶原组,C为定量分析结果。结果显示,给纤溶酶原组胰岛素的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组,且统计差异显著(\*表示 $P<0.05$ )。说明纤溶酶原能促进胰岛功能修复,促进胰岛素的产生和分泌。

[0182] 图14 26周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后胰岛的胰岛素免疫组化染色结果。A为给溶媒PBS对照组,B为给纤溶酶原组,C为定量分析结果。结果显示,给纤溶酶原组胰岛素的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组,且统计差异极显著(\*\*表示 $P<0.01$ )。说明纤溶酶原能有效促进胰岛功能修复,促进胰岛素的产生和分泌。

[0183] 图15 24-25周龄糖尿病小鼠给予纤溶酶原31天后胰腺组织NF- $\kappa$ B免疫组化染色观察结果。A为正常对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组,D为定量分析结果。结果显示,给纤溶酶原组NF- $\kappa$ B的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组,且统计差异显著(\*表示 $P<0.05$ )。说明纤溶酶原能促进多向核转录因子NF- $\kappa$ B的表达,从而促进24-25周龄糖尿病小鼠胰岛炎症的修复。

[0184] 图16 18周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后胰岛胰高血糖素免疫组化观察结果。A为正常对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组,D为定量分析结果。结果显

示,胰高血糖素在正常对照小鼠中表达在胰岛周边 $\alpha$ 细胞区域。与给纤溶酶原组相比,给溶媒PBS对照组胰高血糖素阳性细胞(箭头标识)明显增多,胰高血糖素阳性细胞浸润到胰岛的中央区域,且平均光密度定量分析结果统计差异极显著(\*\*表示 $P<0.01$ );给纤溶酶原组胰高血糖素阳性细胞散在的分布于胰岛周边,给纤溶酶原组与PBS组相比,胰岛形态更接近正常小鼠。说明纤溶酶原能够显著抑制胰岛 $\alpha$ 细胞增殖及胰高血糖素的分泌,修正胰岛 $\alpha$ 细胞分布紊乱,从而促进胰岛损伤的修复。

[0185] 图17 24-25周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后胰岛胰高血糖素免疫组化观察结果。A为正常对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组。结果显示,胰高血糖素在正常对照小鼠中表达在胰岛周边 $\alpha$ 细胞区域。与给纤溶酶原组相比,给溶媒PBS对照组胰高血糖素阳性细胞(箭头标识)明显增多,阳性细胞浸润到胰岛的中央区域;给纤溶酶原组胰高血糖素阳性细胞散在的分布于胰岛周边,给纤溶酶原组与PBS组相比,胰岛形态更接近正常小鼠。说明纤溶酶原能够显著抑制胰岛 $\alpha$ 细胞增殖及胰高血糖素的分泌,修正胰岛 $\alpha$ 细胞分布紊乱,从而促进胰岛损伤的修复。

[0186] 图18 26周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后胰岛胰高血糖素免疫组化观察结果。A为正常对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组,D为定量分析结果。结果显示,胰高血糖素在正常对照小鼠中表达在胰岛周边 $\alpha$ 细胞区域。与给纤溶酶原组相比,给溶媒PBS对照组胰高血糖素阳性细胞(箭头标识)明显增多,阳性细胞浸润到胰岛的中央区域,且平均光密度定量分析结果具有统计学差异(\*表示 $P<0.05$ );给纤溶酶原组胰高血糖素阳性细胞散在的分布于胰岛周边,给纤溶酶原组与PBS组相比,其形态更接近正常小鼠。说明纤溶酶原能够显著抑制胰岛 $\alpha$ 细胞增殖及胰高血糖素的分泌,修正胰岛 $\alpha$ 细胞分布紊乱,从而促进胰岛损伤的修复。

[0187] 图19给予纤溶酶原28天后PLG活性正常小鼠在T1DM模型中胰岛胰高血糖素免疫组化观察结果。A为空白对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组,D为定量分析结果。结果显示,给溶媒PBS对照组胰高血糖素阳性表达明显多于给溶纤溶酶原组,且平均光密度定量分析结果统计差异显著(\*表示 $P<0.05$ )。说明纤溶酶原能够显著减少糖尿病小鼠胰岛 $\alpha$ 细胞分泌胰高血糖素,促进胰岛损伤的修复。

[0188] 图20 24-25周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原31天后胰岛IRS-2免疫组化观察结果。A为正常对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组,D为定量分析结果。结果显示,给溶媒PBS对照组小鼠胰岛IRS-2阳性表达(箭头标识)明显少于给纤溶酶原组,且统计差异显著(\*表示 $P<0.05$ );给纤溶酶原组IRS-2表达水平较给溶媒PBS组更接近正常对照组小鼠。说明纤溶酶原能有效增加胰岛细胞IRS-2的表达,改善胰岛素信号转导,减少糖尿病小鼠胰岛 $\beta$ 细胞损伤。

[0189] 图21 26周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后胰岛IRS-2免疫组化观察结果。A为正常对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组。结果显示,给溶媒PBS对照组小鼠胰岛IRS-2阳性表达(箭头标识)明显少于给纤溶酶原组;给纤溶酶原组IRS-2表达水平较给溶媒PBS组更接近正常对照组小鼠。说明纤溶酶原能有效增加胰岛细胞IRS-2的表达,改善胰岛素信号转导,减少糖尿病小鼠胰岛 $\beta$ 细胞损伤。

[0190] 图22给予纤溶酶原28天后PLG活性正常T1DM小鼠胰岛IRS-2免疫组化观察结果。A为正常对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组。结果显示,给溶媒PBS对照组小鼠



胰岛IRS-2阳性表达(箭头标识)明显少于给纤溶酶原组;给纤溶酶原组IRS-2表达水平较给溶媒PBS组更接近正常对照组小鼠。说明纤溶酶原能有效增加胰岛细胞IRS-2的表达,改善胰岛素信号转导,减少PLG活性正常T1DM小鼠胰岛β细胞损伤。

[0191] 图23 26周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后胰岛中性粒细胞免疫组化观察结果。A为正常对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组。结果显示,给纤溶酶原组阳性表达细胞(箭头标识)少于给溶媒PBS对照组,且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近正常对照组。说明纤溶酶原能减少中性粒细胞的浸润。

[0192] 图24T1DM模型中PLG活性受损小鼠给予纤溶酶原28天后胰岛中性粒细胞免疫组化观察结果。A为空白对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组。结果显示,给纤溶酶原组阳性表达细胞(箭头标识)少于给溶媒PBS对照组,且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组。说明纤溶酶原能减少PLG活性受损小鼠在T1DM模型中胰岛中性粒细胞的浸润。

[0193] 图25PLG活性正常小鼠在T1DM模型中给予纤溶酶原28天后胰岛中性粒细胞免疫组化观察结果。A为空白对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组。结果显示,给纤溶酶原组阳性表达细胞(箭头标识)少于给溶媒PBS对照组,且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组。说明纤溶酶原能促进PLG活性正常小鼠在T1DM模型中胰岛中性粒细胞的浸润。

[0194] 图26T1DM模型中PLG活性受损小鼠给予纤溶酶原28天后胰岛胰岛素免疫组化观察结果。A为空白对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组。免疫组化结果显示,给纤溶酶原组胰岛素阳性表达(箭头标识)明显多于给溶媒PBS对照组,且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组。说明纤溶酶原能促进在T1DM模型中的PLG活性受损小鼠胰岛胰岛素的合成与分泌。

[0195] 图27PLG活性正常小鼠在T1DM模型中给予纤溶酶原28天后胰岛胰岛素免疫组化观察结果。A为空白对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组。免疫组化结果显示,给纤溶酶原组胰岛素阳性表达(箭头标识)明显多于给溶媒PBS对照组,且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组。说明纤溶酶原促进T1DM模型中PLG活性正常小鼠胰岛胰岛素的合成与表达。

[0196] 图28PLG活性受损小鼠在T1DM模型中给予纤溶酶原28天后胰岛NF-κB免疫组化观察结果。A为空白对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组。结果显示,给纤溶酶原组NF-κB的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组。说明纤溶酶原能促进炎症修复因子NF-κB的表达,从而促进胰岛炎症的修复。

[0197] 图29 18周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后胰岛NF-κB免疫组化观察结果。A为给溶媒PBS对照组,B为给纤溶酶原组。实验结果显示,给纤溶酶原组NF-κB的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组。说明纤溶酶原能促进多向核转录因子NF-κB的表达,从而促进相对年轻(18周龄)糖尿病小鼠胰岛炎症的修复。

[0198] 图30 26周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后胰岛NF-κB免疫组化观察结果。A为正常对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组。本发明实验结果显示,给纤溶酶原组NF-κB的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组。说明纤溶酶原能促进多向核转录因子NF-κB的表达,从而促进相对年老(26周龄)糖尿病小鼠胰岛炎症的修复。

[0199] 图31 24-25周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原31天后胰岛TNF- $\alpha$ 免疫组化 观察结果。A为正常对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原组。研究结果显示,给纤溶酶原组TNF- $\alpha$ 的阳性表达(箭头标识)明显高于给溶媒 PBS对照组,且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近正常对照组。说明纤溶 酶原能促进TNF- $\alpha$ 的表达,从而促进24-25周龄糖尿病小鼠胰岛损伤修复。

[0200] 图32 26周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原31天后胰岛TNF- $\alpha$ 免疫组化 观察结果。A为正常对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原 组。研究结果显示,给纤溶酶原组TNF- $\alpha$ 的阳性表达(箭头标识)明显高于 给溶媒PBS对照组,且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近正常对照组。说明纤溶酶原能促进TNF- $\alpha$ 的表达,从而促进26周龄糖尿病小鼠胰岛损伤 修复。

[0201] 图33显示PLG活性受损小鼠T1DM模型中给予纤溶酶原28天后胰岛 TNF- $\alpha$ 免疫组化 观察结果。A为给溶媒PBS对照组,B为给纤溶酶原组。研究结果显示,给纤溶酶原组TNF- $\alpha$ 的 阳性表达(箭头标识)明显高于给溶 媒PBS对照组。说明纤溶酶原能促进TNF- $\alpha$ 的表达,从而 促进PLG活性受 损小鼠T1DM模型中胰岛损伤修复。

[0202] 图34显示PLG活性受损T1DM模型小鼠给予纤溶酶原28天后胰岛 IgM免疫组化观察 结果。A为空白对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为 给纤溶酶原组。本实验研究结果显示,给 纤溶酶原组IgM的阳性表达(箭头 标识)明显低于给溶媒PBS对照组,且给纤溶酶原组比给 溶媒PBS组更接近 正常对照组。说明纤溶酶原能降低IgM的表达,从而减少PLG活性受损小 鼠在T1DM模型中胰岛损伤。

[0203] 图35 24-25周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原31天后胰岛TUNEL染色 观察结果。A 为正常对照组,B为给溶媒PBS对照组,C为给纤溶酶原 组。本实验结果显示,给纤溶酶原组 的阳性细胞数(箭头标识)明显少于 给溶媒PBS对照组。正常对照组TUNEL阳性染色极低。正 常对照组凋亡 率约为8%,给溶媒PBS组凋亡率约为93%,给纤溶酶原组凋亡率为约 16%。说明纤溶酶原组能显著减少糖尿病小鼠胰岛细胞的凋亡。

[0204] 图36 26周龄的糖尿病小鼠给予纤溶酶原35天后血清果糖胺检测结果。检测结果 显示,给纤溶酶原组血清果糖胺的浓度明显低于给溶媒PBS对 照组,统计差异接近显著( $P=0.06$ )。说明纤溶酶原能显著降低糖尿病小鼠 的血糖水平。

[0205] 图37显示T1DM模型小鼠给予纤溶酶原20天后血糖检测结果。结果显 示,给溶媒 PBS对照组小鼠血糖明显高于给纤溶酶原组小鼠,且统计差异显 著( $P=0.04$ )。说明纤溶酶 原能促进T1DM小鼠葡萄糖分解能力,从而降低 血糖。

[0206] 图38显示T1DM模型小鼠给予纤溶酶原20天后血清胰岛素检测结果。结果显示,给 溶媒PBS对照组小鼠血清胰岛素浓度明显低于给纤溶酶原组小 鼠,且统计差异接近显著( $P=0.08$ )。说明纤溶酶原能促进T1DM小鼠胰岛 素的分泌。

## 实施例

[0207] 实施例1纤溶酶原促进18周龄糖尿病小鼠胰岛胰岛素受体底物2 (IRS- 2)的表达

[0208] 18周龄db/db雄性小鼠7只以及db/m雄性小鼠3只,实验开始当天记 为第0天并称 重,db/db小鼠根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组3只,给溶媒PBS对照组4只,db/m小鼠 作为正常对照组。第1天开始给纤溶酶 原或PBS。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原

2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药35天。在第36天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠IRS-2抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0209] 胰岛素受体底物2((Insulin Receptor Substrate-2, IRS-2)是一种能够被激活的胰岛素受体酪氨酸激酶作用的底物,是胰岛素信号转导途径中重要分子,且对胰岛 $\beta$ 细胞的生存非常重要。IRS-2在胰岛 $\beta$ 细胞表达增加时对其具有保护效应,且对功能性胰岛 $\beta$ 细胞的维持至关重要<sup>[46,47]</sup>。

[0210] IRS-2免疫组化结果显示,给溶媒PBS对照组小鼠(图1B)胰岛IRS-2阳性表达(箭头标识)明显少于给纤溶酶原组(图1C),且统计差异极显著(图1D),且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组(1A)。说明纤溶酶原能有效增加18周龄糖尿病小鼠胰岛细胞IRS-2的表达。

[0211] 实施例2纤溶酶原降低糖尿病小鼠血糖

[0212] 24-25周龄db/db雄性小鼠8只,随机分为两组,给纤溶酶原组5只和给溶媒PBS对照组3只。实验开始当天记为第0天并称重分组,第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药31天。在第10、31天禁食16小时后,用血糖试纸(Roche, Mannheim, Germany)进行血糖检测。

[0213] 结果显示,给纤溶酶原组小鼠的血糖明显低于给溶媒PBS对照组,且统计差异显著(\*表示 $P<0.05$ ,\*\*表示 $P<0.01$ )。此外,随着给药时间的延长,给溶媒PBS对照组小鼠血糖有升高趋势,而给纤溶酶原组血糖逐渐降低(图2)。说明纤溶酶原具有降低糖尿病动物血糖的作用。

[0214] 实施例3纤溶酶原降低糖尿病小鼠果糖胺水平

[0215] 24-25周龄db/db雄性小鼠5只,给药前一天每只小鼠眼球静脉丛取血50 $\mu$ l用以检测血清果糖胺浓度,并记为第0天,第一天开始给予纤溶酶原,连续给药31天。第32天摘除眼球取血,检测血清果糖胺的浓度。果糖胺浓度使用果糖胺检测试剂盒(南京建成, A037-2)进行检测。

[0216] 果糖胺浓度反映1~3周内血糖的平均水平。结果显示,给予纤溶酶原后血清果糖胺的浓度明显降低,与给药前相比统计差异极显著(图3)。说明纤溶酶原能有效降低糖尿病动物血糖。

[0217] 实施例4纤溶酶原降低糖尿病小鼠糖化血红蛋白水平

[0218] 26周龄db/db雄性小鼠9只,实验开始当天记称重后根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组4只,给溶媒PBS对照组5只。第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药

35天。在第35天小鼠禁食16小时,第36天摘眼球取血,用以检测血浆糖化血红蛋白的浓度。

[0219] 糖化血红蛋白含量通常可以反映患者近8~12周的血糖控制情况。结果显示,给纤溶酶原组小鼠糖化血红蛋白的浓度明显低于给溶媒PBS对照组,且统计差异显著(图4)。说明纤溶酶原能有效降低糖尿病动物血糖水平。

[0220] 实施例5纤溶酶原改善糖尿病小鼠糖耐受能力

[0221] 26周龄db/db雄性小鼠9只以及db/m小鼠3只。实验开始当天,db/db小鼠称重后并根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组4只和给溶媒PBS对照组5只,db/m小鼠作为正常对照组。第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药10天。第11天小鼠禁食16小时后,每只小鼠按5g/kg体重腹腔注射5%葡萄糖溶液,在0,30,60,90,120,180分钟用血糖试纸(Roche,Mannheim,Germany)检测血糖浓度。

[0222] 腹腔糖耐受检测(Intraperitoneal glucose tolerance test,IPGTT)可检测机体对葡萄糖的耐受能力。现有技术已知糖尿病患者糖耐量是下降的。

[0223] 实验结果显示,腹腔注射葡萄糖后给纤溶酶原组小鼠血糖水平要低于给溶媒PBS对照组,且与给溶媒PBS对照组相比给纤溶酶原组糖耐受曲线更加接近正常小鼠组(图5)。说明纤溶酶原能明显改善糖尿病小鼠糖耐受能力。

[0224] 实施例6纤溶酶原降低PLG活性正常小鼠在T1DM模型中血糖水平

[0225] 9-10周龄PLG活性正常雄性小鼠10只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组以及给纤溶酶原组,每组各5只。两组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg链脲佐菌素(STZ)(sigma S0130)诱导T1DM<sup>[43]</sup>。STZ注射12天后开始给药并记为给药第1天,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药10天。在第11天小鼠禁食6小时后,用血糖试纸(Roche,Mannheim,Germany)测定血糖。

[0226] 结果显示,给溶媒PBS对照组小鼠血糖明显高于给纤溶酶原组小鼠,且统计差异极显著(图6)。说明纤溶酶原能显著降低PLG活性正常小鼠T1DM模型的血糖水平。

[0227] 实施例7纤溶酶原改善T1DM模型小鼠糖耐受水平

[0228] 9-10周龄PLG活性正常雄性小鼠15只,随机分为三组,空白对照组、给溶媒PBS对照组以及给纤溶酶原组,每组各5只。给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg STZ(sigma S0130)诱导T1DM<sup>[43]</sup>,空白对照组不做处理。STZ注射12天后开始给药并记为给药第1天,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药28天。第28天小鼠禁食6小时后,按照5g/kg体重腹腔注射5%葡萄糖溶液,在注射后0、15、30、60、90分钟用血糖试纸(Roche,Mannheim,Germany)检测血糖浓度。

[0229] 腹腔糖耐受检测(Intraperitoneal glucose tolerance test,IPGTT)可检测机体对葡萄糖的耐受能力。现有技术已知糖尿病患者糖耐量下降。

[0230] 结果显示,给溶媒PBS对照组小鼠注射葡萄糖后血糖浓度明显高于给纤溶酶原组,且与给溶媒PBS对照组相比,给纤溶酶原组糖耐受曲线更加接近正常小鼠(图7)。说明纤溶酶原能提高PLG活性正常小鼠T1DM模型的糖耐受能力。

[0231] 实施例8纤溶酶原促进糖尿病小鼠胰岛素分泌功能

[0232] 26周龄db/db雄性小鼠9只,实验开始当天记为第0天,称重并根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组4只,给溶媒PBS对照组5只。第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药35天。在第35天小鼠禁食16小时后,在第36天摘眼球取血,离心取上清,运用胰岛素检测试剂盒(Mercodia AB)按照使用说明检测血清胰岛素水平。

[0233] 检测结果显示,给纤溶酶原组血清胰岛素水平明显高于给溶媒PBS对照组,且统计差异显著(图8)。说明纤溶酶原能显著提高糖尿病小鼠胰岛素的分泌。

[0234] 实施例9纤溶酶原对糖尿病小鼠胰腺的保护作用

[0235] 24-25周龄db/db雄性小鼠7只,实验开始当天记为第0天并称重,根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组4只和给溶媒PBS对照组3只。第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药31天。在第32天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水并用苏木素和伊红染色(HE染色),1%盐酸酒精分化,氨水返蓝,并酒精梯度脱水封片,切片在200和400倍光学显微镜下观察。

[0236] 结果显示,给溶媒PBS对照组(图9A,9B)大部分的胰岛发生萎缩,萎缩的胰岛细胞被腺泡(箭头标示)所代替,胰岛边缘的腺泡增生,致胰岛与腺泡之间分界不清;给纤溶酶原组(图9C,9D)大部分的胰岛较之于对照组面积大,且胰岛内未有腺泡增生,只有少数的胰岛内残存少量的腺泡,胰岛与腺泡之间边界清晰。比较给药组和对照组的胰岛占胰腺的面积比发现,给药组比对照组大近乎一倍(图9E)。说明纤溶酶原可促进糖尿病小鼠胰岛损伤的修复,提示纤溶酶原有可能通过促进胰岛损伤的修复,从而从根本上治愈糖尿病。

[0237] 实施例10纤溶酶原减少糖尿病小鼠胰岛胶原沉积

[0238] 24-25周龄db/db雄性小鼠16只,实验开始当天记为第0天并称重,根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组10只,给溶媒PBS对照组6只。第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药31天。在第32天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡至水后水洗1次,以0.1%天狼星红染色60分钟后,流水冲洗,苏木素染色1分钟,流水冲洗,1%盐酸酒精和氨水分化返蓝,流水冲洗,烘干后封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0239] 天狼星红染色可使胶原持久染色,作为病理切片特殊染色方法,天狼星红染色可以特异显示胶原组织。

[0240] 染色结果显示,给纤溶酶原组小鼠(图10B)胰岛胶原沉积(箭头标识)明显低于给溶媒PBS对照组(图10A),且统计差异显著(图10C)。说明纤溶酶原能降低糖尿病动物胰岛的纤维化。

[0241] 实施例11纤溶酶原减少糖尿病小鼠胰岛细胞凋亡

[0242] 24-25周龄db/db雄性小鼠6只,实验开始当天记为第0天并称重,根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组4只和给溶媒PBS对照组2只。第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药31天。在第32天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织

经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。以3%双氧水孵育15分钟,水洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭1小时;之后,弃除羊血清液,用PAP笔圈出组织。兔抗小鼠Caspase-3 (Abcam) 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育1小时, PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度脱水透明并封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0243] Caspase-3是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,其表达越多表明处于凋亡状态的细胞越多<sup>[44]</sup>。

[0244] 本发明的实验结果显示,给纤溶酶原组(图11B) Caspase-3的表达(箭头标识)明显低于给溶媒PBS对照组(图11A)。说明纤溶酶原能够减少胰岛细胞的凋亡。

[0245] 实施例12纤溶酶原促进18周龄进糖尿病小鼠胰岛素的表达和分泌

[0246] 18周龄db/db雄性小鼠8只,实验开始当天记为第0天并称重,根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组和给溶媒PBS对照组,每组各4只。第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药31天。在第36天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。以3%双氧水孵育15分钟,水洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭1小时;之后,弃除羊血清液,用PAP笔圈出组织。兔抗小鼠胰岛素抗体 (Abcam) 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育1小时, PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度脱水透明并封片,切片在显微镜下200倍下观察。

[0247] 结果显示,给纤溶酶原组(图12B)胰岛素的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组(图12A),且统计差异接近显著( $P=0.15$ ) (图12C)。说明纤溶酶原能够促进胰岛功能修复,促进胰岛素的表达和分泌。

[0248] 实施例13纤溶酶原促进24-25周龄糖尿病小鼠胰岛素的表达和分泌

[0249] 24-25周龄db/db雄性小鼠8只,实验开始当天记为第0天并称重,根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组5只和给溶媒PBS对照组3只。第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药31天。在第32天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。以3%双氧水孵育15分钟,水洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭1小时;之后,弃除羊血清液,用PAP笔圈出组织。兔抗小鼠胰岛素抗体 (Abcam) 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育1小时, PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度脱水透明并封片,切片在显微镜下200倍下观察。

[0250] 结果显示,给纤溶酶原组胰岛素的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组,

且统计差异显著 ( $P=0.02$ ) (图13)。说明纤溶酶原能有效修复胰岛功能,促进胰岛素的表达和分泌。

[0251] 实施例14纤溶酶原促进糖尿病小鼠胰岛素合成分泌功能的修复

[0252] 26周龄db/db雄性小鼠9只,实验开始当天记为第0天并称重,根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组4只给溶媒PBS对照组5只。第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 $2\text{mg}/0.2\text{ml}/\text{只}/\text{天}$ ,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药35天。在第35天小鼠禁食16小时后,在第36天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 $3\mu\text{m}$ ,切片脱蜡复水后水洗1次。以3%双氧水孵育15分钟,水洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭1小时;之后,弃除羊血清液,用PAP笔圈出组织。兔抗小鼠胰岛素抗体 (Abcam)  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育1小时, PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度脱水透明并封片,切片在显微镜下200倍下观察。

[0253] 结果显示,给纤溶酶原组胰岛素的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组,且统计差异极显著 ( $P=0.005$ ) (图14)。说明纤溶酶原能有效修复糖尿病鼠胰岛功能,提高胰岛素的表达和分泌。

[0254] 实施例15纤溶酶原促进24-25周龄糖尿病小鼠胰岛多向核转录因子NF- $\kappa$ B的表达

[0255] 24-25周龄db/db雄性小鼠10只,实验开始当天记为第0天并称重,根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组4只和给溶媒PBS对照组6只,另取4只db/m作为正常对照组,正常对照组不做处理。第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 $2\text{mg}/0.2\text{ml}/\text{只}/\text{天}$ ,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药31天。在第32天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为 $3\mu\text{m}$ ,切片脱蜡复水后水洗1次。以3%双氧水孵育15分钟,水洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭1小时;之后,弃除羊血清液,用PAP笔圈出组织。兔抗小鼠NF- $\kappa$ B (Abcam)  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育1小时, PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度脱水透明并封片,切片在显微镜下200倍下观察。

[0256] NF- $\kappa$ B为转录因子蛋白家族成员,在炎症修复过程中发挥着重要作用<sup>[45]</sup>。

[0257] 本发明实验结果显示,给纤溶酶原组NF- $\kappa$ B的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组,且统计差异显著(图15)。说明纤溶酶原能促进多向核转录因子NF- $\kappa$ B的表达。

[0258] 实施例16纤溶酶原减少18周龄糖尿病小鼠胰岛 $\alpha$ 细胞的增殖,恢复胰岛 $\alpha$ 细胞的正常分布和降低胰高血糖素的分泌

[0259] 18周龄db/db雄性小鼠8只以及db/m雄性小鼠3只,实验开始当天记为第0天并称重,db/db小鼠根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组和给溶媒PBS对照组,每组各4只,db/m小鼠作为正常对照组。第1天开始给纤溶酶原或PBS。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原 $2\text{mg}/0.2\text{ml}/\text{只}/\text{天}$ ,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药35天。在第36天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯

透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠胰高血糖素抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0260] 胰岛 $\alpha$ 细胞合成分泌胰高血糖素,主要散在分布于胰岛周边区域。

[0261] 结果显示,与给纤溶酶原组(图16C)相比,给溶媒PBS对照组(图16B)胰高血糖素阳性细胞(箭头标识)明显增多,阳性细胞浸润到胰岛的中央区域,且平均光密度定量分析结果具有统计学差异(\*\*表示 $P < 0.01$ ) (图16D);给纤溶酶原组胰高血糖素阳性细胞散在的分布于胰岛周边,给纤溶酶原组的胰岛形态比给溶媒PBS组更接近正常对照组(16A)。说明纤溶酶原能够显著抑制18周龄糖尿病小鼠胰岛 $\alpha$ 细胞增殖及胰高血糖素的分泌,修正胰岛 $\alpha$ 细胞分布紊乱,提示纤溶酶原促进胰岛损伤的修复。

[0262] 实施例17纤溶酶原减少24-25周龄糖尿病小鼠胰岛 $\alpha$ 细胞的增殖,恢复胰岛 $\alpha$ 细胞的正常分布和降低胰高血糖素的分泌

[0263] 24-25周龄db/db雄性小鼠11只以及db/m雄性小鼠5只,实验开始当天记为第0天并称重,db/db小鼠称重后随机分为两组,给纤溶酶原组5只,给溶媒PBS对照组6只,db/m小鼠作为正常对照组。第1天开始给纤溶酶原或PBS。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS或不注射任何液体,连续给药31天。在第32天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠胰高血糖素抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0264] 胰岛 $\alpha$ 细胞合成分泌胰高血糖素,主要散在分布于胰岛周边区域。

[0265] 结果显示,与给纤溶酶原组相(图17C)比给溶媒PBS对照组(图17B)胰高血糖素阳性细胞(箭头标识)明显增多,阳性细胞浸润到胰岛的中央区域;给纤溶酶原组胰高血糖素阳性细胞散在的分布于胰岛周边,给纤溶酶原组的胰岛形态比给溶媒PBS组更接近正常对照组(17A)。说明纤溶酶原能够显著抑制24-25周龄糖尿病小鼠胰岛 $\alpha$ 细胞增殖及胰高血糖素的分泌,修正胰岛 $\alpha$ 细胞分布紊乱,提示纤溶酶原能促进胰岛损伤的修复。

[0266] 实施例18纤溶酶原抑制26周龄糖尿病小鼠胰岛 $\alpha$ 细胞的增殖,恢复胰岛 $\alpha$ 细胞的正常分布和降低胰高血糖素的分泌

[0267] 26周龄db/db雄性小鼠9只以及db/m雄性小鼠3只,实验开始当天记为第0天并称重,db/db小鼠称重后随机分为两组,给纤溶酶原组4只,给溶媒PBS对照组5只,db/m小鼠作为正常对照组。第1天开始给纤溶酶原或PBS。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/



0.2ml/只/天,给溶媒 PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药35天。在第36天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc.,USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠胰高血糖素抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc.,USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0268] 胰岛 $\alpha$ 细胞合成分泌胰高血糖素,主要散在分布于胰岛周边区域。

[0269] 结果显示,与给纤溶酶原组相(图18C)比给溶媒PBS对照组(图18B)胰高血糖素阳性细胞(箭头标识)明显增多,阳性细胞浸润到胰岛的中央区域,且平均光密度定量分析结果具有统计学差异(\*\*表示 $P < 0.01$ ) (图18D);给纤溶酶原组胰高血糖素阳性细胞散在的分布于胰岛周边,给纤溶酶原组的胰岛形态比给溶媒PBS组更接近正常对照组(18A)。说明纤溶酶原能够显著抑制26周龄糖尿病小鼠胰岛 $\alpha$ 细胞增殖及胰高血糖素的分泌,修正胰岛 $\alpha$ 细胞分布紊乱,提示纤溶酶原能促进胰岛损伤的修复。

[0270] 实施例19纤溶酶原减少PLG活性正常小鼠T1DM模型中胰高血糖素的分泌

[0271] 9-10周龄PLG活性正常雄性小鼠15只,随机分为三组,空白对照组、给溶媒PBS对照组以及给纤溶酶原组,每组各5只。给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg STZ(Sigma, 货号S0130)诱导T1DM模型<sup>[43]</sup>,空白对照组不做处理。注射12天后开始给药并定为给药第1天,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药28天。在第29天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc.,USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠胰高血糖素抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc.,USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0272] 胰岛 $\alpha$ 细胞合成分泌胰高血糖素,主要分布于胰岛周边区域。

[0273] 结果显示,给溶媒PBS对照组(图19B)胰高血糖素阳性表达明显多于给纤溶酶原组(图19C),且平均光密度定量分析结果统计差异显著(图19D),且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组(19A)。说明纤溶酶原能够显著减少STZ诱导的糖尿病小鼠胰岛 $\alpha$ 细胞分泌胰高血糖素。

[0274] 实施例20纤溶酶原促进24-25周龄糖尿病小鼠胰岛IRS-2的表达

[0275] 24-25周龄db/db雄性小鼠11只以及db/m雄性小鼠5只,实验开始当天记为第0天并称重,db/db小鼠根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组5只,给溶媒PBS对照组6只,db/m小鼠作为正常对照组。第1天开始给纤溶酶原或PBS。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶

原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS或不注射任何液体,连续给药31天。在第32天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠IRS-2抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0276] IRS-2免疫组化结果显示,给溶媒PBS对照组小鼠(图20B)胰岛IRS-2阳性表达(箭头标识)明显少于给纤溶酶原组(图20C),且统计差异显著(图20D),且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近正常对照组(21A)。说明纤溶酶原能有效增加24-25周龄糖尿病小鼠胰岛细胞IRS-2的表达。

[0277] 实施例21纤溶酶原促进26周龄糖尿病小鼠胰岛IRS-2的表达

[0278] 26周龄db/db雄性小鼠9只以及db/m雄性小鼠3只,实验开始当天记为第0天并称重,db/db小鼠根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组4只,给溶媒PBS对照组5只,db/m小鼠作为正常对照组。第1天开始给纤溶酶原或PBS。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药35天。在第36天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠IRS-2抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0279] IRS-2免疫组化结果显示,给溶媒PBS对照组小鼠(图21B)胰岛IRS-2阳性表达(箭头标识)明显少于给纤溶酶原组(图21C);给纤溶酶原组IRS-2表达水平接近正常对照组小鼠(图21A)。说明纤溶酶原能有效增加26周龄糖尿病小鼠胰岛细胞IRS-2的表达。

[0280] 实施例22纤溶酶原促进PLG活性正常T1DM小鼠胰岛IRS-2的表达

[0281] 9-10周龄PLG活性正常雄性小鼠15只,随机分为三组,空白对照组、给溶媒PBS对照组以及给纤溶酶原组,每组各5只。给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg STZ(Sigma, 货号S0130)诱导I型糖尿病<sup>[43]</sup>,空白对照组不做处理。注射12天后开始给药并定为给药第1天,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药28天。在第29天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠IRS-2抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵

育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB 试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200 倍光学显微镜下观察。

[0282] IRS-2免疫组化结果显示,给溶媒PBS对照组小鼠 (图22B) 胰岛IRS-2阳性表达 (箭头标识) 明显少于给纤溶酶原组 (图22C),且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组 (22A)。说明纤溶酶原能有效增加9-10周龄 PLG活性正常小鼠胰岛细胞IRS-2的表达。

[0283] 实施例23纤溶酶原减少24-26周龄糖尿病小鼠胰岛中性粒细胞的浸润

[0284] 24-26周龄db/db雄性小鼠9只以及db/m小鼠3只,db/db小鼠随机分为两组,给纤溶酶原组4只,给溶媒PBS对照组5只,db/m小鼠作为正常对照组。实验开始当天记为第0天称重分组,实验第二天开始给纤溶酶原或PBS并记为第1天。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药35天。在第36天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠中性粒细胞抗体 (Abcam) 4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0285] 中心粒细胞是非特异性细胞免疫系统中重要成员,当炎症发生时,它们被趋化性物质吸引到炎症部位。

[0286] 中心粒细胞免疫组化结果显示,给纤溶酶原组 (图23C) 阳性表达细胞少于给溶媒PBS对照组 (图23B),且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近正常对照组 (23A)。

[0287] 实施例24纤溶酶原减少PLG活性受损小鼠在T1DM模型中胰岛中性粒细胞的浸润

[0288] 9-10周龄PLG活性受损雄性小鼠10只,随机分为三组,空白对照组3只,给PBS对照组3只,给纤溶酶原组4只。给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg STZ (sigma S0130) 诱导I型糖尿病<sup>[43]</sup>,空白对照组不做处理。注射12天后开始给药并定为给药第1天,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药28天。在第29天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液 (Vector laboratories, Inc., USA) 封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠中性粒细胞抗体 (Abcam) 4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG (HRP) 抗体 (Abcam) 二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒 (Vector laboratories, Inc., USA) 显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在400倍光学显微镜下观察。

[0289] 中心粒细胞免疫组化结果显示,给纤溶酶原组 (图24C) 阳性表达细胞 (箭头标识)

少于给溶媒PBS对照组(图24B),且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组(24A)。

[0290] 实施例25纤溶酶原减少PLG活性正常小鼠在T1DM模型中胰岛中性粒细胞的浸润

[0291] 9-10周龄PLG活性正常雄性小鼠11只,随机分为三组,空白对照组3只,给溶媒PBS对照组4只,给纤溶酶原组4只。给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg STZ(sigma S0130)诱导I型糖尿病<sup>[43]</sup>,空白对照组不做处理。注射12天后开始给药并定为给药第1天,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药28天。在第29天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠中心粒细胞抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在400倍光学显微镜下观察。

[0292] 中心粒细胞免疫组化结果显示,给纤溶酶原组(图25C)阳性表达细胞(箭头标识)少于给溶媒PBS对照组(图25B),且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组(25A)。

[0293] 实施例26溶酶原促进在T1DM模型中的PLG活性受损小鼠胰岛素的合成与分泌

[0294] 9-10周龄PLG活性受损雄性小鼠10只,随机分为三组,空白对照组3只,给PBS对照组3只,给纤溶酶原组4只。给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg STZ(sigma S0130)诱导I型糖尿病<sup>[43]</sup>,空白对照组不做处理。注射12天后开始给药并定为给药第1天,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药28天。在第29天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠胰岛素抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0295] 免疫组化结果显示,给纤溶酶原组(图26C)胰岛素阳性表达(箭头标识)明显多于给溶媒PBS对照组(图26B,且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组(26A))。说明纤溶酶原能促进在T1DM模型中的PLG活性受损小鼠胰岛素的合成与分泌。

[0296] 实施例27纤溶酶原促进T1DM模型中PLG活性正常小鼠胰岛素的合成与表达

[0297] 9-10周龄PLG活性正常雄性小鼠11只,随机分为三组,空白对照组3只,给溶媒PBS对照组4只,给纤溶酶原组4只。给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg STZ(sigma S0130)诱导I型糖尿病<sup>[43]</sup>,空白对照组不做处理。注射12天后开始给药并定为给药第1天,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天,

给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药28天。在第29天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories,Inc.,USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠胰岛素抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories,Inc.,USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0298] 免疫组化结果显示,给纤溶酶原组(图27C)胰岛素阳性表达(箭头标识)明显多于给溶媒PBS对照组(图27B),且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组(27A)。说明纤溶酶原促进T1DM模型中PLG活性正常小鼠胰岛素的合成与表达。

[0299] 实施例28纤溶酶原促进PLG活性受损小鼠T1DM模型中胰岛多向核转录因子NF- $\kappa$ B的表达

[0300] 9-10周龄PLG活性受损雄性小鼠10只,随机分为三组,空白对照组3只,给PBS对照组3只,给纤溶酶原组4只。给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg STZ(sigma S0130)诱导I型糖尿病<sup>[43]</sup>,空白对照组不做处理。注射12天后开始给药并定为给药第1天,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药28天。在第29天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories,Inc.,USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠NF- $\kappa$ B抗体(Cell Signal)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories,Inc.,USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0301] NF- $\kappa$ B作为一种多向核转录因子,激活后参与细胞增殖、细胞凋亡及炎症和免疫等多种基因的调节<sup>[24]</sup>。

[0302] 实验结果显示,给纤溶酶原组(图28C)NF- $\kappa$ B的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组(图28B)。说明纤溶酶原能促进多向核转录因子NF- $\kappa$ B的表达。

[0303] 实施例29纤溶酶原促进18周龄糖尿病小鼠胰岛多向核转录因子NF- $\kappa$ B的表达

[0304] 18周龄db/db雄性小鼠7只,实验开始当天记为第0天并称重,根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组3只,给溶媒PBS对照组4只。第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药35天。在第36天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories,Inc.,USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加

兔抗小鼠NF- $\kappa$ B抗体(Cell Signal)4℃孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0305] 本发明实验结果显示,给纤溶酶原组(图29B)NF- $\kappa$ B的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组(图29A)。说明纤溶酶原能促进多向核转录因子NF- $\kappa$ B的表达。

[0306] 实施例30纤溶酶原抑制26周龄糖尿病小鼠多向核转录因子NF- $\kappa$ B的表达

[0307] 26周龄db/db雄性小鼠9只以及db/m雄性小鼠3只,实验开始当天记为第0天并称重,db/db小鼠根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组4只,给溶媒PBS对照组5只,db/m小鼠作为正常对照组。第1天开始给纤溶酶原或PBS并记为第1天,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药35天。在第36天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠NF- $\kappa$ B抗体(Cell Signal)4℃孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0308] 实验结果显示,给纤溶酶原组(图30C)NF- $\kappa$ B的表达(箭头标识)明显高于给溶媒PBS对照组(图30B),且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近正常对照组(30A)。说明纤溶酶原能促进相对年老(26周龄)糖尿病小鼠多向核转录因子NF- $\kappa$ B的表达。

[0309] 实施例31纤溶酶原促进24-25周龄糖尿病小鼠胰岛TNF- $\alpha$ 的表达

[0310] 24-25周龄db/db雄性小鼠11只以及db/m雄性小鼠5只,实验开始当天记为第0天并称重,db/db小鼠根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组5只,给溶媒PBS对照组6只,db/m小鼠作为正常对照组。第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS或不注射任何液体,连续给药31天。在第32天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠TNF- $\alpha$ 抗体(Abcam)4℃孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0311] 肿瘤坏死因子 $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )主要由活化的单核/巨噬细胞产生,是一种重要的促炎症因子<sup>[48]</sup>。

[0312] 本实验研究结果显示,给纤溶酶原组(图31C)TNF- $\alpha$ 的阳性表达明显高于给溶媒PBS对照组(图31B),且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近正常对照组(31A)。说明纤溶酶

原能促进24-25周龄糖尿病小鼠 TNF- $\alpha$ 的表达。

[0313] 实施例32纤溶酶原抑制26周龄糖尿病小鼠胰岛TNF- $\alpha$ 的表达

[0314] 26周龄db/db雄性小鼠9只以及db/m雄性小鼠3只,实验开始当天记为第0天并称重,db/db小鼠根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组4只,给溶媒PBS对照组5只,db/m小鼠作为正常对照组。第1天开始给纤溶酶原或PBS。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS或不注射任何液体,连续给药35天。在第36天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠TNF- $\alpha$ 抗体(Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0315] 研究结果显示,给纤溶酶原组(图32C)TNF- $\alpha$ 的阳性表达明显高于给溶媒PBS对照组(图32B),且给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近正常对照组(32A)。说明纤溶酶原能26周龄糖尿病小鼠促进TNF- $\alpha$ 的表达。

[0316] 实施例33纤溶酶原促进PLG活性受损小鼠在T1DM模型中胰岛TNF- $\alpha$ 的表达

[0317] 9-10周龄PLG活性受损雄性小鼠7只,随机分为两组,给PBS对照组3只,给纤溶酶原组4只。两组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg STZ(sigma S0130)诱导I型糖尿病<sup>[43]</sup>。注射12天后开始给药并定为给药第1天,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药28天。在第29天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories, Inc., USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加兔抗小鼠抗体TNF- $\alpha$ (Abcam)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。山羊抗兔IgG(HRP)抗体(Abcam)二抗室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories, Inc., USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0318] 本实验研究结果显示,给纤溶酶原组(图33B)TNF- $\alpha$ 的阳性表达明显高于给溶媒PBS对照组(图33A)。说明纤溶酶原能促进PLG活性受损小鼠T1DM模型TNF- $\alpha$ 的表达。

[0319] 实施例34纤溶酶原减轻PLG活性受损小鼠在T1DM模型中胰岛损伤

[0320] 9-10周龄PLG活性受损雄性小鼠10只,随机分为三组,空白对照组3只,给PBS对照组3只,给纤溶酶原组4只。给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg STZ(sigma S0130)诱导I型糖尿病<sup>[43]</sup>,空白对照组不做处理。注射12天后开始给药并定为给药第1天,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS,连续给药28天。在第29天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织

切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,以3%双氧水孵育15分钟,0.01MPBS洗2次,每次5分钟。5%的正常羊血清液(Vector laboratories,Inc.,USA)封闭30分钟;时间到后,弃除羊血清液,滴加山羊抗鼠IgM(HRP)抗体(Abcam)室温孵育1小时,0.01M PBS洗2次,每次5分钟。按DAB试剂盒(Vector laboratories,Inc.,USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0321] IgM抗体在清除凋亡和坏死细胞过程中发挥着重要作用,组织器官损伤局部IgM抗体的水平与损伤程度呈正相关<sup>[49,50]</sup>。因此,检测组织器官局部IgM抗体的水平能够反映该组织器官的损伤情况。

[0322] 研究结果显示,给纤溶酶原组(图34C) IgM的阳性表达明显低于给溶媒PBS对照组(图34B)给纤溶酶原组比给溶媒PBS组更接近空白对照组(34A)。说明纤溶酶原能降低IgM的表达,提示纤溶酶原能减轻PLG活性受损小鼠T1DM模型中的胰岛损伤。

[0323] 实施例35纤溶酶原减少24-25周龄糖尿病小鼠胰岛细胞的凋亡

[0324] 24-25周龄db/db雄性小鼠11只以及db/m雄性小鼠5只,实验开始当天记为第0天并称重,db/db小鼠根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组5只,给溶媒PBS对照组6只,db/m小鼠作为正常对照组。第1天开始给纤溶酶原或PBS,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS或不注射任何液体,连续给药31天。在第32天处死小鼠,取胰脏在4%多聚甲醛中固定。固定后的胰脏组织经酒精梯度脱水和二甲苯透明后进行石蜡包埋。组织切片厚度为3 $\mu$ m,切片脱蜡复水后水洗1次。PAP笔圈出组织,滴加蛋白酶K工作液覆盖组织,室温孵育7min,0.01M PBS洗3次,每次3分钟。滴加TUNEL试剂盒(罗氏)试剂1和试剂2混合液体(5:45),于37 $^{\circ}$ C恒温孵育40min,0.01M PBS洗3次,每次3分钟。滴加甲醇配制的3%双氧水溶液(过氧化氢:甲醇=1:9)室温避光孵育20分钟,0.01M PBS洗3次,每次3分钟。滴加tunel试剂盒试剂3,37 $^{\circ}$ C恒温孵育30min,0.01M PBS洗3次,DAB试剂盒(Vector laboratories,Inc.,USA)显色,水洗3次后苏木素复染30秒,流水冲洗5分钟。梯度酒精脱水,二甲苯透明并中性树胶封片,切片在200倍光学显微镜下观察。

[0325] TUNEL染色可以用来检测组织细胞在凋亡晚期过程中细胞核DNA的断裂情况。

[0326] 本实验结果显示,给纤溶酶原组(图35C)的阳性细胞数(箭头标识)明显少于给溶媒PBS对照组(图35B)。正常对照组TUNEL阳性染色极低(图35A)。正常对照组凋亡率约为8%,给溶媒PBS组凋亡率约为93%,给纤溶酶原组凋亡率约为16%。说明纤溶酶原组能显著减少糖尿病小鼠胰岛细胞的凋亡。

[0327] 实施例36纤溶酶原降低26周龄糖尿病小鼠血清果糖胺水平

[0328] 26周龄db/db雄性小鼠9只,实验开始当天记为第0天并称重,根据体重随机分为两组,给纤溶酶原组4只,给溶媒PBS对照组5只。给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶原2mg/0.2mL/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS。第1天开始给纤溶酶原或PBS,连续给药35天。在第36天处死小鼠,检测血清果糖胺的浓度。果糖胺浓度使用果糖胺检测试剂盒(南京建成,A037-2)进行检测。

[0329] 检测结果显示,给纤溶酶原组血清果糖胺的浓度明显低于给溶媒PBS对照组,统计差异接近显著( $P=0.06$ ) (图36)。说明纤溶酶原能降低26周龄糖尿病小鼠的血糖果糖



胺。

[0330] 实施例37纤溶酶原提高T1DM模型小鼠葡萄糖分解能力

[0331] 9-10周龄C57雄性小鼠8只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组以及给纤溶酶原组,每组各4只。给溶媒PBS对照组和给纤溶酶原组小鼠禁食4小时后 单次腹腔注射200mg/kg链脲佐菌素(STZ) (sigma S0130) 诱导T1DM<sup>[43]</sup>。STZ注射12天后开始给药并定为给药第1天,给纤溶酶原组尾静脉注射人源 纤溶酶1mg/0.1ml/只/天,给溶媒PBS对照组尾静脉注射同体积的PBS。连续 给药19天,在第20天小鼠禁食6小时后,以2g/kg体重灌胃20%的葡萄糖,60 分钟后,眼眶静脉丛采血并离心取上清,以葡萄糖测定试剂盒(上海荣盛 361500)测定血糖。

[0332] 结果显示,给溶媒PBS对照组小鼠血糖明显高于给纤溶酶原组小鼠血 糖,且统计差异显著( $P=0.04$ ) (图37)。说明纤溶酶原能提高T1DM小鼠 葡萄糖分解能力,从而降低血糖。

[0333] 实施例38纤溶酶原改善T1DM模型小鼠胰岛素分泌

[0334] 9-10周龄C57雄性小鼠6只,随机分为两组,给溶媒PBS对照组和给纤溶 酶原组各3只。两组小鼠禁食4小时后单次腹腔注射200mg/kg链脲佐菌素 (STZ) (sigma S0130) 诱导 T1DM<sup>[43]</sup>。STZ注射12天后开始给药并定为给药第1 天,给纤溶酶原组尾静脉注射人源纤溶酶1mg/0.1ml/只/天,给溶媒PBS对照 组尾静脉注射同体积的PBS。连续给药20天,在第21天 小鼠禁食6小时后,眼球静脉丛取血,离心取上清,运用胰岛素检测试剂盒(Mercodia AB), 按照使用说明检测血清胰岛素浓度。

[0335] 结果显示,给溶媒PBS对照组小鼠胰岛素浓度明显低于给纤溶酶原组小 鼠,且统计差异接近显著( $P=0.08$ ) (图38)。说明纤溶酶原能促进T1DM 小鼠胰岛素的分泌。

[0336] 参考文献:

[0337] [1]International Diabetes Federation.IDF diabetes atlas[M].7th ed.Brussels:Karakas Print,2015: 13.[2]Lopez AP,de Dios A,Chiesa I,et al.Analysis of mutations in the glucokinase gene in people clinically characterized as MODY2without a family history of diabetes.Diabetes Res Clin Pract,2016,118:38-43.

[0338] [3]Fan M,Li W,Wang L,et al.Association of SLC30A8gene polymorphism with type 2diabetes,evidence from 46studies:a meta-analysis.Endocrine,2016, 53:381-94.

[0339] [4]L iang J,S llingerland JM1Mu ltiple ro les of the P I3K/PKB(Akt) pathway in cell cycle progress ion[J].Cell Cycle,2003,2(4):339-451.

[0340] [5]Dhand R,H iles I,Panayotou G,e t a l.PI 3-k inase is a dual specif icity enzyme:autoregulation by an intrinsic p rotein-serin e k inase activity [J].Em bo J,1994,13(3):522-331.

[0341] [6]Perrin AJ,Gunda M,Yu B,Yen K,Ito S,Forster S,Tissenbaum HA,Derry WB.Noncanonical control of C.elegans germline apoptosis by the insulin/IGF-land Ras/MAPK signaling pathways.Cell Death Differ.2013Jan;20(1):97-107.

[0342] [7]AguirreV,UchidaT,Y enushL,etal.Thec-JunN H(2)-terminlk inasep

- promotes insulin resistance through association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of ser(307) [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275:9047-9054.
- [0343] [8] Hirosumi J, Tuneman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* [J]. 2002, 420:333-336.
- [0344] [9] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance [J]. *Science*, 1993, 259 (5091):87-91.
- [0345] [10] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders [J]. *Nature*, 2006, 444 (7121):860-867.
- [0346] [11] Swaroop JJ, Rajarajeswari D, Naidu JN. Association of TNF- $\alpha$  with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus [J]. *Indian J Med Res*, 2012, 135:127-130.
- [0347] [12] Kentish SJ, O'Donnell TA, Isaacs NJ, et al. Gastric vagal afferent modulation by leptin is influenced by food intake status [J]. *J Physiol*, 2013, 591 (7):1921-1934.
- [0348] [13] Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PI Jr, Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2015:181643
- [0349] [14] LUOTOLA K, PIETIL A, ZELLER T, et al. Associations between interleukin-1 (IL-1) gene variations or IL-1 receptor antagonist levels and the development of type 2 diabetes [J]. *J Intern Med*, 2011, 269 (3):322-332.
- [0350] [15] DONATH M Y, SHOELSON S E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2011, 11 (2):98-107.
- [0351] [16] Reddy VP, Zhu X, Perry G, Smith MA. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009; 16 (4):763-774.
- [0352] [17] Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9 (3):343-353.
- [0353] [18] Ceretta LB, Reus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Zappellini G, Felisbino FF, Steckert AV, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012:302682.
- [0354] [19] Kajimoto Y, Kaneto H. Role of oxidative stress in pancreatic  $\beta$  cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1011:168-176.
- [0355] [20] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39 (1):44-84.
- [0356] [21] Drews G, Krippeit-Drews P, Dufer M. Oxidative stress and  $\beta$  cell dysfunction. *Pflugers Arch* 2010; 460 (4):703-718.

- [0357] [22]Patel S,Santani D.Role of NF- $\kappa$ B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications. *Pharmacol Rep* 2009;61:595-603.
- [0358] [23]Hayden MR,Sowers JR.Isletopathy in type 2 diabetes mellitus: implications of islet RAS,islet fibrosis, islet amyloid,remodeling,and oxidative stress.*Antioxid Redox Signal* 2007;9(7):891-910.
- [0359] [24]Mariappan N,Elks CM,Sriramula S,Guggilam A,Liu Z,Borkhsenius O, Francis J.NF-kappaB- induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes.*Cardiovasc Res* 2010;85(3):473-483.
- [0360] [25]Hofmann MA,Schiekofer S,Isermann B,Kanitz M,Henkels M,Joswig M, Treusch A,Morcós M, Weiss T,Borcea V,Khalek A,Amiral J,Tritschler H,Ritz E, Wahl P,Ziegler R,Bierhaus A,Nawroth PP. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF- $\kappa$ B.*Diabetologia* 1999; 42(2):222-232.
- [0361] [26]Eldor R,Yeffet A,Baum K,Doviner V,Amar D,Ben-Neriah Y,Christofori G,Peled A,Carel JC,Boitard C,Klein T,Serup P,Eizirik DL,Melloul D.Conditional and specific NF-kappaB blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents.*Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(13):5072-5077.
- [0362] [27]Caamano J,Hunter CA.NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions.*Clin Microbiol Rev* 2002;15(3):414-429.
- [0363] [28]Lacraz G,Giroix MH,Kassis N,Coulaud J,Galinier A,Noll C,Cornut M, Schmidlin F,Paul JL,Janel N, Irminger JC,Kergoat M,Portha B,Donath MY,Ehse JA,Homo-Delarche F.Islet endothelial activation and oxidative stress gene expression is reduced by IL-1Ra treatment in the type 2 diabetic GK rat.*PLoS One* 2009;4(9):e6963.
- [0364] [29]Cheng CY,Hsieh HL,Sun CC,Lin CC,Luo SF,Yang CM.IL-1 beta induces urokinase-plasminogen activator expression and cell migration through PKC alpha,JNK1/2,and NF-kappaB in A549 cells.*J Cell Physiol* 2009;219(1):183-193.
- [0365] [30]Mahadev K,Motoshima H,Wu X,Ruddy JM,Arnold RS,Cheng G,Lambeth JD, Goldstein BJ.The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plays an integral role in insulin signal transduction.*Mol Cell Biol* 2004;24(5):1844-1854.
- [0366] [31]Goldstein BJ,Mahadev K,Wu X. Insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets.*Diabetes* 2005;54(2):311-321.
- [0367] [32]Mahadev K,Wu X,Zilbering A,Zhu L,Lawrence JTR,Goldstein BJ.Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is

integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2001;276:48662-48669.

[0368] [33] Loh K, et al., Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab* 2009;10(4):260-272.

[0369] [34] Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal* 2007;9(3):343-353.

[0370] [35] Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003;52(1):1-8.

[0371] [36] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54(6):1615-1625.

[0372] [37] Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med* 2011;51(5):993-999.

[0373] [38] Wang J, Ma H, Tong C, Zhang H, Lawlis GB, Li Y, Zang M, Ren J, Nijland MJ, Ford SP, Nathanielsz PW, Li J. Overnutrition and maternal obesity in sheep pregnancy alter the JNK-IRS-1 signaling cascades and cardiac function in the fetal heart. *FASEB J* 2010;24(6):2066-2076.

[0374] [39] Marder V J, Novokhatny V. Direct fibrinolytic agents: biochemical attributes, preclinical foundation and clinical potential[J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2010, 8(3):433-444.

[0375] [40] Hunt J A, Petteway Jr S R, Scuderi P, et al. Simplified recombinant plasmin: production and functional comparison of a novel thrombolytic molecule with plasma-derived plasmin[J]. *Thromb Haemost*, 2008, 100(3):413-419.

[0376] [41] Sottrup-Jensen L, Claeys H, Zajdel M, et al. The primary structure of human plasminogen: Isolation of two lysine-binding fragments and one "mini"-plasminogen (MW, 38,000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis[J]. *Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis*, 1978, 3:191-209.

[0377] [42] Nagai N, Demarsin E, Van Hoef B, et al. Recombinant human microplasmin: production and potential therapeutic properties[J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2003, 1(2):307-313.

[0378] [43] Brian L. Furman. Streptozotocin-Induced Diabetic Models UNIT 5.47 in Mice and Rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 70:5.47.1-5.47.20.

[0379] [44] Parvesh Chaudhry, Mohan Singh, Sophie Parent et al. Prostate Apoptosis Response 4 (Par-4), a Novel Substrate of Caspase-3 during Apoptosis Activation. *Mol Cell Biol.* 2012 Feb; 32(4):826-839.

[0380] [45] Patrick Viatour, Marie-Paule Merville, Vincent Bours et al. Phosphorylation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: implications in cancer and

inflammation..TRENDS in Biochemical Sciences,2005,30 (1):43-52.

[0381] [46]Withers DJ,Gutierrez JS,Towery H,et al.Disruption of IRS-2 causes type 2diabetes in mice.Nature 1998;391:900-904.

[0382] [47]Withers DJ,Burks DJ,Towery HH et al.White MF.Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling.Nat Genet 1999;23:32-40.

[0383] [48]Jacob CO1,Aiso S,Michie SA,McDevitt HO et al.Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF):similarities between TNF-alpha and interleukin 1.Proc Natl Acad Sci U S A.1990 Feb;87 (3): 968-72.

[0384] [49]Zhang M,Takahashi K,Alicot EM,Vorup-Jensen T,Kessler B,et al.Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury.J Immunol.2006.177:4727-4734.

[0385] [50]Kim SJ,Gershov D,Ma X,Brot N,Elkon KB (2002) I-PLA2 Activation during Apoptosis Promotes the Exposure of Membrane Lysophosphatidylcholine Leading to Binding by Natural Immunoglobulin M Antibodies and Complement Activation.The Journal of Experimental Medicine 196:655-665.

[0386] [51]Ghinwa Barakat,Mohamed E Moustafa,Ibrahim Khalifeh ea al.Effects of exendin-4 and selenium on the expression of GLP-1R,IRS-1,and preproinsulin in the pancreas of diabetic rats.J Physiol Biochem.2017 Jun 7.

## 序列表

<110> 深圳瑞健生命科学研究院有限公司

<120> 一种促进胰岛素受体底物-2表达的方法

<130> PDK03599

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2376

<212> DNA

<213> 不含有信号肽的天然纤溶酶原 (Glu-PLG,Glu-纤维蛋白溶酶原) 核酸序列

<400> 1

```

gagcctctgg atgactatgt gaatacccag ggggettcac tgttcagtgt cactaagaag 60
cagctgggag caggaagtat agaagaatgt gcagcaaat gtgaggagga cgaagaattc 120
acctgcaggg cattccaata tcacagtaaa gagcaacaat gtgtgataat ggctgaaaac 180
aggaagtect ccataatcat taggatgaga gatgtagttt ttttgaaaa gaaagtgtat 240
ctctcagagt gcaagactgg gaatggaaaag aactacagag ggacgatgtc caaaacaaaa 300
aatggcatca cctgtcaaaa atggagtcc acttctcccc acagacctag attctcacct 360
gctacacacc cctcagaggg actggaggag aactactgca ggaatccaga caacgatccg 420
caggggccct ggtgctatac tactgatcca gaaaagagat atgactactg cgacattctt 480
gagtgtgaag aggaatgtat gcattgcagt ggagaaaact atgacggcaa aatttccaag 540
accatgtctg gactggaatg ccaggcctgg gactctcaga gcccacacgc tcatggatac 600
attccttcca aatttccaaa caagaacctg aagaagaatt actgtcgtaa ccccgatagg 660
gagctgcggc cttggtgttt caccaccgac cccaacaage gctgggaact ttgtgacatc 720
ccccgctgca caacacctcc accatcttct ggtcccacct accagtgtct gaagggaaca 780
ggtgaaaact atcgcgggaa tgtggctgtt accgtgtccg ggcacacctg tcagcactgg 840
agtgcacaga cccctcacac acataacagg acaccagaaa acttcccctg caaaaatttg 900
gatgaaaact actgccgcaa tctgacgga aaaagggccc catggtgcca tacaaccaac 960
agccaagtgc ggtgggagta ctgtaagata cegtctgtg actcctcccc agtatccacg 1020
gaacaattgg ctcccacacg accacctgag ctaaccctg tggccagga ctgctaccat 1080
ggtgatggac agagctaccg aggcacatcc tccaccacca ccacaggaaa gaagtgtcag 1140
tcttggatcat ctatgacacc acaccggcac cagaagacc cagaaaacta cccaatgct 1200
ggcctgacaa tgaactactg caggaatcca gatgccgata aaggcccctg gtgttttacc 1260
acagacccca gcgtcagggtg ggagtactgc aacctgaaaa aatgctcagg aacagaagcg 1320
agtgtttag cacctccgcc tgttgcctg ctccagatg tagagactcc ttccgaagaa 1380
gactgtatgt ttgggaatgg gaaaggatac cgaggcaaga gggcgaccac tgttactggg 1440
acgccatgcc aggactgggc tgcccaggag ccccatagac acagcatttt cactccagag 1500
acaaatccac gggcgggtct ggaaaaaaat tactgccgta accctgatgg tgatgtaggt 1560
ggtccctggt gctacacgac aaatccaaga aaactttacg actactgtga tgtccctcag 1620

```

tgtgcggccc cttcatttga ttgtgggaag cctcaagtgg agccgaagaa atgtcctgga 1680  
 agggttgtag gggggtgtgt ggcccacca cattcctggc cctggcaagt cagtcttaga 1740  
 acaaggtttg gaatgcactt ctgtggaggc accttgatat cccagagtg ggtgttgact 1800  
 gctgcccact gcttggagaa gtccccaagg cttcatcct acaaggatcat cctgggtgca 1860  
 caccaagaag tgaatctcga accgcatggt caggaaatag aagtgtctag gctgttcttg 1920  
 gagcccacac gaaaagatat tgccttgcta aagtaagca gtccctgccg catcactgac 1980  
 aaagtaatcc cagcttgtct gccatcccca aattatgtgg tcgctgaccg gaccgaatgt 2040  
 ttcatcactg gctggggaga aaccaaggt acttttggag ctggccttct caaggaagcc 2100  
 cagctccctg tgattgagaa taaagtgtgc aatcgctatg agtttctgaa tggaagagtc 2160  
 caatccaccg aactctgtgc tgggcatttg gccggaggca ctgacagttg ccagggtgac 2220  
 agtggaggtc ctctggtttg cttcgagaag gacaaataca ttttacaagg agtcaacttct 2280  
 tggggtcttg gctgtgcaag cccaataag cctggtgtct atgttcgtgt ttcaaggttt 2340  
 gttacttggg ttgagggagt gatgagaaat aattaa 2376

<210> 2

<211> 791

<212> PRT

<213> 不含有信号肽的天然纤溶酶原 (Glu-PLG, Glu-纤维蛋白溶酶原) 氨基酸序列

<400> 2

Glu	Pro	Leu	Asp	Asp	Tyr	Val	Asn	Thr	Gln	Gly	Ala	Ser	Leu	Phe	Ser
1			5						10					15	
Val	Thr	Lys	Lys	Gln	Leu	Gly	Ala	Gly	Ser	Ile	Glu	Glu	Cys	Ala	Ala
			20					25					30		
Lys	Cys	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Phe	Thr	Cys	Arg	Ala	Phe	Gln	Tyr	His
		35					40					45			
Ser	Lys	Glu	Gln	Gln	Cys	Val	Ile	Met	Ala	Glu	Asn	Arg	Lys	Ser	Ser
		50				55					60				
Ile	Ile	Ile	Arg	Met	Arg	Asp	Val	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Val	Tyr
65				70					75					80	
Leu	Ser	Glu	Cys	Lys	Thr	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	Arg	Gly	Thr	Met
				85				90					95		
Ser	Lys	Thr	Lys	Asn	Gly	Ile	Thr	Cys	Gln	Lys	Trp	Ser	Ser	Thr	Ser
			100					105					110		
Pro	His	Arg	Pro	Arg	Phe	Ser	Pro	Ala	Thr	His	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu
			115					120					125		
Glu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Asp	Pro	Gln	Gly	Pro	Trp
		130				135					140				
Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Glu	Lys	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Asp	Ile	Leu
145					150					155				160	
Glu	Cys	Glu	Glu	Glu	Cys	Met	His	Cys	Ser	Gly	Glu	Asn	Tyr	Asp	Gly

	165		170		175
Lys Ile Ser	Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser				
	180		185		190
Gln Ser Pro	His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys				
	195		200		205
Asn Leu Lys	Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro				
	210		215		220
Trp Cys Phe	Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile				
225		230		235	240
Pro Arg Cys	Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr Gln Cys				
	245		250		255
Leu Lys Gly	Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr Val				
	260		265		270
Ser Gly His	Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr His				
	275		280		285
Asn Arg Thr	Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn Tyr				
	290		295		300
Cys Arg Asn	Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr Asn				
305		310		315	320
Ser Gln Val	Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Asp Ser Ser				
	325		330		335
Pro Val Ser	Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro Glu Leu Thr				
	340		345		350
Pro Val Val	Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly				
	355		360		365
Thr Ser Ser	Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser				
	370		375		380
Met Thr Pro	His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala				
385		390		395	400
Gly Leu Thr	Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro				
	405		410		415
Trp Cys Phe	Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu				
	420		425		430
Lys Lys Cys	Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro Pro Pro Val				
	435		440		445
Val Leu Leu	Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp Cys Met Phe				
	450		455		460
Gly Asn Gly	Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr Val Thr Gly				
465		470		475	480



Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg His Ser Ile  
 485 490 495  
 Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys Asn Tyr Cys  
 500 505 510  
 Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asn  
 515 520 525  
 Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys Ala Ala Pro  
 530 535 540  
 Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro Gly  
 545 550 555 560  
 Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro Trp Gln  
 565 570 575  
 Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly Thr Leu  
 580 585 590  
 Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys Ser  
 595 600 605  
 Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu Val  
 610 615 620  
 Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe Leu  
 625 630 635 640  
 Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala  
 645 650 655  
 Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr  
 660 665 670  
 Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr  
 675 680 685  
 Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val  
 690 695 700  
 Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val  
 705 710 715 720  
 Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser  
 725 730 735  
 Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys  
 740 745 750  
 Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro  
 755 760 765  
 Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile  
 770 775 780  
 Glu Gly Val Met Arg Asn Asn

785  
 <210> 3  
 <211> 2433  
 <212> DNA  
 <213> 含有信号肽的天然纤溶酶原(来源于swiss prot)的核酸序列  
 <400> 3

```

atggaacata aggaagtggg tcttctactt cttttatttc tgaaatcagg tcaaggagag 60
cctctggatg actatgtgaa taccagggg gtttactgt tcagtgtcac taagaagcag 120
ctgggagcag gaagtataga agaatgtgca gcaaatgtg aggaggacga agaattcacc 180
tgcagggcat tccaatatca cagtaaagag caacaatgtg tgataatggc tgaaaacagg 240
aagtcctcca taatcattag gatgagagat gtagttttat ttgaaaagaa agtgtatctc 300
tcagagtgca agactgggaa tggaaagaac tacagagggg cgatgtcca aacaaaaaat 360
ggcatcacct gtcaaaaatg gagttccaact tctcccaca gacctagatt ctcacctgct 420
acacaccct cagagggact ggaggagaac tactgcagga atccagaca cgatccgcag 480
gggccctggg gctatactac tgatccagaa aagagatatg actactgca cattcttgag 540
tgtgaagagg aatgtatgca ttgcagtgga gaaaactatg acggcaaat ttccaagacc 600
atgtctggac tggaatgcca ggccctgggac tctcagagcc cacacgctca tggatacatt 660
ccttccaaat ttccaaacaa gaacctgaag aagaattact gtcgtaacce cgatagggag 720
ctgcggcctt ggtgtttcac caccgacccc aacaagcgtt gggaactttg tgacatcccc 780
cgctgcacaa cacctccacc atcttctggg cccacctacc agtgtctgaa gggaacaggt 840
gaaaactatc gcgggaatgt ggctgttacc gtgtccgggc acactgtca gcaactggagt 900
gcacagacce ctcacacaca taacaggaca ccagaaaact tcccctgcaa aaatttggat 960
gaaaactact gccgcaatcc tgacggaaaa agggccccat ggtgccatac aaccaacagc 1020
caagtgcggg gggagtactg taagataccg tctgtgact cctccccagt atccacggaa 1080
caattggctc ccacagcacc acctgagcta acccctgtgg tccaggactg ctaccatggt 1140
gatggacaga gctaccgagg cacatcctcc accaccacca caggaaagaa gtgtcagtct 1200
tggtcatcta tgacaccaca ccggcaccag aagacccag aaaactacce aatgctggc 1260
ctgacaatga actactgcag gaatccagat gccgataaag gccctggtg ttttaccaca 1320
gaccccagcg tcaggtggga gtactgcaac ctgaaaaaat gctcaggaac agaagcaggt 1380
gtttagcac ctccgcctgt tgtctgtctt ccagatgtag agactccttc cgaagaagac 1440
tgtatgtttg ggaatgggaa aggataccga ggcaagaggg cgaccactgt tactgggacg 1500
ccatgccagg actgggctgc ccaggagccc catagacaca gcattttcac tccagagaca 1560
aatccacggg cgggtctgga aaaaaattac tgccgtaacc ctgatggtga tgtaggtggt 1620
ccctggtgct acacgacaaa tccaagaaaa ctttacgact actgtgatgt ccctcagtgt 1680
gcggccccct catttgattg tgggaagcct caagtggagc cgaagaaatg tcttgggaag 1740
gtttagggg ggtgtgtggt ccaccacat tcttgccct ggcaagtcag tcttagaaca 1800
aggtttgaa tgcaactctg tggaggcacc ttgatatccc cagagtgggt gttgactgct 1860
gccactgct tggagaagtc cccaagcct tcactctaca aggtcactct gggtgcacac 1920
caagaagtga atctcgaacc gcagtctcag gaaatagaag tgtctaggct gttcttggag 1980

```

cccacacgaa aagatattgc cttgctaaag ctaagcagtc ctgcccgtcat cactgacaaa 2040  
 gtaatcccag cttgtctgcc atccccaaat tatgtggteg ctgaccggac cgaatgtttc 2100  
 atcactggct ggggagaaac ccaaggtact tttggagctg gccttctcaa ggaagcccag 2160  
 ctccctgtga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctgaatgg aagagtccaa 2220  
 tccaccgaac tctgtgctgg gcatttggcc ggaggcactg acagttgcca gggtgacagt 2280  
 ggaggtcctc tggtttgctt cgagaaggac aaatacattt tacaaggagt cacttcttgg 2340  
 ggtcttggct gtgcacgccc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgtttc aaggtttgtt 2400  
 acttggattg agggagtgat gagaaataat taa 2433

<210> 4

<211> 810

<212> PRT

<213> 含有信号肽的天然纤溶酶原(来源于swiss prot)的氨基酸序列

<400> 4

Met	Glu	His	Lys	Glu	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Lys	Ser	1	5	10	15
Gly	Gln	Gly	Glu	Pro	Leu	Asp	Asp	Tyr	Val	Asn	Thr	Gln	Gly	Ala	Ser	20	25	30	
Leu	Phe	Ser	Val	Thr	Lys	Lys	Gln	Leu	Gly	Ala	Gly	Ser	Ile	Glu	Glu	35	40	45	
Cys	Ala	Ala	Lys	Cys	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Phe	Thr	Cys	Arg	Ala	Phe	50	55	60	
Gln	Tyr	His	Ser	Lys	Glu	Gln	Gln	Cys	Val	Ile	Met	Ala	Glu	Asn	Arg	65	70	75	80
Lys	Ser	Ser	Ile	Ile	Ile	Arg	Met	Arg	Asp	Val	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	85	90	95	
Lys	Val	Tyr	Leu	Ser	Glu	Cys	Lys	Thr	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	Arg	100	105	110	
Gly	Thr	Met	Ser	Lys	Thr	Lys	Asn	Gly	Ile	Thr	Cys	Gln	Lys	Trp	Ser	115	120	125	
Ser	Thr	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Arg	Phe	Ser	Pro	Ala	Thr	His	Pro	Ser	130	135	140	
Glu	Gly	Leu	Glu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Asp	Pro	Gln	145	150	155	160
Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Glu	Lys	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Cys	165	170	175	
Asp	Ile	Leu	Glu	Cys	Glu	Glu	Glu	Cys	Met	His	Cys	Ser	Gly	Glu	Asn	180	185	190	
Tyr	Asp	Gly	Lys	Ile	Ser	Lys	Thr	Met	Ser	Gly	Leu	Glu	Cys	Gln	Ala	195	200	205	

Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe  
 210 215 220  
 Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu  
 245 250 255  
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr  
 260 265 270  
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala  
 275 280 285  
 Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro  
 290 295 300  
 His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp  
 305 310 315 320  
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His  
 325 330 335  
 Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys  
 340 345 350  
 Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro  
 355 360 365  
 Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser  
 370 375 380  
 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser  
 385 390 395 400  
 Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr  
 405 410 415  
 Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp  
 420 425 430  
 Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr  
 435 440 445  
 Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro  
 450 455 460  
 Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp  
 465 470 475 480  
 Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr  
 485 490 495  
 Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg  
 500 505 510  
 His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys

515	520	525
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr		
530	535	540
Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys		
545	550	555
Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys		
565	570	575
Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp		
580	585	590
Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly		
595	600	605
Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu		
610	615	620
Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His		
625	630	635
Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg		
645	650	655
Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser		
660	665	670
Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser		
675	680	685
Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp		
690	695	700
Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln		
705	710	715
Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn		
725	730	735
Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly		
740	745	750
Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu		
755	760	765
Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys		
770	775	780
Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val		
785	790	795
Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn		
805	810	

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 2145

<212> DNA

<213> LYS77-PLG(Lys-纤溶酶原)核酸序列

<400> 5

```

aaagtgtatc tctcagagtg caagactggg aatggaaaga actacagagg gacgatgtcc 60
aaaacaaaaa atggcatcac ctgtcaaaaa tggagttcca cttctcccca cagacctaga 120
ttctcacctg ctacacaccc ctacagaggga ctggaggaga actactgcag gaatccagac 180
aacgatccgc aggggccctg gtgctatact actgatccag aaaagagata tgactactgc 240
gacattcttg agtgtgaaga ggaatgtatg cattgcagtg gagaaaacta tgacggcaaa 300
atttccaaga ccatgtctgg actggaatgc caggcctggg actctcagag cccacacgct 360
catggataca ttcttccaa atttccaaac aagaacctga agaagaatta ctgtcgtaac 420
cccgataggg agctgcggcc ttggtgtttc accaccgacc ccaacaagcg ctgggaactt 480
tgtgacatcc cccgctgcac aacacctcca ceatcttctg gtcccaccta ccagtgtctg 540
aagggaacag gtgaaaaacta tcgcgggaat gtggtgttta cegtgtccgg gcacacctgt 600
cagcaactgga gtgcacagac ccctcacaca cataacagga caccagaaaa ctteccctgc 660
aaaaatttgg atgaaaaacta ctgccgcaat cctgacggaa aaagggeccc atggtgccat 720
acaaccaaca gccaaagtgcg gtgggagtac tgtaagatac cgtcctgtga ctctcccca 780
gtatccacgg aacaattggc tcccacagca ccacctgagc taaccctgt ggtccaggac 840
tgctaccatg gtgatggaca gagctaccga ggcacatcct ccaccaccac cacaggaaag 900
aagtgtcagt cttggtcadc tatgacacca caccggcacc agaagacccc agaaaactac 960
ccaaatgctg gcctgacaat gaactactgc aggaatccag atgccgataa aggcccctgg 1020
tgttttacca cagaccccag cgtcaggtgg gactactgca acctgaaaaa atgctcagga 1080
acagaagcga gtgtttagc acctccgct gttgtcctgc ttcagatgt agagactcct 1140
tccgaagaag actgtatggt tgggaatggg aaaggatacc gaggcaagag ggcgaccact 1200
gttactggga cgccatgcca ggactgggct gcccaggagc cccatagaca cagcattttc 1260
actccagaga caaatccacg ggcgggtctg gaaaaaatt actgccgtaa ccctgatggt 1320
gatgtaggtg gtccctgggt ctacacgaca aatccaagaa aactttacga ctactgtgat 1380
gtccctcagt gtgcggcccc ttcatttgat tgtgggaagc ctcaagtgga gccgaagaaa 1440
tgtcctggaa gggttgtagg ggggtgtgtg gccaccacc attcctggcc ctggcaagtc 1500
agtcttagaa caaggtttgg aatgcacttc tgtggaggca cttgatatac cccagagtgg 1560
gtgttgactg ctgcccactg cttggagaag tcccgaagc cttatccta caaggtcadc 1620
ctgggtgcac accaagaagt gaatctcgaa ccgcatgttc aggaaataga agtgtctagg 1680
ctgttcttgg agcccacacg aaaagatatt gccttgctaa agctaagcag tctgcccgtc 1740
atcactgaca aagtaatccc agettgtctg ccatecccaa attatgtggt cgctgaccgg 1800
accgaatgtt tcatcactgg ctggggagaa acccaagta cttttggagc tggccttctc 1860
aaggaagccc agctccctgt gattgagaat aaagtgtgca atcgctatga gtttctgaat 1920
ggaagagtcc aatccaccga actctgtgct gggeatttgg ccggaggcac tgacagttgc 1980
cagggtgaca gtggaggtec tctggtttgc ttcgagaagg acaatacat tttacaagga 2040
gtcacttctt ggggtcttgg ctgtgcacgc cccaataagc ctggtgtcta tgttctgtgt 2100
tcaaggtttg ttacttggat tgagggagtg atgagaaata attaa 2145

```

<210> 6  
 <211> 714  
 <212> PRT  
 <213> LYS77-PLG(Lys-纤溶酶原)氨基酸序列  
 <400> 6  
 Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg  
 1                   5                   10                   15  
 Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser  
                   20                   25                   30  
 Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser  
                   35                   40                   45  
 Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln  
                   50                   55                   60  
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys  
 65                   70                   75                   80  
 Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn  
                   85                   90                   95  
 Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala  
                   100                   105                   110  
 Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe  
                   115                   120                   125  
 Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu  
                   130                   135                   140  
 Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu  
 145                   150                   155                   160  
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr  
                   165                   170                   175  
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala  
                   180                   185                   190  
 Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro  
                   195                   200                   205  
 His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp  
                   210                   215                   220  
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His  
 225                   230                   235                   240  
 Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys  
                   245                   250                   255  
 Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro  
                   260                   265                   270

Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser  
 275 280 285  
 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser  
 290 295 300  
 Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr  
 305 310 315 320  
 Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp  
 325 330 335  
 Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr  
 340 345 350  
 Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro  
 355 360 365  
 Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp  
 370 375 380  
 Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr  
 385 390 395 400  
 Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg  
 405 410 415  
 His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys  
 420 425 430  
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr  
 435 440 445  
 Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys  
 450 455 460  
 Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys  
 465 470 475 480  
 Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp  
 485 490 495  
 Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly  
 500 505 510  
 Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu  
 515 520 525  
 Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His  
 530 535 540  
 Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg  
 545 550 555 560  
 Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser  
 565 570 575  
 Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser



580	585	590
Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp		
595	600	605
Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln		
610	615	620
Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn		
625	630	635
Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly		
645	650	655
Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu		
660	665	670
Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys		
675	680	685
Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val		
690	695	700
Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn		
705	710	

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1245

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; delta-plg(delta-纤溶酶原)核酸序列

&lt;400&gt; 7

```

gagcctctgg atgactatgt gaataccag ggggettcac tgttcagtgt cactaagaag 60
cagctgggag caggaagtat agaagaatgt gcagcaaaat gtgaggagga cgaagaattc 120
acctgcaggg cattccaata tcacagtaaa gagcaacaat gtgtgataat ggctgaaaac 180
aggaagtcct ccataatcat taggatgaga gatgtagttt tatttgaaaa gaaagtgtat 240
ctctcagagt gcaagactgg gaatggaaag aactacagag ggacgatgtc caaaacaaaa 300
aatggcatca cctgtcaaaa atggagtcc acttctccc acagacctag attctcacct 360
gctacacacc cctcagaggg actggaggag aactactgca ggaatccaga caacgatccg 420
caggggccct ggtgctatac tactgatcca gaaaagagat atgactactg cgacattctt 480
gagtgtgaag aggcggcccc tcatttgat tgtgggaage ctcaagtgga gccgaagaaa 540
tgtcctggaa gggttgtagg ggggtgtgtg gccacccac attcttgccc ctggcaagtc 600
agtcttagaa caaggtttgg aatgcaette tgtggaggca cttgatata cccagagtgg 660
gtgttgactg ctgcccactg cttggagaag tcccgaagge cttcactcta caaggtcact 720
ctgggtgcac accaagaagt gaatctcgaa ccgcatgttc aggaaataga agtgtctagg 780
ctgttcttgg ageccacacg aaaagatatt gcettgctaa agctaagcag tectgcccgc 840
atcactgaca aagtaatccc agettgtctg ccaccccaa attatgtggt cgctgaccgg 900
accgaatgtt tcatcactgg ctggggagaa acccaagta cttttggagc tggecttctc 960
aaggaagccc agctccctgt gattgagaat aaagtgtgca atcgctatga gtttctgaat 1020

```

ggaagagtcc aatccaccga actctgtgct gggcatttgg ccgaggcac tgacagttgc 1080  
 cagggtgaca gtggaggtcc tctggtttgc ttcgagaagg acaaatacat ttacaagga 1140  
 gtcacttctt ggggtcttgg ctgtgcacgc cccaataagc ctggtgtcta tgttcgtgtt 1200  
 tcaaggtttg ttacttggat tgagggagtg atgagaaata attaa 1245

<210> 8

<211> 414

<212> PRT

<213> delta-plg(delta-纤溶酶原)氨基酸序列

<400> 8

Glu	Pro	Leu	Asp	Asp	Tyr	Val	Asn	Thr	Gln	Gly	Ala	Ser	Leu	Phe	Ser	1	5	10	15
Val	Thr	Lys	Lys	Gln	Leu	Gly	Ala	Gly	Ser	Ile	Glu	Glu	Cys	Ala	Ala	20	25	30	
Lys	Cys	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Phe	Thr	Cys	Arg	Ala	Phe	Gln	Tyr	His	35	40	45	
Ser	Lys	Glu	Gln	Gln	Cys	Val	Ile	Met	Ala	Glu	Asn	Arg	Lys	Ser	Ser	50	55	60	
Ile	Ile	Ile	Arg	Met	Arg	Asp	Val	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Val	Tyr	65	70	75	80
Leu	Ser	Glu	Cys	Lys	Thr	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	Arg	Gly	Thr	Met	85	90	95	
Ser	Lys	Thr	Lys	Asn	Gly	Ile	Thr	Cys	Gln	Lys	Trp	Ser	Ser	Thr	Ser	100	105	110	
Pro	His	Arg	Pro	Arg	Phe	Ser	Pro	Ala	Thr	His	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	115	120	125	
Glu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Asp	Pro	Gln	Gly	Pro	Trp	130	135	140	
Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Glu	Lys	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Asp	Ile	Leu	145	150	155	160
Glu	Cys	Glu	Glu	Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Asp	Cys	Gly	Lys	Pro	Gln	Val	165	170	175	
Glu	Pro	Lys	Lys	Cys	Pro	Gly	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	His	180	185	190	
Pro	His	Ser	Trp	Pro	Trp	Gln	Val	Ser	Leu	Arg	Thr	Arg	Phe	Gly	Met	195	200	205	
His	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Ser	Pro	Glu	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	210	215	220	
Ala	His	Cys	Leu	Glu	Lys	Ser	Pro	Arg	Pro	Ser	Ser	Tyr	Lys	Val	Ile	225	230	235	240



gcttgtctgc catccccaaa ttatgtggtc gctgaccgga ccgaatgttt catcactggc 780  
 tggggagaaa cccaaggtac ttttgagct ggcttctca aggaagccca gctccctgtg 840  
 attgagaata aagtgtgcaa tcgctatgag tttctgaatg gaagagtcca atccaccgaa 900  
 ctctgtgctg ggcatTTGGC cggaggcact gacagttgcc agggtgacag tggaggtcct 960  
 ctggtttTgct tcgagaagga caaatacatt ttacaaggag tcacttcttg gggTcttggc 1020  
 tgtgcacgcc ccaataagcc tggTgtctat gttcgtgttt caaggttTgt tacttggatt 1080  
 gagggagtga tgagaaataa ttaa 1104

<210> 10

<211> 367

<212> PRT

<213> Mini-plg(小纤维蛋白溶酶原)氨基酸序列

<400> 10

Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Asn	Leu	Lys	Lys	Cys	Ser	Gly	Thr	Glu	Ala
1			5					10						15	
Ser	Val	Val	Ala	Pro	Pro	Pro	Val	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Val	Glu	Thr
			20					25						30	
Pro	Ser	Glu	Glu	Asp	Cys	Met	Phe	Gly	Asn	Gly	Lys	Gly	Tyr	Arg	Gly
			35				40							45	
Lys	Arg	Ala	Thr	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Pro	Cys	Gln	Asp	Trp	Ala	Ala
			50				55					60			
Gln	Glu	Pro	His	Arg	His	Ser	Ile	Phe	Thr	Pro	Glu	Thr	Asn	Pro	Arg
65				70						75					80
Ala	Gly	Leu	Glu	Lys	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	Val	Gly
				85						90					95
Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asn	Pro	Arg	Lys	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Cys
			100						105						110
Asp	Val	Pro	Gln	Cys	Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Asp	Cys	Gly	Lys	Pro	Gln
			115						120						125
Val	Glu	Pro	Lys	Lys	Cys	Pro	Gly	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Cys	Val	Ala
			130				135						140		
His	Pro	His	Ser	Trp	Pro	Trp	Gln	Val	Ser	Leu	Arg	Thr	Arg	Phe	Gly
145					150					155					160
Met	His	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Ser	Pro	Glu	Trp	Val	Leu	Thr
				165						170					175
Ala	Ala	His	Cys	Leu	Glu	Lys	Ser	Pro	Arg	Pro	Ser	Ser	Tyr	Lys	Val
				180					185						190
Ile	Leu	Gly	Ala	His	Gln	Glu	Val	Asn	Leu	Glu	Pro	His	Val	Gln	Glu
				195					200						205
Ile	Glu	Val	Ser	Arg	Leu	Phe	Leu	Glu	Pro	Thr	Arg	Lys	Asp	Ile	Ala

210	215	220
Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro		
225	230	235
Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys		
	245	250
Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu		
	260	265
Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg		
	275	280
Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly		
	290	300
His Leu Ala Gly Gly Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro		
305	310	315
Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser		
	325	330
Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg		
	340	345
Val Ser Arg Phe Val Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn		
	355	365

<210> 11

<211> 750

<212> DNA

<213> Micro-plg(微纤维蛋白溶酶原)核酸序列

<400> 11

```

gcccccttcat ttgattgtgg gaagcctcaa gtggagccga agaaatgtcc tggaagggtt 60
gtaggggggt gtgtggccca cccacattcc tggcctggc aagtcagtct tagaacaagg 120
tttggaatgc acttctgtgg aggcaccttg atatccccag agtgggtggt gactgctgcc 180
cactgcttgg agaagtcccc aaggccttca tctacaagg tcctctggg tgacaccaa 240
gaagtgaatc tcgaaccgca tggtcaggaa atagaagtgt ctaggctggt cttggagccc 300
acacgaaaag atattgcctt gctaaagcta agcagtctg ccgtcatcac tgacaaagta 360
atcccagctt gtctgccate cccaaattat gtggtegetg accggaccga atgtttcatc 420
actggctggg gagaaacceca aggtactttt ggagctggcc ttctcaagga ageccagctc 480
cctgtgattg agaataaagt gtgcaatcgc tatgagtttc tgaatggaag agtccaatcc 540
accgaactct gtgtgggca tttggccgga ggcactgaca gttgccaggg tgacagtgga 600
ggtcctctgg tttgcttcca gaaggacaaa tacatcttac aaggagtcac ttcttgggg 660
cttggctgtg cacgccccaa taagcctggt gtctatgttc gtgtttcaag gtttgttact 720
tggattgagg gactgatgag aaataattaa 750

```

<210> 12

<211> 249

<212> PRT

<213> Micro-plg(微纤维蛋白溶酶原)氨基酸序列

<400> 12

Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys  
 1                   5                   10                   15  
 Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro  
                   20                   25                   30  
 Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly  
                   35                   40                   45  
 Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu  
                   50                   55                   60  
 Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln  
 65                   70                   75                   80  
 Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu  
                   85                   90                   95  
 Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser  
                   100                   105                   110  
 Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro  
                   115                   120                   125  
 Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly  
                   130                   135                   140  
 Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu  
 145                   150                   155                   160  
 Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly  
                   165                   170                   175  
 Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr  
                   180                   185                   190  
 Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys  
                   195                   200                   205  
 Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala  
                   210                   215                   220  
 Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr  
 225                   230                   235                   240  
 Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn  
                   245

<210> 13

<211> 684

<212> DNA

<213> 丝氨酸蛋白酶(结构)域的核酸序列

<400> 13

gttgtagggg ggtgtgtggc ccaccacat tcttggeect ggcaagtcag tcttagaaca 60  
 aggtttggaa tgcacttctg tggaggcacc ttgatatccc cagagtgggt gttgactgct 120  
 gccactgct tggagaagtc cccaaggcct tcactctaca aggtcactcct ggtgacacac 180  
 caagaagtga atctcgaacc gcatgttcag gaaatagaag tgtctaggct gttcttgag 240  
 cccacacgaa aagatattgc cttgctaaag ctaagcagtc ctgccgtcat cactgacaaa 300  
 gtaatcccag cttgtctgcc atccccaaat tatgtggteg ctgaccggac cgaatgtttc 360  
 atcactggct ggggagaaac ccaaggtact tttggagctg gccttctcaa ggaagcccag 420  
 ctccctgtga ttgagaataa agtgtgcaat cgctatgagt ttctgaatgg aagagtccaa 480  
 tccaccgaac tctgtgctgg gcatttggcc ggaggcactg acagttgcca gggtgacagt 540  
 ggaggtcctc tggtttgctt cgagaaggac aaatacattt tacaaggagt cacttcttgg 600  
 ggtcttggct gtgcacgecc caataagcct ggtgtctatg ttcgtgtttc aaggtttgtt 660  
 acttgattg agggagtgat gaga 684

<210> 14

<211> 228

<212> PRT

<213> 丝氨酸蛋白酶(结构)域的氨基酸序列

<400> 14

Val	Val	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	His	Pro	His	Ser	Trp	Pro	Trp	Gln	Val
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Thr	Arg	Phe	Gly	Met	His	Phe	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile
				20				25					30		
Ser	Pro	Glu	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Glu	Lys	Ser	Pro
				35			40					45			
Arg	Pro	Ser	Ser	Tyr	Lys	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	His	Gln	Glu	Val	Asn
				50			55				60				
Leu	Glu	Pro	His	Val	Gln	Glu	Ile	Glu	Val	Ser	Arg	Leu	Phe	Leu	Glu
65					70					75				80	
Pro	Thr	Arg	Lys	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Pro	Ala	Val
				85					90					95	
Ile	Thr	Asp	Lys	Val	Ile	Pro	Ala	Cys	Leu	Pro	Ser	Pro	Asn	Tyr	Val
				100				105					110		
Val	Ala	Asp	Arg	Thr	Glu	Cys	Phe	Ile	Thr	Gly	Trp	Gly	Glu	Thr	Gln
				115			120					125			
Gly	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	Gln	Leu	Pro	Val	Ile
				130			135				140				
Glu	Asn	Lys	Val	Cys	Asn	Arg	Tyr	Glu	Phe	Leu	Asn	Gly	Arg	Val	Gln
145					150					155				160	
Ser	Thr	Glu	Leu	Cys	Ala	Gly	His	Leu	Ala	Gly	Gly	Thr	Asp	Ser	Cys

---

				165					170					175				
Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Cys	Phe	Glu	Lys	Asp	Lys	Tyr			
				180					185					190				
Ile	Leu	Gln	Gly	Val	Thr	Ser	Trp	Gly	Leu	Gly	Cys	Ala	Arg	Pro	Asn			
				195					200					205				
Lys	Pro	Gly	Val	Tyr	Val	Arg	Val	Ser	Arg	Phe	Val	Thr	Trp	Ile	Glu			
				210					215					220				
Gly	Val	Met	Arg															
				225														



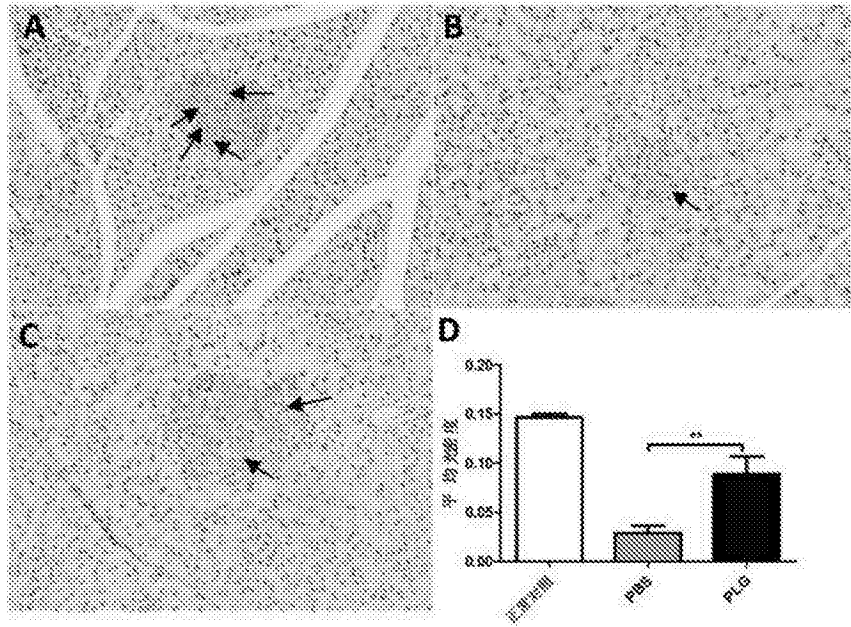


图1

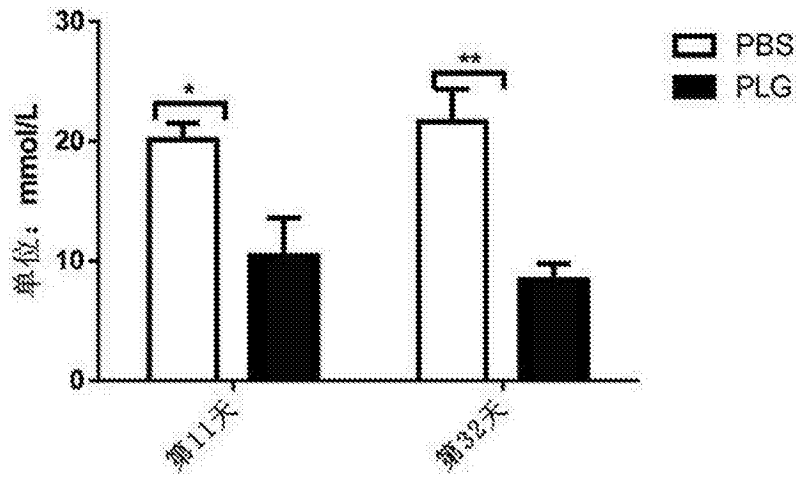


图2

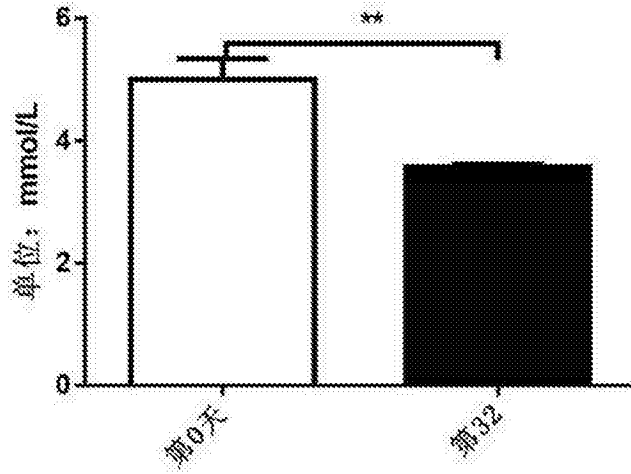


图3

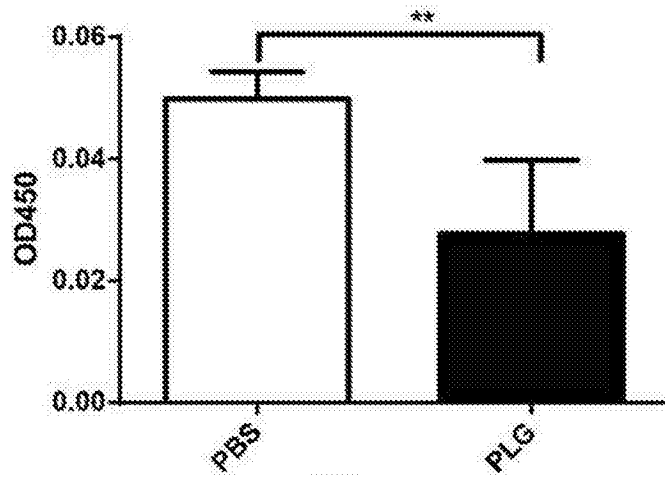


图4

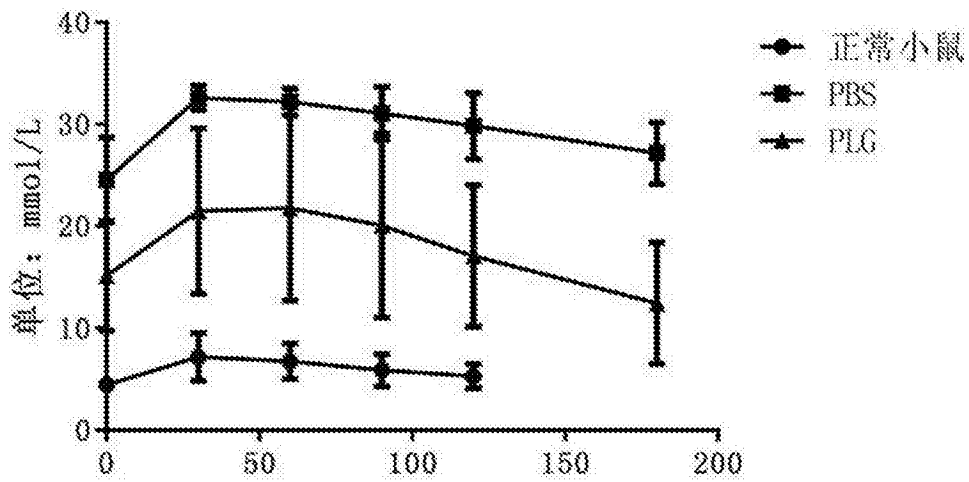


图5

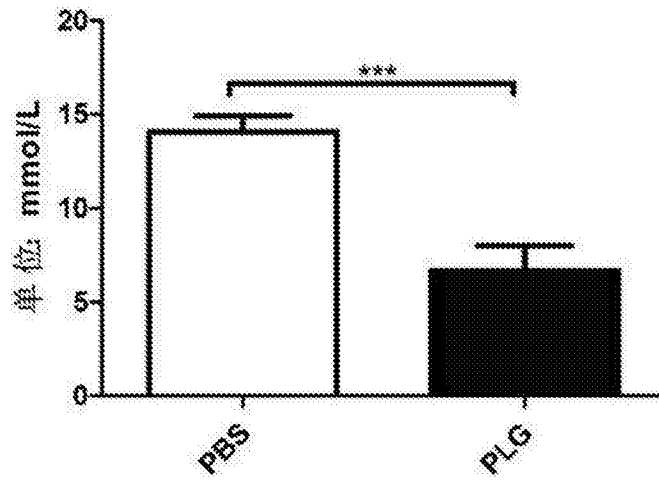


图6

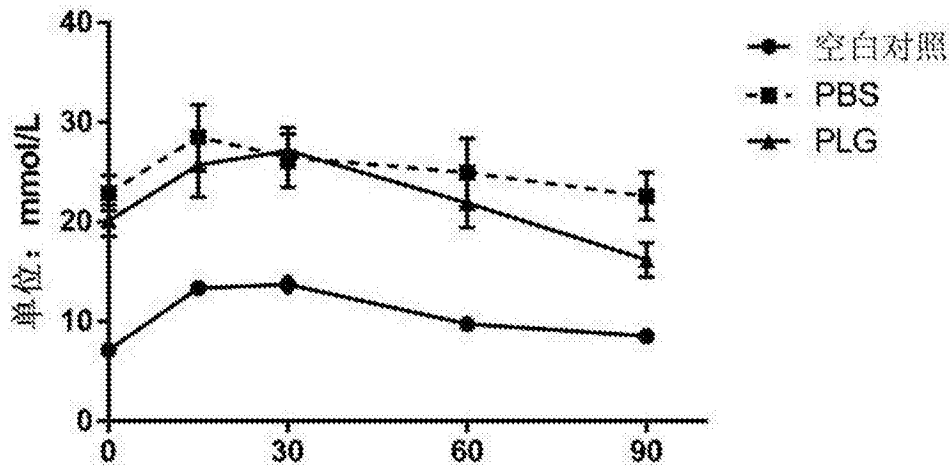


图7

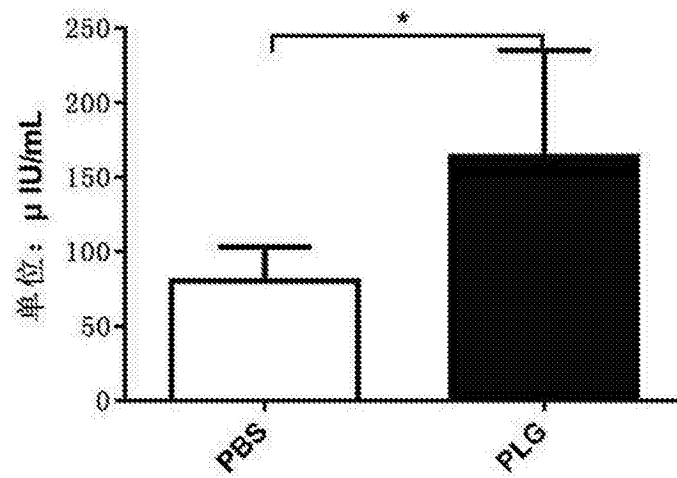


图8

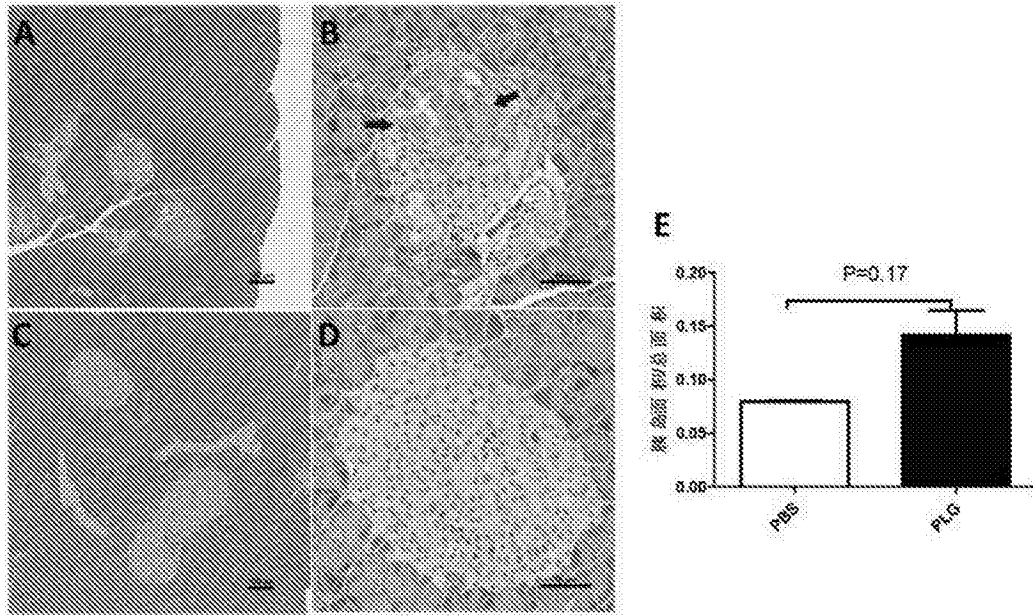


图9

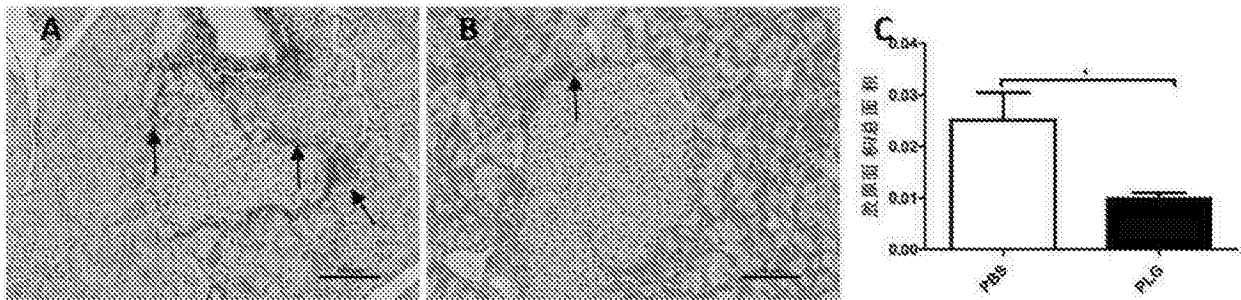


图10

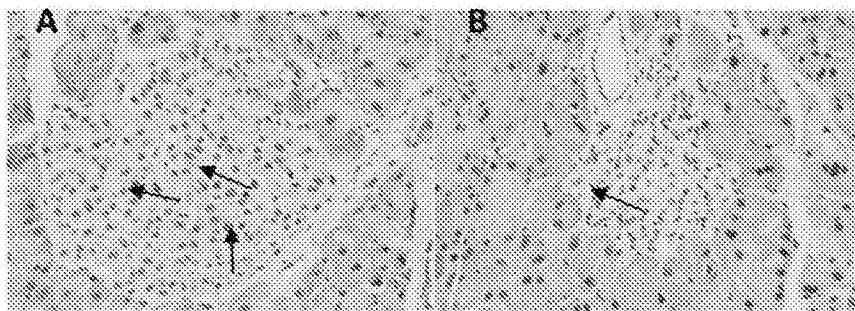


图11

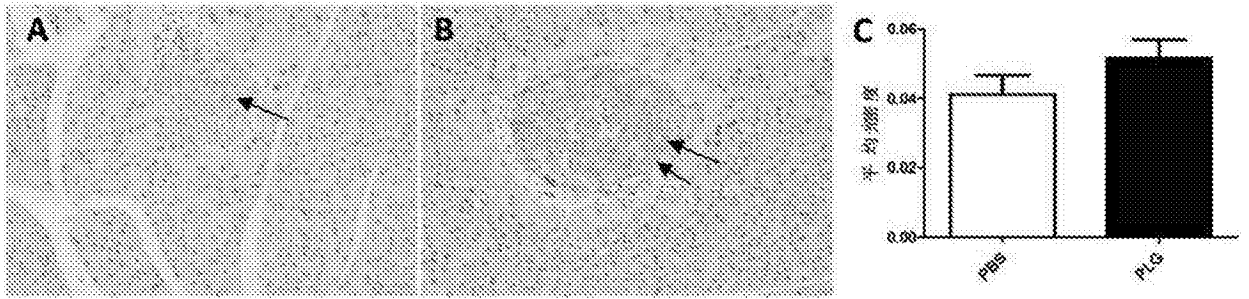


图12

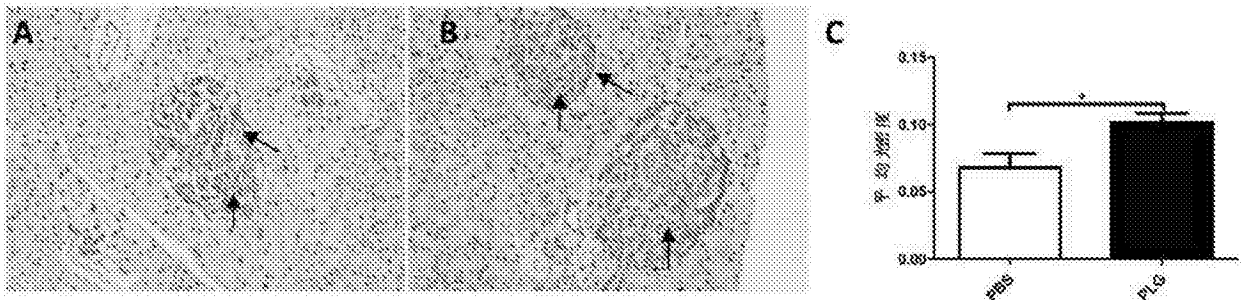


图13

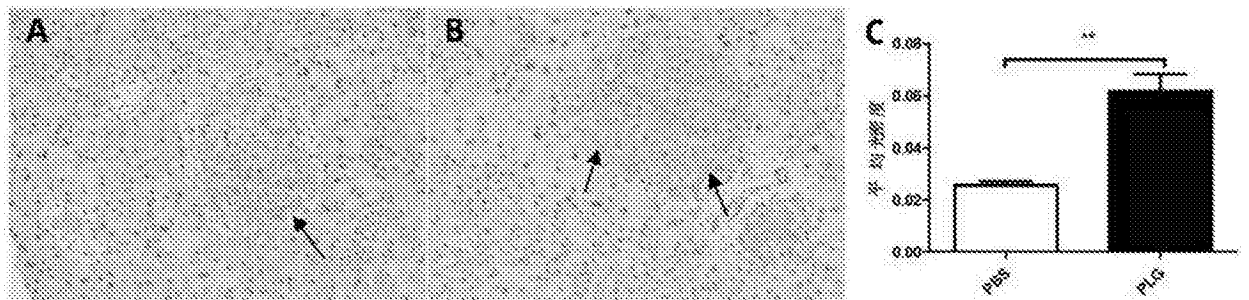


图14

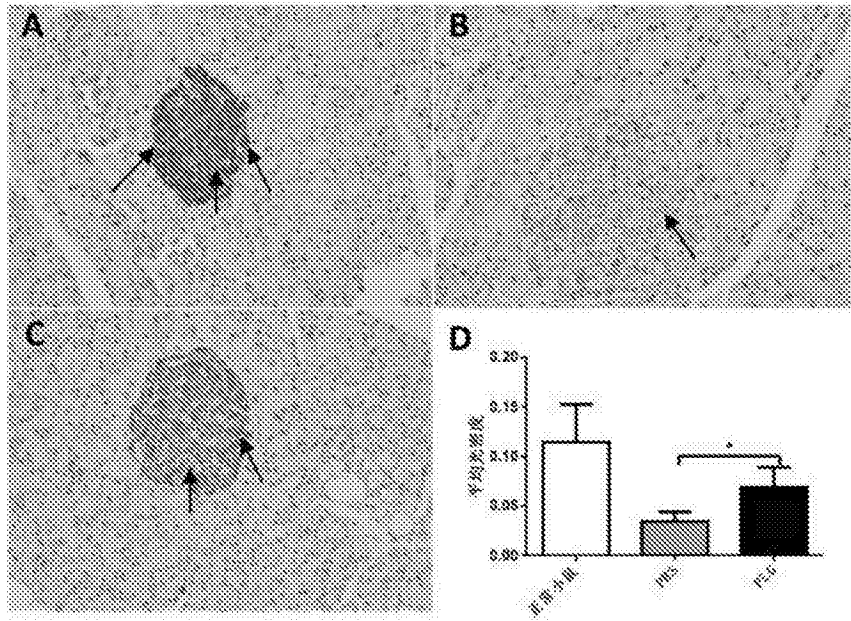


图15

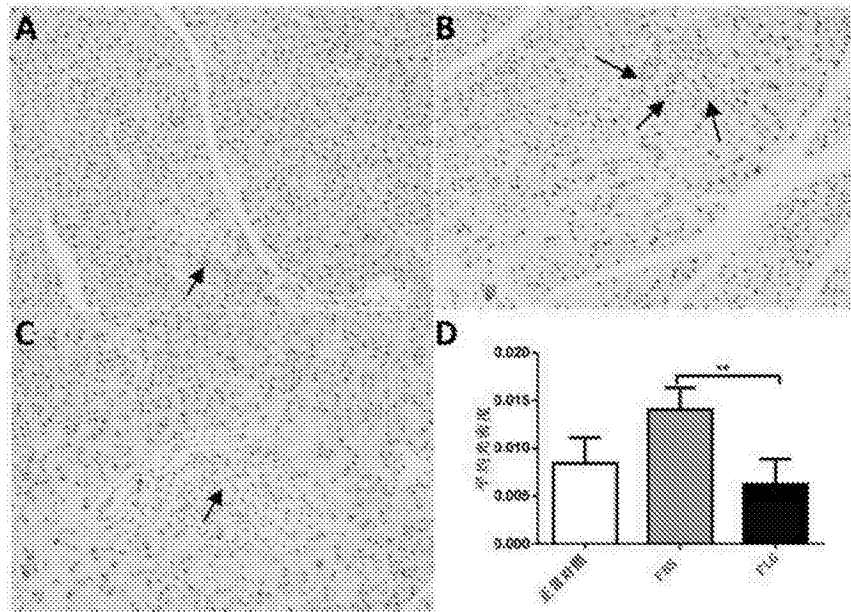


图16

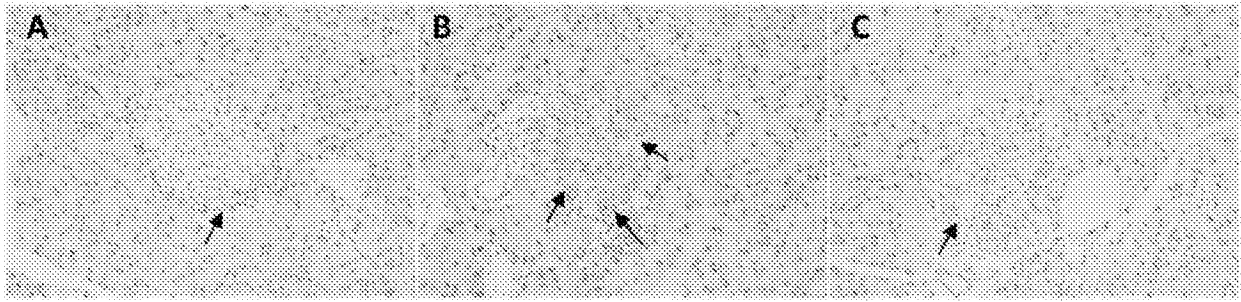


图17

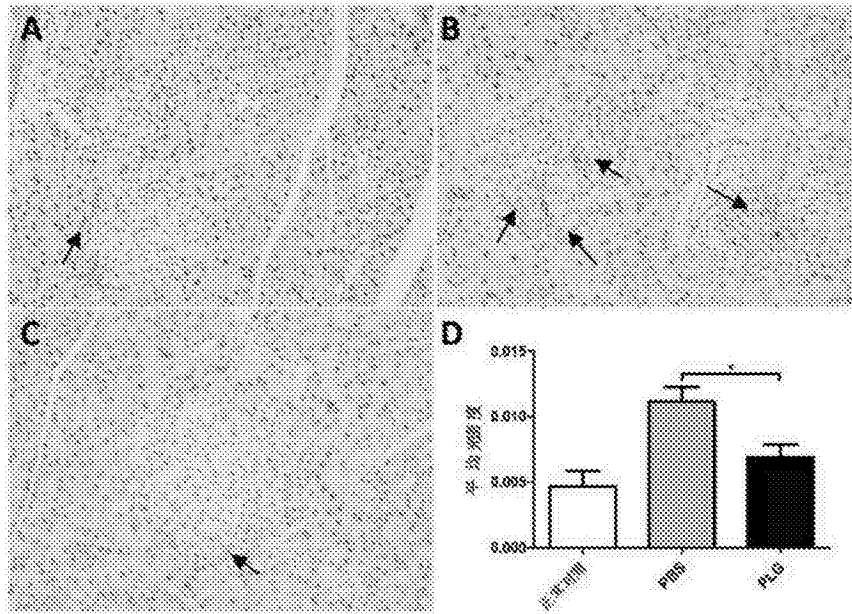


图18

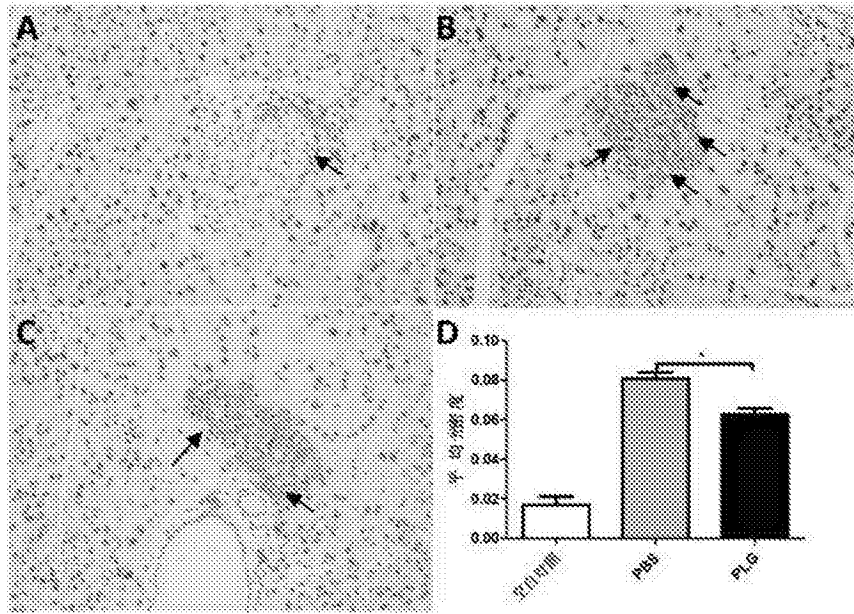


图19

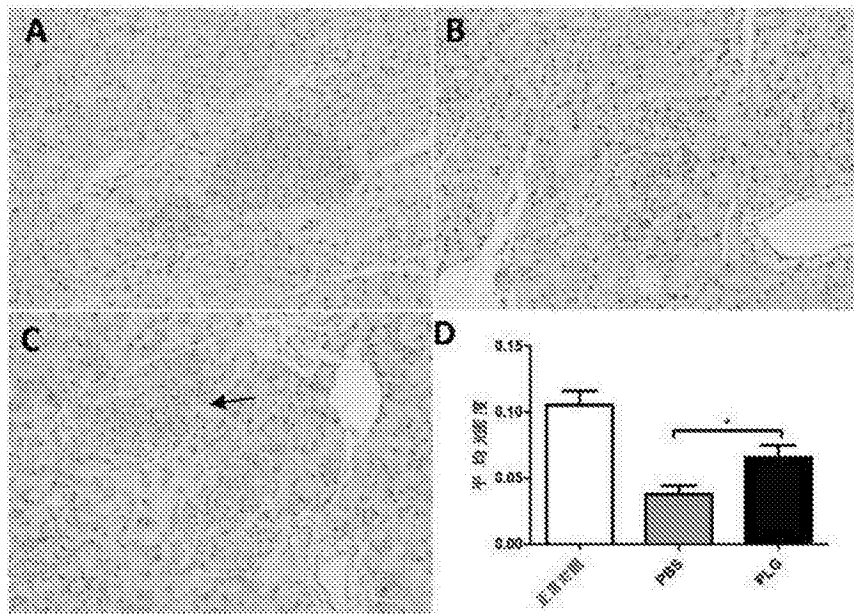


图20



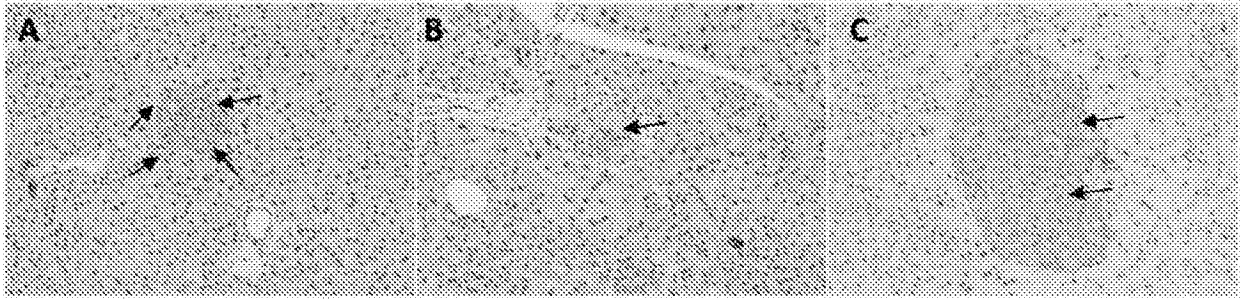


图21

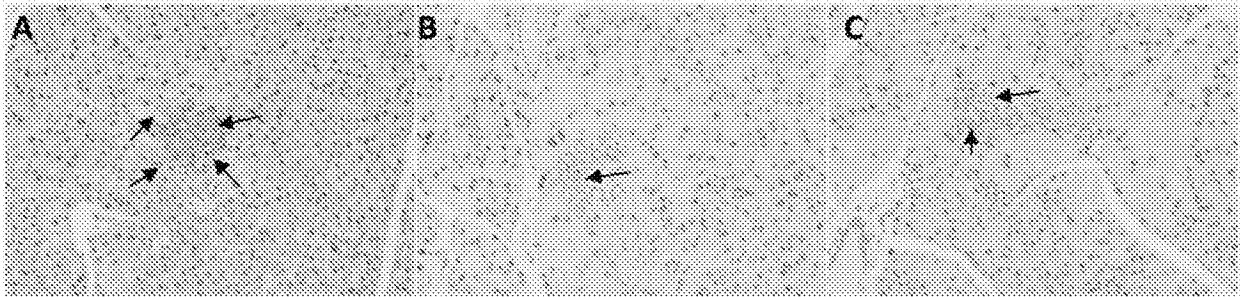


图22

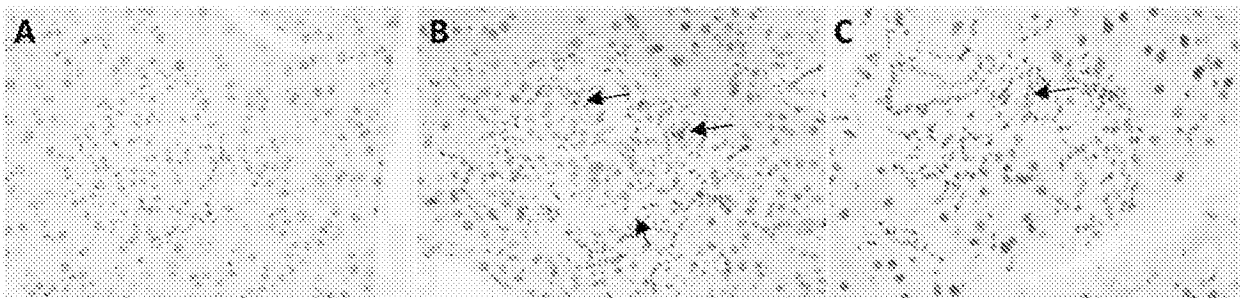


图23

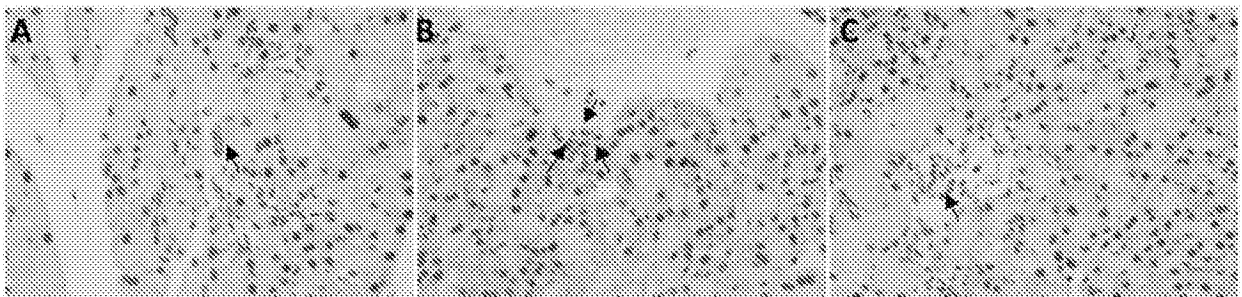


图24

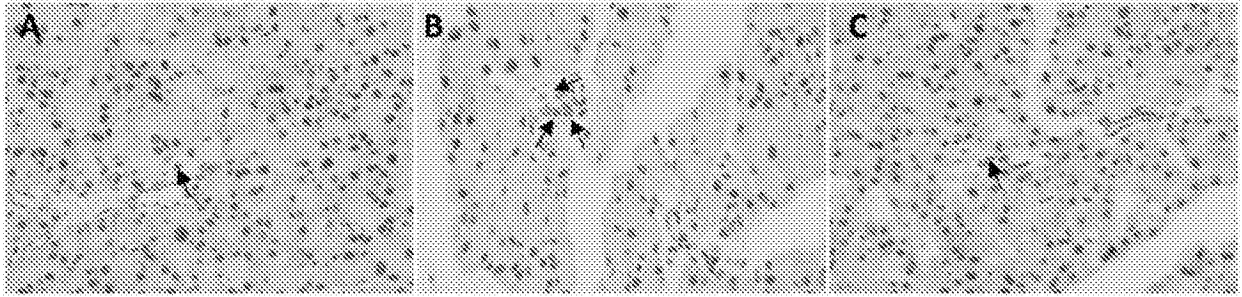


图25

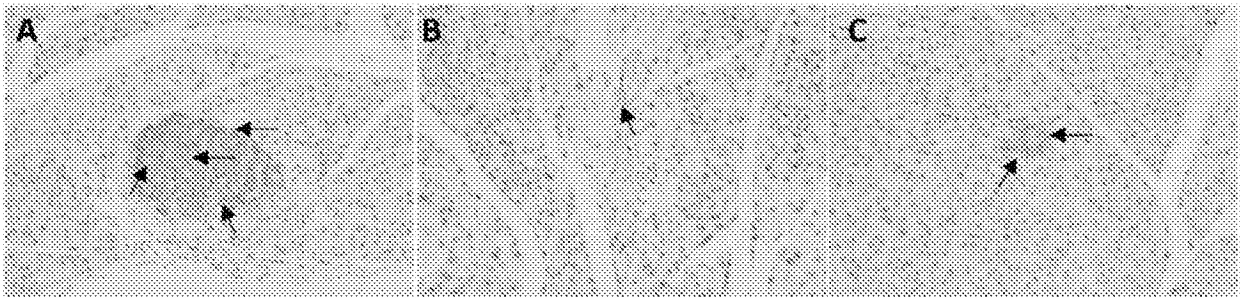


图26

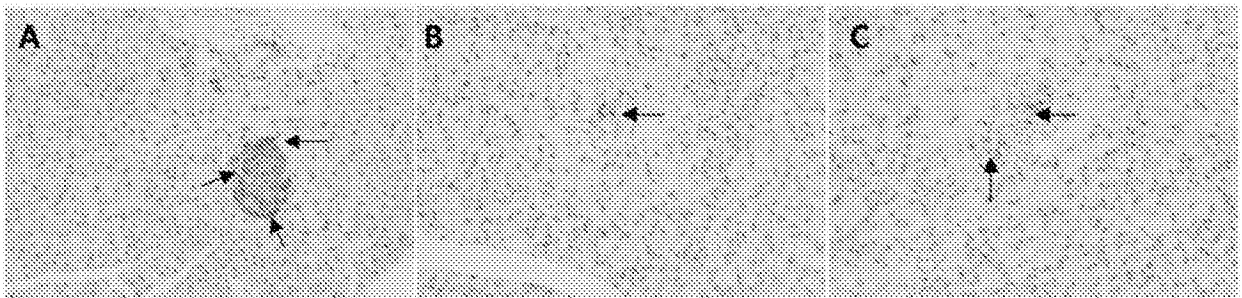


图27

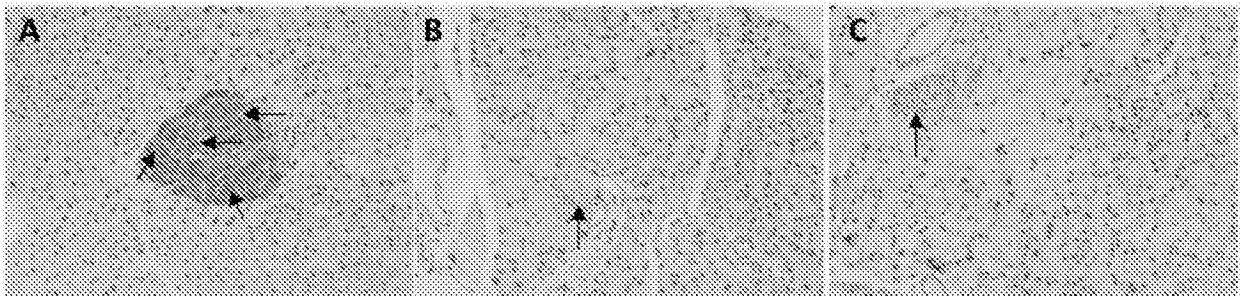


图28

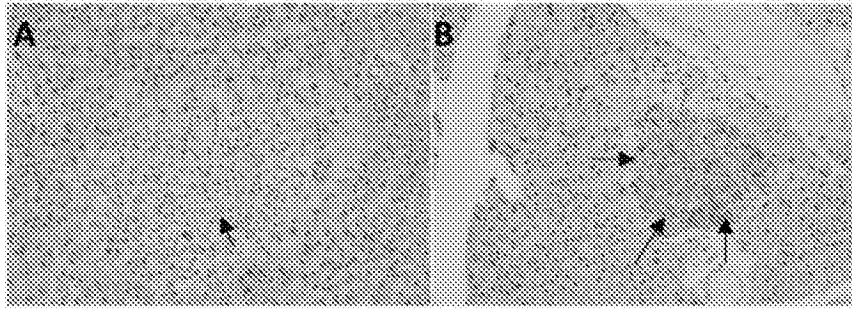


图29

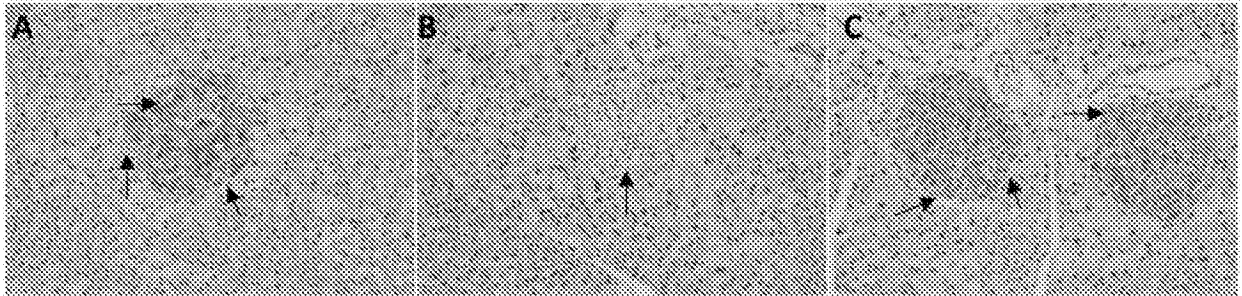


图30

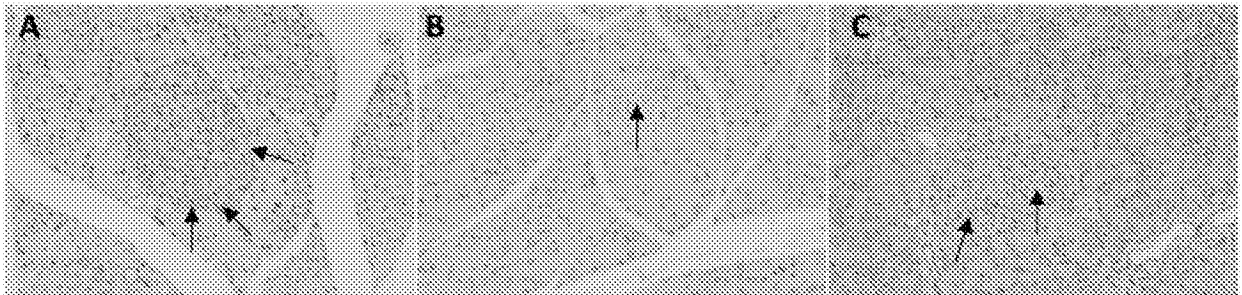


图31

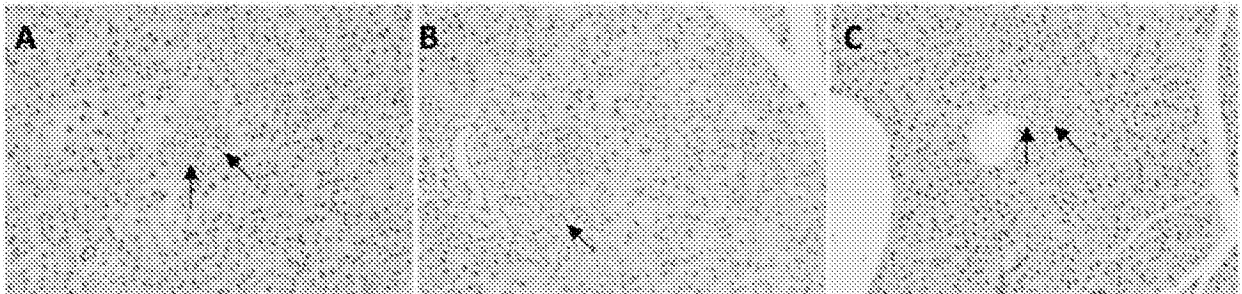


图32

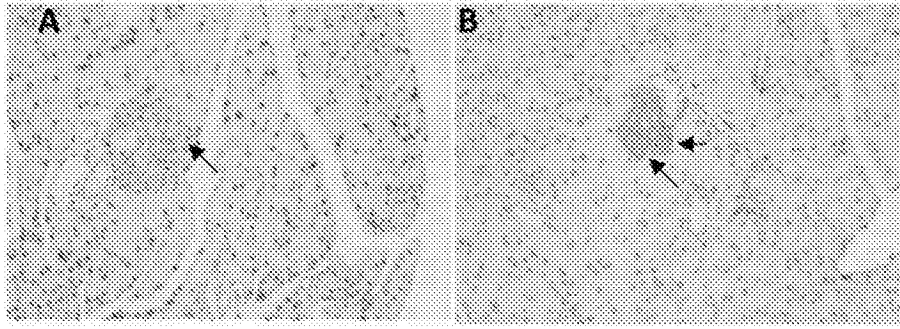


图33

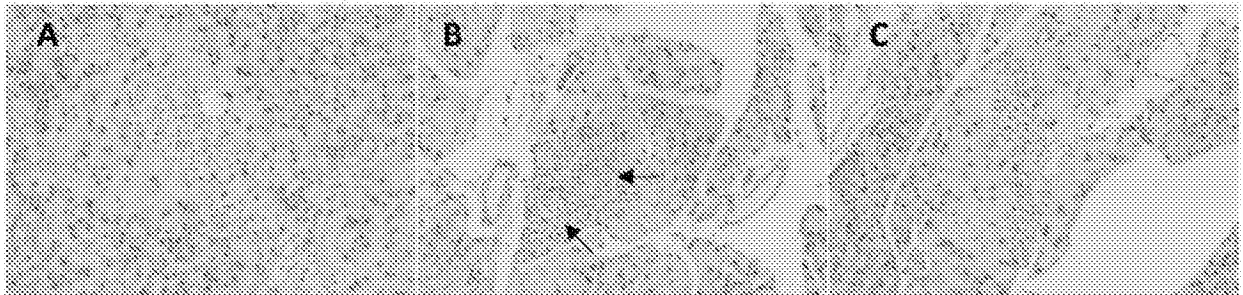


图34

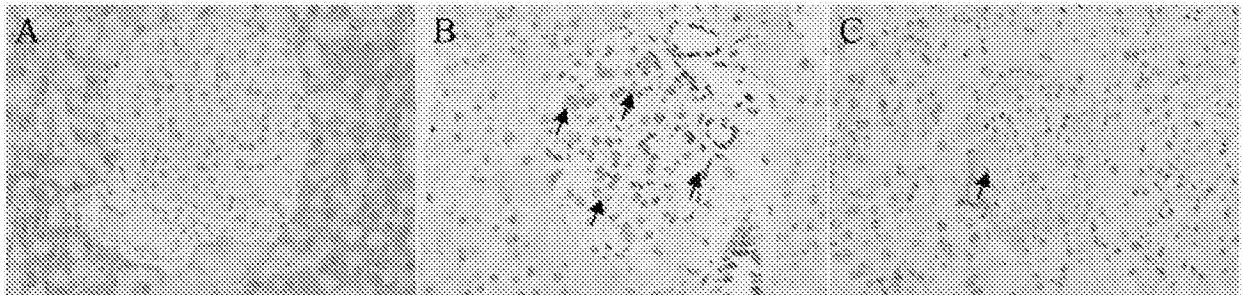


图35

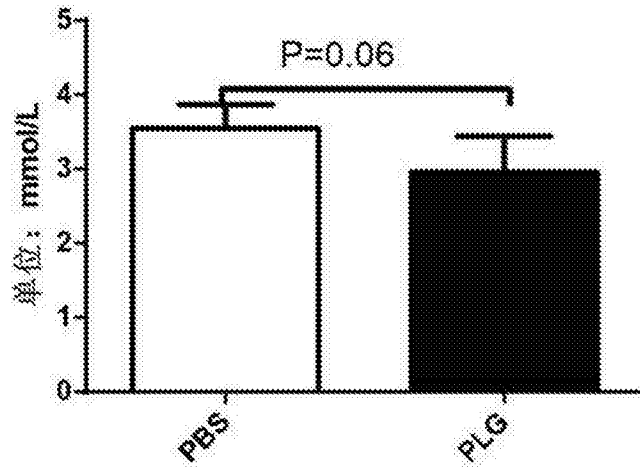


图36

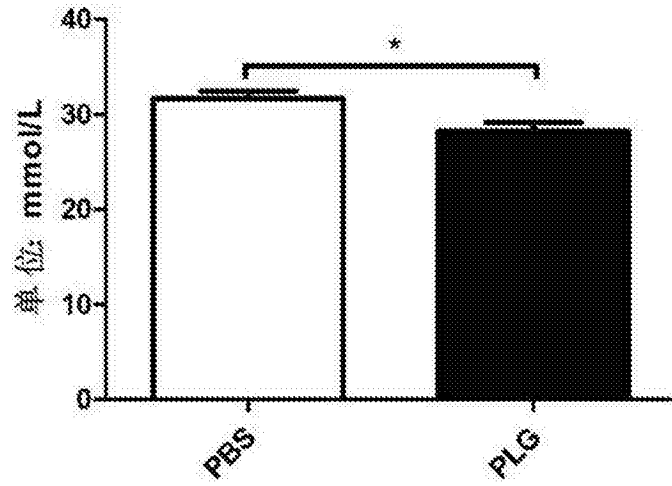


图37

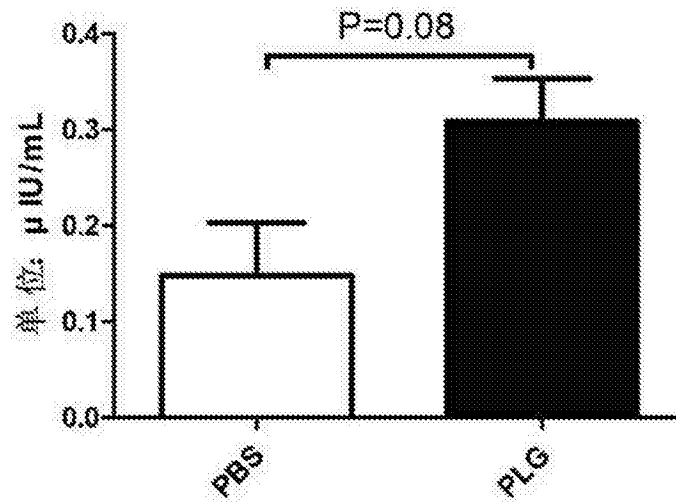


图38