

DOI: 10.13376/j.cblls/2015088

文章编号: 1004-0374(2015)06-0648-08

· 回忆 ·



叶蕴华(1936—), 1960年毕业于北京大学化学系(现名为化学与分子工程学院), 后留校从事有机化学教学与研究40余年, 历任助教、讲师、副教授、教授、博士生导师。获国务院政府特殊津贴。于2000年退休。退休后至今在北京大学世佳研究中心从事中药现代化的研究。曾为本科生和研究生开设《有机化学》、《多肽化学》、《生物有机化学》等课程。1964年作为北大科研组成员之一到上海与中科院上海有机化学研究所及上海生物化学研究所合作, 从事胰岛素合成的研究, 于1965年在国际上首次完成了结晶牛胰岛素的全合成。主要从事生物活性肽的合成及构效关系的研究; 形成肽键的含磷缩合试剂的研究; 环肽合成方法及环化规律的研究; 氨基酸, 肽—甾体缀合物的合成与生物活性研究; 在非水介质中, 蛋白水解酶催化酰胺键形成的研究; 人参属植物水溶性化学成分的研究等。取得了多项开创性的研究成果, 受到国内外同行的关注。

## 我国成功合成结晶牛胰岛素的启示和收获

叶蕴华

(北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

**摘要:** 通过作者参加牛胰岛素A链合成的亲身经历与所见所闻, 用具体的人和事阐述了我国20世纪60年代成功合成结晶牛胰岛素的启示和收获。这就是要敢于向难题挑战, 要坚持严谨的科学作风, 要依靠团队间的合作和发扬奉献的精神。我国60年代成功合成结晶牛胰岛素为我国培养了一批人才, 提高了生命科学领域的科研水平, 并带动了相关产品的研发。

**关键词:** 结晶牛胰岛素; 启示; 收获

### 1 引言

胰岛素(insulin)是一种蛋白质类激素。它是人体内唯一能降低血糖的激素, 也是唯一同时促进糖原、脂肪、蛋白质合成的激素。它的分子量较小而结构比较复杂, 所以在蛋白质的结构与功能研究中占有特殊地位。

1921年, 加拿大外科医生 Frederick Grant Banting 首次从狗的萎缩胰脏中提取了胰岛素, 并将初步纯化的动物胰岛素成功地应用于糖尿病患者。基于该项研究成果, Banting 与 Macleod 获得 1923 年诺贝尔医学和生理学奖。胰岛素的发现被认为是糖尿病研究史上的里程碑, 它激发了各个相关领域科学家的兴趣<sup>[1]</sup>。

从胰腺中提取的胰岛素经纯化得到结晶后, 英国科学家 Sanger 从 1945 年起, 经过 10 年的研究,

于 1955 年报道了牛胰岛素的一级结构<sup>[2-3]</sup>。因为他测定了生物体中第一个蛋白质的一级结构, 而获得了 1958 年诺贝尔化学奖。此后他又测定了猪、羊胰岛素的一级结构。

胰岛素是由 A 链和 B 链两条肽链共 51 个氨基酸残基组成的生物大分子。其种族差异, 只在 A 或 B 链中的个别氨基酸残基有所不同。

由图 1 可见, A 链含有 11 种 21 个氨基酸残基, N-端为 Gly, C-端为 Asn。A 链的 6 位和 11 位上的两个 Cys 通过二硫键相连成环; B 链含有 16 种 30 个氨基酸残基, 其 N-端为 Phe, C-端为 Ala。A 链和 B 链又通过两对二硫键互相连接成胰岛素分子。

50 多年前, 我从北京大学化学系毕业后, 有幸参加了我国合成结晶牛胰岛素 A 链的研究项目。本文通过自己的亲身经历和所见所闻分七节来阐述我国 20 世纪 60 年代成功合成结晶牛胰岛素的启示

和收获：敢于向难题挑战，坚持严谨的科学作风，依靠团队间的合作，发扬奉献的精神，为我国生命科学培养了一批人才，提高了我国有关领域的科研水平以及带动了我国相关产品的研发。

## 2 敢于向难题挑战

1958年在大跃进形势的鼓舞下，我国科学家大胆提出了合成胰岛素的课题。当时在国际上合成的最大多肽是促肾上腺皮质激素的十三肽片段。此前 du Vigneaud 于 1955 年曾合成了含有一个 -S-S- 环的催产素，也只是一个九肽<sup>[4-5]</sup>。而胰岛素是一个蛋白质，不仅分子量大而且结构非常复杂，分子中含有三对 -S-S- 键。胰岛素合成涉及有机合成、化学与生物分析、生物活性等方面。其工作量之大、难度之高是生物化学与有机化学领域中前所未有的。

在我国当时的条件下，靠一个单位来完成这个项目显然是不可能的。1959年3月中国科学院上海生化所派了曹天钦、钮经义、邹承鲁、鲁子贤、王芷涯等5人到北大来探讨与北大共同合成胰岛素的可能性，并做了有关胰岛素的学术报告。北大方面积极响应，同意承担合成A链的研究任务。

Sanger 在测定胰岛素一级结构时，先把胰岛素拆分成A链和B链，经纯化后再分别测定它们的氨基酸序列。据此，我们在设计合成路线时，考虑到是否可以先分别合成A链和B链，再把A、B链连接成为胰岛素呢？由于当时还没有对巯基(-SH)选择性的保护基，所以含有6个-SH基的A链与B链连接方式将有非常非常多的可能性。Kauzmann 曾计算过，并在理论上指出A与B链不仅可以以A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>而且可以A<sub>n</sub>B<sub>m</sub>各种可能的方式结合，此处n与m可以是0或任何正数。因此Kauzmann认为，A链与B链形成正确的胰岛素结构的可能性也就很

小<sup>[6]</sup>。按照这一推论，合成胰岛素几乎是不可能的。

关于胰岛素分子中三对二硫键如何能正确配对的问题在立项时就困扰着大家。为了解决这个问题，1959年初上海生化所邹承鲁课题组的杜雨苍、张友尚等开始探索天然胰岛素拆分与重组的研究。他们的拆、合研究经历了多次失败后，于1959年3月取得了好的苗头，发现重新氧化拆开后的胰岛素A、B链的混合物能表现出天然胰岛素0.7%~1%的活力。经过进一步探索，拆分和重组后的胰岛素生物活力可以达到天然胰岛素的5%~10%。他们最终发现，在适当条件下氧化被还原的A链和B链，生物活力的恢复可达50%。经过多次纯化，杜雨苍等最终获得了与天然胰岛素相同的正立方体结晶。在发表论文的结论中他们明确指出“从充分苯基化了的胰岛素衍生物能恢复活力这一事实，说明可以通过人工合成的A与B链最后合成胰岛素”<sup>[7-8]</sup>。根据他们的研究结果，我们决定先分别合成A链和B链，然后用合成的A或B链分别与天然的B或A链组合成半合成胰岛素，最后用合成的A链与合成的B链完成胰岛素的全合成。

总的合成路线确定后，还有一系列问题需要解决。首先，带有保护基A链和B链的合成，因为侧链的官能团很多，而要按照指定顺序连接时，必须对不与其反应的基团加以保护（我们戏称之为穿靴戴帽）。有的保护基需在不同阶段顺利脱除，而有的保护基则要到最后才脱除。所以对于胰岛素中氨基、羧基及侧链官能团的保护基的选择和设计是十分关键的步骤。其次，组成胰岛素的51个氨基酸残基中，除4个甘氨酸残基(Gly)外，其他47个氨基酸残基均为手性分子，在合成反应的每一步，包括肽键形成及脱保护基时，均要保证手性分子不发生消旋反应，否则将导致胰岛素生物活性失活。所

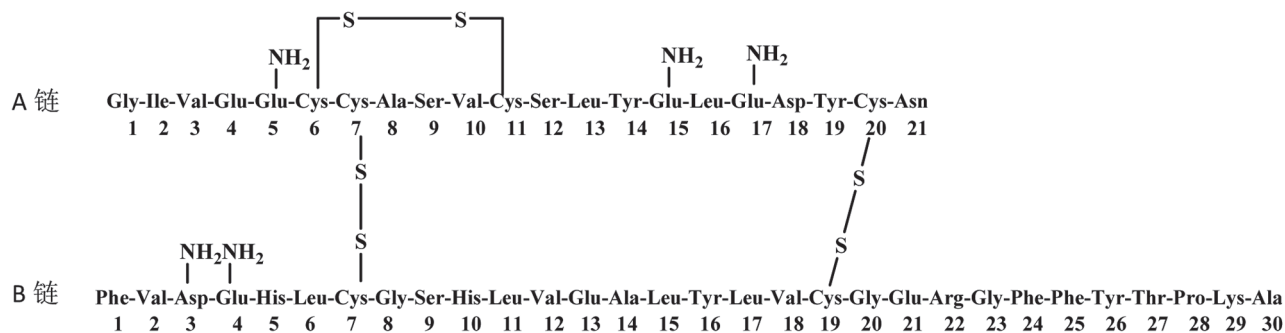


图1 牛胰岛素的一级结构

以在设计合成路线时,何处为避免消旋的最佳接头、合成方法的选择以及保护基的选择与脱除条件均为合成的难点。另外,当时大部分合成胰岛素的最基本的原料氨基酸,都要靠外汇进口。为解决这一问题,上海生化所抽调了陈远聪等创建了我国第一个生产氨基酸的东风生化试剂厂,解决合成胰岛素所需氨基酸的燃眉之急<sup>[9]</sup>。

### 3 坚持严谨的科学作风

胰岛素合成是一个复杂的系统工程。它是由51个氨基酸通过200多步化学反应而合成的具有生物活力的蛋白质。合成中每一个步骤都会影响最后的成败,因此对每一步反应都必须严格把关。所有的中间产物均经过严格鉴定合格后才能用于下一步反应。

在合成过程中,制备的大多数肽段均使用两种或两种以上不同的路线或方法去得到同一性质的产物,从而保证目标肽产物结构的正确性。例如在胰岛素A链合成中,北大负责N-端九肽(A<sub>1-9</sub>)的合成,由于九肽中有一个-S-S-键小环,结构特殊,在合成时就设计了4+5和5+4两条不同的路线以及不同的接肽方法,得到了分析数据相同的九肽后,才认定了我们的N-端九肽的合成正确无误<sup>[10-11]</sup>。由于当年没有质谱、核磁共振等现代光谱分析手段,所有小肽均要通过元素分析、氨基酸的定量分析、不同溶剂系统的纸层析(因为那时没有TLC薄层析板),以及熔点、电泳、比旋光度、酶解图谱等的测定。只要其中一项分析不过关,就不能进行下一步反应,必须重新合成或经反复纯化后再做分析鉴定。元素分析数据的理论值虽然事先都经过仔细的计算,但是结果出来后,汪猷先生还要亲自再用计算尺(当时尚无计算器)复审我们的计算是否有误。

中国科学院上海生物化学研究所、上海有机化学研究所和北京大学化学系三个单位经过通力合作,严格、严谨地实干,于1965年9月终于得到了全合成的牛胰岛素结晶。全合成实验重复了四次均得到了牛胰岛素结晶<sup>[12-14]</sup>。

1966年11月在中科院副院长吴有训的主持下,在上海召开了专家鉴定会。会议肯定了这一成果的创新性和重大学术意义。同时也提出,为了慎重,在向世界宣布这一重大成果之前,还需要补充酶解图谱等数据。在这次鉴定会上,专家们踊跃发言,各抒己见,对取得的结果进行了实事求是的讨论。当时热烈讨论的情景至今记忆犹新。根据鉴定委员

的建议和意见,我们进一步补充了数据。

1966年4月由国家科委组织全国有关专家,在北京再次举行成果鉴定的扩大会议。上海生化所和上海有机所参加胰岛素合成工作的全体同事都到北京来,听取鉴定委员们的意见。这次鉴定委员共有40多名,其中有北大的张龙翔、陈同度、沈同、唐有祺、张滂、杜锦珠、黄爱珠、陈廉生等老师。会议通过了鉴定,一致认为我们通过人工合成得到了与天然牛胰岛素完全相同的结晶牛胰岛素。会后中国科学院郭沫若院长接见了全体鉴定委员和参加胰岛素合成的全体工作人员<sup>[15]</sup>。该项成果于1982年获国家自然科学奖一等奖。

### 4 依靠团队的合作

如前所述,胰岛素合成是一个复杂的系统工程,涉及有机合成、化学与生物分析、生物活性等方面,工作量大、难度高。在我国当时的条件下靠一个单位来完成这个科研项目是不可能的。

1960年北京大学、复旦大学与中科院上海几个研究所共几百人先后开展了科研群众运动(或称大兵团作战)。北大化学系为了合成胰岛素,停止了正常的教学工作。参加研究的主力是没有经过严格科学研究训练的四、五年级大学生(那时北大理科由五年制改为六年制)和一些年轻老师。低年级同学则负责处理溶剂、试剂制备、氨基酸提取、分离和后勤等工作。参加研究的同学们凭着一股革命热情不分昼夜地加班加点。但是他们不了解必须经过多种分析手段才能确定合成产物的结构与纯度。用未经严格分析鉴定的中间体进行下一步反应,所得到的结果是无法肯定是否为预期的目标产物。事实证明,各单位的大兵团作战都没有得到预期的结果。

到1960年下半年,由于国家经济处于极端困难时期,基于中央“调整、巩固、充实、提高”的八字方针,各单位合成胰岛素的群众运动,在付出巨大代价后纷纷收场<sup>[15]</sup>。北大化学系只留下李崇熙、陆德培、张明哲、伍少兰等少数几位老师整理群众运动留下的样品,继续胰岛素A链片段的合成,后来发表了论文<sup>[16-17]</sup>。

1963年,国家经济形势好转后,在国家科委聂荣臻主任及上海市和北京市各级领导支持下,决定集中“精锐部队”在上海重新合作,继续开展胰岛素合成的研究。为了便于及时交流和讨论遇到的问题,1964年3月北大抽调了5位年轻教师在有机教研室主任邢其毅教授和副系主任文重老师率领

下，到上海有机所参加胰岛素 A 链的合成。在北大成员中有师姐季爱雪、师兄陆德培、李崇熙、施溥涛和我。后来邢先生的研究生汤卡罗也加入了我们的团队<sup>[15]</sup>。我们与上海有机所的徐杰诚、张伟君、陈玲玲、钱瑞卿、李鸿绪和实验辅助人员王思清、刘永福与姚月珍等密切合作重新进行牛胰岛素 A 链的合成。

我们和有机所的同事在同一间实验室工作，并定期到负责合成 B 链和 A、B 链拆合研究的上海生化所汇报工作进展及讨论遇到的问题，及时调整工作计划和人力安排。通过三个单位的协作，大大提高了工作效率。

胰岛素中的 A 链虽然比 B 链短，但是 A 链的合成并不顺利。最初在半合成胰岛素时，我们合成的 A 链与天然胰岛素 B 链组合后，所得产物的生物活力只达天然胰岛素的 1%~4%。经过大家反复讨论，认为很可能是 A<sub>10-21</sub> 后十二肽酯在皂化脱保护基时的副反应所致。为了避免后十二肽酯的皂化，重新设计保护基策略，将 17 位谷氨酸的  $\gamma$ -羧基由甲酯改为叔丁酯，而 C 末端的天冬酰胺的  $\alpha$ -羧基则不加保护。同时决定分别用 3+9 与 7+5 两条不同的路线合成。由于保护基策略的改变，整个后十二肽 (A<sub>10-21</sub>) 需要推倒重来，工作量非常大。那时 B 链已合成出一定量，在等待着 A 链的合成。为了加速新设计的后十二肽的合成，北大的李崇熙老师被调到后十二肽组，与有机所同事共同完成了新十二肽的合成<sup>[18]</sup>。用这个新设计的后十二肽 (A<sub>10-21</sub>) 与 N-端九肽 (A<sub>1-9</sub>) 合成的 A 链<sup>[19]</sup>经钠-氨法除去所有保护基得到 A-SSO<sub>3</sub><sup>-</sup>经进一步纯化后，与天然胰岛素 B 链组合后，所得半合成产物的生物活力提高到天然胰岛素的 5%~10%。最后，经过反复探索半合成粗产物的纯化方法后，终于获得了形状与天然胰岛素相同的结晶。在纸层析与纸电泳谱上与天然胰岛素处于同一位置。小白鼠惊厥法测定表明，所得半合成产物具有与天然牛胰岛素同等的生物活力。这表明了半合成的成功<sup>[20-21]</sup>。

人工合成胰岛素虽然是 50 年前的事，但是许多情景至今还历历在目。印象最深的是合成 A 链时，北大派陆德培为代表，有机所派徐杰诚为代表进行实验操作。汪猷先生亲临现场，其他人在陆、徐二人周围观看。玻璃滴管头拉得很细，以便精细调节溶液的 pH 值。再根据精细 pH 试纸的颜色，现场讨论是否要多加一滴碱或一滴酸。可惜当时没有相机，没能拍下这一难忘的认真、紧张和激动人心

的合作场面。最后胰岛素的半合成与全合成是在生化所进行的。施溥涛代表北大，张伟君代表有机所与生化所杜雨苍等少数人进行实验，其他人只能在实验室外面等待结果。

事实证明依靠精锐团队间的合作是一条成功之道。

## 5 发扬奉献的精神

当时德国的 H.Zahn 和美国的 P.G.Katsoyannis 都已经开始了胰岛素的合成研究，并发表了关于胰岛素片段合成的简报。到 1963 年年底，Katsoyannis 和 Zahn 还分别宣称他们合成了胰岛素。不过他们始终未能获得合成胰岛素的结晶。他们所合成的胰岛素也只具有微弱的生物活力。尽管如此，他们取得的成果给了我们巨大的压力。

当年参加该项研究任务的大多数是年轻人，热情非常高，决心要赶在德国人和美国人之前完成胰岛素的合成。大家深知责任重大，必须全身心地投入工作。1964 年初，季爱雪、李崇熙和我都有一个一岁上下的孩子需要人照顾。为了工作需要，我们克服个人困难，离开自己的家人到上海工作。

在合成的过程中大家不分主角和配角，配合默契。比如，在 A 链合成工作中，我们根据工作需要，分担了为公共服务的工作。由于市售的溶剂纯度不够或含水量较大，我们每人包干一、二种溶剂的处理来供大家使用。在试剂的合成方面，我们常用的氨基酸的氨基保护剂是由毒性较大的光气制备的。脱保护基的溴化氢-冰乙酸及保护谷氨酸的  $\gamma$ -羧基的叔丁酯等均需要自己制备后提供给大家使用。

为了争取早日合成 A 链，我们没有周末，没有节假日，整天泡在实验室做实验或到图书室查阅文献。当时没有奖金和加班费，谁都没计较。我们北大几人的月工资分别为 62 元或 56 元，在北大工作时没有保健费，但是在上海有机所，每月有了 3 元多的保健费，大家就很满足了。另外，在北京每人每月只有 2 斤大米的供应，我是南方人，在上海不必吃窝窝头等杂粮，每天能吃米饭就感到非常高兴。尽管我们和家人分离，生活非常单调，但认识到是在进行一项为国争光的重要任务，也就不顾及个人得失了。

从胰岛素课题的提出到进行胰岛素拆合与全合成整个过程中，有几位老科学家，比如时任上海生物化学所所长的王应睐、副所长曹天钦和沈昭文先生等，自始至终给予了我们大力的支持和帮助，在关键时刻为我们出主意。然而在最后发表的文章里

却没有留下他们的名字。还有一些参加过工作的如张友尚先生等,也没有计较文章发表时没有列出他们的名字。他们的高风亮节让我们敬佩和感动,是我们学习的榜样。

当全合成一文在《中国科学》上发表时,没有人去计较作者的排列次序。北大化学系副主任文重老师建议根据大学毕业年限依次排列,即最早毕业的排在前面,毕业晚的排在后面。大家都没有提出异议。

1965年在《中国科学》杂志上发表的全合成的文章上署名共21人<sup>[12-13]</sup>。事实上,北大化学系、上海有机所和上海生化所三个合作单位里在前期涉及该项研究的少说也有上百人。有些同事曾参加过一些胰岛素A链或B链中片段的合成,并发表了文章,为后来的研究提供了经验。但是最后的文章上却没有他们的名字,他们是功不可没的无名英雄。

## 6 培养了一批人才

参加胰岛素合成的人员在整个研究过程中,受到完整和严格的培养和训练。他们就像种子一样,以后培育了一批又一批的学生和后来人。这些人才在各自选定的方向上,开展对多肽与蛋白质的各种研究。

从20世纪80年代到90年代,参加胰岛素工作中的大多数人成为多肽和蛋白质领域研究的学术带头人。其中一些教授被评选为中国科学院院士。

为了发展我国的多肽研究和加强学术交流,特别是为了了解国际上的进展与动态,参加合成胰岛素的三个单位均组织过中国国际多肽学术会议。1990年由上海生化所杜雨苍教授牵头并筹措经费,在上海举办了第1届中国国际多肽学术会。会议邀请了国外几位著名多肽科学家参加并做学术报告,使中国学者开阔了眼界。在那次会议结束的晚宴上,钮经义教授等为纪念人工合成胰岛素25周年做了精彩的发言。

从此,中国国际多肽学术会,每隔两年举办一届。杜雨苍教授共主办过三届(1990年、1992年与2002年)。我本人与时任北京大学化学学院院长徐筱杰教授于1996年主办了第4届会议<sup>[22]</sup>。上海有机所徐杰诚教授与徐红岩博士于2000年主办了第6届会议。从第7届会议到去年第13届会议,均由年轻一代教授主办,每次会议都有十几个国家与地区的多肽科学家参加。历届会议,无论是口头报告还是墙报的内容,都显示了我国多肽研究水平不断

提高,其中有些工作达到同类工作的国际水平。同时,我国多肽研究的队伍也在不断扩大。许多年轻人加入到了这个领域来并做出了高水平的研究成果,我们为他们高兴和骄傲。

改革开放后,作为学术带头人,我有机会参加了国外相关的学术会议,诸如规模最大的美国多肽会议(APS)、欧洲多肽会议(EPS)与日本多肽会议(JPS)、澳大利亚多肽会议(AuPS)、亚太地区多肽会议及国际多肽会议等。我们不仅从中学到了新思想、新方法,同时也结交了一大批国际同行朋友。

此外,许多年轻人在国外取得博士学位或有了博士后的研究经验后,回国从事多肽或蛋白质方面的研究工作。现在中国多肽事业后继有人,令人欣慰。

## 7 提高了科学研究的水平

胰岛素合成成功后,由中国科学院物理所、生物物理所和北京大学有关人员组成了胰岛素晶体结构研究组。在文化大革命那个非常时期立项、上马,先后以4 Å(1970年)、2.5 Å(1971年)和1.8 Å(1973年)的分辨率测定了猪胰岛素三方二锌晶体结构。这是继合成胰岛素之后我国蛋白质科学研究的又一重要成果<sup>[23]</sup>。该项成果于1982年获国家自然科学奖二等奖。

成功合成胰岛素不仅促进了蛋白质晶体结构的研究,还促进了化学与生命科学研究相关领域的发展。比如,胰岛素结构与功能关系的研究,生物活性肽与蛋白质的分离、纯化与结构鉴定,生物活性肽的合成及合成方法学的研究,生物活性肽结构与功能的研究,以及多肽与蛋白质毒素的研究等。

就个人来说,参加胰岛素合成对我影响最深的有两点:一是选题要有创新性、敢于向难题挑战,二是科学研究必须持严谨的态度。

文化大革命后,我们在有机教研室主任邢其毅教授领导下,开展了多肽合成方法学的研究<sup>[24-28]</sup>,并于1988年获国家教委科技进步奖二等奖。邢先生常说科研的创造性就是要有“想头”,要做别人想不到的课题,用现在的话说就是要有创新思维。

1986~1995年期间,邢先生先后主持国家自然科学基金七五重大项目“我国独特的及丰产的天然产物研究”与八五重点项目“我国边远地区和海洋独特天然产物的研究”两大课题的研究,有10余所大学和研究所参加。我们承担的子课题是“参类水溶性化学成分的研究”。研究名贵中草药人参水

溶性成分中的寡肽和非蛋白氨基酸。过去对于中草药的研究主要利用极性不同的有机溶剂提取其化学成分，而服用中草药却以水煎法为主。以前对于人参化学成分的研究主要集中于皂苷成分的研究，而有关其中的肽类化合物却几乎没有涉及。分离和纯化水溶液中的寡肽有很大的困难。当时我们化学系仅有一台分析型的高效液相色谱仪，不能用于人参水提取液的制备分离。我们克服了重重困难，最终首次从人参中分离纯化了一些具有生物活性的寡肽和非编码氨基酸。该项成果获得了1995年国家教委科技进步奖一等奖。

在指导研究生的工作中，我们特别注意传承老一代科学家对科学研究严谨求实的学风。例如从人参水提取液中分离纯化了一个氧化型谷胱甘肽的异构体时，我们发现其结构就是甘氨酸和胱氨酸调换了位置，即C-端不是甘氨酸而是胱氨酸。邢先生认为1929年发现的谷胱甘肽到现在有60多年了，要确认一下这期间是否已有人发现了这个异构体。我和几位博士生、博士后反复查阅文献，的确未见文献报道。后来又用化学法合成这个异构体再与从人参水提取物对照，确认结构无误后才发表了这个研究成果<sup>[29-30]</sup>。1987年，我在为研究生开设“生物有机化学”这门新选修课时，看到一篇文献报道猪胰脂肪酶在有机溶剂中以及高温下仍保持活性，并能在有机溶剂中进行转酯反应。这篇文章引起我极大的兴趣。蛋白水解酶是水解肽键的，可否在有机溶剂中用蛋白水解酶形成肽键？可否用分子筛固定蛋白水解酶在有机溶剂中进行肽的合成反应？经由研究生查阅文献，结果没有找到相关的报道，我认为这是好事，可以由此开拓创新的研究空间。经过十多年的研究，我们终于在不同的有机溶剂中，成功地用胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、木瓜酶、枯草杆菌蛋白酶等合成了一系列生物活性肽，并研究了各种因素对合成的影响。为了扩大蛋白水解酶的应用范围，改变酶催化反应的底物过于专一的限制，我们用非编码氨基酸，D-氨基酸，甚至结构与氨基酸完全不同的甾体化合物作为底物，在有机溶剂中，用蛋白水解酶催化酰胺键的形成，最后得到了预期的目标化合物<sup>[31-32]</sup>。我们还探索将不同的蛋白水解酶固定在不同结构的分子筛上合成了一些小肽，在一定条件下固定化酶可以重复使用，延长了酶的使用寿命。此外，还研究了各种因素对固定化酶催化的影响。我们的研究结果在 *Tetrahedron* (四面体) 杂志发表后<sup>[33]</sup>，应美国 *Applied Biochemistry and Biotechnology*

杂志主编之邀，撰写了一篇有关分子筛固定化酶的综述<sup>[34]</sup>。

通过参加胰岛素的研究，使我深刻认识到对待科学研究必须坚持严肃、严格和严谨的科学作风。在研究有机溶剂中用蛋白水解酶合成生物活性肽时，我们常设计两条不同的合成路线，或用两种不同的蛋白水解酶合成同一个目标肽，并用化学法合成对照酶法的合成产物，以确认目标产物结构的正确性。在指导学生作研究的过程中，有时学生认为老师过于认真，要求太苛刻，心中产生不悦。但是当他们工作后，就非常感激老师曾对他们的严格要求。有些学生现在也当了老师，他们在研究中继续传承严格和严谨的科学学风，使我感到十分高兴。

## 8 带动了相关产品的研发

胰岛素合成有力地推动了我国多肽产业的发展。在合成胰岛素前，国内的多肽研究可以说是一个空白。人工合成胰岛素课题开始时，国内买不到合成胰岛素需要的氨基酸，生化所于1958年在国内首次创建了东风生化试剂厂生产氨基酸，解决了合成胰岛素的原料问题。后来该厂扩大了生产品种，除氨基酸外，还生产其他的生化试剂，成为国内提供多种生化试剂的生产基地。

除东风生化试剂厂外，胰岛素合成也带动了我国整个生化产业的发展，包括氨基酸、生物活性肽、多肽药物、胰岛素等蛋白质激素及生化试剂的生产。目前国内有几十家生产氨基酸和生化试剂的公司。它们不仅生产氨基酸，还生产各种不同保护基的保护氨基酸、缩合试剂、生物活性肽及各种生化试剂，还有用于固相合成肽所需要的不同结构、不同型号的树脂。这些产品无论从品种上，还是从质量上来讲，均与国外品种相当。许多我国生产的氨基酸出口国际市场，其中不少产品已登在国际知名公司 Sigma 和 Aldrich 的目录上。

现在，我国不少多肽公司或制药公司均有 GMP (Good Manufacturing Practice 的缩写) 车间。它们生产的肽类药物如催产素、LHRH 等均获得中国药监局批准，已在临床使用。目前各大医院临床所用的胸腺五肽、胸腺  $\alpha 1$  (二十八肽) 等肽类药物均可由我国多家公司提供。这些产品不仅质量有保证，而且价格比进口的要便宜得多，经济上易为一般患者所接受。目前在临床上应用的胰岛素大部分已用人胰岛素代替了过去常用的动物胰岛素如猪胰岛素、牛胰岛素等，重组人胰岛素的问世才可能为

糖尿病患者提供人胰岛素。据报道,我国现在已成功研制、开发出具有自主知识产权的基因重组人胰岛素,改变了长期以来依赖进口的局面<sup>[35]</sup>。

## 9 结束语

人工合成结晶牛胰岛素是世界上第一个合成的蛋白质,是人类在探索生命奥秘的征途中向前迈进的一大步。从学术理论和方法学上讲,我们的成功有力地证明了蛋白质的一级结构决定其高级结构的科学论断。这是蛋白质合成和蛋白质结构与功能关系研究中的重大发现,从而也否定了Kauzmann计算胰岛素中-S-S-键正确配对的几率极小的推论。人工合成结晶牛胰岛素的成功是我国在基础理论研究中取得的重大成就,在国际上显示了我国科学家的智慧和能力。有机化学家认为,合成固体有机化合物是否获得结晶往往是化合物纯净的金指标。Zahn与Katsoyannis仅得到具有微弱生物活力的产物,始终未得到合成的胰岛素结晶。1965年《中国科学》杂志上发表了全合成结晶牛胰岛素简报后,德国Zahn教授很快来信祝贺我国“第一次完成了结晶牛胰岛素的半合成与第一次完成了结晶牛胰岛素的全合成”。他还多次对我国有关科学家说,是中国取得了这场国际竞赛的胜利<sup>[15]</sup>。1966年4月,王应睐、邹承鲁和龚岳亭参加了在波兰华沙举行的欧洲生化学会联合会,龚岳亭向大会宣读了中国科学家取得的这项成果后,美、英、法、意、荷、比等国科学家纷纷祝贺我们取得的伟大成果。美国的*Science*杂志评论我国胰岛素的全合成的成就是在蛋白质合成领域中由量到质的转变<sup>[36]</sup>。《The World of Peptides》一书也提到中国合成的胰岛素得到了结晶<sup>[37]</sup>。

受益于参加胰岛素的合成,我们在多肽领域里的研究成果曾应邀到日本、韩国、美国、法国、奥地利、澳大利亚等国的大学、研究所或学术会议上报告。

我国成功合成结晶牛胰岛素依靠的是敢于向难题挑战的自信和勇气、严谨的科学作风、几个兄弟单位间的精诚合作和参与个人的无私奉献的精神。它为我国生命科学培养了一批人才,为有关产品提供了研发的契机,为发展我国生命科学研究奠定了基础。

**致谢:** 北京大学化学与分子工程学院汤卡罗教授和中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所施溥

涛研究员、陈远聪研究员、刘望夷研究员对本文撰写提出了宝贵意见,特此致谢。

## [参 考 文 献]

- [1] 叶蕴华. 浅谈胰岛素的结构与生物活性. 大学化学, 2010, 25 增刊: 19-23
- [2] Ryle AP, Sanger F, Smith LF. The disulphide bond of insulin. *Biochem J*, 1955, 60: 541-56
- [3] Sanger F. The chemistry of insulin. *Science*, 1959, 129: 1340-4
- [4] du Vigneaud V, Ressler C, Swan JM, et al. The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *J Am Chem Soc*, 1953, 75: 4879-80
- [5] du Vigneaud V, Ressler C, Swan JM, et al. The synthesis of oxytocin. *J Am Chem Soc*, 1954, 76: 3115-21
- [6] Kauzmann W. Relative probabilities of isomers in cystine-containing randomly coiled polypeptides[M]// Benesch R, et al. Sulfur in protein. London: Academic Press, 1958: 93-108
- [7] 邹承鲁, 杜雨苍, 许根俊. 胰岛素及其苯基衍生物在钠-氨系统中的还原及活力恢复. *生物化学与生物物理学报*, 1961, 1: 76-84
- [8] 杜雨苍, 张友尚, 鲁子贤, 等. 从胰岛素A及B链重合成胰岛素. *生物化学与生物物理学报*, 1961, 1: 13-24
- [9] 陈远聪. 筹建东风生化试剂厂的回顾. *院史资料与研究*, 2000, (5): 35-9
- [10] Wang Y, Chi AH, Loh TP, et al. Cysteine peptides III. Synthesis of a protected N terminal nonapeptide of the A-chain of bovine insulin. *Acta Chim Sin*, 1966, 32(1): 68-76
- [11] 汪猷, 季爱雪, 陆德培, 等. 含半胱氨酸多肽的研究 III. 牛胰岛素A链带保护基的氨端九肽的合成. *化学学报*, 1966, 32(1): 68-76
- [12] Kung YT(龚岳亭), Du YC(杜雨苍), Huang WT(黄维德), et al. Total synthesis of crystalline bovine insulin. *Sci Sin*, 1965, 14: 1710-5
- [13] Kung YT(龚岳亭), Du YC(杜雨苍), Huang WT(黄维德), et al. Total synthesis of crystalline insulin. *Sci Sin*, 1966, 15: 544
- [14] 中国科学院生物化学研究所, 北京大学化学系, 中国科学院有机化学研究所. 结晶胰岛素的全合成. *科学通报*, 1966, 17(6): 241-71
- [15] 熊伟民, 王克迪. 合成一个蛋白质结晶牛胰岛素的人工全合成[M]. 济南: 山东教育出版社, 2005: 82-84; 31-66; 99-100
- [16] 李崇熙, 陆德培, 张明哲, 等. 含半胱氨酸多肽的研究. I. 胰岛素A链中苯氧羰(S-苄基)半胱(S-苄基)半胱•丙•甘•缬(S-苄基)半胱氨酸乙酯(A<sub>6</sub>-A<sub>11</sub>)的合成. *化学学报*, 1963, 29(2): 133-41
- [17] 陆德培, 李崇熙, 邢其毅. 含半胱氨酸多肽的研究 II. *化学学报*, 1965, 31(1): 509-13
- [18] 汪猷, 徐杰诚, 陈玲玲, 等. 带保护基的胰岛素A链羧端的十二肽的合成. *化学学报*, 1966, 32(3): 261-73
- [19] Wang Y(汪猷), Hsu JZ(徐杰诚), Chang WC(张伟君), et al. A preliminary report on the synthesis of the A-chain of bovine insulin. *Sci Sin*, 1964, XIII (12): 2030-1

- [20] Wang Y, Hsu JZ, Chang WC, et al. Partial synthesis of crystalline bovine insulin from synthetic A-chain and natural B-chain. *Sci Sin*, 1965, 14: 1885
- [21] 汪猷, 徐杰诚, 张伟君, 等. 自合成的A链与天然B链合成结晶牛胰岛素. *科学通报*, 1965, 12: 1111-4
- [22] 叶蕴华, 徐筱杰. 多肽研究现状. *国际学术动态*, 1997, (12): 63-4
- [23] 王大成. *生物物理学报*, 2008, (1): 封内
- [24] Li CH, Yieh YH, Lin Y, et al. 3-aminoacyl-tetrahydrothiazole-2-thione as an active amide for peptide synthesis. *Tetrahedron Lett*, 1981, 22: 3467-70
- [25] 叶蕴华, 傅国强, 于娜, 等. 用四氢噻唑-2-硫酮分解氨基酸铜络合物的研究. *科学通报*, 1985, 24: 1873-4
- [26] 常修宝, 雷克健, 李崇熙, 等. 猪B<sub>0</sub>L-丙氨酰胰岛素和猪B<sub>1</sub>L-亮氨酰胰岛素的制备及性质研究. *生物化学杂志*, 1987, 8(1): 81-7
- [27] Fan CX, Hao XI, Ye YH. A novel organophosphorus compounds as a coupling reagent for peptide synthesis. *Synthetic Commun*, 1996, 26: 1455-60
- [28] DEPBT(叶蕴华试剂)[M]//黄培强主编. *有机人名反应、试剂与规则*. 北京: 化学工业出版社, 2007: 153-5
- [29] Yang L, Ye YH, Xing QY. Preliminary study of the water-soluble oligopeptides and amino acids of ginseng. *Chin Chem Lett*, 1990, 1: 51-4
- [30] 叶蕴华, 邢其毅. 人参属植物中水溶性非蛋白氨基酸与寡肽的研究. *化学学报*, 2001, 59(10): 1531-5
- [31] Ye YH, Tian GI, Xing GW, et al. Enzymatic synthesis of N-protected Leu-enkephalin and some oligopeptides in organic solvents. *Tetrahedron*, 1998, 54: 12585-96
- [32] Yan AX, Xing GW, Ye YH, et al. Studies of the enzymatic synthesis of N-protected amino acid-estradiol derivatives in an organic solvent. *Tetrahedron Lett*, 2000, 41: 5379-81
- [33] Xing GW, Li XW, Tian GI, et al. Enzymatic peptide synthesis in organic solvent with different zeolites as immobilization matrixes. *Tetrahedron*, 2000, 56: 3517-22
- [34] Yan AX, Li XW, Ye YH. Recent progress on immobilization of enzyme on molecular sieves for reactions in organic solvents. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, 101(2): 113-29
- [35] 张友尚. 胰岛素生产的回顾与展望. *食品与药品*, 2008, 10(1): 1-3
- [36] McElheny VK. News from Europe: Total synthesis of insulin in red China. *Science*, 1996, 153: 281
- [37] Wieland T, Bodanszky M. A brief history of peptide chemistry [M]// *The world of peptides*. New York: Springer-Verlag, 1991: 230-31