

GLP-1类似物活性检测细胞模型的建立及其功能分析

刘克东 蔡燕飞 陈 蕴 金 坚*

(江南大学药学院, 无锡 214000)

摘要 为探索GLP-1类似物活性检测模型在活性检测过程中影响稳定性与重复性的因素, 该文以中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞为模型细胞, 构建真核表达载体pEGFP-N1/hGLP-1R-EGFP, 并将其转染至CHO中, 经过G418抗性筛选和流式细胞仪分选富集后有限稀释, 筛选获得一株稳定高表达的单克隆细胞株。倒置荧光显微镜分析、流式细胞术分析以及RT-PCR实验结果显示, 此检测模型转录和翻译了hGLP-1R-EGFP基因, 并且表达的受体蛋白质位于细胞膜侧。以利拉鲁肽和艾塞那肽作为模型药物进行活性检测分析, 结果显示, 该检测模型具有极高的药物灵敏度, 不同代数模型细胞测活相对稳定。该文还进一步探索了影响GLP-1类似物EC₅₀测量值的因素, 主要包括模型细胞受体表达量、胎牛血清以及其单一组分BSA。综上所述, 构建的细胞模型在检测GLP-1类似物活性中, 具有较好的稳定性和可重复性, 为GLP-1类似物的药物筛选与活性评价提供方便可靠的模型基础。

关键词 GLP-1类似物; GLP-1R; CHO; 细胞模型; EC₅₀

The Establishment of GLP-1 Analogue Detection Cell Model and Its Functional Analysis

Liu Kedong, Cai Yanfei, Chen Yun, Jin Jian*

(School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214000, China)

Abstract In order to explore the factors influencing the stability and repeatability of the activity of GLP-1 analogue assay by cell models, a eukaryotic expression vector pEGFP-N1/hGLP-1R-EGFP was constructed and transfected into Chinese hamster ovary (CHO) cells. After limited selection by G418, the combination selection of flow cytometry and limiting dilution was performed and a stable and highly expressed monoclonal cell line was obtained. Inverted fluorescence analysis, flow cytometry analysis and RT-PCR results showed that the gene was transcribed and translated, and the expressed receptor protein was located on the cell membrane side. Liraglutide and Exendin-4 were used as a model drug for the activity assay, respectively. The results showed that the cell model has high drug sensitivity, relatively stable activity assay with different model cell generations and initially explored the receptor expression of model cells, fetal bovine serum and its single component BSA has a significant effect on the drug EC₅₀ measurements. In summary, the established cell model can be well applied to the activity test of GLP-1 analogue, providing a simple and reliable model for the screening and activity evaluation of GLP-1 analogues with good activity stability and repeatability.

Keywords GLP-1 analogue; GLP-1R; CHO; cell model; EC₅₀

收稿日期: 2018-01-03

接受日期: 2018-03-07

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

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

Received: January 3, 2018

Accepted: March 7, 2018

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

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

网络出版时间: 2018-06-01 13:48:31

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180601.1348.004.html>

胰高血糖素样肽-1受体(glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R)是一种G蛋白偶联受体,全身多种脏器均有分布,主要分布于 β 胰岛细胞上^[1]。GLP-1R作为2型糖尿病治疗性药物的靶点已被肯定^[2]。由肠道L细胞分泌的GLP-1属于内源性的GLP-1R激动剂,其与GLP-1R结合并激活后,通过以cAMP为第二信使的G蛋白偶联受体信号通路发挥多种功能:(1)控制胰岛素和胰高血糖素的分泌,具有“肠促胰岛素效应”的血糖依赖性调节血糖浓度的作用,不易发生因过量用药而引起低血糖的风险,特别适用于作为2型糖尿病治疗药物^[3];(2)保护和促进 β 细胞增殖以及抗 β 细胞凋亡的作用,具有控制2型糖尿病病程发展的功能^[4];(3)中枢型抑制胃排空和胃酸分泌,周围型干扰胃部平滑肌活动,减缓由进食引起的血糖升高;代谢产物GLP-1₉₋₃₆发挥类胰岛素作用,促进白色脂肪组织脂质分解和脂肪酸氧化,增加基础能量消耗抑制肥胖过程的发展,可作为减肥药物分子^[5];(4)保护心血管系统、调节骨代谢等作用^[6-7]。

但是,天然GLP-1在体内极易被二肽酶IV(DPP IV)于Ala⁸部位切割降解($T_{1/2} < 5$ min),生物利用度极低。从成药性而论,需要对GLP-1分子进行结构改造,在保留活性的基础上避免酶解,延长半衰期。越来越多的GLP-1类似物被设计出来,其中包括已经上市的Exendin-4(2005年, Eli Lilly公司)、Lixisenatide(2013年, Sanofi公司)、Liraglutide(2009年, Novo nordisk公司)和刚上市的Semaglutide(2017年, Novo nordisk公司),因此,建立简单高效的检测模型进行药物活性筛选显得尤为重要。目前的细胞检测模型通常分为两类,一类是基于第二信使(cAMP)分析,另一类是基于报告基因分析,但其本质也是通过第二信使作为中间信号转导。但是已经报道使用的细胞检测模型^[8-11],对相同药物刺激却表现出相对宽泛的 EC_{50} 值(pmol/L~nmol/L之间)。本研究以CHO细胞为模型细胞,构建带绿色荧光蛋白标签的GLP-1检测模型,基于流式细胞术与有限稀释法筛选稳定高表达的单克隆细胞株,并以此为研究对象进行活性检测研究,探索可能影响GLP-1类似物 EC_{50} 测量值的因素。

1 材料与amp方法

1.1 质粒与菌株

中国仓鼠卵巢细胞(CHO-S)、真核表达质粒

pcDNA3.1(+)/GLP-1R和pEGFP/N1均由本实验室保存。大肠杆菌感受态DH5 α 购自天根生化科技有限公司。

1.2 试剂与药品

利拉鲁肽(Liraglutide)、艾塞那肽(Exendin-4)均购自吉尔生化有限公司; RT reagent Kit、DNA聚合酶(PrimeSTAR)、DNA Maker、T4连接酶、核酸内切酶Hind III和EcoR I均购自TaKaRa公司; DMEM/F12细胞培养基、牛血清白蛋白(BSA)、胎牛血清(FBS)、遗传霉素(G418)、HBSS和鲑鱼精均购自Gibco公司; 胰蛋白酶购自无锡莱弗斯生物有限公司; 无内毒素质粒小提试剂盒、DNA胶回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒均购自上海捷瑞生物有限公司; cAMP检测试剂盒(KGE002B)和Human GLP-1R PE-conjugated Antibody (FAB2814P)均购自R&D公司; 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。其余的化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 质粒构建

以实验室保存的pcDNA3.1(+)/hGLP-1R为模板, PCR扩增获得5'-端带Hind III和3'-端带EcoR I位点的GLP-1R基因片段,序列没有终止密码子(TGA换成了CGA), PCR引物如下: 5'-tta gcc caa gct tat ggc cgg cgc ccc cgg ccc gct g-3'(Hind III)和3'-ccg gaa ttc gtc ggc tgc agg agg cct ggc aag tgg c-5'(EcoR I)。质粒pEGFP/N1和hGLP-1R基因片段分别用Hind III和EcoR I双酶切,经割胶回收后, T4连接酶过夜连接。连接好的重组质粒(pEGFP-N1/hGLP-1R-EGFP)转化到DH5 α 感受态细胞中,涂于抗性平板(50 μ g/mL卡那霉素)上筛选,挑取单菌落进行PCR验证,并用质粒提取试剂盒提取质粒进行双酶切验证。验证正确后的质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,进一步验证。

1.4 细胞模型的构建

DMEM/F12全培养基(含10% FBS)培养CHO细胞,胰酶消化收集 2×10^6 个状态良好的细胞,用PBS洗3次去除残留的培养基,离心重悬于200 μ L的PBS中。将20 μ g的重组质粒和10 μ g的鲑鱼精与上述重悬液混合均匀后加入到2 mm的电极杯中,于冰上冰浴1 min后110 V、10 ms电击1次,上述步骤重复3次。将电转好的细胞加入到2个10 cm的培养皿中,分别加入10 mL的D/F12全培养基,于细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)中培养1天。第2天换成抗性D/F12全培养基

(含3 mg/mL G418、10% FBS), 隔天换液, 继续抗性培养7天。消化培养皿中的细胞并转移到T75培养瓶中扩增培养, 利用流式细胞分选仪(FACS Aria II, 美国BD公司)分选富集后, 将富集后的细胞立即用有限稀释法(按每孔0.5个细胞接种)铺于96孔板, 倒置荧光显微镜(Ti-U/B, 日本尼康公司)筛选高表达单克隆菌株, 上述实验同时以空细胞作为阴性对照。

1.5 细胞模型的流式细胞术分析验证

分别收集 1×10^6 个空细胞和模型细胞, PBS洗3次, 200 μ L含1% BSA的PBS重悬细胞, 分别加5 μ L GLP-1R抗体(FAB2814)孵育2 h, 离心PBS洗3次, 流式(LSR II, 美国BD公司)检测, 实验数据由FlowJo 7.6.2分析所得, 另外收集一份模型细胞作为对照。

1.6 细胞模型的RT-PCR验证

收集 1×10^6 个模型细胞, 用预冷的PBS洗2次, 加Trizol裂解后提取胞内的总RNA。利用TaKaRa的一步反转试剂盒将提取的RNA反转录为cDNA。接下来再以cDNA为模板, 用DNA聚合酶和引物(GLP-1R-EGFP: 5'-tta gcc caa gct tat ggc cgg cgc ccc cgg ccc gct g-3'和GLP-1-EGFP: 3'-gtc gcg gcc gct tta ctt gta cag ctc gtc cat gc-5')进行PCR扩增。反应条件为: 98 $^{\circ}$ C预变性3 min; 98 $^{\circ}$ C变性10 s, 68 $^{\circ}$ C退火延伸2 min, 31个循环; 最后延伸5 min。

1.7 单克隆细胞模型稳定性实验

将筛选的单克隆株传代培养, 依次消化收集其10代与20代的细胞, 流式细胞仪检测其荧光强度与细胞阳性率, 实验数据由FlowJo 7.6.2分析所得。

1.8 GLP-1类似物的活性检测

选取单克隆模型细胞与未分选的抗性稳转细胞, 以适宜的细胞密度接种于12孔板中, 每孔加入1 mL的DMEM/F12全培养基。细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)孵育2天后细胞汇合度约为90%时弃培养基, 并用HBSS洗涤干净(至少3次)。Liraglutide、Exendin-4用空的D/F12培养基(含100 μ mol/L的磷酸二酯酶抑制剂IBMX)稀释若干个梯度, 分别加入对应的孔中并置于培养箱中孵育25 min。将上述细胞消化后, 用cAMP检测试剂盒绘制cAMP标准曲线并检测细胞模型内的cAMP含量。所得数据皆由GraphPad Prism.v5.0软件处理。

1.9 血清及其单一组分BSA对GLP-1类似物活性检测的影响

选取单克隆模型细胞, 以适宜的细胞密度接种

于12孔板中, 每孔加入1 mL的DMEM/F12全培养基。细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)孵育2天后细胞汇合度约为90%时弃培养基, 并用HBSS洗涤干净(至少3次)。Liraglutide、Exendin-4用含0.2 g/L牛血清白蛋白(BSA)的D/F12培养基(含100 μ mol/L IBMX)稀释若干个梯度或者用1% FBS培养基(含100 μ mol/L IBMX)稀释若干个梯度后分别加入对应的孔中并置于培养箱中孵育25 min。将上述细胞消化后, 用cAMP检测试剂盒检测细胞模型内的cAMP含量。

2 结果

2.1 重组质粒pEGFP-N1/hGLP-1R-EGFP的构建与验证

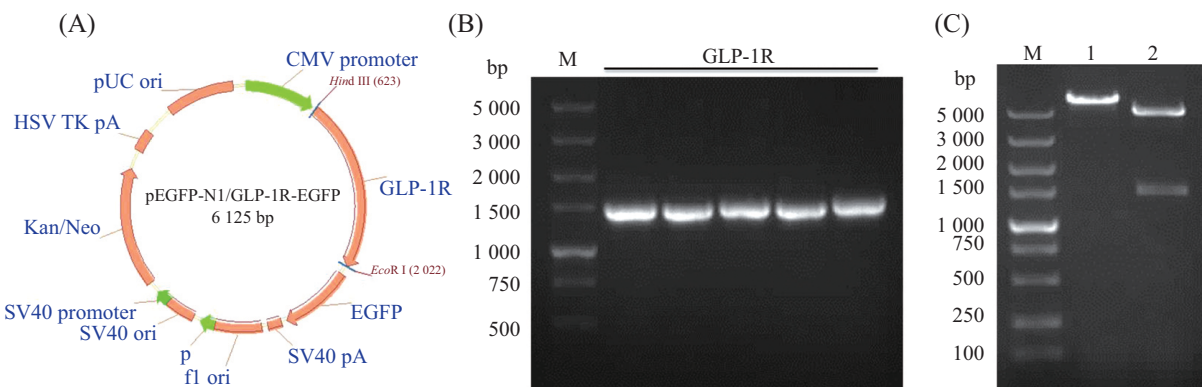
PCR扩增目的基因片段后与载体质粒分别双酶切, 经T4连接酶过夜连接即得重组质粒pEGFP-N1/hGLP-1R-EGFP(图1A); 挑选五株单克隆进行菌落PCR验证, 皆成功转化(图1B); 提取的质粒经Hind III和EcoR I双酶切验证, 结果与预期相符(图1C)。重组质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证, 结果与理论序列一致(测序结果未给出)。

2.2 单克隆细胞模型的构建

单克隆细胞模型构建流程如图2A所示, 在G418抗性筛选的第5天, 对照组细胞全部脱离细胞壁, 漂浮死亡, 而实验组细胞会有少量细胞贴壁, 形成单菌落。G418继续加压2天后, 灯光下可形成肉眼可见的菌苔, 抗性稳转细胞形成, 此时细胞阳性率为30%左右, 并且整体的受体表达量(对应荧光强度, 图2B横坐标越往右强度越高)不高, Liraglutide与Exendin-4活性检测的EC₅₀值都在1~10 nmol/L中(图2E); 胰蛋白酶消化转至T75扩增, 消化细胞进行流式富集, 细胞阳性率达到80%以上(图2C); 将富集的细胞以有限稀释法铺板, 可得若干单克隆株, 根据荧光强度及稳定性选取其中的一株作为后面的模型细胞株(其余单克隆信息未给出), 其细胞阳性率几乎达到100%, 并且细胞受体表达量较未分选之前有了显著的提高(图2D)。Liraglutide与Exendin-4活性检测的EC₅₀值都在 1×10^{-3} ~ 5×10^{-3} nmol/L(图2E), 具有极高的药物灵敏度。

2.3 单克隆细胞模型验证及其稳定性测定

倒置荧光显微镜下观察, 细胞荧光分布均匀且荧光分布于膜侧(图3A); RT-PCR结果显示, 目的基因得到了转录(图3B); 用GLP-1R抗体孵育此模型细



A: 重组质粒pEGFP-N1/hGLP-1R-EGFP图谱; B: 菌落PCR验证; C: 重组质粒双酶切验证; M: DNA Maker。1: 重组质粒; 2: 重组质粒经Hind III和EcoR I双酶切后的片段。

A: schematic of the recombinant plasmid pEGFP-N1/hGLP-1R-EGFP; B: identification of constructed plasmid with GLP-1R using colony PCR; C: identification of constructed plasmid with the digestion of *Hind* III and *Eco* R I. M: DNA Maker; 1: recombinant plasmid; 2: gene fragments of digestion.

图1 重组质粒的构建与验证

Fig.1 The construction and identification of the recombinant plasmid

胞, 流式细胞术分析结果进一步验证了模型细胞表达了GLP-1R受体, 并且表达的GLP-1R受体位于细胞膜侧, 这与绿色蛋白荧光分布具有高度一致性(图3C和图4D)。细胞培养10代及20代后, 其荧光分布几乎没有什么变化(图4A), 并且用模型药物Liraglutide检测第4代、第10代和第15代模型细胞的功能活性, 结果显示, 并无明显差异。以上结果表明, 此模型检测GLP-1类似物活性的功能具有很高的稳定性和可重复性(图4B)。

2.4 FBS及其单一组分BSA对GLP-1-类似物活性检测的影响

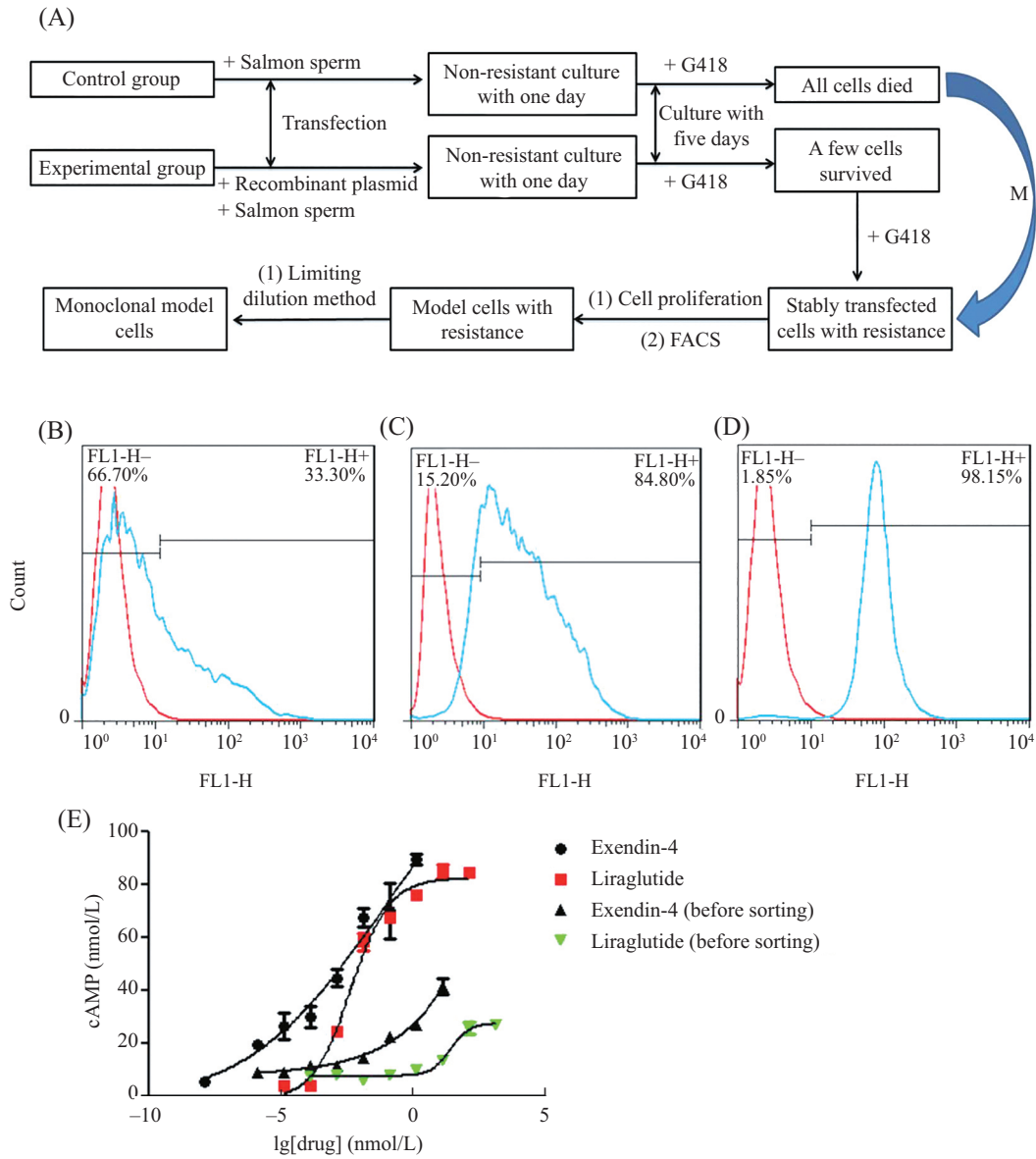
Novo nordisk公司研发的Liraglutide作为一种治疗糖尿病的长效GLP-1类似物, 其与天然的GLP-1分子保持97%的同源性^[12]; Exendin-4是从希拉毒蜥唾液中的一种激素类物质, 由39个氨基酸组成, 与GLP-1具有53%的同源性, 并且生物学效应也几乎完全一致^[13]。不同浓度的Liraglutide与Exendin-4刺激模型细胞, 通过胞内第二信使cAMP含量来检测细胞模型功能活性。根据试剂盒步骤绘制cAMP标准曲线, cAMP与B/B₀(B代表实验组D₄₅₀的值, B₀代表空白组D₄₅₀的值)成指数关系($y = -0.193 \ln(x) + 1.0492$, 且 $R^2 = 0.9821$)(图5A)。根据此标准曲线, 实验样品测得的D₄₅₀可以相对应换算成cAMP浓度。用含0.2 g/L牛血清白蛋白的空培养基稀释药物时, 实验测得Liraglutide的EC₅₀值与空白相比又相差三个数量级, 而Exendin-4实验测得的EC₅₀值相差不大(图5B)。而用1% FBS培养基稀释Liraglutide时, 其结果与

含0.2 g/L牛血清白蛋白的空培养基稀释时相差不大(图5B), 说明血清中影响测定结果的主要因素还是血清白蛋白。

3 讨论

内源性的GLP-1分子治疗2型糖尿病的巨大优势是显而易见的, 但是在体内易被二肽酶酶解, 限制其广泛的使用。为了克服这一个致命的结构缺陷, 需要对GLP-1分子进行结构改造, 实现“在不改变GLP-1分子活性前提下避免二肽基酶解以至于达到长效的目的”成为了众多科研人员的不懈追求的目标。大量的GLP-1类似物被设计出来, 因此需要一个细胞检测模型对其进行生理活性的评价。但是, 像细胞模型这一类的生物学评价方法都没有一个固定的检测标准, 这也直接导致检测结果的可视化差异^[8-11]。单独就细胞检测模型而论, 高稳定性和高重复性应该是此类模型构建评价的基础。本研究汲取了发酵工程相关的研究思路, 认为在构建CHO细胞检测模型过程中, 高表达单克隆细胞株的筛选是解决检测模型高稳定性和重复性的根本途径。

为了获得表达量相对较高的单克隆细胞株, 本研究从三个方面出发: (1)采用流式细胞术和有限稀释法相结合的筛选方法, 尽可能的提高待筛选细胞的阳性率, 减轻筛选工作的劳动量, 节省筛选时间; (2)有限稀释法的过程中, 实验以每孔0.5个细胞铺板, 即50个细胞铺一块96孔板, 从概率学上提高96孔板的单克隆形成率; (3)收集T75的培养基, 用0.22 μm



A: 单克隆细胞模型构建流程图; M: 证实细胞稳转; FACS: 流式细胞荧光分选技术; B: 抗性稳转细胞; C: 流式细胞术分选富集后的模型细胞; D: 筛选的单克隆模型细胞; E: Liraglutide与Exendin-4检测单克隆细胞模型的活性。

A: the construction flow chart of cell model; M: confirming stable transfection of cells; FACS: fluorescence activated cell sorting; B: stable transfected cells against G418; C: enriched model cells with sorting of flow cytometry; D: monoclonal model cells of screening; E: the activity detection of monoclonal cell model using Liraglutide and Exendin-4.

图2 单克隆细胞模型的构建过程

Fig.2 The forming process of the monoclonal cell model

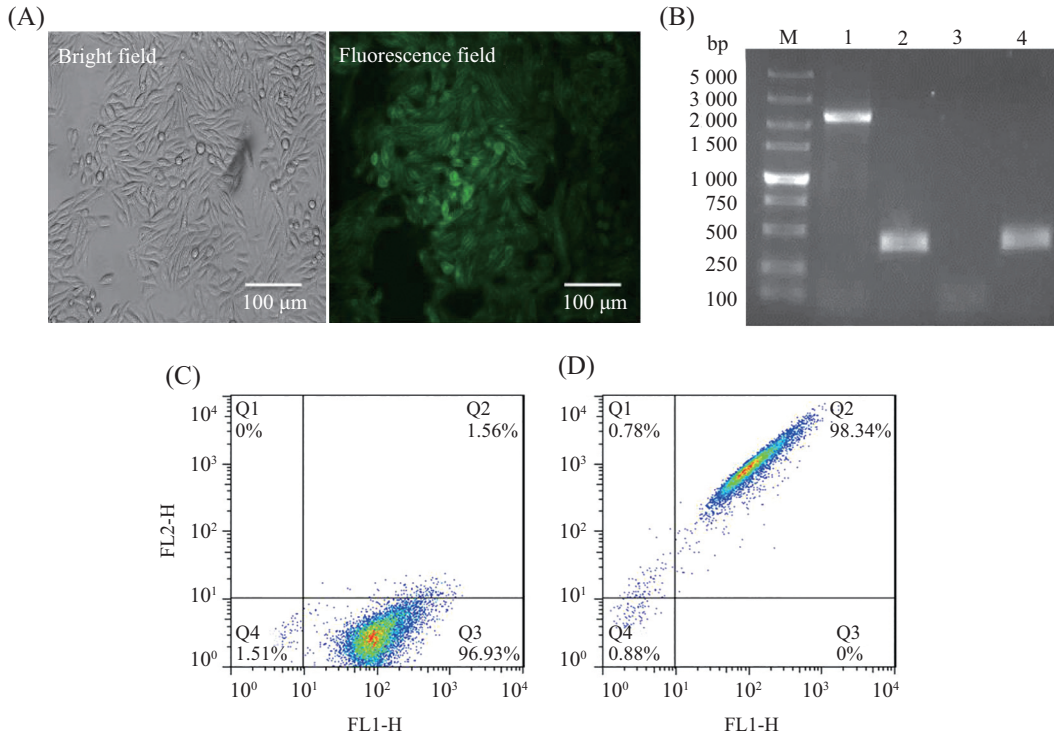
滤膜过滤后与新鲜培养基混合作为后续铺板的培养基, 这样可以提高单细胞的存活率, 因为T75的培养基含有大量的用于细胞间交流的信息分子, 可以促进单细胞的存活^[14]。上述单克隆的筛选方法可以理解为一种筛选模式, 完全可以应用到相关细胞的筛选工作中。

从图2E可以看出来, 无论是Liraglutide还是Exendin-4刺激单克隆细胞和未分选细胞后, 其

测得的EC₅₀值都相差几个数量级(单克隆细胞测得Liraglutide的EC₅₀值大约是2×10⁻³ nmol/L, 而未分选的细胞测得的大约是12 nmol/L), 可能的原因是不同的受体表达量对于GLP-1类似物感应的浓度不同。受体表达量高其对应的药物检测灵敏度就高, 这进一步提示, 对于此类的细胞检测模型, 筛选单克隆是非常必要的。在研究FBS和其单一组分BSA对GLP-1类似物活性检测的影响时, 在相对较低的

血清白蛋白浓度0.2 g/L(或换算成相对等价胎牛血清浓度1%), Liraglutide测得的EC₅₀值也相差几个数量级, 而Exendin-4则相差不是特别明显, 这与事

实相符^[9]。这也从另外一个层面提醒我们, 针对像Liraglutide这一类的长效GLP-1类似物, 在测活性之前, 彻底清洗此类细胞模型培养基(主要影响因素为

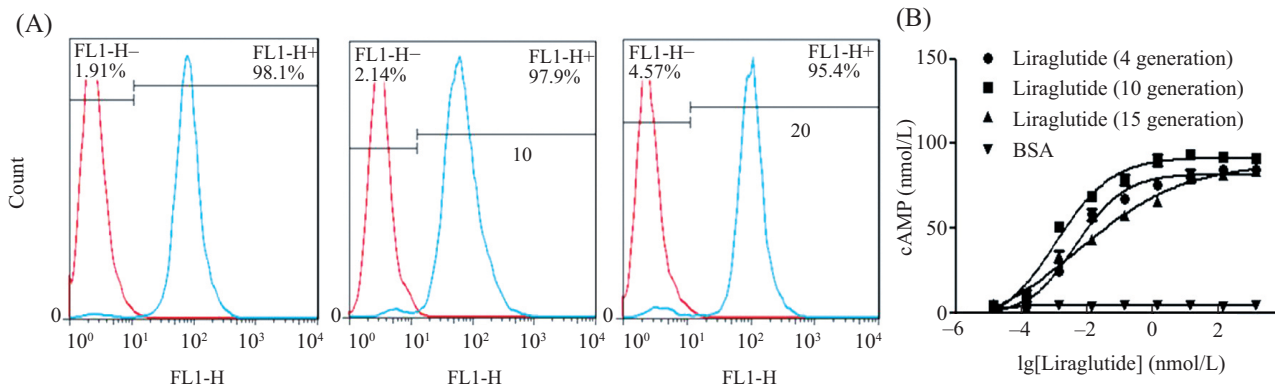


A: 倒置荧光显微镜下单克隆模型细胞及其荧光表达分布; B: 单克隆模型细胞RT-PCR验证; C: 单克隆模型细胞流式细胞术分析图; D: GLP-1R抗体孵育后单克隆细胞模型流式细胞术分析图。M: DNA Maker; 泳道1和2: 模型细胞*hGLP-1R-EGFP*和*Actin*基因的RT-PCR, 泳道3和4: 空白细胞*hGLP-1R-EGFP*和*Actin*基因的RT-PCR。

A: monoclonal model cells and their fluorescent expression profiles in inverted fluorescent microscope; B: RT-PCR identifications of model cells; C: flow cytometry analysis of monoclonal model cells; D: flow cytometry analysis of monoclonal model cells after incubating human GLP-1R PE-conjugated antibody. M: DNA Maker; line 1 and 2: PT-PCR of *hGLP-1R-EGFP* and *Actin* genes in model cells; line 3 and 4: RT-PCR of *hGLP-1R-EGFP* and *Actin* genes in blank cells.

图3 单克隆细胞模型的验证

Fig.3 The identification of the monoclonal cell model

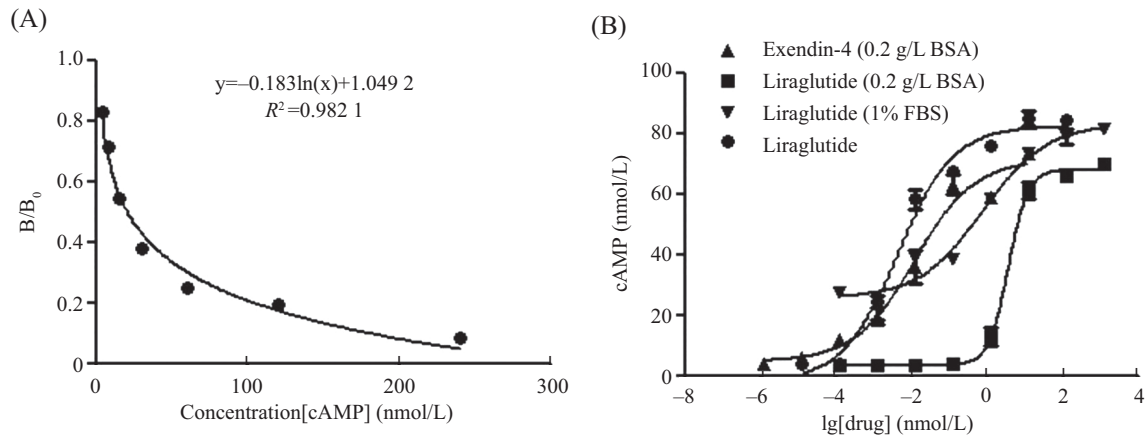


A: 单克隆细胞模型培养10代及20代后的荧光分布; B: 单克隆细胞模型在其第4代、第10代和第15代分别检测Liraglutide的活性。

A: fluorescence distribution after 10 and 20 generation in monoclonal cell model; B: monoclonal cell models were tested for Liraglutide activity at 4th, 10th and 15th generations respectively.

图4 单克隆细胞模型的稳定性

Fig.4 The stability of the monoclonal cell model



A: 根据试剂盒绘制的cAMP标准曲线; B: 血清及其单一组分BSA对GLP-1类似物活性检测的影响。

A: the standard curve of cAMP was drawn using kit; B: effect of serum and its single component BSA on the activity detection of cell models for GLP-1 analogue.

图5 血清及其单一组分BSA对细胞模型活性检测的影响

Fig.5 The effect of serum and its single component BSA on the activity detection of cell model

血清中的BSA)的重要性。综上所述,本研究成功构建了用于检测GLP-1类似物活性的单克隆检测模型,具有良好的稳定性和可重复性,为GLP-1类似物的药物筛选与活性评价提供了一个方便可靠的模型基础。

参考文献 (References)

- 1 Donnelly D. The structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor and its ligands. *Br J Pharmacol* 2012; 166(1): 27-41.
- 2 Nauck M. Incretin therapies: highlighting common features and differences in the modes of action of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Diabetes Obes Metab* 2016; 18(3): 203-16.
- 3 Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007; 132(6): 2131-57.
- 4 Jens JH. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 2007; 87(4): 1409-39.
- 5 Conrad E, Kramer CK., Zinman B, Retnakaran R. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist and basal insulin combination treatment for the management of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2014; 384(9961): 2228-34.
- 6 Calanna S, Christensen M, Holst JJ, Laferrère B, Gluud LL, Vilsbøll T, *et al.* Secretion of glucagon-like peptide-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analyses of clinical studies. *Diabetologia* 2013; 56(5): 965-72.
- 7 Asger Lund, Filip K. Knop, Tina Vilsbøll. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists for the treatment of type 2 diabetes: Differences and similarities. *Eur J Intern Med* 2014; 25(5): 404-17.
- 8 Victor A, GAULT, Barry D, KERR, Patrick HARRIOTT, Peter R. Administration of an acylated GLP-1 and GIP preparation provides added beneficial glucose-lowering and insulinotropic actions over single incretins in mice with Type 2 diabetes and obesity. *Clin Sci (Lond)* 2011; 121(3): 107-17.
- 9 Lau J, Bloch P, Lauge Schäffer, Ingrid Pettersson, Jane Spetzler, Jacob Kofoed, *et al.* Discovery of the once-weekly glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue semaglutide. *J Med Chem* 2015; 58(18): 7370-80.
- 10 钱凯, 蔡燕飞, 陈蕴, 金坚. 胰高血糖素样肽-1类似物活性检测的CHO细胞模型构建. *中国细胞生物学学报*(Qian Kai, Cai Yanfei, Chen Yun, Jian Jian. Constructed CHO cell model to detect the activity of glucagon-like peptide-1 analogues. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(8): 1095-101.
- 11 黎思彤, 郑雪萍, 杨学敏, 聂涛, 陈健文, 刘培庆, 等. 以GLP-1受体为靶点的药物筛选模型的建立及功能鉴定. *中国药理学通报*(Ni Sitong, Zheng Xueping, Yang Xueming, Nie Tao, Chen Jianwen, Liu Peiqing, *et al.* Establishment and functional identification of drug screening model with GLP-1 receptor as target. *Chinese Pharmacological Bulletin*) 2017; 33(2): 285-9.
- 12 Bruce, B. Liraglutide: A review of the first once-daily GLP-1 receptor agonist. *Am J Manag Care* 2011; 17(2): S59-70.
- 13 Parkes DG, Pittner R, Jodka C, Smith P, Young A. Insulinotropic actions of exendin-4 and glucagon-like peptide-1 *in vivo* and *in vitro*. *Metabolism* 2001; 50(5): 583-9.
- 14 Regev-Rudzki N, Wilson DW, Carvalho TG, Sisquella X, Coleman BM, Rug M, *et al.* Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell* 2013; 153(5): 1120-33.