

In-cell Western 法测定人胰岛素生物学活性

王绿音¹, 杨艳枫^{1,2}, 梁誉龄¹, 张 慧¹, 李 晶¹, 梁成罡¹

(1 中国食品药品检定研究院激素室, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 102629; 2 中国药科大学, 南京 211198)

[摘要] **目的:**利用 in-cell Western(ICW)技术研究基于转基因细胞的人胰岛素生物学活性测定方法。**方法:**以 CHO-INSR B1284 为靶细胞,用不同浓度的人胰岛素刺激靶细胞,采用 ICW 技术检测人胰岛素受体酪氨酸磷酸化水平,进行人胰岛素的体外生物学活性测定;根据《中华人民共和国药典》2020 年版通则 9401 “生物制品生物活性/效价测定方法”对该方法进行专属性、相对准确度、中间精密度、线性与范围等方法学验证;以重组人胰岛素国家标准品为参比品,采用本方法测定人胰岛素原料药及其他人胰岛素类似物的生物学活性相对效价。**结果:**不同浓度的人胰岛素作用于 CHO-INSR B1284 细胞后具有较好的剂量依赖性;5 个效价浓度的待测品经 8 次测定,相对效价的几何均值分别为:(63.76 ± 4.38)%, (78.01 ± 5.97)%, (99.52 ± 4.62)%, (122.84 ± 7.4)%, (151.71 ± 8.81)%, 相对偏倚均在 ±5% 范围内,对应的几何变异系数(GCV, %)均 <11%, GCV 的置信上限均 <20%;采用该方法能有效检测人胰岛素及其胰岛素类似物的效价。**结论:**利用 ICW 技术的人胰岛素体外生物学活性测定法专属性强、准确度高、精密度好,可作为人胰岛素生物学活性的常规检测方法。

[关键词] 生物学活性;人胰岛素;转基因细胞;in-cell Western;方法学验证**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)10-1000-07

Bioactivity determination of human insulin using in-cell Western

WANG Lv-yin¹, YANG Yan-feng^{1,2}, LIANG Yu-ling¹, ZHANG Hui¹, LI Jing¹, LIANG Cheng-gang¹

(1 Division of Hormone, National Institutes for Food and Drug Control, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 102629, China; 2 China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] **Objective:** To study the bioactivity determination method of human insulin from transgenic cell using in-cell Western technology. **Methods:** Using CHO-INSR B1284 cells as the target cell, different concentrations of human insulin were used as the stimulants. In-cell Western was used to measure the phosphorylation of human insulin receptor, and the bioactivity of human insulin was determined. According to the 2020 edition 9401 biological products bioactivity/potency determination method verification guiding principles in the General Rules of the fourth part of Chinese Pharmacopoeia, the established method was validated in terms of specificity, precision and durability. The national standard of recombinant human insulin was used as the benchmark to evaluate the relative potency of human insulin drug substance and other insulin analogues. **Results:** Different concentrations of human insulin

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目:创新生物技术药评价及标准化关键技术研究(2018ZX09101001-003-004)**[作者简介]** 王绿音,女,助理研究员,主要从事激素类药物质量控制研究。E-mail:wanglvyin@nifdc.org.cn。**[通讯作者]** 梁成罡,男,研究员,主要从事激素类药物质量控制研究。E-mail:liangchenggang@nifdc.org.cn。

indicated effect on CHO-INSR B1284 cells in a dose-dependent manner. The samples of five potent concentrations were detected for 8 times. The geometric means of the relative potency were $(63.76 \pm 4.38)\%$, $(78.01 \pm 5.97)\%$, $(99.52 \pm 4.62)\%$, $(122.84 \pm 7.49)\%$ and $(151.71 \pm 8.81)\%$, respectively. The relative bias of five potency level were within $\pm 5\%$, the corresponding geometric coefficient of variations (GCV,%) were lower than 11%, and the upper confidence limit of GCV were all lower than 20%. The bioactivity of human insulin and insulin analogues can be effectively detected using this method. **Conclusion:** The *in vitro* bioactivity determination of human insulin using the In-cell Western was of good specificity, accuracy and precision, which can be used as a routine bioassay method of human insulin.

[Key words] biological activity; human insulin; transgenic cells; in-cell Western; method validation

胰岛素是临床最常用的降糖药物之一,在1型糖尿病和部分2型糖尿病治疗中发挥着不可替代的作用^[1]。胰岛素由胰岛β细胞分泌,主要通过与其肝细胞、肌细胞、脂肪细胞上的胰岛素受体结合促进葡萄糖的跨膜转运与氧化分解,从而有效调节三大营养物质代谢^[2-3]。胰岛素受体(insulin receptor, IR)是具有酪氨酸蛋白激酶活性的跨膜糖蛋白,由2个α亚单位和2个β亚单位通过多个二硫键连接^[4]。胰岛素与位于胞外的α亚基特异性结合引起受体与配体的构象变化,使β亚基的3个酪氨酸残基(Tyr-1158, Tyr-1162, Tyr-1163)发生自磷酸化^[5-6],随即激活下游的信号级联反应^[7]。胰岛素受体包括A和B这2种亚型,二者在结构上的区别在于胰岛素受体B含有胰岛素受体A缺少的由外显子11编码的12个氨基酸残基。此外,二者在体内的分布及功能也存在差异,胰岛素受体B主要位于肝脏、肌肉、脂肪等胰岛素靶组织中,通过结合胰岛素发挥代谢功能^[8]。目前国际公认的检测胰岛素生物活性的标准方法仍为体内动物法,如现行《中华人民共和国药典》的小鼠血糖法^[9]及《美国药典》的兔血糖测定法^[10],但上述方法涉及实验动物,且存在操作繁琐、耗时长、结果重复性差等问题^[11]。基于此,《美国药典》将基于细胞的in-cell Western (ICW)法测定胰岛素体外生物学活性作为补充引入了通则(见图1)。但该方法目前尚未在国内外胰岛素类产品生产企业广泛使用,未见有对该方法的适用性进行系统研究的报道。因此,本文旨在通过全面的方法学研究,确证该方法用于胰岛素生物活性测定的可行性,为潜在的标准化研究做好技术储备,同时也为胰岛素类产品的早期研发、工艺优化和内部质量控制提供方法参考,为产品审评提供支持。

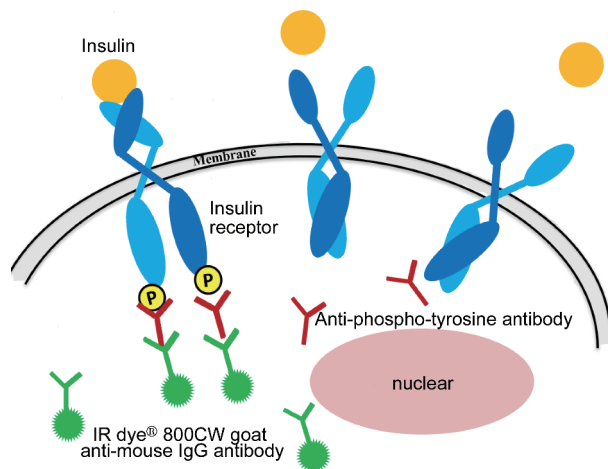


图1 ICW法测定人胰岛素生物学活性原理

ICW是一种直接在微孔板内对细胞内的目标蛋白进行定量免疫荧光检测的方法^[12]。与传统Western印迹法相比,ICW可在细胞原位定量胞内的目标蛋白,不仅操作简便高效,还大大提高了实验通量与重复性^[13-14]。此外,由于近红外荧光的波长范围在700~800nm,此波段实验耗材及细胞的本底信号值较低,也提高了检测的信噪比和相对灵敏度。

本文以稳定表达人胰岛素受体B的CHO-INSR B1284为靶细胞,用不同浓度的人胰岛素刺激靶细胞,通过ICW技术检测人胰岛素受体的自磷酸化水平,测定人胰岛素的体外生物学活性,并对其方法进行学验证。

材料与方法

1 细胞系

细胞CHO-INSRB 1284(ATCC® CRL-3307™)由本实验室保存。

2 药品与试剂

重组人胰岛素国家标准品 (recombinant human insulin, 批号: 140633-201907); 人胰岛素 (甘李药业股份有限公司, 批号: GHIA19001, GHIA19002, GHIA19003); 赖脯胰岛素 (江苏万邦生化医药有限责任公司, 批号: 202108A01); 门冬胰岛素 (珠海联邦制药有限公司, 批号: 4352012103); 甘精胰岛素 (山东新时代药业有限公司, 批号: 03202003002); 德谷胰岛素 (Novo Nordisk A/S 公司, 批号: HK0SKP079); 地特胰岛素 (Novo Nordisk A/S 公司, 批号: FD-FDHP161); 人胰岛素注射液 (Lilly France 公司, 批号: D006619E); 赖脯胰岛素注射液 (甘李药业股份有限公司, 批号: 222010032); 门冬胰岛素注射液 (浙江海正药业股份有限公司, 批号: 20210402); 甘精胰岛素注射液 (甘李药业股份有限公司, 批号: 121910021); 德谷胰岛素注射液 (Novo Nordisk A/S 公司, 批号: KVG1S86); 地特胰岛素注射液 [诺和诺德 (中国) 制药有限公司, 批号: KVG1P52]; 人胰岛素样生长因子 1 国家标准品 (insulin like growth factor1, IGF-1, 批号: 360011-201601); 重组人表皮生长因子活性测定国家标准品 (epidermal growth factor, EGF, 批号: 270013-9701); Ham's F-12 Nutrient Mix, GlutaMAX™ 培养基 (目录号: 31765-035)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 目录号 10099141C)、0.25% Trypsin-EDTA (目录号: 14190-144)、潮霉素 B (目录号: 10687010, 批号: H044-74US) 均购自 Gibco 公司; Anti-p-Tyr 4G10 mouse monoclonal antibody (Sigma-Aldrich 公司, 目录号: 05-321, 批号: 3507846); 封闭液 (目录号: 927-6001, 批号: 211115)、IR dye® 800CW goat anti-mouse IgG antibody (目录号: 926-32210, 批号: D10603-05)、Sapphire 700™ 细胞染料 (目录号: 928-40022, 批号: D10118-10)、DRAQ5™ DNA 染料 (目录号: ab108410, 批号: 511DR50200) 均购自 LI-COR 公司; 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA, American Bio 公司, 批号: 17813400); DPBS (Gibco 公司, 不含钙镁离子, 目录号: 14190-144); 固定液 (3.7% 甲醛溶液, 目录号 352569, 批号: MKCM5172) 与透化液 (0.1% TrionX-100-DPBS 溶液) 采用 Sigma-Aldrich 公司试剂配制。

3 仪器

Odyssey CLx 双色近红外荧光成像系统 (LI-COR 公司); C170i 二氧化碳培养箱 (Eppendorf 公司); nu-437-600s 超净工作台 (NUAIR 公司); TDL-60C

离心机 (上海安亭科学仪器厂); SoftMax Pro 5.4 软件 (MD 公司)。

4 人胰岛素的体外生物学活性测定

4.1 细胞悬液制备

收集对数生长期 CHO-INSRB 1284 细胞, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后重悬至含 10% FBS, 0.6% 潮霉素 B 的 Ham's F-12 Nutrient Mix, GlutaMAX™ 培养基 (生长培养基) 中, 调整细胞密度为 1.25×10^5 个·mL⁻¹, 以每孔 200 μL 接种于 96 孔黑色底透细胞培养板, 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中 18 ~ 24 h。次日, 以每孔 100 μL 加入 DPBS 洗涤 1 次。加入 Ham's F-12 Nutrient Mix 培养基, 每孔 100 μL, 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中 3 ~ 5 h, 弃培养基。

4.2 细胞培养板加样

用 0.01 mol·L⁻¹ 盐酸溶液将人胰岛素样品、重组人胰岛素国家标准品稀释至 2.5 IU·mL⁻¹, 再用含 0.1% 牛血清白蛋白的 Ham's F-12 Nutrient Mix 检测培养基将人胰岛素、重组人胰岛素国家标准品溶液分别稀释至 25.00, 8.33, 2.78, 0.93, 0.31, 0.11, 0.03, 0.01 mIU·mL⁻¹, 共 8 个稀释度, 每个稀释度双复孔, 以每孔 100 μL 依次转入 96 孔黑色底透细胞培养板, 将细胞培养板置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 20 min。

4.3 荧光值测定

吸取细胞培养板中的上清, 用新鲜制备的固定液室温固定细胞 20 min, 采用透化液对细胞进行透化处理 3 次, 每次 10 min。以每孔 100 μL 加入封闭液, 将细胞培养板振摇封闭 1.5 h, 加入一抗溶液 (Anti-p-Tyr 4G10 mouse monoclonal antibody) 4 °C 孵育过夜。次日, 用洗涤液清洗细胞培养板, 加入二抗溶液 (IR dye® 800CW goat anti-mouse IgG antibody) 及细胞、DNA 染料混合物 (Sapphire 700™, DRAQ5™), 置室温孵育 1 h, 用洗涤液充分洗涤后, 采用近红外荧光成像系统, 用 700 和 800 nm 这 2 个通道同时扫描荧光。最终测定结果以 800 nm 通道检测的荧光值 (指征胰岛素受体酪氨酸磷酸化水平) 与 700 nm 通道检测的荧光值 (指征总细胞数) 之比表示。

4.4 数据分析

利用 Softmax 5.4 软件进行四参数计算, 利用 Graphpad Prism 5 软件绘图, 以人胰岛素浓度对数为 X 轴, 对应的荧光值为 Y 轴, 以四参数模式拟合剂量-效应曲线, 方程为 $Y = D + (A - D) / [1 + (X/C)^B]$, 式中的 C 值为半数有效浓度 (50% effective con-

centration, EC_{50}), 样品的相对生物学活性(%) = 标准品 EC_{50} / 样品 EC_{50} $\times 100\%$ 。

5 人胰岛素的体外生物学活性的方法学验证

参照《中华人民共和国药典》2020年版四部通则 9401^[15]对所建立的方法进行专属性、相对准确度、精密度等方法学验证。

6 ICW 法的应用

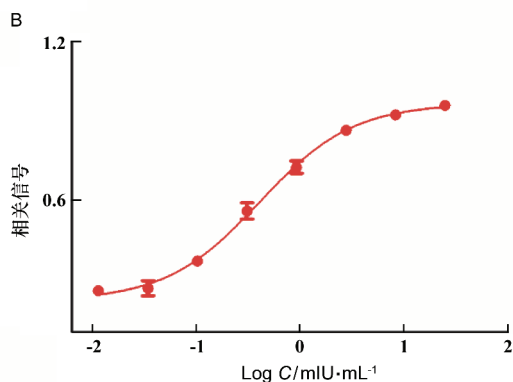
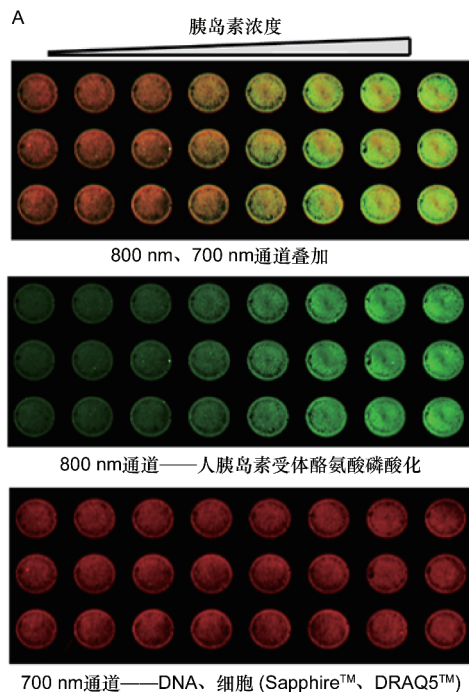
为评价本方法的适用性,以重组人胰岛素国家标准品作为参比品,对人胰岛素原料药进行了效价测定。此外,将赖脯胰岛素、门冬胰岛素、甘精胰岛素、德

谷胰岛素、地特胰岛素原料药及各自相应制剂以相同的起始摩尔浓度,按“4”项所述方法测定生物学活性。

结 果

1 人胰岛素生物学活性剂量效应曲线

如图 2A 所示,绿色荧光指征的胰岛素受体自磷酸化水平以剂量依赖的模式增加,细胞及 DNA 染色后被激发的红色荧光指征孔板内的总细胞数,计算绿色荧光与红色荧光的信号值之比,作为相对荧光强度值。



A: ICW 法检测的剂量效应图;B: 人胰岛素剂量效应曲线

图 2 人胰岛素的剂量效应结果

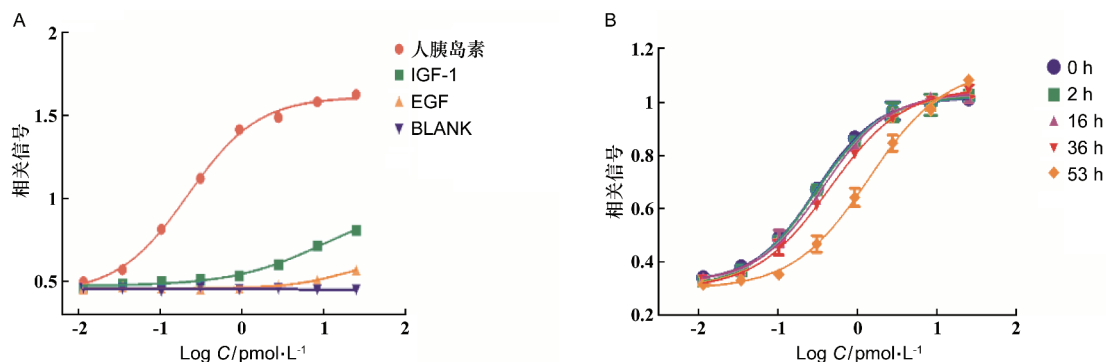
以人胰岛素浓度对数为 X 轴,测定的相对荧光强度值为 Y 轴,按照四参数模型拟合人胰岛素的剂量效应曲线。如图 2B 所示,在对数坐标轴上呈典型的“S”型曲线, EC_{50} 值为 $0.4 \text{ mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$, R^2 为 0.994。

2 方法学验证

2.1 专属性

专属性验证包括辅料基质、可能的降解产物的干扰考察以及样品的专属性考察。辅料基质及可能的降解产物专属性验证中,将重组人胰岛素国家标准品用 Tris-EDTA 溶液 (pH 8.0) 稀释为每 1 mL 含 5 mg 的溶液,于 60°C 放置 2, 6, 16, 53 h。考察用超纯水配制的人胰岛素注射液辅料以及高温处理对检

测结果的影响。结果如图 3A 所示,人胰岛素辅料溶液无效应曲线。随着 60°C 加热处理时间的增加,人胰岛素的相对效价逐渐降低(见图 3B),分别为 98.5%, 81.4%, 67.1% 和 21.4%,表明本方法可反映人胰岛素破坏样品的生物学活性变化。在样品的专属性考察中,选择 EGF, IGF-1 的原因一方面是由于人胰岛素受体与 EGF, IGF-1 受体均具有酪氨酸激酶活性;另一方面还由于 IGF-1 受体与人胰岛素受体同属于胰岛素受体家族成员,该家族成员配体具有交叉结合的特性^[16-17]。如图 3A 所示, EGF, IGF-1 均呈现出一定的激活活性,但其曲线 S/N 值明显低于人胰岛素,且 IGF-1 略高于 EGF。



A: 样品专属性考察结果; B: 辅料基质及可能的降解产物专属性考察结果

图3 ICW法测定人胰岛素生物活性的专属性验证

2.2 线性与范围、相对准确度与中间精密度

取重组人胰岛素国家标准品,按“4”项所述方法,用含0.1%牛血清白蛋白的Ham's F-12 Nutrient Mix检测培养基重组人胰岛素国家标准品溶液分别稀释至初始浓度为16.00,20.00,25.00,31.25,39.00 mIU·mL⁻¹的待测溶液,对应5个相对效价水平64%,80%,100%,125%和156%,在对数尺度上呈均匀间隔,以100%相对效价水平作为标准品。5个待测溶液由2名分析人员在2d进行相对效价测

定,每天每人使用2个细胞代次,每个细胞代次独立测定2份,以2份结果几何均值的对数为测定值,即每个效价水平共测定8次。

以待测溶液的稀释因子为横坐标,以测定的荧光值为纵坐标,利用四参数回归模型拟合剂量效应曲线,方程为 $Y = D + (A - D) / [1 + (X/C)^B]$,式中的C值为半数有效稀释因子(50% effective dilution factor, ED₅₀),相对效价(%) = 待测溶液 ED₅₀/标准溶液 ED₅₀ × 100%,测定结果见表1。

表1 人胰岛素相对效价测定结果

n = 8, %

效价水平/%	时间 1				时间 2			
	人员 1		人员 2		人员 1		人员 2	
	代次 1	代次 2	代次 1	代次 2	代次 3	代次 4	代次 3	代次 4
64	59.73	74.16	60.69	76.59	56.78	56.32	56.61	64.66
	61.63	69.91	60.30	71.45	61.05	55.07	68.59	71.15
80	85.62	75.94	84.65	75.28	75.44	75.34	69.86	69.27
	84.72	85.57	73.57	95.73	81.10	78.51	67.56	73.21
100	108.80	100.99	111.91	100.65	96.51	94.22	90.18	92.56
	106.62	108.84	98.17	108.55	95.35	102.39	86.16	93.90
125	135.70	129.70	140.32	123.90	113.96	132.42	103.08	94.60
	140.41	124.16	118.99	134.70	120.93	126.27	105.70	127.98
156	163.79	164.36	139.02	159.35	133.83	130.75	164.40	170.67
	139.05	171.14	178.49	176.07	130.96	139.10	141.43	133.16

2.2.1 线性与范围 将5个待测溶液的相对效价测定值的对数与相应的理论相对效价的对数进行线性回归分析,回归方程为 $Y = 0.9799X - 0.0175$,R²为0.9992,斜率为0.9799,在0.80~1.25的范围内,表明本方法在16.00~39.00 mIU·mL⁻¹的浓度范围内具有良好的线性。

2.2.2 相对准确度 以相对偏倚[RB/% = (相对效价测定值/相对效价理论值 - 1) × 100%]反映测定值与理论值之间的接近程度,从而评价相对准确度。如表2所示,5个效价水平的相对偏倚的绝对值均 < 5%,90%置信区间的绝对值均 < 10%。

表2 人胰岛素不同效价测定值的相对偏倚及置信区间

效价水平/%	试验次数	对数效价		效价		相对偏倚	
		平均值/%	90% CI/%	平均值/%	90% CI/%	平均值/%	90% CI/%
64	8	-0.451 1	-0.518 4 ~ -0.383 7	63.76	59.38 ~ 68.13	-0.4	-7.0 ~ 6.5
80	8	-0.250 0	-0.300 9 ~ -0.199 0	78.01	74.02 ~ 82.00	2.4	-7.5 ~ 2.4
100	8	-0.005 4	-0.052 3 ~ -0.041 6	99.52	94.90 ~ 104.14	-0.5	-5.1 ~ 4.2
125	8	0.203 6	0.140 2 ~ 0.260 7	122.84	115.35 ~ 130.33	-1.7	-8.0 ~ 4.5
156	8	0.413 9	0.355 3 ~ 0.472 4	151.71	142.90 ~ 160.52	-2.7	-8.5 ~ 2.8

对数转换的底数取 e; 计算 90% 置信区间时 $t_{0.05,7} = 1.89$

2.2.3 中间精密度 考察不同实验人员、不同时间、不同细胞代次等因素对方法精密度的影响,通过计算几何变异系数(GCV,%)及其95%置信上限评价中间精密度,结果见表3,每个效价水平的相对效价测定值的GCV/%均<11%,相应的置信上限均<20%,表明方法的中间精密度良好。

表3 人胰岛素不同效价测定值的几何变异系数及置信上限

效价水平/%	试验次数	GSD	CI _{GSD}	GCV/%	CI _{GCV} /%
64	8	1.106	1.198	10.6	19.8
80	8	1.079	1.147	7.9	14.7
100	8	1.073	1.134	7.3	13.5
125	8	1.100	1.186	10.0	18.6
156	8	1.092	1.170	9.2	17.0

GSD:几何标准偏差;反对数转换的底数取 e; 计算 95% 置信上限时 $\chi_{0.05,7}^2 = 217$

3 ICW 法的应用

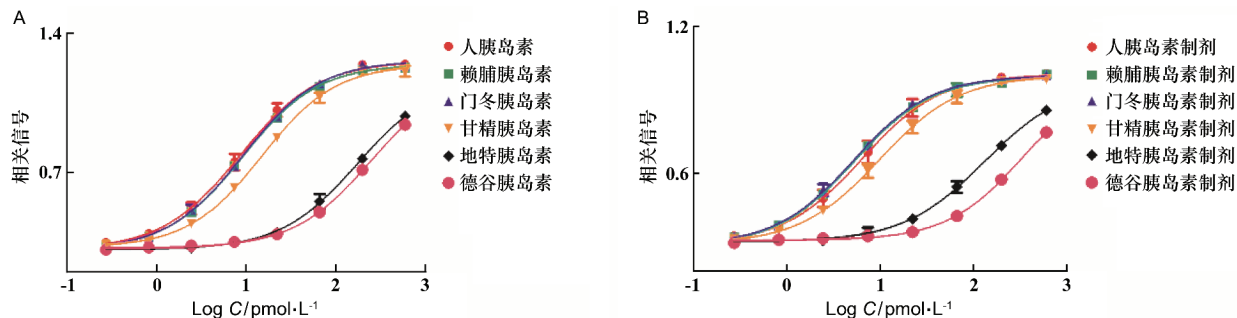
选取同一厂家的3批人胰岛素原料药进行相对效价测定。将采用本方法所得结果与动物法(小鼠血糖法和双交叉兔血糖法)的测定结果进行比较,结果见表4,采用SPSS软件对3种方法的测定结果

进行单因素方差分析, $P = 0.452$, > 0.05 ,表明本方法与体内法的测定结果差异无显著性,可用于人胰岛素原料药的生物学活性测定。

表4 人胰岛素原料药的效价测定结果

批号	IU·mg ⁻¹		
	ICW 法	小鼠血糖法	双交叉兔血糖法
批号 1	29	28	29
批号 2	30	29	29
批号 3	26	30	29

将赖脯胰岛素、门冬胰岛素、甘精胰岛素、德谷胰岛素、地特胰岛素原料药及人胰岛素稀释至相同的起始摩尔浓度,将上述各胰岛素类似物制剂与人胰岛素制剂稀释至相同的起始摩尔浓度。按“4”项所述方法测定生物学活性。结果见图4,不同结构的胰岛素类似物均存在剂量效应曲线,其中德谷胰岛素及地特胰岛素的响应值未达到曲线最大值,故无法计算EC₅₀值。其余品种的EC₅₀值存在差异,与早期的相关研究结果类似^[18-19],在原料药与注射液,EC₅₀值由高至低依次为甘精胰岛素>门冬胰岛素>赖脯胰岛素>人胰岛素,表明本方法可适用于胰岛素类似物的生物学活性测定。



A:样品专属性考察结果;B:辅料基质及可能的降解产物专属性考察结果

图4 相同分子数不同品种胰岛素的剂量效应曲线

讨 论

基于细胞信号通路的生物学活性测定已被应用于多种重组蛋白类药物的生物学活性质量控制。目前,胰岛素类药物的体外细胞活性测定方法有大鼠原代成熟脂肪细胞法、原代前脂肪细胞诱导分化法、同位素标记胰岛素法、测定受体自磷酸化水平的 Elisa 法^[20-21]。这些方法或涉及实验动物,或采用了放射性同位素,或需要将细胞裂解,不能检测完整细胞中的实际受体激活效应。ICW 技术提供了一种基于原位细胞直接测量受体的自磷酸化的方法,该方法操作简便、稳定高效、重现性好,可用于评价人胰岛素的生物学活性。

本研究利用过表达人胰岛素受体的转基因细胞,采用 ICW 法测定人胰岛素体外生物学活性,可以很好地克服现有体内、理化和体外活性测定方法的局限性。经过《中华人民共和国药典》2020 年版 9401 的方法学验证,结果表明该方法的专属性、相对准确度、中间精密度、线性与范围均符合对胰岛素类药物的质量控制要求。采用该方法测定了多批次人胰岛素原料药的效价,结果与体内法无显著差异。将该方法用于长效及速效胰岛素类似物的生物学活性分析,结果显示该方法可用于不同胰岛素类似物的活性比较。

综上所述,本研究利用 ICW 技术对基于转基因细胞的人胰岛素体外生物学活性测定方法进行了全面的方法学研究,结果表明该方法可用于胰岛素生物活性测定,较动物法具有明显优势,可用于此类产品的质量控制在,同时也为其他胰岛素类似物体外生物学活性测定方法的建立提供参考。

[参 考 文 献]

- [1] 代彩玲, 郭健敏, 孙云霄, 等. 糖尿病药物的研究进展[J]. 糖尿病新世界, 2018, 21(3): 194-196.
- [2] 张梓涵, 杨丽霞, 贺云. 脂肪因子、炎症因子与胰岛素抵抗分子机制研究进展[J]. 中医临床研究, 2021, 13(28): 144-148.

- [3] PETERSEN MC, SHULMAN GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(4): 2133-2223.
- [4] 郑晓珂, 王玮玮, 冯卫生. 胰岛素 PI3K/PKB 信号转导通路研究进展[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(23): 2763-2770.
- [5] DENLEY A, COSGROVE LJ, BOOKER GW, et al. Molecular interactions of the IGF system[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(4-5): 421-439.
- [6] RASK-MADSEN C, KAHN CR. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(9): 2052-2059.
- [7] GUO S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms[J]. *J Endocrinol*, 2014, 220(2): T1-T23.
- [8] SCIACCA L, PRISCO M, WU A, et al. Signaling differences from the A and B isoforms of the insulin receptor (IR) in 32D cells in the presence or absence of IR substrate-1[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(6): 2650-2658.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 三部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:378.
- [10] The United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeial[S]. 43th. 2020:6547-6553.
- [11] 贾首前, 王莉芳, 冯润东. 胰岛素效价测定方法的比较[J]. 中国药品标准, 2019, 20(6): 465-468.
- [12] MOERKE NJ, HOFFMAN GR. Development of in-cell Western assays using far-red fluorophores[J]. *Curr Protoc Chem Biol*, 2011, 3(1): 39-52.
- [13] 王德军, 屠珏, 褚燕青, 等. 基于 In-Cell Western 对 Ryanodine 受体 2 检测方法的建立[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(3): 346-352.
- [14] 高翔, 蹇爱荣, 李京宝, 等. In-cell Western 和 Cell ELISA 在大分子量蛋白质相对定量中的应用[J]. 细胞生物学杂志, 2009, 31(6): 882-886.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:530-535.
- [16] WARD CW, GARRETT TPJ. Structural relationships between the insulin receptor and epidermal growth factor receptor families and other proteins[J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2004, 7(5): 630-638.
- [17] 王蕊, 黄昆. 胰岛素受体家族的结构与功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(12): 1102-1109.
- [18] VIGNERI R, SQUATRITO S, SCIACCA L. Insulin and its analogs: actions via insulin and IGF receptors[J]. *Acta Diabetol*, 2010, 47(4): 271-278.
- [19] TENNAGELS N, WERNER U. The metabolic and mitogenic properties of basal insulin analogues[J]. *Arch Physiol Biochem*, 2013, 119(1): 1-14.
- [20] ISSAD T, BOUTE N, PERNET K. The activity of the insulin receptor assessed by bioluminescence resonance energy transfer[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 973: 120-123.
- [21] 杨艳枫, 王绿音, 梁誉龄, 等. 时间分辨荧光免疫分析法测定人胰岛素生物学活性[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(1): 51-59.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-08-18