

读 书 报 告

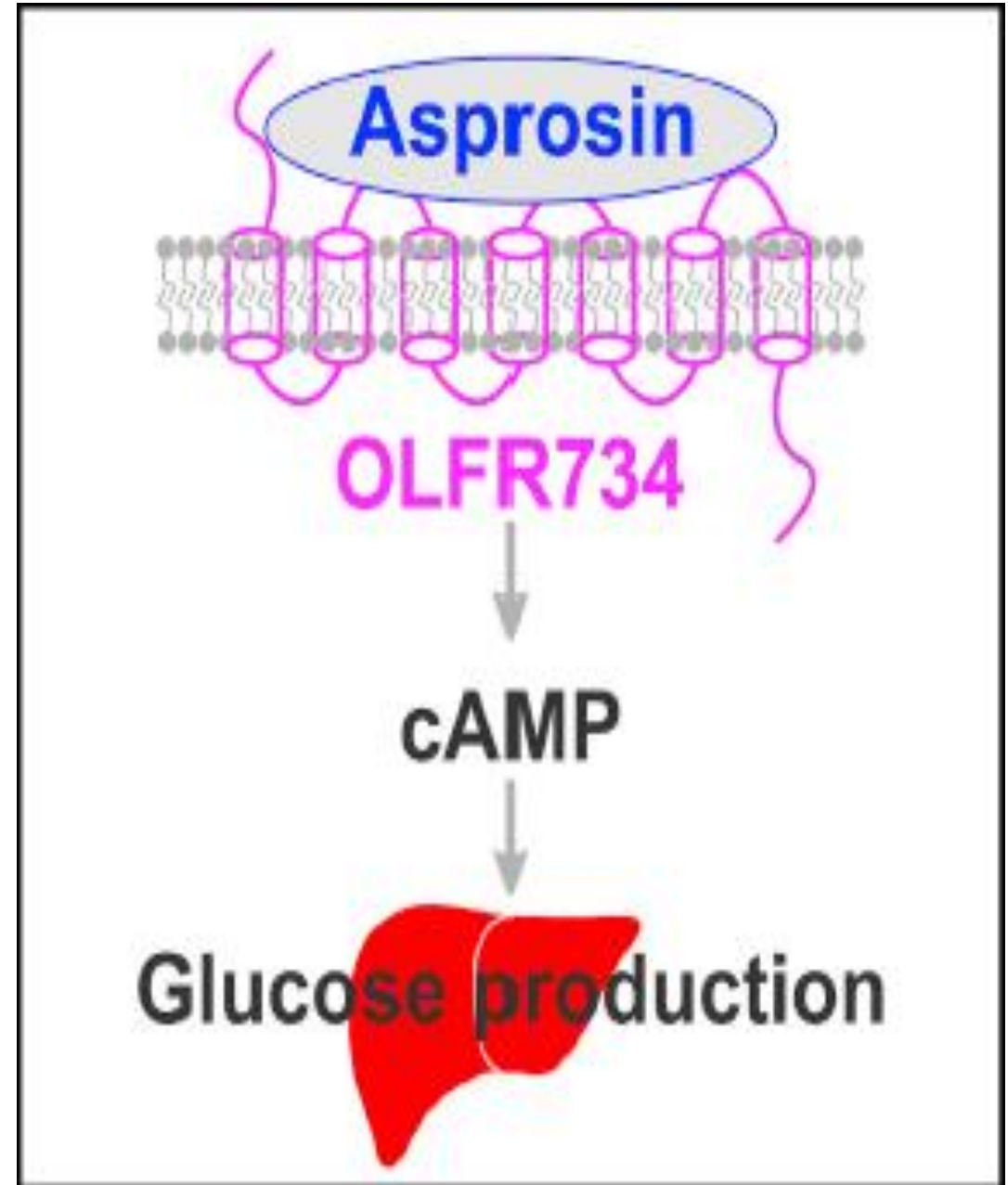
汇报人：职韶阳

日期：2019.8.4

Cell Metabolism

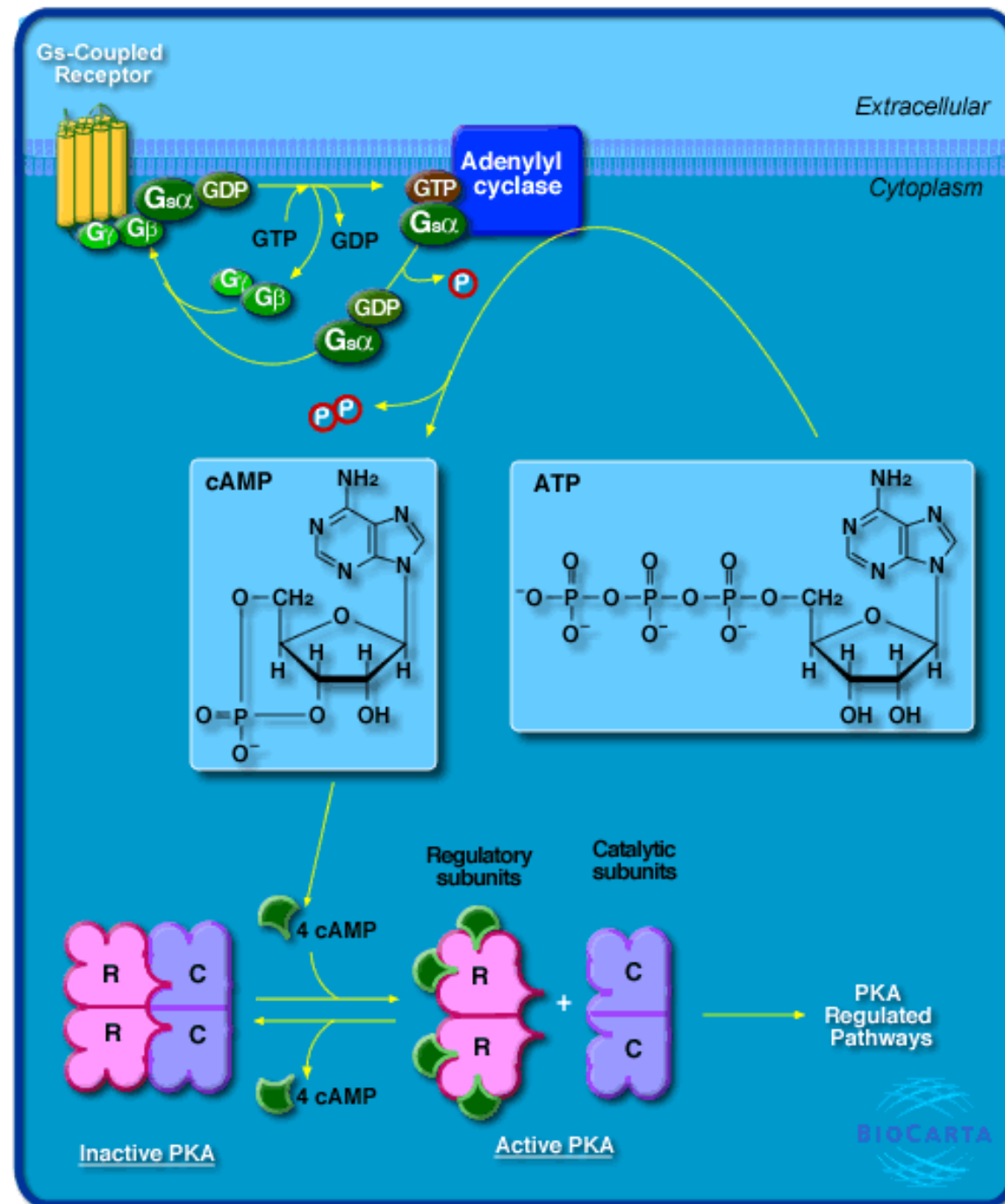
OLFR734 Mediates Glucose Metabolism
as a Receptor of Asprosin

嗅觉受体**OLFR734**作为激素**Asprosin**的
受体调控糖代谢

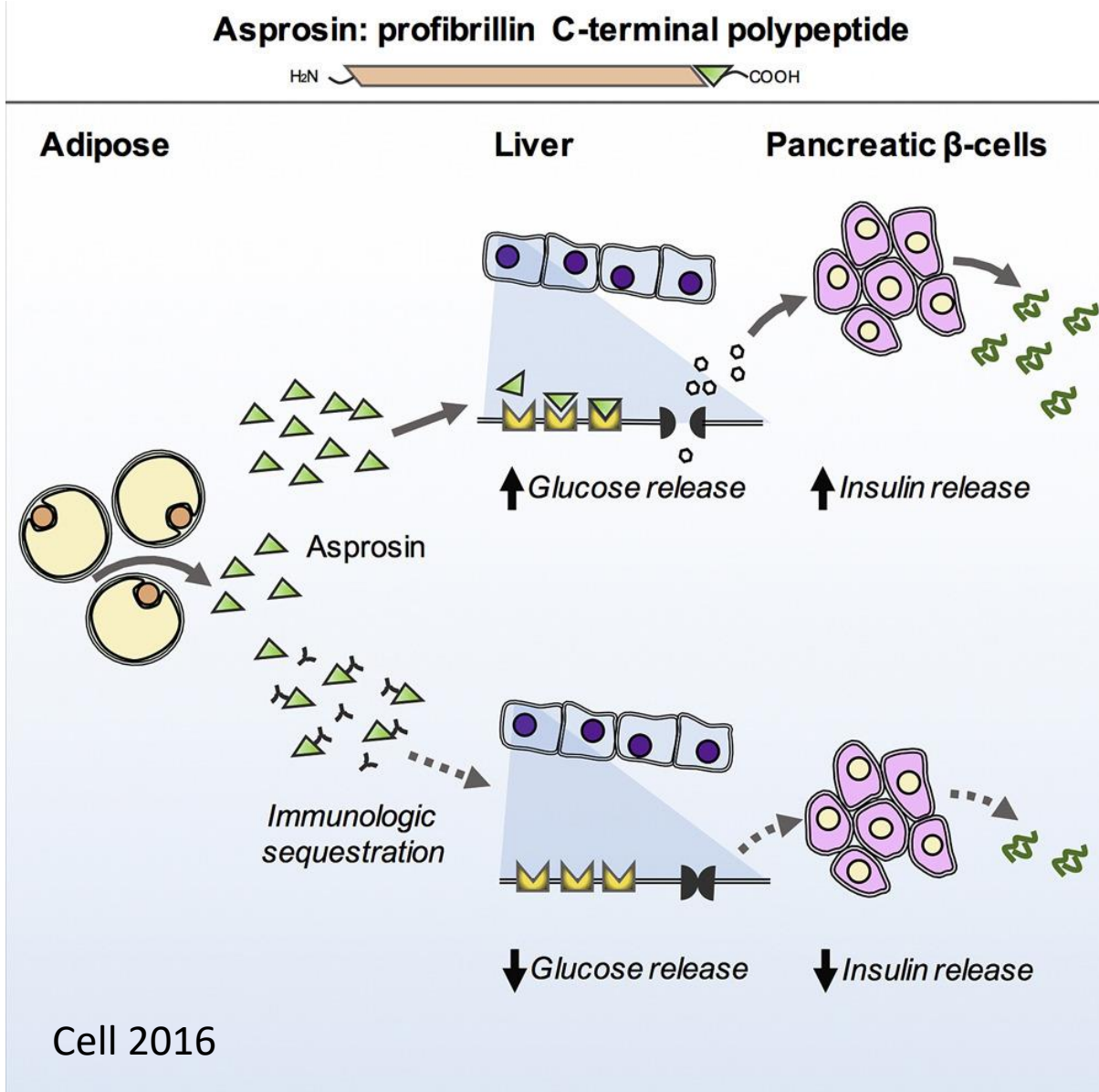


研究背景:

- Asprosin是原纤维蛋白1（由FBN1编码）的C末端切割产物（140aa），在禁食期间由脂肪组织分泌，又称为白脂素（Romereet al., 2016）
- Asprosin被募集到肝脏并通过未知的G蛋白偶联受体（GPCR）激活的cAMP信号传导途径促进葡萄糖生成（Romere等, 2016）
- Asprosin穿过血脑屏障，使下丘脑进食回路活化，能够刺激食欲（Duerrschmid等, 2017）



研究背景:



- 人血浆中 Asprosin 含量较低(纳摩尔水平), 在饥饿时上升, 促进肝细胞分解糖原并释放葡萄糖, 继而引发胰岛素升高; 饱食后, Asprosin 血浆水平恢复正常。

- 该因子的作用靶点为肝细胞、具有促进肝糖合成、升高血糖、升高胰岛素的生理功能; 由于其在血浆含量低, 并通过靶器官发挥生理功能, 因而具有典型的激素特征。

研究思路:

① Asprosin具有促进肝糖异生的作用，对G蛋白偶联受体进行siRNA筛选，看哪些受体敲低后会影响糖异生的基因表达



② 发现Olfr734（人源OR4M1的同源基因）敲除小鼠表现出糖异生能力下降以及胰岛素敏感性增强



③ 通过使用纯化得到的Olfr734在FBS（胎牛血清）中分离鉴定其配体可能是Asprosin。



④ 在进行小鼠的生理实验发现Asprosin通过OLFR734激活了下游cAMP-PKA通路，促进糖异生基因G6pc和Pck1的表达，进而升高血糖（G6Pc:葡萄糖6磷酸酶； PCK1: 磷酸烯醇式丙酮酸羧基酶）



⑤ 给小鼠注射Asprosin抗体后能够阻断Asprosin/OLFR734对糖异生的促进作用，因而干扰Asprosin和OLFR734的相互作用

研究结果:

1 Olfcr734缺乏减少葡萄糖生成



2 Olfcr734基因敲除可改善胰岛素敏感性



3 OLFcr734是Asprosin的受体

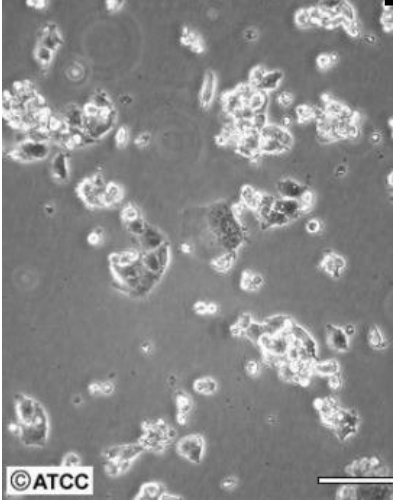


4 Asprosin激活OLFcr734-偶联的cAMP信号并促进葡萄糖生成



5 Asprosin / OLFcr734信号轴有助于在禁食期间产生葡萄糖

结论一：O1fr734缺乏减少葡萄糖生成



HepG2细胞

本图片源于网络

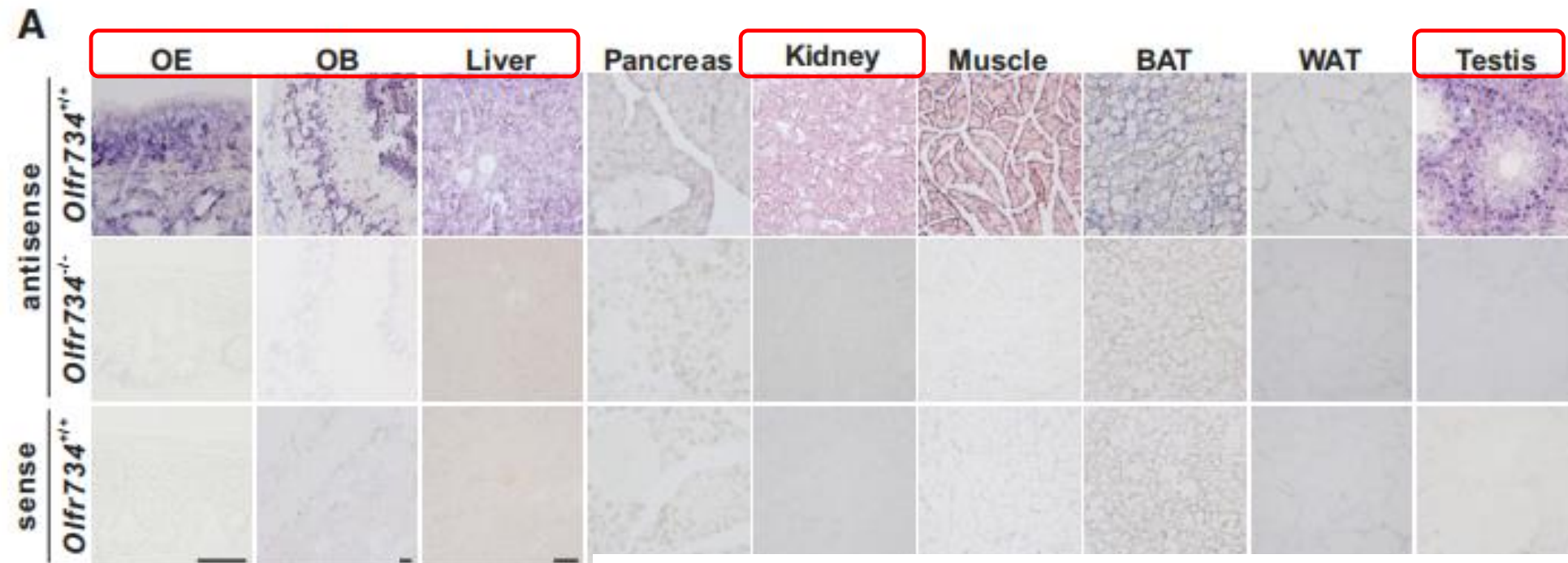
- 1, HepG2来源于肝母细胞瘤, 适合用于肝细胞代谢的研究
- 2, 可以稳定转化和PCK1启动子连接的 luciferase reporter gene

将728个人类的G蛋白偶联受体基因的siRNA和一个空载: RSV-Luc转染到HepG2细胞中

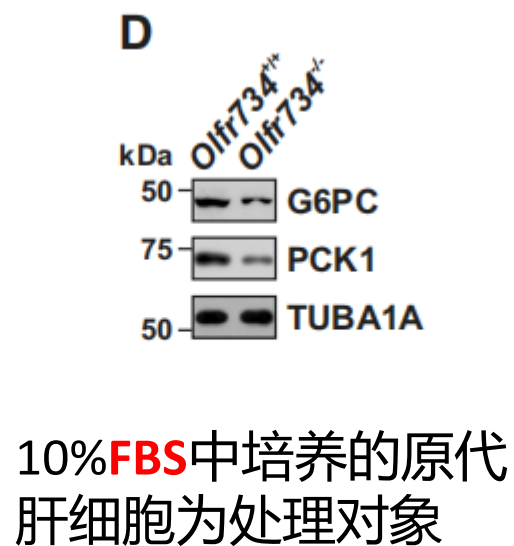
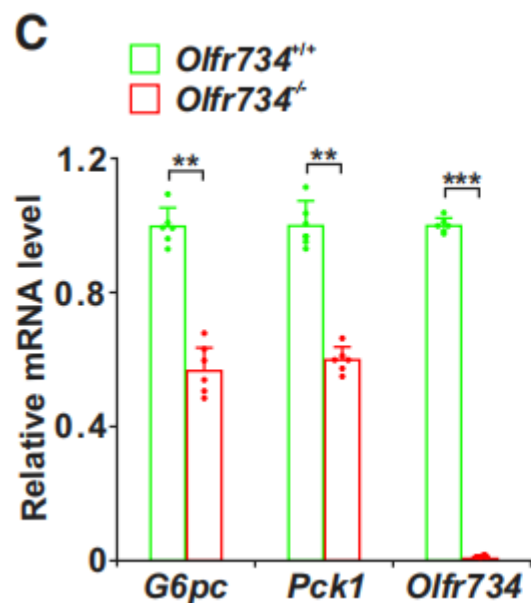
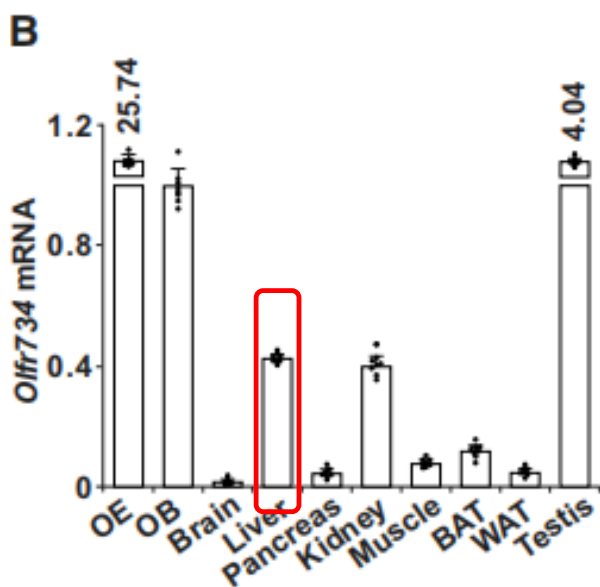
鉴定出OR4M1:
敲降后 *Pck1*-Luc的活性显著下降

根据Asprosin的特性来寻找受体:
糖异生

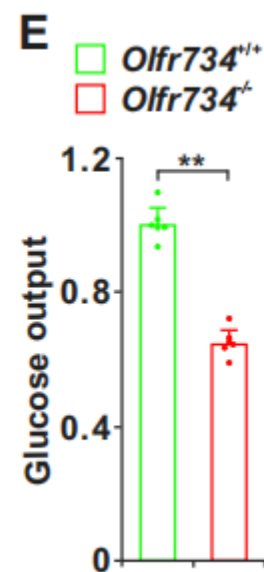
结论一：Olf734缺乏减少葡萄糖生成



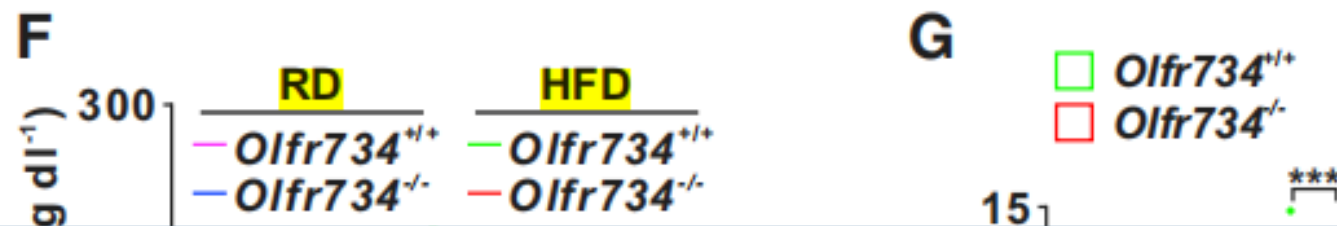
为了建立 Olf734和糖异生之间的关系, 进行了组织分布实验



10%FBS中培养的原代肝细胞为处理对象



结论一：Olfr734缺乏减少葡萄糖生成



作者首先从原位杂交、基因层面、蛋白层面、血糖含量、丙酮酸耐量以及高胰岛素-正常葡萄糖钳夹技术以及先前的G蛋白偶联受体的siRNA筛选实验显示：

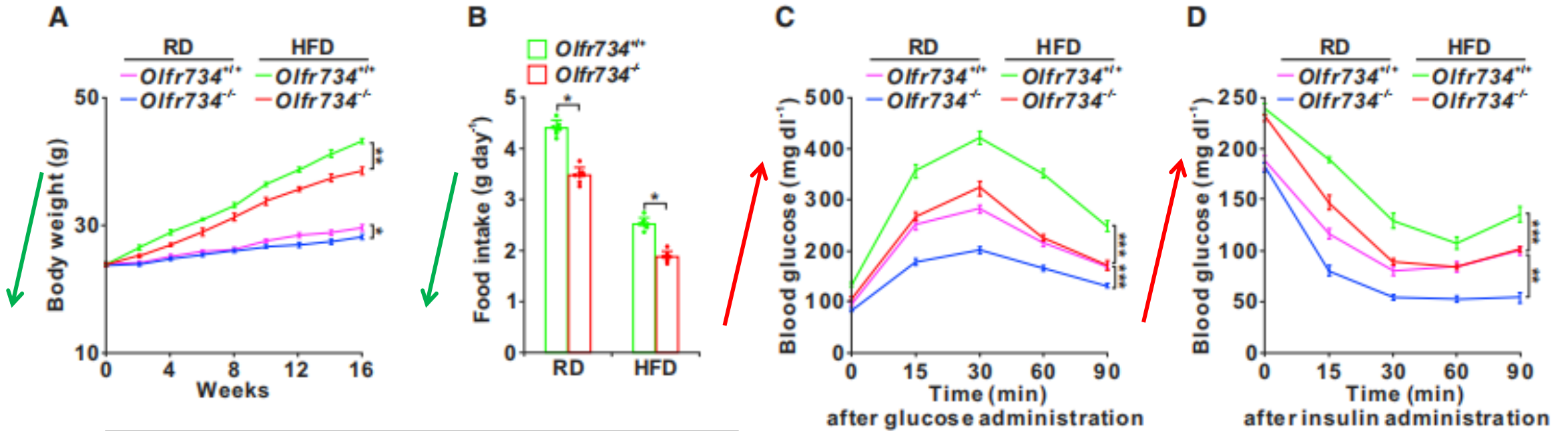
OR4M1/OLFR734在肝细胞和小鼠中均促进糖原生成。

丙酮酸耐量实验原理：

丙酮酸是糖异生的底物，用丙酮酸或丙酮酸钠盐注射后通过测量小鼠血糖上升幅度评估小鼠的糖异生能力。

高胰岛素 - 正常葡萄糖钳夹技术 测定肝糖生成量。
敲除小鼠的肝糖生成显著降低

结论二：Olf734基因敲除可改善胰岛素敏感性



Asprosin与食欲相关

葡萄糖耐量

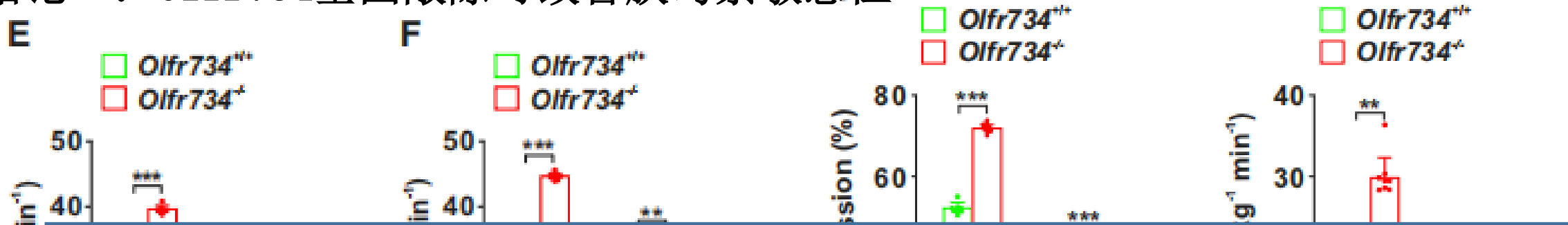
胰岛素敏感性

条件:

分别用正常饮食和高脂饮食饲喂16周

对于Olf734受体缺失小鼠而言，葡萄糖耐量上升，胰岛素敏感性增强

结论二：Olfcr734基因敲除可改善胰岛素敏感性



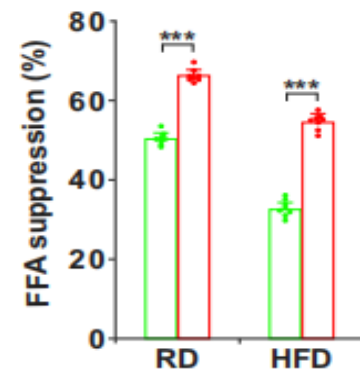
实验显示：

OLFR734基因是肝糖生成的正调控因子，是胰岛素敏感性的负调节因子。

葡萄糖输注速率=体内所有组织的葡萄糖摄取量

葡萄糖处理率增加
缺陷鼠的胰岛素敏感性增强

代表着缺陷鼠的胰岛素敏感性增强

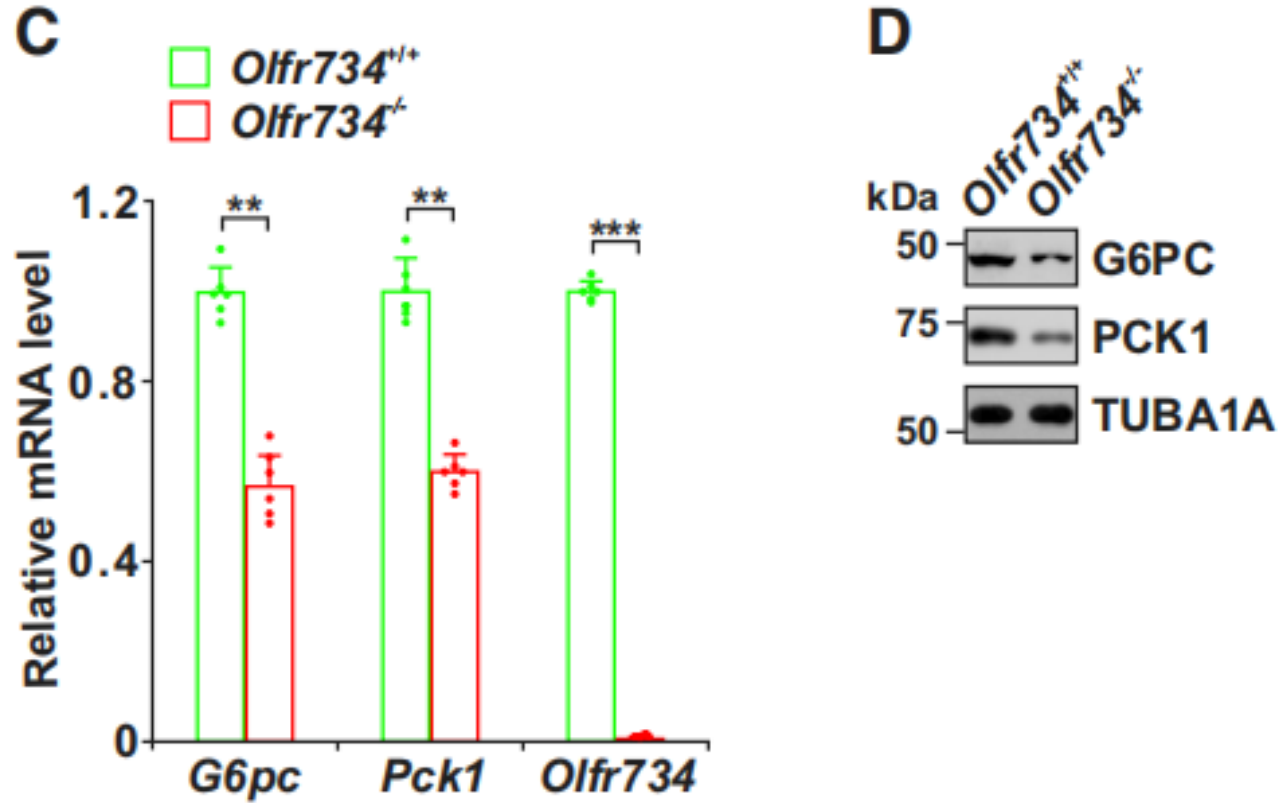


(HGP)增加:FFA升高可促使肝糖异生。而在胰岛素处理后，敲除鼠FFA受更高的抑制，即糖异生下降，胰岛素敏感度增加（同样的胰岛素量，敲除鼠血糖含量下降更多）

率增

出

结论三：Olfr734是Asprosin的受体



从图中可以看出，在10%FBS中培养的原代肝细胞，KO鼠的G6pc和Pck1下调，证明在FBS中存在OLFR的激动剂

通过构建**CRE-Luc**来评估GPCR介导的cAMP信号通路。构建OR4M1和OLFR734载体并转染到HEK293T细胞中，在N端连上一个Rho，有助于ORs的质膜转运

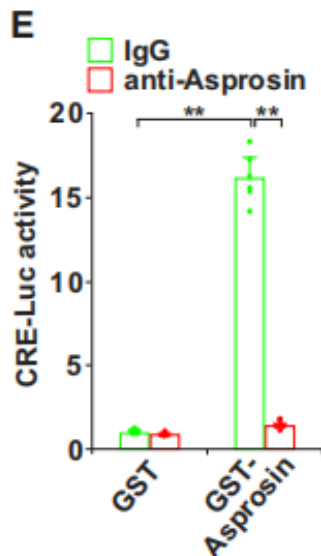
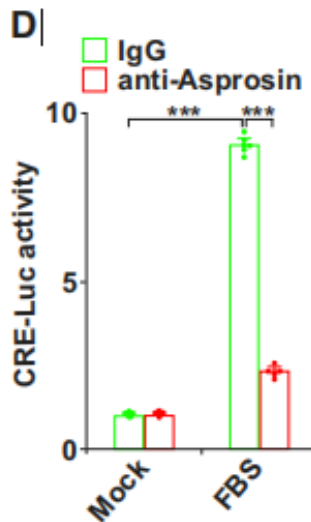
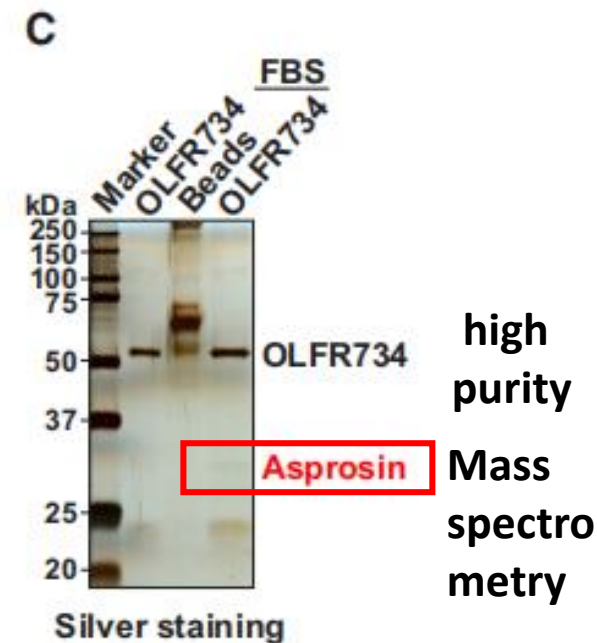
结论三：Olfr734是Asprosin的受体

Agonist

A
 Con
 Rho-OR4M1

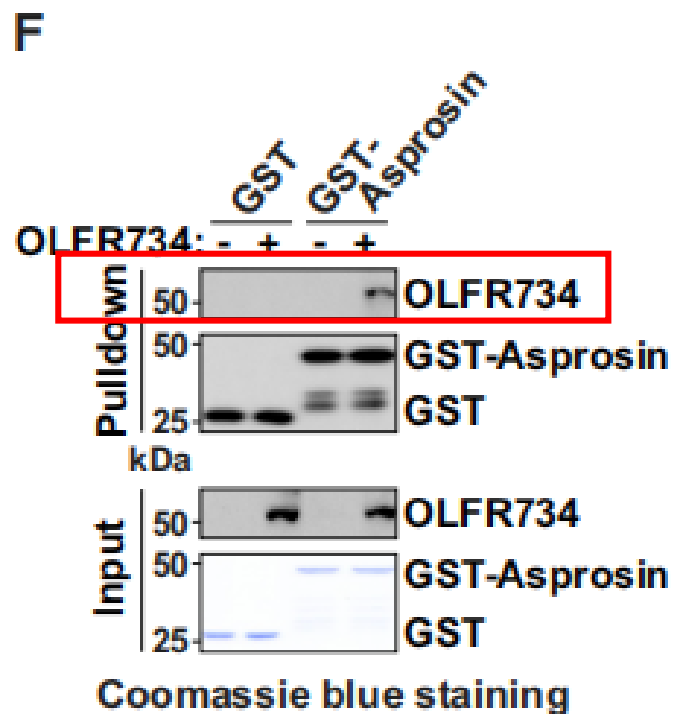
为了分离纯化出FBS中的激动剂，作者从细胞中表达纯化了FLAG-OLFR734-His 蛋白（在昆虫高5细胞，用杆状病毒载体表达）然后以纯化出来的FLAG-OLFR734-HIS蛋白做诱饵，通过pull down实验来钓FBS（10kda以上）中的激动剂

B
 pLKO
 OR4M1 shRNA



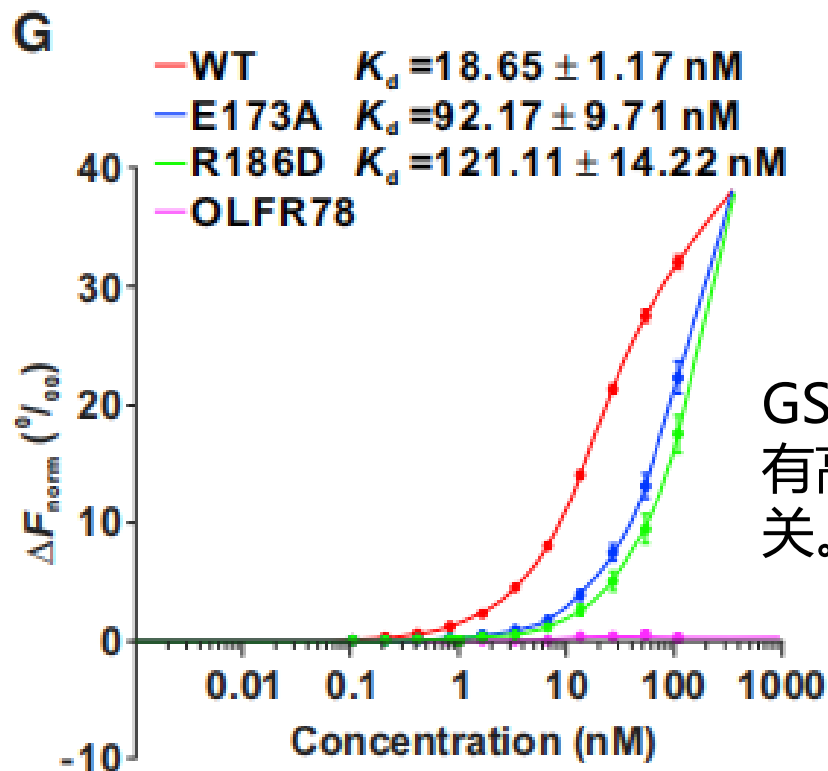
- (A) Effect of FBS on CRE-Luc activity in HEK293T cells with overexpression of OR4M1. PK, proteinase K.
- (B) Effect of FBS on CRE-Luc activity in HEK293T cells with shRNA knockdown of OR4M1. PK, proteinase K.
- (C) Silver staining showing pull down of FLAG-OLFR734-His in FBS.
- (D) Effect of FBS on CRE-Luc activity in HEK293T cells with stable expression of OR4M1 in the presence or absence of Asprosin antibody.
- (E) Effect of Asprosin on CRE-Luc activity in HEK293T cells with stable expression of OR4M1 in the presence or absence of Asprosin antibody.

结论三：Olfr734是Asprosin的受体



GST pull-down assay showing the interaction between GST-Asprosin and **Rho-OLFR734** in **HEK293T cells**.

反向证明：利用Asprosin做饵来钓HEK293T里的OLFR734 发现仍然可以pull down下来

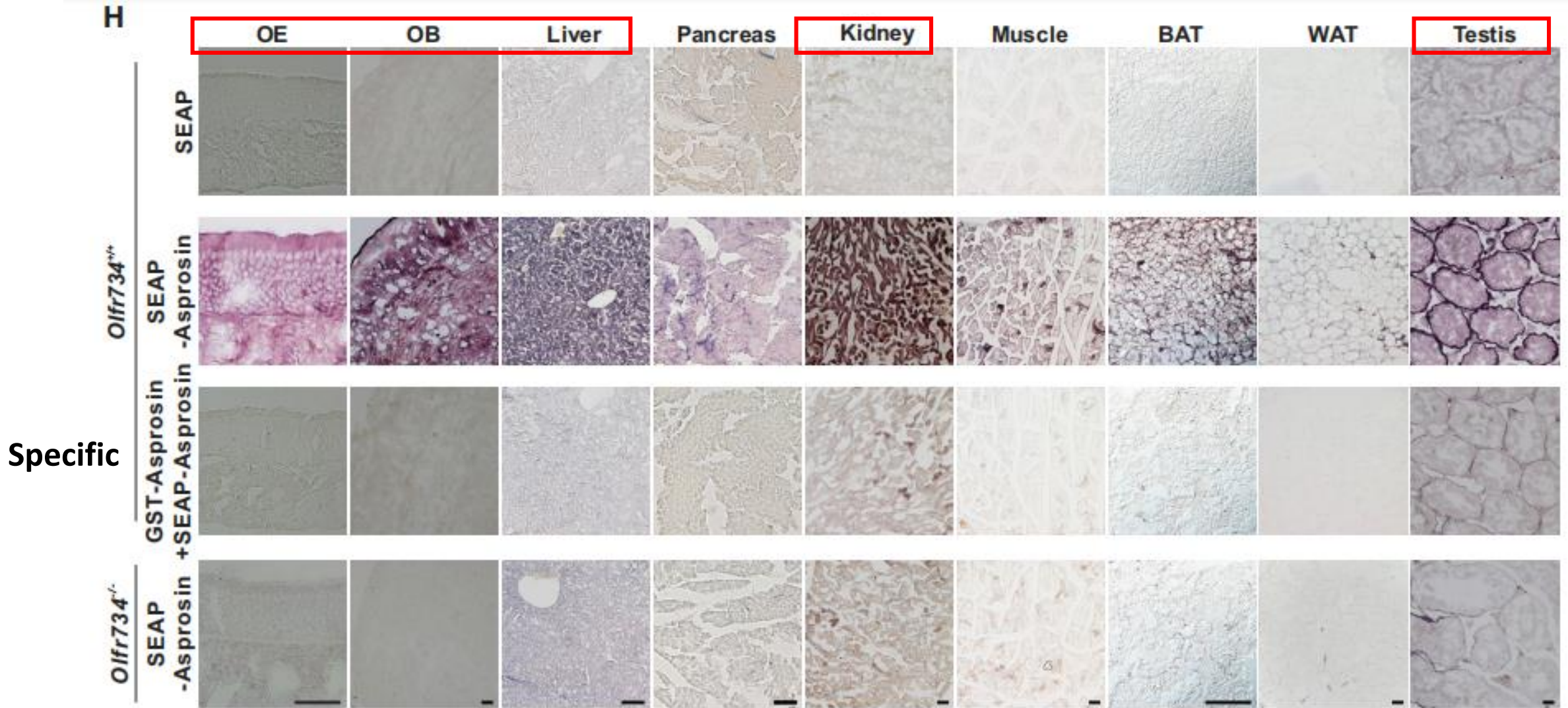


GST-Asprosin对OLFR734具有高亲和力，但与OLFR78无关。

Quantification of the binding affinity between Asprosin and wild-type OLFR734 or its mutants or wild-type OLFR78 by microscale thermophoresis (MST).

微量热涌动仪

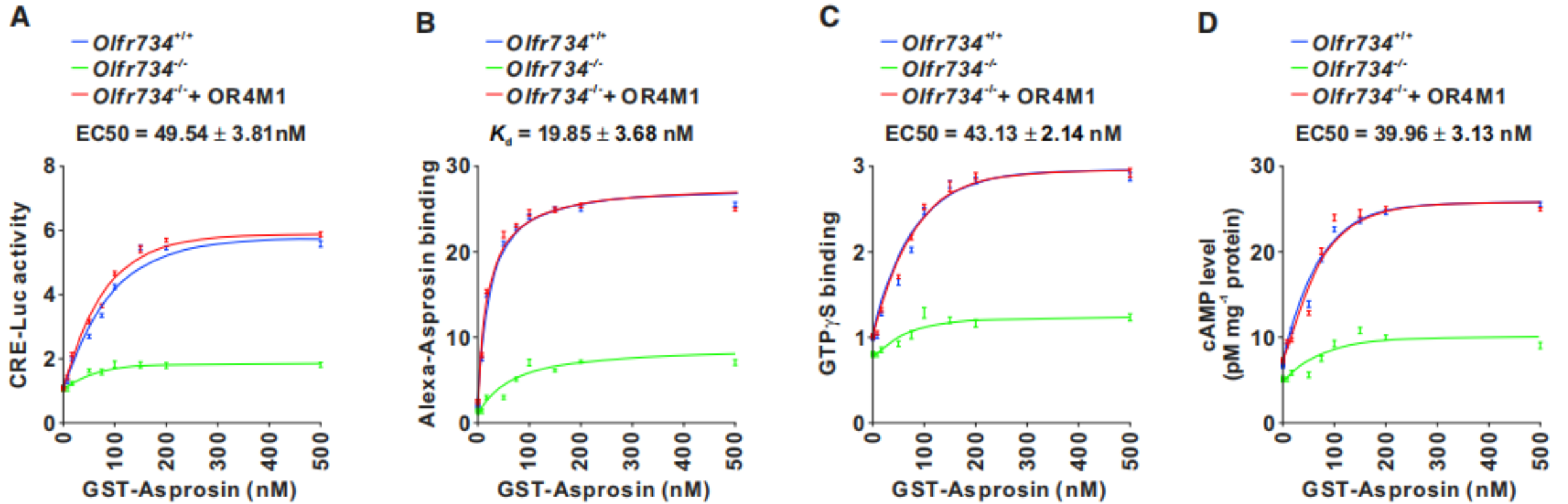
结论三：Olfr734是Asprosin的受体



他们构建了一种SEAP（碱性磷酸酶）标记的Asprosin，通过冷冻切片来检测碱性磷酸酶的活性。

the target tissues of Asprosin.

结论三：Olfr734是Asprosin的受体



Asprosin在WT原代肝细胞中增强CRE-Luc的活性，但在Olfr734敲除鼠的肝细胞中没有增强

Alexa Fluor 647标记的饱和曲线

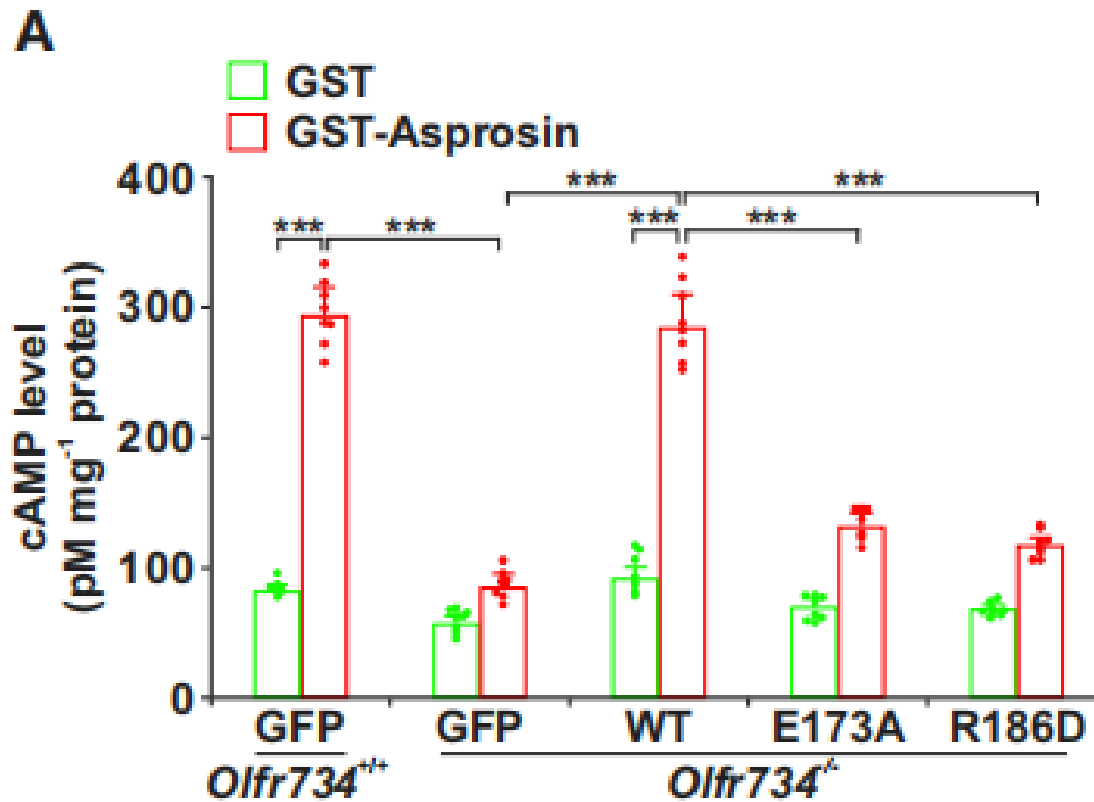
GTPγS的结合实验可以分析G蛋白偶联受体的配体结合效力

第二信使cAMP的水平

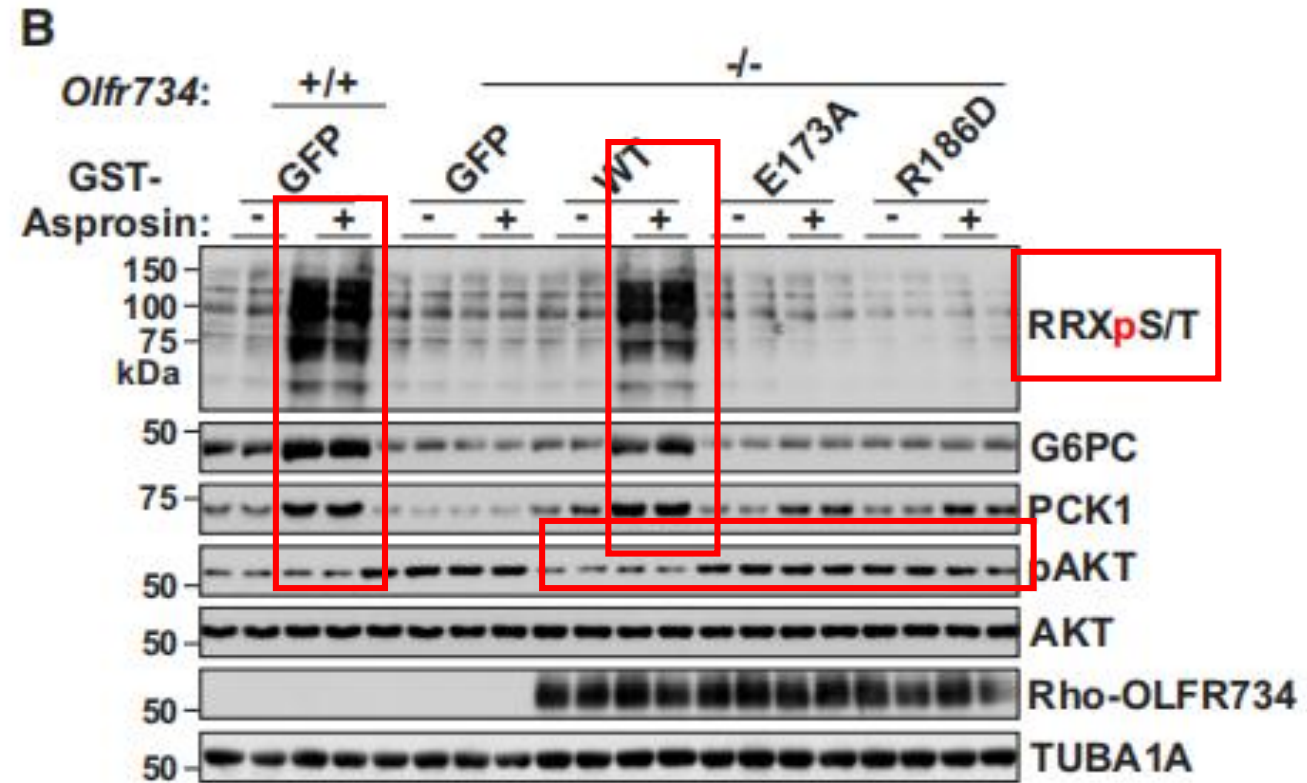
前文已描述CRE-Luc用来评估cAMP信号通路

结论四：Asprosin激活OLFR734-偶联的cAMP信号并促进葡萄糖生成

由于从上述实验中已经证明，通过Asprosin与OLFR734的结合可以激活CRE-Luc，那是否Asprosin是通过了OLFR734来促进葡萄糖生成呢？

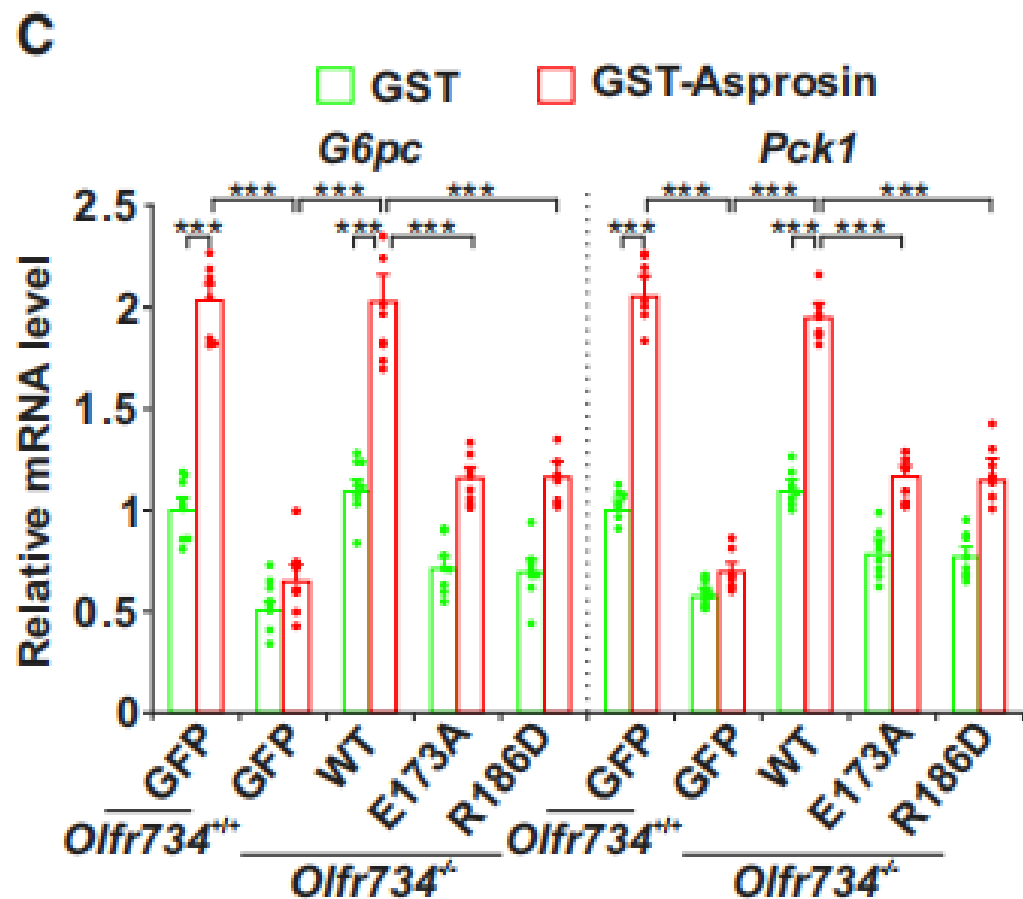


野生型和缺陷型小鼠对肝脏提取物中cAMP的影响

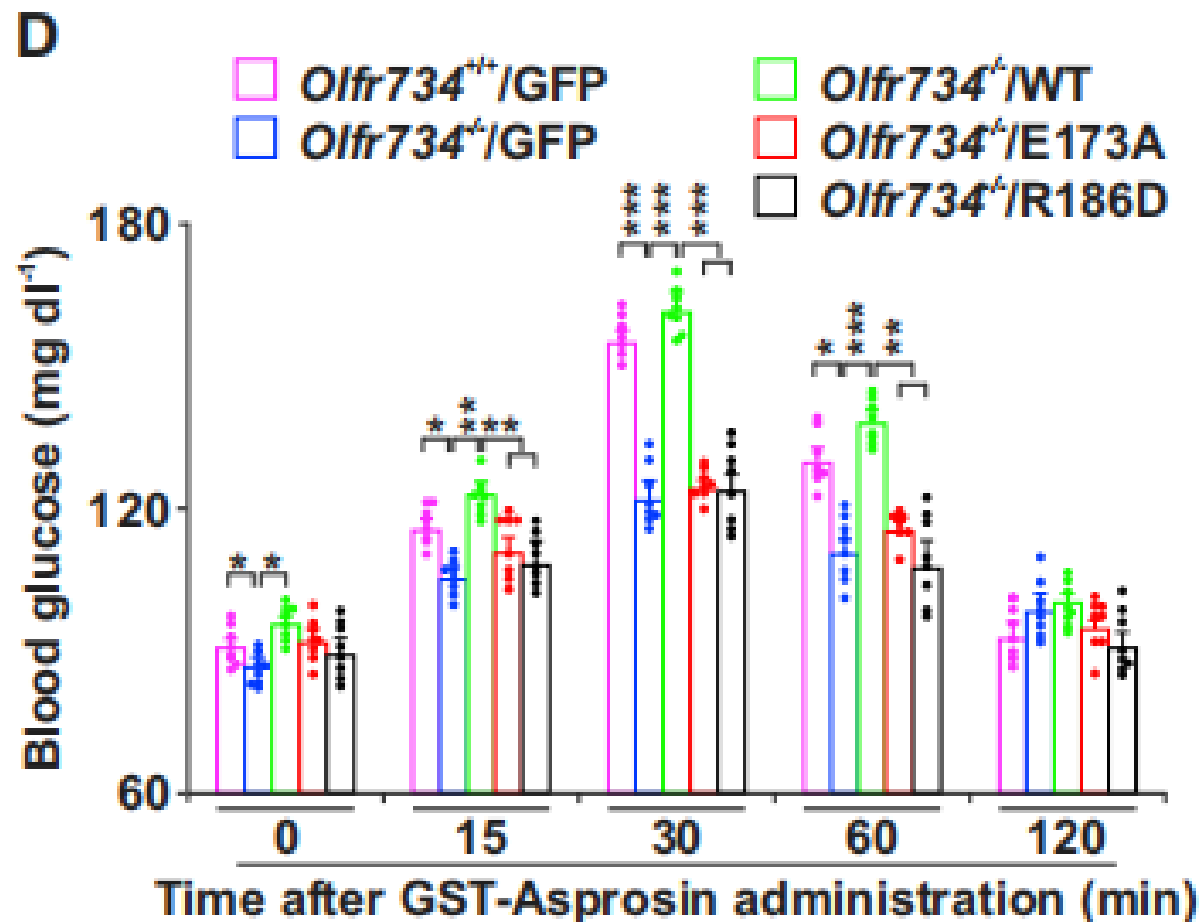


通过肝脏提取物中的PKA底物抗体和糖异生酶（G6PC和PCK1）的免疫印迹评估PKA活性

结论四：Asprosin激活OlfR734-偶联的cAMP信号并促进葡萄糖生成

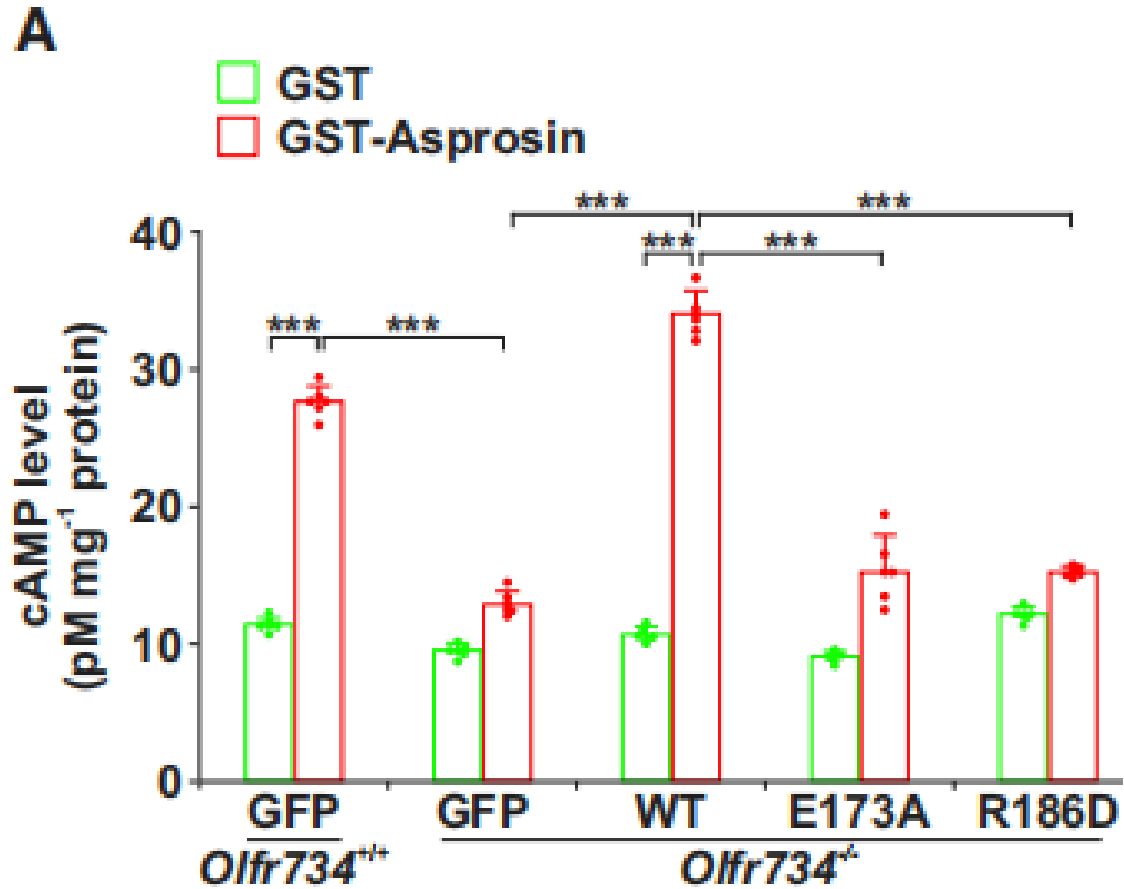


肝脏提取物中糖异生基因 (G6pc和Pck1) 的相对mRNA水平

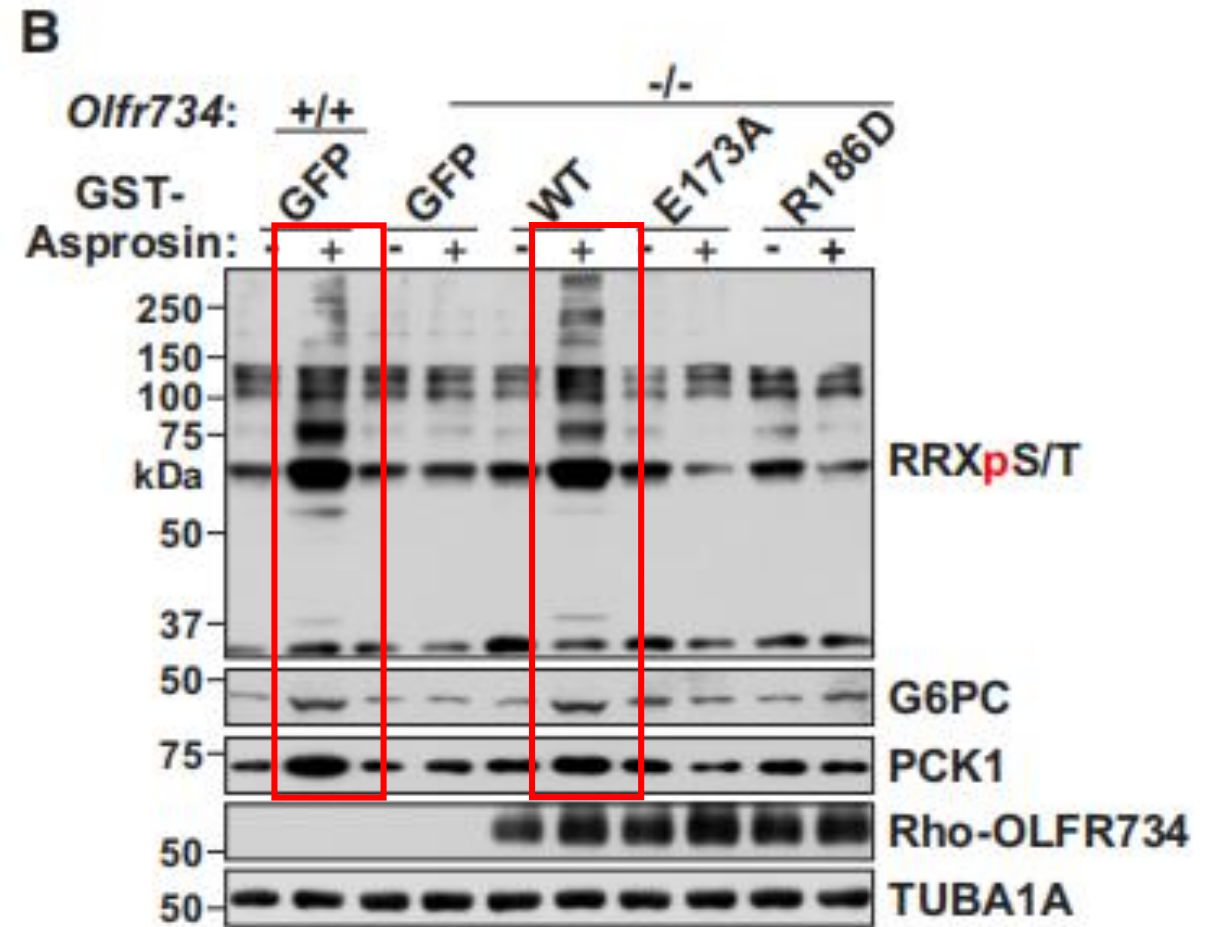


肝脏提取物中糖异生基因 (G6pc和Pck1) 的血糖水平

结论四：Asprosin通过小鼠原代肝细胞中的OLFR734促进葡萄糖生成

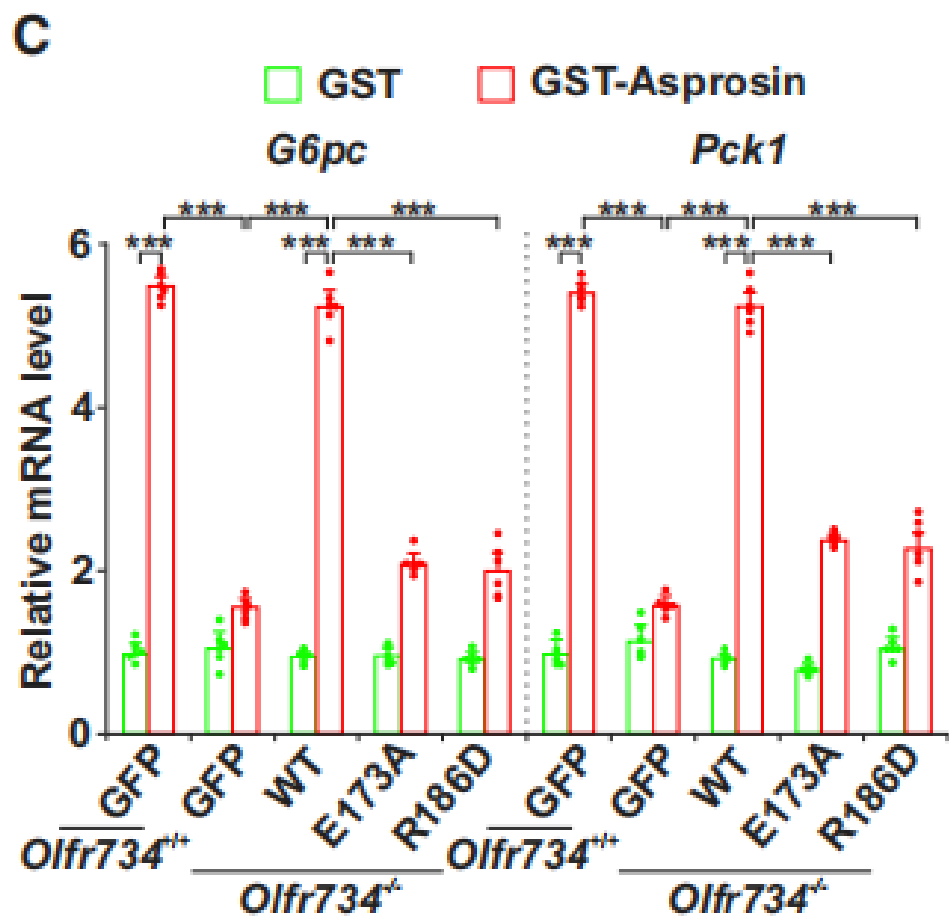


野生型和缺陷鼠对Asprosin刺激的cAMP水平的影响

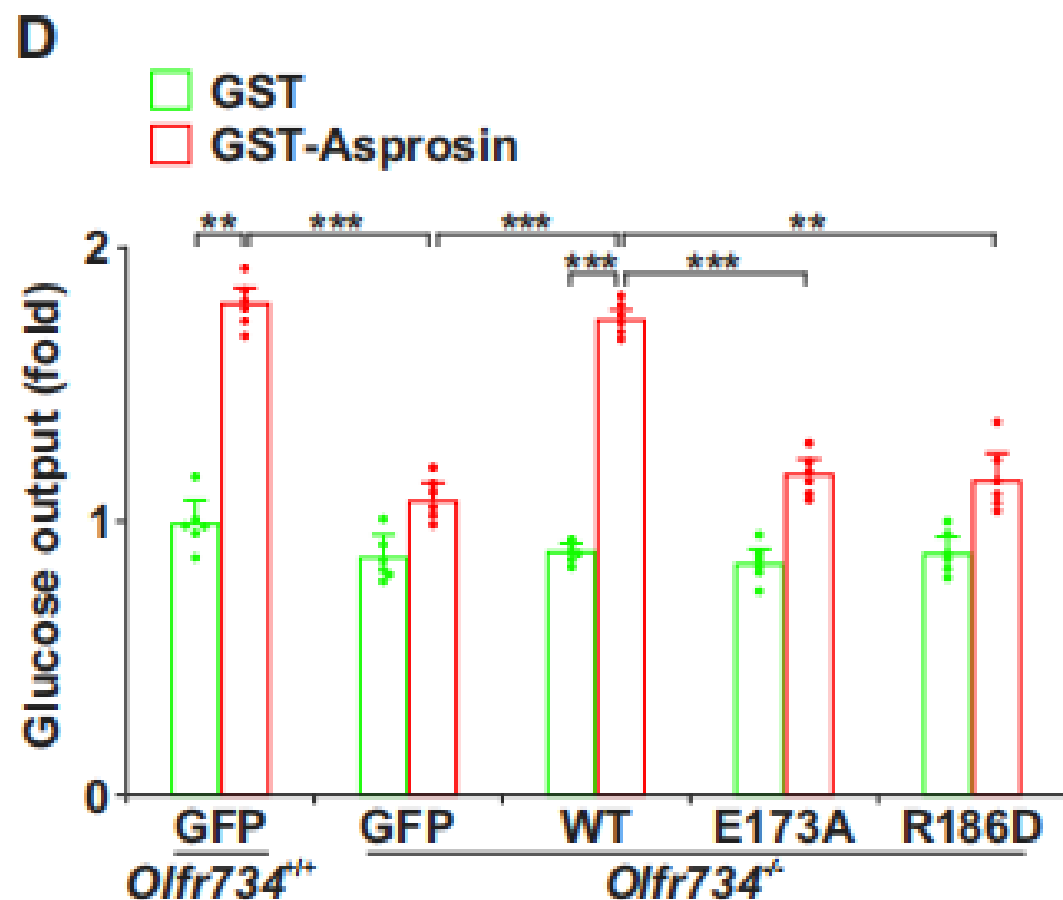


PKA底物抗体的Western blot

结论四：Asprosin通过小鼠原代肝细胞中的OLFR734促进葡萄糖生成

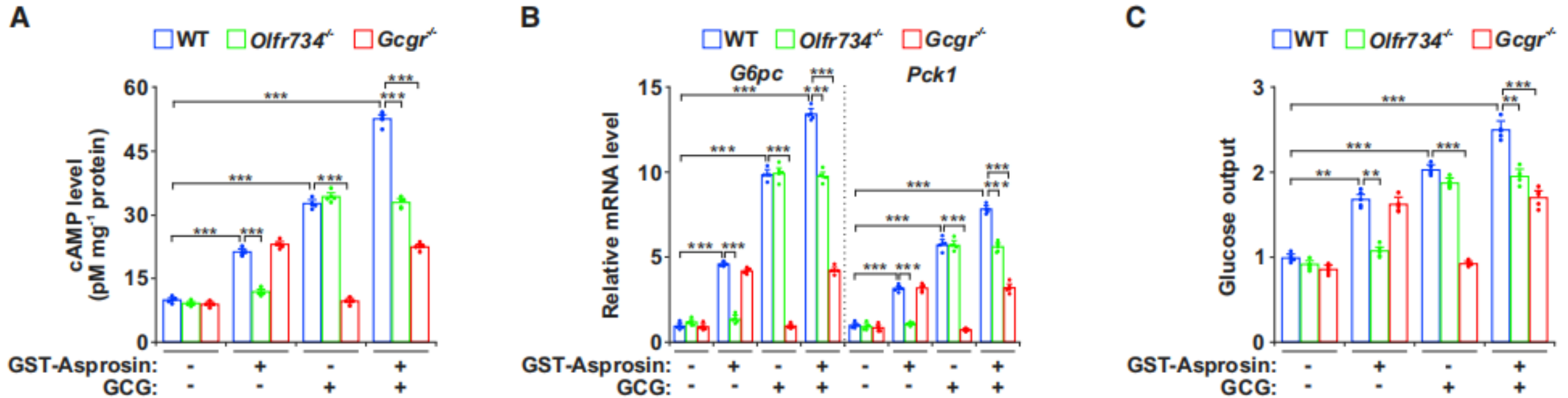


糖异生基因
(*G6pc*和*Pck1*)
的表达



葡萄糖产生量

结论五: Asprosin / OLF734对空腹诱导的cAMP信号和葡萄糖产生的贡献

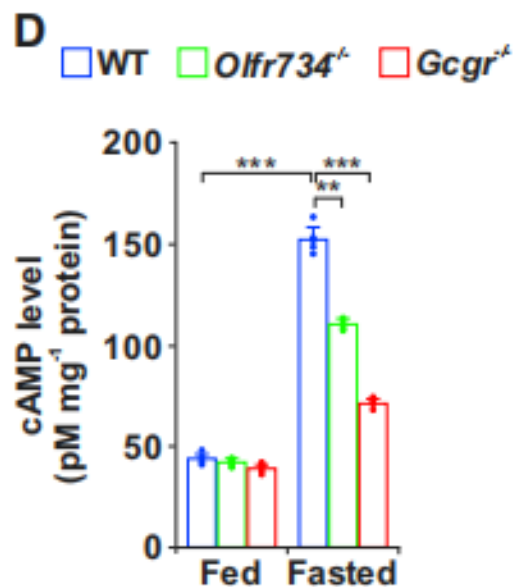


Asprosin或GCG对野生型、Olfr缺陷型, Gcgr缺陷型小鼠的cAMP水平 (原代肝细胞)

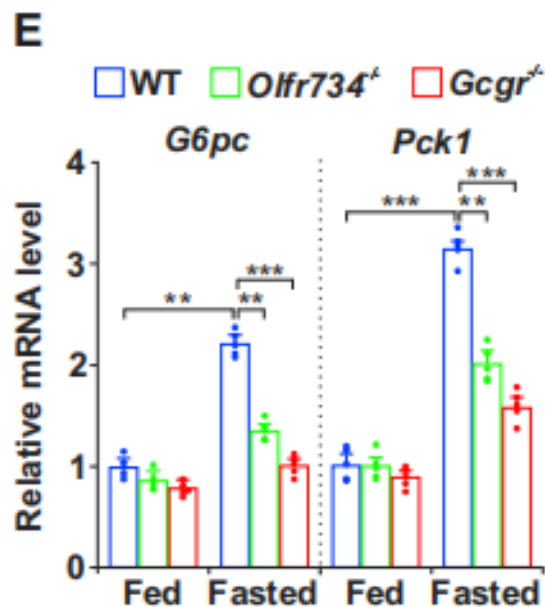
Asprosin或GCG对野生型、Olfr缺陷型, Gcgr缺陷型小鼠的mRNA表达水平 (原代肝细胞)

Asprosin或GCG对野生型、Olfr缺陷型, Gcgr缺陷型小鼠的血糖输出水平 (原代肝细胞)

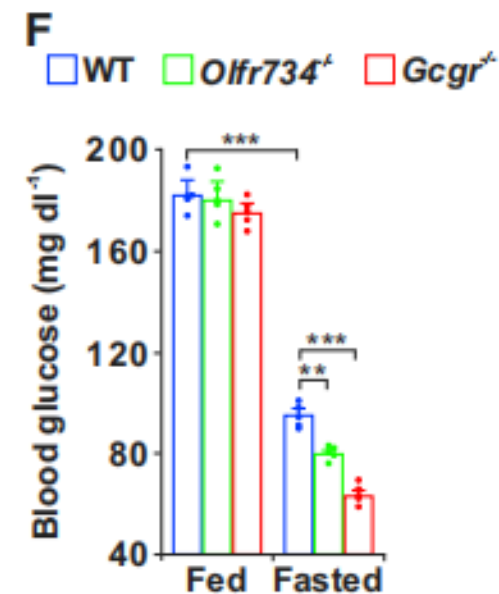
结论五: Asprosin / OLF734对空腹诱导的cAMP信号和葡萄糖产生的贡献



Asprosin或GCG对肝脏cAMP水平的影响



Asprosin或GCG肝脏提取物中糖异生基因(G6pc和Pck1)表达的影响



Asprosin或GCG对血糖水平的影响

实验结论与心得体会：

该研究首次确定了嗅觉受体OLFR734作为Asprosin的受体在饥饿情况下对维持机体葡萄糖稳态的关键作用，为糖尿病的治疗提供了一个潜在的药物靶点，同时拓展了嗅觉受体的非嗅觉功能。

通过文库筛选、基因敲除找到联系、建立联系、体外结合试验、Asprosin通过Olfr734激活下游的cAMP-PKA信号通路及糖异生相关基因表达等方面验证了Olfr734就是Asprosin的受体，其中许多技术对我来说十分新颖，设计实验重复性强，从多个层面验证一个结论，学习到了很多知识。

汇报完毕，请各位老师、
同学批评指正

汇报人：职韶阳
日期：2019.8.4