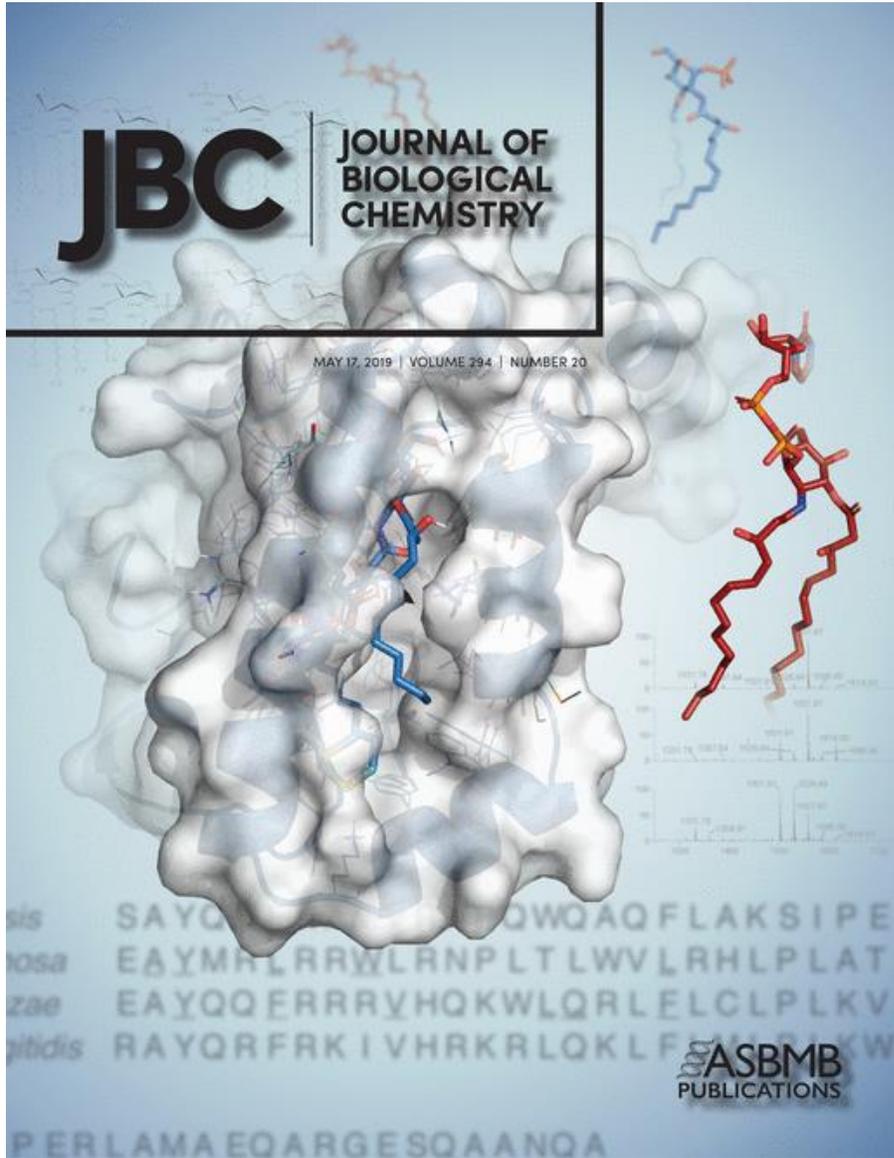


读书报告

汇报时间：2019年5月26日

汇报人：赵文丽



A collagen domain–derived short adiponectin peptide activates APPL1 and AMPK signaling pathways and improves glucose and fatty acid metabolisms

脂联素胶原域衍生的短肽激活 APPL1和AMPK信号通路，改善葡萄糖和脂肪酸代谢

目录
CONTENTS

01

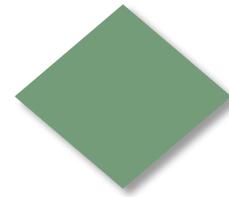
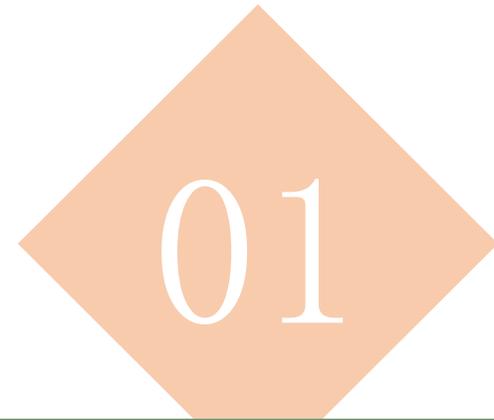
Introduction

02

Research Design and Result

03

Conclusion



Introduction

Introduction

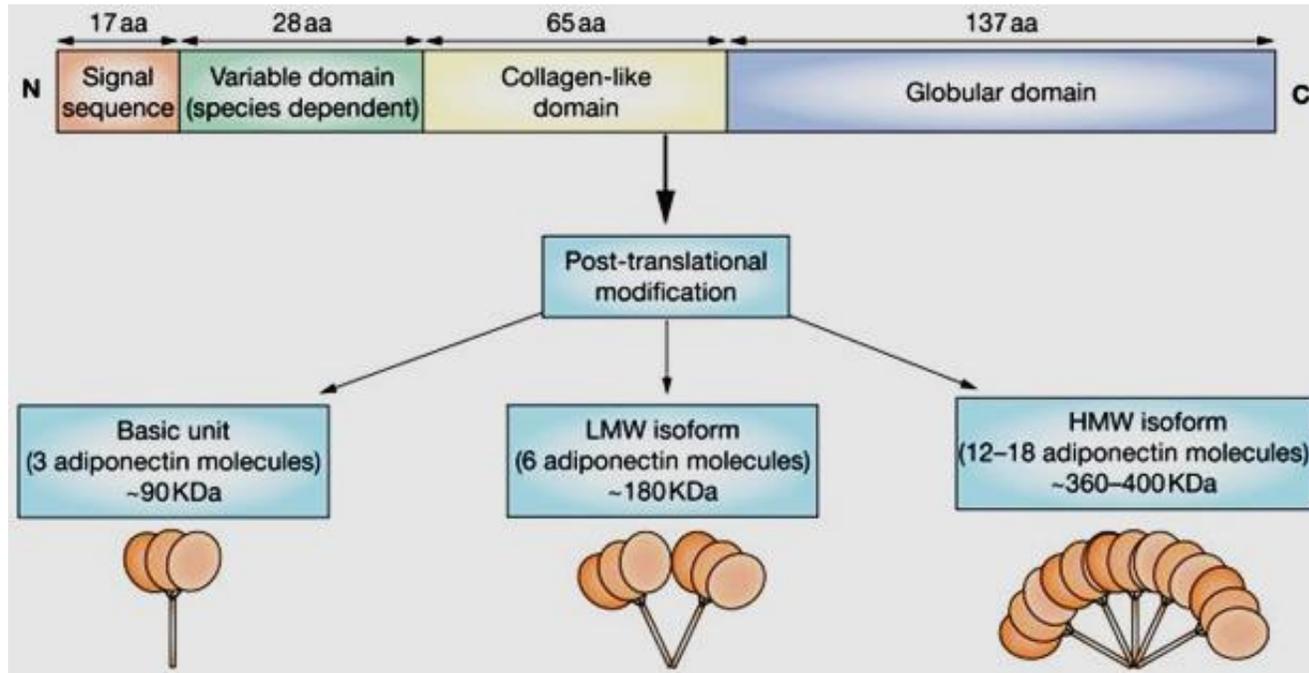
造成2型糖尿病的原因有两个：一个是胰腺 β 细胞产生胰岛素的能力下降；一个是生物体本身的胰岛素抵抗，由于对分泌的胰岛素没有有效的反应，细胞对葡萄糖的摄取减少。

近年来对二型糖尿病研究的热度只增不减。



Introduction

研究表明多种蛋白质可直接或间接地在代谢紊乱中起重要作用，**脂联素**就是其中之一。它可以改善胰岛素抵抗和高甘油三酯症，促进脂肪酸氧化。



- ◆ N端信号肽
- ◆ 可变区
- ◆ 胶原结构域
- ◆ C端球状区

小鼠adiponectin的结构 (参照Goldstein et al.2008)



Introduction

Interestingly, the full length collagen domain peptide showed positive effect on osteoblastic differentiation. Since osteoblast differentiation and type 2 diabetes are closely associated with respect to biochemical pathways/molecular mechanisms. (Jun-ichi *et al.*, 2013)

脂联素的全长胶原域肽对成骨细胞分化有促进作用，并且成骨的细胞分化和2型糖尿病的生物化学途径/分子机制密切相关。目前关于胶原结构域在代谢中的研究还很少。

因此，是否可以从脂联素的胶原结构域来探索对机体代谢的调控作用呢？



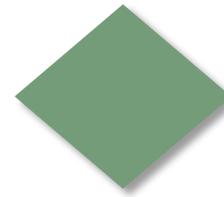
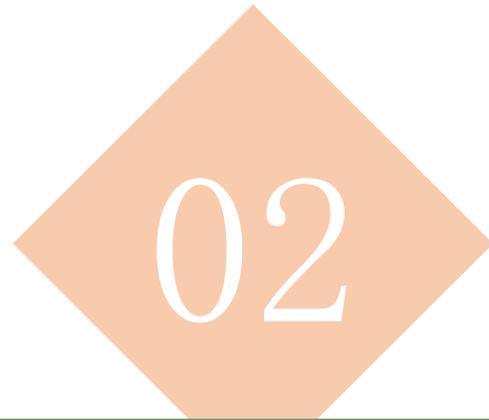


Introduction

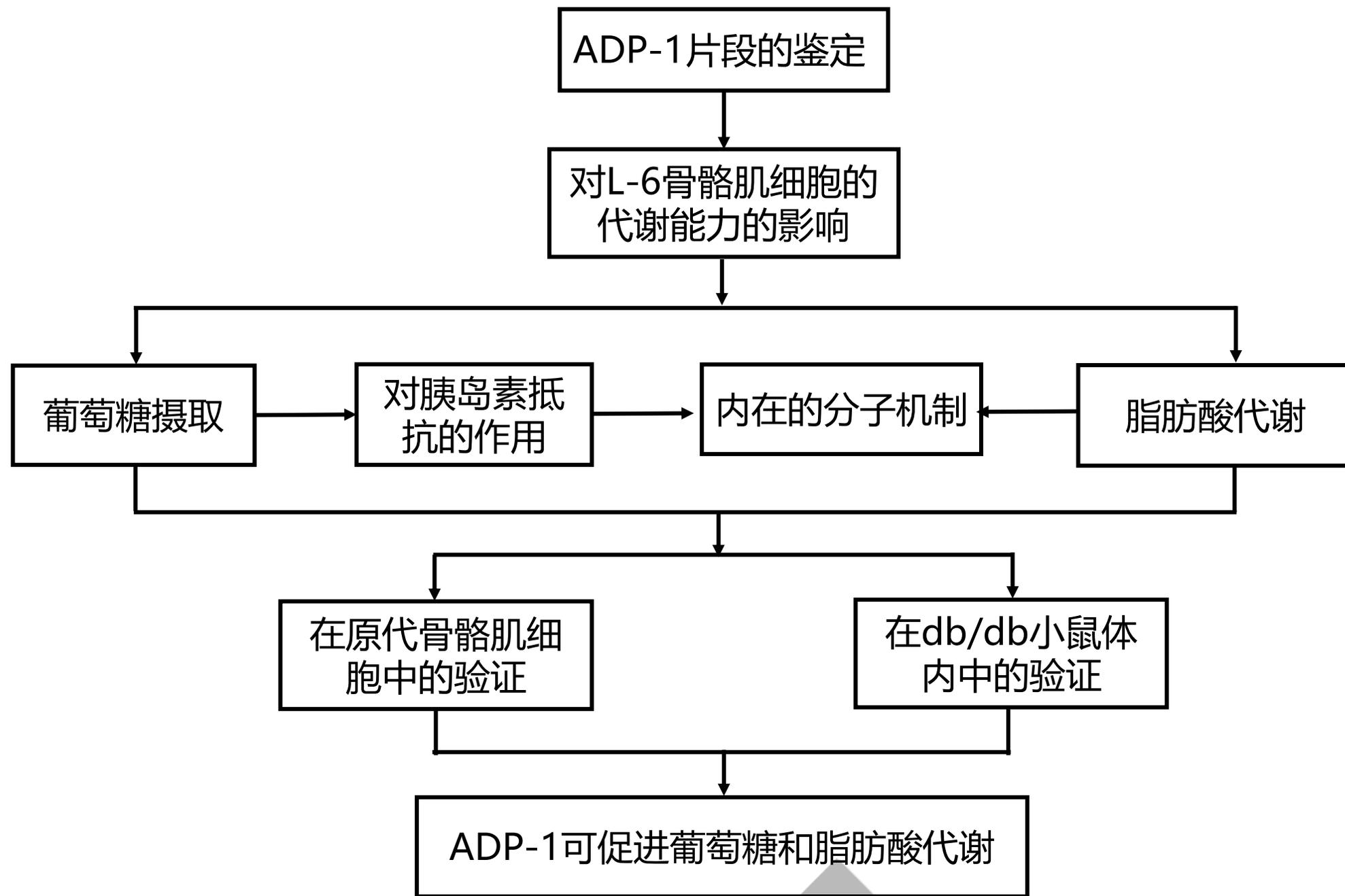
研究内容目的:

为此，作者从脂联素的胶原结构域中找到了一个氨基酸残基42 - 54的对应区域，该区域具有氨基酸寡聚组装的结构基序。

然后通过通过对db/db小鼠骨骼肌细胞(L-6 myotubes)的体外研究、对db/db小鼠原代骨骼肌细胞的体外研究以及对db/db小鼠的体内研究，详细描述了这种13-残留胶原域衍生肽的代谢作用。



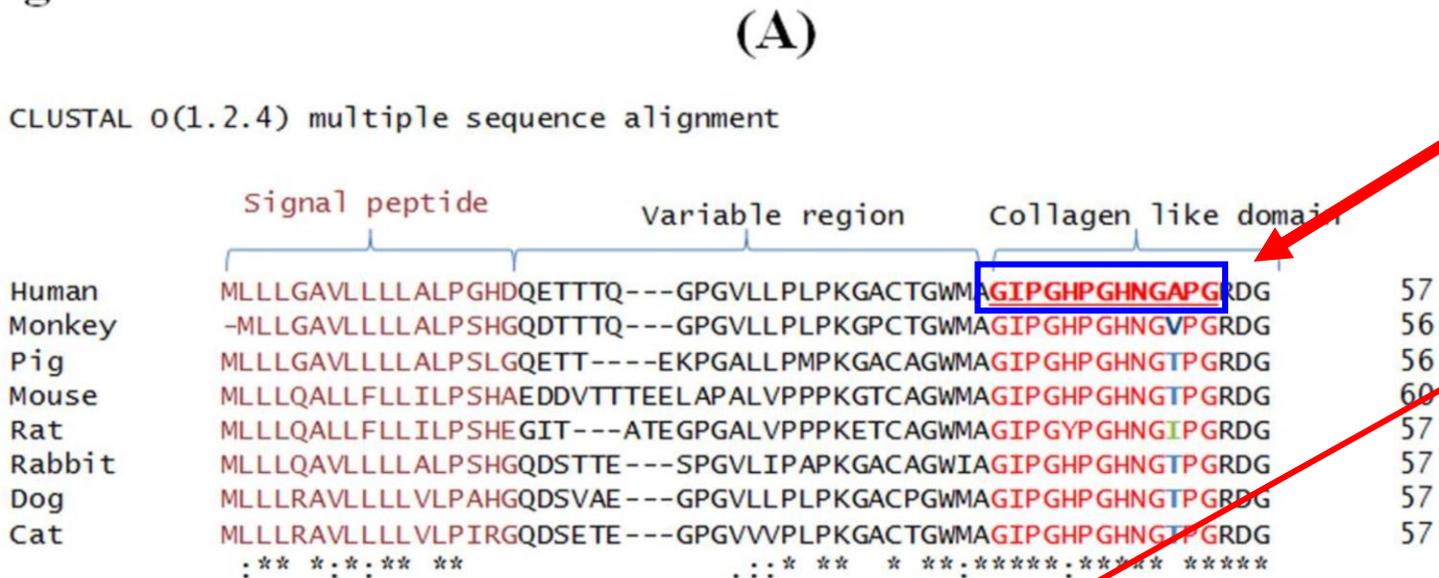
Research Design and Result



Research Design and Result

1. ADP-1片段的鉴定

Figure 1.



在胶原结构域发现了一段保守且特别的片段 (ADP-1)。

2个组氨酸残基 (H)

1个天冬氨酸残基 (N)

4个连续的GXXG序列

3个脯氨酸残基 (P)

与脂联素蛋白的寡聚性密切相关。

(B)

Peptide	Sequence	Calculated mass	Observed mass	Retention Time (min.)
ADP-1	GIPGHPGHNGAPG	1167	1166.5	~ 7-8

Research Design and Result

2. ADP-1对L-6骨骼肌细胞的葡萄糖摄取的影响

脂联素衍生肽ADP-1是否能诱导L-6细胞葡萄糖摄取？

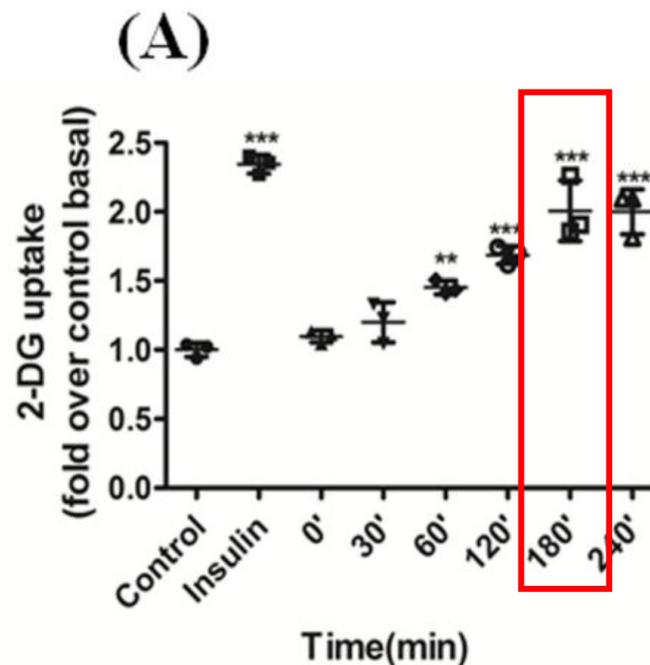
阳性对照：insulin (100nM)与L-6细胞共孵育20min

实验组：ADP-1 (14.3 μ g/ml) 与L-6细胞共孵育不同时间。



测定L-6细胞的葡萄糖摄取能力

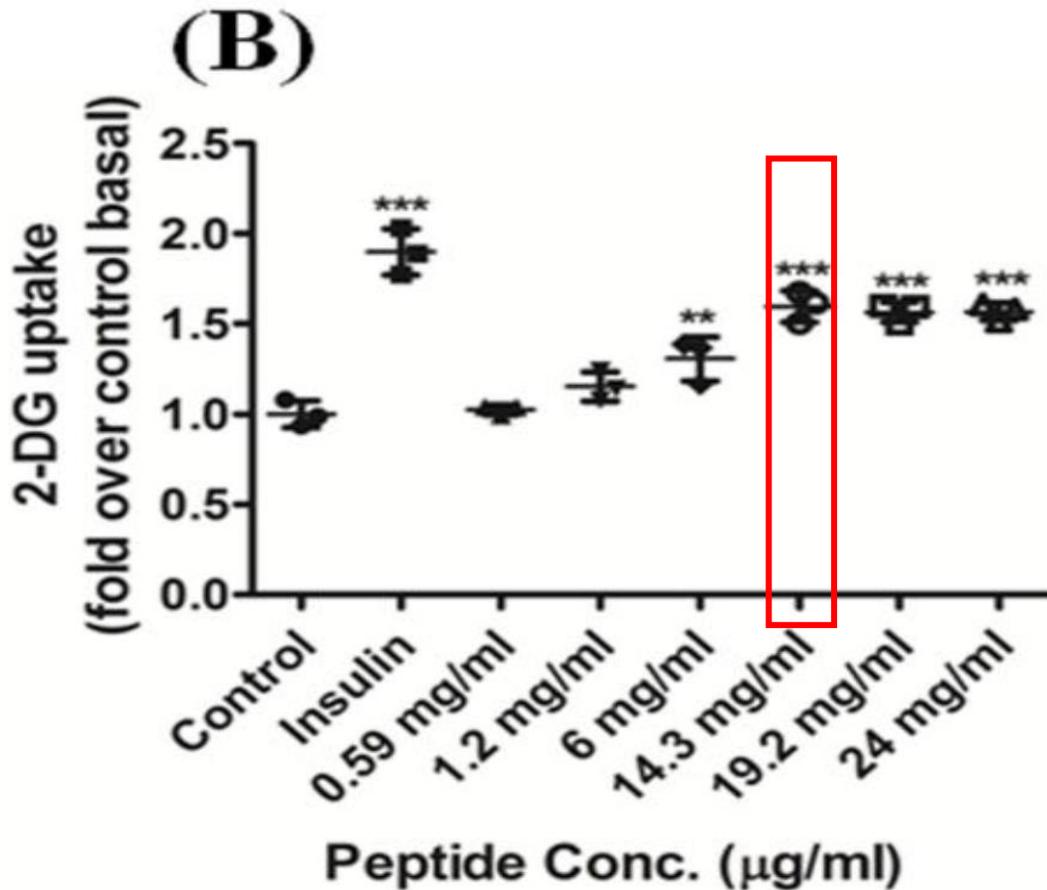
Figure 2.



A图结果表明：与胰岛素相比，ADP-1需要更长的潜伏期，3h才能达到最佳的葡萄糖摄取。

Research Design and Result

2. ADP-1对L-6细胞的葡萄糖摄取的影响



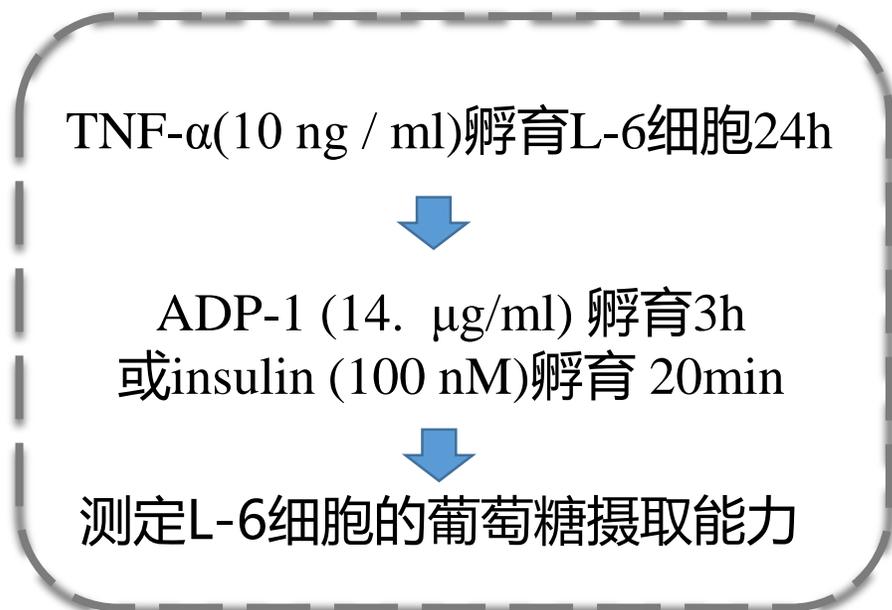
B图结果表明：ADP-1可呈剂量依赖性促进L-6细胞的葡萄糖摄取，且在14.3mg/ml达到最佳。

Research Design and Result

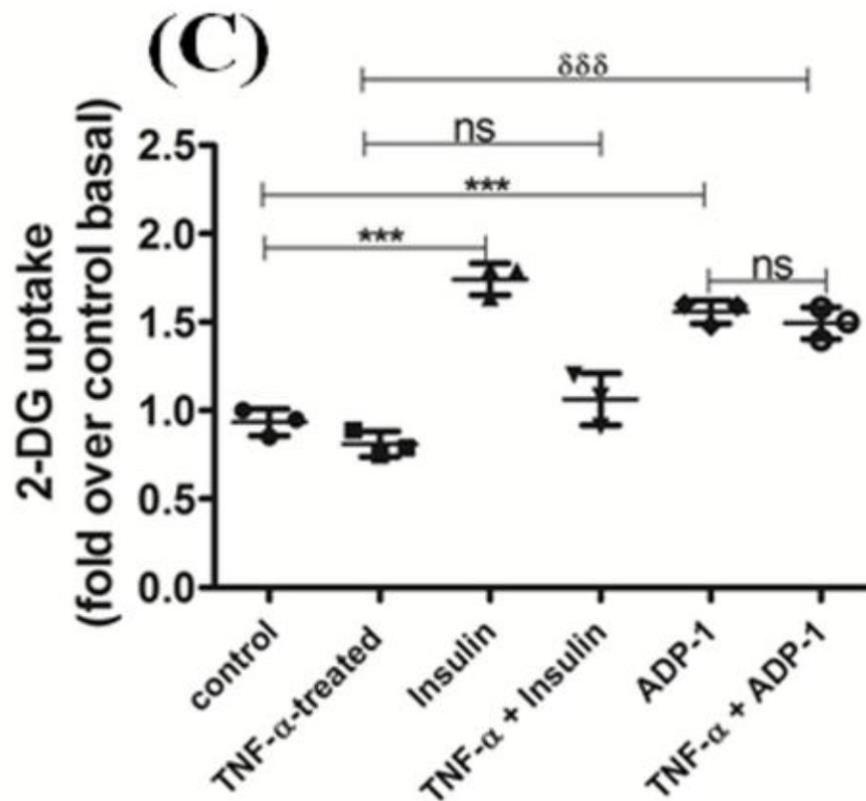
3. ADP-1对TNF- α 处理后的L-6细胞葡萄糖摄取的影响

TNF- α 可以诱导骨骼肌的胰岛素抵抗 (Lorenzo *et al.*,2008) 。

ADP-1是否可以打破这种胰岛素抵抗呢?



ADP-1显著提高了TNF- α 处理的L-6细胞的葡萄糖摄取。说明它可以打破这种胰岛素抵抗。



Research Design and Result

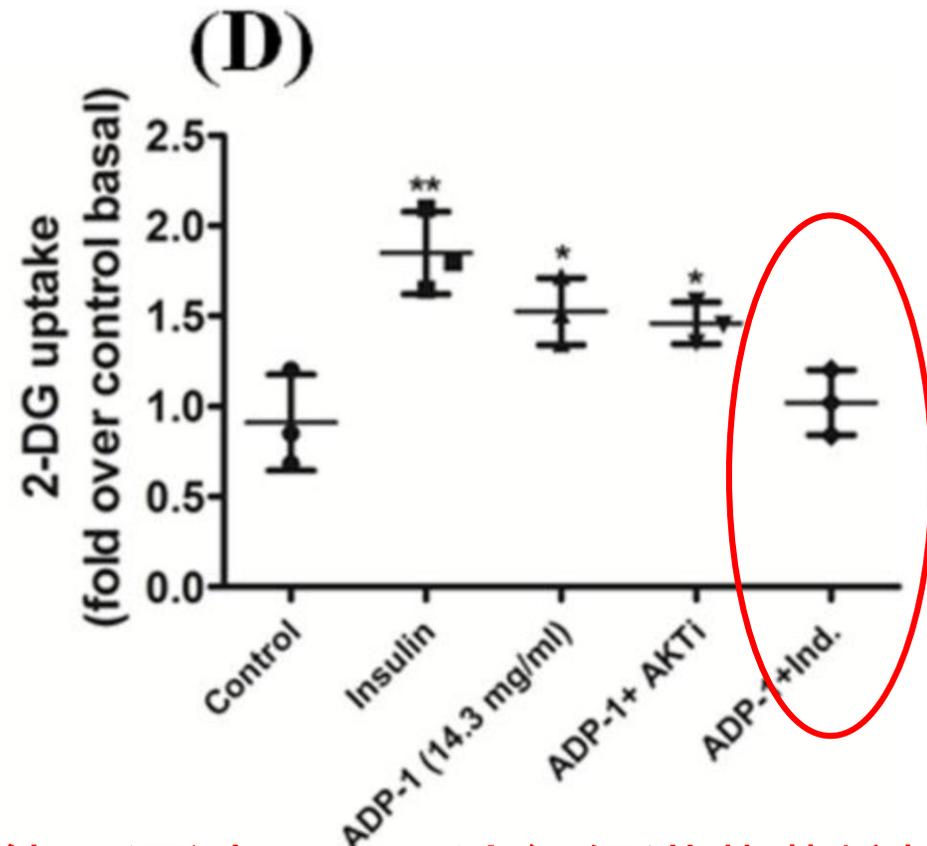
ADP-1促进L-6细胞葡萄糖摄取分子机制是什么？

4. ADP-1在抑制剂存在时对葡萄糖摄取的影响。

- ADP-1 (14.3 $\mu\text{g/ml}$ for 3h)
- **AKT抑制剂** AKT-i (420 nM for 30min)
- **GLUT4抑制剂** indinavir (100 μM for 30min)



分别测定L-6细胞的葡萄糖摄取能力



GLUT4途径显著受到抑制。说明ADP-1可能是通过GLUT4途径促进葡萄糖摄取

Research Design and Result

5. ADP-1对APPL介导的AMPK信号通路的影响

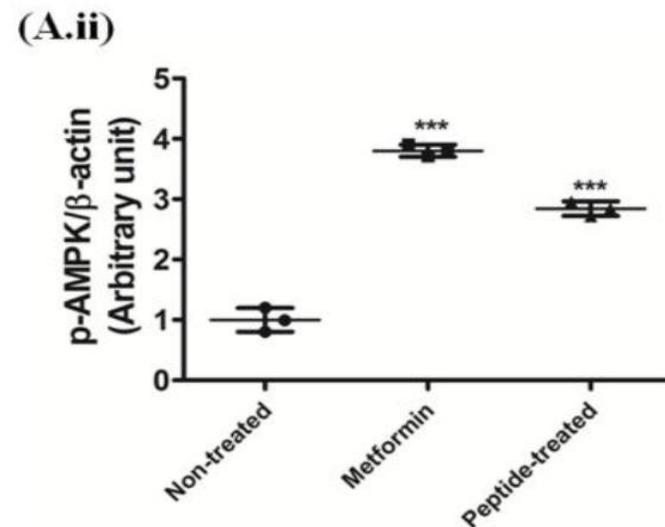
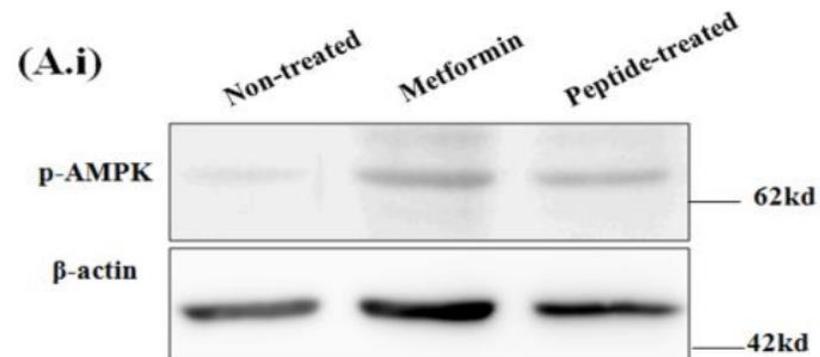
ADP-1是否可以像脂联素一样激活依赖于app11的AMPK通路，而促进葡萄糖摄取呢？



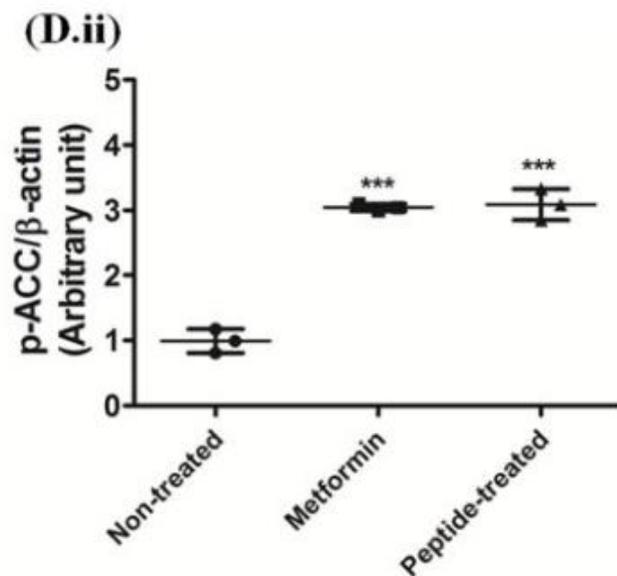
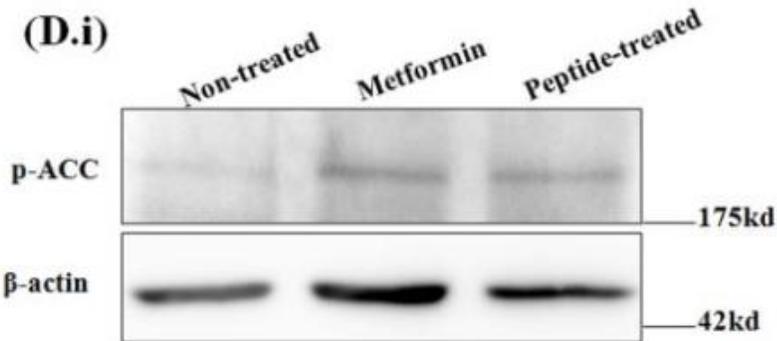
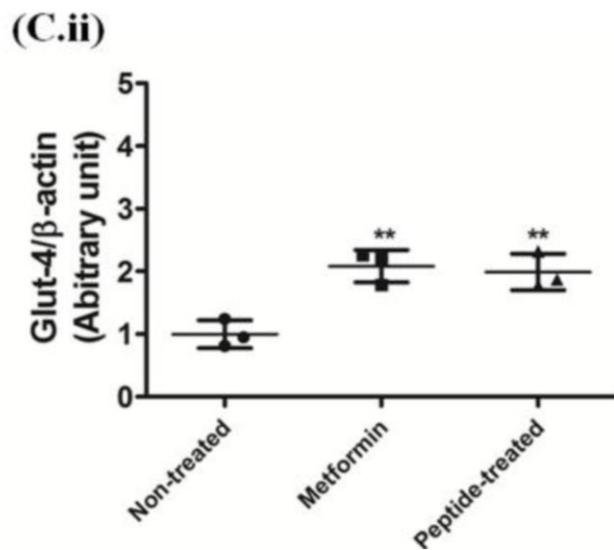
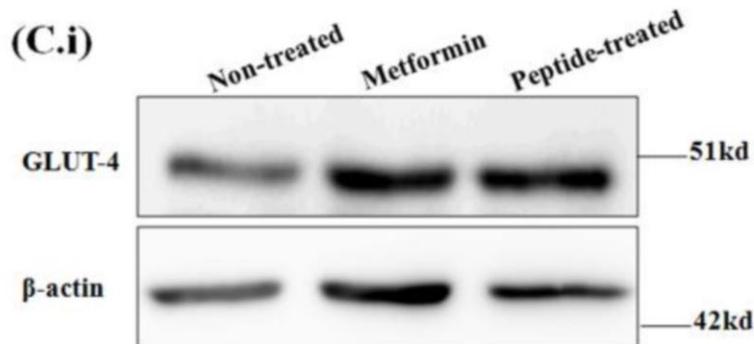
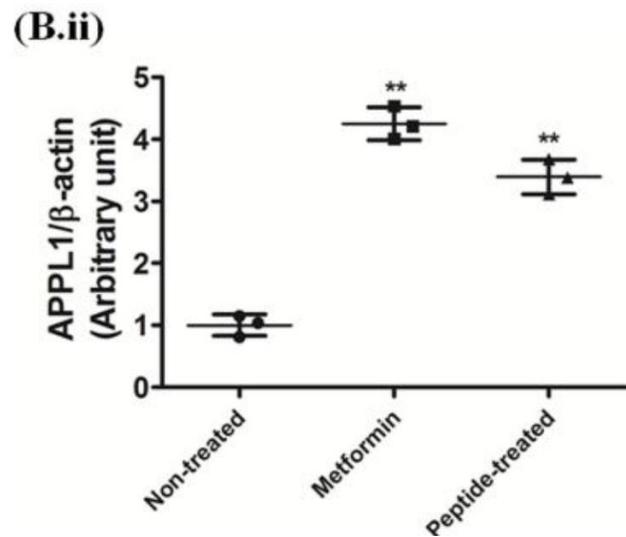
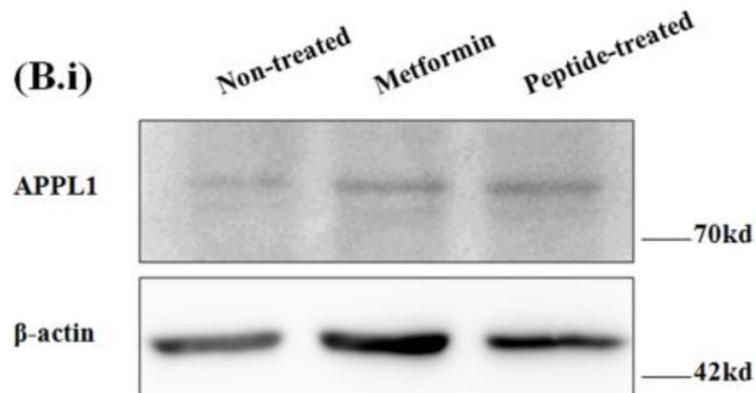
ADP-1孵育L-6细胞3h后，提取总蛋白。
(二甲双胍和未处理的细胞分别为阳性和阴性对照)



测定脂联素信号通路相关标记蛋白的表达。
(p-AMPK、APPL1、GLUT4、ACC)



Research Design and Result



ADP-1可以通过激活APPL1介导的AMPK信号通路促进葡萄糖摄取和脂肪酸代谢。

6. ADP-1对GLUT4mRNA的表达的影响

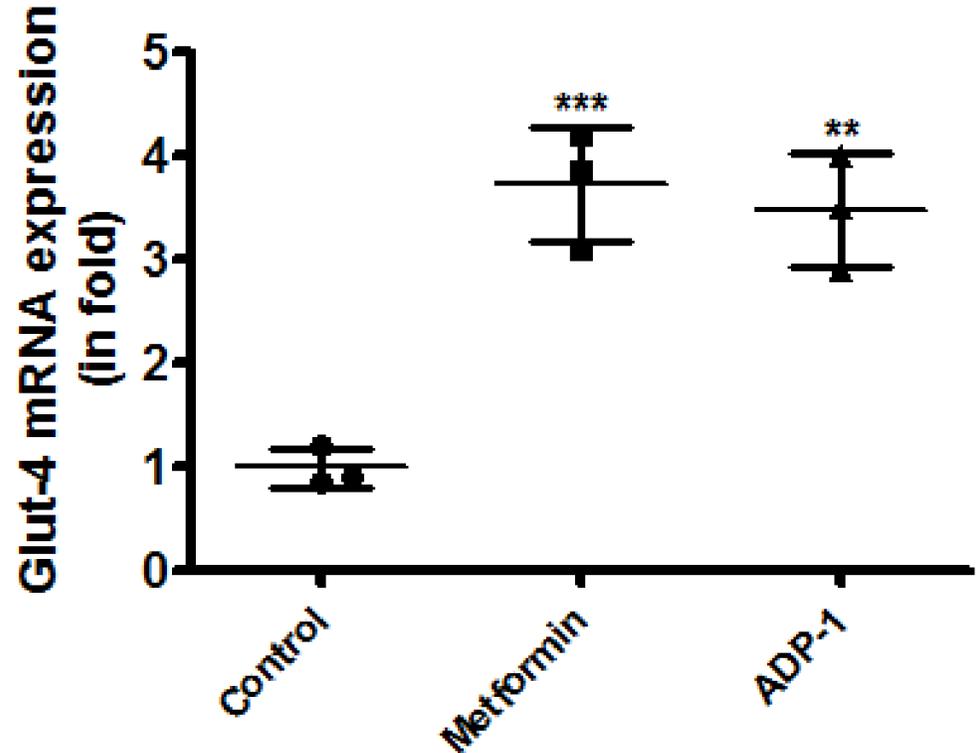
为了进一步了解ADP-1诱导的葡萄糖转运 (GLUT4)。



L-6细胞培养4-6天后, ADP-1处理3h。(二甲双胍和未处理的细胞分别为阳性和阴性对照)



GLUT4mRNA的检测



ADP-1可以促进GLUT4mRNA的表达。

7. ADP-1可以促进GLUT4在L-6细胞中的易位

ADP-1促进了葡萄糖转运是否与GLUT4的易位有关？

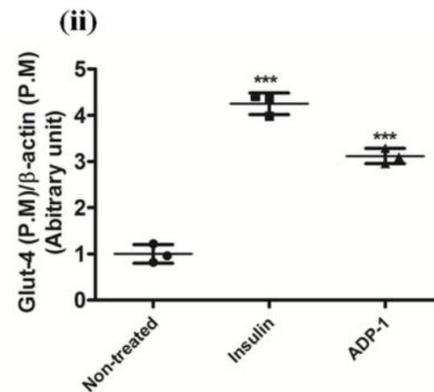
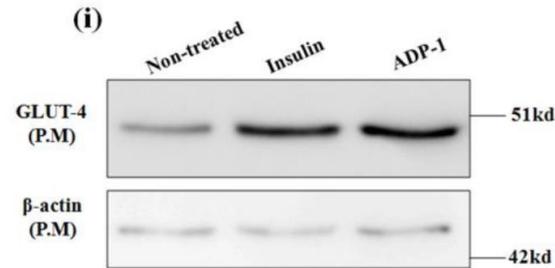


用SDS-PAGE Western Blot对ADP-1处理后的细胞膜和细胞质中GLUT4检测。（二甲双胍和未处理的细胞分别为阳性和阴性对照）

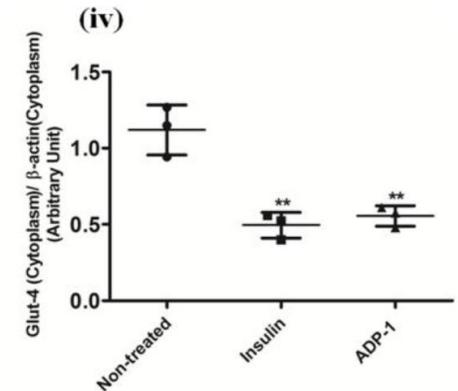
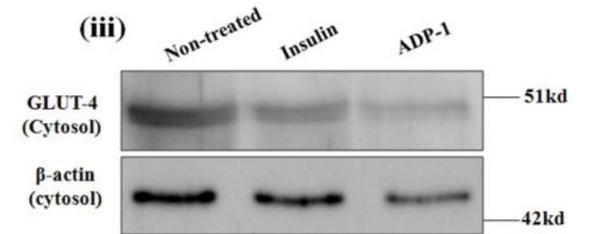
细胞膜上

细胞质中

Figure 4.

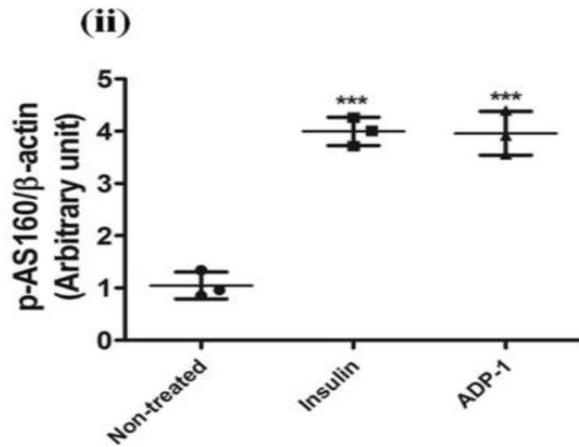
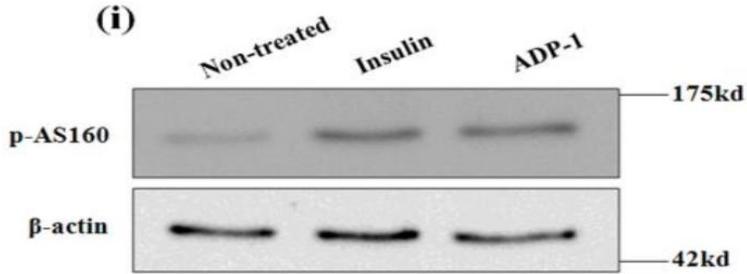


(A)



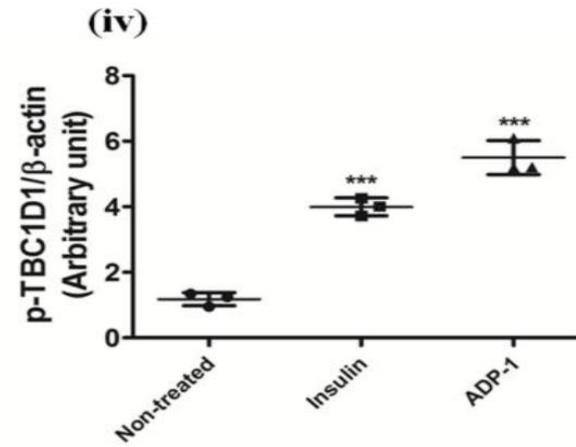
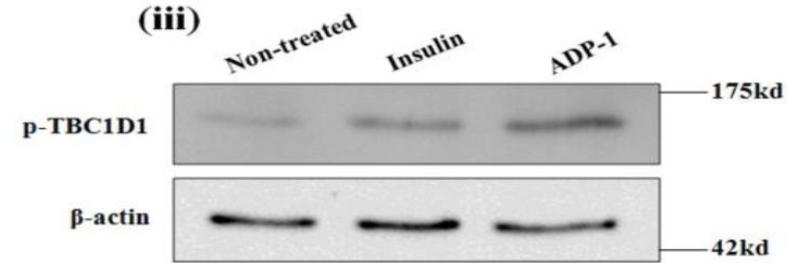
Research Design and Result

AS160的磷酸化水平



(B)

TBC1D的磷酸化水平



这两种蛋白的磷酸化可以促进GLUT4的转位和葡萄糖转运。

ADP-1促进GLUT4mRNA的表达，进而促进葡萄糖转运。

8. ADP-1对L-6 细胞中APPL1和Rab5相互作用的影响

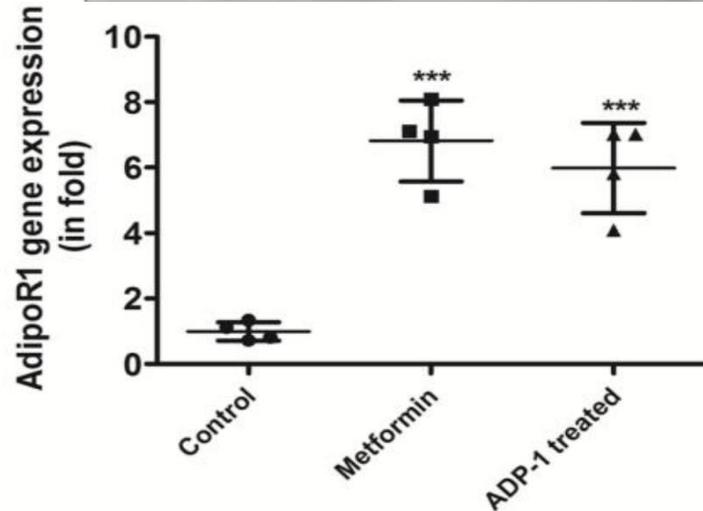
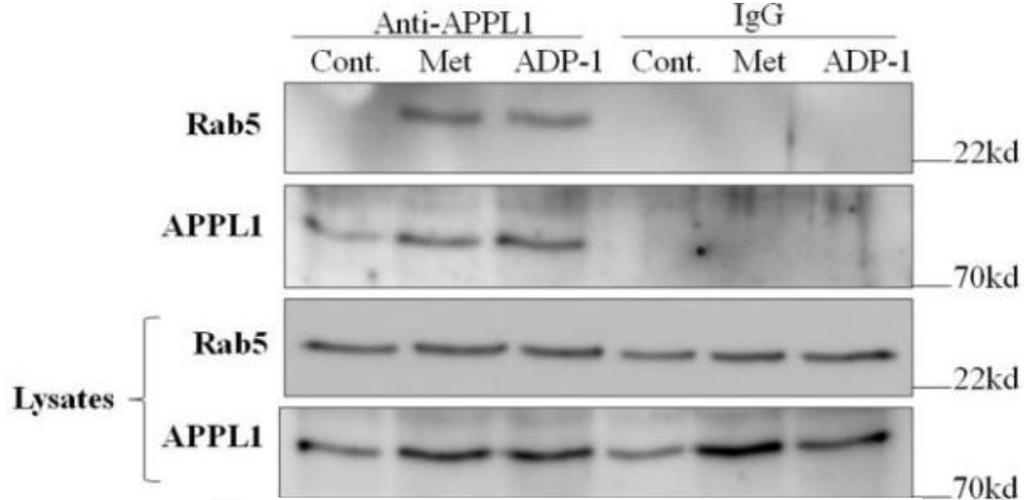
在脂联素诱导的细胞葡萄糖摄取中，Rab5和APPL1之间的相互作用起关键作用。

为了验证ADP-1对L-6 细胞中APPL1和Rab5相互作用的影响

APPL1处理L-6细胞3h

对APPL和Ra5b进行免疫共沉淀

Western blot 验证



结果表明，ADP-1可刺激L-6细胞中APPL1和Ra5b的相互作用。

Research Design and Result

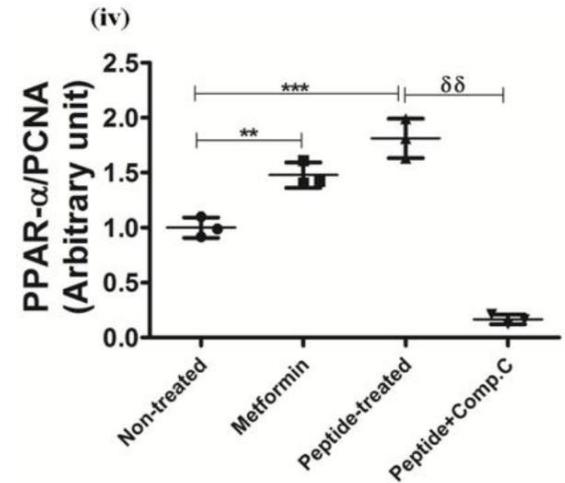
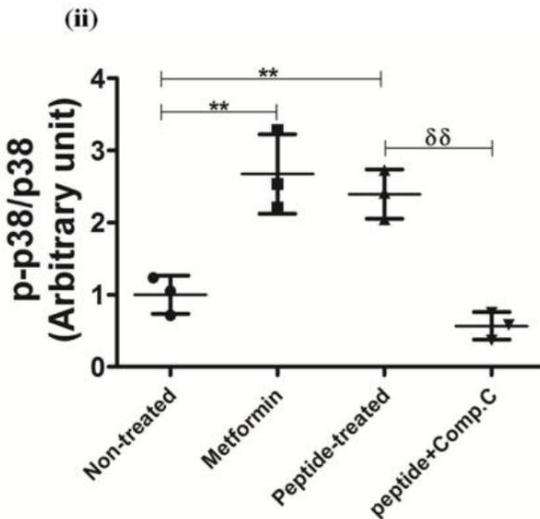
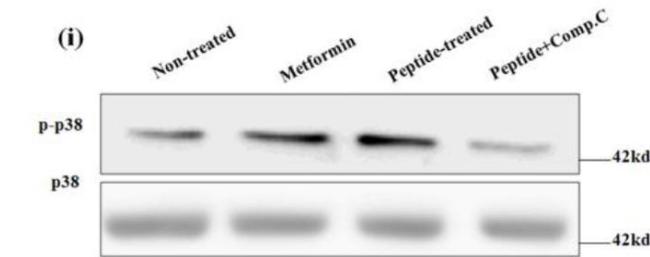
9. ADP-1对p38MAPK的磷酸化和细胞核中PPAR- α 激活的影响

AMPK的激活是否可以导致，p38MAPK的磷酸化和细胞核中PPAR- α 的激活?

ADP-1和Compound C
分别处理L-6细胞



Western blot 检测p-p38和PPAR- α 的含量



ADP-1 诱导的AMPK的激活，在p38MAPK的磷酸化和细胞核PPAR- α 的激活中起重要作用。

Research Design and Result

10. ADP-1对脂肪细胞的分化和脂质积累的影响

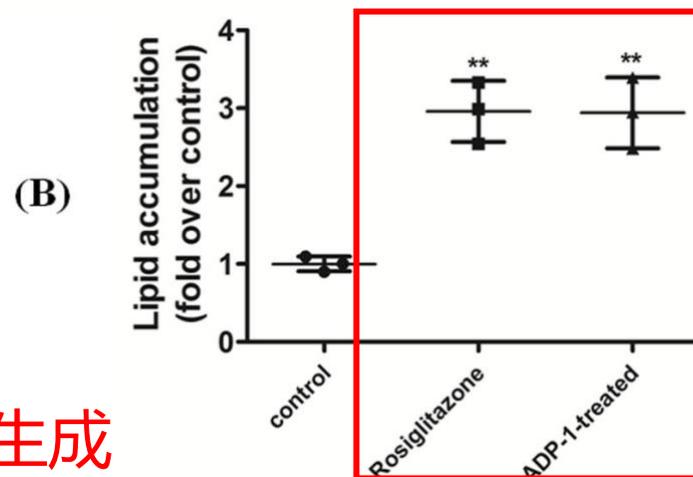
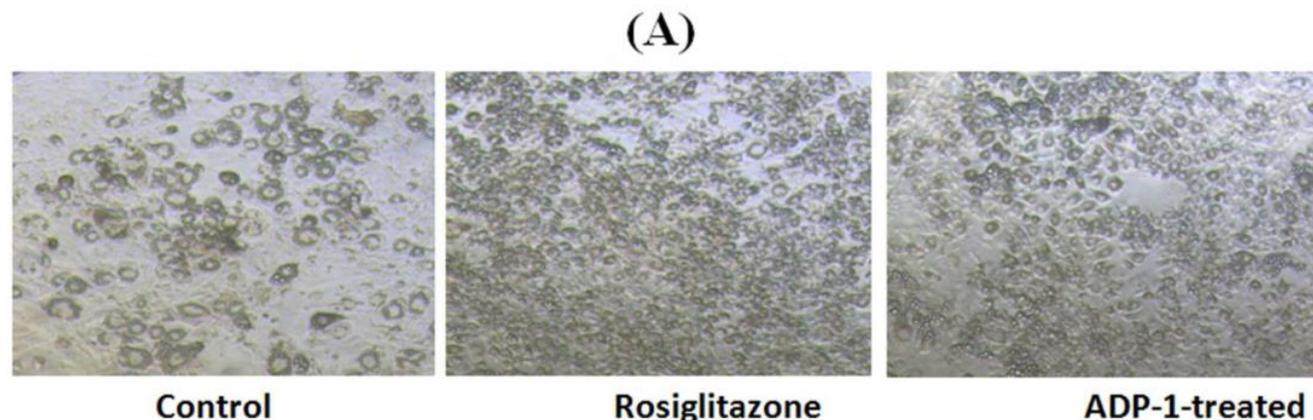
脂肪细胞可以在MDI培养基中形成脂滴，为了研究ADP-1是否影响脂滴的形成。



将ADP-1和罗格列酮 (rosiglitazone) 分别添加到MDI培养基中，对3T3-L1 孵育



油红染色，并用显微镜观察



ADP-1可以诱导3T3-L1细胞的脂肪生成

Research Design and Result

11. ADP-1对原代骨骼肌细胞代谢的影响

为了验证是否ADP-1对小鼠原代骨骼肌细胞代谢具有同样的作用。



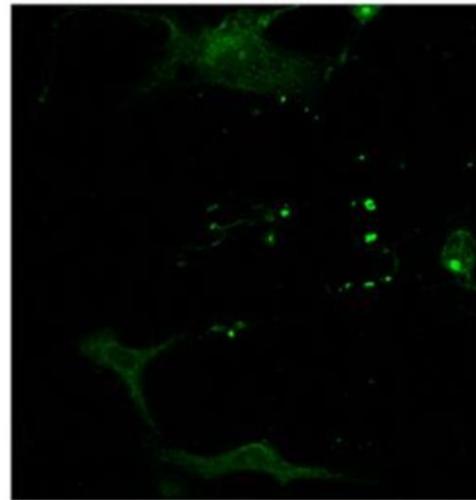
用ADP-1和metformin 分别孵育原代骨骼肌细胞。



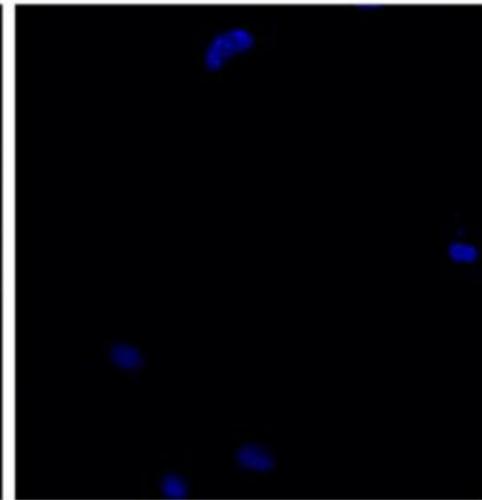
Western blot检测GLUT4和p-AMPK的表达

(A)

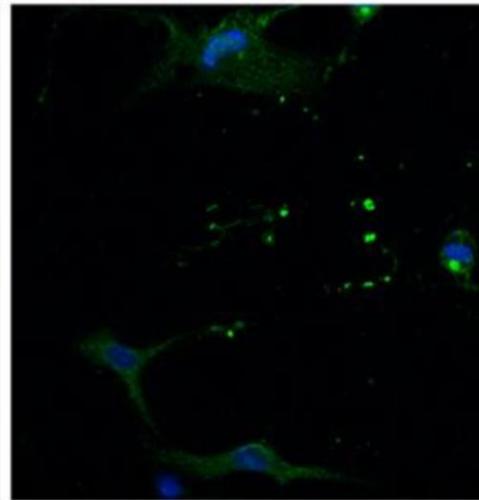
Anti-Pax7



DAPI



Merged



ADP-1也可以影响体外原代骨骼肌细胞代谢。

Research Design and Result

db/db小鼠的ADP-1的体内注射

ADP-1 (30 mg/kg) 或
metformin (50 mg/kg) 每隔
一天注射一次, 连续20天



注射1st, 5th, 10th, 15th and 20thd收
集血清



ELISA检测血清**胰岛素**水平

ADP-1 (30 mg/kg) 或
metformin (50 mg/kg) 每隔
一天注射一次, 连续30天



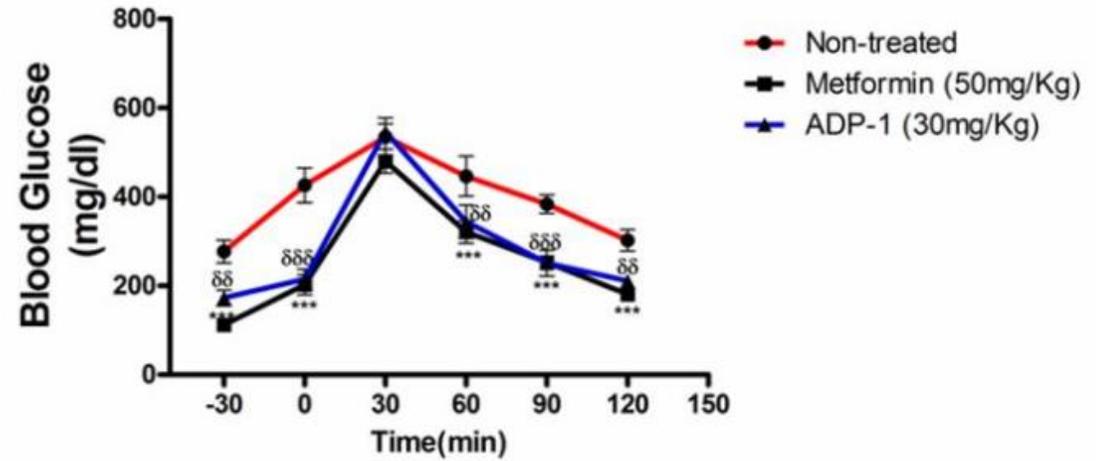
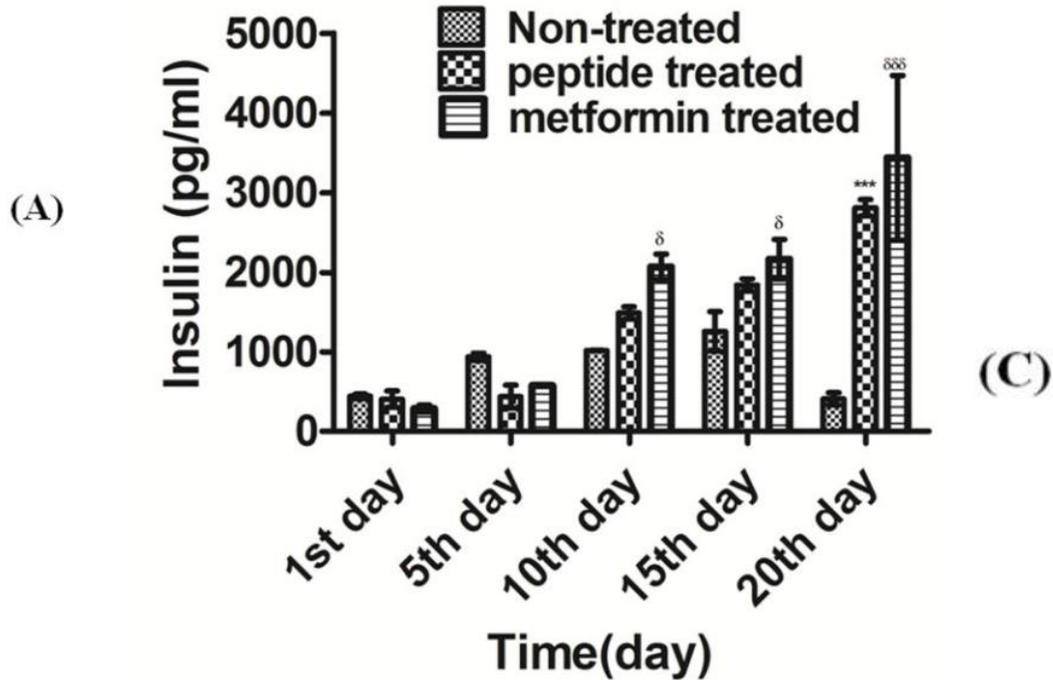
口服葡萄糖耐量



每隔30min检测一次血清**葡萄糖**
水平, 直到120min

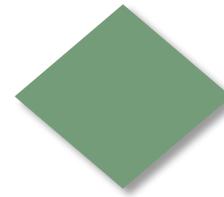
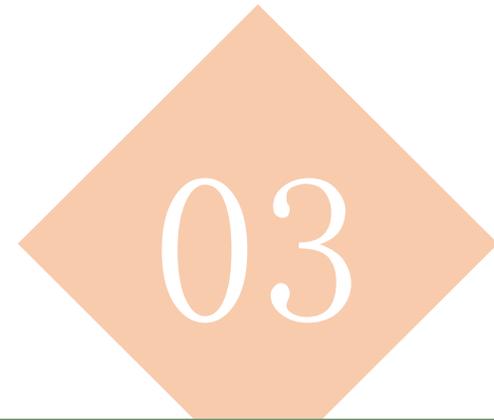
Research Design and Result

10.在体内，ADP-1对db/db小鼠糖耐量的影响



(B)

Treatment	-30 min.	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	AUC	% Lowering
Non-treated	277±25.6	426±38.7	535±42.7	446.6±45	383.7±20.9	302.3±24.19	62430	-
Metformin-treated	112.3±10.2	202±22.5	480.3±26.8	321±25.5	253.3±10.7	180.7±10	42095	32.57***
Peptide-treated	172.7±17.4	215±22.2	546.3±17.7	344.3±37.6	251±29	211.3±10.5	46460	25.5 ⁶⁶

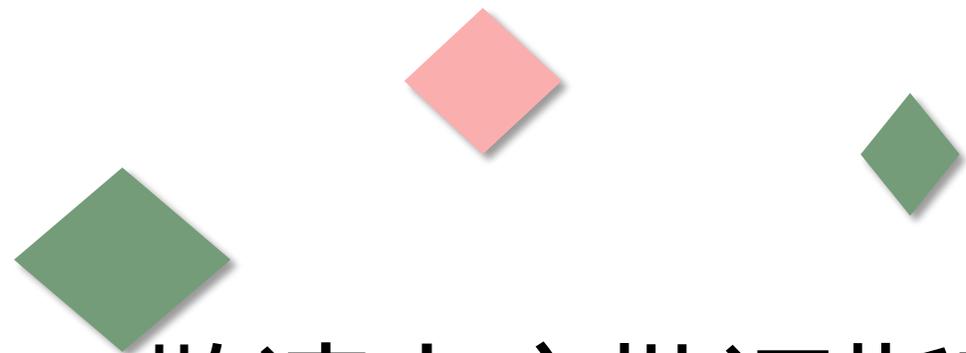
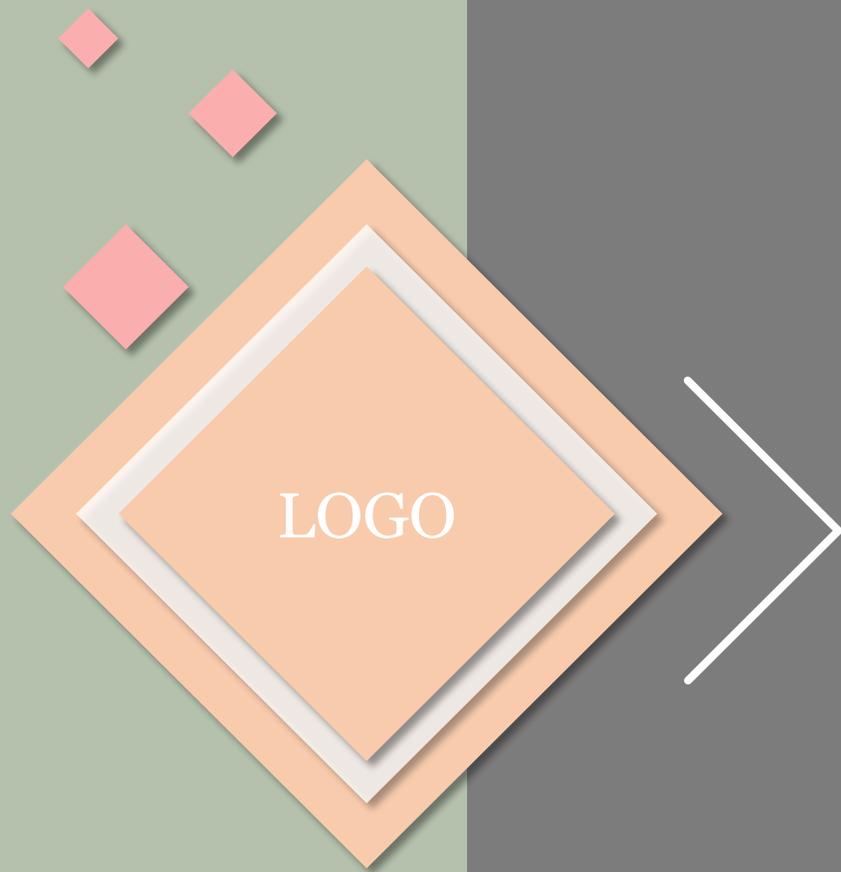


conclusion



conclusion

- ◆ 本研究从脂联素胶原结构域鉴定出了具有13个残基的ADP-1，并具有显著的代谢功能。
- ◆ ADP-1在体外和体内具有显著降糖能力，表明其具有显著的抗糖尿病治疗潜力，本研究可以帮助设计具有有益代谢作用的肽。



敬请大家批评指正!

汇报时间：2018年5月26日

汇报人：赵文丽

END