

2017

读书报告

报告人：闫潇

时间：2017.8.20

目 录

1

背景介绍

2

研究方法和思路

3

研究内容和结果

4

讨论和思考

5

结论

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Central chronic apelin infusion decreases energy expenditure and thermogenesis in mice

Received: 23 May 2016

Accepted: 26 July 2016

Published: 23 August 2016

Anne Drougard^{1,2,*†}, Audren Fournel^{1,2,*}, Alysso Marlin^{1,2}, Etienne Meunier³, Anne Abot^{1,2}, Tereza Bautzova^{1,2}, Thibaut Duparc^{1,2}, Katie Louche¹, Aurelie Batut¹, Alexandre Lucas¹, Sophie Le-Gonidec¹, Jean Lesage⁶, Xavier Fioramonti⁷, Cedric Moro¹, Philippe Valet^{1,2}, Patrice D. Cani^{2,4,5} & Claude Knauf^{1,2}

Apelin is a bioactive peptide involved in the control of energy metabolism. In the hypothalamus, chronic exposure to high levels of apelin is associated with an increase in hepatic glucose production, and then contributes to the onset of type 2 diabetes. However, the molecular mechanisms behind deleterious effects of chronic apelin in the brain and consequences on energy expenditure and thermogenesis are currently unknown. We aimed to evaluate the effects of chronic intracerebroventricular (icv) infusion of apelin in normal mice on hypothalamic inflammatory gene expression, energy expenditure, thermogenesis and brown adipose tissue functions. We have shown that chronic icv infusion of apelin increases the expression of pro-inflammatory factors in the hypothalamus associated with an increase in plasma interleukin-1 beta. In parallel, mice infused with icv apelin exhibit a significant lower energy expenditure coupled to a decrease in PGC1alpha, PRDM16 and UCP1 expression in brown adipose tissue which could explain the alteration of thermogenesis in these mice. These data provide compelling evidence that central apelin contributes to the development of type 2 diabetes by altering energy expenditure, thermogenesis and fat browning.

01

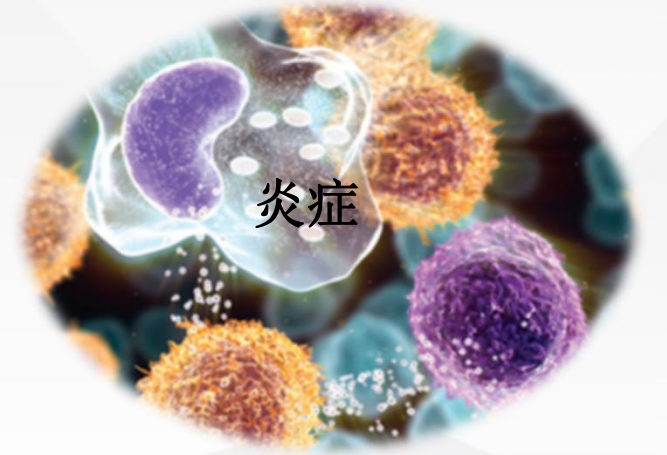
背景介绍



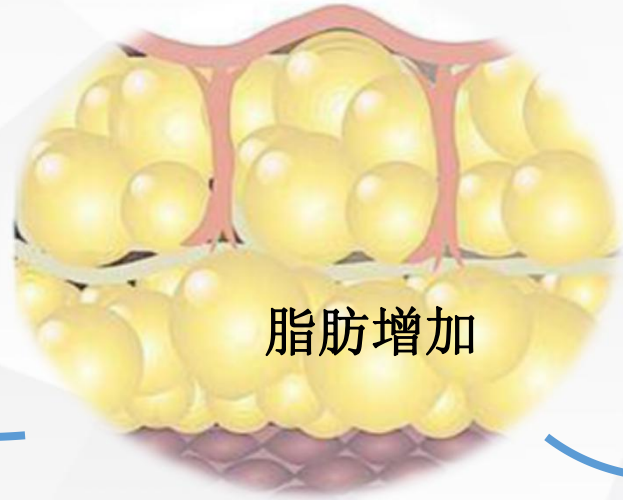
肥胖症和代谢性疾病正在成为世界性流行病



肥胖



炎症



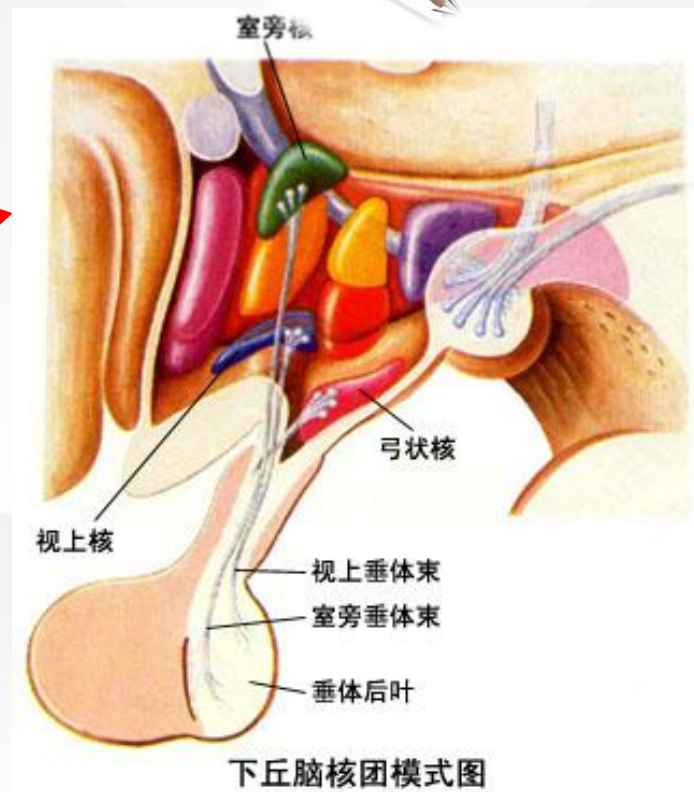
脂肪增加



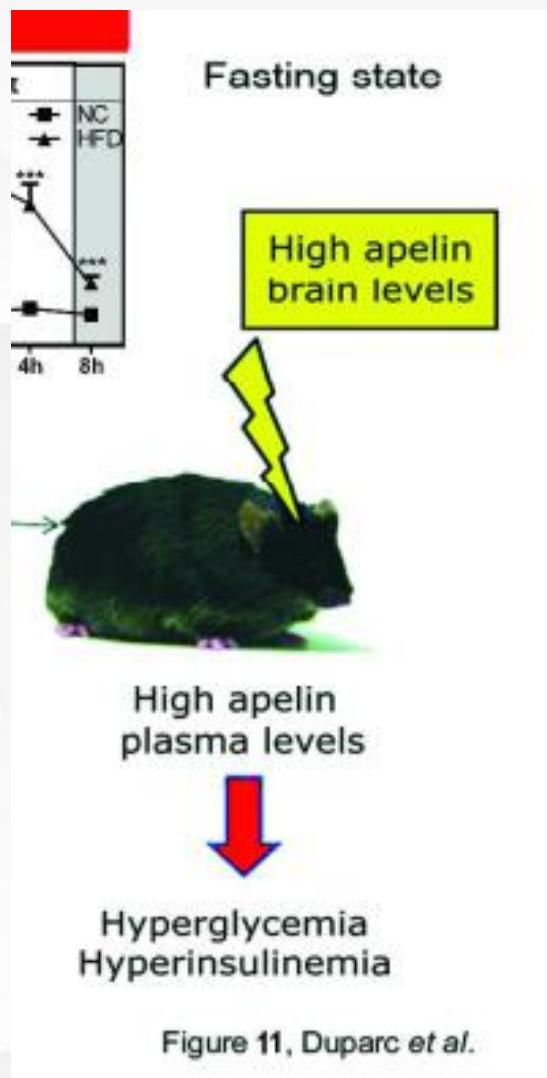
糖尿病



下丘脑反应的改变与代谢和能量平衡失调有关，包括食物摄取、能量消耗、营养感应与糖代谢。



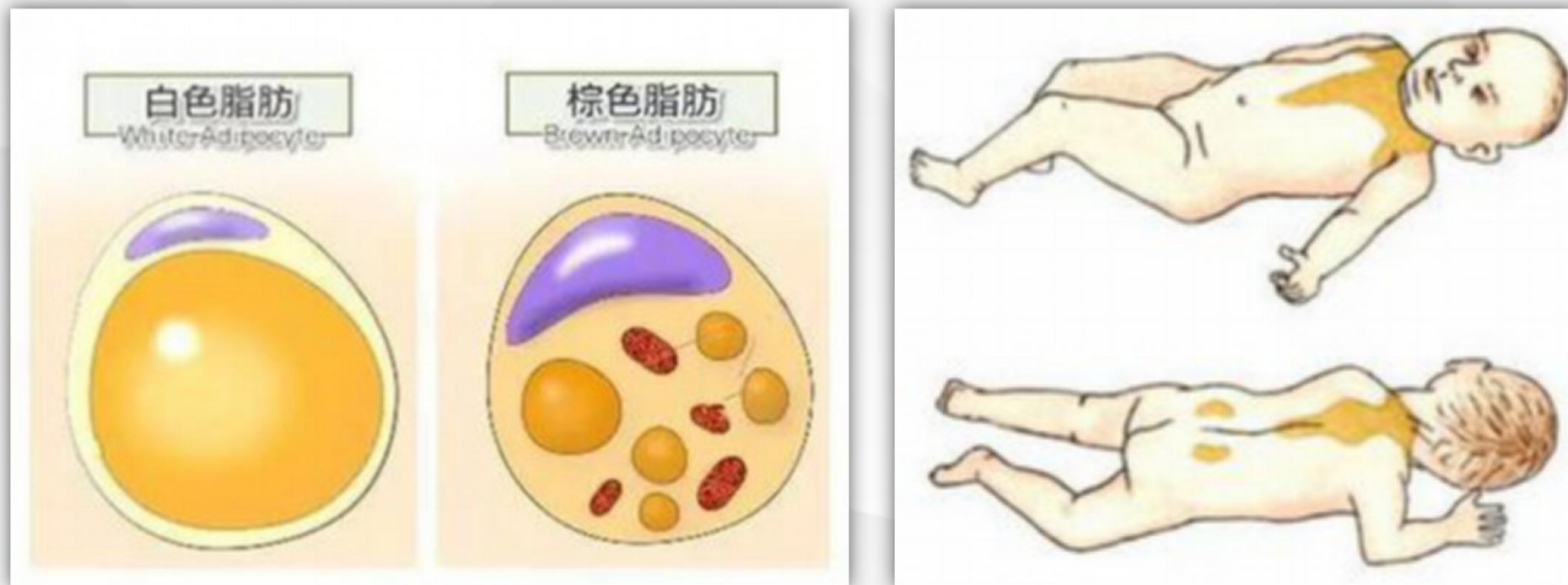
下丘脑是许多促炎症因子的刺激目标，导致机体出现糖尿病的特点。



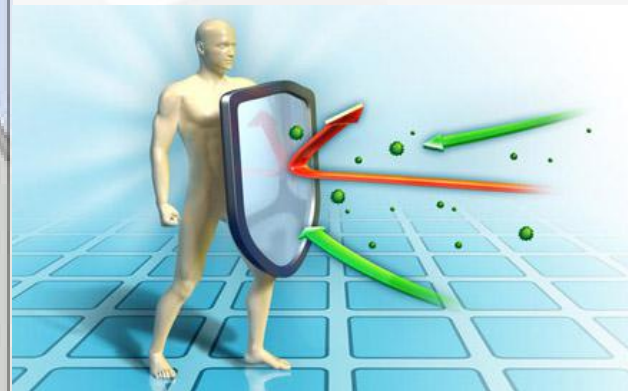
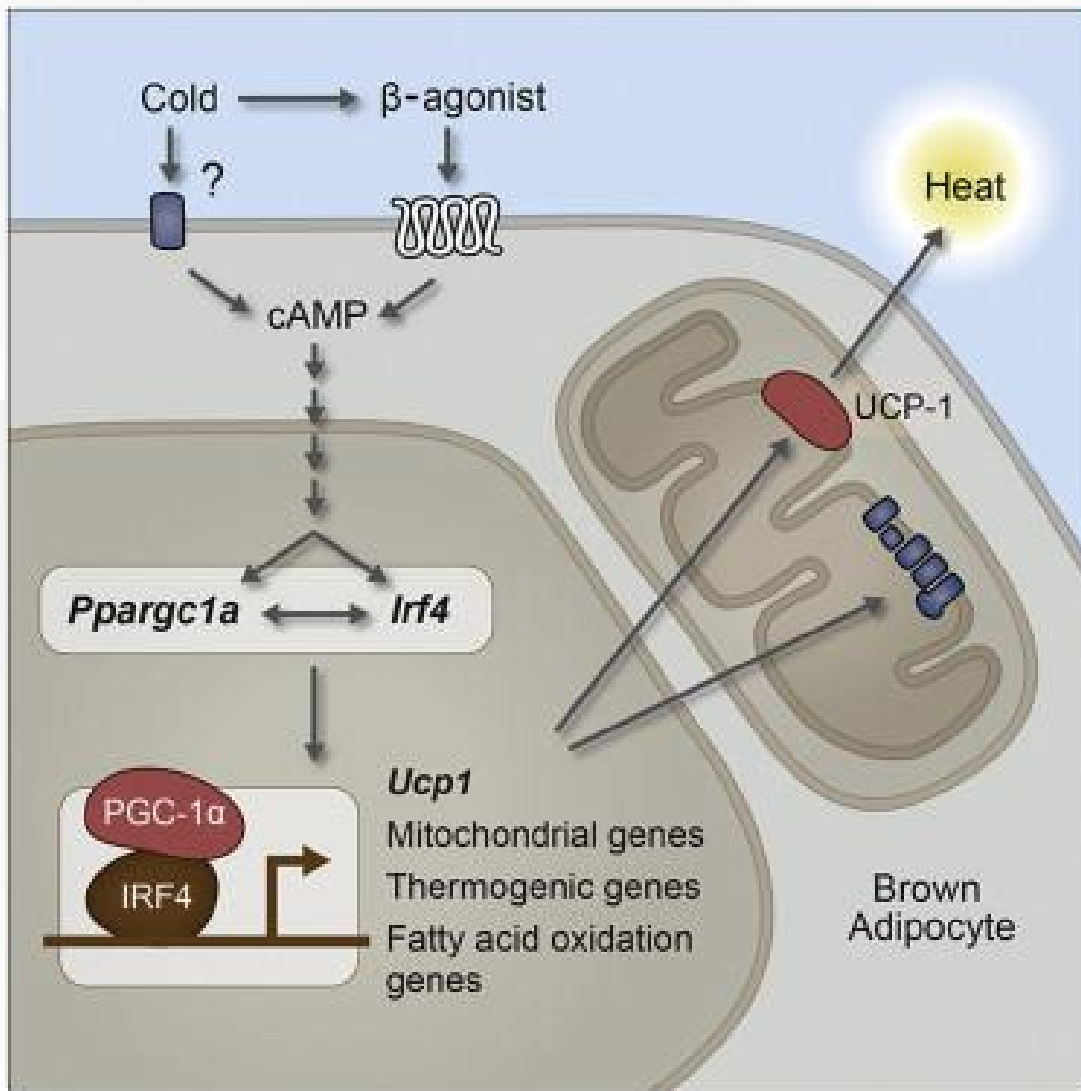
急性和慢性侧脑室（ICV）注射Apelin，
是在模仿肥胖/糖尿病小鼠下丘脑Apelin水平

诱导正常小鼠产生糖尿病的特点

空腹高血糖
高胰岛素血症
胰岛素耐受



棕色脂肪组织（BAT因）其细胞内含有大量血红蛋白和高水平的血红素卟啉，细胞呈棕色而得名。BAT细胞体积比WAT小，细胞表面密布交感神经纤维，细胞中脂肪颗粒很少，此种组织细胞内含有大量线粒体，细胞周围含有丰富毛细血管，这与其产热功能相匹配。

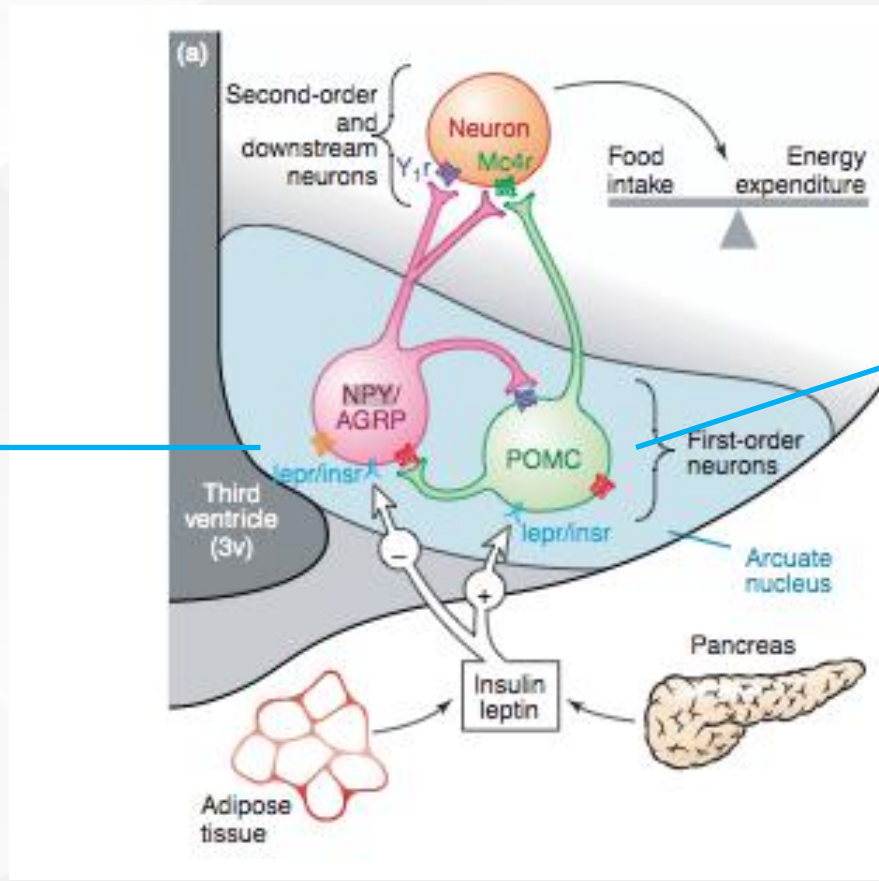


BAT现在被视为一个器官，
可以有针对性地发挥抗糖尿病作用，
改善脂代谢紊乱和胰岛素的分泌，
并在T2D状态下降低胰岛素抵抗。

非颤抖性产热 (NST) 对哺乳动物在冷环境下的生存是必需的，棕色脂肪组织是哺乳动物体内非颤抖产热的主要来源。

在下丘脑弓形核（ARC）中，含有两类调节能量代谢的神经元

（AgRP）神经元：
促进食欲



（POMC）神经元：抑制食欲
POMC神经元通过POMC原的剪切产物促黑激素（alpha-MSH），一方面抑制食欲，另一方面通过调节交感神经系统的兴奋性来影响机体的能量耗散。

研究背景



研究目的

01

确定慢性ICV Apelin输注是否诱导小鼠下丘脑和/或全身产生炎症反应

02

研究这种慢性处理对全身的能量消耗的影响；

在正常和病理条件下受下丘脑控制的棕色脂肪产热功能的改变。

02

研究方法思路



侧脑室注射 (icv) apelin-13

The mice were housed in Specific Pathogen. Free zone in a constant temperature (20-22 °C) and humidity (50–60%) animal room with a 12/12 h light/dark cycle (lights off at 7:00 am) and with free access to food and water over the 24 h period.

An osmotic mini-pump system connected to the lateral ventricle delivered either aCSF or apelin-13 (20 nM) over 2 weeks, at a rate of 0.25 μ l/h.

RT-qPCR:

| Target genes | Primer sequence 5' to 3' | |
|--------------------|----------------------------|--------------------------|
| | Sense | Antisense |
| Beta2microglobulin | CACTGACCGGCCTGTATGC | GGGTGGCGTGAGTATACTTGAATT |
| Cd36 | GGACATACTTAGATGTGGAACCCATA | TGTTGACCTGCAGTCGTTTTG |
| Fabp4 | TGTGGGAACCTGGAAGCTTGTC | TCTGACCGGATGGTGACCAAA |
| Fatp1 | GACAAGCTGGATCAGGCAAGC | AGTGAGGCCACAGAGGCTGTT |
| Fiaf | CAATGCCAAATTGCTCCAATT | TGGCCGTGGGCTCAGT |
| Glut1 | GGTGTGCAGCAGCCTGTGT | CACAGTGAAGGCCGTGTTGA |
| Glut4 | CCGGATTCCATCCCACAAG | CATGCCACCCACAGAGAAGA |
| G6pase | ACGTATGGATTCCGGTGTTTG | CAGCTGCACAGCCCAGAA |
| Inos | CACCTTGGACTTCACCCAGT | ACCACTCGTACTTGGGATGT |
| Il1beta | CAACCAACAAGTGATATTCTCGATG | GATCCACACTCTCCAGCTGCA |
| Npy | CAGAAAACGCCCCCAGAAC | CGGGAGAACAAGTTTCATTTCC |
| Pgc1alpha | AAAGGATGCGCTCTCGTTCA | GGAATATGGTGATCGGGAACA |
| Pomc | AGGCCTGACACGTGGAAGAT | AGCAGGAGGGCCAGCAA |
| Prdm16 | CAGCACGGTGAAGCCATTC | GCGTGCATCCGCTTGTG |
| Rpl19 | GAAGGTCAAAGGGAATGTGTTCA | CCTTGTCTGCCTTCAGCTTGT |
| Tnfalpha | TGGGACAGTGACCTGGACTGT | TTCGAAAGCCCATTGAGT |

Enzymatic activity: Hepatic glucose-6-phosphatase activity

Western Blot : UCP1

Electrophysiology : POMC

Plasma assays : ELISA kits— IL1beta , TNFalpha , iNOS

TG and FFA

Body temperature

Indirect calorimetric and ambulatory activity : Oxygen consumption

(VO₂), carbon dioxide production (VCO₂), Respiratory quotient (RQ)

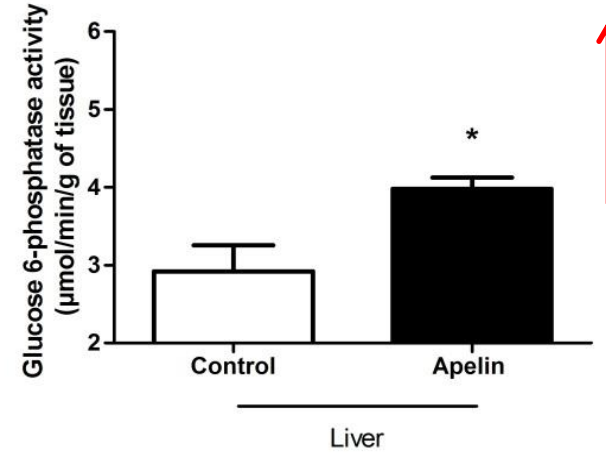
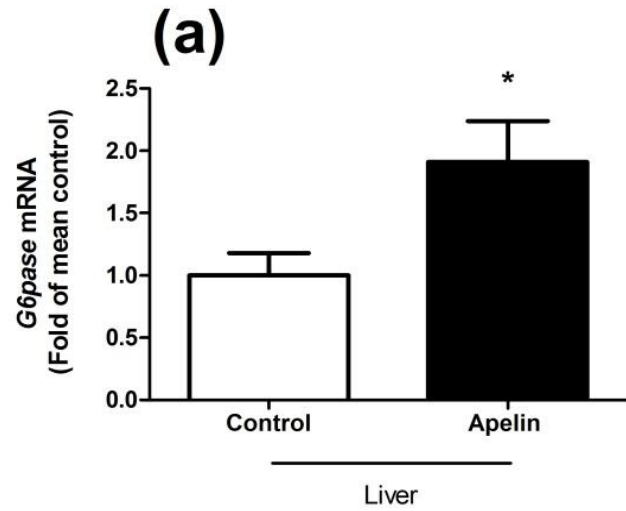
The ambulatory activities of the mice were monitored using an infrared photocell beam interruption method .

03

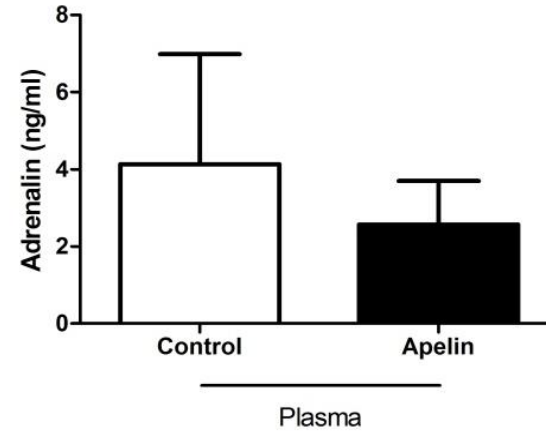
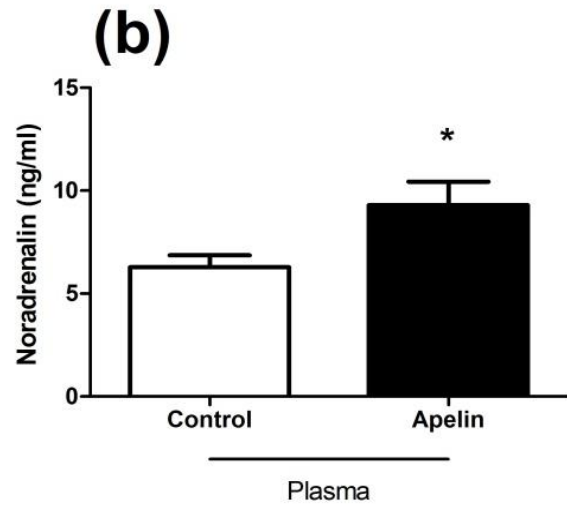
研究内容和结果

1、慢性ICV Apelin 增加下丘脑促炎性因子的表达

葡萄糖-6-磷酸酶
(糖异生)



去甲肾上腺素



甲肾上腺素

A

去甲肾上腺素是一种神经递质，主要由交感节后神经元和脑内肾上腺素能神经末梢合成和分泌，是后者释放的主要递质。和受体结合心肌收缩力增强，心率加快，心排血量增高。

B

交感神经是植物神经系统的重要组成部分。主要功能使心跳加快，皮肤及内脏血管收缩，冠状动脉扩张，血压上升，小支气管舒张，胃肠蠕动减弱，汗腺分泌汗液、立毛肌收缩等。



IL1 β

白细胞介素-1 β ：

局部作用局部低浓度的IL-1 β 主要发挥免疫调节作用。

肿瘤坏死因子 α ：

主要由活化的单核/巨噬细胞产生，能杀伤和抑制肿瘤细胞，促进中性粒细胞吞噬，促进髓样白血病细胞向巨噬细胞分化，是重要的炎症因子，并参与某些自身免疫病的病理损伤。

TNF α

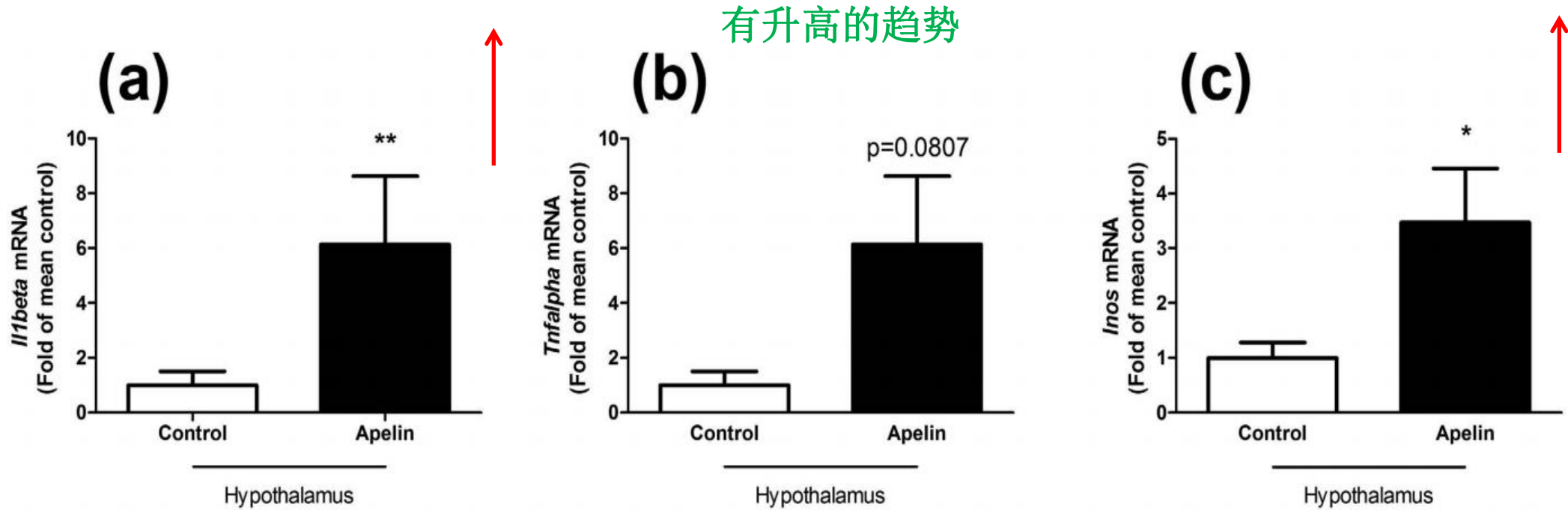
iNOS

诱导型一氧化氮合酶：

利用一氧化氮的氧化应激(自由基)，协助巨噬细胞在免疫系统对抗病原体。它亦存在于心血管系统内。

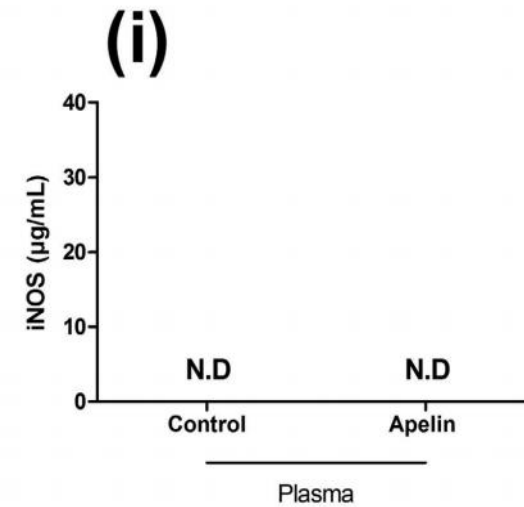
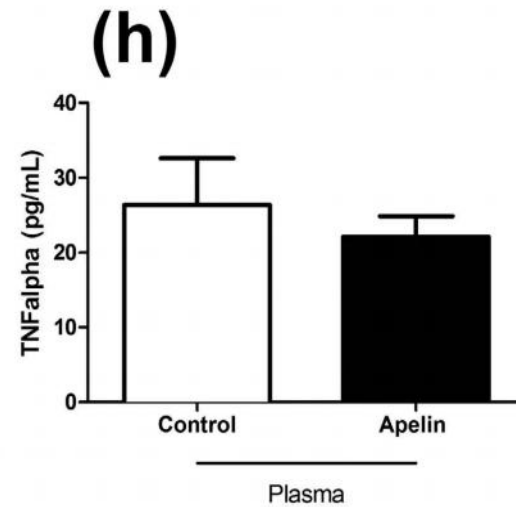
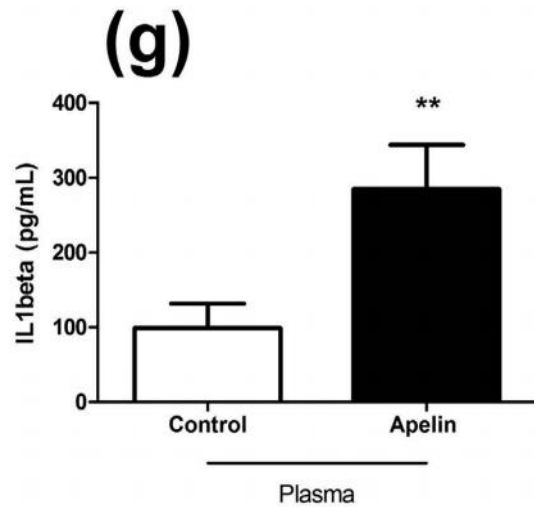
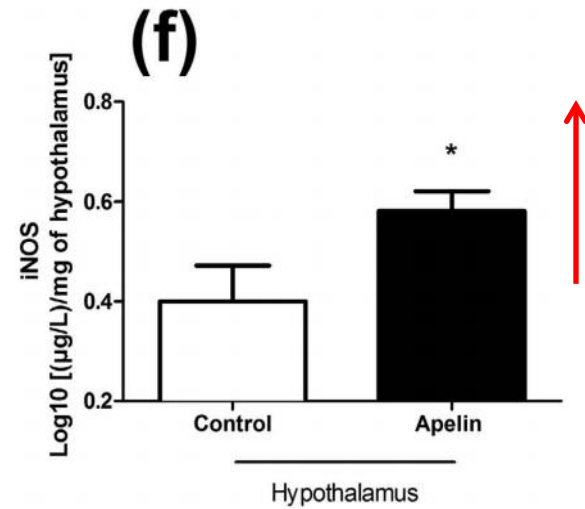
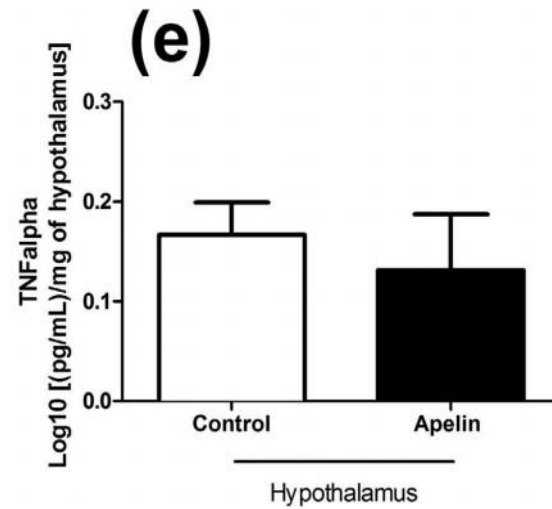
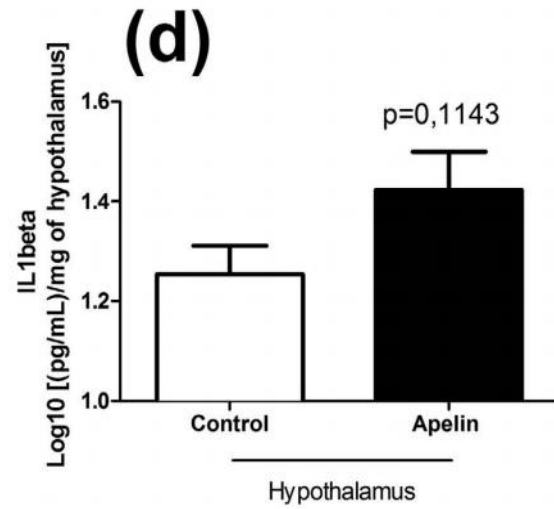
1、慢性ICV Apelin 增加下丘脑促炎性因子的表达

mRNA



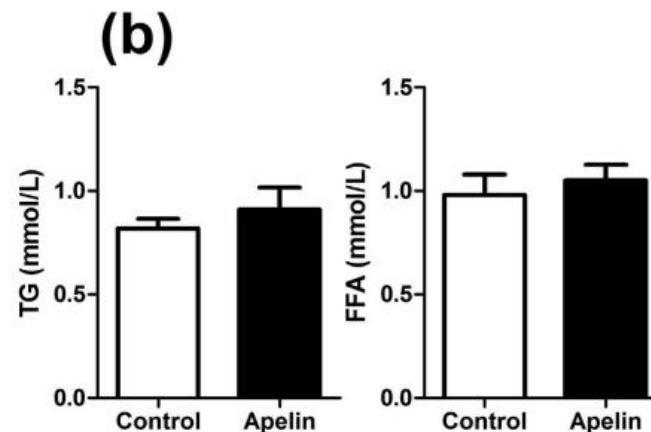
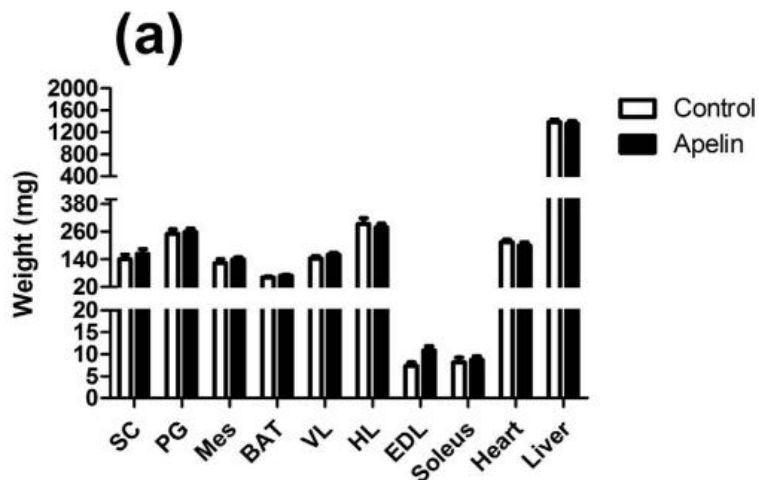
1、慢性ICV Apelin 增加下丘脑促炎性因子的表达

蛋白



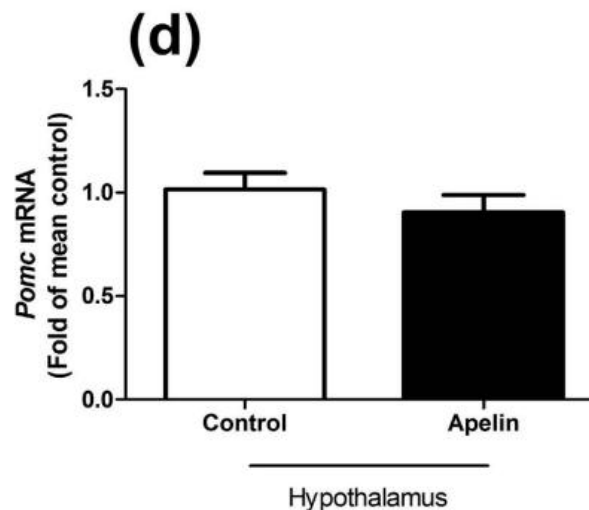
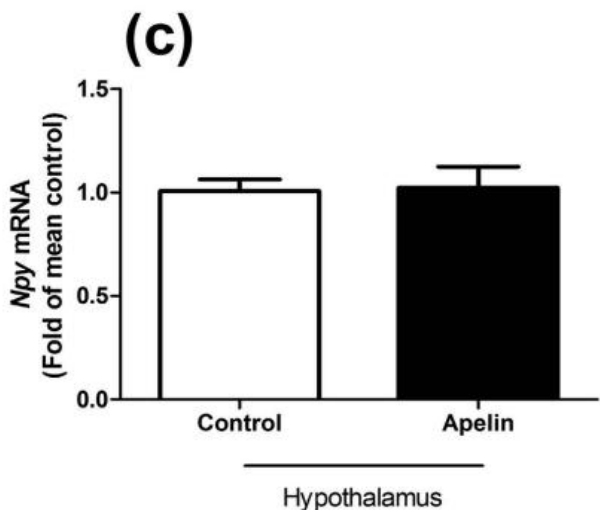
2、慢性ICV Apelin不改变摄食和体重，但激活下丘脑POMC神经元

体重 (weight)



血浆甘油三酯 (TG)
游离脂肪酸 (FFA)

下丘脑神经肽Y
(NPY)



POMC

下丘脑的弓状核（ARC）包含两大类调节代谢的神经元：

一类是抑制食欲的神经元，如阿黑皮素原（POMC）神经元；

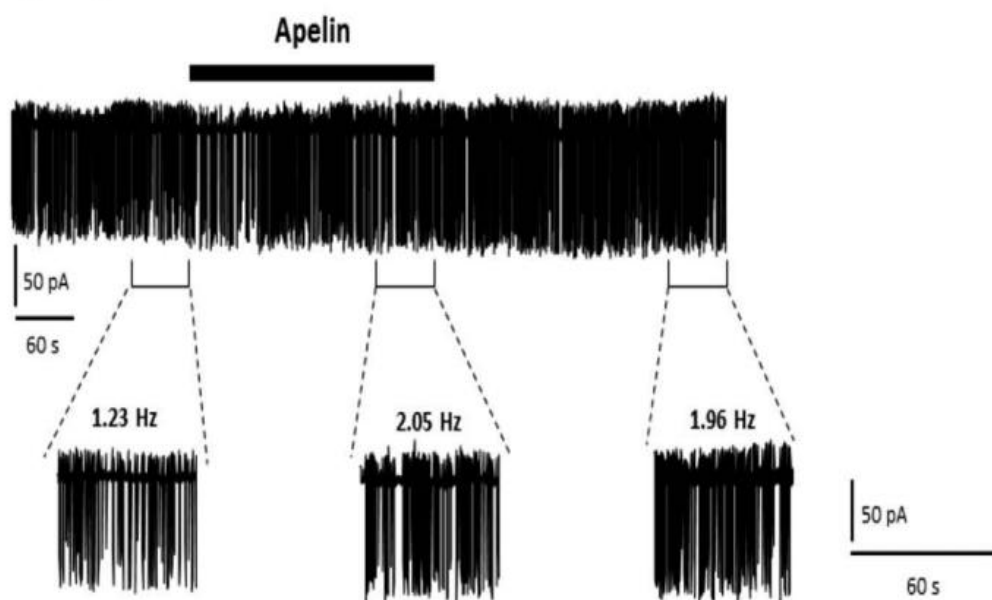
一类是促进食欲的神经元，包括神经肽Y（NPY）和刺鼠肽基因相关蛋白（AgRP）神经元。

POMC神经元通过释放阿黑皮素原的剪切产物促黑激素（ α -MSH），一方面抑制食欲，另一方面通过调节交感神经系统的兴奋性来增加机体的能量耗散。

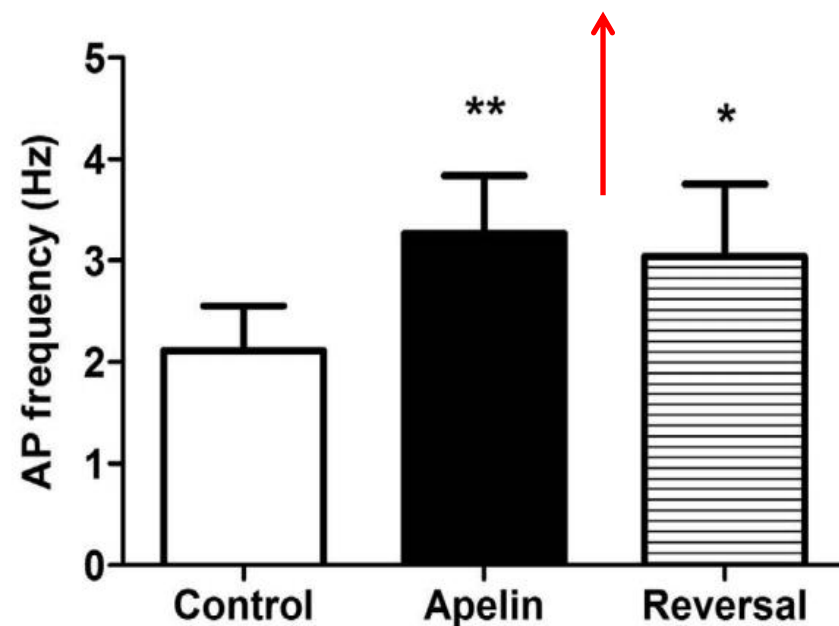
NPY最主要的作用是增加食物的摄入，降低饱食动物的产热效应。

2、慢性ICV Apelin不改变摄食和体重，但激活下丘脑POMC神经元

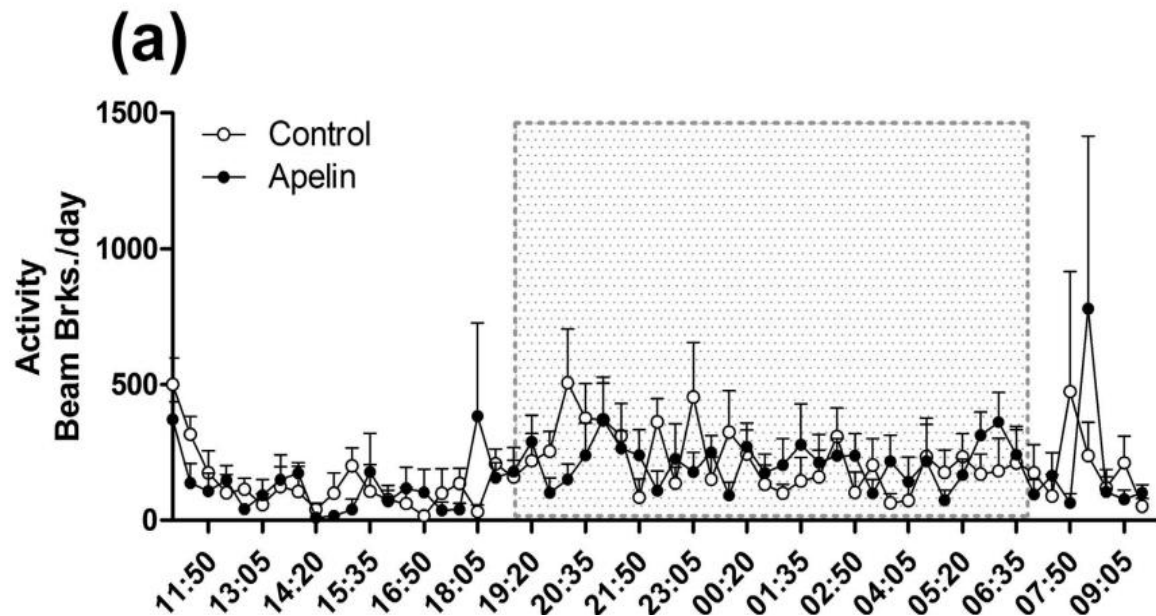
(e)



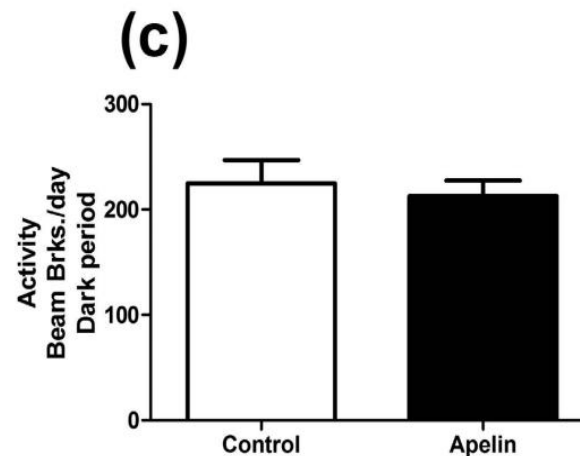
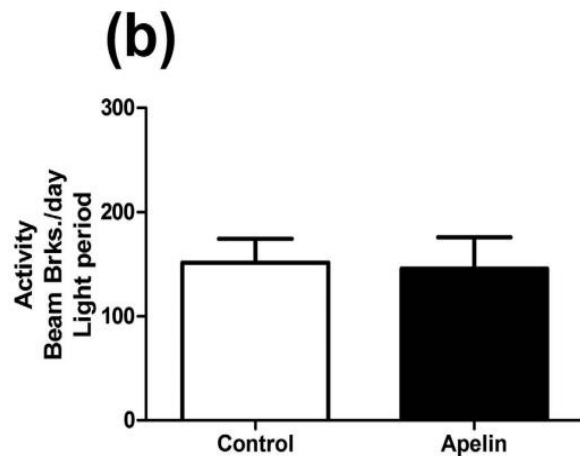
动作电位频率



3、慢性ICV Apelin降低能量消耗，不改变基础活动

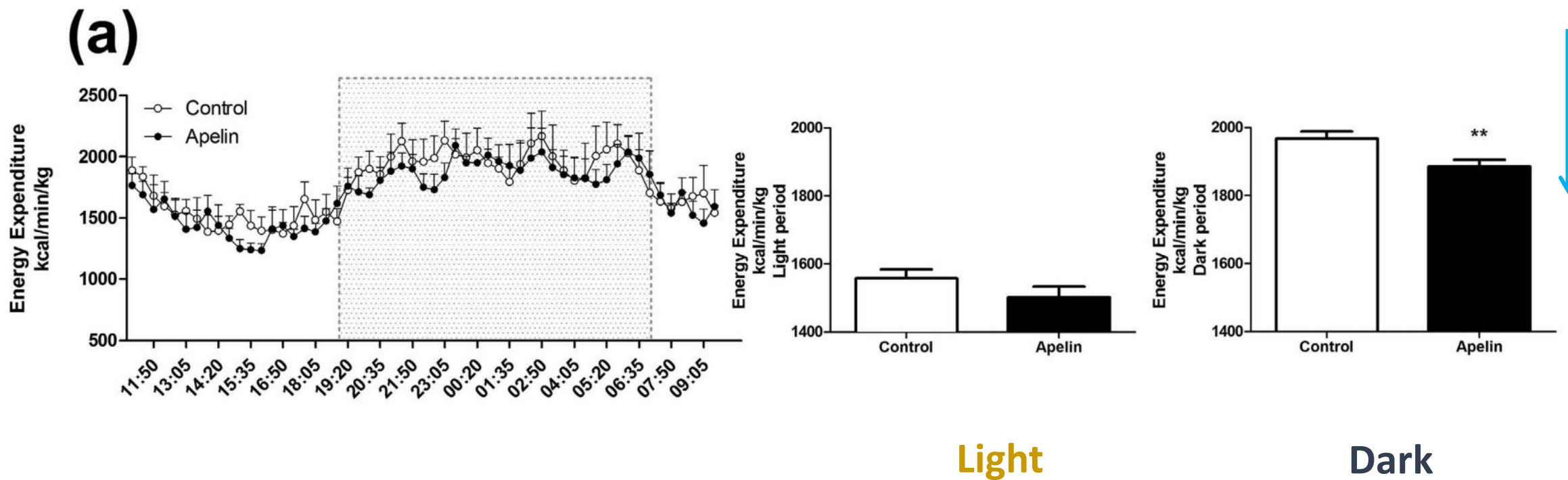


Light

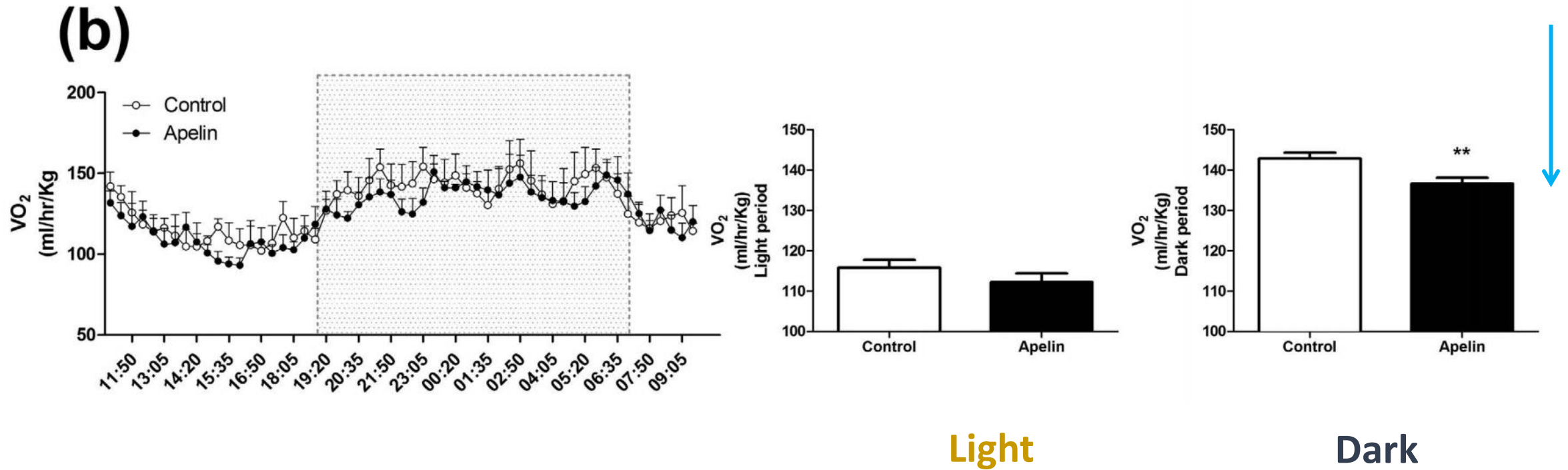


Dark

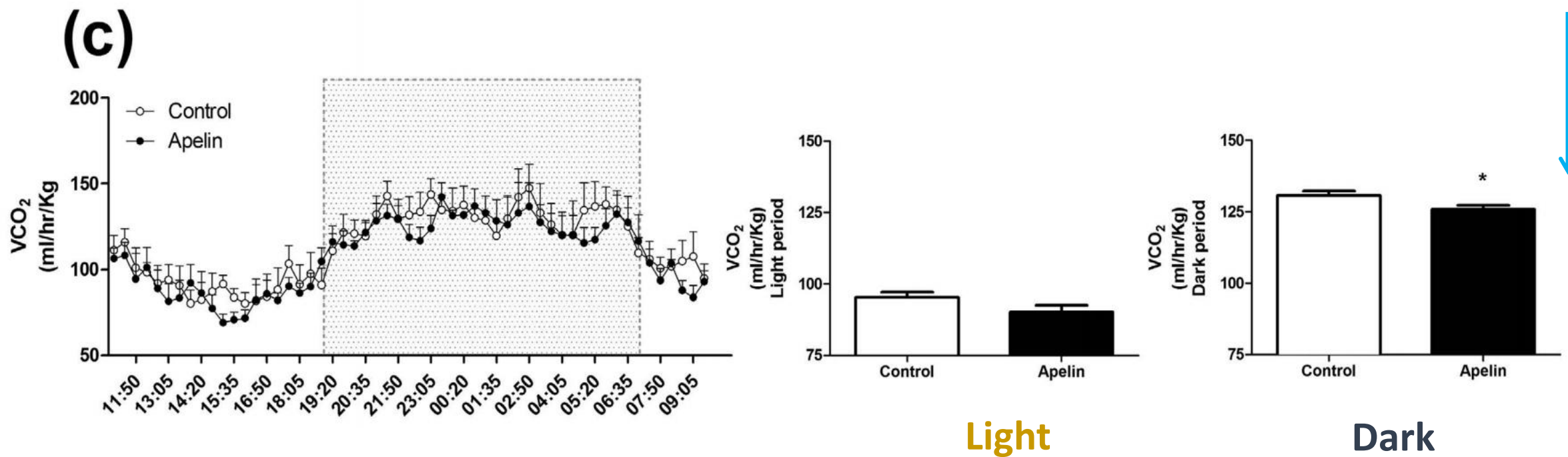
3、慢性ICV Apelin降低能量消耗，不改变基础活动



3、慢性ICV Apelin降低能量消耗，不改变基础活动

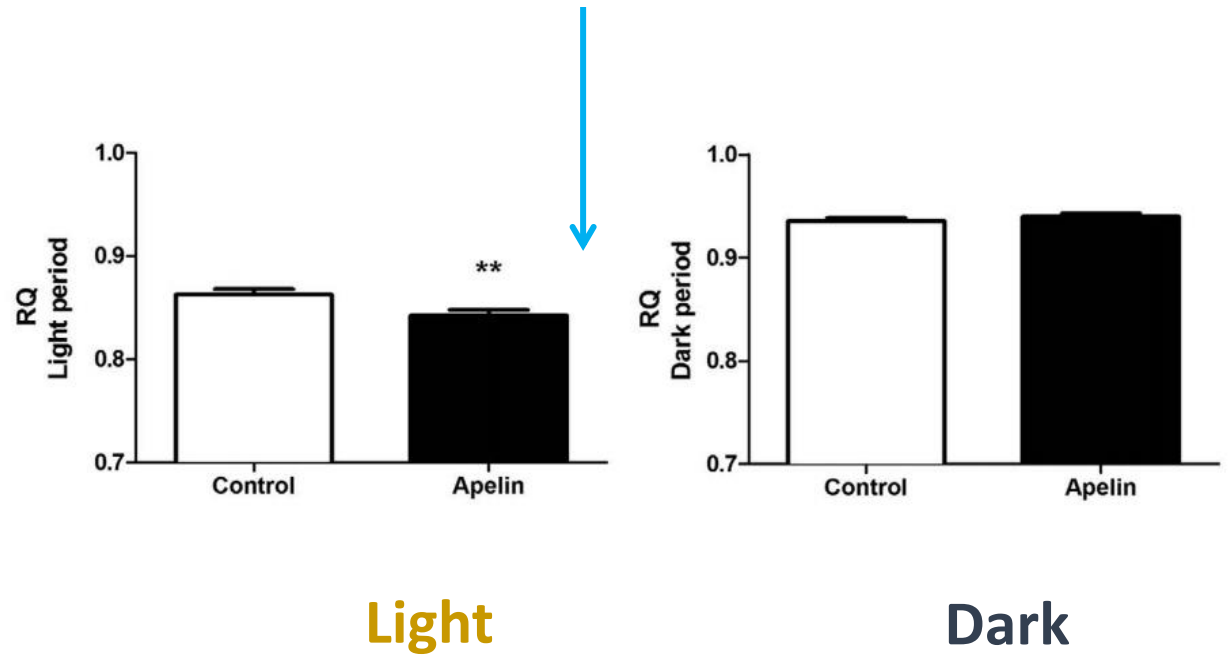
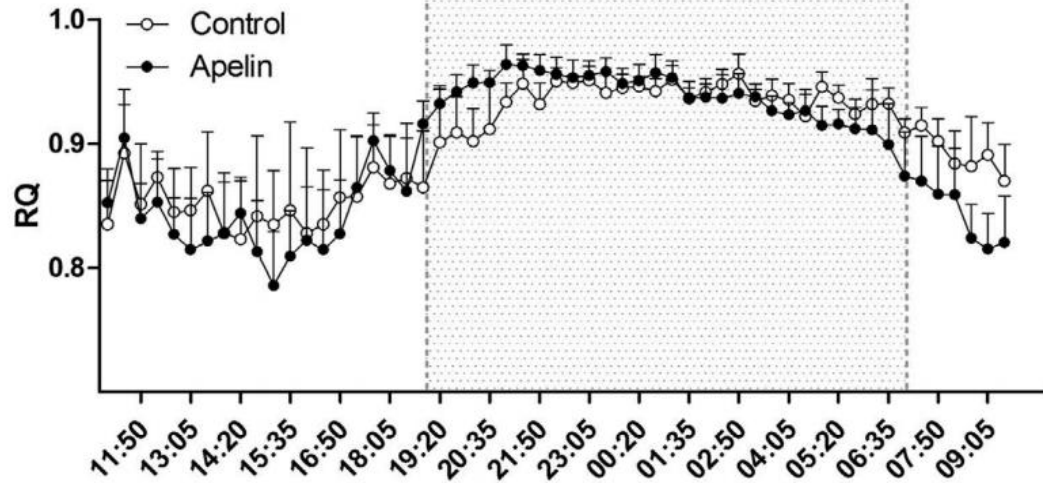


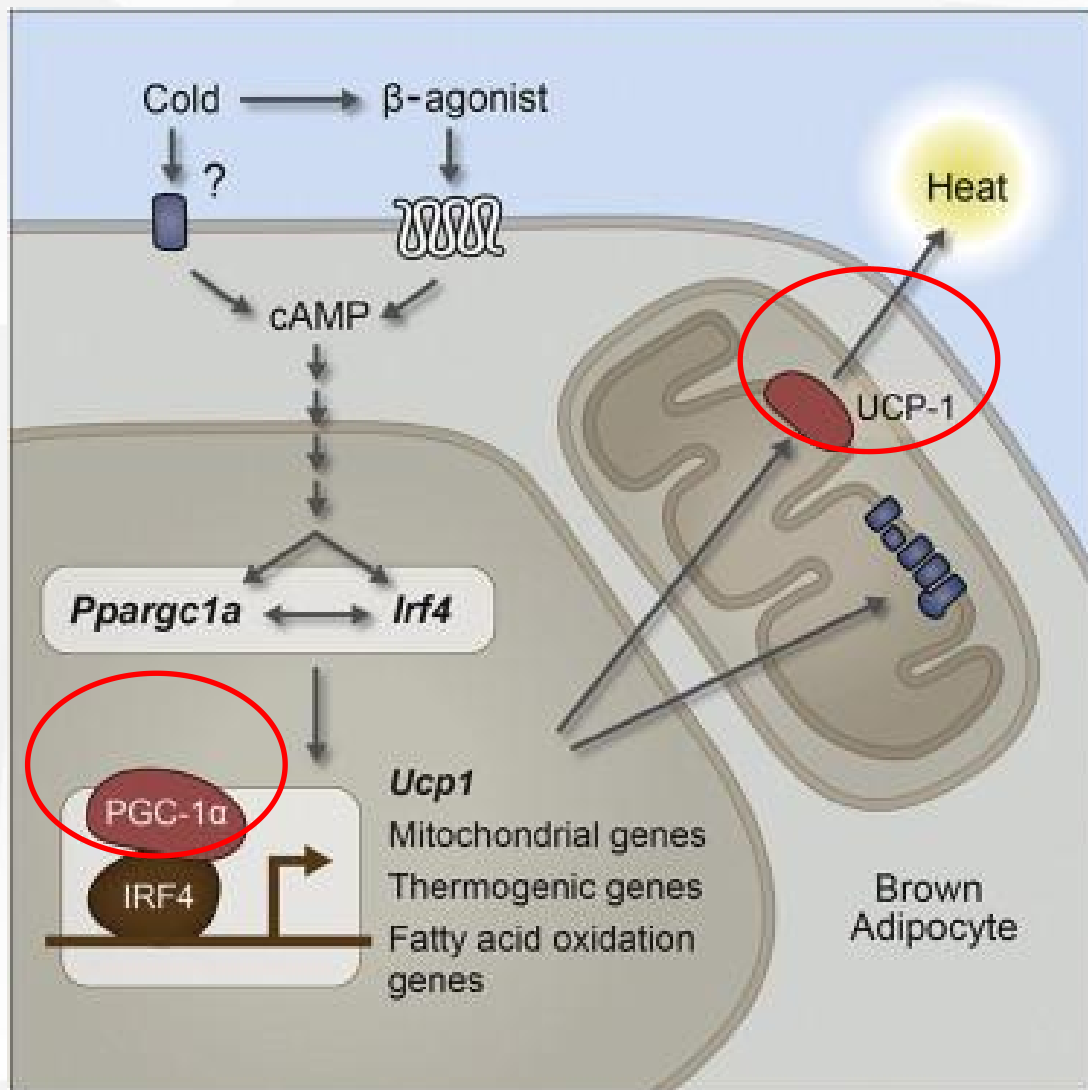
3、慢性ICV Apelin降低能量消耗，不改变基础活动



3、慢性ICV Apelin降低能量消耗，不改变基础活动

(d)



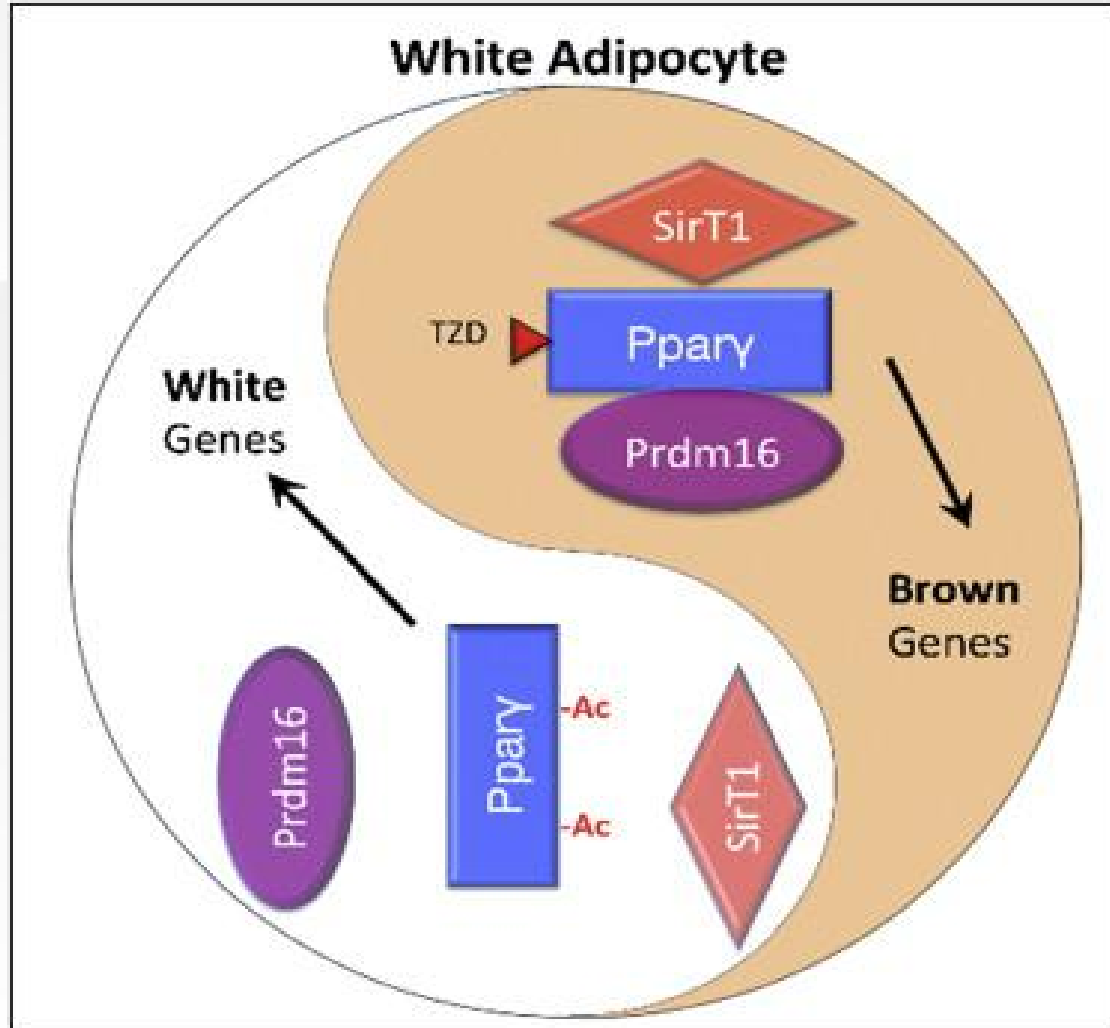


棕色脂肪细胞的线粒体有一种称为解耦联蛋白1（**UCP1**）的物质，是决定BAT功能的关键因素(Heaton等，1978)。这种物质使得葡萄糖和脂肪酸分解产生的能量不能转化为ATP（为生物体直接供能的物质），而只能转化为热能。

PGC-1 α 是诱导棕色脂肪细胞UCP1高表达的重要激活因子。

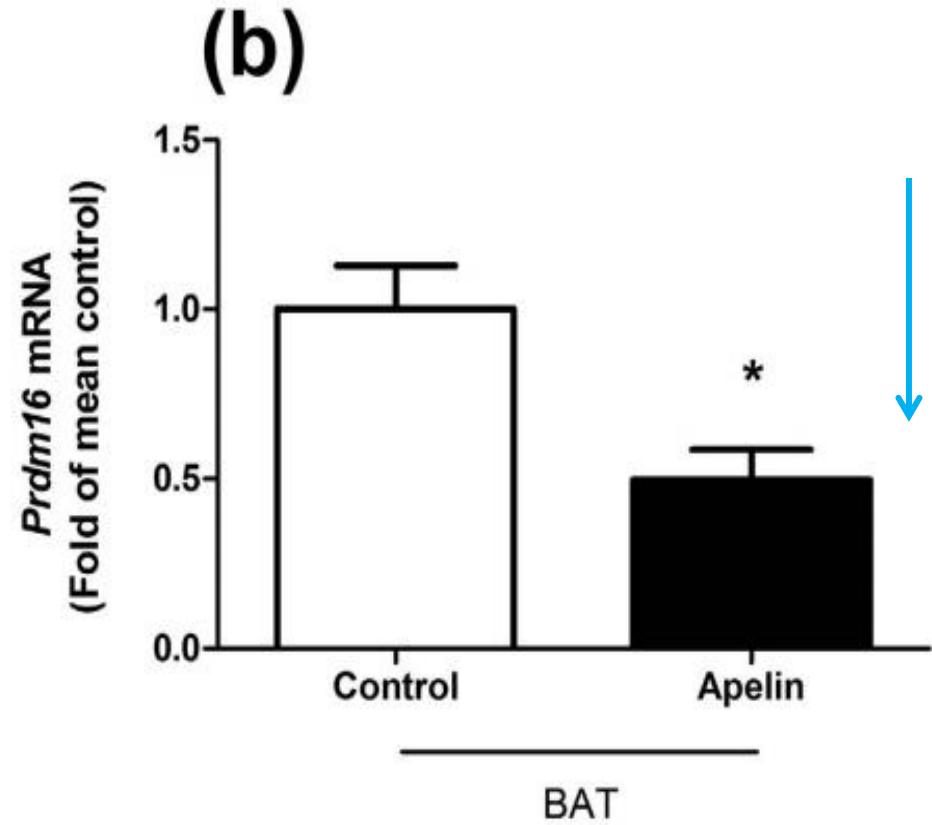
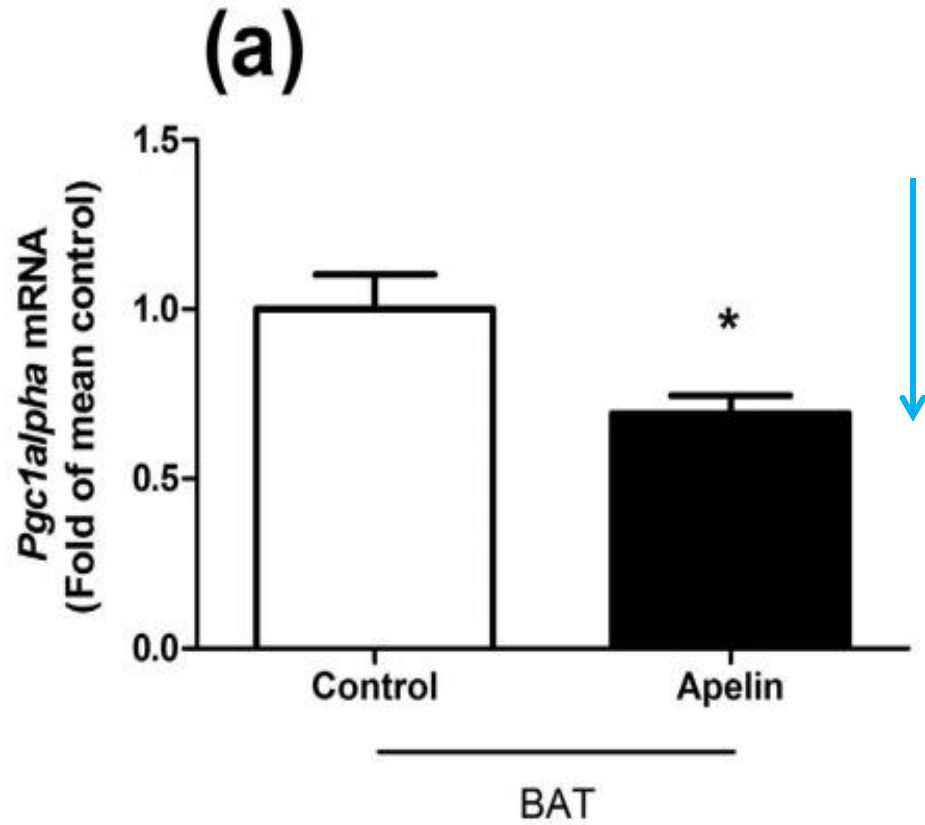
在寒冷、有氧运动和禁食条件下，交感神经兴奋诱导BAT内PGC-1 α 表达，提高UCP1水平，从而增加了机体能量消耗(Pierre, 2003)。

当PGC-1 α 被导入白色脂肪细胞后，从而使WAT细胞具有BAT细胞的特征，能诱导UCP1基因的表达和线粒体的合成，促进BAT产热耗能。

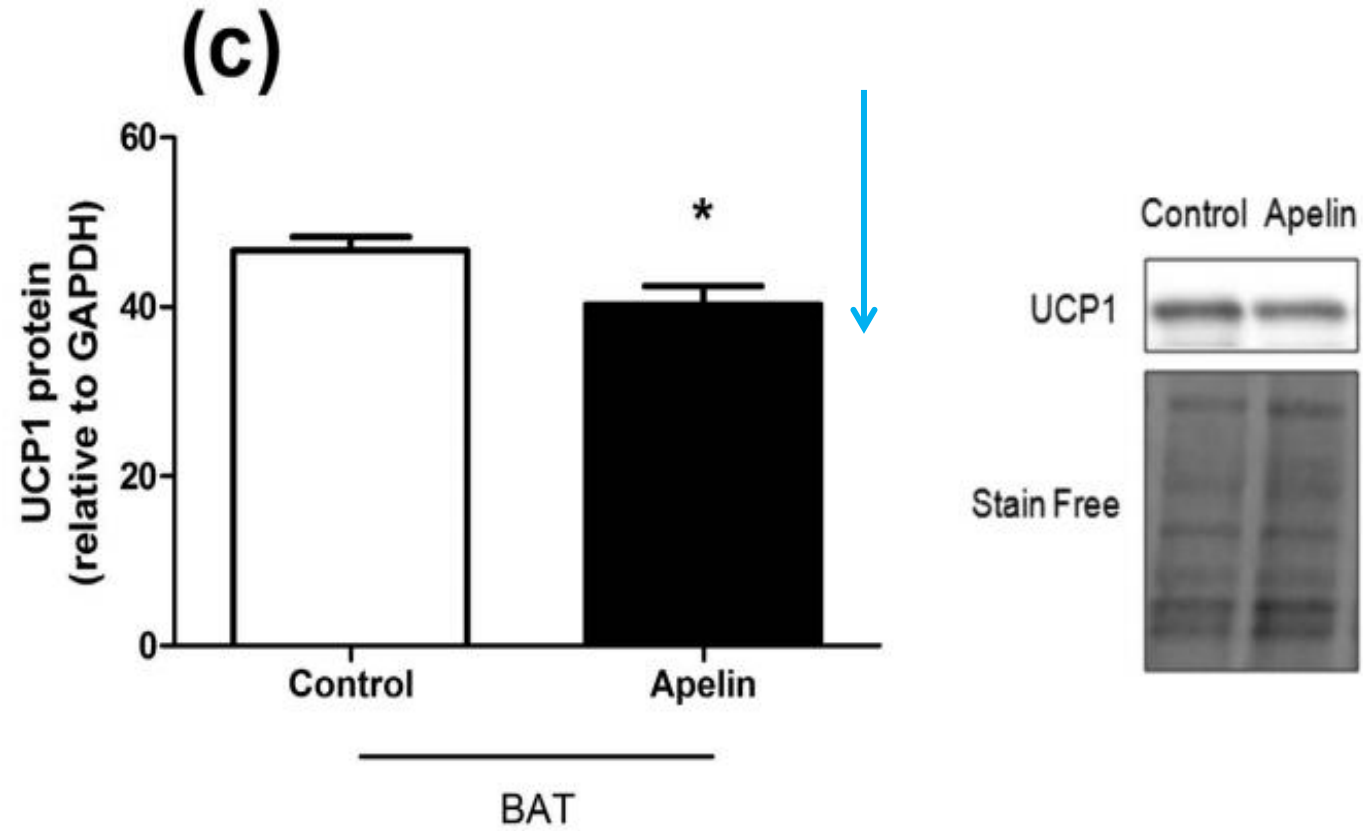


PRDM16是调节棕色脂肪细胞形成的关键转录因子,是控制棕色和白色脂肪细胞特异基因表达程序的分子开关。其机制是C末端结合蛋白和过氧化物酶体增殖剂活性受体 γ 辅助激活子1(PPAR- γ coactivator-1 α and, β PGC-1 α/β)竞争性结合PRDM16,分别形成PRDM16/CtBPs和PRDM16/PGC-1s转录复合物,前者可激活棕色脂肪特异基因的表达,后者则抑制白色脂肪特异基因的表达。

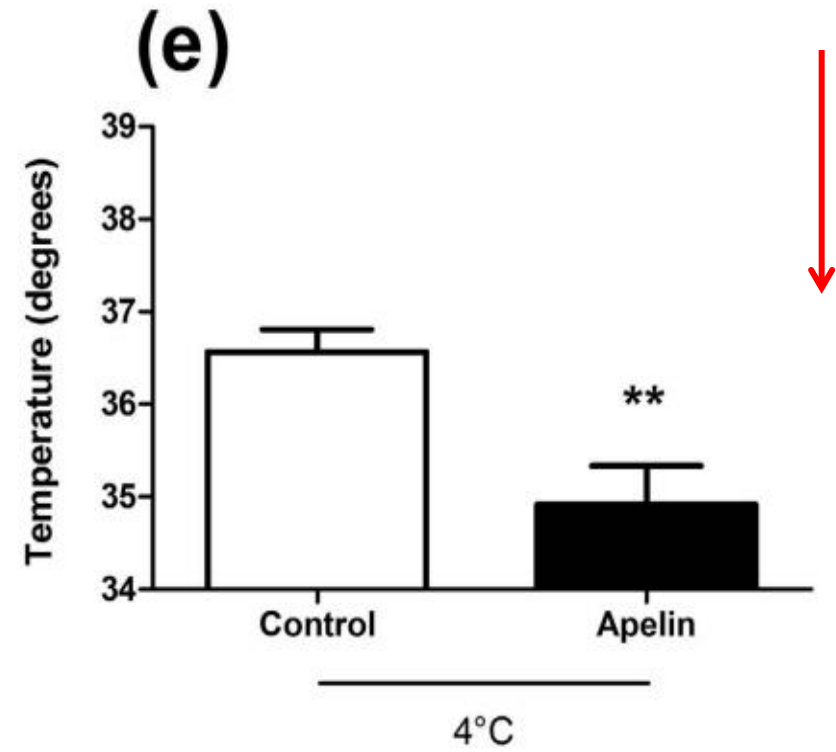
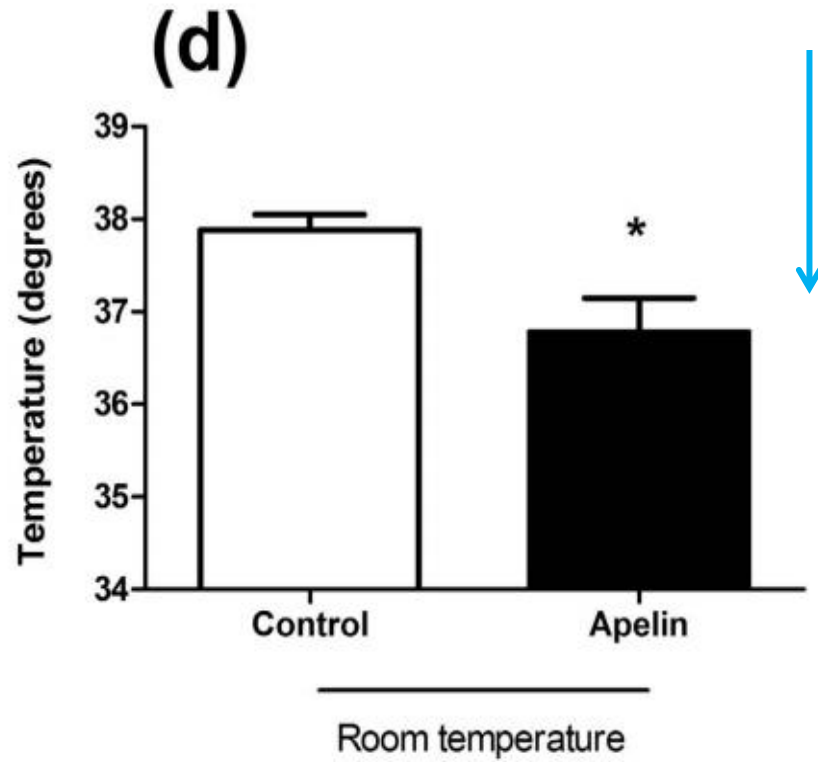
4、慢性ICV Apelin改变产热功能和棕色脂肪作用



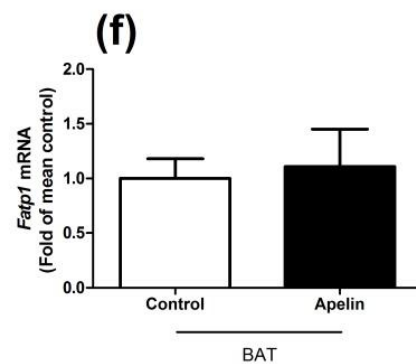
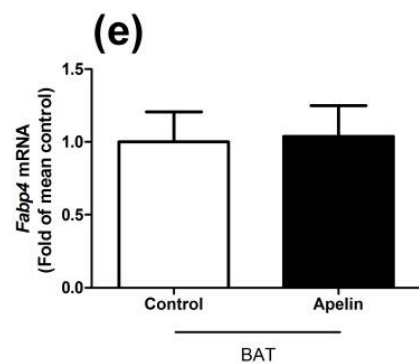
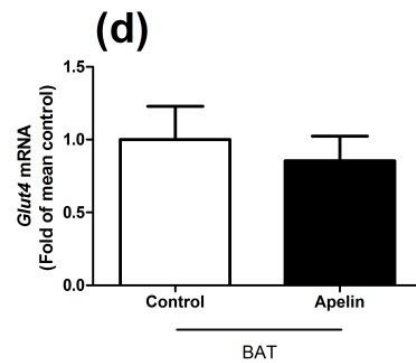
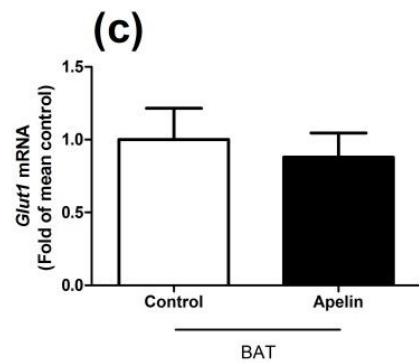
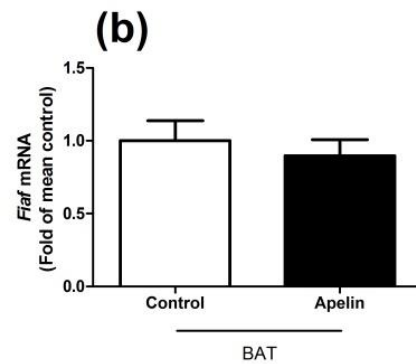
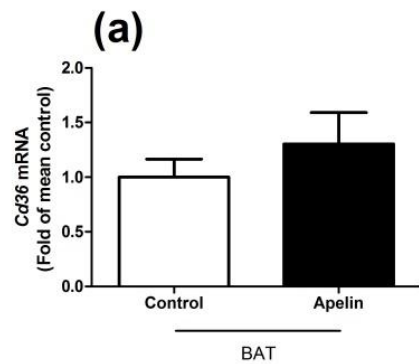
4、慢性ICV Apelin改变产热功能和棕色脂肪作用



4、慢性ICV Apelin改变产热功能和棕色脂肪作用



4、慢性ICV Apelin改变产热功能和棕色脂肪作用



04

讨论和思考

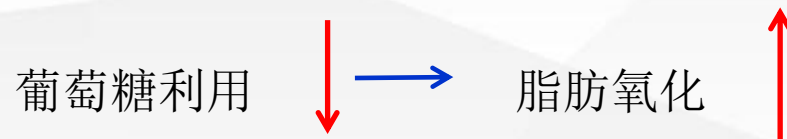
Apelin处理，下丘脑IL1 β 和iNOS mRNA水平增加，验证了apelin在下丘脑中的炎症作用。

但是，下丘脑iNOS蛋白的表达显著增加，IL1 β 没有明显变化。这些数据与变化的mRNA的表达不完全一致。

研究表明，特定的大脑区域包括下丘脑IL1 β 的表达存在昼夜节律。此外，研究表明小胶质细胞的炎症反应也受内在昼夜节律的控制。包括TNF- α 和IL-6，IL-1 β 都存在时钟，从而表明时间是一个需要考虑的因素调查脑的炎症干预。这种现象是否发生在目前的实验环境中？有待调查。

Apelin注入大脑的两周后我们没有观察到体重和脂肪量的发展出现显著的变化，但是能量消耗显著减少。本实验不能排除更长时间的处理可能会显著影响体重和脂肪储存，但是作者用ICV Apelin灌注一个月后发现体重没有显著变化。

另一个结果是慢性apelin处理出现轻微的但是值得关注的现象，在日照的条件下呼吸商降低了。这个发现可能支持了之前学者表达的用外周的长期apelin处理，会有一个转向脂肪氧化而不是碳水化合物的利用的趋势。因此，这或许可以解释为什么没有体重的增加和脂肪的堆积。原因可能是为了在病理状态下补偿减少的能量消耗。



事实上，我们先前已经公布，慢性ICV Apelin增加肝脏新糖原生成，因此促进小鼠的糖尿病表型的发展。最近，Perry等人有显示肥胖/糖尿病小鼠中观察到的肝新糖原生成增加是由于肝脏乙酰辅酶A的增加（肝细胞ATP或乙酰辅酶A(CoA)供应充分时，能加强丙酮酸羧化而成糖。），而肝脏乙酰辅酶A的增加是由于白色脂肪组织脂肪氧化的增加。总之，我们的数据支持的假设是，尽管能源消耗减少与棕色脂肪组织功能障碍，在实验模型中观察到的肝糖原生成的增加有利于倾向于证实脂质氧化增加。



我们发现，糖尿病前期的ICV Apelin处理出现了PGC1 α （线粒体生物合成）和PRDM16 mRNA（BAT分化）的表达减少和BAT UCP1（BAT功能）蛋白水平降低。这里，我们发现中枢apelin对棕色脂肪的功能发挥了负面作用，而不是直接作用于棕色脂肪生成能力或是褐变的过程。

这些参与棕色脂肪产热的关键分子的改变与直肠温度的降低密切相关。

最近，Goto等人已经证明，IL1beta抑制冷诱导的脂肪细胞产热，这带来了一个潜在的分子解释理解我们的中枢apelin处理的小鼠的代谢表型。此外，血浆IL1beta和产热之间的联系可能是UCP1，因为IL1beta能够减少UCP1在脂肪中的表达，



05

结论

能量代谢的中枢调控已成为近年来的研究热点。本实验证明下丘脑结构在很大程度上参与能量代谢。

综合起来，我们发现当增加大脑中的下丘脑Apelin水平，会诱导局部出现炎症状态，也伴随着血浆IL1beta水平的升高。能量消耗的降低可能与棕色脂肪活性的降低和产热作用下降有关。

因此，综合文献和本文研究结果，我们可以推测炎症通过包括棕色脂肪在内的多器官功能障碍，造成T2D的发生和发展。

2017

谢谢观看