View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Xiamen University Institutional Repository

学校编码：10384　分类号__密级__
学号：200215001　UDC___

厦门大学

博 士 学 位 论 文

核受体 PPARγ 与一种新型选择调控剂的结构和功能研究

Structure and function research of the nuclear receptor PPARγ and its novel selective regulator

邱琳

指导教师姓名：李 勇 教 授
专 业 名 称：生物化学与分子生物学
论文提交日期：2016 年 5 月
论文答辩时间：2016 年 5 月
学位授予日期：

答辩委员会主席：卢定强
评阅人：_____

2016 年 4 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（　　李勇　　）课题（组）的研究成果，获得（　　李勇　　）课题（组）经费或实验室的资助，在（　　李勇　　）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（　　）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于　　年　　月　　日解密，解密后适用上述授权。

（　√　）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年　　月

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

过氧化物酶体增殖剂激活受体家族(PPARs)是一类配体依赖型的激活因子，它们是核受体超家族中的重要成员。PPARs 是机体调节新陈代谢平衡的关键转录因子，因此 PPARs 也成为了研发治疗糖尿病，心血管疾病等代谢相关疾病药物的热门分子靶标。

糖尿病是困扰现代人健康的一组常见代谢性疾病，但是目前临床上仍然缺乏安全且有效的糖尿病治疗药物。噻唑烷二酮（Thiazolidinedione，TZD)类药物是经典的PPARγ完全激动剂，由于它能够改善由糖尿病引起的胰岛素耐受等症状，目前已经运用于临床治疗Ⅱ型糖尿病。但是 TZDs 在发挥抗糖尿病功效的同时也伴有严重的副作用，比如肝毒性、水肿、体重增加、骨质疏松和心衰等，这些不良反应也使其应用受限。化学药物治疗在糖尿病的治疗中依旧占据主导地位，因此亟需开发出一类更加安全的抗糖尿病药物。

本文通过前期筛选实验发现一种天然产物白屈菜红碱（Chelerythrine，CHE）是 PPARγ 的特异性配体。以 PPARγ 的完全激动剂 TZD 类药物作为实验对照，我们发现 CHE 对 PPARγ 亲和力介于罗格列酮（rosiglitazone,Rosi）与吡格列酮（piglitazone,Pig）之间，而不同于两者的是其转录激活作用微弱，显示出 CHE 与 TZD 类药物相比对 PPARγ 调节机制的不同。通过对 PPARγ/ CHE 复合物晶体进行三维结构解析，并且与 PPARγ/Rosi 复合物三维结构进行比较，我们从结构生物学的角度揭示了 CHE 和 PPARγ 的特殊结合模式。与 Rosi 相比，CHE 和 PPARγ 的结合导致了 PPARγ 第十二条螺旋结构即 AF-2 结构的松散，这种构象上的变化直接影响了 CHE 介导的 PPARγ 对辅因子的结合，产生了不同于 TZD 类药物的辅因子结合模式，主要表现在辅激活因子的募集能力以及辅抑制因子的解离能力都减弱。另外，在肥胖型糖尿病小鼠 db/db 小鼠中，CHE 能在不引起小鼠体重增加等副作用的情况下降低小鼠血糖、提高小鼠体内胰岛素敏感性，这体现了 CHE 作为 PPARγ 选择性调控剂相较于 Rosi 的优势。最后，体内外磷酸化实验证明了 CHE 是通过抑制 PPARγ 第 273 位丝氨酸的磷酸化作用来改善糖尿病小鼠体内的胰岛素敏感性。综上所述，天然产物 CHE 是 PPARγ 的选择调控剂，能够有效改善Ⅱ型糖尿病并且降低副作用，这也为将来开发以 PPARγ 为靶标的

厦门大学博硕士论文摘要库

Ⅱ型糖尿病治疗药物提供了一种新的更加安全有效的模板。

关键词：PPARγ；白屈菜红碱；Ⅱ型糖尿病

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

The PPARs belong to the nuclear receptor superfamily, a kind of transcription factors which most are ligand-inducible. PPARs are the most important regulators of the metabolic homeostasis, and they have gained a lot of interest as drug targets for cardiovascular disease, diabetes and so on.

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a prevalent metabolic syndrome that is characterized by insulin resistance, hyperglycemia and dyslipidemia. However, the safe and useful medicines available in clinics are still rare. As a member of PPARs, PPARγ is a key factor for the glucose and lipid metabolism. Thiazolidinedione (TZD) drugs are the full agonists of PPARγ that elicit antidiabetic effects by targeting PPARγ. But lots of side effects have been reported at the same time, such as weight gain, fluid retention and cardiovascular risk, which are associated with the transcriptional agonism potency. It's necessary for us to develop more effective and safer drugs for diabetes.

Based on sufficient study results, we report here that a natural product chelerythrine is a unique ligand of PPARγ with a potent PPARγ binding activity but much less classical receptor transcriptional agonism. Structural analysis reveals a unique binding model of PPARγ/chelerythrine complex. Unlike TZDs, chelerythrine destabilizes helix 12 of PPARγ, especially residue tyrosine 473, resulting in a loose configuration of AF-2. The differences in structure lead to a selective cofactor profile distinct from TZDs, as well as a differential target gene expression in adipogenesis in db/db diabetic mice. In addition to the less transcriptional agonism, chelerythrine exhibits more potency to block the phosphorylation at Ser273 of PPARγ by CDK5 compared to TZDs. What's more, it also improves insulin sensitivity and hyperglycemia. Our results establish the mechanism by which chelerythrine retains the benefits of improving insulin sensitivity while reducing the adverse effects of TZDs. It also indicates that the natural product chelerythrine is a promising pharmacological temple by selectively targeting PPARγ for further development in the clinical treatment of

厦门大学博硕士论文摘要库

insulin resistance.

Key words: PPARγ; Chelerythrine; Type 2 diabetes mellitus

厦门大学博硕士论文摘要库

目录

摘要 IV

Abstract VI

第一章 前 言 1

1.1 PPARγ 的亚型和分布 1

1.2 PPARγ 的结构 2

1.2.1 氨基端（A/B）结构域 3

1.2.2 DNA 结合结构域（DBD） 3

1.2.3 铰链区 4

1.2.4 配体结合结构域（LBD） 4

1.2.5 AF-2 结构域 5

1.2.6 PPARγ-RXR-DNA 复合物结构 5

1.3 PPARγ 的激活 6

1.4 PPARγ 的配体 7

1.5 PPARγ 的生理功能 14

1.5.1 PPARγ 与脂肪分化和脂类代谢 15

1.5.2 PPARγ 与糖类代谢和胰岛素抵抗 17

1.5.3 PPARγ 与炎症反应 18

1.5.4 PPARγ 与癌症 19

1.6 PPARγ 的翻译后修饰 20

1.6.1 PPARγ 的磷酸化 21

1.6.2 PPARγ 的其他转录后修饰 23

1.7 白屈菜红碱（Chelerythrine）简介 23

1.7.1 CHE 的抗菌作用 24

1.7.2 CHE 的抗炎作用 24

1.7.3 CHE 的抗肿瘤作用 24

1.7.4 CHE 的其他作用 25

厦门大学博硕士论文摘要库

1.8 研究目的和意义 25

第二章 实验材料和方法 21

2.1 药品与试剂 21

2.2 主要实验仪器 22

2.3 实验方法 22

2.3.1 重组质粒的构建 23

2.3.2 细胞水平实验 30

2.3.3 分子水平实验 33

2.3.4 重组蛋白的表达与纯化 36

2.3.5 动物实验 39

第三章 实验结果 44

3.1 Chelerythrine 是 PPARγ 的一种选择性调控剂 44

3.2 Chelerythrine 调控 PPARγ 辅因子募集 47

3.3 Chelerythrine 和 PPARγ 的复合物晶体结构 50

3.3.1 Chelerythrine 和 PPARγ LBD 的特殊结合模式 52

3.3.2 Chelerythrine 作为部分激动剂的结构机制 54

3.4 Chelerythrine 能够改善 db/db 小鼠的胰岛素抗性 57

3.4.1 Chelerythrine 不会导致实验小鼠的体重增加 57

3.4.2 Chelerythrine 能够降低血糖，改善 db/db 小鼠的胰岛素敏感性 ... 60

3.5 Chelerythrine 能够抑制 CDK5 介导的 PPARγ 磷酸化 63

第四章 讨 论 66

4.1 天然小分子药物用途的再定位 67

4.2 PPARγ 选择性调控剂的特殊结合模式 67

4.3 PPARγ 磷酸化在改善胰岛素敏感性的作用 68

4.4 转录活性或是转录后修饰？ 68

4.5 实验中的不足 69

4.6 总结 69

附录 1 缩略语及中英文对照 70

厦门大学博硕士论文摘要库

参考文献 73

致谢.....86

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of contents

Abstract in Chinese ..... **IV**

Abstract in English ..... **VI**

Chapter 1 Introduction **1**

1.1 Isoforms and tissu **1**

1.2 Structure of PPARγ **2**

1.2.1 N-terminal(A/B)region 3

1.2.2 DNA binding domain(DBD) 3

1.2.3 Hinge 4

1.2.4 Ligand binding domain(LBD) 4

1.2.5 AF-2 5

1.2.6 Structure of PPARγ-RXR-DNA 5

1.3 Activation of PPARγ **6**

1.4 PPARγ ligands **7**

1.5 Function of PPARγ **14**

1.5.1 Adipocyte differentiation and lipid metabolism 15

1.5.2 Glucose metabolism and insulin resistance 17

1.5.3 Inflammation 18

1.5.4 Tumor 19

1.6 Post-translation modification of PPARγ **20**

1.6.1 Phosphorylation of PPARγ 21

1.6.2 Other PTMs of PPARγ 23

1.7 Chelerythrine **23**

1.7.1 Anti-microbial 24

1.7.2 Anti-inflammation 24

1.7.3 Anti-tumor 24

1.7.4 Others 25

厦门大学博硕士论文摘要库

1.8 Singnificance of research.....25

Chapter 2 Materials and methods.....21

2.1 Drugs and reagents.....21

2.2 Instruments.....22

2.3 Methods.....22

2.3.1 Recombinant plasmid cloning..... 23

2.3.2 Cell experiments..... 30

2.3.3 Molecular experiments..... 33

2.3.4 Protein expression and purification..... 36

2.3.5 Animal experiments..... 39

Chapter 3 Results.....44

3.1 Chelerythrine is a selective modulators of PPARγ.....44

3.2 Chelerythrine regulates PPARγ in cofactor binding assay.....47

3.3 Structure of the chelerythrine/PPARγ complex.....50

3.3.1 Chelerythrine recognizes PPARγ in a unique binding mode 52

3.3.2 Structural insights into the partial agonism of chelerythrine..... 54

3.4 Chelerythrine improves insulin resistance in db/db mice.....57

3.4.1 Chelerythrine does not lead to weight gain in db/db mice..... 57

3.4.2 Chelerythrine improves insulin resistance and hyperglycemia 60

3.5 Chelerythrine blocks the CDK5-mediated phosphorylation of PPARγ.....63

Chapter 4 Discussion.....66

4.1 Fuction reposition of the natural drug.....67

4.2 Special binding mode of SPPARM.....67

4.3 Function of phosphorylated PPARγ in insulin resistance.....68

4.4 Transcription activity or post-translation modification.....68

4.5 Area for improvement.....69

4.6 Conclusion.....69

Appendix 1 Abbreviations.....70

厦门大学博硕士论文摘要库

Reference 73

Ackownledgement.....86

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前 言

核受体超家族是一类重要的核转录因子，它通过作用于 DNA 上特定的应答原件来调控下游目的基因的表达，参与机体内的各项生命活动[1, 2]，现已发现人源的核受体共有 48 种[3]。过氧化物酶体增殖剂激活受体（Peroxisome proliferator-activated receptor，PPARs）是一类配体依赖性的核受体物质，1990 年 Issemann 团队首先发现了 PPAR 的存在[4]。作为配体激活型的转录因子，PPARs 主要是通过结合不同的配体导致自身构象发生改变从而募集相应的辅因子来调控目的基因的表达[5]。在哺乳动物细胞中 PPARs 由三种亚型组成：PPARα、PPARδ 和 PPARγ，它们虽然具有相似的结构但是在组织分布、配体特异性以及生理功能等方面都存在差异[6]。在这三种亚型中，PPARγ（nuclear receptor subfamily 1, group C, member 3, NR1C3）因其在营养物质代谢、脂肪分化和胰岛素抵抗等方面的重要作用获得了最为广泛的关注和研究。

1.1 PPARγ 的亚型和分布

PPARγ 最初于非洲爪蛙蟾的肝脏组织中被克隆出并且被鉴定为 PPARs 的一员[7]。随着研究的开展，小鼠和其它物种体内也很快发现了 PPARγ 的踪迹，这些研究同时也发现不同物种的 PPARγ cDNA 序列具有较高同源性，例如鼠源 PPARγ 和非洲爪蛙蟾的 PPARγ 相似性达到 75%[8]，而人与小鼠的 PPARγ 的相似性达 91%[9]。

根据研究报道，人类 PPARγ 基因位于第 3 号染色体短臂（3p25），该基因含有 9 个外显子[10]。由于基因转录时所用的启动子和剪接方式的不同，PPARγ mRNA 可以分为 γ1、γ2、γ3 和 γ4 四种亚型，这四种不同的 mRNA 最终编码两种不同的 PPARγ 蛋白质： PPARγ1 和 PPARγ2[11-13]。如图 1.1 所示[14]，PPARγ1 mRNA、PPARγ3 mRNA 和 PPARγ4 mRNA 翻译所得蛋白均为 PPARγ1，而 PPARγ2 mRNA 翻译 PPARγ2 蛋白。进一步研究发现，PPARγ1 和 PPARγ2 蛋白分别由 477 个氨基酸和 505 个氨基酸组成，相比 PPARγ1，PPARγ2 蛋白在 N-末端多 30 个氨基酸残基。虽然二者氨基酸数量存在差异，但它们享有相同的 AF-1、DNA 结

厦门大学博硕士论文摘要库

合域及配体结合域等结构。

PPARγ 在机体内的分布有一定的组织特异性，在脂肪组织中的表达峰度高，但是在机体内的众多组织中都能检测到表达如脾脏、巨噬细胞、肝脏等[15, 16]。在啮齿类动物中，PPARγ 主要在脂肪组织中表达，而在人体，除了在脂肪组织大量表达外，在巨噬细胞以及其他细胞，如肝、肾、肺、脾脏及直肠等组织中均有表达 [11, 17]。PPARγ1 是 PPARγ 的主要形式，它的表达范围也相对广泛，但 PPARγ2 表达范围较窄，主要在脂肪组织中表达[18]。有研究认为，PPARγ 的 PPARγ2 这一亚型相比于 PPARγ1 有更高的转录激活能力[19]，并且对于脂肪的合成过程更为重要[20]，这些差异也有可能是因为两种亚型的主要表达部位不同。

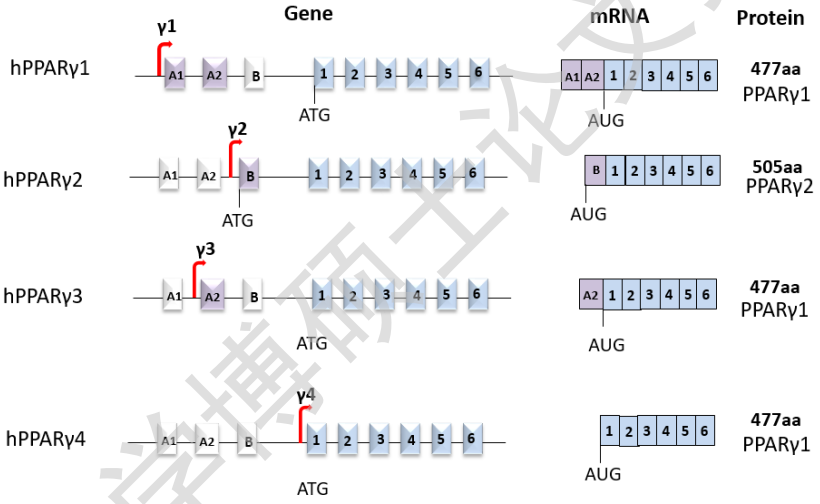

图 1. 1 人 PPARγ 的亚型

Fig. 1.1 hPPARγ isoforms

1.2 PPARγ 的结构

核受体蛋白在结构上具有高度的同源性，为了方便研究者们的研究，习惯将核受体蛋白分为六个区域，并且用字母 A-F 进行标记。PPARγ 的蛋白质结构和大部分核受体结构相似[21]，如图 1.2 所示，主要由四个功能结构域组成，它们包括：氨基端的 A/B 结构域、C 结构区的 DNA 结合结构域（DNA-binding domain, DBD）、连接 C 区域和 E/F 区域的 D 铰链区和由 E/F 结构区域组成的羧基端配体结合结构域（ligand-binding domain，LBD）。

厦门大学博硕士论文摘要库

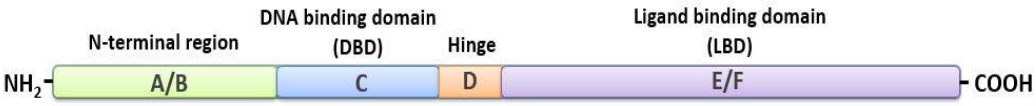

图 1. 2 PPARγ 一级结构

Fig. 1.2 PPARs primary structures

1.2.1 氨基端（A/B）结构域

PPARγ 的氨基端结构域由 A/B 两个区域组成，和多数核受体一样，这一结构域因具有转录激活功能所以也被称为转录激活功能域-1（AF-1）。AF-1 结构域是一段存在于大部分核受体中的固有的无序序列[22]，它的保守性差，序列和长度在不同核受体中也存在高度差异性[23]。在核受体蛋白的研究中对 AF-1 区域的了解还比较少，现阶段都没有 AF-1 结构域的晶体结构被报道，其作用分子机制也不明确。虽然 AF-1 能够不依赖配体行使其激活功能，但在核受体结构完整的情况下，AF-1 的作用还是会受到配体及辅因子的调控，如 SRC1、TIF2 等[24, 25]。目前有文献报道，当 AF-1 与一些特殊分子相结合时能够增强自身的有序性，比如当糖皮质激素受体（GR）、雌激素受体（ER）和孕激素受体（PR）等与 TATA 结合蛋白（TBP）相互作用后能增强 AF-1 区域的结构的有序性[26, 27]。AF-1 结构域参与调控 PPARγ 的转录活性，比如 PPARγ 的氨基端结构域中存在一些丝氨酸残基，丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)催化这些残基磷酸化后会使 PPARγ 的活性受到抑制[28]。也有研究表明 AF-1 结构参与核受体蛋白的翻译后修饰,如 PPARγ 的 AF-1 区第 107 位的赖氨酸可被 SUMO 化修饰[29]。目前认为核受体的 AF-1 区域对于核受体发挥其特异性作用具有重要意义。

1.2.2 DNA 结合结构域（DBD）

根据目前的研究表明，除了 DAX1 和 SHP 这两个没有 DNA 结合结构域(DBD)的核受体外，DBD 在各种核受体蛋白中的序列和结构都十分保守。DNA 结合结构域顾名思义是指核受体结构中能够和 DNA 双螺旋结构结合的结构域，而与 DBD 结合的 DNA 序列为激素反应元件（HREs）。PPARγ 蛋白同样也包含

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the “Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on http://etd.calis.edu.cn/ and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.

2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库