文章编号:1000-5404(2008)12-1167-03

论著

Angptl3基因在大鼠高脂模型中组织表达及其与血脂的关系

王 欣,王继红,黄家利,李 倩,曾建涛,商文静 (重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨Angptl3基因在大鼠高脂模型中各组织表达及其与血脂的关系。**方法** 将60只清洁型SD大鼠随机分为4组:正常对照组、高脂血症组、糖尿病并发高脂血症组、IgA肾病并发高脂血症组。采用定量PCR(SYBR Green Ⅰ)方法,检测以上4组大鼠脑、肺、心、胃、肝、肾、脂肪等7种组织中Angptl3 mRNA的表达。**结果** Angptl3在4组大鼠的肝、肾组织中均有表达,其余5种组织中均未检测出有表达。其中肝表达量占总量的90%左右;并且随着表达总量的增加,肝表达量增加幅度较大。**结论** Angptl3在成年雄性SD大鼠肝、肾组织中特异表达,且此特异性不随血脂水平的改变而改变。

关键词:Angptl3;高脂血症;定量PCR;组织分布;动物模型
中图法分类号:R-332;R341;R589.2 **文献标识码**:A

Correlation of Angptl3 expression in rats with hyperlipidemia and levels of plasma lipid

WANG Xin, WANG Ji-hong, HUANG Jia-li, LI Qian, ZENG Jian-tao, SHANG Wen-jing (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the correlation of the expressions of angiopoietin-related gene 3 (Angptl3) in the brain, lung, heart, stomach, liver, kidney and adipose tissue in hyperlipidemia rats and the levels of plasma lipid. Methods A total of 60 clean-grade male SD rats (200 – 220 g) were randomly divided into 4 groups: control group (group C); hyperlipidemia group (group H); Diabetic hyperlipidemia group (group D). Real-time PCR (SYBR Green Ⅰ) was used to detect mRNA expressions of Angptl3 in the above mentioned tissues. Results It was demonstrated that Angptl3 were expressed in the liver and kidney of every group, but not in other tissues. Its expression was correlated with TG level, and 90% of total angptl3 mRNA were expressed in the liver. Conclusion Angptl3 is expressed in the liver and kidney exclusively, which is not changed with the alteration of blood lipid.

Key words: angiopoietin-related gene 3; hyperlipidemia; real-time PCR; tissue expression; rats

血管生成素样蛋白3(angiopoietin-related protein 3, ANGPTL3)是1999年Conklin等[1]发现的一种多功能分泌因子,由血管生成素相关基因3(angiopoietin-related gene 3, Angptl3)编码,对小鼠Northern blot分析显示,其主要在肝表达。Shimamura等[2-4]研究表明,ANGPTL3的主要作用是调节脂类代谢:抑制脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)的活性,减少血液中三酰甘油的清除,提高其血浆水平,并能与脂肪组织直接结合促进脂肪分解。心脑血管疾病已经逐渐成为人类致死致残的主要原因,而高脂血症又是这些疾病的首要危险因素,因此,研究高脂血症的代谢通路及调节机制,进而找到新的治疗方法成为当前该领域的研究热点。本实验拟建立SD大鼠"高脂血症"、"2型糖尿病并发高脂血症"、"IgA肾病并发高脂血症"模型,采用荧光定量PCR的方法初步探讨Angptl3在不同疾病状态下体内各组织的表达,为进一步研究高脂血症的代谢通路奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物分组及造模

清洁级雄性SD大鼠60只(重庆医科大学实验动物中心),体质量200~220 g。随机分为4组(15只/组):正常对照组、高脂血症组、糖尿病组、IgA肾病组。正常对照组在整个实验过程

基金项目:重庆医科大学创新基金(CX0528)
Supported by the Innovation Foundation of Chongqing Medical University (CX0528)
作者简介:王 欣,男,山东省枣庄市人,硕士研究生,主要从事高脂血症方面的研究。电话:(023)68485140, E-mail: wangxin_km@yahoo.com.cn
通信作者:王继红,电话:(023)68485140,E-mail:wjhkyh@163.com
收稿日期:2007-05-16;修回日期:2007-09-27

中用普通饲料喂养;其余3组用自制高脂饲料(1%胆固醇、5%奶粉、20%猪油、0.5%胆盐、73.5%基础饲料)喂养3个月,以饮食诱导形成高脂状态。

高脂血症组:在整个试验过程中仅进行饮食诱导,不给予以其他干预;糖尿病组[5,6]:高脂饲养2个月后,按30 mg/kg腹腔注射STZ,再高糖、高脂饲养1个月;IgA肾病组[7]:用免疫原牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA),按400 mg/kg隔天1次灌胃,持续6周;皮下注射蓖麻油0.5 ml + CCl_4 0.1 ml,每周1次,持续8周;第6、8周予以0.05 mg脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)/只尾静脉注射,建立IgA肾病模型。

1.2 尿样本采集与检测

处死动物前收集正常对照组、IgA肾病组大鼠24 h尿液做尿常规及24 h尿蛋白检测。在造模的3个月内,每天观察IgA肾病组大鼠有无肉眼血尿。

1.3 血样本采集与检测

用毛细玻璃管于内眦静脉丛采血,用全自动生化分析仪检测血糖、血脂含量。

1.4 组织样本采集

将动物颈椎脱臼致死,剪取小块心、肺、胃、肝、肾、大脑等7种不同的组织,标明样品编号后,迅速投入液氮中备用。此过程中所用器械、耗材等均预先进行RNase抑制剂处理。

1.5 组织样本检测

采用Trizol提取各组织总RNA,以≤0.5 μg总RNA为模板、Oligo(dT)$_{20}$为引物进行逆转录反应,10 μl反应体系,条件为:42 ℃ 5 min;99 ℃ 5 min;4 ℃ 5 min。

两对用于定量检查的引物序列GAPDH(142 bp)正义5′-GCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3′,反义5′-GGTGGTGAAGACGCCAGTA-3′,Angptl3(136 bp)正义5′-CAAGATGATCTGCCTGCTGACT-3′,反义5′-ATGTCCGTGGAGTGCCTGA-3′。上述引物扩增的DNA片段已于前期工作中装载到质粒载体上。将质粒按照1∶10比例进行等比例稀释作为标准品,并与待测样品同时在ABI 7500荧光定量PCR仪上进行反应,20 μl反应体系(SYBR Green Master Mix 10 μl,Primer1 4 pmol,Primer2 4 pmol,cDNA 2 μl,H_2O up to 20 μl),反应条件:94℃ 2 min;94℃ 20 s,56℃ 20 s,72℃ 40 s,40个循环。反应结束后,取5~10 μl PCR产物,2.5%琼脂糖凝胶电泳观察。

标准品反应结束后,得到每个样品的Ct值,通过Ct值与起始模版浓度的对数值之间存在的线性关系绘制标准曲线。待测样品中管家基因GAPDH的Ct值代入管家基因的标准曲线,目的基因Angptl3的Ct值代入目的基因Angptl3的标准曲线,换算出各自的起始模板量。用目的基因的定量结果除以管家基因的定量结果即可得到校正值。将对照组大鼠肝组织的平均表达量定为1,计算样品的相对表达量。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5统计软件进行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 尿液检测

15只对照组大鼠均未检测出血尿,IgA肾病组大鼠9只肉眼血尿、5只镜下血尿(仅1只大鼠未出现血尿,剔出实验组)。14只IgA肾病组大鼠24 h尿蛋白量[(12.85 ± 1.24) mg]显著高于正常对照组大鼠[(4.62 ± 1.36)mg],差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 血样本检测

空腹血糖≥11.1 mmol/L者为糖尿病模型成功,15只大鼠均造模成功;糖尿病组大鼠空腹血糖(19.56 ± 4.96) mmol/L明显高于正常对照组大鼠(6.58 ± 0.86) mmol/L,其差异具有统计学意义($P<0.01$)。各模型组大鼠总三酰甘油(triglyeride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)水平均较正常组有明显升高(表1),差异有统计学意义($P<0.01$)。

表1 各组大鼠血脂水平(mmol/L, $n=15$, $\bar{x} \pm s$)

组别	总三酰甘油		总胆固醇	
	造模前	造模后	造模前	造模后
对照组	0.68 ± 0.32	0.94 ± 0.17	2.29 ± 0.30	2.47 ± 0.27
IgA肾病组	0.72 ± 0.31	1.92 ± 0.19[a]	2.38 ± 0.23	3.48 ± 0.43[a]
高脂血症组	0.69 ± 0.24	2.23 ± 0.46[a]	2.26 ± 0.33	4.14 ± 0.46[a]
糖尿病组	0.71 ± 0.28	2.89 ± 0.51[a]	2.32 ± 0.26	2.63 ± 0.32[a]

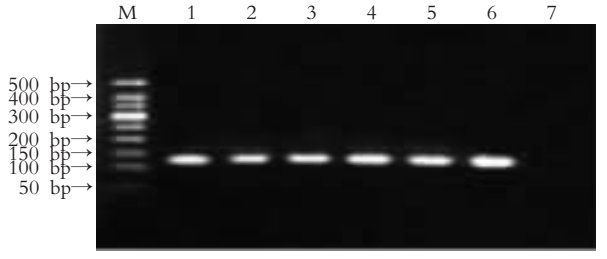
a: $P<0.01$,与对照组比较

2.3 组织样本检测

2条标准曲线相关系数分别为:0.999 6、0.997 6,非常接近于1,用于定量比较理想。产物溶解曲线分析呈单一峰型,无二聚体等非特异性扩增。2.5%琼脂糖凝胶电泳观察条带单一、位置正确(图1)。

根据公式:$E = 10^{[-1/slope]} - 1$ (slope表示斜率),计算出每组样品的反应效率E分别为:0.979 3(GAPDH)、0.862 3(Angptl3)。

样品的相对表达量见表2。



M: 标准; 1、3、5: GAPDH; 2、4、6: Angptl3; 7: 对照

图1 PCR产物2.5%琼脂糖凝胶电泳结果

表2 Angptl3基因各组织相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	脑	肺	心	肝	胃	肾	脂肪
正常对照组	-	-	-	1.00 ± 0.26	-	0.09 ± 0.02	-
IgA肾病组	-	-	-	1.92 ± 0.32	-	0.12 ± 0.02	-
高脂血症组	-	-	-	2.26 ± 0.38	-	0.15 ± 0.03	-
糖尿病组	-	-	-	5.68 ± 0.64	-	0.33 ± 0.05	-

3 讨论

Ono等[8]研究表明,小鼠ANGPTL3在连接区域内断裂,包含氨基端的卷曲螺旋结构的断裂片段,具有抑制脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)活性的作用,

而抗断裂突变的 ANGPTL3 对 LPL 抑制作用明显减弱。Conklin 等[1]对小鼠胚胎 Northern blot 分析认为 Angptl3 在胚胎形成 15 d 时,即肝形成以前就有表达,且成年后在肝、肾中持续表达;Ge 等[9]采用荧光定量 PCR 的方法,对成年小鼠各组织检测显示,其主要在肝中表达。从生物进化的角度分析,大鼠与人的亲缘关系较小鼠远,但我们的实验结果显示 Angptl3 基因的组织分布与小鼠完全相同,仍只在肝、肾组织中表达。本研究采用 Real-time PCR 方法对大鼠肝、肾组织 Angptl3 mRNA 检测结果显示,在正常情况下肝组织 Angptl3 mRNA 占体内总量的 90% 左右;并且随着表达总量的增加,肝表达量增加幅度较大,而肾表达量增加并不明显,上述比值也随之变大。实验结果还表明:血脂水平升高并未影响到 Angptl3 的组织表达特异性,仅对各组织细胞内 Angptl3 表达数量产生了影响。将血脂测定结果与 Angptl3 定量结果进行比较发现:Angptl3 的表达量与血液中三酰甘油水平存在正相关,而与总胆固醇的水平相关性不大。

另有报道,Angptl3 除了与血脂代谢相关外,还与血管的生成、动脉壁厚度、造血功能等也存在密切关系[10,11]。Camenisch 等[12]的实验表明,重组 ANGPTL3 羧基端纤维蛋白原同源结构可与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 连接,强烈刺激鼠角膜的血管生成,显示其可能具有促进血管生成的作用。本实验室其他研究结果显示 Angptl3 在肺癌等癌细胞株也有稳定表达,结合 Conklin 等[1]的研究结果,我们推测:在低分化细胞中,Angptl3 主要参与血管的生成;在高分化的细胞中,Angptl3 主要参与了脂类的代谢。目前对 ANGPTL3 结构和功能的研究还不够深入,有待进一步研究。

参考文献:

[1] Conklin D, Gilbertson D, Taft D W, *et al*. Identification of a mammalian angiopoietin-related protein expressed specifically in liver[J]. Genomics, 1999, 62(3): 477 – 482.

[2] Shimizugawa T, Ono M, Shimamura M, *et al*. ANGPTL3 decreases very low density lipoprotein triglyceride clearance by inhibition of lipoprotein lipase[J]. J Biol Chem, 2002, 277(37): 33742 – 33748.

[3] Shimamura M, Matsude M, Kobayashi S, *et al*. Angiopoietin-like protein 3, a hepatic secretory factor, activates lipolysis in adipocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(2): 604 – 609.

[4] Shimamura M, Matsude M, Yasumo H, *et al*. Angiopoietin-like protein3 regulates plasma HDL cholesterol through suppression of endothelial lipase[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(2): 366 – 372.

[5] Storlien L H, Pan D A, Kriketos A D, *et al*. High fat diet-induced insulin resistance. Lessons and implications for animal studies[J]. Ann N Y Acad Sci, 1993, 683: 82 – 90.

[6] Proietto J, Filippis A, Nakhla C, *et al*. Nutrient-induced insulin resistance[J]. Mol Cell Endocrinol, 1999, 151(1 – 2): 143 – 149.

[7] 汤　颖, 娄探奇, 成彩联, 等. 实验性 IgA 肾病模型的改进[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2006, 27(2): 184 – 187.

[8] Ono M, Shimizugawa T, Shimamura M, *et al*. Protein region important for regulation of lipid metabolism in angiopoietin-like 3 (ANGPTL3): ANGPTL3 is cleaved and activated *in vivo*[J]. J Biol Chem, 2003, 278(43): 41804 – 41809.

[9] Ge H, Cha J Y, Gopal H, *et al*. Differential regulation and properties of angiopoietin-like proteins 3 and 4[J]. J Lipid Res, 2005, 46(7): 1484 – 1490.

[10] Hatsuda S, Shoji T, Shinohara K, *et al*. Association between plasma angiopoietin-like protein 3 and arterial wall thickness in healthy subjects[J]. J Vasc Res, 2007, 44(1): 61 – 66.

[11] Zhang C C, Kaba M, Ge G, *et al*. Angiopoietin-like proteins stimulate *ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells[J]. Nat Med, 2006, 12(2): 240 – 245.

[12] Camenisch G, Pisabarro M T, Sherman D, *et al*. ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration *via* integrin alpha vbeta 3 and induces blood vessel formation *in vivo*[J]. J Biol Chem, 2002, 277(19): 17281 – 17290.

(编辑　吴培红)

《军医大学学报》(英文版)欢迎投稿

Journal of Medical Colleges of PLA 是由 3 所军医大学和南方医科大学共同主办的、国内外公开发行的综合性医学学术类英文期刊,是中国英文版科技论文统计源期刊,并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库、重庆维普数据库。从 2007 年开始,本刊电子版由全球著名的科技出版集团爱思唯尔(Elsevier)负责海外发行,全文已进入 ScienceDirect 全文数据库,期刊网址 http://www.elsevier.com/locate/jmcpla。国内统一刊号:CN31 – 1002/R,国际标准刊号:ISSN 1000 – 1948。双月刊。设有论著、技术与方法、个案报道、交流等栏目。若无彩图,无需缴纳版面费;亦不收取审稿费;无稿酬。投稿要求:中(或大摘要)、英文稿各 1 份,照片提供 3 份。电子投稿 E-mail:gangela@mail.tmmu.com.cn。照片需以附件形式单独提供 JPG 或 TIF 格式。电子投稿请注明英文版。

联系地址:重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部(400038)　　**电话:**(023)68752782