

血管生成素样蛋白家族表达调控及其在动物分子育种领域的现状分析

付玮玮¹, 马云¹, 陈宁博¹, 李何², 白跃宇³

1 信阳师范学院生命科学学院, 河南 信阳 464000

2 信阳职业技术学院应用化学与环境工程学院, 河南 信阳 464000

3 河南省动物卫生监督所, 河南 郑州 450008

付玮玮, 马云, 陈宁博, 等. 血管生成素样蛋白家族表达调控及其在动物分子育种领域的现状分析. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1567–1578.

Fu WW, Ma Y, Chen NB, et al. Expression of angiopoietin-like proteins for animal breeding: a review. Chin J Biotech, 2015, 31(11): 1567–1578.

摘 要: 血管生成素样蛋白 (Angiopoietin-like proteins, Angptls) 是与脂类、葡萄糖、能量代谢和血管生成密切相关的蛋白质家族, 现已发现 8 个成员, 因其在代谢调控和动物辅助选育方面发挥有重要作用而备受研究人员的关注。以下综述了该蛋白家族的结构、介导的信号通路、上游调控基因及代谢网络等方面, 并结合课题组研究工作对其应用于动物育种领域的现状和问题进行了分析, 对前景作了展望。

关键词: 血管生成素样蛋白, 结构, 信号传导, 功能, 动物育种

Received: January 21, 2015; **Accepted:** May 11, 2015

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31172193), Plan For Scientific Innovation Talent of Henan Province (No. 134100510012), Science & Technology Innovation Talents in Universities of Henan Province (No. 2012HASTIT027), Technology Innovation Teams in Universities of Henan Province (No. 14IRTSTHN012).

Corresponding author: Yun Ma. Tel: +86-376-6391081; E-mail: mayun_666@126.com

国家自然科学基金 (No. 31172193), 河南省科技创新人才项目 (No. 134100510012), 河南省高校科技创新人才项目 (No. 2012HASTIT027), 河南省高校科技创新团队项目 (No. 14IRTSTHN012) 资助。

网络出版时间: 2015-09-17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150917.1556.002.html>

Expression of angiopoietin-like proteins for animal breeding: a review

Weiwei Fu¹, Yun Ma¹, Ningbo Chen¹, He Li², and Yueyu Bai³

¹ College of Life Sciences, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, Henan, China

² College of Applied Chemistry and Environmental Engineering, Xinyang Vocational and Technical College, Xinyang 464000, Henan, China

³ Henan Institute of Animal Health Supervision, Zhengzhou 450008, Henan, China

Abstract: Angiopoietin-like proteins are a family of proteins that are closely related to lipid, glucose and energy metabolism, as well as angiogenesis. To date, eight Angptls have been discovered, namely Angptl1 to Angptl8 that play key roles in metabolic regulation and marker assisted selection. In this review, we summarized current progress on the structure, signaling pathways, upstream regulatory genes and metabolic network of Angptl1-8. Finally, in combination with our work, the status and problems of animal breeding as well as the future prospects for Angptls were discussed.

Keywords: Angiopoietin-like proteins (Angptls), structure, signal transduction, function, animal breeding

随着人类生活水平的提高,健康和饮食已逐渐成为人们关注的重点。如何从分子水平上了解机体内在的调控机制不仅有助于疾病诊断,也为动物辅助选育改良提供了可能。长期以来,传统的动物育种依据表型或系谱信息进行,耗时长、成本高;新兴的现代育种则从调控动物表型的基因着手,省时省力。但是由于在种畜上进行的基因结构和功能的研究较为缓慢,这就要求我们通过模式动物小鼠和人信息上的整合为其提供新的技术和知识网络上的参考。笔者实验室长期以来从事家畜遗传育种的相关工作,由于血管生成素样蛋白家族基因(Angiopoietin-like proteins, *angptls*) 在脂类代谢、葡萄糖代谢和能量代谢中均起着重要作用,对于机体代谢调控通路内在机制的揭示和分子标记辅助选育具有非常重要的意义,已成为动物育种的重要候选基因。目前,已发现该家族 8 个成员 (Angptl 1-8),它们的组织表达情况及染色体位置见表 1^[1]。本文就 Angptls 近年来的研

究成果进行综述,并结合课题组研究工作对该家族成员在家养动物应用于分子育种方面的基础研究进展、问题作一简要分析。

1 Angptls 的结构

Angptls 成员拥有共同的结构特征 (Angptl8 除外,仅为非典型的结构特征),它们与血管生成素 (Angiopoietins, Ang) 结构相似而又有所不同: N 端的信号肽序列 (Signal sequence, SS); 介导同源寡聚体形成的螺旋样结构域 (Coiled-coil domain, CCD); 以及 C 端调节配体活性的纤维蛋白原样结构域 (Fibrinogen-like domain, FLD; fibrinogen-homology domain, FHD), 各成员之间的结构特点见图 1^[2]。其中 Angptl8 (又名 Lipasin) 不存在 CCD 和 FLD 结构域,且在培养的 HepG2 细胞中,Angptl8 可促进 Angptl3 的剪切,释放出 Angptl3 的 N 端^[3],该 N 端结构域先前已被证实可抑制脂蛋白脂肪酶 (Lipoprotein lipase, LPL) 的活性^[4]。但最近有研

表 1 *angptls* 基因家族成员的基本情况
Table 1 Properties of *angptls* gene family

<i>angptls</i>	Other common names	Main tissue expression	Chromosomal location		
			Human	Mouse	Bovine
1	<i>ANG3, ANGPT3, AngY, ARP1, dJ595C2.2, KIAA0351, UNQ162, UNQ162/PRO188</i>	Liver, muscle	1	1	16
2	<i>ARP2, AI593246, AW260363, HARP</i>	Heart, vessels, adipose tissue	9	2	11
3	<i>ANL3, ANG-5, FHBL2, ANGPT5</i>	Liver	1	4	3
4	<i>ARP4, PGAR, HFARP, FIAF</i>	Liver, adipose tissue, brain, intestine, kidney, heart	19	17	7
5	<i>ANGL5_HUMAN, A_14_P125422, NP835228.1</i>	Heart	11	--	15
6	<i>AGF, ARP5, ARP3</i>	Liver	19	9	7
7	<i>AngX, dJ647M16.1, CDT6, RP4-647M16.2</i>	Eye (trabecular meshwork)	1	4	16
8	<i>Lipasin, betatrophin, TD26, c19orf80, RIFL, PRO1185, PVPA599, Gm6484</i>	Liver, adipose tissue	19	9	7

Data from website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> and reference^[1].

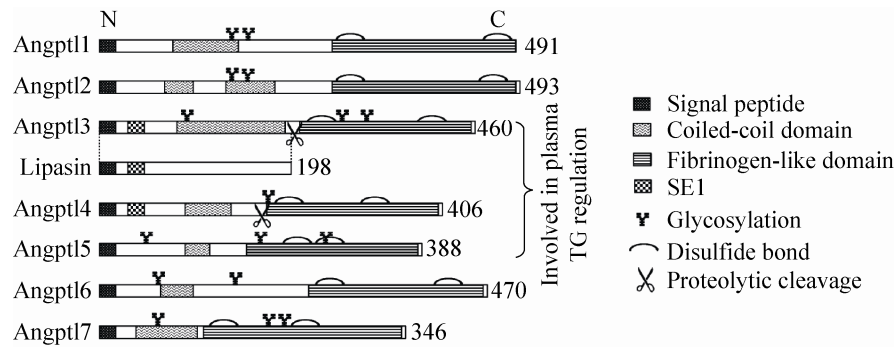


图 1 血管生成素样蛋白家族的结构和蛋白修饰特征^[2]
Fig. 1 Domains and protein modifications of Angptls^[2]. Figure not drawn to scale. Dotted lines denote homologous regions. SE1: a region mediating lipoprotein lipase binding; TG: triglyceride. Angptl3, -4 and -8 have been demonstrated to participate in plasma triglyceride regulation. Notably, both Angptl3 and -4 need to be cleaved to remove the FLD to become active by different proteolytic enzymes respectively, while Angptl8 does not need to be cleaved. Moreover, Angptl8 can promote cleavage of Angptl3.

究发现 Angptl8 对 Angptl3 的促剪切作用并非必需^[5]，目前这一结论尚需更多研究证实。同样，Lei 等^[6]发现 Angptl4 蛋白与 Angptl3 相似，也可发生剪切，剪切位点位于原蛋白转化酶识别序列的第 161–164 个氨基酸处，释放出的功能性 N 端 CCD 可通过干扰 LPL 二聚化不可逆地

抑制 LPL 活性^[7]。Angptls 不能与受体酪氨酸激酶家族的成员 Tie1 和 Tie2 结合 (Tie1 和 Tie2 的结合部位位于 Ang 的 FLD 结构域)，这是其与血管生成素家族的区别所在。最近，有报道发现 Angptls 家族也存在相应的受体，人类中主要为免疫抑制性受体 LILRB2，小鼠则为 PIRB

受体, 这些受体可分别与人和小鼠的 *Angptl1*、-2、-5、-7 成员结合, 对于造血干细胞的干性维持和白血病的研究起到一定作用^[8]。

2 *Angptls* 的信号传导作用

Angptls 家族可通过介导一些信号传导通路, 对细胞发挥调节功能。目前, 该家族中参与信号传导的成员主要为 *Angptl1*、-2、-3、-4、-6 和-7, 涉及的方面包括细胞凋亡活性的调节、细胞黏附和迁移、癌症诱导及其一些代谢过程。Kubota 等^[9]对 *Angptl1* 和-2 研究发现, 两者在血管发育过程中具有协同作用, 且在培养的内皮细胞中, *Angptl1* 和-2 可激活 PI3-K/Akt 通路对细胞凋亡进行抑制。Camenisch 等^[10]发现 *Angptl3* 可通过结合整合素 $\alpha\beta3$, 诱导 $\alpha\beta3$ 依赖的趋触性内皮细胞发生黏附和迁移, 促发的信号包括: Akt 蛋白激酶、促分裂原活化蛋白激酶和黏着斑激酶。Padua 等^[11]对 *Angptl4* 进行了研究, 发现 *Angptl4* 可诱导转移性乳腺癌, 并通过 TGF- β /Smad 信号通路发挥作用。近期有研究发现, *Angptl4* 还可结合并激活整合素 $\beta1$ 和 $\beta5$, 介导信号通路 FAK-Src-PAK1 对细胞迁移进行调节^[12], 并且 *Angptl4* 的羧基端通过抑制 Raf/MEK/ERK 级联信号可有效抑制血管生成^[13]。Urano 等^[14]的研究则表明, 内皮细胞中的 ERK1/2-eNOS-NO 信号通路对血管生成起着关键调控作用, *Angptl6* 可通过激活该通路诱导血管生成和动脉形成, 从而增加血液流动。此外, *Angptl6* 也可通过其他一些途径在代谢过程中发挥作用, 如激活肌肉中的 p38MAPK 信号通路^[15], 通过 Akt/Forkhead Box Class O1-依赖的信号通路抑制糖原异生^[16]等。研究还发现, 人的 *angptl7* 基因启动子区有 4 个 TCF (T cell

factor) /LEF (Lymphoid enhancer factor) 结合位点, 暗示 *Angptl7* 也参与了信号传导, 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的靶标^[17]。这些成果将有助于更加明晰 *Angptls* 在信号传导中发挥的作用, 为后续的研究奠定基础。

3 *Angptls* 的功能

Angptls 在脂类代谢、葡萄糖代谢、能量代谢和血管发生方面均起到一定作用。其家族各成员之间既相互协调、牵制、共同发挥作用, 又各司其职, 在细胞调节中扮演各自的角色。其中, 成员 *Angptl1*、-2、-3、-4 和-6 在调节血管生成方面具有重要作用, 而 *Angptl2*、-3、-4、-6、-8 则在机体的脂肪、葡萄糖和能量代谢方面起着关键调节作用。*Angptls* 家族上游调控基因及该家族成员在脂类和能量代谢中的代谢调控网络关系如图 2 所示。

3.1 *Angptls* 上游调控基因在调控脂类代谢过程中的相互关系

真核生物基因表达的调控主要发生在DNA水平、转录水平、转录后修饰、翻译水平以及翻译后修饰等多种不同层次。Zhang等^[18]通过对 *AdipoQ* 启动子区的拷贝数变异进行研究, 发现 g.9232067_9232133 dup降低了 *AdipoQ* 基因的转录活性, 这既为DNA水平的剂量调控, 又为转录水平启动子区活性的调控。石元等^[19]通过对猪 *CuZnSOD* 基因启动子进行克隆, 发现两个潜在的转录起始位点和该基因转录所必需的基础启动子序列, 为后续的调控机制研究奠定了基础。目前, 越来越多的研究集中在基因转录水平的启动子区, 反式因子与顺式元件的作用机制已成为当今国内外研究的热点。

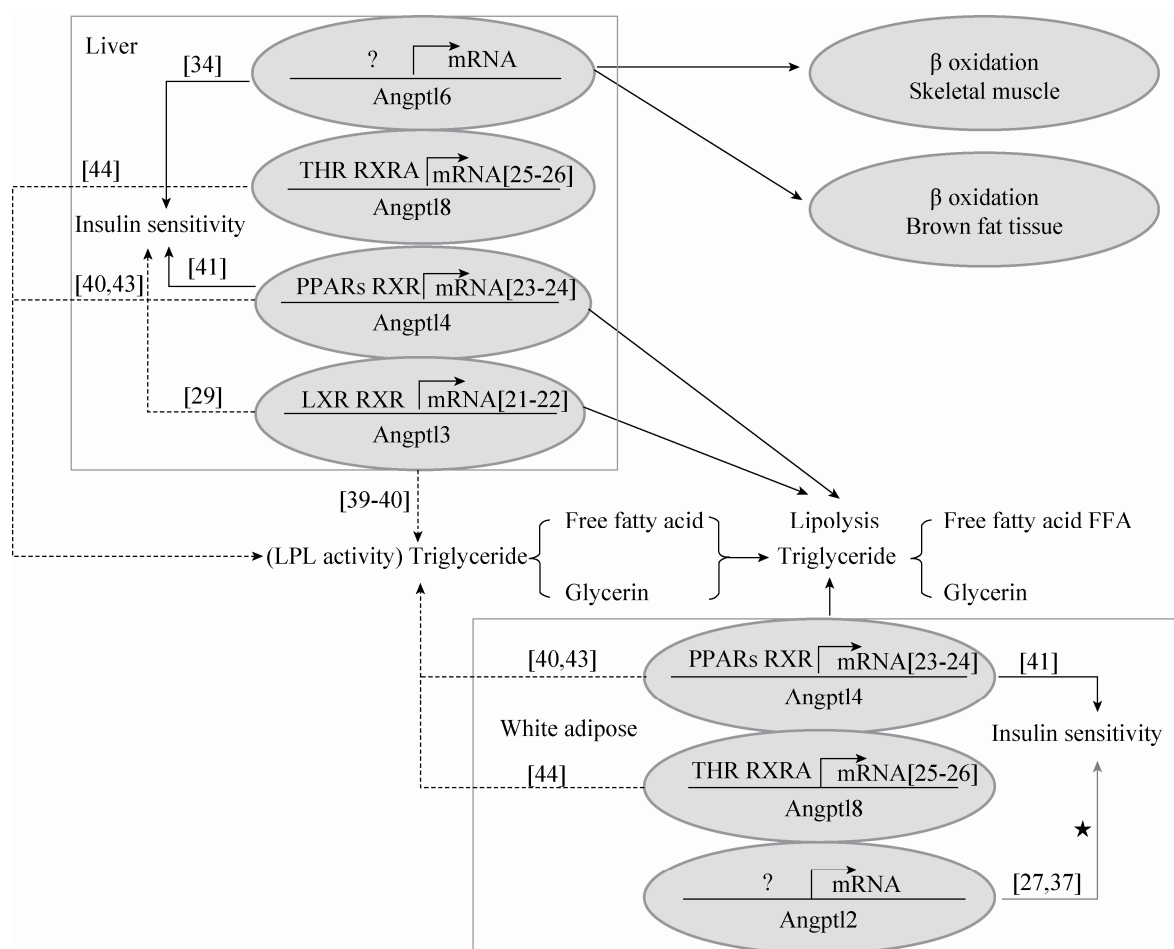


图2 Angptls 家族及其相关基因代谢调控稳态平衡模式图^[21-27,29,34,37,39-41,43-44]

Fig. 2 Metabolic regulation of Angptls and related genes^[21-27,29,34,37,39-41,43-44]. Angptl2, -3, -4, -6, and -8 potentially regulate lipid, glucose, and energy metabolism. Solid line arrows represent the enhancement effects for target gene; dotted line arrows represent inhibitory effects; “?” shows that the studies have not been reported; the solid line arrow with an asterisk indicates the disputed part. Further, Angptl3, -4 and -8 can be governed by a variety of upstream genes, such as *LXRs*, *RXRs* and *PPARs*. Moreover, these three members can also regulate plasma levels of triglyceride by inhibiting LPL activity. *Angpt4* is a downstream target gene of *PPARγ* in adipose tissue as well as a target gene for *PPARα* in liver tissue. The expression of the *angptl3* can be repressed through *PPARβ* competing with *LXRα* for *RXRα*.

现有证据表明,Angptls家族主要受肝X受体(Liver X receptors, *LXRs*)、维甲酸X受体(Retinoid X receptors, *RXRs*)和过氧化物酶体增殖物激活型受体(Peroxisomeproliferator activatedreceptors, *PPARs*)等相关基因的控制。

*LXRs*是一类与脂类代谢相关的核受体,分为α、β两种亚型,由DNA结合区(DBD)和配体结合区(LBD)两部分构成,能与RXR形成异源二聚体LXR/RXR。该异源二聚体与配体结合后可与靶基因上特异的DNA元件(LXRE)结合,调控

靶基因在转录水平上的表达^[20]。PPARs则是一组与脂肪酸代谢调节相关的配体激活核受体转录因子,包括3种亚型: α 、 β/δ 和 γ ,每个亚型都能专一性地同RXRs家族形成异源二聚体。Inaba等发现,*angptl3*基因启动子区有肝X受体(LXR)的反应元件,*angptl3*基因是LXR α 的靶基因^[21],外源性和内源性的LXR配体可以提高*angptl3*基因mRNA和蛋白质水平的表达。PPAR β 可以通过与LXR竞争性结合RXR受体来抑制LXR的激活,从而对*Angptl3*的表达有抑制作用^[22]。研究还发现,*angptl4*在脂肪组织中是PPAR γ 的一个下游靶基因;而在肝脏组织中,该基因又是PPAR α 的一个靶基因^[23]。*angptl4*基因第3内含子部位有PPAR的反应元件^[24],PPARs与RXR相结合后可调节*angptl4*的转录。Tseng等^[25]则发现T3诱导的TRE (Thyroid hormone response element) 可与THR (Thyroid hormone receptor) 和RXRA发生免疫共沉淀,且THR-RXRA异二聚体与*angptl8*基因上游元件相互作用能激发*angptl8*的转录活性。在siRNA抑制(Knockdown)PPAR γ 表达后,3T3-L1细胞系中的*angptl8*转录水平显著降低,证明*Angptl8*调控至少依赖于PPAR γ ,PPAR γ 是一种可以增强*angptl8*转录的重要因子^[26]。截止到今日,该家族其他成员相关研究还没有报道。

3.2 基于人和模式动物小鼠的 *Angptls* 家族在代谢调控方面的研究进展

3.2.1 *Angptls* 家族在人代谢调控方面的研究

Angptls 家族在人代谢调控上的研究集中表现为其对甘油三酯水平、胰岛素敏感性、脂蛋白脂肪酶活性、游离脂肪酸水平的调节方面。众所周知,甘油三酯、游离脂肪酸水平以及脂蛋白脂肪酶活性与脂肪代谢密切相关;胰岛素

敏感性则影响葡萄糖代谢和能量代谢,因此这些研究对于阐明该家族在代谢过程中所起的作用具有重要意义。

2009年,Tabata等^[27]采用免疫组织化学方法分析显示,*Angptl2*由人体脂肪组织的脂肪细胞表达,血清中的*Angptl2*浓度与性别没有关系,但与体重指数、血清胰岛素水平、血清C-反应蛋白之间存在正相关。2011年,Muramoto等^[28]对154名日本肥胖男性进行研究,发现对该群体生活方式进行3个月的特定干预能够促进患者体重减轻并改善糖脂代谢;血清中的*Angptl2*水平与甘油三酯、谷草转氨酶、谷丙转氨酶均存在一定的关联。表明*Angptl2*可在一定程度上反映肥胖,并参与了甘油三酯代谢的调控。

2013年,Robciuc等^[29]发现,*angptl3*完全缺失能够增加胰岛素敏感性和脂蛋白脂肪酶的活性,并降低血清中游离的脂肪酸,为*Angptl3*在调节脂肪酸和葡萄糖代谢方面提供了有力的证据。

2007年,Romeo等^[30]对*angptl4*进行了重测序,发现在欧裔美国人群体中该基因的多态性与低甘油三酯和高密度脂蛋白水平显著相关。2009年,Kersten等^[31]使用酶联免疫吸附定量分析人血浆中的*Angptl4*一昼夜中的表达变化,发现该蛋白在同一个个体内表达量相对稳定,在不同个体间则存在较大差异,且当受试人员遭受长期禁食、慢性热量限制和耐力运动时该蛋白表达量会显著升高,采用脂肪乳注射液和 β -肾上腺素受体激动剂予以治疗时,会显著提升血浆中游离脂肪酸和*Angptl4*的水平。2011年,Smart-Halajko等^[32]首次报道了*angptl4*基因E40K和T266M突变与低甘油三酯水平间的关

联性。这些结论均提示 *Angptl4* 在脂肪代谢调控中具有重要作用。

2011 年, Namkung 等^[33]在研究人类代谢综合征时发现该类型患者与正常人相比, 血清中含有高水平的 *Angptl6*, 提示血浆中的 *Angptl6* 水平可以反映代谢综合症状。同年, Mirzaei 等证实 *Angptl6* 水平还可影响静息代谢率, 促进血脂含量增加, 影响胰岛素浓度和敏感性^[34]。此外, Kadomatsu 等^[35]以肥胖和相关代谢类疾病为模型, 通过抑制 *Angptl2* 活性, 增强 *Angptl6* 活性, 可抵抗代谢类疾病。这些研究表明 *Angptl6* 可能参与了人类代谢过程。

2009 年, Romeo 等^[36]采用反向遗传策略证实了 4 种 *Angptls* (*Angptl3*、-4、-5、-6) 在人类甘油三酯代谢中具有重要作用。编码区重测序结果显示, 鉴定到的多个非同义突变与低甘油三酯水平间存在一定的相关性; 功能研究揭示与低甘油三酯相关的 *angptl3*、*angptl4* 基因突变干扰了蛋白质的合成、分泌以及对 LPL 的抑制; 最终分析结果也表明 *angptl3*、-4、-5 的这些突变位点对于人类血浆中的甘油三酯水平具有累积效应。

3.2.2 *Angptls* 家族在小鼠代谢调控方面的研究

Angptls 在小鼠代谢调控上的研究结果与人上的研究形成了互补, 不仅为进一步阐明该家族复杂的代谢调控网络提供了新的信息, 还对人类该家族基因的研究发现进行了验证, 使得该调控网络更加全面和具体。

2009 年, Tabata 等发现 *angptl2* 缺失的小鼠在摄入高脂食物时可改善脂肪组织炎症和全身胰岛素抵抗, 胰岛素敏感性在骨骼肌和肝脏组织中得到提升; 而在正常小鼠中, *Angptl2* 过表

达将导致局部炎症和胰岛素抵抗^[27]。2011 年, Kitazawa 团队则得出相反的结果, 他们发现在 db/db 小鼠模型中补充 *Angptl2* 却增强了胰岛素敏感性, 改善了胰岛素抵抗^[37]。因此, *Angptl2* 在该问题上还存在一定的争议。

2002 年, Koishi 等^[38]首次报道了 *angptl3* 功能缺失性 KK/San 小鼠患有低血脂症, 静脉注射纯化的 *Angptl3* 蛋白或腺病毒介导载体过表达 *Angptl3* 蛋白, 均可导致 KK/San 小鼠血浆中甘油三酯和游离脂肪酸水平发生显著增加。随后, 该团队在进一步研究 *Angptl3* 对甘油三酯代谢的调控机制时发现, KK/San 小鼠过表达 *Angptl3* 可引起极低密度脂蛋白 (VLDL) 显著升高, 体内试验显示 *Angptl3* 影响了 VLDL 中甘油三酯的清除, 体外试验进一步分析结果显示重组 *Angptl3* 蛋白直接抑制了 LPL 的活性^[39]。这为进一步阐明 *Angptl3* 调控脂质代谢的机制奠定了基础。

2005 年, Köster 等^[40]通过对转基因小鼠进行研究, 发现 *Angptl3* 和 *Angptl4* 是调节体内 VLDL、甘油三酯水平的重要蛋白因子, 并揭示这两种蛋白对调节 LPL 的活性具有非常重要的意义。同年, Xu 等^[41]在研究 *Angptl4* 时发现, *Angptl4* 可降低血液中的葡萄糖水平、改善葡萄糖耐性, 但同时会导致小鼠发生高血脂和脂肪肝病。也有研究者以 KK/San、肥胖和糖尿病小鼠作模型, 静脉注射 *Angptl4* 蛋白到 KK/San 鼠中, 观察到血浆脂质水平显著提高, 暗示 *Angptl4* 是一种潜在的高血脂诱导因子^[42]。另外, *Angptl4* 还是一种急性期蛋白, 在急性期反应时会在肝脏、心脏、肌肉和脂肪组织中表达量升高, 并通过抑制 LPL 的活性导致高甘油三

酯血症^[43]。这些结果均提示 *Angptl4* 是通过调节 LPL 的活性来维持人体内的糖、脂平衡。

2012 年, Quagliarini 等^[3]研究发现, 在小鼠中单独表达 *Angptl3* 不会改变血浆中三酰甘油的水平, 而与 *Angptl8* 共表达后将引起甘油三酯血症, 免疫共沉淀结果显示 *Angptl8* 与 *Angptl3* 的 N 端结构域存在一定的相互作用, 暗示 *Angptl8* 通过激活 *Angptl3* 调节血浆中的脂蛋白水平。同年, Zhang 等^[44]通过序列比对, 发现 *Angptl8* 与 *Angptl3* 的 N 端同源, 腺病毒介导的 *Angptl8* 过表达可增加甘油三酯的水平, 重组 *Angptl8* 蛋白还会抑制 LPL 的活性。与上述研究相一致, 以 *angptl8* 缺失的小鼠为模型时, 血清中的甘油三酯表达水平仅为野生型的 1/3^[26]。这些均证明 *Angptl8* 是脂类代谢调节中的一个新因子。

4 *Angptls* 家族在动物育种领域的研究及思考

当今国内外对动物产品的需求量极大, 如何在增加产肉的基础上保证肉的品质, 已成为广大畜牧科研人员及肉类生产厂家共同追求的目标。大量资料表明, 产肉量和肉品质受到基因调控和环境的影响。除去外部可控的环境条件, 如何筛选相关蛋白表达丰度高, 对经济性状遗传学效应显著的相关候选基因, 并依此制定选种措施有目的地进行种畜选择则显得尤为重要。*Angptls* 部分成员在脂肪、葡萄糖代谢方面的重要调控作用预示其可作为动物分子育种的重要候选基因。笔者实验室长期以来从事牛遗传育种的相关工作, 并取得了一定的成果。

作者课题组以当地品种南阳牛、郟县红牛

的各组织样为材料, 运用实时荧光定量 PCR 方法对牛 *angptl3*、*angptl4* 基因的组织表达谱进行了分析, 结果显示: *Angptl3*^[45]在肝脏中高度表达, *Angptl4*^[46]在肝脏、背脂和腹脂中均高度表达; 马云等克隆了牛 *angptl4* 基因的 cDNA 序列, 并运用辐射杂种定位将其定位在牛的 7 号染色体上^[47]。此外, 笔者实验室还采用中国地方黄牛的特有品种及外国肉牛品种寻找了一批与牛优良性状相关的分子遗传标记。其中, 牛 *angptl3* 基因包含 7 个外显子和 6 个内含子, 对黄牛、肉牛的多态性分析显示, 共有 4 处 SNP, 分别位于启动子区、第 1、第 6 外显子区(g.-38T>C, g.104A>T, g.509A>G, g.8661T>C)^[45,48]。牛 *angptl4* 基因也包含 7 个外显子和 6 个内含子, 在地方黄牛、牦牛、育肥牛等品种中的多态性检测结果显示, 该基因共存在 4 处 SNP, 分别位于第 1 内含子、第 3、第 5 外显子和 3' 非编码区 (g.1145T>C, g.1422T>C, g.5095T>A, g.6640C>T)^[46-47]。牛 *angptl6* 基因包含 5 个外显子和 4 个内含子, 且仅在内含子中发现 3 处 SNP, 分别位于第 2 和第 4 内含子(g.2359T>C, g.2403C>A, g.3258G>T)^[49]。牛 *angptl8* 基因包含 4 个外显子和 3 个内含子, 该基因共检测到 2 处 SNP, 均位于 5' 侧翼区 (g.-562G>A, g.-307T>C; 还未发表)。相关性分析结果表明, 多数突变位点或其组合型与牛的生长、屠宰、肉质性状间存在一定的关联。此外, *angptl6* 基因在 78 头秦川牛个体中鉴别出两种剪切体, 其中一种剪切体 b*Angptl6* β 对胴体重具有显著的负调控作用^[49]。另有课题组在研究荷斯坦牛时发现, 山柰酚可减少 *Angptl4* 的表达, 提高该牛种的胴体性状和肉质性状^[50]。这些研究提示可为牛遗传改良的分子育种提供一定参考。Feng 等^[51]克隆

了猪 *angptl3*、*angptl4* 基因的 cDNA 序列, 并将其分别定位在染色体 6q31→q35 和 2q21→q24 区域。Zhang 等^[52]发现猪 *angptl3* 基因外显子中有 4 处 SNP, 启动子区 CpG 岛分析结果显示长白猪中的平均甲基化率为 70.95%, 宁乡猪中的平均甲基化率为 95.24%, 两者间存在显著差异。另有研究报道淫羊藿苷可通过改变 *Angptl3* 的表达和 LPL 的活性提高猪肉品质^[53]。Cinar^[54]则在鉴定 eQTL 及候选基因与猪肉系水力的相关性时发现 *angptl4* 基因的表达与肉质性状中的滴水损失呈现相关。Ren 等^[55]也发现 *angptl4* 第 3 内含子处的一个突变 (G2737A) 对肌肉脂肪含量、背最长肌的 3 项指标 (含水量、大理石花纹、pH) 均有显著影响 ($P<0.05$)。

综上所述, *Angptls* 在牛、猪等家畜上的研究主要集中在分析基因的遗传变异、组织表达、染色体定位等方面, 其功能研究领域还有很多空白, 也有很多问题需要进一步解决。如该家族起关键作用的功能位点是什么? 启动子区的调控元件及表观修饰情况是怎样的? 各成员间是否存在互作, 它们又是如何发挥作用的? 基于此, 根据文中对 *Angptls* 家族结构及各成员代谢网络的总结, 笔者认为动物育种工作者可以从以下几个角度予以思考, 进一步验证该蛋白家族的功能: 1) 研究 *Angptls* 家族各成员 N 端螺旋样结构域和 C 端调节配体活性的纤维蛋白原样结构域的保守情况, 采用定点突变寻找起作用的关键位点, 从而筛选最有利于经济性状的 SNP 及单倍型。2) 研究 *Angptls* 家族各成员信号肽的作用, 通过不同转录本信号肽的对比探究转录本在细胞中的位置及功能。3) 通过全基因组关联分析 (Genome-wide association study, GWAS) 筛选与动物生长和肉质相关的关

键位点。4) 通过 RACE 实验寻找基因的真正转录起始位点, 鉴定基因的启动子区域和表观修饰情况, 并将表观修饰与经济性状关联起来。

5) 研究各成员之间的相互作用位点, 并通过 Co-IP、Pull-Down、酵母双杂交等实验进行验证。

5 展望

Angptls 家族基因和蛋白的研究在人、鼠等模式动物方面已取得了显著的成效, 在家养动物方面也已经有少量报道。然而, 目前很多实验技术和方法在家畜研究上应用的还较少, 还需要大量的实验予以佐证, 整个家族的网络调控机制和功能也需要进一步研究和深入分析。有理由相信, 随着 *Angptls* 家族基因和蛋白在家养动物领域功能研究的深入开展, 该家族基因和蛋白的功能以及成员之间的代谢调控网络关系将会得到全面阐释, 必将会对包含该家族基因 (蛋白) 的分子育种选择体系的制定和完善发挥重要作用。

REFERENCES

- [1] Santulli G. Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, 5: 4.
- [2] Zhang R, Abou-Samra AB. Emerging roles of lipasin as a critical lipid regulator. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432(3): 401–405.
- [3] Quagliarini F, Wang Y, Kozlitina J, et al. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(48): 19751–19756.
- [4] 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 Biol Chem*, 2003, 278(43): 41804–41809.

- [5] Wang Y, Quagliarini F, Gusarova V, et al. Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(40): 16109–16114.
- [6] Lei X, Shi F, Basu D, et al. Proteolytic processing of angiopoietin-like protein 4 by proprotein convertases modulates its inhibitory effects on lipoprotein lipase activity. *J Biol Chem*, 2011, 286(18): 15747–15756.
- [7] Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, et al. Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(46): 17450–17455.
- [8] Zheng J, Umikawa M, Cui C, et al. Inhibitory receptors bind ANGPTLs and support blood stem cells and leukaemia development. *Nature*, 2012, 485(7400): 656–660.
- [9] Kubota Y, Oike Y, Satoh S, et al. Cooperative interaction of Angiopoietin-like proteins 1 and 2 in zebrafish vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(38): 13502–13507.
- [10] Camenisch G, Pisabarro MT, Sherman D, et al. ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration via integrin α v β 3 and induces blood vessel formation *in vivo*. *J Biol Chem*, 2002, 277(19): 17281–17290.
- [11] Padua D, Zhang XH, Wang Q, et al. TGF β primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*, 2008, 133(1): 66–77.
- [12] Goh YY, Pal M, Chong HC, et al. Angiopoietin-like 4 interacts with integrins β 1 and β 5 to modulate keratinocyte migration. *Am J Pathol*, 2010, 177(6): 2791–2803.
- [13] Yang YH, Wang Y, Lam KS, et al. Suppression of the Raf/MEK/ERK signaling cascade and inhibition of angiogenesis by the carboxyl terminus of angiopoietin-like protein 4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(5): 835–840.
- [14] Urano T, Ito Y, Akao M, et al. Angiopoietin-related growth factor enhances blood flow via activation of the ERK1/2-eNOS-NO pathway in a mouse hind-limb ischemia model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(5): 827–834.
- [15] Oike Y, Akao M, Yasunaga K, et al. Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. *Nat Med*, 2005, 11(4): 400–408.
- [16] Kitazawa M, Ohizumi Y, Oike Y, et al. Angiopoietin-related growth factor suppresses gluconeogenesis through the Akt/forkhead box class O1-dependent pathway in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 323(3): 787–793.
- [17] Katoh Y, Katoh M. Comparative integromics on angiopoietin family members. *Int J Mol Med*, 2006, 17(6): 1145–1149.
- [18] Zhang L, Yang M, Li C, et al. Identification and genetic effect of a variable duplication in the promoter region of the cattle ADIPOQ gene. *Anim Genet*, 2014, 45(2): 171–179.
- [19] Shi Y, Chen W, Zeng YQ, et al. Cloning and analysis of promoter of pig copper zinc superoxide dismutase gene (CuZnSOD). *Chin J Biotech*, 2014, 30(2): 213–222 (in Chinese).
石元, 陈伟, 曾勇庆, 等. 猪 CuZnSOD 基因启动子的克隆鉴定及分析. *生物工程学报*, 2014, 30(2): 213–222.
- [20] Willy PJ, Umesono K, Ong ES, et al. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Gene Dev*, 1995, 9(9): 1033–1045.
- [21] Inaba T, Matsuda M, Shimamura M, et al. Angiopoietin-like protein 3 mediates hypertriglyceridemia induced by the liver X receptor. *J Biol Chem*, 2003, 278(24): 21344–21351.
- [22] Matsusue K, Miyoshi A, Yamano S, et al. Ligand-activated PPAR β efficiently represses the induction of LXR-dependent promoter activity through competition with RXR. *Mol Cell*

- Endocrinol, 2006, 256(1): 23–33.
- [23] Kersten S, Mandard S, Tan NS, et al. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem*, 2000, 275(37): 28488–28493.
- [24] Kaddatz K, Adhikary T, Finkernagel F, et al. Transcriptional profiling identifies functional interactions of TGF beta and PPAR beta/delta signaling: synergistic induction of ANGPTL4 transcription. *J Biol Chem*, 2010, 285(38): 29469–29479.
- [25] Tseng YH, Ke PY, Liao CJ, et al. Chromosome 19 open reading frame 80 is upregulated by thyroid hormone and modulates autophagy and lipid metabolism. *Autophagy*, 2014, 10(1): 20–31.
- [26] Ren G, Kim JY, Smas CM. Identification of RIFL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 303(3): E334–351.
- [27] Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, et al. Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab*, 2009, 10(3): 178–188.
- [28] Muramoto A, Tsushita K, Kato A, et al. Angiopoietin-like protein 2 sensitively responds to weight reduction induced by lifestyle intervention on overweight Japanese men. *Nutr Diabetes*, 2011, 1(11): e20.
- [29] Robciuc MR, Maranghi M, Lahikainen A, et al. Angptl3 deficiency is associated with increased insulin sensitivity, lipoprotein lipase activity, and decreased serum free fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(7): 1706–1713.
- [30] Romeo S, Pennacchio LA, Fu Y, et al. Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL. *Nat Genet*, 2007, 39(4): 513–516.
- [31] Kersten S, Lichtenstein L, Steenbergen E, et al. Caloric restriction and exercise increase plasma ANGPTL4 levels in humans via elevated free fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(6): 969–974.
- [32] Smart-Halajko MC, Kelley-Hedgpeeth A, Montefusco MC, et al. ANGPTL4 variants E40K and T266M are associated with lower fasting triglyceride levels in non-hispanic white Americans from the Look AHEAD Clinical Trial. *BMC Med Genet*, 2011, 12(1): 89.
- [33] Namkung J, Koh SB, Kong ID, et al. Serum levels of angiopoietin-related growth factor are increased in metabolic syndrome. *Metabolism*, 2011, 60(4): 564–568.
- [34] Mirzaei K, Hossein-Nezhad A, Chamari M, et al. Evidence of a role of ANGPTL6 in resting metabolic rate and its potential application in treatment of obesity. *Minerva Endocrinol*, 2011, 36(1): 13–21.
- [35] Kadomatsu T, Tabata M, Oike Y. Angiopoietin-like proteins: emerging targets for treatment of obesity and related metabolic diseases. *FEBS J*, 2011, 278(4): 559–564.
- [36] Romeo S, Yin W, Kozlitina J, et al. Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *J Clin Invest*, 2009, 119(1): 70–79.
- [37] Kitazawa M, Nagano M, Masumoto KH, et al. Angiopoietin-like 2, a circadian gene, improves type 2 diabetes through potentiation of insulin sensitivity in mice adipocytes. *Endocrinology*, 2011, 152(7): 2558–2567.
- [38] Koishi R, Ando Y, Ono M, et al. Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nat Genet*, 2002, 30(2): 151–157.
- [39] Shimizugawa T, Ono M, Shimamura M, et al. ANGPTL3 decreases very low density lipoprotein triglyceride clearance by inhibition of lipoprotein lipase. *J Biol Chem*, 2002, 277(37): 33742–33748.
- [40] Köster A, Chao YB, Mosior M, et al. Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3:

- regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology*, 2005, 146(11): 4943–4950.
- [41] Xu A, Lam MC, Chan KW, et al. Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(17): 6086–6091.
- [42] Yoshida K, Shimizugawa T, Ono M, et al. Angiopoietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *J Lipid Res*, 2002, 43(11): 1770–1772.
- [43] Lu B, Moser A, Shigenaga JK, et al. The acute phase response stimulates the expression of angiopoietin like protein 4. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(4): 1737–1741.
- [44] Zhang R. Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424(4): 786–792.
- [45] Yang T. Tissues expression analysis, novel SNPs of the bovine Angptl3 gene and its effects on growth trait[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2012 (in Chinese).
杨婷. 牛 Angptl3 基因组织表达, 多态性及其与生长性状关联分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.
- [46] Ma Y, Chen N, Li R, et al. Tissues expression analysis, novel SNPs of the bovine Angptl4 gene and its effects on bovine bioeconomic traits. *Livest Sci*, 2012, 149(1): 96–103.
- [47] Ma Y, Li RR, Hou F, et al. Comparative mapping and 3' UTR SNP detection of ANGPTL4 gene in beef cattle. *J Anim Vet Adv*, 2011, 10(13): 1649–1655.
- [48] Chen NB. Genetic diversity analysis of four bovine energy metabolism genes[D]. Xinyang: Xinyang Normal University, 2014 (in Chinese).
陈宁博. 牛能量代谢相关四个基因的遗传特征分析[D]. 信阳: 信阳师范学院, 2014.
- [49] Li AM. Study of genetic variation, alternative splicing, cloning and expression within ANGPTL6 gene in chinese native cattle[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2012 (in Chinese).
李爱民. 中国地方黄牛 ANGPTL6 基因遗传变异, 可变剪切及克隆表达研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [50] Xiao HB, Niu XW, Sun ZL. Kaempferol reduces angiopoietin-like protein 4 expression to improve carcass characteristics and meat quality traits in Holstein steers. *Livest Sci*, 2012, 145(1): 219–222.
- [51] Feng SQ, Chen XD, Xia T, et al. Cloning, chromosome mapping and expression characteristics of porcine ANGPTL3 and -4. *Cytogenet Genome Res*, 2006, 114(1): 44–49.
- [52] Zhang DS, Liu ZY, Chen XJ, et al. Investigation of ANGPTL3 expression, exon sequence and promotor methylation between Ningxiang and Changbai pigs. *Afr Health Sci*, 2013, 12(4): 522–529.
- [53] Xiao HB, Wang JY, Sun ZL. Icaritin changes ANGPTL3 expression and LPL activity to improve meat quality in swine. *J Anim Vet Adv*, 2012, 11(9): 1450–1454.
- [54] Cinar MU. Identification of expression quantitative trait loci (eQTL) and candidate genes associated with water holding capacity in porcine meat [D]. Bonn: Universitäts-und Landesbibliothek Bonn, 2010.
- [55] Ren ZQ, Wu WJ, Liu WH, et al. Differential expression and effect of the porcine ANGPTL4 gene on intramuscular fat. *Genet Mol Res*, 2014, 13(2): 2949–2958.

(本文责编 陈宏宇)