

AG490 对肥胖模型小鼠脂代谢及相关基因表达的影响

谢 亮, 孙 超, 彭永佳, 堵 斌

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 **【目的】**研究 AG490 阻断肥胖模型小鼠 JAK2/STAT3 信号通路对脂代谢及相关基因表达的影响。**【方法】**以雄性昆明小鼠为供试动物, 构建肥胖模型。将肥胖模型小鼠分为 2 组, 处理组用 JAK2 特异性抑制剂 AG490(1 mg/(kg·d))腹腔连续注射 2 周, 对照组腹腔连续注射相同剂量的生理盐水。2 周后处死小鼠, 检测各组小鼠血清中总胆固醇(TC)、总甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的含量;取脂肪组织提取总 RNA, RT-PCR 方法检测 JAK2/STAT3 信号通路基因(JAK2、STAT3)及脂代谢关键基因(FAS、PPAR γ 、HSL)的表达量。**【结果】**与对照组相比, AG490 可显著降低小鼠血清中的 HDL-C 水平;与对照组相比, 处理组脂肪组织中 JAK2 mRNA 表达量差异不显著($P>0.05$), STAT3 mRNA 表达量显著降低($P<0.05$), 脂代谢相关基因 FAS mRNA 表达量极显著降低($P<0.01$), PPAR γ mRNA 表达量显著降低($P<0.05$), HSL mRNA 表达量差异不显著($P>0.05$)。**【结论】**JAK2/STAT3 通路可能通过影响脂肪组织中生脂基因的表达而调节体脂沉积。

【关键词】 JAK2; STAT3; AG490; 肥胖模型; 脂代谢

【中图分类号】 Q493.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)09-0034-05

Effects of AG490 on lipid metabolism of the obese mouse and expression of related genes

XIE Liang, SUN Chao, PENG Yong-jia, DU Bin

(College of Animal Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** It aimed to study the effects of AG 490 on lipid deposition and expression of relevant genes of the obese mouse by JAK2/STAT3 signal transduction pathway occlusion. **【Method】** The obese model which was constructed by the male Kunming mouse were divided into 2 groups. The treatment group was treated with intraperitoneal injection by AG490 (1 mg/(kg·d)) and the control group was treated by the same method with NS (1 mg/(kg·d)) for two weeks, then executed and the adipose was reserved. To estimate the content of TC, TG and HCL-C in blood, Total RNA was extracted. RT-PCR was used to analyze the expression of JAK2/STAT3 signal transduction pathway and adipogenesis genes (FAS, PPAR γ and HSL). **【Result】** Compared with the control group, AG490 was able to cut down the level of HDL-C significantly in blood with the treated mice; Compared with the control group, the mRNA expression of JAK2 had not significant difference ($P>0.05$) and the mRNA expression of STAT3 was significantly lowered ($P<0.05$) in the treatment group. The mRNA expression of FAS was significantly lower ($P<0.01$), the mRNA expression of PPAR γ had a significant reduction ($P<0.05$) and the mRNA ex-

* [收稿日期] 2009-01-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30871785); 国家“十一五”支撑计划项目(2006BAD04A11); 教育部新世纪优秀人才计划项目(NCET-06-0865)

[作者简介] 谢 亮(1982—), 男, 陕西延安人, 在读硕士, 主要从事动物生物技术研究。E-mail: xieliang0413@163.com

[通信作者] 孙 超(1968—), 男, 陕西商南人, 教授, 博士, 主要从事动物遗传育种研究。E-mail: sunchao2775@163.com

pression of *HSL* had no significant difference ($P>0.05$).【Conclusion】We conjectured that JAK2/STAT3 signal transduction pathway regulated lipid deposition by affecting the expression of adipogenesis genes in adipose tissue.

Key words:JAK2;STAT3;AG490;obesity model;lipid metabolism

肥胖主要由机体脂肪代谢失衡造成^[1]。酪氨酸蛋白激酶(Januskinase, JAK)/信号转导子和转录活化子(Signal transducers and activators of transcription, STAT)途径最初由 Darnell 等^[2]发现,该途径是多种细胞生长、分化、凋亡及功能发挥过程中重要的细胞内信号转导途径,可促使带有酪氨酸的蛋白发生磷酸化而活化,产生激酶活化的级联反应,将活化的信号转导给其他分子,如 STAT,引发一系列基因和蛋白质的变化^[3]。目前,已发现的 JAK 家族成员有 4 个,即 JAKs(JAK1, JAK2 和 JAK3)和 TYK2, JAKs 下游信号是 STATs 家族(包括 STAT1—STAT4、STAT5a、STAT5b 和 STAT6 共 7 个成员)。近年来有研究证实, JAK/STATs 通路 与肥胖有密切联系,其不仅本身介导肥胖的产生,而且许多通路调控因子也参与其中,如脂肪组织中高度活化的 STAT3,通过直接作用于 Leptin 的分泌而影响体质质量^[4-6]。

AG490(Tyrphpsin AG490)是一种人工合成的苯亚甲基丙二腈,分子式为 $C_{17}H_{14}N_2O_3$,相对分子量为 294.3,结构类似酪氨酸,可与受体酪氨酸激酶竞争结合点,是 JAK2 的特异性阻断剂。有研究表明,AG490 除了可以阻断 JAK2 外,还可以有效阻断 T 细胞中 JAK3,从而阻断 JAK/STAT 信号通路,引起一系列免疫学效应^[5]。但目前有关 AG490 对脂代谢途径及相关基因表达影响的报道还很少。本试验以肥胖模型小鼠为对象,研究 JAK2 特异性抑制剂 AG490 阻断 JAK2/STAT3 通路对机体脂肪代谢相关基因 *FAS*、*PPAR γ* 和 *HSL* 转录表达的影响,以期揭示 STAT3 调控脂肪代谢的机理,为人类肥胖症及相关疾病的预防和治疗提供有价值的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 雄性昆明小鼠,体质量(10 ± 2)g/只,购自第四军医大学实验动物中心,共 10 只。自由采食、饮水,环境温度(22 ± 3)℃,相对湿度 40%~50%,每天光照 12 h。

1.1.2 试剂 DMSO 购自 Sigma 公司, RNA 提取试剂盒 TRIZOL 和 DL2000 DNA Marker, 购自天根生化公司;反转录试剂盒 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 和 *Taq* 酶, 购自 Fermentas; MIX 购自 WOLSEN;甘油三酯试剂盒、总胆固醇试剂盒和高密度脂蛋白胆固醇试剂盒, 购自中生北控生物公司;其余试剂均为分析纯。

1.1.3 试验日粮 普通日粮:面粉 380 g/kg,玉米粉 200 g/kg,麸皮 160 g/kg,豆粕 150 g/kg,鱼粉 40 g/kg,骨粉 30 g/kg,酵母、食盐、鱼肝油和微量元素添加剂各 10 g/kg。

高脂日粮:在普通日粮的基础上,添加 200 g/kg 猪油即得高脂日粮。

1.2 肥胖小鼠模型的建立

用高脂日粮饲喂小鼠,至第 28 天时称体质量,并测量体长,计算李氏指数(Lee index)^[7],判定饮食诱导肥胖小鼠模型建立是否成功。

1.3 试验设计

将肥胖模型小鼠随机均分为 2 组,换用基础日粮饲喂,测定处理开始第 1 天、第 7 天和第 14 天小鼠空腹体质量。试验组小鼠连续腹腔注射 AG490 ($1\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$)2 周,对照组小鼠同法注射生理盐水。2 周后,小鼠禁食 12 h,摘眼球采血后颈椎脱臼处死,分离血清-20℃保存待测,同时快速剥离小鼠内脏脂肪并称其质量,迅速放入液氮中冷却后转入-80℃保存待测。

1.4 血脂的测定

用酶比色法测定血清中 TC、TG 含量,用磷钨酸-镁沉淀法测定血清中 HDL-C 含量。

1.5 总 RNA 的提取及 RT-PCR

1.5.1 总 RNA 的提取 采用 Trizol 试剂盒提取内脏脂肪总 RNA,用 10 g/L 琼脂糖凝胶检测 RNA 的完整性。

1.5.2 引物设计与合成 根据 GenBank 公布的小鼠 *JAK2*、*STAT3*、*FAS*、*PPAR γ* 、*HSL* 和 β -*actin* 基因序列,采用 Premier 5.0 软件,设计各基因的 PCR 引物,引物由 Invitrogen 公司合成,其具体序列、退火温度、循环数及扩增片段长度见表 1。

表 1 PCR 引物的参数
Table 1 PCR parameter of primers

基 因 Gene	序列(5'→3') Primer sequence	退火温度/℃ T _m	循环数 Cycle	扩增片段长度/bp Length of amplified fragments
JAK2	F:AAGATGCTTTCTGGGTTGG R: ACATTGTCTAAGAGGGAGCAG	50	28	324
STAT3	F:ACCTCCAGGACGACTTTGAT R:TGTCTTCTGCACGTACTCCA	52	29	203
FAS	F: AGTGTCACCAACAAGCG R: GATGCCGTCAGGTTTCAG	55.9	30	280
PPAR γ	F: ACCACTCGCATTCCTTTGAC R:CCACAGACTCGGCACTCAAT	52.1	32	261
HSL	F:CTTGGCTCCTTGAGATTTG R:AGTTGGCAATGTTGTCCTG	53.3	32	455
β actin	F:ACTGCCGCATCCTCTTCTCTC R:CTCCTGCTTGCTGATCCACATC	53.8	29	399

注:F.上游引物;R.下游引物。
Note;F. Forward;R. Reverse.

1.5.3 RT-PCR 反应体系为:200 mmol/L 10×*Taq* Buffer 5 μ L, 25 mmol/L Mg²⁺ 4 μ L, 25 mmol/L dNTP 5 μ L, 10 μ mol/L Forward 引物 1 μ L,10 μ mol/L Reverse 引物 1 μ L,cDNA 2 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA Polymerase 0.5 μ L,加灭菌水补充至 50 μ L。反应条件:95 ℃预变性 10 min;95 ℃变性 40 s,退火 40 s(温度依引物而定),72 ℃延伸 1 min,29 个循环;72 ℃10 min,4 ℃冷却,取 PCR 产物,进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。SynGene Bio-image System 分析扩增结果,读取 Height 值,以 β actin 为内参计算基因的相对表达量。

表 2 不同日粮对小鼠体质量及李氏指数的影响

Table 2 Effects of different diets on the body mass of mice and the Lee index

组 别 Group	体质量/g Weight	体长/cm Length	李氏指数 Lee index
普通对照组 Control	24.87±1.98 A	9.40±1.78	310.53±9.36 a
高脂饲喂组 High-fat-diet	33.99±1.55 B	9.78±2.13	331.21±11.34 b

注:同列数据标不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$),标不同大写字母表示组间差异极显著($P<0.01$)。
Note:Different letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$),different uppercases in the same column indicate extremely significant difference ($P<0.01$).

2.2 AG490 对肥胖模型小鼠体质量的影响

由表 3 可知,试验开始第 1 天,处理组小鼠体质量与对照组无明显差异($P>0.05$);第 7 天,处理组小鼠体质量低于对照组,但差异不显著($P>0.05$);

表 3 AG490 对肥胖小鼠体质量的影响($n=5$)

Table 3 Effects of AG490 on the body weights in obese mouse ($n=5$)

g

组 别 Group	1 d	7 d	14 d
对照组 Control	34.07±0.53	34.22±0.56	34.28±0.89 a
处理组 Treatment	33.87±0.72	33.59±1.21	33.16±0.81 b

2.3 AG490 对肥胖模型小鼠内脏脂肪沉积的影响

小鼠内脏脂肪沉积情况见图 1。AG490 处理组腹腔内脏脂肪含量((0.36±0.04) g)显著低于对照

1.6 数据分析

采用 SPSS 13.0 统计软件 One-way ANOVA 进行方差分析与显著性检验,数据用“平均数±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 李氏指数的计算

由表 2 可知,饲喂至第 28 天,高脂日粮组小鼠体质量、体长和李氏指数均明显高于对照组,其中体质量差异达极显著水平,李氏指数差异达显著水平。表明肥胖小鼠模型构建成功,适用于下一步试验。

第 14 天,处理组小鼠体质量显著低于对照组小鼠($P<0.05$)。表明 AG490 阻断 JAK2/STAT3 信号通路后,小鼠体质量随时间的延长而逐渐降低,至第 14 天时出现显著差异($P<0.05$)。

组((0.54±0.07) g)($P<0.05$)。说明 AG490 阻断 JAK2/STAT3 信号通路后,可降低小鼠内脏脂肪沉积。

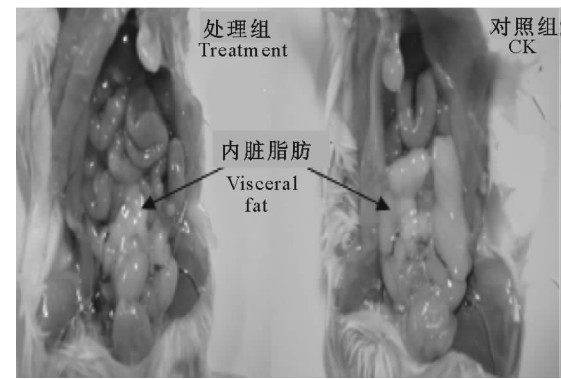


图 1 AG490 对小鼠内脏脂肪沉积的影响
Fig.1 Effects of AG490 on visceral fat of treatment group and control group

2.4 AG490 对肥胖模型小鼠血脂指标的影响

由表 4 可知,与对照组相比,AG490 处理组

HDL-C 含量显著下降($P<0.05$),TG 和 TC 含量无明显变化。表明 AG490 具有降低肥胖模型小鼠 HDL-C 含量的效果。

2.5 AG490 对 JAK2/STAT3 通路基因 mRNA 表达的影响

由图 2 可知,与对照组相比,AG490 抑制 JAK2/STAT3 通路后,处理组小鼠的 JAK2 mRNA 表达量略有下降,但差异不显著($P>0.05$),STAT3 mRNA 表达量显著降低($P<0.05$)。表明 AG490 抑制 JAK2 的酪氨酸磷酸化后,JAK2 无法形成 STAT3 与受体复合物结合的“停泊位点”,使 STAT3 C 端的 Tyr 残基不能磷酸化,从而阻断了 JAK2/STAT3 信号通路。

表 4 AG490 对小鼠血清 TG、TC 和 HDL-C 含量的影响				
Table 4 Effects of AG490 on levels of TC,TG and HDL in blood serum				
组别 Group	样本数 Number of mice	TG	TC	HDL-C
对照组 Control group	5	1.43±0.06	5.10±0.08	1.98±0.13 a
处理组 Treatment group	5	1.20±0.07	4.75±0.12	1.14±0.11 b

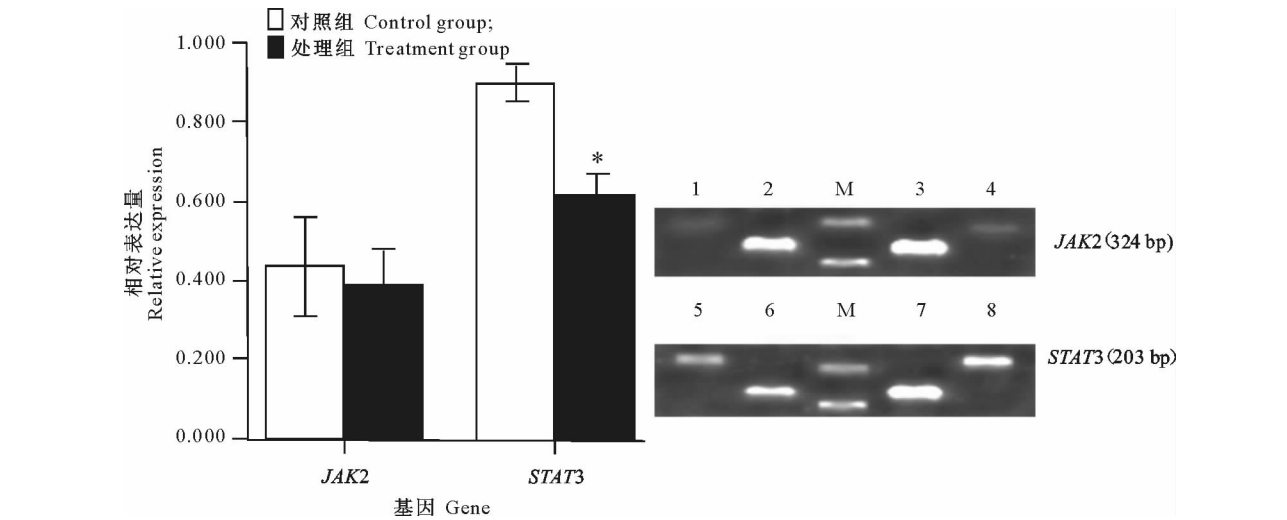


图 2 AG490 对肥胖模型小鼠脂肪组织中 JAK2 和 STAT3 基因 mRNA 表达的影响
1,2. 分别为处理组 JAK2 和 β actin 基因的表达产物;3,4. 分别为对照组 β actin 和 JAK2 基因的表达产物;M. DL2000 DNA Marker;
5,6. 分别为处理组 STAT3 和 β actin 基因的表达产物;7,8. 分别为处理组 β actin 和 STAT3 基因的表达产物;* . 与对照组差异显著。
Fig.2 Effects of AG490 on JAK2 and STAT3 gene expression in adipose tissue of treatment group and control group
1,2. JAK2 and β actin gene expression respectively in treatment group;3,4. β actin and JAK2 gene expression respectively in control group;M. DL2000 DNA Marker;5,6. STAT3 and β actin gene expression respectively in treatment group;
7,8. β actin and STAT3 gene expression respectively in control group;* . Means significant difference compared with control group

2.6 AG490 对肥胖模型小鼠脂代谢相关基因的影响

由图 3 可知,与对照组相比,AG490 处理组脂肪代谢相关基因 FAS mRNA 表达量极显著降低

($P<0.01$),PPAR γ mRNA 表达量显著降低($P<0.05$),HSL mRNA 表达量差异不显著($P>0.05$)。说明 AG490 抑制 JAK2/STAT3 信号通路后可降低脂肪生成。

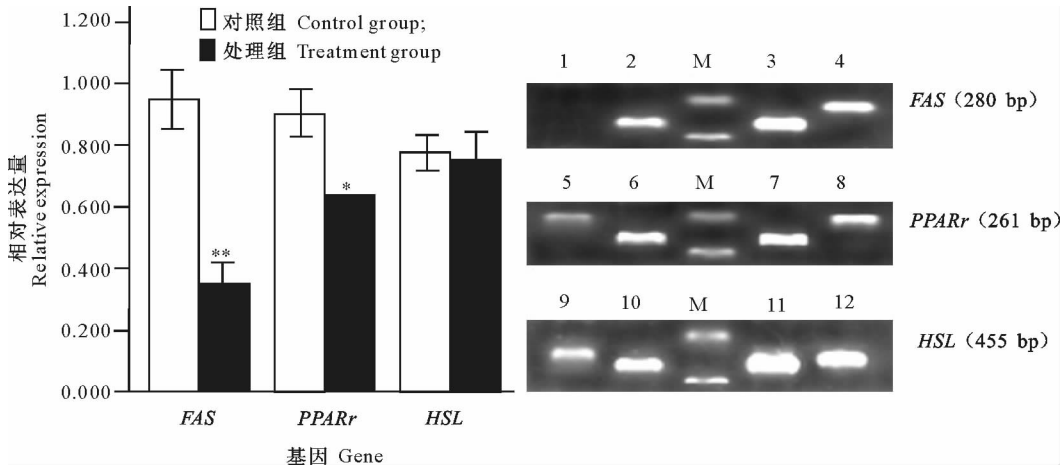


图 3 AG490 对肥胖模型小鼠脂肪组织中 *FAS*、*PPARγ* 和 *HSL* 基因 mRNA 表达的影响

1,2. 分别为处理组 *FAS* 和 β -actin 基因的表达产物;3,4. 分别为对照组 β -actin 和 *FAS* 基因的表达产物;M, DL2000 DNA Marker;
5,6. 分别为处理组 *PPARγ* 和 β -actin 基因的表达产物;7,8. 分别为处理组 β -actin 和 *PPARγ* 基因的表达产物;
9,10. 分别为处理组 *HSL* 和 β -actin 基因的表达产物;11,12. 分别为处理组 β -actin 和 *HSL* 基因的表达产物;*. 表示与对照组差异显著;*. 表示与对照组差异极显著。

Fig. 3 Effects of AG490 on *FAS*, *PPARγ* and *HSL* gene expression in adipose tissue of treatment group and control group
1,2. *FAS* and β -actin gene expression respectively in treatment group;3,4. β -actin and *FAS* gene expression respectively in control group;M, DL2000 DNA Marker;5,6. *PPARγ* and β -actin gene expression respectively in treatment group;
7,8. β -actin and *PPARγ* gene expression respectively in control group;9,10. *HSL* and β -actin gene expression respectively in treatment group;11,12. β -actin and *HSL* gene expression respectively in control group; * Means significant difference compared with control group; * * Means extremely significant difference compared with control group.

3 讨论

JAK/STAT 途径可促使带有酪氨酸的蛋白发生磷酸化而活化,产生激酶活化的级联反应,将活化的信号转导给其他分子,引发一系列基因和蛋白质水平变化^[8]。AG490 是酪氨酸的结构类似物,可与受体酪氨酸激酶竞争结合位点,特异性阻滞各种细胞因子引起的 JAK2 和下游分子 STAT3 的磷酸化激活,从而阻断 JAK/STAT 信号通路。本试验发现,JAK2/STAT3 被抑制后,肥胖小鼠体质量降低,内脏脂肪沉积减少,血清中 HDL-C 含量降低;脂肪组织中 STAT3 基因转录表达明显下调,同时脂肪生成相关基因 *FAS* 的表达极显著降低,*PPARγ* 基因转录表达显著降低,但 *HSL* 基因表达无显著性变化。

动物体脂沉积所需要的脂肪酸大多来自脂肪酸合成酶(FAS)催化乙酰辅酶 A 和丙二酸单酰辅酶 A 合成的脂肪酸^[9]。*PPARγ* 在脂肪细胞分化早期(大多数脂肪细胞基因转录激活前)即有表达,其在纤维母细胞中的异位表达可诱导脂肪细胞分化的全部过程,呈现脂质蓄积及诱导脂肪细胞特异性基因(如脂肪进行蛋白与脂素)的表达^[10]。激素敏感性

脂肪酶(HSL)是脂肪组织脂解的限速酶,使甘油三酯和甘油二酯分解产生游离脂肪酸^[11]。Ji 等^[12]报道,*PPARγ* 受体调节 JAK2/STAT3 的活化及表达;麻微微等^[11]发现,白色脂肪组织中 *HSL* 基因的高表达,多是由高脂饮食诱导产生的,正常饮食无变化;这些结果同本试验结果基本一致。JAK2/STAT3 信号通路被 AG490 抑制后,体质量下降同最近研究发现的 Leptin 通路受 STAT3 的正调节^[13]结果相一致,血清中 HDL-C 含量下调,脂肪生成基因 *FAS* 和 *PPARγ* mRNA 的表达量下调,脂肪分解基因 *HSL* 无明显变化。

本研究发现,JAK2/STAT3 通路对脂肪的生脂基因及脂解基因的调节作用不同,同时通路是否对其他脂肪相关基因有影响,以及在脂肪代谢过程中的作用机制,还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Larsen T M, Toubro S, Astrup A. PPAR gamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy [J]. Int J Obes, 2003, 27: 147-161.