

血管生成素样蛋白 2 在糖尿病肾病 小鼠肾脏中的表达研究 *

郑敬民 ** 刘志红 黎磊石

(南京军区南京总医院解放军肾脏病研究所, 全军肾脏病研究重点实验室, 南京 210002)

摘要 利用半定量 RT-PCR 和免疫组化的方法同时从 mRNA 水平和蛋白质水平对血管生成素样蛋白 2 在不同病理阶段的 2 型糖尿病肾病模型小鼠——db/db 小鼠肾脏中的表达情况进行了较为系统的分析。结果发现: a. 在糖尿病前的 db/db 小鼠(4 周龄的 db/db 小鼠), 血管生成素样蛋白 2 与作为正常对照的 db/m 小鼠相比, 差异不是很大, 随着肥胖的加剧, 高血糖、蛋白尿的出现, 血管生成素样蛋白 2 在 db/db 小鼠肾脏中的表达无论从 mRNA 水平还是从蛋白质水平均显著升高。b. 从免疫组化的分析结果来看, 血管生成素样蛋白 2 主要分布于小鼠肾脏的肾小球部分, 主要是沿毛细血管袢呈线性分布, 其位置与足细胞的位置重叠, 足细胞是小鼠肾脏中血管生成素样蛋白 2 的主要分泌细胞。c. 小鼠肾脏血管生成素样蛋白 2 的表达水平似乎还与鼠龄相关: 虽然变化幅度不是很大, 但在周龄较大的小鼠(如 20 周龄以上), 其表达水平相对较高。上述工作不仅印证了先前对 2 型糖尿病肾病患者肾小球基因表达谱的分析结果, 更加明确了血管生成素样蛋白 2 与糖尿病肾病的相关性, 同时揭示了血管生成素样蛋白 2 在正常小鼠和糖尿病肾病小鼠肾脏中的表达、分布和变化规律, 有利于进一步揭示血管生成素样蛋白 2 的功能及其在糖尿病肾病发生、发展过程中的可能作用, 探讨糖尿病肾病的分子机制。

关键词 血管生成素样蛋白 2, 糖尿病肾病, db/db 小鼠

学科分类号 R54, Q75

作为糖尿病的一种重要并发症, 糖尿病肾病已成为导致终末期肾衰的重要原因, 而且其发病率有不断上升的趋势。多年来, 国内外对糖尿病肾病已进行了大量研究。但由于病因的复杂性, 有关糖尿病肾病发病的分子机制仍然不是很清楚。寻找糖尿病肾病新相关基因, 探讨其在糖尿病肾病发生发展过程中的可能作用, 对于加深对糖尿病肾病分子机制的认识, 发展糖尿病肾病诊断防治方法均具有重要意义。

在前面的工作中, 我们利用基因芯片的方法对 2 型糖尿病肾病模型小鼠肾脏的基因表达谱和人 2 型糖尿病肾病患者肾小球基因表达谱进行了全面的分析^[1~3], 首次发现血管生成素样蛋白 2(angiotensin-like protein 2, ANGPTL2)基因在糖尿病肾病患者肾小球中差异表达。作为一种新的基因表达谱研究方法, 基因芯片检测具有高通量的优势, 但其准确性需进一步的验证。db/db 小鼠是 Leptin 受体基因缺陷导致的先天肥胖性 2 型糖尿病小鼠, 具有高血糖、高血脂、胰岛素抵抗等特性。其发病过程与人 2 型糖尿病肾病非常相似, 是国际上广为采用的研

究糖尿病肾病的动物模型^[4,5]。为了进一步探讨血管生成素样蛋白 2 与糖尿病肾病的关系, 本文同时从 mRNA 和蛋白质水平对血管生成素样蛋白 2 在 db/db 小鼠糖尿病肾病发生发展过程中的表达情况进行了研究, 并就其与糖尿病肾病的关系进行了分析。

1 材料和方法

1.1 实验动物和实验分组

杂合子 db/m 小鼠从美国 Jackson 动物中心引进, 在南京军区南京总医院动物实验科成功繁殖。隐性纯合子 db/db 小鼠由 db/m 小鼠交配产生。分别选取 4 周龄、8 周龄、12 周龄、16 周龄、20 周龄、24 周龄的 db/db 小鼠和 db/m 小鼠各 6 只用于实验。其中 db/m 小鼠作为正常对照。测量每组小鼠的体重、血糖、血甘油三酯、血胆固醇、血肌酐、尿白蛋白水平用以评估糖尿病肾病发生发展的

* 国家自然科学基金(30470801)和江苏省自然科学基金(BK2005086)资助项目。

** 通讯联系人. Tel: 025-80860805, E-mail: zhengjingmin@yahoo.com

收稿日期: 2007-08-28, 接受日期: 2007-11-06

指标, 取小鼠的左肾用以抽提总 RNA 进行后续的血管生成素样蛋白 2 基因 mRNA 表达水平的定量分析, 取小鼠右肾标本制作石蜡切片, 分别进行血管生成素样蛋白 2 表达水平的免疫组化分析和 PAS 染色病理分析.

1.2 血管生成素样蛋白 2 mRNA 表达水平分析

采用半定量 RT-PCR 的方法进行血管生成素样蛋白 2 mRNA 表达水平分析. 抽提小鼠肾脏总 RNA 的 Trizol 试剂购自 Gibicol 公司; 合成 cDNA 的逆转录试剂盒购自 Promaga 公司; 用于 PCR 扩增的 DNA 聚合酶、dNTPs 等购自上海申能博彩公司, 相关引物也由上海申能博彩公司合成. RNA 抽提和逆转录等具体方法均按操作说明进行. 扩增血管生成素样蛋白 2 cDNA 的引物序列为: mANGPTL2 sense, 5' ttaagcagaagcggcagatcga 3'; mANGPTL2 antisense, 5' ggttgatgatgcggttaggt 3', 扩增片段长度为 417 bp. 扩增小鼠 β -actin cDNA 的引物序列为: mactin sense, 5' catcactattggcaacgagc 3'; mactin antisense, 5' tacggatgtcaacgtcacac 3', 扩增片段长度为 131 bp. 其中, β -actin 作为内参. PCR 扩增反应体系如下: 逆转录产物 1 μ l, 10 $\times$ 缓冲液 (Mg²⁺ + free) 2 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l, 10 mmol/L dNTP mix 0.4 μ l, 正义、反义引物各 1 μ l, Taq DNA 聚合酶 0.2 μ l (5 U/ μ l), 纯水 12.9 μ l. ANGPTL2 和 β -actin 的 PCR 扩增条件均为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 接着进行如下 28 个循环的扩增: 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s. PCR 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,

以 Smartview 分析软件进行密度灰度扫描, 以 ANGPTL2 扩增条带的灰度值除以同一样品 β -actin 扩增条带的灰度扫描值, 所得数值作为样品中 ANGPTL2 mRNA 的相对表达水平.

1.3 血管生成素样蛋白 2 免疫组化分析

血管生成素样蛋白 2 免疫组化分析采用小鼠肾脏石蜡切片进行. 切片厚 2 μ m, 以丙酮进行固定, 具体按常规方法进行. 抗血管生成素样蛋白 2 单克隆抗体 1 购自精美公司(R&D 公司产品). 辣根过氧化物酶标记猪抗小鼠 IgG 抗体购自 DaKocytomation 公司. 免疫组化染色的具体方法如下: 3%牛血清白蛋白封闭 60 min; 一抗孵育 4 h; 含 0.2% Tween 20 的 PBS 洗涤 3 次, 5 min/次; 二抗孵育 45 min; 经含 0.2% Tween 20 的 PBS 洗涤 3 次后进行显色反应. 接着以苏木精复染 1 min, 自然风干后封片观察.

2 结 果

2.1 db/db 小鼠的一般情况

如表 1 所示, db/db 小鼠在 4 周龄时虽已出现明显的肥胖, 但此时血糖、血胆固醇、血甘油三酯均未见明显升高, 尿白蛋白排泄与正常对照小鼠相比也没有明显差别, 代表了 db/db 小鼠糖尿病发生前的状态. db/db 小鼠在 8 周龄时, 出现了高血糖、高血脂, 表现出了明显的肾脏损害, 出现了白蛋白尿, 说明此时的 db/db 小鼠已发生糖尿病肾病. 此后, 随着周龄的增加, db/db 小鼠的血糖、血脂水平不断升高, 两者均在约 16 周龄时达到峰值, 此

Table 1 Characteristics of experimental animals

	4 weeks	8 weeks	12 weeks	16 weeks	20 weeks	24 weeks
Body mass/g						
db/m	13.65 $\pm$ 0.52	18.83 $\pm$ 0.55	22.97 $\pm$ 0.90	26.05 $\pm$ 1.15	29.28 $\pm$ 0.95	30.00 $\pm$ 1.13
db/db	18.28 $\pm$ 0.56 ¹⁾	27.72 $\pm$ 0.59 ¹⁾	38.73 $\pm$ 0.55 ¹⁾	45.43 $\pm$ 1.44 ¹⁾	48.82 $\pm$ 1.16 ¹⁾	48.87 $\pm$ 1.31 ¹⁾
Plasma glucose levels /(mmol $\cdot$ L ⁻¹)						
db/m	8.55 $\pm$ 1.72	9.13 $\pm$ 1.49	9.87 $\pm$ 1.57	9.55 $\pm$ 1.87	9.17 $\pm$ 1.42	10.47 $\pm$ 1.98
db/db	10.57 $\pm$ 1.64	24.98 $\pm$ 2.17 ¹⁾	34.28 $\pm$ 2.67 ¹⁾	42.23 $\pm$ 4.05 ¹⁾	43.80 $\pm$ 4.23 ¹⁾	43.25 $\pm$ 4.42 ¹⁾
Plasma cholesterol /(mmol $\cdot$ L ⁻¹)						
db/m	1.54 $\pm$ 0.44	1.96 $\pm$ 0.24	1.92 $\pm$ 0.37	1.86 $\pm$ 0.57	1.81 $\pm$ 0.34	1.71 $\pm$ 0.42
db/db	1.48 $\pm$ 0.32	2.66 $\pm$ 0.20 ¹⁾	3.16 $\pm$ 0.57 ¹⁾	3.41 $\pm$ 0.55 ¹⁾	3.22 $\pm$ 0.56 ¹⁾	3.47 $\pm$ 0.62 ¹⁾
Plasma triglyceride /(mmol $\cdot$ L ⁻¹)						
db/m	1.07 $\pm$ 0.28	1.23 $\pm$ 0.27	1.02 $\pm$ 0.29	1.24 $\pm$ 0.45	1.06 $\pm$ 0.22	0.97 $\pm$ 0.30
db/db	1.10 $\pm$ 0.31	1.85 $\pm$ 0.30 ¹⁾	1.91 $\pm$ 0.39 ¹⁾	2.22 $\pm$ 0.38 ¹⁾	2.43 $\pm$ 0.37 ¹⁾	2.57 $\pm$ 0.32 ¹⁾
Plasma creatinine level / (μ mol $\cdot$ L ⁻¹)						
db/m	25.18 $\pm$ 3.55	27.28 $\pm$ 3.21	27.60 $\pm$ 3.54	28.80 $\pm$ 3.41	29.35 $\pm$ 2.42	30.17 $\pm$ 5.18
db/db	23.05 $\pm$ 4.80	27.80 $\pm$ 3.23	31.28 $\pm$ 4.70	40.23 $\pm$ 4.08 ¹⁾	47.75 $\pm$ 4.78 ¹⁾	48.90 $\pm$ 6.60 ¹⁾
Urinary albumin excretion /(μ g/24 h)						
db/m	10.1 $\pm$ 1.7	11.9 $\pm$ 4.0	13.6 $\pm$ 2.6	16.0 $\pm$ 4.4	14.4 $\pm$ 7.7	19.1 $\pm$ 5.7
db/db	10.3 $\pm$ 2.4	86.9 $\pm$ 19.8 ¹⁾	168.0 $\pm$ 34.2 ¹⁾	202.2 $\pm$ 44.8 ¹⁾	243.5 $\pm$ 62.0 ¹⁾	241.2 $\pm$ 54.1 ¹⁾

¹⁾Data are the ($\bar{x} \pm s$). Each group has $n = 6$. * $P < 0.01$ vs db/m.

后至 24 周龄仍维持在高水平状态. 同时, 尿白蛋白的排泄量也在不断增加, 约在 20 周龄时达到最大值, 说明随着血糖、血脂水平的不断增加, 高血糖、高血脂状态的延续, db/db 小鼠的糖尿病肾病不断发展, 日渐严重. 对 db/db 小鼠肾脏病理变化的分析也证明了这点(图 1): 与正常对照的 db/m 小鼠相比, db/db 小鼠 4 周龄时的肾脏切片未见明显异常, 自 8 周龄以后, 逐渐出现肾小球肥大, 基底膜增厚, 系膜区增宽, 直至出现系膜溶解、微血管瘤等严重的糖尿病肾病病理改变.

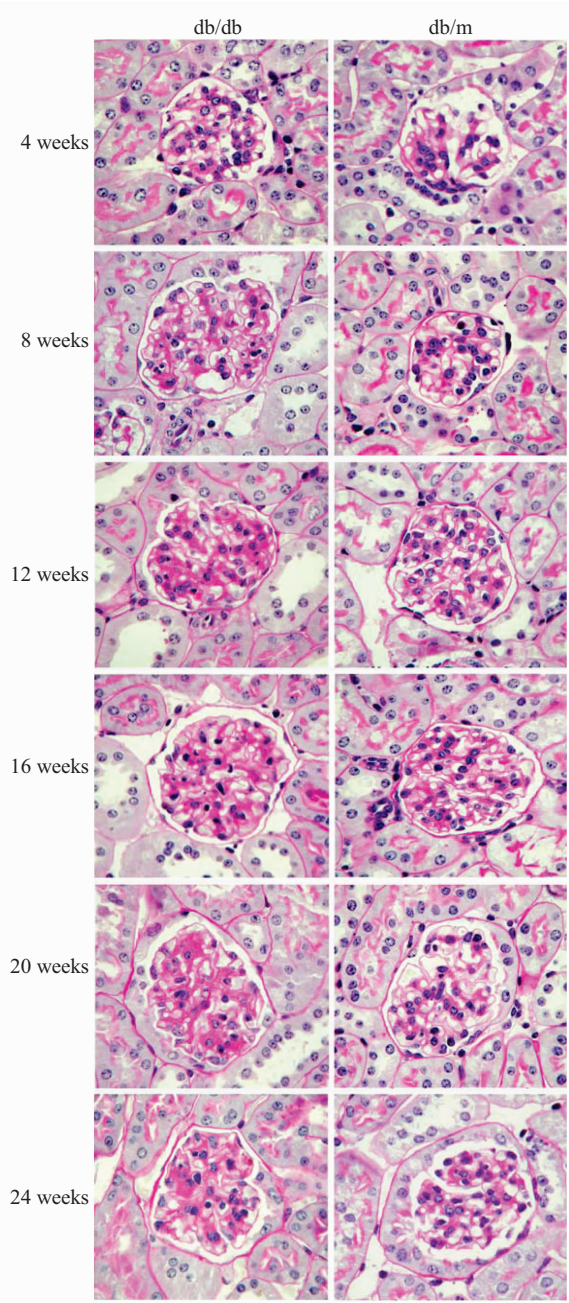


Fig. 1 Increased glomerular injury of db/db mice with the development of diabetic nephropathy (PAS dyeing, originally 400×)

2.2 血管生成素样蛋白 2 mRNA 表达水平的半定量 RT-PCR 分析结果

与作为正常对照的 db/m 小鼠相比(图 2), 4 周龄的 db/db 小鼠肾脏中 ANGPTL2 基因的 mRNA 表达水平虽已有所升高, 但幅度不大, 至 8 周龄时, db/db 小鼠肾脏 ANGPTL2 基因 mRNA 的表达水平已是同龄对照 db/m 小鼠的约 2 倍, 约在 16 周龄达到峰值, 此后至 24 周龄一直维持在一个相对较高的表达水平.

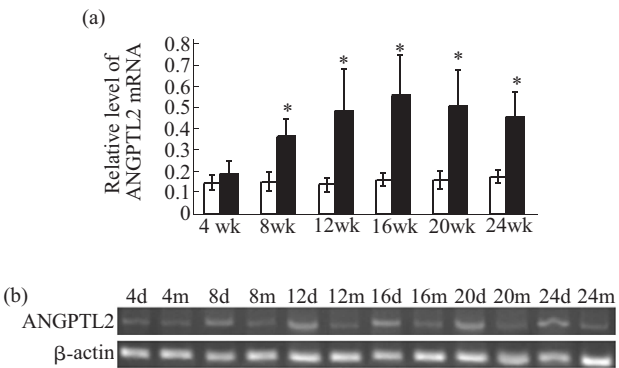


Fig. 2 Relative expression level of ANGPTL2 mRNA in db/db and db/m mice kidney

(a) Comparison of ANGPTL2 mRNA level between db/db mice and db/m mice. □: db/m mice; ■: db/db mice. (b) Partial results of semi-quantitative RT-PCR of ANGPTL2 gene in db/db mice and db/m mice. 4d: 4 weeks old db/db mouse; 4m: 4 weeks old db/m mouse; 8d: 8 weeks old db/db mice; 8m: 8 weeks old db/m mice; 12d: 12 weeks old db/db mice; 12m: 12 weeks old db/m mice; 16d: 16 weeks old db/db mice; 16m: 16 weeks old db/m mice; 20d: 20 weeks old db/db mice; 20m: 20 weeks old db/m mice; 24d: 24 weeks old db/db mice; 24m: 24 weeks old db/m mice.

2.3 血管生成素样蛋白 2 免疫组化分析结果

为了进一步分析血管生成素样蛋白 2 在糖尿病肾病小鼠肾脏中的表达情况, 我们又用抗血管生成素样蛋白 2 抗体对不同病理时期的 db/db 小鼠的肾脏切片进行了免疫组化分析. 免疫组化分析发现(图 3), 在小鼠肾脏中, 血管生成素样蛋白 2 主要分布于肾小球部分, 主要是沿毛细血管袢呈线性分布. 从位置上来看, 主要在毛细血管袢的上皮侧, 大致与足细胞的位置重叠. 由此判断, 足细胞很可能是小鼠肾脏中血管生成素样蛋白 2 的主要分泌细胞. 在作为正常对照的 db/m 小鼠, 血管生成素样蛋白 2 抗体染色均比较淡, 但随着周龄的增长, 血管生成素样蛋白 2 的水平有一种逐渐增加的趋势. 不过, 这种不同周龄间的血管生成素样蛋白 2 水平的差异幅度不是很大, 总体上, 血管生成素样蛋白 2

在正常小鼠的肾脏表达水平不是很高。与此相比, db/db 糖尿病肾病小鼠的血管生成素样蛋白 2 表达水平总体上要高得多, 并与小鼠糖尿病肾病的病理进程表现出相关性: 在已出现小许肥胖但尚未发生糖尿病的 4 周龄的 db/db 小鼠, 血管生成素样蛋白 2 的水平与 db/m 小鼠相比差异不大, 从 8 周龄开始, db/db 小鼠肾小球中的血管生成素样蛋白 2 表达水平明显要高于对照的 db/m 小鼠。总体来说, 上述小鼠血管生成素样蛋白的免疫组化分析结果与其 mRNA 水平的 RT-PCR 分析结果是一致的。

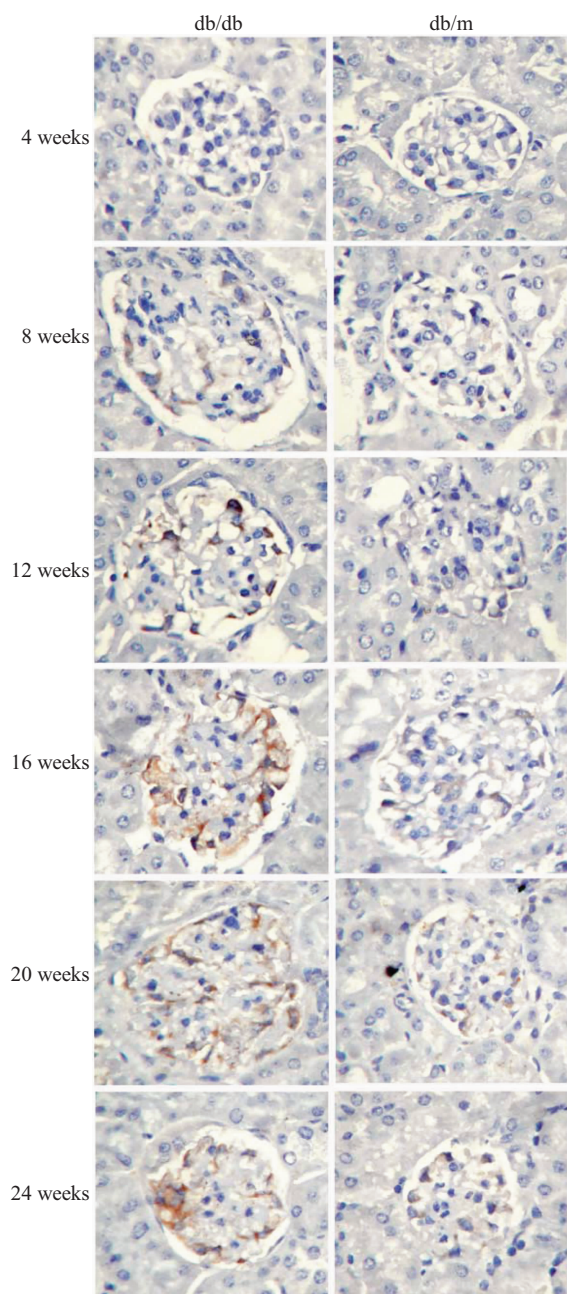


Fig. 3 Results of immunohistochemistry staining of mice glomeruli by ANGPTL2 antibody (originally 400×)

3 讨 论

血管生成素样蛋白 2 是一种功能尚不清楚的分泌性糖蛋白。1999 年 Kim 等^[6]在利用同源扩增寻找新的血管生成素家族成员时发现并克隆了其 cDNA。在离体实验中, Kim 等^[6]曾发现: 经 COS7 细胞重组表达得到的血管生成素样蛋白 2 能促使脐静脉内皮细胞出芽。但未见更多的有关血管生成素样蛋白 2 表达和功能的报道。

经过多年的研究, 血管生成素在血管发生、血管重建以及血管正常结构和功能维护中的重要作用已为人们所共识^[7]。与此相比, 有关血管生成素样蛋白的研究仍然不是很多。但作为一类与血管生成素具有相似结构和一定同源性的新的分泌性糖蛋白, 血管生成素样蛋白在生物体内的功能及其在一些人类疾病中的可能作用是很值得探讨的。从已有的对于血管生成素样蛋白 3、4、6 等的研究来看, 血管生成素样蛋白可能有两方面的功能: 一是在血管发生、血管功能维护方面的可能作用^[8~12]; 二是在代谢调节中的可能作用^[13~21]。而且, 这两方面的功能可能分别由血管生成素样蛋白的两个不同功能域——N 端的卷曲 - 卷曲结构域 (coiled-coil domain, CCD) 和 C 端的纤维蛋白原样结构域 (fibrinogen like domain, FLD) 完成。糖尿病肾病从本质来说是一种因代谢异常而导致的微血管并发症, 血管发生异常在糖尿病肾病的发生发展中起着重要作用。在分析糖尿病肾病肾脏基因表达谱时, 我们首次发现血管生成素样蛋白 2 mRNA 在糖尿病肾病患者肾小球中高表达。为了进一步探讨血管生成素样蛋白 2 与糖尿病肾病的关系, 本文首先对血管生成素样蛋白 2 在不同周龄的 db/db 小鼠肾脏中的表达情况进行了分析。其中 4 周龄的 db/db 小鼠代表糖尿病发生前的情况, 8 周龄的 db/db 小鼠代表糖尿病肾病的早期阶段, 而 16 周龄、20 周龄和 24 周龄的 db/db 小鼠则代表糖尿病肾病不断进展的情况。与作为正常对照的 db/m 小鼠相比, 发生糖尿病前的 db/db 小鼠(4 周龄的 db/db 小鼠)肾脏血管生成素样蛋白 2 表达水平没有明显差异。但随糖尿病肾病的发生和发展, 血管生成素样蛋白 2 在 db/db 小鼠肾脏中的表达水平(无论从 mRNA 水平还是从蛋白质水平分析来看)显著升高, 血管生成素样蛋白 2 的表达水平与糖尿病肾病的发生发展显示了明显的相关性。

从免疫组化的分析结果来看, 血管生成素样蛋

白 2 在肾小球中主要是沿毛细血管祥呈线性分布, 其位置大致与足细胞的位置重叠. 足细胞很可能是小鼠肾脏中血管生成素样蛋白 2 的主要分泌细胞. 作为肾脏的一种固有细胞, 足细胞具有非常重要的功能. 它不仅是肾小球滤过屏障的组成部分, 同时还是肾脏的一种重要分泌细胞. 其合成和分泌的细胞因子(如 VEGF)可直接作用于内皮细胞. 考虑到微血管病变是糖尿病肾病的一个主要特征, 而血管发生异常又是糖尿病肾病中微血管病变的一个重要内容, 再结合 Kim 等有关重组表达得到的血管生成素样蛋白 2 能促使脐静脉内皮细胞出芽的研究结果, 我们推测: 血管生成素样蛋白 2 在糖尿病肾病小鼠肾小球中的高表达很可能与糖尿病肾病微血管病变有关.

在上述对血管生成素样蛋白 2 表达水平的分析中, 我们还发现, 作为正常对照的 db/m 小鼠, 其肾脏血管生成素样蛋白 2 的表达水平似乎还与鼠龄相关: 虽然变化幅度不是很大, 但在周龄较大的小鼠(如 20 周龄以上), 其表达水平相对较高. 这可能提示血管生成素样蛋白 2 还与小鼠衰老所致的肾脏病理改变有关.

总之, 通过对血管生成素样蛋白 2 在不同病理时期的糖尿病肾病小鼠肾脏中表达情况的全面分析, 本文印证了我们先前发现的血管生成素样蛋白 2 在 2 型糖尿病肾病患者肾小球中高表达(与正常的比较)的现象, 更加明确了血管生成素样蛋白 2 与糖尿病肾病的相关性, 同时揭示了血管生成素样蛋白 2 在正常小鼠和糖尿病肾病小鼠肾脏中的表达、分布和变化规律. 对于进一步揭示血管生成素样蛋白 2 的功能及其在糖尿病肾病发生、发展过程中的作用, 探讨糖尿病肾病的分子机制都是有意义的.

参 考 文 献

- 刘志红, 郑敬民, 吴义超, 等. db/db 糖尿病肾病小鼠肾脏基因表达谱及大黄酸对其的影响. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2002, **11** (3): 201~220
Liu Z H, Zheng J M, Wu Y C, *et al.* Chin J Nephrol Dialy Transplant, 2002, **11**(3): 201~220
- 郑敬民, 刘志红, 张鑫, 等. db/db 小鼠糖尿病肾病相关基因的分析 and 克隆. 生物化学与生物物理进展, 2003, **30**(3): 404~411
Zheng J M, Liu Z H, Zhang X, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, **30**(3): 404~411
- 吴义超, 刘志红, 曾彩虹, 等. 糖尿病肾病患者肾小球基因表达谱及其与病情进展的关系. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2004, **13**(6): 503~511
Wu Y C, Liu Z H, Zeng C H, *et al.* Chin J Nephrol Dialy Transplant, 2004, **13** (6): 503~511
- Like A A, Lavine R L, Poffenbarger P L, *et al.* Studies in the diabetic mutant mouse VI. Evolution of glomerular lesions and associated proteinuria. Am J Pathol, 1972, **66**(2): 193~224
- Coleman D L. Diabetes-obesity syndromes in mice. Diabetes, 1982, **31**(suppl 1): 1~6
- Kim I, Moon S O, Koh K N, *et al.* Molecular cloning, expression, and characterization of angiopoietin related protein. J Biol Chem, 1999, **274**(37): 26523~26528
- Loughna S, Sato T N. Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development. Matrix Biol, 2001, **20**(5-6): 319~325
- Oike Y, Yasunaga K, Ito Y, *et al.* Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling, and regeneration. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**(16): 9494~9499
- Ito Y, Oike Y, Yasunaga K, *et al.* Inhibition of angiogenesis and vascular leakiness by angiopoietin-related protein 4. Cancer Res, 2003, **63**(20): 6651~6657
- Oike Y, Ito Y, Maekawa H, *et al.* Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes angiogenesis. Blood, 2004, **103**(10): 3760~3765
- Camenisch G, Pisabarro M T, Sherman D, *et al.* ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration via integrin $\alpha_3\beta_3$ and induces blood vessel formation *in vivo*. J Biol Chem, 2002, **277** (19): 17281~17290
- Le Jan S, Amy C, Cazes A, *et al.* Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. Am J Pathol, 2003, **162**(5): 1521~1528
- Koishi R, Ando Y, Ono M, *et al.* Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. Nat Genet, 2002, **30**(2): 151~157
- Shimizu-gawa 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
- Yoshida K, Shimizu-gawa 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
- Xu A, Lam M C, Chan K W, *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
- Oike Y, Akao M, Yasunaga K, *et al.* Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. Nat Med, 2005, **11** (4): 400~4008
- Ono M, Shimizu-gawa T, Shimamura M, *et al.* Protein region important for regulation of lipid metabolism in angiopoietin-like 3 (ANGPTL3). 2003, **278**(43): 41804~41809
- Ge H, Yang G, Yu X, *et al.* Oligomerization state-dependent hyperlipidemic effect of angiopoietin-like protein 4. J Lipid Res, 2004, **45**(11): 2071~2079
- Oike Y, Akao M, Kubota Y, *et al.* Angiopoietin-like proteins: potential new targets for metabolic syndrome therapy. Trends Mol Med, 2005, **11**(10): 473~479
- Mandard S, Zandbergen F, van Straten E, *et al.* The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. J Biol Chem, 2006, **281**(2): 934~944

Expression of ANGPTL2 in The Kidney of Diabetic Nephropathy db/db Mice *

ZHENG Jing-Min**, LIU Zhi-Hong LI Lei-Shi

(Research Institute of Nephrology, Jinling Hospital, Nanjing 210002, China)

Abstract Kidney samples were obtained from db/db mice and their db/m littermates at the age of 4, 8, 12, 16, 20 and 24 weeks. The expression of ANGPTL2 was assessed by RT-PCR and immunohistochemistry, and then correlated with biochemical and histological indices of kidney injury. No significant difference of ANGPTL2 expression was found in the kidney of db/db mice and the control db/m mice at the age of 4 weeks, a time when all biochemical and histological indices indicated that the db/db mice were in pre-diabetic condition. However, with the development of obesity, hyperglycemia and proteinuria, the expression of ANGPTL2 in the kidney of db/db mice increased, which indicated that the increased expression of ANGPTL2 associated with diabetic nephropathy. ANGPTL2 protein was found distributed mainly in the glomerulus. It is along the capillary loop, located just outside the basement membrane, and in the same location as podocytes, which suggested that podocytes are the main origin of ANGPTL2 in the kidney. Besides, increased expression of ANGPTL2 was found in older db/m mice though it has not reached to a significant level, which may suggest that ANGPTL2 might have some thing to do with the kidney injury caused by ageing.

Key words angiotensin-like protein 2 (ANGPTL2), diabetic nephropathy, db/db mice

*This work was supported by grants from The National Science Foundation of China (30470801) and The Science Foundation of Jiangsu Province of China (BK2005086).

**Corresponding author . Tel: 86-25-80860805, E-mail:zhengjingmin@yahoo.com

Received: August 28, 2007 Accepted: November 6, 2007