[文章编号] 1671-587X(2026)04-0905-09 DOI:10.13481/j.1671-587X.20260403

血管生成素样蛋白6对蛋氨酸和胆碱缺乏饮食诱导的小鼠肝脏脂质沉积的改善作用及其机制

温升聪[1]，邓娅娅*，张鑫铬△，何佳怡#，孙雨萌*，朱井玲[1]，宋永顺[2]，张云华[1]
（1. 新疆地方与民族高发病教育部重点实验室石河子大学医学院生化教研室，新疆 石河子 832002；
2. 新疆维吾尔自治区克拉玛依市中心医院检验科，新疆 克拉玛依 834000）

[摘 要] **目的：**探讨血管生成素样蛋白6（ANGPTL6）对蛋氨酸和胆碱缺乏（MCD）饮食诱导的小鼠肝脏脂质沉积的改善作用，并阐明其可能的作用机制。**方法：**将42只6周龄C57BL/6小鼠随机分为对照组、模型组和ANGPTL6过表达组（ANGPTL6组），每组14只。适应性饲养1周后，对照组小鼠正常饮食喂养，模型组和ANGPTL6组小鼠采用MCD饲料喂养8周；并于MCD饮食后1周，经尾静脉分别向模型组和ANGPTL6组小鼠注射腺相关病毒8-型腺相关病毒（AAV8）-绿色荧光蛋白（GFP）空载体及AAV8-ANGPTL6过表达载体。以油酸（OA）与棕榈酸（PA）混合物诱导HepG2细胞脂肪变性模型，将细胞分为空载体对照组（BSA组）、模型组（OD组）、ANGPTL6处理组（OAD组）和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mTOR）激动剂组（OAM组）。采用HE染色和油红O染色评估各组小鼠肝组织形态及脂质沉积情况，试剂盒检测各组小鼠肝组织和各组HepG2细胞中总胆固醇（TC）及甘油三酯（TG）水平，实时荧光定量PCR（RT-qPCR）法检测各组小鼠肝组织和各组HepG2细胞中脂质代谢相关基因mRNA表达水平，Western blotting法检测各组小鼠肝组织和各组HepG2细胞中ANGPTL6、mTOR及磷酸化mTOR（p-mTOR）蛋白表达水平。**结果：**与对照组比较，模型组和ANGPTL组小鼠肝脏出现严重的空泡样变性及脂质异常堆积，且肝组织中ANGPTL6蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。与模型组比较，ANGPTL6组小鼠肝脏空泡样变性和脂质蓄积减轻，肝组织中TG水平降低（$P<0.05$），肝组织中脂质合成相关基因固醇调节元件结合蛋白1（*SREBF1*）和脂肪酸合成酶（*FASN*）mRNA表达水平均降低（$P<0.05$），脂质分解相关基因脂肪组织甘油三酯水解酶（*ATGL*）和肉碱棕榈酰转移酶1A（*CPT1A*）mRNA表达水平均升高（$P<0.05$）；肝组织中mTOR和p-mTOR蛋白表达水平均降低（$P<0.05$）。与BSA组比较，OD组细胞中TG水平、*FASN*和乙酰辅酶A羧化酶α（*ACACA*）mRNA表达水平及mTOR和p-mTOR蛋白表达水平均升高（$P<0.05$）；与OD组比较，OAD组细胞中TG水平、*FASN*和*ACACA* mRNA表达水平及mTOR和p-mTOR蛋白表达水平均降低（$P<0.05$）；与OAD组比较，OAM组细胞中TG水平、*FASN*和*ACACA* mRNA表达水平及mTOR和p-mTOR蛋白表达水平均升高（$P<0.05$）。**结论：**ANGPTL6可改善MCD饮食诱导的小鼠肝脏脂质沉积，其机制可能与抑制mTOR信号通路活性有关。

[关键词] 血管生成素样蛋白6；代谢相关脂肪性肝病；哺乳动物雷帕霉素靶蛋白；脂质代谢；小鼠，C57BL/6
[中图分类号] R363 [文献标志码] A

[收稿日期] 2025-10-18 [录用日期] 2025-12-02
[基金项目] 国家自然科学基金项目（82260126，32460221）；兵团指导性科技计划项目（2024ZD020）；新疆第二医学院科研项目（ZR202540）
[作者简介] 温升聪（1999－），男，江西省吉安市人，在读硕士研究生，主要从事代谢性疾病方面的研究。
[通信作者] 张云华，副教授，硕士研究生导师（E-mail：yunhuazhang@shzu.edu.cn）；
宋永顺，副主任技师（E-mail：1521003011@qq.com）

©《吉林大学学报（医学版）》编辑部，开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。
© Editorial Board of Journal of Jilin University（Medicine Edition）. Open access under CC BY-NC-ND license.

Improvement effect of angiopoietin-like protein 6 on liver lipid accumulation induced by methionine- and choline-deficient diet in mice and its mechanism

WEN Shengcong[1], DENG Yaya[*], ZHANG Xinge[△], HE Jiayi[#], SUN Yumeng[*], ZHU Jingling[1], SONG Yongshun[2], ZHANG Yunhua[1]

(1. Key Laboratory of Xinjiang Endemic & Ethnic Diseases, Ministry of Education, Department of Biochemistry, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Central Hospital, Karamay City, Xinjiang Uygur Autonomous Region, Karamay 834000, China)

ABSTRACT **Objective**: To discuss the effect of angiopoietin-like protein 6 (ANGPTL6) on improving liver lipid accumulation induced by methionine- and choline-deficient (MCD) diet in the mice, and to clarify its possible mechanism. **Methods**: Forty-two six-week-old C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group and ANGPTL6 overexpression group (ANGPTL6 group), with 14 mice in each group. After one week of adaptive feeding, the mice in control group were fed normal diet, and the mice in model group and ANGPTL6 group were fed with MCD diet for 8 weeks. One week after starting the MCD diet, adeno-associated virus serotype 8(AAV8)-green fluorescent protein (GFP) empty vector and AAV8-ANGPTL6 overexpression vector were injected into the mice in model group and ANGPTL6 group *via* the tail vein, respectively. The steatosis model in HepG2 cells was induced by a mixture of oleic acid(OA) and palmitic acid(PA), and the cells were divided into blank control group (BSA group), model group (OD group), ANGPTL6-treated group (OAD group) and mammalian target of rapamycin (mTOR) agonist group (OAM group). HE staining and oil red O staining were used to evaluate the liver tissue morphology and lipid deposition in the mice in various groups; kits were used to detect the levels of total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) in liver tissue of the mice in various groups and in HepG2 cells in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the mRNA expression levels of lipid metabolism-related genes in liver tissue of the mice in various groups and in HepG2 cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of ANGPTL6, mTOR and phosphorylated mTOR (p-mTOR) proteins in liver tissue of the mice in various groups and in the HepG2 cells in various groups. **Results**: Compared with control group, the livers of the mice in model and ANGPTL groups showed severe vacuolar degeneration and abnormal lipid accumulation, and the expression levels of ANGPTL6 protein in the liver tissue were decreased ($P<0.05$). Compared with model group, the vacuolar degeneration and lipid accumulation in liver tissue of the mice in ANGPTL6 group were alleviated, the TG level in liver tissue was decreased ($P<0.05$); the expression levels of lipid synthesis-related genes sterol regulatory element binding factor 1 (*SREBF1*) and fatty acid synthase (*FASN*) mRNA in liver tissue were decreased ($P<0.05$), and the expression levels of lipid decomposition-related genes adipose triglyceride lipase (*ATGL*) and carnitine palmitoyltransferase 1A (*CPT1A*) mRNA in liver tissue were increased ($P<0.05$); the expression levels of mTOR and p-mTOR proteins in liver tissue were decreased ($P<0.05$). Compared with BSA group, the TG level, the expression levels of *FASN* and acetyl-CoA carboxylase alpha (*ACACA*) mRNA, and the expression levels of mTOR and p-mTOR proteins in the cells in OD group were all increased ($P<0.05$); compared with OD group, the TG level, the expression levels of *FASN* and *ACACA* mRNA, and the expression levels of mTOR and p-mTOR proteins in the cells in OAD group were all decreased ($P<0.05$); compared with OAD group, the TG level, the expression levels of *FASN* and *ACACA* mRNA, and the expression levels of mTOR and

p-mTOR proteins in the cells in OAM group were all increased ($P<0.05$). **Conclusion**: ANGPTL6 can improve MCD diet-induced liver lipid accumulation in the mice, and its mechanism may be related to the inhibition of mTOR signaling pathway activity.

KEYWORDS Angiopoietin-like protein 6; Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease; Mammalian target of rapamycin; Lipid metabolism; Mice, C57BL/6

代谢相关性脂肪性肝病（metabolic-associated fatty liver disease，MAFLD）是以全身代谢功能失调为特征的慢性肝脏疾病，以肝细胞内脂质异常沉积为核心病理特征[1-2]。研究[3]显示：在肝脏中，哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）通路可通过影响脂质合成与分解的平衡参与MAFLD进展。有研究[4]进一步显示：衰老通过下调过氧化物酶体增殖物激活受体α（peroxisome proliferator-activated receptor alpha，PPARα）和肉碱棕榈酰转移酶1（carnitine palmitoyltransferase-1，CPT-1）活性，协同mTOR通路紊乱加速MAFLD病理进程。

血管生成素样蛋白6（angiopoietin-like protein 6，ANGPTL6）是一种主要在肝脏表达的分泌性蛋白[5]。有文献[6]报道：ANGPTL6可通过调节线粒体氧化磷酸化偶联脂肪成纤维细胞生长因子21（fibroblast growth factor 21，FGF21）的表达，参与能量代谢调控。另有研究[7]表明：ANGPTL6可通过增加能量消耗改善肥胖和胰岛素抵抗，并可作为肝细胞癌的生物标志物[8]。目前，关于ANGPTL6与MAFLD关系的研究较为有限，且缺乏对其分子机制的深入探讨。

本研究旨在探讨ANGPTL6是否通过mTOR通路影响MAFLD的脂质代谢过程，为揭示其潜在的治疗价值提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器 6周龄雄性C57BL/6小鼠42只，体质量18～22 g，购自北京斯贝福生物有限公司，动物生产许可证号：SYXK（京）2024-0010。小鼠饲养于石河子大学动物实验中心无特定病原体屏障环境，动物使用许可证号：SYXK（新）2023-0003，环境温度为（22±1）℃，湿度为50%～60%，12 h明暗循环。小鼠自由摄食饮水，适应性饲养1周后进行实验。本研究所有动物操作均经石河子大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准（批准文号：A2023-214-01）。肝癌HepG2细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。蛋氨酸胆碱缺乏饲料（methionine- and choline-deficient diet，MCD）和含蛋氨酸胆碱的对照饲料购自美国MP Biomedicals公司，总胆固醇（total cholesterol，TC）试剂盒和甘油三酯（triglyceride，TG）试剂盒购自南京建成生物工程研究所，10%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购自美国Gibco公司，1%青-链霉素购自美国Hyclone公司，DMEM高糖培养基购自美国Gibco公司，0.5%牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）和0.1%二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）购自美国Sigma公司，油酸（oleic acid，OA）、棕榈酸（palmitic acid，PA）和mTOR激动剂MHY1485购自美国MedChemExpress公司，重组人ANGPTL6蛋白购自南京安研生物科技有限公司，含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的放射免疫沉淀测定（radio-immunoprecipitation assay，RIPA）裂解液、二辛可宁酸（bicinchoninic acid，BCA）检测试剂盒、辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记二抗和增强化学发光液（enhanced chemiluminescence solution，ECL）购自上海碧云天生物技术有限公司，RNA isolater Total RNA Extraction Reagent、HiScript Ⅲ RT SuperMix for qRT-PCR和SYBR Green Pro Taq HS Premix试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司，引物由北京睿博兴科生物有限公司合成，聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜购自美国Millipore公司，ANGPTL6抗体购自英国Abcam公司，mTOR抗体和磷酸化mTOR（phosphorylated mTOR，p-mTOR）购自美国Cell Signaling Technology公司，β-actin抗体购自美国Proteintech公司，腺相关病毒由山东维真生物科技有限公司提供。酶标仪（型号：xMark）购自美国BIO-RAD公司，BIOER FQD-96C实时荧光定量PCR（real-time fluorescence quantitative PCR，RT-qPCR）系统购自杭州博日科技有限公司。

1.2 MAFLD模型的制备及样本采集 将小鼠随机分为3组（每组14只）：①正常对照组：饲喂正常饲料；②模型组：饲喂MCD饲料，并于

MCD饲料喂养开始后1周经尾静脉注射8-型腺相关病毒（adeno-associated virus serotype 8，AAV8）绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）空载体（AAV8-GFP）；③ANGPTL6过表达组（ANGPTL6组）：饲喂MCD饲料，并于MCD饲料喂养开始后1周经尾静脉注射AAV8介导的ANGPTL6过表达载体（AAV8-ANGPTL6）。腺相关病毒注射剂量为每只5×10^{11} μg（溶于0.9%氯化钠注射液，总体积100 μL）。总实验周期为8周，每周记录小鼠体质量和摄食量。喂养结束时，小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠（50 mg·kg^{-1}）麻醉，心脏采血收集血清（4 ℃、3 000 r·min^{-1}离心10 min），并采集肝组织。部分肝组织于4%多聚甲醛中固定用于组织学检测，部分肝组织经液氮速冻后－80 ℃保存用于分子生物学分析。以小鼠肝脏出现严重空泡样变和脂质异常堆积为MAFLD模型构建成功标准。

1.3 组织学检测 小鼠肝组织经20%蔗糖溶液脱水后，分别行石蜡包埋（用于HE染色）和冰冻切片（用于油红O染色）。HE染色评估肝组织形态表现，油红O染色观察肝组织内脂质沉积情况。

1.4 细胞培养 人肝癌细胞HepG2培养于含10%FBS和1%青-链霉素的DMEM高糖培养基中，置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。取对数生长期细胞进行实验，分组如下：①对照组（BSA组）：加入0.5%BSA和0.1%DMSO；②模型组（OD组）：加入100 μmol·L^{-1} OA与50 μmol·L^{-1} PA混合物（OA∶PA＝2∶1）干预24 h以诱导脂肪变性，同时加入0.1% DMSO；③ANGPTL6处理组（OAD组）：在OD组基础上加入0.5 mg·L^{-1}重组人ANGPTL6蛋白；④mTOR激动剂组（OAM组）：在OAD组基础上加入1 μmol·L^{-1} mTOR激动剂MHY1485。处理后收集细胞用于后续检测。

1.5 生化指标检测 取小鼠肝组织和HepG2细胞，制备组织匀浆液或细胞裂解液。采用相应试剂盒检测肝组织和细胞中TC及TG水平，操作严格遵循试剂盒说明书。采用酶标仪在450 nm波长处检测吸光度（A）值。根据以下公式计算样本中TC和TG的水平，单位为mmol·g^{-1}。TC/TG水平＝［（样本孔A值－空白孔A值）/（标准孔A值－空白孔A值）］×$C_{标准}$÷C_{pr}。$C_{标准}$为标准品浓度，C_{pr}为溶液蛋白浓度一致。

1.6 RT-qPCR法检测肝脏组织和HeG2细胞中脂质代谢相关基因表达水平 采用RNA isolater Total RNA Extraction Reagent提取小鼠肝组织或HepG2细胞中总RNA，使用HiScript Ⅲ RT SuperMix for RT-qPCR试剂盒逆转录为互补DNA。RT-qPCR反应使用SYBR Green Pro Taq HS Premix试剂盒在BIOER FQD-96C RT-qPCR系统中进行。反应条件：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性10 s，60 ℃退火并延伸30 s，共40个循环。以β-actin为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因mRNA表达水平。各基因引物序列见表1。

表1 各基因引物序列

Tab.1 Primer sequences of each gene

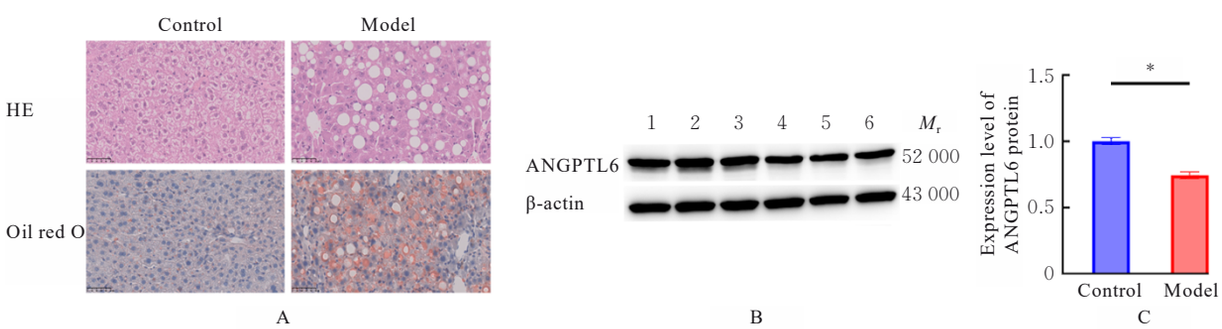
Primer	Sequence(5′－3′)
SREBF-1	F:TGACCCGGCTATTCCGTGA
(*mouse*)	R:CTGGGCTGAGCAATACAGTTC
SREBF-2	F:GCAGCAACGGGACCATTCT
(*mouse*)	R:CCCCATGACTAAGTCCTTCAACT
HMGCR	F:TGTGGCCAGCACTAACAGAG
(*mouse*)	R:GCACCTCCACCAAGGCTTAT
ACACA	F:GATGAACCATCTCCGTTGGC
(*mouse*)	R:GACCCAATTATGAATCGGGAGTG
FASN	F:GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT
(*mouse*)	R:TGGGTAATCCATAGAGCCCAG
DGAT1	F:TCCGTCCAGGGTGGTAGTG
(*mouse*)	R:TGAACAAAGAATCTTGCAGACGA
ATGL	F:GGATGGCGGCATTTCAGACA
(*mouse*)	R:CAAAGGGTTGGGTTGGTTCAG
CPT1A	F:CTCCGCCTGAGCCATGAAG
(*mouse*)	R:CACCAGTGATGATGCCATTCT
CD36	F:ATGGGCTGTGATCGGAACTG
(*mouse*)	R:GTCTTCCCAATAAGCATGTCTCC
APOB	F:AAGCACCTCCGAAAGTACGTG
(*mouse*)	R:CTCCAGCTCTACCTTACAGTTGA
mTOR	F:CAGTTCGCCAGTGGACTGAAG
(*mouse*)	R:GCTGGTCATAGAAGCGAGTAGAC
ACTIN	F:GGCTGTATTCCCCTCCATCG
(*mouse*)	R:CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
ACACA	F:ATCTTGAGGGCTAGGTCTTTTT
(*human*)	R:AGAGTGCTGGTTCAGCTCC
FASN	F:AGTTCACGGACATGGAGCAC
(*human*)	R:TTGGCCTTGGGTGTGTACTG
ACTIN	F:CATGTACGTTGCTATCCAGGC
(*human*)	R:CTCCTTAATGTCACGCACGAT

1.7 Western blotting法检测各组肝组织和HepG2细胞中ANGPTL6、mTOR及p-mTOR蛋白表达水平 取小鼠肝组织或HepG2细胞，于RIPA裂解液中裂解提取总蛋白，BCA法测定蛋白浓度。取80 μg总蛋白经十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）分离，转移至PVDF膜。以5%脱脂牛奶室温封闭2 h，加入一抗4 ℃孵育过夜，ANGPTL6(1∶1 000)、mTOR(1∶1 000)、p-mTOR(1∶1 000)和β-actin（1∶5 000）。洗膜后加入HRP标记二抗（1∶5 000）室温孵育2 h，ECL发光液显影。使用Image J图像软件分析目的蛋白条带灰度值，计算目的蛋白表达水平，蛋白表达水平＝目的蛋白条带灰度值/内参蛋白β-actin条带灰度值。

1.8 统计学分析 采用GraphPad Prism 10.0软件进行统计学分析。小鼠肝组织和HepG2细胞中TC及TG水平，各基因mRNA表达水平，肝组织和HeG2细胞中ANGPTL6、mTOR及p-mTOR蛋白表达水平均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示。多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用LSD-t检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同饮食喂养后2组小鼠肝组织中ANGPTL6蛋白表达水平 C57BL/6小鼠经MCD饮食喂养8周后，HE和油红O染色结果显示：与对照组比较，模型组小鼠肝脏呈现严重的空泡样变性和脂质异常堆积。Western blotting法检测结果显示：与对照组比较，模型组小鼠肝组织中ANGPTL6蛋白表达水平明显降低（$P<0.05$）。见图1。



A：HE and Oil Red O staining（×200）；B：Electrophoregram(Lane 1－3：Control group；Lane 4－6：Model group)；C：Histogram（$^*P<0.05$）.

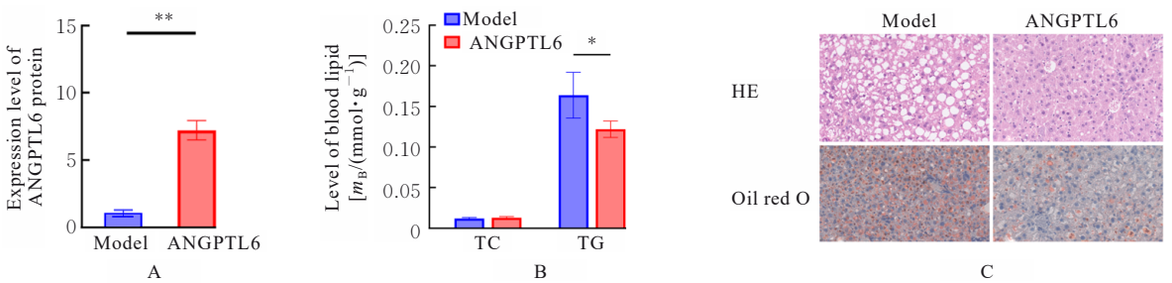
图1 不同饮食喂养后2组小鼠肝组织形态表现和肝组织中ANGPTL6蛋白表达

Fig. 1 Expression of ANGPTL6 protein in liver tissue of mice in two groups after fed with different diets

2.2 2组小鼠肝脏脂质沉积情况 与模型组比较，ANGPTL6组小鼠肝组织中ANGPTL6蛋白表达水平升高，表明通过尾静脉注射AAV8-ANGPTL6腺相关病毒可成功实现ANGPTL6在小鼠肝脏的特异性过表达（图2A）。肝组织血脂水平检测结果显示：与模型组比较，ANGPTL6组小鼠肝组织中TG水平降低（$P<0.05$）；2组小鼠肝组织中TC水平比较差异无统计学意义（$P>0.05$）（图2B）。HE和油红O染色结果显示：与模型组比较，ANGPTL6组小鼠肝组织中空泡样变性和脂滴沉积得到显著改善（图2C）。

2.3 2组小鼠肝组织中调控脂质代谢相关基因表达水平 与模型组比较，ANGPTL6组小鼠肝组织中脂质合成相关基因表达水平降低（$P<0.05$或$P<0.01$），这些基因包括固醇调节元件结合蛋白1（sterol regulatory element binding factor-1，*SREBF-1*）、固醇调节元件结合蛋白2（sterol regulatory element binding factor 2，*SREBF-2*）、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶（3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase，*HMGCR*）、乙酰辅酶A羧化酶α（acetyl-coa carboxylase alpha，*ACACA*）、脂肪酸合酶（fatty acid synthase，*FASN*）、二酰甘油酰基转移酶1（diacylglycerol o-acyltransferase 1，*DGAT1*）和白细胞分化抗原簇36（cluster of differentiation 36，*CD36*）；ANGPTL6组小鼠肝组织中脂质分解代谢关键基因表达水平升高（$P<0.05$或$P<0.01$），包括脂肪甘油三酯脂酶(adipose triglyceride lipase，*ATGL*）和肉碱棕榈酰转移

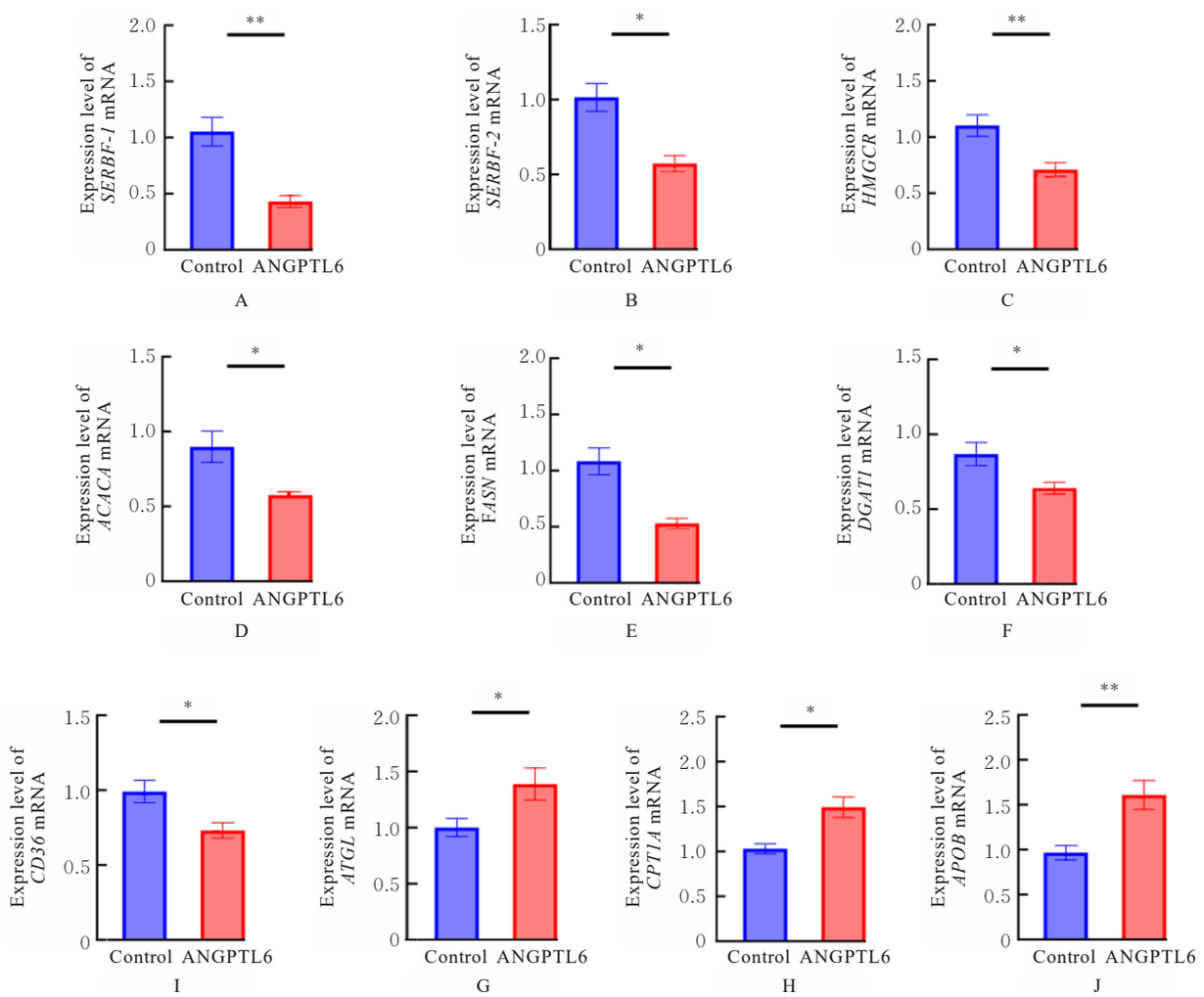
酶 1A（carnitine palmitoyltransferase 1A，*CPT1A*）及低密度脂蛋白摄取与清除的载脂蛋白 B（apolipoprotein B，*APOB*）基因。见图 3。



A，B：Histograms（$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；A：Expression level of ANGPTL6 protein；B：Levels of TC and TG；C：HE and oilred O staining（×200）.

图 2　2组小鼠肝组织中 ANGPTL6 蛋白表达水平（A）、肝组织中 TC 和 TG 水平（B）及肝组织形态表现（C）

Fig. 2　Expression levels of ANGPTL6 protein(A) in liver tissue, levels of TC and TG(B) in liver tissue, and morphology of liver tissue(C) of mice in two groups

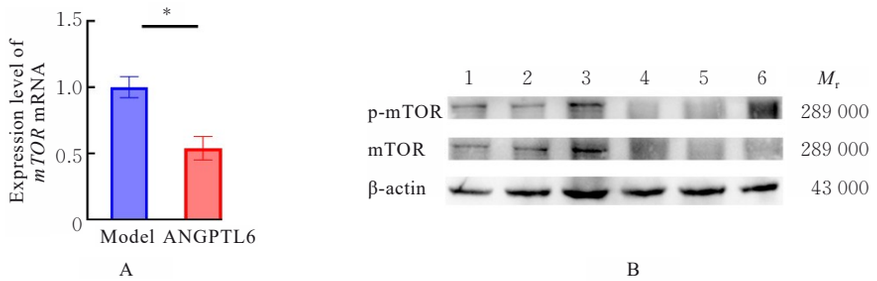


$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.05$ compared with control group.

图 3　2组小鼠肝组织中脂质合成（A～G）和分解代谢（H～J）相关基因表达水平

Fig. 3　Expression leves of genes related to lipid synthesis (A－G), and catabolism (H～J) in liver tissue of mice in two groups

2.4 2组小鼠肝组织中*mTOR*和*p-mTOR* mRNA及蛋白表达水平 RT-qPCR法结果显示：与模型组比较，ANGPTL6组小鼠肝组织中*mTOR* mRNA表达水平降低（$P<0.05$）。Western blotting法检测结果显示：与模型组比较，ANGPTL6组小鼠肝组织中mTOR和p-mTOR蛋白表达水平降低。见图4。



A: Expression levels of mRNA; B: Electrephoregram (Lane 1−3: Model group; Lane 4−6: ANGPTL6 group). *$P<0.05$ compared with model group.

图4 2组小鼠肝组织中*mTOR*和*p-mTOR* mRNA蛋白表达

Fig. 4 Expressions of *mTOR* and *p-mTOR* mRNA proteins in liver tissue of mice in two groups

2.5 mTOR激活剂作用后各组HepG2细胞中TG和TC水平及相关基因mRNA和蛋白表达水平 与BSA组比较，OD组细胞中TG水平升高（$P<0.05$）；与OD组比较，OAD组细胞中TG水平明显降低（$P<0.05$）；与OAD组比较，OAM组细胞中TG水平升高（$P<0.05$）。各组细胞中TC水平比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表2。RT-qPCR法检测结果显示：与BSA组比较，OD组细胞中脂质合成相关基因*FASN*和*ACACA* mRNA表达水平均升高（$P<0.05$）；与OD组比较，OAD组细胞中*FASN*和*ACACA* mRNA表达水平均降低（$P<0.05$）；与OAD组比较，OAM组细胞中*FASN*和*ACACA* mRNA表达水平均升高（$P<0.05$）。Western blotting法检测结果显示：与BSA组比较，OD组细胞中mTOR和p-mTOR蛋白表达水平均升高（$P<0.05$）；与OD组比较，OAD组细胞中mTOR和p-mTOR蛋白表达水平均降低（$P<0.05$）；与OAD组比较，OAM组上述蛋白表达水平均升高（$P<0.05$）。见图5。

表2 各组HepG2细胞中TC和TG水平及*FASN*和*ACACA* mRNA表达水平

Tab. 2 Levels of TC and TG and expression levels of *FASN* and *ACACA* mRNA in HepG2 cells in various groups

（$n=3, \bar{x}\pm s$）

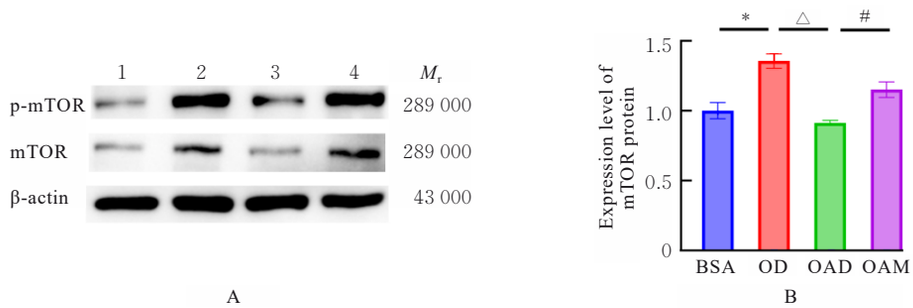
Group	TC [m_B/(mmol·g^{-1})]	TG [m_B/(mmol·g^{-1})]	*FASN* mRNA	*ACACA* mRNA
BSA	0.034±0.011	0.058±0.007	1.000±0.127	1.000±0.260
OD	0.035±0.016*	0.099±0.015*	2.600±0.493*	1.545±0.280*
OAD	0.036±0.009△	0.065±0.007△	0.973±0.358△	0.689±0.181△
OAM	0.039±0.006#	0.093±0.021#	1.878±0.749	1.664±0.274#

*$P<0.05$ compared with BSA group; △$P<0.05$ compared with OD group; #$P<0.05$ compared with OAD group.

3 讨 论

ANGPTL6是一种肝脏富集的分泌蛋白，与血管生成素结构同源，既往研究提示其参与血管生成、表皮细胞增殖和伤口愈合过程[9-11]。研究[12-13]表明：ANGPTL6可通过增加能量消耗缓解饮食诱导的肥胖和胰岛素抵抗，但其在MAFLD中的作用机制尚不明确。本研究通过体内外实验证实：ANGPTL6过表达可显著改善MCD饮食诱导的肝脏脂质沉积，并初步揭示其作用可能与抑制mTOR信号通路相关。

mTOR通路在代谢性疾病中发挥关键作用。研究[14-16]显示：mTOR通路作为营养感知枢纽，其过度激活可促进SREBF-1介导的脂质合成并抑制PPARα依赖的脂肪酸氧化，加剧肝脂肪变性。本研究发现：ANGPTL6过表达可降低MAFLD小



Lane 1：BSA group；Lane 2：OD group；Lane 3：OAD group；Lane 4：OAM group. $^{*}P<0.05$ compared with BSA group；$^{\triangle}P<0.05$ compared with OD group；$^{\#}P<0.05$ compared with OAD group.

图 5 各组 HepG2 细胞中 mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达电泳图（A）和直条图（B）

Fig. 5 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of mTOR and p-mTOR proteins in HepG2 cells in various groups

鼠肝组织中 TG 水平及脂质合成基因（*ACACA* 和 *FASN*）表达，同时升高脂质分解基因（*ATGL* 和 *CPT1A*）表达。Western blotting 法结果显示：ANGPTL6 过表达可抑制小鼠肝组织中 mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达水平，提示 ANGPTL6 可能通过调控 mTOR 信号通路影响肝脂质代谢。本研究细胞实验使用 mTOR 激动剂 MHY1485 验证了 ANGPTL6-mTOR 轴的功能性关联，结果显示：MHY1485 处理可逆转 ANGPTL6 对 TG 积累和 mTOR 通路活性的抑制作用，这证实 ANGPTL6 可通过 mTOR 通路改善脂质沉积。

有研究[6]显示：ANGPTL6 通过 FGF21 调控线粒体氧化磷酸化影响能量代谢，但未涉及 mTOR 机制。本研究拓展了 ANGPTL6 的功能谱，为其代谢调控作用提供了新视角。然而，ANGPTL6 影响 mTOR 通路的具体上游机制仍未完全阐明，其是否涉及磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B 通路、腺苷单磷酸活化蛋白激酶或其他信号通路尚需进一步探索。此外，mTOR 作为丝氨酸/苏氨酸激酶，具有 mTORC1 和 mTORC2 两个功能复合物[17]。mTOR 通路在肝脂代谢中具有双重角色，mTORC1 促进脂质合成，而 mTORC2 通过 Akt 信号影响胰岛素敏感性[18-20]。本研究未区分 mTORC1 与 mTORC2 的作用，未来需通过基因敲除或特异性抑制剂细化机制。本研究亦存在一定局限性：首先，实验仅基于 MCD 饮食模型，未在高脂饮食等其他 MAFLD 模型中验证结论的普适性；其次，ANGPTL6 是否通过 FGF21-线粒体途径间接影响 mTOR 未被探讨。

综上所述，本研究证实 ANGPTL6 通过抑制 mTOR 通路活性，调控脂质代谢基因网络，改善 MCD 饮食诱导的小鼠肝脏脂肪变性。这一发现为 MAFLD 的靶向治疗提供了潜在新策略，针对 ANGPTL6-mTOR 轴的干预可能成为未来研究方向。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

温升聪参与研究设计、实验操作和论文撰写，邓娅娅和张鑫铬参与实验质量控制及统计学分析，何佳怡和孙雨萌参与实验数据收集及分析，朱井玲参与实验数据收集和实验质量控制，宋永顺参与研究设计，张云华参与研究设计、实验质量控制和论文审阅。

[参考文献]

[1] GUO Z W, WU D J, MAO R H, et al. Global burden of MAFLD, MAFLD related cirrhosis and MASH related liver cancer from 1990 to 2021[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 7083.

[2] ITURBE-REY S, MACCALI C, ARRESE M, et al. Lipotoxicity-driven metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD)[J]. Atherosclerosis, 2025, 400: 119053.

[3] LIN S, QIU X S, FU X Y, et al. SNRK modulates mTOR-autophagy pathway for liver lipid homeostasis in MAFLD[J]. Mol Ther, 2025, 33(1): 279-296.

[4] WAN J, WU X S, CHEN H B, et al. Aging-induced aberrant RAGE/PPARα axis promotes hepatic steatosis *via* dysfunctional mitochondrial β oxidation[J]. Aging Cell, 2020, 19(10): e13238.

[5] CHEN E B, TANG C, PENG K, et al. ANGPTL6-mediated angiogenesis promotes alpha fetoprotein-

producing gastric cancer progression [J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(8): 152454.
[6] KANG S G, YI H S, CHOI M J, et al. ANGPTL6 expression is coupled with mitochondrial OXPHOS function to regulate adipose FGF21 [J]. J Endocrinol, 2017, 233(1): 105-118.
[7] VALENCIA-MARTÍNEZ A, SCHAEFER-GRAF U, AMUSQUIVAR E, et al. Relationship of ANGPTL6 with neonatal glucose homeostasis and fat mass is disrupted in gestational diabetic pregnancies [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2022, 107(10): e4078-e4085.
[8] HU G M, GAO F, WANG G Z, et al. Use of proteomics to identify mechanisms of hepatocellular carcinoma with the CYP2D6*10 polymorphism and identification of ANGPTL6 as a new diagnostic and prognostic biomarker[J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 359.
[9] TANG C, CHEN E B, PENG K, et al. Mining the role of angiopoietin-like protein family in gastric cancer and seeking potential therapeutic targets by integrative bioinformatics analysis [J]. Cancer Med, 2020, 9(13): 4850-4863.
[10] OIKE Y, YASUNAGA K, ITO Y, et al. Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling, and regeneration [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(16): 9494-9499.
[11] WANG W Z, ZHAO Y X, ZHU P J, et al. Differential proteomic profiles of coronary serum exosomes in acute myocardial infarction patients with or without diabetes mellitus: ANGPTL6 accelerates regeneration of endothelial cells treated with rapamycin *via* MAPK pathways[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2024, 38(1): 13-29.
[12] ERKAN G, MURATOGLU S, ERCIN U, et al. Angiopoietin-like protein 2 and angiopoietin-like protein 6 levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Arch Med Sci, 2018, 14(4): 781-787.
[13] MIAO X L, ALIDADIPOUR A, SAED V, et al. Hepatokines: unveiling the molecular and cellular mechanisms connecting hepatic tissue to insulin resistance and inflammation [J]. Acta Diabetol, 2024, 61(11): 1339-1361.
[14] SUN Z L, WEI Y H, MA S Y, et al. Zhuru extracts ameliorate lipid accumulation of MASLD *via* suppressing the mTORC1/SREBPs pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2025, 352: 120246.
[15] SUN Y C, SHEN Y, YAN Y M, et al. *GLS1* promotes lipid metabolism in hepatocellular carcinoma by regulating the PI3K/AKT/mTORC1 signaling pathway through *SREBP-1*[J]. Am J Transl Res, 2025, 17(4): 2527-2540.
[16] GU H Y, JIANG W, YOU N, et al. Soluble Klotho improves hepatic glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetes [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2020, 18: 811-823.
[17] 吴 涵，黄 红，易欧阳，等. mTOR调控T细胞增殖与功能的研究进展[J]. 中国免疫学杂志，2024，40(9)：1992-2000.
[18] CASTRO É, VIEIRA T S, PEIXOTO Á S, et al. Fish oil and EPA improve insulin sensitivity, in part through adipocyte mTORC2 activation in diet-induced obese male mice[J]. Mol Nutr Food Res, 2025, 69(6): e70001.
[19] PANWAR V, SINGH A, BHATT M, et al. Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease[J]. Sig Transduct Target Ther, 2023, 8: 375.
[20] 吴世陶，张 敏，石伟伟，等. 核黄素反应性脂质沉积性肌病的临床、肌肉病理、MRI和分子生物学特征[J]. 郑州大学学报(医学版)，2025，60(3)：358-362.

*石河子大学医学院2022级临床医学专业
△石河子大学医学院2022级口腔医学专业
#石河子大学医学院2024级影像学专业