

NPC1L1 在树鼩 AS 造模中小肠和肝的表达及意义

陈丽玲¹⁾, 吴晓云²⁾, 张林强²⁾, 李匀海²⁾, 梁 斌²⁾

(1) 昆明医科大学实验动物学部, 云南昆明 650031; 2) 中国科学院昆明动物研究所, 云南昆明 650223)

[摘要] **目的** 探讨建树鼩 AS 模型中 NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like1) 基因在小肠和肝中 mRNA 的表达差异. 即树鼩脂质代谢和动脉粥样硬化的关系. **方法** 通过半定量 RT-PCR 分别检测树鼩不同膳食组间小肠、肝组织中的 NPC1L1 mRNA 表达差异. **结果** 高脂饲料组树鼩肠组织中基因 NPC1L1 mRNA 的表达 (3910 ± 262) $\mu\text{mol/L}$, 与正常饲料组比较 ($P < 0.05$), 表达水平显著高于正常饲料组. **结论** 树鼩消化道组织 NPC1L1 表达增加与脂肪代谢小肠组织中 NPC1L1 的高表达有关, NPC1L1 可能参与了血脂紊乱的病理生理过程, NPC1L1 与促成动脉粥样硬化的发生机制有待进一步研究.

[关键词] Niemann-PickC1-Like 1; 树鼩; 动脉粥样硬化; RT-PCR[D2]

[中图分类号] Q95-3; R543.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 03 - 0018 - 04

Expression and Significance of Niemann-PickC1-Like 1 in Small Intestine and Liver of Tree Shrews with Atherosclerosis

CHEN Li - ling¹⁾, WU Xiao - xun²⁾, ZHANG Lin - qiang²⁾, LI Yun - hai²⁾, LIANG Bin²⁾

(1) Dept. of Laboratory Animal Kunming Medical University; 2) Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression differences of the Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) gene mRNA in the small intestine and liver of atherosclerotic tree shrews. That is, the relationship of tree shrews lipid metabolism and atherosclerosis. **Methods** Measured the expression differences of the NPC1L1 gene mRNA in the small intestine and liver of atherosclerotic tree shrews among different dietary groups by means of semi-quantitative RT-PCR detection, respectively. **Results** The NPC1L1 mRNA expression in intestinal tissue of tree shrews fed a high-fat diet was (3910 ± 262) nmol/L , and the expression level was significantly above that of normal forage ($P < 0.01$). **Conclusion** The increase of NPC1L1 expression in gastrointestinal tissue and fat metabolism of tree shrews were related to the high expression of NPC1L1 in the small intestine. NPC1L1 might participate in the pathophysiological process of dyslipidemia. The mechanism of NPC1L1 in the occurrence of atherosclerosis is needed to be further research.

[Key words] Niemann-PickC1-Like 1; Tree shrew; Atherosclerosis; RT-PCR

Niemann-Pick C1-Like1 (NPC1L1) 在胃肠细胞、肝脏细胞调解人胆固醇的吸收^[1], 胆固醇是心脏疾患的一个重要因子, NPC1L1 基因是胆固醇吸收抑制剂依泽替米贝 (Ezetimibe) 作用的对象. 药物依泽替米贝阻碍 NPC1L1 导致胆固醇的吸收减

少, 从而降低血液中的胆固醇的吸收减少 15% ~ 20% 之间. 树鼩被认为具有特殊脂质代谢机制的不易感动脉粥样硬化动物^[2], 因其血浆中含有高水平的高密度脂蛋白, 在饲喂高脂、高胆固醇饲料数周后, 血清高密度脂蛋白、胆固醇的比例增高,

[基金项目] 云南省应用基础研究面上基金资助项目 (2011FZ107)

[作者简介] 陈丽玲 (1974~), 女, 云南宣威市人, 在读兽医学博士生, 高级实验师, 主要从事动物营养代谢与实验动物管理工作.

[通讯作者] 梁斌. E-mail: kmyxy18@sina.com

而低密度脂蛋白胆固醇在总胆固醇中的比例下降, 动脉血管病理切片检查其内膜无明显粥样斑块病变形^[2]. 为深入探讨该动物的脂代谢特点及其胆固醇的吸收机制. 检测树鼩小肠、肝组织中 NPC1L1 mRNA 的表达差异, 以了解树鼩 NPC1L1 对血脂代谢和动脉粥样硬化发生的影响, 分析树鼩不易感动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的机制.

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性树鼩 30 只, 体重 (120 ± 20) g, 由昆明医科大学实验动物学部提供.

1.2 主要试剂

Transzol up 试剂, 购自北京全式金生物技术有限公司; 逆转录酶购自 TaKaRa 大连生物技术有限公司, 血脂测定试剂盒由北京鼎国生物试剂有限公司提供.

1.3 主要仪器

LKB800 石蜡切片机, 德国; 日本日立 7060 型全自动生化分析仪, 法国 Secoma 公司; PE480 型 PCR 仪: 美国 PE 公司生产; BIO-RAD 凝胶成像系统: 美国 BIO-RAD 公司生产.

1.4 方法

1.4.1 动物分组及造模 树鼩 30 只随机分为 3 组: 正常组 (n = 10) 普通饲料饲养; 高脂饲料组 (n = 10); 高胆固醇组 (n = 10) 制动脉粥样硬化. 高脂模型饲料配方: 1.5% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、15% 白糖、10% 猪油、72.5% 基础饲料^[2]. 高胆固醇建立 AS 组饲料配方: 含胆固醇 3.0%, 15% 白糖、10% 猪油、71.5% 基础饲料混匀后制成小颗粒饲料. 饲喂 8 个周后, 空腹从股静脉或眼眶静脉丛采血 1 mL, 待检 TC、TG、HDL、LDL; 麻醉抽样取树鼩主动脉弓, 以发现动脉粥样硬化斑块为造模成功.

1.4.2 取材 2 周后空腹股静脉或眼眶静脉丛采血 1.0 mL, 分离血清冷冻保存检测血脂, 8 周后用速眠 0.3 ~ 0.6 mL/kg 肌肉注射麻醉, 分离腹主动脉, 开胸腔分离主动脉, 剥去外膜脂肪, 从主动脉弓处剪去 2 cm、冠脉 0.5 cm 立即投入 10% 甲醛固定液中作 HE 染色检测用; 取近胃端小肠组织约 15 cm (120 mg), 用 PBS 液冲洗干净投入液氮中速冻后放入 -80 °C 冰箱保存, 用作基因表达检测.

1.5 RT-PCR

树鼩肠、肝部分别提 RNA: 先取刨冰用盒子装

满备放研钵用, 从 -80 °C 冰箱中取出树鼩肠、肝组织 100 mg, 立即放入盛有液氮的研钵中, 快速研磨, 边研边浇液氮至到研成粉末, 取约 50 mg 组织粉末加入 1 mL TransZol up 试剂中, 用移液枪吹吸摇匀, 振荡摇匀后, 放置 5 min, 使组织细胞充分裂解. 加入 0.2 mL 氯仿, 振摇 30 s, 室温下放置 3 min, 10 000 × g 4 °C 离心 15 min, 样品分成 3 层, 收集无色水相 (上层), 于 EP 管中, 弃粉红色沉淀管. 再加入 0.5 mL 异丙醇于 EP 管, 振荡混匀室温孵育 10 min; 10 000 × g 4 °C 离心 10 min, 弃上清, RNA 沉淀于 EP 管底部. RNA 洗涤, 加入 1 mL (EDPC 处理的水配制的) 75% 乙醇. 充分涡旋洗涤, 7 500 × g 4 °C 离心 5 min, 弃上清, 室温放置凉干燥 15 min, 加入 50 ~ 100 RNA 溶解液. 50 °C ~ 60 °C 孵育 10 min, 保存样品于 -70 °C 以备长期使用.

逆转录: 取 1 UL 测 RNA 浓度, 以便反转录使用, 采用 20 UL 反应体系.

去除基因组 DNA 反应. 操作如下:

5 g DNA .Eraser Buffer 2 μL
gDNA .Eraser 1 μL
Total RNA *1
RNase Free DH2O up to 10 μL
42 °C 2 min
4 °C 保持

反转录反应: 反应液配制在冰上进行, 为了保证反应液配制的准确性, 进行各项反应时, 应按反应时, 应先按反应数 *1 的量配制 Master Mix, 然后再分装到每个反应管中. 操作如下:

20 μL 体系反应
Total RNA 2 μg
5 × Prime Script Buffer 2 4 μL
Prime Script .Re Enzyme Mix, 2 μL
Ri primer Mix*4 2 μL
加 (1) 的反应液 20 μL
Rnase Free .dH2O up to 40 μL
37 °C 15 min
85 °C 5 sec
4 °C *T

合成的 cDNA 需要长时间保存, 请于 -20 °C 保存.

PCR 扩增: 引物设计, 内参照 β-actin: 上游引物为: 5'-ATGCCATCCTGCCGTCTGGACCTGGC-3', 下游引物为: 5'-AGCATTTCGGGTGCACG ATG GAGGG-3', PCR 扩增片段大小为 750 bp, 上游引物为: 5'-CTTCTTCCGCAAGGTCTACG-3' 下游引

物为 5'- TTCCTCGCTGGAGAAGTTGT-3'PCR 扩增片段大小为 750 bp 含 DNA 片段 150 ng, PCR 反应条件: β -actin, 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 61 °C 30 s, 72 °C 50 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 5 min; NPC1L1: 95 °C 变性 2 min 30 s, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 10 min, 28 个循环, 4 °C. 电泳 0.1% 琼脂糖 2 μ L 样品点样, 用凝胶成像系统记录电泳结果, 图象处理, 测定各个条带的灰度值, 以目的基因与内参照的灰度面积比值为半定量资料, 进行统计分析.

1.6 统计学处理

用 SPSS 软件包进行统计分析, 计量资料的结果用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组间比较单因素方差分析. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

由主动脉弓组织切片图可观察到正常对照组和高脂血症组动脉内膜表面光滑, 即各组主动脉弓切片与正常组相比差异无统计学意义见图 1.

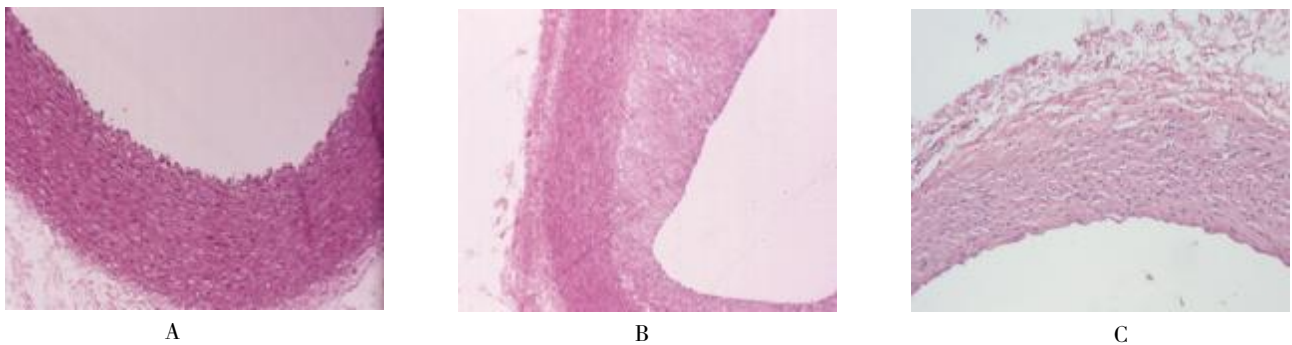


图 1 主动脉弓组织观察 (HE \times 200)

Fig. 1 The histological observation of aortic arch (HE \times 200)

A: 正常组; B: 高脂饲料组; C: 高胆固醇组

高脂饲料组和动脉粥样硬化组树鼯血清总 TC、TG、HDL-C、与正常对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 动脉粥样硬化组与单纯高脂饮食组各

项血脂指标无统计学意义. 组织切片显示饲喂树鼯 8 周的高胆固醇饲料没有形成 AS, 见表 1.

表 1 不同膳食组树鼯模型血脂指标 [mmol/L, ($\bar{x} \pm s$)]

Tab. 1 The serum lipid parameters of tree shrews in different dietary groups [mmol/L, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	n	TG	TC	HDL-C	LDL-C
正常对照组	10	0.47 \pm 0.21	3.32 \pm 0.39	1.13 \pm 0.19	2.8 \pm 0.22
高脂血症	10	1.20 \pm 0.17	5.8 \pm 0.43*	1.98 \pm 0.20	3.78 \pm 0.35
高胆固醇 AS 组	10	1.75 \pm 0.14*	4.7 \pm 0.37*	0.87 \pm 0.11*	3.26 \pm 0.21

与正常对照组比较, * $P < 0.05$.

不同树鼯模型小肠组织中 NPC1L1 mRNA 表达差异通过半定量分析 (图 2): 3 个组别树鼯小肠组织中均存在 NPC1L1 mRNA, 高脂饮食和造 AS 模型中树鼯小肠和肝组织中 NPC1L1 表达明显高于正常对照树鼯 ($P < 0.05$); 高脂饮食和造 AS 模型中树鼯小肠组织中 NPC1L1 mRNA 表达之间有明显差异 ($P < 0.05$). 动脉粥样硬化组与单纯高脂饮食组各项血脂指标无统计学意义

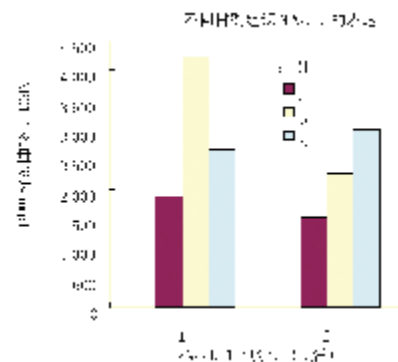


图 2 不同树鼯组织 NPC1L1 的表达

Fig. 2 Expression of NPC1L1 in different tree shrew

3 讨论

NPC1L1 是近年发现的与胆固醇吸收相关的基因。胆固醇的吸收是形成 AS 的重要因素。据资料敲除 NPC1L1 基因的小鼠可被观察到胆固醇吸收显著减少以及完全抵抗食物所诱导的高胆固醇血症^[4,5], NPC1L1 是肠内植物甾醇和胆固醇运载体, 是全身胆固醇稳态调节的重要因子, 是高胆固醇血症和内固醇血症的靶点。树鼩是应激性较强的动物, 部分资料表明肝脏应激内质网产生不稳定 apo-B, 导致肝脏产生 VLDL 减少, 游离胆固醇增加, 转运进入膜的较少; 树鼩肠蠕动比大鼠快, 胆固醇排除时间比大鼠快^[6], 同一时间段疑似造 AS 不易成模。其机制和树鼩中有利于动脉粥样硬化新基因有待进一步开发能更好地为人类治疗 AS 提供新思路。

(致谢: 由衷的感谢中国科学院昆明动物研究所梁斌老师提供的支持、指导极其实验室所有成员的帮助!)

[参考文献]

- [1] GARCIA-CALVO M, LISNOCK J, BULL H G, et al. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(23): 8132-8137.
 - [2] 曾武威, 张坚, 陈保生, 等. 树鼩 CETP 的 cDNA 和蛋白质结构分析[J]. *中华医学杂志*, 2001, 81(21): 1316-1320.
 - [3] ATMANN S W, DAVIS H R, LI-JI Z, et al. Niemann-pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption [J]. *Science (Washington, DC)*, 2004, 303: 1201-1204.
 - [4] DAVIS H R, ZHU L J, HOOBS L M, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(33): 586-592.
 - [5] DAVIES J P, SCOTT C, OISHIKI, et al. Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(12): 710-720.
 - [6] 陈丽玲, 刘汝文, 何保丽, 等. 树鼩胃肠排空与小鼠的比较[J]. *实验动物与比较医学*, 2012, 32(4): 1-2. (2013-01-15 收稿)
-
- (上接第7页)
- [13] 王艳丽, 孙智睿, 杜丽娟, 等. 缺氧后适应中蛋白激酶 C ϵ 与钙感受体相互作用对大鼠心肌细胞的保护作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(8): 1457-1462.
 - [14] SAURIN A T, PENNINGTON D J, RAAT N J H, et al. Targeted disruption of the protein kinase Cepsilon gene abolishes the infarct size reduction that follows ischaemic preconditioning of isolated buffer-perfused mouse hearts [J]. *Cardiovascular Research*, 2002, 55(3): 672-680.
 - [15] YANG W M, ROBERT M, APRIL BOFFERDING, et al. Nitric oxide and catalase sensitive relaxation by scutellarin in the mouse thoracic aorta [J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 2009, 53(1): 66-76.
 - [16] INAGAKI K, CHURCHILL E, MOCHLY-ROSEN D. Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart [J]. *Cardiovascular Research*, 2006, 70(2): 222-230.
 - [17] KERKHOF C J, VANDER LINDEN P J, SIPKEMA P. Role of myocardium and endothelium in coronary vascular smooth muscle responses to hypoxia [J]. *American journal of physiology*, 2002, 282(5): 1296-1303.
 - [18] LU L, YANG P Y, RUI Y C H, et al. Comparative proteome analysis of rat brain and coronary microvascular endothelial cells [J]. *Physiological research Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 2007, 56(2): 159-168.
 - [19] 徐光, 张礼萍, 洗楚芬, 等. 野黄芩甙元及其类似物对蛋白激酶 C 的抑制作用 [J]. *上海医科大学学报*, 1993, 20(3): 187-191.
 - [20] XU W, ZHANG R P, WANG W Y, et al. Effects of scutellarin on PKCgamma in PC12 cell injury induced by oxygen and glucose deprivation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(10): 1573-1579.
 - [21] BEIBARZ E J, WILLIAMS C E, DRAGUNOW M. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic ischemia injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss [J]. *Mol Brain Res*, 1995, 29(13): 1-14.
 - [22] 廖维靖, 杨运煌, 范明. 灯盏花制剂对大鼠缺血性脑损伤再灌注早期脑成像及神经代谢物的作用 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(2): 163-166. (2013-01-14 收稿)