

[文章编号] 1007-3949(2008)16-12-0953-04

• 实验研究 •

Niemann-Pick C1-Like 1表达缺陷缓解肝 X受体激动剂诱导的小鼠肝脏脂肪性变

唐蔚青, 李红霞, 满永

(卫生部北京医院 卫生部北京老年医学研究所 卫生部老年医学重点实验室, 北京市 100730)

[关键词] 病理学与病理生理学; Niemann-Pick C1-Like 1; 肝 X受体; 肝脏脂肪性变; T0901317

[摘要] 目的 探讨 Niemann-Pick C1-Like 1在肝 X受体激动剂诱导的肝脏脂肪性变中的作用。方法 给 C57BL/6小鼠和 Niemann-Pick C1-Like 1基因敲除小鼠喂食 0.015%胆固醇饮食 21天,胃饲溶剂或肝 X受体激动剂 T0901317一周后,收集小鼠肝脏,称重;抽提肝脏脂质并用酶法检测脂质含量;用实时定量聚合酶链反应法检测肝脏表达与脂肪合成相关基因固醇调节元件结合蛋白 1c、脂肪酸合成酶和硬脂酰 CoA 去饱和酶 1的 mRNA 水平。结果 在胃饲 T0901317一周后, C57BL/6小鼠肝脏由 1.1 ± 0.1 g 增大到 2.8 ± 0.3 g 肝脏甘油三酯含量由 34.2 ± 18.1 mg/g 增至 232.2 ± 67.9 mg/g 固醇调节元件结合蛋白 1c、脂肪酸合成酶和硬脂酰 CoA 去饱和酶 1 mRNA 水平在肝脏的表达也显著增高;而 Niemann-Pick C1-Like 1基因敲除小鼠肝脏由 0.9 ± 0.1 g 增大到 1.5 ± 0.1 g 肝脏甘油三酯含量由 43.7 ± 26.5 mg/g 增至 104.9 ± 62.1 mg/g 脂肪酸合成酶和硬脂酰 CoA 去饱和酶 1 mRNA 水平在肝脏的表达也显著增高。但在 T0901317诱导下, Niemann-Pick C1-Like 1基因敲除小鼠肝脏脂肪酸合成酶 mRNA 水平仍比 C57BL/6小鼠低 63%。结论 Niemann-Pick C1-Like 1表达缺陷降低肝 X受体激动剂诱导的肝脏固醇调节元件结合蛋白 1c和脂肪酸合成酶的表达,缓解小鼠肝脏脂肪性变。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Genetic Elimination of Niemann-Pick C1-Like 1 Attenuates Hepatic Steatosis in Mice Induced by Liver X Receptor Agonist

TANG Weiqing, LI Hongxia and MAN Yong

(The Key Laboratory of Geriatrics, Beijing Institute of Geriatrics, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] Niemann-Pick C1-Like 1; Liver X Receptor; Hepatic Steatosis; T0901317

[ABSTRACT] **Aim** To determine the role of Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) in hepatic steatosis induced by liver X receptor (LXR) agonist in mice. **Methods** After being fed with 0.015% cholesterol diet for 21 days and gavaged with vehicle or T0901317 [$25 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{day})$] for 7 days, both C57BL/6 mice and NPC1L1 knockout (NPC1L1-KO) mice were anaesthetized, livers were weighed and hepatic lipids were extracted and measured by enzymatic methods.

Relative hepatic sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), fatty acid synthase (FAS) and stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) mRNA levels were analyzed by real-time quantitative PCR.

Results After being gavaged with T0901317 for one week, the livers of C57BL/6 mice enlarged from 1.1 ± 0.1 g to 2.8 ± 0.3 g and hepatic triglyceride content markedly increased from 34.2 ± 18.1 mg/g to 232.2 ± 67.9 mg/g, which was associated with the significantly enhanced hepatic mRNA levels of SREBP-1, FAS and SCD-1. However in NPC1L1-KO mice, liver weight only increased from 0.9 ± 0.1 g to 1.5 ± 0.1 g and hepatic triglyceride content increased from 43.7 ± 26.5 mg/g to 104.9 ± 62.1 mg/g after treated with T0901317. Though hepatic mRNA levels of FAS and SCD-1 enhanced, the hepatic mRNA level of FAS in NPC1L1-KO mice treated with T0901317 was still 63% lower than that in C57BL/6 mice T0901317 treatment.

Conclusion The down-regulation of hepatic SREBP-1 and FAS induced by NPC1L1 elimination attenuates the LXR agonist-dependent hepatic steatosis in mice.

肝 X受体 (liver X receptor, LXR) 是核受体家族成员之一,它参与调控胆固醇和脂肪酸代谢。氧化甾醇及人工合成物 T0901317 和 GW 3965 是 LXR

的激动剂,激活的 LXR 可进一步促进靶基因的转录,促进胆固醇向体外排出^[1-4]。在肝脏表达的几种调控脂肪生成的基因如固醇调节元件结合蛋白 1c (sterol regulatory element-binding protein-1c, SREBP-1c)、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS) 和硬脂酰 CoA 去饱和酶 1 (stearoyl-CoA desaturase-1, SCD-1) 等也是 LXR 的靶基因,它们的转录激活促使肝脏脂肪性变^[5-7]。

[收稿日期] 2008-08-17 [修回日期] 2008-11-17

[作者简介] 唐蔚青,副研究员,主要从事血脂与动脉粥样硬化关系的研究。Email为 wtang_2004@yahoo.com。李红霞,主管技师,主要从事血脂与动脉粥样硬化关系的研究。满永,主管技师,主要从事脂质代谢的研究。

Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1)是近年来发现的新基因,主要表达在人、猴子及大、小鼠的小肠和肝脏,并调控胆固醇的吸收^[8]。前期研究表明,NPC1L1的表达缺陷抑制 T0901317激活 LXR所诱导的高密度脂蛋白 (HDL)形成,大大降低 LXR激活所诱导的胆固醇的逆向转运^[9]。但是,NPC1L1的表达缺陷是否能抑制肝脏的脂肪性变还需进一步探讨。本研究应用 T091317诱导 NPC1L1基因敲除小鼠以探讨 NPC1L1在 LXR激活所诱导的肝脏脂肪性变中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

将 T0901317溶于 DMSO中,配置成 100 g/L T0901317溶液;使用前用 PBS稀释 (T0901317溶液: PBS= 1: 3)。

1.2 实验动物及分组

给 NPC1L1基因敲除 (NPC1L1-KO)小鼠 (来源于美国 Wake Forest大学病理系)及与其有相同遗传背景的 C57BL/6小鼠喂食低胆固醇饮食 (含 0.015%胆固醇,10%能量来源于棕榈油)21天,在喂食低胆固醇饮食的第 15天,将 C57BL/6及 NPC1L1-KO小鼠各分为两组,分别胃饲 25 mg/(kg·d) T0901317或 100 μ L溶剂 7天;第 22天,小鼠禁食 4 h后麻醉,称体重,收集小鼠肝脏并经称重后置于液氮中冰冻。

1.3 肝脏脂质含量的测定

称取 100 mg肝脏,置于玻璃试管中,用 6 mL氯仿: 甲醇 (2: 1)溶剂于室温过夜抽提脂质,加入 0.05%硫酸 1.2 mL,混合后于 2700 r/min室温离心 10 min,将 1 mL底层 (氯仿层)溶液转入干净试管中并加入 1 mL含 1% Triton X-100的氯仿,于 50℃氮气下干燥后,溶于 1 mL蒸馏水中,酶法测定总胆固醇 (TC)、游离胆固醇 (FC)、磷脂和甘油三酯 (TG)含量。

1.4 实时定量 PCR检测脂肪合成相关基因在肝脏的表达

用 Trizol试剂 (Invitrogen公司)提取小鼠肝组织总 RNA,经 DNA酶处理后,应用逆转录试剂盒 (Applied Biosystems公司)将 RNA逆转录成 cDNA;定量 PCR反应体系为 20 μ L,包含 0.2 ng cDNA、5 pmol引物和 10 μ L 2 \times SYBR;在 ABI 700型荧光定量 PCR仪 (Applied Biosystems公司)上扩增,每个样品做 3个重复,反应条件为: 50℃ 2 min, 94℃ 10 min,然后在 94℃ 15 s, 60℃ 1 min条件下循环 40

次,再于 60℃ 1 min。将 C57BL/6溶剂组 GAPDH的 mRNA量设定为 1,其余各基因的 mRNA与其进行比较。GAPDH上游引物为 5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA -3',下游引物为 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA T -3'; SREBP-1c上游引物为 5'-GGA GCC ATG GAT TGC ACA TT -3',下游引物为 5'-GGC CCG GGA AGT CAC TGT -3'; FAS上游引物为 5'-ATG GAG ATG GGC GAG TTC TTC -3',下游引物为 5'-CCG ACC TTT CCC GTC ACA -3'; SCD-1上游引物为 5'-CCG GAG ACC CCT TAG ATC GA -3',下游引物为 5'-TAG CCT GTA AAA GAT TTC TGC AAA CC-3'。

1.5 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析;实时定量 PCR各组比较用 *t*检;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NPC1L1基因的敲除缓解 T0901317诱导的小鼠肝脏增大

C57BL/6小鼠在喂饲 T0901317一周后,与 C57BL/6溶剂组相比,其肝脏明显增大,颜色苍白,呈明显脂肪性变,肝重和肝重/体重比均显著升高; NPC1L1-KO小鼠在喂饲 T0901317一周后,肝脏也有增大,但无明显的颜色改变,肝重和肝重/体重比虽然显著高于 NPC1L1-KO溶剂组,但明显低于 C57BL/6小鼠喂饲 T0901317组 (表 1)。

表 1 溶剂或 T0901317处理后小鼠肝重与体重 ($n=6$)

分 组	体重 (g)	肝重 (g)	肝重/体重比
C57BL/6溶剂组	4.7 \pm 1.3	1.1 \pm 0.1	0.05 \pm 0.00
C57BL/6 T0901317组	24.0 \pm 0.8	2.8 \pm 0.3 ^a	0.12 \pm 0.01 ^a
NPC1L1-KO溶剂组	23.3 \pm 2.6	0.9 \pm 0.1 ^b	0.04 \pm 0.00 ^b
NPC1L1-KO T0901317组	21.3 \pm 0.8	1.5 \pm 0.1 ^{abc}	0.07 \pm 0.01 ^{abc}

a为 $P < 0.05$ 与 C57BL/6溶剂组比较; b为 $P < 0.05$ 与 C57BL/6 T0901317组比较; c为 $P < 0.05$ 与 NPC1L1-KO溶剂组比较。

2.2 T0901317诱导的小鼠肝脏甘油三酯含量改变

各组小鼠 TC、FC和磷脂含量差异无显著性。C57BL/6小鼠在喂饲 T0901317一周后,其肝脏 TG含量是胃饲溶剂组的 6.7倍,呈现明显的 TG在肝脏堆积;而 NPC1L1-KO小鼠喂饲 T0901317后,肝脏 TG含量与胃饲溶剂组相比虽然升高了 1.3倍,但由于组内变异太大,差异无显著性 (表 2)。

表 2 溶剂或 T0901317处理后小鼠肝脏的脂质含量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$ mg/g)

分 组	TC	FC	磷脂	TG
C57BL/6溶剂组	4.3 ± 0.8	2.9 ± 0.3	19.2 ± 0.8	34.2 ± 18.1
C57BL/6 T0901317组	3.4 ± 1.1	2.3 ± 0.9	12.3 ± 1.7	232.2 ± 67.9 ^a
NPC1L1-KO 溶剂组	4.1 ± 0.9	3.6 ± 0.5	18.8 ± 1.3	43.7 ± 26.5
NPC1L1-KO T0901317组	3.2 ± 0.8	2.9 ± 0.8	19.1 ± 1.3	104.9 ± 62.1

a为 $P < 0.05$ 与 C57BL/6溶剂组比较。

2.3 T0901317诱导的小鼠肝脏脂肪相关合成基因的表达

C57BL/6小鼠经 T0901317 诱导后 SREBP-1 α 、FAS 和 SCD-1 的 mRNA 表达水平显著高于 C57BL/6 溶剂组, 其中 FAS mRNA 水平升高了 37 倍。NPC1L1-KO 小鼠经 T0901317 诱导后 SREBP-1 α mRNA 水平无显著改变, FAS 和 SCD-1 的 mRNA 水平虽有显著升高, 但 FAS mRNA 水平仍比 T0901317 诱导的 C57BL/6 小鼠低 63% (图 1)。

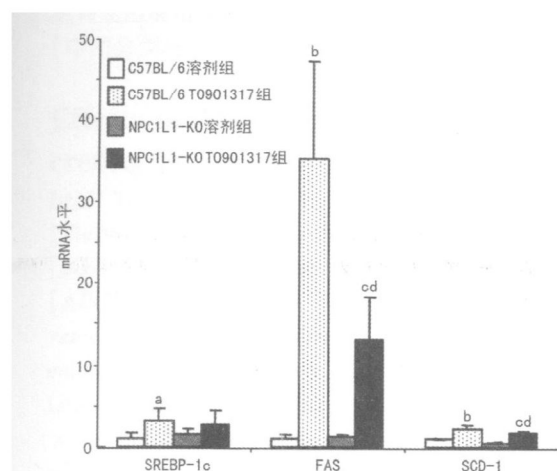


图 1 溶剂或 T0901317处理后小鼠肝脏 SREBP1- α 、FAS 和 SCD-1 的 mRNA 水平 a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$ 与 C57BL/6 溶剂组比较; c为 $P < 0.01$ 与 C57BL/6 T0901317 组比较; d为 $P < 0.01$ 与 NPC1L1-KO 溶剂组比较。

3 讨论

本研究的主要发现是: NPC1L1 在 C57BL/6 小鼠的表达缺陷可有效地减缓 LXR 激动剂诱导的小鼠肝脏 TG 的堆积和肝脏的脂肪性变, 同时显著降低 LXR 激活后肝脏 FAS 的 mRNA 水平。LXR (LXR α 和 LXR β) 是核受体家族成员, 也是配体依赖的转录因子, 可与视黄酸 X 受体 (RXR) 形成异源二聚体并可被 LXR 配体或 RXR 配体激活; 激活后的二聚体随即结合到靶基因的 LXR 反应元件 (LXRE) 上, 调节靶基因的转录。LXR 可调节脂代谢中的多种基因的转录, 其中包括与固醇转运及脂

肪酸合成相关基因^[10]。近年研究显示, LXR 的激活可上调三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 等基因的表达, 提高血浆 HDL 水平, 促进胆固醇的逆向转运, 同时上调脂肪合成基因中的 SREBP-1 α 、FAS、SCD-1 和 ACC 等, 诱导肝脏的脂肪酸合成, 促使 TG 在肝脏的积聚^[11]。

NPC1L1 是近年发现的与胆固醇吸收相关的基因。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^[8, 12, 13]。NPC1L1 基因敲除小鼠在接受 T0901317 处理一周后, 虽然血浆 HDL 水平并无显著升高, 但小肠 ABCA1 的表达与接受 T0901317 的 C57BL/6 小鼠一样都显著上调, 表明 NPC1L1 基因的敲除并不影响 T0901317 对 LXR 的激活, 却显著抑制 LXR 激活后所诱导的 HDL 形成, 推测与胆固醇吸收减少有关^[9]。由于 LXR 的激活不但能促进胆固醇的逆向转运还影响着肝脏的脂肪代谢, 那么 NPC1L1 的缺失在抑制胆固醇逆向转运的同时是否也影响肝脏的脂肪合成? 本研究中, C57BL/6 小鼠在接受 LXR 激动剂 T0901317 处理一周后, 血浆 TG 含量无显著改变 (结果未显示), 而肝脏 TG 含量比未接受 LXR 激动剂小鼠升高约 6 倍, 肝脏重量增加 1.6 倍, 并且肝脏 SREBP-1 α 、FAS 和 SCD-1 的 mRNA 水平明显增高, 其中 FAS mRNA 水平升高了 37 倍, 显示 T0901317 诱导的 C57BL/6 小鼠 TG 在肝脏的堆积所至肝脏的脂肪变性与 SREBP1- α 、FAS 和 SCD-1 在肝脏的表达升高相关, 这与以前的报道基本一致。NPC1L1-KO 小鼠在接受 T0901317 处理后, 肝脏 TG 含量只升高了 1.3 倍, 肝脏重量增加了 0.66 倍; FAS 和 SCD-1 mRNA 水平虽有明显增高, 但 FAS mRNA 水平比 T0901317 诱导的 C57BL/6 小鼠的表达量下降了 67%。提示, FAS 基因的表达降低减少了脂肪酸的合成可能是缓解 T0901317 诱导的 NPC1L1-KO 小鼠肝脏脂肪堆积和脂肪性变的原因。FAS 基因的启动子上既有 LXR/RXR 的结合位点 (LXRE) 也有 SREBP 的结合位点, 可被 LXR/RXR

和 SREBP 激活。NPC1L1 基因的敲除不会影响 T0901317 对小鼠 LXR 的激活^[9], 但 NPC1L1-KO 小鼠在接受 T0901317 处理后, SREBP-1c 的表达没有明显升高, 这可能是影响 FAS mRNA 水平的原因之一, 但为什么 NPC1L1 基因敲除所引起的胆固醇吸收障碍能影响 SREBP-1c 和 FAS 的表达, 最终减轻由 LXR 激活所引起的肝脏脂肪性变还需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, et al. Regulation of absorption and ABC1 mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers [J]. *Science*, 2000 **289** (5484): 1 524-529.
- [2] Costet P, Luo Y, Wang N, et al. Steroid-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor [J]. *J Biol Chem*, 2000 **275** (36): 28 240-245.
- [3] Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000 **97** (22): 12 097-102.
- [4] Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, et al. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001 **98** (2): 507-512.
- [5] Schultz JR, Tu H, Luk A, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis [J]. *Genes Dev*, 2000 **14** (22): 2 831-838.
- [6] Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, et al. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors [J]. *J Biol Chem*, 2002 **277** (13): 11 019-025.
- [7] Liang G, Yang J, Horton JD, et al. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c [J]. *J Biol Chem*, 2002 **277** (11): 9 520-528.
- [8] Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption [J]. *Science*, 2004 **303** (1): 201-204.
- [9] Tang W, Ma Y, Jia L, et al. Niemann-Pick C1-Like 1 is required for an LXR agonist to raise plasma HDL cholesterol in mice [J]. *ATVB*, 2008 **28** (3): 448-454.
- [10] Willy PJ, Umehono K, Ong ES, et al. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway [J]. *Genes Dev*, 1995 **9** (1): 033-045.
- [11] Peet DJ, Turley SD, Ma W, et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha [J]. *Cell*, 1998 **93**: 693-704.
- [12] Davis HR Jr, Zhu LJ, Hoos LM, 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.
- [13] Davies JR, Scott C, Oishi K, 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.

(此文编辑 文玉珊)