

糖尿病小型猪三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达的变化*

唐朝克¹⁾ 席守民²⁾ 尹卫东²⁾ 贺修胜³⁾ 刘德平¹⁾

易光辉¹⁾ 杨峻浩¹⁾ 王 双¹⁾ 韦 星¹⁾ 杨永宗¹⁾ **

(¹⁾ 南华大学心血管病研究所, 衡阳 421001; ²⁾ 南华大学生物化学与分子生物学教研室, 衡阳 421001;

³⁾ 南华大学病理学教研室, 衡阳 421001)

摘要 用贵州小香猪建立 2 型糖尿病动物模型, 探讨糖尿病小型猪三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ABCA1) 表达的变化。采用高脂高蔗糖饲料喂养贵州小香猪, 建立 2 型糖尿病动物模型。血浆总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇和葡萄糖的浓度均用氧化酶法测定, 血浆游离脂肪酸 (FFA) 用比色法测定, 采用逆转录-聚合酶链反应、蛋白质印迹和免疫组织化学分别检测 ABCA1 mRNA 和蛋白质的表达。喂养 6 个月后, 实验组与正常对照组比较, 空腹血糖值明显升高; 空腹胰岛素水平在头 3 个月轻度升高, 在第 6 个月末其水平降低; 血清总胆固醇、甘油三酯和游离脂肪酸水平升高; 肝组织、冠状动脉、肾组织 ABCA1 表达上调, 同时观测到糖尿病小型猪肝组织 LXR α 表达上调。结果提示高脂高蔗糖饲料可引起小型猪脂质和糖代谢紊乱, 并导致肝组织、冠状动脉和肾组织 ABCA1 表达上调以及肝组织 LXR α 表达上调。

关键词 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1, 游离脂肪酸, 糖尿病, 小型猪

学科分类号 R363

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 性心血管疾病是糖尿病发病和死亡的主要原因。2 型糖尿病病人脂质代谢紊乱, 包括血浆甘油三酯 (TG) 升高和高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 降低^[1], HDL 降低是心血管疾病的主要危险因素, HDL 代谢异常在增加与糖尿病相关联的动脉粥样硬化中起重要作用。

三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 在 HDL 形成过程中起着重要的作用。在胆固醇逆转运过程中, ABCA1 将细胞内胆固醇和磷脂转运到载脂蛋白 A1^[2, 3]。ABCA1 基因突变导致 Tangier 病 (Tangier disease, TD), 而 TD 是一种严重的 HDL 缺乏综合症, 其组织巨噬细胞中堆积大量的固醇, 并有 As 形成^[4, 5]。因此, 与糖尿病相关的因素可能影响脂质代谢途径, 导致动脉壁巨噬细胞固醇堆积和 As 形成。

胆固醇代谢与脂肪酸代谢之间有一种联系即固醇调节元件结合蛋白 (sterol regulatory element binding protein, SREBP)。SREBP 可调节固醇、脂肪酸合成和脂蛋白胆固醇吸收的相关基因^[6]。固醇和脂肪酸分别或一同反馈抑制 SREBP。而且, 肝 X 受体 (LXR) 固醇配体可激活 ABCA1 和 SREBP-1c 的转录^[7, 8]。

2 型糖尿病的脂质异常之一是脂肪酸升高, 糖尿病病人各组织器官暴露于异常高的脂肪酸和其他代谢紊乱中。因此, 本实验用高脂高蔗糖饲料喂养

贵州小香猪, 制备糖尿病动物模型, 以便探讨 ABCA1 在糖尿病动物中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

蔗糖购自广西柳州糖厂; 猪油购自湖南衡阳肉联厂; 逆转录-多聚酶链反应试剂盒为美国 Promega 公司产品; 总 RNA 提取试剂盒 (TRIzol) 为上海生物工程公司产品; ABCA1 和 GAPDH (作为内参) 引物均由上海生物工程公司合成; 羊抗人 ABCA1 和 LXR α 一抗 (Santa Cruz 公司); 免疫组织化学染色试剂盒及辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗 (武汉博士德生物工程有限公司); 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 动物与饲料

贵州小香猪共 10 头, 雄雌不分, 3~4 月龄, 购自第三军医大学实验动物中心。按体重随机分为 2 组。正常对照组, 喂普通猪饲料 (control diet, CD); 实验组, 喂高脂高蔗糖饲料 (high fat/high sucrose diet, HFSD) 即 10% 猪油加 37% 蔗糖。动物分栏喂养, 每日投食两次, 日粮为体重的 2%。本实验所用的高脂高蔗糖饲料与已有报道的能引起

* 国家自然科学基金资助项目 (30370675) 和湖南省科技厅重点资助项目 (01SSY1003) 及湖南省教育厅资助项目 (02C399)。

** 通讯联系人。

Tel: 0734-8281288, E-mail: yzyang@mail.hy.hn.cn

收稿日期: 2003-11-24, 接受日期: 2003-12-29

易感鼠糖尿病的“致糖尿病”饲料相类似^[9]。

1.3 血糖、血脂和胰岛素的检测

每月末称体重并从禁食过夜的小香猪眶静脉窦采集血样,检测血糖、血脂和胰岛素浓度。于第6个月末颈动脉放血处死动物,取各组织器官进行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质印迹和免疫组化检测 ABCA1 表达。血浆游离脂肪酸(FFA)的浓度用比色法测定(试剂盒购自南京建成生物技术公司);血浆总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇和葡萄糖的浓度均用氧化酶法测定(试剂盒均购自上海荣盛生物技术有限公司)。胰岛素测定用放射免疫分析法(试剂盒购自北京原子能研究所)。

1.4 口服葡萄糖耐量试验

于第6个月末进行口服葡萄糖耐量试验。给禁食过夜18h的动物按2 g/kg葡萄糖与25 g猪饲料混合后饲喂,吃完后开始计时,分别在0、30、60、90和120 min从眶静脉窦采集血样,测定血糖和胰岛素的浓度。

1.5 胰岛素敏感性试验

第6个月末给空腹动物按0.75 U/kg一次性耳缘静脉注射胰岛素,注射后分别在0、30、60和90 min采集血样,测定血糖浓度,用胰岛素敏感性指数(K_I)^[10]表示。

$$K_I(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = (\rho_{\text{血糖}, t=0} - \rho_{\text{血糖}, t=30}) / 30 \text{ min}$$

1.6 逆转录-聚合酶链反应

按TRIzol试剂盒说明书提取总RNA。取总RNA 2 μg 逆转录合成cDNA,再取逆转录产物10 μl 进行PCR循环。94℃温育5 min, 94℃变性1 min, 60℃复性1 min, 72℃延伸1 min, 共34个循环,末次循环72℃,延伸10 min。ABCA1(GenBank序列号: AF285167)的引物序列:上游5' GCTGCTGA-AGCCAGGGCATGGG 3',下游5' GTGGGGCAGTGG-CCATACTCC 3',PCR扩增产物长度为306 bp。LXR α 的引物序列:上游5' GGGGCCAGCCCC-AAAATGCTG 3',下游:5' GCATCCGTGGGAACATC-AGTCC 3',PCR扩增产物长度为965 bp。GAPDH的引物序列:上游5' TCACCATCTTCCAGGAGCGAG 3',下游5' TGTCGCTGTTGAAGTCAGAG 3',PCR扩增产物长度为697 bp。反应结束后,取反应产物10 μl 进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,UVF型凝胶图像分析系统摄图,并分析各组目的基因及GAPDH基因灰度值,以二者的比值代表ABCA1和LXR α 的表达。

1.7 蛋白质印迹检测 ABCA1 蛋白质表达

组织中加入三去污剂裂解缓冲液进行组织细胞裂解,于4℃离心10 min,弃除沉淀,BCA法进行蛋白质定量,取50 μg 蛋白质加入2 $\times$ SDS凝胶加样缓冲液中,在100℃加热10 min以使蛋白质变性。用6% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,转PVDF膜,丽春红染色观察转移效果,并确定蛋白质分子质量标准位置。封闭液封闭2 h,按1:200加入羊抗人ABCA1一抗,4℃孵育过夜,TBST洗3次,1:2 000加入辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗,室温孵育1 h,TBST洗3次,用蛋白质印迹荧光检测试剂盒显示于X光片。结果用Labwork凝胶图像分析系统对胶片扫描,以对照组的面积灰度值为100%与实验组进行比较和半定量分析^[11]。

1.8 免疫组织化学检测

标本经10%甲醛固定,石蜡包埋,制备4 μm 厚连续切片,常规脱蜡至水,0.01 mol/L pH 6.0枸橼酸盐缓冲液进行微波修复,再按SABC法常规免疫组织化学染色,DAB显色,苏木素复染,脱水,透明,封片,显微镜观察。PBS代替一抗作阴性对照。抗原呈细颗粒状或弥漫性着色,着色强度不同,分布亦不均匀,但凡是能辨认有棕褐色或棕黄色着色的细胞视为阳性细胞。

1.9 统计学处理

实验所得数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用方差分析及 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 小香猪体重变化

每月末称体重,实验结果显示,经高脂高蔗糖饲料喂养后动物体重快速增加,但实验组与对照组小猪平均体重的差别未达到显著性水平(图1)。

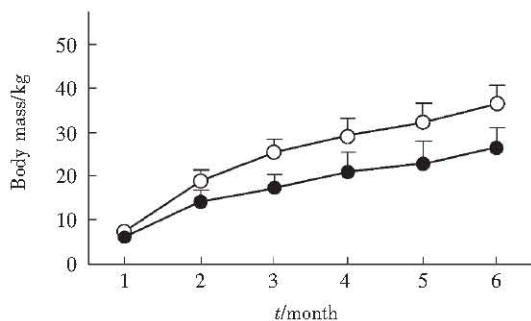


Fig. 1 The mean body mass of the two groups throughout the study
●—●: Control; ○—○: HFSD.

2.2 口服葡萄糖耐量试验结果

对照组血糖浓度在 30 min 时最高, 随后基本恢复正常水平. 但是, HFSD 组每一时间点的血糖水平均比对照组高, $P < 0.01$ (图 2a). 说明这种高脂高蔗糖饲料可引起葡萄糖转运能力的降低. 观测两组动物胰岛素的变化, 对照组在 30 min 时有一胰岛素分泌急性相高峰出现, 而在 HFSD 组这一胰岛素分泌急性相缺失 (图 2b).

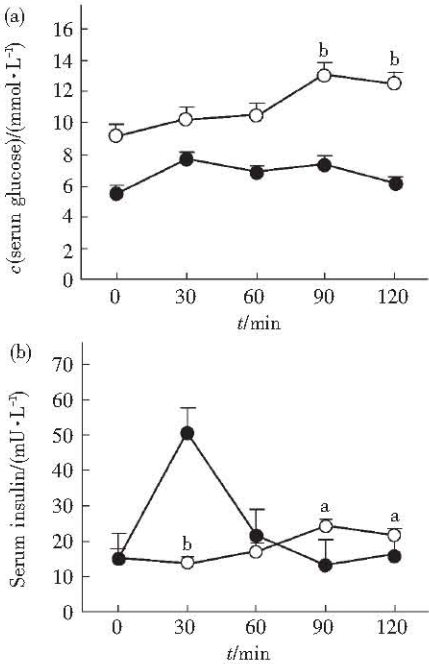


Fig. 2 Changes in blood glucose (a) and insulin (b) concentrations before and after an oral-glucose-tolerance test in high fat/high sucrose (HFSD) and normal control diet (CD) fed minipigs examined at the end of month 6

(a) $P < 0.05$, (b) $P < 0.01$, Compared with control group. ●—●: Control group; ○—○: HFSD group.

2.3 胰岛素敏感性试验结果

糖耐量取决于葡萄糖刺激后 β 细胞分泌胰岛素的能力、肝脏对葡萄糖的摄取和组织对胰岛素的敏感性. 在胰岛素敏感性试验中, 注射胰岛素后通过检测血浆葡萄糖的清除率来观察组织对胰岛素的敏感性 (K_i). K_i 值升高说明组织对胰岛素敏感性高. 图 3 显示, 对照组的 K_i 值约为 HFSD 组的 2 倍, 有显著性差异 ($P < 0.01$). HFSD 组在各时间点的血糖浓度均比对照组显著高, 说明高脂高蔗糖饲料喂养小香猪可引起严重的胰岛素抵抗.

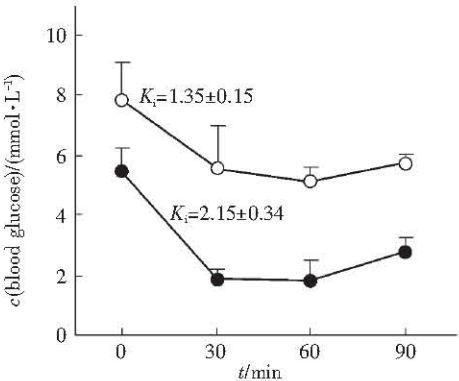


Fig. 3 Changes in plasma glucose concentrations during insulin sensitivity test in high fat/high sucrose (HFSD) and normal control diet (CD) fed minipigs examined at the end of month 6

●—●: Control group; ○—○: HFSD group.

2.4 糖尿病小型猪血糖、血脂和胰岛素水平的改变

高脂高蔗糖饲料喂养小型猪 6 个月后, 空腹血糖和 FFA 逐渐呈持续增高趋势, 实验组小型猪血糖和 FFA 明显高于对照组 ($P < 0.05$); 同时总胆固醇和甘油三酯逐渐也呈持续增高趋势 ($P < 0.05$). 在整个实验中, 空腹胰岛素水平在头 3 个月轻度升高, 而在第 6 个月末降低 (表 1).

Table 1 Plasma level of glucose, lipids and insulin in diabetic minipigs

	Control group			HFSD group		
	1 month	3 months	6 months	1 month	3 months	6 months
$\rho(\text{glucose})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	705.8 ± 61.5	710.9 ± 45.6	686.5 ± 62.6	719.6 ± 83.4	1 214.7 ± 107.9 *	1 408.4 ± 102.7 *
$\rho(\text{TG})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	1 171.9 ± 118.7	1 158.1 ± 51.0	954.8 ± 56.9	1 225.9 ± 70.9	1 766.2 ± 95.6 *	1 645.7 ± 203.7 *
$\rho(\text{TC})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	884.2 ± 104.6	785.7 ± 90.3	746.8 ± 80.9	671.2 ± 69.4	1 227.5 ± 148.5 *	1 955.9 ± 231.1 *
$\rho(\text{HDL-C})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	402.3 ± 36.8	372.0 ± 49.2	436.4 ± 56.6	410.1 ± 42.5	472.1 ± 138.1	451.2 ± 29.9
Insulin(U/L)	10.27 ± 1.33	11.35 ± 1.22	11.32 ± 2.92	11.71 ± 1.83	14.95 ± 2.15 *	8.61 ± 1.29 *
$c(\text{FFA})/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	120.19 ± 19.60	127.55 ± 17.33	110.98 ± 10.51	115.27 ± 15.12	180.62 ± 21.82 *	458.62 ± 49.93 *

TG: Triglycerides. TC: Total cholesterol. HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol. FFA: Free fatty acids. ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$). * $P < 0.05$, compared with control group.

2.5 糖尿病小型猪 ABCA1 mRNA 表达的变化

为了观察高脂高蔗糖饲料是否对小型猪肝组织、冠状动脉和肾组织 ABCA1 mRNA 表达的影响, 采用 RT-PCR 检测这些组织细胞 ABCA1 mRNA 的表达. 结果显示, 与对照组小型猪比较, 实验组小型猪肝组织、冠状动脉和肾组织 ABCA1 mRNA 表达上调 ($P < 0.05$) (图 4).

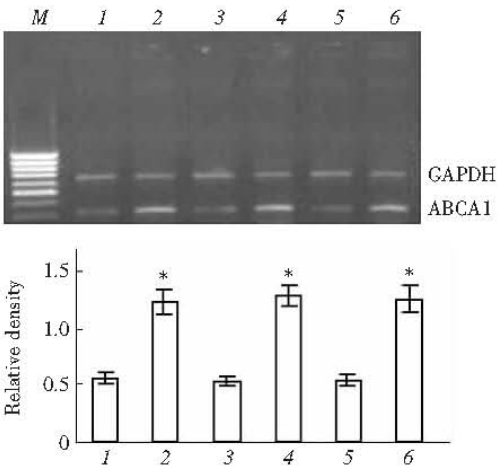


Fig. 4 Expression of ABCA1 mRNA in diabetic minipigs
1: Kidney in control group minipigs; 2: Kidney in diabetic minipigs; 3: Coronary artery in control group minipigs; 4: Coronary artery in diabetic minipigs; 5: Liver in control group minipigs; 6: Liver in diabetic minipigs; M: DNA marker. * $P < 0.05$, compared with control group. $n = 5$.

2.6 糖尿病小型猪 ABCA1 蛋白质表达的变化

高脂高蔗糖饲料喂养小型猪 6 个月后, 蛋白质印迹检测肝组织、冠状动脉和肾组织 ABCA1 蛋白质的表达. 实验结果显示 (图 5), 与对照组小型猪

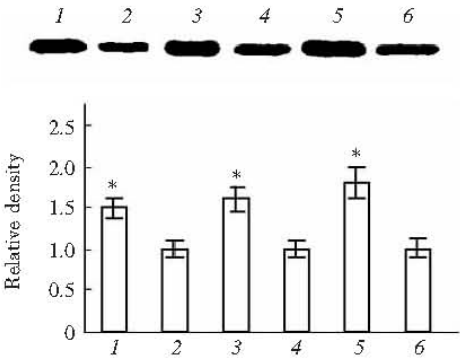


Fig. 5 Expression of ABCA1 protein in diabetic minipigs
1: Kidney in diabetic minipigs; 2: Kidney in control group minipigs; 3: Coronary artery in diabetic minipigs; 4: Coronary artery in control group minipigs; 5: Liver in diabetic minipigs; 6: Liver in control group minipigs. * $P < 0.05$, compared with control group. $n = 5$.

比较, 高脂高蔗糖饲料喂养的小型猪肝组织、冠状动脉和肾组织 ABCA1 蛋白质表达明显增高 ($P < 0.05$). 免疫组织化学检测小型猪肝组织、冠状动脉和肾组织 ABCA1 蛋白质的表达, 其结果与蛋白质印迹检测结果相一致, 实验组小型猪肝组织、冠状动脉和肾组织切片上棕褐色或棕黄色着色的细胞明显多于对照组 (图 6).

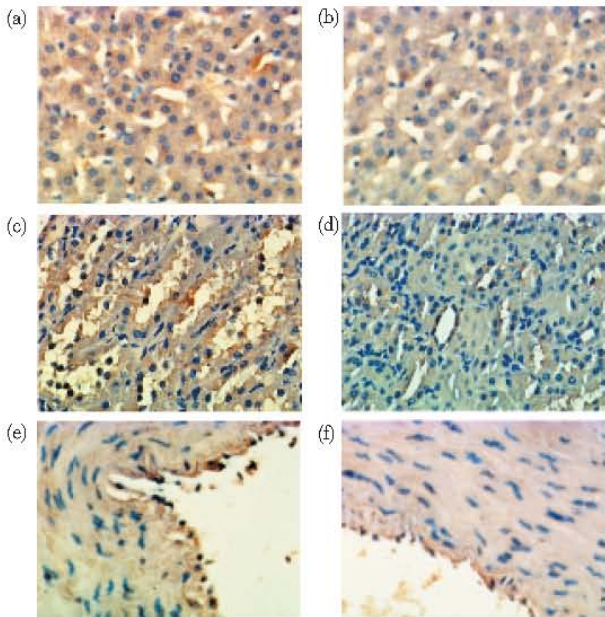


Fig. 6 Expression of ABCA1 protein in diabetic minipigs
(a) Liver in diabetic minipig; (b) Liver in control group minipig; (c) Kidney in diabetic minipig; (d) Kidney in control group minipig; (e) Coronary artery in diabetic minipig; (f) Coronary artery in control group minipig.

2.7 糖尿病小型猪肝 X 受体 α 表达的变化

高脂高蔗糖饲料喂养小型猪 6 个月后, 采用逆转录-聚合酶链反应检测小型猪肝组织 LXR α mRNA. 结果显示: 糖尿病小型猪 LXR α mRNA 比对照组小型猪 LXR α mRNA 表达增强 (图 7). 同时采用蛋白质印迹检测肝组织 LXR α 蛋白质的表达. 实验结果显示, 与对照组小型猪比较, 高脂高蔗糖饲料喂养的小型猪肝组织 LXR α 蛋白质表达明显增高 ($P < 0.05$) (图 8).

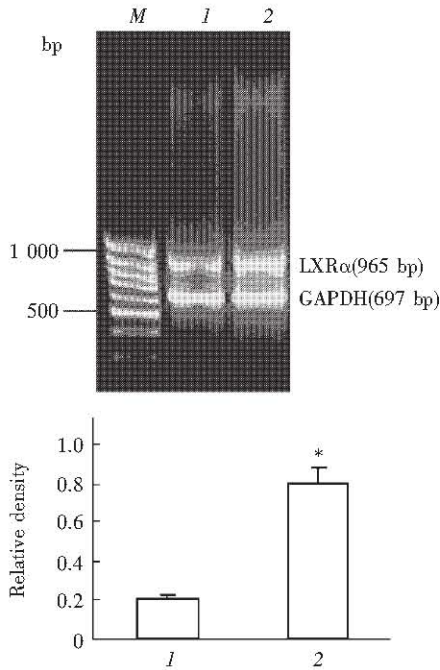


Fig. 7 Expression of LXR α mRNA in diabetic minipigs
 I: Liver in control group minipigs; 2: Liver in diabetic minipigs; M: DNA marker. * $P < 0.05$, compared with control group. $n = 5$.

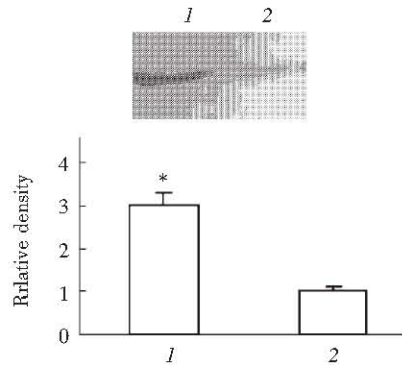


Fig. 8 Expression of LXR α protein in diabetic minipigs
 1: Liver in diabetic minipigs; 2: Liver in control group minipigs.
 * $P < 0.05$, compared with control group. $n = 5$.

3 讨 论

胆固醇和脂质代谢紊乱与心血管疾病、肥胖、糖尿病和高血压形成紧密相关。机体形成灵敏的调控网络以确保脂质的体内平衡。既往研究认为，配体依赖性转录因子核激素受体是胆固醇和脂质代谢相关基因的重要调节者^[12]。过氧化物酶体增生激活型受体 (PPARs)、法呢醇 X 受体 (FXR) 和 LXR 是转录因子，脂肪酸及胆固醇代谢物与它们

直接结合可控制其活性。因此，这些转录因子能感受细胞内胆固醇和脂质浓度的变化，以调节细胞内代谢^[13]。

最近研究显示，LXRs 在胆固醇和脂肪酸代谢相关基因的调控方面起着重要的作用，LXRs 直接结合胆固醇代谢物和脂肪酸^[14]。胆固醇衍生物和脂肪酸抑制 LXR 转录活性，而 24 (S)、25-环氧胆固醇、22 (R)-羟基胆固醇和 24 (S)-羟基胆固醇是 LXR 激动剂，并能增加 ABCA1、ABCG1、ABCG5、ABCG8 和载脂蛋白 E 等基因的转录^[15~19]。这些 LXR 靶基因对固醇代谢的重要性最近引起人们高度关注。ABCA1 与 Tangier 病有关^[20]；ABCG5 和 ABCG8 与谷固醇血症有关^[21]。这 2 个人类基因综合症都是以胆固醇转运紊乱为特征。引起 Tangier 病的 ABCA1 突变导致高密度脂蛋白 (HDL) 几乎完全缺乏，并促进外周组织胆固醇堆积，ABCA1 的生物化学分析显示 ABCA1 介导细胞内胆固醇和磷脂转运到细胞外接受者如 HDL^[22, 23]。LXR 激动剂也增加 CYP7a 的表达，CYP7a 基因编码胆固醇 7 α 羟基酶，而该酶是胆固醇代谢转变成胆汁酸的限速酶^[24]。因此，在胆固醇升高的条件下，LXRs 促进胆固醇从外周转运到肝脏并加速其代谢与分泌。此外，在肠 LXRs 上调 ABCA1、ABCG5 和 ABCG8 以限制固醇的吸收^[16]。

最近，Yin 等^[25]用高脂高蔗糖饲料喂养建立了发生糖尿病和动脉粥样硬化的兔模型。本实验用加有饱和脂肪和蔗糖的“致糖尿病”饲料来喂养小型猪 6 个月，实验结果显示：实验组与正常对照组比较，空腹血糖明显升高；空腹胰岛素水平在头 3 个月轻度升高，在第 6 个月末其水平降低；血清总胆固醇、甘油三酯和游离脂肪酸水平升高。连续 2 次以上空腹血糖 $> 6.7 \text{ mmol/L}$ 的动物判定患了糖尿病^[26]。1997 年由美国糖尿病学会提出的诊断标准规定，空腹血糖值 $\geq 7.0 \text{ mmol/L}$ 可诊断为糖尿病^[27]。本实验用高脂高蔗糖饲料喂养小香猪可引起糖尿病的基本病变，如胰岛素抵抗、高血糖症、高脂血症和胰岛素分泌急性相的损害。其空腹血糖持续增高，均值为 $(9.16 \pm 1.05) \text{ mmol/L}$ 。实验结果显示，我们初步建立了较理想的 2 型糖尿病动物模型。

在体内，胰岛素分泌与胰岛素敏感性、胰岛素清除率的改变密切相关。胰岛素分泌和胰岛素敏感性之间存在一个双曲线关系，在 β 细胞功能正常的个体，胰岛素敏感性的下降，必然有胰岛素分泌

的代偿性增加,从而维持机体处理葡萄糖的能力。这说明胰岛素敏感性和胰岛素分泌是一种负反馈关系,而在糖尿病早期,虽有胰岛素敏感性下降, β 细胞功能缺陷,但胰岛素绝对分泌量并不一定降低。研究发现,高脂高蔗糖饲料喂养损伤了小香猪胰腺 β 细胞,导致 HFSD 组这一胰岛素分泌急性相缺失。在口服糖耐量试验的 90、120 min, HFSD 组动物的胰岛素水平却维持在较高水平,但其血糖却居高不下,说明高脂高蔗糖饲料喂养既损伤了小香猪胰腺 β 细胞又导致外周组织的胰岛素抵抗。

高脂高蔗糖饲料可引起小型猪脂质和糖代谢紊乱,并可导致糖尿病小型猪肝组织、冠状动脉和肾组织 ABCA1 表达上调,同时我们观察到糖尿病小型猪肝组织 LXR α 表达也上调。引起 ABCA1 表达上调可能有多种因素,一方面高糖可引起 ABCA1 表达上调^[28],另一方面,高脂也可引起 ABCA1 表达上调^[29~32]。我们推测高糖高脂可能先引起 LXR α 表达上调,然后 LXR α 上调 ABCA1。但糖尿病小型猪肝组织、冠状动脉和肾组织 ABCA1 表达上调的具体机制还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- Hayden J M, Reaven, P D. Cardiovascular disease in diabetes mellitus type 2: a potential role for novel cardiovascular risk factors. *Curr Opin Lipidol*, 2000, **11** (5): 519 ~ 528
- 唐朝克, 杨永宗, 易光辉, 等. 三磷酸腺苷结合盒转运体 1 在 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出中的作用. *中国病理生理杂志*, 2003, **19** (8): 1084 ~ 1088
Tang C K, Yang Y Z, Yi G H, *et al.* *Chin J Pathophysiology*, 2003, **19** (8): 1084 ~ 1088
- 唐朝克, 易光辉, 唐国华, 等. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在泡沫细胞胆固醇流出中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (4): 304 ~ 308
Tang C K, Yi G H, Tang G H, *et al.* *Chin J Arteriosclerosis*, 2003, **11** (4): 304 ~ 308
- 唐朝克, 易光辉, 王 佐, 等. 干扰素- γ 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出和 ABCA1 表达的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31** (2): 127 ~ 133
Tang C K, Yi G H, Wang Z, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (2): 127 ~ 133
- 唐朝克, 王 佐, 易光辉, 等. Rolipram 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出和 ABCA1 表达的影响. *中国药理学通报*, 2003, **19** (10): 1177 ~ 1182
Tang C K, Wang Z, Yi G H, *et al.* *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2003, **19** (10): 1177 ~ 1182
- Osborne T F. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem*, 2000, **275** (42): 32379 ~ 32382
- 唐朝克, 贺修胜, 易光辉, 等. 肝 X 受体 α 在泡沫细胞胆固醇流出中的调控作用. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (6): 940 ~ 944
Tang C K, He X S, Yi G H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (6): 940 ~ 944

- 唐朝克, 杨永宗. LXR 和 ABCA1 对体内胆固醇代谢的调节作用. *生命的化学*, 2003, **23** (5): 381 ~ 384
Tang C K, Yang Y Z. *Chemistry of Life*, 2003, **23** (5): 381 ~ 384
- Tsutsumi K, Inoue Y, Shima A, *et al.* The novel compound NO-1886 increases lipoprotein lipase activity with resulting elevation of high density lipoprotein cholesterol, and long-term administration inhibits atherogenesis in the coronary arteries of rats with experimental atherosclerosis. *J Clin Invest*, 1993, **92** (1): 411 ~ 417
- Schreyer S A, Wilson D L, LeBoeuf R C. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1998, **136** (1): 17 ~ 24
- 唐朝克, 杨峻浩, 易光辉, 等. 油酸对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达和胆固醇流出的影响. *生物化学与生物物理学报*, 2003, **35** (12): 1077 ~ 1082
Tang C K, Yang J H, Yi G H, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 2003, **35** (12): 1077 ~ 1082
- Chawla A, Repa J J, Evans R M, *et al.* Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*, 2001, **294** (5548): 1866 ~ 1870
- Edwards P A, Kast H R, Anisfeld A M. BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. *J Lipid Res*, 2002, **43** (1): 2 ~ 12
- Ou J, Tu H, Shan B, *et al.* Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (11): 6027 ~ 6032
- Costet P, Luo Y, Wang N, *et al.* Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem*, 2000, **275** (36): 28240 ~ 28245
- Repa J J, Turley S D, Lobaccaro J M A, *et al.* Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*, 2000, **289** (5484): 1524 ~ 1529
- Laffitte B A, Repa J J, Joseph S B, *et al.* LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (2): 507 ~ 512
- Venkateswaran A, Laffitte B A, Joseph S B, *et al.* Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (22): 12097 ~ 12102
- Schwartz K, Lawn RM, Wade D P. ABC1 gene expression and ApoA-1-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **274** (3): 794 ~ 802
- Bodzioch M, Orso E, Klucken J, *et al.* The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*, 1999, **22** (4): 347 ~ 351
- Lee M H, Lu K, Hazard S, *et al.* Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet*, 2001, **27** (1): 79 ~ 83
- Hayden M R, Clee S M, Brooks-Wilson A, *et al.* Cholesterol efflux regulatory protein, Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Curr Opin Lipidol*, 2000, **11** (2): 117 ~ 122
- Tall A R, Wang N. Tangier disease as a test of the reverse cholesterol transport hypothesis. *J Clin Invest*, 2000, **106** (10): 1205 ~ 1207
- Peet D J, Turley S D, Ma W, *et al.* Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*, 1998, **93** (5): 693 ~ 704
- Yin W, Tsutsumi K, Yuan Z, *et al.* Effects of lipoprotein lipase activator NO-1886 as a suppressor agent of atherosclerosis in aorta of

- mild diabetic rabbits. *Arzneimittelforschung*, 2002, **52** (8): 610 ~ 614
- 26 唐朝克, 梁丽红, 徐刚, 等. 糖尿病新西兰兔心、肾 NOS 和抗氧化酶的变化. *中国病理生理杂志*, 2002, **18** (6): 714 ~ 721
Tang C K, Liang L H, Xu G, *et al.* *Chin J Pathophysiology*, 2002, **18** (6): 714 ~ 721
- 27 The Expert Committee on the Diagnosis and the Classification of the Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and the classification of the diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 1997, **20** (7): 1 183 ~ 1 197
- 28 Tu A Y, Albers J J. Glucose regulates the transcription of human genes relevant to HDL metabolism: responsive elements for peroxisome proliferator-activated receptor are involved in the regulation of phospholipid transfer protein. *Diabetes*, 2001, **50** (8): 1851 ~ 1856
- 29 Oram J F, Lawn R M. ABCA1: The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res*, 2001, **42** (8): 1173 ~ 1179
- 30 唐朝克, 杨永宗. ABCA1 在动脉粥样硬化发生与发展中的作用. *生命的化学*, 2003, **23** (2): 138 ~ 140
Tang C K, Yang Y Z. *Chemistry of Life*, 2003, **23** (2): 138 ~ 140
- 31 唐朝克, 严鹏科, 杨永宗. ABCA1 在巨噬细胞胆固醇流出中的作用. *中国病理生理杂志*, 2003, **19** (10): 1427 ~ 1431
Tang C K, Yan B K, Yang Y Z, *et al.* *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2003, **19** (10): 1427 ~ 1431
- 32 唐朝克, 易光辉, 阮长耿, 等. ABC 转运体超家族对胆固醇吸收和血浆植物甾醇水平的调节作用. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31** (5): 398 ~ 401
Tang C K, Yi G H, Ruan C G, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (5): 398 ~ 401

Change of ATP Binding Cassette Transporter A1 Expression in Diabetic Minipigs*

TANG Chao-Ke¹⁾, XI Shou-Min²⁾, YIN Wei-Dong²⁾, HE Xiu-Sheng³⁾, LIU De-Ping¹⁾,
YI Guang-Hui¹⁾, Yang Jun-Hao¹⁾, Wang Shuang¹⁾, WEI Xing¹⁾, YANG Yong-Zong¹⁾**

(¹⁾*Institute of Cardiovascular Research, Nanhua University, Hengyang 421001, China;*

(²⁾*Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Sciences and Technology, Nanhua University, Hengyang 421001, China;*

(³⁾*Department of Pathology, Nanhua University Medical School, Hengyang, 421001, China)*

Abstract To establish a new animal model of the human type 2 diabetes mellitus and investigate the change of ATP binding cassette transporter A1 expression in diabetic minipigs, Chinese minipigs were fed a normal control diet (CD) or a high fat/high sucrose diet (HFSD) for 6 months. Plasma total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG) and glucose were determined by commercially enzymatic methods. Plasma free fatty acids (FFA) were measured by a colorimetric method. ABCA1 mRNA and protein level were determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blot and immunohistochemistry, respectively. After HFSD for 6 months, plasma serum total cholesterol, HDL cholesterol, FFA, triglyceride, and glucose in diabetic minipigs were increased compared with the control. Insulin level of diabetic minipigs was increased in the first 3 months and then decreased at the end of the 6th month. ATP binding cassette transporter A1 expression and liver X receptor α in diabetic minipigs was upregulated. HFSD may induce hyperglycemia, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and upregulation of ATP binding cassette transporter A1 expression and liver X receptor α in diabetic minipigs.

Key words ATP binding cassette transporter A1, free fatty acids, diabetes, minipigs

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30370675), The Special Funds for Department of Science and Technology of Hunan province (01SSY1003) and The Special Funds for Department of Education of Hunan Province (02CG399).

** Corresponding author. Tel: 86-734-8281288, E-mail: yzyang@mail.hy.hn.cn

Received: November 24, 2003 Accepted: December 29, 2003