

肥胖对小鼠十二指肠 DMT1 和 FPN1 表达的影响

高 倩^{1,2}, 李 蔓^{1,2}, 张万山^{1,2}, 魏守刚^{1,2}

(1. 首都医科大学公共卫生学院儿少卫生与妇幼保健学系, 北京 100069;
2. 首都医科大学, 环境毒理学北京市重点实验室, 北京 100069)

【摘要】 目的 观察肥胖对小鼠十二指肠二价金属离子转运体(divalent metal transporter 1, DMT1)mRNA、膜铁转运蛋白(ferroportin1, FPN1)mRNA 及蛋白表达的变化, 探讨肥胖影响铁吸收的机制。**方法** C57BL/6J 小鼠随机分为正常对照组和肥胖模型组, 每组 6 只, 通过喂养高脂饲料喂养建立肥胖模型, 对照组采用普通饲料饲养, 实验干预期 14 周。建模完成后, 采用实时荧光定量 PCR 方法检测小鼠十二指肠 DMT1、FPN1 mRNA 的表达, 用 Western blot 检测小鼠十二指肠 FPN1 蛋白表达。**结果** 与对照组小鼠相比, 肥胖模型组小鼠十二指肠 DMT1、FPN1 mRNA 表达以及 FPN1 蛋白表达水平降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 肥胖会下调机体十二指肠 DMT1、FPN1 的表达, 导致铁吸收不良, 为进一步研究肥胖引起铁缺乏机制提供理论和实验依据。

【关键词】 关键词 肥胖; 铁代谢; 二价金属离子转运体; 膜铁转运蛋白

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 09-0018-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.009.005

Effect of obesity on the expression of DMT1 and FPN1 in the duodenal in mice

GAO Qian^{1,2}, LI Man^{1,2}, ZHANG Wan-shan^{1,2}, WEI Shou-gang^{1,2}

(1. Department of child and adolescent health and maternal care, School of Public Health,
Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Beijing Key Laboratory of Environmental Toxicology, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

【Abstract】 Objective To study the expression of divalent metal transporter 1 (DMT1) and ferroportin 1 (FPN1) in obese mice's duodenal epithelium and investigate the mechanism of the effect of obesity on iron absorption in mice. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into control group and obesity model group, each group of 6. To establish obese mice model by having a high-fat diet and the control group were fed with a normal diet for 12 weeks. After completion of modeling, The level of DMT1 and FPN1 mRNA expression in the duodenum were measured by real-time fluorescent quantitative PCR (Real-time PCR) method, the protein expression of FPN1 was measured by Western-Blot. **Results** Compared with the control group, the level of DMT1, FPN1 mRNA and FPN1 protein expression in the duodenum were decreased significantly in obese mice ($P < 0.05$). **Conclusion** Obesity can decrease the expression levels of DMT1, FPN1 mRNA and FPN1 protein and induce iron deficiency, in order to provide experimental and theoretical basis for studying the mechanism of iron deficiency caused by obesity further.

【Key words】 Obesity; Iron metabolism; Divalent metal transporter 1; Ferroportin 1

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373020); 北京自然科学基金项目(7112014)。

[作者简介] 高倩(1988-), 女, 硕士生, 主要从事儿童期慢性病预防控制, E-mail: mygq163@163.com。

[通讯作者] 魏守刚(1965-), 男, 副教授, 主要从事儿童期慢性病预防控制, E-mail: shangwei@ccmu.edu.cn。

肥胖症已成为世界范围内危害人体健康、影响生命质量、增加社会医疗负担的现代流行性疾病^[1]。铁是人体一种必需微量元素,铁缺乏可造成免疫损伤,运动能力下降等危害。近年来的许多研究发现,肥胖患者比正常体重人群更易发生铁缺乏^[2]。肥胖与铁缺乏集于一身,将对机体带来双重危害,严重影响人体尤其是儿童的健康。一些研究表明,肥胖儿童铁的需要量并无增加,膳食铁的摄入量和生物利用度也不低^[3],肥胖儿童对稳定性同位素示踪铁的膳食吸收率显著低于正常对照儿童^[4],提示我们膳食铁吸收不良是导致肥胖性铁缺乏发生的原因。十二指肠是铁吸收的主要部位,十二指肠中有两种主要铁吸收分子即二价金属离子转运体(divalent metal transporter 1, DMT1)和膜铁转运蛋白(ferroportin 1, FPN1)对铁的吸收发挥起直接调控作用。目前国内外有关肥胖对肠铁吸收影响机制的研究较少,相关铁吸收分子在肥胖机体内如何调节铁的吸收尚不清楚。因此本实验以高脂膳食建立小鼠肥胖模型,采用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法分析营养性肥胖对小鼠十二指肠 DMT1、FPN1 mRNA 及蛋白表达的影响,初步探讨肥胖影响铁吸收的机制,为今后有效预防和治疗肥胖性铁缺乏提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理

4 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠 12 只,体重 10 ~ 13 g,由军事医学科学院实验动物中心提供【SCXK(军)2012-0004】。动物饲养于首都医科大学实验动物中心【SYXK(京)2010-0022】。以普通饲料适应性喂养 1 周后,将小鼠随机分为 2 组,即正常对照组和肥胖模型组,每组 6 只。对照组小鼠继续饲以普通饲料,模型组饲以经辐照消毒的特制高脂鼠料,配方为基础饲料 79%、猪油 10%、蛋黄粉 10%、胆固醇 1% (军事医学科学院实验动物中心提供),饲养期 14 周,每周测体重 1 次。

饲养建模结束后,用 10% 水合氯醛按 400 mg/kg 体重腹腔注射麻醉小鼠,开腹剪取十二指肠,液氮中速冻保存,用于后续实验检测。

动物饲养及实验符合《实验动物管理条例》,并经首都医科大学伦理委员会许可。

1.2 实时荧光定量 PCR 法检测 DMT1、FPN1 mRNA 含量

取冻存十二指肠组织 100 mg, Trizol 法提取总 RNA,用紫外分光光度计测量 260 nm、280 nm 波长处的吸光度值,计算 A260/A280 和 RNA 浓度。取 5 μ L RNA 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,检测 RNA 的完整性。参照 DNase I 试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)对 RNA 中残留的基因组 DNA 进行消化处理,在 2 μ g 总 RNA 样本中加入 DNase I 2 μ L, 10 $\times$ 缓冲液 2 μ L, 无 RNase 水至 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后,加入 2 μ L 200 mmol/L EDTA 终止反应, 65 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。处理后的总 RNA 样品用 HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒(北京康为)进行反转录, cDNA 合成反应体系(20 μ L): 2 μ L Primer mix (Oligo dT 引物, 随机引物), 5 $\times$ 缓冲液 4 μ L, 0.1 mmol/L DTT 2 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 消化后的 RNA 10 μ L, 200 μ mol/L HiFi-MMLV 反转录酶 1 μ L, 加无 RNase 水至 20 μ L。反应条件: 37 $^{\circ}$ C 孵育 50 min, 70 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。反应产物置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

用荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)按照 Ultra SYBR Mixture PCR 试剂盒(北京康为)进行扩增。目的基因和内参基因的引物序列如下: (1) DMT1 上游 5'-GCGCTCTTTGTTTCCTTCAT-3', 下游 5'-TTGTCACCTGGGAAAGAGGTC-3', 扩增片段长度 140 bp; (2) FPN1 上游 5'-CCCTTCCGC ACTTCCGAAT-3', 下游 5'-GAGAATAGACC AGTCCGAACAAGGC-3', 扩增片段长度 257 bp; (3) β -actin 上游 5'-GCCTTCCTTCTTGGGTAT-3', 下游 5'-GGCATAGAGGTCTTTACGG-3', 扩增片段长度 97 bp。20 μ L 扩增反应体系包括: 2 $\times$ Ultra SYBR Mixture 10 μ L, 0.4 μ L 上游引物 10 μ mol/L, 0.4 μ L 下游引物 10 μ mol/L, 2 μ L cDNA 10 μ mol/L, 加入灭菌蒸馏水至 20 μ L。扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, (95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s) $\times$ 45 个循环。每个样品同时做 3 个重复。试验结果按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量公式计算即 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}})_{\text{对照组}}$, 将对照组小鼠 mRNA 表达水平定为 1, 分析模型组和对照组不同基因表达的差异。

1.3 Western blot 法检测 FPN1 蛋白的表达

应用 RIPA 试剂提取组织蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 取等量蛋白质采用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜至 NC 膜, 丽春红染膜。室温封闭(3% BSA, TBST 稀释) 30 min, 然后加入兔抗 FPN1 多克

隆抗体(英国 Abcam 公司, 1:2000), 4℃ 过夜。次日 TBST 洗膜后加入 1:5000 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(H+L)抗体(北京天德悦生物科技有限公司), 室温摇动孵育 40 min。使用 ECL 试剂盒发光显影, 胶片曝光。以 GAPDH 作为内参, 相同实验重复 3 次。胶片曝光结果扫描输入计算机后, 用 TotalLab Quant 凝胶成像分析软件分析处理, 以目的蛋白与内参蛋白的积分光密度(integral optical density, IOD)比值表示相对表达水平。

1.4 统计学处理

实验数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 软件进行独立样本 *t* 检验统计学分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肥胖模型的构建情况

自喂养干预第 3 周, 肥胖模型组小鼠体重增长量开始超出对照组, 至第 14 周末, 模型组和对照组小鼠平均体重分别为 32.34 ± 1.24 g 和 23.67 ± 0.96 g, 差异具有统计学意义。根据肥胖度计算公式计算模型组每只小鼠的肥胖度: 肥胖度(%) = (模型组实际体重 - 对照组平均体重) / 对照组平均体重 × 100, 结果模型组所有小鼠体重均超过对照组小鼠平均体重的 20%, 其中体重最轻的小鼠肥胖度为 28.43%, 表明小鼠肥胖模型建立成功。模型组和对照组小鼠各周平均体重(表 1)。

表 1 不同组小鼠各周平均体重的情况(单位:g)

Tab. 1 Body weight in different weeks of different groups (unit:g)

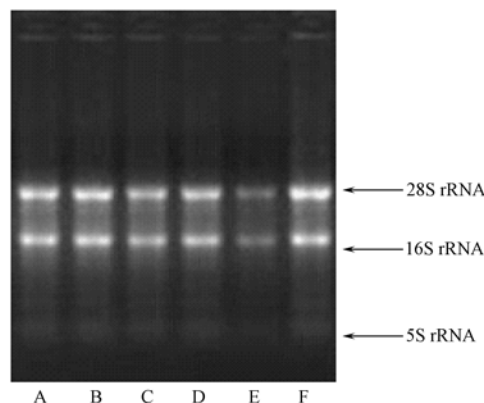
周数 (Weeks)	模型组 (Model group)	对照组 (Control group)
1	11.14 ± 0.69	11.03 ± 0.63
2	11.79 ± 0.73	11.68 ± 0.62
3	13.26 ± 0.79 *	12.32 ± 0.69
4	14.55 ± 0.83 *	13.29 ± 0.72
5	15.79 ± 0.85 *	14.27 ± 0.72
6	17.41 ± 0.93 *	15.02 ± 0.79
7	19.27 ± 0.97 *	16.22 ± 0.78
8	20.98 ± 1.02 *	17.28 ± 0.83
9	22.75 ± 1.06 *	18.39 ± 0.85
10	24.69 ± 1.14 *	19.28 ± 0.83
11	26.51 ± 1.17 *	20.33 ± 0.87
12	28.40 ± 1.22 *	21.37 ± 0.88
13	30.22 ± 1.21 *	22.51 ± 0.93
14	32.34 ± 1.24 *	23.67 ± 0.96

注: * 与对照组比较 $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ compared with control group.

2.2 十二指肠 DMT1、FPN1 mRNA 表达水平

十二指肠样本中提取 RNA 的 A260/A280 均在 1.9~2.1, 说明提取的 RNA 纯度较高。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 图 1 可见 28S、18S 和 5S rRNA 3 条带, 其中前两条带的相对亮度为 2:1, 说明 RNA 完整性好, 无明显降解。



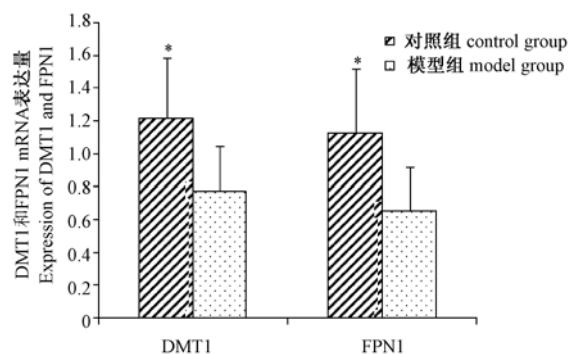
注: A、B、C; 对照组样本, D、E、F; 模型组样本。

图 1 十二指肠样本 RNA 凝胶电泳图

Note: A、B、C; control group; D、E、F; model group.

Fig. 1 The gel electrophoresis figure of duodenal RNA

实时荧光定量 PCR 结果, 目的基因 DMT1、FPN1 和内参基因 β -actin 的标准曲线线性良好, 相关系数 (R^2) 均大于 0.997, 扩增效率在 99%~105% 之间。融解曲线呈单峰, 各基因均为特异性扩增。统计分析显示, 与对照组相比, 模型组小鼠 DMT1、FPN1 mRNA 的相对表达水平均降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2)。



注: * 与对照组比较 $P < 0.05$ 。

图 2 不同组小鼠 DMT1、FPN1 mRNA 的相对表达水平

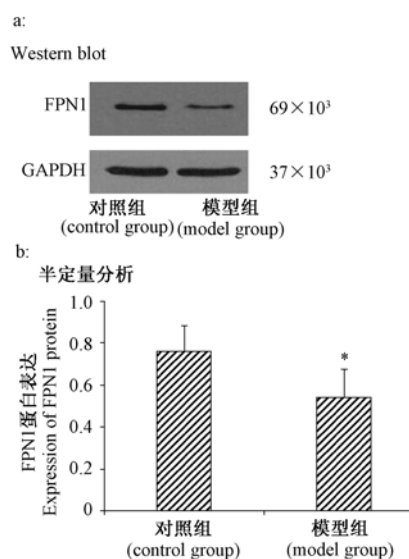
Note: * compared with control group $P < 0.05$.

Fig. 2 The level of DMT1 and FPN1 mRNA expression in different mice

2.3 十二指肠 FPN1 蛋白的表达水平

Western blot 检测结果见图 3 所示; 模型组小鼠十二指肠 FPN1 蛋白表达水平低于对照组, 其相对

表达量分别为 0.54 ± 0.13 和 0.76 ± 0.12 , 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: * 与对照组比较 $P < 0.05$ 。

图3 两组小鼠十二指肠 FPN1 蛋白表达比较

Note: * compared with control group $P < 0.05$.

Fig.3 Expression level of FPN1 protein in duodenum of different mice

3 讨论

肥胖动物模型是研究肥胖及其相关疾病的主要工具^[5], 以与人类肥胖最为接近高脂饲料所致的单纯性肥胖模型应用最为广泛, 由于 C57BL/6J 小鼠对高脂饮食较为敏感, 国外很多肥胖相关的研究选用 C57BL/6J 小鼠进行^[6-7]。因此, 本研究选择 C57BL/6J 小鼠作为研究对象, 采用饮食诱导方式建立肥胖模型, 模型组小鼠平均体重高于对照组, 差异具有统计学意义, 证明成功构建肥胖小鼠模型。

肠铁吸收和释放主要依赖于肠上皮细胞的铁吸收蛋白的介导, 食物中的三价铁离子首先被位于十二指肠刷状缘上的游离还原剂还原成二价铁离子, 然后由位于刷状缘上的 DMT1 将其转运至肠上皮细胞的细胞质内, 在上皮细胞内一部分铁以铁蛋白的形式储存在铁池内, 另一部分铁被亚铁氧化酶氧化为高铁后, 通过基底膜上的铁转运分子 FPN1 的介导, 穿过上皮细胞的基底端细胞膜被运载出细胞, 进入循环系统, 满足机体对铁的需要。机体主要通过控制近端小肠的铁吸收量和铁释放量以达到铁稳态。肥胖状态下容易发生铁代谢紊乱, 机体是通过怎样的途径如何调节小肠铁吸收蛋白的表达, 肠铁吸收蛋白如何调节铁吸收, 其具体调节机

制目前还不甚清楚。

DMT1 仅在哺乳动物小肠上皮细胞高度表达, 其最主要的功能是对二价金属离子的摄取和转运, 是介导膳食中非血红素铁从肠腔转入肠细胞的唯一铁转运体^[8]。FPN1 是一种跨膜的铁输出蛋白, 主要位于十二指肠上皮细胞的基底部和基底侧膜, FPN1 是铁离子释放的唯一出口, 负责将细胞内的铁转运出细胞。本次实时荧光定量 PCR 实验结果显示, 肥胖小鼠十二指肠上皮细胞的 DMT1 和 FPN1 表达水平低于正常小鼠表达水平。肥胖小鼠 DMT1 表达降低, 说明摄入细胞内的铁量减少, FPN1 表达降低, 输出的铁量则会减少, 表明肥胖小鼠转运铁的能力下降, 肥胖导致小肠上皮细胞摄取及释放铁的能力发生障碍。一些利用高脂饲料喂养大鼠建立营养性肥胖模型的实验也得到了和本研究类似的结论, 肥胖可使小肠上皮细胞 DMT1mRNA 表达降低^[9]。许多因素参与 DMT1mRNA 表达的调控, 例如: 蛋白激酶 C、TNF- α 、IFN- γ 、炎症介质、不同的发育阶段等。肥胖使小鼠十二指肠 DMT1mRNA 的表达降低, 是肥胖引起上述因素调节 DMT1mRNA 的表达, 还是肥胖状态直接作用于 DMT1mRNA 的表达, 还需进一步研究。

Frazer 等^[10]研究发现, 细胞基底膜 FPN1 表达水平仅受机体铁状况的影响, 而不受肠腔内铁水平的影响; 而 DMT1 表达水平明显依赖肠腔内铁含量的调节, 这提示 FPN1 可能是决定肠铁吸收水平的关键性或限速性铁转运分子。目前研究发现, 铁调素是一种肝脏分泌的负性铁调节因子, 其可与 FPN1 结合, 使 FPN1 内吞、降解, 导致细胞内铁贮留, 减少铁的输出。铁调素和 FPN1 蛋白表达呈负相关。本次 Western blot 实验发现, 肥胖导致 FPN1 蛋白表达下降, 推测可能与肥胖机体肝脏铁调素的表达增加有关, 铁调素表达增加造成十二指肠 FPN1 蛋白表达减少, 肠细胞输出的铁量降低, 进而影响体内铁水平, 这需要进行进一步的研究, 为进一步阐明肥胖影响铁吸收的分子机制提供理论和实验基础。

综上所述, 肥胖导致铁缺乏主要与负责十二指肠肠铁吸收的 DMT1 和 FPN1 两种蛋白表达密切相关。肥胖可致使十二指肠 DMT1 和 FPN1 表达下降, 肠上皮细胞吸收和释放铁的能力减弱, 造成机体不能满足对铁的需求, 导致肥胖铁缺乏的发生。

参考文献:

- [1] Teegarden D. Calcium intake and reduction in weight or fat mass

- [J]. J Nutr, 2003, 133(1): 249S-251S
- [2] Nead KG, Halterman JS, Kaczorowski JM, *et al.* Overweight children and adolescents: a risk group for iron deficiency[J]. Pediatrics, 2004, 11(4):104-108.
- [3] 王文媛, 何怡峰, 李晓华, 等. 147 名单纯肥胖儿膳食调查[J]. 中国生育健康杂志, 2003, 14(4):240-241.
- [4] Zimmermann MB, Zederl C, Muthayya S, *et al.* Adiposity in women and children from transition countries predicts decreased iron absorption, iron deficiency and a reduced response to iron fortification[J]. Int J Obes, 2008, 32(7):1098-1104.
- [5] 汤锦花, 严海东. 营养性肥胖大鼠模型的建立及评价[J]. 同济大学学报, 2010, 31(1):32-34.
- [6] Halade GV, Rahman MM, Fernandes G. Differential effects of conjugated linoleic acid isomers in insulin-resistant female C57BL/6J mice[J]. J Nutr Biochem, 2010, 21(4): 332-337.
- [7] Henry M, Davidson L, Cohen Z, *et al.* Whole blood aggregation, coagulation, and markers of platelet activation in diet-induced diabetic C57BL/6J mice[J]. Diabetes Res Clin Pract. 2009, 84(1): 11-18.
- [8] Shawki A, Mackenzie B. Interaction of calcium with the human divalent metal-ion transporter-1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 393(3):471-475.
- [9] 冯荔. 肥胖模型大鼠铁代谢和铁营养状态指标的检测及其意义[D]. 吉林大学, 2013.
- [10] Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, *et al.* A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Lreg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption[J]. Gut, 2003, 52(3):340-346.

[修回日期]2014-08-25