

TỐI ƯU QUY TRÌNH PHÂN TÍCH ĐA HÌNH ĐƠN NUCLEOTIDE *NPC1L1* rs2072183 BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐA HÌNH CHIỀU DÀI ĐOẠN GIỚI HẠN

Bùi Thị Khánh Thuận¹, Bùi Thị Thuý Nga²,
Dương Tuấn Linh², Trần Quang Bình^{2,✉}

¹ Trường Đại học Điều dưỡng Nam Định

² Viện Dinh dưỡng, Hà Nội

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng quy trình phân tích kiểu gen của đa hình đơn nucleotide *NPC1L1* rs2072183 bằng phương pháp đa hình chiều dài đoạn giới hạn (RFLP-PCR).

Phương pháp: Sử dụng phần mềm để thiết kế và các kỹ thuật sinh học phân tử để tối ưu hóa cặp mồi, chu trình nhiệt thích hợp. Phương pháp giải trình tự Sanger được sử dụng để xác định kiểu gen chuẩn của đa hình rs2072183. Các thí nghiệm được thực hiện trên 16 mẫu ADN được tách từ máu toàn phần của người Việt Nam.

Kết quả: Đã xây dựng và tối ưu hóa quy trình phân tích kiểu gen của đa hình *NPC1L1* rs2072183 có liên quan đến rối loạn lipid máu bằng phương pháp PCR-RFLP với kết quả chính xác.

Kết luận: Quy trình PCR-RFLP để phân tích đa hình đơn rs2072183 trên gen *NPC1L1* có độ chính xác cao, cho kết quả nhanh, có thể thực hiện trên quần thể mẫu lớn hơn, cũng như ở các quần thể khác nhau nhằm tiến tới thực hiện nghiên cứu mối liên quan của đa hình này với rối loạn lipid máu ở người Việt Nam.

Từ khóa: rs2072183, gen *NPC1L1*, rối loạn lipid máu, RFLP-PCR

OPTIMAL PROTOCOL FOR GENOTYPING THE *NPC1L1* RS2070895 POLYMORPHISM USING THE POLYMERASE CHAIN REACTION - RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM METHOD

ABSTRACT

Aims: To develop and optimize a method for genotyping the SNP *NPC1L1* rs2072183 in the Vietnamese population using polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

Methods: Software was used to design primer pairs and molecular biology techniques to optimize primer pairs and appropriate thermal cycling. Sanger sequencing method was used to determine the standard genotype of rs2072183 polymorphism. Experiments were performed on 16 DNA samples extracted from whole blood of Vietnamese people.

Results: A protocol for genotyping the rs2072183 has been developed and optimized using the PCR-RFLP method with accurate results.

Conclusions: The PCR-RFLP protocol for analyzing *NPC1L1*rs2072183 polymorphism has high accuracy, fast results, low cost and it can be applied on larger sample samples in different populations to conduct research on the association of this polymorphism with dyslipidemia in Vietnamese people.

Keywords : rs2072183, dyslipidemia, gene *NPC1L1*, PCR-RFLP

✉ Tác giả liên hệ: Trần Quang Bình
Email: tranquangbinh@dinhduong.org.vn
Doi: 10.56283/1859-0381/792.

Nhận bài: 4/10/2024 Chỉnh sửa: 12/10/2024
Chấp nhận đăng: 2/11/2024
Công bố online: 4/11/2024

I. GIỚI THIỆU

Gen là một đơn vị di truyền được tạo thành từ đoạn trình tự ADN mang thông tin di truyền, xác định một chức năng sinh học. Cấu trúc hóa học của bộ gen gồm hai mạch kép, thông tin di truyền nhỏ nhất là cặp bazơ. Mục tiêu của di truyền y học là xác định các gen khi bị thay đổi trình tự ADN sẽ dẫn đến tình trạng bệnh ở người. Một số đột biến có thể thay đổi hoạt động của gen và cuối cùng tạo ra protein bị rối loạn chức năng dẫn đến gây ra bệnh [1].

Rối loạn lipid máu (RLLPM) là tình trạng bệnh lý khi có một hoặc nhiều thông số lipid bị rối loạn như tăng cholesterol, hoặc tăng triglycerid, hoặc tăng LDL hoặc giảm HDL [2]. RLLPM là một trong các yếu tố nguy cơ gây nên các bệnh tim mạch, nội tiết, chuyển hóa,...Nguyên nhân của RLLPM có thể là yếu tố di truyền, lối sống, hoạt động thể lực và chế độ ăn uống không hợp lý [3]. Tại Việt Nam, theo Kết quả điều tra quốc gia các yếu tố nguy cơ bệnh không lây nhiễm tại Việt Nam (STEP) năm 2021, tỷ lệ người có cholesterol máu ≥ 5.0 mmol/L hoặc đang dùng thuốc điều trị tăng cholesterol đã tăng từ 30.2% vào năm 2015 lên đến 44.1% vào năm 2021 [4].

Các nghiên cứu cho thấy gen có liên quan đến rối loạn lipid máu ở người bao gồm các gen mã hóa apolipoprotein (*APOB*, *APOE*, *APOC1*), gen mã hóa thụ thể lipoprotein và các protein liên quan (*LDLR*, *LPA*, *SCARB1*...), gen mã hóa các enzyme tham gia vào quá trình chuyển hóa lipoprotein (*LPL*, *LIPC*, *LCAT*,...), gen mã hóa các chất vận chuyển lipid (*NPC1L1*, *CETP*, ...). [5] [6]

Gen *NPC1L1* nằm trên nhiễm sắc thể 7p13, là gen mã hóa protein Niemann-Pick C1-Like 1 (*NPC1L1*) là một protein xuyên màng, có chứa N-terminal Niemann-Pick C1 (*NPC1*) hoạt động như

một màng plasma để truyền tín hiệu vận chuyển mạng Golgi trong các protein khác. Protein này đưa cholesterol tự do vào tế bào thông qua quá trình nội bào và đóng vai trò quan trọng trong việc hấp thụ cholesterol ở ruột. Sự ức chế protein này làm giảm sự hấp thụ cholesterol trong tế bào ruột và do đó làm giảm nồng độ cholesterol trong máu. [7] [8]

Các biến thể di truyền ở gen *NPC1L1* đã được nghiên cứu rộng rãi trong những năm gần đây và đã được chứng minh là có liên quan đến việc mức độ LDL-C và CHO gồm rs2072183, rs217434, rs217428, trong đó rs2072183 được chứng minh là có sự khác biệt đáng kể về số lượng người bị RLLPM ở quần thể người Nhật Bản [9]. Đa hình đơn rs2072183 nằm ở vị trí 7:44539581 trên gen *NPC1L1* có ảnh hưởng đến mức lipid đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây tại Nhật Bản và Trung Quốc đã cho thấy người mang kiểu gen có alen C có liên quan đến mức giảm TG và cholesterol hơn so với người mang kiểu gen có alen G [10] [11]. Do đó, việc xác định kiểu gen của rs2072183 có vai trò quan trọng trong việc phát hiện sớm, dự phòng, điều trị và ngăn ngừa các biến chứng của bệnh rối loạn lipid máu cho cá nhân, góp phần nâng cao sức khỏe cho cộng đồng.

Hiện nay, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào tìm hiểu mối liên quan giữa đa hình *NPC1L1* rs2072183 đối với bệnh rối loạn lipid máu sử dụng phương pháp đa hình đoạn cắt giới hạn. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng và tối ưu quy trình phân tích đa hình đơn *NPC1L1* rs2072183 bằng phương pháp đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn (PCR-RFLP).

II. PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các thông tin về đối tượng nghiên cứu được thu thập từ hồ sơ của cuộc điều tra dịch tễ học theo đề tài “Nghiên cứu thuần tập 5 năm về bệnh đái tháo đường typ 2 và hội chứng chuyển hóa ở người Việt Nam: Vai trò yếu tố di truyền và lối sống” mã số 106 – YS.01 – 2015.10. Chọn 16 mẫu ADN được tách chiết từ 5ml mẫu máu toàn phần của đối tượng nghiên cứu tại tỉnh Hà Nam, Việt Nam. Máu tĩnh mạch được lấy vào buổi sáng, sau đó được ly tâm ngay, khối tế bào máu được lưu vào các ống ependoff và được

lưu trữ ở từ -20°C hoặc -80°C cho đến khi tiến hành phân tích mẫu.

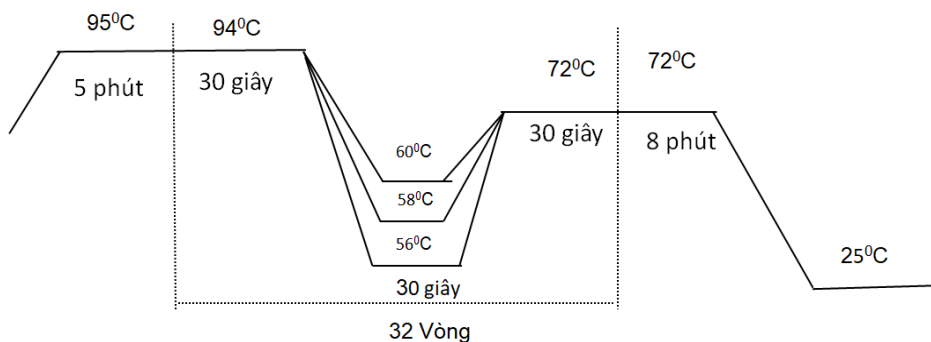
ADN sau khi được tách từ bạch cầu máu ngoại vi bằng bộ kit Wizard® Genomic ADN Purification Kit (Promega, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất được đo nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang (OD: Optical Density) trên máy Nanodrop 2000. Độ tinh sạch của ADN được đo bằng tỷ số A260/A280 và mẫu ADN tinh sạch khi tỷ số này từ 1,8 đến 2,0.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Xác định điểm đa hình gen *NPC1L1*rs2072183: Sử dụng thông tin từ cơ sở dữ liệu từ Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia – NCBI của Mỹ, lựa chọn GRCh38.p14 (NC_000015.10), từ đó thiết kế các đoạn mồi chứa biến thể rs2072183 trên gen *NPC1L1*.

- Thiết kế mồi cho phản ứng PCR: Các đoạn mồi được chọn có độ dài lý tưởng từ 18 đến 22 nucleotide và hàm lượng G và C từ 40% đến 60%. Điều này đảm bảo nhiệt độ nóng chảy của các đoạn mồi khoảng 50°C đến 65°C . Sử dụng các công cụ trực tuyến Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) và trang web: <http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html> để thiết kế mồi xuôi *NPC1L1*_rs2072183F: 5'-GGGATGACAGATAGCACCAA-3' và mồi ngược *NPC1L1*_rs2072183R: 5'-GACATCACCTCCACCTCTTG-3'.

- Tối ưu phản ứng PCR: Phương pháp Gradient-PCR được sử dụng để xác định nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho phản ứng PCR với ba giải nhiệt độ từ 56°C , 58°C , 60°C theo chu trình nhiệt: biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút và 32 chu kỳ biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 56°C , 58°C , 60°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 30 giây và bước kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 8 phút (Hình 1). Phản ứng được thực hiện trong thể tích 20 μl bao gồm 8,5 μl nước không có nuclease, 1,0 μl cho mỗi mồi (mỗi mồi 10 pmol), 2,0 μl ADN và 7,5 μl GoTaq® Green PCR Master Mix 2X (GoTaq® DNA Polymerase được cung cấp trong 2X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8,5), 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP). Lấy 5.0 μl sản phẩm PCR thực hiện điện di trên gel agarose nồng độ 1,5% trong 30 phút. Các dải băng ADN được quan sát bằng camera gel Geldoc-It™ để phân tích kết quả.



Hình 1. Chu trình nhiệt độ cho phản ứng PCR

- Chọn enzyme cắt giới hạn: Kết hợp với xây dựng bản đồ enzym, chọn enzym cắt giới hạn *TaqI* để phân biệt alen G và

C ở vị trí cắt
 $5' \dots T \overset{\uparrow}{C} G A \dots 3'$
 $3' \dots A G C T \overset{\uparrow}{A} \dots 5'$. Lấy 5,0 µl sản phẩm PCR ủ với 0.5 µl enzym *TaqI*, 7.0 µl nước tinh khiết, 3.5 µl CutSmart®

NEBuffer 10X ; ủ trong 20 phút ở 65°C bằng máy ủ nhiệt khô.

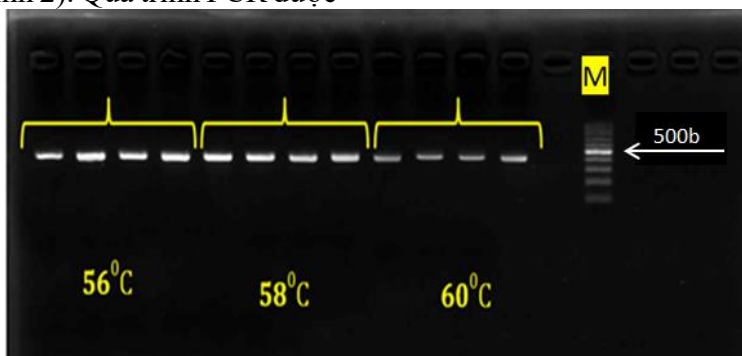
- Kiểm tra kết quả bằng giải trình tự: Chọn 3 mẫu ADN đã xác định kiểu gen GG, GC, CC để giải trình tự bằng phương pháp Sanger nhằm xác định chính xác của phương pháp PCR-RFLP.

III. KẾT QUẢ

3.1. Lựa chọn nhiệt độ bắt môi

Thử nghiệm Gradient PCR tiến hành ở các nhiệt độ gắn môi 56°C, 58°C, 60°C. Nhiệt độ ở 56°C và 58°C cho băng sáng đều, không có sản phẩm phụ; ở nhiệt độ 60°C cho băng mờ hơn và không có băng phụ. Để tiết kiệm được thời gian thực hiện quy trình PCR, lựa chọn mức nhiệt độ gắn môi ở 56°C (Hình 2). Quá trình PCR được

thực hiện trong 32 chu kỳ, bắt đầu bằng biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút, mỗi chu kỳ sau bao gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, tiếp theo là gắn môi ở 56°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 30 giây. Cuối cùng, bước kéo dài kết thúc ở 72°C trong 8 phút. (Hình 2)



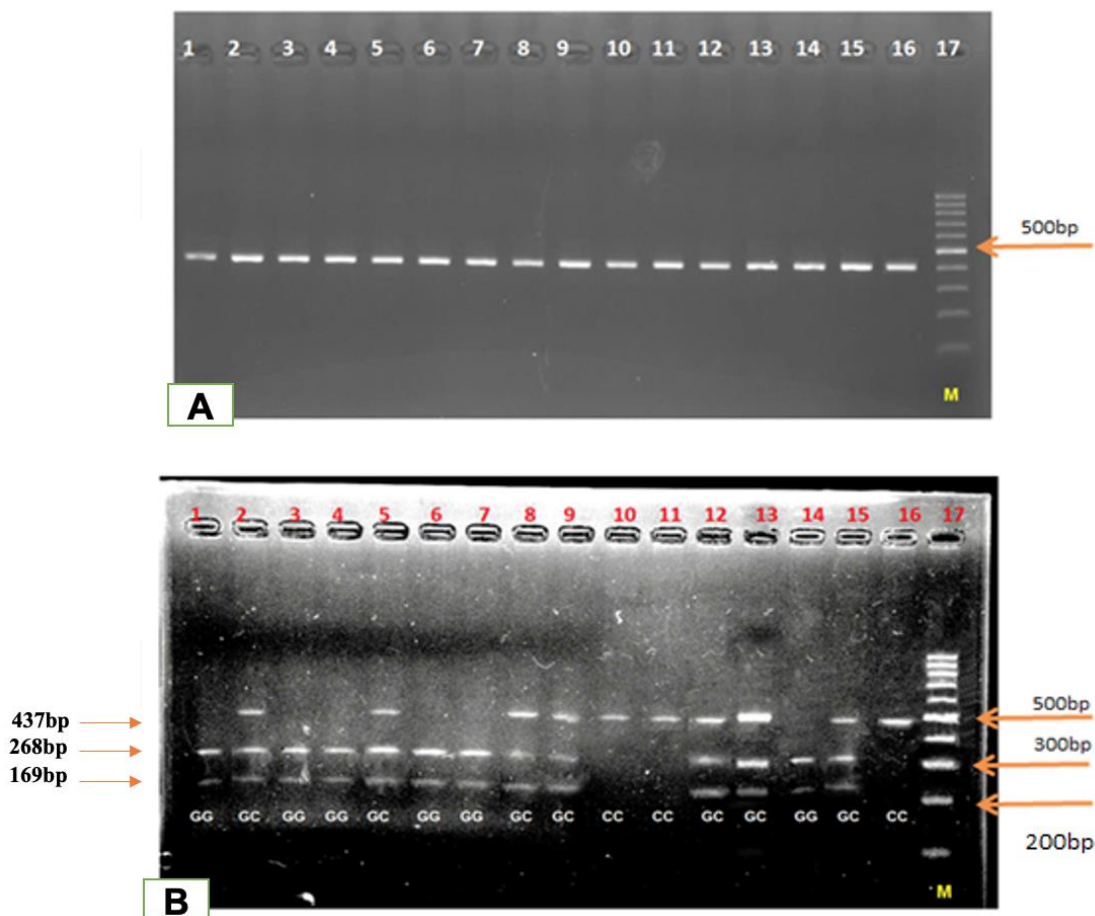
Hình 2. Hình ảnh điện di các sản phẩm PCR theo các nhiệt độ khác nhau.

Các sản phẩm sau PCR được điện di trên gel 2.5% trong 40', 100V. Các ở các vị trí số 1,2, 3, 4 cùng giải nhiệt độ 56 độ C, các vị trí số 5, 6, 7, 8 cùng giải nhiệt độ 58 độ C, các vị trí 9, 10, 11, 12 cùng giải nhiệt độ 60 độ C, vị trí 13 là thang chỉ thị M 100bp (Invitrogen).

3.2. Chọn enzyme thích hợp để nhận biết đa hình rs2072183

Các sản phẩm PCR đã được cắt hoàn toàn bằng cách ủ với enzym giới hạn *TaqI*. Sự xuất hiện của ba kiểu gen GG, GC, CC được xác định dựa trên các băng riêng biệt quan sát được sau điện di trên gel agarose 2,5% nhuộm bằng Redsafe trong đệm TBE 0,5X. Những mẫu có kiểu

gen đồng hợp tử CC không bị cắt bởi enzyme với băng 437 bp, những mẫu có kiểu gen dị hợp tử GC được cắt thành 3 băng: 437 bp, 268 bp và 169 bp và những mẫu mang kiểu gen đồng hợp tử GG được cắt thành 2 băng 268 bp và 169 bp (Hình 3).



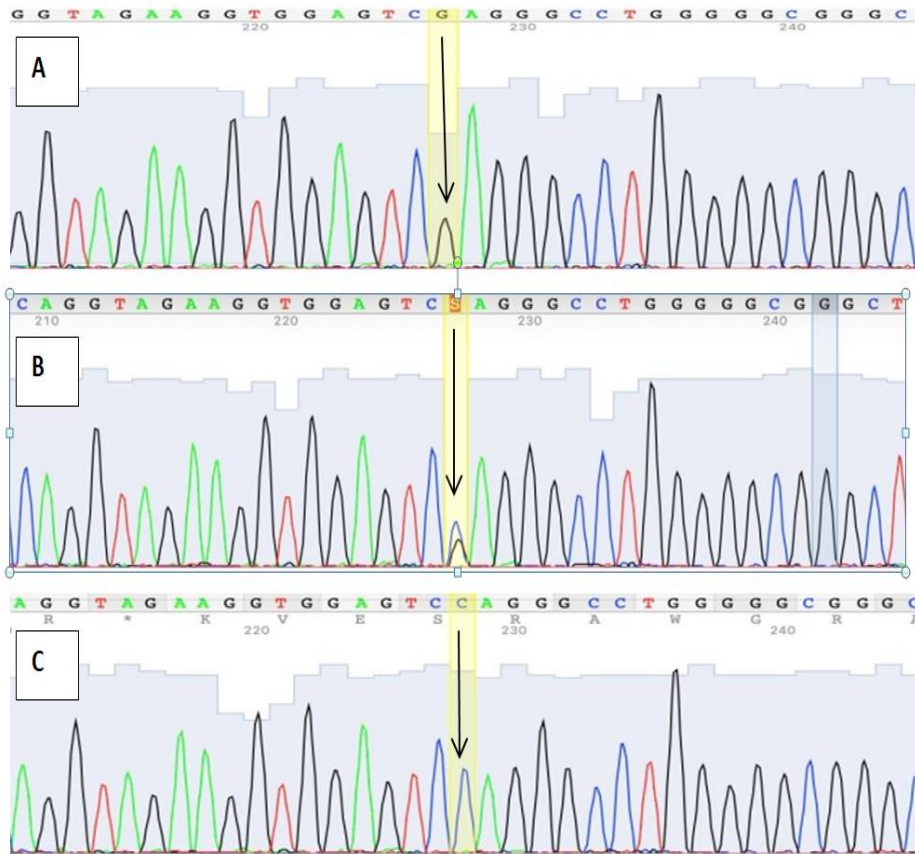
Hình 3. Kết quả điện di 16 mẫu ADN bằng phương pháp PCR-RFLP.

(A) Hình ảnh điện di sản phẩm PCR; (B) hình ảnh điện di sau được ủ sản phẩm PCR với enzyme cắt giới hạn *TaqI* ở 65 độ C trong 20 phút. Hình ảnh từ giếng 1 đến giếng 17 tương ứng với 16 mẫu. ADN, giếng 17 là thang chỉ thị M : 100bp (Invitrogen)

3.3. Giải trình tự Sanger

Sử dụng 3 mẫu số 1, 2 và mẫu số 10 (Hình 3) để gửi đi giải trình tự. Trình tự SNP rs2072183 đối chiếu với kết quả PCR-RFLP và phương pháp giải trình tự gen Sanger, kết quả cho thấy, hai phương pháp có độ tương đồng khi phân tích kiểu

gen GG, GC và CC (Hình 4). Như vậy, quy trình PCR-RFLP phân tích đa hình đơn *NPC1L1* rs2072183 cho kết quả đảm bảo độ tin cậy với mục tiêu phân tích các kiểu gen trên đối tượng nghiên cứu.



Hình 4. Kết quả phân tích giải trình tự kiểu gen của đa hình đơn nucleotide bằng phương pháp Sanger. (A) kiểu gen GG có cường độ sáng màu đen, (B) kiểu gen GC có cường độ 2 màu xanh đen và (C) kiểu gen CC có cường độ 1 màu xanh lam tương ứng.

IV. BÀN LUẬN

Phân tích mối liên quan giữa các đa hình đơn gen và bệnh là một bước tiên quan trọng trong việc xây dựng các chiến lược phòng, chống bệnh tật. Nghiên cứu về gen liên quan đến bệnh đã được thực hiện trong các nhiều năm gần đây. Các nghiên cứu di truyền có thể giúp đưa ra cá thể hóa các phương pháp điều trị với sự hiểu biết chính xác về những người có nguy cơ đối với các bệnh nhất là các bệnh đang có xu hướng gia tăng và để lại những hậu quả nặng nề cho cá nhân và xã hội như bệnh đái tháo đường, cao huyết áp, ung thư,... Điều này mang lại phương pháp tiếp cận có hệ thống để chữa bệnh,

giúp phát hiện bệnh nhanh chóng ở giai đoạn đầu, xác định chính xác đặc điểm của bệnh và chỉ định các biện pháp phòng ngừa cần thiết. Ngoài ra, việc phát hiện kịp thời và tìm ra sự liên kết của các biến thể di truyền với các bệnh sẽ giúp cá nhân hóa điều trị bệnh [12].

Nhiều phương pháp phân tích gen đã xuất hiện trong những thập kỷ qua để phân tích kiểu gen SNP, bao gồm phản ứng chuỗi polymerase môi đặc hiệu alen (AS-PCR), phản ứng chuỗi polymerase hai cặp môi (CTPP-PCR), phương pháp TaqMan, công nghệ chip gen và giải trình tự. Điều quan trọng là phải lựa chọn một

phương pháp đảm bảo cho kết quả chính xác, ít tốn kém thời gian và tài chính, phù hợp với từng nghiên cứu cụ thể. Mỗi phương pháp phân tích gen đều có những ưu điểm và hạn chế riêng. Phương pháp CTPP-PCR cung cấp một giải pháp đơn giản và hiệu quả về mặt chi phí, chỉ cần một phản ứng PCR và một bước điện di duy nhất tương tự như các phương pháp PCR truyền thống, do đó giảm đáng kể thời gian và nguồn lực cần thiết để triển khai. Tuy nhiên thiết kế mỗi trong phương pháp CTPP-PCR là khá phức tạp, cần nghiên cứu kỹ lưỡng để có kết quả tối ưu. Trong khi giải trình tự mang lại thông tin di truyền toàn diện nhất, nhưng chi phí để thực hiện cao. Phương pháp AS-PCR được thực hiện tương đối chính xác, đơn giản, tuy nhiên phương pháp này yêu cầu thực hiện hai phản ứng PCR đồng thời dẫn đến tăng chi phí, thời gian. Đối với phương pháp RFLP-PCR là một phương pháp hiệu quả, chính xác và là sự lựa chọn được nhiều nhà nghiên cứu áp dụng. Các kiểu gen đồng hợp tử GG, CC hoặc dị hợp tử GC có thể dễ dàng phân biệt với nhau thông qua điện di trên gel agarose một cách chính xác với quy trình thực hiện đơn giản và có thể thiết lập tối thiểu ở các phòng thí nghiệm phân tích gen. Các nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh phương pháp RFLP-PCR sử dụng enzyme *TaqI* để phân tích đa hình rs2072183 cho kết quả chính xác [11, 13, 14].

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xây dựng và tối ưu thành công quy trình PCR-RFLP để xác định đa hình *NPC1L1* rs2072183. Đây là quy trình có nhiều ưu điểm với thiết kế đơn giản, ít tốn kém, không cần các trang thiết bị đắt tiền, cho kết quả chính xác và có thể thiết lập ở các phòng thí nghiệm.

Gen *NPC1L1* đã được xác định là một gen tiềm năng liên quan đến rối loạn lipid máu [6], Kết quả nghiên cứu của Harry.R và cộng sự (2007) đã cho thấy khi *NPC1L1* bị ức chế sẽ làm giảm hấp thu cholesterol ở ruột và giúp điều trị tăng lipid máu [15]. Ngoài ra, biến thể di truyền ở *NPC1L1* cũng đã được chứng minh làm giảm nguy cơ mắc bệnh nhồi máu cơ tim do làm giảm LDL [16]. Theo Chen và cộng sự (2009) khi nghiên cứu trên quần thể người Trung Quốc đã cho thấy những người có kiểu gen CC có mức cholesterol, LDL thấp hơn so với những người có kiểu gen GG. Nghiên cứu của Kashiwabara tại Nhật Bản (2014) đã chỉ ra sự khác biệt đáng kể về biến thể rs2072183 giữa những người Nhật Bản khỏe mạnh và những người mắc chứng rối loạn lipid máu [9]. Mức cholesterol, TG, LDL cũng được chứng minh giảm hơn ở người mang kiểu gen CC so với người mang kiểu gen GG ở quần thể người Hán và Mulao Trung Quốc [11].

Tóm lại, phương pháp PCR-RFLP có nhiều ưu điểm, dễ thực hiện và chỉ yêu cầu lượng ADN tối thiểu nhưng lại cho kết quả chính xác, tin cậy. Bên cạnh đó, tính tương đồng của kết quả giữa quy trình PCR-RFLP và giải trình tự gen của *NPC1L1* rs2072183 cũng đã được xác định.

Quy trình kỹ thuật này nên được áp dụng để xác định kiểu gen của đa hình *NPC1L1* rs2072183 trong các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn ở các quần thể khác nhau nhằm xác định mối liên quan giữa đa hình này và bệnh rối loạn lipid máu và các bệnh khác ở người Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

1. Ahmed Z, Zeeshan S, Mendhe D, Dong X. Human gene and disease associations for clinical-genomics and precision medicine research. *Clin Transl Med.* 2020;10(1):297-318.
2. Trương Quang Bình. *Rối Loạn Lipid Máu Trong Thực Hành Lâm Sàng.* NXB Y học; 2018.
3. Bộ Y tế. Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh rối loạn chuyển hóa, nội tiết. Published online 2015.
4. Bộ Y tế. Điều tra quốc gia các yếu tố nguy cơ bệnh không lây nhiễm tại Việt Nam. Published online 2022.
5. Yamada Y, Matsuo H, Warita S, et al. Prediction of genetic risk for dyslipidemia. *Genomics.* 2007;90(5):551-558. doi:10.1016/j.ygeno.2007.08.001
6. Paththinige C, Sirisena N, Dissanayake V. Genetic determinants of inherited susceptibility to hypercholesterolemia – a comprehensive literature review. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):103. doi:10.1186/s12944-017-0488-4
7. Betters JL, Yu L. NPC1L1 and Cholesterol Transport. *FEBS Lett.* 2010;584(13):2740-2747. doi:10.1016/j.febslet.2010.03.030.
8. Jia L, Betters JL, Yu L. Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) Protein in Intestinal and Hepatic Cholesterol Transport. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:239-259.
9. Kashiwabara Y, Kobayashi Y, Koba S, et al. Gene polymorphism and frequencies of the *NPC1L1* Gene (rs2072183, rs217434 and rs217428) in Japanese patients with dyslipidemia. *J Clin Pharm Ther.* 2014;39(5):551-554. doi:10.1111/jcpt.12176
10. Osaki R, Imaeda H, Takahashi K, et al. Polymorphisms of the Niemann-Pick C1-like 1 gene in a Japanese population. *Biomedical Reports.* 2013;1(1):156-160.
11. Miao L, Yin RX, Hu XJ, et al. Association of rs2072183 SNP and serum lipid levels in the Mulao and Han populations. *Lipids Health Dis.* 2012;11:61. doi:10.1186/1476-511X-11-61
12. Opap K, Mulder N. Recent advances in predicting gene–disease associations. *F1000Res.* 2017;6:578. doi:10.12688/f1000research.10788.1
13. Maeda T, Honda A, Ishikawa T, et al. A SNP of NPC1L1 Affects Cholesterol Absorption in Japanese. *JAT.* 2010;17(4):356-360. doi:10.5551/jat.2451
14. Zambrano T, Saavedra N, Lanás F, Caamaño J, Salazar LA. Efficacy of Ezetimibe Is Not Related to NPC1L1 Gene Polymorphisms in a Pilot Study of Chilean Hypercholesterolemic Subjects. *Mol Diagn Ther.* 2015;19(1):45-52. doi:10.1007/s40291-014-0128-x
15. Davis HR, Veltri EP. Zetia: Inhibition of Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) to Reduce Intestinal Cholesterol Absorption and Treat Hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb.* 2007;14(3):99-108. doi:10.5551/jat.14.99
16. Lauridsen BK, Stender S, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in the cholesterol transporter NPC1L1, ischaemic vascular disease, and gallstone disease. *Eur Heart J.* 2015;36(25):1601-1608. doi:10.1093/eurheartj/ehv108.