

文章编号 1006-8147(2022)01-0053-05

论著

利用 CRISPR/Cas9 技术体内标记示踪小鼠内源性 NPC1L1 蛋白

武晓静¹, 陈玉霞², 麻献华², 章卫平^{1,2}

(1.天津医科大学朱宪彝纪念医院,天津市内分泌研究所,国家卫健委激素与发育重点实验室,天津市代谢性疾病重点实验室,天津 300134;2.海军军医大学基础医学院病理生理学教研室,上海 200433)

摘要 目的:对小鼠内源性 NPC1L1 蛋白进行标记和示踪,为研究体内胆固醇的吸收机制提供新的技术手段。方法:利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术,针对小鼠 NPC1L1 基因的 3' 末端非编码区,设计不同 sgRNA,利用细胞内的荧光素酶法,检测分析其 Cas9/sgRNA 核酸酶活性,筛选出高活性的 sgRNA 序列,经体外转录制备 sgRNA 和 Cas9 mRNA。PCR 扩增基因打靶的两侧同源臂,与 FLAG-EGFP 的编码 cDNA 一起克隆至打靶载体。经酶切和测序鉴定正确的打靶载体 DNA 与 sgRNA、Cas9 mRNA 一起显微注射入小鼠受精卵,移植至假孕小鼠体内自然发育;通过基因组 DNA 的 PCR 和 Southern 印迹分析,筛选、鉴定重组正确且无随机插入的子代小鼠。制备小肠组织冰冻切片,荧光显微镜下观察 NPC1L1-EGFP 的表达分布。结果:成功构建了 NPC1L1 基因敲入打靶载体,筛选了高活性的 sgRNA,利用 CRISPR/Cas9 技术获得了对内源性 NPC1L1 蛋白 C 端进行 FLAG 和 EGFP 双重标记的子代小鼠,荧光显微镜下观察到该融合蛋白分布于小肠绒毛上皮细胞的刷状缘,与 NPC1L1 的分布特征一致。结论:成功实现了对小鼠内源性 NPC1L1 蛋白进行体内标记,为研究 NPC1L1 囊泡转运和胆固醇吸收机制提供了有效手段。

关键词 NPC1L1; CRISPR/Cas9; 胆固醇吸收; 示踪; 转基因小鼠; 标签蛋白

中图分类号 R589.2

文献标志码 A

Genetic labeling and tracing of mouse endogenous NPC1L1 protein by CRISPR/Cas9 technology *in vivo*

WU Xiao-jing¹, CHEN Yu-xia², MA Xian-hua², ZHANG Wei-ping^{1,2}

(1.NHC Key Laboratory of Hormones and Development, Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Chu Hsien-I Memorial Hospital, Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300134, China; 2.Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Science, Navy Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Objective: To label and trace endogenous NPC1L1 protein in mouse model, providing a new tool for studying the absorption mechanisms of cholesterol *in vivo*. **Methods:** Using CRISPR/Cas9 genomic editing technology, different sgRNAs were designed according to the 3' untranslated region of mouse NPC1L1 gene. The activity of Cas9/sgRNA nuclease was analyzed in cellular luciferase detection system, and the sgRNA sequence with high activity was screened out. The sgRNA and Cas9 mRNA were transcribed *in vitro*. The two homologous arms of the target gene were amplified by PCR and cloned into the target vector together with the cDNA encoding FLAG-EGFP. The correct targeting vector identified by restriction enzyme digestion and sequencing, along with sgRNA and cas9 mRNA were microinjected into fertilized eggs and then transplanted into pseudopregnant mice for natural development. The offspring mice with correct recombination and no random insertion were verified by PCR and Southern blotting analysis of genomic DNA. The expression of NPC1L1-FLAG-EGFP fusion protein was observed under fluorescence microscope using jejunal cryosections. **Results:** The FLAG-EGFP knock-in targeting vector of NPC1L1 gene was successfully constructed. The highly active sgRNA was determined, and the offspring mice with FLAG and EGFP dual-tags on the C-terminal of endogenous NPC1L1 protein were finally obtained by CRISPR/cas9 technology. The localization of the fusion protein along the brush border of villous epithelial cells in the small intestine was observed under fluorescence microscope, which was consistent with the distribution characteristics of NPC1L1. **Conclusion:** The successfully constructed mouse model with endogenous NPC1L1 protein labeling of dual-tags, FLAG and EGFP provides an effective tool to study the mechanism of vesicle transport and cholesterol absorption of NPC1L1 *in vivo*.

Key words NPC1L1; CRISPR/Cas9; cholesterol absorption; tracing; transgenic mice; tag protein

膳食胆固醇的过量摄入是导致高胆固醇血症

基金项目 国家重点研发计划(2019YFA0802503);国家自然科学基金重大研究计划(91857203)

作者简介 武晓静(1994-),女,硕士,研究方向:肠道胆固醇代谢的分子机制研究;通信作者:章卫平, E-mail: zbtb20@aliyun.com。

的常见原因,对胆固醇吸收机制的认识可望为高胆固醇血症的防治提供新的思路。目前认为,胞外游离胆固醇的吸收主要是由尼曼-匹克 C1 型样蛋白 1 (Niemann-Pick C1-Like 1, NPC1L1)介导的囊泡内吞(vesicular endocytosis)途径实现的^[1-3]。NPC1L1 高

表达于小肠吸收型上皮细胞的刷状缘和人及灵长类动物的肝细胞胆管面^[1,4]。NPC1L1 基因敲除小鼠对胆固醇的吸收率下降约 70%，能够抵抗饮食诱导的高胆固醇血症；而其他脂类（如甘油三酯、磷脂）和植物性甾醇的吸收则不受影响^[1-3]。解析 NPC1L1 囊泡形成、内吞、运输和循环等相关过程的细胞分子机制，对揭示胆固醇的吸收机制具有重要意义。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术，通过融合表达，在内源性 NPC1L1 蛋白的 C 端分别标记上增强型绿色荧光蛋白 EGFP 和由 DYKDDDDK 8 个氨基酸组成的 FLAG 蛋白标签，为该分子的示踪和功能研究提供有效手段。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 C57BL/6N 小鼠（品系代码 213）引自北京维通利华实验动物公司。按照 SPF 级动物饲养标准繁殖饲养于本实验室动物房[许可证号:SYXK(沪)2019-0034]，环境温度 25℃，湿度 40%~70%，12 h 光照，昼夜交替。小鼠饲料、垫料和饮水均经过高温高压灭菌处理。8~10 周龄的雄性小鼠用于实验。

1.2 主要试剂 载体质粒 pT7-2G、pCS-3G、pTV-4G 来自 Biocytogen Pharmaceuticals 公司，限制性核酸内切酶(Thermo Scientific Fast Digest 系列)，GeneRuler

1 kb plus DNA Ladder(Thermo Scientific, SM1332)，Neon™ Transfection System(Invitrogen, MPK 10096)，2xTaq Plus Master Mix II Dye Plus(Vazyme, P213-01)，KODFXDNA 聚合酶(TOYOBO, KFX-101)，MEGAscript™ T7 转录试剂盒(ThermoFisher Scientific, AM1354)，MEGAclear™ 转录纯化试剂盒(ThermoFisher Scientific, AM1908)，DAPI(Invitrogen, D1306)。

1.3 sgRNA 序列设计和活性检测 根据 CRISPR/Cas9 系统中 sgRNA 切割原理，针对 NPC1L1 基因终止密码子后的非翻译区，在 CRISPR 设计网站(<http://www.sanger.ac.uk/htgt/wge/>) 上选择打靶分数高且脱靶率低的 sgRNA 序列，3' 端引入一个与靶向 DNA 序列错配的碱基。sgRNA 序列和对应的靶向序列见表 1。于 sgRNA 序列两侧加上与 pCS-3G 骨架质粒互补的同源臂序列，左侧同源臂序列为 5'-CTATTTCTAGCTCTAAAAC-3'，右侧同源臂序列为 5'-GGT-GTTTCGTCCTTTCCA-3'。合成单链寡核苷酸片段，经退火后，通过 Gibson 无缝连接的方式连入经 *XhoI* 和 *BamHI* 双酶切线性化的 pCS-3G 质粒，连接产物转化后选择经测序验证正确的克隆，采用 UCA™-CRISPR/Cas9 荧光素酶活性检测法检测 Cas9/sgRNA 的活性。

表 1 靶向 NPC1L1 基因 3'UTR 的 sgRNA 序列及其靶向 DNA 序列

Tab 1 sgRNA and DNA sequences targeting 3'UTR of NPC1L1 gene

sgRNA	sgRNA 寡核苷酸序列(5'→3')	靶向 DNA 序列(5'→3')
sgRNA1	CGTGGCCCTTATCAGCC	CTTGCTGATAAGGGGCCACGAGG
sgRNA2	GAGGGAAGACCCTCGTGGCC	GGCCACGAGGCTCTCCCTCTGG
sgRNA3	CTGCTGTTTCCAAGGCC	CAGGCCTTGGAAACAACCAGAGG
sgRNA4	CGAGGCTTCCCTCTGGTTCC	AACCAGAGGGAAGACCCTCGTGG
sgRNA5	CGGGACCTATGACAACCC	TTTGTGTCATAGGTCGCCGAGG
sgRNA6	ACTCCATTAGAACTTTTGGTCC	ACCAAAAATTCTAATGGAGTAGG
sgRNA7	TGGAGCTGGACAAGCTCC	AGGAGCTTCTCCAGGCTCCATGG
sgRNA8	ATGACAACAAAGTGCC	ACTGCCACTTTGTGTCATAGG

1.4 Cas9/sgRNA 体外转录 选择高活性的 sgRNA，在其对应的 DNA 序列两侧分别加上与骨架质粒匹配的同源臂序列，其中 5' 端同源臂序列为 5'-CTATTTCTAGCTCTAAAAC-3'，3' 端同源臂序列为 5'-TATAGTGAGTCGTATTA-3'。合成的两条互补单链寡核苷酸片段经退火后，通过 Gibson 无缝克隆方式组装至经 *XhoI* 和 *BamHI* 双酶切的质粒载体 pT7-2G，质粒经测序正确后，使用 T7 RNA 聚合酶和 MEGAscript™ T7 转录试剂盒，体外转录 sgRNA 和 Cas9 mRNA，产物经 MEGAclear™ 转录纯化试剂盒纯化回收后，进行 RNA 电泳检测。

1.5 基因敲入打靶载体的构建 根据打靶方案，在 NPC1L1 基因 3'UTR 插入 FLAG-EGFP 基因序列。构建打靶载体所用的引物见表 2。以基因组 DNA 为模板，用引物 LA-F/R PCR 扩增 5' 端同源臂(LA)，大小为 1 388 bp；以基因组 DNA 为模板，用引物 RA-F1/R 的扩增产物为模板，再用引物 RA-F2/R 扩增得到 3' 端同源臂(RA)，大小为 1 294 bp；引物 FG-F/R 扩增插入的 FLAG-EGFP 基因序列(FG)，长度为 789 bp。扩增产物经 AIO™ 法克隆进载体 pTV-4G，经酶切和 DNA 测序鉴定正确的克隆用于后续显微注射。

表 2 构建打靶载体的引物序列

Tab 2 Primer sequences for the construction of targeting vectors

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物大小(bp)
LA-F	TTTAAGAAGGAGATATACATGCACAACAGTCTCCAGCTACATCACC	1 388
LA-R	CGTCATCGTCTTTGTAGTCGGATCCGCCACCTCCGAACCTTTTGGTCACTTTTGGGCAGA	
FG-F	GATCCGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGAGGTGGCGGATCCATGGTGAGCAAG	789
FG-R	CTACTCCACCTCTGGCAGGTTCATGATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAG	
RA-F1	GTCCAGGCTCCATGTTCTTGCTGATAAAGGGCCACGAGCCTTCCCTCTGTTGTTTC	1 256
RA-R	TTGTTAGCAGCCGGATCTCAGGGGTCACACTCTGTCCTAGGGCTAT	
RA-F2	CAAGTAATCATGACCTGCCAGAGGTGGAGTAGGAGCTTGTCCAGGCTCCATGGTTCTT	1 294
RA-R	TTGTTAGCAGCCGGATCTCAGGGGTCACACTCTGTCCTAGGGCTAT	

1.6 小鼠受精卵显微注射 将体外转录制备的 sgRNA、Cas9 mRNA 和打靶载体质粒配制成混合物,通过显微注射法注射到 C57BL/6N 小鼠受精卵胞质中,然后移植到假孕受体母鼠内,母鼠生产获得的子鼠称为 F0 代小鼠。

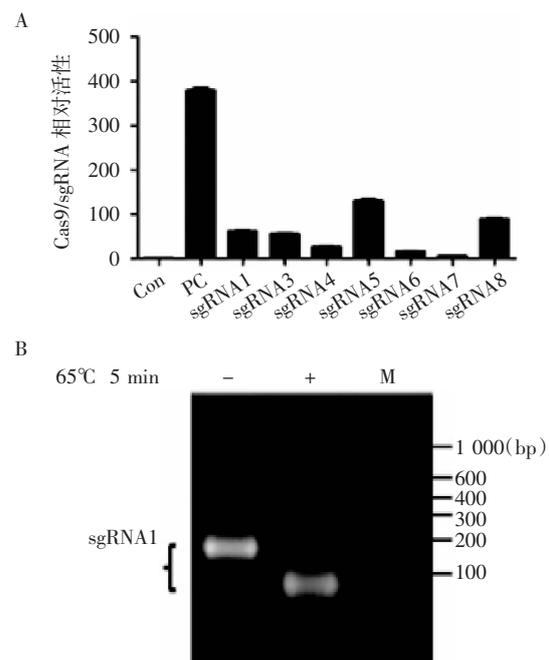
1.7 小鼠基因型鉴定 受精卵移植的假孕母鼠单笼饲养 20 d 后,观察乳鼠出生情况。剪取长至 1 周后 F0 代小鼠尾尖组织 1 cm,溶于 500 μ L 基因组 DNA 裂解液[0.2% SDS、0.2 mol/L NaCl、5 mmol/L EDTA、0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 g/L 蛋白酶 K],提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定其基因型。基因型鉴定引物设计见图 2A,反应体系为基因组 DNA 1 μ L (50 ng),2 \times PCR mix 12.5 μ L,10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L,ddH₂O 9.5 μ L,总体积为 25 μ L。采用 Touchdown PCR,反应条件为 94 $^{\circ}$ C,2 min;98 $^{\circ}$ C,10 s,67~57 $^{\circ}$ C,30 s,68 $^{\circ}$ C,2 min,每个循环降低 0.7 $^{\circ}$ C,共 15 个循环;98 $^{\circ}$ C,10 s,57 $^{\circ}$ C,30 s,68 $^{\circ}$ C,2 min,共 25 个循环;再于 68 $^{\circ}$ C,10 min。反应结束后取 10 μ L PCR 产物跑 2% 琼脂糖凝胶电泳,根据产物大小判断小鼠基因型并经测序确认。以 P1F/P1R 引物扩增得到 2 154 bp 产物且以 P2F/P2R 为引物扩增得到 1 971 bp 产物,为 F0 阳性小鼠。P1F 序列为 5'-ACTTCTCTGTA-GATGGAACCCAG-3',P1R 序列为 5'-GTAGTTG TACTCCAGCTTGTGCCCC-3';P2F 序列为 5'-CAC-GACTTCTTCAAGTCCGCCATGC-3',P2R 序列为 5'-CAGCCATAAGACCCATGCCAG-3';P3F 序列为 5'-CAGGGCCAGATGTTAACCAAGC TCT-3',P3R 序列为 5'-GTACCACTGCCACACG TTCCCAAG-3'。鉴定阳性的 F0 代小鼠和野生型 C57BL/6N 小鼠交配,获得 F1 代小鼠。F1 代小鼠基因型鉴定方法同 F0 代小鼠,经鉴定有同源重组者再经 Southern 印迹检测确认。

1.8 可视化观察 NPC1L1-FLAG-EGFP 蛋白的分布 野生型和纯合小鼠腹腔注射 4% 水合氯醛溶液麻醉后快速取小肠组织,剪取 1 cm 空肠中段组织,浸泡入 4% 的中性多聚甲醛中于 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。组织经 PBS 洗涤后,依次在 15%、30% 的蔗糖溶液中脱水过

夜,OCT 包埋并经液氮速冻后切片。厚度为 8 μ m 的冰冻切片于 55 $^{\circ}$ C 烘烤 20 min,10 μ g/mL DAPI 溶液衬染 5 min,PBS 轻洗 3 min \times 3 次,晾干后中性树脂胶封片,于倒置荧光显微镜(Olympus DP80)下观察。

2 结果

2.1 sgRNA 靶向活性的检测和制备 针对 NPC1L1 基因第 19 外显子靶向位点附近的区域,定制 8 条 sgRNA 的相应寡核苷酸链,构建重组载体 pCS-sgRNA,并与包含靶点基因片段的 pUCA-NPC1L1 载体共转染检测 Cas9/sgRNA 的剪切活性。如图 1A 所示,sgRNA1、sgRNA3、sgRNA5、sgRNA8 均有较强的剪切向导活性。综合考虑靶点位置和活性结果,选择 sgRNA1 进行体外转录制备向导 RNA,凝胶电泳显示 sgRNA1 在 65 $^{\circ}$ C 温育 5 min 呈现出单一条带,提示成功制备可用于显微注射的 RNA(图 1B)。



注:A:UCATM-CRISPR/Cas9 荧光素酶法检测 sgRNA 活性;B:凝胶电泳检测 sgRNA 的体外转录产物

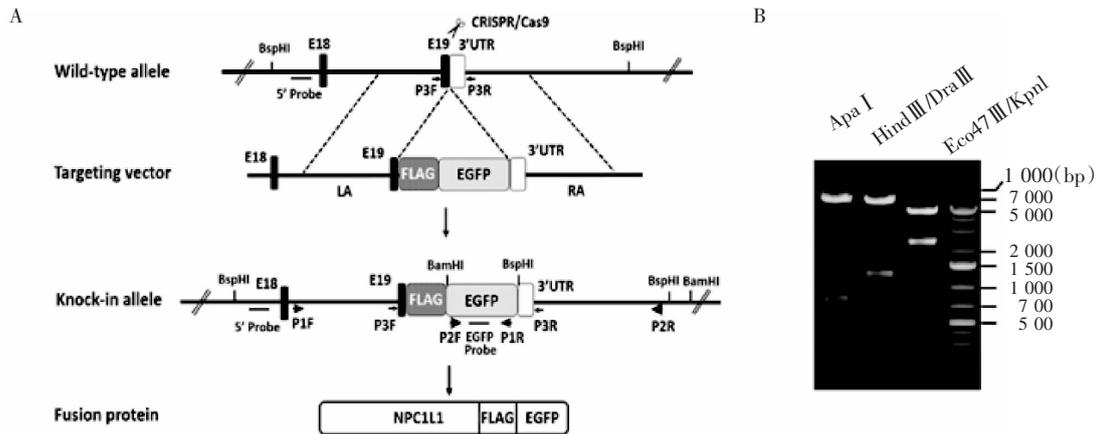
图 1 靶向 NPC1L1 基因 3' 端 sgRNA 的活性检测和转录

Fig 1 The activity and transcription products of the sgRNA targeting 3' end of NPC1L1 gene

2.2 打靶载体的构建和鉴定 在小鼠 NPC1L1 基因的终止密码子前面敲入 FLAG-EGFP 编码序列的打靶策略见图 2A。打靶载体酶切鉴定结果如图 2B 所示,正确的克隆经 *Apa*I 酶切可得到 6 076 bp 和 800 bp 片段;经 *Hind*III 和 *Sph*I 双酶切可得到 3 842 bp、2 025 bp 和 1 009 bp 片段;经 *Eco*47III 和 *Kpn*I 双酶切可得到 4 611 bp 和 2 265 bp 片段。

2.3 F0 及 F1 代小鼠的获得与基因型鉴定 通过 446 个受精卵的显微注射和体内移植, 出生子鼠 44 只, 出生率 9.86%; 经 PCR 基因型鉴定, 其中 4 只 F0

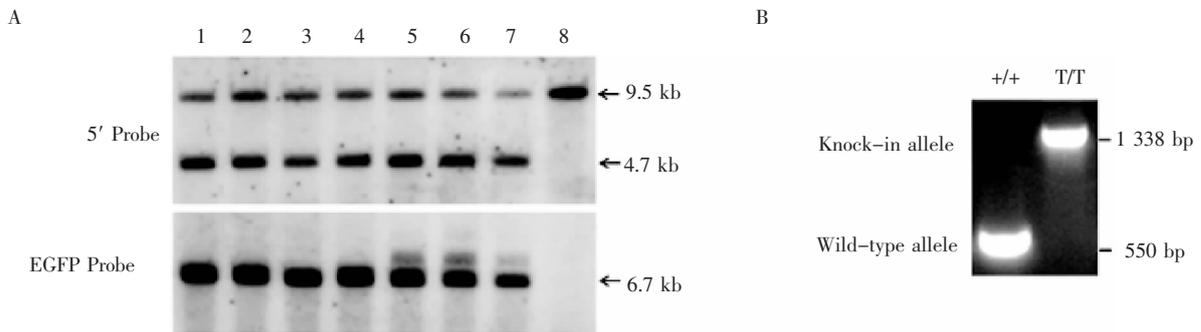
小鼠发生同源重组, 阳性率 9.1%。对 PCR 鉴定同源重组阳性的 F1 代小鼠, 进一步进行基因组的 Southern 印迹检测, 探针结合位点和限制性内切酶酶切位点见图 2A 所示。基因组 DNA 经 *Bsp*H I 酶切后, 以 5' 探针杂交显影, 出现 9.5 kb 条带者为野生型, 4.7 kb 条带者为重组小鼠。基因组 DNA 经 *Bam*H I 酶切后, 以 EGFP 探针杂交, 仅见 6.7 kb 条带者为正确重组且无随机插入的阳性 F1 代小鼠。Southern 印迹结果显示编号 1~4 为阳性 F1 代小鼠, 编号 5~7 为有随机插入的重组小鼠, 编号 8 为野生型小鼠(图 3A)。



注:A: NPC1L1 基因 3' 端非翻译区插入 FLAG-EGFP 基因的打靶载体构建示意图; 5' probe 和 EGFP probe 所示为 Southern 印迹检测所用探针结合位置; P1F/P1R、P2F/P2R 和 P3F/P3R 所示为小鼠基因型鉴定用引物位置; E18: 外显子 18; E19: 外显子 19; LA: 左侧同源臂; RA: 右侧同源臂; *Bsp* III、*Bam*H I 为限制性内切酶; B: 正确重组的打靶载体酶切鉴定结果; *Apa* I、*Hind* III、*Dra* III、*Eco*47 III、*Kpn* I 为限制性内切酶

图 2 CRISPR/Cas 9 介导的 NPC1L1 基因编辑策略及打靶载体酶切鉴定

Fig 2 Schematic demonstration for CRISPR/Cas9-mediated editing of NPC1L1 gene and restrictive enzyme digestion analysis of gene targeting vector



注:A: Southern 印迹检测 F1 代小鼠的基因同源重组情况; 各泳道上方所示为小鼠编号; 5' Probe: 5' 探针; EGFP Probe: EGFP 探针; B: PCR 法鉴定小鼠基因型; Knock-in allele: 敲入等位基因; Wild-type allele: 野生型等位基因; +/+ 为野生型小鼠; T/T 为 NPC1L1-FG 纯合小鼠

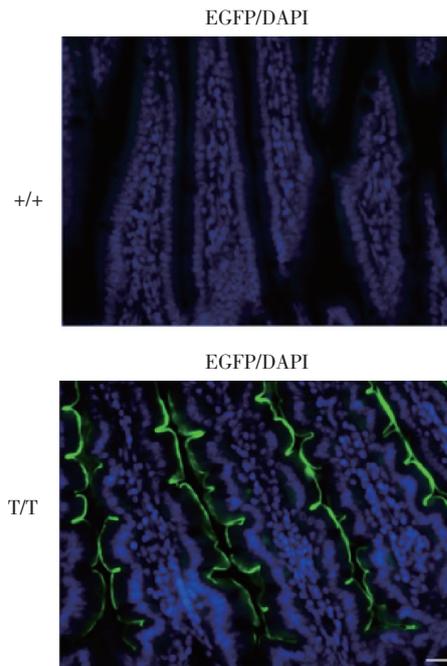
图 3 F1 代阳性小鼠的 Southern 印迹检测和基因型鉴定

Fig 3 Southern blotting and genotyping analysis of positive F1 generation mice

进一步鉴定 F1 代小鼠基因型的引物设计见图 2A, 以引物 P3F/P3R 扩增, 野生型基因和 FLAG-EGFP 敲入的等位基因型可分别得到 550 bp 和 1 338 bp 的产物。如图 3B 所示, 只有 550 bp 产物的是野生型小鼠(+/+); 只有 1 338 bp 扩增产物的是表达 NPC1L1-FLAG-EGFP 融合蛋白(简称

NPC1L1-FG)的纯合小鼠(T/T)。

2.4 EGFP 可视化示踪 NPC1L1 蛋白在小肠上皮细胞的表达特征与野生型小鼠(+/+)相比, 纯合小鼠(T/T)的空肠绒毛上皮细胞肠腔面可见明显的绿色荧光, 勾勒出清晰的刷状缘质膜轮廓(图 4)。



注: +/+ 为野生型小鼠; T/T 为 NPC1L1-FG 纯合小鼠; 内置标尺: 20 μm (400 \times)

图 4 空肠组织中 NPC1L1-FG 融合蛋白的表达分布

Fig 4 Distribution of NPC1L1-FG fusion protein in jejunum tissue

3 讨论

NPC1L1 蛋白在肠道和肝内胆道游离胆固醇的摄取中发挥重要作用。寻找 NPC1L1 的共作用分子, 是解析胆固醇吸收机制的有效策略。因包括大鼠在内的啮齿类动物肝脏组织几乎不表达 NPC1L1 蛋白, 迄今关于 NPC1L1 介导胆固醇吸收机制的研究多以离体大鼠肝癌细胞为模型, 导入人 NPC1L1 基因进行的。有课题组利用 NPC1L1-EGFP 在大鼠肝癌细胞过表达的细胞模型, 经免疫沉淀和质谱分析, 发现共作用分子 Flotillin 在介导形成富含胆固醇的 NPC1L1 微区 (microdomain) 膜结构和胆固醇吸收中发挥重要作用^[5]。该课题组还发现 Clathrin 的接头蛋白 Numb 能特异性识别和结合 NPC1L1 蛋白 C 末端的 YVNXXF 内吞信号肽, 从而招募 Clathrin 以启动 NPC1L1 内吞^[6-7]。此外, 该课题组还证实了卸载胆固醇后的 NPC1L1 从内吞循环体 (endocytic recycling compartment, ERC) 转运回胞膜时, 需要小 G 蛋白 Cdc42^[8] 和 LIM 区和 actin 结合蛋白 1 (LIM domain and actin binding 1, LIMA1)^[9] 介导耦联含 myosin Vb 的运输复合物。然而, 目前尚无可体内示踪 NPC1L1 的动物模型, 用以进一步在体探索 NPC1L1 在胆固醇吸收中的作用机制。

在 NPC1L1 蛋白的在体功能研究方面, 目前常用的小鼠模型为 NPC1L1 基因全身敲除模型^[1-2], 或

者在全身敲除的基础上利用 villin-Cre 使肠道过表达人源 NPC1L1^[10], 或者利用载脂蛋白 E 启动子在肝脏过表达人源 NPC1L1^[4, 11-12], 以探讨肠道或肝脏 NPC1L1 蛋白在胆固醇代谢中的作用。虽然敲入的外源 NPC1L1 在靶组织的定位与内源性蛋白的定位基本一致, 但是也会发生脱靶现象。比如胃和肾组织也有 villin 启动子活性^[10], 因此无法排除这些组织表达的外源 NPC1L1 在胆固醇代谢稳态维持中的作用。本研究的 NPC1L1-FG 工具小鼠是利用 CRISPR/Cas9 技术在内源性 NPC1L1 基因末端插入标签蛋白基因, 不会改变内源性 NPC1L1 蛋白的表达分布, 因此可以有效避免 NPC1L1 在靶组织外表达而造成的实验假象。

文献报道的关于 NPC1L1 定位的研究, 不管是在体的小鼠组织还是离体的细胞模型, 均利用荧光标记二抗杂交显影, 这在放大荧光信号的同时也会产生杂信号。本研究的小鼠模型在内源性 NPC1L1 蛋白 C 端标记上 EGFP 蛋白, 荧光显微镜下可见绿色荧光分布在小肠上皮细胞的刷状缘膜, 与文献报道的 NPC1L1 蛋白的分布特征一致, 说明 EGFP 敲入能准确示踪内源性 NPC1L1 蛋白的表达分布。该模型可以方便地利用荧光显微镜直接观察内源性 NPC1L1 蛋白的定位、内吞囊泡的形成及其在细胞内的转运, 也可避免抗体杂交所致的杂信号的干扰。另外, NPC1L1 蛋白还带有 FLAG 标签, 利用 FLAG 抗体可以高效地富集 NPC1L1 蛋白及其共作用蛋白, 结合蛋白组学分析手段, 可以深入分析调控 NPC1L1 蛋白表达、降解的分子机制以及参与胆固醇代谢的信号通路。

总之, 笔者成功构建了肠道特异性表达 NPC1L1-FG 融合蛋白的小鼠模型, 且可利用 EGFP 标签蛋白镜下可视化追踪 NPC1L1 蛋白的在体运动轨迹, 利用 FLAG 标签抗体富集捕获 NPC1L1 蛋白及其潜在的共作用蛋白, 为今后探讨 NPC1L1 介导的胆固醇和脂溶性维生素稳态维持的分子机制提供有力工具。

参考文献:

- [1] ALTMANN S W, DAVIS HR J R, ZHU L J, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption[J]. *Science*, 2004, 303(5661): 1201
- [2] DAVIES J P, 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(13): 12710
- [3] ZHANG J H, GE L, QI W, et al. The N-terminal domain of NPC1L1 protein binds cholesterol and plays essential roles in cholesterol uptake[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(28): 25088

(下转第 64 页)

- 43(4):989993.
- [18] QIAN J, CHEN X, CHEN X, et al. Kaempferol reduces K63-linked polyubiquitination to inhibit nuclear factor- κ B and inflammatory responses in acute lung injury in mice[J]. *Toxicol Lett*, 2019, 306:53-56.
- [19] 史东梅, 董明, 陆颖, 等. PI3K/Akt 信号通路参与骨破坏: 问题与机制[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(23):3716-3722.
- [20] CAO H, FENG Y, NING Y, et al. Edaravone protects rats and human pulmonary alveolar epithelial cells against hyperoxia injury: heme oxygenase-1 and PI3K/Akt pathway may be involved[J]. *Exp Lung Res*. 2015. 41(7): 404-414.
- [21] 殷令妮, 陈德宣. PI3K/Akt 通路在低氧诱导脂肪干细胞增殖和向内皮细胞分化中的作用[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(19): 3004-3009.
- [22] KIM G D. Kaempferol inhibits angiogenesis by suppressing HIF-1 α and VEGFR2 activation via ERK/p38 MAPK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in endothelial cells[J]. *Prev Nutr Food Sci*, 2017, 22(4):320-326.
- [23] CHIN H K, HORNG C T, LIU Y S, et al. Kaempferol inhibits angiogenic ability by targeting VEGF receptor-2 and downregulating the PI3K/AKT, MEK and ERK pathways in VEGF-stimulated human umbilical vein endothelial cells[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(5): 2351-2357.
- [24] 康新, 王立志, 王屹刚, 等. 重症急性胰腺炎肺损伤时磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B 信号转导通路的表达[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(11): 732-737.
- [25] ZHUANG Y, WU H, WANG X, et al. Resveratrol attenuates oxidative stress-induced intestinal barrier injury through PI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:7591840.
- [26] PERAMAIYAN R, BEN A R, ALSAEDI FATMA J, et al. Kaempferol Inhibits Zearalenone-induced oxidative stress and apoptosis via the PI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathway: in vitro and in vivo studies[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1):217.
- [27] CUI H, ZHANG Q. Dexmedetomidine ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway[J]. *J Anesth*, 2021, 35(3):394.
- [28] CHEN Y H, CHEN D, LIU S J, et al. Systematic elucidation of the mechanism of genistein against pulmonary hypertension via network pharmacology approach[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22):5569.

(2021-04-10 收稿)

(上接第 57 页)

- [4] TEMEL R E, TANG W, MA Y, et al. Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(7): 1968
- [5] GE L, QI W, WANG L J, et al. Flotillins play an essential role in Niemann-Pick C1-like 1-mediated cholesterol uptake[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(2):551
- [6] LI P S, FU Z Y, ZHANG Y Y, et al. The clathrin adaptor Numb regulates intestinal cholesterol absorption through dynamic interaction with NPC1L1[J]. *Nat Med*, 2013, 20(1): 80
- [7] WEI J, FU Z Y, LI P S, et al. The clathrin adaptor proteins ARH, Dab2, and Numb play distinct roles in Niemann-Pick C1-Like 1 versus low density lipoprotein receptor-mediated cholesterol uptake[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(48): 33689
- [8] XIE C, LI N, CHEN Z J, et al. The small GTPase Cdc42 interacts with Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) and controls its movement from endocytic recycling compartment to plasma membrane in a cholesterol-dependent manner[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(41):35933
- [9] ZHANG Y Y, FU Z Y, WEI J, et al. A LIMA1 variant promotes low plasma LDL cholesterol and decreases intestinal cholesterol absorption[J]. *Science*, 2018, 360(6393): 1087
- [10] XIE P, ZHU H, JIA L, et al. Genetic demonstration of intestinal NPC1L1 as a major determinant of hepatic cholesterol and blood atherogenic lipoprotein levels[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 237(2):609
- [11] TANG W, JIA L, MA Y, et al. Ezetimibe restores biliary cholesterol excretion in mice expressing Niemann-Pick C1-Like 1 only in liver[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1811(9):549
- [12] XIE P, JIA L, MA Y, et al. Ezetimibe inhibits hepatic Niemann-Pick C1-Like 1 to facilitate macrophage reverse cholesterol transport in mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(5):920

(2021-03-15 收稿)