

许崇利, 许崇波, 宫语晨, 等. 肝特异性表达 *hNPC1L1* 转基因巴马小型猪的获得[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(5): 1069-1075.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.05.017

肝特异性表达 *hNPC1L1* 转基因巴马小型猪的获得

许崇利¹, 许崇波², 宫语晨³, 欧阳红生⁴

(1. 吉林化工学院生物与食品工程学院, 吉林 吉林 132022; 2. 韶关学院英东生命科学院, 粤北生猪生产及疫病防控协同创新发展中心, 广东 韶关 512005; 3. 吉林农业大学动物科学技术学院, 吉林 长春 130118; 4. 吉林大学动物医学学院, 吉林 长春 130062)

摘要: 利用 FuGENE[®]6 将线性化的 pLiv-11-*Neo^r/Kan^r-hNPC1L1* 转染至小型猪胎儿成纤维细胞, G418 筛选和 PCR 鉴定结果表明, 成功获得了肝特异性表达人尼曼-匹克 C1 型类似蛋白 1 (Human Niemann-Pick C1 Like 1, *hNPC1L1*) 转基因小型猪胎儿成纤维细胞。利用体细胞核移植技术将转 *hNPC1L1* 基因小型猪胎儿成纤维细胞作为核供体细胞, 获得了肝特异性表达 *hNPC1L1* 转基因巴马小型猪, 并对转基因巴马小型猪进行了基因组水平、转录水平和表达水平检测, 同时对目的基因进行了免疫组化定位分析。结果显示, 目的基因特异性地表达于肝组织, 并且定位于肝小叶间胆管膜上, 表明已成功获得了转 *hNPC1L1* 基因巴马小型猪, 从而为研究尼曼-匹克 C1 型类似蛋白 1 (Niemann-Pick C1 Like 1, *NPC1L1*) 在肝中作用的分子机制提供了很好的模型动物。

关键词: 人尼曼-匹克 C1 型类似蛋白 1 (*hNPC1L1*); 肝特异性表达; 体细胞核移植; 巴马小型猪

中图分类号: S858.286.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)05-1069-07

Generation of transgenic Bama minipigs with liver-specific expression of human Niemann-Pick C1-like 1 (*hNPC1L1*)

XU Chong-li¹, XU Chong-bo², GONG Yu-chen³, OUYANG Hong-sheng⁴

(1. College of Biology and Food Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China; 2. North Guangdong Collaborative Innovation and Development Center for Swine Farming and Disease Control, Yingdong College of Life Sciences, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China; 3. College of Animal Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 4. College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: In this study, the minipig fetal fibroblast cells with human Niemann-Pick C1-like *NPC1L1* specially expressed in liver were obtained through transfecting linearized vector pLiv-11-*Neo^r/Kan^r-hNPC1L1* into minipig fetal fibroblast cell by FuGENE[®] 6. The positive clones were selected with G418 and identified by PCR. The transgenic Bama miniature pigs with *hNPC1L1* specifically expressed in the livers were generated by using somatic cell nuclear transfer technique with the minipig fetal fibroblast cells as nuclear donor cells. The transgenic Bama miniature pigs were detected on the genomic level, transcription level and expression level. Meanwhile, the target gene was analyzed by immunohistochemistry. The results showed that the target gene was specifically expressed in the liver tissue and localized on the hepatic interlobular

bile duct membrane. The successful generation of *hNPC1L1* transgenic Bama miniature pigs will provide a model animal for studying the molecular mechanism of *NPC1L1* in liver.

Key words: human Niemann-Pick C1 like 1; liver-specific expression; somatic cell nuclear transfer; Bama miniature pig

收稿日期: 2016-10-18

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2011BA115B02)

作者简介: 许崇利 (1974-), 男, 黑龙江鸡东人, 博士, 教授, 主要从事微生物分子生物学研究。 (Tel) 0432-62185256; (E-mail) xcl902@163.com

通讯作者: 欧阳红生, (Tel) 0431-87836175; (E-mail) ouyh@jlu.edu.cn

近年的研究表明,位于肠上皮细胞刷状缘膜上的尼曼-匹克 C1 型类似蛋白 1 (Niemann-Pick C1 Like 1, NPC1L1) 是肠道胆固醇转运的关键蛋白,维持着体内胆固醇的代谢平衡^[1-2]。NPC1L1^{-/-}小鼠胆固醇和植物甾醇吸收显著降低,即使饮食中添加高浓度胆固醇,血胆固醇含量也不会发生变化。说明 NPC1L1 基因敲除小鼠能有效抑制高胆固醇血症^[3]。在 NPC1L1^{-/-}小鼠体内,胆固醇吸收抑制剂依泽替米贝 (Ezetimibe) 并不能进一步降低胆固醇的吸收^[4-5]。上述研究结果表明,NPC1L1 有望成为与胆固醇吸收密切相关疾病的治疗靶标。另外,NPC1L1 与代谢性疾病密切相关,NPC1L1 基因敲除和依泽替米贝对于动脉粥样硬化、非酒精性脂肪肝和胰岛素抗性都起到有效的治疗作用^[6-9]。虽然 NPC1L1 在脂代谢中发挥着重要作用,但 NPC1L1 在导致肝脏疾病的脂代谢紊乱中的分子机制并没有完全被阐明。先前的研究表明,NPC1L1 与脂肪肝密切相关。因此,假设 NPC1L1 通过调控脂质合成中特定基因的转录从而在脂代谢紊乱和肝脏疾病发生中发挥作用。近年来,随着原核显微注射、胚胎干细胞介导、核移植、精子介导的基因转移 (Sperm-mediated gene transfer, SMGT) 和体细胞核移植 (Somatic cell nuclear transfer, SCNT) 等转基因技术的发展,转基因猪在各种疾病研究中发挥了重要作用^[10-13]。利用 SCNT 技术已成功克隆了多种动物并且克隆猪在生物医学研究领域已获得丰硕成果,尤其在研究疾病以及基因和环境因素相互作用的生物特性方面,比如肥胖症、抑郁症和心血管疾病,转基因猪都具有宝贵价值。

本研究拟利用体细胞核移植技术,将构建的肝特异性表达人尼曼-匹克 C1 型类似蛋白 1 (human Niemann-Pick C1 Like 1, hNPC1L1) 的小型猪胎儿成纤维细胞作为核供体细胞,获得肝特异性表达 hNPC1L1 转基因巴马小型猪,并对转基因巴马小型猪进行基因组水平、转录水平和表达水平检测,同时对目的基因进行免疫组化定位分析,为研究 NPC1L1 在肝中作用的分子机制提供很好的模型动物。

1 材料与方法

1.1 载体、细胞和试验动物

小型猪胎儿成纤维细胞和 pLiv-11-*Neo*^r/*Kan*^r-

hNPC1L1 重组质粒由本实验室保存,代孕雌性巴马小型猪由第三军医大学基础部试验动物教研室提供。

1.2 试剂

D2000、DNA MarkerIII、Proteinase K、*Spe* I 酶、TIANamp Genomic DNA Kit 基因组 DNA 提取试剂盒、总 RNA 提取试剂盒 TRNzol Reagent、Quant 一步法 RT-PCR 试剂盒、2×Taq Platinum PCR MasterMix、Bradford 蛋白质定量试剂盒、Pro-light HRP 化学发光检测试剂购自北京天根生化科技有限公司,两步法免疫组合检测试剂盒、蓝色 DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,Biospin 质粒 DNA 小量提取试剂盒购自杭州博日科技有限公司,FuGENE® HD Transfection Reagent 购自 Roche 公司,膜蛋白提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司,PMSF、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,胎牛血清(FBS)、NP-40、DMEM 购自 Invitrogen 公司,二甲基亚砷(DMSO)和 G418 购自 Sigma 公司。

1.3 肝特异性表达 *hNPC1L1* 转基因小型猪成纤维细胞的构建

肝特异性表达 *hNPC1L1* 的重组质粒 pLiv-11-*Neo*^r/*Kan*^r-*hNPC1L1* 用 *Spe* I 单酶切进行线性化,75%乙醇纯化回收,FuGENE® 6 转染至小型猪胎儿成纤维细胞,置于二氧化碳培养箱培养 48 h 后加入浓度为 800 μg/ml G418 选择培养基,筛选获得阳性细胞克隆。针对 *hNPC1L1* 基因序列设计 2 对特异性引物进行 PCR 鉴定,引物 1: 5'-GGGTGAATA-AGAGCAGATAGAG-3',引物 2: 5'-CCCTTGAAA-CATCCCAGAC-3',引物 3: 5'-GATGAGGTCCTTCAG-GTAATG-3',引物 4: 5'-CTGGCTTTGTGGTAGTATGT-TG-3'。将鉴定为阳性的细胞克隆进行扩大培养并冻存。

1.4 猪卵母细胞的采集和供体细胞制备

用 30~35 °C 生理盐水浸泡屠宰场收集的猪卵巢,放入保温瓶。卵巢用 37 °C 生理盐水清洗 3~4 次,用一次性注射器吸取卵泡液。选取卵丘-卵母细胞复合体用洗卵液清洗 2 次,成熟培养液洗 3 次后,5% CO₂、39 °C 培养 42~44 h。采用 0.5 mg/ml 透明质酸酶去除卵丘细胞,选取成熟卵母细胞供核移植使用。复苏构建的肝特异性表达 *hNPC1L1* 小型猪成纤维细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化后制成细胞

悬液,用含 10%FBS 的洗卵液清洗 1 次,250 g 离心 10 min,0.5 ml 胚胎操作液重悬后分装待用。

1.5 胚胎移植

采用盲吸法去除成熟卵母细胞核,固定管吸住卵母细胞后,用去核针吸出第一极体及其附近适量胞质完成去核,再用注射针吸取供体细胞注射进卵周间隙进行重组胚的电融合。选取雌性巴马小型猪作为代孕受体,戊巴比妥钠水溶液和异氟烷麻醉后,经手术将胚胎移植到输卵管内,抗生素消炎 7 d,定期观察胎儿发育状况,3 个月后检测产仔情况。体细胞核移植制备转基因巴马小型猪技术路线如图 1 显示。

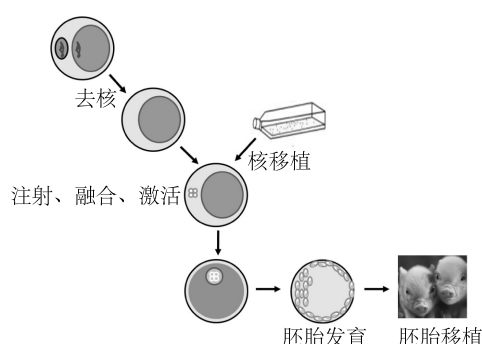


图 1 体细胞核移植制备转基因巴马小型猪技术路线

Fig. 1 Technological roadmap of generation of transgenic Bama miniature pig

1.6 转基因猪 PCR 鉴定

以提取的基因组作为模板,根据 *hNPC1L1* 基因序列设计 1 对引物,引物序列为:引物 1:5'-TAATG-CAACAAGGCTTGGAAGGCTAACCTG-3',引物 2:5'-CATGGCTCGACTAATCGATACCGTCGACTAG-3'。以 pLiv-11-*Neo*^r/*Kan*^r-*hNPC1L1* 质粒为模板,通过 PCR 扩增 4 267 bp *hNPC1L1* 基因作为阳性对照,以非转基因猪基因组和不加模板的水作为阴性对照。

1.7 RT-PCR 分析 *hNPC1L1* 表达

分别提取转基因猪和非转基因猪肝、心、脾、肺、肾、胃、胰、肠、肌肉组织的总 RNA,进行 RT-PCR 分析,检测 *hNPC1L1* 在各组织中的表达情况。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) 为内参,引物序列为:引物 1:5'-TATTTCCAGAACAACCGCAGCCTC-3',引物 2:5'-TGGGCAGGTCTTCAGCTGTGGTCCG-3', *GAPDH*1:

5'-CATGGTCTACATGTTCCAGTATG-3', *GAPDH*2:5'-CCACAGCCTTGGCAGCGCCGGTAG-3'。同时以 pLiv-11-*Neo*^r/*Kan*^r-*hNPC1L1* 质粒为阳性对照,以非转基因猪各组织和不加模板的水为阴性对照。

1.8 Western Blot 分析 *hNPC1L1* 表达

分别称取 200 mg 转基因猪肝、心、脾、肺、肾、胃、胰、肌肉组织和非转基因猪肝组织样本,匀浆后提取膜蛋白,总蛋白浓度用 Bradford 法测定。每组取 50 μg 蛋白进行 6% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,浓缩胶电压为 90 V,分离胶电压为 110 V,电泳后 90 V、1.5 h 电转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗膜后加入鼠抗人 NPC1L1 单克隆抗体 (1:800),4 °C 孵育过夜,再次 TBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 (1:10 000) 二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 ECL 显色发光。

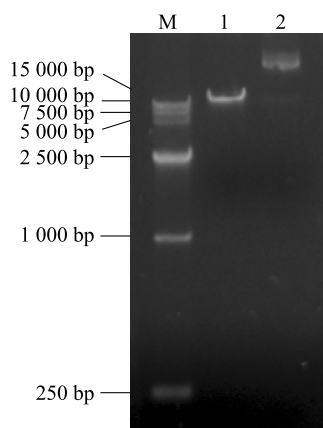
1.9 转基因巴马小型猪免疫组化分析

常规方法制作肝组织切片, PBS 清洗肝组织, 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液固定 12.0 h。弃去固定液,蒸馏水洗 3 次,50%酒精洗 2 次,然后用酒精逐级脱水,70%酒精 1 d,80%酒精 24.0 h,95%酒精 3.0 h,100%酒精 I 2.0 h,100%酒精 II 2.0 h。100%酒精与二甲苯混合液 (1:1) 浸泡 45 min,二甲苯 I 30 min,二甲苯 II 30 min,在恒温箱内将其浸入石蜡,二甲苯与石蜡 (1:1) 58 °C 45 min,石蜡 I、石蜡 II、石蜡 III 共 2.5 h,最后石蜡 III 包埋组织。包埋的组织块修整后,切片机切成 5 μm 厚的薄片,然后放入 50 °C 温水中烫平,贴到载玻片上,放入恒温箱内 68 °C 烘烤 2.0 h。组织切片经二甲苯 I、二甲苯 II 浸泡 25 min,脱蜡后用 100%酒精 I、100%酒精 II、95%酒精、80%酒精、70%酒精各 2 min 进行水化, PBS 清洗 3 次,1 次 5 min。3% H₂O₂ 孵育 10 min, PBS 清洗 3 次,1 次 5 min。切片放入 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液 (pH 6) 中 95 °C 15~20 min,冷却 20 min 后, PBS 清洗 3 次,1 次 5 min。5% BSA 室温封闭 10 min,甩去液体,不清洗。滴加 1:800 稀释的鼠抗人 NPC1L1 抗体 37 °C 孵育 2.0 h, PBS 洗 3 次,1 次 2 min。滴加 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 37 °C 孵育 30 min, PBS 洗 4 次,1 次 5 min。显色剂 A、B、C 各 1 滴,分别加入 1 ml 蒸馏水混匀,滴加到切片显色 30 min,蒸馏水清洗终止反应,苏木素复染 5 min,水洗,中性树胶封片,显微镜观察。

2 结果

2.1 肝特异性表达 *hNPC1L1* 转基因小型猪成纤维细胞的鉴定

pLiv-11-*Neo*^r/*Kan*^r-*hNPC1L1* 质粒用 *Spe* I 单酶切获得含有 *Neo*^r/*Kan*^r、目的基因 *NPC1L1* 和肝内调控区 HCR 的线性化 DNA 片段。酶切产物琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 2。在含有 800 μ g/ml G418 选择性培养基中筛选 10 d 后,获得具有抗生素抗性的阳性细胞克隆(图 3)。NP40 细胞裂解液裂解阳性细胞克隆并以其为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物长度分别是引物 1 为 526 bp、引物 2 为 526 bp,引物 3 为 585 bp、引物 4 为 585 bp(图 4)。设立以含有 *hNPC1L1* 基因的重组质粒作为阳性对照,以非转基因小型猪胎儿成纤维细胞和水作为阴性对照,结果(图 4)表明,目的基因已整合到小型猪胎儿成纤维细胞的基因组中。



M: D15000 DNA marker; 1: *Spe* I 单酶切; 2: 原质粒。

图 2 pLiv-11-*Neo*^r/*Kan*^r-*hNPC1L1* 载体线性化

Fig.2 Linearization of vector pLiv-11-*Neo*^r/*Kan*^r-*hNPC1L1*

2.2 肝特异性表达 *hNPC1L1* 转基因巴马小型猪的制备与鉴定

重构胚移植到受体母猪,110 d 后获得了 11 头健康的巴马克隆猪(图 5)。以提取的转基因猪基因组作为模板,利用引物扩增出 4 267 bp 目的条带,并设立阳性对照和阴性对照,结果如图 6 显示,7 头克隆猪为阳性。

2.3 RT-PCR 检测 *hNPC1L1* 组织表达

分别提取转基因猪和非转基因猪肝、心、脾、肺、肾、胃、胰、肠、肌肉组织的总 RNA,进行 RT-PCR 分

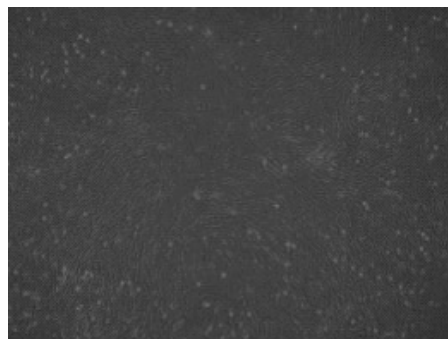
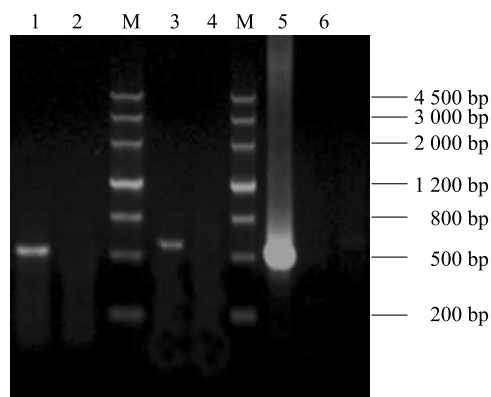


图 3 筛选 10 d 后获得的阳性细胞克隆($\times 40$)

Fig.3 Positive cell clones after 10-d screening($\times 40$)



M: DNA marker III; 1: 引物 1、2 鉴定; 2: 阴性对照; 3: 引物 3、4 鉴定; 4: 阴性对照; 5: 阳性对照; 6: 水对照。

图 4 阳性细胞克隆 *hNPC1L1* 基因的 PCR 鉴定

Fig.4 PCR identification of positive cell clones



图 5 克隆巴马小型猪照片

Fig.5 Picture of cloned Bama miniature pigs

析。结果如图 7 显示,只在转基因猪的肝中扩增出 427 bp 目的基因片段,其他组织和非转基因肝中均未扩增出目的基因片段,说明 *hNPC1L1* 只在转基因猪的肝中表达。*GAPDH* 作为内参,其扩增产物为 470 bp。

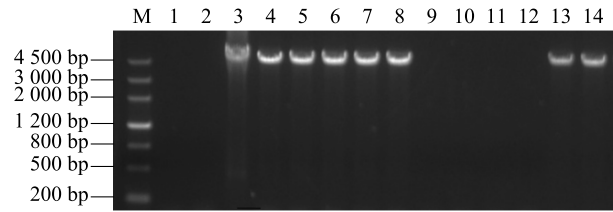
2.4 Western Blot 分析 *hNPC1L1* 表达

Western Blot 检测 *hNPC1L1* 在转基因猪各组织

中的表达, β -actin 作为内参。结果如图 8 显示,只在转基因猪肝中检测到 *hNPC1L1* 表达,在转基因猪其他组织和非转基因猪肝中均未检测到 *hNPC1L1* 表达。

2.5 免疫组化检测 *hNPC1L1* 表达

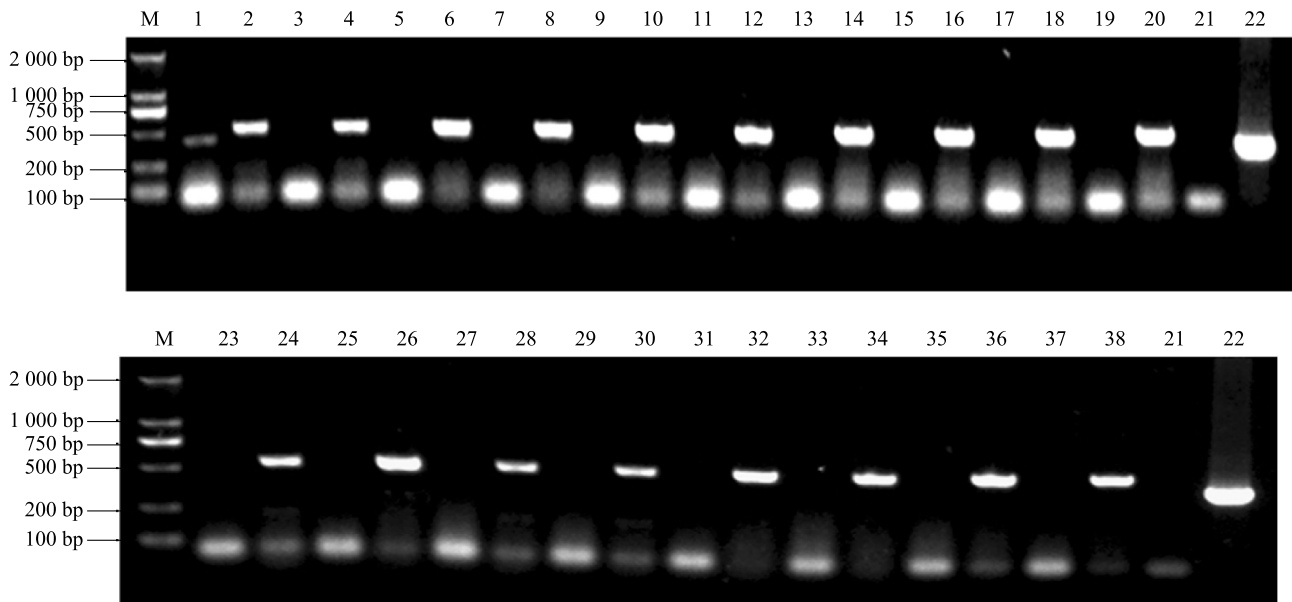
为了对肝中 *hNPC1L1* 表达进行定位,取转基因和非转基因猪肝组织进行免疫组化分析,结果如图 9 显示,*hNPC1L1* 表达于肝小叶间胆管膜上,而非转基因猪并没有发现 *hNPC1L1* 表达。



M: DNA marker III; 1: 阴性对照; 2: 水对照; 3: 阳性对照; 4、5、6、7、8、13、14 阳性克隆猪; 9、10、11、12: 未扩出目的基因的克隆猪。

图 6 转基因巴马小型猪的 PCR 鉴定

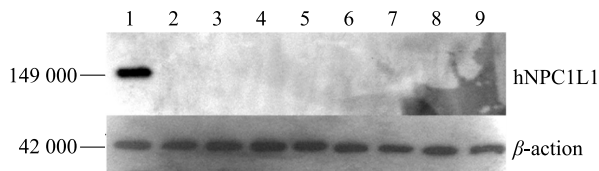
Fig.6 PCR identification of transgenic Bama miniature pigs



M: D2000 DNA marker; 1: 转基因肝; 2: 转基因肝 *GAPDH*; 3: 非转基因肝; 4: 非转基因肝 *GAPDH*; 5: 转基因心; 6: 转基因心 *GAPDH*; 7: 非转基因心; 8: 非转基因心 *GAPDH*; 9: 转基因脾; 10: 转基因脾 *GAPDH*; 11: 非转基因脾; 12: 非转基因脾 *GAPDH*; 13: 转基因肺; 14: 转基因肺 *GAPDH*; 15: 非转基因肺; 16: 非转基因肺 *GAPDH*; 17: 转基因肾; 18: 转基因肾 *GAPDH*; 19: 非转基因肾; 20: 非转基因肾 *GAPDH*; 21: 水对照; 22: 阳性对照; 23: 转基因胃; 24: 转基因胃 *GAPDH*; 25: 非转基因胃; 26: 非转基因胃 *GAPDH*; 27: 转基因胰; 28: 转基因胰 *GAPDH*; 29: 非转基因胰; 30: 非转基因胰 *GAPDH*; 31: 转基因肠; 32: 转基因肠 *GAPDH*; 33: 非转基因肠; 34: 非转基因肠 *GAPDH*; 35: 转基因肌肉; 36: 转基因肌肉 *GAPDH*; 37: 非转基因肌肉; 38: 非转基因肌肉 *GAPDH*。

图 7 转基因巴马小型猪的 RT-PCR 鉴定

Fig.7 Identification of transgenic Bama miniature pigs by RT-PCR



1: 转基因肝; 2: 非转基因肝; 3: 转基因心; 4: 转基因脾; 5: 转基因肺; 6: 转基因肾; 7: 转基因胃; 8: 转基因胰; 9: 转基因肌肉。

图 8 转基因巴马小型猪 *hNPC1L1* 蛋白免疫印迹

Fig.8 Western blotting of transgenic Bama miniature pigs

3 讨论

胆固醇在体内承担着关键的信号分子作用,体内胆固醇动态平衡对于人体健康至关重要,胆固醇及相关分子的调控机制发生紊乱都会影响到身体健康。虽然体内胆固醇合成过程已经被阐明,但对于肠吸收胆固醇机制的了解仍然十分有限。在人体中,大约 50% 的胆固醇被肠道吸收,其中 2/3 的胆固醇来自胆汁,另外 1/3 来自于饮食。随后,游离的胆

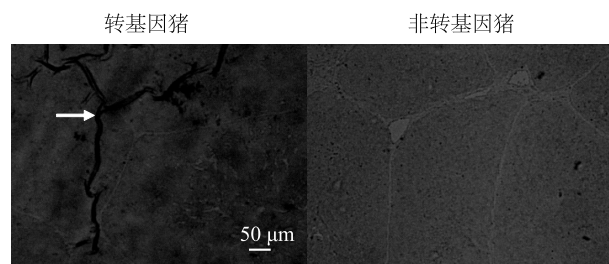


图 9 转基因和非转基因猪肝免疫组化结果($\times 100$)

Fig.9 Immunohistochemistry of transgenic and non-transgenic pigs ($\times 100$)

固醇从胶粒被转移到肠上皮细胞刷状缘膜表面,但游离胆固醇具体的转运机制仍然没有被阐释清楚。近年发现 NPC1L1 是肠道胆固醇吸收的关键转运蛋白,能够调节小肠细胞对胆固醇的吸收及肝细胞分泌到胆汁中的胆固醇浓度^[14]。研究证实,NPC1L1 是临床广泛使用的降脂药依泽替米贝的作用靶点^[15-18]。NPC1L1 的发现进一步揭示了体内胆固醇代谢尤其是肠胆固醇吸收的分子机制。深入研究结果表明,NPC1L1 在非酒精性脂肪肝、糖尿病及肥胖症等许多代谢性疾病中都起着关键作用。NPC1L1 位于肠上皮细胞的刷状缘膜上。人类和非人类灵长类动物,NPC1L1 表达于肝胆小管膜上,吸收胆汁中的胆固醇回流到肝脏,从而维持胆固醇动态平衡。NPC1L1 的体内分布具有物种差异性。在小鼠中,NPC1L1 主要表达于小肠中,肝脏表达极少。而在人类中,NPC1L1 在肝脏中表达最多,同时在小肠、胰腺、肾脏、肺和心脏中也有表达^[19-20]。虽然 NPC1L1 在脂代谢中发挥着重要作用,但是目前研究结果并没有阐明 NPC1L1 在与肝脏疾病密切相关的脂代谢紊乱中的作用及其分子机制。现有的研究结果表明,NPC1L1 与肝脂代谢紊乱存在某种必然联系,因此有必要构建 1 个 NPC1L1 转基因模型动物,阐明其在脂代谢中作用的分子机制,从而为由此引发的肝脏疾病找寻新的治疗途径。本研究利用体细胞核移植技术,将构建的肝特异性表达 *hNPC1L1* 的小型猪胎儿成纤维细胞作为核供体细胞,获得了肝特异性表达 *hNPC1L1* 转基因巴马小型猪,并对转基因巴马小型猪进行了基因组水平、转录水平和表达水平检测,同时对目的基因进行了免疫组化定位分析,结果显示,目的基因特异性地表达于肝组织,并且定位于肝小叶间胆管膜上,表明已成功获得了

hNPC1L1 转基因巴马小型猪,从而为更好地研究 NPC1L1 在肝脏脂代谢紊乱中的作用及机制提供了很好的模型动物。

参考文献:

- [1] JOHNSON T A, PFEFFER S R. Ezetimibe-sensitive cholesterol uptake by NPC1L1 protein does not require endocytosis[J]. Molecular Biology of the Cell, 2016, 27(11): 1845-1852.
- [2] PIRILLO A, L CATAPANO A, D NORATA G. Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) inhibition and cardiovascular diseases[J]. Current Medicinal Chemistry, 2016, 23(10): 983-999.
- [3] HE J, SHIN H, WEI X, et al. NPC1L1 knockout protects against colitis-associated tumorigenesis in mice[J]. BMC Cancer, 2015, 15: 189.
- [4] ALTMANN S W, DAVIS H R, ZHU L, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption[J]. Science, 2004, 303(5661): 1201-1204.
- [5] DAVIES J P, SCOTT C, OISHI K, et al. Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(13): 12710-12720.
- [6] DEUSHI M, NOMURA M, KAWAKAMI A, et al. Ezetimibe improves liver steatosis and insulin resistance in obese rat model of metabolic syndrome[J]. FEBS Letters, 2007, 581(29): 5664-5670.
- [7] HUGHES E A, TRACEY I, SINGHAL S, et al. Unexpected beneficial effect in the use of ezetimibe in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Medical Hypotheses, 2006, 67(6): 1463-1464.
- [8] LABONTÉ E D, CAMAROTA L M, ROJAS J C, et al. Reduced absorption of saturated fatty acids and resistance to diet-induced obesity and diabetes by ezetimibe-treated and *Npc1l1*^{-/-} mice[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2008, 295(4): G776-G783.
- [9] ASSY N, GROZOVSKI M, BERSUDSKY I, et al. Effect of insulin-sensitizing agents in combination with ezetimibe, and valsartan in rats with non-alcoholic fatty liver[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(27): 4369-4376.
- [10] JAKOBSEN J E, JOHANSEN M G, SCHMIDT M, et al. Generation of minipigs with targeted transgene insertion by recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) and somatic cell nuclear transfer (SCNT)[J]. Transgenic Research, 2013, 22(4): 709-723.
- [11] DE CECCO M, SPINACI M, ZANNONI A, et al. Coupling sperm mediated gene transfer and sperm sorting techniques: a new perspective for swine transgenesis[J]. Theriogenology, 2010, 74(5): 856-862.
- [12] SCOTT P A, DE CASTRO J P F, KAPLAN H J, et al. A Pro23His mutation alters prenatal rod photoreceptor morphology in a transgenic swine model of retinitis pigmentosa[J]. Investigative

- Ophthalmology & Visual Science, 2014, 55(4): 2452-2459.
- [13] WOLF E, BRAUN-REICHHART C, STRECKEL E, et al. Genetically engineered pig models for diabetes research[J]. Transgenic Research, 2014, 23(1): 27-38.
- [14] 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]. The Journal of Clinical Investigation, 2007, 117(7): 1968-1978.
- [15] FIELD F J, WATT K, MATHUR S N. Ezetimibe interferes with cholesterol trafficking from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum in CaCo-2 cells[J]. Journal of Lipid Research, 2007, 48(8): 1735-1745.
- [16] JAKULJ L, TRIP M D, SUDHOP T, et al. Inhibition of cholesterol absorption by the combination of dietary plant sterols and ezetimibe effects on plasma lipid levels[J]. Journal of Lipid Research, 2005, 46(12): 2692-2698.
- [17] BROWN W V. Cholesterol absorption inhibitors: defining new options in lipid management[J]. Clinical Cardiology, 2003, 26(6): 259-264.
- [18] AHMED M H, BYRNE C D. Ezetimibe as a potential treatment for non-alcoholic fatty liver disease: is the intestine a modulator of hepatic insulin sensitivity and hepatic fat accumulation? [J]. Drug Discovery Today, 2010, 15(15/16): 590-595.
- [19] YU L, BHARADWAJ S, BROWN J M, et al. Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(10): 6616-6624.
- [20] DAVIES J P, LEVY B, IOANNOU Y A. Evidence for a Niemann-Pick C (NPC) gene family: identification and characterization of NPC1L1[J]. Genomics, 2000, 65(2): 137-145.

(责任编辑:王 妮)