

# 卵黄脂磷蛋白通过网格蛋白介导的内吞作用 进入培养的人成纤维细胞

王晓蝶<sup>1#</sup> 武崇光<sup>1,2#</sup> 王文霞<sup>1</sup> 王瑜<sup>1</sup> 宋志学<sup>1</sup> 吉宁<sup>1</sup> 吴沛园<sup>1</sup> 王秀芳<sup>1\*</sup> 吕占军<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>河北医科大学河北省实验动物重点实验室, 遗传研究室, 石家庄 050017; <sup>2</sup>河北省邯郸市中心医院, 邯郸 056002)

**摘要** 为了探究从斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎裂解液中纯化的卵黄脂磷蛋白(lipovitellin, Lv)进入培养的人成纤维细胞的分子途径, 该研究用Sephadex G-200色谱柱结合QAE-Sephadex A50阴离子交换色谱柱从斑马鱼0 h胚胎裂解液中分离纯化出Lv。FITC标记的Lv(FITC-Lv)预先分别与Hepes、牛组蛋白、鱼精蛋白、卵磷脂、0 h胚胎胰蛋白酶水解物或者斑马鱼胚胎裂解液孵育, 再加入至opti-MEM培养基中培养人成纤维细胞, 培养一定时间后, 用荧光倒置显微镜观察, 发现Hepes和组蛋白可以促进Lv进入细胞。制霉菌素是陷窝介导的内吞作用(caveolae-mediated endocytosis)的抑制剂, 氯丙嗪和蔗糖是网格蛋白介导的内吞作用(clathrin-mediated endocytosis)的抑制剂, 阿米洛利是巨胞饮作用(macropinocytosis)的抑制剂。为了证实Lv进入细胞的分子途径, 在FITC标记Lv与人成纤维细胞的培养体系中, 分别加入上述抑制剂。结果发现氯丙嗪和蔗糖可以抑制Lv进入细胞。该研究获得如下结论: 纯化的斑马鱼Lv单独不能进入细胞, 在组蛋白的协同作用下, Lv通过网格蛋白介导的内吞作用进入细胞。该研究将为进一步研究Lv进入细胞发挥生物学功能奠定基础。

**关键词** 卵黄脂磷蛋白; 斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎; 组蛋白; 网格蛋白介导的内吞作用

## Lipovitellin Enters Cultured Human Fibroblasts through Clathrin-Mediated Endocytosis

WANG Xiaodie<sup>1#</sup>, WU Chongguang<sup>1,2#</sup>, WANG Wenxia<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, SONG Zhixue<sup>1</sup>, JI Ning<sup>1</sup>,  
WU Peiyuan<sup>1</sup>, WANG Xiufang<sup>1\*</sup>, LÜ Zhanjun<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Hebei Key Lab of Laboratory Animal, Department of Genetics, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

<sup>2</sup>Handan Central Hospital of Hebei Province, Handan 056002, China)

**Abstract** To demonstrate the molecular pathway by which Lv (lipovitellin) purified from zebrafish (*Danio rerio*) embryonic lysate enters cultured human fibroblasts, in this study, purified Lv was obtained from 0 h zebrafish embryo lysate using Sephadex G-200 column combined with QAE-Sephadex A50 anion exchange column. FITC-labeled Lv was pre-incubated with Hepes, calf histone, protamine, lecithin, embryonic trypsin hydrolysate or zebrafish embryo lysate. Next, the incubation mixture was added into human fibroblasts cultured using opti-MEM medium. After a certain period of culture, the inverted microscope was used to observe fluorescence intensity. The

收稿日期: 2023-05-18 接受日期: 2023-09-19

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81771499)和河北省自然科学基金面上项目(批准号: H2018206099、H2021206460)资助的课题

<sup>#</sup>共同第一作者

\*通讯作者。Tel: 15076110502, E-mail: wangxf1966@hebm.edu.cn; Tel: 13785198996, E-mail: ls1ab@hebm.edu.cn

Received: May 18, 2023 Accepted: September 19, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81771499), and the Natural Science Foundation of Hebei Province (Grant No.H2018206099, H2021206460)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

\*Corresponding authors. Tel: +86-15076110502, E-mail: wangxf1966@hebm.edu.cn; Tel: +86-13785198996, E-mail: ls1ab@hebm.edu.cn

results showed that Hepes and histone promoted the entry of Lv into cells. The nystatin is the inhibitors of caveolae-mediated endocytosis; chlorpromazine and sucrose are the inhibitors of clathrin-mediated endocytosis; amiloride is the inhibitor of macropinocytosis. To confirm the molecular pathway of Lv entry into cells, the above inhibitors were added to the culture systems of Lv and human fibroblasts, respectively. Chlorpromazine and sucrose were found to inhibit the entry of Lv into cells. It has been concluded that the purified zebrafish Lv alone could not enter cells. Under the synergic action of histone, Lv entered cells through clathrin-mediated endocytosis. This study will lay a foundation for further study of Lv entering cells to play biological functions.

**Keywords** lipovitellin; zebrafish (*Danio rerio*) embryo; histone; clathrin-mediated endocytosis

卵黄蛋白最终被水解为游离氨基酸, 为胚胎发育提供营养<sup>[1]</sup>。卵黄脂磷蛋白(lipovitellin, Lv)是一种载脂蛋白, 是卵黄蛋白原水解过程中产生的最大卵黄蛋白, 是一种帮助磷脂进入发育中的卵母细胞的载脂蛋白<sup>[2-3]</sup>。斑马鱼Lv非变性电泳的分子量为445 kDa, SDS-PAGE电泳后有3条带, 分别为117 kDa、102 kDa和23.8 kDa<sup>[4-5]</sup>。卵黄蛋白原及其衍生的Lv和卵黄高磷蛋白除了具有给胚胎发育提供营养的作用外<sup>[6-7]</sup>, 还具有抗氧化活性, 能够保护机体免受氧化应激的损伤<sup>[8]</sup>, 此外, 也参与鱼类胚胎免疫作用<sup>[9-10]</sup>, 抵抗细菌以及病毒的感染<sup>[11-13]</sup>。

据研究, 卵黄蛋白原受体是一种低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)受体, 在昆虫卵形成过程中, 卵黄蛋白原通过网格蛋白介导的内吞作用在滤泡细胞中转运<sup>[14]</sup>。在生理状态下蛋白质进入细胞的途径包括吞噬作用(phagocytosis)、胞饮作用(pinoctocytosis)和受体介导的内吞作用(receptor-mediated endocytosis)。LDL属于胆固醇携带蛋白, 研究发现其细胞表面存在LDL受体, LDL受体与LDL结合, 通过内吞机制, 包被凹陷进入细胞形成囊泡, 该研究产生了“受体介导内吞作用”的概念<sup>[15-16]</sup>。受体介导的内吞作用又分为: 网格蛋白介导的内吞作用(clathrin-mediated endocytosis)、陷窝介导的内吞作用(caveolae-mediated endocytosis), 以及不依赖于网格蛋白和陷窝介导的内吞作用(clathrin- and caveolae-independent endocytosis)<sup>[17-18]</sup>。制霉菌素是陷窝介导内吞作用的抑制剂<sup>[19]</sup>, 氯丙嗪和蔗糖为网格蛋白介导内吞作用的抑制剂<sup>[20]</sup>, 而阿米洛利是巨胞饮作用的抑制剂<sup>[21]</sup>。本研究的前期工作发现斑马鱼Lv有调节基因表达的作用, 但是Lv是否可以进入细胞以及如何进入细胞尚未见报道。本文首先从斑马鱼的胚胎裂解液中纯化出了Lv, 然后用培养的人成纤维细胞为模型, 证明了Lv进入细胞的途径是通过网格

蛋白介导的内吞作用。人细胞缺乏Lv, 但是本研究证明鱼Lv可以进入人成纤维细胞, 并发挥生物学作用。鱼Lv进入人成纤维细胞以及发挥生物学作用的物质基础, 一定不是为鱼Lv准备的, 推测人胚胎细胞存在与鱼Lv的同功成分。探讨这些同功成分对于认识人胚胎基因重编程发育过程有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 TU种斑马鱼来自南京尧顺禹生物科技有限公司。将16周龄的成年斑马鱼在流动系统中按雌雄分开饲养<sup>[22-23]</sup>。产卵时, 3尾雌鱼和3尾雄鱼被放置在一个交配盒中。交配盒包括一个塑料网盒和一个塑料盒。在光线照射下, 斑马鱼在塑料网上产卵, 卵落在网下以防被捕食。产卵30 min内收集的斑马鱼卵(胚胎)称为斑马鱼0 h胚胎。

1.1.2 细胞 人成纤维细胞来自河北医科大学第四医院包皮环切手术的患者, 取样本前患者已经签署知情同意书。本研究经河北医科大学第四医院医学伦理委员会的批准(批准号: (2020) BC0005)。人成纤维细胞在含10%胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的MEM培养基中, 于5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养。每次转染蛋白质前将细胞接种于24孔细胞培养板中, 在上述条件下培养过夜, 转染蛋白30 min前, 将培养基更换为MEM培养基或opti-MEM培养基(reduced serum medium)。

1.1.3 试剂药品及仪器 MEM培养基、opti-MEM培养基购自美国Gibco公司。胎牛血清购自美国ZETA™ Life公司。4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(Hepes)购自北京博奥拓科技有限公司。异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)购自南京都莱生物科技有限公司。硝酸纤维素薄膜购自美国Pall Life Science公司。小鼠抗斑马鱼Lv的抗体(一抗)由

本实验室制备, HRP-兔抗小鼠IgG抗体(二抗)购自北京索莱宝生物科技有限公司。DBA显色试剂盒购自武汉博士德生物科技有限公司。牛组蛋白、鱼精蛋白、卵磷脂、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自上海源叶生物科技有限公司。制霉菌素、蔗糖、盐酸氯丙嗪和阿米洛利购自天津永大化学试剂有限公司。Sephadex G-200葡聚糖凝胶和QAE-Sephadex A50阴离子交换葡聚糖凝胶为美国Pharmacia公司产品。UV-2800紫外分光光度计购自上海尤尼柯仪器有限公司。荧光倒置显微镜购自德国Leica公司。超声波破碎仪(VCX105PB)购自美国Sonics公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 制备斑马鱼0 h胚胎裂解液** 收集0 h斑马鱼胚胎, 加入胚胎缓冲液。胚胎缓冲液的配方为: 0.1 mol/L NaCl、0.5 mmol/L苯甲基磺酰氟(phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)、2 mmol/L二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、0.5 mmol/L乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)、10 mmol/L Tris-HCl(pH7.4)。然后用超声波细胞破碎仪粉碎胚胎。粉碎的胚胎在12 000 r/min室温离心5 min。上清即为胚胎裂解液。

**1.2.2 制备斑马鱼0 h胚胎胰蛋白酶水解物** 将胰蛋白酶加入2 mL胚胎裂解液中, 使胰蛋白酶的终浓度为1%。将混合物装入至截留分子量10 kDa、压平宽度25 mm的透析袋。透析袋用生理盐水在50 °C透析6 h。收集的透析外液装入至截留分子量0.5 kDa、压平宽度25 mm的透析袋, 透析袋外面加入蔗糖使透析袋内的液体浓缩(该步骤简称蔗糖浓缩), 即获得胰蛋白酶水解物。用分光光度计测量胰蛋白酶水解物 $D_{280}=30.0$ 。

**1.2.3 纯化卵黄脂磷蛋白(lipovitellin, Lv)** 按文献[24]报道的方法, 用分子筛加离子交换层析从胚胎裂解液中分离Lv。具体步骤如下: 用3倍柱体积的含10 mmol/L Tris-HCl和0.15 mol/L NaCl(pH7.4)的缓冲液, 平衡Sephadex G-200色谱柱(3.5 cm×62.0 cm)。7.5 mL胚胎裂解液(pH7.4)过Sephadex G-200柱。每管3 mL分部收集蛋白质洗脱液, 用紫外分光光度计监测蛋白质洗脱液的 $D_{280}$ 值, 将 $D_{280}$ 值处于第二峰的洗脱液混合, 共获得65 mL。用5倍柱体积的缓冲液平衡QAE-Sephadex A50阴离子交换色谱柱(1.8 cm×10.0 cm, 体积为25 mL)。将

65 mL Sephadex G-200第二峰洗脱液, 过平衡后的QAE-Sephadex A50柱。然后用1个柱体积的缓冲液对QAE-Sephadex A50柱进行洗脱, 再用1.5倍柱体积(37.5 mL)的含10 mmol/L Tris-HCl和0.4 mol/L NaCl(pH7.4)的缓冲液以0.5 mL/min的流速, 洗脱吸附蛋白, 可见蛋白吸附带向下移动。收集含有蛋白质的洗脱液, 共获得30 mL, 装入截留分子量0.5 kDa的透析袋, 用0.1 mol/L NaCl(pH7.0)在4 °C透析过夜, 蔗糖浓缩。非变性聚丙烯酰胺凝胶(Native-PAGE)电泳鉴定Lv的纯度: 用0.1 mol/L NaCl将纯化后的蛋白溶液和胚胎裂解液调至 $D_{280}=40.0$ , 分别在每个样本(每个样本的体积28  $\mu$ L)中加入4  $\mu$ L 50 mmol/L Tris-HCl(pH8.8)和8  $\mu$ L  $\beta$ 巯基乙醇-溴酚蓝-甘油, 然后各取5  $\mu$ L加入一个泳道, 进行7.5% Native-PAGE电泳。电泳后用考马斯亮蓝染色。

**1.2.4 蛋白质质谱分析** 用分子筛加离子交换层析从胚胎裂解液中分离Lv后, 为了鉴定纯化出的蛋白质为Lv, 我们将纯化的蛋白样本委托上海鹿明生物科技有限公司用Easy-nLC 1200高效液相色谱仪进行蛋白质成分分析。

**1.2.5 点印迹实验** 硝酸纤维素薄膜用转移缓冲液浸泡1 h。转移缓冲液含0.037%十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS, 分子量288.38)和50 mmol/L Tris-甘氨酸(pH8.3)。用滤纸将硝酸纤维素薄膜上的水分吸出。将纯化的蛋白样本(Lv)、雄性斑马鱼血清以及雌性斑马鱼血清分别用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)配制成1 mg/mL的溶液, 每个样品分别取2  $\mu$ L, 点样在硝酸纤维素薄膜上, 每个样本形成一个圆点。室温干燥固定至少1 h, PBST(0.02% Tween 20-PBS)洗3次, 用封闭液(0.2% BSA-0.02%  $\text{NaN}_3$ -PBS)室温封闭1 h, 1:500稀释的小鼠抗斑马鱼Lv的抗体(一抗)室温孵育1 h, PBST洗3次, 1:250稀释的HRP-兔抗小鼠IgG抗体(二抗)室温孵育1 h, PBST洗3次后, 用DBA显色试剂盒显色。

**1.2.6 FITC标记Lv或BSA** FITC与Lv或BSA在0.15 mol/L NaCl的溶液中, 以质量1:100的比例混合。用碳酸盐缓冲液调节混合物的pH值至9.5。混合物在摇床上室温摇2 h后, 放入透析袋中, 对着生理盐水, 在4 °C透析5次, 每次12 h, 以除去未标记的荧光素, 透析完成后, 即获得FITC标记的Lv(FITC-Lv)或FITC标记的BSA(FITC-BSA), 放置于-70 °C冻存。

**1.2.7 观察Lv是否可以进入细胞** 将人成纤维细



胞配成 $4 \times 10^5$ /mL, 24孔板每孔接种0.5 mL, 用10% FCS-MEM培养基培养过夜后, 将培养基更换为无血清的MEM或opti-MEM培养基, 37 °C培养30 min后, 每孔加50  $\mu$ L 16 mg/mL FITC-Lv或FITC-BSA。培养4、6、8、12、24 h后, 用PBS洗3次, 更换为新的10% FCS-MEM培养基, 于荧光显微镜下观察。

**1.2.8 Hepes对Lv进入细胞的影响** 将FITC-Lv或FITC-BSA与不同浓度的Hepes(0、20、40、80、160、320 mmol/L)等体积在生理盐水溶液中混合, 混合液体积为50  $\mu$ L, 其中FITC-Lv或FITC-BSA的浓度为16 mg/mL。室温孵育15~30 min。于24孔板中培养过夜的成纤维细胞(每孔 $2 \times 10^5$ 个细胞), 换成无血清opti-MEM培养基(每孔0.5 mL培养基), 37 °C培养30 min。将50  $\mu$ L Hepes与FITC-Lv或FITC-BSA的混合物加入培养成纤维细胞的一个24孔板的孔中, 37 °C培养24 h。用PBS洗3次, 更换为新的10% FCS-MEM培养基, 用荧光显微镜观察, 再用ImageJ软件(National Institutes of Health, USA)测量细胞的荧光强度值, 取3次独立实验的平均值。

**1.2.9 牛组蛋白对Lv进入细胞的影响** 将人成纤维细胞置于24孔板中, 每孔 $2 \times 10^5$ 个细胞, 10% FCS-MEM培养基培养过夜, 更换为无血清的opti-MEM培养基。4  $\mu$ L 2  $\mu$ g/ $\mu$ L牛组蛋白、4  $\mu$ L 2  $\mu$ g/ $\mu$ L鱼精蛋白、8  $\mu$ L 60  $\mu$ g/ $\mu$ L卵磷脂、8  $\mu$ L  $D_{280}=30.0$ 的胰蛋白酶水解物、8  $\mu$ L  $D_{280}=30.0$ 胚胎裂解液, 分别与8  $\mu$ L 100  $\mu$ g/ $\mu$ L FITC-Lv混合, 用生理盐水补足至50  $\mu$ L, FITC-Lv终浓度为16 mg/mL, 在室温孵育30 min。不同物质与FITC-Lv孵育混合物, 加入培养人成纤维细胞的一个孔中, 继续培养4 h后, 用PBS洗3次, 更换为新的10% FCS-MEM培养基, 用荧光显微镜观察细胞的荧光强度, 用ImageJ软件测量细胞的荧光强度值, 取3次独立实验的平均值。

**1.2.10 牛组蛋白浓度及培养时间对Lv进入细胞的影响** 将人成纤维细胞用10% FCS-MEM培养基在24孔板中培养过夜, 更换为无血清的opti-MEM培养基。2、0.2、0.02、0.002  $\mu$ g/ $\mu$ L牛组蛋白各取4  $\mu$ L, 再分别与100  $\mu$ g/ $\mu$ L FITC-Lv 8  $\mu$ L混合, 用生理盐水补足至50  $\mu$ L, 在室温孵育30 min。其中FITC-Lv与牛组蛋白的质量比分别为100:1、1 000:1、10 000:1和100 000:1。分别加入培养人成纤维细胞的一个孔中, 继续培养2、4和6 h后, 用PBS洗3次, 更换为新的10% FCS-MEM培养基, 用荧光显微镜观察细胞的荧

光强度, 用ImageJ软件测量细胞的荧光强度值, 取3次独立实验的平均值。

**1.2.11 不同抑制剂对Lv进入细胞的影响** 将人成纤维细胞在加入不同抑制剂(制霉菌素、蔗糖、阿米洛利或氯丙嗪)的opti-MEM培养基中, 37 °C培养30 min。在培养基中制霉菌素的终浓度为9  $\mu$ g/mL, 蔗糖的终浓度为20 mmol/L, 阿米洛利的终浓度为150  $\mu$ mol/L, 氯丙嗪的终浓度为1  $\mu$ g/mL。然后Lv和牛组蛋白按照1 000:1的比例, 在37 °C孵育15~30 min后, 与人成纤维细胞共培养4 h, 用PBS洗3次, 更换为新鲜的10% FCS-MEM培养基, 用荧光显微镜观察细胞的荧光强度, 用ImageJ软件测量细胞的荧光强度值, 取3次独立实验的平均值。

**1.2.12 统计学分析** 采用IBM SPSS Statistics 24.0软件(IBM Corp. Armonk, New York)进行统计学分析, 采用*t*检验进行比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 Lv纯化的结果

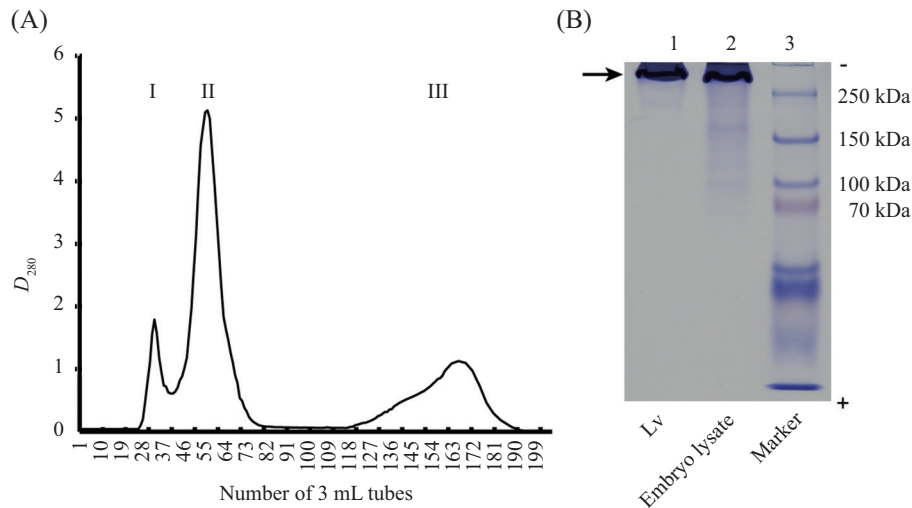
图1A显示Sephadex G200凝胶层析液的 $D_{280}$ 值呈现三个峰。Lv位于第二峰的洗脱液中, 将第二峰洗脱液过QAE-Sephadex A50阴离子交换层析柱, 蔗糖浓缩后, 7.5% Native-PAGE电泳检测, 结果见图1B, 显示纯化后的蛋白呈1条带(泳道1), 泳道2显示胚胎裂解液呈现一条主要的条带, 与Lv占胚胎裂解液蛋白质含量的95%以上, 分子量大约为445 kDa的报道一致<sup>[4]</sup>。

### 2.2 质谱分析和点印迹实验证明了分离出的蛋白质属于Lv

将纯化出的蛋白质样本进行质谱分析, 虽然质谱仪分析出样本中有多种成分, 但是Lv在样本中的含量高达99.22%。图2是点印迹实验的结果, 图2A显示在纯化的蛋白质样本中检测到了Lv, 图2C显示在雌性斑马鱼血清中也检测到了Lv的存在, 而图2B显示在雄性斑马鱼的血清中没有检测到Lv的存在。

### 2.3 观察Lv是否可以进入培养的人成纤维细胞

FITC-Lv或FITC-BSA与成纤维细胞共培养4、6、8、12和24 h后观察结果显示, 无论使用MEM培养基, 还是opti-MEM培养基, Lv均不能进入细胞。对照BSA蛋白也不能进入细胞。该结果的部分数据

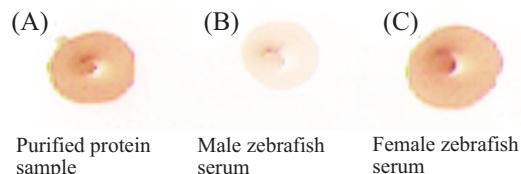


A: Sephadex G200凝胶色谱法3 mL分部收集洗脱液的 $D_{280}$ 值。I、II、III分别代表 $D_{280}$ 值的三个峰。B: 7.5% Native-PAGE电泳结果。泳道1: 纯化出的蛋白仅显示一条带。泳道2: 胚胎裂解液显示出不同的带, 其中主要为Lv(箭头所示)。泳道3: 蛋白分子量标准。

A: the  $D_{280}$  values of the eluent were collected by Sephadex G200 gel chromatography in 3 mL sections. I, II, and III represent the three peaks of  $D_{280}$  values, respectively. B: the results of 7.5% Native-PAGE electrophoresis. Lane 1: the purified protein shows only one band. Lane 2: the embryonic lysate shows different bands, the main of which are Lv (indicated by the arrow). Lane 3: protein marker.

图1 从胚胎裂解液中纯化Lv

Fig.1 Lv was purified from embryo lysate



A: 纯化蛋白质的点印迹实验结果, 检测到了Lv的存在。B: 雄性斑马鱼血清的点印迹结果, 没有检测到Lv。C: 雌性斑马鱼血清的点印迹实验结果, 检测到了Lv的存在。

A: dot blotting results of purified proteins showed the presence of Lv. B: dot blotting results of male zebrafish serum showed no Lv detected. C: dot blotting results of female zebrafish serum showed the presence of Lv.

图2 点印迹实验证明了从胚胎裂解液中纯化的蛋白质属于Lv

Fig.2 Dot blotting proved that the protein purified from the embryo lysate belonged to Lv

作为实验的阴性对照。

## 2.4 Hepes可以促进Lv和BSA进入细胞

Hepes是一种常用的蛋白质转染试剂, 能够促进蛋白质进入细胞<sup>[25]</sup>。图3A显示当培养基中没有Hepes时, 在成纤维细胞中没有观察到荧光, 而随着Hepes浓度的上升, 进入细胞的FITC-Lv的量上升, 其中160和320 mmol/L Hepes较好地促进Lv进入细胞的作用(160 mmol/L vs 0 mmol/L Hepes,  $t=15.44$ ; 320 mmol/L vs 0 mmol/L Hepes,  $t=13.70$ ,  $P<0.05$ )。图3B显示当160 mmol/L Hepes存在时, 用MEM培养基以及opti-MEM培养基均可以使Lv有效进入细胞; 同时也可以有效促进BSA进入细胞。图3B显示当160 mmol/L Hepes存在时, 各组的荧光强度值显

著高于Hepes不存在组(FITC-Lv+MEM组比较,  $t$ 值分别为13.66、10.50; 与FITC-Lv+opti-MEM组比较,  $t$ 值分别为20.58、1.78,  $P<0.05$ )。这些结果显示Hepes可以促进Lv和BSA进入细胞, 没有蛋白质类型特异性。

## 2.5 牛组蛋白有效促进Lv进入细胞

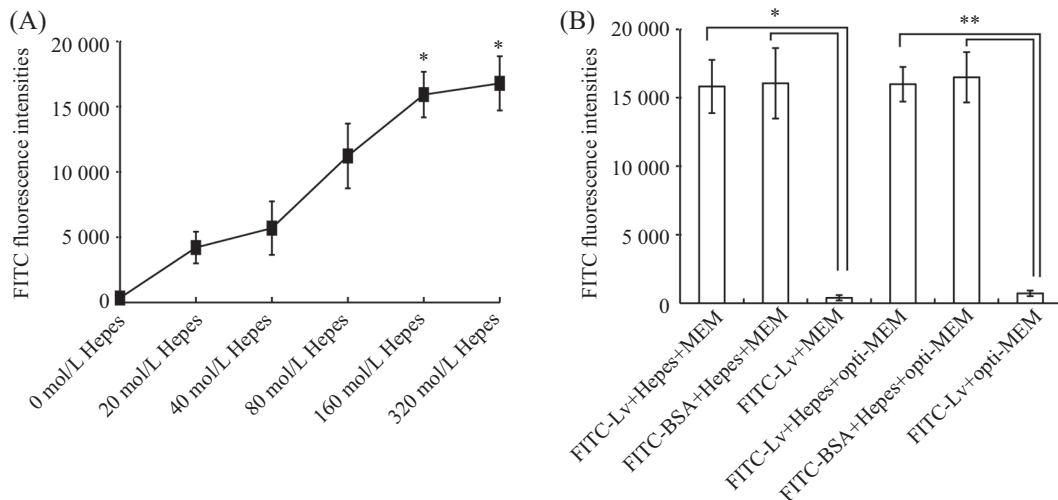
为了证实在早期胚胎中存在促进Lv进入细胞的物质这一假设, 本研究将与早期胚胎相关的物质, 包括卵磷脂、鱼精蛋白、牛组蛋白、胚胎胰蛋白酶水解物或胚胎裂解液与FITC-Lv孵育后, 再与成纤维细胞在opti-MEM培养基中共培养4 h。图4显示牛组蛋白(第4条柱子)显著地促进了Lv进入细胞, 而实验的其他物质, 没有促进Lv进入细胞的作用(牛组蛋白

组与其他各组比较,  $t$ 值分别为12.91、12.92、12.44、12.91、12.74,  $P < 0.05$ )。用FITC标记胚胎裂解液, 与成纤维细胞共培养, 显示胚胎裂解液中的Lv可以进入细胞, 本实验中将纯化的FITC-Lv与少量胚胎裂解液混合, 胚胎裂解不能促进纯化的Lv进入细胞, 这可能是因为胚胎裂解液所提供的组蛋白含量少或者因

为胚胎裂解液中的组蛋白已经与其他的伴侣分子形成稳定结合的缘故。

### 2.6 Lv(或BSA)与牛组蛋白比例对其进入细胞的影响

进一步探讨了牛组蛋白浓度对其辅助Lv(或BSA)进入细胞的影响。图5A~图5D显示当FITC-Lv

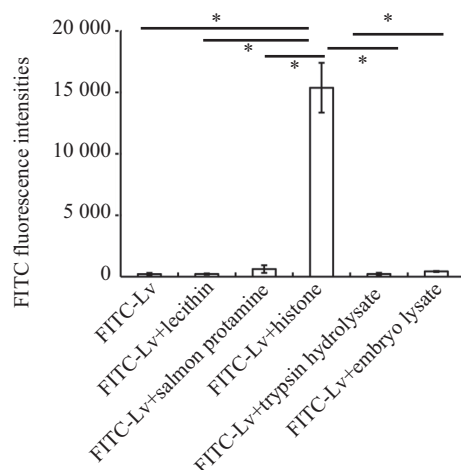


A: 随着Hepes浓度的上升FITC-Lv进入细胞的量上升, 结果为3次独立实验的均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ ),  $n=3$ ,  $*P < 0.05$ , 与0 mmol/L Hepes组比较。B: 160 mmol/L Hepes既可以有效促进FITC-Lv进入细胞也可以有效促进FITC-BSA进入细胞。结果为3次独立实验的均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ ),  $n=3$ ,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 。Hepes: 160 mmol/L Hepes。

A: the amount of FITC-Lv entering cells increased with the increase of Hepes concentration. The result is the  $\bar{x} \pm s$  of the three independent experiments,  $n=3$ .  $*P < 0.05$  vs 0 mmol/L Hepes group. B: 160 mmol/L Hepes can effectively promote both FITC-Lv and FITC-BSA into cells. The result is the  $\bar{x} \pm s$  of the three independent experiments,  $n=3$ .  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ . Hepes: 160 mmol/L Hepes.

图3 Hepes有效促进Lv和BSA进入细胞

Fig.3 Hepes effectively promoted the entry of Lv and BSA into cells



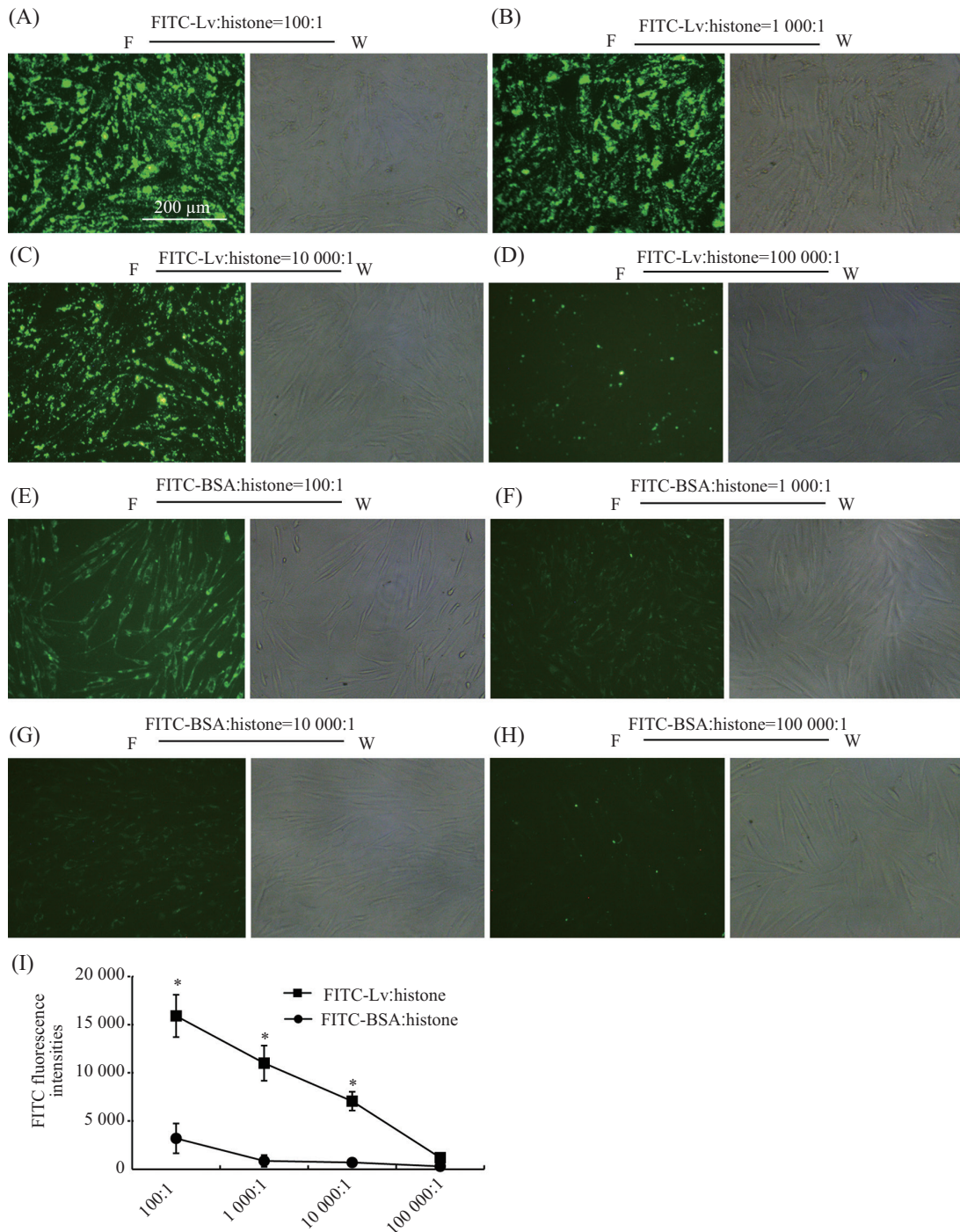
ImageJ软件测量的各组细胞的荧光强度值。FITC-Lv分别与卵磷脂、鱼精蛋白、牛组蛋白、胚胎胰蛋白酶水解物及胚胎裂解液共同孵育。结果为3次独立实验的均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ ),  $n=3$ ,  $*P < 0.05$ 。

The fluorescence intensity values of each group of cells measured by the ImageJ software. FITC-Lv was incubated with lecithin, salmon protamine, bovine histone, embryonic trypsin hydrolysate and embryo lysate, respectively. The result is the  $\bar{x} \pm s$  of the three independent experiments,  $n=3$ .  $*P < 0.05$ .

图4 牛组蛋白有效促进Lv进入细胞

Fig.4 Histone effectively promoted the entry of Lv into cells



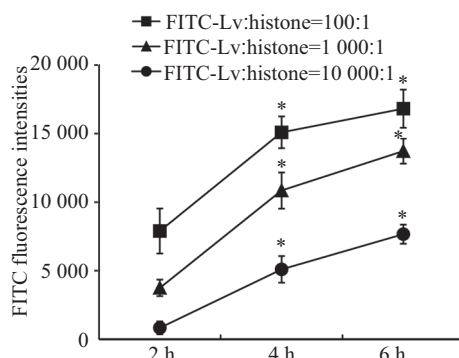


A: FITC-Lv和牛组蛋白质量比为100:1时, Lv可以有效进入细胞。B: FITC-Lv和牛组蛋白质量比为1 000:1时, Lv也可以较好地进入细胞。C: FITC-Lv和牛组蛋白质量比为10 000:1时, Lv也可以进入细胞。D: FITC-Lv和牛组蛋白质量比为100 000:1时, 仅少量Lv进入细胞。E: FITC-BSA与牛组蛋白质量比为100:1时, 一些BSA可以进入细胞。F~H: FITC-BSA和牛组蛋白质量比为1 000:1, 10 000:1, 100 000:1时, BSA均不能进入细胞。F: 荧光; W: 白光。I: ImageJ软件测量图A~H组的荧光强度值。结果为3次独立实验的均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ ),  $n=3$ 。\* $P<0.05$ , 与相应的FITC-BSA:histone组比较。

A: when the mass ratio of FITC-Lv and bovine histone is 100:1, Lv can efficiently enter the cells. B: when the mass ratio of FITC-Lv and bovine histone is 1 000:1, Lv can also enter the cells. C: Lv can also enter cells when the mass ratio of FITC-Lv and bovine histone is 10 000:1. D: when the mass ratio of FITC-Lv and bovine histone is 100 000:1, only a small amount of Lv enter the cells. E: when the mass ratio of FITC-BSA and bovine is 100:1, some BSA can enter the cells. F-H: when the FITC-BSA and bovine histone mass ratios are 1 000:1, 10 000:1, 100 000:1, BSA cannot enter the cells. F: fluorescence; W: white light. I: the ImageJ software was used to measure the fluorescence intensity values of groups A-H. The result is the  $\bar{x}\pm s$  of the three independent experiments,  $n=3$ . \* $P<0.05$  vs the corresponding FITC-BSA:histone group.

图5 FITC-Lv(或FITC-BSA)与牛组蛋白比例对其进入细胞的影响

Fig.5 Effect of the ratio of FITC-Lv (or FITC-BSA) to calf histone on their entry into cells



ImageJ软件测量各组的荧光强度值。结果为3次独立实验的均值±标准差( $\bar{x}\pm s$ ),  $n=3$ 。\* $P<0.05$ , 与相应的2 h组比较。

The ImageJ software was used to measure the fluorescence intensity values of each group. The result is the  $\bar{x}\pm s$  of the three independent experiments,  $n=3$ . \* $P<0.05$  vs the corresponding 2 h group.

图6 培养时间对牛组蛋白促进FITC-Lv进入细胞的影响

Fig.6 Effect of culture time on histone promoting FITC-Lv entry into cells

与牛组蛋白比例为100:1、1 000:1、10 000:1、100 000:1时, Lv进入细胞的量依次减弱, 100 000:1时仍有少量Lv进入细胞。图5E~图5H显示FITC-BSA与牛组蛋白的比例为100:1时, 有若干BSA进入细胞, 其他比例时BSA均不能进入细胞。用ImageJ测量各组的荧光强度值, 取3次独立实验的平均值。图5I显示在相同浓度牛组蛋白存在时, Lv组的细胞荧光强度显著高于BSA组(比例为100:1、1 000:1和10 000:1时, FITC-Lv组与FITC-BSA组比较,  $t$ 值分别为8.194、9.129、10.49,  $P<0.05$ )。牛组蛋白促进Lv进入细胞的效果显著好于BSA, 说明牛组蛋白促进Lv进入细胞具有一定特异性。

### 2.7 培养时间对牛组蛋白促进Lv进入细胞的影响

图6显示随着培养时间的延长, 各组FITC-Lv进入细胞的量均增加(FITC-Lv与牛组蛋白质量比为100:1时, 培养4 h、6 h分别与培养2 h进行比较,  $t$ 值分别为6.199、7.170; FITC-Lv与牛组蛋白质量比为1 000:1时, 培养4 h、6 h分别与培养2 h进行比较,  $t$ 值分别为8.471、15.74; FITC-Lv与牛组蛋白质量比为10 000:1时, 培养4 h、6 h与培养2 h进行比较,  $t$ 值分别为6.829、14.12,  $P<0.05$ ), FITC-Lv与组蛋白比例为100:1时, 共培养4 h时荧光强度接近平台值; 随着组蛋白所占比例的下降, FITC-Lv进入细胞的量显著减少。

### 2.8 不同抑制剂证明了Lv通过网格蛋白介导的内吞作用进入细胞

图7A显示在FITC-Lv与组蛋白比例为1 000:1时, Lv较好地进入了细胞。图7B显示制霉菌素没有抑制Lv进入细胞, 这说明Lv不是通过陷窝介导的内

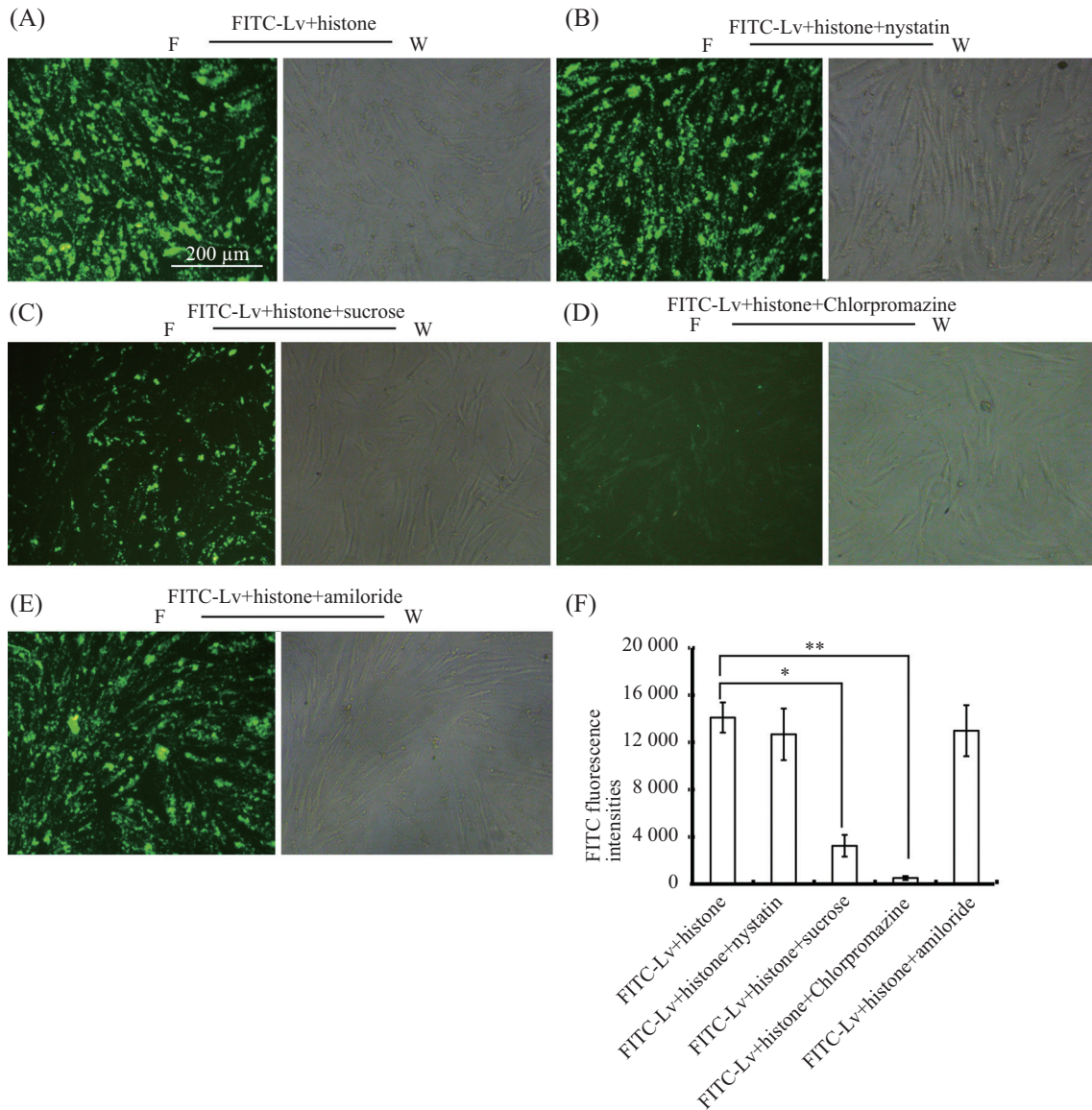
吞作用进入细胞。图7E显示阿米洛利没有抑制Lv进入细胞, 这说明Lv不是通过胞饮作用进入细胞。图7C显示在蔗糖存在时, Lv进入细胞的量显著低于Lv+牛组蛋白组, 说明蔗糖抑制了Lv进入细胞; 图7D显示氯丙嗪显著抑制了Lv进入细胞。因此, 我们推测Lv进入细胞的途径可能是通过网格蛋白介导的内吞作用。用ImageJ测量各组细胞的荧光强度值, 取3次独立实验的平均值。图7F显示蔗糖组以及氯丙嗪组的荧光强度值显著低于FITC-Lv+组蛋白组( $t$ 值分别为11.95、18.28,  $P<0.05$ )。

## 3 讨论

本研究首先用Sephadex G-200分子筛柱结合QAE-Sephadex A50阴离子交换柱, 从斑马鱼0 h胚胎裂解液中分离纯化出Lv。Native-PAGE电泳考马斯亮蓝染色显示纯化的蛋白质样本为单一条带, 说明纯化蛋白质的分子量以及所带电荷均一; 纯化的蛋白质样本用质谱分析显示Lv占99.22%; 免疫点印迹实验显示纯化的蛋白质样本以及雌性斑马鱼血清中检测到了Lv的存在, 而雄性斑马鱼血清中Lv显示阴性, Lv属于卵黄蛋白原的主要成分, 卵黄蛋白原由雌鱼肝脏产生, 进入血液被卵细胞摄取, 因此用免疫点印迹方法可以在雌性斑马鱼血清中检测到Lv。以上三组实验的结果证实了本文纯化的蛋白质属于Lv。

本研究室的前期工作用FITC标记0 h斑马鱼胚胎裂解液, 加入培养的人成纤维细胞中, 发现胚胎裂解液中的Lv可以进入细胞; RNA-seq发现Lv进入细胞后影响多个基因的表达水平; 体外染色质重组





A: FITC-Lv和牛组蛋白质量比为1 000:1时, Lv有效进入细胞。B: 制霉菌素没有抑制Lv进入细胞。C: 蔗糖抑制了Lv进入细胞。D: 氯丙嗪抑制了Lv进入细胞。E: 阿米洛利没有抑制Lv进入细胞。F: 荧光; W: 白光。F: ImageJ测量A~E组的荧光强度值。结果为3次独立实验的均值±标准差( $\bar{x}\pm s$ ),  $n=3$ , \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

A: when the mass ratio of FITC-Lv and bovine histone is 1 000:1, Lv effectively enters the cell. B: nystatin does not inhibit Lv entry into cells. C: sucrose inhibits Lv entry into cells. D: chlorpromazine inhibits Lv entry into cells. E: amiloride does not inhibit Lv entry into cells. F: fluorescence; W: white light. F: ImageJ was used to measure the fluorescence intensity values in groups A-E. The result is the  $\bar{x}\pm s$  of the three independent experiments,  $n=3$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

图7 不同抑制剂证明了Lv通过网格蛋白介导的内吞的方式进入细胞

Fig.7 Different inhibitors demonstrated that Lv entered the cell by clathrin-mediated endocytosis

实验证明Lv与基因组中长散布核元件1(long interspersed nuclear element 1, *LINE-1*)高亲和, 促进*LINE-1*相关基因的活化(尚未发表)。据研究, 用去黄斑马鱼胚胎做SDS-PAGE电泳实验, 发现高囊胚期(3.5 h)仍然存在多量卵黄蛋白, 提示卵黄蛋白可以进入胚胎细胞<sup>[26]</sup>。较多研究证明了卵黄蛋白原进入卵细胞的机制是通过受体介导的内吞作用<sup>[14,27]</sup>, 但是卵黄

蛋白是否进入其他细胞及其机制尚未见报道。

本研究发现从斑马鱼胚胎裂解液中纯化的Lv, 在没有使用蛋白转染试剂以及其他辅助因子时, 不能进入培养的人成纤维性细胞。Hepes是一种弱酸, 能促进蛋白质转染到哺乳动物细胞<sup>[28]</sup>。当Hepes与FITC-Lv预先混合, 再与细胞共培养时, 发现160 mmol/L的Hepes可以有效地促进Lv以及BSA进入细胞(图3), 说

明通过使用 HEPES 转染试剂可以将 Lv 转染进入人成纤维细胞。据研究, 在斑马鱼的早期胚胎细胞中可以检测到卵黄蛋白<sup>[29]</sup>。我们认为存在两种可能, 一种是在斑马鱼胚胎细胞与卵黄囊相通时卵黄蛋白进入细胞; 另一种可能是胚胎细胞形成完整细胞膜后, 卵黄蛋白仍可以进入细胞。如果是后者, 推测早期胚胎存在促进 Lv 进入细胞的机制。为了进一步探讨 0 h 斑马鱼胚胎裂解液中何种成分促进 Lv 进入细胞, 本研究使用 5 种与胚胎相关的物质, 分别为卵磷脂、牛组蛋白、鱼精蛋白、胚胎胰蛋白酶水解物以及斑马鱼胚胎裂解液。卵磷脂广泛存在于胚胎中, 占鱼类胚胎干物质的 5% 左右<sup>[30]</sup>。斑马鱼早期胚胎中含有丰富的组蛋白, 其含量可以包装大约 3 000 个基因组<sup>[31]</sup>。组蛋白在进化上有较强的保守性, 酵母、鱼类、人类的组蛋白的氨基酸序列十分类似, 包装 DNA 均形成核小体样结构<sup>[32]</sup>。鱼精蛋白是一种碱性蛋白, 在某些物种代替组蛋白包装精子的 DNA<sup>[31]</sup>, 精子进入卵细胞后精蛋白逐渐被组蛋白取代。本文中用牛组蛋白代替斑马鱼组蛋白, 发现牛组蛋白可以有效辅助 Lv 进入细胞。所使用的其他 4 种胚胎相关物质不能辅助 Lv 进入细胞(图 4)。改变 Lv 与牛组蛋白的质量比, 发现随着牛组蛋白所占比例的下降, Lv 进入细胞的量下降, Lv 与牛组蛋白的质量比为 1 000:1, Lv 可以较好地进入细胞(图 5), 10 000:1 时, Lv 也可以进入细胞, 经过测算在生理状态下, Lv 与组蛋白在卵细胞中的质量比大约为 10 000:1<sup>[33]</sup>。当 BSA 与牛组蛋白的质量比为 100:1 时, 可以使 BSA 一定程度地进入细胞, 但是 BSA 进入细胞的量显著低于相应条件下的 Lv。当 BSA 与牛组蛋白的质量比为 1 000:1 时, BSA 几乎不能进入细胞, 而该比例下的 Lv 仍能较好地进入细胞, 可见牛组蛋白可以特异性地协助 Lv 进入细胞。组蛋白是一种碱性蛋白, 有协助 DNA 转染进入细胞的作用<sup>[34]</sup>。本文首次发现组蛋白可以特异性地协助 Lv 进入细胞, 说明在胚胎发育过程中 Lv 与组蛋白相互作用调节 Lv 和组蛋白进入胚胎细胞。

生理状态下蛋白质进入细胞的途径有吞噬作用、胞饮作用及受体介导的内吞作用。在吞噬作用中, 细胞的质膜包裹着一个大分子(大的固体颗粒大于 0.5  $\mu\text{m}$ ), 甚至从细胞外环境中分离出整个细胞, 并在细胞内产生吞噬体<sup>[35]</sup>。细胞胞饮是指细胞通过挤压并形成比吞噬体(0.5~5.0  $\mu\text{m}$ ) 小的囊泡来吸收液体和营养物质<sup>[36]</sup>。吞噬作用和胞饮作用都是非选择

性的分子吸收方式。然而, 有时细胞需要特定的分子, 通过受体介导的内吞作用过程更有效地吸收。特定受体的内吞作用包括网格蛋白介导的内吞、陷窝介导的内吞以及不依赖于网格蛋白和陷窝介导的内吞途径<sup>[37]</sup>。本研究用 3 类具有代表性的抑制剂, 分别是陷窝介导内吞作用的抑制剂制霉菌素<sup>[19]</sup>、网格蛋白介导内吞作用的抑制剂氯丙嗪和蔗糖<sup>[20]</sup>以及巨胞饮作用抑制剂阿米洛利<sup>[21]</sup>。本研究的结果显示制霉菌素以及阿米洛利没有抑制 Lv 进入细胞, 而氯丙嗪以及蔗糖显著抑制了 Lv 进入细胞, 这些结果说明 Lv 进入培养的人成纤维细胞的途径是通过网格蛋白介导的内吞作用。卵黄蛋白有营养和参与胚胎免疫功能的作用, 本研究结果说明了大分子卵黄蛋白原的分解物 Lv 在组蛋白作用下可以进入除了卵细胞以外的体细胞, 为进一步研究 Lv 进入细胞发挥何种生物学作用奠定了基础。

#### 4 结论及进一步研究设想

本文首先从斑马鱼的胚胎裂解液中纯化出了 Lv, 然后用培养的人成纤维细胞为模型, 证明了 Lv 进入细胞的途径是通过网格蛋白介导的内吞作用来实现的。本研究的其他研究工作初步证明了 Lv 进入人成纤维细胞后, 可以调节多种基因的表达水平。由于人体细胞缺乏 Lv, 于是本研究证明鱼 Lv 可以进入人成纤维细胞, 并发挥生物学作用, 进一步的工作将探讨人体细胞中是否存在与 Lv 具有相同功能的成分。

#### 参考文献 (References)

- [1] YILMAZ O, PATINOTE A, NGUYEN T, et al. Multiple vitellogenins in zebrafish (*Danio rerio*): quantitative inventory of genes, transcripts and proteins, and relation to egg quality [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2018, 44(6): 1509-25.
- [2] JESSUS C, MUNRO C, HOULISTON E. Managing the oocyte meiotic arrest-lessons from frogs and jellyfish [J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1150.
- [3] YILMAZ O, PRAT F, IBÁÑEZ A J, et al. Multiple vitellogenin yolk precursors in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 2013, 78(4): 505-8.
- [4] WANG J, ZHANG X, SHAN R, et al. Lipovitellin as an antigen to improve the precision of sandwich ELISA for quantifying zebrafish (*Danio rerio*) vitellogenin [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2016, 185/86: 87-93.
- [5] YI X, LI C, ZHONG X, et al. Development of a lipovitellin-based sandwich ELISA for determination of vitellogenin in the marine medaka *Oryzias melastigma* [J]. *Chemosphere*, 2018, 197: 477-84.

- [6] ZHANG S, DONG Y, CUI P. Vitellogenin is an immunocompetent molecule for mother and offspring in fish [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 46(2): 710-5.
- [7] YILMAZ O, PATINOTE A, NGUYEN T, et al. Genome editing reveals reproductive and developmental dependencies on specific types of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Mol Reprod Dev*, 2019, 86(9): 1168-88.
- [8] LEIPART V, HALSKAU Ø, AMDAM G V. How honey bee vitellogenin holds lipid cargo: a role for the C-terminal [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 865194.
- [9] LIANG X, HU Y, FENG S, et al. Heavy chain (LvH) and light chain (LvL) of lipovitellin (Lv) of zebrafish can both bind to bacteria and enhance phagocytosis [J]. *Dev Comp Immunol*, 2016, 63: 47-55.
- [10] HU L, SUN C, LUAN J, et al. Zebrafish phosvitin is an antioxidant with non-cytotoxic activity [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2015, 47(5): 349-54.
- [11] TSUTSUI S, SATO M, MIYASHITA M, et al. Vitellogenin-derived fragment in embryos of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* with binding and bactericidal activities against an infectious bacterium via an interaction with saccharides [J]. *Mol Immunol*, 2022, 142: 76-82.
- [12] WRENSCH F, CROUCHET E, LIGAT G, et al. Hepatitis C virus (HCV)-apolipoprotein interactions and immune evasion and their impact on HCV vaccine design [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1436.
- [13] MEDINA-GALI R, BELLÓ-PÉREZ M, CIORDIA S, et al. Plasma proteomic analysis of zebrafish following spring viremia of carp virus infection [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 86: 892-9.
- [14] DOHANIK V T, GONÇALVES W G, OLIVEIRA L L, et al. Vitellogenin transcytosis in follicular cells of the honeybee *Apis mellifera* and the wasp *Polistes simillimus* [J]. *Protoplasma*, 2018, 255(6): 1703-12.
- [15] BROWN M S, GOLDSTEIN J L. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(7): 3330-7.
- [16] GOLDSTEIN J L, BROWN M S. The LDL receptor [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(4): 431-8.
- [17] OBA M, TANAKA M. Intracellular internalization mechanism of protein transfection reagents [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(7): 1064-8.
- [18] KHAN I, STEEG P S. Endocytosis: a pivotal pathway for regulating metastasis [J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(1): 66-75.
- [19] DING Y, ZHANG R, LI B, et al. Tissue distribution of polystyrene nanoplastics in mice and their entry, transport, and cytotoxicity to GES-1 cells [J]. *Environ Pollut*, 2021, 80: 116974.
- [20] CHEN H, YU F, XU J, et al. Channel catfish virus entry into host cells via clathrin-mediated endocytosis [J]. *Virus Res*, 2022, 315: 198794.
- [21] KOIVUSALO M, WELCH C, HAYASHI H, et al. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling [J]. *J Cell Biol*, 2010, 188(4): 547-63.
- [22] DONG M, DING Y, LIU Y, et al. Molecular insights of 2,6-dichlorobenzoquinone-induced cytotoxicity in zebrafish embryo: activation of ROS-mediated cell cycle arrest and apoptosis [J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(3): 694-700.
- [23] DANG Y, WANG F, LIU C. Real-time PCR array to study the effects of chemicals on the growth hormone/insulin-like growth factors (GH/IGFs) axis of zebrafish embryos/larvae [J]. *Chemosphere*, 2018, 207: 365-76.
- [24] 张年国, 张颖, 曲秋芝, 等. 施氏鲟卵黄蛋白的分离纯化及其性质[J]. *中国水产科学*(ZHANG N G, ZHANG Y, QU Q Z, et al. Purification and properties of vitellin from Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(2): 309-14.
- [25] CHEN S H, CHAO A, TSAI C L, et al. Utilization of HEPES for enhancing protein transfection into mammalian cells [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018, 13: 99-111.
- [26] ROBERSON M M, BARONDES S H. *Xenopus laevis* lectin is localized at several sites in *Xenopus* oocytes, eggs, and embryos [J]. *J Cell Biol*, 1983, 97(6): 1875-81.
- [27] HUSAIN M, RASOOL K G, TUFAIL M, et al. Molecular characterization, expression pattern and RNAi-mediated silencing of vitellogenin receptor gene in almond moth, *Cadra cautella* [J]. *Insect Mol Biol*, 2020, 29(4): 417-30.
- [28] CHEN S H, CHAO A, TSAI C L, et al. Utilization of Hepes for enhancing protein transfection into mammalian cells [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018, 13: 99-111.
- [29] PURUSHOTHAMAN K, DAS P P, PRESSLAUER C, et al. Proteomics analysis of early developmental stages of zebrafish embryos [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6359.
- [30] WEI J, ZHAO X, WANG S, et al. Determination of related substances in egg yolk lecithin by HPLC-CAD and characterization of its profiling by HPLC-Q-TOF-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 21: 115079.
- [31] JOSEPH S R, PÁLFY M, HILBERT L, et al. Competition between histone and transcription factor binding regulates the onset of transcription in zebrafish embryos [J]. *eLife*, 2017, 6: e23326.
- [32] MILLÁN-ZAMBRANO G, BURTON A, BANNISTER A J, et al. Histone post-translational modifications: cause and consequence of genome function [J]. *Nat Rev Genet*, 2022, 23(9): 563-80.
- [33] JODAR M, OLIVA R. Protamine alterations in human spermatozoa [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 791: 83-102.
- [34] HAN H, YANG J, CHEN W, et al. A comprehensive review on histone-mediated transfection for gene therapy [J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(1): 132-44.
- [35] COCKRAM T O J, DUNDEE J M, POPESCU A S, et al. The phagocytic code regulating phagocytosis of mammalian cells [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 629979.
- [36] CUI K, DONG Y, WANG B, et al. Endocytic adaptors in cardiovascular disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 624159.
- [37] BERQUEZ M, KROHN P, LUCIANI A, et al. Receptor-mediated endocytosis and differentiation in proximal tubule cell systems [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2021, 32(5): 1265-7.