

· 基础研究 ·

线粒体靶向过表达 ECSIT 转基因小鼠的构建与鉴定

何 昀, 张美玲, 胡媛萍, 李建涛, 阙玲俐, 李跃华*

南京医科大学心血管病转化医学协同创新中心, 江苏 南京 211166

[摘要] **目的:**构建线粒体靶向过表达 ECSIT 转基因小鼠, 并对其进行鉴定和心功能分析, 建立 ECSIT 基因相关功能研究模型动物。**方法:**构建过表达打靶载体 pCAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA, 采用电转导方法将线性化打靶载体转入胚胎干细胞(ES 细胞); 将含有过表达载体的 ES 细胞进行囊胚腔注射, 并将嵌合囊胚移植至代孕小鼠体内, 繁殖嵌合体小鼠。嵌合体小鼠和 C57BL/6J 鼠交配繁殖出杂合子, PCR 筛选阳性过表达小鼠。采用小动物超声分析线粒体靶向过表达 ECSIT 小鼠的心功能。**结果:**成功构建了线粒体靶向过表达 ECSIT 载体 pCAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA, 经 PCR 鉴定为阳性; 完成线粒体靶向过表达 ECSIT 基因打靶及囊胚注射, 经 PCR 鉴定为阳性; 分别提取转基因小鼠心肌组织线粒体和胞浆蛋白, 检测发现线粒体特异性过表达 ECSIT。8 周龄转基因小鼠心功能与同龄野生型小鼠无明显差异。**结论:**成功构建出线粒体靶向过表达 ECSIT 小鼠; 线粒体过表达 ECSIT 对 8 周龄小鼠心功能无明显影响。

[关键词] ECSIT; 线粒体靶向过表达; 转基因小鼠

[中图分类号] R363.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)08-1095-06

doi:10.7655/NYDXBNS20190801

Construction and identification of mitochondria-targeted ECSIT transgenic mice

He Yun, Zhang Meiling, Hu Yuanping, Li Jiantao, Que Lingli, Li Yuehua*

Collaborative Innovation Center For Cardiovascular Disease Translational Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to construct mitochondria-targeted ECSIT transgenic mice, identify the phenotype of the mice generated, and establish an animal model for ECSIT gene-related function. **Methods:** The expression vector pCAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA was constructed, and the linearized targeting vector was transferred into embryonic stem cells (ES cells) by electro transduction. The positive clones were injected into the blastocyst and transplanted into the surrogate mice to breed the chimeric mice. Chimeric mice and C57BL/6J mice then gave birth to potential heterozygote founders. The gene type of the mice was assayed by PCR. The cardiac function of mitochondria-targeted ECSIT mice was analyzed using small animal ultrasound. **Results:** Homologous recombinant vector pCAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA with mitochondrial targeted-overexpression of ECSIT was successfully constructed and identified correctly by PCR. Mitochondrial targeted-overexpression of ECSIT gene and blastocyst injection were completed and identified correctly by PCR. Mitochondrial and cytoplasmic proteins were isolated from transgenic mice, and ECSIT protein was specifically overexpressed in mitochondrion. **Conclusion:** Mitochondria-targeted ECSIT mice were successfully constructed; overexpression of ECSIT in mitochondrion had no significant effect on cardiac function in 8-week-age mice.

[Key words] ECSIT; mitochondria targeted-overexpression; transgenic mice

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(08):1095-1100]

心脏是高能需求器官,其消耗的腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)约 95%来自于线粒体

的有氧氧化,线粒体功能障碍可导致能量产生和供给减少,使心肌收缩发生障碍^[1]。已有研究证实,线粒体功能障碍在心力衰竭的发生发展进程中具有重要作用^[1-2]。在冠状动脉阻塞使相应心肌出现供血、供氧不足时,可导致心肌细胞线粒体结构损伤

[基金项目] 国家自然科学基金(81470418)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yhli@njmu.edu.cn

与功能失调^[3],如线粒体裂解与融合平衡失调、ATP产生减少、线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mROS)产生增加等,从而导致心肌损伤和心功能障碍。同时,线粒体也是细胞稳态、细胞存活和细胞死亡的动态调节因子^[4]。因此,有学者提出,在心力衰竭的发展进程中,线粒体可作为直接改善心脏功能的重要治疗靶点^[5]。

Toll途径进化保守信号介导因子(evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways, ECSIT)在心肌组织中高表达,是Toll受体/白介素-1受体(Toll-like receptors/interleukin-1 receptor, TLRs/IL-1R)信号通路中高度保守的信号分子。已有文献报道,鸟氨酸氨基甲酰转移酶(ornithine transcarbamylase, OTC)的N端32个氨基酸(OTC-leader, OTCL)可以使得目的蛋白靶向定位于线粒体^[6-7]。

为了研究线粒体定位的ECSIT对线粒体稳态平衡、线粒体有氧氧化等的调控机制及其在心力衰竭发展进程中的病理生理作用,本研究通过在全长的ECSIT-N端添加OTCL序列使其定位于线粒体,构建线粒体过表达ECSIT转基因小鼠,并对其进行鉴定和心功能分析,为后续深入开展ECSIT线粒体定位的生物学功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

C57BL/6J小鼠为SPF级(购自南京医科大学医药实验动物基地并饲养于此基地)。实验方法与操作符合南京医科大学实验动物伦理委员会要求。

PCR仪、Mini PROTEAN 3Cell电泳仪(Bio-Rad公司,美国),大型台式离心机、CO₂培养箱(Heraeus公司,德国),GNP-9080型隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司),AE-100电子分析天平(METTLER公司,瑞士),SSC-24P空气恒温摇床(江苏太仓实验设备厂)。

PrimerScript RT反转录试剂盒,PrimeSTRA高保真酶,DL2000 Marker、DL15000 Marker、Not I、Hind III、Sal I、Spe I、BamH I限制性内切酶,DNA marker(TaKaRa公司,日本);T4 DNA连接酶、Taq酶、PCR试剂(NEB公司,美国);小牛肠碱性磷酸酶(calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP, TaKaRa公司,日本);氨苄青霉素(上海生光公司);Flag(一抗抗鼠,Sigma公司,美国),GAPDH(一抗抗鼠,杭州碧云天生物技术研究),VDAC1(一抗抗山羊,Santa-Cruz公司,美国)。质粒抽提试剂盒

(Promega公司,美国),凝胶回收试剂盒(北京天根生化),线粒体分提试剂盒(Qiagen公司,德国)。质粒homo DNA、PAD-ECSIT-3Xflag和大肠杆菌DH5 α 感受态细胞均由本实验室自行制备。同源臂扩增引物、质粒鉴定引物及小鼠DNA鉴定引物的合成和测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

同源臂扩增引物(5'→3'): OTCL-F:GGGAAGTGTGCCACCGCCATGCTGTTTAATCTGAGGAT, OTCL-R:GGGAGTCGACAGATCCCAATGTAGTGTTGTCCACACCGAAAATTTTCGAACCATG; ECSIT-3Xflag-F:GGGAGTCGACAGCTGGGTGCAGGTCAACT, ECSIT-3Xflag-R:GGGAGCGGCCGCTCATTACTATTTGTCTCATCATCCTTATAGT。质粒鉴定引物(5'→3'): ECSIT-F4573:GTTGGGACGACTATGAGTTTG, bGlobin-pA-reverse:TTTTGGCAGAGGGAAAAAG;小鼠鉴定(5'→3'):PCAG-F:GCAACGTGCTGGTTATTGTG, ECSIT-R:CCTGATGGCTTGAA-CGACTCT。

1.2 方法

1.2.1 靶向信号序列的扩增与纯化

小鼠cDNA获取:提取C57BL/6J小鼠mRNA,采用反转录试剂盒进行mRNA逆转录,合成单链cDNA。OTCL序列获取:以homo DNA为模板,以OTCL-F/OTCL-R为引物扩增OTCL片段。PCR产物全长134 bp,为了纯化PCR产物,在引物5'端分别加入Spe I/Sal I内切酶位点,切胶纯化后,产物全长120 bp。ECSIT-3Xflag序列获取:以pAD-ECSIT-3Xflag为模板,以ECSIT-3Xflag-F/ECSIT-3Xflag-R为扩增引物,扩增ECSIT-3Xflag的特异性产物,PCR产物全长1409 bp,纯化PCR产物,Sal I/Not I酶切,切胶纯化后,产物为1395 bp。pInsulator-CAG-GFP-RPL22-V5载体酶切:使用Nhe I/Not I限制性内切酶,37℃酶切2 h,再用CIAP处理1 h去磷酸化,切胶纯化,所需片段为7650 bp。

将上述载体与插入片段经T4连接酶连接,连接产物转入DH5 α 感受态大肠杆菌中,37℃摇床培养45 min后,涂布于含氨苄抗性LB固体培养板中培养14 h。随后挑取单克隆摇菌扩大培养并PCR鉴定,产物479 bp,筛选的阳性克隆摇菌扩大培养,委托公司进行DNA测序分析。

1.2.2 pCAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA质粒转染

以Invitrogen Lipofectamine™ 2000为介质,按说明书操作转染pCAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA质粒入293T细胞。转染36 h后,收集细胞提取蛋白,进

行蛋白质免疫印迹检测。

1.2.3 基因打靶进入ES细胞

采用限制性内切酶和无水乙醇分别线性化和纯化靶向载体 pCAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA, 再通过电穿孔将其转入胚胎干细胞(ES 细胞内)。打靶后克隆每天使用 ES 细胞筛选液连续筛选 8 d。抽提抗性克隆的基因组 DNA, 进行基因型鉴定。

1.2.4 制备嵌合体小鼠

小鼠囊胚的显微注射: 选取 13.0~15.0 g 的 4 周龄 C57BL/6J 未发情雌鼠, 按 Arslan 等^[9]方法腹腔注射孕马血清促性腺激素和人绒毛膜促性腺激素后, 与配种雄鼠同笼, 次日早晨检查阴道栓。第 3 天处死有阴道栓的雌鼠, 小心取出囊胚, 置于 CO₂ 培养箱培养至囊胚腔明显膨大后注射。按文献[8]提前准备注射用 ES 细胞以及显微注射用的持卵针和注射针, 每个囊胚腔注射 13~15 个 ES 细胞。注射后的囊胚继续置培养箱内培养 2 h。

小鼠囊胚的子宫移植: 选取 8 周龄的发情雌鼠与输精管结扎的雄鼠合笼, 次日早晨检查阴道栓, 2 d 后可用于囊胚的子宫移植。麻醉假孕雌鼠, 对其进行背部手术将 4 个囊胚移植入单侧子宫, 小鼠于 18~21 d 后出生。

1.2.5 嵌合体小鼠基因型鉴定

按照编号剪取出生 5~10 d 小鼠脚趾 3~5 mm 于裂解液中, 55 °C 过夜。用酚氯仿法提取编号脚趾样本的 DNA, 以特异性鉴定引物 PCAG-F/ECSIT-R 为扩增引物, PCR 扩增小鼠 DNA 片段。取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析筛选阳性转基因小鼠。嵌合体小鼠成长至 8 周小鼠性成熟后, 与野生型 C57BL/6J 合笼, 交配繁殖后可出现潜在的杂合子, 取小鼠脚趾以鉴定 F₀ 代小鼠的方法 PCR 鉴定出生 F₁ 代小鼠的基因型。

1.2.6 细胞或组织中线粒体与胞浆蛋白提取

体外培养细胞, 采用胰酶消化收集细胞, 生理盐水洗涤, 去除残留培养基, 取沉淀的细胞; 小鼠安乐死后, 开胸取心脏, 生理盐水洗涤去除残留血液, 取心肌组织。上述细胞或组织, 按照 Qiagen 线粒体分离试剂盒说明书分别提取细胞线粒体与胞浆蛋白, 进行蛋白质免疫印迹鉴定。

1.2.7 蛋白质免疫印迹

BCA 法测定组织线粒体蛋白或胞浆蛋白浓度。加入 6×loading buffer, 99 °C 煮 5 min 后制成蛋白样品, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。湿转法转膜、封闭、洗膜, 随后加入相应一抗 4 °C 垂直摇床摇晃孵

育过夜, 次日去除一抗并洗膜后二抗室温孵育 80 min, 再次洗膜, ECL 显色液显影, 采用 Image Lab 图像分析软件对灰色条带进行分析。

1.2.8 小鼠心功能检测

采用小动物高频彩色超声仪 (VisualSonics Vevo2100), 探头 MS-400, 频率 30 MHz, 帧频 300 帧/s, 检测小鼠心脏射血分数 (ejection fraction, EF) 和短轴缩短率 (fraction shortening, FS) 等。

1.3 统计学方法

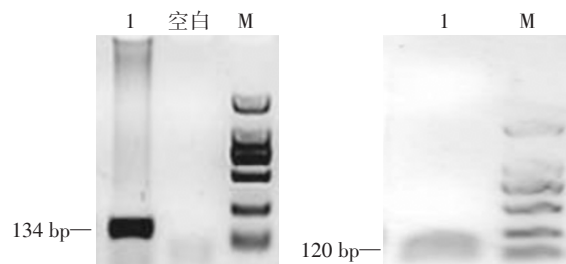
所涉及数据均用 GraphPad Prism 5 统计软件进行处理, 数值均以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本的比较经方差齐性分析后行 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转基因载体的构建与鉴定

2.1.1 转基因插入序列与载体的准备与鉴定

扩增 OTCL 序列并进行酶切。使用引物 OTCL-F/OTCL-R 进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳可见在 134 bp 处出现特异性 PCR 扩增条带 (图 1); 进一步对 PCR 产物采用 *Spe* I / *Sal* I 限制性内切酶进行酶切纯化, 酶切鉴定结果可见长度为 120 bp 的目的片段 (图 1)。



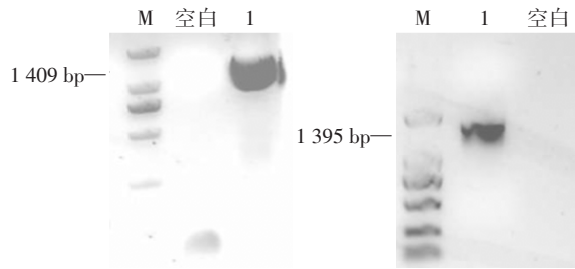
1: 克隆样品; M: DL2000 Marker。

图 1 PCR 鉴定 OTCL 序列

Figure 1 PCR identification of OTCL sequence

对 3Xflag-ECSIT 序列进行 PCR 扩增和酶切结果可见, 使用引物 ECSIT-3Xflag-F/ECSIT-3Xflag-R 在 1 409 bp 处出现特异性扩增条带 (图 2); 酶切鉴定结果显示, 使用 *Sal* I / *Not* I 限制性内切酶进行酶切纯化后, 可得到长度为 1 395 bp 的目的片段 (图 2)。

对 pInsulator-CAG-GFP-RPL22-V5 载体进行酶切和 PCR 鉴定。将载体中的 GFP 片段切下, 为融合上述 2 个序列片段提供载体片段, 使用 *Nhe* I / *Not* I 限制性内切酶进行酶切, 酶切位点为 7 650、1 187 bp, 使用 CIAP 处理去磷酸化, 所需片段长度



1: 克隆样品; M: DL2000 Marker。

图2 PCR 鉴定 3Xflag-ECSIT

Figure 2 PCR identification result of 3Xflag-ECSIT vector

为 7 650 bp(图3)。

2.1.2 pCAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA 质粒的鉴定

将上述已纯化的 OTCL 序列片段、3Xflag-ECSIT 序列片段与含有黏性末端的载体片段以 T4 连接酶连接获得 pCAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA 重组质粒(图 4A)。经 PCR 鉴定, 18 号泳道出现阳性条带, 说明对应的克隆含有目的重组质粒(图 4B), 阳性克隆

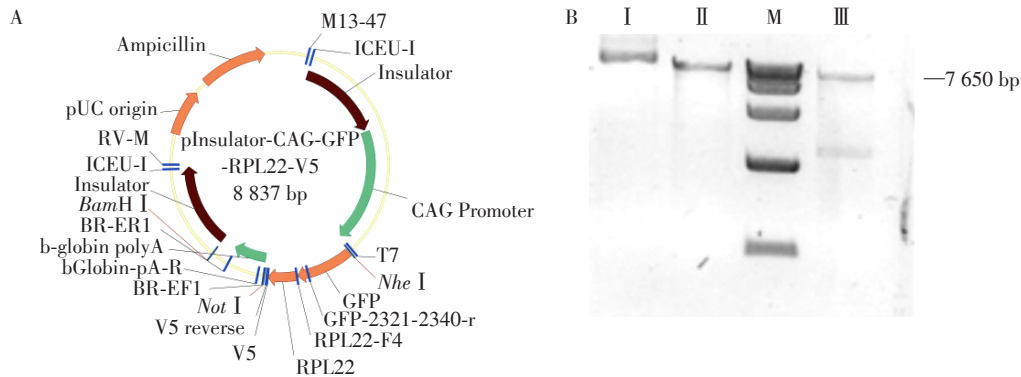
测序, 对比验证重组质粒构建成功。

2.2 转染 pCAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA 质粒后融合蛋白的表达

通过蛋白免疫印迹检测到转染重组质粒组(OE)有 Flag 蛋白的表达, 而在转染 GFP 的空载组(Con)中则未检测出 Flag(图 5A), 对比转染阳性对照组, 提示融合蛋白成功表达。分别提取细胞线粒体和胞浆蛋白, 在线粒体中检测到 Flag 蛋白的表达, 在胞浆中未检测出, 而空载组中胞浆和线粒体中均未检测出 Flag(图 5B)。

2.3 ES 细胞基因打靶及嵌合体与 F1 代转基因小鼠的鉴定

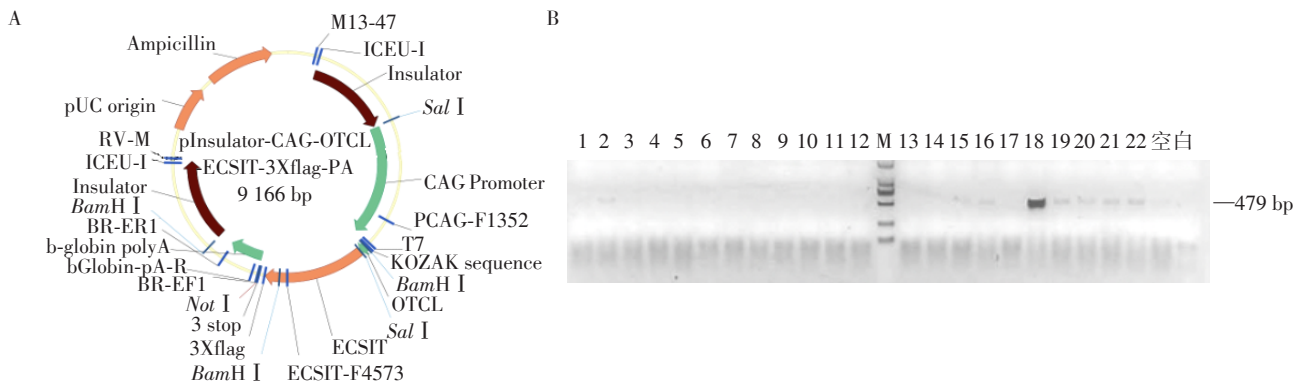
将筛选出的 ES 细胞注射入 8 个囊胚, 移植 2 只小鼠, 各 4 个囊胚, 共出生 8 只小鼠。提取小鼠的脚趾 DNA, 以 ECSIT-F4573/ bGlobin-pA-reverse 为引物通过 PCR 扩增, 产物经琼脂糖胶电泳可见在 479 bp 处出现特异性扩增条带, 与阳性参照对比, 有 2 只小鼠(2 号和 6 号)出现阳性条带, 提示嵌合体小鼠构建



A: 载体示意图; B: 载体酶切产物电泳结果; I: pInsulator-CAG-GFP-RPL22-V 载体; II: Nhe I 单酶切产物; III: Nhe I/Not I 双酶切产物; M: DL15000 Marker。

图3 PCR 和酶切鉴定 pInsulator-CAG-GFP-RPL22-V 酶切载体

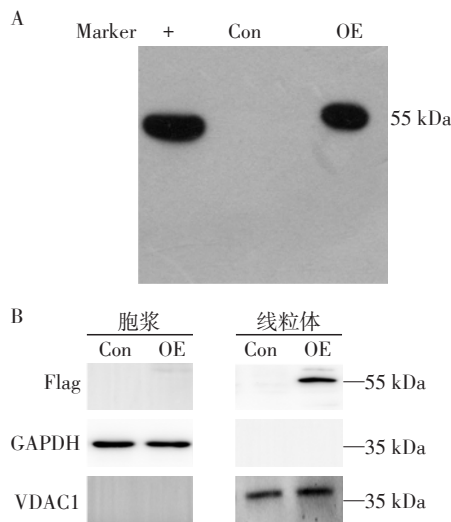
Figure 3 identification of pInsulator-CAG-GFP-RPL22-V by PCR and restriction endonuclease cleavage



A: 重组质粒示意图; B: PCR 鉴定; 1~22: 克隆样品; M: DL15000 Marker。

图4 PCR 鉴定 pInsulator-CAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA 载体

Figure 4 PCR identification result of pInsulator-CAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA vector

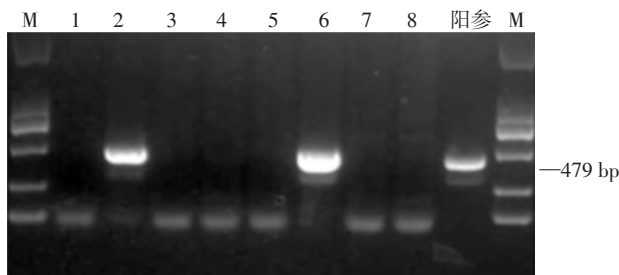


A: 蛋白免疫印迹检测 Flag 的表达; B: 蛋白免疫印迹检测胞浆和线粒体中 Flag 的表达; Con: 空载组; OE: 转染重组质粒组; +: 阳性对照组。

图5 蛋白免疫印迹检测 293T 细胞中 pCAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA 载体融合蛋白表达

Figure 5 Fusion protein expressed by pCAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA in 293T cells by Western blot

成功(图6)。阳性嵌合体(F0)转基因小鼠性成熟后,作为种鼠与野生型 C57BL/6J 交配,繁殖出 F1 代小鼠,采用与筛选 F0 阳性小鼠相同的方法进行 PCR 鉴定。



鼠尾样品: 1~8; M: DL2000 marker。

图6 ECSIT线粒体靶向过表达阳性小鼠的PCR鉴定

Figure 6 PCR identification of ECSIT mitochondria-targeted mice

2.4 转基因小鼠ECSIT蛋白定位表达的检测

取F1代小鼠心脏组织,分别提取组织线粒体和胞浆蛋白,采用免疫印迹法检测ECSIT蛋白表达情况,以GAPDH作为胞浆蛋白内参,VDAC1作为线粒体蛋白内参。图7显示,野生型小鼠心肌组织胞浆和线粒体蛋白中均未检测到融合蛋白ECSIT-Flag的表达,而ECSIT转基因F1代小鼠线粒体蛋白中融合蛋白ECSIT-Flag高表达,但胞浆中几乎未检测到其表达。表明实验成功构建了线粒体靶向过表达EC-

SIT转基因小鼠,而且融合蛋白ECSIT-Flag主要定位于线粒体。

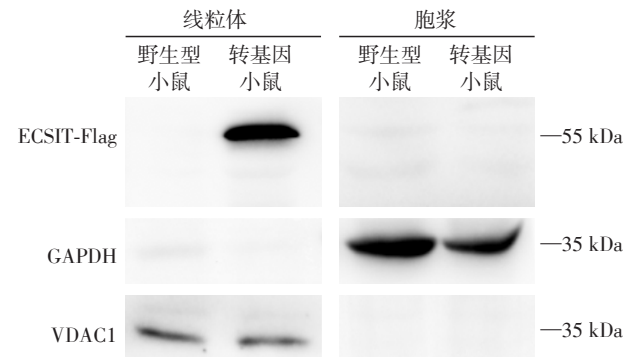


图7 ECSIT线粒体靶向过表达转基因小鼠心肌组织ECSIT蛋白定位表达情况

Figure 7 The localization and expression of ECSIT in myocardial tissue of ECSIT mitochondria-targeted transgenic mice

2.5 转基因小鼠心功能分析

为了解线粒体靶向过表达ECSIT转基因小鼠在未给予任何病理因素刺激时对心功能的影响,在小鼠8周龄时进行彩色心脏超声检测。图8显示,线粒体靶向过表达ECSIT转基因小鼠与同龄野生型小鼠相比,EF和FS未见统计学学差异。提示线粒体靶向过表达ECSIT对8周龄小鼠心功能没有明显影响。

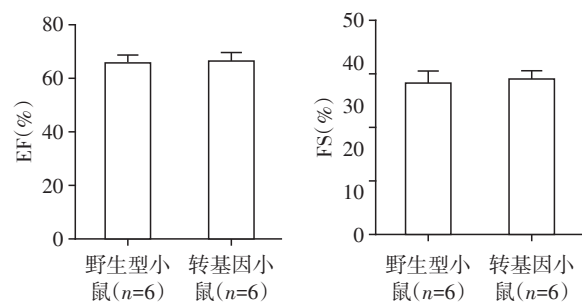


图8 转基因阳性小鼠心功能分析

Figure 8 Analysis the cardiac function of transgenic positive mice

3 讨论

本研究通过构建过表达载体 pCAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA,使其线性化后转入ES细胞再将含过表达载体的ES细胞注射入囊胚腔,最后把囊胚腔转移至代孕小鼠体内,生育嵌合体小鼠。嵌合体小鼠和C57BL/6J小鼠交配繁殖出潜在的杂合子,通过PCR鉴定嵌合体小鼠基因型后获得了线粒体靶向过表达ECSIT转基因小鼠,并通过蛋白免疫印迹检

测证明转基因小鼠构建成功。

由于基因剪切位点和整合位置的不同,外源基因在转基因动物中的表达也是不同的。转基因小鼠中外源基因由于随机插入,插入位点未知以及拷贝数无法确定,可能会导致后期小鼠基因拷贝数和表达量有差异。由于外源基因是整合于转基因动物的染色体上,对高表达的个体进行繁育就可得到大量表达水平相近的转基因动物^[9]。本研究通过分子克隆技术构建转基因载体 pCAG-OTCL-ECSIT-3Xflag-BPA, OTCL 特异性靶定于线粒体上,在染色体水平上可使 ECSIT 在线粒体过表达。研究结果亦表明,实验构建的线粒体过表达 ECSIT 转基因小鼠可以稳定传至下一代。而且,8 周龄转基因小鼠心功能与同龄野生型小鼠无明显差异。

研究发现,在线粒体定位的 ECSIT 可与线粒体组装蛋白泛醌氧化还原酶复合物组装因子 1 (ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 1, NDUFAF1) 相互作用,共同组装线粒体复合物 I。采用 siRNA 抑制 ECSIT 基因表达时,会严重损伤线粒体复合物 I 的组装,使 mROS 产生增加,导致线粒体稳态失衡,同时释放线粒体损伤相关的分子模式,促进中性粒细胞迁移,进而引起单核细胞和巨噬细胞的迁移、活化,促进炎症因子释放,最终引起免疫炎症反应^[10]。在巨噬细胞中,受到脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 处理后激活 TLR4 信号通路, ECSIT 与肿瘤坏死因子受体相关分子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6) 产生相互作用,并且 ECSIT 可发生泛素化修饰^[11-12],定位于线粒体内膜的 ECSIT 向线粒体外膜转移抑制了呼吸链复合物 I 的活性,促进了 mROS 的产生^[13],线粒体功能受到明显损伤。本研究发现,线粒体靶向过表达 ECSIT 的转基因小鼠,在生理状态下其心功能与野生型小鼠无明显差异,但是在病理条件下,如心肌缺血、压力过负荷等,是否对疾病导致的线粒体功能障碍发挥调控作用尚需进一步研究。

线粒体靶向过表达 ECSIT 转基因小鼠的成功构建,为深入探讨线粒体定位的 ECSIT 在疾病发生发展中的作用及其机制提供了合适的动物模型。

[参考文献]

[1] Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in pathophysi-

ology of heart failure [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128 (9): 3716-3726

- [2] Dudek J, Hartmann M, Rehling P. The role of mitochondrial cardiolipin in heart function and its implication in cardiac disease [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(4): 810-821
- [3] Nan J, Zhu W, Rahman MS, et al. Molecular regulation of mitochondrial dynamics in cardiac disease [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2017, 1864(7): 1260-1273
- [4] Lisowski P, Kannan P, Mlody B, et al. Mitochondria and the dynamic control of stem cell homeostasis [J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(5): e45432
- [5] Brown DA, Perry JB, Allen ME, et al. Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14(4): 238-250
- [6] Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria [J]. *Science*, 2005, 308(5730): 1909-1911
- [7] Dai DF, Santana LF, Vermulst M, et al. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging [J]. *Circulation*, 2009, 119(21): 2789-2797
- [8] Arslan F, Houtgraaf JH, Keogh B, et al. Treatment with OPN-305, a humanized anti-Toll-Like receptor-2 antibody, reduces myocardial ischemia/reperfusion injury in pigs [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2012, 5(2): 279-287
- [9] 周建丽, 赖娅娜, 李树珍, 等. pCAG-3×flag-PP2A Cα 转基因小鼠构建及高表达系的筛选 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(3): 283-287
- [10] Carneiro FRG, Lepelley A, Seeley JJ, et al. An essential role for ECSIT in mitochondrial complex I assembly and mitophagy in macrophages [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(10): 2654-2666
- [11] Wi SM, Park J, Shim JH, et al. Ubiquitination of ECSIT is crucial for the activation of p65/p50 NF-κB in Toll-like receptor 4 signaling [J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(1): 151-160
- [12] Min Y, Wi SM, Shin D, et al. Peroxiredoxin-6 negatively regulates bactericidal activity and nf-κB activity by interrupting TRAF6-ECSIT complex [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 94
- [13] West AP, Brodsky IE, Rahner C, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS [J]. *Nature*, 2011, 472(7344): 476-480

[收稿日期] 2019-03-17