

· 基础医学 ·

成年小鼠 ECSIT 3'-UTR 的鉴定及功能分析

周小蓉, 陆霞, 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:**鉴定成年小鼠 Toll 途径进化保守信号介导因子(evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways, ECSIT)的 3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)序列,并在细胞中验证非编码 RNA 对 ECSIT 表达的影响。**方法:**采用 RACE 技术克隆得到小鼠 ECSIT 3'-UTR 序列,并与基因组数据库进行比对;预测 ECSIT 3'-UTR 可能结合的微小 RNA(miRNA, miRNA),并针对 ECSIT 的全长序列设计小干扰 RNA(siRNA);通过 Western blot 分别检测使用不同 miRNA 和 siRNA 干扰后,细胞中 ECSIT 的表达。**结果:**成功鉴定了 346 bp 的小鼠 ECSIT 3'-UTR,与 NCBI 上序列一致率达到 99%;在细胞中 miR-7-5p 和 siRNA1、2 可以干扰 ECSIT 的表达。**结论:**成功鉴定得到成年小鼠心脏 ECSIT mRNA 3'-UTR 序列,该非编码区可作为非编码 RNA 的调控区域,为进一步从分子水平探明 ECSIT 在小鼠生长发育及疾病中的作用提供科学依据。

[关键词] 3'非翻译区;3'RACE;ECSIT;microRNA;siRNA

[中图分类号] Q756

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)07-937-06

doi:10.7655/NYDXBNS20210701

Identification and functional analysis of ECSIT 3'-UTR in adult mice

ZHOU Xiaorong, LU Xia, 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 identify the 3'-UTR sequence of the ECSIT spliceosome in adult mice, and verify the effects of non-coding RNA on ECSIT expression. **Methods:** Using RACE technology to clone the mice ECSIT 3'-UTR non-coding region sequence, and further compare with the genomic database. Predict the possible binding microRNAs, and design siRNA against the full-length sequence of ECSIT. The expression levels of ECSIT in cells were determined by Western blot after using different microRNAs and siRNAs. **Results:** The results show that the 346 bp mouse ECSIT 3'-UTR was successfully identified and the sequence consistency rate with NCBI reached 99%. In cells, miR-7-5p and siRNA1, 2 can interfere with the expression of ECSIT. **Conclusion:** These results shows that the 3'-UTR sequence of mouse ECSIT mRNA was successfully identified and this non-coding region can be used as a regulatory region of non-coding RNA, which can provide a scientific basis at the molecular level for further proving research of ECSIT in mouse growth and pathophysiological condition.

[Key words] 3'-UTR;3'RACE;ECSIT;microRNA;siRNA

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(07):937-942]

基因表达的调控大多数发生在转录过程中, mRNA 的稳定性、定位和可翻译性在这一过程发挥重要作用^[1]。3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)是 mRNA 非编码区的一部分,其碱基长度从编

码区末端的终止密码子延伸至多聚 A 尾巴(poly A)的前端^[2], 3'-UTR 包含大量的调控元件,具有调节 mRNA 稳定性、定位、翻译以及介导蛋白与蛋白的相互作用等功能^[3-4],通过 3'-UTR 调节转录后的基因表达对维持细胞的内稳态非常重要。

Toll 途径进化保守信号介导因子 ECSIT(evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll path-

[基金项目] 国家自然科学基金(82070234)

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

ways, ECSIT)是Toll样受体/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,在先天免疫、胚胎发育和线粒体相关功能中发挥重要作用^[5-7]。Toll样受体识别病原体相关分子模式并通过转化生长因子激酶1(TGF beta-activated kinase 1, TAK1)或有丝分裂原/细胞外信号调节激酶激酶1(mitogen/extracellular signal-regulated kinase kinase 1, MEKK-1)激活NF- κ B和AP-1转录因子的表达,促进炎症信号的激活,肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)是这两个级联下游信号分子。在应激条件下, ECSIT与TRAF6结合,参与NF- κ B信号与MEKK-1的信号通路调控^[5]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)是转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)超家族的成员。在BMP通路中, ECSIT可以作为Smad1和Smad4的辅助因子,并与特定BMP靶基因(如Tlx2)的启动子结合,在小鼠的胚胎发育过程中起关键作用,且ECSIT敲除小鼠具有胚胎致死性^[6]。此外, ECSIT与分子伴侣NDUFAF1相互作用并参与线粒体复合物I的组装,沉默ECSIT的表达可导致线粒体复合物I组装严重损伤,进而导致线粒体功能紊乱^[7]。已有研究报道, ECSIT在成年小鼠骨骼肌、肝脏、肾脏和心脏中均有表达^[5]。但是, ECSIT的表达受哪些因素调控,尤其是在翻译水平上的调控尚不清楚。

在真核生物中,长为20~30个核苷酸的非编码RNA分子已成为基因组表达和功能的关键调控因子,根据其作用模式不同,其主要被分为两类,即微小RNA(microRNA, miRNA)和小干扰RNA(siRNA)^[8]。miRNA是一类由内源基因编码的长度为20~24个核苷酸的非编码单链RNA,可在多种生物过程中调控基因表达,包括发育、细胞分化、脂肪代谢和生长控制^[9]。转录后基因表达的抑制方法包括抑制翻译和mRNA的剪切,miRNA可直接与靶mRNA的3'-UTR序列互补结合,通过去帽化作用对靶mRNA进行非切割降解,起到翻译抑制作用^[10-11]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是一种内源性RNA干扰途径,通过精确调控基因表达,为调控细胞信号通路提供了强大的机制,作为RNAi复合物的一个组成部分,siRNA能够沉默具有互补序列的特定基因的表达^[12]。ECSIT mRNA的3'-UTR作为其mRNA的重要组成部分,可能与miRNA或siRNA结合,引导ECSIT mRNA发生翻译受阻或降解,从而引起下

游信号通路的改变。目前,通过干预ECSIT 3'-UTR从而调节ECSIT的表达尚无文献报道。因此,本研究使用3'RACE技术克隆得到ECSIT 3'-UTR的序列,并观察miRNA和siRNA对细胞中ECSIT表达的影响,以验证调控ECSIT mRNA翻译表达的序列区域,为后续从分子水平探明ECSIT的作用机制及其在心血管疾病等防治方面的开发应用奠定良好的理论基础。

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),研究经南京医科大学实验动物伦理委员会批准(批准号:IACUC 2008005)。

反转录试剂盒PrimerScript™ RT、pMD-18T载体、DL1000 Marker(TaKaRa公司,日本);氨苄青霉素(上海生光公司);凝胶回收试剂盒、大肠杆菌DH5 α 感受态细胞(北京天根生化);Taq酶(NEB公司,美国);Lipofectamine™2000转染试剂(Invitrogen公司,美国);ECSIT抗体(Abcam公司,美国);GAPDH抗体、HRP标记的山羊抗兔IgG、山羊抗小鼠IgG(上海碧云天生物有限公司);DMEM细胞培养基(Gibco公司,美国);胎牛血清(BI公司,以色列)。PCR仪、mini PROTEAN 3cell电泳仪(Bio-Rad公司,美国);SSC-24P空气恒温摇床(江苏太仓实验设备厂);AE-100电子分析天平(METTLER公司,瑞士);台式离心机(Heraeus公司,德国)。

根据NCBI数据库里的小鼠ECSIT基因序列设计合成引物,测序由上海英骏生物技术有限公司完成。引物序列为3' Adaptor: 5'-GCTGTCAACGATAC-GCTACGTAACGGCATGACAGTGTTTTTTTTTTTTTTTT - TTTTT-3', 3' Adaptor MN: 5'-GCTGTCAACGATAC-GCTACGTAACGGCATGACAGTGTTTTTTTTTTTTTTTT - TTTMN-3', 3' musECSIT-F: 5'-ATGAGTTTGACGTG-GATGAA-3', 3' Nested-primer: 5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'。

1.2 方法

1.2.1 3'RACE实验

使用TRIzol法提取小鼠总RNA,再参照PrimeScript™RT试剂盒说明书方法将RNA逆转录为cDNA。具体步骤为:①去除基因组DNA。5 \times gDNA Eraser Buffer 2 μ L, gDNA Eraser 1 μ L, Total RNA (1 000 ng), RNase Free dH₂O 补齐, 42 $^{\circ}$ C 2 min。②

反转录。PrimeScriptRT Enzyme Mix I 2 μL , $5\times$ PrimeScript Buffer(for real time) 4 μL , 步骤①的反应液 10 μL , 3' Adaptor, 3' Adaptor MN 各 1 μL , RNase Free dH_2O 3 μL , 反应条件为 42 $^\circ\text{C}$ 30 min, 85 $^\circ\text{C}$ 5 s, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。③PCR 及其产物鉴定回收。使用逆转录产物 cDNA 为模板, 以 musECSIT F 作为外侧上游引物, 3' Nested-Primer 为下游引物和 Taq 酶进行套式 PCR 扩增。反应条件如下: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 2 min, 95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。反应结束后经琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.2.2 目的片段 T 载体克隆及序列分析

3' RACE 扩增条带切胶回收, 连接于 pMD18-T 载体(具体操作参照产品说明书), 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 菌落 PCR 鉴定的阳性克隆样品送测序。经过以上步骤, 获得 ECSIT 3' 下游未知序列, 将碱基序列提交到 NCBI 数据库做 BLAST 比对。

1.2.3 miRNA 和 siRNA 的设计和合成

使用 TargetScan 软件预测 ECSIT 基因潜在结合的 miRNA, 其中 miR-7-5p (序列为 3'-UGUU-GUUUAGUGAUCAGAAGGU-5') 和 miR-296-5p (序列 3'-UGUCCUAACUCCCCCGGGU-5') 预测可能与 ECSIT 3'-UTR 的序列结合, 因此将 2 种 miRNA 序列交由广州锐博生物技术有限公司合成。根据 3' RACE 实验结果及 NCBI 数据库中 ECSIT 的序列设计 4 个干扰不同序列的 siRNA, 它们干扰 ECSIT 靶基因段为 siRNA1: 5'-GCCACGTGGACTTCATCTA-3', 位于第 601~619 个碱基; siRNA2: 5'-GCCTGATCT-CAGTGCTAAA-3', 位于第 992~1 009 个碱基; siRNA3: 5'-GGAAGATGATGAGGCCATT-3', 位于第 1 547~1 565 个碱基; siRNA4: 5'-GTAATAAGTGC-GTCTATTA-3', 位于第 1 547~1 565 个碱基, siRNA 均交由广州锐博生物技术有限公司设计并合成。

1.2.4 细胞培养

从液氮中取出 RAW264.7 细胞和 Hepa1-6 细胞, 迅速在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中摇晃, 融化后转移至预先装好培养基的离心管内, 500 r/min 4 $^\circ\text{C}$ 离心 5 min, 弃上清, 加入含有 10% 血清的 DMEM 培养基进行重悬后种板, 置于细胞培养箱中培养。当细胞铺满皿底 80%~90% 时, 进行传代, 每 48 h 换 1 次完全培养基。

1.2.5 miRNA 和 siRNA 转染

将 siRNA 和 miRNA 配成浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的储液, 并分装冻存于 -80 $^\circ\text{C}$ 冰箱。密度为 30%~50% 的细胞换新鲜无血清和不含双抗的 DMEM 培养基, 使

用 LipofectamineTM2000, 按照说明将 50 nmol/L 的 siRNA 和 miRNA 转染至 RAW264.7 细胞和 Hepa1-6 细胞, 4 h 后换完全培养基, 培养 36 h 后进行下一步实验。

1.2.6 蛋白免疫印迹(Western blot)

提取细胞总蛋白并使用 BCA 法测定其浓度, 加 $5\times$ 加样缓冲液后 99 $^\circ\text{C}$ 煮 5 min 使蛋白变性, 再进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束后使用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 将膜置于 TBS-T 配制的 5% 脱脂奶粉溶液中, 室温封闭 1 h, TBS-T 清洗膜 3 次, 加入一抗置于 4 $^\circ\text{C}$ 摇床孵育过夜, 次日回收一抗, TBS-T 清洗膜 3 次, 二抗室温孵育 1.5 h, 清洗膜 3 次后, 使用 ECL 显色液曝片, 采用 Image Lab 图像分析软件进行灰度分析。

1.3 统计学方法

应用 GraphPad Prism5 软件统计数据, 计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用单因素方差分析(one-way ANOVA)方法分析组间变异度, 组内的两两比较采用 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ECSIT mRNA 3'-UTR 的鉴定及测序

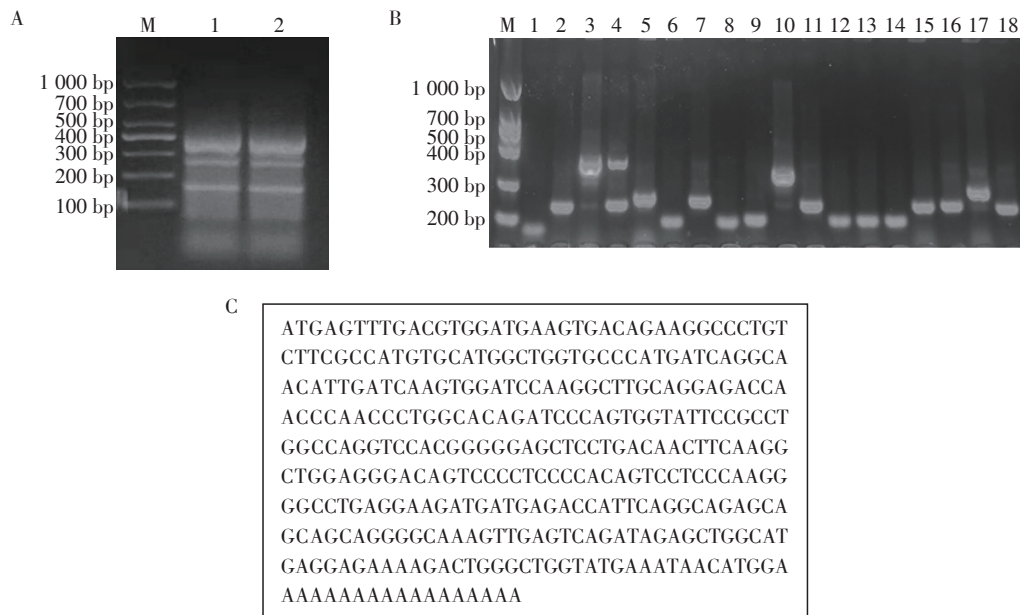
ECSIT 的 3' RACE-PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测可见阳性条带(图 1A), 凝胶回收扩增的片段, 克隆于 pMD-18T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆(图 1B), 测序结果显示有效序列的长度为 346 bp(图 1C)。将序列与 NCBI 数据库中 ECSIT 的 mRNA 序列进行比对, 一致率达到 99%。

2.2 miR-7-5p 调节小鼠细胞中 ECSIT 蛋白的表达

图 2A 为预测软件识别的 ECSIT 与 miRNA 的互补序列。Western blot 结果发现, 与 NC 组相比, Hepa1-6 细胞转染 miR-7-5p 可以明显抑制 ECSIT 的蛋白表达($P < 0.05, n=3$), 而转染 miR-296-5p 对 ECSIT 的表达没有明显影响($P > 0.05$, 图 2B), 并且在 RAW264.7 中观察到相同的变化趋势($P < 0.01$, 图 2C)。以上结果提示 miR-7-5p 可能是 ECSIT 的潜在调节因子。

2.3 siRNA 干扰小鼠细胞系中 ECSIT 蛋白的表达

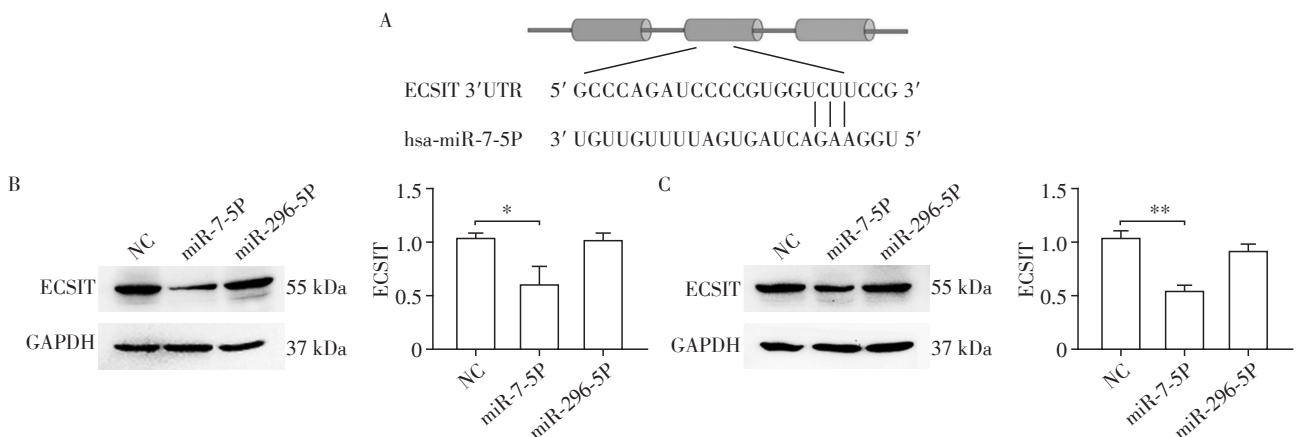
Western blot 结果显示, 与 NC 组相比, 在 Hepa1-6 细胞中转染 siRNA 1、2 后 ECSIT 的表达显著下降($P < 0.01, n=3$), 但 siRNA 3、4 对其表达没有明显影响($P > 0.05$, 图 3A); 此外, 在 RAW264.7 中观察到相同的变化趋势($P < 0.05$, 图 3B)。



A: 3'RACE-PCR产物琼脂糖凝胶电泳, 1、2: 阳性样品, M: DL 1 000 DNA marker; B: 菌落 PCR产物电泳, 15、16、18测序结果为阳性的菌落 PCR条带, M: DL 1 000 DNA marker; C: 阳性条带测序所得序列。

图1 3'RACE的克隆鉴定和序列

Figure 1 Clone identification and sequence of 3'RACE



A: TargetScan 软件预测 miR-7-5p 与 ECSIT 的序列互补; B: Hepa1-6 细胞转染 miR-7-5p 和 miR-296-5p 后, Western blot 检测 ECSIT 蛋白表达水平; C: RAW264.7 细胞转染 miR-7-5p 和 miR-296-5p 后, Western blot 检测 ECSIT 蛋白表达水平。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图2 miR-7-5p 抑制 Hepa1-6 细胞和 RAW264.7 细胞中 ECSIT 的表达

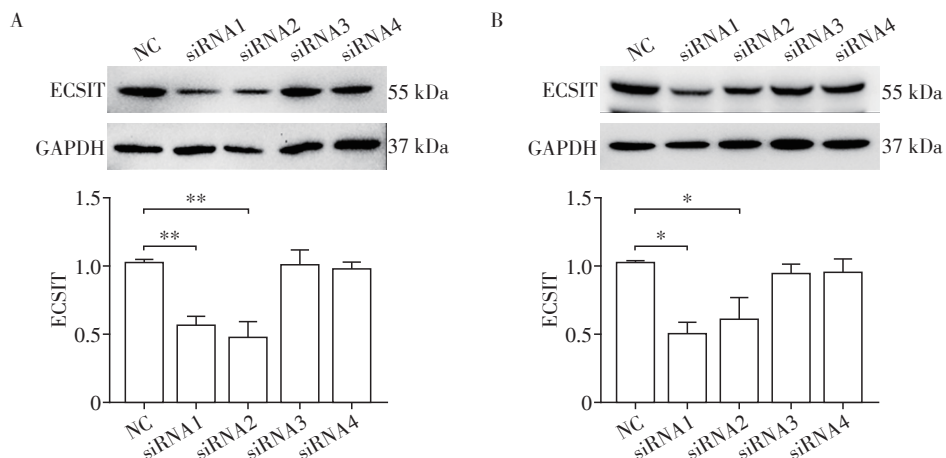
Figure 2 MiR-7-5p inhibits ECSIT expression in Hepa1-6 cells and RAW264.7 cells

3 讨论

本研究采用 3'RACE 实验获得 ECSIT 3'-UTR 区域的碱基序列;通过 miRNA 及 siRNA 干扰实验发现, ECSIT 3'-UTR 区域可被 miR-7-5p 调控,但 siRNA 作用于 ECSIT 编码区更有效率,这可能是由于 siRNA 识别靶序列具有高度特异性,而降解首先发生在相对于 siRNA 来说的中间位置,所以这些中央位置的碱基位点就显得极为重要,一旦发生错配就会严重抑制 RNAi 的效应,相对而言,3'末端的核苷酸

序列并不要求与靶 mRNA 完全匹配^[13]。

基因 mRNA 3'-UTR 区域作为转录后控制的枢纽,是 miRNA 和 RNA 结合蛋白(RBPs)的靶点,3'-UTR 介导的信息传递可以调控氨基酸序列中未编码的蛋白质特征,在调节生物复杂性中发挥重要作用^[14-15]。ECSIT 是多个信号通路的关键蛋白,参与先天免疫、炎症和线粒体功能等多方面的调节, ECSIT 的转录后表达调控对其分子作用机制是非常重要的。基因库中 ECSIT 的序列是预测的,其 3'-UTR 区域是未知的,这给后续的一些研究带来困



A: Hepa1-6细胞转染siRNA1~4后, Western blot检测ECSIT蛋白表达水平; B: RAW264.7细胞转染siRNA1~4后, Western blot检测ECSIT蛋白表达水平。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图3 siRNA干扰RAW264.7和Hepa1-6细胞中ECSIT的表达

Figure 3 siRNAs in RAW264.7 and Hepa1-6 cells interfere with the expression of ECSIT

难。本研究测序所得ECSIT 3'-UTR长度为346 bp,与基因库中ECSIT mRNA(XM_011242538.4)的第2 231~2 576碱基序列一致率达99%。

已有研究报道,当miRNA与mRNA 3'-UTR序列不完全互补结合时,主要影响翻译过程,对mRNA稳定性没有明显影响;当miRNA与mRNA 3'-UTR序列完全互补结合时,可能通过特异性切割mRNA抑制翻译或者导致mRNA降解^[16]。本研究结果发现miR-7-5p可能在ECSIT的表达调节中起重要作用,预测软件提示miR-7-5p与ECSIT 3'-UTR为不完全序列互补,因此miR-7-5p可能通过影响翻译过程从而影响ECSIT的表达。

哺乳动物细胞中内源性RNA干扰通路的存在,使其能够精确地调控基因表达,使用siRNA疗法在治疗各种疾病方面取得了重大进展^[17]。siRNA治疗的序列可以根据编码靶蛋白的mRNA序列来确定,一旦进入细胞质,siRNA分子将被并入RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)^[18], siRNA双链将在RISC复合体中分离,5'端更稳定的链被整合到活性的RISC复合体中,然后siRNA通过启动催化性RISC蛋白,引导RISC复合物寻找和剪切目的分子,从而达到抑制mRNA表达的目的^[19]。本研究结果显示,siRNA1、2号干扰序列分别为第601~619和第992~1 009碱基,这些区域可能是调节ECSIT mRNA表达的功能序列。

已有研究报道,脂多糖刺激巨噬细胞TLR4受体后,ECSIT与TAK1、TRAF6结合形成内源性高分子复合物,调节TAK1的活性,通过影响下游的级联信号,促进炎症信号NF- κ B的激活^[20]。在巨噬细胞

中,Toll样受体的激活促进TRAF6易位至线粒体,在线粒体外周与ECSIT相互作用,ECSIT发生泛素化并在线粒体外周富集,导致线粒体和细胞活性氧生成增加,有助于巨噬细胞内细菌的清除^[21]。此外,ECSIT的缺失导致巨噬细胞代谢由有氧呼吸转变为糖酵解,线粒体复合物I的组装受损、活性下降。线粒体功能障碍时,ECSIT通过与自噬调节因子Parkin结合并发生泛素化,导致线粒体自噬受损^[22]。以上研究表明ECSIT在炎症相关Toll样受体信号级联和线粒体功能中发挥重要作用。

心力衰竭的机制是复杂和多样的,研究发现,TLR4受体信号的激活通过促进炎症因子的产生和基质降解,促进心肌梗死后左室不良室重构发生发展^[23]。健康小鼠心脏驻留的巨噬细胞约占心肌非心肌细胞群的6%~8%,抑制巨噬细胞招募并中和巨噬细胞破坏性的促炎功能,可以促进衰竭心脏的恢复^[24]。线粒体功能障碍是心力衰竭发展的一个关键因素,线粒体通过氧化磷酸化维持心肌收缩所必需的能量,心力衰竭时期线粒体功能障碍,导致能量代谢障碍,活性氧释放增加,加重心力衰竭后的心脏损伤^[25]。这些结果提示ECSIT在心力衰竭中可能发挥重要作用,需要进一步的研究证实。本研究获得了ECSIT 3'-UTR碱基序列,并验证了miR-7-5p作为ECSIT 3'-UTR潜在结合分子调控ECSIT表达,这可为后续ECSIT的研究提供分子基础。

【参考文献】

- [1] KUERSTEN S, GOODWIN E B. The power of the 3' UTR: translational control and development[J]. Nat Rev Genet, 2003, 4(8): 626-637

- [2] MAYR C. Regulation by 3'-untranslated regions [J]. *Annu Rev Genet*, 2017, 51: 171-194
- [3] MAYR C. What are 3' UTRs doing? [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11(10): a034728
- [4] BERKOVITS B D, MAYR C. Alternative 3' UTRs act as scaffolds to regulate membrane protein localization [J]. *Nature*, 2015, 522(7556): 363-367
- [5] KOPP E, MEDZHITOV R, CAROTHERS J, et al. ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(16): 2059-2071
- [6] XIAO C, SHIM J H, KLÜPPEL M, et al. Ecsit is required for Bmp signaling and mesoderm formation during mouse embryogenesis [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(23): 2933-2949
- [7] VOGEL R O, JANSSEN R J, VAN DEN BRAND M A, et al. Cytosolic signaling protein ECSIT also localizes to mitochondria where it interacts with chaperone NDUFAF1 and functions in complex I assembly [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(5): 615-624
- [8] BARTEL D P. Metazoan microRNAs [J]. *Cell*, 2018, 173(1): 20-51
- [9] SØRENSEN A E, WISSING M L, SALÖ S, et al. MicroRNAs related to polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. *Genes (Basel)*, 2014, 5(3): 684-708
- [10] SILLIVAN S E, JAMIESON S, DE NIJS L, et al. MicroRNA regulation of persistent stress-enhanced memory [J]. 2020, 25(5): 965-976
- [11] EULALIO A, HUNTZINGER E, NISHIHARA T, et al. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation [J]. *RNA*, 2009, 15(1): 21-32
- [12] DONG Y, SIEGWART D J, ANDERSON D G. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 144: 133-147
- [13] CROOKE S T, WITZTUM J L, BENNETT C F, et al. RNA-targeted therapeutics [J]. *Cell Metab*, 2018, 27(4): 714-739
- [14] TIAN B, MANLEY J L. Alternative polyadenylation of mRNA precursors [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(1): 18-30
- [15] MAYR C. Evolution and biological roles of alternative 3' UTRs [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(3): 227-237
- [16] HUTVÁGNER G, ZAMORE P D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex [J]. *Science*, 2002, 297(5589): 2056-2060
- [17] HAMMOND S M, BERNSTEIN E, BEACH D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells [J]. *Nature*, 2000, 404(6775): 293-296
- [18] RYTHER R C, FLYNT A S, PHILLIPS J A, et al. siRNA therapeutics: big potential from small RNAs [J]. *Gene Ther*, 2005, 12(1): 5-11
- [19] NAIR J K, WILLOUGHBY J L, CHAN A, et al. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(49): 16958-16961
- [20] WI S M, MOON G, KIM J, et al. TAK1-ECSIT-TRAF6 complex plays a key role in the TLR4 signal to activate NF- κ B [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(51): 35205-35214
- [21] WEST A P, BRODSKY I E, RAHNER C, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS [J]. *Nature*, 2011, 472(7344): 476-480
- [22] CARNEIRO F R, LEPELLEY A, SEELEY J J, et al. An essential role for ECSIT in mitochondrial complex I assembly and mitophagy in macrophages [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(10): 2654-2666
- [23] TIMMERS L, SLUIJTER J P, VAN KEULEN J K, et al. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2008, 102(2): 257-264
- [24] DEBERGE M, SHAH S J, WILSBACHER L, et al. Macrophages in heart failure with reduced versus preserved ejection fraction [J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(4): 328-340
- [25] LI Y, CHEN B, YANG X, et al. S100a8/a9 signaling causes mitochondrial dysfunction and cardiomyocyte death in response to ischemic/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2019, 140(9): 751-764

[收稿日期] 2021-04-30