

# Nrdp1 siRNA 重组腺病毒载体的构建及其对心肌肥大的影响

张圆<sup>1</sup>, 韩丽莎<sup>1</sup>, 胡海<sup>1</sup>, 张坤<sup>1</sup>, 王艳国<sup>1</sup>, 刘佳<sup>1</sup>, 牛常存<sup>2</sup>

(1. 包头医学院病理生理学教研室, 内蒙古包头市 014060; 2. 包头医学院第一附属医院神经外科, 内蒙古包头市 014010)

[关键词] Nrdp1 基因; 小干扰 RNA; 腺病毒载体; 心肌肥大

[摘要] **目的** 构建及鉴定神经调节素受体蛋白 1(Nrdp1) 基因 siRNA 重组腺病毒载体, 初步研究 Nrdp1 基因对心肌细胞肥大的影响。**方法** 设计并合成 Nrdp1 的 siRNA 靶向 DNA 序列, 克隆至穿梭载体 GV119 中, 并与腺病毒骨架质粒 AdMax 在 BJ5183 细菌中进行同源重组, 转染 HEK293 细胞, 包装得到含 siNrdp1 的重组腺病毒, 实时定量 PCR 及 Western blot 检测重组腺病毒对新生大鼠原代心肌细胞 Nrdp1 表达的影响。然后利用血管紧张素 II 和沉默 Nrdp1 的腺病毒干预体外培养的新生大鼠原代心肌细胞, 实时定量 PCR 检测心肌肥大标志基因 (ANF、 $\beta$ -MHC、Skeletal- $\alpha$ -actin) 的表达。**结果** 酶切后 PCR 分析、测序鉴定表明, 干扰 Nrdp1 腺病毒构建成功, 病毒纯化后滴度为  $1.5 \times 10^9$  PFU/mL; 重组干扰 Nrdp1 腺病毒可在蛋白水平和 mRNA 水平明显抑制 Nrdp1 的表达 ( $P < 0.001$ ); 沉默 Nrdp1 基因后, 可明显上调血管紧张素 II 诱导的心肌细胞肥大标志基因 ANF、 $\beta$ -MHC 和 Skeletal- $\alpha$ -actin 的表达 ( $P < 0.01$ )。**结论** 构建的 Nrdp1 siRNA 重组腺病毒能有效地抑制新生大鼠原代心肌细胞中 Nrdp1 表达, 且 Nrdp1 基因沉默后可加重 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。

[中图分类号] Q29

[文献标识码] A

## Construction of Recombinant Adenovirus Vector of Nrdp1 siRNA and Its Effect of Promoting Cardiomyocyte Hypertrophy

ZHANG Yuan<sup>1</sup>, HAN Li-Sha<sup>1</sup>, HU Hai<sup>1</sup>, ZHANG Kun<sup>1</sup>, WANG Yan-Guo<sup>1</sup>, LIU Jia<sup>1</sup>, and NIU Chang-Cun<sup>2</sup>

(1. Department of Pathophysiology, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014060, China; 2. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

[KEY WORDS] Nrdp1 Gene; siRNA; Adenovirus Vector; Cardiomyocyte Hypertrophy

[ABSTRACT] **Aim** To construct and identificate recombinant adenovirus with siNrdp1 gene using AdMax system, and investigate the effect of Nrdp1 gene on cardiomyocyte hypertrophy. **Methods** Designing and synthesizing siRNA sequences targeting of Nrdp1 DNA, then cloned into the shuttle vector GV119 and homologous recombined with adenovirus backbone plasmid AdMax in BJ5183 bacteria transfected HEK293 cells, and got adenovirus containing Nrdp1-siRNA gene through packaging. Real-time quantitative PCR and Western blot were used to detect Nrdp1 expression in primary rat neonatal cardiomyocytes. After adenoviral containing siNrdp1 transfection and angiotensin II (Ang II) stimulation, real-time quantitative PCR was used to detect the expression of myocardial hypertrophy marker gene (ANF,  $\beta$ -MHC and Skeletal- $\alpha$ -actin) of rat neonatal cardiomyocytes. **Results** Digested PCR analysis and sequencing showed that interference Nrdp1 adenovirus was successfully constructed, and the titer of virus was  $1.5 \times 10^9$  PFU/mL. Real-time PCR and Western blot indicated that the expressions of Nrdp1 mRNA and protein were greatly inhibited after infection in rat primary cardiomyocytes with recombinant adenovirus particles ( $P < 0.001$ ). Nrdp1 gene silencing cloud significantly increase expression of Ang II induced cardiomyocyte hypertrophy marker genes including ANF,  $\beta$ -MHC and Skeletal- $\alpha$ -actin ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The recombinant adenovirus vector containing the Nrdp1-siRNA gene was successfully constructed, which can effectively silence Nrdp1 gene and enhance Ang II induced cardiomyocytes hypertrophy in vitro.

[收稿日期] 2014-07-15

[修回日期] 2014-10-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81200124); 内蒙古自治区自然科学基金资助(2012MS1107); 内蒙古自治区高等学校青年科技英才支持计划资助(NJYT-13-B19)

[作者简介] 张圆, 博士, 副教授, 研究方向为心血管分子病理与病理生理学, E-mail 为 susanyuan821@163.com。韩丽莎, 教授, 研究方向为复杂疾病病理生理学。胡海, 副教授, 研究方向为疾病发生机制。

心肌肥大是心肌细胞对多种病理刺激的一种适应性反应,许多体液因子可诱发心肌细胞肥大,如血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)、内皮素等。心肌肥大最本质的特征是心肌细胞基因表达的异常,如心房利钠因子(atrial natriuretic factor, ANF)、 $\beta$ -肌球蛋白重链( $\beta$ -myosin heavy chain,  $\beta$ -MHC)等基因在肥大心肌细胞中被活化。

泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin proteasome system, UPS)是蛋白质降解的主要途径,在心血管疾病中,特别是心肌肥厚、缺血再灌注损伤中发挥重要的作用<sup>[1]</sup>。神经调节素受体降解蛋白 1(neuregulin receptor degradation protein 1, Nrdp1)也称为环指蛋白 41(ring finger protein 41, RNF41),最早在小鼠造血干细胞和祖母细胞的研究过程中被发现<sup>[2]</sup>。Nrdp1 是一种泛素连接酶,具有泛素连接酶活性,它能够特异性识别某些底物蛋白,然后进行泛素化降解,并且可参与细胞增殖、促进细胞凋亡、抵抗炎症反应等生理和病理过程<sup>[3-5]</sup>。本文通过构建 Nrdp1 siRNA 腺病毒表达载体并感染新生大鼠原代心肌细胞,利用血管紧张素(angiotensin II, AngII)诱导心肌细胞肥大,观察 Nrdp1 在心肌细胞肥大过程中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

腺病毒包装系统 AdMax、限制性内切酶 Age I 和 EcoR I、穿梭质粒载体 GV119、pBHG lox  $\Delta E_{1,3}$  Cre 及 HEK293 细胞购自上海吉凯基因化学技术有限公司;DH5 $\alpha$  菌株购自 Stratagene 公司;T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司;Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 脂质体转染试剂、胶原酶购自 Invitrogen 公司;DMEM 培养基、DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶购自 Hyclone 公司;特级胎牛血清购自北京元亨圣马生物技术研究;Ang II、5-溴脱氧尿嘧啶、层粘连蛋白购自 Sigma 公司;实时定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;Trizol 试剂购自北京鼎国生物技术有限责任公司;兔抗鼠 Nrdp1 多克隆抗体购自 BETHYL 公司;兔抗鼠  $\beta$ -actin 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠、羊抗鼠抗体购自 Cell Signaling Technology 公司;靶 DNA 序列合成及测序由上海吉凯基因技术有限公司完成。SD 大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

### 1.2 穿梭载体 GV119-siRNA 的构建与鉴定

通过 GenBank 检索 Nrdp1 基因序列(GenBank

编号 NM\_001012195.1),按照 siRNA 的设计原则,在其开放阅读框区域选择 GGA CCT CAT CTG CCC TAT T 作为干扰靶序列。设计编码发夹结构 siRNA 的正义链和反义链,由上海吉凯基因化学技术有限公司合成寡核苷酸序列,正义链为 5'-CCG GGA GGA CCT CAT CTG CCC TAT TCT CGA GAA TAG GGC AGA TGA GGT CCT CTT TTTG-3',反义链为 5'-AAT TCA AAA AGA GGA CCT CAT CTG CCC TAT TCT CGA GAA TAG GGC AGA TGA GGT CCTC-3'。设计一对无关序列作为阴性对照。将靶向 Nrdp1 的干扰序列退火成为双链 DNA 片段,通过 T4 DNA 连接酶将经 Age I 和 EcoR I 双酶切线性化的穿梭质粒载体 GV119 和 DNA 片段连接,胶回收连接产物,转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌,在含有卡那霉素抗性的培养基上筛选阳性克隆,提取质粒,酶切鉴定后获得含 siRNA 表达框的腺病毒穿梭质粒 GV119-Nrdp1-siRNA。

### 1.3 构建携带 SPK1 特异干扰序列的腺病毒穿梭质粒

将经过 Age I 和 EcoR I 双酶切线性化的 2  $\mu$ g 穿梭载体 GV119-siRNA 进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收;取 200 ng 回收产物转化入预转 pAdMax 的 DH5 $\alpha$  感受态细菌中进行同源重组,在卡那霉素抗性培养基中培养 16 h 后,提取质粒,使用 PCR 法鉴定重组阳性克隆,然后委托上海美季生物技术有限公司进行测序验证。

### 1.4 重组腺病毒的包装、扩增及滴度测定

采用 AdMax 腺病毒包装系统,将携带特异干扰序列的腺病毒穿梭质粒与携带腺病毒大部分基因组的辅助包装质粒共转染 HEK293 细胞,产生重组腺病毒。培养 5~7 h 更换含血清的 DMEM 培养基,24 h 后观察细胞形态变化及绿色荧光表达情况。10~12 天后当 90% 以上细胞出现细胞病变时,收集细胞,经过液氮速冻、37℃ 水浴溶解,反复冻融 4 次,裂解细胞收集病毒上清液,用上清液再感染 HEK293 细胞,大量扩增腺病毒并分装保存于 -80℃。获得的重组腺病毒命名为 Ad-Nrdp1-siRNA。利用终点稀释法检测病毒滴度,按病毒滴度 =  $10(x + 0.8)$  (PFU/mL),  $x$  为  $10^{-1}$  到  $10^{-13}$  依次稀释度下 CPE 阳性率总和。

### 1.5 乳鼠原代心肌细胞的培养和处理

采用差速贴壁法和酶消化法分离心肌细胞。选取出生后健康的 1~3 天 SD 大鼠乳鼠,酒精消毒,剪取心脏,放入冰冷的 D-Hanks 中,用剪刀剪取心尖部组织,将其剪为约 1 mm<sup>3</sup> 碎块,加入混合消化酶(0.07% 胰蛋白酶 + 0.04% 胶原酶),置 37℃ 磁

力搅拌下反复消化,将消化细胞差速贴壁 2 h,吸出细胞悬液并离心,弃上清,吹打细胞悬液并接种于培养皿,37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,24 h 后观察心肌细胞贴壁和搏动情况,为后续实验做准备。分别利用重组干扰腺病毒 Ad-siNrdp1 和对照组腺病毒 Ad-control 感染大鼠原代心肌细胞,24 h 后荧光显微镜下观察绿色荧光表达情况,然后分别给予 Ang II (100 nmol)处理心肌细胞 18 h,弃掉培养基,加入 Trizol 提取 RNA。

1.6 实时定量 PCR 检测

根据 Trizol 试剂说明书提取心肌细胞总 RNA, RNA 纯度用 OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> 鉴定,取 2 μg RNA 进行逆转录合成 cDNA,以 1μg cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应,扩增条件为 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 复性 34 s, 40 个循环。各种基因的定量 PCR 引物序列见表 1。计算目的基因和 β-actin 的比值做相对定量,采用比较 CT 法进行数据分析。

表 1. 实时定量 PCR 的引物序列

Table 1. The sequence of real-time PCR primers	
基 因	引物序列
Nrdp1	正义链 5'-AGG GAA GGA AGA GGG TAG-3'
	反义链 5'-TAC AAT CAC AGG ACT GAA GAG-3'
ANF	正义链 5'-ATG GGC TCC TTC TCC ATC AC-3'
	反义链 5'-TCT TCG GTA CCG GAA GCT G-3'
β-MHC	正义链 5'-GCA GCT TAT CAG GAA GGA ATA C-3'
	反义链 5'-CTT GCG TAC TCT GTC ACT C-3'
Skeletal-α-actin	正义链 5'-TCA GGC GGT GCT GTC TCT CT-3'
	反义链 5'-TCC CCA GAA TCC AAC ACG AT-3'
GAPDH	正义链 5'-GTG CCG CCT GGA GAA ACC T-3'
	反义链 5'-TTG CTG TAG CCG TAT TCA TTG TCA TA-3'

1.7 Western blot 检测

SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品,将凝胶中的蛋白样品电转至 PVDF 膜,牛奶封闭 1 h,滴加一抗 (1:1000),4℃ 摇床过夜, TBST 清洗,二抗室温孵育 1 h, TBST 清洗, ECL 显色,暗室曝光,观察结果并保存。

1.8 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 穿梭质粒的鉴定

收集 LB 平板上培养长出的克隆,利用载体上的引物进行 PCR 鉴定,引物序列上游为 5'-GGA

CCT CAT CTG CCC TAT T-3',下游为 5'-AAT AGG GCA GAT GAG GTC CTC-3'。阳性克隆 PCR 片段大小为 365 bp,空载体克隆 PCR 片段大小为 307 bp (图 1)。挑选阳性克隆进行测序,结果显示插入序列正确无误,获得所需的穿梭质粒载体 (图 2)。

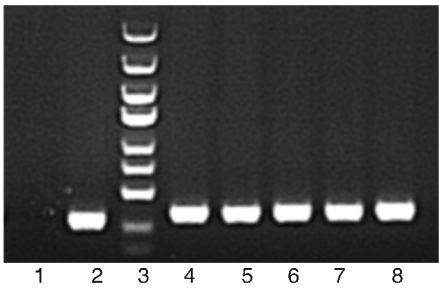


图 1. PCR 鉴定 Nrdp1 腺病毒穿梭质粒 1 为阴性对照 (ddH<sub>2</sub>O), 2 为空载体克隆 (307 bp), 3 为 Marker, 4 ~ 8 为阳性克隆 (365 bp)。Marker 从上至下分别为 5 kb、3 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp。

Figure 1. Nrdp1 siRNA adenovirus shuttle plasmid identified by PCR

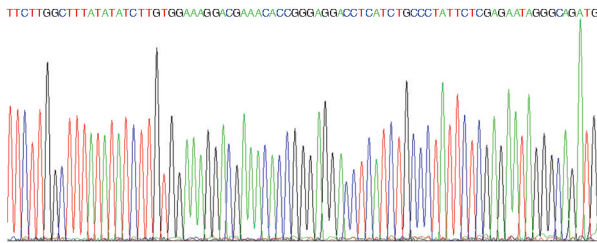


图 2. 测序鉴定 Nrdp1 siRNA 表达载体的插入序列  
Figure 2. The insert sequencing results of the Nrdp1 siRNA

2.2 重组干扰腺病毒载体的包装和扩增情况

干扰腺病毒载体经酶切后,转染至 HEK293 细胞中进行包装,10 天后可观察到明显的细胞病变效应,细胞肿胀,脱落 (图 3)。经终点稀释法测定并计算出病毒滴度为 1.5E + 9 PFU/mL。

2.3 重组干扰腺病毒感染原代心肌细胞效果

与 Ad-control 组相比,感染 Ad-Nrdp1-siRNA 腺病毒的原代心肌细胞中 Nrdp1 mRNA 和蛋白的表达明显降低 ( $P < 0.001$ ; 图 4)。

2.4 沉默 Nrdp1 对 Ang II 诱导心肌肥大标志基因的影响

未给予 Ang II 刺激时,与 Ad-control 组相比, Ad-siNrdp1 组 ANF、β-MHC 和 Skeletal-α-actin 的表达无显著差异。给予 Ang II 刺激后,上述基因的表达明显增高 ( $P < 0.01$ ),且 Nrdp1 基因的沉默对 Ang II 所致心肌肥大标志基因的表达具有显著地促进作



用( $P < 0.01$ ;图 5)。

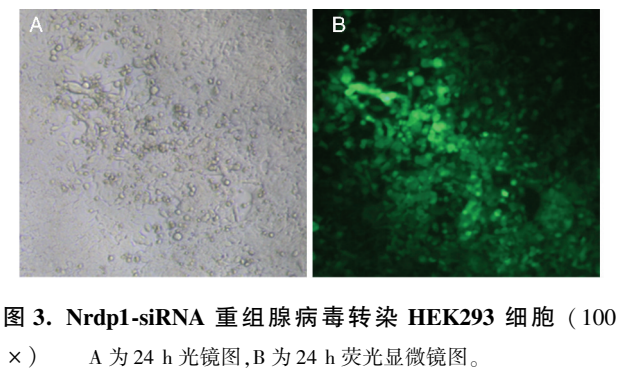


图 3. Nrdp1-siRNA 重组腺病毒转染 HEK293 细胞 (100 ×) A 为 24 h 光镜图,B 为 24 h 荧光显微镜图。

Figure 3. Nrdp1-siRNA recombinant adenovirus packaged and transduced in HEK293 cells(100 ×)

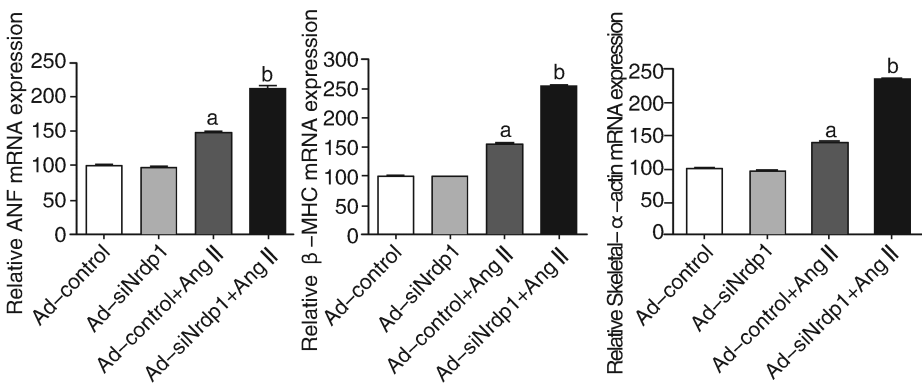


图 5. 沉默 Nrdp1 上调 Ang II 诱导的心肌细胞肥大标志基因的表达 ( $n = 3$ ) a 为  $P < 0.01$ ,与 Ad-control 组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与 Ad-control + Ang II 组比较。

Figure 5. Silencing Nrdp1 increases the expression of hypertrophy-associated gene in rat primary cardiomyocytes after Ang II stimulation ( $n = 3$ )

### 3 讨论

心肌受到多种刺激因素的影响后可以发生肥大性生长,进而导致心功能受损。既往研究表明心肌细胞肥大机制的关键在于探寻信号传导通路的调控机制。心肌肥大的信号传导通路是一个复杂的调节网络,AKT 信号途径和 ERK 的激活参与了心肌肥大的发生发展,被认为是调节心肌细胞肥大的重要因素<sup>[6-7]</sup>。

UPS 主要由泛素激活酶 (E1)、泛素交联酶 (E2)、泛素连接酶 (E3) 和 26 s 蛋白酶体组成,可有效地识别和泛素化蛋白底物或酶底物。其中,泛素连接酶是促进蛋白底物降解的限速酶,在底物的识别和降解过程中起着关键作用。近年研究证实泛素连接酶包括 atrogin-1<sup>[8]</sup>、肌肉特异性环指蛋白 1<sup>[9]</sup>及 Hsc70 羧基末端反应蛋白<sup>[10]</sup>等通过降解不同

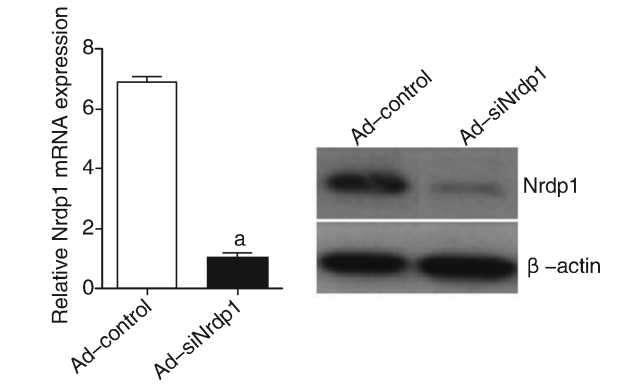


图 4. Ad-siNrdp1 腺病毒载体感染原代心肌细胞的效率及干扰效果验证 ( $n = 3$ ) a 为  $P < 0.001$ ,与 Ad-control 组比较。

Figure 4. The identification of Nrdp1-siRNA adenoviral vector infected rat primary cardiomyocytes ( $n = 3$ )

的蛋白底物,调节相应的信号通路参与心肌肥大的发展过程。

Nrdp1 在成人各组织中具有广泛的分布,尤其在心脏、大脑、骨骼肌、性腺中表达丰富。目前发现 Nrdp1 的作用底物有 BRUCE、髓样分化初级反应基因 88 (myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88)、TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1)、表皮生长因子受体 3 (ErbB3) 和 Par-kin,通过作用于这些底物蛋白来调节生理或疾病过程,如:Nrdp1 与神经调节蛋白受体 ErbB3 结合,泛素化降解 ErbB3,抑制细胞增殖<sup>[3]</sup>;Nrdp1 可泛素化降解凋亡抑制蛋白 BRUCE,促进细胞凋亡<sup>[4]</sup>;Nrdp1 通过促进 MyD88 的泛素化和降解,抑制 NF- $\kappa$ B 的活化和炎性细胞因子的产生,在 Toll 样受体的信号传导过程中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。虽然研究证明 Nrdp1 在心脏中表达丰富,但是关于 Nrdp1 在调节心肌细胞

和心脏功能中的报道较少。

本研究组在前期工作中首次发现大鼠原代心肌细胞过表达 Nrdp1 促进缺血再灌注损伤诱导的心肌细胞凋亡,揭示 Nrdp1 通过抑制其靶蛋白 ErbB3 及下游的信号分子激活,从而加重缺血再灌注诱导的心肌损伤<sup>[11]</sup>。此外,又发现 Nrdp1 可加重阿霉素诱导的心肌细胞凋亡,降低细胞活力,且 Nrdp1 通过抑制相关信号蛋白的激活而促进阿霉素诱导的心脏功能失调<sup>[12]</sup>。关于 Nrdp1 对心肌肥大的调节作用,尚无相关报道。前期体外心肌细胞的实验中发现提高 Nrdp1 的表达活性可下调缺血再灌注诱导的 AKT 和 ERK1/2 的激活水平;相反,降低 Nrdp1 的表达活性可上调缺血再灌注诱导的 AKT 和 ERK1/2 的激活水平。由此推测 Nrdp1 可能通过调节它的已知底物蛋白或未知的心肌特异性底物或关键蛋白的活性水平来延缓心肌肥大的发生发展。

本研究成功构建了 Nrdp1-siRNA 腺病毒,感染原代心肌细胞的效率可达到 90% 以上,可以用于细胞或动物实验,进而对 Nrdp1 的功能及其与心肌肥大的关系进行初步探讨。本研究中,我们采用 Ad-Max 腺病毒包装系统,通过细菌体内同源重组的方法构建针对 Nrdp1 基因的 siRNA 重组腺病毒载体。在随后研究中,分别利用实时定量 PCR 和 Western blot 方法在 mRNA 水平和蛋白水平证实,针对 Nrdp1 基因的 siRNA 重组腺病毒能够有效地抑制 Nrdp1 的表达。通过实时定量 PCR 检测心肌细胞肥大标志基因的表达,结果发现,在没有 Ang II 刺激的心肌细胞内,抑制 Nrdp1 表达对 ANF、 $\beta$ -MHC 和 Skeletal- $\alpha$ -actin 的表达无明显影响,但是抑制 Nrdp1 表达的心肌细胞在受到 Ang II 刺激后,肥大程度显著高于 Nrdp1 表达正常的心肌细胞,提示沉默 Nrdp1 后可加重 Ang II 诱导的心肌肥大效应,即表明 Nrdp1 对 Ang II 诱导的心肌肥大具有负性调控作用。关于沉默 Nrdp1 加重 Ang II 所致心肌细胞肥大的机制尚不明确,可能与以下因素有关:①降低 Nrdp1 的表达可上调 Ang II 诱导的 AKT 活性水平,沉默 Nrdp1 后可通过增强心肌细胞内 AKT 磷酸化水平而促进 AKT 信号通路介导的细胞生长<sup>[11]</sup>,加重心肌细胞肥大。②降低 Nrdp1 的表达来促进心肌肥大的作用还可能与 BRUCE 有关,BRUCE 是一种凋亡抑制蛋白,属于凋亡蛋白抑制因子家族成员之一,具有调节细胞周期和调控死亡受体介导信号传导的功能,Nrdp1 可泛素化降解 BRUCE,促进细胞

凋亡,抑制细胞增殖<sup>[4]</sup>,如果沉默 Nrdp1 的表达,泛素化降解 BRUCE 的作用会减弱,抑制细胞凋亡,促进心肌肥大。上述观点还需要进一步的研究证实。

上述实验结果为进一步研究 siNrdp1 是如何引起心肌细胞肥大的分子机制以及研究 Nrdp1 与心肌重塑的关系提供了重要的实验基础。

#### [参考文献]

- [1] Li HH, Vishram KD, Zhang CL, et al. Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex [J]. J Clin Invest, 2004, 114 (8): 1 058-071.
- [2] Abdullah JM, Li X, Nachtman RG, et al. FLRF, a novel evolutionarily conserved RING finger gene, is differentially expressed in mouse fetal and adult hematopoietic stem cells and progenitors [J]. Blood Cells Mol Dis, 2001, 27 (1): 320-333.
- [3] Ingalla EQ, Miller JK, Wald JH, et al. Post-transcriptional mechanisms contribute to the suppression of the ErbB3 negative regulator protein Nrdp1 in mammary tumors [J]. J Biol Chem, 2010, 285 (37): 28 691-697.
- [4] Qiu XB, Markant SL, Yuan J, et al. Nrdp1-mediated degradation of the gigantic IAP, BRUCE, is a novel pathway for triggering apoptosis [J]. EMBO J, 2004, 23 (4): 800-810.
- [5] Wang C, Chen TY, Zhang J, et al. The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 'preferentially' promotes TLR-mediated production of type I interferon [J]. Nat Immunol, 2009, 10 (7): 744-752.
- [6] 陈志衡, 杨作成. PI3K-Akt-mTOR 信号通路病毒性心肌炎 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2012, 32 (3): 226-230.
- [7] 许研, 刘海梅, 徐进文, 等. ERK1/2 蛋白在 17 $\beta$ -雌二醇抑制睾酮诱导的心肌细胞肥大反应中的作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (10): 876-880.
- [8] Zeng Y, Wang HX, Guo SB, et al. Transcriptional effects of E3 ligase atrogin-1/MAFbx on apoptosis, hypertrophy and inflammation in neonatal rat cardiomyocytes [J]. PLoS One, 2013, 8 (1): e53831.
- [9] Maejima Y, Usui S, Zhai P, et al. Muscle-specific RING finger 1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy through down-regulation of calcineurin A [J]. Circ Heart Fail, 2014, 7 (3): 479-490.
- [10] Schisler JC, Rubel CE, Zhang C, et al. CHIP protects against cardiac pressure overload through regulation of AMPK [J]. J Clin Invest, 2013, 123 (8): 3 588-599.
- [11] Zhang Y, Zeng Y, Wang M, et al. Cardiac-specific overexpression of E3 ligase Nrdp1 increases ischemia and reperfusion-induced cardiac injury [J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106 (3): 371-383.
- [12] Zhang Y, Tian C, Du J, et al. Overexpression of Nrdp1 in the heart exacerbates doxorubicin-induced cardiac dysfunction in mice [J]. PLoS One, 2011, 6 (6): e21104.

(此文编辑 文玉珊)