

分类号_____

论文编号_____

密 级 _____ 公开

海军军医大学

博士学位论文

DCIP 通过维持线粒体稳态调控巨噬细胞在
急性炎症中的免疫应答

DCIP Regulates Immune Response of Macrophages
During Acute Inflammation via Maintaining
Homeostasis of Mitochondria

研究生姓名: 徐博文 学号: 20202005

指导教师: 李楠 教授 海军军医大学基础医学院

学科、专业: 免疫学

学位类型: 学术学位

答辩日期: 2023年5月26日

二〇二三年五月

分类号_____

论文编号_____

密 级_____公开

海军军医大学

博士学位论文

DCIP 通过维持线粒体稳态调控巨噬细胞在 急性炎症中的免疫应答

DCIP Regulates Immune Response of Macrophages During
Acute Inflammation via Maintaining Homeostasis of
Mitochondria

研究生姓名:	徐博文	学号:	20202005
指导教师:	李楠 教授	海军军医大学基础医学院	
学科、专业:	免疫学		
学位类型:	学术学位		
答辩委员会主席:	储以微 教授	复旦大学上海医学院	
委员:	方以群 教授	海军军医大学特色医学中心	
	康九红 教授	同济大学生命科学与技术学院	
	王青青 教授	浙江大学医学院	
	杨鹏远 教授	中国科学院生物物理研究所	
答辩日期:	2023年5月26日		

二〇二三年五月

目 录

缩略词表.....	6
第一部分 DCIP 抑制巨噬细胞在急性炎症中的免疫应答	8
一、 前言.....	8
二、 材料与方法.....	11
三、 实验结果.....	25
四、 讨论.....	30
参考文献.....	31
第二部分 DCIP 抑制巨噬细胞在急性细菌性炎症中的免疫应答	36
一、 前言.....	36
二、 材料与方法.....	36
三、 实验结果.....	42
四、 讨论.....	47
参考文献.....	48
第三部分 DCIP 抑制炎症的分子机制探索	50
一、 前言.....	50
二、 材料与方法.....	50
三、 实验结果.....	53
四、 讨论.....	58
五、 主要意义和创新之处.....	61
参考文献.....	61
文献综述.....	64
参考文献.....	68

摘要

背景：在细菌感染急性期的病理过程中，炎症的转归是消退还是扩大，不仅是机体和入侵病原体动态博弈的过程，也是一系列复杂免疫调控的结果，但是上述机制尚未得到充分阐明。本课题旨在寻找新的急性炎症相关分子，完善炎症调控机制理论，探索潜在治疗靶点。树突状细胞来源干扰素 γ 诱导蛋白（dendritic cell-derived interferon-gamma induced protein, DCIP）是本实验室团队于 2000 年在首次在人类树突状细胞中克隆并鉴定的天然免疫相关蛋白，已有研究证实，DCIP 具有如下功能：1. 抵御肿瘤和某些自身免疫性疾病；2. 参与了抗多种病毒的免疫应答；3. 维持细胞基因组的稳定。上述功能的发挥，均同其脱氧核苷三磷酸酶（dNTPase）活性相关，即将 dNTP（Deoxyribonucleoside triphosphates）水解为 dNs（脱氧核苷）和 PPPi（三磷酸基团）的能力。另外，人源 DCIP 有一个被认为和抗病毒活性有关的磷酸化位点 T592，细胞周期蛋白依赖性激酶（Cyclin dependent kinase, CDK）调控该位点的磷酸化，但其是否影响 DCIP 的 dNTP 酶活性尚存在争议。在鼠源 DCIP 与 T592 对应的同源磷酸化位点为 T634，但是对于 T634 磷酸化是否同样影响 DCIP 的抗病毒功能目前尚不明确。尽管目前针对 DCIP 在抗病毒、抗自身免疫和抗肿瘤等方面的研究相对较为深入，但是其是否具有抗细菌感染性炎症的免疫功能及其详细机制，目前尚未有相关报道。本课题的预实验结果表明，在 LPS 刺激的野生型小鼠巨噬细胞中，DCIP 的表达呈时间相关性先升高后降低，提示其可能参与了炎症的天然免疫调控，因此我们决定对其开展进一步研究。

方法：我们利用 Cas9 基因编辑技术，分别构建了髓系 *Dcip* 条件性敲除 (*Dcip*^{-/-}) 小鼠品系和 *Dcip*^{-/-} RAW264.7 小鼠巨噬细胞系作为本课题的研究模型，以评估 DCIP 在 LPS 诱导急性炎症中的作用。另外，我们构建了全长野生型鼠源 DCIP 的真核表达载体，并在此基础上构建了如下突变体：1. 使 DCIP 的 dNTP 酶失活的突变体 H238A/D239A；2. 使 T634 位点磷酸化缺失的突变体 T634A；3. 使 T634 位点模拟磷酸化的突变体 T634D。通过将上述全长 DCIP 或 DCIP 突变体在 *Dcip*^{-/-} RAW264.7 细胞内过表达并观察表型回复，进一步明确 DCIP 在急性炎症中的功能，以及在这一过程中，dNTP 酶活性和 T634 磷酸化位点的影响。

结果：体内实验结果，腹腔注射 LPS 的 *Dcip*^{-/-} 小鼠相比于对照小鼠血清中 IL-6、TNF α 、乳酸等炎症因子水平更高；HE 染色显示，*Dcip*^{-/-} 小鼠肺组织内有更多炎性细胞浸润，伴有肺泡腔狭窄，肺泡壁增厚等病理特征。在致死量 LPS 注射下，*Dcip*^{-/-} 小鼠相比于对照小鼠，在 60 小时观察时间内的存活率显著降低。体外实验结果，LPS 刺激的 *Dcip*^{-/-} 腹腔巨噬细胞相比于对照细胞表达更高水平的 IL-6、TNF α 、

IFN β , 对 LPS-TLR4 通路上的关键蛋白总量和磷酸化水平进行检测, 发现 *Dcip*^{-/-} 腹腔巨噬细胞的 TLR4 通路活化更显著; 在经过 M1 极化诱导后, *Dcip*^{-/-} 腹腔巨噬细胞相比对照细胞有更高的 M1 极化比例; 另外, 在静息和 M1 极化诱导状态下, *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞的线粒体膜电位降低, 线粒体来源 ROS 升高, 线粒体有氧呼吸受抑制, 而糖酵解代偿性增加。尽管 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞的线粒体功能受损, 但是并未观察到显著的细胞凋亡, 在静息状态的 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞中, 观察到了线粒体自噬, 而对照细胞则无此表型。在 *Dcip*^{-/-} RAW264.7 中分别转染全长野生型 DCIP 及其突变载体, 用 LPS 刺激后检测细胞的 IL-6 分泌, 或诱导细胞向 M1 极化后, 分别检测细胞的膜电位水平、M1 细胞极化比例。结果表明, DCIP 能够抑制炎症因子分泌、维持线粒体膜电位和抑制细胞的 M1 极化, 上述功能依赖于 DCIP 的 dNTP 酶活性, 并且受到磷酸化位点 T634 的调控。最后, 我们探索了 DCIP 调控线粒体功能的潜在互作分子。co-IP 和使用激光共聚焦显微镜的免疫荧光共定位分析证实 DCIP 与电压依赖性阴离子通道 1 (Voltage Dependent Anion Channel 1, VDAC1) 存在相互作用。VDAC1 是一个定位于线粒体外膜的通道蛋白, 能够转运多种物质通过线粒体外膜, 因此可能参与到 DCIP 介导的线粒体内 dNTP 池调控, 从而影响线粒体基因组的稳定。VDAC1 寡聚化将使线粒体外膜上形成孔洞, 使细胞色素 c 泄露至胞浆引发细胞凋亡。另外有研究表明, Pink1-Parkin 通路介导的 VDAC1 泛素化可招募蛋白 p62 和 LC3B, 形成线粒体自噬。因此, DCIP-VDAC1 相互作用可能通过上述机制影响线粒体的状态。IP 联用蛋白鉴定质谱的结果提示, 内质网脂筏相关蛋白 1 (ER Lipid Raft Associated 1, ERLIN1) 也和 DCIP 存在相互作用。在细胞内存一种叫做“线粒体相关内质网膜” (Mitochondrial Associated ER Membrane, MAM) 的微观结构, 是内质网和线粒体进行物质运输和信号转导的部位, 而内质网脂筏是 MAM 的组成之一。ERLIN1 作为内质网脂筏上的关键蛋白, 帮助稳定了 MAM, 同时 ERLIN1 被证实通过和 AMBRA1、VDAC1 的相互作用, 调控线粒体自噬。我们的研究结果表明, DCIP 和 ERLIN1、VDAC1 同时存在互作, 提示其可能通过 MAM 结构调控线粒体的功能。

结论: 本课题发现了 LPS-TLR4 信号传导新的调节机制, DCIP 通过与 VDAC1、ERLIN1 等分子的相互作用, 维持线粒体功能、抑制 LPS-TLR4 通路诱导的急性炎症和巨噬细胞 M1 极化。

关键词: DCIP, 巨噬细胞, VDAC1, 线粒体, ERLIN1, TLR4, 急性炎症, M1 极化

Abstract

Background: In the pathological process of the acute phase of bacterial infection, whether the outcome of inflammation is mitigation or exacerbation, depends not only on the dynamic game between host and invading pathogens, but also on the important role that molecular mechanism of immune regulation plays. However, the above mechanism has not been fully elucidated. Our research aims to find new molecules related to acute inflammation, improve the theory of inflammation regulation, and explore potential therapeutic targets. DCIP (Dendritic cell-derived interferon-gamma induced protein) is an innate immune associated protein that is first cloned and identified in human dendritic cells by the research team of our laboratory in the year of 2000. Based on the current research progress, DCIP has the following functions: 1. Being protective in anti-autoimmune diseases; 2. Involved in immune responses against multiple viruses; 3. Maintaining the stability of the cell genome. The exertion of the above functions is related to its dNTPase activity, namely, the ability to hydrolyze deoxynucleotide triphosphates into dNs (deoxynucleosides) and PPPi (inorganic triphosphate). Human DCIP has a phosphorylation site T592 thought to be involved in antiviral activity, but whether it affects the dNTPase activity of DCIP is controversial. Cyclin dependent kinase (CDK) regulates the phosphorylation of this site. In murine DCIP, the homologous phosphorylation site corresponding to human DCIP is T634. However, the function of T634's phosphorylation is still unclear. Although the current research on DCIP in its anti-viral, anti-autoimmune and anti-tumor aspects is relatively in-depth, there are no relevant reports about whether DCIP has anti-bacterial function and the detailed mechanism. Our previous studies found that the expression of DCIP increased and then decreased in a time-dependent manner in LPS-stimulated wild-type mouse macrophages, suggesting that it may be involved in the innate immune regulation of inflammation. So, we decided to study it further.

Methods: Monocyte-macrophage specific *Dcip* knockout (*Dcip*^{-/-}) mice and *Dcip*^{-/-} mouse macrophage cell line RAW264.7 were constructed and used as research models to evaluate the role of DCIP in TLR4-activated inflammation. In addition, we constructed an expression vector of full-length wild-type murine DCIP, and the following mutants on this basis: 1. Mutant H238A/D239A that specifically inhibits the activity of dNTPase; 2. T634 phosphorylation inhibitory mutant T634A; 3. T634 phosphorylation mimic mutant T634D. By overexpressing the above full-length DCIP or DCIP mutants in *Dcip*^{-/-} RAW264.7

cells and observing phenotypic reversion, the function of DCIP in acute inflammation and the influence of dNTPase activity and T634 phosphorylation site in this process might be further clarified.

Results: *In vivo*, LPS-challenged *Dcip^{-/-}* mice showed higher serum inflammatory factors including IL-6, TNF α and lactate. HE staining of sections showed that *Dcip^{-/-}* mice had more inflammatory cell infiltration in lung tissues, accompanied with pathological features such as narrowing of the alveolar cavity and thickening of the alveolar wall. Under lethal LPS injection, *Dcip^{-/-}* mice had significantly lower survival rates over a 60 hours observation period compared to control mice. *In vitro*, LPS-treated *Dcip^{-/-}* peritoneal macrophages had higher level of IL-6, TNF α and IFN β as well as more activated TLR4 pathway. *Dcip^{-/-}* peritoneal macrophages had a higher tendency to be M1-polarized than control cells upon M1 induction, accompanied with oxidative stress, depolarization and dysfunction of mitochondria. But the glycolysis of *Dcip^{-/-}* macrophages increased compensatively. Though mitochondrial function of *Dcip^{-/-}* macrophages were impaired, they didn't undergo apoptosis. Instead, mitophagy have been observed in *Dcip^{-/-}* macrophages, but not the control cells. These results could be reversed by overexpressing full length wild-type DCIP or its phospho-mimetic T634D mutant, whereas the other mutants, dNTP hydrolase-function-deprived H238A/D239A and phospho-ablative T634A, didn't exert the same effect. Lastly, co-IP and immunofluorescence assays confirmed that DCIP interacted with an outer mitochondrial membrane-localized protein, voltage-dependent anion channel-1 (VDAC1). IP-mass spectrum assay had identified that ER Lipid Raft Associated 1 (ERLIN1) was also an interacting protein of DCIP. VDAC1 is a channel protein localized on the outer mitochondrial membrane that transports a variety of substances through the outer mitochondrial membrane and may therefore participate in DCIP-mediated regulation of the mitochondrial dNTP pool, thereby affecting the stability of the mitochondrial genome. VDAC1 oligomerization will form pores on the outer mitochondrial membrane, allowing cytochrome c to leak into the cytoplasm and cause apoptosis. In addition, studies have shown that the Pink1-Parkin mediated VDAC1 ubiquitination can recruit proteins p62 and LC3B to initiate mitochondrial autophagy. Thus, DCIP-VDAC1 interactions may affect the state of mitochondria through the mechanisms described above. The results of immunoprecipitation followed by mass spectrometry (IP-MS) showed that ER Lipid Raft Associated 1 (ERLIN1) also interacted with DCIP. A microstructure called the mitochondrial Associated ER Membrane (MAM) is the site of

material transport and signal transduction between the endoplasmic reticulum and mitochondria, and the endoplasmic reticulum lipid raft is one of the components of MAM. ERLIN1 is a key protein on the endoplasmic reticulum lipid raft to help stabilize MAM. ERLIN1 has been revealed to regulate mitochondrial autophagy through interaction with AMBRA1 and VDAC1. Our results showed that DCIP interacts with ERLIN1 and VDAC1, suggesting DCIP may regulate mitochondrial function through MAM structure.

Conclusion: DCIP inhibits TLR4-induced acute inflammation and M1 polarization of macrophages by maintaining mitochondria function via interacting with VDAC1 and ERLIN1, which outlines a novel regulatory mechanism of TLR signaling upon LPS stimulation.

KEY WORDS: DCIP, macrophage, VDAC1, mitochondrion, ERLIN1, TLR4, acute inflammation, M1 polarization

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
DC	Dendritic Cell	树突状细胞
DCIP	dendritic cell-derived interferon-gamma induced protein	树突状细胞来源干扰素 γ
VDAC1	Voltage Dependent Anion Channel 1	电压依赖性阴离子通道 1
ERLIN1	ER Lipid Raft Associated 1	内质网脂筏相关蛋白 1
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RT	reverse transcription	反转录
qPCR	quantitative PCR	定量 PCR
TAE	Tris Acetate-EDTA buffer	Tris 乙酸盐 EDTA 缓冲液
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
MAM	Mitochondrial Associated ER Membrane	线粒体相关内质网膜
TBK1	TANK-binding kinase1	TANK 结合激酶 1
ROS	Reactive oxygen species	活性氧簇
TLR4	Toll-like receptors 4	Toll 样受体 4
TNF- α	Tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子- α
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
IRF3	Interferon regulatory factor 3	干扰素调节因子 3
IKK	I κ B kinase	I κ B 激酶
IFN- β	Interferon- β	干扰素 β
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
CoIP	Co-Immunoprecipitation	免疫共沉淀
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B	核转录因子 kappaB
SeV	Sendai Virus	仙台病毒
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
IL-6	Interleukin-6	白细胞介素 6
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene 1	维甲酸诱导基因蛋白 I
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
HIV	Human immunodeficiency virus	人免疫缺陷病毒
HE	Hematoxylin-eosin	苏木精-伊红
CBA	Cytometric beal array	流式微球实验
FC	Flow cytometry	流式

OCR	Oxygen consumption rate	耗氧率
ECAR	Extracellular acidification rate	细胞外酸化率
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1	PTEN 诱导激酶 1
IP3R	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor	肌醇 1,4,5-三磷酸受体

第一部分

DCIP 抑制巨噬细胞在急性炎症中的免疫应答

一、前言

(一) 巨噬细胞在急性炎症中发挥了关键作用

在细菌感染急性期，机体应对感染时产生的紊乱和过度的全身炎症反应，可进展为多器官功能障碍，严重时将引发休克^[1]。感染性休克具有较高的发病率和死亡率，全球每年有关临床病例超过 3000 万例，其中死亡超过 600 万例^[2]，同时还具有较高的复发率以及伴随长期的认知功能障碍^[3]。急性细菌感染给医疗系统带来的挑战主要来自于它的以下特点：1. 发病机制复杂，临床症状多样，这给临床实践中“早诊断、早治疗”的要求带来了困难，例如，免疫抑制期的患者并不总是发烧但是可能存在感染，而危重期患者有一定程度的高热，但可能未有感染^[4, 5]；2. 缺乏单一特异性诊断标志物，需要结合不同靶标及目前所处的病理阶段综合诊断^[6]；3. 治疗以早期给予广谱抗生素、吸氧和大量补液等支持治疗为主，缺乏特效治疗手段^[7]。产生上述挑战的原因，其根本在于目前在细胞生物学和分子生物学层面对于急性细菌感染发生及进展的机制认知不足，无法全面应对临床诊疗所面临的巨大挑战。

巨噬细胞作为天然免疫系统的重要组成，深度参与了败血症的进程，主要体现在以下两个方面：

首先，天然免疫应答是机体应对感染的第一道防线。在感染与炎症性疾病过程中，以巨噬细胞为代表的多种天然免疫细胞上表达模式识别受体（Pattern recognition receptors, PRR），通过识别病原相关分子模式（Pathogen-associated molecular patterns, PAMP），激活一系列信号通路，诱导炎症因子和 I 型干扰素的表达，进一步诱导下游效应蛋白表达，启动天然免疫及后期的适应性免疫应答。例如，巨噬细胞表面 Toll 样受体（Toll like receptor, TLR）识别细菌细胞壁中的脂多糖（Lipopolysaccharide, LPS）后，产生天然免疫应答的过程被认为是研究败血症的基本模型^[6]。在健康的机体中，即使没有经过有效的治疗，该炎症反应也是自限性的：随着局部病原体被有效清除，炎症消退。但是，在发生败血症的患者中，局部炎症反应被过度上调为全身性炎症，超过机体内环境稳态的调控范围，引发一系列代谢、循环紊乱，并最终导致危及生命的多器官功能障碍和脓毒性休克。因此，探索在炎症早期，巨噬细胞如何造成“适当炎症”与“过度炎症”差异的分子生物学机制，尤其

是寻找参与启动“过度炎症”瀑布效应的分子靶点，对于控制细菌感染急性炎症的发展，显得尤为关键。

另一方面，在败血症发生过度活化先天性免疫应答同时的，适应性免疫应答却产生耐受，即形成败血症免疫耐受期，这也被认为是败血症高死亡率和复发率的原因之一^[8]。巨噬细胞作为沟通天然免疫和适应免疫的桥梁，很可能参与诱导了败血症后期的免疫耐受。目前研究为上述猜测提供了部分证据，其具体机制包括：1. 巨噬细胞极化状态从 M1 向 M2 的转变。通常，在细菌感染的早期阶段巨噬细胞偏向 M1 表型分化，此时巨噬细胞活化并产生大量促炎介质，包括 TNF-α, IL-1 和一氧化氮（NO）以杀死入侵的病原体^[9]，如果不能迅速控制巨噬细胞介导的炎症反应，将形成细胞因子风暴，从而导致严重败血症的发生^[10]，为了抵消过度的炎症反应，M1 巨噬细胞发生凋亡或极化为 M2 表型，M2 巨噬细胞可产生 IL-10 等抑炎细胞因子，以保护机体免受过度伤害，随着感染的持续，机体可能表现出 LPS 耐受状态^[9]。有研究证实，NF-κB (nuclear factor kappa-B) 的 p50 亚基是 M2 驱动的 LPS 耐受状态的关键调节因子^[11]；2. 败血症患者巨噬细胞降低了 II 类 MHC 分子的表达，由于该分子具有向 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 展示外源肽的作用，因此缺乏 II 类 MHC 分子的巨噬细胞限制了 T 细胞的适应性免疫应答。例如有临床研究证实，在大多数败血症发病患者中，外周血单核细胞主要组织相容性抗原 (histocompatibility leukocyte antigen, HLA) (人的 II 类 MHC 分子) 表达受到明显抑制，但幸存者可在十天内恢复表达^[12]。另外低水平的 HLA 表达有较差的生存预后^[13]和更高的院内感染风险^[14]。

因此，无论是在败血症的早期启动，还是在败血症进展到免疫耐受期的过程中，巨噬细胞均发挥了关键作用。研究巨噬细胞功能状态及其对败血症病程的影响，有着重要的科学意义。

（二）本课题的研究对象——DCIP 的研究进展

树突状细胞来源于干扰素 γ 诱导蛋白 (dendritic cell-derived interferon-gamma induced protein, DCIP) 是本实验室研究团队于 2000 年首次在抗原活化的人树突状细胞 (dendritic cell, DC) 中自主发现并克隆的分子^[15]，目前又名 SAMHD1 (SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1)。人类蛋白图谱网站的数据显示，DCIP 的表达缺乏特异性，广泛存在于各组织器官和细胞类型，尤其在巨噬细胞中具有较高的表达^[16]。有研究表明，DCIP 具有脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP) 水解酶活性，能够将 dNTP 水解为脱氧核糖核苷 (deoxynucleoside, dN) 和三磷酸基团 (PPPi)^[17]，围绕着这一关

键功能，DCIP 具有多种生物学效应，深度参与到机体的免疫防御、免疫自稳和免疫监视，是重要的天然免疫调控分子。

首先，DCIP 在抗肿瘤、抗自身免疫中具有保护作用。DCIP 的突变和缺失，可能导致的临床疾病有 Aicardi Goutières 综合征——一种以进行性炎症性脑病、脑脊液中 IFN α 异常分泌和 IFN 刺激基因（IFN stimulated genes, ISG）表达上调为特征的神经退行性自身免疫病^[18]。目前关于 DCIP 和该病的成因有两种观点，1. 由 *Dcip* 缺陷引起的 dNTP 池失衡、基因组不稳定活化了 cGAS-STING 通路，导致 IFN α 升高并引发 Aicardi-Goutières 综合征^[19, 20]；2. DCIP 具有单链 RNA 3'外切酶活性，DCIP 缺失使胞内双链 RNA 积累，通过维甲酸诱导基因 I (retinoic-acid-inducible gene I, RIG-I) 受体活化了 I 型干扰素^[21]；更详细的机制还有待进一步研究。另外，在结肠癌^[22]、肺癌^[23]、慢性淋巴细胞白血病^[24]、恶性淋巴瘤^[25]等多种类型肿瘤中均发现了 DCIP 的突变。*Dcip* 缺陷造成的胞内 dNTP 池紊乱、基因组不稳定和慢性炎症可能是引起上述肿瘤的原因^[19, 26, 27]。然而，也有观点认为，DCIP 也不全发挥抗肿瘤的保护作用：尽管 DCIP 有利于维持健康人群的免疫监视，抑制肿瘤，但对于肿瘤患者，DCIP 的 dNTP 酶活性增强了核苷类似物抗肿瘤药物的代谢，使肿瘤对核苷类药物产生耐受^[28, 29]。因此，在抗肿瘤方面，DCIP 是一把双刃剑，其作用需要辩证看待。

其次，DCIP 参与了抗病毒免疫应答。人们最初发现 DCIP 可抑制 1 型艾滋病毒 (HIV-1) 的复制^[30]，可能的机制是：DCIP 对于调节 dNTP 代谢，维持胞内 dNTP 池的稳态具有重要作用^[31]，在非增殖细胞（如静息 CD4 $^{+}$ T 细胞、巨噬细胞）中，DCIP 通过限制胞内 dNTP 浓度在较低水平，减少了逆转录反应的底物来源，从而阻断了病毒的复制^[32]。更多的研究发现，DCIP 的抗病毒作用不仅局限于针对 HIV-1，也可以抑制其它 DNA 病毒，如人乳头状瘤病毒 (Human papillomavirus 16, HPV16)^[33]、乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV)^[34]、1 型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus 1, HSV-1)^[35]等，以及 RNA 病毒，如马传染性贫血病毒 (Equine infectious anemia virus, EIAV)^[36]、猫免疫缺陷病毒 (Feline immunodeficiency virus, FIV)^[36]等的复制。DCIP 的 dNTP 水解酶活性受到多种翻译后修饰的调节，例如 T592 磷酸化、C522 与 C341 或 C350 巯基氧化等，这些修饰阻断了 DCIP 的活性形式——四聚体的形成^[37, 38]；而 K405 的乙酰化增强了 dNTP 水解酶活性^[39]。上述机制表明，DCIP 的活性受到多种翻译后修饰机制的动态调节，以精确地调控 dNTP 池，不仅满足了细胞的核酸代谢需求，同时也使其具有抵抗病毒复制的能力^[40, 41]。

另外，DCIP 维持了细胞基因组的稳定。其机制包括：1. 调控 dNTP 池处于稳态：其对 DNA 复制和基因组的稳定至关重要，过低的 dNTP 池将导致复制应激^[42]，过高或碱基不平衡的 dNTP 池可能导致复制过程中碱基的错配掺入或 DNA 聚合酶停滞^[43]，

^{44]}; 2. 参与错误复制 DNA 的修复: DCIP 能够招募 MRE11 到双链 DNA 断端, 通过后者的核酸内切酶活性, 切除并降解错误复制的 DNA, 这是 DNA 复制纠错的重要机制, 避免了从错误复制叉溢漏的单链 DNA 引起的 I 型干扰素相关自身炎症反应^[45]; 3. 长散布元件-1 (Long interspersed element 1, LINE-1) 是一种内源性的 DNA 逆转录座子, 约占人类基因组的 17%^[46]。目前已经发现非常多的致病突变是由 LINE-1 介导逆转录转座引起的^[47]。DCIP 可以通过多种独立于 dNTP 水解酶以外的途径限制 LINE-1 的逆转录转座活性, 从而维持基因组的稳定^[48-50]。

综上, DCIP 是一种高表达于树突细胞及巨噬细胞, 具有调控 dNTP 池和基因组稳定功能, 以及抗肿瘤、抗自身免疫、抗病毒等功能生物学效应的重要天然免疫相关分子。然而, 目前 DCIP 在抗细菌炎症方面的研究还相对较少。Chen 等人发现, *Dcip* 敲除的 THP-1 人单核细胞系经过 LPS 刺激, 相比于对照细胞表达更高水平的 TNF α , 并且增加了 I κ B α 的磷酸化。Valverde-Estrella 等人发现用 LPS 刺激小鼠骨髓来源巨噬细胞 (Bone marrow-derived macrophages, BMDM) 后, DCIP 的表达升高。我们的前期实验也得到了相同的结果: 用 LPS 刺激野生型小鼠的腹腔巨噬细胞, DCIP 的表达逐渐升高, 到 24 小时达到最高, 随后逐渐降低。上述结果都提示 DCIP 可能参与了炎症相关的天然免疫调控, 有必要深入研究以明确其功能。

(三) 本课题的研究目的

基于已有研究背景和前期研究基础, 本课题将通过 Cas9 基因编辑技术, 分别构建髓系 *Dcip* 条件性敲除 (*Dcip*^{-/-}) 小鼠和 *Dcip*^{-/-} RAW264.7 小鼠巨噬细胞系作为本课题的体内、体外研究模型, 以明确 DCIP 在急性炎症天然免疫应答中发挥作用, 寻找 DCIP 在 LPS 诱导的急性炎症中发挥的免疫应答功能及其分子机制。

二、材料与方法

(一) 方法

1. 关于所有实验动物育种、饲养、操作的伦理说明

所有实验小鼠均在无特定病原体条件 (specific pathogen free, SPF) 下饲养繁殖, 所有涉及动物的实验均按照《实验动物管理条例》^[51]、《关于善待实验动物的指导性意见》^[52]和《实验动物福利伦理审查指南》^[53]等条例进行, 并经海军军医大学伦理委员会批准。

2. *Dcip*^{-/-}小鼠的构建、繁育和鉴定

1) 确定 *Dcip* 第 2 外显子为基因敲除位点

Dcip 基因 (NCBI 参考序列: NM_018851.4) 定位在小鼠的第二染色体上, 有 16 个外显子, 起始密码子 ATG 定位于第 1 外显子, TAG 终止密码子定位于第 16 外显子。我们选择第 2 外显子作为条件性敲除区域, 敲除第 2 外显子将导致 *Dcip* 的移码突变和功能缺失。5'-loxP 插入位点在第 1 内含子下游 4475bp 处; 3'-loxP 插入位点在第 2 内含子下游 5810 bp 处 (图 1.1A)。敲除片段长约 1370 bp, 并且经鉴定其中不含有其它已知基因 (图 1.1B)。

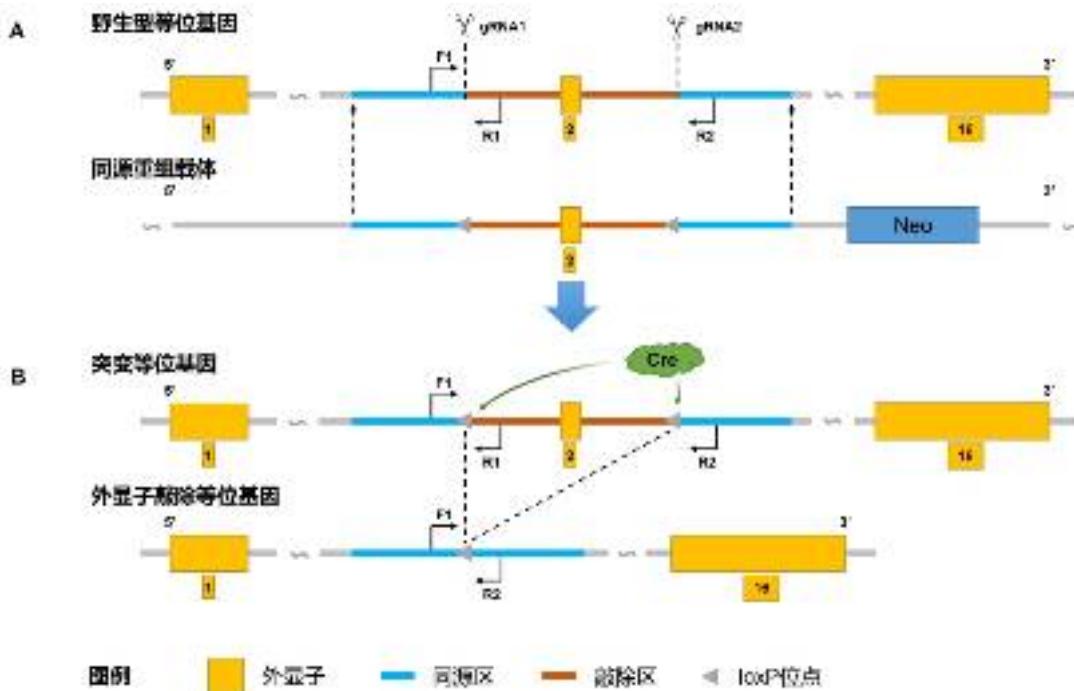
相应的 gRNA 序列如下:

gRNA1: TGTTGACAGGAAGGGATCGCTGG

gRNA2: TTGTGGTGACCGTGAACTAAGGG

2) 利用 Cas9 技术构建 *Dcip*^{fl/fl} 小鼠并和 *Lyz2-Cre* 杂交繁殖出目的小鼠

将 Cas9 基因编辑混合物 (包括靶向小鼠 *Dcip* 的 gRNA1/gRNA2、含有 loxP 位点和同源区的同源重组载体、Cas9 mRNA) 以显微注射的方式导入 C57BL/6N 品系雌鼠的受精卵, 使野生型等位基因被 Cas9 切除后替换成同源重组载体来源的带 loxP 位点的突变等位基因 (图 1.1A)。该受精卵由相同遗传背景的野生型雌鼠代孕, 生成 F0 代, 成熟后和野生型小鼠杂交生成 F1 代。F1 代自交生 *Dcip*^{fl/fl} 或 *Dcip*^{fl/+} 小鼠 F2 代。将 *Dcip*^{fl/fl} F2 代小鼠和带有 *Lyz* 启动子位点 Cre 酶的 *Lyz2-Cre* 工具鼠杂交, 生成 F3 代, 选择 *Dcip*^{fl/+}, *Lyz2-Cre* F3 代和 *Dcip*^{fl/fl} 杂交, 生成 *Dcip*^{fl/fl}, *lyz2Cre* F4 代, 即我们需要繁育的髓系特异性敲除 *Dcip* 小鼠 (后表示为 *Dcip*^{-/-}), 以 *Dcip*^{fl/fl} 纯合子作为对照。

图 1.1. *Dcip*^{-/-} 小鼠的基因编辑过程示意图

A. 野生型等位基因在 gRNA 的引导下被 Cas9 切断，受精卵以载体中同源的 DNA 片段为供体，修复 DNA 断端的同时为第 2 外显子两端加上 loxP 位点。B. 在 *Dcip*^{fl/fl}, *lyz2Cre* 小鼠的髓系细胞内，表达活化的 Cre 酶识别 *Dcip* 第 2 外显子两端 loxP 位点将其切除，此时 *Dcip* 因缺失第 2 外显子而被敲除

3) 小鼠基因型的鉴定方法

使用细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒（中国上海，捷瑞生物，GK0122）提取鼠尾组织内的基因组 DNA。剪取约 5~10mm 小鼠尾巴末端于 EP 管中，然后加入 400 μ L ACL Solution 和 10 μ L 的 Proteinase K，震荡混匀 1 分钟，然后置于 55°C 水浴 1~3 小时，在此期间适当取出混匀，帮助充分裂解。取出样品，待降至室温时轻轻震荡混。在 gDNA recovery Column 中加入 200 μ L Buffer CBS，12000rpm 离心 1 分钟，弃透过液备用。在经过预处理好的样品中，依次加入 300 μ L Ext solution 和 300 μ L AB solution，用力摇匀，然后 12000rpm 离心 5 分钟。溶液将分层，上层为蓝色的抽提层，下层为透明水相，两层溶液中间可能会有部分沉淀层，DNA 在下层水相中。添加 300 μ L AB Solution 摆匀后离心。将枪头穿过上层溶液，深入到下层溶液，将下层溶液仔细吸出到 gDNA recovery Column 中，尽量避免吸到上层溶液及中间层的沉淀。8000rpm 离心 1 分钟，取下 gDNA recovery Column，倒掉收集管中废液。将 gDNA recovery Column 放回收集管中，加入 500 μ L Wash Solution，8000rpm，室温离心 1 分钟。重复步骤 Wash Solution 清洗步骤一次。取下 gDNA recovery Column，弃去收集管中的废液。将柱放回收集管中，12000rpm，室温离心 1 分钟，以除去残留

Wash Solution。将柱放入新的洁净 1.5mL 离心管中，在柱中央加入 50~100 μ L Elution Buffer，室温或 55°C 放置 2 分钟。然后 12000rpm，室温离心 1 分钟。离心管中的液体即为基因组。

使用基因组 DNA、引物（序列见下文）、PCR 预混试剂（中国南京，诺唯赞，P222）进行聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR），反应体系如表 1.1，反应程序如表 1.2。PCR 反应结束后加入核酸上样缓冲液（中国南京，诺唯赞，P502-d1-AG）配成 PCR 产物样品待用。

表 1.1 PCR 反应体系

ddH ₂ O	加至 50 μ L
2 × Rapid Taq Master Mix	25 μ L
引物 1 (10 μ M)	2 μ L
引物 2 (10 μ M)	2 μ L
模板 DNA	x μ L (约 0.1 μ g)

表 1.2 PCR 反应程序

95°C	3min (预变性)	1 cycle
95°C	15s	
60°C	15s	35 cycles
72°C	15s	
72°C	5min (彻底延伸)	1 cycle

在 Tris 乙酸盐 EDTA 缓冲液 (Tris Acetate-EDTA buffer, TAE) 中加入 1% 的琼脂糖 (瑞士, LONZA, 50002)，微波加热煮沸，待稍冷却后 1:10000 加入核酸染料 (中国上海，天能，170-3006)，将溶液倒入插有上样孔梳的模具室温静置至凝固后，拔出孔梳，将琼脂糖凝胶转移至含有 TAE 溶液的电泳槽中，在上样孔内点入 20 μ L/孔 PCR 产物样品，100V 恒压直流电泳 30min，将凝胶转移至凝胶成像系统内拍照。

基因鉴定引物序列及 DNA 凝胶电泳结果判定：

小鼠 5'-loxP 位点鉴定引物序列如下 (引物位点如图 1.1A 所示)：

loxP F: ACACCTAGTAGTCCCTCTGAGGTG;

loxP R: TCTTTACCACAATCTGCCTGACA。

在 DNA 凝胶电泳图中，*Dcip*^{fl/fl} 为 200bp 的单条带 (图 1.2B)，*Dcip*^{+/+} 为 139bp 的单条带 (图 1.2A)，*Dcip*^{fl/+} 为 200bp 和 139bp 的双条带 (图 1.2A)。

小鼠 *Lyz2-Cre* 的鉴定引物序列如下：

Lyz2-Cre F: CCCAGAAATGCCAGATTACG;

Lyz2-Cre R: CTTGGGCTGCCAGAATTCTC。

Lyz2-Cre⁺ 鉴定结果为 700bp 的条带，*Lyz2-Cre*⁻ 鉴定结果为无条带（图 1.2C）。

使用细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒（中国上海，捷瑞生物，GK0122）提取小鼠腹腔巨噬细胞的基因组 DNA 后，以此为模板并使用引物 Knockout F、Knockout R（图 1.1B）进行 PCR 和 DNA 凝胶电泳，可确认 *Dcip* 在巨噬细胞中的敲除，Knockout F、Knockout R 引物序列如下：

Knockout F: ACACTAGTAGTCCCTCTGAGGTG;

Knockout R: AGTAAAAGCCCTGAACCTCTGTGAC。

发生敲除时鉴定条带长 267bp，野生型鉴定条带长 1637bp（图 1.2D）。

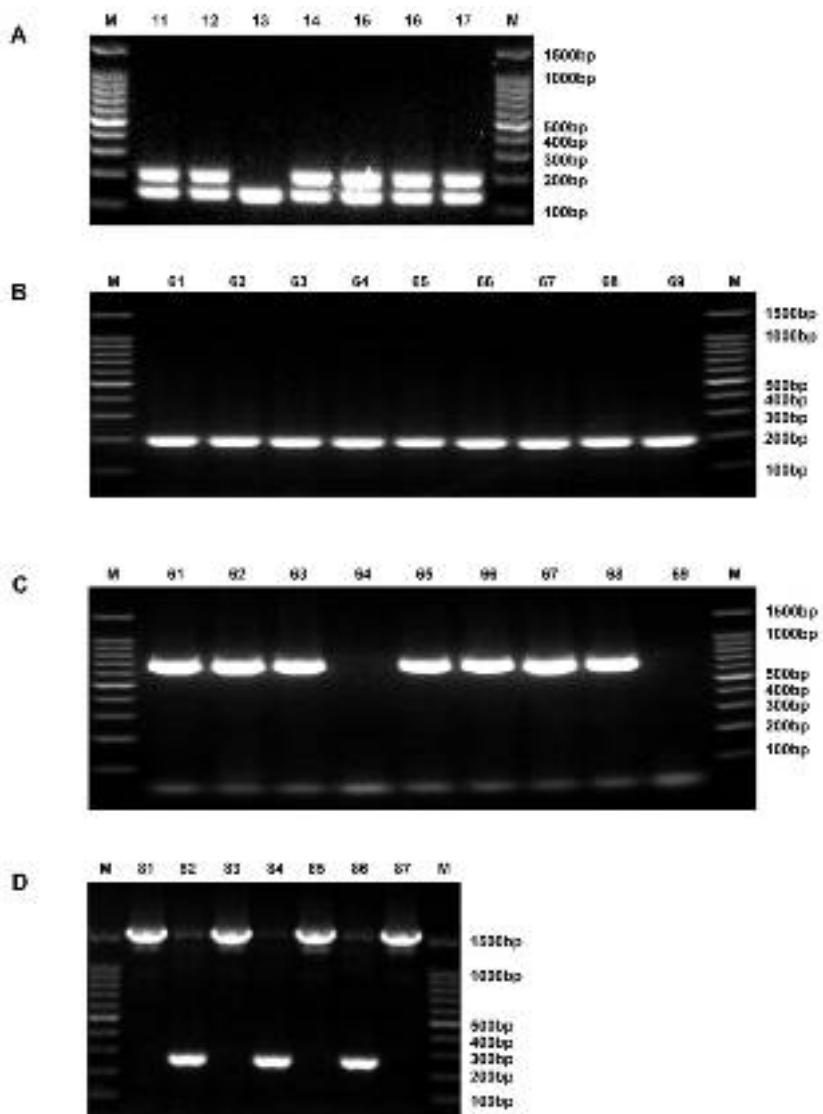


图 1.2. 髓系条件性敲除 *Dcip* 小鼠的代表性基因鉴定结果。A. F2 代 5'-loxP 位点鉴定结果，编号 11、12、14-17 的小鼠为 *Dcip*^{fl/fl} 杂合子；编号 13 的小鼠为 *Dcip*^{+/+} 纯合子。B. F4 代 5'-loxP 位点鉴定，

编号 61-69 的小鼠均为 *Dcip*^{fl/fl} 纯合子。C. F4 代 *Lyz2-Cre* 鉴定，编号 61-63、65-68 的小鼠均为 *Lyz2-Cre*⁺；编号 64、69 的小鼠均为 *Lyz2-Cre*⁻。D. F4 代 *Dcip* 敲除鉴定，编号 81、83、85、87 的小鼠均为未敲除 *Dcip* 小鼠，编号 82、84、86 的小鼠均为已敲除 *Dcip* 小鼠。

3. 小鼠原代腹腔巨噬细胞的分离培养

选取 6~8 周龄小鼠腹腔注射 2mL 无菌 3% 硫乙醇酸盐培养基（德国，Merck 公司 GranuCult 品牌，1.08191.0500），4 d 后麻醉处死小鼠，用 75 % 酒精浸泡小鼠 10 min 消毒。在无菌条件下剪开小鼠腹部皮肤使腹膜暴露，用 20 mL 注射器吸取约 20 mL RPMI-1640 培养基（美国，Thermo Fisher Scientific 公司 Gibco 品牌，11875-093），在小鼠腹腔内抽吸 10~15 次使巨噬细胞游离，最后回抽所有腹腔内液体，经过 70μm 滤网（美国，Corning 公司 Falcon 品牌，352350）过滤后将细胞悬液转移至 50 mL 离心管（美国，Corning 公司 Falcon 品牌，352070），4 °C 500g 离心 5 min。弃上清，用含 10 % FBS 的 DMEM 培养基（美国，Thermo Fisher Scientific 公司 Gibco 品牌，11965-092）重悬，吹打至单细胞悬液后用细胞计数板计数并铺板。培养 1 h 后，轻轻摇晃细胞板，弃上清，使用新鲜温热的 10 % FBS DMEM 培养基换液，小鼠原代腹腔巨噬细胞镜下呈圆梭形，贴壁，无增殖。

4. 小鼠急性炎症模型的构建

取 6-8 周的小鼠腹腔注射 LPS (15mg/kg)（德国，Merck，L2630），3 小时后眼眶静脉取血，麻醉处死后收完整肺叶固定于 4% 多聚甲醛固定液（中国上海，碧云天，P0099-100ml），作为 HE 染色样本备用，或者将肺脏剪碎后用胶原酶（德国，Merck，C6885-100MG）消化至单细胞悬液，用磁珠法（美国，stemcell，100-0659）分选巨噬细胞供流式检测用。血液样本储存于 EP 管内 4°C 过夜自然凝固，平衡后于第二天 1000rpm 4°C 离心 10min，收取上清即为血清样本，作为 ELISA 检测样本备用。为了观察比较小鼠在腹腔注射致死剂量 LPS 后的生存率，LPS 腹腔注射的剂量为 25mg/kg，注射后持续观察 60h，直至以完全丧失行为能力为观察终点。随后小鼠在麻醉后通过颈椎脱位实施安乐死。

5. Western 印记

每 2×10^6 个细胞加入 200μL 含有蛋白酶、磷酸酶抑制剂（美国，Thermo Fisher Scientific，78442）的蛋白裂解液（美国，英文特，SD-001/SN-002）充分裂解，柱式法提纯，BCA 法（美国，Thermo Fisher Scientific，23227）检测总蛋白浓度，使用裂解液将不同样品的总蛋白浓度配至均一，加入蛋白加样缓冲液（中国上海，生工，C508320）后于沸水中煮 8 分钟，立刻进行 Western 印记检测或储存于 -20°C 备

用。在电泳槽内装上预制胶（中国南京，金斯瑞生物科技有限公司，M00657），分别在内外液槽倒入足量 MOPS 缓冲液（中国南京，金斯瑞生物科技有限公司，C508320），在上样孔内分别点上 20 μ L 蛋白样本或蛋白 Marker（美国，Thermo Fisher Scientific，26616），200V 恒压电泳 30min 后，取下预制胶，快速转膜仪转膜后，室温封闭 1h，剪膜，加入稀释（中国上海，生工，P0273）的一抗 4°C 孵育过夜。第二天使用 TBST（中国上海，生工，C520009）清洗孵育一抗的膜 5 次，每次 5min，室温孵育二抗 1h，TBST 清洗孵育二抗的膜 5 次，每次 5min，在膜上加入 ECL 发光液（美国，Thermo Fisher Scientific，34580），于自动成像仪显影拍照。DCIP 有商业化抗体，预实验中通过转染全长过表达/对照质粒验证了该抗体的特异性（结果未显示）。

6. qPCR

取 1 \times 10⁷ 细胞以柱式法抽提总 RNA（中国上海，飞捷生物，220011），反转录、qPCR 分别先后根据反转录试剂盒（中国南京，诺唯赞，R323-01）及染料法实时荧光定量试剂盒（中国南京，诺唯赞，Q712-02）说明书的标准方案实施，引物序列见表 1.7，以 actin 为内参对照，反应体系见表 1.3，反应程序见表 1.4，使用美国 Thermo Fisher Scientific 公司 QuantStudio 12K Flex 实时荧光定量 PCR 系统检测。用 $\Delta\Delta Ct$ 值进行数据分析。

表 1.3 染料法 qPCR 反应体系

ddH ₂ O	8.2 μ L
2 × Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix	10 μ L
引物 F (10 μ M)	0.4 μ L
引物 R (10 μ M)	0.4 μ L
模板 DNA	1 μ L

表 1.4 染料法 qPCR 反应程序

95°C	30s (预变性)	1 cycle
95°C	10s	40 cycles
60°C	30s (检测)	
95°C	15s (融解曲线)	1 cycle
60°C	60s (融解曲线)	1 cycle
95°C	15s (融解曲线)	1 cycle

7. 流式细胞术

采用本实验室的常规流式细胞术检测技术实施，本项目中所需的检测抗体均存在商品化流式抗体。流式用巨噬细胞均经过 CD16/32 抗体封闭以减少非特异性荧光信号。采用 CD45.2⁺、F4/80⁺、CD11b⁺标记巨噬细胞，分别以 CD86、CD206 作为 M1 巨噬细胞和 M2 巨噬细胞的标志物，其中 CD206 需要将细胞固定后进行破膜染色。

8. CBA 和 ELISA

所需检测的 IL-6、IL-1a、IL-1b、TNFa、MCP-1、IL-10 等指标均有成熟的 ELISA 及 CBA 商品化试剂盒，按照厂家推荐方案操作。使用 CBA 检测到样品的大致浓度范围后，适当稀释样品到合适浓度区间，再用 ELISA 进行更精确的定量。

9. 组织包埋和 HE 染色

PBS 漂洗一次新鲜小鼠肺组织用，固定于 4% 多聚甲醛 24h。依次浸入梯度浓度的乙醇脱水后，用二甲苯:无水乙醇（1:1）溶液浸泡 20min，纯二甲苯溶液浸泡 10min，浸泡石蜡包埋，切片机切成 5μm 厚组织片，用二甲苯和不同浓度梯度乙醇脱蜡。使用苏木素液染色 5 分钟，双蒸水清洗一次，1% 盐酸酒精分色 3~10s，伊红染液染色 1min，二甲苯和梯度乙醇脱水透明，装载于载玻片，中性树脂封片。

10. 利用 CRISPER-Cas9 技术构建 *Dcip* 敲除细胞系

将 RAW264.7 细胞计数后按照 2×105/孔铺入 6 孔板中，12 小时后，将带有 *Dcip*-guide RNA 的 CRISPER-CAS9 质粒转染入 RAW264.7 细胞中。48 小时后，将细胞吹打重悬为单个细胞，用无血清 DMEM 洗两遍，再用 1mL 无血清 DMEM 重悬细胞，FACS 分选出绿色荧光较强的细胞，收集约 1000 个细胞。按 100 个细胞/96 孔板铺入培养板中。每天观察，当能够在显微镜下观察到明显的细胞集落时，挑选出单个细胞集落至 24 孔板，细胞长满后，收取约 3/4 的细胞提取总蛋白进行 Western 印迹验证敲除效果，剩余约 1/4 的细胞继续在孔中培养。Western 印迹显示 DCIP 蛋白表达缺失的克隆即成功敲除 *Dcip* 的细胞，进行常规传代培养。

11. 统计学分析

所有定量数据均汇总为平均值±标准差。两组之间的比较方法采用双侧非配对 Student's t 检验分析。采用对数秩检验分析存活率。采用 P < 0.05 为差异有统计学意义。

(二) 材料

1. 耗材

1) 细胞培养耗材

所用的离心管、冻存管、移液管、培养皿、细胞滤网购自美国 Corning 公司 Falcon 品牌，培养板购自美国 Corning 公司 Costar 品牌。

2) 实验耗材

EP 管、PCR 管和枪头购自美国 Corning 公司 Axygen 品牌；电动移液排枪枪头采购自瑞士 INTEGRA 公司；定量 PCR 所用的 96 孔板购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司，光学封板膜购自中国无锡耐思生命科技股份有限公司；western 印记用硝酸纤维素膜（NC 膜）购自德国 Merck 公司，转膜海绵购自中国南京金斯瑞生物科技有限公司；载玻片和方形盖玻片购自中国江苏世泰实验器械有限公司。

2. 细胞培养试剂

- 1) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 高糖细胞培养基
- 2) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司 Gibco 品牌，11965-092。
- 3) 改良型 RPMI-1640 培养基
- 4) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司 Gibco 品牌，11875-093。
- 5) 0.25% 胰蛋白酶-EDTA，含酚红
- 6) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司 Gibco 品牌，25200056。
- 7) 盘尼西林、链霉素双抗
- 8) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司 Gibco 品牌，15140-122。
- 9) 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)
- 10) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司 Gibco 品牌，10199-141C。
- 11) 二甲基亚砜 (DMSO)
- 12) 购自中国上海生工生物工程有限公司，A610163。
- 13) 细胞冻存液
- 14) 将 70% RPMI-1640 培养基、20% FBS 和 10% DMSO 混匀后，4°C 保存待用。
- 15) 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS)

表 1.5 1mol/L 的磷酸盐缓冲液即 10×PBS 的配方

试剂	质量
KCl	2g
KH ₂ PO ₄	2.4g
NaCl	80g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	35.6g

用大约800mL的超纯水溶解上述试剂，接着用10mmol/L的NaOH将pH调节至7.4左右，最后加超纯水定容至1000mL，分装，121℃高压灭菌20min，4℃保存待用。

3. 实验试剂

- 1) 细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）
购自中国上海捷瑞生物工程有限公司，GK0122。
- 2) 琼脂糖粉末（SeaKem® LE Agarose）
购自瑞士 LONZA 公司，50002。
- 3) Tanon™ 核酸染料 Green
购自中国上海天能科技有限公司，170-3006。
- 4) DNA 上样缓冲液（10 × DNA Loading Buffer）
购自中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司，P502-d1-AG。
- 5) PCR 预混试剂（2×Rapid Taq Master Mix）
购自中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司，P222。
- 6) 来源于大肠杆菌 O111:B4 的脂多糖（LPS）
购自德国 Merck 公司，L2630。
- 7) 细胞因子
小鼠 IFN γ 购自美国 R&D Systems 公司，485-MI-100；小鼠 IL-4 购自美国 R&D Systems 公司，404-ML-025/CF。
- 8) 液体巯基乙醇酸盐培养基（Fluid Thioglycollate medium）
购自德国 Merck 公司 GranuCult 品牌，1.08191.0500。
- 9) RNAfast 200 总 RNA 急速抽提试剂盒
购自中国上海飞捷生物技术有限公司，220011。
- 10) 反转录试剂（HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)）
购自中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司，R323-01。
- 11) 染料法实时荧光定量试剂盒（Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix）
购自中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司，Q712-02。

- 12) 4%多聚甲醛固定液
购自中国上海碧云天生物技术有限公司， P0099-100ml。
- 13) 巨噬细胞磁珠分选试剂盒 (EasySep™ Mouse F4/80 Positive Selection Kit)
购自美国 stemcell 公司， 100-0659。
- 14) 蛋白提取试剂盒 (Minute™动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒)
购自美国英文特生物技术股份有限公司， SD-001/SN-002。
- 15) 蛋白酶、磷酸酶抑制剂 (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (100X))
购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司， 78442。
- 16) 5X 蛋白质加样缓冲液
购自中国上海生工生物工程有限公司， C508320。
- 17) MOPS 缓冲液 (Tris-MOPS-SDS Running Buffer Powder)
购自中国南京金斯瑞生物科技有限公司， M00138。使用时将干粉溶于双蒸水配制成 1×液体。
- 18) ELISA 试剂盒
小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司， M6000B； 小鼠 TNF α ELISA 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司， MTA00B； 小鼠 IFN β ELISA 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司， MIFNB0。
- 19) CBA 试剂盒 (LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel (13-plex) with V-bottom Plate)
购自美国 Biolegend 公司， 740446。
- 20) 胶原酶 type II
购自德国 Merck 公司 Sigma-Aldrich 品牌， C6885-100MG。
- 21) 流式胞内染色试剂盒 (FIX & PERM 细胞透化试剂盒)
购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司， GAS003。
- 22) 10X TBST WB 漂洗液
购自中国上海生工生物工程有限公司， C520009。使用时将加入双蒸水稀释成 1×液体。
- 23) SignalUp™ Western 一抗稀释液
购自中国上海生工生物工程有限公司， P0273。
- 24) Western ECL 发光底物 (SuperSignal West Pico PLUS)
购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司， 34580。
- 25) Western 印记预制胶

- 购自中国南京金斯瑞生物科技有限公司，M00657。
- 26) 蛋白 marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder)
购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司，26616。
- 27) 大提质粒试剂盒 (PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kits)
购自美国 Invitrogen 公司，K2100。
- 28) LB 液体培养基
取酵母提取物 (Yeast Extract) 5g, 氯化钠 (NaCl) 10g 和蛋白胨 (Tryptone) 10g 溶于大约 900 毫升超纯水 (ddH₂O) 中, 充分搅拌至其完全溶解, 再用 10mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 7.4, 最后用超纯水定容至 1000 毫升, 混匀, 分装, 120°C 高温高压灭菌 20min, 4°C 保存待用。
- 29) Amp⁺ LB 琼脂糖培养基预制粉末 (Fast-Media)
购自美国 Invitrogen 公司, Cat#fas-am-s。在 500mL 锥形瓶中加入 1 包 Fast-Media 粉末, 加入 200mL 高压灭菌水, 微波炉高火 5min 至沸腾, 取出摇晃 10s 再放回微波炉高火 30s, 戴隔热手套拿出锥形瓶, 待培养基稍冷却后, 无菌条件下倒平板, 培养基完全凝结后, 平板倒置于 4°C 保存待用。
- 30) 氨苄青霉素 (Amp) 溶液:
将氨苄青霉素粉末 0.5 克溶于 5 毫升灭菌的超纯水中, 制备成终浓度为 100mg/mL 的储存液, 混匀, 用 0.22μm 的滤膜过滤除菌, 分装, -20°C 保存。
- 31) 感受态细菌
购自中国北京全式金生物有限公司, CD201。
- 32) 50 × TAE 电泳缓冲液
取 242.0g Tris、57.1mL 冰醋酸、100mL 0.5mol/L 的 EDTA, 加双蒸水定容至 1000mL, 调节 pH 至 8.0, 常温保存备用。
- 33) 100bp DNA 电泳 Marker
购自中国北京全式金生物有限公司, BM301。
- 34) 抗体
详细信息见表 1.6。

表 1.6 抗体信息

抗体名称	货号	厂商
Samhd1 mouse mAb for WB and IF	ab128107	Abcam, 英国
Samhd1 rabbit pAb for co-IP	12586-1-AP	Proteintech, 中国
Vdac1 rabbit pAb for IF	55259-1-AP	Proteintech, 中国
Vdac1 rabbit mAb for WB	A19707	Abclonal, 中国
Vdac2 rabbit mAb for WB	A21260	Abclonal, 中国
β-Tubulin Rabbit mAb	A12289	Abclonal, 中国
Phospho-IKKα/β (Ser176/180) rabbit mAb	2697T	CST, 美国
IKKα rabbit mAb	a19694	Abclonal, 中国
IKKβ rabbit pAb	a21464	Abclonal, 中国
Phospho-IκBα (Ser32) (14D4) rabbit mAb	2859S	CST, 美国
IκBα (44D4) rabbit mAb	4812S	CST, 美国
Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (93H1) Rabbit mAb	3033S	CST, 美国
NF-κB p65 (D14E12) XP® Rabbit mAb	8242S	CST, 美国
Phospho-TBK1 (Ser172) (D52C2) XP® Rabbit mAb	5483S	CST, 美国
TBK1/NAK (E8I3G) Rabbit mAb	38066S	CST, 美国
Phospho-Erk1/2 MAPK (Thr202/Tyr204) mouse mAb	9106S	CST, 美国
p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody	9102S	CST, 美国
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Antibody	9211S	CST, 美国
p38 MAPK Antibody	9212S	CST, 美国
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185) (81E11) rabbit mAb	4668S	CST, 美国
JNK2 (56G8) Rabbit mAb	9258S	CST, 美国
Alexa Fluor 700 anti-mouse CD45.2	109822	Biolegend, 美国
AF647 anti-mouse F4/80 Antibody for FC	123122	Biolegend, 美国
BV421 anti-mouse/human CD11b Antibody for	101235	Biolegend, 美国

FC			
FITC anti-mouse CD80 Antibody for FC	104706	Biolegend, 美国	
AF700 anti-mouse CD86 Antibody for FC	105122	Biolegend, 美国	
PE anti-mouse CD206 (MMR) Antibody for FC	141706	Biolegend, 美国	
FC			

35) 引物

引物由中国上海生工生物工程有限公司合成，序列见表 1.7。

表 1.7 mRNA qPCR 引物信息

引物名称	引物序列
mIL-6 Forward	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG
mIL-6 Reverse	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
mTNF α Forward	CTGAACCTCGGGGTGATCGG
mTNF α Reverse	GGCTTGTCACTCGAATTGAGA
mIFN β Forward	CAGCTCCAAGAAAGGACGAAC
mIFN β Reverse	GGCAGTGTAACTCTTCTGCAT
m β -actin Forward	GGCTGTATTCCCCTCCATCG
m β -actin Reverse	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

4. 设备和软件

- 1) 美国 Bio-Rad 公司水平电泳槽
- 2) 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 QuantStudio 12K Flex 实时荧光定量 PCR 系统及配套软件 QuantStudio 12K Flex Software
- 3) 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 NanoDrop 2000 超微量分光光度计
- 4) 德国 Analytikjena 公司 Biometra TRIO 48 PCR 仪
- 5) 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 CO₂ 恒温培养箱
- 6) 德国 Eppendorf 公司台式低温高速离心机
- 7) 中国上海翌圣生物科技有限公司垂直电泳槽
- 8) 美国 Bio-Rad 公司 PowerPac™ HC 高电流电泳仪电源
- 9) 中国南京金斯瑞生物科技有限公司 eBlot L1 快速湿转仪
- 10) 中国上海天能科技有限公司 Tanon 4600 系列全自动化学发光/荧光图像分析系统

- 11) 中国苏州净化设备有限公司超净工作台
- 12) 德国 Eppendorf 公司手动移液枪
- 13) 美国 Stemcell 公司细胞分选磁力架
- 14) 美国 Thermo Fisher Scientific 公司电动移液枪
- 15) 瑞士 INTEGRA 公司 8 通道电动移液排枪
- 16) 日本松下公司 SIM-F140AD 制冰机
- 17) 中国上海博迅公司 YXQ-2S-30S 高压灭菌锅
- 18) 瑞士 Mettler 公司 E160 型电子天平
- 19) 德国 IKA 公司 Color Squid 07.472498 涡旋震荡器
- 20) 日本松下公司 4°C 及 -20°C 冰箱
- 21) 美国 Thermo Fisher Scientific 公司超低温冰箱
- 22) 德国 Memert 公司自动温控水浴箱
- 23) 美国 Thermo Fisher Scientific 公司恒温震荡金属浴
- 24) 美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 图像定量分析软件 ImageJ
- 25) 美国 Dotmatics 公司统计作图软件 GraphPad Prism 9.4

三、实验结果

(一) DCIP 在巨噬细胞具有一定水平的基础表达并且在 LPS 的刺激下表达升高

为了探索 DCIP 在野生型 C57BL/6N 小鼠巨噬细胞中的基础表达以及在急性炎症条件下的表达改变，我们提取了小鼠的腹腔巨噬细胞进行体外培养，在培养基中加入 LPS 刺激 (100ng/mL, 德国 Merck 公司, L2630)，收集以 6 小时为间隔的 9 份不同刺激时间的细胞样品，加入蛋白裂解液后制备 Western 印记样品，在蛋白层面检测 DCIP 的表达。结果显示，DCIP 在巨噬细胞中具有一定水平的基础表达，随着 LPS 刺激时间的延长，其表达明显升高，至 24 小时到达峰值，随后逐渐降低到基础水平 (图 1.3)，提示 DCIP 可能参与了 LPS 刺激相关的天然免疫应答。

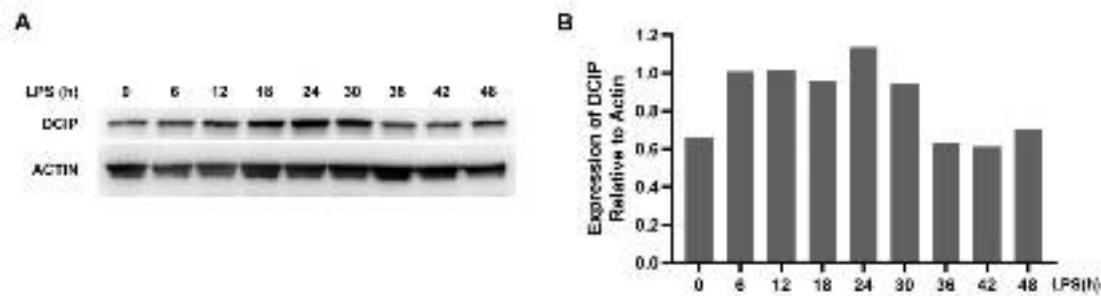


图 1.3 野生型巨噬细胞在 LPS 刺激 0-48 小时过程中，DCIP 在蛋白层面的表达。

A. Western 印记检测 LPS 分别刺激腹腔巨噬细胞 0-48h，DCIP 的表达。

B. 使用 ImageJ 图像软件对条带的量化分析结果。

(二) 使用 Cas9 技术繁育髓系条件性敲除 *Dcip* (*Dcip*^{-/-}) 小鼠并验证了巨噬细胞中 DCIP 的敲除效率

我们繁育了髓系 *Dcip*^{-/-} 小鼠，以此为模型探索 DCIP 在腹腔巨噬细胞中的功能（见方法部分）。为了验证该 *Dcip* 敲除的有效性，我们提取小鼠腹腔巨噬细胞，分别在 DNA 层面（图 1.2D）和蛋白层面（图 1.4）对 *Dcip* 的敲除进行了验证，结果显示 *Dcip* 在小鼠原代腹腔巨噬细胞中被有效敲除。

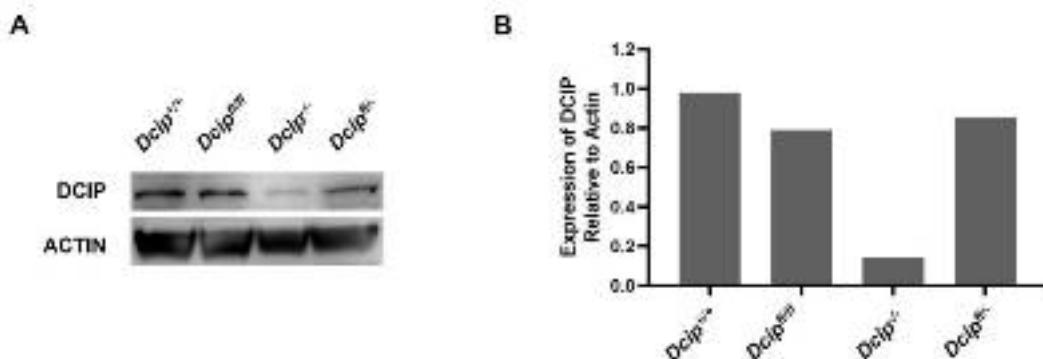


图 1.4 验证巨噬细胞中蛋白质层面的 *Dcip* 敲除效率。

A. Western 印记检测不同基因型小鼠腹腔巨噬细胞中 *Dcip* 的表达。B. 使用 ImageJ 图像软件对条带的量化分析结果。

(三) *Dcip*^{-/-} 小鼠的急性炎症模型相较于对照小鼠表现出更强的炎症反应

1) 为小鼠腹腔注射 LPS (15mg/kg) 或 PBS (空白对照)，3h 后收集小鼠血清，

分别使用 ELISA 试剂盒和生化试剂盒检测小鼠血清中 IL-6、TNF α 、乳酸的水平，发现注射 LPS 后，*Dcip*^{-/-}小鼠相较于对照小鼠，血清中 IL-6、TNF α 和乳酸的水平更高（图 1.5）。

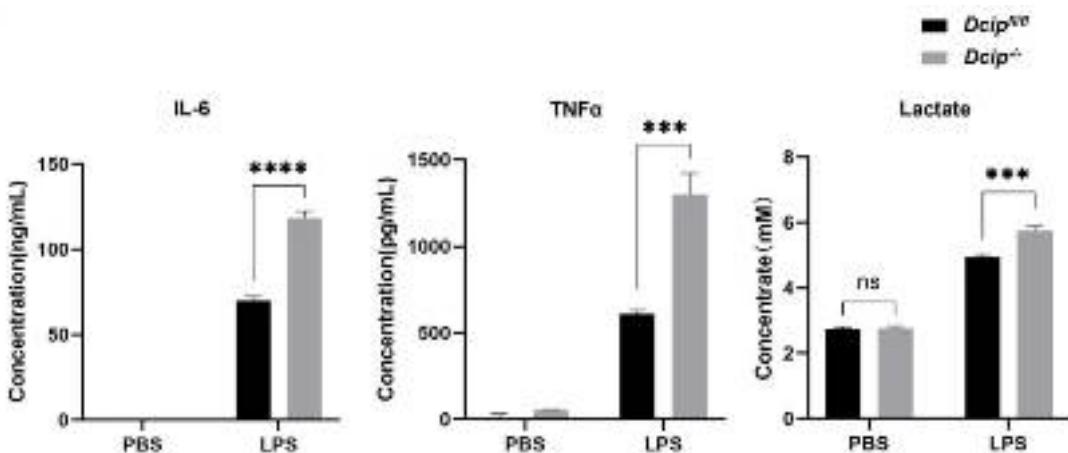


图 1.5 腹腔注射 LPS (15mg/kg) 或 PBS (空白对照) 3h 后 IL-6、TNF α 和乳酸的水平。
****p < 0.0001, ***p < 0.001, Student's t 检验, n=3

2) 取腹腔注射 LPS (15mg/kg) 或 PBS (空白对照) 3h 的小鼠肺组织，4%多聚甲醛固定后脱水、包埋、切片、HE 染色，镜下观察肺组织的病理变化。在注射 PBS 的 *Dcip*^{-/-} 小鼠和对照小鼠，二者的肺组织均未发现炎症浸润；而在注射 LPS 的 *Dcip*^{-/-} 小鼠和对照小鼠，二者的肺组织均有显著的炎症，其病理表现为炎性细胞浸润，伴有肺泡腔狭窄、肺泡壁增厚，并且 *Dcip*^{-/-} 小鼠相比于对照小鼠，肺组织炎性浸润更严重（图 1.6A）。为小鼠腹腔注射致死量 LPS (25mg/kg)，并在 60 小时观察时间内观察存活率，发现 *Dcip*^{-/-} 小鼠相比于对照小鼠的存活率显著降低（图 1.6B）。

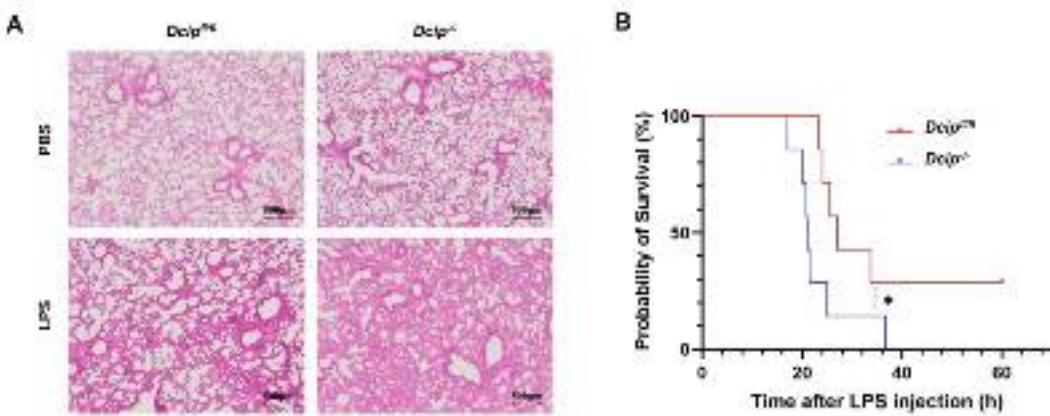


图 1.6 A. 腹腔注射 LPS (15mg/kg) 或 PBS (空白对照) 3h 后 *Dcip*^{-/-} 小鼠和对照小鼠的肺组织 HE 染色。B. 腹腔注射致死量 LPS (25mg/kg) 后，*Dcip*^{-/-} 小鼠和对照小鼠的生存率，*p < 0.05, Log-rank 检验, n=7

(四) LPS 刺激 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞有更高的炎症因子表达

提取小鼠腹腔巨噬细胞，使用 LPS 刺激（100ng/mL）6h，裂解细胞柱式法提取胞内总 RNA（中国上海，飞捷生物，220011），反转录（中国南京，诺唯赞，R323-01）后用 qPCR 检测细胞 mRNA 层面的炎症因子表达，结果显示 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞的 IL-6、TNF α 和 IFN β mRNA 表达高于对照细胞（图 1.7A）；提取小鼠腹腔巨噬细胞，使用 LPS 刺激（100ng/mL）12h，用 ELISA 检测细胞培养上清中蛋白层面的炎症因子表达，结果显示 *Dcip*^{-/-} 小鼠巨噬细胞在细胞上清中 IL-6、TNF α 和 IFN β 表达均高于对照细胞（图 1.7B）。

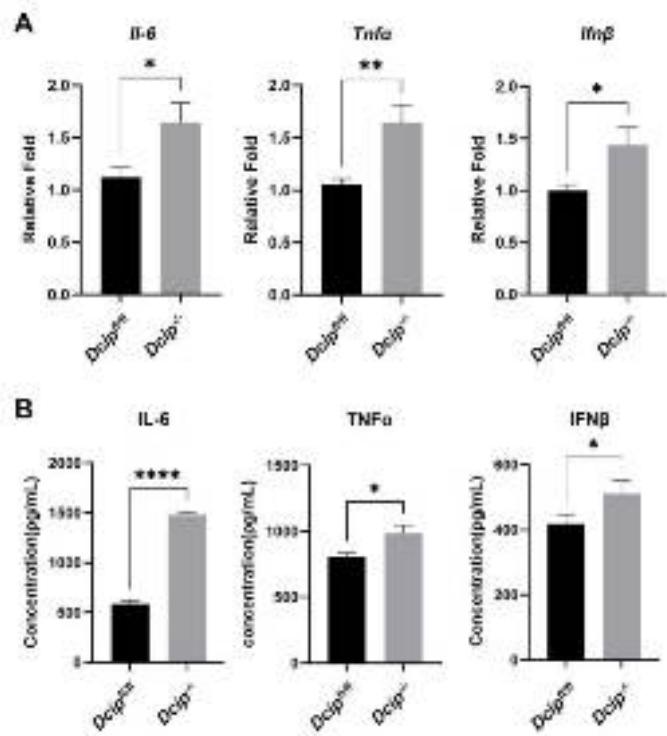


图 1.7 在体外用 LPS 刺激（100ng/mL）巨噬细胞，

A. *DCIP*^{-/-} 腹腔巨噬细胞 IL-6、TNF α 和 IFN β mRNA 表达升高，* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student's t 检验, $n=3$ ；B. *DCIP*^{-/-} 腹腔巨噬细胞培养上清中的 IL-6、TNF α 和 IFN β 表达升高，* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, Student's t 检验, $n=3$ 。

(五) LPS 刺激下 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞的 TLR4 通路活化水平升高

由于 LPS-TLR4 是 LPS 刺激后细胞主要的活化通路，因此我们提取小鼠腹腔巨噬细胞，在体外使用 LPS 刺激（100ng/mL）0~90min，期间收集多个时间点的蛋白样品，Western 印记检测 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞和对照细胞在 TLR4 通路中关键蛋白的表达和磷酸化。结果显示，*Dcip*^{-/-} 巨噬细胞 TLR4 通路关键分子的总蛋白表达和磷酸化

水平均普遍高于对照细胞（图 1.8），证实 *Dcip* 敲除导致 LPS-TLR4 通路活化增强。

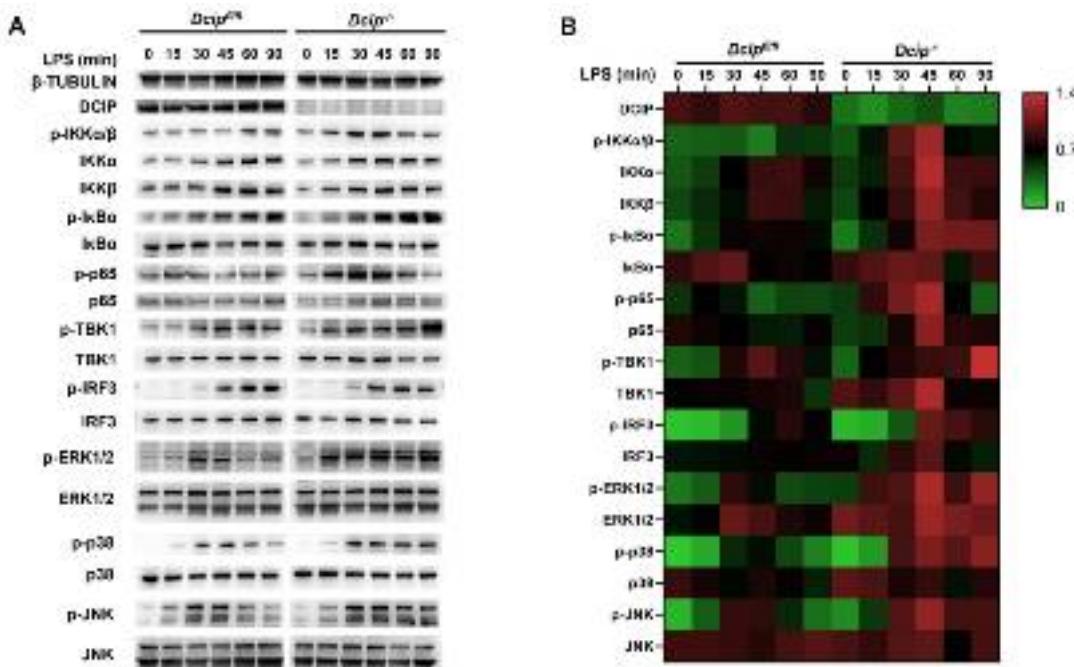


图 1.8 A. 在体外用 LPS 刺激 (100ng/mL) 小鼠巨噬细胞，Western 印记检测在 0~90min 内 TLR4 通路中关键蛋白的表达和磷酸化。B. 使用 ImageJ 图像软件对条带的量化分析热图。

(六) LPS 刺激下 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞 M1 极化比例升高

活化的 TLR4 通路会影响到巨噬细胞的极化，为了比较 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞和对照细胞在极化水平的差异，我们取腹腔注射 LPS (15mg/kg) 或 PBS (空白对照) 3h 的小鼠肺脏，通过磁珠法分选出 F4/80⁺ 细胞，即肺脏巨噬细胞，使用流式细胞术检测肺脏巨噬细胞的极化水平，发现 *Dcip*^{-/-} 小鼠肺组织巨噬细胞 M1 极化比例明显高于对照小鼠（图 1.9 AB），和 TLR4 通路活化的结果相一致。提取小鼠腹腔巨噬细胞，在体外利用刺激因子对巨噬细胞分别进行 M1 (20 ng/mL IFN γ + 100 ng/mL LPS) /M2 (20 ng/mL IL-4) 极化诱导，然后流式检测各诱导组的极化比例，实验结果显示，*Dcip*^{-/-} 腹腔巨噬细胞相比于对照细胞，在 M1 极化诱导条件下，M1 阳性细胞比例升高，在 M2 极化诱导条件下，M2 阳性细胞比例降低（图 1.9 C）。这说明当 *Dcip* 缺陷后，细胞更容易被诱导成 M1 巨噬细胞而非 M2 巨噬细胞。

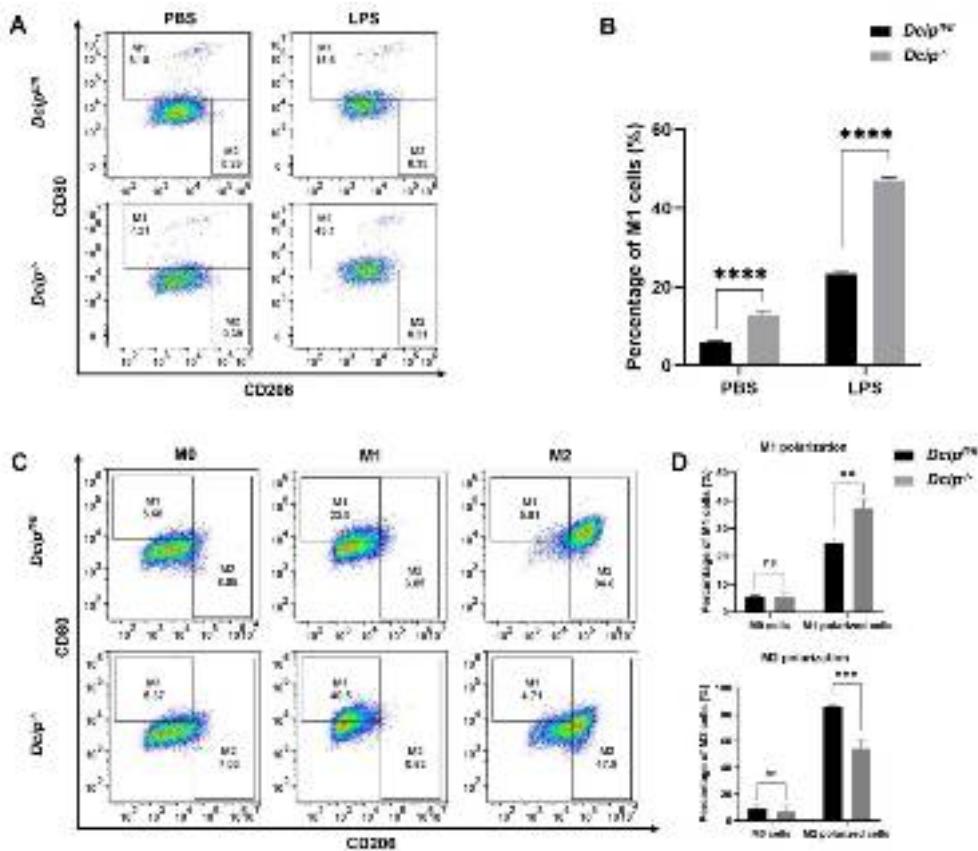


图 1.9 A. 腹腔注射 LPS (15mg/kg) 或 PBS (空白对照) 3h 后, 流式检测肝脏巨噬细胞中的 M1 极化比例, 圈门 $F4/80^+CD11b^+$ 细胞为巨噬细胞, 以 $CD80^+$ 细胞为 M1 巨噬细胞标志物; **B.** A 的统计分析, $**p < 0.01$, Student's *t*-test, $n=3$; **C.** 在体外用刺激因子分别诱导小鼠巨噬细胞向 M1 (20 ng/mL IFN γ + 100 ng/mL LPS) 或 M2 (20 ng/mL IL-4) 极化, 流式检测 $Dcip^{-/-}$ 小鼠巨噬细胞和对照细胞中的 M1/M2 极化比例; **D.** C 的统计分析, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, Student's *t*-test, $n=3$ 。

四、讨论

我们构建了髓系 *Dcip* 条件性敲除的小鼠模型并进行了一系列的体内、体外实验, 初步探索了 DCIP 在急性炎症天然免疫应答中的作用。具体结果如下: 1. 体内、体外实验表明 *Dcip* 缺陷导致 LPS 刺激诱导的炎症因子分泌增多, 组织炎症细胞浸润增强和小鼠致死率的升高, 提示 DCIP 可能发挥抑炎作用; 2. LPS 刺激下, *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞相比于对照细胞 TLR4 通路活化增强, 该结果和上个结果一致, 因为活化的 TLR4 会导致细胞表达更高水平的 IL-6、TNF α 、IFN β 等炎症因子, 这些结果共同提示 DCIP 对 TLR4 通路具有某种负反馈调节机制; 3. *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞在 M1/M2 极化诱导条件下, M1 极化比例增高, M2 极化比例降低, 提示 DCIP 对于巨噬细胞的极化有某种调控作用。然而, 这些结果也带来了更多的疑问, 例如: DCIP 调控 TLR4

的具体机制是什么？*Dcip*^{-/-}巨噬细胞 M1 极化比例的增高，是否为 TLR4 通路活化的结果，还是有其它的分子机制？为了回答这些问题，我们开始了下一部分的探索。

参考文献：

- [1] VINCENT J L, OPAL S M, MARSHALL J C, et al. Sepsis definitions: time for change [J]. Lancet, 2013, 381(9868): 774-5. doi:10.1016/s0140-6736(12)61815-7
- [2] FLEISCHMANN C, SCHERAG A, ADHIKARI N K, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016, 193(3): 259-72. doi:10.1164/rccm.201504-0781OC
- [3] PRESCOTT H C, ANGUS D C. Postsepsis Morbidity [J]. JAMA, 2018, 319(1): 91-. doi:10.1001/jama.2017.19809
- [4] KUSHIMOTO S, GANDO S, SAITO D, et al. The impact of body temperature abnormalities on the disease severity and outcome in patients with severe sepsis: an analysis from a multicenter, prospective survey of severe sepsis [J]. Crit Care, 2013, 17(6): R271. doi:10.1186/cc13106
- [5] VINCENT J L. The Clinical Challenge of Sepsis Identification and Monitoring [J]. PLoS Med, 2016, 13(5): e1002022. doi:10.1371/journal.pmed.1002022
- [6] FAIX J D. Biomarkers of sepsis [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2013, 50(1): 23-36. doi:10.3109/10408363.2013.764490
- [7] RHODES A, EVANS L E, ALHAZZANI W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016 [J]. Crit Care Med, 2017, 45(3): 486-552. doi:10.1097/ccm.0000000000002255
- [8] BERGMANN C B, BECKMANN N, SALYER C E, et al. Potential Targets to Mitigate Trauma- or Sepsis-Induced Immune Suppression [J]. Front Immunol, 2021, 12(622601. doi:10.3389/fimmu.2021.622601
- [9] MURRAY P J, WYNN T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets [J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(11): 723-37. doi:10.1038/nri3073
- [10] STEARNS-KUROSAWA D J, OSUCHOWSKI M F, VALENTINE C, et al. The pathogenesis of sepsis [J]. Annu Rev Pathol, 2011, 6(19-48. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130327
- [11] PORTA C, RIMOLDI M, RAES G, et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(35): 14978-83. doi:10.1073/pnas.0809784106
- [12] TSCHAIKOWSKY K, HEDWIG-GEISSING M, SCHIELE A, et al. Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes

- in T-cell subsets in septic and postoperative patients [J]. Crit Care Med, 2002, 30(5): 1015-23. doi:10.1097/00003246-200205000-00010
- [13] MONNERET G, LEPAPE A, VOIRIN N, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock [J]. Intensive Care Med, 2006, 32(8): 1175-83. doi:10.1007/s00134-006-0204-8
- [14] LANDELLE C, LEPAPE A, VOIRIN N, et al. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock [J]. Intensive Care Med, 2010, 36(11): 1859-66. doi:10.1007/s00134-010-1962-x
- [15] LI N, HUANG X, ZHAO Z, et al. Identification and characterization of a novel gene KE04 differentially expressed by activated human dendritic cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279(2): 487-93. doi:10.1006/bbrc.2000.3935
- [16] ATLAS T H P. Tissue cell type classification of Samhd1. 2023. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000101347-SAMHD1/tissue+cell+type>.
- [17] POWELL R D, HOLLAND P J, HOLLIS T, et al. Aicardi-Goutières syndrome gene and HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a dGTP-regulated deoxynucleotide triphosphohydrolase [J]. J Biol Chem, 2011, 286(51): 43596-600. doi:10.1074/jbc.C111.317628
- [18] RICE G I, BOND J, ASIPU A, et al. Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response [J]. Nat Genet, 2009, 41(7): 829-32. doi:10.1038/ng.373
- [19] COQUEL F, NEUMAYER C, LIN Y L, et al. SAMHD1 and the innate immune response to cytosolic DNA during DNA replication [J]. Curr Opin Immunol, 2019, 56(24-30). doi:10.1016/j.co.2018.09.017
- [20] KRETSCHMER S, WOLF C, KÖNIG N, et al. SAMHD1 prevents autoimmunity by maintaining genome stability [J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(3): e17. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204845
- [21] MAHARANA S, KRETSCHMER S, HUNGER S, et al. SAMHD1 controls innate immunity by regulating condensation of immunogenic self RNA [J]. Mol Cell, 2022, 82(19): 3712-28.e10. doi:10.1016/j.molcel.2022.08.031
- [22] RENTOFT M, LINDELL K, TRAN P, et al. Heterozygous colon cancer-associated mutations of SAMHD1 have functional significance [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(17): 4723-8. doi:10.1073/pnas.1519128113
- [23] WANG J L, LU F Z, SHEN X Y, et al. SAMHD1 is down regulated in lung cancer by methylation and inhibits tumor cell proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 455(3-4): 229-33. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.153
- [24] CLIFFORD R, LOUIS T, ROBBE P, et al. SAMHD1 is mutated recurrently in chronic lymphocytic leukemia and is involved in response to DNA damage [J]. Blood, 2014, 123(7): 1021-31. doi:10.1182/blood-2013-04-490847
- [25] DE SILVA S, WANG F, HAKE T S, et al. Downregulation of SAMHD1 expression correlates with

- promoter DNA methylation in Sézary syndrome patients [J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(2): 562-5. doi:10.1038/jid.2013.311
- [26] GAO W, LI G, BIAN X, et al. Defective modulation of LINE-1 retrotransposition by cancer-associated SAMHD1 mutants [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(2): 213-9. doi:10.1016/j.bbrc.2019.08.155
- [27] KOTSANTIS P, PETERMANN E, BOULTON S J. Mechanisms of Oncogene-Induced Replication Stress: Jigsaw Falling into Place [J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(5): 537-55. doi:10.1158/2159-8290.Cd-17-1461
- [28] HEROLD N, RUDD S G, SANJIV K, et al. With me or against me: Tumor suppressor and drug resistance activities of SAMHD1 [J]. *Exp Hematol*, 2017, 52(32-9). doi:10.1016/j.exphem.2017.05.001
- [29] SCHOTT K, MAJER C, BULASHEVSKA A, et al. SAMHD1 in cancer: curse or cure? [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2022, 100(3): 351-72. doi:10.1007/s00109-021-02131-w
- [30] LAGUETTE N, SOBHIAN B, CASARTELLI N, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx [J]. *Nature*, 2011, 474(7353): 654-7. doi:10.1038/nature10117
- [31] FRANZOLIN E, PONTARIN G, RAMPAZZO C, et al. The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(35): 14272-7. doi:10.1073/pnas.1312033110
- [32] LAHOUASSA H, DADDACHA W, HOFMANN H, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(3): 223-8. doi:10.1038/ni.2236
- [33] JAMES C D, PRABHAKAR A T, OTOA R, et al. SAMHD1 Regulates Human Papillomavirus 16-Induced Cell Proliferation and Viral Replication during Differentiation of Keratinocytes [J]. *mSphere*, 2019, 4(4): doi:10.1128/mSphere.00448-19
- [34] CHEN Z, ZHU M, PAN X, et al. Inhibition of Hepatitis B virus replication by SAMHD1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(4): 1462-8. doi:10.1016/j.bbrc.2014.07.023
- [35] KIM E T, WHITE T E, BRANDARIZ-NÚÑEZ A, et al. SAMHD1 restricts herpes simplex virus 1 in macrophages by limiting DNA replication [J]. *J Virol*, 2013, 87(23): 12949-56. doi:10.1128/jvi.02291-13
- [36] GRAMBERG T, KAHLE T, BLOCH N, et al. Restriction of diverse retroviruses by SAMHD1 [J]. *Retrovirology*, 2013, 10(26). doi:10.1186/1742-4690-10-26
- [37] JANG S, ZHOU X, AHN J. Substrate Specificity of SAMHD1 Triphosphohydrolase Activity Is Controlled by Deoxyribonucleoside Triphosphates and Phosphorylation at Thr592 [J]. *Biochemistry*, 2016, 55(39): 5635-46. doi:10.1021/acs.biochem.6b00627
- [38] MAUNEY C H, ROGERS L C, HARRIS R S, et al. The SAMHD1 dNTP Triphosphohydrolase Is Controlled by a Redox Switch [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(16): 1317-31.

doi:10.1089/ars.2016.6888

- [39] LEE E J, SEO J H, PARK J H, et al. SAMHD1 acetylation enhances its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity and promotes cancer cell proliferation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 68517-29. doi:10.18632/oncotarget.19704
- [40] WELBOURN S, DUTTA S M, SEMMES O J, et al. Restriction of virus infection but not catalytic dNTPase activity is regulated by phosphorylation of SAMHD1 [J]. *J Virol*, 2013, 87(21): 11516-24. doi:10.1128/jvi.01642-13
- [41] WANG Z, BHATTACHARYA A, WHITE T, et al. Functionality of Redox-Active Cysteines Is Required for Restriction of Retroviral Replication by SAMHD1 [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(4): 815-23. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.090
- [42] BESTER A C, RONIGER M, OREN Y S, et al. Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development [J]. *Cell*, 2011, 145(3): 435-46. doi:10.1016/j.cell.2011.03.044
- [43] CHABOSSEAU P, BUHAGIAR-LABARCHÈDE G, ONCLERCQ-DELIC R, et al. Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome [J]. *Nat Commun*, 2011, 2(368). doi:10.1038/ncomms1363
- [44] BUCKLAND R J, WATT D L, CHITTOOR B, et al. Increased and imbalanced dNTP pools symmetrically promote both leading and lagging strand replication infidelity [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(12): e1004846. doi:10.1371/journal.pgen.1004846
- [45] COQUEL F, SILVA M J, TÉCHER H, et al. SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction [J]. *Nature*, 2018, 557(7703): 57-61. doi:10.1038/s41586-018-0050-1
- [46] BECK C R, GARCIA-PEREZ J L, BADGE R M, et al. LINE-1 elements in structural variation and disease [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2011, 12(187-215). doi:10.1146/annurev-genom-082509-141802
- [47] GOODIER J L, KAZAZIAN H H, JR. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites [J]. *Cell*, 2008, 135(1): 23-35. doi:10.1016/j.cell.2008.09.022
- [48] HU S, LI J, XU F, et al. SAMHD1 Inhibits LINE-1 Retrotransposition by Promoting Stress Granule Formation [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(7): e1005367. doi:10.1371/journal.pgen.1005367
- [49] ZHAO K, DU J, HAN X, et al. Modulation of LINE-1 and Alu/SVA retrotransposition by Aicardi-Goutières syndrome-related SAMHD1 [J]. *Cell Rep*, 2013, 4(6): 1108-15. doi:10.1016/j.celrep.2013.08.019
- [50] WHITE T E, BRANDARIZ-NUÑEZ A, HAN K, et al. Modulation of LINE-1 Retrotransposition by a Human SAMHD1 Polymorphism [J]. *Virol Rep*, 2016, 6(53-60). doi:10.1016/j.virep.2016.06.001
- [51] 中华人民共和国科学技术部. 《实验动物管理条例》 [J]. 2017,
- [52] 中华人民共和国科学技术部. 《关于善待实验动物的指导性意见》 . 2006. <https://www.most.gov.cn/xxgk/xinxifenlei/fdzdgknr/fgzc/gfxwj/gfxwj2010before/201712/t2017122>

2_137025.html.

- [53] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 《实验动物福利伦理审查指南》. 2018. <https://openstd.samr.gov.cn/bzgk/gb/newGbInfo?hcno=9BA619057D5C13103622A10FF4BA5D14>.

第二部分

DCIP 抑制巨噬细胞在急性细菌性炎症中的免疫应答

一、前言

TLR4 的过度激活是急性细菌感染走向败血症的关键分子机制之一^[1]。在宿主抵御革兰氏阴性菌入侵时，LPS 活化的炎性 M1 巨噬细胞构成了的天然免疫的第一道防线^[2]：活化的 M1 巨噬细胞产生大量的促炎介质，包括 IL-6、TNF α 、IL-1、一氧化氮（NO）和活性氧（ROS），以杀死入侵的病原体^[3]。如果 M1 巨噬细胞介导的炎症强度过大，可能会进展为细胞因子风暴和严重的败血症^[4]。相反，M2 巨噬细胞表达如 IL-10、TGF β 等抑炎细胞因子，从而在持续感染的宿主体内诱导 LPS 耐受状态^[5]。M1 和 M2 细胞比例的失调，将会导致败血症的发生，线粒体调控的能量代谢状态在巨噬细胞 M1/M2 极化中发挥着关键作用：M1 巨噬细胞的三羧酸循环（TAC）和氧化磷酸化收抑制，而作为替代能量来源，其糖酵解和磷酸戊糖代谢更加活跃；M2 巨噬细胞具有完整的 TAC 和氧化磷酸化，它们能够通过氧化丙酮酸和脂肪酸产生三磷酸腺苷（ATP）^[6, 7]。有研究表明，线粒体的功能状态调控着极化的方向：线粒体完整的 M2 巨噬细胞在 LPS 和 IFN γ 诱导后更容易向 M1 巨噬细胞极化，但是当线粒体功能障碍时，M1 巨噬细胞将难以向 M2 巨噬细胞极化^[7]。综上，我们推测 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞中的线粒体功能可能受到影晌，致使其 M1/M2 极化比例失衡。因此我们设计了第二部分的实验，着重研究线粒体功能以验证我们的科学假设。

二、材料与方法

（一）材料

1. 动物和细胞

如第一部分所述。

2. 耗材

Seahorse 实验探针板、培养板，购自美国 Agilent 公司；圆形细胞爬片购自中国无锡耐思生命科技股份有限公司；其余如第一部分所述。

3. 仪器

美国 Thermo Fisher Scientific 公司，QuantStudio 12K Flex 实时荧光定量 PCR 系统及配套软件 QuantStudio 12K Flex Software；美国 Agilent 公司，Seahorse XFe 24 活细胞能量代谢检测仪；德国 Leica 公司，激光共聚焦显微镜 SP8，所用软件为 LASX；德国 Satorius 公司，Incucyte 活细胞成像仪；日本 Sony 公司，全光谱流式仪 ID7000；瑞士 Tecan 公司，全光谱发光及荧光多功能成像仪 SPARK；其余如第一部分所述。

4. 其他实验试剂

- 1) JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒
购自中国上海翌圣生物科技有限公司，40706ES60。
- 2) 细胞线粒体分离试剂盒
购自中国上海碧云天生物技术有限公司，C3601。
- 3) Hanks 平衡盐溶液（含 Ca^{2+} Mg^{2+} ,无酚红）
购自中国上海博光生物有限公司，B410KJ。
- 4) 活细胞成像溶液
购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司，A14291DJ。
- 5) 定量线粒体的引物、探针
引物、探针由中国上海生工生物工程有限公司合成，序列见表 2.1。

表 2.1 线粒体 qPCR 引物、探针信息

引物名称	引物/探针序列及修饰
m.mtDNA 16S F	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG
m.mtDNA 16S R	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
m.mtDNA ND5 F	CTGAACCTCGGGGTGATCGG
m.mtDNA ND5 R	GGCTTGTCACTCGAATTGAGA
m.nucDNA Tert F	CTAGCTCATGTGTCAAGACCCTCTT
m.nucDNA Tert R	GCCAGCACGTTCTCTCGTT
Probe 16S	FAM-CAGCTCCAAGAAAGGACGAAC-BHQ1
Probe ND5	VIC-GGCAGTGTAACCTTCTGCAT-BHQ1

- 6) 超级探针法多重 PCR 试剂盒
购自中国常州百代生物科技有限公司，41027。

- 7) 50×ROX 参比染料 II (ROX Reference Dye II)
购自宝日医生物技术（北京）有限公司，为该公司染料法定量试剂盒 TB Green® Fast qPCR Mix (RR430S) 中的一个组分。
- 8) 染料法实时荧光定量试剂盒 (Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix)
购自中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司，Q712-02。
- 9) 细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒
购自中国上海捷瑞生物工程有限公司，GK0122。
- 10) Seahorse 能量代谢实验相关试剂
XF Glycolytic Stress Assay Kit (糖酵解压力测试，6包/盒)，102340-100；
XF Cell Mito Stress Test Kit (线粒体压力测试,6包/盒)，103015-100； XF RPMI Base Medium, PH7.4, 500 mL (RPMI 基础培养液, PH7.4,无酚红), 103576-100； XF 1.0M Glucose Solution.50ml (葡萄糖), 103577-100； XF 100 mM Pyruvate Solution, 50 mL (丙酮酸), 103578-100； XF 200 mM Glutamine Solution, 50 mL (谷氨酰胺), 103579-100。均购自美国 Agilent 公司。
- 11) 线粒体、溶酶体探针
MitoTracker® Red CMXRos 线粒体红色荧光探针，购自中国上海翌圣生物科技有限公司，40741ES50。Lysotracker Green DND-26 溶酶体绿色荧光探针，购自中国上海翌圣生物科技有限公司，40738ES50。
- 12) DAPI Fluoromount-G™ 抗荧光淬灭封片剂 (含 DAPI, 水溶性)
购自中国上海翌圣生物科技有限公司，36308ES20。
- 13) 抗体
见第一部分

(二) 方法

1. JC-1 检测线粒体膜电位

将 LPS 处理的巨噬细胞消化并与线粒体膜电位探针 JC-1 (中国上海，翌圣生物, 40706ES60) 在 37°C 避光孵育 20 分钟。然后，使用 JC-1 缓冲液清洗巨噬细胞两次。将用 JC-1 染色的细胞加载到 96 孔白底板上。使用流式细胞仪 (日本，Sony, ID7000) 或荧光酶标仪 (瑞士，Tecan, SPARK) 进行检测。

2. 提取细胞线粒体

准备溶液：室温融解试剂盒中的各种溶液，融解后立即置于冰上并混匀。在线粒体分离试剂加入到细胞样品中前数分钟内加入适量蛋白酶/磷酸酶抑制剂（美国，Thermo Fisher Scientific，78442），使抑制剂成为 1×的工作浓度。收集巨噬细胞：用 PBS 洗一遍，用胰酶细胞消化液（美国，Thermo Fisher Scientific 公司 Gibco 品牌，25200056）消化细胞，500g，室温离心 5min 收集细胞。用冰浴预冷的 PBS 轻轻重悬细胞沉淀，取少量细胞用于计数，剩余细胞 600g，4°C 离心 5min 沉淀细胞，弃上清。预处理：加入 2.5mL 线粒体分离试剂至 5×10⁷ 细胞中，轻轻悬浮细胞，冰浴放置 15min。匀浆：把细胞悬液转移到一适当大小的玻璃匀浆器中，匀浆 10 下。匀浆效果的鉴定：在匀浆 10 次后取约 2μL 细胞匀浆，加入 30μL 台盼蓝染色液，混匀后显微镜下观察台盼蓝染色阳性（蓝色）细胞的比例。如果阳性细胞比例不足 50%，增加 5 次匀浆。随后再同前取样进行台盼蓝染色鉴定。当阳性比例超过 50% 时停止匀浆进入下一步。取细胞匀浆在 600g，4°C 离心 10min。小心把上清转移到另一离心管中，在 11000g，4°C 离心 10min。小心去除上清。沉淀即为分离得到的细胞线粒体。

3. 提取细胞总基因组（含核基因组和线粒体基因组）

使用细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒（中国上海，捷瑞生物，GK0122）提取腹腔巨噬细胞的基因组 DNA。取约 1×10⁷ 的细胞，加入 400μL ACL Solution 和 10μL 的 Proteinase K，震荡混匀 1 分钟，然后置于 55°C 水浴 10 分钟，在此期间适当取出混匀，帮助充分裂解。取出样品，待降至室温时轻轻震荡混。在 gDNA recovery Column 中加入 200μL Buffer CBS，12000rpm 离心 1 分钟，弃透过液备用。在经过预处理好的样品中，依次加入 300μL Ext solution 和 300μL AB solution，用力摇匀，然后 12000rpm 离心 5 分钟。溶液将分层，上层为蓝色的抽提层，下层为透明水相，两层溶液中间可能会有部分沉淀层，DNA 在下层水相中。添加 300μL AB Solution 摆匀后离心。将枪头穿过上层溶液，深入到下层溶液，将下层溶液仔细吸出到 gDNA recovery Column 中，尽量避免吸到上层溶液及中间层的沉淀。8000rpm 离心 1 分钟，取下 gDNA recovery Column，倒掉收集管中废液。将 gDNA recovery Column 放回收集管中，加入 500μL Wash Solution，8000rpm，室温离心 1 分钟。重复步骤 Wash Solution 清洗步骤一次。取下 gDNA recovery Column，弃去收集管中的废液。将柱放回收集管中，12000rpm，室温离心 1 分钟，以除去残留 Wash Solution。将柱放入新的洁净 1.5mL 离心管中，在柱中央加入 50μL Elution Buffer，室温或 55°C 放置 2 分钟。然后 12000rpm，室温离心 1 分钟。离心管中的液体即为基因组。

4. qPCR 检测线粒体基因组拷贝数和完整度

染料法 qPCR：用于定量细胞基因组中线粒体拷贝数，方法和试剂同第一部分，线粒体引物为 m.mtDNA 16S F 和 m.mtDNA 16S R，以核基因组 *Tert* 作为内参对照，引物为 m.nucDNA Tert F 和 m.nucDNA Tert R（表 2.1），反应体系见表 2.2，反应程序见表 2.3，用 $\Delta\Delta Ct$ 值进行数据分析。

表 2.2 染料法 qPCR 反应体系

ddH ₂ O	8.2μL
2 × Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix	10μL
引物 F (10μM)	0.4μL
引物 R (10μM)	0.4μL
模板 DNA	1μL

表 2.3 染料法 qPCR 反应程序

95°C	30s (预变性)	1 cycle
95°C	10s	40 cycles
60°C	30s (检测)	
95°C	15s (融解曲线)	1 cycle
60°C	60s (融解曲线)	1 cycle
95°C	15s (融解曲线)	1 cycle

探针法 qPCR：用于检测线粒体基因组的完整性，探针 Probe 16S 的引物为 m.mtDNA 16S F 和 m.mtDNA 16S R，探针 Probe ND5 的引物为 m.mtDNA ND5 F 和 m.mtDNA ND5 R（表 2.1），以探针法多重 PCR 试剂盒（中国，常州，百代生物，41027）作为 qPCR 试剂，反应体系见表 2.4，反应程序见表 2.5。以探针 Probe 16S 和探针 Probe ND5 分别检测到的定量拷贝数之比判断线粒体基因组完整性，越接近数值 1，则基因组完整性越好。

表 2.4 探针法 qPCR 反应体系

ddH ₂ O	5.8μL
2 × Super MultiProbe Master Mix	10μL
引物 1 F (10μM)	0.4μL
引物 1 R (10μM)	0.4μL

探针 1 (10μM)	0.4μL
引物 2 F (10μM)	0.4μL
引物 2 R (10μM)	0.4μL
探针 2 (10μM)	0.4μL
模板 DNA	1μL
Taq 酶保护液	0.4μL
ROX Reference Dye II	0.4μL

表 2.5 探针法 qPCR 反应程序

95°C	10min (预变性)	1 cycle
95°C	10s	45 cycles
60°C	40s (检测)	

5. Seahorse 能量代谢实验

分别根据糖酵解压力测试试剂盒和线粒体压力测试试剂盒的说明书，使用 Seahorse XFe 24 活细胞能量代谢检测仪（美国，Agilent）进行。

6. 激光共聚焦显微镜观察免疫荧光

将细胞爬片铺入 24 孔板，以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 密度铺上细胞，贴壁完全后加相应刺激或诱导。线粒体、溶酶体双标：按照说明书加载线粒体探针和溶酶体探针（中国上海，翌圣生物，40741ES50, 40738ES50），37°C避光孵育半小时后，取出爬片，倒扣于滴有封片剂（中国上海，翌圣生物，36308ES20）的载玻片上，即刻于共聚焦显微镜下观察。细胞表面标志物双标：对细胞进行转染或刺激等实验操作后，弃培养基，用 PBS 洗一次，加入 1 mL/孔 4% 多聚甲醛固定 15min。固定结束后弃固定液，用 PBS 洗两次，加入封闭液（含 5% BSA 和 0.2% Saponin 的 PBS）封闭 1h。按照抗体说明书推荐的浓度用封闭液稀释抗体，加到盖玻片表面的细胞上，在湿盒中 4°C 过夜孵育。将盖玻片用 PBS 洗三次，每次 15min，加入带荧光的二抗，室温孵育 1h，再用 PBS 洗三次，取出爬片，倒扣于滴有封片剂（中国上海，翌圣生物，36308ES20）的载玻片上，即刻于激光共聚焦显微镜（德国，Leica，SP8）下观察。

7. 活细胞成像

将细胞以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 密度铺入 96 孔白底板，贴壁完全后加相应刺激或诱导。按照说明书加载线粒体探针和溶酶体探针（中国上海，翌圣生物，40741ES50，

40738ES50), 37°C避光孵育半小时后, 用 Hanks 液清洗细胞 2 次, 加上 200 μ L/孔活细胞成像液后, 放入 Incucyte 活细胞成像仪内拍照观察, 统计结果为发出荧光面积(线粒体或溶酶体面积)和白场面积(细胞总面积)之比。

8. 能量代谢靶向质谱检测

全细胞能量代谢靶向蛋白质谱交由中国上海伯豪生物有限公司检测; 线粒体能量代谢靶向蛋白质谱交由中国杭州景杰生物科技股份有限公司检测。按实验设计处理细胞或制备得到线粒体后, 将细胞/线粒体离心弃上清, 留细胞/线粒体沉淀过液氮速冻后放于-80°C冰箱保存。运输过程中全程干冰保存。

9. 统计学分析

见第一部分。

三、实验结果

(一) *Dcip*^{-/-}巨噬细胞在 M0 和 M1 诱导极化条件下, 线粒体膜电位低于对照

由于不同的细胞能量代谢状态可能导致了 *Dcip*^{-/-}巨噬细胞和对照细胞 M1/M2 极化水平的差异, 因此需要比较二者细胞线粒体的功能状态。为细胞加载 JC-1 探针(中国上海, 翌圣生物, 40706ES60)后分别通过流式和荧光酶标仪检测线粒体膜电位的变化, 结果显示 *Dcip*^{-/-}巨噬细胞在 M0 和 M1 诱导极化条件下, 线粒体膜电位均低于对照细胞, 提示线粒体状态变差(图 2.1)。

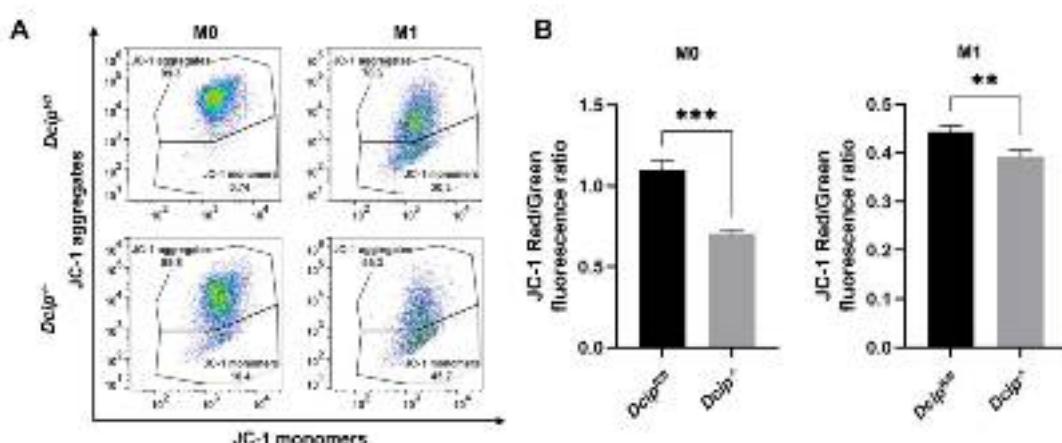


图 2.1 A. 加载 JC-1 探针, 比较 *Dcip*^{-/-}巨噬细胞与对照细胞的线粒体膜电位, 图为代表性流式结果。B. 加载 JC-1 探针, 比较 *Dcip*^{-/-}巨噬细胞与对照细胞的线粒体膜电位, 图为酶标仪定量

结果，取红色荧光强度（激发波长 525 ± 10 nm，发射波长 590 ± 10 nm）和绿色荧光强度（激发波长 490 ± 10 nm，发射波长 535 ± 10 nm）之比定量， $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, Student's *t* 检验， $n=3$ 。

（二）*Dcip*^{-/-}巨噬细胞在 M0 和 M1 诱导极化条件下，线粒体功能低于对照，但是细胞未见明显凋亡

线粒体压力实验和糖酵解压力实验结果显示，相比于对照细胞，*Dcip*^{-/-}巨噬细胞在静息时，有氧呼吸功能下降，而在 M1 极化诱导前后，糖酵解功能均增强（图 2.2A）。上述结果证实了 *Dcip*^{-/-}巨噬细胞中线粒体功能的降低以及糖酵解代偿性增强。我们没有呈现 M1 极化后的线粒体压力测试结果，因为在加入寡霉素（Oligomycin）、鱼藤酮（Rotenone）后，OCR 均反常地升高，我们推测可能的原因是此时细胞线粒体功能已经完全被抑制，加入电子传递链抑制物并不能降低耗氧率（Oxygen consumption rate, OCR），而由于这些抑制剂刺激了 ROS 的产生，因此反而增大了耗氧率，此时已经不属于讨论线粒体功能的范畴。值得注意的是，尽管我们推测线粒体损伤可能导致细胞凋亡，但检测凋亡的流式结果显示，不论 *Dcip*^{-/-}巨噬细胞还是对照细胞，在 M0、M1、M2 极化状态下，均未发生显著的凋亡（图 2.2B）。

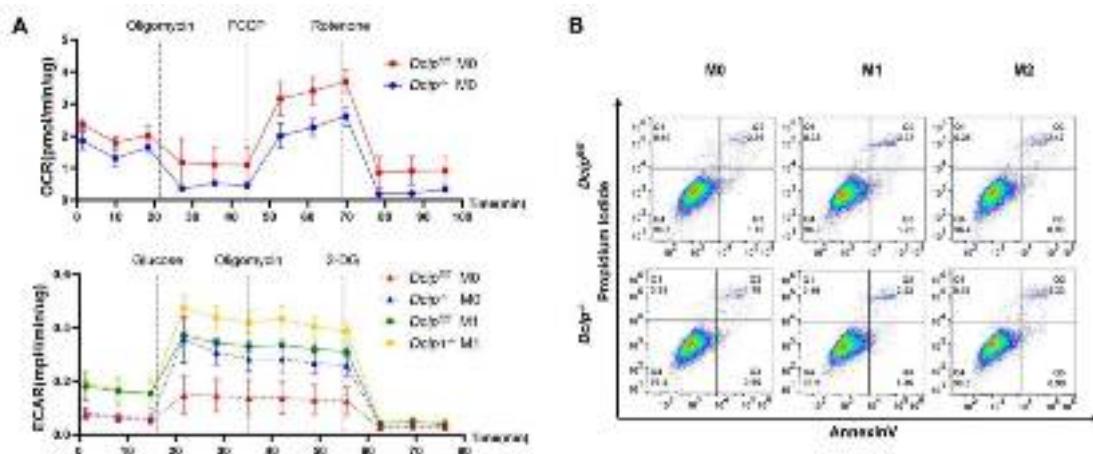


图 2.2 A. 用线粒体压力实验检测 *Dcip*^{-/-}巨噬细胞和对照细胞在静息状态下的耗氧率 (OCR) (上)，用糖酵解压力实验检测 *Dcip*^{-/-}巨噬细胞和对照细胞和细胞外酸化率 (ECAR) (下)；B. 流式检测在 M0、M1、M2 极化状态下，*Dcip*^{-/-}巨噬细胞和对照巨噬细胞的凋亡。

（三）能量代谢质谱显示 *Dcip*^{-/-}巨噬细胞的糖酵解产物增多，线粒体内 ATP 合成减弱，天冬氨酸-精氨琥珀酸分流增加

为了进一步明确 *Dcip*^{-/-}巨噬细胞增强了糖酵解，我们通过靶向质谱检测 M0、

M1 极化状态下 *Dcip*^{-/-} 和对照巨噬细胞中涵盖 TCA 循环和糖酵解途径中 18 种能量代谢物的含量，18 种能量代谢物分别为：柠檬酸、苹果酸、延胡索酸、琥珀酸、 α -酮戊二酸、顺乌头酸、草酰乙酸、三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸鸟苷、二磷酸鸟苷、 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸、 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、还原型辅酶 I、还原型辅酶 II、葡萄糖、6-磷酸葡萄糖、6-磷酸果糖、1,6-二磷酸果糖、3-磷酸甘油醛、磷酸二羟丙酮、2,3-二磷酸甘油酸、3-磷酸甘油酸、甘油酸-2-磷酸、磷酸烯醇式丙酮酸、丙酮酸、乳酸。我们从中这些代谢物中筛选出的差异代谢物是 M0 极化状态下的丙酮酸、M1 极化状态下的 3-磷酸甘油醛和葡萄糖，均为糖酵解通路的代谢物，它们的积累再次证实 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞相比于对照细胞在 M0 和 M1 极化状态下，糖酵解功能更活跃（图 2.3A）。

然而，我们并未检测到线粒体相关代谢物的表达差异，该结果和之前能量代谢检测结果相矛盾，推测可能是由于线粒体内代谢物含量极少（例如柠檬酸和葡萄糖的浓度差达 100 倍），蛋白质谱灵敏度不足以检测出全细胞裂解液样本中线粒体相关代谢物的差异。因此，我们提取小鼠腹腔巨噬细胞中的线粒体，将来自三个 *Dcip*^{-/-} 小鼠及三个对照小鼠的线粒体样本分别混合，以满足单个样本的最低检测蛋白量要求，重新进行代谢质谱检测。结果显示，*Dcip*^{-/-} 巨噬细胞线粒体中，ATP 水平显著低于对照细胞，提示了线粒体氧化磷酸化功能的抑制。另外，在 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞线粒体中，延胡索酸、苹果酸、精氨琥珀酸、天冬氨酸显著高于对照细胞，提示三羧酸循环阻滞，并使天冬氨酸-精氨琥珀酸分流（aspartate arginosuccinate shunt, AASS）增强。对照细胞中琥珀酸水平显著高于 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞，笔者认为这是由于提取线粒体过程中由于失去耗能细胞器，ATP 无法转化为 ADP，发生了线粒体呼吸链的阻滞，因此琥珀酸脱氢酶功能抑制，无法催化琥珀酸转化为延胡索酸，这是对照细胞的线粒体功能正常的结果。将葡萄糖转化为 6-磷酸葡萄糖的己糖激酶定位于线粒体外膜，我们检测到 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞线粒体中的 6-磷酸葡萄糖高于对照细胞，提示了 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞中的糖酵解更活跃。

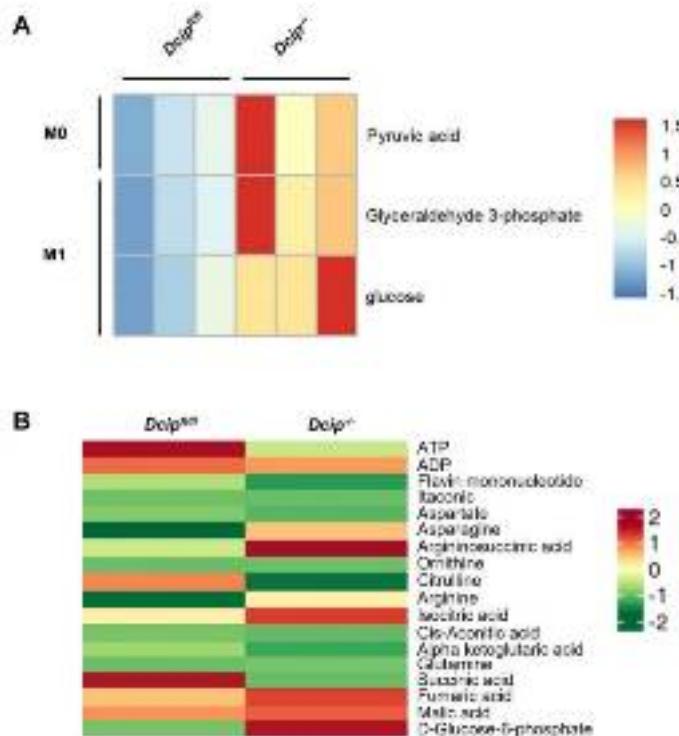


图 2.3 靶向能量代谢质谱结果。A. 全细胞裂解液的能量代谢质谱结果；B. 线粒体裂解液的能量代谢质谱结果。Pyruvic acid: 丙酮酸; Glyceraldehyde 3-phosphate: 3-磷酸甘油醛; glucose: 葡萄糖; ATP: 腺嘌呤核苷三磷酸; ADP: 腺嘌呤核苷二磷酸; Flavin mononucleotide (FMN): 核黄素磷酸钠; Iaconic: 衣康酸; Aspartate: 天冬氨酸; Asparagine: 天冬酰胺; Argininosuccinic acid: 精氨琥珀酸; Ornithine: 鸟氨酸; Citrulline: 瓜氨酸; Arginine: 精氨酸; Isocitric acid: 异柠檬酸; Cis-Aconitic acid: 顺乌头酸; Alpha ketoglutaric acid: α -酮戊二酸; Glutamine: 谷氨酸; Succinic acid: 琥珀酸; Fumaric acid: 延胡索酸; Malic acid: 苹果酸; D-Glucose-6-phosphate: 6-磷酸葡萄糖

(四) *Dcip*^{-/-}巨噬细胞在 M0 状态下，存在自发的线粒体自噬

由于 *Dcip*^{-/-}巨噬细胞线粒体膜电位降低，氧化磷酸化功能降低，但是细胞并未发生凋亡，因此我们怀疑此时细胞发生了线粒体自噬以维持生存。为细胞双标溶酶体、线粒体探针，在共聚焦显微镜下仅在 *Dcip*^{-/-}巨噬细胞内观察到了线粒体和溶酶体的共定位，其线粒体的形态相比于对照细胞也明显改变：在对照细胞内的线粒体均小于 $1\mu\text{m}$ ，呈颗粒状密布于细胞中，*Dcip*^{-/-}巨噬细胞的线粒体呈 $2\sim 3\mu\text{m}$ 囊泡装，且已经与溶酶体发生融合（图 2.4A）。加载溶酶体探针、线粒体探针后，在活细胞成像仪内定量比较红（线粒体）绿（溶酶体）通道荧光强度，我们确认了在 M0 状态下 *Dcip*^{-/-}巨噬细胞相比于对照细胞，线粒体总量减少而溶酶体总量增加（图 2.4B）。我们通过 Western 印记，检测 *Dcip*^{-/-}巨噬细胞和对照细胞中自噬相关蛋白的表达，同样发现在静息状态下，*Dcip*^{-/-}巨噬细胞存在 Pink1-Parkin 通路的活化，以

及自噬标志物 LC3B 的表达升高（图 2.4C）。上述结果提示 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞内发生了线粒体自噬。

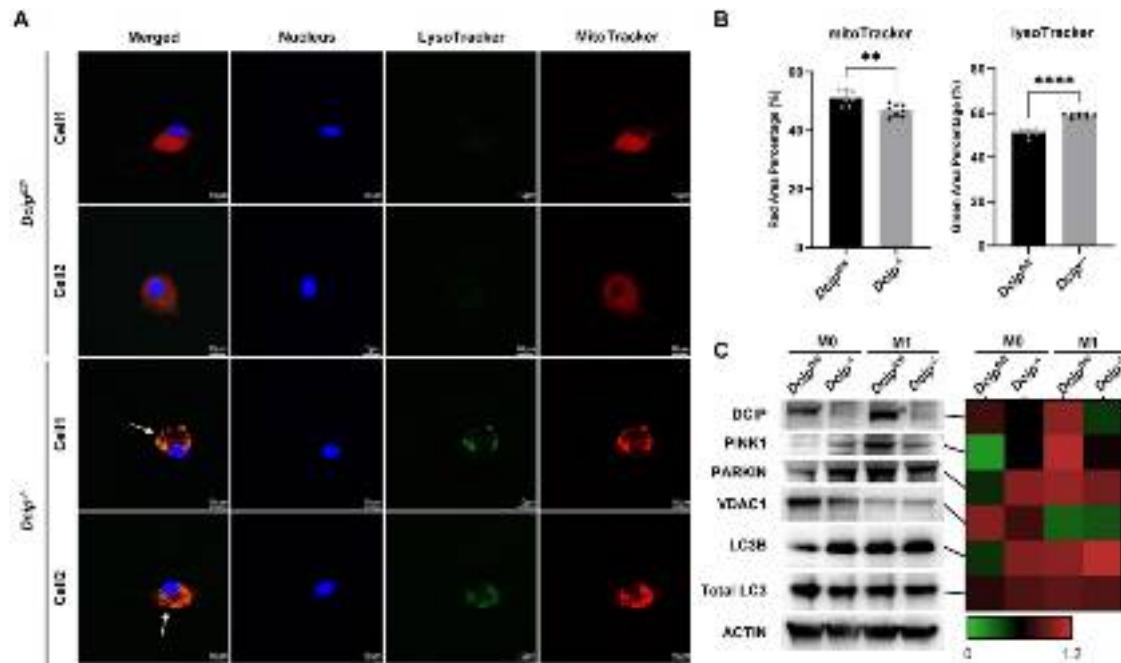


图 2.4 A. 在激光共聚焦显微镜下观察双标溶酶体探针（绿）和线粒体探针（红）的巨噬细胞，使用 DAPI（蓝）负染细胞核；B. 通过活细胞成像仪定量 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞和对照细胞的线粒体、溶酶体总量， ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, Student's *t* 检验, $n=8$; C. Western 比较 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞和对照细胞自噬相关蛋白的表达。

（五）*Dcip*^{-/-} 巨噬细胞在 M0 和 M1 诱导极化条件下，线粒体基因组拷贝数未见显著变化，但是完整度降低

线粒体压力实验、线粒体能量代谢质谱结果均提示 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞线粒体功能抑制，且激光共聚焦显示 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞存在自发的线粒体自噬，因此我们猜测这是 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞线粒体基因组损伤的结果。为了验证这一猜想，我们提取了巨噬细胞的总基因组（包含了核基因组和线粒体基因组），以核基因组上的 *Tert* 基因为内参，以 m.mtDNA 16S F 和 m.mtDNA 16S R 为引物定量检测线粒体基因组上编码核糖体 16S 亚基的基因片段拷贝数（表 2.1），发现 *Dcip*^{-/-} 和对照巨噬细胞在 M0、M1 极化状态下的线粒体拷贝数无显著差异（图 2.5A）。该结果可能是由于腹腔巨噬细胞是终末分化细胞，线粒体基因组复制不活跃导致。为了进一步检测上述细胞线粒体基因组的完整度，我们设计了 2 组引物探针，分别检测线粒体基因组上 *mt-Rnr2*（16S rRNA, mitochondrial）基因和 *Nd5*（NADH dehydrogenase 5）基因片段的拷贝数（表 2.1）。当线粒体在氧化应激等情况下，线粒体基因组受损，基因组上相距

较远的不同位置的修复程度可能不一致，因此将导致该位置拷贝数的差异。以 *Nd5* 和 *mt-Rnr2* 拷贝数之比来判断线粒体基因组完整度，越接近 1，则完整度越高。结果显示，在 M0、M1 极化状态下，*Dcip*^{-/-} 巨噬细胞线粒体基因组完整度均显著低于对照细胞（图 2.5B）。上述结果提示，*Dcip*^{-/-} 巨噬细胞线粒体基因组拷贝数和对照细胞接近，但是其线粒体质量显著低于对照细胞。

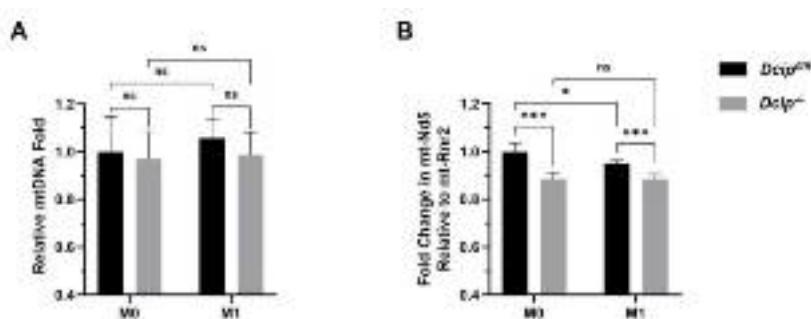


图 2.5 A. 比较 M0、M1 极化状态下 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞与对照细胞的线粒体拷贝数；B. 比较 M0、M1 极化状态下 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞与对照细胞的线粒体完整度。ns：无统计学差异， $*p < 0.05$, $***p < 0.001$, Student's *t* 检验, $n=3$ 。

四、讨论

线粒体是广泛存在于真核生物中的细胞器，其主要功能是为细胞过程提供能量。线粒体在形态上由可渗透的外膜和不可渗透的内膜组成，利用一套被称为电子传递链的蛋白质复合物，将还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide, NADH）中的电子传递给氧，产生的能量驱动质子泵将 H⁺ 泵入线粒体内膜内，腺嘌呤核苷三磷酸（Adenosine triphosphate, ATP）合成酶依赖该电化学梯度将腺嘌呤核苷二磷酸（adenosine diphosphate, ADP）合成为 ATP^[8]。ATP 作为“能量货币”为包括生物合成、细胞运动、膜运输、信号转导、遗传信息传递和表达等一系列细胞生命活动提供能量，其中也包括巨噬细胞行使其免疫功能：巨噬细胞被活化后，会引发细胞因子分泌、脂肪酸氧化、活性氧簇（Reactive oxygen species, ROS）产生、细胞迁移和细胞极化等免疫反应，上述反应均依赖线粒体供能。此外，线粒体 DNA（mitochondrial DNA, mtDNA）是一种危险相关分子模式（danger-associated molecular pattern, DAMP）^[9]，线粒体在损伤时释放 mtDNA，可活化 TLR9-NF-κB^[10]、NLRP3-IL-1β^[11]、cGAS-STING-IRF3^[12] 等通路，引发后续多种炎症反应；线粒体外膜作为 RIG-I 信号传导中 MAVS 等分子以及 NLRP3 炎症小体的信号平台，起到了免疫信号中转的作用^[13]；线粒体内三羧酸循环的中间代谢物琥珀酸、衣康酸、柠檬酸等等参与了炎症的调控^[6]；线粒体自噬使受感染的巨噬细胞

避免了死亡^[14]；线粒体来源 ROS 可通过激活天然免疫、适应性免疫等多种机制杀伤入侵病原体^[15-18]。上述机制共同表明：线粒体是调控免疫反应的关键节点。

在本部分，我们通过实验证实了 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞的线粒体膜电位降低、氧化呼吸功能抑制，糖酵解代偿性升高，然而，细胞并未发生显著的凋亡。由于上述表型在 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞的静息状态下即自发存在，因此我们相信 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞线粒体损伤是造成其 TLR4 通路异常活化、M1/M2 极化失衡的原因而非结果（对于 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞，TLR4 通路活化、M1/M2 极化还是需要加相应的刺激物，无法自发产生）。另外，我们在静息的 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞观察到了线粒体自噬，推测这可能使巨噬细胞避免了凋亡。*Dcip*^{-/-} 巨噬细胞线粒体基因组拷贝数和对照细胞无显著差异，但是其线粒体完整度显著低于对照细胞，我们认为这是造成上述表型的原因。

全细胞的能量代谢质谱显示 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞的糖酵解功能增强，这和之前糖酵解压力测试的结果一致。线粒体能量代谢质谱检测结果显示 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞线粒体内 ATP 合成减弱，天冬氨酸-精氨琥珀酸分流增加。有趣的是，Hooftman 等人通过代谢组学和稳定同位素辅助追踪证明，LPS 刺激后会诱导炎性天冬氨酸-精氨酸琥珀酸分流^[19]。我们发现 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞即使在未经 LPS 刺激的情况下，即存在天冬氨酸-精氨琥珀酸分流增加，猜测可能是由于其线粒体基因组的损伤，导致了能量代谢的“预编程”，恰好和 LPS 刺激的能量代谢转化相同，因此实现了 TLR4 通路在 LPS 刺激的情况下活化增强。

在下一部分，我们将进一步探索和 DCIP 互作的分子以及其调控线粒体功能的活性位点。

参考文献：

- [1] LI Q, WU C, LIU Z, et al. Increased TLR4 Expression Aggravates Sepsis by Promoting IFN- γ Expression in CD38(-/-) Mice [J]. J Immunol Res, 2019, 2019(3737890). doi:10.1155/2019/3737890
- [2] VAN DEN BOSSCHE J, O'NEILL L A, MENON D. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? [J]. Trends Immunol, 2017, 38(6): 395-406. doi:10.1016/j.it.2017.03.001
- [3] MURRAY P J, WYNN T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets [J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(11): 723-37. doi:10.1038/nri3073
- [4] STEARNS-KUROSAWA D J, OSUCHOWSKI M F, VALENTINE C, et al. The pathogenesis of sepsis [J]. Annu Rev Pathol, 2011, 6(19-48). doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130327
- [5] LIU Y C, ZOU X B, CHAI Y F, et al. Macrophage polarization in inflammatory diseases [J]. Int J

- Biol Sci, 2014, 10(5): 520-9. doi:10.7150/ijbs.8879
- [6] MILLS E L, KELLY B, O'NEILL L A J. Mitochondria are the powerhouses of immunity [J]. Nat Immunol, 2017, 18(5): 488-98. doi:10.1038/ni.3704
- [7] MILLS E L, O'NEILL L A. Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal [J]. Eur J Immunol, 2016, 46(1): 13-21. doi:10.1002/eji.201445427
- [8] SAZANOV L A. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015, 16(6): 375-88. doi:10.1038/nrm3997
- [9] ZHANG Q, RAOOF M, CHEN Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury [J]. Nature, 2010, 464(7285): 104-7. doi:10.1038/nature08780
- [10] YE W, WEN C, ZENG A, et al. Increased levels of circulating oxidized mitochondrial DNA contribute to chronic inflammation in metabolic syndrome, and MitoQ-based antioxidant therapy alleviates this DNA-induced inflammation [J]. Mol Cell Endocrinol, 2023, 560(111812). doi:10.1016/j.mce.2022.111812
- [11] LIU Q, ZHANG D, HU D, et al. The role of mitochondria in NLRP3 inflammasome activation [J]. Mol Immunol, 2018, 103(115-24). doi:10.1016/j.molimm.2018.09.010
- [12] WEST A P, KHOURY-HANOLD W, STARON M, et al. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response [J]. Nature, 2015, 520(7548): 553-7. doi:10.1038/nature14156
- [13] BUSKIEWICZ I A, MONTGOMERY T, YASEWICZ E C, et al. Reactive oxygen species induce virus-independent MAVS oligomerization in systemic lupus erythematosus [J]. Sci Signal, 2016, 9(456): ra115. doi:10.1126/scisignal.aaf1933
- [14] ZHANG Y, YAO Y, QIU X, et al. Listeria hijacks host mitophagy through a novel mitophagy receptor to evade killing [J]. Nat Immunol, 2019, 20(4): 433-46. doi:10.1038/s41590-019-0324-2
- [15] ZHOU R, YAZDI A S, MENU P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation [J]. Nature, 2011, 469(7329): 221-5. doi:10.1038/nature09663
- [16] WEST A P, BRODSKY I E, RAHNER C, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS [J]. Nature, 2011, 472(7344): 476-80. doi:10.1038/nature09973
- [17] KAMIŃSKI M M, SAUER S W, KAMIŃSKI M, et al. T cell activation is driven by an ADP-dependent glucokinase linking enhanced glycolysis with mitochondrial reactive oxygen species generation [J]. Cell Rep, 2012, 2(5): 1300-15. doi:10.1016/j.celrep.2012.10.009
- [18] JANG K J, MANO H, AOKI K, et al. Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates [J]. Nat Commun, 2015, 6(6750). doi:10.1038/ncomms7750
- [19] HOOFTMAN A, PEACE C G, RYAN D G, et al. Macrophage fumarate hydratase restrains mtRNA-mediated interferon production [J]. Nature, 2023, 615(7952): 490-8. doi:10.1038/s41586-023-05720-6

第三部分

DCIP 抑制炎症的分子机制探索

一、前言

已有研究表明 DCIP 是一个 dNTP 酶，即可将 dNTP 水解为 dNs（脱氧核昔）和 PPPi（三磷酸基团）^[1]，其抗自身免疫、抗病毒、抗肿瘤等诸多已知功能均和 dNTP 酶活性相关。H238A/D239A（以下简称 H238A）是已知可使小鼠 DCIP 失去 dNTP 酶活性的突变^[2]。在人源 DCIP 上有一个磷酸化位点 T592 可被 CDK1 和 CDK2 磷酸化从而降低抗 HIV-1 病毒能力^[3]。T634 被证实是在小鼠 DCIP 上和人源 DCIP T592 同源的位点，可被小鼠 CDK1 和 CDK2 磷酸化^[3]。因此，我们构建了全长野生型小鼠 DCIP 的真核表达载体，并在此基础上构建了如下突变体：1. 使 DCIP 的 dNTP 酶失活的突变体 H238A/D239A；2. 使 T634 位点磷酸化缺失的突变体 T634A；3. 使 T634 位点模拟磷酸化的突变体 T634D。

为了进一步阐明 DCIP 缺陷如何导致上述结果，我们使用 Cas9 技术构建了 *Dcip*^{-/-} RAW264.7 小鼠巨噬细胞系。利用其比原代腹腔巨噬细胞更易得且相对易转染的特性，拟通过将全长 DCIP 或 DCIP 突变体在 *Dcip*^{-/-} RAW264.7 细胞内过表达并观察表型回复的方法，进一步明确 DCIP 在急性炎症中的功能。

另外，拟通过 IP 联用蛋白鉴定质谱，筛选和 DCIP 互作的靶分子。

二、材料与方法

（一）材料

1. 动物和细胞

如第一部分所述。

2. 耗材

如第一部分所述。

3. 仪器

如第一部分所述。

4. 实验试剂

如第一部分所述。

(二) 方法

1. 蛋白质谱

非靶向蛋白质谱交由中国杭州景捷生物有限公司检测，按实验设计处理细胞后，将细胞离心弃上清，留细胞团沉淀过液氮速冻后放于-80°C冰箱保存。运输过程中全程干冰保存。

2. 免疫沉淀实验 (IP)

将 300 μg 全细胞蛋白裂解液稀释至 800 μl ，留取 20 μL 作为 input，其余按照 0.5-1 μg 抗体/mg 蛋白的比例加入特异性抗体或同种属的对照抗体 IgG，4°C 旋转摇床孵育过夜。第二天加入预先用 0.5% BSA 封闭的 protein A/G-beads 25 μL ，4°C 旋转摇床孵育 2 小时。 $3000 \times g$ ，4°C 离心 5 分钟，弃上清，琼脂糖珠沉淀用含 900 mM NaCl 高钠盐 NETN 缓冲液漂洗一次，用含 100 mM NaCl 的低钠盐 NETN 缓冲液漂洗三次。弃去大部分上清，保留终体积 15~20 μl ，加入等体积 2×蛋白上样缓冲液，煮沸 8 min，将蛋白与琼脂糖珠解离，通过 Western 印迹检测目标蛋白。

3. Western 印记

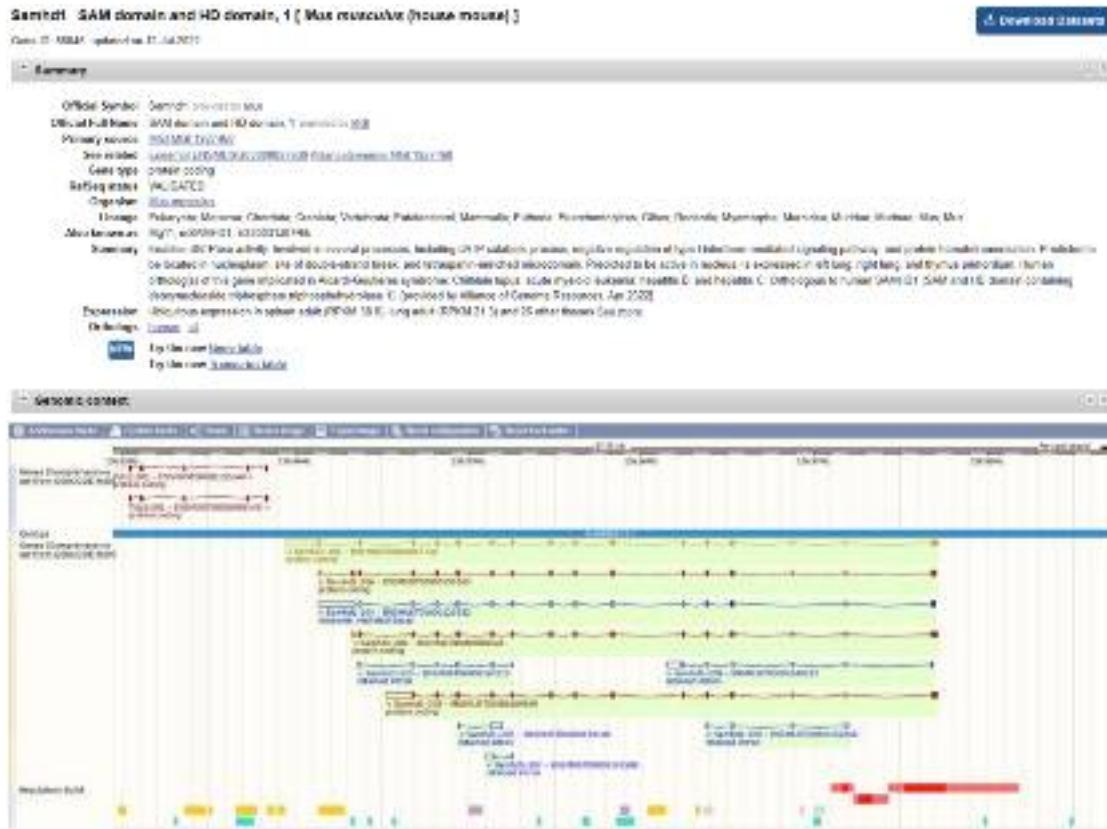
见第一部分。

4. 构建 *Dcip*^{-/-}RAW264.7 细胞系

1) 设计原则

根据提供的物种、基因名称或者基因 ID 在 NCBI 或 ENSEMBLE 中进行查找。找到该基因 CDS 区，分析相应的基因组结构，明确 CDS 的外显子部分。按照基因本身的性质，选择候选的待敲除外显子，确定待敲除位点。确定敲除位点后，将序列输入到在线免费设计 sgRNA 的软件 Input 框中 (<http://crispor.tefor.net>)，然后进行设计运算，软件会自动输出 sgRNA 序列。最终选择 off-target 较少的作为基因敲除的靶点

2) 靶点设计



外显子信息及靶点位置如上图所示。

以 Samhd1-201 为转录本，在 exon2 上下游各设计 1 个靶点（选择 off-target 较少的 guide RNA

作为靶点）

gRNA-A1: CCAATCGGAATCCATTGGG GGG

gRNA-A2: AAAAGTTACCGCCCTTTGT AGG

3) 实验流程



4) 细胞验证

细菌、真菌、支原体等检测，确保细胞无微生物污染。

克隆形成率实验，用于检测细胞的增殖能力。

设计引物针对 gRNA 打靶位置及其附近基因组序列进行测序，确认细胞的基因型。

5) 载体构建

根据设计方案合成 gRNA 物料和 Cas9 蛋白。

6) 细胞转染

电转使用仪器为 NeonTM 转染仪 (Cat# MPK5000)，实验操作严格按照官网说明进行。取状态良好的对数期生长的靶细胞消化离心去上清（悬浮细胞可直接收集），使用 PBS 重悬计数并取用 1×10^6 cells 至 EP 管，离心获得细胞沉淀。将 gRNA 和 Cas9 蛋白孵育结合为 RNP 复合物，作为悬液重悬细胞。输入最适电转参数，对上述混合物进行电转，并在同样参数下电转 EGFP 对照组。将电转后的各组细胞分别转移至对应的培养器皿中，放置培养箱中培养，24h 后观察细胞状态，并根据 EGFP 对照组情况判断本次电转效率。

7) 单克隆化

消化细胞计数，接种单克隆。期间观察克隆生长状态，及时换液。待克隆生长至足够数量，备份后送检 PCR。

8) PCR 鉴定

提取克隆样品基因组进行 PCR 检测，鉴定 gRNA 打靶位点和敲除条带，初步判断敲除成功的单克隆细胞株并送检测序。

9) 测序鉴定

测序结果经 Snapgene 软件比对后确定敲除成功的单克隆细胞株。

10) 阳性克隆扩增

将敲除成功的单克隆细胞株进行扩大培养。

5. 统计学分析

见第一部分。

三、实验结果

1. 通过 Cas9 技术构建的 *Dcip* 敲除 RAW264.7 细胞系和 *Dcip* 敲除原代巨噬细胞具有相同的表型

我们通过 Cas9 技术成功挑选出 *Dcip* 敲除 RAW264.7 细胞系单克隆，并在蛋白层面验证了其敲除效率（图 3.1AB）。使用 LPS 刺激（100ng/ mL）上述 RAW264.7 细胞，12h 后通过 ELISA 检测培养上清中 IL-6、TNF α 的浓度，*Dcip*^{-/-} RAW264.7 的 IL-6、TNF α 浓度均高于对照细胞，该表型和在第一部分 *Dcip*^{-/-} 腹腔巨噬细胞中的一致（图 3.1C），证明该敲除未发生脱靶效应。

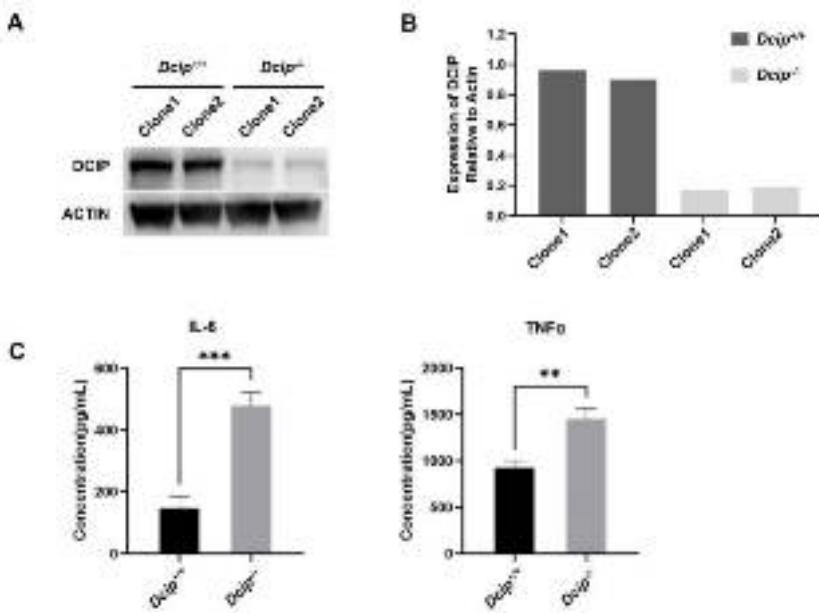


图 3.1 A. Western 印记验证 *Dcip^{-/-}* 在 RAW264.7 细胞系中的敲除效率；B. 使用 ImageJ 图像软件对条带的量化分析结果。C. ELISA 检测 *Dcip^{-/-}* RAW264.7 在 LPS 刺激（100ng/ mL）12h 后，细胞培养上清内 IL-6、TNF α 的表达。

2. DCIP 抑制 IL-6 分泌和 M1 极化的功能依赖于其 dNTP 酶活性和磷酸化位点的调控

在 *Dcip^{-/-}* RAW264.7 细胞中分别转染全长 DCIP 或 DCIP 突变载体，24h 后用 LPS（100ng/ mL）各刺激 12h，收集细胞培养上清和细胞分别用 ELISA 检测细胞培养上清中 IL-6 的表达和用 JC-1 探针检测线粒体膜电位。过表达全长 DCIP 及 T634D 突变的细胞培养上清中 IL-6 水平显著低于对照细胞，过表达 T634A 突变的细胞与对照细胞相比无显著差异，过表达 H238A 的细胞培养上清中的 IL-6 水平显著高于对照细胞（图 3.2A）。过表达全长 DCIP 及 T634D 突变的细胞 JC-1 红绿荧光强度比高于对照细胞，过表达 T634A 突变的细胞与对照细胞相比无显著差异，过表达 H238A 的 JC-1 红绿荧光强度比低于对照细胞（图 3.2BD）。在 *Dcip^{-/-}* RAW264.7 细胞中分别转染全长 DCIP 或 DCIP 突变载体，24h 后进行 M1 极化诱导，再过 24h 后流式检测细胞的 M1 极化比例。过表达全长 DCIP 的细胞 M1 极化比例低于对照细胞，过表达 H238A 的细胞 M1 极化比例高于对照细胞，过表达 T634A 突变的细胞 M1 极化比例高于过表达 T634D 的细胞（图 3.2CE）。上述结果表明，DCIP 能够抑制炎症因子分泌、维持线粒体膜电位和抑制细胞的 M1 极化，上述功能依赖于 DCIP 的 dNTP 酶活性，并且受到磷酸化位点 T634 的调控。

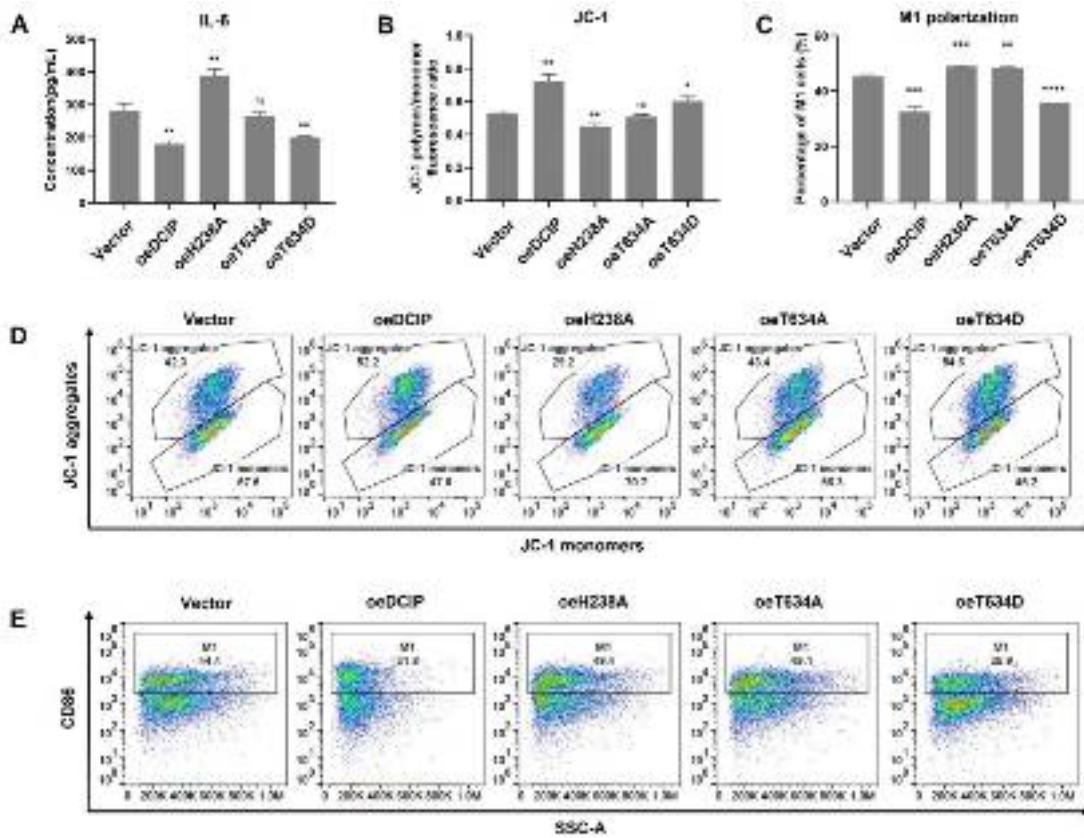


图 3.2 构建 *Dcip*^{-/-} RAW264.7 细胞系及未敲除 *Dcip* 的对照细胞，通过转染全长 *Dcip* 或 *Dcip* 突变载体，24h 后用 LPS（100ng/ mL）各刺激 12h。A. ELISA 检测各细胞培养上清中 IL-6 的表达，** $p < 0.01$, Student's *t*-test, $n=3$ 。B,D. 给细胞加载 JC-1 探针，流式和荧光酶标仪检测细胞内 JC-1 聚合体和单体的比例，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$, Student's *t*-test, $n=3$; C,E. 通过转染全长 DCIP 或 DCIP 突变载体，24h 后进行 M1 (IFN γ 20ng/ml+LPS 100ng/ mL) 极化诱导，再过 24h 后流式检测细胞的 M1 极化比例，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ ，Student's *t*-test, $n=3$ 。

3. IP-MS 和 co-IP 结果提示 DCIP 和 VDAC1 存在相互作用

我们用 DCIP 抗体和琼脂糖珠对 RAW264.7 非变性裂解液进行免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, co-IP)，在免疫复合物加入 SDS-PAGE loading buffer 煮沸，随后在 BIS-Tris Gels 上跑电泳，切取泳道上 1cm 长胶条送非靶向蛋白质谱，对结果进行筛选，发现 VDAC1 是 DCIP 潜在的互作分子（图 3.3A）。Vdac1 和其家族中的另外两个分子——VDAC2、VDAC3 在结构上高度保守，功能上存在一定的互补冗余，是一种特异性定位于线粒体外膜的通道蛋白，负责跨膜物质运输^[26]。巧合的是，VDAC1 不仅是线粒体的表明标志物，同时也是线粒体自噬相关分子^[4]。通过 Co-IP 和 Western 印记确认了 DCIP 和 VDAC1 存在相互作用（图 3.3B）。

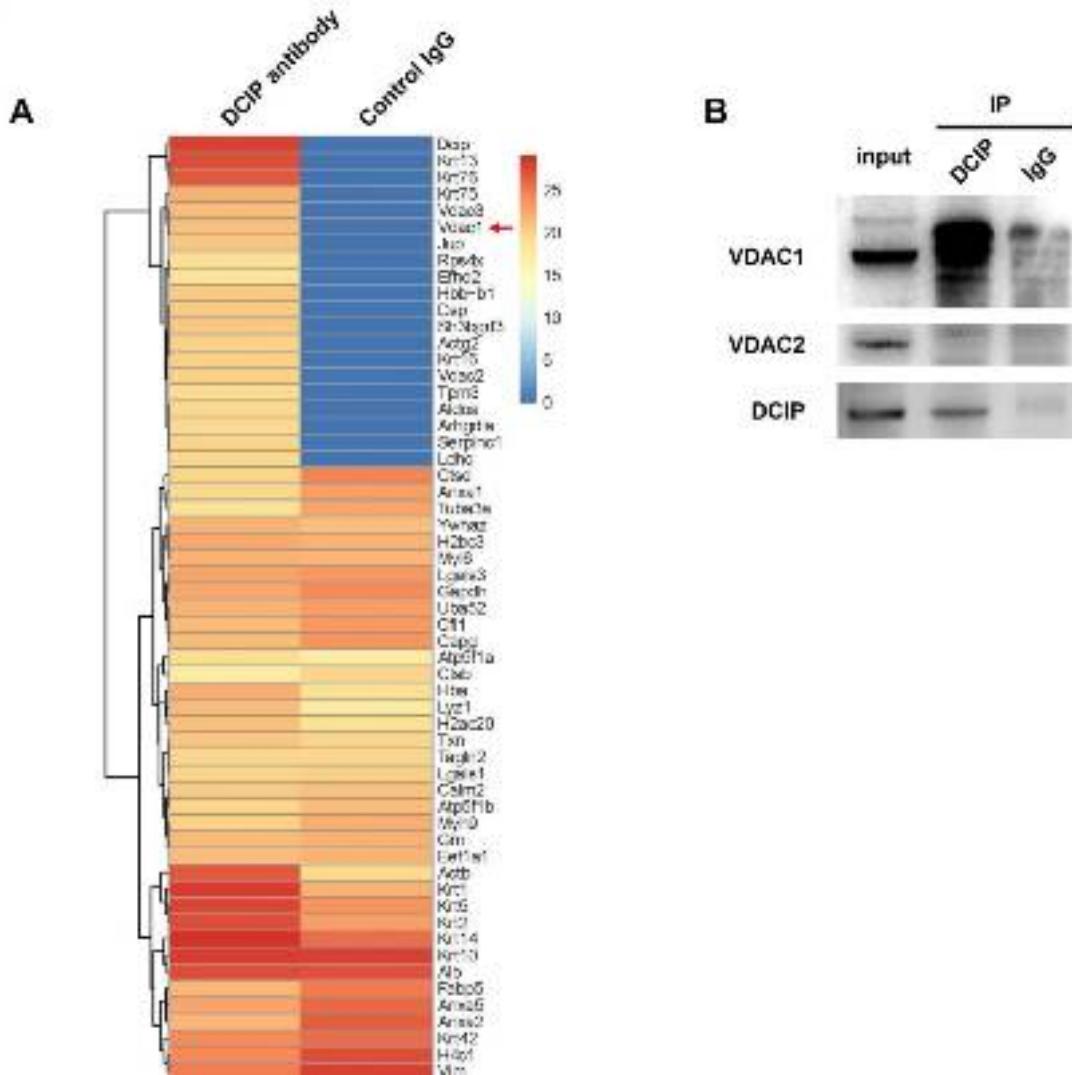


图 3.3 A. IP-MS 结果提示 DCIP 和 VDAC1 存在相互作用。B. 以野生型小鼠 RAW264.7 细胞裂解液作为 input，分别加入小鼠 DCIP 抗体或同型对照 IgG，和偶联蛋白 A/G 的琼脂糖珠进行免疫共沉淀，Western 印记分别检测 input 及沉淀复合物中 VDAC1、VDAC2、DCIP 的含量。

4. 激光共聚焦显微镜发现 DCIP 和 VDAC1 在胞内可形成簇状共定位

为了进一步明确 DCIP 和 VDAC1 在细胞内的原位相互作用，我们使用 DCIP 和 VDAC1 双标了小鼠巨噬细胞，在激光共聚焦显微镜下观察到 DCIP 和 VDAC1 存在簇状共定位点（图 3.4，白色箭头所指），*Dcip* 敲除巨噬细胞验证了 DCIP 抗体的特异性。

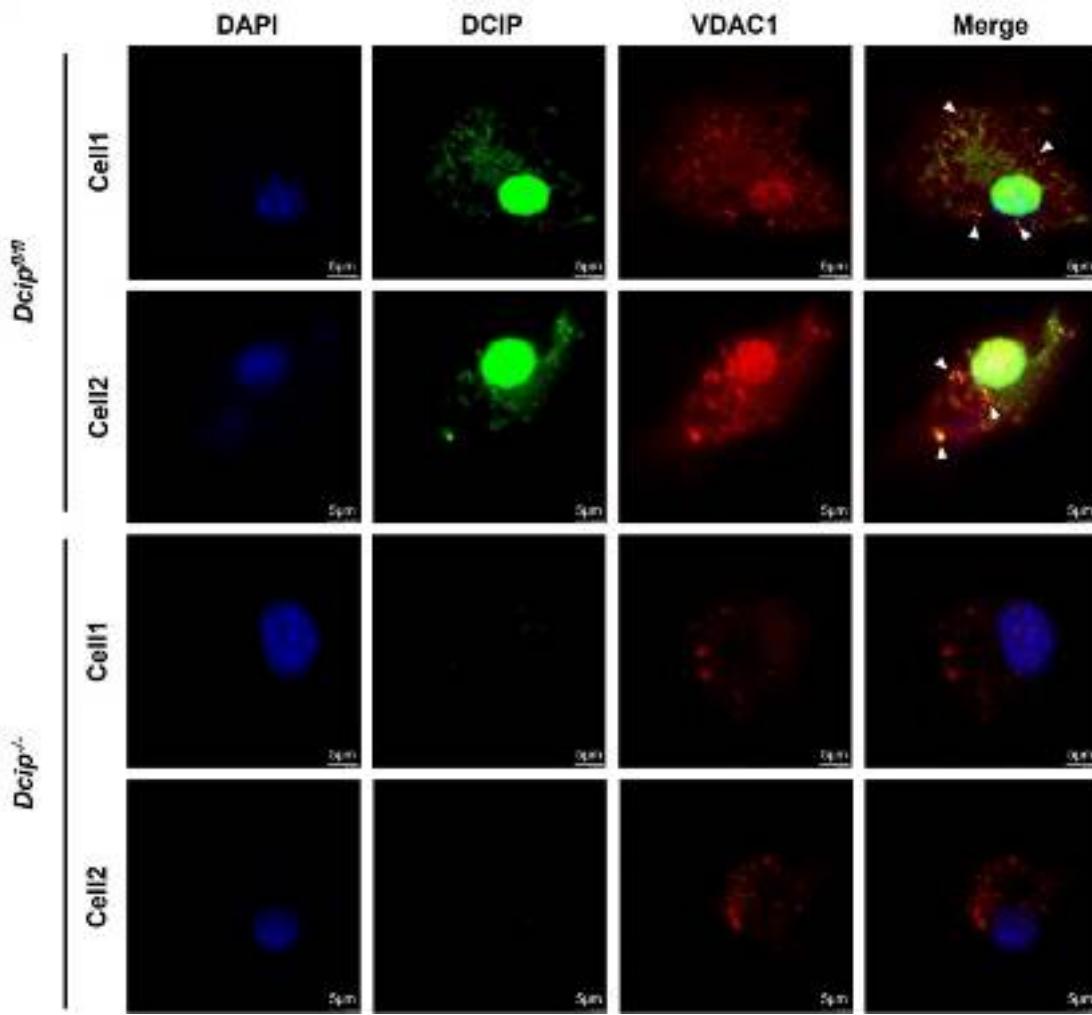


图 3.4 分别用 DAPI、AF488、AF647 标记小鼠腹腔巨噬细胞的细胞核、DCIP、VDAC1，在激光共聚焦显微镜下观察到 DCIP 和 VDAC1 的簇状共定位（如白色箭头所示）。

5. ERLIN1 的 IP-MS 及 Western 印记结果提示其和 DCIP 存在相互作用

本课题团队目前还有一个针对 ERLIN1 在巨噬细胞功能研究的平行课题，ERLIN1 同样是本实验室于 2000 年在 IFN γ 活化的 DC 中鉴定并报道的功能基因^[5]，后来，其他研究团队发现其特异性地定位于细胞内质网中，并且是内质网脂筏上的标志分子，因此将其命名为现在的名字，内质网脂筏相关蛋白 1 (ER lipid raft-associated protein 1, ERLIN1)。非常巧合的是：IP-MS 结果同样鉴定出 DCIP 是 ERLIN1 的潜在互作分子，并且 IP-Western 印记验证了该结果（图 3.5）。因此我们推测 ERLIN1 可能和 DCIP 存在着某种功能联系。

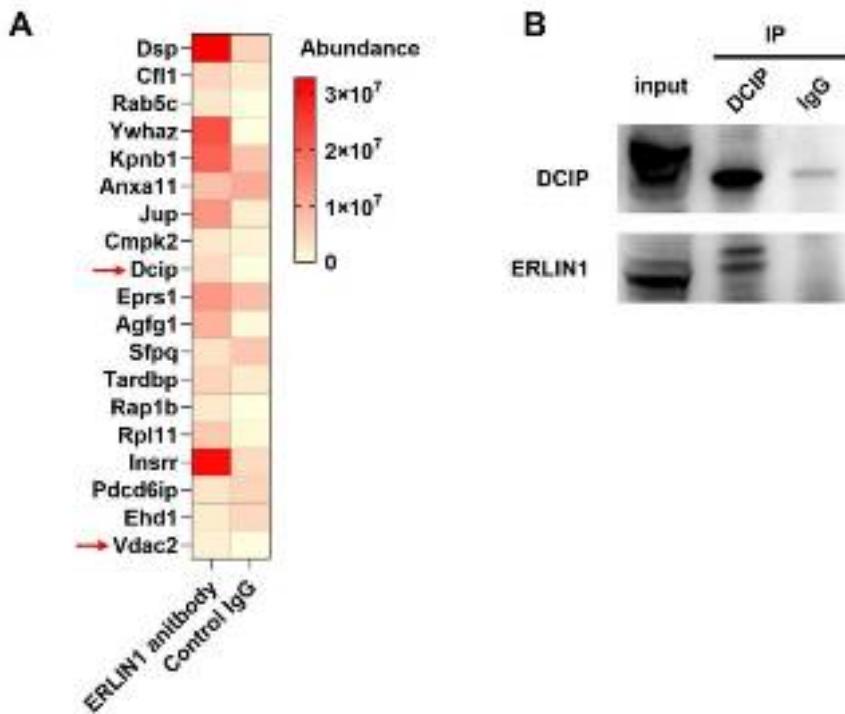


图 3.5 A. ERLIN1 的 IP-MS 结果提示其和 DCIP 存在相互作用；B. 以野生型小鼠 RAW264.7 细胞裂解液作为 input，分别加入小鼠 ERLIN1 抗体或同型对照 IgG，和偶联蛋白 A/G 的琼脂糖珠进行免疫共沉淀，Western 印记分别检测 input 及沉淀复合物中 DCIP 和 ERLIN1 的含量。

四、讨论

败血症的发病机制还未完全阐明，目前主流观点认为巨噬细胞表面 Toll 样受体（Toll like receptor, TLR）识别细菌细胞壁中的脂多糖（Lipopolysaccharide, LPS）后，产生天然免疫应答的过程被认为是研究败血症的基本模型^[5]。如果在细菌感染的早期阶段巨噬细胞偏向 M1 过度极化，同时具有抑制炎症作用的 M2 未能平衡 M1 的炎症反应，则可能导致局部炎症失控，进展为全身性的败血症^[6]。受线粒体功能状态调控的能量代谢途径是决定巨噬细胞向 M1 或 M2 极化的重要分水岭^[7, 8]，因此线粒体有望成为改变败血症进程的关键靶点。

已有的研究证明 DCIP 具有 dNTPase 活性，将 dNTP 水解为脱氧核糖核苷（deoxynucleoside, dN）和三磷酸基团（PPPi）^[1]，并且能够维持胞内 dNTP 池稳态^[9]、维护基因组稳定^[10-13]和抗病毒^[14]。作为一个天然免疫相关分子，其是否参与调控细菌感染、败血症的进程，目前尚未有同类相关报道。我们发现 DCIP 在 LPS 刺激的野生型巨噬细胞中表达升高，提示其可能在败血症的病理过程中发挥作用。通过对 *Dcip*^{-/-} 小鼠以及 *Dcip*^{-/-} 腹腔巨噬细胞等模型分别进行体内外的 LPS 刺激，发现 *Dcip* 的缺失使 LPS-TLR4 信号通路更充分地活化，从而引发了更强的全身/局部炎

症反应、更高的致死率，并且 *Dcip*^{-/-} 腹腔巨噬细胞在受到 M1 或 M2 诱导后更倾向于向 M1 而非 M2 极化。我们推测可能是 *Dcip*^{-/-} 细胞和对照细胞的能量代谢状态不同导致了二者的极化差异。于是我们为细胞加载 JC-1 探针比较了二者的线粒体状态，发现静息或者 M1 诱导后的 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞线粒体质量均不如对照细胞，线粒体压力实验证明了 *Dcip*^{-/-} 细胞的线粒体的确存在功能障碍，并以糖酵解进行代偿。有趣的是尽管 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞线粒体受损，其在 M0、M1、M2 等状态下均并未发生明显的凋亡，说明细胞内可能存在线粒体自噬等机制，维持了细胞的生存。

通过在 *Dcip*^{-/-} RAW264.7 细胞中过表达全长野生型小鼠 DCIP 的回补实验，进一步明确了在巨噬细胞在受到 LPS 刺激时，DCIP 可以发挥降低炎症因子分泌，维持线粒体稳定，抑制细胞向 M1 过度极化等作用。我们同时也过表达了全长 *Dcip* 的几个突变体，其中使 dNTPase 活性丧失的 H238A 突变不能逆转上述表型，提示 DCIP 发挥上述功能依赖于 dNTPase 活性。小鼠 DCIP T634 被证明是和人源 *Dcip* T592 同源的磷酸化位点，其功能尚不明确，尽管研究表明 T634D 模拟磷酸化突变导致非分裂细胞中 HIV-1 限制的丧失，但它对分裂细胞中的鼠白血病病毒感染没有影响^[3]。我们分别在 *Dcip*^{-/-} RAW264.7 细胞中过表达了 T634 缺失磷酸化的突变 T634A 和 T634 模拟磷酸化的突变 T634D，发现过表达 T634D 突变，而非 T634A 突变，能够得到和过表达野生型全长 DCIP 相类似的表型。这表明 T634 的磷酸化是调控 DCIP 抗败血症功能的潜在靶点。值得注意的是，本课题回补实验中采用永生化的 RAW264.7 作为细胞模型，其调控 T634 磷酸化的 CDK 活性可能和终末分化的巨噬细胞有所不同，更多的细节有待进一步研究。

我们通过 IP-MS 筛选出了和 DCIP 互作的候选分子 VDAC1，co-IP 实验和激光共聚焦显微镜免疫荧光共同验证了 DCIP 可以和 VDAC1 发生互作。有趣的是，VDAC1 是特异性定位于线粒体外膜的分子，是介导离子、核苷酸和其他大分子量代谢物（例如丙酮酸，苹果酸，琥珀酸盐，NADH / NAD 以及血红素和胆固醇等）通过线粒体外膜的唯一途径^[15]。关于 DCIP 与 VDAC1 如何通过互作调控线粒体功能的更多细节还有待进一步探索，已有研究表明，VDAC1 可以同 Bcl-2^[16-20]、己糖激酶^[20, 21]、肌酸激酶^[22]、ERLIN1^[23]等多种分子相互作用，因此我们推测其不仅是一个通道蛋白，同时也具有“分子脚手架”的功能，通过和 DCIP 的相互作用，使 DCIP 固定于线粒体外膜，让 DCIP 能够更好地发挥其 dNTP 酶的作用，调控线粒体内 dNTP 池的稳态，从而维持了线粒体基因组的稳定。

同样通过 IP-MS，我们意外地发现平行课题的目的分子 ERLIN1，也能够和本课题研究的 DCIP 发生相互作用。已有关于 ERLIN1 的研究认为，它定位于内质网，是内质网脂筏结构上的关键分子，内质网、内质网脂筏、线粒体三者能够相互作用，

共同形成一个叫做线粒体相关 ER 膜 (Mitochondrial-associated ER membrane, MAM) 的微观结构^[24]。有学者认为, ERLIN1 能够在 MAM 上同时和 AMBRA1、VDAC1 互作, 引起线粒体自噬^[25]。将其结论结合我们的研究成果, 可推测出 VDAC1、DCIP、ERLIN1 三者同时存在相互作用, 并且, 三者均和线粒体自噬相关^[4, 25] (图 2.4)。由此, 我们提出科学假设: DCIP、ERLIN1、VDAC1 作为一个复合体存在于 MAM 结构上, 它们共同参与到线粒体自噬的调控, 进而调控巨噬细胞极化及其功能。虽然尚缺乏更多的证据支持我们的假设, 但是这个意外的发现为我们指明了未来一段时间的研究方向。

关于 DCIP 调控 TLR4 通路的机制, 之前也有部分学者进行过研究, 例如有两个研究团队分别指出, DCIP 通过抑制 I κ B α ^[26]或 TRAF6-TAK1^[27]的信号传导, 抑制 NF- κ B 的磷酸化。他们得出的 DCIP 可抑制 TLR4 通路的结论和本课题一致, 但是他们认为 DCIP 是直接作用于 TLR4 通路, 而非通过影响线粒体间接发挥上述作用。对于这些看似矛盾的观点, 我们给出两种可能解释: 1. 这些调控机制同时存在, 只不过何种机制占据主导以及它们间的相互作用, 需要更深入的研究; 2. 他们的研究结论存在瑕疵。首先, 他们只进行过细胞层面实验, 而未进行过动物体内实验; 其次, 他们得出结论的关键实验所用的刺激剂是 IL-1 β 、仙台病毒 (SeV), 而非 LPS, 不能很好地模拟细菌相关急性炎症; 最后, Chen 等人通过 co-IP 实验证实了 DCIP 与 I κ B α 以及 NF- κ B1 / 2 相互作用, 但是 DCIP 在细胞核中高度富集, 其与核因子之间的相互作用可能只是它转运到细胞核的一种方式, 而与抑制 I κ B α 的磷酸化无关, 至于 DCIP 是否能够抑制 I κ B α 和 TAK1 的磷酸化需要通过细胞外纯化蛋白磷酸化的金标准实验来检验, 但是在那些研究中并未进行该实验, 因此证据并不能让人信服。我们的研究成果表明, 在 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞中, 包括 MyD88 依赖和非依赖的整个 LPS-TLR4 信号通路均比对照细胞的更加活跃 (图 1.8A)。因此, DCIP 似乎并不仅仅是调节 LPS-TLR4 通路中某个节点的磷酸化。而我们提出的 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞中线粒体受损假说更吻合于实际表型。

综上, 我们发现 LPS 刺激的急性炎症使 DCIP 表达升高, DCIP-Vdac1 的相互作用参与调控了线粒体的功能。*Dcip* 缺失加重了线粒体基因组的损伤, 能量代谢“预重编程”使得巨噬细胞更倾向于向 M1 极化, LPS-TLR4 信号通路活化增强, IL-6、TNF α 等细胞因子分泌增多。在 LPS 腹腔注射的小鼠败血症模型中表现出同样更高的局部和全身性炎症反应以及更高的致死率。因此 DCIP 是一个潜在的抗败血症靶分子。另外我们发现了小鼠 DCIP 上的 H238 和 T634 是两个调控其抗败血症功能的关键靶点。最后, 用一张模式图来总结我们的发现 (图 3.6):

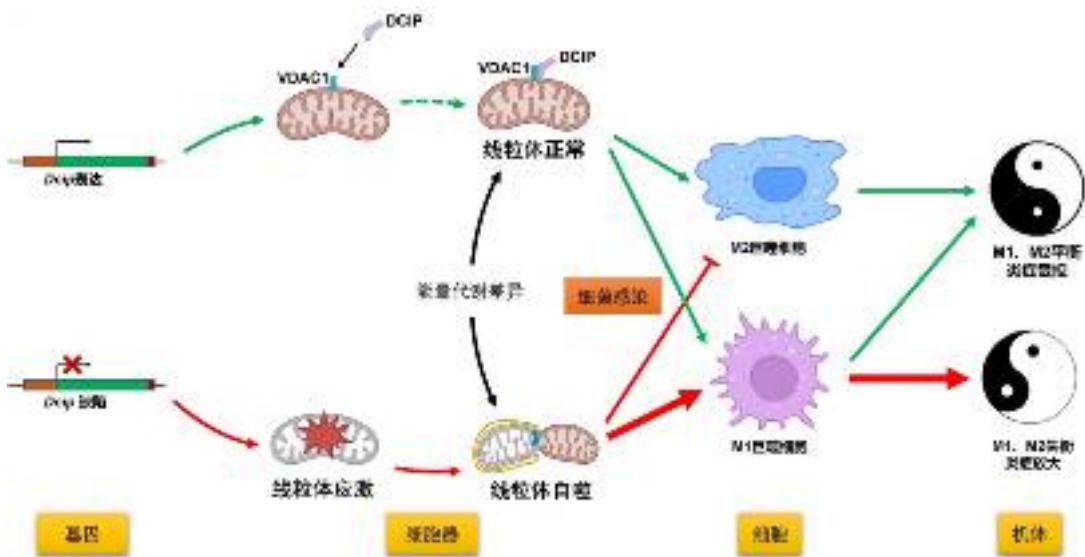


图 3.6 本课题探索机制的模式图。

五、主要意义和创新之处

首次发现 DCIP 可通过改变巨噬细胞线粒体能量代谢水平调控细菌感染急性期的炎症水平；

首次提出 DCIP 是一种线粒体自噬相关分子；

率先探索 DCIP 和 VDAC1 的相互作用；

提供了一个干预细菌感染急性期病理进程的候选靶标。

参考文献：

- [1] POWELL R D, HOLLAND P J, HOLLIS T, et al. Aicardi-Goutieres syndrome gene and HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a dGTP-regulated deoxynucleotide triphosphohydrolase [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(51): 43596-600. doi:10.1074/jbc.C111.317628
- [2] WANG F, ST GELAIS C, DE SILVA S, et al. Phosphorylation of mouse SAMHD1 regulates its restriction of human immunodeficiency virus type 1 infection, but not murine leukemia virus infection [J]. *Virology*, 2016, 487(273-84). doi:10.1016/j.virol.2015.10.024
- [3] CRIBIER A, DESCOURS B, VALADAO A L, et al. Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1 [J]. *Cell Rep*, 2013, 3(4): 1036-43. doi:10.1016/j.celrep.2013.03.017
- [4] GEISLER S, HOLMSTRÖM K M, SKUJAT D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(2): 119-31. doi:10.1038/ncb2012
- [5] FAIX J D. Biomarkers of sepsis [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2013, 50(1): 23-36.

- doi:10.3109/10408363.2013.764490
- [6] CHEN X, LIU Y, GAO Y, et al. The roles of macrophage polarization in the host immune response to sepsis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96(107791). doi:10.1016/j.intimp.2021.107791
 - [7] MILLS E L, KELLY B, O'NEILL L A J. Mitochondria are the powerhouses of immunity [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(5): 488-98. doi:10.1038/ni.3704
 - [8] MILLS E L, O'NEILL L A. Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal [J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(1): 13-21. doi:10.1002/eji.201445427
 - [9] FRANZOLIN E, PONTARIN G, RAMPAZZO C, et al. The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(35): 14272-7. doi:10.1073/pnas.1312033110
 - [10] BESTER A C, RONIGER M, OREN Y S, et al. Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development [J]. *Cell*, 2011, 145(3): 435-46. doi:10.1016/j.cell.2011.03.044
 - [11] CHABOSSEAU P, BUHAGIAR-LABARCHÈDE G, ONCLERCQ-DELIC R, et al. Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome [J]. *Nat Commun*, 2011, 2(368). doi:10.1038/ncomms1363
 - [12] BUCKLAND R J, WATT D L, CHITTOOR B, et al. Increased and imbalanced dNTP pools symmetrically promote both leading and lagging strand replication infidelity [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(12): e1004846. doi:10.1371/journal.pgen.1004846
 - [13] KRETSCHMER S, WOLF C, KÖNIG N, et al. SAMHD1 prevents autoimmunity by maintaining genome stability [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(3): e17. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204845
 - [14] LAHOUASSA H, DADDACHA W, HOFMANN H, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(3): 223-8. doi:10.1038/ni.2236
 - [15] SHOSHAN-BARMATZ V, MALDONADO E N, KRELIN Y. VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress [J]. *Cell Stress*, 2017, 1(1): 11-36. doi:10.15698/cst2017.10.104
 - [16] GEULA S, BEN-HAIL D, SHOSHAN-BARMATZ V. Structure-based analysis of VDAC1: N-terminus location, translocation, channel gating and association with anti-apoptotic proteins [J]. *Biochem J*, 2012, 444(3): 475-85. doi:10.1042/bj20112079
 - [17] ABU-HAMAD S, ARBEL N, CALO D, et al. The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 11): 1906-16. doi:10.1242/jcs.040188
 - [18] SHI Y, CHEN J, WENG C, et al. Identification of the protein-protein contact site and interaction mode of human VDAC1 with Bcl-2 family proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305(4): 989-96. doi:10.1016/s0006-291x(03)00871-4
 - [19] ARBEL N, BEN-HAIL D, SHOSHAN-BARMATZ V. Mediation of the antiapoptotic activity of

- Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(27): 23152-61. doi:10.1074/jbc.M112.345918
- [20] ARBEL N, SHOSHAN-BARMATZ V. Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with Bcl-2 to prevent antiapoptotic activity [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(9): 6053-62. doi:10.1074/jbc.M109.082990
- [21] ARZOINE L, ZILBERBERG N, BEN-ROMANO R, et al. Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with hexokinase to prevent its anti-apoptotic activity [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(6): 3946-55. doi:10.1074/jbc.M803614200
- [22] SCHLATTNER U, DOLDER M, WALLIMANN T, et al. Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(51): 48027-30. doi:10.1074/jbc.M106524200
- [23] MANGANELLI V, MATARRESE P, ANTONIOLI M, et al. Raft-like lipid microdomains drive autophagy initiation via AMBRA1-ERLIN1 molecular association within MAMs [J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2528-48. doi:10.1080/15548627.2020.1834207
- [24] MANGANELLI V, LONGO A, MATTEI V, et al. Role of ERLINs in the Control of Cell Fate through Lipid Rafts [J]. *Cells*, 2021, 10(9): doi:10.3390/cells10092408
- [25] MANGANELLI V, MATARRESE P, ANTONIOLI M, et al. Raft-like lipid microdomains drive autophagy initiation via AMBRA1-ERLIN1 molecular association within MAMs [J]. *Autophagy*, 2020, 1-21. doi:10.1080/15548627.2020.1834207
- [26] CHEN S, BONIFATI S, QIN Z, et al. SAMHD1 suppresses innate immune responses to viral infections and inflammatory stimuli by inhibiting the NF-κB and interferon pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(16): E3798-e807. doi:10.1073/pnas.1801213115
- [27] ESPADA C E, ST GELAIS C, BONIFATI S, et al. TRAF6 and TAK1 Contribute to SAMHD1-Mediated Negative Regulation of NF-κB Signaling [J]. *J Virol*, 2021, 95(3): doi:10.1128/jvi.01970-20

文献综述

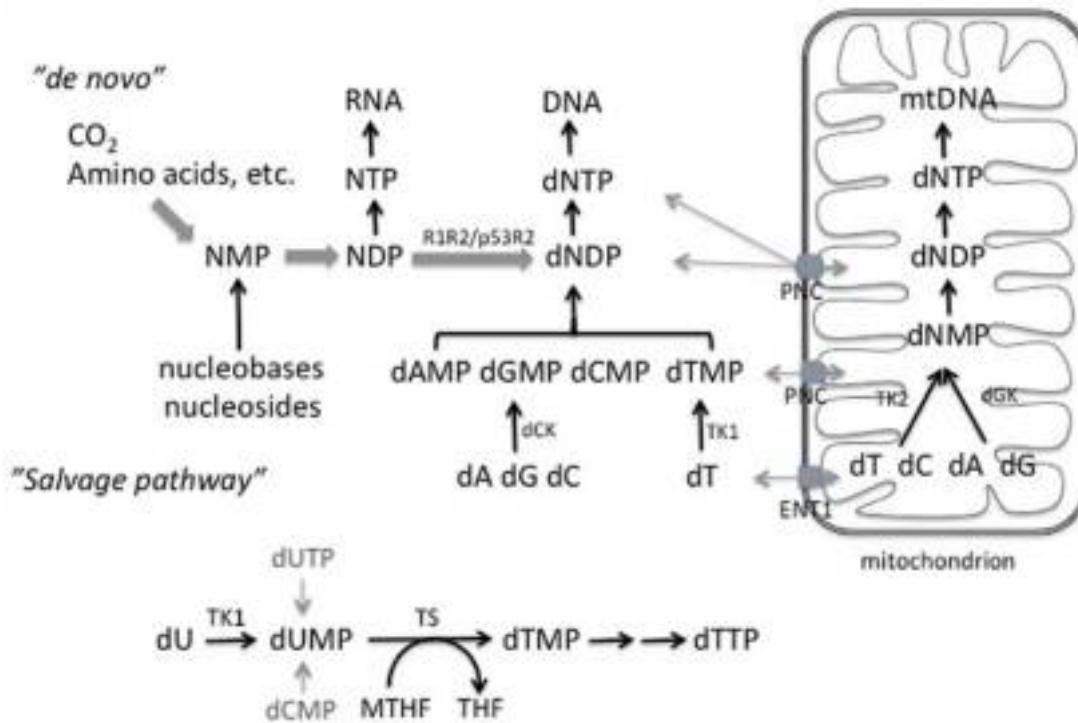
如前文所述，本课题成功发现 DCIP 能够通过维持线粒体状态，实现间接调控巨噬细胞的功能，并影响 LPS 诱导急性炎症反应的病理进程。我们通过功能回补实验，证明了上述表型依赖于 DCIP 的 dNTP 酶活性，并且受到 T634 位点磷酸化的调控。此外，通过 IP-MS、co-IP 和免疫荧光激光共聚焦成像等技术，我们成功发现一个定位于线粒体的 DCIP 互作分子 VDAC1，通过 IP-MS 意外发现 ERLIN1 和 DCIP 也可能存在互作。然而，本课题尚存在着一些不足，例如：未能充分阐明 DCIP 如何通过和 VDAC1、ERLIN1 互作，实现维持线粒体稳定的功能以及 DCIP 的 dNTP 酶活性和 T634 位点在这一过程中扮演的角色。

在此，基于已有的研究成果，我们谨以综述的形式，提出四种可能的机制假设，为下一步的研究理清思路的同时，也希望能够抛砖引玉。

一、假设机制一：VDAC1 将 DCIP 固定于线粒体表面，使其可以更好地调控线粒体内 dNTP 池稳态，从而维持线粒体稳定

dNTP 是 DNA 复制的原料，线粒体 dNTP 池的平衡对于维持线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 稳定和复制至关重要，TK2、SUCLA2、SUCLG1、RRM2B、DGUOK、MPV17 和 TYMP 等分子维持线粒体 dNTP 池的稳定，他们中的任何一个突变都会导致 mtDNA 合成慢于 mtDNA 消耗，最后使 mtDNA 耗竭，临上相应的疾病被命名为线粒体 DNA 耗竭综合征^[1-3]。

在经历细胞周期的细胞中，dNTPs 可以通过从头途径合成，而在静息的细胞中，dNTPs 主要依靠以脱氧核苷（dN）为原料的补救合成生成^[4, 5]（图 3.7）。巨噬细胞一般是无法分裂增殖的终末分化细胞，因此线粒体内 dNTP 来源以补救合成为主。当 DCIP 功能正常时，首先，DCIP 能够将胞质内多余的 dNTP 降解为 dN，为合成其他种类的 dNTP 提供了原料；其次，DCIP 和处于线粒体外膜上的 VDAC1 直接相互作用，通过 VDAC1 的非特异性跨线粒体膜运输作用，使 DCIP-VDAC1 复合体能够直接调控线粒体内的 dNTP 池（目前 dNTP 如何跨线粒体膜运输尚未有明确论断，由于 VDAC1 参与 ATP 的跨线粒体运输^[6]，因此提出科学假设，VDAC1 也能够帮助同为阴离子的 dNTP 跨线粒体运输）。当 DCIP 缺失时，细胞则缺乏了调控上述线粒体内 dNTP 池的能力，由于 dNTP 池处于稳态对于 DNA 复制和基因组的稳定至关重要，过低的 dNTP 池将导致复制应激^[42]，过高或碱基不平衡的 dNTP 池可能导致复制过程中碱基的错配掺入或 DNA 聚合酶停滞^[43, 44]，因此失去调控的 dNTP 将最终导致线粒体基因组复制减缓、线粒体功能下调。

图 3.7 线粒体内 dNTP 池的调控，引自^[5]

并且，在 DCIP 调控线粒体内 dNTP 池的过程中，可能不止 VDAC1 参与互作，因为 VDAC1 是定位于线粒体外膜分子，尚需要有跨线粒体内膜分子接应，才可能使 dNTP 在胞浆和线粒体基质间来回转运。我们发现，MPV17 是有能力完成这一过程的潜在互作分子：首先，MPV17 是一个定位于线粒体内膜的分子；其次，目前有充分的临床证据表明，MPV17 突变将导致线粒体 DNA 耗竭综合征^[1-3, 7]；最后，有研究报道，MPV17 敲除细胞中的线粒体 dNTP 池发生紊乱，线粒体基因组拷贝数降低^[8]。

对于验证这一类机制假设，需要检测 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞和对照细胞的线粒体内 dNTP 池、线粒体基因组拷贝数和线粒体基因组完整性等指标。另外，可尝试使用 VDAC1 抑制剂，使其失去跨膜运输能力，观察是否能够得到 *Dcip*^{-/-} 巨噬细胞类似的表型。

二、假设机制二：DCIP 和 VDAC1 的相互作用抑制了 VDAC1 通过寡聚化引发的细胞凋亡

VDAC1 是存在于线粒体外膜上的关键分子，下面从结构到功能对其进行介绍。

目前已经明确了 VDAC1 在原子尺度下的三维结构：VDAC1 由 19 条跨膜 β 链组成，通过柔性环连接形成 β 桶，其中链 β_1 和 β_{19} 平行构象，N 末端区域的 25 个氨基酸残基位于 VDAC1 孔形结构内^[9-11]。N 端区域可以在 VDAC1 的孔洞内部和外

部自由移动，就像盖子一般地开合^[12]，这一结构让其得以有效地改变离子或代谢物地通过率^[11, 13]。连接 N 端区域和 β 桶的可伸缩的多聚酪氨酸残基，提供了 N 端区域变换结构所需要的柔软度^[12, 14, 15]。并且还有报道指出，N 端区域参与了二聚体形成过程^[12]，同时也是抗凋亡蛋白 Bcl-2^[12, 16-19]和己糖激酶（hexokinase, HK）^[19, 20]的互作位点。VDAC1 β 桶的孔径估计在 3~3.8nm 之间^[9]。纯化的 VDAC1 能够组装成二聚体、三聚体、四聚体、六聚体和更高聚体^[14, 21-29]。VDAC1 组成二聚体和更高聚体的接触位点已经鉴定明确：在生理状态下，VDAC1 呈单体或二聚体，此时组装接触位点为 1、2、19 号 β 链；在诱导细胞凋亡时，VDAC1 二聚体发生构象变化，组装成更高的聚合体^[30]，此时 8、16 号 β 链也涉及到组装过程^[30]。VDAC1 寡聚化在调节 VDAC1 生理功能中起重要的作用，包括帮助稳定蛋白质^[31]，作为其他寡聚蛋白的平台（如己糖激酶^[29]和肌酸激酶^[32]），以及介导细胞色素 c 释放到胞浆并启动下游细胞凋亡调节蛋白等^[16, 21, 29]。

根据上午所述 VDAC1 的特殊结构及其功能再进行总结，能够归纳出其有以下特点：首先，能和 VDAC1 发生相互作用的分子非常多，除了之前提及的 Bcl-2、己糖激酶、肌酸激酶外，我们在第三部分也介绍了其他研究者发现的 ERLIN1 和 VDAC1 之间的相互作用^[33]，以及本课题发现的 DCIP 和 VDAC1 之间的相互作用，因此，VDAC1 不仅仅是一个跨膜通道蛋白，其本身也像是一个“分子脚手架”，即可通过和大量蛋白非特异性互作，实现不同生理、病理条件下的多种功能，甚至其中某些互作是可逆的、动态变换的；其次，VDAC1 通过寡聚化，在线粒体膜上形成大的孔洞，造成线粒体去极化、线粒体肿胀、氧化应激，乃至释放出细胞色素 c，启动凋亡信号，上述过程应该是启动线粒体凋亡途径的关键机制；最后，尽管 VDAC1 的寡聚化能够通过变构自发实现，但是这一过程应该也可以通过和某些蛋白互作实现被抑制或催化，目前已经有研究团队证实 VDAC1 能够被 TMBIM6 抑制寡聚化，进而实现保护心肌细胞线粒体、降低脓毒症相关心肌损伤。

基于上述原因，我们提出第二个合理的机制假设：DCIP 能通过和 VDAC1 的相互作用，抑制其寡聚化，从而避免了线粒体外膜孔洞的形成，阻止了线粒体去极化和细胞凋亡的发生。

为了验证上述猜想，后续工作需要在不同刺激条件下观察 DCIP 和 VDAC1 的互作，如果野生型巨噬细胞在静息状态下，DCIP 和 VDAC1 的结合确实抑制了 VDAC1 的寡聚化，并且在诱导凋亡条件下，VDAC1 已经被其他研究团队观察到发生了寡聚化，那么在加入诱导凋亡刺激后，很可能会观察到 DCIP 和 VDAC1 的解离，从而启动 VDAC1 的寡聚化。刺激前后的 co-IP 实验能够帮助我们验证这一猜想，在理想情况下，用高分辨率激光共聚焦显微镜动态实时拍摄，如能观察到在加入刺激

前后 DCIP 和 VDAC1 共定位簇的动态解聚过程，则能更好地证明我们的科学假设。

三、假设机制三：DCIP 和 VDAC1 的相互作用抑制了 VDAC1 引发的线粒体自噬

线粒体自噬过程限制炎性细胞因子的分泌，在炎症信号通路的调节中起关键作用^[34-38]。PTEN 诱导的激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1) -Parkin 通路被广泛报道参与了线粒体自噬^[39-42]。PINK1 磷酸化 Parkin 的泛素样结构域 (ubiquitin-like, UBL) 上的第 65 位丝氨酸，导致 Parkin 的泛素化能力被激活^[43]。VDAC1 能够被 Parkin 泛素化标记第 27 位赖氨酸，引发线粒体自噬^[44-47]。VDAC1 是指导 PINK1-Parkin 识别并清除受损线粒体的关键靶点，部分干扰 VDAC1 将显著减少 Parkin 从胞浆转位到受损线粒体，并且相应地减少了线粒体的清除，如果此时过表达 VDAC1 则可恢复 Parkin 对线粒体的定位和清除^[45]。Parkin 通过 VDAC1 清除线粒体的方式，主要依赖于线粒体自噬^[47]。在 VDAC1 和 VDAC3 缺陷的情况下，Parkin 靶向清除受损线粒体的功能被抑制，但当过表达 VDAC1 和 VDAC3 后，则能够恢复 Parkin 的功能^[47]。这些证据表明 VDAC1 对 PINK1-Parkin 介导的线粒体自噬具有重要作用。

由此，我们提出第三个科学假设：DCIP 和 VDAC1 的相互作用占据了 VDAC1 的泛素化位点，阻止了其被 Parkin 泛素化，因此减少了静息状态下的下线粒体自噬。

可以通过干扰、过表达 Parkin，添加 Parkin 抑制剂、泛素化酶抑制剂等方法，验证我们的上述假设。

四、假设机制四：DCIP-VDAC1-ERLIN1 的共同作用抑制了线粒体自噬

内质网脂筏相关蛋白 1 (ER Lipid Raft Associated 1, ERLIN1) 是一种跨膜糖蛋白，其常与 ERLIN2 形成复合物。ERLINS 已知的功能包括促进内质网相关蛋白质降解^[48, 49]，介导肌醇 1,4,5-三磷酸受体 (Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, IP3R) 泛素化降解^[50-52]，以及参与胆固醇代谢^[53, 54]。ERLINS 被认为是内质网脂筏上的标志蛋白。在某些情况下，例如内质网应激等病理条件下，脂筏和线粒体相接触，形成叫做线粒体相关的内质网膜 (Mitochondrial Associated ER Membrane, MAMs) 的微观结构。有学者认为，ERLIN1 能够在 MAM 上同时和 AMBRA1、VDAC1 互作，引起线粒体自噬^[55]。将上述结论结合我们的研究成果，可推测出 VDAC1、DCIP、ERLIN1 三者同时存在相互作用，并且，三者均被发现和线粒体自噬相关^[45, 55]（图 2.4）。

由此，我们提出科学假设：DCIP、ERLIN1、VDAC1 作为一个复合体存在于 MAM 结构上，它们共同参与到线粒体自噬的调控，进而调控巨噬细胞极化及其功能（图 3.8）。

为了验证这一假设，需要做更多实验证明在各自刺激条件下，ERLIN1 和 DCIP 发生了互作，并且有必要构建髓系 *Erlin1* 条件性敲除小鼠，观察在 LPS 诱导的急性炎症中，是否可以表现出和 *Dcip*^{-/-} 小鼠相同的表型。

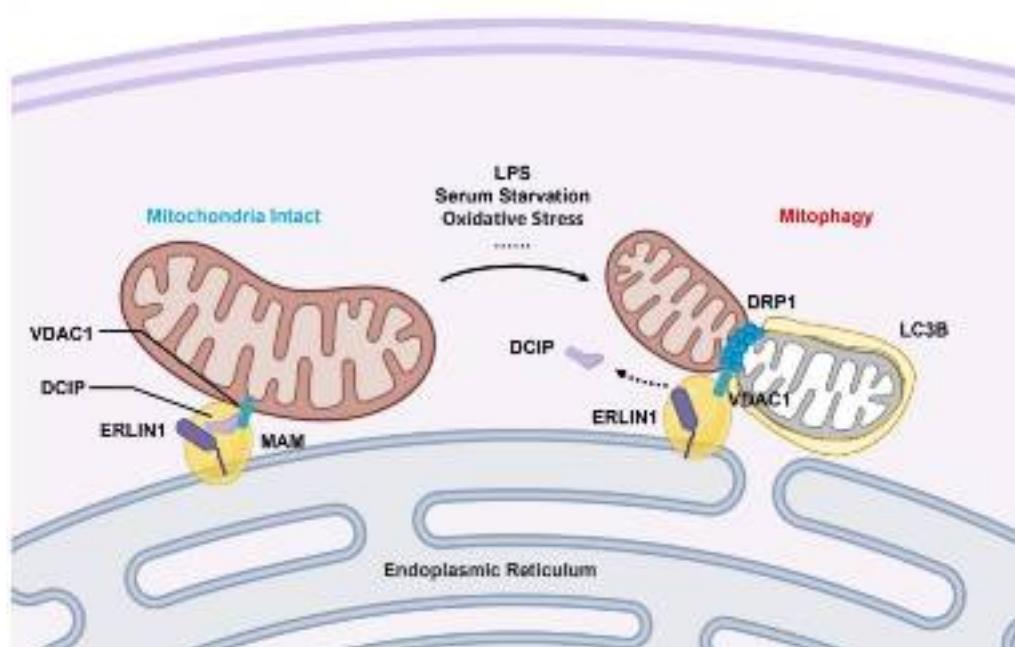


图 3.8 DCIP-ERLIN1-VDAC1 复合体调控线粒体自噬科学假设模式图。

综上，我们总结了四种 DCIP 和 VDAC1 相互作用调控线粒功能的可能机制。DCIP、VDAC1 均为功能非常复杂多样的分子，为了彻底弄清它们间相互作用的机制，需要对上述假说一一试验、排除，可能它们没有一个能够符合最终的实验结果，证明我们的猜测均不正确；也可能上述假说是其实是共同作用，假说一、二、三、四均是基于已知的某些分子功能出发，试图从一个角度解释可能的真相，但本质上它们并不矛盾。不论如何，这些假说为我们指明了后续的实验思路，希望可以通过更深入的探索，得到更多的启迪。

参考文献：

- [1] VISCOMI C, ZEVIANI M. MtDNA-maintenance defects: syndromes and genes [J]. Journal of

- Inherited Metabolic Disease, 2017, 40(4): 587-99. doi:<https://doi.org/10.1007/s10545-017-0027-5>
- [2] FINSTERER J, WAKIL S M. Mitochondrial Depletion Syndromes [M]. eLS. 2015: 1-9.
- [3] EL-HATTAB A W, SCAGLIA F. Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options [J]. Neurotherapeutics, 2013, 10(2): 186-98. doi:[10.1007/s13311-013-0177-6](https://doi.org/10.1007/s13311-013-0177-6)
- [4] RAMPAZZO C, MIAZZI C, FRANZOLIN E, et al. Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances [J]. Mutat Res, 2010, 703(1): 2-10. doi:[10.1016/j.mrgentox.2010.06.002](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.06.002)
- [5] WANG L. Mitochondrial purine and pyrimidine metabolism and beyond [J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2016, 35(10-12): 578-94. doi:[10.1080/15257770.2015.1125001](https://doi.org/10.1080/15257770.2015.1125001)
- [6] SHOSHAN-BARMATZ V, MALDONADO E N, KRELIN Y. VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress [J]. Cell Stress, 2017, 1(1): 11-36. doi:[10.15698/cst2017.10.104](https://doi.org/10.15698/cst2017.10.104)
- [7] EL-HATTAB A W, WANG J, DAI H, et al. MPV17-Related Mitochondrial DNA Maintenance Defect [M]//ADAM M P, MIRZAA G M, PAGON R A, et al. GeneReviews(®). Seattle (WA); University of Washington, Seattle Copyright © 1993-2023, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved. 1993.
- [8] DALLA ROSA I, CáMARA Y, DURIGON R, et al. MPV17 Loss Causes Deoxynucleotide Insufficiency and Slow DNA Replication in Mitochondria [J]. PLoS Genet, 2016, 12(1): e1005779. doi:[10.1371/journal.pgen.1005779](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005779)
- [9] BAYRHUBER M, MEINS T, HABECK M, et al. Structure of the human voltage-dependent anion channel [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(40): 15370-5. doi:[10.1073/pnas.0808115105](https://doi.org/10.1073/pnas.0808115105)
- [10] HILLER S, GARCES R G, MALIA T J, et al. Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles [J]. Science, 2008, 321(5893): 1206-10. doi:[10.1126/science.1161302](https://doi.org/10.1126/science.1161302)
- [11] UJWAL R, CASCIO D, COLLETTIER J P, et al. The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(46): 17742-7. doi:[10.1073/pnas.0809634105](https://doi.org/10.1073/pnas.0809634105)
- [12] GEULA S, BEN-HAIL D, SHOSHAN-BARMATZ V. Structure-based analysis of VDAC1: N-terminus location, translocation, channel gating and association with anti-apoptotic proteins [J]. Biochem J, 2012, 444(3): 475-85. doi:[10.1042/bj20112079](https://doi.org/10.1042/bj20112079)
- [13] ZHOU R, YAZDI A S, MENU P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation [J]. Nature, 2011, 469(7329): 221-5. doi:[10.1038/nature09663](https://doi.org/10.1038/nature09663)
- [14] SHOSHAN-BARMATZ V, DE PINTO V, ZWECKSTETTER M, et al. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death [J]. Mol Aspects Med, 2010, 31(3): 227-85. doi:[10.1016/j.mam.2010.03.002](https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.03.002)

- [15] CHENG E H, SHEIKO T V, FISHER J K, et al. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis [J]. *Science*, 2003, 301(5632): 513-7. doi:10.1126/science.1083995
- [16] ABU-HAMAD S, ARBEL N, CALO D, et al. The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 11): 1906-16. doi:10.1242/jcs.040188
- [17] SHI Y, CHEN J, WENG C, et al. Identification of the protein-protein contact site and interaction mode of human VDAC1 with Bcl-2 family proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305(4): 989-96. doi:10.1016/s0006-291x(03)00871-4
- [18] ARBEL N, BEN-HAIL D, SHOSHAN-BARMATZ V. Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(27): 23152-61. doi:10.1074/jbc.M112.345918
- [19] ARBEL N, SHOSHAN-BARMATZ V. Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with Bcl-2 to prevent antiapoptotic activity [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(9): 6053-62. doi:10.1074/jbc.M109.082990
- [20] ARZOINE L, ZILBERBERG N, BEN-ROMANO R, et al. Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with hexokinase to prevent its anti-apoptotic activity [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(6): 3946-55. doi:10.1074/jbc.M803614200
- [21] KEINAN N, TYOMKIN D, SHOSHAN-BARMATZ V. Oligomerization of the mitochondrial protein voltage-dependent anion channel is coupled to the induction of apoptosis [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(24): 5698-709. doi:10.1128/mcb.00165-10
- [22] SHOSHAN-BARMATZ V, ISRAELSON A, BRDICZKA D, et al. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(18): 2249-70. doi:10.2174/138161206777585111
- [23] SHOSHAN-BARMATZ V, MIZRACHI D. VDAC1: from structure to cancer therapy [J]. *Front Oncol*, 2012, 2(164). doi:10.3389/fonc.2012.00164
- [24] SHOSHAN-BARMATZ V, MIZRACHI D, KEINAN N. Oligomerization of the mitochondrial protein VDAC1: from structure to function and cancer therapy [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2013, 117(303-34). doi:10.1016/b978-0-12-386931-9.00011-8
- [25] SHOSHAN-BARMATZ V, GOLAN M. Mitochondrial VDAC1: function in cell life and death and a target for cancer therapy [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(5): 714-35. doi:10.2174/092986712798992110
- [26] SHOSHAN-BARMATZ V, KEINAN N, ZAID H. Uncovering the role of VDAC in the regulation of cell life and death [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2008, 40(3): 183-91. doi:10.1007/s10863-008-9147-9
- [27] ZETH K, MEINS T, VONRHEIN C. Approaching the structure of human VDAC1, a key molecule in mitochondrial cross-talk [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2008, 40(3): 127-32. doi:10.1007/s10863-008-9144-z

- [28] SCHLATTNER U, TOKARSKA-SCHLATTNER M, WALLIMANN T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1762(2): 164-80. doi:10.1016/j.bbadi.2005.09.004
- [29] ZALK R, ISRAELSON A, GARTY E S, et al. Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria [J]. *Biochem J*, 2005, 386(Pt 1): 73-83. doi:10.1042/bj20041356
- [30] GEULA S, NAVVED H, LIANG J, et al. Structure-based analysis of VDAC1 protein: defining oligomer contact sites [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(3): 2179-90. doi:10.1074/jbc.M111.268920
- [31] UJWAL R, CASCIO D, CHAPTAL V, et al. Crystal packing analysis of murine VDAC1 crystals in a lipidic environment reveals novel insights on oligomerization and orientation [J]. *Channels (Austin)*, 2009, 3(3): 167-70. doi:10.4161/chanc.3.3.9196
- [32] SCHLATTNER U, DOLDER M, WALLIMANN T, et al. Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(51): 48027-30. doi:10.1074/jbc.M106524200
- [33] MANGANELLI V, MATARRESE P, ANTONIOLI M, et al. Raft-like lipid microdomains drive autophagy initiation via AMBRA1-ERLIN1 molecular association within MAMs [J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2528-48. doi:10.1080/15548627.2020.1834207
- [34] MAREK-IANNUCCI S, OZDEMIR A B, MOREIRA D, et al. Autophagy-mitophagy induction attenuates cardiovascular inflammation in a murine model of Kawasaki disease vasculitis [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(18): doi:10.1172/jci.insight.151981
- [35] GREEN D R, GALLUZZI L, KROEMER G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging [J]. *Science*, 2011, 333(6046): 1109-12. doi:10.1126/science.1201940
- [36] XU Y, SHEN J, RAN Z. Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases [J]. *Autophagy*, 2020, 16(1): 3-17. doi:10.1080/15548627.2019.1603547
- [37] ZIEGLER P K, BOLLRATH J, PALLANGYO C K, et al. Mitophagy in Intestinal Epithelial Cells Triggers Adaptive Immunity during Tumorigenesis [J]. *Cell*, 2018, 174(1): 88-101.e16. doi:10.1016/j.cell.2018.05.028
- [38] MA K, CHEN G, LI W, et al. Mitophagy, Mitochondrial Homeostasis, and Cell Fate [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8(467). doi:10.3389/fcell.2020.00467
- [39] MATSUDA N, SATO S, SHIBA K, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy [J]. *J Cell Biol*, 2010, 189(2): 211-21. doi:10.1083/jcb.200910140
- [40] VIVES-BAUZA C, ZHOU C, HUANG Y, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(1): 378-83. doi:10.1073/pnas.0911187107
- [41] SHIBA-FUKUSHIMA K, IMAI Y, YOSHIDA S, et al. PINK1-mediated phosphorylation of the

- Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy [J]. *Sci Rep*, 2012, 2(1002). doi:10.1038/srep01002
- [42] NARENDRA D, TANAKA A, SUEN D F, et al. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy [J]. *J Cell Biol*, 2008, 183(5): 795-803. doi:10.1083/jcb.200809125
- [43] HAM S J, LEE S Y, SONG S, et al. Interaction between RING1 (R1) and the Ubiquitin-like (UBL) Domains Is Critical for the Regulation of Parkin Activity [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(4): 1803-16. doi:10.1074/jbc.M115.687319
- [44] HAM S J, LEE D, YOO H, et al. Decision between mitophagy and apoptosis by Parkin via VDAC1 ubiquitination [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(8): 4281-91. doi:10.1073/pnas.1909814117
- [45] GEISLER S, HOLMSTRÖM K M, SKUJAT D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(2): 119-31. doi:10.1038/ncb2012
- [46] YANG X, ZHOU Y, LIANG H, et al. VDAC1 promotes cardiomyocyte autophagy in anoxia/reoxygenation injury via the PINK1/Parkin pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(7): 1448-58. doi:10.1002/cbin.11583
- [47] SUN Y, VASHISHT A A, TCHIEU J, et al. Voltage-dependent anion channels (VDACs) recruit Parkin to defective mitochondria to promote mitochondrial autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(48): 40652-60. doi:10.1074/jbc.M112.419721
- [48] PEARCE M M, WANG Y, KELLEY G G, et al. SPFH2 mediates the endoplasmic reticulum-associated degradation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and other substrates in mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(28): 20104-15. doi:10.1074/jbc.M701862200
- [49] STEVENSON J, HUANG E Y, OLZMANN J A. Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and Lipid Homeostasis [J]. *Annu Rev Nutr*, 2016, 36(511-42. doi:10.1146/annurev-nutr-071715-051030
- [50] WRIGHT F A, WOJCIKIEWICZ R J. Chapter 4 - Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Ubiquitination [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2016, 141(141-59. doi:10.1016/bs.pmbts.2016.02.004
- [51] PEARCE M M, WORMER D B, WILKENS S, et al. An endoplasmic reticulum (ER) membrane complex composed of SPFH1 and SPFH2 mediates the ER-associated degradation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(16): 10433-45. doi:10.1074/jbc.M809801200
- [52] WRIGHT F A, BONZERATO C G, SLITER D A, et al. The erlin2 T65I mutation inhibits erlin1/2 complex-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ubiquitination and phosphatidylinositol 3-phosphate binding [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(40): 15706-14. doi:10.1074/jbc.RA118.004547
- [53] HUBER M D, VESELY P W, DATTA K, et al. Erlins restrict SREBP activation in the ER and regulate cellular cholesterol homeostasis [J]. *J Cell Biol*, 2013, 203(3): 427-36.

doi:10.1083/jcb.201305076

- [54] WANG G, ZHANG X, LEE J S, et al. Endoplasmic reticulum factor ERLIN2 regulates cytosolic lipid content in cancer cells [J]. Biochem J, 2012, 446(3): 415-25. doi:10.1042/bj20112050
- [55] MANGANELLI V, MATARRESE P, ANTONIOLI M, et al. Raft-like lipid microdomains drive autophagy initiation via AMBRA1-ERLIN1 molecular association within MAMs [J]. Autophagy, 2020, 1-21. doi:10.1080/15548627.2020.1834207