

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230011

· 论 著 ·

过氧化物酶体特异性绿色荧光蛋白腺病毒载体的构建

江天行^{1△}, 刘育鹏^{2△}, 李 阳¹, 宋晓伟¹, 赵仙先¹, 郭志福¹, 史承勇³, 吴 弘^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院心血管内科, 上海 200433

2. 中国人民解放军总医院京中医疗区, 北京 100141

3. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇三医院心内科, 杭州 310013

[摘要] **目的** 构建一种特异性标记过氧化物酶体的 GFP 腺病毒载体。**方法** 设计含过氧化物酶体信号肽的 GFP 序列, PCR 扩增该序列片段, 并将其与腺病毒穿梭质粒载体 pAdTrack 连接, 然后将连接产物转化到大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞中获得重组质粒并测序鉴定。重组质粒经限制性内切酶 *Pme* I 酶切线性化后, 转化到含腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态细胞中进行同源重组。重组腺病毒质粒经限制性内切酶 *Pac* I 酶切线性化后感染 293A 细胞, 进行病毒包装, 得到含过氧化物酶体信号肽的 Ad-GFP-Peroxi 重组腺病毒颗粒。用腺病毒 Ad-GFP-Peroxi 和不含过氧化物酶体信号肽的腺病毒 Ad-GFP 感染培养的大鼠心肌细胞 H9C2, 48 h 后在荧光显微镜下观察绿色荧光强弱。将用 Ad-GFP-Peroxi 腺病毒感染的 H9C2 细胞分为正常培养组和 1% O₂ 浓度培养组, 培养 24 h 后于共聚焦显微镜下观察, 并进行荧光信号聚集情况分析。**结果** 含过氧化物酶体信号肽的 GFP 腺病毒载体构建成功。与不含过氧化物酶体信号肽的腺病毒 Ad-GFP 相比, 含过氧化物酶体信号肽的腺病毒 Ad-GFP-Peroxi 能够特异性显示大鼠心肌细胞 H9C2 内过氧化物酶体的分布, 且缺氧培养的 H9C2 细胞内过氧化物酶体分布出现聚集现象。**结论** 利用同源重组方法成功构建了过氧化物酶体特异性 GFP 腺病毒, 其对大鼠心肌细胞 H9C2 有较高的感染效率, 共聚焦显微镜下可以明确显示心肌细胞内过氧化物酶体的分布情况。

[关键词] 心肌细胞; 腺病毒; 绿色荧光蛋白; 过氧化物酶体; 共聚焦显微镜

[引用本文] 江天行, 刘育鹏, 李阳, 等. 过氧化物酶体特异性绿色荧光蛋白腺病毒载体的构建[J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(11): 1315-1320. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230011.

Construction of adenovirus vector carrying peroxisome specific green fluorescence protein

JIANG Tianxing^{1△}, LIU Yupeng^{2△}, LI Yang¹, SONG Xiaowei¹, ZHAO Xianxian¹, GUO Zhifu¹, SHI Chengyong³, WU Hong^{1*}

1. Department of Cardiovasology, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Central Beijing Medical Sector, PLA General Hospital, Beijing 100141, China

3. Department of Cardiology, No. 903 Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Hangzhou 310013, Zhejiang, China

[Abstract] **Objective** To construct a green fluorescence protein (GFP) adenovirus vector specifically labeled with peroxisomes (Ad-GFP-Peroxi). **Methods** The GFP sequence modified with peroxisome signal peptide sequence was designed. The sequence fragment was amplified by polymerase chain reaction and linked with adenovirus shuttle plasmid vector (pAdTrack); then the connecting product was transformed into *E. coli* DH5 α . The recombinant plasmids were obtained from DH5 α cells and sequenced for identification. The recombinant plasmid was linearized by *Pme* I, and homologous recombination was carried out in BJ5183 competent cells containing pAdEasy-1. The recombinant plasmid was linearized by *Pac* I, and then used to infect 293A cells for virus packaging to obtain Ad-GFP-Peroxi particles. Rat cardiomyocytes H9C2 were infected with Ad-GFP-Peroxi adenovirus or Ad-GFP adenovirus, and the green fluorescence intensity was observed under fluorescence microscope after 48 h. H9C2 cells infected with Ad-GFP-Peroxi adenovirus were divided into 2 groups (normal culture group and 1% oxygen concentration group), observed under confocal microscope after 24 h, and the fluorescence signal aggregation was analyzed. **Results** The recombinant Ad-GFP-Peroxi was successfully constructed. Compared with

[收稿日期] 2023-01-16 [接受日期] 2023-06-05

[基金项目] 国家自然科学基金(82070419). Supported by National Natural Science Foundation of China (82070419).

[作者简介] 江天行, 博士生. E-mail: 603066289@qq.com; 刘育鹏, 硕士生. E-mail: 2952809679@qq.com

[△]共同第一作者 (Co-first authors).

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161248, E-mail: doctorwh666@126.com

Ad-GFP, Ad-GFP-Peroxi could specifically display the distribution of peroxisomes in H9C2 cells. Peroxisomes accumulated in H9C2 cells after hypoxia stimulation. **Conclusion** Ad-GFP-Peroxi is successfully constructed by homologous recombination, and it can highly infect rat cardiomyocytes H9C2, clearly showing the distribution of peroxisomes in cardiomyocytes under confocal microscope.

[**Key words**] cardiomyocytes; adenovirus; green fluorescence protein; peroxisomes; confocal microscope

[**Citation**] JIANG T, LIU Y, LI Y, et al. Construction of adenovirus vector carrying peroxisome specific green fluorescence protein[J]. Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(11): 1315-1320. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230011.

过氧化物酶体是由单个脂质双分子层构成的球状细胞器,根据其参与的代谢过程不同,内部可能装载有多种不同的相关酶。过氧化物酶体利用过氧化氢的产生和分解来代谢脂肪及中和细胞中的有害分子,它分布在细胞质中,与其他细胞器相互作用^[1-2]。有研究表明,细胞器的动态接触和相互作用在调节代谢底物转运和调节过氧化物酶体的生物发生、生长、分裂及周转中起重要作用^[3-4]。过氧化物酶体参与多种生理生化过程,也在多种疾病的发展中扮演重要角色。过氧化物酶体基因突变引起的各类细胞器(尤其是线粒体)损伤常与致命的遗传疾病有关,如 Zellweger 综合征^[5-6]。过氧化物酶体除具备代谢相关的功能外,还充当细胞信号转导的枢纽^[7]。同时,定位于过氧化物酶体的线粒体抗病毒信号蛋白参与Ⅲ型干扰素反应的启动^[8]。

腺病毒是被广泛运用的外源基因转录载体,具有载体基因组大小适中、易于基因重组操作、繁殖滴度高、宿主范围广、安全性好等诸多特点,因此这种基因导入方式往往比其他非病毒转移方式更加有效。同时,腺病毒作为载体可感染多种组织细胞包括高度分化的组织细胞,并复制产生子代病毒。随着免疫原性降低、靶向性改造、包装方法的改进等一系列进展,这种工具性载体正被更加广泛地用于生物医学工程的研究。

为了研究过氧化物酶体在心脏疾病中的作用机制,我们尝试构建了一种特异性标记过氧化物酶体的 GFP 腺病毒载体,借助腺病毒载体将 GFP 导入细胞标记并显示可能存在的过氧化物酶体,以期后续实验搭建稳定的技术平台。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 50×TAE 缓冲液[生工生物工程(上海)股份有限公司],琼脂糖粉(武汉赛维尔生物科技有限公司),100 bp DNA 分子量

标准(北京全式金生物技术股份有限公司),0.25% 胰蛋白酶(南京杜莱生物技术有限公司),反转录试剂盒 ReverTra Ace[®]qPCR RT Kit、荧光定量 PCR 试剂盒(日本 Toyobo 公司),T4 多聚核苷酸激酶、pMD-18T 载体系统(日本 Takara 公司),DH5 α 感受态大肠埃希菌(上海唯地生物技术有限公司),BJ5183 感受态细胞[宝日医生物技术(北京)有限公司],5-溴-2-脱氧尿苷(美国 Sigma 公司),限制性内切酶 *Pme* I、*Pac* I(美国 NEB 公司),4% 多聚甲醛固定液(上海碧云天生物技术有限公司),TRIzol 试剂、Hoechst 染液(美国 ThermoFisher 公司)。

TP350 型 PCR 仪(日本 Takara 公司),6600 型双通道实时荧光定量 PCR 仪(澳大利亚 RotorGene 公司),低温离心机(日本 Hitachi 公司),LSM510 型激光扫描共聚焦显微镜(德国 Carl Zeiss 公司),琼脂糖凝胶电泳仪、CO₂ 细胞培养箱、无菌超净工作台(美国 ThermoFisher 公司)。

1.2 含过氧化物酶体信号肽的 GFP 序列合成 通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)官网查询过氧化物酶体信号肽序列,加入 GFP 序列下游。过氧化物酶体信号肽引物序列由苏州金维智生物科技有限公司合成,正向引物:5'-TAGAAGCTTAGAGG-CGGGACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3',反向引物:5'-CCGCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCG-AG-3'。经 PCR 扩增得到含有过氧化物酶体信号肽的 GFP 序列,行琼脂糖凝胶电泳后割胶回收,并送苏州金维智生物科技有限公司进行 Sanger 法测序验证。

1.3 含过氧化物酶体信号肽的 GFP 腺病毒载体的构建 将扩增得到的含过氧化物酶体信号肽的 GFP 片段与腺病毒穿梭质粒载体 pAdTrack(上海碧云天生物技术有限公司)连接,将连接产物转化到大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞中获得重组质粒,并进

行基因测序确定插入片段是否正确。测序结果正确的重组质粒经限制性内切酶 *Pme* I 酶切线性化,然后转化到含腺病毒骨架质粒 pAd-Easy-1 (上海碧云天生物技术有限公司)的 BJ5183 感受态细胞中进行重组,获得的重组质粒经 *Pac* I 酶切后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4 腺病毒的扩增 将 293A 细胞按 1.5×10^5 /mL 密度接种于 6 cm 的细胞培养皿中,待细胞长满培养皿的 70% 左右,采用脂质体 Lipofectamine™ 2000 介导 *Pac* I 线性化后的重组含过氧化物酶体信号肽的 GFP 序列质粒转染细胞,培养 7~9 d,当出现细胞病变效应的细胞达到细胞总量的 80% 以上并出现片状葡萄串珠样时收集细胞,反复冻融,循环 3 次,收取原始病毒液,获得的病毒颗粒命名为 Ad-GFP-Peroxi。将原始病毒液按感染复数 (multiplicity of infection, MOI) = 10 的滴度多次感染 293A 细胞,获得较高滴度的病毒液,经氯化铯密度梯度离心纯化。将纯化后的病毒液稀释 10 000 倍,然后按 10 倍浓度梯度稀释,感染 293T 细胞 (美国 ATCC 细胞库), 37 °C 孵育 48 h, 荧光显微镜下观察,确定病毒滴度和最佳感染滴度。

1.5 心肌细胞 H9C2 培养与腺病毒感染 大鼠来源的心肌细胞 H9C2 由海军军医大学 (第二军医大学) 第一附属医院心血管内科实验室提供。细胞培养采用 DMEM 培养基,培养条件为 37 °C、5% CO₂。分别用 Ad-GFP-Peroxi 腺病毒和不含过氧化物酶体信号肽的 Ad-GFP 腺病毒按 50 MOI 滴度感染培养的 H9C2 细胞,于 37 °C 培养箱孵育。培养 48 h 后于荧光显微镜下观察绿色荧光强弱。

1.6 心肌细胞 H9C2 的缺氧培养 用 Ad-GFP-peioxi 腺病毒按 50 MOI 滴度感染 H9C2 细胞后,将细胞分为两组:常氧组和低氧组。将低氧组细胞置于 37 °C 恒温箱内,持续通入 94% N₂、5% CO₂、1% O₂ 的混合气体,维持饱和湿度。常氧组置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中。常氧组细胞和低氧组细胞在培养箱中培养 24 h 后于共聚焦显微镜下观察。

1.7 细胞核荧光染色 取细胞吸弃培养基,以 PBS 洗涤 2 遍。加入恰好覆盖全部细胞的适量 4% 多聚甲醛溶液进行固定,15 min 后弃去多聚甲醛溶液,用 PBS 洗涤 2 遍,加入 100 μL Hoechst 染液,摇床上缓慢摇晃 4 min。随后吸弃染液,以 PBS 洗涤 2 遍,

加入 5 μL 抗荧光淬灭封片剂,置于阴暗处保存。

1.8 荧光信号聚集情况分析 从常氧及缺氧培养细胞的荧光图中各选择 6 个 H9C2 细胞,通过 ImageJ 软件计算图中荧光点的质心坐标,利用 RStudio R-4.2-3 软件计算各质心坐标间的距离矩阵,导出各点间欧式距离的平均值。通过欧式距离的变化量化荧光标记间聚集情况。

1.9 统计学处理 应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。实验至少独立重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用非配对双尾 *t* 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 含过氧化物酶体信号肽的 GFP 腺病毒载体的鉴定 获得的重组质粒用 *Pac* I 酶切线性化后行琼脂糖凝胶电泳鉴定,得到长为 4 500 kb 的片段 (图 1),提示重组含过氧化物酶体信号肽 GFP 腺病毒载体构建成功。

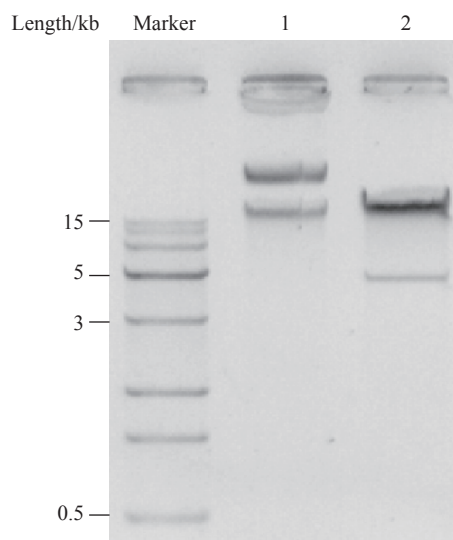


图 1 含过氧化物酶体信号肽的 GFP 腺病毒载体经 *Pac* I 酶切后行琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig 1 Agarose gel electrophoresis identification of *Pac* I enzyme-digested linearized adenovirus vector with peroxisome signaling peptide

1: pAd-Easy-1; 2: pAd-Easy-1 with peroxisome signaling peptide digested by *Pac* I; GFP: Green fluorescence protein.

2.2 腺病毒扩增结果 以 293A 细胞扩增病毒,采用氯化铯密度离心法纯化病毒。按 10 倍浓度梯度稀释病毒液后感染 293T 细胞,48 h 后观察绿色荧光强弱,确定重组腺病毒滴度约为 1.0×10^9 PFU/mL

(PFU 为空斑形成单位)。

2.3 含过氧化物酶体信号肽的 GFP 腺病毒对心肌细胞的感染效率及其对过氧化物酶体的标记结果 实验结果显示重组腺病毒对培养的 H9C2 细胞有较高的感染效率。感染后共聚焦显微镜下观察可见,与 Ad-GFP 腺病毒相比, Ad-GFP-Peroxi 腺病毒能够特异性显示大鼠心肌细胞内过氧化物酶体的分布情况(图 2)。

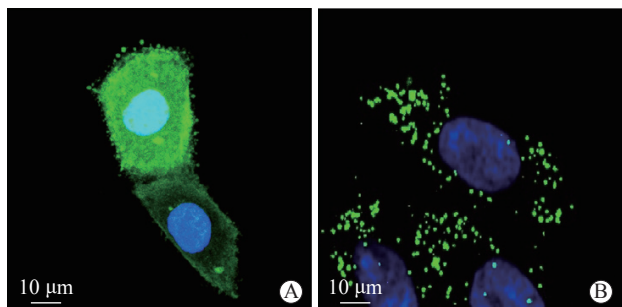


图 2 腺病毒感染大鼠心肌细胞的共聚焦显微镜观察
Fig 2 Confocal microscopy observation of adenovirus infected rat cardiomyocytes

A: Ad-GFP adenovirus infected cardiomyocytes H9C2; B: Ad-GFP-Peroxi adenovirus infected cardiomyocytes H9C2. GFP: Green fluorescence protein; Peroxi: Peroxisome.

2.4 缺氧培养下心肌细胞 H9C2 内过氧化物酶体分布的变化 结果显示,与正常培养的 H9C2 细胞相比,缺氧培养下细胞内过氧化物酶体出现明显聚集。见图 3。荧光信号聚集情况分析结果显示,低氧组 H9C2 细胞内过氧化物酶体之间的欧氏距离明显短于常氧组 [(0.57±0.06) μm vs (1.00±0.24) μm, $P<0.01$], 提示细胞内过氧化物酶体出现聚集。

3 讨论

过氧化物酶体是一种存在于所有真核生物的单层膜细胞器,在多种底物的分解代谢中发挥作用,如脂肪酸、D-氨基酸、L-α-羟基酸、尿酸和多胺。为了更好地探讨过氧化物酶体在心肌缺血缺氧过程中的功能及作用机制,实现对心肌细胞的高效感染,我们尝试构建了含有过氧化物酶体信号肽的 GFP 腺病毒载体。蛋白质在细胞内通常由各种标签引导其运输与加工,这些标签包括信号肽、线粒体定向肽、核定位信号及过氧化物酶体信号肽等。最常见的过氧化物酶体信号肽是过氧化物酶体信号肽 1

(peroxisomal targeting signal 1, PTS1),它是羧基末端的丝氨酸-赖氨酸-亮氨酸三肽。大多数过氧化物酶体基质蛋白具有 PTS1 型信号肽。过氧化物酶体中所有的酶都由核基因编码,在细胞质基质中合成,在信号肽及信号肽的引导下进入过氧化物酶体^[9]。本实验利用 PTS1 型信号肽将 GFP 定位于 H9C2 细胞的过氧化物酶体中,从而对其进行特异性标记。

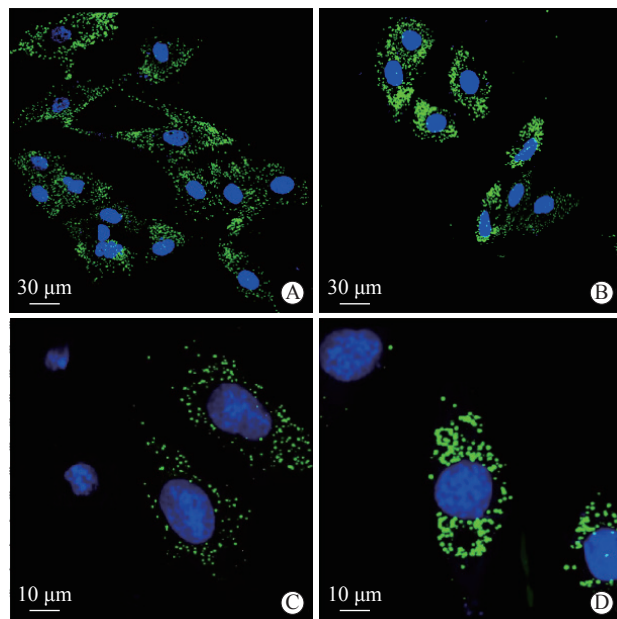


图 3 共聚焦显微镜观察过氧化物酶体在大鼠心肌细胞内分布的变化

Fig 3 Changes of peroxisome distribution in rat cardiomyocytes observed by confocal microscopy

A, C: Cardiomyocytes H9C2 cultured under normal conditions for 24 h; B, D: Cardiomyocytes H9C2 cultured under hypoxia condition (1% O₂ concentration) for 24 h.

越来越多的证据表明,脂质代谢与铁死亡之间关系密切^[10-12]。铁死亡是梗死区心肌细胞死亡的重要模式,可能在缺血性心脏病病理过程中发挥重要作用,寻找新的铁死亡分子靶点正逐渐成为心血管研究领域的焦点。定量蛋白质组学分析表明,心肌梗死发生时谷胱甘肽过氧化物酶 4 的下调会促进心肌细胞的铁死亡^[13]。葛根素可通过诱导铁蛋白产生、减少活性氧和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 的表达缓解心肌细胞铁死亡并预防心力衰竭^[14]。然而,尚未有充足的研究将过氧化物酶体及其参与的脂质代谢过程与铁死亡在心血管疾病中的作用建立联系。而监测某种分子或微小细胞结构在不同时相中的变化并对其进行定性、定量检

測,對於各類相關實驗設計而言一直都是較為重要也較難突破的實驗方法。因此,我們希望通過對心肌細胞中過氧化物酶體的特異性熒光標記,為細胞中過氧化物酶體的定性、定量檢測與分布、定位觀察提供一種可能性,使研究者可以更為精確有效地獲取相關數據,並為進一步研究過氧化物酶體是否參與缺血性心臟病或其他疾病的发生、發展,以及進一步了解其具體的作用機制提供新思路和可靠的方法。

我們探討了過氧化物酶體特異性 GFP 腺病毒載體的構建方法,以期實現對心肌細胞較高的感染效率。本研究利用過氧化物酶體信號肽構建了 GFP 重組腺病毒,該法具有可以簡單快捷構建篩選重組體的優點,實現了對培養的大鼠心肌細胞的較高感染效率。我們將腺病毒 Ad-GFP-Peroxi 按 50 MOI 滴度感染大鼠心肌細胞,通過熒光顯微鏡觀察發現,感染後 24 h 可見綠色熒光。通過共聚焦顯微鏡發現,Ad-GFP-Peroxi 感染大鼠心肌細胞在缺氧條件下過氧化物酶體出現明顯聚集。

腺病毒屬於線性雙鏈 DNA 無包膜病毒,病毒基因組較少發生重排,比較穩定,多被用於表達各種細胞和病毒的基因^[15]。重組腺病毒表達載體是以腺病毒為基礎發展起來的工具病毒載體,其免疫原性強、基因容量大,不會整合到染色體中,僅瞬間表達,故安全性高,同時具有高感染效率、高蛋白質表達水平等特點,感染後的數小時,基因表達便可被檢測到。此外,腺病毒表達載體具有廣泛的宿主範圍,對分裂細胞和非分裂細胞均具有感染能力,故重組腺病毒表達載體是研究原代非增殖細胞基因表達的最佳工具。

對於傳統應用的熒光素標記法,本研究使用的是 GFP。相比其他已有方法,GFP 對於靶細胞器具有更強的特異性且熒光更為穩定^[16],亮度高、可辨識性較好。由於腺病毒載體的特點,本方法也適宜在活體成像中應用,且相對而言更為經濟,對實驗設備要求也更低,在各種實驗中的適用性較為廣泛^[17-19]。此外,相比諸如以碘標記和生物合成法標記為主的核素標記法,本方法更具有安全性和易操作性,且在量化評價時我們通過熒光信號間歐氏距離評估其相對位置變化,結果更為直觀。

綜上所述,本研究探討了過氧化物酶體特異性 GFP 腺病毒的製備過程,並證實利用同源重組方法

構建的過氧化物酶體特異性 GFP 腺病毒能夠成功標記大鼠心肌細胞內過氧化物酶體、顯示其在細胞內的分布,為進一步研究過氧化物酶體對心血管疾病的影響及尋找其潛在作用機制搭建了穩定的技術平台。

[參考文獻]

- [1] LAZAROW P B, FUJIKI Y. Biogenesis of peroxisomes[J]. *Annu Rev Cell Biol*, 1985, 1: 489-530. DOI: 10.1146/annurev.cb.01.110185.002421.
- [2] SMITH J J, AITCHISON J D. Peroxisomes take shape[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(12): 803-817. DOI: 10.1038/nrm3700.
- [3] PLATTA H W, ERDMANN R. Peroxisomal dynamics[J]. *Trends Cell Biol*, 2007, 17(10): 474-484. DOI: 10.1016/j.tcb.2007.06.009.
- [4] SHAI N, SCHULDINER M, ZALCKVAR E. No peroxisome is an island—peroxisome contact sites[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(5): 1061-1069. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.016.
- [5] WATERHAM H R, FERDINANDUSSE S, WANDERS R J A. Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(5): 922-933. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.11.015.
- [6] SALPIETRO V, PHADKE R, SAGGAR A, et al. Zellweger syndrome and secondary mitochondrial myopathy[J]. *Eur J Pediatr*, 2015, 174(4): 557-563. DOI: 10.1007/s00431-014-2431-2
- [7] ZHANG J, KIM J, ALEXANDER A, et al. A tuberous sclerosis complex signalling node at the peroxisome regulates mTORC1 and autophagy in response to ROS[J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(10): 1186-1196. DOI: 10.1038/ncb2822.
- [8] DIXIT E, BOULANT S, ZHANG Y, et al. Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity[J]. *Cell*, 2010, 141(4): 668-681. DOI: 10.1016/j.cell.2010.04.018.
- [9] WALTER T, ERDMANN R. Current advances in protein import into peroxisomes[J]. *Protein J*, 2019, 38(3): 351-362. DOI: 10.1007/s10930-019-09835-6.
- [10] LEE H, ZANDKARIMI F, ZHANG Y, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(2): 225-234. DOI: 10.1038/s41556-020-0461-8.
- [11] DOLL S, PRONETH B, TYURINA Y Y, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 91-98. DOI: 10.1038/nchembio.2239.
- [12] 陳奕婷,王培.非凋亡程序性細胞死亡在代謝相

- 关脂肪性肝病中的作用[J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(6):657-665. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220745.
- CHEN Y, WANG P. Roles of non-apoptotic programmed cell death in metabolic-associated fatty liver disease[J]. Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(6): 657-665. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220745.
- [13] PARK T J, PARK J H, LEE G S, et al. Quantitative proteomic analyses reveal that GPX4 downregulation during myocardial infarction contributes to ferroptosis in cardiomyocytes[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(11): 835. DOI: 10.1038/s41419-019-2061-8.
- [14] LIU B, ZHAO C, LI H, et al. Puerarin protects against heart failure induced by pressure overload through mitigation of ferroptosis[J]. BiochemBiophys Res Commun, 2018, 497(1): 233-240. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.061.
- [15] 林洁,袁镜皓,麻献华,等. *ZBTB20* 基因干扰腺病毒的制备及功能鉴定[J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(3):292-297. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220891.
- LIN J, YUAN J, MA X, et al. Preparation and functional characterization of *ZBTB20*-interfering adenovirus[J]. Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(3): 292-297. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220891.
- [16] LIU C Y, ZHU J, XIE Z. Visualizing yeast organelles with fluorescent protein markers[J]. J Vis Exp, 2022(182): e63846. DOI: 10.3791/63846.
- [17] METZ J, CASTRO I, SCHRADER M. Peroxisome motility measurement and quantification assay[J]. Bio Protoc, 2017, 7(17): e2536. DOI: 10.21769/bioprotoc.2536.
- [18] STELLMACH H, HOSE R, RÄDE A, et al. A new set of golden-gate-based organelle marker plasmids for colocalization studies in plants[J]. Plants, 2022, 11(19): 2620. DOI: 10.3390/plants11192620.
- [19] MILDNER K, ZEUSCHNER D. Cryo-immuno electron microscopy of peroxisomal marker proteins[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1595: 101-111. DOI: 10.1007/978-1-4939-6937-1_11.

[本文编辑] 商素芳