

· 研究原著 ·

构建线粒体钙离子摄入蛋白1慢病毒表达载体及在H9C2细胞中的应用

荆哲¹, 刘峰舟², 刘燕¹, 陈永清¹ (1解放军兰州军区兰州总医院心内科, 甘肃省兰州市 730050; 2西京医院心内科, 陕西省西安市 710032)

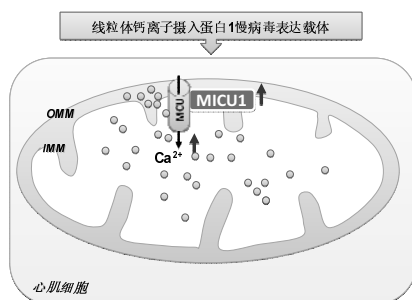
引用本文: 荆哲, 刘峰舟, 刘燕, 陈永清. 构建线粒体钙离子摄入蛋白1慢病毒表达载体及在H9C2细胞中的应用[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(37):5560-5566.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.37.013

ORCID: 0000-0002-6829-4901(荆哲)

文章快速阅读:

线粒体钙离子摄入蛋白1通过线粒体钙离子单向转运蛋白促进心肌细胞线粒体钙摄取



荆哲, 男, 1986年生, 浙江省绍兴市人, 汉族, 2010年第二军医大学毕业, 医师, 主要从事心血管疾病研究。

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)37-05560-07

稿件接受: 2016-06-17

文题释义:

线粒体功能紊乱: 主要以线粒体钙稳态失衡为角度阐述线粒体功能紊乱在细胞生物学功能中所发挥的作用。细胞线粒体钙主要与细胞胞浆钙稳态、线粒体三羧酸循环关键酶、细胞自噬、生存、死亡以及线粒体的空间位置等关系密切。

线粒体钙离子单向转运复合体: 目前研究发现, 该复合体主要以构成线粒体内膜孔道的线粒体钙离子单向转运蛋白, 以及调节其活性的 MICU1, MICU2, MCUR1 及 EMRE 组成, 共同完成细胞线粒体钙摄取的精密调节。

摘要

背景: 线粒体钙离子摄入蛋白1 (mitochondrial calcium uptake 1, MICU1) 是维持细胞线粒体钙稳态的重要分子, MICU1 对线粒体钙稳态的调节可能在糖尿病心肌病的发生及发展中起着重要作用, 但目前机制尚不明确。

目的: 构建 MICU1 基因的慢病毒表达载体, 产毒感染 H9C2 细胞, 评价 MICU1 基因在 H9C2 细胞中的表达效果, 为后续在细胞水平研究糖尿病心肌病的发生及发展建立平台。

方法: PCR 提取 H9C2 细胞 MICU1 基因, Spe I 及 EcoR I 双酶切后, 将 MICU1 基因片段插入慢病毒载体 pRRLsin.CMV.eGFP 中, 构建慢病毒表达质粒 pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP。使用 pCMVDR8.91、pCMV-VSVG 共转染于 293T 细胞中包装产毒, 用于感染 H9C2 细胞。通过 RT-PCR 及 Western blot 检测感染后 H9C2 细胞中 MICU1 mRNA 及蛋白的表达。共聚焦显微镜检测 Rhod-2 染色 H9C2 细胞后线粒体钙水平。

结果与结论: ① MICU1 基因成功插入 pRRLsin.CMV.eGFP 慢病毒表达质粒; ② 转染 pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP 慢病毒表达质粒后, 可见 293T 细胞表达绿色荧光蛋白, 并且 MICU1 的蛋白表达明显升高; ③ 病毒液感染 H9C2 细胞后, MICU1 的蛋白及 mRNA 水平较未感染组及空质粒包装组明显升高; ④ Rhod-2 染色后观察发现, MICU1 能够明显增强线粒体钙水平; ⑤ 结果表明, pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP 慢病毒能够高效感染 H9C2 细胞, 为构建永生细胞系奠定基础。

关键词:

组织构建; 组织工程; H9C2 细胞; 线粒体钙离子摄入蛋白1 (MICU1); 慢病毒载体; 病毒包装; 钙

主题词:

慢病毒感染; 线粒体蛋白质类; 肌细胞; 心脏

Jing Zhe, Physician,
Department of Cardiology,
Lanzhou General Hospital
of Lanzhou Military Region
of Chinese PLA, Lanzhou
730050, Gansu Province,
China

Construction of lentiviral vector carrying mitochondrial calcium uptake 1 and its use in infected H9C2 cells

Jing Zhe¹, Liu Feng-zhou², Liu Yan¹, Chen Yong-qing¹ (¹Department of Cardiology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Region of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China;

²Department of Cardiology, Xijing Hospital, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Mitochondrial calcium uptake 1 (MICU1) is one of the important molecules to maintain the mitochondrial calcium homeostasis. The regulation of MICU1 to mitochondrial calcium homeostasis may play an important role in diabetic cardiomyopathy, but the underlying mechanism remains unclear.

OBJECTIVE: To construct a lentiviral vector carrying MICU1 gene to transfect H9C2 cells, and then to assess MICU1 level in H9C2 cells thereby establishing a platform for researching the occurrence and development of diabetic cardiomyopathy at a cellular level.

METHODS: DNA fragments of MICU1 were amplified by PCR, cleaved with *Spe* I, *Eco*R I and cloned into the lentiviral vector pRRLsin.CMV.eGFP to construct pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP vector. 293T cells were co-transfected with recombinant pCMVDR8.91 and pCMV-VSVG to produce pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP lentiviral viruses, and then used to infect H9C2 cells. mRNA and protein expressions of MICU1 in the transfected H9C2 cells were evaluated by real-time PCR and western blot assay. Mitochondrial calcium level in Rhod-2-stained H9C2 cells was tested under confocal microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: The recombinant inducible lentiviral vector containing MICU1 gene was successfully constructed. 293T could express green fluorescent protein with increased MICU1 level after pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP transfection. The mRNA and protein expressions of MICU1 in the infected H9C2 group were obviously up-regulated compared with the other groups. MICU1 could remarkably improve the mitochondrial calcium level under Rhod-2 staining. These results show that pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP lentiviral viruses are efficient to transfect H9C2 cells, which will be powered to lay a foundation for the immortalized cell line establishment.

Subject headings: Lentivirus Infections; Mitochondrial Proteins; Myocytes, Cardiac

Cite this article: Jing Z, Liu FZ, Liu Y, Chen YQ. Construction of lentiviral vector carrying mitochondrial calcium uptake 1 and its use in infected H9C2 cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(37):5560-5566.

0 引言 Introduction

线粒体功能紊乱被认为是糖尿病心肌病发生的重要原因^[1-3]。近年来陆续有多篇关于细胞线粒体钙摄取机制的研究原著发表在《Nature》^[4-6],《Cell》^[7-8],《Cell Metabolism》等高水平杂志上^[9-10],鉴定出线粒体钙离子单向转运蛋白(mitochondrial calcium uniporter, MCU)、线粒体钙离子摄入蛋白1(mitochondrial calcium uptake 1, MICU1)等调控线粒体钙摄取的关键分子。线粒体钙离子单向转运蛋白定位在线粒体内膜形成孔道,而MICU1具有两个典型的“EF”手形结构域,该结构可感知钙离子的变化,可能调节线粒体钙离子单向转运蛋白发挥作用^[11-12]。

慢病毒对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力,同时具有稳定整合靶细胞基因组,长时间稳定表达外源基因以及对外源基因容量大等特点^[13-15]。实验室前期研究发现,经过高糖高脂培养的H9C2心肌细胞表达较正常组明显降低,其可能与糖尿病心肌病的发生发展有密切关系。实验通过基因工程技术构建大鼠MICU1基因过

表达慢病毒载体,产毒感染H9C2细胞,并评价其上调被感染细胞MICU1表达效果,为后续在细胞水平研究MICU1对糖尿病心肌病的发生及发展建立平台。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 实验方法相关基础医学实验。

1.2 时间及地点 于2014年3至12月在解放军第四军医大学基础医学教学实验中心完成。

1.3 材料 SD大鼠购自解放军第四军医大学动物中心。慢病毒表达载体pRRLsin.CMV.eGFP及其包装质粒pCMVDR8.91、pCMV-VSVG由解放军第四军医大学生化教研室提供;大肠埃希菌感受态细胞DH5a购自天根生化科技有限公司;人胚肾上皮细胞系293T、H9C2心肌细胞系购自中科院上海细胞库;限制性内切酶、T₄ DNA连接酶、Trizol、反转录试剂盒购自TaKaRa公司;DNA凝胶回收试剂盒、无内毒素质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;lipofectamine2000、线粒体钙染料Rhod-2购自Invitrogen公司;MICU1抗体购自NOVUS

1.4.3 PCR及Western blot检测重组慢病毒MICU1基因及蛋白的表达 取2 μ L冻存病毒上清煮沸15 min, 冰浴15 min, 用PCR方法检测重组慢病毒MICU1基因的表达。MICU1上游引物: 5'-CGG ACG GGA TGT TTC GTC TTAAC-3'; 下游引物: 5'-AGA AGC ATC AGC

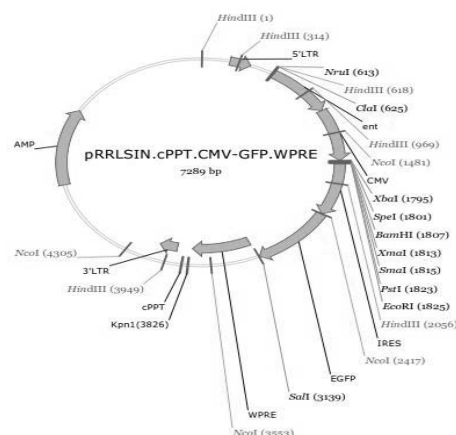


Figure 1 Map of pRRLsin.CMV.eGFP lentiviral vector

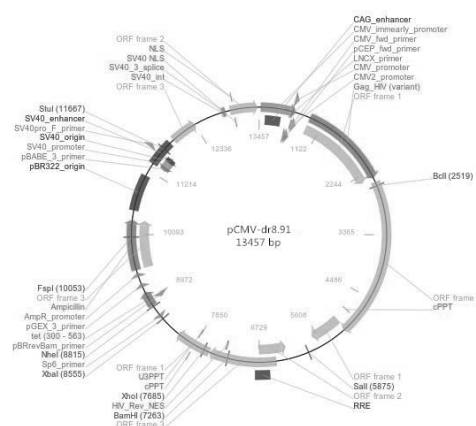


Figure 2 Map of pCMVDR8.91

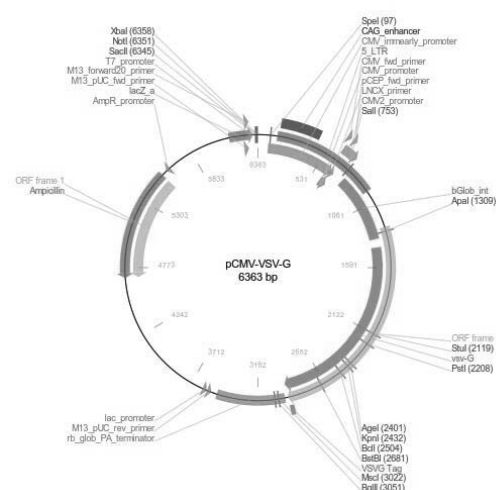


Figure 3 Map of pCMV-VSVG

P.O. Box 10002, Shenyang 110180 www.CRTER.org

1.4.4 MICU1基因重组慢病毒的滴度测定 第1天, 将293T细胞按 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于24孔板, 37°C 、体积分数为5% CO_2 条件下培养过夜。第2天, 将保存于 -80°C 的病毒液 37°C 水浴融解, 用含体积分数为5%胎牛血清的DMEM培养基进行10倍梯度稀释, 6孔为1组, 从 10^{-1} 稀释到 10^{-6} 。取细胞已长至60%–70%汇合的孔板进行感染, 去掉孔板中的培养基, 轻轻颠倒混匀每管慢病毒稀释液, 各取500 μL 加入每孔细胞中, 加入聚酰胺(Polybrene)至终质量浓度8 mg/L, 轻摇混匀, 37°C 过夜培养; 第3天, 去除含慢病毒的培养基, 加入1 mL完全培养基; 第4, 5天时, 在荧光显微镜下观察各孔中有绿色荧光蛋白表达细胞, 计算病毒滴度^[16-18]。

1.4.5 重组慢病毒感染H9C2心肌细胞 用浓缩的重组慢病毒按文献[19-20]方法感染H9C2心肌细胞系和293T细胞, 观察有GFP表达的细胞比例。

1.4.6 RT-PCR及Western blot检测感染前后H9C2细胞中MICU1基因及蛋白的表达 实验分为3组: MICU1重组慢病毒组、空质粒慢病毒组和未感染组。用Trizol试剂提取3组细胞感染后3 d的总RNA, 各取2 μg RNA反转录为cDNA。用RT-PCR方法检测MICU1基因表达, 以GAPDH为内参照, 确定感染前后H9C2细胞MICU1基因的表达。RIPA提取感染后3 d H9C2细胞蛋白后, Western blot检测3组细胞中MICU1蛋白表达, 方法同前。

1.4.7 线粒体内钙水平的检测 使用Rhod-2染料按Invitrogen公司的说明染色H9C2细胞后, 共聚焦显微镜下观察染色后细胞荧光强度, 并使用ImageJ软件进行荧光强度的分析。

1.5 主要观察指标 ①pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP慢病毒表达质粒转染293T细胞表达效率; ②病毒液感染H9C2细胞后感染效果; ③Rhod-2染色后MICU1对线粒体钙摄取的影响。

1.6 统计学分析 检测结果数据用GraphPad Prism5进行处理并以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 成功构建大鼠MICU1基因组慢病毒表达载体pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP 将构建的pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP进行测序, 测序结果与GenBank的大鼠MICU1基因(NM_199412.1)编码区序列(CDS)比对, 相似性达100%。pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP质粒经Spe I及EcoR I双酶切, 酶切产物发现pRRLsin.

CMV.eGFP(11 kb)片段和MICU1目的基因片段(1.8 kb)(图4), 表明该目的片段已正确插入pRRLsin.CMV.eGFP表达载体, pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP表达质粒构建成功。

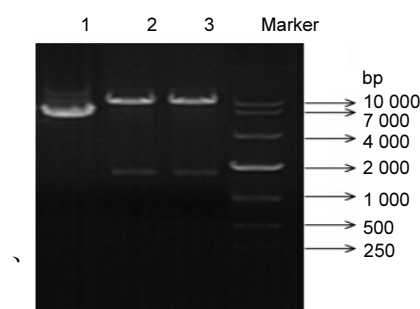


图4 质粒pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP的Spe I/EcoR I双酶切产物

Figure 4 Identification of recombinant plasmid pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP by using restriction endonuclease Spe I and EcoR I

图注: 1: pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP; 2, 3: pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP经Spe I/EcoR I双酶切后。

2.2 转染pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP质粒后293T细胞GFP的表达 将pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP质粒和包装质粒共转染293T细胞8 h, 可以看到绿色荧光蛋白的表达呈阳性, 随着培养时间增加, 荧光表达增强, 在48 h时达到最强, 通过观察表达绿色荧光蛋白细胞比例, 判断转染效率达80%以上(图5)。

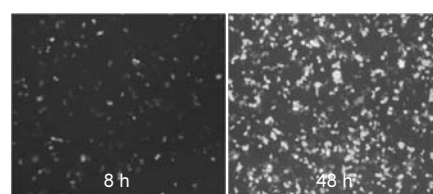


图5 重组慢病毒表达载体pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP及包装质粒转染293T细胞8 h及48 h荧光表达情况($\times 200$)

Figure 5 Fluorescence microscopy image of 293T cells transfected with pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP and the packaging plasmids pCMVDR8.91 and pCMV-VSVG at 8 and 48 hours ($\times 200$)

图注: 转染8 h可以看到绿色荧光蛋白的表达呈阳性, 随着培养时间增加, 荧光表达增强, 在48 h时达到最强。

2.3 重组慢病毒滴度的测定及MICU1基因的表达 pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP质粒和包装质粒共转染293T细胞后, 成功包装表达具有MICU1基因和GFP基因的慢病毒。病毒基因组PCR证实重组慢病毒含有MICU1基因片段(图6)。Western blot证实转染pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP质粒的293T细胞MICU1蛋白表达明显增加(图7)。收集、浓缩重组慢病毒后按逐孔稀释滴度测定法测定其滴度为 $6 \times 10^8 \text{ TU/L}$ 。

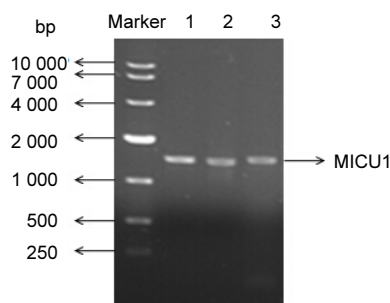


图6 PCR 鉴定重组慢病毒基因组 MICU1 基因表达

Figure 6 MICU1 expression in recombinant lentiviral genome by PCR technology

图注: 1-3: 不同 6 孔板中 pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP 感染 293T 细胞后上清液 PCR 检测结果, 证实重组慢病毒含有 MICU1 基因片段。

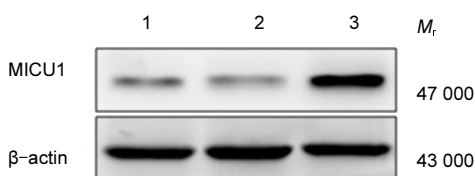


图7 Western blot 检测 MICU1 蛋白在 293T 细胞中的表达

Figure 7 Protein expression of MICU1 in 293T cells transfected with pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP by western blot assay

图注: 1: 未转染组; 2: 空质粒组; 3: pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP 转染组。



图8 MICU1 基因重组慢病毒感染 H9C2 心肌细胞 72 h 荧光表达情况(×200)

Figure 8 Fluorescence microscopy image of H9C2 cells infected with MICU1 gene recombinant lentivirus at 72 hours (×200)

图注: 感染 72 h 可见绿色荧光蛋白在 H9C2 心肌细胞中表达最强。

2.4 MICU1基因重组慢病毒感染H9C2细胞后MICU1的表达 将MICU1基因重组慢病毒感染H9C2细胞后, 可以看到绿色荧光蛋白的表达呈阳性, 随着培养时间增加, 荧光表达增强, 在72 h时达到最强, 通过观察表达绿色荧光蛋白的H9C2心肌细胞比例, 判断感染效率为60%以上(图8)。qPCR检测感染后H9C2细胞MICU1 mRNA表达水平及Western blot检测MICU1蛋白表达水平。结果表明, MICU1重组慢病毒组MICU1 mRNA表达水平与蛋白表达水平明显强于空质粒慢病毒组和未感染组(图9, 10)。

2.5 MICU1基因重组慢病毒感染H9C2细胞线粒体内钙水平 采用Rhod-2染料染色后检测3组H9C2细胞的线粒体内钙水平的改变, 结果发现, MICU1重组慢病毒组的Rhod-2荧光强度明显强于空质粒慢病毒组和未感染组(图11), 提示MICU1能够促进线粒体内钙水平的增高, 这一结果与Madesh等^[21]发表在《Cell》杂志上关于MICU1能够促进线粒体钙摄取的结果相一致。

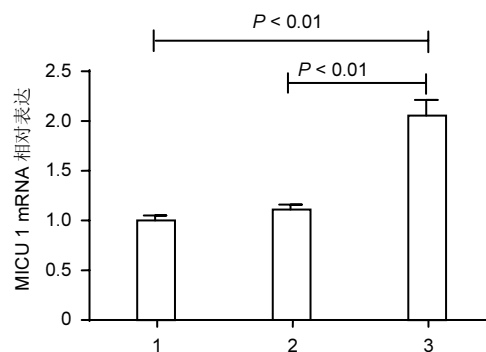


图9 MICU1 重组慢病毒感染 H9C2 后 MICU1 mRNA 的相对表达量

Figure 9 The relative expression level of MICU1 mRNA in H9C2 cells infected with MICU1 gene recombinant lentivirus

图注: 1: 未感染组; 2: 空质粒病毒组; 3: MICU1 重组慢病毒感染组。

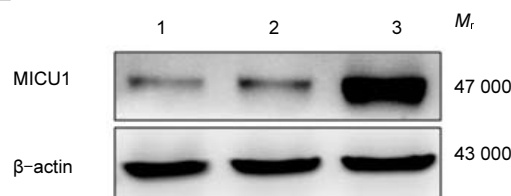


图10 Western blot 检测 MICU1 蛋白在 H9C2 细胞中的表达

Figure 10 Protein expression of MICU1 in H9C2 cells transfected with pRRLsin.CMV.MICU1-eGFP by western blot assay

图注: 1: 未感染组; 2: 空质粒病毒组; 3: MICU1 重组慢病毒感染组。

3 讨论 Discussion

MICU1 又名 CBARA1, 最早人们在对 I 型变态反应的研究中发现了它的身影^[22]。目前, 关于 MICU1 的研究主要以其结构及生理性功能为主, 对其可能介导的线粒体钙摄取调控细胞存活相关研究甚少, 仍处于初级阶段。Csordas 等^[9]研究发现 MICU1 促进激动剂刺激的线粒体钙摄取。在上述研究基础上, de la Fuente 等^[23]发现在 MICU1 被敲除的 HeLa 细胞中, 低钙时(Ca^{2+} 浓度 $< 2 \mu\text{mol/L}$)线粒体的钙摄取能力显著增加, 但在高钙时(Ca^{2+} 浓度 $> 4 \mu\text{mol/L}$)线粒体的钙摄取显著减少, 提示在低钙时, MICU1 作为门控分子抑制线粒体钙摄取, 在激动剂刺激引起的高钙时, MICU1 则促进钙摄取。Csordas 等研究发现 MICU1 定位在线粒体内膜的外部, 配合孔道 MCU 行使对钙离子的调控, MICU1 在胞浆钙低浓度时可抑制 MCU 与钙离子的亲和力, 但同时也发现 MICU1 敲除可以抑制激动剂刺激的线粒体钙摄取, 并认为细胞缺失 MICU1, 会使线粒体易损性增强, 导致细胞功能的损伤, 这些损伤包括压力应激所导致的活性氧生成增多。Hoffman 等^[24]研究发现在心血管疾病患者的内皮细

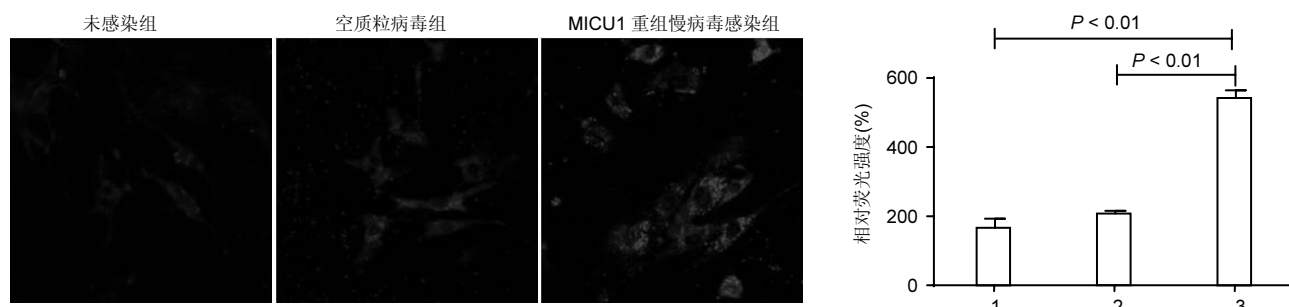


图 11 MICU1 重组慢病毒感染 H9C2 后线粒体内钙水平($\times 400$)

Figure 11 The mitochondrial calcium level in H9C2 cells infected with MICU1 gene recombinant lentivirus ($\times 400$)

图注: 1: 未感染组; 2: 空质粒病毒组; 3: MICU1 重组慢病毒感染组。

胞中 MICU1 表达降低, 而在小鼠体内抑制 MICU1 可加重血管功能紊乱, 提示 MICU1 可能参与心血管疾病的病理进程。近期有研究发现, MICU1 通过调控线粒体钙稳态参与黑色素瘤细胞的生长与凋亡^[25]。Antony 等^[26]研究发现, MICU1 通过影响线粒体的钙摄取决定组织的生存与再生。最近研究发现, MICU1 通过对线粒体钙信号调控参与线粒体源性凋亡途径进而影响头部鳞状细胞癌的生长与凋亡^[27]。但是, MICU1 是否参与了糖尿病心肌线粒体钙稳态调控及其对糖尿病心肌病的发生及机制方面的研究, 仍然处在空白阶段。

目前实验中将目的基因导入靶细胞的主要方法包括病毒载体介导感染和真核质粒转染。真核表达质粒的转染存在有效表达时间短, 转染效率不稳定, 对部分特殊细胞转染效率差等问题。病毒载体介导感染靶细胞的方法具有更好的适应性及稳定性^[28-30]。考虑到第 2 代三质粒病毒包装系统具有更高的生物安全性这一优点^[31], 实验采用第 2 代三质粒病毒包装系统进行 MICU1 重组慢病毒的包装, 并拟通过流式细胞术筛选表达绿色荧光蛋白 H9C2 心肌细胞的方法来提高感染效率。

实验室前期的研究中发现, 在 H9C2 心肌细胞中 MICU1 的表达降低, 因此包装 MICU1 重组慢病毒上调 H9C2 心肌细胞中 MICU1 的表达对后期实验至关重要。在实验中, 通过使用第 2 代病毒包装系统成功包装出 MICU1 重组慢病毒, 并通过荧光显微镜观察, 实时定量 PCR 及 Western blot 实验对包装的病毒效果进行了验证。MICU1 是调节线粒体钙摄取的关键分子, 实验通过感染 H9C2 上调 MICU1 表达后, 采用 Rhod-2 染色方法观察 H9C2 心肌细胞线粒体钙水平, 提示上调 MICU1 能明显提高 H9C2 心肌细胞线粒体钙水平, 这一结果与 Kevin Foskett 等^[21]的结果相一致。MICU1 重组慢病毒的成功包装, 为进一步构建永生 H9C2 心肌细胞系及 MICU1 对糖尿病心肌病的发生及发展的相关研究提供

实验基础。

作者贡献: 实验设计为荆哲, 实验实施为荆哲、刘峰舟, 实验评估为荆哲、陈永清, 资料收集为刘燕。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Duncan JG. Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7): 1351-1359.
- [2] Anderson EJ, Kypson AP, Rodriguez E, et al. Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(20): 1891-1898.
- [3] Liang Q, Kobayashi S. Mitochondrial quality control in the diabetic heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;95:57-69.
- [4] Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2011;476 (7360):341-345.
- [5] Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, et al. MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca^{2+} uptake. *Nature*. 2010;467(7313):291-296.

- [6] Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature*. 2010;464(7293):1313-1319.
- [7] Mallilankaraman K, Doonan P, Cárdenas C, et al. MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca(2+) uptake that regulates cell survival. *Cell*. 2012;151(3):630-644.
- [8] Wheeler DG, Groth RD, Ma H, et al. Ca(V)1 and Ca(V)2 channels engage distinct modes of Ca(2+) signaling to control CREB-dependent gene expression. *Cell*. 2012;149(5):1112-1124.
- [9] Csordás G, Golenár T, Seifert EL, et al. MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Cell Metab*. 2013;17(6):976-987.
- [10] Cheng A, Yang Y, Zhou Y, et al. Mitochondrial SIRT3 Mediates Adaptive Responses of Neurons to Exercise and Metabolic and Excitatory Challenges. *Cell Metab*. 2016;23(1):128-142.
- [11] Mallilankaraman K, Doonan P, Cárdenas C, et al. MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca(2+) uptake that regulates cell survival. *Cell*. 2012;151(3):630-644.
- [12] Kevin Foskett J, Madesh M. Regulation of the mitochondrial Ca(2+) uniporter by MICU1 and MICU2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;449(4):377-383.
- [13] Marin V, Stornaiuolo A, Piovan C, et al. RD-MolPack technology for the constitutive production of self-inactivating lentiviral vectors pseudotyped with the nontoxic RD114-TR envelope. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;3:16033.
- [14] De Groote P, Grootjans S, Lippens S, et al. Generation of a new Gateway-compatible inducible lentiviral vector platform allowing easy derivation of co-transduced cells. *Biotechniques*. 2016;60(5):252-259.
- [15] Jang YH, Song HI, Yang Y, et al. Reliable RT-qPCR-based titration of retroviral and lentiviral vectors via quantification of residual vector plasmid DNA in samples. *Biotechnol Lett*. 2016;38(8):1285-1291.
- [16] Kafaie J, Song R, Abrahamyan L, et al. Mapping of nucleocapsid residues important for HIV-1 genomic RNA dimerization and packaging. *Virology*. 2008;375(2):592-610.
- [17] LaBarre DD, Lowy RJ. Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID₅₀ and plaque assays. *J Virol Methods*. 2001;96(2):107-126.
- [18] Nauta JJ, de Bruijn IA. On the bias in HI titers and how to reduce it. *Vaccine*. 2006;24(44-46):6645-6646.
- [19] Fan J, Guan S, Cheng CF, et al. PKCdelta clustering at the leading edge and mediating growth factor-enhanced, but not ecm-initiated, dermal fibroblast migration. *J Invest Dermatol*. 2006;126(6):1233-1243.
- [20] Chen M, Li W, Fan J, et al. An efficient gene transduction system for studying gene function in primary human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Clin Exp Dermatol*. 2003;28(2):193-199.
- [21] Kevin Foskett J, Madesh M. Regulation of the mitochondrial Ca(2+) uniporter by MICU1 and MICU2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;449(4):377-383.
- [22] Aichberger KJ, Mittermann I, Reininger R, et al. Hom s 4, an IgE-reactive autoantigen belonging to a new subfamily of calcium-binding proteins, can induce Th cell type 1-mediated autoreactivity. *J Immunol*. 2005;175(2):1286-1294.
- [23] de la Fuente S, Matesanz-Isabel J, Fonteriz RI, et al. Dynamics of mitochondrial Ca²⁺ uptake in MICU1-knockdown cells. *Biochem J*. 2014;458(1):33-40.
- [24] Hoffman NE, Chandramoorthy HC, Shamugapriya S, et al. MICU1 motifs define mitochondrial calcium uniporter binding and activity. *Cell Rep*. 2013;5(6):1576-1588.
- [25] Tian Y, Qin L, Qiu H, et al. RPS3 regulates melanoma cell growth and apoptosis by targeting Cyto C/Ca²⁺/MICU1 dependent mitochondrial signaling. *Oncotarget*. 2015;6(30):29614-29625.
- [26] Antony AN, Paillard M, Moffat C, et al. MICU1 regulation of mitochondrial Ca(2+) uptake dictates survival and tissue regeneration. *Nat Commun*. 2016;7:10955.
- [27] Zhou X, Ren Y, Kong L, et al. Targeting EZH2 regulates tumor growth and apoptosis through modulating mitochondria dependent cell-death pathway in HNSCC. *Oncotarget*. 2015;6(32):33720-33732.
- [28] Mattila M, Koskenvuo J, Söderström M, et al. Intramyocardial injection of SERCA2a-expressing lentivirus improves myocardial function in doxorubicin-induced heart failure. *J Gene Med*. 2016;18(7):124-133.
- [29] Shen SH, Yu N, Xu H, et al. Inhibition of Human Glioma Cell Proliferation Caused by Knockdown of Utrophin Using a Lentivirus-Mediated System. *Cancer Biother Radiopharm*. 2016;31(4):133-138.
- [30] Yue B, Lin Y, Ma X, et al. Survivin-TGFB3-TIMP1 Gene Therapy Via Lentivirus Vector Slows the Course of Intervertebral Disc Degeneration in an In Vivo Rabbit Model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2016;41(11):926-934.
- [31] 张磊,刘庆友,胡天,等.第三代慢病毒高效率包装系统的建立[J].基因组学与应用生物学,2009,28(2):326-330.