

DOI:10.13350/j.cjpb.240908

• 论著 •

人ZRANB3蛋白在大肠埃希菌中的表达纯化和功能研究^{*}

郑琳,向嵩^{**},陈朴^{**}

(天津医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系,天津 300070)

【摘要】 目的 人体细胞中,ZRANB3蛋白在DNA损伤应对通路中发挥重要作用。目前,对ZRANB3的结构及其发挥功能的机制还了解甚少。为开展对ZRANB3蛋白结构和功能的研究,急需一种大规模制备高纯度、折叠正确ZRANB3的方法。ZRANB3是大分子量、多结构域的人源蛋白,这类蛋白的表达和纯化一般较为困难。本研究的目的是建立一种高效的ZRANB3的表达和纯化方法。**方法** 通过基因克隆技术将经过密码子优化的ZRANB3基因插入到pET.28a载体中,构建重组质粒;将重组质粒转化至大肠埃希菌Rosetta菌株中,用IPTG诱导ZRANB3表达;采用亲和层析、离子交换层析和凝胶过滤层析等多种层析手段纯化ZRANB3并通过SDS-PAGE鉴定目的蛋白的纯度。通过核酸内切酶实验和复制叉退行实验对重组蛋白ZRANB3的功能进行验证。**结果** 本研究建立了从大肠埃希菌中制备人源ZRANB3的方案,有效地纯化了ZRANB3蛋白,获得了较大量高纯度的ZRANB3蛋白,并且通过体外功能实验证明了制备的人源重组蛋白ZRANB3具有被报导的生化活性,包括ATP依赖的核酸内切酶活性和催化复制叉退行的活性。通过本研究建立的方法,可从9L的大肠埃希菌培养液中制备约0.5mg纯度大于95%的、具有生化活性的ZRANB3蛋白。**结论** 本研究提供了一种高效制备大量、高纯度且具有酶活性的人源ZRANB3蛋白的方法,为深入理解其促进复制叉重启的功能提供了线索,并为ZRANB3结构和功能的进一步研究奠定了基础。

【关键词】 ZRANB3;表达纯化;DNA损伤修复;复制叉退行;核酸内切酶

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)09-1031-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Sep.;19(9):1031-1035,1041.]

Expression, purification and function of human ZRANB3 protein in *Escherichia coli*

ZHENG Lin, XIANG Song, CHEN Pu (Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

【Abstract】 **Objective** The human protein ZRANB3 plays critical roles in DNA damage response pathways. To date, the structure of ZRANB3 and its functional mechanism in DNA damage response are poorly understood. To study the structure and function of ZRANB3, a protocol to produce large quantities of correctly folded and biologically active ZRANB3 is urgently needed. The expression and purification of large and multiple-domain human proteins such as ZRANB3 are usually difficult. The objective of this study is to establish an efficient method to produce ZRANB3.

Methods The ZRANB3 gene was codon optimized for expression in *E. coli*, synthesized and inserted into vector pET.28a. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* Rosetta (DE3) cells and ZRANB3 expression was induced by IPTG. ZRANB3 was purified by affinity, ion exchange, gel filtration chromatography and its purity was assessed with SDS-PAGE. The biochemical function of the purified ZRANB3 was analyzed with endonuclease and replication fork reversal assays. **Results** This study established a protocol for the human ZRANB3 expression in *E. coli* and its purification. *In vitro* assays demonstrated that the purified recombinant ZRANB3 possesses the nuclease and replication fork regression activities reported for ZRANB3. With the established protocol, approximately 0.5 mg of biologically active ZRANB3 with greater than 95% purity can be prepared from 9 liters of *E. coli* culture. **Conclusion** This study provides an efficient method for the preparation of a large number of high-purity and enzymatically active human ZRANB3 proteins, which provides clues for a deeper understanding of its ability to promote replication fork restart, and lays a foundation for further research on the structure and function of ZRANB3.

【Keywords】 ZRANB3; expression and purification; DNA damage repair; fork reversal; endonuclease^{***}

* 【基金项目】 天津市教委科研计划项目(自然科学)(No. 2021KJ249)。

** 【通讯作者】 向嵩,E-mail:xiangsong@tmu.edu.cn;陈朴,E-mail:chenpu@tmu.edu.cn

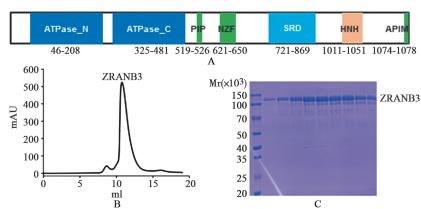
【作者简介】 郑琳(1999-),女,四川人,硕士在读,主要研究方向:DNA损伤修复相关蛋白的结构和功能研究。

E-mail:zhenglin0303@tmu.edu.cn

DNA 复制的保真性与完整性对于维持基因组稳定性至关重要。DNA 在复制过程中会遭受来自细胞内外的复制压力,这些复制压力可能导致复制叉停滞、崩解以及基因组不稳定,甚至引发癌症^[1-4]。为了有效地复制基因组内容,细胞必须应对 DNA 损伤带来的干扰复制叉进程的挑战。细胞已经进化出稳定停滞的分叉和促进 DNA 复制恢复的方法^[5]。复制应激反应中涉及数百种在多种途径中发挥作用的蛋白质,其中包括 SNF2 家族中的酶^[6]。

SNF2 家族包括多种稳定和修复停滞复制叉的复制应激反应蛋白,广泛参与核酸代谢的多个过程^[7]。SNF2 家族蛋白通过其 DNA 解旋酶或 DNA 转位酶的活性介导复制叉退行过程。在这个酶家族中,有 3 个密切相关的成员:SMARCAL1、ZRANB3 和 HLTF^[8-9]。

ZRANB3 (zinc finger, RAN-binding domain containing 3)是一种包含 1 079 个氨基酸的蛋白质,基于序列同源性,它是与 SMARCAL1 关系最密切的 SNF2 蛋白。与 SMARCAL1 在 DNA 损伤修复中的功能不同^[10-12],ZRANB3 是一种退火解旋酶、复制叉重塑酶和结构特异性核酸内切酶^[13-16]。ZRANB3 定位于 DNA 复制位点,并与关键复制因子 PCNA 和复制解旋酶复合物 MCM 的亚基相互作用,参与细胞对复制应激的反应^[16]。ZRANB3 蛋白的 N-末端是 ATP 酶结构域,紧随其后的是 PIP 结构域、NZF 结构域、SRD 结构域、HNH 结构域和 APIM 结构域(图 1A)。



A ZRANB3 结构域示意图 B ZRANB3 经凝胶过滤层析柱洗脱峰 C ZRANB3 洗脱蛋白 SDS-PAGE

图 1 人源 ZRANB3 蛋白的结构域分布和纯化结果

A Schematic diagram of ZRANB3 domains B The elution peak of ZRANB3 by gel filtration chromatography column C The elution of ZRANB3 by SDS-PAGE

Fig. 1 Domains and purification of human ZRANB3 protein

其中 PIP、NZF 和 APIM 结构域通过与多泛素化的 PCNA 相互作用,从而将 ZRANB3 募集到 DNA 损伤位点,以稳定停滞的复制叉^[17]。SRD 结构域能够结合张开臂的 DNA,提供了对复制叉连接的特异性。C 端的 HNH 结构域具有核酸内切酶活性,ZRANB3 在体外切割复制叉结构的能力依赖于其 HNH 基序^[18]。ZRANB3 是脊椎动物中最早发现的含有 HNH 结构域的蛋白质。ZRANB3 主要在复制应激反应中发挥

作用,通过多种方式来促进复制叉重启。目前研究提出了一种可能的模型:复制叉的重启首先需要 ZRANB3 发挥核酸内切酶的功能,然后核酸内切酶活性与复制叉退行相结合,可能有助于去除 DNA 损伤^[8]。ZRANB3 功能缺陷会导致对多种 DNA 损伤剂的超敏感性,并导致基因组不稳定。ZRANB3 的缺失降低了停滞分叉从复制压力挑战中恢复的能力^[17]。本课题组近期对 HLTF 的酵母同源蛋白 Rad5 的结构和功能的研究为理解 ZRANB3 的功能机制提供了线索^[19]。对 ZRANB3 结构和功能的研究将帮助我们进一步理解 SNF2 家族各成员在细胞中的 DNA 复制压力挑战中发挥作用的机制。因此,制备大量、高纯度且正确折叠的 ZRANB3 对该研究至关重要。虽然已有研究人员利用昆虫细胞表达系统表达并纯化 ZRANB3^[18,20],但该表达系统操作非常繁琐,蛋白产量也比较有限。与真核表达系统相比,原核表达系统通常耗时更短,同时蛋白产量更高^[21-22]。但是,由于高等真核生物和细菌之间存在密码子偏好性差异,高等真核生物蛋白在细菌中的表达会有一定的困难。同样因为蛋白折叠环境的差异,很多细菌中表达的高等真核生物蛋白不能正确折叠。在前期基础研究中,本课题组发现通过优化 ZRANB3 基因的密码子偏好性能够在大肠埃希菌表达系统中顺利表达 ZRANB3。本研究优化了 ZRANB3 的表达和纯化方式,获得了大量高纯度的 ZRANB3。体外酶活性实验结果表明,重组蛋白 ZRANB3 具有完整高效的酶活性,提示它是正确折叠的。本研究提供了一种高效制备大量、高纯度且折叠正确 ZRANB3 的方法,并为深入理解其促进复制叉重启功能提供了线索,为 ZRANB3 的进一步研究奠定了基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株和载体 全长人源 ZRANB3 的基因由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,表达载体为 N 端 His 标签的 pET. 28a 载体,具有硫酸卡那霉素抗性。本实验通过二级结构预测,发现 ZRANB3 的 N 端有一些无序区域,删除无序区域后蛋白表达更好更稳定,因此构建了从第 22 位氨基酸开始的 ZRANB3。感受态大肠埃希菌 Rosetta (DE3) 菌株由本实验室制备保存。

1.2 试剂和仪器 Phusion 超保真 DNA 聚合酶、T4 连接酶、限制性内切酶 Xho I 和 Nde I 等内切酶购于美国 NEB 公司; Yeast extract 和 Tryptone 购于美国 OXOID 公司; 硫酸卡那霉素、蛋白 Marker、PMSF 和 Tris-HCl 购于生工生物工程(上海)股份有限公司;

IPTG 购于大连美伦生物技术有限公司;亲和层析介质 Ni NTA Beads 6FF 购于常州天地人和生物科技有限公司。AKTA 纯化仪,离子交换柱及凝胶层析柱等均购于思拓凡(Cytiva)生物科技有限公司。

2 方法

2.1 重组蛋白的表达与纯化 将含有目的基因的质粒 ZRANB3(22-1079)转化到大肠埃希菌 Rosetta(DE3)菌株中,包含质粒的大肠埃希菌在37℃摇床培养2~3 h左右(A_{600} 约为0.8),加入终浓度0.25 mmol/L的IPTG在16℃诱导表达16~18 h。离心收集菌液,用高压匀质破碎仪破碎细菌,18 000 r/min,离心30 min收集上清。将上清液和镍亲和凝胶孵育后进行亲和层析,再经过离子交换层析和凝胶过滤层析柱去除杂蛋白。将纯化后的蛋白经脱盐柱置换缓冲液,并浓缩至适当浓度后,进行生化功能实验,余下的蛋白分装并保存到-80℃冰箱,以备用。

2.2 DNA 的组装与纯化

2.2.1 简易 Y型 DNA 的组装 将两条DNA单链以1:1的摩尔比混合,在PCR仪中升温到95℃再以每分钟减少1℃的方式退火,退火完成后在4℃保存DNA。

2.2.2 复制叉型 DNA 的组装 将互补的长链DNA和短链DNA以1:1的摩尔比混合,在PCR仪中升温到95℃再以每分钟减少1℃的方式退火。再将两部分退火的长短链以1:1的摩尔比混合,于37℃孵育30 min,使其缓慢结合形成4链DNA。

2.2.3 “鸡爪”结构 DNA 的组装 将N端互补或C端互补的2条DNA各自以1:1的摩尔比混合,在PCR仪中升温到95℃再以每分钟减少1℃的方式退火。再将两部分退火好的双链DNA以1:1的摩尔比混合,于37℃孵育30 min,使其缓慢结合形成4链DNA。

2.2.4 纯化 将退火组装好的DNA,通过纯化仪的Loop环上样到CHT-II(羟基磷灰石)柱中,在22℃下,通过梯度升高磷酸盐来洗脱组装后的DNA。纯化后的组装DNA纯度较纯化前有明显提升,但仍然存在一些单链DNA。进行非变性凝胶电泳,并通过Gel Safe泡染法分析组装结果。

2.3 ZRANB3 的核酸内切酶实验 使用简易Y型DNA来验证ZRANB3的核酸内切酶活性。在200 nmol/L DNA、50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)、50 mmol/L NaCl、5 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L ATP和0.1 mg/mL BSA条件下,加入200 nmol/L ZRANB3蛋白。在37℃水浴下反应30 min。反应结束后,在30℃水浴下,加入终浓度分别为0.1%的SDS、4 mg/mL的蛋白酶K和20 mmol/L的EDTA,孵育10

min,使ZRANB3蛋白失去活性。再离心5 min后,进行非变性凝胶电泳,并通过Gel Safe泡染法分析反应结果。

2.4 ZRANB3 的复制叉退行实验 使用了实验室已有的长链带有荧光基团的复制叉型DNA来检测ZRANB3的复制叉退行功能。首先在20 nmol/L DNA底物、20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、2 nmol/L MgCl₂、1 nmol/L DTT、100 μg/mL BSA、50 mmol/L KCl、2 mmol/L ATP条件下,加入1 μmol/L ZRANB3蛋白,反应在30℃水浴下进行10 min。反应结束后,在37℃水浴下,使用终浓度0.2% SDS和0.5 mg/mL的蛋白酶K孵育5 min,灭活蛋白。再离心5 min后,进行非变性凝胶电泳,并通过凝胶成像仪分析反应结果。

结 果

1 重组 ZRANB3 蛋白在细菌中的表达与纯化

本实验使用亲和层析、离子交换层析和凝胶过滤层析等多种层析手段,有效地去除纯化ZRANB3蛋白时残留的大量杂蛋白和错误折叠的蛋白,提高蛋白质的产量和纯度,获得了大量可溶性、纯度高的ZRANB3蛋白。最终目的蛋白从Superdex 200 Increase 10/300 GL分子筛柱的10.7 mL处洗脱出来(图1B),与溶液中ZRANB3蛋白的单体形式一致(预期分子质量为120 ku)。优化的纯化流程可从9 L的大肠埃希菌培养液中制备约0.5 mg纯度大于95%的ZRANB3蛋白(图1C)。

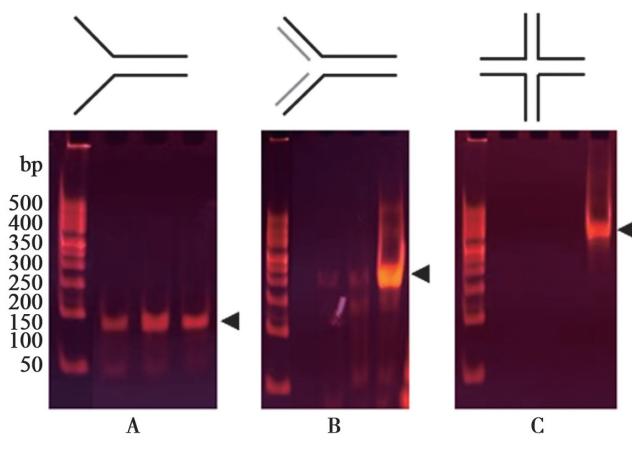
2 复制叉 DNA 的体外组装与纯化

ZRANB3对不同类型的DNA结构有着不同的选择性,即具有针对分支DNA结构的特异性。为了研究ZRANB3在DNA上发挥的功能,本实验参考文献组装了三种类型的DNA,包括用于验证其核酸内切酶功能的简易Y型DNA,模拟无法发生退行的简易复制叉;用于验证其复制叉退行功能的Y型DNA,模拟DNA损伤时停滞的复制叉(发生退行前);“鸡爪”结构的DNA,模拟被ZRANB3退行后的DNA。非变性凝胶电泳结果表明,不同类型的DNA已组装成功,并且经过CHT-II柱的纯化,DNA组装产物的纯度较高,为进一步的功能实验提供了合适的底物(图2)。

3 重组蛋白 ZRANB3 的核酸内切酶活性

ZRANB3是脊椎动物中最早发现的含有HNH结构域的蛋白质,该结构域序列高度保守并具有核酸内切酶活性。该酶活反应在简易Y型DNA中同时加入ZRANB3和ATP,结果发现该DNA被酶切为多个片段,而没有加入ZRANB3或加入ATP类似物AMP-PNP的反应中没有观察到有酶切后的片段(图

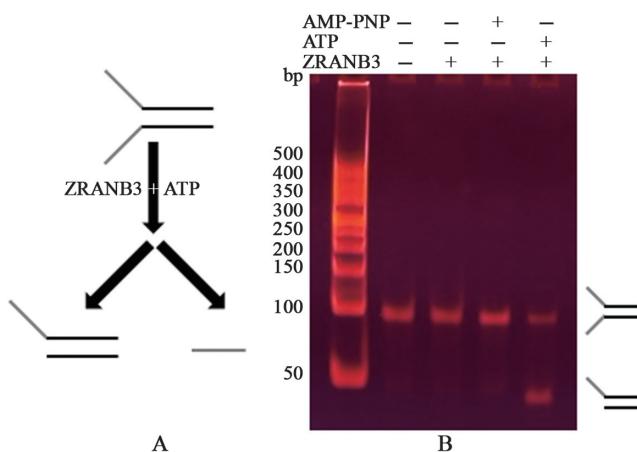
3)。这些数据表明,ZRANB3 具有依赖 ATP 的针对分支 DNA 结构的核酸内切酶活性。



A 简易 Y型 DNA B 复制叉 Y型 DNA C “鸡爪”结构型 DNA
图 2 不同类型复制叉 DNA 组装后纯化结果

A Simple Y structure DNA B Replicationfork Y structure DNA
C 'Chicken foot' structure DNA(Holliday Junction DNA)

Fig. 2 Purification of different types of replication fork DNA after assembly



A ZRANB3 核酸内切酶功能示意图, ZRANB3 具有针对性分支 DNA 结构的核酸内切酶活性 B ZRANB3 发挥切割简易 Y 型 DNA 的内切酶活性

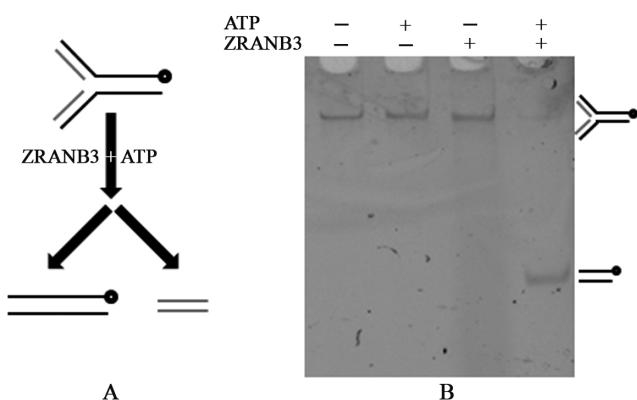
图 3 ZRANB3 具有依赖 ATP 的核酸内切酶活性

A Functional diagram of endonuclease ZRANB3, ZRANB3 has endonuclease activity targeting branching DNA B ZRANB3 exerts endonuclease activity to cleave simple replication fork DNA

Fig. 3 ZRANB3 exhibits ATP dependent endonuclease activity

4 重组蛋白 ZRANB3 的复制叉退行功能

为了应对复制压力,复制叉在受到干扰时会发生退行,这将导致“鸡爪”结构的形成和 DNA 模板链的重新退火。该反应使用了实验室已有的长链带有荧光基团的复制叉 Y 型 DNA。结果表明,当同时加入 ZRANB3 和 ATP 后,经过凝胶成像仪分析结果,可以观察到带有荧光基团的退行长链产物(图 4)。这些数据表明纯化的重组 ZRANB3 蛋白具有催化复制叉退行的功能。



A ZRANB3 复制叉退行功能示意图:两条子链 DNA 同模板链解离,反向迁移并且两条子链间退火形成双链、同时两条模板链间也重新形成双链 B ZRANB3 催化复制叉 Y 型 DNA 发生退行并形成双链

图 4 ZRANB3 促进复制叉退行的催化功能

A Schematic diagram of ZRANB3 replication fork reversal function: Two daughter strands of DNA dissociate from the parent strands, migrate in the opposite direction, and anneal between the two daughter strands to form a double strand, while the two parent strands also reform a double strand B ZRANB3 catalyzes the reversal of replication fork DNA and formation of the double strand

Fig. 4 Catalytic function of ZRANB3 in promoting replication fork reversal

讨 论

原核表达系统是目前应用最广泛的表达系统,以大肠埃希菌表达为主。相比真核表达系统而言,原核表达系统具有操作简单,表达量高的优点。但是由于真核生物和细菌在密码子偏好性上存在差异,一些真核生物的蛋白在细菌中无法正常表达或者形成折叠错误不具备生物活性的包涵体蛋白^[23]。在细菌中表达高等真核生物的大分子量、多结构域蛋白尤为困难。大分子量多结构域的人源 ZRANB3 蛋白在细胞的 DNA 复制压力应对中发挥关键作用,对它的结构和功能研究急需建立大规模制备高纯度、折叠无误的 ZRANB3 的方法。在本课题组前期的工作中,通过密码子的优化成功在大肠埃希菌中表达人源 ZRANB3。本研究优化了从大肠埃希菌中制备 ZRANB3 的方案,建立了一个有效的制备大量、高纯度的 ZRANB3 的方法。值得注意的是,体外功能实验表明制备的 ZRANB3 具有完整的生物活性,提示它是折叠无误的。之前有报道表明 ZRANB3 可以使用昆虫细胞表达系统表达。该系统通过细胞培养诱导蛋白表达,耗时较长,且受限于较小的表达量。与该方法相比,本研究建立的方法耗时更短,细菌培养和诱导蛋白表达仅需要 2 天,且可以制备多达几毫克的高纯度、准确折叠的 ZRANB3。因此,本研究提供了一个高效的方案来制备准确折叠的人源 ZRANB3 蛋白,为该蛋白的结构和功能研究奠定了基础。

DNA 复制的准确性和完整性在维持基因组稳定

性方面起到重要作用。但是DNA复制过程经常会因为遭遇来自细胞内外的复制压力而导致停滞,如果无法重新及时启动复制,将会造成复制叉垮塌断裂、基因组的不稳定甚至细胞死亡^[24-25]。本实验证明了重组蛋白ZRANB3具有结构特异性的ATP依赖性核酸内切酶活性,催化活性的发生依赖于N端ATP酶结构域对ATP的水解。核酸内切酶结构域有助于ZRANB3定位于受损分叉,ZRANB3中的一些癌症相关突变使其核酸内切酶活性失活,但不影响其ATP酶活性^[18]。因此,核酸内切酶活性可能对维持基因组稳定性非常重要,但还需要进一步的研究来确定核酸内切酶失活是否真的驱动了肿瘤的发生。在高等真核生物中,复制叉退行是应对复制压力的关键调控机制。与SMARCAL1一样,ZRANB3催化复制叉退行和恢复。尽管ZRANB3能够在体外催化这些相同的反应,但与SMARCAL1相比,ZRANB3对不同类型的DNA结构表现出不同的底物偏好,即对于具有分支结构的DNA有特异选择性^[13]。本实验也证明了组装的复制叉Y型DNA在重组蛋白ZRANB3和ATP的共同作用下能够发生复制叉退行。基于近年来对复制叉退行功能的研究,这一过程逐渐被认为是一把“双刃剑”,即具备一定的生理作用的同时也存在潜在的风险,如导致神经退行性综合征和癌症发生^[26]。细胞处理DNA损伤的机制相当多。在复制叉上处理DNA损伤可能与复制叉退行有关,这将导致“鸡爪”结构的形成和DNA模板链的重新退火^[27]。因此,导致复制阻断的损伤位点将被放置在dsDNA区域,进而可以通过切除损伤部位DNA的方式来修复复制叉。ZRANB3在体内积极促进复制叉退行,其核酸内切酶活性与复制叉退行功能相结合,可能有助于去除DNA损伤。然而,这种损伤修复模型需要核酸内切酶的切除修复机制和复制叉退行功能相协调,目前尚不清楚ZRANB3如何在分子水平上实现这一调控。在ZRANB3大规模纯化基础上的蛋白结构解析将为这些问题的解决提供高精度的三维模型和分子基础。

【参考文献】

- [1] Berti M, Cortez D, Lopes M. The plasticity of DNA replication forks in response to clinically relevant genotoxic stress [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(10): 633-651.
- [2] Berti M, Vindigni A. Replication stress: getting back on track [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23(2): 103-109.
- [3] Macheret M, Halazonetis TD. DNA replication stress as a hallmark of cancer [J]. *Annu Rev Pathol*, 2015, 10: 425-448.
- [4] Rickman K, Smogorzewska A. Advances in understanding DNA processing and protection at stalled replication forks [J]. *J Cell Biol*, 2019, 218(4): 1096-1107.
- [5] Friedberg EC. Suffering in silence: the tolerance of DNA damage [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(12): 943-953.
- [6] Kondratick CM, Washington MT, Spies M. Making choices: DNA replication fork recovery mechanisms [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2021, 113: 27-37.
- [7] Hopfner KP, Gerhold CB, Lakomek K, et al. Swi2/Snf2 remodelers: hybrid views on hybrid molecular machines [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2012, 22(2): 225-233.
- [8] Poole LA, Cortez D. Functions of SMARCAL1, ZRANB3, and HLTf in maintaining genome stability [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2017, 52(6): 696-714.
- [9] Halder S, Ranjha L, Taglialatela A, et al. Strand annealing and motor driven activities of SMARCAL1 and ZRANB3 are stimulated by RAD51 and the paralog complex [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(14): 8008-8022.
- [10] Bansbach CE, B tous R, Lovejoy CA, et al. The annealing helicase SMARCAL1 maintains genome integrity at stalled replication forks [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(20): 2405-2414.
- [11] Yusufzai T, Kadonaga JT. HARP is an ATP-driven annealing helicase [J]. *Science*, 2008, 322(5902): 748-750.
- [12] Yusufzai T, Kong X, Yokomori K, et al. The annealing helicase HARP is recruited to DNA repair sites via an interaction with RPA [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(20): 2400-2404.
- [13] Weston R, Peeters H, Ahel D. ZRANB3 is a structure-specific ATP-dependent endonuclease involved in replication stress response [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(14): 1558-1572.
- [14] Vujanovic M, Krietsch J, Raso MC, et al. Replication fork slowing and reversal upon DNA damage require PCNA polyubiquitination and ZRANB3 DNA translocase activity [J]. *Mol Cell*, 2017, 67(5): 882-890.e5.
- [15] Wit N, Buoninfante OA, van den Berk PC, et al. Roles of PCNA ubiquitination and TLS polymerases κ and η in the bypass of methyl methanesulfonate-induced DNA damage [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(1): 282-294.
- [16] Yuan J, Ghosal G, Chen J. The HARP-like domain-containing protein AH2/ZRANB3 binds to PCNA and participates in cellular response to replication stress [J]. *Mol Cell*, 2012, 47(3): 410-421.
- [17] Ciccia A, Nimonkar AV, Hu Y, et al. Polyubiquitinated PCNA recruits the ZRANB3 translocase to maintain genomic integrity after replication stress [J]. *Mol Cell*, 2012, 47(3): 396-409.
- [18] Sebesta M, Cooper CDO, Ariza A, et al. Structural insights into the function of ZRANB3 in replication stress response [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15847.
- [19] Shen M, Dhingra N, Wang Q, et al. Structural basis for the multi-activity factor Rad5 in replication stress tolerance [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 321.
- [20] Moore CE, Yalcindag SE, Czeladko H, et al. RFWD3 promotes ZRANB3 recruitment to regulate the remodeling of stalled replication forks [J]. *J Cell Biol*, 2023, 222(5): e202106022.
- [21] Jansen JG, Tsaalbi-Shylik A, Langerak P, et al. The BRCT domain of mammalian Rev1 is involved in regulating DNA translesion synthesis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(1): 356-365.

(下转 1041 页)

- 物学杂志,2023,18(2):224-228,237.
- [4] 靳涛,武倩,董雨,等.长托宁通过下调 miR-217 表达抑制缺氧/复氧诱导的大鼠心肌细胞 H9C2 损伤的机制研究[J].广西医科大学学报,2021,38(6):1118-1123.
- [5] 艾永飞,刘静,苏菲菲,等.褪黑素上调 SIRT1 改善高糖诱导原代心肌细胞损伤的机制研究[J].山西医科大学学报,2021,52(5):572-579.
- [6] Olejniczak M, Schwartz M, Webber E, et al. Viral myocarditis-incidence, diagnosis and management[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2020,34(6):1591-1601.
- [7] Matshela MR. The role of echocardiography in acute viral myocarditis[J]. Cardiovasc J Afr,2019,30(4):239-244.
- [8] Lin J, Xue A, Li L, et al. MicroRNA-19b downregulates gap junction protein Alpha1 and synergizes with MicroRNA-1 in viral myocarditis[J]. Int J Mol Sci,2016,17(5):741-756.
- [9] 杨慧敏,王芳洁,姚晓利.微 RNA-34a-5p 通过靶向调控 KLOTHO 对病毒性心肌炎心肌细胞损伤的影响及机制研究[J].中华生物医学工程杂志,2019,25(5):571-577.
- [10] Gou W, Zhang Z, Yang C, et al. MiR-223/Pknox1 axis protects mice from CVB3-induced viral myocarditis by modulating macrophage polarization[J]. Exp Cell Res,2018,366(1):41-48.
- [11] Wang Y, Zhang Z, Li H, et al. miR-29b-3p regulates cardiomyocytes pyroptosis in CVB3-induced myocarditis through targeting DNMT3A[J]. Cell Mol Biol Lett,2024,29(1):55-67.
- [12] Jiahui C, Jiadai Z, Nan Z, et al. miR-19b-3p/PKNOX1 regulates viral myocarditis by regulating macrophage polarization[J]. Front Genet,2022,13(1):902-916.
- [13] Yang L, Liu S, Yang L, et al. miR-217-5p suppresses epithelial-mesenchymal transition and the NF-κB signaling pathway in breast cancer via targeting of metadherin[J]. Oncol Lett,2022,23(5):162-174.
- [14] Flum M, Kleemann M, Schneider H, et al. miR-217-5p induces apoptosis by directly targeting PRKCI, BAG3, ITGAV and MAPK1 in colorectal cancer cells[J]. J Cell Commun Signal,
- 2018,12(2):451-466.
- [15] Papageorgiou AA, Roussos A, Papathanasiou I, et al. MiR-217 regulates SIRT1 expression and promotes inflammatory and apoptotic responses in osteoarthritis[J]. Genes (Basel),2023,14(12):2155-2169.
- [16] You T, Zhang B. CircWDR33 alleviates human pulmonary microvascular endothelial cell injury in sepsis-associated acute lung injury by targeting miR-217-5p/SERP1 axis [J]. Int Immunopharmacol,2022,113(1):109-121.
- [17] 李学文,郭为钧.大蒜素通过 AKT/NF-κB 通路诱导大肠癌细胞凋亡的实验研究[J].现代消化及介入诊疗,2020,25(2):193-198.
- [18] Mahdavi S, Khodarahmi P, Roodbari NH. Effects of cadmium on Bcl-2/ Bax expression ratio in rat cortex brain and hippocampus [J]. Hum Exp Toxicol,2018,37(3):321-328.
- [19] Zhu L, Hao J, Cheng M, et al. Hyperglycemia-induced Bcl-2/Bax-mediated apoptosis of Schwann cells via mTORC1/S6K1 inhibition in diabetic peripheral neuropathy[J]. Exp Cell Res,2018,367(2):186-195.
- [20] 顾烽,符霞,孙立勤,等.白藜芦醇通过 Nrf2/ARE 通路减轻柯萨奇病毒 B3 感染的乳鼠心肌细胞炎症和氧化应激反应[J].病毒学报,2020,36(1):63-69.
- [21] Qi Y, Zhang K, Li P, et al. Down-regulating miR-217-5p protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury by restoring mitochondrial function via targeting SIRT1[J]. Inflammation,2021,44(1):383-396.
- [22] 夏洪娟,王延鹏,朱伟,等.白藜芦醇通过上调 SIRT1 抑制阿霉素诱导的 H9c2 细胞损伤[J].中国药理学通报,2014,30(2):220-224.
- [23] 王瑞,高钊,张晓东,等.白藜芦醇通过调节沉默信息调节因子 1 通路改善大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用机制[J].世界中医药,2022,17(15):2171-2177.

【收稿日期】 2024-05-03 【修回日期】 2024-07-22

(上接 1035 页)

- [22] Pustovalova Y, Maciejewski MW, Korzhnev DM. NMR mapping of PCNA interaction with translesion synthesis DNA polymerase Rev1 mediated by Rev1-BRCT domain [J]. J Mol Biol,2013,425(17):3091-3105.
- [23] Kim HJ, Kim HJ. Yeast as an expression system for producing virus-like particles: what factors do we need to consider? [J]. Lett Appl Microbiol,2017,64(2):111-123.
- [24] Franchitto A, Pichierri P. Replication fork recovery and regulation of common fragile sites stability [J]. Cell Mol Life Sci,2014,71(23):4507-4517.

- [25] Kuzminov A. Chromosomal replication complexity: A novel DNA metrics and genome instability factor [J]. PLoS Genet,2016,12(10):e1006229.
- [26] McMurray CT. Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development [J]. Nat Rev Genet,2010,11(11):786-799.
- [27] Neelsen KJ, Lopes M. Replication fork reversal in eukaryotes: from dead end to dynamic response [J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2015,16(4):207-220.

【收稿日期】 2024-03-14 【修回日期】 2024-06-04