

TRIM21对脑心肌炎病毒的增殖调控作用研究

赵克学^{1,2} 许淑娟^{1,2} 耿金静^{1,2} 刘杨^{1,2} 李琼毅^{2*} 冯若飞^{1*}

(¹西北民族大学, 生物医学研究中心, 生物工程与技术国家民委重点实验室, 兰州 730030;

²西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730030)

摘要 TRIM21是三基序蛋白家族的成员之一, 与多种病毒的复制增殖相关, 但其与EMCV感染的研究机制尚不明确。该研究采用脂质体介导法将构建成功的TRIM21的真核表达质粒pcDNA3.1-TRIM21以及针对该靶点的小RNA干扰序列瞬时转染至HEK293和HeLa细胞, 探讨细胞内TRIM21的表达对脑心肌炎病毒复制增殖的影响, 并进一步进行机制研究。结果显示, TRIM21在细胞中成功过表达; EMCV感染24 h后进行检测, 结果证明, 过表达TRIM21组病毒滴度、病毒拷贝数及病毒蛋白均低于对照组。RNA干扰实验下调TRIM21后, 病毒滴度、病毒拷贝数及病毒蛋白显著高于对照组。此外, 机制研究提示, TRIM21可正调节II型干扰素及促炎性因子IL-6的转录, 从而抑制EMCV的增殖。以上结果表明, TRIM21与EMCV的复制增殖密切相关, 可能通过对IFN信号通路部分蛋白及促炎性因子的调控参与对病毒复制增殖的影响。

关键词 三基序蛋白21; 脑心肌炎病毒; IFN; IL-6

Study on Regulatory Effects of TRIM21 in Encephalomyocarditis Virus Proliferation

ZHAO Kexue^{1,2}, XU Shujuan^{1,2}, GENG Jinjing^{1,2}, LIU Yang^{1,2}, LI Qiongyi^{2*}, FENG Ruofei^{1*}

(¹Key Laboratory of Biotechnology and Bioengineering of State Ethnic Affairs Commission, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; ²Life Science and Engineering College of Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China)

Abstract TRIM21, a member of the TRIM (tripartite motif) family proteins, is associated with replication and proliferation of diverse viruses. However, the relationship between TRIM21 and EMCV (encephalomyocarditis virus) infection is still unclear. In order to study the potential involvement of TRIM21 in EMCV replication, the eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-TRIM21 and small RNA interference sequence were transfected into cells by lipofectamine mediated transfection. The effect of TRIM21 on proliferation of EMCV as well as its mechanism was studied. EMCV replication significantly decreased compared to control group when TRIM21 overexpressed in HeLa and HEK293 cells. Virus infectivity increased when TRIM21 was downregulated by specific siRNAs. The mechanism study suggested that overexpression of TRIM21 not only positively regulated the transcription of IFN II, but also increased the expression of pro-inflammatory factors IL-6. This study firstly demonstrated that TRIM21 restricted EMCV replication in HeLa and HEK293 cells in a type II interferon and IL-6 dependent manner.

Keywords TRIM21; encephalomyocarditis virus (EMCV); IFN; IL-6

收稿日期: 2019-06-28 接受日期: 2019-09-06

国家自然科学基金(批准号: 31702234、31460665)、中央专项研究生科研创新项目(批准号: Yxm2018146)、教育部“创新团队发展计划”(批准号: IRT_17R88)、甘肃省教育厅项目(批准号: 2018B-018)和中央高校项目(批准号: 31920180123)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13669301879, E-mail: lqy@xbmu.edu.cn; Tel: 13639311305, E-mail: fengruofei@xbmu.edu.cn

Received: June 28, 2019 Accepted: September 6, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31702234, 31460665), Central special postgraduate research and innovation project (Grant No.Yxm2018146) and Ministry of Education “Innovation Team Development Plan” project (Grant No.IRT_17R88), Gansu provincial education department project (Grant No.2018B-018), and Central university project (Grant No.31920180123)

*Corresponding authors. Tel: +86-13669301879, E-mail: lqy@xbmu.edu.cn; Tel:+86-13639311305, E-mail: fengruofei@xbmu.edu.cn

网络出版时间: 2020-01-07 13:42:12

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20200107.1342.020.html>

脑心肌炎病毒(encephalomyocarditis virus, EMCV)是一种重要的人畜共患病病原体^[1], 属于无包膜、正义单链小RNA病毒, 是小核糖核酸病毒科心病毒属的成员^[2]。EMCV可感染多种哺乳动物和啮齿动物, 与心肌炎、神经系统疾病以及部分因 β 细胞损伤导致的糖尿病密切相关^[3-4]。EMCV对猪养殖业危害较为严重, 可使猪发生致死性心肌炎和脑炎^[5-7]。1958年以来, EMCV在全球各国的猪群中均有爆发^[8], 给养殖业带来了重大的经济损失。然而, 目前EMCV感染的机制尚不明确, 因此, 开展与EMCV相关的致病机制研究, 为预防及控制此病提供科学思路。

TRIM21是三基序蛋白家族的成员之一, 该家族蛋白与细胞固有免疫应答密切相关。TRIM21也被称为Ro52或SS-A, 属于TRIM超家族的一员, 在来源细胞中广泛表达^[9]。TRIM21与其它TRIM家族成员一样, 由RING、B-box以及N-端尾部的卷曲螺旋结构域组成, 另外它还有一个可变的C末端, 因此被称为RBCC家族^[10-12]。TRIM21 C-端具有PRY-SPRY域, 该结构域能结合抗病毒活性的蛋白质^[13]。在HCV、VSV等RNA病毒感染过程中, TRIM21通过K-27连接的MAVS的多聚泛素化正调控先天性免疫反应来抑制病毒的增殖^[14]。Zhang等^[15]还发现, TRIM21蛋白与DDX41结合并促进K48泛素链的降解, 进而在DNA病毒侵染机体时负调控固有免疫系统。此外, TRIM21被鉴定与DDX19相互作用, 它与RLR介导的I-IFN的调控有关^[16-18]。上述结果提示, TRIM21在细胞抗病毒固有免疫中扮演关键作用。

本实验研究TRIM21对EMCV体外增殖调控作用, 以期为进一步揭示EMCV的感染机制奠定基础。研究结果显示, 过表达TRIM21后病毒的增殖被抑制; 下调该蛋白后病毒增殖明显增加, 这提示TRIM21参与病毒的复制增殖过程, 且TRIM21参与EMCV复制增殖可能与其上调II型干扰素IFN- γ 及促炎因子IL-6相关, 但其具体的作用机制还需进一步研究探索。

1 材料与方法

1.1 细胞及毒株

人胚肾细胞(HEK293)、人宫颈癌细胞(HeLa)、金仓鼠肾细胞(BHK-21)、脑心肌炎病毒(EMCV)毒株(GenBank号为X74312)均由西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室提供。

1.2 主要试剂与耗材

胰蛋白酶、DMEM培养基及新生牛血清购自兰州民海生物工程有限公司; Trans-Blot Turbo Mini-size Transfer Stacks购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 细胞总RNA提取试剂盒RNAiso plus、LA-Taq聚合酶、M-MLV反转录酶、PMD-18T vector购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 随机引物、DEPC水购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Endo-free小提质粒提取试剂盒购自Omega公司; SYBR Gree购自美国Applied biosystems公司; siRNA购自广州市锐博生物科技有限公司; LipofectamineTM2000 Transfection试剂购自Invitrogen公司; Opti-MEM购自Gibco公司; Human IFN- β (interferon beta) ELISA试剂盒购自Elabscience公司; EMCV VP1鼠抗由南京农业大学白娟副教授馈赠; 兔抗TRIM21多克隆抗体及鼠抗 β -actin抗体均购自Abcam公司; 山羊抗兔IgG-HRP、山羊抗鼠IgG-HRP购自Jackson公司; Hyper Singal高敏ECL化学发光底物试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司; RIPA细胞裂解液及PMSF蛋白保护剂均购自上海碧云天生物技术有限公司; 大肠杆菌感受态细胞BL21、pcDNA3.1载体由西北民族大学生物工程与技术国家民委重点实验室提供。

1.3 引物

实验中所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 序列见表1。

1.4 EMCV感染细胞后TRIM21表达水平检测

取对数生长期的HEK293细胞, 接种EMCV后于2 h、4 h、6 h、8 h、10 h收细胞, 使用细胞总RNA提取试剂盒RNAiso plus提取RNA并定量反转录, 将得到的cDNA稀释成终浓度为100 ng后用qRT-PCR检测TRIM21的表达。同时, 使用RIPA裂解液裂解细胞后通过Western blot检测TRIM21蛋白表达情况。

1.5 重组质粒pcDNA3.1-TRIM21的构建及转染

以Genbank上发表的人源TRIM21基因序列(BC010861.1), 设计表达引物TRIM21-hF、TRIM21-hR(表1)。经PCR扩增后与pcDNA3.1载体连接, 将得到的质粒经双酶切验证后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序正确命名为pcDNA3.1-TRIM21。

转染前24 h将对数生长期的细胞接种6孔细胞培养板, 当细胞融合度达到80%~90%时进行转染实验。将0.5 μ g、1.0 μ g、1.5 μ g的重组质粒pcDNA3.1-TRIM21和对照载体pcDNA3.1按LipofectamineTM2000

表1 引物序列
Table 1 Sequence of primer

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
TRIM21-qF	CAG CAG CAC GCT TGA CAA TGA TG
TRIM21-qR	GAT GCT CAC AGG CTC CAC GAA G
β-actin-qF	TGG CAC CCA GCA CAA TGA A
β-actin-qR	CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A
TRIM21-hF	GGAATT CAT GGC TTC AGC AGC ACG CTT GAC AAT GAT
TRIM21-hR	GCTCTA GAT CAA TAG TCA GTG GAT CCT TGT GAT CCA AT A
EMCV-3D-qF	GTC ATA CTA TCG TCC AGG GAC TCT AT
EMCV-3D-qR	CAT CTG TAC TCC ACA CTC TCG AAT G

下划线表示酶切位点EcoR I和Xba I; qF/qR表示qPCR引物; hF/hR表示表达引物。
Underline stands for digestion sites of EcoR I and Xba I; qF/qR are qPCR primer; hF/hR are expression primer.

表2 TRIM21小RNA干扰序列
Table 2 Small RNA interference sequence of TRIM21

序列名称 Sequence	RNA干扰序列(5'→3') RNA interference sequence (5'→3')
siRNA-002	GGT GAT AAT TGT CCT GGA A
siRNA-003	GCA GAG TTT GTG CAG CAA A
siRNA-004	GGA CAA TTT GGT TGT GGAA

Transfection试剂说明书进行操作。转染完成后将细胞培养板置于37℃、5% CO₂培养箱中,6 h后换为10% NBS DMEM培养基,继续培养至48 h时进行qRT-PCR及Western blot检测TRIM21过表达效果及最优浓度的筛选。

1.6 siRNA下调内源性TRIM21

TRIM21干扰序列和阴性对照由广州锐博生物科技有限公司合成(表2)。

转染前24 h将对数生长期的细胞以1×10⁵个/mL的密度接种于6孔板中,当细胞融合度达到30%~50%时进行转染。3对干扰序列及1对阴性对照序列,被命名为siRNA-002、siRNA-003、siRNA-004、siRNA-NC,转染时终浓度为100 nmol/L,具体操作按Lipofectamine™2000试剂说明书进行,48 h后进行qRT-PCR及Western blot检测TRIM21敲低效果及最佳干扰序列的筛选。

1.7 EMCV感染实验

TRIM21在细胞内成功过表达和下调后,进行EMCV感染实验。感染实验前接种TRIM21过表达和下调的细胞,接种量为0.01 MOI。病毒体积=细胞数×0.01 MOI/0.7×TCID₅₀^[19]。孵育1 h后弃去毒液,更换3% NBS的DMEM培养基以维持细胞正常生

长。48 h后收上清进行病毒滴度检测,同时收细胞检测EMCV-VP1蛋白的表达,用TaqMan探针法检测EMCV 3D拷贝数,TaqMan实时荧光定量PCR条件参考本实验室已建立的方法^[20]。

1.8 TRIM21过表达后干扰素及促炎性因子的检测

在HEK293细胞中过表达TRIM21后,设置对照组和接毒组,接毒方法同上1.7。接毒24 h后收细胞,提取细胞RNA后通过qRT-PCR检测干扰素信号通路下游分子IFN-α、IFN-β、IFN-γ以及促炎性因子TNF-α和IL-6的转录情况。此外,收上清用ELISA检测IFN-α、IFN-β、IFN-γ和IL-6蛋白表达。

1.9 统计学分析

论文中的实验数据使用GraphPad Prism 5软件进行统计学分析,使用 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据采用t-tests和One-Way ANOVA分析方法。所有的统计学差异用P表示(*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001)。

2 结果

2.1 EMCV感染HEK293细胞对TRIM21的影响

为验证EMCV感染细胞后对TRIM21的影响,取HEK293细胞接种EMCV后于不同时间段检测TRIM21的表达情况。结果显示(图1),在病毒感染后8 h和10 h,

*TRIM21*的转录水平明显上升($P<0.001$), 然而 *TRIM21* 蛋白在6 h、8 h和10 h时明显增高, 这提示, *TRIM21*在 EMCV 的感染过程中可能发挥一定的作用。

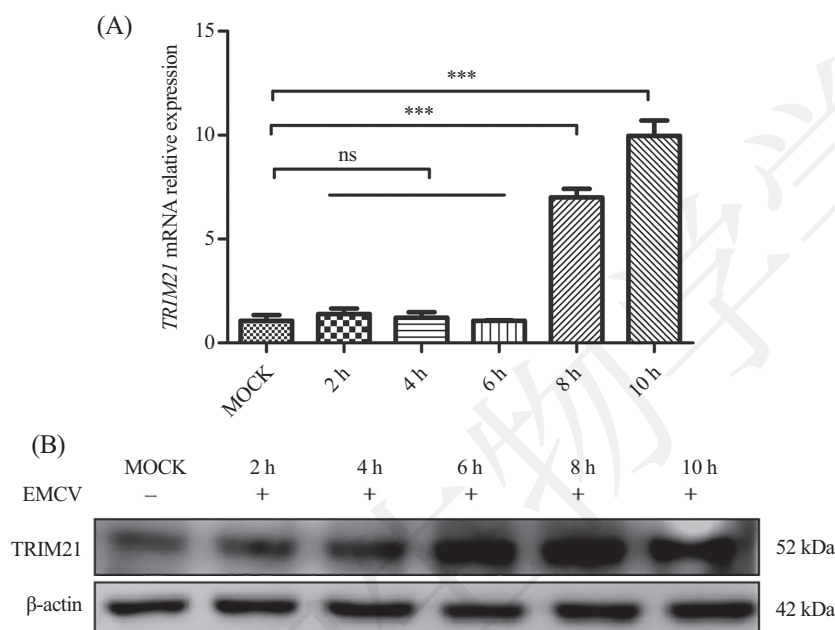
2.2 *TRIM21*真核表达载体构建

PCR扩增后经核酸凝胶检测目的条带, 大小符合预期(图2A)。利用 T4连接酶将 *TRIM21* 与 pcDNA3.1进行重组连接, 双酶切验证为阳性(图2B)的质

粒测序, 结果与参考序列(BC010861.1)比对同源性和为 100%, 证明 pcDNA3.1-*TRIM21* 表达载体构建成功。

2.3 *TRIM21*过表达对EMCV感染的影响

将外源基因转染HEK293细胞后提取RNA进行基因水平的检测。图3A显示, 转染组 *TRIM21* 基因表达较空载组显著提高($P<0.001$), 提示外源 *TRIM21* 在基因水平成功表达。Western blot检测结果显示, 与

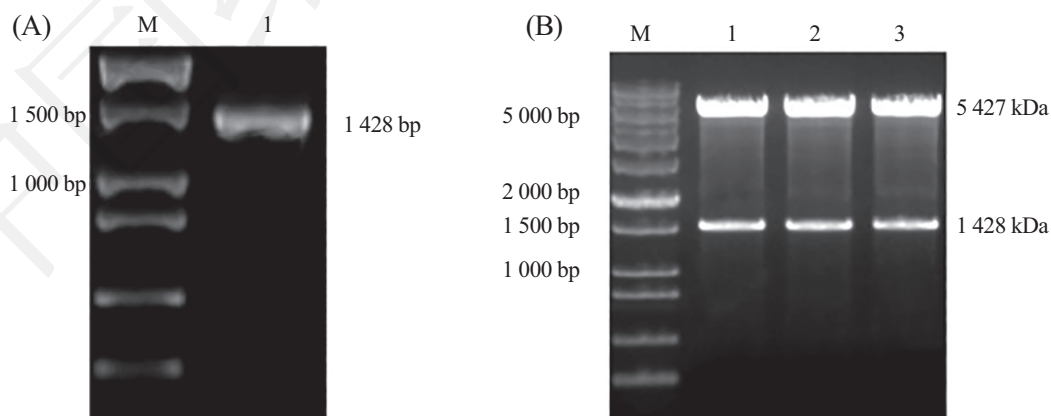


A: EMCV感染HEK293细胞后, *TRIM21*的mRNA表达水平; B: EMCV感染HEK293细胞后, *TRIM21*的蛋白表达水平。“-”和“MOCK”为EMCV未感染组, “+”为EMCV感染组, β -actin作为内参, ns为 $P>0.05$, *** $P<0.001$, 与MOCK组比较。

A: mRNA expression of *TRIM21* after virus infected HEK293 cells; B: protein expression of *TRIM21* after virus infected HEK293 cells. “-” and “MOCK” indicate uninfected EMCV group, “+” indicates EMCV group, β -actin is an internal reference. ns indicates $P>0.05$, *** $P<0.001$ compared with MOCK group.

图1 EMCV感染细胞后*TRIM21*的表达量检测

Fig.1 The expression of *TRIM21* in EMCV infected cells



A: *TRIM21*基因的扩增; M为1 Kb plus DNA分子质量标准; 1为*TRIM21*基因; B: 双酶切验证; 1, 2, 3泳道为pcDNA3.1-*TRIM21*重组质粒双酶切检测。A: *TRIM21* amplification; M was 1 Kb plus DNA molecular mass standard; 1 was the detection of *TRIM21* gene. B: double enzyme digestion; 1,2,3 lanes were double enzyme detection of pcDNA3.1-*TRIM21* plasmid.

图2 *TRIM21*基因的扩增及双酶切验证

Fig.2 Amplification of *TRIM21* gene and double digestion validation

空载组相比, TRIM21的表达量随着TRIM21浓度的增加而增加, 呈剂量依赖性关系(图3B), TRIM21瞬时过表达成功。

瞬时过表达TRIM21后进行EMCV感染实验, 接毒量为0.01 MOI。接毒后收集上清和细胞, 检测细胞内和胞外的病毒滴度。结果显示, 随着TRIM21浓度的增加, 细胞内和细胞外病毒滴度也逐渐减少, 当TRIM21浓度为1.5 μg 时, 病毒滴度显著下降(图3C和图3D, $P<0.05$)。后期, 本实验尝试用较高浓度的TRIM21质粒转染细胞, 发现当浓度高于1.5 μg 时对细胞活力产生了影响(结果未显示)。为了验证TRIM21在不同细胞中是否有相同的作用, 在HeLa细胞中做了同样的实验。在基因(图3E)和蛋白(图3F)水平检测TRIM21过表达后, EMCV VP1蛋白和EMCV 3D(图3G)的表达被明显抑制。这一结果提示, TRIM21的表达量与EMCV增殖呈负相关。

2.4 TRIM21下调后对EMCV增殖的影响

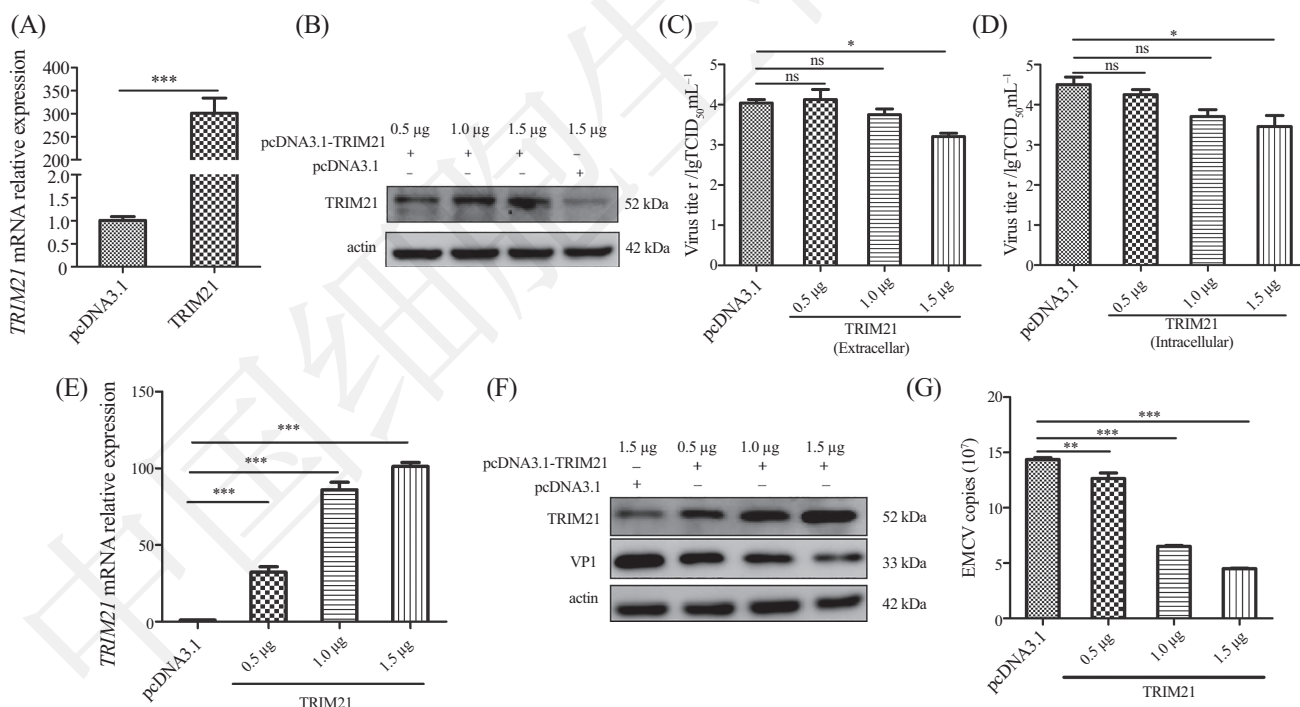
siRNA下调HEK293细胞和HeLa细胞中TRIM21

的表达, 干扰48 h后进行基因和蛋白水平的检测, 检测干扰效率。qPCR结果显示(图4A和图4D), TRIM21干扰组中的002和004号 mRNA转录水平比阴性对照组NC要低。Western blot结果与基因水平相一致(图4B和图4E)。这提示, 干扰48 h后siRNA-002和siRNA-004可下调细胞中TRIM21基因和蛋白水平的表达。

将瞬时敲低 TRIM21的 HEK293细胞和 HeLa 细胞接种于6孔板, 进行EMCV感染实验, 接毒量为0.01 MOI。在HEK293细胞中接毒后收集上清检测子代病毒的滴度, 结果显示(图4C), TRIM21干扰组细胞中EMCV的病毒滴度比对照组高, 经统计学分析差异显著(siRNA-002, $P<0.01$; siRNA-004, $P<0.001$)。在HeLa细胞中接毒后检测EMCV VP1蛋白(图4E)和EMCV 3D(图4F)基因的表达, 结果同HEK293细胞。这些结果提示, 抑制TRIM21的表达可促进病毒增殖。

2.5 TRIM21过表达抑制EMCV增殖的机制探讨

2.5.1 TRIM21过表达对干扰素通路的影响 为了阐明TRIM21对EMCV增殖影响的机制, 本实验初步

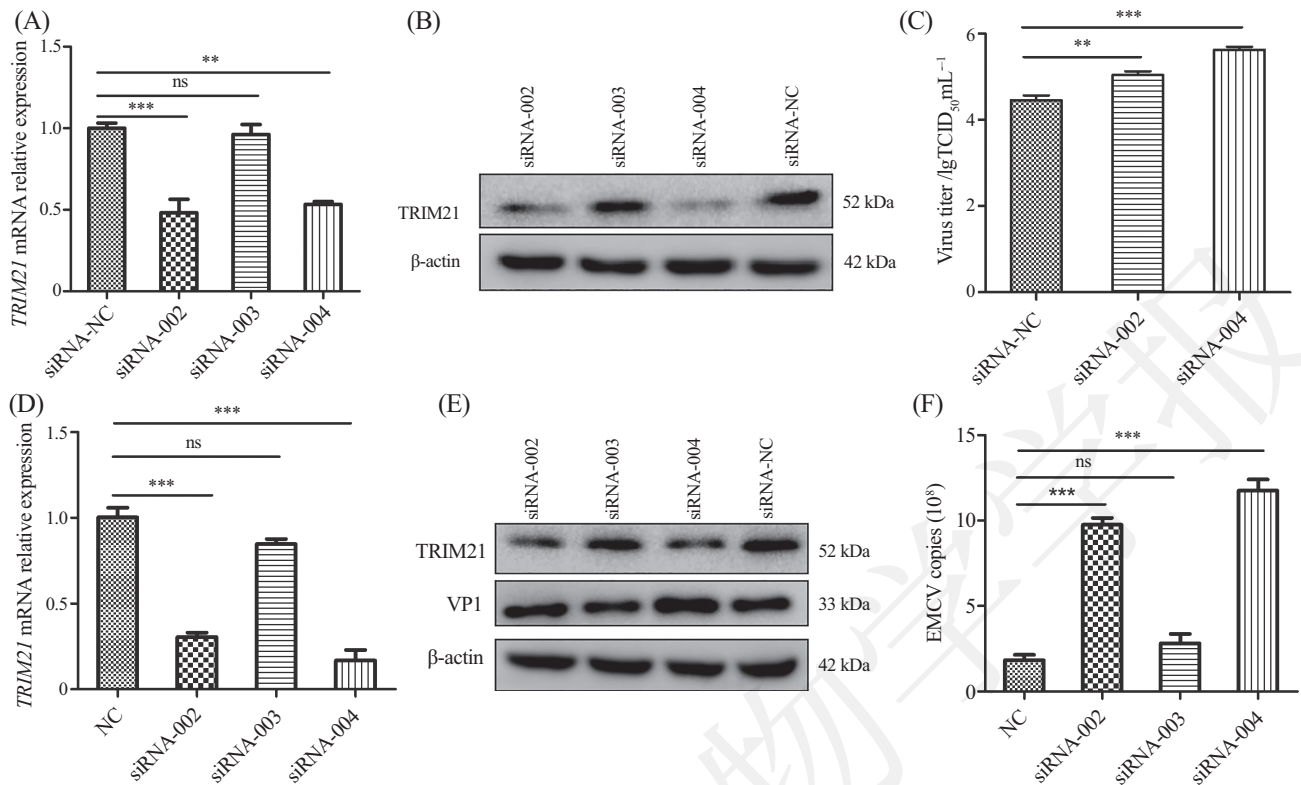


A、B: 在HEK293细胞中TRIM21 mRNA及蛋白表达; C、D: 胞外和胞内病毒滴度检测; E: 在HeLa细胞中TRIM21 mRNA表达; F: 在HeLa细胞中EMCV VP1蛋白表达; G: 在HeLa细胞中病毒拷贝数检测。“-”代表质粒未转染细胞, “+”代表质粒转染细胞, ns为 $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与pcDNA3.1组比较。

A,B: TRIM21 mRNA and protein expression in HEK293 cells; C,D: virus titer detection in extracellular and intracellular; E: TRIM21 mRNA expression in HeLa cells; F: EMCV VP1 protein expression in HeLa cells; G: virus copies test in HeLa cells. “-” indicates plasmids were untransfected in cells, “+” indicates plasmids were transfected in cells; ns indicates $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with pcDNA3.1 group.

图3 TRIM21过表达对EMCV感染的影响

Fig.3 Effect of TRIM21 overexpression on EMCV infection



A, B: 3对干扰序列siRNA-002、siRNA-003、siRNA-004转染HEK293细胞后, TRIM21 mRNA及蛋白表达; C: siRNA处理HEK293细胞后病毒滴度检测; D: siRNA处理HeLa细胞后TRIM21 mRNA检测; E、F: siRNA处理HeLa细胞后EMCV VP1蛋白及拷贝数检测。ns为 $P>0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A,B: TRIM21 mRNA and protein expression after three pairs RNA interference sequence, siRNA-002, siRNA-003, siRNA-004 treatment HEK293 cells; C: virus titer detection after siRNA treatment of HEK293 cells; D: TRIM21 mRNA expression after siRNA treatment of HeLa cells; E,F: EMCV VP1 protein and virus copies detection after siRNA treatment of HeLa cells; ns indicates $P>0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图4 TRIM21下调对EMCV感染的影响

Fig.4 Effect of TRIM21 downregulation on EMCV infection

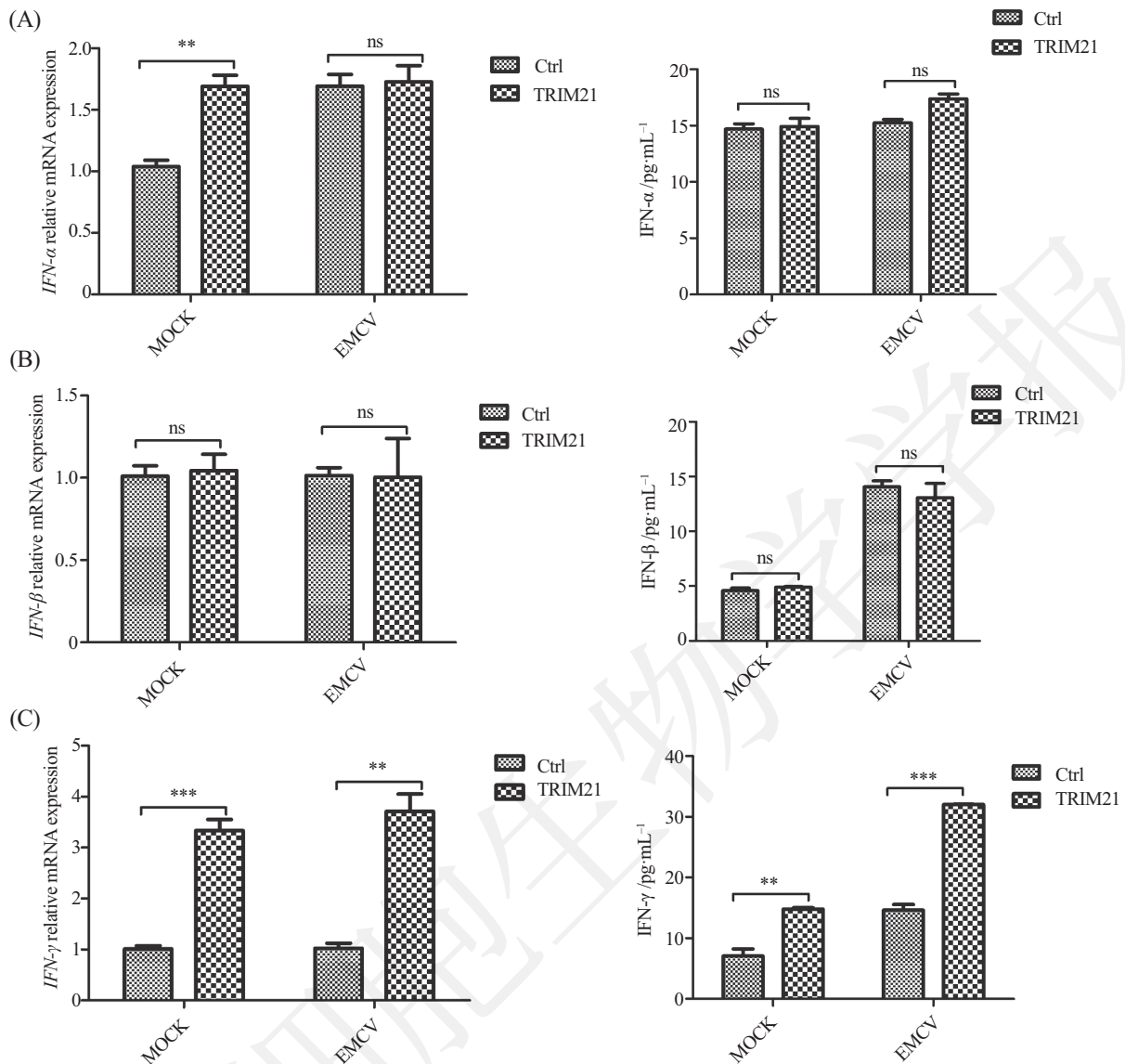
探索了TRIM21对EMCV激活的干扰素信号通路的影响。将过表达TRIM21的HEK293细胞进行EMCV感染,然后检测干扰素信号通路分子IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 的转录和蛋白表达情况。结果显示,TRIM21过表达对EMCV激活的IFN-I信号通路IFN α (图5A)、IFN β (图5B)的转录和蛋白都没有影响,但是可促进II型干扰素IFN- γ 的表达(图5C, $P<0.05$)。这一结果提示,TRIM21可能通过上调II-型干扰素抑制EMCV复制增殖。

2.5.2 TRIM21过表达对促炎细胞因子的影响 许多TRIM蛋白对促炎因子的表达具有调控作用,例如鱼TRIM8以及TRIM13能调节促炎因子的转录^[21-22]。为了验证人源TRIM21是否具有类似的功能,在TRIM21体外过表达情况下,检测两种促炎细胞因子的表达水平。TRIM21的过表达对EMCV刺激的TNF- α 的表达没有影响(图6A, $P>0.05$),但TRIM21过表达

可促进IL-6的mRNA的表达(图6B, $P<0.05$)。同时,ELISA实验也验证了过表达TRIM21能促进IL-6蛋白的表达。这一结果提示,外源性表达TRIM21对促炎因子具有一定的正调控作用,这与TRIM21的抗EMCV机制相关。

3 分析与讨论

脑心肌炎病毒是一种潜在的人畜共患病原体,在过去的70年里,该病毒在世界上许多国家都有发现,包括加拿大、南非、澳大利亚、韩国、中国等^[24-26]。由于EMCV是世界性的流行病之一,有必要进一步探索有效的预防和治疗措施。近年来,研究发现,TRIM家族蛋白具有多种生物学功能,包括转录调控、细胞分化、凋亡和肿瘤发生等参与多种细胞过程^[27]。同时也发现,许多具有E3泛素连接酶活性的TRIM蛋白具有抗病毒功能,尤其是对逆转录病毒具



A: 在EMCV未感染或感染HEK293细胞后, IFN-α mRNA及蛋白表达; B: 在EMCV未感染或感染HEK293细胞后, IFN-β mRNA及蛋白表达; C: 在EMCV未感染或感染HEK293细胞后, IFN-γ mRNA及蛋白表达。MOCK为EMCV未感染组, ns为 $P>0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: IFN-α mRNA and protein detection after EMCV treatment and untreated of HEK293 cells; B: IFN-β mRNA and protein detection after EMCV treatment and untreated of HEK293 cells; C: IFN-γ mRNA and protein detection after EMCV treatment and untreated of HEK293 cells. MOCK indicates uninfected EMCV group, ns indicates $P>0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

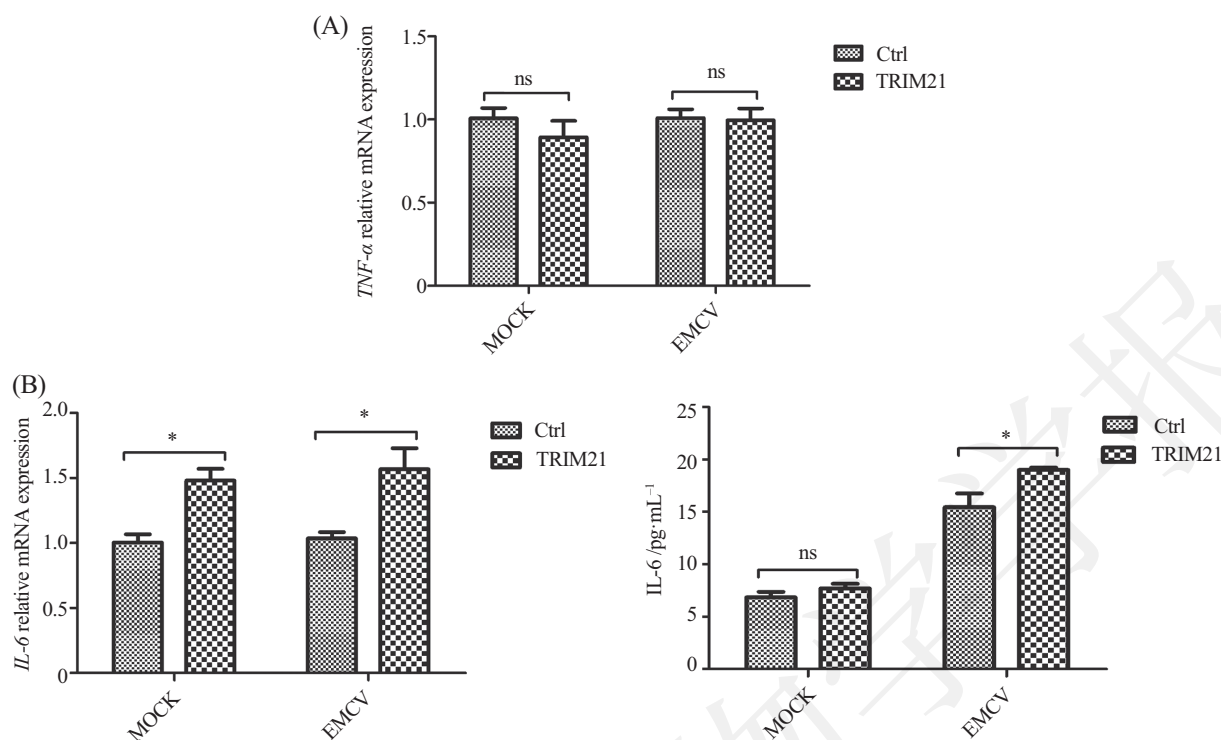
图5 TRIM21对干扰素通路的影响

Fig.5 Effect of TRIM21 to IFN signals

有限制作用, 此外, 它还参与固有免疫相关的生物学过程^[27]。例如, TRIM5α和TRIM22可以抑制HIV-1的感染^[28], TRIM41可以抑制病毒基因的转录来抑制HBV增强子I和增强子II核心启动子活性, 从而抑制HBV的感染^[29]。此外TRIM28能够与MMLV的引物结合位点结合沉默MMLV, 进而抑制病毒感染^[30]。因此, 研究TRIM21在EMCV感染宿主细胞中的作用具有一定的科学价值及意义。

前期实验发现, EMCV处理 HEK293细胞后,

TRIM21的转录水平和蛋白水平发生变化, 提示TRIM21很有可能与EMCV的复制增殖有关系。因此本文将pcDNA3.1-TRIM21重组质粒转染至HEK293和HeLa细胞后进行EMCV攻毒实验, 结果提示, TRIM21过表达组的病毒滴度、拷贝数及VP1蛋白均比对照组要低(图3), 说明体外过表达TRIM21可抑制EMCV的增殖; 与此同时, 为进一步证明TRIM21与EMCV的关系, 还进行了TRIM21的RNA干扰实验, 发现下调TRIM21后实验组病毒滴度、拷贝数及VP1



A: 在EMCV未感染或感染HEK293细胞后, *TNF-α* mRNA表达; B: 在EMCV未感染或感染HEK293细胞后, IL-6 mRNA及蛋白表达。MOCK为EMCV未感染组, ns为 $P>0.05$, $*P<0.05$ 。

A: *TNF-α* mRNA detection after EMCV treatment and untreated of HEK293 cells; B: IL-6 mRNA and protein detection after EMCV treatment and untreated of HEK293 cells. MOCK indicates uninfected EMCV group, ns indicates $P>0.05$, $*P<0.05$.

图6 TRIM21对炎症因子的影响

Fig.6 Effect of TRIM21 to pro-inflammatory factors

蛋白比阴性对照组高(图4), 说明下调TRIM21可促进病毒在细胞内的增殖。

TRIM家族中的许多蛋白能调控干扰素等信号通路, 进而对病毒感染进行正调控或负调控。为了阐明TRIM21对EMCV感染增殖的调控机制, 本实验对干扰素及炎症因子通路进行了初步的探索。TRIM21过表达后进行EMCV感染, 然后检测干扰素及促炎性因子mRNA和蛋白的表达。结果显示, TRIM21过表达对INF- α 和INF- β 没有影响(图5A和图5B), 但它明显促进了INF- γ 的表达(图5C)。INF- γ 属于免疫干扰素, 具有很强的免疫调节作用, 能激活免疫系统抵抗病原体的入侵^[31]。INF- γ 通过与细胞表面特异性受体IFNGR结合, 然后激活JAK-STAT信号通路并诱导ISG的表达。但与INF- α 是由病毒感染的细胞直接分泌并发挥抗病毒作用这一特性不同, INF- γ 的产生受被感染细胞分泌的IL-12和IL-18等炎性细胞因子的调节^[32-33]。李朵璐等^[34]在研究中发现, INF- γ 能抑制HBV的复制中间体并能降解HBV在复制过程中产生的前基因组RNA, 从而抑制了病毒

的复制。实验过程中还发现过表达TRIM21会促进炎症因子IL-6的表达(图6B)。IL-6被证明能够激活JAK1和STAT3信号通路^[35], 并且能增加巨噬细胞增强对病毒的吞噬能力, 进而对流感病毒导致的肺损伤具有修复作用^[36]。本文中TRIM21可能通过促进IL-6的表达激活下游信号通路, 从而抑制了EMCV的复制, 但具体的抑制机制还需进一步验证。

本实验证明, TRIM21通过促进INF- γ 的表达降低了EMCV的复制, 但是INF- γ 如何抑制EMCV的复制过程还不明确。此外, TRIM21过表达对促炎因子IL-6具有调节作用。上述结果提示, TRIM21可能激活干扰素信号通路进而抑制病毒的增殖。TRIM21抑制病毒增殖的机制还需更深入的研究, 同时, 在后期的研究中我们还需验证TRIM21是否与EMCV的某些病毒蛋白存在相互作用进而抑制病毒增殖。

参考文献 (References)

- 1 陆承平. 兽医微生物学, 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2006,

- 559-64.
- 2 Reddacliff LA, Kirkland PD, Hartley WJ, Reece RL. Encephalomyocarditis virus infections in an australian zoo. *J Zoo Wildl Med* 1997; 28(2): 153-7.
- 3 Carocci M, Bakkali-Kassimi L. The encephalomyocarditis virus. *Virulence* 2012; 3(4): 351-67.
- 4 Jun HS, Yoon JW. A new look at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19 (1): 8-31.
- 5 Gelmetti D, Meroni A, Brocchi E. Pathogenesis of encephalomyocarditis experimental infection in young piglets: a potential animal model to study viral myocarditis. *Vet Res* 2006; 37 (1): 15-23.
- 6 白娟, 蒋康富, 李玉峰. 猪脑心肌炎病毒NJ08株基因组序列测定与分析. *中国预防兽医学报*(Bai Juan, Jiang Kangfu, Li Yufeng. Genome sequencing and analysis of porcine cerebral myocarditis virus NJ08 strain. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*) 2011; 33(5): 402-4.
- 7 Qin SM, Darren U, Luke D. Evaluation of a duplex reverse-transcription real-time PCR assay for the detection of encephalomyocarditis virus. *J Vet Diagn Invest* 2018; 30(4): 554 -9.
- 8 Murnane TG, Craighead JE, Mondragon H. Fatal disease of swine due to encephalomyocarditis virus. *Science* 1960; 131(3399): 498-9.
- 9 Ozato K, Shin DM, Chang TH, Morse HC. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(11): 849-60.
- 10 Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, *et al.* The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J* 2001; 20(9): 2140-51.
- 11 Ramisha K, Amna K, Amjad A, Muhammad I. The interplay between viruses and TRIM family proteins. *Rev Med Virol* 2019; 29(2): e2028.
- 12 Torok M, Etkin LD. Two B or not two B? overview of the rapidly expanding B-box family of proteins. *Differentiation* 2001; 67(3): 63-71.
- 13 Oke V, Wahren-Herlenius M. The immunobiology of Ro52 (TRIM21) in autoimmunity: a critical review. *J Autoimmun* 2012; 39(1/2): 77-82.
- 14 Xue BB, Li HY, Guo MM, Wang JJ. TRIM21 promotes innate immune response to RNA viral infection through Lys27-linked polyubiquitination of MAVS. *J Virol* 2018; 92(14): pii: e00321-18.
- 15 Zhang Z, Bao M, Lu N, Weng L, Yuan B, Liu YJ. The E3 ubiquitin ligase TRIM21 negatively regulates the innate immune response to intracellular double-stranded DNA. *Nat Immunol* 2013; 14(2): 172-8.
- 16 Zhang KL, Zhang YF, Xue J, Meng QW. DDX19 inhibits type I interferon production by disrupting TBK1-IKK ϵ -IRF3 Interactions and promoting TBK1 and IKK ϵ degradation. *Cell Rep* 2019; 26(5): 1258-72.
- 17 Riho K, Atsushi T, Tomo Y, Hidetoshi I. TRIM39R, but not TRIM39B, regulates type I interferon response. *Biochem Bioph Res Co* 2013; 436(1): 90-5.
- 18 Higgs R, Ni GJ, Ben LN, Breen EP, Fitzgerald KA, Jefferies CA. The E3 ubiquitin ligase Ro52 negatively regulates IFN-beta production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation of IRF3. *J Immunol* 2008; 181(3): 1780-6.
- 19 Quinting B, Robert B, Letellier C. Development of a 1-step enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid diagnosis of bovine respiratory syncytial virus in postmortem specimens. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19(3): 238-43.
- 20 Zhang HX, Feng RF, Wang D. Establishment and application of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of encephalomyocarditis virus. *J Microbiol Immunol* 2013; 9(33): 706-10.
- 21 Huang YH, Yu YP, Yang Y, Yang M, Zhou LL, Huang XH, *et al.* Fish TRIM8 exerts antiviral roles through regulation of the proinflammatory factors and interferon signaling. *Fish Shellfish Immun* 2016; 54: 435-44.
- 22 Huang YH, Yang M, Yu YP, Yang Y, Zhou LL, Huang XH, *et al.* Grouper TRIM13 exerts negative regulation of antiviral immune response against nodavirus. *Fish Shellfish Immun* 2016; 55: 106-15.
- 23 燕杰. E3泛素连接酶TRIM4和TRIM21调节细胞抗病毒天然免疫信号转导的机制. 武汉大学(博士学位论文), 2012.
- 24 Czechowicz J, Huaman JL, Forshey BM, Morrison AC, Castillo R, Huaman A, *et al.* Prevalence and risk factors for encephalomyocarditis virus infection in Peru. *Vector-Borne Zoonot* 2011; 11(4): 367-74.
- 25 Oberste MS, Gotuzzo E, Blair P, Nix WA, Ksiazek TG, Comer JA, *et al.* Human febrile illness caused by encephalomyocarditis virus infection, peru. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(4): 640-6.
- 26 Ge X, Zhao D, Liu C, Wang F, Guo X, Yang H. Seroprevalence of encephalomyocarditis virus in intensive pig farms in China. *Vet Rec* 2010; 166(5): 145-6.
- 27 Meroni G, Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* 2005; 27(11): 1147-57.
- 28 Singh R, Patel V, Mureithi MW, Naranbhai V, Ramsuran D, Tulsi S, *et al.* TRIM5 α and TRIM22 are differentially regulated according to HIV-1 infection phase and compartment. *J Virol* 2014; 88(8): 4291-303.
- 29 Zhang S, Guo JT, Wu JZ, Yang G. Identification and characterization of multiple TRIM proteins that inhibit hepatitis B virus transcription. *PLoS One* 2013; 8(8): e70001.
- 30 Wolf D, Goff SP. TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells. *Cell* 2007; 131(1): 46-57.
- 31 汪春彦. 金荞麦对克雷伯杆菌肺炎大鼠的保护作用及其机制. 安徽医科大学(硕士学位论文), 2011.
- 32 Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv immunol* 2007; 96: 41-101.
- 33 Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr opin immunol* 1998; 10(3): 259-64.
- 34 李朵璐. 人IFN- γ 在表达HBsAg肝细胞中的特异性表达及其体外抑制乙肝病毒的作用. 郑州大学(博士学位论文), 2010.
- 35 Zhang XX, Yang J, Bian ZG, Shi D, Cao ZW. Long noncoding RNA DANCR promotes nasopharyngeal carcinoma progression by interacting with STAT3,enhancing IL-6/JAK1/STAT3 signaling. *Biomed Pharmacother* 2019; 113: 108713.
- 36 Yang ML, Wang CT, Yang SJ, Leu CH, Chen SH, Wu CL, *et al.* IL-6 ameliorates acute lung injury in influenza virus infection. *Sci Rep* 2017; 7: 43829.