鸡TRIM25蛋白可促进宿主对禽流感病毒的自然免疫应答

曲楠楠, 陈祖贤, 赵冰兵, 刘伟强, 刘智婷, 王霞, 何婉婷, 瞿孝云, 焦培荣*

华南农业大学兽医学院, 人兽共患病防控剂国家地方联合工程实验室, 农业部兽用疫苗创制重点实验室, 广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广州 510642

* 联系人, E-mail: prjiao@scau.edu.cn

收稿日期: 2018-11-05; 接受日期: 2018-11-29; 网络版发表日期: 2018-12-12

“十三五”国家重点研发计划专项(批准号: 2016YFD0500207)和国家自然科学基金(批准号: 31872497)资助

摘要 TRIM家族蛋白在抗病毒天然免疫中发挥着重要作用。然而, 鸡TRIM25(chicken tripartite motif25, chTRIM25)蛋白对禽流感病毒复制的影响仍不明确。本文旨在克隆chTRIM25基因并初步分析其功能。首先应用RT-PCR方法, 从鸡成纤维细胞(chicken embryo fibroblast, CEF)中扩增chTRIM25基因。序列分析发现, chTRIM25基因可读框全长1902 bp, 编码633个氨基酸, 预测其分子量为71.42 kD。结构预测发现, chTRIM25蛋白的21~66位氨基酸为RING结构域, 110~146位氨基酸为B-box1结构域, 160~189位氨基酸为B-box2结构域, 208~311位氨基酸则为卷曲螺旋结构域, 465~633位氨基酸则为B30.2结构域。同源性分析发现, 鸡TRIM25与鸭和鹅TRIM25氨基酸序列同源性在74%~77%, 具有较高的同源性; 而鸡TRIM25与人和鼠TRIM25的氨基酸序列同源性在46%左右, 同源性较低。荧光定量实验发现, 在禽流感病毒感染CEF后, TRIM25及相关抗病毒相关因子的表达量上调; 也发现, TRIM25可以促进流感病毒对天然免疫信号通路的激活。这为深入了解TRIM25基因在禽流感病毒感染宿主后激发的宿主抗病毒天然免疫应答提供实验基础。

关键词 禽流感病毒, 鸡TRIM25, 鉴定, 天然免疫应答

禽流感(avian influenza, AI)是由正黏病毒科A型病毒属中的禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)引起的禽类传染病^[1]。根据流感病毒表面血凝素HA和神经氨酸酶NA的不同, HA可分为18个亚型(H1~H18), NA可分为11个亚型(N1~N11)^[2]。根据其致鸡的致病性不同, 禽流感分为高致病性禽流感(highly pathogenic avian influenza, HPAI)和低致病性禽流感(low pathogenic avian influenza, LPAI)。其中, 大多数H5和H7亚型

禽流感病毒感染禽类后表现出高致病性和高致死率。

流感病毒感染宿主后会诱导宿主的抗病毒天然免疫应答, 而天然免疫是机体抵御病原体的第一道防线, I型干扰素信号通路作为天然免疫系统的重要组成部分, 在抗病毒反应中扮演着重要的角色, 而TRIM(Tripartite motif)蛋白又是天然免疫应答中重要的抗病毒蛋白, 在宿主抗病毒天然免疫中起着非常重要的作用。目前在人类的基因组中已经发现了80多个TRIM蛋

引用格式: 曲楠楠, 陈祖贤, 赵冰兵, 等. 鸡TRIM25蛋白可促进宿主对禽流感病毒的自然免疫应答. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 1273–1278
Qu N N, Chen Z X, Zhao B B, et al. Chicken TRIM25 protein promotes host antiviral innate immune response to avian influenza virus in chicken fibroblast cells (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 1273–1278, doi: [10.1360/N052018-00250](https://doi.org/10.1360/N052018-00250)

白^[3], 尽管TRIM蛋白有相同的结构域, 但不同的TRIM蛋白发挥着不同的作用. 例如与HIV相关联的TRIM5 α 蛋白^[4]、与天然免疫RIG- I 通路相关的TRIM23和TRIM25蛋白^[5,6]以及与转录调控相关的TRIM28蛋白^[7]等. 目前对人和鼠TRIM25蛋白的研究较为深入, 但对鸡TRIM25(chicken tripartite motif25, chTRIM25)蛋白的相关研究较少, 因此, 本文克隆了鸡TRIM25蛋白并对其初步分析, 为后续深入了解TRIM家族蛋白在抗病毒天然免疫应答中发挥的作用提供实验基础.

1 材料与方法

1.1 材料

9~11日龄的SPF鸡胚购于广东温氏大华农生物科技有限公司(中国); 高保真酶Pfx, PBS粉剂、无血清培养基Opti-MEM、高糖DMEM培养基、Gibco胎牛血清为Invitrogen公司产品(美国); T4 DNA连接酶、pMD-18T, dNTPs, DNA Marker DL2000和DL5000为TaKaRa公司(日本)的产品; PCR产物琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒和普通质粒抽提试剂盒为天根生化科技有限公司的产品(中国); 10000 U/mL的青霉素和10000 U/mL的链霉素为华北制药集团有限公司的产品(中国); 限制性内切酶Xho I和Sma I为NEB公司(美国)的产品; 宿主菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为TaKaRa公司(日本)的产品; 锥形瓶、漏斗、剪刀、镊子、平皿、纱布、60 cm²平皿、细胞六孔板、琼脂粉、酵母提取物(yeast extra)、蛋白胶试剂盒和蛋白胨为北京鼎国昌盛生物技术有限公司的产品(中国); 0.25%胰酶为Sigma公司(德国)产品; 蛋白裂解液(lysis buffer)为碧云天生物技术有限公司的产品(中国); RNeasy plus Mini试剂盒、QuantiFast SYBR Green PCR试剂盒为Qiagen公司的产品(德国); 转染试剂Lipofectamine2000为Invitrogen公司(美国)的产品; TRIM25一抗为Abcam公司(英国)的产品. 本实验所用禽流感病毒A/Duck/Guangdong/212/2004(H5N1亚型, 简称GD212)由本实验室保存, 人胚肾293T细胞、CEF鸡胚成纤维细胞由本实验室保存.

1.2 方法

(1) 引物合成. 利用DNASar Lasogene7.1基因分析

软件分析GenBank中鸡TRIM25全基因序列(登录号: NM_001318458), 用Oligo7.0设计针对鸡TRIM25的特异性引物. 引物信息见表1.

(2) 总RNA的提取及反转录. 选取发育状况良好的9~11日龄的SPF鸡胚制作成鸡成纤维细胞(CEF), 待细胞长至80%~90%时, 用PBS缓冲液洗三遍后用禽流感病毒以50TCID₅₀/孔的剂量感染细胞, 于37℃恒温CO₂培养箱中作用2 h; 2 h后弃去病毒液, 加入含2%血清的DMEM于37℃恒温CO₂培养箱进行培养. 16 h后使用Qiagen公司的RNeasy plus Mini Kit试剂盒抽提总RNA, 接着参照Promega公司的M-MLV反转录酶的说明书进行反转录, 取总RNA 41 μ L, 加入RNA酶抑制剂1 μ L, 5 $\times$ M-MLV缓冲溶液16 μ L, R:O(random primer和oligo dT混合物)4 μ L, dNTP(2.5 mmol/ μ L)16 μ L, M-MLV反转录酶2 μ L于37℃水浴锅中水浴3 h.

(3) PCR扩增、序列测定及真核表达载体的构建. 按照Pfx酶说明书的推荐体系, 扩增鸡的TRIM25片段. PCR反应条件: 94℃预变性2 min, 1个循环; 94℃变性15 s, 56℃退火30 s, 68℃延伸2 min, 运行35个循环; 68℃终延伸3 min. PCR反应产物用DNA凝胶纯化试剂盒回收后送测序. 以chTRIM25的cDNA为模板, 用N-端Sma I, C-端Xho I酶切位点的特异性引物扩增得到含有酶切位点的chTRIM25基因. 将该片段酶切后连接到真核表达载体pCAGGS上, 连接转化及筛选后获得pCAGGS-chTRIM25质粒, 而后用琼脂糖凝胶电泳验证该质粒大小是否与预期一致.

(4) chTRIM25的生物信息学分析. 使用DNASTAR 7.0软件对鸡TRIM25与人、鼠、鸭和鹅的同源性进行比较分析, 同时绘制进化树. 使用SMART在线分析软件预测其结构域.

(5) CEF的制备和chTRIM25的过表达. 将锥形瓶、漏斗、剪刀、镊子、平皿、纱布及PBS高压灭菌后待用; 选取发育状况良好的9~11日龄的SPF鸡胚, 在生物安全柜中用酒精棉球擦拭蛋壳两次后敲碎蛋壳, 除去壳膜, 夹出鸡胚, 放入高压灭菌过的平皿中; 用PBS清洗鸡胚, 去除鸡胚的头部、四肢和内脏, 剩余的胚体用PBS清洗后置于高压灭菌过的烧杯中; 将胚体用剪刀剪碎; 向剪碎的胚体中加入适量的胰酶摇匀后用刻度吸管将其转移至50 mL的离心管中, 于37℃恒温CO₂培养箱中消化30 min, 每15 min摇匀一次; 30 min后, 以1000 r/min的转速离心5 min, 弃上层清液;

表 1 本研究所用的克隆引物

引物名称	核苷酸序列(5'→3')
chTRIM25-F	CAAATGGCGACGTTGACC
chTRIM25-R	ACATTACCAGAGAGAGAACA

向沉淀物中加入适量的DMEM培养基, 吹打混匀后将其转移到垫有四层纱布的漏斗中过滤; 将滤下的细胞均分于60 cm²平皿或96孔中, 并向其中加入血清浓度为10%的血清, 将铺好的细胞置于37℃恒温CO₂培养箱中培养, 待用。

转染前一天, 将293T细胞铺6孔细胞板, 使每孔细胞量约为4×10⁵~8×10⁵; 当细胞密度达到80%~90%时转染; 分别用250 μL Opti-MEM稀释3 μg的pCAGGS-chTRIM25质粒和10 μL的Lipofectamine 2000, 加入脂质体后先静置5 min, 5 min后将含有脂质体的Opti-MEM加入到含有质粒的Opti-MEM中, 吹打混匀, 室温下孵育20 min; 20 min后将混合液加入到六孔板的一个孔中, 轻轻晃动使其在孔中均匀分布; 将细胞板置于37℃培养箱中培养。

(6) 实时荧光定量PCR. 用50TCID₅₀/孔剂量的禽流感病毒感染鸡成纤维细胞和过表达chTRIM25的CEF细胞, 在病毒感染16 h后提取细胞的总RNA, 接着将其反转录成cDNA, 继而用qRT-PCR的方法检测鸡CEF细胞和过表达chTRIM25基因后的鸡CEF细胞在病毒激活后的宿主细胞内抗病毒相关因子表达情况。靶基因与内参基因(β-action)的比率计算根据2^{-ΔΔC_t}公式。标准偏差(SD)通过三次重复实验的数据计算得到。统计分析使用GraphPad Prism 5软件(GraphPad Software Inc., 美国)。

2 结果

2.1 chTRIM25片段和载体的PCR结果

chTRIM25分子扩增的产物经过琼脂糖凝胶电泳分析, 可见扩增出一条长约为1902 bp的目的片段(图1)。将该片段送至生物公司测序获得该片段的基因序列, 接着应用NCBI GenBank中的BLAST对比该基因是否与数据库中预测的鸡TRIM25序列相一致, 比对结果显示本研究克隆的chTRIM25基因是正确的。chTRIM25基因克隆到真核表达载体pCAGGS上, 筛选得到pCAGGS-chTRIM25阳性质粒, 用琼脂糖凝胶电泳鉴

图 1 鸡TRIM25基因扩增结果和pCAGGS-chTRIM25阳性质粒鉴定结果

M1: DL2000; M2: DL15000; 1: 鸡TRIM25基因; 2: pCAGGS; 3: pCAGGS-chTRIM25真核表达质粒

定该阳性质粒, 可见一条长约为6650 bp的目的片段(图1), 将该克隆质粒送至英俊测序公司测序进一步确认其是正确的。

2.2 chTRIM25片段的序列分析

序列分析发现, chTRIM25的可读框全长为1902 bp, 编码633个氨基酸, 预测分子量为71.42 kD。通过用SMART软件对其分析, 发现21~66位氨基酸为RING结构域, 110~146位氨基酸为B-box1结构域, 160~189位氨基酸为B-box2结构域, 208~311位氨基酸则为卷曲螺旋结构域(coiled coil domain, CCD), 465~633位氨基酸则为PRY和SPRY构成的B30.2结构域(图2)。

2.3 chTRIM25遗传进化分析

通过比对鸡TRIM25与其他物种TRIM25基因氨基酸序列同源性发现: 鸡TRIM25与鸭TRIM25氨基酸序列同源性为74.8%, 与鹅TRIM25氨基酸序列同源性为77.3%, 而鸡TRIM25与人TRIM25的氨基酸序列同源性为47.7%, 与鼠TRIM25氨基酸序列同源性为46.5%。系统进化树分析也可以看出, 鸡TRIM25与鸭、鹅的亲缘关系较近, 与人、鼠的亲缘关系较远(图3)。

2.4 chTRIM25基因的外源性表达

将pCAGGS-chTRIM25质粒及pCAGGS空载体分别转染到293T细胞, 48 h后用Western-blot方法检测蛋白的表达情况。如图4所示, 在转染了pCAGGS-chTRIM25质粒的293T细胞中, 可以检测到目的条带

图2 鸡TRIM25结构示意图(网络版彩图)

图3 不同动物TRIM25基因遗传进化树

图4 鸡TRIM25蛋白Western-blot检测结果

A: Western-blot: Anti-GAPDH; B: Western-blot: Anti-chTRIM25. M: 蛋白Marker; 1: pCAGGS-chTRIM25真核表达质粒; 2: pCAGGS; 3: 空白对照

及GAPDH内参, 而转染了空载体pCAGGS的293T细胞及空细胞并未有目的条带但仍然可以检测到GAPDH内参。以上结果表明, 本实验所构建的真核表达质粒pCAGGS-chTRIM25可以在293T细胞中正常表达, 且能表达出约72 kD的目的蛋白(图4)。

2.5 禽流感病毒感染后诱导的天然免疫应答

用50TCID₅₀剂量的H5N1亚型禽流感病毒GD212感染CEF细胞, 结果表明, 宿主抗病毒蛋白基因(*MDA5*, *TRIM25*, *MX1*, *OAS*和*TLR3*)和细胞因子(*IFN-β*)的表达量有所升高(图5); 用50TCID₅₀剂量的H5N1亚型禽流感病毒GD212感染过表达chTRIM25的CEF细胞, 结果发现*IFN-β*, *MDA5*, *MX1*, *OAS*及*TLR-3*的表达量明显上调(图6)。

3 讨论

研究发现, 当A型流感病毒感染宿主后, 会诱导宿主的抗病毒天然免疫应答。细胞抗病毒天然免疫是机体抵御病毒入侵的第一道防线, 具有反应快、普遍性、多样性等特点。近年来发现, 很多TRIM蛋白通过介导I型干扰素的产生来参与天然免疫^[8,9], 这暗示着TRIM蛋白在抗病毒免疫中会发挥重要的作用。TRIM家族部分蛋白主要通过其E3泛素酶活性调控I型干扰素通路中关键分子的泛素化, 从而影响其功能或蛋白丰度。TRIM蛋白除了参与细胞增殖、细胞凋亡和microRNA活化等, 也在抗病毒相关信号通路中扮演着

图5 禽流感病毒感染CEF细胞后抗病毒相关基因的表达

重要的角色^[10,11]。

TRIM家族的名称是由于其具有3个保守的结构域而得名, 从N-端到C-端依次为RING结构域(RING区域)、1个或2个B-box结构域、1个卷曲螺旋结构域(coiled-coil 区域), 此外该家族还具有一个可变的C末端, 因此TRIM家族也称为RBCC家族。C端结构域包括COS盒、B30.2结构域、纤维连接蛋白3(FN3)、植物

图 6 禽流感病毒感染过表达chTRIM25的CEF细胞后抗病毒相关基因的表达

通源结构域(plant homeodomain, PHD)、跨膜结构域(transmembrane domain, TM)等。最常见的C端结构域是B30.2结构域, 它是由长约61个氨基酸残基的PRY结构域和140个氨基酸残基的SPRY结构域融合在一起形成的, 该结构域可能参与蛋白间的互作。其C端的结构域具有多样性, 它很有可能既是特殊的E3连接酶, 同时又起着分子骨架的作用。人和鼠TRIM25结构域分析发现: 11~65位氨基酸为RING结构域, 102~150位氨基酸为B-box1结构域, 150~191位氨基酸为B-box2结构

域, 255~425位氨基酸则为卷曲螺旋结构域, 450~630位氨基酸则为B30.2结构域, 由此可见人、鼠的TRIM25和鸡TRIM25的结构类似。但是, 鸡TRIM25与人、鼠TRIM25基因氨基酸序列同源性分析发现: 鸡TRIM25与人、鼠TRIM25的氨基酸序列同源性相差较大。系统进化树分析也可见, 鸡TRIM25与鸭、鹅的亲缘关系较近, 与人、鼠的亲缘关系较远。

研究发现, TRIM25可以泛素化RNA受体视黄酸诱导基因- I (RIG- I)的N末端, 从而激活RIG- I与下游接头分子MAVS结合, 参与线粒体MAVS抗病毒信号通路, 最后诱导I型干扰素(interferon, IFN)的产生从而抑制病毒复制^[12]。TRIM蛋白在人和鼠中研究较多, 但在禽类动物中研究甚少^[13,14]。本研究发现, 在感染禽流感病毒的鸡成纤维细胞中主要的抗病毒蛋白(MDA5, TRIM25, MX1, OAS及TLR3)和细胞因子(IFN-β)的表达量有所升高。继而用50TCID₅₀剂量的禽流感病毒感染过表达chTRIM25的鸡成纤维细胞, 用qRT-PCR的方法检测过表达chTRIM25基因的鸡成纤维细胞在病毒激活后的宿主抗病毒相关因子的表达量, 发现过表达TRIM25后, TLR-3, MDA5, MX1, OAS及IFN-β的表达量明显上调, 说明TRIM25可以促进I型干扰素介导的抗病毒天然免疫应答, 但其具体作用机制尚有待进一步研究。

参考文献

- 甘孟侯. 禽流感. 第二版. 北京: 中国农业出版社, 2002. 9
- Le T H, Nguyen N T B. Evolutionary dynamics of highly pathogenic avian influenza A/H5N1 HA clades and vaccine implementation in Vietnam. *Clin Exp Vaccine Res*, 2014, 3: 117
- 李洋. TRIM蛋白发挥泛素连接酶活性机制的结构研究. 北京: 清华大学, 2014
- Berthou L, Sebastian S, Sokolskaja E, et al. Cyclophilin A is required for TRIM5-mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 14849–14853
- Arimoto K, Funami K, Saeki Y, et al. Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 15856–15861
- Li M M H, Lau Z, Cheung P, et al. TRIM25 enhances the antiviral action of zinc-finger antiviral protein (ZAP). *PLoS Pathog*, 2017, 13: e1006145
- Wolf D, Hug K, Goff S P. TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of Lys1,2 tRNA-utilizing retroviruses in embryonic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 12521–12526
- Carthagen L, Bergamaschi A, Luna J M, et al. Human TRIM gene expression in response to interferons. *PLoS ONE*, 2009, 4: e4894
- Rajsbaum R, Stoye J P, O'Garra A. Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells. *Eur J Immunol*, 2008, 38: 619–630
- Meroni G, Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays*, 2005, 27: 1147–1157

- 11 Schwamborn J C, Berezikov E, Knoblich J A. The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell*, 2009, 136: 913–925
- 12 Castanier C, Zemirli N, Portier A, et al. MAVS ubiquitination by the E3 ligase TRIM25 and degradation by the proteasome is involved in type I interferon production after activation of the antiviral RIG-I-like receptors. *BMC Biol*, 2012, 10: 44
- 13 Inoue S, Orimo A, Hosoi T, et al. Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a RING finger protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 11117–11121
- 14 Inoue S, Urano T, Ogawa S, et al. Molecular cloning of rat efp: expression and regulation in primary osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 261: 412–418

Chicken TRIM25 protein promotes host antiviral innate immune response to avian influenza virus in chicken fibroblast cells

QU NanNan, CHEN ZuXian, ZHAO BingBing, LIU WeiQiang, LIU ZhiTing, WANG Xia, HE WanTing, QU XiaoYun & JIAO PeiRong

College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University; the National and Regional Joint Engineering Laboratory for Medicament of Zoonosis Prevention and Control; the Key Laboratory of Animal Vaccine Development, Ministry of Agriculture; the Key Laboratory of Zoonoses Control and Prevention of Guangdong, Guangzhou 510642, China

TRIM family proteins play an important role in antiviral innate immunity. However, the function of chicken TRIM25 (chTRIM25) protein remains unclear. In this study, we cloned the full-length of chTRIM25 gene and analyzed its function. Sequence analysis revealed that chicken TRIM25 contained a 1902-bp open-reading frame that probably encodes a 633-amino acid protein with a molecular weight of 71.42 kD. Structural analysis demonstrated that the chTRIM25 protein had a RING finger domain (amino acids 21–66), B-box1 (amino acids 110–146), B-box2 (amino acids 160–189), a coiled-coil region (amino acids 208–311) and B30.2 domain (amino acids 465–633). The homology analysis showed that the amino acid sequence homology of chicken TRIM25 with duck and goose TRIM25 was from 74% to 77%, while the amino acid sequence homology of chicken TRIM25 with human and mouse TRIM25 was about 46%. We further found that chTRIM25 promoted type I interferon-mediated immune response to avian influenza virus in chicken fibroblast cells. This study will help us to further understand the host antiviral innate immune response to avian influenza virus in chickens.

avian influenza virus, chicken TRIM25, characterization, innate immune response

doi: [10.1360/N052018-00250](https://doi.org/10.1360/N052018-00250)