网络出版时间:2025-12-05 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.06.002

TRIM21调控Ⅱ型干扰素信号通路抑制脑心肌炎病毒在RAW264.7巨噬细胞中的增殖

邵帅[1,2],刘明启[1,2],范益阳[1,2],纪晓岚[1,2],柏家林[2,3,4],李琼毅[1,3,4]

(1 西北民族大学 细胞基质疫苗关键技术与产业化教育部工程研究中心,甘肃 兰州,730030;2 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,甘肃 兰州,730030;3 西北民族大学 生命科学与工程学院,甘肃 兰州,730030;4 甘肃省动物细胞技术创新中心,甘肃 兰州,730030)

[摘 要] 【目的】探究TRIM21调控脑心肌炎病毒(EMCV)复制增殖机制与JAK1-STAT1信号通路的关系。【方法】用Western Blot和RT-qPCR,检测EMCV感染小鼠RAW264.7巨噬细胞后内源性TRIM21的变化;Western Blot、RT-qPCR和$TCID_{50}$法检测RAW264.7巨噬细胞过表达或敲低表达TRIM21的效果,以及对EMCV复制增殖的影响;半定量PCR和ELISA法检测固有免疫应答中细胞因子的变化;采用半定量PCR和Western Blot法,检测RAW264.7巨噬细胞过表达或敲低表达TRIM21并感染EMCV后对JAK-STAT信号通路的影响。【结果】EMCV感染RAW264.7巨噬细胞后,内源性TRIM21表达增加,说明TRIM21参与EMCV的复制增殖过程;Western Blot、RT-qPCR和病毒滴度检测结果表明,TRIM21过表达抑制EMCV复制增殖;TRIM21未参与病毒的吸附和侵入过程,但可抑制病毒释放;EMCV感染RAW264.7巨噬细胞后可诱导产生IFN-γ,并促进JAK1、STAT1和IRF9表达。【结论】TRIM21通过抑制子代病毒释放并诱导RAW264.7巨噬细胞分泌IFN-γ,激活JAK1-STAT1信号通路,以抑制EMCV病毒蛋白的复制增殖。

[关键词] 脑心肌炎病毒;固有免疫应答;TRIM21;IFN-γ

[中图分类号] S855.3 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)06-0008-12

Regulatory effect of TRIM21 on the type Ⅱ interferon signaling pathway to inhibit the proliferation of encephalomyocarditis virus in RAW264.7 cells

SHAO Shuai[1,2],LIU Mingqi[1,2],FAN Yiyang[1,2],JI Xiaolan[1,2],
BAI Jialin[2,3,4],LI Qiongyi[1,3,4]

(1 *Engineering Research Centre of Ministry of Education for Key Technology and Industrialisation of Acellular Matrix Vaccine, Northwest Minzu University, Lanzhou, Gansu* 730030, *China*; 2 *Key Laboratory of Biotechnology and Bioengineering of State Ethnic Affairs Commission, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou, Gansu* 730030, *China*; 3 *School of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou, Gansu* 730030, *China*; 4 *Gansu Tech Innovation Center of Animal Cell, Lanzhou, Gansu* 730030, *China*)

Abstract: 【Objective】This research aims to investigate the relationship between the mechanism by which TRIM21 regulates the replication and proliferation of encephalomyocarditis virus (EMCV) and JAK1-STAT1 signalling pathway.【Method】Western Blot and RT-qPCR were used to detect the changes of endogenous

[收稿日期] 2025-04-01 [修回日期] 2025-05-15
[基金项目] 甘肃省自然科学基金项目(23JRRA720)
[作者简介] 邵帅(1998—),女(达斡尔族),内蒙古呼伦贝尔人,在读硕士,主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail:ss17695931107@163.com
[通信作者] 李琼毅(1980—),女,甘肃兰州人,教授,博士,主要从事分子病原生物学研究。E-mail:lqy@xbmu.edu.cn

TRIM21 after the mouse RAW264.7 macrophages were infected by EMCV. Western Blot, RT-qPCR, and $TCID_{50}$ were used to detect the effects of overexpression or knockdown of TRIM21 and their impact on EMCV replication and proliferation. Semi-quantitative PCR and ELISA were used to detect the changes of cytokines in the intrinsic immune response; semi-quantitative PCR and Western Blot were used to detect the effect of overexpression or knockdown of TRIM21 in RAW264.7 macrophages infected with EMCV on the JAK-STAT signalling pathway.【Result】Endogenous TRIM21 expression was upregulated after EMCV infection of RAW264.7 macrophages, suggesting that TRIM21 was involved in the replication and proliferation process of EMCV. Western Blot, RT-qPCR and viral titre assay showed that TRIM21 overexpression inhibited the replication and proliferation of EMCV. TRIM21 was not involved in the adsorption and invasion process of virus, but it inhibited virus release. EMCV infection of RAW264.7 macrophages induced the production of IFN-γ and promoted the expression of JAK1, STAT1 and IRF9.【Conclusion】TRIM21 inhibited the replication and proliferation of EMCV viral proteins by inhibiting the release of progeny virus and inducing RAW264.7 macrophages to secrete IFN-γ, thereby activating the JAK1-STAT1 signalling pathway.

Key words: Encephalomyocarditis virus; intrinsic immune response; TRIM21; IFN-γ

脑心肌炎病毒（encephalomyocarditis virus，EMCV）是无囊膜的单股正链RNA病毒，属于小核糖核酸病毒科，心病毒属[1]。EMCV是一种人畜共患病原体，感染后可引起心肌炎、脑炎、生殖障碍和糖尿病等疾病。EMCV基因组长度约为7.8 kb，编码4种结构蛋白（VP1、VP2、VP3和VP4）和8种非结构蛋白（2A、2B、2C、2D、3A、3B、3C和3D），其中衣壳蛋白VP1抗原性最强，与病毒粒子表面的拓扑结构、抗原性、受体吸附及脱壳有关，且与病毒基因组的复制有密切关系[2]。

三基序蛋白家族（tripartite motif，TRIM）属于E3泛素连接酶家族成员之一，在多细胞真核生物中均有表达，TRIM基因总数与生物进化程度相关，生物进化程度越高，TRIM家族蛋白成员越多。目前，人类表达近80个TRIM家族蛋白成员，小鼠表达64种TRIM家族蛋白[3]。TRIM家族蛋白N端包括3个保守结构域（RING结构域、1～2个B-box结构域和Coiled-coil（CC）结构域），以及从N端到C端的高度可变的羧基末端结构域，因此TRIM家族蛋白又被称为RBCC蛋白。TRIM21参与信号转导及细胞增殖、分化和凋亡等多种生物学过程，同时还参与蛋白的翻译后修饰和自噬过程，调控宿主的免疫信号通路以及抗病毒免疫应答[4]。有研究发现，TRIM-21通过多种机制抑制甲型流感病毒[5]、猪流行性腹泻病毒[6]、乙型肝炎病毒[7]和猪繁殖与呼吸综合征病毒[8]复制。WANG等[9]研究表明，TRIM家族蛋白在传染性法氏囊病毒吸附、侵入、基因组复制以及病毒释放等阶段发挥作用。目前，TRIM21在EMCV感染免疫细胞过程中的潜在影响尚不明确。本试验探究了TRIM21在EMCV感染小鼠RAW264.7巨噬细胞中的作用和机制，以期为抗EMCV药物靶点的开发提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材　料

1.1.1　细胞、毒株和质粒　EMCV（GenBank登录号：X74312），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。小鼠RAW264.7巨噬细胞、BHK-21细胞、空载体质粒pcDNA3.1、pcDNA3.1-TRIM21等，均由西北民族大学甘肃省动物细胞技术创新中心提供。大肠杆菌感受态细胞Trans 5α，购于北京全式金生物技术股份有限公司。

1.1.2　主要试剂　DMEM高糖培养基、胰蛋白酶，购自兰州百灵生物技术有限公司；胎牛血清、新生牛血清，均购自兰州民海生物工程有限公司；Opti-MEM、Lipofectamine™ 2000、BCA蛋白浓度测定试剂盒，购自赛默飞世尔科技公司；无酶无菌水，购自北京索莱宝科技有限公司；Evo M-MLV反转录预混型试剂盒、Evo M-MLV RT-PCR试剂盒，购自湖南艾科瑞生物工程有限公司；TransStart® Top Green qPCR SuperMix，购自北京全式金生物技术有限公司；CCK-8试剂盒，购自上海碧云天生物技术股份有限公司；ECL特超敏发光检测试剂盒，购自深圳市尚唯生物科技有限公司；TRIM21兔单克隆抗体、GAPDH小鼠抗单克隆抗体，购自Abcam公司；JAK1兔抗单克隆抗体、STAT1兔抗单克隆抗体、IRF9兔抗单克隆抗体，购自CST公司；辣根过氧化物酶HRP标记亲和纯化山羊抗小鼠IgG（H＋

L)、HRP标记亲和纯化山羊抗兔IgG(H+L),购自Jackson Immunoresearch公司;RNAiso plus Total RNA提取试剂、TaKaRa Ex *Taq*® PCR酶,购自宝日医生物技术(北京)有限公司;Endo-free小提质粒提取试剂盒,购自Omega公司;Mouse IFN-γ ELISA试剂盒,购自酶联生物科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 小鼠RAW264.7巨噬细胞对EMCV的易感性 用感染复数(multiplicity of infection,MOI)为0.1的EMCV感染RAW264.7巨噬细胞,以未感染细胞为对照组(0 h),分别在病毒感染后3,6,9和12 h收集细胞上清液样本,设置3组重复。采用$TCID_{50}$法测定细胞上清液的病毒滴度,以BHK-21细胞为阳性对照,绘制RAW264.7巨噬细胞的生长动力学曲线。用MOI为0.1的EMCV感染RAW264.7巨噬细胞,以未感染细胞为对照组(0 h),分别在病毒感染后1,3,6和9 h收集细胞样本,设置3组重复。利用RNAiso plus Total RNA提取试剂提取细胞总RNA,使用Evo M-MLV反转录预混型试剂盒进行反转录。以*β-actin*为内参基因,采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测EMCV *VP*1基因mRNA表达水平;利用NP40细胞裂解液提取细胞总蛋白,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH)为内参蛋白,采用Western Blot法检测EMCV VP1蛋白表达水平。RT-qPCR试验所用引物如下,*VP*1 Forward序列:5′-TCGGCACCGGGTTCTTTG-CT-3′,*VP*1 Reverse序列:5′-AATCTTGTCAA-CGGAAGT-GG-3′;*β-actin* Forward序列:5′-TG-GCACCCAG-CACAATGAA-3′,*β-actin* Reverse序列:5′-CT-AAGTCATAGTCCGCCTAGAAG-CA-3′。

1.2.2 EMCV感染对TRIM21表达的影响 用0.1 MOI EMCV感染RAW264.7巨噬细胞,以未感染细胞为对照组,分别在病毒感染后3,6和9 h收集细胞样本,设置3组重复。以*β-actin*为内参基因,采用RT-qPCR法检测*TRIM*21和EMCV *VP*1基因mRNA表达水平;以GAPDH为内参蛋白,采用Western Blot法检测TRIM21和EMCV VP1蛋白表达水平。RT-qPCR试验所用引物及其序列为:*TRIM*21 Forward序列:5′-CCTCAGACCACCC-TCCACA-3′;*TRIM*21 Reverse序列:5′-CAGCCT-CATAGTCCACAAAGAT-3′。

1.2.3 TRIM21过表达对EMCV复制增殖的影响 采用脂质体介导法将pcDNA3.1空载体质粒(对照)和TRIM21过表达质粒pcDNA3.1-TRIM21瞬时转染至RAW264.7巨噬细胞,设置3组重复。以*β-actin*为内参基因,采用RT-qPCR检测*TRIM*21基因mRNA表达水平;以GAPDH为内参蛋白,采用Western Blot法检测TRIM21蛋白表达水平。以未转染细胞为对照组(CK),采用CCK-8试剂盒检测外源质粒对细胞活力(OD_{490})的影响。

设置RAW264.7巨噬细胞未接毒对照组(CK)和EMCV接毒组,EMCV接毒组细胞先转染1.0 μg的pcDNA3.1空载体质粒(EV)和不同剂量(0.5和1.0 μg)的pcDNA3.1-TRIM21重组质粒,分别记为pcDNA3.1-TRIM21 (0.5 μg)和pcDNA3.1-TRIM21(1.0 μg),然后感染0.1 MOI EMCV。在病毒感染后9 h收集细胞和细胞上清液样本,设置3组重复。以*β-actin*为内参基因,采用RT-qPCR法检测EMCV *VP*1和*TRIM*21基因mRNA表达水平;以GAPDH为内参蛋白,采用Western Blot法检测EMCV VP1和TRIM21蛋白表达水平;采用$TCID_{50}$法测定各组细胞上清液的病毒滴度。

1.2.4 TRIM21敲低对EMCV增殖的影响 采用脂质体介导法将阴性对照siRNA-NC以及3对siRNA-TRIM21(siRNA1-TRIM21、siRNA2-TRIM21和siRNA3-TRIM21)瞬时转染至RAW264.7巨噬细胞,设置3组重复。以*β-actin*为内参基因,采用RT-qPCR法检测*TRIM*21基因mRNA表达水平;以GAPDH为内参蛋白,采用Western Blot法检测TRIM21蛋白表达水平;以未转染细胞为对照组(CK),采用CCK-8试剂盒检测外源质粒对细胞活力(OD_{490})的影响。

设置未接毒对照组(CK)和EMCV接毒组,接毒组转染siRNA-NC和siRNA3-TRIM21,设置3组重复。在病毒感染后9 h收集细胞和细胞上清液样本,设置3组重复。以*β-actin*为内参基因,采用RT-qPCR法检测EMCV *VP*1和*TRIM*21基因mRNA表达水平;以GAPDH为内参蛋白,采用Western Blot法检测EMCV VP1和TRIM21蛋白表达水平;采用$TCID_{50}$法测定各组细胞上清液的病毒滴度。siRNA-TRIM21由广州锐博生物科技有限公司设计并合成,siRNA1-TRIM21序列:5′-GGAGCCT-ATGAGTATCGAA-3′;siRNA2-TRIM21序列:5′-CCTGGACACGTTAGATATT-3′;siRNA3-

TRIM21 序列：5′-GCTCCCTCATTTACACCT-T-3′。

1.2.5　TRIM21 对 EMCV 吸附、侵入和释放的影响　在 RAW264.7 巨噬细胞中瞬时过表达和敲低表达 TRIM21，在病毒吸附试验中，接种 3 MOI EMCV 并在 4 ℃条件下孵育 1 h；在病毒侵入试验中，接种 2 MOI EMCV 并在 37 ℃条件下孵育 1 h；在病毒释放试验中，接种 0.1 MOI EMCV 并在 37 ℃条件下孵育 9 h，分别收集细胞和细胞上清液样本。以 *β-actin* 为内参基因，采用 RT-qPCR 法检测 EMCV *VP*1 基因 mRNA 表达水平；采用 $TCID_{50}$ 法测定细胞内和细胞上清液的病毒滴度。

1.2.6　TRIM21 过表达对 IFN-γ 的影响　在 RAW264.7 巨噬细胞中瞬时过表达 TRIM21 并感染 0.1 MOI EMCV，在病毒感染后 9 h 收集细胞和细胞上清液样本，设置 3 组重复。使用 ELISA 试剂盒检测 IFN-γ 蛋白表达水平；以 *GAPDH* 为内参基因，采用半定量 PCR 法检测 *TRIM*21、EMCV *VP*1 和 *IFN-γ* 基因 mRNA 表达水平。半定量 PCR 所用引物及其序列为：*IFN-γ* Forward 序列：5′-TGGCTGTTTCTGGCTGTTACTGC-3′，*IFN-γ* Reverse 序列：5′-AATGACGCTTATGTTGTTGCTGATGG-3′；*GAPDH* Forward 序列：5′-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3′，*GAPDH* Reverse 序列：5′-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3′。

1.2.7　TRIM21 对 IFN-γ 介导的 JAK1-STAT1 信号通路的影响　在 RAW264.7 巨噬细胞中瞬时过表达和敲低表达 TRIM21 并感染 0.1 MOI EMCV，设置未接毒对照组（CK），分别在病毒感染 0，6 和 9 h 收集细胞样本，设置 3 组重复。以 *GAPDH* 为内参基因，采用半定量 PCR 法检测 *TRIM*21、EMCV *VP*1、*IFN-γ*、*STAT*1 和 *IRF*9 基因 mRNA 表达水平；以 GAPDH 为内参蛋白，采用 Western Blot 法检测 TRIM21、EMCV VP1、JAK1、STAT1 和 IRF9 蛋白表达水平。半定量 PCR 所用引物及其序列为：*STAT*1 Forward 序列：5′-ATCCGCTTCCATGACCTCC-TCTC-3′，*STAT*1 Reverse 序列：5′-ACCATTGGCTTCACCTTCTCTGTTC-3′；*IRF*9 Forward 序列：5′-ATCGTGGAGCAGGTGGAGAGTG-3′，*IRF*9 Reverse 序列：5′-GCACAGCGTAGGCGAGTCTTC-3′。

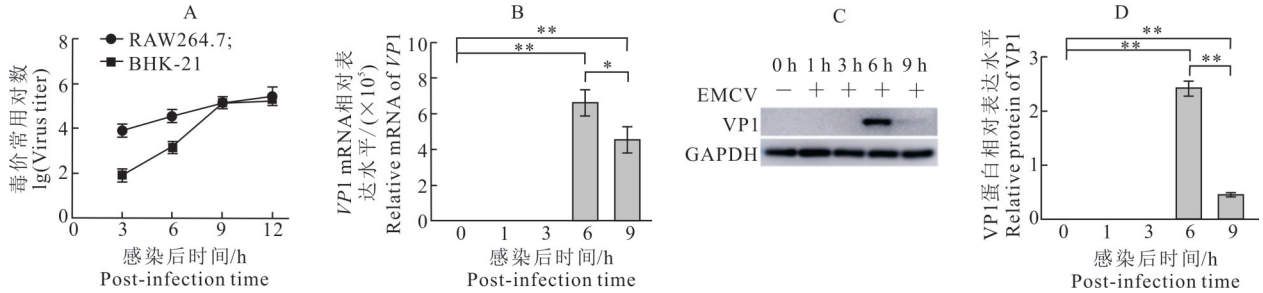
1.3　数据统计分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析并绘图，具体包括学生 *t* 检验（Student's *t*-test）、单因素方差分析（One-Way ANOVA）和双因素方差分析（Two-Way ANOVA）。数据采用“平均值±标准差”表示，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　小鼠 RAW264.7 巨噬细胞对 EMCV 的易感性

图 1 显示，小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的生长趋势与 BHK-21 细胞相似，在感染早期（0～3 h），两种细胞的病毒滴度均较低；随着感染时间的延长（3～9 h），病毒滴度迅速上升；到了感染后期（9～12 h），病毒滴度趋于稳定（图 1-A）。



A. 细胞生长曲线；B. *VP*1 基因 mRNA 表达水平；C. VP1 蛋白表达水平；D. VP1 条带灰度值 ImageJ 软件定量分析结果。*表示差异显著（$P<0.05$），**表示差异极显著（$P<0.01$），下图同。

A. Growth kinetics curve; B. *VP*1 gene mRNA expression levels; C. VP1 protein expression level; D. Quantitative analysis results of the band gray-scale value of VP1 using ImageJ software. * indicates significant difference ($P<0.05$), and ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$) in comparison to the control. The same below.

图 1　小鼠 RAW264.7 巨噬细胞对 EMCV 的易感性

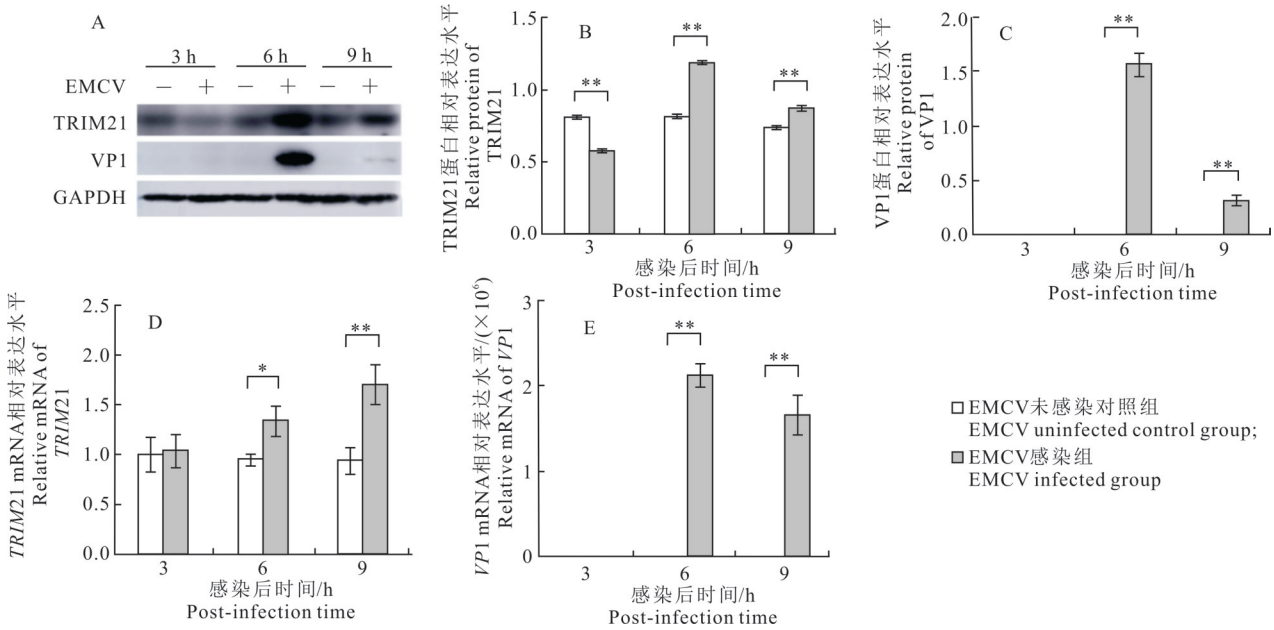
Fig. 1　Susceptibility of mouse RAW264.7 macrophages to EMCV

基因表达水平检测结果显示，*VP*1 基因 mRNA 表达水平极显著高于对照组，病毒感染 9 h 时的 *VP*1 基因 mRNA 表达水平显著低于 6 h 试验组（图 1-B）。Western Blot 结果进一步验证了这一现象，病毒感染 9 h 时的 VP1 蛋白表达水平极显著低于 6 h 试验组（图 1-C，D）。上述结果表明，EMCV 可感

染RAW264.7巨噬细胞,且可在其中有效复制并释放子代病毒。

2.2 EMCV感染对TRIM21表达的影响

图2表明,EMCV感染RAW264.7巨噬细胞3 h时,TRIM21蛋白表达水平极显著低于对照组,未检测到VP1蛋白;在感染6 h时,TRIM21和VP1蛋白表达水平均极显著高于对照组,并达到峰值;而在感染9 h时,TRIM21和VP1蛋白表达水平仍极显著高于对照组(图2-A,B,C)。基因表达水平检测结果显示,EMCV感染后6和9 h,*TRIM21*和*VP1*基因mRNA表达水平较对照组均显著或极显著提高(图2-D,E)。上述结果表明,EMCV感染RAW264.7巨噬细胞后,促进了内源性TRIM21的表达。



A. TRIM21和VP1蛋白表达水平;B,C. TRIM21和VP1条带灰度值ImageJ软件定量分析结果;D,E. *TRIM21*和*VP1*基因mRNA表达水平。

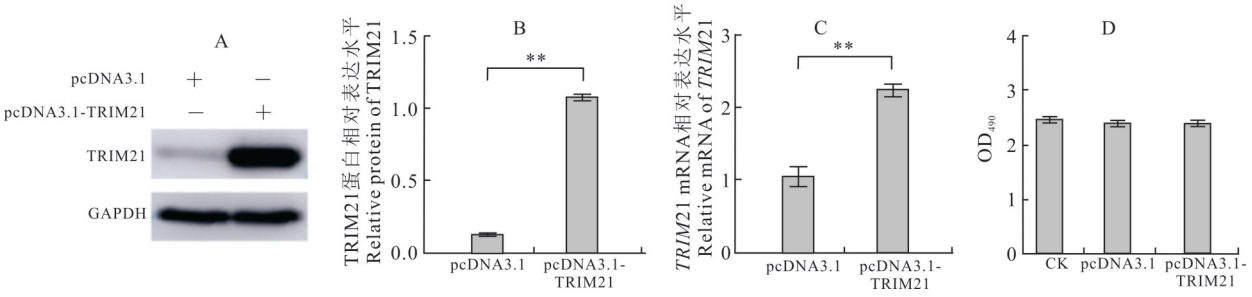
A. TRIM21 and VP1 protein expression levels;B,C. Quantitative analysis results of the band gray-scale values for TRIM21 and VP1 using ImageJ software;D,E. *TRIM21* and *VP1* gene mRNA expression levels.

图2 EMCV感染对TRIM21表达的影响

Fig. 2 Effects of EMCV infection on TRIM21 expression

2.3 TRIM21过表达对EMCV复制增殖的影响

由图3可知,转染pcDNA3.1-TRIM21重组质粒的RAW264.7巨噬细胞中,TRIM21蛋白及其基因mRNA表达水平均极显著高于pcDNA3.1空载体质粒对照组(图3-A,B,C);转染pcDNA3.1和pcDNA3.1-TRIM21质粒的细胞活力与CK组相比无统计学差异(图3-D)。试验结果表明,TRIM21在小鼠RAW264.7巨噬细胞中成功过表达,且转染的外源质粒对细胞活力无显著影响。



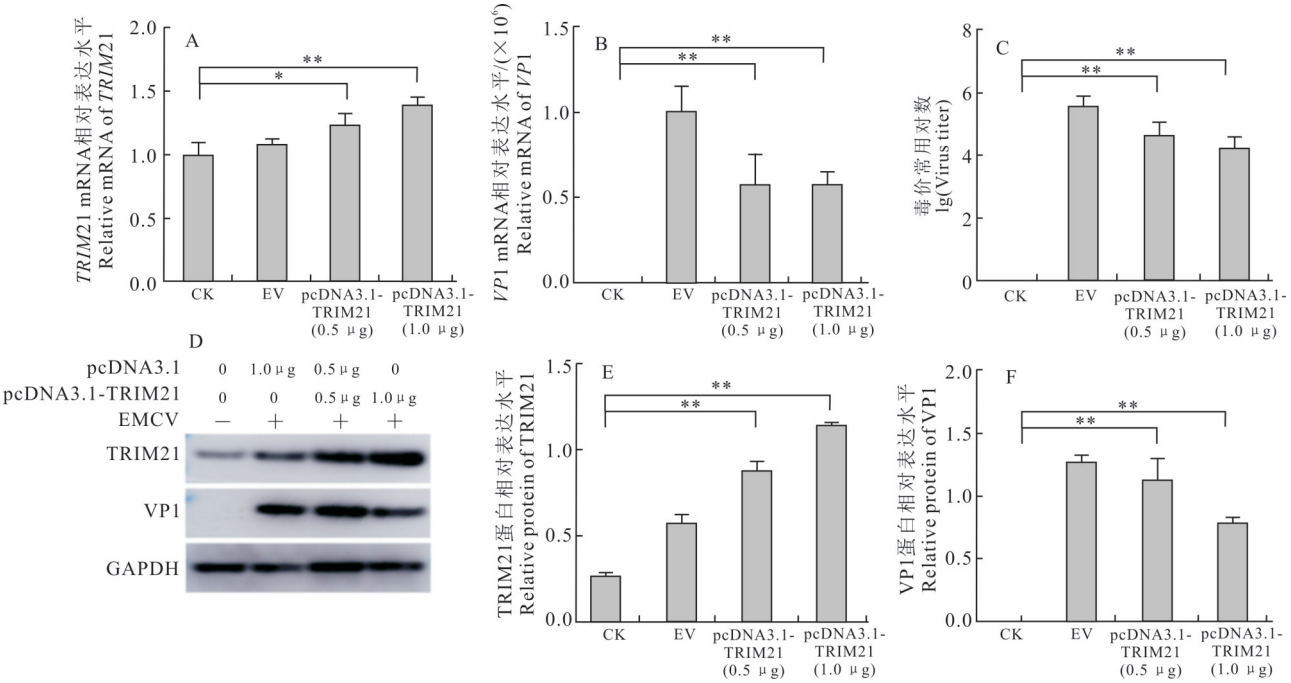
A. TRIM21蛋白表达水平;B. TRIM21条带灰度值ImageJ软件定量分析结果;C. *TRIM21*基因mRNA表达水平;D. RAW264.7细胞活力检测。

A. TRIM21 protein expression levels;B. Quantitative analysis results of the band gray-scale value of TRIM21 using ImageJ software;C. *TRIM21* gene mRNA expression levels;D. RAW264.7 cell viability assay.

图3 TRIM21在小鼠RAW264.7巨噬细胞中过表达效果检测

Fig. 3 Detection of TRIM21 overexpression effect in mouse RAW264.7 macrophages

图 4 显示，转染 0.5 和 1.0 μg 的 pcDNA3.1-TRIM21 重组质粒后，*TRIM*21 基因 mRNA 表达水平均显著或极显著提高，*VP*1 基因 mRNA 表达水平均极显著低于 CK 组（图 4-A，B）；转染 1.0 μg 的 pcDNA3.1-TRIM21 重组质粒能够更有效地抑制细胞上清液的病毒滴度（图 4-C）；Western Blot 结果显示，转染 0.5 和 1.0 μg 的 pcDNA3.1-TRIM21 重组质粒后，TRIM21 和 VP1 蛋白表达水平与 CK 组相比均极显著升高（$P<0.01$）；转染 1.0 μg 的 pcDNA3.1-TRIM21 重组质粒后，TRIM21 蛋白表达水平与 CK 组相比极显著升高，VP1 蛋白表达水平极显著降低（图 4-D，E，F）。综合 RT-qPCR 和 Western Blot 结果，高剂量的 pcDNA3.1-TRIM21 重组质粒对 EMCV 增殖的抑制作用更为明显。



A，B. *TRIM*21 和 *VP*1 基因 mRNA 表达水平；C. 病毒滴度；D. TRIM21 和 VP1 蛋白表达水平；E，F. TRIM21 和 VP1 条带灰度值 ImageJ 软件定量分析结果。

A，B. *TRIM*21 and *VP*1 gene mRNA expression levels；C. Virus titer；D. TRIM21 and VP1 protein expression levels；E，F. Quantitative analysis results of the band gray-scale values for TRIM21 and VP1 using ImageJ software.

图 4　TRIM21 过表达对 EMCV 复制增殖的影响

Fig. 4　Effects of TRIM21 overexpression on EMCV replication and proliferation

2.4　TRIM21 敲低对 EMCV 复制增殖的影响

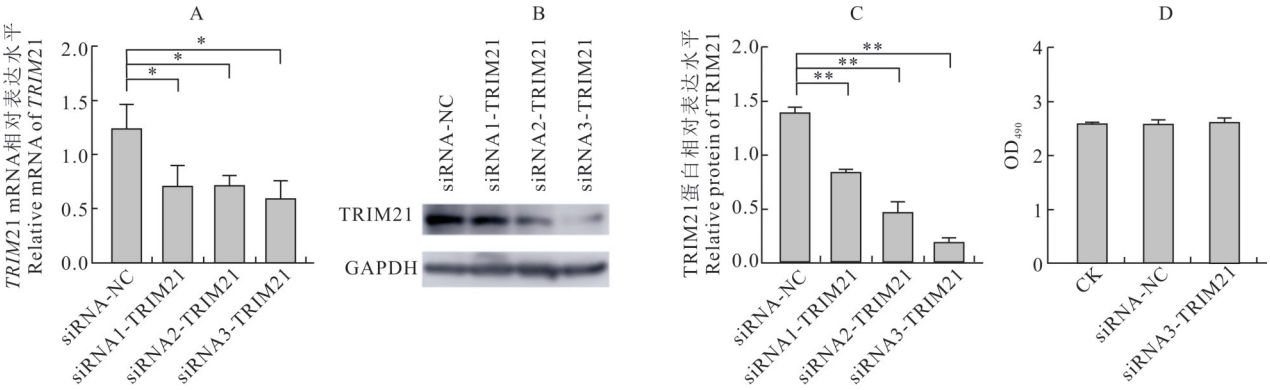
由图 5 可知，转染 siRNA1-TRIM21、siRNA2-TRIM21 和 siRNA3-TRIM21 的 RAW264.7 巨噬细胞中，*TRIM*21 基因 mRNA 表达水平均显著低于阴性对照 siRNA-NC（图 5-A）；Western Blot 结果显示，TRIM21 蛋白表达水平均极显著低于阴性对照 siRNA-NC 组，其中 siRNA3-TRIM21 的敲低效果最为明显（图 5-B，C）。转染 siRNA3-TRIM21 的细胞活力与对照组相比无统计学差异（图 5-D）。试验结果表明，TRIM21 敲低成功，且转染的外源质粒对细胞活力无显著影响。

图 6 结果显示，转染 siRNA3-TRIM21 的 RAW264.7 巨噬细胞中，TRIM21 蛋白与 VP1 蛋白的表达水平均极显著高于 CK 组（图 6-A，B，C）；*TRIM*21 基因 mRNA 表达水平极显著低于 CK 组，*VP*1 基因 mRNA 表达水平极显著高于 CK 组（图 6-D，E）；细胞上清液的病毒滴度极显著高于 CK 组（图 6-F）。该结果表明，TRIM21 敲低显著上调了 EMCV VP1 的表达水平，促进了 EMCV 的复制增殖。

2.5　TRIM21 对 EMCV 吸附、侵入和释放的影响

图 7 显示，TRIM21 过表达 EMCV 吸附阶段 *VP*1 基因 mRNA 表达水平有所升高，但无统计学差异（图 7-A）；细胞表面吸附的病毒滴度与对照组相比无统计学差异（图 7-B）。TRIM21 敲低表达 EMCV 吸附阶段 *VP*1 基因 mRNA 的表达水平与对照组相比有所升高，但无统计学差异（图 7-C）；细胞表面吸附的病毒滴度与对照组相比有所降低，但无统计学差异（图 7-D）。TRIM21 过表达 EMCV 侵入阶段 *VP*1 基因 mRNA 表达水平与对照组相比有所

升高,但无统计学差异(图7-E);侵入细胞内的病毒滴度与对照组相比有所下降,但无统计学差异(图7-F)。TRIM21敲低表达EMCV侵入阶段*VP1*基因mRNA的表达水平与对照组相比无统计学差异(图7-G);侵入细胞内的病毒滴度与对照组相比有所升高,但无统计学差异(图7-H)。TRIM21过表达EMCV释放阶段RAW264.7巨噬细胞释放到上清液中的病毒滴度极显著低于对照组(图7-I),细胞内的病毒滴度极显著高于对照组(图7-J)。TRIM21敲低表达试验中,细胞释放到上清液中的病毒滴度显著高于对照组(图7-K),细胞内的病毒滴度极显著低于对照组(图7-L)。上述结果表明,TRIM21过表达显著抑制了病毒粒子的释放,TRIM21敲低表达显著促进了EMCV病毒粒子的释放,但无论TRIM21过表达或敲低表达对EMCV的吸附和侵入均未表现出显著的调控作用。

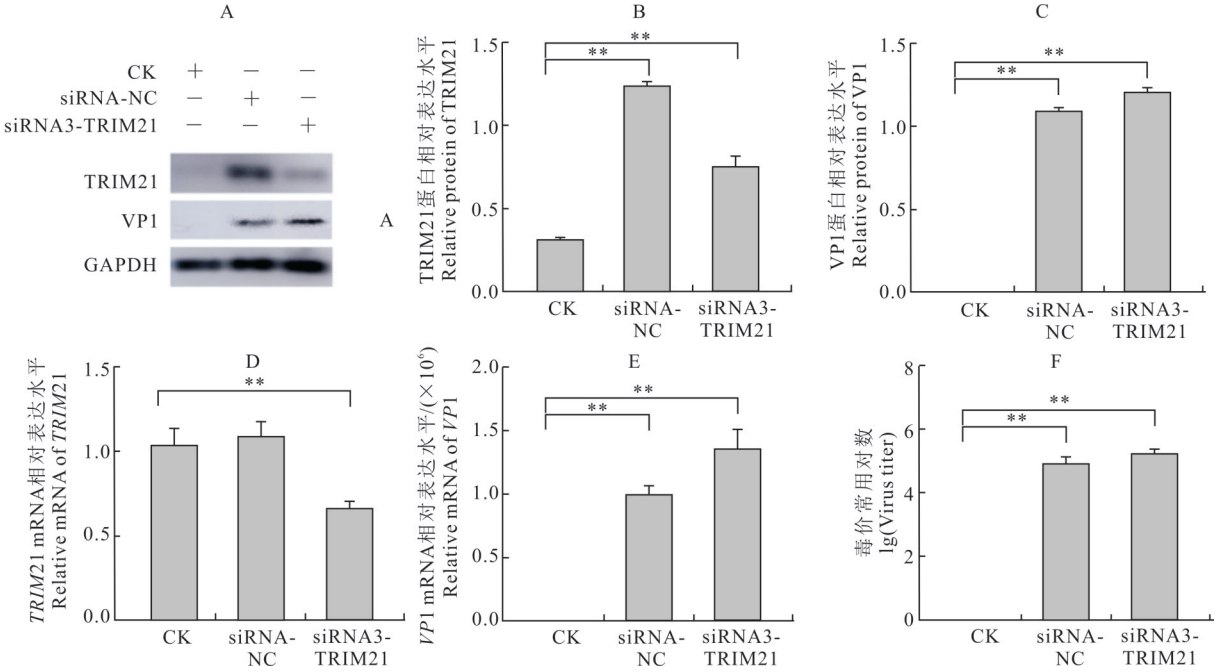


A. *TRIM*21基因mRNA表达水平;B. TRIM21蛋白表达水平;C. TRIM21条带灰度值ImageJ软件定量分析结果;D. RAW264.7细胞活力检测。

A. *TRIM*21 gene mRNA expression levels;B. TRIM21 protein expression levels;C. Quantitative analysis results of the band gray-scale value of TRIM21 using ImageJ software;D. RAW264.7 cell viability assay.

图5 TRIM21敲低表达效果检测

Fig. 5 Detection of TRIM21 knockdown effect

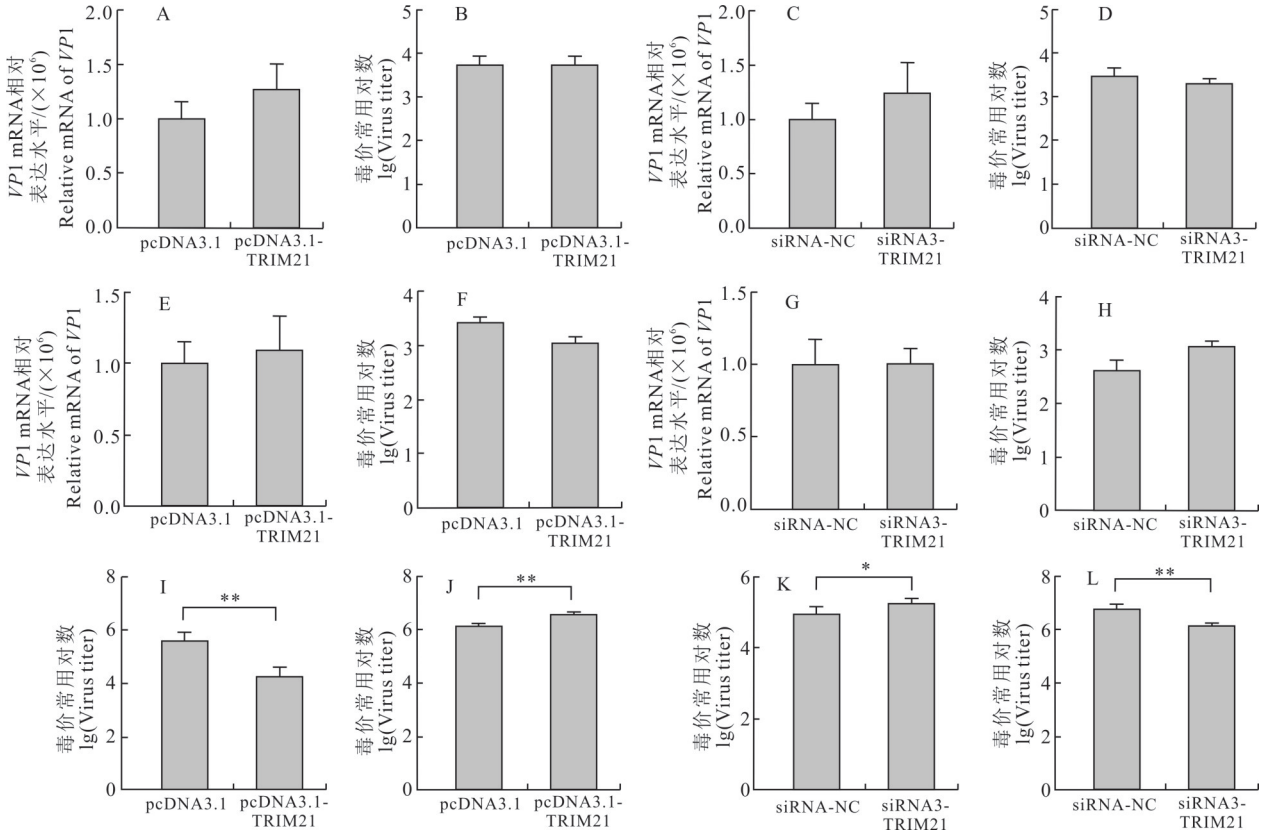


A. TRIM21和VP1蛋白表达水平;B,C. TRIM21和VP1条带灰度值ImageJ软件定量分析结果;D,E. *TRIM*21和*VP*1基因mRNA表达水平;F. 病毒滴度。

A. TRIM21 and VP1 protein expression levels;B,C. Quantitative analysis results of the band gray-scale values for TRIM21 and VP1 using ImageJ software;D,E. *TRIM*21 and *VP*1 gene mRNA expression levels;F. Virus titer.

图6 TRIM21敲低表达对EMCV复制增殖的影响

Fig. 6 Effects of TRIM21 knockdown on EMCV replication and proliferation



A，C. 分别为TRIM21过表达和敲低表达EMCV吸附阶段 *VP1* 基因mRNA表达水平；B，D. 分别为TRIM21过表达和敲低表达EMCV吸附阶段的病毒滴度；E，G. 分别为TRIM21过表达和敲低表达EMCV侵入阶段 *VP1* 基因mRNA表达水平；F，H. 分别为TRIM21过表达和敲低表达EMCV侵入阶段的病毒滴度；I，J. 分别为TRIM21过表达EMCV释放阶段上清液中和RAW264.7细胞内的病毒滴度；K，L. 分别为TRIM21敲低表达EMCV释放阶段上清液中和RAW264.7细胞内的病毒滴度。

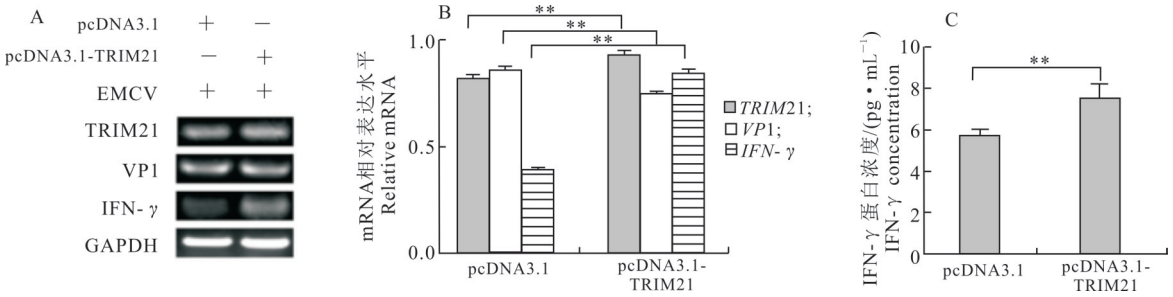
A，C. The mRNA expression levels of the *VP1* gene during the EMCV adsorption phase in TRIM21 overexpression and knockdown；B，D. The viral titers during the EMCV adsorption phase in TRIM21 overexpression and knockdown；E，G. The mRNA expression levels of the *VP1* gene during the EMCV invasion phase in TRIM21 overexpression and knockdown；F，H. The viral titers during the EMCV invasion phase in TRIM21 overexpression and knockdown；I，J. The viral titers in the supernatant and within RAW264.7 cells during the EMCV release phase in TRIM21 overexpression；K，L. The viral titers in the supernatant and within RAW264.7 cells during the EMCV release phase in TRIM21 knockdown.

图7　TRIM21表达改变对EMCV吸附、侵入和释放阶段的影响

Fig. 7　Effects of altered TRIM21 expression on EMCV adsorption，entry and release phases

2.6　TRIM21过表达对IFN-γ的影响

TRIM21过表达对IFN-γ的影响结果如图8所示。



A. *TRIM21*、*VP1* 和 *IFN-γ* 基因mRNA表达水平；B. *TRIM21*、*VP1* 和 *IFN-γ* mRNA条带灰度值ImageJ软件定量分析结果；C. IFN-γ蛋白表达水平。

A. *TRIM21*，*VP1* and *IFN-γ* gene mRNA expression levels；B. Quantitative analysis results of the band gray-scale values for *TRIM21*，*VP1*，and *IFN-γ* mRNA using ImageJ software；C. IFN-γ protein expression levels.

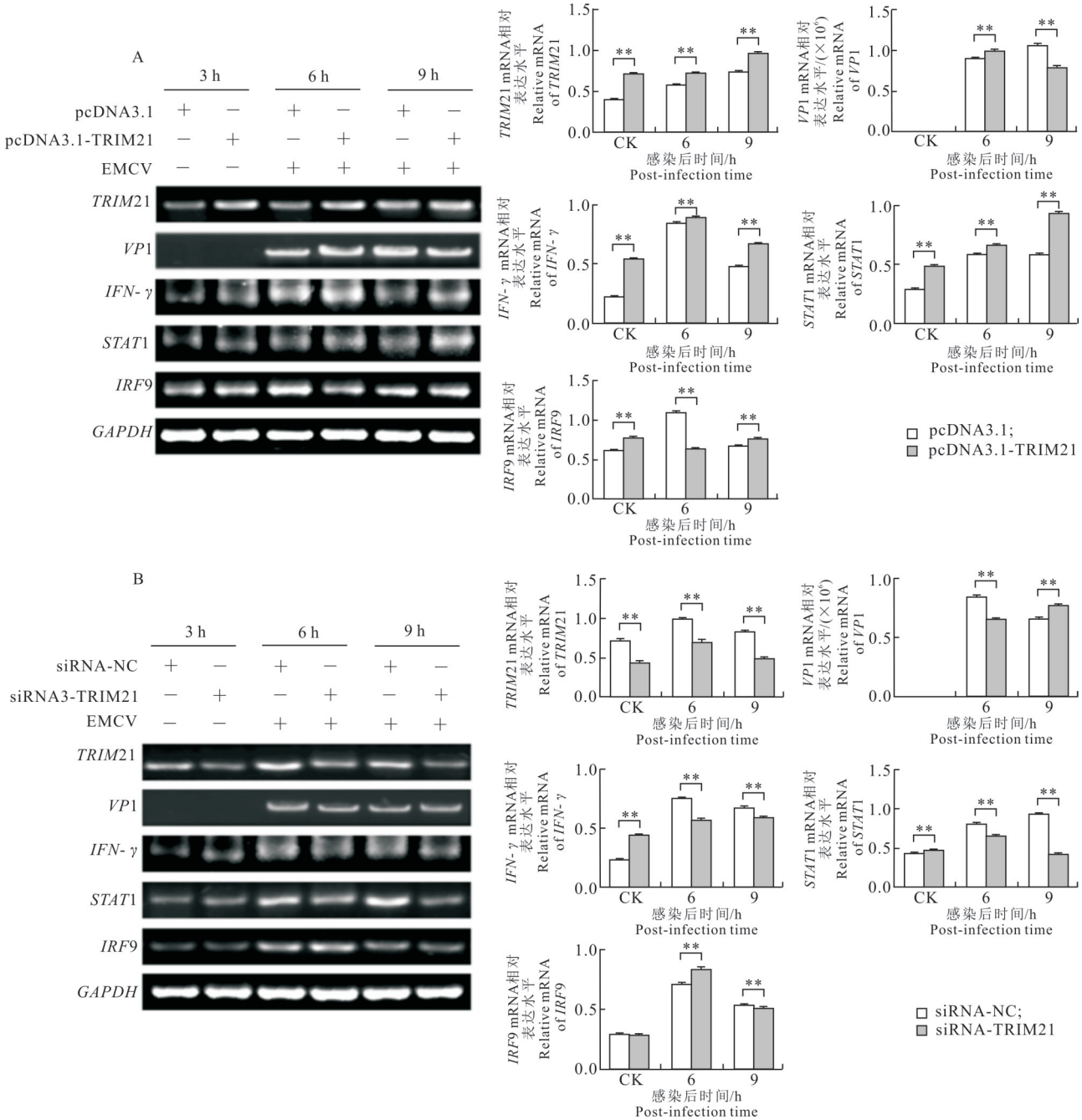
图8　TRIM21过表达对IFN-γ的影响

Fig. 8　Effects of TRIM21 overexpression on IFN-γ

图8显示,TRIM21过表达极显著抑制了*VP*1基因mRNA表达水平,同时极显著上调了*IFN-γ*基因mRNA表达水平(图8-A,B);ELISA结果显示,TRIM21过表达极显著提高了IFN-γ蛋白表达水平(图8-C)。上述结果表明,TRIM21过表达显著促进了IFN-γ的表达。

2.7 TRIM21对JAK1-STAT1信号通路的影响

TRIM21表达改变对JAK1-STAT1信号通路分子mRNA水平的影响如图9所示。



A,B. 分别为TRIM21过表达和敲低表达条件下*TRIM*21、*VP*1、*IFN-γ*、*STAT*1和*IRF*9基因mRNA表达水平。

A,B. The mRNA expression levels of *TRIM*21, *VP*1, *IFN-γ*, *STAT*1, and *IRF*9 genes under TRIM21 overexpression and knockdown.

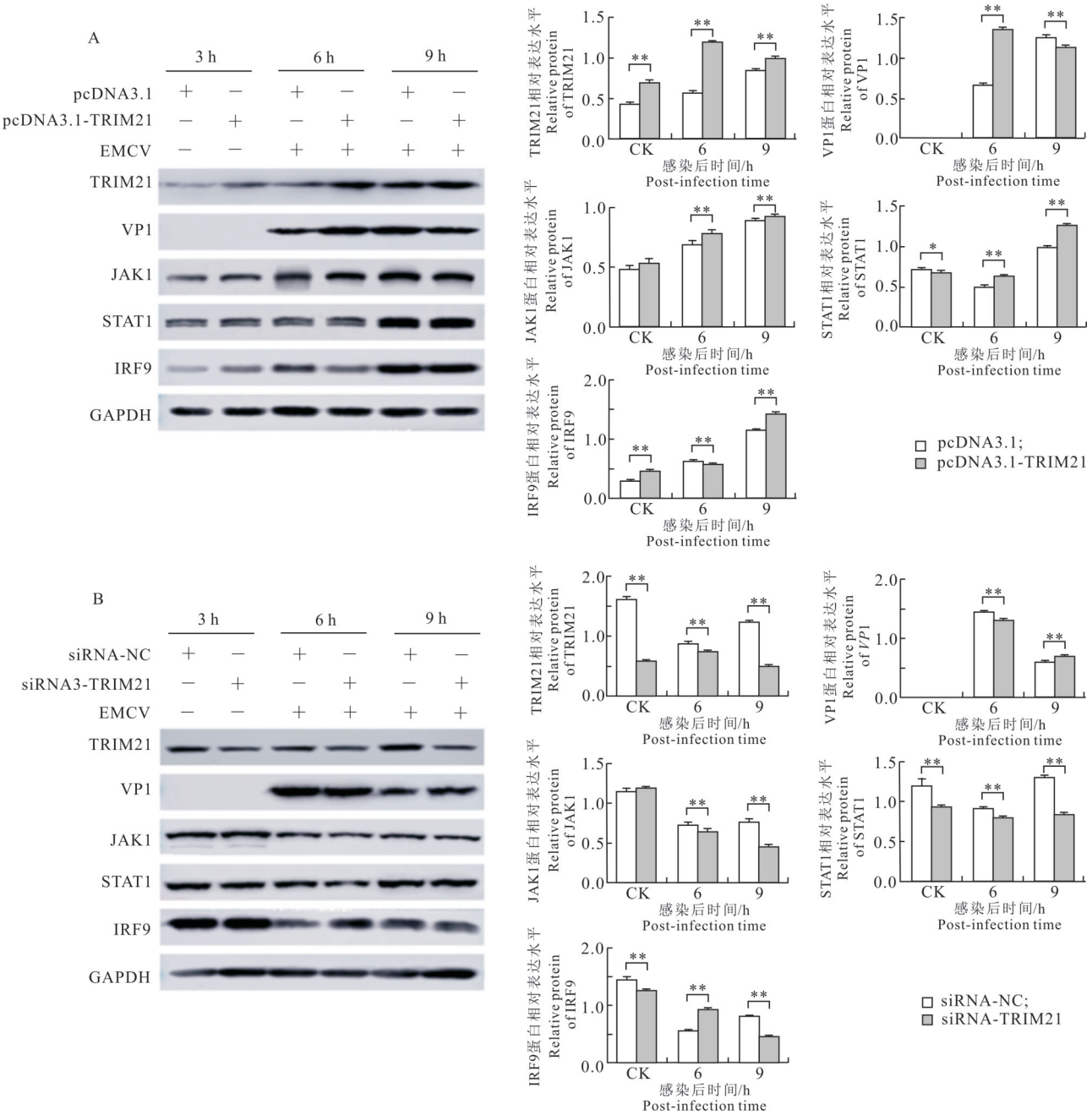
图9 TRIM21表达改变对JAK1-STAT1信号通路分子mRNA水平的影响

Fig. 9 Effects of altered TRIM21 expression on molecular mRNA levels of the JAK1-STAT1 signalling pathway

图9-A结果表明,在TRIM21过表达试验组,EMCV感染6 h时,EMCV *VP*1、*IFN-γ*和转录因子*STAT*1基因mRNA表达水平均极显著上调($P<0.01$),转录因子*IRF*9基因mRNA表达水平极显著下调($P<0.01$);EMCV感染9 h时,*VP*1基因mRNA表达水平极显著下调($P<0.01$),*IFN-γ*、

*STAT1*和*IRF9*基因mRNA表达水平极显著上调（$P<0.01$）。图9-B结果显示，在TRIM21敲低试验中，EMCV感染6 h时，EMCV *VP1*、*IFN-γ*和*STAT1*基因mRNA表达水平极显著下调（$P<0.01$），*IRF9*基因mRNA表达水平极显著上调（$P<0.01$）；EMCV感染9 h时，EMCV *VP1*基因mRNA表达水平极显著上调（$P<0.01$），*IFN-γ*、*STAT1*和*IRF9*基因mRNA表达水平极显著下调（$P<0.01$）。

TRIM21表达改变对JAK1-STAT1信号通路分子蛋白水平的影响结果见图10。



A，B. 分别为TRIM21过表达和敲低表达条件下TRIM21、VP1、JAK1、STAT1和IRF9蛋白表达水平。

A，B. The protein expression levels of TRIM21，VP1，JAK1，STAT1，and IRF9 under TRIM21 overexpression and knockdown.

图10　TRIM21表达改变对JAK1-STAT1信号通路分子蛋白水平的影响

Fig. 10　Effects of altered TRIM21 expression on molecular protein levels of the JAK1-STAT1 signalling pathway

图10-A显示，在TRIM21过表达试验组，EMCV感染6 h时，EMCV VP1、JAK1和STAT1蛋白表达水平极显著上调（$P<0.01$），IRF9蛋白表达水平极显著下调（$P<0.01$）；EMCV感染9 h时，VP1蛋白表达水平极显著下调（$P<0.01$），JAK1、STAT1和IRF9蛋白表达水平极显著上调（$P<$

0.01)。图10-B结果显示,在TRIM21敲低试验中,EMCV感染6 h时,EMCV VP1、JAK1和STAT1蛋白表达水平极显著下调($P<0.01$),IRF9蛋白表达水平极显著上调($P<0.01$);EMCV感染9 h时,VP1蛋白表达水平极显著上调($P<0.01$),JAK1、STAT1和IRF9蛋白表达水平极显著下调($P<0.01$)。上述结果表明,EMCV感染6 h时,TRIM21过表达对EMCV复制具有促进作用,TRIM21敲低表达对EMCV复制有抑制作用;随感染时间增长至9 h,TRIM21过表达对EMCV复制有抑制作用,TRIM21敲低表达对EMCV复制有促进作用。

3 讨 论

大量研究表明,TRIM蛋白在病毒感染中具有双重作用,如在乙型肝炎病毒感染中,TRIM21可抑制病毒的复制[10];而在盖塔病毒感染中,TRIM21可促进病毒复制[11]。TRIM蛋白通过直接识别病毒组分或调节固有免疫反应,抑制病毒复制并增强宿主防御能力[12]。然而,某些病毒能够劫持TRIM蛋白,利用其E3泛素连接酶活性修饰病毒蛋白或宿主因子,从而促进病毒复制或逃避免疫监视[13]。本研究结果发现,TRIM21蛋白可抑制EMCV粒子的释放,并通过IFN-γ介导的JAK1-STAT1信号通路负调控EMCV的感染,这为EMCV防治提供了新的策略和思路。

TRIM家族蛋白在炎症、病毒感染和癌症等不同类型疾病中发挥重要作用[14-15]。为了探究TRIM21是否影响EMCV的增殖,对EMCV感染的RAW264.7巨噬细胞进行测定,发现EMCV感染后细胞内源性TRIM21显著上调,说明TRIM21参与了EMCV的增殖过程。VP1作为EMCV的主要结构蛋白,TRIM21过表达可下调*VP1*基因mRNA和蛋白表达水平,VP1表达水平的变化可能与病毒自身的复制调控机制相关。在HBV感染中,TRIM21对DNA聚合酶(DNA Pol)蛋白水平具有剂量依赖性的负向调控作用,TRIM21表达量增加可显著降低DNA Pol蛋白水平,进而抑制HBV复制[10]。在本研究中,TRIM21过表达程度越大,EMCV增殖受到的抑制作用越强。

有研究表明,TRIM家族蛋白在病毒的生命周期中发挥不同作用[16]。TRIM11和TRIM31可抑制人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)的侵入,TRIM25、TRIM31和TRIM62基因的沉默可抑制HIV的释放[17]。WEI等[8]研究证实,TRIM21通过RING结构域的E3泛素连接酶抑制PRRSV的复制,但不影响病毒的吸附和侵入。为进一步探究TRIM21对EMCV复制增殖的影响,分别测定EMCV吸附、侵入以及释放阶段*VP1*基因mRNA表达水平以及病毒滴度的变化,发现TRIM21过表达显著抑制了EMCV病毒粒子的释放。这一发现提示,TRIM21作为细胞内的一种重要免疫因子,其主要功能可能集中在细胞质和细胞核内,对进入细胞的病毒进行识别和调控,而不是直接参与细胞表面的病毒吸附和侵入。

TRIM家族蛋白因参与细胞固有免疫应答而被广泛研究。TRIM7通过调控IFN-β启动子活性并与MAVS相互作用,激活RIG-I/MDA5/MAVS介导的IFN-β信号通路[18]。本课题组前期研究发现,TRIM13可抑制由MDA5、MAVS和TBK1介导的IFN-β的表达[19],TRIM21过表达能够显著促进HEK293细胞中IFN-β和IL-6的表达,激活IFN-Ⅰ信号通路和炎症信号通路,增强宿主细胞的抗病毒能力[20]。本研究发现,EMCV感染RAW264.7小鼠巨噬细胞后IFN-γ表达水平上调。病毒感染诱导IFN-γ的产生是机体抗病毒反应激活的标志,IFN-γ通过多种机制参与抗病毒防御,包括直接抑制病毒复制、激活和调节免疫细胞、增强抗原递呈能力等[21]。IFN-γ与其细胞表面受体结合后,激活JAK1-STAT1信号通路,调控下游抗病毒基因的转录,诱导抗病毒蛋白的表达[22]。有研究表明,ZIKV的NS4B蛋白通过抑制STAT1磷酸化来逃避宿主免疫[23];PEDV感染可显著降低JAK1、STAT1、IRF9和磷酸化STAT1的表达,并抑制了STAT1的核转位,促进病毒复制[24]。本研究发现,TRIM21过表达显著增强了RAW264.7巨噬细胞中IL-6和IFN-γ的表达水平,在感染6 h,TRIM21过表达通过抑制IRF9的表达动态调控JAK1-STAT1信号通路。但TRIM21与JAK1-STAT1信号通路中具体分子的相互作用还有待进一步研究。未来的研究需要深入探索TRIM21与JAK1、STAT1、IRF9等分子之间的直接或间接作用,以及这些相互作用如何影响宿主细胞的抗病毒免疫应答。

4 结 论

TRIM21过表达能够显著抑制EMCV病毒粒子的释放过程,并促进RAW264.7巨噬细胞分泌

IFN-γ，通过调控JAK1-STAT1信号通路，有效抑制EMCV的复制增殖。这一机制的阐明，为深入理解TRIM21在抗病毒免疫中的作用机制奠定了基础，也为后续相关研究提供了重要的参考。

[参考文献]

[1] ZIMMERMANN A, NELSEN-SALZ B, KRUPPENBACHER J P, et al. The complete nucleotide sequence and construction of an infectious cDNA clone of a highly virulent encephalomyocarditis virus[J]. Virology, 1994, 203(2): 366-372.

[2] CAROCCI M, BAKKALI-KASSIMI L. The encephalomyocarditis virus[J]. Virulence, 2012, 3(4): 351-367.

[3] DI RIENZO M, ROMAGNOLI A, ANTONIOLI M, et al. TRIM proteins in autophagy: selective sensors in cell damage and innate immune responses[J]. Cell Death and Differentiation, 2020, 27(3): 887-902.

[4] AHSAN N, SHARIQ M, SUROLIA A, et al. Multipronged regulation of autophagy and apoptosis: emerging role of TRIM proteins[J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2024, 29(1): 13.

[5] LIN L L, WANG X B, CHEN Z, et al. TRIM21 restricts influenza A virus replication by ubiquitination-dependent degradation of M1[J]. PLoS Pathogens, 2023, 19(6): e1011472.

[6] WANG H, CHEN X Y, KONG N, et al. TRIM21 inhibits porcine epidemic diarrhea virus proliferation by proteasomal degradation of the nucleocapsid protein[J]. Archives of Virology, 2021, 166(7): 1903-1911.

[7] SONG Y H, LI M, WANG Y Q, et al. E3 ubiquitin ligase TRIM21 restricts hepatitis B virus replication by targeting HBx for proteasomal degradation[J]. Antiviral Research, 2021, 192: 105107.

[8] WEI Y, ZENG S Y, ZOU C C, et al. Porcine TRIM21 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for anti-PRRSV activity[J]. Veterinary Microbiology, 2021, 256: 109043.

[9] WANG S Y, YU M M, LIU A J, et al. TRIM25 inhibits infectious bursal disease virus replication by targeting VP3 for ubiquitination and degradation[J]. PLoS Pathogens, 2021, 17(9): e1009900.

[10] MU T, ZHAO X Q, ZHU Y N, et al. The E3 ubiquitin ligase TRIM21 promotes HBV DNA polymerase degradation[J]. Viruses, 2020, 12(3): 346.

[11] 王娟. TRIM21与TRIM25影响GETV复制的分子机制研究[D]. 北京：中国农业科学院，2021.
WANG J. Study on molecular mechanism of TRIM21 and TRIM25 affecting GETV replication[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.

[12] KHAN R, KHAN A, ALI A, et al. The interplay between viruses and TRIM family proteins[J]. Reviews in Medical Virology, 2019, 29(2): e2028.

[13] 王艳明. TRIM调控DNA病毒感染所诱导的免疫应答及TLR信号通路的机制研究[D]. 合肥：中国科学技术大学，2015.
WANG Y M. Study on the mechanism of TRIM regulating immune response induced by DNA virus infection and TLR signaling pathway[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2015.

[14] 杨东亮，毕冬琳，杨晓莉，等. TRIM家族蛋白在病毒感染中作用的研究进展[J]. 微生物学报，2023，63(4)：1356-1364.
YANG D L, BI D L, YANG X L, et al. Role of TRIM family proteins in viral infection[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1356-1364.

[15] SHEN Z, WEI L, YU Z B, et al. The roles of TRIMs in antiviral innate immune signaling[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 628275.

[16] KIMURA T, JAIN A, CHOI S W, et al. TRIM-directed selective autophagy regulates immune activation[J]. Autophagy, 2017, 13(5): 989-990.

[17] UCHIL P D, QUINLAN B D, CHAN W T, et al. TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle[J]. PLoS Pathogens, 2008, 4(2): e16.

[18] LI M J, YAN J F, ZHU H X, et al. TRIM7 inhibits encephalomyocarditis virus replication by activating interferon-β signaling pathway[J]. Veterinary Microbiology, 2023, 281: 109729.

[19] 赵克学. TRIM13对EMCV体外感染增殖的影响及机制初探[D]. 兰州：西北民族大学，2020.
ZHAO K X. Effect of TRIM13 on EMCV proliferation in vitro and preliminary study of mechanism[D]. Lanzhou: Northwest Minzu University, 2020.

[20] 赵克学，许淑娟，耿金静，等. TRIM21对脑心肌炎病毒的增殖调控作用研究[J]. 中国细胞生物学学报，2019，41(12)：2291-2299.
ZHAO K X, XU S J, GENG J J, et al. Study on regulatory effects of TRIM21 in encephalomyocarditis virus proliferation[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2019, 41(12): 2291-2299.

[21] KANDHAYA-PILLAI R, YANG X M, TCHKONIA T, et al. TNF-α/IFN-γ synergy amplifies senescence-associated inflammation and SARS-CoV-2 receptor expression via hyper-activated JAK/STAT1[J]. Aging Cell, 2022, 21(6): e13646.

[22] WANG S S, ZHENG G, ZHAO L F, et al. Shp-2 contributes to anti-RSV activity in human pulmonary alveolar epithelial cells by interfering with the IFN-α-induced Jak/Stat1 pathway[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2015, 19(10): 2432-2440.

[23] FANUNZA E, GRANDI N, QUARTU M, et al. INMI1 zika virus NS4B antagonizes the interferon signaling by suppressing STAT1 phosphorylation[J]. Viruses, 2021, 13(12): 2448.

[24] LI X, WU Y W, PENG J, et al. Porcine epidemic diarrhea virus induces mitophagy to inhibit the apoptosis and activation of JAK/STAT1 pathway[J]. Veterinary Microbiology, 2025, 303: 110427.

（责任编辑：马秋明）