

## 恒河猴 *TRIM5 $\alpha$* 的组织分布及不同刺激促进 PBMC 中 *TRIM5 $\alpha$* 转录水平的上调

汤霞<sup>1,2</sup>, 戴正喜<sup>1,2</sup>, 夏厚军<sup>1,2</sup>, 刘丰亮<sup>1,2</sup>, 况轶群<sup>1,2</sup>, 张高红<sup>1</sup>, 郑永唐<sup>1,\*</sup>

(1. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室, 云南 昆明 650223;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** *TRIM5 $\alpha$* (tripartite motif protein 5- $\alpha$ )蛋白是恒河猴体内一种非常重要的限制因子, 能抑制人免疫缺陷病毒(HIV-1, human immunodeficiency virus type 1)、马感染性贫血病毒(EIAV, equine infectious anemia virus)和猫免疫缺陷病毒(FIV, feline immunodeficiency virus)等逆转录病毒的复制。恒河猴 *TRIM5 $\alpha$*  的组织分布以及在受到外界刺激时 *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 表达量的变化研究还未见报道。本研究从中国恒河猴的各组织中提取总 RNA, 以  $\beta$ -actin 基因作为内参照, 通过半定量 RT-PCR 检测各组织中 *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 的表达。选择 HIV-GFP-VSVG 假病毒感染外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 非特异性刺激剂——佛波脂(Phorbol myristate acetate, PMA)+离子霉素(ionomycin, Ion)及 CD28 抗体+CD49d 抗体分别共刺激恒河猴 PBMC, 研究不同刺激对恒河猴 *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 表达水平的影响。结果表明: *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 表达于所研究的恒河猴 21 种组织中, 免疫系统和泌尿生殖系统组织中表达量最高, 而神经系统组织, 如大脑、脊髓中表达较少, 其他组织中未见明显的表达差异; HIV-GFP-VSVG 感染和用 PMA+Ion、CD28 抗体+CD49d 抗体分别共刺激 PBMC 能促进 PBMC 中 *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 的转录水平的上调。

**关键词:** *TRIM5 $\alpha$* ; 恒河猴; 组织分布; PBMC; 共刺激; 表达水平

中图分类号: Q959.848; Q959.848.06; Q522 文献标识码: A 文章编号: 0254-5853-(2009)04-0354-07

## Tissue Distribution of *TRIM5 $\alpha$* in Rhesus Monkey and Upregulation in Peripheral Blood Mononuclear Cell by Using Different Stimuli

TANG Xia<sup>1,2</sup>, DAI Zheng-xi<sup>1,2</sup>, XIA Hou-jun<sup>1,2</sup>, LIU Feng-liang<sup>1,2</sup>,  
KUANG Yi-quan<sup>1,2</sup>, ZHANG Gao-hong<sup>1</sup>, ZHENG Yong-tang<sup>1,\*</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650223, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** *TRIM5 $\alpha$*  (tripartite motif protein 5- $\alpha$ ) protein is a very important restriction factor in rhesus monkey. It can restrict the replication of retroviruses, such as HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1), EIAV (equine infectious anemia virus) and FIV (feline immunodeficiency virus). Up to now, there is no report about the tissue distribution of *TRIM5 $\alpha$*  in rhesus monkey. The influence of different stimuli on the expression of *TRIM5 $\alpha$*  mRNA has also not been examined in monkey peripheral blood mononuclear cell (PBMC). In this study, total RNA was extracted from different tissues of a rhesus monkey collected in Yunnan, China, and was quantified using the  $\beta$ -actin gene as the internal reference. The expression levels of *TRIM5 $\alpha$*  mRNA in PBMC that was treated with three conditions (the HIV-GFP-VSVG pseudotyped virus challenged, PMA and Ion-costimulated, anti-CD28 and anti-CD49d antibody-costimulated) were also evaluated at different time points. Our results showed that *TRIM5 $\alpha$*  mRNA expressed broadly in all 21 studied tissues, with the highest level in tissues of immune system and urogenital system and a lower level in nervous system, such as cerebrum and spinal cord. The expression level of the *TRIM5 $\alpha$*  mRNA level in PBMC was upregulated after being activated by the three treatments.

**Key words:** *TRIM5 $\alpha$* ; Rhesus monkey; Tissue distribution; PBMC; Costimulation; Transcription level

收稿日期: 2009-05-18; 接受日期: 2009-06-08

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB504302); 国家自然科学基金(30671960; U0832601; 30872317; 30800113); 中国科学院知识创新工程重要方向(KSCX1-YW-R-15); 云南省科技基础条件平台计划(2006PT08)资助课题

\*通讯作者(Corresponding author), Tel/Fax: 0871-5195684, E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn

恒河猴 *TRIM5 $\alpha$*  蛋白是其体内一种非常重要的限制因子, 能抑制 HIV-1、EIAV 和 FIV 等逆转录病毒的复制(Stremlau et al, 2004; Yap et al, 2004; Saenz et al, 2005; Wilson et al, 2008)。它具有 RING、B-box2、Coiled-Coil 和 B30.2 四个结构域(Javanbakht et al, 2005), 每个结构域都有重要的功能(Tang et al, 2009): RING 结构域具有 E3 泛素连接酶的活性, 参与自身蛋白的泛素化(Javanbakht et al, 2005; Yamauch et al, 2008)。RING 与 B-box2 结构域可能共同决定了蛋白的半衰期, *TRIM5 $\alpha$*  的平均半衰期只有 50~60 min (Diaz-Griffero et al, 2006)。B-box2 结构域含有 1 个锌指结构, 可能参与蛋白之间的相互作用, 是恒河猴 *TRIM5 $\alpha$*  发挥抗病毒活性必不可少的结构域。缺失 B-box2 结构域, 恒河猴 *TRIM5 $\alpha$*  将完全丧失抗 HIV-1 活性(Javanbakht et al, 2006)。Coiled-Coil 结构域含有 1 个  $\alpha$  螺旋结构, 它与相连的 Link2(L2)一起, 参与自身的多聚化(Mische et al, 2005; Javanbakht et al, 2006; Welkin et al, 2009)。*TRIM5 $\alpha$*  以同源三聚体的形式与 HIV-1 衣壳蛋白(capsid, CA)结合, 从而限制 HIV-1 复制, 而 Coiled-Coil 是 *TRIM5 $\alpha$*  三聚化的必要结构域, 是其抗 HIV-1 活性必不可少的区域(Javanbakht et al, 2006)。B30.2 结构域在 *TRIM5 $\alpha$*  限制 HIV-1 复制的过程中发挥重要的作用。三聚体 *TRIM5 $\alpha$*  通过 B30.2 结构域识别并结合 HIV-1 的 CA, 促进 CA 的脱壳或降解, 从而限制 HIV-1 的逆转录(Stremlau & Perron, 2006; Javanbakht et al, 2006; Chatterji & Bobardt, 2006)。我们发现 *TRIM5 $\alpha$*  在 SPRY 结构域的单位点突变 344R/Q/P 可能是不同灵长类具有不同抗 HIV-1 活性的原因(Liu et al, 2005), 并首次发现在平顶猴体内表达一种融合蛋白 TRIMCyp, 这种蛋白不具有限制 HIV-1 复制的活性(Liao et al, 2007)。我们研究还发现平顶猴均表达这种 TRIMCyp 融合蛋白, 这可能就是平顶猴对 HIV-1 易感的原因, 并提示平顶猴可能是适合建立 HIV-1 感染模型的理想动物之一(Liao et al, 2007; Kuang et al, 2009)。

自发现恒河猴 *TRIM5 $\alpha$*  能限制 HIV-1 复制以来, 人们大多将焦点集中在 *TRIM5 $\alpha$*  限制逆转录病毒感染机制的研究, 而它是否具有其他的生理功能尚不清楚。研究发现, 人类 *TRIM5 $\alpha$*  能限制 N 型小鼠白血病病毒 N-MLV(N-tropic murine leukemia virus), 猴免疫缺陷病毒 SIV (simian

immunodeficiency virus) 等病毒的复制(Perron et al, 2004; Yap et al, 2004; Wilson et al, 2008), 并广泛表达于人类各组织中(Sawyer et al, 2007)。研究还发现 IFN- $\alpha/\beta/\gamma$  与 *TRIM5* 基因启动子 ISRE 元件结合可上调 *TRIM5 $\alpha$*  在细胞内的表达(Asaoka et al, 2005)。然而, 关于恒河猴 *TRIM5 $\alpha$*  的组织分布及其意义的研究还未见报道。本研究试图了解中国恒河猴 *TRIM5 $\alpha$*  的组织分布模式, 以及在受到外界刺激时, *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 表达水平的变化情况, 为理解 *TRIM5 $\alpha$*  的生理功能和限制病毒作用机制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 中国恒河猴的组织及其外周血单核细胞取健康的中国产恒河猴腋下淋巴结、腹淋巴结、大脑、小脑、脊髓、心肌、胸肌、肝脏、脾脏、肾脏、食道、胃、空肠、回肠、肺、主动脉、前列腺、附睾和睾丸等组织, 置液氮保存。外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分离自健康的中国产恒河猴新鲜全血。

1.1.2 主要试剂、引物及仪器 TRIZOL TR-118 和 PE 标记抗人 CD25 抗体购自 Molecular Research Center, Inc; Primescript<sup>TM</sup> 1st strand cDNA synthesis kit 和 rTaq polymerase 购自 TAKARA 公司; Ficoll-paque<sup>TM</sup> premium 购自 GE Healthcare; 抗人 CD28 和 CD49d 抗体购自美国 BD 公司; 白介素 2(IL-2) 购自上海华新生物高技术有限公司; 佛波酯和离子霉素购自 FERMENTEK 公司; RPMI-1640 培养基购自 Hyclone 公司。扩增 *TRIM5 $\alpha$*  第 4 至第 8 外显子片段的引物为: P-*TRIM5* (正向): 5' -AGCAGCAGGAAGCTGAAAAG-3'; P-*TRIM5* (反向): 5' -ATTGGAAGCCAGCACATACC-3', 产物长度为 693bp; 扩增  $\beta$ -actin 的引物为: P-actin (正向): 5' -AGGCTCTCTCCAACCTTCCTT-3'; P-actin (反向): 5' -CGTACAGGTCTT-TACGGATGTCCA-3', 产物长度为 108 bp。Trans2K DL2000 Plus DNA Maker 购自 TransGen Biotech 公司。一次性真空采血管 EDTAK2 购自武汉致远医疗科技有限公司。PCR 仪为 BIO-RAD PTC-200。HIV-GFP-VSVG 假病毒由中国科学院生物物理研究所高光侠研究员惠赠。

### 1.2 实验方法

1.2.1 总RNA提取以及逆转录 按Trizol TR-118试剂使用说明书提取各组织和PBMC总RNA,紫外分光光度计测定RNA浓度,OD260nm/OD280nm比值在1.7~2.0之间。RT-PCR采用TAKARA的Primescript™1st strand cDNA synthesis kit, RNA模板量均为2μg。

1.2.2 恒河猴PBMC的分离、培养和刺激 采用一次性真空采血管采健康雄性中国产恒河猴全血,EDTA<sub>K2</sub>抗凝。等体积PBS稀释血液,按照Ficoll-paque™ premium使用说明书分离PBMC, PBS洗涤, RPMI-1640完全培养基重悬细胞,并按 $1.5 \times 10^6$ 细胞/孔接种于24孔板中培养。分设4组,各组均设2个复孔。未处理组仅加入IL-2 (0.05 U/mL)。HIV-GFP-VSVG感染实验组每孔均加入IL-2 (0.05 U/mL),以及500 μL假病毒上清。抗人CD28和CD49d抗体共刺激实验组每孔均加入IL-2(0.05 U/mL),各抗体终浓度均为4 μg/mL。PMA和Ion共刺激实验组设3组,每孔均加入IL-2、PMA和Ion,使其终浓度分别为0.05 U/mL、50 ng/mL和5 μg/mL。未处理组和实验组分别于8 h和24 h提取总RNA, RT-PCR检测TRIM5α和β-actin mRNA的表达。

1.2.3 循环次数的选择 分别确定PBMC和各组织(以胃组织为代表)的RT-PCR指数期循环数。TRIM5α和β-actin基因均设4个反应体系,按照普通PCR程序,分别设定循环数为15、20、25和30,琼脂糖凝胶电泳鉴定。选择循环数在线性范围内且电泳效果好的循环数作为最佳循环数。

1.2.4 TRIM5α和β-actin基因的PCR扩增 在2个PCR管中分别扩增TRIM5α和β-actin基因, cDNA模板量2 μL,反应体积均为25 μL。PCR热循环条件分别为: TRIM5α: 94℃预变性2 min; 94℃变性30 sec, 58℃退火30 sec, 72℃延伸1 min,共30个循环; 72℃延伸10 min。β-actin: 94℃预变性2 min; 94℃变性30 sec, 60℃退火30 sec, 72℃延伸30 sec。各组织β-actin基因扩增采用25个循环, PBMC β-actin基因扩增采用30个循环。琼脂糖凝胶电泳检测TRIM5α和β-actin PCR产物时,按照1:1混合上样于同一胶孔中。

1.2.5 恒河猴被共刺激后活化程度的检测 收集刺激后各时段PBMC约 $2 \times 10^5$ 细胞,加至1.5 mL eppendorf管中,1500 rpm离心10 min;弃上清,500 μL PBS洗涤细胞,1500 rpm离心10 min;弃上清,加50 μL PBS重悬细胞,加PE标记抗人CD25抗体2

μL, 4℃孵育20 min; FACS检测PBMC活化程度,8 h和24 h时观察细胞形态变化,用Olympus数码相机拍摄观察结果。

## 2 结果

### 2.1 循环次数的确定

分别采用15、20、25和30个循环扩增胃组织和未经处理的正常恒河猴PBMC中TRIM5α和β-actin基因,琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明:组织和PBMC中TRIM5α基因采用30个循环扩增,β-actin基因分别采用25个和30个循环扩增能使PCR扩增处于指数扩增期(图1)。

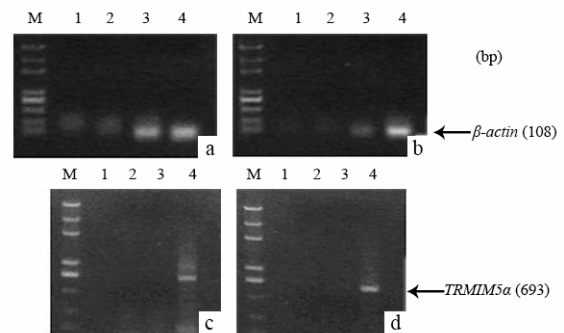


图1 采用不同循环数扩增组织和PBMC中的TRIM5α和β-actin基因

Fig. 1 The amplifying of TRIM5α and β-actin genes in tissues and PBMC separately by using different cycles

a: 15(1)、20(2)、25(3)和30(4)循环扩增胃组织β-actin; b: 15(1)、20(2)、25(3)和30(4)循环扩增PBMC β-actin; c: 15(1)、20(2)、25(3)和30(4)循环扩增胃组织TRIM5α; d: 15(1)、20(2)、25(3)和30(4)循环扩增PBMC TRIM5α; M: DNA相对分子质量标准。

a: β-actin gene in stomach amplified through using 15(1), 20(2), 25(3), 30(4) cycles; b: β-actin gene in PBMC amplified through using 15(1), 20(2), 25(3), 30(4) cycles; c: TRIM5α gene in stomach amplified through using 15(1), 20(2), 25(3), 30(4) cycles; d: TRIM5α gene in PBMC amplified through using 15(1), 20(2), 25(3), 30(4) cycles; Lane M(a,b,c,d): DL 2000 plus DNA marker.

### 2.2 恒河猴各组织中的TRIM5α的表达

TRIZOL TR-118提取恒河猴21种冻存组织的总RNA, Primescript™1st strand cDNA synthesis kit逆转录cDNA。采用30个循环扩增TRIM5α基因,25个循环扩增β-actin基因,琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明:TRIM5α mRNA在恒河猴的各个组织中均有表达,其中免疫系统和泌尿生殖系统各组织表达量较高,如腋淋巴结、腹淋巴结、睾丸、附睾、前列腺和肾脏,而中枢神经系统各组织表达量较

少, 如大脑、小脑和脊髓, 在另外其他各组织中的表达介于这两者之间(图 2)。

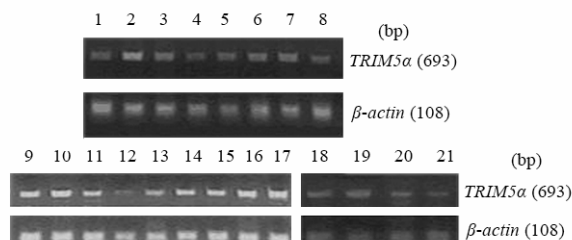


图 2 恒河猴 21 种组织中 *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 的表达

Fig. 2 The expression of the *TRIM5 $\alpha$*  mRNA in 21 tissues of rhesus monkey

1: 大脑; 2: 肺; 3: 主动脉; 4: 食道; 5: 胸肌; 6: 心肌; 7: 回肠; 8: 空肠; 9: 腹淋巴结; 10: 前列腺; 11: 小脑; 12: 脊髓; 13: 甲状腺; 14: 腮腺; 15: 肝脏; 16: 脾脏; 17: 肾脏; 18: 腋淋巴结; 19: 附睾; 20: 睾丸; 21: 胃。

1: cerebrum; 2: lung; 3: artery; 4: esophagus; 5: pectorals; 6: myocardium; 7: ileum; 8: jejunum; 9: lymphonodi abdominals; 10: prostate; 11: cerebella; 12: spinal cord; 13: thyroid; 14: parotid; 15: liver; 16: spleen; 17: kidney; 18: axillary lymph node; 19: epididymis; 20: testicle; 21: stomach.

### 2.3 CD28 抗体+CD49d 抗体及 PMA+Ion 共刺激与 HIV-GFP-VSVG 感染恒河猴 PBMC 后的活化程度检测

CD28 抗体+CD49d 抗体及 PMA+Ion 共刺激和 HIV-GFP-VSVG 感染恒河猴 PBMC, 8 h 和 24 h 后分别观察细胞形态和聚集状态变化。结果表明: 刺激后 8 h 时, 未处理组和 CD28 抗体+CD49d 抗体共刺激实验组细胞形态和聚集状态均无明显变化, 细胞比较圆, 聚集状态不明显; PMA+Ion 共刺激实验组以及 HIV-GFP-VSVG 假病毒感染实验组细胞有

部分变得不规则, 且出现了部分聚集。24 h 时, 未处理组和 CD28 抗体+ CD49d 抗体共刺激实验组细胞变化不明显, 细胞只有少部分形态变得不规则并发生聚集, 少部分细胞贴壁且不紧; PMA+Ion 共刺激实验组和 HIV-GFP-VSVG 假病毒感染实验组绝大部分细胞已经贴壁且很紧, 大部分细胞聚集成片, 表明细胞已经被活化(图 3)。

FACS 检测刺激 8 h 和 24 h 时各组细胞表面分子 CD25 的表达情况。结果表明: CD28 抗体+CD49d 抗体共刺激组活化程度较小, PMA 和 Ion 共刺激组和 HIV-GFP-VSVG 假病毒感染组活化程度较明显, 且随着时间的延长, 各实验组的活化程度逐渐增高(图 4)。

### 2.4 CD28 抗体+CD49d 抗体及 PMA+Ion 共刺激和 HIV-GFP-VSVG 感染对恒河猴 PBMC 中 *TRIM5 $\alpha$* mRNA 表达量的影响

CD28 抗体+CD49d 抗体共刺激、PMA+Ion 共刺激和 HIV-GFP-VSVG 感染恒河猴 PBMC, 于 8 h 和 24 h 时分别提取未处理组和实验组 PBMC 总 RNA, 半定量 RT-PCR 检测 *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 的表达。结果表明: 8 h 时, 与未处理组比较, CD28 抗体+CD49d 抗体共刺激组和 HIV-GFP-VSVG 病毒感染组 *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 表达量没有明显变化, 而 PMA+Ion 共刺激组 *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 表达量有一定程度下降。共刺激处理 24 h 时, 各实验组 *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 表达量均有一定程度升高, 其中 CD28 抗体+CD49d 抗体共刺激组和 PMA+Ion 共刺激组升高较明显(图 5)。

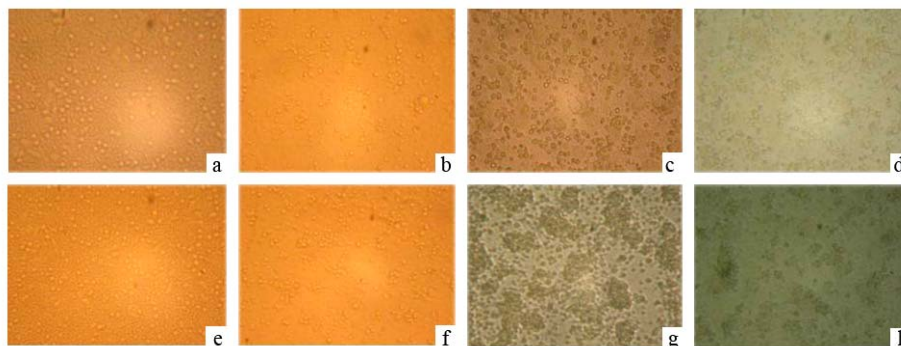


图 3 不同刺激对 PBMC 形态的影响( $\times 500$ )

Fig. 3 The effect of different stimuli on the shape of PBMC ( $\times 500$ )

a, e: 未被刺激的 PBMC(8h, 24h); b, f: CD28 抗体+ CD49d 抗体共刺激 PBMC(8h, 24h); c, g: PMA+ Ion 共刺激 PBMC(8h, 24h); d, h: HIV-GFP-VSVG 假病毒感染 PBMC(8h, 24h)。

a,e: PBMC unstimulated (8h, 24h); b, f: PBMC co-stimulated by CD28 antibody+CD49d antibody (8h, 24h); c, g: PBMC co-stimulated by PMA+ Ion (8h, 24h); d, h: PBMC infected by HIV-GFP-VSVG(8h, 24h).

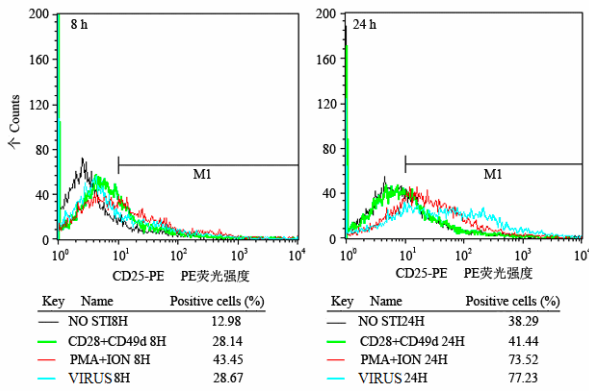


图 4 不同刺激对 PBMC CD25 分子表达的影响

Fig. 4 The effects on the expression of CD25 molecule in PBMC after different stimulation

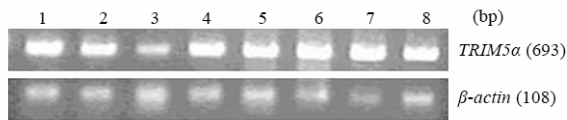


图 5 刺激后 PBMC 中 *TRIM5α* 和 *β-actin* mRNA 的表达  
Fig. 5 The expression of *TRIM5α* and *β-actin* mRNA in PBMC stimulated

1, 5: 未刺激(8h, 24h); 2, 6: CD28 抗体+CD49d 抗体共刺激(8h, 24h); 3, 7: PMA+Ion 共刺激(8h, 24h); 4, 8: HIV-GFP-VSVG 感染(8h, 24h)。  
1, 5: Unstimulated(8h, 24h); 2, 6: Co-stimulated by CD28+CD49d antibody (8h, 24h); 3, 7: Co-stimulated by PMA+Ion (8h, 24h); 4, 8: Infected by HIV-GFP-VSVG (8h, 24h).

### 3 讨论

病毒与其宿主在共存的数千万年间不断的进行斗争。病毒通过基因突变等方式逃避宿主的防御体系, 以利于病毒自身的复制和生存。宿主也发展了多种形式的天然免疫和特异性免疫方式来抑制病毒的复制, 以利于自身的生存。此外, 宿主体内还存在称为内在免疫的第 3 种免疫方式, 它是指宿主细胞内存在的天然限制因子。限制因子在抵抗病毒感染过程中具有重要作用, 如胞嘧啶脱氨酶 (apolipoprotein B-editing catalytic polypeptide 3G, APOBEC3G)(Sheehy et al, 2002)、锌指抗病毒蛋白 (zinc anti-viral protein, ZAP) (Gao et al, 2002) 和 *TRIM5α*(Stremlau et al, 2004) 等均具有限制逆转录病毒复制的功能。这些内在限制因子的组织分布和特异的组织表达模式可能为分析病毒侵染历史及其限制作用机制有重要的提示。

研究发现 *TRIM5* 基因广泛地存在于多种哺乳动物中, 如灵长类、牛和兔等(Welkin et al, 2009)。该基因由 8 个外显子组成, 其初始转录本经过不同

的剪切方式, 经翻译产生 *TRIM5α*、*TRIM5γ*、*TRIM5δ* 等不同的 *TRIM5* 剪切体。*TRIM5α* 是最长的剪切体(Diaz-Griffero et al, 2007), 也是哺乳动物体内一种非常重要的内在限制因子, 它以物种依赖的方式限制包括 HIV-1 在内的多种逆转录病毒的感染。如人类 *TRIM5α* 能限制 N-MLV 的感染, 恒河猴 *TRIM5α* 能限制 HIV-1、FIV、EIAV 的感染 (Perron et al, 2004; Stremlau et al, 2004; Saenz et al, 2005; Wilson et al, 2008; Tang et al, 2009), 牛 *TRIM5α* 同源蛋白能限制 N-MLV 的复制(Si et al, 2006)。

*TRIM5α* 除限制逆转录病毒感染的功能之外, 尚不清楚它是否具有其他的生理功能。研究表明, 人类 *TRIM5α* mRNA 广泛表达于人类各组织中 (Sawyer et al, 2007), 而恒河猴 *TRIM5α* 的组织分布及其意义的研究却未见报道, 了解恒河猴 *TRIM5α* 的组织分布模式, 以及在受到外界刺激时, *TRIM5α* mRNA 水平的变化情况, 有助于了解 *TRIM5α* 限制 HIV-1 复制的作用机制, 并为探索 *TRIM5α* 可能未知的限制活性和生理功能提供重要的线索。

本研究采用半定量逆转录 PCR 来研究恒河猴 *TRIM5α* mRNA 的组织分布与表达丰度。在实验过程中摸索了循环数与 PCR 终产量的关系。选择处于指数扩增期的循环数来进行 PCR 扩增, 结果具有一定的可靠性。研究结果表明, 恒河猴 *TRIM5α* mRNA 广泛表达于被研究的各个组织中。恒河猴与人类 *TRIM5α* mRNA 的组织表达分布具有相似之处, 两者在中枢神经系统, 如大脑、脊髓和小脑中的表达量都较低, 而在生殖系统各组织, 如睾丸、附睾和前列腺中的表达量都较高。此外, 我们还研究了淋巴系统各组织, 如腹淋巴结、腋淋巴结 *TRIM5α* mRNA 的表达丰度, 发现恒河猴 *TRIM5α* mRNA 在淋巴系统各组织中均有较高表达。*TRIM5* 家族是机体天然免疫系统的重要组成部分(Uchil et al, 2008), 而免疫系统及生殖系统是病毒入侵的主要靶器官组织, *TRIM5α* 高表达可能有利于其抵抗病原微生物的感染。有趣的是, 未受刺激的人类 PBMC 几乎不表达 *TRIM5α* mRNA (Sawyer et al, 2007), 而即使是未受刺激的恒河猴 PBMC 也高表达 *TRIM5α* mRNA。比较恒河猴与人类 *TRIM5α* mRNA 组织分布与表达丰度发现, 恒河猴 *TRIM5α* mRNA 具有比人类 *TRIM5α* mRNA 更广泛的组织分布, 如人类肝脏和肺脏基本不表达 *TRIM5α* mRNA, 而恒河猴

*TRIM5 $\alpha$*  mRNA 在肝脏和肺脏以及腮腺和甲状腺中均有较高的表达。恒河猴 *TRIM5 $\alpha$*  这种广泛组织分布模式也可能预示着恒河猴 *TRIM5 $\alpha$*  除了具有抗逆转录病毒活性外, 可能还具有别的未知的生理功能, 如可能参与细胞凋亡、转录调控、分化和细胞周期进程的调控等。

TRIM 家族的很多成员都能在干扰素刺激下表达上调, 如人类 TRIM34 和 TRIM21, 人类 *TRIM5 $\alpha$*  和猕猴 *TRIMCyp* 都能在 I 型干扰素 IFN- $\alpha/\beta/\gamma$  的刺激下上调表达(Asaoka et al, 2005; Carthagen et al, 2008; Sakuma et al, 2007)。干扰素  $\alpha/\beta/\gamma$  刺激可增强 *TRIM5 $\alpha$*  和猕猴 *TRIMCyp* 介导的抗病毒活性(Carthagen et al, 2008; Sakuma et al, 2007)。鉴于 *TRIM5 $\alpha$*  能被刺激上调的特性, 本实验研究了各种刺激对 PBMC 中 *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 表达量的影响。PMA+Ion 以非特异的方式激活 PBMC 的活化, 可用来研究非特异性外界刺激对 PBMC 中 *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 表达量的影响。CD28 抗体+CD49d 抗体特异性激活 PBMC 中 T 淋巴细胞, 上调 IFN- $\gamma$  的表达(Betts et al, 2001), 可作为以 T 淋巴细胞为靶细胞的病原微生物感染 PBMC 对 *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 表达量影

响的模型。复制缺陷的假病毒 HIV-GFP-VSVG 只能单次感染多种靶细胞, 可用来研究非特异性感染、HIV-1 基因转录和蛋白表达对 PBMC *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 表达量的影响。CD25 是 PBMC 活化的标志。本研究的结果表明, HIV-GFP-VSVG 假病毒感染, PMA+Ion、CD28 抗体+CD49d 抗体分别共刺激 PBMC 均能促进 PBMC 的活化和 *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 表达上调。

*TRIM5 $\alpha$*  组成性低表达于各组织中, 有利于宿主细胞抵抗逆转录病毒的早期感染。*TRIM5 $\alpha$*  受天然免疫系统, 如干扰素调节, 上调表达可能主要是为了更好地限制逆转录病毒的后期复制和病毒的进一步扩散(Sakuma et al, 2007)。本研究发现 HIV-GFP-VSVG 假病毒感染, PMA+Ion、CD28 抗体+CD49d 抗体分别共刺激 PBMC 均能促进 PBMC *TRIM5 $\alpha$*  mRNA 表达量的上调, 可能最终也是通过天然免疫系统对 *TRIM5 $\alpha$*  的调节实现的。*TRIM5 $\alpha$*  这种在各组织中广泛表达并且能被外界刺激迅速上调表达的模式, 可能是宿主在长期抵御病原体感染进化过程中产生的既经济又高效的内部免疫模式。

## 参考文献:

- Asaoka K, Ikeda K, Hishinuma T, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. 2005. A retroviral restriction factor TRIM5 $\alpha$  is transcriptionally regulated by interferons [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **338**(4): 1950-1956.
- Betts M, Ambrozak D, Douek D, Bonhoeffer S, Brenchley J, Casazza J, Koup R, Picker L. 2001. Analysis of total Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell responses:relationship to viral load in untreated HIV infection [J]. *J Virol*, **75**(24): 11983-11991.
- Carthagen L, Parise M, Ringard M, Chelbi-Alix M, Hazan U, Nisole S. 2008. Implication of TRIM $\alpha$  and TRIMCyp in interferon-induced anti-retroviral restriction activities [J]. *Retrovirology*, **5**: 59.
- Chatterji U, Bobardt M, Gaskill P, Sheeter D, Fox H, Gallay P. 2006. Trim5 $\alpha$  accelerates degradation of cytosolic capsid associated with productive HIV-1 Entry [J]. *J Biol Chem*, **281**(48): 37025-37033.
- Diaz-Griffero F, Li X, Javanbakht H, Song B, Welikala S, Stremlau M, Sodroski J. 2006. Rapid turnover and polyubiquitylation of the retroviral restriction factor TRIM5 [J]. *Virology*, **349**(2): 300-315.
- Diaz-Griffero F, Kar A, Perron M, Xiang S, Javanbakht H, Li X, Sodroski J. 2007. Modulation of retroviral restriction and proteasome inhibitor-resistant turnover by changes in the TRIM5 $\alpha$  B-box2 domain [J]. *J Virol*, **81**(19): 10362-10378.
- Gao GX, Guo XM, Goff S. 2002. Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCCH-type zinc finger protein [J]. *Science*, **297**: 1703-1706.
- Javanbakht H, Diaz-Griffero F, Stremlau M, Si Z, Sodroski J. 2005. The Contribution of RING and B-box 2 domains to retroviral restriction mediated by monkey TRIM5 $\alpha$  [J]. *J Biol Chem*, **280**(29): 26933-26940.
- Javanbakht H, Yuan W, Yeung D, Song B, Diaz-Griffero F, Li Y, Li X, Stremlau M, Sodroski J. 2006. Characterization of TRIM5 $\alpha$  trimerization and its contribution to human immunodeficiency virus capsid binding [J]. *Virology*, **353**(1): 234-246.
- Kuang YQ, Tang X, Liu FL, Jiang XL, Zhang YP, Gao GX, Zheng YT. 2009. Genotyping of *TRIM5* locus in Northern pig-tailed macaques (*Macaca leonina*), a primate species susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection [J]. *Retrovirology*, **6**(1):58
- Liao CH, Kuang YQ, Liu HL, Zheng YT, Su B. 2007. A novel fusion gene, TRIM5-Cyclophilin A in the pig-tailed macaque determines its susceptibility to HIV-1 infection [J]. *AIDS*, **8**: S19-26.
- Liu HL, Wang YQ, Liao CH, Kuang YQ, Zheng YT, Su B. 2005. Adaptive evolution of primate TRIM5 $\alpha$ , a gene restricting HIV-1 infection [J]. *Gene*, **362**: 109-116.
- Mische C, Javanbakht H, Song B, Diaz-Griffero F, Stremlau M, Strack B, Si Z, Sodroski J. 2005. Retroviral restriction factor TRIM5 $\alpha$  is a trimer [J]. *J Virol*, **79**(22): 14446-14450.
- Perron M, Stremlau M, Song B, Ulm W, Mulligan R, Sodroski J. 2004. TRIM5 $\alpha$  mediates the postentry block to N-tropic murine leukemia viruses in human cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**(32): 11827-11832.
- Saenz D, Teo W, Olsen J, Poeschla E. 2005. Restriction of feline immunodeficiency virus by Ref1, Lvl1, and primate TRIM5 $\alpha$  proteins [J]. *J Virol*, **79**(24): 15175-15188.
- Sakuma R, Mael A, Ikeda Y. 2007. Alpha interferon enhances TRIM5 $\alpha$  mediated antiviral activities in human and rhesus monkey cells [J]. *J Virol*, **81**(18): 10201-10206.
- Sawyer S, Emerman M, Malik H. 2007. Discordant evolution of the adjacent antiretroviral genes TRIM22 and TRIM5 in mammals [J].

- PLoS Pathogens*, **3**(12): e197.
- Sheehy A, Gaddis N, Choi J, Malim M. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein [J]. *Nature*, **418**(6898): 646-650.
- Si Z, Vandegraaff N, O'huigin C, Song B, Yuan W, Xu C, Perron M, Li X, Marasco W, Engelman A, Dean M, Sodroski J. 2006. Evolution of a cytoplasmic tripartite motif (TRIM) protein in cows that restricts retroviral infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**(19): 7454-7459.
- Stremlau M, Owens C, Perron M, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5 $\alpha$  restricts HIV-1 infection in Old World monkeys [J]. *Nature*, **427**(6977): 848-853.
- Stremlau M, Perron M, Lee M, Li Y, Song B, Javanbakht H, Diaz-Griffero F, Anderson D, Sundquist W, Sodroski J. 2006. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5 $\alpha$  restriction factor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**(14): 5514-5519.
- Tang X, Kuang YQ, Zheng YT. 2009. Research advance of TRIM5 $\alpha$  on structure and restriction mechanism to HIV-1 replication[J]. *Chn J Virol*, **25**(2): 148-153. [汤霞, 况轶群, 郑永唐. 2009. TRIM5 $\alpha$  分子结构和限制 HIV-1 复制机制的研究进展. 病毒学报, **25**(2): 148-153.]
- Uchil P, Quinlan B, Chan W, Luna J, Mothes W. 2008. TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle [J]. *PLoS Pathogens*, **4** (2): e16.
- Welkin E, Johnson & Sara L, Sawyer. 2009. Molecular evolution of the antiretroviral TRIM5 gene [J]. *Immunogenetics*, **61**: 163-176.
- Wilson S, Webb B, Maplanka C, Newman R, Verschoor E, Heeney J, Towers G. 2008. Rhesus Macaque TRIM5 alleles have divergent antiretroviral specificities [J]. *J Virol*, **82**(14): 7243-7247.
- Yamauchi K, Wada K, Tanji K, Tanaka M, Kamitani T. 2008. Ubiquitination of E3 ubiquitin ligase TRIM5 $\alpha$  and its potential role [J]. *FEBS J*, **275**(7): 1540-1555.
- Yap M, Nisole S, Lynch C, Stoye J. 2004. Trim5 $\alpha$  protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**(29): 10786-10791.

## 《基因组学与应用生物学》征订启事

《基因组学与应用生物学》是由广西大学主管和主办，公开发行的双月刊科学期刊。广西大学聘请中国科学院院士及美国国家科学院外籍院士张启发博士任主编，北京大学教授朱玉贤博士和海南省热带农业资源研究所所长方宣钧博士任执行主编，国内众多的著名学者出任编委。

《基因组学与应用生物学》将面向基因组学、分子遗传学、生化与分子生物学、生物信息学等基础学科领域，着重刊登农林科学、医药科学、动物科学、环境与生态科学以及生物学实验技术与方法等应用生物学领域的最新研究进展和成果。将开设综述与专论、研究论文、新技术新基因新种质等栏目。本刊按国际标准编排，题目摘要、图表、引用文献等均实行中英文对照，实现网上领先发表模式。

《基因组学与应用生物学》，前身是原《广西农业大学学报》，创刊于 1982 年。广西农业大学合并入广西大学以后更名为《广西农业生物科学》。《广西农业生物科学》已入编《中文核心期刊要目总览》2008 年版（即第五版）之综合性农业科学类的核心期刊，是中国科学引文数据库（CSCD）来源期刊，也是中国科技核心期刊即中国科技论文统计源期刊。2001 年入选国家新闻出版总署“中国期刊方阵”，先后被国际知名检索系统——英国国际农业与生物科学研究中心（CABI）、美国《化学文摘》（CA）、美国《剑桥科学文摘：自然科学》（CSA: NS）、英国《动物学记录》（ZR）、俄罗斯《文摘杂志》（AJ）等收录。

承载着《广西农业生物科学》的历史与荣誉，《基因组学与应用生物学》将在新的高度开拓奋进，为现代生命科学和应用生物学的研究与发展提供学术交流的平台，使之成为中国科学家走向世界的桥梁。

《基因组学与应用生物学》《Genomics and Applied Biology》，ISSN1674-568X，CN45-1369/Q，双月刊，双月 28 日出版，国内定价：人民币¥40.00/期，人民币¥240.00/年；国际定价：美元\$40.00/期，美元\$240.00/年。