中图分类号：R512.6+2　　学校代码：10660
UDC：616.9　　学　　号：2021110020300
学科专业代码：100201　　密　　级：公开

贵州醫科大學

# 2024 届硕士学位论文

（学术学位）

# TRIM29 影响 HBV 复制和聚乙二醇干扰素-α2b 抗病毒效应的研究

# Effect of TRIM29 on HBV replication and antiviral effect of pegylated interferon-α2b

研 究 生：廖心
指导教师：吴亚云 主任医师
张宝芳 副教授

年　　级：2021 级
专　　业：内科学（传染病学）
提交日期：二〇二四年五月

中图分类号：R512.6+2　　学校代码：10660
UDC：616.9　　学　　号：2021110020300
学科专业代码：100201　　密　　级：公开

# 贵州医科大学

# 2024 届 硕 士 学 位 论 文

（学术学位）

# TRIM29 影响 HBV 复制和聚乙二醇干扰素-α2b 抗病毒效应的研究

# Effect of TRIM29 on HBV replication and antiviral effect of pegylated interferon-α2b

论文作者：廖心
指导教师：吴亚云 主任医师；张宝芳 副教授
申请学位：医学硕士学位
培养单位：临床医学院
学科专业：内科学
研究方向：内科学（传染病学）
研究起止日期：2021年9月至 2024年6月
答辩委员会主席：赵雪珂 主任医师
论文答辩日期：2024年5月17日

# 目　录

前言.....1
1 材料与方法.....3
2 结果.....17
3 讨论.....31
4 结论.....33
参考文献.....34
综述 TRIM 蛋白在肝脏相关疾病发生发展中的作用.....38
参考文献.....44

# TRIM29 影响 HBV 复制和聚乙二醇干扰素-α2b 抗病毒效应的研究

专业：内科学　　学号：2021110020300　研究生：廖心

导师：吴亚云 张宝芳

## 摘要

**目的：**

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）是一种嗜肝类病毒，乙肝病毒感染可发展为慢性肝炎、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌。三联基序（the tripartite motif，TRIM）29蛋白是TRIM家族蛋白成员之一，已证实TRIM29能够参与先天免疫反应，调控病毒复制。然而，TRIM29蛋白与HBV相关的研究并不多见。因此，本研究主要探索TRIM29在HBV复制中发挥的作用，初步阐述TRIM29对聚乙二醇干扰素-α2b（pegylated interferon-α2b，PEG-IFN-α2b）抗病毒效应的影响，为HBV DNA的复制机制探索及聚乙二醇干扰素-α2b抗病毒作用靶点提供科学依据。

**方法：**

1. HBV复制与TRIM29有关：收集30名健康志愿者和34名未接受过治疗的慢性乙型病毒性肝炎（Chronic Hepatitis B，CHB）患者外周血标本，分离出外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cells，PBMCs），定量聚合酶链式反应（quantitative real time polymerase chain reaction，qRT-PCR）检测两组样本中TRIM29 mRNA的相对表达水平；蛋白质免疫印迹（Western Blot，WB）检测HepG2.2.15和HepG2细胞中TRIM29蛋白的表达情况。

2. TRIM29促进HBV复制：将pHBV1.3质粒转染至HepG2，构建HBV瞬时转染细胞模型。通过转染TRIM29过表达质粒和特异性si-RNA来上调和下调乙肝细胞模型的TRIM29基因，转染成功后，酶联免疫吸附测定试验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）检测细胞培养基中乙肝表面抗原（Hepatitis B surface antigen，HBsAg）和乙肝e抗原（Hepatitis B e antigen，HBeAg）的表达情况，qRT-PCR分析细胞中HBV pgRNA的相对表达水平，以此比较病毒复制水平

的变化情况。

3. TRIM29促进HBV复制相关机制的研究：将TRIM29过表达质粒或空载质粒转染至乙肝细胞模型中，WB检测两组细胞中扰素基因刺激因子（stimulator of interferon genes，STING）、TANK结合激酶1（TANK-binding kinase 1，TBK1）、TBK1磷酸化蛋白（p-TBK1）、干扰素调节因子3（interferon regulatory factor 3，IRF3）、IRF3磷酸化蛋白（p-IRF3）表达情况，qRT-PCR检测两组细胞IFN-α和IFN-β mRNA的相对表达水平。在HEK 293T细胞中按剂量梯度转染TRIM29质粒，并同时转染等量pHBV1.3质粒和STING质粒，WB检测TRIM29蛋白和STING蛋白表达情况，分析TRIM29对STING蛋白的影响作用。最后，使用蛋白免疫共沉淀（Co-Immunoprecipitation，Co-IP）技术检测TRIM29与STING之间的互作关系。

4. PEG-IFN-α2b对TRIM29表达的影响：不同浓度的PEG-IFN-α2b (0，10，100，1000和10000 U/mL) 处理HepG2和Huh7细胞24 h，利用qRT-PCR和WB检测TRIM29 mRNA和蛋白表达情况。

5. TRIM29表达与PEG-IFN-α2b抗病毒效应的影响：将TRIM29特异性si-RNA及对照si-RNA转染至HepG2.2.15细胞，转染成功后加入PEG-IFN-α2b处理细胞，WB检测细胞内抗病毒蛋白粘液病毒抗性基因1（myxoma resistance 1，MX1）和干扰素诱导蛋白1（tetratricopeptide repeats 1，IFIT1）表达情况。

6. PEG-IFN-α2b治疗早期CHB患者外周血PBMCs中TRIM29表达的动态变化：收集42例接受PEG-IFN-α2b治疗的CHB患者外周血，根据患者治疗24周时HBV DNA和HBsAg的变化情况，将CHB患者分为早期应答组（n＝18）和早期无应答组（n＝24），分析两组患者治疗前后TRIM29表达差异和动态变化特征。

**结果：**

1. 未治疗 CHB 患者 PBMCs 中 TRIM29 mRNA 相对表达水平高于健康对照组，HepG2.2.15 细胞内 TRIM29 蛋白的表达水平高于 HepG2 细胞。

2. 在乙肝细胞模型中，HBsAg、HBeAg 和 HBV pgRNA 的表达水平在过表达 TRIM29 后高于空载对照组，在敲低 TRIM29 后低于对照组。在机制研究方面，TRIM29 与 STING 蛋白相互结合，转染的 TRIM29 过表达质粒浓度越大，STING 蛋白的表达越低。此外，过表达 TRIM29 以后，STING、p-TBK1 和 p-IRF3 蛋白

表达增加，TBK1 和 IRF3 总蛋白表达无明显变化，并且 IFN-α和 IFN-β mRNA 相对表达水平降低。

3．PEG-IFN-α2b 分别处理 HepG2 和 Huh7 细胞，使用的 PEG-IFN-α2b 浓度越高 TRIM29 的表达越低。用等量 PEG-IFN-α2b 处理 HepG2.2.15 细胞，敲低 TRIM29 后，MX1 和 IFIT1 蛋白表达增加。在 PEG-IFN-α2b 治疗早期的 CHB 患者中，有应答患者 PBMCs 中 TRIM29 mRNA 的相对表达水平低于无应答患者，且在治疗过程中明显下降。

**结论：**

TRIM29 靶向 STING 降解，负向调控 STING-TBK1-IRF3 介导的干扰素信号通路促进 HBV 复制。TRIM29 干扰 PEG-IFN-α2b 的抗病毒作用，CHB 患者 PBMCs 中 TRIM29 的表达水平可能作为预测患者对 PEG-IFN-α2b 治疗应答效果的指标。

**关键词 ：**

TRIM29；乙型肝炎病毒；STING–TBK1–IRF3；聚乙二醇干扰素-α2b

# Effect of TRIM29 on HBV replication and antiviral effect of pegylated interferon-α2b

## ABSTRACT

Major: Internal Medicine Student ID：2021110020300 Candidate: Xin Liao

Supervisor: Wu Yayun；Zhang Baofang

**Objective：**

Hepatitis B virus (HBV) is a hepatotropic virus that can lead to chronic hepatitis, liver fibrosis, cirrhosis and even liver cancer. The tripartite motif (TRIM) 29 protein is a member of the TRIM family, and it has been proved that TRIM29 can participate in innate immune response and regulate viral replication. However, there are few studies on the relationship between TRIM29 protein and HBV. Therefore, this study mainly explores the role of TRIM29 in HBV replication, and preliminatively discusses the influence of TRIM29 on the antiviral effect of pegylated interferon-α2b (PEG-IFN-α2b). It provides scientific basis for exploring the replication mechanism of HBV DNA and the target of pegylated interferon-α2b antiviral action.

**Methods：**

1. HBV replication is associated with TRIM29: peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 30 healthy volunteers and 34 untreated Chronic Hepatitis B (CHB) patients. Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the relative expression of TRIM29 mRNA in the two groups. The difference of TRIM29 protein expression in HepG2.2.15 and HepG2 cells was detected.

2. TRIM29 promoted HBV replication: HepG2 was transfected with pHBV1.3 plasmid to construct HBV transient transfection cell model. TRIM29 gene was up-regulated and down-regulated in hepatitis B cell models by transfection of

TRIM29 overexpression plasmid and specific si-RNA. After successful transfection, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and Hepatitis Be antigen (HBeAg) in cell medium. The relative expression level of HBV pgRNA in cells was analyzed by qRT-PCR.

3. Study on the mechanism of HBV replication promoted by TRIM: The overexpressed or empty plasmid of TRIM29 was transfected into the hepatitis B cell model, and the expressions of stimulator of interferon genes (STING), TANK-binding kinase 1 (TBK1),TBK1 phosphorylated protein (p-TBK1), interferon regulatory factor 3 (IRF3) and IRF3 phosphorylated protein (p-IRF3) in the two groups were detected by WB, and the relative expression levels of IFN-α and IFN-β mRNA in the two groups were detected by qRT-PCR. In HEK 293T cells, TRIM29 plasmid was transfected according to dose gradient, and equal amounts of pHBV1.3 and STING plasmid were transfected simultaneously. WB detected the expression of TRIM29 protein and STING protein, and analyzed the effect of TRIM29 on STING protein. Finally, the interaction between TRIM29 and STING was investigated using the Co-Immunoprecipitation (Co-IP) technique.

4. Effects of PEG-IFN-α2b on TRIM29 expression: HepG2 and Huh7 cells were treated with different concentrations of PEG-IFN-α2b (0,10,100,1000 and 10000 U/mL) for 24 hours, and TRIM29 mRNA and protein changes were detected by qRT-PCR and WB.

5. Influence of TRIM29 expression and antiviral effect of PEG-IFN-α2b: TRIM29-specific si-RNA and control si-RNA were transfected into HepG2.2.15 cells. PEG-IFN-α2b cells were added after transfection, and the expression of antiviral proteins Myxoma resistance 1 (MX1) and tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1) in cells was detected by WB.

6. Dynamic changes of TRIM29 expression in PBMCs of early CHB patients treated with PEG-IFN-α2b: PBMCs of 42 CHB patients receiving PEG-IFN-α2b treatment was collected. According to the changes of HBV DNA and HBsAg at 24 weeks of treatment, CHB patients were divided into early response group (n = 18) and

early non-response group (n = 24). The differences and dynamic changes of TRIM29 expression before and after treatment were analyzed.

**Results:**

1. The relative expression level of TRIM29mRNA in PBMCs in untreated CHB patients was higher than that in healthy controls, and the expression level of TRIM29 protein in HepG2.2.15 cells was higher than that in HepG2 cells.

2. In the hepatitis B cell model, the expression levels of HBsAg, HBeAg and HBV pgRNA were higher than those of no-load control group after overexpression of TRIM29 and lower than those of control group after knockdown of TRIM29. In terms of mechanism studies, TRIM29 and STING protein bind to each other, and the higher the concentration of transfected TRIM29 overexpressed plasmid, the lower the expression of STING protein. In addition, after overexpression of TRIM29, the protein expressions of STING, p-TBK1 and p-IRF3 were increased, while the total protein expressions of TBK1 and IRF3 were not significantly changed, and the relative mRNA expression levels of IFN-α and IFN-β were decreased.

3. PEG-IFN-α2b treated HepG2 and Huh7 cells, the higher the concentration of PEG-IFN-α2b used, the lower the expression of TRIM29. HepG2.2.15 cells were treated with an equal amount of PEG-IFN-α2b, and the expression of MX1 and IFIT1 proteins increased after TRIM29 was knocked down. In the CHB patients at the early stage of PEG-IFN-α2b treatment, the relative expression level of TRIM29 mRNA in PBMCs in the responding patients was lower than that in the non-responding patients, and was significantly decreased during treatment.

**Conclusions：**

TRIM29 targets STING degradation and negatively regulates interferon signaling mediated by STING-TBK1-IRF3 to promote HBV replication. TRIM29 interferes with the antiviral effect of PEG-IFN-α2b, and the expression level of TRIM29 in PBMCs of CHB patients may serve as a predictor of the response of patients to PEG-IFN-α2b therapy.

**Key Words：**

TRIM29；Hepatitis B Virus；STING–TBK1–IRF3；pegylated interferon-α2b

# 缩略词表

| 缩略词 | 英文全称 | 中文全称 |
| --- | --- | --- |
| HBV | hepatitis B virus | 乙型肝炎病毒 |
| TRIM | the tripartite motif | 三联基序 |
| PEG-IFN-α2b | pegylated interferon-α2b | 聚乙二醇干扰素-α2b |
| CHB | Chronic Hepatitis B | 慢性乙型肝炎 |
| PBMCs | peripheral blood mononuclear cells | 外周血单个核细胞 |
| ELISA | enzyme linked immunosorbent assay | 酶联免疫吸附测定试验 |
| HBsAg | Hepatitis B surface antigen | 乙肝表面抗原 |
| HBeAg | Hepatitis B e antigen | 乙肝 e 抗原 |
| qRT-PCR | Quantitative real time polymerase chain reaction | 实时定量聚合酶链式反应 |
| WB | Western Blot | 蛋白质免疫印迹实验 |
| STING | stimulator of interferon genes | 干扰素基因刺激因子 |
| TBK1 | TANK-binding kinase 1 | TANK 结合激酶 1 |
| IRF3 | interferon regulatory factor 3 | 干扰素调节因子 3 |
| Co-IP | Co-Immunoprecipitation | 免疫共沉淀 |
| MX1 | myxoma resistance 1 | 粘液病毒抗性基因 1 |
| IFIT1 | tetratricopeptide repeats 1 | 干扰素诱导蛋白 1 |
| ISGs | interferon-stimulating genes | 干扰素刺激基因 |
| NAs | nucleos(t)ide analogs | 核苷(酸)类似物 |
| rcDNA | relaxed-circular DNA | 松弛环状 DNA |
| ORF | open reading frames | 开放阅读框 |
| HBcAg | Hepatitis B core antigen | 乙肝核心抗原 |
| NTCP | sodium taurocholate cotransporting polypeptide | $Na^+$-牛磺胆酸共转运多肽 |
| cccDNA | covalently closed circular DNA | 共价闭合的环状 DNA |

续上表

| | | |
|---|---|---|
| cGAS | cyclic GMP-AMP Synthase | 环鸟嘌呤核苷酸-腺嘌呤核苷酸合成酶 |
| cGAMP | Cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate | 环化二嘌呤核苷 |
| ATDC | ataxia-telangiectasia group D complementing | 共济失调毛细血管扩张症 D 组互补基因 |
| EBV | Epstein-Barr virus | EB 病毒 |
| RFD | RING-finger domain | 环指结构域 |
| BBX | B-box domain | 锌指结构域 |
| CCD | coiled-coil domain | 螺旋线圈结构域 |

# TRIM29 影响 HBV 复制和对聚乙二醇干扰素-α2b 抗病毒效应的研究

## 前 言

HBV 感染是一个重大的全球公共卫生问题，全世界约有 2.96 亿人感染 HBV，一年有超过 80 万人死于 HBV 感染[1]。HBV 是嗜肝类病毒，病毒在肝脏内不断地复制可能发展为慢性肝炎、肝纤维化、肝硬化甚至肝细胞肝癌[2, 3]。HBV 传播方式主要有 3 种，包括母婴传播、血液传播和性传播，其中母婴传播是我国乙肝病毒感染的主要途径[4, 5]。接种乙肝疫苗是预防乙肝的主要手段，尽管乙型肝炎疫苗对预防和控制 HBV 感染成果显著，但对于长期感染的患者，还需要其他手段来控制病毒复制[6]。目前临床上常用的抗病毒药物主要为两种，核苷类似物（nucleos(t)ide analogs，NAs）和 PEG-IFN-α。PEG-IFN-α给药方式复杂，副作用较大，不过有希望清除 HBsAg，而 NAs 治疗通常难以达到功能性治愈。因此需要寻找新的靶点、研究新的药物是当前 HBV 研究的重要方向[7, 8]。

HBV 是一种包膜 DNA 病毒，基因组 DNA 是一个长度约为 3.2 kb 的松弛环状 DNA(relaxed-circular DNA，rcDNA)，编码四个高度重叠的开放阅读框（open reading frames，ORF），分别为聚合酶（polymerase，P）基因、pre-S1/pre-S2/S 基因、precore/core（preC/C）基因和 X 基因[9, 10]。P 基因区是 HBV 基因中最长的 ORF，编码病毒聚合酶和反转录酶，在乙肝病毒的复制过程中发挥关键作用[9]。S 基因区编码 HBsAg、Pre S1 和 Pre S2 抗原[11]。preC/C 基因区编码乙肝核心抗原（Hepatitis B core antigen ，HBcAg）和 e 抗原[12]。X 基因区是 HBV 基因组中最小的 ORF，编码乙肝病毒的 X 蛋白（HBx），目前 X 蛋白的确切功能尚不完全清楚，该蛋白可能与调节多种信号转导途径有关，与肝细胞癌发生也可能存在关系[13, 14]。

病毒入侵宿主后，肝细胞膜表面的 $Na^+$-牛磺胆酸共转运多肽(sodium taurocholate cotransporting polypeptide，NTCP)能够与病毒包膜蛋白发生特异性结合，继而病毒包膜与肝细胞膜融合，通过内吞作用将 rcDNA 吞入宿主肝细胞的细胞核总，rcDNA 通过细胞修复系统转化为共价闭合的环状 DNA (covalently

closed circular DNA ,cccDNA)[15-17]。cccDNA 是所有病毒蛋白转录本的模板，在病毒持续感染和复发中起着至关重要的作用，也是治愈 CHB 的主要障碍[18, 19]。胞质中的 dsDNA 可被环鸟嘌呤核苷酸-腺嘌呤核苷酸合成酶（cyclic GMP-AMP Synthase，cGAS）识别，活化并催化产生环化二嘌呤核苷（Cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate，cGAMP），活化的 cGAMP 与 STING 结合，激活 TBK1、IRF3 信号转导，从而促进 IFN-I 的产生[20-22]。多项研究发现，IFN 作为直接抗病毒作用的细胞因子，参与先天免疫应答反应，具有清除 cccDNA 发挥抗病毒的作用[23, 24]。

根据 IFN 受体的信号类型，IFN 分为三类:I型(α， β， λ， κ， ω)， II型(γ)和III型(λ)。当病毒侵入宿主时，先天免疫系统通过模式识别受体（Pattern recognition receptors，PRRs）检测病毒，启动一系列信号级联反应，产生抗病毒因子 IFN[25]。干扰素与细胞膜受体结合后，激活 Janus 激酶信号转导和转录激活因子（Janus kinase signal transducer and activator of transcription ，JAK-STAT）信号通路，促使干扰素刺激基因（IFN-stimulated genes，ISGs）表达，这些基因编码的蛋白可通过抑制病毒的转录、翻译和复制来抑制病毒的增殖，发挥抗病毒作用[26, 27]。迄今为止，已经发现了数百种干扰素刺激基因，比如 APOBEC、IFIT1、MX1 和 TRIM14 等[28-30]。

TRIM 蛋白家族是 E3 泛素连接酶家族，参与免疫、转录调节、炎症、细胞周期进程和细胞凋亡等多种生物学过程[31, 32]。蛋白的改变与疾病发生相关，TRIM 蛋白在多种疾病中起着作用，包括神经精神疾病、发育性疾病、心血管疾病、染色体异常、感染性疾病以及癌症[33, 34]。TRIM29 是 TRIM 蛋白家族中的一员，位于染色体 11q23，编码 588 个氨基酸的蛋白质，又名共济失调毛细血管扩张症 D 组互补基因（ataxia-telangiectasia group D complementing，ATDC） ，具有一系列保守结构域[35]。TRIM29 蛋白广泛表达于多种组织和细胞中，比如外周血单个核细胞、肠上皮细胞和气道上皮细胞等[36, 37]。近年研究还发现 TRIM29 能够负向调节宿主对 RNA 病毒和 DNA 病毒的先天免疫反应，具有抑制免疫激活的作用[38, 39]。TRIM29 可在 k11 的介导下，与 RNA 病毒感知信号通路中的关键适配器线粒体抗病毒信号蛋白直接结合，诱导 MAVS 泛素化和降解，负向调控 IFN 的生成[38]。EB 病毒（Epstein-Barr virus ，EBV）感染可诱导 TRIM29 高

表达，TRIM29 可通过抑制 IFN-I的产生来促进 EBV 感染[40]。在 HSV-1 感染模型中，TRIM29 基因敲除小鼠对病毒感染的抵抗性比野生型小鼠更强，生存率更好，器官内病毒载量较少，血清中 IFN-I水平也较高[40]。

当前研究发现，TRIM 蛋白家族多个成员影响 HBV 复制。例如，TRIM21 与 HBx 蛋白相互作用，靶向 HBx 泛素化和蛋白酶体降解，导致染色体结构维持蛋白 6 降解受损，抑制 HBV 复制[41]；TRIM5γ通过促进 k48 相关的泛素化和 K95 泛素位点 HBx 蛋白的降解来抑制 HBV 复制[42]；TRIM25 可以增强 HBx 的 k90 位点泛素化，并通过蛋白酶体途径促进 HBx 降解，TRIM25 还可能作为适配器，增强 RIG-I 对 pgRNA 的识别，从而进一步促进干扰素的产生，抑制 HBV 的复制[43]。

目前关于 TRIM29 与 HBV 之间的研究还不多见，鉴于 TRIM29 在 EBV、HSV 等 DNA 病毒中发挥作用，HBV 作为一种 DNA 病毒，我们猜测，TRIM29 也可能在 HBV 复制中发挥作用。本研究对 TRIM29 在 HBV 复制和 PEG-IFN-a2b 治疗疗效中的潜在作用进行初步探讨。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 研究对象

本实验所用血液标本均采集自 2021 年 7 月至 2023 年 9 月就诊于贵州医科大学附属医院感染科门诊的 CHB 患者 72 名和体检中心健康志愿者 30 名。其中未治疗 CHB 患者 34 名，接受 PEG-IFN-α2b 治疗的 CHB 患者 42 名。本研究经贵州医科大学附属医院伦理委员会批准（伦理批号：2020208），所有研究参与者均获得书面知情同意。在进一步处理之前，从血液样本中分离出 PBMCs。

纳入标准：（1）患者年龄＞18 岁，性别不限；（2）CHB 患者诊断与 2019 年更新的《中国慢性乙型肝炎防治指南（2019 版）》一致[44]；（3）所有研究参与者在收集样本前均签署了知情同意书。

排除标准：（1）神经精神疾病、发育性疾病、心血管疾病、染色体异常以及肿瘤等严重疾病患者；（2）合并其他病毒性肝炎如甲肝、丙肝、戊肝、自身

免疫性肝病等任何一种，CHB 与其他肝脏疾病并存的患者如肝硬化、肝豆状核变性、有肝移植史和/或肝细胞癌证据的患者；（3）接受免疫抑制治疗的患者。

1.1.2 实验细胞株

本实验所用的 HepG2 和 Huh7 细胞购于武汉普诺赛生命科技有限公司，HepG2.2.15 细胞购于上海富衡生物科技有限公司，HEK293T 细胞株为本实验室留存。

1.1.3 实验质粒

本实验中所用 HBV 1.3-mer WT replico 质粒购于淼灵生物公司，pCMV-TRIM29-Flag、pCMV-STING-Myc 购于上海吉凯基因公司，si-TRIM29 购于上海汉恒生物科技公司。

1.1.4 实验药品

PEG-IFN-α2b 购于中国厦门特宝生物工程股份有限公司，批准文号：国药准字 S20160001，货号：202208JS15。

1.1.5 实验试剂和耗材

| 名称 | 生产公司 | 产地 |
|---|---|---|
| DMEM 培养基 | Hyclone | 美国 |
| MEM 培养基 | GIBCO | 美国 |
| PBS | 索莱宝科技有限公司 | 北京 |
| DMSO | 索莱宝科技有限公司 | 北京 |
| 胰酶-EDTA | GIBCO | 美国 |
| 胎牛血清 | BI | 以色列 |
| G418 | 索莱宝科技有限公司 | 北京 |
| 人 HBsAg 酶联免疫分析(ELISA)试剂盒 | 晶美生物 | 江苏 |
| 人 HBeAg 酶联免疫分析(ELISA) | 晶美生物 | 江苏 |
| 无酶无菌水 DEPC 处理水 | 索莱宝科技有限公司 | 北京 |
| 人外周血单核细胞分离液 | 索莱宝科技有限公司 | 北京 |
| 青霉素链霉素溶液 双抗 | GIBCO | 美国 |

续上表

| | | |
|---|---|---|
| 无血清冻存液 | 新赛美生物科技有限公司 | 苏州 |
| PrimeScript RT reagent Kit with gDNA EraserRR047A | Takara | 日本 |
| TB Green Premix Ex Taq II RR820A | Takara | 日本 |
| 甘氨酸 | 索莱宝科技有限公司 | 北京 |
| Tris | 索莱宝科技有限公司 | 北京 |
| SDS | 索莱宝科技有限公司 | 北京 |
| PEG-IFN-α2b | 特宝生物工程 | 厦门 |
| 质粒提取试剂盒 | Omega | 美国 |
| 甘油 | 索莱宝科技有限公司 | 北京 |
| 氨苄青霉素 | 索莱宝科技有限公司 | 北京 |
| 琼脂粉 | Biofroxx | 德国 |
| LB 肉汤 | 海博生物技术有限公司 | 青岛 |
| RNA 提取试剂盒 | Omega | 美国 |
| Opti-MEM 培养基 | GIBCO | 美国 |
| Lipofectmine 3000 | Invitrogen | 美国 |
| RIPA 裂解液 | 索莱宝科技有限公司 | 北京 |
| 快速制胶盒 | 索莱宝科技有限公司 | 北京 |
| 免冰浴快速转膜缓冲液（10X） | 雅酶 | 上海 |
| 脱脂奶粉 | 雅酶 | 上海 |
| ProteinA/G 磁珠 | Santa Cruze | 美国 |
| DYKDDDDK tag Recombinant antibody | 三鹰 | 武汉 |
| MYC tag Polyclonal antibody | 三鹰 | 武汉 |
| MG-132 | APEXBIO | 美国 |
| 彩虹 marker11-180KD | Invitrogen | 美国 |
| ECL 发光液 | 雅酶 | 上海 |

续上表

| | | |
|---|---|---|
| BCA 蛋白浓度测定试剂盒 | 索莱宝科技有限公司 | 北京 |
| WB 一抗稀释液 | 雅酶 | 上海 |
| WB 二抗稀释液 | 雅酶 | 上海 |
| 山羊抗兔二抗 | 三鹰 | 武汉 |
| TRIM29 抗体 | 三鹰 | 武汉 |
| STING 抗体 | 三鹰 | 武汉 |
| IFIT1 抗体 | 三鹰 | 武汉 |
| MX1 抗体 | 三鹰 | 武汉 |
| Tbk1 抗体 | 博奥龙生物 | 苏州 |
| IRF-3 抗体 | 博奥龙生物 | 苏州 |
| p-Tbk1 抗体 | 博奥龙生物 | 苏州 |
| p-IRF-3 抗体 | 博奥龙生物 | 苏州 |
| GAPDH 抗体 | Abcam 公司 | 美国 |
| β-actin 抗体 | Abcam 公司 | 美国 |
| PVDF 膜 | Merck Millipore | 美国 |
| 5X 蛋白上样缓冲液 | 碧云天 | 上海 |
| T25 透气盖培养瓶 | 耐思生物 | 上海 |
| 六孔板 | 耐思生物 | 上海 |
| 96 孔板 | 耐思生物 | 上海 |
| 5mL 离心管 | 耐思生物 | 上海 |
| 50mL 离心管 | 耐思生物 | 上海 |
| 0.2mL 离心管 | 耐思生物 | 上海 |
| 吸头 | 耐思生物 | 上海 |
| 75%乙醇 | 厦门研科生物 | 厦门 |
| 多聚甲醛 | 厦门研科生物 | 厦门 |
| 0.2mL 八连管 | 耐思生物 | 上海 |
| 1.5 ml EP 管 | 耐思生物 | 上海 |
| β-巯基乙醇 | 索莱宝科技有限公司 | 北京 |

1.1.6 实验仪器设备

| 设备名称 | 生产厂家 |
| --- | --- |
| 恒温震荡摇床 | 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 |
| 水平摇床 | 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 |
| 超微定量核酸蛋白检测仪 | 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 |
| 多功能酶标仪 | 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 |
| 生物安全柜 | 新加坡艺思高（ESCO）科技有限公司 |
| CO2 细胞培养箱 | 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 |
| 台式高速冷冻离心机 | 德国 Eppendorf 生物科技公司 |
| 微量台式离心机 | 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 |
| 台式离心机 | 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 |
| 微量可调移液器 | 德国 Eppendorf 生物科技公司 |
| 微量可调移液器 | 上海大龙生物科技有限公司 |
| -20℃低温冰箱 | 青岛海尔 |
| 4℃冰箱 | 青岛海尔 |
| -80℃冰箱 | 苏州医疗仪器厂产品 |
| Western Blot 垂直电泳仪 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| Western Blot 转膜仪 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| 实时荧光定量 PCR 仪 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| 研磨仪 | 美国 MPbio 公司 |
| ProFlex PCR 仪 | 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 |
| 倒置显微镜 | 德国蔡司公司 |
| 正置显微镜 | 德国徕卡（Leica）公司 |
| 电子天平 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| 高压灭菌锅 | 新加坡艺思高（ESCO）科技有限公司 |
| 化学发光成像仪 | 上海勤翔 |
| 凝胶成像仪 | 美国 Bio-Rad 公司 |
| 超声破碎仪 | 宁波新芝 |
| 制冰机 | 日本三洋公司 |

1.1.7 引物序列

| 引物名称 | 序列（5'to 3'） |
|---|---|
| HBV pgRNA-F | TCTTGCCTTACTTTTGGAAG |
| HBV pgRNA-R | AGTTCTTCTTCTAGGGGACC |
| Hu-TRIM29-F | TGCGAGCTGCATCTCAAGC |
| Hu-TRIM29-R | GGTGCTATGATTCTTGTGCTCC |
| Hu-IFN-α-F | TGACCTCAAAGCCTGTGTGATG |
| Hu-IFN-α-R | AAGTATTTCCTCACAGCCAGCAG |
| Hu-IFN-β-F | ACTGCCTCAAGGACAGGATG |
| Hu-IFN-β-R | AGCCAGGAGGTTCTCAACAA |
| Hu-STING-F | GATATCTGCGGCTGATCCTG |
| Hu-STING-R | GCTGTAAACCCGATCCTTGA |
| Hu-GAPDH-F | CGGATTTGGTCGTATTGGG |
| Hu-GAPDH-R | TCTCGCTCCTGGAAGATGG |

## 1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞提取

（1）取新鲜抗凝全血 4 mL，用等体积 PBS 稀释全血。

（2）在离心管中加入等体积分离液（二者的总体积不能超过离心管的三分之二），将稀释后的血液平铺到分离液液面上方，注意保持两液面界面清晰。

（3）室温，水平转子 1000 g，离心 20~30 min。

（4）离心后将出现明显的分层：最上层是稀释的血浆层，中间是透明的分离液层，血浆与分离液之间的白膜层即为单个核细胞层，离心管底部是红细胞与粒细胞。

（5）小心的吸取白膜层细胞到 15 mL 洁净的离心管中，10 mL PBS 洗涤白膜层细胞。

（6）250 g，离心 10 min。

（7）弃上清，5 mL 的 PBS 重悬细胞，250 g，离心 10 min。

（8）重复步骤（7）

（9）弃上清，细胞重悬备用。

1.2.2 细胞实验

1.2.2.1 培养条件

Huh7、HepG2、HEK 293T 细胞在 10% 胎牛血清和 1%双抗的 DMEM 培养基中培养，HepG2.2.15 细胞在 10% 胎牛血清、1%双抗和 480 μg/mL G418 的 MEM 培养基中培养。培养环境：37℃；空气，95%；二氧化碳，5%，培养箱湿度为 70%-80%。

1.2.2.2 细胞复苏

水浴锅提前预热至 37℃，将含有细胞悬液的冻存管放入水浴锅中迅速解冻，待冻存液融化后快速转移至含 5 mL 完全培养基的离心管中，缓慢吹打混匀，1000 rpm 离心 5 min 培养基，弃去上清液后加入 5 mL 完全培养基重悬细胞。然后将细胞悬液等量分成 2 或 3 份，分别加入含 2 mL 完全培养基的 T25 细胞培养瓶，置于细胞培养箱培养。

1.2.2.3 细胞传代

当细胞密度达 80%-90%后弃去培养上清，用高压灭菌的 PBS 润洗细胞 2 次，弃 PBS。向培养瓶中加入 1 mL 胰蛋白酶，放入细胞培养箱消化 4~5 min，待 70%细胞变圆脱落后加入 5 mL 完全培养基终止消化。轻轻吹打细胞，细胞消化完成后转移至 15 mL 离心管，1000 rpm 离心 5 min，离心后弃去培养基，向离心管中加入 2 mL 完全培养基重悬细胞。将细胞悬液按 1：3 的比例分到新 T25 细胞培养瓶中，添加 4 mL 完全培养基混匀，置于细胞培养箱培养。

1.2.2.4 细胞冻存

细胞密度达 75%~85%后，用高压灭菌的 PBS 润洗 3 次。向培养瓶中加入 1 mL 胰蛋白酶，消化细胞 4~5 分钟，待 70%细胞变圆脱落后加入 5 mL 完全培养基终止消化。轻轻吹打后转移至 15 mL 离心管，1000rpm 离心 5 min，离心后弃去培养基，用 1 mL 无血清细胞冻存液重悬细胞。然后把细胞悬液转移到冻存管，用封口膜封好冻存管，标记细胞名称、日期等信息，迅速将要冻存的细胞置于-80℃冰箱。

1.2.2.5 PEG-IFN-α2b 处理细胞

处理前一天将 Huh7 和 HepG2 细胞接种到六孔板内，次日分别加入浓度为 0、10、100、1000 和 10000 U/mL 的 PEG-IFN-α2b 培养，培养 24 小时后弃上清，收集细胞，提取细胞 RNA 和蛋白。

1.2.3 细胞或组织总 RNA 的检测

1.2.3.1 细胞或组织总 RNA 提取

（1）使用前每 1 mL TRK Lysis Buffer 加入 20 μL β-巯基乙醇配置成裂解液

① 取 350 μL 裂解液加入细胞充分吹打，将裂解液转移至匀浆柱后套入 2 mL 离心管，常温 14000 g 离心 2 min，收集滤液；

② 称取 15 mg 组织，液氮研磨后加入 350 μL 裂解液充分混匀，裂解液转移至匀浆柱后套入 2 mL 离心管，室温 14000 g 离心 2 min，收集滤液。

（2）加入等体积的 70%乙醇到滤液中，涡旋混匀。

（3）将 RNA 结合柱套入收集管中，转移第二步得到的混合液，室温 10000 g 离心 1min，弃滤液。

（4）将 RNA 结合柱套入收集管中，加入 500 μL RNA Wash Buffer I 至结合柱，10000 g 离心 30 s，弃滤液。

（5）将 RNA 结合柱套回收集管中，加入 500 μL RNA Wash Buffer II 至结合柱，10000 g 离心 1 min，弃滤液。此操作重复 2 次。

（6）将 RNA 结合柱套回收集管中，10000 g 离心空甩 2 min。

（7）将 RNA 结合柱套入新的 1.5 mL 离心管中，加入 50 μL 无菌无酶水至结合柱中，10000 g 离心 2 min 洗脱 RNA，测定 RNA 的浓度和 OD 值。

1.2.3.2 RNA 逆转录为 cDNA

（1）配置反应体系，去除基因组 DNA

| 试剂 | 使用量 |
|---|---|
| gDNA Eraser | 1.0 μL |
| 5×gDNA Eraser Buffer | 2.0 μL |
| Total RNA | *1 |
| RNase Free dH2O | 补足至 10 μL |

（2）42℃金属浴 2min，置冰上。

（3）配置反应体系，反转录反应

| 试剂 | 使用量 |
| --- | --- |
| 步骤 1 的反应液 | 10.0 μL |
| 5×PrimeScript Buffer 2（for Real Time） | 4.0 μL |
| RT Primer Mix | 1.0 μL |
| PrimeScript RT Enzyme Mix I | 1.0 μL |
| RNase Free dH2O | 4.0 μL |
| 总量 | 20 μL |

（4）37℃，15 min，85℃，5 s，4℃金属浴。

1.2.3.3 实时定量聚合酶链式反应（Quantitative real time polymerase chain reaction，qRT-PCR）

（1）配置 PCR 反应液

| 试剂 | 使用量 |
| --- | --- |
| cDNA | 2 μL |
| PCR Forward Primer（10 μM） | 0.8 μL |
| PCR Reverse Primer（10 μM） | 0.8 μL |
| TB Green Premix Ex Taq II（Tli RNaseH Plus）（2X） | 10 μL |
| ROX Reference Dye（50X） | 0.4 μL |
| 无菌无酶水 | 6 μL |
| 总量 | 20 μL |

（2）反应条件：

① 95℃，30 s，重复 1 次

② 95℃，5 s，60℃，30 s，重复 40 次

（3）分析数据。

1.2.4 细胞或组织蛋白检测

1.2.4.1 提取细胞或组织蛋白

（1）样品处理：按每 1 mL RIPA 加入 10 μL PMSF 配制裂解液，再向裂解液中加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂，裂解液和抑制剂比例为 5:1。

① 对于贴壁细胞：细胞去除培养液后用 PBS 缓冲液冲洗 3 遍，弃掉 PBS 后 6 孔板每孔中加入 200 μL 裂解液，细胞刮收集细胞，转移至 1.5 mL 离心管中，用枪吹打数下，使细胞充分裂解，冰上裂解 30 分钟。

② 对于组织样品：先把组织剪切成细小的碎片，按照每 20 mg 组织加入 250 μL 裂解液，再用超声破碎仪破碎组织，使组织充分裂解，冰上放置 30 分钟。

（2）将裂解后的样品 4℃ 10000 g 离心 5min，收集上清至新的离心管，得到总蛋白。

1.2.4.2 BCA 法蛋白定量

（1）BCA 试剂和 Cu 试剂按 50:1 比例配制 BCA 工作液，充分混匀。

（2）取 10 μL BSA 标准品用 PBS 稀释至 100 μL。将标准品按 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 μL 加到 96 孔板的蛋白标准品孔中，加 PBS 补足至 20 μL。

（3）样品适当稀释后取 20 μL 到 96 孔板中，每个样品设置 3 个复孔。

（4）各孔加入 200 μL BCA 工作液，37℃放置 15~30 min。用多功能酶标仪测定 562 nm 处吸光值，作标准曲线，分析蛋白浓度。

1.2.4.3 蛋白变性

根据 BCA 法计算出的蛋白浓度，分别加入适量 PBS 和蛋白样品于 1.5 mL 离心管中，使各组浓度一致，同时加入 5×Loading Buffer，5×Loading Buffer：样本量比例为 1:5，随后在 100℃金属浴中进行变性 10 min，最后保存于-80℃冰箱备用。

1.2.4.4 蛋白免疫印迹法检测蛋白表达水平

（1）配制 Western blot 实验中的试剂：

① 电泳缓冲液：电子天平分别称取 SDS 1.0 g、Tris 3.03 g、甘氨酸 14.4 g，加入 1 L 的去离子水，使用电动磁力搅拌器充分溶解混匀。

② 转膜液：按去离子水 0.8 L、甲醇溶液 0.1 L 和免冰浴快速转膜缓冲液（10X）0.1 L 的配方配制转膜液，放入冰箱中 4℃保存。

c.封闭液（5%脱脂牛奶）：电子天平称取脱脂奶 2 g，溶解于 50 mL 去离子水中，放置于摇床上震荡，使奶粉充分溶解。

（2）SDS-PAGE 电泳

① 根据蛋白分子量的大小，配制合适浓度的分离胶。分离胶配制步骤均按照北京索莱宝制胶盒说明书严格进行。

② 将提前配制好的分离胶放入电泳槽内，夹子固定住。

③ 向电泳槽中加入提前配制好的电泳液，拔下分离胶中的梳子，电泳液淹没所有分离胶。

④ 向分离胶的泳道加入 3 μL 蛋白 marker 和 15 μL 已经提取的蛋白样品。

⑤ 电泳仪先恒压 80 V 电泳 30 min，再恒压 120 V 电泳，电泳至蛋白样品及 Marker 到达胶底后关闭电泳仪，停止电泳。

（3）转膜

① 剪裁合适大小的 PVDF 膜，浸泡于甲醇中激活 15 s。

② 以纤维垫、厚滤纸、PVDF 膜、分离胶、厚滤纸、纤维垫的顺序从上到下放置转模夹，再将转模夹放入转模槽。

③ 连接电源，以恒流 280 mA 的条件转膜 90 min。

（4）封闭

转膜结束后，取出 PVDF 膜，用 TBST 洗涤 5 min，洗去残留的转膜液后放入 5%脱脂奶粉的封闭液 PVDF 膜，室温水平摇床上缓慢摇动约 2 h。

（5）孵育一抗

封闭结束后弃掉封闭液，用 TBST 清洗 PVDF 膜，去除膜上的封闭液，一共清洗 3 次，每次 5 min。按照抗体说明书的比例，使用一抗稀释液稀释好抗体，将 PVDF 膜放入配置好的一抗，使 PVDF 膜完全浸入一抗中，4℃冰箱中过夜孵育。

（6）洗膜

一抗过夜孵育后，回收一抗，取出 PVDF 膜，用 TBST 清洗 3 次，每次 5 min。

（7）孵育二抗

按照抗体说明书的比例，使用二抗稀释液稀释好抗体，将 PVDF 膜放入配置好的二抗，使 PVDF 膜完全浸入二抗中，平整的放置于水平摇床上，室温孵育 1.5 h。孵育后回收二抗，取出 PVDF 膜，用 TBST 清洗 3 次，每次 5 min。

（8）化学发光

按 ECL 超敏化学发光液说明书的方法配制曝光液，用镊子取出 PVDF 膜，将其平整铺于化学发光仪中，滴加配好的混合化学发光液，随后显影成像，保存图像结果。

（9）条带分析：使用 Image J 软件分析条带结果的灰度值，随后统计分析结果。

1.2.5 酶联免疫吸附测定

（1）用无菌管收集细胞培养上清，2000 rpm 离心 20 min 后仔细收集上清。

（2）设置标准品孔，标准品按 8、4、2、1、0.5、0 ng/mL 浓度一次加入标准品孔。

（3）设置空白孔，空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同

（4）设置样品孔，酶标包被板待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL，然后再加待测样品 10 μL，加样时样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。 每个样本设置 3 个复孔。

（5）每孔加入 100 μL 酶标试剂（空白孔除外）。

（6）用封板膜封板，37℃温箱温育 60 min。

（7）用去离子水稀释浓缩洗涤液，稀释 20 倍后备用。

（8）小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 s 后弃去，重复洗涤 5 次后拍干。

（9）每孔先加入 50 μL 显色剂 A ，再加入 50 μL 显色剂 B，轻轻震荡混匀，37℃避光显色 15 min。

（10）每孔加入 50 μL 终止液，充分混匀，终止反应，溶液颜色由蓝转黄。

（11）加终止液后 15 min 以内，以空白孔调零，450 nm 波长依序测量各孔的吸光度。

（12）计算结果，分析浓度。

1.2.6 质粒提取

（1）取出过表达目的基因的甘油菌，接种环蘸取适量菌液，按平板划线法在 LB 固体培养基表面进行分区划线，培养箱 37℃恒温培养 12 h。

（2）挑取培养基表面单克隆菌落接种于 LB 液体培养基中，37℃，220 rpm，摇床上培养 12 h。

（3）向 650 μL 菌种中加入 150 μL 甘油，甘油保种，余下的菌液用于提取质粒。

（4）取 5 mL 菌液，室温，10000 g 离心 1 min。

（5）弃上清，取 250 μL Solution I/RNase A，涡旋振荡器充分混匀。

（6）转移菌液至新的 1.5 mL 离心管，加入 250 μL Solution II，移液枪吹打混匀（不超过 5 min）。

（7）加入 350 μL Solution III，温和颠倒数次，出现白色絮状物。

（8）室温下 10000 g 离心 10 min。

（9）小心吸取上清液，转移至 2 mL HIBind DNA Mini 收集管。

（10）室温下 13000 g 离心 1 min。

（11）弃过滤液，加入 500 μL HBC Buffer。

（12）室温下 13000 g 离心 1 min。

（13）弃过滤液，加入 700 μL DNA Wash Buffer。

（14）室温下 13000 g 离心 1 min。

（15）重复（13）-（14）步骤一次

（16）弃过滤液，室温下 13000 g 离心 2 min，干燥 DNA 收集管。

（17）加入 50μL 无菌无酶水，室温下放置 1 min 后 13000 g 离心 1 min，洗脱 DNA。

（18）检测浓度，-20℃保存。

1.2.7 质粒转染

（1）HepG2、HepG2.2.15、HEK293T 采用 Lipofectamine 3000 转染。

（2）转染前一天将需要接种的细胞于六孔板上种板，细胞浓度达 65%~75%时，弃含血清培养基，PBS 缓慢清洗 2 次细胞，加入 2 mL MEM 或 DMEM 培养基，开始制备转染体系。

（3）使用 125 μL Opti-MEM 培养基稀释 5 μL Lipofectamine 3000 试剂。

（4）按照 125 μL Opti-MEM 培养基、5 μg 质粒 DNA 和 5 μL P3000 试剂的成分配制 DNA 预混液。

（5）将 DNA 预混液加入稀释好的 Lipofectamine 3000，室温孵育 15 分钟。

（6）将孵育完成的 DNA- 脂质复合物加入细胞培养液中，轻摇混匀，使 DNA-脂质复合物能够在六孔板内均匀转染。

（7）37℃、5%CO2 的恒温培养箱中转染 6 h，然后弃培养基，PBS 清洗 2 遍后更换新鲜的完全培养基。

（8）按需要时间点收集培养液和细胞，-80℃冰箱保存。

1.2.8 si-RNA 转染

（1）HepG2、HepG2.2.15 采用 Lipofectamine 3000 转染。

（2）转染前一天将需要接种的细胞于六孔板上种板，细胞浓度达 65%~75%时，弃含血清培养基，PBS 缓慢清洗 2 次细胞，加入 2mL MEM 或 DMEM 培养基，开始制备转染体系。

（3）使用 125 μL Opti-MEM 培养基稀释 5 μL Lipofectamine 3000 试剂。

（4）si-RNA 加入到 125 μL Opti-MEM 培养基中。

（5）将 si-RNA 稀释液加入到稀释好的 Lipofectamine 3000 溶液中，室温孵育 15 min。

（6）将孵育完成的 si-RNA 加入细胞培养液中。

（7）细胞于 37℃、5% CO2 的恒温培养箱培养。

（9）按需要时间点收集培养液和细胞，-80℃冰箱保存。

1.2.9 免疫共沉淀试验

1.2.9.1 细胞转染

（1）转染前一天将 293T 细胞接种于六孔板上，细胞浓度达 65%~75%时，弃含血清培养基，PBS 缓慢清洗 2 次细胞，加入 2mL DMEM 培养基，准备转染。

（2）使用 125 μL Opti-MEM 培养基稀释 5 μL Lipofectamine 3000 试剂。

（4）按照 125 μL Opti-MEM 培养基、3 μg TRIM29 质粒、3 μg STING 质粒和 5 μL P3000 试剂的成分配制 DNA 预混液。

（5）将 DNA 预混液加入稀释好的 Lipofectamine 3000，室温孵育 15 分钟。

（6）将孵育完成的 DNA-脂质复合物加入细胞培养液中，轻摇混匀，使 DNA- 脂质复合物能够在六孔板内均匀转染。

（7）37℃、5% $CO_2$ 的恒温培养箱中转染 8 h，然后弃培养基，PBS 清洗 2 遍后更换新鲜的完全培养基。

（8）细胞收集前 12 h，向其中一组细胞中加入 MG132 试剂，共转染 48 h 后收集细胞，准备提取蛋白。

1.2.9.2 Co-IP 试验

（1）往收集的细胞中加入含有蛋白酶/磷酸酶抑制剂的预冷 RIPA 裂解液，重悬细胞，冰上裂解 30 min。

（2）冰上超声破碎 90 s，使膜蛋白充分的溶解。4℃，10000 g 离心 10 min，取上清，转移至新的 EP 管。

（3）BCA 法测蛋白浓度，取 50 μL 蛋白变性作为 Input，检测蛋白表达。

（4）取 1 mg 蛋白加入 5 μg 抗体，4℃摩天轮旋转过夜。

（5）将 Protein A/G 磁珠充分混悬， 取 30 μL 磁珠悬液于 1.5 mL EP 管中， 加入 500 μL RIPA 裂解液，充分混悬，置于磁力架上，磁性分离，弃上清；重复以上洗涤步骤 2 次。

（6）向 4°C 孵育过夜后的抗原-抗体混合物中加入预洗好的磁珠，4℃摩天轮旋转孵育 4 h。

（7）加入 500 μL PBST，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复四次。

（8）向磁珠中加入 10 μL 5X 蛋白上样缓冲液，按体积调整至 1x，混合均匀，100℃煮样 10 min。分离磁珠，收集上清，进行 SDS-PAGE。

### 1.3 统计分析

采用 SPSS 27.0（SPSS Inc., Chicago, IL, USA）进行统计分析。正态分布连续变量以均数 ± 标准差（x±s）表示，组间比较采用独立样本 t 检验。计数资料比较采用$\chi 2$ 检验分析。$p< 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 TRIM29 与 HBV 复制有关

为了证明 TRIM29 与 HBV 复制有关，我们首先收集了 30 名健康志愿者和 34 名 CHB 患者的外周血，CHB 患者一般临床资料见表 1。利用人外周血单核细胞分离液分离出 PBMCs，提取细胞 RNA，qRT-PCR 分析两组标本中 TRIM29 mRNA 的相对表达水平差异。结果显示，CHB 患者（n = 34）PBMCs 中 TRIM29 mRNA 表达明显高于健康对照组（n = 30），如图 1a，*P*=0.0008；然后，我们比较了 HepG2 和稳定表达 HBV 基因的细胞株 HepG2.2.15 中 TRIM29 蛋白的表达差异，结果显示，与 HepG2 细胞相比，HepG2.2.15 细胞中 TRIM29 蛋白表达水平明显更高，并有统计学差异，如图 1b。这些结果表明 TRIM29 与 HBV 复制有关。

**表 1　CHB 患者一般临床特征**

**Tab. 1　Clinical characteristics of CHB patients.**

| | 健康对照（n = 30） | CHB 患者（n = 34） | *P* 值 |
|---|---|---|---|
| 年龄 | 38.2±10.4 | 33.8±5.0 | 0.328 |
| 男/女 | 15/15 | 16/18 | 0.814 |
| 民族 | | | 0.583 |
| 汉 | 23 | 24 | |
| 其他 | 7 | 10 | |
| ALT（U/L） | 18.81±10.62 | 22.18±11.95 | 0.545 |
| AST（U/L） | 17.67±10.6 | 16.42±10.84 | 0.844 |
| TBIL（μmol/L） | 6.21±3.73 | 8.61±2.72 | 0.195 |
| DBIL（μmol/L） | 3.42±0.8 | 4.06±1.63 | 0.138 |

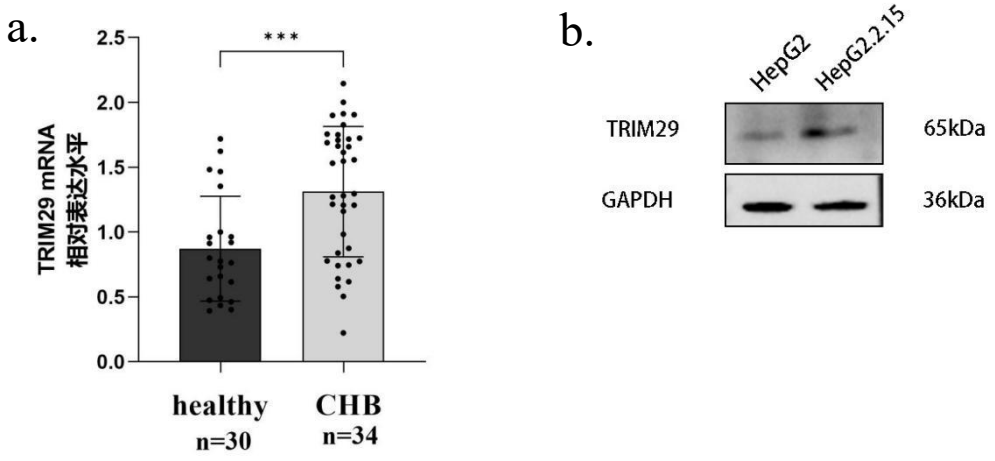



**图 1 TRIM29 与 HBV 复制有关 a. qRT-PCR 检测健康对照（n=30）与 CHB 患者（n=34）外周血 PBMCs 中 TRIM29 mRNA 相对表达水平；b. WB 检测 HepG2.2.15 和 HepG2 细胞中 TRIM29 蛋白表达水平。 ***$P$<0.001。**

**Fig. 1　TRIM29 is associated with HBV replication a.the relative expression of TRIM29 mRNA in PBMCs of healthy controls (n=30) and CHB patients (n=34) was detected by qRT-PCR；b. detection of TRIM29 protein expression in HepG2.2.15 and HepG2.***$P$<0.001.**

## 2.2 过表达 TRIM29 可促进 HBV 复制

为了进一步证明 TRIM29 在 HBV 复制中发挥的作用，将 HBV 全基因组 1.3 倍体重组质粒 pHBV1.3 转染至 HepG2 细胞中，可构建 HBV 瞬时转染细胞模型。将外源性 TRIM29 过表达质粒或空载质粒 Vector 和 pHBV1.3 质粒共转染至 HepG2 细胞，48 小时后收集细胞和培养基。提取细胞蛋白和 RNA，利用 WB 和 qRT-PCR 技术检测 TRIM29 质粒的转染效率，结果如图 2a，质粒转染成功。利用 ELISA 检测细胞培养基中 HBsAg 和 HBeAg 的表达量，qRT-PCR 检测 HBV pgRNA 的相对表达水平。结果显示，过表达组中 HBsAg、HBeAg 和 HBV pgRNA 的表达均高于空载组，结果具有统计学意义，瞬时转染细胞中 HBV 复制明显增强，如图 2b、2c。

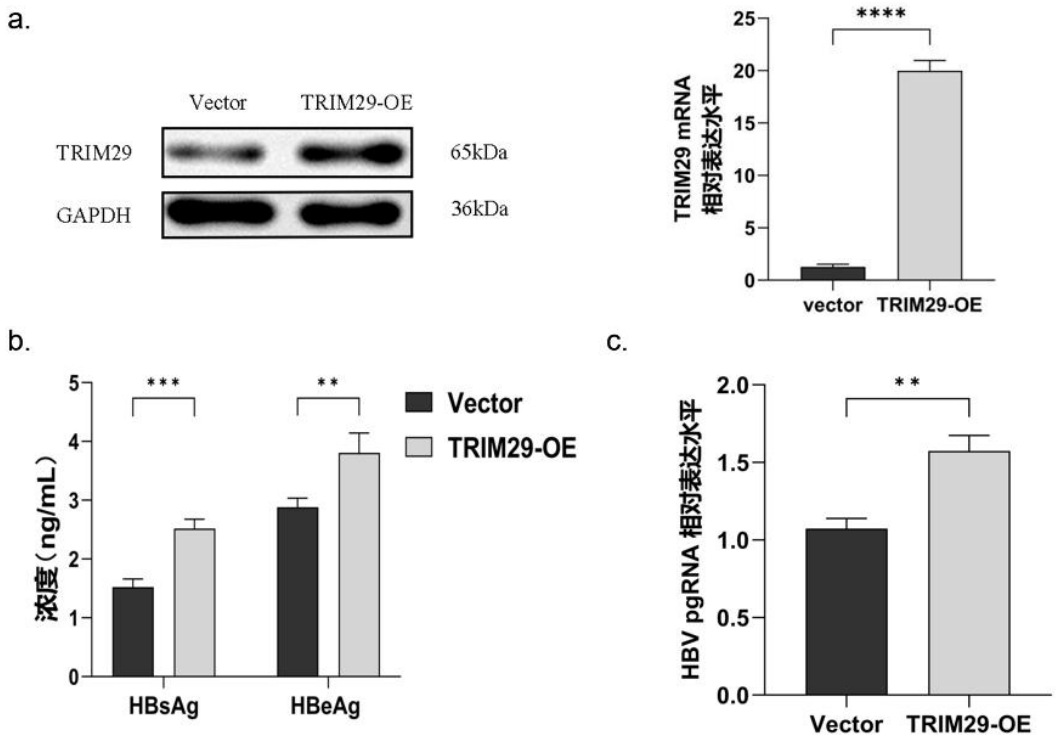



**图 2　将 TRIM29 过表达质粒或空载质粒 Vector 和 pHBV1.3 质粒共转染至 HepG2 细胞 a. WB 和 qRT-PCR 检测 TRIM29 质粒转染后 TRIM29 蛋白和 mRNA 的相对表达水平；b. ELISA 检测 TRIM29 过表达组和对照组中 HBsAg 和 HBeAg 的浓度；c. qRT-PCR 检测 TRIM29 过表达组和对照组中 HBV pgRNA 的相对表达水平。*****P*<0.01, ******P*< 0.001, *******P*<0.0001。**

**Fig. 2 HepG2 cells were transfected with TRIM29 overexpression plasmid or vector and pHBV1.3 a. the relative expression levels of TRIM29 protein and mRNA after transfection with TRIM29 plasmid were detected by WB and qRT-PCR; b. HBsAg and HBeAg concentrations in TRIM29 overexpression group and control group were detected by ELISA;c. The relative expression level of HBV pgRNA in TRIM29 overexpression group and control group was detected by qRT-PCR.*****P*<0.01, ******P*< 0.001, *******P*<0.0001.**

此外，本实验还选择了能够稳定表达 HBV 基因的细胞株 HepG2.2.15 再次验证结果。将 TRIM29 过表达质粒转染至 HepG2.2.15 细，转染 48 小时后收集细胞和培养基，利用 WB 和 qRT-PCR 检测 TRIM29 质粒的转染效率，结果显示 TRIM29 质粒转染成功，结果有统计学意义，如图 3a。利用 ELISA 检测细胞培养基中 HBsAg 和 HBeAg 的含量，qRT-PCR 检测细胞中 HBV pgRNA 的相对表达水平。结果显示，与对照组相比，过表达 TRIM29 后 HBsAg 和 HBeAg 的浓度明显增强（图 3b）。qRT-PCR 结果一致，TRIM29 过表达后，HepG2.2.15 细胞的 HBV RNA 表达水平也明显增强（图 3c）。以上结果表明，在 HepG2.2.15 细胞中，TRIM29 表达上调可促进 HBV 的复制。

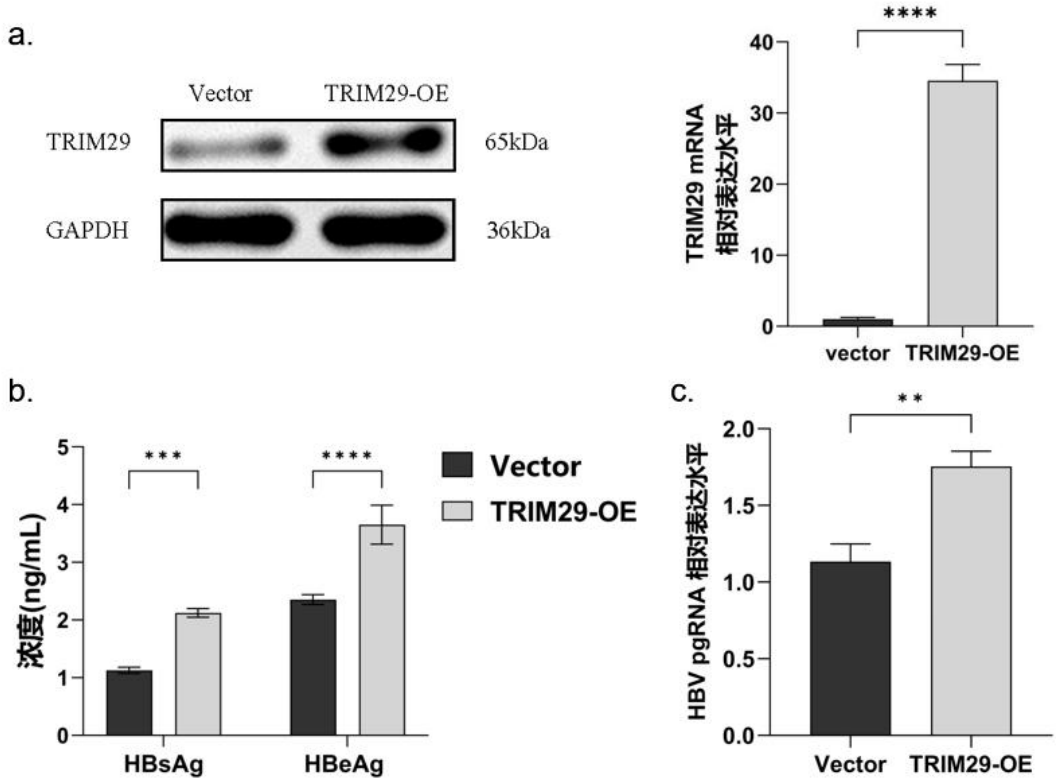
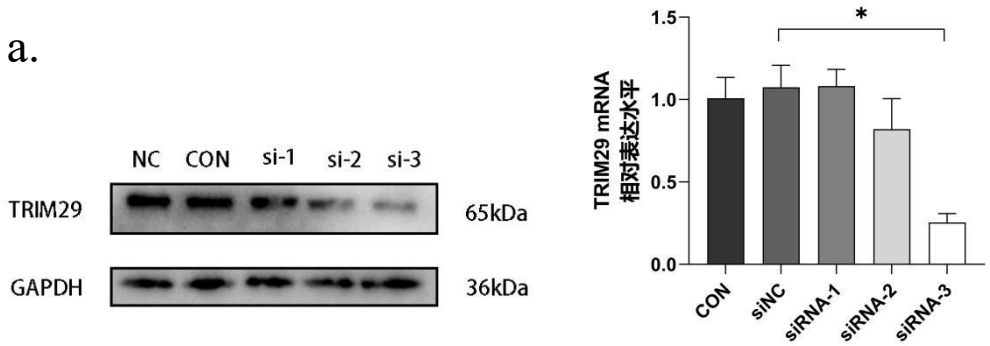


**图 3　将 TRIM29 过表达质粒或空载质粒 Vector 转染至 HepG2.2.15 细胞 a. WB 和 qRT-PCR 检测 TRIM29 质粒转染后的表达水平；b. ELISA 检测 TRIM29 过表达组和对照组细胞培养基中 HBsAg 和 HBeAg 的浓度；c. qRT-PCR 检测 TRIM29 过表达组和对照组细胞中 HBV RNA 的相对表达水平。*****P*** **<0.01, ******P*** **< 0.001, *******P*** **<0.0001。**

**Fig. 3 TRIM29 overexpression plasmid or vector was transfected into HepG2.2.15 cells. a. the expression levels of TRIM29 protein and mRNA after transfection with TRIM29 plasmid were detected by WB and qRT-PCR; b. the concentrations of HBsAg and HBeAg in cell medium of TRIM29 overexpression group and control group were detected by ELISA;c. the relative expression level of HBV pgRNA in TRIM29 overexpression group and control group was detected by qRT-PCR.*****P***<0.01, ******P***< 0.001, *******P***<0.0001.**

## 2.3 下调 TRIM29 可抑制 HBV 复制

使用 TRIM29 的特异性 siRNA（si-TRIM29）和阴性对照 siRNA（siNC），分别将它们与 pHBV1.3 共转染至 HepG2 细胞中，下调 TRIM29 基因的表达，转染 48 h 后收集细胞，提取细胞蛋白和总 RNA。WB 和 qRT-PCR 检测 TRIM29 下调情况，检测结果显示 siRNA-3 可特异性降低 TRIM29 的表达，如图 4a。将 TRIM29 特异性 siRNA-3 或 siNC 和 pHBV1.3 质粒共转染至 HepG2 细胞，转染 48 h 后收集细胞和培养基。利用 ELISA 检测细胞培养基中 HBsAg 和 HBeAg 的浓度，qRT-PCR 检测细胞 HBV pgRNA 的相对表达水平。结果显示，与 siNC 组相比，下调 TRIM29 表达后，HBsAg、HBeAg 和 HBV pgRNA 表达水平均呈现下降趋势，HepG2 瞬时转染细胞中 HBV 复制明显受到抑制，如图 4b、4c，结果具有统计学意义。



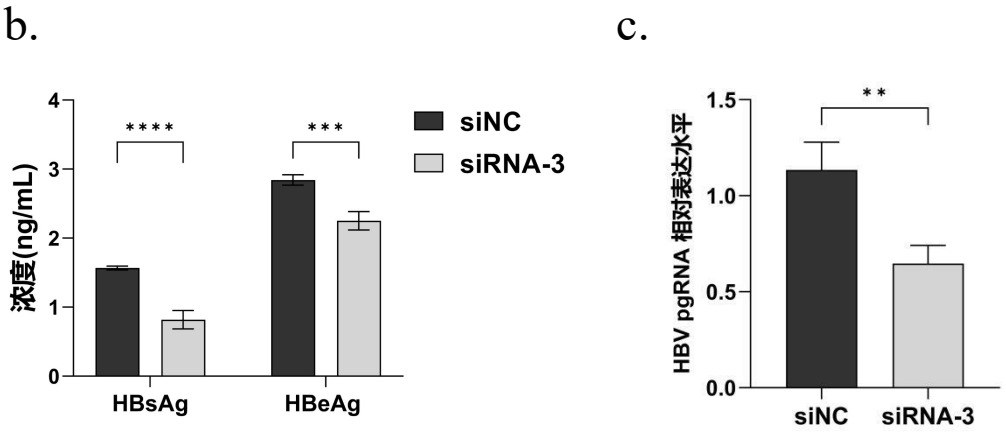



**图4 TRIM29的特异性siRNA或siNC和pHBV1.3共转染至HepG2细胞 a. WB和qRT-PCR验证TRIM29特异性 siRNA转染效率，选出具备敲低TRIM29基因表达能力的特异性siRNA-3; b. ELISA检测siRNA-3转染组和siNC组细胞培养基中HBsAg和HBeAg的表达浓度；c. qRT-PCR检测siRNA-3转染组和siNC组细胞中HBV pgRNA的相对表达水平。*$P$<0.05, **$P$<0.01, ***$P$<0.001, ****$P$<0.0001。**

**Fig.4 The specific siRNA of TRIM29 or siNC and pHBV1.3 were co-transfected into HepG2 cells a. WB and qRT-PCR verified the transfection efficiency of TRIM29 specific siRNA, and selected the specific SIRNA-3 with the ability to knock down TRIM29 gene expression; b. the expression levels of HBsAg and HBeAg in cell medium of siRNA-3 transfection group and siNC group were detected by ELISA; c. the relative expression level of HBV pgRNA in siRNA-3 transfected group and siNC group was detected by qRT-PCR.*$p$ <0.05, **$P$<0.01, ***$P$< 0.001, ****$P$<0.0001.**

再次使用稳定表达HBV基因的细胞系HepG2.2.15验证下调TRIM29基因对HBV复制的影响。使用TRIM29特异性siRNA和siNC，分别将它们转染至HepG2.2.15细胞，转染 48h后收集细胞，提取细胞蛋白质和总RNA，WB和qRT-PCR检测siRNA转染效率，如图5a。将siRNA-3或siNC转染至HepG2.2.15细胞中，转染48 h后收集培养基和细胞。利用ELISA检测细胞培养基中HBsAg和 HBeAg的表达浓度，qRT-PCR检测 HBV pgRNA的水平。结果显示，与siNC组相比，HBsAg、HBeAg和HBV RNA的表达在TRIM29表达下调后均下降，HepG2.2.15细胞中HBV复制明显受到抑制，如图5b、5c，结果具有统计学意义。

综上所述，下调 TRIM29 表达可抑制 HBV 复制。

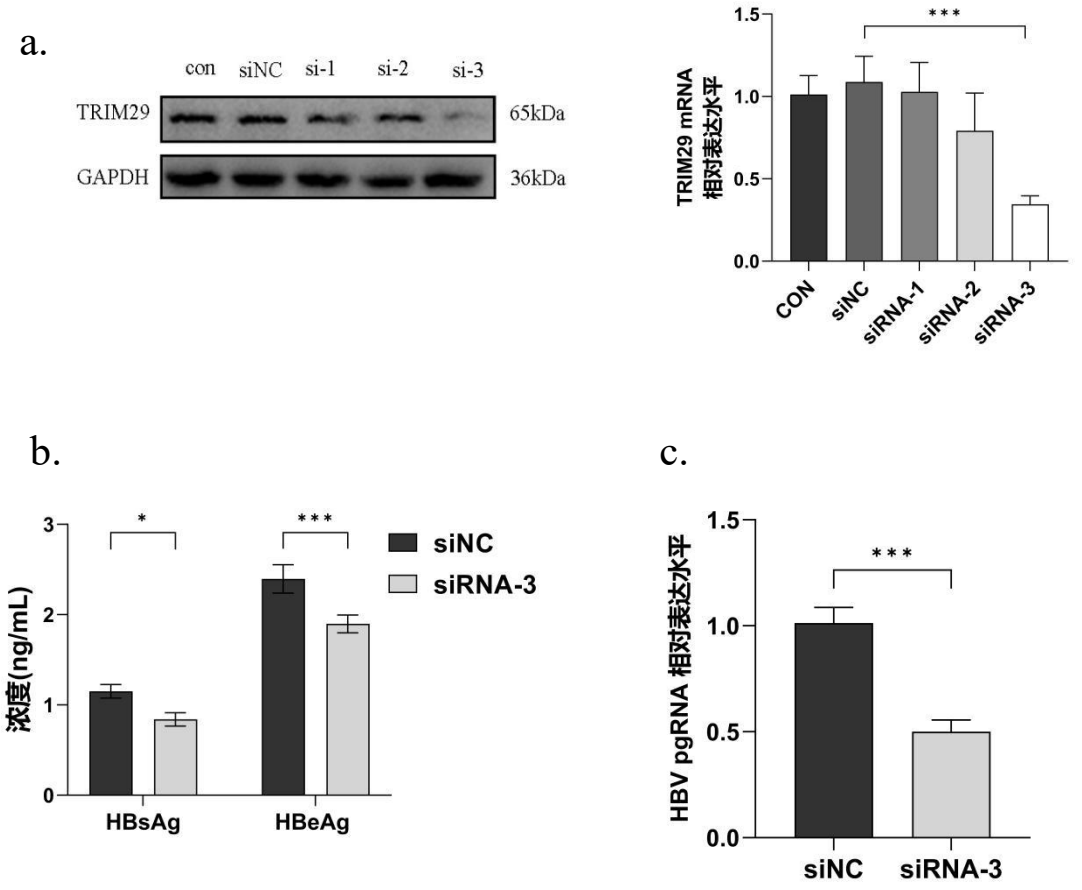



**图 5 TRIM29 的特异性 siRNA 或 siNC 转染至 HepG2.2.15 细胞 a. WB 和 qRT-PCR 检测特异性 TRIM29 siRNA 转染效率，选择具有下调 TRIM29 基因能力的特异性 siRNA-3；b. ELISA 检测细胞培养基中 HBsAg 和 HBeAg 的浓度;c. qRT-PCR 检测细胞中 HBV pgRNA 的相对表达水平。*$P$<0.05，***$P$< 0.001。**

**Fig.5 The specific siRNA or siNC of TRIM29 was transfected into HepG2.2.15 cells a. transfection efficiency of specific TRIM29 siRNA was measured by WB and qRT-PCR, and specific SIRNA-3 with the ability to down-regulate TRIM29 gene was selected；b. the concentrations of HBsAg and HBeAg in cell medium were detected by ELISA; c. the relative expression level of HBV RNA was detected by qRT-PCR.*$P$ <0.05，***$P$< 0.001.**

## 2.4 TRIM29 抑制 STING-TBK1-IRF3 信号通路

有研究者发现，TRIM29 通过负向调控 STING-TBK1-IRF3 信号通路，并抑

制干扰素的产生来应对 DNA 病毒[23]。为了研究 TRIM29 是否也通过负向调控 STING-TBK1-IRF3 信号通路来促进 HBV 复制，我们利用上述 TRIM29 基因上调的 HBV 复制细胞模型：转染 pHBV1.3 质粒的 HepG2 细胞和 HepG2.2.15 细胞，在细胞转染 TRIM29 质粒 48h 后收集细胞并提取细胞总蛋白，通过 WB 检测 STING、TBK1、p-TBK1、IRF3 和 p-IRF3 蛋白的变化情况。WB 结果显示，上调 TRIM29 基因对 TBK1 和 IRF3 蛋白总表达量没有影响，而对 STING、p-TBK1 和 p-IRF3 蛋白表达量具有抑制作用，如图 6a、6b。这些结果表明，在 HBV 复制细胞模型中，TRIM29 表达可抑制 STING-TBK1-IRF3 信号通路。

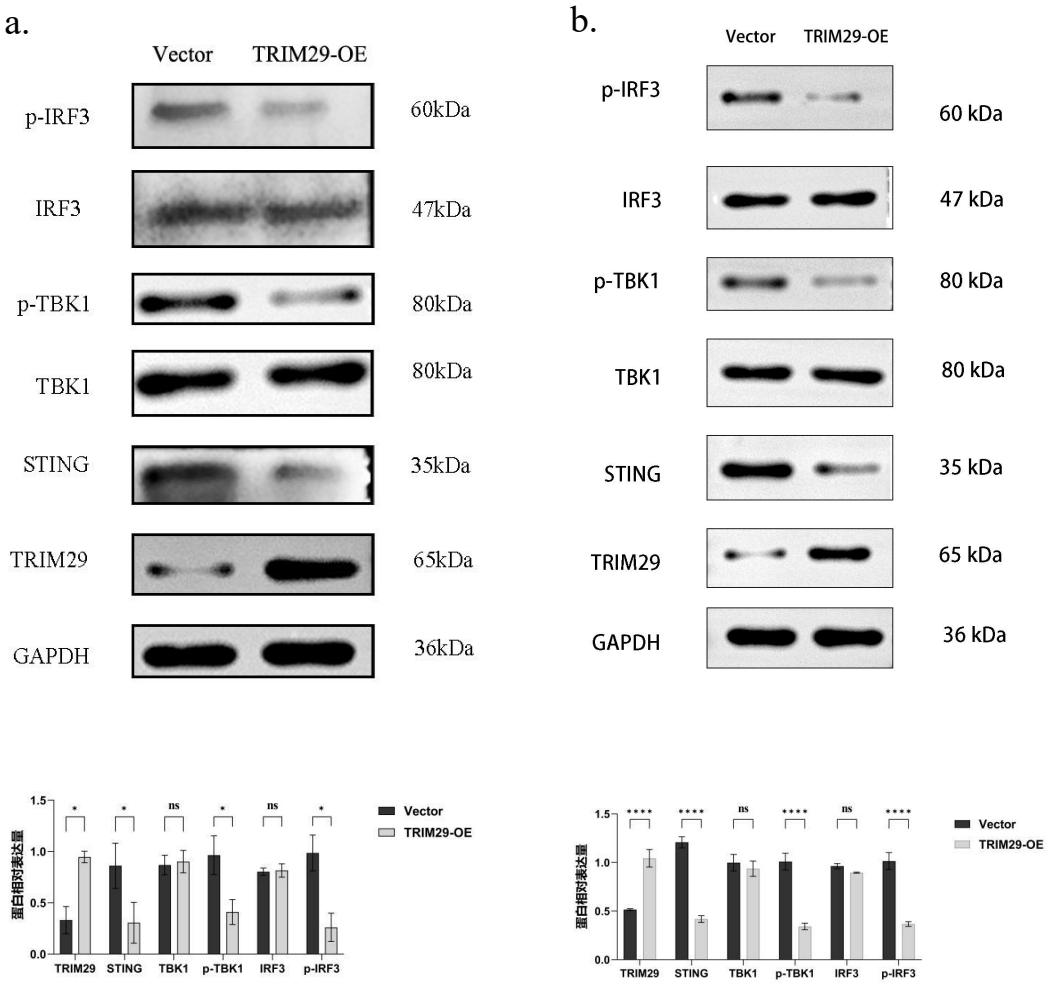



**图 6 a. 将 TRIM29 过表达质粒和 pHBV1.3 共转染至 HepG2 细胞，转染 48 h 后，收集细胞提取蛋白，WB 检测 STING、TBK1、p-TBK1、IRF3 和 p-IRF3 蛋白表达水平；b. 将 TRIM29 质粒转染至 HepG2.2.15 细胞，转染 48h 后，收集细胞提取总蛋白，WB 检测 STING、TBK1、p-TBK1、IRF3 和 p-IRF3 蛋白表达水平。*$P$<0.05，****$P$< 0.0001。**

**Fig.6 a. TRIM29 overexpression plasmid and pHBV1.3 were co-transfected into HepG2 cells. After transfection for 48 h, cells were collected to extract proteins, and the expression levels of STING, TBK1, p-TBK1, IRF3 and p-IRF3 proteins were detected by WB；b. TRIM29 plasmid was transfected into HepG2.2.15 cells, after transfection for 48 h, cells were collected to extract proteins, and the expression levels of STING, TBK1, p-TBK1, IRF3 and p-IRF3 were detected by WB. *$P$<0.05，****$P$< 0.0001.**

STING-TBK1-IRF3 信号通路是干扰素产生通路，我们利用上述收集的细胞提取 RNA，qRT-PCR 检测 IFN-α和 IFN-β mRNA 的相对表达水平。结果显示，在 HepG2 瞬时转染细胞模型中，过表达 TRIM29 后，IFN-α（图 6a，$P$=0.0011）和 IFN-β（图 6b，$P$=0.0007）的表达都受到了抑制。同样的，在过表达 TRIM29 的 HepG2.2.15 中，IFN-α（图 6c，$P$=0.0060）和 IFN-β（图 6d，$P$=0.0043）的表达也受到了抑制。以上结果表明，TRIM29 通过负向调控 STING-TBK1-IRF3 信号通路抑制干扰素的产生。

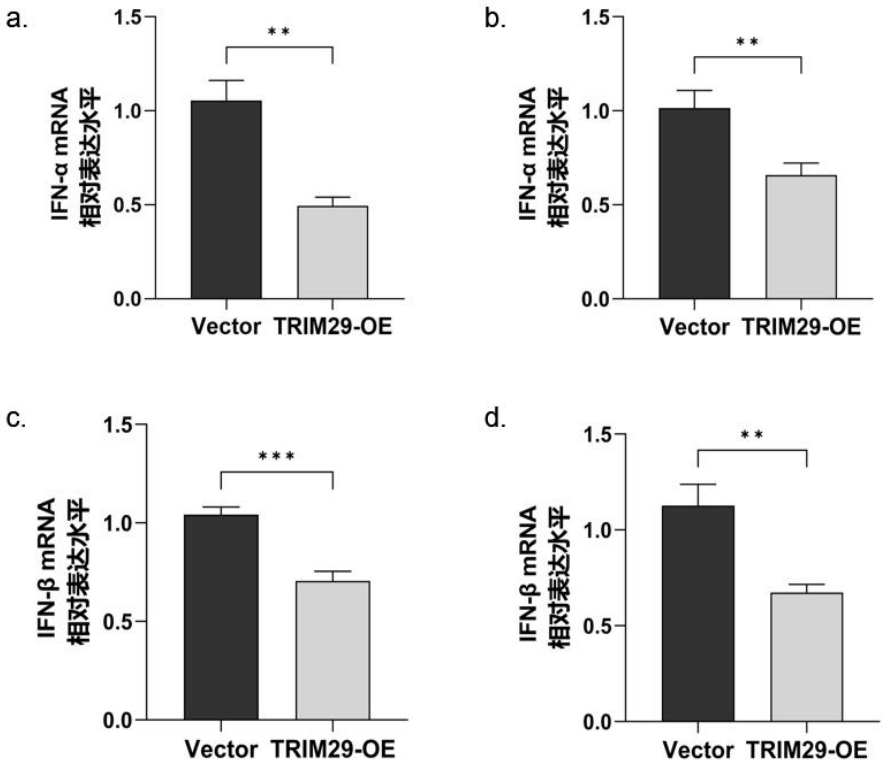


**图 7 将 TRIM29 过表达质粒或空载质粒和 pHBV1.3 质粒共转染至 HepG2 细胞，转染 48h 后收集细胞，提取细胞 RNA：a. qRT-PCR 检测 IFN-α mRNA 的相对表达水平；b. qRT-PCR 检测 IFN-β mRNA 的相对表达水平。将 TRIM29 质粒或空载质粒转染至 HepG2.2.15 细胞，转染 48h 后收集细胞，提取细胞 RNA：c. qRT-PCR 检测 IFN-α mRNA 的相对表达水平；d. qRT-PCR 检测 IFN-β mRNA 的相对表达水平。*****P*<0.01, ******P*< 0.001。**

**Fig.7 HepG2 cells were transfected with overexpressed TRIM29 or empty plasmid and pHBV1.3 plasmid. After transfection for 48h, cells were collected and cell RNA was extracted：a. qRT-PCR was used to detect the relative expression level of IFN-α mRNA；b. qRT-PCR was used to detect the relative expression level of IFN-β mRNA.TRIM29 plasmid or empty plasmid was transfected into HepG2.2.15 cells. After transfection for 48h, cells were collected and cell RNA was extracted：c. the relative expression level of IFN-α mRNA was detected by qRT-PCR；d. the relative expression level of IFN-β mRNA was detected by qRT-PCR.*****P*<0.01, ******P*< 0.001.**

### 2.5 TRIM29 结合并诱导 STING 降解

先前研究发现，在其他病毒感染下，TRIM29 靶向并降解 STING[40]。为了验证 TIM29 在 HBV 复制中是否有同样作用，我们先将 TRIM29 过表达质粒转染至 HepG2.2.15 细胞中，qRT-PCR 检查 TRIM29 对 STING mRNA 的影响，实验结果显示，TRIM29 对 STING mRNA 的表达无明显影响（$P = 0.7791$）,如图 8a。然后，我们又把 pHBV1.3 质粒、pCMV-STING-Myc 质粒和不同浓度的 pCMV-TRIM29-Flag 质粒共转染至 HEK 293T 细胞中，结果显示 TRIM29 的表达以剂量依赖的方式降低了 STING 水平，随着 TRIM29 剂量的增加，STING 的表达水平呈下降趋势，如图 8b。接下来，在有或没有蛋白酶抑制剂 MG132 的情况下，通过免疫共沉淀实验分析 TRIM29 对 STING 是否涉及降解机制。如图 8c 显示，在没有 MG132 抑制剂处理时，有或没有 pCMV-STING-Myc 的 pCMV-TRIM29-Flag 转染 HEK 293T，结果一致。而在有 MG132 处理的情况下，STING 表达恢复。这些结果证明，TRIM29 与 STING 相互结合，且 TRIM29 诱导 STING 蛋白酶体降解。

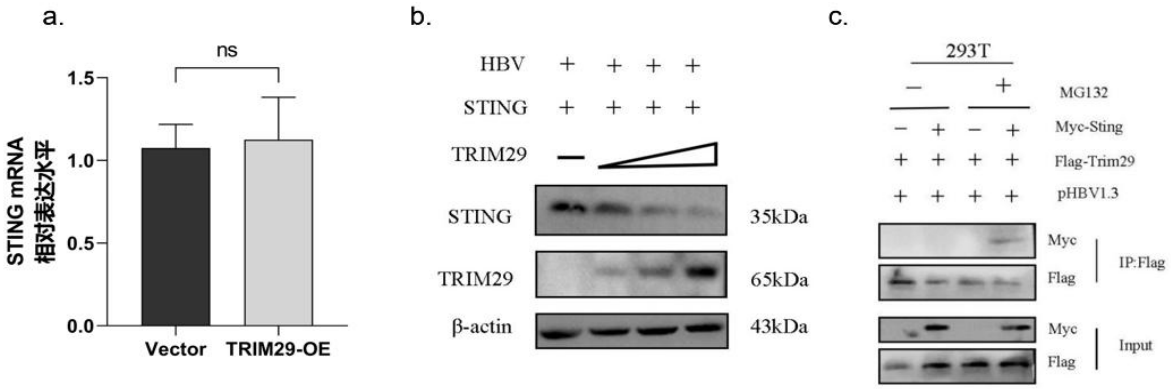



**图 8 a. 将 TRIM29 过表达质粒转染至 HepG2.2.15 细胞中，转染 48 h 后收集细胞，提取 RNA，qRT-PCR 检测 STING mRNA 相对表达水平；b. 将 pHBV1.3、pCMV-STING-Myc 和不同浓度的 pCMV-TRIM29-Flag 质粒共转染至 HEK 293T 细胞，转染 48 h 后收集细胞，提取总蛋白，WB 检测 STING 和 TRIM29 的表达差异；c. 用含或不含 pCMV-STING-Myc 的 pCMV-TRIM29-Flag 质粒与 pHBV1.3 质粒共转染 HEK 293T 细胞，转染 36 h 后向细胞培养基中加入 DMSO 或 MG132，再处理 12 h 后收集细胞，Co-IP 检测 STING 和 TRIM29 之间的相互作用。$^{ns}P>0.05$。**

**Fig.8 a. TRIM29 overexpression plasmid was transfected into HepG2.2.15 cells. After transfection for 48 h, cells were collected, RNA was extracted, and the relative expression level of STING mRNA was detected by qRT-PCR; b. different concentrations of TRIM29 plasmid, pHBV1.3 and STING plasmid were co-transfected into HEK 293T cells, 48 h after transfection, the cells were collected and total proteins were extracted. The expression levels of STING and TRIM29 were detected by WB; c. pCMV-TRIM29-Flag plasmid with or without pCMV-STING-Myc and pHBV1.3 were co-transfected into HEK 293T cells. DMSO or MG132 was added into the cell medium after transfection for 36 h, and cells were collected after 12 h of treatment. Co-IP detects the interaction between STING and TRIM29.$^{ns}P>0.05$.**

## 2.6 PEG-IFN-α2b 体外抑制 TRIM29 的表达

PEG-IFN-α是目前临床上最常用的抗病毒药物之一，为了进一步探究了 IFN-α与 TRIM29 的关系，分别用不同浓度的 PEG-IFN-α2b（0、10、100、1000 和 10000 U/mL）刺激 HepG2 细胞和 Huh7 细胞，WB 和 qRT-PCR 检测 TRIM29

表达水平变化情况。结果显示，PEG-IFN-α2b 可抑制 HepG2 和 Huh-7 细胞 TRIM29 的表达，随着处理的 PEG-IFN-α2b 浓度升高，TRIM29 的表达越来越低，如图 9a、9b、9c 和 9d。通过这一发现我们猜测 TRIM29 可能与干扰素抗病毒效应有关。

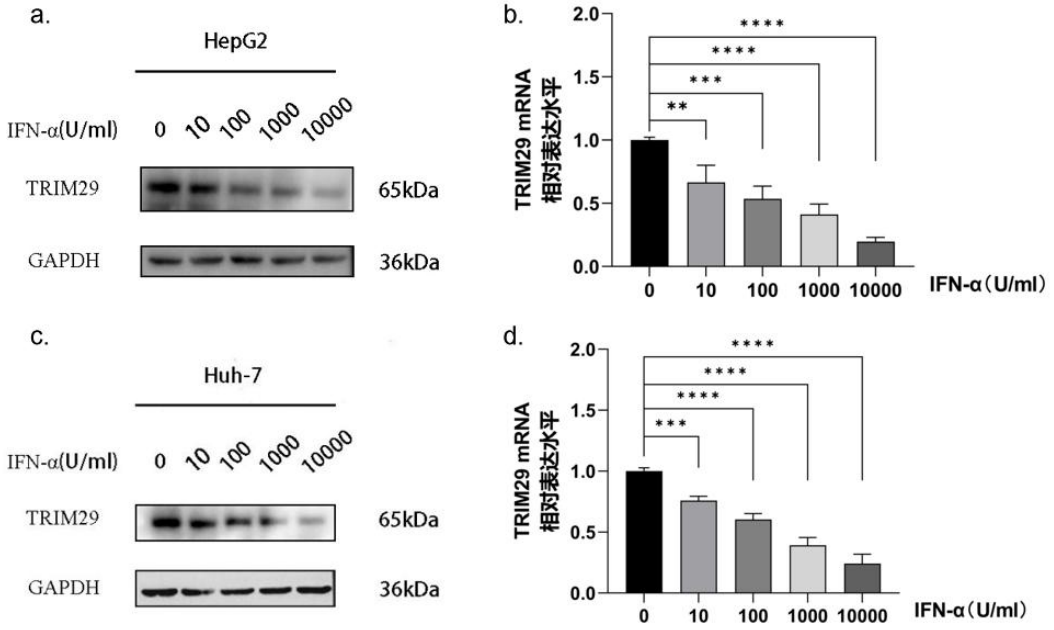



**图 9 用不同浓度的 PEG-IFN-α2b (0、10、100、1000 和 10000 U/ml)处理 HepG2，24 h 后收集细胞，提取细胞蛋白和总 RNA：a. WB 检测 TRIM29 蛋白表达情况；b. qRT-PCR 检测 TRIM29 mRNA 的相对表达水平。用不同浓度的 PEG-IFN-α2b （0、10、100、1000 和 10000 U/ml）处理 Huh-7，24 h 后收集细胞，提取细胞蛋白和总 RNA：c. WB 检测 TRIM29 蛋白表达情况；d. qRT-PCR 检测 TRIM29 mRNA 的相对表达水平。**$P$<0.01, ***$P$< 0.001，****$P$ < 0.0001。**

**Fig.9 HepG2 was treated with PEG-IFN-α2b at different concentrations (0, 10, 100, 1000 and 10000 U/ml). After 24 h, cells were collected and cell protein and total RNA were extracted.：a. TRIM29 protein expression was detected by WB；b. the relative expression level of TRIM29 mRNA was detected by qRT-PCR. After HuH-7 was treated with different concentrations of PEG-IFN-α2b (0, 10, 100, 1000 and 10000 U/ml) for 24 h, cells were collected and cell protein and total RNA were extracted：c. TRIM29 protein expression was detected by WB；d. the relative expression level of TRIM29 mRNA was detected by qRT-PCR.**$P$<0.01, ***$P$< 0.001，****$P$ < 0.0001**

.

### 2.7 TRIM29 的表达干扰 PEG-IFN-α2b 的抗病毒效应

干扰素一般通过刺激 MX1 和 IFIT1 等 ISGs 的表达，起到抗病毒作用。为了进一步研究 TRIM29 蛋白是否对干扰素抗病毒作用产生影响，我们以 HepG2.2.15 细胞为模型，一组转染 siNC，一组转染 si-TRIM29，一组转染 siNC 后使用 1000 U/ml 的 PEG-IFN-α2b 处理细胞 24 h，一组转染 si-TRIM29 后使用 1000 U/ml 的 PEG-IFN-α2b 处理细胞 24 h。收集细胞后提取总蛋白，WB 检测分析各组抗病毒蛋白 MX1 和 IFIT1 的表达情况。WB 检测结果显示，与其他处理组相比，PEG-IFN-α2b 和 si-TRIM29 联合处理的 HepG2.2.15 细胞中 Mx1 和 IFIT1 的表达最高，siNC 联合 PEG-IFN-α2b 组次之，siNC 组最少，如图 10a、10b。这些结果提示 TRIM29 蛋白影响 PEG-IFN-α2b 的抗病毒作用。

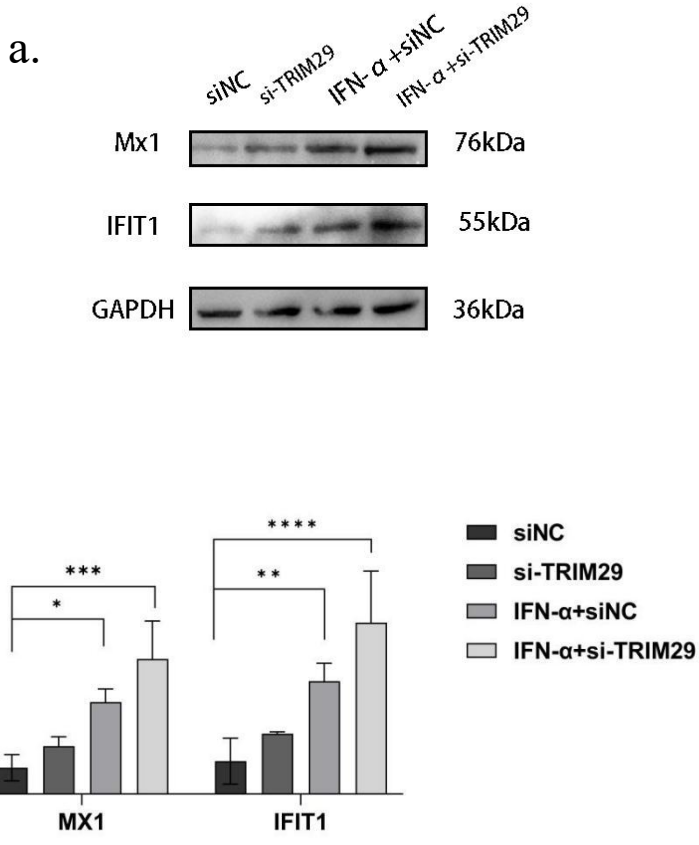



**图 10 设置 siNC 转染组、si-TRIM29 转染组、PEG-IFN-α2b 联合 siNC 转染组和 PEG-IFN-α2b 联合 si-TRIM29 转染组四组，在四种不同情况下处理 HepG2.2.15 细胞。a. b. 提取四组细胞蛋白，WB 检测四组细胞 MX1 和 IFIT1 蛋白变化情况，实验重复三次。*$P$ <0.05,**$P$<0.01, ***$P$< 0.001，****$P$< 0.0001。**

**Fig.10 HepG2.2.15 cells were treated with siNC transfection group, si-TRIM29 transfection group, PEG-IFN-α2b combined with siNC transfection group and PEG-IFN-α2b combined with si-TRIM29 transfection group under four different conditions. a. b. extracted four groups of cell proteins, WB detected the changes of MX1 and IFIT1 proteins in four groups of cells, and the experiment was repeated three times.*$P$ <0.05,**$P$<0.01, ***$P$< 0.001，****$P$< 0.0001.**

## 2.8 PEG-IFN-α2b 治疗早期 CHB 患者 PBMCs 中 TRIM29 表达的动态变化

纳入 42 名接受 PEG-IFN-α2b 治疗的 CHB 患者，慢乙肝患者临床特征如表 2。治疗 24 周后，将 HBV DNA 下降> 2 $\log_{10}$ IU/ml 或 HBsAg 迅速下降(24 周时 HBsAg <200 IU/ml 或下降> 1 $\log_{10}$ IU/ml)的患者定义为早期应答者（n = 18），其余的患者定义为早期无应答者（n = 24），两组 CHB 患者的 HBV DNA 和 HBsAg 动态变化如图 11a，11b。分别收集这些患者治疗 0、12 和 24 周时的外周血标本，分离出 PBMCs，提取细胞 RNA，qRT-PCR 检测 TRIM29 mRNA 表达水平。结果显示，TRIM29 在早期应答组和早期无应答组均有所降低，不过，仅在早期应答组治疗 24 周时，TRIM29 表达水平在治疗前后的差异具有统计学意义，如图 11c。

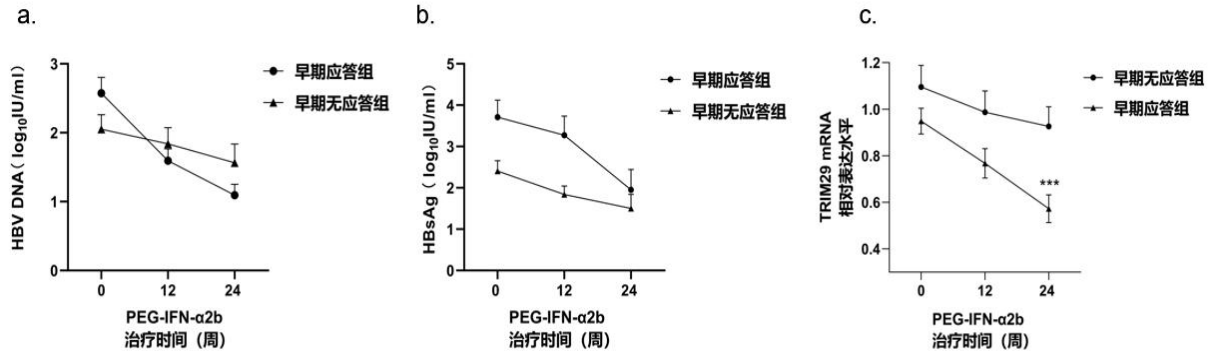



**图 11 a、b. CHB 患者在 PEG-IFN-α2b 治疗早期外周血 HBV DNA 和 HBsAg 水平的动态变化；c. PEG-IFN-α2b 治疗早期 CHB 患者外周血 PBMCs 中 TRIM29 mRNA 相对表达水平的动态变化。***$P$< 0.001。**

**Fig.11 a.b. Dynamic changes of HBV DNA and HBsAg levels in peripheral blood of CHB**

**patients during early treatment with PEG-IFN-α2b；c. Dynamic changes of TRIM29 mRNA relative expression level in PBMCs in peripheral blood of early CHB patients treated with PEG-IFN-α2b.******P*< 0.001.**

**表 2 慢乙肝患者临床特征**

**Tab. 2 Characteristics of CHB patients.**

| | 早期应答组（n = 18） | 早期无应答组（n = 24） | *P* 值 |
|---|---|---|---|
| 男/女（例） | 12/6 | 15/9 | 0.520 |
| 年龄（岁） | 26.50±2.72 | 27.33±3.63 | 0.420 |
| ALT（U/L） | 24.25±5.31 | 26.22±4.94 | 0.227 |
| AST（U/L） | 28.02±3.08 | 30.24±3.61 | 0.043 |
| TBIL（μmol/L） | 11.81±4.52 | 12.22±5.98 | 0.884 |
| DBIL（μmol/L） | 4.33±2.24 | 6.36±1.88 | 0.083 |
| HBsAg（$\log_{10}$ IU/ml） | 3.71±1.31 | 2.41±0.84 | 0.036 |
| HBV DNA（$\log_{10}$ IU/ml） | 2.57±0.23 | 2.05±0.21 | <0.001 |

## 3 讨 论

从 60 年前首次发现乙肝病毒以来，全世界有数亿人被发现感染该病毒。直至现在，在中国仍约有 7000 多万人感染 HBV，该病毒仍然威胁着成千上万病人的生命健康[44]。目前临床上使用的抗病毒药物还不够理想，难以实现临床治愈，HBV 分子机制和免疫反应等相关研究还有待推进。

先前的研究表明，外周血细胞与大脑、肝脏、肺、结肠、肾脏、心脏、前列腺、脾脏和胃共享超过 80%的转录组，因此外周血细胞基因可用于预测基因与疾病的关系[45, 46]。在本研究中，我们通过比较不同人群外周血 PBMCs 中 TRIM29 mRNA 的表达差异展开研究。qRT-PCR 检测结果显示，与健康对照相比，未经药物治疗的 CHB 患者 PBMCs 的 TRIM29 mRNA 的表达明显更高。这个结果提示 TRIM29 表达与 HBV 复制有关。然后，又通过比较 HepG2.2.15 细胞和 HepG2 细胞 TRIM29 蛋白的表达差异，再次验证猜想。

HBV 可用于乙肝研究的细胞模型选择较多，例如，使用乙肝病毒基因瞬时转染的肝癌细胞系 HepG2 和 Huh7 细胞，稳定表达乙肝病毒基因的 HepAD38 和 HepG2.2.15 细胞，人肾胚胎细胞系 HEK293 和鸡肝癌细胞系 LMH[47-50]。在本实验中，我们利用多种 HBV 复制细胞模型用于开展实验，减小误差，提高实验结果准确性。

近年来，TRIM、hnRNP、APOBEC3 和 SAMHD1 等分子已经确定在病毒生命周期的几个步骤干预 HBV 复制[51-54]。在这些因子中，TRIM29 是 TRIM 蛋白家族的成员之一，已经有多篇文献报道 TRIM29 参与 RNA、DNA 病毒复制过程，在免疫调节中起着重要作用，但关于 HBV 与 TRIM29 的研究还不多见，本研究中，我们通过上调或下调 TRIM29 基因来检测 TRIM29 对 HBV 复制的影响作用。选择 pCMV-TRIM29-Flag 过表达质粒和 TRIM29 特异性 siRNA，分别将质粒或 siRNA 转染至具有乙肝病毒复制能力的细胞模型中，检测 HBsAg、HBeAg 和 HBV pgRNA 的变化情况，实验结果显示 TRIM29 具有促进 HBV 复制的能力。不仅如此，我们还发现，随着 TRIM29 基因的上调，IFN-α和 IFN-β的表达降低，这些变化提示 TRIM29 可能通过控制 IFN-α和 IFN-β的产生来影响 HBV 复制。

通过机制研究我们发现，在乙肝细胞模型中，TRIM29 能够抑制 STING-TBK1-IRF3 信号通路中关键蛋白的表达，由于 IFN-I是 STING-TBK1-IRF3 信号通路的下游因子，我们推测 TRIM29 可能通过负向调控该信号通路来降低 IFN-α和 IFN-β的表达，从而保护 HBV 免受干扰素作用，促进乙肝病毒复制。不仅如此，我们还发现 TRIM29 对 STING 基因的转录并无太大影响，而蛋白质免疫共沉淀实验鉴定 TRIM29 能够与 STING 蛋白互相结合，使 STING 发生蛋白酶体降解。

干扰素类药物是临床上除了 NAs 类药物以外最常用的抗病毒药物。IFN-α具有免疫调节和抗病毒作用，相较于 NAs 类药物，IFN-α治疗的疗程更短，HBsAg 清除率更高，由于能够抑制 HBV cccDNA 活性，病毒反弹的可能性也更小[23]。在研究中我们发现，PEG-IFN-α2b 能够抑制 HepG2 和 Huh7 细胞中 TRIM29 的表达，虽然确切的机制尚不清楚，但我们猜测 TRIM29 可能与 PEG-IFN-α2b 抗病毒作用有关。如预期所料，利用 TRIM29 特异性 siRNA 联合

PEG-IFN-α2b 共同处理 HepG2.2.15 细胞，在等量 PEG-IFN-α2b 的处理下，相较于阴性对照组，下调 TRIM29 基因的表达促进了抗病毒蛋白 MX1 和 IFIT1 的表达，结果表明在 HepG2.2.15 细胞中，TRIM29 的表达对 PEG-IFN-α2b 的抗病毒作用产生影响。

Luo 等研究发现 IFN-α可诱导 TRIM26 表达，并通过降解 HBx 发挥抗病毒作用，而 TRIM26 rs116806878 位点与 PEG-IFN-α的治疗反应相关[55]。然而，PEG-IFN-α2b 在 CHB 患者中的疗效是否与 TRIM29 表达有关还尚未阐明。根据接受 PEG-IFN-α2b 治疗后的 CHB 患者 HBsAg 和 HBV DNA 的变化将其分为有早期应答组和无早期应答组。收集这些 CHB 患者接受 PEG-IFN-α2b 治疗过程中以及治疗前的外周血标本，提取 PBMCs，检测 TRIM29 mRNA 相对表达水平。检测结果显示 CHB 患者接受 PEG-IFN-α2b 治疗后的第 12 周和第 24 周，TRIM29 mRNA 相对表达水平逐渐降低。除此之外，TRIM29 表达的动态变化在不同应答者之间表现不同。相较于早期无应答者，早期应答者外周血 PBMCs TRIM29 的表达降低得更多，并且在治疗开始前和治疗 24 周后，TRIM29 的表达差异具有统计学意义。这一发现提示 TRIM29 的低表达水平可能与较好的预后相关，因此，PEG-IFN-α2b 治疗慢乙肝早期患者 PBMCs TRIM29 表达水平可能作为预测患者对 PEG-IFN-α2b 治疗应答的指标。不过 TRIM29 的功能作用仍需进一步深入研究，需要更大的样本量来验证。

总之，我们的研究表明 TRIM29 在通过负向调控 STING-TBK1-IRF3 通路来降低 IFN-α和 IFN-β的表达，以此发挥对 HBV 复制和基因表达的促进作用。TRIM29 表达情况与 PEG-IFN-α2b 治疗效果相关。我们的发现可能解释了在一些 CHB 患者中观察到的 PEG-IFN-α2b 治疗效果不好的现象，这可能有助于开发治疗慢性 HBV 感染的新策略。

# 4 结 论

**4.1** TRIM29 靶向 STING 降解，负向调控 STING-TBK1-IRF3 信号通路介导的干扰素信号通路促进 HBV 复制。

**4.2** TRIM29 低表达可增强 PEG-IFN-α2b 抗病毒效应，CHB 患者 PBMCs 中 TRIM29 的表达水平可能作为预测患者对 PEG-IFN-α2b 治疗应答的指标。

# 参考文献

[1]Jeng W J, Papatheodoridis G V, Lok A S F. Hepatitis B [J]. Lancet, 2023, 401(10381): 1039-1052.

[2]Tsukuda S, Watashi K. Hepatitis B virus biology and life cycle [J]. Antiviral Res, 2020, 182: 104925.

[3]Rizzetto M, Ciancio A. Chronic HBV-related liver disease [J]. Mol Aspects Med, 2008, 29(1-2): 72-84.

[4]Wang H, Men P, Xiao Y, Gao P, Lv M, Yuan Q, Chen W, Bai S, Wu J. Hepatitis B infection in the general population of China: a systematic review and meta-analysis [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1): 811.

[5]Terrault N A, Levy M T, Cheung K W, Jourdain G. Viral hepatitis and pregnancy [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(2): 117-130.

[6]Pattyn J, Hendrickx G, Vorsters A, Van Damme P. Hepatitis B Vaccines [J]. J Infect Dis, 2021, 224(12 Suppl 2): S343-s351.

[7]Nguyen M H, Wong G, Gane E, Kao J H, Dusheiko G. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy [J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33(2).

[8]Lee H W, Lee J S, Ahn S H. Hepatitis B Virus Cure: Targets and Future Therapies [J]. Int J Mol Sci, 2020, 22(1).

[9]Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd A H. Genetic variability in hepatitis B viruses [J]. J Gen Virol, 2002, 83(Pt 6): 1267-1280.

[10]Wang J, Huang H, Liu Y, Chen R, Yan Y, Shi S, Xi J, Zou J, Yu G, Feng X, Lu F. HBV Genome and Life Cycle [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1179: 17-37.

[11]Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus [J]. Elife, 2012, 1: e00049.

[12]Datta S, Chatterjee S, Veer V, Chakravarty R. Molecular biology of the hepatitis B virus for clinicians [J]. J Clin Exp Hepatol, 2012, 2(4): 353-365.

[13]Sivasudhan E, Blake N, Lu Z, Meng J, Rong R. Hepatitis B Viral Protein HBx and the Molecular Mechanisms Modulating the Hallmarks of Hepatocellular Carcinoma: A Comprehensive Review [J]. Cells, 2022, 11(4).

[14]Nasser N, Tonnerre P, Mansouri A, Asselah T. Hepatitis-B virus: replication cycle, targets, and antiviral approaches [J]. Curr Opin Virol, 2023, 63: 101360.

[15]Wei L, Ploss A. Mechanism of Hepatitis B Virus cccDNA Formation [J]. Viruses, 2021, 13(8).

[16]Martinez M G, Boyd A, Combe E, Testoni B, Zoulim F. Covalently closed circular DNA: The ultimate therapeutic target for curing HBV infections [J]. J Hepatol, 2021, 75(3): 706-717.

[17]Yan H, Wang C. Key Factors for "Fishing" NTCP as a Functional Receptor for HBV and HDV [J]. Viruses, 2023, 15(2).

[18]Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B [J]. Gut, 2015, 64(12): 1972-1984.

[19]Zhu A, Liao X, Li S, Zhao H, Chen L, Xu M, Duan X. HBV cccDNA and Its Potential as a Therapeutic Target [J]. J Clin Transl Hepatol, 2019, 7(3): 258-262.

[20]Li Y, He M, Wang Z, Duan Z, Guo Z, Wang Z, Gong R, Chu T, Cai J, Gao B. STING signaling activation inhibits HBV replication and attenuates the severity of liver injury and HBV-induced fibrosis [J]. Cell Mol Immunol, 2022, 19(1): 92-107.

[21]Chen C, Xu P. Cellular functions of cGAS-STING signaling [J]. Trends Cell Biol, 2023, 33(8): 630-648.
[22]Hopfner K P, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(9): 501-521.
[23]Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, Sprinzl M F, Koppensteiner H, Makowska Z, Volz T, Remouchamps C, Chou W M, Thasler W E, Hüser N, Durantel D, Liang T J, Münk C, Heim M H, Browning J L, Dejardin E, Dandri M, Schindler M, Heikenwalder M, Protzer U. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA [J]. Science, 2014, 343(6176): 1221-1228.
[24]Tropberger P, Mercier A, Robinson M, Zhong W, Ganem D E, Holdorf M. Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(42): E5715-5724.
[25]Han Q, Zhang C, Zhang J, Tian Z. The role of innate immunity in HBV infection [J]. Semin Immunopathol, 2013, 35(1): 23-38.
[26]MacMicking J D. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(5): 367-382.
[27]Hoffmann H H, Schneider W M, Rice C M. Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions [J]. Trends Immunol, 2015, 36(3): 124-138.
[28]Crosse K M, Monson E A, Beard M R, Helbig K J. Interferon-Stimulated Genes as Enhancers of Antiviral Innate Immune Signaling [J]. J Innate Immun, 2018, 10(2): 85-93.
[29]Zhang L, Cao L, Yang F, Han X, Wang Y, Cao N, Yang L. Relative abundance of interferon-stimulated genes STAT1, OAS1, CXCL10 and MX1 in ovine lymph nodes during early pregnancy [J]. Anim Reprod Sci, 2020, 214: 106285.
[30]Tan G, Xu F, Song H, Yuan Y, Xiao Q, Ma F, Qin F X, Cheng G. Identification of TRIM14 as a Type I IFN-Stimulated Gene Controlling Hepatitis B Virus Replication by Targeting HBx [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1872.
[31]Gushchina L V, Kwiatkowski T A, Bhattacharya S, Weisleder N L. Conserved structural and functional aspects of the tripartite motif gene family point towards therapeutic applications in multiple diseases [J]. Pharmacol Ther, 2018, 185: 12-25.
[32]Lu K, Pan Y, Huang Z, Liang H, Ding Z Y, Zhang B. TRIM proteins in hepatocellular carcinoma [J]. J Biomed Sci, 2022, 29(1): 69.
[33]Watanabe M, Hatakeyama S. TRIM proteins and diseases [J]. J Biochem, 2017, 161(2): 135-144.
[34]Koepke L, Gack M U, Sparrer K M. The antiviral activities of TRIM proteins [J]. Curr Opin Microbiol, 2021, 59: 50-57.
[35]Kapp L N, Painter R B, Yu L C, van Loon N, Richard C W, 3rd, James M R, Cox D R, Murnane J P. Cloning of a candidate gene for ataxia-telangiectasia group D [J]. Am J Hum Genet, 1992, 51(1): 45-54.
[36]Cai C, Tang Y D, Zhai J, Zheng C. The RING finger protein family in health and disease [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 300.
[37]Marzano F, Caratozzolo M F, Pesole G, Sbisà E, Tullo A. TRIM Proteins in Colorectal Cancer: TRIM8 as a Promising Therapeutic Target in Chemo Resistance [J]. Biomedicines, 2021, 9(3).
[38]Xing J, Zhang A, Minze L J, Li X C, Zhang Z. TRIM29 Negatively Regulates the Type I IFN Production in Response to RNA Virus [J]. The Journal of Immunology, 2018, 201(1): 183-192.

[39]Xing J, Zhang A, Zhang H, Wang J, Li X C, Zeng M S, Zhang Z. TRIM29 promotes DNA virus infections by inhibiting innate immune response [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 945.
[40]Li Q, Lin L, Tong Y, Liu Y, Mou J, Wang X, Wang X, Gong Y, Zhao Y, Liu Y, Zhong B, Dai L, Wei Y Q, Zhang H, Hu H. TRIM29 negatively controls antiviral immune response through targeting STING for degradation [J]. Cell Discov, 2018, 4: 13.
[41]Song Y, Li M, Wang Y, Zhang H, Wei L, Xu W. E3 ubiquitin ligase TRIM21 restricts hepatitis B virus replication by targeting HBx for proteasomal degradation [J]. Antiviral Res, 2021, 192: 105107.
[42]Tan G, Yi Z, Song H, Xu F, Li F, Aliyari R, Zhang H, Du P, Ding Y, Niu J, Wang X, Su L, Qin F X, Cheng G. Type-I-IFN-Stimulated Gene TRIM5γ Inhibits HBV Replication by Promoting HBx Degradation [J]. Cell Rep, 2019, 29(11): 3551-3563.e3553.
[43]Song H, Xiao Q, Xu F, Wei Q, Wang F, Tan G. TRIM25 inhibits HBV replication by promoting HBx degradation and the RIG-I-mediated pgRNA recognition [J]. Chin Med J (Engl), 2023, 136(7): 799-806.
[44]王贵强, 段钟平, 王福生, 庄辉, 李太生, 郑素军, 赵鸿, 侯金林, 贾继东, 徐小元, 崔富强, 魏来. 慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版) [J]. 实用肝脏病杂志, 2020, 23(01): 9-32.
[45]Gliddon H D, Herberg J A, Levin M, Kaforou M. Genome-wide host RNA signatures of infectious diseases: discovery and clinical translation [J]. Immunology, 2018, 153(2): 171-178.
[46]Bushel P R, Heinloth A N, Li J, Huang L, Chou J W, Boorman G A, Malarkey D E, Houle C D, Ward S M, Wilson R E, Fannin R D, Russo M W, Watkins P B, Tennant R W, Paules R S. Blood gene expression signatures predict exposure levels [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(46): 18211-18216.
[47]Hu X, Jiang J, Ni C, Xu Q, Ye S, Wu J, Ge F, Han Y, Mo Y, Huang D, Yang L. HBV Integration-mediated Cell Apoptosis in HepG2.2.15 [J]. J Cancer, 2019, 10(17): 4142-4150.
[48]Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(24): 15655-15660.
[49]Acs G, Sells M A, Purcell R H, Price P, Engle R, Shapiro M, Popper H. Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84(13): 4641-4644.
[50]Hantz O, Parent R, Durantel D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Zoulim F. Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells [J]. J Gen Virol, 2009, 90(Pt 1): 127-135.
[51]Giraldo M I, Hage A, van Tol S, Rajsbaum R. TRIM Proteins in Host Defense and Viral Pathogenesis [J]. Curr Clin Microbiol Rep, 2020, 7(4): 101-114.
[52]Wang L, Wen M, Cao X. Nuclear hnRNPA2B1 initiates and amplifies the innate immune response to DNA viruses [J]. Science, 2019, 365(6454).
[53]Sadeghpour S, Khodaee S, Rahnama M, Rahimi H, Ebrahimi D. Human APOBEC3 Variations and Viral Infection [J]. Viruses, 2021, 13(7).
[54]Coggins S A, Mahboubi B, Schinazi R F, Kim B. SAMHD1 Functions and Human Diseases [J]. Viruses, 2020, 12(4).
[55]Luo M, Hou J, Mai H, Chen J, Chen H, Zhou B, Hou J, Jiang D K. TRIM26 inhibits hepatitis B virus replication by promoting HBx degradation and TRIM26 genetic polymorphism predicts

PegIFNα treatment response of HBeAg-positive chronic hepatitis B Patients [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2022, 56(5): 878-889.

# 综述

## TRIM 蛋白在肝脏相关疾病发生发展中的作用

廖心 综述　　张宝芳 审校

**概要：**

TRIM 蛋白家族是 E3 泛素连接酶家族，该家族成员广泛分布于各个细胞、组织和器官中，发挥多种多样的功能和作用，与细胞分裂、生长、分化和成熟等过程都有密切关系。近年来多篇论文已有报道，TRIM 蛋白与肝脏疾病的发生和发展密切相关。例如，TRIM16 能够发挥抑制肝癌细胞迁移和侵袭的作用，TRIM59 可以通过增强 GPX4 泛素化来促进 NAFLD 的脂肪变性和铁死亡，TRIM8 缺乏可通过 TAK1 依赖的信号通路缓解肝脏缺血再灌注损伤。TRIM 蛋白对不同的肝脏疾病作用不同，有的促进疾病发生和发展，而有的 TRIM 蛋白则是产生抑制作用。现在泛素蛋白正转变为一种有效的新兴治疗类蛋白，本文综述了近年来 TRIM 蛋白在几种常见肝脏疾病中的研究进展，为认识和治疗肝脏疾病提供了新的思路。

**关键词：**

TRIM，肝脏疾病，病毒性肝炎、代谢相关脂肪性肝病、肝纤维化、肝细胞癌、肝脏缺血再灌注损伤

肝脏是人体内脏里最大的器官，承担着维持正常生命活动的重要功能，它不仅能够合成和分解蛋白质、去氧化、储存肝糖，还具有调节化学药物代谢、调节全身血容量、排出体内毒素、调节免疫力等功能[1]。肝脏疾病是指一系列发生在肝脏的病变。内外多种致病因素可导致肝脏病理变化引起肝病，例如药物、毒素、病毒、酒精、营养不良等[2]。肝病是一个严重的公共卫生问题，据统计，全球有大量的肝病患者，每年因肝病死亡的人数约在 200 万左右，占全球死亡人数的 4%，其中的三分之一为女性[3]。目前，肝病是第十一大死因，肝硬化是东南亚第九大死因[3]。肝脏疾病主要包括病毒性肝炎、酒精性肝病(alcoholic liver disease，

ALD)、代谢性脂肪性肝病（metabolic associated fatty liver disease，MAFLD)及其相关的肝硬化、肝衰竭(liver failure，LF)、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma，HCC)。在我国，乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）和丙型肝炎病毒（hepatitis C virus，HCV）感染者数量庞大，其中一部分人会发展为慢性肝炎、肝硬化甚至肝癌。而且，治疗肝病需要的费用较高，且治疗时间较长，给患者个人、家庭和社会带来不小的经济压力。一项研究发现，在 2016 年，美国在肝脏疾病相关的花费约为 325 亿美元(95% CI 为 270 - 404 亿美元)，其中住院或急诊护理花费的费用占总费用的三分之二[4]。

## 1 TRIM 蛋白结构及生物学特征

翻译后修饰是细胞生物学和分子生物学领域中的热门研究内容，其中泛素化是一种重要的翻译后修饰，在许多细胞过程中发挥广泛而复杂的作用，包括蛋白质降解、细胞周期控制、蛋白质定位、免疫应答以及信号转导[5]。泛素化由三种泛素酶实现，包括泛素活化酶（ubiquitin-activating enzyme，E1）、泛素结合酶（ubiquitin-conjugating enzyme ，E2）和泛素连接酶（ubiquitin ligase，E3）[6]。这三种酶按顺序催化泛素化过程，E1 酶激活泛素，将泛素转移到 E2 结合酶上，E2 结合酶然后与 E3 泛素连接酶结合，使泛素转移到靶蛋白上[7]。三元基序(Tripartite motif，TRIM)蛋白家族是 E3 泛素连接酶家族，该蛋白家族包含 70 多个成员，根据 TRIM 蛋白存在的 C 末端结构域类型，这些 TRIM 蛋白成员被分为 11 个亚组（C-I–C-XI)[8]。所有 TRIM 蛋白共享一个 N 端 RBCC 基序，这个基序由一个环指结构域（RING-finger domain，RFD）组成，后跟一个或两个锌指结合域（B-box domain）和螺旋线圈结构域（coiled-coil domain，CCD），这三种结构域与 TRIM 蛋白命名有关，参与多种疾病的发病机制[9]。其中 RING 结构域包含一个结合了两个锌原子的 Cys3HisCys4 氨基酸基序，能够结合负载泛素的 E2 泛素结合酶，促进泛素向靶蛋白的转移，从而赋予 TRIM 蛋白发挥 E3 泛素连接酶的作用，是 TRIM 蛋白发挥其泛素化调控作用的关键区域之一[10]。B-box 结构域通常由 B1 和 B2 结构域组成，在一些 TRIM 蛋白中仅有 B2 结构域[11]。B-box 结构域参与 TRIM 蛋白的寡聚化、底物蛋白的识别和调控以及自身稳定性的调节，是 TRIM 家族发挥其功能的主要决定因素之一[12]。

TRIM 蛋白的 CCD 负责与其他蛋白互相结合发挥作用，定义 TRIM 蛋白成员的功能[13]。多个相同的 TRIM 蛋白还能通过 CCD 发生自缔结，形成蛋白复合物，这个复合物可定位于细胞质或细胞核中[13]。总的来说，TRIM 蛋白家族作为 E3 泛素连接酶家族的一部分，在细胞生物学和分子生物学领域中具有重要的研究价值。对于其在不同生理和病理状态下的调节机制的深入研究，有助于深入理解细胞信号传导途径的调控机制，并为相关疾病的治疗提供新的靶点和策略。

近年来，大量文献表明 TRIM 蛋白与多种肝脏疾病的发生发展密切相关。虽然 TRIM 蛋白家族在肝脏疾病发生发展中的重要性已经得到广泛认可，但是针对 TRIM 蛋白家族在肝脏疾病治疗和/或发病机制中的研究仍需要进一步拓展。因此，本文就 TRIM 蛋白家族在多种肝脏疾病中的调控作用及机制进行综述。在此基础上，本综述讨论了几种常见肝脏疾病与 TRIM 蛋白家族之间的关系。

## 2 TRIM 蛋白介导的肝脏疾病

### 2.1 TRIM 在病毒性肝炎中的作用

TRIM 蛋白与抗病毒作用间的研究首次发表于 2004 年，这项研究表明，TRIM5α作为显性抑制因子，使人类免疫缺陷病毒无法完成逆转录，有效地阻止 HIV 入侵人体[14]。自该发现以来，对 TRIM 蛋白和病毒进行了广泛研究,其中包括 HBV 和 HCV。

HBV 感染可发展为慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌，是全世界死亡的主要原因，中国是 HBV 相关肝病负担最重的国家之一。HBV 是一种嗜肝类 DNA 病毒，病毒 DNA 可整合到宿主基因组中实现免疫逃逸，目前的临床治疗手段仍然难以实现治愈[15]。研究发现，TRIM5γ是一种干扰素刺激基因，其 B-box 结构域可与 HBx 相互作用，通过促进 k48 泛素化和 k95 泛素化来降解 HBx 蛋白抑制 HBV 复制，TRIM5γ还可招募 TRIM31 并与 HBx 形成复合物，从而导致 HBx 的蛋白酶体降解[16]。HBV 核心启动子（CP）在 HBV 复制中起着核心作用，在一项研究中发现 TRIM22 依赖于 RING 结构域抑制 HBV CP 的活性，从而实现抑制 HBV 基因的表达和复制[17]。在 HBV 感染期间，TRIM56 也是一种重要的抗病毒免疫效应物。TRIM56

通过 RING 结构域泛素化 IκBα，这种泛素化诱导 p65 磷酸化，进而在 HBV cccDNA 转录过程中阻止 HBV CP 的活性，抑制 HBV 复制[18]。TRIM21 促进 HBV DNA Pol 的 K260 和 K283 位点的泛素修饰，并通过 k48 连接的泛素蛋白酶体途径加速 HBV DNA Pol 的降解，从而抑制 HBV DNA 复制，TRIM21 对 HBV DNA 的抑制主要依靠 SPRY 结构域[19]。除此之外，TRIM 家族其他成员包括 TRIM11、14、25 和 26 也可能导致 HBV 基因表达降低。

丙型肝炎病毒(hepatitis virus C，HCV)是一种 RNA 病毒，全球约有 7100 万人感染 HCV，每年至少有 40 万人死于 HCV 相关疾病，中国是疾病负担最高的国家[20]。TRIM14 被发现能够靶向 NS5A 并由 SPRY 结构域介导的剂量依赖性方式导致其降解，NS5A 降解可能通过 K48 泛素化途径,发挥其抗病毒功能[21]。TRIM22 也能降解 NS5A，干扰 HCV 复制[22]。

2.2 代谢性脂肪性肝病

代谢性脂肪性肝病是全球最普遍的慢性肝病之一，是全球范围内最常见的慢性肝病之一，与肥胖、II 型糖尿病和高甘油三酯血症等代谢和心血管异常密切相关[23]。目前关于 MAFLD 的发病机制尚不清楚。1980 年，Ludwig 等人首次将在没有大量酒精摄入情况下发生的脂肪性肝病称为非酒精性脂肪性肝病（Non-Alcoholic Fatty Liver Disease，NAFLD）。然而，到了 2023 年，一项关于新命名法的多学会德尔菲共识声明建议采用术语"代谢功能障碍相关脂肪变性肝病"来取代非酒精性脂肪性肝病[24]。近年调查发现，全球 NAFLD 的总体患病率估计为 32.4%。亚洲地区 NAFLD 的患病率在 28%-32.4%之间，而中国的患病率从 23.8%上升到 29%。[25]。NAFLD 是肝移植的第二大原因，同时也是女性的主要原因[26]。在过去三十年中，NAFLD 占所有死亡原因的百分比从 0.10%增加到 0.17%[3]。

既往研究表明，TRIM 家族的许多成员与 MAFLD 的发病相关。在正常肝脏中，TRIM8 的表达水平几乎可以忽略不计，但肥胖情况下会导致 TRIM8 在肝脏中大量表达。研究发现，TRIM8 能够促进 TAK1 的磷酸化，而磷酸化的 TAK1 可激活 JNK/P38 信号通路，从而调节 MAFLD 的发生[27]。此外，GPX4 作为保护细胞免受脂质过氧化的关键酶，抑制 GPX4 可导致铁下垂，TRIM59 与 GPX4 相

互作用并促进其泛素化，促进 NAFLD 的脂肪变性和铁死亡[28]。而 TRIM16 的 C 端与 TAK1 的 N 端激酶结构域直接相互作用，促进磷酸化的 TAK1 蛋白酶体降解，从而抑制非酒精性脂肪肝炎进展[29]。此外，还有其他 TRIM 家族蛋白如 TRIM11、15、24、31 和 67 等也与 MAFLD 发展相关，这些研究成果为未来研究 MAFLD 提供了重要的参考[30]。

2.3 肝纤维化

脏器纤维化是慢性炎症性疾病进展的特征，占全球全因死亡率的 45%[31]。肝纤维化的特征是肝星状细胞活化转分化为产生胶原的肌成纤维细胞，这些肌成纤维细胞持续分泌I型和III型胶原，纤维胶原的进行性积累，从而破坏肝脏的生理结构[32]。很长时间以来都认为肝纤维化不可逆转，没有有效治疗方法[33]。近年来，一些临床和基础医学研究提高了对纤维化病理机制的理解，为肝纤维化逆转提供了一些的分子机制的信息[34]。

最近的一些关于肝纤维化分子机制的研究表明，TRIM 蛋白有望成为纤维化治疗的新靶点。具体来说，TRIM26 能够与 SLC7A11 相互结合，促进 SLC7A11 的泛素化，从而促进肝星状细胞的铁死亡，从而减轻肝纤维化[35]。另外，TRIM15 也被认为具有抑制肝星状细胞激活的能力，从而减轻肝纤维化[36]。TRIM52 与 PPM1A 相互结合，增强 PPM1A 的泛素化，通过 Smad2/3 通路促进 LX-2 细胞的纤维化[37]。研究还发现，TRIM37 通过靶向 SMAD7 的降解来促进肝纤维化[38]。在合并感染人类免疫缺陷病毒和 HCV 的患者中，抗病毒治疗后肝纤维化发病率显著增加与 TRIM5 和 TRIM22 的表达有关[39]。另外，在高脂饮食给药后的肝脂肪变性中，TRIM8 转基因小鼠表现出对纤维化基因表达和组织学纤维化的促进作用[27]。而在 TRIM24 基因缺失小鼠和肝脏 TRIM24 特异性缺失小鼠中，肝脏稳态失衡，小鼠肝脏发展为肝纤维化和肝细胞癌[40]。然而，这些 TRIM 蛋白在肝纤维化中的具体作用仍需进一步研究。

2.4 肝细胞癌

原发性肝癌是全球第六大常见癌症和第三大癌症死亡原因，肝细胞癌占原发性肝癌的 85-90%，是一个全球性的健康问题[41]。慢性 HBV 或 HCV 感染是肝细

胞癌发生的主要危险因素，75%的肝癌发生在亚洲，主要与 HBV、HCV 相关。其次是与代谢综合征相关的脂肪肝疾病，还有酒精、黄曲霉毒素和免疫系统疾病等[42]。其中慢性 HBV 感染和黄曲霉毒素 B1 是中国和印度等发展中地区的主要危险因素[43]。HCC 的治疗方法取决于诊断阶段和患者的整体健康状况，可分为药物治疗和非药物治疗两类[44]。临床治疗使用的药物包括索拉非尼、乐伐替尼、瑞戈非尼和卡博替尼等，肝切除术、肝移植、经动脉化疗栓塞术和射频消融术等是临床主要的非药物治疗方式[45]。

近年来，TRIM 在肝细胞癌发生发展中的重要作用逐渐被揭示。Liu 等发现 TRIM25 直接靶向 Keap1 的 K615，促进其泛素化和降解，激活 Nrf2，增强抗氧化防御和细胞存活[46]。Ge 等发现 TRIM37 与 P53 蛋白相互作用，诱导 P53 蛋白 k48 泛素化和降解，进一步促进肝细胞癌的恶性特征，从而促进糖酵解过程。P53 的基因敲低逆转了 TRIM37 对肝癌细胞生长和转移的促进作用[47]。Lv 等发现 TRIM55 与甲状腺受体相互作用蛋白 6 相互作用，通过影响泛素化过程来调节其稳定性，从而激活 Wnt 信号通路来促进 HCC 增殖[48]。TRIM 蛋白的失调还与 HCC 的预后有关，Dai 等研究发现，TRIM3、TRIM5、TRIM21、TRIM27、TRIM32、TRIM44、TRIM47、TRIM72 等 TRIM 家族成员的高表达与 HCC 患者不良整体存活率显著相关[49]。

### 2.5 其他

肝移植是肝硬化、肝衰竭和肝癌等终末期肝病的主要治疗方式之一，肝缺血再灌注损伤 （ischemia-reperfusion injury，IRI）是移植的主要并发症[50]。IRI 是一个复杂的病理生理过程，主要发生在肝脏中断供血后重新获得血液供应时，这个过程可能使肝脏受到的损伤加重[51]。目前关于 IRI 的治疗还具有一定挑战性，了解肝脏 IRI 的分子机制有利于为新药的开发或治疗方法提供可靠依据。两项研究表明，TRIM 蛋白与 IRI 也有关系。Chen 等研究发现，TRIM27 与肝 IRI 相关，TRIM27 的缺失会加重肝损伤时的细胞凋亡和炎症反应，而过表达 TRIM27 可改善肝 IRI 引起的肝损伤和炎症。机制研究结果显示，TRIM27 通过介导 TAB2/3 的降解抑制 TAK1 活性,从而抑制下游的 TAK1-JNK/p38 信号通路，以此来减轻肝脏 IRI[52]。Qiu 等发现，Trim8 蛋白在肝脏 IRI 中表达显著升高，Trim8 缺乏依

赖于 TAK1-JNK1/2/p38 信号通路在肝脏 IRI 中发挥保护作用[53]。关于 TRIM 蛋白在肝脏 IRI 中还不多见，未来还需要更深入的研究。

## 3 总结与展望

肝病是全球性健康问题，我们正处于全球肝病认识和控制的关键时期。随着人口老龄化，尤其是慢性病如肝病和糖尿病的增加，东亚等地区面临着巨大的医疗需求。肝病治疗市场已经对临床需求做出了快速反应[3]。泛素化作为一种化学修饰过程，随着泛素化相关药物研究的成功而受到广泛关注。例如，蛋白酶体抑制剂硼替佐米和卡非佐米已经被美国 FDA 批准用于治疗多发性骨髓瘤[54]。TRIM 蛋白作为一类具有泛素化靶蛋白功能的蛋白，在肝脏疾病的发生和发展中扮演着重要角色。尽管目前在实验室或临床水平上缺乏涉及 TRIM 蛋白的治疗药物的开发，但越来越多的研究表明，TRIM 家族蛋白与肝脏疾病有密切关联。因此，进一步分析和研究 TRIM 蛋白的潜在作用至关重要，这有助于探索相关的潜在治疗靶点和预后生物标志物。

## 参考文献

[1]Jeng W J, Papatheodoridis G V, Lok A S F. Hepatitis B [J]. Lancet, 2023, 401(10381): 1039-1052.

[2]Tsukuda S, Watashi K. Hepatitis B virus biology and life cycle [J]. Antiviral Res, 2020, 182: 104925.

[3]Nguyen M H, Wong G, Gane E, Kao J H, Dusheiko G. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy [J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33(2).

[4]Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd A H. Genetic variability in hepatitis B viruses [J]. J Gen Virol, 2002, 83(Pt 6): 1267-1280.

[5]Datta S, Chatterjee S, Veer V, Chakravarty R. Molecular biology of the hepatitis B virus for clinicians [J]. J Clin Exp Hepatol, 2012, 2(4): 353-365.

[6]Sivasudhan E, Blake N, Lu Z, Meng J, Rong R. Hepatitis B Viral Protein HBx and the Molecular Mechanisms Modulating the Hallmarks of Hepatocellular Carcinoma: A Comprehensive Review [J]. Cells, 2022, 11(4).

[7]Wang J, Huang H, Liu Y, Chen R, Yan Y, Shi S, Xi J, Zou J, Yu G, Feng X, Lu F. HBV Genome and Life Cycle [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1179: 17-37.

[8]Martinez M G, Boyd A, Combe E, Testoni B, Zoulim F. Covalently closed circular DNA: The ultimate therapeutic target for curing HBV infections [J]. J Hepatol, 2021, 75(3): 706-717.

[9]Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B [J]. Gut, 2015, 64(12): 1972-1984.

[10]Li Y, He M, Wang Z, Duan Z, Guo Z, Wang Z, Gong R, Chu T, Cai J, Gao B. STING signaling activation inhibits HBV replication and attenuates the severity of liver injury and HBV-induced fibrosis [J]. Cell Mol Immunol, 2022, 19(1): 92-107.
[11]Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, Sprinzl M F, Koppensteiner H, Makowska Z, Volz T, Remouchamps C, Chou W M, Thasler W E, Hüser N, Durantel D, Liang T J, Münk C, Heim M H, Browning J L, Dejardin E, Dandri M, Schindler M, Heikenwalder M, Protzer U. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA [J]. Science, 2014, 343(6176): 1221-1228.
[12]Tropberger P, Mercier A, Robinson M, Zhong W, Ganem D E, Holdorf M. Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(42): E5715-5724.
[13]Han Q, Zhang C, Zhang J, Tian Z. The role of innate immunity in HBV infection [J]. Semin Immunopathol, 2013, 35(1): 23-38.
[14]MacMicking J D. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(5): 367-382.
[15]Hoffmann H H, Schneider W M, Rice C M. Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions [J]. Trends Immunol, 2015, 36(3): 124-138.
[16]Crosse K M, Monson E A, Beard M R, Helbig K J. Interferon-Stimulated Genes as Enhancers of Antiviral Innate Immune Signaling [J]. J Innate Immun, 2018, 10(2): 85-93.
[17]Gushchina L V, Kwiatkowski T A, Bhattacharya S, Weisleder N L. Conserved structural and functional aspects of the tripartite motif gene family point towards therapeutic applications in multiple diseases [J]. Pharmacol Ther, 2018, 185: 12-25.
[18]Lu K, Pan Y, Huang Z, Liang H, Ding Z Y, Zhang B. TRIM proteins in hepatocellular carcinoma [J]. J Biomed Sci, 2022, 29(1): 69.
[19]Watanabe M, Hatakeyama S. TRIM proteins and diseases [J]. J Biochem, 2017, 161(2): 135-144.
[20]Kapp L N, Painter R B, Yu L C, van Loon N, Richard C W, 3rd, James M R, Cox D R, Murnane J P. Cloning of a candidate gene for ataxia-telangiectasia group D [J]. Am J Hum Genet, 1992, 51(1): 45-54.
[21]Cai C, Tang Y D, Zhai J, Zheng C. The RING finger protein family in health and disease [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 300.
[22]Xing J, Zhang A, Minze L J, Li X C, Zhang Z. TRIM29 Negatively Regulates the Type I IFN Production in Response to RNA Virus [J]. The Journal of Immunology, 2018, 201(1): 183-192.
[23]Xing J, Zhang A, Zhang H, Wang J, Li X C, Zeng M S, Zhang Z. TRIM29 promotes DNA virus infections by inhibiting innate immune response [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 945.
[24]Li Q, Lin L, Tong Y, Liu Y, Mou J, Wang X, Wang X, Gong Y, Zhao Y, Liu Y, Zhong B, Dai L, Wei Y Q, Zhang H, Hu H. TRIM29 negatively controls antiviral immune response through targeting STING for degradation [J]. Cell Discov, 2018, 4: 13.
[25]Song Y, Li M, Wang Y, Zhang H, Wei L, Xu W. E3 ubiquitin ligase TRIM21 restricts hepatitis B virus replication by targeting HBx for proteasomal degradation [J]. Antiviral Res, 2021, 192: 105107.
[26]Tan G, Yi Z, Song H, Xu F, Li F, Aliyari R, Zhang H, Du P, Ding Y, Niu J, Wang X, Su L, Qin F X, Cheng G. Type-I-IFN-Stimulated Gene TRIM5γ Inhibits HBV Replication by Promoting HBx Degradation [J]. Cell Rep, 2019, 29(11): 3551-3563.e3553.

[27]Song H, Xiao Q, Xu F, Wei Q, Wang F, Tan G. TRIM25 inhibits HBV replication by promoting HBx degradation and the RIG-I-mediated pgRNA recognition [J]. Chin Med J (Engl), 2023, 136(7): 799-806.
[28]王贵强, 段钟平, 王福生, 庄辉, 李太生, 郑素军, 赵鸿, 侯金林, 贾继东, 徐小元, 崔富强, 魏来. 慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版) [J]. 实用肝脏病杂志, 2020, 23(01): 9-32.
[29]Kayesh M E H, Sanada T, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Tree Shrew as an Emerging Small Animal Model for Human Viral Infection: A Recent Overview [J]. Viruses, 2021, 13(8).
[30]Li F, Wang Z, Hu F, Su L. Cell Culture Models and Animal Models for HBV Study [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1179: 109-135.
[31]Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(24): 15655-15660.
[32]Acs G, Sells M A, Purcell R H, Price P, Engle R, Shapiro M, Popper H. Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84(13): 4641-4644.
[33]Hantz O, Parent R, Durantel D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Zoulim F. Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells [J]. J Gen Virol, 2009, 90(Pt 1): 127-135.
[34]Lucifora J, Durantel D, Testoni B, Hantz O, Levrero M, Zoulim F. Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells [J]. Hepatology, 2010, 51(1): 63-72.
[35]Hu J, Lin Y Y, Chen P J, Watashi K, Wakita T. Cell and Animal Models for Studying Hepatitis B Virus Infection and Drug Development [J]. Gastroenterology, 2019, 156(2): 338-354.
[36]Gliddon H D, Herberg J A, Levin M, Kaforou M. Genome-wide host RNA signatures of infectious diseases: discovery and clinical translation [J]. Immunology, 2018, 153(2): 171-178.
[37]Cheng S T, Tang H, Ren J H, Chen X, Huang A L, Chen J. Interleukin-34 inhibits hepatitis B virus replication in vitro and in vivo [J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0179605.
[38]Christophi G P, Hudson C A, Gruber R C, Christophi C P, Mihai C, Mejico L J, Jubelt B, Massa P T. SHP-1 deficiency and increased inflammatory gene expression in PBMCs of multiple sclerosis patients [J]. Lab Invest, 2008, 88(3): 243-255.
[39]Garofalo M, Pandini C, Bordoni M, Jacchetti E, Diamanti L, Carelli S, Raimondi M T, Sproviero D, Crippa V, Carra S, Poletti A, Pansarasa O, Gagliardi S, Cereda C. RNA Molecular Signature Profiling in PBMCs of Sporadic ALS Patients: HSP70 Overexpression Is Associated with Nuclear SOD1 [J]. Cells, 2022, 11(2).
[40]Esposito D, Koliopoulos M G, Rittinger K. Structural determinants of TRIM protein function [J]. Biochem Soc Trans, 2017, 45(1): 183-191.
[41]Decout A, Katz J D, Venkatraman S, Ablasser A. The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(9): 548-569.
[42]Xing J, Weng L, Yuan B, Wang Z, Jia L, Jin R, Lu H, Li X C, Liu Y J, Zhang Z. Identification of a role for TRIM29 in the control of innate immunity in the respiratory tract [J]. Nat Immunol, 2016, 17(12): 1373-1380.
[43]Han J, Zhao Z, Zhang N, Yang Y, Ma L, Feng L, Zhang X, Zuo J, Fan Z, Wang Y, Song Y, Wang G. Transcriptional dysregulation of TRIM29 promotes colorectal cancer carcinogenesis via pyruvate kinase-mediated glucose metabolism [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(4): 5034-5054.

[44]Yin Y T, Shi L, Wu C, Zhang M Y, Li J X, Zhou Y F, Wang S C, Wang H Y, Mai S J. TRIM29 modulates proteins involved in PTEN/AKT/mTOR and JAK2/STAT3 signaling pathway and suppresses the progression of hepatocellular carcinoma [J]. Med Oncol, 2024, 41(3): 79.
[45]Deng X, Fu X, Teng H, Fang L, Liang B, Zeng R, Chen L, Zou Y. E3 ubiquitin ligase TRIM29 promotes pancreatic cancer growth and progression via stabilizing Yes-associated protein 1 [J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 332.
[46]Xu X, Qin Z, Zhang C, Mi X, Zhang C, Zhou F, Wang J, Zhang L, Hua F. TRIM29 promotes podocyte pyroptosis in diabetic nephropathy through the NF-kB/NLRP3 inflammasome pathway [J]. Cell Biol Int, 2023, 47(6): 1126-1135.
[47]Deng Y, Li Z, Sun X, Ma N, Song L, Chen D, Gao F. TRIM29 (Tripartite Motif Containing 29) Alleviates NLRC4 (NLR Family CARD Domain Containing Protein 4) Inflammasome Related Cerebral Injury via Promoting Proteasomal Degradation of NLRC4 in Ischemic Stroke [J]. Stroke, 2023, 54(5): 1377-1389.
[48]Wu J, Dobbs N, Yang K, Yan N. Interferon-Independent Activities of Mammalian STING Mediate Antiviral Response and Tumor Immune Evasion [J]. Immunity, 2020, 53(1): 115-126.e115.
[49]Liu S, Cai X, Wu J, Cong Q, Chen X, Li T, Du F, Ren J, Wu Y T, Grishin N V, Chen Z J. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation [J]. Science, 2015, 347(6227): aaa2630.
[50]EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection [J]. J Hepatol, 2017, 67(2): 370-398.
[51]Liem K S, van Campenhout M J H, Xie Q, Brouwer W P, Chi H, Qi X, Chen L, Tabak F, Hansen B E, Janssen H L A. Low hepatitis B surface antigen and HBV DNA levels predict response to the addition of pegylated interferon to entecavir in hepatitis B e antigen positive chronic hepatitis B [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2019, 49(4): 448-456.
[52]Xu B, Tang B, Wei J. Role of STAT1 in the resistance of HBV to IFN-α [J]. Exp Ther Med, 2021, 21(6): 550.
[53]Rehermann B, Bertoletti A. Immunological aspects of antiviral therapy of chronic hepatitis B virus and hepatitis C virus infections [J]. Hepatology, 2015, 61(2): 712-721.
[54]Luo M, Hou J, Mai H, Chen J, Chen H, Zhou B, Hou J, Jiang D K. TRIM26 inhibits hepatitis B virus replication by promoting HBx degradation and TRIM26 genetic polymorphism predicts PegIFNα treatment response of HBeAg-positive chronic hepatitis B Patients [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2022, 56(5): 878-889.

# 学位论文数据集

| 关键词* | 密级* | 中图分类号* | UDC | 论文资助 |
|---|---|---|---|---|
| 乙型肝炎病毒 | ☑公开<br>☐不公开 | R512.6+2 | 616.9 | |

| 学位授予单位名称* | 学位授予单位代码* | 学位类别* | 学位级别* |
|---|---|---|---|
| 贵州医科大学 | 10660 | 硕士 | 硕士 |

| 论文题名* | 论文语种* |
|---|---|
| TRIM29 影响 HBV 复制和聚乙二醇干扰素-α 2b 抗病毒效应的研究 | 中文 |

| 并列题名* | Effect of TRIM29 on HBV replication and antiviral effect of pegylated interferon-α 2b | | |
|---|---|---|---|
| 作者姓名* | 廖心 | 学号* | 2021110020300 |

| 培养单位名称* | 培养单位代码* | 培养单位地址 | 邮编 |
|---|---|---|---|
| 贵州医科大学 | 10660 | | |

| 学科专业* | 研究方向* | 学制* | 学位授予年* |
|---|---|---|---|
| 临床医学 | 乙型肝炎病毒复制机制 | 3 | 2024 |

| 论文提交日期* | 2024 年 5 月 30 日 |
|---|---|

| 导师姓名* | 张宝芳 | 职称* | 副教授 |
|---|---|---|---|

| 评阅人 | 答辩委员会主席* | 答辩委员会成员 |
|---|---|---|
| | 赵雪珂 | |

电子版论文提交格式　文本（）　图像（）　视频（）　音频（）　多媒体（）
其它（）

推荐格式：application/msword；application/pdf

| 电子版论文出版（发布）者 | 电子版论文出版（发布）地 | 权限声明 |
|---|---|---|
| | | |

| 论文总页数* | 63 |
|---|---|

共 33 项，其中带*为必填数据，为 22 项。