

廉梅,林晓琳,贾俊双,等. TRIM26在人和小鼠主要组织器官中的表达谱[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 10-15.
Lian M, Lin XL, Jia JS, et al. TRIM26 expression profile in multiple human and mouse tissues and organs [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 10-15.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.002

TRIM26在人和小鼠主要组织器官中的表达谱

廉梅^{1,2}, 林晓琳¹, 贾俊双¹, 肖胜军³, 肖东^{1,2*}

(1.南方医科大学基础医学院, 广州 510515; 2.南方医科大学实验动物管理中心, 广州 510515;
3.桂林医学院第二附属医院病理科, 广西 桂林 541199)

【摘要】 目的 明确 TRIM26 在人和小鼠不同组织器官中的表达定位和水平。**方法** 表达定位研究采用免疫组织化学 PV-9000 二步法(非生物素), 利用 BioGPS 数据库分析 TRIM26 在人体组织中的表达水平, RT-qPCR 检测小鼠主要组织器官中 TRIM26 表达水平。**结果** IHC 的结果显示, TRIM26 蛋白信号定位于细胞质和细胞核, 其表达多见于上皮细胞。TRIM26 蛋白在人和小鼠的食管鳞状上皮细胞、胃上皮细胞、小肠上皮细胞、结肠上皮细胞、胰岛细胞、脑胶质细胞、肾小管上皮细胞和肾小球细胞以及子宫内膜腺上皮细胞中的表达定位一致。另外, TRIM26 分别在人体气管组织和小鼠脾组织上的相对表达量最高。**结论** TRIM26 在人和小鼠组织上的表达定位具有一致性, 表达量略有差异。TRIM26 在人和小鼠主要组织器官上的表达谱的明确, 将为利用 TRIM26 条件性敲除小鼠解析 TRIM26 在不同组织器官的功能奠定了良好基础。

【关键词】 TRIM26; 免疫组织化学; 表达谱

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0010-06

TRIM26 expression profile in multiple human and mouse tissues and organs

LIAN Mei^{1,2}, LIN Xiaolin¹, JIA Junshuang¹, XIAO Shengjun³, XIAO Dong^{1,2*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China.

2. Laboratory Animal Management Center, Southern Medical University, Guangzhou 510515.

3. Pathology Department of the Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541199)

【Abstract】 Objective To examine the expression level and distribution of TRIM26 in multiple human and mouse tissues and organs. **Methods** The immunohistochemistry (IHC) PV-9000 two-step method (non-biotin) was used to determine the expression and distribution of TRIM26. BioGPS was used to calculate TRIM26 expression levels in human tissues and organs, whereas RT-qPCR was performed to determine its counterparts in mice. **Results** The IHC result indicated that the TRIM26 protein is expressed in the cytoplasm and nucleus, mainly in epithelial cells. Its expression distribution in human esophageal squamous cells, gastric epithelial cells, small intestinal epithelial cells, colon epithelial cells, islet cells, brain glial cells, renal tubular epithelial cells, glomerular cells, and endometrial glandular epithelial cells was consistent with that in the mouse equivalent cells. The highest relative expression of TRIM26 was observed in human tracheal cells and mouse spleen. **Conclusions** Humans and mice show consistent expression distribution of TRIM26 in multiple tissues and organs, but with different expression levels. Revealing the TRIM26 expression profile in human and mouse main organs and tissues lays a foundation for further exploration of the functions of TRIM26 in different tissues and organs by engineering conditional TRIM26-knockout mice.

【Keywords】 TRIM26; immunohistochemistry; expression profile

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81702778); 桂林市科学研究与技术开发计划课题(20130120-8); 广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA159131)。

【作者简介】 廉梅(1995—), 女, 硕士研究生, 主要从事糖脂代谢研究。E-mail: 751139482@qq.com

【通信作者】 肖东(1968—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 糖脂代谢和肝源化肝脏动物模型(鼠和小型猪等)开发与应用。
E-mail: xiao_d@hotmail.com

TRIM(三结构域蛋白, Tripartite motif)家族蛋白具有高度保守的 RBCC 结构域,由众多的成员组成,广泛存在于大多数动物体内,具有免疫调节和 E3 泛素连接酶活性,可参与机体的免疫应答过程和泛素依赖的蛋白酶体介导的蛋白质降解^[1]。大多数 TRIM 蛋白由一个 RING 锌指结构域、一个或两个 B-box 结构域和一个卷曲螺旋结构域(coiled-coil, CC),又被称为 RBCC 结构域^[2]。到目前为止已经发现了 70 多个人源 TRIM 蛋白,它们在机体中参与了多种生物过程和疾病发病机制的调控过程。

TRIM26/ZNF173/RNF95 基因位于 6 号染色体的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)区域^[3]。TRIM26 由一个 RING 锌指结构域、一个 B-box 2 结构域、一个卷曲螺旋结构域和一个 PRY-SPRY 结构域^[4]组成;其中锌指结构域结合 DNA,参与基因表达调控,RING 结构域具有 E3 泛素连接酶的活性^[5],B-box 2 结构域参与蛋白泛素化修饰调节,PRY-SPRY 结构域对免疫应答有调控作用,可以促进多聚信号复合体的形成^[6]。迄今,为数不多的研究表明,TRIM26 具有 E3 泛素连接酶的活性^[7],其在呼吸道疾病^[8]、抗 HIV-1 感染^[9]和作为精神分裂症的易感基因^[10]等方面发挥着重要作用。此外,E3 连接酶 TRIM26 通过泛素化降解核内的 IRF3 负向调控 IFN- β 的产生和抗病毒免疫反应^[11];TRIM26 是抗 RNA 病毒先天免疫反应的一个重要调节因子^[12]。

最近有研究表明,TRIM26 与肿瘤有一定关系。Mule 和 TRIM26 介导的 NEIL1 泛素化依赖调节是细胞 DNA 损伤反应所需要的,RNA 干扰沉默 TRIM26 表达可增强人骨肉瘤 U2OS 细胞对放疗的抵抗性^[13]。TRIM26 可通过泛素化调节 NTH1 参与人结直肠癌 HCT116 细胞对氧化应激敏感性的调控,RNA 干扰沉默 TRIM26 表达可增强对过氧化氢(H_2O_2)所致 HCT116 细胞氧化应激损伤的保护作用^[14]。此外,RT-qPCR、基因芯片和原位杂交等研究结果显示,TRIM26 在鼻咽癌组织中表达显著下调;同时,基因芯片数据亦揭示,在下调最明显的 10 个基因中,TRIM26 位于第 4 位^[15]。新近研究亦证实,鼻咽癌组织中 TRIM26 表达下调与鼻咽癌低免疫反应密切相关^[16]。总之,目前对 TRIM26 在肿瘤发生、发展中的调控作用仍然知之甚少,还有待进一步的探索。

为明确 TRIM26 在人和小鼠主要组织器官上的

表达谱,本文通过免疫组织化学技术检测 TRIM26 在正常人体和小鼠组织器官中的表达,了解该基因在不同组织上的表达定位情况,再结合 BioGPS 数据库和 RT-qPCR 对 TRIM26 在组织上的表达水平进行分析。通过表达定位和表达水平的综合分析,明确该基因在人和小鼠主要组织器官上的表达谱,将为利用 TRIM26 条件性敲除小鼠解析 TRIM26 在不同组织器官的功能及其在肿瘤等疾病发生发展过程的作用及其分子调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠,雌性 5 只,30~35 日龄,体重 15~17 g,购买于南方医科大学实验动物中心[SCXK(粤)2016-0041],饲养在南方医科大学实验动物中心 SPF 实验动物部[SYXK(粤)2016-0167]。实验方案通过南方医科大学实验动物伦理审查委员会审批(L2017068),符合 3R 原则。

1.1.2 实验组织

正常人体组织标本来自桂林医学院第二附属医院病理科,取自手术切除器官病变旁正常组织(标本来源经桂林医学院第二附属医院伦理委员会批准并由患者签署知情同意书)。肝(10 例),胃(7 例),肺(6 例),结肠、胰腺、肾和脾(各 5 例),食管和子宫内膜(各 4 例),甲状腺、皮肤和乳腺(各 3 例),脑和卵巢(各 2 例)。所有组织经病理学检查不含癌组织。

1.2 主要试剂与仪器

无水乙醇、二甲苯、氯仿、异丙醇(天津市大茂化学试剂厂);TRIM26 抗体(ab188017)(美国 Abcam 公司);PBS 缓冲液粉末、柠檬酸盐修复液(pH6.0)、封闭用羊血清(工作液)、兔二步法试剂盒(内源性过氧化物酶阻断剂、酶标山羊抗兔 IgG 聚合物)、DAB 显色试剂盒(20X)、苏木素染色液(北京中杉金桥生物技术有限公司);TRIzol、PrimeScriptTM RT Reagent Kit、SYBR Premix Ex TaqTM(TaKaRa 公司)。荧光定量 PCR 仪(LightCycler[®] 96,瑞士 Roche 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标本处理

4%多聚甲醛溶液固定组织 24 h,常规石蜡脱水、包埋、切片(4 μ m)(为减少误差,相同器官组织

包埋于一个蜡块上)。

1.3.2 免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 染色

选择 PV-9000 二步法 (非生物素): 石蜡切片经脱蜡、水化、抗原修复后, 滴加一抗并 4℃ 过夜; 酶标山羊抗兔 IgG 聚合物 37℃ 孵育 30 min, DAB 显色 (显色时间控制一致), 苏木素复染, 经过梯度乙醇与二甲苯脱水, 最后中性树脂封片后在光镜观察并拍照。阴性对照为 PBS 代替一抗。

1.3.3 免疫组织化学结果判读

免疫组织化学染色, 呈棕黄色为阳性, 不着色为阴性。结果由两位桂林医学院第二附属医院病理科医生独立判读 TRIM26 所表达的组织部位并评分, 根据阳性信号强度不同分为 0~3 分, 分别代表 TRIM26 在组织上不表达、弱阳性表达、中等阳性表达和强阳性表达, 统计评分结果, 确定该基因在不同组织上的表达强度。阴性对照不着色为不表达。

1.3.4 BioGPS 数据库分析

利用 BioGPS 数据库中的 Gene Atlas U133 A, gcrma (<http://biogps.org/>) 数据集, 分析 TRIM26 在人的主要组织器官中的 mRNA 表达水平, 并用 GraphPad Prism 5 做柱形图。

1.3.5 小鼠组织 RNA 提取和实时荧光定量 PCR 反应 (quantitative real time polymerase chain reaction, RT-qPCR)

收取小鼠主要组织器官, 按说明书抽提总 RNA 和逆转录反应。以获得的 cDNA 为模板, 设计引物进行 RT-qPCR 检测。选择 GAPDH 基因作为内参照, 检测 TRIM26 的表达; 选择在小鼠组织中表达量最低的组织为 1, 其他组织器官按其相对表达量作图。

小鼠 GAPDH 上游引物序列: 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3', 下游引物序列: 5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'; 小鼠 TRIM26 上游引物序列: 5'-TCGGCCAGTGGATACCTACAT-3', 下游引物序列: 5'-TGGCTCAGTCAAAGTCTG-3'。

2 结果

2.1 人体主要组织器官中 TRIM26 的表达谱

对不同人体组织的 IHC 染色结果进行评分, 染色呈深棕色为强表达, 不着色为不表达。IHC 结果分析显示, TRIM26 蛋白主要定位于细胞质中, 少部

分组织定位于细胞核, 同一组织的表达定位在多例标本中一致 (图 1)。在食管鳞状上皮细胞 (图 1A)、胃底腺上皮细胞 (图 1B)、小肠和结肠的上皮细胞 (图 1C、1D)、肝细胞 (图 1E)、胰岛细胞 (图 1F)、脑神经元和胶质细胞 (图 1G)、气管及支气管纤毛柱状上皮细胞 (图 1H)、肺泡腔内巨噬细胞及上皮细胞 (图 1I)、脾血窦内皮细胞 (图 1J)、肾小管和肾球囊壁上皮细胞及肾小球细胞 (图 1K)、卵巢间质细胞 (图 1L)、子宫内膜腺上皮细胞 (图 1M)、甲状腺滤泡上皮细胞 (图 1N)、乳腺小叶上皮细胞 (图 1O) 和鳞状上皮细胞 (图 1P) 中 TRIM26 均有表达, 但在以上这些组织中, 乳腺小叶上皮细胞和胰岛细胞中 TRIM26 表达较强。

2.2 TRIM26 在人体主要组织器官中的相对表达水平

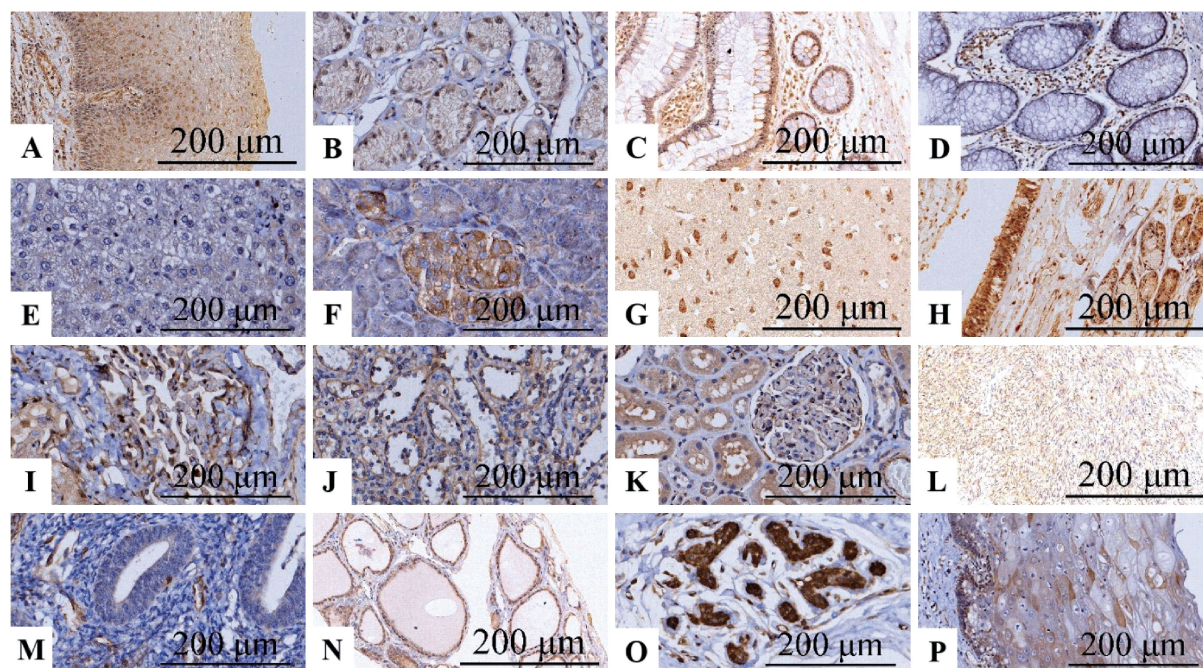
根据 BioGPS 数据库中的 Gene Atlas U133A, gcrma 数据集, 以数据库中 TRIM26 表达量最低的卵巢组织为 1, 其它组织器官按其相对表达量作图。TRIM26 在人的主要组织器官上的 mRNA 表达量见图 2。TRIM26 在气管、肝和甲状腺上的表达水平较高, 并且该基因在胰岛细胞上的表达量高于其在胰腺组织上的表达量。

2.3 IHC 揭示小鼠主要组织器官中 TRIM26 表达谱

对小鼠组织的 IHC 染色结果进行评分, 染色呈深棕色为强表达, 不着色为不表达。IHC 结果分析显示, TRIM26 在小鼠细胞的细胞质与细胞核中均有表达 (图 3)。TRIM26 表达于食管鳞状上皮细胞及附属腺体 (图 3A)、胃上皮细胞 (图 3B)、小肠和结肠上皮细胞 (图 3C、3D)、胰岛细胞及外分泌腺 (图 3E)、脑神经元及胶质细胞 (图 3F)、细小支气管上皮细胞及肺泡上皮细胞 (图 3G)、肾小管上皮细胞和肾小球细胞 (图 3H) 以及子宫内膜腺上皮细胞 (图 3I)。

2.4 RT-qPCR 揭示 TRIM26 在小鼠主要组织器官中的表达水平

RT-qPCR 检测了 TRIM26 在小鼠组织中的表达量, 结果如图 4 所示。选择在小鼠组织中表达量最低的心脏为 1, 其它组织器官按其相对表达量作图。结果显示, TRIM26 在小鼠的脾、肺和胰腺组织上的表达量相对较高。



注:A:食管;B:胃;C:小肠;D:结肠;E:肝;F:胰腺;G:脑;H:气管;I:肺;J:脾;K:肾;L:卵巢;M:子宫内膜;N:甲状腺;O:乳腺;P:皮肤。

图1 TRIM26在人体主要组织器官中的表达

Note. A, Esophagus. B, Stomach. C, Small Intestine. D, Colon. E, Liver. F, Pancreas. G, Brain. H, Trachea. I, Lung. J, Spleen. K, Kidney. L, Ovary. M, Endometrium. N, Thyroid. O, Breast. P, Skin.

Figure 1 Expression of TRIM26 in human tissues and organs

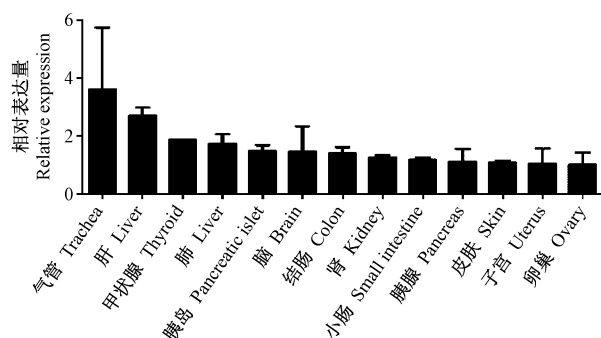


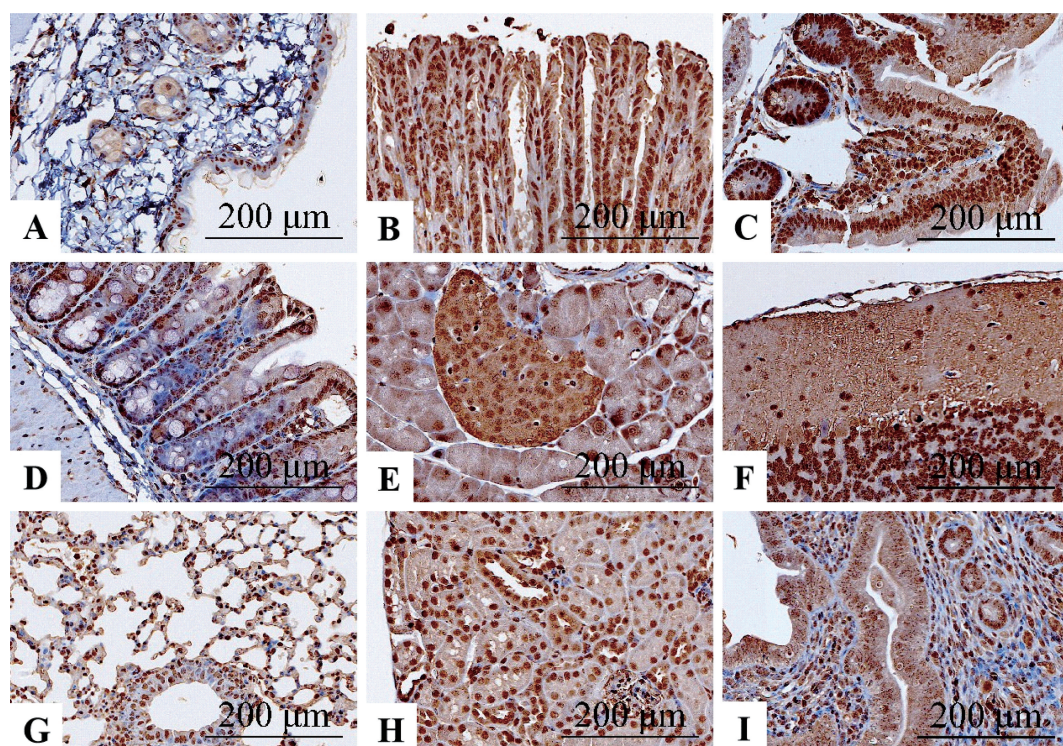
图2 TRIM26在人体主要组织器官中的相对表达量

Figure 2 The relative expression of TRIM26 in human tissues and organs

3 讨论

本研究通过 IHC 和 RT-qPCR 明确了 TRIM26 基因在人和小鼠主要组织器官中的表达定位及相对表达量。研究发现,TRIM26 在细胞核与细胞质中均有表达,且多表达于上皮细胞,其表达定位在人和小鼠的主要组织器官中具有高度的一致性,同时表达于食管鳞状上皮,胃、小肠和结肠的上皮细胞,胰岛细胞,脑神经元和胶质细胞和子宫内膜腺上皮细胞等。

根据文献报道,TRIM 蛋白参与调控肿瘤的发生发展^[5],这与蛋白在组织中的表达与定位密切相关。在结直肠癌中,Williams 等^[14]发现 TRIM26 通过泛素化调节 NTH1 实现人结直肠癌 HCT116 细胞对氧化应激敏感性的调控;本研究证实,TRIM26 在人和小鼠的结肠上皮细胞上有表达,可进一步通过基因修饰小鼠探究该基因在结直肠癌进程中的调控方式。Wang 等^[17]发现 TRIM26 在肝癌临床组织标本中的表达水平量明显下调,且该基因表达缺失与肝细胞癌的恶性程度密切相关;本研究中,TRIM26 表达于肝细胞胞质中,以上结果提示 TRIM26 可能发挥抑癌基因的功能,降低该基因在肝细胞上的表达水平,可接下来探讨其表达缺失与肝癌发生的相关性。另外,赵学英等^[18]和李振强等^[19]分别在胶质瘤细胞中过表达和沉默 TRIM26 表达,证实 TRIM26 正向调控了胶质瘤细胞的增殖,并与患者的预后呈负相关。本研究发现,TRIM26 在人和小鼠的脑胶质细胞中均有较强的表达,这提示 TRIM26 在胶质细胞中表达水平变化可能引起细胞功能的改变。由此可见,明确 TRIM26 的表达定位与表达水平在研究肿瘤的发生发展过程中具有重大意义。然而,目前

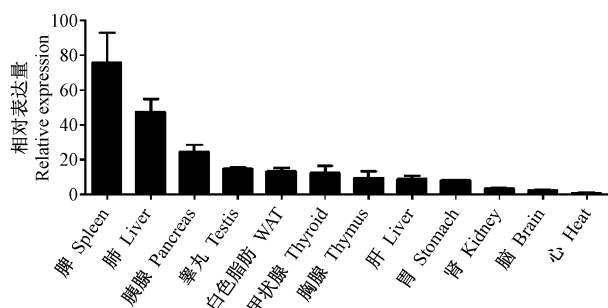


注: A: 食管; B: 胃; C: 小肠; D: 结肠; E: 胰腺; F: 脑; G: 肺; H: 肾; I: 子宫内膜。

图 3 TRIM26 在小鼠主要组织器官中的表达

Note. A, Esophagus. B, Stomach. C, Small Intestine. D, Colon. E, Pancreas. F, Brain. G, Lung. H, Kidney. I, Endometrium.

Figure 3 The expression of TRIM26 in different tissues and organs of mice



注: WAT: 白色脂肪组织。

图 4 TRIM26 在小鼠主要组织器官中的相对表达量

Note. WAT, White adipose tissue.

Figure 4 The relative expression of TRIM26 in different tissues and organs of mice

对于 TRIM26 在人和小鼠主要组织器官中的功能还知之甚少,还有待进一步深入研究。

此外,本研究发现 TRIM26 在胰岛细胞上的表达尤为明显, IHC 结果显示,该基因在胰岛细胞上的表达强度明显高于胰腺外分泌腺细胞,在小鼠胰腺上亦得到了类似的结果。可见, TRIM26 在胰岛细

胞上可能发挥重要而特殊的功能。根据此结果,本课题组已委托南京大学-南京生物医药研究院构建了 TRIM26 条件性基因敲除小鼠,拟再与 Pdx-Cre 小鼠交配,获得胰岛 β 细胞特异性敲除 TRIM26 的 C57BL/6 小鼠,进而探究该基因在胰岛细胞上的功能。

本实验在对成人组织与成年小鼠的研究中发现, TRIM26 表达具有一定的组织器官特异性,提示其功能的复杂性和组织器官依赖的特征。为深入探究 TRIM26 在生长发育过程中承担的生物学功能,本课题组将利用小鼠进一步明确 TRIM26 在胚胎发育至老龄化过程中的不同时期、不同组织器官中 RNA 表达水平及蛋白表达量的变化,完善该基因在不同时间与空间的表达谱和功能谱,不仅为后续探索 TRIM26 基因在组织发育中的分子调控机制奠定基础,同时对于利用基因修饰小鼠阐明该基因在研究肿瘤的发生发展过程中的作用也是十分重要的。

参考文献:

- [1] Ikeda K, Inoue S. TRIM proteins as RING finger E3 ubiquitin ligases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 770: 27-37.
- [2] 仇艳光, 王江雁, 王沛. TRIM 蛋白家族结构与抗病毒功能 [J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(1): 107-110.
- [3] Beck TW, Menninger J, Murphy WJ, et al. The feline major histocompatibility complex is rearranged by an inversion with a breakpoint in the distal class I region [J]. *Immunogenetics*, 2005, 56(10): 702-709.
- [4] Kawai T, Akira S. Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins [J]. *EMBO Mol Med*, 2011, 3(9): 513-527.
- [5] 陈艳清, 曹树辉, 李传友. 三结构域蛋白 (TRIM) 家族结构及功能的研究进展 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2017, 37(6): 479-484.
- [6] D'cruz AA, Babon JJ, Norton RS, et al. Structure and function of the SPRY/B30.2 domain proteins involved in innate immunity [J]. *Protein Sci*, 2013, 22(1): 1-10.
- [7] Perfetto L, Gherardini PF, Davey NE, et al. Exploring the diversity of SPRY/B30.2-mediated interactions [J]. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38(1): 38-46.
- [8] Zhao W, Li Q, Ayers S, et al. Jmjd3 inhibits reprogramming by upregulating expression of INK4a/Arf and targeting PHF20 for ubiquitination [J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1037-1050.
- [9] Raposo RA, Abdel-mohsen M, Bilska M, et al. Effects of cellular activation on anti-HIV - 1 restriction factor expression profile in primary cells [J]. *J Virol*, 2013, 87(21): 11924-11929.
- [10] De Jong S, Van Eijk KR, Zeegers DW, et al. Expression QTL analysis of top loci from GWAS meta-analysis highlights additional schizophrenia candidate genes [J]. *Eur J Hum Genet*, 2012, 20(9): 1004-1008.
- [11] Wang P, Zhao W, Zhao K, et al. TRIM26 negatively regulates interferon - β production and antiviral response through polyubiquitination and degradation of nuclear IRF3 [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(3): e1004726.
- [12] Ran Y, Zhang J, Liu LL, et al. Autoubiquitination of TRIM26 links TBK1 to NEMO in RLR-mediated innate antiviral immune response [J]. *J Mol Cell Biol*, 2016, 8(1): 31-43.
- [13] Edmonds MJ, Carter RJ, Nickson CM, et al. Ubiquitylation-dependent regulation of NEIL1 by Mule and TRIM26 is required for the cellular DNA damage response [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(2): 726-738.
- [14] Williams SC, Parsons JL. NTH1 is a new target for ubiquitylation-dependent regulation by TRIM26 required for the cellular response to oxidative stress [J]. *Mol Cell Biol*, 2018, 38(12): e00616-e00617.
- [15] Xiong S, Wang Q, Zheng L, et al. Identification of candidate molecular markers of nasopharyngeal carcinoma by tissue microarray and in situ hybridization [J]. *Med Oncol*, 2011, 1: S341-S348.
- [16] Lyu XM, Zhu XW, Zhao M, et al. A regulatory mutant on TRIM26 conferring the risk of nasopharyngeal carcinoma by inducing low immune response [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(8): 3848-3861.
- [17] Wang Y, He D, Yang L, et al. TRIM26 functions as a novel tumor suppressor of hepatocellular carcinoma and its downregulation contributes to worse prognosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(3): 458-465.
- [18] 赵学英, 樊明德, 董文艳, 等. 三结构域蛋白 26 在胶质瘤组织中的表达及临床意义 [J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2019, 57(3): 63-68.
- [19] 李振强, 刘健, 出良钊. 干扰 TRIM26 表达对胶质瘤细胞增殖的影响 [J]. *郑州大学学报 (医学版)*, 2019, 54(6): 802-806.

[收稿日期] 2020-02-05