

张丽,马元武,张旭,等. *Trim44* 敲除导致老年大鼠神经元凋亡和学习记忆能力下降 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(3): 1-8.
Zhang L, Ma YW, Zhang X, et al. *Trim44* knockout promotes neuronal apoptosis and decreases learning and memory abilities in aged rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3): 1-8.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.03.001

Trim44 敲除导致老年大鼠神经元凋亡和学习记忆能力下降

张丽^{2,3}, 马元武^{2,3}, 张旭², 丁登峰¹, 陈炜², 盛瀚萱¹, 高祥²,
董伟², 张连峰^{1,3*}

(1.北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021;2.北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100021;3.国家人类疾病动物模型资源库,北京 100021)

【摘要】目的 本文利用 *Trim44* 条件敲除大鼠,分析 *Trim44* 基因敲除后大鼠行为学异常和脑组织的病理改变,探究 *Trim44* 基因在神经系统中的作用机制。方法 采用蛋白印迹法,免疫组化法检测 TRIM44 在脑组织的表达,利用 TUNEL 染色观察 *Trim44* 敲除大鼠神经元的凋亡,Y 迷宫、水迷宫和食物迷宫等行为学测试观察敲除大鼠的行为学改变,蛋白印迹法检测凋亡相关蛋白的表达异常。结果 TRIM44 在脑皮质中表达,敲除大鼠大脑组织中 *Trim44* 敲除效率可达 67%;*Trim44* 敲除导致老年大鼠学习记忆能力下降,神经元凋亡,活性形式的 caspase 3、caspase 9 蛋白表达增加。结论 *Trim44* 敲除促进神经元凋亡,损害大鼠学习记忆能力。提示了 *Trim44* 在神经系统的重要作用,敲除模型也可以用于深入的机制探索。

【关键词】神经元;*Trim44*;敲除;凋亡;大鼠

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2023) 03-0001-08

Trim44 knockout promotes neuronal apoptosis and decreases learning and memory abilities in aged rats

ZHANG Li^{2,3}, MA Yuanwu^{2,3}, ZHANG Xu², DING Dengfeng¹, CHEN Wei², SHENG Hanxuan¹, GAO Xiang²,
DONG Wei², ZHANG Lianfeng^{1,3*}

(1. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of China (NHC), Comparative Medicine Center, Peking Union College (PUMC) & Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), Beijing 100021, China. 2. Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Diseases, Comparative Medicine Center, Peking Union College (PUMC) & Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), Beijing 100021. 3. National Human Disease Animal Model Resource Center, Beijing 100021)

【Abstract】Objective To explore the effect of the *Trim44* gene in the nervous system, *Trim44* conditional knockout rats were used to analyze behavioral abnormalities and pathological changes in the brain. Methods TRIM44 expression in brain tissue was detected by Western blot and immunohistochemistry. Neuronal apoptosis was determined by TUNEL staining. Behavioral changes of knockout rats were assessed by Morris Y, Morris water, and food maze tests. Abnormal expression of apoptosis-related proteins was detected by Western blot. Results TRIM44 was highly expressed in

[基金项目] 医科院创新工程 (2021-I2M-1-034); 国家自然科学基金面上项目 (31900380, 31970508)。
[作者简介] 张丽 (1981—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 比较医学。E-mail: zhangl@cnilas.org
[通信作者] 张连峰 (1963—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 比较医学。E-mail: zhanglf@cnilas.org

brain tissues of adult rats. The knockout efficiency of *Trim44* in brain tissues was 67%. *Trim44* knockout decreased learning and memory abilities, increased neuronal apoptosis, and expression of active caspase 3 and 9 proteins in aged rats.

Conclusions *Trim44* knockout promotes neuronal apoptosis and impairs learning and memory abilities in rats. These result suggest that TRIM44 plays an important role in the nervous system, and the *Trim44* knockout rat model can be used for further mechanism exploration.

[Keywords] neuron; *Trim44*; knockout; apoptosis; rat

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

神经退行性疾病 (neurodegenerative disease) 是一组涉及大脑和脊髓的神经元退行性变性、丢失的疾病总称。主要包括阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 和肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 等。其中 AD 是导致老年人学习记忆衰退甚至完全丢失的一种痴呆症, 危害极大。2021 中国 AD 报告, 我国 AD 患者已近千万, 而且该数字仍在逐年攀升^[1]。然而, AD 因发病机制复杂, 至今尚未完全了解, 更是缺乏有效的治疗手段。除了聚焦 *APP*、*Tau* 等致病基因突变导致神经元丢失和记忆障碍的研究外, 近些年基于全基因组关联研究 (genome-wide association studies, GWAS) 揭示的 AD 风险基因^[2-3]以及在大脑中高表达的其他基因已成为 AD 研究的热点, 旨在为 AD 防治寻找新的靶点。

三结构域 (tripartite motif, TRIM) 蛋白质家族成员几乎存在于所有多细胞真核生物中, 它们在细胞周期、细胞凋亡、分化、代谢以及病毒的免疫应答等过程中均有重要作用。*Trim44* (tripartite motif containing 44, *Trim44*) 是一个蛋白质编码基因, 编码的蛋白属于 TRIM 家族蛋白, 在大脑组织中高表达^[4]。TRIM44 在结构上与 TRIM33 最为相似。TRIM44 不直接泛素化某个蛋白底物, 而是和 TRIM17 蛋白互作, 调节其蛋白活性, 稳定促进 TRIM17 的泛素化作用^[5]。TRIM44 是 PAX6 表达的负向调节因子, 与无虹膜综合征相关^[6]。*Trim44* 的研究报道多集中在肿瘤领域, *Trim44* 的过表达促进肾细胞癌^[7]、多发性骨髓瘤^[8]、黑色素瘤^[9]、胶质母细胞瘤^[10]、肝内胆管癌^[11]、食管癌^[12]、睾丸生殖细胞肿瘤^[13]、肝细胞癌^[14]、非小细胞肺癌^[15]和肺癌^[16]等肿瘤细胞的增殖、迁移、存活和发展, 反之, *Trim44* 敲低表达则抑制胶质细胞瘤^[17]、前列腺癌^[18]和甲状腺乳头状癌^[19]等肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。TRIM44 可作为宫颈癌^[20]和睾丸生殖细胞肿瘤^[13]的诊断和预后的重要生物标记物, 高表达程度反映出子宫内膜癌患者^[21]、乳腺癌患者^[22]的

预后差或者预后不良, 与皮肤鳞状细胞癌患者术后预后关联^[23], 过表达与食管鳞状细胞癌^[24]或者胃癌^[25]的侵袭性潜能和恶性结局相关。此外, TRIM44 对于病毒的应答也有重要意义^[26-27]。

Genecards 提示根据蛋白结构的相似性, TRIM44 可能参与神经元的分化和成熟。AlzData 数据库显示, TRIM44 蛋白在 AD 患者海马和皮质中表达下调。尽管 TRIM44 主要在脑组织表达, 但是其在神经系统的作用尚不清楚。迄今, 国内外尚无 *Trim44* 脑敲除大小鼠的研究报道, 本实验室首次建立 *Trim44* 神经元特异敲除大鼠, 探究 TRIM44 在神经系统的功能和作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

Trim44-loxp 大鼠和 *Neun-cre* 大鼠均由中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物资源研究中心创制生产供应 [SCXK (京) 2019-0011], 繁育所用动物均为 8 周龄 SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各 10 只, 体重 180~400 g, 饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所屏障环境动物房 [SYXK (京) 2019-0014], 饲养间温度 20~25℃, 12 h/12 h 明暗交替, 动物自由饮水和采食。*Trim44-loxp* 大鼠和 *Neun-cre* 大鼠二者经过两轮杂交得到 *Trim44* 脑组织特异敲除大鼠。PCR 鉴定子代基因型。引物序列: R-TRIM44-S1: 5'-ACTTTTCCTCTGCCCCACTAG ATC-3'; R-TRIM44-A3: 5'-CCACTTTACCCACGCCGTC-3'; R-neun-upF1: 5'-CCTCTCAGATGTTGGAACCTCTC T-3'; R-neun-dwR1: 5'-AGTGCTGTTTCTGCTTTTCG-3'; CRE-new-R: 5'-GTGCCCTTCTCTACACCTGCG-3'; CRE-new-F: 5'-AACATGCTTCATCGTCGGTC-3'。*Trim44-loxp* 杂合子作为对照和鉴定获得敲除大鼠一起用于后续行为学和病理学检测等等。实验中涉及动物的操作程序得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会批准 (MYW22001), 实验设计及饲养使用过程遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

TRIM44 一抗购自 proteintech 公司; caspase 相关抗体来自美国 CST 公司; GAPDH 内参抗体购自康成生物; 兔二步免疫组化试剂盒和 DAB 染色液购自于北京中杉金桥; Tunnel 细胞凋亡检测试剂盒购自德国 merck 公司; DNA 提取试剂盒购自北京全式金; 组织固定液来自北京益利精细。大鼠 Y 迷宫、旷场和水迷宫购自安徽正华; VisuTrack 软件购自上海欣软; 3D Histech 数字切片扫描仪购自匈牙利。

1.3 实验方法

1.3.1 蛋白提取和免疫印迹

利用 RIPA 强裂解液匀浆法提取大鼠脑组织总蛋白, BCA 法测定浓度, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 300 mA 转膜 1 h, 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入 Trim44 兔源多克隆抗体 (1 : 1000, 11511-1-AP, proteintech), 4℃ 孵育过夜, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。然后加入 1 : 15000 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG, 室温杂交 1 h。采用 HRP-GAPDH 作为内参, 膜上加入化学发光剂, 曝光显影。

1.3.2 免疫组化与 TUNEL 染色

麻醉法牺牲大鼠, 取出脑组织, 福尔马林固定, 脱水后石蜡包埋切片。脱蜡至水, PBS 洗 3 遍, 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, 高压修复 5 min。正常山羊血清工作液, 室温封闭 60 min。兔抗 Trim44 兔源多克隆抗体 (1 : 200, 11511-1-AP, proteintech), 4℃ 过夜。山羊抗兔 IgG-HRP 多聚体, 37℃ 孵育 30 min。DAB 显色, 苏木精复染, 光镜下观察。

脑组织石蜡切片采用 Tunnel 细胞凋亡检测试剂盒的方法进行染色, 每个脑 10 张图片 ($n = 3 \sim 4$) 统计阳性细胞百分比。

1.3.3 Y 迷宫与新异臂

大鼠 Y 迷宫分为 A、B、C 三个长臂和一个等边三角形的中心区, 臂长 50 cm, 边长 15 cm。将大鼠放入 A 起始区, 时间为 5 min, 记录大鼠探索轨迹。期间大鼠倾向于交替探索不同臂, 如 ABC、ACB、BAC、BCA、CAB、CBA 等作为正确转换次数 (Alternation), BCB、ACA、CAC 等则不计入, 进臂总数为 n , 转换率计算公式为: $\text{Alternation}/(n-2) \times 100$ 。

1 周后进行新异臂探索实验, 分为训练期和测试期。A 臂仍为起始臂, C 臂设为新异臂 (Novel), B 为其他臂 (Other)。训练期将新异臂用隔板挡住, 将大鼠放入起始臂, 在起始臂和其他臂中自由活动 3 min, 训练结束后归笼。15 min 后进行测试期实验。测试期将新异臂挡板抽离, 将大鼠放置起始

臂, 在三个臂中自由活动 3 min, 记录每只大鼠在各个臂停留时间和次数。

1.3.4 Morris 水迷宫

利用 Morris 水迷宫进行大鼠行为分析, 方法参考以往大、小鼠的研究方案^[28-29], 并作适当修改, 采用 VisuTrack 进行视频追踪和数据分析)。水迷宫宫体直径 150 cm, 高 60 cm, 平台直径 10 cm, 高 30 cm。水迷宫实验过程分为连续 5 d 的隐藏平台获得实验和第 6 天的空间探索实验两部分。每天训练 2 次, 每次游泳时间为 60 s。水迷宫平均分为 1、2、3、4 四个象限, 每次使大鼠在不同象限入水, 平台区位于第 4 象限。水温 23~25℃。隐藏平台实验考察大鼠学习能力, 大鼠从入水到找到平台的时间为潜伏期, 没有找到平台的按 60 s 计算; 最后 1 d 撤去平台, 空间探索实验测试大鼠空间记忆, 统计跨台次数和平台区运动距离百分比。

1.3.5 食物迷宫

本课题组设计了一种适用于大鼠的食物迷宫, 宫体包含 1 号和 2 号两个封闭区域及相邻的两个开放通道, 3 号玩具通道一侧对应的是终点食物区。实验前大鼠禁食不禁水 12 h, 学习训练期, 3~4 只大鼠同时进入迷宫, 自由活动 30 min; 测试期, 48 h 后进行记忆测试, 将 1 只大鼠放入起点区域, 自主探索 2 min, 一旦到达食物终点, 实验提前结束。从起点到达食物终点的时间定义为潜伏期。如果未能成功找到食物, 则潜伏期为 120 s。

1.4 统计学方法

所有实验重复 3 次, 用 Image J 软件计算 Western blot 条带灰度值和凋亡神经元个数, 用 GraphPad Prism 7.0 软件进行柱形图绘制和统计学分析, 两组间比较采用 t -test 分析, 多组比较采用 two-way ANOVA 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

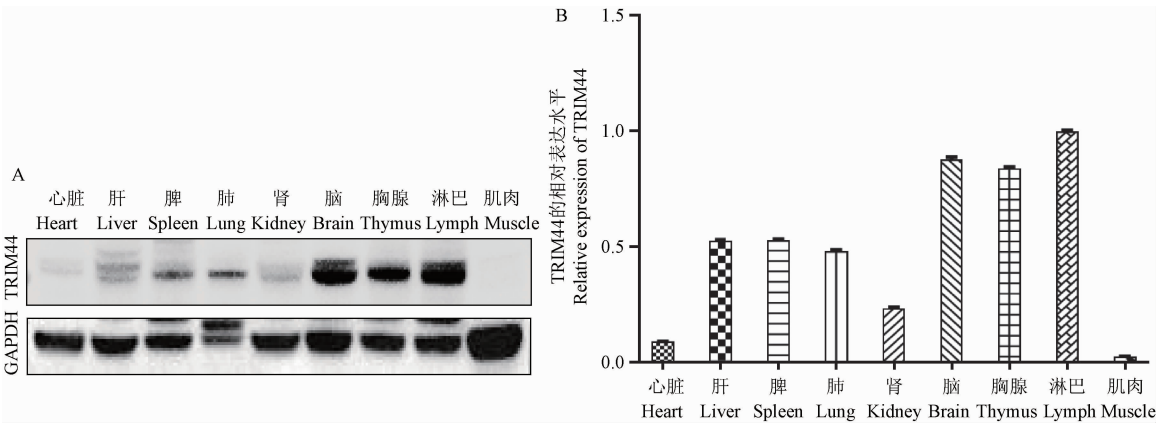
2 结果

2.1 TRIM44 在野生大鼠脑组织中高表达

提取 2 月龄野生型大鼠心脏、肝、脾、肺、肾、脑、胸腺、淋巴结和肌肉组织总蛋白, Western blot 比较 TRIM44 蛋白在各个脏器或者组织中的表达。如图 1 结果显示, TRIM44 在脑、胸腺和淋巴结中表达最高, 在脾和肺中表达较高, 在肝和肾中表达较低, 而心脏和肌肉中表达最低。

2.2 Trim44 脑组织特异敲除大鼠的建立和鉴定

如图 2 结果显示, 分别提取 2 月龄野生型和敲

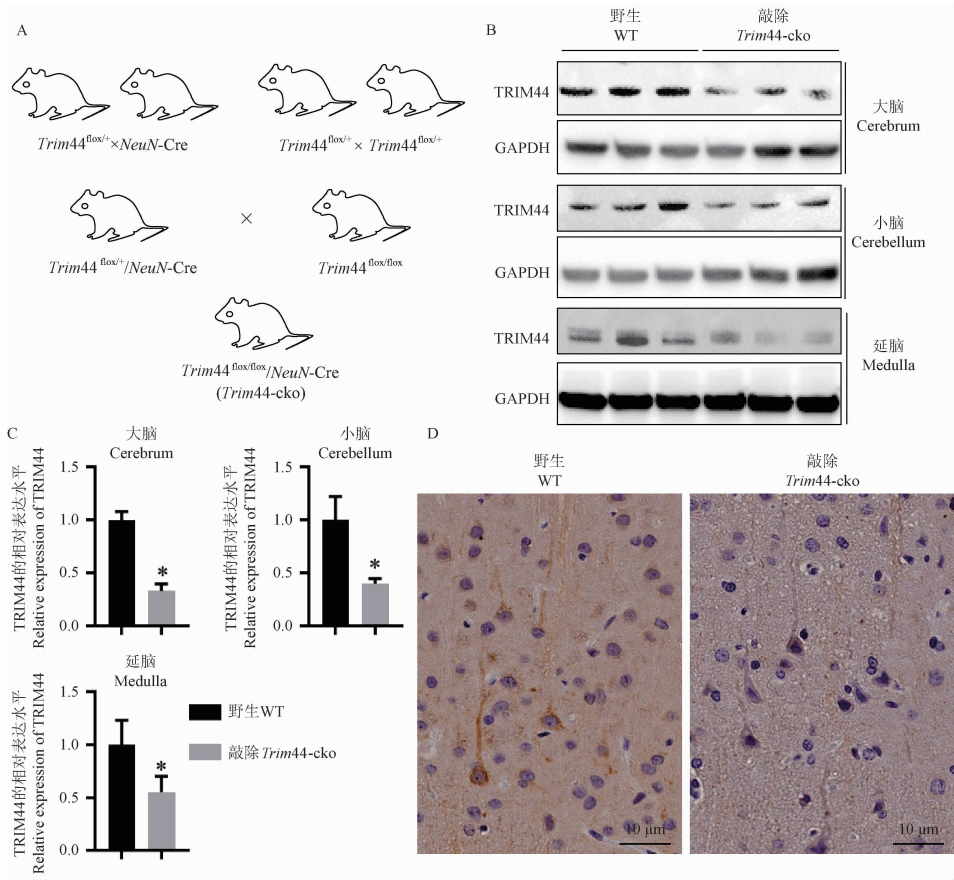


注:A:Western blot 检测大鼠心脏、肝、脾、肺、肾、脑、胸腺、淋巴和肌肉组织中 TRIM44 的表达;B:TRIM44 蛋白表达的相对量比较。

图 1 TRIM44 组织表达谱

Note. A, Western blot was used to detect the expression of TRIM44 in heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, thymus, lymph and muscle. B, Relative quantitative analysis of TRIM44 protein expression.

Figure 1 Tissue expression profile of TRIM44



注:A:Trim44 脑特异敲除大鼠的繁育策略;B:Western blot 鉴定 TRIM44 在敲除大鼠脑组织中的表达;C:TRIM44 表达定量分析,GAPDH 作为内参校正;D:IHC 分析 TRIM44 在脑皮层的表达。与野生组相比, * $P<0.05$ 。

图 2 TRIM44 蛋白在敲除大鼠脑组织的表达鉴定

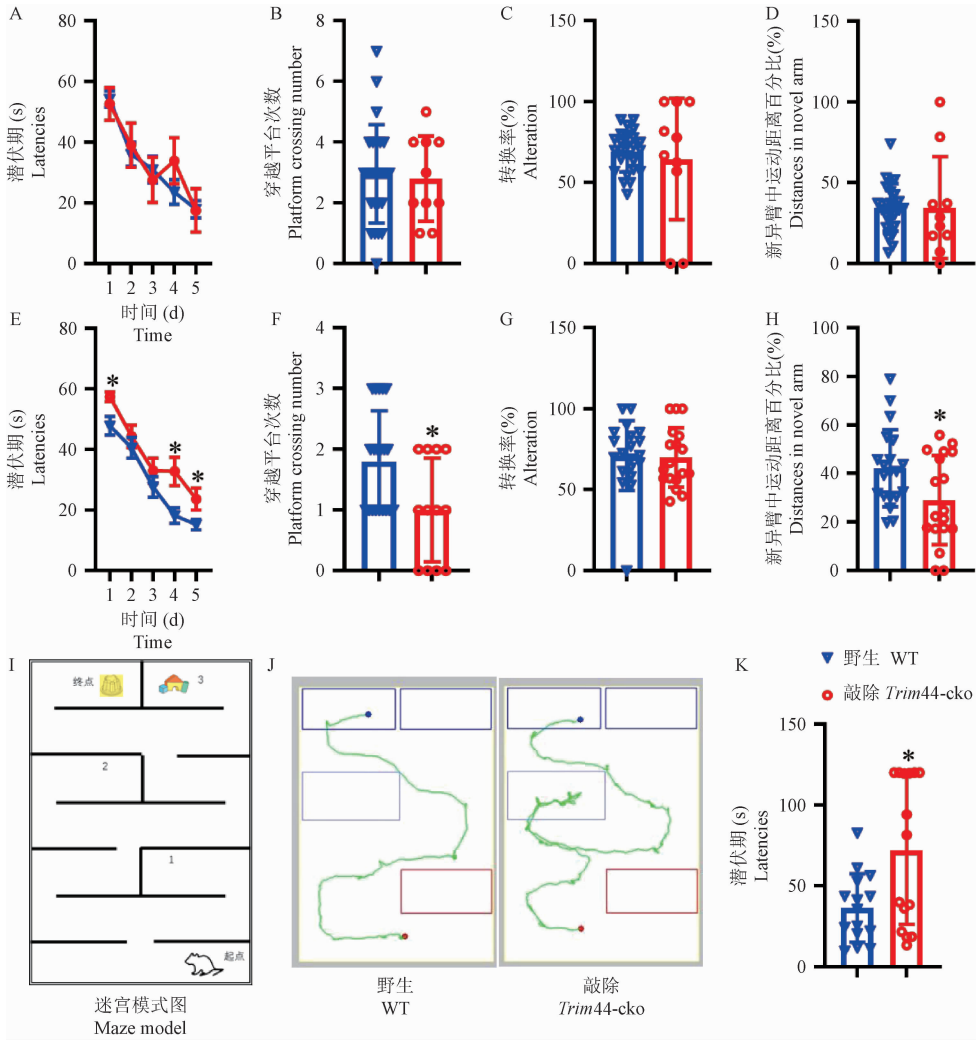
Note. A, Designing strategy of Trim44 brain-specific knockout rats. B, Expression of TRIM44 in the brain tissue of knockout rats was identified by Western blot. C, Quantitative analysis of TRIM44 expression normalized by GAPDH. D, Immunohistochemistry stain of TRIM44 in cerebral cortex. Compared with WT group, * $P<0.05$.

Figure 2 The expression and identification of TRIM44 protein in brain tissue of knockout rats

除大鼠大脑、小脑和延脑组织总蛋白, Western blot 鉴定 TRIM44 蛋白在脑组织中的敲除表达。TRIM44 在大脑、小脑和延脑的敲除效率分别为 66.8%、59.9% 和 46.6%。免疫组化结果提示 TRIM44 敲除大鼠大脑皮层中表达减少。

2.3 Trim44 敲除导致学习记忆能力下降

敲除大鼠和同窝对照大鼠分别在 7 月龄、12 月龄进行水迷宫和 Y 迷宫测试。如图 3 结果显示, 7 月龄时, 在 5 d 的游泳学习中, 敲除大鼠的潜伏期和野生型相比, 差异不显著。在第 6 天的空间探索实



注: A、E: 7 月龄和 12 月龄 *Trim44* 脑特异敲除大鼠与野生大鼠在隐藏平台获得训练中的逃避潜伏期; B、F: 7 月龄和 12 月龄 *Trim44* 脑特异敲除大鼠第 6 天空间探索; C、G: 7 月龄和 12 月龄 *Trim44* 脑特异敲除大鼠 Y 迷宫中自发交替率; D、H: 7 月龄和 12 月龄 *Trim44* 脑特异敲除大鼠 Y 迷宫新异臂中运动距离百分比。I~K: 12 月龄 *Trim44* 脑特异敲除大鼠食物迷宫中潜伏期升高。7 月龄所有行为实验中, WT 大鼠 ($n=25$), *Trim44-cko* 大鼠 ($n=10$); 12 月龄水迷宫中, WT 大鼠 ($n=20$), *Trim44-cko* 大鼠 ($n=12$); 12 月龄 Y 迷宫及新异臂, WT 大鼠 ($n=20$), *Trim44-cko* 大鼠 ($n=18$); 食物迷宫 ($n=15$)。与野生组相比, $*P<0.05$ 。

图 3 Trim44 基因敲除大鼠学习记忆能力测试

Note. A/E, Escape latencies of *Trim44-cko* rats and WT rats aged 7 months and 12 months in hidden platform acquisition training. B/F, Comparison of platform frequency between *Trim44-cko* rats and WT rats aged 7 months and 12 months. C/G, Spontaneous alternation rate in Y maze of 7-month-old and 12-month-old *Trim44-cko* rats and WT rats. D/H, Comparison of percentage of movement distances in the novel arm of Y maze between *Trim44-cko* rats and WT rats aged 7 months and 12 months. I~K, The latencies of 12-month-old *Trim44-cko* rats in the food maze increased. In all behavioral experiments at the age of 7 months, WT rats ($n=25$), *Trim44-cko* rats ($n=10$). In the water maze at the age of 12 months, WT rats ($n=20$); *Trim44-cko* rats ($n=12$). For Y maze and novel arm test at the age of 12 months, WT rats ($n=20$). *Trim44-cko* rats ($n=18$). For food maze test ($n=15$). Compared with WT group, $*P<0.05$.

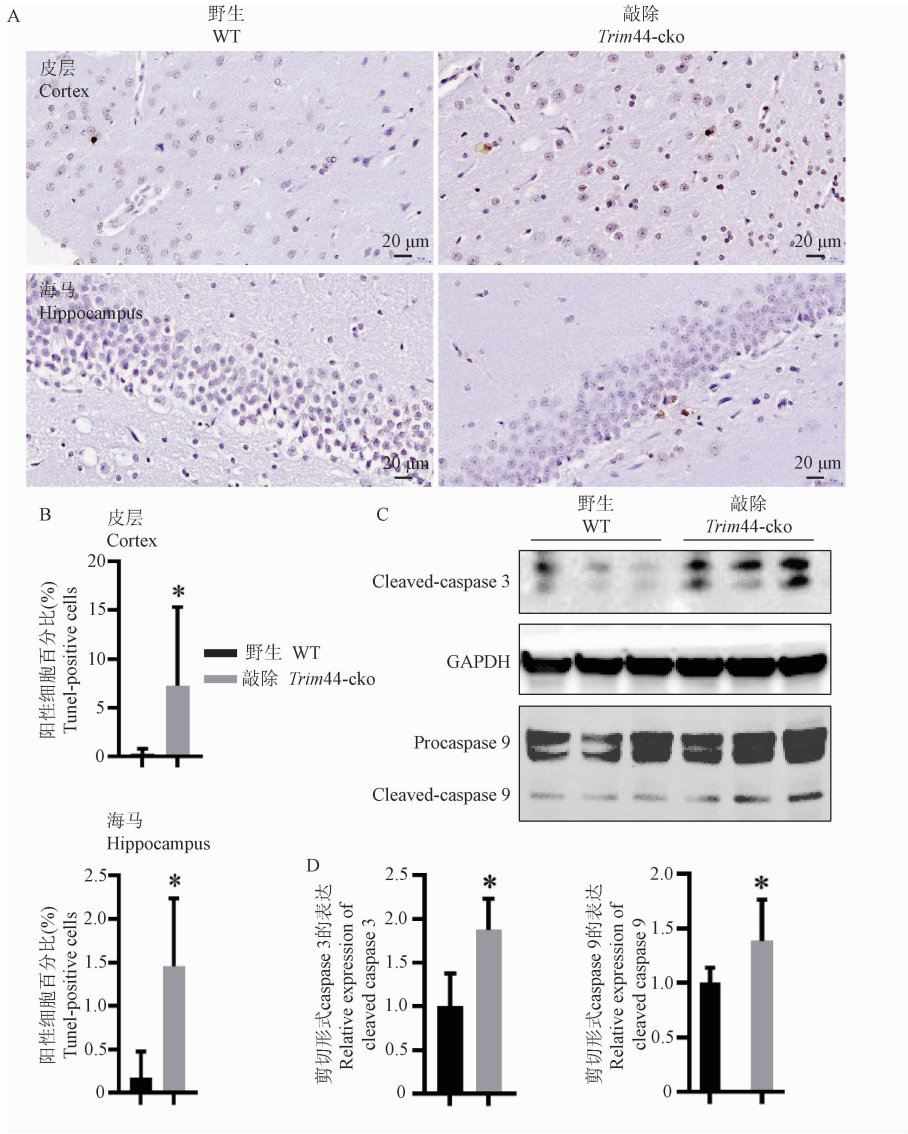
Figure 3 Learning and memory ability test of *Trim44-cko* rats

验中,敲除大鼠跨台次数减少,但不具统计学意义。Y 迷宫中,7 月龄敲除大鼠和野生对照相比,自发交替率和新异臂中运动距离百分比均没有显著差异。12 月龄时,在 5 d 的游泳学习训练中,第 1 天、第 4 天和第 5 天敲除大鼠的潜伏期和野生型相比,显著增加;空间探索实验中,敲除大鼠跨台次数显著减少。Y 迷宫中,12 月龄敲除大鼠和野生对照相比,自发交替率差异不显著,但在新异臂中运动距

离百分比显著下降。同时,12 月龄敲除大鼠和同窝对照大鼠进行了 48 h 食物迷宫测试,结果显示,敲除大鼠找到食物的潜伏期显著增加,与水迷宫结果一致,提示 12 月龄敲除大鼠学习记忆能力下降。

2.4 Trim44 敲除导致神经元凋亡

12 月龄敲除大鼠和同窝对照大鼠在行为学结束后,取脑固定,石蜡切片后行 TUNEL 染色。如图 4 结果表明,敲除大鼠脑皮层及海马区神经元发生



注:A:12 月龄野生和敲除大鼠脑切片 TUNEL 染色 ($n=7$);B:TUNEL 阳性细胞定量分析;C:Western blot 鉴定 cleaved-caspase 3 和 cleaved-caspase 9 在敲除大鼠脑组织中的表达 ($n=3$);D:cleaved-caspase 3 和 cleaved-caspase 9 蛋白表达定量分析,GAPDH 和 procaspase 9 作为内参校正。与野生组相比, $*P<0.05$ 。

图 4 *Trim44* 基因敲除大鼠大脑切片 TUNEL 染色和 caspase 蛋白表达检测
Note. A, TUNEL staining of brain sections of 12-month-old wild and knockout rats ($n=7$). B, Quantitative analysis of TUNEL positive cells. C, Expression of cleaved-caspase 3 and cleaved-caspase 9 in the brain tissues of knockout rats was identified by Western blot ($n=3$). D, Quantitative analysis of cleaved-caspase 3 and cleaved-caspase 9 protein expression normalized by GAPDH and procaspase 9. Compared with WT group, $*P<0.05$.

Figure 4 TUNEL staining and caspase protein expression in the brain of *Trim44* knockout rats

零星小面积凋亡,并随月龄有所增加。提取 12 月龄野生型和敲除大鼠大脑组织总蛋白,Western blot 检测 caspase 蛋白在脑组织中的表达,与对照大鼠比,敲除大鼠脑组织中活性形式的 caspase 3、caspase 9 蛋白表达分别增加 87.3% 和 38.5%,且具有统计学意义。因此,Trim44 敲除导致神经元凋亡且 caspase 相关蛋白表达增加。

3 讨论

神经元特异性核蛋白(neuron-specific nuclear protein, NeuN)是成熟神经元的特异性标记物,其在大部分神经细胞种类中表达。NeuN-cre 工具鼠是将 Cre 定点敲入大鼠内源基因 NeuN 启动子下游。NeuN-cre 工具鼠,用来与 flox 大鼠杂交实现脑组织特异性敲除。本研究利用 Trim44(tm-LOXP)大鼠与 NeuN(tm-Cre)大鼠经多轮杂交得到 Trim44 脑组织特异敲除大鼠,免疫印迹检测 TRIM44 在敲除脑组织的蛋白表达情况,敲除效率可达 55%~66%,相对于其他品系,敲除效率较低,原因可能是机体自身对该基因的表达调控作用。

肿瘤研究中发现 TRIM44 具有抗凋亡作用, SiRNA 敲低 TRIM44 表达诱导睾丸生殖细胞肿瘤^[13]、肝内胆管癌(ICC)^[11]、卵巢癌(OC)细胞^[30]和神经胶质瘤细胞^[10]的凋亡。神经元凋亡是神经退行性疾病的病理特征之一。12 月龄时,敲除大鼠相对于对照发生了较为显著的神经元凋亡,且 7 月龄大鼠学习记忆损害不明显,而 12 月龄大鼠学习记忆能力下降较为显著,可能归因于神经元凋亡随时间的积累造成老年大鼠的脑损伤。

本研究中采用一种新设计的检测大鼠空间学习记忆能力的装置,再次验证了水迷宫中敲除大鼠学习记忆能力下降的实验结果。本研究尽管只检测了第一次学习结束 48 h 后大鼠的记忆。此后研究也可以采用训练结束后数分钟或者 24 h/72 h 的测试进行大鼠短时、长时记忆评价。潜伏期和错误次数结合也可以更好地用于鉴别大鼠的学习记忆能力差异。

尽管 Trim44 基因(又名 mc7)的 cDNA 最早分离自小鼠脑神经母细胞和成熟神经元^[4],但是目前国内尚无 TRIM44 在脑表达及其对于神经系统作用机制的报道,本研究首次揭示 TRIM44 蛋白在脑组织高水平表达,脑皮层中也呈免疫阳性着色。本实验室首次建立 Trim44 神经元特异敲除大鼠,探究 TRIM44 对神经元的调节机制。结果初步显示

TRIM44 缺失一定程度上导致神经元凋亡,并逐步损害大鼠的学习记忆能力。本研究加深了对 Trim44 基因功能的理解,鉴于阿尔茨海默数据库(<http://www.alzdata.org/>)显示 AD 患者颞叶皮层中 TRIM44 表达减少($P=0.022$,数据未显示),本研究对于神经退行性疾病的防治也有重要意义。

TRIM44 除了与增殖、凋亡相关,还与泛素化相关。最新报道 TRIM44 是连接泛素蛋白酶体系统(UPS)与溶酶体自噬降解途径的中心^[31]。抑制 UPS 降解途径导致 TRIM44 上调,通过 K48 泛素链与蛋白质的结合进一步促进聚集蛋白质清除。TRIM44 表达通过促进 SQSTM1/p62 寡聚化激活自噬,从而迅速提高聚集蛋白质的去除率。异常的蛋白质聚集和蛋白降解失衡是神经退行性疾病(包括阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病和相关疾病)常见的中心病理特征^[32-33]。过度表达的 TRIM44 诱导自噬,表明其在蛋白质聚集神经病理学中的潜在用途。未来研究可通过建立 TRIM44 过表达大鼠,并与 AD 模型大鼠杂交,研究 TRIM44 过表达是否能够提高脑内免疫细胞对于 A-beta 寡聚体以及异常 Tau 蛋白的清除能力。

然而,TRIM44 在神经系统的主要泛素化靶点是什么? TRIM44 又是如何调控神经元凋亡,未来仍需要更多的实验以探究其深入的作用机制。一旦揭示对于 AD 发病过程中神经元凋亡机制的研究以及 AD 防治也将具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 任汝静,殷鹏,王志会,等. 中国阿尔茨海默病报告 2021 [J]. 诊断学理论与实践, 2021, 20(4): 317-337.
- [2] Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis [J]. Biol Psychiatry, 2015, 77(1): 43-51.
- [3] Deming Y, Li Z, Kapoor M, et al. Genome-wide association study identifies four novel loci associated with Alzheimer's endophenotypes and disease modifiers [J]. Acta Neuropathol, 2017, 133(5): 839-856.
- [4] Boutou E, Matsas R, Mamalaki A. Isolation of a mouse brain cDNA expressed in developing neuroblasts and mature neurons [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 86(1-2): 153-167.
- [5] Urano T, Usui T, Takeda S, et al. TRIM44 interacts with and stabilizes terf, a TRIM ubiquitin E3 ligase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 383(2): 263-268.
- [6] Zhang X, Qin G, Chen G, et al. Variants in TRIM44 cause aniridia by impairing PAX6 expression [J]. Hum Mutat, 2015, 36(12): 1164-1167.
- [7] Yamada Y, Kimura N, Takayama KI, et al. TRIM44 promotes

- cell proliferation and migration by inhibiting FRK in renal cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(3): 881–890.
- [8] Chen Z, Lin TC, Bi X, et al. TRIM44 promotes quiescent multiple myeloma cell occupancy and survival in the osteoblastic niche via HIF-1 α stabilization [J]. *Leukemia*, 2019, 33(2): 469–486.
- [9] Wei CY, Wang L, Zhu MX, et al. TRIM44 activates the AKT/mTOR signal pathway to induce melanoma progression by stabilizing TLR4 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 137.
- [10] Zhou X, Yang Y, Ma P, et al. TRIM44 is indispensable for glioma cell proliferation and cell cycle progression through AKT/p21/p27 signaling pathway [J]. *J Neurooncol*, 2019, 145(2): 211–222.
- [11] Peng R, Zhang PF, Zhang C, et al. Elevated TRIM44 promotes intrahepatic cholangiocarcinoma progression by inducing cell EMT via MAPK signaling [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(3): 796–808.
- [12] Xiong D, Jin C, Ye X, et al. TRIM44 promotes human esophageal cancer progression via the AKT/mTOR pathway [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(10): 3080–3092.
- [13] Yamada Y, Takayama KI, Fujimura T, et al. A novel prognostic factor TRIM44 promotes cell proliferation and migration, and inhibits apoptosis in testicular germ cell tumor [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(1): 32–41.
- [14] Zhu X, Wu Y, Miao X, et al. High expression of TRIM44 is associated with enhanced cell proliferation, migration, invasion, and resistance to doxorubicin in hepatocellular carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(11): 14615–14628.
- [15] Xing Y, Meng Q, Chen X, et al. TRIM44 promotes proliferation and metastasis in non-small cell lung cancer via mTOR signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(21): 30479–30491.
- [16] Luo Q, Lin H, Ye X, et al. Trim44 facilitates the migration and invasion of human lung cancer cells via the NF- κ B signaling pathway [J]. *Int J Clin Oncol*, 2015, 20(3): 508–517.
- [17] Li L, Shao MY, Zou SC, et al. miR-101-3p inhibits EMT to attenuate proliferation and metastasis in glioblastoma by targeting TRIM44 [J]. *J Neurooncol*, 2019, 141(1): 19–30.
- [18] Tan Y, Yao H, Hu J, et al. Knockdown of TRIM44 inhibits the proliferation and invasion in prostate cancer cells [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(8): 1253–1259.
- [19] Zhou Z, Liu Y, Ma M, et al. Knockdown of TRIM44 inhibits the proliferation and invasion in papillary thyroid cancer cells through suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2017, 96: 98–103.
- [20] Liu S, Meng F, Ding J, et al. High TRIM44 expression as a valuable biomarker for diagnosis and prognosis in cervical cancer [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(3): BSR20181639.
- [21] Li P, Yin H, Meng F, et al. High TRIM44 expression in endometrial carcinoma is associated with a poorer patient outcome [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(5): 727–731.
- [22] Kawabata H, Azuma K, Ikeda K, et al. TRIM44 is a poor prognostic factor for breast cancer patients as a modulator of NF- κ B signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1931.
- [23] Wu J, Guo NZ, Cui LL, et al. Correlation between tripartite motif-containing protein 44 protein expression and the prognosis of postoperative patients exhibiting skin squamous cell carcinoma [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(44): e13021.
- [24] Kawaguchi T, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Overexpression of TRIM44 is related to invasive potential and malignant outcomes in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6): 1010428317700409.
- [25] Kashimoto K, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Overexpression of TRIM44 contributes to malignant outcome in gastric carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(11): 2021–2026.
- [26] Yang B, Wang J, Wang Y, et al. Novel function of Trim44 promotes an antiviral response by stabilizing VISA [J]. *J Immunol*, 2013, 190(7): 3613–3619.
- [27] König R, Zhou Y, Elleder D, et al. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication [J]. *Cell*, 2008, 135(1): 49–60.
- [28] Pang S, Sun C, Gao S, et al. Evodiamine derivatives improve cognitive abilities in APP^{swe}/PS1^{ΔE9} transgenic mouse models of Alzheimer's disease [J]. *Animal Model Exp Med*, 2020, 3(2): 193–199.
- [29] 张丽, 陈炜, 张旭, 等. APP^{swe}/PS1^{ΔE9}/TAU 三转基因阿尔兹海默病大鼠模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(3): 61–66, 90.
- [30] Meng F, Ding J, Xu W, et al. Knockdown of *TRIM44* inhibits the progression of ovarian cancer and is related to the *FOXO1-EZH2* signaling pathway [J]. *Transl Cancer Res*, 2022, 11(2): 414–425.
- [31] Lyu L, Chen Z, McCarty N. TRIM44 links the UPS to SQSTM1/p62-dependent autophagy and removing misfolded proteins [J]. *Autophagy*, 2022, 18(4): 783–798.
- [32] Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs [J]. *Nat Med*, 2004, 10(10): 1055–1063.
- [33] Jellinger KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2009, 116(9): 1111–1162.

[收稿日期] 2022-06-17