

胡欣妍, 高明阳, 杨宣叶, 等. TRIM 蛋白在宿主抗流感病毒感染中的作用 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (1): 138-146.

HU X Y, GAO M Y, YANG X Y, et al. Role of TRIM protein in host defence against influenza infection [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (1): 138-146.

TRIM 蛋白在宿主抗流感病毒感染中的作用

胡欣妍^{1,2}, 高明阳^{1,2}, 杨宣叶^{1,2}, 王进千^{1,2}, 吴玉湖^{1,2}, 马晓霞¹, 张德荣^{1*}

(1. 西北民族大学生物医学研究中心/生物工程与技术国家民委重点实验室/甘肃省动物细胞技术创新中心, 甘肃 兰州 730030;

2. 西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730010)

摘要: 泛素化是所有真核生物中蛋白质翻译后修饰 (protein post-translational modifications, PTMs) 之一, 可调节数千种蛋白, 其中, 泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 可诱导蛋白酶体降解靶蛋白, 随后激活多种信号通路, 在多种细胞生命周期中发挥调节作用, 并在细胞生命过程中的许多方面发挥至关重要的作用。三结构域蛋白 (tripartite motif-containing proteins, TRIMs) 是一类可以在胞内信号转导、细胞发育及凋亡、蛋白质质量控制、固有免疫反应、自噬、癌症中发挥重要调节作用的 E3 泛素连接酶。本文着重阐述了 TRIMs 在抗流感病毒感染中发挥的作用, 包括对流感病毒蛋白的直接作用, 对模式识别受体 (pathogen recognition receptor, PRR) 介导的固有免疫反应的调节以及对病毒自噬的诱导, 为流感的防治提供更多新的思路, 并为进一步深入研究 TRIM 家族成员介导的抗流感病毒感染机制奠定理论基础。

关键词: 流感病毒; 泛素化; 抗病毒免疫; TRIM 家族

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)01-0138-09

Role of TRIM protein in host defence against influenza infection

HU Xinyan^{1,2}, GAO Mingyang^{1,2}, YANG Xuanye^{1,2}, WANG Jinqian^{1,2}, WU Yuhu^{1,2},
MA Xiaoxia¹, ZHANG Derong^{1*}

(1. Biomedical Research Center, Northwest Minzu University/Key Laboratory of Biotechnology and Bioengineering of State Ethnic Affairs Commission/Gansu Tech Innovation Center of Animal Cell, Lanzhou 730030, China;

2. College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730010, China)

Abstract: Ubiquitination is one of the protein post-translational modifications (PTMs) found in all eukaryotes, regulating thousands of proteins. Among them, the ubiquitin-proteasome system (UPS) can induce the proteasome to degrade target proteins, and then activates a variety of signaling pathways, which plays a regulatory role in a variety of cell life cycles, and plays a crucial role in many aspects of cell life processes. Tripartite motif-containing proteins (TRIMs) are a class of E3 ubiquitin ligases that play an important role in the regulation of intracellular signal transduction, development, apoptosis, protein quality control, innate immune response, autophagy and cancer. In this review, we have focused on the role of TRIMs in anti-influenza virus infection, including the regulation of the innate immune response mediated by the direct effect on influenza virus proteins, pathogen recognition receptor (PRR), and induction of viral autophagy. This provides more new ideas for the prevention and control of influenza virus, and further lays a theoretical foundation for in-depth research on the mechanism of anti-viral infection mediated by TRIM family members.

Keywords: influenza virus; ubiquitination; antiviral immunity; TRIM family

流感病毒是一种有包膜的 RNA 病毒, 其基因组由 8 个负义单链 RNA 片段构成, 可编码至少 10 种蛋白质^[1]。它是主要的可引起季节性或全球大流行人畜共患呼吸道疾病的病原体之一, 为公共卫生及经济

发展带来巨大负担^[1-2]。流感在世界范围内较为常见, 每年导致约 500 万患者住院治疗, 近 40 万人死亡^[3], 其主要症状包括: 发烧、咳嗽、鼻塞、喉咙痛, 严重时可能引发肺炎或下呼吸道继发性细菌感染。在某些情况下, 流感病毒的感染还会诱发心脏、中枢神经系统及其他器官系统并发症的发生^[4-5]。在病毒颗粒中, 基因组片段分别被核蛋白 (nucleoprotein, NP) 包裹, 与 PB1、PB2、PA 这 3 个聚合酶亚基结合形成病毒核糖核蛋白 (viral ribonucleoproteins, vRNPs)。当病毒血凝素 (hemagglutinin, HA) 识别

收稿日期: 2024-03-28; 修回日期: 2024-11-13

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (31920230063)

第一作者: 胡欣妍, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 张德荣, 副教授, 硕士生导师, 主要从事反刍动物细胞基因工程方面的相关教学科研工作, E-mail: zdr_79@126.com。

并与细胞表面的唾液酸受体结合后,病毒通过内吞作用进入细胞并将 vRNPs 释放到细胞质中,随后 vRNPs 会进入细胞核中进行复制^[6-7]。在这一过程中,低 pH 值的内吞体不仅会刺激血凝素 2 (hemagglutinin 2, HA2) 蛋白介导膜融合,还会激活 M2 离子通道驱动 vRNPs 从 M1 基质蛋白释放到细胞质中^[8-9]。新合成的病毒蛋白在细胞核中组装,并通过与 M1 蛋白互作形成复合物,招募病毒核输出蛋白 (nuclear export protein, NEP) 和宿主蛋白输出蛋白 1 (chromosomal maintenance 1, CRM1) 组成出核复合物^[10-13],最终子代病毒在质膜装配出芽。然而,流感病毒能够通过抗原漂移快速获得适应性突变,从而逃避人类免疫反应及药物治疗,因此流感病毒往往导致感染者的高发病率和死亡率。例如:1918 年 H1N1 流感病毒在全球造成多达 5 000 万人死亡^[14],2009 年 H1N1 流感病毒造成超过 37.5 万人感染^[15]。因此,探索更多有效抑制流感病毒感染的抗病毒策略对于临床上流感病毒的治疗与预防具有重大意义。

泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 是一种能够靶向蛋白质进行泛素化并控制细胞多种功能的网络系统。病毒在感染细胞的过程中需要破坏或者利用这一细胞机制来改变细胞内环境,以创造适合自身复制的环境。基于此,越来越多的研究证明,在流感病毒感染过程中,三结构域蛋白 (tripartite motif-containing proteins, TRIMs) 调节作用的发挥需要 UPS 的密切参与^[16-17]。TRIM 蛋白家族是一类泛素连接酶 (Ubiquitin-ligase enzymes, E3),是 UPS 的重要组成部分,并且通过调控蛋白质水平参与固有免疫和自噬等多种细胞生理活动^[18-20]。此外,一些 TRIM 蛋白还可以直接靶向病毒蛋白,通过蛋白酶体介导的降解途径或调节靶蛋白的活性来达到抑制病毒复制的效果^[21-22]。有研究表明,一些病毒已进化出可以对抗 TRIM 蛋白抗病毒活性的能力。本文聚焦于 TRIM 蛋白在流感病毒生命周期中发挥的抗病毒作用,为制定抗流感病毒策略奠定理论基础。

1 TRIM 家族

泛素化属于其中重要的一种修饰类型,通过由 76 个氨基酸组成的小分子蛋白质——泛素 (ubiquitin, Ub) 与蛋白质上的赖氨酸残基结合,从而对靶蛋白进行泛素化修饰,而被泛素化的靶蛋白大部分会被 26S 蛋白酶体识别,进一步被降解。泛素化的过程通常由 3 个级联步骤组成,首先,泛素激活酶 (ubiquitin-activating enzyme, E1) 利用 ATP 供能,激活泛素分子并形成 Ub-E1 复合物;随后 Ub-E1 复合

体通过转酯作用将 Ub 转移到泛素偶联酶 (ubiquitin-conjugating enzymes, E2) 上,形成 Ub-E2 复合物;最后, E3 特异性识别靶蛋白后, E2 上的 Ub 最终转移到靶蛋白上 (图 1A)。根据目前研究,已在 UPS 中发现 600 余种可特异性结合底物的人源性 E3。根据 Ub 通过 E3 从 E2 转移到底物的机制,将 E3 蛋白分为 3 种: RING (really interesting new gene) E3,与 E6AP 羧基末端同源 (homologous to E6-associated protein C Terminus, HECT) E3 和 RBR (RING-in-between-RING) E3^[23-24]。其中, RING E3 较为普遍,具有能够直接介导 Ub 从 E2 转移到底物上的 RING 结构域^[25],且其本身不与泛素形成共价中间体。与 RING E3 不同, HECT E3 通过其 HECT 域与 Ub 形成共价中间体,随后将泛素转移到底物上^[26]。而 RBR E3 具有 2 个 RING 结构域 (RING1、RING2) 和 1 个 RING 中间域 (in-between-RING, IBR),其转移 Ub 的机制与 HECT E3 类似,先通过 RING1 识别 Ub-E2 复合物,后将 Ub 转移到 RING2 上形成中间体,最后将 Ub 转移到底物上与之结合^[27]。

TRIM 蛋白是一种具有 RING 结构域的 E3,它参与了细胞生长、凋亡、肿瘤形成等多种生命活动。另外, TRIM 蛋白还能够通过多种途径发挥抗病毒作用^[18-19, 28-30]。目前, TRIM 蛋白家族中已发现 80 余种人源性蛋白。TRIM 蛋白拥有 3 个高度保守的结构域,从 N 端到 C 端依次是 RING 锌指结构, 1 个或 2 个 B-box 结构域和 1 个卷曲螺旋结构域 (central coiled-coiled domain, CCD) (图 1B)。RING 结构域作为 TRIM 家族蛋白中最常见的结构域,具有 E3 泛素连接酶的催化活性,从而能够调节靶蛋白。B-box 结构域包含 1 个与 RING 结构域类似的锌指序列,但其功能尚不明确。然而,研究表明, B-box 结构域的自寡聚化使其能够区别于其他未参与寡聚化的 TRIM 家族蛋白^[18]。有研究表明, CCD 结构域可能与 TRIM 家族蛋白形成同源或异源寡聚体以及蛋白间互作相关^[18, 28-29]。此外, TRIM 蛋白 C 端通常包含 1~2 个长度可变的片段,该片段被分为 11 个亚型,包括 SPRY 结构域 (Sp1A kinase and ryanodine receptors domain)、PRY-SPRY 结构域和 COS 结构域 (C-terminal subgroup one signature domain)。值得一提的是, C 端的这一区域可以影响亚细胞定位以及对靶蛋白的作用,有研究表明 TRIM25 蛋白的 SPRY 和 PRY-SPRY 结构域可促进蛋白间互作,并在固有免疫应答中发挥调节作用^[18],而 COS 结构域通常与细胞骨架的微管网络相关^[18-19]。

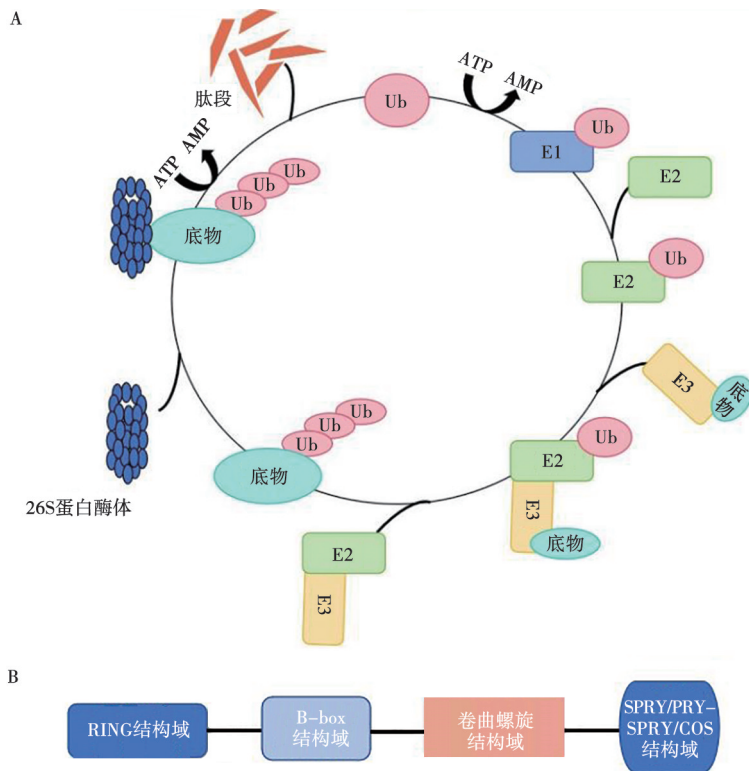


图 1 蛋白质泛素化修饰过程 (A) 和 TRIM 蛋白结构域构成 (B)

2 TRIM 蛋白的抗流感病毒机制

TRIM 蛋白在调抗病毒反应中发挥着至关重要的作用，其主要的调控方法有以下 3 种：a. 直接靶向病毒蛋白，阻碍病毒复制过程；b. 调节模式识别受体 (pathogen recognition receptor, PRR) 介导固有免疫反应；c. 病毒感染诱导的自噬。本文从 TRIM 家族蛋白所具有的抗病毒活性这一角度切入，分别对这 3 种调控机制进行阐述。

2.1 靶向流感病毒蛋白

部分 TRIM 蛋白，如 TRIM5 和 TRIM22，能够直接靶向病毒蛋白，从而有效地抑制病毒的复制^[18,31]。已有研究表明，干扰素诱导的 TRIM22 对多种病毒均具有抗病毒活性，如：能够结合人类免疫缺陷病毒 1 型 (human immunodeficiency virus 1, HIV-1) 的启动子，从而抑制 HIV-1 长末端重复序列 (long terminal repeat, LTR) 驱动的转录^[32]；能够通过促进 3C 蛋白酶泛素化，抑制乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 和脑心肌炎病毒 (encephalomyocarditis virus, EMCV) 蛋白的表达^[33]。Pietro 等^[34]通过研究发现，TRIM22 能够与甲型流感病毒 (IAV) 的 NP 蛋白发生互作，并诱导其蛋白酶体降解，最终抑制病毒的复

制。有研究发现，TRIM41 的 SPRY 结构域能够与流感病毒核蛋白 (nucleoprotein, NP) 发生互作，诱导 NP 泛素化，这表明，TRIM41 是宿主固有的流感病毒限制因子^[35]。与 TRIM41 类似，TRIM14 也能与 NP 结合并降解，从而有效抑制 vRNP 复合物的形成，从而抑制流感病毒的复制^[36]。此外，TRIM32 能够直接与流感病毒聚合酶亚基 PB1 互作并泛素化 PB1，触发其发生蛋白酶体降解，最终降低病毒聚合酶活性^[37]。Sun 等^[38]研究表明，IAV 的 PB2 蛋白会抑制 TRAF3 的 K63 泛素化，并进一步阻止 MAVS 与 TRAF3 形成复合物，从而最终影响 RIG-I 下游通路的信号转导。TRIM35 的 RING 结构域是其具有 E3 泛素连接酶活性的关键结构域，能够对 IAV 的 PB2 蛋白进行 K48 泛素化蛋白酶体降解，从而抑制 IAV 在宿主体内的复制，并进一步增强由 IAV 感染引起的固有免疫反应。有研究表明，TRIM25 可以与宿主细胞核中的 vRNPs 结合，从而抑制流感病毒 RNA 链的延伸^[39]。TRIM74 对于流感病毒的增殖同样具有抑制作用，且具有保守的 RING 结构域，其 E3 泛素连接酶活性可能通过与靶蛋白结合并进行泛素化修饰，从而发挥其抗病毒功能，但其机制仍需进一步研究^[40]。而 TRIM56 能够以不依赖于 E3 泛素连接酶活性的方

式, 有效地抑制胞内病毒 RNA 的合成^[41]。综上所述, 多种 TRIM 蛋白通过直接靶向流感病毒 PB1、PB2、PA、NP 等蛋白, 在抑制负链 RNA 病毒 vRNPs 复合物形成方面发挥重要作用。除此之外, Fan 等^[42]发现 TRIM7 对于多种肠道病毒具有抑制作用, 而 TRIM52 能够通过靶向乙脑病毒 NS2A 蛋白抑制乙脑病毒^[43], 这也提示我们进一步探索 TRIM 蛋白对流感病毒存在的潜在作用。值得注意的是, Isable 等^[44]发现, 2009 年流行的 H1N1 毒株以及 1933 年至 1934 年流行的 H1N1 毒株对 TRIM22 的抗病毒作用均具有一定的耐受性。这说明流感病毒在进化过程中产生了适应性突变, 以更好地适应环境, 从而逃避 TRIM 蛋白所介导的抗病毒机制。

2.2 介导固有免疫反应

正如前文所提到的, TRIM 蛋白对于 PRR 介导的固有免疫信号转导有着正向或负向的调控, 有些类型的 PRRs 可以识别具有不同病原体相关分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMP) 的病毒 DNA 或 RNA, 并激活固有免疫反应中相关的信号分子。RIG-I 样受体 (RIG-I-like receptor, RLR) 是病毒感染细胞后, 识别病毒双链 (double-stranded RNA, dsRNA) 或单链 RNA (single-stranded RNA, ssRNA) 的重要传感器^[45]。在静息状态下, RIG-I 处于非活性阶段, 其 CARDs 结构域结合于解旋酶结构域的插入区。当 RNA 病毒入侵后, RIG-I 的 C 末端结构域 (carboxy-terminal domain, CTD) 识别并结合 5'-pppRNA, 之后 RIG-I 分子会转变为开放构象并释放 CARDs 结构域。被释放的 CARDs 会形成四聚体并进一步招募位于线粒体外膜上的线粒体抗病毒信号蛋白 (mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS)。接下来, MAVS 会同时招募 I κ B 激酶 ϵ (IKK ϵ) 和 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1) 从而激活干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 或 IRF7。并且, 为了进一步激活 NF- κ B, MAVS 还参与了 IKK α / β / γ 复合体的形成, 从而降解 NF- κ B 的抑制剂 I κ B α 。在这过程中, NF- κ B 会易位进入细胞核, 并对其下游包括促炎细胞因子和趋化因子在内的多种免疫调节因子进行调节^[21]。值得注意的是, NF- κ B 的激活可以上调 RLR 介导的 I 型干扰素 (interferons, IFNs) 的水平^[45]。本课题组在前期研究中发现, 流感病毒的感染能够显著升高 I 型 IFN 及几种干扰素刺激基因 (interferon-stimulated genes, ISGs) 的水平, 如 ISG15、CXCL10、Mx1 等, 且病毒感染诱导产生的

IFN 具有抗流感病毒生物活性^[46]。因而, PPR 介导的固有免疫反应在流感病毒的感染过程中发挥着重要作用。

一些 TRIM 蛋白可以通过靶向 RIG-I、MDA5、MAVS, 正向调控 PRR 介导的固有免疫反应^[21]。其中 TRIM25 在调控方面有着显著优势, 它通过诱导 RIG-I CARD 结构域 K172 残基的 K63 多聚泛素化促进 RIG-I 寡聚化并调节其抗病毒活性^[47]。此外, TRIM25 还会合成未锚定多聚泛素链, 从而进一步增强 RIG-I 的活性^[48]。当 RIG-I 激活后, TRIM25 会通过 K48 多聚泛素化促进其自身发生蛋白酶体降解, 进而对与 RIG-I 相关的下游信号分子进行负调控, 而泛素特异性蛋白酶 15 (ubiquitin specific protease 15, USP15) 能够促进 TRIM25 的去泛素化, 从而维持 TRIM25 的稳定水平以及机体稳定的固有免疫应答水平^[49]。由于甲型和乙型流感病毒的非结构蛋白 1 (nonstructural protein 1, NS1) 会对 RIG-I 介导的抗病毒信号转导产生拮抗作用^[50], 因此 TRIM25 在抗病毒信号转导中发挥的作用尚未阐明。NS1 与 TRIM25 的互作会阻碍 RIG-I CARD 结构域的 K63 多聚泛素化, 从而抑制 RIG-I 介导的 I 型 IFN 信号通路^[51]。更重要的是, 这种拮抗作用广泛存在于多种种源 IAV 毒株中, Rajsbbaum 等^[52]的研究表明, 人源 A/California/04/09、禽源 A/Hong Kong/156/1997、猪源 A/Swine/Texas/4199-2/98 及鼠源 A/Puerto Rico/8/34 毒株的 NS1 蛋白均与其直系同源 TRIM25 蛋白存在相互作用。Marcos-Villar 等^[53]研究表明, 流感病毒的感染会通过依赖于 NS1 的方式上调组蛋白 H3K79 甲基转移酶 Dot1L 的表达, 从而抑制 TRIM25 的表达, 最终导致 IFN- β 的减少。这些研究都表明 TRIM25 是一种抗病毒因子, 而 NS1 则在流感病毒生命周期中发挥重要的作用。与 TRIM25 调控机制类似, TRIM44 通过抑制 MAVS 的 K48 泛素化降解, 从而稳定 MAVS 水平并刺激 I 型 IFN 通路^[54]。而 TRIM35 除直接靶向流感病毒 PB2 蛋白外, 还能够促进 TRAF3 的 K63 泛素化, 进一步增强 I 型 IFN 的产生。尽管 TRIM 蛋白家族中多种蛋白参与 RIG-I 介导的免疫应答, 但 TRIM25 能够直接靶向流感病毒的蛋白。因此, 不同 TRIM 蛋白对于由流感病毒感染诱发的固有免疫反应的调节作用还需更深入的研究。

此外, TRIM 蛋白家族除了刺激胞质 RNA 受体, 还可以调节环状 GMP-AMP 合成酶 (cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)-干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING) 介导的胞内 DNA 传

感途径。当 cGAS 识别到异常 DNA 后, 会催化 GTP 和 ATP 合成“环状 GMP-AMP” (cyclic GMP-AMP, cGAMP), cGAMP 能够结合并激活 STING, 触发 TBK1 对 IRF3 的磷酸化。随后, 被激活的 IRF3 会上调 I 型 IFN 的转录水平^[55-56]。目前, 已有研究表明 E3 泛素连接酶 TRIM56 能够诱导 cGAS 单泛素化, 从而正调控 cGAS-STING 介导的 DNA 传感通路^[57]。TRIM14 可以招募去泛素化酶 USP14, 从而稳定 cGAS 水平, 增强 I 型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus type 1, HSV-1) 激活的 I 型 IFN 信号通路^[58]。然而, 目前并没有研究表明流感病毒能够破坏 TRIM 蛋白针对 cGAS-STING 通路的活性。因此, 流感病毒感染对 TRIM 蛋白调节 cGAS-STING 通路的影响还需进一步研究。

2.3 调节自噬

自噬是一种极其保守的胞内分解代谢途径, 可诱导溶酶体对胞质内的成分进行降解。这一过程由拥有独特双层膜结构的自噬小体介导, 随后与溶酶体融合并降解。依据不同的递送方式, 自噬能够被分为 3 类, 包括巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬。自噬在多种生理和病理过程中发挥重要的功能, 例如: 胞内非必要蛋白和细胞器的清除、抗衰老、细胞凋亡、抗肿瘤、炎症反应、固有免疫和适应性免疫以及抗微生物感染^[59]。有趣的是, 由于病毒、细胞类型、宿主物种的不同, 自噬对于病毒的复制有着“双面”的调控机制。例如: 登革病毒、柯萨奇病毒和丙型肝炎病毒利用自噬促进自身复制, 而寨卡病毒、EMCV 和多种疱疹病毒, 如 HSV-1、人巨细胞病毒和卡波西肉瘤疱疹病毒的复制会受到自噬的抑制。值得注意的是, 自噬在病毒复制和发病机制方面发挥着重要作用, 且多种亚型 IAV 的感染, 如 H5N1、H3N2、H9N2 以及 H1N1 都可以触发自噬^[59]。高致病性禽流感 H5N1 能够通过调节自噬抑制因子——哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 以增强自噬^[60]。一方面, 已有研究证明, IAV 的 M2 离子通道蛋白能够抑制自噬小体与溶酶体的融合, 使得自噬小体在巨噬细胞中积累, 从而使 IAV 在宿主细胞中得以生存与增殖^[61-62]; 另一方面, IAV 的 M2 蛋白能够直接与自噬相关蛋白 LC3 发生互作, 诱导 LC3 易位, 从而扭转自噬的发生, 最终增强病毒自身的出芽及自带病毒颗粒的稳定释放^[63]。最近一项研究表明, IAV 感染 A549 细胞后会促进自

噬小体, 以促进病毒自身的蛋白质翻译机制^[64]。

多项研究表明, TRIM 蛋白与自噬途径中多个过程密切相关^[65], 首先 UNC-51 样自噬激活激酶 1 (Unc-51-like autophagy activating kinase 1, ULK1) 激活自噬, 随后组装含有 Beclin 1 的复合物。Atg12-Atg5-LC3 II 复合物在自噬小体形成的各个阶段发挥着重要作用^[30, 66]。研究发现 TRIMs 5、6、17、22、49 能够与 ULK1 互作, 促进 Beclin 1 复合物的形成, 从而激活自噬^[67-68]。也有研究表明 TRIMs 13、16、20、21、28、32、50 与 ULK1 以及 Beclin 1 有关^[66-67, 69-70]。虽然 TRIM 蛋白的泛素化活性并不是这些自噬复合物形成所必需的, 但 TRIM32 的 E3 泛素连接酶活性却是刺激 ULK1 的关键所在^[65]。另外, TRIM17 和 TRIM59 能够抑制 Beclin 1 介导的自噬^[70-71]。而 Zhirnov 等^[72]研究发现, IAV 的 M2 蛋白与 Beclin 1 之间的互作能够进一步形成自噬体, 诱导自噬的发生, 因此这些 TRIM 蛋白在抗流感病毒感染方面的作用还有待进一步探究。在 HeLa 细胞中, 研究人员发现, TRIM 蛋白能够在自噬小体形成过程中对自噬进行调节。利用 siRNA 对 21 种不同 TRIM 蛋白进行敲低, 对 67 种人源 TRIM 蛋白进行敲除, 均能有效降低 LC3 的产生^[66]。p62 作为底物与溶酶体之间的适配蛋白, 在调节自噬方面发挥着关键的作用, 而 TRIM 蛋白与 p62 之间存在着互作关系^[65]。通过敲除人单核细胞白血病细胞 (THP-1) 中 TRIM 蛋白并用 IFN- γ 进行刺激, 可以发现 24 种不同 TRIM 蛋白的敲除能够减少 LC3, 这表明, IFN- γ 诱导的自噬作为一种非经典自噬通路, 同样需要 TRIM 蛋白的参与^[73]。根据最新的研究显示, TRIM 蛋白在与自噬相关的抗病毒途径和病毒诱导的自噬中具有新的作用^[30, 59, 65, 68]。Sparrer 等^[74]发现, TRIM23 作为 E3 泛素连接酶和 ADP-核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor, ARF) 的 GTP 酶, 利用其 GTP-GDP 水解活性促进 TBK1 二聚体的形成, 使自噬受体 p62 发生磷酸化。最终 TRIM23-TBK1-p62 复合物会进一步促进流感病毒触发的自噬。然而, TRIM 蛋白对于 IAV 感染所导致的自噬过程的影响还需进一步的研究。

图 2 为基于上述研究成果总结的 TRIM 蛋白在流感病毒复制和 PRR 介导的固有免疫反应中发挥的作用示意图, 表 1 为抑制流感病毒复制的相关 TRIM 蛋白汇总。

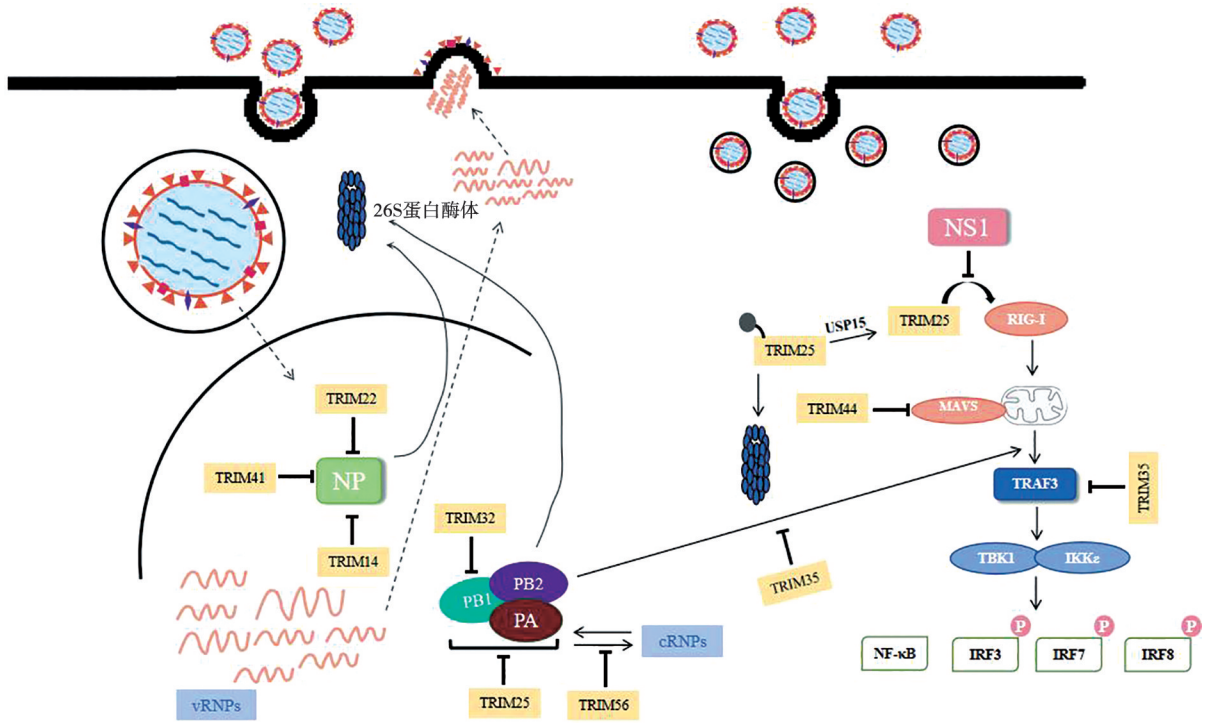


图2 TRIM 蛋白在流感病毒复制和 PRR 介导的固有免疫反应中发挥的作用

表 1 抑制流感病毒复制的相关 TRIM 蛋白

调控途径	TRIM 蛋白	调控机制
直接靶向病毒的蛋白	TRIM22	与流感病毒 NP 蛋白互作，使其发生泛素化降解
	TRIM41	与流感病毒 NP 蛋白互作，使其发生泛素化降解
	TRIM14	与流感病毒 NP 蛋白互作，使其发生泛素化降解
	TRIM32	与流感病毒 PB1 蛋白互作，使其发生泛素化降解
	TRIM35	与流感病毒 PB2 蛋白互作，使其发生泛素化降解
	TRIM25	与宿主细胞核中的 vRNPs 结合，抑制流感病毒 RNA 链的延伸
	TRIM74	有待进一步研究
	TRIM56	不依赖于 E3 泛素连接酶活性，抑制胞内病毒 RNA 的合成
先天免疫反应	TRIM25	诱导 RIG-I CARD 结构域 K63 多聚泛素化促进其寡聚化
	TRIM44	抑制 MAVS K48 泛素化降解，稳定其水平并刺激 I 型 IFN 通路
	TRIM35	促进 TRAF3 K63 泛素化，增强 I 型 IFN 的产生
自噬	TRIM23	TRIM23-TBK1-p62 复合物会进一步促进流感病毒触发的自噬

4 其他 E3 介导的抗流感病毒机制

绝大多数 TRIM 蛋白在流感病毒生命周期中发挥着负调控的作用，有研究表明，通过泛素化所有 vRNP 成员能够激活流感病毒的聚合酶活性，同时不改变病毒的蛋白水平，最终增强流感病毒的复制^[75]。基于 RNAi 文库高通量筛选，Lin 等^[76]发现 CCR4-NOT 转录复合物亚基 4 (CCR4-NOT transcription complex subunit 4, CNOT4) 作为一种具有 E3 泛素连接酶活性调节因子，以不依赖于蛋白酶体降解途径的方

式增强 IAV NP 蛋白的泛素化，进一步削弱病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) 活性，最终抑制 IAV 的复制。此外，有研究发现，一种包含 HECT 结构域的 E3 泛素连接酶 ITCH 也是流感病毒入侵宿主细胞的重要因子。ITCH 能够与 M1 发生互作，并使其发生泛素化并降解，从而促进病毒颗粒中 vRNPs 的释放^[77]。Liu 等^[78]研究发现，泛素连接酶 MARCH8 激活 M2 蛋白易位进入溶酶体，并发生泛素化降解从而抑制 IAV 的增殖。位于 M2 胞质结构域 K78 残基的泛素化对具

有感染性的子代病毒的产生和病毒介导的胞死亡至关重要,但目前并没有发现相应的泛素连接酶^[79]。这些研究表明泛素化活性是在病毒感染多个阶段中发挥调控作用的关键因素。

综上所述,TRIM 蛋白已在多项研究中被证实可以通过多种途径发挥抗病毒感染作用。而流感病毒作为每年造成季节性疫病大流行的“罪魁祸首”之一,许多科研人员致力于寻找针对其有效的防治手段。又因病毒本身具有高突变性,且目前临床上所使用的防治手段十分受限,因此进一步探索针对流感病毒有效且安全的防控策略对于社会经济发展,亦或是公共卫生安全均具有重大的意义。本团队一直致力于病毒所介导的固有免疫^[46,80]以及抗流感药物的研究^[81],研究发现许多针对免疫应答因子的药物或是通过泛素化修饰靶向病毒自身蛋白的手段同样具有显著的抗病毒效应,同时免疫抑制剂的应用还能够有效降低病毒感染造成系统性炎症反应综合征(system inflammatory response syndrome, SIRS)的风险。另外流感病毒复制过程中需要依赖宿主为其提供源源不断的“原料”,因而宿主细胞中的许多因子对于病毒的复制也至关重要。基于此,宿主导向疗法(host-directed therapies, HDTs)在流感防治中的应用也值得更深入的研究。

4 总结

TRIM 家族是抗病毒的宿主限制因子和免疫反应的“指挥官”。本文着重阐述了 TRIM 家族能够通过靶向病毒蛋白、调节 PRR 介导的固有免疫反应或病毒感染诱导的自噬来对抗流感病毒的增殖。尽管 TRIM 蛋白对病毒存在着拮抗作用,但流感病毒逃避 TRIM 蛋白抗病毒作用的机制尚不明确。事实上,NS1 是唯一被证实能够破坏 TRIM25 介导的免疫信号传导的病毒蛋白,强调了它在病毒感染过程中发挥的重要作用。因此,为了进一步研究流感病毒拮抗 TRIMs 的机制,应该深入了解 TRIMs 在特异性调控方面发挥的作用。通过不断深化对 TRIM 蛋白的了解,不仅了解病毒与宿主间相互作用的多个方面,同时也了解泛素化修饰的过程。显而易见,TRIM 介导的泛素修饰是流感病毒感染细胞的生理和病理过程的关键。对流感病毒如何逃避 TRIM 介导的抗病毒机制的进一步研究,可能会为抗病毒感染提供的新策略。

参考文献:

[1] LEUNG N H L, CHU D K W, SHIU E Y C, et al. Respiratory virus shedding in exhaled breath and efficacy of face masks [J]. *Nat*

Med, 2020, 26 (5): 676-680.

- [2] FLERLAGE T, BOYD D F, MELIOPOULOS V, et al. Influenza virus and SARS-CoV-2: pathogenesis and host responses in the respiratory tract [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19 (7): 425-441.
- [3] LAFOND K E, PORTER R M, WHALEY M J, et al. Global burden of influenza-associated lower respiratory tract infections and hospitalizations among adults: a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS Med*, 2021, 18 (3): e1003550.
- [4] SELLERS S A, HAGAN R S, HAYDEN F G, et al. The hidden burden of influenza: a review of the extra-pulmonary complications of influenza infection [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2017, 11 (5): 372-393.
- [5] KWONG J C, SCHWARTZ K L, CAMPITELLI M A, et al. Acute myocardial infarction after laboratory-confirmed influenza infection [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378 (4): 345-353.
- [6] ZHU Y, WU Y, CHAI Y, et al. The postfusion structure of the *Heartland virus* Gc glycoprotein supports taxonomic separation of the *Bunyaviral* families *Phenuiviridae* and *Hantaviridae* [J]. *J Virol*, 2017, 92 (1): e01558-17.
- [7] JAKOB C, LOVATE G L, DESIRÒ D, et al. Sequential disruption of SPLASH-identified vRNA-vRNA interactions challenges their role in influenza A virus genome packaging [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51 (12): 6479-6494.
- [8] SCOTT C, KANKANALA J, FOSTER T L, et al. Site-directed M2 proton channel inhibitors enable synergistic combination therapy for rimantadine-resistant pandemic influenza [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16 (8): e1008716.
- [9] GUTHMILLER J J, HAN J, UTSET H A, et al. Broadly neutralizing antibodies target a haemagglutinin anchor epitope [J]. *Nature*, 2022, 602 (7896): 314-320.
- [10] LIN L, WANG X, CHEN Z, et al. TRIM21 restricts influenza A virus replication by ubiquitination-dependent degradation of M1 [J]. *PLoS Pathog*, 2023, 19 (6): e1011472.
- [11] HUI X, CAO L, XU T, et al. PSMD12-mediated M1 ubiquitination of influenza A virus at K102 regulates viral replication [J]. *J Virol*, 2022, 96 (15): e0078622.
- [12] ESPARZA M, BHAT P, FONTOURA B M. Viral-host interactions during splicing and nuclear export of influenza virus mRNAs [J]. *Curr Opin Virol*, 2022, 55: 101254.
- [13] BRUNOTTE L, FLIES J, BOLTE H, et al. The nuclear export protein of H5N1 influenza A viruses recruits Matrix 1 (M1) protein to the viral ribonucleoprotein to mediate nuclear export [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (29): 20067-20077.
- [14] JESTER B, UYEKI T M, JERNIGAN D B, et al. Historical and clinical aspects of the 1918 H1N1 pandemic in the United States [J]. *Virology*, 2019, 527: 32-37.
- [15] PATEL M, DENNIS A, FLUTTER C, et al. Pandemic (H1N1) 2009 influenza [J]. *Br J Anaesth*, 2010, 104 (2): 128-142.
- [16] YU C, LI S, ZHANG X, et al. MARCH8 inhibits Ebola virus glycoprotein, human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, and avian influenza virus H5N1 hemagglutinin maturation [J]. *mBio*, 2020, 11 (5): e01882-20.
- [17] LEE H R, LEE M K, KIM C W, et al. TRIM proteins and their roles in the influenza virus life cycle [J]. *Microorganisms*, 2020, 8 (9): 1424.

- [18] VAN GENT M, SPARRER K M J, GACK M U. TRIM proteins and their roles in antiviral host defenses [J]. *Annu Rev Virol*, 2018, 5 (1): 385–405.
- [19] SHEN Z, WEI L, YU Z B, et al. The roles of TRIMs in antiviral innate immune signaling [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 628275.
- [20] FIORENTINI F, ESPOSITO D, RITTINGER K. Does it take two to tango? RING domain self-association and activity in TRIM E3 ubiquitin ligases [J]. *Biochem Soc Trans*, 2020, 48 (6): 2615–2624.
- [21] VAN TOL S, HAGE A, GIRALDO M I, et al. The TRIMendous role of TRIMs in virus–host interactions [J]. *Vaccines (Basel)*, 2017, 5 (3): 23.
- [22] KHAN R, KHAN A, ALI A, et al. The interplay between viruses and TRIM family proteins [J]. *Rev Med Virol*, 2019, 29 (2): e2028.
- [23] ZHENG N, SHABEK N. Ubiquitin ligases: structure, function, and regulation [J]. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 129–157.
- [24] SLUIMER J, DISTEL B. Regulating the human HECT E3 ligases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75 (17): 3121–3141.
- [25] SWATEK KN, KOMANDER D. Ubiquitin modifications [J]. *Cell Res*, 2016, 26 (4): 399–422.
- [26] BERNASSOLA F, CHILLEMI G, MELINO G. HECT-type E3 ubiquitin ligases in cancer [J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44 (12): 1057–1075.
- [27] WANG P, DAI X, JIANG W, et al. RBR E3 ubiquitin ligases in tumorigenesis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67 (Pt 2): 131–144.
- [28] ZHAN W, ZHANG S. TRIM proteins in lung cancer: mechanisms, biomarkers and therapeutic targets [J]. *Life Sci*, 2021, 268: 118985.
- [29] LU K, PAN Y, HUANG Z, et al. TRIM proteins in hepatocellular carcinoma [J]. *J Biomed Sci*, 2022, 29 (1): 69.
- [30] HATAKEYAMA S. Trim family proteins: roles in autophagy, immunity, and carcinogenesis [J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42 (4): 297–311.
- [31] GANSER-PORNILLOS B K, PORNILLOS O. Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5 [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17 (9): 546–556.
- [32] VICENZI E, POLI G. The interferon-stimulated gene TRIM22: a double-edged sword in HIV-1 infection [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 40: 40–47.
- [33] PAGANI I, POLI G, VICENZI E. TRIM22. a multitasking antiviral factor [J]. *Cells*, 2021, 10 (8): 1864.
- [34] DI PIETRO A, KAJASTE-RUDNITSKI A, OTEIZA A, et al. TRIM22 inhibits influenza A virus infection by targeting the viral nucleoprotein for degradation [J]. *J Virol*, 2013, 87 (8): 4523–4533.
- [35] PATIL G, ZHAO M, SONG K, et al. TRIM41-mediated ubiquitination of nucleoprotein limits influenza A virus infection [J]. *J Virol*, 2018, 92 (16): e00905–18.
- [36] WU X, WANG J, WANG S, et al. Inhibition of influenza A virus replication by TRIM14 via its multifaceted protein-protein interaction with NP [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 344.
- [37] FU B, WANG L, DING H, et al. TRIM32 senses and restricts influenza A virus by ubiquitination of PB1 polymerase [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11 (6): e1004960.
- [38] SUN N, JIANG L, YE M, et al. TRIM35 mediates protection against influenza infection by activating TRAF3 and degrading viral PB2 [J]. *Protein Cell*, 2020, 11 (12): 894–914.
- [39] MEYERSON N R, ZHOU L, GUO Y R, et al. Nuclear TRIM25 specifically targets influenza virus ribonucleoproteins to block the onset of RNA chain elongation [J]. *Cell Host Microbe*, 2017, 22 (5): 627–638.
- [40] 叶苗苗, 孙楠, 李奇兵, 等. TRIM74 对流感病毒复制机制影响的研究 [J]. *中国预防兽医学报*, 2022, 44 (10): 1025–1033.
- [41] LIU B, LI N L, SHEN Y, et al. The C-terminal tail of TRIM56 dictates antiviral restriction of influenza A and B viruses by impeding viral RNA synthesis [J]. *J Virol*, 2016, 90 (9): 4369–4382.
- [42] FAN W, MAR KB, SARI L, et al. TRIM7 inhibits enterovirus replication and promotes emergence of a viral variant with increased pathogenicity [J]. *Cell*, 2021, 184 (13): 3410–3425.
- [43] FAN W, WU M, QIAN S, et al. TRIM52 inhibits Japanese encephalitis virus replication by degrading the viral NS2A [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33698.
- [44] PAGANI I, DI PIETRO A, OTEIZA A, et al. Mutations conferring increased sensitivity to tripartite motif 22 restriction accumulated progressively in the nucleoprotein of seasonal influenza A (H1N1) viruses between 1918 and 2009 [J]. *mSphere*, 2018, 3 (2): e00110–18.
- [45] MESEV E V, LEDESMA R A, PLOSS A. Decoding type I and III interferon signalling during viral infection [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4 (6): 914–924.
- [46] 蒲飞洋, 汪梦竹, 冯茜莉, 等. 乙型流感病毒感染过程中干扰素介导的天然免疫应答 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36 (4): 423–428.
- [47] CHOUDHURY N R, HEIKEL G, MICHLEWSKI G. TRIM25 and its emerging RNA-binding roles in antiviral defense [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2020, 11 (4): e1588.
- [48] LIU F, ZHUANG W, SONG B, et al. MAVS-loaded unanchored Lys63-linked polyubiquitin chains activate the RIG-I-MAVS signaling cascade [J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20 (10): 1186–1202.
- [49] PAULI E K, CHAN Y K, DAVIS M E, et al. The ubiquitin-specific protease USP15 promotes RIG-I-mediated antiviral signaling by deubiquitylating TRIM25 [J]. *Sci Signal*, 2014, 7 (307): ra3.
- [50] KOLIOPOULOS M G, LETHIER M, VAN DER VEEN A G, et al. Molecular mechanism of influenza A NS1-mediated TRIM25 recognition and inhibition [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 1820.
- [51] LAMOTTE L A, TAFFOREAU L. How influenza A virus NS1 deals with the ubiquitin system to evade innate immunity [J]. *Viruses*, 2021, 13 (11): 2309.
- [52] RAJSBAUM R, ALBRECHT R A, WANG M K, et al. Species-specific inhibition of RIG-I ubiquitination and IFN induction by the influenza A virus NS1 protein [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8 (11): e1003059.
- [53] MARCOS-VILLAR L, NISTAL-VILLAN E, ZAMARREÑO N, et al. Interferon- β stimulation elicited by the influenza virus is regulated by the histone methylase Dot1L through the RIG-I-TRIM25 signaling axis [J]. *Cells*, 2020, 9 (3): 732.

- [54] ZHENG J, ZHANG Y, ZHI L, et al. The novel gene TRIM44L from orange-spotted grouper negatively regulates the interferon response [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 92: 746–755.
- [55] 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.
- [56] CHEN Q, SUN L, CHEN Z J. Regulation and function of the cGAS–STING pathway of cytosolic DNA sensing [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17 (10): 1142–1149.
- [57] SEO G J, KIM C, SHIN W J, et al. TRIM56-mediated monoubiquitination of cGAS for cytosolic DNA sensing [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 613.
- [58] CHEN M, MENG Q, QIN Y, et al. TRIM14 inhibits cGAS degradation mediated by selective autophagy receptor p62 to promote innate immune responses [J]. *Mol Cell*, 2016, 64 (1): 105–119.
- [59] LEVINE B, KROEMER G. Biological functions of autophagy genes; a disease perspective [J]. *Cell*, 2019, 176 (1/2): 11–42.
- [60] MA J, SUN Q, MI R, et al. Avian influenza A virus H5N1 causes autophagy-mediated cell death through suppression of mTOR signaling [J]. *J Genet Genomics*, 2011, 38 (11): 533–537.
- [61] GANNAGÉ M, DORMANN D, ALBRECHT R, et al. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes [J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 6 (4): 367–380.
- [62] LONDINO J D, LAZRAK A, NOAH J W, et al. Influenza virus M2 targets cystic fibrosis transmembrane conductance regulator for lysosomal degradation during viral infection [J]. *FASEB J*, 2015, 29 (7): 2712–2725.
- [63] BEALE R, WISE H, STUART A, et al. A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability [J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 15 (2): 239–247.
- [64] BECKER AC, GANNAGÉ M, GIESE S, et al. Influenza A virus induces autophagosomal targeting of ribosomal proteins [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2018, 17 (10): 1909–1921.
- [65] DI RIENZO M, ROMAGNOLI A, ANTONIOLI M, et al. TRIM proteins in autophagy: selective sensors in cell damage and innate immune responses [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27 (3): 887–902.
- [66] MANDELL MA, JAIN A, ARKO-MENSAH J, et al. TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition [J]. *Dev Cell*, 2014, 30 (4): 394–409.
- [67] FUSCO C, MANDRIANI B, DI RIENZO M, et al. TRIM50 regulates Beclin 1 proautophagic activity [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865 (6): 908–919.
- [68] KIMURA T, MANDELL M, DERETIC V. Precision autophagy directed by receptor regulators—emerging examples within the TRIM family [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129 (5): 881–891.
- [69] CHAUHAN S, KUMAR S, JAIN A, et al. TRIMs and galectins globally cooperate and TRIM16 and galectin-3 co-direct autophagy in endomembrane damage homeostasis [J]. *Dev Cell*, 2016, 39 (1): 13–27.
- [70] HAN T, GUO M, GAN M, et al. TRIM59 regulates autophagy through modulating both the transcription and the ubiquitination of BECN1 [J]. *Autophagy*, 2018, 14 (12): 2035–2048.
- [71] MANDELL M A, JAIN A, KUMAR S, et al. TRIM17 contributes to autophagy of midbodies while actively sparing other targets from degradation [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129 (19): 3562–3573.
- [72] ZHIRNOV O P, KLENK H D. Influenza A virus proteins NS1 and hemagglutinin along with M2 are involved in stimulation of autophagy in infected cells [J]. *J Virol*, 2013, 87 (24): 13107–13114.
- [73] KIMURA T, JAIN A, CHOI S W, et al. TRIM-mediated precision autophagy targets cytoplasmic regulators of innate immunity [J]. *J Cell Biol*, 2015, 210 (6): 973–989.
- [74] SPARRER K M J, GABLESKE S, ZURENSKI M A, et al. TRIM23 mediates virus-induced autophagy via activation of TBK1 [J]. *Nat Microbiol*, 2017, 2 (11): 1543–1557.
- [75] KIRUI J, MONDAL A, MEHLE A. Ubiquitination upregulates influenza virus polymerase function [J]. *J Virol*, 2016, 90 (23): 10906–10914.
- [76] LIN Y C, JENG K S, LAI MMC. CNOT4-mediated ubiquitination of influenza A virus nucleoprotein promotes viral RNA replication [J]. *mBio*, 2017, 8 (3): e00597–17.
- [77] BIALEK W, COLLAWN JF, BARTOSZEWSKI R. Ubiquitin-dependent and independent proteasomal degradation in host-pathogen interactions [J]. *Molecules*, 2023, 28 (18): 6740.
- [78] LIU X, XU F, REN L, et al. MARCH8 inhibits influenza A virus infection by targeting viral M2 protein for ubiquitination-dependent degradation in lysosomes [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 4427.
- [79] SU W C, YU W Y, HUANG S H, et al. Ubiquitination of the cytoplasmic domain of influenza A virus M2 protein is crucial for production of infectious virus particles [J]. *J Virol*, 2018, 92 (4): e01972–17.
- [80] MA P, LI L, JIN L, et al. Antiviral responses of ATG13 to the infection of peste des petits ruminants virus through activation of interferon response [J]. *Gene*, 2020, 754: 144858.
- [81] 蒲飞洋. 免疫抑制剂抗 B 型流感病毒作用及机制研究 [D]. 兰州: 西北民族大学, 2023.