

张金霞, 曹莹, 张昊文, 等. 猪 TRIM56 E3 泛素连接酶活性突变体的构建及功能研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (6): 98-104.

ZHANG J X, CAO Y, ZHANG H W, et al. Construction and function of swine TRIM56 E3 ubiquitin ligase activity mutant [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (6): 98-104.

猪 TRIM56 E3 泛素连接酶活性突变体的构建及功能研究

张金霞^{1,2}, 曹莹², 张昊文², 刘德鹏^{1,2}, 李铎², 王晓冉²,
田似报², 吴香菊², 齐静², 周萌³, 王先炜^{1*}, 杜以军^{2*}

(1. 南京农业大学动物医学院/农业农村部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210095;

2. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所/农业农村部畜禽生物组学重点实验室, 山东 济南 250100;

3. 济南市企业服务中心, 山东 济南 250001)

摘要: 旨在构建猪三基序蛋白 (TRIM) 56 E3 泛素连接酶活性突变体并验证其在干扰素刺激蛋白 (STING) 介导的 I 型干扰素信号通路中的作用。对猪源、人源 TRIM56 进行同源性比对、氨基酸序列分析, 确定猪 TRIM56 E3 泛素连接酶活性位点; 设计猪 TRIM56 E3 泛素连接酶活性突变体引物, 定点突变猪 TRIM56 E3 泛素连接酶活性位点, 构建猪 TRIM56 E3 泛素连接酶活性突变体质粒并通过蛋白质免疫印迹 (Western blot) 验证表达; 通过双荧光素酶报告基因 (Luciferase) 试验、实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 试验及免疫共沉淀 (Co-IP) 试验研究猪 TRIM56 及其 E3 泛素连接酶活性突变体在 STING 介导的 I 型干扰素信号通路中的作用。结果: 猪 TRIM56 E3 泛素连接酶活性突变体构建成功; 猪 TRIM56 促进 STING 介导的干扰素 β (IFN- β) mRNA 水平和启动子活性, 促进 STING K63 连接的多聚泛素化修饰, 而猪 TRIM56 E3 泛素连接酶活性突变体没有显著促进作用。本研究为后续开展猪 TRIM56 在抗病毒天然免疫中的作用提供了有效工具。

关键词: 猪 TRIM56; E3 泛素连接酶; 定点突变; STING

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)06-0098-07

Construction and function of swine TRIM56 E3 ubiquitin ligase activity mutant

ZHANG Jinxia^{1,2}, CAO Ying², ZHANG Haowen², LIU Depeng^{1,2}, LI Duo², WANG Xiaoran²,
TIAN Sibao², WU Xiangju², QI Jing², ZHOU Meng³, WANG Xianwei^{1*}, DU Yijun^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Bacteriology,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210095, China;

2. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences/Key
Laboratory of Livestock and Poultry Multi-omics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Jinan 250100, China;

3. Jinan Enterprise Service Center, Jinan 250001, China)

Abstract: This study was to construct a swine TRIM56 E3 ubiquitin ligase activity mutant and to verify its role in the STING-mediated type I interferon signaling pathway. Here, homology comparison and amino acid sequence analysis of swine and human TRIM56 were performed to identify the swine TRIM56 E3 ubiquitin ligase active site. Then, primers for the swine TRIM56 E3 ubiquitin ligase activity mutant were designed, the swine TRIM56-E3 ubiquitin ligase active sites were site-mutated, the swine TRIM56 E3 ubiquitin ligase activity mutant plasmid was constructed, and its expression was verified by Western blot. Finally, the role of swine TRIM56 and its E3 ubiquitin ligase activity mutant in the STING-mediated type I IFN signaling pathway was explored by Luciferase assay, Real-time PCR assay and Co-IP assay. The results showed that the swine TRIM56 E3 ubiquitin ligase activity mutant plasmid was successfully constructed, that swine TRIM56 promoted the STING-mediated IFN- β mRNA level and promoter activity, and catalyzed the K63-linked polyubiquitination of STING; while the swine TRIM56 E3 ubiquitin ligase activity mutant had no significant effect. This study provided an effective tool for future research on the role of

收稿日期: 2024-12-06; 修回日期: 2025-04-25

基金项目: 中央引导地方基金发展项目 (YDZX2024019); 山东省科技型中小企业创新能力提升项目 (2024TSGC0274); 山东省农业科学院农业科技创新项目 (CXGC2024D10, CXGC2025A04)

第一作者: 张金霞, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 王先炜, 教授, 主要从事动物传染病教学与研究工作, E-mail: xwwang@njau.edu.cn; 杜以军, 研究员, 主要从事动物抗病毒感染与免疫学研究, E-mail: duyijun0916@163.com。

swine TRIM56 in antiviral natural immunity.

Keywords: swine TRIM56; E3 ubiquitin ligase; site-specific mutation; STING

三基序蛋白 (tripartite motif protein, TRIM) 家族是一类具有 E3 泛素连接酶活性的蛋白家族, 该家族参与调节细胞信号转导过程和机体的抗病毒免疫等^[1]。迄今为止在人体内发现 80 多种 TRIM 蛋白, 猪体内发现 50 多种 TRIM 蛋白, TRIM56 在二者中均被发现^[2]。TRIM56 又名 RNF109, 包含 3 个结构域, 分别为 RING 结构域、B-box 结构域、卷曲螺旋 (coiled-coil) 结构域, 其中 RING 结构域发挥 E3 泛素连接酶活性^[3]。

泛素是由 76 个氨基酸组成的分子量大约 8 kDa 的蛋白质^[4]。泛素化修饰是指在 E1 泛素激活酶、E2 泛素结合酶、E3 泛素连接酶的共同作用下, 将一个或多个泛素分子共价连接到靶蛋白上的过程, 从而完成对靶蛋白单泛素化、多泛素化、多聚泛素化修饰^[5]。每个泛素分子有 7 种赖氨酸 (K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63), 连接成不同的多聚泛素链。其中 K48、K63 连接的多聚泛素链研究的相对广泛, 靶蛋白被 K48 连接的多聚泛素链标记后通常会被带到蛋白酶体降解, 而被 K63 连接的多聚泛素链标记后会参与细胞信号转导等过程^[6]。

病原微生物入侵机体时, 机体的天然免疫系统形成第一道屏障, 散布在机体全身的各种模式识别受体 (PRRs) 识别到相应的病原体相关分子模式 (PAMPs) 后招募各接头蛋白, 各接头分子相互联通, 形成强大的网状信号通路, 产生 I 型干扰素或炎症细胞因子, 从而抵御病原微生物侵袭以及帮助机体建立起适应性免疫^[7-8]。病原体的致病性 DNA 作为 PAMPs 可被胞质内的环状 GMP - AMP 合成酶 (cGAS)、干扰素诱导蛋白 16 (IFI16)、死盒解旋酶 41 (DDX41) 等 DNA 样受体识别, 触发信号传递在 STING 处汇合, STING 是诱导 I 型干扰素启动子激活的重要接头分子^[9-10]。双链 DNA 刺激后, 人 TRIM56 (hTRIM56) 促进 STING 的泛素化修饰, 增强 STING 介导的干扰素 β (IFN- β) 启动子的激活, 增强先天性免疫反应^[11]。猪 TRIM56 (sTRIM56) 是否具有相似的功能, 尚未见报道。为了更好地探究 sTRIM56 的功能, 本研究成功构建了 sTRIM56 E3 泛素连接酶活性突变体, 通过对野生型 sTRIM56 及其 E3 泛素连接酶活性突变体的功能研究, 确立了 sTRIM56 促进 STING 介导的 I 型干扰素信号通路, 而 sTRIM56 E3 泛素连接酶活性突变体不具有显著促进作用, 确定了其 E3 泛素连接酶的重要作用, 为后续开展 sTRIM56 在抗病毒天然免疫中的作用研究提供了有效工具。

1 材料与方法

1.1 细胞与质粒

人胚胎肾上皮细胞 (HEK-293T)、猪肺泡巨噬细胞 (3D4/21), pXJ41 - Flag - sTRIM56、pXJ41 - Myc-STING、pIFN- β -Luc、pRL-TK、pXJ41 - HA - Ubiquitin、pXJ41 - HA - Ubiquitin (K48)、pXJ41 - HA - Ubiquitin (K63) 质粒 (其中 K48、K63 是指将野生型泛素的所有赖氨酸残基除第 48、63 位外均突变为精氨酸) 均由本实验室保存。

1.2 主要试剂

高糖型 DMEM 细胞培养基、Opti-MEM、0.25% Trypsin-EDTA 购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自以色列 BI 公司; 转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase 购自安捷伦科技有限公司; DH5 α 感受态细胞、180 kDa Prestained Protein Marker、Dual Luciferase Reporter Assay Kit、RNA-easy Isolation Reagent 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 细胞裂解液、PMSF 购自上海碧云天生物科技有限公司; Western-Bright Sirius 化学发光检测试剂盒购自美国 advansta 公司; Protein A/G PLUS-Agarose、鼠源 c-Myc 抗体购自 Santa Cruz 公司; 兔源 Flag 抗体、兔源 c-Myc 抗体购自 Sigma 公司; β -actin 抗体购自上海泊湾生物科技有限公司; 质粒小提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。

1.3 sTRIM56 和 hTRIM56 比较分析

登录 NCBI 数据库查询下载 sTRIM56 (GenBank 登录号: XP_020941915.1), hTRIM56 (GenBank 登录号: NP_112223.1) 基因组 CDS 区序列, 通过 DNASTAR7.1 分子生物研究软件中的 MegAlign 软件对 sTRIM56、hTRIM56 氨基酸的序列及同源性进行比较; 通过 AlphaFold 预测 sTRIM56、hTRIM56 蛋白结构。

1.4 sTRIM56 E3 泛素连接酶活性位点突变体的引物设计与合成

hTRIM56 E3 泛素连接酶活性位点为第 21、24 位的半胱氨酸^[12], sTRIM56 和 hTRIM56 的氨基酸同源性较高, 且第 21、24 位的半胱氨酸及其前后序列基本一致, 结合定点突变引物设计原则设计 sTRIM56 酶活性位点突变体的引物, 引物序列见表 1, 由北京擎科生物技术有限公司合成。

表 1 sTRIM56 CC21/24AA 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物长度/bp
F	AGCGACTTCTGGCCGCCAAAATCGCCCT- GGAGCAGCTGCGG	42
R	CCGCAGCTGCTCCAGGGCGATTTTGGCG- GCCAGGAAGTCGCT	42

1.5 sTRIM56 E3 泛素连接酶活性突变体质粒的构建

根据 PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase 说明书, 以 pXJ41-Flag-sTRIM56 质粒为模版, 用上述设计的引物进行 PCR 扩增, 取 5 μ L PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。取 8 μ L PCR 产物使用 *Dpn* I 内切酶酶切, 取 1.5 μ L 酶切产物转化至 30 μ L DH5 α 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后挑取单菌落加入到含有氨苄青霉素抗性的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 过夜培养后提取质粒, 送北京擎科生物有限公司测序。

1.6 Western blot 检测 sTRIM56 E3 泛素连接酶活性突变体质粒的表达

HEK-293T 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞汇合至大约 70% 时, 将 2 μ g 测序正确的 sTRIM56 E3 泛素连接酶活性突变体质粒转染至 HEK-293T 细胞中。培养 24 h 后弃去培养基, 用预冷的 PBS 洗 2 遍, 加入 120 μ L 含 PMSF 的细胞裂解液至冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液与 4 \times loading buffer 混匀, 沸水浴 15 min。将样品使用 10% 蛋白胶进行 SDS-PAGE 分离后, 采用湿法转印将蛋白转印至 NC 膜上, 将膜转移至 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h, 一抗用兔源 Flag 抗体 (1 : 2 000 稀释) 和 β -actin 抗体 (1 : 10 000 稀释), 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜孵育, 二抗用 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1 : 7 500 稀释), 室温孵育 1 h。洗膜后用 Western-Bright Sirius 化学发光检测试剂盒显色, BIO-RAD 凝胶成像仪曝光。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测 sTRIM56 及其 E3 泛素连接酶活性突变体对 STING 介导的肿瘤坏死因子 β (IFN- β) mRNA 的影响

将 3D4/21 细胞接种于 24 孔板中, 待细胞汇合至大约 70% 时, 将 0.25 μ g pXJ41-Myc-STING 与 0.25 μ g pXJ41 或 pXJ41-Flag-sTRIM56 或 pXJ41-Flag-sTRIM56 CC21/24AA 共转染细胞, 24 h 后收集细胞。使用 RNA-easy Isolation Reagent 试剂盒提取细胞总 RNA, 并用 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+ gDNA wiper) 试剂盒反转录为 cDNA。使用 β -actin 作为内参基因, Real-time PCR 检测 IFN- β 的

mRNA 相对表达水平, 引物序列如表 2 所示。同时通过 Western blot 确定蛋白表达。

表 2 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物长度/bp
IFN- β -F	TGCATCCTCCAAAATCGCTCT	20
IFN- β -R	ATTGAGGAGTCCCAGGCAAC	20
β -actin-F	TCTGGCACCACACCTTCT	18
β -actin-R	GATCTGGGTCATCTTCTCAC	20

1.8 双荧光素酶报告基因 (Luciferase) 试验检测 sTRIM56 及其 E3 泛素连接酶活性突变体对 STING 介导的 IFN- β 启动子的影响

将 3D4/21 细胞接种于 24 孔板中, 待细胞汇合至大约 70% 时, 将 0.2 μ g pIFN- β -Luc 及 0.02 μ g pRL-TK 转染细胞, 同时将 0.2 μ g pXJ41-Myc-STING 与 0.2 μ g pXJ41 或 pXJ41-Flag-sTRIM56 或 pXJ41-Flag-sTRIM56 CC21/24AA 共转染细胞, 24 h 后参照 Dual Luciferase Reporter Assay Kit 说明书进行收样检测。同时通过 Western blot 确定蛋白表达。

1.9 免疫共沉淀 (Co-IP) 试验检测 sTRIM56 及其 E3 泛素连接酶活性突变体对 STING 泛素化修饰的影响及 sTRIM56 促进 STING 泛素化修饰的类型

将 HEK-293T 细胞接种于 6 cm 细胞培养皿中, 待细胞汇合至大约 70% 时, 将 2 μ g pXJ41-Myc-STING、2 μ g pXJ41-HA-Ubiquitin 和 2 μ g pXJ41 或 pXJ41-Flag-sTRIM56 或 pXJ41-Flag-sTRIM56 CC21/24AA 共转染细胞。培养 24 h 后弃去培养基, 用预冷的 PBS 洗 2 遍, 加入 600 μ L 含 PMSF 的细胞裂解液至冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min 后取 45 μ L 上清液加 15 μ L 4 \times loading buffer, 沸水浴 15 min 作为 WCL 检测蛋白表达情况。剩余部分加入鼠源 c-Myc 抗体, 置于 4 $^{\circ}$ C 旋转混匀仪缓慢摇动 6 h, 加入 30 μ L Protein A/G Agarose 于 4 $^{\circ}$ C 旋转混匀仪缓慢摇动过夜。将上述样品 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 5 min 后弃掉上清液, 用 1 mL 裂解液洗 5 次每次 5 min。最后 1 次离心后吸干上清液, 加 50 μ L 2 \times loading buffer, 沸水浴 15 min 作为 IP 组, 按 1.6 方法进行 Western blot, 检测 sTRIM56 及其 E3 泛素连接酶活性突变体对 STING 泛素化修饰的影响。

将 HEK-293T 细胞接种于 6 cm 细胞培养皿中, 待细胞汇合至大约 70% 时, 将 2 μ g pXJ41-Myc-STING、2 μ g pXJ41-HA-Ubiquitin 或 pXJ41-HA-Ubiquitin (K48) 或 pXJ41-HA-Ubiquitin (K63) 和 2 μ g pXJ41 或 pXJ41-Flag-sTRIM56 共转染细胞, Co-IP 试验检测 sTRIM56 促进 STING 泛素化修饰

类型。

1.10 数据统计与分析

所有试验均重复 3 次，数据以“平均值±标准差”表示，采用单因素方差分析 (ANOVA) 和最小显著性差异 (LSD) 统计差异，以 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 sTRIM56、hTRIM56 比较分析

通过 DNASTAR7.1 分子生物学软件对 sTRIM56、

hTRIM56 的氨基酸序列进行同源性比较，其的氨基酸同源性达到 88.2% (图 1 A)。AlphaFold 预测 sTRIM56、hTRIM56 蛋白结构如图 1 B 所示，结构相似。sTRIM56、hTRIM56 部分氨基酸序列比较如图 1 C 所示，第 21、24 位半胱氨酸及其前后序列基本一致，如前文所述，hTRIM56 E3 泛素连接酶活性位点为第 21、24 位的半胱氨酸，因此将 sTRIM56 CDS 区的第 21、24 位的半胱氨酸突变为丙氨酸构建 sTRIM56 E3 泛素连接酶活性突变体 sTRIM56 CC21/24AA。

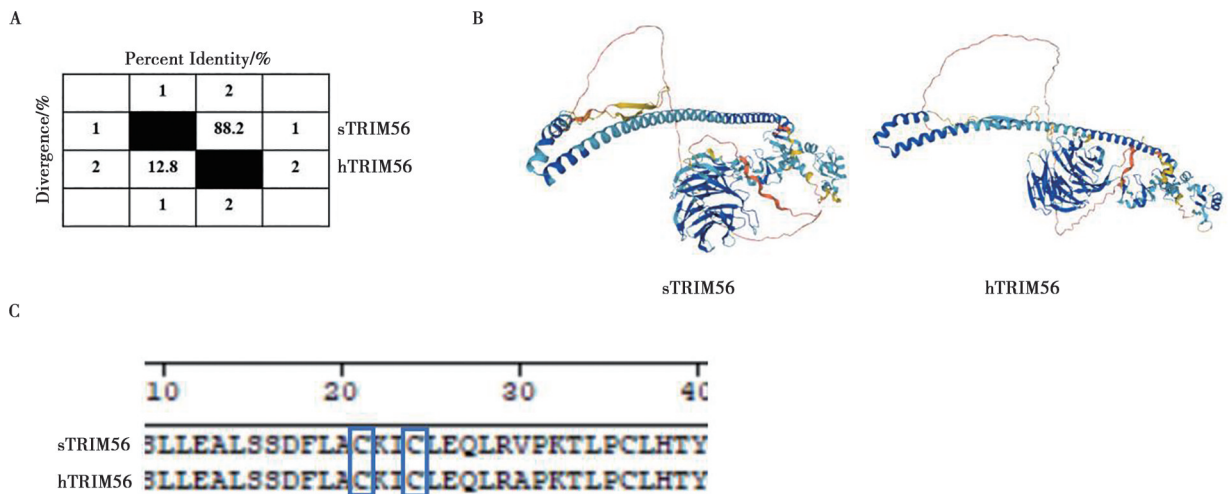


图 1 sTRIM56、hTRIM56 氨基酸同源性 (A)、结构预测 (B) 及部分氨基酸序列 (C) 比较

2.2 sTRIM56 E3 泛素连接酶活性突变体的构建及鉴定

图 2 显示，pXJ41-Flag-sTRIM56 CC21/24AA 点突变 PCR 扩增产物得到与预期大小相符的条带；产物经 *Dpn* I 内切酶处理后第 21、24 位半胱氨酸均突变为丙氨酸，其余序列与 sTRIM56 序列完全一致，表明突变体质粒构建成功，命名为 pXJ41-Flag-sTRIM56 CC21/24AA；Western blot 检测表达的蛋白约 82 kDa，与预期相符。

2.3 sTRIM56 及其 E3 泛素酶活性突变体对 STING 介导的 IFN- β mRNA 的影响

如图 3 所示，各蛋白均正常表达；sTRIM56 显著促进 STING 介导的 IFN- β 的 mRNA 相对表达量 ($P < 0.01$)，而突变体 sTRIM56 CC21/24AA 对 STING 介导的 IFN- β 的 mRNA 相对表达量没有明显影响 ($P > 0.05$)，表明 pXJ41-Flag-sTRIM56 CC21/24AA E3 泛素连接酶活性消失。

2.4 sTRIM56 及其 E3 泛素酶活性突变体对 STING 介导的 IFN- β 启动子的影响

如图 4 所示，各蛋白均正常表达。sTRIM56 显著促进 STING 介导的 IFN- β 启动子的相对表达量 ($P < 0.01$)，而突变体 pXJ41-Flag-sTRIM56 CC21/24AA 对 STING 介导的 IFN- β 启动子的相对表达量没有显著作用 ($P > 0.05$)，表明 pXJ41-Flag-sTRIM56 CC21/24AA E3 泛素连接酶活性消失。

2.5 sTRIM56 及其 E3 泛素酶活性突变体对 STING 多聚泛素化修饰的影响

sTRIM56 促进 STING 的多聚泛素化修饰 (图 5 A)，而 sTRIM56 CC21/24AA 没有显著的促进作用 (图 5 A)，表明 pXJ41-Flag-sTRIM56 CC21/24AA E3 泛素连接酶活性消失。同时，sTRIM56 促进 STING 的 K63 连接的多聚泛素化修饰 (图 5 B)，这与 hTRIM56 促进 STING 多聚泛素化修饰的类型相同。

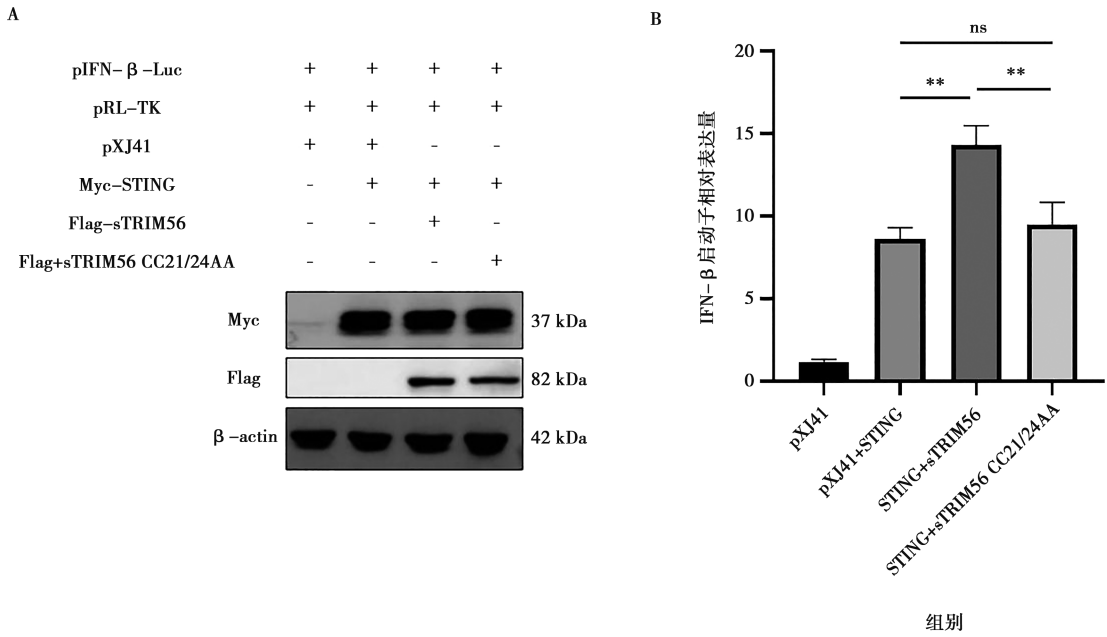


图 4 Western blot 检测各蛋白表达情况 (A)、Luciferase 试验检测 sTRIM56 及其 E3 泛素酶活性突变体对 STING 介导的 IFN-β 启动子相对表达量的影响 (B)

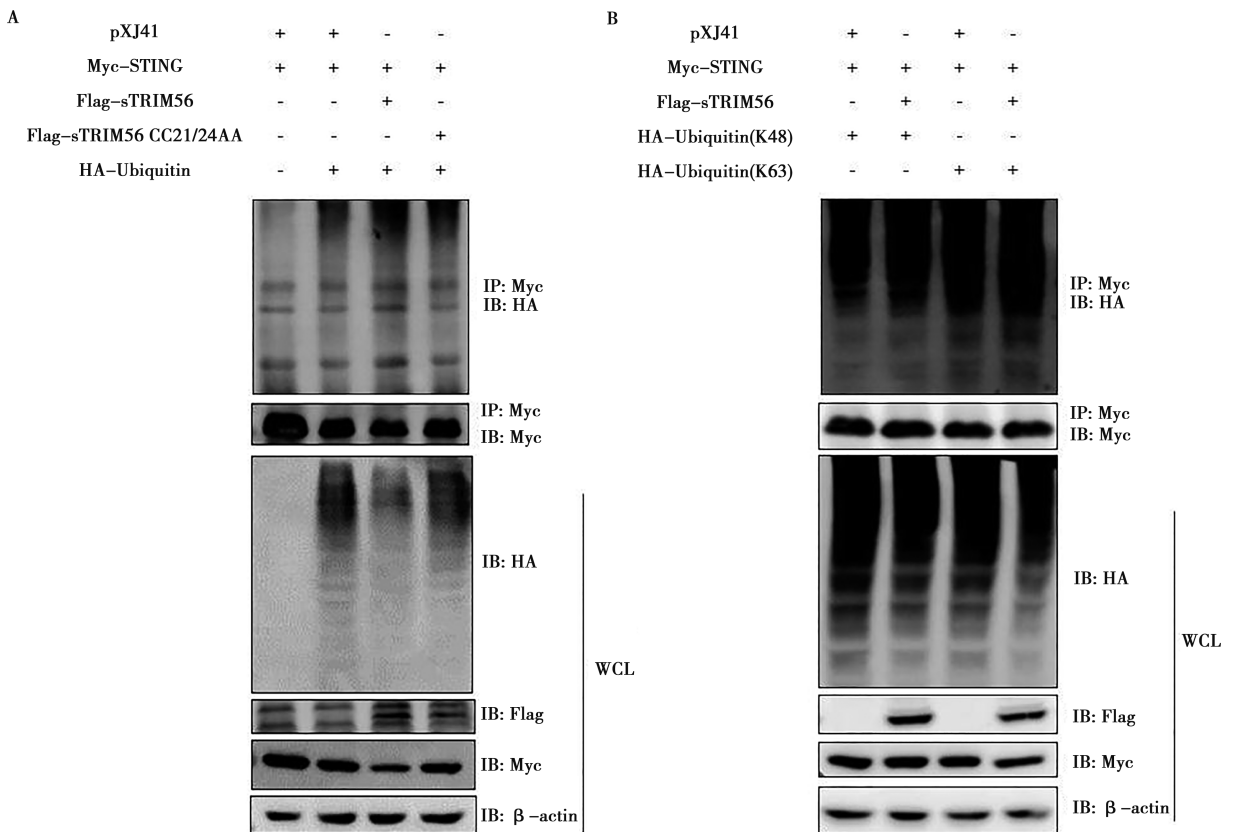


图 5 Co-IP 试验检测 sTRIM56 及其 E3 泛素酶活性突变体对 STING 多聚泛素化修饰的影响 (A)、sTRIM56 促进 STING 多聚泛素化修饰的类型 (B)

3 讨论

近年来,越来越多的 TRIM 蛋白在真核生物中被发现。研究发现生物体内 TRIM 家族蛋白成员总数与生物的进化程度正相关^[13],它们直接或间接参与机体的抗病毒过程、肿瘤的发生发展、细胞的信号转导等。TRIM22 在甲型流感病毒 (IAV) 感染时上调,通过泛素-蛋白酶体途径降解 IAV 的核蛋白 (NP),从而抑制 IAV 的复制^[14];脑心肌炎病毒 (EMCV) 感染时,TRIM65 可以作为 RLR 信号通路中的一个重要组成部分,通过促进黑色素瘤分化相关蛋白 5 (MDA5) 的 K63 连接的多聚泛素化修饰,促进 I 型干扰素的产生,从而抵抗病毒感染^[15]。TRIM24 可以抑制肝癌的发生与发展^[16]。TRIM56 先前被报道可以通过参与调控猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 诱导的 TLR3 天然免疫信号通路抑制 PEDV 的复制^[17];能与猪瘟病毒 (CSFV) 的 N 蛋白存在相互作用负调控 CSFV 的增殖^[18];可以通过促进 cGAS 的单泛素化修饰参与 DNA 病毒诱导的 I 型干扰素通路;可以通过促进转化生长因子激酶 1 (TAK1) 的泛素化修饰正向调控肿瘤坏死因子 α (TNF α) 介导的 NF- κ B 信号通路;依赖其 E3 泛素连接酶功能抵抗瘟病毒以及 1 型单纯疱疹病毒 (HSV-1) 感染等^[4,12,19]。由此可见,TRIM56 作为一种 E3 泛素连接酶,对于机体抗病毒天然免疫发挥着重要作用。先前有研究报道过 hTRIM56 的 E3 连接酶活性位点^[12],但并未有关于 sTRIM56 E3 泛素连接酶活性位点的相关报道。

本研究将 sTRIM56 的第 21、24 位半胱氨酸突变为丙氨酸,成功构建了 sTRIM56 E3 泛素连接酶活性突变体,通过 Luciferase、实时荧光定量 PCR、Co-IP 等试验对突变体质粒进行了功能验证,确定了 sTRIM56 及其 E3 泛素连接酶活性位点在 STING 介导的 I 型干扰素信号通路中的作用,为探究 sTRIM56 在猪的病毒病感染及天然免疫中的作用提供了有效工具。

参考文献:

[1] HUANG N, SUN X, LI P, et al. TRIM family contribute to tumorigenesis, cancer development, and drug resistance [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2022, 11 (1): 75.

[2] ZHAN W, ZHANG S. TRIM proteins in lung cancer: mechanisms, biomarkers and therapeutic targets [J]. *Life Sci*, 2021, 268: 118985.

[3] FU L, ZHOU X, JIAO Q, et al. The functions of TRIM56 in antiviral innate immunity and tumorigenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (5): 5046.

[4] 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.

[5] POUYO R, CHUNG K, DELACROIX L, et al. The ubiquitin-proteasome system in normal hearing and deafness [J]. *Hear Res*, 2022, 426: 108366.

[6] 顾天天. 鸭 TRIM25 泛素化介导 RLR 信号通路调控 IFN- β 的产生 [D]. 扬州: 扬州大学, 2021.

[7] SADLER A J, WILLIAMS B R. Interferon-inducible antiviral effectors [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8 (7): 559-568.

[8] LIU J, ZHANG H, SU Y, et al. Application and prospect of targeting innate immune sensors in the treatment of autoimmune diseases [J]. *Cell Biosci*, 2022, 12 (1): 68.

[9] DECOUT A, KATZ J D, VENKATRAMAN S, et al. The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21 (9): 548-569.

[10] ISHIKAWA H, BARBER G N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling [J]. *Nature*, 2008, 455 (7213): 674-678.

[11] TSUCHIDA T, ZOU J, SAITOH T, et al. The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA [J]. *Immunity*, 2010, 33 (5): 765-776.

[12] WANG J, LIU B, WANG N, et al. TRIM56 is a virus- and interferon-inducible E3 ubiquitin ligase that restricts pestivirus infection [J]. *J Virol*, 2011, 85 (8): 3733-3745.

[13] 杨东亮, 毕冬琳, 杨晓莉, 等. TRIM 家族蛋白在病毒感染中作用的研究进展 [J]. *微生物学报*, 2023, 63 (4): 1356-1364.

[14] 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.

[15] LANG X, TANG T, JIN T, et al. TRIM65-catalyzed ubiquitination is essential for MDA5-mediated antiviral innate immunity [J]. *J Exp Med*, 2017, 214 (2): 459-473.

[16] TISSERAND J, KHETCHOUMIAN K, THIBAUT C, et al. Tripartite motif 24 (Trim24/Tif1 α) tumor suppressor protein is a novel negative regulator of interferon (IFN) γ /signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling pathway acting through retinoic acid receptor α (Rar α) inhibition [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (38): 33369-33379.

[17] 王理想. TRIM56 抑制猪流行性腹泻病毒复制的分子机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.

[18] 张恩瑜, 朱妍, 王竞晗, 等. 宿主 TRIM56 蛋白与猪瘟病毒 N^{pro} 蛋白的相互作用及其对猪瘟病毒复制的影响 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31 (10): 1071-1074.

[19] LIU Y, CHEN Y, DING C, et al. TRIM56 positively regulates TNF α -induced NF- κ B signaling by enhancing the ubiquitination of TAK1 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 219: 571-578.