

王浩楠, 郭梦翰, 张小荣, 等. 兔 TRAF4 基因克隆及其转录特性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (7): 48-54.

WANG H N, GUO M H, ZHANG X R, et al. Cloning and transcription characteristics analysis of rabbit TRAF4 gene [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (7): 48-54.

兔 TRAF4 基因克隆及其转录特性分析

王浩楠¹, 郭梦翰², 张小荣¹, 吴艳涛¹, 郭梦娇^{1*}

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009;

2. 吉林农业大学动物科技学院, 吉林 长春 130000)

摘要: 旨在探究兔肿瘤坏死因子受体相关因子 4 (TRAF4) 的分子特征及转录特性。本研究首次克隆并鉴定了兔 TRAF4 基因, 采用生物信息学的方法对兔 TRAF4 的分子特征和转录特性进行分子结构预测分析; 通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析了兔在感染肠出血性大肠杆菌 (EHEC) 后 TRAF4 基因的转录水平变化, 并利用间接免疫荧光技术确定了 TRAF4 的亚细胞定位。结果: 兔 TRAF4 基因编码区长为 1 422 bp, 编码 483 个氨基酸残基; 通过与系统发育树中其他哺乳动物的氨基酸相似性比对, 发现兔 TRAF4 与其他哺乳动物具有较高的同源性和密切的亲缘关系; 亚细胞定位试验显示, TRAF4 在细胞质和细胞核中均有表达; 在 EHEC 感染后, 脾脏、肾脏和胸腺中 TRAF4 的转录水平整体呈下调趋势, 提示 TRAF4 基因可能通过负反馈机制参与调控感染后的免疫应答。综上, 本研究成功克隆了兔的 TRAF4 基因并进行了生物信息学分析, 阐明了其在细胞中的定位及在细菌感染后的转录水平变化, 为进一步研究兔 TRAF4 在先天免疫中的作用提供了理论基础。

关键词: 兔; TRAF4; 序列分析; 亚细胞定位; 转录特性

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)07-0048-07

Cloning and transcription characteristics analysis of rabbit TRAF4 gene

WANG Haonan¹, GUO Menghan², ZHANG Xiaorong¹, WU Yantao¹, GUO Mengjiao^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130000, China)

Abstract: To investigate the molecular characteristics and transcriptional properties of rabbit tumor necrosis factor receptor associated factor 4 (TRAF4), we first cloned and identified the rabbit TRAF4 gene in this study. Through bioinformatics analysis, the molecular characteristics and transcriptional properties of rabbit TRAF4 were predicted. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was used to analyze the transcriptional changes of the TRAF4 gene in the rabbits infected with enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Furthermore, indirect immunofluorescence was employed to determine the subcellular localization of TRAF4. The results showed that the rabbit TRAF4 gene had a coding region length of 1 422 bp encoding 483 amino acid residues. Comparative analysis of amino acid similarity with other mammals on the phylogenetic tree revealed a high homology and close evolutionary relationship of rabbit TRAF4 with other mammals. Subcellular localization experiments demonstrated TRAF4 expression in both the cytoplasm and nucleus. Following infection with enterohemorrhagic *E. coli*, a down-regulation trend of TRAF4 transcription was observed in the spleen, kidney, and thymus of the rabbits, suggesting that the TRAF4 gene might participate in the immune response regulation through a negative feedback mechanism post-infection. In summary, the rabbit TRAF4 gene was successfully cloned in this study, bioinformatics analysis was conducted, the subcellular localization of the gene and transcription changes post-bacterial infection were elucidated; all of which laid a theoretical foundation for further research on the role of rabbit TRAF4 in innate immunity.

Keywords: rabbit; TRAF4; sequence analysis; subcellular localization; transcriptional characteristics

肿瘤坏死因子受体相关因子 (TRAF) 蛋白是参

与机体先天免疫和适应性免疫的信号分子, 在肿瘤坏死因子受体 (TNFR)、Toll 样受体 (TLR)、白介素-1 受体 (IL-1R) 及 RIG-I 样受体 (RLR) 家族介导的细胞信号传导中起关键作用^[1]。TRAF 蛋白普遍分布于不同动物的不同组织中, 是一种在遗传进化上较为保守的细胞内接头蛋白, 能连接上游细胞表面受体与下游激酶, 促进级联反应并介导信号传导^[2]。

收稿日期: 2024-07-15; 修回日期: 2025-04-24

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFD1800200); 江苏省高校优势学科建设工程项目

第一作者: 王浩楠, 男, 硕士研究生

*通信作者: 郭梦娇, 博士, 副教授, 主要从事病原微生物与宿主免疫研究工作, E-mail: guomj@yzu.edu.cn.

TRAF 蛋白同时还参与胚胎发育、组织稳态、细胞分化、凋亡以及先天性和适应性免疫、氧化应激及骨代谢过程。自 1994 年 Rothe 等^[3]发现 TRAF 蛋白以来,哺乳动物中已经出鉴定了 7 个 TRAF 家族成员 (TRAF1~TRAF7), TRAF 蛋白的保守性较强且结构组成也相似,除 TRAF1 不具有环指结构外,其余 TRAF 蛋白主要由 N 端的一个环指结构和若干个锌指结构^[4], C 端的一个卷曲螺旋结构和一个高度保守的 MATH 结构组成^[5]。这种锌指结构,使得 TRAF 蛋白可以发挥泛素化连接酶的作用。TRAF 蛋白的 N 端和 C 端的对称性不匹配意味着当受体聚集时, RING 二聚体连接 TRAF 三聚体形成网络,从而参与到机体的多种免疫途径。

近年来, TRAF4 在人、鼠以及鱼类中的研究较为深入。人的破骨细胞活性可以被 TRAF6 的小分子抑制剂 TRAF-STOP 有效抑制,从而缓解牙周炎的破骨形成^[6]。TRAF4 是气道中 2 型反应的重要调节因子,然而,其潜在的细胞和分子机制仍不清楚。Xiao 等^[7]制备了 T 细胞特异性 TRAF4 缺陷小鼠,并研究了 TRAF4 在表达白介素-33 (IL-33) 受体的记忆 Th2 细胞 ST2⁺mTh2 中的作用,结果表明,与野生型相比,体外 TRAF4 缺陷 ST2⁺mTh2 细胞表现出 IL-33 诱导的增殖减少;此外,在 IL-33 介导的 2 型气道炎症的临床前模型中, TRAF4 缺陷型小鼠在肺部表现出比野生型小鼠更少的 ST2⁺mTh2 细胞增殖和嗜酸性粒细胞浸润;在 IL-33 刺激的 ST2⁺mTh2 细胞中, TRAF4 是激活 AKT/mTOR 和 ERK1/2 信号通路,以及转录因子 Myc 和营养转运蛋白表达所必需的,这些基因是参与 T 细胞生长和增殖的重要标志基因。该研究揭示了 TRAF4 在 IL-33 介导的 2 型肺部炎症中 ST2⁺mTh2 细胞的作用,为新疗法的开发指出了新的方向。有研究表明, TRAF4 通过与 TRAF6 和 β 干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (TRIF) 的关联,从而在 TLR 介导的信号传导中起沉默作用^[2]。人的 TRAF4 可通过与其他分子的相互作用,调控 JNK、MAPK 和

NF- κ B 等信号通路^[8-9]。以上研究都表明 TRAF4 蛋白在病原微生物感染过程中对细胞信号转导有重要作用,但兔 TRAF4 基因的克隆及相关的研究却鲜有报道。

随着近年来我国兔养殖行业的逐渐壮大,各种病原微生物疾病给兔养殖业带来的经济损失也引起了人们的重视,肠出血性大肠杆菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) 可造成兔的出血性肠炎和溶血性尿毒综合征等疾病^[10-11]。该菌作为人畜共患病的致病菌之一,可通过水源和食源感染人,有一定的公共卫生意义。本研究首次克隆了兔 TRAF4 基因,并运用生物信息学在线分析软件对 TRAF4 蛋白的理化性质、结构域、二级结构及其同源性等进行分析,同时利用荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测了 EHEC 感染后组织中 TRAF4 转录水平的变化。本研究为揭示兔 TRAF 家族成员在抵抗病原微生物感染过程中的免疫应答机制提供了理论依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

新西兰大白兔购自江苏某兔场 (35 日龄,体重为 500 g);兔肾细胞 RK-13,本实验室保存;EHEC MY 菌株,从临床样本中分离并保存于实验室;pEF1 α -3 \times FLAG 表达载体,本实验室保存。

总核糖核酸提取试剂盒,购自北京康为世纪生物科技有限公司;Trans1-T1 感受态细胞,购自北京全式金生物技术有限公司;同源重组试剂盒,购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;限制性内切酶 *Eco*R I、*Xba* I、DNA Marker DL5000,购自 TaKaRa 公司。

1.2 引物设计及合成

参照 NCBI 上的兔 TRAF4 预测序列 (XM_017348951.1) 和兔 GAPDH 基因序列 (NM_001082253.1) 进行引物的设计,详细信息见表 1。

表 1 引物序列信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp	用途
rTRAF4-F	ATGCCCGGCTTCGACTAC	1 422	克隆 TRAF4 基因
rTRAF4-R	CCTCTCCAGAGTCAGCCAAC		
pEF1 α -rTRAF4-3 \times FLAG-F	AGCGCCCTCGAGCGGAAATTCATGCCCGGCTTCGACTACAAG	1 443	同源重组载体构建
pEF1 α -rTRAF4-3 \times FLAG-R	GGCTAGAGCGCGCCCTATCTAGATCAGCTGAGGATCTTCTCGGG		
q-rTRAF4-F	GTCTGCGTTCCTCAATGGC	191	RT-qPCR
q-rTRAF4-R	GGTCAGGGTGAAGTCTCA		

注: pEF1 α -rTRAF4-3 \times FLAG -F/R 引物下划线部分为 *Eco*R I 和 *Xba* I 酶切位点,加粗部分为兔 TRAF4 基因同源序列,其他部分为载体同源部分。

1.3 兔 TRAF4 基因扩增及真核表达载体构建

用 TRIzol 裂解 RK-13 细胞, 然后用超纯 RNA 提取试剂盒提取细胞的总 RNA, 通过反转录试剂盒反转录为 cDNA。以 RK-13 细胞 cDNA 为模版, 以 rTRAF4-F 和 rTRAF4-R 为引物扩增兔 TRAF4 基因。胶回收目的片段后, 以 pEF1 α -rTRAF4-3 \times FLAG-F 和 pEF1 α -rTRAF4-3 \times FLAG-R 为引物进行扩增, 通过同源重组试剂盒构建 TRAF4 真核表达载体 pEF1 α -rTRAF4-3 \times FLAG。

1.4 生物信息学分析

利用 NCBI 的 BLAST 工具查找同源基因序列, 并使用 DNASTAR 软件比对不同物种 TRAF4 基因的相似性。用 MEGA X 软件构建兔的 TRAF4 基因与其他物种的系统进化树。通过 ProtParam 在线软件分析兔 TRAF4 蛋白的理化性质。使用 Signal5.0 在线软件预测兔 TRAF4 蛋白的信号肽。用 NovoPro 在线软件预测兔 TRAF4 蛋白的二级结构, 并通过 SWISS-MODEL 在线软件预测其三级结构。

1.5 兔 TRAF4 蛋白的亚细胞定位

转染前 24 h 将 RK-13 细胞铺至 24 孔板, 待细胞生长密度达到 70%~80% 时转染 pEF1 α -rTRAF4-3 \times FLAG 至细胞, 24 h 后通过间接免疫荧光试验 (IFA) 以及利用激光共聚焦显微镜观察兔 TRAF4 蛋白在细胞中的定位情况。

1.6 兔 TRAF4 在感染 EHEC 后的组织表达分析

将试验动物随机分为试验组与对照组, 对照组腹腔注射 PBS, 试验组注射 10⁸ CFU EHEC。在感染后的前 3 d, 每组随机挑选 5 只大白兔进行安乐死。剖检后取肾脏、脾脏与胸腺。利用 RT-qPCR 检测 TRAF4 基因在兔的各组织中的转录水平及 EHEC 感染后转录水平的变化。

2 结果

2.1 兔 TRAF4 基因的扩增及真核表达载体的构建

以 rTRAF4-F、rTRAF4-R 为特异性引物扩增兔的 TRAF4 基因, 扩增结果符合预期 (图 1A)。将 PCR 产物回收后连接到 pEF1 α -3 \times FLAG 载体上, PCR 鉴定 (图 1B) 后, 挑取阳性克隆并扩增培养, 然后送至上海生工生物测序。序列已上传至 NCBI, 登录号为 PP879187。

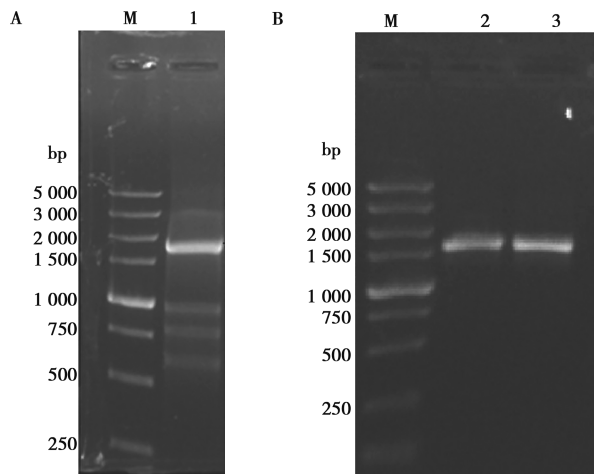


图 1 DL5000 DNA Marker; 1. TRAF4; 2、3. pEF1 α -rTRAF4-3 \times FLAG。

图 1 兔 TRAF4 基因 PCR 扩增 (A) 及 pEF1 α -rTRAF4-3 \times FLAG 载体的 PCR 鉴定 (B)

2.2 兔 TRAF4 基因序列分析

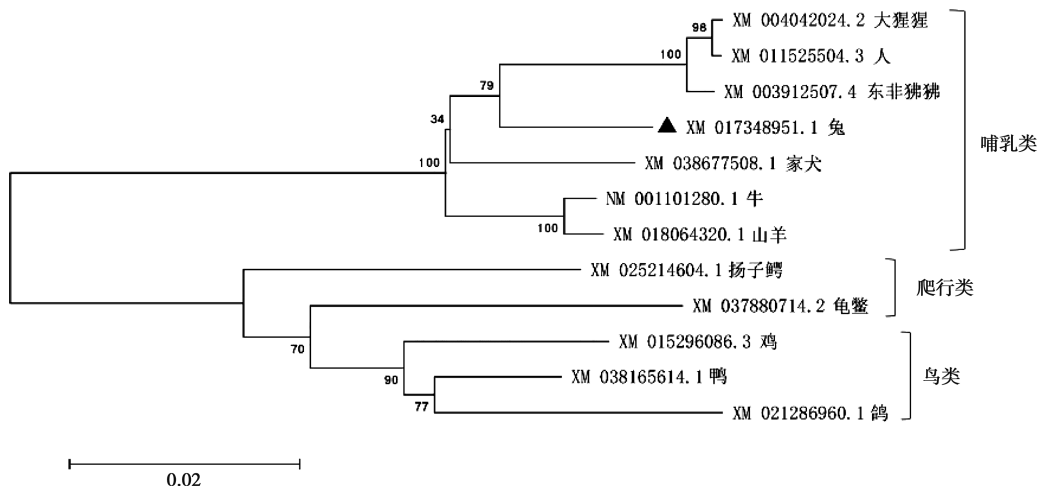
利用 DNASTAR 软件对不同物种的 TRAF4 基因进行相似性比较, 结果发现兔与其他哺乳动物 TRAF4 基因的核苷酸序列相似度在 91.3%~92.6%, 其中与人类和大猩猩的相似度最高, 达到 92.6%, 而与鸟类和爬行动物的相似度在 76.4%~80.9% (图 2)。此外, 通过 Mega X 软件构建了 TRAF4 基因的系统进化树, 结果表明该进化树主要有 3 个分支: 哺乳类、鸟类和爬行类; 兔 TRAF4 位于哺乳类分支, 与大猩猩、人、东非狒狒亲缘关系较近 (图 3)。

2.3 兔 TRAF4 蛋白的理化性质

通过 ProtParam 在线软件分析得知, 兔 TRAF4 蛋白基因编码区长为 1 422 bp, 分子式为 C₂₃₇₄H₃₇₀₀N₆₈₂O₆₇₇S₃₈, 分子大小为 53.84 ku, 包含 473 个氨基酸。TRAF4 蛋白中含有多种氨基酸且比例不同 (表 2), 其中最高的是占比 10.4% 的亮氨酸 (L), 而色氨酸 (W) 含量最低, 仅为 1.1%。负电荷残基 (Asp+Glu) (天冬氨酸+谷氨酸) 的总数为 73, 而带正电荷残基 (Arg+Lys) (精氨酸+赖氨酸) 为 80。理论等电点为 8.54。

		相似性/%													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
变异位点/%	1	■	84.4	77.2	76.6	77.3	83.8	85.6	82.1	74.6	74.7	74.7	76.4	1	XM_025214604.1 扬子鳄
	2	17.5	■	70.5	69.6	70.9	77.1	91.9	90.1	68.3	68.4	68.1	80.9	2	XM_038165614.1 鸭
	3	27.3	37.7	■	90.4	98.0	66.2	77.6	71.3	88.8	86.3	88.9	92.0	3	NM_001101280.1 牛
	4	28.2	39.1	10.4	■	90.3	67.9	77.2	71.9	90.6	90.4	90.1	91.3	4	XM_038677508.1 家犬
	5	27.1	36.9	2.1	10.5	■	68.3	77.5	71.2	89.0	89.0	88.9	91.6	5	XM_018064320.1 山羊
	6	18.3	27.4	45.1	42.0	41.3	■	86.6	78.7	66.1	54.3	66.1	79.7	6	XM_037880714.2 龟鳖
	7	15.9	8.5	26.7	27.3	26.8	14.7	■	89.9	75.4	75.7	75.7	77.8	7	XM_021286960.1 鸽
	8	20.5	10.7	36.3	35.4	36.4	25.1	10.8	■	69.5	69.8	69.4	80.0	8	XM_015296086.3 鸡
	9	31.3	41.4	12.2	10.2	12.0	45.4	30.0	39.3	■	99.1	97.5	92.6	9	XM_004042024.2 大猩猩
	10	31.2	41.3	15.3	10.4	12.0	70.7	29.5	38.9	0.9	■	97.6	92.6	10	XM_011525504.3 人
	11	31.1	41.8	12.2	10.7	12.1	45.5	29.5	39.5	2.5	2.4	■	92.5	11	XM_003912507.4 东非狒狒
	12	28.5	22.2	8.5	9.3	9.0	23.8	26.4	23.4	7.9	7.9	8.0	■	12	XM_017348951.1 兔
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

图2 兔与其他物种 TRAF4 基因相似性分析



注：▲为本研究兔 TRAF4 基因。

图3 TRAF4 基因系统进化树

表2 兔 TRAF4 蛋白氨基酸组成

氨基酸	数量/个	比例/%	氨基酸	数量/个	比例/%
Ala (A)	22	4.7	Leu (L)	49	10.4
Arg (R)	35	7.4	Lys (K)	28	5.9
Asn (N)	12	2.5	Met (M)	8	1.7
Asp (D)	21	4.4	Phe (F)	23	4.9
Cys (C)	30	6.3	Pro (P)	38	8.0
Gln (Q)	23	4.9	Ser (S)	32	6.8
Glu (E)	32	6.8	Thr (T)	16	3.4
Gly (G)	31	6.6	Trp (W)	5	1.1
His (H)	18	3.8	Tyr (Y)	14	3.0
Ile (I)	11	2.3	Val (V)	25	5.3

注：Ala 为丙氨酸，Arg 为精氨酸，Asp 为天冬氨酸，Cys 为半胱氨酸，Gln 为谷氨酰胺，Glu 为谷氨酸，Gly 为甘氨酸，His 为组氨酸，Ile 为异亮氨酸，Leu 为亮氨酸，Lys 为赖氨酸，Met 为甲硫氨酸，Phe 为苯丙氨酸，Pro 为脯氨酸，Ser 为丝氨酸，Thr 为苏氨酸，Trp 为色氨酸，Tyr 为酪氨酸，Val 为缬氨酸，Asn 为天冬酰胺。

2.4 兔 TRAF4 蛋白的信号肽及结构域预测

利用 Signal5.0 信号肽预测软件分析显示，兔 TRAF4 蛋白均不存在信号肽。使用 SMART 在线软件预测扬子鳄、鸡和兔的 TRAF4 结构域，结果显示，扬子鳄 TRAF4 含有 1 个低复杂性结构域、1 个卷螺旋区域和 1 个 MATH 结构域；鸡 TRAF4 包含 3 个低复杂性结构域、1 个环指结构和 1 个 MATH 结构域；兔 TRAF4 包含环指结构 1 个、锌指结构 3 个、卷螺旋区域 1 个以和 1 个 MATH 结构域（图 4）。

2.5 兔 TRAF4 蛋白的二级结构和三级结构预测

通过 NovoPro 在线软件预测兔 TRAF4 蛋白的二级结构，结果表明 TRAF4 由 4 种结构组成，包括 149 个 α -螺旋，75 个延伸链，14 个 β -转角，235 个无规则卷曲（图 5）。通过 SWISS-MODEL 对 TRAF4 蛋

白的三维结构进行预测后发现，该蛋白主要由无规则卷曲和 α -螺旋构成。

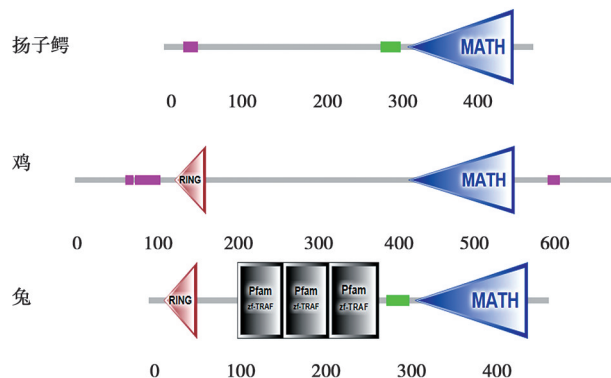


图 4 扬子鳄、鸡、兔 TRAF4 蛋白结构域预测



注：h 表示 α -螺旋，t 表示 β -转角，e 表示延伸链，c 表示无规则卷曲。

图 5 兔 TRAF4 二级结构预测

2.6 兔 TRAF4 的亚细胞定位

将 pEF1 α -rTRAF4-3 \times FLAG 转染至 RK-13 后进

行 IFA，用激光共聚焦显微镜拍照后可观察到兔 TRAF4 蛋白在细胞质和细胞核中均有表达（图 6）。

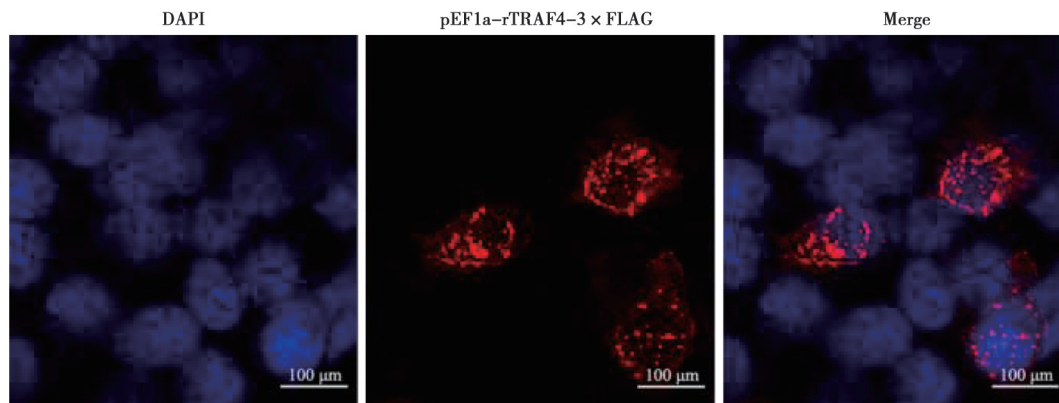
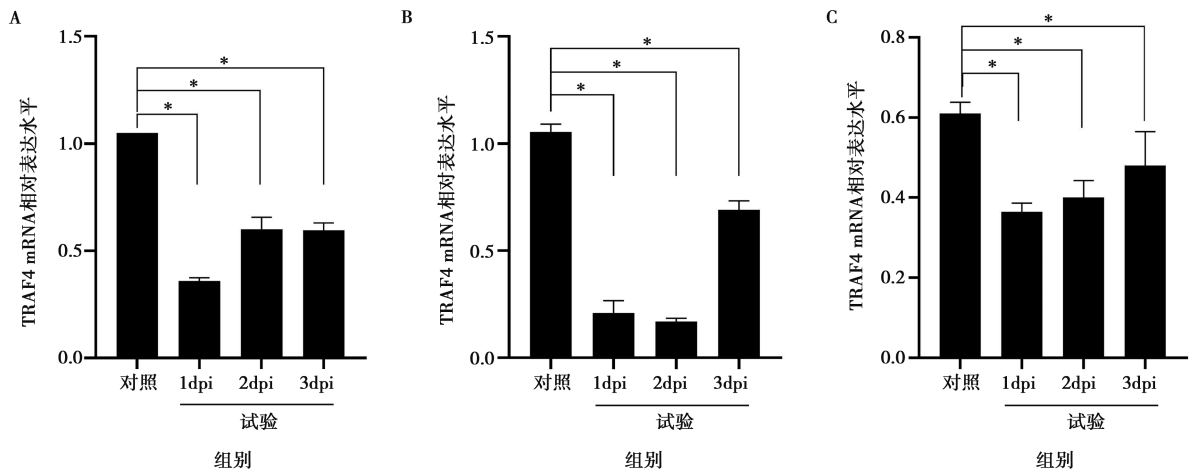


图 6 pEF1 α -rTRAF4-3 \times FLAG 在 RK-13 细胞中的定位

2.7 EHEC 感染兔后 TRAF4 基因的表达

如图 7 所示, EHEC 感染兔后, 在脾脏、肾脏和

胸腺中, TRAF4 的转录水平均显著下调 ($P < 0.05$), 第 3 天逐渐恢复。



注: dpi 表示感染后天数, * 表示 $P < 0.05$ 。

图 7 EHEC 感染兔脾脏 (A)、肾脏 (B) 和胸腺 (C) 中 TRAF4 的转录水平

3 讨论

TRAF 蛋白家族在动物体内广泛分布, 其在不同细胞表面受体 (如 CD27、CD30、CD40 等) 的胞浆区寡聚, 并与这些受体相互作用, 从而介导受体的信号转导, 这一过程激活了多种信号转导通路, 包括 MAPK、NF- κ B 等^[12]。同时, TRAF 蛋白还能通过与效应蛋白形成多蛋白复合物, 从而促进细胞的生存或触发细胞的凋亡。TRAF4 还可以触发机体的炎症反应, 促进癌症的发展等^[13]。TRAF4 的发现最早是由 Regnier^[14] 在人的乳腺癌上皮细胞中发现, 后续研究发现, TRAF4 不仅仅在乳腺癌细胞中高表达, 在肺癌、结肠癌、子宫癌等癌细胞中也有着较高的表达水平, 且这种现象只存在于癌细胞中^[15]。TRAF4 尽管在三级结构方面与其他 TRAF 蛋白有较高的同源性, 但是在功能上与其他 TRAF 蛋白还是有很大差别, TRAF4 不仅参与调控炎症反应, 还可以调节胚胎及中枢神经系统发育等^[16]。本研究成功扩增且克隆了兔的 TRAF4 基因, 同源性分析及遗传进化树构建的结果表明, 兔 TRAF4 和哺乳动物的亲缘性及基因相似性较高, 说明兔 TRAF4 蛋白在哺乳动物中具有遗传保守性。IFA 结果表明, TRAF4 以点状聚集分布为主, 在细胞核与细胞质中均有分布。对兔 TRAF4 蛋白的结构域预测显示其 N 端含有环指结构和多个锌指结构, 而 C 端包括卷曲螺旋区域和 MATH 结构域。这些结构对于 TRAF 蛋白介导受体信号转导和调节细胞反应至关重要, 例如 N 端结构可以传递信号以激

活 NF- κ B, 环指结构具有 E3 泛素连接酶活性, C 端结构可与各种受体相互作用等^[17]。

许多研究表明 TRAF4 在人类癌症中表达上调, 然而, 其在癌症中的作用, 特别是炎症诱导的癌症中的作用仍然未知^[18]。据报道, TRAF4 参与到了 TRAF4-AKT/NF- κ B-Glut1/HK2/RSK4/Slug 通路当中, 这些通路在肿瘤上皮-间质转化 (EMT) 过程以及癌细胞的迁移、侵袭、转移和干细胞样特性维持中起重要作用^[19]。在肺癌细胞中, TRAF4 还可以通过泛素化激活 AKT, 是预防和治疗肺癌的候选分子靶点, 这表明 TRAF4 的调节可能是一种很有前途的癌症治疗策略^[20]。有研究指出, TRAF4 是一种特定的 E3 连接酶, 可将 LAMTOR1 的 K151 靶向为 Lys63-连接的多泛素化, 而 LAMTOR1 的泛素化调节了 Ragulator 和 Rag GTPases 之间的相互作用, 并增强了 Ragulator 对 RagC/D 的鸟苷酸交换因子 (GEF) 活性, 从而促进 mTORC1 的激活并影响基于炎症的结直肠癌 (CRC) 的发展^[21]。

研究发现, 罗非鱼感染无乳链球菌后, 鱼鳃和血液中的 TRAF4 表达量呈先降后升再降趋势, 72 h 后才会到达峰值; 而 TRAF4 在肾脏中的表达趋势和在肠道组织中相同, 整体呈现下降和上升的交替波动^[22]。当黄颡鱼感染鲑爱德华菌后, 脾脏中 TRAF4 的表达量在 6、24、48 和 96 h 显著下调, 头肾中 TRAF4 的表达量在细菌感染后所有检测时间均显著下调^[23]。本研究结果表明, 兔在感染 EHEC 后, 脾脏、肾脏和胸腺中 TRAF4 的转录水平显著下调, 整

体呈先下降后上升的趋势,说明 TRAF4 蛋白的表达变化具有物种差异性。这些结果有助于更好地理解 EHEC 感染对兔免疫系统的影响,为进一步研究 EHEC 感染的免疫机制提供重要参考。

参考文献:

- [1] BRADLEY J R, POBER J S. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (44): 6482-6491.
- [2] TAKESHITA F, ISHII K J, KOBIYAMA K, et al. TRAF4 acts as a silencer in TLR-mediated signaling through the association with TRAF6 and TRIF [J]. *European Journal of Immunology*, 2005, 35 (8): 2477-2485.
- [3] ROTHE M, WONG S C, HENZEL W J, et al. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor [J]. *Cell*, 1994, 78 (4): 681-692.
- [4] XIE P. TRAF molecules in cell signaling and in human diseases [J]. *Journal of Molecular Signaling*, 2013, 8 (1): 7.
- [5] LALANI A I, ZHU S, GOKHALE S, et al. TRAF molecules in inflammation and inflammatory diseases [J]. *Current Pharmacology Reports*, 2018, 4 (1): 64-90.
- [6] AARTS S A B M, SEIJKENS T T P, KUSTERS P J H, et al. Inhibition of CD40-TRAF6 interactions by the small molecule inhibitor 6877002 reduces neuroinflammation [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2017, 14 (1): 105.
- [7] XIAO J X, CHEN X, LIU W W, et al. TRAF4 is crucial for ST2⁺ memory Th2 cell expansion in IL-33-driven airway inflammation [J]. *JCI Insight*, 2023, 8 (18): e169736.
- [8] KEDINGER V, RIO M C. TRAF4, the unique family member [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2007, 597: 60-71.
- [9] ROUSSEAU A, RIO M C, ALPY F. TRAF4, at the crossroad between morphogenesis and cancer [J]. *Cancers*, 2011, 3 (2): 2734-2749.
- [10] O'BRIEN A D, MELTON A R, SCHMITT C K, et al. Profile of *Escherichia coli* O157: H7 pathogen responsible for hamburger-borne outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in Washington [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31 (10): 2799-2801.
- [11] GARCÍA A, FOX J G. The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli* [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2003, 9 (12): 1592-1597.
- [12] SONG Z, JIN R, YU S, et al. CD40 is essential in the upregulation of TRAF proteins and NF- κ B-dependent proinflammatory gene expression after arterial injury [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (8): e23239.
- [13] ZHANG F, LUO B H, WU Q H, et al. LncRNA HCG18 upregulates TRAF4/TRAF5 to facilitate proliferation, migration and EMT of epithelial ovarian cancer by targeting miR-29a/b [J]. *Molecular Medicine*, 2022, 28 (1): 2.
- [14] RÉGNIER C H, TOMASETTO C, MOOG-LUTZ C, et al. Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (43): 25715-25721.
- [15] 郝苗苗. TRAF4 通过抑制纺锤体装配相关蛋白 Eg5 的泛素化抑制乳腺癌凋亡、促进乳腺癌增殖 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2021.
- [16] RÉGNIER C H, MASSON R, KEDINGER V, et al. Impaired neural tube closure, axial skeleton malformations, and tracheal ring disruption in TRAF4-deficient mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99 (8): 5585-5590.
- [17] SINGH R, MENG H, SHEN T, et al. TRAF4-mediated nonproteolytic ubiquitination of androgen receptor promotes castration-resistant prostate cancer [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120 (20): e2218229120.
- [18] CAMILLERI-BROËT S, CREMER I, MARMEY B, et al. TRAF4 overexpression is a common characteristic of human carcinomas [J]. *Oncogene*, 2007, 26 (1): 142-147.
- [19] SHARMA S, PAVLASOVA G M, SEDA V, et al. miR-29 modulates CD40 signaling in chronic lymphocytic leukemia by targeting TRAF4: an axis affected by BCR inhibitors [J]. *Blood*, 2021, 137 (18): 2481-2494.
- [20] KIM E, KIM W, LEE S, et al. TRAF4 promotes lung cancer aggressiveness by modulating tumor microenvironment in normal fibroblasts [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 8923.
- [21] ZHAO L, GAO N, PENG X, et al. TRAF4-mediated LAMTOR1 ubiquitination promotes mTORC1 activation and inhibits the inflammation-induced colorectal cancer progression [J]. *Advanced Science*, 2024, 11 (12): e2301164.
- [22] 韩雪晴, 高风英, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼 TRAF4 基因的克隆、表达及功能分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27 (3): 381-392.
- [23] 尤沈丽. 黄颡鱼 TRAF 基因家族分子特征和表达分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2024.