

DOI: 10.12264/JFSC2020-0072

鳊 SIRT3 蛋白在传染性脾肾坏死病毒感染中的作用

李科瑾^{1,2}, 付小哲², 林强², 刘礼辉², 牛银杰², 梁红茹², 罗霞², 李宁求²

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部渔用药物创制重点实验室, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380

摘要: 沉默交配型信息调节因子 2 同源蛋白 3 (silent mating type information regulation 2 homolog 3, SIRT3) 是一种去乙酰化酶, 可调节线粒体氧化代谢。为探讨鳊(*Siniperca chuatsi*) SIRT3 在传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)感染中的作用, 本研究克隆分析了鳊 SIRT3 基因, 采用 qRT-PCR 和 western blotting 方法检测了病毒感染后 SIRT3 基因的表达, 并探讨了 SIRT3 对细胞代谢酶基因的表达和病毒增殖的影响。结果显示, 鳊 SIRT3 基因的开放阅读框全长 1350 bp, 编码 449 个氨基酸, 在鳊各组织均表达, 其中后肾中表达量最高, 脾脏中表达量较低; ISKNV 感染鳊脑细胞系和鱼体后, SIRT3 表达量均显著升高; 使用 SIRT3 抑制剂 3-TYP (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 siRNA 处理细胞后, 谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS)和谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)的表达量以及 ISKNV 产量均显著降低; 使用 SIRT3 激动剂 honokiol (7 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞后, 代谢酶表达量和 ISKNV 产量均显著升高。结果表明, ISKNV 感染可通过 SIRT3 诱导宿主细胞谷氨酰胺代谢重编程, 进而促进自身增殖。

关键词: 鳊; 沉默交配型信息调节因子 2 同源蛋白 3 (SIRT3); 传染性脾肾坏死病毒(ISKNV); 谷氨酰胺代谢

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)05-0550-11

鳊(*Siniperca chuatsi*)是我国淡水鱼养殖的重要品种。近年来, 由于养殖模式和自然环境等不利因素的影响, 鳊病害频发, 其中传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)是引起鳊发病的主要病原之一, 可造成养殖鳊暴发性死亡^[1]。ISKNV 在感染后上调宿主细胞中谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS)和谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)介导的谷氨酰胺代谢, 以满足自身增殖对生物大分子和能量的需求^[2-3]。阐明 ISKNV 调控代谢的分子机制可为该病的防控提供新的抗病毒靶标。

沉默交配型信息调节因子 2 同源蛋白 3 (silent mating type information regulation 2 homolog 3, SIRT3)是 Sirtuins 家族中的一种 NAD⁺依赖性去乙酰

化酶, 通过去乙酰化作用调节线粒体能量代谢^[4-5]。Egnatchik 等^[6]检测到人肺动脉高压患者体内 SIRT3 活性丧失, 导致肺内皮细胞异常吸收和消耗谷氨酰胺; Choi 等^[7]发现 SIRT3 通过激活谷氨酰胺氧化代谢途径的 GDH, 促进人肾癌细胞增殖; Zou 等^[8]报道 SIRT3 可增强谷氨酰胺还原性代谢, 进而促进人乳腺癌细胞生长。病毒感染细胞的代谢状态与癌细胞代谢状态具有相似之处^[9-10], 提示 SIRT3 可能参与病毒感染细胞中的谷氨酰胺代谢调控。人类去乙酰化酶 Sirtuins 家族是进化上保守的抗病毒因子, 其中 SIRT3 调控人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCV)、腺病毒(adenovirus, ADV)和甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)等多种 DNA 和 RNA 病毒在宿主细胞中的复

收稿日期: 2020-12-23; 修订日期: 2021-01-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872589, U1701233); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020XT0402); 广东省现代农业产业技术创新团队专项基金项目(2019KJ140, 2019KJ141).

作者简介: 李科瑾(1996-), 女, 硕士研究生, 从事水生动物医学研究. E-mail: erica_likejin@163.com

通信作者: 李宁求, 研究员, 从事水产动物病害研究. E-mail: liningq@126.com

制增殖^[11]。在乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染期间, 人类 SIRT3 通过抵抗氧化应激, 参与 HBV 的复制增殖^[12]。而徐红艳等^[13]发现 SIRT3 激动剂 honokiol (HKL)具有抗 HBV 活性。HKL 是从木兰中提取的一种多酚类化合物, 可直接上调 *SIRT3* 基因的表达^[14-15]。除 HKL 外, 3-TYP 作为 SIRT3 的选择性抑制剂, 也常用于线粒体功能研究中^[15-16]。随着对 SIRT3 的深入研究, 斑马鱼(*Danio rerio*)^[17]和金头鲷(*Sparus aurata*)^[18]两种鱼类生物 SIRT3 的组织差异表达和线粒体代谢调控功能已被报道。然而, 目前尚无鱼类 SIRT3 调控病毒诱导的谷氨酰胺代谢重编程的报道。

为揭示鳊 SIRT3 在 ISKNV 感染中的作用, 本研究首先分析鳊 SIRT3 的结构和功能, 并根据 ISKNV 感染鳊后体内、外 *SIRT3* 基因的时序性表达模式, 分别研究激活、抑制和敲降 SIRT3 条件下谷氨酰胺代谢酶基因表达及 ISKNV 增殖的变化, 研究结果将为抗病毒研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

实验鳊体长(6±1) cm, 购自广东省荔湾水产

市场; 鳊脑细胞系(Chinese perch brain cells, CPB)和 ISKNV 毒株均由本实验室保存; 2×Taq Mix、T4 DNA 连接酶、pMD18-T 载体和 *E.coli* DH5a 感受态细胞购于 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司; L-15 培养基、胰酶、血清和 PBS 液购自 Gibco 公司; SIRT3 激动剂和抑制剂购于 MedChemExpress 公司; siRNA 和引物由广东艾基生物有限公司合成; FuGENE®6 转染试剂购自 Promega 公司; 病毒基因组提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; Trizol 购于广州化学试剂厂; 5×All-In-one RT Master Mix 购自 Abm 公司; SYBR Green Pro Taq HS 预混试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; 12%蛋白预制胶购于 Life 公司; 兔抗 SIRT3 (10099-1-AP)、GLS (12855-1-AP)、GDH (14299-1-AP)和鼠抗 β -actin (66009-1- Ig)购于 Proteintech 公司。

1.2 方法

1.2.1 *SIRT3* 基因克隆 用 Trizol 提取 CPB 细胞总 RNA, 用 5×All-In-One RT Master Mix Kit 反转 RNA 为 cDNA。根据鳊转录组中 *SIRT3* 序列, 设计引物 *SIRT3*-F 和 *SIRT3*-R (表 1)。采用 PCR 扩增鳊 *SIRT3* 基因, 反应体系为: cDNA 2 μ L,

表 1 本研究使用的引物和 siRNA
Tab. 1 Primers and siRNA used in this study

名称 name	应用 application	序列(5'-3') sequence (5'-3')
<i>SIRT3</i> -F	<i>SIRT3</i> 的克隆 cloning of <i>SIRT3</i>	ATGAACAGGTCCAGGTCCAGCTGGG
<i>SIRT3</i> -R		TCAGTTGCTCAGGCTGGATGATGCAG
siRNA- <i>SIRT3</i> (S)	<i>SIRT3</i> 的敲降 knockdown of <i>SIRT3</i>	CCCAAAGCAGACCUGCUAAAdTdT
siRNA- <i>SIRT3</i> (AS)		UUAGCAGGUCUGCUUUGGdTdT
scrambled siRNA (S)	阴性对照 negative control	UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT
scrambled siRNA (AS)		ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT
ISKNV- ORF007-F	荧光定量 PCR qPCR	CGAGGCCACATCCAACATC
ISKNV-ORF007-R		CGCCTTTAACGTGGGATATATTG
ISKNV-ORF007-Probe		CACCAAAGTGACCGCGGACTCGT
q-18S-F		CATTCGTATTGTGCCGCTAGA
q-18S-R		CAAATGCTTTTCGCTTTGGTC
q- <i>SIRT3</i> -F		AGCCACCGACCCAACTACATAC
q- <i>SIRT3</i> -R		GTGTAGCACAGGTGACAGGAAGC
q- <i>GLS</i> -F		TCCTGCGGCATGTACGACTTCT
q- <i>GLS</i> -R		CCAGCTTGTCAGTGGAGGTGA
q- <i>GDH</i> -F		AGGTCCGTCATATGCCGATGC
q- <i>GDH</i> -R		AGATCCTCCACCAGCTTGTCCTC

SIRT3-F 和 *SIRT3*-R (10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL , 2 $\times$ Taq Mix 25 μL , ddH₂O 19 μL 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 产物进行切胶回收。将回收片段克隆至 pMD18-T 载体, 取阳性克隆进行测序。

1.2.2 序列分析 用 NCBI 的 Protein blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 确定保守区; 用 SMART (<http://smart.embl.de/>)预测结构域及其功能; 用 DNAMAN 8.0 比对氨基酸序列; 用 SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)进行三级结构建模; 用 MEGA 7.0 中的 Neighbor-Joining 算法构建进化树。

1.2.3 鳊 *SIRT3* 基因的表达分析 选取 10 尾鳊, 提取其头肾、中肾、后肾、胃、脾脏、肝脏、鳃、心脏、脑、肌肉和外周血共 11 个组织的 RNA, 反转成 cDNA 后用 qPCR 法检测 *SIRT3* 表达情况。每组选取 10 尾鳊, 感染组鳊进行腹腔注射, 剂量为 100 μL ISKNV (1×10^5 TCID₅₀/mL), 对照组鳊注射 100 μL 0.75% (*W/V*)生理盐水, 注射后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 检测脾脏中 *SIRT3* 表达情况。取单层 CPB 细胞接 ISKNV 病毒液(MOI=1), 感染后不同时间点用 qRT-PCR 法和 western blotting 检测 CPB 细胞中 *SIRT3* 表达情况。每个时间点设 3 个重复。

1.2.4 *SIRT3* 基因表达干扰实验 用 CCK-8 法确定 HKL 和 3-TYP 的安全浓度。CPB 细胞孵育药物后 1 h 感染 ISKNV, 感染后 72 h 用 qRT-PCR 法和 western blotting 检测 GLS 和 GDH 的表达情况。CPB 细胞转染 siRNA-*SIRT3* 和 scrambled siRNA (表 1), 转染后 72 h 检测 *SIRT3* 表达情况。细胞转染后 24 h 感染 ISKNV, 感染后 48 h 用 qPCR 法^[19]检测 ISKNV 基因组拷贝数; 感染后 72 h 收集上清,

测定 TCID₅₀; 感染后 72 h 用 qRT-PCR 法和 western blotting 检测 GLS 和 GDH 表达情况。

1.2.5 基因表达分析 用 qRT-PCR 法检测 *SIRT3*、*GLS* 和 *GDH* mRNA 表达量。以 18S rRNA 为内参, 用 SYBR Green Pro Taq HS 检测 mRNA 表达量。反应体系为: 2 $\times$ SYBR Premix 10 μL , cDNA 1 μL , 正、反引物 0.4 μL , ROX Reference Dye (4 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , ddH₂O 7.8 μL 。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。每个样品设 3 次重复。用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 mRNA 相对表达量。引物见表 1。

1.2.6 蛋白免疫印迹分析 用 Western Blotting 检测 *SIRT3*、GLS 和 GDH 蛋白表达量。提取的蛋白样品, 经 SDS-PAGE 分离, 转移至 PVDF 膜, 孵育一抗(兔抗 *SIRT3*、GLS、GDH 和鼠抗 β -actin) 2 h, 孵育二抗 2 h, 进行显色。

1.2.7 统计分析 数据来源于 3 个重复实验, 以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm\text{SD}$)表示。用 GraphPad Prime 6 绘图。用 SPSS 21.0 软件分析数据差异和显著性。差异显著用 $P<0.05$ 表示, 差异极显著用 $P<0.01$ 表示。

2 结果与分析

2.1 鳊 *SIRT3* 序列分析

鳊 *SIRT3* 基因的开放阅读框全长 1350 bp, 编码 449 个氨基酸, 其保守区(127~367 aa)具有 SIR2 超家族结构域, 包括 15 个 NAD⁺结合位点、11 个底物结合位点和 4 个锌结合位点(图 1)。SMART 分析该蛋白保守区具有植物同源结构域(plant homeodomain, PHD)和锌指相关结构域(zinc finger associated domain, ZAD)。DNAMAN 比对 *SIRT3* 氨基酸序列, 鳊与大黄鱼、黄金鲈和橙胸

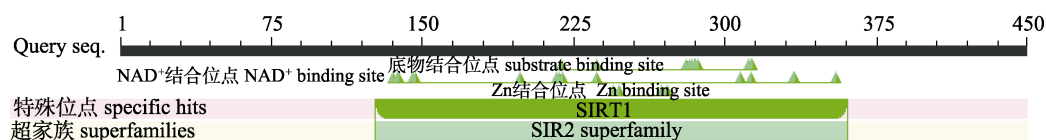


图 1 鳊 *SIRT3* 的保守结构域

Query seq.: 鳊 *SIRT3* 氨基酸序列

Fig. 1 Conserved domains of *Siniperca chuatsi* *SIRT3*
Query seq.: amino acid sequences of *Siniperca chuatsi* *SIRT3*.

鳊相比, C 端至 N 端序列同源性均较高, 分别为 87.42%、87.63% 和 85.71%, 与斑马鱼、条纹鲈、人、家兔和小鼠相比, 保守区同源性较高(图 2)。SWISS MODEL 预测鳊 SIRT3 与人 SIRT3 的三级结构非常相似, 其中 α -螺旋和无规卷曲占比大, 是主要构成部分(图 3)。MEGA 构建 SIRT3 系统进化树, 鱼类中条纹鲈和斑马鱼聚为一支, 鳊与其他鱼类聚为一支, 鳊 SIRT3 与黄金鲈亲缘关系最近(图 4)。

2.2 鳊 SIRT3 基因的表达分析

结果显示, SIRT3 mRNA 在鳊各组织均表达, 其在后肾的表达量最高, 其次是鳃。在头肾、心脏、中肾、脑、脾脏、肝脏、肌肉、胃和血细胞中表达量较低(图 5A)。ISKNV 感染鳊后, 脾脏中 SIRT3 mRNA 表达量在 3~12 h 显著升高, 在 24 h 显著降低, 在 48~72 h 再次升高, 在 96 h 降低(图 5B)。ISKNV 体外感染 CPB 细胞后, SIRT3 mRNA 和蛋白的表达量均在 6~12 h 和 48~72 h 显著升高,

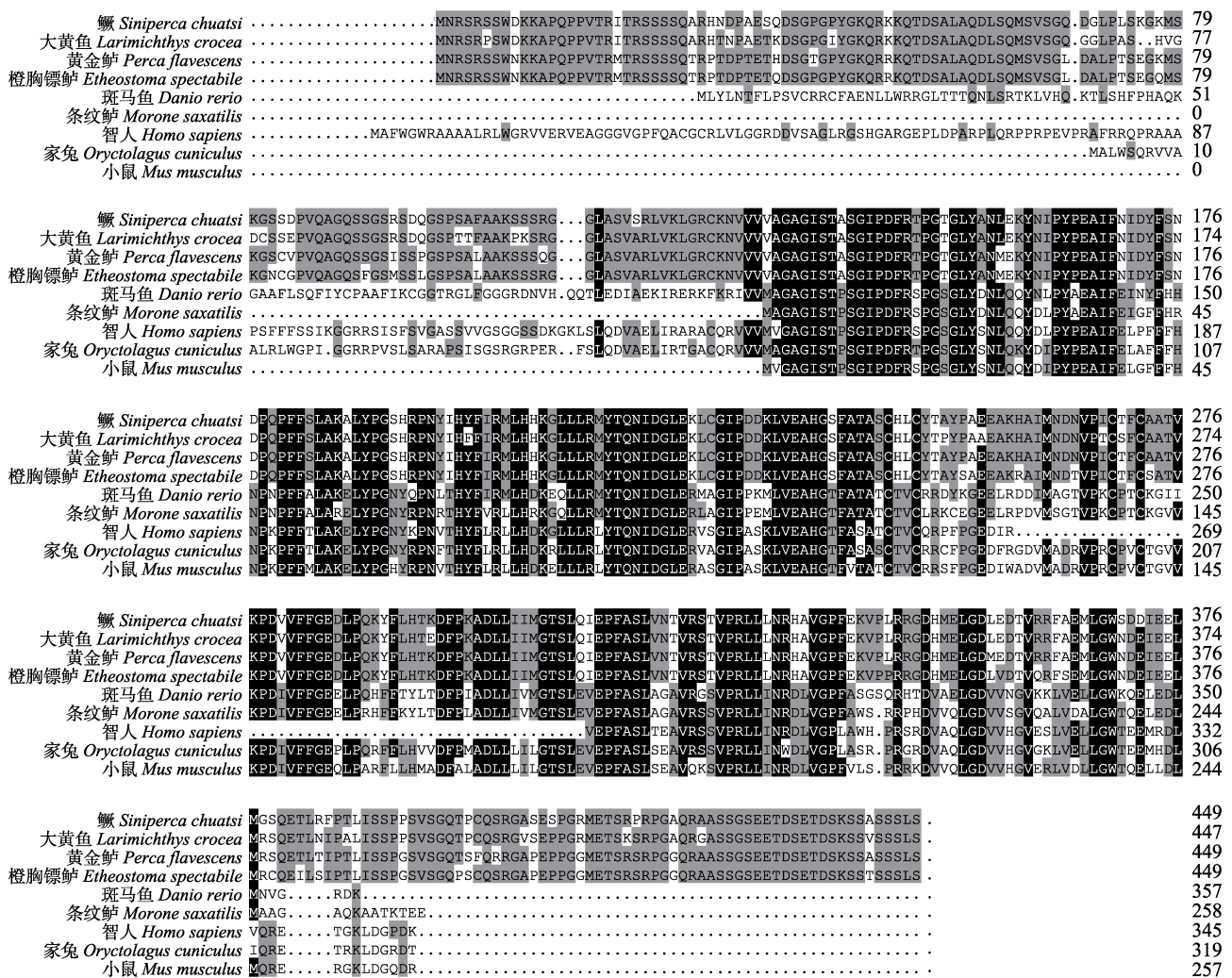
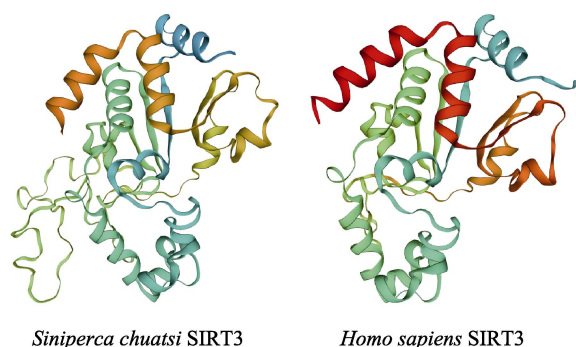


图 2 SIRT3 氨基酸序列比对

使用 DNAMAN 比对 SIRT3 氨基酸序列; 完全保守的序列以黑色背景显示; 高度保守的序列以灰色背景显示。大黄鱼(XP_019129197), 黄金鲈(XP_028441325.1), 橙胸鲈(XP_032378453.1), 条纹鲈(XP_035507583.1), 斑马鱼(NP_001073643.1), 智人(NP_001357243.1), 家兔(ACJ170656.1), 小鼠(CAJ18608.1)。

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of SIRT3

Amino acid sequences of SIRT3 were aligned by DNAMAN; completely conserved sequences and highly conserved sequences were shaded in black and gray, respectively. *Larimichthys crocea* (XP_019129197), *Perca flavescens* (XP_028441325.1), *Etheostoma spectabile* (XP_032378453.1), *Morone saxatilis* (XP_035507583.1), *Danio rerio* (NP_001073643.1), *Homo sapiens* (NP_001357243.1), *Oryctolagus cuniculus* (ACJ170656.1), *Mus musculus* (CAJ18608.1)。



Siniperca chuatsi SIRT3

Homo sapiens SIRT3

图 3 鳊 SIRT3 与人 SIRT3 的三级结构

Fig. 3 Tertiary structure of *Siniperca chuatsi* SIRT3 and *Homo sapiens* SIRT3

在 24 h 显著降低, 此与脾脏中的表达变化趋势相同(图 5C 和 5D)。

2.3 调控 SIRT3 对 ISKNV 诱导的谷氨酰胺代谢的影响

在培养基中添加不同浓度的药物, 结果显示添加 7 $\mu\text{mol/L}$ HKL (SIRT3 激动剂)和 10 $\mu\text{mol/L}$ 3-TYP (SIRT3 抑制剂), 72 h 内细胞活力均为 80% (图 6A 和 6B)。进一步检测 HKL、3-TYP 和 siRNA-SIRT3 (siS3)对 SIRT3 表达的影响, 结果显

示 SIRT3 蛋白表达量在 7 $\mu\text{mol/L}$ HKL 处理组中增加, 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 3-TYP 处理中无显著变化, 在 siS3 转染组中减少(图 6C)。因此, 将 7 $\mu\text{mol/L}$ HKL、10 $\mu\text{mol/L}$ 3-TYP 和 siS3 用于后续研究。qRT-PCR 结果显示, ISKNV 感染期间, 培养基中添加 7 $\mu\text{mol/L}$ HKL, *GLS* 和 *GDH* mRNA 表达显著上调(图 6D); 添加 10 $\mu\text{mol/L}$ 3-TYP, *GDH* mRNA 表达显著下调, 而 *GLS* mRNA 表达无显著变化(图 6E); siS3 转染组中, *GLS* 和 *GDH* mRNA 表达显著下调(图 6F)。Western blotting 结果显示, 添加 7 $\mu\text{mol/L}$ HKL, 感染细胞和未感染细胞中 *GLS* 和 *GDH* 表达显著上调(图 6G); 添加 10 $\mu\text{mol/L}$ 3-TYP, 感染细胞中 *GLS* 和 *GDH* 表达显著下调, 未感染细胞中仅 *GDH* 表达显著下调(图 6H); siS3 转染组中, 感染细胞和未感染细胞中 *GLS* 和 *GDH* 表达均显著下调(图 6I)。综上, SIRT3 促进谷氨酰胺代谢途径 *GLS* 和 *GDH* 的表达。

2.4 调控 SIRT3 对 ISKNV 复制增殖的影响

qPCR 结果显示, 7 $\mu\text{mol/L}$ HKL 处理组中 ISKNV 基因组拷贝数显著升高(图 7A), 10 $\mu\text{mol/L}$

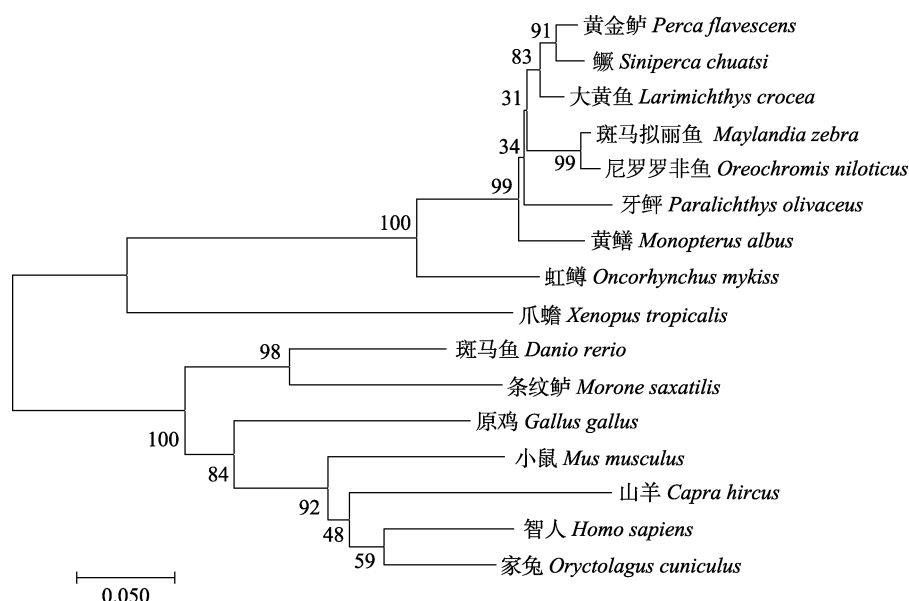


图 4 基于 SIRT3 氨基酸序列比对结果构建的系统进化树

斑马拟丽鱼(XP_004553451.1), 尼罗罗非鱼(XP_005470975.1), 牙鲈(XP_019934238.1), 黄鳝(XP_020467789.1), 虹鳉(XP_021429870.2), 爪蟾(CAL49353.1), 原鸡(NP_001186422.1), 山羊(AWG96534.1).

Fig. 4 Phylogenetic tree based on alignment of amino acid sequences of SIRT3
Maylandia zebra (XP_004553451.1), *Oreochromis niloticus* (XP_005470975.1), *Paralichthys olivaceus* (XP_019934238.1), *Monopterus albus* (XP_020467789.1), *Oncorhynchus mykiss* (XP_021429870.2), *Xenopus tropicalis* (CAL49353.1), *Gallus gallus* (NP_001186422.1), *Capra hircus* (AWG96534.1).

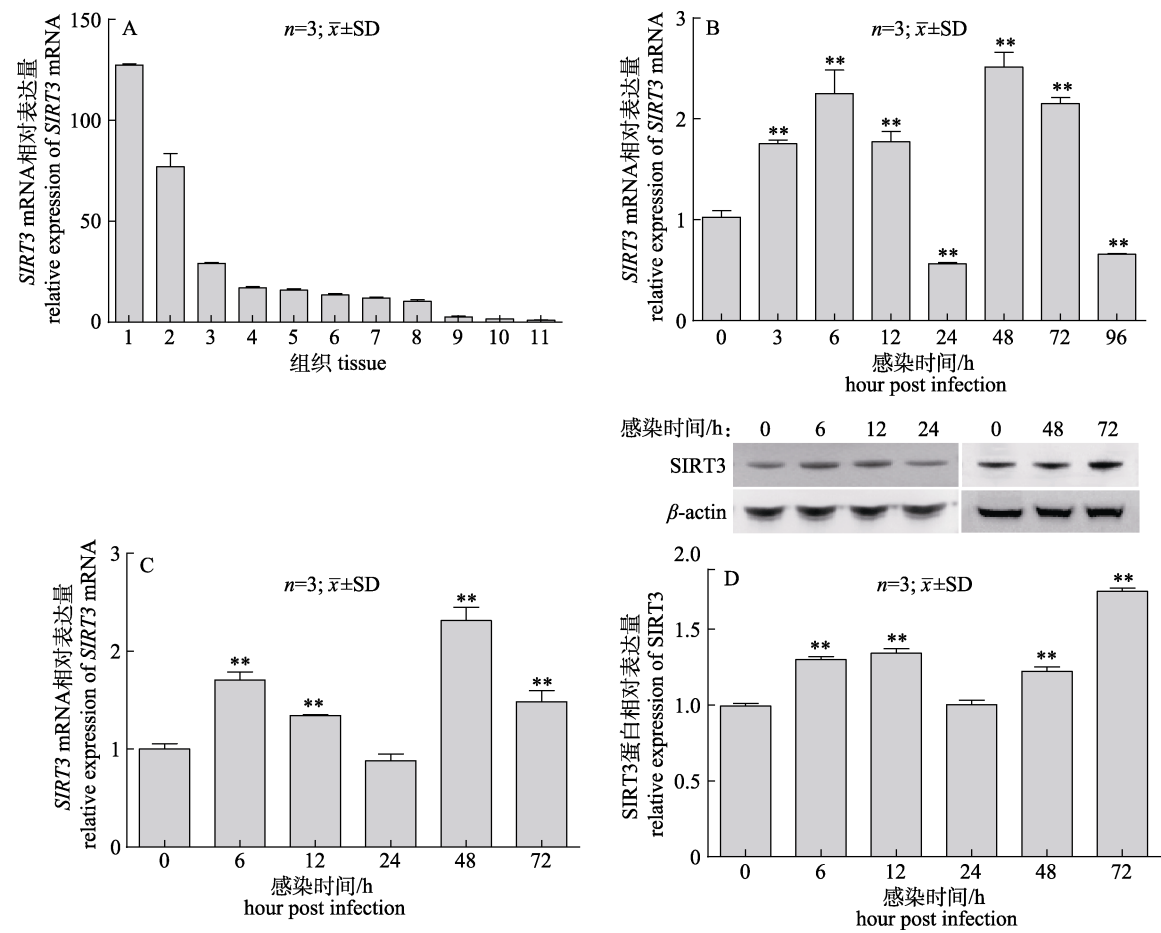


图 5 鳊 SIRT3 基因的表达分析

A. SIRT3 mRNA 在鳊不同组织表达分布; 1: 后肾; 2: 鳃; 3: 头肾; 4: 心脏; 5: 中肾; 6: 脑; 7: 脾脏; 8: 肝脏; 9: 肌肉; 10: 胃; 11: 血细胞; B. ISKNV 感染鳊后 SIRT3 mRNA 在脾脏中的表达; C. ISKNV 感染 CPB 细胞后 SIRT3 mRNA 的表达; D. ISKNV 感染 CPB 细胞后 SIRT3 蛋白的表达; *表示与 0 h 相比差异显著($P<0.05$); **表示与 0 h 相比差异极显著($P<0.01$).

Fig. 5 Expression analysis of *Siniperca chuatsi* SIRT3 gene

A. Expression of SIRT3 mRNA in different tissues of *Siniperca chuatsi*; 1: hind kidney; 2: gill; 3: head kidney; 4: heart; 5: trunk kidney; 6: brain; 7: spleen; 8: liver; 9: muscle; 10: stomach; 11: hemocyte; B. Expression of SIRT3 mRNA in spleen of *Siniperca chuatsi* after ISKNV infection; C. Expression of SIRT3 mRNA in ISKNV-infected CPB cells; D. Expression of SIRT3 protein in ISKNV-infected CPB cells; * indicates significant difference compared with 0 h ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference compared with 0 h ($P<0.01$).

3-TYP 处理组和 siS3 转染组中 ISKNV 基因组拷贝数显著降低(图 7B 和 7C)。TCID₅₀ 结果显示, 7 μmol/L HKL 处理组中 ISKNV 滴度显著升高(图 7D), 10 μmol/L 3-TYP 处理组和 siS3 转染组中, ISKNV 滴度显著降低(图 7E 和 7F)。综上, SIRT3 促进 ISKNV 在宿主细胞中复制增殖。

3 讨论

SIRT3 是线粒体能量代谢的关键调节因子, 可参与人类肺内皮细胞^[6]、人肾癌细胞^[7]、人乳腺癌细胞^[8]、人肝内胆管癌细胞^[20]、人弥漫性大 B

细胞淋巴瘤^[21]等多种细胞的谷氨酰胺代谢调控。Li 等^[21]根据此机制, 开发了 SIRT3 抑制剂 YC8-02, 其在小鼠体内抑制 B 细胞淋巴瘤的生长。研究表明在 ISKNV 感染期间上调 SIRT3, 显著升高 GLS 和 GDH 的表达量, 而下调 SIRT3, 显著降低 GLS 和 GDH 的表达量, 表明 ISKNV 可通过 SIRT3 诱导宿主细胞谷氨酰胺代谢重编程。研究结果可为抗 ISKNV 研究提供新的靶点。

SIR2 超家族结构域在基因表达和能量代谢中发挥调控作用^[22]。SIRT3 属于 SIR2 超家族, 具有 NAD⁺结合位点、乙酰化底物结合位点和锌结合位

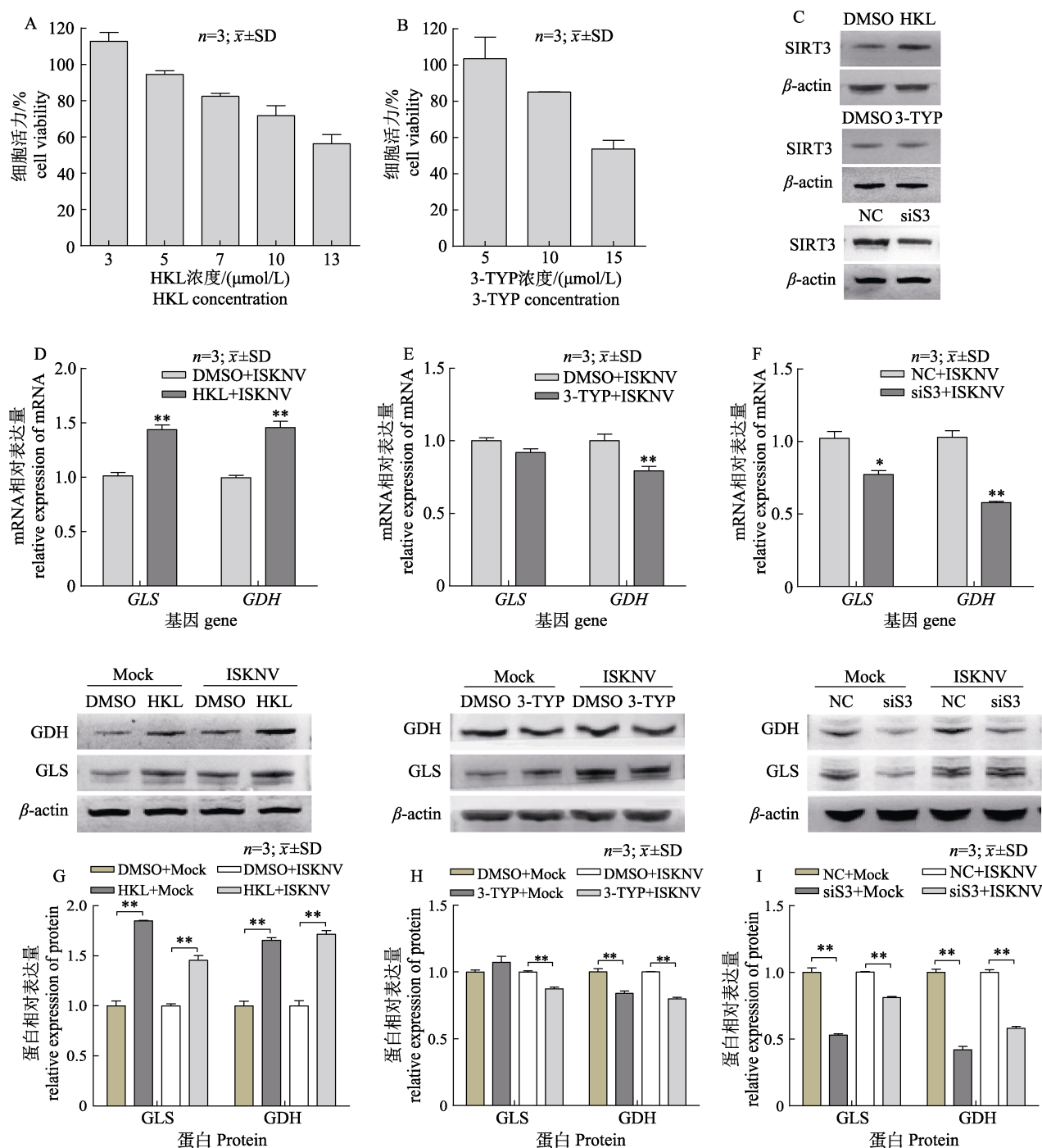


图 6 调控 SIRT3 对 ISKNV 诱导的谷氨酰胺代谢的影响

A-B: 不同浓度 HKL 或 3-TYP 处理 72 h CPB 细胞活力; HKL: SIRT3 激动剂; 3-TYP: SIRT3 抑制剂; C: 7 μmol/L HKL、10 μmol/L 3-TYP 和 siRNA-SIRT3 (siS3) 对 SIRT3 表达的影响; D-F: 7 μmol/L HKL、10 μmol/L 3-TYP 和 siS3 对谷氨酰胺酶(GLS)和谷氨酸脱氢酶(GDH)基因 mRNA 表达的影响; G-I: 7 μmol/L HKL、10 μmol/L 3-TYP 和 siS3 对 GLS 和 GDH 蛋白表达的影响。

*表示显著差异($P<0.05$); **表示极显著差异($P<0.01$)。

Fig. 6 Effect of SIRT3 on ISKNV-induced glutamine metabolism

A-B: Viability of CPB cells at 72 hours after treatment with different concentrations of HKL or 3-TYP; HKL: activator of SIRT3; 3-TYP: inhibitor of SIRT3; C: Effects of 7 μmol/L HKL and 10 μmol/L 3-TYP and siRNA-SIRT3 (siS3) on expression of SIRT3; D-F: Effects of 7 μmol/L HKL, 10 μmol/L 3-TYP and siS3 on the mRNA expression of glutaminase (GLS) and glutamate dehydrogenase (GDH) genes; G-I: Effects of 7 μmol/L HKL, 10 μmol/L 3-TYP and siS3 on the protein expression of GLS and GDH. * indicates significant difference ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

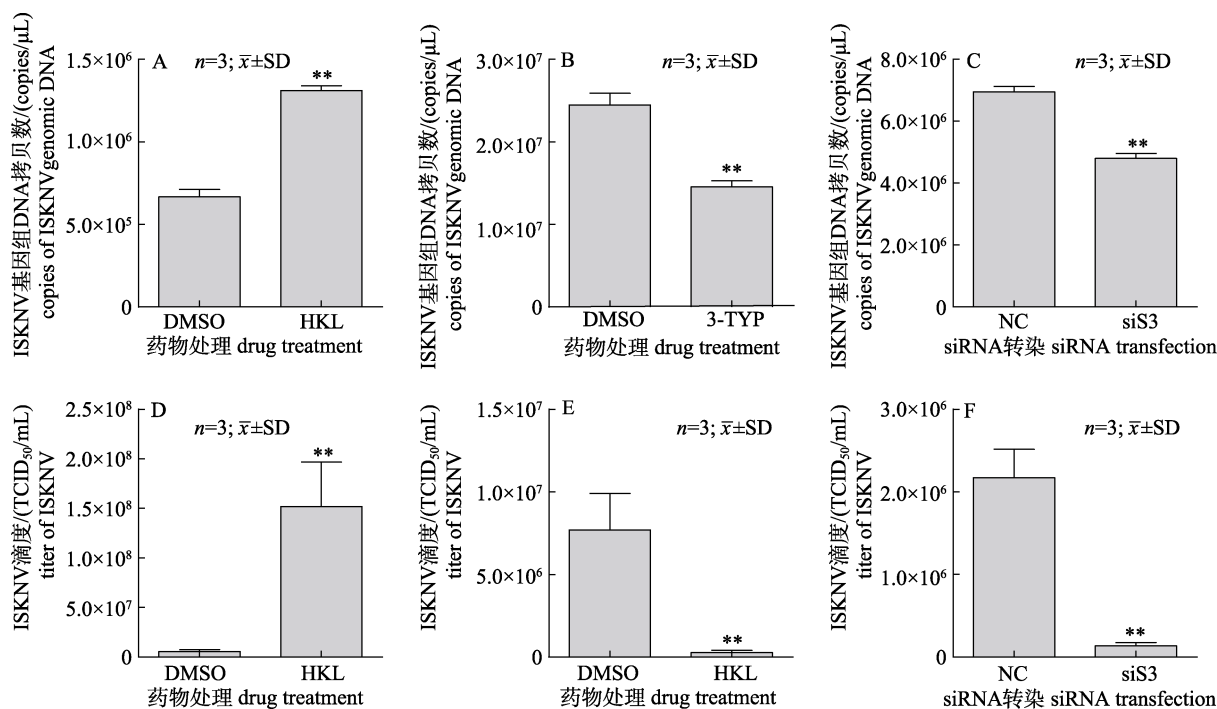


图 7 调控 SIRT3 对 ISKNV 产量的影响

A-C. 7 μ mol/L HKL、10 μ mol/L 3-TYP 和 siS3 对 ISKNV 基因组拷贝数的影响; D-F. 7 μ mol/L HKL、10 μ mol/L 3-TYP 和 siS3 对 ISKNV 滴度的影响; *表示显著差异 ($P < 0.05$); **表示极显著差异 ($P < 0.01$).

Fig.7 Effect of SIRT3 on the yield of ISKNV

A-C. Effects of 7 μ mol/L HKL, 10 μ mol/L 3-TYP and siS3 on the copy number of ISKNV genome; D-F. Effects of 7 μ mol/L HKL, 10 μ mol/L 3-TYP and siS3 on the titer of ISKNV; * indicates significant difference ($P < 0.05$); ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

点^[23-24]。本研究揭示鳎 SIRT3 与其他物种 SIRT3 的核心区域(127-367 aa)同源性较高, 且具有 NAD⁺依赖性的去乙酰化作用位点, 表明 SIRT3 在进化上保守, 且以该保守区作为免疫原制备的抗体可用于检测人^[25]和兔^[26]等不同物种 SIRT3 的表达。鳎 SIRT3 与人类 SIRT3 的三级结构高度相似, 揭示鳎 SIRT3 可能具有与人类 SIRT3 相似的功能, 为进一步研究鳎 SIRT3 在 ISKNV 感染中的作用奠定基础。

本研究表明 SIRT3 基因在鳎各组织表达具有差异性, 在后肾中表达量最高, 在肌肉和脾脏中表达量较低, 这与鳎 GLS 基因的组织表达差异性一致^[27]。Xu 等^[25]报道下调 SIRT3, 可促进人胰腺癌细胞有氧糖酵解。肌肉组织中糖酵解旺盛, 因此, 鳎 SIRT3 在肌肉组织低水平表达, 可能是为了维持代谢稳态。脾脏是 ISKNV 感染的靶器官, 常用于评估免疫相关基因的表达^[28]。ISKNV 感染后, SIRT3 表达在鳎脾脏和 CPB 细胞中呈相同变

化趋势: 在感染后 6~12 h 和 48~72 h, 表达量显著上调。6~12 h 是 ISKNV 感染周期的早期, 48~72 h 是 ISKNV 感染周期的中期和晚期^[29]。ISKNV 在感染后 48~72 h 上调谷氨酰胺代谢^[2,27], 这与 SIRT3 在 48~72 h 表达上调一致, 揭示 SIRT3 在 ISKNV 感染后期调节谷氨酰胺代谢。Ren 等^[12]报道 SIRT3 过表达阻断 HBV 感染引起的氧化应激。Someya 等^[30]报道 SIRT3 显著升高 NADPH 和还原型谷胱甘肽水平, 进而防止氧化应激诱导的细胞死亡。因此, SIRT3 在 ISKNV 感染早期上调表达可能是为了参与抵抗氧化应激, 维持感染细胞存活。

HKL 通过促进 SIRT3 表达并与 SIRT3 结合, 可稳定 SIRT3 的功能^[13-14,31]。Kerr 等^[31]使用该激动剂, 有效改善了糖尿病患者心脏线粒体中许多代谢酶的乙酰化水平。本研究结果显示, HKL 上调鳎 SIRT3 的表达, 而 3-TYP 对鳎 SIRT3 的表达无明显影响, 这可能是由于 3-TYP 抑制 SIRT3 的

活性。SIRT3 已被证实作为翻译后修饰因子, 调节线粒体许多代谢酶的乙酰化水平^[4-5]。本研究中使用 HKL、3-TYP 和 siRNA 调控 SIRT3 后, *GLS* 和 *GDH* 基因表达量均发生显著变化, 且 SIRT3 具有 PHD 结构域, 而 PHD 结构域是一种锌指结构基序, 可与 DNA、RNA 和蛋白质结合, 普遍存在于转录因子中^[32]。在牛肝细胞中过表达或敲降 SIRT3, 均可促使脂代谢相关酶基因表达量显著变化^[33]。在人肾上皮细胞中过表达 SIRT3, 导致糖酵解相关酶基因表达量显著变化^[34]。且 SIRT3 可调节 *GLS* 和 *GDH* 基因的转录共激活因子 PGC-1 α 的表达^[35-36]。以上研究均表明 SIRT3 在代谢基因表达中发挥重要调控作用。

Koyuncu 等^[11]报道, SIRT3 抑制 HCV、ADV 和 IAV 的复制。Ren 等^[37]报道 SIRT3 被募集到 HBV cccDNA 中, 介导其中的组蛋白赖氨酸残基去乙酰化, 进而抑制 HBV cccDNA 的转录。虽然 SIRT3 具有一定的抗病毒活性, 但单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus type 1, HSV-1) 对 SIRT3 的抗病毒活性具有抵抗力^[11]。本研究 ISKNV 复制未能被 SIRT3 抑制, 可能是 ISKNV 感染阻断了 SIRT3 的抗病毒作用, 从而在最大程度上利用 SIRT3 的代谢调节作用。

本研究成功克隆分析了 SIRT3 结构和表达特征, 发现 SIRT3 通过促进谷氨酰胺代谢为 ISKNV 在宿主细胞中复制增殖提供能量和生物大分子, 揭示了 ISKNV 增殖依赖于 SIRT3 的机制, 证实 SIRT3 可作为有效的抗病毒靶标, 可为开发抗病毒药物提供新的靶点。

参考文献:

- [1] Hu S, Li N Q, Fu X Z, et al. Research progress of infectious spleen and kidney necrosis virus of *Siniperca chuatsi*[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(3): 976-984. [胡松, 李宁求, 付小哲, 等. 鳊传染性脾肾坏死病毒研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(3): 976-984.]
- [2] Fu X Z, Guo X X, Wu S W, et al. Non-targeted UHPLC-Q-TOF/MS-based metabolomics reveals a metabolic shift from glucose to glutamine in CPB cells during ISKNV infection cycle[J]. Metabolites, 2019, 9(9): E174.
- [3] Fu X Z, Hu X Q, Li N Q, et al. Glutamine and glutaminolysis are required for efficient replication of infectious spleen and kidney necrosis virus in Chinese perch brain cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(2): 2400-2412.
- [4] He X C, Zeng H, Chen J X. Emerging role of SIRT3 in endothelial metabolism, angiogenesis, and cardiovascular disease[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(3): 2252-2265.
- [5] Wang T S, Cao Y, Zheng Q, et al. SENP1-Sirt3 signaling controls mitochondrial protein acetylation and metabolism[J]. Molecular Cell, 2019, 75(4): 823-834.e5.
- [6] Egnatchik R A, Brittain E L, Shah A T, et al. Dysfunctional BMPR2 signaling drives an abnormal endothelial requirement for glutamine in pulmonary arterial hypertension[J]. Pulmonary Circulation, 2017, 7(1): 186-199.
- [7] Choi J, Koh E, Lee Y S, et al. Mitochondrial Sirt3 supports cell proliferation by regulating glutamine-dependent oxidation in renal cell carcinoma[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 474(3): 547-553.
- [8] Zou X H, Zhu Y M, Park S H, et al. SIRT3-mediated dimerization of IDH2 directs cancer cell metabolism and tumor growth[J]. Cancer Research, 2017, 77(15): 3990-3999.
- [9] Mesquita I, Estaquier J. Viral manipulation of the host metabolic network[M]//Experientia Supplementum. Cham: Springer, 2018, 109: 377-401.
- [10] Li Z Y, Zhang H F. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73(2): 377-392.
- [11] Koyuncu E, Budayeva H G, Miteva Y V, et al. Sirtuins are evolutionarily conserved viral restriction factors[J]. mBio, 2014, 5(6): e02249-14.
- [12] Ren J H, Chen X, Zhou L, et al. Protective role of Sirtuin3 (SIRT3) in oxidative stress mediated by hepatitis B virus X protein expression[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0150961.
- [13] Xu H Y, Jiang H, Qin Y P, et al. Effects of the SIRT3 activator on HBV transcription and replication[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2020, 42(2): 276-285. [徐红艳, 姜慧, 秦一萍, 等. SIRT3 激动剂对乙肝病毒转录和复制的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(2): 276-285.]
- [14] Pillai V B, Samant S, Sundaresan N R, et al. Honokiol blocks and reverses cardiac hypertrophy in mice by activating mitochondrial Sirt3[J]. Nature Communications, 2015, 6: 6656.
- [15] Ye J S, Chen L, Lu Y Y, et al. SIRT3 activator honokiol ameliorates surgery/anesthesia-induced cognitive decline in mice through anti-oxidative stress and anti-inflammatory in hippocampus[J]. CNS Neuroscience & Therapeutics, 2019, 25(3): 355-366.
- [16] Galli U, Mesenzani O, Coppo C, et al. Identification of a

- sirtuin 3 inhibitor that displays selectivity over sirtuin 1 and 2[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 55: 58-66.
- [17] Dhillon R S, Richards J G. Hypoxia induces selective modifications to the acetylome in the brain of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 224: 79-87.
- [18] Simó-Mirabet P, Bermejo-Nogales A, Calduch-Giner J A, et al. Tissue-specific gene expression and fasting regulation of sirtuin family in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. *Journal of Comparative Physiology B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 2017, 187(1): 153-163.
- [19] Fu X Z, Li N Q, Lin Q, et al. qPCR method for virus titer testing of infectious spleen and kidney necrosis virus[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1573-1578. [付小哲, 李宁求, 林强, 等. 基于荧光定量 PCR 的鳊传染性脾肾坏死病毒滴度检测方法[J]. *水产学报*, 2014, 38(9): 1573-1578.]
- [20] Zeng B, Ye H L, Chen J M, et al. LncRNA TUG1 sponges miR-145 to promote cancer progression and regulate glutamine metabolism via Sirt3/GDH axis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(69): 113650-113661.
- [21] Li M, Chiang Y L, Lyssiotis C A, et al. Non-oncogene addiction to SIRT3 plays a critical role in lymphomagenesis[J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(6): 916-931.e9.
- [22] Wang L H, Jin W Y, Chen Y, et al. Function and mechanism of Sir2 gene family[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2006, 28(6): 822-826. [王丽辉, 金炜元, 陈勇, 等. Sir2 基因家族的功能和作用机制[J]. *细胞生物学杂志*, 2006, 28(6): 822-826.]
- [23] Onyango P, Celic I, McCaffery J M, et al. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(21): 13653-13658.
- [24] Jin L, Wei W T, Jiang Y B, et al. Crystal structures of human SIRT3 displaying substrate-induced conformational changes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(36): 24394-24405.
- [25] Xu W Y, Hu Q S, Qin Y, et al. Zinc finger E-box-binding homeobox 1 mediates aerobic glycolysis via suppression of sirtuin 3 in pancreatic cancer[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2018, 24(43): 4893-4905.
- [26] Zhu Z Y, Li H H, Chen W L, et al. Perindopril improves cardiac function by enhancing the expression of SIRT3 and PGC-1 α in a rat model of isoproterenol-induced cardiomyopathy[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 94.
- [27] Liu S G, Li N Q, Lin Q, et al. Glutaminase 1 in mandarin fish *Siniperca chuatsi*: Molecular characterization, expression pattern and function involving in virus replication[J]. *Aquaculture*, 2020, 519: 734924.
- [28] Fu X Z, Li N Q, Lai Y T, et al. Protective immunity against *Iridovirus* disease in mandarin fish, induced by recombinant major capsid protein of infectious spleen and kidney necrosis virus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(4): 880-885.
- [29] Wu S W, Yu L J, Fu X Z, et al. iTRAQ-based proteomic profile analysis of ISKNV-infected CPB cells with emphasizing on glucose metabolism, apoptosis and autophagy pathways[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 79: 102-111.
- [30] Someya S, Yu W, Hallows W C, et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction[J]. *Cell*, 2010, 143(5): 802-812.
- [31] Kerr M, Miller J J, Thapa D, et al. Rescue of myocardial energetic dysfunction in diabetes through the correction of mitochondrial hyperacetylation by honokiol[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(17): e140326.
- [32] Ma H H, Fang C L, Zeng P Y. The PHD finger: A reader of the histone code[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2008, 35(6): 625-630. [马红辉, 方存磊, 曾平耀. 植物同源结构域(PHD 结构域)——组蛋白密码的解读[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(6): 625-630.]
- [33] Liu L, Xing D M, Du X L, et al. Sirtuin 3 improves fatty acid metabolism in response to high nonesterified fatty acids in calf hepatocytes by modulating gene expression[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(7): 6557-6568.
- [34] Liu H, Chen Y L, Xu R H, et al. SIRT3 overexpression inhibits growth of kidney tumor cells via regulating cellular metabolic transformation[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2019, 19(5): 801-806. [刘欢, 陈宇凌, 徐仁华, 等. SIRT3 过表达通过调控细胞代谢转换抑制肾肿瘤细胞的增殖[J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(5): 801-806.]
- [35] Wang Q, Li L, Li C Y, et al. SIRT3 protects cells from hypoxia via PGC-1 α - and MnSOD-dependent pathways[J]. *Neuroscience*, 2015, 286: 109-121.
- [36] De Vitto H, Bode A M, Dong Z G. The PGC-1/ERR network and its role in precision oncology[J]. *NPJ Precision Oncology*, 2019, 3: 9.
- [37] Ren J H, Hu J L, Cheng S T, et al. SIRT3 restricts hepatitis B virus transcription and replication through epigenetic regulation of covalently closed circular DNA involving suppressor of variegation 3-9 homolog 1 and SET domain containing 1A histone methyltransferases[J]. *Hepatology*, 2018, 68(4): 1260-1276.

Role of the SIRT3 protein in spleen and kidney necrosis virus infections in *Siniperca chuatsi*

LI Kejin^{1,2}, FU Xiaozhe², LIN Qiang², LIU Lihui², NIU Yinjie², LIANG Hongru², LUO Xia², LI Ningqiu²

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Aural Affairs; Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangzhou 510380, China

Abstract: *Siniperca chuatsi* is an economically important freshwater fish species cultivated in China. Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) is the main causative agent of disease in *S. chuatsi* and causes huge economic losses in aquaculture. Viruses depend on cellular metabolisms for rapid replication and proliferation, and metabolomics analyses have revealed that the carbon flux of glutamine metabolism increases in ISKNV-infected cells. Previously, ISKNV has been reported to up-regulate the expression of glutaminase (GLS) and glutamate dehydrogenase (GDH) genes in host cells. These enzymes mediate glutamine metabolism and are necessary for the production of high-titer ISKNV particles. However, the mechanism of ISKNV-induced glutamine metabolism remains unclarified. The silent mating type regulation 2 homolog 3 (SIRT3) is an NAD⁺-dependent deacetylase that regulates cellular metabolic conditions and participates in biological activities including cell cycle, mitochondrial ageing, and energy production. SIRT3 has been widely reported to respond to nutrient deficiencies and participate in cancer progression by regulating glutamine metabolism. The metabolic status of virus-infected cells is very similar to that of cancer cells, suggesting that SIRT3 may play a regulatory role during ISKNV infection. To clarify the potential mechanistic link between ISKNV and glutamine metabolism, we analyzed cloned sequences of *S. chuatsi* SIRT3 and detected expression of SIRT3 in different tissues of *S. chuatsi*. Then, the time-dependent expression patterns of the *S. chuatsi* SIRT3 *in vitro* and *in vivo* after ISKNV infection were assessed using real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) and western blotting. Finally, the effects of SIRT3 on glutamine metabolism and the proliferation of ISKNV in host cells were analyzed by regulating the expression and the activity of SIRT3. Results showed that the *S. chuatsi* SIRT3 encoded 449 amino acids that showed high conservation. Expression of SIRT3 in 12 tissues of *S. chuatsi* was detected by qRT-PCR, with the maximum expressions obtained from the hind kidney. Moreover, the expression of SIRT3 was lower in the spleen, the target organ of ISKNV infections. *In vivo* and *in vitro* infection tests results showed that ISKNV infection significantly increased the expression of SIRT3 in *S. chuatsi* spleen and brain cells and that the time-dependent expression pattern of SIRT3 in spleen and brain cells was similar. Subsequently, we found that the expression of GLS and GDH, the copy number of the ISKNV genome, and the titer of ISKNV significantly increased in ISKNV-infected cells treated with 7 $\mu\text{mol/L}$ honokiol and significantly decreased in ISKNV-infected cells treated and transfected with 10 $\mu\text{mol/L}$ 3-TYP and siRNA-SIRT3, respectively. From the results described above, ISKNV infection was shown to induce the reprogramming of glutamine metabolism via SIRT3, suggesting that SIRT3 may be an effective target for antiviral therapy.

Key words: *Siniperca chuatsi*; SIRT3; ISKNV; glutamine metabolism

Corresponding author: LI Ningqiu. E-mail: liningq@126.com