

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.19051

鳊弹状病毒调控谷氨酰胺还原性代谢途径促进自身增殖

郭茜茜^{1,2}, 付小哲¹, 梁红茹¹, 林强¹, 刘礼辉¹, 牛银杰¹, 李宁求¹

1. 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;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 为探究鳊弹状病毒(*Siniperca chuatsi* rhabdovirus, SCR)复制增殖与谷氨酰胺还原性代谢(reductive glutamine metabolism, RGM)途径的相互作用关系, 以鳊脑细胞系(Chinese perch brain cells, CPB)为增殖体系, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测病毒拷贝数和 RGM 途径关键酶 mRNA 表达水平变化, 并通过蛋白免疫印迹方法检测 RGM 途径关键酶蛋白表达水平变化。结果发现, 当培养基缺失谷氨酰胺时 SCR 拷贝数降低了 99.5%, 表明谷氨酰胺是 SCR 增殖所必需; 而 SCR 感染上调 CPB 细胞 RGM 途径关键酶的表达, 其中异柠檬酸脱氢酶 2(isocitrate dehydrogenase 2, IDH2)上调倍数最大, 表明 SCR 感染上调了细胞 RGM 途径中关键酶基因的表达; 同时, 抑制细胞 RGM 途径关键酶的表达导致 SCR 病毒产量显著下降, 表明 RGM 途径有利于 SCR 复制增殖; 进一步敲降细胞 IDH2 基因表达可显著抑制 SCR N 蛋白表达, 而过表达细胞 IDH2 基因可显著促进 SCR N 蛋白表达, 表明 IDH2 在病毒增殖中具有重要作用。综上所述, SCR 感染可调控 CPB 细胞 RGM 通路以满足其自身增殖, 其结果可为阐明鳊弹状病毒致病机制和抗病毒治疗策略提供新的思路。

关键词: 鳊脑细胞系; 鳊弹状病毒; 谷氨酰胺还原性代谢途径

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)05-0993-11

鳊(*Siniperca chuatsi*)是中国重要淡水名优养殖鱼类, 随着养殖规模的扩大和养殖密度的提高, 其病害问题愈发严重, 其中鳊弹状病毒(*Siniperca chuatsi* rhabdovirus, SCR)是养殖鳊的重要病原, 其致死率可高达 80%~100%^[1]。该病毒是一类有包膜的负链 RNA 病毒, 基因组大小为 11~16 kb, 共编码 5 个蛋白, 分别为核蛋白(nucleoprotein, N)、磷酸化蛋白(phosphoprotein, P)、基质蛋白(matrix protein, M)、糖蛋白(glycoprotein, G)和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶蛋白(polymerase, L)^[2]。由 SCR 引起的弹状病毒病每年给中国鳊养殖业造成严重的经济损失, 研究 SCR 与宿主细胞相

互作用, 阐明其致病机制对该病的防治具有重要意义。病毒是严格胞内寄生生物, 必须劫持宿主细胞代谢系统以完成自身复制增殖。因此, 病毒增殖与细胞代谢关系密切, 已有一些病毒调控宿主细胞代谢的报道, 如白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)^[3-4]、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)^[5]、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)^[6]、人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)^[7-8]、卡波西肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma associated herpesvirus, KSHV)^[9]、登革病毒(Dengue virus)^[10]等。谷氨酰胺(glutamine, Gln)是体内含量最丰富

收稿日期: 2019-02-28; 修订日期: 2019-04-08.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872589); 广东省渔港建设和渔业产业发展专项(粤财农[2017]17 号); 广东省促进经济发展专项资金(海洋经济发展用途)(GDME-20181007); 广州市珠江科技新星项目(201710010087).

作者简介: 郭茜茜(1993-), 女, 硕士研究生, 主要从事水生动物医学研究. E-mail: guoxixig@126.com

通信作者: 李宁求, 副研究员. E-mail: liningq@126.com

的非必需氨基酸,可提供 ATP 和生物大分子供机体之所需^[11-12]。特别在肿瘤细胞中谷氨酰胺可作为一种重要的回补底物,进入 TCA 循环用于 ATP 的产生和生物大分子合成供肿瘤细胞快速增殖^[13-14]。肿瘤细胞中谷氨酰胺可通过谷氨酰胺酵解途径和谷氨酰胺还原性代谢(reductive glutamine metabolism, RGM)途径满足肿瘤细胞快速增殖所需,且 RGM 途径发挥更重要的作用^[15-18]。当肿瘤细胞在缺氧条件或线粒体功能缺失时,完全依赖于 RGM 途径衍生的柠檬酸转化成乙酰辅酶 A 进行脂类合成^[8, 19]。与肿瘤细胞类似,一些病毒增殖也依赖谷氨酰胺代谢^[20-22],已有报道谷氨酰胺在水生动物病毒增殖中也发挥重要作用,如鳃传染性脾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)^[23]、乌鳢弹状病毒(snakehead fish vesiculovirus, SHVV)^[24]、石斑鱼神经坏死病毒(red-spotted grouper nervous necrosis virus, RCNNV)^[25]等。但谷氨酰胺的何种代谢途径在病毒增殖过程中发挥作用,特别是谷氨酰胺 RGM 途径与病毒增殖的关系仍未见报道。

为了探究 RGM 途径在 SCR V 复制增殖中的作用,本研究从谷氨酰胺对 SCR V 增殖的影响、SCR V 感染后对 RGM 途径关键酶表达以及调控 RGM 途径对 SCR V 增殖的影响等方面探讨了 RGM 途径在 SCR V 增殖中的作用,为阐明 SCR V 调控宿主细胞谷氨酰胺代谢的分子机制奠定基础,可为阐明鳃弹状病毒病致病机制及抗病毒治疗策略提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

鳃脑细胞系(Chinese perch brain cell, CPB)由本实验室建立并保藏^[26],鳃弹状病毒(*Siniperca chuatsi* rhabdovirus, SCR V)由本实验室分离和保存,鳃 IDH2 基因干扰载体、IDH2 基因过表达载体由本实验室构建。L-15 培养基、DMEM 培养基、胰蛋白酶、血清、透析血清、PBS 和 Hank's 液购自 Gibco 公司;谷氨酰胺酶抑制剂[bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide,

BPTES]、谷氨酸抑制剂[(-)-epigallocatechinmonogallate, EGCG]、乙酰辅酶 A 羧化酶抑制剂[5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid, TOFA]和脂肪酸合酶抑制剂(4-methylene-2-octyl-5-oxotetrahydrofuran-3-carboxylic acid, C75)均购自 Sigma 公司;细胞 DNA 提取试剂盒购自 Magen 公司;病毒 DNA/RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;PCR 和 qPCR 的引物和探针购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Trizol、氯仿、异丙醇、乙醇购自广州化学试剂厂;5×All-In-One RT MasterMix 试剂盒、Abm OneScript cDNA synthesis Kit (with AccuRT Genomic DNA Removal Kit)试剂盒购自 Abm 公司;蛋白预置胶、电泳缓冲液、蛋白转膜缓冲液购自 Life 公司;脱脂奶粉购自碧迪医疗器械(上海)有限公司;兔抗 GLS、GDH、IDH1、IDH2 和 ACLY 以及鼠抗 β -actin 多克隆抗体购自 Proteintech 公司;SCR V N 蛋白由仲恺农业工程学院林鑫教授赠与;辣根过氧化物(HRP)标记的二抗购自 KPL 公司;DAB 显色液购自北京天根生化科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和病毒接种 CPB 细胞用含 10% 血清的 L-15 培养基,置于 28℃、无 CO₂ 培养箱中培养。将 T25 培养瓶中 CPB 细胞消化后转移到 12 孔板,待 12 孔板中细胞长满至 90%左右,换成含 10%透析血清的 DMEM 培养基,置于 28℃含 5% CO₂ 培养箱中培养过夜,弃掉培养基,每孔加入 0.3 mL 用 DMEM 培养基稀释的 SCR V 病毒液(MOI=1),对照组加入 0.3 mL 不含病毒液的 DMEM 培养基,置于 28℃含 5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h。然后,弃去孵育病毒液,每孔补加 1 mL 含 5%透析血清的 DMEM 培养基,置于 28℃含 5% CO₂ 培养箱中培养,每个样品设置 3 个重复。

1.2.2 RNA 提取及反转录 CPB 细胞接种 SCR V 后,分别在感染 4 h 和 12 h 收取实验组和对照组样品(测定 SCR V 病毒增殖曲线时分别取 2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h 和 18 h 样品),每个样品设置 3 个重复。将 3 个复孔上清样品混合均匀,使用 TIANGEN TIANamp Genomic RNA Kit 试剂盒提取 RNA 作为上清中病毒 RNA 定量

样品; 弃掉培养基, 用 PBS 洗 2 次, 再用刮刀刮取 3 个复孔细胞, 利用 Trizol 法提取细胞内总 RNA 作为胞内病毒 RNA 定量样品。提取 RNA 后, 使用 Abm OneScript cDNA synthesis Kit (with AccuRT Genomic DNA Removal Kit)试剂盒进行反转录, 每个样品用 1 μg RNA 进行反转录。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 SCRv 病毒拷贝数 分别取 SCRv 感染后 4 h 和 12 h 实验组和对照组 cDNA 样品(测定 SCRv 病毒增殖曲线时分别取 2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h 和 18 h cDNA 样品)。采用 Vazyme 探针法试剂盒测定 SCRv 病毒拷贝数, 荧光定量 PCR 引物及探针见表 1, 反应体系如下: 2×AceQ qPCR Probe Master Mix 10.0 μL, Primer F (10 μmol/L) 0.4 μL, Primer R (10 μmol/L) 0.4 μL, TaqMan Probe (10 μmol/L) 0.2 μL, Rox Reference Dye II 0.4 μL, 模板 cDNA 2 μL, dd H₂O 补充至 20 μL。反应条件为: 95℃ 5 min, 1 个循环; 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。

表 1 该研究所使用的定量 PCR 引物
Tab. 1 The primers of RT-qPCR used in this study

引物名称 primer name	基因名称 gene name	序列(5'-3') sequence (5'-3')
SCRv-F	SCRv-V87	GGCCGTCATGGTGGCGAAT
SCRv-R		GGATAAGTGGCCTGAGCTTC
SCRv-Probe		AGAACTGCCTTGACTTCGGCTCC
q-18s-F	18S RNA	CATTCGTATTGTGCCGCTAGA
q-18s-R		CAAATGCTTTCGCTTTGGTC
q-GLS-F	glutami- nase	TCCTGCGGCATGTACGACTTCT
q-GLS-R		CCAGCTTGTCAGTGGAGGTGA
q-GDH-F	glutamate dehydro- genase	AGGTCCGTCACTATGCCGATGC
q-GDH-R		AGATCCTCCACCAGCTTGTCCTC
q-IDH1-F	isocitrate dehydro- genase1	TTGTTGGCGTGTACGTCATCTCC
q-IDH1-R		AGGCCATCATCTGCAAGAACATCC
q-IDH2-F	isocitrate dehydro- genase2	GTCATCAGTGTGGTCACGGTACG
q-IDH2-R		TGGAGATGGACGGAGACGAGATG
q-ACLY-F	ATP citrate lyase	GCTAAGCCACTGGACACTGAGTTC
q-ACLY-R		GACTGTGCCGTCTTGGACTGTG
q-SCRv/N-F	SCRv-N	ATGAAATCAATCATTGCACTTACGT
q-SCRv/N-R		TTAGGGAACAAATTGATACTGCTGC
q-SCRv/M-F	SCRv-M	ATGCCTCTGTTAAGAAGAGCAACA
q-SCRv/M-R		TTAATGCCAGCTATGACCAGGGTC
q-SCRv/G-F	SCRv-G	ATGGAACCAAAATCATCAAGAG
q-SCRv/G-R		TCACAAAGCTTGGTGTTCAG

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 RGM 途径相关基因的表达 分别取 SCRv 感染后 4 h 和 12 h 实验组和对照组 cDNA 样品, 采用 Vazyme 染料法试剂盒测定 RGM 途径相关酶基因表达, 共检测了谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS)、谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)、异柠檬酸脱氢酶 1(isocitrate dehydrogenase1, IDH1)、异柠檬酸脱氢酶 2(isocitrate dehydrogenase2, IDH2)和 ATP 柠檬酸裂解酶(ATP citrate lyase, ACLY)等 5 个 RGM 途径相关酶基因, 以鳎 18S rRNA 基因作为内参, 定量 PCR 所用引物见表 1。PCR 反应体系如下: 2×ChamQ SYBR qPCR Master MIX (Low ROX Premixed) 10.0 μL, Primer F (10 μmol/L) 0.4 μL, Primer R (10 μmol/L) 0.4 μL, Template DNA/cDNA 2.0 μL, ddH₂O 补充至 20 μL。反应条件为: 95℃ 3 min, 1 个循环; 95℃ 10 s, 56℃ 30 s, 72℃ 60 s, 40 个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 95℃ 15 s, 1 个循环。

1.2.5 蛋白免疫印迹检测 RGM 途径相关酶蛋白表达 分别取 SCRv 感染后 4 h 和 12 h 实验组和对照组细胞样品, 利用蛋白免疫印迹方法检测 RGM 途径相关酶蛋白表达。将收集的细胞样品用含 1% PMSF 的 RIPA 裂解, 用 12%的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 转膜到固定化-P-聚偏二氟乙烯膜, 然后分别将兔抗-GLS(1 : 200; proteintech, 12855-1-AP)、兔抗-GDH(1 : 1000; proteintech, 14299-1-AP)、兔抗-IDH1(1 : 1000; proteintech, 12332-1-AP)、兔抗-IDH2(1 : 1000; proteintech, 15932-1-AP)、兔抗-ACLY(1 : 1000; proteintech, 15421-1-AP)、鼠抗-SCRv N 蛋白(1 : 500)和鼠抗-β-actin(1 : 3000; proteintech, 60008-1-Ig)多克隆抗体 4℃ 孵育过夜, PBST 洗涤后孵育二抗 (1 : 5000)1 h, 最后进行 DAB 显色。

1.2.6 细胞转染 将 CPB 细胞接种于 6 孔板, 待细胞密度达到 70%~80%, 分别将 IDH2 基因干扰载体、IDH2 基因过表达载体转染 CPB 细胞, 具体步骤参照郭慧芝^[27]的方法。

1.2.7 稳定细胞系筛选 采用浓度为 2 μg/mL 嘌呤霉素筛选 IDH2 基因干扰载体转染细胞, 处理 24~48 h, 换新鲜培养基, 待细胞长满至 100%, 重复上述筛选步骤, 直至筛选出 IDH2 基因敲降稳定转染细胞系; 采用 1000 μg/mL 遗传霉素

(geneticin, G418)筛选 *IDH2* 基因过表达载体转染细胞, 处理 3~5 d, 待细胞边缘发亮时消化细胞, 并换新鲜培养基; 待细胞贴壁后, 弃去漂浮细胞, 用 PBS 洗 2 次, 换新鲜培养基; 待细胞长满至 100%, 重复上述筛选步骤, 直至筛选出 *IDH2* 基因过表达稳定转染细胞系。筛选稳定转染的细胞用于病毒感染试验。

1.3 统计分析

数据以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。采用 GraphPad Prime 5 软件进行试验数据整理和制图; 使用 SPSS 21.0 软件进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

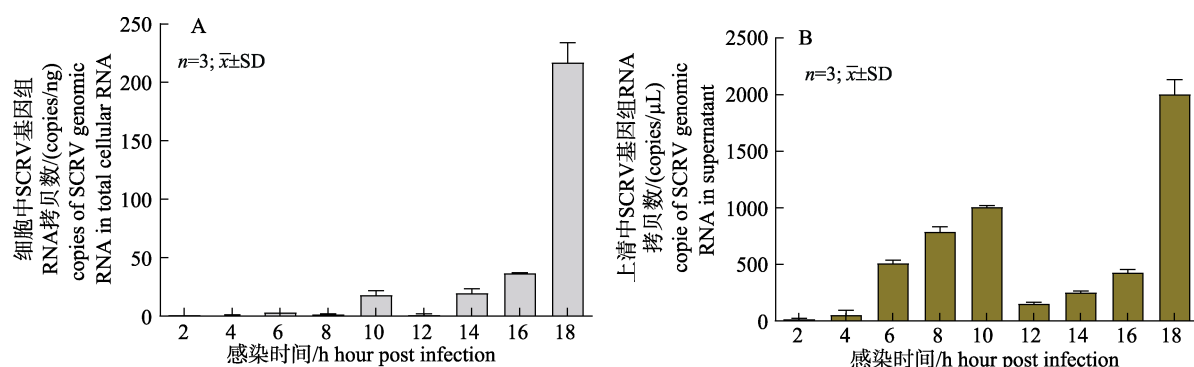


图 1 SCR 在 CPB 细胞中的复制动力学

A. CPB 细胞内病毒基因组拷贝数; B. 培养上清中病毒基因组拷贝数。

Fig. 1 Kinetics of SCR virus replication and multiplication in CPB cells

A. SCR virus genomic RNA copy numbers in CPB cells; B. SCR virus genomic RNA copy numbers in medium.

2.2 谷氨酰胺为 SCR 增殖所必需

前期实验结果表明, 缺失谷氨酰胺对 CPB 细胞活力没有影响^[28]。当培养基中缺失谷氨酰胺后, SCR 病毒拷贝数降低 99.5%, 而在完全培养基中添加谷氨酰胺酶抑制剂 BPTES (10 $\mu\text{mol/L}$), SCR 病毒拷贝数降低 69.3% (图 2A), 表明 SCR 复制增殖需要谷氨酰胺。为了确定 SCR 复制增殖的哪个阶段需要谷氨酰胺, 首先检测培养基中缺失谷氨酰胺对病毒基因转录的影响, 结果显示, 当培养基中缺失谷氨酰胺, N 蛋白基因转录水平在 SCR 感染后 4 h 显著上调, 在感染后 8 h 和 12 h 被显著抑制 (图 2B); M 蛋白基因转录水平在 SCR 感染后 3 个时间点均被抑制 (图 2C); G 蛋白基因转录水平在 SCR 感染后 4 h 显著上调, 在感染后 8 h 和 12 h 无显著变化 (图 2D), 结果表明缺失谷氨酰胺抑制 SCR 病毒 M、N 蛋白基因转录。

2 结果与分析

2.1 SCR 在 CPB 细胞中的复制动力学

采用实时荧光定量 PCR 方法测定了 SCR 在 CPB 细胞中的复制动力学, 结果显示, 细胞内 SCR 基因组拷贝数在感染后 2~10 h 逐渐增加, 10~12 h 显著减少 (图 1A)。上清中 SCR 基因组拷贝数在 2~10 h 逐渐增加, 10~12 h 上清中病毒拷贝数显著减少, 推测 10~12 h 处于 SCR 第一轮复制增殖结束和第二轮复制增殖的吸附阶段之间 (图 1B)。以上结果表明 SCR 在 CPB 细胞中复制增殖周期为 12 h, 其中, 4 h 和 12 h 分别是 SCR 增殖的早期和晚期。

然后, 检测培养基中缺失谷氨酰胺对 SCR 结构蛋白合成的影响, 结果显示, 当培养基中缺乏谷氨酰胺时, SCR 的 N 蛋白表达量显著下降 (图 2E), 说明 SCR 蛋白的合成需要外源性谷氨酰胺的参与。这些结果表明, SCR 病毒在 CPB 细胞中的复制增殖需要谷氨酰胺。

2.3 SCR 感染促进谷氨酰胺 RGM 途径中关键酶基因的表达

采用荧光定量 PCR 方法测定了 SCR 感染后 *GLS*、*GDH*、*IDH1*、*IDH2* 和 *ACLY* 等 5 个 RGM 途径相关酶基因转录水平, 结果显示 SCR 感染细胞后 4 h, *GLS*、*GDH* 和 *IDH2* 基因表达显著上调, 而 *IDH1* 和 *ACLY* 基因表达无显著差异, 说明 SCR 在基因组复制阶段主要促进 RGM 途径中 *GLS*、*GDH* 和 *IDH2* 的表达 (图 3B)。SCR 感染细胞后 12 h, *GLS*、*GDH*、*IDH1*、*IDH2* 和 *ACLY*

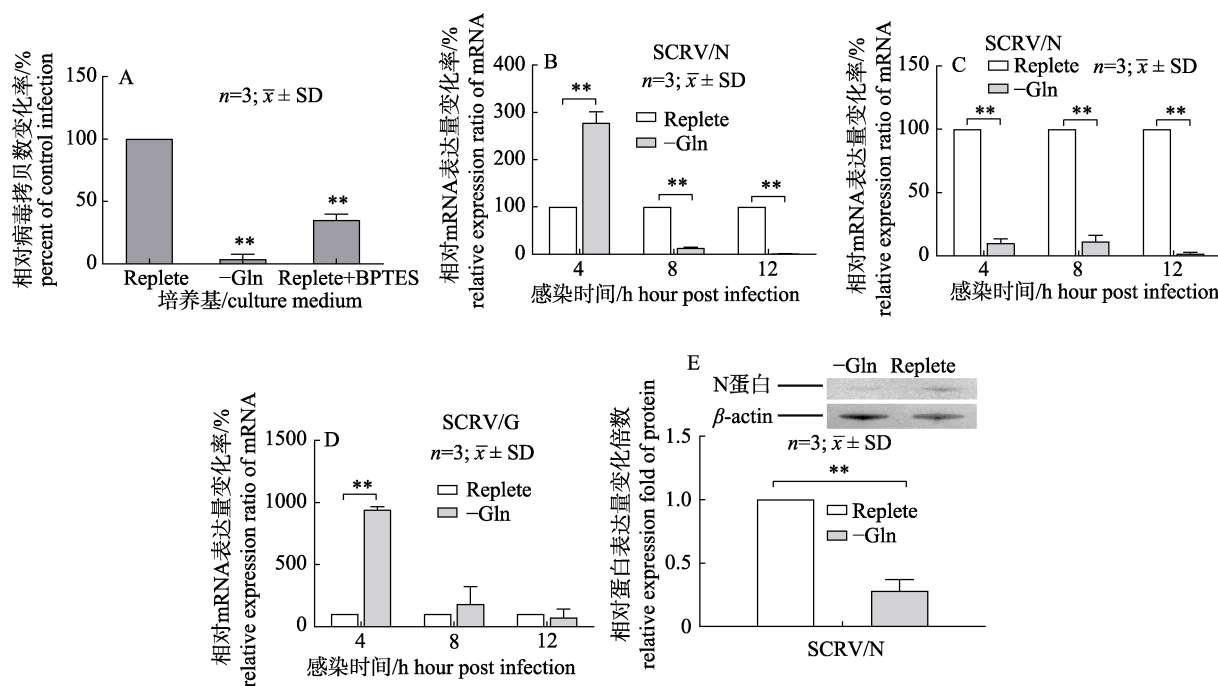


图2 SCRVR复制增殖对谷氨酰胺的依赖性

A. 不同处理组 SCRVR 病毒产量; B-D. 不同处理组 SCRVR 结构蛋白 mRNA 水平表达; E. 利用蛋白免疫印迹方法检测不同处理组 N 蛋白的蛋白表达水平(用 β -actin 作为内参, 每种目的蛋白设置 3 个生物学重复。

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Replete: 培养基含有谷氨酰胺; -Gln: 培养基缺失谷氨酰胺。

Fig. 2 The requirement of glutamine for efficient SCRVR replication

A. The yield of SCRVR in different experimental groups. B-D. The expression analysis of SCRVR structural protein by qRT-PCR. E. The expression analysis of SCRVR N protein by Western blotting. Actin was used as an internal control. For each target protein, three parallel samples were pooled as biological replicates. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Replete means the cell culture media with the presence of glutamine. -Gln means the cell culture media with the absence of glutamine.

基因表达均显著上调, 说明 SCRVR 在装配释放阶段显著促进 RGM 途径相关酶的表达(图 3B)。然后检测了 SCRVR 感染后 GLS、GDH、IDH1、IDH2 和 ACLY 蛋白水平的表达, 结果显示 SCRVR 感染细胞后 4 h, GLS、GDH 和 IDH2 的表达显著上调(图 3C)。SCRVR 感染细胞后 12 h, GDH、IDH2 和 ACLY 的表达显著上调(图 3C)。综上所述, SCRVR 感染 CPB 细胞显著促进 RGM 途径相关酶 mRNA 及蛋白的表达。

2.4 调控 RGM 途径相关酶的表达对 SCRVR 复制增殖的影响

在本实验室前期研究中已确定抑制剂 BPTES 和 EGCG 的使用浓度分别为 $10 \mu\text{mol/L}$ ^[28], 添加后对 SCRVR 增殖有显著的抑制作用。完全培养基中添加 GLS 的特异抑制剂 BPTES ($10 \mu\text{mol/L}$), 结果显示 SCRVR 感染后 4 h 病毒产量降低 74.3%, 感染后 12 h 病毒产量降低 99.5%(图 4A); EGCG

是 GDH 的特异抑制剂, 完全培养基中添加 $10 \mu\text{mol/L}$ EGCG, 结果显示 SCRVR 感染后 4 h 病毒产量略有增加, 但在感染后 12 h 病毒产量降低 40.7%(图 4B); 表明抑制 RGM 途径中 GLS 或 GDH 会抑制 SCRVR 复制增殖, 进而降低 SCRVR 病毒产量。SCRVR 是一种包膜病毒, 需要利用宿主细胞合成脂类形成包膜以完成自身的释放。TOFA 是乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)的特异抑制剂, C75 是脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)的特异抑制剂^[8]。通过 MTS 法检测分别添加 0~20 mg/mL TOFA 和 C75 对细胞活力无显著影响(图 4C, 4D)。在完全培养基中分别添加 10 mg/mL TOFA 和 10 mg/mL C75, 病毒产量分别降低 59.3%和 22.2%(图 4E, 4F), 表明抑制 RGM 途径脂类合成酶的表达也会抑制 SCRVR 复制增殖。综上所述, 抑制 RGM 通路关键酶的表达可抑制 SCRVR 复制增殖。

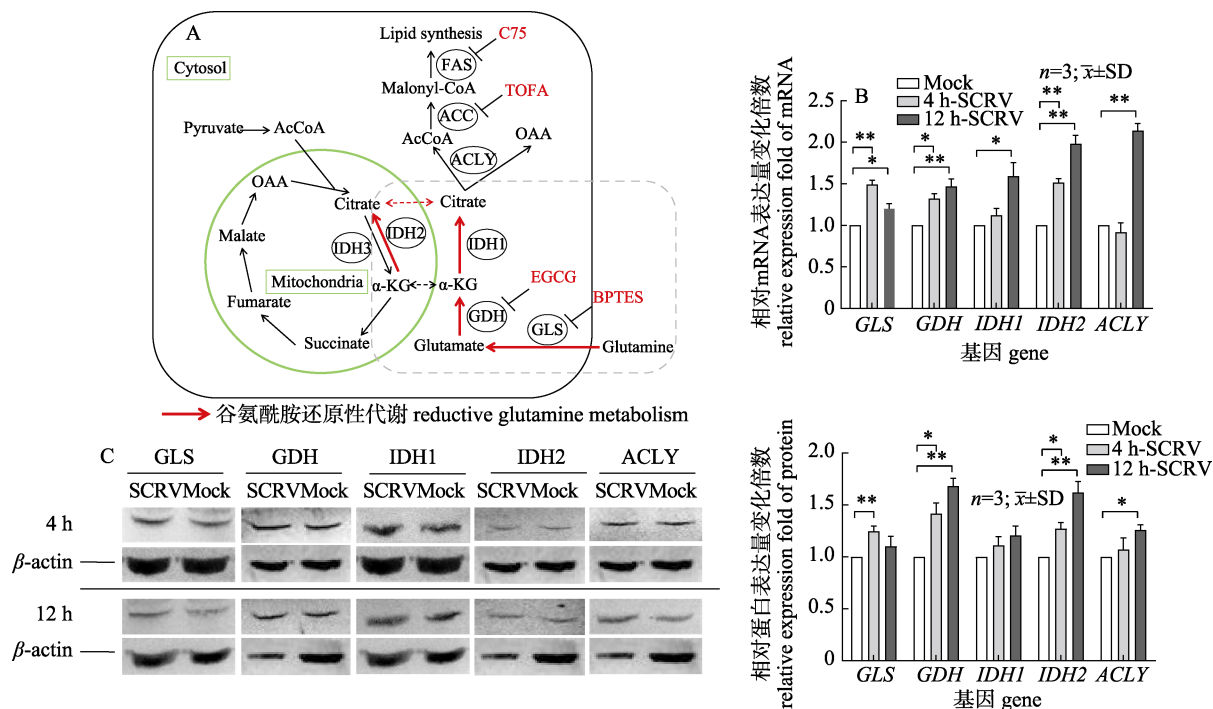


图 3 SCR 感染促进谷氨酰胺还原性代谢途径相关基因转录水平和蛋白水平的表达

A. 谷氨酰胺还原性代谢和 TCA 循环的简化原理图; B. 谷氨酰胺还原性代谢途径中关键酶 mRNA 表达水平; C. 谷氨酰胺还原性代谢途径中关键酶蛋白表达水平(用 β -actin 作为内参, 每种目的蛋白有 3 个生物学重复。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

GLS: 谷氨酰胺酶; GDH: 谷氨酸脱氢酶; IDH1: 异柠檬酸脱氢酶; ACLY: ATP-柠檬酸裂解酶; ACC: 乙酰辅酶 A 羧化酶; FAS: 脂肪酸合酶; Glutamine: 谷氨酰胺; Glutamate: 谷氨酸; α -KG: α -酮戊二酸; Citrate: 柠檬酸; OAA: 草酰乙酸; Malate: 苹果酸; Fumarate: 延胡索酸; Succinate: 琥珀酸; AcCoA: 乙酰辅酶 A; Pyruvate: 丙酮酸; Malonyl-CoA: 丙二酰辅酶 A; Lipid synthesis: 脂类合成; BPTES: 谷氨酰胺酶抑制剂; EGCG: 谷氨酸脱氢酶抑制剂; TOFA: 乙酰辅酶 A 羧化酶抑制剂; C75: 脂肪酸合酶抑制剂; Mitochondria: 线粒体; Cytosol: 胞质。

Fig. 3 SCR promoted the expression of mRNA and protein of RGM pathway related genes in CPB cells

A. Simplified schematic of reductive glutamine metabolism and the TCA cycle. B. The mRNA and protein levels of RGM pathway related genes were measured by qRT-PCR. C. The protein levels of RGM pathway related genes were measured by qRT-PCR. β -actin was used as an internal control. For each target protein protein, three parallel samples were pooled as biological replicates. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

GLS: glutaminase; GDH: glutamic dehydrogenase; IDH1: Isocitrate dehydrogenase 1; ACLY: ATP-citrate lyase; ACC: acetyl CoA carboxylase; FAS: fatty acid synthase; α -KG: α -ketoglutarate; OAA: oxaloacetic acid; AcCoA: acetyl CoA; BPTES: glutaminase inhibitor; EGCG: Dehydrogenase inhibitor; TOFA: ACC inhibitor; C75: fatty acid synthase inhibitor.

另外, 采用荧光定量 PCR 方法测定抑制 RGM 途径对 SCR 结构蛋白基因表达水平的影响。结果显示, 在添加 BPTES、EGCG、C75 后 SCR N 蛋白基因表达在 4 h 和 12 h 均被显著抑制, 而添加 TOFA 后 12 h SCR N 蛋白基因表达被显著抑制(图 5A); SCR M 蛋白的表达在添加 BPTES、TOFA 和 C75 后 4 h 和 12 h 均被显著抑制, 而添加 EGCG 后仅 12 h 被显著抑制(图 5B); SCR G 蛋白基因表达在添加 EGCG 和 C75 后 4 h 和 12 h 均被显著抑制, 而添加 BPTES 仅在 4 h、添加 TOFA 仅在 12 h 被显著抑制(图 5C)。接着利用蛋白免疫印迹方法检测 SCR 结构蛋白表达水

平。结果显示, 培养基中添加抑制剂 BPTES 或 EGCG 显著抑制 SCR N 蛋白的表达, 而抑制剂 TOFA 和 C75 对 SCR N 蛋白表达无显著影响(图 5D)。综上, SCR 复制增殖依赖 RGM 途径, 抑制 RGM 途径相关酶的表达会抑制 SCR 结构蛋白的 mRNA 和蛋白表达水平, 进而影响病毒产量。

2.5 调控 IDH2 基因表达对 SCR 复制增殖的影响

利用鳃 IDH2 基因干扰细胞系和 IDH2 基因过表达细胞系测定 IDH2 基因表达对 SCR 复制增殖的影响。结果表明, 在敲降 IDH2 基因细胞中 SCR 病毒产量显著降低, 而在过表达 IDH2 基因细胞中 SCR 病毒产量显著升高(图 6A)。同时, 在

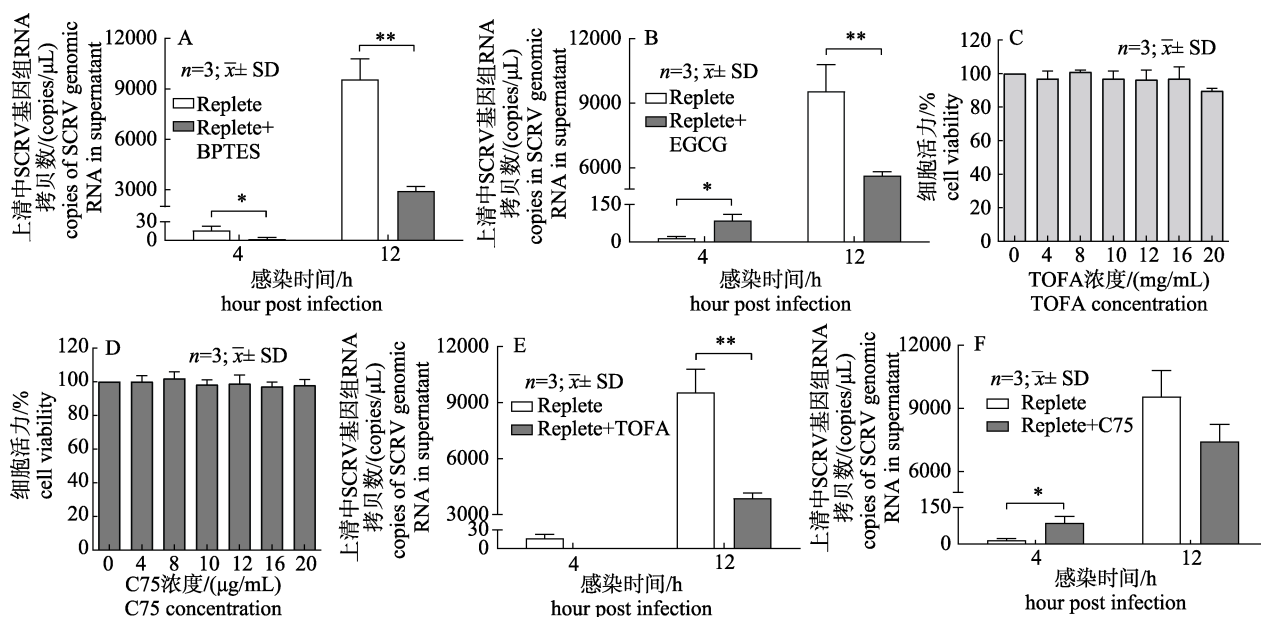


图4 抑制 RGM 途径对 SCR 病毒产量的降低作用

A-B. BPTES 和 EGCG 2 种抑制剂分别对 SCR 病毒产量的影响; C-D. 不同浓度 TOFA 和 C75 在 72 h 内对 CPB 细胞活力的影响; E-F: TOFA 和 C75 2 种抑制剂分别对 SCR 病毒产量的影响。

Fig. 4 The reduction of SCR virus yield by inhibition of RGM pathway

A-B. Effects of two inhibitors of BPTES and EGCG on the production of SCR virus. C-D. Effects of different concentrations of TOFA and C75 on the viability of CPB cells within 72 hours. E and F: Effects of two inhibitors of TOFA and C75 on the production of SCR virus.

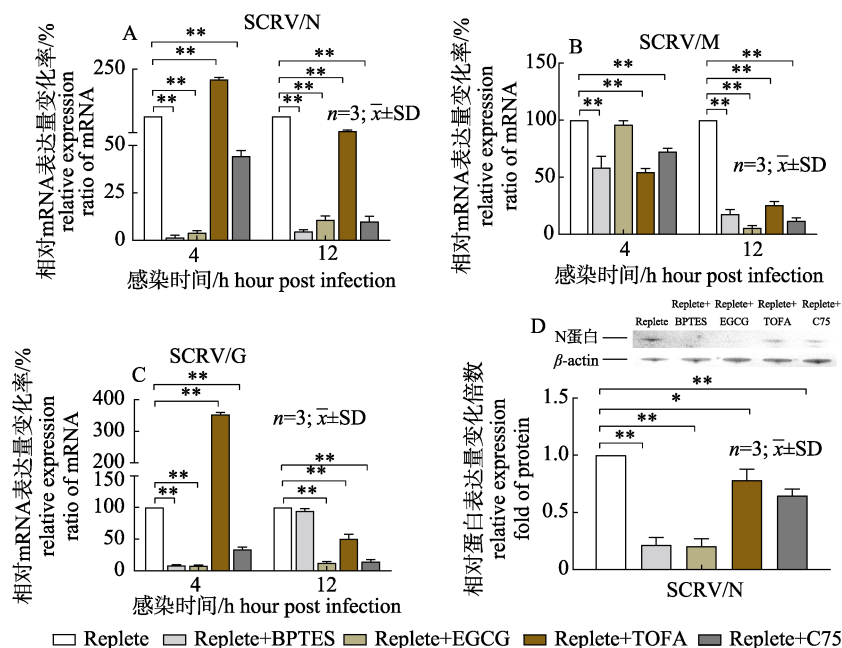


图5 抑制 RGM 途径降低病毒结构蛋白 mRNA 水平和蛋白水平的表达

A-C. BPTES、EGCG、TOFA 和 C75 4 种抑制剂分别对 SCR 病毒结构蛋白 mRNA 水平表达的影响;

D. BPTES、EGCG、TOFA 和 C75 4 种抑制剂分别对 SCR 病毒 N 结构蛋白表达的影响

(用 β -actin 作为内参, 每种目的蛋白有 3 个生物学重复, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Fig. 5 Inhibition of RGM pathway reduced mRNA and protein expression of viral structural protein

A-C. Effects of four inhibitors of BPTES, EGCG, TOFA and C75 on the expression of structural protein mRNA of SCR virus. D. Effects of four inhibitors of BPTES, EGCG, TOFA and C75 on the expression of N protein of SCR virus. Actin was used as an internal control. For each target protein, three parallel samples were pooled as biological replicates. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

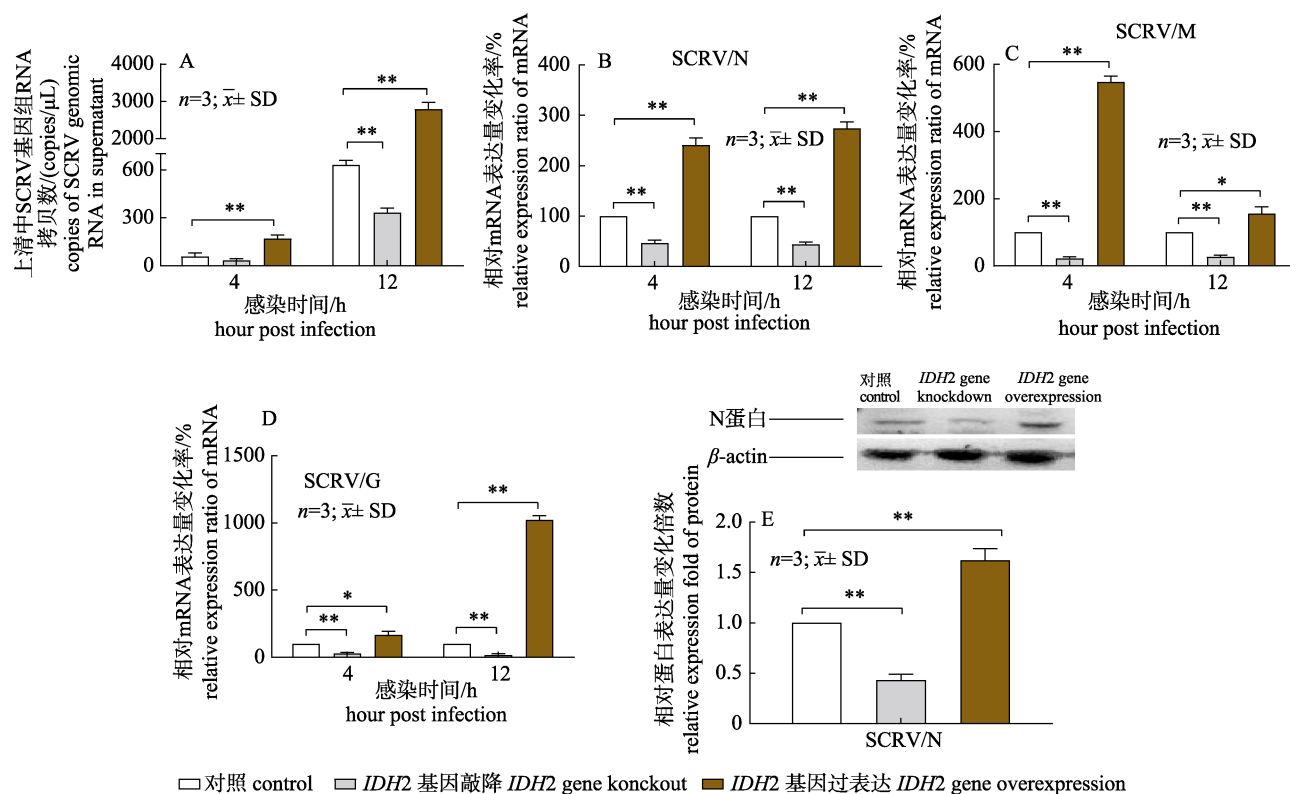


图 6 *IDH2* 基因的表达促进 SCRV 病毒复制增殖

A. *IDH2* 基因的表达对 SCRV 病毒产量的影响; B-D. *IDH2* 基因对 SCRV 病毒结构蛋白 mRNA 水平表达的影响; E. *IDH2* 基因对 SCRV 病毒 N 结构蛋白表达的影响(用 β -actin 作为内参, 每种目的蛋白有 3 个生物学重复. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Fig. 6 The promotion of SCRV replication in CPB cells by *IDH2* gene expression

A. The effect of *IDH2* gene on the production of SCRV virus. B-D. The effect of *IDH2* gene on the expression of structural protein mRNA of SCRV virus. E. The effect of *IDH2* gene on the expression of N protein of SCRV virus. Actin was used as an internal control. For each target protein, three parallel samples were pooled as biological replicates. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

敲降 *IDH2* 基因细胞中 SCRV 3 种结构蛋白基因表达均被显著抑制; 在过表达 *IDH2* 基因细胞中 SCRV 3 种结构蛋白基因表达均被显著促进(图 6B~6D)。另外, 采用蛋白免疫印迹方法检测 SCRV 结构蛋白表达水平, 结果显示, 在 *IDH2* 基因敲降细胞中 SCRV N 蛋白表达被显著抑制, 而在 *IDH2* 基因过表达细胞中 SCRV N 蛋白表达被显著促进(图 6E)。以上结果表明, *IDH2* 基因的表达可促进 SCRV 病毒复制增殖。

3 讨论

谷氨酰胺是细胞提供能量和生物大分子的重要营养物质之一。已有研究报道, 在肿瘤细胞和某些病毒感染细胞中主要以谷氨酰胺作为碳源进入 TCA 循环产生 ATP 和生物大分子供细胞生长之所需^[7, 9, 13-14]。且已有报道表明谷氨酰胺在

ISKNV^[23]、SHVV^[24]、RCNNV^[25]等多种鱼类病毒复制增殖过程中发挥重要作用。本研究结果表明 SCRV 复制增殖依赖谷氨酰胺, 而病毒感染促进 CPB 细胞 RGM 途径关键酶的表达, 且抑制细胞 RGM 途径关键酶的表达可显著降低 SCRV 病毒产量和结构蛋白表达, 表明 SCRV 可调控细胞 RGM 途径以促进自身复制增殖。这些结果可为阐明 SCRV 调控宿主细胞谷氨酰胺代谢的分子机制奠定基础, 为阐释 SCRV 病毒的致病机制及抗病毒治疗策略提供新的思路。

通过 RT-qPCR 方法检测 SCRV 在上清和胞内的病毒基因组拷贝数, 发现 0~12 h 是 SCRV 在 CPB 细胞中的一个复制增殖周期, 其中 0~4 h 是 SCRV 吸附、入侵 CPB 细胞阶段, 在 4~8 h 进行病毒基因组复制, 12 h 后被释放进入培养上清。同时观察到从 10 h 开始部分宿主细胞出现拉丝的病

理变化特征, 10 h 后出现病变的细胞数量进一步增加, 说明经过第一轮复制增殖, 随着大量病毒的入侵、复制和释放, 宿主细胞出现细胞病变效应。通过利用 qPCR 方法检测上清和宿主细胞内病毒基因组拷贝数的变化来确定病毒复制动力学曲线在 DNA 病毒中也有报道, 如 WSSV^[3] 和 ISKNV^[23] 等。病毒增殖周期的测定为后续实验取样点的选择提供有效参考。

病毒的复制增殖需要劫持宿主细胞代谢系统得以完成。在本研究中, 通过检测 GLS、GDH、IDH1、IDH2 和 ACLY 等 5 个 RGM 途径相关酶基因转录水平和蛋白表达水平, 发现 SCR 感染 CPB 细胞会促进 RGM 途径关键酶表达; 而抑制 GLS 和 GDH 表达可降低 SCR 产量和结构蛋白表达。已有研究表明, HCMV 和 KSHV 病毒感染亦可上调 GLS 和 GDH 表达, 且这 2 种酶表达的上调对病毒复制增殖具有重要的作用^[29-30]。但 SCR 感染上调 GLS 和 GDH 表达机制及其在病毒复制增殖中的作用有待进一步研究。

谷氨酰胺代谢为 α -酮戊二酸后, 在线粒体经 IDH2 催化直接生成柠檬酸, 部分 α -酮戊二酸在胞质中经 IDH1 催化生成柠檬酸。在本研究中, SCR 感染细胞后, IDH1 和 IDH2 表达水平均被上调, 而 IDH2 的表达上调倍数最大。其结果与肿瘤细胞中 IDH1 和 IDH2 表达升高现象一致^[19, 31-32]。而 IDH2 基因过表达促进 SCR 复制增殖, 抑制 IDH2 基因表达可抑制 SCR 复制增殖。推测 SCR 可利用细胞 RGM 途径中的 IDH2 直接催化 α -酮戊二酸生成柠檬酸, 但具体作用机制有待进一步证实。

在肿瘤细胞中, α -酮戊二酸经还原羧化直接生成柠檬酸, 柠檬酸经 ACLY 催化生成乙酰辅酶 A 和草酰乙酸, 乙酰辅酶 A 是合成脂类的重要生物合成前体, 对肿瘤细胞的生长具有至关重要的作用^[8, 19]。在本研究中, 在 SCR 感染后期促进 CPB 细胞中 ACLY 的表达, 而抑制 ACC 和 FAS 的表达可显著抑制病毒复制增殖。推测 SCR 感染后期的病毒粒子的装配、释放以及包膜形成需要宿主细胞提供大量的脂类, 而谷氨酰胺经

RGM 途径生成的柠檬酸可作为脂类合成的原料, 但其具体作用机制还有待进一步验证。

综上所述, SCR 在 CPB 细胞中的高效复制增殖依赖于谷氨酰胺, 且在病毒感染过程中劫持多种酶来加速谷氨酰胺还原性代谢途径, 从而为病毒复制增殖提供能量和生物合成大分子, 这些发现提示 RGM 途径关键酶可能成为有效控制 SCR 感染的新靶点, 可为鳃弹状病毒治疗策略提供新的思路。

参考文献:

- [1] Zhang Q Y, Li Z Q. Three viruses were observed in sick mandarin fish tissues[J]. Chinese Science Bulletin, 1999, 44(2): 192-195. [张奇亚, 李正秋. 在患病鳊鱼组织中观察到 3 种病毒[J]. 科学通报, 1999, 44(2): 192-195.]
- [2] Tao J J. Isolation, identification and complete genomic sequence analysis of the mandarin fish *siniperca chuatsi* rhabdovirus[D]. Beijing: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2006. [陶建军. 鳊鱼弹状病毒的分离、鉴定及基因组测序分析[D]. 北京: 中国科学院水生生物研究所, 2006.]
- [3] Chen I T, Aoki T, Huang Y T, et al. White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection[J]. Journal of Virology, 2011, 85(24): 12919-12928.
- [4] Hsieh Y C, Chen Y M, Li C Y, et al. To complete its replication cycle, a shrimp virus changes the population of long chain fatty acids during infection via the PI3K-Akt-mTOR-HIF1 α pathway[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2015, 53(1): 85-95.
- [5] Diamond D L, Syder A J, Jacobs J M, et al. Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics[J]. PLoS Pathogens, 2010, 6(1): e1000719.
- [6] Hollenbaugh J A, Munger J, Kim B. Metabolite profiles of human immunodeficiency virus infected CD4⁺ T cells and macrophages using LC-MS/MS analysis[J]. Virology, 2011, 415(2): 153-159.
- [7] Munger J, Bajad S U, Collier H A, et al. Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection[J]. PLoS Pathogens, 2006, 2(12): e132.
- [8] Munger J, Bennett B D, Parikh A, et al. Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy[J]. Nature Biotechnology, 2008,

- 26(10): 1179-1186.
- [9] Delgado T, Sanchez E L, Camarda R, et al. Global metabolic profiling of infection by an oncogenic virus: KSHV induces and requires lipogenesis for survival of latent infection[J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(8): e1002866.
- [10] Birungi G, Chen S M, Loy B P, et al. Metabolomics approach for investigation of effects of dengue virus infection using the EA.hy926 cell line[J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(12): 6523-6534.
- [11] Baggetto L. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells[J]. Biochimie, 1992, 74(11): 959-974.
- [12] Curi R, Lagranha C J, Doi S Q, et al. Molecular mechanisms of glutamine action[J]. Journal of Cellular Physiology, 2005, 204(2): 392-401.
- [13] DeBerardinis R J, Mancuso A, Daikhin E, et al. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(49): 19345-19350.
- [14] DeBerardinis R J, Sayed N, Ditsworth D, et al. Brick by brick: Metabolism and tumor cell growth[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2008, 18(1): 54-61.
- [15] Yang L F, Venneti S, Negrath D. Glutaminolysis: A hallmark of cancer metabolism[J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2017, 19(1): 163-194.
- [16] Jiang L, Shestov A A, Swain P, et al. Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth[J]. Nature, 2016, 532(7598): 255-258.
- [17] Fendt S M, Bell E L, Keibler M A, et al. Metformin decreases glucose oxidation and increases the dependency of prostate cancer cells on reductive glutamine metabolism[J]. Cancer Research, 2013, 73(14): 4429-4438.
- [18] Mullen A R, Hu Z P, Shi X L, et al. Oxidation of alpha-ketoglutarate is required for reductive carboxylation in cancer cells with mitochondrial defects[J]. Cell Reports, 2014, 7(5): 1679-1690.
- [19] Metallo C M, Gameiro P A, Bell E L, et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia[J]. Nature, 2012, 481(7381): 380-384.
- [20] Chambers J W, Maguire T G, Alwine J C. Glutamine metabolism is essential for human cytomegalovirus infection[J]. Journal of Virology, 2010, 84(4): 1867-1873.
- [21] Sanchez E L, Carroll P A, Thalhoffer A B, et al. Latent KSHV infected endothelial cells are glutamine addicted and require glutaminolysis for survival[J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(7): e1005052.
- [22] Fontaine K A, Camarda R, Lagunoff M. Vaccinia virus requires glutamine but not glucose for efficient replication[J]. Journal of Virology, 2014, 88(8): 4366-4374.
- [23] 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.
- [24] Sun L D, Yi L Z, Zhang C, et al. Glutamine is required for snakehead fish vesiculovirus propagation via replenishing the tricarboxylic acid cycle[J]. Journal of General Virology, 2016, 97(11): 2849-2855.
- [25] Asim M, Jiang S J, Yi L Z, et al. Glutamine is required for red-spotted grouper nervous necrosis virus replication via replenishing the tricarboxylic acid cycle[J]. Virus Research, 2017, 227: 245-248.
- [26] Fu X, Li N, Lai Y, et al. A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi*: Development and characterization[J]. Journal of Fish Biology, 2015, 86(1): 32-45.
- [27] Guo H Z. The replication of infectious spleen and kidney necrosis virus and *Siniperca chuatsi* rhabdovirus inhibited by tumor suppressor gene p53 in *Siniperca chuatsi*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018. [郭慧芝. 肿瘤抑制基因 p53 抑制鳊传染性脾肾坏死病毒和弹状病毒增殖的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.]
- [28] 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: 2400-2412.
- [29] Yu Y J, Clippinger A J, Alwine J C. Viral effects on metabolism: Changes in glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection[J]. Trends in Microbiology, 2011, 19(7): 360-367.
- [30] Zhu Y, Li T T, da Silva S R, et al. A critical role of glutamine and asparagine γ -nitrogen in nucleotide biosynthesis in cancer cells hijacked by an oncogenic virus[J]. mBio, 2017, 8(4): e01179-17.
- [31] Du J H, Yanagida A, Knight K, et al. Reductive carboxylation is a major metabolic pathway in the retinal pigment epithelium[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(51): 14710-14715.
- [32] Reitman Z J, Duncan C G, Poteet E, et al. Cancer-associated isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) R132H mutation and d-2-hydroxyglutamine stimulate glutamine metabolism under hypoxia[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(34): 23318-23328.

Reductive glutamine metabolism promotes the efficient replication of *Siniperca chuatsi* rhabdovirus in Chinese perch brain cells

GUO Xixi^{1,2}, FU Xiaozhe¹, LIANG Hongru¹, LIN Qiang¹, LIU Lihui¹, NIU Yinjie¹, LI Ningqiu¹

1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangzhou 510380, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Viruses rely on host cellular metabolism for energy and macromolecule synthesis during replication. Therefore, there is a close relationship between viral replication and cellular metabolism. *Siniperca chuatsi* rhabdovirus (SCRV) causes significant economic losses in the Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) industry. Thus, it is important to address the interaction between SCRВ replication and host cells to prevent and control SCRВ. However, little is known about the relationship between SCRВ replication and cellular metabolism. In addition, glutamine is an abundant amino acid necessary for energy generation and macromolecule synthesis in cells. Glutamine is also essential for the infection and replication of some viruses. Glutaminolysis and reductive glutamine metabolism (RGM) are the main pathways of glutamine metabolism. Particularly, the RGM pathway plays an important role in tumor cells. However, the metabolic pathway of glutamine involved in viral replication remains largely uncharacterized. To clarify the interaction between SCRВ replication and RGM, we analyzed the expression of key enzymes in the RGM pathway in Chinese perch brain (CPB) cells following infection with SCRВ, using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and western blotting. Our results showed that SCRВ replication was decreased in CPB cells cultured in a glutamine-depleted medium, indicating that glutamine is required for efficient SCRВ replication. In addition, SCRВ infection promoted the expression of key enzymes involved in the RGM pathway in CPB cells, particularly the expression of isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2), indicating that RGM in CPB cells is altered during SCRВ infection. SCRВ proliferation was also inhibited in CPB cells cultured in the presence of bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (a glutaminase inhibitor), (–)-epigallocatechin monogallate (a glutamate dehydrogenase inhibitor), 5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid (an acetyl-CoA carboxylase inhibitor), or 4-methylene-2-octyl-5-oxotetrahydrofuran-3-carboxylic acid (a fatty acid synthase inhibitor), suggesting that the RGM pathway is beneficial for SCRВ replication and proliferation. Furthermore, downregulation of the IDH2 gene, the product of which converts α -ketoglutarate (α -KG) to citrate, significantly inhibited the yield of SCRВ and the expression of the SCRВ structural protein. Conversely, overexpression of the IDH2 gene significantly increased the yield of SCRВ and the expression of SCRВ structural protein, indicating that IDH2 plays an important role in SCRВ replication and proliferation. These results indicated that SCRВ infection induces RGM to accommodate the biosynthetic and energy needs required for its efficient replication and proliferation. These findings provide new insights into viral pathogenesis and antiviral treatment strategies.

Key words: Chinese perch brain cells; SCRВ; reductive glutamine metabolic

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