

• 动物及兽医生物技术 •

猪繁殖与呼吸综合征病毒诱导巨噬细胞糖酵解促进病毒复制

段滇宁¹, 李雅楠¹, 梁燕娇¹, 黄诗婷¹, 刘建奎^{1,2,3}, 邱龙新^{1,2,3}, 陈洪博^{1,2,3*}

1 龙岩学院 生命科学学院, 福建 龙岩 364012

2 福建省预防兽医学与生物技术高校重点实验室(龙岩学院), 福建 龙岩 364012

3 动物源性人兽共患病防控福建省高校工程研究中心, 福建 龙岩 364012

段滇宁, 李雅楠, 梁燕娇, 黄诗婷, 刘建奎, 邱龙新, 陈洪博. 猪繁殖与呼吸综合征病毒诱导巨噬细胞糖酵解促进病毒复制[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4546-4556.

DUAN Dianning, LI Yanan, LIANG Yanjiao, HUANG Shiting, LIU Jiankui, QIU Longxin, CHEN Hongbo. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection induces glycolysis of macrophages to facilitate viral replication[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4546-4556.

摘要: 为探究糖酵解对猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)在猪肺泡巨噬细胞(porcine alveolar macrophages, PAMs)中复制的作用, 以 PRRSV 感染 PAMs 为研究对象, 采用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、实时荧光定量 PCR、病毒滴度测定和蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 PAMs 感染 PRRSV 后糖代谢的变化, PRRSV 蛋白和病毒滴度及细胞相关基因和蛋白的表达水平; 并应用靶向低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)特异性 siRNA 分析 HIF-1 α 在病毒复制中的作用。结果显示, PRRSV 感染增强 PAMs 糖酵解, 上清液葡萄糖摄取和乳酸含量显著升高($P < 0.05$ 或 0.01), 细胞内 ATP 显著降低($P < 0.05$), 己糖激酶 2 (hexokinase 2, HK2)、6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3, PFKFB3)和丙酮酸激酶 M2 型(pyruvate kinase isozyme type M2, PKM2)含量显著升高($P < 0.05$ 或 0.01); 抑制糖酵解会显著降低 PRRSV 蛋白表达和病毒滴度($P < 0.01$); 特异性 siRNA 敲低 HIF-1 α 的表达后, 糖酵解和 PRRSV 滴度显著降低($P < 0.05$); 抑制糖酵解过程后逆转了 PRRSV 抑制干扰素信号通路。本研究为探索糖酵解在 PRRSV 复制过程中的功能提供了理论支持。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 糖酵解; 缺氧诱导因子 1 α ; 巨噬细胞

资助项目: 国家自然科学基金(32102628); 福建省自然科学基金(2021J01568, 2022J011157)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32102628) and the Natural Science Foundation of Fujian Province (2021J01568, 2022J011157).

*Corresponding author. Tel: +86-597-2797255; E-mail: 82014021@lyun.edu.cn

Received: 2024-03-31; Accepted: 2024-05-13; Published online: 2024-05-15

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection induces glycolysis of macrophages to facilitate viral replication

DUAN Dianning¹, LI Yanan¹, LIANG Yanjiao¹, HUANG Shiting¹, LIU Jiankui^{1,2,3}, QIU Longxin^{1,2,3}, CHEN Hongbo^{1,2,3*}

1 College of Life Science, Longyan University, Longyan 364012, Fujian, China

2 Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine and Biotechnology (Longyan University), Longyan 364012, Fujian, China

3 Engineering Research Center for the Prevention and Control of Animal Original Zoonosis, Longyan 364012, Fujian, China

Abstract: This work aims to explore the effect of glycolysis on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in porcine alveolar macrophages (PAMs). The changes of glucose metabolism, PRRSV protein levels, PRRSV titers, and the relative expression levels of genes and proteins in PAMs were analyzed by ELISA, qPCR, virus titration, and Western blotting after PRRSV infection. The effect of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) on PRRSV replication was subsequently assessed by specific siRNAs targeting to HIF-1 α . The results showed that PRRSV infection enhanced glycolysis, elevated the levels of glucose uptake and lactate in the supernatant ($P < 0.05$ and 0.01 , respectively), reduced ATP production ($P < 0.05$), and up-regulated the expression of hexokinase 2 (HK2), 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (PFKFB3), and pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) in PAMs ($P < 0.05$ and 0.01 , respectively). Glycolysis inhibitors down-regulated the expression of PRRSV proteins and reduced virus titers ($P < 0.01$). The knockdown of HIF-1 α by siRNAs inhibited glycolysis and lowered PRRSV titers ($P < 0.05$). In addition, the interferon pathways inhibited by PRRSV infection were reversed by the inhibition of glycolysis. These findings may facilitate further investigation of the role of glycolysis in PRRSV replication.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; glycolysis; hypoxia-inducible factor 1 α ; macrophages

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的猪的一种高度传染性疾病, 主要造成母猪繁殖障碍和仔猪呼吸困难、高死亡率及免疫机能障碍, 在世界范围内广泛流行, 困扰全球养猪业的持续健康发展。PRRSV 主要感染猪肺泡巨噬细胞, 感染后肿瘤

坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、单核细胞趋化蛋白 1 (macrophage chemoattractant protein-1, MCP-1)、白介素 6 (interleukin-6, IL-6)和白介素 8 (interleukin-8, IL-8)等多种炎症因子大量表达, 使猪机体炎症调节失衡, 目前 PRRSV 没有特效治疗药物, PRRSV 活疫苗和灭活疫苗分别存在对异源毒株效果较差和不能有效介导细胞免疫

等问题,因此充分了解 PRRSV 的复制机制有助于进行疾病防控^[1-3]。

病毒复制改变了宿主细胞的代谢过程,包括糖酵解、脂肪酸合成和谷氨酰胺分解^[4],不同病毒诱导宿主细胞代谢途径有一定差异,葡萄糖作为细胞供能和大分子物质合成重要碳源,在细胞代谢重构中的作用重大。葡萄糖主要通过 2 种途径分解代谢:糖酵解和三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle),目前研究发现宿主细胞糖代谢改变在病毒复制过程中起重要作用,如新型冠状病毒^[5-6]、Seneca virus A^[7]、鸡新城疫病毒^[8]诱导糖酵解过程升高都会促进病毒复制。另有研究发现 PRRSV 通过低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)^[9]、甘油醛-3-磷酸脱氢酶^[10]改变了宿主细胞糖代谢过程,然而目前对猪原代肺泡巨噬细胞(porcine alveolar macrophages, PAMs)糖酵解与 PRRSV 复制之间的关系的研究较少,因此本研究将 PRRSV 感染 PAMs,利用不同种类糖酵解酶的抑制剂,研究抑制糖酵解对 PRRSV 复制的影响,探究糖酵解在 PRRSV 复制过程中的作用,进一步揭示 PRRSV 感染增殖的机制。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

Marc145 细胞、PRRSV 病毒(GenBank 登录号:KP860909)、shHIF1 α 慢病毒(滴度 1×10^8 TU/mL)由本实验室保存;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Biological Industries (BI); Total RNA Extraction Reagent、HiScript III RT SuperMix 和 SYBR Green Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; β -actin 鼠抗单克隆抗体(1:1 000 稀释)购自 Cell Signaling Technology 公司; HIF-1 α 鼠抗单克隆抗体(1:1 000 稀释)抗体购自 Abcam 公司; HK2 兔多克隆抗体(1:1 000

稀释)、PFKFB3 兔多克隆抗体(1:1 000 稀释)、PKM2 兔多克隆抗体(1:1 000 稀释)、PDK3 兔多克隆抗体(1:1 000 稀释)购自北京博奥森公司;山羊抗兔 IgG-HRP、SDS-PAGE 凝胶制试剂盒和超敏增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)检测试剂盒购自碧云天生物科技有限公司;2-脱氧-D-葡萄糖(2-deoxy-D-glucose, 2-DG)、6-磷酸果糖-2-激酶(6-phosphofructo-2-kinase, PFK)抑制剂 PFK-015、草氨酸钠(oxamate)和 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 激动剂 PS48 均购自 Med Chem Express 公司; ATP 含量检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;葡萄糖和乳酸检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 猪原代肺泡巨噬细胞的制备和处理

30 日龄健康断奶仔猪自由采食饮水饲养 3 d 消除机体应激反应,根据文献[11]中的方法采用肺泡灌洗法无菌分离收集 PAMs,用 10% FBS 和 1%青-链霉素的培养液调整细胞浓度至 1×10^6 个/mL 备用。PAMs 以原液感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 1 感染 PRRSV,2 h 后换成含 2% FBS 和 1%青-链霉素的维持液,感染不同时间后收集细胞;或使用不同浓度糖酵解抑制剂的维持液处理,在感染后 24 h 收获细胞,用于后续试验。本研究经龙岩学院伦理委员会审核批准(审查批号:LY2024012X)。

1.2.2 qPCR 检测 mRNA 表达

按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA,并反转录为 cDNA 进行扩增反应,以 β -actin 为内参基因,检测多种目的基因 mRNA 表达水平。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Gene name	Primer sequences (5'→3')	Product length (bp)
<i>PRRSV-F</i>	ACCTCCAGATGCCGTTTGT	78
<i>PRRSV-R</i>	ATGTGCCGTTGACCGTAGT	
<i>IFN-β-F</i>	GCTCCACTACTCAAGTGCTGAAGGCTC	348
<i>IFN-β-R</i>	GCTCCACTACTCAAGTGCTGAAG	
<i>IFITM3-F</i>	GCTGCCCTTCCACCAACG	132
<i>IFITM3-R</i>	ACTGAGTCGATCATCCTTCTCC	
<i>ISG15-F</i>	ACCTGTCGCCAAAGCCCAC	48
<i>ISG15-R</i>	TCTTCACCTTCAGTTCCTACCCAT	
<i>β-actin-F</i>	AGGAAGGAGGGCTGGAAGAG	175
<i>β-actin-R</i>	TGCGGGACATCAAGGAGA	

1.2.3 Western blotting 分析

收集 PAMs 用 RIPA 裂解液获得细胞蛋白样品, 测定浓度, 蛋白质经 Western blotting 进行分析, 4 °C 冰箱过夜孵育目的蛋白一抗, 37 °C 恒温箱孵育辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗 2 h, 洗膜后曝光观察分析, 结果用 Image J 对结果条带进行灰度分析。

1.2.4 病毒 TCID₅₀ 测定

收集的细胞上清液用无血清培养液 10 倍比稀释为 10⁻¹ 至 10⁻⁸, 接种到 96 孔板融合度为 85% 的 Marc145 细胞, 每个稀释度设置 4 个重复, 每孔 100 μL, 在 37 °C CO₂ 培养箱中接种 2 h 后换成维持液, 继续放在 37 °C CO₂ 培养箱中培养 72 h, 观察并统计细胞病变, 用 Reed-Muench 法计算病毒的半数组织细胞感染剂量(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)。

1.2.5 RNAi

将 PAMs 接种 12 孔板, 每孔 1×10⁶ 个, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜, -80 °C 冻存的 shHIF-1α 慢病毒(HIF-1α-559-CCGUGCGAC CAUGAGGAAATT)在冰上融化后使用, 按照 MOI=5 接种, 病毒感染时, 加入 1/2 体积新鲜培养液, 慢病毒感染 4 h 后补足至培养体积。

1.2.6 葡萄糖、乳酸和 ATP 检测

葡萄糖、乳酸和 ATP 检测试剂盒用于检测 PAMs 上清液和细胞中的葡萄糖、ATP 和乳酸

含量。使用葡萄糖测定试剂盒在 505 nm 处通过吸收检测细胞上清液含量; 使用乳酸测定试剂盒在 570 nm 下测量培养上清液中的乳酸产量; 使用 ATP 测定试剂盒在 340 nm 处通过吸收检测细胞内 ATP 含量。

1.3 数据统计分析

试验数据用 GraphPad Prism 5.0 软件进行分析: 组间差异性采用单因素方差分析确定, 结果以平均值±标准差($\bar{x}±s$)表示; $P<0.05$ 表示差异显著; $P<0.01$ 表示差异极显著; ns 表示无显著差异。

2 结果与分析

2.1 PRRSV 感染促进肺泡巨噬细胞糖酵解

为检测 PAMs 感染 PRRSV 后葡萄糖代谢的变化, 将 MOI=1 的 PRRSV 感染 PAMs 后不同时间, 收集细胞和上清液, 结果显示, 与空白对照组相比, PRRSV 感染 24 h 后上清液中葡萄糖浓度显著降低($P<0.05$) (图 1A); 在乳酸含量方面, 与空白对照组相比, PRRSV 感染 12 h 后上清液中乳酸浓度显著升高($P<0.05$), 24 h 后极显著升高($P<0.01$) (图 1B), 表明感染 PRRSV 的 PAMs 对葡萄糖利用增加, 诱导乳酸产生。相较于三羧酸循环(TCA 循环), 葡萄糖若仅通过糖酵解途径进行代谢, 则在相同的质量

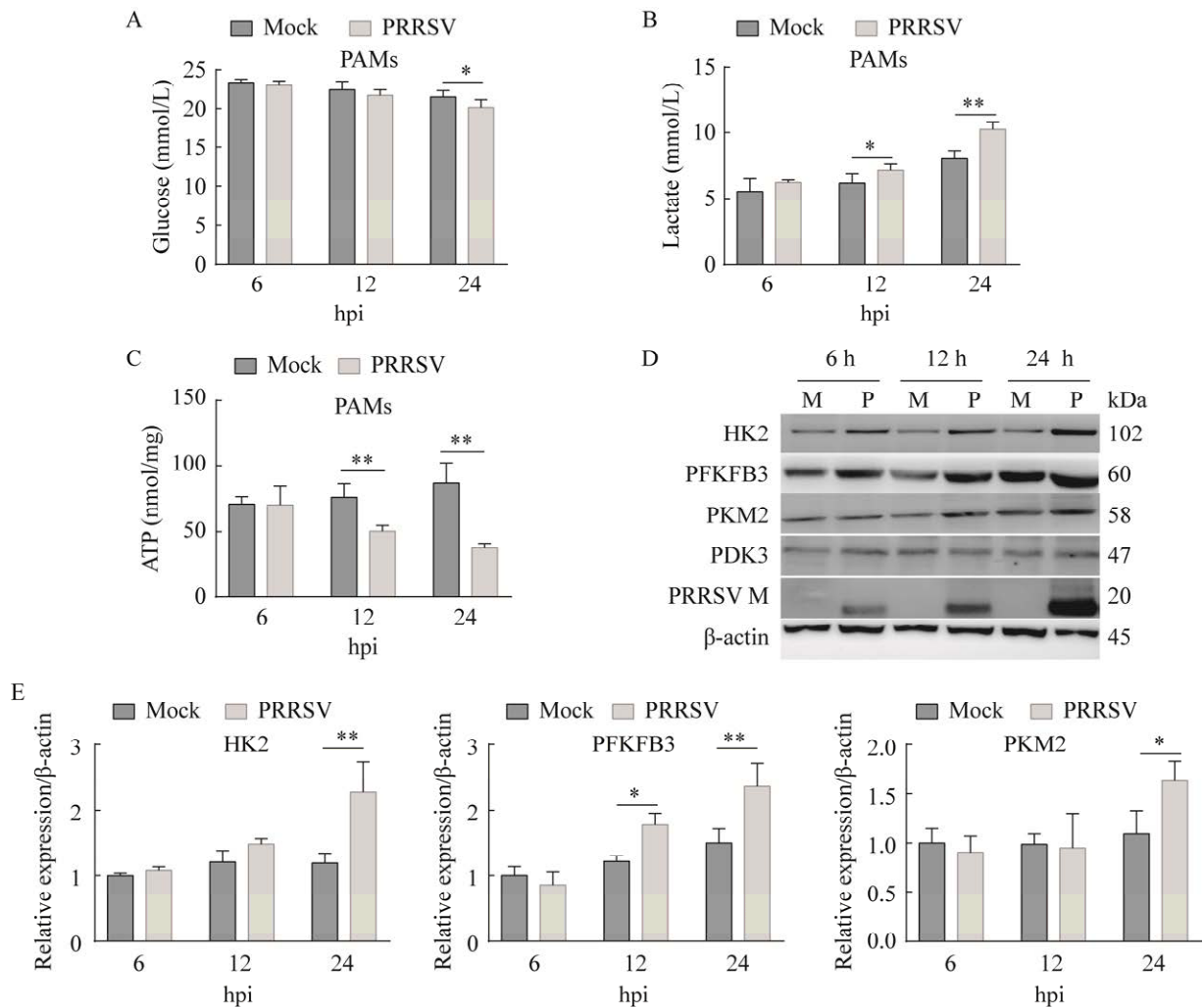


图 1 PRRSV 诱导 PAMs 糖代谢变化 上清液中葡萄糖(A)、乳酸(B)和 PAMs 细胞内 ATP 含量(C)变化. D: Western blotting 检测 HK2、PFKFB3、PKM2、PDK3 和 PRRSV M 的蛋白表达量. E: HK2、PFKFB3 和 PKM2 的灰度值分析. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

Figure 1 PRRSV infection induces glycolysis in PAMs. The content of glucose (A) and lactate (B) in the supernatant, and intracellular ATP content in PAMs (C). D: The expression of HK2, PFKFB3, PKM2, PDK3 and PRRSV M protein were analyzed by Western blotting. E: Gray value analysis of HK2, PFKFB3 and PKM2. M: Mock; P: PRRSV. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

下, 所产生的 ATP 数量显著较少。结果显示, 与空白对照组相比, PRRSV 感染的 PAMs 细胞在 24 h 的细胞内 ATP 水平显著降低($P < 0.01$) (图 1C)。使用 Western blotting 方法进一步检测糖酵解关键限速酶的蛋白水平, 结果如图 1D 所示, HK2、PFKFB3 和 PKM2 在感染后 12 h 或 24 h 显著升高, 而 PDK3 的表达无明显变化。

以上结果表明 PAMs 感染 PRRSV 后糖酵解水平升高。

2.2 糖酵解抑制剂阻碍 PRRSV 复制

为验证 PAMs 糖酵解过程对 PRRSV 复制的必要性, 使用糖酵解抑制剂降低糖酵解水平后检测 PRRSV。2-DG 是葡萄糖的类似物和己糖激酶的竞争性抑制剂, PFK-015 是一种特异性

的 PFKFB3 抑制剂, oxamate 是一种特殊的乳酸脱氢酶抑制剂, 分别用不同浓度的 2-DG、PFK-015 和 oxamate 处理 PAMs, CCK-8 法检测不同抑制剂对细胞毒性, 结果如图 2A 所示, 所用浓度的药物对细胞均无毒性。使用 Western blotting 方法检测 PRRSV 蛋白水平, 结果如图 2B 所示, 2-DG、PFK-015 和 oxamate 均以剂量依赖的方式降低 PRRSV M 蛋白表达。与之相似, 2-DG、PFK-015 和 oxamate 处理 24 h

后, 细胞上清液中的病毒滴度也显著降低(图 2C) ($P<0.05$), PAMs 内病毒 RNA 显著减少(图 2D) ($P<0.05$), 表明抑制糖酵解过程会降低 PAMs 内病毒复制。

2.3 敲低 HIF-1 α 信号通路抑制糖酵解进程影响 PRRSV 复制

HIF-1 α 是决定葡萄糖是通过氧化磷酸化还是糖酵解过程的关键因子, 通过激活糖酵解相关调节酶如 HK2、PFKFB3 和 PKM2 的转录来

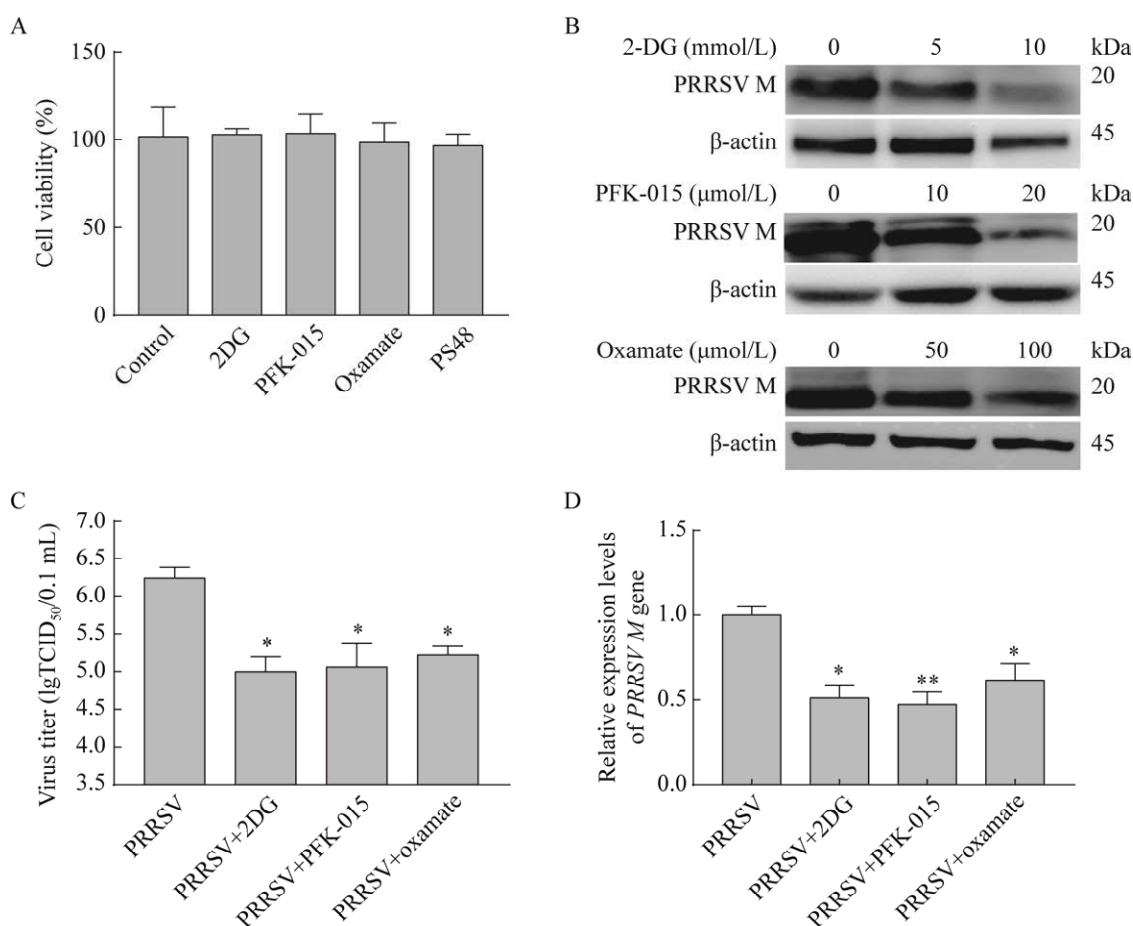


图 2 抑制糖酵解过程减弱 PRRSV 复制 A: 不同抑制剂对 PAMs 细胞活力影响. B: 不同抑制剂对 PRRSV M 蛋白表达水平影响. C: 不同抑制剂对病毒滴度的影响. D: 不同抑制剂对 PRRSV M 基因表达的影响. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

Figure 2 Glycolytic inhibitors impair PRRSV replication. A: The effects of different inhibitors on PAMs cell viability. B: The effects of different inhibitors on PRRSV M protein expression level. C: The effects of different inhibitors on PRRSV viral titer. D: The effects of different inhibitors on PRRSV M gene expression. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

上调糖酵解途径,通过敲低 HIF-1 α 通路下调 PAMs 细胞糖酵解,然后检测其对 PRRSV 复制的影响。检测 PAMs 感染 PRRSV 后 HIF-1 α 表达情况,结果如图 3A 所示,与 Mock 组(未感染 PRRSV)相比, PAMs 感染 PRRSV 后细胞内 HIF-1 α 含量显著升高($P<0.05$)。PRRSV 感染激活 PAMs 内 HIF-1 α 表达,为验证 HIF-1 α 对 PRRSV 复制的作用,通过敲低 HIF-1 α 下调 PAMs 的糖酵解,然后检测其对 PRRSV 复制的影响。利用慢病毒介导的 RNAi 技术建立 shHIF-1 α , 感染 PAMs 48 h 后再接种 PRRSV 24 h 后收取细胞和上清液,与 shctrl 组 PAMs 相比, shHIF-1 α PAMs 中的 HIF-1 α 蛋白显著降低(图 3B); 与 PRRSV 感染的 shctrl 组相比, PRRSV 感染的 shHIF-1 α 细胞中的 PRRSV M 蛋白显著降低

(图 3B);与 PRRSV 感染的 shctrl 组相比, PRRSV 感染的 shHIF-1 α PAMs 细胞上清液中的乳酸浓度显著降低,表明 PRRSV 诱导的糖酵解过程受 HIF-1 α 的调控(图 3C)。结果表明 HIF-1 α 信号通路在 PRRSV 复制过程中起重要作用。

2.4 提高糖酵解代谢过程对 PRRSV 复制的影响

为了进一步验证 PAMs 细胞糖酵解对 PRRSV 复制的影响,测定了糖酵解增强剂对 PRRSV 复制产生的影响。PS48 是一种 PDK1 激活剂,能够将葡萄糖代谢从 TCA 循环转移到糖酵解。PAMs 细胞以 MOI=1 感染 PRRSV, 24 h 后收获细胞和细胞上清液。结果如图 4A–4C 所示, PS48 提高细胞内 PRRSV M 蛋白、病毒 mRNA 水平和病毒滴度,表明增强糖酵解能促进 PRRSV 的复制。

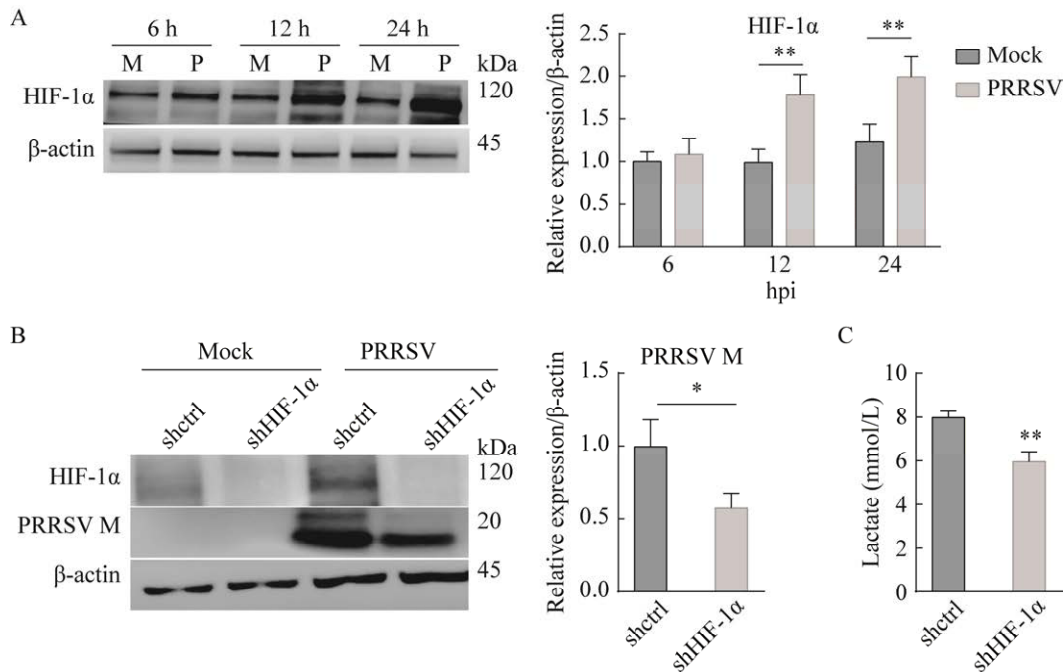


图 3 HIF-1 α 信号通路影响 PRRSV 复制 A: PAMs 感染 PRRSV 后 HIF-1 α 表达水平. B: 抑制 HIF-1 α 表达对 PRRSV M 蛋白表达影响. C: 抑制 HIF-1 α 表达对乳酸含量影响. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

Figure 3 PRRSV replication is impaired by knocking down HIF-1 α pathway. A: The levels of HIF-1 α in PAMs infected with PRRSV. B: The expression of PRRSV M protein in PAMs transfected with HIF-1 α shRNA. C: The levels of lactate in PAMs supernatant transfected with HIF-1 α shRNA. M: Mock; P: PRRSV. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

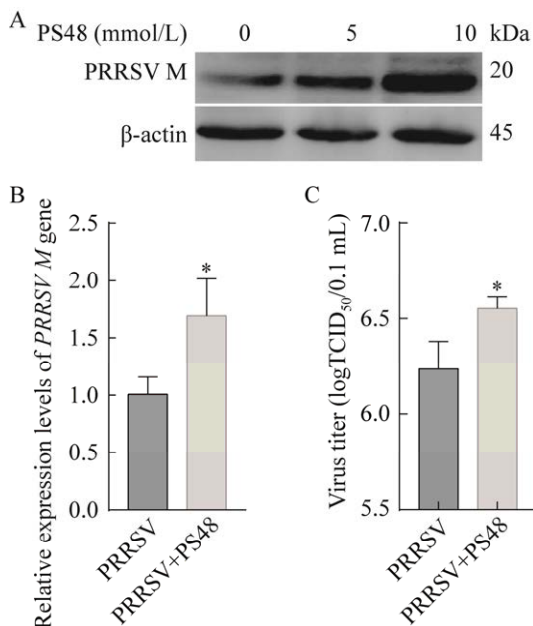


图4 提高糖酵解过程促进 PRRSV 复制 PS48 对 PAMs 细胞 PRRSV M 蛋白表达(A)、*PRRSV M* 基因表达(B)、病毒滴度(C)的影响

Figure 4 Enhancing the glycolytic pathway further promotes PRRSV replication. The effects of PS48 affects the expression of PRRSV M protein (A), *PRRSV M* gene (B), and viral titer (C) in PAMs cells. *: $P < 0.05$.

2.5 糖酵解对 PRRSV 感染 PAMs 中干扰素诱导的影响

干扰素在抗 PRRSV 感染过程中发挥了重要作用,然而 PRRSV 的感染能够抑制干扰素的产生,从而引起猪机体出现明显的免疫抑制现象。干扰素的抗病毒机制是通过诱导机体组织细胞产生抗病毒蛋白,从而抑制病毒的复制。本研究证明 PRRSV 感染促使糖酵解,为进一步验证糖酵解和干扰素的关系,检测抑制或增强糖酵解过程时,PRRSV 感染的 PAMs 细胞中的干扰素产生和干扰素刺激基因(interferon stimulated gene, ISG)水平。结果如图 5 所示,PRRSV 显著抑制 *IFN- β* 的表达($P < 0.01$); PRRSV 感染 2-DG 或 oxamate 抑制糖酵解的 PAMs 后,干扰素表达升高, *ISG15* mRNA 转录水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), *IFITM3* mRNA 转录水平升高但无统计学差异; PS48 处理使 *IFN- β* 、*IFITM3* 和 *ISG15* mRNA 转录水平进一步降低。这些结果表明,PRRSV 调控干扰素表达与糖酵解过程密切相关。

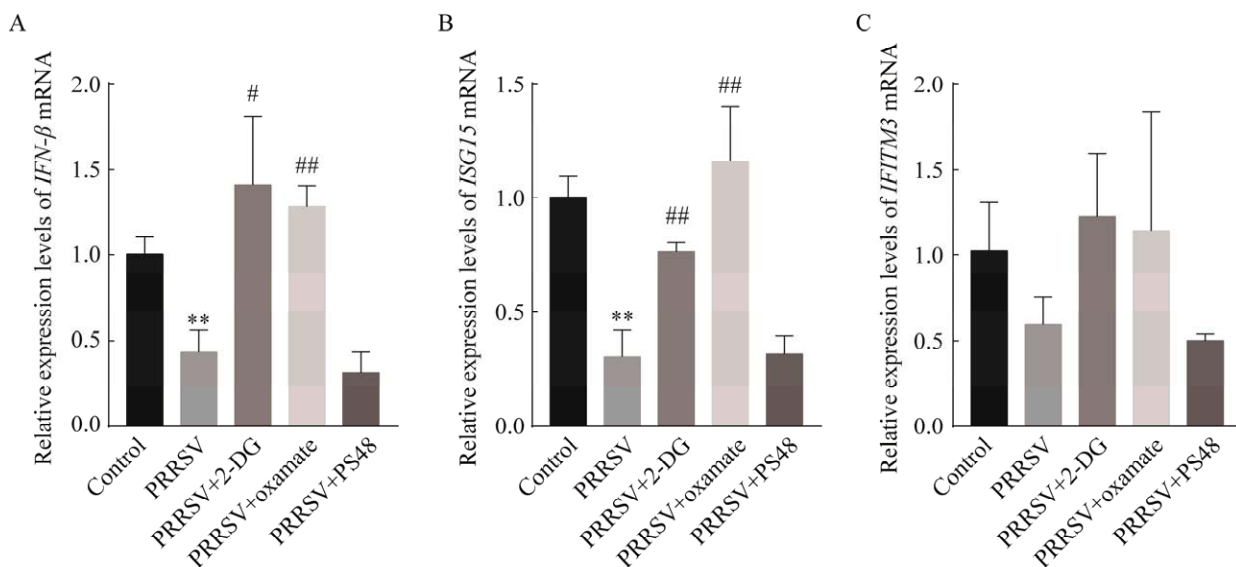


图5 糖酵解对 *IFN- β* mRNA (A)、*ISG15* mRNA (B) and *IFITM3* mRNA (C) 表达的影响

Figure 5 Effect of glycolysis on *IFN- β* mRNA (A), *ISG15* mRNA (B) and *IFITM3* mRNA (C) expression. **: $P < 0.01$ vs. control. #: $P < 0.05$; ##: $P < 0.01$ vs. PRRSV.

3 讨论

病毒依赖宿主细胞代谢来提供其复制所需的能量来驱动其复制、装配和释放,在病毒感染过程中宿主细胞运用多种方式抵御病毒的入侵,包括自身代谢方式改变、自身的免疫防御等,因此对病毒-宿主相互作用的更好理解可能为防控病毒感染提供新的潜在方法。本研究的结果揭示了糖酵解促进 PRRSV 复制,在 PRRSV 感染过程中起重要作用,这可能成为潜在的抗 PRRSV 新方法。

先前的研究结果显示,某些病毒增强宿主细胞的糖酵解,以促进病毒复制。Codo 等^[6]研究发现新型冠状病毒感染的单核细胞通过诱导的 mtROS 产生稳定 HIF-1 α ,从而上调糖酵解基因和表达大量的促炎细胞因子,而糖酵解过程是新型冠状病毒复制所必需的。Zhou 等^[12]研究发现 HBV 激活糖酵解来阻止视黄酸诱导基因 I (retinoic acid-inducible gene-I, *RIG-I*)诱导的干扰素产生,糖酵解抑制剂 DCA 减少 HBV 复制。Li 等^[13]研究发现猪瘟疫病毒(classical swine fever virus, CSFV)感染后会提高糖酵解水平,增加乳酸和丙酮酸的含量,沉默糖酵解代谢的限速酶 HK2 可以诱导自噬,但减少干扰素信号通路、核转录因子 κ B (nuclear transcription factor kappa B, NF- κ B)信号通路,并抑制 CSFV 感染诱导的细胞凋亡。本研究发现 PRRSV 感染 PAMs 后,葡萄糖摄取量增加,细胞上清液中乳酸量显著升高,细胞内 ATP 产生量减少,糖酵解关键酶 HK2、PFKFB3 和 PKM2 含量升高,表明 PRRSV 感染后提高 PAMs 糖酵解水平。使用糖酵解的抑制剂 2-DG、PFK-015 和 oxamate 后,均能抑制 PRRSV 在 PAMs 内的复制;而糖酵解增强剂 PS48 增强 PRRSV mRNA 和蛋白的表达,这些结果表明糖酵解在 PRRSV 复制过程

中起重要作用。

HIF-1 α 是一种主要的转录激活因子,允许细胞适应缺氧,对组织细胞适应缺氧具有调节作用,HIF-1 α 的作用几乎涵盖了生理学的全部方面,包括细胞能量代谢、胚胎发育、免疫应答等方面,同时,HIF-1 α 在炎症方面也起到至关重要的调控作用^[14]。在正常氧气环境条件下,HIF-1 α 被 3 种脯氨酰羟化酶域(prolyl hydroxylase domain, PHD)羟基化,然后被含有冯·希佩尔-林道肿瘤抑制因子(von Hippel Lindau tumor suppressor protein, pVHL)的 E3 连接酶识别,导致其多泛素化和降解,在低氧条件下,PHD 活性的抑制减少了 HIF-1 α 的羟基化,使其稳定^[15]。HIF-1 α 在病毒诱导炎症中起重要作用,病毒感染后细胞内 HIF-1 α 稳定性增加,降解减少,转运进入细胞核,激活 HIF-1 α 通路,使细胞糖酵解水平升高,巨噬细胞向 M1 型极化,诱导多种促炎细胞因子表达,如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等,促进病毒复制^[16-20]。本研究发现 PRRSV 感染导致 PAMs 内 HIF-1 α 蛋白含量升高,可能与 HIF-1 α 的泛素化降低从而引起其在细胞内积累有关。为进一步验证 HIF-1 α 在 PRRSV 感染中的作用,使用 HIF-1 α 的慢病毒降低其在细胞内含量,结果发现 PRRSV 感染后细胞上清液中乳酸含量显著降低,病毒蛋白表达量也显著降低,表明 PRRSV 诱导的糖酵解部分依赖于 HIF-1 α 信号通路。

干扰素是限制病毒基因表达和复制的一道重要防线,研究表明糖代谢与机体免疫系统活动密切相关,一方面激活的免疫系统将代谢系统重新编程为增强的分解代谢活动,另一方面提高代谢满足免疫细胞增加的能量需求^[21-23]。当 RNA 病毒进入细胞,模式识别受体 RIG-I 与线粒体的诱导线粒体抗病毒信号转导蛋白(mitochondria antiviral signaling protein, MAVS)

结合产生反应,诱导 IFN 的产生;病毒感染细胞后,通过提高己糖激酶、乳酸含量,促进细胞糖代谢由氧化磷酸化转为糖酵解,己糖激酶和乳酸竞争性结合 MAVS,促进 MAVS 与 RIG-I 解离,从而抑制干扰素表达^[12,24-25]。本研究结果显示,PRRSV 感染 PAMs 后抑制干扰素表达,PAMs 糖酵解水平升高,抑制 PAMs 糖酵解过程后 PRRSV 诱导的干扰素呈显著降低升高,增强糖酵解后抑制干扰素表达,这表明糖酵解对 PRRSV 复制的影响与干扰素信号密切相关。

4 结论

PRRSV 感染 PAMs 可以激活 HIF-1 α 信号通路,促进宿主细胞的糖酵解,并为病毒的快速复制提供支持,抑制 PAMs 糖酵解过程能显著降低 PRRSV 复制水平。因此,研究 PAMs 细胞代谢与 PRRSV 复制相互作用关系,对阐明 PRRSV 感染机制具有重要意义,为 PRRSV 防控提供了新的方向。

REFERENCES

- [1] HAN J, ZHOU L, GE XN, GUO X, YANG HC. Pathogenesis and control of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 209: 30-47.
- [2] WANG LJ, XIE WT, CHEN XX, QIAO SL, ZHAO MM, GU Y, ZHAO BL, ZHANG GP. Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in central China since 2014: the prevalence of NADC30-like PRRSVs[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 109: 20-28.
- [3] 杨汉春. 猪场蓝耳病的流行现状与防控对策[J]. *兽医导刊*, 2021(1): 7.
YANG HC. Epidemic situation and prevention and control countermeasures of blue ear disease in pig farms[J]. *Veterinary Orientation*, 2021(1): 7 (in Chinese).
- [4] SANCHEZ EL, LAGUNOFF M. Viral activation of cellular metabolism[J]. *Virology*, 2015, 479/480: 609-618.
- [5] MAHROOZ A, MUSCOGIURI G, BUZZETTI R, MADDALONI E. The complex combination of COVID-19 and diabetes: pleiotropic changes in glucose metabolism[J]. *Endocrine*, 2021, 72(2): 317-325.
- [6] CODO AC, DAVANZO GG, de BRITO MONTEIRO L, de SOUZA GF, MURARO SP, VIRGILIO-DA-SILVA JV, PRODONOFF JS, CARREGARI VC, de BIAGI JUNIOR CAO, CRUNFLI F, RESTREPO JL, VENDRAMINI PH, REIS-DE-OLIVEIRA G, dos SANTOS KB, TOLEDO-TEIXEIRA DA, PARISE PL, MARTINI MC, MARQUES RE, CARMO HR, BORIN A, et al. Elevated glucose levels favor SARS-CoV-2 infection and monocyte response through a HIF-1 α /glycolysis-dependent axis[J]. *Cell Metabolism*, 2020, 32(3): 437-446.e5.
- [7] LI HZ, LIN CH, QI WB, SUN ZZ, XIE ZX, JIA WX, NING ZY. Senecavirus A-induced glycolysis facilitates virus replication by promoting lactate production that attenuates the interaction between MAVS and RIG-I[J]. *PLoS Pathogens*, 2023, 19(5): e1011371.
- [8] GONG YB, TANG N, LIU PR, SUN YJ, LU SX, LIU WW, TAN L, SONG CP, QIU XS, LIAO Y, YU SQ, LIU XF, LIN SH, DING C. Newcastle disease virus degrades SIRT3 via PINK1-PRKN-dependent mitophagy to reprogram energy metabolism in infected cells[J]. *Autophagy*, 2022, 18(7): 1503-1521.
- [9] PANG Y, ZHOU YR, WANG YC, SUN Z, LIU J, LI CY, XIAO SB, FANG LR. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp1 β stabilizes HIF-1 α to enhance viral replication[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(6): e0317322.
- [10] LIU XW, LIU X, BAI J, GAO YN, SONG ZB, NAUWYNCK H, WANG XW, YANG YQ, JIANG P. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase restricted in cytoplasmic location by viral GP5 facilitates porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication via its glycolytic activity[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(18): e0021021.
- [11] LU Q, BAI J, ZHANG LL, LIU J, JIANG ZH, MICHAL JJ, HE QD, JIANG P. Two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) labeling approach revealed first proteome profiles of pulmonary alveolar macrophages infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(5): 2890-2903.

- [12] ZHOU L, HE R, FANG PN, LI MQ, YU HS, WANG QM, YU Y, WANG FB, ZHANG Y, CHEN AD, PENG NF, LIN Y, ZHANG R, TRILLING M, BROERING R, LU MJ, ZHU Y, LIU S. Hepatitis B virus rigs the cellular metabolome to avoid innate immune recognition[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 98.
- [13] LI XW, SONG YW, WANG XY, FU C, ZHAO FF, ZOU LK, WU KK, CHEN WX, LI ZY, FAN JD, LI YW, LI BK, ZENG S, LIU XD, ZHAO MQ, YI L, CHEN JD, FAN SQ. The regulation of cell homeostasis and antiviral innate immunity by autophagy during classical swine fever virus infection[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2023, 12(1): 2164217.
- [14] McGETTRICK AF, O'NEILL LAJ. The role of HIF in immunity and inflammation[J]. *Cell Metabolism*, 2020, 32(4): 524-536.
- [15] KOYASU S, KOBAYASHI M, GOTO Y, HIRAOKA M, HARADA H. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: two decades of knowledge[J]. *Cancer Science*, 2018, 109(3): 560-571.
- [16] TIAN MF, LIU WY, LI X, ZHAO PY, SHEREEN MA, ZHU CL, HUANG SY, LIU SY, YU X, YUE MM, PAN P, WANG WB, LI YK, CHEN XL, WU KL, LUO Z, ZHANG QW, WU JG. HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6: 308.
- [17] TANNAHILL GM, CURTIS AM, ADAMIK J, PALSSON-MCDERMOTT EM, McGETTRICK AF, GOEL G, FREZZA C, BERNARD NJ, KELLY B, FOLEY NH, ZHENG L, GARDET A, TONG Z, JANY SS, CORR SC, HANEKLAUS M, CAFFREY BE, PIERCE K, WALMSLEY S, BEASLEY FC, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α [J]. *Nature*, 2013, 496: 238-242.
- [18] GUO XK, ZHU ZQ, ZHANG WJ, MENG XX, ZHU Y, HAN P, ZHOU XH, HU YW, WANG RL. Nuclear translocation of HIF-1 α induced by influenza A (H1N1) infection is critical to the production of proinflammatory cytokines[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2017, 6(5): e39.
- [19] ZHU BB, WU Y, HUANG S, ZHANG RX, SON YM, LI CF, CHEON IS, GAO XC, WANG M, CHEN Y, ZHOU X, NGUYEN Q, PHAN AT, BEHL S, TAKETO MM, MACK M, SHAPIRO VS, ZENG H, EBIHARA H, MULLON JJ, et al. Uncoupling of macrophage inflammation from self-renewal modulates host recovery from respiratory viral infection[J]. *Immunity*, 2021, 54(6): 1200-1218.e9.
- [20] EARLY JO, MENON D, WYSE CA, CERVANTES-SILVA MP, ZASLONA Z, CARROLL RG, PALSSON-MCDERMOTT EM, ANGIARI S, RYAN DG, CORCORAN SE, TIMMONS G, GEIGER SS, FITZPATRICK DJ, O'CONNELL D, XAVIER RJ, HOKAMP K, O'NEILL LAJ, CURTIS AM. Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1 β in macrophages via NRF2[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(36): E8460-E8468.
- [21] LIU XJ, COOPER DE, CLUNTUN AA, WARMOES MO, ZHAO S, REID MA, LIU J, LUND PJ, LOPES M, GARCIA BA, WELLEN KE, KIRSCH DG, LOCASALE JW. Acetate production from glucose and coupling to mitochondrial metabolism in mammals[J]. *Cell*, 2018, 175(2): 502-513.e13.
- [22] LI TL, LI XH, ATTRI KS, LIU CH, LI LP, HERRING LE, ASARA JM, LEI YL, SINGH PK, GAO CJ, WEN HT. O-GlcNAc transferase links glucose metabolism to MAVS-mediated antiviral innate immunity[J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 24(6): 791-803.e6.
- [23] WANG A, HUEN SC, LUAN HH, YU S, ZHANG CL, GALLEZOT JD, BOOTH CJ, MEDZHITOV R. Opposing effects of fasting metabolism on tissue tolerance in bacterial and viral inflammation[J]. *Cell*, 2016, 166(6): 1512-1525.e12.
- [24] ZHANG WN, WANG GH, XU ZG, TU HQ, HU FQ, DAI J, CHANG Y, CHEN YQ, LU YJ, ZENG HL, CAI Z, HAN F, XU C, JIN GX, SUN L, PAN BS, LAI SW, HSU CC, XU J, CHEN ZZ, et al. Lactate is a natural suppressor of RLR signaling by targeting MAVS[J]. *Cell*, 2019, 178(1): 176-189.e15.
- [25] ZHANG LJ, LIU X, MAO J, SUN YY, GAO YN, BAI J, JIANG P. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-mediated lactate facilitates virus replication by targeting MAVS[J]. *Veterinary Microbiology*, 2023, 284: 109846.

(本文责编 陈宏宇)