

吴冰, 季霖, 徐雅雯, 等. 细胞糖酵解对猪流行性腹泻病毒复制的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (3): 113-117.

WU B, JI L, XU Y W, et al. Effect of cellular glycolysis on PEDV replication [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (3): 113-117.

细胞糖酵解对猪流行性腹泻病毒复制的影响

吴冰^{1#}, 季霖^{1#}, 徐雅雯^{1#}, 唐泰山², 杨龙圣³, 何召庆³, 范红结¹, 蔺辉星^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

2. 南京海关动植物与食品检测中心, 江苏 南京 210019;

3. 兆丰华生物科技(南京)有限公司, 江苏 南京 211102)

摘要: 为研究猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 感染细胞后, 细胞糖酵解的变化及其对 PEDV 复制的影响, 本试验通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 PEDV 感染猪小肠上皮细胞 IPEC-J2 后 36 h 糖酵解相关酶己糖激酶 2 (HK2) 的表达水平, 然后通过添加糖酵解抑制剂 2-脱氧-D-葡萄糖 (2-DG) 来进一步验证细胞糖酵解对 PEDV 复制的影响, 最后检测了正常浓度葡萄糖 (5.5 mmol/L) 和高浓度葡萄糖 (11.1 mmol/L 和 22.2 mmol/L) 培养条件下 PEDV 复制情况来探究葡萄糖浓度对 PEDV 复制的影响。结果表明, PEDV 感染显著增加糖酵解限速酶 HK2 的表达, PEDV 感染可增强 IPEC-J2 细胞的糖酵解, 细胞糖酵解水平增强有利于 PEDV 的复制。在一定范围内提高葡萄糖浓度可促进 PEDV 复制。研究结果为初步阐明 PEDV 感染机制以及冠状病毒病的综合防控提供了理论依据。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; 糖酵解; 复制

中图分类号: S852.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)03-0113-05

Effect of cellular glycolysis on PEDV replication

WU Bing^{1#}, JI Lin^{1#}, XU Yawen^{1#}, TANG Taishan², YANG Longsheng³,

HE Zhaoqing³, FAN Hongjie¹, LIN Huixing^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Animal, Plant and Food Inspection Center, Nanjing Customs District, Nanjing 210019, China;

3. Zhaofenghua Bio-Industry (Nanjing) Co., Ltd., Nanjing 211102, China)

Abstract: This study was to investigate the changes in glucose metabolism in IPEC-J2 cells infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and the effect of cell glycolysis on PEDV replication. The level of glycolysis related enzyme Hexokinase 2 (HK2) in IPEC-J2 cells at 36 h post PEDV infection was detected by quantitative PCR and Western blot. Then, the effect of cell glycolysis on PEDV replication was further identified by adding glycolysis inhibitor 2-Deoxy-D-glucose (2-DG). Finally, the replication of PEDV under the conditions of normal concentration of glucose (5.5 mmol/L) and high concentration of glucose (11.1 mmol/L and 22.2 mmol/L) conditions was detected to investigate the effect of glucose concentration on PEDV replication. The results showed that PEDV infection significantly increased the expression of the glycolysis rate limiting enzyme HK2, which means that PEDV infection could enhance the glycolysis in IPEC-J2 cells. The enhanced level of cell glycolysis was conducive to the replication of PEDV. Increasing glucose concentration within a certain range could promote the replication of PEDV. This research provided a theoretical basis for preliminary elucidation of the infection mechanism of PEDV and comprehensive prevention and control of coronaviruses.

Keywords: PEDV; glycolysis; replication

猪流行性腹泻 (PED) 是一种急性肠道传染病,

主要表现为急性水样腹泻、呕吐和死亡, 对新生仔猪的致死率较高^[1-3]。其病原猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 是单股正链 RNA 病毒, 属于套式病毒目冠状病毒科 α 冠状病毒属^[4]。病毒属胞内寄生物, 依靠宿主细胞代谢来完成其复制。病毒感染可诱导宿主细胞代谢途径发生显著的变化, 主要包括中心碳代谢、脂肪酸合成和谷氨酰胺分解代谢等^[5]。尽管病毒诱导的细胞代谢变化在某种程度上存在相似之处, 但每种病毒可能需要其独特的代谢变化才能完成其生

收稿日期: 2023-06-05; 修回日期: 2024-01-09

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1800900); 国家自然科学基金项目 (31702278); 大学生创新训练计划 (SRT) 项目 (202317YX034、202217YX777); 江苏高校优势学科建设工程专项基金项目 (PAPD)

第一作者: 吴冰, 女, 硕士; 季霖, 女, 硕士; 徐雅雯, 女, 硕士研究生。*共同第一作者

*通信作者, 蔺辉星, 讲师, 硕导, 研究方向为兽医微生物学与免疫学, E-mail: linhuixing@njau.edu.cn。

命周期^[5]。例如,甲型流感病毒 H1N1、登革热病毒 (DENV)、诺如病毒 (NV) 和卡波西肉瘤疱疹病毒 (KSHV) 主要诱导糖酵解变化^[6-9];而丙型肝炎病毒 (HCV) 和痘苗病毒 (VACV) 主要激活谷氨酰胺分解代谢变化^[8,10]。据报道,某些冠状病毒如新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 可通过增强宿主细胞的糖酵解来促进自身复制^[11-12],但 PEDV 感染对细胞代谢的影响则报道较少。本研究拟检测 PEDV 感染对细胞糖酵解的影响,并验证糖酵解变化对 PEDV 复制的影响,研究结果将有助于阐明 PEDV 的感染机制,并为冠状病毒病的综合防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

猪小肠上皮细胞 IPEC-J2 和 PEDV 流行毒株 YC2014^[13] (GenBank: KU252649.1) 均由本实验室保存。PEDV N 蛋白单克隆抗体由本实验室制备并保存,糖酵解抑制剂 2-脱氧-D-葡萄糖 (2-DG) 购自美国 MCE 公司,DMEM/F-12 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司,RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 PMSF 购自上海碧云天生物技术有限公司,己糖激酶 2 (HK2) 抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司,鼠抗 β -actin 单克隆抗体购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 PEDV 感染后细胞糖酵解的变化

1.2.1 病毒的细胞感染

IPEC-J2 细胞在 12 孔板中培养约 24 h 长成单层细胞,以感染复数 (MOI) 为 1 将 PEDV YC2014 毒株感染细胞,孵育 1 h 后弃去病毒液并加入维持液。

1.2.2 实时荧光定量 PCR (qPCR)

PEDV 感染 IPEC-J2 细胞后 36 h 将细胞板置于超低温冰箱,反复冻融 3 次,收取细胞裂解液。用 TRIzol 法提取细胞裂解液总 RNA,然后用试剂盒将其反转录为 cDNA。将 cDNA 稀释至合适浓度后作为模板,qPCR 检测糖酵解关键酶 HK2 基因的 mRNA 量,以 β -actin 为内参基因。qPCR 反应条件:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火延伸 30 s,共计 40 个循环。每个样本设 3 个重复。qPCR 所用引物见表 1。

1.2.3 Western blot 分析

PEDV 感染 IPEC-J2 细胞后 36 h,细胞用 PBS 清洗 3 次,每孔加入 100 μ L 蛋白裂解液,冰上作用 15 min 充分裂解细胞。将细胞样品刮下并收集到 1.5 mL 离心管中,在 4 °C 12 000 r/min 离心后吸取上清液,使用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白经 SDS-PAGE 后转印至 PVDF 膜。转印后,用 5% 脱脂乳封

闭 2 h, PBST 清洗 3 次。将 PVDF 膜分别置于脱脂乳稀释的 PEDV N 抗体、HK2 抗体中 4 °C 过夜进行孵育。然后 PBST 清洗 3 次,将 PVDF 膜分别置于羊抗鼠 IgG-HRP 或羊抗兔 IgG-HRP 中,室温孵育 1 h, PBST 清洗 3 次后加入 ECL 显色液,用化学发光成像仪进行拍照。

表 1 引物信息

目的基因	引物序列 (5'-3')	产物长度/ bp
PEDV-N	F: GTGGCTGCCGTC AAGGATT	144
	R: GCCGAAGTGGCTCTGGATT	
HK2	F: ATCCGCTTCCTCCGCTCT	162
	R: CCACCTTCATCCTCCTCTTG	
β -actin	F: GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC	114
	R: CTCCATCATGAAGTGGACGT	

1.3 糖酵解抑制剂对病毒复制的影响

为了研究糖酵解对 PEDV 复制的影响,本试验检测了糖酵解抑制剂 2-DG 对 PEDV 复制的影响。IPEC-J2 细胞在 12 孔板中培养 24 h,加入含有 10 μ mol/L 2-DG 的培养基,预处理 2 h 后弃去培养基,以 MOI 为 1 将 PEDV YC2014 毒株感染细胞,孵育 1 h 后弃去病毒液,然后加入含有 10 μ mol/L 2-DG 的维持液。在感染后 36 h 收取样品,通过 qPCR 以及 Western blot 检测病毒复制的变化。

1.4 不同葡萄糖浓度对病毒复制的影响

为探究葡萄糖浓度适度升高是否有利于 PEDV 的复制,本试验检测了正常浓度 (5.5 mmol/L) 和高浓度 (11.1 mmol/L 和 22.2 mmol/L) 葡萄糖条件下 PEDV 复制的情况。IPEC-J2 细胞在 12 孔板中培养 24 h,以 MOI 为 1 将 PEDV YC2014 毒株感染细胞,孵育 1 h 后弃去病毒液并加入含有正常浓度和高浓度葡萄糖的维持液进行培养。于感染后 36 h 收取样品,通过 qPCR 以及 Western blot 检测病毒复制变化。

1.5 统计分析

使用 GraphPad Prism 8.0 分析所有数据。组间的差异如下所示: $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 表示差异极显著。

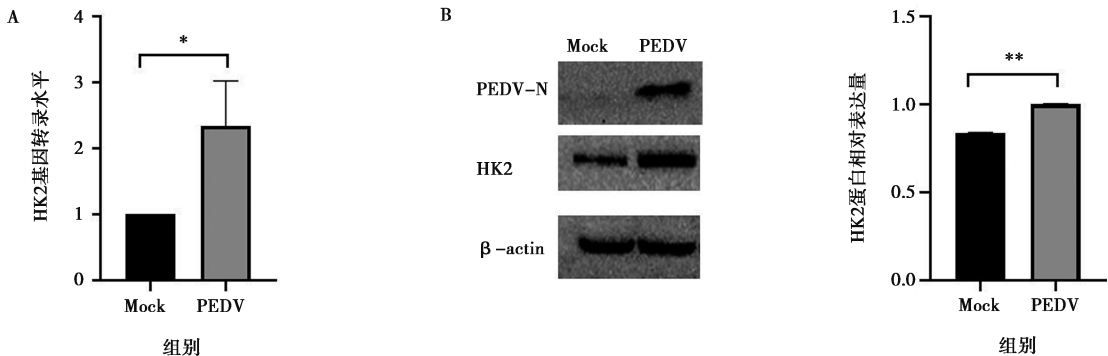
2 结果

2.1 PEDV 感染增强 IPEC-J2 细胞糖酵解

实验室前期的非靶向代谢组学数据显示,与对照组 IPEC-J2 细胞样品相比,PEDV 感染的 IPEC-J2 细胞中糖酵解产物乳酸的含量显著增加,并且通过乳酸含量检测试剂盒验证了该结果。为了确定 PEDV 感染后 IPEC-J2 细胞中糖酵解的变化,收取 PEDV 感染

后 36 h 的 IPEC-J2 细胞样品, 通过 qPCR 检测了 HK2 的转录水平。结果如图 1A 显示, 与对照组 IPEC-J2 细胞样品相比, PEDV 感染显著增强了 HK2 的转录 ($P < 0.05$)。通过 Western blot 分析 PEDV 感

染组和对对照组的糖酵解限速酶 HK2 的表达, 结果如图 1B 所示, 与对照组 IPEC-J2 细胞样品相比, PEDV 感染显著增加 HK2 的表达 ($P < 0.01$), 表明 PEDV 感染增强了 IPEC-J2 细胞的糖酵解。



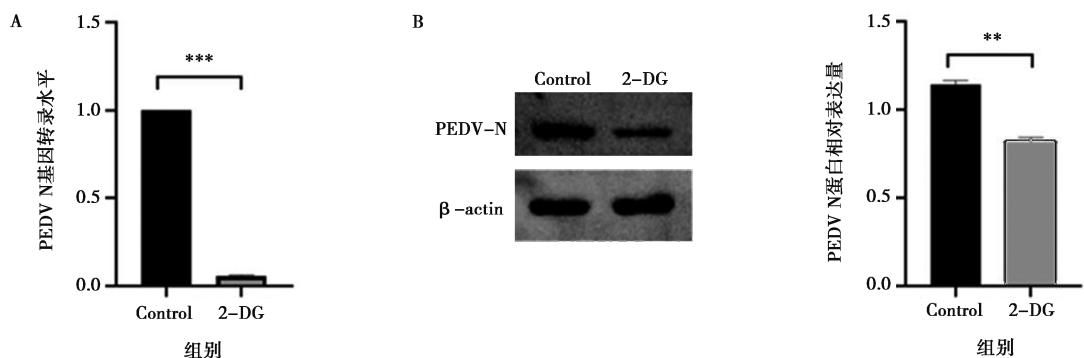
A. HK2 基因转录水平; B. HK2 蛋白表达水平; Mock 为未感染 IPEC-J2 细胞样品; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下同。

图 1 PEDV 感染对 IPEC-J2 细胞 HK2 的影响

2.2 糖酵解抑制剂对 PEDV 复制的影响

本研究进一步检测了使用糖酵解抑制剂来抑制糖酵解是否会对 PEDV 的复制产生影响。己糖激酶是糖酵解途径中的关键酶, 2-DG 是一种葡萄糖类似物, 可竞争性抑制己糖激酶以抑制糖酵解。使用 qPCR 检测对照组与 2-DG 处理组 PEDV N 基因的转录水平, 结果如图 2A 所示, 与对照组 PEDV 感染的 IPEC-J2 细胞相比, 2-DG 处理显著抑制了 PEDV N 基因的转

录 ($P < 0.001$)。使用 Western blot 检测对照组和 2-DG 处理组的 PEDV N 蛋白表达水平, 结果如图 2B 所示, 与对照组 PEDV 感染的 IPEC-J2 细胞相比, 2-DG 处理显著降低了 PEDV N 蛋白的表达水平 ($P < 0.01$), 即 PEDV 复制受到了抑制。上述结果表明, 糖酵解是 PEDV 复制过程中所需的关键代谢途径之一。



A. PEDV N 基因转录水平; B. PEDV N 蛋白表达水平; Control 为 PEDV 感染 IPEC-J2 细胞 36 h 后收取的细胞样品; *** $P < 0.001$ 。

图 2 糖酵解抑制剂 2-DG 对 PEDV 复制的影响

2.3 不同葡萄糖浓度对 PEDV 复制的影响

由于前期研究发现 PEDV 感染会导致培养基中葡萄糖消耗增加, 本试验探究了在细胞维持液中适度增加葡萄糖浓度是否可促进 PEDV 的复制。在病毒感染后使用含有正常浓度 (5.5 mmol/L) 和高浓度

(11.1 mmol/L 和 22.2 mmol/L) 葡萄糖的维持液进行培养, 36 h 后提取细胞蛋白进行 Western blot 检测, 结果如图 3 所示, 高浓度葡萄糖条件下病毒复制显著增加。

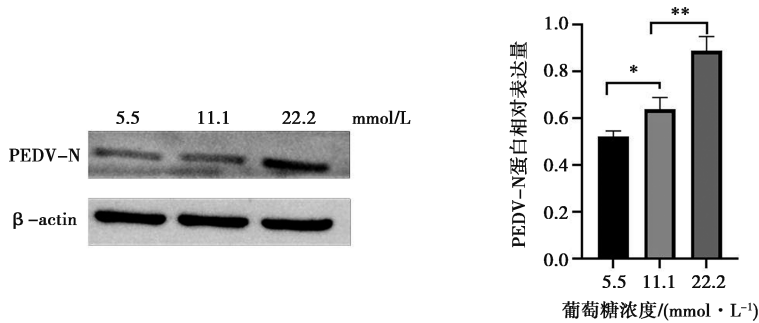


图3 不同葡萄糖浓度对 PEDV 复制的影响

3 讨论

病毒需要依赖细胞代谢来为病毒复制提供能量和生物大分子。许多病毒可增强细胞糖酵解, 如人巨细胞病毒 (HCMV) 和 SARS-CoV-2 感染可激活细胞糖酵解, 而抑制细胞糖酵解可抑制 HCMV 和 SARS-CoV-2 的复制^[11,14-16]。糖酵解可促进细胞脂质的生物合成, 从而促进病毒的复制^[17]。DENV 感染可激活糖酵解促进脂质的生物合成^[18]。HCMV 通过糖酵解为脂肪酸合酶 (FAS) 的生物合成提供原料^[19-20]。本实验室在前期的代谢组学研究发现, PEDV 感染 IPEC-J2 细胞后 36 h, 细胞中乳酸的量显著升高。由于乳酸是细胞糖酵解的产物, 乳酸浓度的升高可反映细胞糖酵解的增强。HK2 是糖酵解过程中的第一个限速酶, 是糖酵解的关键代谢酶之一^[21-22]。本研究结果表明, PEDV 感染导致 HK2 表达水平的升高, 而抑制细胞糖酵解后, PEDV 的复制也受到了抑制。可见, 适度抑制细胞糖酵解有利于防控 PEDV 感染。

病毒感染对细胞糖酵解的调控机制各不相同。腺病毒通过其 E4ORF1 蛋白与上皮细胞中的转录因子 Myc 结合, 激活糖酵解相关基因, 使糖酵解相关酶的表达量升高, 最终使糖酵解增强^[23]。甲病毒可通过其非结构蛋白 3 (Nsp3) 中的 YXXM 基序激活 PI3K/AKT 信号通路, 从而增强细胞糖酵解^[24]。SARS-CoV-2 的非结构蛋白 6 (Nsp6) 与宿主细胞中的 MGA/MAX 复合物相互作用从而介导糖酵解的增强^[25]。PEDV 感染通过何种途径来增强宿主细胞的糖酵解有待进一步研究。

参考文献:

[1] HAVE P, MOVING V, SVANSSON V, et al. Coronavirus infection in mink (*Mustela vison*). Serological evidence of infection with a coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Vet Microbiol*, 1992, 31 (1): 1-10.

[2] LI W, LI H, LIU Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18 (8): 1350-1353.

[3] SUEYOSHI M, TSUDA T, YAMAZAKI K, et al. An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhoea [J]. *J Comp Pathol*, 1995, 113 (1): 59-67.

[4] VIJAYKRISHNA D, SMITH G J, ZHANG J X, et al. Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses [J]. *J Virol*, 2007, 81 (8): 4012-4020.

[5] SANCHEZ E L, LAGUNOFF M. Viral activation of cellular metabolism [J]. *Virology*, 2015 (479/480): 609-618.

[6] REN L, ZHANG W, ZHANG J, et al. Influenza A virus (H1N1) infection induces glycolysis to facilitate viral replication [J]. *Virology*, 2021, 36 (6): 1532-1542.

[7] YOGEV O, LAGOS D, ENVER T, et al. Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs induce metabolic transformation of infected cells [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10 (9): e1004400.

[8] THAI M, THAKER S K, FENG J, et al. MYC-induced reprogramming of glutamine catabolism supports optimal virus replication [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8873.

[9] PASSALACQUA K D, LU J, GOODFELLOW I, et al. Glycolysis is an intrinsic factor for optimal replication of a norovirus [J]. *mBio*, 2019, 10 (2): e02175-18.

[10] FONTAINE K A, CAMARDA R, LAGUNOFF M. Vaccinia virus requires glutamine but not glucose for efficient replication [J]. *J Virol*, 2014, 88 (8): 4366-4374.

[11] CODO A C, DAVANZO G G, MONTEIRO L B, et al. Elevated glucose levels favor SARS-CoV-2 infection and monocyte response through a HIF-1 α /glycolysis-dependent axis [J]. *Cell Metab*, 2020, 32 (3): 437-446.

[12] DE OLIVEIRA L G, DE SOUZA ANGELO Y, YAMAMOTO P, et al. SARS-CoV-2 infection impacts carbon metabolism and depends on glutamine for replication in Syrian hamster astrocytes [J]. *J Neurochem*, 2022, 163 (2): 113-132.

[13] LIN H, CHEN L, GAO L, et al. Epidemic strain YC2014 of porcine epidemic diarrhea virus could provide piglets against homologous challenge [J]. *Virol J*, 2016, 13: 68.

[14] DELGADO T, CARROLL P A, PUNJABI A S, et al. Induction of the Warburg effect by Kaposi's sarcoma herpesvirus is required for the maintenance of latently infected endothelial cells [J]. *PNAS*, 2010, 107 (23): 10696-10701.

[15] MCARDLE J, SCHAFFER X L, MUNGER J. Inhibition of

- calmodulin-dependent kinase kinase blocks human cytomegalovirus-induced glycolytic activation and severely attenuates production of viral progeny [J]. *J Virol*, 2011, 85 (2): 705-714.
- [16] RADSAK K D, WEDER D. Effect of 2-deoxy-D-glucose on cytomegalovirus-induced DNA synthesis in human fibroblasts [J]. *J Gen Virol*, 1981, 57 (Pt 1): 33-42.
- [17] FONTAINE K A, SANCHEZ E L, CAMARDA R, et al. Dengue virus induces and requires glycolysis for optimal replication [J]. *J Virol*, 2015, 89 (4): 2358-2366.
- [18] HEATON N S, PERERA R, BERGER K L, et al. Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis [J]. *PNAS*, 2010, 107 (40): 17345-17350.
- [19] 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]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26 (10): 1179-1186.
- [20] SEO J Y, CRESSWELL P. Viperin regulates cellular lipid metabolism during human cytomegalovirus infection [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9 (8): e1003497.
- [21] WOLF A, AGNIHOTRI S, MICALLEF J, et al. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme [J]. *J Exp Med*, 2011, 208 (2): 313-326.
- [22] GERSHON T R, CROWTHER A J, TIKUNOV A, et al. Hexokinase-2-mediated aerobic glycolysis is integral to cerebellar neurogenesis and pathogenesis of medulloblastoma [J]. *Cancer Metab*, 2013, 1 (1): 2.
- [23] THAI M, GRAHAM N A, BRAAS D, et al. Adenovirus E4ORF1-induced MYC activation promotes host cell anabolic glucose metabolism and virus replication [J]. *Cell Metab*, 2014, 19 (4): 694-701.
- [24] MAZZON M, CASTRO C, THAA B, et al. Alphavirus-induced hyperactivation of PI3K/AKT directs pro-viral metabolic changes [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14 (1): e1006835.
- [25] ZHU J Y, WANG G, HUANG X, et al. SARS-CoV-2 Nsp6 damages *Drosophila* heart and mouse cardiomyocytes through MGA/MAX complex-mediated increased glycolysis [J]. *Commun Biol*, 2022, 5 (1): 1039.

