

# 家蝇 *Mdsirt1* 基因在细菌、高温和重金属胁迫下的表达分析

顾冀海, 李亚静, 李文倩, 唐 婷, 柳峰松\*

(河北大学生命科学学院, 河北保定 071002)

**摘要:**【目的】探究家蝇 *Musca domestica sirt1* 基因 (*Mdsirt1*) 在各种胁迫条件下的表达模式。【方法】以家蝇 2 龄幼虫 cDNA 为模板, PCR 扩增 *Mdsirt1* 基因序列并进行生物信息学分析; 实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测 *Mdsirt1* 在家蝇不同发育阶段 (卵、1 龄幼虫、2 龄幼虫、3 龄幼虫、蛹和成虫) 的表达变化, 2 龄幼虫不同组织 (表皮、肠道、脂肪体和血细胞) 中的表达分布, 以及胁迫条件 (细菌刺激、热激及 CdCl<sub>2</sub> 刺激) 下的转录水平变化; 通过 RNAi 干扰 *Mdsirt1* 基因表达, 观察敲低 *Mdsirt1* 表达后家蝇幼虫抗病能力变化, 并检测机体氧化应激水平。【结果】家蝇 *Mdsirt1* 基因编码蛋白含有 SIR2 结构域, 与厩螫蝇 *Stomoxys calcitrans* SIR2 氨基酸序列一致性为 66%。qRT-PCR 结果显示, *Mdsirt1* 基因主要在家蝇蛹期表达, 在家蝇 2 龄幼虫脂肪体中表达量较高。家蝇幼虫 *Mdsirt1* 分别在大肠杆菌 *Escherichia coli* 刺激 3 h, 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 刺激 6 h, 42°C 热激 30 min 以及 30 mmol/L CdCl<sub>2</sub> 刺激 48 h 时表达量达到最高峰。敲低 *Mdsirt1* 表达的家蝇幼虫受到细菌感染 (大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 1:1 混合感染) 后存活率较对照组显著降低 1.47 倍, 且敲低 *Mdsirt1* 后机体处于氧化应激状态, 活性氧自由基水平和丙二醛含量较对照组分别升高 1.58 和 1.59 倍。【结论】*Mdsirt1* 参与家蝇幼虫的抗菌免疫应答和抗逆反应。

**关键词:** 家蝇; Sirtuins 蛋白; 免疫; 热激; 重金属胁迫

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2017)12-1394-09

## Expression profiles of *Mdsirt1* in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) under stresses of bacteria, high temperature and heavy metal

GU Ji-Hai, LI Ya-Jing, LI Wen-Qian, TANG Ting, LIU Feng-Song\* (College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China)

**Abstract:**【Aim】This study aims to explore the expression pattern of *Musca domestica sirt1* gene (*Mdsirt1*) under various stress conditions.【Methods】The sequence of *Mdsirt1* gene was cloned by PCR from the 2nd instar larvae of *Musca domestica* and subjected to bioinformatics analysis. The expression profiles of *Mdsirt1* in different developmental stages (egg, 1st instar larva, 2nd instar larva, 3rd instar larva, pupa and adult), various tissues of the 2nd instar larvae (cuticle, gut, fat body and hemocyte), and the 2nd instar larvae under stresses (challenged by bacteria, heat shock and CdCl<sub>2</sub> stimulation) were investigated via quantitative real-time PCR (qRT-PCR). RNAi was employed to knock down the expression of *Mdsirt1* in *M. domestica* larvae by microinjection with dsRNA, and then the resistance of larvae to bacteria and oxidative stress was detected.【Results】The deduced protein encoded by *Mdsirt1* contains a predicted SIR2 domain, and shows 66% sequence identity with SIR2 from *Stomoxys calcitrans*.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31572327); 河北省自然科学基金项目 (C2015201013); 河北省重点实验室运行补助费 (14967611D)

作者简介: 顾冀海, 男, 1990 年生, 硕士研究生, 研究方向为无脊椎动物免疫学, E-mail: biogjh@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: liufengsong@hbu.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-08-28; 接受日期 Accepted: 2017-11-21

qRT-PCR results showed that *Mdsirt1* was mainly transcribed in the pupal stage and fat body of the 2nd instar larvae of *M. domestica*. Enhanced expression of *Mdsirt1* was observed in response to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* challenge for 3 and 6 h, respectively. The expression of *Mdsirt1* was significantly induced by heat shock of 42°C for 30 min, and cadmium stimulation (exposure to 30 mmol/L CdCl<sub>2</sub>) for 48 h. The survival rate observed in larvae treated with dsRNA of *Mdsirt1* under bacterial challenge (*E. coli*: *S. aureus* = 1:1) was 1.47-fold lower than that treated with dsRNA of *GFP*. RNAi-mediated knockdown of *Mdsirt1* led to oxidative stress, and caused rapid increase of 1.58- and 1.59-fold in the reactive oxygen species (ROS) level and malondialdehyde (MDA) content, respectively. **【Conclusion】** *Mdsirt1* is involved in immunity and stress resistance in *M. domestica* larvae.

**Key words:** *Musca domestica*; sirtuins; immunity; heat shock; heavy metal stress

SIR2 (silent information regulator 2) 蛋白是最早发现于啤酒酵母中的一种烟酰胺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>) 依赖的组蛋白/非组蛋白去乙酰基酶, 因其编码基因表达上调能显著延长酵母寿命而备受关注 (Shore *et al.*, 1984; Rine and Herskowitz, 1987; Kaeberlein *et al.*, 1999)。SIR2 同源蛋白相对保守, 形成一个 Sirtuins 蛋白家族, 广泛分布在从古细菌到哺乳动物的各个生物类群中 (Imai *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2001)。

Sirtuins 家族蛋白属于保守的 III 类去乙酰化酶, 以 NAD<sup>+</sup> 作为催化的底物, 活性不受曲古菌素 A 和聚 4-甲基戊烯的抑制 (Imai *et al.*, 2000)。从酵母到哺乳动物的真核生物中, Sirtuins 家族蛋白被认为与机体的抗衰老相关 (Guarente, 2013), 并且能够阻止包括神经退行性疾病、糖尿病、心血管、癌症等多种与衰老相关疾病的发生 (Guarente, 2011)。SIRT1 蛋白是哺乳动物中研究最为深入的 Sirtuins 家族蛋白成员, 在哺乳动物中均能找到 SIRT1 同源蛋白, 它们主要存在于细胞核中 (Knight and Milner, 2012)。最初的研究认为 SIRT1 只是一种具备能够将组蛋白去乙酰化的去乙酰化酶 (Imai *et al.*, 2000), 但随后的研究证实 SIRT1 也能够以非组蛋白作为底物, 如 p53 (Gonfloni *et al.*, 2014), PGC-1 $\alpha$  和 FoxO1 (Frescas *et al.*, 2005) 等。随着研究深入, SIRT1 在能量代谢、线粒体发生、缺氧应激、血管生成等方面的作用得到了证实 (Knight and Milner, 2012)。此外, SIRT1 作为调控癌症发生的重要蛋白, 以及作为影响基因组稳定的调控因子也备受瞩目 (Jang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Menssen *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014)。另外也有报道认为, SIRT1 调控先天免疫细胞中前炎症细胞因子的生成, 参与哺乳动物的免疫防御过程 (Geissmann *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2017)。SIRT1

通过激活 T 细胞参与获得性免疫应答过程 (Kong *et al.*, 2012, 2013)。

家蝇 *Musca domestica* 属双翅目 (Diptera) 蝇科 (Muscidae), 是一种世界性广泛分布的昆虫, 长期进化使得该类群具有强大的防御保护体系和环境适应能力, 以家蝇作为模式动物研究免疫机制具有明显的优势。本实验室对家蝇感染细菌前后的转录组进行了分析 (Tang *et al.*, 2014), 发现家蝇体内 *sirt1* 同源基因 *Mdsirt1* 的表达在细菌感染后显著上调, 暗示此基因可能参与了家蝇的免疫应答。本研究对 *Mdsirt1* 基因进行了克隆验证, 并探究了其在家蝇免疫和抗逆过程中的作用, 对完善家蝇 *sirt1* 功能及其作用机制具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试虫与试剂

家蝇 *Musca domestica* 种蝇为中国科学院动物研究所何凤琴老师惠赠, 由本实验室饲养。攻毒用大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC25922、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC29213、L4440 质粒和 HT115 宿主为实验室保存。RNAiso Plus, M-MLV 反转录酶和 SYBR Green 为 TaKaRa 公司产品, 引物合成由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

### 1.2 家蝇 *Mdsirt1* 基因克隆及序列分析

按照 NCBI 数据库家蝇 SIR2 序列 (XM\_005182577.3) 设计引物 sirt-F1 和 sirt-R1 (表 1), 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增验证 *Mdsirt1* 基因序列。PCR 条件: 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 40 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环。PCR 产物经电泳分离, 切胶回收后连接 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  细胞, 筛选阳性克隆测序鉴定。

表 1 引物列表  
Table 1 Primer list

引物 Primers	引物序列(5' - 3') Primer sequences	引物用途 Use of primers
sirt-F1	CATCACCTAATATAGTTG	cDNA 克隆
sirt-R1	TTTTTTTATCAAGATTAT	cDNA cloning
dsMdsirt-F	GCGAATTCAAGTCCGACCAGTAGCAT	RNA 干扰 RNA interference
dsMdsirt-R	GCAAGCTTGAAACGCAGTCATTATCC	
dsGFP-F	CGGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	
dsGFP-R	CGCTCGAGCTTGACAGCTCGTCCATGC	
sirt-F2	AAGTCCGACCAGTAGCAT	qRT-PCR
sirt-R2	ACATCACCATCTCCCAAC	
actin-F	GAGAAATCCTATGAACTTCCCGACG	
actin-R	GGATACCGCAAGATTCCATACCCAA	

利用 NCBI 在线 ORF Finder 软件搜索开放阅读框,翻译成氨基酸序列;利用 Protein BLAST 在 NCBI 数据库中进行相似性比对,下载其他物种 *sirt1* 蛋白序列,通过 ClustalW 软件进行多重比对,用 MEGA6 软件构建 NJ(neighbor-joining)分子系统进化树。

### 1.3 家蝇不同发育阶段和组织样品制备

分别选取处于不同发育时期的家蝇,包括卵、1 龄幼虫、2 龄幼虫、3 龄幼虫、蛹和成虫;参考 Gao 等 (2015) 方法,解剖家蝇 2 龄幼虫,分离表皮、肠道、脂肪体,并收集血细胞。发育和组织样品每组设置 3 个生物学重复,分别提取总 RNA,合成 cDNA。

### 1.4 家蝇幼虫攻毒实验

选取大小均一的 2 龄幼虫,用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌对家蝇幼虫进行攻毒实验 (Gao *et al.*, 2015)。用 0.9% 生理盐水分别将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌稀释成  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$  CFU/mL 浓度,以 0.9% 生理盐水作为对照组,细菌感染 12 h 后取样分别提取 RNA。以一定细菌浓度感染家蝇幼虫,在感染 3, 6, 12, 24, 48 和 72 h 取样分别提取 RNA。各实验点分别设置 3 个生物学重复。

### 1.5 家蝇幼虫热激和重金属胁迫实验

参考柳峰松等 (2012) 方法,在高温 42°C 和 CdCl<sub>2</sub> 条件下处理家蝇幼虫。选取大小均一家蝇 2 龄幼虫置于 42°C 培养箱处理 15, 30 和 60 min 取样,之后将幼虫置于 28°C 条件下恢复 2 h (记为 R2 h) 和 4 h (记为 R4 h) 取样;30 mmol/L CdCl<sub>2</sub> 水溶液代替饲料中的水投喂家蝇幼虫,于 6, 12, 24 和 48 h 取样。各实验点分别设置 3 组生物学重复,分别提取 RNA。

### 1.6 RNA 提取及反转录

按照 RNAiso Plus 使用说明书提取家蝇幼虫总

RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测其完整性后,测定浓度后取 2 μg 总 RNA 为模板,用 oligo dT 反转录合成 cDNA。

### 1.7 dsRNA 诱导及 RNAi 实验

按照路永鹏等 (2016) 的方法,制备 *Mdsirt1* 基因 dsRNA,首先根据 *Mdsirt1* 序列信息设计引物 dsMdsirt-F 和 dsMdsirt-R (表 1),以家蝇 2 龄幼虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,将 289 bp 的扩增产物经切胶回收、酶切后连接 L4440 载体,转化 DH5α 感受态,挑选阳性克隆并测序验证,得到 L4440-*Mdsirt1* 干扰载体,提取质粒转化大肠杆菌 HT115 感受态细胞,诱导 dsRNA 表达,纯化 dsRNA 并测定其浓度。同时以 dsGFP-F 和 dsGFP-R 为引物 (表 1) 制备 GFP 的 dsRNA 作为对照。

通过显微注射分别将 0.5 ng dsRNA-*Mdsirt1* (ds*Mdsirt1*) 和 dsRNA-GFP (ds*GFP*) 注射到家蝇 2 龄幼虫体内,分别在注射 12, 24 和 48 h 后利用 qRT-PCR 检测 *Mdsirt1* 干扰效果。取干扰效果显著的 ds*Mdsirt1* 实验组和 ds*GFP* 对照组幼虫各 100 头,按照上文攻毒实验方法进行大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 1:1 混合感染,分别在 3, 6, 24 和 36 h 统计家蝇幼虫存活率,各实验点分别设置 3 个生物学重复。

### 1.8 活性氧 (ROS) 水平和脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 含量测定

提取家蝇幼虫总蛋白,运用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测,采用碧云天生物技术公司的活性氧检测试剂盒,在 488 nm 激发波长,525 nm 发射波长下实时检测荧光的强弱变化,荧光值反映细胞内活性氧的水平;通过南京建成生物工程研究所丙二醛 (MDA) 测定试剂盒检测硫代巴比妥酸在 532 nm 下比色吸光度值变化,测定脂质过氧化物 MDA 含

量。各实验点分别设置 3 个生物学重复。

### 1.9 qRT-PCR 检测 *Mdsirt1* 在不同发育阶段和组织中的表达

根据家蝇 *Mdsirt1* 基因序列设计 qRT-PCR 定量引物 sirt-F2 和 sirt-R2, 以组成型表达的  $\beta$ -actin 为内参基因, 引物为 actin-F 和 actin-R (表 1), qRT-PCR 检测 *Mdsirt1* 在家蝇不同发育阶段和 2 龄幼虫不同组织中的表达。qRT-PCR 反应体系: cDNA 2.5  $\mu$ L, sirt-F2 和 sirt-R 各 1.25  $\mu$ L, 2  $\times$  SYBR Premix Ex Taq 12.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7.5  $\mu$ L。qRT-PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 40 个循环。

### 1.10 数据统计与分析

利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 qRT-PCR 检测的基因的相对表达量。采用 SPSS 软件对实验数据进行统计分析, 实验结果用平均值  $\pm$  标准误差表示, 组间差异采用单因素方差分析和 Tukey 氏检验方法, 两组比较采用 Student *t* 检验进行分析。

## 2 结果

### 2.1 家蝇 *Mdsirt1* 的序列分析

经 PCR 和测序验证, 获得家蝇 *Mdsirt1* 基因 cDNA 序列 3 486 bp, 此序列包含 2 673 bp 完整的开放阅读框, 推导的多肽序列含 890 个氨基酸残基。在 NCBI 进行 Protein BLAST 同源搜索, 比对结果表明 *Mdsirt1* 氨基酸序列与厩螫蝇 *Stomoxys calcitrans* SIR2 (GenBank 登录号: XP013114235) 氨基酸序列一致性最高 (66%)。Mdsirt1 序列含有保守的 206 个氨基酸残基的 SIRT1 结构域, 与厩螫蝇 *Stomoxys calcitrans* 和果蝇 *Drosophila arizonae* 等双翅目昆虫 Sirtuins 家族成员 SIR2 结构域具有较高相似性 (图 1: A)。与酵母 SIR2 和人的 SIRT1 序列的氨基酸序列一致性分别为 45% 和 58%。将 *Mdsirt1* 与部分其他物种的 Sirtuins 蛋白家族成员进行比对后构建 NJ 系统发育树, 结果发现 *Mdsirt1* 与光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*、细枝蚂蚁 *Pseudomyrmex gracilis* 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster sirt1* 蛋白聚为一支, 表明家蝇 *Mdsirt1* 属于 SIR2 家族 sirt1 成员 (图 1: B)。

### 2.2 *Mdsirt1* 在不同发育阶段、幼虫不同组织及胁迫条件下的表达

运用 qRT-PCR 方法对家蝇不同发育阶段和 2 龄幼虫不同组织中的 *Mdsirt1* 表达水平进行分析, 结

果显示, *Mdsirt1* 在蛹期表达量最高, 幼虫和成虫期表达量较低 (图 2: A); *Mdsirt1* 在 2 龄幼虫脂肪体中的表达量最高, 其他依次是肠道、表皮和血细胞 (图 2: B)。在  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$  CFU/mL 的细菌浓度范围内, *Mdsirt1* 表达量随着感染细菌的浓度升高而升高, 在细菌浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 时, *Mdsirt1* 表达量最高 (图 2: C)。Mdsirt1 在该浓度下的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌刺激不同时间呈现出相似的表达模式, 均在刺激 3 h 后表达上调, 分别在金黄色葡萄球菌刺激 6 h, 大肠杆菌刺激 3 h 时达到峰值, 随后逐渐回落但表达量仍高于对照组 (图 2: D)。在 42 $^{\circ}$ C 高温热激 15 min 时 *Mdsirt1* 开始上调, 在热激 30 min 时 *Mdsirt1* 的表达量达到最高值, 热激 1 h 以及恢复 2 h 和 4 h 时 *Mdsirt1* 表达量均逐渐下降, 但是仍然高于对照组 (图 2: E)。不同 Cd<sup>2+</sup> 浓度投喂家蝇幼虫 24 h 统计其存活率, 确定半致死浓度 LC<sub>50</sub> 为 30 mmol/L (数据未给出)。以此浓度投喂家蝇幼虫不同时间 *Mdsirt1* 的表达结果显示, 随着 30 mmol/L Cd<sup>2+</sup> 处理时间的延长 *Mdsirt1* 的表达量随之升高 (图 2: F)。

### 2.3 RNAi 敲低 *Mdsirt1* 后家蝇体内氧化应激水平检测

将 ds*Mdsirt1* 注射家蝇 2 龄幼虫进行 RNA 干扰, 处理 24 ~ 48 h *Mdsirt1* mRNA 的表达量显著低于对照组 (图 3: A)。将干扰 24 h 后的家蝇幼虫进行细菌感染实验, 结果显示随着时间延长 *Mdsirt1* 干扰组存活率较 ds*GFP* 对照组明显降低 1.47 倍 (图 3: B)。而 ds*Mdsirt1* 处理 36 h 后 *Mdsirt1* 干扰组中, 家蝇幼虫体内的活性氧 (ROS) 水平 (图 3: C) 和脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 含量 (图 3: D) 较 ds*GFP* 对照组分别升高 1.58 和 1.59 倍。

## 3 讨论

哺乳动物中发现有 7 个 SIR2 样蛋白 Sirtuins (SIRT1 - 7) (Guarente, 2013)。我们在家蝇的转录组中搜索到 5 条基因编码的蛋白具有 SIR2 结构域, 与其他 Sirtuins 蛋白超家族聚类分析发现, 这 5 个基因的编码蛋白分别属于 SIRT1, SIRT2, SIRT4, SIRT6 和 SIRT7 成员。在公共数据库中检索黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 Sirtuins 基因, 可搜索到 SIRT1, SIRT2, SIRT4, SIRT6 和 SIRT7, 与家蝇的 Sirtuins 家族成员一样缺少与哺乳动物同源的 SIRT3 和 SIRT5。本研究 *Mdsirt1* 结构域与其他双翅目蝇

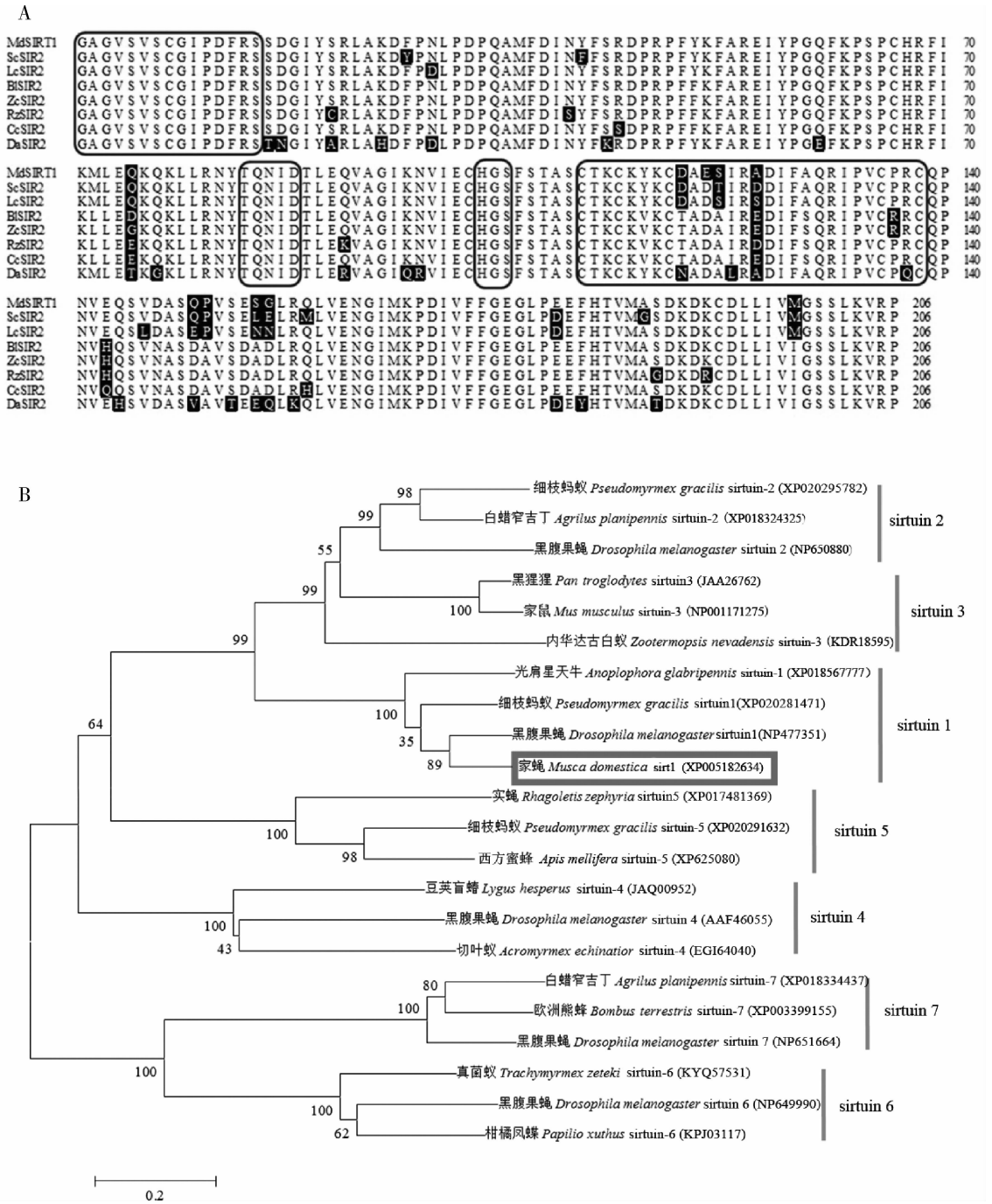


图 1 家蝇 Mdsirt1 与其他昆虫 SIR2 的氨基酸序列比对 (A) 以及基于氨基酸序列构建的进化树 (B)

Fig. 1 Multiple sequence alignment (A) of Mdsirt1 from *Musca domestica* and SIR2 from other insects and the phylogenetic tree (B) constructed based on amino acid sequences

A: 基于 sirt1 结构域的家蝇 Mdsirt1 与其他昆虫 SIR2 多序列比对 Multiple alignment of Mdsirt1 from *M. domestica* and SIR2 from other insects based on sirt1 domains. 蛋白来源及 GenBank 登录号 Origin of proteins and their GenBank accession numbers: MdsIRT1: 家蝇 *Musca domestica*, XP005182634; ScSIR2: 厩螫蝇 *Stomoxys calcitrans*, XP013114235; LcSIR2: 铜绿蝇 *Lucilia cuprina*, KNC22852; BISIR2: 辣椒实蝇 *Bactrocera latifrons*, XP018783705; ZcSIR2: 瓜实蝇 *Zeugodacus cucurbitae*, XP011180253; RzSIR2: 苹果实蝇 *Rhagoletis zephyria*, XP017475416; CcSIR2: 地中海实蝇 *Ceratitis capitata*, XP004531383; DaSIR2: 果蝇 *Drosophila arizonae*, XP017859852. GAGxSxxxGIPDFR, TQNIID, HGS 和 CxxC-x<sub>20</sub>-CxxC 基序分别用方框标示 The motifs of GAGxSxxxGIPDFR, TQNIID, HGS and CxxC-x<sub>20</sub>-CxxC are indicated with the box, respectively. B: 家蝇与其他物种基于 Sirtuins 氨基酸序列的邻接法系统发育树。分支数数值表示重复 1 000 次后的自展值。Neighbor-joining phylogenetic tree based on the amino acid sequences of sirtuins from *M. domestica* and other insects. Numbers on branches are bootstrap values based on 1 000 replicates.

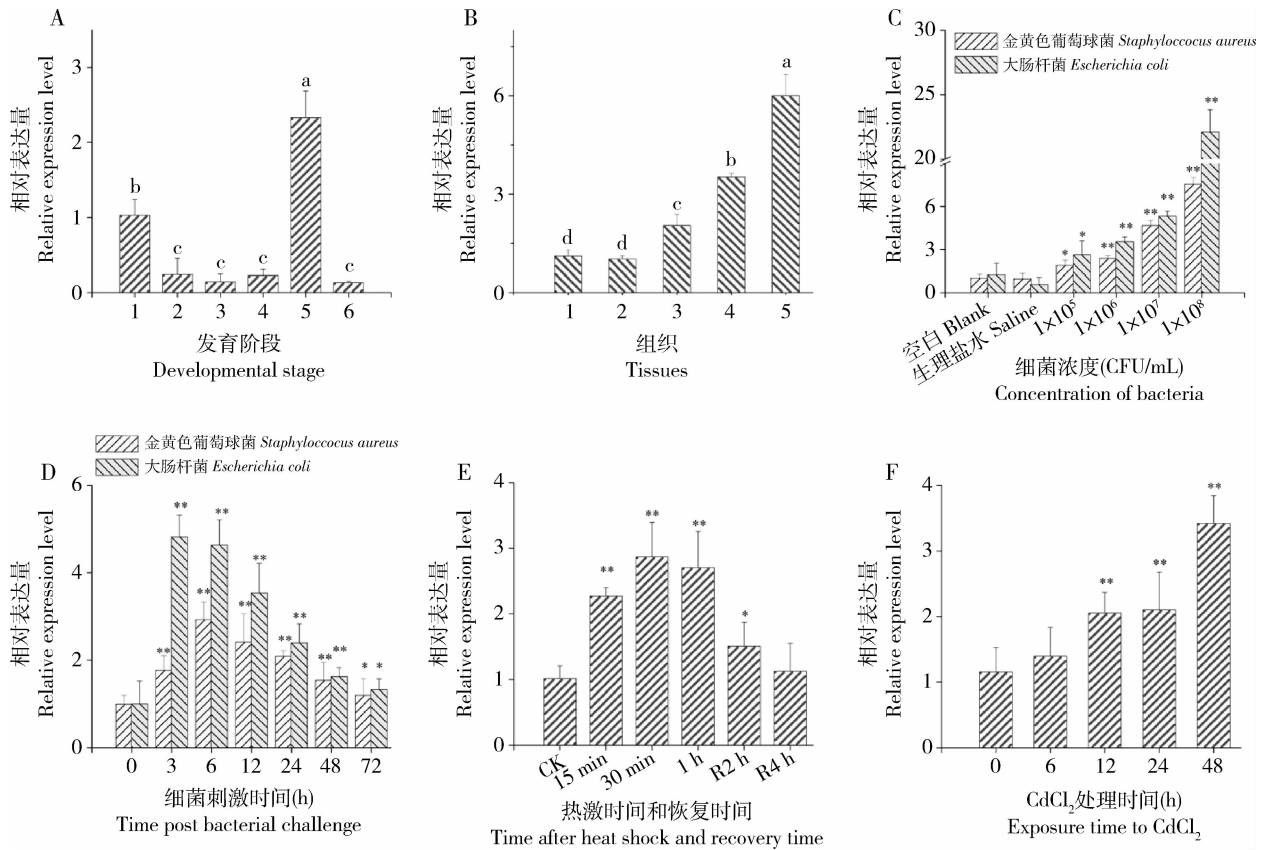


图 2 *Mdsirt1* 在家蝇不同发育阶段(A)以及 2 龄幼虫不同组织(B)和胁迫条件(C-F)下的表达分析

Fig. 2 Expression profiles of *Mdsirt1* in different developmental stages (A), various tissues (B) and under stress (C-F) in the 2nd instar larvae of *Musca domestica*

A: 家蝇 *Mdsirt1* 基因在不同发育阶段的表达 Expression of *Mdsirt1* at different developmental stages of *M. domestica*; 1: 卵 Egg; 2: 1 龄幼虫 1st instar larva; 3: 2 龄幼虫 2nd instar larva; 4: 3 龄幼虫 3rd instar larva; 5: 蛹 Pupa; 6: 成虫 Adult. B: *Mdsirt1* 基因在家蝇 2 龄幼虫不同组织中的表达 *Mdsirt1* transcripts in different tissues from the 2nd instar larvae of *M. domestica*; 1: 全虫 Whole body; 2: 血细胞 Hemocyte; 3: 表皮 Cuticle; 4: 肠道 Gut; 5: 脂肪体 Fat body. C: 不同浓度细菌刺激 12 h 后 *Mdsirt1* 基因的表达 Relative expression level of *Mdsirt1* post challenge with different concentrations of bacteria for 12 h. D: *Mdsirt1* 基因在细菌刺激家蝇 2 龄幼虫后不同时间的表达 Relative expression level of *Mdsirt1* in the 2nd instar larvae of *M. domestica* at different time post bacterial challenge. E: *Mdsirt1* 在家蝇 2 龄幼虫 42°C 热激不同时间 (15 min, 30 min 和 1 h) 以及 28°C 恢复不同时间 (2 h 和 4 h) 下的表达量 Relative expression level of *Mdsirt1* in *M. domestica* under heat shock of 42°C for different time (15 min, 30 min and 1 h) and recovery at 28°C for different time (2 h and 4 h); CK: 28°C; R2 h: 28°C 恢复 2 h Recovery at 28°C for 2 h; R4 h: 28°C 恢复 4 h Recovery at 28°C for 4 h. F: 30 mmol/L CdCl<sub>2</sub> 刺激家蝇 2 龄幼虫不同时间后 *Mdsirt1* 基因的表达量 Relative expression level of *Mdsirt1* in the 2nd instar larvae of *M. domestica* exposed to 30 mmol/L CdCl<sub>2</sub> for different time. A 和 B 图中柱上不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ) (单因素方差分析和 Tukey 氏检验); C-F 图中柱上星号和双星号分别表示与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ) 和极显著 ( $P < 0.01$ ) (Student *t* 检测)。Different letters above bars in Figs. A and B indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) (ANOVA and Tukey's test); the asterisk and double asterisk in Figs. C-F above bars indicate significant difference ( $P < 0.05$ , Student's *t*-test,) and extremely significant difference ( $P < 0.01$ , Student's *t*-test,) from the blank control group, respectively.

类物种 SIR2 结构域高度保守, 并且含有保守的催化核心结构域, 该核心结构域包含 CxxC-x<sub>20</sub>-CxxC 基序, 形成 SIR2 保守的锌指结构; 保守的 GAGVSxxxGIPDFRS, TQNID 以及 HGS 基序形成了 NAD<sup>+</sup> 结合位点 (Ishikawa *et al.*, 2013)。

*sirt1* 在哺乳动物包括人 (Frye, 1999)、牛 (Ghinis-Hozumi *et al.*, 2011)、猪 (Jin *et al.*, 2009) 以及猫 (Ishikawa *et al.*, 2013) 等类群中的多种组织中均有表达。但 *sirt1* 基因在不同组织中的功能各异,

例如: 猫的 SIRT1 在肝脏中与脂肪酸平衡相关, 而在骨骼肌中则与葡萄糖代谢相关 (Ishikawa *et al.*, 2013)。家蝇 *Mdsirt1* 基因在血细胞、表皮、肠道以及脂肪体中均有表达, 其中脂肪体中表达量较高。人们将昆虫的脂肪体比拟为哺乳动物的肝脏, 并且是重要的免疫器官。*Mdsirt1* 基因在家蝇幼虫遭受细菌感染时显著上调表达, 并且在感染 3-6 h 时间段内出现峰值。同样 *Mdsirt1* 在高温和重金属的应激条件下也表现出可诱导性, *Mdsirt1* 在热激 30 min 和

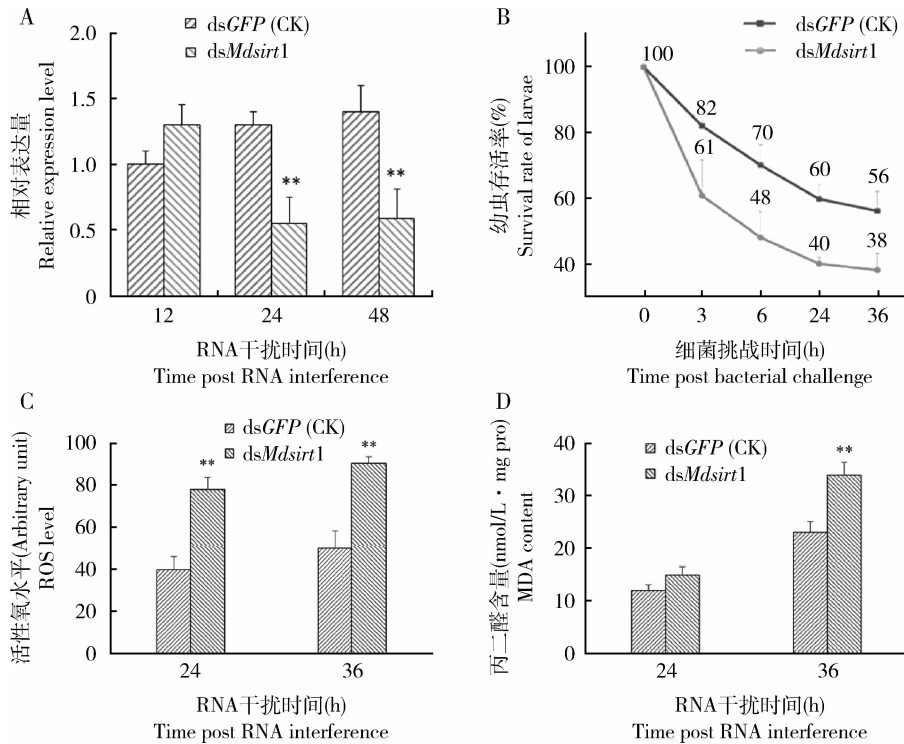


图3 RNAi 干扰 *Mdsirt1* 后家蝇 2 龄幼虫对细菌刺激的抗性和抗氧化胁迫的能力

Fig. 3 Resistance to bacterial challenge and oxidative stress in the 2nd instar larvae of *Musca domestica* after knock-down of *Mdsirt1* by RNAi

A: 注射双链 RNA 后家蝇幼虫 *Mdsirt1* 基因表达分析 Relative expression level of *Mdsirt1* in *M. domestica* larvae after injection with dsRNA; B: RNAi 后细菌感染 (大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 1:1 混合感染) 条件下家蝇幼虫的存活率 Survival rate of *M. domestica* larvae exposed to bacteria (*Escherichia coli*: *Staphylococcus aureus* = 1:1) after RNAi; C: 注射双链 RNA 后家蝇幼虫体内活性氧水平 ROS level in *M. domestica* larvae after injection with dsRNA; D: 注射双链 RNA 后家蝇幼虫体内丙二醛含量 MDA content in *M. domestica* larvae after injection with dsRNA. 注射双链 GFP 为对照组。差异显著性用 Student *t* 检验进行分析, 柱上双星号表示与对照相比差异极显著 ( $P < 0.01$ )。Injection with dsGFP as the control group. Double asterisk above bars denotes extremely significant difference from the control ( $P < 0.01$ , Student's *t*-test).

$\text{Cd}^{2+}$  刺激 48 h 条件下具有较高表达量, 结果表明 *Mdsirt1* 参与了机体应对环境中生物因子和理化因子的胁迫反应。机体遭受细菌侵染后, 导致大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 释放, 这是先天免疫系统重要的防御保护机制。此外, 机体在高温、重金属等诸多理化因子胁迫条件下也会导致机体 ROS 水平升高, 引发氧化应激。有文献报道通过敲除 SIRT1 可以降低热休克因子的去乙酰化, 从而影响热休克蛋白的表达升高, 缓解内质网应激 (Zheng *et al.*, 2017); 我们推测 *Mdsirt1* 在免疫和抗逆过程中表达量升高与调控 ROS 水平相关。哺乳动物 SIRT1 在免疫过程中升高抑制了先天免疫调控因子 NF- $\kappa$ B 的转录活性 (Yeung *et al.*, 2004; Gilmore, 2006), 减小巨噬细胞的炎症反应强度, 并降低 ROS 水平避免机体过度免疫 (Yang *et al.*, 2007; Schug *et al.*, 2010; Stein *et al.*, 2010; Yoshizaki *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010)。但是也有研究者发现, SIRT1

在脂多糖诱导 3 h 以及降血糖药物处理 2 h 后的小鼠白血球细胞中受到了显著抑制, 通过负反馈对应激起到保护作用, 参与调控抗衰老和抗炎症过程 (Aljada, 2015)。

越来越多的研究证实了 Sirtuins 是一类保守的寿命调控因子。SIR2 过表达后会延长酵母 (Howitz *et al.*, 2003)、线虫 (Tissenbaum and Guarente, 2001) 和果蝇寿命 (Banerjee *et al.*, 2012; Hoffmann *et al.*, 2013)。而在大脑中特异性过表达 SIRT1 也延长了小鼠的寿命 (Satoh *et al.*, 2013), 但是全身过表达 SIRT1 却引发了癌症 (Herranz *et al.*, 2010), 以及缺失 *sirt1* 的新生小鼠存活率下降 (Cheng *et al.*, 2003; McBurney *et al.*, 2003)。我们的结果与已有报道相一致, 通过 RNAi 敲低 *Mdsirt1* 表达的家蝇幼虫遭受细菌感染后存活率降低, 我们认为 *Mdsirt1* 增强了家蝇抵抗细菌感染的存活能力。当 *Mdsirt1* 表达降低时, ROS 水平升高并且 MDA 含量增加, 说明机体处

在氧化应激状态,而高水平的氧化应激对机体细胞和组织产生损伤,继而产生代谢异常最后导致死亡。我们推测 *Mdsirt1* 的存在可维持细胞内氧化还原平衡 (Singh *et al.*, 2017),具有保护机体抵抗氧化应激的生物学效应,但是 *Mdsirt1* 对氧化应激作用的具体机制尚不清楚。鉴于此,我们的结果为后续研究家蝇 *sirt1* 基因的功能奠定了基础。

## 参考文献 (References)

- Aljada A, 2015. Lipopolysaccharides-induced inflammatory response in white blood cells is associated with alterations in senescence mediators; modulation by metformin. *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, 13(6): 278–285.
- Banerjee KK, Ayyub C, Ali SZ, Mandot V, Prasad NG, Kolthur-Seetharam U, 2012. dSir2 in the adult fat body, but not in muscles, regulates life span in a diet-dependent manner. *Cell Rep.*, 2(6): 1485–1491.
- Chan SH, Hung CH, Shih JY, Chu PM, Cheng YH, Lin HC, Tsai KL, 2017. SIRT1 inhibition causes oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Redox Biol.*, 13: 301–309.
- Chen X, Sun K, Jiao S, Cai N, Zhao X, Zou H, Xie Y, Wang Z, Zhong M, Wei L, 2014. High levels of SIRT1 expression enhance tumorigenesis and associate with a poor prognosis of colorectal carcinoma patients. *Sci. Rep.*, 4: 7481.
- Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, Manis JP, Gu Y, Patel P, Bronson R, Appella E, Alt FW, Chua KF, 2003. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(19): 10794–10799.
- Frescas D, Valenti L, Accili D, 2005. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J. Biol. Chem.*, 280(21): 20589–20595.
- Frye RA, 1999. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (Sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 260(1): 273–279.
- Gao Y, Tang T, Gu J, Sun L, Gao X, Ma X, Wang X, Liu F, Wang J, 2015. Downregulation of the *Musca domestica* peptidoglycan recognition protein SC (PGRP-SC) leads to overexpression of antimicrobial peptides and tardy pupation. *Mol. Immunol.*, 67(2 Pt B): 465–474.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K, 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327(5966): 656–661.
- Ghinis-Hozumi Y, Gonzalez-Gallardo A, Gonzalez-Davalos L, Antaramian A, Villarroya F, Shimada A, Varela-Echavarría A, Mora O, 2011. Bovine sirtuins: initial characterization and expression of sirtuins 1 and 3 in liver, muscle, and adipose tissue. *J. Anim. Sci.*, 89(8): 2529–2536.
- Gilmore TD, 2006. Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51): 6680–6684.
- Gonfloni S, Iannizzotto V, Maiani E, Bellusci G, Ciccone S, Diederich M, 2014. P53 and Sirt1: routes of metabolism and genome stability. *Biochem. Pharmacol.*, 92(1): 149–156.
- Guarente L, 2011. Franklin H. Epstein Lecture: sirtuins, aging, and medicine. *N. Engl. J. Med.*, 364(23): 2235–2244.
- Guarente L, 2013. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes Dev.*, 27(19): 2072–2085.
- Herranz D, Munoz-Martin M, Canamero M, Mulero F, Martinez-Pastor B, Fernandez-Capetillo O, Serrano M, 2010. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat. Commun.*, 1: 3.
- Hoffmann J, Romey R, Fink C, Yong L, Roeder T, 2013. Overexpression of Sir2 in the adult fat body is sufficient to extend lifespan of male and female *Drosophila*. *Aging (Albany NY)*, 5(4): 315–327.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA, 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(6954): 191–196.
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L, 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403(6771): 795–800.
- Ishikawa S, Li G, Takemitsu H, Fujiwara M, Mori N, Yamamoto I, Arai T, 2013. Change in mRNA expression of sirtuin1 and sirtuin3 in cats fed on high fat diet. *BMC Vet. Res.*, 9: 187.
- Jang KY, Noh SJ, Lehwald N, Tao GZ, Bellovin DI, Park HS, Moon WS, Felsner DW, Sylvester KG, 2012. SIRT1 and c-Myc promote liver tumor cell survival and predict poor survival of human hepatocellular carcinomas. *PLoS ONE*, 7(9): e45119.
- Jin D, Tan HJ, Lei T, Gan L, Chen XD, Long QQ, Feng B, Yang ZQ, 2009. Molecular cloning and characterization of porcine sirtuin genes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 153(4): 348–358.
- Kaeberlein M, McVey M, Guarente L, 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.*, 13(19): 2570–2580.
- Knight JR, Milner J, 2012. SIRT1, metabolism and cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, 24(1): 68–75.
- Kong S, McBurney MW, Fang D, 2012. Sirtuin 1 in immune regulation and autoimmunity. *Immunol. Cell Biol.*, 90(1): 6–13.
- Kong S, Yeung P, Fang D, 2013. The class III histone deacetylase sirtuin1 in immune suppression and its therapeutic potential in rheumatoid arthritis. *J. Genet. Genomics*, 40(7): 347–354.
- Li L, Osdal T, Ho Y, Chun S, McDonald T, Agarwal P, Lin A, Chu S, Qi J, Li L, Hsieh YT, Dos Santos C, Yuan H, Ha TQ, Popa M, Hovland R, Bruserud O, Gjertsen BT, Kuo YH, Chen W, Lain S, McCormack E, Bhatia R, 2014. SIRT1 activation by a c-MYC oncogenic network promotes the maintenance and drug resistance of human FLT3-ITD acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*, 15(4): 431–446.



- Li L, Wang L, Li L, Wang Z, Ho Y, McDonald T, Holyoake TL, Chen W, Bhatia R, 2012. Activation of p53 by SIRT1 inhibition enhances elimination of CML leukemia stem cells in combination with imatinib. *Cancer Cell*, 21(2): 266–281.
- Liu FS, Li J, Tang T, Zhang D, Dong XY, 2012. Roles of rhodanese-like gene in stress responses of *Musca domestica* toward hyperthermy and cadmium tolerance. *Sichuan J. Zool.*, 31(4): 558–563. [柳峰松, 李娟, 唐婷, 张迪, 董晓寅, 2012. 硫氰酸生成酶样基因在家蝇高温和重金属镉应激中的作用. *四川动物*, 31(4): 558–563]
- Lu YP, Gu JH, Gao YF, Tang T, Liu FS, Huang DW, 2016. Functional analysis of peptidoglycan recognition protein PGRP-SC in intestinal of *Musca domestica*. *Acta Entomol. Sin.*, 59(3): 269–277. [路永鹏, 顾冀海, 高一夫, 唐婷, 柳峰松, 黄大卫, 2016. 肽聚糖识别蛋白 PGRP-SC 在家蝇肠道免疫中的功能分析. *昆虫学报*, 59(3): 269–277]
- Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W, 2001. Negative control of p53 by Sir2 $\alpha$  promotes cell survival under stress. *Cell*, 107(2): 137–148.
- McBurney MW, Yang X, Jardine K, Hixon M, Boekelheide K, Webb JR, Lansdorp PM, Lemieux M, 2003. The mammalian SIR2 $\alpha$  protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Mol. Cell Biol.*, 23(1): 38–54.
- Menssen A, Hydbring P, Kapelle K, Vervoorts J, Diebold J, Luscher B, Larsson LG, Hermeking H, 2012. The c-MYC oncoprotein, the NAMPT enzyme, the SIRT1-inhibitor DBC1, and the SIRT1 deacetylase form a positive feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(4): E187–E196.
- Rine J, Herskowitz I, 1987. Four genes responsible for a position effect on expression from *HML* and *HMR* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 116(1): 9–22.
- Satoh A, Brace CS, Rensing N, Cliften P, Wozniak DF, Herzog ED, Yamada KA, Imai S, 2013. Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metab.*, 18(3): 416–430.
- Schug TT, Xu Q, Gao H, Peresdasilva A, Draper DW, Fessler MB, Purushotham A, Li X, 2010. Myeloid deletion of SIRT1 induces inflammatory signaling in response to environmental stress. *Mol. Cell Biol.*, 30(19): 4712–4721.
- Shore D, Squire M, Nasmyth KA, 1984. Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. *EMBO J.*, 3(12): 2817–2823.
- Singh CK, Chhabra G, Ndiaye M, Garcia-Peterson LM, Mack NJ, Ahmad N, 2017. The role of sirtuins in antioxidant and redox signaling. *Antioxid. Redox Signal.*, doi: 10.1089/ars.2017.7290.
- Stein S, Schäfer N, Breitenstein A, Besler C, Winnik S, Lohmann C, Heinrich K, Brokopp CE, Handschin C, Landmesser U, 2010. SIRT1 reduces endothelial activation without affecting vascular function in ApoE $^{-/-}$  mice. *Aging (Albany NY)*, 2(6): 353–360.
- Tang T, Li X, Yang X, Yu X, Wang J, Liu F, Huang D, 2014. Transcriptional response of *Musca domestica* larvae to bacterial infection. *PLoS ONE*, 9(8): e104867.
- Tissenbaum HA, Guarente L, 2001. Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 410(6825): 227–230.
- Yang SR, Wright J, Bauter M, Seweryniak K, Kode A, Rahman I, 2007. Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF- $\kappa$ B in macrophages *in vitro* and in rat lungs *in vivo*: implications for chronic inflammation and aging. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 292(2): L567.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW, 2004. Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.*, 23(12): 2369–2380.
- Yoshizaki T, Schenk S, Imamura T, Babendure JL, Sonoda N, Bae EJ, Da YO, Min L, Milne JC, Westphal C, 2010. SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 298(3): E419–E428.
- Zhang HN, Li L, Gao P, Chen HZ, Zhang R, Wei YS, Liu DP, Liang CC, 2010. Involvement of the p65/RelA subunit of NF- $\kappa$ B in TNF- $\alpha$ -induced SIRT1 expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 397(3): 569–575.
- Zheng X, Xu F, Liang H, Cao H, Cai M, Xu W, Weng J, 2017. SIRT1/HSF1/HSP pathway is essential for exenatide-alleviated, lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress. *Hepatology*, 66(3): 809–824.

(责任编辑: 马丽萍)