

猪源 *SIRT1* 基因过表达载体的构建及在 IPEC-DQ 细胞中表达

姚婧婷¹ 张悦² 蒋路遥¹ 高崧¹ 郇长超^{1*}

1 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009;

2 山东省青岛蔚蓝动物保健集团有限公司, 山东 青岛 266111

摘要: 目的: 构建猪源 *SIRT1* 基因的过表达载体。方法: 以 GenBank 中猪源 *SIRT1* 基因序列作为参考序列设计 1 对引物, 通过 IPEC-DQ 细胞提取总 RNA 反转录成 cDNA 扩增 *SIRT1* 基因, 构建 pLVX-AcGFP1-N1-*SIRT1* 克隆质粒, 转染 HEK 293T 细胞并收集包装液, 感染 IPEC-DQ 细胞, 进行荧光检测和蛋白质免疫印迹检测。结果: 经 PCR 扩增、测序验证, pLVX-AcGFP1-N1-*SIRT1* 重组表达质粒构建成功; 荧光检测显示, 感染含有 pLVX-AcGFP1-N1-*SIRT1* 重组质粒包装液的 IPEC-DQ 细胞中有明显绿色荧光信号。结论: 成功构建猪源 *SIRT1* 基因的过表达载体, 并在 IPEC-DQ 细胞中表达。

关键词: *SIRT1* 基因; 载体构建; IPEC-DQ 细胞; 基因表达

Construction of an Overexpression Vector for Porcine *SIRT1* Gene and Its Expression in IPEC-DQ Cells

Yao,Jingting¹ Zhang,Yue² Jiang,Luyao¹ Gao,Song¹ Huan,Changchao^{1*}

1Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225009, China

2Qingdao Vland Animal Health Group Co., Ltd., Qingdao, Shandong, 266111, China

Abstract: Objective: To construct an overexpression vector for the porcine *SIRT1* gene. Methods: A pair of primers was designed based on the porcine *SIRT1* gene sequence in GenBank as the reference sequence. Total RNA was extracted from IPEC-DQ cells, reverse transcribed into cDNA, and the *SIRT1* gene was amplified. The pLVX-AcGFP1-N1-*SIRT1* cloning plasmid was constructed, transfected into HEK 293T cells, and the packaging solution was collected. IPEC-DQ cells were infected, and fluorescence detection and Western blot detection were performed. Results: After PCR amplification and sequencing verification, the pLVX-AcGFP1-N1-*SIRT1* recombinant expression plasmid was successfully constructed. Fluorescence detection showed obvious green fluorescence signals in IPEC-DQ cells infected with the packaging solution containing the pLVX-AcGFP1-N1-*SIRT1* recombinant plasmid. Conclusion: The overexpression vector for the porcine *SIRT1* gene was successfully constructed and expressed in IPEC-DQ cells.

Keywords: *SIRT1* gene; Vector construction; Ipec-dq cells; Gene expression

DOI: 10.62639/sspis11.20250204

SIRT1 (Sirtuin1, *SIRT1*), NAD⁺ 依赖的去乙酰化酶家族 (*SIRT1*-*SIRT7*) 的一员, 在广泛的生物活性中发挥重要作用。在哺乳动物 sirtuins 中, *SIRT1* 具有调节多种细胞和生物过程的明确特征^[1], 包括新陈代谢和衰老^[2,3]。*SIRT1* 通过其底物的去乙酰化发挥作用, 包括组蛋白底物, 如乙酰化组蛋白 H4K16 和 H3K56, 以及非组蛋白靶标, 如 p53^[4,5]。已被证明是一种广谱且进化上保守的宿主抑制因子, 能够通过不同的机制抑制多种病毒, 包括 DNA 病毒 (HCMV、HSV-1 和腺病毒) 和 RNA 病毒 (流行性病毒

毒、流感病毒、肠道病毒 71 和 HTLV-1), 其作用机制各不相同^[6-9]。*SIRT1* 在畜禽中的研究也表明能够通过不同的机制影响氧化应激^[10]、促进猪前体脂肪细胞凋亡^[11]、*SIRT1* 激动剂白藜芦醇 (resveratrol, RSV) 处理和过表达 *SIRT1* 均显著抑制犬新孢子虫 (*N.caninum*) 速殖子在山羊子宫内膜上皮细胞中的增殖^[12], 也能够通过上调 *SIRT1*/*Nrf2* 减轻氧化应激提高产蛋性能^[13]。因此, 构建 *SIRT1* 基因过表达载体及在 IPEC-DQ 细胞中表达, 以期为进一步探究 *SIRT1* 基因在猪病防治等相关研究中提供基础。

(稿件编号: IS-25-4-1012)

作者简介: 姚婧婷 (1998-), 女, 汉族, 籍贯: 安徽合肥, 博士, 在读, 研究方向: 预防兽医学, 畜禽重要疫病流行规律和防制新技术。

张悦 (1987-), 女, 汉族, 籍贯: 山东德州, 硕士, 研发人员, 研究方向: 动物疫苗。

蒋路遥 (1994-), 男, 汉族, 籍贯: 江苏淮安, 博士后, 研究方向: 预防兽医学, 畜禽重要疫病流行规律和防制新技术。

高崧 (1962-), 男, 汉族, 教授, 博士生导师, 研究方向: 预防兽医学, 畜禽重要疫病流行规律和防制新技术。

通讯作者: 郇长超 (1987-), 男, 汉族, 籍贯: 山东青州, 博士, 研究方向: 预防兽医学, 畜禽重要疫病流行规律和防制新技术。

基金项目: 江苏省优秀青年基金项目: “去乙酰化转移酶 (*SIRT1*) 调控猪流行性腹泻病毒逃逸先天免疫的作用机制” (BK20220114)。

国家自然科学基金项目: “沉默调节蛋白 1 调控猪流行性腹泻病毒逃逸先天免疫机制的研究” (32273015)。

一、材料方法

(一) 细胞、载体、菌株及主要试剂

猪小肠上皮细胞 (IPEC-DQ) 由扬州大学徐秀龙教授赠予并保存于本实验室, HEK 293T 细胞为本实验保存细胞。IPEC-DQ 细胞生长于 10 % FBS (Eallbio Life Science, 货号: 03.A16001DC) RPMI 1640 (Gibco, 货号: 31800022), 37℃、5 % CO₂ 细胞培养箱。HEK 293T 细胞生长于 10 % FBS (Empriza Biotech, Lonsera, 货号: S711-001S) 的 DMEM 培养基 (Sigma, 货号: D5648), 37℃、5 % CO₂ 细胞培养箱。大肠杆菌 DH5a (*E.coli* DH5a) 感受态细胞均由本实验室制备并保存; pLVX-AcGFP1-N1 载体、包装载体 (pLP1、pLP2、pLP/VSVG) 均保存于本实验室。2×Taq Master Mix (Dye Plus) (货号: P112-01) 与 180 kDa prestained protein marker (货号: MP102-01) 购自 Vazyme 公司。DL10,000 DNA Marker (货号: 3584Q)、限制性内切酶 Xho I、EcoR I、T4 DNA 连接酶 (货号: 2011A) 购自 TaKaRa 公司。Trans2K Plus II DNA Marker (货号: R40627) 购自 TransGen Biotech 公司。AgaroseG-10 (琼脂糖) (货号: 111885) 购自 BIOWEST 公司。Goodview Nucleic Acid Stain (核酸染料) 购自北京赛百盛公司。Lipo8000™ 转染试剂 (货号: C0533) 购自 Beyotime 公司。嘌呤霉素 (Puromycin) (10 mg/mL) 购自 InvivoGen 公司。通用型 ECL 发光底物 (货号: SB-WB012) 购自圣尔生物。氨苄青霉素 (Ampicillin sodium) (货号: A610028-0025)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) (货号: A501492-0500)、丙烯酰胺 (Acrylamide) (货号: A501033-0500)、十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS) (货号: A100227-0500) 购自生工。HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (货号: R211-01)、胶回收试剂盒 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit (货号: DC301-01) 均购自 Vazyme 公司。BioFlux 质粒 DNA 小量提取试剂盒 (货号: BSC01S1) 购自杭州博日科技公司。无内毒素质粒小提中量试剂盒 (货号: DP118-02) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司。RNA isolater Total RNA Extraction Reagent (货号: R401-01) 购自 Vazyme 公司。b-actin 抗体 (货号: HC201-01) 购自 TRANS 公司。HRP 标记的羊抗鼠 IgG (H+L) (货号: A0216) 和 HRP 标记的羊抗兔 IgG (H+L) (货号: A0208) 均购自 Beyotime 公司。鼠源 GFP 单克隆抗体 (货号: 66002-1-Ig) 购自 Proteintech 公司。SirT1 (D1D7) Rabbit mAb 抗体购自 CST 公司, 货号: 9475S。

(二) 主要仪器

CO₂ 细胞培养箱、生物安全柜、核酸浓度测定仪 Nano Drop-2000 购自 Thermo Fisher Scientific 产品。PCR 仪购自 Eppendorf 公司。核酸凝胶电泳仪、电泳槽和转膜仪购自 BIO-RAD 公司。金属浴为天根生化科技产品。Tanon-4600 全自动化学发光图像分析系统为上海天能科技有

限公司。GeneGenius 凝胶成像系统为 Syngene 公司产品。荧光显微镜购自 OLYMPUS 公司。

(三) 引物设计与合成

根据 *Sus scrofa sirtuin 1 (SIRT1)* 基因序列 (GenBank 登录号: NM_001145750.2) 使用 SnapGene 软件设计 1 对引物。SIRT1-F: 5' - AA~~ACTCGAG~~atggcggacgagggcg-3'; SIRT1-R: 5' - GG~~GGAATTC~~gtgattgtttgatggatagtaacgcctgtgcttc-3' (下划线为: Xho I、EcoR I 酶切位点), 扩增片段预期: 2248 bp, 退火温度 59℃。载体通用引物鉴定设计为使用 CMV 启动子部分序列为上游引物, GFP 蛋白表达处选取部分序列为下游引物, CMV-F: 5' - ggagttgtttggcaccacaa-3'; GFP-R: 5' - gaagtcgtgctgcttc-3', 扩增片段预期 534 bp, 退火温度 50℃。引物序列送至南京擎科生物有限公司合成。

(四) SIRT1 基因的 PCR 扩增

参考 Trizol 法^[14] 提取 IPEC-DQ 细胞总 RNA 并反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板扩增 SIRT1 基因。PCR 体系 25 μL: 2×Taq Master Mix 12.5 μL, ddH₂O 6.5 μL, SIRT1-F (10 μM) 1 μL, SIRT1-R (10 μM) 1 μL, cDNA 4 μL。PCR 反应条件: 预变性 94℃ 5 min; 变性 94℃ 15 s, 退火 59℃ 15 s, 延伸 72℃ 2 min 30 s, 30 个循环。最终延伸 72℃ 5 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 130 V, 45 min。凝胶成像系统观察结果。

(五) 过表达 SIRT1 基因重组质粒的构建

将 PCR 产物及 pLVX-AcGFP1-N1 载体用 Xho I、EcoR I 进行双酶切, 载体 37℃ 水浴酶切 4 h, PCR 产物 37℃ 水浴酶切 2 h, 然后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收, PCR 产物纯化参考试剂盒说明书进行。参考 T4 连接酶说明书, 16℃ 连接过夜。将连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5a, 37℃、100 rpm 培养 2 h, 5000 rpm 离心 5 min。取 200 μL 上清重悬沉淀, 均匀涂抹在氨苄抗性的固体 LB 培养基表面, 置于 37℃ 恒温培养箱, 静置培养 16~18 h。挑取单克隆菌落, 扩大培养后进行菌液 PCR 鉴定, PCR 体系 25 μL: 2×Taq Master Mix 12.5 μL, ddH₂O 7.5 μL, CMV-F (10 μM) 1 μL, GFP-R (10 μM) 1 μL, 菌液 3 μL。PCR 反应条件: 预变性 94℃ 10 min; 变性 94℃ 15 s, 退火 59℃ 15 s, 延伸 72℃ 2 min 30 s, 30 个循环。最终延伸 72℃ 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳, 鉴定正确, 送南京擎科生物有限公司测序。

(六) IPEC-DQ、HEK 293T 细胞的培养

将上述两种细胞从液氮罐中取出, 快速置于 37℃ 水浴锅中搅动, 1 min 内全部溶解, 500 rpm 离心 5 min, 置于超净工作台中, 弃上清, IPEC-DQ 细胞使用 1 mL 10 % FBS RPMI 1640 (10 % 1640) 重悬, 加入含有 4 mL 10 % 1640 的 T 25 细胞瓶中, HEK 293T 细胞步骤同上, 培养基为 10% FBS DMEM (10% DMEM)。均在 5% CO₂ 培养箱中培养至 80~90 % 密度进行传代。IPEC-DQ 细胞弃去培养基, 5 mL PBS 润洗 2 次,

加入 1 mL PBS 和 150 μ L 含有 EDTA 0.25 % 的胰酶, CO₂ 培养箱消化 3 min, 弃去含有胰酶的 PBS, 加入 3 mL 培养基连续吹打 20 下左右, 留 1/3 细胞继续培养。HEK 293T 细胞传代过程同上, 仅改加入 500 μ L 胰酶室温消化 30 s, 以上步骤均为无菌操作。

(七) 过表达 SIRT1 蛋白细胞系的构建和检测

包装慢病毒: 将长势最佳的 HEK 293T 细胞铺至 6 孔板中, 当汇合度达到 60% 时, 更换为新鲜的 10% DMEM, 参考 lipo8000TM 转染试剂说明书, 将成功构建的 pLVX-AcGFP1-N1-SIRT1、实验室保存的 pLVX-AcGFP1-N1 质粒与慢病毒的 3 个辅助质粒 pLP1、pLP2、pLP/VSVG 共同转染, 质粒与 lipo8000 转染试剂比例为质量与体积比 (1:1.6)。转染 6 h, 更换为 5 % FBS DMEM, 观察 24 h 的细胞绿色荧光蛋白强度, 收集转染的 48 h 和 72 h 细胞上清, 4 $^{\circ}$ C、12000 rpm 离心 15 min, 取上清, -70 $^{\circ}$ C 保存。同时等待转染 48 h 时将 IPEC-DQ 细胞铺至 6 孔板中,

铺的细胞数量培养 24 h 能够达到 40~50 % 汇合度, 取 2 mL 包装的病毒液, 感染 IPEC-DQ 细胞 48 h, 更换新鲜的 2 mL 包装液培养至 72 h。将感染后的细胞消化至 T25 细胞瓶中, 使用含有 0.75 μ g/mL 嘌呤霉素的 10 % 1640 培养基培养, 每日均更换新鲜的含有嘌呤霉素的培养基, 持续 10~14 d, 直至细胞不发生明显死亡及荧光显微镜下出现绿色荧光蛋白阳性细胞, 继续维持培养等待绿色荧光蛋白阳性率升高。Western blot 方法对 SIRT1 蛋白水平进行过表达的检测鉴定。

二、结果与分析

(一) SIRT1 基因的 PCR

从 IPEC-DQ 细胞中提取 RNA, 测浓度后根据反转录试剂盒说明书, 获得 cDNA, 再以该 cDNA 为模板, 扩增大小为 2248 bp 的目的基因(包含酶切位点和保护性碱基 4 bp) (图 1)。(1.3 引物设计与合成中写的片段大小是 2244 bp, 此处是 2248 bp)

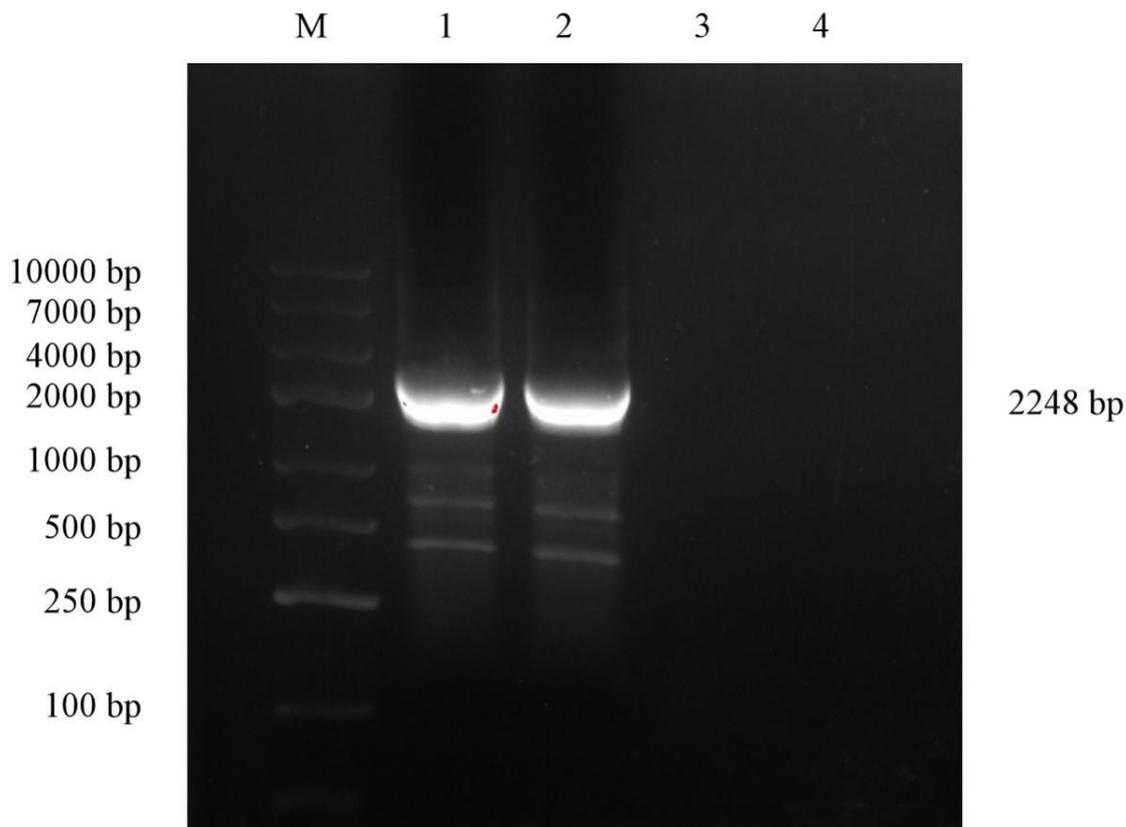


图 1 SIRT1 基因 PCR 产物

M: DL10,000 DNA Marker, 1: SIRT1 基因的 PCR 产物, 2: SIRT1 基因的 PCR 产物

(二) pLVX-AcGFP1-N1-SIRT1 重组质粒的 PCR 验证及测序结果比对

预期重组质粒鉴定 PCR 扩增大小为 SIRT1 基因片段大小与载体上部分片段之和, 为 2782

bp, 见图 2。测序结果经 SnapGene 软件比对, 未发现碱基序列错配, 突变, 说明 pLVX-AcGFP1-N1-SIRT1 重组质粒构建成功, 见图 2 和图 3。

(注: Expect 表示随机匹配的可能性, E 值接近 0 或为 0 时, 序列完全匹配; Indentities 表示随机匹配的可能性, Gaps 表示插入或缺失; Query 表示测序序列; Sbjct 表示比对序列)

(三) pLVX-AcGFP1-N1-SIRT1、pLVX-AcGFP1-N1 慢病毒包装的鉴定

荧光显微镜激发光 488 nm 观察转染 24 h 含有 pLVX-AcGFP1-N1/ pLVX-AcGFP1-N1-SIRT1 的 HEK 293T 细胞, 可见绿色荧光蛋白汇合度达到 60~70%, 见图 4, 结果表明包装成功, 在 HEK 293T 细胞中成功表达 GFP 蛋白和 GFP-SIRT1 蛋白。

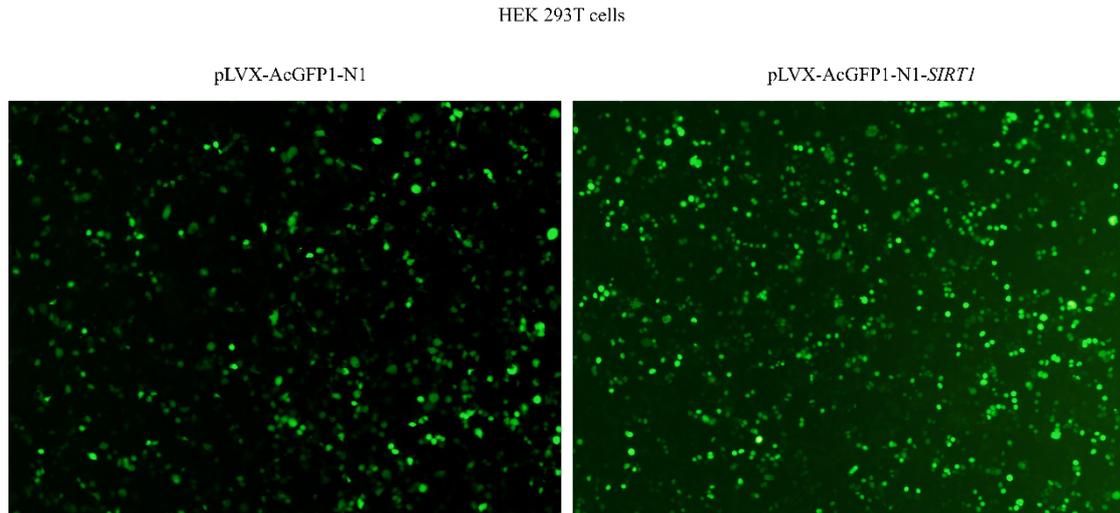


图 4 HEK 293T 细胞过表达 GFP 蛋白及 GFP-SIRT1 蛋白的荧光

A: 过表达 GFP 蛋白; B: 过表达 GFP-SIRT1 蛋白

(四) pLVX-AcGFP1-N1-SIRT1、pLVX-AcGFP1-N1 的 IPEC-DQ 细胞系

由图 5 可见: 荧光显微镜显示, 感染 pLVX-AcGFP1-N1-SIRT1、pLVX-AcGFP1-N1 包装

病毒液的 IPEC-DQ 细胞有明显的绿色荧光信号, 见图 5-A。Western blot 结果显示构建细胞系中 GFP 蛋白 (25 kDa), GFP-SIRT1(145 kDa) 蛋白分别表达, SIRT1 蛋白 (120 kDa) 有显著条带, 见图 5-B。结果均表明细胞系构建成功。

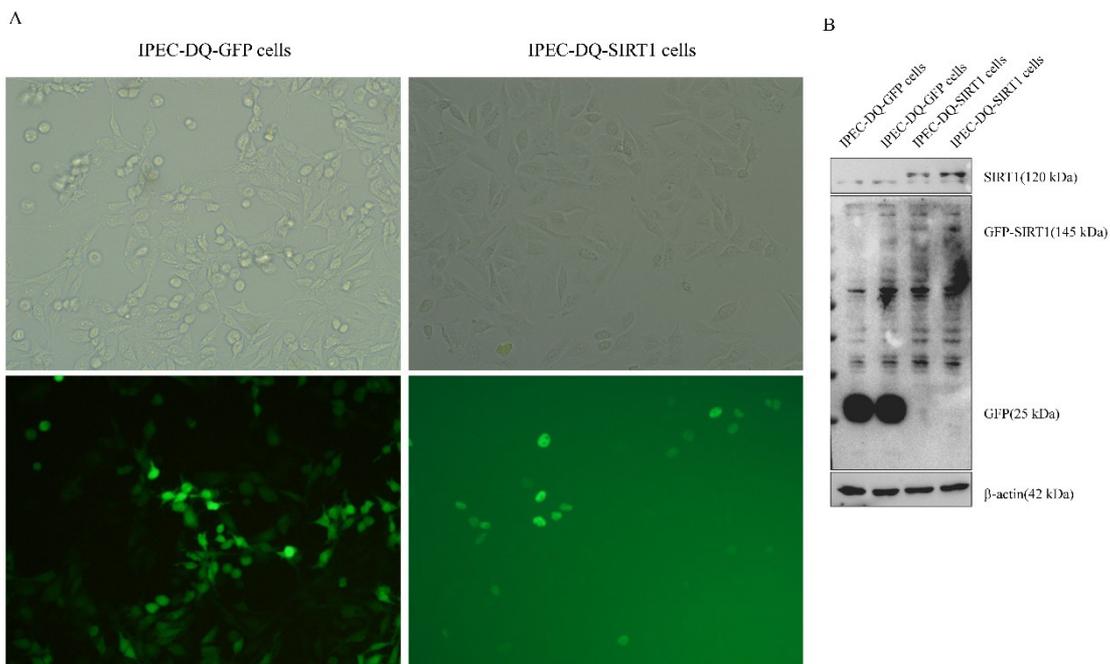


图 5 检测过表达 GFP、GFP-SIRT1 IPEC-DQ 细胞系

A: 白光及绿色荧光光源 IPEC-DQ-GFP 及 IPEC-DQ-SIRT1 细胞系; B: Western blot 检测两种过表达细胞系中的 GFP 蛋白水平、SIRT1 蛋白水平

三、结论

本试验成功构建 pLVX-AcGFP1-N1-SIRT1 重组质粒, 并通过慢病毒包装后感染 IPEC-DQ 细胞, 经嘌呤霉素筛选得到 IPEC-DQ-SIRT1 细胞系; 同时实验室保存的 pLVX-AcGFP1-N1 质粒也经过同样方法, 得到了表达 GFP 蛋白的 IPEC-DQ-GFP 细胞系。

四、讨论

SIRT6 是依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD)⁺ 使赖氨酸底物去乙酰化, 也是催化位于组蛋白和非组蛋白的赖氨酸残基去除乙酰基的酶。通过影响蛋白乙酰化、去乙酰化水平影响蛋白表达及功能^[15]。NAD⁺ 依赖多种信号通路调控细胞周期进程、转录、DNA 修复、凋亡和代谢、病毒感染等多种生物学进程, 许多信号涉及分子的降解, 通过不同的生物合成途径进行永久的核苷酸合成, 与癌症、代谢的紊乱、病毒的持续增殖有关^[16]。SIRT1 通过去乙酰化使 HIF1a 失活, 并抑制其核易位, 即通过拮抗 HIF1a 的作用介导肿瘤的抑制和血管的生成^[17]。在治疗相关疾病的研究中指出 SIRT1 的激活和抑制作为一种新的机制将是一种有效的方式^[18], 使用 SIRT1 的激活剂 Resveratrol 在 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) 病毒的研究过程中发挥关键作用^[19]。pLVX-AcGFP1-N1 是一种基于 HIV-1 的慢病毒表达载体, 绿色荧光蛋白 AcGFP1 源自水母 *Aequorea coerulescens*。将猪源 SIRT1 基因克隆到位于 AcGFP1 编码序列上游的多克隆位点 (MCS) 中的基因, 将以 AcGFP1 蛋白 N 端融合的形式表达。融合蛋白的表达由位于 MCS 上游的组成型活性人巨细胞病毒早期启动子 (PCMV IE) 驱动, 由该载体衍生的慢病毒颗粒在 IPEC-DQ 细胞中表达 AcGFP1-SIRT1 融合蛋白, 进一步筛选成为 IPEC-DQ-SIRT1 细胞系, 同时构建对照组 IPEC-DQ-GFP 细胞系, 将为 SIRT1 在猪类相关疾病研究中奠定基础。

参考文献:

- [1] J.A. Hall, J.E. Dominy, Y. Lee, P. Puigserver, The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies, *Journal of Clinical Investigation* 123(3) (2013) 973-979.
- [2] S.J. Lin, P.A. Defossez, L. Guarente, Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*, *Science* 289(5487) (2000) 2126-8.
- [3] H.A. Tissenbaum, L. Guarente, Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 410(6825) (2001) 227-30.
- [4] C. Xu, L. Wang, P. Fozouni, G. Evjen, V. Chandra, J. Jiang, C. Lu, M. Nicastrì, C. Bretz, J.D. Winkler, R. Amaravadi, B.A. Garcia, P.D. Adams, M. Ott, W. Tong, T. Johansen, Z. Dou, S.L. Berger, SIRT1 is downregulated by autophagy in senescence and ageing, *Nat Cell Biol* 22(10) (2020) 1170-1179.
- [5] M.C. Haigis, D.A. Sinclair, Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5(1) (2010) 253-295.
- [6] E. Koyuncu, H.G. Budayeva, Y.V. Miteva, D.P. Ricci, T.J. Silhavy, T. Shenk, I.M. Cristea, D.E. Griffin, Sirtuins Are Evolutionarily Conserved Viral Restriction Factors, *mBio* 5(6) (2014).
- [7] 孙莉, 褪黑素通过 Sirt1 差异调节自噬和凋亡在流感病毒诱发气道炎症中的分子作用机制, 2022.
- [8] H.-M.V. Tang, W.-W. Gao, C.-P. Chan, Y. Cheng, J.-J. Deng, K.-S. Yuen, H. Iha, D.-Y. Jin, S.R. Ross, SIRT1 Suppresses Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Transcription, *Journal of Virology* 89(16) (2015) 8623-8631.
- [9] S. Zhang, J. Wang, L. Wang, S. Aliyari, G. Cheng, SARS-CoV-2 virus NSP14 Impairs NRF2/HMOX1 activation by targeting Sirtuin 1, *Cellular & Molecular Immunology* 19(8) (2022) 872-882.
- [10] 张宇飞, Sirt1 在奶牛乳腺上皮细胞氧化应激中的作用及其机制研究, 2024.
- [11] 杨扬, 杨公社, 庞卫军, 猪 Sirt1 基因慢病毒干扰载体的构建及其对前体脂肪细胞凋亡的初步研究, 第十五次全国动物遗传育种学术讨论会, 中国陕西杨凌, 2009, p. 1.
- [12] 赵姗姗, XR_001919077.1 调控宿主细胞线粒体功能和自噬影响犬新孢子虫在山羊 EECs 增殖的机制, 2024.
- [13] X. Wang, Q. Yuan, Y. Xiao, X. Cai, Z. Yang, W. Zeng, Y. Mi, C. Zhang, Pterostilbene, a Resveratrol Derivative, Improves Ovary Function by Upregulating Antioxidant Defenses in the Aging Chickens via Increased SIRT1/Nrf2 Expression, *Antioxidants* (Basel) 13(8) (2024).
- [14] 潘昊纯, 宿主蛋白 PDZK1 和 IGFBP3 对 PCV2 复制的影响及机制研究, 2024.
- [15] M.H. Alqarni, A.I. Foudah, M.M. Muharram, N.E. Labrou, The Pleiotropic Function of Human Sirtuins as Modulators of Metabolic Pathways and Viral Infections, *Cells* 10(2) (2021).
- [16] A. Chiarugi, C. Dölle, R. Felici, M. Ziegler, The NAD metabolome—a key determinant of cancer cell biology, *Nat Rev Cancer* 12(11) (2012) 741-52.
- [17] J.-H. Lim, Y.-M. Lee, Y.-S. Chun, J. Chen, J.-E. Kim, J.-W. Park, Sirtuin 1 Modulates Cellular Responses to Hypoxia by Deacetylating Hypoxia-Inducible Factor 1 α , *Molecular Cell* 38(6) (2010) 864-878.
- [18] J.W. Hwang, H. Yao, S. Caito, I.K. Sundar, I. Rahman, Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence, *Free Radic Biol Med* 61 (2013) 95-110.
- [19] H.S. Zhang, W.W. Sang, Y.O. Wang, W. Liu, Nicotinamide phosphoribosyltransferase/sirtuin 1 pathway is involved in human immunodeficiency virus type 1 Tat-mediated long terminal repeat transactivation, *J Cell Biochem* 110(6) (2010) 1464-70.