

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.23.001

• 基础研究 •

smc5 基因敲除斑马鱼肝脏转录组学分析*

施缘萍 朱文娇 张昌润 彭雅洁 乔洁[△]

(上海交通大学医学院附属第九人民医院内分泌科 上海 200011)

摘要 目的: 探讨 smc5 基因敲除对斑马鱼肝脏基因表达谱的影响, 进一步明确 smc5 突变对斑马鱼代谢的影响。**方法:** 用 CRISPR/Cas9 技术构建 smc5 基因敲除斑马鱼模型, 取 3 个月的 smc5^{-/-} 和野生型斑马鱼肝脏进行转录组测序, 创建基因表达谱文库, 观察 smc5 基因敲除后斑马鱼肝脏基因表达谱的变化, 将筛选出的差异表达基因进行功能富集, 并运用荧光定量 PCR 对 KEGG 通路中显著的差异表达基因进行验证。**结果:** 成功构建出 7 号外显子上 2 碱基缺失造成移码突变的 smc5 基因敲除斑马鱼模型。RNA-seq 发现 smc5^{-/-} 斑马鱼的肝脏基因表达谱变化显著, 包含 p53 的多个通路激活, 如细胞周期和凋亡。糖酵解、脂肪酸降解与代谢、丙酮酸代谢等相关通路显著下调。荧光定量 PCR 结果与 RNA-seq 结果一致。**结论:** smc5 基因敲除下调斑马鱼肝脏糖脂代谢。本研究结果为进一步研究 SMC5 基因在糖脂代谢调控中的潜在机制奠定基础。

关键词: CRISPR/Cas9; 斑马鱼; smc5; 代谢; 转录组测序

中图分类号: R-33; R575.5; Q959.4 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2022)23-4401-06

The Hepatic Transcriptome Analysis of smc5 Knockout Zebrafish Model*

SHI Yuan-ping, ZHU Wen-jiao, ZHANG Chang-run, PENG Ya-jie, QIAO Jie[△]

(Department of Endocrinology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200011, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the hepatic transcriptomic changes and the effects on metabolism of smc5 gene knockout zebrafish. **Methods:** The smc5 knockout zebrafish model was constructed by CRISPR/Cas9 technology and total RNA of the liver from wildtype and smc5^{-/-} zebrafish was extracted for RNA sequencing, and gene expression profile of smc5^{-/-} zebrafish was established. To better understand the differentially expressed genes (DEGs) in the smc5^{-/-}, DEGs were subjected to the Kyoto encyclopedia of genes (KEGG). qRT-PCR analysis was used to validate a set of genes. **Results:** The smc5 knockout lines of zebrafish carrying 2 base deletion were successfully constructed, which is expected to cause a frame shift. Further bioinformatic analysis revealed that p53 related pathways are significantly enriched among the genes upregulated. The downregulated DEGs were mainly enriched in glycolysis/gluconeogenesis, fatty acid degradation and metabolism, pyruvate metabolism. qRT-PCR results also validated that a set of genes of metabolism was downregulated. **Conclusions:** smc5 deficiency affects hepatic metabolism in zebrafish. The results of this study lay a foundation for further research on the potential mechanism of SMC5 gene in the regulation of glucose and lipid metabolism.

Key words: CRISPR/Cas9; Zebrafish; smc5; Metabolism; RNA-seq

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R575.5; Q959.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)23-4401-06

前言

染色体结构维持蛋白 5 (Structural Maintenance of Chromosomes protein 5, SMC5) 属于染色体结构维持蛋白, 其广泛参与 DNA 损伤修复、稳定 DNA 复制叉以及染色体分离等许多 DNA 相关进程, 并在染色体结构的维持和动态变化发挥重要作用^[1,2]。SMC5 是 SMC5/6 复合体的核心蛋白之一^[3,4], 该复合体还包含 6 个非 SMC 蛋白亚基 (non-SMC element, NSMCE), 分别是 NSMCE1-6。SMC5/6 复合体的功能研究早期主要在酵母

中进行, SMC5/6 复合物可以以一种 ATP 依赖的方式使复合体构象发生改变, 从而结合双链 DNA, SMC5 的 coiled-coil 结构域可以作为 DNA 感应器, 与 DNA 结合后激活 NSMCE2 的 E3 连接酶活性, 促进染色质蛋白的 SUMO 化, 增强酵母细胞的 DNA 损伤修复能力^[5]; SMC5/6 复合物还可以通过调节核仁功能或抑制 AMPK 功能, 调节能量代谢^[6,7]。然而, 该复合物是否调节体内能量代谢尚不可知。

SMC5/6 复合物与人类代谢疾病表型的关系于 2014 年被报道, Payne^[8]描述了两例 NSMCE2 基因复合杂合突变患者, 表

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81873652); 上海市自然科学基金项目(21ZR1438300)

作者简介: 施缘萍, 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 分子内分泌, E-mail: shlyuanping@126.com

△ 通讯作者: 乔洁, 女, 博士生导师, 主任医师, 主要研究方向: 遗传性内分泌代谢疾病的临床和基础研究, E-mail: qiaoj2001@126.com

(收稿日期: 2022-04-23 接受日期: 2022-05-18)

现为原基性侏儒症伴有严重胰岛素抵抗和性腺功能减退等一系列复杂临床表型,但其并未对患者的代谢表型进行深入的机制研究。另有研究显示,Smc6 敲除小鼠出现胚胎致死,其 ATP 酶水解酶的点突变(SMC6-S994A)小鼠表现有糖耐量异常、骨量减少和造血系统异常等多系统表型^[8]。然而,目前 SMC5/6 复合体在代谢领域的相关研究极少,可能是由于 smc5/6 复合体敲除小鼠胚胎致死^[8,9],限制了对 smc5 在整体动物水平缺失后对代谢的影响。斑马鱼是一种新型的模式生物,其具有体积小、产卵多、体外受精、生长周期短、饲养成本低^[10,11],且在斑马鱼胚胎易于进行基因编辑等优势^[12-14]。同时,斑马鱼还具有许多与哺乳动物相似的器官与功能,如具有甲状腺、胰腺、肝脏等,斑马鱼的肝脏色红,与周围组织分界清楚,易于取材^[15,16]。

SMC5 在肝脏代谢中的作用目前尚无研究涉及。本研究选用斑马鱼作为体内模型,通过 CRISPR/Cas9 技术构建 smc5 基因敲除模型,进而通过转录组学分析,探讨 smc5 敲除对斑马鱼肝脏代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 采用 Tuebingen (TU)品系野生型斑马鱼为研究对象,在上海市第九人民医院中心实验室鱼房进行饲养繁殖,28.5℃恒温,pH 值 7.2、光照黑暗交替。

1.1.2 主要材料与设备 PCR 引物和 oligo (铂尚),PCR 试剂(莱枫),pGEM-T Easy Vector System I (Promega),mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion)、T7 转录试剂盒(Invitrogen)、PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara)、SYBR® Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (Takara)、NanoDrop2000 紫外分光光度计、测序由武汉华大基因科技有限公司 BGISEQ-500 平台完成。

1.2 实验方法

1.2.1 sgRNA 的设计与合成 登录 UCSC 网站(<http://genome.ucsc.edu/>),选取 "zebrafish Sep.2014 GRCz10/danRer10",搜索斑马鱼 smc5 基因的全部序列。在 <http://crispor.tefor.net/> 网站寻找 Cas9 靶点,并评估其效率、脱靶和特异性(<http://asia.ensembl.org>),挑选最优 sgRNA (碱基序列为 GGCACGTAAA-GAGCTGGAGG)。设计合成 oligo。选定靶点后,在靶点的 5' 端加上 T7 启动子,在靶点的 3' 端加上和反向 oligo 互补的 20 个碱基。oligo 序列如下:

Smc5 oligo:

TAATACGACTCACTATAGGCACGTAAAGAGCTGGA-
GGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC

Rev_sgRNA_scaffold:

AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGAT-
AACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCT-
AAAAC。

体外转录体系(20 μL)如下:T7 酶 2 μL,10× Transcription Buffer 12.5 μL,DNA 模板 1 μg,ATP (10 mM)1 μL,GTP(10 mM)1 μL,CTP(10 mM)1 μL,UTP(10 mM)1 μL,Nuclease-free Water 补足至 20 μL,37℃体外转录 1 小时;加入 1 μL TURBO DNase,37℃水浴 15 分钟;取 1 μL 转录产物看转录效果;转录

产物用 mirVana™ miRNA Isolation Kit 试剂盒进行回收;NanoDrop2000 测定浓度;-80℃冰箱冻存。

1.2.2 smc5^{-/-} 斑马鱼的鉴定与筛选 将 cas9 核酸酶与 sgRNA 混合物注射至单细胞期胚胎,注射剂量为 2 μL (120 pg sgRNA)。注射完后将胚胎置于 28℃培养箱孵育。分别在 6 小时、24 小时、48 小时挑除死胚胎。注射 48 小时后随机选取 10 枚胚胎用于提取斑马鱼基因,PCR 测序验证,引物为:5'-CAAAACA-CACCCAGCACAAT-3'、5'-TCAGGAGGTGAAAAACAAACC-TC-3',将测序结果为后双峰的斑马鱼 PCR 产物连入 T-easy 载体,进行 TA 克隆,筛出有移码突变的 F0 斑马鱼。将 F0 斑马鱼与野生型鱼交配得到 F1 代;1-2 个月后,剪 F1 代尾鳍,消化裂解提取基因组 DNA 进行 PCR 测序验证,筛出 F1 杂合子;将携带同样突变的 F1 杂合子进行自交产生 F2 代,F2 代剪尾鉴定即可筛出 smc5^{-/-} 斑马鱼。

1.2.3 RNA seq 测序及分析 收集不同基因型的 3 个月(three months post-fertilization,3mpf)成鱼肝脏。5 条同基因型的斑马鱼肝脏混为一管,收集 3 管;速冻液氮,注意剔除成鱼肝脏组织周围的脂肪、脾脏等组织;送武汉华大进行测序。HISAT 比对后,比对过滤后的序列和参考基因组序列(zfish_GRCz11),后由 DESeq2 筛选差异基因,标准为 $P < 0.05$ and $|\log_2FC| \geq 1$,最后通过 clusterProfiler 进行 KEGG 通路富集。

1.2.4 逆转录及实时荧光定量 PCR(Real-Time PCR) 以不同基因型的 3mpf 成鱼肝脏 RNA 为逆转录模板,用逆转录试剂盒合成 cDNA,将反应得到的 cDNA 作为模板进行 qRT-PCR,内参为 eflα。反应条件:预变性 95℃ 30 s;PCR 反应:95℃ 5 s,60℃ 30 s,一共 40 个循环,反应结束后 Dissociation Stage。结果采用 2^{-ΔΔCt} 相对定量算法,t 检验方法分析,数据的统计分析和作图采用 Graphpad Prism8.0。

1.2.5 引物设计原则 在 UCSC 网址检索相关基因的 CDNA 序列,粘贴序列到 primer 2 软件的 New files 下 DNA 对话框,引物参数设置如下:扩增的片段长度为 100 bp,GC 含量为 40%-60%,引物长度为 15-30 bp,Tm 值最好在 60℃左右,Tm 值相差不超过 4℃,3' 末端最好不要是连续的碱基且不为 A。找到序列后比对二级结构并在 pubmed 上进行 Prime-Blast 明确引物的特异性。

2 结果

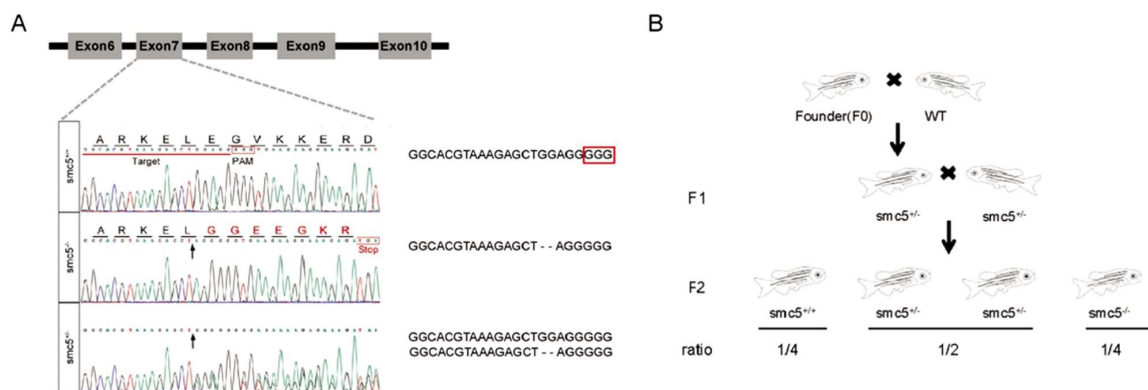
2.1 smc5 基因敲除斑马鱼的构建

利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,以 TU 系斑马鱼为背景,将 sgRNA 与 Cas9 核酸酶混合液显微注射到单细胞期胚胎中,构建 smc5 基因敲除斑马鱼。经筛选和测序鉴定,我们发现针对 7 号外显子的 gRNA,可以造成靶点处 2bp 缺失(c.813_814delGG),形成移码突变,在继续编码 7 个氨基酸后出现提前终止,筛出 smc5 基因突变个体(F0 代)(见图 1A);将 F0 与野生型斑马鱼交配,进一步拿到与 F0 代携带相同突变位点的 F1 代杂合斑马鱼(简称 smc5^{+/-})。再将 F1 代进行自交至 F2 代,经剪尾鉴定可筛选到纯合的 smc5 基因敲除斑马鱼(简称 smc5^{-/-}),smc5^{+/-} 自交得到的同窝野生、杂合、纯合三种基因型比例符合孟德尔遗传规律(筛选流程见图 1B)。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primers used for qRT-PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
zebrafish		
smc5	AGTCCAGTATCGTGTGTGCCAT	CCTCTTTGACACCCTCTCTTCAC
ef1 α	CCCCTGGACACAGAGACTTCATC	ATACCAGCCTCAAACCTACCCGAC
aldob	GTGGCTCCTGGAAAAGGCAT	GAAGGTCGCGAAAGCTACGG
pgam1a	CGTCTCTATGACATTCCACCA	AGCACGTGCAATAGTGTCTCT
me1	ATGTTACACGCAACCCCAT	ACCCGCAAAACTTGACATC
tp1b	ACTGAATAGCGCCAAGCTCAA	TGAAAGCTCCCTTTGCAACC
acaa1	TGTGGGACTCAAGCCCTCTT	TGGTACGGACTCTGGAAAGC
acsbg2	AGAGCCTCCTTCAGTCTGT	TGTGTGCTCTGTTCGGCTTT
acads	CTGGACTGCTGGACAAAGAGC	AGCCAGACAATAGGCCAGATA
ldhbb	CGTGGTGGAGGACAACTGA	ACCACGATACGAGAGTTCGC
eno3	GGAGACAAAACGCGCTACCT	GCTCCAGCATGAACTGTGCG
acadl	AACACGACCTGTTTCAGGCAA	GTTCTCCAGCCTTCTCCCAA
acadm	GCATGGGAGCTGGGTCTAAT	GAGAGTTCGCCTCAATGGCT
acat1	GTCCTACAGCACACGACCAT	CCCAGTTTGGTGGCTGGTAA
echs1	TAGCAGCGACAAGGCAATCC	ATTCAGGCCTTTGGTCTGT
cpt1a	GCTCTTCGGCAAGTCTATCTC	AACACCAGCACGAACCC
cpt1b	TCATGGGCTGACTCTCTATC	CAATGTCCCTCTGCTGTGTATC
cpt2	TCTAAATACCACGGGCAACTC	GTGCCATTCTTTTGAATTAGC
cact	GACGGCTCCAGAAGGTAAAT	GGCGTTGAAGCCCTTATAGA
crata	GCTATTCAGCTTGCTACTACA	CGAATGTAGTCTGTTCTGCTCTC
Ascl1b	GCTGCCATCACCACATACT	GGATAGAGCGACGTGCATATT

图 1 CRISPR-Cas9 介导的斑马鱼 *smc5* 基因敲除示意图Fig.1 Schematic diagram of zebrafish *smc5* knockout by CRISPR-Cas9

Note: Figure A is the sanger sequencing results of zebrafish mutation alleles. Black arrow indicate the deletion position, The PAM site is shown in red box, the sgRNA site is shown in red lines. Figure B is the screening process of *smc5*^{-/-} zebrafish.

2.2 转录组测序数据降维分析

我们采用 RNA seq 检测 3mpf 的野生型和 *smc5*^{-/-} 斑马鱼肝脏表达谱。主成分降维分析结果显示 *smc5*^{-/-} 突变体和野生型斑马鱼肝脏组织之间出现明显分离,两组内样本之间聚集较集中,说明两组样本分组较好且组内相关性较好(见图 2)。

2.3 差异基因分析

差异分析结果显示 *smc5* 敲除突变体的肝脏基因表达谱发

生显著变化,*smc5*^{-/-} 突变体和野生型肝脏之间共筛选到 4181 个差异表达基因 (Differential Expressed Genes, DEGs) ($P < 0.05$ 且 $FDR \leq 1$),显著上调基因有 2344 个,为红色点表示;显著下调基因 1837 个,为蓝色点表示(见图 3)。其中,差异基因最显著的前 10 个基因中,如 *cpt1b*,明显与糖脂代谢多种途径相关。

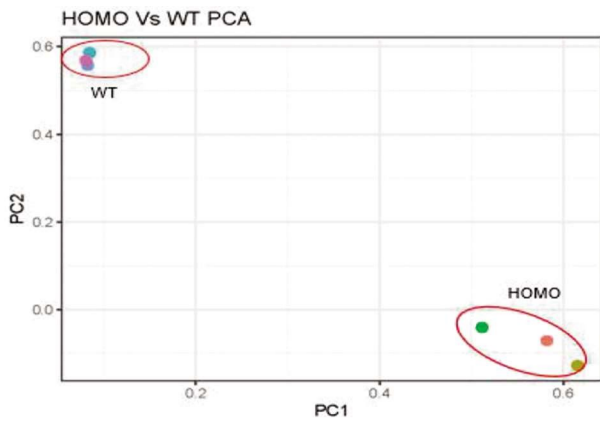


图2 野生型和 *smc5*^{-/-} 斑马鱼肝脏 RNA seq PCA 图

Fig. 2 Principal component analysis (PCA) plot of wildtype and *smc5*^{-/-} RNA-seq datasets

2.4 KEGG 通路分析

在 KEGG 数据库中将 DEGs 进行通路注释,富集分析结果均为显著差异的 KEGG 通路($P < 0.05$)。其中,上调基因富集的通路(红色表示)主要包括细胞周期、细胞衰老、铁死亡、p53 信号通路、RNA 转运和降解、DNA 复制等;下调基因富集的通路(蓝色表示)主要包括糖酵解和糖异生、脂肪酸代谢、氨基酸代谢等(见图 4)。

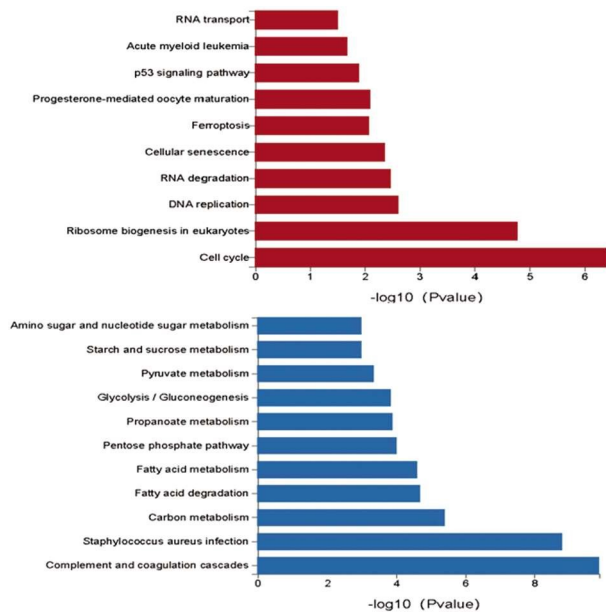


图4 野生型和 *smc5*^{-/-} 斑马鱼肝脏 RNA seq KEGG 通路富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of wildtype and *smc5*^{-/-} RNA-seq datasets

Note: The KEGG enrichment analysis from the significantly upregulated (Red) genes and downregulated (Blue) (FDR ≤ 1)

2.5 Real-Time PCR 验证基因表达

本研究针对转录组测序数据,挑选 KEGG 通路富集在糖酵解、糖异生、丙酮酸代谢、脂肪酸 β -氧化及代谢等相关的差异基因,对 *smc5*^{-/-} 和野生型斑马鱼肝脏组织 RNA 进行验证。Real-Time PCR 结果显示,与野生型斑马鱼肝脏组织基因表达水平相比,*smc5*^{-/-} 斑马鱼肝脏的基因表达趋势和倍数基本与 RNA-seq 结果相当(图 5),荧光定量 PCR 结果与 RNA-seq 结

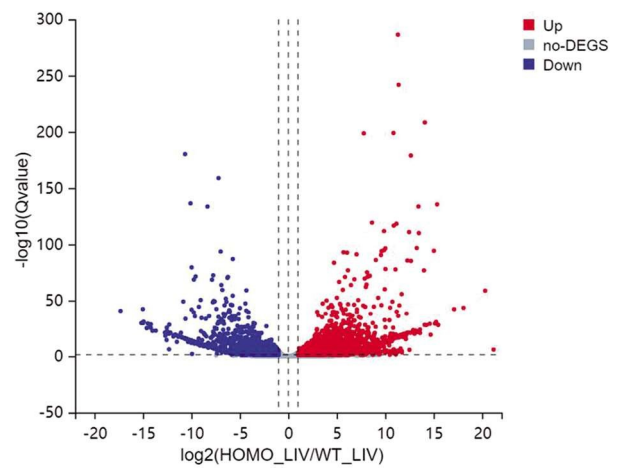


图3 野生型和 *smc5*^{-/-} 斑马鱼肝脏 RNA seq 火山图

Fig. 3 Volcano plot of wildtype and *smc5*^{-/-} RNA-seq datasets

Note: Red shows upregulated genes and blue shows downregulated genes.

果一致,说明 RNA-seq 测序结果可靠。而且,检测的 30 个参与糖脂代谢的差异基因中,斑马鱼肝脏整体代谢水平下降。

3 讨论

染色体结构维持蛋白复合体 (Structural Maintenance of Chromosomes proteins, SMCs) 是近年发现的一种新的蛋白复合体,普遍存在于生物界,是一类维持染色质高级结构和动态稳定性的蛋白质,参与姐妹染色单体内聚和 DNA 损伤修复等过程^[1,17]。目前已知的 SMC 复合体有三类:黏连蛋白复合体^[18]、凝缩蛋白复合体^[19]和 SMC5/6 复合体。其中 SMC5/6 复合体是发现较晚的第三种 SMC 复合体^[20],SMC5/6 复合体参与 DNA 损伤后的同源重组修复,维持基因组的完整性等^[21-24]。SMC5 和 SMC6 是多种物种中保守的 SMC5/6 复合物的关键组分,且该复合体还包含 6 个非 SMC 蛋白亚基(分别是 NSMCE1-6)。SMC5 基因功能复杂,目前远未被阐释。据近几年文献报道,SMC5/6 复合体功能缺陷导致代谢异常^[25],但其机制未明,SMC5 在代谢中的作用目前也尚无研究涉及。为了对 SMC5 进行深入的解析,进一步验证 SMC5 缺陷产生的表型以及 SMC5 缺陷对代谢的影响及其致病机制,我们拟采用斑马鱼这一模式生物来进行后续的机制研究。

在生理条件下,肝脏是日常大量营养物质(如碳水化合物、蛋白质)代谢的主要场所,协调合成代谢和分解代谢,以维持全天的能量稳态^[26,27]。同时,肝脏在维持空腹血糖水平方面起着关键作用^[28,29],空腹状态时,血糖水平的维持主要依赖于肝脏的糖异生作用^[30],肝脏可以将各种糖异生前体(除甘油外)通过丙酮酸羧化酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(pck)和葡萄糖-6-磷酸酶(g6pca.1)等关键酶生成各种单糖或多糖^[31]。研究野生型和 *smc5*^{-/-} 斑马鱼的肝脏可能有助于阐明 *smc5* 诱导的代谢性疾病的潜在机制。于是,我们进一步收集野生型和 *smc5*^{-/-} 斑马鱼肝脏 RNA 进行了转录组分析,以观察 *smc5* 基因敲除后肝脏基因表达谱变化,探讨代谢异常的发生机制。

通过 RNA-seq 结果,我们观察到 *smc5*^{-/-} 斑马鱼肝脏基因表达谱发生显著变化,敲除 *smc5* 斑马鱼肝脏中 p53 相关通路显著上调,Venegas^[32]等曾发现 SMC5/6 的缺失会导致细胞产生

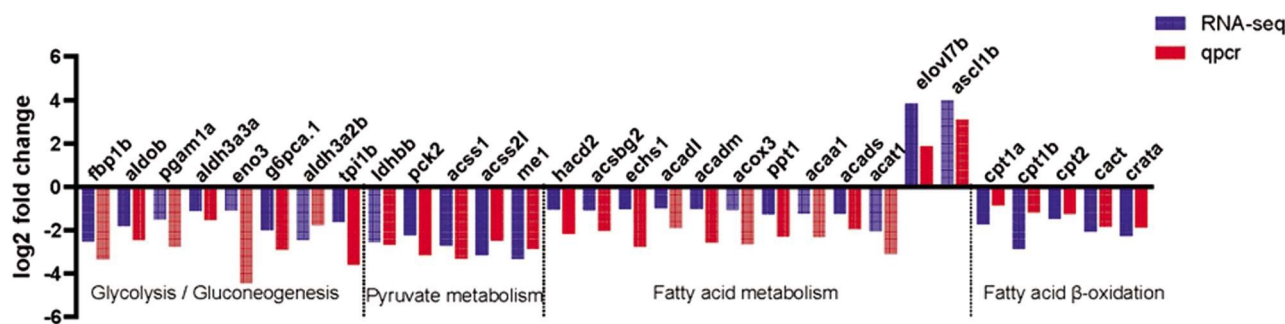
图5 野生型和 *smc5*^{-/-} 斑马鱼肝脏 RNA seq 的荧光定量 PCR 验证结果

Fig. 5 Validation of RNA-seq data using qRT-PCR

Note: The log₂ fold change values from the RNA-seq analysis are compared with those obtained by qRT-PCR determined by $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Blue shows RNA-seq datas and red shows qRT-PCR datas.

自发诱导 DNA 损伤、p53 激活、细胞周期阻滞和衰老,以及各种有丝分裂过程中染色体分离异常频率的增加;提示 SMC5/6 功能障碍可能通过诱导 DNA 损伤修复异常,激活 P53 途径,从而影响细胞的增殖和凋亡。我们同样发现下调基因主要富集在代谢相关通路。*smc5*^{-/-} 斑马鱼糖代谢、脂肪酸代谢等相关基因表达下降,如糖酵解/糖异生途径中的果糖-1,6-二磷酸酶 1b(*fbp1b*)、醛缩酶 b(*aldob*)、磷酸甘油酸变位酶 1a(*pgam1a*)、乙醛脱氢酶(*aldh*)、烯醇酶 3(*eno3*)、磷酸丙糖异构酶 1b(*tpi1b*)等;丙酮酸代谢途径中的乳酸脱氢酶(*ldhbb*)、乙酰辅酶 A 合成酶 1(*acss1*)、苹果酸酶 1(*me1*)等,脂肪酸代谢途径中的非常长链脂酰辅酶 A 脱水酶 2(*hacd2*)、长链脂酰辅酶 A 连接酶(*acsb2*)、烯酰辅酶 A 水合酶短链 1(*ech1*)等、乙酰辅酶 A 酰基转移酶 1(*aca1*)、脂肪酸 β 氧化途径中的肉碱脂酰转移酶 1(*cpt1*)、肉碱脂酰转移酶 2(*cpt2*)、脂酰肉碱转位酶(*cact*)、肉碱脂酰辅酶 A 转移酶 a(*crata*)等。*smc5* 基因缺失影响斑马鱼肝脏代谢。

综上所述,敲除 *smc5* 的斑马鱼肝脏中 p53 相关通路基因表达都升高,糖酵解、脂肪酸代谢等相关基因表达下降。这一结果不仅验证了之前报道的 SMC5/6 复合体的组分蛋白基因突变会导致代谢异常的疾病表型,而且也进一步明确了 *smc5* 影响斑马鱼肝脏代谢。本研究首次构建了 *smc5* 基因敲除的斑马鱼模型,了解 *smc5* 敲除对斑马鱼肝脏的影响,揭示其在基本生命过程中的作用,为进一步研究 SMC5 基因的生理功能及其在糖脂代谢调控中的潜在机制奠定实验基础。

参考文献(References)

- [1] Hassler M, Shaltiel IA, Haering CH. Towards a Unified Model of SMC Complex Function[J]. *Curr Biol*, 2018, 28(21): R1266-r81
- [2] Behlke-Steinert S, Touat-Todeschini L, Skoufias DA, et al. SMC5 and MMS21 are required for chromosome cohesion and mitotic progression[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(14): 2211-8
- [3] Duan X, Sarangi P, Liu X, et al. Structural and functional insights into the roles of the Mms21 subunit of the Smc5/6 complex[J]. *Mol Cell*, 2009, 35(5): 657-668
- [4] Serrano D, Cordero G, Kawamura R, et al. The Smc5/6 Core Complex Is a Structure-Specific DNA Binding and Compacting Machine[J]. *Mol Cell*, 2020, 80(6): 1025-38.e5
- [5] Varejão N, Ibars E, Lascorz J, et al. DNA activates the Nse2/Mms21 SUMO E3 ligase in the Smc5/6 complex [J]. *Embo j*, 2018, 37(12): e98306
- [6] Kim DH, Harris B, Wang F, et al. Mms21 SUMO Ligase Activity Promotes Nucleolar Function in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics*, 2016, 204(2): 645-658
- [7] Simpson-Lavy KJ, Bronstein A, Kupiec M, et al. Cross-Talk between Carbon Metabolism and the DNA Damage Response in *S. cerevisiae* [J]. *Cell Rep*, 2015, 12(11): 1865-1875
- [8] Ju L, Wing J, Taylor E, et al. SMC6 is an essential gene in mice, but a hypomorphic mutant in the ATPase domain has a mild phenotype with a range of subtle abnormalities[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2013, 12(5): 356-366
- [9] Jacome A, Gutierrez-Martinez P, Schiavoni F, et al. NSMCE2 suppresses cancer and aging in mice independently of its SUMO ligase activity[J]. *Embo j*, 2015, 34(21): 2604-2619
- [10] Howe DG, Bradford YM, Eagle A, et al. The Zebrafish Model Organism Database: new support for human disease models, mutation details, gene expression phenotypes and searching [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D758-d68
- [11] Seth A, Stemple DL, Barroso I. The emerging use of zebrafish to model metabolic disease[J]. *Dis Model Mech*, 2013, 6(5): 1080-1088
- [12] Bai X, Jia J, Kang Q, et al. Integrated Metabolomics and Lipidomics Analysis Reveal Remodeling of Lipid Metabolism and Amino Acid Metabolism in Glucagon Receptor-Deficient Zebrafish [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 605979
- [13] Nath AK, Ma J, Chen ZZ, et al. Genetic deletion of *gpr27* alters acylcarnitine metabolism, insulin sensitivity, and glucose homeostasis in zebrafish[J]. *FASEB J*, 2020, 34(1): 1546-1557
- [14] Sun F, Fang Y, Zhang MM, et al. Genetic Manipulation on Zebrafish duox Recapitulate the Clinical Manifestations of Congenital Hypothyroidism[J]. *Endocrinology*, 2021, 162(8): bqab101
- [15] Schlegel A, Gut P. Metabolic insights from zebrafish genetics, physiology, and chemical biology [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(12): 2249-2260
- [16] Santoro MM. Zebrafish as a model to explore cell metabolism[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(10): 546-554
- [17] Jeppsson K, Kanno T, Shirahige K, et al. The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(9): 601-614

- [18] Diaz M, Pecinka A. Scaffolding for Repair: Understanding Molecular Functions of the SMC5/6 Complex[J]. *Genes (Basel)*, 2018, 9(1): 36
- [19] Martin CA, Murray JE, Carroll P, et al. Mutations in genes encoding condensin complex proteins cause microcephaly through decatenation failure at mitosis[J]. *Genes Dev*, 2016, 30(19): 2158-2172
- [20] Hirano T, Nishiyama T, Shirahige K. Hot debate in hot springs: Report on the second international meeting on SMC proteins [J]. *Genes Cells*, 2017, 22(11): 934-938
- [21] Alt A, Dang HQ, Wells OS, et al. Specialized interfaces of Smc5/6 control hinge stability and DNA association [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14011
- [22] Aragón L. The Smc5/6 Complex: New and Old Functions of the Enigmatic Long-Distance Relative [J]. *Annu Rev Genet*, 2018, 52: 89-107
- [23] Peng J, Feng W. Incision of damaged DNA in the presence of an impaired Smc5/6 complex imperils genome stability [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(21): 10216-10229
- [24] Atkins A, Xu MJ, Li M, Rogers NP, et al. SMC5/6 is required for replication fork stability and faithful chromosome segregation during neurogenesis[J]. *Elife*, 2020, 9: e61171
- [25] Payne F, Colnaghi R, Rocha N, et al. Hypomorphism in human NSM-CE2 linked to primordial dwarfism and insulin resistance [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(9): 4028-4038
- [26] Benegiamo G, Mure LS, Erikson G, et al. The RNA-Binding Protein NONO Coordinates Hepatic Adaptation to Feeding [J]. *Cell Metab*, 2018, 27(2): 404-18.e7
- [27] Papazyan R, Sun Z, Kim YH, et al. Physiological Suppression of Lipotoxic Liver Damage by Complementary Actions of HDAC3 and SCAP/SREBP[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(6): 863-874
- [28] Wang L, Scott I, Zhu L, et al. GCN5L1 modulates cross-talk between mitochondria and cell signaling to regulate FoxO1 stability and gluconeogenesis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 523
- [29] Karanth S, Adams JD, Serrano MLA, et al. A Hepatocyte FOXN3- α Cell Glucagon Axis Regulates Fasting Glucose[J]. *Cell Rep*, 2018, 24(2): 312-319
- [30] Mata-Torres G, Andrade-Cetto A, Espinoza-Hernández FA, et al. Hepatic Glucose Output Inhibition by Mexican Plants Used in the Treatment of Type 2 Diabetes[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 215
- [31] Chen SJ, Wu X, Wadas B, et al. An N-end rule pathway that recognizes proline and destroys gluconeogenic enzymes [J]. *Science*, 2017, 355(6323): eaal3655
- [32] Venegas AB, Natsume T, Kanemaki M, et al. Inducible Degradation of the Human SMC5/6 Complex Reveals an Essential Role Only during Interphase[J]. *Cell Rep*, 2020, 31(3): 107533

(上接第 4444 页)

- [23] 欧阳鹏荣, 全黎, 董海龙. 心脏手术术后认知功能障碍的研究进展[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2015, 36(6): 527-530, 535
- [24] 张洁, 单东艳, 孙菊芳, 等. 老年患者心脏术后认知功能障碍发生现状及影响因素分析[J]. *护士进修杂志*, 2021, 36(24): 2214-2216, 2221
- [25] Shanker A, Upadhyay P, Rangasamy V, et al. Impact of frailty in cardiac surgical patients-Assessment, burden, and recommendations[J]. *Ann Card Anaesth*, 2021, 24(2): 133-139
- [26] Pisano C, Polisano D, Balistreri CR, et al. Role of Cachexia and Frailty in the Patient Candidate for Cardiac Surgery [J]. *Nutrients*, 2021, 13(2): 517
- [27] 陈政文, 汪艳萍, 陈爱芳, 等. 非心脏手术老年患者术前衰弱与术后认知功能障碍的关系[J]. *中华麻醉学杂志*, 2021, 41(5): 542-545
- [28] Emmert DA, Arcario MJ, Maranhao B, et al. Frailty and cardiac surgery: to operate or not?[J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2022, 35(1): 53-59
- [29] Abdullahi YS, Athanasopoulos LV, Casula RP, et al. Systematic review on the predictive ability of frailty assessment measures in cardiac surgery[J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2017, 24(4): 619-624
- [30] Li Z, Ding X. The incremental predictive value of frailty measures in elderly patients undergoing cardiac surgery: A systematic review[J]. *Clin Cardiol*, 2018, 41(8): 1103-1110