

Wang J L, Zhou M, Feng H H, *et al.* Regulatory mechanism of gcrv nonstructural protein NS38 on host protein SAMHD1 [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2026, 50(4): 042608. [王佳良, 周蔓, 封浩浩, 等. GCRV非结构蛋白NS38调控宿主蛋白SAMHD1的机制 [J]. 水生生物学报, 2026, 50(4): 042608.]

GCRV非结构蛋白NS38调控宿主蛋白SAMHD1的机制

王佳良^{1,2} 周蔓² 封浩浩^{2,3} 曹宏^{2,3}

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 大连 116023; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072;

3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为探究GCRV编码的蛋白在病毒与宿主间相互作用及免疫逃逸中的具体作用机制, 本研究聚焦于 I 型 GCRV 的非结构蛋白 NS38, 通过免疫共沉淀联合质谱分析, 筛选并鉴定出草鱼 SAMHD1 蛋白为 NS38 的相互作用蛋白。免疫共沉淀和亚细胞定位实验证实二者在细胞内直接结合, 并共定位于细胞质中, 截短实验表明, SAMHD1 的 HD 结构域是介导其与 NS38 互作的关键区域。进一步实验表明, SAMHD1 对 GCRV 复制具有一定的抑制作用: 在草鱼 CIK 细胞中过表达 SAMHD1 可显著降低病毒拷贝数并缓解细胞病变效应, 而通过 RNA 敲降 SAMHD1 则促进病毒复制。值得注意的是, SAMHD1 的抗病毒作用不依赖于干扰素通路的激活, 更可能依赖于其 dNTP 三磷酸水解酶活性, 通过消耗细胞内的 dNTP 储备来限制病毒逆转录从而阻断病毒复制。同时发现, GCRV NS38 可通过自噬-溶酶体途径诱导 SAMHD1 降解, 从而拮抗其抗病毒功能。本研究揭示了一种 GCRV 免疫逃逸的新机制, 即 NS38 通过靶向降解 SAMHD1 蛋白实现免疫逃逸。本发现深化了对 GCRV 致病机制的认知, 为抗 GCRV 疫苗的研制提供了潜在靶点。

关键词: 草鱼呼肠孤病毒; NS38; SAMHD1; 自噬; 拮抗; 免疫逃逸

中图分类号: Q939.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2026)04-042608-09

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0381 **CSTR:** 32229.14.SSSWXB.2025.0381



草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)所引起的草鱼出血病, 其传染性高且防治困难, 给我国的草鱼养殖业造成了巨大的损失^[1,2]。GCRV 属于水呼肠孤病毒属 C 组成员, 基于基因组和生物学特征, 可划分为 3 种基因型 (I、II 和 III 型)^[3], 其中 I 型 GCRV 编码 7 种结构蛋白 (VP1—VP7) 和 6 种非结构蛋白 (NS80、NS38、NS31、NS26、NS16 和 NS12)^[4,5]。目前, 这些病毒蛋白的具体功能机制尚有待深入研究, 尤其是病毒与宿主间的互作及其在免疫逃逸中的作用机制仍知之甚少。

SAMHD1 (SAM domain and HD domain containing protein 1) 蛋白作为一种宿主限制因子, 因其具备独特的抗病毒功能而成为分子免疫学研究热点。研究表明, SAMHD1 作为 dNTP 三磷酸水解酶, 可通过消耗细胞内的脱氧核苷酸 (dNTP) 来限制病

毒, 从而抑制 HIV-1 等逆转录病毒的复制, 发挥其抗病毒功能^[6]。SAMHD1 包含一个不育 α 基序 (SAM) 结构域和一个组氨酸-天冬氨酸 (HD) 结构域, 最初被鉴定为干扰素- γ (IFN- γ) 诱导的小鼠基因 Mg11 的直系同源物^[7,8]。SAMHD1 是一种 dGTP 激活的三磷酸水解酶 (dNTPase), 其主要功能是水解脱氧核苷三磷酸 (dNTP), 从而降低细胞内 dNTP 的整体水平^[9,10]。SAMHD1 的纯合突变会导致 Aicardi-Goutières 综合征 (AGS), 这是一种罕见的常染色体隐性遗传神经系统疾病, 临床表现类似于先天性病毒感染^[11], 其外周血中干扰素刺激基因 (ISG) 产物水平升高^[12]。此外, 研究证明, SAMHD1 基因敲除 (KO) 的小鼠可产生自发性 I 型干扰素 (IFN-I) 诱导, 其淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞 (DC) 内的 dNTP 浓度增加^[13]。这些发现表明 SAMHD1 在哺乳动物细

收稿日期: 2025-10-30; 修订日期: 2025-12-12

基金项目: 国家自然科学基金(32270532)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (32270532)]

作者简介: 王佳良(2000—), 男, 硕士研究生; 主要从事鱼类分子遗传学研究。E-mail: wangjialiang@ihb.ac.cn

通信作者: 曹宏, E-mail: regancao@ihb.ac.cn

胞中可调控IFN信号通路,其潜在机制可能是当SAMHD1缺失时,细胞内的逆转录转座子被激活,这些基因组内的移动元件会进行复制并易位,产生类似于病毒核酸的中间产物,从而模拟病毒入侵,触发先天免疫系统的应答^[14]。

值得注意的是, *SAMHD1*本身也是一个干扰素刺激基因(Interferon-Stimulated Genes),其表达可由白细胞介素-12 (IL-12)和IL-18在人单核细胞来源的巨噬细胞(MDM)中诱导^[15]。I型干扰素处理可增加多种细胞系中SAMHD1的表达水平,但在原代CD4⁺T淋巴细胞中则无此效应^[16]。在U87-MG胶质瘤细胞中,干扰素- α (IFN- α)能够上调SAMHD1的表达,然而,在人原代单核巨噬细胞(MDM)或单核细胞系THP-1中,其表达均未被显著诱导^[17]。此外,干扰素处理还可通过调节微小核糖核酸(microRNA)来激活不同细胞系中的SAMHD1表达^[18]。因此,干扰素以细胞类型依赖性的方式上调SAMHD1表达,其机制可能与SAMHD1介导的抗病毒活性相关。同时, SAMHD1亦是限制非分裂细胞中HIV-1感染的关键因子^[19],作为dNTPase,其可通过水解细胞内dNTP来限制逆转录所需的原料,从而抑制HIV-1 cDNA合成^[20]。此外,作为一种多功能蛋白, SAMHD1在调节细胞周期进程、癌症发展、适应性免疫及对其他病毒感染的应答中也发挥着重要作用^[21]。

本研究聚焦于I型GCRV毒株, GCRV-JX0901编码的非结构蛋白NS38,通过IP-MS技术筛选出了与其具有蛋白互作功能的宿主蛋白SAMHD1,并进一步探究了SAMHD1与NS38蛋白之间的互作机制。实验证实SAMHD1是GCRV复制的负调控因子。NS38与SAMHD1在293T细胞中发生外源性互作,亚细胞定位分析显示,在GCO细胞中NS38与SAMHD1共定位于细胞质。机制研究表明, NS38通过自噬溶酶体途径降解SAMHD1,进而实现免疫逃逸。本研究为理解GCRV的致病机制提供了新的视角,并为草鱼出血病的防控策略和疫苗研发提示了潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用I型草鱼呼肠孤病毒(GCRV-JX0901, 10^6 TCID₅₀/mL)和II型草鱼呼肠孤病毒(GCRV-HZ08, 2.97×10^3 RNA copy/ μ L)均为本实验室保存。所用细胞系均来自中国科学院水生生物研究所,其中草鱼性腺细胞系(GCO)和草鱼肾脏细胞系(CIK)用含10%胎牛血清(FBS)的M199细胞培养基在28℃、5% CO₂培养箱中培养, HE293T细胞

用含10%胎牛血清(FBS)的DMEM细胞培养基在37℃、5% CO₂培养箱中培养。实验用鱼来自中国科学院水生生物研究所,选取同批次相同规格体型相似个体,在实验前12h停止投喂,并在实验用水中驯化2周后进行实验。

1.2 RNA提取与qRT-PCR分析

细胞和组织总RNA采用TRIzol法提取, RNA浓度及纯度通过超微量分光光度计(ND-100, 中国)测定,选取 A_{260}/A_{280} 值介于1.8至2.0且尽量接近2.0的样品用于后续实验。cDNA合成使用反转录试剂盒[UnionScript First-strand cDNA Synthesis Mix for qPCR (with dsDNase)],按照说明书进行体系配置与温控程序,所得cDNA产物短期储存于-20℃。qPCR反应体系为20 μ L,包括1 μ L反转录产物、0.4 μ L上游引物、0.4 μ L下游引物、10 μ L Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix预混液和8.2 μ L无酶水,在Applied Biosystems StepOne™实时荧光定量PCR系统(Bio-Rad)上进行。以 β -actin作为内参基因,实验设置3个生物学重复,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因在样本中的相对表达量。实验引物序列见表1。

1.3 基因过表达与敲降

为获得病毒NS38及草鱼SAMHD1基因的重组表达载体,对测序所得的病毒基因组序列和自NCBI数据库获取的草鱼SAMHD1基因序列,利用同源重组方法将各基因开放阅读框(ORF)分别克隆至pCMV-Myc/Flag、pAcGFP-N1及pm-Cherry-N1 (Clontech)

表1 实验所用引物及序列

Tab. 1 Primers and sequences used in this experiment		
基因名 Gene name	序列Sequence (5'—3')	登录号 Accession number
NS38	ATGGCACACACAGGCACC TTACATACCCCCGATCGGCA	PX647869
SAMHD1	ATGGATAAGCGGATTAAACG GCCA TCAGAGGTTGTTTTGTCCCTG AG	MF326081.1
VP2	ATCAAGGATCCCATTCGCC TTCA TTAGAGGATCGTGCCATTGA GGGT	MT543211
VP7	ACCACCAACTTTGATCACGC TGAG AGCGTGGGAGTCTTGAATGG TCTT	AF403396
IFN1	AAGCAACGAGTCTTTGAGCC T GCGTCCTGGAAATGACACCT	DQ357216.1
IFN3	TACATTTATAGAGACTGCGG GTGG TGGAGTGTCTGGTAAACAGC CTT	DQ357216.1
β -actin	AGCCATCCTTCTGGGTATG GGTGGGGCGATGATCTTGAT	DQ211096.1

载体中,用于后续实验。在过表达实验中,将所构建的重组质粒与Neofect™转染试剂(码因)共同孵育后转染进细胞内,48h内进行后续实验分析。

本实验所采用的siRNA序列由武汉擎科科技有限公司设计,共合成3个siRNA序列,si-SAMHD1 #1: GCUCUUCAUAACAAAGCAA, si-SAMHD1#2: GAGCCUAGAAGCUGCUAAA, si-SAMHD1#3: GCAACAUCGAGACCAU。3组siRNA分别靶向SAMHD1的不同区域。使用Lipo fectamine 2000转染试剂(Invitrogen)将siRNA转染进GCO细胞。通过qRT-PCR评估候选siRNA的沉默效率,并与供应商提供的阴性对照siRNA (si-NC)进行比较,筛选出敲降率最高的siRNA进行后续实验。

1.4 Western Blot与质谱分析

为探究GCRV NS38与宿主的潜在互作蛋白网络,进行了免疫共沉淀联合质谱分析。具体实验流程:通过脂质体转染法将真核表达质粒pCMV-Flag-NS38或其空载对照pCMV-Flag导入细胞,转染24h后,以GCRV感染细胞,并于感染后24h收集细胞。使用预冷的RIPA裂解液(50 mmol/L Tris-HCL pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.25%脱氧胆酸钠, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L NaF)裂解细胞,将获得的细胞总蛋白裂解液与经RIPA充分洗涤后的抗Flag标签免疫磁珠共同孵育,以特异性富集NS38蛋白及其潜在的相互作用蛋白复合物。在孵育完成后,用RIPA充分洗涤磁珠以去除非特异性结合蛋白。为验证NS38蛋白在实验体系中的成功表达与免疫沉淀效率,取部分洗脱样品进行SDS-PAGE分离,然后采用蛋白质印迹技术,使用抗Flag抗体检测目的条带。同时,为直观评估蛋白富集情况,采用银染试剂盒(Beyotime)对平行泳道进行可视化分析。最后,将剩余的免疫沉淀样品送至普渡众合质谱平台进行分析,通过比对实验组与空载对照组的质谱数据,筛选与NS38特异性结合的潜在宿主互作蛋白。

1.5 蛋白定量分析

使用BCA蛋白浓度测定试剂盒(TRANS)对蛋白样品进行定量。将蛋白标准品(BSA)按说明书进行系列稀释以绘制标准曲线。将标准品与样品加入96孔板,每孔加入200 μ L BCA工作液,混匀后于37 $^{\circ}$ C放置30min。随后,使用分光光度计(ND-100, 中国)或酶标仪测定562 nm波长下的吸光度值。根据标准曲线计算各样品蛋白浓度,并将所有样品浓度调整一致以备后续实验。

1.6 亚细胞定位

为分析GCRV NS38与草鱼SAMHD1在GCO细

胞中的亚细胞定位,将GCO细胞接种于共聚焦培养皿中,分别转染GFP-NS38与mCherry-SAMHD1融合表达质粒。在转染24h后,细胞经4%多聚甲醛固定、0.5% Triton X-100通透,并使用DAPI染色细胞核。样品在激光扫描共聚焦显微镜(SP8, 美国)下成像,通过多通道荧光信号叠加分析蛋白分布。

1.7 药物干扰试验

将293T细胞接种于6孔板(A、B、C板),每板以不同剂量共转染Flag-SAMHD1与Myc-NS38质粒。A板转染16h后加入10 μ mol/L蛋白酶体抑制剂MG-132 (MCE), B板和C板转染12h后分别加入1 mmol/L自噬功能抑制剂3-MA (MCE)和10 mmol/L溶酶体功能抑制剂NH₄Cl (SIGMA)进行处理。转染24h后收集细胞,裂解并提取蛋白,通过Western Blotting使用相应抗体进行检测。

1.8 统计分析

实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,其中qRT-PCR数据为3个独立实验的平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE)。使用GraphPad Prism 10软件进行统计学分析,组间比较采用非配对 t 检验。 $P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。蛋白质印迹结果的条带灰度值分析使用ImageJ软件完成。

2 结果

2.1 GCRV NS38与SAMHD1相互作用

为鉴定与GCRV NS38互作的宿主蛋白,本研究在草鱼性腺细胞(GCO)中分别转染pCMV-Flag-NS38与空载体pCMV-Flag (对照),利用抗Flag抗体进行Co-IP实验。对洗脱样品进行蛋白质印迹及银染色分析(图 1A),通过质谱鉴定出6个GCRV NS38的潜在互作蛋白。其中SAMHD1在先天性免疫及抗病毒应答中发挥着重要作用,因此,本研究选择该蛋白进行深入研究。为验证NS38与SAMHD1之间的相互作用,本研究在293T细胞中进行了Co-IP实验,结果显示SAMHD1可与NS38发生免疫共沉淀(图 1C)。亚细胞定位分析表明, SAMHD1与GCRV NS38共定位于细胞质(图 1D)。结构域截断实验显示, SAMHD1的组氨酸-天冬氨酸(HD)结构域是其与NS38相互作用的关键区域(图 1E和1F)。

2.2 GCRV感染对草鱼细胞和个体水平SAMHD1的影响

为研究GCRV感染后草鱼在个体水平上及细胞层面的SAMHD1表达变化趋势,将过夜培养的GCO细胞用GCRV感染24h,提取细胞总RNA,通过qPCR来检测其mRNA,结果显示, GCRV感染不能单独引

起GCO细胞中*SAMHD1*基因量的变化(图2A和2B)。同时,在个体水平,通过qRT-PCR检测发现,*SAMHD1*在草鱼所有组织中均检出其mRNA,其中在脑组织中的表达量最高,肝脏中的表达量最低(图2C)。时空表达特征分析显示(图2D—2H),在GCRV攻毒以后,在检测的全部草鱼组织中,其*SAMHD1*的表达水平均有所上调,并且均在GCRV感染后的1d达到峰值。值得注意的是,在其肠道组

织中*SAMHD1*表达水平在4d后显著性下调了87.58% ($P<0.0001$)。

2.3 过表达SAMHD1抑制GCRV复制

将*SAMHD1*-Myc质粒转染进CIK细胞,同时转染pCMV-Myc质粒进另一组CIK细胞作为对照组,24h后感染2 μ L GCRV病毒液,感染24h后用1%结晶紫染色并收集细胞上清液,用TCID₅₀法测定病毒滴度。结果显示过表达*SAMHD1*组的细胞病变效

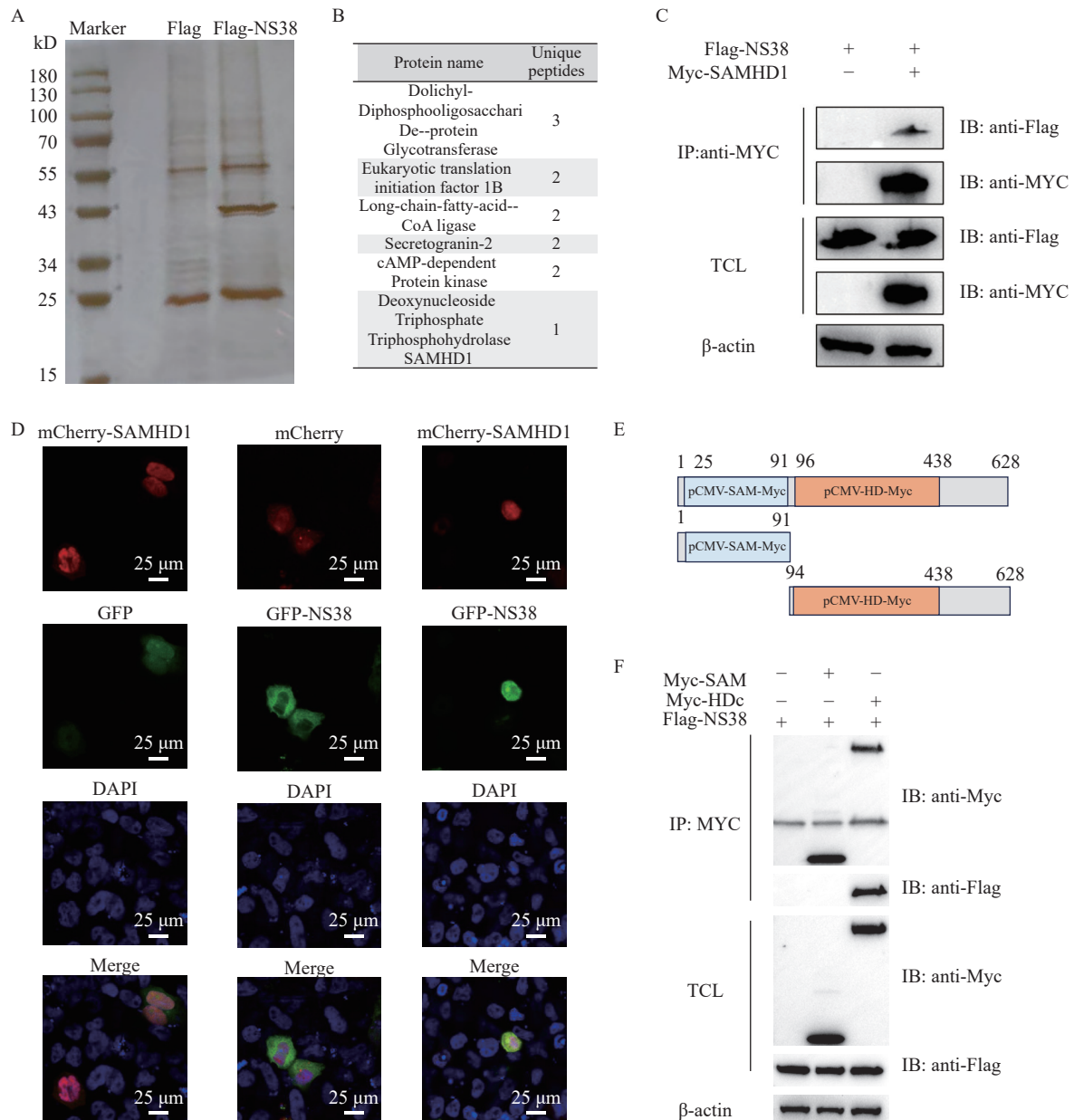


图1 GCRV NS38与SAMHD1相互作用

Fig. 1 GCRV NS38 interacts with SAMHD1

A. NS38银氨染色; B. IP-MS鉴定与NS38互作的宿主蛋白; C. NS38与SAMHD1免疫共沉淀; D. GCO细胞中NS38与SAMHD1共定位; E. SAMHD1截短; F. SAMHD1与NS38互作结构域鉴定

A. NS38 silver staining; B. Identification of host proteins interacting with NS38 by IP-MS; C. Co-immunoprecipitation of NS38 and SAMHD1; D. Colocalization of NS38 and SAMHD1 in GCO cells; E. SAMHD1 truncation; F. Mapping of the SAMHD1 domain interacting with NS38

应(CPE)比对照组明显减少(图 3A), SAMHD1组细胞上清液中的病毒滴度(图 3B)也低于对照组。同时, 通过将SAMHD1-Flag或pCMV-Flag质粒分别转染到GCO细胞中, 转染24h后感染相同滴度的GCRV, 并在感染24h后收集细胞RNA, qPCR检测病毒VP2与VP7的mRNA表达量。本文发现, 过表达SAMHD1能显著抑制病毒蛋白VP2和VP7的表达(图 3C和3D), 与CPE和TCID₅₀测定结果一致, 说明草鱼SAMHD1可以抑制GCRV病毒在草鱼细胞内的增殖。

2.4 敲降SAMHD1促进GCRV复制

使用靶向SAMHD1的3条siRNA序列转染GCO细胞, 以转染si-NC的为对照组, 通过qPCR技术评

估SAMHD1的敲降效率。结果显示, 与对照组相比, 这3条siRNA序列均能显著敲降细胞内SAMHD1的mRNA表达水平(图 4A)。因此, 本文将si-SAMHD1#1及对照组si-NC分别转染至CIK细胞, 24h后感染2 μ L GCRV病毒液, 感染24h后用1%结晶紫染色观察并拍照记录, 结果显示, si-SAMHD1#1组CPE较对照组更加明显(图 4B)。将si-NC或si-SAMHD1#1和si-SAMHD1#2转染至GCO细胞后, 用GCRV感染细胞24h, qPCR检测GCRV VP2与VP7的表达量, 结果表明转染si-SAMHD1的细胞中, VP2和VP7表达量显著升高(图 4C和4D)。以上结果说明, 敲降SAMHD1在细胞水平上可促进病毒的复制。

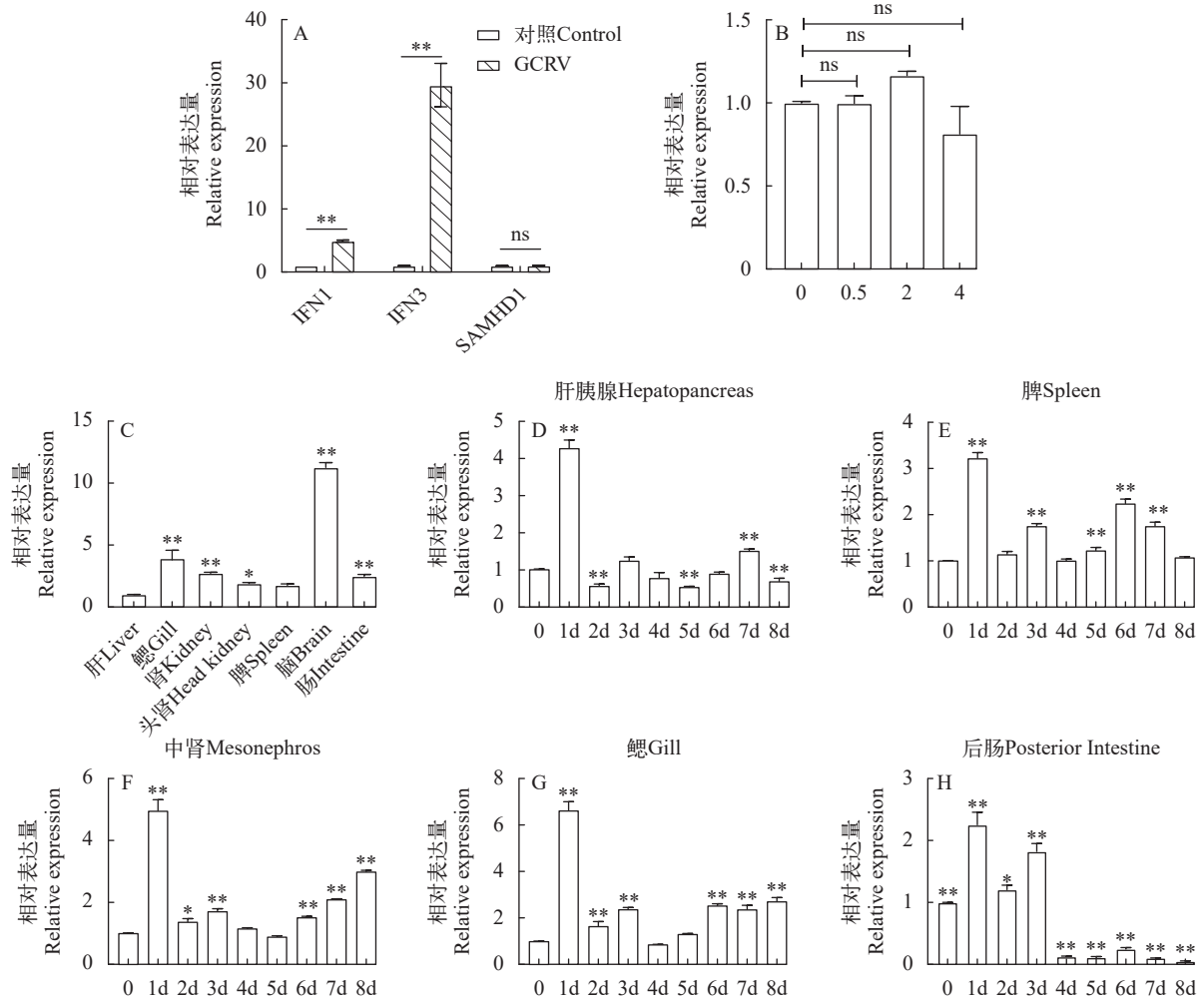


图 2 GCRV感染对草鱼SAMHD1基因表达的影响

Fig. 2 GCRV infection on SAMHD1 expression in grass carp

A. GCRV感染未诱导GCO细胞SAMHD1的变化; B. 不同滴度GCRV感染GCO细胞对SAMHD1的影响; C. 草鱼组织中SAMHD1的表达量; D—H. 攻毒0—8d草鱼不同组织中SAMHD1的变化情况; 数据为3个独立实验的平均值 $\pm$ SE, 每个实验重复3次; 使用GraphPad Prism 10 (非配对t检验)进行统计分析, * $P<0.05$ 表示差异显著, ** $P<0.01$ 表示差异极显著; 下同

A. GCRV infection did not induce changes in SAMHD1 levels in GCO cells; B. Effect of GCRV infection at different titers on SAMHD1 in GCO cells; C. Expression levels of SAMHD1 in grass carp tissues; D—H. Changes in SAMHD1 levels in different tissues of grass carp at 0—8 days post-infection; Data are presented as the mean $\pm$ SE of three independent experiments, each performed in triplicate; Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 10 (unpaired t -test), with (not significant), * $P<0.05$, ** $P<0.01$; The same applies below

3 讨论

3.1 过表达NS38或SAMHD1不能诱导IFN反应, NS38可以促进病毒复制

在草鱼中, IFN1与IFN3是介导抗病毒免疫反应的主要 I 型干扰素^[22]。为了深入研究NS38蛋白及SAMHD1在GCRV感染草鱼后的调控机制, 将NS38与SAMHD1在GCO细胞中分别过表达后, 进行GCRV病毒刺激, 24h后收集细胞, 提取细胞总RNA, 通过qPCR检测IFN1、IFN3的表达情况。结果显示, NS38和SAMHD1对IFN1和IFN3的表达水平均无显著性影响(图 5A—5D)。SAMHD1不通过IFN抗病毒, 可能是通过SAMHD1的dNTP三磷酸水解酶活性, 通过消耗细胞内dNTP贮备来限制病毒逆转录从而阻

断病毒复制^[6]。同时, 亦有研究报道, SAMHD1也通过增强细胞内氧化胁迫从而抑制病毒复制^[23]。此外, 有研究表明, GCRV的结构蛋白对于病毒感染期间进入细胞非常重要, 非结构蛋白被认为在病毒复制和新生病毒颗粒组装中不可或缺^[24]。同时, 在GCO细胞中过表达NS38, qPCR实验结果显示GCRV VP2和VP7表达水平显著升高(图 5E和5F), 表明NS38参与病毒自身复制。

3.2 NS38通过自噬-溶酶体途径降解SAMHD1

为深入探究NS38与SAMHD1互作的分子机制, 将不同剂量的SAMHD1-Flag表达质粒(0、0.2、0.5和1 μ g)分别与1 μ g的NS38-Myc表达质粒共转染至HEK293T细胞中。同时, 本文也进行了反向验证, 即NS38-Myc(0、0.2、0.5和1 μ g)与1 μ g的SAMHD1-

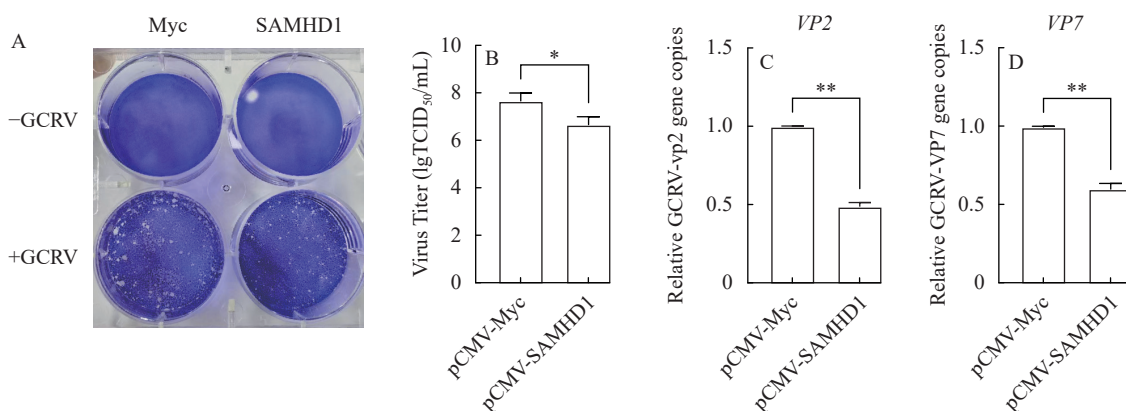


图3 过表达SAMHD1抑制细胞中GCRV的复制

Fig. 3 Overexpression of SAMHD1 inhibits GCRV replication in cells

A. 相同滴度病毒水平下细胞病变效应结果图; B. TCID₅₀法测定CIK细胞中培养基的病毒滴度; C—D. 过表达SAMHD1后VP2和VP7的表达水平

A. Images of cytopathic effects under the same viral titer; B. Viral titers in the culture medium of CIK cells determined by the TCID50 method; C—D. Expression levels of VP2 and VP7 after SAMHD1 overexpression

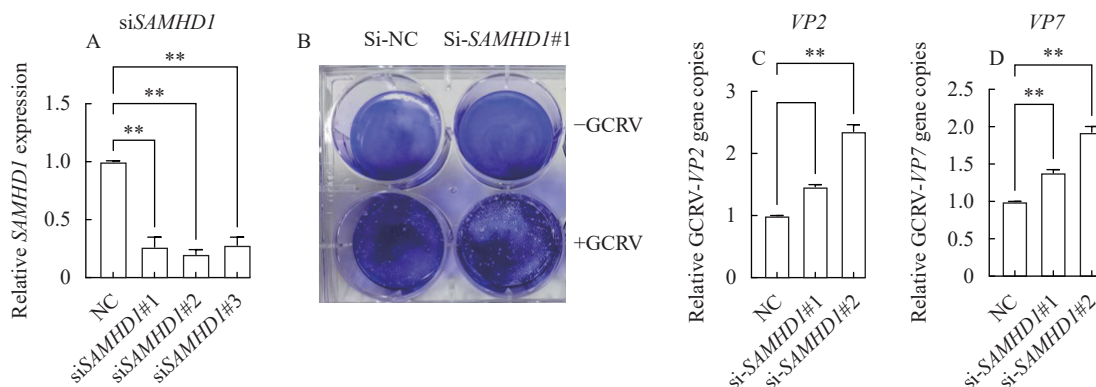


图4 敲降SAMHD1促进细胞中GCRV的复制

Fig. 4 Knockdown of SAMHD1 promotes GCRV replication in cells

A. GCO细胞中SAMHD1敲低效率验证; B. 相同滴度病毒水平下细胞病变效应结果图; C—D. 过表达siSAMHD1后VP2和VP7的表达水平

A. Validation of SAMHD1 knockdown efficiency in GCO cells; B. Images of cytopathic effects under the same viral titer; C—D. Expression levels of VP2 and VP7 after transfection with si-SAMHD1

Flag, 转染24h后提取总蛋白进行WB实验分析, 结果显示, SAMHD1的表达受到NS38以剂量依赖性方式进行的负向调控, 而NS38的表达则与SAMHD1的剂量无关(图 6A和6B)。

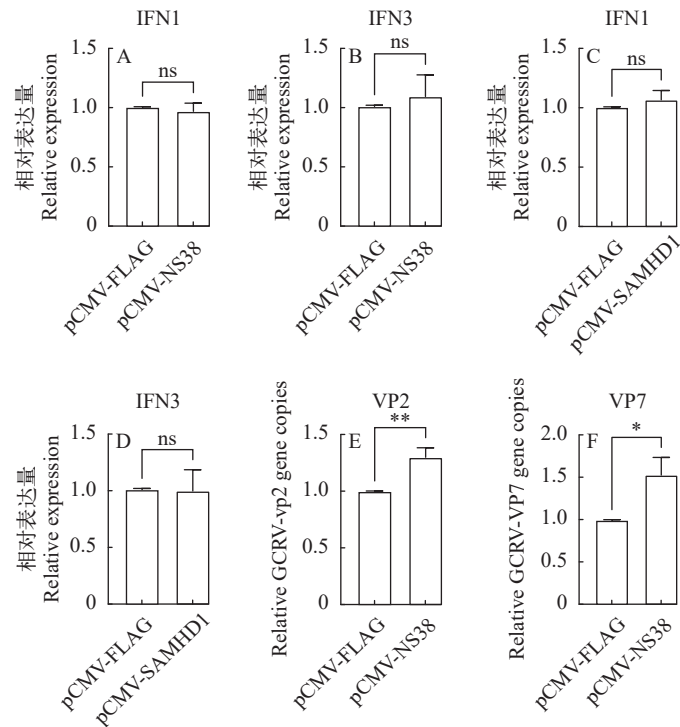


图 5 NS38与SAMHD1未诱导IFN反应及NS38促进病毒复制

Fig. 5 NS38 and SAMHD1 do not induce an IFN response, but NS38 promotes viral replication

A—B. 过表达NS38对IFN的影响; C—D. 过表达SAMHD1对IFN的影响; E—F. 过表达NS38促进GCO细胞中病毒复制

A—B. Effect of NS38 overexpression on IFN; C—D. Effect of SAMHD1 overexpression on IFN; E—F. NS38 overexpression promotes viral replication in GCO cells

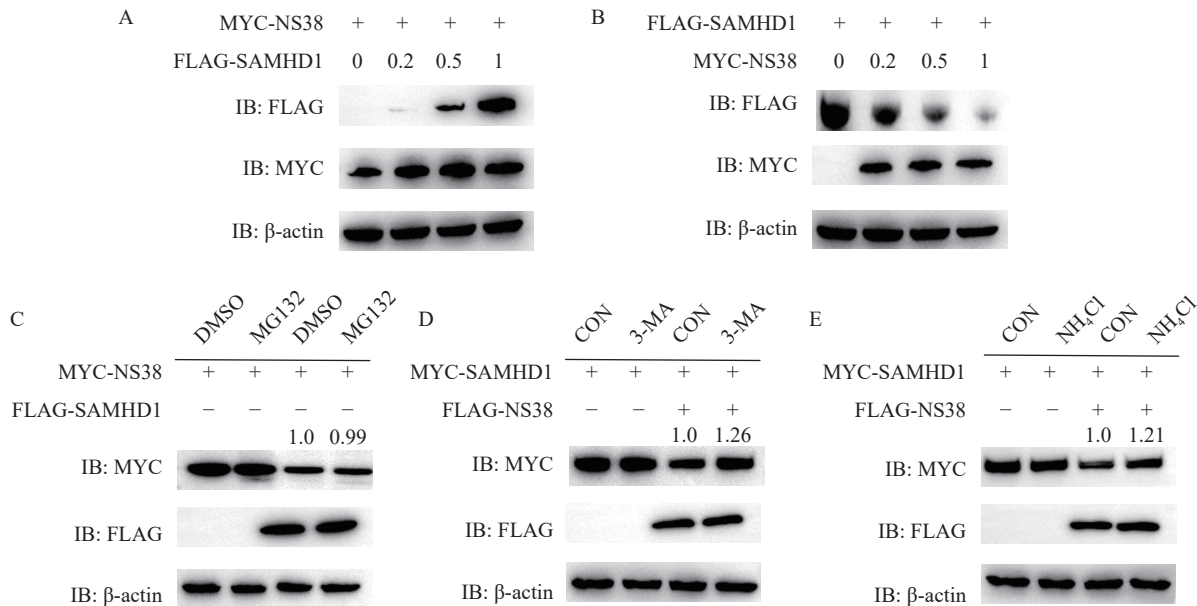


图 6 GCRV NS38诱导SAMHD1通过自噬-溶酶体途径降解

Fig. 6 GCRV NS38 induces the degradation of SAMHD1 via the autophagy-lysosome pathway

A—B. NS38与SAMHD1不同剂量转染293T细胞对彼此间的影响; C—E. 添加MG132、3-MA和NH₄Cl对NS38降解SAMHD1的影响

A—B. Effects of transfection with different doses of NS38 and SAMHD1 plasmids in 293T cells on their mutual regulation; C—E. The impact of MG132, 3-MA, and NH₄Cl on NS38-induced degradation of SAMHD1

由于NS38是GCRV第9段基因组编码的一种非结构蛋白,而且GCRV-NS38可以诱导草鱼SAMHD1的降解,为了探寻GCRV NS38是通过何种方式降解草鱼SAMHD1,本文通过药物阻断实验进行验证。采用3种药物:蛋白酶体抑制剂MG-132、自噬功能抑制剂3-MA和溶酶体功能抑制剂NH₄Cl。分别将pCMV-Myc、SAMHD1-Myc与NS38-Flag共转染到HEK293T细胞中,在相应的时间分别用不同的药物处理细胞后提取蛋白,以不加药物处理的为对照组,加入药物处理的为实验组,药物处理结果表明(图 6C—6E),MG132的添加不影响NS38诱导的SAMHD1蛋白降解,而3-MA和NH₄Cl的加入恢复了SAMHD1的蛋白表达量,说明GCRV NS38通过自噬-溶酶体途径降解草鱼SAMHD1。

4 结论

本研究揭示了GCRV NS38通过与宿主限制因子SAMHD1相互作用,并诱导其经由自噬-溶酶体途径降解,实现病毒免疫逃逸的新机制。该发现为理解GCRV的致病机制提供了新视角,也为开发针对草鱼出血病的防控策略和疫苗开发提供了潜在靶点。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Rao Y, Su J. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp [J]. *Journal of Immunology Research*, 2015, **2015**(1): 670437.
- [2] Jiang Y. Hemorrhagic disease of grass carp: status of outbreaks, diagnosis, surveillance, and research [J]. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2009(61): 188-197.
- [3] Jiang L, Liu A, Zhang C, *et al.* Hsp90 regulates GCRV-II proliferation by interacting with VP35 as its receptor and chaperone [J]. *Journal of Virology*, 2022, **96**(19): e01175-22.
- [4] Yu F, Wang L, Li W, *et al.* Aquareovirus NS31 protein serves as a specific inducer for host heat shock 70-kDa protein [J]. *Journal of General Virology*, 2020, **101**(2): 145-155.
- [5] Fei Y, Hu G, Xu J, *et al.* Involvement of transcriptional co-activator p300 in upregulated expression of HSP70 by aquareovirus non-structural protein NS31 [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2024(150): 105077.
- [6] Deutschmann J, Gramberg T. SAMHD1 horizontal ellipsia and viral ways around it [J]. *Viruses*, 2021, **13**(3): 395.
- [7] Li N, Zhang W, Cao X. Identification of human homolog of mouse IFN-gamma induced protein from human dendritic cells [J]. *Immunology Letters*, 2000, **74**(3): 221-224.
- [8] Zhu C, Gao W, Zhao K, *et al.* Structural insight into dGTP-dependent activation of tetrameric SAMHD1 deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase [J]. *Nature Communications*, 2013(4): 2722.
- [9] Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, *et al.* SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates [J]. *Nature Immunology*, 2012, **13**(3): 223-228.
- [10] Langton M, Sun S, Ueda C, *et al.* The HD-domain metalloprotein superfamily: An apparent common protein scaffold with diverse chemistries [J]. *Catalysts*, 2020, **10**(10): 1191.
- [11] Rice G I, Bond J, Asipu A, *et al.* Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response [J]. *Nature Genetics*, 2009, **41**(7): 829-832.
- [12] Crow Y J, Manel N. Aicardi-Goutières syndrome and the type I interferonopathies [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, **15**(7): 429-440.
- [13] Rehwinkel J, Maelfait J, Bridgeman A, *et al.* SAMHD1-dependent retroviral control and escape in mice [J]. *The EMBO Journal*, 2013, **32**(18): 2454-2462.
- [14] Herrmann A, Wittmann S, Thomas D, *et al.* The SAMHD1-mediated block of LINE-1 retroelements is regulated by phosphorylation [J]. *Mobile DNA*, 2018, **9**(1): 11.
- [15] Pauls E, Jimenez E, Ruiz A, *et al.* Restriction of HIV-1 replication in primary macrophages by IL-12 and IL-18 through the upregulation of SAMHD1 [J]. *Journal of Immunology*, 2013, **190**(9): 4736-4741.
- [16] St Gelais C, de Silva S, Amie S M, *et al.* SAMHD1 restricts HIV-1 infection in dendritic cells (DCs) by dNTP depletion, but its expression in DCs and primary CD4⁺ T-lymphocytes cannot be upregulated by interferons [J]. *Retrovirology*, 2012(9): 105.
- [17] Goujon C, Schaller T, Galão R P, *et al.* Evidence for IFN α -induced, SAMHD1-independent inhibitors of early HIV-1 infection [J]. *Retrovirology*, 2013(10): 23.
- [18] Jin C, Peng X, Liu F, *et al.* microRNA-181 expression regulates specific post-transcriptional level of SAMHD1 expression *in vitro* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, **452**(3): 760-767.
- [19] Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, *et al.* SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx [J]. *Nature*, 2011, **474**(7353): 654-657.
- [20] Goldstone D C, Ennis-Adeniran V, Hedden J J, *et al.* HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase [J]. *Nature*, 2011, **480**(7377): 379-382.

- [21] Ballana E, Esté J A. SAMHD1: At the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction [J]. *Trends in Microbiology*, 2015, **23**(11): 680-692.
- [22] Wan Q, Yang C, Rao Y, *et al.* MDA5 induces a stronger interferon response than RIG-I to GCRV infection through a mechanism involving the phosphorylation and dimerization of IRF3 and IRF7 in CIK cells [J]. *Frontiers in Immunology*, 2017(8): 189.
- [23] Wan Q, Liao Z, Rao Y, *et al.* Transferrin receptor 1-associated iron accumulation and oxidative stress provides a way for grass carp to fight against reovirus infection [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(23): 5857.
- [24] Cai L, Sun X, Shao L, *et al.* Functional investigation of grass carp reovirus nonstructural protein NS80 [J]. *Virology Journal*, 2011, **8**(1): 168.

REGULATORY MECHANISM OF GCRV NONSTRUCTURAL PROTEIN NS38 ON HOST PROTEIN SAMHD1

WANG Jia-Liang^{1,2}, ZHOU Man², FENG Hao-Hao^{2,3} and CAO Hong^{2,3}

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: To investigate how GCRV-encoded proteins interact with host cells and evade immune responses, this study focuses on the non-structural protein NS38 of type I GCRV. Using co-immunoprecipitation combined with mass spectrometry, we identified grass carp SAMHD1 as an interacting partner of NS38. Further co-IP and subcellular localization assays confirmed their interaction and co-localize in the cytoplasm, with the HD domain of SAMHD1 being the key region mediating the interaction with NS38. We also demonstrated that SAMHD1 inhibits GCRV replication. The overexpression of SAMHD1 in CIK cells significantly reduced viral copy numbers and alleviated cytopathic effects, whereas knockdown of SAMHD1 promoted viral replication. Notably, the antiviral effect of SAMHD1 was independent of interferon pathway activation and appeared to rely primarily on its dNTP triphosphohydrolase activity, which depletes intracellular dNTP pool and thereby restricts substrates for viral reverse transcription. Mechanistic studies revealed that GCRV NS38 induces SAMHD1 degradation via the autophagy-lysosome pathway, thereby counteracting its antiviral function. In summary, our study revealed that NS38 targets the host restriction factor SAMHD1 for degradation and facilitate the immune escape of GCRV. This finding enhances the understanding of GCRV pathogenesis and provides a potential target for the development of vaccines against GCRV.

Key words: Grass carp reovirus (GCRV); NS38; SAMHD1; Autophagy; Antagonism; Immune evasion