

猪源 G3BP1 基因的稳定敲低 PK-15 细胞系构建及生物信息学分析

林馨倩, 郭紫晶, 张瑞, 向晗一, 林含睿, 黄雄挺, 陈劲松, 张志东, 李彦敏*

西南民族大学 动物医学四川省高校重点实验室, 四川 成都 610041

林馨倩, 郭紫晶, 张瑞, 向晗一, 林含睿, 黄雄挺, 陈劲松, 张志东, 李彦敏. 猪源 G3BP1 基因的稳定敲低 PK-15 细胞系构建及生物信息学分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 970-984.

LIN Xinqian, GUO Zijing, ZHANG Rui, XIANG Hanyi, LIN Hanrui, HUANG Xiongtong, CHEN Jingsong, ZHANG Zhidong, LI Yanmin. Construction and bioinformatics analysis of a PK-15 cell line with stable knockdown of porcine G3BP1 gene[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 970-984.

摘要: 【背景】Ras-GTP 酶活化蛋白 SH3 结构域结合蛋白 1 (Ras-GTPase-activating protein SH3 domain binding protein 1, G3BP1) 是应激颗粒(stress granule, SG)的重要组成部分和标志性蛋白, 在宿主抵抗病原体入侵过程中发挥重要作用。【目的】构建 G3BP1 稳定敲低的 PK-15 细胞系, 探究敲低 G3BP1 基因对水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)、塞内卡病毒(seneca virus, SVV)和痘苗病毒(vaccinia virus, VACV)复制的影响和对肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6)、抗黏病毒蛋白 1 (myxovirus resistance protein 1, Mx1)、干扰素刺激基因 54 (IFN-stimulated gene 54, ISG54)和干扰素 β (interferon β , IFN- β)表达的影响, 并对该基因进行生物信息学分析。【方法】利用慢病毒载体构建稳定敲低 G3BP1 基因的 PK-15 细胞系, 利用逆转录实时定量 PCR (reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR)和实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)分析敲低 G3BP1 基因对 VSV、SVV 和 VACV 复制的影响, 利用 RT-qPCR 分析感染 VSV、SVV 和 VACV 后敲低 G3BP1 基因对 TNF- α 、IL-6、Mx1、ISG54 和 IFN- β 的影响, 通过在线工具对 G3BP1 基因进行生物信息学分析。【结果】RT-qPCR 和免疫印迹(Western blotting, WB)结果显示成功构建稳定敲低 G3BP1 的 PK-15 细胞系; RT-qPCR 和 qPCR 结果显示敲低 G3BP1 基因可极显著促进 VSV 和 SVV 的复制($P < 0.0001$), 但对 VACV 的复制无显著影响($P > 0.05$); RT-qPCR 结果显示 VSV 和 SVV 感染可显著或极显著促进 TNF- α 、IL-6、Mx1、ISG54 和 IFN- β 的 mRNA 表达水平($P < 0.05$, $P < 0.0001$), 敲低 G3BP1 基因可极显著抑制上述细胞因子的

资助项目: 西南民族大学引进高层次人才科研资助金项目(RQD202100); 四川省自然科学基金(2022NSFSC0073); 中央高校基本科研业务费专项基金(ZYN2023042)

This work was supported by the Southwest University for Nationalities Introduced High-level Talent Research Funding Program (RQD202100), the Natural Science Foundation of Sichuan Province (2022NSFSC0073), and the National Central University Basic Research Business Fund (ZYN2023042).

*Corresponding author. E-mail: liyanmin@swun.edu.cn

Received: 2023-08-10; Accepted: 2023-10-17; Published online: 2023-11-20

mRNA 表达($P<0.01$, $P<0.000 1$), RT-qPCR 结果显示 VACV 感染可以极显著抑制上述细胞因子的 mRNA 表达($P<0.01$, $P<0.000 1$), 敲低 G3BP1 基因对 VACV 抑制的细胞因子 mRNA 表达无显著影响($P>0.05$); 理化性质预测结果显示, 猪源 G3BP1 蛋白存在 30 个磷酸化位点, 具有不稳定性和亲水性, 属于非跨膜和非分泌蛋白; 蛋白质高级结构预测显示, 该蛋白的二级结构主要由无规则卷曲(52.47%)组成, 主要定位于细胞质和细胞核中, 分别占 34.38%和 31.25%。【结论】本研究获得了猪源 G3BP1 基因稳定敲低的 PK-15 细胞系, 敲低该基因可极显著促进 VSV 和 SVV 的复制, 但对 VACV 的复制无显著影响; 敲低该基因可显著或极显著抑制 TNF- α 、IL-6、Mx1、ISG54 和 IFN- β 的产生; 预测该蛋白存在 30 个磷酸化位点, 为非跨膜和非分泌蛋白, 具有不稳定性和亲水性。这些结果可为进一步研究 G3BP1 在病毒感染过程中的作用机制提供工具和参考依据。

关键词: PK-15 细胞; G3BP1 基因; 细胞因子; 生物信息学

Construction and bioinformatics analysis of a PK-15 cell line with stable knockdown of porcine G3BP1 gene

LIN Xinqian, GUO Zijing, ZHANG Rui, XIANG Hanyi, LIN Hanrui, HUANG Xiongting, CHEN Jingsong, ZHANG Zhidong, LI Yanmin*

Key Laboratory of Veterinary Medicine in Universities of Sichuan Province, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: [Background] Ras-GTPase-activating protein SH3 domain binding protein 1 (G3BP1), an important component and iconic protein of stress granules (SGs), plays a role in host resistance to pathogen invasion. [Objective] To construct a PK-15 cell line with stable knockdown of G3BP1 gene, and to explore the effects of knocking down G3BP1 gene on the replication of vesicular stomatitis virus (VSV), seneca virus (SVV), and vaccinia virus (VACV) and the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), myxovirus resistance protein 1 (Mx1), interferon-stimulated gene 54 (ISG54), and interferon- β (IFN- β). [Methods] The lentiviral vector was used to construct a PK-15 cell line with stable knockdown of porcine G3BP1 gene. Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) and quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) were carried out to analyze the effects of G3BP1 knockdown on the replication of VSV, SVV, and VACV and the expression of TNF- α , IL-6, Mx1, ISG54, and IFN- β after infection with VSV, SVV and VACV. The bioinformatics tools were used to characterize the G3BP1 gene. [Results] A PK-15 cell line with stable knockdown of G3BP1 was successfully constructed. RT-qPCR and qPCR results showed that knockdown of G3BP1 gene promoted the replication of VSV and SVV ($P<0.000 1$), while it had no significant effect on the replication of VACV ($P>0.05$). RT-qPCR results showed that VSV and SVV infections up-regulated the mRNA levels of TNF- α , IL-6, Mx1, ISG54, and IFN- β ($P<0.05$, $P<0.000 1$), and knocking down G3BP1 gene down-regulated the mRNA levels of these cytokines ($P<0.01$, $P<0.000 1$). RT-qPCR results showed that VACV

infection inhibited the production of these cytokines ($P < 0.01$, $P < 0.0001$), and knocking down G3BP1 gene had no significant effect on the expression of the cytokines inhibited by VACV ($P > 0.05$). The deduced porcine G3BP1 protein was an unstable, hydrophilic, and non-secretory protein with 30 phosphorylation sites, with no transmembrane region. The secondary structure of the protein was mainly composed of random coils (52.47%). The protein was mainly located in the cytoplasm (34.38%) and nucleus (31.25%). **[Conclusion]** In this study, a PK-15 cell line with stable knockdown of porcine G3BP1 gene was obtained. Knocking down this gene promoted the replication of VSV and SVV but had no significant effect on the VACV replication. Furthermore, it significantly inhibited the production of TNF- α , IL-6, Mx1, ISG54, and IFN- β . The protein had 30 phosphorylation sites and was an unstable, hydrophilic, and non-secretory protein with no transmembrane region. The results help to further reveal the role of G3BP1 in viral infection.

Keywords: PK-15 cells; G3BP1 gene; cytokine; bioinformatics

当真核细胞暴露于环境压力如氧化应激、热休克、病毒感染和蛋白酶体抑制时, RNA 结合蛋白(RNA-binding proteins, RBP)通过招募非翻译信使核糖核蛋白(messenger ribonucleoprotein, mRNP)形成应激颗粒(stress granule, SG), 以防止细胞内错误折叠蛋白质的积累。SG 形成后通过两种方式发挥生物学功能: (1) 招募与 SG 内蛋白相互作用的分子, 如在病毒感染期间, SG 可募集大量抗病毒蛋白, 如视黄酸诱导基因 1 (retinoic acid inducible gene-1, RIG-1)^[1]和蛋白激酶 R (protein kinase R, PKR)^[2]等; (2) 通过隔离信号通路中的某个蛋白阻断该蛋白在细胞质中的信号传导, 如 SG 可通过隔离活性蛋白激酶 C 受体 1 (receptor for activated C kinase 1, RACK1) 抑制 MTK1-SAPK 通路的激活从而抑制细胞凋亡^[3]。可见, SG 作为细胞质传感器在维持细胞稳态中发挥重要作用。由于 SG 在液-液相分离 (liquid-liquid phase separation, LLPS) 生物物理机制下形成, 具有无膜性和动态性, 所以很难直接进行研究^[4]。因此可通过分析不同应激条件下 SG 中特征性蛋白与其他蛋白的相互作用探究 SG 在细胞稳态中的调控机制。

Ras-GTP 酶活化蛋白 SH3 结构域结合蛋

白(Ras-GTPase-activating protein SH3 domain binding protein, G3BP)家族是 SG 的一个重要组成部分, 由 3 种同源蛋白 G3BP1、G3BP2a 和 G3BP2b 组成^[5]。目前 G3BP1 已显示出多种生物活性, 如在肿瘤细胞中过表达, 参与细胞增殖、分化, 调控细胞的凋亡、自噬, 以及发挥抗病毒作用等。在食管癌细胞模型中, G3BP1 可通过抑制 G0/G1 细胞周期、PI3K/AKT/mTOR 信号通路和 Wnt 信号通路抑制癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[6]。在胃癌细胞模型中, G3BP1 可以增强酪氨酸 3-单加氧酶/色氨酸 5-单加氧酶激活蛋白(tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta, YWHAZ) 与凋亡调节因子 Bax 之间的相互作用, 减少 Bax 在线粒体中的滞留, 从而发挥抗凋亡功能^[7]。此外, G3BP1 可通过与病毒蛋白互作, 协助病毒逃逸宿主先天免疫反应。研究表明, 猪圆环病毒 3 (porcine circovirus 3, PCV3) 的衣壳蛋白与 G3BP1 互作, 阻止环鸟苷酸-腺苷酸合成酶 (cyclic GMP-AMP synthase, cGAS) 识别病毒 DNA, 从而抑制干扰素的转录和干扰素启动子的激活^[8]。因此, 阐明 G3BP1 在病毒感染过程中的确切功能不仅可推进宿主-病毒相互作用

的研究,还可能会为病毒性传染病提供新的治疗靶点。

本研究利用慢病毒载体构建 G3BP1 基因稳定敲低的猪肾细胞(porcine kidney 15, PK-15),通过检测敲低 G3BP1 基因对病毒复制和细胞因子的影响探究 G3BP1 基因在先天免疫中的作用,并对该基因进行生物信息学分析,以期为后续研究 G3BP1 在病毒感染过程中的作用机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒和病毒

人肾上皮细胞(293T)和猪肾细胞(PK-15)由本实验室保存;质粒 pLKO.1 puro、pSPAX2、pMD2G 和塞内卡病毒(seneca virus, SVV)、水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)、痘苗病毒(vaccinia virus, VACV)均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

Anti-G3BP1 抗体, Santa Cruz Biotechnology 公司; Anti- β -actin 抗体, Proteintech 公司; RNA 提取试剂盒(Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit)、PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 和山羊抗鼠荧光二抗, Thermo Fisher Scientific 公司; RNA 反转录试剂盒, Toyobo 公司; 小提质粒试剂盒、标准分子质量 DNA 和血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒, Tiangen 公司; 无内毒素质粒提取试剂盒(E.Z.N.A. Endo-free Plasmid DNA Mini Kit II), Omega 公司; DMEM 培养基、嘌呤霉素和胰酶, Gibco 公司; 氨苄青霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; CCK-8 试剂盒、血清和转染试剂, 上海李记生物科技有限公司; ECL 显色液, Affinity 公司; 胰蛋白胨和酵母提取物, Oxoid

公司; 琼脂糖和琼脂粉, Biofroxx 公司; 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI), Abcam 公司。

荧光 PCR 仪, 鲲鹏基因有限公司; 蛋白凝胶电泳仪, Bio-Rad 公司; 荧光显微镜, Thermo Fisher Scientific 公司; 智能型多功能核酸蛋白图像仪, 广州博鹭腾生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据 GenBank 中猪源 G3BP1 基因序列(登录号为 XM_021076549.1), 利用在线网站(<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=shrna&pid=4638135223820125803>)选取 2 条 shRNA 干扰序列, 命名为 sh-1 和 sh-2, 在正义链 5'端加入 CCGG 碱基, 3'端加入 TTTTGT 碱基, 在反义链的 5'端加入 AATT CAAAAA 碱基, shRNA 干扰序列引物见表 1。根据 GenBank 中 VACV、G3BP1、抗黏病毒蛋白 1 (myxovirus resistance protein 1, Mx1)和干扰素刺激基因 54 (IFN-stimulated gene 54, ISG54)的基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计逆转录实时定量 PCR (reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)和实时定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)引物(表 1)。内参基因 GAPDH、干扰素 β (interferon β , IFN- β)、肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6)和 SVV 引物根据参考文献[9]设计(表 1)。VSV 引物根据参考文献[10]设计(表 1)。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 干扰载体的构建与鉴定

双酶切(Age I和 EcoR I) pLKO.1 puro 质粒, 用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果, 按照胶回收试剂盒步骤进行胶回收和纯化。在 T4 DNA 连接酶的作用下连接 G3BP1 shRNA 退火产物

表 1 本试验中用到的引物

Table 1 Primers used in this study

Name of primer	Primer sequence (5'→3')	Source of primer
G3BP1 sh-1	F: CCGGGCCTCAGGAGGAATCTGAAGACTCGAGTCTTCAGATTC CTCCTGAGGCTTTTTG R: AATTCAAAAAGCCTCAGGAGGAATCTGAAGACTCGAGTCTTC AGATTCCTCCTGAGGC	This study
G3BP1 sh-2	F: CCGGGGTGGACAAGTTAGAGCTTAACTCGAGTTAAGCTCTAAC TTGTCCACCTTTTTG R: AATTCAAAAAGGTGGACAAGTTAGAGCTTAACTCGAGTTAAG CTCTAACTTGTCCACC	This study
G3BP1	F: ATGGGCTTGCTCTCGAACAA R: CCGTGACAAAGCCACCAAAG	This study
Mx1	F: CACAGAACTGCCAAGTCCAA R: GCAGTACACGATCTGCTCCA	This study
ISG54	F: TCAATGGAATTCCGAGAAGG R: CCAAAATGAAAGGGCAAAGA	This study
VACV	F: CCTCATCCTCCTCCTCGTGTACG R: GTCGGTGTTTGGTCTTGCTTTGTG	This study
GAPDH	F: GTCGGTTGTGGATCTGACCT R: AGCTTGACGAAGTGGTCGTT	[9]
TNF- α	F: CCTCATCTACTCCCAGGTCCTCTTC R: GATGCGGCTGATGGTGTGAGTG	[9]
IL-6	F: GCTGCTTCTGGTGATGGCTACTG R: AGAGCATTTTGTCTGAGGTGGCATC	[9]
IFN- β	F: TGACGGTTTCATTCCAGCCAGTG R: TGCAACCACCACAATTCCAGAAGG	[9]
SVV	F: CACCGACAACGCCGAGAC R: GAGATCGGTCAAACAGGAATTTGAC	[9]
VSV	F: GGCAACATTTGGACACCTCT R: AAGTGGAAAGGCAGGGTTTT	[10]

与酶切处理后的线性载体,转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,均匀涂布于含有氨苄青霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 固体培养基平板上,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养过夜。挑取平板上的单菌落,接种于含有氨苄青霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)抗性的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 1 h,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将测序正确的菌液扩大培养后提取纯化。

1.2.3 稳定干扰 G3BP1 的 PK-15 细胞系的构建

将 293T 细胞铺于 60 mm 细胞培养皿中,

待细胞融合度达到 60%–70%时,按照转染试剂说明书将 3 μg 干扰重组质粒、22.5 μg psPAX2 包装质粒、7.5 μg pMD2.G 包膜质粒和转染试剂共转染至 293T 细胞。转染后 48 h 和 72 h 收集细胞上清,1 000 r/min 离心 10 min,0.45 μm 过滤器过滤,滤液保存于-70 $^{\circ}\text{C}$ 备用。将生长状态良好的 PK-15 细胞传代至 T25 细胞瓶中,待细胞融合度达到 70%,弃去细胞上清,加入 1 mL 慢病毒上清,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h,加入 4 mL 含有 10%胎牛血清(fetal bovine serum,

FBS)和含 1%青霉素(100 U/mL)/链霉素(100 mg/L)双抗的 DMEM 培养基进行培养。48 h 后,加入含 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的培养液筛选目的细胞;筛选 24 h 后,更换含 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的培养液;若对照细胞未脱落,则在筛选 24 h 后更换为含 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的培养液,直至对照组细胞完全脱落,获得敲低 G3BP1 的 PK-15 细胞系。

1.2.4 细胞培养与病毒感染

PK-15 细胞、敲低 G3BP1 的 PK-15 细胞培养于含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中进行培养。待细胞融合度达到 80%以上时,用胰酶消化进行传代。待 6 孔板中的细胞融合度为 70%–90%时, VSV 以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 1 感染细胞, SVV 和 VACV 以 MOI 为 10 感染细胞,将感染后的细胞放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h, 1 h 后弃去病毒液,加入 2 mL 含 2% FBS 的维持液继续培养, 24 h 收集细胞样品。

1.2.5 G3BP1 敲低细胞系的鉴定

收集对照组细胞和干扰 G3BP1 基因的细胞,使用裂解液裂解细胞,通过蛋白免疫印迹(Western blotting, WB)验证 G3BP1 蛋白表达水平;使用 RNA 提取试剂盒提取 RNA,随后用反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录成 cDNA,使用 PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix 检测 G3BP1 mRNA 水平。

1.2.6 应激颗粒的形成检测

将 PK-15 细胞和敲低 G3BP1 基因的细胞在 52 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中热激 20 min,用 4%多聚甲醛于室温固定 10 min,再用 0.2% Triton X-100 于室温穿透 10 min,再用含 5%牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)的封闭液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中封闭 1 h,封闭结束后用 G3BP1 抗体孵育过夜;次日,用荧光二抗于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 1 h,用 DAPI 于室温孵育 10 min。以上每个步骤之间使用

PBS 清洗细胞 3 次,每次 5 min。

1.2.7 细胞活力的测定

将 PK-15 和敲低 G3BP1 基因的 PK-15 细胞按照每孔 3 000 个细胞均匀铺于 96 孔板内,每组细胞设置 8 个重复。待细胞贴壁后弃去原培养基,每孔加入 10 μL CCK8 溶液和 90 μL 培养液,在细胞培养箱中孵育 1–2 h,使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度,记录结果,分析细胞活力状况。

1.2.8 RT-qPCR 和 qPCR

将生长状态良好的对照组细胞和敲低 G3BP1 基因的 PK-15 细胞分别接种于六孔板中,待细胞融合度达到 80%–90%时,收取细胞样品,使用 RNA 提取试剂盒提取核酸。随后用反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录成 cDNA。使用 PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix 检测 G3BP1 和细胞因子(TNF- α 、IL-6、Mx1、ISG54 和 IFN- β)的 mRNA 表达水平。将生长状态良好的细胞分别接种于六孔板中,待细胞融合度达到 80%–90%时接种病毒,感染 24 h 后收取细胞样品。使用 RNA 和 DNA 提取试剂盒提取核酸,通过 RT-qPCR 检测 VSV 和 SVV 复制水平,通过 qPCR 检测 VACV 复制水平。RT-qPCR 和 qPCR 的反应体系和反应程序按照生产手册规定设置。本研究使用的引物如表 1 所示,以 GAPDH 表达水平为内参值, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 表达水平。

1.2.9 猪源 G3BP1 基因生物信息学分析

猪源 G3BP1 基因生物信息学分析工具及介绍见表 2。

1.2.10 统计学分析

实验数据用 GraphPad Prism 8.0 软件进行处理,统计学分析采用 *t*-test 或 one-way ANOVA 检验,数据用均数 \pm 标准差表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, * $P<0.05$ 表示差异显著,

表 2 生物信息学分析工具

Table 2 Bioinformatics analysis tools and corresponding functions

Analysis software tool	Function	Website
ExPASy ProtParam tool	Analysis of physical and chemical properties	https://web.expasy.org/protParam/
TMHMM server v2.0	Predictive analysis of transmembrane structural domains	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0
NetPhos 3.1 server	Prediction and analysis of protein phosphorylation sites	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1
SignalP 4.0 server	Prediction and analysis of protein signal peptide	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
SOPMA	Secondary structure prediction	https://npsapra.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
SWISS-MODEL	Prediction of protein tertiary structure	https://swissmodel.expasy.org/interactive/VwPKsN/models/
STRING	Protein interaction prediction	https://cn.string-db.org/cgi/network?taskId=bDHEOtN2Y2eq&sessionId=bDICRyGvkmNZ&allnodes=1
WoLF PSORT	Subcellular localization	https://wolfsort.hgc.jp/

** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 表示差异极显著。试验均进行 3 次独立重复。

2 结果与分析

2.1 稳定干扰 G3BP1 基因的 PK-15 细胞系构建

将测序成功的重组慢病毒干扰载体和慢病毒包装质粒共转染 293T 细胞,收获慢病毒上清并感染 PK-15 细胞,经 4、6 和 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素分别筛选 24 h,获得干扰 G3BP1 基因的 PK-15 细胞系。取部分细胞制样,使用 G3BP1 抗体进行 WB 检测,确定 G3BP1 蛋白表达水平。WB 结果显示 sh-1 组和 sh-2 组的 G3BP1 蛋白表达水平极显著低于对照组($P < 0.0001$) (图 1A),且 sh-2 敲低效率显著高于 sh-1 ($P < 0.05$) (图 1B),因此选用 sh-2 组进行后续实验,将其命名为 PK sh-G3BP1。取部分样品制样,通过 RT-qPCR 确定 G3BP1 mRNA 表达水平,结果显示 sh-2 组 G3BP1 mRNA 水平极显著低于对照组($P < 0.01$) (图 1C)。

2.2 敲低 G3BP1 基因不影响 PK-15 细胞的细胞活力和应激颗粒的形成

使用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力,结果显示连续传代至 14 代后,PK-15 sh-G3BP1 细胞活力与对照细胞相比无显著差异($P > 0.05$) (图 2A);通过显微镜观察对照细胞(图 2B)与 PK-15 sh-G3BP1 细胞(图 2C)的形态,结果显示敲低 G3BP1 基因并不会影响细胞的正常形态,这说明敲低 G3BP1 基因不会影响 PK-15 细胞的活力和形态,可用于后续实验。通过间接免疫荧光试验(immunofluorescence assay, IFA)检测敲低 G3BP1 基因对应激颗粒形成的影响,结果显示敲低 G3BP1 基因并不会影响应激颗粒的产生(图 2D、2E)。

2.3 敲低 G3BP1 对不同病毒复制的影响

为了探讨猪源 G3BP1 基因对不同种类病毒复制的影响,利用 RT-qPCR 检测敲低 G3BP1 基因对 VSV 和 SVV 复制的影响,利用 qPCR 检测敲低 G3BP1 基因对 VACV 复制的影响。结果表明,敲低 G3BP1 可极显著促进 VSV 和 SVV

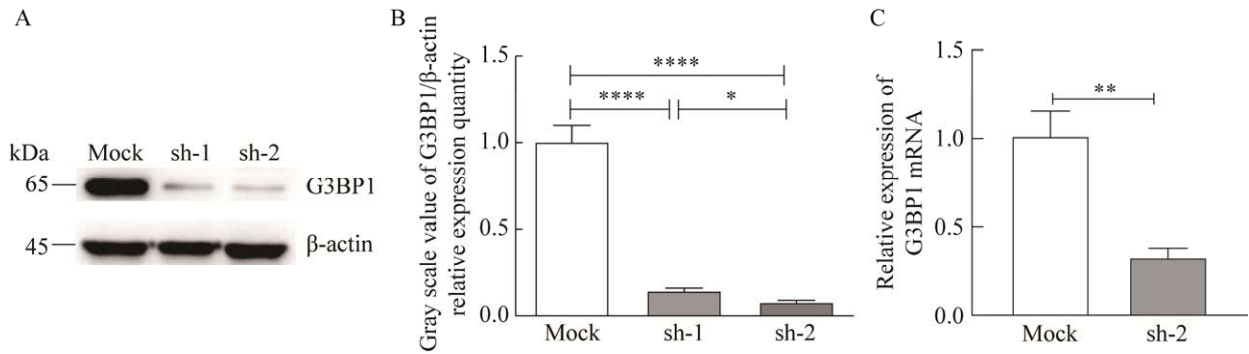


图1 稳定干扰 G3BP1 的 PK-15 细胞系鉴定 A: Western blotting 检测 G3BP1 蛋白的表达. B: G3BP1/ β -actin 灰度扫描. *: $P < 0.05$; ****: $P < 0.0001$. C: RT-qPCR 检测 G3BP1 mRNA 表达. **: $P < 0.01$

Figure 1 Identification of G3BP1-knockdown PK-15 cell line. A: Identification of G3BP1 expression detected by Western blotting. B: G3BP1/ β -actin gray scale scans. *: $P < 0.05$; ****: $P < 0.0001$. C: Identification of G3BP1 mRNA expression detected by RT-qPCR. **: $P < 0.01$.

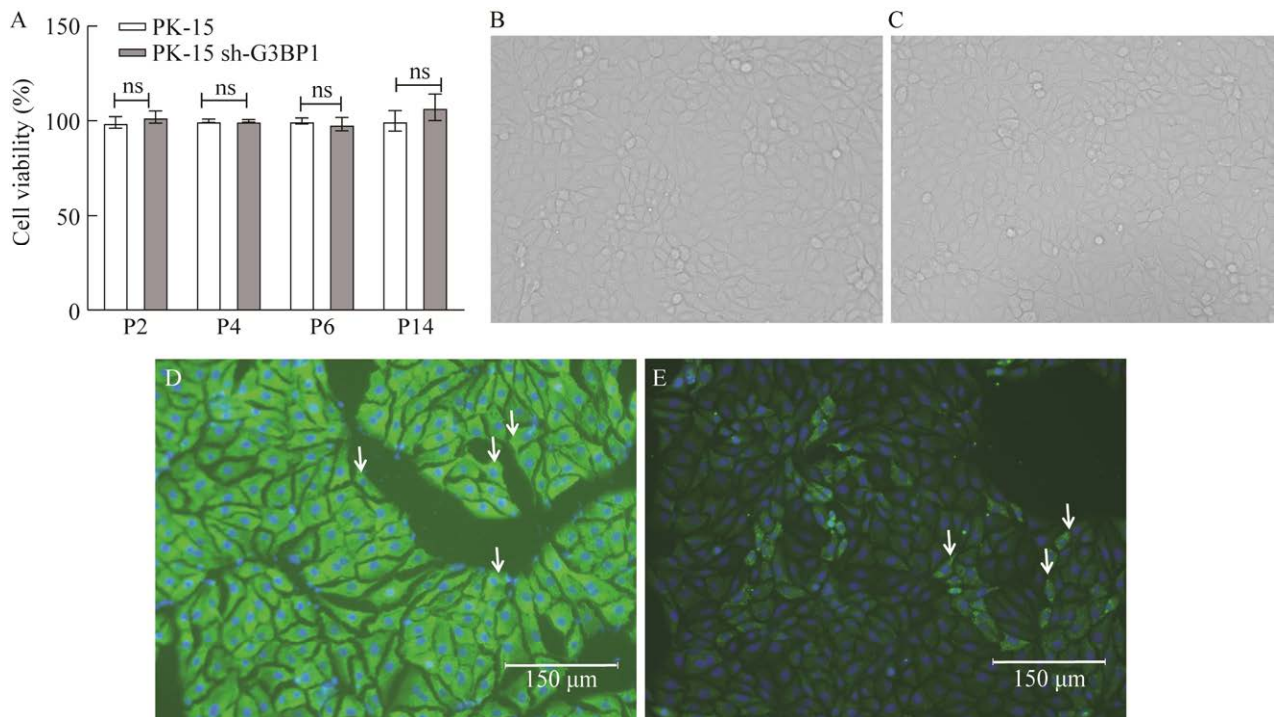


图2 PK-15 sh-G3BP1 细胞的细胞活力与应激颗粒形成的检测 A: CCK8 实验检测 PK-15 sh-G3BP1 细胞与对照细胞的活力. ns: $P > 0.05$. B: PK-15 细胞形态(20 \times). C: PK-15 sh-G3BP1 细胞形态(20 \times). D: IFA 检测热激条件下 PK-15 细胞中应激颗粒的形成. E: IFA 检测热激条件下, PK-15 sh-G3BP1 细胞中应激颗粒的形成

Figure 2 Detection of cell viability and stress granule formation in PK-15 sh-G3BP1 cells. A: The cell viability of PK-15 sh-G3BP1 cells and control cells was detected by CCK8 assay. ns: $P > 0.05$. B: Cell morphology of PK-15 (20 \times). C: Cell morphology of PK-15 sh-G3BP1 (20 \times). D: Detection of stress granule formation in PK-15 cells under heat shock conditions using IFA. E: Detection of stress granule formation in PK-15 sh-G3BP1 cells under heat shock conditions using IFA.

复制($P<0.0001$), 但对 VACV 复制无显著影响($P>0.05$) (图 3)。

2.4 敲低 G3BP1 抑制 TNF- α 、IL-6、Mx1、ISG54 和 IFN- β 的产生

为了探讨 G3BP1 基因在先天免疫功能中的作用, 利用 RT-qPCR 检测敲低 G3BP1 基因对 TNF- α 、IL-6、Mx1、ISG54 和 IFN- β mRNA 表达的影响。结果显示 TNF- α 、IL-6、Mx1、ISG54 和 IFN- β 在 PK-15 sh-G3BP1 细胞中的表达均极显著下降($P<0.0001$) (图 4A)。利用 RT-qPCR 检测 VSV 感染 PK-15 细胞和 PK-15 sh-G3BP1 细胞中细胞因子 mRNA 表达水平, 结果显示 VSV 感染可极显著促进上述细胞因子的产生($P<0.0001$), 敲低 G3BP1 基因可极显著抑制 VSV 促进的细胞因子 mRNA 表达($P<0.0001$) (图 4B); 利用 RT-qPCR 检测 SVV 感染 PK-15 细胞和 PK-15 sh-G3BP1 细胞中细胞因子 mRNA

表达水平, 结果显示 SVV 感染可以显著或极显著促进细胞因子的产生($P<0.05$, $P<0.0001$), 敲低 G3BP1 基因可极显著抑制 SVV 促进的细胞因子 mRNA 表达($P<0.01$, $P<0.0001$) (图 4C); 利用 RT-qPCR 检测 VACV 感染 PK-15 细胞和 PK-15 sh-G3BP1 细胞中细胞因子 mRNA 表达水平, 结果显示 VACV 感染可极显著抑制细胞因子的产生($P<0.01$, $P<0.0001$), 但敲低 G3BP1 基因对 VACV 抑制的细胞因子 mRNA 表达无显著影响($P>0.05$) (图 4D)。

2.5 G3BP1 理化性质分析

使用 ExPASy ProtParam 在线工具对猪源 G3BP1 蛋白的理化性质进行分析, 结果显示该蛋白分子式为 $C_{2278}H_{3574}N_{672}O_{711}S_{10}$, 分子量为 52 072.11 kDa, 等电点 pI 为 5.36, 说明该蛋白可能呈酸性; 该蛋白平均亲水系数为 -0.826, 不稳定系数为 55.74, 说明该蛋白可能属于不稳

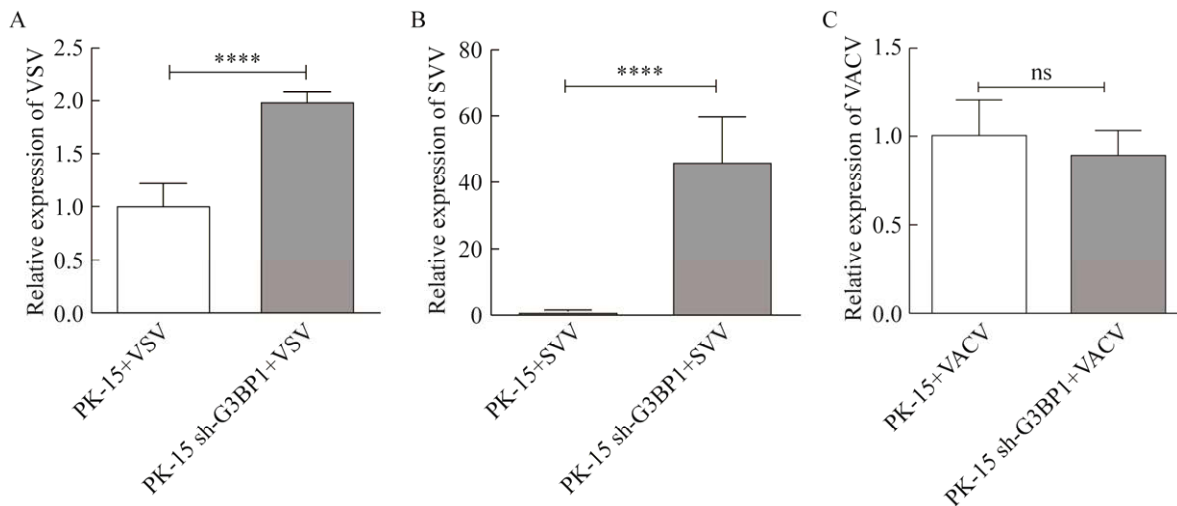


图 3 敲低 G3BP1 基因对不同病毒复制的影响 A 和 B: RT-qPCR 检测在 PK-15 细胞中敲低 G3BP1 基因对 VSV 和 SVV 复制的影响. ****: $P<0.0001$. C: qPCR 检测 PK-15 细胞中敲低 G3BP1 基因对 VACV 复制的影响. ns: $P>0.05$

Figure 3 Effect of knockdown of G3BP1 gene on replication of different viruses. A, B: The effect of G3BP1 gene knockdown on VSV and SVV replication in PK-15 cells was detected by RT-qPCR. ****: $P<0.0001$. C: The effect of knockdown G3BP1 gene knockdown on VACV replication in PK-15 cells was detected by qPCR. ns: $P>0.05$.

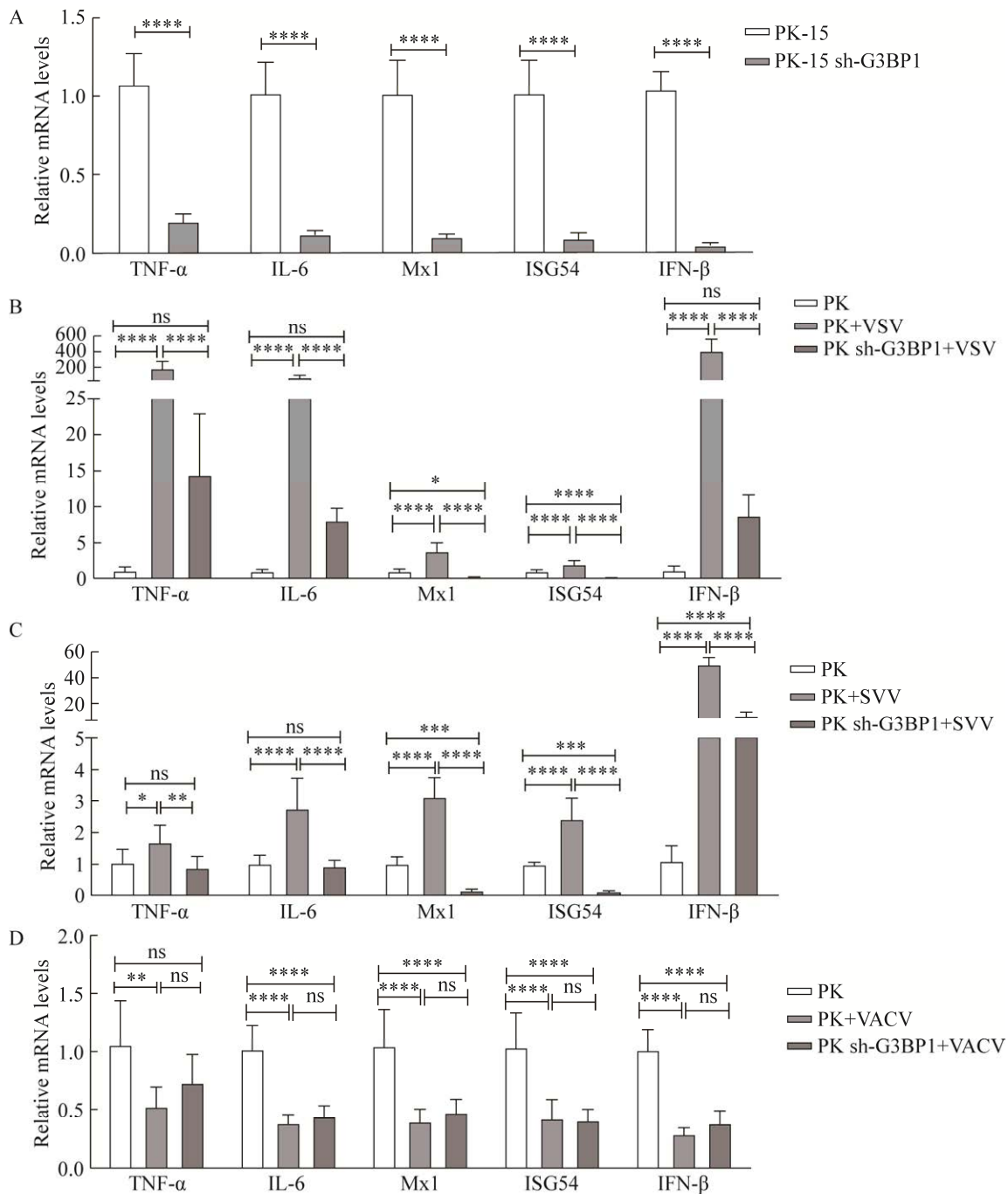


图 4 敲低 G3BP1 抑制 TNF- α 、IL-6、Mx1、ISG54 和 IFN- β 的表达 A: RT-qPCR 检测在 PK-15 sh-G3BP1 细胞中, TNF- α 、IL-6、Mx1、ISG54 和 IFN- β 的 mRNA 表达水平. B-D: RT-qPCR 检测 VSV、SVV 和 VACV 感染 PK-15 细胞和 PK-15 sh-G3BP1 细胞中细胞因子的 mRNA 表达. ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$

Figure 4 Knocking down G3BP1 inhibits the expression of TNF- α , IL-6, Mx1, ISG54 and IFN- β . A: mRNA expression levels of TNF- α , IL-6, Mx1, ISG54, and IFN- β in PK-15 sh-G3BP1 cells detected by RT-qPCR. B-D: mRNA expression levels of cytokines in PK-15 cells and PK-15 sh-G3BP1 cells infected with VSV, SVV, and VACV detected by RT-qPCR. ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

定亲水蛋白;预测该蛋白由 465 个氨基酸组成,脂肪氨基酸系数为 66.32,带正电荷的氨基酸残基总数(Arg+Lys)为 56 个,带负电荷的氨基酸残基总数(Asp+Glu)为 72 个,表明该蛋白可能带负电荷(表 3)。使用 ProtScale 在线工具进行亲水性分析,该多肽链的第 94 位的缬氨酸(V)和第 422 位的精氨酸(R)分别具有最高分值(2.489)和最低分(-3.600),前者疏水性最强,后者亲水性最强,表明该蛋白可能为亲水性蛋白(图 5A)。使用 Netphos 3.1 在线工具进行磷酸化修饰位点预测,结果显示该蛋白具有 30 个磷酸化位点,其中丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和酪氨酸(Y)磷酸化位点数目分别是 17、9 和 4 (图 5B)。使用 SignalP 4.1 在线工具进行 G3BP1 蛋白信号肽预测分析,结果显示该蛋白第 69 位天冬酰胺(N)的残基具有最高原始剪切位点,分值(C-score)为 0.111,第 11 位缬氨酸(V)最高综合剪切位点分值(Y-score)为 0.131,且多肽链首位蛋氨酸(M)残基的最高信号肽分值(S-score)为 0.193 (图 5C),由于所有分值均低于平均分 0.5,可推测该蛋白是无信号肽结构的非分泌蛋白。使用 TMHMM v2.0 在线工具进行跨膜结构域预测,结果显示该蛋白质无明显跨膜区(图 5D),为非生物膜上的功能蛋白。

表 3 猪源 G3BP1 蛋白基本理化性质

Table 3 Basic physical and chemical properties of porcine G3BP1 protein

Item	Result
Theoretical PI	5.36
Relative molecular weight (kDa)	52 072.11
Instability index	55.74
Aliphatic index	66.32
Grand average of hydropathicity	-0.826
Molecular formula	C ₂₂₇₈ H ₃₅₇₄ N ₆₇₂ O ₇₁₁ S ₁₀
Amino acid number	465

2.6 G3BP1 蛋白二级、三级结构及相互作用蛋白预测

利用 SOPMA 在线工具对 G3BP1 蛋白的二级结构进行预测分析,结果显示猪源 G3BP1 蛋白质由 465 个氨基酸组成,约有 108 个氨基酸形成 α -螺旋,占 23.23%;约有 77 个氨基酸形成延伸链,占 16.56%;约有 36 个氨基酸形成 β -转角,占 7.74%;约有 244 个氨基酸形成无规则卷曲,占 52.47% (图 6A)。利用 SWISS-MODEL 在线工具对 G3BP1 蛋白质三级结构预测分析,结果显示该蛋白主要由 α -螺旋、 β -转角、无规卷曲和延伸链构成(图 6B),与二级结构预测相符。利用 STRING 在线工具对 G3BP1 相互作用进行蛋白预测分析的结果显示,G3BP1 蛋白可能与 CAPRIN1、TIA1、ATXN2L、PABPC1、ABCE1、FBL、EIF4G1、USP10 等蛋白存在相互作用(图 6C)。利用 WoLF PSORT 在线工具对 G3BP1 蛋白亚细胞定位进行预测的结果显示,G3BP1 蛋白大部分定位于细胞质中,占 34.38%,其余分布在细胞核、线粒体和过氧化物酶体、细胞质基质中,所占百分比分别为 31.25%、12.50%、12.50%和 9.38%。

3 讨论与结论

本研究成功构建了 G3BP1 稳定敲低的 PK-15 细胞系,该细胞稳定传代至第 14 代,仍对细胞活力无显著影响($P>0.05$),说明该细胞系可用于后续实验研究。而且敲低 G3BP1 基因并不会影响应激颗粒的产生,这与之前的研究结果相符,推测 G3BP1 基因可能通过多种生物学途径发挥其功能和作用^[11]。本研究通过 RT-qPCR 和 qPCR 检测敲低 G3BP1 基因对不同病毒复制的影响,结果显示敲低 G3BP1 可极显著促进 VSV 的复制($P<0.000 1$),这与 Yang 等^[1]的结果一致;敲低 G3BP1 可极显著促进 SVV

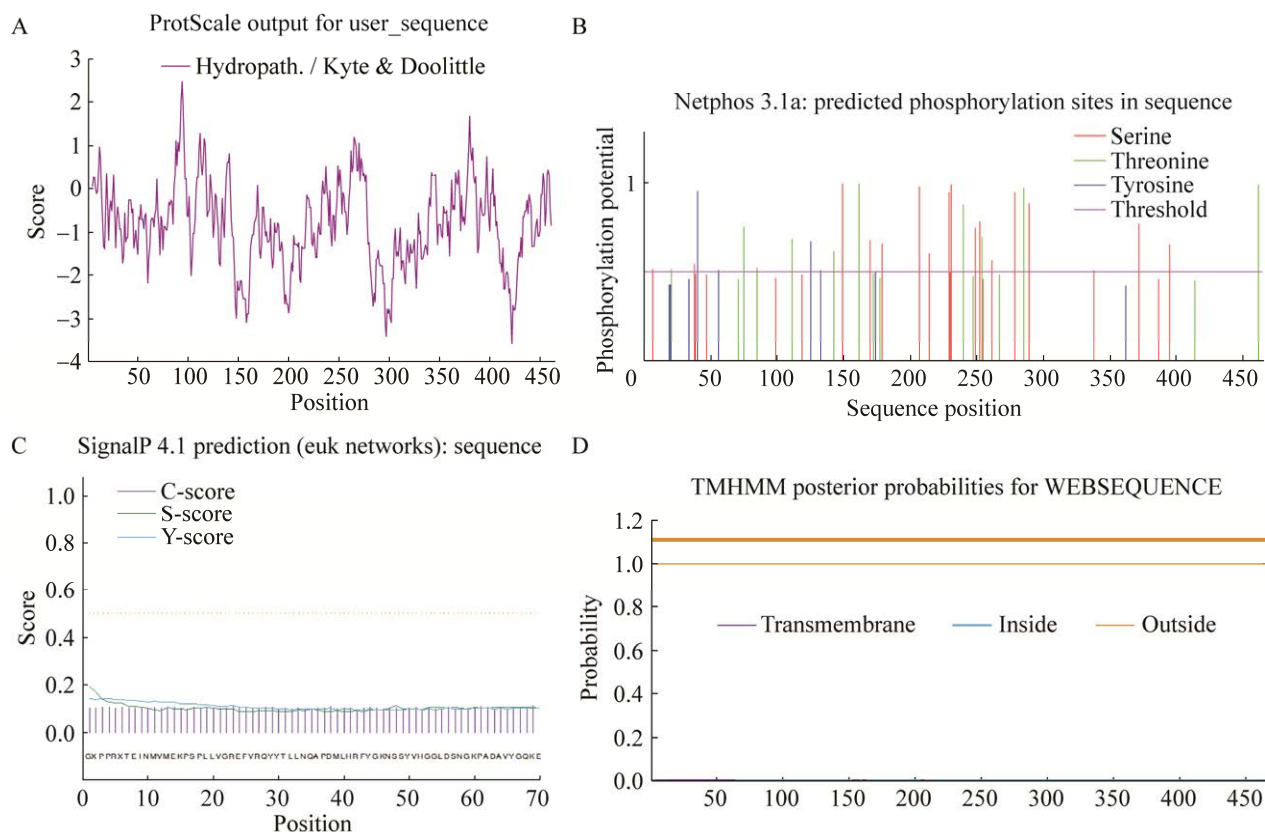


图5 猪源 G3BP1 蛋白跨膜结构分析 A: ProtScale 预测 G3BP1 亲疏水性. B: Netphos 3.1 预测 G3BP1 蛋白磷酸化位点. C: SignalP 4.1 预测 G3BP1 蛋白信号肽. D: TMHMM v2.0 预测 G3BP1 蛋白跨膜结构域

Figure 5 Transmembrane structure analysis of porcine G3BP1 protein. A: Prediction of G3BP1 protein hydrophilicity and hydrophobicity by ProtScale. B: Prediction of G3BP1 protein phosphorylation sites by Netphos 3.1. C: Prediction of G3BP1 protein signal peptide by SignalP 4.1. D: Prediction of G3BP1 protein transmembrane region by TMHMM v2.0.

的复制($P < 0.0001$), 这与 Wen 等^[12]的研究结果不一致, 由于该实验使用的是 293T 细胞, 而本研究使用的是 PK-15 细胞, 推测 G3BP1 基因对 SVV 复制的影响可能存在细胞特异性; 而缺失 G3BP1 基因对 VACV 复制无显著影响($P > 0.05$), 这可能与 VACV 可以抑制宿主干扰素抗病毒免疫反应有关^[13]。通过 RT-qPCR 检测 VSV、SVV 和 VACV 感染 PK-15 细胞和 PK-15 sh-G3BP1 细胞中 TNF- α 、IL-6、Mx1、ISG54 和 IFN- β 的 mRNA 表达, 结果显示 VSV 和 SVV 均可显著

或极显著促进细胞因子 mRNA 表达($P < 0.05$, $P < 0.0001$), 而敲低 G3BP1 基因后可极显著抑制细胞因子 mRNA 表达($P < 0.01$, $P < 0.0001$), 这与 Yang 等^[1]和 Wen 等^[12]的研究结果相符。VACV 感染可极显著抑制细胞因子的 mRNA 表达($P < 0.01$, $P < 0.0001$), 但敲低 G3BP1 基因对 VACV 抑制的细胞因子 mRNA 表达无显著影响($P > 0.05$), 推测 G3BP1 对不同病毒复制的影响可能与病毒核酸类型有关。SVV 于 2015 年在我国广东省暴发^[14], 作为一种新发疾病, 目前

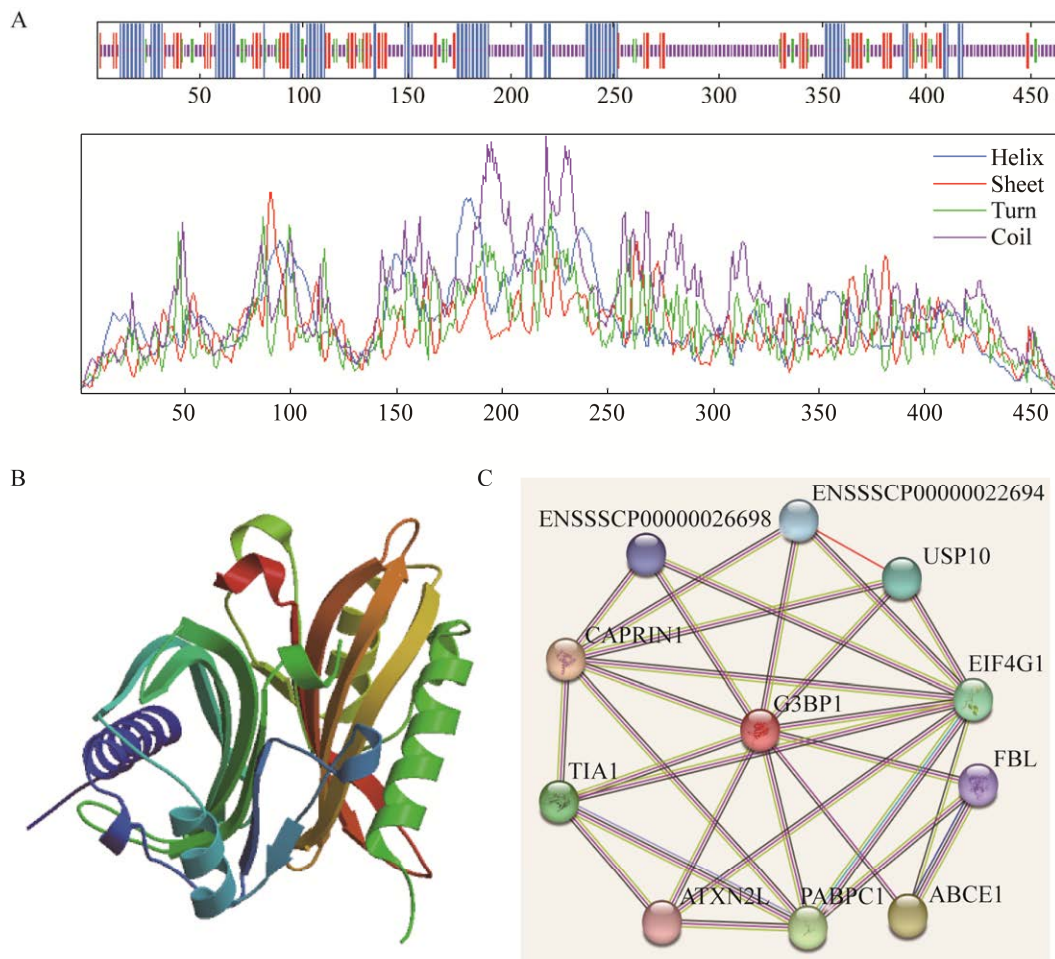


图 6 猪源 G3BP1 蛋白结构及相互作用蛋白预测 A: SOPMA 预测 G3BP1 蛋白的二级结构. B: SWISS-MODEL 预测 G3BP1 蛋白的三级结构. C: STRING 预测与 G3BP1 相互作用蛋白

Figure 6 Prediction of porcine G3BP1 protein structure and interaction protein. A: Prediction of the secondary structure of G3BP1 protein by SOPMA. B: Prediction of the tertiary structure of G3BP1 protein by SWISS-MODEL. C: Prediction of G3BP1 interaction protein predicted by STRING.

暂无商品化疫苗, 并且 SVV 在我国的流行情况逐渐复杂^[15], 因此本研究构建的缺失 G3BP1 基因的 PK-15 细胞系可用于提高 SVV 产量, 作为一种生产 SVV 灭活苗或弱毒苗的有力工具。VSV 是一种常用的工具载体病毒, 目前常用于疫苗研究^[16]和抗肿瘤治疗^[17]等, 具有良好的发展前景, G3BP1 基因缺失的 PK-15 细胞系也可作为提高 VSV 产量的有效工具。

应激颗粒是宿主细胞面临刺激时形成的一种

mRNA 复合物, G3BP1 作为 SG 的重要组成部分, 在病毒复制过程中起着极为重要的作用。研究表明, G3BP1 可以促进甲病毒属(Alphavirus) 中塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus, SFV) 和基孔肯雅病毒(chikungunya virus, CHIKV)的复制^[18]; 缺失 G3BP1 基因可促进猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)^[19] 和严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)^[20]

的复制, 但是其机制却有所不同。如甲病毒属病毒的非结构蛋白 3 可通过 G3BP1 招募翻译起始复合物, 促进病毒复制^[18]; PEDV 在感染后期可通过宿主蛋白酶 caspase-8 靶向裂解 G3BP1 抑制应激颗粒的组装, 从而逃避宿主抗病毒免疫^[19]; SARS-CoV-2 的 N 蛋白可使 G3BP1 发生相分离, 抑制应激颗粒的组装, 逃避宿主的抗病毒反应^[20]。有研究表明, 细胞周期相关蛋白-1 (cell cycle associated protein 1, Caprin-1) 和泛素特异性蛋白酶 10 (ubiquitin-specific peptidase 10, USP10) 可与 G3BP1 互作, 分别促进和抑制应激颗粒的形成^[21]。本研究利用 STRING 在线工具对 G3BP1 相互作用蛋白预测分析, 预测结果显示 G3BP1 蛋白可能与 Caprin-1 和 USP10 等蛋白存在相互作用, 预测结果与上述研究结果相符。然而 G3BP1 在病毒感染过程中是否通过与这些蛋白相互作用调控宿主的先天免疫机制还有待进一步研究。此外, 目前对 G3BP1 的研究大多为细胞质中开展, 本研究利用 WoLF PSORT 在线工具对 G3BP1 蛋白亚细胞定位进行预测, 结果显示该蛋白在细胞核中也有分布。有研究表明, 在结肠癌细胞模型中, 过表达 G3BP1 可促进 β -catenin 蛋白从细胞质中转移至细胞核, 从而促进癌症的发生^[22], 但在此过程中 G3BP1 基因是否在细胞核中发挥作用以及发挥何种作用尚不清楚。因此, 在病毒感染过程中, G3BP1 基因在细胞核中发挥的作用有待深入研究。

本研究以 PK-15 细胞为研究对象, 利用慢病毒包装系统成功构建了 G3BP1 基因稳定敲低的细胞系, 并且敲低 G3BP1 基因对细胞活力无显著影响 ($P>0.05$); 敲低 G3BP1 可以显著促进 VSV 和 SVV 复制 ($P<0.0001$), 但是对 VACV 复制无显著影响 ($P>0.05$), 在 PK-15 sh-G3BP1 细胞中, TNF- α 、IL-6、Mx1、ISG54 和 IFN- β

的 mRNA 水平均极显著降低 ($P<0.0001$); 利用生物信息学软件对其性质进行分析, 预测该蛋白带负电具有亲水性, 并且无信号肽, 是一种非生物膜上的功能蛋白, 主要由无规则卷曲构成, 分布于细胞质中。本研究可为研究 G3BP1 基因在动物病毒病中的作用提供有力工具, 也为丰富 G3BP1 基因的生物功能提供参考。

REFERENCES

- [1] YANG WP, RU Y, REN JJ, BAI JC, WEI JS, FU SZ, LIU XT, LI D, ZHENG HX. G3BP1 inhibits RNA virus replication by positively regulating RIG-I-mediated cellular antiviral response[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10: 946.
- [2] MANIVANNAN P, SIDDIQUI MA, MALATHI K. RNase L amplifies interferon signaling by inducing protein kinase R-mediated antiviral stress granules[J]. Journal of Virology, 2020, 94(13): e00205-e00220.
- [3] ARIMOTO K, FUKUDA H, IMAJOH-OHMI S, SAITO H, TAKEKAWA M. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways[J]. Nature Cell Biology, 2008, 10(11): 1324-1332.
- [4] HOFMANN S, KEDERSHA N, ANDERSON P, IVANOV P. Molecular mechanisms of stress granule assembly and disassembly[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2021, 1868(1): 118876.
- [5] KENNEDY D, FRENCH J, GUITARD E, RU K, TOCQUE B, MATTICK J. Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP (120) binding studies[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2001, 84(1): 173-187.
- [6] ZHANG LN, ZHAO L, YAN XL, HUANG YH. Loss of G3BP1 suppresses proliferation, migration, and invasion of esophageal cancer cells via Wnt/ β -catenin and PI3K/AKT signaling pathways[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(11): 20469-20484.
- [7] ZHAO JJ, FU XH, CHEN H, MIN LQ, SUN J, YIN JY, GUO JP, LI HJ, TANG ZQ, RUAN YY, WANG XF, SUN YH, HUANG LY. G3BP1 interacts with YWHAZ to regulate chemoresistance and predict adjuvant chemotherapy benefit in gastric cancer[J]. British Journal of Cancer, 2021, 124(2): 425-436.
- [8] ZHANG PF, SHEN HQ, LIU XH, WANG SY, LIU YL,

- XU Z, SONG CX. Porcine circovirus type 3 cap inhibits type I interferon induction through interaction with G3BP1[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 594438.
- [9] 王梦瑶, 张瑞, 谭小雨, 游青, 马潇雨, 周泷, 柏玲, 张志雄, 李彦敏, 张志东. A型塞内卡病毒2C蛋白通过STING调控IFN β 、TNF- α 和IL-6的表达[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(5): 2087-2098.
- WANG MY, ZHANG R, TAN XY, YOU Q, MA XY, ZHOU L, BAI L, ZHANG ZX, LI YM, ZHANG ZD. Protein 2C of Senecavirus A regulates the expression of IFN β , TNF- α and IL-6 through STING[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(5): 2087-2098 (in Chinese).
- [10] 游青, 张瑞, 郭紫晶, 谭小雨, 周泷, 王梦瑶, 马潇雨, 张志东, 李彦敏. 二甲双胍对水疱性口炎病毒的抑制作用及其机制的初步研究[J]. *中国兽医科学*, 2023, 53(6): 787-795.
- YOU Q, ZHANG R, GUO ZJ, TAN XY, ZHOU L, WANG MY, MA XY, ZHANG ZD, LI YM. Preliminary study on the inhibitory effect of Metformin on vesicular stomatitis virus and its mechanism[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2023, 53(6): 787-795 (in Chinese).
- [11] MATSUKI H, TAKAHASHI M, HIGUCHI M, MAKOKHA GN, OIE M, FUJII M. Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation[J]. *Genes to Cells*, 2013, 18(2): 135-146.
- [12] WEN W, ZHAO QQ, YIN MG, QIN LX, HU JJ, CHEN HC, LI XM, QIAN P. Seneca Valley virus 3C protease inhibits stress granule formation by disrupting eIF4GI-G3BP1 interaction[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 577838.
- [13] RIVAS C, GIL J, MĚLKOVÁ Z, ESTEBAN M, DÍAZ-GUERRA M. Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (IFN)-induced 2-5A synthetase enzyme[J]. *Virology*, 1998, 243(2): 406-414.
- [14] WU QW, ZHAO XY, CHEN YS, HE XM, ZHANG GQ, MA JY. Complete genome sequence of Seneca Valley virus CH-01-2015 identified in China[J]. *Genome Announcements*, 2016, 4(1): e01509-15.
- [15] ZHANG JY, ZHANG H, SUN WC, JIAO CC, XIAO PP, HAN JC, NAN FL, XIE CZ, HA Z, LI ZX, XIE YB, MENG Y, LU HJ, JIN NY. Genetic evolution and epidemiological analysis of Seneca Valley virus (SVV) in China[J]. *Virus Research*, 2021, 291: 198177.
- [16] LIU GD, CAO WG, SALAWUDEEN A, ZHU WJ, EMETERIO K, SAFRONETZ D, BANADYGA L. Vesicular stomatitis virus: from agricultural pathogen to vaccine vector[J]. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(9): 1092.
- [17] BISHNOI S, TIWARI R, GUPTA S, BYRAREDDY SN, NAYAK D. Oncotargeting by vesicular stomatitis virus (VSV): advances in cancer therapy[J]. *Viruses*, 2018, 10(2): 90.
- [18] GÖTTE B, PANAS MD, HELLSTRÖM K, LIU LF, SAMREEN B, LARSSON O, AHOLA T, McINERNEY GM. Separate domains of G3BP promote efficient clustering of alphavirus replication complexes and recruitment of the translation initiation machinery[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(6): e1007842.
- [19] SUN LM, CHEN H, MING X, BO ZY, SHIN HJ, JUNG YS, QIAN YJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection induces caspase-8-mediated G3BP1 cleavage and subverts stress granules to promote viral replication[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(9): e02344-e02320.
- [20] LIU HN, BAI Y, ZHANG X, GAO T, LIU Y, LI ET, WANG XF, CAO Z, ZHU L, DONG QC, HU Y, WANG GF, SONG CW, NIU XY, ZHENG T, WANG D, LIU ZJ, JIN YW, LI P, BIAN XW, CAO C, LIU X. SARS-CoV-2 N protein antagonizes stress granule assembly and IFN production by interacting with G3BPs to facilitate viral replication[J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(12): e0041222.
- [21] SONG D, KUANG LS, YANG L, WANG L, LI H, LI X, ZHU ZM, SHI CW, ZHU HN, GONG WM. Yin and Yang regulation of stress granules by Caprin-1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(44): e2207975119.
- [22] LI YZ, WANG JD, ZHONG S, LI J, DU WL. Overexpression of G3BP1 facilitates the progression of colon cancer by activating β -catenin signaling[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 22(5): 4403-4411.