

DOI:10.16781/j.0258-879x.2018.10.1109

· 论 著 ·

单纯疱疹病毒 I 型诱导人成神经细胞瘤细胞 SH-SY5Y 表达 β -淀粉样蛋白

徐娟, 张力航, 高金超, 赵文娟*, 殷明*

上海交通大学药学院神经药理学实验室, 上海 200240

[摘要] **目的** 探讨单纯疱疹病毒 I 型 (HSV-1) 感染对人成神经细胞瘤细胞 SH-SY5Y β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 表达的影响。**方法** 通过非洲绿猴肾细胞 Vero 扩增 HSV-1, 测定病毒滴度。取感染复数 (MOI) 为 10 的 3.2×10^8 PFU/mL HSV-1 分别感染 SH-SY5Y 细胞 12、24 h, 显微镜下观察 SH-SY5Y 细胞的形态变化, 使用 PCR 检测细胞中 HSV-1 DNA 的表达; 双色免疫荧光检测 SH-SY5Y 细胞中 $A\beta$ 和载脂蛋白 E (ApoE) 的表达; 蛋白质印迹法检测淀粉样蛋白前体 (APP)、黑素代谢酶 (MME)、ApoE、糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)、磷酸化糖原合成酶激酶 3 β (p-GSK-3 β) 蛋白的表达。**结果** HSV-1 感染 SH-SY5Y 细胞 12 h 后, 镜下可见细胞突触减少, 突起回缩; 感染 24 h 后细胞开始聚集, 呈圆形, 并有细胞脱落。与磷酸盐缓冲液 (PBS) 对照组相比, HSV-1 感染 12 h 后细胞中 $A\beta$ 表达增加 ($P < 0.01$), ApoE 蛋白表达无明显改变; 感染 24 h 后, $A\beta$ 表达仍增加 ($P < 0.05$), 但弱于 12 h 时 ($P < 0.01$), ApoE 蛋白表达增加 ($P < 0.01$)。蛋白质印迹分析结果显示, 与 PBS 对照组比较, HSV-1 感染 12 h 后细胞中 APP 蛋白的表达水平降低 ($P < 0.05$), GSK-3 β 总蛋白的表达水平增加 ($P < 0.05$) 且磷酸化活性增强 ($P < 0.05$), MME 蛋白的表达水平增加 ($P < 0.05$); 感染 24 h 时 MME 蛋白的表达水平降低 ($P < 0.05$), ApoE 蛋白的表达水平增加 ($P < 0.05$)。**结论** HSV-1 感染后可诱导 SH-SY5Y 细胞 $A\beta$ 表达增加, 在感染 12 h 时可能通过促进 APP 代谢、GSK-3 β Ser9 磷酸化诱导 $A\beta$ 产生, 而在 24 h 时主要是通过抑制 $A\beta$ 降解促使 $A\beta$ 表达增加。

[关键词] 单纯疱疹病毒 I 型; 阿尔茨海默病; 淀粉样蛋白; 载脂蛋白 E; 淀粉样蛋白前体

[中图分类号] R 749.16

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2018)10-1109-06

Herpes simplex virus type I induces β -amyloid expression in human neuroblastoma cell lines SH-SY5Y

XU Juan, ZHANG Li-hang, GAO Jin-chao, ZHAO Wen-juan*, YIN Ming*

Laboratory of Neuropharmacology, School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of herpes simplex virus type I (HSV-1) infection on expression of β -amyloid ($A\beta$) in human neuroblastoma cell lines SH-SY5Y. **Methods** African green monkey kidney cell lines Vero cells were used to amplified HSV-1, and the virus titers were measured. SH-SY5Y cells were infected with HSV-1 3.2×10^8 plaque forming unit (PFU)/mL at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for 12 h or 24 h, and the morphological changes of the cells were observed under microscope. PCR was used to detect the expression of HSV-1 DNA. Double-color immunofluorescence assay was performed to show the expression of $A\beta$ and apolipoprotein E (ApoE). Western blotting was used to detect the expression levels of amyloid precursor protein (APP), melanin metabolic enzyme (MME), ApoE, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β (p-GSK-3 β). **Results** After infection with HSV-1 for 12 h, the SH-SY5Y cells had synapse reduction and neurite retraction and few neurites. And after 24 h of infection, the cells began to aggregate, and were round and shed. Compared with phosphate buffer saline (PBS) control group, the expression of $A\beta$ was significantly increased after infection with HSV-1 for 12 h ($P < 0.01$), while the expression of ApoE protein was not significantly changed. After 24 h of infection, the expressions of $A\beta$ and ApoE were significantly increased ($P < 0.05$), but the expression of $A\beta$ was significantly lower than that on 12 h of post-infection ($P < 0.01$). Western blotting analysis showed that, compared with PBS control group, the expression of APP was significantly decreased on 12 h of post-infection ($P < 0.05$), and the expressions of GSK-3 β , p-GSK-3 β and MME were significantly increased ($P < 0.05$). However, the expression of MME was significantly decreased ($P < 0.05$) and the expression of ApoE was significantly increased ($P < 0.05$) 24 h post-infection. **Conclusion** HSV-1 infection induces the expression of $A\beta$ in SH-SY5Y cells through promoting APP metabolism and Ser9 phosphorylation of GSK-3 β on 12 h of post-infection, and inhibiting the degradation of $A\beta$ on 24 h of post-infection.

[收稿日期] 2018-04-04 **[接受日期]** 2018-07-18

[基金项目] 国家自然科学基金(81471232). Supported by National Natural Science Foundation of China (81471232).

[作者简介] 徐娟, 硕士生. E-mail: xu_juan@sjtu.edu.cn

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-34204736, E-mail: zhaowj@sjtu.edu.cn; Tel: 021-34204736, E-mail: myin@sjtu.edu.cn

[Key words] herpes simplex virus type I; Alzheimer disease; amyloid; apolipoprotein E; amyloid precursor protein

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(10): 1109-1114]

单纯疱疹病毒 I 型 (herpes simplex virus type I, HSV-1) 是一种普遍存在的嗜神经 DNA 病毒, 可以潜伏在宿主神经元中并激活引起病变, 最终导致细胞死亡。阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种以认知障碍、记忆损伤为主要临床表现的进行性神经退行性疾病, 脑内大量 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 积聚形成的老年斑和细胞内 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结为 AD 的主要病理特征。流行病学调查显示, HSV-1 感染可能会加重 AD 的病理学进程, 增加 HSV-1 携带者患 AD 的风险^[1]。在 AD 患者的大脑中, 90% 的老年斑附近存在 HSV-1 DNA, 72% 的老年斑与其病毒 DNA 有关^[2]。A β 与 HSV-1 的糖蛋白 gB 具有一定的同源序列, 研究认为, HSV-1 感染可以诱导细胞内 A β 生成^[3-4], HSV-1 蛋白或可作为淀粉样斑块沉积中的补充剂促进 A β 的沉积^[5]。但也有研究认为 A β 在对抗 HSV-1 感染中呈现保护作用^[6]。

AD 患者脑内大量 HSV-1 DNA 与载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 基因密切相关, ApoE 和 HSV-1 可能在细胞表面存在交互作用。ApoE 和 HSV-1 在与受体结合进入细胞时, 都要先与细胞表面硫酸类肝素蛋白多糖 (heparan sulfate proteoglycan, HSPG) 分子结合, 即 HSV-1 会与 ApoE 竞争细胞表面的 HSPG 分子, 而不同基因型 ApoE 的蛋白结构和分子结合力等不同, 从而产生一定的差异^[7]。本研究通过检测 HSV-1 感染 SH-SY5Y 细胞 12、24 h 后相关蛋白的表达, 探讨 HSV-1 感染与 AD 发病可能的联系。

1 材料和方法

1.1 材料与主要试剂 非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞)、SH-SY5Y 细胞均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, HSV-1 由同济大学附属第十人民医院王平教授馈赠。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养基、DMEM/F12 培养基、青霉素-链霉素双抗购自美国 Gibco 公司。抗 ApoE 抗体 (ab7620)、兔抗神经元核抗原 (NeuN) 抗体 (ab177487)、鼠抗 HSV-1 糖蛋

白 gC 抗体购自英国 Abcam 公司; 鼠抗 NeuN 抗体 (MAB377, 1:200) 购自美国 Merck 公司; 鼠抗 A β ₄₂ 淀粉样蛋白抗体 (MOAB-2; NBP2-13075, 1:250) 购自美国 Novus 公司; 兔抗淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 抗体 (21204) 购自英国 SAB 公司; 兔抗磷酸化糖原合成酶激酶 3 β (phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β , p-GSK-3 β) 抗体购自美国 CST 公司; Alexa Fluor 594 标记的抗鼠免疫球蛋白 G、Alexa Fluor 488 标记的抗兔免疫球蛋白 G、Alexa Fluor 488 标记的抗羊免疫球蛋白 G 荧光二抗购自美国 Invitrogen 公司; 糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、内参 β -肌动蛋白 (β -actin) 及相应二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司。化学发光显色试剂盒购自美国 Millipore 公司。

1.2 Vero 细胞与 SH-SY5Y 细胞培养 Vero 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养液, SH-SY5Y 细胞用含 1% 青霉素-链霉素双抗、10% FBS 的 DMEM/F12 培养液, 均置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中常规培养, 待细胞长满, 弃掉培养液, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 1:3 传代培养。

1.3 HSV-1 的扩增与滴度测定 待 Vero 细胞长至 80% 左右时弃掉培养液, 加入 100 μ L HSV-1 悬液 [5×10^5 空斑形成单位 (plaque forming unit, PFU) /mL] 和适量无血清培养液于培养箱中孵育 1 h, 每隔 20 min 晃动培养液以使病毒充分接触细胞。1 h 后弃掉病毒悬液, 加入含 3% FBS 的维持液培养 48 h, 待细胞出现大量的细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 后收集上清液。重复上述步骤扩增 3 次病毒, 于 -80 °C 冰箱反复冻融 3 次, 以便充分裂解, 300 \times g 离心 5 min, 取上清液分装保存。于 96 孔板中进行 HSV-1 滴度测定, 测得滴度为 3.2×10^8 PFU/mL。

1.4 HSV-1 感染 SH-SY5Y 细胞 取 SH-SY5Y 细胞分为 4 组: 以滴度为 3.2×10^8 PFU/mL 的 HSV-1 感染 SH-SY5Y 细胞, 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 分别设为 1、10、20, 即为 1 MOI 组、10 MOI 组、20 MOI 组, 同时设磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 对照组。取

处于对数生长期的 SH-SY5Y 细胞, 消化后重悬, 分别以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于多聚赖氨酸包被的 24 孔板、每孔 1×10^6 个细胞的密度接种于 6 孔板, 置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中常规培养。24 h 后弃掉培养液, 用无血清培养液转入 1、10、20 MOI HSV-1 悬液, 感染 1 h 后弃掉病毒悬液, 加入含 3% FBS 的维持液分别培养 12、24 h 后行后续实验, 每组设置 3 个复孔。显微镜下观察 SH-SY5Y 细胞形态变化。取细胞培养上清液, 行 PCR 鉴定细胞外液中 HSV-1 DNA 的表达。HSV-1 DNA 上游引物: $5' \text{-TGG GAC ACA TGC CTT CTT GG-3'}$, 下游引物: $5' \text{-ACC CTT AGT CAG ACT CTG TTA CTT ACC C-3'}$; 扩增产物长度为 147 bp。

1.5 免疫荧光检测 HSV-1 感染后 SH-SY5Y 细胞中 A β 和 ApoE 表达 按 1.4 项下方法用 10 MOI HSV-1 感染 SH-SY5Y 细胞, 设 PBS 对照组。12、24 h 后取出 24 孔板, 弃去培养液, PBS 洗 3 次, 每次 3 min; 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 洗 3 次, 0.5% Triton X-100 (PBS 配制) 透膜 15 min, PBS 洗 3 次。加入 10% 山羊血清于室温中封闭 1 h, 回收封闭液, 加入一抗 4°C 冰箱孵育过夜。回收一抗, PBST 洗 3 次, 加入荧光二抗室温孵育 2 h。回收二抗, PBST 洗 3 次, 加入 DAPI 染色液孵育 5 min, PBST 洗 3 次, 用抗荧光淬灭剂封片, 于荧光显微镜下拍照记录。所有免疫荧光染色图像的获得采用统一的设置和曝光时间, 将其转换为 8 字节的图片, 每组随机选取至少 10 张图片, 选择统一的感兴趣区域应用 ImageJ 软件分析其染色光密度。

1.6 蛋白质印迹法检测 HSV-1 感染后 SH-SY5Y 细胞中 APP、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、黑素代谢酶 (melanin metabolic enzyme, MME)、ApoE 表达 按 1.4 项下方法用 10 MOI HSV-1 感染 SH-SY5Y 细胞, 设 PBS 对照组, 用 RIPA 裂解液裂解提取感染 12、24 h 后的 SH-SY5Y 细胞总蛋白, 采用 BCA 法测定总蛋白浓度。上样量为每孔 30 μg , 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转膜到聚偏氟乙烯膜上, 加入 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h。加入一抗 4°C 孵育过夜, 回收一抗, TBST 洗 3 次, 每次 10 min; 加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗室温孵育 2 h。TBST 洗 3 次, 化学发光液显影, 并使用 ImageJ 软件进行灰度分析。

1.7 统计学处理 应用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 HSV-1 感染后 SH-SY5Y 细胞形态的改变 由图 1 可见, HSV-1 分别感染 SH-SY5Y 细胞 12、24 h 后, HSV-1 为 10 MOI 时细胞中 HSV-1 DNA 已显著表达。因此, 选用 10 MOI HSV-1 行后续实验。

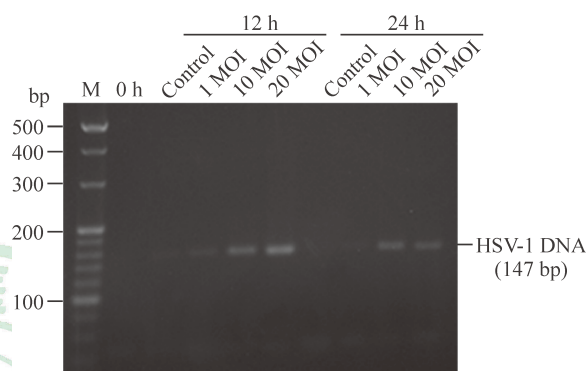


图 1 感染 HSV-1 后细胞上清中 HSV-1 DNA 表达

Fig 1 Expression of HSV-1 DNA in supernatants

HSV-1: Herpes simplex virus I; M: Marker; MOI: Multiplicity of infection

10 MOI 的 HSV-1 感染 SH-SY5Y 细胞 12 h 后, 镜下可见细胞神经突起开始减少, 且出现神经突起回缩; 感染 24 h 后很少有明显的神经突起存在, 且细胞开始聚集, 呈圆形, 并有细胞脱落。见图 2。

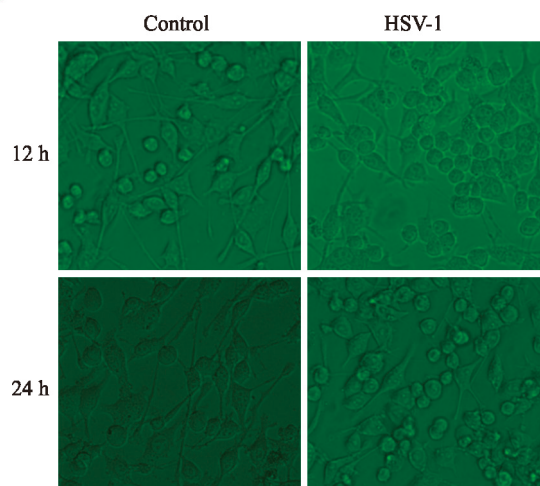


图 2 10 MOI HSV-1 感染后 SH-SY5Y 细胞的形态改变

Fig 2 HSV-1 (10 MOI) infection inducing morphological changes in SH-SY5Y cells

MOI: Multiplicity of infection; HSV-1: Herpes simplex virus I. Original magnification: $\times 200$

2.2 HSV-1 感染诱导 SH-SY5Y 细胞表达 A β 10 MOI 的 HSV-1 感染 12 h 后,免疫荧光染色可观察到明显的 A β 阳性染色(图 3A),且与对照组相比,HSV-1 感染组细胞中 A β 的表达增加 ($P<0.01$,图 3C)。HSV-1 感染 24 h 后 A β 阳性染色主要集中于细胞内(图 3B),A β 表达较 12 h 时有所下降 ($P<0.01$),但仍较对照组高 ($P<0.05$,图 3C)。

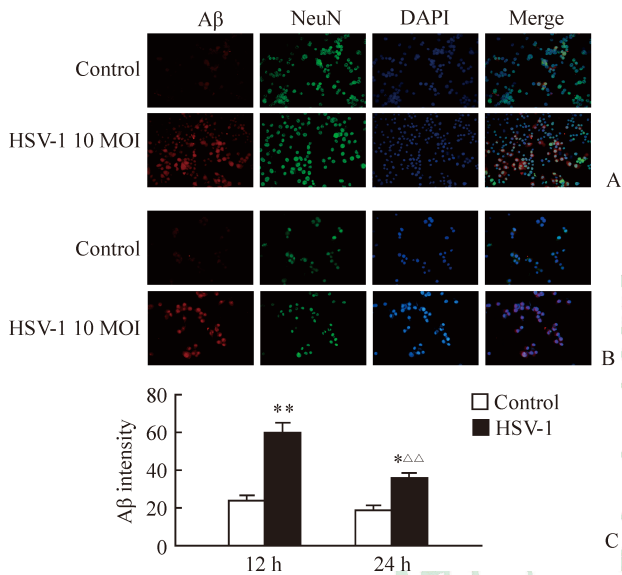


图 3 10 MOI HSV-1 感染对 SH-SY5Y 细胞 A β 表达的影响

Fig 3 Effect of HSV-1 (10 MOI) infection on A β expression in SH-SY5Y cells

A: Expression of A β in SH-SY5Y cells on 12 h of post-infection; B: Expression of A β in SH-SY5Y cells on 24 h of post-infection; C: Statistical analysis of immuno-intensity of A β in control and HSV-1 infected group. HSV-1: Herpes simplex virus I; A β : β -Amyloid; MOI: Multiplicity of infection; NeuN: Neuronal nuclei; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole. Original magnification: $\times 400$ (A, B). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group at the same time point; $\Delta\Delta P<0.01$ vs HSV-1 group at 12 h. $n=3, \bar{x}\pm s$

2.3 HSV-1 感染对 SH-SY5Y 细胞 ApoE 表达的影响 10 MOI 的 HSV-1 感染 12 h 后,SH-SY5Y 细胞中 ApoE 蛋白的表达与对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$);感染 24 h 后,ApoE 蛋白的表达增加 ($P<0.01$),见图 4A~4C。免疫荧光染色结果(图 4D)显示,HSV-1 gC 蛋白和 ApoE 蛋白主要聚集在细胞核周围,两者免疫荧光共染提示其可能相互作用,影响 HSV-1 感染诱导 A β 的表达。

2.4 HSV-1 调控 APP、MME、ApoE 蛋白表达

及 GSK-3 β 活化过程 蛋白质印迹结果(图 5)显示,与对照组相比,HSV-1 感染 12 h 后细胞中 APP 蛋白的表达水平降低 ($P<0.05$),GSK-3 β 总蛋白的表达水平增加 ($P<0.05$)且 Ser9 位磷酸化活性增强 ($P<0.05$),MME 蛋白的表达水平增加 ($P<0.01$);感染 24 h 后细胞中 MME 蛋白的表达水平降低 ($P<0.05$),ApoE 蛋白的表达水平增加 ($P<0.05$)。

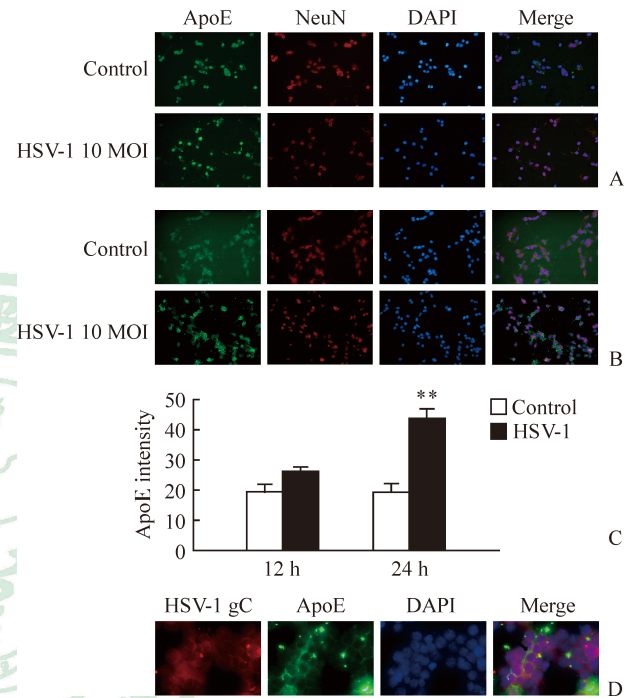


图 4 10 MOI HSV-1 感染对 SH-SY5Y 细胞 ApoE 表达的影响

Fig 4 Effect of HSV-1 (10 MOI) infection on ApoE expression in SH-SY5Y cells

A: Expression of ApoE in SH-SY5Y cells 12 h post-infection; B: Expression of ApoE in SH-SY5Y cells 24 h post-infection; C: Statistical analysis of immuno-intensity of ApoE in control and HSV-1 infected group; D: HSV-1 gC co-localized with ApoE protein in perinuclear after HSV-1 infection. HSV-1: Herpes simplex virus I; ApoE: Apolipoprotein E; MOI: Multiplicity of infection; NeuN: Neuronal nuclei; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole. Original magnification: $\times 400$ (A, B, D). ** $P<0.01$ vs control group at the same time point. $n=3, \bar{x}\pm s$

3 讨论

HSV-1 为嗜神经性 DNA 病毒,可在中枢神经系统中建立潜伏感染,其激活导致神经病变,且可在免疫低下等情况下复发。有研究发现,HSV-1 感染与 AD 的发生和发展密切相关,其可以增加病毒携带者患病的风险^[8]。目前关于 HSV-1 与神经元的

体外研究主要集中于鼠原代神经元和全能干细胞, 本实验选用 SH-SY5Y 细胞是因为该细胞可以模拟神经元, 与神经元在生物学和功能特征上有许多相

似性, 相对于原代神经元可重复性好, 且对于培养条件要求更简单^[9]。

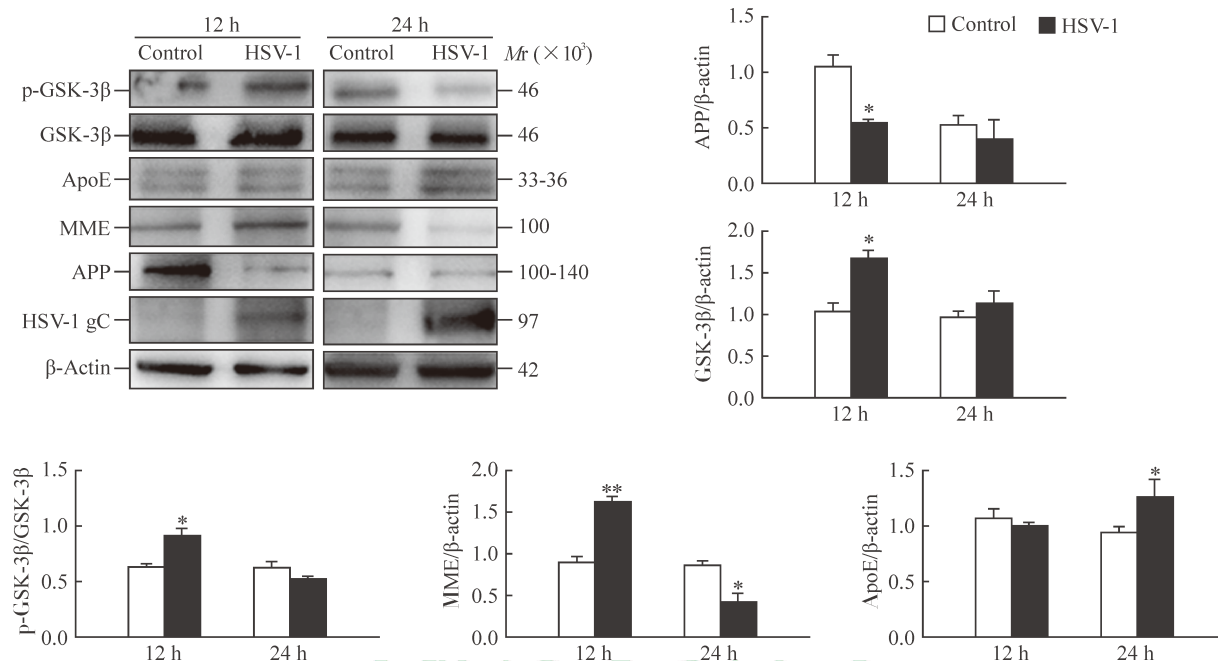


图 5 HSV-1 对 APP、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、MME、ApoE 表达的影响

Fig 5 Effect of HSV-1 infection on expressions of APP, MME, ApoE, GSK-3 β and p-GSK-3 β in SH-SY5Y cells

HSV-1: Herpes simplex virus I; APP: Amyloid precursor protein; GSK-3 β : Glycogen synthase kinase-3 β ; p-GSK-3 β : Phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β ; MME: Melanin metabolic enzyme; ApoE: Apolipoprotein E. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group at the same time point. $n = 3, \bar{x} \pm s$

HSV-1 侵染细胞的过程复杂。病毒包膜上含有多种糖蛋白, 糖蛋白 gB、gC、gD、gH、gL 均参与病毒对细胞的侵染。gB 和 gC 蛋白可以介导病毒与细胞表面的硫酸类肝素蛋白多糖分子结合, 从而促进 gD 蛋白与细胞表面的特异性受体结合, 进而触发病毒包膜与细胞膜融合, 促进病毒进入细胞^[10]。

研究发现, AD 患者的大脑中 HSV-1 主要分布于 A β 斑块附近^[11], 且 HSV-1 gB 蛋白与 A β 有一定的同源性, 这提示 HSV-1 可能影响脑内 A β 的水平。大脑内 A β 水平的调节主要有 A β 生成和降解两条途径。细胞合成的 APP 若被 β -分泌酶和 α -分泌酶连续切割形成 A β 肽分泌到细胞外, 一般认为不会对细胞造成太大损伤; 但经过 β -分泌酶和 γ -分泌酶连续切割, 则会生成 A β_{40} 或 A β_{42} 的片段, 而 A β_{42} 片段更易造成 A β 寡聚体的形成, 促进 A β 聚集进而产生细胞毒性。MME 可以降解脑内错误折叠以及缠结的 A β 肽。

本研究发现 HSV-1 感染 SH-SY5Y 细胞 12 h 后 A β 蛋白表达明显增加, 而 APP 蛋白的表达降低, 同时 ApoE 蛋白的表达无明显改变。但感染 24 h 后, APP 蛋白表达无明显改变, 而 ApoE 蛋白表达增加; A β 蛋白表达较对照组虽有所增加, 但相较于 12 h 时却下降。本研究中采用的 MOAB2 为特异性针对 A β 的 1~4 位氨基酸残基的抗体^[12], 而 HSV-1 gB 蛋白与 A β_{42} 的同源性位置为 22~42 位氨基酸^[3], 因此 A β 表达的增加并不是由于其与 HSV-1 存在交叉反应。这提示 A β 表达升高可能与 HSV-1 感染、ApoE 蛋白表达有关。

以往研究发现, HSV-1 感染神经元后一方面会诱导 APP 发生剪切, 导致 A β 和其他神经毒性片段在神经元内外累积^[13-14], 其产生的羧基端 APP 可以改变 HSV-1 进入神经元的方式, 调控脑啡肽酶和 GSK-3 β 的转录, 参与 A β 级联反应; 另一方面, HSV-1 可以活化 GSK-3 依赖性通路而上调神经元内 A β 的表达^[15]。APP 为一种跨膜

蛋白, GSK-3 β 可以干预 APP 的裂解过程, 诱导淀粉样途径的进行, 从而促进 A β 的生成。本研究发现 HSV-1 感染 12 h 后 APP 蛋白的表达降低 ($P < 0.05$), 表明 HSV-1 在感染 12 h 时通过影响 APP 的代谢过程进而影响 A β 产生, 而 A β 的增多可以反馈增加 MME 的表达。GSK-3 β 磷酸化增强, 活性下降, 从而促进病毒通过微管网络进行蔓延^[16-17]。感染 24 h 时 APP、GSK-3 β 蛋白的表达均无明显变化, MME 蛋白表达降低, 提示此时 HSV-1 主要是影响其降解过程而促进 A β 增加, 此时 ApoE 蛋白表达增加, 可与 HSV-1 竞争表面受体, 减少 HSV-1 进入细胞, 从而导致 A β 的表达弱于感染 12 h 时。

总之, 本研究表明 HSV-1 感染可以诱导 SH-SY5Y 细胞 A β 表达增加, 感染 12 h 时 A β 表达增加与促进 APP 蛋白代谢密切相关, 可能是通过影响 GSK-3 β 的活化从而增加 A β 表达; 感染 24 h 时 HSV-1 可能主要是抑制其降解过程进而增加 A β 的表达, 此时 ApoE 蛋白表达增强, 其可能与 HSV-1 竞争细胞表面受体, 减少 HSV-1 进入细胞发挥作用, 导致 A β 表达弱于感染 12 h 时。这为进一步阐明 HSV-1 参与 AD 发病的观点提供了证据, 其分子机制仍需进一步实验验证。

[参考文献]

- [1] MIKLOSSY J. Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease[J/OL]. *Expert Rev Mol Med*, 2011, 13: e30. doi: 10.1017/s1462399411002006.
- [2] JAMIESON G A, MAITLAND N J, WILCOCK G K, CRASKE J, ITZHAKI R F. Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains[J]. *J Med Virol*, 1991, 33: 224-227.
- [3] WOZNIAK M A, ITZHAKI R F, SHIPLEY S J, DOBSON C B. Herpes simplex virus infection causes cellular β -amyloid accumulation and secretase upregulation[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 429(2/3): 95-100.
- [4] SANTANA S, RECUERO M, BULLIDO M J, VALDIVIESO F, ALDUDO J. Herpes simplex virus type 1 induces the accumulation of intracellular beta-amyloid in autophagic compartments and the inhibition of the non-amyloidogenic pathway in human neuroblastoma cells[J]. *Neurobiol Aging*, 2012, 33: 430.
- [5] CRIBBS D H, AZIZEH B Y, COTMAN C W, LAFERLA F M. Fibril formation and neurotoxicity by a herpes simplex virus glycoprotein B fragment with homology to the Alzheimer's A β peptide[J]. *Biochemistry*, 2000, 39: 5988-5994.
- [6] BOURGADE K, GARNEAU H, GIROUX G, LE PAGE A Y, BOCTI C, DUPUIS G, et al. β -Amyloid peptides display protective activity against the human Alzheimer's disease-associated herpes simplex virus-1[J]. *Biogerontology*, 2014, 16: 85-98.
- [7] ITZHAKI R F, WOZNIAK M A. Herpes simplex virus type 1 in Alzheimer's disease: the enemy within[J]. *J Alzheimers Dis*, 2008, 13: 393-405.
- [8] MCNAMARA J, ANN MURRAY T A. Connections between herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease pathogenesis[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2016, 13: 996-1005.
- [9] SHIPLEY M M, MANGOLD C A, KUNY C V, SZPARA M L. Differentiated human SH-SY5Y cells provide a reductionist model of herpes simplex virus 1 neurotropism[J/OL]. *J Virol*, 2017, 91. doi: 10.1128/jvi.00958-17.
- [10] SPEAR P G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry[J]. *Cell Microbiol*, 2004, 6: 401-410.
- [11] WOZNIAK M A, MEE A P, ITZHAKI R F. Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques[J]. *J Pathol*, 2009, 217: 131-138.
- [12] YOUMANS K L, TAI L M, KANEKIYO T, STINE W B, MICHON S C, NWABUISI-HEATH E, et al. Intraneuronal A β detection in 5xFAD mice by a new A β -specific antibody[J]. *Mol Neurodegener*, 2012, 7: 8.
- [13] DE CHIARA G, MARCOCCI M E, CIVITELLI L, ARGNANI R, PIACENTINI R, RIPOLI C, et al. APP processing induced by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) yields several APP fragments in human and rat neuronal cells[J/OL]. *PLoS One*, 2010, 5: e13989. doi: 10.1371/journal.pone.0013989.
- [14] HARRIS S A, HARRIS E A. Molecular mechanisms for herpes simplex virus type 1 pathogenesis in Alzheimer's disease[J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 48.
- [15] PIACENTINI R, LI PUMA D D, RIPOLI C, MARCOCCI M E, DE CHIARA G, GARACI E, et al. Herpes simplex virus type-1 infection induces synaptic dysfunction in cultured cortical neurons via GSK-3 activation and intraneuronal amyloid-beta protein accumulation[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15444. doi: 10.1038/srep15444.
- [16] CIVITELLI L, MARCOCCI M E, CELESTINO I, PIACENTINI R, GARACI E, GRASSI C, et al. Herpes simplex virus type 1 infection in neurons leads to production and nuclear localization of APP intracellular domain (AICD): implications for Alzheimer's disease pathogenesis[J]. *J Neurovirol*, 2015, 21: 480-490.
- [17] NAGHAVI M H, GUNDERSEN G G, WALSH D. Plus-end tracking proteins, CLASPs, and a viral Akt mimic regulate herpesvirus-induced stable microtubule formation and virus spread[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 18268-18273.