

上调 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (KEAP1)抑制单纯疱疹病毒 1 型复制

吴松斌[#], 叶凌风[#], 胡鹏涛, 熊东林, 肖礼祖^{*}, 李容珍^{*}

深圳市南山区人民医院疼痛科, 深圳市疼痛学重点实验室, 广东 深圳

吴松斌, 叶凌风, 胡鹏涛, 熊东林, 肖礼祖, 李容珍. 上调 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (KEAP1)抑制单纯疱疹病毒 1 型复制[J]. 微生物学报, 2026, 66(3): 1225-1235.

WU Songbin, YE Lingfeng, HU Pengtao, XIONG Donglin, XIAO Lizu, LI Rongzhen. Upregulation of Kelch-like ECH-associated protein 1 represses the replication of herpes simplex virus type 1[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(3): 1225-1235.

摘要: 【目的】探讨 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1)对单纯疱疹病毒 1 型(herpes simplex virus type 1, HSV-1)复制的影响, 为抗单纯疱疹病毒研究提供理论依据。【方法】通过 qPCR 和 Western blotting 试验检测人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19 细胞)感染 HSV-1 后 KEAP1-NRF2 信号通路及病毒分子的 mRNA 和蛋白表达情况。构建 KEAP1 沉默和过表达的 ARPE-19 细胞株, 采用 Western blotting 检测 KEAP1 沉默和过表达对核因子红细胞 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)信号通路的影响。用 KEAP1 沉默和过表达细胞株感染 HSV-1, 采用 qPCR 检测病毒 mRNA 表达变化, 采用免疫荧光和 Western blotting 检测病毒蛋白表达变化, 采用空斑形成试验检测病毒滴度变化。用 KEAP1 沉默细胞株感染 HSV-1, 采用 Western blotting 检测不同时间点 NRF2 信号通路和病毒蛋白的表达情况。【结果】KEAP1 沉默可激活 NRF2 信号通路, 促进 HSV-1 的复制; KEAP1 过表达可下调 NRF2 信号通路, 抑制 HSV-1 的复制。这一结果与先前研究中关于 NRF2 信号通路上调及活化可抑制 HSV-1 复制的结论相矛盾。进一步研究发现, KEAP1 沉默诱导的 NRF2 上调在 HSV-1 感染后受到显著抑制。【结论】KEAP1 在宿主细胞抗 HSV-1 感染过程中发挥重要作用, 其与 NRF2 的相互作用在抗病毒免疫应答中具有复杂的生物学功能。

关键词: Kelch 样 ECH 相关蛋白 1; 单纯疱疹病毒 1 型; 核因子红细胞 2 相关因子 2; 病毒复制

资助项目: 深圳市南山区技术研发和创意设计项目(NS2023041, NS2024033); 深圳市南山区卫生健康系统科技重大项目(NSZD2024029); 深圳市医学重点学科建设项目(市级财政补贴)

This work was supported by the Science and Technology Major Project of Shenzhen Nanshan District Health System (NS2023041, NS2024033), the Shenzhen Nanshan District Healthcare System Science and Technology Key Project (NSZD2024029), and the Municipal Financial Subsidy of Shenzhen Medical Key Discipline Construction.

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding authors. E-mail: LI Rongzhen, lirongzhen_2019@foxmail.com; XIAO Lizu, nsyyjoe@live.cn

Received: 2025-10-13; Accepted: 2025-12-16; Published online: 2026-01-04

Upregulation of Kelch-like ECH-associated protein 1 represses the replication of herpes simplex virus type 1

WU Songbin[#], YE Lingfeng[#], HU Pengtao, XIONG Donglin, XIAO Lizu^{*}, LI Rongzhen^{*}

Department of Pain Medicine and Shenzhen Municipal Key Laboratory for Pain Medicine, Shenzhen Nanshan People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China

Abstract: **[Objective]** To investigate the effect of Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) on the replication of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and thus provide theoretical support for anti-herpes simplex virus research. **[Methods]** The mRNA and protein levels of molecules in the KEAP1-NRF2 signaling pathway and viral molecules in ARPE-19 cells infected with HSV-1 were determined by qPCR and Western blotting, respectively. KEAP1-silenced and overexpressing ARPE-19 cell lines were constructed, and Western blotting was employed to assess the effects of KEAP1 silencing and overexpression on the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) signaling pathway. The KEAP1-silenced and overexpressing cell lines were subsequently infected with HSV-1. Changes in viral mRNA expression were detected *via* qPCR, while immunofluorescence and Western blotting were used to evaluate alterations in viral protein expression. Additionally, a plaque formation assay was conducted to measure variations in viral titer. Western blotting was performed on KEAP1-silenced cell lines infected with HSV-1 to assess the expression levels of NRF2 signaling pathway and viral proteins at different time points. **[Results]** Silencing of KEAP1 activated the NRF2 signaling pathway and promoted HSV-1 replication, whereas KEAP1 overexpression downregulated the NRF2 signaling pathway and inhibited HSV-1 replication. These findings contradict previous studies suggesting that upregulation and activation of the NRF2 signaling pathway can suppress HSV-1 replication. Further investigation revealed that KEAP1 silencing-induced NRF2 upregulation was significantly inhibited following HSV-1 infection. **[Conclusion]** KEAP1 plays a crucial role in the host cell resistance to HSV-1 infection, and its interaction with NRF2 exerts complex biological functions in antiviral immune responses.

Keywords: Kelch-like ECH-associated protein 1; herpes simplex virus type 1; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; virus replication

单纯疱疹病毒 1 型(herpes simplex virus type 1, HSV-1)是一种人类嗜神经双链 DNA 病毒, 隶属于疱疹病毒科 α 病毒亚科, 可引发多种疾病^[1]。据报道, HSV-1 感染中枢神经系统可引发单纯疱疹脑炎(herpes simplex encephalitis, HSE), 其死亡率和致残率均较高^[2]。越来越多的研究表明, HSV-1 感染与阿尔茨海默病(Alzheimer's

disease, AD)等神经退行性疾病的发生发展存在关联^[3]。此外, HSV-1 感染引发的角膜炎致盲率在全球角膜炎中位居首位^[4]。截至目前, 尽管全球研究者付出了巨大努力, 但尚未找到彻底治愈 HSV-1 的方法^[5]。

Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1)是一种 E3 泛素连接

酶的底物衔接蛋白, 能够介导核因子红细胞 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2) 的泛素化, 并促使其随后发生蛋白酶体降解^[6]。此前, 大量研究聚焦于 KEAP1 与 NRF2 的相互作用, 探讨其如何调控细胞的氧化还原稳态, 进而影响病毒复制^[7-9]。近年来, KEAP1 独立于 NRF2 的抗病毒功能受到越来越多的关注。Burns 等^[10]研究发现, KEAP1 可通过募集 G9a-GLP 和 NF kappa-B p50 抑制仙台病毒诱导的基因转录, 且这一过程不依赖 NRF2。此外, 一种新发现的环状 RNA 被报道可通过调节 miR-24-3p/KEAP1 轴抑制伪狂犬病毒复制^[11]。然而, KEAP1 在 HSV-1 感染中的作用尚不明确。本研究旨在探讨 KEAP1 与 HSV-1 感染的相互作用机制, 为抗单纯疱疹病毒研究提供理论支持。

1 材料与方 法

1.1 细胞、病毒和试剂

人视网膜上皮细胞 (ARPE-19)、非洲绿猴肾细胞 (Vero)、单纯疱疹病毒 1 型 (herpes simplex virus type I) (KOS 株), ATCC; DMEM 细胞培养基、胎牛血清、胰酶, Gibco 公司; TRIzon, Life Technologies 公司; 反转录试剂盒, 山东思科捷生物技术有限公司; NRF2、KEAP1 抗体, CST 公司; ICP0、gB 抗体, Abcam 公司; HO-1、GAPDH 抗体, 武汉三鹰生物技术有限公司; RealStar Fast SYBR qPCR Mix (Low ROX)、Lipofectamine 2000, 北京康润诚业生物技术有限公司; puromycin、DAPI、polybrene, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司; pLVX-GFP-PURO-KEAP1 (KEAP1 过表达)、pLKO-CMV-copGFP-PURO-shKEAP1 (沉默 KEAP1) 质粒、相应的空载质粒, 北京擎科生物科技股份有限公司。

1.2 KEAP1 过表达和沉默株构建

使用 Lipofectamine 2000、慢病毒载体 (2 μg)、包装质粒 pMD2.G (1 μg) 和 psPAX2 (1 μg) 转染

HEK 293T 细胞以制备慢病毒颗粒。转染 24 h 至 48 h 后, 收集细胞培养基, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min 取上清液。为获得稳定沉默或过表达 KEAP1 的细胞株, 将 ARPE-19 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔 4×10^5 个细胞。待细胞贴壁后, 将含有 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polybrene 的慢病毒悬液加入 ARPE-19 细胞中。慢病毒感染 24 h 后, 在荧光显微镜下观察细胞表达荧光标签蛋白的情况, 随后弃去原培养液, 更换为含有 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin 的新鲜培养液以筛选阳性细胞株。持续培养 2 周后, 更换为不含 puromycin 的完全培养基, 采用 qPCR 和 Western blotting 检测细胞株中 KEAP1 的表达情况, 最终获得的稳转细胞株将用于后续实验。

1.3 qPCR 检测

使用 TRIzon 试剂提取细胞总 RNA, 并通过反转录试剂盒获得 cDNAs。qPCR 检测采用北京康润诚业生物技术有限公司的 2 \times RealStar Fast SYBR qPCR Mix (Low ROX) 进行, 以 GAPDH 作为内参, 目的基因的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析计算。所有引物序列均由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 引物序列如表 1 所示。

1.4 Western blotting 实验

不同处理组的细胞用 RIPA 细胞裂解液在冰上裂解 30 min, 5 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 并使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定上清液中的总蛋白浓度。蛋白质经 SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜上, 然后使用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h 后进行 ECL 法曝光以获得目的蛋白条带。利用 ImageJ 软件分析蛋白条带灰度并进行定量。

1.5 免疫荧光实验

将分别转染 KEAP1 过表达载体、KEAP1 沉默载体及对照空载载体的 ARPE-19 细胞株接种于 12 孔板中, 待细胞贴壁后, 加入 HSV-1 (MOI=0.02) 吸附 2 h 后弃上清液, 用 PBS 洗涤细胞 3 次后加入新鲜培养基, 置于细胞培养箱

表1 qPCR引物序列

Table 1 Sequence of the primer for qPCR

Gene	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')
<i>KEAP1</i>	CTGGAGGATCATACCAAGCAGG	GGATACCCTCAATGGACACCAC
<i>NRF2</i>	TCCCCGGTCACATCGAGAG	TCCTGTTGCATACCGTCTAAATC
<i>HO-1</i>	AAGACTGCGTTCTCTCAAC	AAAGCCCTACAGCAACTGTCTG
<i>ICP0</i>	GGTCGCCCTGTCGCCTTA	GGTCGCCATGTTTCCCGT
<i>US4</i>	TGGACACCCTCTTCG	CAGGCACACGTAACG
<i>LAT</i>	CGCCTTTCCTGTTCTCGCT	ACGCGGCGTCTTTGTTGA
<i>GAPDH</i>	TGGCCTTCCGTGTTCCCTAC	GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA

培养。24 h 后弃上清液，用 4% PFA 固定细胞，随后加入免疫荧光封闭液室温封闭 1 h，弃封闭液后向细胞中加入 ICP0 或 gB 抗体于 4 °C 孵育过夜。第 2 天，用 PBS 洗涤细胞 3 次后，孵育 Alexa Fluor 594 (红色)偶联山羊抗小鼠 IgG H&L 二抗，最后用 DAPI 染色 8 min 后置于荧光显微镜下拍照。

1.6 空斑形成实验

将分别转染 KEAP1 过表达载体、KEAP1 沉默载体及对照空载载体的 ARPE-19 细胞株按每孔 2×10^5 个接种于 6 孔板，待细胞完全贴壁后，加 HSV-1 (MOI=0.02) 吸附 2 h 后弃上清液，更换新鲜培养基后置于细胞培养箱培养，24 h 后收集上清液。将收集的病毒上清液作连续 6 个梯度的稀释(100 μ L 病毒液加到 400 μ L 培养基中)，每个稀释度设置 3 孔，重复 3 次。将不同稀释梯度的病毒液加入长满单层的 Vero 细胞中，37 °C 吸附 2 h 后弃病毒液，用 PBS 轻轻洗涤细胞 3 遍并吸尽，加入甲基纤维-DMEM 混合物，48 h 后，用 4% PFA 固定 20 min，1% 结晶紫染色 30 min，拍照并计数空斑。病毒滴度计算如公式(1)所示。

$$\text{病毒滴度} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n) / (n \times v) \times d \quad (1)$$

式中： n 表示复孔个数， v 表示病毒量(mL)， d 表示稀释倍数。 x_1 、 x_2 、 x_n 表示同一稀释度在不同培养孔板中获得的空斑数。

1.7 统计学处理

使用 Excel 软件进行数据整理，使用

GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析和绘图。计量资料采用均值 \pm 标准差表示，两组间比较采用 t 检验，多组比较运用 one-way ANOVA 分析， $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 HSV-1 感染 ARPE-19 细胞后抑制 KEAP1 表达

使用 MOI=0.02 的 HSV-1 感染 ARPE-19 细胞，待病毒感染 24 h 和 36 h 后收集细胞，通过 qPCR 检测不同时间点 KEAP1-NRF2 信号通路和病毒基因的表达情况。结果显示，HSV-1 感染后 *KEAP1* 表达显著降低，*NRF2* 及 *HO-1* 表达无显著差异、病毒即刻早期(IE)基因 *ICP0*^[12]、糖蛋白 g 编码基因 *US4*^[13] 和潜伏期相关基因 *LAT*^[14] 表达显著增加(图 1A)。为了进一步探究 HSV-1 感染对 KEAP1-NRF2 信号通路和病毒蛋白表达的影响，通过 Western blotting 检测 HSV-1 感染后 KEAP1、NRF2、HO-1、病毒即刻早期蛋白 ICP0 和包膜糖蛋白 gB 的表达水平。结果显示，HSV-1 感染后病毒蛋白 ICP0 和 gB 表达显著增加，KEAP1 蛋白表达显著降低，NRF2 和 HO-1 蛋白表达无显著差异(图 1B)。

2.2 沉默 KEAP1 促进 HSV-1 复制

为了探究 KEAP1 下调对 HSV-1 复制的影响，设计了 3 个特异性靶向 KEAP1 的 shRNAs 来沉默 KEAP1，并通过 qPCR 和 Western blotting 验证 KEAP1 的敲低水平(图 2A、2B)，

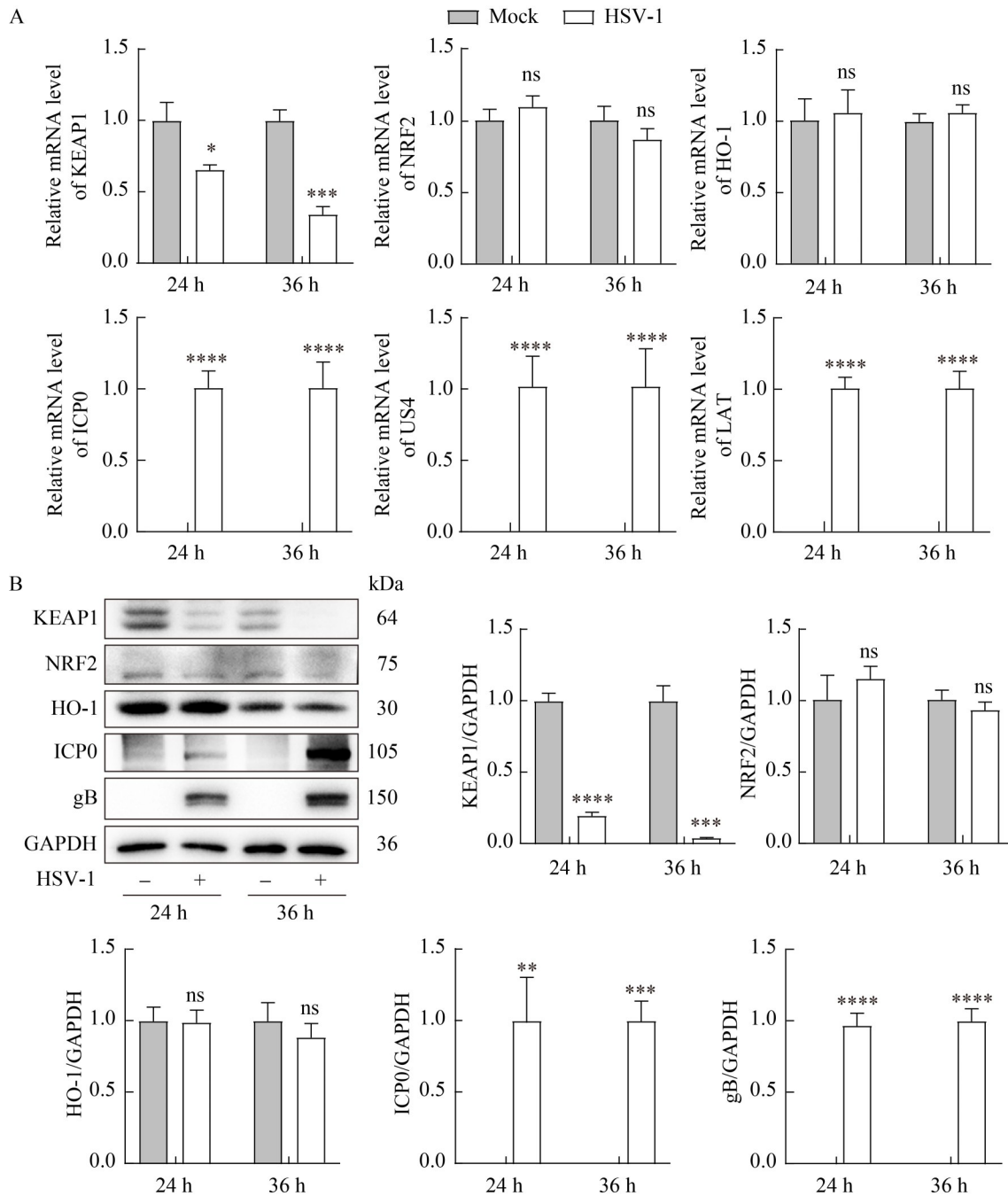


图1 HSV-1感染抑制KEAP1表达。 A: HSV-1感染后, *KEAP1*、*NRF2*、*HO-1*、*ICP0*、*US4*和*LAT*的mRNA水平; B: HSV-1感染后, *KEAP1*、*NRF2*、*HO-1*、*ICP0*和*gB*的蛋白水平。与mock组(无HSV-1感染)相比, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$, ns表示无显著差异。

Figure 1 HSV-1 infection inhibits KEAP1 expression. A: mRNA levels of *KEAP1*, *NRF2*, *HO-1*, *ICP0*, *US4* and *LAT* after HSV-1 infection; B: Protein levels of *KEAP1*, *NRF2*, *HO-1*, *ICP0* and *gB* after HSV-1 infection. **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ vs. mock group (not infected with HSV-1), ns indicates no significant difference.

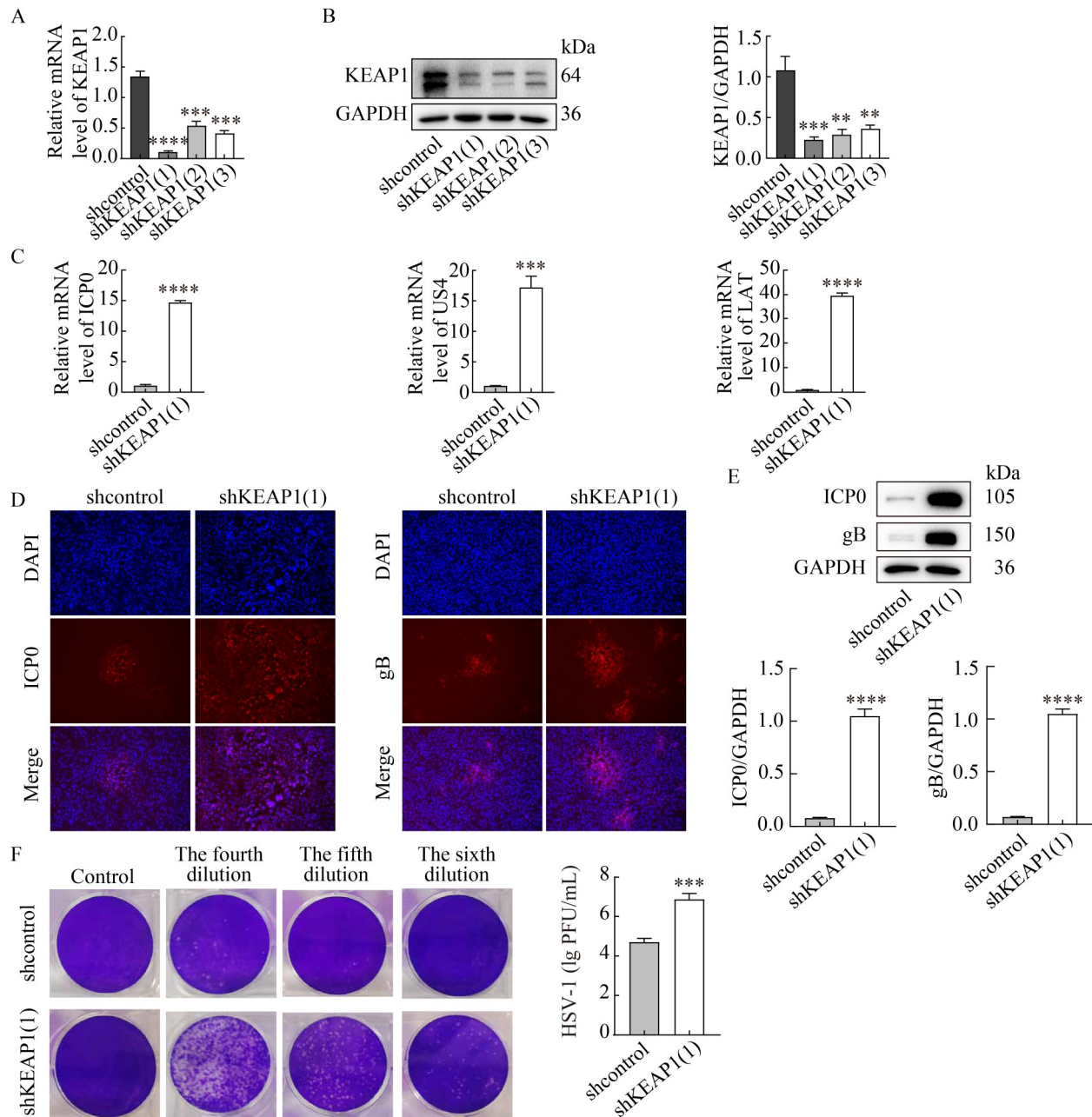


图2 KEAP1沉默对HSV-1复制的影响

Figure 2 The effect of KEAP1 silencing on HSV-1 replication. A: ARPE-19 cells were transfected with KEAP1 shRNA or empty plasmid, and the expression of *KEAP1* gene was detected by qPCR; B: After silencing KEAP1 using shRNAs that specifically targeted KEAP1, Western blotting was used to detect the protein level of KEAP1; C: KEAP1 silenced and control cells were infected with HSV-1 for a period of 24 h, and qPCR experiments were performed to detect the expression of virus genes *ICP0*, *US4* and *LAT*; D: ICP0 and gB localization was determined by immunofluorescence assays using a fluorescence microscope to preliminarily determine the replication level of the virus; E: The expression of virus proteins ICP0 and gB were identified by Western blotting; F: Detection of viral titer in the supernatants of KEAP1 silenced cell group and control cell group by plaque assay. **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ vs. shcontrol group.

最终选择敲低效率最高的细胞株 shKEAP1(1)开展后续实验。shcontrol 与 shKEAP1(1)细胞株分别感染 HSV-1 24 h 后, 采用 qPCR 检测细胞中病毒 mRNA 表达水平。结果显示, shKEAP1(1)组 *ICP0*、*US4* 和 *LAT* 的转录水平显著高于 shcontrol 组(图 2C)。进一步使用免疫荧光和 Western blotting 探究病毒蛋白表达情况, 结果表明 KEAP1 敲低促进了 HSV-1 蛋白 ICP0 和 gB 表达(图 2D、2E)。随后收集病毒感染 24 h 后的 shcontrol 组和 shKEAP1(1)组细胞的上清, 利用 DMEM 培养基梯度稀释后感染 Vero 细胞, 通过细胞病变形成的空斑数量探究所释放的子代病毒颗粒数量。结果显示, shKEAP1(1)组病毒滴度与 shcontrol 组比较显著增加(图 2F)。上述结果表明, 抑制 KEAP1 可以促进 HSV-1 病毒复制。

2.3 KEAP1 过表达抑制 HSV-1 复制

为了进一步探究 KEAP1 在 HSV-1 复制中的功能, 构建了 KEAP1 过表达 ARPE-19 细胞株, 并通过 qPCR 和 Western blotting 进行 KEAP1 表达验证(图 3A-3B)。与对照组(vector)相比, KEAP1 过表达可显著下调病毒基因 *ICP0*、*US4* 和 *LAT* 的转录水平(图 3C)。免疫荧光和 Western blotting 实验显示, 与对照组相比, KEAP1 过表达显著抑制病毒蛋白 ICP0 和 gB 的表达(图 3D-3E)。利用空斑实验进一步评估 HSV-1 感染后对照组和 KEAP1 过表达组细胞上清中病毒粒子释放情况, 结果显示 KEAP1 过表达组病毒滴度显著低于对照组(图 3F)。上述结果表明 KEAP1 在细胞中参与抗 HSV-1 感染。

2.4 KEAP1 抗 HSV-1 作用不依赖于 NRF2-HO-1 信号通路

NRF2 是动物细胞氧化还原稳态的关键调节因子^[15]。在正常生理条件下, NRF2 与细胞质中的 KEAP1 结合, 最终被蛋白酶体降解。在应激状态下, NRF2 从 KEAP1 释放并易位至细胞核, 与肌腱膜纤维肉瘤 (musculoaponeurotic

fibrosarcoma, MAF) 蛋白形成异源二聚体, NRF2-MAF 复合物进一步与抗氧化反应元件 (antioxidant response elements, ARE) 结合, 启动细胞保护基因的转录, 如血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)^[16]。有研究报道, NRF2-HO-1 通路可通过激活干扰素抑制 HSV-1 感染^[7]; 最新研究也证实, NRF2 过表达能够抑制 HSV-1 复制, 且发现 NRF2 介导的抗 HSV-1 作用不依赖于 HO-1^[17]。因此, 本研究进一步探究了 KEAP1 沉默和过表达对 NRF2 和 HO-1 表达的影响, 结果显示 KEAP1 沉默上调 NRF2 和 HO-1 表达(图 4A), 促进 HSV-1 复制(图 2C-2F); 而 KEAP1 过表达抑制 NRF2 和 HO-1 表达(图 4B), 抑制 HSV-1 复制(图 3C-3F)。这与之前研究报道的 NRF2、HO-1 上调抑制 HSV-1 的现象相矛盾。因此, 推测 KEAP1 介导的抗 HSV-1 作用不依赖于 NRF2-HO-1 信号通路。

2.5 HSV-1 抑制 KEAP1 沉默诱导的 NRF2 表达上调

为进一步探究 KEAP1 介导的抗 HSV-1 作用是否独立于 NRF2-HO-1 信号通路, 本研究在 KEAP1 沉默细胞株(具有高基础 NRF2 表达水平)中建立了 HSV-1 感染模型, 并检测了感染后不同时间点 NRF2 蛋白的动态变化。实验结果表明, HSV-1 感染后原本显著升高的 NRF2 蛋白水平迅速下调(图 5), 提示病毒可能通过某种机制降解 NRF2, 从而逃逸宿主的抗氧化与固有免疫应答。在病毒感染条件下, 尽管 NRF2 表达被显著抑制, 但 HO-1 的表达水平并未受到明显影响(图 5)。据此推测 KEAP1-NRF2 信号通路在抗病毒免疫中可能发挥复杂的调控作用。

3 讨论与结论

KEAP1 是一种 E3 泛素连接酶的底物衔接物, 能够介导 NRF2 泛素化并使其降解^[6]。本研究发现 HSV-1 感染抑制了 ARPE-19 细胞中 KEAP1 的表达(图 1), 但 KEAP1 在 HSV-1 感染

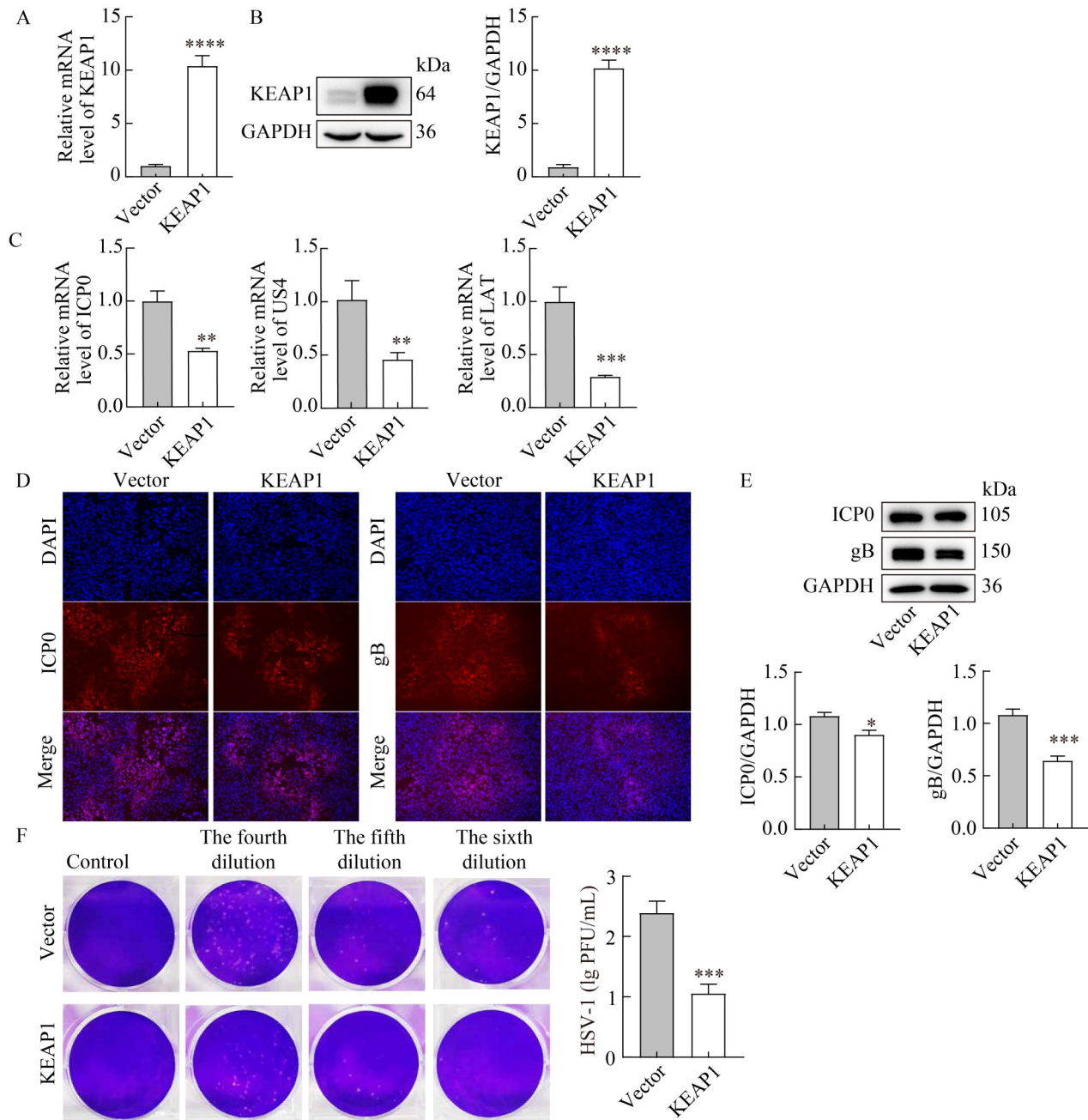


图3 KEAP1过表达对HSV-1复制的影响

Figure 3 The effect of KEAP1 overexpression on HSV-1 replication. A: ARPE-19 cells were transfected with KEAP1 plasmid or empty vector plasmid, and the expression of the *KEAP1* gene was detected by qPCR; B: Western blotting was used to detect the protein level of KEAP1 after overexpression of KEAP1; C: KEAP1 overexpressing and control cells were infected with HSV-1 for a period of 24 h, and qPCR experiments were performed to detect the expression of virus genes *ICP0*, *US4* and *LAT*; D: ICP0 and gB localization was determined by immunofluorescence assays using a fluorescence microscope to preliminarily determine the replication level of the virus; E: The expression of virus proteins ICP0 and gB were identified by Western blotting; F: Detection of viral titer in the supernatants of KEAP1 overexpressing cell group and control cell group by plaque assay. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ vs. vector group.

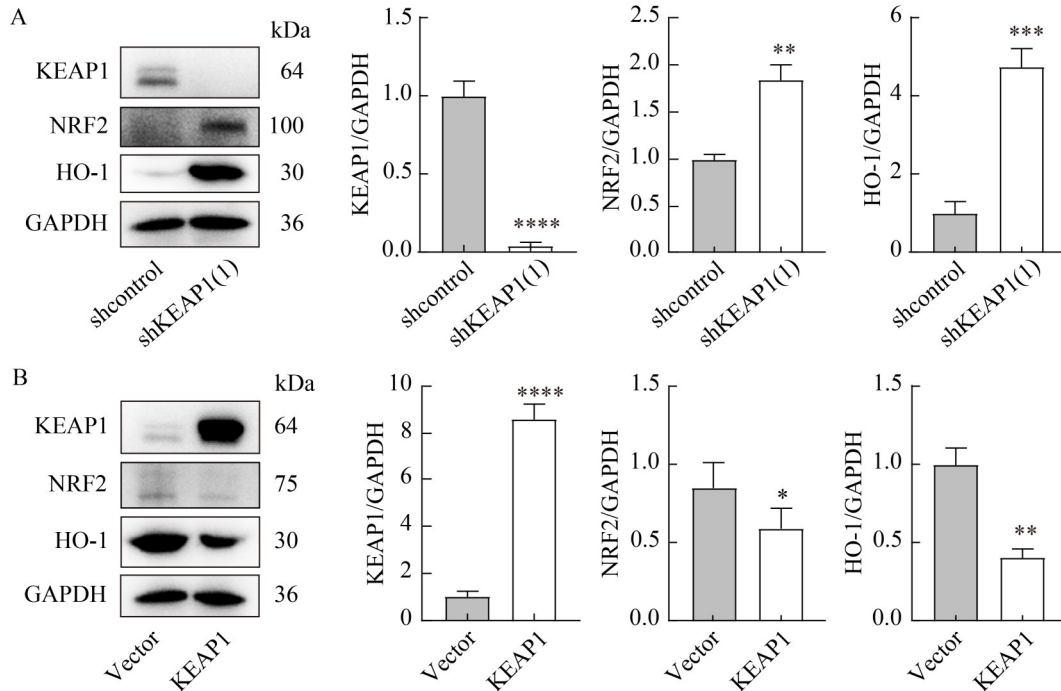


图4 KEAP1沉默或过表达对NRF2和HO-1表达的影响。 A: KEAP1沉默后, KEAP1、NRF2和HO-1的蛋白水平; B: 过表达KEAP1后, KEAP1、NRF2和HO-1的蛋白水平。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ vs.对照组。

Figure 4 The effect of KEAP1 silencing or overexpression on the expression of NRF2 and HO-1. A: Protein levels of KEAP1, NRF2 and HO-1 after KEAP1 silencing; B: Protein levels of KEAP1, NRF2 and HO-1 after KEAP1 overexpression. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ vs. shcontrol or vector group.

过程中的作用尚不明确。因此, 本研究探究了 KEAP1 与 HSV-1 复制之间的相互作用。

为了探究 KEAP1 对 HSV-1 病毒复制的影响, 本研究构建了 KEAP1 沉默和过表达的 ARPE-19 细胞株, 并使其感染 HSV-1。结果显示, KEAP1 抑制可以显著促进 HSV-1 病毒复制和释放(图 2), 而 KEAP1 过表达可以抑制 HSV-1 病毒复制和释放(图 3)。此外, 研究发现 KEAP1 过表达显著抑制病毒蛋白 gB 的表达, 对病毒蛋白 ICPO 的抑制作用不强(图 3D、3E)。ICPO 蛋白是一种即刻早期蛋白, 可使宿主内在防御蛋白失活并刺激病毒转录^[18]。gB 是 HSV-1 的主要包膜糖蛋白, 在 gD 和 gH/gL 复合物的辅助下, 通过介导病毒与细胞或细胞膜的融合促进 HSV-1 的侵袭和核衣壳的释放^[19]。这些实验

结果表明, KEAP1 可能主要通过调控 HSV-1 包膜糖蛋白 gB 表达来干扰 HSV-1 的复制和释放, 具体机制有待进一步研究。

大量研究报道了 KEAP1-NRF2 信号通路参与病毒感染, 如 KEAP1 通过识别 HBX 蛋白激活 NRF2/ARE 信号通路, 进而抑制乙型肝炎病毒的复制^[20]; 马尔堡病毒 VP24 蛋白与 KEAP1 相互作用, 调控 NRF2 信号通路, 进而激活细胞保护性抗氧化反应途径^[21]。NRF2 是一种调节抗氧化基因表达的转录因子^[22]。NRF2 过表达或者激活被报道可以抑制 HSV-1 病毒复制^[7], Wu 等^[17]的研究中也得到了一致的结果。NRF2 可以易位进入细胞核并与 ARE 结合, 启动细胞保护基因的转录, 如 HO-1^[16]。然而, ARPE-19 细胞感染 HSV-1 后, NRF2 及其下游效应物 HO-1 的

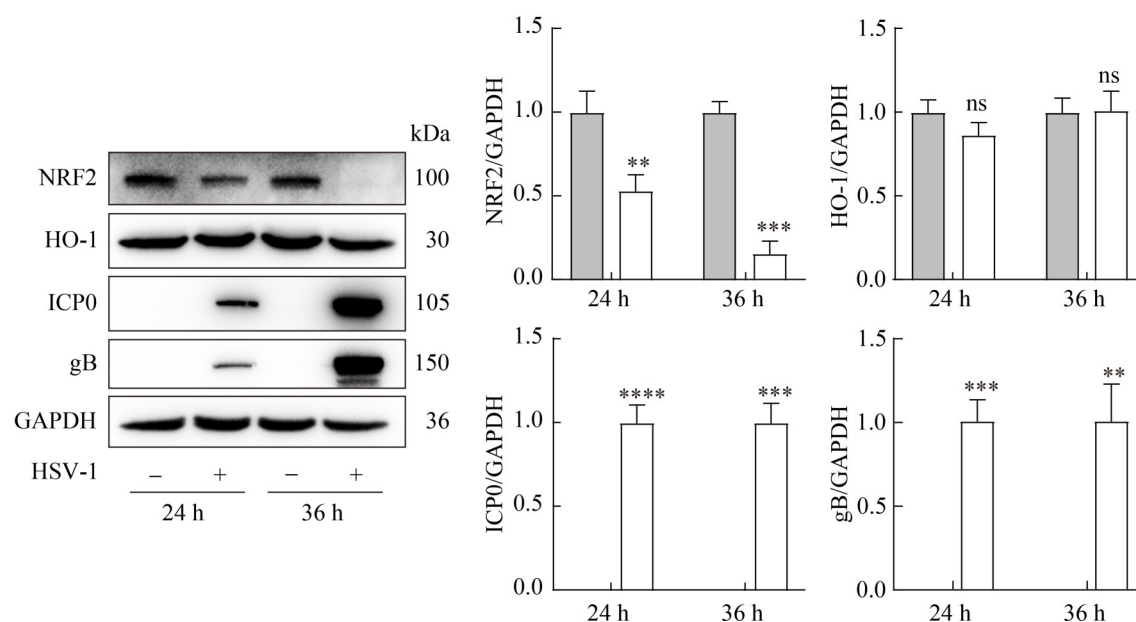


图5 HSV-1感染抑制shKEAP1细胞株中NRF2表达。 shKEAP1细胞株感染HSV-1后，NRF2、HO-1、ICP0和gB的蛋白水平。**: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ vs.对照组(无HSV-1感染), ns表示无显著差异。

Figure 5 HSV-1 infection suppresses NRF2 expression in shKEAP1 cell lines. Protein levels of NRF2, HO-1, ICP0, and gB in shKEAP1 cell lines following HSV-1 infection. **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ vs. control group (not infected with HSV-1), ns indicates no significant difference.

表达并未出现显著变化(图 1), 表明在 ARPE-19 细胞中 HSV-1 感染对 NRF2 的表达或核转移无显著影响。进一步的研究发现, KEAP1 沉默上调 NRF2 及其下游通路表达, KEAP1 过表达抑制 NRF2 及其下游通路表达(图 4)。然而 KEAP1 过表达表现出抗 HSV-1 特性的同时却抑制了 NRF2 通路活性, KEAP1 沉默促进 HSV-1 复制(图 2、图 3)的同时又激活 NRF2 通路。据此推测 KEAP1 介导的抗 HSV-1 效果可能独立于 NRF2-HO-1 信号通路。

为探究 KEAP1 介导的抗 HSV-1 效应是否独立于 NRF2-HO-1 信号通路, 研究继续在 KEAP1 沉默细胞模型中进行了 HSV-1 感染实验, 并检测了 NRF2 信号通路关键分子的表达变化。结果显示, HSV-1 感染能够显著抑制由 KEAP1 沉默所引起的 NRF2 表达上调(图 5), 而对 NRF2 下游蛋白 HO-1 的表达无显著影响(图 5), 提示

HSV-1 可能通过靶向 NRF2 实现免疫逃逸。值得注意的是, 这一结果与图 1 所示数据, 即 HSV-1 感染对正常 ARPE-19 细胞中 NRF2 表达未产生显著影响存在不一致之处。进一步对 Western blotting 结果进行分析发现, 在 KEAP1 沉默条件下诱导上调的 NRF2 蛋白分子量约为 100 kDa, 而在未经 KEAP1 干预的 ARPE-19 细胞中 NRF2 主要呈现为约 75 kDa 的条带。这一现象表明, 细胞内 NRF2 可能以不同分子量形式存在, 且不同形式的 NRF2 在 HSV-1 感染过程中可能承担不同的生物学功能。

作者贡献声明

吴松斌: 实验操作、数据处理与分析、论文撰写与修改; 叶凌风: 获取基金、协助实验操作、数据处理; 胡鹏涛: 协助实验操作; 熊东林: 参与文章编辑和审阅; 肖礼祖: 提供资源、论文讨论、监督管理;

李容珍: 获取基金、研究构思与设计、论文撰写与修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] STEINER I, KENNEDY PG, PACHNER AR. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster[J]. *The Lancet Neurology*, 2007, 6(11): 1015-1028.
- [2] ROZENBERG F. Herpes simplex virus and central nervous system infections: encephalitis, meningitis, myelitis[J]. *Virologie*, 2020, 24(5): 283-294.
- [3] MANCUSO R, SICURELLA M, AGOSTINI S, MARCONI P, CLERICI M. Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease: link and potential impact on treatment[J]. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2019, 17(9): 715-731.
- [4] ROWE AM, ST LEGER AJ, JEON S, DHALIWAL DK, KNICKELBEIN JE, HENDRICKS RL. Herpes keratitis[J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2013, 32: 88-101.
- [5] RUSSELL AB, TRAPNELL C, BLOOM JD. Extreme heterogeneity of influenza virus infection in single cells[J]. *eLife*, 2018, 7: e32303.
- [6] DONE AJ, TRAUSTADÓTTIR T. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise[J]. *Redox Biology*, 2016, 10: 191-199.
- [7] ZHANG L, WANG J, WANG Z, LI Y, WANG H, LIU HT. Upregulation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) represses the replication of herpes simplex virus type 1[J]. *Virology Journal*, 2022, 19(1): 23.
- [8] WANG TT, HU LY, LI RB, REN HY, LI SW, SUN Q, DING XD, LI YB, WANG CF, LI LL. Hyperoside inhibits EHV-8 infection *via* alleviating oxidative stress and IFN production through activating JNK/Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathways[J]. *Journal of Virology*, 2024, 98(4): e0015924.
- [9] LIU LH, DU J, YANG SD, ZHENG BR, SHEN J, HUANG JC, CAO L, HUANG SY, LIU X, GUO LP, LI CM, KE CW, PENG XF, GUO DY, PENG H. SARS-CoV-2 ORF3a sensitizes cells to ferroptosis *via* Keap1-NRF2 axis[J]. *Redox Biology*, 2023, 63: 102752.
- [10] BURNS VE, KERPPOLA TK. Keap1 moderates the transcription of virus induced genes through G9a-GLP and NFκB p50 recruitment[J]. *Immunology*, 2022, 167(1): 105-121.
- [11] LI HM, DU LY, LI J, HUANG YM, LU CH, DENG TJ, YAN Y, JIN YL, WU W, GU JY, ZHOU JY. A previously unidentified circRNA inhibits virus replication by regulating the miR-24-3p/KEAP1 axis[J]. *PLoS Pathogens*, 2024, 20(12): e1012712.
- [12] HOU FJ, SUN ZY, DENG Y, CHEN SY, YANG XY, JI FY, ZHOU MH, REN KY, PAN DL. Interactome and ubiquitinome analyses identify functional targets of herpes simplex virus 1 infected cell protein 0[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 856471.
- [13] PFAFF F, GROTH M, SAUERBREI A, ZELL R. Genotyping of herpes simplex virus type 1 by whole-genome sequencing[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(10): 2732-2741.
- [14] TORMANEN K, MATUNDAN HH, WANG SH, JAGGI U, MOTT KR, GHIASI H. Small noncoding RNA (sncRNA1) within the latency-associated transcript modulates herpes simplex virus 1 virulence and the host immune response during acute but not latent infection[J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(7): e0005422.
- [15] MOI P, CHAN K, ASUNIS I, CAO A, KAN YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(21): 9926-9930.
- [16] MIRZAEI S, ZARRABI A, HASHEMI F, ZABOLIAN A, SALEKI H, AZAMI N, HAMZEHLU S, FARAHANI MV, HUSHMANDI K, ASHRAFIZADEH M, KHAN H, KUMAR AP. Nrf2 signaling pathway in chemoprotection and doxorubicin resistance: potential application in drug discovery[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(3): 349.
- [17] WU SB, WANG SS, LIN XM, YANG SM, BA XY, XIONG DL, XIAO LZ, LI RZ. Lanatoside C inhibits herpes simplex virus 1 replication by regulating NRF2 distribution within cells[J]. *Phytomedicine*, 2024, 124: 155308.
- [18] BOUTELL C, EVERETT RD. Regulation of alphaherpesvirus infections by the ICP0 family of proteins[J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94(Pt 3): 465-481.
- [19] ATANASIU D, SAW WT, COHEN GH, EISENBERG RJ. Cascade of events governing cell-cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins GD, gH/gL, and gB[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(23): 12292-12299.
- [20] ARIFFIANTO A, DENG L, ABE T, MATSUI C, ITO M, RYO A, ALY HH, WATASHI K, SUZUKI T, MIZOKAMI M, MATSUURA Y, SHOJI I. Oxidative stress sensor Keap1 recognizes HBx protein to activate the Nrf2/ARE signaling pathway, thereby inhibiting hepatitis B virus replication[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(10): e0128723.
- [21] EDWARDS MR, JOHNSON B, MIRE C, XU W, SHABMAN RS, SPELLER LN, LEUNG DW, GEISBERT TW, AMARASINGHE GK, BASLER CF. The Marburg virus VP24 protein interacts with Keap1 to activate the cytoprotective antioxidant response pathway[J]. *Cell Reports*, 2014, 6(6): 1017-1025.
- [22] XU XQ, XU TR, JI WT, WANG C, REN YJ, XIONG XB, ZHOU X, LIN SH, XU Y, QIU Y. Herpes simplex virus 1-induced ferroptosis contributes to viral encephalitis[J]. *mBio*, 2023, 14(1): e0237022.