EV71 非结构蛋白的结构和功能及其为靶点的药物研究进展

秦咸蕴[1,2], 林 霖[1,2], 杨 燕[2], 张书香[2], 孔建强[2], 程克棣[2],
赵云峰[1], 王 伟[2*]

(1. 曲阜师范大学生命科学学院, 山东 曲阜 273165; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 卫生部天然药物生物合成重点实验室、天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 近年肠道病毒 71 型 (EV71) 等引起的手足口病在中国大陆呈现上升的流行趋势, 其正链的 RNA 基因组翻译成一个多聚蛋白, 进一步自剪切为结构蛋白和非结构蛋白; 随着研究的深入, 非结构蛋白在病毒生命周期中的功能逐一被鉴定, 本文就 EV71 非结构蛋白的结构功能及针对这些靶点的抗病毒药物进行综述。

关键词: 肠道病毒 71 型; 非结构蛋白; 抗 EV71 药物

中图分类号: R963 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870 (2011) 07-0753-09

Advances in functional studies of nonstructural proteins and development of antiviral agents for enterovirus 71

QIN Xian-yun[1,2], LIN Lin[1,2], YANG Yan[2], ZHANG Shu-xiang[2], KONG Jian-qiang[2], CHENG Ke-di[2], ZHAO Yun-feng[1], WANG Wei[2*]

(*1. College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China; 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Key Laboratory of Biosynthesis of Natural Products, Ministry of Health of PRC; State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Beijing 100050, China*)

Abstract: Human enterovirus 71 (EV71) is one of the major etiological agents for the hand, foot, and month disease (HFMD) and is causing frequent, widespread occurrence in the mainland of China. The single positive-stranded RNA genome of EV71 is translated into a single polyprotein which is autocleavaged into structural and nonstructural proteins. The functions of many nonstructural proteins characterized in the life cycle of virus are potential targets for blocking viral replication. This article reviews the studies of the structures and functions of nonstructural proteins of EV71 and the anti-enterovirus 71 drugs targeting on these nonstructural proteins.

Key words: enterovirus 71; nonstructural protein; antiviral drugs against EV71

肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) 和柯萨奇病毒 A16 (coxackievirus A16, CA16) 是引起手足口病散发及暴发流行的两大主要病原体, EV71 更易导致严重的神经系统并发症如无菌性脑膜炎、脑干脑炎、脊髓灰质炎样麻痹和神经源性肺水肿等, 具有较高的病死率和致残率[1,2]。1969 年在美国加里福尼亚分离出 EV71[3], 目前在世界范围内呈周期性暴发或流行, 在亚太地区的流行也呈上升趋势, 近年来我国大陆与台湾均有 EV71 感染的报道[4−7]。国家卫生部已于 2008 年 5 月将手足口病列入传染病防治法规定的丙类传染病进行管理, 从 2006 年以来手足口病发病人数和死亡人数呈逐年上升趋势, 仅 2010 年度发病人数就高达 181 万病例, 远大于前 4 年发病人数的总和 (约 174 万); 同样死亡病例 888 例远超前 4 年死亡病例之和 (502 例)。基于对上述统计数据的分析, 如何防治 EV71 等病毒引起的手足口病是一个非常严

收稿日期: 2011-01-27.
基金项目: 国家科技重大专项综合平台炎症及免疫性疾病药效评价研究平台 (2009ZX09301-003-13).
*通讯作者 Tel: 86-10-63165196, Fax: 86-10-63017757, E-mail: wwang@imm.ac.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

峻的公共卫生问题, 倍受人们的关注。

EV71 的复制首先是病毒与受体结合, 有关受体的研究取得了突破性进展, 来自日本的 Koike 和 Shimizu 2 个研究组的最新研究成果表明 EV71 病毒可能依靠 2 种不同的受体感染不同种类的细胞, 即白细胞 (如T细胞) 上特异地表达P-选择素糖蛋白配体-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1) 和非白细胞 (如 RD 细胞) 表面特异地表达清道夫受体 B2 (human scavenger receptor class B, member 2, SCARB2; CD36b like-2)[8, 9]; 病毒颗粒与受体相互作用致使其空间构型改变, 丢失 VP4; 最终脱去病毒的外壳并释放病毒基因组 RNA 穿过细胞膜进入细胞质, 作为 mRNA 开始病毒多聚蛋白的翻译合成。病毒的繁殖复制需要利用宿主细胞的核糖体以及其他蛋白合成因子, 但是病毒产物构成的 RNA 合成系统是病毒复制中的关键。EV71 基因组为含有 7 408 个核苷酸的单股正链 RNA, 仅有 1 个开放阅读框 (ORF), 首先直接翻译出一个由 2 194 个氨基酸组成的多聚蛋白, 多聚蛋白在合成的同时, 不断被其自身的 2A 蛋白酶切割产生 P1、P2-P3 二个前体蛋白。P1 前体蛋白再经过一系列的加工, 最终形成 VP1、VP2、VP3 和 VP4 病毒外壳蛋白。P2-P3 前体蛋白被进一步切割形成非结构蛋白中间体, 进而形成成熟的非结构蛋白 (图 1)。病毒在翻译后期开始启动基因组 RNA 的复制, 加工成熟的外壳蛋白与复制的 RNA 包装, 产生成熟的病毒颗粒, 病毒引起宿主细胞的裂解导致子代病毒的释放。有关结构蛋白的功能及其在分子流行病学研究中的作用已有多篇文献进行了综述[10−12]。

病毒的非结构蛋白 (nonstructural protein, NS) 主要包括 P2 和 P3 前体蛋白, 分别被进一步加工形成 2A、2B、2C 和 3A、3B、3C、3D 等非结构蛋白, 它们不是病毒颗粒的构成部分, 但是在病毒侵染和复制过程中对病毒自身增殖发挥非常重要的作用。鉴于目前对 EV71 或其他小 RNA 病毒研究的深入, EV71 的各种非结构蛋白的功能也渐渐清晰, 本文就 EV71 非结构蛋白的结构功能及其为靶点的抗 EV71 药物进行了综述。

1 蛋白酶加工病毒多聚蛋白和影响细胞功能

EV71 的多聚蛋白要经过非结构蛋白的加工才能成为成熟的蛋白, 这主要由 2A 蛋白酶和 3C 蛋白酶来完成。EV71 的 2A 蛋白可以催化前体蛋白 P1 与 P2 之间肽键断裂, 完成对多聚蛋白的初级加工。对多聚蛋白的次级加工则主要由 3C 蛋白酶或 3CD 前体蛋白来完成。

1.1 2A 蛋白酶 EV71 的 2A 蛋白酶是一种半胱氨酸蛋白酶, 负责病毒翻译合成的多聚蛋白的剪切、诱导宿主细胞的凋亡, 并作为转录因子激活酵母基因的表达。EV71 2A 蛋白酶是多聚蛋白的初级加工酶, 含有 150 个氨基酸残基, 其中 His21、Asp39、Cys110 氨基酸残基位于 2A 蛋白酶催化活性中心; 以阜阳分离株为 EV71 (EU703812)[13]的多聚蛋白为例, 通过 blastp 对 GenBank 蛋白数据库中 123 条 EV71 多聚蛋白数据的比较, 结果表明 2A 蛋白酶理论上催化前体蛋白 P1 (VP1 的 C-末端) 与 P2 (2A 蛋白酶 N-末端) 之间的 Leu-Gly 肽键断裂[14]; 有关 2A 蛋白酶的功能活性研究源于鼻病毒 (rhinovirus) 多聚蛋白的加工过程, 剪切 Tyr-Gly 肽键, 其突变分析结果表明仅分支氨基酸 Val-Gly 或 Ile-Gly 不能剪切[15, 16]。此外, EV71 2A 蛋白酶还切割 3CD 产生 3C'和 3D'[17, 18]。

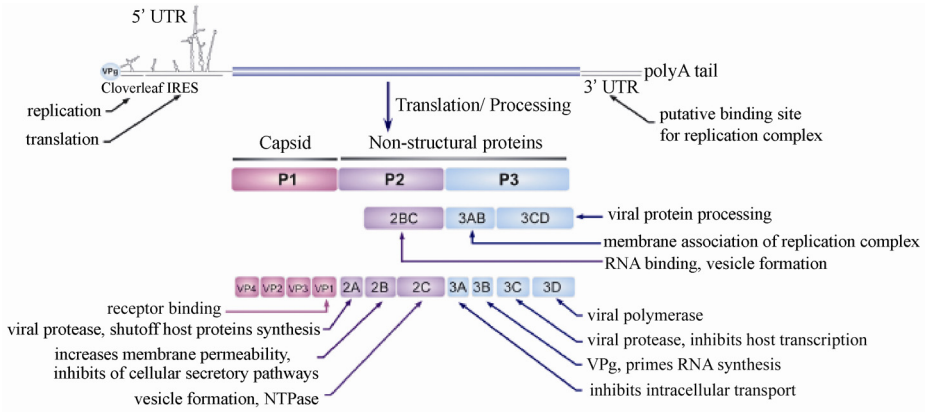


Figure 1 Scheme of the enterovirus genome, the polyprotein products and their major functions. A diagrammatic representation of the enterovirus genome is shown. The 11 mature polypeptides are shown, together with the three main cleavage intermediates. The main biological functions are included for each polypeptide. UTR: Untranslated region; IRES: Internal ribosome entry site; VPg: Viral protein genome-linked[19]

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

EV71 感染会引起宿主蛋白合成抑制和细胞凋亡, 主要通过肠道病毒 2A 蛋白酶切割宿主翻译起始因子 eIF4G1 和 DNA 修复酶 PARP [poly (ADP-ribose) polymerase] 诱导细胞凋亡; 其中 eIF4G1 是真核生物成熟 mRNA 帽结合复合体 (cap-binding complex eIF4F) 的亚单位, 促进 mRNA 和 40S 核糖体亚基的相互作用, 2A 蛋白酶剪切 eIF4G1 破坏翻译起始复合体的形成, 在翻译水平上抑制与宿主细胞生理活动相关蛋白因子的合成。EV71 2A 蛋白酶主要依赖 Caspase-3 活化和 DNA 修复酶 PARP 的剪切而诱导细胞凋亡[20]。

EV71 2A 蛋白酶在酵母细胞中呈现出转录因子活性且不依赖于蛋白酶活性, 而自身没有类似其他真核转录因子如 CTF/NF-1 富含 Q 区 (glutamine-rich domain)、亮氨酸拉链 (leucine zipper domain) 或 P 区 (proline-rich domain) 等结构域; 突变研究表明 N-端截短 40 个或 C-端截短 20 个氨基酸残基的突变体依然保持转录活性, 其中 C-端的酸性结构域 (acidic domain) 是转录活性所必需的, 缺失第 146～149 位氨基酸残基 (EAME) 的突变体丧失转录活性, 酸性结构域是病毒 RNA 复制所必需的[21]。

1.2 3C 蛋白酶 EV71 3C 蛋白酶是催化病毒前体蛋白裂解并形成成熟的结构蛋白、非结构蛋白的主要蛋白酶。它是集丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶特性为一体的一种半胱氨酸蛋白酶, 含有 183 个氨基酸, 其三维晶体结构与其他小 RNA 病毒 3C 蛋白酶的折叠一样, 含有两个通过一个小的连接子连接的 β-折叠桶结构, 且每个 β-折叠桶由 6 个 β-折叠片层组成; 两个 β-折叠桶之间形成一条狭窄的裂隙是催化底物的结合部位[22]。3C 蛋白酶催化活性位点为 His40、Glu71 和 Cys147, 专一性切割 Gln-Gly (或者 Gln-Ser) 位点[5]。切割位点两端多富含促使螺旋断开的氨基酸残基如 Pro、Thr, 但没有保守的结构域。3C 蛋白酶在病毒复制过程中起到非常重要的作用, 首先自身从 P3 前体蛋白切割下来, 然后在 P2、P3 前体蛋白之间进行重要的加工处理, 切割产生病毒蛋白。此外, 其前体蛋白 3CD 也发挥蛋白酶活性; 3C 蛋白酶可以通过其前体 3CD' 和 3CD 入核, 其核定位信号 (NLS) 位于第 126～129 位“KKKRD”, 3C 蛋白酶以其前体形式 3CD 进入细胞核, 然后自剪切形成 3C 蛋白酶, 进而剪切核内的转录因子如“TATA-盒”结合蛋白 (TATA-box binding protein, TBP)、转录因子 P53、组蛋白 H3、转录因子 III C 和 pre-mRNA 切割刺激因子 (cleavage stimulation factor) CstF-64 等, 在宿主 pre-mRNA 加工和多聚腺苷酸化步骤抑制基因表达, 导致宿主细胞的转录水平下降[19, 23, 24]。

3C 蛋白酶具有 RNA 结合活性, 其中第 82～86 位的“KFRDI”和第 154～156 位的“VGK”是 RNA 的结合区[25]。研究发现 3C 蛋白酶与 RNA 结合位置上序列的改变会影响 3C 蛋白酶活性, 而催化位置上的突变, 却不会改变 3C 蛋白的 RNA 结合能力。利用 pEV71 感染性克隆 (pEV71 infectious clone) 在 KFKl 序列与 VGK 序列突变型的转录体 (transcript), 探讨 RNA 结合能力对病毒复制的影响, 发现具有 RNA 结合能力的 3C 蛋白突变型亦能够合成负链 RNA, 表明 3C 蛋白的 RNA 结合能力与病毒 RNA 的复制有着密切的关系[25]。

被病毒感染的细胞凋亡是宿主的一种重要的防御机制, 可抑制病毒的复制和子代病毒的转移。研究表明 3C 蛋白酶通过剪切 DNA 修复酶 PARP (poly (ADP-ribose) polymerase), 激活 caspase, 进而诱导细胞凋亡[26]。

2 非结构蛋白诱导被感染细胞的生化和内膜结构的改变

2.1 2B 蛋白 EV71 的 2B 蛋白含有 99 个氨基酸残基, 属于病毒离子孔道蛋白 (viroporin), 可能与其他小 RNA 病毒一样具有破坏细胞器膜的完整性和提高其通透性的功能。2B 蛋白包含 2 个穿膜结构域 (transmembrane domain, TMD), 其中 N-端第 32～55 位为富含碱性氨基酸残基的双亲性螺旋和 C-端第 61～81 位为疏水螺旋, 单体分子形成一个“螺旋–环–螺旋 (α-loop-α)”发夹结构, 在磷脂双层膜上形成一个四聚体水孔。因此, 在病毒感染后期宿主细胞内膜通透性增强, 可以改变细胞器膜通透性, 降低在内质网、高尔基体、线粒体之间的 Ca^{2+}信号水平, 抑制 Ca^{2+} 介导的细胞凋亡通路, 确保病毒复制正常进行[27−30]。最近台湾大学临床医学研究所黄立民研究组利用 yeast two-hybrid 证明了 EV71 2B 蛋白与髓样细胞白血病-1 (myeloid cell leukemia-1, Mcl-1) 之间的相互作用, 2B 蛋白影响 Mcl-1 的泛素化 (polyubquitinated) 而调控 Mcl-1 的表达量。Mcl-1 的增加导致细胞凋亡减少, 说明 2B 蛋白调控宿主细胞凋亡反应。

2.2 2C 蛋白 2C 蛋白可以重排宿主细胞的膜蛋白, 形成病毒复制复合体。2C 蛋白是小 RNA 病毒 (picornaviruses) 中最保守的非结构蛋白之一, 含有 329 个氨基酸残基; N-端的第 5～43 位的氨基酸残基具有潜在的膜结合活性, 结合和重排宿主细胞的膜蛋白, 参与病毒复制复合体的形成。Tang 等[31]研究

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

发现内质网膜蛋白 3 (reticulon 3, RTN3) 首先与 2C 蛋白作用, 然后结合病毒 dsRNA 进而形成病毒复制复合体。通过对 I25 突变分析研究, 证实了 EV71 通过 2C 蛋白 N-端的膜结合区与 RTN3 的内质网蛋白同源区 (reticulon homology domain, RHD) 相互作用。

3 非结构蛋白参与病毒 RNA 的复制

病毒的前体蛋白 P3 由 3C 蛋白酶剪切形成 3D 聚合酶、膜结合蛋白 3A、病毒 RNA 末端结合蛋白 VPg、3C 蛋白酶及 2 个多功能前体蛋白 3AB 和 3CD。

3.1 3A/3AB 蛋白 EV71 3A 蛋白含有 86 个氨基酸残基, 它是一个膜结合蛋白, 在病毒感染过程中抑制宿主细胞蛋白的分泌和从内质网至高尔基体的顺序转运, 从而降低干扰素-β (interferon-β)、IL-6、IL-8 和被感染细胞膜上的 MHC I 抗原和 TNF 受体的表达[32]。3A 蛋白 N-端为一个富含脯氨酸的结构域, 可能参与蛋白−蛋白的相互作用, 它是抑制从内质网至高尔基体的顺序转运所必需的功能域[33]。

3AB 是一个多功能蛋白, 其疏水的 3A 蛋白结构域具有锚定病毒复制复合体到膜泡的作用, 也能与 3CD 直接作用并激活其蛋白酶活性; 稳定 RNA 复制复合体上的 3D 聚合酶, 参与形成 RNA 复制复合体; 3AB 是细胞内 3D 聚合酶催化 VPg (3B) 尿苷酸化的底物[24]。Gangaramani 等[34]报道了脊髓灰质炎病毒 (poliovirus) 的 3AB 具有核酸分子伴侣活性, 通过突变研究表明其 C-端的 22 个氨基酸残基 (VPg, 3B) 是保持分子伴侣活性必需的, 3A 蛋白最后的 7 个氨基酸残基和 3B (即 3B+7) 是 3AB 内在的分子伴侣活性位点。

3.2 3B 蛋白 3B 蛋白通常又称为 VPg, 含有 22 个氨基酸残基, 与病毒 RNA 5'末端结合; 其 Y3 绝对保守, 它是 VPg 尿苷酸化和病毒负链 RNA 复制必需的功能氨基酸残基; 中心位置含有 3 个赖氨酸和 1 个精氨酸残基; VPg 被 3D 聚合酶催化尿苷酸化后作为病毒 RNA 合成的引物[35]。

3.3 3CD/3D 蛋白 3CD 蛋白是成熟的 3C 蛋白酶和 3D 聚合酶的前体, 具有蛋白酶活性而不具有聚合酶活性。3CD 能与病毒 RNA 5'-端三叶草结构 (cloverleaf) 的茎环 I、3' UTR、顺式作用复制元件 (*cis*-acting replication element, cre) 结合。其中 cre 是一个小的 RNA 发夹 (RNA hairpin) 且位于 2C 蛋白的编码区, 它是病毒正链 RNA 合成必需的元件; Cre (2C) 保守元件“AAACA”中起始的 2 个保守的“A”是 3D 催化 VPg 合成尿苷酸化 VPgPU 和 VPgpUpU 的模板。脊髓灰质炎病毒 (PV) 是研究正链 RNA 病毒复制的模式病毒, Murray 等提出了病毒 RNA 不对称复制的 4 步反应模型: ① 负链 RNA 起始复制; ② VPg 尿苷酸化起始; ③ VPg 尿苷酸化终止; ④ 正链 RNA 复制。首先 VPg 与结合病毒 RNA 5'和 3'的核糖核蛋白、2C、3AB 和 3CD 协同作用形成起始负链 RNA 复制的蛋白复合体, 负链 RNA 开始复制, 3D 聚合酶催化负链 RNA 延伸, 随后 3D 聚合酶破坏 3'-端的核糖核蛋白复合体, 阻止重复启动负链 RNA 的复制。随着负链 RNA 的延伸, 3'-端解离的核糖核蛋白复合体重新形成 5'-端核糖核蛋白复合体并与位于 cre 的核糖核蛋白复合体 (包括 3CD) 相互作用, VPg 尿苷酸化开始; 随着负链 RNA 继续延伸, 模板 RNA 的结构发生变化, 3D 聚合酶促使包含三叶草结构、cre 和 3CD 的核糖核蛋白复合体解离, VPg 尿苷酸化终止; VPgpUpU 与负链 RNA 5'-端的 2 个“A”碱基配对作为引物起始正链 RNA 的合成[36, 37]。其中 3CD 蛋白切割结合于膜的 3AB 产生 VPg 和 3A, 促进 3D/VPg 与模板的结合和/或稳定 RNA 结构, 促进 VPg 的尿苷酸化[37, 38]。EV71 2C 蛋白编码区与其他小 RNA 病毒一样也具有一个保守的 cre (2C) RNA 元件, 已有文献对小 RNA 病毒的复制进行了综述[39, 40], 但 EV71 的 RNA 复制机制还有待进一步确定。

EV71 3D 蛋白含有 462 个氨基酸残基, 它是一个依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp), 与其他正链 RNA 病毒的复制酶结构相似, 含有 A、B、C、D、E、F 6 个保守的基序 (motif), 而基序 C 含有体现 RdRp 功能特征的 GDD 保守序列; 其晶体结构呈一只由手指、手掌和拇指等结构域组成的闭合的“右手”, 其中食指 (S16-T21)、环指 (S155-E158, R174-A178)、小指 (H113-L130) 形成与单链模板 RNA 结合的孔道并向位于手掌结构域的活性位点延伸, 而引物链与拇指结构域相作用[41]。EV71 3D 蛋白是特异性依赖于 Mn^{2+}的聚合酶, 在 Mg^{2+}存在条件下完全没有活性。体外转录活性研究结果表明, EV71 3D 可以利用双核苷酸和十核苷酸 RNA 作为引物, 以 poly (C) 和基因组 RNA 为模板从头起始转录, DNA 引物如寡聚 dT_{15} 可以增强其转录活性[42]。

4 作用于病毒 EV71 非结构蛋白的抗病毒药物 (表 1)

EV71 的生命周期包括病毒吸附、脱衣壳、RNA 翻译、多聚蛋白的剪切、RNA 复制、病毒颗粒的组装和释放等环节, 参与这些生命过程的功能蛋白都可以作为药物靶点研制抗病毒药物。目前, 针对在

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

EV71 侵染阶段发挥重要作用的结构蛋白 VP1 设计合成了 pyridyl imidazolidinones 和 pyridazinyl oxime ethers 类化合物[43, 44], 这类药物与 VP1 的疏水口袋相互作用, 抑制其与受体结合。结构蛋白 VP1 变异快, 使得抗 EV71 的药物研究和疫苗的制备更加困难; 而非结构蛋白因其结构保守, 且在病毒的复制过程中起关键作用, 所以一直是抗病毒药物作用靶点的重要选择。目前, 作为抗 EV71 药物靶点研究较多的非结构蛋白主要有 3A、2A 蛋白酶、3C 蛋白酶和 3D 聚合酶。

4.1 作用于病毒复制复合体骨架蛋白的抗病毒药物 3A 蛋白是小 RNA 病毒中最为保守的和参与病毒复制复合体形成的骨架蛋白, Enviroxime 是苯并咪唑 (benzimidazole) 的衍生物, 作用于 EV71 3A 或 3AB, 抑制病毒复制体的形成, 进而抑制病毒 RNA 的复制; GW5074 是一个作用于 3A 蛋白的细胞激酶 (Raf-1) 抑制剂; 化合物 AN-12-H5 结构类似于 enviroxime, 同时能与结构蛋白 VP1 相互作用, 它是一类作用于 EV71 早期侵染和复制阶段的双功能抑制剂[45−48]。

4.2 具有抑制病毒蛋白酶活性的抗病毒药物 病毒非结构蛋白 2A 和 3C 加工病毒多聚蛋白形成成熟的结构蛋白和非结构蛋白, 目前已鉴定靶向 2A 蛋白酶的酰化剂如碘乙酰胺 (iodoacetamide)、马来酰亚胺 (*N*-ethylmaleimide) 等能够降低脊髓灰质炎病毒 2A 蛋白酶活性; Caspase 抑制剂如 zVAD-fmk、zIETD.fmk 可抑制鼻病毒 (HRV) 和柯萨奇病毒 (CVB4) 的 2A 蛋白酶, 而作用于 EV71 2A 蛋白酶的化合物尚没有报道[49]。

3C 蛋白酶抑制剂是基于该酶剪切多肽底物肽键的过渡态 (P1−P1') 设计合成的不可逆小分子抑制剂, 如 AG7088 (rupintrivir) 可有效地抑制鼻病毒的 3C 蛋白酶活性, 临床研究结果表明它是最有前景的抗小 RNA 病毒的化合物, 其构效关系研究结果表明, AG7088 的 P3 基团用肉桂酰基衍生物通过酰胺键直接与 P2 基团连接, 同时在 P1'引入醛基后合成的衍生物, 体外抑制 EV71 3C 蛋白酶活性 EC_{50} 为 18 nmol·L^{-1}, 没有明显的细胞毒性[50, 51]; 以 EV71 3C 蛋白酶建立的筛选方法可以筛选抗 EV71 的 3C 蛋白酶抑制剂[52]。本研究组把 GAL4 转录因子 DNA 结合结构域和转录激活结构域分别融合到含有 3C 蛋白酶 3 个切割位点的 Δ3A-3B-3C-Δ3D 多肽片段的 N-端和 C-端构建表达载体, 转化酵母细胞建立逆向双杂交模型, 采用固体平板培养的方法初步评价了 46 种中成药, 筛选得到 18 种具有抑制活性的中药, 例如热毒宁注射液具有 3C 蛋白酶抑制活性与其治疗手足口病的临床疗效相符[53]。

4.3 3D 聚合酶的抑制剂 EV71 3D 聚合酶是参与病毒 RNA 复制的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶, 利用此靶点设计了新的抗 EV71 药物 DTriP-22, 作用于 3D 聚合酶的位点是 R163, 比较分析了肠道病毒属 136 株病毒, 结果表明 R163 极为保守, 其晶体结构研究结果表明 R163 残基位于其右手结构 (right-hand) 的环指 (ring finger) 结构域, 此结构域包含有保守的碱性氨基酸残基 R163、K167 和 R174, 这些碱性氨基酸残基与在 RNA 复制过程中即将参入的核苷三磷酸相互作用。DTriP-22 是通过阻止核苷酸进入 3D 的空穴结构而抑制 RNA 链的延伸, 在感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 1 GFU/cell 时, 其 EC_{50} 为 0.16 μmol·L^{-1}, 细胞毒性 CC_{50} 大于 100 μmol·L^{-1} [54]。最近 Hung 等[55]研究发现金黄三羧酸 (aurintricarboxylic acid, ATA) 通过抑制 3D 聚合酶的延伸活性来抑制病毒 EV71 的复制, 其抑制细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) EC_{50} 为 2.9 μmol·L^{-1}, CC_{50} 大于 211 μmol·L^{-1}。

除上述作用机制明确的抗 EV71 药物分子外, Chern 等[56]还设计合成了具有抗 EV71 的化合物 pyrazolo [3, 4-d] pyrimidines, 其 EC_{50} 为 0.32～65 μmol·L^{-1}, CC_{50} 大于 25 μmol·L^{-1}。天然药物也显示了广谱的抗病毒活性, 如从植物 (*Raoulia australis*) 提取分离的 raoulic acid 具有抗 EV71 活性, 其 EC_{50} 小于 0.1 μg·mL^{-1} [57]。尽管文献报道了上述众多的具有抗 EV71 活性的药物分子, 但目前也仅限于体外细胞水平的评价, 能否作为先导物分子, 是否能发展成抗 EV71 的药物, 还需要更深入的研究。

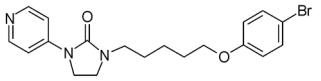
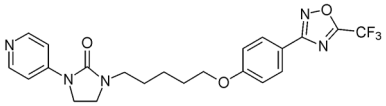
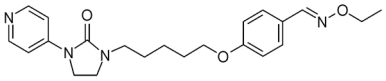
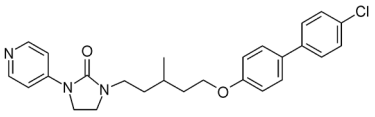
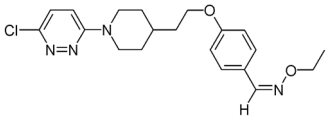
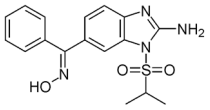
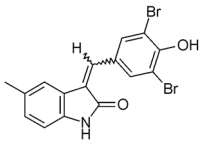
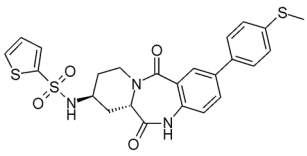
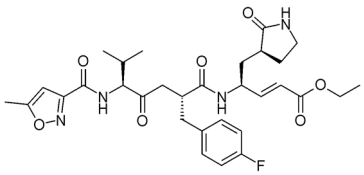
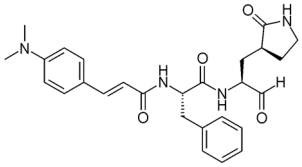
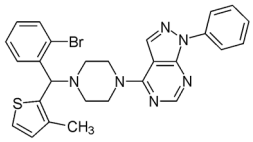
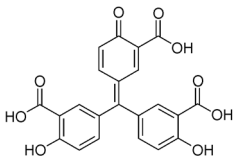
5 小结

EV71 编码的结构蛋白和非结构蛋白参与了包括 IRES 介导的翻译、RNA 复制等生命周期的活动, 而宿主细胞的多种蛋白因子也参与了病毒复制过程中 RNA-蛋白质和蛋白质−蛋白质之间的相互作用, 但其作用机制仍不清楚; 尤其是病毒嗜神经组织专一性的毒力因子依然没有被阐明, 还有待更深入的研究。

尽管针对病毒复制过程中的不同靶点设计合成了许多抗病毒药物, 已有文献对其进行了详细的综述分析[49, 58, 59], 但设计作用于不同靶点的活性高、毒性低的抗病毒新药, 同时对现存的抗病毒药物进行修饰, 二者相结合是快速研制更有效的新型的抗 EV71 药物的重要举措; 而且以具有临床疗效的中药

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Table 1 Anti-EV71 activity of select compounds. N/R, not reported

Inhibitor	Structure	EC_{50}/μmol·L^{-1}	CC_{50}/μmol·L^{-1}	References
Capsid-binding				
BPROZ-194		1.552	>50	[43]
BPROZ-299		0.021	>50	[43]
BPROZ-101		0.001 2	>50	[43]
BPROZ-033		0.008 8	>50	[43]
BTA39		0.001	>4.588	[44]
3A inhibitor				
Enviroxime		0.15	N/R	[47]
GW5074		6.4	96	[46]
AN-12-H5		0.55	78	[48]
3C inhibitor				
Rupintrivir		0.8	N/R	[51]
Compound 10b		0.018	>25	[50]
3D inhibitor				
DTriP22		0.15	>100	[54]
Aurintricarboxylic acid		2.9	211	[55]

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为基础, 建立新型的药物筛选模型, 可以大大地加速抗 EV71 药物的研发进程。由于病毒自身具有高突变率, 常导致耐药毒株的出现。因此, 临床治疗可采用类似于抗 HIV 的“鸡尾酒”疗法, 使用作用于病毒复制不同环节的药物进行复合治疗, 结合其他潜在靶点的深入研究, 有希望最终解决抗手足口病的难题。

References

[1] McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance [J]. FEMS Microbiol Rev, 2002, 26: 91−107.

[2] Weng KF, Chen LL, Huang PN, et al. Neural pathogenesis of enterovirus 71 infection [J]. Microbes Infect, 2010, 12: 505−510.

[3] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system [J]. J Infect Dis, 1974, 129: 304−309.

[4] Chen KT, Chang HL, Wang ST, et al. Epidemiologic features of hand-foot-mouth disease and herpangina caused by enterovirus 71 in Taiwan, 1998-2005 [J]. Pediatrics, 2007, 120: e244−252.

[5] Qiu J. Enterovirus 71 infection: a new threat to global public health [J]. Lancet Neurol, 2008, 7: 868−869.

[6] Wong SS, Yip CC, Lau SK, et al. Human enterovirus 71 and hand, foot and mouth disease [J]. Epidemiol Infect, 2010, 138: 1071−1089.

[7] Mao LX, Wu B, Bao WX, et al. Epidemiology of hand, foot, and mouth disease and genotype characterization of enterovirus 71 in Jiangsu, China [J]. J Clin Virol, 2010, 49: 100−104.

[8] Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71 [J]. Nat Med, 2009, 15: 798−801.

[9] Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, et al. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71 [J]. Nat Med, 2009, 15: 794−797.

[10] Tian B, Duan HS, Rong YB, et al. Progress of research on molecular epidemiology of enterovirus 71 [J]. Virol Sin (中国病毒学), 2004, 19: 426−429.

[11] Lu YH, Jiang QW. EV71 and hand, foot and mouth disease [J]. Chin J Dis Control Prev (中华疾病控制杂志), 2008, 12: 183−187.

[12] Ge XQ, Li HJ. Biological characteristics and research progress of enterovirus 71 [J]. Int J Biologicals (国际生物制品学杂志), 2010, 33: 85−88.

[13] Zhang Y, Zhu Z, Yang W, et al. An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of hand foot and mouth disease in Fuyang city of China [J]. Virol J, 2010, 7: 94−103.

[14] Hsu YY, Liu YN, Wang W, et al. *In vivo* dynamics of enterovirus protease revealed by fluorescence resonance emission transfer (FRET) based on a novel FRET pair [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353: 939−945.

[15] Sousa C, Schmid EM, Skern T. Defining residues involved in human rhinovirus 2A proteinase substrate recognition [J]. FEBS Lett, 2006, 580: 5713−5717.

[16] Skern T, Sommergruber W, Auer H, et al. Substrate requirements of a human rhinoviral 2A proteinase [J]. Virology, 1991, 181: 46−54.

[17] Ventoso I, Carrasco L. A poliovirus 2A(pro) mutant unable to cleave 3CD shows inefficient viral protein synthesis and transactivation defects [J]. J Virol, 2003, 69: 6280−6288.

[18] Hellen CU, Lee CK, Wimmer E. Determinants of substrate recognition by poliovirus 2A proteinase [J]. J Virol, 1992, 66: 3330−3338.

[19] Lin JY, Chen TC, Weng KF, et al. Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle [J]. J Biomed Sci, 2009, 16: 103−116.

[20] Kuo RL, Kung SH, Hsu YY, et al. Infection with enterovirus 71 or expression of its 2A protease induces apoptotic cell death [J]. J Gen Virol, 2002, 83: 1367−1376.

[21] Yang CH, Li HC, Jiang JG, et al. Enterovirus type 71 2A protease functions as a transcriptional activator in yeast [J]. J Biomed Sci, 2010, 4: 17−65.

[22] Cui S, Wang J, Fan T, et al. Crystal structure of human enterovirus 71 3C protease [J]. J Mol Biol, 2011, 408: 449−461.

[23] Sharma R, Raychaudhuri S, Dasgupta A. Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off [J]. Virology, 2004, 320: 195−205.

[24] Weng KF, Li ML, Hung CT, et al. Enterovirus 71 3C protease cleaves a novel target CstF-64 and inhibits cellular polyadenylation [J]. PLoS Pathog, 2009, 5: 1−13.

[25] Shih SR, Chiang C, Chen TC, et al. Mutations at KFRDI and VGK domains of enterovirus 71 3C protease affect its RNA binding and proteolytic activities [J]. J Biomed Sci, 2004, 11: 239−248.

[26] Kuo RL, Li ML, Hsu TA, et al. The 3C protease activity of enterovirus 71 induces human neural cell apoptosis [J]. Virology, 2002, 293: 386−395.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[27] Agirre A, Barco A, Carrasco L, et al. Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein [J]. Biol Chem, 2002, 277: 40434−40441.

[28] Campanella M, de Jong AS, Lanke KW, et al. The coxsackievirus 2B protein suppresses apoptotic host cell responses by manipulating intracellular Ca^{2+} homeostasis [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 18440−18450.

[29] Madan V, Sánchez-Martínez S, Vedovato N, et al. Plasma membrane-porating domain in poliovirus 2B protein. A short peptide mimics viroporin activity [J]. J Mol Biol, 2007, 374: 951−964.

[30] De Jong AS, de Mattia F, Van Dommelen MM. Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking [J]. J Virol, 2008, 82: 3782−3790.

[31] Tang WF, Yang SY, Wu BW, et al. Reticulon 3 binds the 2C protein of enterovirus 71 and is required for viral replication [J]. J Biol Chem, 2007, 282: 5888−5898.

[32] Choe SS, Dodd DA, Kirkegaard K. Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins [J]. Virology, 2005, 337: 18−29.

[33] Wessels E, Duijsings D, Notebaart RA, et al. A proline-rich region in the coxsackievirus 3A protein is required for the protein to inhibit endoplasmic reticulum-to-golgi transport [J]. J Virol, 2005, 79: 5163−5173.

[34] Gangaramani DR, Eden EL, Shah M, et al. The twenty-nine amino acid C-terminal cytoplasmic domain of poliovirus 3AB is critical for nucleic acid chaperone activity [J]. RNA Biol, 2010, 7: 120−119.

[35] Paul AV, Yin J, Mugavero J, et al. A “slide-back” mechanism for the initiation of protein-primed RNA synthesis by the RNA olymerase of poliovirus [J]. J Biol Chem, 2003, 278: 43951−43960.

[36] Paul AV, Rieder E, Kim DW, et al. Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the *in vitro* uridylylation of VPg [J]. J Virol, 2000, 74: 10359−10370.

[37] Murray KE, Barton DJ. Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis [J]. J Virol, 2003, 77: 4739−4750.

[38] Morasco BJ, Sharma N, Parilla J, et al. Poliovirus cre (2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive - but not negative-strand RNA synthesis [J]. J Virol, 2003, 77: 5136−5144.

[39] Jiang MG, Xin AG, Yang LF. Advance in regulation of picornavirus gene expression [J]. Prog Vet Med (动物医学进展), 2006, 27: 54−58.

[40] Wang YJ, Zhang CY, Xiao M. Replication of plus-strand RNA viral genome [J]. J Henan Norm Univ (Nat sci) (河南师范大学学报 自然科学版), 2007, 35: 126−131.

[41] Wu Y, Lou Z, Miao Y, et al. Structures of EV71 RNA-dependent RNA polymerase in complex with substrate and analogue provide a drug target against the hand-foot-and-mouth disease pandemic in China [J]. Protein Cell, 2010, 1: 491−500.

[42] Jiang H, Weng L, Zhang N, et al. Biochemical characterization of enterovirus 71 3D RNA polymerase [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1809: 211−219.

[43] Chen TC, Liu SC, Huang PN, et al. Antiviral activity of pyridyl imidazolidinones against enterovirus 71 variants [J]. J Biomed Sci, 2008, 15: 291−300.

[44] Barnard DL, Hubbard VD, Smee DF, et al. *In vitro* activity of expanded-spectrum pyridazinyl oxime ethers related to pirodavir: novel capsid-binding inhibitors with potent antipicornavirus activity [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48: 1766−1772.

[45] Heinz BA, Vance LM. The antiviral compound enviroxime targets the 3A coding region of rhinovirus and poliovirus [J]. J Virol, 1995, 69: 4189−4197.

[46] Arita M, Wakita T, Shimizu H. Cellular kinase inhibitors that suppress enterovirus replication have a conserved target in viral protein 3A similar to that of enviroxime [J]. J Gen Virol, 2009, 90: 1869−1879.

[47] De Palma AM, Thibaut HJ, van der Linden L, et al. Mutations in the nonstructural protein 3A confer resistance to the novel enterovirus replication inhibitor TTP-8307 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53: 1850−1857.

[48] Arita M, Takebe Y, Wakita T, et al. A bifunctional anti-enterovirus compound that inhibits replication and the early stage of enterovirus 71 infection [J]. J Gen Virol, 2010, 91: 2734−2744.

[49] Chen TC, Weng KF, Chang SC, et al. Development of antiviral agents for enteroviruses [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 62: 1169−1173.

[50] Kuo CJ, Shie JJ, Fang JM, et al. Design, synthesis, and evaluation of 3C protease inhibitors as anti-enterovirus 71 agents [J]. Bioorg Med Chem, 2008, 16: 7388−7398.

[51] Tsai MT, Cheng YH, Liu YN, et al. Real-time monitoring of human enterovirus (HEV)-infected cells and anti-HEV 3C protease potency by fluorescence resonance energy transfer [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53: 748−755.

[52] Lee JC, Shih SR, Chang TY, et al. A mammalian cell-based

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

reverse two-hybrid system for functional analysis of 3C viral protease of human enterovirus 71 [J]. Anal Biochem, 2008, 375: 115−123.

[53] Li Y, Feng JH. Effective analysis of treating HFMD with Redu Ning injection [J]. Clin J Chin Med (中医临床研究), 2010, 2: 25−27.

[54] Chen TC, Chang HY, Lin PF, et al. Novel antiviral agent DTriP-22 targets RNA-dependent RNA polymerase of enterovirus 71 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53: 2740−2747.

[55] Hung HC, Chen TC, Fang MY, et al. Inhibition of enterovirus 71 replication and the viral 3D polymerase by aurintricarboxylic acid [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65: 676−683.

[56] Chern JH, Shia KS, Hsu TA, et al. Design, synthesis, and structure-activity relationships of pyrazolo[3, 4-d]pyrimidines: a novel class of potent enterovirus inhibitors [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2004, 14: 2519−2525.

[57] Choi HJ, Lim CH, Song JH, et al. Antiviral activity of raoulic acid from *Raoulia australis* against Picornaviruses [J]. Phytomedicine, 2009, 16: 35−39.

[58] Wu KX, Ng MM, Chu JJ. Developments towards antiviral therapies against enterovirus 71 [J]. Drug Discov Today, 2010, 15: 1041−1051.

[59] De Palma AM, Vliegen I, De Clercq E, et al. Selective inhibitors of picornavirus replication [J]. Med Res Rev, 2008, 28: 823−884.

欢迎订阅 2012 年《药学学报》

《药学学报》（CN: 11-2163/R, ISSN: 0513-4870）是由中国药学会主办、中国医学科学院药物研究所承办、国内外公开发行的药学综合性学术期刊。辟有栏目：述评和综述、研究论文、研究简报、学术动态。本刊自 1953 年创刊以来，一直报道药学领域原始性、创新性科研成果，旨在促进国内外学术交流。刊登论文内容包括药理学、合成药物化学、天然药物化学、药物分析学、药剂学、生药学等。

《药学学报》为我国自然科学核心期刊，据中国科学引文数据库的数据统计，在中国科技核心期刊排行表中，《药学学报》名列前茅，在药学类期刊中居首位；本刊已被世界主要检索系统收录，为我国药学界高水平的学术刊物，在国际上享有一定知名度。本刊 1999 年荣获首届“国家期刊奖”，2001 年入选中国期刊方阵“双高”（高知名度、高学术水平）期刊；2002 年被评为第二届“国家期刊奖百种重点科技期刊”，并荣获第三届“中国科技优秀期刊奖”二等奖；2002～2009 年连续 8 届荣获“百种中国杰出学术期刊”称号；2008～2010 年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助（B 类）；2011 年荣获第二届中国出版政府奖期刊奖提名奖。

本刊为 128 页，月刊，大 16 开本。每期定价 40 元，全年定价 480 元。国内邮发代码：2-233，国外代码：M105。欢迎广大作者踊跃投稿，欢迎广大读者订阅。可采用的订阅方式如下：

• 通过当地邮局；

• 通过 E-mail (yxxb@imm.ac.cn) 或从网上 (www.yxxb.com.cn) 下载订阅单，填好后寄至编辑部；

• 通过本刊编辑部，联系人：李淑芬、张晓晔

电话：86-10-63165208，传真：86-10-63026192

编辑部地址：北京市先农坛街 1 号《药学学报》编辑部

邮编：100050

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net