

文章编号: 1004-0374(2012)01-0043-07

## 肠道病毒71型的功能基因组学研究进展

高爽, 龙健儿\*

(复旦大学上海医学院病原生物学系, 上海 200032)

**摘要:** 肠道病毒 71 型 (enterovirus type 71, EV71) 感染通常引起婴幼儿手足口病 (hand, foot and mouth disease, HFMD), 但少数可引起无菌性脑膜炎 (aseptic meningitis)、脑炎 (encephalitis) 和类脊髓灰质炎的麻痹性疾病 (poliomyelitis-like paralysis) 等严重的神经系统疾病。功能基因组学研究对于探讨 EV71 的感染及复制过程、药物及疫苗的研制具有重大意义。该文就 EV71 的基因组结构及其功能的研究进展作简要的概述。

**关键词:** EV71; 病毒复制; 基因组功能

**中图分类号:** R373.2; Q789 **文献标志码:** A

## Progress in the functional genomics researches on human enterovirus 71

GAO Shuang, LONG Jian-Er\*

(Department of Medical Microbiology and Parasitology, Shanghai Medical College of Fudan University, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** Enterovirus 71 (EV71) is the main causative agent of hand, foot and mouth disease (HFMD) in infant, also has been associated with neurological diseases including aseptic meningitis, brain stem encephalitis and poliomyelitis-like paralysis. Here we focus on the progress in the research on EV71 genomic structure and function. Knowledge on EV71 functional genomics would be great helpful to development of antiviral drugs and vaccines.

**Key words:** EV71; virus replication; functional genomics

肠道病毒属于小 RNA 病毒科 (Picornaviridae), 分为肠道病毒 A (human enterovirus A, HEV-A)、B (HEV-B)、C (HEV-C)、D (HEV-D) 等 4 种类型。HEV-A 除包括肠道病毒 71 型 (enterovirus type 71, EV71) 外, 还包括柯萨奇病毒 A 型 (coxsackie A virus, CAV) 2、8、10、12、14、16 型, EV76, EV89~92; HEV-B 主要包括 CAV9、CBV1-6、埃可病毒 (echovirus)、EV73~75 等; HEV-C 包括 CAV1、11、13、17、19~22, 脊髓灰质炎病毒 (poliovirus, PV) 1~3, EV95~96, EV104~105 等; HEV-D 包括 EV68、70、94<sup>[1]</sup>。EV71 自 1969 年首次被报道以来, 已经引发全球范围内的 10 多次爆发与流行<sup>[2]</sup>。EV71 感染主要引起患者手足口病, 还能引起无菌性脑膜炎、脑干脑炎和脊髓灰质炎样的麻痹等多种与神经系统相关的疾病。目前, 人类是该病毒唯一已知的自然宿主, 主要通过粪口传播, 还可通过飞沫传播, 且 10 岁以下儿童为主要易感人群, 其他则以隐性感染为主。根据

VP1 的序列差异, 主要将 EV71 分为 A、B、C 3 个基因型。B 和 C 型各包括 5 个亚型, 分别为 B1~B5 和 C1~C5<sup>[2-3]</sup>。目前, 尚无有效的疫苗能够预防 EV71 的感染, 临床上也缺乏特异高效的抗病毒药物, 只能以对症支持治疗为主<sup>[4-5]</sup>。EV71 的基础研究主要包括病毒基因组的结构与功能, 目前 EV71 基因组功能学研究主要来源于肠道病毒其他类型, 如 PV 等。本文以 EV71 基因组的一些重要功能区域在病毒复制过程中的作用进行综述。

### 1 EV71 的基因组结构特征及其复制过程

EV71 的基因组为约 7.4 kb 的单股正链 RNA (图

收稿日期: 2011-07-12; 修回日期: 2011-09-24

基金项目: 国家科学与技术传染病重大专项(2008ZX-10002-011); 上海市科学与技术基金(09411964500)

\*通信作者: E-mail: longjianer@fudan.edu.cn

1), 仅含一个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码含有 2 193 个氨基酸的多聚蛋白 (polyprotein)。在基因组的 5' 端和 3' 端分别有约为 745 nt 的 5' 非编码区 (untranslated region, UTR) 和约为 83 nt 的 3' 非编码区。在 3'UTR 的末端含有一个长度可变的 poly(A) 尾, 而 5' 端共价结合一个小相对分子质量的蛋白质 VPg。多聚蛋白被进一步水解成 P1、P2、P3 三个前体蛋白, P1 进一步裂解成四个病毒外壳蛋白 VP1~VP4; P2 和 P3 分别裂解成 7 个非结构蛋白 (2A、2B、2C 和 3A、3B、3C、3D)<sup>[4,6]</sup>。非结构蛋白与病毒的复制以及病毒毒力有关<sup>[5]</sup>, 它们参与调控多聚蛋白的加工、RNA 的复制和宿主细胞蛋白合成<sup>[7]</sup>。结构蛋白的切割方式大致如下: 通过 2A 蛋白酶的自我切割使多聚蛋白从 N 端裂解成 P1 前体蛋白<sup>[8-9]</sup>, 3C 蛋白酶介导的 PV 多聚蛋白的切割只发生在 Glu-Gly 位点, 但是

其他小 RNA 病毒的 3C 蛋白酶二肽识别能力会更为灵活, 切割位点可能是由 Gln 或 Glu 以及 P1' 位置的 Gly、Ser 或者 Ala 组成。水解成三个衣壳蛋白 VP0、VP3 和 VP1<sup>[10]</sup>, 这三个结构蛋白自发形成一个 5S 的原聚体, 随后装配形成一个 14S 的五聚体亚体, 再装配成二十面体的原衣壳<sup>[9]</sup>, 在 RNA 衣壳化的基础上, VP0 的 Asp-Ser 或者 Thr-Ser 位点处被切割, 形成 VP2 和 VP4<sup>[10]</sup>。

EV71 复制的机制尚不明确, 目前认为它与同为肠道病毒的 PV 的复制模式高度相似<sup>[11]</sup>。EV71 的复制发生在宿主细胞胞浆内 (图 2)。首先, 病毒与细胞膜表面受体结合, 导致病毒颗粒的空间构象连续改变, 丢失 VP4 并使宿主细胞膜穿孔, 最终病毒脱去外壳并释放病毒核酸穿过细胞膜进入胞质, 开始病毒多肽的翻译<sup>[2,6]</sup>。已报道的 EV71 受体至少包括: 清道夫受体 B2 (human scavenger receptor class B, member 2, SCARB2)<sup>[12]</sup>、P 选择素糖蛋白配体 -1 (human P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1)<sup>[13]</sup>、唾液酸多聚糖 (sialic acid-linked glycans)<sup>[14]</sup>, 而另一研究发现 EV71 能通过 C 型凝集素受体 DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) 感染人未成熟的树突状细胞<sup>[5,15]</sup>。由于宿主细胞内缺乏 EV71 基因组 RNA 进

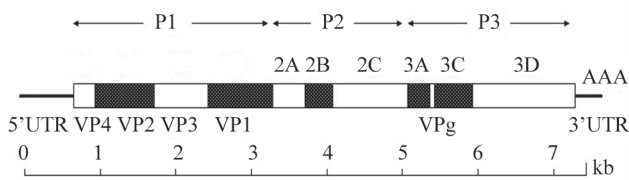


图1 EV71基因组结构图

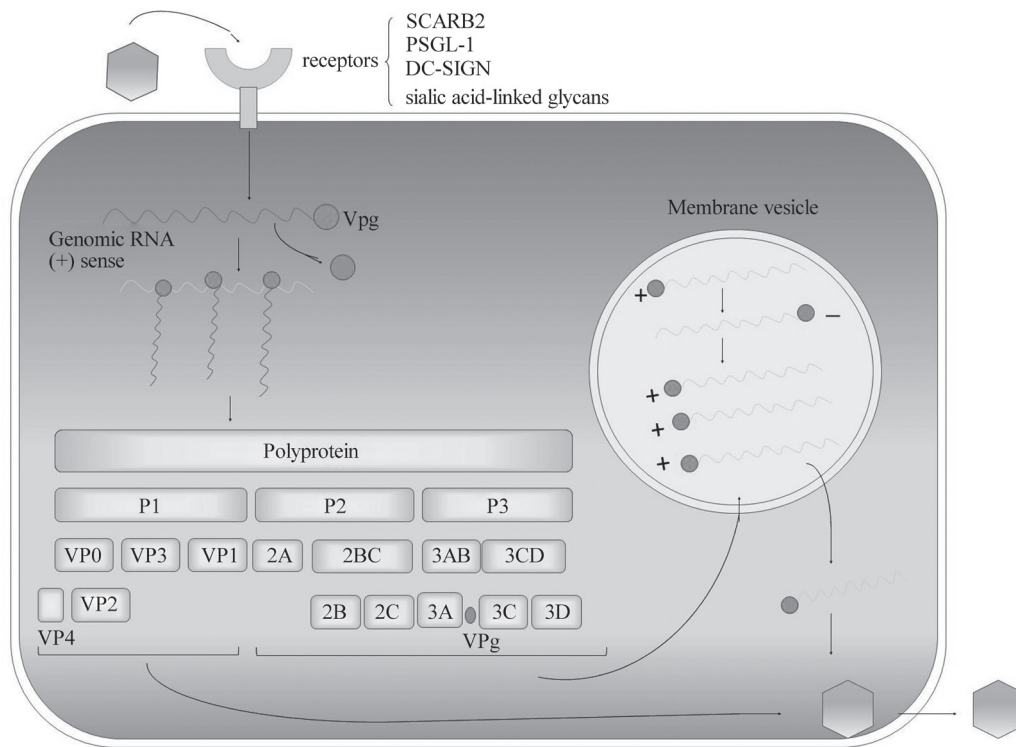


图2 EV71病毒复制示意图

行复制的 RNA 聚合酶,所以病毒进入胞浆后先进行基因组的转录和翻译。EV71 病毒的复制与其他正链 RNA 病毒相似,首先以病毒 RNA 作为 mRNA 合成病毒多聚前体蛋白,随后被切割成 4 个结构蛋白和 7 个非结构蛋白,非结构蛋白 3D 形成 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)。随后, RNA 模板在 RdRp 的作用下合成负链 RNA,再以负链 RNA 为模板在细胞内质网进一步合成大量的正链 RNA。随着大量病毒正链 RNA 在细胞浆内的堆积,子代病毒颗粒开始组装<sup>[16]</sup>。由于 3C 或 3CD 的增多以及活性的增强,加速了 P1 前体蛋白的切割,其产物构成的原聚体组成五聚体,进一步包装病毒 VPg-RNA 形成原病毒颗粒 (provirion)。一般情况下,肠道病毒的原病毒颗粒无感染性,经过蛋白酶的再加工产生 VP1~VP4 多肽后才具备感染性<sup>[6]</sup>。

## 2 非编码区功能

### 2.1 5'非编码区(5'UTR)

EV71 的 5' UTR 通常折叠成特异性的空间结构 (图 3),包括一个三叶草结构 (1~90 nt) 和内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES, 91~745 nt)。这些结构通过与宿主细胞蛋白因子结合,调控病毒基因组 RNA 的合成以及病毒蛋白翻译的起始<sup>[17-19]</sup>,如多聚嘧啶结合蛋白 (polypyrimidine tract binding protein, PTB)、多聚胞嘧啶结合蛋白 1 (poly(rC)-binding protein 1, PCBP1) 等<sup>[20]</sup>。

肠道病毒基因组 5' UTR 的三叶草结构是一段保守序列,它在 PV 的 RNA 复制中是一个决定性因素<sup>[21]</sup>。Herold 和 Andino<sup>[17]</sup> 研究表明,三叶草结构与 3CD 蛋白和 PCBP2 形成三元复合物,其中,三叶草结构与 PCBP2 相互作用促进病毒的翻译;而其与 3CD 结合将会抑制病毒的翻译并且增加病

毒负链 RNA 的合成。若此结构断裂,则会抑制病毒的复制以及 RNA 与宿主细胞蛋白之间的相互作用。同时,三叶草结构对维持基因组的稳定性起重要作用,它能形成一个核糖核蛋白的复合结构,在以 3' 末端负链 RNA 为模板合成新的正链 RNA 的翻译起始过程中起重要作用<sup>[21-22]</sup>。

IRES 是 5'UTR 一段可与核糖体 40S 亚基结合的序列。根据小 RNA 病毒 IRES 的一级序列、二级结构以及距离起始密码子的位置的差异, IRES 可分为 3 型。EV71 5'UTR 的 IRES 属于 1 型,在起始密码子 AUG 上游 30~150 bp。第 II 到第 V 个茎环结构属于 IRES 区域,在 II 区、IV 区和 V 区的下游分别有三个胞嘧啶富集区域。IRES 对于指导病毒 mRNA 翻译具有非常重要的作用<sup>[23]</sup>,可作为抗病毒药物的靶点。病毒感染时,宿主细胞翻译被阻止,病毒 RNA 翻译开始进行,此过程主要依赖于翻译起始因子和特殊的 IRES 作用因子 (IRES trans-acting factors, ITAFs)。ITAFs 可与多个 IRES 元件相互作用,通过招募核糖体和改变 IRES 的结构来调节 IRES 的活性。有两种蛋白,异质性核糖核酸核蛋白 A1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, hnRNP A1) 和远端上游因子结合蛋白质 2 (far upstream element binding protein 2, FBP2) 通过生物素化的 RNA 亲和色谱分析以及蛋白质组学的方法被确认参与调整 EV71 IRES 的功能<sup>[5,18-20]</sup>。通常, hnRNPA1 和 FBP2 位于细胞核内,在 EV71 感染后,病毒 RNA 合成的这两种蛋白在细胞质中特别丰富。hnRNP A1 在细胞质中的再分布促进 EV71 感染细胞中 IRES 介导的翻译,而 FBP2 则抑制性调节 IRES 的活性<sup>[5]</sup>。另一种蛋白 hnRNP K 同前两种蛋白相似,也在 EV71 感染后在细胞质中分布增多。若抑制 hnRNP K 的活性则延迟 RNA 合成并且降低了感染细胞中病毒的产量,进一步的研究表明 hnRNP K 可以与 5'UTR 相互作用,也参与病毒蛋白的翻译<sup>[5,18]</sup>。

由于 5'UTR 基因序列高度保守,临床上可通过设计 RT-PCR 引物,从手足口病患者的粪便和咽拭子中敏感地检测出预知大小基因片段。

### 2.2 3'非编码区(3'UTR)

EV71 的 3'UTR 的末端含有一个长度可变的多聚腺苷酸尾 poly(A),它对于细胞和小核糖核酸病毒的 mRNA 表达非常重要。Poly(A) 在真核细胞中有助于 mRNA 的稳定性,促进 mRNA 的翻译,并将 mRNA 从细胞核转运到细胞质<sup>[24]</sup>。但 EV71 病

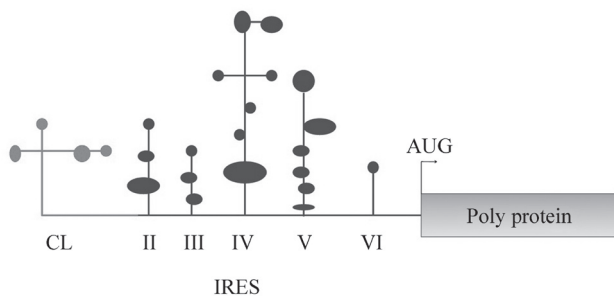


图3 EV71病毒5'非编码区结构图

毒基因组 3'UTR 和 poly(A) 的具体功能尚不完全清楚, 而对 PV 的研究表明, 3'UTR 的缺失虽然降低但并不完全抑制 PV 的复制效率<sup>[17,22]</sup>。实验证明, PV 的 poly(A) 的长度从 12 增加到 20 时, RNA 负链的合成增加了 30 倍以上<sup>[22]</sup>。而且, poly(A) 与宿主细胞 poly(A) 结合蛋白 (poly(A)-binding protein) 相互作用, 并与 5'UTR 的 PCBP2 相接合, RNA 两端的桥连接促进病毒的复制<sup>[25]</sup>。而 5' 端和 3' 端环化结构的形成可能是病毒 RNA 正链开始复制的重要步骤<sup>[17]</sup>。Todd 等<sup>[26]</sup> 证明缺失 3'UTR 的重组 PV 是有活性的, 但是其复制速度比野生型的慢。另外, 虽然鼻病毒 14 型 (human rhinovirus 14, HR14) 的 3'UTR 空间结构与 PV 完全不同, 但 Herold 和 Andino 等<sup>[17]</sup> 将 PV 与 HR14 的 3'UTR 相互替换后病毒仍然有活性。这说明 3'UTR 在 RNA 负链合成过程中只具有调节作用。另外, Sim 等<sup>[27]</sup> 研究表明, 化学合成的 siRNA 靶向作用于 3'UTR, 可以降低病毒的复制, 所以 RNA 干扰也可能作为一种临床上抗病毒治疗的方法。

### 3 蛋白质编码区

#### 3.1 P1 区

P1 前体蛋白编码 VP1(293 aa)、VP2(254 aa)、VP3 (245 aa) 和 VP4(69 aa) 4 个病毒衣壳蛋白。P1 前体蛋白, 首先被切割为 VP0、VP3 和 VP1, VP0 在病毒粒子成熟时再被切割为 VP4 和 VP2<sup>[4,9]</sup>。

##### 3.1.1 VP1

VP1 在 EV71 基因组研究中广受重视: (1) VP1 是主要的病毒中和决定因子, 它直接决定病毒的抗原性; (2) VP1 基因具有与病毒血清型完全对应的遗传多样性; (3) VP1 不仅可作为肠道病毒属内不同血清型分类的依据, 而且可作为小 RNA 病毒科内不同属的分类参考<sup>[4]</sup>。

VP1~VP3 首先作为抗原被特异性的宿主细胞受体识别<sup>[28]</sup>, 其中 VP1 含有主要的抗原结合位点和大多数型特异的中和决定因子<sup>[6]</sup>。酵母双杂交分析表明, VP1 可与鸟氨酸脱羧酶 (ornithine decarboxylase, ODC1)、基因套锚蛋白重复序列 (gene trap ankyrin repeat, GTAR) 和在脑组织中表达的 KIAA0697 相结合。VP1 与 ODC1 间作用可能与 EV71 的激活有关, 能干扰 EV71 感染细胞的生物合成、生长和增殖。VP1 与 GTAR 间作用促使 EV71 通过锚定蛋白与中枢神经细胞的黏附分子结合, 与 CRASH 神经性症状密切相关。VP1 在蛋白表面形成的峡谷样

结构是受体分子的结合位点<sup>[29]</sup>。有研究表明, VP1 衣壳蛋白的 N 端有一个重要抗原区域, 是中和抗体决定簇; 而 C 端的多肽 66~77 和 208~222 有可能刺激中和抗体的产生, 但其准确的抗原表位仍然不清楚。此外, 多肽 66~77、145~159、247~261 能诱导特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞增殖<sup>[3]</sup>。

Lal 等<sup>[30]</sup> 研究表明, EV71 的 VP1 可以进行自我缔合并参与了二十面体衣壳的形成, 提高病毒的致病性和适应外部环境的能力, 使用酵母双杂交可检测到 VP1 的二聚化, 其中 66~132 aa 是参与二聚化的主要区域, 而 132~297 aa 区域增强 VP1 与 VP1 之间的作用。

另外, 研究发现, 在 EV71 感染 RD 细胞早期, 牛和人的乳铁蛋白 (lactoferrin, LF) 可以有效地阻止 EV71 的感染。LF 可与 EV71 VP1 结合, 而这种结合可被 EV71 VP1 特异性抗体所终止<sup>[11,31]</sup>。

频繁的基因突变使 EV71 具有遗传多样性<sup>[32]</sup>。VP1 作为表面抗原非常适合成为 EV71 疫苗的候选。目前, 主要有两类候选疫苗, 包括福尔马林灭活病毒疫苗和针对 EV71 VP1 的亚单位疫苗<sup>[4]</sup>。有学者通过调控  $\alpha$ - 乳清蛋白的启动子和  $\alpha$ - 酪蛋白前导序列 (leader sequence) 使转基因小鼠分泌的乳汁中表达高水平的 EV71 重组 VP1 蛋白, 含 VP1 蛋白的乳汁作为一种口服疫苗具有较大潜力<sup>[33]</sup>。目前, VP1 转基因蛋白、多肽 SP55(163~177 aa) 和 SP70(208~222 aa)、VP1 合成亚单位疫苗 (66~77、145~159 和 247~261 aa) 都被视为 EV71 的候选疫苗<sup>[28]</sup>。

##### 3.1.2 VP2~VP4

小 RNA 病毒颗粒的衣壳的组成复杂, 在 4 个结构蛋白中, VP1、VP2 和 VP3 等 3 个多肽暴露在病毒外壳的表面, 虽然它们之间的核苷酸序列并无同源性, 但在蛋白质拓扑结构上具有一定相似性; 而 VP4 包埋在病毒外壳的内侧与病毒核心紧密连接, 具有延伸的空间构象特征, 成为连接内外的桥梁<sup>[28,34]</sup>。当病毒与受体结合时, 病毒颗粒的空间构象改变使 VP4 丢失, 最终脱去病毒的外壳并释放病毒核酸穿过细胞膜进入胞质, 开始多肽的翻译。在 VP4 中甘氨酸残基上常常共价结合十四烷酸 (myristic acid), 与 VP3、VP4 的氨基酸侧链相互作用, 共同维持病毒衣壳的稳定性<sup>[35]</sup>。EV71 病毒衣壳蛋白 VP2 和 VP4 是肠道病毒外壳蛋白质的重要组成部分, 它们与病毒的抗原性相关, 基于 VP1 与 VP4 的基因分型具有很高的相关性。VP、VP3 和 VP1 因为有相似的结构, 也有可能成为潜在的候选表位<sup>[28]</sup>。

## 3.2 P2区

### 3.2.1 2A蛋白

PV 作为小 RNA 病毒的典型代表,其 2A 蛋白酶具有半胱氨酸蛋白酶活性,催化切割 Tyr-Gly 位点处,主要裂解前体多聚蛋白 P1-P2<sup>[36-37]</sup>。Collis 等<sup>[38]</sup>删除 PV 基因组 2A 编码区后,发现病毒复制能力明显下降,并且病毒粒子缺乏衣壳蛋白样结构。真核细胞起始因子 4G(eukaryotic translation initiation factor 4G, eIF-4G)是诱导宿主细胞蛋白合成的关键因素,而 EV71 的 2A 蛋白酶诱导 eIF-4G 的裂解能够阻止宿主蛋白的合成<sup>[2,5,39]</sup>。此外, EV71 的 2A 蛋白酶在酵母菌中表现出较强的转录活性,如果把 2A 区域 N 端的 40 个氨基酸截断后,其仍然能够保留转录活性;但是,如果截断 N 端的 60 个氨基酸或者是 C 端的 20 个氨基酸,转录活性消失。因此,2A 蛋白质的 C 端的氨基酸对于转录的活性非常重要。而截断此区域 146~149 的氨基酸,尽管此蛋白酶活性还保留,却丢失了其转录活性<sup>[37]</sup>。

### 3.2.2 2B蛋白

2B 蛋白是一种相对分子质量较小、疏水性的膜相关蛋白,可以促进病毒 RNA 早期复制<sup>[40-41]</sup>。Johnson 和 Sarnow<sup>[41]</sup>研究证实替换小 RNA 病毒 2B 蛋白可以导致病毒 RNA 的复制缺陷,但 2B 蛋白发挥的作用尚不明确。2B 蛋白含有两个疏水区,可以介导高尔基复合体的有效靶定位、膜融合以及膜的渗透作用。2B 蛋白可以抑制宿主蛋白从高尔基复合体中分泌,并增加细胞膜的通透性,从而促进病毒粒子从宿主细胞中的释放。另外,2B 蛋白可与 3A 蛋白协同作用,促进感染细胞内囊泡的形成,从而间接促进病毒 RNA 的复制<sup>[40]</sup>。

### 3.2.3 2C蛋白

2C 蛋白是一个高度保守的蛋白质,尽管其生化特性和结构功能没有被完全阐明,但其在 PV 的 RNA 复制过程中发挥重要作用。此蛋白具有 ATP 酶活性,并且具有 RNA 结合功能和膜结合功能<sup>[42]</sup>。2C 蛋白的空间结构与其功能密切相关,该蛋白的 C 端和 N 端各有一个两性螺旋结构,介导与细胞膜的结合,蛋白质中间部分为 NTP 结合区<sup>[42]</sup>。EV71 的 2C 蛋白招募宿主细胞编码的网状蛋白质 3(reticulacon 3, RNT3),形成复制复合物来参与病毒的复制。2C 蛋白可以控制核苷三磷酸活性,并且参与 RNA 负链的合成和 PV 子代病毒颗粒的衣壳形成<sup>[11]</sup>。同样,2C 蛋白在 EV71 的复制中也起着重要作用。实验表明,2C 蛋白的 N 端具有与 RNA 和膜结合活性,与

RNT3 作用在 2C 蛋白的第 25 个氨基酸即 Ile。通过 RNA 干扰减少 RNT3 表达,可明显减少 EV71 编码蛋白质的合成和双链 RNA 的复制,从而减少了病毒蚀斑的形成和细胞凋亡<sup>[43]</sup>。

## 3.3 P3区

### 3.3.1 3A蛋白

在小 RNA 病毒中,3A 蛋白可以调节宿主细胞的胞膜内运输,它的前体蛋白 3AB 有结合 RNA 的性能,刺激 3CD 蛋白酶的切割,以及 RNA 聚合酶 3D 的活性<sup>[11]</sup>。在 RNA 复制过程中,3A 蛋白通过其疏水区促进囊膜与复制复合体结合以及病毒 RNA 的合成<sup>[44-45]</sup>。Choe 等<sup>[46]</sup>发现 PV 在哺乳动物细胞内表达的 3A 蛋白可以导致内质网的裂解以及高尔基复合体蛋白运输功能障碍。3A 的这些功能可能与抑制宿主抗病毒免疫密切相关,尤其是它可以抑制多种细胞因子,如 IFN- $\beta$ 、IL-6、IL-8 等以及 MHC I 和 TNF 受体的表达。

### 3.3.2 3B蛋白

3B 蛋白质又称为 VPg 蛋白,是一种小分子蛋白质。VPg 蛋白通过其 Try 残基的羟基基团与 EV71 基因组 RNA 5' 末端的 pUpU 形成磷酸二酯键,然后以 VPg-pUpU 作为引物参与负链、正链 RNA 的合成<sup>[4,47-48]</sup>。结合在 5' 末端的 VPg 蛋白可以与聚合酶 3D 相互作用,以此进行病毒 RNA 复制<sup>[48]</sup>。

### 3.3.3 3C蛋白

3C 蛋白在 EV71 复制过程中,具有蛋白水解酶活性。目前发现 3C 蛋白酶有两种功能:促进病毒复制和促使宿主细胞凋亡<sup>[49]</sup>。3C 蛋白酶进入宿主细胞核内,而病毒的复制发生在细胞质中,它的最主要作用就是抑制宿主细胞转录<sup>[24]</sup>。Weng 等<sup>[24]</sup>发现 3C 蛋白酶有可能通过消化宿主蛋白 CstF-64 来干扰宿主细胞内 RNA 多聚腺苷酸化,而 CstF-64 在宿主细胞基因 3' 端 Pre-mRNA 加工过程中发挥重要作用<sup>[50]</sup>。

3C 蛋白酶能够通过激活半胱氨酸天冬氨酸酶来诱导细胞凋亡,与中枢神经系统发病有密切的关系。由于 EV71 的 3C 蛋白酶在病毒复制中发挥重要作用,而且序列分析表明哺乳动物中无 EV71 3C 的同源序列,所以 3C 蛋白可能是抗病毒药物的潜在靶点<sup>[50]</sup>。

### 3.3.4 3D蛋白

3D 蛋白是一种 RNA 依赖的 RNA 聚合酶,在病毒的复制过程中主要完成 RNA 链的延伸。3D 多聚酶在蛋白质引物和 VPg 的尿苷酰化作用中必不可

少,也是病毒复制起始的重要因素。当3D从3CD中裂解后,3D蛋白的核酸定位信号介导3CD转运到宿主细胞核,关闭宿主细胞的转录。EV71的3D区域对于改变病毒毒力起重要作用<sup>[51]</sup>。

另外,5'UTR结构中的三叶草结构与病毒蛋白质3CD形成的复合物促进RNA的合成以及多聚蛋白质的形成。由于3D蛋白在病毒复制过程中的重要作用,也使其成为了治疗EV71病毒感染的潜在关键靶位<sup>[11]</sup>。

综上所述,目前对于EV71基因组功能的研究取得了一定的进展,但是还不够深入,比如P2切割后形成的2B和2C等蛋白质以及P3切割后的3A等蛋白的功能都不明确,还有3'UTR区域的功能也比较模糊,有待于进一步研究。基因组功能学的研究对EV71致病机制和其防控及治疗方面具有重要作用,不仅可以进一步地掌握其病毒复制的重要因素,而且可以选择多个靶位点来进行EV71疫苗和药物的研究设计,这些对于肠道病毒的防治具有重要意义。

#### [参 考 文 献]

- [1] Yip CC, Lau SK, Zhou B, et al. Emergence of enterovirus 71 "double-recombinant" strains belonging to a novel genotype D originating from southern China: first evidence for combination of intratypic and intertypic recombination events in EV71. *Arch Virol*, 2010, 155(9): 1413-24
- [2] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11): 778-90
- [3] Huang YP, Lin TL, Hsu LC, et al. Genetic diversity and C2-like subgenogroup strains of enterovirus 71, Taiwan, 2008. *Virol J*, 2010, 7: 277
- [4] McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, 26(1): 91-107
- [5] Yi L, Lu J, Kung HF, et al. The virology and developments toward control of human enterovirus 71. *Crit Rev Microbiol*, 2011, 37(4): 313-27
- [6] Huang SC, Hsu YW, Wang HC, et al. Appearance of intratypic recombination of enterovirus 71 in Taiwan from 2002 to 2005. *Virus Res*, 2008, 131(2): 250-9
- [7] Cardoso MJ, Perera D, Brown BA, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(4): 461-8
- [8] Ansardi DC, Porter DC, Morrow CD. Complementation of a poliovirus defective genome by a recombinant vaccinia virus which provides poliovirus P1 capsid precursor in trans. *J Virol*, 1993, 67(6): 3684-90
- [9] Hu YC, Hsu JT, Huang JH, et al. Formation of enterovirus-like particle aggregates by recombinant baculoviruses co-expressing P1 and 3CD in insect cells. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(12): 919-25
- [10] Ansardi DC, Morrow CD. Poliovirus capsid proteins derived from P1 precursors with glutamine-valine cleavage sites have defects in assembly and RNA encapsidation. *J Virol*, 1993, 67(12): 7284-97
- [11] Wu KX, Ng MML, Chu JJH. Developments towards antiviral therapies against enterovirus 71. *Drug Discov Today*, 2010, 15(23-24): 1041-51
- [12] Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med*, 2009, 15(7): 798-801
- [13] Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog*, 2010, 6: 11
- [14] Yang B, Chuang H, Yang KD. Sialylated glycans as receptor and inhibitor of enterovirus 71 infection to DLD-1 intestinal cells. *Virol J*, 2009, 6: 141
- [15] Lin YW, Wang SW, Tung YY, et al. Enterovirus 71 infection of human dendritic cells. *Exp Biol Med*: Maywood, 2009, 234(10): 1166-73
- [16] Bedard KM, Semler BL. Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes Infect*, 2004, 6(7): 702-13
- [17] Herold J, Andino R. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell*, 2001, 7(3): 581-91
- [18] Lin JY, Li ML, Huang PN, et al. Heterogeneous nuclear ribonuclear protein K interacts with the enterovirus 71 5' untranslated region and participates in virus replication. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 10): 2540-9
- [19] Lin JY, Shih SR, Pan M, et al. hnRNP A1 interacts with the 5' untranslated regions of enterovirus 71 and Sindbis virus RNA and is required for viral replication. *J Virol*, 2009, 83(12): 6106-14
- [20] Lin JY, Li ML, Shih SR, et al. Far upstream element binding protein 2 interacts with enterovirus 71 internal ribosomal entry site and negatively regulates viral translation. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(1): 47-59
- [21] Barton DJ, O'Donnell BJ, Flanagan JB, et al. 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J*, 2001, 20(6): 1439-48
- [22] Silvestri LS, Parilla JM, Morasco BJ, et al. Relationship between poliovirus negative-strand RNA synthesis and the length of the 3' poly(A) tail. *Virology*, 2006, 345(2): 509-19
- [23] Thompson SR, Sarnow P. Enterovirus 71 contains a type I IRES element that functions when eukaryotic initiation factor eIF4G is cleaved. *Virology*, 2003, 315(1): 259-66
- [24] Weng KF, Li ML, Hung CT, et al. Enterovirus 71 3C protease cleaves a novel target CstF-64 and inhibits cellular polyadenylation. *PLoS Pathog*, 2009, 5(9): e1000593
- [25] Fernandez-Miragall O, Lopez de Quinto S, Martinez-Salas

- E, et al. Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements. *Virus Res*, 2009, 139(2): 172-82
- [26] Todd S, Towner JS, Brown DM, et al. Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol*, 1997, 71(11): 8868-74
- [27] Sim AC, Luhur A, Tan TM, et al. RNA interference against enterovirus 71 infection. *Virology*, 2005, 341(1): 72-9
- [28] Shao ZJ, Chen XM, Zhang Q, et al. Analysis of recombination and natural selection in human enterovirus 71. *Virology*, 2010, 398(2): 251-61
- [29] Chow VTK, Yeo WM. The VP1 structural protein of enterovirus 71 interacts with human ornithine decarboxylase and gene trap ankyrin repeat. *Microb Pathogen*, 2007, 42(4): 129-37
- [30] Lal SK, Kumar P, Yeo WM, et al. The VP1 protein of human enterovirus 71 self-associates via an interaction domain spanning amino acids 66-297. *J Med Virol*, 2006, 78(5): 582-90
- [31] Weng TY, Chen LC, Shyu HW, et al. Lactoferrin inhibits enterovirus 71 infection by binding to VP1 protein and host cells. *Antivir Res*, 2005, 67(1): 31-7
- [32] Bible JM, Iturriza-Gomara M, Megson B, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 in the United Kingdom from 1998 to 2006. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(10): 3192-200
- [33] Chen HL, Huang JY, Chu TW, et al. Expression of VP1 protein in the milk of transgenic mice: a potential oral vaccine protects against enterovirus 71 infection. *Vaccine*, 2008, 26(23): 2882-9
- [34] Rowlands DJ, Tuthill TJ, Gropelli E, et al. Picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010, 343: 43-89
- [35] Chow M, Newman JF, Filman D, et al. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, 1987, 327(6122): 482-6
- [36] Cuconati A, Xiang W, Lahser F, et al. A protein linkage map of the P2 nonstructural proteins of poliovirus. *J Virol*, 1998, 72(2): 1297-307
- [37] Yang CH, Li HC, Jiang JG, et al. Enterovirus type 71 2A protease functions as a transcriptional activator in yeast. *J Biomed Sci*, 2010, 17: 65
- [38] Collis PS, O'Donnell BJ, Barton DJ, et al. Replication of poliovirus RNA and subgenomic RNA transcripts in transfected cells. *J Virol*, 1992, 66(11): 6480-8
- [39] Morley SJ, Curtis PS, Pain VM. eIF4G: translation's mystery factor begins to yield its secrets. *RNA*, 1997, 3(10): 1085-104
- [40] De Jong AS, Wessels E, Dijkman HBPM, et al. Determinants for membrane association and permeabilization of the coxsackie virus 2B protein and the identification of the Golgi complex as the target organelle. *J Biol Chem*, 2003, 278(2): 1012-21
- [41] Johnson KL, Sarnow P. Three poliovirus 2B mutants exhibit noncomplementable defects in viral RNA amplification and display dosage-dependent dominance over wild-type poliovirus. *J Virol*, 1991, 65(8): 4341-9
- [42] Adams P, Kandiah E, Effantin G, et al. Poliovirus 2C protein forms homo-oligomeric structures required for ATPase activity. *J Biol Chem*, 2009, 284(33): 22012-21
- [43] Tang WF, Yang SY, Wu BW, et al. Reticulon 3 binds the 2C protein of enterovirus 71 and is required for viral replication. *J Biol Chem*, 2007, 282(8): 5888-98
- [44] Fujita K, Krishnakumar SS, Franco D, et al. Membrane topography of the hydrophobic anchor sequence of poliovirus 3A and 3AB proteins and the functional effect of 3A/3AB membrane association upon RNA replication. *Biochemistry*, 2007, 46(17): 5185-99
- [45] Giachetti C, Hwang SS, Semler BL. Cis-acting lesions targeted to the hydrophobic domain of a Poliovirus membrane-protein involved in RNA replication. *J Virol*, 1992, 66(10): 6045-57
- [46] Choe SS, Dodd DA, Kirkegaard K. Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology*, 2005, 337(1): 18-29
- [47] Herrero LJ, Lee CS, Hurrelbrink RJ, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000. *Arch Virol*, 2003, 148(7): 1369-85
- [48] Liu Y, Franco D, Paul AV, et al. Tyrosine 3 of poliovirus terminal peptide VPg(3B) has an essential function in RNA replication in the context of its precursor protein, 3AB. *J Virol*, 2007, 81(11): 5669-84
- [49] Lee JC, Shih SR, Chang TY, et al. A mammalian cell-based reverse two-hybrid system for functional analysis of 3C viral protease of human enterovirus 71. *Anal Biochem*, 2008, 375(1): 115-23
- [50] Cui S, Wang J, Fan TT, et al. Crystal structure of human enterovirus 71 3C protease. *J Mol Biol*, 2011, 408(3): 449-61
- [51] Wang JR, Kung YH, Huang SW, et al. Introduction of a strong temperature-sensitive phenotype into enterovirus 71 by altering an amino acid of virus 3D polymerase. *Virology*, 2010, 396(1): 1-9