

DOI: 10.13376/j.cblls/2017024

文章编号: 1004-0374(2017)02-0179-10

## 肠道病毒71型逃逸宿主固有免疫的分子机制

常章梅, 王玉燕, 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, EV-A71) 感染常引起婴幼儿手足口病 (hand, foot, and mouth disease, HFMD), 严重者可伴有中枢神经系统并发症。近年来, EV-A71 引起的手足口病已成为我国以及亚太地区迫切需要解决的公共卫生问题。目前, EV-A71 的致病机制并不清楚, 但逃逸宿主免疫应答被认为是其重要的致病机理之一。现主要就 EV-A71 逃逸宿主固有免疫的分子机制做一综述, 概述近年来有关 EV-A71 如何利用其自身编码的 2A<sup>pro</sup>、3C<sup>pro</sup> 等非结构蛋白, 影响宿主对病毒核酸的识别、IFN 诱发生成及 IFN 信号通路的激活, 从而逃逸宿主固有免疫的主要进展情况, 并对抗病毒感染免疫治疗策略作简略讨论。

**关键词:** 肠道病毒 71 型; 固有免疫; 免疫逃逸

**中图分类号:** R373.2; R392.11 **文献标志码:** A

## The molecular mechanisms of enterovirus A71 evading host innate immunity

CHANG Zhang-Mei, WANG Yu-Yan, LONG Jian-Er\*

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

**Abstract:** Enterovirus 71 (EV-A71) is a major etiological agent for outbreaks of hand, foot, and mouth disease (HFMD) in young children and infants. Infection with EV-A71 also results in severe neurological diseases. Recently, HFMD caused by EV-A71 has been the public health problem that needs great efforts in our country and other Asia-Pacific regions. However, the pathogenesis of EV-A71 infection has been unknown. Evasion of host innate immunity elicited by the virus has been considered to be the most important factor that contributes to the pathogenesis of EV-A71 infection. In this review, we summarized that EV-A71 evades host innate immunity and its molecular mechanisms, including the pathways by which the host recognizes virus infection, and the virus how to inhibit the production of host IFNs and block IFNs signaling. We also discussed the strategies for antiviral treatments based on the molecular mechanism of the virus evading host immunity.

**Key words:** EV-A71; innate immunity; immune evasion

肠道病毒 71 型 (enterovirus type 71, EV-A71) 是近来婴幼儿手足口病 (hand, foot, and mouth disease, HFMD) 的主要病原体, 主要表现为患者手、足、口腔等部位发生疱疹, 少数可引起无菌性脑膜炎、脑炎、脊髓灰质炎样麻痹, 甚至可引起严重的神经源性肺水肿和肺出血。自从 1969 年在美国加利福尼亚州确认了第一例 EV-A71 感染患儿后<sup>[1]</sup>, EV-A71 引起的手足口病在世界范围内多次爆发流行。EV-A71 属于小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 肠道病毒属 (*Enterovirus*) 成员, 基因组为单股正链 RNA,

全长约 7.4 kb, 仅含一个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码约 2 194 个氨基酸的多聚蛋白 (polyprotein)。EV-A71 与细胞 SCARB2 或 PSGL-1 等受体及唾液酸多聚糖、DC-SIGN 等辅助性受体作用后<sup>[2-4]</sup>, 病毒颗粒的空间构象发生改变, 脱去衣壳释放 RNA 入细胞质中, 随后病毒基因组 RNA 翻译

收稿日期: 2016-08-25; 修回日期: 2016-09-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570516); 传染病重大专项基金项目(2012ZX10004503003)

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

形成多聚蛋白,多聚蛋白被病毒蛋白酶 2A 和 3C 水解成 3 个前体蛋白 P1、P2、P3;P1 进一步被水解成 4 个病毒衣壳蛋白 VP1、VP2、VP3、VP4;P2 和 P3 裂解成 7 个非结构蛋白 2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D。病毒 RNA 在病毒编码的 3D 蛋白,即 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp) 作用下合成负链 RNA,再以负链 RNA 为模板合成子代正链 RNA。随着大量病毒子代正链 RNA 在细胞浆内的堆积,子代病毒开始组装并释放成熟的病毒粒子(图 1)。

EV-A71 的致病机制目前尚不清楚,但病毒逃逸宿主免疫应答被认为是其致病的前提。因此,本文主要就近年来 EV-A71 逃逸宿主免疫应答,尤其是其如何逃逸宿主固有免疫的机制有关研究进展做一综述,为防治 EV-A71 的感染提供思路。

## 1 宿主抗病毒免疫

人体的免疫系统根据免疫应答识别特点、获得形式以及效应机制,可分为固有免疫 (innate immunity) 和适应性免疫 (adaptive immunity)。固有免疫是机体抵御病原体入侵的第一道防线,可通过模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRRs) 识别病原体相关模式分子 (pathogen associated molecule patterns, PAMPs),诱导干扰素 (interferon, IFN) 和炎症细胞因子的产生,调动细胞进入抗病原体免疫状态和启

动适应性免疫应答。目前,在哺乳动物细胞内发现 5 种主要的识别病毒 PAMPs 的 PRRs,包括 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs),如 TLR3、TLR7、TLR8、TLR9 等;RIG-I 样受体 (RIG-I like receptors, RLRs),如 RIG-I 和 MDA5;NOD 样受体 (NOD-like receptors, NLRs);AIM2 样受体 (AIM2-like receptors, ALRs);cGAS/STING 系统。

### 1.1 病毒感染信号识别与固有免疫应答

细胞通过不同的 PRRs 识别各种病毒组分,包括基因组 DNA、单链 RNA (ssRNA)、双链 RNA (dsRNA)、5'-ppp-RNA 和病毒蛋白。小 RNA 病毒基因组 RNA 主要被 MDA5 识别<sup>[5]</sup>。RIG-I 和 MDA-5 通过识别不同结构的病毒 RNA 来激活免疫应答。一旦与病毒 RNA 结合,RIG-I 和 MDA5 与下游接头分子 MAVS (mitochondrial antiviral signaling) 相互作用,MAVS 与 TRAF3 (TNF-receptor-associated factor 3) 结合并招募活化两种 IKK 相关激酶——TBK1 和 IKK-i,进而活化转录因子 IRF-3 或 IRF-7。活化的 IRF-3 或 IRF-7 进入细胞核结合干扰素刺激反应元件 (IFN-stimulated response elements, ISREs),引起 IFN 基因表达<sup>[6]</sup>。

除胞质中的 MDA5 和 RIG-I 外,细胞膜和内吞体上的 TLR3 等分子也可识别小 RNA 病毒<sup>[7]</sup>。结合病毒 RNA 后,TLR3 与下游 IFN- $\beta$  TIR 结构

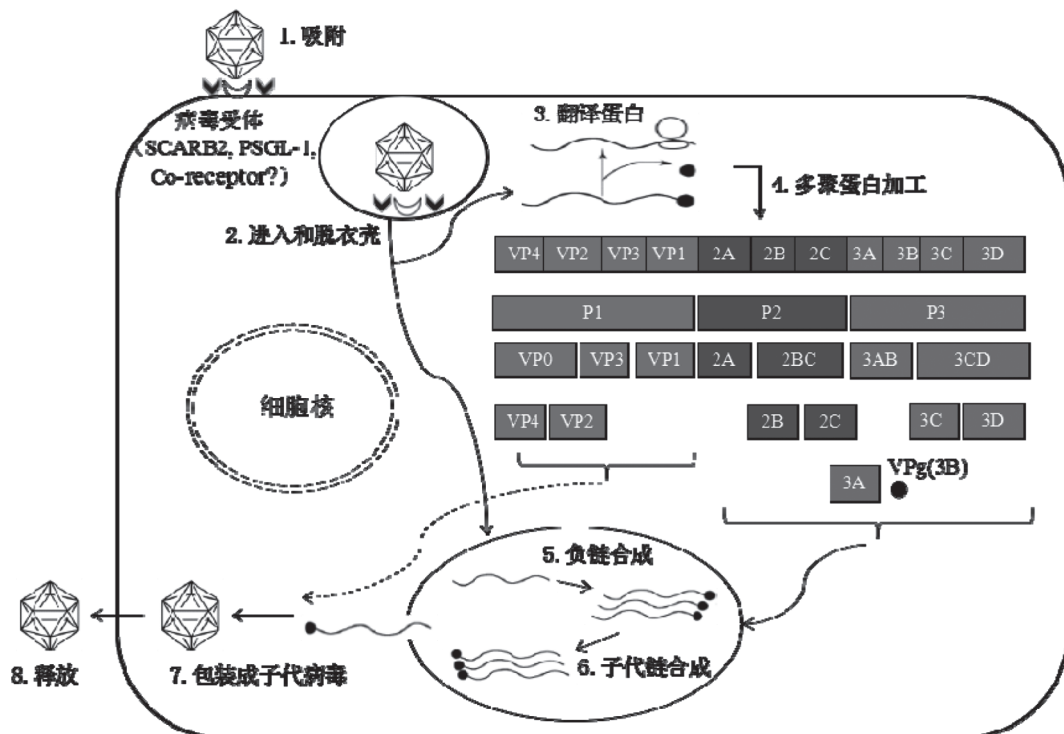


图1 EV-A71感染和增殖过程示意图

域衔接蛋白 (TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$ , TRIF/TICAM1) 作用, TRIF 与 TRAF3 或 TRAF6 联系, 也可活化 NF- $\kappa$ B 引起下游炎症细胞因子释放<sup>[7]</sup>。

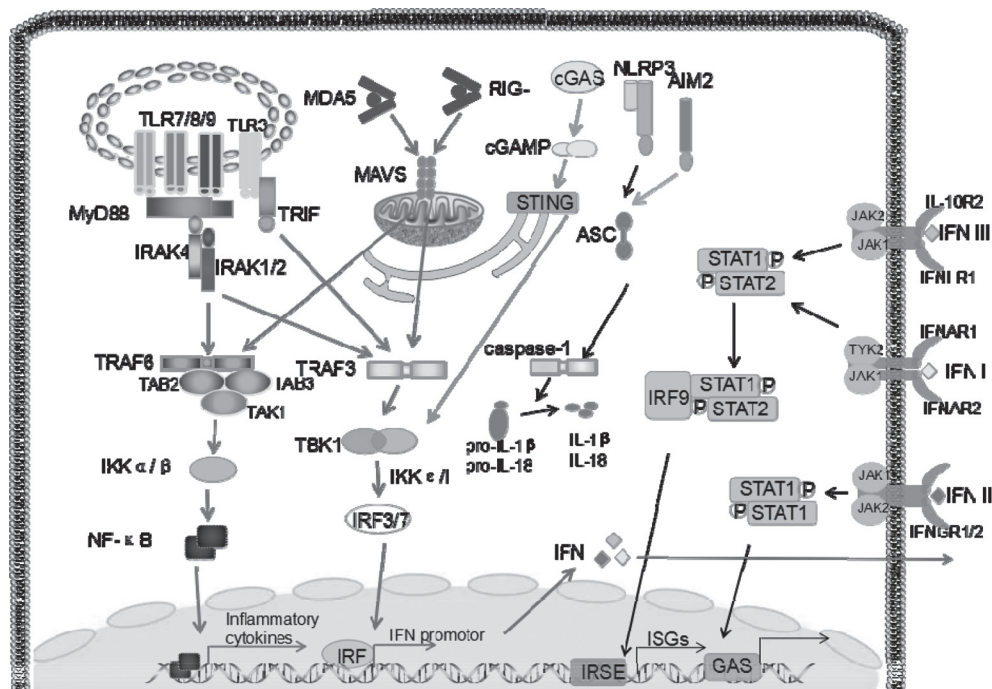
ALR 和 NLR 家族主要功能是形成炎症小体, 控制促炎性细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 成熟和分泌。STING 位于内质网, 可以识别细胞中的 DNA, 如细菌、病毒基因组 DNA, 通过 TBK1 和 IKK 蛋白酶分别引起 IRF 转录和 NF- $\kappa$ B 活化<sup>[8]</sup>。

病毒被宿主 PRRs 识别后, 首先引起以诱生 IFNs 为主的固有免疫应答, 促使细胞分泌 IFNs。IFN 与相应受体结合后, 受体胞内段招募活化的酪氨酸蛋白激酶 JAKs, 并被磷酸化。I 型 IFN 激活 JAK-STAT 信号转导过程中, STAT1 和 STAT2 活化形成异源二聚体, 并招募 IRF9, 形成 ISGF3

(IFN-stimulated gene factor 3) 复合物入核, 随之结合于 DNA 序列 ISRE 上, 从而激活干扰素刺激因子 (ISGs), 如 PKR 和 ISG15 的表达<sup>[9]</sup>; 而在 II 型 IFN 信号转导通路中, STAT1 活化形成同源二聚体, 入核后与 GAS 元件 (IFN $\gamma$ -activated sequence) 结合, 诱导 ISGs 表达<sup>[9]</sup>; III 型 IFN 通路与 I 型 IFN 类似, 但是 III 型 IFN 被认为在 I 型 IFN 作用高峰平息后发挥作用<sup>[9]</sup>。通常认为, IFN 在控制病毒感染早期起主要作用, 且可诱导超过 300 多种 ISGs 表达, 包括 MX、OAS1 和 PKR 等。ISGs 可以诱导病毒 RNA 降解, 导致细胞凋亡, 使细胞处于一个抗病毒状态的微环境中 (图 2)。

### 1.2 IFN在抗EV-A71感染中的作用

IFN 在固有免疫中起着主要作用。I 型 IFN 部分亚型, 如 IFN- $\alpha$ 6、IFN- $\alpha$ 4、IFN- $\alpha$ 14 和 IFN- $\alpha$ 16, 已



TLR: Toll-like receptor, Toll样受体; MyD88: Myeloid differentiation factor 88, 髓样分化因子; TRIF: TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$ ,  $\beta$ 干扰素TIR结构域衔接蛋白; IRAK: IL-1 receptor-associated kinase, 白介素-1受体相关激酶; TRAF: tumor necrosis factor receptor-associated factor, 肿瘤坏死因子受体相关因子; TAB: TAK1 binding protein, TAK1结合蛋白; TAK1: TGF $\beta$ -activated kinase 1, TGF $\beta$ 活化激酶1; IKK $\alpha$ / $\beta$ : inhibitor  $\kappa$ B kinase  $\alpha$ / $\beta$ , I $\kappa$ B激酶 $\alpha$ / $\beta$ ; NF- $\kappa$ B: nuclear factor-kappa B, 核转录因子kappa B; MDA5: melanoma differentiation-associated gene-5, 黑色素瘤相关因子5; RIG-I: retinoic acid-inducible gene, 维甲酸诱导基因I受体; MAVS: mitochondrial antiviral signaling, 线粒体抗病毒信号蛋白; IRF: Interferon regulatory factor, 干扰素调节因子; cGAMP: cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate; cGAS: cGMP-AMP synthase, 核酸转移酶; STING: stimulator of interferon genes, 干扰素刺激基因; NLRP3: NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3, Nod样受体蛋白3; AIM2: absent in melanoma 2, 黑色素瘤缺乏因子2; ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, 含CARD结构域的凋亡相关颗粒样蛋白; IFN: Interferon, 干扰素; JAK: Janus kinase, 两面神激酶; TYK: tyrosine kinase, 酪氨酸激酶; STAT: signal transducer and activator of transcription, 信号转导和转录激活因子; ISGs: interferon-stimulated genes, 干扰素刺激基因; IRSE: IFN-stimulated response element, 干扰素刺激反应元件; GAS: IFN $\gamma$ -activated sequence

图2 机体识别病毒感染、诱导IFNs产生, 促使IFN信号通路激活等固有免疫应答

被证实可以抑制 EV-A71 复制, 其中 IFN- $\alpha$ 14 抑制 EV-A71 复制的能力比常用的 IFN- $\alpha$ 2a 高达 20 倍<sup>[10]</sup>。但是, 干扰素只能作为预处理抑制 EV-A71 复制, 而在感染后注射几乎无效<sup>[11]</sup>。另外, 利用 IFN- $\alpha/\beta$  的中和抗体可以增加病毒载量且加重症状。抗病毒药物芦平曲韦 (rupintrivir)(EV-A71 3C 蛋白的抑制剂) 对抗 EV-A71 的效果有限, 但是与 IFN- $\alpha$  结合使用后可以有效抑制 EV-A71 的复制<sup>[12]</sup>。

而 II 型 IFN (IFN- $\gamma$ ) 在 EV-A71 感染中的作用颇有争议, IFN- $\gamma$  是由 NK 细胞、T 细胞和抗原递呈细胞产生的一种促炎症细胞因子, 具有抗微生物感染和抗肿瘤的作用<sup>[13]</sup>。与 IFNAR 敲除小鼠相比, IFNAR 和 IFN- $\gamma$  受体 (IFN- $\gamma$ R) 双敲除小鼠更容易感染 EV-A71<sup>[14]</sup>。本实验室此前也发现, IFN- $\gamma$  处理 RD 细胞亦可抑制 EV-A71 复制<sup>[15]</sup>, 说明 IFN- $\gamma$  具有保护机体的作用。然而, 也有报道发现, IFN- $\gamma$  可以促进 EV-A71 引起的患者肺水肿和脑炎<sup>[16]</sup>。

此外, III 型 IFN (IFN- $\lambda$ ) 在抗病毒作用中也起着重要作用。Pott 等<sup>[17]</sup>发现 III 型 IFN 在肠道上皮细胞抗病毒免疫防御中很关键。因为肠道病毒的复制主要在胃肠道进行, 因此, IFN- $\lambda$  也许在控制病毒感染方面有重要作用。据报道, 用 III 型 IFN 处理人胰岛细胞可以显著降低柯萨奇病毒 B3 型 (coxsackievirus B3, CVB3) 的复制, 且可诱导一些 ISGs, 包括 MxA、RIG-I 和 MDA 表达<sup>[18-19]</sup>。但 IFN- $\lambda$  对脑心肌炎病毒 (encephalomyocarditis virus, EMCV) 的感染并没有表现出显著的作用<sup>[20]</sup>。因此, IFN- $\lambda$  在小 RNA 病毒感染中的确切作用还有待进一步确认。

IFN 作为宿固有免疫抗病毒感染的作用被广泛认同, 但 EV-A71 进化形成诸多途径来逃逸宿主免疫, 包括利用不同的分子机制下调 I 型 IFN 的产生, 并抑制宿主 IFN 的信号通路, 从而促进病毒复制。下文主要就 EV-A71 如何抑制宿主识别病毒侵入, 抑制 IFN 的产生, 以及阻断 IFN 信号转导通路等机体固有免疫的分子机制做一详述。

## 2 EV-A71 逃逸宿主固有免疫机制

### 2.1 EV-A71 阻碍宿主对病毒 RNA 的识别和 IFNs 的诱导

#### 2.1.1 EV-A71 阻断 RLR 通路

RIG-I 样受体通路 (RLR 通路) 中识别病毒 RNA 的分子, 包括 MDA5 和 RIG-I。小 RNA 病毒基因组 RNA 主要被 MDA5 识别<sup>[5]</sup>。RIG-I 和 MDA-5 通过识别不同结构的病毒 RNA 来激活固有免疫应答。

RIG-I 可识别 5'-ppp-ssRNA 和短片段的 dsRNA, 而 MDA-5 主要识别大于 2 kb 的长片段 dsRNA<sup>[21]</sup>。病毒 RNA 被识别后, RIG-I 和 MDA5 与下游 MAVS 相互作用, 进而诱导 IFN 合成。

#### 2.1.1.1 EV-A71 2A 蛋白可裂解 MDA5

MDA5 是识别小 RNA 病毒的关键受体<sup>[5]</sup>。肠道病毒 (如 CVB3 和 PV) 感染时, 2A<sup>pro</sup> 可以裂解 MDA5 导致 IFN 产生受抑制<sup>[22-23]</sup>。Barral 等<sup>[22]</sup>发现, 在 PV 感染时, MDA5 裂解与蛋白酶体 (proteasome) 和 Caspase (cysteinylyl aspartate specific proteinase) 活性有关。但这有可能是因为细胞被 poly(I:C) 或病毒 RNA 处理后启动了 IFN 反应, 导致包括 MDA5 等 ISGs 上调, 从而以依赖蛋白酶体和 Caspase 的方式裂解 MDA5。然而, 在未经 poly(I:C) 或病毒 RNA 处理的细胞中, 病毒 2A<sup>pro</sup> 水解酶的表达可以促进 MDA5 的裂解, 这说明 MDA5 的裂解主要与病毒水解酶相关<sup>[24]</sup>。与其他肠道病毒相似, EV-A71 2A 蛋白也可以裂解 MDA5, 从而抑制 IRF3 的活化, 并下调 I 型 IFN 产生<sup>[24]</sup> (图 3)。Kuo 等<sup>[25]</sup>利用 EV-A71 RNA 作为激动剂, 发现 MDA5 可识别 EV-A71 RNA 并活化 IRF3, 且 EV-A71 感染可以促进 MDA5 降解, 而过表达 MDA5 可以逆转 EV-A71 感染引起的 IRF3 活化抑制效应。

#### 2.1.1.2 EV-A71 3C 蛋白可与 RIG-I 结合

Barral 等<sup>[26]</sup>研究表明, RIG-I 可以被一些小 RNA 病毒 (如 PV、RV、ECHO、EMCV 等) 调控。Lei 等<sup>[27]</sup>报道 EV-A71 3C 蛋白也可与 RIG-I 作用, 并抑制 I 型 IFN 的产生。EV-A71 感染后, 3C 蛋白可以直接结合 RIG-I 的 N 端结构域并阻止其与下游分子 MAVS 结合, 导致 IRF3 活化受抑制和下游 I 型 IFN 产生减少 (图 3)。通过突变研究发现, EV-A71 3C 蛋白的活性与 H40、KFRDI (82~86 aa) 和 VGK (154~156 aa) 基序有关, 这 3 段序列对其 RNA 结合能力和蛋白酶活性必不可少。此外, EV-A71 3C 蛋白可呈剂量依赖性地大幅下调 RIG-I 引起的 IFN- $\beta$  启动子活性, 但并不影响 MDA5 调节的 IFN- $\beta$  的活性<sup>[27]</sup>。

然而, EV-A71 3C 蛋白结合 RIG-I 的确切作用并不清楚。在 EV-A71 RNA 转染细胞后, 用 RNAi 技术将 RIG-I 沉默后并没有阻止 IRF3 的活化, 但是, 下调 MDA5 后 IRF3 活化却明显降低<sup>[25]</sup>。鼻病毒 (RV1B) 感染人支气管上皮细胞 (HBECs) 可引起 RIG-I 表达上调, 下调 RIG-I 后导致 HBECs 产生 IFN- $\beta$  减少, 但 III 型 IFN 表达不受影响; 而同时下

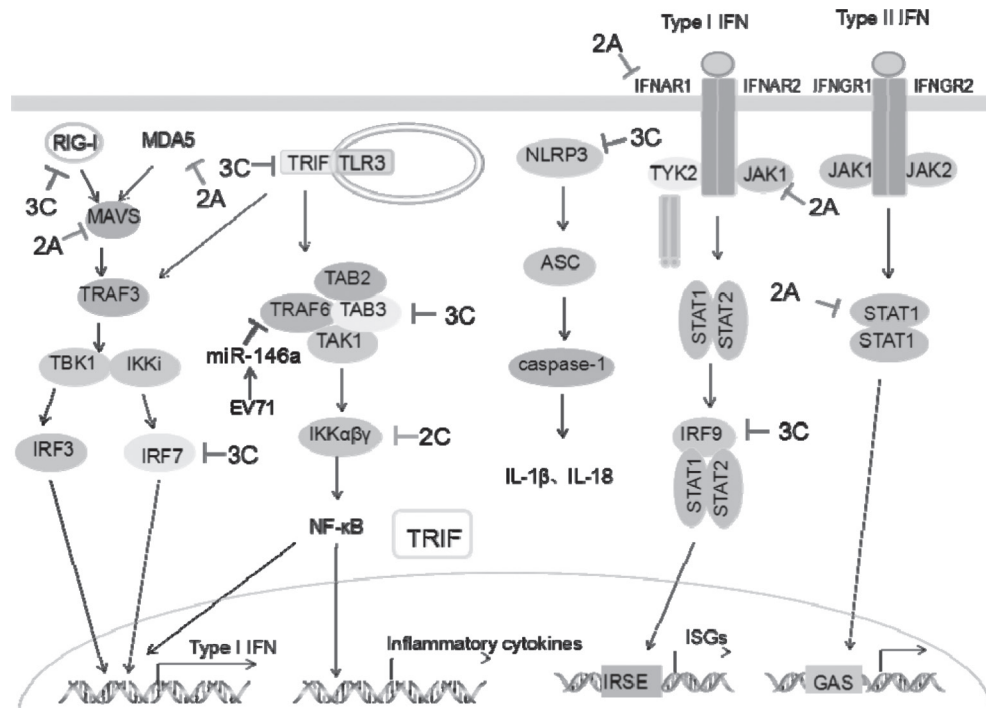


图3 EV-A71逃逸宿主固有免疫的主要分子机制

调 RIG-I 和 MDA5, 则 I 型和 III 型 IFN 表达均受影响<sup>[28]</sup>。与体外实验相比, 体内实验用 RV16 感染后, 支气管组织活检并没有发现 RIG-I 表达上调<sup>[28]</sup>。这或许与该实验感染后仅检测了其中一个时间点有关。另外, 分别利用不同的病毒株 (RV1B 感染 HBEC 和 RV16 感染活体组织) 进行实验, 导致对比困难。因此, RIG-I 在小 RNA 病毒感染中的作用还需要更多的实验来确认。

### 2.1.1.3 EV-A71 2A 蛋白裂解 MAVS

因为 MAVS 在诱导 IFN 产生通路中的重要作用, 因此, 在很多病毒感染中都发现 MAVS 激活受到抑制, 如 HCV 的 NS3/4 蛋白酶可以结合 MAVS 并在 Cys508 位将其裂解<sup>[29]</sup>; HAV 的蛋白酶前体可以在 MAVS 的 Gln428 位将其裂解, 抑制 I 型 IFN 的产生<sup>[30]</sup>; RV 的 2A 和 3C 蛋白酶也可以裂解 MAVS<sup>[31]</sup>; CVB3 可在 Gln148 位裂解 MAVS<sup>[32]</sup>。EV-A71 也被报道可以蛋白水解方式裂解 MAVS (图 3)。EV-A71 2A 在 Gly209、Gly251 和 Gly265 位裂解 MAVS。通过免疫印迹和差异速度离心发现, MAVS 被裂解后从线粒体上分离, 裂解产物释放到胞质中。另外还发现, EV-A71 的 VP1 与线粒体共定位, 这意味着 EV-A71 病毒复制可能与线粒体有关: 在 EV-A71 增殖过程中, 2A 或可引起线粒体功能丧失和 MAVS 裂解, 因而阻断 IRF3 的磷酸化并拮抗 I 型

IFN 产生, 有利于病毒增殖<sup>[33]</sup>, 而 EV-A71 的这些作用与其诱导细胞凋亡和蛋白酶激活无关。

### 2.1.2 EV-A71 阻断 TLR 通路

细胞膜和内吞体上的 TLR 分子也可识别小 RNA 病毒。结合病毒 RNA 后, TLR 与下游 TRIF 等作用激活 IFN 产生, 也可活化 NF- $\kappa$ B 引起下游炎症细胞因子释放<sup>[7]</sup>。

#### 2.1.2.1 EV-A71 3C 蛋白裂解 TRIF

TLR3 主要识别病毒 dsRNA。dsRNA 结合 TLR3 后招募 TRIF/TICAM, 然后激活 IRF3 和 NF- $\kappa$ B, 从而启动 IFN 的诱导和炎症因子的分泌。TLR3/TICAM 途径在抗小 RNA 病毒感染方面有重要作用。如在 PV 感染中, 人 PVR TICAM-1<sup>-/-</sup> 转基因小鼠与野生型、MAVS<sup>-/-</sup> 小鼠相比, TICAM-1<sup>-/-</sup> 转基因小鼠表现出更高的易感性。此外, TICAM-1<sup>-/-</sup> 转基因小鼠脾脏树突状细胞的 I 型 IFN mRNA 表达水平也是最低的<sup>[34]</sup>。另外一项研究显示, 虽然 MDA5、TLR3 和 MyD88 调节的信号通路在抗 PV 感染中都有作用, 但 TLR3 起关键作用<sup>[7]</sup>。

Abe 等<sup>[7]</sup>解释了 MDA5 在 IFN 处理鼠肾脏细胞中识别 PV 的作用。他们发现在 PV 感染时, 显著抑制 I 型 IFN 产生的是 MDA5<sup>-/-</sup>/RIG-I<sup>-/-</sup> 细胞, 而不是 RIG-I<sup>-/-</sup>/MDA5<sup>+/-</sup> 细胞。而根据体内实验, 他们认为 TLR3 是识别 PV 的关键 PRR。因为他们

发现 PV 在非神经组织中复制不依赖于 RLRs, 而主要依赖于 TLR3。PV 感染的 TRIF<sup>-/-</sup> 小鼠非神经组织中的病毒载量比野生型小鼠显著升高, 然而, 在神经组织中并没有显著差异。这说明 TLR3-TRIF 通路可在 PV 病毒扩散进入中枢神经系统前抑制非神经组织中病毒复制, 从而保护中枢神经系统免受病毒感染<sup>[7]</sup>。Lei 等<sup>[27]</sup> 发现, EV-A71 3C 蛋白可以裂解 TRIF 的 Q312-S313 氨基酸残基, 从而抑制 IRF3 和 NF- $\kappa$ B 介导的免疫应答, 包括 ISG56、ISG54 和 IFN- $\beta$  的产生 (图 3)。在 EV-A71 感染后 12~24 h, TRIF 裂解最显著, 但 EV-A71 抑制由 poly I:C 诱导产生的 ISGs 发生的时间更早 (感染后 6~16 h)<sup>[35]</sup>。因此, 很难说 TRIF 的裂解是导致 ISGs 抑制的直接原因。3C 蛋白在感染后 4 h 产生, 它可能在更早的时间内与 TRIF 作用, 但因为 TRIF 蛋白表达量太低而不易检测。另外, 3C 蛋白还可与其他引起 ISGs 表达的重要蛋白相互作用, 从而抑制 ISGs 产生, 如 RIG-I、IRF7、IRF9 等。除 3C 蛋白外, EV-A71 的 2A 蛋白酶也可以裂解其他的细胞信号分子并抑制 ISGs 产生。

#### 2.1.2.2 EV-A71 阻断 IRAK1 和 TRAF6

MicroRNAs (miRNAs) 是一类高度保守的非编码小分子 RNA, 通过与靶 mRNA 的 3'-UTR 结合抑制翻译。miRNAs 可作为诱导剂或抑制剂作用于宿主免疫系统。miR-146a 的靶基因包括 IRAK1 和 TRAF6。研究发现, EV-A71 感染后可以上调 miR-146a 且抑制 IRAK1 和 TRAF6 的表达, 从而抑制 IFN- $\beta$  产生。miR-146a<sup>-/-</sup> 小鼠与野生型小鼠在感染 EV-A71 后相比, 生存率更高且症状更轻微<sup>[36]</sup>。

#### 2.1.3 EV-A71 作用 IFN 调节因子 7 (IRF7)

IRF7 是引起 I 型 IFN 产生的一个重要转录因子。一旦接受到各种 PRRs (RIG-I、MDA5、TLR3、TLR7、TLR8、TLR9) 的信号后, IRF7 磷酸化并转移到核内诱导 I 型 IFN 的产生。通常认为 IRF3 作用于 I 型 IFN 产生的初始阶段, 而 IRF7 作用于放大阶段且对初始反应有正反馈作用<sup>[37]</sup>。EV-A71 3C 蛋白可以降解 IRF7 并影响 I 型 IFN 的产生 (图 3), 从而导致下游 ISGs, 如 ISG56 产生减少。EV-A71 3C 对 IRF7 的降解是 3C 水解酶活性的作用, 而与其介导宿主的 Caspase 活性、蛋白酶活性、溶酶体活性等无关<sup>[37]</sup>。

miR-562a 在 VSV 感染时表达上调。miR-562a 可抑制头帕肿瘤综合征蛋白 (cylindromatosis, CYLD) 的表达及其去泛素化酶活性, CYLD 是 RIG-I K63

位连接泛素链的负调控因子, 因而 CYLD 表达下调可增加 RIG-I 介导的 IFN- $\beta$  表达, 且病毒引起 miR-526a 上调是部分依赖于 IRF7 的。然而, EV-A71 感染后 miR-562a 表达水平非常低, 同时, IFN- $\beta$  表达水平也很低。Xu 等<sup>[38]</sup> 研究发现, 导致这一现象的原因是 EV-A71 3C 蛋白可裂解 IRF7。

#### 2.2 EV-A71 阻断 IFN 信号通路

##### 2.2.1 EV-A71 2A 蛋白下调 I 型 IFN 受体 (interferon receptor 1, IFNAR1) 表达

病毒感染诱导 IFN 表达后, 分泌的 I 型 IFN 可结合 IFNARs, 进而激活 JAK1 和 TYK2, JAK1 和 TYK2 激酶磷酸化 STAT1 和 STAT2, 引起 ISGs 转录和表达, 产生抗病毒反应<sup>[9]</sup>, 但外源性 IFN 治疗 EV-A71 感染者几乎无效, 病毒感染导致 IFNs 不敏感的分子机制目前尚不清楚。2012 年, Lu 等<sup>[39]</sup> 报道, EV-A71 感染可以下调 IFNAR1 表达并阻止 IFN 信号通路。RD 细胞感染 EV-A71 后, IFN- $\beta$  mRNA 水平升高, 但不能产生高水平的 ISGs 表达。另外, 病毒感染后, p-STAT1、p-STAT2、TYK2 和 JAK1 都表达下调。他们发现 EV-A71 2A 蛋白可以降低 IFNAR1、p-TYK2 和 p-STAT1 水平 (图 3), 但是失去蛋白水解活性的 2A 蛋白突变体没有抑制 IFN 通路的活性。外源性 IFN- $\alpha$  可以上调这些蛋白水平, 但是 IFN- $\alpha$  预处理过的细胞经 EV-A71 感染后 ISGs 表达仍然受损, 与 EV-A71 感染导致 IFNAR1 水平下调一致。另一项研究显示, EV-A71 2A 对肠道病毒在 IFN 预处理细胞中复制至关重要<sup>[40]</sup>。IFN 受体表达下调的细胞不能对外源性 IFNs 产生应答<sup>[41]</sup>, 这或许解释了为什么病毒感染后, 用 IFN 处理不能抑制 EV-A71 复制。然而, 与此相矛盾的是, Liu 等<sup>[42]</sup> 的研究表明, EV-A71 并没有改变 IFNAR1 的表达水平, 但它确实抑制了 IFN 信号通路中的 JAK1 和 Tyk2 的磷酸化, 并且 EV-A71 2A 和 3C 在此过程中并没有明显作用。至于这些相互矛盾的结果, 还需要更多深入和重复性的实验来确认。

##### 2.2.2 EV-A71 3C 蛋白裂解 IFN 调节因子 9 (IRF9)

IRF9 是 IFN 信号通路中激活 ISGs 转录的上游调控转录因子。据报道, EV-A71 3C 蛋白可结合并降解 IRF9 (图 3)。在病毒感染细胞 5 h 后, IRF9 开始降解。体外酶反应实验显示, 重组 3C 蛋白可将 IRF9 降解, 而 3C 蛋白的突变体没有这种能力, 但是这种反应的具体分子机制还不清楚<sup>[12]</sup>。

##### 2.2.3 EV-A71 2A 和 3D 蛋白拮抗 IFN- $\gamma$ 信号通路

IFN- $\gamma$  的抗病毒作用相比于 I 型 IFN 要弱的多,

它主要参与调节细胞免疫和炎症反应。Wang 等<sup>[43]</sup>发现, EV-A71 感染后 IRF1 激活受阻而使 IFN- $\gamma$  信号转导减弱。EV-A71 的 2A 和 3D 蛋白可以阻断 IFN- $\gamma$  引起的 IRF1 反式激活, 且使 STAT1 核迁移受抑制。2A 和 3D 分别通过不同的机制影响 IFN- $\gamma$  的效应。3D 蛋白为病毒 RNA 聚合酶 (RdRp), 主要在 EV-A71 RNA 非引物依赖型 (*de novo*) 复制中起作用。在稳定表达 3D 蛋白的细胞中, IFN- $\gamma$  不能将 STAT1 的 Tyr701 磷酸化, 但是上游 JAK2 磷酸化并未受影响, 且 STAT1 蛋白和 mRNA 水平都下调, 而 IFN- $\gamma$ R 表达水平未受影响<sup>[43]</sup>。与 3D 作用机制不同, 在稳定表达 2A 细胞中, IFN- $\gamma$  引起的 STAT1 酪氨酸磷酸化和表达水平并未受影响, 但是对 STAT1/STAT1 二聚体形成和稳定核转位的 Ser727 磷酸化被抑制 (图 3), 而且上游 c-Raf/MEK1/2/ERK 通路激活信号也被阻断<sup>[43]</sup>。有关 EV-A71 2A 和 3D 引起上述现象的具体机制还需要进一步的研究。

#### 2.2.4 EV-A71 可能降低 IFN- $\lambda$ 1 表达水平

IFN- $\lambda$  (III IFN) 在抗病毒感染中具有重要作用。Li 等<sup>[44]</sup>发现, 在 RD 细胞中 miR-548 可以作用于 IFN- $\lambda$ 1 的 3'-UTR 并可促进 EV-A71 的感染, 说明 EV-A71 感染与 IFN- $\lambda$ 1 的表达水平有关。但他们发现 miR-548 的表达在 EV-A71 感染后下调。而 Lui 等<sup>[45]</sup>利用基因芯片和 qPCR 等技术, 发现 HT29 细胞被 EV-A71 感染后 miR-548 明显上调了。由于他们实验采用了不同的细胞系, 这或许表明宿主 miR-548 对病毒感染的应答和作用具有组织特异性。

### 2.3 EV-A71 阻断炎症因子的产生

#### 2.3.1 EV-A71 3C 蛋白裂解 TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 复合物

TAK1 是 MAP3K 家族中的一员, 可被 TLR、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  激活。在 EV-A71 感染后, TAK1 形成 TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 复合物, 其可以激活 IKK  $\alpha\beta\gamma$ 、p38 和 JNK, 并使下游 NF- $\kappa$ B 活化。EV-A71 3C 蛋白可直接作用于 TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 复合物 (图 3), 并导致 TAK1 和 TAB2 降解, TAK1/TAB2 降解后引起 NF- $\kappa$ B 活化受到抑制, 从而导致下游炎症因子产生减少。有趣的是, 过表达 TAB2 可以抑制约 50% EV-A71 病毒复制, 然而过表达 TAK1、TAB1、TAB3 产生的作用却非常小<sup>[46]</sup>。因此, TAK 复合物中各个分子在 EV-A71 感染中的作用还需进一步分析确定。

#### 2.3.2 EV-A71 2C 蛋白抑制 NF- $\kappa$ B 活化

NF- $\kappa$ B 可以诱导 I 型 IFNs 和促炎症因子产生,

因而在机体抗病毒免疫应答中有着重要作用。有报道称, EV-A71 的 2C 蛋白可以抑制 NF- $\kappa$ B 活化, 从而促进病毒复制。2C 蛋白直接与 IKK $\beta$  和 I $\kappa$ B $\alpha$  的蛋白激酶结构域结合并抑制其磷酸化, 导致 NF- $\kappa$ B 活化受阻, 因而病毒复制增强<sup>[47]</sup>。

#### 2.3.3 EV-A71 阻断 NLR 通路

EV-A71 感染患者, 特别是神经系统并发症患者细胞分泌大量的炎症因子, 包括 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8, 说明 EV-A71 感染引起的炎症反应中可能包含了炎症小体的活化。Wang 等<sup>[48]</sup>发现, NLRP3<sup>-/-</sup>小鼠与野生型小鼠相比, 其出现症状更早、更严重, 且恢复更慢, 发病率也更高, 说明 NLRP3 炎症小体在 EV-A71 感染中起保护机体的作用。另外, 他们在 EV-A71 感染的 THP-1 细胞中检测到成熟的 Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 ASC 寡聚物, 因为炎症小体活化的直接证据是 Caspase-1 的活化和 ASC 寡聚体的形成<sup>[49]</sup>, 这就说明 EV-A71 感染可激活 NLRP3 炎症小体。其他小 RNA 病毒, 如 EMCV 和鼻病毒的 2B 蛋白也都可激活 NLRP3 炎症小体<sup>[50-51]</sup>。利用 EV-A71 3C 和 2A 重组蛋白, 发现 3C 利用其蛋白酶活性在 Q225-G226 间裂解 NLRP3; EV-A71 2A 也可在 G493-L494 间裂解 NLRP3, 且 3C 可抑制 NLRP3 引起的 IL-1 $\beta$  分泌<sup>[48]</sup> (图 3)。在 EV-A71 感染的早期 (2 d), NLRP3<sup>-/-</sup>小鼠体内 IL-1 $\beta$  和促炎症因子分泌量低于野生型小鼠, 而在感染的后期 (9 d), NLRP3 敲除小鼠病毒复制失控, 且促炎症细胞因子和趋化因子水平高于野生型小鼠, 因此, 炎症小体在 EV-A71 感染的早期对宿主起保护作用, 而在感染后期对机体是有害的。所以, 调节炎症小体的活性对控制 EV-A71 感染是有帮助的。

### 3 抗病毒感染免疫治疗策略和展望

EV-A71 可以通过阻断 RLR、TLR、NLR 通路, 以及 IFN 信号转导抑制宿主免疫应答, 因此, 针对这些病毒作用靶点可设计各种药物及疫苗来阻断病毒感染, 但目前并没有有效的抗 EV-A71 感染药物。芦平曲韦 (Rupintrivir, AG7088) 是一种 3C 蛋白抑制剂, 被认为是一种有效的抗 EV-A71 感染的药物。之前研究显示, 低浓度的芦平曲韦 (0.1 mg/kg) 可以保护幼鼠免于 EV-A71 致命性剂量感染引起的瘫痪和死亡<sup>[52]</sup>, 然而, 还需要通过严格实验进一步评估其实际的临床治疗效果。因此, 筛选出高效, 尤其是对 EV-A71 2A 和 3C 功能的药物尤为重要。

此外, TLR 激动剂对 EV-A71 的治疗也许有一

定作用。TLR3、TLR7 和 TLR9 被认为是抗病毒治疗最具优势的潜在靶标<sup>[53]</sup>。各种 TLR 激动剂可以抑制 HCV 和 HBV 感染<sup>[54-56]</sup>。鼻内用 TLR7/8 激动剂处理可以有效减少大鼠流感病毒滴度<sup>[57]</sup>。此外,还有报告显示在流感病毒感染的小鼠中,TLR3、TLR9 和 TLR4 激动剂可以增强免疫和抗病毒反应<sup>[58-60]</sup>。最近有报道表明,在 EV-A71 感染小鼠中,TLR9 介导的保护作用是由于释放了损伤相关分子模式 (damage-associated molecular pattern, DAMPs)。EV-A71 感染后凋亡细胞上清中内源性 DNA 可以激活 TLR9 信号通路并释放 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-10<sup>[61]</sup>。因此,TLR 激动剂在治疗机体 EV-A71 感染中可能有着重要作用。

有效激活机体免疫应答是控制病毒感染的一个重要因素。而肠道病毒在人体内漫长的共同进化,促使它们形成了有效的免疫逃逸能力。与其他小 RNA 病毒一样, EV-A71 也编码自身的蛋白酶 3C 和 2A,除促进病毒多聚蛋白的裂解和功能蛋白的成熟外,这些病毒蛋白的蛋白水解酶特性还参与了一些细胞内信号蛋白的功能调节,并因此促进病毒复制。除 2A 和 3C 具有抗 IFNs 的特性外,病毒编码蛋白,包括 EV-A71 2B、3A 和 3D 也能轻微地抑制 IFN- $\beta$  启动子活性,而其他病毒蛋白,如 VP1、VP2、VP3、VP4,以及 2AB、2BC 和 3AB 则没有这样的功能<sup>[27]</sup>。然而,2A、2B 和 3D 在固有免疫信号通路中的作用还并未有研究。

研究 EV-A71 病毒与宿主相互作用的报道有很多,但有一些研究结果是有争议的。例如,负责识别 EV-A71 的 PRRs 还在研究之中。尽管 MDA5 通路参与识别 EV-A71,而 RIG-I 与 EV-A71 3C 蛋白相互作用的目的还不清楚。因此,它们在病毒致病过程中的作用仍需进一步的研究。2014 年,miRNA 在信号通路和宿主免疫反应中的重要作用已被发现,如 miR-146 可以下调 IRAK1 和 TRAF6 表达,抑制 IFN 的产生,因此 miR-146<sup>-/-</sup> 小鼠的 IFN 产生增加<sup>[36]</sup>。然而,由于 EV-A71 的蛋白酶破坏了多种信号蛋白,包括 RLRs、JAK-STAT 通路,并抑制 ISGs 产生,因此 miR-146<sup>-/-</sup> 小鼠如何从病毒感染中幸存下来仍然不清楚。

研究的最终目的,在于能够发现针对多种 EV-A71 基因型的病毒株,及其他主要 HFMD 病原体,如 CVB16 等产生持久交叉免疫力的一种新型疫苗。然而,由于 EV-A71 频繁的基因型和亚型转变,研究这样的疫苗非常具有挑战性。因此,需要理解

EV-A71 和宿主免疫应答如何相互作用,以及它们的行为特征,确认新的治疗靶点,包括病毒和宿主因子。了解 EV-A71 病毒编码蛋白更多的结构和功能特性,将有利于理解病毒毒力因子与宿主免疫系统的相互作用,而这也将为发展潜在的治疗药物提供新的思路。

### [参 考 文 献]

- [1] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis*, 1974, 129: 304-9
- [2] Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med*, 2009, 15: 798-801
- [3] 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: e1001174
- [4] Lin YW, Wang SW, Tung YY, et al. Enterovirus 71 infection of human dendritic cells. *Exp Biol Med*: Maywood, 2009, 234: 1166-73
- [5] Feng Q, Hato SV, Langereis MA, et al. MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. *Cell Rep*, 2012, 2: 1187-96
- [6] Potter JA, Randall RE, Taylor GL. Crystal structure of human IPS-1/MAVS/VISA/Cardif caspase activation recruitment domain. *BMC Struct Biol*, 2008, 8:11
- [7] Abe Y, Fujii K, Nagata N, et al. The toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J Virol*, 2012, 86: 185-94
- [8] Yin Q, Fu TM, Li J, et al. Structural biology of innate immunity. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33: 393-416
- [9] Chow KT, Gale MJ. SnapShot: interferon signaling. *Cell*, 2015, 16: 1808-1808.e1
- [10] Yi L, He Y, Chen Y, et al. Potent inhibition of human enterovirus 71 replication by type I interferon subtypes. *Antivir Ther*, 2011, 1: 51-8
- [11] Liu ML, Lee YP, Wang YF, et al. Type I interferons protect mice against enterovirus 71 infection. *J Gen Virol*, 2005, 86: 3263-9
- [12] Hung HC, Wang HC, Shih SR, et al. Synergistic inhibition of enterovirus 71 replication by interferon and rupintrivir. *J Infect Dis*, 2011, 203: 1784-90
- [13] Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*, 2007, 96: 41-101
- [14] Caine EA, Partidos CD, Santangelo JD, et al. Adaptation of enterovirus 71 to adult interferon deficient mice. *PLoS One*, 2013, 8: e59501
- [15] Bian L, Wang Y, Liu Q, et al. Prediction of signaling pathways involved in enterovirus 71 infection by algorithm analysis based on miRNA profiles and their target genes. *Arch Virol*, 2015, 160: 173-82
- [16] Yang J, Zhao N, Su NL, et al. Association of interleukin 10 and interferon gamma gene polymorphisms with



- enterovirus 71 encephalitis in patients with hand, foot and mouth disease. *Scand J Infect Dis*, 2012, 44: 465-9
- [17] Pott J, Mahlakoiv T, Mordstein M, et al. IFN- $\lambda$  determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 7944-9
- [18] Lind K, Richardson SJ, Leete P, et al. Induction of an antiviral state and attenuated coxsackievirus replication in type III interferon-treated primary human pancreatic islets. *J Virol*, 2013, 87: 7646-54
- [19] Lind K, Svedin E, Utorova R, et al. Type III interferons are expressed by Coxsackievirus-infected human primary hepatocytes and regulate hepatocyte permissiveness to infection. *Clin Exp Immunol*, 2014, 177: 687-95
- [20] Ank N, West H, Bartholdy C, et al. Lambda interferon (IFN- $\lambda$ ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections *in vivo*. *J Virol*, 2006, 80: 4501-9
- [21] Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*, 2008, 205: 1601-10
- [22] Barral PM, Morrison JM, Drahos J, et al. MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells. *J Virol*, 2007, 81: 3677-84
- [23] Huhn MH, McCartney SA, Lind K, et al. Melanoma differentiation-associated protein-5 (MDA-5) limits early viral replication but is not essential for the induction of type I interferons after *Coxsackievirus* infection. *Virology*, 2010, 401: 42-8
- [24] Feng Q, Langereis MA, Lork M, et al. Enterovirus 2A<sup>pro</sup> targets MDA5 and MAVS in infected cells. *J Virol*, 2014, 88: 3369-78
- [25] Kuo RL, Kao LT, Lin SJ, et al. MDA5 plays a crucial role in enterovirus 71 RNA-mediated IRF3 activation. *PLoS One*, 2013, 8: e63431
- [26] Barral PM, Sarkar D, Fisher PB, et al. RIG-I is cleaved during picornavirus infection. *Virology*, 2009, 391: 171-6
- [27] Lei X, Liu X, Ma Y, et al. The 3C protein of enterovirus 71 inhibits retinoid acid-inducible gene I-mediated interferon regulatory factor 3 activation and type I interferon responses. *J Virol*, 2010, 84: 8051-61
- [28] Slater L, Bartlett NW, Haas JJ, et al. Co-ordinated role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the innate response to rhinovirus in bronchial epithelium. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1001178
- [29] Lin R, Lacoste J, Nakhaei P, et al. Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKe molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J Virol*, 2006, 80: 6072-83
- [30] Yang Y, Liang Y, Qu L, et al. Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 7253-8
- [31] Drahos J, Racaniello VR. Cleavage of IPS-1 in cells infected with human rhinovirus. *J Virol*, 2009, 83: 11581-7
- [32] Mukherjee A, Morosky SA, Delorme-Axford E, et al. The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling. *PLoS Pathog*, 2011, 7: e1001311
- [33] Wang B, Xi X, Lei X, et al. Enterovirus 71 protease 2A<sup>pro</sup> targets MAVS to inhibit anti-viral type I interferon responses. *PLoS Pathog*, 2013, 9: e1003231
- [34] Oshiumi H, Okamoto M, Fujii K, et al. The TLR3/TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J Immunol*, 2011, 187: 5320-7
- [35] Lei X, Sun Z, Liu X, et al. Cleavage of the adaptor protein TRIF by enterovirus 71 3C inhibits antiviral responses mediated by Toll-like receptor 3. *J Virol*, 2011, 85: 8811-8
- [36] Ho BC, Yu IS, Lu LF, et al. Inhibition of miR-146a prevents enterovirus-induced death by restoring the production of type I interferon. *Nat Commun*, 2014, 5: 3344
- [37] Lei X, Xiao X, Xue Q, et al. Cleavage of interferon regulatory factor 7 by enterovirus 71 3C suppresses cellular responses. *J Virol*, 2013, 87: 1690-8
- [38] Xu C, He X, Zheng Z, et al. Downregulation of microRNA miR-526a by enterovirus inhibits RIG-I-dependent innate immune response. *J Virol*, 2014, 88: 11356-68
- [39] Lu J, Yi L, Zhao J, et al. Enterovirus 71 disrupts interferon signaling by reducing the level of interferon receptor 1. *J Virol*, 2012, 86: 3767-76
- [40] Morrison JM, Racaniello VR. Proteinase 2A<sup>pro</sup> is essential for enterovirus replication in type I interferon-treated cells. *J Virol*, 2009, 83: 4412-22
- [41] Hsu AC, Parsons K, Barr I, et al. Critical role of constitutive type I interferon response in bronchial epithelial cell to influenza infection. *PLoS One*, 2012, 7: e32947
- [42] Liu Y, Zhang Z, Zhao X, et al. Enterovirus 71 inhibits cellular type I interferon signaling by downregulating JAK1 protein expression. *Viral Immunol*, 2014, 27: 267-76
- [43] Wang LC, Chen SO, Chang SP, et al. Enterovirus 71 proteins 2A and 3D antagonize the antiviral activity of gamma interferon via signaling attenuation. *J Virol*, 2015, 89: 7028-37
- [44] Li Y, Xie J, Xu X, et al. MicroRNA-548 down-regulates host antiviral response via direct targeting of IFN-lambda1. *Protein Cell*, 2013, 4: 130-41
- [45] Lui YL, Tan TL, Woo WH, et al. Enterovirus71 (EV71) utilise host microRNAs to mediate host immune system enhancing survival during infection. *PLoS One*, 2014, 9: e102997
- [46] Lei X, Han N, Xiao X, et al. Enterovirus 71 3C inhibits cytokine expression through cleavage of the TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 complex. *J Virol*, 2014, 88: 9830-41
- [47] Zheng Z, Li H, Zhang Z, et al. Enterovirus 71 2C protein inhibits TNF- $\alpha$ -mediated activation of NF- $\kappa$ B by suppressing I $\kappa$ B kinase  $\beta$  phosphorylation. *J Immunol*, 2011, 187: 2202-12
- [48] Wang H, Lei X, Xiao X, et al. Reciprocal regulation between enterovirus 71 and the NLRP3 inflammasome. *Cell Rep*, 2015, 12: 42-8
- [49] Wang B, Xi X, Lei X, et al. Enterovirus 71 protease 2A<sup>pro</sup>

- targets MAVS to inhibit anti-viral type I interferon responses. *PLoS Pathog*, 2013, 9: e1003231
- [50] Triantafilou K, Kar S, van Kuppeveld FJ, et al. Rhinovirus-induced calcium flux triggers NLRP3 and NLRC5 activation in bronchial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49: 923-34
- [51] Ito M, Yanagi Y, Ichinohe T. Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome. *PLoS Pathog*, 2012, 8: e1002857
- [52] Zhang X, Song Z, Qin B, et al. Rupintrivir is a promising candidate for treating severe cases of enterovirus-71 infection: evaluation of antiviral efficacy in a murine infection model. *Antiviral Res*, 2013, 9: 264-9
- [53] Thomas A, Laxton C, Rodman J, et al. Investigating Toll-like receptor agonists for potential to treat hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 2969-78
- [54] Horsmans Y, Berg T, Desager JP, et al. Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection. *Hepatology*, 2005, 4: 724-31
- [55] Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, et al. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication *in vivo*. *J Virol*, 2005, 79: 7269-72
- [56] Lee J, Wu CC, Lee KJ, et al. Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 1828-33
- [57] Hammerbeck DM, Burleson GR, Schuller CJ, et al. Administration of a dual toll-like receptor 7 and toll-like receptor 8 agonist protects against influenza in rats. *Antiviral Res*, 2007, 73: 1-11
- [58] Cluff CW, Baldrige JR, Stver AG, et al. Synthetic Toll-like receptor 4 agonists stimulate innate resistance to infectious challenge. *Infect Immun*, 2005, 73: 3044-52
- [59] Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, et al. Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J Virol*, 2005, 79: 2910-9
- [60] Wong JP, Christopher ME, Salazar AM, et al. Nucleic acid-based antiviral drugs against seasonal and avian influenza viruses. *Vaccine*, 2007, 25: 3175-8
- [61] Hsiao HB, Chou AH, Lin SI, et al. Toll-like receptor 9-mediated protection of enterovirus 71 infection in mice is due to the release of danger-associated molecular patterns. *J Virol*, 2014, 88: 11658-70