

· 综述 ·

抗肠道病毒 71 型治疗策略的研究进展

毛莉萍 秦刚 章幼奕

肠道病毒71型 (enterovirus 71, EV71) 目前被认为是引起儿童手足口病的主要病原体之一。该病毒可以引起疱疹性咽峡炎、脑干脑炎、神经源性肺水肿等多种疾病^[1], EV71感染引起的手足口病呈周期性暴发与流行,在亚太地区暴发较为严重^[2]。我国自2008年5月,安徽省阜阳市暴发了EV71相关性手足口病以来,在此后5年内中国部分地区逐渐呈现增多趋势。目前, EV71被认为是继脊髓灰质炎病毒被消灭以后最重要的嗜神经性病毒,手足口病也被喻为“21世纪的脊髓灰质炎”。针对EV71目前临床上尚无有效的抗病毒药物或已被批准的疫苗应用。因此,研制有效的抗EV71的药物及疫苗是今后的医学科研的重点。现将近年来国内外有关EV71抗病毒药物、疫苗的研究进展综述如下。

一、抗肠道病毒相关药物

(一) 病毒衣壳结合剂

阻断病毒进入细胞是一种理想的抗病毒策略。譬如在一定程度上,免疫球蛋白用于治疗EV71重症病例感染,部分是依赖于其非特异性中和病毒的作用。相应的,相关动物实验提示,通过注射EV71抗血清可以在小鼠间传递被动免疫保护。既往研究显示, EV71病毒衣壳蛋白中和表位位于VP1结构蛋白, VP1是EV71感染的主要受体结合蛋白^[3]。因此,针对病毒衣壳蛋白VP1中和表位研制的特异性抗体是一种有前景的抗病毒策略。与其他肠道病毒如脊髓灰质炎病毒或鼻病毒相似, EV71的VP1蛋白是一个峡谷样结构,这个结构是非常重要的受体结合位点, VP1蛋白构象改变是病毒脱衣壳和释放病毒RNA进入宿主细胞中关键的一步。因此,设计小分子靶向结合VP1蛋白可以干扰EV71型感染。普拉康纳利 (pleconaril) 已被证实可以通过结合衣壳蛋白抑制鼻病毒复制的药物^[4]。普拉康纳利临床上应用于危及生命的肠道病毒严重感染。该药主要通过与病毒的蛋白衣壳结合而干扰病毒对宿主细胞的吸附和脱衣壳,能对90%以上的肠道病毒有作用。一个药物设计软件以普拉康纳利为模板,研制出一类新的吡啶基咪唑啉酮衍生物 BPROZ-194和 BTA798,体外实验表明,这些衍生物能抑制EV71引起的细胞病变效应,并且细胞毒性很低,但当VP1蛋

白192位氨基酸由缬氨酸突变为甲硫氨酸时, EV71对BPROZ-194则产生耐药性^[5]。

(二) 酶抑制剂

1. 蛋白酶抑制剂3C和2A: 成熟分裂是EV71病毒蛋白合成的关键步骤。在人类的肠道病毒中3C和2A蛋白是病毒前体加工的关键蛋白酶。3C蛋白酶是微小RNA病毒属复制所必需的特异性蛋白酶之一,基因组研究提示其编码基因序列高度保守,因此, 3C蛋白酶就成为抗小RNA病毒药物开发的重要靶向目标。目前依据3C蛋白结构设计出的抗病毒药物有很多种,其中芦平曲韦 (rupintrivir, AG7088) 近年来,已被确定可以通过抑制3C蛋白酶活动从而起到抑制病毒复制的作用^[6]。在芦平曲韦的基础上合成一系列3C蛋白酶抑制剂,其中的一种化合物10b,已被证明能抑制人鼻病毒3C蛋白酶,其可能是另一个通过抑制3C蛋白酶阻止EV71病毒感染的候选药物。最近, EV71 3C蛋白酶的X-射线晶体结构已经被解决,为进一步基于结构设计3C蛋白酶拮抗剂提供了便利。

2A蛋白酶可以切割病毒多肽和翻译因子eIF4GI,从而停止宿主细胞的翻译。2A蛋白酶也被认为可以作为一种抗病毒药物策略来抑制EV71复制。遗憾的是,目前仍未开发出特异性的抑制剂以阻止2A蛋白酶及相关蛋白酶。然而,研究者分析人类鼻病毒2型和柯萨奇B4这两种病毒的2A蛋白酶的X-射线晶体结构^[7],发现这些蛋白酶的活性非常接近。由于他们相似的功能, EV71 2A蛋白酶的催化三联体序列,可以预测为His-21、Asp39和Cys-110。因此,通过将2A蛋白酶X-射线晶体结构和预测的催化序列相结合, 2A蛋白酶抑制剂的设计仍然是适用的。此外,针对EV71蛋白酶的药物不仅能阻止病毒蛋白成熟,而且可协助保护宿主蛋白的蛋白酶降解。

2. 3DRNA聚合酶抑制剂: EV71病毒RNA基因的复制需通过RdRp (RNA-dependent RNA polymerase), 即3D蛋白,因此,以3D聚合酶为目标特异性地抑制EV71复制是一个有效的策略。核苷(酸)类似物,如利巴韦林是研究最为广泛的小核糖核酸病毒聚合酶抑制剂。其主要通过抑制肌苷酸-5-磷酸脱氢酶,阻断肌苷酸变为鸟苷酸而抑制病毒的核酸合成,对核糖核酸RNA及脱氧核糖核酸DNA病毒均有显著的抑制作用^[8]。此外,非核苷(酸)类似物, DTriP-22也被确定是一种3D聚合酶抑制剂。DTriP-22是一个含有哌嗪的吡啶并嘧啶衍生物^[3-4], DTriP-22

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.05.035

基金项目: 江苏省预防医学科研课题资助项目 (No. Y2012076)

作者单位: 226006 南通市, 南通大学附属南通第三医院感染病科

通讯作者: 章幼奕, Email: youyizhang@hotmail.com

通过靶向抑制EV71病毒3D聚合酶来选择性抗病毒治疗^[8]。此外,铝酸最初被报道作为丙型肝炎病毒和SARS冠状病毒复制酶的抑制剂,也表现出具有抑制肠病毒71型3D聚合酶的能力。

(三) IRES元件抑制剂

由于EV71 mRNA无5'的帽子结构,翻译是依赖于其内部核糖体进入位点IRES (internal ribosomal entry site) 元件。许多研究提示EV71 IRES依赖性翻译是通过高度特异性的反式作用因子ITAFs (IRES-specific transacting factors) 控制。远端上游元件结合蛋白2 (far upstream element binding protein 2, FBP2) 被报道可以通过PTB竞争性抑制EV71 IRES活性^[9]。利用蛋白质破坏EV71 IRES元件, EV71复制就可以被抑制。这个概念可以提供抗EV71肠道病毒感染新策略。例如,山奈酚(一种黄酮类化合物)已被证明能够通过改变ITAFs结构,起到抑制EV71病毒复制及抑制IRES活性的作用。

(四) 其他小分子药物

恩韦肟是一种可以抑制鼻病毒和脊髓灰质炎病毒复制的化合物。已通过分析确定恩韦肟耐药突变的靶位点为病毒蛋白3A^[10]。病毒蛋白3A及其前体3AB在肠道病毒复制复合物形成中扮演关键角色^[10]。针对病毒蛋白3A或病毒蛋白3AB发展抗病毒药物以抑制EV71复制是一个成功的策略。例如,an-12-h5是功能类似于恩韦肟的一种化合物,被证明是一种可以体外抑制EV71复制的新的抑制剂。

(五) RNA干扰技术

RNA干扰是近年来发现的利用外源性或内源性双链RNA以高度序列特异性方式抑制基因表达的技术。RNA干扰技术是通过双链RNA介导特异性的降解相应序列的mRNA,从而阻断相应基因表达的转录后水平,使得“基因沉默”。基于这一概念,人工生成的小干扰RNA (siRNA) 被广泛应用于研究基因功能。由于siRNA能够有效下调基因表达,病毒序列特异性siRNA已被认为是潜在的治疗策略。小干扰RNA在感染的早期阶段能有效地抑制病毒的复制,病毒感染能被针对病毒基因和相关宿主基因的siRNA所阻断。一些研究已经表明,病毒特异性siRNA可以成功抑制人类病毒的复制,如脊髓灰质炎病毒、HIV-1和HCV。这项技术也被应用到EV71感染的治疗上^[11]。有学者已成功采用小鼠乳鼠模型来评估siRNA在活体中抗EV71效果,显示其是一种有潜力的治疗方法。

(六) 宿主的免疫和干扰素治疗

天然免疫系统是宿主抵御病毒入侵的第一道防线。I型干扰素(IFN- α 和IFN- β)的产生属于天然免疫反应,其可激活干扰素刺激基因表达来阻断病毒的复制。IFN- α 已被用于临床治疗HCV感染,但尚无证据显示其可用于肠道病毒感染的患者。为了评估I型

IFN是否具有抗EV71的治疗作用,将重组鼠IFN- α 应用于被EV71感染的新生小鼠,结果发现可以增加新生小鼠的存活率。相似于动物模型研究,体外试验结果也提示IFN- α 14具有抑制EV71复制的功效^[12]。尽管已证实, EV71病毒编码的蛋白酶3C可以下调干扰素调节因子9(interferon regulatory factor-9, IRF9), IRF9被认为参与I型干扰素下游信号的调节,但IFN- α 联合3C蛋白酶抑制剂-芦平曲韦治疗EV71型,被认为是将来可能的一种强有力的抗肠道病毒策略。体外实验发现,两药联合在抑制EV71复制方面表现出协同效应^[13]。上述研究提示I型干扰素可以作为有效抗EV71治疗策略。不过最近一项的研究发现, EV71 2A可能是一种干扰素拮抗剂^[14],因为其下调了I型干扰素受体表达的水平, I型干扰素能否有效对抗EV71感染尚存有不确定因素。

(七) 抗病毒治疗的耐药问题

由于EV71病毒RNA基因是通过RdRp合成,而RdRp不具备校对功能,所以在新合成的病毒基因复制过程中突变基因经常产生。因此,针对于EV71的变种,目前的抗病毒药物通常可以通过耐药表型选择抗病毒治疗。例如,DTriP-22的作用机制是基于耐药突变体表型及整个病毒基因序列^[15]。可以针对耐药出现的突变体和整个病毒基因组进行测序。对EV71病毒的耐药位点,借鉴HIV治疗方法,联合治疗的可行性值得进一步评估。理想的情况下,联合治疗选择的分子应通过不同的作用机制发挥作用。基于最近的两项研究评估抗EV71联合治疗,一些联合治疗被证实在抑制EV71型方面表现出协同效应,如联合IFN- α 和芦平曲韦、芦平曲韦和普拉康纳利类似物BTA798等^[16]。因此,联合治疗可能是对抗EV71型的一个有效策略。

(八) 抗病毒中药

中医中药作为我国的传统医学,在对有关病毒引起的疾病及其防治方面积累了较为丰富的临床经验,我国地大物博,有利于中草药的采集,这为临床研究开发新的抗肠道病毒中草药制剂开辟了十分广阔的前景。有研究证实,某些抗病毒中草药可以通过阻断病毒增殖过程中的某个环节,从而起到抑制病毒复制的目的。遗憾的是中草药是否具有直接抗病毒作用及其确切的抗病毒作用机制尚不十分明确,还需要进一步的实验及临床研究。不可否认的是中医中药或许也可以作为抗EV71的一个有效方法。

二、用于测试抗EV71药物的动物模型

要验证抗病毒药物对EV71的有效性,除了通过体外实验,迫切需要大量的动物研究。成年小鼠等动物普遍对EV71毒株不敏感,感染后不能表现出明显的临床症状,因此,通常以乳鼠作为模型动物。自从Wang等^[17]建立了实验动物感染模型,新生小鼠是目前最广泛用于EV71感染体内研究的动物。例如,利用1日龄

ICR小鼠进行体内研究来评价抗EV71中和抗体的保护作用以及研究EV71感染后中枢神经系统受累情况。尽管1日龄小鼠是最敏感和常用的感染模型,但在处理1日龄小鼠用于评估抗病毒疗效和毒性等技术上仍存在一定的困难。此外, EV71小鼠适应株已通过小鼠连续传代建立。小鼠适应株病毒能通过口服接种感染7日龄ICR小鼠,并导致致命性中枢神经系统并发症。由于乳鼠免疫系统发育尚不完善,因此不能完全模拟人体感染过程,所以建立成年小鼠感染模型具有更大实用价值。相对于灵长类动物模型而言,小鼠模型成本低、周期短,是目前最为实用的实验动物。

非人灵长类在生物学、遗传学和行为学等方面与人类具有高度相似性,因此建立病毒感染的灵长类模型模拟人类感染症状,在疾病治疗、疫苗与药物评价等方面至关重要。灵长类实验动物常用的是恒河猴与食蟹猴^[18], EV71感染模型中最常见的是猕猴属的食蟹猴,动物感染年龄为5~23岁,而且由于个体差异较大,因此, EV71感染猴模型尚缺乏标准化参考数据。尽管非人灵长类模型存在研究成本和条件较高等问题,但其感染特征与人类感染EV71病毒后出现的神经系统症状最为相似,因此仍将是研究病毒致病机制和疫苗应用于人体前评价效果的重要动物模型。

三、EV71疫苗研制的困难及进展

基于在脊髓灰质炎病毒控制方面的经验,在防止儿童EV71感染上疫苗应作为首要战略措施。虽然直到现在尚无有效的商业化EV71疫苗上市,不过有研究已经揭露了EV71疫苗的有效性。如病毒衣壳蛋白VP1最初是作为一种免疫原性亚单位疫苗候选^[19]。除了VP1亚单位疫苗,甲醛灭活病毒的EV71也广泛评估作为候选疫苗^[20]。合适的动物模型则是评价疫苗免疫及保护效果的重要平台。然而, EV71病毒疫苗的研制尚有一些障碍需要克服。首先,由于成年小鼠模型的不足,大部分的研究是通过新生小鼠实验被动免疫策略来验证中和抗体的保护作用。要克服小鼠模型的局限性, EV71小鼠适应株或EV71受体转基因小鼠可被用于疫苗的生产。其次,由于许多EV71基因型是基于VP1基因序列基础上分离出来的,因此,如何选择参考菌株可能是另一个影响疫苗生产的障碍。另外在EV71疫苗的研发过程中也发现了一些问题,例如EV71感染的病人血清可以和大脑中的某些组织发生交叉反应,提示在疫苗设计时应注意避免引入反应原性强的抗原表位^[21]。此外,还应高度重视疫苗可能诱导的抗体依赖增强作用^[22]。因此,迫切需要建立国际协作以便共享病毒学和流行病学的信息。不过,在中国已经在进行I期临床试验用以评价一个新开发的灭活EV71疫苗的安全性和免疫原性^[23]。

四、展望

在过去的12年中, EV71感染的手足口病已经从一

个罕见的、散发的肠道传染病,逐渐发展成为目前在亚太地区常见的、流行的一种伴有严重的神经系统并发症的疾患。EV71感染的手足口病的发病率及重症发生率均呈逐年上升趋势,预防控制形势十分严峻。对于EV71肠道病毒的治疗目前主要以对症治疗为主,抗EV71病毒药物的发展成为亚太流行地区迫切需要解决的问题。基于小核糖核酸病毒的复制特性,已开发了针对EV71的策略设计出来抗病毒药物。此外,实验小鼠模型的建立,有助于进一步评估候选的一系列抗病毒药物的抗病毒疗效及验证疫苗的安全性和保护效果,以便探讨疫苗的保护水平和免疫持久性。中医中药方面的探索也为临床抗肠道病毒治疗提供便利。

参考文献

- 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(3):304-309.
- Ho M, Chen ER, Hsu KH, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group[J]. *N Engl J Med*,1999,341(13):929-935.
- 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(7):794-797.
- 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 anticoronavirus activity[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2004,48(5):1766-1772.
- Weng TY, Chen LC, Shyu HW, et al. Lactoferrin inhibits enterovirus 71 infection by binding to VP1 protein and host cells[J]. *Antiviral Res*,2005,67(1):31-37.
- Lu G, Qi J, Chen Z, et al. Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 3C proteases: binding to rupintrivir and their substrates and anti-hand, foot, and mouth disease virus drug design[J]. *Virology*,2011,85(19):10319-10331.
- Baxter NJ, Roetzer A, Liebig HD, et al. Structure and dynamics of coxsackievirus B4 2A proteinase, an enzyme involved in the etiology of heart disease[J]. *Virology*,2006,80(3):1451-1462.
- 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(7):2740-2747.
- Lin JY, Li ML, Shih SR. Far upstream element binding protein 2 interacts with enterovirus 71 internal ribosomal entry site and negatively regulates viral translation[J]. *Nucleic Acids Res*,2009,37(1):47-59.
- Tsai FJ, Lin CW, Lai CC, et al. Kaempferol inhibits enterovirus 71 replication and internal ribosome entry site (IRES) activity through FUBP and HNRP proteins[J]. *Food Chem*,2011,128(2):312-322.
- Tan EL, Tan TM, Tak Kwong Chow V, et al. Inhibition of enterovirus 71 in virus-infected mice by RNA interference[J]. *Mol Ther*,2007,15(11):1931-1938.
- Hung HC, Wang HC, Shih SR, et al. Synergistic inhibition of enterovirus 71 replication by interferon and rupintrivir[J]. *Infect Dis*,2011,203(12):1784-1790.
- Thibaut HJ, Leyssen P, Puerstinger G, et al. Towards the design of combination therapy for the treatment of enterovirus infections[J]. *Antiviral Res*,2011,90(3):213-217.
- Lu J, Yi L, Zhao J, et al. Enterovirus 71 disrupts interferon signaling by reducing the interferon receptor I [J]. *Virology*,2012,86(7):3767-3776.

- 15 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(7):2740-2747.
- 16 Shih SR, Stollar V, Li ML. Host factors in enterovirus 71 replication[J]. *Virology*,2011,85(19):9658-9666.
- 17 Wang YF, Chou CT, Lei HY, et al. A mouse-adapted enterovirus 71 strain causes neurological disease in mice after oral infection[J]. *Virology*,2004,78(15):7916-7924.
- 18 Nagata N, Shimizu H, Ami Y, et al. Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71[J]. *Med Virology*,2002,67(2):207-216.
- 19 Chen CW, Lee YP, Wang YF, et al. Formaldehyde-inactivated human enterovirus 71 vaccine is compatible for co-immunization with a commercial pentavalent vaccine[J]. *Vaccine*,2011,29(15):2772-2776.
- 20 Ong KC, Devi S, Cardosa MJ, et al. Formaldehyde-inactivated wholevirus vaccine protects a murine model of enterovirus 71 encephalomyelitis against disease[J]. *Virology*,2010,84(1):661-665.
- 21 Jia CS, Liu JN, Li WB, et al. The cross-reactivity of the enterovirus 71 to human brain tissue and identification of the cross-reactivity related fragments[J]. *Virology*,2010,7(1):47-56.
- 22 Han JF, Cao RY, Deng YQ, et al. Antibody dependent enhancement infection of enterovirus 71 in vitro and in vivo[J]. *Virology*,2011,8(1):106-112.
- 23 Li YP, Liang ZL, Gao Q, et al. Safety and immunogenicity of a novel human enterovirus 71 (EV71) vaccine: a randomized, placebo-controlled, double-blind, phase I clinical trial[J]. *Vaccine*,2012,30(22):3295-3303.

(收稿日期: 2013-10-29)
(本文编辑: 孙荣华)

毛莉萍, 秦刚, 章幼奕. 抗肠道病毒71型治疗策略的研究进展[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2014, 8(5): 715-718.

