

EV71 感染抗病毒药物及疫苗研究进展

张迎秋¹ 杨怀义² 杨倬² 时迎娣² 赵春晖^{1*}

(1. 辽宁师范大学 生命科学学院 辽宁 大连 116029)

(2. 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室 北京 100101)

摘要: 手足口病在世界多个地区, 尤其是亚洲爆发并流行, 且其感染率和死亡率逐年增高, 危害十分严重。肠道病毒 71 (Enterovirus 71, EV71) 是手足口病 (Hand, foot, and mouth disease, HFMD) 的主要病原体, 以感染婴幼儿为主, 其感染常伴随神经系统并发症, 严重可导致儿童死亡。近年来, 分子生物学和抗病毒研究方面取得的进展为 EV71 感染的预防及治疗提供了新的途径。本文对 EV71 病毒学特点及抗 EV71 药物的筛选、疫苗开发、RNA 干扰等进行了综述, 以期对相关研究提供参考。

关键词: 肠道病毒 71 型, 抗病毒药物, 疫苗, RNA 干扰

Developments towards antiviral agents and vaccine against enterovirus 71

ZHANG Ying-Qiu¹ YANG Huai-Yi² YANG Zhuo²
SHI Ying-Di² ZHAO Chun-Hui^{1*}

(1. College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029, China)

(2. Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Hand, foot, and mouth disease (HFMD) outbreaks have been reported in many areas, especially in Asia. Enterovirus 71 (EV71) is the major causative pathogen of HFMD in children and infants, its infection usually accompanied with severe neurological complication which causes high mortality. In recent years, the molecular biology study of EV71 and the progress of antiviral therapies development provide us new strategies for the treatment and

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 21102067)

*通讯作者: Tel: 86-411-85827068; ✉: chunhuiz@hotmail.com

收稿日期: 2011-11-14; 接受日期: 2012-01-30

prevention of EV71 infection. This paper reviewed the latest achievements in virology and antiviral agents of EV71, including drugs, vaccine, and RNA interference etc, which may be expected to serve as references for related research.

Keywords: Enterovirus 71, Antiviral agents, Vaccine, RNA interference

肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)于 1969 年首次从美国加利福尼亚患有中枢神经系统疾病的婴儿粪便标本中分离得到^[1]。目前,包括澳大利亚、东南亚和欧洲在内的许多国家都出现了 EV71 的流行,尤其在亚洲国家流行更为严重。儿童感染 EV71 可引起发热,口腔黏膜溃疡性疱疹和四肢末端水疱样皮疹,还可引起脑炎、无菌性脑膜炎、急性迟缓性麻痹等严重的神经系统并发症,严重者可能致残或致死^[2]。由于 EV71 无包膜,对去污剂、乙醚、脱氧胆酸盐及弱酸处理不敏感,且 EV71 在病毒复制过程中易产生突变^[3],这为 EV71 的预防及治疗造成了困难。目前,虽有一些针对 EV71 复制周期抗病毒药物、EV71 的疫苗开发、RNA 等方面的报道,但迄今为止,还没有找到行之有效的预防措施及治疗方法,因此,抗 EV71 研究仍将是病毒学研究的重点之一。

1 EV71 病毒学特点

EV71 属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae)肠道病毒属(Enterovirus, EV),为单股正链 RNA 病毒,基因组由 7 400 多个核苷酸构成。EV71 基因组只有一个开放阅读框架,该阅读框编码 2 194 个氨基酸的多聚蛋白,并进一步水解为 P1、P2、P3 3 个前体蛋白, P1 前体蛋白编码 VP1-VP4 四个病毒外壳蛋白, P2 和 P3 前体蛋白编码 2A (特异蛋白水解酶)、2B (离子孔道蛋白)、2C (重排宿主膜蛋白)、3A (抑制胞内运输)、VPg (5'末端结合蛋白)、3C (特异蛋白水解酶)、3D (RNA 依赖的 RNA 聚合酶)等 7 个非结构蛋白。EV71 病毒颗粒直径在 24 nm-30 nm 之间,为正二十面结构,无包膜和突起。病毒外壳由 VP1、VP2、VP3 和 VP4

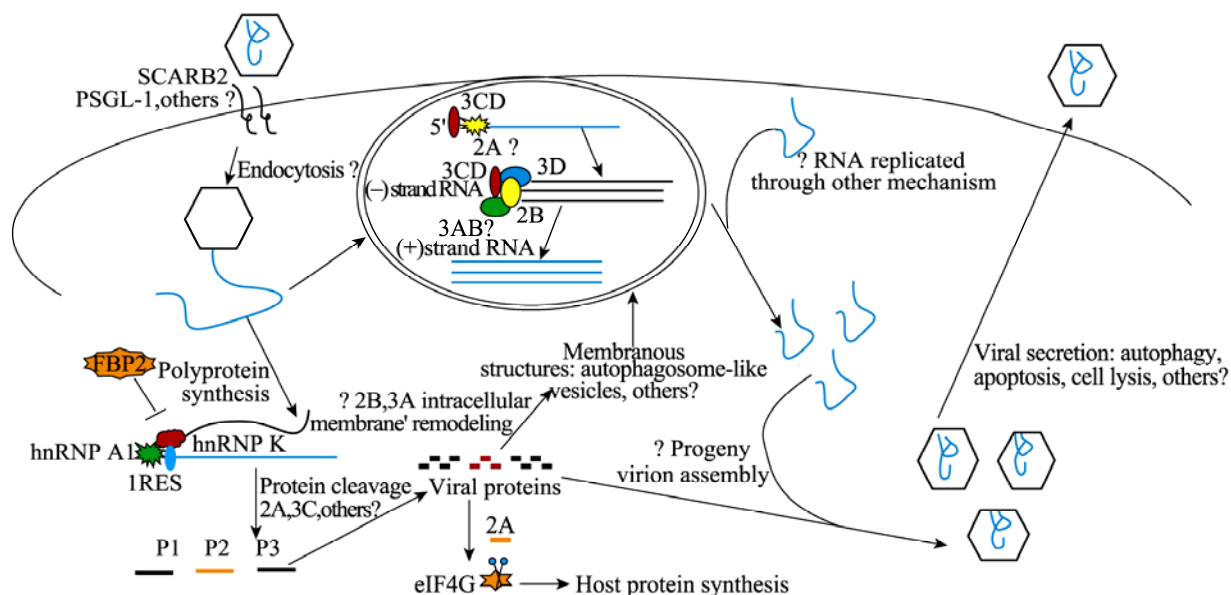
构成原聚体, VP4 包埋在病毒颗粒内部,抗原决定簇一般在 VP1、VP2、VP3^[4-5]。

EV71 通过外壳蛋白与宿主细胞受体结合后,随即进入内吞体,在内吞体中,伴随着 pH 降低,病毒外壳构型发生改变,病毒脱衣壳并将 RNA 基因组释放到细胞中。病毒利用宿主细胞的翻译机制来产生蛋白多聚体,再通过病毒编码的蛋白酶 2A^{pro} 和 3C^{pro} 切割成 P1、P2-P3 二个前体蛋白。P1 经过加工形成 VP1、VP2、VP3 和 VP4 病毒外壳蛋白。P2-P3 被进一步切割形成蛋白中间体,进而形成成熟的非结构蛋白。在翻译后期病毒开始启动基因组 RNA 的复制,加工成熟的外壳蛋白与基因组 RNA 包装成为成熟的病毒颗粒,子代病毒从宿主细胞释放(图 1)^[6]。

目前 EV71 的分型依据有 VP1、VP2、VP4、3'UTR 或全基因。VP1 位于病毒胞膜蛋白外,且病毒的主要抗原决定簇位于 VP1 上,所以是目前普遍采用的分型依据。Brown 等分析 VP1 核酸序列的同源性,首先将 EV71 划分为 A、B 和 C 基因型。C 基因型又可进一步划分为 C1-C4,从 1998 年至今,中国 HFMD 中 EV71 的基因型主要是 C4,基因型变化较小^[7]。

2 抗感染药物

为了找到 EV71 感染的有效治疗方法,目前,国内外学者在药物研发方面已经取得了一些重要成果。一是利用现有的抗病毒药物治疗手足口病;二是依据 EV71 的分子生物学特点设计并合成现有抗病毒药物的衍生物;三是筛选新的抗 EV71 的药物。但是现今取得的抗 EV71 成果大多停留在实验室阶段,能否被应用于临床治疗,还有待深入的研究。

图 1 EV71 在宿主细胞中的复制过程^[6]Fig. 1 EV71 replication in host cell^[6]

2.1 位点结合阻断

2.1.1 受体结合阻断剂: 至今发现两种 EV71 的胞内受体: 清道夫受体 B2 (Human scavenger receptor class B, member 2, SCARB2)^[8]、P 选择素糖蛋白配体(Human P-selectin glycoprotein ligand-1, PGSL-1/CD162)^[9]。抗 SCARB2 抗体和可溶的 SCARB2 结合剂能够阻止 EV71 的侵入^[8]。可溶性的 PGSL-1 单克隆抗体和人乳中纯化的唾液酸多糖亦能阻断 EV71 的感染。但在 EV71 滴度较高的情况下, 这些阻断剂都不能有效的抑制感染, 这可能与 EV71 存在多种细胞受体有关。因为在此情况下, 只针对一种受体的抗体不能彻底抑制病毒感染。还需进一步研究病毒是否存在其它受体, 或者应该将多种受体的抗体结合在一起阻止 EV71 感染。

2.1.2 病毒衣壳阻断剂: 普拉康纳利(Pleconaril)能够通过和病毒的蛋白衣壳结合而干扰病毒的吸附和脱壳, 是一种广谱的抗微小核糖核酸病毒药物。其胍醚衍生物同样也具有广谱的抗微小核糖核酸病毒的效果。其咪唑啉酮衍生物, 能够抑

制 EV71 在横纹肌肉瘤(Rhabdomyosarcoma, RD)细胞中引起的病变效应($EC_{50}=2.13-4.67 \mu\text{mol/L}$)且细胞毒性很低($CC_{50} > 25 \mu\text{mol/L}$)。这些化合物包括有苯氧基取代物 BPROZ-194、胍醚添加物 BPROZ-101、甲基添加物 BPROZ-033^[10]、还有胍醚衍生物 BTA39 (表 1)^[11]。

牛和人乳铁蛋白能够抑制 EV71 对 RD 细胞的早期感染。小鼠感染 EV71 后连续注入乳铁蛋白 2 周, 可以延缓麻痹症状和死亡的发生。研究发现乳铁蛋白可以与 VP1 相结合, VP1 抗体可以阻断这种结合。此外, 还发现乳铁蛋白可以诱导细胞产生 α 干扰素, 并抑制 EV71 诱导的白介素产生, 从而帮助小鼠抵制 EV71 感染(表 1)^[12]。

苏拉明是一种治疗 HIV 的多位点结合剂。苏拉明类似物 NF449 [4,4',4'',4'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis(carbonylimino))) tetrakis-benzene-1,3-disulfonic acid], 是 EV71 感染的衣壳和受体结合阻断剂, 同时发现 VP1 可能是 NF449 的作用位点, 但是化合物与病毒、胞内蛋白之间的具体作用机制还需进一步验证(表 1)^[13]。

表 1 EV71 病毒衣壳阻断剂的 EC_{50} 和 CC_{50}
Table 1 The EC_{50} and CC_{50} of EV71 capsid-binding molecules

阻断剂 Inhibitor	半数有效浓度 EC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	半数致死浓度 CC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	参考文献 References
BPROZ-194	1.552	> 50	[10]
BPROZ-101	0.001 2	> 50	[10]
BPROZ-033	0.008 8	> 50	[10]
BTA39	0.001	4.588	[11]
Lactoferrin	10.5	—	[12]
NF449	6.7	> 1 000	[13]

2.2 蛋白合成抑制剂

2.2.1 蛋白酶 3C 抑制剂: 芦平曲韦(Rupintrivir)是根据鼻病毒 3C 结构设计的抗病毒物质。Kuo 等^[14]根据芦平曲韦设计了一系列衍生物, 作为 EV71 蛋白酶 3C 抑制剂进行了验证。最终发现, 其衍生物 10b 是一种有前景的抑制剂(表 2), EC_{50} 为 0.018 $\mu\text{mol/L}$, 并且没有明显的细胞毒性, 但其在体内是否仍然具有抗病毒活性有待于进一步验证^[14]。

2.2.2 2C 抑制剂: 在研究 NF449 的过程中, 还发现腺苷地尔 [N-(2-methylphenyl)menthyladenosine]和 N⁶-苄基腺苷(N⁶-benzyladenosine)也能够抑制 EV71 的复制(表 2)。EV71 突变分析发现 2C 为以上两种化合物的作用位点, 但是其具体的作用机制还需进一步研究^[13]。

2.2.3 3A 抑制剂: 恩韦肱(Enviroxime)是一种苯并咪唑衍生物, 能够靶向病毒的 3A 蛋白, 在体

外抑制鼻病毒和脊髓灰质炎病毒(表 2)。最近有报道在 EC_{50} =0.150 $\mu\text{mol/L}$ 时对 EV71 有很好的抑制效果^[15]。

GW5074 (3-(3,5-Dibromo-4-hydroxybenzylidene-5-iodo-1,3-dihydro-indol-2-one))为一种恩韦肱类似物, 也是 3A 抑制剂(表 2)^[13]。

2.3 3D RNA 多聚酶抑制剂

在药物开发过程中病毒多聚酶被认为是潜在药物作用位点。DTriP-22 是一种新的抗 EV71 非核苷类似物, 能阻碍病毒 RNA 正义链和反义链的合成, 并且具有广谱的抗小核糖核酸病毒的性能。其 EC_{50} 在 0.15–0.98 $\mu\text{mol/L}$ 之间, CC_{50} 大于 100 $\mu\text{mol/L}$ ^[16]。

Hung 等报道金黄三羧酸(Aurintricarboxylic acid, ATA)在非洲绿猴肾细胞(Vero)上通过空白减数实验表现出抗 EV71 的作用, EC_{50} 为 2.9 $\mu\text{mol/L}$, 且细胞毒性很低(CC_{50} =211 $\mu\text{mol/L}$)。对 ATA 作用机制研究表明, ATA 作用于 EV71 复制的早期阶段, 能够抑制病毒 3D RNA 多聚酶活性^[17]。

2.4 核苷类似物

利巴韦林是核苷、次黄嘌呤核苷类似物, 是一种广谱的抗病毒药物, 已被用于治疗乙肝病毒和一些呼吸道合胞病毒感染。研究表明利巴韦林的主要抗病毒机制是在病毒 RNA 复制过程中诱导致死突变。利巴韦林能够抑制 EV71 在 RD 细胞中复制(EC_{50} =266 $\mu\text{mol/L}$), 并能减轻感染

表 2 EV71 病毒蛋白合成抑制剂的 EC_{50} 和 CC_{50}
Table 2 The EC_{50} and CC_{50} of EV71 3C protease inhibitor

抑制剂 Inhibitor	半数有效浓度 EC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	半数致死浓度 CC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	参考文献 References
Compound 10b	0.018	> 25	[14]
N-(2-methylphenyl)menthyladenosine	1.300	> 50	[13]
N ⁶ -benzyladenosine	0.100	3330	[13]
Enviroxime	0.150	N/R	[15]
GW5074	2.000	170	[13]

EV71 小鼠的麻痹和死亡^[18]。利巴韦林已在临床上联合清开灵用于治疗手足口病,但是核苷类似物药物对人体的副作用很大,长期大量使用可引起白细胞减少、贫血、血清转氨酶和胆红素升高,儿童注射利巴韦林还可能会出现过敏反应。所以还需要找到专一的、特效的抗 EV71 药物。

2.5 调节宿主细胞环境的物质

2.5.1 抗氧化剂:表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG),是一种绿茶提取物,具有抗 EV71 效果。在空斑实验中使用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 EGCG 空斑减少 54%^[19]。细胞感染 EV71 会增加细胞内的氧化压力,所以鉴于胞内的氧化还原作用和 EV71 复制之间的关系,研究者认为 EGCG 通过调节细胞内的氧化压力来抑制病毒复制^[20]。

2.5.2 干扰素:干扰素已是临床上一种广泛应用的抗病毒药物。适量的干扰素能够提高机体的细胞免疫,抑制病毒感染。体外试验表明,人干扰素 α/ω 能够阻止 EV71 感染 3 种人源细胞(RD、Caco-2 和 SK-N-SH)。在小鼠接种 EV71 前 12 个小时,注射 10 μg poly (I:C),导致血清中 IFN α 上升,明显减少病毒的含量和细胞死亡率^[21]。

2.6 其他化合物

2.6.1 合成物质:抗疟药物氯喹是一种有效的抗病毒药物,有研究发现它还可以用来抑制冠状病毒和 HIV 感染。Shih 等在研究 EV71 引起的凋亡时发现,使用 1.2 mmol/L 氯喹会导致 EV71RNA 的合成率降低 10^4 倍^[22]。

2.6.2 天然物质:别蓝藻素(Allophycocyanin)是从螺旋藻中提取的一种红色荧光蛋白,能够抑制由 EV71 感染引起的细胞凋亡,减缓病毒 RNA 的合成。在持续感染 EV71 的 Vero 细胞中 EC_{50} 为 0.1 $\mu\text{mol/L}$, CC_{50} 为 1.52 $\mu\text{mol/L}$,可以减少空斑的形成,从以上结果看来,别蓝藻素很有可能成为抗 EV71 药物^[23]。

乌索酸是从常见的中药罗勒中提取的三萜类化合物。罗勒(*Ocimum basilicum*)常被用来治疗一些传染性疾病,罗勒中有很多重要的化学成分。乌索酸能够减轻 EV71 感染引起的细胞病变($EC_{50}=0.5 \mu\text{mol/L}$),治疗指数大于 200,具有很好的应用前景^[24]。

从六棱菊属植物臭灵丹(*Laggera pterodonta*)中提取的两种 O-甲基化黄酮醇类化合物即猎眼草黄素(Chrysosplenetin)和垂叶黄素(Penduletin),在 Vero 和 RD 细胞中具有抑制 EV71 的作用。通过细胞病变试验、空斑减数试验和病毒产量抑制试验验证了这两种化合物具有抗 EV71 作用, IC_{50} 为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。猎眼草黄素和垂叶黄素的作用机制可能是抑制 EV71 RNA 复制,而对病毒入侵和失活没有影响^[25]。

2.7 常见中药

清开灵冲剂具有清热解毒、镇静安神的功效,有良好的退热、抑菌和抑制病毒的作用。清开灵冲剂对 HFMD 引起的发热及口腔愈合方面治疗效果明显,口服效果好于利巴韦林。临床可以联合阿昔洛韦或利巴韦林使用,治疗 EV71 感染效果好,副作用少^[26]。

注射用双黄连、银翘解毒汤都有清热解毒的功效,临床上也都有用来治疗小儿手足口病的报道,对治疗 EV71 感染引起的病症有明显效果^[27-28]。虽然以上中药已经用于治疗 EV71 感染,但是属于广谱的清热解毒药物,针对性不强,且其直接作用机制还不明确,因此利用中药抗 EV71 感染,还需深入的研究开发。

3 疫苗

疫苗接种是预防病毒感染的一种有效措施。Wu 等报道,热灭活疫苗、病毒 VP1 DNA 和 *Echerichia coli* 表达的 VP1,都能够引起小鼠的抗体中和反应,但只有灭活疫苗对病毒侵染起到保

护作用^[29]。而 Chiu 等报道, 热灭活疫苗和在两株 *Salmonella typhimurium* 中表达的 VP1 蛋白, 虽然不能引起高水平的抗体中和反应, 但是它们能有效抑制病理现象的产生^[30]。Chung 等合成 EV71 病毒样颗粒, 其对小鼠的免疫效果优于灭活疫苗^[31]。与灭活疫苗和亚单位疫苗相比, Wu 等发现口服低毒性活病毒的免疫小鼠, 没有引起明显的抗体免疫反应, 但能够起到保护作用^[32]。

Chen 等在番茄和大肠杆菌中表达 VP1, 发现通过口服免疫血清能产生少量的抗体, 同时发现口服 VP1 免疫需要相应的佐剂^[33]。Foo 等针对 EV71 B4 亚型的外膜蛋白 VP1 人工合成覆盖 VP1 的 95 个重叠 15 肽, 但结果显示其免疫效果低于灭活疫苗^[34]。

Chen 等构建 VP1 和 α -lactalbumin promoter、 α S1-casein signal peptide sequence 的融合蛋白, 在转基因鼠乳中表达, 并通过动物实验验证 VP1 转基因鼠乳与正常鼠乳相比对小鼠有更好的保护作用^[35]。但是由于 EV71 不同株 VP1 具有不同的抗原性, 所以在用 VP1 做疫苗时应考虑病毒亚型之间的交叉保护问题^[36]。Chen 等还考虑在原有 VP1 融合蛋白的基础上再加入 VP2、VP3 或 VP4 以保证疫苗的特异性。

疫苗是一种免疫预防措施, 接种到人体, 诱导人体发生相应的免疫应答, 使机体产生免疫, 已被用来作为预防疾病的有效措施。但是由于 EV71 基因型会发生变异^[3], 并缺乏临床数据, 至今还没有成熟的 EV71 疫苗问世。《临床合理用药》2011 年 2 月报道, 由中国生物技术创新服务联盟成员北京微谷生物医药有限公司、中国疾病预防控制中心和中国食品药品检定研究院共同承担的国家“十一五”科技支撑计划应急项目—国家 I 类新药“手足口病 EV71 型疫苗的研制”取得重大突破。2010 年 12 月 24 日, 该疫苗获得国家食品药品监督管理局签发的临床研究批件, 成为

全球首批获准开展临床实验研究的 EV71 型灭活疫苗。这将对我国提供安全有效的手足口病预防用疫苗、有效控制手足口病疫情具有重大意义。

4 小 RNA

4.1 siRNA

小干扰 RNA (Small interfering RNA, siRNA) 在病毒感染的早期阶段能够抑制病毒的复制, 已经有研究证明 siRNA 很可能成为治疗 HIV、RSV 的有效治疗手段^[37]。有报道称, 针对 EV71 3'UTR^[38]或者其他非结构蛋白(2C, 3C 和 3D)设计的 siRNA 能有效阻断 EV71 的复制^[39-40]。靶向病毒 RNA 多聚酶 3D, 对病毒感染也具有很好的抑制效果^[40-41]。靶向 3D 的 siRNA 对病毒感染乳鼠引起的麻痹、减重和死亡也能够起到保护作用^[41]。以上研究证明了 siRNA 对 EV71 复制具有较强的抑制作用, 将来 siRNA 很有可能成为有效的 EV71 感染治疗方法。

4.2 miRNA

miRNA 是广泛存在于动植物体内的一类约 22 nt 大小的非编码小分子 RNA, 通过与靶基因的完全互补配对和不精确互补配对而调节或抑制 mRNA 的翻译, 最终达到对基因表达的调控目的。miRNA 具有调节动物生长发育、参与细胞生长分化和凋亡的功能, 许多研究已经证明 miRNA 的表达与肿瘤和癌症有着密切关系。随着对 miRNA 研究的深入, 发现宿主和病毒都可以编码 miRNA, 并且两者都在调控病毒生存周期及病毒与宿主的相互作用的过程中起着关键的作用。已经证明了肝特异性的 miR-122^[42]和 miR-125b、miR-223^[43]在 HCV 和 HIV 中的关键作用, miRNA 也很可能成为治疗 EV71 的一种有效方法。

Cui 等通过对感染 EV71 的 Hep2 细胞进行深度测序, 来研究感染 EV71 后宿主细胞内的

miRNA 表达的变化^[2]。其中发现有 64 种 miRNAs 的表达量增加超过了 2 倍, 并通过基因本体(Gene ontology)分析, 发现这其中大部分基因参与 EV71 感染相关的神经活动、免疫应答和细胞凋亡。其首次验证了 miRNA 与 EV71 感染的关系, 但是具体的作用机制还有待于深入研究。

RD 细胞感染 EV71 后, 通过定量 PCR 检测 miRNAs 的表达变化, 发现 miR-141 和 miR-146a 的表达增高, 其它还有 14 种 miRNAs 表达下调。进一步研究发现肠道病毒诱导的 miR-141 能够通过靶向 eIF4E 进而抑制宿主蛋白的表达^[44]。这一发现是研究 miRNA 在调节病毒与宿主间的相互作用关系方面取得的又一进展。

但是 miRNA 用于治疗 EV71 感染还有很多问题需要解决, 比如 miRNA 可能有多个靶基因位点, 在治疗过程中缺少作用的特异性^[45]; miRNA 调控是一个复杂的网络, 一个靶点有可能受多个 miRNAs 的调控^[2]。此外, 由于 RNA 容易降解, 常需要脂质体或病毒载体的帮助进入细胞, 这些转运载体可能引起一些毒副作用, 并且病毒基因具有高突变性, 容易对小 RNA 产生抗性。为了达到理想的治疗效果, 可以从化学修饰方面增加小 RNA 对核酸酶的抵抗力, 或使用小 RNA 联合抗体技术增强小 RNA 药物治疗的细胞特异性, 或改进药物的导入方法^[46-47]。

5 展望

EV71 的感染人群主要为婴幼儿儿童, 而且危害严重, 已受到广泛关注。在治疗 EV71 感染方面, 临床上一线药物普遍使用的是类似于利巴韦林、阿昔洛韦等广谱的抗病毒药物, 并可以联合清开灵、双黄连等中药使用, 起到了抗病毒的功效。但是还是缺乏特效的、专一的、机制明确的抗 EV71 药物。核不均一核糖核蛋白 A1 (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, hnRNP

A1), 远上游元件结合蛋白 2 (Far-upstream element-binding protein 2, FBP2), 远上游元件结合蛋白 1(FBP1), 核不均一核糖核蛋白 K (hnRNP K)和网状蛋白 3 (Reticulon 3)是宿主内与 EV71 复制相关的作用因子, 将来也可能作为 EV71 的治疗靶点^[48]。随着 EV71 分子生物学研究的深入, 已经针对 EV71 复制过程中不同靶点设计了诸多抗病毒药物和疫苗, 但大多还需进一步的体内试验和临床验证。与此同时, 利用小 RNA 干扰开展 EV71 感染的治疗也已取得明显进展。

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]. *Journal of Infectious Diseases*, 1974, 129(3): 304-309.
- [2] Cui LB, Guo XL, Qi YH, et al. Identification of microRNAs involved in the host response to enterovirus 71 infection by a deep sequencing approach[J]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 2010: 425939.
- [3] Drake JW, Holland JJ. Mutation rates among RNA viruses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(24): 13910-13913.
- [4] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 606-610.
- [5] 秦咸蕴, 林霖, 杨燕, 等. EV71非结构蛋白的结构和功能及其为靶点的药物研究进展[J]. *药理学学报*, 2011, 46(7): 753-761.
- [6] Yi LN, Lu J, Kung HF, et al. The virology and developments toward control of human enterovirus 71[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2011, 37(4): 313-327.
- [7] 黄维金, 梁争论. 肠道病毒71型研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2009, 37(2): 54-59.
- [8] Yamayoshi S, Yamashita Y, Li JF, et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71[J]. *Nature Medicine*, 2009, 15(7): 798-801.

- [9] Laszik Z, Jansen PJ, Cummings RD, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells[J]. *Blood*, 1996, 88(8): 3010–3021.
- [10] Chen TC, Liu SC, Huang PN, et al. Antiviral activity of pyridyl imidazolidinones against enterovirus 71 variants[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2008, 15(3): 291–300.
- [11] 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]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(5): 1766–1772.
- [12] Lin TY, Chu C, Chiu CH. Lactoferrin inhibits enterovirus 71 infection of human embryonal rhabdomyosarcoma cells *in vitro*[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2002, 186(8): 1161–1164.
- [13] Arita M, Wakita T, Shimizu H. Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infectivity[J]. *Journal of General Virology*, 2008, 89(10): 2518–2530.
- [14] Kuo CJ, Shie JJ, Fang JM, et al. Design, synthesis, and evaluation of 3C protease inhibitors as anti-enterovirus 71 agents[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2008, 16(15): 7388–7398.
- [15] 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]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(5): 1850–1857.
- [16] Chen TC, Chang HY, Lin PF, et al. Novel antiviral agent DTriP-22 targets RNA-dependent RNA polymerase of enterovirus 71[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(7): 2740–2747.
- [17] Hung HC, Chen TC, Fang MY, et al. Inhibition of enterovirus 71 replication and the viral 3D polymerase by aurointricarboxylic acid[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(4): 676–683.
- [18] Li ZH, Li CM, Ling P, et al. Ribavirin reduces mortality in enterovirus 71-infected mice by decreasing viral replication[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2008, 197(6): 854–857.
- [19] Ho HY, Cheng ML, Weng SF, et al. Antiviral effect of epigallocatechin gallate on enterovirus 71[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(14): 6140–6147.
- [20] Ho HY, Cheng ML, Weng SF, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency enhances enterovirus 71 infection[J]. *Journal of General Virology*, 2008, 89(9): 2080–2089.
- [21] Liu ML, Lee YP, Wang YF, et al. Type I interferons protect mice against enterovirus 71 infection[J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86(12): 3263–3269.
- [22] Shih SR, Weng KF, Stollar V, et al. Viral protein synthesis is required for Enterovirus 71 to induce apoptosis in human glioblastoma cells[J]. *Journal of Neurovirology*, 2008, 14(1): 53–61.
- [23] Shih SR, Tsai KN, Li YS, et al. Inhibition of enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis*[J]. *Journal of Medical Virology*, 2003, 70(1): 119–125.
- [24] Chiang LC, Ng LT, Cheng PW, et al. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*[J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2005, 32(10): 811–816.
- [25] Zhu QC, Wang Y, Liu YP, et al. Inhibition of enterovirus 71 replication by chrysosplenetin and penduletin[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 44(3): 392–398.
- [26] 江雪娟, 张艺. 清开灵治疗手足口病临床观察[J]. *临床和实验医学杂志*, 2006, 5(10): 1610.
- [27] 陈永宏, 徐辉, 桂金贵. 注射用双黄连治疗小儿手足口病临床观察[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2006, 13(1): 47.
- [28] 杜玉琳, 张建丽. 银翘散去牛蒡子加杏仁滑石方合季德胜蛇药治疗小儿手足口病22例[J]. *浙江中医杂志*, 2009, 44(5): 337.
- [29] Wu CN, Lin YC, Fann C, et al. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by

- passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus[J]. *Vaccine*, 2001, 20(5/6): 895–904.
- [30] Chiu CH, Chu C, He CC, et al. Protection of neonatal mice from lethal enterovirus 71 infection by maternal immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing VP1 of enterovirus 71[J]. *Microbes and Infection*, 2006, 8(7): 1671–1678.
- [31] Chung YC, Ho MS, Wu JC, et al. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge[J]. *Vaccine*, 2008, 26(15): 1855–1862.
- [32] Wu TC, Wang YF, Lee YP, et al. Immunity to avirulent enterovirus 71 and coxsackie A16 virus protects against enterovirus 71 infection in mice[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(19): 10310–10315.
- [33] Chen HF, Chang MH, Chiang BL, et al. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71[J]. *Vaccine*, 2006, 24(15): 2944–2951.
- [34] Foo DGW, Alonso S, Phoon MC, et al. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides[J]. *Virus Research*, 2007, 125(1): 61–68.
- [35] 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[J]. *Vaccine*, 2008, 26(23): 2882–2889.
- [36] Bible JM, Pantelidis P, Chan PKS, et al. Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications[J]. *Reviews in Medical Virology* 2007, 17(6): 371–379.
- [37] Haasnoot J, Westerhout EM, Berkhout B. RNA interference against viruses: strike and counterstrike[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(12): 1435–1443.
- [38] Wu ZQ, Yang F, Zhao R, et al. Identification of small interfering RNAs which inhibit the replication of several enterovirus 71 strains in China[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 159(2): 233–238.
- [39] Sim ACN, Luhur A, Tan TMC, et al. RNA interference against Enterovirus 71 infection[J]. *Virology*, 2005, 341(1): 72–79.
- [40] Lu WW, Hsu YY, Yang JY, et al. Selective inhibition of enterovirus 71 replication by short hairpin RNAs[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 325(2): 494–499.
- [41] Tan EL, Tan TMC, Tak Kwong Chow V, et al. Inhibition of enterovirus 71 in virus-infected mice by RNA interference[J]. *Molecular Therapy*, 2007, 15(11): 1931–1938.
- [42] Jopling CL, Yi MK, Lancaster AM, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA[J]. *Science*, 2005, 309(5740): 1577–1581.
- [43] Huang JL, Wang FX, Argyris E, et al. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4⁺ T lymphocytes[J]. *Nature Medicine*, 2007, 13(10): 1241–1247.
- [44] Ho BC, Yu SL, Chen JJW, et al. Enterovirus-induced miR-141 contributes to shutoff of host protein translation by targeting the translation initiation factor eIF4E[J]. *Cell Host and Microbe*, 2011, 9(1): 58–69.
- [45] 刘艳宁, 楼国华, 陈智. 基于 RNA 干扰技术和 microRNA 调控的丙型肝炎治疗研究进展[J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2011, 40(6): 609–616.
- [46] 严小虎, 常山, 田家亮. RNA 干扰治疗新进展[J]. *西南军医*, 2008, 10(4): 119–120.
- [47] Seyhan AA. RNAi: a potential new class of therapeutic for human genetic disease[J]. *Human Genetics*, 2011, 130(5): 583–605.
- [48] Shih SR, Stollar V, Li ML. Host factors in enterovirus 71 replication[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(19): 9658–9666.