抗肠道病毒 71 型的药物研究进展

袁彩丽 姚艳红 寇静 胡康洪

【关键词】 肠道病毒 71 型;小核糖核酸病毒;抗病毒药物

肠道病毒 71 型(enterovirus 71,EV71)是一种人类肠道病毒,属于小核糖核酸病毒科肠道病毒属。EV71 于 1969 - 1974 年之间首次从美国利福尼亚患有中枢神经系统疾病婴儿的粪便标本中分离[1],随后在世界上许多国家和地区包括台湾、澳大利亚、马来西亚和新加波都出现了 EV71 流行的报道[2]。EV71 是引起手足口病的主要病原体,手足口病的一般表现为轻度发热并伴有局部皮疹,有些患者常伴有神经系统症状,如无菌性脑膜炎、脑干脑炎和脊髓灰质炎急性迟缓性麻痹等严重并发症,导致心肺衰竭,甚至死亡。EV71 严重危害人类健康,目前对于抗 EV71 药物的研发基本还处于实验室体外试验的初级阶段,距离临床上实际应用较为遥远。目前还没有有效的 EV71 疫苗和特效抗 EV71 的药物,因此对抗 EV71 药物的开发势在必行。

EV71 对人类特别是儿童的危害不容忽视,随着对 EV71 感染的重视和研究的深入,针对 EV71 病毒复制周期不同靶点的抗病毒药物也成为研究的热点。本研究着重关注对抗 EV71 药物的研究现状,整理了近五年来开发或发现的合成化合物和天然化合物作为潜在治疗药物的研究进展。

1 EV71 病毒复制周期的抗病毒药物

EV71 增殖周期可以划分为如下步骤:病毒附着、进入、脱壳、多聚蛋白翻译和切割、病毒 RNA 复制、装配和释放,这些关键步骤均可以作为抗病毒药物作用的有效靶点。

1.1 病毒吸附与脱壳

VP1 蛋白的疏水腔是 EV71 病毒附着位点,病毒颗粒的脱壳和基因组 RNA 的释放需要一定程度的衣壳蛋白提供足够的空间来满足构象的改变和脱壳的发生。故位于疏水腔的病毒蛋白 VP1 可作为抗病毒药物设计的靶标。在 VP1 疏水腔内结合的抑制剂可以诱导疏水口袋底部的构象变化,从而防止病毒吸附到宿主细胞[3]。此外,在 VP1 疏水口袋中插入化合物可能增加病毒颗粒的稳定性,使病毒的脱壳不能发生,而病毒脱壳对病毒基因组 RNA 的释放是必需的。

1.1.1 硫酸乙酰肝素 硫酸乙酰肝素及其类似物在体外抗 EV71 实验中具有显著的抗病毒活性,浓度低于 250mg/mL。作用机制研究表明这些化合物是通过阻碍病毒吸附到宿主细胞来表现抗病毒活性[4]。

1.1.2 十五聚体的合成肽 SP40(Ac - QMMRKVELFTYMRFD - NH2),跨越在 VP1 区域的 118 位到 132 位,能显著降低所有 EV71 病毒株引起的细胞病变效应。作用机理研究发现 SP40 多肽干扰病毒吸附到宿主细胞[5]。

1.2 内部核糖体进入位点(IRES)

位于 EV71 病毒核酸 RNA 开放阅读框架(ORF)的 5′末端存在一个非常保守的区域,又叫内部核糖体进入位点(IRES),该位点可通过形成二级结构来调节病毒多聚蛋白的翻译,从而影响病毒的复制能力和毒力。索拉菲尼是多靶点酪氨酸和丝氨酸 - 苏氨酸激酶抑制剂,目前用于肿瘤治疗。索拉菲尼也能有效抑制 EV71 子代病毒的产生,当用 3μm 处理 RD 细胞和神经母细胞瘤细胞(SK - N - SH),10μM 处理非洲绿猴肾细胞(Vero)时对细胞活力没有影响。作用机制研究表明,索拉菲尼在感染 EV71 细胞中能特异性抑制 IRES 驱动的蛋白翻译,其能阻止病毒介导的细胞病变效应(CPE)和通过阻断病毒诱导的 ERK 和 p38 信号通路激活来缓解 EV71 引起的炎症反应[6]。

1.3 病毒蛋白翻译

1.3.1 2A 蛋白酶蛋白 EV71 病毒多聚蛋白首先由 2A 蛋白酶催化裂解形成 P1 区的衣壳蛋白和 P2 - P3 区的病毒复制蛋白,2A 蛋白酶也催化 3C 和 3D 蛋白的分离。EV71 2A 蛋白酶的表达也会导致真核起始因子 4GI(eIF4GI)与多聚腺苷酸结合蛋白(PABP)的裂解[7]。最近有研究表明,氨基酸多肽(LVLQTM)能结合 2A 蛋白酶的活性位点,显著地抑制 eIF4GI 裂解[8],这一发现有可能促进开发新的抗 EV71 药物。

1.3.2 2B 蛋白 2B 蛋白在 EV71 病毒复制中的作用甚少了解。最近研究表明 EV71 2B 蛋白可能分导卵母细胞氯化物依赖性电流。4,4′ - 二异硫氰酸基 - 2,2′ - 二苯乙烯磺酸(DIDS),一种氯化物依

DOI:10.3706/cma.j.issn.1673-4092.2016.04.019
基金项目:湖北省自然科学基金重点项目(2011CD011);国家自然科学基金青年项目(31400153)
作者单位:430068 武汉 湖北工业大学 中德生物医学中心;发酵工程湖北省创新中心
通讯作者:胡康洪,Email:hukh@mail.hbut.edu.cn

糖性电流的抑制剂,在 RD 细胞中能有效抑制病毒的产生和病毒诱导的细胞病变效应,这可以提供识别潜在的抗 EV71 药物的新方法[9]。

1.3.3 2C 蛋白 2C 蛋白是小核糖核酸病毒最保守的非结构蛋白,具有中性粒细胞碱性磷酸酶活性。2C 蛋白能干扰 TNF - α 介导活化的 NF - κB 信号通路,它在炎症反应中起关键作用。最近研究发现 EV71 2C 蛋白的表达能抑制 IκB 激酶β 的活化来降低 TNF - α 介导 NF - κB 的活化[10],因此了解 EV71 2C 蛋白在抗宿主免疫应答中的作用有可能为开发抗病毒策略提供新思路。

1.3.4 3A 蛋白 EV71 3A 蛋白在抑制细胞蛋白的分泌和介导膜蛋白的呈现中起着重要的作用,它是通过 ADP - 核糖基化因子(ARF)家族来影响蛋白的转运[11]。恩韦斯是苯并咪唑衍生物,通过作用于 3A 蛋白而抑制鼻病毒和脊髓灰质炎病毒[12-13]。有研究表明恩韦斯对 EV71 病毒有强的抗病毒活性(EC_{50} = 0.15μm)。功能类似恩韦斯的化合物 AN - 12 - H5,能抑制 EV71 病毒的感染(EC_{50} = 0.55μm)。实验研究表明 AN - 12 - H5 是双功能抑制剂,既能作用于 3A 蛋白干扰病毒复制,又能作用于 VP1 和 VP3 来抑制 EV71 病毒感染的早期阶段[14]。

1.3.5 3C 蛋白酶蛋白 EV71 3C 蛋白酶是半胱氨酸蛋白酶,在形成成熟病毒颗粒过程中起着至关重要的作用,这使其成为开发药物极具吸引力的靶标。研究发现 3C 蛋白酶通过消化 CstF64 因子(3′ 前 mRNA 加工的关键宿主因子)来干扰宿主细胞 RNA 的多聚腺苷酸化,该研究表明了一种新颖的作用机制,即小核糖核酸病毒具有利用 3C 蛋白酶损害宿主细胞的功能[15]。3C 蛋白酶在 EV71 复制中起着至关重要的作用,这使其成为药物开发极具吸引力的靶标。芦平曲韦(AG7088)是最成功的抑制 3C 蛋白酶的拟肽类抑制剂(IC_{90} = 2.3μm)[16]。它能不可逆地抑制人鼻病毒(HRV)3C 蛋白酶活性,具有广谱抗小核糖核酸病毒活性[17]。

1.3.6 3D 聚合酶蛋白 EV71 3D 聚合酶是病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶,是 RNA 复制复合物的主要成分。3D 聚合酶对 VPg 具有尿苷酰化作用,并利用 VPg - pUpU 作为引物启动 RNA 的复制[18]。一类聚阴离子化合物,含有金精三羧酸(ATA)能在细胞培养中抑制儿种病毒。研究表明,ATA 能通过干扰病毒包膜糖蛋白(gp120)和细胞表面的 CD4 受体之间的相互作用来抑制病毒的吸附,从而干扰 HIV 的复制。最近有研究发现,ATA 是 EV71 复制的强效抑制剂(EC_{50} = 2.9μM)。作用机制研究表明,ATA 作用于病毒的 3D 聚合酶[19]。BPR - 3P0128 ATA 作用于病毒的 3D 聚合酶[19]。BPR - 3P0128 是最初的设计和开发是用来抑制 A 型流感病毒,但其表现出抗 RNA 病毒活性,如 EV71、柯萨奇病毒 A6、A10、A16 和 B3、A 型和 B 型流感病毒、人鼻病毒 2(HRV2)。研究表明,BPR - 3P0128 能有效抑制 EV71,其抑制 EV71 3D 聚合酶和 VPg(3B 蛋白)的尿苷酰化作用,从而降低病毒的复制[20]。

1.4 病毒 RNA 的复制

病毒基因组 RNA 首先作为 mRNA 合成病毒蛋白,然后再作为模板在病毒 RNA 聚合酶的作用下合成负链 RNA,后者又作为模板在细胞质内进一步合成大量的正链 RNA。NITD008 是一种核苷类似物,有研究表明,它是特异性抑制黄病毒的抗病毒试剂。研究表明,NITD008 在 RD 细胞系和 Vero 细胞系感染 EV71 病毒(EC_{50} = 0.1μm),能有效抑制 EV71 多种病毒株的复制。三磷酸化的 NITD008(ppp - NITD008)作为合成 RNA 链终止剂直接抑制 EV71 的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶活性而不影响复制起始。研究者还发现,NITD008 和 AG7088 的联合作用表现出很强的协同抗 EV71 效应,为此提供了巨大的潜在治疗 EV71 的感染和规避了单药治疗的局限性[21]。

2 天然化合物的抗 EV71 活性

最近有研究报道一些天然产物具有抗 EV71 病毒活性,但其作用机制不明确,待进一步研究证明。

2.1 κ - 角叉菜胶

海藻硫酸多糖具有广泛的生物活性。最近研究表明 κ - 角叉菜胶在 EV71 吸附宿主细胞前和正处在吸附阶段能减少病毒空斑的形成和阻止病毒的复制。病毒结合实验表明,κ - 角叉菜胶能够结合 EV71,形成卡拉胶 - 病毒复合物,其可能干扰病毒 - 受体的相互作用[22]。

2.2 石蒜碱

石蒜碱处理感染 EV71 的 RD 细胞,其能通过抑制病毒的复制来降低细胞病变效应。研究表明,石蒜碱在 EV71 RNA 基因组翻译过程中干扰病毒多聚蛋白的延伸。致死剂量 EV71 感染小鼠时,石蒜碱能抑制病毒的复制从而降低死亡率,改善临床评分和减少肌肉的病理变化。中等剂量 EV71 感染小鼠时,石蒜碱的处理可以阻止 EV71 引起的瘫痪[23]。

2.3 WS - 30581 A 和 WS - 30581 B

吲哚类生物碱在过去十年中因其具有不同生物活性而引起广泛关注,5 - (3′ - 吲哚基)2 - 甲基噁唑(pimprinine,抗生素 9792B)的家族成员有抗生素 9792A,5 - (3′ - 吲哚基)2 - 乙基噁唑(pimprinethine),WS - 30581 A 5 - (3′ - 吲哚基)2 - 丙基噁唑和 WS - 30581 B 5 - (3′ - 吲哚基)2 - 丁基噁唑,它们是天然的吲哚类生物碱,可从多种微生物发酵液中分离,并具有广泛的药理活性。研究表明,Pimprinethine,WS - 30581 A 和 WS - 30581 B 通过抑制

EV71 病毒 RNA 和蛋白的合成而抑制病毒的复制。这些化合物在 RD 细胞系中能有效抑制 EV71 引起的细胞凋亡,间接反应了它们对病毒蛋白合成的抑制[24]。

2.4 灵芝三萜类化合物 GLTA 和 GLTB

药用蘑菇灵芝属的灵芝和灵芝提取物是广泛用于各种疾病的中草药。从灵芝粗提物中分离纯化的两种灵芝三萜类化合物 GLTA 和 GLTB,在 RD 细胞中没有明显的细胞毒性,化合物浓度从 0.16μg/mL 增加到 4μg/mL,抗 EV71 病毒活性也随之增强。作用机制研究表明,GLTA 和 GLTB 化合物通过干扰 EV71 病毒的脱壳从而抑制 EV71 的复制[25]。

3 问题与展望

手足口病的频繁暴发是一个严重危害公共健康的问题,而 EV71 是引起手足口病的主要病原体,故对肠道病毒 71 型的致病机制、流行病学及临床诊断等方面的研究刻不容缓。在文中提及的硫酸乙酰肝素等药物抗病毒复制、卢平曲韦等药物作用于病毒蛋白从而影响病毒复制、核苷类似物 NITD008 抑制病毒复制和一些天然提取物干扰病毒的复制,这些化合物都能有效的抑制 EV71 的活性,可以作为抗 EV71 病毒潜在药物;但是对这些抗 EV71 药物的研究基本还处于实验室试验的初级阶段,距离在临床上的实际应用还比较遥远。另外,安全有效的动物模型的缺乏,成为药物筛选的障碍。

对现有抗病毒药物的联合作用进行研究,探究其中的协同抗 EV71 的作用,这也许可以提供潜在的抗 EV71 作用和规避了单药治疗的局限性。我们也期待随着科技的快速进步和研究者们不懈的努力,能早日寻找到具有良好药效学的特异抗 EV71 的安全有效药物。

参 考 文 献

[1] Deibel R, Gross LL, Collins DN. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system [J]. J Infect Dis, 1974, 129 (3): 304-309.
[2] McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance [J]. FEMS Microbiol Rev, 2002, 26 (1): 91-107.
[3] Paul AV, Peters J, Mugavero J, et al. Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus [J]. J Virol, 2003, 77 (2): 891-904.
[4] Pourianfar HR, Poh CL, Fecondo J, et al. In vitro evaluation of the antiviral activity of heparin sulfate mimetic compounds against Enterovirus 71 [J]. Virus Res, 169 (1): 22-29.
[5] Tan CW, Chan YF, Sim KM, et al. Inhibition of enterovirus 71 (EV-71) infections by a novel antiviral peptide derived from EV-71 capsid protein VP1 [J]. PLOS One, 2012, 7 (5): e34589.
[6] Gao M, Duan H, Liu J, et al. The multi-targeted kinase inhibitor sorafenib inhibits enterovirus 71 replication by regulating IRES-dependent translation of viral proteins [J]. J Antiviral Research, 106: 80-85.
[7] Kempf BJ, Barton DJ. Poliovirus 2A (Pro) increases viral mRNA and polysome stability coordinately in time with cleavage of eIF4G [J]. J Virol, 82 (12): 5847-5859.
[8] Falah N, Montserret R, Lelogeais V, et al. Blocking human enterovirus 71 replication by targeting viral 2A protease [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67 (12): 2865-2869.
[9] Xie S, Wang K, Yu W, et al. DIDS blocks a chloride-dependent current that is mediated by the 2B protein of enterovirus 71 [J]. Cell Res, 2011, 21 (8): 1271-1275.
[10] Zheng Z, Li H, Zhang Z, et al. Enterovirus 71 2C protein inhibits TNF-α-mediated activation of NF-κB by suppressing IκB kinase β phosphorylation [J]. J Immunol, 2011, 187 (5): 2202-2212.
[11] Belov GA, Fogg MH, Ehrenfeld E. Poliovirus proteins induce membrane association of GTPase ADP-ribosylation factor [J]. J Virol, 2005, 79 (11): 7207-7216.
[12] Heinz BA, Vance LM. Sequence determinants of 3A-mediated resistance to enviroxime in rhinoviruses and enteroviruses [J]. J Virol, 1996, 70 (7): 4854-4857.
[13] De Palma AM, Vliegen I, De Clercq E, et al. Selective inhibitors of picornavirus replication [J]. Neyts J Med Res Rev, 2008, 28 (6): 823-884.
[14] 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 (Pt 11): 2734-2744.
[15] 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 (9): e1000593.
[16] Cui S, Wang J, Fan T, et al. Crystal structure of human enterovirus 71 3C protease [J]. J Mol Biol, 2011, 408 (3): 449-461.
[17] Shih SR, Chen SJ, Hakimelahi GH, et al. Selective human enteroviruses and rhinovirus inhibitors; an overview of capsid-binding and protease-inhibiting molecules [J]. Med Res Rev, 2004, 24 (4): 449-474.
[18] Paul AV, van Boom JH, Filippov D, et al. Proteinprimed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase [J]. Nature, 1998, 393 (6682): 280-284.
[19] Hung HC, Chen TC, Fang MY, et al. Inhibition of enterovirus 71 replication and the viral 3D polymerase by aurintricarboxylic acid. J Antimicrob Chemother, 2010, 65 (4): 676-683.
[20] Vedy AB, Chen GW, Hsieh PT, et al. BPR-3P0128 inhibits RNA-dependent RNA polymerase elongation and VPg uridylylation activities of Enteroviruss 71 [J]. Antiviral Res, 2014, 112: 18-25.
[21] Shang L, Wang Y, Qing J, et al. An adenosine nucleoside analogue NITD008 inhibits EV71 proliferation [J]. Antiviral Res, 2014, 112: 47-58.
[22] Chiu YH, Chan YL, Tsai LW, et al. Prevention of human enterovirus 71 infection by kappa carrageenan [J]. Antiviral Res, 95 (2): 128-134.
[23] Liu J, Yang Y, Xu Y, et al. Lycorine reduces mortality of human enterovirus 71-infected mice by inhibiting virus replication. Virol J, 2011, 27 (8): 483.
[24] Wei Y, Fang W, Wan Z, et al. Antiviral effects against EV71 of pimprinine and its derivatives isolated from Streptomyces sp [J]. J Virology Journal, 2014, 20 (11): 195.
[25] Zhang W, Tao J, Yang X, et al. Antiviral effects of two Ganoderma lucidum triterpenoids against enterovirus 71 infection. Biochem Biophys Res Commun, 449 (3): 307-312.

(收稿日期:2015-08-29)
(本文编辑:田丽丽)