



专论与综述

## 抗肠道病毒 71 型的药物研究进展

乔俊华<sup>1</sup> 孙欣<sup>1</sup> 王盛羽<sup>1,2</sup> 宋鸿<sup>\*1</sup>

1 遵义医科大学微生物学教研室 贵州 遵义 563000

2 遵义医科大学贵州省普通高等学校传染病与生物安全特色重点实验室 贵州 遵义 563000

**摘要:** 肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)是引起重症手足口病(Hand, Foot and Mouth Disease, HFMD)的主要病原体。重症 HFMD 进展迅速,可表现为严重的神经系统并发症,甚至危及生命。目前临床上防治 EV71 感染缺乏特异、高效的药物,其残疾率和死亡率很高。随着研究的深入,已经发现了大量具有抗 EV71 能力的化合物,人们探索的药物机制和药物靶点各不相同。因此,本文从药物靶向病毒、宿主等角度出发,针对抗 EV71 感染的天然药物、合成药物及常见中药中活性成分作用机制的最新进展进行综述与讨论。此外,对抗病毒药物筛选技术进行简要概述,以期能为抗 EV71 药物的筛选与研发设计等相关研究提供参考。

**关键词:** 肠道病毒 71 型, 抗病毒, 药物

## Recent progress towards enterovirus 71 about antiviral agents

QIAO Junhua<sup>1</sup> SUN Xin<sup>1</sup> WANG Shengyu<sup>1,2</sup> SONG Hong<sup>\*1</sup>

1 Department of Microbiology, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China

2 Key Laboratory of Infectious Diseases and Biosafety in Guizhou Universities of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China

**Abstract:** Enterovirus 71 (EV71) belonging to human enterovirus, is the mainly causative agent of severe Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD) and has been associated with various neurological complications, even death. There is currently no effective prevention and specific therapy for EV71, following high disability and mortality rates. Along with the profound study, a large number of compounds with anti-EV71 ability have been discovered, and the mechanisms and drug targets explored are different. Thus, from the perspective of drug to virus and host, this paper reviews and discusses the latest progress in the mechanism of active ingredients in natural drugs, synthetic drugs and common traditional Chinese medicine against EV71 infection. In addition, the screening technology of anti-EV71 drugs was briefly

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (81660340); Zunyi Medical University 2018 Academic New Seedling Cultivation and Innovation Exploration Special Project ([2018] 5772-068); Zunyi Science and Technology Bureau & Zunyi Medical University Collaborative Fund ([2019] 18; [2020] 61); Youth Science and Technology Talent Growth Project of Guizhou Provincial Education Department ([2018] 224)

**\*Corresponding author:** E-mail: hongsong@zmu.edu.cn

**Received:** 25-03-2021; **Accepted:** 25-05-2021; **Published online:** 05-07-2021

**基金项目:** 国家自然科学基金(81660340); 遵义医科大学 2018 年度学术新苗培育及创新探索专项项目(黔科合平台人才[2018] 5772-068); 遵义市科技局-遵义医科大学科学技术联合资金项目(遵市科合 HZ 字[2019] 18 号; 遵市科合 HZ 字[2020] 61 号); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY [2018] 224)

**\*通信作者:** E-mail: hongsong@zmu.edu.cn

**收稿日期:** 2021-03-25; **接受日期:** 2021-05-25; **网络首发日期:** 2021-07-05

summarized, aiming to provide help for the screening, research and development of anti EV71 drugs.

**Keywords:** enterovirus 71, antiviral, agents

肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)最早是在 1969 年至 1974 年间从加利福尼亚州的中枢神经系统疾病患者中分离出来的, 而后迅速蔓延全球<sup>[1]</sup>。其主要通过粪-口途径传播, 人类是目前已知的唯一宿主<sup>[2]</sup>。EV71 是 5 岁以下儿童严重手足口病(Hand, Foot and Mouth Disease, HFMD)的主要病原体<sup>[3]</sup>。患儿临床症状多表现为手、足及口等部位的皮疹、疱疹和短暂发热, 而且具有自限性<sup>[4]</sup>。然而少数患儿在急性感染时会迅速发展为脑干脑炎、无菌性脑膜炎和肺水肿等严重并发症, 甚至死亡<sup>[5-6]</sup>。1998 年, 我国台湾省暴发 EV71 感染后存活下来的儿童出现长期的神经系统后遗症的症状, 神经发育及认知功能受损<sup>[7-8]</sup>。近年来, 我国 EV71 感染呈暴发流行趋势<sup>[9-10]</sup>。此前手足口病的疫情中, 有近乎 90% 以上的死亡与 EV71 感染相关<sup>[11]</sup>。2008-2015 年, 在 577 087 例实验室确诊的手足口病病例中, 约 43.6% 的患者感染了 EV71<sup>[12]</sup>。2009-2018 年江苏省共报告 HFMD 病例 41 858 例, EV71 为主要病原, 占 36.52%; 重症病例中以 EV71 为主<sup>[13]</sup>。目前临床上防治 EV71 感染缺乏特异、高效的药物, 常以对症治疗为主。上市的单价 EV71 疫苗无法应对快速变化的病原谱, 而且具有潜在的不安全因素<sup>[14-15]</sup>。迄今为止, EV71 感染 HFMD 的发病机制尚不明确, 因此, 研发特异性防治 EV71

的药物势在必行。

## 1 EV71 的结构特征与分型

EV71 是微小 RNA 病毒科肠道病毒属 A 组的成员, 为一种无包膜的单股正链 RNA 病毒, 有极强的传染性和致病性<sup>[16]</sup>。其病毒颗粒为二十面体立体对称的球形结构, 直径 30 nm; 该病毒基因组长约 7.4 kb, 其两端分别是保守的 5'和 3'非编码区(Untranslated Region, UTR), 中间是一个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF), 如图 1 所示<sup>[17]</sup>。3'UTR 是高度结构化的区域, 在翻译和 RNA 合成过程中与多种病毒和宿主蛋白相互作用。病毒 RNA 的非依赖性翻译是通过病毒 RNA 的 5'UTR 内部核糖体进入位点招募宿主复制机制来实现的<sup>[18]</sup>。EV71 进入细胞经过脱壳作用后释放出基因组 RNA, 其基因组中的 ORF 可编码多聚前体蛋白, 并进一步水解为 P1-P3 这 3 个前体蛋白。P1 前体蛋白编码 VP1-VP4 这 4 种结构蛋白<sup>[19]</sup>, P2 和 P3 前体蛋白编码非结构蛋白(2A、2B、2C、3A、VPg、3C 和 3D 等), 其中外壳蛋白 VP1 是最重要的抗原决定簇<sup>[20]</sup>。根据 VP1 核苷酸序列的差异, 可将 EV71 分为 A、B、C 这 3 个主要基因型, 又可进一步细分为 11 个亚型, 即 A、B1-B5 和 C1-C5 亚型。在我国, 引起手足口病的 EV71 流行株主要为 C 基因型<sup>[21]</sup>。

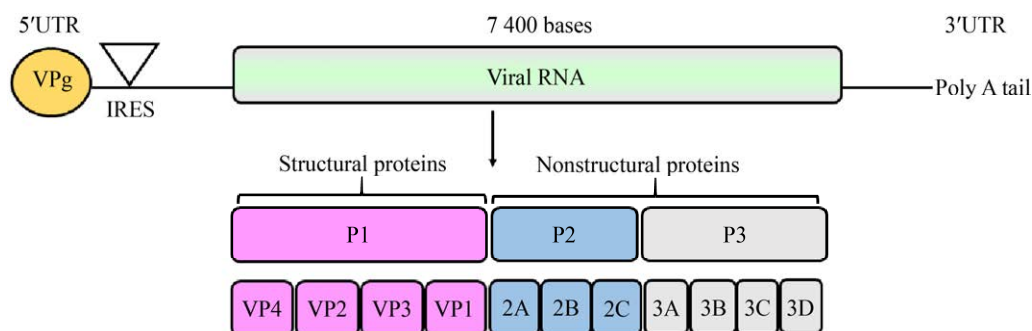


图 1 EV71 基因组及蛋白结构图

Figure 1 Structure of EV71 genome and protein

## 2 抗病毒药物

最常见的抗病毒药物是病毒靶向性药物和宿主靶向性药物, 对于抗 EV71 药物而言, 研究更多的是针对病毒感染的过程; 针对宿主的抗病毒药物发挥效用多是靶向宿主后借助免疫应答实现。因此, 本文就这两方面进行综述。

### 2.1 靶向病毒药物

理论上, 病毒生命周期的任何一个步骤都可作为药物抗病毒治疗的潜在靶点。因此, 根据病毒的生命周期, 靶向 EV71 感染的具体过程是抗 EV71 药物治疗的思路之一。

#### 2.1.1 阻止病毒的吸附、穿入与脱壳

细胞表面受体如 PSGL-1、唾液酸化聚糖、硫酸乙酰肝素和 Anx2 等常被病原体作为附着受体, 将病毒粒子集中在宿主细胞表面, 增强 EV71 的传染性<sup>[22]</sup>。病毒吸附于宿主表面后, EV71 通过表面衣壳蛋白受体修饰糖基(SCARB2 和 PSGL-1 等)的相互作用来完成吸附过程<sup>[23]</sup>。因此, 合适的糖分子将成为阻断 EV71 表面糖基结合位点的潜在竞争性抑制剂。阿卡波糖作为一种葡萄糖通道抑制剂, 可能通过阻断病毒表面的受体结合位点或通过抑制细胞表面的各种糖类受体来降低 EV71 的感染<sup>[24]</sup>。

由于病毒-细胞受体相互作用是感染过程中的第一个事件, 阻断该事件的抑制剂可以作为潜在的治疗手段。在研究金银花-连翘对 EV71 的抗病毒作用时, 体外不同方式处理试验中, 同时加入药物和病毒组比感染后加药物组的作用更强, 可能是由于金银花-连翘阻止了病毒对细胞的吸附和传入<sup>[25]</sup>; 一种有效的复方植物槐果碱, 是苦参中含量最丰富的生物碱之一, 可能通过阻断病毒与细胞的粘附而靶向 EV71 病毒<sup>[26]</sup>, 切断了 EV71 与宿主细胞的进一步相互作用。

根据 EV71 的晶体结构, 其二十面体五倍对称轴周围都有一个圆形凹陷或“峡谷”, 具有免疫球蛋白样折叠的受体已被证明与峡谷结合; 当受体分子

结合到峡谷中时, 它们会将一个“口袋因子”从峡谷底部正下方 VP1 的口袋中移除; 该“口袋因子”使病毒粒子从紧邻峡谷底部的 VP1 的口袋中稳定下来, 调节病毒的稳定性和传染性<sup>[27]</sup>。因此, 结合到亚基 VP1 内疏水口袋中的小分子抑制剂是有效的 EV71 抑制剂, 比如 Win51711, 是鼻病毒和脊髓灰质炎病毒的抑制剂。该化合物被发现可以取代病毒蛋白 VP1“口袋因子”, 阻止病毒的脱壳, 从而稳定 EV71 的病毒粒子, 并限制其传染性<sup>[28]</sup>。此外, EV71 的 VP1 环较小, 其表面峡谷区与其他肠道病毒相比较浅, 更易暴露其底部的氨基酸, 是 EV71 识别、吸附和结合靶细胞的关键位点<sup>[29]</sup>。以肠道病毒衣壳结合剂设计并改造的哌嗪新衍生物 VP1-4 (用哌嗪取代咪唑啉酮环设计) 便靶向 EV71 表面衣壳蛋白 VP1, 抑制 EV71 的复制<sup>[30]</sup>。在 BPROZ 系列化合物的吡啶环上引入氨基/酰胺基团合成的 TJAB1099 作为一种高效的抗 EV71 抑制剂, 具有良好的化学稳定性, Ma 等开发了含 TJAB1099 的体外凝胶剂, 能有效抑制 EV71 在体外的传播<sup>[31]</sup>。随着研究的深入, 有研究发现 BTA39 可以显著抑制 EV71 复制的活性, 而且这种化合物在动物实验中可口服利用, 但是对于该化合物的后续临床试验却未见跟进<sup>[32]</sup>。此外, Ren 等发现, 经批准的小儿抗寄生虫药苏拉明的萘三烯酸基团可以与病毒衣壳结合来抑制病毒的附着与进入, 阻断 EV71 感染<sup>[33]</sup>。

EV71 与受体相互作用后, 借助网格蛋白依赖的内吞途径完成内化过程, 诱导病毒膜融合蛋白构象变化, 入侵宿主细胞<sup>[17]</sup>。作为有几千年使用历史的中药, Yen 等研究发现茵陈蒿(*Artemisia capillaris*)通过阻止病毒内化发挥其抗病毒活性, 减少 EV71 诱导的细胞损伤, 因此他们假定病毒接种前给药更有效, 然而事实并非如此: 在不同补充时间点的抗病毒试验中, 在病毒感染前后加药更有效, 无论是在病毒接种前还是接种后, 1 h 的补充都优于 2 h, 但是茵陈蒿对 EV71 蛋白翻译和细胞

凋亡无明显抑制作用<sup>[34]</sup>。

### 2.1.2 阻止病毒 RNA 的翻译与复制

由于 EV71 基因组 RNA 的 5'端无帽子结构,其翻译起始主要由 EV71 基因组 5'UTR 处核糖体内部进入位点(Internal Ribosome Entry Site, IRES)元件通过 Cap 独立机制介导<sup>[35]</sup>。IRES 是一种顺式作用元件,在翻译和基因组的复制期间,需要翻译起始因子和 IRES 特异性反式作用因子的协助促进翻译的进程<sup>[23]</sup>,该高度结构化的 5'UTR IRES 位点可作为 EV71 的潜在药物靶点。Tsai 等首次发现山奈酚可能改变 FUBP1、FUBP3、HNRPD、HNRH1 和 HNRPF 蛋白这些新的 IRES 特异性反式作用因子的组成,与高度结构化的 EV71 的 5'UTR 结合并抵抗 EV71 感染<sup>[36]</sup>。从医学应用的角度来看,一种有效的抗 EV71 治疗药物应该特异性地抑制病毒 IRES 而不影响真核启动子区域的活性,Chung 等发现 2 种咖啡酸衍生物紫草酸镁(Magnesium Lithospermate B, MLB)和迷迭香酸(Rosmarinic Acid, RA)抑制了 EV71-IRES 介导的翻译,抑制了 EV71 的感染;更重要的是,MLB 和 RA 对真核 Cap 依赖的翻译无影响<sup>[37]</sup>。此外,Zhang 等研究证明芹菜素也可干扰病毒 IRES 活性,发挥抗 EV71 作用<sup>[38]</sup>。

### 2.1.3 抑制病毒非结构蛋白活性

EV71 翻译后的 7 个非结构蛋白 2A-2C 和 3A-3D 等是参与多种病毒功能的重要元素,包括蛋白酶、ATPase 活性和 RNA 复制等,已使用基于靶点的策略来寻找这些特异性酶抑制剂。

EV71 的 2A 蛋白酶与 3C 蛋白酶属于半胱氨酸蛋白酶,参与 EV71 多聚蛋白的加工。2A 蛋白酶介导 VP1 自身 N 末端和 C 末端的初始裂解,从而区分结构蛋白前体和非结构部分;3C 蛋白酶完成多聚蛋白的后续水解过程,在 EV71 复制和宿主细胞凋亡中起重要作用<sup>[6]</sup>。因此,以 3C 蛋白酶为靶点的抗逆转录病毒药物的开发成为一个热点。Rupintrivir (AG7088)是最初开发的人鼻病毒(Human Rhinovirus, HRV) 3C 蛋白酶的不可逆抑制

剂,是迄今为止唯一进入临床试验的 3C 抑制剂。研究表明,其能与 EV71 的 3C 蛋白酶的活性位点共价结合<sup>[39]</sup>。基于 Rupintrivir 与 3C 蛋白酶的共价结合,Wang 等开发了一系列高抑制性药物,如基于物质的肽模拟物、醛类及氰醇衍生物。Wang 等报道肽醛衍生物 NK-1.9k 抑制 EV71 3C 蛋白酶活性和 EV71 增殖<sup>[40]</sup>。Zeng 等发现  $\alpha$ -酮酰胺细胞毒性相对较低,可作为 EV71 3C 蛋白酶的抑制剂<sup>[41]</sup>。许多天然化合物对 3C 蛋白酶也有抑制作用。对 3C 蛋白酶-槲皮素复合物分子结合的模拟显示,植物中广泛存在的槲皮素被预测插入 EV71 的 3C 蛋白酶底物结合囊中,阻断底物识别,从而抑制 EV71 3C 蛋白酶的活性<sup>[42]</sup>。此外,木犀草素、菲西汀和芦丁、白杨素(Chrysin, CR)及其衍生物白杨素-7-磷酸二异丙酯(Diisopropyl Chrysin-7-Yl Phosphate, CPI)等均可抑制 EV71 3C 蛋白酶活性,从而阻断 EV71 的复制<sup>[43-45]</sup>。

非结构蛋白 3A 及其前体 3AB 是复制复合物的的重要组成部分,但它们在病毒复制中的确切作用仍不清楚。在筛选美国食品和药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的化合物文库时,三唑类抗真菌药物伊曲康唑被确定是一种针对 3A 蛋白肠道病毒的广谱抑制剂<sup>[46]</sup>。

3D 蛋白具有 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RdRp)活性,是病毒 RNA 合成所必需的。EV71 的 RNA 复制始于基因组 RNA 在 5'端与 3B 蛋白(VPg)连接,形成 VPg 的尿苷酰化(VPg-pUpU)复合物。病毒 RNA 正链和负链的合成都由 VPg-pUpU 启动<sup>[23]</sup>。Chen 等通过体外聚合酶检测表明新型抗病毒药物非核苷类似物 DTriP-22 抑制 EV71 聚合酶的聚(U)延伸活性,但不抑制 VPg 尿苷酰化活性;其以 3D 聚合酶为靶点,在开发广谱抗肠道病毒药物方面有很大的潜力<sup>[47]</sup>。

成熟的病毒是以形态完整的颗粒形式即病毒体存在的。EV71 利用细胞裂解机制释放子代病毒以供进一步感染<sup>[3]</sup>。据李文森等研究,杨梅素有体外抗病毒作用,主要作用机制可能与直接作用

于病毒颗粒有关<sup>[48]</sup>; Li 等发现从海带中提取的 LJ04 可以直接干扰细胞和病毒颗粒之间的结合, 发挥抗 EV71 活性<sup>[3]</sup>。吡啶啉族化合物, 包括 Pimprinthine、WS-30581 A 和 WS-30581 B 尤其对 EV71 有稳定的抵抗效应; 它们还有轻微的抗 CVB3、HSV-1 和 H1N1 (除少数外)活性, 可以成为抗病毒感染的适宜治疗药物<sup>[49]</sup>。然而, Kim 等发现棘白菌素抗真菌药物米卡芬净对 EV71 复制子具有显著的抗病毒作用, 但一项广泛的分析排除了 2C 和 3A 蛋白、IRES 依赖性翻译以及多蛋白加工参与米卡芬净的抗病毒作用<sup>[50]</sup>。此外, 7-羟基黄酮和磷酸二异丙基黄酮、甘草酸、老鹤草和鱼腥草等天然植物中活性成分与合成药物 AN-12-H5、NITD008 等均有抑制 EV71 复制的活性<sup>[51-56]</sup>。

## 2.2 靶向宿主药物

病毒感染宿主的同时, 一方面可以诱导抗病原体的天然免疫应答; 另一方面还能通过机体水平的宿主反应, 包括 B 细胞介导的体液免疫和 T 细胞介导的细胞免疫, 即获得性免疫应答来抵抗病毒的入侵<sup>[57]</sup>。先前研究发现, 喜树碱 C 通过激活宿主固有免疫抑制 EV71 的繁殖, 表现出明显的抗病毒活性<sup>[58]</sup>; Li 等通过一系列实验证明穿心莲内酯磺酸盐(喜炎平注射液)直接作用于激活的嗜中性粒细胞和 T 淋巴细胞, 调节其免疫活性, 提高机体的免疫力, 从而保护小鼠免受致死性 EV71 攻击<sup>[59]</sup>。另外, Yang 等采用动物与细胞实验结合的方法, 报道了喹诺利啉生物碱通过补偿降低的 T 细胞水平而有效保护 EV71 感染的小鼠, 其中氧化槐果碱效果最显著<sup>[60]</sup>。

天然免疫研究中, 病原模式识别受体及信号传导调控是一个前沿热点, 也是抗病毒药物作用的关键。Toll 样受体(Toll-Like Receptor, TLR)被认为是体内最重要的模式识别分子, 在病毒感染后, TLR 发生构象变化, 通过 MyD88 依赖和 MyD88 非依赖途径激活信号转导; TLR 激活后一连串的事件发生, 特别是丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen

Activated Protein Kinase, MAPK)激活<sup>[61]</sup>。然后由细胞外信号调节激酶(Extracellular Signal-Regulated Kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun Aminoterminal Kinase, JNK)和 p38 这 3 个信号分子介导的信号通路激活, 启动多种炎症因子的转录<sup>[62]</sup>。芒柄花黄素便是通过调节 ERK、p38 和 JNK 等 MAPK 途径抑制 EV71 诱导的 COX-2 表达和 PGE<sub>2</sub> 的产生, 从而抑制病毒复制和炎症因子的表达<sup>[63]</sup>。此外, 病毒的刺激可触发 NF- $\kappa$ B 信号通路, 从而调节免疫应答和炎症反应等, 盐酸去氢骆驼蓬碱便通过抗氧化机制特异性抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活, 抑制 EV71 复制并减少 EV71 诱导的活性氧的产生<sup>[64]</sup>; 类似地, 白藜芦醇通过阻断 IKKs/NF- $\kappa$ B 信号通路, 抑制炎症反应并减轻 RD 细胞的损伤来有效减轻 EV71 对宿主细胞的感染<sup>[65]</sup>, 见图 2。

EV71 感染诱导宿主免疫应答, 也可通过其他途径抑制 EV71 的复制。例如, 异绿原酸 C (Isochlorogenic Acid C, ICAC)通过调节谷胱甘肽氧化还原平衡, 防止 EV71 感染; 进一步的生化分析显示, ICAC 调节了几种参与还原和氧化谷胱甘肽(GSH 和 GSSG)稳态的抗氧化酶, 从而恢复 GSH/GSSG 比值和活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)水平<sup>[66]</sup>。此外, 载奥司他韦的 SeNPs 在人星形细胞瘤细胞模型中通过线粒体途径抑制 EV71 感染诱导的宿主细胞凋亡, 减少活性氧的产生<sup>[67]</sup>。Wang 等发现, 甘草碱衍生物 LY-55 至少部分地通过抑制自噬来抑制 EV71 和 CVA16 的复制<sup>[68]</sup>。与以上方式不同, 姜黄素在 Vero 细胞中通过泛素-蛋白酶体途径抑制蛋白质降解, 激活细胞外信号调节激酶, 在病毒感染的早期阶段显示出其强大的抗凋亡活性<sup>[69]</sup>。

靶向病毒分子可能更特异、毒性更小, 但病毒谱较窄, 产生抗药性病毒的风险更高; 相反地, 以细胞分子为靶点的化学物质可能具有更广泛的抗病毒活性谱, 产生病毒抗性的风险较小, 但对宿主细胞的毒性可能更大<sup>[70]</sup>。这些针对宿主的抑制剂

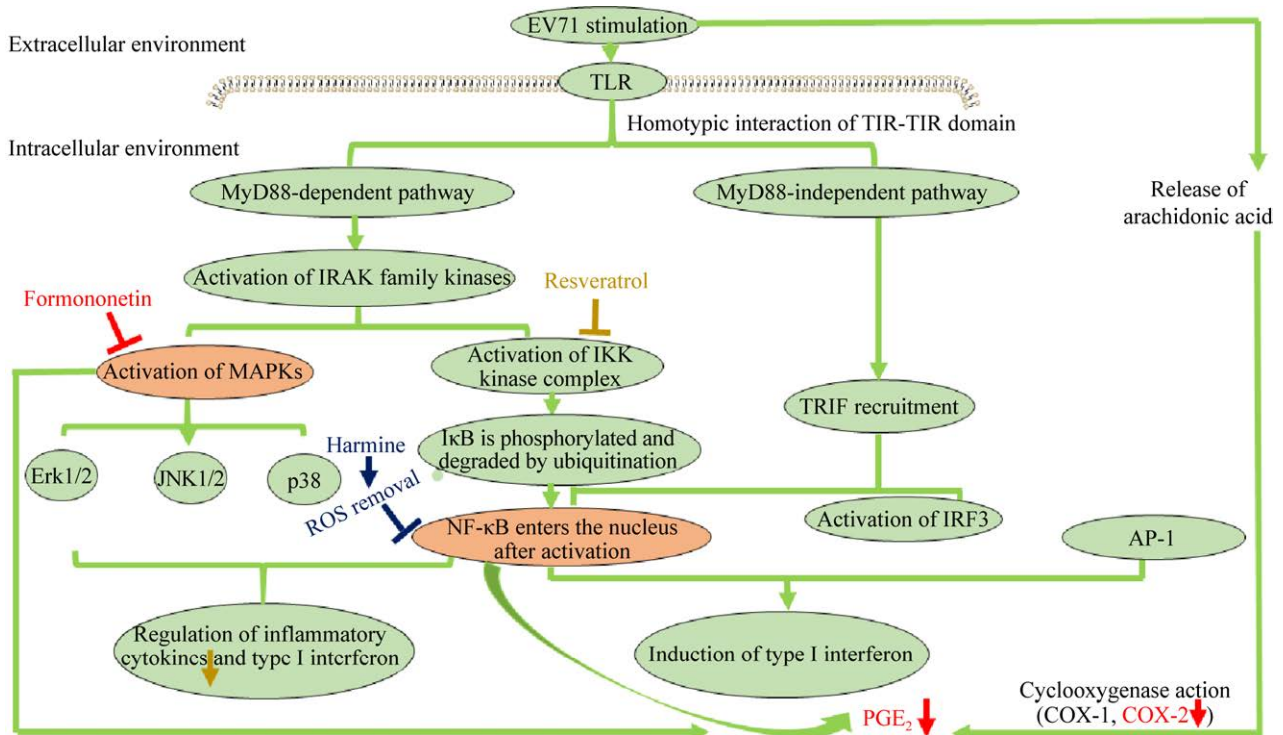


图 2 EV71 感染后相关药物作用图

Figure 2 Drug action map of EV71 infection

其主要缺点是脱靶效应和细胞毒性。因此,在 EV71 感染过程中,开发特异性的、无毒的抗病毒药物,是一个尚未得到满足的需求。

### 2.3 多途径抗病毒药物

鉴于之前发现的化合物多为单一靶向病毒或宿主,尚有很多化合物是通过多重作用机制发挥抗病毒效应的。因此,广谱的抗病毒药物也是治疗 EV71 感染的有效选择。

蜜环菌(*Melissa Officinalis*, MO)是一种在欧洲和中东地区有着悠久历史的药用植物。首先,其提取物中的生物活性成分迷迭香酸(Rosmarinic Acid, RA)可与病毒颗粒结合,干扰其与受体的连接和内化,减少病毒的粘附和进入;其次,RA 在吸附后阶段的抗 EV71 活性更与宿主多种机制有关:RA 抑制 EV71 诱导的宿主细胞翻译的破坏和病毒翻译的启动;真核细胞翻译起始因子 4G 的裂解;异质核糖核蛋白 A1 的细胞质重新定位;活

性氧的产生,这些结果提示 MO 及其成分 RA 具有抗 EV71 活性,可作为治疗和预防 EV71 感染的候选药物<sup>[71]</sup>。此外,荆芥水提物(*Aqueous Extract of Schizonepeta tenuifolia* Briq, STE)也通过作用于多个靶点对 EV71 产生抗病毒作用,但 RA 同样是 STE 的生物活性成分之一,因此其作用机制与 MO 类似,不同点在于 STE 清除 ROS 并抑制 p38 激酶激活,抑制 EPS15 的翻译后修饰<sup>[72]</sup>。作为以上 2 种药草的共有成分,RA 对 EV71 有显著的抑制作用且机制广泛,是值得深入挖掘的潜力成分。此外,STE 可能直接抑制 2A 蛋白酶。该中药中或许还存在其他有抗 EV71 活性的有效成分,可深入探讨。研究表明,黄芩苷和小檗碱对 EV71 感染具有很强的抗病毒作用。黄芩苷对病毒与宿主存在双重作用,可能是通过抑制 EV71/3D 聚合酶表达和激活 Fas/FasL 信号通路来实现,而且靠阻断/下调 NF-κB 信号通路减少细胞因子的分泌<sup>[73]</sup>;小檗碱

以剂量依赖性发挥作用, 通过下调 MRK/ERK 信号通路和 EV71 诱导的自噬表达来抑制 EV71 的活性<sup>[74]</sup>。

### 3 抗病毒药物筛选技术

药物的研发是一件过程烦琐、周期长且与技术应用密切相关的事情, 其中, 药物筛选技术对于研发高效、低毒、特异性高的抗病毒药物有着举足轻重的作用。随着科学技术的快速发展, 各种先进技术层出不穷。

#### 3.1 传统的抗病毒药物筛选

病毒由于缺少增殖所需的酶系统, 只能在易感活细胞内进行扩增, 因此, 先前抗病毒药物的筛选多是基于病毒诱导的细胞病变效应和病毒核酸定量检测等建立体外抗病毒药物筛选。例如: Ren 等在 96 孔板中筛选药物文库, 对感染细胞接种药物进行培养, 最后收集上清检测病毒载量, 即筛选出有抗病毒作用的苏拉明<sup>[33]</sup>。作为检测药物效应的常用方法, 传统的抗病毒药物筛选方法简单实用, 但不乏费时、费力与效率低等缺点。

#### 3.2 计算机虚拟筛选-分子对接

随着计算机科学与大数据的迅猛发展, 计算机虚拟筛选技术成为药物设计的重要手段之一。在进行生物活性筛选之前, 利用大量的化合物结构, 在计算机上对化合物分子进行预筛选, 以降低实际筛选化合物的数目, 然后采用分子对接方法来进行; 分子对接的关键环节是配体结合构象的优化, 再通过打分函数评判配体分子和受体结合能力的强弱<sup>[75]</sup>。利用小分子化合物与药物靶标间的分子对接运算, 研究人员可以准确地获取两者之间的相互作用情况, 从候选化合物库中快速筛选出潜在的药物或药物前体, 从而加速药物开发过程<sup>[76]</sup>。Wang 等利用自动对接程序 AutoDock 4.0 来模拟 EV71 3C 蛋白酶配体构象, 预测了 7-羟基黄酮及其磷酸酯与 EV71 的 3C 蛋白酶的结合, 由此发现了其潜在的抗病毒作用<sup>[51]</sup>; 同样地, 借助虚拟筛选, 张倩等在 TCM Database@Taiwan 数据库中选抗

EV71 3C 蛋白酶的候选中药单体<sup>[77]</sup>。该方法针对特定的靶标结构, 将研究目标集中而减少实验浪费, 缩短药物筛选时间, 缩小新药研究的周期, 却也因此受到化合物结构等的限制。然而, 在计算机技术推动下, 计算机辅助药物设计的研究成为一个基本的工作, 用其进行抗 EV71 药物筛选的应用前景十分广阔。

#### 3.3 高通量筛选(High Throughput Screening, HTS)

自 1970 年以来, 高通量筛选技术的出现使得药物筛选进入分子水平时代, 药物筛选中速度瓶颈问题得到了解决。高通量筛选技术是 20 世纪末发展起来的药物筛选新技术体系, 以分子水平和细胞水平的实验方法为基础, 将微板形式作为实验工具载体, 实验过程自动化, 用灵敏快速的检测仪器采集实验数据, 通过计算机对数以千计的样品数据进行分析处理; 其基于大量的实体化合物, 通过特异地作用于体内的靶点实现了药物筛选的规模化, 受到药物研发与筛选者的极大重视<sup>[78]</sup>。为了确定在脊髓灰质炎病毒和肠道病毒感染中具有保守靶点的抗性化合物, Arita 等使用带有 PV 和 EV71 假病毒感染系统的高通量筛选系统对一个药理活性化合物库进行了筛选, 以 PV 和 EV71 假病毒为靶点, 包埋荧光素酶编码的复制子, 进行药物筛选<sup>[79]</sup>。Gao 等开发了一种高通量筛选方法, 一个基于细胞的无偏筛选系统, 包括 96 孔格式的多轮 EV71 感染, 以筛选 FDA 批准的药物库<sup>[46]</sup>。该方法若是用于抗 EV71 的药物筛选, 可以在同一时间内得到大量有意义的数据, 极大地提高了药物筛选的效率。

#### 3.4 高内涵药物筛选(High Content Screening, HCS)

高内涵药物筛选技术是指保持细胞结构和功能完整性的前提下, 利用各种荧光标记物(如 GFP、荧光抗体、Hoechst 等)来检测被筛样品对细胞作用的多维信息(细胞形态、生长、分化、迁移、凋亡、代谢途径及信号转导等), 是确定药物靶标、

优化药物先导物的重要手段。从筛选载体上来看,高内涵药物筛选与高通量药物筛选均在微孔板上进行,差别不大。其优势是获取信息以细胞为单位,全面反映样品的生物活性、数据来源与细胞群体,研究者能以更少的时间和花费进行更多的实验,获得更多研究信息和统计数据<sup>[80]</sup>。Zhou 等利用高内涵药物筛选技术,在 FDA 批准的药物库中确定了在胎儿样器官和成人脑中抑制寨卡病毒感染的候选药物,其中氢溴酸氢哌嗪具有很强的体内抗寨卡病毒活性<sup>[81]</sup>。作为一项成熟技术,高内涵药物筛选可以在保持细胞结构和功能完整的前提下对抗 EV71 的化合物进行多元化、多靶点的检测。虽然目前 HCS 在抗 EV71 药物研究中应用尚少,但值得借用此技术深入研究。

### 3.5 其他

随着病毒研究的深入,假病毒技术逐步得到了广泛应用。假病毒可利用病毒包膜蛋白或衣壳蛋白包裹非病毒自身核酸进行抗病毒药物筛选,尤其是高致病性活病毒<sup>[82]</sup>。基于此, Xu 等开发了一个两步筛选平台,使用包括假病毒在内的报告病毒分析与基于细胞活力的二次筛选,从 400 种高度纯化的化合物中筛选鉴定木犀草素为 EV71 和柯萨奇病毒 A16 抑制剂<sup>[83]</sup>。在进行药物筛选时,很多方法可以创新并灵活应用,采用多种技术结合的方式或者自行建立相关分析平台进行检测,如离子通道药物筛选平台、Luminex (液相芯片技术)检测平台等。此外,还可以根据病毒研究内容制定个性化的药物筛选方案。为评估抑制 EV71 病毒 IRES 介导的翻译和/或真核启动子介导的翻译的候选成分, Chung 等通过建立一个方便的基于 EV71-IRES 的双顺反子分析平台,筛选出 2 种有抗 EV71-IRES 活性的咖啡酸衍生物<sup>[37]</sup>。

随着对新药研发要求的不断提高,从天然化合物文库及上市药物中进行筛选的方法以其风险小、成本低、耗时短等优势越发受到关注。与此同时,各种抗病毒药物筛选技术不断革新,相信会为抗

EV71 药物活性靶点的确定提供巨大帮助。

## 4 问题与展望

近年来,以 EV71 感染引起的手足口病在许多亚洲国家频繁暴发,迫切需求有效的抗病毒药物,也成为国内关注的严重公共卫生问题<sup>[84]</sup>。在中国每年就有数十万儿童感染 EV71 并发展为手足口病<sup>[14]</sup>。目前并无防治 EV71 感染的特效药,而单价疫苗是针对 C4 亚型研发,对其他肠道病毒引起的手足口病尚无针对性,覆盖范围狭窄,并不具备普遍性。而且,新型联合多价疫苗的研制由于血清型的多样性而变得复杂,成本高且疫苗接种存在问题<sup>[9,85]</sup>,因此,继续努力开发安全有效的抗病毒药物至关重要。

首先,靶向病毒的抗 EV71 药物靶点多集中在衣壳蛋白 VP1 与 3C 蛋白酶。VP1 是主要的病毒中和决定因子,直接决定病毒的抗原性,并含有主要的抗原结合位点<sup>[6]</sup>,而且 VP1 在 EV71 多种亚型中相对保守,开发相应的衣壳结合抑制剂,阻断病毒与宿主相互作用,抑制效应更具广谱性, EV71 变异产生的耐药性问题也可以得到改善。目前靶向 EV71 的抑制剂方面投入研究很多,但大多抗 EV71 机制尚不明确,而且未经过临床的验证,有待进一步考量。其次,至今还没有获准的抗病毒治疗方法来预防或治疗肠道病毒感染,这仍然是对公众健康的重大威胁。与再次投入大量人力、物力用于发现新的有抗 EV71 活性的化合物相比,从经批准的药物文库中筛选可能被重新用作肠道病毒抗病毒药物的化合物作为抑制剂会更加节约成本与时间<sup>[46]</sup>。专注于已批准的药物有几个优点:(1) 临床试验数据与经验,尤其是药代动力学安全性可以显著缩短开发时间;(2) 大多数批准药物靶点的生理作用是已知的,继续推进其作用机制研究,有针对性地进行改造并提高相应活性,以增加现有临床常用抗 EV71 药物方面新的适应症。作为小儿抗寄生虫药,苏拉明已经在临床上使用了几十年,因此, Ren 等确定苏拉明是 EV71 的抑制剂时可以首先排



除其在儿童身上应用安全性的担忧<sup>[33]</sup>。此外, 一些中药及天然药物被认为是丰富但尚未开发的化学物质来源, 随着药物筛选与合成技术的提高, 从天然药物中筛选或者设计靶标合成抗 EV71 化合物已成为近些年国内研究 EV71 的治疗热点。此外, 在民族药剂学资源丰富的中国, 中药及天然药物的药效与益处在上几千年的使用历史中已经有了很好的验证。因此, 对它们的研究可以集中在民间医学中有令人信服的使用记录的植物化学物质上。其中, 中药复方多个靶点是其发挥抗病毒作用的重要优势, 如甘露消毒丹、双黄连、升麻葛根汤等<sup>[25,86]</sup>。

截至目前, 虽然很多抗病毒药物被研究发现, 但其临床应用由于对宿主的潜在不利影响和耐药突变体的出现而受到阻碍<sup>[23]</sup>。尽管病毒靶向制剂继续主导临床, 但具有宿主靶向机制的候选药物数量已从批准的抗病毒的 14% 显著增加到所有抗病毒临床候选药物的 27%<sup>[87]</sup>, 而且宿主因子不易产生耐受及突变, 靶向宿主的活性成分也能成为有效的广谱抗病毒药物, 所以加大靶向宿主的药物研发力度会是一个不错的选择。此前靶向宿主的相关药物研究多涉及抗病毒天然免疫反应, 因此, 根据 EV71 致病的免疫机制, 干扰 EV71 复制相关的免疫途径可能是治疗 EV71 的一个新靶点。

对于抗病毒的体外研究, 目前采用的二维细胞培养法并不能比拟细胞在人体内的自然生长过程, 有关药物抗 EV71 的作用机制研究便缺乏一定的准确性。随着三维支架材料的广泛应用, 多种细胞体外纳米自组装短肽和胶原水凝胶三维培养模型及腺病毒体外 3D 培养模型已被成功构建<sup>[88-90]</sup>, 尝试结合三维细胞培养技术进行药物抗 EV71 的研究会有更大的价值, 尤其可用于开发有用的体外临床药物筛选平台。相信随着研究的不断深入, 密切寻找相关靶标, 提高药物筛选、分离与设计手段, 一定会为抗 EV71 药物的研发打开新的局面, 从而提高临床成功应用的可能性。

## REFERENCES

- [1] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 1974, 129(3): 304-309
- [2] Jin Q. *Medical Molecular Virology*[M]. Beijing: Science Press, 2001: 606-613 (in Chinese)  
金奇. *医学分子病毒学*[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 606-613
- [3] Li ZH, Cui B, Liu XW, Wang LC, Xian QJ, Lu ZX, Liu ST, Cao YG, Zhao YR. Virucidal activity and the antiviral mechanism of acidic polysaccharides against enterovirus 71 infection *in vitro*[J]. *Microbiology and Immunology*, 2020, 64(3): 189-201
- [4] Wongs A, Nulsri E, Phawong C, Puthavathana P, Tassaneetrithep B. Replication and cytokine profiles of different subgenotypes of enterovirus 71 isolated from Thai patients in peripheral blood mononuclear cells[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 132: 215-221
- [5] Zhang WJ, Huang ZG, Huang MY, Zeng JC. Predicting severe enterovirus 71-infected hand, foot, and mouth disease: cytokines and chemokines[J]. *Mediators of Inflammation*, 2020, 2020: 9273241
- [6] Wang HQ, Li YH. Recent progress on functional genomics research of enterovirus 71[J]. *Virologica Sinica*, 2019, 34(1): 9-21
- [7] Wu KX, Ng MM, Chu JJ. Developments towards antiviral therapies against enterovirus 71[J]. *Drug Discovery Today*, 2010, 15(23/24): 1041-1051
- [8] Lu LL, Zou XL, Yan D, Yuan Q, Deng HY, Yu ZJ. Mechanism of autophagy induced by EV71 in human neuroblastoma cell SH-SY5Y[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(4): 850-857 (in Chinese)  
卢莉莉, 邹晓琳, 晏丹, 袁琼, 邓海英, 于志君. EV71 诱导人神经细胞 SH-SY5Y 自噬的分子机制[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(4): 850-857
- [9] Zhang J. Trend of epidemics and variation of pathogens of hand, foot and mouth disease in China: a dynamic series analysis, 2008-2017[J]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 2019, 40(2): 147-154 (in Chinese)  
张静. 2008-2017 年中国手足口病流行趋势和病原变化动态数列分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2019, 40(2): 147-154
- [10] Li DM, Lin M. Epidemiology and multiple organ injury in HFMD of enterovirus 71: research progress[J]. *Chinese Journal of Clinical Pathologist*, 2017, 9(4): 252-254 (in Chinese)  
李东明, 林明. 肠道病毒 71 型手足口病流行病学及多器官损伤研究进展[J]. *实用检验医师杂志*, 2017, 9(4): 252-254
- [11] Luo Z, Su R, Wang WB, Liang YC, Zeng XF, Shereen MA,

- Bashir N, Zhang Q, Zhao L, Wu KL, et al. EV71 infection induces neurodegeneration via activating TLR7 signaling and IL-6 production[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(11): e1008142
- [12] Yang BY, Liu FF, Liao QH, Wu P, Chang ZR, Huang J, Long L, Luo L, Li Y, Leung GM, et al. Epidemiology of hand, foot and mouth disease in China, 2008 to 2015 prior to the introduction of EV-A71 vaccine[J]. *Eurosurveillance*, 2017. DOI:10.2807/1560-7917.es.2017.22.50.16-00824
- [13] Fan H, Ji H, Huo X, Hu JL, Qi X, Bao CJ. Epidemiological and genetic characteristics of EV71 strains circulating in Jiangsu province from 2009 to 2018[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2019, 39(9): 686-692 (in Chinese)  
樊欢, 嵇红, 霍翔, 胡建利, 祁贤, 鲍倡俊. 2009—2018年江苏省EV71分子流行病学及其基因特征分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2019, 39(9): 686-692
- [14] Zhou HT. Recent research advances in EV71 vaccines and drugs[J]. *World Latest Medicine Information*, 2018, 18(58): 72 (in Chinese)  
周慧婷. EV71疫苗及药物的最新研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(58): 72
- [15] Lu JH, Feng QJ, Guo ZM. The current situation and prospect of the vaccine for hand, foot and mouth disease[A]//Workshop for Control of Emerging Infectious Diseases[C]. Chinese Medical Association Medical Virology Branch, Guangdong Preventive Medicine Association Medical Virology Professional Committee, Guangdong Immunology Association: Guangdong Preventive Medicine Association Medical Virology Professional Committee, 2011: 3 (in Chinese)  
陆家海, 冯谦谨, 郭中敏. 手足口病疫苗的研究现状与展望[A]//新发和再发传染病防治热点研讨会论文集[C]. 中华医学会医学病毒学分会, 广东省预防医学会医学病毒学专业委员会, 广东省免疫学会: 广东省预防医学会医学病毒学专业委员会, 2011: 3
- [16] McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance[J]. *FEMS Microbiol Reviews*, 2002, 26(1): 91-107
- [17] Yan YH, Liu SA, Cheng J, Liang P. Progress on human enterovirus 71 infection and its prevention and treatment[J]. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Infectious Diseases: Electronic Edition*, 2019, 13(5): 366-369 (in Chinese)  
阎永红, 刘顺爱, 成军, 梁璞. 人肠道病毒71型感染及其防治研究进展[J]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2019, 13(5): 366-369
- [18] Chang CK, Wu SR, Chen YC, Lee KJ, Chung NH, Lu YJ, Yu SL, Liu CC, Chow YH. Mutations in VP1 and 5'-UTR affect enterovirus 71 virulence[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 6688
- [19] Zhang YQ, Yang HY, Yang Z, Shi YD, Zhao CH. Developments towards antiviral agents and vaccine against enterovirus 71[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(4): 544-552 (in Chinese)  
张迎秋, 杨怀义, 杨倬, 时迎娣, 赵春晖. EV71感染抗病毒药物及疫苗研究进展[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(4): 544-552
- [20] Li YM, Yu J, Qi XW, Yan HM. Monoclonal antibody against EV71 3D<sup>pol</sup> inhibits the polymerase activity of RdRp and virus replication[J]. *BMC Immunology*, 2019, 20(1): 6
- [21] Sun HY, Gao M, Cui DW. Molecular characteristics of the VP1 region of enterovirus 71 strains in China[J]. *Gut Pathogens*, 2020, 12: 38
- [22] Kobayashi K, Koike S. Cellular receptors for enterovirus A71[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2020, 27(1): 23
- [23] Tan CW, Lai JKF, Sam IC, Chan YF. Recent developments in antiviral agents against enterovirus 71 infection[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2014, 21(1): 14
- [24] Feng QY, Zhou HT, Zhang XY, Liu X, Wang J, Zhang CP, Ma XJ, Quan CJ, Zheng ZL. Acarbose, as a potential drug, effectively blocked the dynamic metastasis of EV71 from the intestine to the whole body[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2020, 81: 104210
- [25] Huang PC, Yang Q, Cheng XG, Gao XR, Wen Y, Zhang YQ. Preliminary study on antiviral activity of *Flos Ionicerae-Fructus forsythiae* herb couples against enterovirus 71[J]. *Practical Pharmacy and Clinical Remedies*, 2019, 22(6): 589-592 (in Chinese)  
黄培成, 杨强, 程小耕, 高秀容, 文燕, 张玉琴. 金银花-连翘药对抗肠道病毒71型的初步探究[J]. *实用药物与临床*, 2019, 22(6): 589-592
- [26] Jin ZJ, Yang LX, Ding GT, Yang GX, Han YH, Zhang X, Li WH. Sophocarpine against enterovirus 71 *in vitro*[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2017, 14(4): 3792-3797
- [27] Plevka P, Perera R, Cardoso J, Kuhn RJ, Rossmann MG. Crystal structure of human enterovirus 71[J]. *Science*, 2012, 336(6086): 1274
- [28] Plevka P, Perera R, Yap ML, Cardoso J, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structure of human enterovirus 71 in complex with a capsid-binding inhibitor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(14): 5463-5467
- [29] Smith TJ, Kremer MJ, Luo M, Vriend G, Arnold E, Kamer G, Rossmann MG, McKinlay MA, Diana GD, Otto MJ. The site of attachment in human rhinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating[J]. *Science*, 1986, 233(4770): 1286-1293
- [30] Yang Z, Wang JB, Qin W, Wang LY, Zhuo Q, Tian B. Novel virus capsid-binding agent prevents enterovirus 71 from proliferation[J]. *Chinese Journal of Microecology*,

- 2019, 31(7): 776-780 (in Chinese)  
杨倬, 王晶波, 秦文, 王丽媛, 卓勤, 田波. 新型病毒衣壳结合剂哌嗪新衍生物抑制肠道病毒 71 型的复制[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(7): 776-780
- [31] Ma HQ, Wang Y, Mao YH, Wang SY, Zhang YP, Zuo CQ, Liang SJ, Liu JW. The inactivation of the non-enveloped enterovirus 71 (EV71) by a novel disinfectant gel formulation for topical use[J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2019, 45(3): 506-513
- [32] Zhao PP, He WL, Zhao YY, Mao YH, Wang Y, Cai Y. Advances in the synthesis of drugs for human hand, foot and mouth disease[J]. Chemistry, 2017, 80(10): 900-907 (in Chinese)  
赵佩佩, 贺万丽, 赵杨杨, 毛永红, 汪颖, 蔡岩. 抗手足口病药物的合成研究进展[J]. 化学通报, 2017, 80(10): 900-907
- [33] Ren PJ, Zou G, Bailly B, Xu SS, Zeng M, Chen XS, Shen L, Zhang Y, Guillon P, Arenzana-Seisdedos F, et al. The approved pediatric drug suramin identified as a clinical candidate for the treatment of EV71 infection — suramin inhibits EV71 infection *in vitro* and *in vivo*[J]. Emerging Microbes & Infections, 2014, 3(1): 1-9
- [34] Yen MH, Huang CI, Lee MS, Cheng YP, Hsieh CJ, Chiang LC, Chang JS. *Artemisia capillaris* inhibited enterovirus 71-induced cell injury by preventing viral internalization[J]. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2018, 34(3): 150-159
- [35] Su YS, Tsai AH, Ho YF, Huang SY, Liu YC, Hwang LH. Stimulation of the internal ribosome entry site (IRES)-dependent translation of enterovirus 71 by DDX3X RNA helicase and viral 2A and 3C proteases[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1324
- [36] Tsai FJ, Lin CW, Lai CC, Lan YC, Lai CH, Hung CH, Hsueh KC, Lin TH, Chang HC, Wan L, et al. Kaempferol inhibits enterovirus 71 replication and internal ribosome entry site (IRES) activity through FUBP and HNRP proteins[J]. Food Chemistry, 2011, 128(2): 312-322
- [37] Chung YC, Hsieh FC, Lin YJ, Wu TY, Lin CW, Lin CT, Tang NY, Jinn TR. Magnesium lithospermate B and rosmarinic acid, two compounds present in *Salvia miltiorrhiza*, have potent antiviral activity against enterovirus 71 infections[J]. European Journal of Pharmacology, 2015, 755: 127-133
- [38] Zhang W, Qiao HS, Lv Y, Wang JJ, Chen XQ, Hou YY, Tan RX, Li EG. Apigenin inhibits enterovirus-71 infection by disrupting viral RNA association with trans-acting factors[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110429
- [39] Zhang XN, Song ZG, Qin BY, Zhang XL, Chen LX, Hu YW, Yuan ZH. Rupintrivir is a promising candidate for treating severe cases of enterovirus-71 infection: evaluation of antiviral efficacy in a murine infection model[J]. Antiviral Research, 2013, 97(3): 264-269
- [40] Wang YX, Cao L, Zhai YY, Ma JM, Nie QD, Li T, Yin Z, Sun YN, Shang LQ. Inhibition of enterovirus 71 replication by an  $\alpha$ -hydroxy-nitrile derivative NK-1.9k[J]. Antiviral Research, 2017, 141: 91-100
- [41] Zeng DB, Ma YY, Zhang R, Nie QD, Cui ZJ, Wang YX, Shang LQ, Yin Z. Synthesis and structure-activity relationship of  $\alpha$ -keto amides as enterovirus 71 3C protease inhibitors[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016, 26(7): 1762-1766
- [42] Yao CG, Xi CL, Hu KH, Gao W, Cai XF, Qin JL, Lv S, Du CH, Wei YH. Inhibition of enterovirus 71 replication and viral 3C protease by quercetin[J]. Virology Journal, 2018, 15(1): 116
- [43] Cao ZY, Ding Y, Ke ZP, Cao L, Li N, Ding G, Wang ZZ, Xiao W. Luteoloside acts as 3C protease inhibitor of enterovirus 71 *in vitro*[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0148693
- [44] Lin YJ, Chang YC, Hsiao NW, Hsieh JL, Wang CY, Kung SH, Tsai FJ, Lan YC, Lin CW. Fisetin and rutin as 3C protease inhibitors of enterovirus A71[J]. Journal of Virological Methods, 2012, 182(1/2): 93-98
- [45] Wang JM, Zhang T, Du J, Cui S, Yang F, Jin Q. Anti-enterovirus 71 effects of chrysin and its phosphate ester[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e89668
- [46] Gao QQ, Yuan SL, Zhang C, Wang Y, Wang YZ, He GM, Zhang SY, Altmeyer R, Zou G. Discovery of itraconazole with broad-spectrum *in vitro* anti-enterovirus activity that targets nonstructural protein 3A[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, 59(5): 2654-2665
- [47] Chen TC, Chang HY, Lin PF, Chern JH, Hsu JTA, Chang CY, Shih SR. Novel antiviral agent DTriP-22 targets RNA-dependent RNA polymerase of enterovirus 71[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(7): 2740-2747
- [48] Li WM, Zhang Y, Wang W. Effect of myricetin on enterovirus 71 infection *in vitro*[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2020, 36(4): 508-513 (in Chinese)  
李文森, 张洋, 王伟. 杨梅素体外抗 EV71 病毒作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(4): 508-513
- [49] Wei YH, Fang W, Wan ZY, Wang KM, Yang QY, Cai XF, Shi LQ, Yang ZW. Antiviral effects against EV71 of pimprinine and its derivatives isolated from *Streptomyces* sp.[J]. Virology Journal, 2014, 11(1): 1-14
- [50] Kim C, Kang H, Kim DE, Song JH, Choi M, Kang MG, Lee K, Kim HS, Shin JS, Jeong H, et al. Antiviral activity of micafungin against enterovirus 71[J]. Virology Journal, 2016, 13: 99
- [51] Wang JM, Su HX, Zhang T, Du J, Cui S, Yang F, Jin Q. Inhibition of enterovirus 71 replication by 7-hydroxyflavone and diisopropyl-flavon-7-yl phosphate[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92565
- [52] Wang JJ, Chen XQ, Wang W, Zhang YT, Yang ZY, Jin Y, Ge HM, Li EG, Yang G. Glycyrrhizic acid as the antiviral component of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. against

- coxsackievirus A16 and enterovirus 71 of hand foot and mouth disease[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 147(1): 114-121
- [53] Yang YJ, Zhang LF, Fan XX, Qin C, Liu JN. Antiviral effect of geraniin on human enterovirus 71 *in vitro* and *in vivo*[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22(6): 2209-2211
- [54] Zhang HF, Guo SY, Ma YH, Zhuang Y, Yu H. Inhibitory effect of water extract of *Houttuynia cordata* Thunb and its main ingredients on enterovirus type 71 *in vitro*[J]. *Shandong Medical Journal*, 2018, 58(7): 28-32 (in Chinese) 张慧锋, 郭淑英, 马莹慧, 庄艳, 于欢. 鱼腥草水提液及其主要成分体外对 71 型肠道病毒的抑制作用观察[J]. *山东医药*, 2018, 58(7): 28-32
- [55] Arita M, Takebe Y, Wakita T, Shimizu H. A bifunctional anti-enterovirus compound that inhibits replication and the early stage of enterovirus 71 infection[J]. *The Journal of General Virology*, 2010, 91(Pt 11): 2734-2744
- [56] Deng CL, Yeo H, Ye HQ, Liu SQ, Shang BD, Gong P, Alonso S, Shi PY, Zhang B. Inhibition of enterovirus 71 by adenosine analog NITD008[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(20): 11915-11923
- [57] Fan ST, Liao Y, Lian YR, Jiang GR, Jiang L, Dong CH, Yang EX, Wang LC, Xu XL, Feng M, et al. Role of innate lymphoid cells and dendritic cells in intradermal immunization of the enterovirus antigen[J]. *NPJ Vaccines*, 2019, 4: 14
- [58] Wang YE, Kang NX, Zhao JP, Liu YL, Li KP, Xu QM, Khan IA, Yang SL. Hederacolchiside C inhibits enterovirus 71 propagation through activating innate immunity[J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2019, 25(12): 1074-1077
- [59] Li M, Yang XL, Guan C, Wen T, Duan YQ, Zhang W, Li XH, Wang YG, Zhao ZP, Liu SC. Andrographolide sulfonate reduces mortality in enterovirus 71 infected mice by modulating immunity[J]. *International Immunopharmacology*, 2018, 55: 142-150
- [60] Yang YJ, Guan FF, Bai L, Zhang L, Liu JN, Pan XD, Zhang LF. Quinolizidine alkaloids reduced mortality in EV71-infected mice by compensating for the levels of T cells[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015, 25(17): 3526-3528
- [61] Zhu L, Li WH, Qi GJ, Liu N, Sheng LP, Shang L, Qi BX. The immune mechanism of intestinal tract Toll-like receptor in mediating EV71 virus type severe hand-foot-and-mouth disease and the MAPK pathway[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2017, 13(5): 2263-2266
- [62] Kumar R, Khandelwal N, Thachamvally R, Tripathi BN, Barua S, Kashyap SK, Maherchandani S, Kumar N. Role of MAPK/MNK1 signaling in virus replication[J]. *Virus Research*, 2018, 253: 48-61
- [63] Wang HQ, Zhang DJ, Ge M, Li ZR, Jiang JD, Li YH. Formononetin inhibits enterovirus 71 replication by regulating COX-2/PGE<sub>2</sub> expression[J]. *Virology Journal*, 2015, 12: 35
- [64] Chen DY, Tian XY, Zou X, Xu SJ, Wang HR, Zheng N, Wu ZW. Harmine, a small molecule derived from natural sources, inhibits enterovirus 71 replication by targeting NF- $\kappa$ B pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2018, 60: 111-120
- [65] Zhang L, Li YY, Gu ZW, Wang YY, Shi M, Ji Y, Sun J, Xu XP, Zhang LR, Jiang J, et al. Resveratrol inhibits enterovirus 71 replication and pro-inflammatory cytokine secretion in rhabdomyosarcoma cells through blocking IKKs/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116879
- [66] Cao ZY, Ding Y, Cao L, Ding G, Wang ZZ, Xiao W. Isochlorogenic acid C prevents enterovirus 71 infection via modulating redox homeostasis of glutathione[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 16278
- [67] Zhong JY, Xia Y, Hua L, Liu XM, Xiao MS, Xu TT, Zhu B, Cao H. Functionalized selenium nanoparticles enhance the anti-EV71 activity of oseltamivir in human astrocytoma cell model[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47(1): 3485-3491
- [68] Wang HQ, Guo TT, Yang YJ, Yu L, Pan XD, Li YH. Lycorine derivative LY-55 inhibits EV71 and CVA16 replication through downregulating autophagy[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 277
- [69] Qiu LH, Luo WY. Research progress in apoptosis of host cells induced by enterovirus 71 infection[J]. *Chinese Medicinal Biotechnology*, 2019, 14(5): 460-463 (in Chinese) 邱丽红, 罗文英. 肠道病毒 71 型感染诱导宿主细胞凋亡的研究进展[J]. *中国医药生物技术*, 2019, 14(5): 460-463
- [70] Park SW, Kwon MJ, Yoo JY, Choi HJ, Ahn YJ. Antiviral activity and possible mode of action of ellagic acid identified in *Lagerstroemia speciosa* leaves toward human rhinoviruses[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 14: 171
- [71] Chen SG, Leu YL, Cheng ML, Ting SC, Liu CC, Wang SD, Yang CH, Hung CY, Sakurai H, Chen KH, et al. Anti-enterovirus 71 activities of *Melissa officinalis* extract and its biologically active constituent rosmarinic acid[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 12264
- [72] Chen SG, Cheng ML, Chen KH, Horng JT, Liu CC, Wang SM, Sakurai H, Leu YL, Wang SD, Ho HY. Antiviral activities of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. against enterovirus 71 *in vitro* and *in vivo*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 935
- [73] Li X, Liu YY, Wu TT, Jin Y, Cheng JP, Wan CB, Qian WH, Xing F, Shi WF. The antiviral effect of baicalin on enterovirus 71 *in vitro*[J]. *Viruses*, 2015, 7(8): 4756-4771
- [74] Wang HQ, Li K, Ma LL, Wu S, Hu J, Yan HY, Jiang JD, Li YH. Berberine inhibits enterovirus 71 replication by

- downregulating the MEK/ERK signaling pathway and autophagy[J]. *Virology Journal*, 2017, 14(1): 1-8
- [75] Liu YT, Zhao SY, Lv SW. Application of virtual screening technology based on molecular docking in drug discovery[J]. *Chemical Engineer*, 2020, 34(2): 59-63 (in Chinese)  
刘玉甜, 赵诗雨, 吕邵娃. 基于分子对接的计算机虚拟筛选技术在新药发现中的应用进展[J]. *化学工程师*, 2020, 34(2): 59-63
- [76] Zhang YZ, Qi HS, Gu XY, Li TL, Liu LY, Yu Z. Progress of molecular docking application in drug virtual screening[J]. *Guangzhou Chemistry*, 2017, 42(6): 62-67 (in Chinese)  
张煜卓, 戚涵姝, 谷笑雨, 李天乐, 刘丽艳, 于湛. 分子对接在药物虚拟筛选中的应用进展[J]. *广州化学*, 2017, 42(6): 62-67
- [77] Zhang Q, Chen T, Li ZR, Pan Q, Cao K. Virtual screening of Chinese herbal monomer against EV71 3C protease[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2019, 50(18): 4405-4410 (in Chinese)  
张倩, 陈恬, 李祖锐, 潘渠, 曹康. 抗 EV71 3C 蛋白酶活性中草药单体的虚拟筛选[J]. *中草药*, 2019, 50(18): 4405-4410
- [78] Liang YX, Pan JZ, Fang Q. Research advances of high-throughput cell-based drug screening systems based on microfluidic technique[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2021, 39(6): 567-577 (in Chinese)  
梁怡萧, 潘建章, 方群. 基于微流控技术的细胞水平高通量药物筛选系统的研究进展[J]. *色谱*, 2021, 39(6): 567-577
- [79] 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
- [80] Sun W, Li M. A novel advancement in drug screening techniques: high content screening[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2006, 15(1): 12-16 (in Chinese)  
孙婉, 李敏. 药物筛选技术的最新进展: 高内涵筛选[J]. *中国新药杂志*, 2006, 15(1): 12-16
- [81] Zhou T, Tan L, Cederquist GY, Fan YJ, Hartley BJ, Mukherjee S, Tomishima M, Brenand KJ, Zhang QS, Schwartz RE, et al. High-content screening in hPSC-neural progenitors identifies drug candidates that inhibit zika virus infection in fetal-like organoids and adult brain[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(2): 274-283
- [82] Huo YQ, Mao QY, Li XL. Application of enterovirus in relevant researches on pseudovirus[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2021, 34(1): 106-110 (in Chinese)  
霍雅倩, 毛群颖, 李秀玲. 假病毒在肠道病毒相关研究中的应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34(1): 106-110
- [83] Xu L, Su WH, Jin J, Chen JW, Li XJ, Zhang XY, Sun MY, Sun SY, Fan PH, An D, et al. Identification of luteolin as enterovirus 71 and coxsackievirus A16 inhibitors through reporter viruses and cell viability-based screening[J]. *Viruses*, 2014, 6(7): 2778-2795
- [84] Kiener TK, Jia Q, Meng T, Chow VTK, Kwang J. A novel universal neutralizing monoclonal antibody against enterovirus 71 that targets the highly conserved "knob" region of VP3 protein[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014, 8(5): e2895
- [85] Liu D, Leung K, Jit M, Yu H, Yang J, Liao Q, Liu F, Zheng Y, Wu JT. Cost-effectiveness of bivalent versus monovalent vaccines against hand, foot and mouth disease[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2020, 26(3): 373-380
- [86] Pourianfar HR, Grollo L. Development of antiviral agents toward enterovirus 71 infection[J]. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2015, 48(1): 1-8
- [87] Chaudhuri S, Symons JA, Deval J. Innovation and trends in the development and approval of antiviral medicines: 1987-2017 and beyond[J]. *Antiviral Research*, 2018, 155: 76-88
- [88] Song H, Han YZ, Cai GH, Tang FS, Yang ZH, Ao DS, Zhou A. The effects of self-assembling peptide RADA16 hydrogel on malignant phenotype of human hepatocellular carcinoma cell[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8(9): 14906-14915
- [89] Song H, Cai GH, Liang J, Ao DS, Wang H, Yang ZH. Three-dimensional culture and clinical drug responses of a highly metastatic human ovarian cancer HO-8910PM cells in nanofibrous microenvironments of three hydrogel biomaterials[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2020, 18(1): 90
- [90] Ao DS, Gao LY, Gu JH, Qiao JH, Wang H, Liu YF, Song H. Study on adenovirus infection *in vitro* with nanoself-assembling peptide as scaffolds for 3D culture[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 6327-6338