

维莫非尼通过Raf-MEK-ERK通路抑制EV病毒A71基因组复制和组装作用的实验研究

霍惠子¹, 杨思妹², 林立辉¹

(1. 佳木斯市中心医院药剂科, 黑龙江佳木斯 154000; 2. 佳木斯市传染病院感染科, 黑龙江佳木斯 154000)

摘要: **目的** 研究维莫非尼(VEM)对肠道病毒A组71型(EV-A71)的体外抑制作用及可能机制。**方法** 以EV-A71病毒和人横纹肌肉瘤(RMS)细胞系CCL-136为研究对象, 细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测药物细胞毒性; 致细胞病变效应(CPE)抑制实验评估VEM对EV-A71感染后CCL-136细胞的保护作用; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测培养上清中的病毒载量和细胞中病毒基因组复制水平; 药物作用时间实验分析VEM对EV-A71复制周期的影响; 蛋白质印迹(Western blot)检测病毒组装水平和Raf蛋白激酶(Raf)/丝裂原激活蛋白激酶激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)通路相关蛋白表达。**结果** 与0 μmol/L VEM和瑞德西韦(REM)相比, 11.11 ~ 100 μmol/L VEM和REM处理后CCL-136细胞存活率逐渐降低, 差异具有统计学意义($F=62.874, 94.632$, 均 $P<0.001$)。0.05 ~ 100 μmol/L VEM和REM处理后EV-A71诱导的CCL-136细胞CPE形成抑制率逐渐升高, 差异具有统计学意义($F=62.874, 94.632$, 均 $P<0.001$)。与对照组相比, 0.05 ~ 100 μmol/L VEM处理后EV-A71感染CCL-136细胞的病毒载量逐渐降低($F=473.847, P<0.001$)。与EV71组相比, 病毒感染-1 ~ 4h时, EV71+VEM组培养液上清液中病毒滴度降低, 差异具有统计学意义($t=4.698 \sim 42.114$, 均 $P<0.05$); 病毒感染-1 ~ 8h时, EV71+VEM组上清液和胞质中病毒mRNA水平及衣壳蛋白(VP)2/VP0比值均降低, 差异具有统计学意义($t_{\text{mRNA}}=45.098, 101.451, t_{\text{VP2/VP0}}=6.839, 23.552$, 均 $P<0.01$)。各组干预2、4、6和8h后, 与EV71组相比, EV71+VEM组细胞中磷酸化(p)-MEK和p-ERK水平升高, 差异具有统计学意义($t_{\text{p-MEK}}=11.455 \sim 19.305, t_{\text{p-ERK}}=5.196 \sim 25.497$, 均 $P<0.05$)。**结论** VEM可能通过激活Raf/MEK/ERK通路, 抑制EV-A71病毒基因组复制和组装, 发挥抗病毒活性。

关键词: 维莫非尼; 肠道病毒A组71型; Raf蛋白激酶/丝裂原激活蛋白激酶激酶/细胞外信号调节激酶; 复制; 组装

中图分类号: R373.25; Q753 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2026)02-100-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2026.02.017

Experimental Study on the Inhibitory Effect of Vemurafenib on EV Virus A71 Genome Replication and Assembly through the Raf-MEK-ERK Pathway

HUO Huizi¹, YANG Simei², LIN Lihui¹ (1. Department Pharmacy, Jiamusi Central Hospital, Heilongjiang Jiamusi 154000, China; 2. Department of Infectious Disease, Jiamusi Infectious Disease Hospital, Heilongjiang Jiamusi 154000, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of vemurafenib (VEM) on *Enterovirus* group A type 71 (EV-A71) in vitro and its possible mechanism. **Methods** EV-A71 virus and human rhabdomyosarcoma (RMS) cell line CCL-136 were used as the research objects, and drug cytotoxicity was detected by cell counting kit-8 method. The protective effect of VEM on CCL-136 cells after EV-A71 infection was evaluated by the cytopathic effect (CPE) inhibition assay. The viral load in the culture supernatant and the viral genome replication levels in the cells were detected by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Time-course experiments analyzed the effect of VEM on the replication cycle of EV-A71 was analyzed by drug action time experiment. Western blot was used to detect the level of virus assembly and the expression of Raf protein kinase (Raf) / mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) / extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway-related proteins. **Results** Compared with 0 μmol/L VEM and remdesivir (REM), the survival rate of CCL-136 cells progressively decreased after treatment with 11.11 ~ 100 μmol/L VEM and REM, and the differences were statistically significant ($F= 62.874, 94.632$, all $P < 0.001$). After treatment with 0.05 ~ 100 μmol/L VEM and REM, the inhibition rate of EV-A71-induced CPE formation in CCL-136 cells gradually increased, and the differences were statistically significant ($F= 62.874, 94.632$, all $P < 0.001$). Compared with the control group, the viral load of EV-A71-infected CCL-136 cells gradually decreased after treatment with 0.05 ~ 100 μmol/L VEM ($F = 473.847, P < 0.001$). Compared with the EV71 group, viral titers in the supernatant of the EV71 + VEM group decreased at -1 ~ 4 h post-infectio and the differences were stacistically significant($t=4.698 \sim 42.114$, all $P<0.05$),

基金项目: 黑龙江省卫生健康委科研课题(2022-311)。

作者简介: 霍惠子(1984-), 女, 本科, 主管药师, 研究方向: 临床药学, E-mail: LCJ23459@163.com。

respectively. The levels of viral mRNA and the capsid protein (VP) 2 / VP0 ratio in the supernatant and cytoplasm of the EV71 + VEM group were significantly decreased at -1 ~ 8h after virus infection and the differences were statistically significant ($t_{mRNA} = 45.098 \sim 101.451, t_{VP2/VP0} = 6.839, 23.552$, all $P < 0.01$). At 2, 4, 6 and 8h post-intervention in all groups, the levels of phosphorylated (p) -MEK and p-ERK in the EV71 + VEM group were significantly higher than those in the EV71 group and the differences were statistically significant ($t_{p-MEK} = 11.455 \sim 19.305, t_{p-ERK} = 5.196 \sim 25.497$, all $P < 0.05$). **Conclusions** VEM may inhibit the replication and assembly of EV-A71 virus genome by activating the Raf / MEK / ERK pathway and exert antiviral activity.

Keywords: Vemurafenib; Enterovirus group A type 71; raf protein kinase / mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase; replication; assembly

肠道病毒A组71型(Enterovirus group A type 71, EV-A71)感染是手足口病(hand-feet-mouth disease, HFMD)的主要病因,伴有脑炎、脑膜炎和脊髓灰质炎样综合征等多种危及生命的神经系统并发症,已成为婴幼儿的严重健康威胁^[1]。但目前疫苗效果有限,迫切需要探索有效抗病毒药物。EV-A71属于小RNA(microRNA, miRNA)病毒科肠道病毒属,基因组DNA组装是该属病毒复制的必需环节,也是开发抗病毒药物的关键靶点^[2]。在感染病毒时,宿主体内激酶信号通路发生异常调节,抑制宿主抗病毒反应并促进病毒复制^[3]。Raf蛋白激酶(Raf protein kinase, Raf)/丝裂原激活蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK, MEK)/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路是三种丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联之一,在细胞增殖、分化和凋亡的调控中发挥着重要作用^[3]。研究发现,抑制ERK/MAPK通路会导致流感病毒的核糖核蛋白滞留在细胞核中,并影响病毒复制^[4],说明该通路具有抗病毒复制和组装的潜力。相较于新药开发的困难程度和高成本,药物重定位因其已知的安全度和药代动力学数据等潜在优势,大大降低代价和时间并增加药物批准率,已越来越多地应用于确定病毒感染的潜在治疗方法^[5]。维莫非尼(Vemurafenib, VEM)是一种已应用于临床的靶向Raf抑制剂,可选择性地抑制活化的Raf激酶,从而阻断下游Raf/MEK/ERK信号转导,减少癌细胞的异常增殖并促进其凋亡^[6]。然而,VEM是否可以通过调控Raf/MEK/ERK通路发挥抗EV-A71病毒作用尚未可知。故此,本研究以抗病毒药物瑞德西韦(Remdesivir, REM)为阳性对照,观察VEM在体外对EV-A71病毒的抑制作用和可能机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 EV-A71病毒分离株MY104-9-SAR-97(中国科学院武汉病毒学研究所国家病毒资源库),人横纹肌肉瘤细胞系CCL-136(中国典型培养物保藏中心)。

1.2 仪器与试剂 VEM和瑞德西韦REM(美国MedChemExpress公司);细胞技术试剂盒-8(cell

counting kit-8, CCK-8)检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);磷酸化(Phosphorylated, p)-MEK1/MEK2(Ser217、Ser221)单克隆抗体和p-ERK1/ERK2(Thr185、Tyr187)多克隆抗体CFX96荧光定量PCR仪(美国Invitrogen公司); γ -微管蛋白(γ -tubulin)抗体(美国Sigma公司);iMark680多功能酶标仪(美国Bio-Rad公司),Promega多功能读板仪(北京普洛麦格生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养:复苏CCL-136细胞后,接种于含10ml/dl胎牛血清和100U/ml链霉素/青霉素的Dulbecco改良Eagle(Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)细胞培养液中,置于37℃,5ml/dl CO₂细胞培养箱中培养。待细胞生长至对数生长期时进行后续实验。

1.3.2 CCK-8检测药物细胞毒性:将VEM和REM溶解于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中,制备100 μ mol/L原液。将对数生长期的CCL-136细胞(3×10^4 个细胞/孔)接种到96孔板中,待细胞融合度达80%~90%时,分别加入0、0.05、0.14、0.41、1.23、3.70、11.11、33.33和100 μ mol/L的VEM或REM,72h后加入CCK-8试剂(10 μ l/孔),37℃下孵育2h,利用酶标仪检测450nm波长处各孔吸光度(A)值,细胞存活率(%)= $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.3.3 致细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)抑制实验评估药物对EV-A71感染后CCL-136细胞的保护作用:参考文献[7]方法,将对数生长期的CCL-136细胞(3×10^4 个/孔)接种到96孔板中,加入浓度梯度稀释的VEM和REM(0、0.05、0.14、0.41、1.23、3.70、11.11、33.33和100 μ mol/L)后,再加入EV-A71病毒,病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)为0.01。37℃孵育48h后,每孔加入50 μ l Promega细胞滴度荧光试剂,混匀后显微镜下用Promega多功能读板仪检测化学发光信号。CPE形成抑制率(%)=(样品孔-病毒感染对照孔)/(空白对照孔-病毒感染对照孔) $\times 100\%$ 。

1.3.4 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测培养上清液中病毒载量和细胞中病毒基因组复制水平:以1.3.3方法用VEM和EV-A71处理CCL-136细胞后,收集培养上清液和细胞进行分析。根据制造商的说明,使用

RNeasy Mini Kit试剂盒提取病毒RNA,使用One Step TB Green®PrimeScript™ RT-PCR Kit II进行qRT-PCR分析,引物序列:EV-A71:F:5'-GCCCTGAATGCG-GCTAAT-3',R:5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3';GAPDH:F:5'-GCCTCTTGTCTCTTAGATTTG-GTC-3',R:5'-TAGCACTCACCATGTAGTTGAG-GT-3'。以GAPDH为参照,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析病毒载量相对水平, $\Delta Ct=Ct_{目的基因}-Ct_{内参}$ 。

1.3.5 药物作用时间过程分析实验分析VEM对EV-A71复制周期的影响:VEM添加时间测定按照先前文献描述方法进行^[8]。简单地说,在感染EV-A71前一天,将CCL-136细胞接种于24孔板(2×10^5 个/孔)中。接种后不同时间点(-1、0、2、4、6和8h)分别加入VEM(20 $\mu\text{mol/L}$)预孵育RD细胞1h,然后加入EV-A71病毒,感染复数为1。在10h时间点收获培养上清和细胞,并利用qRT-PCR测定病毒基因组表达量。

1.3.6 蛋白免疫印迹(Western blot)检测病毒组装水平和Raf/MEK/ERK通路相关蛋白表达:为了分析病毒组装水平,当T175烧瓶中CCL-136细胞的融合度为90%~100%时,感染EV-A71,MOI为0.01或1。吸附1h后,在培养液中加入VEM。当50%以上的细胞出现细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)时,收获培养液。低速离心($4\ 000 \times g$, 5min)清除细胞碎片后,将病毒通过20g/dl蔗糖缓冲液进行超离心($175\ 000 \times g$, 1.5h),在 $1 \times \text{TNE}$ 缓冲液[10mmol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris)、100mmol/L氯化钠(NaCl)和1mmol/L乙二胺四乙酸(EDTA),pH7.4]中重悬,然后进行Western blot

分析衣壳蛋白VP0、VP2和VP1表达。

为了分析Raf/MEK/ERK通路激活情况,在MOI为5的情况下,将未感染EV-A71或感染EV-A71的CCL-136细胞同时用VEM(20 $\mu\text{mol/L}$)或DMSO处理1h。然后用完全DMEM清洗细胞一次,并补充无血清DMEM。在感染后的不同时间点(0.25、0.5、1、2、4、6和8h)收集细胞,并在添加蛋白酶和磷酸酶抑制剂的放射免疫沉淀测定缓冲液中裂解。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离细胞裂解液中的蛋白,并将其转移到聚偏氟乙烯膜上。使用p-MEK1/MEK2(Ser217、Ser221)单克隆抗体和p-ERK1/ERK2(Thr185、Tyr187)多克隆抗体4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,与二抗孵育1h。通过增强型化学发光检测系统检测蛋白印迹。以 γ -tubulin用作内参并使用Image J软件分析目的蛋白条带灰度值。

1.4 统计学分析 采用SPSS 26.0统计学软件处理数据,所有计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 VEM、REM对CCL-136细胞存活率的影响 见表1。与0 $\mu\text{mol/L}$ VEM和REM相比,11.11~100 $\mu\text{mol/L}$ VEM和REM处理后CCL-136细胞存活率逐渐降低,差异具有统计学意义($t_{\text{VEM}}=4.314、15.973、20.030$; $t_{\text{REM}}=7.502、21.234、27.568$,均 $P < 0.001$);50%细胞毒性浓度(50% cytotoxic concentration, CC50)为 $27.71 \pm 2.38\mu\text{mol/L}$ 和 $22.51 \pm 1.92\mu\text{mol/L}$ 。

表1 VEM和REM对CCL-136细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, %, $n=3$)

药物	浓度($\mu\text{mol/L}$)									F值	P值
	0	0.05	0.14	0.41	1.23	3.70	11.11	33.33	100		
VEM	97.36 \pm 11.32	100.34 \pm 12.31	102.57 \pm 12.11	109.73 \pm 13.13	104.35 \pm 12.93	105.48 \pm 13.42	81.35 \pm 12.76	41.28 \pm 11.28	26.38 \pm 12.36	62.874	<0.001
REM	95.12 \pm 10.94	97.83 \pm 13.24	100.74 \pm 13.79	102.38 \pm 12.16	103.11 \pm 11.84	102.37 \pm 12.88	73.38 \pm 13.11	29.36 \pm 11.64	14.23 \pm 12.21	94.632	<0.001

2.2 VEM、REM对EV-A71感染CCL-136细胞后CPE形成能力的影响 见表2。与0 $\mu\text{mol/L}$ VEM和REM相比,0.05~100 $\mu\text{mol/L}$ VEM和REM处理后EV-A71诱导的CCL-136细胞CPE形成抑制率逐渐

升高,差异具有统计学意义(均 $P < 0.001$);半数最大有效浓度(half-maximal effective concentration, EC50)分别为 $0.34 \pm 0.01\mu\text{mol/L}$ 、 $0.55 \pm 0.39\mu\text{mol/L}$,选择性指数(selectivity index, SI)分别为52.1、35.3。

表2 VEM、REM对EV-A71感染CCL-136细胞后CPE形成抑制率的影响($\bar{x} \pm s$, %, $n=3$)

药物	浓度($\mu\text{mol/L}$)									F值	P值
	0	0.05	0.14	0.41	1.23	3.70	11.11	33.33	100		
VEM	1.35 \pm 0.32	8.24 \pm 1.21	13.27 \pm 2.33	21.39 \pm 2.78	32.37 \pm 8.29	63.38 \pm 8.23	82.37 \pm 9.46	87.38 \pm 3.21	98.37 \pm 4.57	372.374	<0.001
REM	1.17 \pm 0.27	8.16 \pm 1.05	12.67 \pm 1.53	14.23 \pm 2.46	16.33 \pm 2.31	41.38 \pm 3.49	72.36 \pm 8.13	86.29 \pm 3.48	97.27 \pm 4.39	362.937	<0.001

2.3 VEM对EV-A71感染CCL-136细胞后病毒载量的影响 与0 $\mu\text{mol/L}$ VEM相比,0.05~100 $\mu\text{mol/L}$ VEM

处理后EV-A71感染CCL-136细胞的病毒载量逐渐降低($4.35 \times 10^6 \pm 2.25 \times 10^3$ 、 $8.87 \times 10^5 \pm 1.46 \times 10^3$ 、 $6.73 \times 10^4 \pm 3.32 \times 10^2$ 、 $8.56 \times 10^4 \pm 1.33 \times 10^2$ 、 $1.13 \times 10^3 \pm 1.02 \times 10^2$ 、 $1.42 \times 10^3 \pm 1.04 \times 10^2$ 、 $5.43 \times 10^2 \pm 1.13 \times 10$ 、 $4.87 \times 10^3 \pm 0.76 \times 10$ vs $7.45 \times 10^6 \pm 1.46 \times 10^3$ copies/ml), 差异具有统计学意义($F=473.847, P<0.001$)。

2.4 VEM对EV-A71复制水平的影响 见表3。与EV71组相比, 病毒感染-1~4h时, EV71+VEM组

培养液上清液中病毒滴度降低, 差异具有统计学意义($t=4.698, 42.114, 22.198, 29.480$, 均 $P<0.01$)。在感染后6、8h, EV71+VEM组培养液上清液中病毒滴度与EV71组比较差异无统计学意义($t=2.247, 2.255$, 均 $P>0.05$)。与EV71组相比, 病毒感染-1~8h时, EV71+VEM组胞质中病毒mRNA水平降低, 差异具有统计学意义($t=69.180, 101.451, 50.356, 50.614, 91.169, 45.098$, 均 $P<0.001$)。

表3 VEM对培养液上清液和胞质中病毒 mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

类别	EV-A71 病毒感染时间 (h)	EV-A71 病毒感染时间 (h)						F	P
		-1	0	2	4	6	8		
上清液病毒滴度	EV71 组	$1.56 \times 10^7 \pm 5.54 \times 10^6$	$8.75 \times 10^6 \pm 3.25 \times 10^5$	$9.03 \times 10^6 \pm 3.11 \times 10^5$	$9.53 \times 10^6 \pm 2.53 \times 10^5$	$8.13 \times 10^6 \pm 2.23 \times 10^5$	$8.87 \times 10^6 \pm 1.95 \times 10^5$	68.364	< 0.001
	EV71+VEM 组	$5.74 \times 10^5 \pm 1.24 \times 10^4$	$8.21 \times 10^5 \pm 2.68 \times 10^4$	$4.53 \times 10^6 \pm 1.63 \times 10^5$	$4.48 \times 10^6 \pm 1.55 \times 10^5$	$8.53 \times 10^6 \pm 2.13 \times 10^5$	$8.52 \times 10^6 \pm 1.85 \times 10^5$	62.173	< 0.001
胞质病毒 mRNA	EV71 组	1 521.36 ± 35.76	1 873.64 ± 29.37	1 829.47 ± 57.48	2 341.45 ± 74.38	2 137.46 ± 36.67	1 945.39 ± 67.38	73.287	< 0.001
	EV71+VEM 组	53.46 ± 8.48	114.47 ± 6.28	143.28 ± 7.74	157.38 ± 7.34	169.52 ± 7.29	178.35 ± 8.11	67.878	< 0.001

2.5 VEM对EV-A71病毒组装的影响 分别用0.01和1 MOI的EV-A71病毒处理CCL-136细胞, 与EV71组相比, EV71+VEM组VP2/VP0比值明显降低(0.49 ± 0.13 vs 1.04 ± 0.05 、 0.17 ± 0.06 vs 1.03 ± 0.02), 差异具有统计学意义($t=6.839, 23.552$, 均 $P<0.01$)。

2.6 VEM对Raf-MEK-ERK通路相关蛋白表达的影响

见表4。各组干预2、4、6和8h后, 与EV71组相比, EV71+VEM组细胞中p-MEK、P-ERK水平升高, 差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。而在干预0.25、0.5和1h时, 两组间p-MEK、p-ERK水平比较, 差异无统计学意义(均 $P>0.05$)

表4 VEM对Raf-MEK-ERK通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

干预时间 (h)	p-MEK		t 值	P 值	p-ERK		t 值	P 值
	EV71 组	EV71+VEM 组			EV71 组	EV71+VEM 组		
0.25	3.14 ± 0.34	3.18 ± 0.29	0.155	0.884	0.95 ± 0.11	0.90 ± 0.12	0.532	0.623
0.5	2.86 ± 0.44	3.02 ± 0.37	0.482	0.655	0.92 ± 0.09	0.96 ± 0.13	0.438	0.684
1	2.54 ± 0.23	2.38 ± 0.27	0.781	0.478	1.21 ± 0.22	1.18 ± 0.24	0.160	0.881
2	0.87 ± 0.12	3.95 ± 0.45	11.455	<0.001	0.95 ± 0.08	1.46 ± 0.15	5.196	0.007
4	0.89 ± 0.09	4.23 ± 0.42	13.468	<0.001	1.07 ± 0.17	2.75 ± 0.24	9.894	0.001
6	0.76 ± 0.05	4.37 ± 0.32	19.305	<0.001	0.89 ± 0.14	2.44 ± 0.21	10.637	<0.001
8	0.79 ± 0.07	4.12 ± 0.35	16.159	<0.001	0.67 ± 0.05	3.42 ± 0.18	25.497	<0.001

3 讨论

EV-A71病毒是引起手足口病的主要病原体, 其嗜神经性可导致严重神经系统后遗症甚至死亡^[1]。然而, 肠道病毒感染抗病毒药物的缺乏和新抑制剂上市的困难促使研究人员寻找新的策略来对抗EV-A71病毒。VEM作为一种BRaf^{V600E}基因突变抑制剂, 于2011年被美国食品及药物管理局批准用于临床治疗转移性或不可切除的恶性黑色素瘤^[6]。有研究发现, 除了有效的抗肿瘤功能, VEM不仅能显著缓解

甲型流感病毒在A549和Calu-3细胞中的复制, 并能抑制人类埃可病毒在A549细胞中的感染病毒载量, 显示出潜在的抗病毒能力^[9-10]。但目前国内外尚无关于VEM对EV-A71病毒的作用研究。近期LAJALA等^[11]发现, VEM可通过影响细胞激酶磷脂酰肌醇-4-激酶IIIβ抑制急性和慢性肠道病毒感染。提示VEM对肠道病毒可能具有显著的抑制作用, 故此, 本研究将VEM重新定义为一种潜在的抗EV-A71药物。结果发现, VEM能在体外呈剂量依赖性地有效抑制

EV-A71活性和病毒载量, EC50在纳摩尔范围内, 其抗病毒活性与广谱病毒聚合酶抑制剂REM相似, 后者对EV-A71、严重急性呼吸综合征冠状病毒2型和其他RNA病毒具有抑制活性^[12-14]。重要的是, VEM的选择性指数(52.1)甚至高于REM(35.5), 这表明VEM有可能成为EV-A71感染的重新定位药物。

进入细胞对病毒而言是极为重要的一步, EV-A71属于miRNA病毒科肠道病毒属, 无包膜结构病毒, 其单股正链RNA基因组被由VP0~VP4组成的衣壳包围^[1]。EV-A71进入宿主细胞过程已被阐释的较为清晰, 研究发现, 病毒粒子通过内存作用进入宿主细胞后, 发生衣壳蛋白变形的脱包组装过程, 将病毒RNA基因组释放到细胞质中, 这是EV-A71侵入宿主机体的关键步骤^[2]。而基因组复制和转录发生在病毒诱导的膜复制胞质细胞器中, 合成一个可被用作病毒基因组扩增的模板全长RNA链, 复制出完整子代病毒负链基因组RNA^[15]。证据显示, 在EV-A71生命周期的后期, 病毒结构衣壳蛋白VP0、VP1和VP3组装成异三聚体原聚体, 然后转换为五聚体, 启动子代病毒粒子的组装^[16]。随后VP0裂解为VP2和VP4, 这是生成完全成熟病毒粒子的关键步骤^[16]。因此, 为了研究VEM是否会影响EV-A71的组装, 我们分析了在VEM浓度不完全抑制病毒复制的情况下感染时VP2相对于VP0的数量, 发现VEM治疗导致VP2产生减少, 这表明病毒组装存在缺陷。VP0的切割可能是通过病毒基因组RNA掺入衣壳介导的^[17]。因此, VEM引起的病毒基因组复制受损可能是VP0切割受到影响的原因。EV-A71的一个复制周期通常在6~8h内完成^[18], 药物时间添加试验也发现, 随着给药时间的推迟, VEM对EV-A71复制的抑制作用减小, 提示VEM在病毒进入宿主机体后复制的早期发挥作用。为了进一步验证VEM的抗病毒活性, 我们分析了细胞中的病毒RNA合成和蛋白质翻译。在较早的时间点, 细胞病毒载量也随着药物的添加而下降。即使在6h或8h时添加VEM, 抑制作用也很明显, 并且注意到类似的抗病毒活性逐渐下降的模式。这些结果表明VEM不具有进入抑制剂或靶向病毒功能蛋白(如蛋白酶或聚合酶)的功能。相反, 它可能会诱导宿主细胞发生变化, 损害病毒基因组的复制和转录, 导致病毒蛋白翻译减少。

由于病毒的基因组大小和编码能力有效, 它们依赖于无数的细胞因子或机制来确保协调复制。MAPK通路是控制大量主要细胞生物学过程的中枢信号网络, Raf/MEK/ERK信号转导通路作为MAPK级联之一, 由三种连续的激酶组成: Raf、MEK1/2及细胞外信号调节激酶1和2(ERK1/2)^[3]。在各种细胞外刺激下, 这种调节级联事件导致ERK1/2激活, 其

磷酸化许多下游底物, 导致多种细胞功能(如细胞增殖、分化、存活或凋亡)所必需的多个基因的转录^[3]。因此, 病毒劫持细胞信号级联并不奇怪, 这反过来又调节和促进了病毒的生存。事实上, 包括EV-A71等多种病毒已被证明继承宿主细胞Raf/MEK/ERK通路以完成其复制周期^[4,7,19-20]。近期有研究发现, Raf抑制剂PLX8394可通过阻断Raf/MEK/ERK通路抑制EV-A71病毒复制^[7], 但该化合物距离转化临床尚需时日。研究发现, BRaf是Raf家族的一种丝氨酸-苏氨酸激酶, 参与Raf/MEK/ERK信号通路, 通常调节细胞生长、存活和分化^[21]。而该激酶突变导致下游信号过度活跃, 从而诱导癌细胞过度增殖和存活。药理学研究发现, VEM可高度选择性地直接结合BRaf激酶并阻断下游Raf/MEK/ERK信号传导激活, 抑制细胞增殖并促进BRaf^{V600E}突变细胞凋亡^[6]。因此, 本研究探索了Raf/MEK/ERK在单独或与EV-A71感染的RD细胞中对VEM的反应。结果发现, VEM诱导了Raf/MEK/ERK激酶级联的快速激活, 并且随着治疗时间的延长, 效果更加突出。总之, VEM激活Raf/MEK/ERK激酶级联的内在特性可能潜在地干扰EV-A71复制的后期阶段。

然而, VP0切割的确切机制仍然知之甚少。其他宿主因子如无菌 α 基序和含组氨酸-天冬氨酸结构域蛋白1(SAMHD1)等也参与了这一过程^[18]。MAPK信号与SAMHD1之间的联系需要进一步探索。

综上所述, VEM对EV-A71感染具有抗病毒活性, 其机制可能与激活Raf/MEK/ERK通路进而抑制病毒基因组复制和组装有关。本研究为开发靶向Raf/MEK/ERK信号通路的抗病毒抑制剂作为潜在的广谱抗病毒策略提供了新的见解。

参考文献:

- [1] 何艳, 许红梅. 肠道病毒A组71型手足口病的流行病学研究进展[J]. 儿科药学杂志, 2024,30(2):50-55.
HE Y, XU H M. Progress in epidemiologic study of Enterovirus group A 71 hand-foot-mouth disease[J]. Journal of Pediatric Pharmacy, 2024, 30(2): 50-55.
- [2] WANG S Q, PANG Z H, FAN H H, et al. Advances in anti-EV-A71 drug development research [J]. Journal of Advanced Research, 2024, 56: 137-156.
- [3] 李阳, 包刚. LncRNA UCA1介导Raf/MEK/ERK信号通路调控乳腺癌细胞生物学作用的机制研究[J]. 现代检验医学杂志, 2022,37(6):40-45.
LI Y, BAO G. Mechanism of lncRNA UCA1 mediating Raf/MEK/ERK signaling pathway to regulate the biological effects of breast cancer cells[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(6): 40-45.
- [4] HOFFMANN H, EBENSPERGER M, SCHÖNSIEGEL A, et al. Influenza A virus replication has a strong dependency on Raf/MEK/ERK signaling pathway

(下转第153页)

- flammation-related core genes and modules in cerebral ischemia[J]. *Molecular Neurobiology*, 2023, 60(6): 3439-3451.
- [21] PAN J Z, WANG Z Q, SUN W, et al. ATF3 is a neuron-specific biomarker for spinal cord injury and ischemic stroke[J]. *Clinical and Translational Medicine*, 2024, 14(4): e1650.
- [22] 陈峰林, 石晓花, 王姣琦, 等. 线粒体生物发生与缺血性脑卒中研究进展[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2024, 41(10): 950-955.
CHEN F L, SHI X H, WANG J Q, et al. Research advances in mitochondrial biogenesis and ischemic stroke[J]. *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*, 2024, 41(10): 950-955.
- [23] WANG W K, HUANG X L, ZHANG Y, et al. Transient compression injury triggers neuroinflammation in a new rat model of acute peripheral neuropathic pain[J]. *Pain Physician*, 2024, 27(1): E131-E145.
- [24] ZHANG H, WU Z S, LIU J Q, et al. Serum calcium channel subunit $\alpha 2 \delta -1$ concentrations and outcomes in patients with acute spontaneous intracerebral hemorrhage [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2022, 527: 17-22.
- [25] RAHI V, KAUNDAL R K. Exploring the intricacies of calcium dysregulation in ischemic stroke: insights into neuronal cell death and therapeutic strategies [J]. *Life Sciences*, 2024, 347: 122651.
- [26] WU T, CHEN S R, PAN H L, et al. The $\alpha 2 \delta -1$ -NMDA receptor complex and its potential as a therapeutic target for ischemic stroke [J]. *Frontiers in Neurology*, 2023, 14: 1148697.
- 收稿日期: 2025-01-24
修回日期: 2025-04-12
- (上接第104页)
- activity than SARS-CoV-2 [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 13: 1264983.
- [5] 张微, 谷峰, 付义凯, 等. 药物重定位在新药研发中的研究进展 [J]. *畜牧与兽医*, 2021, 53(12): 123-127.
ZHANG W, GU F, FU Y K, et al. Progress in research on drug repositioning in new drug research and development[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 53(12): 123-127.
- [6] SCHMITT A M, DUMAS L, LARKIN J. Atezolizumab, cobimetinib, and vemurafenib as first-line treatment for unresectable metastatic BRAF V600 mutated melanoma[J]. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2022, 22(1): 17-25.
- [7] WU C Y, ZHU G Y, QIU F, et al. PLX8394, a RAF inhibitor, inhibits *Enterovirus 71* replication by blocking RAF/MEK/ERK signaling[J]. *Virologics Sinica*, 2023, 38(2): 276-284.
- [8] 张梦云, 丁晓娟, 肖静静, 等. 穿心莲内酯对新型冠状病毒奥密克戎毒株的体外抑制作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2023, 39(12): 58-63.
ZHANG M Y, DING X J, XIAO J J, et al. Study on inhibitory effect of andrographolide on sars-cov-2 omicron variant in vitro[J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2023, 39(12): 58-63.
- [9] HOLZBERG M, BOERGELING Y, SCHRÄDER T, et al. Vemurafenib limits influenza A virus propagation by targeting multiple signaling pathways [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2426.
- [10] IANEVSKI A, YAO R A, BIZA S, et al. Identification and tracking of antiviral drug combinations[J]. *Viruses*, 2020, 12(10): 1178.
- [11] LAAJALA M, ZWAAGSTRA M, MARTIKAINEN M, et al. Vemurafenib inhibits acute and chronic *Enterovirus* infection by affecting cellular kinase phosphatidylinositol 4-kinase type III β [J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(4): e0055223.
- [12] YE W, YAO M, DONG Y C, et al. Remdesivir (GS-5734) impedes enterovirus replication through viral RNA synthesis inhibition [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1105.
- [13] GORDON C J, TCHESNOKOV E P, WOOLNER E, et al. Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(20): 6785-6797.
- [14] AGOSTINI M L, ANDRES E L, SIMS A C, et al. Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exoribonuclease[J]. *mBio*, 2018, 9(2): e00221-18.
- [15] LI X H, WANG M S, CHENG A C, et al. *Enterovirus* replication organelles and inhibitors of their formation [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1817.
- [16] CAO J M, LIU H T, QU M, et al. Determination of the cleavage site of *Enterovirus 71* VP0 and the effect of this cleavage on viral infectivity and assembly [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 134: 103568.
- [17] CHANDLER-BOSTOCK R, MATA C P, BINGHAM R J, et al. Assembly of infectious *Enteroviruses* depends on multiple, conserved genomic RNA-coat protein contacts[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(12): e1009146.
- [18] ZHAO Z L, LI Z L, HUAN C, et al. SAMHD1 inhibits multiple *Enteroviruses* by interfering with the interaction between VP1 and VP2 proteins[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(13): e0062021.
- [19] LI M X, ZHANG L P, ZHOU P, et al. Porcine deltacoronavirus nucleocapsid protein interacts with the Grb2 through its proline-rich motifs to induce activation of the Raf-MEK-ERK signal pathway and promote virus replication[J]. *Journal of General Virology*, 2024, 105(8): 1-16.
- [20] JEON J H, LEE Y J, LEE C. Porcine deltacoronavirus activates the Raf/MEK/ERK pathway to promote its replication [J]. *Virus Research*, 2020, 283: 197961.
- [21] CASTELLANI G, BUCCARELLI M, ARASI M B, et al. BRAF mutations in melanoma: biological aspects, therapeutic implications, and circulating biomarkers[J]. *Cancers*, 2023, 15(16): 4026.
- 收稿日期: 2024-11-30
修回日期: 2025-03-31