

# 肠道病毒 71 型 VP1 蛋白研究进展

张志勤,项国仕(综述),黄孝天(审校)

**摘要:** 肠道病毒 71 型(Enterovirus71, EV71)为手足口病的主要病原体。目前,手足口病的发病机制并不完全清楚,临  
床上缺乏有效的疫苗及特异性治疗药物。作为 EV71 主要衣壳蛋白,VP1 在 EV71 的吸附和穿入过程中起着重要作用。另  
一方面,VP1 上存在特异性中和性抗原表位,在 EV71 疫苗研究中占有重要地位。本文主要概括 EV71 VP1 结构、功能及与之相  
关疫苗的研究进展。

**关键词:** 手足口病; 肠道病毒 71 型; 衣壳蛋白

中图分类号:R373.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2015)04-0377-03

## Research progress of enterovirus 71 VP1

ZHANG Zhi-qin, XIANG Guo-shi, HUANG Xiao-tian

(Department of Medical Microbiology, Medical School of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

**Abstract:** Enterovirus 71 (EV71) is a major causative factor of hand, foot and mouth disease (HFMD). Currently, the mechanism of HFMD is not clearly understood, and neither vaccine nor antiviral therapy is available. As a capsid protein of EV71, VP1 plays an important role during the adsorption and penetration of EV71. The presence of the VP1-specific neutralizing epitopes makes it an important position in the EV71 vaccine research. This review article provides a summary of the structure, function and associated vaccine of EV71 VP1.

**Keywords:** hand-foot-mouth disease; enterovirus 71; capsid protein

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81160196) and the Young Scientists Training Program of Jiangxi Province (No. 20133BCB23005)

Corresponding author: Huang Xiao-tian, Email: xthuang@ncu.edu.cn

据 2013 年国际病毒分类委员会最新分类, EV71 属于小 RNA 病毒科肠道病毒属 A 种肠道病毒。病毒颗粒呈球形, 无包膜, 衣壳为二十面立体对称, 由 60 个相同的亚单位构成, 每个亚单位均包含 VP1、VP2、VP3、VP4 四种结构蛋白。EV71 为手足口病的主要病原体之一, 由 EV71 引起的手足口病大部分是轻微及自限性的, 但仍有部分患者的病情进展为重症神经系统疾病及致命性脑炎。Yu<sup>[1]</sup> 等通过 2008-2012 年中国手足口病流行病学调查显示, 80% 以上的重症病例以及 90% 以上的死亡病例由 EV71 感染所致。VP1 作为 EV71 的结构蛋白, 且 EV71 主要的中和抗原决定簇集中于 VP1 上, 因此具有重要的研究意义。

国家自然科学基金(No. 81160196), 江西省青年科学家培养项目(No. 20133BCB23005)

通讯作者: 黄孝天, Email: xthuang@ncu.edu.cn

作者单位: 南昌大学医学院微生物学教研室, 南昌 330006

### 1 EV71 VP1 结构

EV71 VP1 蛋白包含 297 个氨基酸 (amino acid, aa), 大小为 32 kD。晶体结构显示, VP1 具有“果冻卷”型的  $\beta$ -桶状结构, 这种桶状结构包括 8 个  $\beta$ -折叠, 分别排列于 2 个  $\beta$ -片层中, 每个片层包含 4 个  $\beta$  折叠, 其中 1、8、3、6  $\beta$ -折叠形成一个  $\beta$  片层, 而 2、7、4、5  $\beta$ -折叠形成另外一个  $\beta$  片层。VP1 中还包括另一个重要的结构: 疏水性口袋因子。此结构在 EV71 和其他肠道病毒中存在不同, 在 EV71 中, 口袋因子有约  $40 \text{ \AA}^2$  的表面积, 主要暴露在 VP1 五聚体周围的峡谷区的表面, 并经 VP1  $\beta$  桶状结构直达深处, 其中包含天然脂质成分<sup>[2-3]</sup>, 而在其他肠道病毒中, 口袋因子是被完全包埋的。病毒表面, VP1  $\beta$  桶状结构区存在一个深凹, 此凹陷被认为是 EV71 病毒的粘附位点, 也被称为峡谷样结构(canyon)<sup>[4]</sup>。EV71 衣壳内表面结构与其他肠道病毒也存在差异, 这种差异通常表现在 VP1 上, 肠道病毒中 VP1

第 1-28 aa 通常朝向五重旋转对称轴,而在 EV71 中转向了另一侧。

小 RNA 病毒中可变性最强的结构为暴露于病毒表面的茎环结构(loop),EV71 病毒中 VP1 上存在 BC、DE、 $\beta$ E/ $\alpha$ B、GF、GH、HI 等 6 个茎环结构,其中 BC、DE 及 HI 茎环结构为扁平并远离二十面体的五重旋转对称轴,BC(96-102 aa)及 GH 茎环结构(208-222 aa)是暴露于最外围的<sup>[3]</sup>,此外 DE 茎环结构和 EF 茎环结构定位于峡谷样结构表面,由于 EV71 VP1 的茎环结构比其他肠道病毒的更小,导致了 EV71 的峡谷样结构比其他的肠道病毒更深<sup>[5]</sup>。Chen 等报道 EV71 安徽阜阳株与 EV71-1095 株 VP1 的 GH 环状结构存在不同,而 SCARB2 的结合域 VP1 第 172 位 aa(位于峡谷样结构区)却没有观察到不同<sup>[6]</sup>,这表明在不同的 EV71 病毒株间峡谷样区域可能保守。

## 2 EV71 VP1 功能

EV71 VP1 与其他肠道病毒及其他小 RNA 病毒结构上的差异均可能导致其功能独具特性。EV71 VP1 作为病毒结构蛋白,其主要功能为协助病毒感染,结合细胞受体。目前,包括多个与 EV71 相互作用的细胞受体被鉴定<sup>[7-12]</sup>,其中与 VP1 相关的包括清道夫受体 B2(Scavenger receptor class B, member 2, SCARB2)、选择素 P 糖蛋白配体 1(P-selectin Glycoprotein Ligand, PSGL-1)、人膜联蛋白 II(human annexin II, Anx2)以及硫酸乙酰肝素类糖胺聚糖(Heparan Sulfate Glycosaminoglycan)。SCARB2 是主要表达于核内体及溶酶体膜的 III 型糖蛋白,EV71 与 SCARB2 的作用是通过结合到 VP1 的 Gln-172 周围的 canyon 结构来达到病毒感染的目的,SCARB2 的第 4 个外显子与这种相互作用有关,尤其在酸性条件下,这种作用使完整的病毒体(160S)变成 135S 的 A 颗粒,A 颗粒被认为是完整病毒体与脱壳后病毒的中间物<sup>[7]</sup>。PSGL-1 表达于骨髓细胞及受激后的 T 淋巴细胞,作为细胞粘附因子 P、E、L 高亲和性配体,EV71 VP1 与白细胞 PSGL-1 的相互作用由 VP1-145 的分子开关控制,病毒表面赖氨酸与硫酸化 PSGL-1 的 N-末端酪氨酸相互作用,而 VP1-145 作为一个开关,通过调节 VP1-244K 的转向来调控 VP1 与 PSGL-1 的结合,这种作用使 EV71 更倾向与表达 PSGL-1 的白细胞结合。同时 PSGL-1 与白细胞迁移,细胞因子产生及免疫反应的调控有关<sup>[8,11]</sup>,这可能介导病毒在体内的播散,此外过度炎症因子的产生,将导致严重疾

病的发生。Anx2 是膜联蛋白家族的一员。其除通过钙离子结合区域( $\alpha$ 螺旋核心区域)与磷脂膜的相互作用外,还与多种细胞因子作用参与调节细胞功能,如内吞及胞吐等过程。在 EV71 感染过程中,Anx2 则是通过与 EV71 VP1 上第 40-100 位 aa 相互作用来增加病毒感染能力的,这种相互作用在低感染剂量时尤为明显<sup>[10]</sup>。Tan<sup>[12]</sup> 等研究表明表达于细胞表面的糖胺聚糖中的硫酸乙酰肝素也能作为 EV71 受体,使用多聚赖氨酸中和细胞表面阴离子及通过抗硫酸乙酰肝素多肽封闭细胞表面硫酸乙酰肝素均能抑制 EV71 的感染,同时他们还使用三维建模来了解 EV71 上硫酸乙酰肝素可能的结合位点。总之,EV71 通过不同的受体感染不同细胞。

除结合宿主受体外,EV71 VP1 还能自身结合形成二聚体,形成这种二聚体的主要活性区域位于第 66-132 位 aa。VP1 二聚体的形成导致其三级结构更加稳定,同时使病毒衣壳蛋白的结构更加简洁紧凑,这有助于病毒的穿入及释放<sup>[13]</sup>。

另外,有研究表明<sup>[14]</sup>,VP1 能激活钙调素依赖性蛋白激酶 II(calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK-II)。CaMK-II 存在于许多动物细胞内,尤其在神经组织中含量丰富。正常生理状态下,CaMK-II 在转录调节、骨架蛋白的磷酸化以及学习记忆等过程起重要作用。EV71 感染后,CaMK-II 磷酸化波形蛋白(Vimentin)N 端第 82 位丝氨酸,而波形蛋白的磷酸化及 aggresomes 的形成是病毒复制所需要的。具体的作用模式为:被 EV71 感染的细胞内合成的 VP1 蛋白介导了 CaMK-II Thr286 的磷酸化激活 CaMK-II,激活的 CaMK-II 再磷酸化波形蛋白细丝(filament)Ser82,引起波形蛋白细丝的分解,VP1 结合被分解的波形蛋白并被转运至核周开始形成病毒复制中心。复制中心的形成成为病毒基因组的合成提供平台,这表明 VP1 在病毒复制过程中扮演着重要的角色。

此外,VP1 还能与乳铁蛋白(Lactoferrin, LF)相互作用<sup>[15]</sup>,研究发现 LF 能抑制 EV71 感染,具体作用机制可能为 LF 封闭细胞受体或者直接与病毒颗粒结合,从而防止病毒结合受体进入细胞引起感染。尽管 LF 未被批准作为治疗 EV71 的药物,但仍可将其考虑为抑制病毒进入细胞的一种药物,辅助治疗 EV71 感染。

EV71 VP1 晶体结构及其在基因型间的差异<sup>[2-3, 16]</sup>均有报道,而一些有关 VP1 在 EV71 病毒生物学行为中的作用也提出相应的模式,如作为 RNA 释放的传感器<sup>[3]</sup>等,而这些模式的确证都需要

我们通过更多的实验来证实。

### 3 EV71 VP1 相关疫苗研究

EV71 疫苗研究涉及灭活疫苗、减毒活疫苗、DNA 疫苗、重组疫苗、多肽疫苗等。而 VP1 作为主要抗原蛋白则多应用于抗原表位疫苗、重组疫苗研究, 目前已经有许多研究<sup>[17-23]</sup>在动物水平证实了 VP1 蛋白及其多肽能有效的预防 EV71 感染。

抗原表位疫苗方面,Guang 等<sup>[22]</sup>应用覆盖 VP1 全长的 95 条合成多肽免疫小鼠, 获得 2 个保守的线性化的中和抗原表位 SP55 (163~177 aa) 和 SP70 (208~222 aa), 这两个表位在不同的 EV71 基因亚型间高度保守, 尤其是 SP70, 几乎在所有 EV71 基因亚型间均相同, 表明其可作为开发 EV71 疫苗的抗原表位。此外, Lim 等<sup>[23-24]</sup>发现 VP1 最小抗原决定簇位于 215~219 aa 及 N 端 12~19 aa。重组疫苗方面, Chen 等<sup>[18]</sup>用转基因鼠(VP1+/+)产的包含 VP1 蛋白的奶, 喂养腹腔注射 EV71 的幼鼠, 发现外源 VP1 蛋白能起到保护幼鼠作用, 表明 VP1 口服疫苗在理论上是有效和可行的。在重组 VP1 蛋白疫苗研究方面, Cao<sup>[17]</sup>等用枯草杆菌作为载体将 VP1 融合其衣壳蛋白 COTB 蛋白生产表达 VP1 蛋白的疫苗, 结果表明重组的疫苗能引起细胞及体液免疫, 这为低成本的疫苗制备提供了线索, 同时 Chen<sup>[25]</sup>等利用转基因西红柿表达 EV71 VP1 蛋白作为口服疫苗, 实验证实, 在 BALB/C 小鼠粪便中能检测到 VP1 特异性 IgA 同时血液中也能检测到 VP1 特异性 IgG, 且服用此口服疫苗的小鼠的血清能抑制 EV71 对横纹肌肉瘤细胞(RD cells)的感染, 这为转基因西红柿作为口服疫苗来预防 EV71 的可行性提供了实验及理论基础。

### 4 展望

在 EV71 感染过程中, VP1 蛋白承担着重要的角色, 参与吸附、穿入、脱壳等过程, 实验研究表明针对 VP1 设计的疫苗能保护实验动物, 能抑制 EV71 感染或减轻感染后症状, 这为 EV71 疫苗开发提供了实验及理论基础。

至今仍未有 EV71 特效药及有效的疫苗应用于临床, 加速 EV71 致病机制的研究及有效疫苗的开发将成为 EV71 研究的一项重要内容。欣慰的是, 中国已研制出的灭活疫苗并对疫苗 III 期临床试验阶段的疗效、安全性及免疫原性做了详细的评估<sup>[26-27]</sup>, 这将为我们抵御这种传染病提供有力的武器。

### 参考文献:

- [1] Xing W, Liao Q, Viboud C, et al. Hand, foot, and mouth disease in China, 2008-12: an epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(4): 308-318. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70342-6
- [2] Plevka P, Perera R, Cardosa J, et al. Crystal structure of human enterovirus 71[J]. Science, 2012, 336(6086): 1274-1274. DOI: 10.1126/science.1218713
- [3] Wang X, Peng W, Ren J, et al. A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71[J]. Nat Struct Mol Biol, 2012, 19(4): 424-429. DOI: 10.1038/nsmb.2255
- [4] Ke YY, Chen YC, Lin TH. Structure of the virus capsid protein VP1 of enterovirus 71 predicted by some homology modeling and molecular docking studies[J]. J Computat Chem, 2006, 27(13): 1556-1570. DOI: 10.1002/jcc.20460
- [5] Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, et al. Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1 [J]. J General Virol, 2011, 92(2): 287-291.
- [6] Chen P, Song ZL, Qi YH, et al. Molecular determinants of enterovirus 71 viral entry cleft around gln-172 on vp1 protein interacts with variable region on scavenger receptor b 2[J]. J Biologic Chem, 2012, 287(9): 6406-6420. DOI: 10.1074/jbc.M111.301622
- [7] Yamayoshi S, Yamashita Y, Li JF, et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71[J]. Nat Med, 2009, 15(7): 798-801. DOI: 10.1038/nm.1992. Epub 2009 Jun 21.
- [8] 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. DOI: 10.1038/nm.1961. Epub 2009 Jun 21.
- [9] Yang B, Chuang H, Yang KD. Sialylated glycans as receptor and inhibitor of enterovirus 71 infection to DLD-1 intestinal cells[J]. Virol J, 2009, 6(141): 1-6. DOI: 10.1186/1743-422X-6-141
- [10] Yang SL, Chou YT, Wu CN, et al. Annexin II binds to capsid protein VP1 of enterovirus 71 and enhances viral infectivity[J]. J Virol, 2011, 85(22): 11809-11820. DOI: 10.1128/JVI.00297-11
- [11] Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, et al. Enterovirus 71 binding to PSGL-1 on leukocytes: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(7): e1003511-e1003511. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003511
- [12] Tan CW, Poh CL, Sam IC, et al. Enterovirus 71 uses cell surface heparan sulfate glycosaminoglycan as an attachment receptor[J]. J Virol, 2013, 87(1): 611-620. DOI: 10.1128/JVI.02226-12
- [13] Lal SK, Kumar P, Yeo WM, et al. The VP1 protein of human enterovirus 71 self-associates via an interaction domain spanning amino acids 66-297[J]. J Med Virol, 2006, 78(5): 582-590. DOI: 10.1002/jmv.20579
- [14] Haolong C, Du N, Hongchao T, et al. Enterovirus 71 VP1 activates calmodulin-dependent protein kinase II and results in the rearrangement of vimentin in human astrocyte cells[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73900-e73900. DOI: 10.1371/journal.pone.0073900
- [15] 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. DOI: 10.1016/j.antiviral.2005.03.005

(下转第 390 页)

结果显示,虫卵保存于4℃下10d、20d和3个月,均能正常孵化出毛蚴;不管含虫卵的粪便是新鲜,还是保存于4℃下,或是室温下,均不影响其孵化。文献报道<sup>[1,3]</sup>,牛源大片形吸虫虫卵在25~28℃需15~17d孵化出毛蚴,在25~35℃需10~14d。本实验只做了在恒温28℃下人体大片形吸虫虫卵的发育情况观察,即恒温28℃下,孵出毛蚴的时间为11~16d,而相对集中则是第12d和第13d。表明人体和牛体大片形吸虫虫卵孵化所需的温度和时间条件是相似的。

大片形吸虫虫卵在28℃恒温水浴箱中孵化,当卵内毛蚴发育成熟,从水浴箱中取出见光0~6min,即有毛蚴孵出,因此,我们认为大片形吸虫毛蚴有较强的趋光性。另外,毛蚴成熟后,如果不将孵化瓶从水浴箱中取出见光,即毛蚴成熟后仍放在水浴箱中避光,则毛蚴不会孵化而出。这两点均与王冬英<sup>[2]</sup>观察的结果有异。

本实验结果表明,虫卵在低温下可长时间保存而不失活性;虫卵在粪便中无论以何种方式保存都不能发育,虫卵必须在有水的环境及适宜的温度下才能顺利发育并最终孵化出毛蚴。

## 参考文献:

- [1] Lin YG, Sun YL, Chen CR, et al. Studies on the development of *Fasciola Gigantica* cobbolt in its snail host and the epidemiology

of Fascioliasis of cattle in Tsinchiang region, Fukien[J]. Acta Zoologica Sinica, 1974, 20(4): 378-390. (in Chinese)

林宇光,孙毓兰,陈存瑞,等.大片形吸虫的发育史和二种片形吸虫的流行学研究[J].动物学报,1974,20(4):378-390.

- [2] Wan DY. The epidemiology of Guangxi, life cycle in intermediate host and taxonomy of *Fasciola* spp[D]. Nanning: Guangxi University, 2006. (in Chinese)

王冬英.广西片形吸虫流行情况,在中间宿主体内的发育与分类学的初步研究[D].广西大学,2006.

- [3] Ma L. Research on the cultivation of *Fasciola* metacercariae and kinetics of specific antibodies in rabbits experimentally infected with *Fasciola*[D]. Nanning: Guangxi University, 2002. (in Chinese)

马丽.片形吸虫囊蚴培养及感染家兔后特异性抗体的动力学研究[D].广西大学,2002.

- [4] Chen MX, Ai L, Xu XN, et al. Twenty six cases of human *Fasciola giganaca* infection in Dali, Yunnan province[J]. Chin J Endemol, 2012, 31(6): 595-598. (in Chinese)

陈木新,艾琳,许学年,等.云南省大理州大片形吸虫群体感染26例分析[J].中国地方病学杂志,2012,31(6):595-598.

- [5] Chen PH, Kong DF, Li HZ, et al. Experimental technology of human parasitology[M]. Beijing: Science Press, 1988: 119-120. (in Chinese)

陈佩惠,孔德芳,李慧珠,等.人体寄生虫学实验技术[M].北京:科学出版社,1988, 119-120.

收稿日期:2014-07-30;修回日期:2014-11-03

(上接第379页)

- [16] Cifuentes JO, Lee H, Yoder JD, et al. Structures of the procapsid and mature virion of Enterovirus 71 strain 1095[J]. J Virol, 2013, 87(13): 7637-7645. DOI: 10.1128/Jvi.03519-12

- [17] Cao YG, Li ZH, Yue YY, et al. Construction and evaluation of a novel *Bacillus subtilis* spores-based enterovirus 71 vaccine[J]. J Appl Biomed, 2013, 11(2): 105-113. DOI: 10.2478/v10136-012-0032-9

- [18] 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. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.03.041

- [19] Kiener TK, Premanand B, Kwang J. Immune responses to baculovirus-displayed enterovirus 71 VP1 antigen[J]. Expert Rev Vaccines, 2013, 12(4): 357-364. DOI: 10.1586/Erv.13.18

- [20] Meng T, Kolpe AB, Kiener TK, et al. Display of VP1 on the surface of baculovirus and its immunogenicity against heterologous human Enterovirus 71 strains in mice[J]. PLoS One, 2011, 6 (7): e21757-e21757. DOI: 10.1371/journal.pone.0021757

- [21] Sivasamugham LA, Cardosa MJ, Tan WS, et al. Recombinant Newcastle disease virus capsids displaying enterovirus 71 VP1 fragment induce a strong immune response in rabbits[J]. J Med Virol, 2006, 78(8): 1096-1104. DOI: 10.1002/Jmv.20668

- [22] Guang D, Foo W, Alonso S, et al. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides[J]. Virus Res, 2007, 125(1): 61-68. DOI: 10.1016/j.virusres.2006.12.005

- [23] Lim XF, Jia Q, Chow VTK, et al. Characterization of a novel monoclonal antibody reactive against the N-terminal region of Enterovirus 71 VP1 capsid protein[J]. J Virologic Methods, 2013, 188(1-2): 76-82. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.11.038

- [24] Lim XF, Jia Q, Khong WX, et al. Characterization of an isotype-dependent monoclonal antibody against linear neutralizing epitope effective for prophylaxis of enterovirus 71 infection[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e29751.

- [25] 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. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.12.047

- [26] Zhu F, Xu W, Xia J, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China[J]. N Engl J Med, 2014, 370(9): 818-828.

- [27] Li R, Liu L, Mo Z, et al. An inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy children[J]. N Engl J Med, 2014, 370(9): 829-837. DOI: 10.1056/NEJMoa1303224

收稿日期:2014-08-31;修回日期:2015-01-30