

蛋白酶体抑制剂 PS-341 抑制人肠道病毒 D68 复制研究

张可可¹ 夏冬² 刘思华¹ 周振威¹ 韩俊² 王涛¹

¹天津大学生命科学学院 300110; ²中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 传染病诊断和治疗协同创新中心,北京 1002206

张可可和夏冬对本文有同等贡献

通信作者:王涛,Email: wangtaobio@tju.edu.cn; 电话:022-27403906, 韩俊,Email: hanjun_sci@163.com, 电话:010-58900680

【摘要】 目的 探究蛋白酶体抑制剂 PS-341 对肠道病毒属病毒复制的抑制作用。方法 利用 MTT 实验分析药物毒性。利用实时荧光定量 PCR 技术,从核酸水平检测 PS-341 处理对宿主细胞内肠道病毒 D68 型(enterovirus D68, EV-D68)、柯萨奇 B3 型(coxsackievirus B3, CV-B3)复制的影响。通过 Western blot 检测细胞内病毒蛋白表达水平。结果 PS-341 处理 EV-D68 或 CV-B3 感染后的细胞,细胞内病毒 RNA 含量分别被抑制 50%~70% 和 60%~90%。EV-D68 感染细胞后,加入 PS-341, RD 细胞内病毒滴度下调 90.23%, 上清中病毒滴度下调 83.4%, HeLa 细胞内病毒滴度下调 93.08%, 上清中病毒滴度下调 90%。但 PS-341 对病毒吸附、进入及释放无影响。当 PS-341 与凋亡抑制剂 Ac-YVAD-CHO 共处理 EV-D68 感染的细胞,与 PS-341 处理组相比,PS-341 对病毒 RNA 复制抑制率为 10%~30%,同时病毒蛋白表达水平提高,PS-341 对病毒复制抑制作用减弱。结论 PS-341 能够抑制肠道病毒属病毒在细胞内复制及组装,但对病毒吸附、进入及释放无影响。PS-341 可能通过调节蛋白酶体通路,诱导细胞凋亡,抑制 EV-D68 在宿主体内的基因复制抑制病毒增殖。此外,PS-341 对小 RNA 病毒科肠道病毒属病毒可能具有广谱抗病毒作用。

【关键词】 肠道病毒 D68; 柯萨奇病毒 B3; PS-341; 细胞凋亡

基金项目: 国家重点研发项目(2017YFA0205102)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.03.003

Proteasome inhibitor bortezomib inhibits replication of Enterovirus D68

Zhang Keke¹, Xia Dong², Liu Sihua¹, Zhou Zhenwei¹, Han Jun², Wang Tao¹

¹School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300110, China; ²National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Disease, Beijing 102206, China

Corresponding author: Wang Tao, Email: wangtaobio@tju.edu.cn; Tel: 0086-22-27403906, Han Jun, Email: hanjun_sci@163.com, Tel: 0086-10-58900680

【Abstract】 **Objective** To investigate the inhibitory effect of bortezomib (PS-341) on enterovirus replication. **Methods** The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to value cell viability in response to PS-341 treatment. The protein and viral gene mRNAs were measured by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). **Results** Our result show that after enterovirus (EV)-D68 or coxsackievirus B3 (CV-B3) infected cells were treated with PS-341, compared with the control group, the inhibition rate of the intracellular viral RNA reached 50%~70% or 60%~90%. PS-341 was added after RD cells were infected with EV-D68, the intracellular virus titer was down-regulated by 90.23% and 83.40% in the supernatant, the intracellular virus titer was down-regulated by 93% and 90% in the supernatant and in RD cells. PS-341 had no effect on virus adsorption and importing. The cells were treated with PS-341 and apoptosis-inhibiting agent Ac-YVAD-CHO, the viral RNA replication inhibition rate reached 10%-30%, and the expression of viral protein was increased, which indicated that the inhibitory effect of PS-341 on viral replication was

attenuated. **Conclusions** According to the result of the study, PS-341 could reduce apoptosis by regulating the proteasome pathway, inhibiting the gene replication and assemble, without effect on virus adsorption, entry and release. In addition, PS-341 also inhibited the replication of CV-B3 in cells, which suggest that PS-341 has a broad spectrum anti-EVs effects.

【Key words】 EV-D68; CV-B3; PS-341; Apoptosis

Fund programs: National Key Research and Development Program of China(2017YFA0205102)

DOI: 10. 3760/cma.j.issn.1003-9279. 2019. 03. 003

肠道病毒 (enterovirus, EV), 属于小 RNA 病毒科, 肠道病毒属, 为单股正链 RNA 病毒, 根据血清型可分为 A、B、C、D 四型。人肠道病毒 D68 型 (EV-D68) 是 D 组血清型 EV (D70、D94、D111、D68、D120) 的一种, 于 1962 年首次被成功分离出来^[1]。根据流行病学数据分析, EV-D68 感染会引起严重的呼吸系统疾病, 如呼吸道感染、支气管炎及肺炎等^[2-5]。近年来, 随着急性弛缓性脊髓炎 (AFM) 患者逐渐增多, 越来越多的流行病学数据表明 EV-D68 感染人体后极有可能会引起急性弛缓性麻痹和颅内神经功能障碍等严重的神经系统并发症^[6-8]。最新研究通过结构生物学手段, 解析 EV-D68 不同类型病毒颗粒及其免疫复合物的高分辨率结构, 阐明了 EV-D68 病毒的生活周期及各时期的病毒中和机制, 进一步完善了小 RNA 病毒的吸附入胞及感染机制理论研究^[9-10]。但是对于 EV-D68 这种小 RNA 病毒的致病机制研究不够深入, 至今尚无有效的疫苗或抗病毒药物来预防和治疗该类病原体引起的疾病。化合物 PS-341 是一种二肽硼酸衍生物, 20S 蛋白酶体抑制剂, 也是第一个临床批准的人类蛋白酶体抑制剂^[11]。PS-341 作为恶性淋巴瘤的抗肿瘤药物, 可以强烈而可逆地抑制蛋白酶体的功能, 导致一些本应被清除的蛋白质在细胞内大量堆积, 进而引起细胞凋亡^[12]。研究表明, PS-341 可以通过抑制蛋白酶体通路抑制登革热病毒与裂谷热病毒进入及复制^[13-14]; 可以通过在内质网应激过程中激活 JNK 起到抗病毒作用^[15]。然而, PS-341 能否抑制小 RNA 病毒科肠道病毒属病毒复制, 目前尚未见报道。本研究通过检测 PS-341 处理 EV-D68 感染后的细胞内病毒 RNA 水平来探究 PS-341 对病毒增殖的影响; 通过凋亡抑制剂与 PS-341 共处理细胞, 探究 PS-341 抑制病毒增殖机理; 同时, 实验中通过分析 PS-341 对 CV-B3 病毒增殖影响, 研究 PS-341 对肠道病毒属病毒是否具有潜在的抗病毒作用。

1 材料与方法

1.1 材料 HeLa、RD 细胞购于美国 ATCC; 肠道病

毒 D68 型 Fermon 株由本实验室保存, 柯萨奇病毒 B3 型 (coxsachievirus B3, CV-B3) 由中国疾病预防控制中心病毒病所保存; 0.25% 胰酶、DMEM 培养基、青一链霉素购于 Gibco 公司; FBS 购自 Ausbian 公司。PS-341 (cat. no. HY-10227) 购自 MCE 公司; 凋亡抑制剂 Ac-YVAD-CHO (ALX-260 -027-M005) 购自 Enzo life science 公司; 病毒 RNA 提取试剂盒 QIAamp Viral RNA Mini Kit 购自 Qiagen 公司; 反转录试剂盒 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix Kit、荧光定量检测试剂盒 (SYBR Green) 购自 TransGen 公司; MTT 试剂盒 (M1020) 购自北京索莱宝科技有限公司; NC 膜购自 Millipore 公司; 化学发光试剂 (ECL) 购自 Thermo 公司; EV-D68 VP1 抗体由天德悦 (北京) 生物科技有限责任公司制备。

1.2 病毒培养和滴度测定 选择 EV-D68 易感的 RD 细胞扩增病毒。细胞培养瓶内接种 RD 细胞, 细胞融合 80% ~ 90% 后, 弃掉细胞培养基, 加入 DMEM, 取 EV-D68 病毒冻存液 (MOI = 0.1) 感染细胞。病毒吸附 4 ~ 6 h 后, 弃上清, 加入细胞维持液继续培养 48 h。收集上清与细胞, 反复冻融 3 次, 离心后取上清即为病毒液。利用半数组织细胞感染量 (TCID₅₀) 测定病毒滴度并保存待用。

1.3 药物毒性检测 在 96 孔板中传代培养 HeLa 细胞和 RD 细胞, 调整细胞悬液浓度, 5 000 ~ 8 000 个细胞/孔。细胞融合 80% ~ 90%, 加入梯度浓度 PS-341 药物 (0、6.25 μmol/L、12.5 μmol/L、25 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L、400 μmol/L)。药物处理细胞 24 h 后吸去上清, 加入 90 μl 新鲜完全培养基与 10 μl MTT 溶液。培养 4 h 后, 弃掉上清, 每孔加入 110 μl Formazan 溶解液 (主要成分为 DMSO), 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 492 nm 处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔 (培养基、MTT、Formazan 溶解液), 每组设定 3 复孔。

1.4 病毒 RNA 提取及反转录 用预冷的 PBS 将细胞轻轻吹悬, 收集至 1.5 ml 离心管中。900×g 离

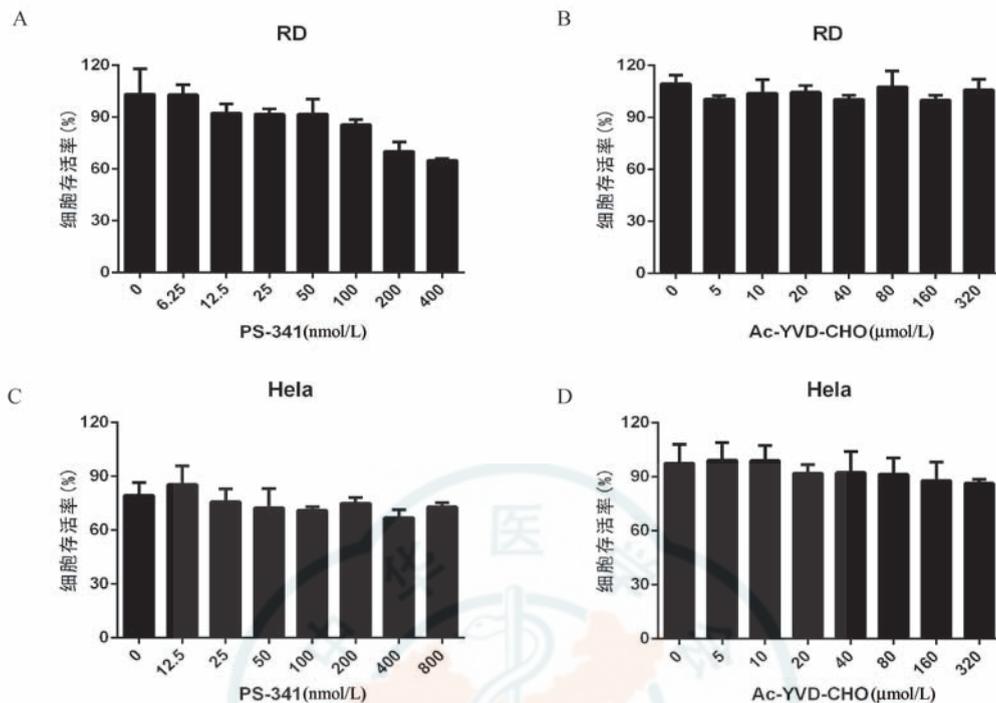


图1 PS-341 与 Ac-YVD-CHO 对 RD 和 HeLa 细胞活性影响

Fig.1 Effect of PS-341 and Ac-YVD-CHO on RD and HeLa cell viability

心 5 min, 弃上清。按说明书操作, 使用 RNeasy Mini Kit 试剂盒, 提取病毒 RNA。利用 cDNA 第一条链合成试剂盒进行 RNA 反转录并严格按照说明书进行操作。

1.5 实时荧光定量 PCR 根据 GenBank (AY426531.1XM-017879280.1) 基因序列, 本实验室已筛选出 EV-D68 引物序列及内参序列, 具体为: VP1-F (AY426531.1), 5'-GGCAGCCTATCAGGTG GAGAG-3', VP1-R (AY426531.1), 5'-GAGTTTGT ATGGCTTCTTCTGGTT-3', 细胞内参引物 GAPDH-F (NM_001115114), 5'-CCCACTCCTCCACCTTTGAC-3', GAPDH-R (NM_001115114), 5'-CATACCAGGA AATGAGCTTGA-3'。利用 SYBR Green 法进行实时定量 PCR 检测, 通过分析 EV-D68 结构蛋白 VP1 RNA 的相对丰度作为病毒复制的指标, GAPDH RNA 作为内参。反应体系按照试剂盒 FastStart Top Green qPCR Supermix 进行配制, 实验数据利用 GraphPad Prism 进行处理。

1.6 Western blot 实验 收集细胞后, 加入 RIPA 裂解液破碎细胞。配制 12% 的 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白, 利用半干转技术将蛋白转印至 NC 膜上, 用 5% 的脱脂牛奶封闭 30 min, 一抗按照 1:1 000 配制, 4 °C 过夜孵育。二抗按照 1:2 000 配制, 室温孵育 1

h。经过显色曝光, 检测 VP1 蛋白表达水平。

1.7 细胞培养与药物处理 细胞接种后, 密度生长到 80%~90%。PS-341 对病毒吸附、进入的影响实验中, 药物处理条件为: (1) 终浓度为 100 nmol/L 的 PS-341 预处理细胞 2 h, 弃掉上清培养基, 加入 EV-D68 病毒 (MOI=0.1) 吸附 1 h, PBS 漂洗细胞 3 次, 加入含有 100 nmol/L PS-341 的新鲜培养基。(2) 终浓度为 100 nmol/L 的 PS-341 处理细胞同时加入 EV-D68 病毒 (MOI=0.1) 吸附 1 h, PBS 漂洗细胞 3 次, 加入含有 100 nmol/L PS-341 的新鲜培养基。(3) EV-D68 病毒吸附 1 h 后, PBS 漂洗细胞 3 次, 加入含有 100 nmol/L PS-341 的新鲜培养基, 继续培养 12 h 或 24 h 后收集细胞。对照组只感染 EV-D68 病毒 (MOI=0.1)。

2 结果

2.1 PS-341 抑制 EV-D68 病毒增殖 已有文献报道, PS-341 能够诱导细胞发生凋亡, 因此, 首先本研究确定药物对本实验的安全使用浓度范围。结果如图 1。在 RD 和 HeLa 细胞系中, PS-341 药物浓度为 200 nmol/L 时, 细胞存活率分别为 72% 和 91%, PS-341 对细胞无明显毒性作用。同时测定凋亡抑制剂在 320 nmol/L 以内, 细胞存活率均大于 90%。为了

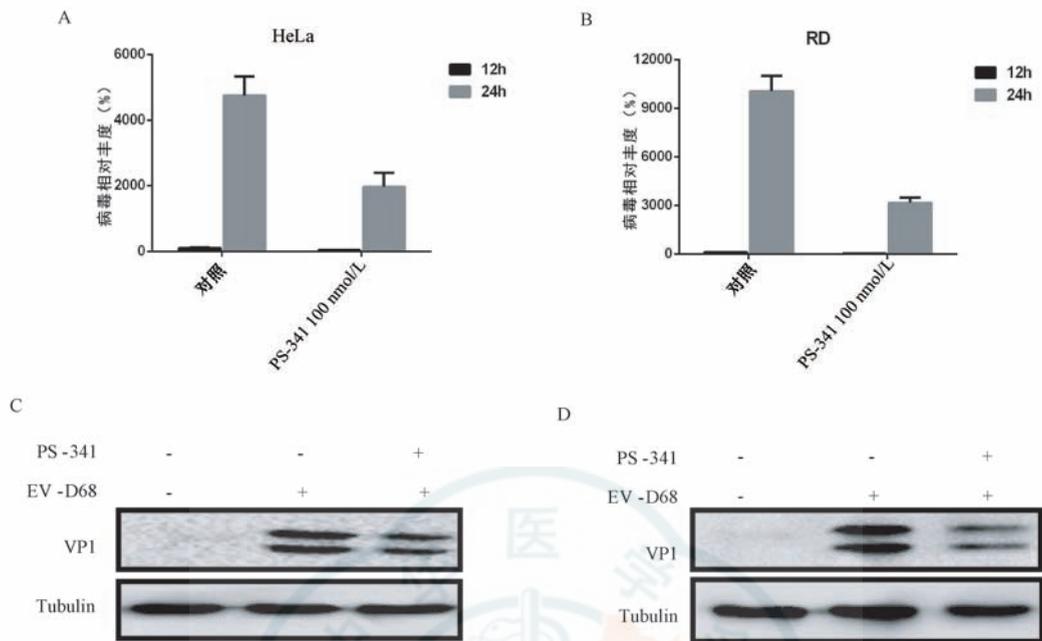


图 2 PS-341 抑制 RD 和 HeLa 细胞内的 EV-D68 增值
Fig.2 PS-341 inhibits the replication of EV-D68 in RD and HeLa cell

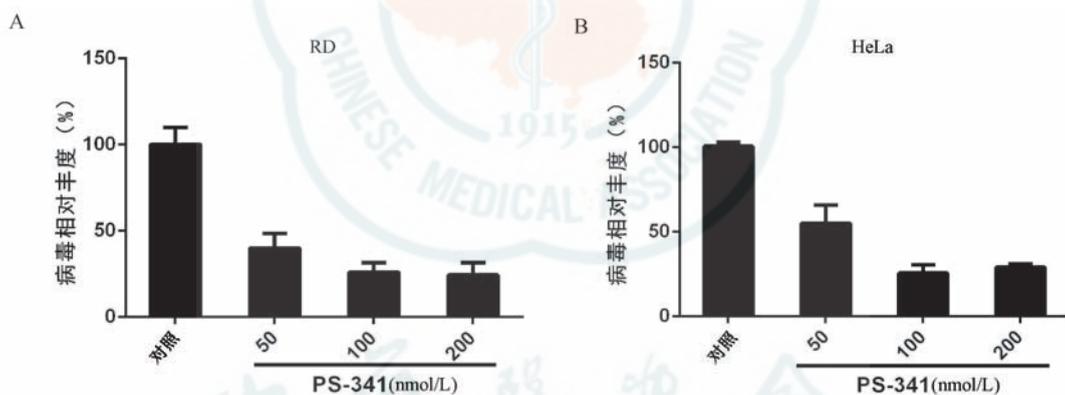


图 3 PS-341 抑制 RD 和 HeLa 细胞内的 EV-D68 增值具有剂量依赖效应

Fig.3 PS-341 inhibits EV-D68 proliferation with dose-dependent effect in RD and HeLa cell

避免 PS-341 的细胞毒性影响细胞状态,进而对病毒增殖产生影响,本研究选择 PS-341 浓度为 100 nmol/L 来探究药物对 EV-D68 增殖影响。RD 与 HeLa 细胞接种于 24 孔细胞培养板,细胞融合 80%~90%,EV-D68(MOI=0.1)吸附 1 h,PBS 漂洗 3 次后,加入终浓度为 100 nmol/L 的 PS-341 处理细胞。继续培养 12 h 或 24 h 后收集细胞并提取 RNA 或裂解细胞后进行 Western blot 检测。如图 2 所示,与对照组相比,加入 PS-341 组细胞内病毒基因降低 50%~70%,且蛋白表达水平明显下降,说明 PS-341 能够抑制 EV-D68 在宿主细胞内的增殖及蛋白表达。

2.2 PS-341 抑制 EV-D68 病毒复制具有剂量依赖

性效应 为了进一步探究 PS-341 抑制病毒复制与药物剂量关系,本研究以终浓度为 50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L 的 PS-341 进行实验探究。RD 与 HeLa 细胞接种于 24 孔细胞培养板,细胞融合 80%~90%,EV-D68(MOI=0.1)吸附 1 h,PBS 漂洗细胞 3 次后,加入 PS-341 处理细胞,继续培养 24 h 后收集细胞并提取 RNA。逆转录及病毒 RNA 水平检测按照反转录试剂盒及荧光定量检测试剂盒说明书进行操作。结果如图 3 所示。实验结果表明,在 RD 与 HeLa 细胞内,PS-341 对 EV-D68 的增殖被抑制了约 70%,且随着药物浓度增加,抑制作用更趋显著。综上,PS-341 可以抑制 EV-D68 在宿主细胞

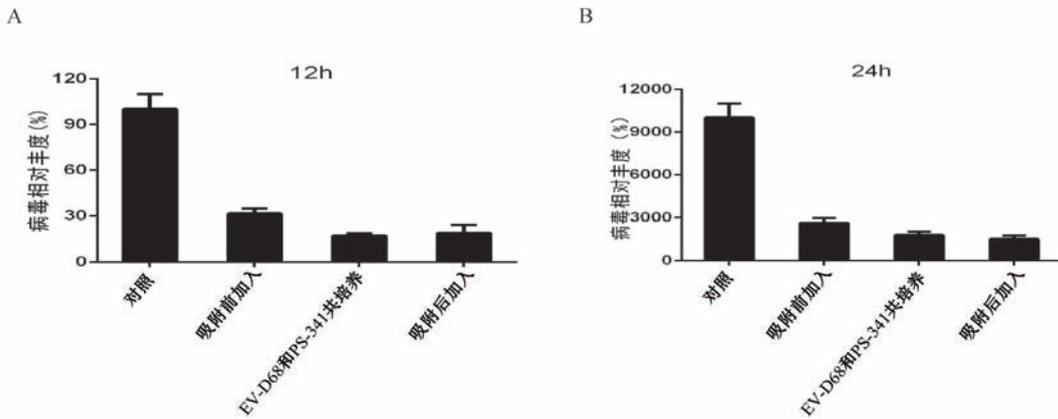


图 4 PS-341 影响病毒复制但对吸附、进入无显著影响

Fig.4 PS-341 inhibits viral replication without significant effect on adsorption and import

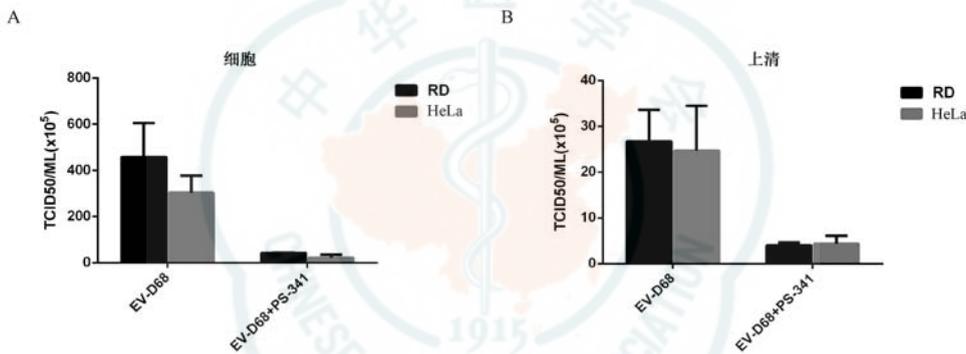


图 5 PS-341 抑制 EV-D68 组装但对释放无影响

Fig.5 PS-341 inhibits EV-D68 proliferation with dose-dependent effects

内增殖且具有剂量依赖效应。

2.3 PS-341 对病毒吸附、进入的影响 RD 细胞接种后,分别在病毒感染细胞的不同时期加入 PS-341 处理细胞。病毒吸附完成后,均加入 100 nmol/L 的 PS-341,细胞继续培养 12 h 或 24 h 后,收集细胞,提取 RNA 进行反转录及 qRT-PCR 检测。分析不同时间点细胞内病毒基因水平,实验结果图 4 所示,与只感染病毒组相比,药物预处理细胞组病毒 RNA 水平约为 28%~32%,病毒吸附过程中加药组病毒 RNA 水平约为 25%,病毒吸附完成后加药组病毒 RNA 水平为 24%~28%。将药物预处理细胞组、病毒吸附过程中加药组与病毒吸附后加药组对比,发现 PS-341 对 EV-D68 的抑制作用没有显著性差异,表明 PS-341 对病毒吸附与进入过程没有影响,而是主要作用于病毒基因复制的过程。

2.4 PS-341 对 EV-D68 组装与释放影响 实验表明,PS-341 能够抑制病毒在宿主细胞内基因复制,进一步探究 PS-341 对 EV-D68 组装与释放影响。

RD 与 HeLa 细胞感染 EV-D68 病毒(MOI=0.1),病毒吸附 1 h 后,加入 100 nmol/L PS-341 继续培养 24 h,分别收取上清与细胞沉淀。用 100 μl DMEM 将细胞沉淀吹打均匀,置于-80℃冰箱,反复冻融 3 次。上清与细胞内的病毒滴度用 TCID50 进行检测。结果如图 5 所示,病毒感染组 RD 细胞内病毒滴度为 107.65TCID50/ml,上清中病毒滴度为 106.38TCID50/ml,PS-341 处理组细胞内病毒滴度为 106.64TCID50/ml,上清中病毒滴度为 105.60TCID50/ml; HeLa 细胞内病毒滴度为 107.48TCID50/ml,上清中病毒滴度为 106.63TCID50/ml,PS-341 处理组细胞内病毒滴度为 106.32TCID50/ml,上清中病毒滴度为 105.63TCID50/ml。加入 PS-341 后,RD 细胞内病毒滴度下调 90.23%,上清中病毒滴度下调 83.4%,HeLa 细胞内病毒滴度下调 93%,上清中病毒滴度下调 90%。实验说明加入 PS-341 后,细胞内病毒组装显著被抑制,但对病毒释放无影响。

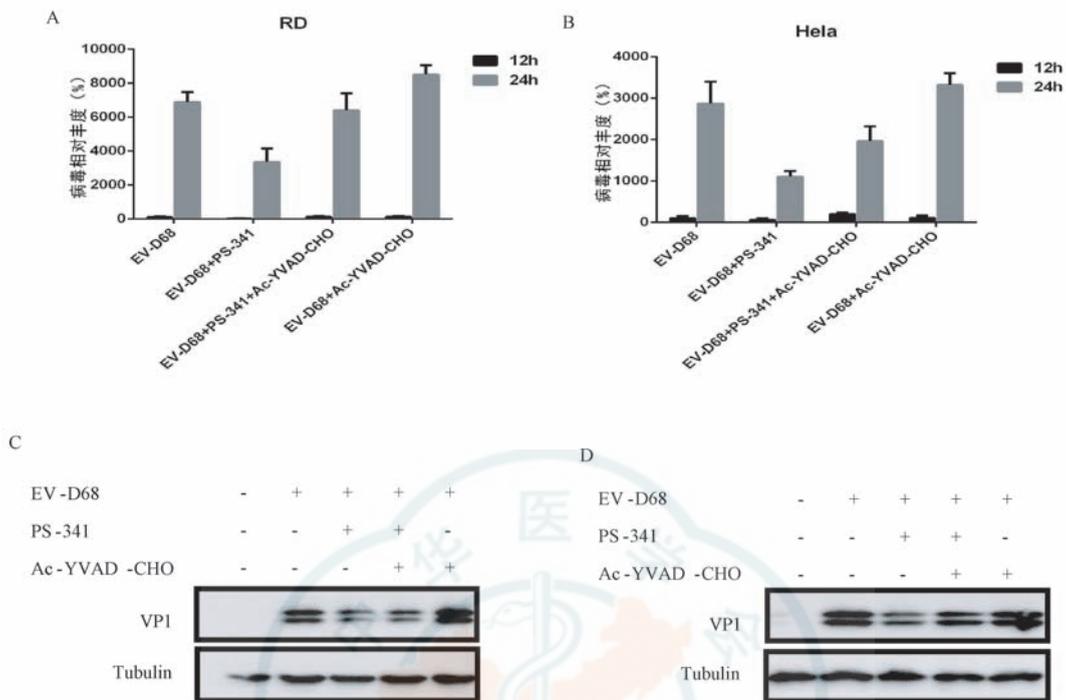


图 6 凋亡抑制剂拮抗 PS-341 对病毒增殖的抑制作用

Fig.6 Inhibitors of apoptosis attenuate the inhibition of PS-341 on viral proliferation

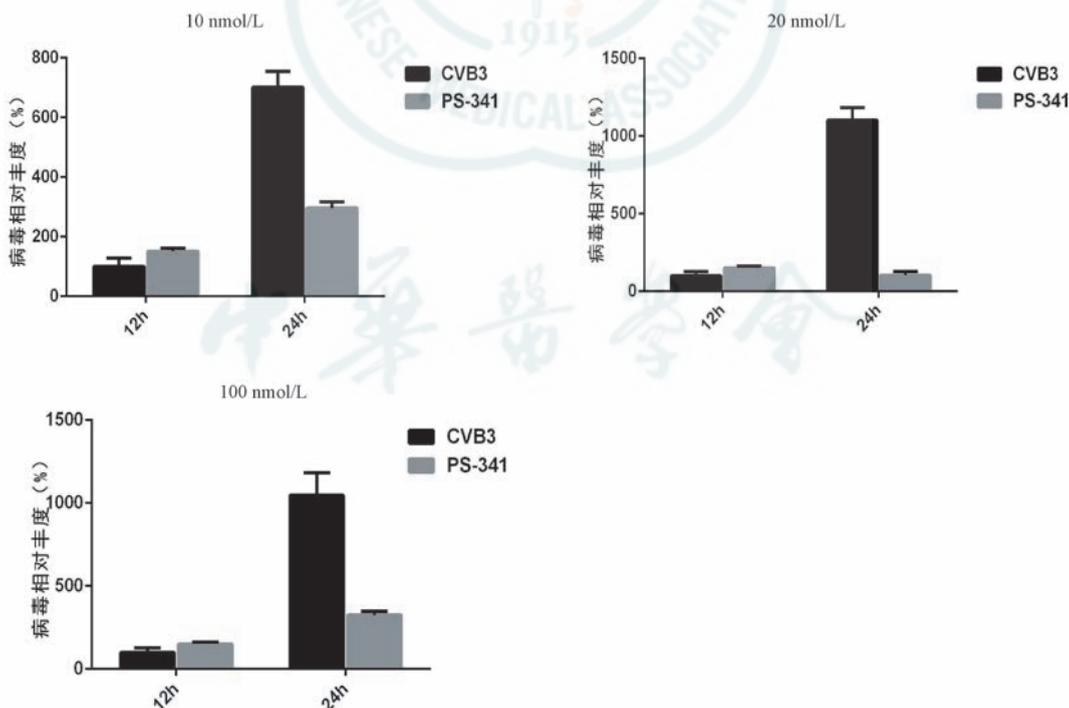


图 7 PS-341 抑制 CV-B3 增殖

Fig.7 PS-341 inhibit the replication of CV-B3

2.5 凋亡抑制剂拮抗 PS-341 对 EV-D68 复制的抑制作用
 本研究发现, PS-341 处理病毒感染后的细

胞具有抑制病毒增殖作用。研究表明, 病毒可以通过激活内质网(ER)应激, 诱导细胞凋亡影响病毒增

值^[14]。因此,为了进一步探究 PS-341 抑制 EV-D68 复制机理,本实验中细胞感染病毒后,以终浓度为 100 nmol/L 的 PS-341 与 40 μ mol/L 的凋亡抑制剂 Ac-YVAD-CHO 共处理细胞。分别在药物作用 12 h、24 h 后收取细胞并提取 RNA,逆转录后利用 qRT-PCR 检测病毒 RNA 水平,利用 Western blot 检测药物处理 24 h 后细胞内 VP1 表达情况。如图 6 所示,药物作用 24 h 后,RD 细胞中凋亡抑制剂与 PS-341 共处理组病毒基因水平为 32%,单一 PS-341 处理组病毒基因水平为 62%,病毒基因水平上调 30%,同样处理条件下,HeLa 细胞中病毒基因水平上调 10%。免疫印迹结果显示细胞内病毒 VP1 蛋白表达量增加。实验结果说明加入凋亡抑制剂后,PS-341 对病毒复制的抑制作用被减弱,推测 PS-341 可能通过诱导细胞凋亡来抑制 EV-D68 增殖。

2.6 PS-341 抑制 CV-B3 病毒增殖 为了探究 PS-341 是特异性抑制 EV-D68 复制,还是对肠道病毒属病毒具有广谱抗病毒作用,本研究又选择了 CV-B3 病毒进行研究。HeLa 细胞接种后,细胞融合 80%~90%,CV-B3 以 MOI=0.1 感染细胞 1 h 后,加入终浓度为 10 nmol/L、20 nmol/L、100 nmol/L 的 PS-341 继续培养。对照组细胞只感染 CV-B3 病毒(MOI=0.1)。细胞培养 12 h、24 h 后收集细胞并提取细胞内 RNA 进行检测。实验结果如图 7 所示,以不同浓度 PS-341 处理细胞 12 h、24 h 后,细胞内病毒 RNA 含量明显下降,与对照组相比,病毒增殖被抑制 60%~90%。因此,实验证明 PS-341 对 CV-B3 在细胞内的增殖具有显著抑制作用。实验结果提示,PS-341 可能具有潜在的广谱抗肠道病毒属病毒增殖作用。

3 讨论

EV-D68 病毒会引起呼吸系统疾病及导致神经系统并发症,对免疫系统较弱的儿童和老年人影响尤其严重^[17]。由于对肠道病毒致病机理研究不够全面,目前没有有效的预防和治疗药物与手段。因此本研究旨在寻找一种潜在的抗病毒药物,为肠道病毒疾病的预防与临床治疗提供可行性。

PS-341 作为一种高选择性和有效的蛋白酶体抑制剂,能够抑制蛋白酶体介导的细胞凋亡抑制蛋白(cIAPs)的降解,诱导细胞发生坏死性凋亡^[18-19],因此,对细胞具有一定的毒性。在药物安全浓度下,PS-341 能够抑制 EV-D68 在细胞内增殖,且具有药

物剂量依赖性。研究发现,蛋白酶体抑制剂可以通过调节游离泛素含量,使病毒基质蛋白由细胞核向细胞质的输出受损,来抑制病毒吸附及释放^[20-21]。广谱蛋白酶抑制剂 β -内酯处理细胞后,对病毒进入及在细胞内的 RNA 复制无影响,但能够抑制病毒在宿主内成熟的病毒颗粒组装过程^[13]。本研究通过设计不同处理条件,分析细胞内病毒 RNA 含量及病毒 VP1 蛋白表达水平,发现 PS-341 对细胞内病毒 RNA 合成的抑制率为 60%,并能显著抑制病毒在宿主内的蛋白合成。通过在病毒感染不同时期加入 PS-341 处理细胞,证明该药物对 EV-D68 吸附、进入无影响。实验进一步检测细胞内病毒滴度,发现 PS-341 对病毒滴度抑制率为 90%,说明该药物不仅抑制病毒生物合成,而且对病毒在细胞内组装也具有抑制作用,但通过比较细胞内与上清中病毒滴度,发现该药物对病毒释放过程没有影响。当 PS-341 与凋亡抑制剂 Ac-YVAD-CHO 共同处理细胞时,PS-341 对病毒增殖的抑制作用显著下降,说明在有凋亡抑制剂作用下,一定程度上增强了蛋白酶体通路,促进了病毒在宿主细胞内的增殖。此外,为了进一步探究 PS-341 对肠道病毒属病毒抗病毒效果是否具有普遍性,我们又探究了 PS-341 对 CV-B3 病毒增殖影响。实验结果表明,PS-341 能够显著抑制 CV-B3 在宿主细胞内的增殖。因此,本我们的研究提示 PS-341 具有潜在的抗肠道病毒属病毒作用。

本研究结果表明,PS-341 可能通过抑制病毒感染细胞内的蛋白酶体通路,诱导细胞发生凋亡有效抑制肠道病毒在宿主体内的增殖。同时,药物 PS-341 对 EV-D68 与 CV-B3 在宿主细胞内的增殖均有抑制作用。本研究推测,PS-341 具有广谱抗肠道病毒属病毒活性。特别需要指出,PS-341 作为临床药物,其血药浓度最低为 300 nmol/L。本研究显示,100 nmol/L PS-341 在体外(in vitro)实验中即已表现出良好的抗病毒效果,其安全性毋庸置疑,有潜力成为未来预防与治疗肠道病毒所引起疾病的临床应用药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 张可可、夏冬: 酝酿和设计实验、实施研究、采集、分析数据、文章撰写; 刘思华: 对文章的知识性内容作批评性审阅; 周振威: 酝酿和设计实验、分析数据、对文章的知识性内容作批评性审阅; 韩俊、王涛: 酝酿和设计实验、对文章的知识性内容作批评性审阅、统计分析、获取研究经费

参考文献

- [1] Schieble JH, Fox VL, Lennette EH. A probable new human picornavirus associated with respiratory diseases [J]. *Am J Epidemiol*, 1967, 85(2): 297-310.
- [2] Carrion MA, Pebody RG, Danis K, et al. The emergence of enterovirus D68 in England in autumn 2014 and the necessity for reinforcing enterovirus respiratory screening [J]. *Epidemiol Infect*, 2017, 145 (9): 1855-1864. DOI: 10.1017/S0950268817000590.
- [3] Esposito S, Bosis S, Niesters H, et al. Enterovirus D68 infection [J]. *Viruses*, 2015, 7 (11): 6043-6050. DOI: 10.3390/v7112925.
- [4] Steele MT, Walsh I. Commentary. Severe respiratory illness associated with enterovirus D68-missouri and illinois, 2014 [J]. *Ann Emerg Med*, 2015, 65 (3): 335. DOI: 10.1016/j.annemergmed.2014.12.007.
- [5] 张铁钢, 罗明, 李爱华, 等. 北京市一例重症肺炎儿童的呼吸道中检出肠道病毒 D68 [J]. *中华预防医学杂志*, 2015, 49 (3): 282, 1 283. DOI: 10.3769/cma.jissn.0253-9624.2015.03.019.
- [6] Holm-Hansen CC, Midgley SE, Fischer TK. Global emergence of enterovirus D68: a systematic review [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16 (5): e64-e75. DOI: 10.1016/S1473-3099 (15) 00543-5.
- [7] Kirolos A, Mark K, Shetty J, et al. Outcome of paediatric acute flaccid myelitis associated with enterovirus D68: a case series [J]. *Dev Med Child Neurol*, 2019, 61 (3): 376-380. DOI: 10.1111/dmcn.14096.
- [8] Messacar K, Schreiner TL, Maloney JA, et al. A cluster of acute flaccid paralysis and cranial nerve dysfunction temporally associated with an outbreak of enterovirus D68 in children in Colorado, USA [J]. *Lancet*, 2015, 385 (9978): 1662-1671. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)62457-0.
- [9] 杨泽宁, 闻惠文, 李喜礼花, 等. 肠道病毒-D68 型流行株 3C 和 3D 蛋白结构域功能陈防和结构特征 比较分析 [J]. *国际病毒学杂志*, 2018, 25 (1): 29-34. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-409..2018.01.07
- [10] Zheng Q, Zhu R, Xu L, et al. Atomic structures of enterovirus D68 in complex with two monoclonal antibodies define distinct mechanisms of viral neutralization [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4 (1): 124-133. DOI: 10.1038/s41564-018-0275-7.
- [11] Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG. The potential of proteasome inhibition in the treatment of colon cancer [J]. *Expert Opin Invest Drugs*, 2006, 15 (9): 1067-1075. DOI: 10.1517/13543784.15.9.1067.
- [12] Klinger PP, Schubert U. The ubiquitin-proteasome system in HIV replication; potential targets for antiretroviral therapy [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2005, 3(1): 61-79.
- [13] Choy MM, Zhang SL, Costa VV, et al. Proteasome inhibition suppresses dengue virus egress in antibody dependent infection [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9(11): e4058. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004058.
- [14] Keck F, Amaya M, Kehn-Hall K, et al. Characterizing the effect of Bortezomib on Rift Valley Fever Virus multiplication [J]. *Antiviral Res*, 2015, 120: 48-56. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.05.004.
- [15] Granato M, Romeo MA, Tiano MS, et al. Bortezomib promotes KHSV and EBV lytic cycle by activating JNK and autophagy [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 13052. DOI: 10.1038/s41598-017-13533-7.
- [16] Zhu G, Zheng Y, Zhang L, et al. Cocksackievirus A16 infection triggers apoptosis in RD cells by inducing ER stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(4): 856-861. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.142.
- [17] Imamura T, Oshitani H. Erratum: Global reemergence of enterovirus D68 as an important pathogen for acute respiratory infections [J]. *Rev Med Virol*, 2015, 25 (4): 268. DOI: 10.1002/rmv.1844.
- [18] Zhang Y, Cheng J, Zhang J, et al. Proteasome inhibitor PS-341 limits macrophage necroptosis by promoting eIAPs-mediated inhibition of RIP1 and RIP3 activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477(4): 761-767. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.06.132.
- [19] Lee KH, Jang AH, Yoo CG. 17-allylamino-17-demethoxy geldanamycin and the enhancement of PS-341-induced lung cancer cell death by blocking the NF- κ B and PI3K/Akt pathways [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 53(3): 412-421. DOI: 10.1165/rcmb.2014-01860C.
- [20] Wang YE, Park A, Lake M, et al. Ubiquitin-regulated nuclear-cytoplasmic trafficking of the Nipah virus matrix protein is important for viral budding [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6 (11): e1001186. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001186.
- [21] Mimnaugh EG, Chen HY, Davie JR, et al. Rapid deubiquitination of nucleosomal histones in human tumor cells caused by proteasome inhibitors and stress response inducers: effects on replication, transcription, translation, and the cellular stress response [J]. *Biochemistry*, 1997, 36(47): 14418-14429. DOI: 10.1021/bi970998j.

(收稿日期:2019-02-27)

(本文编辑:唐浏英)