

DOI:10.14188/j.ajsh.2023.02.010

柯萨奇病毒 A 组 10 型感染 RD 细胞的转录组学分析

江俊涛^{1,2}, 任盈盈³, 刘洪波^{1,2*}

- (1. 桂林医学院第二附属医院 广西糖脂代谢病重点实验室, 广西 桂林 541199;
2. 桂林医学院 医学检验学院, 广西 桂林 541199;
3. 武汉大学生命科学院, 病毒学国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要: 探讨柯萨奇病毒 A 组 10 型(coxsackievirus A10, CV-A10)感染人横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RD)细胞的基因表达谱变化, 为深入理解 CV-A10 致病机制提供重要基础数据。本研究将 CV-A10 以感染复数(MOI)为 0.1 的剂量感染 RD 细胞 12 h 后提取总 RNA, 通过 RNA-Seq 技术获取 RD 细胞中的全部转录本信息, 基于生物信息学的方法对差异表达基因进行 GO(gene ontology, GO)和 KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析。结果显示, 共筛选到 2 610 个差异表达基因, 其中表达上调的基因有 1 582 个, 表达下调的基因有 1 028 个。随机选取 8 个差异表达基因, 经 RT-qPCR 验证后发现, 其变化趋势与转录组数据一致。GO 和 KEGG 富集分析结果显示, 差异表达基因主要聚焦于细胞内信号转导、mRNA 加工、抗病毒免疫反应等过程。结果表明, CV-A10 感染可能会引起 RD 细胞发生自噬。

关键词: 柯萨奇病毒 A 组 10 型; 人横纹肌肉瘤细胞; 转录组学

中图分类号: R373.2

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2023)02-0185-08

Transcriptomics analysis of RD cells infected with coxsackievirus A10

JIANG Juntao^{1,2}, REN Yingying³, LIU Hongbo^{1,2*}

- (1. Guangxi Health Commission Key Laboratory of Glucose and Lipid Metabolism Disorders, The Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541199, Guangxi, China;
2. College of Clinical Laboratory Science of Guilin Medical University, Guilin 541199, Guangxi, China;
3. State Key Laboratory of Virology, College of life sciences at Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China)

Abstract: To explore the changes of gene expression profile in human rhabdomyosarcoma (RD) cells infected with coxsackievirus A10 (CV-A10), and to provide important basic data for further understanding the pathogenesis of CV-A10, RD cells were infected with CV-A10 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 for 12 h, and total RNA was extracted. All transcriptional information of infected RD cells was obtained through RNA-Seq technology. Based on bioinformatics methods, differentially expressed genes were analyzed using GO (gene ontology) and KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes). The results showed that a total of 2 610 differentially expressed genes were screened, of which 1 582 were up-regulated and 1 028 were down-regulated. 8 differentially expressed genes were randomly selected and verified by RT-qPCR, and the variation trend was consistent with the transcriptome data. The enrichment analysis results of GO and KEGG showed that the differentially expressed genes mainly focused on intracellular signal transduction, mRNA processing, antiviral immune response, and other processes. This study suggests that CV-A10 infection may cause autophagy in RD cells.

收稿日期: 2023-03-24 修回日期: 2023-04-17 接受日期: 2023-04-29

作者简介: 江俊涛(1994-), 男, 硕士生, 研究方向: 肠道病毒致病机制。E-mail: jjt281390041@163.com

* 通讯联系人: 刘洪波(1973-), 男, 教授, 研究方向: 感染性疾病诊断、疫苗及机制研究。E-mail: hbliu@glmc.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(81660280)

引用格式: 江俊涛, 任盈盈, 刘洪波. 柯萨奇病毒 A 组 10 型感染 RD 细胞的转录组学分析[J]. 生物资源, 2023, 45(2): 185-192.

Jiang J T, Ren Y Y, Liu H B. Transcriptomics analysis of RD cells infected with coxsackievirus A10 [J]. Biotic Resources, 2023, 45(2): 185-192.

Key words: coxsackievirus A10; human rhabdomyosarcoma cell; transcriptomics

0 引言

柯萨奇病毒A组10型(CV-A10)是无包膜的单股正链RNA病毒,与肠道病毒71型(Enterovirus 71, EV-A71)、柯萨奇病毒A组16型(CV-A16)和柯萨奇病毒A组6型(CV-A6)同为婴幼儿手足口病的主要致病原^[1]。手足口病(Hand-foot-and-mouth disease, HFMD)的临床症状一般较为温和,多为自限性感染,主要表现为发热和手、足、口腔等部位出现皮疹或疱疹等^[2]。值得注意的是,CV-A10和CV-A6感染后除了出现手足口病的一般表现外,还会引起不同程度的脱甲症状^[3],少数患者还会发展成严重并发症,例如病毒性脑膜炎^[4]、脑炎^[5]等。与CV-A6和CV-A16相比,CV-A10和EV-A71更容易导致严重的循环系统和神经系统相关疾病^[6],一些重症患者由于病情发展迅速可能导致死亡^[7]。尽管已经成功获批上市的EV-A71疫苗可以有效预防EV-A71引起的手足口病,但它对其他型别的肠道病毒并没有交叉保护作用^[8]。目前针对CV-A10的研究大多集中于流行病学,对其致病机制方面的认识还相当有限,及时开展CV-A10致病机制方面的研究将有利于开发针对CV-A10的抗病毒药物和疫苗。

病毒是严格的细胞内寄生生物,通常病毒要成功感染宿主细胞,需要劫持宿主细胞的亚细胞组分,利用宿主细胞的生物大分子合成机器,在宿主细胞实现成功的增殖,必须逃逸宿主细胞的抗病毒天然免疫和克服宿主细胞的抗病毒应激等反应,因而病毒与宿主细胞的相互作用精密有序且十分复杂^[9]。采用单一的病毒学、生物化学、细胞生物学等技术与方法很难窥探病毒与宿主细胞的相互作用的生物学效应及其分子机制。转录组测序(RNA-Seq)技术可以从总体上获得细胞在病毒感染前后的所有基因表达信息,对研究病毒与宿主细胞的相互作用是十分高效的技术手段^[10]。尽管过去有研究组涉及EV-A71和CV-A16感染宿主细胞的转录组学研究^[11],但尚未有CV-A10感染细胞的RNA-Seq相关研究。因此,本研究利用实验室前期从手足口病患者分离鉴定的CV-A10病毒分离株,通过RNA-Seq技术对CV-A10感染后的RD细胞进行转录组测序,期望从RNA水平来理解CV-A10的致病机制。

1 材料与方法

1.1 病毒株和细胞株

CV-A10病毒分离株P148(GenBank登录号:

MK645898.1)于2012年从广东省中山市临床手足口病患者粪便中分离得到,经鉴定为C基因型。根据Reed-Muench法计算出CV-A10滴度约为 $10^{7.41}$ TCID₅₀/mL。RD细胞为本实验室保存。

1.2 病毒感染和测序样品准备

将RD细胞均匀接种于60 mm培养皿中,置于37℃,5% CO₂培养箱,待细胞生长到90%汇合度后,将CV-A10以MOI=0.1的剂量感染RD细胞,孵育2 h后,把含10%胎牛血清的DMEM培养基(Gibco)更换为含2%胎牛血清的DMEM维持液,12 h后收集细胞样品。将未感染的RD细胞设为阴性对照组,CV-A10感染组和对照组(MOCK)分别设置3个独立重复。

1.3 文库构建与测序

提取样品总RNA进行质检,把质检合格的RNA样品进行mRNA富集并随机打断,反转录成双链cDNA,经过末端修复、加A尾并连接测序接头后进行PCR扩增,随后纯化PCR产物,完成文库构建。文库质检合格后在Illumina NovaSeq 6000测序仪上进行上机测序。

1.4 RNA-seq数据分析

对原始数据进行过滤后获得Clean reads,使用HISAT2软件将Clean reads与参考基因组进行比对。通过DESeq2软件进行差异基因分析,差异基因筛选标准为 $P \leq 0.05$ 。最后用cluster Profiler软件对筛选得到的差异表达基因进行GO富集分析和KEGG通路分析,以 $Q \leq 0.05$ 作为富集显著性的判定标准。

1.5 RT-qPCR验证差异表达基因

随机选取8个差异表达基因,以GAPDH为内参基因,对转录组测序结果进行验证。使用Primer 6.0软件设计引物,引物序列和参数见表1,由擎科生物(武汉)合成。分别从感染组和对照组提取总RNA并反转录为cDNA。按照ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Vazyme)配置反应体系,然后在荧光定量PCR仪上进行上机检测(反应程序:Stage 1:95℃ 30 s;Stage 2:95℃ 10 s,60℃ 30 s,40个循环;Stage 3:95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s)。最后通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出目的基因在mRNA水平上的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 总RNA的提取和质量评估

本研究使用Trizol法提取总RNA后,通过Nanodrop进行初步定量和纯度测定,然后通过Agi-

表 1 引物列表
Table 1 Primer list

基因	引物序列 (5'~3')	产物长度/bp
<i>FTH1</i>	F: ACTACCACCAGGACTCAGAGG R: ACTACCACCAGGACTCAGAGG	100
<i>NDUFA1</i>	F: TTTTGGCCTAGGTAACGGGG R: TGTGGATGTACGCAGTAGCC	107
<i>COX6A1</i>	F: CATCAGGACCAAGCCGTT R: TAACGGTCCAAACCAGTGCT	198
<i>LSM7</i>	F: CGCGACAAGATGGCGGATA R: GGTTGAGGAGTGGGTCGAAG	145
<i>RPS2P46</i>	F: CGTCAAGACCCACACCAGAG R: GTGTCTCTTGAAGGTCACTGT	146
<i>EEF1A1P5</i>	F: TTTTGGCTTTTTTCGCAACGGG R: TGGACTTGCCCGAATCTACG	132
<i>RPS23</i>	F: CGTGCTGGAAAAAGTAGGAGTTG R: AGCAACCGTCATTGGGTACA	122
<i>RPL26</i>	F:CGGAAGCAGCGTGTAGTTCTCTT R: CGGTCGGAAGTCACAAAGGGATT	101
<i>GAPDH</i>	F: CAAGGGCATCCTGGGCTAC R: TTGAAGTCAGAGGAGACCACCTG	131

lent 5400 bioanalyzer 检测 RNA 的完整性。表 2 显示,RNA 纯度、完整性以及总量同时达标,可以作为合格样品用于构建文库。

2.2 原始数据统计

测序结果如表 3 所示,本研究的 6 个样品的清洁序列占比均在 90% 以上,Q20 比值在 97.15%~98.34%,Q30 比值在 92.34%~95.02%,说明测序获得的序列质量较高。

2.3 参考基因组比对

将所有样品的 Clean reads 比对到参考基因组,从表 4 统计的比对信息可以看出,Clean reads 中,成功比对到参考基因组的 reads 比例在 93.90%~95.78%;比对到参考基因组唯一位置的 reads 比例在 91.56%~93.40%;成功比对至外显子区域的 reads 比例在 90.78%~92.24%,以上数据显示比对

表 2 RNA 质量评估
Table 2 RNA quality assessment

样品名	A260/280	A260/230	RIN	总量/ μ g	检测结论
CA10-1	1.94	1.87	10.00	73.290	A
CA10-2	1.96	1.85	10.00	72.280	A
CA10-3	1.93	1.83	10.00	75.880	A
MOCK-1	1.97	1.89	10.00	58.485	A
MOCK-2	1.95	1.86	10.00	50.155	A
MOCK-3	1.98	1.87	10.00	51.625	A

注:A260/280 合格范围为 1.8~2.4;A260/230 合格范围为 1.5~2.4;RIN 合格范围为 7~10
Note: A260 / 280 qualified range is 1.8~2.4; A260/230 qualified range is 1.5~2.4; the qualified range of RIN is 7~10

率均在 90% 以上,说明测序质量较好且基因注释比较完善,可以用于后续生物信息学分析。

表 3 测序质量分析
Table 3 The quantity of RNA-Seq

样品名称	原始序列	清洁序列	清洁序列占比/%	Q20/%	Q30/%
CA10-1	47509424	43010476	90.53	98.11	94.48
CA10-2	44308136	40876004	92.25	97.82	93.93
CA10-3	45310386	41971856	92.63	98.27	94.90
MOCK-1	45437180	41517434	91.37	98.27	94.90
MOCK-2	42128284	42077048	99.88	98.34	95.02
MOCK-3	49362546	44786386	90.73	97.15	92.34

表4 参考基因组比对
Table 4 Reference genome alignment

样品名称	清洁序列	总比对率/%	唯一比对率/%	比对至外显子区域/%
CA10-1	43010476	95.00	92.69	92.00
CA10-2	40876004	94.58	92.22	90.78
CA10-3	41971856	95.67	93.26	92.24
MOCK-1	41517434	95.78	93.40	92.18
MOCK-2	42077048	94.15	91.78	91.56
MOCK-3	44786386	93.90	91.56	91.07

2.4 差异表达基因的筛选和分析

把 $P \leq 0.05$ 作为差异表达基因的筛选标准,建立以 $\log_2(\text{Fold Change})$ 为横坐标,以 $-\log_{10}P$ 为纵坐标的火山图(图1)。由火山图可知相比,于MOCK组, CV-A10感染组共有2 610个差异表达基因,其中表达上调的基因有1 582个,表达下调的基因有1 028个。表5和表6分别列出了感染组上调和下调最显著的基因各10条。

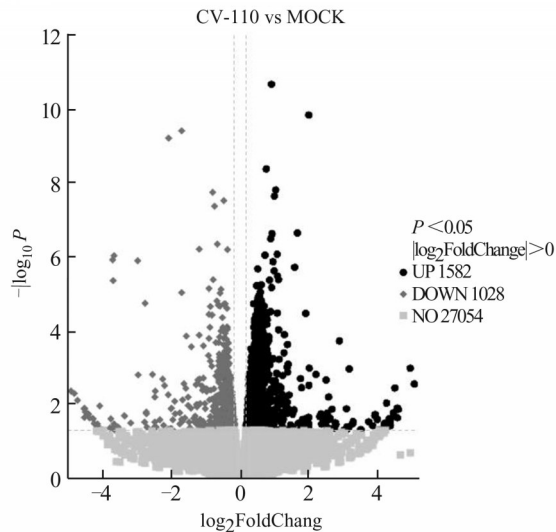


图1 CV-A10感染RD细胞的差异表达基因火山图
Fig.1 Volcano plot of differentially expressed genes in RD cells infected with CV-A10

2.5 GO富集分析

GO数据库涵盖了细胞组分、分子功能和生物学过程三个方面,对差异表达基因进行GO功能富集分析结果显示,差异表达基因主要参与了细胞周期、细胞内信号转导、mRNA加工、抗病毒免疫等生物学过程;与蛋白质结合、受体结合等功能相关;同时定位于核糖体、细胞核、微管等细胞组分(图2)。

2.6 KEGG通路分析

富集分析结果如图3所示,差异表达基因富集到mTOR信号通路(mTOR signaling pathway)、

表5 CV-A10感染RD细胞后上调表达基因(前10)

Table 5 Up-regulated expression of genes in RD cells infected with CV-A10 (top 10)

转录本名称	基因名称	$\log_2(\text{Fold Change})$	P值
ENSG00000278783	MIR6071	4.569 809	0.012 777
ENSG00000285441	SOD2	4.569 714	0.023 127
ENSG00000207575	MIR649	4.493 882	0.003 645
ENSG00000233242	AL512604.3	4.458 046	0.016 976
ENSG00000066336	SPI1	4.450 433	0.019 825
ENSG00000256603	AP003170.4	4.364 245	0.038 263
ENSG00000182107	TMEM30B	4.359 917	0.027 414
ENSG00000279532	AC002094.5	4.353 687	0.026 246
ENSG00000272954	AP000553.2	4.331 307	0.038 895
ENSG00000275703	U47924.3	4.331 217	0.024 672

表6 CV-A10感染RD细胞后下调表达基因(前10)

Table 6 Down-regulated expression of genes in RD cells infected with CV-A10 (top 10)

转录本名称	基因名称	$\log_2(\text{Fold Change})$	P值
ENSG00000200591	AC114489.1	-4.754 189	0.007 750
ENSG00000245080	MIR3150BHG	-4.554 593	0.013 359
ENSG00000265490	AP001178.2	-4.544 748	0.012 734
ENSG00000283408	MIR548A1HG	-4.536 613	0.013 677
ENSG00000214711	CAPN14	-4.435 887	0.017 973
ENSG00000262728	AC123768.3	-4.432 835	0.018 945
ENSG00000228221	LINC00578	-4.396 384	0.023 298
ENSG00000273165	AL121652.1	-4.301 768	0.024 286
ENSG00000245662	LINC02211	-4.295 280	0.024 645
ENSG00000167749	KLK4	-4.293 585	0.024 740

Notch信号通路(Notch signaling pathway)、MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)、Wnt信号通路(Wnt signaling pathway)等重要信号通路,以上信号通路与细胞信号传导、宿主细胞抗病毒免疫反应、病毒免疫逃逸等过程密切相关,提示CV-A10感染引起RD细胞发生强烈的抗病毒应激反应。

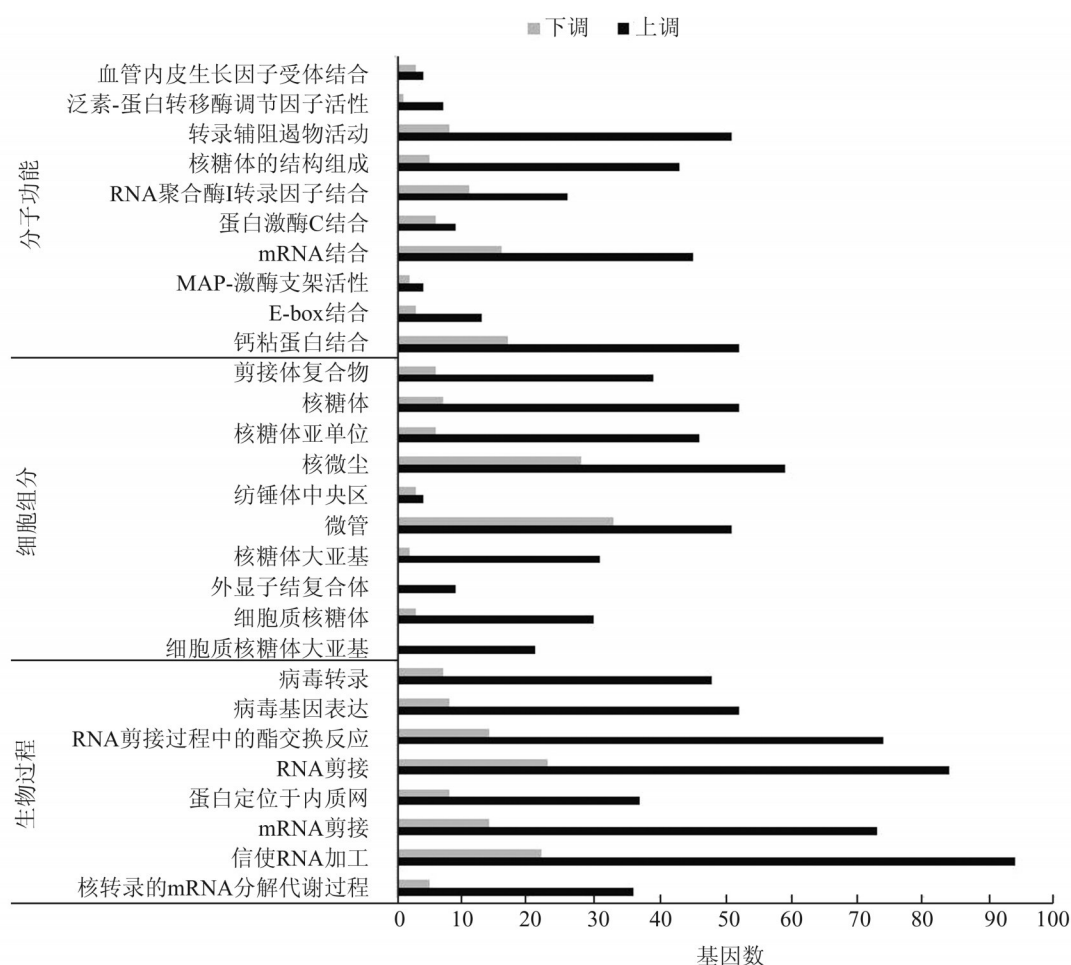


图2 差异表达基因的GO富集分析

Fig. 2 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

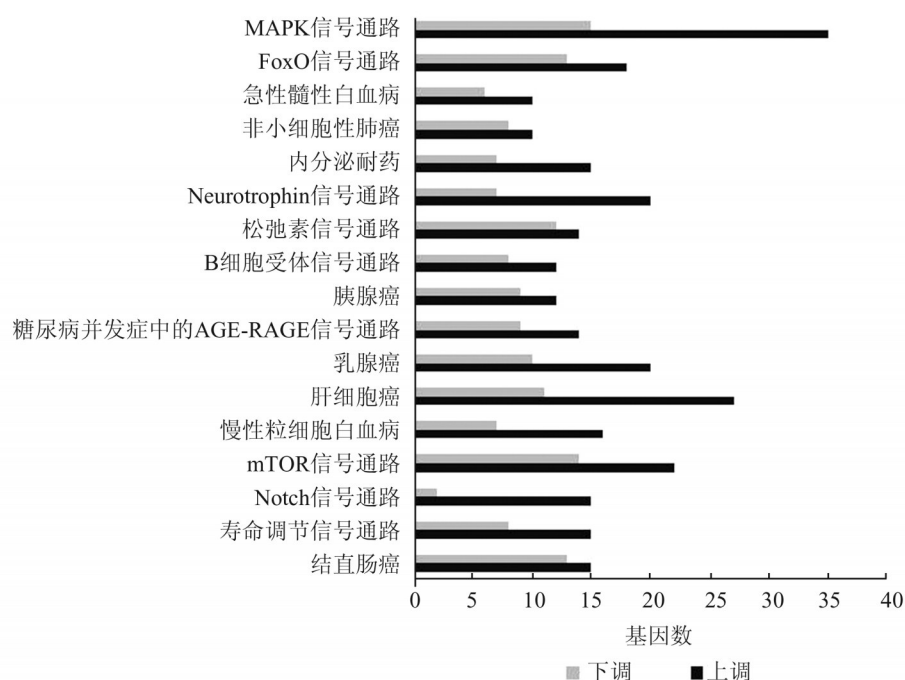


图3 差异表达基因的KEGG通路分析

Fig. 3 KEGG pathway analysis of differentially expressed genes

2.7 RT-qPCR 验证分析

为了验证转录组数据的准确性,本研究选取 *GAPDH* 作为内参基因,并随机挑选 5 个上调基因 (*FTH1*、*NDUFA1*、*COX6A1*、*RPL26*、*LSM7*) 和 3 个下调基因 (*RPS2P46*、*EEF1A1P5*、*RPS23*) 进行 RT-qPCR。如图 4 所示,RT-qPCR 的结果与转录组测序获得的差异表达基因的表达式变化趋势一致,说明本次转录组测序获得的数据是可信的。

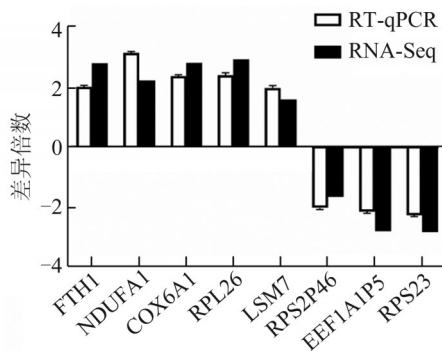


图 4 差异表达基因的 RT-qPCR 验证

Fig. 4 Verification of differentially expressed genes by RT-qPCR

3 讨论

近年来, CV-A10 在手足口病肠道病毒病原谱中的占比呈逐渐上升的趋势, 已经引起人们广泛的关注^[12]。我国近年流行的 CV-A10 主要基因型为 C 基因型。以往针对 CV-A10 的研究多集中在流行病学和临床诊断等方面^[13], 与同为手足口病主要病原体的 EV-A71 和 CV-A16 相比, 我们对 CV-A10 转录水平上的认识还十分有限。本研究通过 RNA-Seq 技术, 对 CV-A10 感染 RD 细胞 12 h 后的基因表达谱进行分析, 发现了 2 610 个差异表达基因, 进一步对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 分析, 结果显示差异表达基因主要在 308 条信号通路中富集, 富集程度比较显著的关键通路大多与信号转导、抗病毒免疫、细胞周期、细胞凋亡、自噬等过程相关, 如 mTOR 信号通路、IL-17 信号通路、Wnt 信号通路等。随后, 我们以 *GAPDH* 作为内参基因, 对随机挑选的 8 个差异表达基因进行 RT-qPCR 验证, 结果显示差异表达基因的变化趋势与 RNA-Seq 结果一致, 因此, 我们认为本研究获得的转录组数据是可信的。

自噬可以帮助机体在生理或病理状态下努力维持稳态, 主要是通过降解损伤或衰老的细胞器来满足细胞本身的代谢需要和实现部分细胞器的更

新。特别是在饥饿、缺乏生长因子或病原体感染等刺激下, 自噬水平会明显上调, 程凯等^[14]通过 RNA-Seq 技术研究 EV-A71 感染 RD 细胞的基因表达谱发现, 在 EV-A71 感染 RD 细胞 3 h 的差异表达基因大多与自噬和凋亡相关, 感染 9 h 后检测到自噬蛋白 Atg5 和 mTOR 伴侣蛋白 Rictor 的表达水平都有上升, 进一步证实了 EV-A71 感染会引起 RD 细胞自噬。本研究的 KEGG 分析结果显示, mTOR 信号通路的富集程度较高。mTOR 信号通路是经典的自噬信号通路^[15], 因此, 我们猜测 CV-A10 也能引起 RD 细胞自噬。自噬不仅可以维持机体稳态, 还能在抵抗病毒感染过程中发挥重要作用^[16]。宿主细胞可以通过自噬将病毒的蛋白质和核酸转移至溶酶体降解, 发挥异体吞噬作用来抵抗病毒感染^[17]。本研究的 GO 分析富集到与蛋白质降解功能相关的泛素-蛋白酶体系统^[18]。泛素-蛋白酶体系统是细胞内蛋白质降解的主要途径, 参与细胞内 80% 以上蛋白质的降解^[19]。我们推测 RD 细胞也会通过异体吞噬作用来抵抗 CV-A10 的感染。有研究发现细菌也是采用与人类细胞相似的方式, 通过泛素转移酶启动抗病毒免疫反应^[20]。泛素作为一种普遍的识别信号参与蛋白质降解和抗病毒免疫反应。

MAPK 信号通路作为细胞信号传导的主要途径, 参与细胞的生长、分化、对环境的应激适应、炎症反应等多种生理或病理过程。肠道病毒感染引起的炎症反应及病毒复制与 JNK/SAPK 和 p38 MAPK 的活化相关^[21]。有研究报道, JNK/SAPK 和 p38 MAPK 抑制剂可以抑制 EV-A71 的复制, 表明 JNK/SAPK 和 p38 MAPK 信号通路的激活促进了 EV-A71 的感染^[22]。本研究通过 KEGG 通路分析富集到了 MAPK 信号通路, 且 MAPK 信号通路中上调的差异表达基因数在 20 个以上, 提示 CV-A10 感染 RD 细胞的过程中激活了 MAPK 信号通路, MAPK 信号通路被激活后促进了 CV-A10 的复制过程。

一般来说, 干扰素信号通路是天然免疫的主要组成部分, 在病毒入侵宿主时被激活从而发挥保护作用^[22], 但本研究中并没有富集到干扰素信号通路。Lei 等发现 EV-A71 感染时可以通过多种途径抑制 IFN 的产生来达到免疫逃逸的目的^[23]。因此, 我们推测 CV-A10 在感染 RD 细胞的过程中, 通过抑制 IFN 的产生来达到免疫逃逸的目的。

尽管肠道病毒引起的手足口病已在 2008 年被我国列为丙类传染病, 其感染率长期居于前三, 给公共卫生安全带来威胁, 但目前研究发现部分肠道病

毒因其对人体的低毒性、靶向性及复制周期短等特性,具有作为溶瘤病毒发挥特异性杀伤肿瘤细胞的作用,如 CV-A21^[24]、CV-B3^[25]等,说明肠道病毒可以作为一种有价值的生物研究资源,在肿瘤治疗中具有重要应用价值。

4 结 论

本研究主要讨论了 CV-A10 感染 RD 细胞过程中, RD 细胞抵抗病毒感染的可能方式以及 CV-A10 实现免疫逃逸的几种途径,加深了对 CV-A10 感染致病机制的理解。但本研究仍缺乏具体实验来对关键基因或通路进行验证和探索,下一步将对自噬过程中的具体基因加以验证,深入探索 CV-A10 免疫逃逸与宿主细胞自噬之间的联系。

参考文献

- [1] Chakraborty S, Mohapatra R K, Chandran D, *et al.* Hand-foot-and-mouth disease (HFMD) in children. Current scenario, and advancements in developing vaccines and therapeutics: an update - correspondence [J]. *Int J Surg*, 2022, 105: 106834.
- [2] Qi H, Li Y, Zhang J, *et al.* Quantifying the risk of hand, foot, and mouth disease (HFMD) attributable to meteorological factors in East China: a time series modelling study [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 728: 138548.
- [3] He Y Q, Chen L, Xu W B, *et al.* Emergence, circulation, and spatiotemporal phylogenetic analysis of coxsackievirus a6-and coxsackievirus A10-associated hand, foot, and mouth disease infections from 2008 to 2012 in Shenzhen, China [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(11): 3560-3566.
- [4] Song C, Li Y, Zhou Y, *et al.* Enterovirus genomic load and disease severity among children hospitalised with hand, foot and mouth disease [J]. *Ebiomedicine*, 2020; 62: 103078.
- [5] Nhan L N T, Khanh T H, Hong N T T, *et al.* Clinical, etiological and epidemiological investigations of hand, foot and mouth disease in southern Vietnam during 2015-2018 [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2020, 14(8): e0008544.
- [6] Wang M, Chen T, Peng J, *et al.* The spatial-temporal distribution and etiological characteristics of hand-foot-and-mouth disease before and after EV-A71 vaccination in Kunming, China, 2017-2020 [J]. *Sci Rep*, 2022, 12 (1): 17028.
- [7] Duan S, Yang F, Li Y, *et al.* Pathogenic analysis of coxsackievirus A10 in rhesus macaques [J]. *Virol Sin*, 2022, 37(4): 610-618.
- [8] Fang C Y, Liu C C. Recent development of enterovirus A vaccine candidates for the prevention of hand, foot, and mouth disease [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2018, 17 (9): 819-831.
- [9] Liou A T, Wu S Y, Liao C C, *et al.* A new animal model containing human SCARB2 and lacking stat-1 is highly susceptible to EV71 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31151.
- [10] Ratnasiri K, Wilk A J, Lee M J, *et al.* Single-cell RNA-seq methods to interrogate virus-host interactions [J]. *Semin Immunopathol*, 2023, 45(1): 71-89.
- [11] Song J, Jiang X, Hu Y, *et al.* High-throughput sequencing of putative novel microRNAs in rhesus monkey peripheral blood mononuclear cells following EV71 and CA16 infection [J]. *Intervirology*, 2018, 61(3): 133-142.
- [12] Li J, Yang Z, Wang Z, *et al.* The surveillance of the epidemiological and serotype characteristics of hand, foot, mouth disease in Neijiang city, China, 2010-2017: a retrospective study [J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0217474.
- [13] Xie M Z, Chen L Y, Yang Y N, *et al.* Molecular epidemiology of herpangina children in Tongzhou district, Beijing, China, during 2019-2020 [J]. *Front Med(Lausanne)*, 2022, 9: 822796.
- [14] 程凯, 曹丽, 张鑫艳, *et al.* 基于转录组测序的 EV71 感染 RD 细胞的基因表达变化研究 [J]. *天津医药*, 2020, 48(8): 689-694.
- Cheng K, Cao L, Zhang X Y, *et al.* Transcriptome sequencing based gene expression changes in EV71 infected RD cells [J]. *Tianjin Pharmaceutical*, 2020, 48(8): 689-694
- [15] Peng W, Chen J, He R, *et al.* ID2 inhibits lung adenocarcinoma cell malignant behaviors by inhibiting the activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Tissue Cell*, 2022, 79: 101950.
- [16] Wu X C, Ma J R, Jia S D, *et al.* High concentration of FBS can save mTOR down-regulation caused by *Mycoplasma bovis* infection [J]. *Vet Sci*, 2022, 9(11): 630.
- [17] Hao T, Li Y, Fan S, *et al.* Design, synthesis and pharmacological evaluation of a novel mTOR-targeted anti-EV71 agent [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 175: 172-186.
- [18] Al-Qusairi L, Basquin D, Roy A, *et al.* Renal tubular ubiquitin-protein ligase NEDD4-2 is required for renal adaptation during long-term potassium depletion [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(8): 2431-2442.
- [19] Cohen A, Rosenthal E, Shifman J M. Analysis of structural features contributing to weak affinities of ubiquitin/protein interactions [J]. *J Mol Biol*, 2017, 429 (22): 3353-3362.
- [20] Ledvina H E, Ye Q Z, Gu Y J, *et al.* An E1-E2 fusion protein primes antiviral immune signalling in bacteria [J]. *Nature*, 2023, 616(7956): 319-325.

- [21] Tung W H, Sun C C, Hsieh H L, *et al.* EV71 induces VCAM-1 expression via PDGF receptor, PI₃-K/Akt, p38 MAPK, JNK and NF- κ B in vascular smooth muscle cells [J]. *Cell Signal*, 2007, 19(10): 2127-2137.
- [22] Zhu L, Li W, Qi G, *et al.* 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]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(5): 2263-2266.
- [23] Lei X, Xiao X, Xue Q, *et al.* Cleavage of interferon regulatory factor 7 by enterovirus 71 3C suppresses cellular responses [J]. *J Virol*, 2013, 87(3): 1690-1698.
- (编辑: 张丽红)