

DOI:10.13350/j.cjpb.220204

• 论著 •

糖代谢在肠道病毒 EV71 复制中的作用研究*

杨秀文¹, 陆剑云², 卢紫欣¹, 陈嘉仪¹, 郭彦彤¹, 梁羽芃¹, 王佳颐¹, 朱利^{1**}, 张宝^{1***}

(1. 南方医科大学公共卫生学院三级生物安全实验室, 广东广州 510515; 2. 广东省广州市疾病预防控制中心)

【摘要】 目的 研究细胞内糖代谢对 EV71 病毒复制的影响。方法 用 MOI=100 的 EV71 感染 HUVECs, 观察 HUVECs 在 4 h、8 h 和 12 h 时存活率和 EV71 复制水平变化, 确定 EV71 复制峰值时间点。用不含糖的 DMEM 培养基培养感染 EV71 的 HUVECs 4 h、8 h 和 12 h, 检测 EV71 的 RNA 和蛋白水平改变。在 EV71 复制峰值时间点使用糖代谢抑制剂 KAN0438757 干扰糖代谢途径, 检测 EV71 复制的改变; 采用靶向代谢组学技术检测 EV71 感染或 KAN0438757 处理 HUVEC 后糖代谢关键代谢产物丙酮酸的含量变化。结果 用 MOI=100 的 EV71 感染 HUVECs 8 h 和 12 h 后, EV71 mRNA 分别为 4 h 的 123.8 倍和 298.9 倍 (均 $P < 0.05$); 在感染后 4 h、8 h、12 h 细胞存活率为对照组的 81%、66% 和 48% (均 $P < 0.05$); 感染后 12 h, 细胞内的丙酮酸含量明显降低 ($P < 0.05$)。糖代谢抑制剂 KAN0438757 处理 HUVECs 后丙酮酸含量降低 ($P < 0.05$), 糖代谢水平受到抑制, EV71 复制受到抑制 ($P < 0.05$)。感染 EV71 的 HUVECs 使用不含糖的 DMEM 培养基培养 4 h、8 h 和 12 h, 相同时间点的 EV71 复制水平低于含糖细胞培养组 ($P < 0.05$)。结论 EV71 病毒感染 HUVECs 后利用 HUVECs 内糖代谢提供的能量促进自身的复制, 抑制 HUVECs 内糖代谢水平可抑制 EV71 的复制。

【关键词】 糖代谢; EV71; 丙酮酸

【中图分类号】 R373.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)02-0143-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Feb;17(2):143-148.]

The role of glucose metabolism in the replication of enterovirus EV71

YANG Xiu-wen¹, LU Jian-yun², LU Zi-xin¹, CHEN Jia-yi¹, GUO Yan-tong¹, LIANG Yu-peng¹, WANG Jia-yi¹, ZHU Li¹, ZHANG Bao¹ (1. Biosafety Level 3 Laboratory, School of Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Guangzhou Center for Disease Control and Prevention)

【Abstract】 **Objective** Effect of intracellular glucose metabolism on EV71 virus replication. **Methods** HUVECs were infected with EV71 with MOI=100. The changes of survival rate and EV71 replication level of HUVECs at 4 h, 8 h and 12 h were observed to determine the peak time point of EV71 replication. HUVECs infected with EV71 were cultured in sugar free DMEM medium for 4 h, 8 h and 12 h, and the changes of RNA and protein levels of EV71 were detected. At the peak time point of EV71 replication, the glucose metabolism inhibitor KAN0438757 was used to interfere with the glucose metabolism pathway and detect the changes of EV71 replication; The changes of pyruvate, a key metabolite of glucose metabolism, after EV71 infection or KAN0438757 treatment of HUVEC were detected by targeted metabolomics. **Results** After HUVECs were infected with EV71 with MOI=100 for 8 h and 12 h, EV71 mRNA was 123.8 times and 298.9 times higher than that at 4 h (all $P < 0.05$); The cell survival rates at 4 h, 8 h and 12 h after infection were 81%, 66% and 48% of those in the control group (all $P < 0.05$); The level of pyruvate in cells decreased significantly at 12 h after EV71 infection ($P < 0.05$). The level of pyruvate decreased ($P < 0.05$), the level of glucose metabolism was inhibited and the replication of EV71 was inhibited ($P < 0.05$) after treatment of HUVECs with KAN0438757. HUVECs infected with EV71 were cultured in sugar free DMEM medium for 4 h, 8 h and 12 h. The replication level of EV71 at the same time point was lower than that in sugar containing cell culture group ($P < 0.05$). **Conclusion** After EV71 virus infects HUVECs, it uses the energy provided by glucose metabolism in HUVECs to promote its own replication. Inhibiting the level of glucose metabolism in HUVECs can inhibit EV71 replication.

【Key words】 glucose metabolism; EV71; pyruvic acid

*** 肠道病毒 71 (EV71) 属于小核糖核酸病毒科, 肠道病毒属, 颗粒无包膜, 呈二十面体结构, 由 4 种结构蛋白和 7 种非结构蛋白及一条单股正链 RNA 组成。EV71 是导致手足口病的重要病原体之一, 可通过患者的粪便、呼吸道飞沫和唾液等方式传播, 主要感染 5

* **【基金项目】** 广东省自然科学基金项目 (No. 2018A030313767)。

** **【通讯作者】** 张宝, E-mail: zhang20051005@126.com; 朱利, E-mail: zhuli89@126.com

【作者简介】 杨秀文 (1993-), 男, 贵州人, 硕士。主要研究方向: 病原生物学。E-mail: 1192021392@qq.com

岁及以下儿童^[1]。EV71 感染导致的重症手足口病可引起中枢神经系统并发症,致死率极高。EV71 感染导致的手足口病曾在中国、马来西亚和新加坡等亚太国家流行^[2,3],其中,在中国大规模爆发期间造成许多人死亡^[4-5]。

病毒的复制与宿主代谢活动密切相关,大多数病毒会诱导宿主细胞代谢重编程以影响病毒复制。人类巨细胞病毒感染可上调宿主细胞内糖酵解、乳酸和脂肪酸水平,导致葡萄糖消耗增加,从而抑制病毒复制^[6-8]。流感病毒可使宿主细胞内糖酵解、脂肪酸生物合成、胆固醇代谢和核苷酸代谢发生显著改变^[9-10]。除此之外,乙型肝炎病毒^[11-12]或丙型肝炎病毒^[13-14]也可使宿主细胞内代谢过程发生明显变化。病毒除了引起宿主细胞整体代谢变化之外,还可特异性干扰糖代谢等途径。腺病毒 E4ORF1 的基因产物诱导腺病毒的宿主细胞葡萄糖代谢上调,激活 MYC 促进培养的上皮细胞的糖酵解,使原代肺上皮细胞中的腺病毒复制达到最佳^[15]。寨卡病毒感染人类细胞可增加三羧酸循环中的葡萄糖使用量,重编程宿主细胞中的葡萄糖代谢^[16]。葡萄糖可通过细胞自噬调节乙肝病毒转录和乙肝病毒复制的转录后步骤影响乙肝病毒的生命周期,乙肝病毒还可激活糖酵解代谢产物影响其在感染期间的聚集和线粒体定位^[17-18]。登革病毒的感染会增强糖酵解,从而促进病毒复制^[19]。新冠病毒在宿主细胞中的复制依赖于葡萄糖代谢的改变^[20]。研究表明病毒可操作宿主细胞内的糖代谢水平,糖代谢最重要的一个作用是为细胞内生化的反应提供能量。同时,在 EV71 的相关研究中也发现 EV71 感染的细胞内线粒体功能和氧化还原稳态发生显著改变^[21],而线粒体是细胞内能量代谢的核心场所,为能量的供应发挥重要作用。这意味着 EV71 可能促使宿主细胞内能量代谢的变化。

本研究主要通过观察 EV71 复制与 HUVECs 内糖代谢水平变化的关系,探究糖代谢对 EV71 复制的影响,揭示糖代谢在 EV71 复制中为其提供能量的重要作用,为病毒在细胞内的复制机制研究提供实验资料,为病毒的药物治疗提供新靶点。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 细胞和病毒 人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs),人横纹肌肉瘤细胞(RD 细胞)以及 EV71 病毒均由本实验室保存。

1.2 主要试剂 DMEM 高糖培养基,不含糖的 DMEM 培养基,胎牛血清(FBS)和胰酶购自美国 Gibco 公司;细胞内总 RNA 提取试剂,逆转录试剂盒及

SYBR Green 预混合型染料法实时荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TAKARA 公司;Bestar qPCR Master Mix Taqman Probe 探针法实时荧光定量试剂盒购自德国 DBI[®] Bioscience 公司;CCK8 试剂盒购自日本同仁公司;兔抗人 EV71 VP1 抗体购自美国 CST 公司;鼠抗人 β -actin 抗体购自 Proteintech(中国)公司;HRP-山羊抗鼠和山羊抗兔抗体以及 ECL 显色液购自美国 Bioworld 公司;PVDF 膜测试剂盒购自德国 Millipore 公司;KAN0438757 购于中国 Selleck 公司。

2 方法

2.1 细胞培养和病毒扩增 HUVECs 和 RD 细胞均用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基在 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。EV71 病毒用 RD 细胞进行扩大培养,并根据 TCID₅₀ 测定病毒的滴度。

2.2 细胞形态观察 HUVECs 感染或不感染 EV71 病毒条件下,置于倒置光学显微镜下使用 10 \times 物镜观察细胞形态学结构并拍照记录。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测目的基因 用苯酚氯仿抽提法提取细胞内总 RNA,测定浓度后取 1 μ g 逆转录成 cDNA,采用 Taqman 探针法检测 EV71 VP1 基因的相对表达量,采用 SYBR Green 染料法检测 GAPDH 基因的相对表达量,结果用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 计算各目的基因相对于 GAPDH 的倍数。引物、探针序列见表 1。

表 1 引物及探针
Table 1 Primers and probe

引物名称 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
EV71 F Primer	CCAGAAGAATTTTACCATGAAGTTGT
EV71 R Primer	AGGGCTCTGCTCATACTATC
GAPDH F Primer	CATCCTGGGCTACACTGAGC
GAPDH R Primer	AAAGTGGTCGTTGAGGGCAA
EV71 Probe	FAM-CAGACGGGCACTATACAGGGAG -BHQ1

2.4 Western blot 检测目的蛋白 HUVECs 分别铺于细胞培养皿中,进行不同的处理,用 4 °C 预冷的 PBS 润洗细胞 3 次,细胞刮轻轻将细胞刮下,转移到 2 ml 的离心管中。3 000 r/min 离心 1 min,弃上清。加入 RIPA 强裂解液,冰上裂解 10 min,4 °C、15 000 r/min 离心 10 min,取上清进行 SDS-PAGE 电泳,然后电转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h;加入 1% BSA 稀释的一抗,4 °C 摇床过夜,PBST 洗膜 3 次,每次 5 min;加入 PBST 稀释的相应二抗(1 : 10 000)孵育 1 h,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,显影后拍照保存。

2.5 CCK8 检测细胞存活率 将 HUVECs 接种于 96 孔板,加入 100 μ l/孔完全培养基,设置对照组和处理组。于检测前 2 h 加入 10 μ l/孔的 CCK8 溶液,混匀,继续培养 2 h,用酶标仪检测各孔在 450 nm 处的

吸光度(A)值。

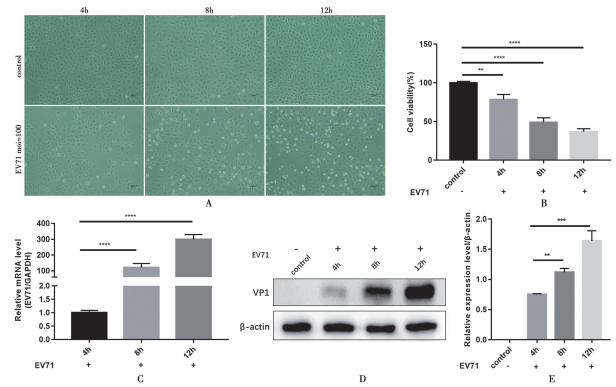
2.6 LC/MS/MS 代谢组学分析 将 10^6 个 HUVECs 接种在 10 cm 培养皿中,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 的恒温培养箱中培养。24 h 后,空白组继续使用 2% FBS 的 DMEM 培养, EV71 组用 $\text{MOI}=100$ 的 EV71 病毒感染 1 h, 然后换成 2% FBS 的 DMEM 培养, KAN0438757 组使用 $25\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 KAN0438757 培养。12 h 后除去培养基,用 PBS 洗涤细胞两次。在冰上用预冷至 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 的 80% 甲醇溶液刮细胞单层收集于 2 ml 的离心管,并以 $15\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min,保留上清液。提取物在氮气流下干燥并溶解在 $200\text{ }\mu\text{L}$ 0.1% 甲酸中, $15\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min,留取上清液,使用全自动在线样品纯化及液相系统(Prelude SPLC System)进行代谢组学分析。柱温和流速分别设置为 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 和 0.4 mL/min 。使用梯度曲线进行样品洗脱: $0-4.0\text{ min}$, $1\%-50\%\text{ B}$; $4.0-5.0\text{ min}$, $50\%-98\%\text{ B}$; $5.0-7.4\text{ min}$, $98\%\text{ B}$; $7.5-10.0\text{ min}$, $1\%\text{ B}$ (用于重新平衡)。溶剂 A 为 0.1% 甲酸水溶液,溶剂 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液。以正离子和负离子模式运行。扫描范围为 $50-990\text{ m/z}$ 。脱溶剂温度和气体流速分别设置为 $500\text{ }^\circ\text{C}$ 和 1000 L/h 。源温度为 $150\text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.7 统计学分析 采用 IBM SPSS 20 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,采用 Graphpad Prim 7 软件作图。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 高浓度的 EV71 感染 HUVECs 情况

EV71 是高度嗜神经病毒,可感染血脑屏障的内皮细胞并破坏其完整性,最终进入中枢神经系统,导致患者出现严重的中枢神经系统并发症^[22]。EV71 以 $\text{MOI}=100$ 感染 HUVECs,分别在感染后 4、8 和 12 h 时观察细胞形态学变化,检测细胞的存活率和病毒的复制水平。结果显示, EV71 感染细胞后,随着时间的增加细胞死亡数量增加;在感染后 4、8 和 12 h 时细胞存活率为对照组的 81% 、 66% 和 48% ,差异具有统计学意义(均 $P<0.05$);在感染后 12 h 时,细胞存活率最低(图 1A, 1B)。EV71 mRNA 在感染后 8 h 和 12 h 分别为对照组 4 h 的 123.8 倍和 298.9 倍,差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。随时间的增加, EV71 mRNA 表达增加(图 1C)。Western blot 显示,随时间增加, VP1 表达增加(图 1D, 1E)。提示高浓度的 ($\text{MOI}=100$) EV71 感染 HUVECs,可在感染后 4、8 和 12 h 内复制增加。表明 $\text{MOI}=100$ 的 EV71 可感染 HUVECs 并在短时间内大量复制,复制与细胞存活状态呈现负相关(均 $P<0.05$)。



A 感染或未感染 EV71 后细胞形态学图片($\times 100$) B EV71 感染后细胞存活率 C EV71 mRNA 表达水平 D VP1 蛋白表达水平 E VP1 蛋白表达定量计算

图 1 高浓度 EV71 感染在短时间的内复制增加

A Cell morphology after EV71 infection or non infection($\times 100$)
B Cell survival rate after EV71 infection C EV71 mRNA expression level D VP1 protein expression level E VP1 protein expression quantitative calculation

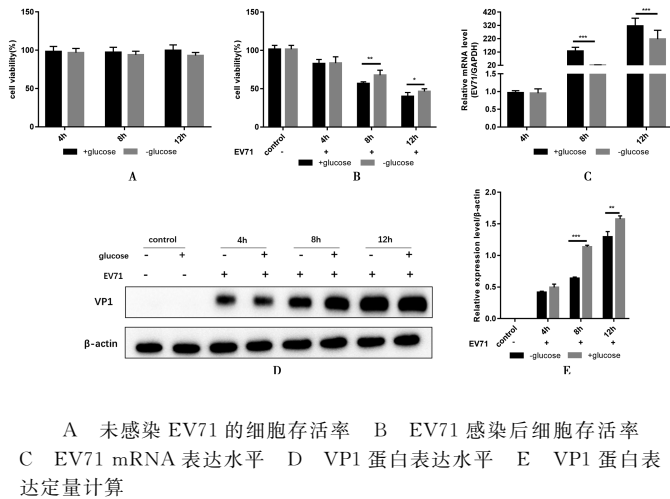
Fig. 1 High concentrations of EV71 infection can replicate in a short time

2 去除外源性葡萄糖供给对 EV71 复制的抑制作用

糖代谢作为生命体新陈代谢的主要能量来源,葡萄糖的糖酵解和 TCA 为生命体提供大量的能量^[23]。由此推测高浓度的 EV71 在短时间内的复制与糖代谢相关。为了探索糖代谢为 EV71 的复制提供所需要的能量,使用含糖和不含糖的 DMEM 培养基对细胞进行培养,观察 EV71 的复制变化。将 HUVECs 接种于 12 孔板,待细胞贴壁后分别使用不含糖和含糖的 DMEM 培养 12 h,然后用 $\text{MOI}=100$ 的 EV71 感染 HUVECs,分别在感染后 4、8、12 h 检测细胞的存活和病毒复制水平。

结果显示,未感染 EV71 时,在含糖和不含糖的 DMEM 培养条件下细胞存活率差异均无统计学意义(图 2A);EV71 感染细胞后,随着时间的增加含糖与不含糖组细胞死亡均增加,在相同时间点不同处理组之间细胞存活率差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),在 8 h 和 12 h 时不含糖组的细胞存活率显著高于含糖组(图 2B)。含糖组和不含糖组的 EV71 mRNA 表达量均随时间的增加而增加(均 $P<0.05$)。4 h 时含糖与不含糖组的 EV71 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);在 8 h 和 12 h,含糖与不含糖组的 EV71 mRNA 表达水平差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),不含糖组的 EV71 mRNA 表达水平显著低于同时间点的含糖组(图 2C)。Western blot 检测显示,含糖和不含糖组的 EV71 VP1 蛋白表达水平均增加,但在相同时间点时含糖组的 VP1 蛋白表达量均高于不含糖组(均 $P<0.05$)(图 2D, 2E)。提示去除外源性葡萄糖的供给可抑制 EV71 的复制,糖代谢可能为

EV71 的复制提供能量,从而促进 EV71 的复制。



A 未感染 EV71 的细胞存活率 B EV71 感染后细胞存活率
C EV71 mRNA 表达水平 D VP1 蛋白表达水平 E VP1 蛋白表达定量计算

图 2 EV71 复制的葡萄糖代谢依赖

A Cell survival rate without EV71 infection B Cell survival rate after EV71 infection C EV71 mRNA expression level D VP1 protein expression level E VP1 protein expression quantitative calculation

Fig. 2 The replication of EV71 depends on glucose metabolism

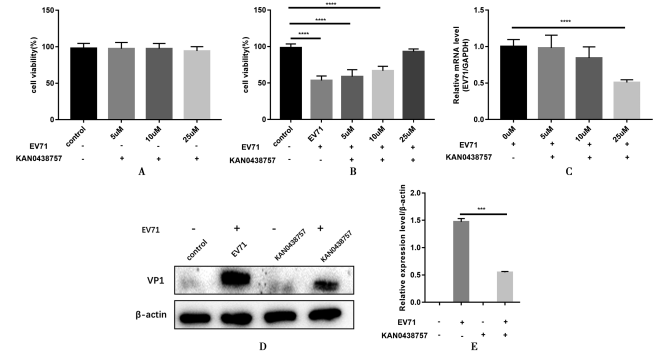
3 葡萄糖代谢在 EV71 复制中的作用

PFKFB3 是糖酵解的限速酶,可将 F6P 转化为 F2,6-BP。KAN0438757 是糖酵解 PFKFB3 的抑制剂,KAN0438757 可通过抑制 PFKFB3 的活性从而抑制糖酵解的过程^[24-25]。应用 KAN0438757 抑制细胞内糖酵解,并观察 EV71 的复制水平变化。分别使用 5、10、25 μmol/L 的 KAN0438757 预处理 HUVECs 12 h 后,用 MOI=100 的 EV71 感染 HUVECs,并在感染 EV71 的细胞中加入 KAN0438757 继续培养 12 h,检测细胞的存活率和病毒复制水平。结果显示,KAN0438757 处理 HUVECs 12 h,各药物浓度下细胞存活率差异均无统计学(均 $P > 0.05$) (图 3A),表明设计的药物浓度无细胞毒性。KAN0438757 与 EV71 共同加入培养后,在 5、10、25 μmol/L 的 KAN0438757 浓度下细胞存活率分别为对照组的 58%、67%和 94%,随药物浓度增加细胞的存活率增加,且呈现出浓度依赖关系(均 $P < 0.05$) (图 3B)。在 5、10、25 μmol/L 的 KAN0438757 浓度下,EV71 mRNA 表达水平分别为对照组的 98%、84%和 51%,EV71 mRNA 水平随药物浓度的增加而降低(图 3C)。Western blot 检测显示,KAN0438757 可显著抑制 VP1 的表达 ($P < 0.05$) (图 3D, 3E)。表明 KAN0438757 处理细胞可抑制 EV71 的复制。提示糖代谢参与 EV71 的复制过程。

4 丙酮酸含量检测

为进一步确定糖代谢在 EV71 复制中的作用,应用 LC/MS/MS 检测 EV71 感染后 HUVECs 内丙酮酸含量的变化,探索 KAN0438757 处理 HUVECs 后

细胞内丙酮酸含量的变化。建立标准曲线(图 4A),根据标准曲线求出不同处理组细胞内丙酮酸含量。结果显示,EV71 感染 12 h 后,HUVECs 内的丙酮酸是对照组含量的 58%,KAN0438757 含量是对照组的 34%,差异均具有统计学意义(图 4B)。提示 EV71 的复制可使 HUVECs 内丙酮酸减少,KAN0438757 可通过抑制 PFKFB3 活性减少细胞内丙酮酸的含量,从而抑制糖代谢。



A KAN0438757 处理后的细胞存活率 B EV71 感染后细胞存活率 C EV71 mRNA 表达水平 D VP1 蛋白表达水平 E VP1 蛋白表达定量计算

图 3 KAN0438757 对 EV71 复制的抑制作用

A Cell survival rate after KAN0438757 treatment B Cell survival rate after EV71 infection C EV71 mRNA expression level D VP1 protein expression level E VP1 protein expression quantitative calculation

Fig. 3 Inhibitory effect of KAN0438757 on EV71 replication

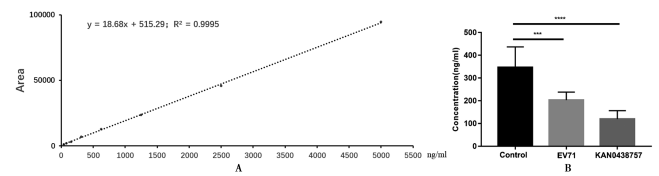


图 4 EV71 的复制及 KAN0438757 抑制丙酮酸表达作用
Fig. 4 EV71's replication and KAN0438757 in hibits pyruvate expression

讨论

EV71 是引起手足口病的病原体,在亚太地区的儿童中可反复引起流行。最近,越来越多的研究表明,病毒可以操纵宿主细胞代谢而有利于自身的复制,如柯萨奇病毒^[26],人类巨细胞病毒^[27]和腺病毒^[28]。在 EV71 的相关研究中发现,EV71 的复制受到细胞内葡萄糖水平和糖代谢相关酶的影响。在我国的手足口病病例中,EV71 感染的患者血糖水平和高血糖的患病率随手足口病的严重程度而增加^[29]。葡萄糖 G6PD 缺陷细胞对病毒感染高度敏感,敲低 G6PD 的细胞肠道病毒基因的表达受抑制^[30-31]。ARRDC4 在葡萄糖代谢和 G 蛋白偶联受体(GPCR)相关的生理和病理过程中具有重要作用,并在手足口病患者中发现

ARRDC4 表达增加^[32]。然而,糖代谢在 EV71 复制中的作用知之甚少。

许多病毒的复制和组装都发生在“病毒复制工厂”中,细胞膜和细胞骨架参与该结构的生物发生,在该结构中还发现了大量线粒体的存在,该结构为病毒的复制和组装提供必须的能量^[33]。因此,细胞内的充足能量供应为这种高感染复数病毒短时间内能大量复制提供了能量基础。葡萄糖是细胞内各种耗能生物反应的主要碳源,其分解代谢是细胞的重要供能来源和保障^[23]。

为了探索糖代谢是否为 EV71 的复制提供必要的能量,本研究使用不含糖的 DMEM 培养基培养细胞并分别于感染病毒 4、8、12 h 检测 EV71 的复制水平,结果发现在 8 h 和 12 h 时不含糖的 DMEM 组 EV71 的复制水平显著低于含糖 DMEM 组。为进一步确定糖代谢在 EV71 复制中提供必要的能量从而促进 EV71 的复制,采用化学药物和靶向代谢组学试验进一步明确 KAN0438757 可以通过抑制 PFKFB3 活性进而抑制糖分解代谢,结果表明 KAN0438757 可浓度依赖抑制 EV71 的复制。为了验证 KAN0438757 可抑制糖酵解过程,选取糖酵解中的关键代谢产物丙酮酸作为研究对象,使用靶向代谢组学技术检测了在 EV71 感染和 KAN0438757 处理的条件下细胞内丙酮酸含量的变化,结果显示在 EV71 感染或 KAN0438757 处理 12 h 后,细胞内的丙酮酸含量均出降低。进一步确定糖代谢在病毒复制中有重要作用。

综上所述,药物抑制葡萄糖的代谢和去除外源性葡萄糖的供应, EV71 的复制受到抑制,说明糖代谢在 EV71 复制中具有重要作用,为手足口病的药物治疗提供了新靶点。

【参考文献】

- [1] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71 [J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11):778-790.
- [2] Yang F, Ren L, Xiong Z, Li J, et al. Enterovirus 71 outbreak in the People's Republic of China in 2008 [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(7):2351-2352.
- [3] Weng KF, Chen LL, Huang PN, et al. Neural pathogenesis of enterovirus 71 infection [J]. *Microbes Infect*, 2010, 12(7):505-510.
- [4] Yang F, Zhang T, Hu Y, et al. Survey of enterovirus infections from hand, foot and mouth disease outbreak in China, 2009 [J]. *Virology*, 2011(8):508.
- [5] Mao LX, Wu B, Bao WX, et al. Epidemiology of hand, foot, and mouth disease and genotype characterization of Enterovirus 71 in Jiangsu, China [J]. *J Clin Virol*, 2010, 49(2):100-104.
- [6] Munger J, Bajad SU, Collier HA, et al. Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection [J]. *PLoS Pathog*, 2006, 2(12):e132.
- [7] Ripoli M, D'aprile A, Quarato G, et al. Hepatitis C virus-linked mitochondrial dysfunction promotes hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated glycolytic adaptation [J]. *J Virol*, 2010, 84(1):647-660.
- [8] Vysochan A, Sengupta A, Weljie AM, et al. ACS2-mediated acetyl-CoA synthesis from acetate is necessary for human cytomegalovirus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(8):E1528-e35.
- [9] Lin S, Liu N, Yang Z, et al. GC/MS-based metabolomics reveals fatty acid biosynthesis and cholesterol metabolism in cell lines infected with influenza A virus [J]. *Talanta*, 2010, 83(1):262-268.
- [10] Smallwood HS, Duan S, Morfouace M, et al. Targeting metabolic reprogramming by influenza infection for therapeutic intervention [J]. *Cell Rep*, 2017, 19(8):1640-1653.
- [11] Rodgers MA, Saghatelian A, Yang PL. Identification of an overabundant cholesterol precursor in hepatitis B virus replicating cells by untargeted lipid metabolite profiling [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(14):5030-5031.
- [12] Li H, Zhu W, Zhang L, et al. The metabolic responses to hepatitis B virus infection shed new light on pathogenesis and targets for treatment [J]. *Sci Rep*, 2015(5):8421.
- [13] Roe B, Kensicki E, Mohney R, et al. Metabolomic profile of hepatitis C virus-infected hepatocytes [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8):e23641.
- [14] Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, et al. Prominent steatosis with hypermetabolism of the cell line permissive for years of infection with hepatitis C virus [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4):e94460.
- [15] Thai M, Graham NA, Braas D, et al. Adenovirus E4ORF1-induced MYC activation promotes host cell anabolic glucose metabolism and virus replication [J]. *Cell Metab*, 2014, 19(4):694-701.
- [16] Thaker SK, Chapa T, Garcia G, et al. Differential metabolic reprogramming by Zika virus promotes cell death in human versus mosquito cells [J]. *Cell Metab*, 2019, 29(5):1206-16. e4.
- [17] Wang X, Lin Y, Kemper T, et al. AMPK and Akt/mTOR signalling pathways participate in glucose-mediated regulation of hepatitis B virus replication and cellular autophagy [J]. *Cell Microbiol*, 2020, 22(2):e13131.
- [18] Zhou L, He R, Fang P, et al. Hepatitis B virus rigs the cellular metabolome to avoid innate immune recognition [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):98.
- [19] Lee YR, Wu SY, Chen RY, et al. Regulation of autophagy, glucose uptake, and glycolysis under dengue virus infection [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020, 36(11):911-919.
- [20] Icard P, Lincet H, Wu Z, et al. The key role of Warburg effect in SARS-CoV-2 replication and associated inflammatory response [J]. *Biochimie*, 2021(180):169-177.
- [21] Cheng ML, Weng SF, Kuo CH, et al. Enterovirus 71 induces mitochondrial reactive oxygen species generation that is required for efficient replication [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e113234.
- [22] Ong KC, Wong KT. Understanding enterovirus 71 neuropathogenesis and its impact on other neurotropic enteroviruses [J].

Brain Pathol, 2015, 25(5):614-624.

[23] Mulukutla BC, Yongky A, Le T, et al. Regulation of glucose metabolism-a perspective from cell bioprocessing [J]. Trends Biotechnol, 2016, 34(8):638-651.

[24] Gustafsson NMS, F rneg rdh K, Bonagas N, et al. Targeting PFKFB3 radiosensitizes cancer cells and suppresses homologous recombination [J]. Nat Commun, 2018, 9(1):3872.

[25] De oliveira T, Goldhardt T, Edelmann M, et al. Effects of the novel PFKFB3 inhibitor KAN0438757 on colorectal cancer cells and its systemic toxicity evaluation *In vivo* [J]. Cancers, 2021, 13(5): 205-209.

[26] Burke JD, Platanius C, Fish EN. Beta interferon regulation of glucose metabolism is PI3K/Akt dependent and important for antiviral activity against coxsackievirus B3 [J]. J Virol, 2014, 88(6):3485-3495.

[27] Mcardle J, Moorman NJ, Munger J. HCMV targets the metabolic stress response through activation of AMPK whose activity is important for viral replication [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(1): e1002502.

[28] Prusinkiewicz MA, Mymryk JS. Metabolic reprogramming of the host cell by human adenovirus infection [J]. Viruses, 2019, 11(2): 230-238.

[29] Li Y, Zhu R, Qian Y, et al. The characteristics of blood glucose and WBC counts in peripheral blood of cases of hand foot and mouth disease in China; a systematic review [J]. PLoS One, 2012, 7(1):e29003.

[30] Wu YH, Chiu DT, Lin HR, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase enhances antiviral response through downregulation of NADPH sensor HSCARG and upregulation of NF-κB signaling [J]. Viruses, 2015, 7(12):6689-6706.

[31] Ho HY, Cheng L, Weng SF, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency enhances enterovirus 71 infection [J]. J Gen Virol, 2008, 89(Pt 9):2080-2089.

[32] Meng J, Yao Z, He Y, et al. ARRDC4 regulates enterovirus 71-induced innate immune response by promoting K63 polyubiquitination of MDA5 through TRIM65 [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(6):e2866.

[33] De castro IF, Volonte L, Risco C. Virus factories; biogenesis and structural design [J]. Cell Microbiol, 2013, 15(1):24-34.

【收稿日期】 2021-12-23 【修回日期】 2022-02-14

(上接 142 页)

[61] Shen Y, Xu W, Li C, et al. A Cluster of novel coronavirus disease 2019 infections indicating person-to-person transmission among casual contacts from social gatherings; an outbreak case-contact investigation [J]. Open Forum Infect Dis, 2020, 7(6): ofaa231.

[62] Bernadou A, Bouges S, Catroux M, et al. High impact of COVID-19 outbreak in a nursing home in the Nouvelle-Aquitaine region, France, March to April 2020 [J]. BMC Infect Dis, 2021, 21(1): 198.

[63] 张 晓, 黄 勇, 李 科, 等. 一起娱乐场所共同暴露引起的外籍人员新型冠状病毒肺炎聚集性疫情的传播特征分析 [J]. 医学动物防制, 2021, 37(8):814-817.

[64] Madewell ZJ, Yang Y, Longini IM, et al. Household transmission of SARS-CoV-2; a systematic review and meta-analysis [J]. JAMA Netw Open, 2020, 3(12):e2031756.

[65] Ministry of Health, Labour, and Welfare. Avoid the “Three Cs”! [EB/OL]. <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000619576.pdf>.

[66] 王 姣, 王 先 良, 叶 丹, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情期间公共场所卫生防控措施 [J]. 环境卫生学杂志, 2020, 10(4):410-413.

[67] Ong SWX, Tan YK, Chia PY, et al. Air, Surface environmental, and personal protective equipment contamination by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from a symptomatic patient [J]. Jama, 2020, 323(16):1610-1612.

[68] Hellewell J, Abbott S, Gimma A, et al. Feasibility of controlling COVID-19 outbreaks by isolation of cases and contacts [J]. Lancet Glob Health, 2020, 8(4):e488-e496.

[69] Atzrodt CL, Maknoja I, Mccarthy RDP, et al. A Guide to COVID-19; a global pandemic caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2 [J]. FEBS J, 2020, 287(17):3633-3650.

[70] Black JRM, Bailey C, Przewrocka J, et al. COVID-19; the case for health-care worker screening to prevent hospital transmission [J]. Lancet, 2020, 395(10234):1418-1420.

[71] CDC expands definition of who is a ‘close contact’ of an individual with covid-19 [EB/OL]. <https://www.washingtonpost.com/health/2020/10/21/coronavirus-close-contact-cdc/>.

【收稿日期】 2021-11-23 【修回日期】 2022-02-11