

EV71 感染人胶质瘤细胞 U251 蛋白质组学特征分析

文娟^{1,2,3},熊明霞^{1,2},刘正芸^{1,2},王欢^{1,2}
(遵义医科大学,1. 贵州省普通高等学校传染病与生物安全特色重点实验室;2. 基础医学院生命科学研究院,贵州 遵义 563000;3. 陆军军医大学附属第一医院麻醉科,重庆 400038)

【摘要】目的: 基于蛋白质组学技术,分析 EV71 感染人胶质瘤细胞系 U251 的蛋白表达谱变化,探讨 EV71 感染导致 U251 细胞病变的潜在分子特征。**方法:** 将 MOI=0.1 的 EV71 病毒接种于人胶质瘤细胞系 U251,构建体外感染模型。采用光学显微镜观察细胞病变效应(CPE);CCK-8 法检测细胞增殖活力;Western blot 和免疫荧光检测病毒衣壳蛋白 VP1 表达;基于高通量蛋白组学技术分析细胞差异蛋白表达谱。**结果:** EV71 感染 U251 细胞后呈现典型 CPE;细胞增殖能力降低,存活率明显下降;Western blot 和免疫荧光显示 EV71 感染后 VP1 蛋白表达高于对照组;蛋白质组学鉴定到 6 326 个蛋白质,其中 103 个表达上调;106 个表达下调。GO 功能和 KEGG 通路富集分析表明,差异蛋白主要富集于溶酶体通路(下调)、抗原处理和呈递(下调)及代谢通路(上调)。**结论:** EV71 感染改变了 U251 细胞的蛋白表达谱,其机制可能与抑制溶酶体和抗原呈递功能,以及激活细胞代谢等通路相关。

【关键词】 肠道病毒 71 型;人神经胶质瘤 U251 细胞;蛋白质组学

【中图分类号】 R373.2 **【文献标志码】** A

Proteomic analysis of EV71-infected human glioblastoma cells U251

WEN Juan^{1,2,3},XIONG Ming-xia^{1,2},LIU Zheng-yun^{1,2},WANG Huan^{1,2}
(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Infectious Diseases and Biosafety;2. School of Basic Medical Sciences, Institute of Life Sciences, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou;3. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China)

【Abstract】Objective: To analyze the proteomic profile changes in EV71-infected human glioblastoma U251 cells using proteomics technology, and to elucidate the potential molecular mechanisms underlying EV71-induced cytopathic effects. **Methods:** The EV71 virus with an MOI of 0.1 was inoculated into the human glioblastoma cell line U251 to establish an in vitro infection model. Cytopathic effects (CPE) were observed under an optical microscope, cell proliferation viability was assessed via CCK-8 assay, viral capsid protein VP1 expression was detected by Western blot and immunofluorescence, and high-throughput proteomics was employed to analyze differential protein expression profiles. **Results:** EV71 infection induced typical CPE in U251 cells, reduced proliferation and survival rates. Western blot and immunofluorescence confirmed elevated VP1 protein expression post-infection compared to controls. Proteomic analysis identified 6,326 proteins, with 103 upregulated and 106 downregulated. The GO function and KEGG pathway enrichment analyses indicated that the differentially expressed proteins were primarily enriched in the lysosome pathway (downregulated), antigen processing and presentation (downregulated), and metabolic pathways (upregulated). **Conclusion:** EV71 infection altered the proteome of U251 cells, with the underlying mechanisms possibly associated with the inhibition of lysosomal and antigen presentation functions, as well as the activation of cellular metabolic pathways.

【Key words】 Enterovirus 71; Human glioblastoma U251 cells; Proteomics

手足口病是儿童常见的肠道病毒感染性疾病,典型表现为手、足、口腔等部位的特征性皮疹或疱疹^[1]。多数病例呈自限性,但部分患儿可迅速进展为严重并发症,如无菌性脑膜脑炎、神经源性肺水肿和心肌炎,甚至导致死亡^[2]。其中,手足口病病原体

肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)因其显著的嗜神经性和高传染性备受关注^[3]。研究^[4-5]表明, EV71 可通过周围脊髓运动神经的逆行轴突运输或突破血脑屏障等侵袭中枢神经系统,但目前关于 EV71 通过影响宿主蛋白参与神经致病的过程仍需

深入探讨。

随着组学技术的发展,蛋白质组学已成为研究病毒-宿主相互作用的重要工具。该技术能够系统地揭示病毒感染后宿主细胞的蛋白质表达变化,为解析病毒感染过程提供新的研究视角。本研究以 EV71 感染的人胶质瘤细胞 U251 为模型,采用高通量蛋白质组学技术,通过定量比较感染组与对照组的蛋白质表达差异,结合生物信息学分析,全面鉴定 EV71 感染相关的差异表达蛋白及其功能特征。

1 材料与方法

1.1 材料

U251 细胞为本实验室保存,用含有 10% 的胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 完全培养基,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱内培养。所有涉及 EV71 实验均在贵州省普通高等学校传染病与生物安全特色重点实验室的二级生物安全实验室完成。

EV71 病毒株 (BrCr 株, ATCC-1775) 购自 ATCC 公司,抗 EV71-VP1 抗体鼠源单克隆抗体 (ab36367, Abcam) 用于免疫荧光检测,抗 EV71-VP1 兔源单克隆抗体 (华安生物定制) 用于 Western blot 分析, GAPDH Mouse mAb (AF0006) 和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (A0208) 购于碧云天, Alexa Fluor 594 标记山羊抗小鼠 IgG (D-9708) 购于博奥森。

1.2 方法

1.2.1 EV71 的增殖与滴度测定 采用 Vero 细胞对 EV71 进行扩增^[6],用 Reed-Muench 公式计算病毒液的 50% 细胞感染剂量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)。TCID₅₀ = (cytopathic effect, CPE) > 50% 病毒稀释度 + (CPE > 50% 的百分数 - 50) / (CPE > 50% 的百分数 - CPE < 50% 的百分数)。根据 TCID₅₀ 计算感染复数 (MOI)。MOI = 0.7 $\times$ TCID₅₀ $\times$ 病毒液体积 / 总细胞数,公式中病毒液体积单位为“mL”。

1.2.2 EV71 感染 U251 细胞 取对数生长期 U251 细胞接种于 24 孔板 (1.0 $\times$ 10⁵ 个/孔),细胞生长至 80% 以上时,弃培养液,用 PBS 洗 3 次。以 MOI = 0.1 的 EV71 感染 U251 细胞 (EV71 组),阴性对照组 (Ctrl 组) 加入 DMEM 培养基。每日观察并记录 CPE,连续 48 h。

1.2.3 CCK-8 (cell counting kit-8) 法测定细胞增殖 取对数生长期 U251 细胞接种于 96 孔板 (1 $\times$ 10⁴ 个/孔),待细胞长满单层,同时设空白对照组 (仅培养基) 和实验组 (EV71 组), MOI = 0.1 的

EV71 感染 U251 细胞 48 h,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,孵育 2 h,使用酶标仪在 450 nm 波长处测量吸光度。计算细胞存活率:存活率 (%) = (OD 对照组 - OD 空白组) / (OD 实验组 - OD 空白组) $\times$ 100%。

1.2.4 Western blot 检测 VP1 病毒蛋白的表达

收集方法 1.2.2 中的细胞,加入蛋白裂解液提取蛋白。BCA 法测蛋白浓度并定量,取 40 μ g 蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳分离,转印至 PVDF 膜。室温 5% BSA 封闭 2 h 后,加入一抗 VP1 (1:1 000) 和 GAPDH (1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗 5 min 5 次,加入二抗羊抗兔 (1:1 000),室温孵育 2 h, TBST 洗 5 min 5 次。使用 ECL 试剂在凝胶成像系统中曝光条带, Image J 软件扫描条带灰度值。

1.2.5 激光共聚焦显微镜检测 U251 细胞 VP1 蛋白的表达 取对数生长期的 U251 细胞接种于 24 孔板 (1 $\times$ 10⁵ 个/孔) 的爬片中培养 24 h,按 1.2.2 方法构建 EV71 感染 U251 细胞模型,弃培养基,4% 多聚甲醛固定 15 min,弃培养基, PBS 洗 3 min 3 次,10% 血清封闭 1 h,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育一抗 (VP1 1:1 000), PBS 洗 3 min 3 次,加入荧光标记二抗 (羊抗鼠, Alexa Fluor 594) 孵育 1 h, PBS 洗 3 min 3 次,加入 DAPI 染液避光染色 5 min, PBS 洗 3 min 3 次,防荧光淬灭封片剂封片,荧光倒置显微镜下观察。

1.2.6 高通量多通路蛋白质定量分析 取 1.2.2 的样本加入细胞裂解液,常温裂解 30 min,用 BCA 法测定蛋白浓度并定量。样本采用 LysC 和胰蛋白酶进行双重酶解并冻干处理,进行 TMT 标记与肽段分离,肽段经分离后注入 NSI 离子源电离, Q Exactive 质谱进行分析。使用 Maxquant (v1.6) 进行二级质谱数据检索, TMT-6PLEX 方法蛋白定量,确立各蛋白质的相对丰度和鉴定差异表达的蛋白质目标,分析差异表达蛋白并进行作图。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism6 软件进行数据分析并绘制图形。计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EV71 感染 U251 细胞模型的构建

图 1A 显示了 EV71 感染 U251 细胞模型示意图;光学显微镜下可见 EV71 感染的 U251 细胞出现变圆、皱缩、细胞间隙增大等典型 CPE 现象 (图 1B);CCK-8 法结果提示,与对照组相比, EV71 组细胞增殖能力降低,存活率明显下降 (图 1C);Western blot 和激光共聚焦显微镜检测均证实感染组细胞特异性表达 VP1 蛋白 (图 1D-F)。结果从细胞形态

学、增殖活力和病毒蛋白表达三个层面证实了 EV71 感染 U251 细胞的实验模型构建成功。

2.2 EV71 感染 U251 细胞蛋白质组学分析

为探究 EV71 感染 U251 细胞后的蛋白变化,提取 EV71 感染 U251 细胞蛋白行蛋白质组学筛选。共鉴定出 6 326 个蛋白,图 2A 显示主成分分析,其中有一对照组(Mock-3)的蛋白表达量整体偏低,故在后续分析中删除了该组数据,而其余 5 组蛋白样本相关性分析系数均在 0.92 以上,纳入后续差

异分析(图 2B)。在差异表达蛋白筛选中,设定显著性阈值($P \leq 0.05$)和表达变化阈值($|\log_2FC| > 1.2$)。如图 2C 所示,火山图显示差异表达蛋白的分布特征,位于左上和右上区域的点分别代表下调和上调的蛋白质。以 1.5 倍为变化, $P \leq 0.05$ 为筛选阈值,共筛选出 103 个蛋白上调,106 个蛋白下调(图 2D)。层次聚类分析显示,组内聚类效果良好,差异蛋白在不同组间表现出明显差异(图 2E)。结果提示:EV71 感染改变 U251 细胞蛋白质表达谱。

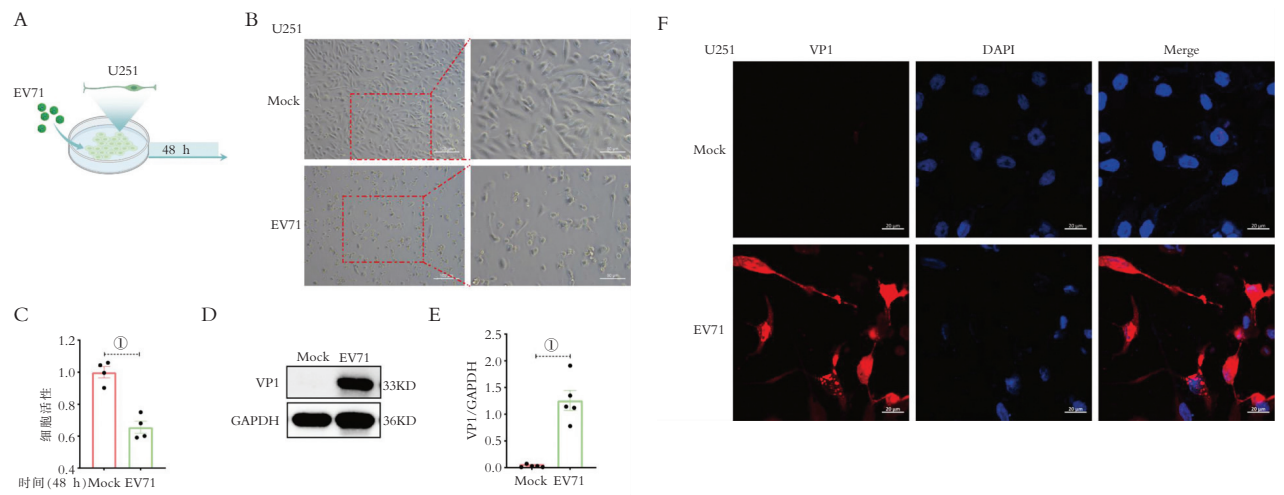


图 1 EV71 成功感染 U251 细胞

A. EV71 感染 U251 细胞流程示意图; B. 光学显微镜下观察 EV71 对 U251 细胞形态的影响 (标尺分别示 100 μm 和 50 μm); C. CCK-8 法检测 EV71 感染 U251 细胞后增殖活力及毒性结果; D. Western blot 检测 EV71 感染 U251 细胞后 VP1 蛋白的表达情况; E. 图 D 统计图; F. 激光共聚焦显微镜下观察 EV71 感染 U251 细胞后 VP1 蛋白表达情况(标尺示 20 μm)。① $P < 0.01$ 。

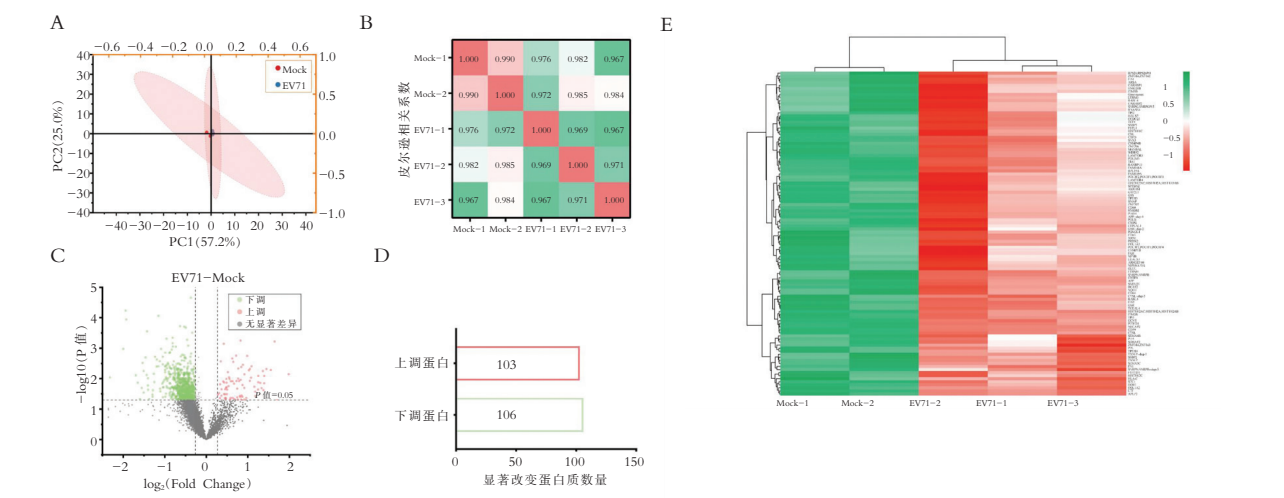


图 2 EV71 感染 U251 细胞蛋白表达差异分析

A. PCA 主成分分析,每个点代表一个样本,不同颜色分别代表不同组别; B. 不同实验组样品的 Pearson 相关系数分析,系数越接近-1 表示负相关,越接近 1 表示正相关,越接近 0 表示不相关; C. 差异表达蛋白火山图,红色表示上调蛋白,绿色表示下调蛋白,灰色表示非显著差异蛋白; D. 蛋白质定量差异结果柱状图,红色表示上调蛋白,绿色表示下调蛋白; E. 差异蛋白表达层次聚类分析,纵坐标为显著性差异表达的蛋白质,红色代表显著性上调,绿色代表显著性下调,白色代表无蛋白质定量信息。

2.3 差异蛋白的 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

GO 功能分析系统性地鉴定了差异表达蛋白相关生物过程、分子功能和细胞成分,筛选显著性排名前 15 的上调及下调 GO 功能绘制富集因子气泡图(图 3A-图 3B)。在生物过程方面,蛋白质水解和抗原加工呈递功能显著下调, RNA 聚合酶 II 介导的转录起始和 p38MAPK 信号通路显著下调;在细胞组分分析方面,溶酶体和细胞外泌体相关蛋白表达下调,核质和中介体复合物组分表达上调;在分子功能方面,蛋白质结合和 DNA 结合能力减弱,而 DNA 引导的 RNA 聚合酶活性增强。这些功能主要与病毒感染和神经退行性病变相关,溶酶体通路功能障碍可导致异常蛋白聚集和神经元代谢紊乱^[7], p38MAPK 异常可促进神经元凋亡^[8]。

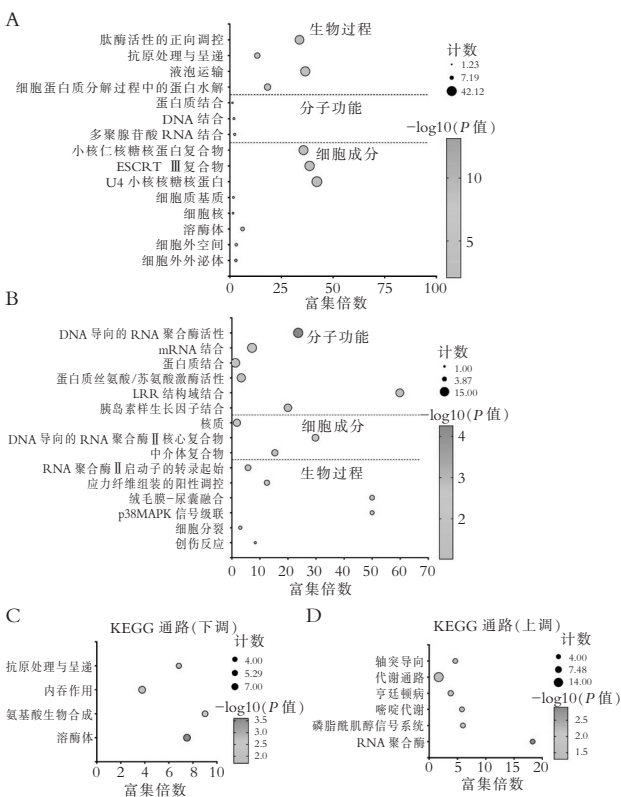


图 3 差异蛋白 GO 富集和 KEGG 富集通路分析

A. 下调蛋白 GO 富集图,纵轴为 P 值($P<0.05$)负对数转换; B. 上调蛋白 GO 富集图,纵轴为 P 值($P<0.05$)负对数转换; C. 下调蛋白 KEGG 富集通路图,纵轴为 P 值($P<0.05$)负对数转换; D. 上调蛋白 KEGG 富集通路图,纵轴为 P 值($P<0.05$)负对数转换。

KEGG 通路分析进一步构建了差异蛋白的相互作用网络,富集到 10 条 KEGG 通路,其中 4 条通路显示下调(图 3C):抗原处理和呈递、内吞作用、氨基酸生物合成和溶酶体,6 条通路显示上调(图 3D):轴突导向、代谢通路、磷脂酰肌醇信号通路、亨廷顿病、嘧啶代谢、RNA 聚合酶。这些通路改变呈

现出三个显著特征:首先,病毒感染导致抗原呈递功能受损;其次,代谢通路和 RNA 聚合酶通路的协同上调反映了病毒对宿主转录和代谢系统进行代谢重编程和增强应激反应;此外,溶酶体通路功能障碍与亨廷顿病通路的异常激活共同提示了 EV71 潜在的神经致病作用。这些通路系统性地从多角度展现了 EV71 感染的复杂生物学特征。

深入分析 KEGG 通路中与病毒感染机制和神经性疾病发病过程密切相关的差异蛋白(表 1)。主要涉及以下功能通路,抗原呈递与处理通路:核因子 Y 亚基 B(nuclear factor Y subunit B, NFYB)、组织蛋白酶 L(cathepsin L, CTSL)和人类白细胞抗原 C(human leukocyte antigen C, HLA-C);溶酶体通路:鞘磷脂酶 1(sphingomyelin phosphodiesterase 1, SMPD1)、CD63 分子(CD63 molecule, CD63)、组织蛋白酶 H(cathepsin H, CTSH)和芳基硫酸酯酶 A(arylsulfatase A, ARSA);代谢通路:细胞色素 C 氧化酶亚基 5B(cytochrome C oxidase subunit 5B, COX5B)、神经酰胺合成酶 2(ceramide synthase 2, CERS2)、天冬酰胺连接糖基化 14 同源物(asparagine-linked glycosylation 14 homolog, ALG14)、外泌体蛋白样糖基转移酶 3(exostosin-like glycosyltransferase 3, EXTL3)、磷脂酰肌醇-4-磷酸 5-激酶 1A(phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type I alpha, PIP5K1A)、NADH 脱氢酶泛醌 1 亚基 C1 (ubiquinone oxidoreductase subunit C1, NDUFC1);嘧啶代谢通路:RNA 聚合酶 II 亚基 J(RNA polymerase II subunit J, POLR2J)、RNA 聚合酶 I 亚基 A(RNA polymerase I subunit A, POLR1A)。上述蛋白表达变化表明, EV71 诱导的神经细胞损伤可能涉及对宿主细胞炎症反应、代谢重编程及神经信号传导的精细调控。

3 讨论

临床研究表明, EV71 感染预后与神经系统病变程度密切相关,重症病例不仅病死率高,且常导致不可逆的神经功能损伤^[9]。EV71 已被明确为嗜神经病毒,但其诱发神经系统症状的原因尚不明确。

本研究成功构建 EV71 感染 U251 细胞模型,观察到典型的 CPE,发现细胞感染 EV71 后增殖能力显著降低, Western blot 和免疫荧光检测显示感染组细胞高表达病毒特异性蛋白 VP1。通过蛋白质组学分析,鉴定出 209 个差异表达蛋白(106 个上调, 103 个下调)。GO 和 KEGG 富集分析表明,这些差异蛋白主要参与抗原呈递与处理、溶酶体和代谢等关键信号通路。

表 1 KEGG 通路相关差异蛋白

通路	基因 ID	基因名称	结果	基因说明	相关疾病
溶酶体	P17405	SMPD1	下调	将磷脂转化为神经酰胺,并编码具有磷脂酶 C 活性的前胶原蛋白	尼曼—皮克病 B 型和尼曼—皮克病 A 型
	P09668	CTSH	下调	在溶酶体中蛋白质的整体降解过程中起重要作用	婴幼儿全身性动脉钙化症 2 型和眼肌运动疾病
	P15289	ARSA	下调	水解脑苷脂硫酸盐	异染性脑白质营养不良和脑白质营养不良
	P08962	CD63	下调	作为 TIMP1 的细胞表面受体	眼底白点症和先天性静止性夜盲症
抗原处理和呈递	P25208	NFYB	下调	与多种基因启动子区域中的 CCAAT 基序具有高特异性结合	炎症性肠病 10 型和环孢子虫病
	P07711	CTSL	下调	在细胞内蛋白水解代谢中起主要作用	中东呼吸综合征和 COVID-19
	P30505	HLA-C	下调	通过呈递来自内质网腔的肽段在免疫系统中发挥核心作用	银屑病 1 型和人类免疫缺陷病毒 1 型
	P10606	COX5B	上调	将电子从细胞色素 c 转移到分子氧进行偶联	线粒体疾病和良性婴儿型 Cox 缺乏症
代谢	Q99755	PIP5K1A	上调	参与多个过程,包括激活 GTP 酶活性	智力发育障碍 60 型,伴癫痫发作和致死性先天性挛缩综合征 3 型
	Q96G23	CERS2	上调	该人类蛋白可能在细胞生长调控中发挥作用	Unverricht-Lundborg 型肌阵挛性癫痫和青少年型肌阵挛性癫痫 3 型
	Q96F25	ALG14	上调	催化内质网 N-连接糖基化的前两步	先天性重症肌无力综合征 15 型和心肌病、癫痫及进行性脑萎缩
	O43909	EXTL3	上调	催化 N-乙酰葡萄糖胺转移到糖胺聚糖链上	免疫骨骼发育不良伴神经发育异常和骨骼发育不良-T 细胞免疫缺陷发育迟缓综合征
嘧啶代谢	O43677	NDUFC1	上调	可变剪接导致多种转录变体	线粒体疾病与细菌性胃炎
	Q9GZM3	POLR2J	上调	负责合成真核生物信使 RNA 的聚合酶	免疫缺陷 25 型和小眼症
	O95602	POLR1A	上调	将 DNA 转录为核糖体 RNA 前体	阿克罗颜面发育不良辛辛那提型和脑白质营养不良 27 型

数据来源于 GeneCards。

溶酶体通路蛋白 (SMPD1、CD63、CTSH 和 ARSA) 在 GO 功能和 KEGG 通路分析均显著下调,作为细胞稳态调控中枢,溶酶体功能紊乱与多种病毒感染密切相关,在 EV71 感染中表现尤为显著^[10]。其中,溶酶体膜糖蛋白 SCARB2 被确认为 EV71 入侵的关键受体^[11]。研究^[12]发现,溶酶体相关蛋白在病毒致病过程中具有多效性功能;SMPD1 是 COVID-19 潜在治疗靶点;CD63 可能是 HIV 感染导致神经元损伤的新型生物标志物^[13-14];CTSL 调控神经胶质瘤细胞对 SARS-CoV-2 的易感性^[15];ARSA 不仅参与带状疱疹病毒所致神经痛的致病机制^[16],其缺乏引起神经代谢紊乱^[17]。病毒感染引发的溶酶体功能紊乱可能诱发神经系统病变,这一现象在猪血凝性脑脊髓炎病毒和 HIV 感染中已有报道^[18-19]。EV71 感染通过下调抗原呈递通路 (NFYB、CTSL、HLA-C) 相关蛋白,介导病毒致病过程,可能为病毒入侵和复制创造有利条件。已有研究^[20]证实,NFYB 参与甲型流感病毒持续性肺损伤;CTSL 调控戊型肝炎病毒的细胞内化^[21];HLA-C 在清除 COVID-19 过程中发挥重要作用。

代谢通路的上调 (COX5B、CERS2、EXTL3、ALG14、PIP5K1A、NDUFC1、POLR2J 和 POLR1A) 揭示典型病毒性代谢重编程特征,为病毒复制提供

必要的能量和原料。如 COX5B 上调氧化磷酸化过程^[22];CERS2 通过调控鞘脂代谢参与 COVID-19 相关炎症反应^[23];EXTL3 在淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒感染后,促进硫酸乙酰肝素的生物合成^[24]。

综上,本研究通过对 EV71 感染后 U251 细胞的蛋白质组学变化进行深入分析,发现 EV71 通过多种途径的协同作用有效促进感染进程,其机制可能与抑制溶酶体和抗原呈递功能及激活细胞代谢等通路相关。

参考文献

[1]

Nguyen TT,Chiu CH,Lin CY,*et al.* Efficacy, safety, and immunogenicity of an inactivated, adjuvanted enterovirus 71 vaccine in infants and children: a multiregion, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. *Lancet*,2022,399 (10336):1708—1717.

[2]

陈天扬,刘正芸,王欢. 肠道病毒 71 型致神经元病变的机制研究进展[J]. *病毒学报*,2022,38(1):212—218.

[3]

Hu S,Zhong Q,Xie X,*et al.* Research progress on critical viral protease inhibitors for coronaviruses and enteroviruses [J]. *Bioorganic &. Medicinal Chemistry Letters*,2025,122:130168.

[4]

Hixon AM,Clarke P,Tyler KL. Contemporary circulating enterovirus D68 strains infect and undergo retrograde axonal transport in spinal motor neurons independent of sialic acid

- [J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(16): e00578–19.
- [5] Chen BS, Lee HC, Lee KM, *et al.* Enterovirus and encephalitis [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 261.
- [6] 张琬桢, 刘正芸, 王盛羽, 等. 肠道病毒 71 型对人神经胶质瘤 U251 细胞线粒体动力学的影响[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2020, 51(2): 159–164.
- [7] Gómez O, Perini-Villanueva G, Yuste A, *et al.* Autophagy and glycativ stress: a bittersweet relationship in neurodegeneration [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 790479.
- [8] Moreno-Cugnon L, Revuelta M, Arrizabalaga O, *et al.* Neuronal p38 α mediates age-associated neural stem cell exhaustion and cognitive decline[J]. *Aging Cell*, 2019, 18(6): e13044.
- [9] Zhang W, Yang H, Liu Z, *et al.* Enterovirus 71 leads to abnormal mitochondrial dynamics in human neuroblastoma SK-N-SH cells[J]. *Virus Research*, 2024, 339: 199267.
- [10] Wang X, Hu Z, Zhang W, *et al.* Inhibition of lysosome-tethered Ragulator-Rag-3D complex restricts the replication of Enterovirus 71 and Cocksackie A16[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2023, 222(12): e202303108.
- [11] Zhang X, Yang P, Wang N, *et al.* The binding of a monoclonal antibody to the apical region of SCARB2 blocks EV71 infection [J]. *Protein & Cell*, 2017, 8(8): 590–600.
- [12] Abusukhun M, Winkler MS, Pöhlmann S, *et al.* Activation of sphingomyelinase-ceramide-pathway in COVID-19 purposes its inhibition for therapeutic strategies[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 784989.
- [13] Florin L, Lang T. Tetraspanin assemblies in virus infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1140.
- [14] De Menezes EGM, Liu JS, Bowler SA, *et al.* Circulating brain-derived extracellular vesicles expressing neuroinflammatory markers are associated with HIV-related neurocognitive impairment[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1033712.
- [15] Zhang L, Wei C, Li D, *et al.* COVID-19 receptor and malignant cancers: Association of CTSL expression with susceptibility to SARS-CoV-2[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2022, 18(6): 2362–2371.
- [16] Yu X, Li L, Chan MTV, *et al.* Bioinformatic analyses suggest augmented interleukin-17 signaling as the mechanism of COVID-19-associated herpes zoster[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2021, 28 (46): 65769–65775.
- [17] Beerepoot S, Boelens JJ, Lindemans C, *et al.* Progressive demyelinating polyneuropathy after hematopoietic cell transplantation in metachromatic leukodystrophy: a case series[J]. *Journal of Neurology*, 2024, 271(7): 4028–4038.
- [18] Lan Y, Li Z, Wang Z, *et al.* An experimental model of neurodegenerative disease based on porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus-related lysosomal abnormalities[J]. *Molecular Neurobiology*, 2020, 57(12): 5299–5306.
- [19] Santerre M, Arjona SP, Allen CN, *et al.* HIV-1 Vpr protein impairs lysosome clearance causing SNCA/alpha-synuclein accumulation in neurons[J]. *Autophagy*, 2021, 17(7): 1768–1782.
- [20] Savin IA, Sen'kova AV, Goncharova EP, *et al.* Novel core gene signature associated with inflammation-to-*Metaplasia* transition in influenza A virus-infected lungs[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(22): 11958.
- [21] Klöhn M, Burkard T, Janzen J, *et al.* Targeting cellular cathepsins inhibits hepatitis E virus entry [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2024, 80(5): 1239–1251.
- [22] Chu YD, Lim SN, Yeh CT, *et al.* COX5B-mediated bioenergetic alterations modulate cell growth and anticancer drug susceptibility by orchestrating claudin-2 expression in colorectal cancers[J]. *Biomedicine*, 2021, 10(1): 60.
- [23] Khan RJ, Single SL, Simmons CS, *et al.* Altered sphingolipid pathway in SARS-CoV-2 infected human lung tissue[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1216278.
- [24] Volland A, Lohmüller M, Heilmann E, *et al.* Heparan sulfate proteoglycans serve as alternative receptors for low affinity LCMV variants[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(10): e1009996.

(收稿日期: 2025–04–03)

修回日期: 2025–05–24)