

以 EV71 3C^{pro} 为靶标的抗病毒药物筛选模型的建立及抗 3C^{pro} 化合物筛选*

曾施暖¹⁾ 李倩雯¹⁾ 潘婷¹⁾ 孟小斌²⁾ 黄清苑²⁾ 郭学敏^{1)**}

¹⁾ 中山大学中山医学院人类病毒学研究所, 广州 510080; ²⁾ 梅州市人民医院, 梅州 514031

摘要 建立一种以 EV71 3C 蛋白酶为靶标的抗肠道病毒药物筛选模型, 并应用于小分子化合物库筛选具有抗 EV71 活性的化合物. 从临床手足口病标本中分离肠道病毒进行 PCR 鉴定及基因组测序. 通过插入突变在黄色荧光 YFP 编码框合适位点处引入 EV71 3C 酶切位点, 构建对 3C 蛋白酶敏感的报告质粒 pcDNA3-mYFP, 然后将其与表达 3C 的质粒共转 293A 细胞, 在 3C 抑制剂 Rupintrivir 存在与否的情况下通过荧光显微镜和酶标仪检测 $E_x(500\text{nm})/E_m(535\text{nm})$ 荧光信号的变化, 判断建模是否成功; 利用建好的筛选模型在高通量药物筛选平台对小分子化合物库进行初筛和复筛; 再利用空斑分析检测筛选出的活性化合物是否对临床分离的 EV71 毒株具有抑制作用. mYFP 在 293A 细胞中表达良好, 3C 的表达使荧光信号下降 80%, Rupintrivir 的存在则几乎不影响荧光表达, 说明以 3C 为靶位的筛选模型构建成功. 经过高通量初筛和复筛从 26 000 多种小分子化合物中获得 26 种能够显著回复 mYFP 表达的活性化合物; 空斑分析显示其中 2 种化合物具有较为明显的抑制 EV71 复制的活性. 因此, 我们所构建的 3C-mYFP 共表达系统是一种简便有效的、可用于高通量筛选抗 EV71 3C^{pro} 药物的筛选模型.

关键词 手足口病, 肠道病毒 71 型, 3C 蛋白酶, 高通量筛选, 抗病毒药物

学科分类号 R373.2, R9

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0167

手足口病(hand foot and mouth diseases, HFMD)是全球性传染疾病, 尤其在亚太地区广泛流行^[1]. 近年来, 手足口病发病率、重症和死亡病例数居于中国丙类传染病之首. 引发 HFMD 的肠道病毒有 20 多种(型), 其中以柯萨奇病毒 A16 型(CVA16)和肠道病毒 71 型(EV71)最为常见^[2-3]. 全球首个保护性 EV71 灭活疫苗于 2015 年底在中国上市, 该疫苗为 C4a 单价疫苗, 对不同基因型的 EV71 毒株感染均有一定的保护作用, 但无治疗作用. 目前对于已经感染 EV71 或其他肠道病毒的 HFMD 患者而言, 缺少有效的抗病毒药物, 主要采取对症和支持疗法. 因而急需开发特异性抗肠病毒药物.

3C 蛋白酶在 EV71 的生命周期中起着至关重要的作用^[4], 几乎参与了病毒复制过程中所有的蛋白质剪切割^[5], 同时又通过损伤宿主细胞促进自身繁殖^[6-10], 是抗病毒药物研发的重要靶点. 高通量药物筛选(high throughput screening, HTS)是一项快速、高效、应用自动化操作系统对高容量的化合物库中的样品进行高效筛选的技术^[11], 是充分利用现

有药物资源寻找新型靶向药的最有效的方法之一. 本文通过在报告基因 YFP 中插入 3C^{pro} 敏感酶切位点合并共转染分析, 以报告基因 YFP 的荧光强度作为观察指标, 建立了一个以 EV71 3C 蛋白酶抑制药为靶标的筛选模型, 并将该模型应用于一个包含 2 万种小分子的化合物库, 在高通量药物筛选平台进行了初筛、复筛, 最后利用临床分离的 EV71 毒株对筛选出来的活性化合物进行了抗病毒活性的人工复证.

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞, 载体与病毒

293A、RD 细胞由中国科学院生物物理研究所

* 广东省引进创新科研团队计划资助项目(2009010058).

** 通讯联系人.

Tel: 020-29882615, E-mail: xmguo2005@yahoo.com

收稿日期: 2017-06-01, 接受日期: 2017-07-24

高光侠课题组惠赠; pcDNA4-To myc/hisB 质粒购自 Life technology; 质粒 pcDNA3-YFP 由中山医学院人类病毒研究所保藏。

1.1.2 主要试剂

细胞培养基及血清购于 Gibco 公司; 所用到的工具酶、PrimeScript[®] RT reagent Kit 购于 Takara 公司; Phusion 超保真 DNA 聚合酶购于 Thermo Scientific 公司; Trizol LS 购于 Life Technology; 转染试剂 2010 购于北京中科亚光生物科技有限公司; Rupintrivir 购于 Santacruz 公司. Enamine Drug-like library 购于上海陶素生化科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 手足口病病原体的分离、鉴定以及毒株基因组测序

11 例手足口病患儿咽拭子标本分别在 RD 细胞连续扩培 2 代后, 收集培养上清, 用 Trizol LS 提取总 RNA, 经 PrimeScript[®] RT reagent Kit 反转录得到病毒 cDNA, 依据文献分别合成人肠道病毒 (包括但不限于 EV71 和 CVA16)、EV71、CVA16 的核酸检测引物 PE、EV71、CVA16^[1]。通过 PCR 鉴定毒株并将毒株冻存于 -80℃ 备用。同时以病毒 cDNA 为模板, 设计引物 5'UTR Fw: 5' TTAAAA-CAGCCTGTGGGTTG 3', 3'UTR Rev: 5' TTTT-TTTTGCTATTCTGGTT 3', 用 Phusion 高保真酶扩增全长片段, 由生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序。

1.2.2 质粒构建

pcDNA3-mYFP 以 pcDNA3-YFP 为模板, 设计包含插入突变位点(下划线标注)的正向引物 5' C-GCACAGCAACAGTACAGGGCCCAAGCCTTGA-TTTTGCTGACAAGCAGAAGAACGGCAT 3', 及反向引物 5' GGCCATGATATAGACGTTGTGGC 3', 用 Phusion 超保真 DNA 聚合酶通过 PCR 反应在 YFP 序列中间引入 3C 蛋白酶识别序列, 获得 pcDNA3-modified YFP 质粒(pcDNA3-mYFP)。

以 EV71 cDNA 为模板, 设计引物 EV71 3C Fw 5' cacGGATCCATGGGCCCGAGCCTTGACTT-T 3', EV71 3C Rev: 5' cacGCGGCCGCTTATTG-TTCACTAGCAAAGT 3', 通过 PCR 反应得到 EV71 3C 蛋白酶 cDNA 序列, 经 BamH I 和 Not I 酶切后插入对应限制性酶消化后的载体 pcDNA4-TO myc/his B 中, 获得 EV71 3C 的表达载体, pcDNA4-3C。

1.2.3 以 3C^{pro} 为靶标的质粒共转模型的建立

将 293A 细胞按 1.5×10^5 个 / 孔接种于 24 孔板, 培养 18~20 h 后按转染试剂 Lipo 2010 说明书, 每孔以 pcDNA4-3C : pcDNA3-mYFP 为 250 ng : 100 ng 的比例瞬时转染 293A 细胞, 4 h 后更换加入新鲜培养液或含 Rupintrivir(50 nmol/L)的新鲜培养液, 48 h 后通过倒置荧光显微镜观察, 以黄色荧光蛋白的表达情况为指标, 考察 3C 蛋白酶的活性。

1.2.4 EV71 3C^{pro} 抑制物的高通量筛选

利用高通量药物筛选平台 TECAN EVO150 配备的 96 道自动加样系统, 将 293A 细胞按 0.5×10^5 个 / 孔浓度接种于 96 孔板, 并于培养 18~20 h 后进行质粒转染。每孔按 pcDNA4-3C : pcDNA3-mYFP 为 50ng : 100ng 的比例转染 293A 细胞, 4 h 后更换分别含溶剂 DMSO、阳性对照 Rupintrivir(50 nmol/L)、一定浓度(5 μ mol/L)小分子化合物的新鲜培养液, 72 h 后倒弃培养基, 用 PBS 洗 2 次, 应用 PerkinElmer EnVision 多功能酶标仪, 在激发波长 E_x (500 nm)、发射波长 E_m (535 nm)下检测荧光强度, 并记录分析。

1.2.5 空斑分析

将 1×10^6 个 / 孔的 RD 细胞接种于 6 孔板, 过夜培养后, 将待测病毒液(EV71-MZ)按 10 倍比稀释感染细胞, 每个稀释度 3 个重复孔, 在 37℃ 感染 1 h 后弃去上清, 加入含 1.2% 甲基纤维素、2% 血清的半固体培养基, 置于培养箱培养 5~6 天至病毒蚀斑形成。经多聚甲醛固定、结晶紫染色、清水漂洗、晾干后作空斑计数, 计算病毒滴度 (PFU/ml)。以 MOI=0.001/0.01 的 EV71-MZ 病毒液感染接种于 6 孔板的 RD 细胞, 感染后, 加入含有 5 μ mol/L 化合物的半固体培养基, 置于 37℃ 培养箱培养, 并进行空斑计数。以加入含有溶剂 DMSO 的半固体培养基为对照, 考察活性化合物对病毒滴度的影响。

2 结 果

2.1 以 3C^{pro} 为靶标的筛选模型的建立

为建立以 3C 蛋白酶为靶标的筛选模型, 我们构建了 3C^{pro} 表达质粒 pcDNA4-3C 和含有 3C^{pro} 酶切位点的报告质粒 pcDNA3-mYFP(图 1a)。二者共表达时, 3C 酶切识别位点而使 mYFP 失活、荧光信号降低; 当抑制 3C^{pro} 活性的小分子化合物存在时, mYFP 的荧光信号不受影响。为考察该模型是否工作, 我们通过荧光显微镜检测了 3C 活性正常

或受 Rupintrivir(阳性对照)抑制时对 mYFP 表达的影响. 单转 pcDNA3- mYFP 的情况下, 观察到明显的黄色荧光信号. 质粒共转时, 由于 3C 蛋白酶正常表达并发挥酶活性, 导致黄色荧光信号很弱、几乎观测不到, 同时 3C 的蛋白毒性引起显著的细胞病变. Rupintrivir 存在的情况下, 由于 3C 蛋白酶活性受到抑制, mYFP 保持完整从而表现出较强的荧光信号. 用酶标仪 $E_x(500\text{ nm})/E_m(535\text{ nm})$ 定量荧光信号的变化, 设定未转染 3C 质粒的荧光值

为 100%, 3C 的表达使荧光信号降低至 20%以下, Rupintrivir 则使荧光信号回复至 90%. YFP 荧光信号在转染后 12 h 开始表达, 72 h 后开始减弱, 48 h 时差异较为显著(图 1b, c). 上述结果表明, 我们成功建立了以 YFP 荧光信号为考察指标的 EV71 3C 蛋白酶抑制物筛选的模型. 该模型适用于对具有抑制 3C^{pro} 活性 或潜在抑制 EV71 的抗病毒活性物质的快速检测或筛选.

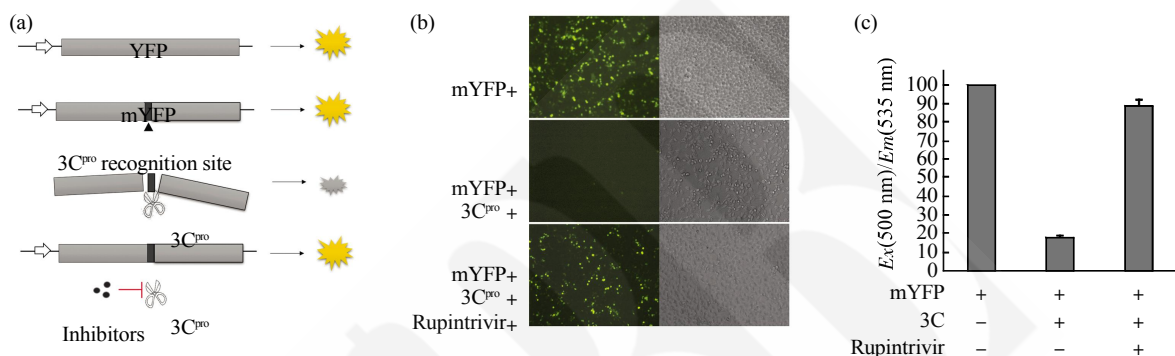


Fig. 1 Establishment of screening model targeting 3C^{pro}

(a) Schematic diagram of 3C^{pro}-mYFP screening model. (b, c) Fluorescence signal assay by fluorescence microscope and microplate reader.

2.2 应用高通量平台筛选具有抑制 3C^{pro} 活性的小分子化合物

鉴于上述筛选模型的成功建立, 我们利用高通量药物筛选平台的自动加样系统及多功能酶标仪, 通过检测荧光信号是否回复以及回复的程度, 对一

个含有 26 000 多种化合物的药物库进行了高通量筛选. 结果发现 26 个化合物具有潜在的明显抑制 3C^{pro} 的活性, 其中以编号为 10 和 19 的化合物抑制活性最为显著(图 2).

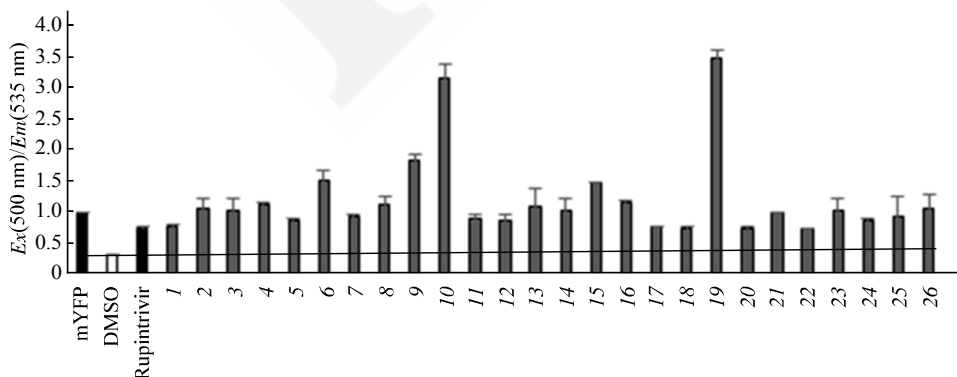


Fig. 2 Identification of 3C^{pro} inhibitors by high-throughput screening (HTS) Assay

26 compounds, numbering from 1 to 26, showed potential inhibition on 3C protease activity. mYFP, the fluorescence signal of mYFP in absence of 3C^{pro}, was set as 1.

2.3 空斑实验检测化合物的抗病毒活性

为进一步检测所筛选的活性化合物的体外抗病

毒活性, 我们从手足口病临床标本中分离鉴定出一株 EV71, 命名为 EV71-MZ, 完成了该病毒基因组

测序并上传至 NCBI GeneBank 数据库, 收录号 (Accession number) 为 KY582572. 然后采用空斑实验对高通量系统筛选获得的 26 个活性化合物进行了抗体外抗活病毒 EV71-MZ 的人工复证. 空斑实

验结果(图 3)显示, 与 DMSO 溶剂对照组相比, 在编号为 3 和 8 小分子化合物存在的情况下, 空斑形成数显著降低, 表明这 2 种化合物在一定程度上可抑制 EV71 病毒的复制, 具有抗病毒活性.

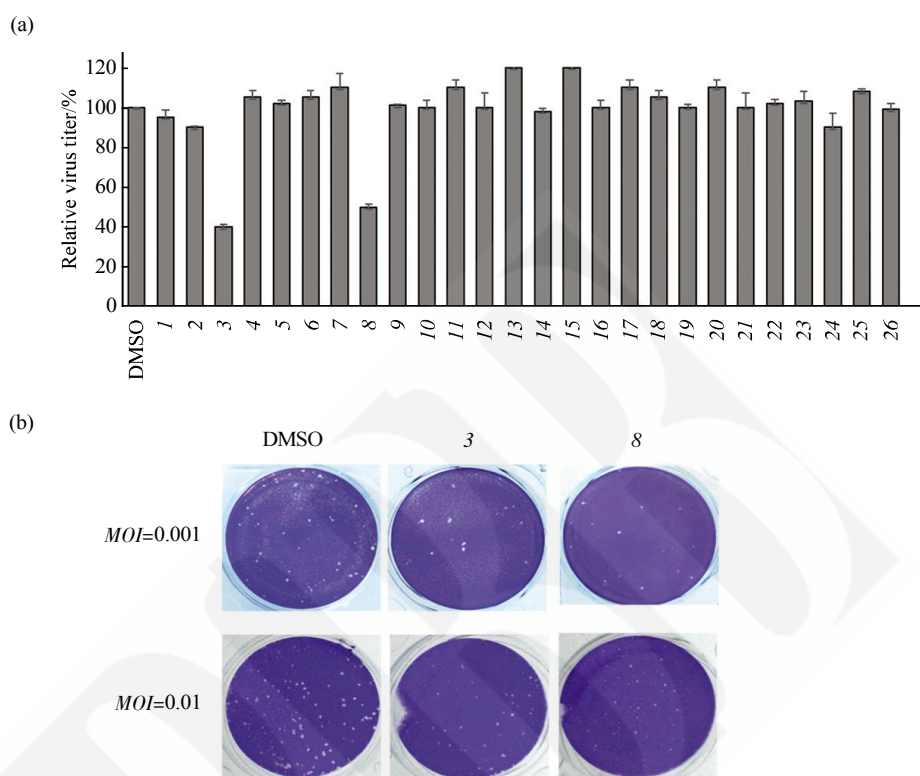


Fig. 3 Antiviral activity assay of the small molecular compounds

(a) DMSO or the small molecular compounds (numbering 1–26) were individually added to the medium after virus infection. Viral titer was determined by plaque assay. (b) Plaque formation of the compounds No.3 and No.8.

2.4 常见手足口病病原体 3C^{pro} 酶活性催化位点高度保守

引起手足口病的肠道病毒有 20 多种, 对 NCBI GeneBank 数据库已登记的肠道病毒, 包括柯萨奇病毒 A 组 CVA4、CVA6、CVA10 和 CVA16, 以及不同基因型的 EV71^[12], 进行 3C 氨基酸序列的比对分析, 结果显示, 尽管不同种类肠道病毒 3C 蛋白酶全长氨基酸同源性仅约 80%, 但其催化活性位点 H40、E71、C147 却高度保守(图 4), 说明以 3C 蛋白酶活性为靶标进行筛选得到的化合物可能具有潜在的广谱抗肠病毒活性.

3 讨 论

针对婴幼儿手足口病的治疗, 目前仍缺乏有效的多价疫苗和特异性抗病毒药物^[13–15]. Rupintrivir 虽然是一种广谱的抗病毒活性显著的 3C 蛋白酶抑

制剂, 对几乎所有受试的轮状病毒(HRV)和戊肝病毒(HEV)分离株都显示出较好的抗病毒活性^[16], 但由于其口服生物利用性较差、体内代谢毒性高等缺点, 至今尚未能通过临床试验^[17]. 因此, 继续研发广谱、安全、高效、婴幼儿易服用的抗病毒药物, 是实现疾病控制目标的必要补充.

氨基酸序列同源性比对表明, 肠道病毒的 3C 蛋白均具有典型的糜蛋白酶结构, 其催化活性基团 His40、Glu71 和 Cys147 构成的 Cys-His-Glu 催化三联体高度保守, 因此, 以 3C 蛋白酶为靶标的药物筛选对于开发潜在的广谱抗肠病毒药物具有重要意义.

司沛等^[18]根据荧光共振能量转移(FRET)的原理, 通过体外合成两端具有荧光基团并且含有 EV71 多聚蛋白自切割位点 3B-3C(有 Q-G 连接)的多肽作为底物来建立 EV71 3C^{pro} 的测活平台. Guo 等^[19]把荧

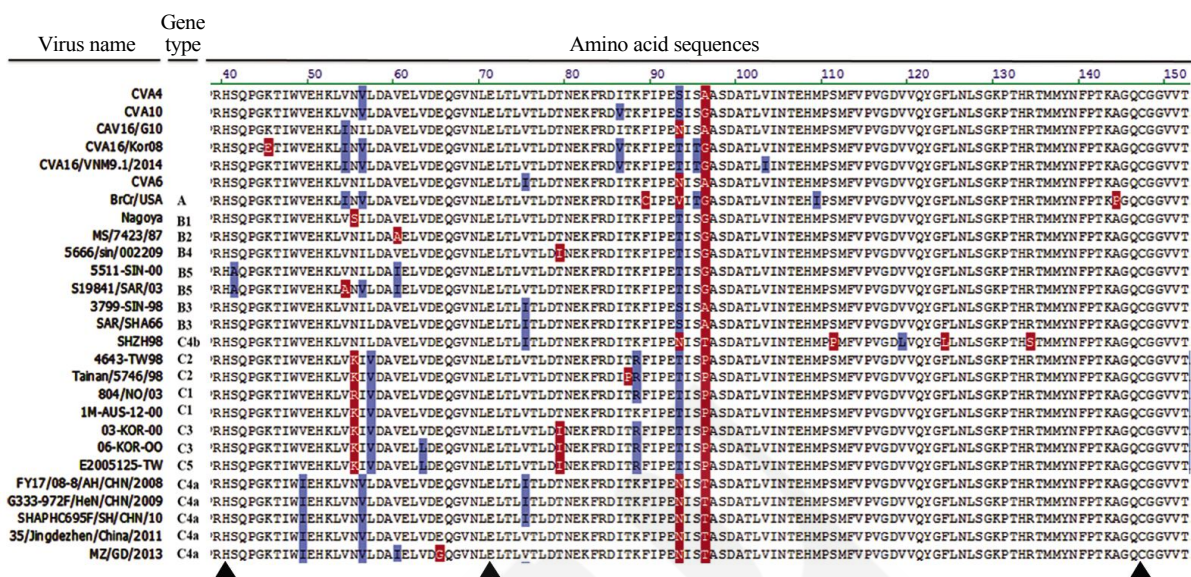


Fig. 4 The amino acid sequence alignment of 3C^{pro} of enterovirus

▲ : Catalytic sites of 3C^{pro}, H41, E71, C147. Residues in black are highly conserved. Block of similar residues are shadowed in blue. Weakly similar residues are shadowed in red.

光虫荧光素酶基因的 N 端、C 端分别融合表达相互作用的肽段 A、肽段 B，并在中间插入 3C 蛋白酶识别作用位点建立报告基因系统。秦咸蕴等^[20]建立了 3C 蛋白酶逆向酵母双杂交模型菌株固体培养的方法。然而，这些模型对于药物化合物库的高通量筛选，存在体外氨基酸肽段合成实验成本高、特殊报告基因载体获取路径范围窄、载体构建技术难度大、耗时长弊端。

建立高效的药物筛选模型，尤其是适用于一般高通量筛选平台的模型，可以大大地加快抗病毒药物的研发进程。本实验成功建立的 EV71 3C-mYFP 共表达系统，高效便利、成本低、有利于加速 3C 蛋白酶抑制物的研发。我们在 20 天内完成 26 000 多种化合物的初步筛选，并对表现出抑制活性的化合物进行二筛确证，得到 26 个潜在抑制 3C^{pro} 活性的化合物。但是在荧光显微镜观察发现，10、19 号化合物荧光信号回复程度较大是由于该药物自带荧光，需进一步对这 26 种化合物进行抗活病毒活性检测。通过分离临床毒株，进行空斑实验检测，发现其中 2 个化合物确实在一定程度上能抑制 EV71 病毒复制。本文着重探究高通量筛选模型的建立及实际应用，下一步将对筛选得到的两种具有抗病毒活性的药物进行结构分析、抗 3C^{pro} 作用机制研究，为通过化合物的结构式反向寻找抑制 3C 活性的靶位及寻找抗 3C 药物奠定基础。

在酶标仪检测系统中，由于某些化合物本身自带荧光，荧光读值并不能如实反映 mYFP 的荧光强度，从而无法准确体现药物的抗病毒功能，致使筛选过程中存在假阳性率较高，造成高通量筛选结果与空斑分析结果存在偏差。因此，化合物库的药物属性是不容忽视的。对于这类能自发荧光的化合物，采用本实验建立的模型，用流式细胞仪高通量检测 YFP 表达情况来替代多功能酶标仪系统，将能大大降低筛选过程中药物自身背景的影响，提高阳性率，用于对不同药库的大量筛选。另外，利用活病毒复证化合物的抗病毒活性是药物筛选的必要环节。综上所述，本实验建立的筛选模型高效、简便，同时也为建立更多蛋白酶活性抑制剂筛选模型提供新思路。

参 考 文 献

[1] 卫生部办公厅.手足口病诊疗指南(2010年版).中国:卫生部办公厅,2010 [2017-5-01]. <http://www.iyyi.com/d-02-9530.html>
Ministry of Health. Hand, Foot and Mouth Disease Diagnosis and Treatment Guide (2010 edition).China: Ministry of Health, 2010 [2017-5-01]. <http://www.iyyi.com/d-02-9530.html>

[2] Guan D, Van Der Sanden S, Zeng H, et al. Population dynamics and genetic diversity of C4 strains of human enterovirus 71 in Mainland China, 1998-2010. PloS one, 2012, 7(9): e44386

[3] Mathes E F, Oza V, Frieden I J, et al. "Eczema coxsackium" and unusual cutaneous findings in an enterovirus outbreak. Pediatrics,

- 2013, **132**: e149–e157
- [4] 安志杰. 肠道病毒 71 型灭活疫苗使用技术指南. 中国疫苗和免疫, 2016(4): 458–464
An Z J. EV71 inactivated vaccine technical guidelines. China Vaccines and Immunization. 2016(4): 458–464
- [5] Kuo C J, Shie J J, Fang J M, *et al.* Design, synthesis, and evaluation of 3C protease inhibitors as anti-enterovirus 71 agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, **16**(15): 7388–7398
- [6] Weng K F, Li M L, Hung C T, *et al.* Enterovirus 71 3C protease cleaves a novel target CstF-64 and inhibits cellular polyadenylation. *PLoS Pathogens*, 2009, **5**(9): e1000593
- [7] Lei X, Liu X, Ma Y, *et al.* The 3C protein of enterovirus 71 inhibits retinoid acid-inducible gene I-mediated interferon regulatory factor 3 activation and type I interferon responses. *Journal of Virology*, 2010, **84**(16): 8051–8061
- [8] Lei X, Sun Z, Liu X, *et al.* Cleavage of the adaptor protein TRIF by enterovirus 71 3C inhibits antiviral responses mediated by Toll-like receptor 3. *Journal of Virology*, 2011, **85**(17): 8811–8818
- [9] Lei X, Han N, Xiao X, *et al.* Enterovirus 71 3C inhibits cytokine expression through cleavage of the TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 complex. *Journal of Virology*, 2014, **88**(17): 9830–9841
- [10] Li M L, Hsu T A, Chen T C, *et al.* The 3C protease activity of enterovirus 71 induces human neural cell apoptosis. *Virology*, 2002, **293**(2): 386–395
- [11] 许媛媛, 陈鹏辉, 吴英理. 高通量药物筛选模型的研究进展. 上海交通大学学报(医学版), 2013, 10-1415-05
Xu Y Y, Chen P H, Wu Y L. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*. 2013, 10-1415-05
- [12] Bessaud M, Razafindratsimandresy R, Nougairède A, *et al.* Molecular comparison and evolutionary analyses of VP1 nucleotide sequences of new African human enterovirus 71 isolates reveal a wide genetic diversity. *PloS One*, 2014, **9**(3): e90624
- [13] Qiu J. Enterovirus 71 infection: a new threat to global public health?. *The Lancet Neurology*, 2008, **7**(10): 868–869
- [14] Mao Q, Wang Y, Shao J, *et al.* The compatibility of inactivated-Enterovirus 71 vaccination with Coxsackievirus A16 and Poliovirus immunizations in humans and animals. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2015, **11**(11): 2723–2733
- [15] 王宏杰, 邹映雪, 张文双. 肠道病毒 71 型感染手足口病的抗病毒药物及疫苗研究进展. 淮海医药, 2015, **33**(4): 412–414
Wang H J, Zou Y X, Zhang W S. *J Huaihai Med*, 2015, **33**(4): 412–414
- [16] Binford S L, Maldonado F, Brothers M A, *et al.* Conservation of amino acids in human rhinovirus 3C protease correlates with broad-spectrum antiviral activity of rupintrivir, a novel human rhinovirus 3C protease inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, **49**(2): 619–626
- [17] De Palma A M, Vliegen I, De Clercq E, *et al.* Selective inhibitors of picornavirus replication. *Medicinal Research Reviews*, 2008, **28**(6): 823–884
- [18] 司 沛. 肠病毒 71(EV71)3C 蛋白酶抑制剂的发现及功能研究. 上海:上海师范大学. 2014
Si P. *Discovery of Enterovirus 71 (EV71) 3C protease inhibitors and their functional studies*. Shanghai: Shanghai Normal University. 2014
- [19] Guo Z, Zhong X, Lin L, *et al.* A 3C (pro)-dependent bioluminescence imaging assay for *in vivo* evaluation of anti-enterovirus 71 agents. *Antiviral Research*, 2014, **101**: 82–92
- [20] 秦咸蕴. 以肠道病毒 71 型 3C 蛋白酶为靶点的药物筛选模型的建立及药物筛选[D]. 曲阜: 曲阜师范大学, 2011
Qin X Y. *Establishment of Drug Screening Model Targeting Enterovirus 71 3C Protease and Screening of Drugs[D]*. Qufu: Qufu Normal University, 2011

Establishment and Application of High-throughput Screening Model for Antiviral Agents Targeting EV71 3C^{pro}*

ZENG Shi-Nuan¹⁾, LI Qian-Wen¹⁾, PAN Ting¹⁾, MENG Xiao-Bin²⁾, HUANG Qing-Yuan²⁾, GUO Xue-Min^{1)**}

¹⁾ Institute of Human Virus Research, Zhongshan School of Medical, Sun-Yet Sen University, Guangzhou 510080, China;

²⁾ Meizhou People's Hospital, Meizhou 514031, China)

Abstract Enterovirus 71 (EV71) is the main causing agent of hand-foot-mouth disease (HFMD), however, the specific antiviral agents are still not commercially available. In order to find antiviral agents against EV71, a high throughput drug-screening model targeting EV71 3C^{pro} was established and a small-molecular compound library was screened. The virus EV71-MZ was isolated from an HFMD patient, and identified by PCR. A 3C^{pro} recognition site was inserted into the middle region of YFP open reading frame to generate the mYFP by insertion mutation. The full length mYFP proteins were observed by fluorescence microscope and the protein level was measured by using microplate reader in *Ex*(500 nm)/*Em*(535 nm). Change of the fluorescence value reflected the degree of the inhibition on 3C^{pro} activity. A small-molecular compound was screened by using the established screening model in the high throughput drug screening system, then the antiviral activity of the active compounds was further evaluated by plaque assay. As a result, mYFP expressed well in 293A cell; the expression of 3C^{pro} reduced the fluorescence signal remarkably, however, the signal was recovered by adding Rupintrivir, an inhibitor of 3C^{pro}. These results indicated that the screening model targeting 3C^{pro} was established successfully. 26 of 26 000 compounds significantly reverted the fluorescence signal of the mYFP in the presence of 3C^{pro}; noticeably, two of the 26 compounds, *i.e.* numbering 3 and 8, exhibited strong antiviral activity by plaque assay. All together, 3C-mYFP co-expression system is an optimized and effective screening method for high-throughput screening of anti-EV71 3C^{pro} drugs.

Key words hand foot and mouth disease (HFMD), enterovirus 71, 3C protease, high throughput-screening, antiviral drugs

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0167

*This work was supported by a grant from Guangdong Innovative Research Team Program(2009010058).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-29882615, E-mail: xmguo2005@yahoo.com

Received: June 1, 2017 Accepted: July 24, 2017