

HIV - 1 进攻靶细胞的机制及相应环节抑制剂的 研究进展

邱 阳

(北京大学基础医学院生物物理学系, 北京 100083)

摘要: HIV - 1 是导致获得性免疫缺陷综合症(AIDS)的流行最广、破坏力最强的病毒。HIV - 1 分两个步骤特异性地进攻 CD4⁺ 细胞:一是利用表面糖蛋白 gp120 和靶细胞膜上的受体结合;二是通过跨膜糖蛋白 gp41 使病毒的包膜和靶细胞的质膜发生融合。经过上述步骤,病毒的核心蛋白和遗传物质得以进入人体细胞,在其中进行复制,同时,细胞膜的稳定性被破坏,细胞的内外环境失去平衡,最终导致细胞死亡。HIV - 1 进攻靶细胞的机制研究所取得的成就为研制安全有效的抗 HIV/AIDS 药物提供了新的思路 and 方向。

关键词: HIV - 1; 进攻机制; 抑制剂

中图分类号: Q 735 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 673X(2002)01 - 0011 - 08

自从 1981 年美国报道首例获得性免疫缺陷综合症(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)以来,全世界已有近五千万人感染 HIV,超过一千六百万人死亡,HIV 已成为当今最致命的传染病。

AIDS 由灵长类动物传染给人类,导致这一疾病的病毒—猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)传染给人之后发生变异,称为人免疫缺陷病毒。不同的来源导致病毒在人体内发生不同的变异,因而 HIV 又分为不同的种系(lineage)。已知 HIV - 1 由黑猩猩传染给人类,而 HIV - 2 则由黑色白眉猴传染所致。绝大部分 HIV/AIDS 患者感染 HIV - 1, HIV - 2 感染基本局限在西非。本文将简要综述有关 HIV - 1 进攻靶细胞的机制以及相应环节的抑制剂研究现状。

1 HIV - 1 进攻靶细胞的机制

HIV - 1 感染人体有一个固定的模式:只有 CD4⁺ 的细胞(T 淋巴细胞,单核细胞,树突状细胞,小胶质细胞)才能被感染。

1.1 HIV - 1 与靶细胞膜上受体的结合

同其他包膜病毒一样, HIV - 1 也利用位于其表面的糖蛋白分子和靶细胞膜上的分子特异结合并相互作用,以获得进入靶细胞的机会。gp160 是 HIV - 1 包膜上唯一的糖蛋白,在宿主细胞的粗面内质网上合成,是一个由 845 - 870 个氨基酸残基组成的蛋白质前体分子,运输到高尔基体时被细胞内

的蛋白酶水解为非共价连接的两部分:表面糖蛋白 gp120 和跨膜糖蛋白 gp41。HIV - 1 进攻靶细胞时, gp120 首先与靶细胞膜上的 CD4 分子发生高亲和力的结合。一系列的研究证明, CD4 与 gp120 结合的主要意义可能在于促使 gp120 发生构象变化使其暴露出隐藏的、可以和共同受体(coreceptor)结合的 V3 环,使 gp120 和共同受体发生高效结合,并为随后发生的病毒包膜与靶细胞膜的融合提供能量。

靶细胞膜上的许多分子都可作为 HIV - 1 的共同受体,到目前为止,已鉴定出 HIV - 1 的 12 个共同受体^[1],它们都与趋化因子受体家族有关,均为 7 次跨膜的 G 蛋白偶连蛋白。这些分子是:CCR5、CXCR4、CCR2b、CCR3、CCR8、CCR9、CX3CR1、GPR - 15/BOBS、STRL - 33/BONZO、US28、APJ 和 ChemR23。

上述 12 个分子中,CCR5 和 CXCR4 是 HIV - 1 的主要共同受体。CXCR4 是第一个被发现 HIV - 1 嗜 T 细胞(T cell-tropic)毒株的共同受体。此后不久,先后有 5 个不同的研究小组成功地鉴定出 HIV - 1 嗜巨噬细胞(macrophage-tropic)毒株的共同受体—CCR5。某些 HIV - 1 毒株的共同受体选择性并不强,可感染表达 CXCR4 或

收稿日期:2001 - 10 - 19

作者简介:邱阳,理学博士,电话:(010)62092444,

E-mail: biophy@mail.bjmu.uedu.cn.

CCR5的细胞,故称为双重嗜性(dual-tropic)毒株。此外,少数毒株的共同受体可为CCR3、CCR2b和CCR1,但必须与CXCR4或CCR5同时表达。

共同受体的分离和鉴定进一步阐明了HIV-1感染细胞的复杂机制。Sartentan等应用一种新的病毒子结合实验直接观察了gp120、CD4和HIV-1共同受体之间的相互作用,证明只有在CD4和共同受体同时存在的条件下,HIV-1才能有效地与靶细胞结合^[2]。但由于HIV-1共同受体的三维结构尚未得到解析,我们还不能完全理解HIV-1毒株的不同趋向性。目前得到证实的是:在缺少CD4时,gp120和HIV-1共同受体的亲和力非常低,而在缺少gp120时,CD4分子仍能 and HIV-1共同受体结合^[3]。由此,我们得出一个有趣的推论:不同的HIV-1共同受体与CD4分子的竞争结合能力可能决定了HIV-1毒株的趋向性。

HIV-1共同受体在病毒感染和病程发展的过程中究竟起什么作用,目前还不清楚。Conner等观察到HIV-1在感染初期主要利用CCR5作为共同受体,随着病程发展,HIV-1开始使用CCR5、CCR3、CCR2b及CXCR4作为共同受体,同时CD4⁺T细胞的数量迅速减少^[4]。R.Weiss曾提出,在HIV进化的初期,趋化因子受体可能就是HIV的受体,而CD4作为HIV的受体则是进化适应的结果。

通过利用大量CCR5的突变体、嵌合体和类似物来分析CCR5的结构与HIV感染的关系,证明了CCR5的N端对于嗜巨噬细胞株的HIV-1感染起关键作用,是CCR5与gp120结合的主要位点。Farzan等^[5]发现CCR5 N端的一段富含Tyr残基的结构单元是共同受体与HIV结合的关键区域,这一功能域已被用来鉴定新的HIV共同受体。另外,CCR5胞外的环状结构和Lys197、Asp276也对HIV感染起重要作用^[6]。

HIV-1共同受体的发现为我们解释了HIV-1易感性高低的原因。某些趋化因子受体基因突变的人群对HIV-1产生抵抗力,使HIV-1无法进入人体细胞,从而失去感染和复制的能力。据分析,美国白人的CCR5基因突变率为10%,黑人却仅为1.6%。我国学者已采集研究了1300个中国人的CCR5基因,其中仅3人有基因突变,这一发现无疑为国人敲响了警钟。

1.2 HIV-1与靶细胞膜的融合

HIV-1属于包膜病毒,只有当其包膜和靶细

胞的质膜融合之后,病毒的核心蛋白和遗传物质才能进入宿主细胞,在宿主细胞内进行复制,并随宿主细胞的分裂传至子代细胞,造成病毒感染在体内的扩散,所以,膜融合是HIV-1感染细胞的一个关键过程。

由于生物膜的高度水化状态、静电斥力和封闭的球状结构所形成的屏障,使膜融合成为一个能量不利的过程(energetically unfavorable event)。为了克服上述三重障碍,HIV-1使用表面糖蛋白gp41直接与靶细胞的脂膜相互作用,促使病毒包膜和靶细胞膜融合,所以,gp41也称为HIV-1的融合蛋白。gp41诱导的膜融合过程的研究受到了广泛的关注并已取得显著成绩。

1.2.1 gp41的结构

和其它包膜病毒的融合蛋白一样,gp41也属于I型整合膜蛋白,分子的C端位于病毒包膜以内,而巨大的N端位于包膜外部。研究指出,gp41至少存在两种主要构象,一种是天然的,也称为无融合活性的构象(nonfusogenic conformation),是病毒从被感染细胞中出胞后,病毒包膜上糖蛋白所具有的构象,当gp120和靶细胞膜上的受体结合后,gp41即发生构象变化,具备了诱导膜融合的能力,此时的构象称为融合活性构象(fusion-active conformation)。

gp41存在两种构象的证据来源于两个方面,第一方面为间接证据:gp120与受体的结合使gp41暴露出更多的抗原决定簇并使gp120与gp41解离,天然状态的gp41(与gp120非共价联结)和在昆虫细胞中表达的gp41(无gp120)具有不同的抗体反应活性;第二方面为直接证据:突变实验指出,gp41核心结构中的氨基酸残基改变后将会影响HIV-1的感染效率及融合性能,却不影响gp41/gp120复合物的正常表达及与受体的结合。

gp41的N端是一段高度疏水的、富含Gly的序列;与N端相邻的是两段4,3七残基疏水重复序列(heptad repeat)对形成复合螺旋(coiled coil)的结构特征起重要作用。位于这两段七残基疏水重复序列之间的是一个含有两个Cys残基的环状区(loop region)。Gallaher等和Chamber等早在1989年和1990年就比较并描述了包膜病毒的融合蛋白的结构相似性,他们预测,与融合蛋白的N末端疏水序列相邻的结构应为coiled coil。此后,Wild等、Blacklow等和Lu等人应用合成多肽研究了相应部分的结构并据此推测出gp41分子中的两段4,3七

残基疏水重复序列成反平行的三股螺旋的二聚体^[7]。这些预测和推论于 1997 年得到了 X - 射线晶体分析结果的证实^[8] :gp41 的核心结构是一个由三个发卡结构 (hairpin) 紧密排列而成的六聚体螺旋束, 其中, gp41 的 N 端螺旋形成中心的三聚体 coiled coil, 而 C 端螺旋以反平行的方式堆积在 N 端螺旋形成的疏水槽表面, 组成外层的三聚体螺旋 (图 1)^[8]。这种排列方式使 gp41 N 末端的疏水序列

和 C 末端的跨膜区域位于螺旋束的同一端, 有利于病毒包膜和靶细胞膜相互靠近 (见后文)。实验证明, 化学合成的 gp41 C 端的多肽 (C43, C34, T649 和 DP178) 在 nM 数量级即可有效抑制 HIV - 1 感染和合胞体形成; 但如果把上述多肽与 HIV - 1 共同温育后再移走, 则不能影响病毒进入靶细胞^[9]。这些现象提示我们, gp41C 端的多肽不能与 gp41 的天然构象相互作用, 但却在 gp41 构象变化的过程

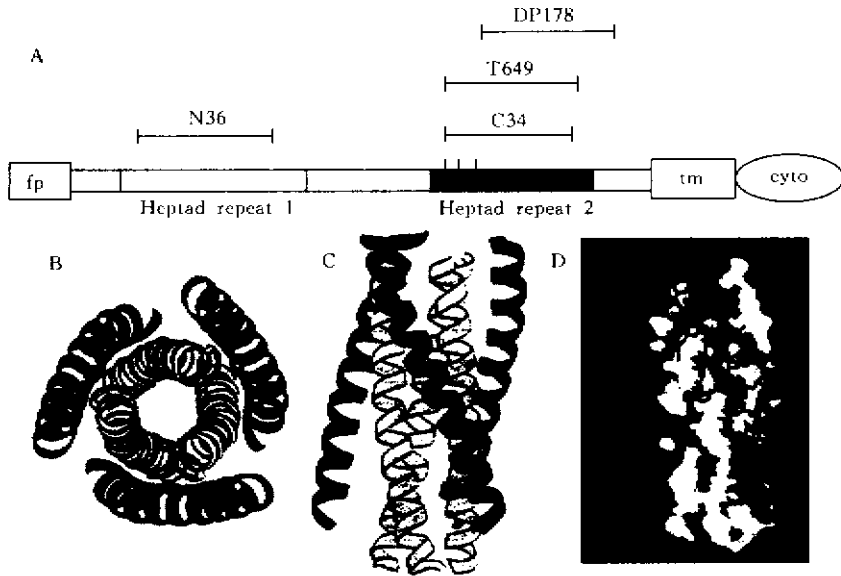


Fig.1 The structure of HIV - 1 gp41. A. The scheme of the primary structure of gp41. B, C and D. The nuclear hairpin structures of gp41 hexamer

中和 gp41 的 N 端结合, 抑制 gp41 形成六股螺旋束, 进而抑制 HIV - 1 进入靶细胞。另一方面, Lu 等证明^[7], gp41 N 端螺旋区和 C 端螺旋区组成的多肽不能抑制 gp41 诱导的膜融合, 没有抗病毒活性。这些结果说明六股螺旋结构代表了 gp41 的融合活性构象。Chan 等^[8]把 gp41 构象变化的中间过渡态称为“前发卡 (prehairpin)”结构, 在这一阶段, gp41 N 端螺旋和 C 端螺旋还未发生结合, 所以化学合成的 gp41 C 端多肽能够与 gp41N 端区域结合, 从而抑制 gp41 形成融合活性构象。X - 射线晶体衍射未能显示出 gp41 N 末端的疏水序列以及连接 N 端螺旋与 C 端螺旋的 39 个氨基酸残基的结构。Weissenhorn 等认为 gp41 N 端螺旋和 C 端螺旋之间的序列会形成一个短的被二硫键连接的环, 起到改变构象的作用。

1.2.2 HIV - 1 融合肽的结构 - 功能关系

酶解过程将 gp160 分解成 gp120 和 gp41 后, gp41 获得了一个新的 N 末端, 该末端由一段高度

保守的疏水序列组成, 在 gp41 构象变化之后被暴露出来。这段序列起着“桥”的作用, 可以直接与质膜相互作用, 将 HIV - 1 与靶细胞的质膜连接起来, 称为 HIV - 1 融合肽。gp41 形成融合活性构象之后, 一方面, 其跨膜区域 - gp41 的 C 端螺旋将与 N 端螺旋相互结合, 病毒包膜和靶细胞膜由于 gp41 的两个末端的位置变化驱使而相互靠近, 膜融合的能量垒被降低; 另一方面, gp41 的 N 末端插入质膜, 扰乱了靶细胞膜的脂双层结构, 破坏膜稳定性, 给病毒包膜和靶细胞膜的融合提供了前提条件。Freed 等人用分子生物学点突变的方法已经确定, HIV - 1 融合肽大约由 25 个左右的氨基酸残基组成。并且证明, 用亲水性氨基酸残基取代其 N 末端的某个或某些疏水性氨基酸残基之后, gp41 引起的合胞体形成率将会大大降低^[10]。这一结果说明, HIV - 1 融合肽的一级结构和疏水性对 gp41 诱导的膜融合过程起关键作用。

目前, 多采用化学方法合成代表 HIV - 1 gp41

N末端的多肽,在人工脂质体模型上研究这些多肽诱导膜融合的机理。这样做不仅简化了研究体系,而且还可以直接观察单一因素在膜融合过程中所起的作用。大量实验已经证实, gp41 N末端的23肽(残基519-541)不但具有破坏脂质体稳定性、诱导脂质体融合的作用,也能使人红细胞或CD4⁺淋巴细胞溶解^[11,12]。表1是gp41 N端23肽及其突变体诱导的合胞体形成率,“—”代表突变后的氨基酸残基。

Table 1 Syncytium formation induced by the 23 amino acids peptide and mutations of the gp41 N terminus^[10,13]

Primary structure of gp41 N-terminal 23 peptide and its mutants	Syncytium formation (%)
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS	100
<u>E</u> VGIGALFLGFLGAAGSTMGARS	4
A <u>E</u> GIGALFLGFLGAAGSTMGARS	<2
AVGIGALFRGFLGAAGSTMGARS	<2
AVGIGALFLGFLGA <u>E</u> GSTMGARS	<2
AV <u>V</u> IGALFLGFLGAAGSTMGARS	34
AVG <u>I</u> VALFLGFLGAAGSTMGARS	45
AVGIGAL <u>V</u> LGLFLGAAGSTMGARS	33
AVGIGALFL <u>V</u> FLGAAGSTMGARS	0
AVGIGALFLG <u>V</u> LGAAGSTMGARS	15
AVGIGALFLGFL <u>V</u> AAGSTMGARS	6
AVGIGALFLGFLGAA <u>V</u> STMGARS	0
AVGIGALFLGFLGAAGSTM <u>V</u> ARS	45
AVGIGAL <u>A</u> LGA <u>L</u> GGAAGSTMGARS	0
AVGIGALFL <u>V</u> FL <u>V</u> AAGSTMGARS	0
<u>V</u> VGIGAL <u>L</u> LGLFLGAAGSTMGARS	4

由上表可以看出,23肽N末端及分子中央的疏水性氨基酸残基(Phe8,11,Leu9和Ala15)对融合肽功能的发挥起决定作用,此外,第10、13和16位的Gly残基也起了不可替代的作用。虽然这几个位置的Gly残基都被疏水性更强的Val残基取代,但突变体的融合效率却表现为不同程度的降低。由此看来,HIV-1融合肽的疏水性并不决定一切,Gly残基可能因其体积小、活动性大的分子特征对HIV-1融合肽功能的发挥起重要作用。Delahunty等认为HIV-1融合肽形成 α -螺旋后,第3,5,10,13,16,20位的Gly残基位于 α -螺旋的同一外侧,形成甘氨酸条形特征序列(glycine strip motif),有助于分子与分子之间发生紧密、稳定的相互作用^[14]。

除了23肽之外, gp41 N末端的13肽、16肽、

28肽、31肽和33肽都具有诱导膜融合的功能。

在诱导膜融合时, HIV-1融合肽究竟采取什么样的构象,现在还没有定论。一部分学者认为HIV-1融合肽实现其功能时的二级结构是 α -螺旋^[15],但另一部分人认为HIV-1融合肽的活性构象是 β -折叠^[16]。之所以出现分歧的原因在于现有的技术方法只能探测融合肽与脂膜作用后所采取的平衡构象,而融合肽诱导膜融合的过程则是动态变化的,要确切掌握HIV-1融合肽结构与功能的关系,还需要进一步了解HIV-1融合肽在膜中的三维结构。

综上所述, HIV-1进攻靶细胞的过程可概括为以下四个步骤:(1)gp120与靶细胞表面的受体分子结合,使病毒附着于靶细胞表面;(2)gp41发生构象变化,暴露出位于gp41 N末端的融合肽;(3)融合肽插入靶细胞膜,破坏膜结构;(4)gp41变化为最后的融合性构象,使病毒膜和靶细胞的质膜相互靠近,排除两膜中间的水分子,继而发生融合。

由于HIV-1融合蛋白构象的成功解析以及突变体研究的成果,我们了解了HIV-1进攻靶细胞的基本过程。进一步的问题是研究融合蛋白与脂双层的相互作用,以深入探索病毒包膜和靶细胞膜融合的分子机理。然而,由于研究手段的局限性,膜融合的中间状态难以分辨、不易捕捉。所以,膜融合的确切机理一直是个难解之谜。

目前对HIV-1融合蛋白诱导的膜融合机理有两种推测。一是形成“融合孔(fusion pore)过渡态^[17]”。这种假说认为,在HIV-1融合蛋白的作用下,HIV-1的包膜和靶细胞的质膜相互靠拢,同时,融合蛋白分子之间发生聚集,插膜后在靶细胞的质膜上重排并形成孔道,使细胞内容物漏出,脂双层的稳定性被破坏,细胞膜和紧密接触的病毒包膜发生融合,重新形成稳定的封闭脂双层。不过“融合孔”的存在和结构仍未得到实验证实。而且,大量研究证明,融合肽插膜很浅,不足以跨膜。这些证据对“融合孔”假说提出了质疑。相形之下,另一种假说较为合理,即形成“茎状(stalk)中间体^[18]”。这一假说认为,当HIV-1融合蛋白使病毒的包膜和靶细胞的质膜相互靠近并接触时,膜融合的能量已经大大降低,随后,两个互相接触的膜的外层磷脂朝向对方发生弯曲,形成茎状,导致两个膜的局部成为半融合接触,破坏了脂双层的稳定性,使磷脂分子发生重排。

2 HIV - 1 感染抑制剂的研究进展

HIV - 1 进攻靶细胞的机制研究所得的成就为研制安全有效的抗 HIV - 1 药物开辟了方向。

2.1 抑制 gp120 与受体结合

1996 年的文献报道 CCR5 基因中一段 32 碱基对的缺失可使人体免受 HIV - 1 感染, 而 CCR5 启动子的突变更可以延缓 AIDS 的病程发展^[19]。说明 HIV - 1 共同受体是抗 HIV - 1 药物设计的有效靶点。而且, 趋化因子自身就可以作为特异性的 HIV - 1 抑制因子, 利用趋化因子与其受体结合后产生的立体位阻来阻碍 gp120 和趋化因子受体的结合。1995 年 Cocchi 等发现经人嗜 T 淋巴细胞病 I 型 (HTLV - 1) 转化的或 HIV 感染者的 CD8⁺T 细胞培养上清液具有抑制 HIV 复制的作用。后从这些培养上清液中鉴定出三种 CC 亚类趋化因子, 即活化后可调节的、正常 T 细胞表达并可能分泌的因子 (RANTES)、巨噬细胞炎性蛋白 (MIP - I α 和 MIP - 1 β)。这些趋化因子单独或联合应用时均具有抑制效应, 以 RANTES 活性最强。趋化因子的抑制活性随 HIV 毒株的不同而有所差异。嗜巨噬细胞毒株受抑制程度最高, 主要见于 HIV 感染早期, 而嗜 T 细胞系毒株多不敏感, 且见于病程发展期。

由于趋化因子的使用会产生炎症反应, 不能作为理想的 HIV - 1 感染抑制剂, 变通的方法是利用结构修饰后的趋化因子、趋化因子受体的单克隆抗体、可以和趋化因子受体结合的多肽以及有机小分子来抑制 HIV - 1 感染。Clapham 等在 RANTES 的 N 端加上 hydrocarbon groups, 得到 N - oxyptane - RANTES (APO - RANTES), 和 RANTES 相比, APO - RANTES 可以更有效地与 CCR5 结合, 使 CCR5 很快从细胞表面内化到内体 (endosome) 并且不再循环到细胞膜上, 从而抑制 HIV - 1 感染大多数 CD4⁺ 和 CCR5⁺ 的原代培养细胞及细胞株^[20]。另外, 有机小分子由于口服吸收好、生物利用度高而具有更加优良的应用价值, 也是开发抗 HIV 药物的一个主要方向。Howard 等筛选了一系列具有趋化因子拮抗剂活性的小分子化合物, 发现一种 distamy 的小分子类似物 - NSC651016 能够抑制 HIV - 1 引起的合胞体形成和细胞融合。机理研究证明, 这种化合物不影响 gp120 和 gp41 的构象变化, 即不干扰 HIV - 1 与靶细胞膜上受体的结合, 而是通过抑制趋化因子与其受体的结合, 使 CXCR4 和 CCR5 受体内化, 下调 HIV - 1 共同受体

的水平, 从而抑制 HIV - 1 进攻靶细胞^[21]。

2.2 抑制 gp41 诱导的膜融合

gp41 作为抗 HIV 药物设计的一个靶点具有以下特点: (1) gp41 的序列保守性比 gp120 强, 针对 gp41 的药物可以具有更广的特异性, 引起病毒耐药性变异的机会少; (2) gp41 的核心结构已经明确, 给药物设计提供了结构信息; (3) 由于 gp41 的功能是介导病毒包膜与靶细胞膜融合, 因此相应的药物将能够阻止病毒进入细胞并保护未被侵染的细胞免受包括耐药毒株在内的病毒攻击。

gp41 分子中的两段 4, 3 七残基重复模式 (heptad repeats, HR) 分别与 gp41 胞外部分的 N 端和 C 端相连, 称为 NHR 和 CHR。NHR 和 CHR 的二级结构都是 α -螺旋, 是 gp41 寡聚和构象转化的结构基础。X - 射线晶体衍射显示 NHR 三聚体的表面有三段较长的疏水槽, 是与 CHR 肽段结合的区域, 这些疏水槽的一端呈现为 400Å³ 的袋状结构 (长 ~ 16Å, 宽 ~ 7Å, 深 ~ 5 - 6Å), 可以容纳 CHR 肽段的三个疏水残基: Ile635、Try631 和 Try628, 如果这三个残基被突变, NHR 和 CHR 的结合能力就会下降^[22], 说明该袋状结构是 NHR 和 CHR 结合的关键区域, 是抗 HIV 药物设计的靶目标。

1992 年, Wild 等报道用化学方法合成的 gp41 N 端多肽 DP - 107 (553 - 590 残基) 能够抑制 HIV - 1 诱导的细胞融合^[23]。Jiang 等^[24]在 1993 年也报道了另一种 gp41 C 端多肽 - SJ - 217 (630 - 659 残基) 在 nmol/L 水平即可抑制 HIV - 1 感染。1994 年, Wild 等又发现 gp41 C 端多肽 DP - 178 (638 - 673 残基) 抑制 HIV - 1 诱导的合胞体形成的效率是 DP - 107 的 1000 倍^[25]。在 I 期和 II 期临床实验中, 短期静脉注射 DP - 178 (或称 T 20) 后, 血浆中 HIV - 1 RNA 的浓度降低的水平与目前 3 - 4 种抗 HIV 药物联合使用所能达到的效果相当^[26], 这一多肽药物将于 2002 年由 Trimeris 公司推广上市。

gp41 C 端多肽抑制 HIV - 1 感染的机理可能在于以下两个方面: (1) 和 NHR 三聚体的疏水槽或疏水槽顶端的袋状结构相结合, 阻止 NHR 三聚体和 CHR 三聚体结合成六聚体, 使 HIV - 1 的包膜和靶细胞的质膜不能互相靠近, 失去融合的前提条件。(2) 和 gp41 的 N 端融合肽结合, 使融合肽不能正常发挥功能。

表 2 列举了可以和 NHR 三聚体的疏水槽或疏水槽顶端的袋状结构相结合的一些 CHR 肽段的类

Table 2 HIV-1 Entry Inhibitors Targeting the N36 Coiled Coil of the gp41 Glycoprotein

Inhibitor	Description	Target on the NHR coiled coil	Inhibitory Concentration (LC50) for HIV-1 entry or cell-cell fusion
C34	34-residue peptide	Hydrophobic groove and pocket	2-5nmol/L
DP178(T20)	36-residue peptide	Hydrophobic groove only	50-60nmol/L
P30	30-residue peptide	Hydrophobic groove only	7 μ mol/L
C7-Mn34-Mn42-P30	30-residue peptide with non-peptide elements	Hydrophobic groove and pocket	0.3 μ mol/L
D10-PX-2K	16-to 18-residue cyclic D-peptides	pocket only	3-200 μ mol/L

似物^[9]。

这些 CHR 肽段的类似物对细胞融合的有效抑制,尤其是 DP178 在临床试验中表现出的良好效果极大地鼓舞了抗 HIV 感染领域的研究者们,抑制 gp41 转变为融合活性构象成为抗 HIV 药物设计的另一个极具吸引力的目标。

由于外源性多肽易被体内的酶水解或被免疫系统清除,通常口服无效。所以 gp41 融合功能抑制剂的开发趋向于设计针对 N36 疏水槽袋状结构的、分子量较小的 C34 多肽类似物。表 2 中的 D10-PX-2K 是 Eckert 等设计的能与 N36 三聚体的袋状区域结合的环状多肽,均由 D 型氨基酸组成,克服了多肽被蛋白酶水解的缺点。但 D10-PX-2K 的结构仍需进一步优化,以缩小分子体积、提高抗融合能力。另外,利用组合化学库来筛选能与 N36 袋状区域结合的非天然化合物也是目前开发 gp41 功能抑制剂的一个方向, Ferrer 等用非天然化合物取代和 NHR 带状区域结合的 gp41 C 端多肽 P30(残基 628-665),检测了这一系列共 61,275 个杂交分子与 gp41 的 N 端螺旋结合的能力,表 2 中的 C7-Mn34-Mn42-P30 就是用这种方法筛选出来的。C7-Mn34-Mn42 是三种非肽结构,它们与 gp41 C 端的短肽 P30(残基 636-665)结合而成的杂化化合物的抗 HIV-1 感染效率比 P30 高约 20 倍, Ferrer 等认为 C7-Mn34-Mn42 模拟了 gp41 C 端三个关键的疏水性残基(Trp628, Trp631 和 Ile635)与 N 端带状区的结合。但是和天然的 CHR 相比,非天然物的结合能力显然要弱得多。Jiang 等认为带状疏水区内的静电相互作用(lys574)可能也是药物设计必须考虑的因素^[27]。

Jiang 等^[28]进一步提出仅仅针对袋状区域来设计抗 HIV 药物可能是一个误区,由于 gp41 的 NHR

和 CHR 有 10 个不同位置的结合点,袋状区域以外的结合位置可能也很重要,证据是(1)DP-178 不含与袋状疏水区结合的序列,但抗 HIV-1 感染的活性很强;(2)gp41 C 段的多肽在袋状疏水区结合位点以外发生的突变使其丧失抗 HIV-1 感染活性;(3)包括袋状疏水区结合序列的短肽不能抑制 HIV-1 感染;(4)CHR 的全序列多肽(残基 628-661)与 NHR 的结合能力很强(++++),而较短的多肽(残基 628-646)的结合能力则很弱(+),抗 HIV-1 感染能力也与该序列的长短正相关。Jiang 等认为 gp41 NHR 上至少有三个重要位点是其与 CHR 结合的关键。一是位于 NHR C 端的袋状疏水区;第二个位点位于 NHR 的中央,因为去除 NEQE(残基 656-659)的 gp41 C 端多肽 SJ-2176 将失去抗 HIV-1 感染的活性^[27];第三个位点是 NHR 的 N 末端,因为去除 WNWF(残基 670-673)后,DP-178 的抗感染活性消失^[24]。所以,与其中一个位点结合的小分子具有一定程度的抗 HIV-1 活性,如果联合应用分别与三个位点结合的小分子药物可能会获得最好的抗 HIV-1 感染效果。

如果说 gp41 的核心结构是诱导膜融合的结构基础,那么 gp41N 末端的融合肽则是其诱导膜融合不可缺少的武器。已经证明, HIV-1 融合肽扰乱靶细胞膜脂双层结构、引发膜融合的结构基础在于它高度疏水的一级结构,甚至一个氨基酸残基的改变也会使其丧失功能。这一特征使 HIV-1 融合肽明显区别于其它能和膜脂结合的多肽,如抗菌多肽、孔道形成多肽和表面活性肽。和 HIV-1 融合肽一样,这些多肽也通过与膜脂成分的直接作用实现生物学功能,但是它们的一级结构可以发生较大程度的改变却不影响功能的发挥。

实验表明,膜结合状态的 HIV - 1 融合肽可以发生自身聚集,形成三聚体或四聚体,这可能是 HIV - 1 融合肽诱导膜融合的分子机理之一。从这一现象出发 Kliger 等^[29]和 Pritsker 等^[30]推测并证实 gp41N 末端的多肽(包括 L 型和 D 型)可以部份抑制 HIV - 1 引起的细胞融合,他们认为这种抑制作用是由于多肽与融合蛋白 N 末端的相互结合而使 HIV - 1 融合蛋白 N 末端相互结合而使 HIV - 1 融合肽形成无活性的聚集体。D 型的 gp41N 末端多肽不被酶水解,可望成为抗 HIV 药物设计的另一新思路。

3 结束语

随着研究的深入, HIV - 1 感染人体细胞的机制日益明朗。HIV - 1 共同受体的发现和鉴定、gp41 的构象变化与病毒包膜和靶细胞膜融合关系的研究标志着 HIV - 1 研究领域所取得的最新成果。这些成果为抗 HIV - 1 感染药物的研制和开发提供了新的方向和具体策略。

目前已上市的抗 HIV/AIDS 药物中,大部分是针对 HIV 复制过程的逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂,这是 HIV 感染的病毒学研究成果给社会的回报。但是,这一类药物存在很多局限性,例如产生抗药性、治疗费用昂贵等。而针对 HIV - 1 进攻靶细胞的各个阶段来设计抗感染药物不仅可以直接抑制 HIV - 1 进入宿主细胞,达到理想的治疗效果,还可以克服抗药性,为开发安全有效的抗 HIV/AIDS 药物开辟了另一条充满希望的道路。DP - 178(T20) 临床试验的成功验证了这一设计思想的可行性。在 DP - 178 给我们提供的结构信息和研究模板的基础上,下一阶段的努力方向将是发展有效的小分子非肽药物,以克服多肽药物口服无效、生物利用度低的缺点。

参考文献:

- [1] Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV - 1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease[J]. *Annu Rev Immunol*, 1999,17:657 - 700.
- [2] Sattentau QJ, Moore JP. The role of CD4 in HIV binding and entry[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1993,342(1299):59 - 66.
- [3] Wu L, Gerard NP, Wyatt R, et al. CD4 - induced interaction of primary HIV - 1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR - 5[J]. *Nature*, 1996,384(6605):179 - 183.
- [4] Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, et al. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV - 1 - infected individuals[J]. *J Exp Med*, 1997,185(4):621 - 628.
- [5] Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P, et al. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV - 1 entry[J]. *Cell*, 1999,96(5):667 - 676.
- [6] Lu Z, Berson JF, Chen Y, et al. Evolution of HIV - 1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997,94(12):6426 - 6431.
- [7] Lu M, Blacklow SC, Kim PS. A trimeric structural domain of the HIV - 1 transmembrane glycoprotein[J]. *Nat Struct Biol*, 1995,2(12):1075 - 1082.
- [8] Chan DC, Fass D, Berger JM, et al. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein[J]. *Cell*, 1997,89(2):263 - 273.
- [9] Sodroski JG. HIV - 1 entry inhibitors in the side pocket[J]. *Cell*, 1999,99(3):243 - 246.
- [10] Freed EO, Myers DJ, Risser R. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990,87(12):4650 - 4654.
- [11] Rafalski M, Lear JD, DeGrado WF. Phospholipid interactions of synthetic peptides representing the N - terminus of HIV gp41[J]. *Biochemistry*, 1990,29(34):7917 - 7922.
- [12] Mobley PW, Curtain CC, Kirkpatrick A, et al. The amino - terminal peptide of HIV - 1 glycoprotein 41 lyses human erythrocytes and CD4⁺ lymphocytes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992,1139(4):251 - 256.
- [13] Delahunty MD, Rhee I, Freed EO, et al. Mutational analysis of the fusion peptide of the human immunodeficiency virus type 1: identification of critical glycine residues[J]. *Virology*, 1996,218(1):94 - 102.
- [14] Freed EO, Delwart EL, Buchsacher GL, et al. A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992,89(1):70 - 74.
- [15] Qiu Y, Sha YL, Huang LX, et al. Interaction of HIV - 1 fusion peptide and its mutant with lipid membrane[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2000,45(9):819 - 825.
- [16] Nieva JL, Nir S, Muga A, et al. Interaction of the HIV - 1 fusion peptide with phospholipid vesicles: different structural requirements for fusion and leakage[J]. *Biochemistry*, 1994,33(11):3201 - 3209.

致谢: 本文得到了林克樵教授和聂松青教授的大力支持,在写作的过程中,他们和我进行了有益的讨论,在此表示衷心的感谢!

- [17] Tse FW, Iwata A, Almers W. Membrane flux through the pore formed by a fusogenic viral envelope protein during cell fusion[J]. *J Cell Biol*, 1993,121(3):543–552.
- [18] Siegel DP. Energetics of intermediates in membrane fusion: comparison of stalk and inverted micellar intermediate mechanisms[J]. *Biophys J*, 1993,65(5):2124–2140.
- [19] Dean M, Carrington M, Winkler C, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study[J]. *Science*, 1996,273(5283):1856–1862.
- [20] Simmons G, Clapham PR, Picard L, et al. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist[J]. *Science*, 1997,276(5310):276–279.
- [21] Howard OM, Oppenheim JJ, Hollingshead MG, et al. Inhibition of in vitro and in vivo HIV replication by a distamycin analogue that interferes with chemokine receptor function: a candidate for chemotherapeutic and microbicidal application[J]. *J Med Chem*, 1998,41(13):2184–2193.
- [22] Dubay JW, Roberts SJ, Brody B, et al. Mutations in the leucine zipper of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity[J]. *J Virol*, 1992,66(8):4748–4756.
- [23] Wild C, Oas T, McDanal C, et al. A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992,89(21):10537–10541.
- [24] Jiang S, Lin K, Strick N, et al. HIV-1 inhibition by a peptide[J]. *Nature*, 1993,365(6442):113.
- [25] Wild CT, Shugars DC, Greenwell TK, et al. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994,91(21):9770–9774.
- [26] Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, et al. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry[J]. *Nat Med*, 1998,4(11):1302–1307.
- [27] Jiang S, Lin K. Effect of amino acid replacements, additions and deletions on the antiviral activity of a peptide derived from the HIV-1 GP41 sequence[J]. *Pept Res*, 1995,8(6):345–348.
- [28] Jiang S, Lin K, Strick N, et al. Inhibition of HIV-1 infection by a fusion domain binding peptide from the HIV-1 envelope glycoprotein GP41[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993,195(2):533–538.
- [29] Kliger Y, Aharoni A, Rapaport D, et al. Fusion peptides derived from the HIV type 1 glycoprotein 41 associate within phospholipid membranes and inhibit cell-cell fusion. Structure-function study[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(21):13496–13505.
- [30] Pritsker M, Jones P, Blumenthal R, et al. A synthetic all D-amino acid peptide corresponding to the N-terminal sequence of HIV-1 gp41 recognizes the wild-type fusion peptide in the membrane and inhibits HIV-1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998,95(13):7287–7292.

ADVANCES IN MECHANISMS OF HIV-1 ATTACKING HOST CELLS AND INHIBITORS IN RELATED STEPS

QIU Yang

(Department of Biophysics, School of Basic Medical Sciences, Peking University,
Beijing 100083, China)

Abstract: HIV-1 is the most popular and destructive virus that causes Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). HIV-1 attacks CD4⁺ cells specifically by two steps: 1. binding to the receptors on the target cell membranes by viral surface glycoprotein gp120; 2. fusing with the plasma membrane through the transmembrane glycoprotein gp41. After these two steps, the viral nucleoproteins and genetic materials are injected into the target cell and replicated in it. The cell membrane stability is disrupted. The inner and outer environments of cells lose balance, and lead to the death of cells. These acquired achievements of studying the mechanism of HIV-1 attacking target cells provide us with new ideas for exploiting effective anti-HIV/AIDS drugs.

Key Words: HIV-1; Mechanism of viral attacking; Inhibitor