

# 包膜病毒膜融合及其在生物医学中的应用

卞传秀, 杨建勇, 廖国阳, 李卫东

卞传秀, 廖国阳, 李卫东, 中国医学科学院协和医科大学医学微生物研究所  
云南省昆明市 650118  
杨建勇, 卫生部北京生物制品所 北京市 100024  
云南省科技厅新药专项基金资助项目, No. 2000XY05  
云南省技术创新人才项目, No. 2003PY07  
通讯作者: 李卫东, 650118, 云南省昆明市, 中国医学科学院协和医科大学  
医学微生物研究所. imblwd@yahoo.com.cn  
电话: 0871-8333576 传真: 0871-8334483  
收稿日期: 2005-04-07 接受日期: 2005-04-09

## 摘要

病毒结合到宿主细胞表面受体后, 启动了病毒融合蛋白的一系列构象变化, 暴露出融合肽, 使病毒包膜和细胞膜融合. 膜融合使病毒蛋白及病毒 RNA 基因组释放到宿主细胞内而感染宿主. 针对包膜病毒进入细胞的分子机制设计抗病毒药物和疫苗, 为防治疾病发生开辟了新的思路.

卞传秀, 杨建勇, 廖国阳, 李卫东. 包膜病毒膜融合及其在生物医学中的应用.  
世界华人消化杂志 2005;13(12):1437-1439  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1437.asp>

## 0 引言

病毒侵染细胞的生命周期需要吸附、侵入、脱壳、病毒成分合成、病毒粒子的装配和释放等一系列步骤, 这是一个连续的过程, 而且这主要针对有包膜的病毒而言. 按病毒外壳是否包裹着富含脂质的膜, 将病毒分为无包膜病毒和有包膜病毒. 无包膜病毒主要通过吞饮作用在网格蛋白的介导下进入被感染的细胞内<sup>[1-2]</sup>, 包膜病毒的入侵过程主要是病毒包膜和宿主细胞膜的融合过程, 两个膜融合成为一个膜, 从而使病毒侵入, 完成生命周期的第一个关键步骤. 在分子水平上研究这一过程, 找出阻止病毒侵入细胞的方法, 达到预防和治疗病毒疾病的目的<sup>[3-5]</sup>.

## 1 病毒包膜结构

病毒的包膜实际上是病毒外壳包裹着的一层富含脂质的膜, 从宿主细胞膜衍生而来, 故其反映了宿主细胞膜脂成分. 脂质若被脂溶性溶剂溶解, 包膜结构即遭到破坏, 病毒也就失去感染性<sup>[6]</sup>. 病毒包膜上有一种或几种病毒基因编码的包膜蛋白, 并且多数为糖基化的糖蛋白. 这些糖蛋白的重要功能是介导病毒包膜与细胞膜之间的融合<sup>[7]</sup>. 在分子水平上包膜病毒蛋白分为两类, 第 1 类以正黏病毒、副黏病毒、逆转录病毒、丝状病毒与冠状病毒的病毒进入蛋白为代表, 其主要特征为融合片段形成了螺旋化的卷曲螺旋. 第 2 类以甲病毒和黄病毒进入蛋白为代表,

其有内化融合顺序, 与其他的膜蛋白以异源二聚体的形式组装<sup>[8]</sup>. 不同包膜病毒膜蛋白结构有很大差异, 如流感病毒主要含有两种糖蛋白: 血凝素(HA)、神经酰胺酶(NA), HA和NA共同介导病毒与宿主的相互作用(即和受体唾液酸结合), HA具有诱发融合功能<sup>[9]</sup>. 人类免疫缺陷病毒(HIV), 其包膜主要糖蛋白为gp160, 其被细胞内酶裂解成gp120/gp41, 分别具有与靶细胞膜受体分子结合及诱发融合的功能<sup>[10]</sup>.

## 2 包膜病毒与膜的融合

包膜病毒与膜的融合方式可分为两类, 一类为非pH依赖型, 其中性pH下即可发生融合. 如HIV、疱疹病毒、冠状病毒、仙台病毒等. 另一类为pH依赖型, 在pH为5-6的条件下才能发生融合, 如流感病毒、水疱型口炎病毒、森林病毒. 前者融合先以受体介导的内吞作用, 后者在胞内体酸性环境下触发融合, 后者包膜直接与细胞膜融合. 但是无论哪种情况都需要包膜上特异糖蛋白介导<sup>[11]</sup>. 以流感病毒和HIV为例, 包膜糖蛋白在宿主细胞内以前体蛋白形式合成(流感病毒HA<sub>0</sub>/HIVgp160), 然后被蛋白酶裂解为两个表面亚单位(HA<sub>1</sub>/gp120)及跨膜亚单位(HA<sub>2</sub>/gp41), 表面亚单位用于识别及结合到宿主细胞的特异性受体, 跨膜亚单位包含融合肽区域, 是病毒融合的功能单位, 共同特点是形成同源三聚体, 这种结构对维持包膜病毒包膜蛋白完整性和“隐藏”融合肽都十分重要<sup>[12]</sup>.

对包膜病毒来讲, 膜融合是一种非常有效的递送病毒至胞质的方式, 在膜融合过程中关键一步是病毒包膜蛋白的构象经历显著变化. 根据最新提出的亚稳定状态假说<sup>[13]</sup>: 多种病毒包括脊髓灰质炎病毒、流感病毒等病毒的包膜蛋白处于亚稳定状态, 病毒蛋白与受体的结合或pH的改变(或者二者均有, 但两个过程均有争议)能提供能量, 克服病毒进入时的能量障碍, 使病毒达到一个遗传上稳定的有利状态. 转变到这种状态的能量使不稳定的病毒蛋白外在化. 病毒包膜蛋白结构的转变、内在化不稳定膜序列表现为外在化的活性的过程克服了能量障碍, 诱导形成膜孔和膜融合孔.

## 3 病毒抑制剂、抗体与疫苗

3.1 病毒抑制剂 病毒进入抑制剂在细胞外与病毒结合阻止病毒进入细胞, 与靶向胞内的病毒进入机制相比, 设计药物相对比较容易, 成为药物设计中一个有吸引力的方向, 从而防止病毒性疾病发生. 在该方面应用HIV-1抑制

剂的研究取得了一定的进展<sup>[14]</sup>. 根据 HIV-1 进入细胞的机制: 当 gp120 亚基结合 CD4 的最外面 IgG 结构域时, 糖蛋白构型发生变化, 使病毒和辅助受体 CXCR4 或 CCR5 结合, 激发 gp41 亚基具有融合能力. 设计的抗 HIV-1 药物有 (1) 抗 CD4 与 gp120 结合的抑制剂: CD4 的类似物; gp120 各表位单抗如 PRO540、FP21399; 可与 CD4 结合的分子如 PRO2000、BMI-378806<sup>[15]</sup>. (2) 阻断 gp120 与辅助受体结合的抑制剂: AMD3100 (CXCR4 的拮抗剂) 等. 张颖 *et al*<sup>[16]</sup> 将 HIV-1 辅助配体 RANTS 和 SDF-1 的逆转录病毒载体转染至人外周血淋巴细胞, 在细胞内表达并与 HIV-1 辅助受体 CCR5 和 CXCR4 结合, 以 HIV-1 DP1 株攻击后没见到合胞体形成; 第 4、7、10 d 分别发现 p24 抗原分泌显著地受到抑制.

包膜病毒进入细胞过程中可形成中间过渡态复合物. 这种复合物暂时暴露, 病毒可能还没进化出靶向这些抑制剂的结构. 此外, 这些保守的过渡态对病毒来说也是重要的, 可使病毒不容易被诱变的其他结构所取代. 包膜病毒抑制剂在这方面也取得了进展, 如 T-20, 其来自于 HIV gp41 羧基末端 7 个一组的区域, 可与 gp41 N 端结合形成超螺旋, 阻止 gp41N 端形成螺旋发夹结构前体, 抑制 HIV 进入. 目前 T-20 已被美国 FDA 批准<sup>[17]</sup>, 正进入 III 期临床.

病毒进入抑制剂研究中一个有前景的方向就是研制结合病毒表面一个相同或不同的蛋白的几个区域的多价抑制剂, 从而克服病毒蛋白诱变后逃避抑制剂作用. 例如流感病毒和 HIV-1 多亚基可溶性受体, 体外是强效进入抑制剂, 体内在抑制病毒方面也起到一定作用<sup>[18]</sup>. Fang *et al*<sup>[19]</sup> 研制出多价重组抗体融合蛋白受体抑制剂 CFY196, 其由人化 MA1A6 Fab 片段和人 IgD 铰链的一个连接器融合而成, 比 HRV 受体 ICAM-1 的单抗更能阻止鼻病毒 HRV 感染.

3.2 中和抗体和疫苗 中和抗体通常可以黏附到细胞或结合至过渡态复合物抑制病毒进入<sup>[20]</sup>. 从人血浆中获取的免疫球蛋白已成功用于治疗多种病毒感染, 包括抗狂犬病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、麻疹病毒、巨细胞病毒等. 但机体一旦感染病毒后, 治愈率是非常低的, 单抗 Synagis 可高亲和力地结合呼吸道合胞病毒 RSV 的 F 蛋白, 体内抑制病毒进入和细胞融合. Synagis 比目前使用的多克隆免疫球蛋白更有效, 广泛应用于临床, 治疗 A 型 RSV、B 型 RSV 分离株感染<sup>[21]</sup>.

抗体或衍生物虽然能结合至表位上抑制病毒进入, 但是在抗病毒应用方面仍存在潜在问题: 抗体形态相对大、病毒包膜蛋白与受体接触机会有限, 这些都会限制抗体分子与病毒结合. 通过对鼻病毒和脊髓灰质炎病毒的 X-射线晶体结构分析表明, 微小 RNA 病毒能通过受体结合位点 2 nm 深 2 nm 宽的峡谷的非保守氨基酸残基的突变来避免抗体的中和作用<sup>[22]</sup>. HIV-1 中和抗体体外强有效然而体内效果却不成功, 说明目前应考虑从病毒抗原性方面来设计疫苗<sup>[23]</sup>.

#### 4 病毒抑制剂研究中的挑战

同其他抗病毒、抗癌药物研究过程中遇到的困难一样, 病毒抑制剂研究中的主要问题也是抗药物突变株的产生、药物体内效率低和药物的毒副作用. 此外, 病毒进入抑制剂的研制还有特异性困难: (1) 病毒进化出了识别受体的机制: 使用可变环、不完全补体结合表面、低聚物的潜伏、糖基化<sup>[18]</sup>、构象的伪装及多价相互作用来逃避宿主对其的识别<sup>[24]</sup>. (2) 用小分子的抑制剂来抑制蛋白-蛋白之间高亲和力的相互作用, 抑制效果不很理想. (3) 病毒通过直接的细胞间转移抵抗抑制剂. (4) 在临床使用中, 病毒进入抑制剂的作用机制或治疗方案都没建立在结构模式的基础上, 大量的抑制剂仍为小的有机分子、肽和抗体<sup>[11]</sup>.

因此, 对包膜病毒进入细胞的分子机制的研究仍是一个非常重大的挑战. 现在的主要目标是测定病毒包膜蛋白、相关细胞受体的结构, 以便对病毒嗜亲性与致病机制有更详尽的了解. 以免疫原作用机制为基础设计疫苗对临床应用有一定的帮助. 总之对致病性相关的抗各种包膜蛋白的研究可加速对进入机制的理解, 有助于防止病毒性疾病发生.

#### 5 参考文献

- Chazal N, Gerlier D. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67:226-237
- Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekens R. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* 2004;377(Pt 1):1-16
- Weissenhorn W, Dessen A, Calder LJ, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC. Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol Membr Biol* 1999;16:3-9
- 徐耀先, 周小峰, 刘立德. 分子病毒学. 第一版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2000:64-72
- Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* 2001;70:777-810
- Tamm LK, Crane J, Kiessling V. Membrane fusion: a structural perspective on the interplay of lipids and proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2003;13:453-466
- Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998;280:1884-1888
- Heinz FX, Allison SL. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr Opin Microbiol* 2001;4:450-455
- Wiley DC, Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 1987;56:365-394
- Freed EO, Myers DJ, Risser R. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4650-4654
- Smith AE, Helenius A. How viruses enter animal cells. *Science* 2004;304:237-242
- 王小佳, 张卫红, 汪明, 高福. 囊膜病毒膜融合的分子机制. *生物化学与生物物理进展* 2004;31:482-490
- Remeta DP, Krumbiegel M, Minetti CA, Puri A, Ginsburg A, Blumenthal R. Acid-induced changes in thermal stability and fusion activity of influenza hemagglutinin. *Biochemistry* 2002;41:2044-2054
- 余勇, 肖庚富, 李敏, 詹睿, 张文涛. 人类免疫缺陷病毒 HIV-1 进入细胞的分子机制及相关药物的研究. *生物化学与生物物理进展* 2003;30:13-17
- Jacobson JM, Lowy I, Fletcher CV, O'Neill TJ, Tran DN, Ketas TJ, Trkola A, Klotman ME, Maddon PJ, Olson WC, Israel RJ. Single-dose safety, pharmacology, and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibi-

- tor PRO 542 in HIV-infected adults. *J Infect Dis* 2000;182:326-329
- 16 张颖, 白雪帆, 李靖, 张岩, 王九平, 孙永涛, 黄长形. 淋巴细胞 HIV-1 辅受体表型剔除阻断病毒感染的研究. *中华微生物学和免疫学杂志* 2004;24:72-75
- 17 Matthews T, Salgo M, Greenberg M, Chung J, DeMasi R, Bolognesi D. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:215-225
- 18 Kwong PD, Doyle ML, Casper DJ, Cicala C, Leavitt SA, Majeed S, Steenbeke TD, Venturi M, Chaiken I, Fung M, Katinger H, Parren PW, Robinson J, Van Ryk D, Wang L, Burton DR, Freire E, Wyatt R, Sodroski J, Hendrickson WA, Arthos J. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* 2003;420:678-682
- 19 Fang F, Yu M. Viral receptor blockage by multivalent recombinant antibody fusion proteins: inhibiting human rhinovirus (HRV) infection with CFY196. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:23-25
- 20 Braisted AC, Oslob JD, Delano WL, Hyde J, McDowell RS, Waal N, Yu C, Arkin MR, Raimundo BC. Discovery of a potent small molecule IL-2 inhibitor through fragment assembly. *J Am Chem Soc* 2003;125:3714-3715
- 21 Pollack P, Groothuis JR. Development and use of palivizumab (Synagis): a passive immunoprophylactic agent for RSV. *J Infect Chemother* 2002;8:201-206
- 22 Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 1985;229:1358-1365
- 23 Dimitrov DS. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:109-122
- 24 Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003;422:307-312

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》 2004年版内科学类的核心期刊

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 依据文献计量学的原理和方法, 经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊, 编入《中文核心期刊要目总览》2004年版(第四版)。本版核心期刊研究, 被列为“2001年国家社会科学基金项目”。该书定于2004-07由北京大学出版社出版。

该书已于1992, 1996, 2000年出版过三版, 在社会引起了较大反响、图书情报界、学术界、出版界和科研管理部门对这项研究成果都给予了较高评价, 普遍认为他适应社会需要, 为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据, 促进了中文期刊编辑和出版质量的提高, 已成为具有一定权威性的参考工具书。为了及时反映中文期刊发展变化的新情况, 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 开展了新一版核心期刊的研究工作, 课题组认真总结了前三版的研究经验, 对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究, 在此基础上, 进一步改进评价方法, 使之更加科学合理, 力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况。本版核心期刊定量评价, 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等7个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库达51种, 统计文献量达到943万余篇次(1999-2001年), 涉及期刊1万2千种。本版还加大了专家评审力度, 1873位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1800种核心期刊, 分属七大编75个学科类目。该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成, 不仅可以查询学科核心期刊, 还可以检索正在出版的学科专业期刊, 是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书。

该书由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会合编, 北京大学图书馆戴龙基馆长和蔡蓉华研究馆员任主编, 北京高校图书馆期刊工作研究会成员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学书报资料中心等相关部门的百余名专家和期刊工作参加了研究。(世界胃肠病学杂志2004-05-05)