

人类免疫缺陷病毒-1 进入细胞的分子机制 及相关药物的研究

余 勇 肖庚富 李 敏 詹 睿 张文涛*

(武汉大学生命科学院现代病毒研究中心, 武汉 430072)

摘要 艾滋病 (AIDS) 是由人类免疫缺陷病毒 (HIV) 侵染表达 CD4 表面抗原 (CD4⁺) 的 T 淋巴细胞而引起的。艾滋病病毒进入 CD4⁺ T 淋巴细胞首先是通过病毒与细胞膜的融合来完成的。该融合过程涉及到病毒表面膜蛋白 (gp120 和 gp41) 与细胞表面受体蛋白 (CD4 和 CCR5 等) 之间的相互作用。根据对这些蛋白质分子结构及作用机制的认识, 从破坏病毒与细胞的融合入手, 设计新型的抗艾滋病药物及疫苗, 已成为目前药物开发的新热点。

关键词 人类免疫缺陷病毒 (HIV), 分子相互作用, 抑制

学科分类号 Q78

艾滋病 (AIDS) 是由人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染造成的。自从 20 世纪 80 年代首次报告艾滋病临床病例以来, 艾滋病已经成为人类前所未有的最具毁灭性的疾病。至今, 发达国家已投入了大量的资金及人力资源, 对 HIV 本身以及抗 HIV 的药物进行研究。目前被批准用于临床的 13 种治疗 AIDS 的药物主要分为病毒逆转酶抑制剂和蛋白酶抑制剂两大类, 这些药物主要是通过和底物竞争结合酶或结合到酶上使之变性, 抑制酶的活性, 从而破坏 HIV 的生活周期, 达到抑制病毒复制的目的。这些药物可以在一定程度上延缓病人病情的恶化, 但并不能彻底清除患者体内的病毒。大部分病人一直生活在病毒低水平复制的状态中, 长期用药患者将产生抗药性, 并且一旦停止用药, 病人体内病毒水平很快又恢复到甚至超过用药前的水平。这些药物在杀伤病毒的同时, 也破坏了身体内

正常的生理机能, 使病人产生较大的药物反应。而且这些药物价格昂贵, 众多患者没有能力负担。因此迫切需要研制新型的, 尤其是与现有药物作用机制不同的抗艾滋病药物。

抗艾滋病药物的开发极大地依赖于我们对 HIV 的结构、生命周期以及侵染宿主细胞的分子生物学机制的认识。HIV 侵染宿主细胞从病毒包膜与细胞膜的融合开始。融合过程可简单地概括为以下 3 个步骤 (图 1): a. 病毒的表面糖蛋白 gp120 与细胞表面受体蛋白 CD4 以高亲和力结合, 吸附到宿主细胞上; b. gp120 再与宿主细胞表面辅助受体 (以细胞趋化因子受体 CCR5/CXCR4 为代表) 相互作用, 使病毒与宿主细胞膜更接近; c. gp41 产生一系列构象变化, 其 N 端的融合肽片段插入宿主细胞膜, 导致病毒包膜与细胞膜的最终融合, 病毒 RNA 进入细胞。

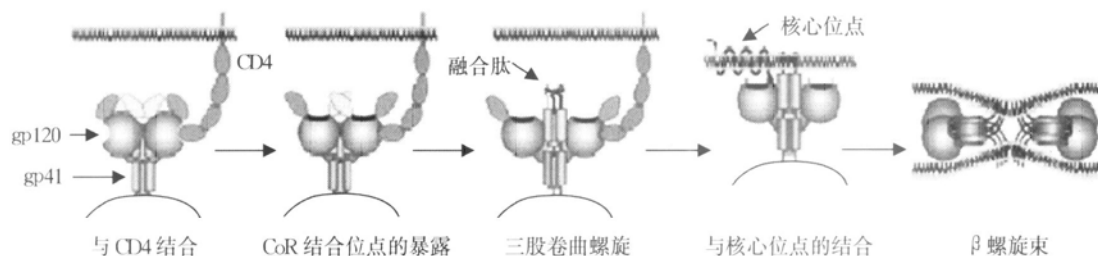


Fig. 1 The process of HIV entry^[1]

图 1 HIV 进入宿主细胞的过程

近年来, 随着结构生物学技术在艾滋病研究中的广泛应用, 我们对融合过程涉及到的病毒膜蛋白 gp120 和 gp41, 细胞表面受体蛋白 CD4 和辅助受

* 通讯联系人。

Tel: 027-87869897, E-mail: mmv@whu.edu.cn

收稿日期: 2002-05-30, 接受日期: 2002-06-28

体 CCR5 或 CXCR4 的分子结构, 以及他们的相互作用有了更深入的认识, 对 HIV 病毒进入宿主细胞的分子生物学机制有了更多的了解, 也为开发新型抗艾滋病药物提供了一条新的思路. 下面我们将首先概述融合过程涉及到的蛋白质分子结构特征, 然后再总结目前针对融合过程的 3 个步骤所进行的、以破坏 HIV 与宿主细胞的融合为目标的药物设计工作.

1 HIV 进入宿主细胞的分子基础

1.1 病毒膜表面蛋白 gp120 和 gp41 的结构特征

参与 HIV 进入 CD4⁺ T 淋巴细胞的主要是病毒表面蛋白 gp120 和 gp41. gp120 和 gp41 是由病毒全长 RNA 单剪接的产物 gp160, 在宿主细胞内质网内, 被细胞的蛋白酶水解而成的. gp120 和 gp41 以三聚体的形式, 通过 gp41 固定在病毒膜上. 其中 gp41 为跨膜蛋白, 其 C 端位于病毒膜内. X 射线衍射及核磁共振研究显示, gp41 的三维结构特征是: 单体 N 端的 α 螺旋与 C 端的 α 螺旋能形成反向平行双 α 螺旋结构, 在三聚体中三个单体通过分子间疏水力形成超螺旋结构, C 端的 α 螺旋位于超螺旋结构的外周^[2,3], 每一个单体中 gp41 的细胞外区域与 gp120 通过非共价键结合在一起. 每个病毒颗粒含有大约 50 个这样的三聚体.

比较来自不同病毒株的 gp120 的氨基酸序列发现, gp120 分子中有 5 个保守区 (C1~C5) 和 5 个多变区 (V1~V5). 保守区是 gp120 的核心结构, 是 gp120 与 CD4、辅助受体及 gp41 相互作用的主要位点. 多变区中 V1~V4 的底部通过分子内双硫键形成大的环状结构 (loop), 这些高变异性的环区都暴露在病毒表面^[4], 是 HIV 变异性高, 能逃避机体免疫监控的原因之一.

gp120 分子质量大, 构象多变, 糖基化程度高, 组成不均一, 很难结晶. 目前还没有完整的 gp120 的三维结构的报道. 在 1998 年报道的三组分复合物^[4] (包括修饰后的 gp120 核心部分、T 细胞表面受体蛋白 CD4 的 D1、D2 部分和单克隆抗体 17b 的 Fab 片段) 共结晶晶体结构中, gp120 核心部分包括 25 个 β 链, 5 个 α 螺旋和 10 个环状结构. gp120 折叠成两个主要的结构域: 内部结构域和外部结构域, 通过四段“桥型” β 折叠连在一起 (图 2). 修饰后的 gp120 仍然保留了与受体和抗体的结合能力, 说明 gp120 活性结构不受这些修饰的影响, 该晶体结构所提供的有关 gp120 的结构信息

有十分重要的价值^[3,4].

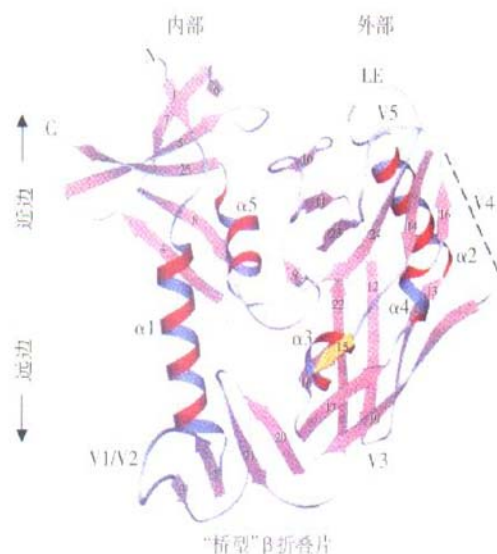


Fig 2 The structure of gp120^[4]

图 2 gp120 的结构^[4]

1.2 细胞表面受体蛋白的结构特征

HIV 通过作用于 T 淋巴细胞表面的 CD4 分子以及辅助受体 CCR5 或 CXCR4 进入宿主细胞. 其中 CD4 是 MHC II 类分子限制的 T 细胞 TCR 识别抗原的辅助受体, CD4 为单链跨膜糖蛋白, 人源 CD4 分子质量为 55 ku, 由 435 个氨基酸组成, 胞外区共有 4 个 IgSF 结构 (D1~D4), 其中 D1~D2 区是 HIV 的主要结合区域^[5]. CD4 是 HIV 的主要细胞受体, 除 CD4 这个主要受体以外, HIV 的进入还依赖于细胞表面膜蛋白 CCR5/CXCR4 作为辅助受体. 虽然在体外实验发现了多种辅助受体, 但在体内被证明的辅助受体只有 CCR5 和 CXCR4 两种. CCR5 是 HIV-1 的主要辅助受体, 是细胞因子 β 受体, 属于一类 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体^[6]. CCR5 的拓扑结构包括: 1 个胞外复杂的 N 端、3 个胞外环、3 个胞内环和 1 个胞内的 C 端.

2 HIV 侵入的分子机制及相应的药物设计

2.1 HIV 的吸附

2.1.1 gp120 与 CD4 的相互作用: HIV 进入细胞是从 CD4 与 gp120 的结合开始的, CD4 主要作用在 gp120 的内部结构域与外部结构域相互连接的一个凹下去的区域内, CD4 上 74.2 nm² 的面积和 gp120 上 80.2 nm² 的面积相互结合. CD4 胞外的 D1 和 D2 结构域参与了和 gp120 的相互作用, CD4 与 gp120 的相互作用主要发生在 22 个 CD4 氨基酸

残基和 26 个 gp120 氨基酸残基之间, 其中 22 个氨基酸残基位于 CD4 的第 25~64 氨基酸残基内, 但 gp120 的 26 个氨基酸则分布于 gp120 主链的 6 个片段 (V1/V2 茎部、环 I D 和 $\beta 15 \sim \alpha 5$ 的表面) 上. CD4 上 Phe43 和 Arg59 构成了与 gp120 作用的中心, Phe43 结合到 gp120 上由 Trp427、Trp112、Val225、Thr257、Glu370、Ile371 和 Asp368 按顺时针方向构成的腔内, Trp427 的吲哚环在作用的过程中向前滑动夹住 Phe43 的一侧, Glu370 位于 Phe43 苯环的底部, Asp368 在 Phe43 苯环的底部右侧夹住 Phe43. Phe43 的苯环叠在 Glu370 上, 通过氢键和 gp120 上第 425 和第 473 氨基酸残基上的羧基氧及 Trp427 的 NH 基团相互作用. Asp368 和 Arg59 的胍基上 N_H 原子与 CD4 中第 44 氨基酸残基上 NH 通过氢键相互连接, 这样为 Phe43 苯环上一个氢键的进入提供了最佳位置^[4, 7~9] (图 3).



Fig. 3 The interaction between gp120 and CD4^[4]

图 3 gp120 和 CD4 的相互作用^[4]

2.1.2 针对吸附过程的药物设计: 由于 CD4 与 gp120 的结合使 HIV 病毒颗粒吸附到宿主细胞表面, 因此当 CD4 与 gp120 的这种结合作用被阻断后, HIV 细胞的感染就会被终止. 有一些药物被设计用来阻断 CD4 和 gp120 之间的相互作用, 以达到抑制 HIV 的目的. 这些药物大致可以分为两类: a. 是结合到 gp120 上来阻断 HIV 对宿主细胞的吸附, 主要有 CD4 的类似物、gp120 各个表位的单克隆抗体和一些化学小分子^[6, 10]; b. 是结合到 CD4 分子上使 HIV 病毒颗粒无法与之结合从而来抑制 HIV 的感染, 主要是一些化学小分子、合成多肽.

目前第一种药物进入临床的有: PRO542^[11] 是一种由 CD4 的 D1~D2 区和 HIV 一种天然抗体 IgG2 的保守区融合而成的重组蛋白. PRO542 含有 4 个

gp120 的结合位点, 因而比溶液状态的 CD4 蛋白有更好的抗 HIV 活性和机体耐受性. FP21399^[12] 是一种抗 HIV 的化学小分子药物, FP21399 与 CD4 竞争结合到 gp120 的 V3 环上, 从而阻断 gp120 与 CD4 的相互作用, EC 值为 $0.03 \sim 1.8 \text{ mmol/L}$, 已经进入临床 II 期. 对于第二类药物, 有 PRO2000 和 SPC3 进入了临床实验阶段. PRO2000 是 1-甲基-5-磺酸钠萘的多聚体, 结合在 CD4 分子上阻碍了 gp120 的结合. 由于 PRO2000 结合的是 CD4 的保守序列, 所以 PRO2000 可以广泛地抑制多种 HIV 的感染, EC 值约为 $13 \text{ } \mu\text{mol/L}$. SPC3 是根据 gp120 V3 环上保守氨基酸序列设计的, 含有 8 个氨基酸的合成多肽. 由于 gp120 上 V3 环是与 CD4 结合的区域, 所以这个合成肽有一定的与 CD4 结合的活性^[13]. 除了以上这些已经进入临床的药物以外, 科研工作者还在积极地寻找针对病毒吸附到宿主细胞这一步的一些潜在药物. 一种 HIV 的天然抗体 2G1b12 经研究证明能有效地抑制 HIV 的感染, b12 主要识别 gp120 与 CD4 结合位点中高度保守的区域, 因此 b12 对大部分 HIV 都有中和活性. 晶体结构的研究结果表明, b12 有与 CD4 Phe43 类似的指状结构, 可以穿入 gp120 与 CD4 结合的腔内, 完全封闭 CD4 的结合, 从而达到阻断病毒对宿主细胞的目的吸附^[14].

2.2 HIV 与细胞的进一步结合

2.2.1 gp120 与辅助受体的结合: CD4 与 gp120 结合的作用有两个. 一是病毒吸附到宿主细胞上; 二是引起 gp120 构象发生改变——暴露出辅助受体的结合位点, 使得 gp120 进一步结合到宿主细胞表面. 动力学活性检测表明, CD4 的存在可以增强 gp120 与辅助受体之间的相互结合^[13, 15]. CCR5 的胞外区都参与了与 gp120 的结合, 但 gp120 主要作用在 CCR5 的 N 端和第二胞外区, 其中 CCR5 N 端的 9 个氨基酸 (10~18) 构成了与 gp120 结合的中心, 通过二硫键结合到 gp120 的保守区域, 特别是 10 位和 14 位的 Tyr 是结合的关键点^[16]. CCR5 的第二胞外区结合在 gp120 的 V3 环、C1、C2、C3 区上. CCR5 的 N 端在 CCR5 与 gp120 的结合上显得较为重要, 而 CCR5 的胞外结构特别是第二胞外区, 对于引起膜融合和病毒感染 gp120 构象的进一步改变显得更为重要^[16]. CCR5 中穿膜结构也与 CCR5 和 gp120 的结合有一定的关系, 当 CCR5 第 4 个穿过细胞膜与第 2 胞外区连接的 163 位 Arg 突变成 Gly 后, gp120 和 CCR5 的结合作用

明显下降^[17]。已证明第3穿膜区的 Met 与病毒进入过程中的信号转导有关^[16]。gp120 和 CD4 结合后 V1/V2 和 V3 环转动到面向宿主细胞成为 CCR5 结合的核心位点, V1/V2 环上 K121、T123 和 V3 环上 P438、P440、I420、Q422、K421、R419 通过疏水作用直接和 CCR5 连接, 并且这些氨基酸较为保守, 因此是药物作用的理想靶点^[8,9] (图 4)。

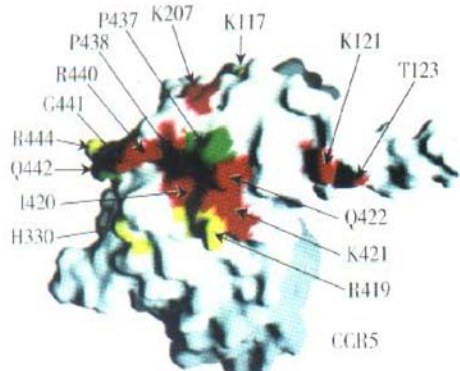


Fig. 4 The CCR5 binding sites on the surface gp120

图 4 gp120 表面的 CCR5 结合位点

2.2.2 阻断 gp120 与辅助受体结合的药物设计: 鉴于 CCR5 与 gp120 的相互作用发生在 N 端及第二胞外环结构相对复杂, 目前抑制 CCR5 功能的抗 HIV 药物也相对较少。TAK779^[18] 是一个小分子的 CCR5 抑制剂, 它作用在 CCR5 的第二胞外环上, 可以显著降低 CCR5 的天然配体 MIP-1 α , MIP-1 β 和 RANTES 与 CCR5 的相互作用。抑制 CCR5 介导的 Ca²⁺ 信号转导, 同时 TAK779 还可以阻碍 HIV-1 的 gp120 与 CCR5 的结合, 并且 EC₅₀ 约为 1.6~3.7 μ mol/L, 半衰期为 8.7 h, 目前 TAK779 已进入临床实验阶段。另外一个有 8 个氨基酸的 gp120 V2 环类似物的小肽, 被证明可以通过结合到 CCR5 上来阻断 gp120 与 CCR5 的结合, 从而达到抗 HIV 的作用。CCR5 N 端的单克隆抗体能较好地封闭 CCR5 的 N 端, 是潜在的抗 HIV 药物。一种根据 gp120 上 V2 环设计的多肽 T 被证明能够有效地阻断 gp120 和 CCR5 的结合^[17]。gp120 上的 CCR5 结合位点也是药物设计的靶位点, 一些 gp120 的天然抗体 (b17、CG10) 同样具有一定的抗 HIV 活性, 但由于这些天然抗体不易得到以及其分子太大, 所以目前还没有在药物应用上得到很好的结果^[9]。

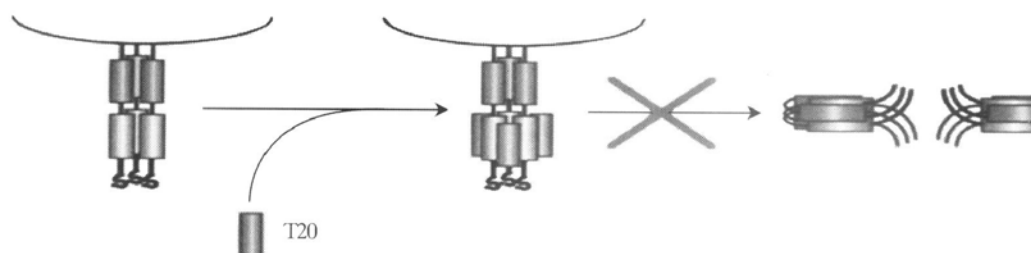
2.3 HIV 的进入

2.3.1 gp41 在病毒进入过程中的作用: 病毒表面

蛋白 gp41 在病毒进入过程中扮演着重要的角色。gp120 结合 CD4 和辅助受体 CCR5 后, gp120 的构象进一步改变, 引起 gp41 N 端的螺旋结构, 从由 N 端螺旋和 C 端螺旋组成的超螺旋发夹结构中释放出来, 这种结构的改变受到超螺旋中心疏水作用的影响。在 N 端 625 位的 Gln 变异成 Leu 后, HIV 的感染将会被大大地减低^[19]。释放出来的 N 端可以使病毒和细胞膜相互连接, N 端的 517~532 位氨基酸有很强的疏水性, 是插入宿主细胞膜的融合肽。当融合肽进入宿主细胞膜后, N 端螺旋和 C 端螺旋在亮氨酸/异亮氨酸的拉链结构作用下, 形成暂时的超螺旋发夹前体, 将病毒囊膜和细胞膜拉近, 利用膜自身的疏水作用使之融合^[19,20]。

2.3.2 gp41 抑制剂: 在膜融合过程中, gp41 的 N 端和 C 端是暴露的并且易受攻击, 所以药物设计的靶位点也多集中在这两个区域。一系列 N 端序列的合成多肽 (N 端多肽) 已被证明有一定的抗 HIV 的功能。这些多肽主要作用方式分为两种: 一种与 C 端螺旋结合形成超螺旋结构阻碍 N 端螺旋的进入, 达到抑制膜融合的目的; 另一种与 N 端螺旋结合自身形成超螺旋, 阻碍 N 端参与超螺旋发夹结构前体的形成, 从而抑制 HIV 的进入^[14,19,20]。DP107 (T21) 是一种 N 端多肽, 由 gp160 上 558~595 位的 8 个氨基酸组成, 结合在 gp41 的 N 端。目前一种针对 N 端螺旋融合肽的合成多肽 DP178 (T20), 已经进入 II 期临床并且最有可能成为被批准的此类抗 HIV 的药物。T20 由 gp160 上 643~678 位的 36 个氨基酸组成, 是一条富含 Trp 的亲水多肽链, T20 结合到细胞膜上并与 N 端连接, 中断了 gp41 超螺旋发夹结构前体的形成 (图 5)。T20 的 EC₅₀ 约为 1 μ mol/L, 明显少于其他的药物^[10,20], 有良好的药物开发前景。

综上所述, HIV 与宿主细胞融合的过程包括了多组蛋白质的相互作用和复杂的蛋白质构象变化, 所以目前已有许多有吸引力的开发抗 HIV 药物的目标。但对于 HIV 进入机制中的一些问题, 尤其是 gp120 的构象改变, 以及 gp41 在融合中的作用细节还未阐明, 这些问题的解决还有待于研究方法的进一步改进。但我们有理由相信在结构生物学, 分子生物学所提供的不断深入的蛋白质结构和融合过程机理的指导下, 一方面可以使我们进一步地认识 HIV 的进入机制, 另一方面可以使我们找到新型的抗 HIV 药物。

Fig. 5 How does T20 work^[17]图 5 T20 的工作机制^[17]

参 考 文 献

- 1 Doms R W, Moore J P. HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J Cell Biol*, 2000, **151** (2): F9~ F13
- 2 Eckert D M, Kim P S. Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (2): 11187~ 11192
- 3 Chain D C, Fass D, Berger J M, *et al.* Core structure of gp41 form the HIV envelop glycoprotein. *Cell*, 1997, **89** (7): 263~ 273
- 4 Kwong P D, Wyatt R, Robiuson J, *et al.* Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 1998, **393** (3451): 648 ~ 659
- 5 Wang J H, Meijers R, Xiong Y, *et al.* Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (3): 10799~ 10804
- 6 O'Brien S J, Mare J P. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev*, 2000, **177** (7): 99~ 111
- 7 Wyatt R, Kwong P D, Ronblisom J, *et al.* The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature*, 1998, **393** (3451): 705~ 711
- 8 Rizzuto C D, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, *et al.* A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science*, 1998, **280** (1876): 1949~ 1953
- 9 Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens and immunogens. *Science*, 1998, **280** (1876): 1884~ 1888
- 10 Blair W, Lin P F, Halverson N W, *et al.* HIV-1 entry-an expanding portal for drug discovery. *Development of Drug Today*, 2000, **5** (3): 183~ 194
- 11 Allaway G P, Ahuja M, Sung T, *et al.* Expression and characterization of CD4 IgG2 a novel heterotetramer that neutralizes primary HIV type I isolates. *AIDS Res. Hum Retroviruses*, **11**: 533~ 579
- 12 Gandhin M G, Madim M H, Meijers P, *et al.* Fp21399 blocks HIV envelope protein-mediated SCID mice against challenge by primary human immunodeficiency virus type I isolates. *J Virol*, 1998, **72** (3): 3475~ 3478
- 13 Saplin E O, Parren Paul W H I, Pantophlet R, *et al.* Crystal structure of a neutralizing human IgG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science*, 2001, **293** (2653): 1155~ 1159
- 14 Zhang W T, Canziani G, Plugariu C, *et al.* Conformation changes of gp120 in epitopes near the CCR5 binding site are induced by CD4 and a CD4 miniprotein mimetic. *Biochemistry*, 1999, **38** (5): 9405~ 9416
- 15 Zhang W T, Godillot A P, Wyatt R, *et al.* Antibody 17b binding at the coreceptor site weakens the kinetics of the interaction of envelope glycoprotein gp120 with CD4. *Biochemistry*, 2001, **40** (4): 1662~ 1670
- 16 Cormier E G, Tran D N H, Sanders R W, *et al.* Mapping the determinants of CCR5 amino-terminal sulfopeptide interaction with soluble human immunodeficiency virus type 1 gp120-CD4 complex. *J Virol*, 2001, **75** (1): 5541~ 5549
- 17 Redwine L S, Pert C B, Rone J D, *et al.* Peptide T blocks GP120/CCR5 chemokine receptor-mediated chemotaxis. *Clinical Immunology*, 1999, **93**: 124~ 131
- 18 Baba M, Binley J M, Carole A, *et al.* A Small molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **96** (2): 5698~ 5703
- 19 Shu W, Ji H, Lu M, *et al.* Interaction between HIV-1 gp41 core and detergent and their implications for membrane fusion. *J Biol Chem*, 2000, **274** (4): 1893~ 1846
- 20 Louis J M, Bewley C A, Clors G M. Design and properties of NccG-gp41 a chimeric gp41 molecule with nanomolar HIV fusion inhibitory activity. *J Biol Chem*, 2001, **33** (8): 29485~ 29489

Molecular Mechanism of The Entry of HIV-1 into Cells and The Related Drug Research

YU Yong, XIAO Geng-Fu, LI Min, ZHAN Rui, ZHANG Wen-Tao*

(Life Science College of Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract The human immunodeficiency viruses (HIV) cause the destruction of CD4 lymphocytes, resulting in the development of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The entry of HIV into host cells is mainly mediated by the fusion of the viral and cellular membranes, which involves the interactions of a series of biomacromolecules, such as gp120, gp41, CD4 and CCR5. The deep understanding of the crystal structures, the surfactant details of their interaction, and the change of conformation during interaction of the macromolecules provides a new idea for the anti HIV drugs. At present some new drugs have been found arising from this idea.

Key words human immunodeficiency viruses (HIV), interactions of molecular, inhibit

* Corresponding author. Tel: 86-27-87869897, E-mail: mmv@whu.edu.cn

Received: May 30, 2002 Accepted: June 28, 2002