

HIV 的病原学研究进展

李敬云

(军事医学科学院微生物流行病研究所、中国人民解放军艾滋病检测中心, 北京 100071)

〔摘要〕 人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus,简称 HIV)是导致艾滋病的病原体。研究 HIV 的病原学是认识 HIV 的致病机理、寻找有效的抗病毒治疗的靶位、设计 HIV 疫苗和诊断方法并最终控制艾滋病的基础。自从 1983 年 HIV 被分离出来,HIV 的病原学研究取得了长足进展:阐明了 HIV 的形态、结构以及病毒各个组成部分的功能;了解了 HIV 的复制和生命周期,并对病毒复制的调控有了基本的认识;对 HIV 在体内的动态和变异规律有了深入的了解;在上述认识的基础上,对 HIV 的致病机理以及病毒与宿主细胞的相互作用进行了深入的研究并取得了良好的进展。但是,艾滋病的抗病毒治疗和特异性免疫预防还没有解决。开展深入的艾滋病病原学和致病机理研究,进一步揭示病毒复制、调控和致病的分子机制,阐明病毒与宿主细胞的相互作用,是发展新型抗药物、设计有效的 HIV 疫苗的前提和保证。本文概括了 HIV 病原学研究领域的主要进展,并提出了今后研究的展望。

〔关键词〕 病原学,人类免疫缺陷病毒,艾滋病,致病机理

〔中图分类号〕 R512.91

〔文章标识码〕 A

〔文章编号〕 1000-7857-(2005)07-0009-08

Advance on HIV Biology and Pathogenesis

LI Jing-yun

(Institute of Microbiology & Epidemiology, Academy of Military Medical Science, PLA HIV Test Center, Beijing 100071, China)

Abstract: Human Immunodeficiency Virus (HIV) is the pathogen of AIDS. Research on HIV etiology is the basis of understanding HIV pathogenesis, searching for the targets of antiretroviral therapy, designing of effective HIV vaccine and diagnostic methods. Since HIV was isolated in 1983, the biology study has made great progress. The shape, structure and function of each ingredient of the viral particle have been clarified. The replication and life cycle of the virus have been understood, the control and regulation of virus replication have been revealed. The dynamic and variation of the virus have been comprehended. On the basis of the these knowledge, the pathogenesis of HIV and the interaction between HIV and host cell have been bright to light. However, HIV antiretroviral therapy and specific immune prevention are still great problems, the advanced research on HIV biology and pathogenesis is urgently needed for revealing molecular mechanism of HIV replication, regulation and pathogenesis, clarifying the interaction between HIV and host cell and development of new antiretroviral agents and vaccine.

Key Words: etiology, Human Immunodeficiency Virus, AIDS, pathogenesis

CLC Number: R512.91

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2005)07-0009-08

艾滋病(Acquired Immunodeficiency Syndrom)于 20 世纪 80 年代初在美国被发现,至今已有 20 多年的历史。对于这样一种新出现的传染病,人类的认识经历了一个曲折的过程。从最初认识病人零乱的临床表现到发现免疫缺陷,确定其主要的传播途径,从分离出艾滋病病毒到研制出特异性的检测方法,从对致病机理的深入了解到提出行之有效的治疗方法,人类对艾滋病的认识不断深入。1983 年,法国巴斯德研究所 Montagnier 教授和美国国立癌症研究所的 Robert Gallo 教授先后从艾滋病病人的外周血淋巴细胞中分离出艾滋病的病原体,即人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus,简称 HIV),它在分类学上属于逆转录病毒科(Retroviridae)、慢病毒属(Lentivirus)、灵长类慢病毒群(Primate lentivirus Group)。

1 HIV 的基因组结构、主要蛋白及其功能

HIV 颗粒呈球形,被来自宿主细胞膜的脂质双层膜所包裹;表面是糖蛋白 Gp120 和 Gp41,是病毒感染宿主细胞时与细胞膜结合和融合的部位。在病毒包膜的下面是甲基化基质蛋白(P17)MA,这个蛋白与包膜有一定的联系,在病毒复制的早期(病毒穿入以后、整合之前)起重要的作用。在毒粒的中心有松散的核,核的外形呈锥形,由病毒的衣壳蛋白(CA P24)组成。CA 在感染过程中的作用尚不清楚。在锥形的衣壳内侧是所有合成前病毒 DNA 所需要的机器,包括 2 个 RNA 拷贝、2 个来自宿主细胞的引导 DNA 合成的 tRNA 分子、与全长的病毒 RNA 结合的核衣壳蛋白 NC(P7)、病毒的逆转录酶(RT)、整合酶(IN)、蛋白酶(PR)。

HIV 的主要基因结构与其它逆转录病毒相同,由

收稿日期: 2005-05-01

作者简介: 李敬云,女;北京市丰台区东大街 20 号军事医学科学院微生物流行病研究所研究员,中国人民解放军艾滋病检测中心主任,主要研究方向为艾滋病的致病机理和检测方法;E-mail: lijy@nic.bmi.ac.cn

5'LTR,gag,pro,pol,env, 3'LTR 组成,5'端有帽状(cap)结构,3'端有多聚腺苷酸 Poly (A) 序列,如果去掉 Poly (A),基因组全长 9 100 bp。HIV 基因及其编码的蛋白至少有 9 种,可以大致分为 3 组:主要结构基因和结构蛋白 (Gag、Pol 和 Env)、调节基因和调节蛋白 (Tat、Rev)、附属基因和附属蛋白 (Vpu、Vpr、Vif、Nef)^[1]。

1.1 结构基因和结构蛋白

1.1.1 Gag 蛋白

Gag 基因编码分子量为 55 KD 的前体蛋白 P55,它由未拼接的病毒 mRNA 表达。在翻译的过程中,P55 的氨基端被烷基化,与细胞膜的胞浆面相连,并与其它病毒和细胞的蛋白一道吸收 2 个拷贝的病毒 RNA 基因组。这些蛋白与病毒从感染细胞的表面芽生有关。出芽以后,在病毒成熟的过程中,P55 被病毒编码的蛋白酶裂解为 4 个更小的部分,分别称为基质(MA)P17、衣壳(CA)P24、P9 和 P6。MA 多肽来源于 P55 的氨基端,多数 MA 分子附着于病毒脂质双层膜的内侧,起稳定病毒颗粒的作用。一小部分 MA 与整合酶结合,被包裹在病毒颗粒的更深层,起着促进病毒基因组转运的作用。P24 蛋白形成病毒颗粒的锥形核。Gag 蛋白的羧基端(NC)负责特异性识别 HIV 的包装信号,它们是 4 个位于病毒 RNA 5'端的环状结构,对于调节 RNA 与 HIV 毒粒的配合是必须的。P6 多肽调节 Gag P55 与附加蛋白 Vpr 的互相作用,使 Vpr 结合进入装配的毒粒。

1.1.2 蛋白酶(Pro)

HIV-1 蛋白酶(PR)对于病毒颗粒的成熟是必要的,在病毒出芽的过程中,PR 裂解 Gag 和 Gag-Pol 前体蛋白产生病毒的结构蛋白和酶蛋白。自 Gag 多聚蛋白产生基质 P17、衣壳 P24、核壳体 P7 和 P6 蛋白,自 Gag-Pol 多聚蛋白产生蛋白酶、逆转录酶和整合酶。PR 由 2 个非共价结合的、结构完全一样的 99 个氨基酸的单体组成,它的活性位点含一个保守的三联体,在底物结合的活性部位有一个柔韧的折翼区。

1.1.3 逆转录酶(RT)由 Pol 基因编码

逆转录酶(RT)具有 RNA 依赖的和 DNA 依赖的 DNA 聚合酶的活性。RT 是一个异源二聚体,包含 P66 和 P51 两个亚单位。P51 亚单位由 Pol 基因头 440 个氨基酸组成,P66 亚单位由 Pol 基因的所有 560 个氨基酸组成。虽然 2 个亚单位共享 440 个氨基酸,但它们排列是显著不同的。P66 亚单位含有 DNA 结合凹槽和活性部位,P51 亚单位没有酶活性,它只是 P 66 亚单位酶活性的一个支架。P66 亚单位还包含 RNaseH 域和一个连接域。在逆转录过程中,聚合酶以毒粒的单链 RNA 基因组为模板合成双链 DNA 拷贝。在病毒穿入 6 小时之内,病毒 DNA 可以全部合成。病毒 RNA 的很多顺式激活因子对于合成病毒 DNA 是必须的。例如,Tat 因子是位于病毒 RNA 5'端的一个小环状结构,含有 Tat 基因的结合位点,对于逆转录的起始是必须的。逆转录酶的主要功能成分是 P65 和 P50,在游离的 HIV 毒粒衣壳内可以找到所有的 Pol 基因产物。由于逆转录酶没有阅读校正功能,在每一个新拷贝病毒基因组中,都会引入点突变。

1.1.4 整合酶(Integrase IN)使 HIV 的前病毒 DNA 进入感染细胞的基因组 DNA

在这个过程中整合酶发挥了 3 种功能。首先,发挥外切

核酸酶的活性从线状病毒 DNA 的 3'端切下 3 个寡核苷酸;然后,发挥双链内切核酸酶的活性,在整合部位切开宿主细胞的 DNA;最后发挥连接酶的活性,在病毒 DNA 的两端进行单一的共价连接,然后由细胞的酶进一步修补整合部位。整个过程不需要外来的能量。整合以后病毒基因的表达效率大大提高。

1.1.5 Env 蛋白

从单一拼接的 mRNA 表达 160 KD (Gp160) 的 Env 蛋白,首先在内质网中合成,在穿过高尔基体时完成糖基化,在天门冬氨酸残基上加上 25~30 个碳水化合物侧链。Env 蛋白的糖基化对于病毒的传染性是必须的。细胞的蛋白酶将 Gp160 裂解成为 Gp120 和 Gp41 两部分,Gp41 是 Env 蛋白的跨膜部分,镶嵌在脂质双层包膜内。Gp120 位于感染细胞和毒粒的表面,与 Gp41 之间有非共价结合。Env 蛋白表现为 Gp41 的多聚体,一般是三聚体。

HIV 通过 G120 与感染细胞表面的 CD4 分子结合。Gp120 有 9 个高度保守的链间二硫键。也有 5 个高变区,称为 V1-V5,它们的氨基酸序列在不同的 HIV 分离株之间差别很大。其中 V3 区是决定 HIV 对 T 淋巴细胞和巨噬细胞嗜性的重要因素,也是阻断 HIV 传染性的中和抗体结合的主要靶位^[2]。V3 环还与 HIV 辅助受体 CCR 5 互相作用,决定细胞对特定病毒株的敏感性。Gp41 能够介导病毒与细胞膜的融合,从而使得病毒内的成分进入感染细胞的胞浆内。

1.2 HIV 的调节蛋白

1.2.1 Tat

Tat 是 HIV 复制所必须的转录激活因子(Transactivator),早期全部拼接和晚期末完全拼接的 mRNA 分别表达 72 和 101 个氨基酸 2 种形式的 Tat 蛋白,二者均为转录激活因子,在 HIV 感染细胞的核仁中可以找到。Tat 是一种 RNA 结合蛋白,它与 HIV RNA 5'端 TAR 的结合可以使 HIV LTR 的转录至少增强 1 000 倍。Tat 在 mRNA 的转录过程中与位于新生病毒 mRNA 5'末端 LTR 的 TAR RNA 结合而发挥翻译激活作用,从而保证病毒的有效复制^[3]。Tat 蛋白和 TAR RNA 的结构均具有高度保守性,因此,阻断 Tat 与 TAR RNA 的相互作用有望成为一个新的抗病毒机制。

1.2.2 Rev

Rev 是一种 13 KD 序列特异的 RNA 结合蛋白,由全部拼接的 mRNA 产生。它的作用是促进 HIV 基因表达早期到晚期的转换。Rev 由 2 个外显子编码,在感染细胞的核仁内积累。Rev 与 RNA 二级结构复合物中长度为 240 碱基、称为 Rev 反应因子(RRE)的区域结合,位于 HIV 的第二个内含子。Rev 与 RRE 的结合促进未拼接和未完全拼接的病毒 RNA 从胞核向胞浆内的转运。正常情况下,含有内含子的 RNA 只限制在核内,高水平 Env 蛋白的表达可以导致这种含内含子的病毒 RNA 的大量输出,可用于完全拼接的 RNA 的量减少,反过来又降低了 Rev 表达的水平。因此,这种 Rev 降低病毒 RNA 拼接速率的能力产生了负反馈环,通过它调节 Env 表达的水平。

1.3 附加蛋白(Accessory Protein)

除了逆转录病毒共有的 Gag、Pol、Env 结构基因和 Tat、Rev 调节基因以外,HIV 还有 4 个附加基因 Nef、Vif、Vpr 和 Vpu 编码附加蛋白。HIV-2 没有 Vpu 而有 Vpx。附加蛋白对于病毒的复制不是必须的,但是对于保持病毒在体内的毒

力以及病毒与宿主细胞的相互作用是十分重要的。

1.3.1 Nef

Nef 是一个 27KD、由延伸至 3'LTR 的单一外显子编码的甲基化蛋白。作为一个 HIV 复制的早期蛋白,是 HIV-1 感染以后在细胞内积累到可以达到检测水平的第一个蛋白。Nef 对于 HIV 基因的表达有直接的作用,已经发现它有多种活性,包括降低细胞表面 CD4⁺分子表达的水平,干扰 T 细胞的活化和激发 HIV 的传染性。Nef 在转录以后起作用,可以降低细胞表面 CD4⁺分子表达的水平。Nef 也可以增加 CD4 分子内吞酶解速率,降低细胞表面 MHC-I 分子的表达水平。Nef 降低 T 细胞的活性,在 Jurkat T 细胞系上的研究发现,Nef 表达对于 NF-KB 诱导和 IL-2 表达有负效应,转基因鼠的研究提示 Nef 导致 T 细胞信号的增强,在 Jurkat 细胞,CD8-Nef 嵌合分子的表达依杂合 Nef 分子在细胞内的位置有正的或负的效应。当 CD8-Nef 蛋白在胞浆内积累的时候,可以阻断 T 细胞受体正常的信号发生,当 CD8-Nef 嵌合分子在细胞表面高水平表达的时候,Nef 与几种不同的细胞内激酶发生联系。Nef 也激发毒粒的传染性,Nef 存在时产生的 HIV-1 颗粒的传染性比没有 Nef 时产生的毒粒高 10 倍以上。Nef 被包装进入毒粒,在毒粒成熟的过程中被毒粒的蛋白酶切割。缺乏 Nef 时,产生毒粒的前病毒 DNA 合成非常低效。

1.3.2 Vpr

Vpr 也被装配进入病毒颗粒,每个毒粒大约含有 100 个拷贝的 Vpr。Vpr 装配进入毒粒的过程通过与特异性的 Gag P55 羧基末端相互作用而调节。Vpr 在 HIV 感染未分裂细胞时起作用。它可以阻断细胞分裂,表达 Vpr 的细胞停留在细胞周期的 G2 期,Vpr 的表达可以预防 P24 cdc 2/cylinB 复合物的活化,后者是细胞周期进入有丝分裂的主要调节因子;反过来,P24 cdc 2/cylinB 复合物的活化可以预防 Vpr 诱导的细胞停留在 G2 期。

1.3.3 Vpu

Vpu 是分子量为 16KD 的多肽,是最初位于膜内侧的蛋白。Vpu 由同时编码 Env 蛋白的 mRNA 表达,从同一个 mRNA 翻译,但是比 Env 翻译的水平低 10 倍,因为 Vpu 翻译的起始密码是无效的。Vpu 有 2 个独立的功能,降低 CD4 分子的表达水平和增强毒粒的释放。在 HIV 感染的细胞,病毒受体 CD4 和病毒包膜蛋白结合形成复合物,细胞内 Env-CD4 复合物的形成干扰毒粒的装配,Vpu 也增强 HIV 从感染细胞表面的释放。缺乏 Vpu 的时候,可看到附着于感染细胞表面的大量毒粒。

1.3.4 Vif

Vif 是分子量为 2KD 的多肽,对于 HIV 在外周血淋巴细胞-巨噬细胞和其它细胞系中的复制是重要的。HIV-1 必须克服细胞固有的防御机制才能建立感染,Vif 蛋白是其突破细胞防御屏障的关键因素,它能够有效地对抗 APOBEC 3 G 的抗病毒作用,从而保持其在体内的持续复制。Vif 基因对于 HIV 的感染和复制是必需的,缺乏 Vif 基因的病毒感染宿主细胞的能力大大降低。在感染 HIV 而病情长期不进展的病例中曾经发现,Vif 基因有 2 个氨基酸的插入突变,带有这种突变的病毒在细胞中复制的能力比野毒株低大约 20 倍,突变修复以后,病毒复制可恢复到野毒株的水平。最初认为没有 Vif 基因的病毒不能完成 RNA 基因组的

逆转录,后来发现 APOBEC 3 G 是 HIV-1 Vif 蛋白的细胞内靶标,Vif 正是通过抑制 APOBEC 3 G 的作用而使病毒在细胞内持续复制的。Vif 能够直接与 APOBEC 3 G 作用,导致 APOBEC 3 G 蛋白失活、降解或被排出细胞外^[4]。最新的研究证实,Vif 抑制 APOBEC 3 G 的抗病毒作用特异性地依赖 Cul 5-SCF 的功能,它与细胞内 Cul 5 蛋白结合,形成 HIV-1 Vif-Cul 5-SCF 复合物,通过泛素-蛋白酶体(Ubiquitin-proteasome)旁路导致 APOBEC3G 发生遍在蛋白化(Ubiquitination)和降解^[5]。这种作用可以被蛋白酶体抑制因子(如 MG132)或遍在蛋白的突变 K 48 R 所阻断。Vif 基因高度保守的半胱氨酸突变或保守的 SLQXLA 序列缺失导致的突变体,不能使 APOBEC 3 G 降解,从而产生没有传染性的 HIV-1 颗粒^[6]。

研究指出,有可能通过在生产性细胞中表达 Vif 来弥补 Vif 突变 HIV 的传染性,这指示在毒粒装配的过程中必须存在 Vif。Vif 被装配进入 HIV 的毒粒,这个现象可能是非特异的,因为 Vif 也被装配进入其它的逆转录病毒,如鼠白血病病毒(Murine Leukemia Virus)。Vif 缺陷的 HIV 毒株可以进入细胞,但是不能有效地合成前病毒 DNA,现在还不清楚是否 Vif 缺陷影响反转录及病毒核蛋白复合物的稳定性。电镜观察显示,Vif 突变的毒粒有非恰当装配的核蛋白核心。

2 HIV 的复制周期

HIV 的复制过程包括以下几个步骤:病毒穿入、逆转录、整合、基因表达、装配、出芽和成熟。病毒复制的第一步是病毒的包膜蛋白与特异的宿主细胞表面受体和其它辅助因子相互作用,导致病毒与细胞膜融合,病毒的核蛋白复合物进入靶细胞的胞浆内,并很快被转运到细胞核内,在那里逆转录酶催化合成病毒 RNA 基因组的 DNA 拷贝。整合酶指导病毒的 DNA 与宿主细胞的染色体 DNA 整合形成前病毒。整合的前病毒转录生成拼接和未拼接的病毒 mRNA,分别表达病毒的调节蛋白和结构蛋白。Gag 和 Gag-Pol 蛋白的前体与病毒 RNA 一道在宿主细胞表面被装配进入新的病毒颗粒。在它们通过宿主细胞膜出芽的时候,病毒颗粒获得含有 Env 蛋白的脂质双层。在出芽过程中或出芽以后,病毒的蛋白酶(PR)裂解 Gag 和 Gag-Pol 前体蛋白成为成熟的蛋白,生成有传染性的毒粒^[7]。

2.1 病毒穿入

2.1.1 HIV 与细胞表面结合

首先发生病毒与细胞膜的融合,这一过程依赖病毒的表面蛋白 Gp120 与特异性宿主细胞表面受体的结合,最主要的是 CD4 受体。CD4 分子含有 4 个胞外免疫球蛋白样(Ig-like)的决定簇,表达在 T 淋巴细胞亚群和一些巨噬细胞的表面。CD4 是 HIV 的结合受体,这已经为很多实验所证实,如 CD4 抗体能够特异性阻断 HIV 的感染,与可溶性 CD4 分子共同孵育 HIV 可以被中和;更为有力的证据是人 Hela 细胞在表达 CD4 分子以后可以获得与 HIV-1 颗粒结合的能力。Gp120 的 CD4 结合部位包含 400-430 氨基酸残基,病毒与受体结合的主要部位是一个暴露的环状结构。占 Gp120 分子量一半的碳水化合物侧链并不能与 CD4 分子结合^[8]。除了 CD4 分子以外,HIV 还可以通过其它的途径与细胞结合,如抗体包裹的病毒与巨噬细胞表面的 Fc 受体结合,这是抗体介导的促进病毒感染的过程。除此之外,病毒还需要

利用辅助受体。

2.1.2 融合

病毒外膜与宿主细胞膜的融合需要病毒包膜与宿主细胞表面受体特异的相互作用,两种病毒的包膜蛋白,Gp120 和 Gp41,在构像是相互关联的,形成一个三聚体功能单位,包含 3 个暴露于毒粒表面的 Gp120 分子。3 个分子的 Gp41 插入病毒的脂质包膜,毒粒表面的三聚体 Gp120 与靶细胞表面的 CD4 分子结合,导致包膜蛋白的构像变化,使得毒粒与细胞表面特定的辅助受体结合。辅助受体包含 7 个跨膜结构域,正常情况下通过 G 蛋白进行信号转导。在体外培养的细胞,发现 12 种趋化因子的受体能够充当 HIV 感染的辅助受体,但是只有 2 种能够在体内发挥作用。一种是 CCR 5,与巨噬细胞嗜性、非合胞体诱导型病毒(R5)结合,与粘膜和静脉传播的 HIV 感染有关。另外一种 CXCR 4,与 T 细胞嗜性、合胞体诱导型病毒(X4)结合,通常是在疾病的晚期被发现。

HIV 利用的 CD4 和辅助受体在细胞脂质双层膜上都不是均匀分布的,这些富含胆固醇和鞘磷脂的微小结构域能够为膜融合提供更好的环境^[9]。去除毒粒的胆固醇,HIV 的感染性将大大下降,这提示去除胆固醇的复合物有可能成为一种有效抑制 HIV 粘膜传播的杀微生物剂。

Gp120、CD4 和辅助受体的结合导致 Gp 41 根本性的构像变化。在毒粒的膜表面装配成三聚体。这种卷曲螺旋蛋白裂开,突出 3 个插入靶细胞脂质双层的多肽融合域,然后这些融合域形成夹样结构,牵引毒粒和细胞膜靠近并融合,导致病毒的核物质释放到细胞内。融合抑制剂 T-20 和 T-1249 通过阻止发夹结构的形成预防融合。

HIV 毒粒也能够通过内吞作用进入细胞内。一般来说,有效的感染并不导致这些毒粒内含体的失活,然而,已经证实粘膜炎下层树突状细胞存在一种特殊形式的内吞。这些在正常情况下起加工和递呈抗原作用的细胞,表达一种特殊的称为 DC-SIGN 的吸附结构,这种 C 型凝集素与 HIV Gp120 具有高度亲合性并与之结合,并不触发融合的构像变化,而是与 DC-SIGN 结合的毒粒陷入酸性间隔中,并在树突状细胞成熟和移行至附近淋巴结以后,显示在细胞的表面。因此,表达 DC-SIGN 的树突状细胞就像特洛伊木马,促进 HIV 从粘膜表面向淋巴器官的 T 细胞浸润^[10]。

2.1.3 逆转录

逆转录生成病毒 RNA 基因组的线性 DNA 拷贝,这个过程发生在病毒的核蛋白复合物内,需要逆转录酶(RT)、RNA 和 DNA 依赖的 DNA 聚合酶与 RNase H 的相互配合,后者降解 RNA-DNA 杂合分子中的 RNA。HIV-1 的 RT 由 2 个亚单位 P66 和 P51 组成,现在已经确定了它的 X 线晶体结构。RT 和 RNase H 共同配合完成一系列精细的操作,包括几个 RNA 模板,在每 2 个共同包装的病毒 RNA 之间转接,产生带有长末端重复序列的线性病毒 DNA 分子,这称为分子体操(Molecular Gymnastic)^[11]。

HIV 感染之所以难以控制,原因之一是毒株的高度变异。造成这种变异的一部分原因是 RT 的忠实性较差,即缺乏 3'-5' 外切核酸的校读功能。估计每一轮 HIV-1 的复制都会引入 10 个错误的碱基,突变的类型包括碱基替换、移码和缺失。另外,有时逆转录可以导致包含多个 G 到 A 碱基替换的高突变前病毒。在 DNA 合成的过程中,由于 2 个

共包装的病毒 RNA 分子之间的模板转接导致重组,可以引入更多的突变。

病毒 DNA 合成需要的唯一原料是脱氧核糖核苷酸。在一些细胞中,这一过程可能是细胞周期调节的目标,而正在分裂的 T 细胞能够有效地支持 HIV DNA 的完全合成。停留在体外的 T 细胞包含的多数是逆转录病毒 DNA 的未完成形式,相反,全长的染色体外 DNA 是 HIV 感染者 T 淋巴细胞中 HIV 的主要形式。

由于病毒的核蛋白复合物很快被转运到宿主细胞核内,病毒 DNA 的合成主要发生在核内,已经在 Vpr 和胞内复合物的 MA 部分确定了负责吸收病毒的核蛋白复合物进入胞核的核位置信号。MA 蛋白是一个转运病毒复合物至核孔的蛋白,它通过直接与整合酶结合而与病毒的核蛋白复合物有关^[12]。

2.1.4 病毒 DNA 与宿主 DNA 整合

核蛋白复合物可被视为将病毒 DNA 整合进宿主染色体,即形成前病毒的一个机器。这个步骤绝对依赖病毒整合酶的活性,对于病毒蛋白的表达是必须的。尽管某些靶位是优先的,HIV DNA 可以在很多重要的随机位置整合进入宿主基因。HIV-1 可以感染未分裂细胞,如巨噬细胞和单核细胞,病毒基因在 HIV-1 感染靶细胞以后在细胞周期的 G2 期表达。这些事实证实 HIV-1 DNA 通常与细胞的有丝分裂相伴随,在核膜破裂之前就整合。在感染的细胞内可以观察到 3 种不同形式的病毒 DNA: 两侧有 2 个 LTRs 的线状 DNA 和包含 1 个或 2 个 LTRs 的环状 DNA。线状 DNA 在感染细胞的胞浆和胞核内被发现,是整合的直接底物;环状 DNA 只在胞核内发现。它们的形成不需要整合酶,多数对于病毒的复制没有意义。

整合的前病毒是共线性的,包含全部线状病毒 DNA,除了两端移去几个核苷酸以外,侧面有宿主基因整合部位的短直接重复序列。整合需要可以识别线状病毒 DNA 末端(又叫 att 位)的整合(IN)蛋白。整合蛋白催化每条病毒 DNA 链 3' 端移去 2 个碱基对,暴露出在所有逆转录病毒都十分保守的 1 个 CA 二核苷酸,这些 3' 凸出或凹进的病毒 DNA 末端与宿主基因 DNA 靶位切开的 5' 端结合,通过一步转酯作用与宿主细胞 DNA 结合。这些步骤可以在体外通过对应于病毒 att 序列的合成寡核苷酸与纯化的整合酶蛋白共同孵育来重复。细胞的酶修补整合的病毒 DNA 与宿主细胞基因组 DNA,生成短的直接重复序列。已经确定了 HIV-1 整合酶催化部位的晶体结构,加上对有关这个蛋白作用的了解,对于设计针对 HIV-1 复制这个关键步骤的抗病毒药物很有用处。

2.1.5 病毒蛋白的表达

病毒基因的表达需要宿主细胞转录机制(RNA 聚合酶和转录因子 Sp 1、NFkB)和病毒的调节蛋白(Tat、Rev)的互相配合。拼接的病毒 mRNA 转录生成 Env 和调节蛋白 Tat、Rev、Nef,未拼接的编码 Pr55 Gag 和 Pr160 Gag-Pol 融合蛋白,也是包装进新的装配病毒颗粒的基因组 RNA 的一部分。虽然多数逆转录病毒的 Gag 和 Pol 区使用不同的翻译读框,Gag 和 Gag-Pol 的前体蛋白都是在感染细胞内合成的,Gag-Pol 融合蛋白导致生成移框事件,核糖体以一定的速率从 Gag 移到 Pol。这一事件在病毒转录的时候在特定的移动部位发生,也依赖于下游 RNA 的二级结构。移框和核

糖体移框可能是重要的调节步骤,因为 Gag 和 Gag-Pol 融合蛋白相对数量的改变可能使病毒失去传染性。

病毒包膜蛋白(Env)在感染细胞的内质网内合成,被宿主细胞的分泌通道转运到细胞表面,在内质网内,Gp160 单体,即 Env 蛋白的前体,在折叠和聚合之前被装配进入三同聚体。Gp160 寡聚复合物被从内质网转运到高尔基体,在那里被细胞的蛋白酶分解成 Gp120 和 Gp41 两个亚单位。一旦 Env 蛋白被感染的细胞表达,细胞表面 CD4 合成的水平就会下降,细胞就变得对再感染有抗性。细胞表面 CD4 水平的下降一部分是由于 Gp160/CD4 复合物的形成,细胞表面 CD4 的水平也被病毒 Nef 和 Vpu 蛋白的活性所调节,CD4 水平的下降对于感染性毒粒的装配是必需的,因为受体的存在可能干扰 Env 装配进入病毒颗粒。

病毒装配 Env 蛋白是一个选择性过程,多数宿主细胞表面蛋白除 HLA-DR 和 β -微球蛋白外,都被排除在 HIV-1 颗粒以外,HIV-1 Env 的胞浆尾决定簇对于病毒的装配是十分重要的,因为只有 19 个羧基末端氨基酸的缺失就可能导致产生缺失 Env 蛋白的无感染性的病毒颗粒。似乎 HIV-1 的 MA 蛋白专司在病毒装配的过程中 Env 蛋白的装配,MA 的突变可以导致产生缺乏 Env 的毒粒。

逆转录病毒经常装配其它病毒的 Env 蛋白。如,一些甲病毒颗粒(Pseudotypes),包含 HTLV-1 或鼠白血病病毒的 HIV-1 核心和 Env 蛋白。因此,HIV-1 和其它病毒的共同感染可能产生改变了细胞嗜性的混合的病毒颗粒。在出芽过程中或出芽以后,病毒的蛋白酶将 Gag 和 Gag-Pol 蛋白裂解为成熟的蛋白产物,病毒随之成熟。HIV-1 的蛋白酶是 1 个同二聚体天冬氨酰蛋白酶,包含 2 个相同的 99 个氨基酸的亚单位。蛋白酶裂解是逆转录病毒颗粒成熟必需的步骤,因为蛋白酶的突变导致含未裂解核蛋白的非传染性病毒颗粒的产生。裂解以后成熟的毒粒从产病毒细胞的表面释放,然后进入感染其它靶细胞的复制周期。

2.1.6 病毒装配(Virus Assembly)

毒粒内部的蛋白最初在胞浆内合成,作为 Gag 和 Gag-Pol 蛋白的一部分,被转运到细胞膜的胞浆面。2 个拷贝 RNA 分子通过 Gag 蛋白的相互作用被包装,毒粒的外膜蛋白最初是 Env 多蛋白,随后 Gp 160 被病毒的蛋白酶裂解为 Gp 120 和 Gp 41。

MA Gag 蛋白可能决定病毒装配的部位,MA 包含膜结合位点,能够导致膜的出芽。Gag 和 Gag-Pol 前体蛋白装配进入功能性病毒颗粒需要 Gag I 决定簇与 P6 Gag 蛋白的相互作用。在逆转录病毒,病毒基因组 RNA 从胞浆 RNA 池中被选择性地吸收,只有未拼接的基因组长度的病毒转录产物才能被包装进入病毒的核心,HIV-1 的包装信号形成了稳定的 RNA 二级结构的一部分,它在不同的病毒分离株之间是高度保守的,NC 的共同序列 Cys-Xz-Cys-X4-His-X4-Cys 对于病毒 RNA 的包装是必需的。

近年来病毒颗粒装配研究的主要进展是搞清了病毒主要核蛋白的三维结构。Gag 蛋白由 3 个主要的决定簇组成,对于病毒的装配起核心作用。这些决定簇的结构是基质(MA)、衣壳(CA)、核衣壳(NC)。这些结构信息使我们能够了解病毒的成份之间是怎样相互作用以生成包含 2 个拷贝病毒 RNA 分子的衣壳。最近的发现指出,宿主细胞的蛋白在病毒装配的过程中也起重要的作用。与病毒 RNA 紧密结合的

NC 蛋白为启动 CA 分子中蛋白之间的相互作用,被 MA 多肽甲基化的氨基末端信号调节的、针对 Gag 蛋白的包膜,对于前体衣壳蛋白在细胞膜内侧的装配起关键作用,但参与这个过程的宿主细胞蛋白尚未确定。Gag 蛋白的水解与病毒出芽和毒粒从细胞表面释放相连,这种裂解改变了每种 Gag 决定簇的结构,生成了稳定的、成熟的衣壳结构。目前已经发展了研究逆转录病毒衣壳装配详细过程的系统。但是这方面的工作需要进一步加强,因为这个系统生成的病毒结构与观察到的感染细胞中的完整病毒并不相同。毒粒从细胞表面释放涉及其在细胞表面的修剪。最近的研究证实了 Gag 多蛋白羧基末端对于毒粒释放的重要性。这个蛋白被裂解产生 P6,在出芽的过程中与宿主细胞蛋白相互作用。

3 HIV 的遗传和变异

HIV 的一个显著特点是具有高度变异性,这是 HIV 在免疫和药物选择压力下赖以生存的基础,也是病毒难以清除的主要原因和疫苗研制的主要障碍。HIV 变异的频率是真核细胞 DNA 基因组的 100 万倍。真核细胞 DNA 多聚酶的错误率大约是 10^{-10} ~ 10^{-9} ,而 HIV-1 逆转录酶平均每一个位点的错误率是 10^{-4} ~ 10^{-3} ,这意味着每一个 HIV 基因组(104 碱基)的逆转录酶都有 1~10 个错误。

3.1 HIV-1 的型和亚型

根据 HIV-1 Gag 和 Env 基因的序列,可以将 HIV-1 分为 M 群、O 群和 N 群,代表 3 个独立的由猩猩向人类传播和进化的病毒。各群病毒基因的序列差异超过 45%。根据 Env 区基因的序列可将 M 群分成 A、B、C、D、F、G、H、J、K 共 9 个亚型,各亚型之间的序列差异达 30%,同一亚型之内有 3%~23% 的差别。O 群内各毒株也有高度的异质性。HIV 亚型之间的重组十分多见,大约 10% 的 HIV 分离株是重组的嵌合体。重组流行毒株(CRFs, Circulate Recombinant Forms)指重组或嵌合病毒,CRF 按照文献报道的先后顺序排列,目前已经确定了 16 个重组流行毒株(表 1)。确定一个新的 CRF,必须是在 3 个独立的没有流行病学联系的人身上发现该病毒并进行了序列测定。

3.2 HIV 的高突变率和快速复制速率是变异的基础

HIV 高度变异性的分子基础是其逆转录酶的忠实性较差,缺乏 3'-5' 外切核酸的校读功能,导致 RNA 转录为

表 1 HIV-1 的重组流行毒株

名称	参考毒株	重组的亚型
CRF 01_AE	CM 240	A、E
CRF 02_AG	Ib NG	A、G
CRF 03_AB	Kall 53	A、B
CRF 04_cpx	94 CY 032	A、G、H、K、U
CRF 05_DF	VII 310	D、F
CRF 06_cpx	BFP 90	A、G、J、K
CRF 07_BC	CN 54	B'、C
CRF 08_BC	GX-6 F	B'、C
CRF 09_cpx	96 GH 2911	尚未发表
CRF 10_CD	TZBF 061	C、D
CRF 11_cpx	GR 17	A、G、J、CRF01_AE
CRF 12_BF	ARMA 159	B、F
CRF 13_cpx	96 CM-1849	A, CRF01_AE, G, J, U
CRF 14_BG	X 397	B、G
CRF 15_01B	99TH.MU 2079	CRF01_AE, B
CRF 16_A2D	KISH 5009	A2、D

DNA 时经常出现错误。据估计每一轮 HIV-1 的复制都会引入 10 个错误的碱基,突变的类型包括碱基替换、移码和缺失。在 DNA 合成的过程中由于 2 个共包装的病毒 RNA 分子之间的模板转接以及不同亚型病毒之间的重组,可以引入更多的突变。

在 HIV 感染的个体,HIV 变异株出现的频率是 HIV 复制周期的函数。现在已经知道在 HIV 感染的所有阶段,都有持续高水平的 HIV 复制,有时相对较低水平的血浆 HIV RNA 是通过高水平的 HIV 复制和破坏所保持的,研究也显示更高水平的 HIV 复制发生在外周组织中,特别是淋巴器官。感染过程中每天发生的大量复制周期提供了产生大量变异毒株的机会。每天 HIV 基因的每一个位置都可能引入突变。HIV 的快速复制速率加上高突变率,使 HIV 从原发感染时的状态进化为一群遗传差异很大的病毒,每一个成员都保存了生存所必需的基因,但是在不妨碍复制的基因位点上有细小的差异,结果导致出现高度分化的群体。由于这样的快速复制、突变、选择,HIV 突变可以在几天之内就出现。由于病毒群有较大的基因多样性,经常是在抗病毒治疗开始之前,携带耐药性突变的病毒就已经存在了,一旦开始治疗,已经存在的耐药性病毒就开始快速繁殖,很快占据主导地位^[13]。快速复制和进化的后果是 CD4⁺ T 细胞的破坏,出现针对不同宿主细胞的毒力更强的毒株,逃脱免疫系统的控制和抗病毒药物的抑制,所有这些都促进了病程的发展。

3.3 病毒的进化

新感染的个体体内的病毒相对同质性较高。很多病例观察证实,急性感染者获得的是来自传染源的主要或次要病毒亚群,这提示传播发生时有选择性。选择的机制可能有:①接种的少量病毒只是传染源病毒群的一个很小的随机样本;②病毒在传染源体内被分隔化,导致不同组织中(如血液和精液)的病毒群体不同;③不同 HIV 毒株传播的效率不同,与病毒的细胞嗜性和使用的受体有关。

传播时病毒的同质性被称为传播的瓶颈。传播的瓶颈对于未来感染的发展有重要的影响。血清阳转以后,病毒保持持续稳定的低水平,这个时期发生持续的病毒群的进化,每一个周期复制的结果都是产生基因序列彼此不同的 HIV 毒株的混合物,通常称为准种(Quasispecies)。序列分析发现,这些准种的核苷酸差异在感染的过程中不断变化,这是病毒逃避免疫监视和增加病毒表型的一个原因。

3.4 HIV 感染过程中病毒学和免疫学的改变

3.4.1 HIV 感染建立和播散

在接种的部位,HIV 首先在巨噬细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、血液和组织中的树突状细胞中复制。感染的细胞携带 HIV 颗粒从接种部位迁移到淋巴组织(脾和淋巴结),树突状细胞是有效的抗原递呈和 CD4⁺活化细胞,有多个树突样的、能够有效地结合抗原的胞浆表面突起,这些细胞从血液和组织中捕获大量 HIV 颗粒,并转运到淋巴结。正常情况下,CD4⁺ T 细胞大量存在于淋巴滤泡中,对于正常的免疫反应,树突状细胞提供的捕获抗原能够刺激细胞活化和增殖。HIV 感染活化的非静止的 CD4⁺ T 细胞,在 HIV 存在的情况下,这些活化的细胞变成感染和复制的宿主,导致产生高浓度的感染性 HIV 颗粒。因此,通过有效地将 HIV 捕获和转运到淋巴组织,通过有效地活化淋巴组织中 CD4⁺ T 细胞、

树突状细胞和其它抗原递呈细胞促进了新一轮 HIV 感染和复制。这个过程巩固了淋巴器官中的 HIV 感染,使 HIV 保持持续高水平的复制。在几周之内,出现血浆 HIV RNA,其后数天之内出现 HIV 抗原以及可以检测到的传染性 HIV 颗粒,然后宿主产生细胞免疫反应并出现 HIV 抗体。虽然几乎所有的病人在感染后几周之内都产生抗体,但用于诊断 HIV 感染的抗体检测方法不能诊断处于窗口期的 HIV 感染。检测 HIV RNA 和 HIV P24 抗原的方法可以在窗口期较早地作出诊断,有助于个别高度怀疑 HIV 感染,但是抗体持续阴性的病例的诊断。

3.4.2 HIV 的动态变化

不论以前定点的水平如何,快速进展的血浆 HIV-1 RNA 浓度总是预示着 AIDS 疾病的发展。稳定状态的 HIV-1 RNA 浓度是循环中病毒产生和清除的函数,欲估计病毒的变化速率需要利用有效的抗病毒药物打破病毒复制的稳定状态,然后测量病毒清除和产生的速率。

表 2 HIV 颗粒及其感染细胞的半衰期 (Greene W,1998.12)

HIV 毒粒	T _{1/2} (半衰期)
血浆	6 小时
活跃感染的细胞	1.1 天
潜伏感染的 T 细胞	8.5 天
潜伏感染的巨噬细胞	14 天

研究揭示了病毒产生和清除的动态过程,用数学模型计算病毒下降的速率和 HIV-1 的半衰期,发现血液循环中 HIV 毒粒的半衰期非常短,仅有 6 个小时,因此病毒群体每 6 小时更新一半。HIV 感染的细胞也始终处于快速转变、更新的状态(表 2)。这些清除速率在不同的 CD4⁺ T 细胞计数和不同 HIV-1 RNA 浓度的个体变化不大,这提示病毒的清除并不依赖特定的宿主免疫反应。

决定稳定状态 HIV-1 浓度的主要因素是任何时刻体内病毒产生和清除的数量。为了保持稳定的毒粒水平,每天必须产生 10⁸~10⁹ 个毒粒释放到细胞外体液中,同时有大约相同数量的病毒被清除。使用有效的抗病毒药物后,血浆 HIV-1 RNA 出现快速下降,提示一旦新一轮 HIV 感染被阻断,感染细胞内产生的病毒只能维持很短的时间,平均约 2 天。病毒的产生由于细胞的死亡而被阻断,估计 HIV-1 平均每一代的时间(从细胞释放一个毒粒到它感染另外一个细胞,释放出新的毒粒)大约为 2.5 天。这意味着病毒复制的速率是每年 140 或更多个周期。这样,从 HIV 感染到诊断 AIDS,病毒已经更新了上千代。

3.4.3 HIV 靶细胞的动态改变

研究显示,99% 以上的病毒由新近感染的细胞产生,而不是长期存活的慢性感染细胞或新近被活化的潜伏感染的细胞。血浆中 30%~50% 毒粒是由前一天感染的 CD4⁺ T 细胞产生的。支持产生这样大量毒粒细胞的是 CD4⁺ T 细胞,这种认识促使人们重新评价持续 HIV-1 感染中慢性或潜伏感染细胞的重要性。因为外周血和淋巴结中有大量含 HIV-1 DNA 的 CD4⁺ T 细胞,这些细胞可以代表潜伏感染的细胞,它们中的大多数携带复制缺陷的 HIV-1 变异株。比如巨噬细胞及其它它们在中枢神经系统内的同类就可以提供潜在的 HIV-1 慢性来源。这种慢性潜伏感染的细胞数量不一定很多,就能够提供 HIV-1 繁殖的重要途径,因为它们

可以提供能够逃避宿主免疫反应和抗病毒治疗清除的病毒库。由于存在慢性或潜伏感染的细胞,以及机体某些部位抗病毒药物不能有效渗透,达到完全阻断病毒复制的浓度(中枢神经系统是最令人担心的病毒库),抗病毒治疗只能抑制而不能清除 HIV 感染。

抗病毒药物治疗时,在血浆 HIV-1 RNA 水平快速下降的同时,循环 CD4⁺ 细胞计数水平上升,这代表了侥幸逃脱 HIV 感染的细胞的增殖。以病人 CD4⁺ T 细胞增加的速率和数量为基础,估计每天有 2×10^9 个 CD4⁺ T 细胞被破坏,占全部 CD4⁺ T 细胞数的 5%。为了保持稳定的 CD4⁺ T 细胞计数,每天必须产生同样数量的 CD4⁺ T 细胞^[14]。但是尚不清楚观察到的外周血 CD4⁺ T 细胞的增加是否真正反映活化补充的 T 细胞数,或仅仅是它们从淋巴器官向外周循环的再分布。因为淋巴器官巨大细胞库(占全部 T 细胞的 98%)中仅仅一小部分的再分布就可以导致外周血循环中 T 细胞数目的较大变化。

T 细胞在体内产生、破坏、再分配的速率对于控制 HIV 疾病,保持免疫系统的功能是十分重要的。实际上,HIV 导致 T 细胞减少的主要机制是 T 细胞产生的抑制。同时宿主有很强的产生新的 T 细胞的能力,这使人们看到了免疫重建的希望。然而产生 T 细胞的能力并不等于 T 细胞分化的能力,还有很多有待澄清的问题,如通过什么机制 T 细胞被杀死? T 细胞怎样产生的? 记忆细胞的增殖还是淋巴细胞组织成分的再分配?

3.4.4 影响 HIV 感染进程的因素

从 HIV 感染到发展为 AIDS 的平均时间是 10 年,但是有很大的个体差异。一些人在急性感染阶段就快速发展为 AIDS,在几个月内死亡;而另外一些人,称为长期不进展者(Long-Term Non-Progressors LTNP),在感染 15 年以后仍然没有任何临床表现和实验室改变。很显然,有一些决定疾病进展速率的因素,这些因素包括宿主的遗传特征(细胞因子受体、SDF-1 变异等)、宿主的免疫应答(T 细胞动态和细胞免疫应答)、HIV 的特征和复制的动态(毒力、复制适应性、遗传分化)等。

1) 感染缺陷的 HIV 毒株:一些不进展者可能感染了缺陷的 HIV 毒株,特别是 Nef 基因的缺失,使病毒失去毒力。但是,这种情况出现的机会很小。

2) 辅助受体基因的突变:研究显示,人编码细胞因子受体及其调节和结构蛋白的基因变异与 HIV 感染的缓慢进展有关。在 HIV 感染宿主细胞的过程中,它不仅需要与 T 细胞表面的 CD4⁺受体结合,还需要与辅助受体结合。辅助受体分子的基因变异导致 HIV 结合的低效,从而减少了 HIV 的复制。

编码细胞因子受体 CCR 5 基因的同质缺失($\Delta 32$)可以明显降低,但是不能完全清除 HIV 感染的危险,可以使 HIV 感染发展到 AIDS 的进程减缓 1~2 年^[15]。另一个突变是编码 CCR 2 受体基因的突变(CCR 2-64 I),虽然不能保护 HIV 感染,但是可以减缓发病的进程,一般减缓 2~3 年,可能是通过影响 CCR 5 的合成而间接发生作用,因为它的基因位点与 CCR 5 十分靠近。还有一个突变(SDF 1-3'A)影响编码细胞因子 SDF-1 基因的调节区域。SDF-1 是天然的使用 CXCR 4 受体的细胞因子,这种变异可能导致对 HIV 感染的保护。SDF 1-3'A 的作用似乎在 HIV 病程的晚期更加明

显。SDF 1-3'A 通过改变 CXCR 4 受体的使用而发挥作用,可能是通过增加 SDF-1 的合成,阻断或减少细胞表面表达的 CXCR 4^[16]。目前还没有发现与这些突变有关的有害作用,这揭示了干预和控制 HIV 进程的途径。随着对突变认识的加深,检测这些突变有助于估计进展的危险,作出如何治疗的决定。

3) 失去有效的细胞免疫控制:有效的细胞免疫对于控制 HIV 复制是十分重要的。如一些经常暴露于 HIV 的个体用核酸、病毒培养、抗体等方法都检测不出 HIV,但是在体外它们的淋巴细胞可特异性地对 HIV 抗原产生反应。这个现象激发人们去研究细胞介导的免疫机制怎样控制 HIV,促进 HIV 疫苗的研究。病程快速进展者常常丧失了有效的细胞免疫控制。

CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞是免疫效应细胞,这不仅仅由于它们的数量,也在于它们的分化。确定疾病进程的因素之一是早期能够识别 HIV 抗原的 CD4⁺ T 细胞遭到破坏的程度。失去这些细胞意味着失去天然抗 HIV 免疫的 CD4⁺ T 细胞,这对于控制 HIV 复制是至关重要的。

在年轻的免疫系统,由胸腺产生新的幼稚 T 细胞。在那里,通过 T 细胞受体基因的重排产生出有特异性受体的细胞,存活的 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞被释放到外周循环中,结果是产生了大量 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞的克隆。每个克隆能够产生具有独特结构的 T 细胞表面受体,因此特定的 CD4⁺ T 细胞克隆具有针对特定抗原结构的亲和力,能够与特定的抗原起反应。当 T 细胞受体识别的抗原被递呈给幼稚 T 细胞,就会刺激大量抗原特异性记忆 T 细胞的增殖,一旦幼稚 T 细胞和记忆 T 细胞克隆丢失,正如 HIV 感染时发生的那样,它们将不能由失去功能的胸腺组织产生。CD4⁺ T 细胞在被抗原活化的过程中产生合适的细胞因子,作为信号传递给其它的免疫系统成分,特别是 CD8⁺ T 细胞,作为细胞毒 T 细胞能够杀死被病毒感染的细胞^[17]。由于 HIV 优先感染 CD4⁺ T 细胞,是 HIV 复制的宿主细胞,这个过程始于 HIV 原发感染,贯穿于整个感染过程,使得功能性 CD4⁺ T 细胞从 T 细胞库中逐渐消失。CD8⁺ T 细胞(细胞毒淋巴细胞)也可能在早期 HIV 感染阶段被破坏,可能是由于克隆的成员在攻击 HIV 的过程中被耗尽。

丧失免疫系统功能,特别是细胞免疫,是 HIV 疾病进展的一个主要原因。研究发现,细胞免疫功能对于控制 HIV 复制、预防感染是十分重要的。CD4⁺ T 细胞作为辅助性 T 细胞、CD8⁺ T 细胞作为细胞毒 T 细胞,二者都是有效的细胞免疫的关键成分。像以前描述的那样,有效的细胞免疫取决于 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞的数量、分化程度以及细胞免疫应答的质量。在细胞免疫成分被破坏、不能产生或受到合适的调节信号,或出现对正常细胞毒效应不敏感的 HIV 突变株等情况下,细胞免疫功能就会下降。

4) 其它病原体的感染和免疫接种:HIV 感染者的免疫系统在受到外来抗原的刺激时(感染、注射毒品、免疫接种等),可以激发免疫应答,活化 T 细胞使之成为 HIV 复制的宿主,促进了 HIV 的复制和病程的发展。一些研究发现,在受到这些刺激以后,血浆 HIV RNA 的水平升高,这通常是一过性的,几天或几周内恢复至刺激前的水平。比 HIV RNA 增加更严重的是导致对于防御十分重要的抗原特异性 T 细胞克隆的活化和破坏。因为这些原因,一些专家建议

HIV 感染者要避免预防接种。但是也有相反的意见,认为预防接种可以防止相应的靶目标感染所导致的更为严重的抗原刺激。

HIV 导致的免疫系统损伤开始于第一个 HIV 复制周期,直至死亡,免疫系统损伤是病毒复制的直接结果。在每一个复制周期中,HIV 都破坏它的靶细胞,即 CD4⁺ T 细胞。虽然人的免疫系统有潜在的再生能力,但肯定是十分有限的。多数 HIV 感染者都不可避免地会出现 CD4⁺ T 细胞数的下降,还将失去特定的免疫应答。由于抗原特异的免疫反应的克隆特征,不能从未成熟的母细胞产生功能性的 T 细胞,即使新一轮病毒感染被抗病毒药物所中止,T 细胞的应答一旦失去也再难获得。更为严重的是,CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞残存的再生潜能随 HIV 感染时间的延长而下降,随着累计损失数量的增加和再生能力的下降,使用抗病毒药物对于重建足够数量的功能性 T 细胞的作用是有限的。除此之外,对于中晚期 HIV 感染者,即使用抗病毒药物抑制了活跃的病毒复制,仍然很难修复遭到破坏的淋巴器官的结构。

4 展望

人类已经与艾滋病进行了 20 多年的抗争,尽管取得了很大的成绩,但仍然面临许多挑战;至今仍然没有有效的艾滋病疫苗;抗病毒治疗虽然能够有效抑制病毒至现有方法检测不到的水平,但是并不能清除病毒;病毒可能很快出现耐药性,使抗病毒药物失去作用。因此,艾滋病防治的根本性问题还远没有解决。

艾滋病的抗病毒治疗和特异性免疫预防越来越依赖于对病原学和致病机理的深入研究。目前主要有以下亟待阐明和解决的问题。① 病毒潜伏的机制及潜伏病毒的生物学特性。HIV 具有高突变特性,在复制的过程中能够不断调整和改变自身并优化与宿主细胞的相互作用,以有利于它的复制和传播。病毒需要首先确保宿主细胞的存活才能完成自身的复制,HIV 的潜伏感染能够支持其慢性复制,并能够作为机体潜伏的病毒库。潜伏的病毒半衰期长,难以清除,是目前抗病毒治疗的主要困难。② 建立能够模拟 HIV 感染和致病过程的小动物模型。没有合适的 HIV 感染和致病的动物模型,使得 HIV 病原学和致病机理研究缺乏有力的工具。③ 寻找新的抗病毒治疗靶位和抗病毒治疗策略,能够有效抑制野生和耐药 HIV 的复制,清除潜伏感染的病毒。除了常用的以病毒酶为靶标的抗病毒治疗策略以外,病毒的辅助受体、病毒 RNA 的剪切加工、病毒的 Gag 蛋白、病毒的调节和附属基因都是有希望的抗病毒治疗靶位。只有深入了解病毒复制和调控的分子机制、病毒基因与宿主蛋白的相互作用、病毒致病的关键环节,才能确定药物研究的切入点,设计出有效的抗病毒药物和疫苗。可以说,艾滋病的病原学和致病机理研究任重而道远。

参考文献(References)

- [1] Thomas J. Hope and Dider Trono : Structure, Expression and Regulation of the HIV Genome. HIV Insite Knowledge Base. <http://www.hivinsite.com>
- [2] Misse D, Gajardo J, Oblet C, et al. Soluble HIV -1 gp120 enhances HIV -1 replication in non -dividing CD4⁺ T cells, mediated via cell signaling and Tat cofactor over expression[J]. *AIDS*, 2005 ,19(9): 897~905
- [3] Bettaccini A A, Baj A, Accolla R S, et al. Proliferative activity of extracellular HIV -1 Tatprotein in human epithelial cells: expression profile of pathogenetically relevant genes [J]. *BMC Microbiol.* ,2005, 5(1): 20
- [4] Liu B,Yu X,Luo K, et al: Influence of Primate lentiviral vif and proteasome inhibitors on human immunodeficiency virus packaging of APOBEC3G[J]. *J. Virology*,2004, 78 (4): 2 072 ~ 2 081
- [5] Mehle A, Strack B, Ancute P et al. Vif overcome the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway [J]. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279 (9): 7 792~7 798
- [6] Kewal Ramani VN, Coffin J M. Weapons of mutational destruction[J]. *Science*, 2003, 301: 923~925
- [7] Warner C, Greene M D, B Matijia Peterlin . Molecular Insight Into HIV Biology. HIV Insite Knowledge Base. <http://www.hivinsite.com>
- [8] Kwong P D, Wyatt R, Robinson J, et al. Structure of an HIV gp120 envelop glycoprotine in complex with the CD₄ receptor and a neutralizing human antibody [J] . *Nature*, 1998, 393 (6 686): 648~659
- [9] Liao Z, Cimaskasy LM, Hampton R, et al: Lipid rafts and HIV pathogenesis: Host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1 [J]. *AIDS Res. Hum. Restroviruses*, 2001, 17(11): 1 009~1 019
- [10] Kwon D S, Gregorio G , Bitton N, et al. DC-SIGN mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection[J]. *Immunity*, 2002, 16(1): 135~144
- [11] Karageorgos L, Li p, Burrell C et al. Characterization of HIV replication complexes early after cell to cell infection [J]. *AIDS Res. Hum. Restroviruses*, 1993, 9(9): 817~823
- [12] Turelli P, Doucas V, Craig E et al. Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication [J]. *Mol. Cell*, 2001, 7(6): 1 245~1 254
- [13] Rodrigues R, Vazquez CM, Colares JK, et al. Antiretroviral resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 infected patients enrolled in genotype testing at the Central Public Health Laboratory [J]. *Sao Paulo, Brazil: preliminary results. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 2005, 100(1): 97~102
- [14] Killian M S, Sabado R L, Kilpatrick S, et al. Clonal breadth of the HIV -1 -specific T -cell receptor repertoire in vivo as determined by subtractive analysis [J]. *AIDS*, 2005, 19 (9): 887~896
- [15] Simon JH, Gaddis NC, Fouchier RA, et al. Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV phenotype [J]. *Nat. Med.*, 1998, 4(12): 1 397~1 400
- [16] Singh K K, Hughes M D, Chen J, et al. Genetic Polymorphisms in CX3CR1 Predict HIV -1 Disease Progression in Children Independently of CD4⁺ Lymphocyte Count and HIV-1 RNA Load [J]. *J. Infect. Dis.*, 2005, 191(11):1 971~1 980
- [17] Holm GH, Gabuzda D. Distinct mechanisms of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell activation and bystander apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 virions[J]. *J. Virol.*, 2005, 79(10): 6 299~6 311

(责任编辑 李慧政)