

97, 12(4)  
285-294  
第12卷第4期  
1997年12月

病毒学杂志

3282(1)  
http://www.cqvip.com

1997/925/0A/012/004

285-373

## HIV 基因结构及其疫苗研究

金宁一

R373.9, R512.910.3

(解放军农牧大学研究所病毒室, 解放军基因工程实验室, 长春 130062)

### Research on Gene Structure and Vaccines of HIV

Jin Ningyi

(Institute of Changchun University of Agriculture and Animal Sciences, Changchun 130062)

关键词 人免疫缺陷病毒, 结构, 疫苗

Key words HIV, Structure, Vaccine

艾滋病, 感染, 基因结构, 疫苗

艾滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)危及全世界,成为本世纪难以治疗的病毒病。病原体是反转录病毒科的人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)。AIDS又叫获得性免疫缺陷综合症,是由于机体感染 HIV 后造成细胞免疫缺陷,抗感染能力下降,以致伴有机会感染、恶性肿瘤及神经障碍等症候群的统称。

HIV 感染到 AIDS 发病为止,大约需 5~15 年。这期间大致经过四个过程。无症状带毒者(asymptomatic carrier, AC)、持续性全身淋巴结肿(persistent generalized lymphadenopathy, PGL)、AIDS 相关症候群(AIDS related complex, ARC)最后发展成 AIDS。1983 年 5 月法国巴氏德研究所 Montagnier 等从 ARC 患者多发性病变淋巴结分离出 HIV-1,1986 年 4 月 Montagnier 等又分离出 HIV-2。目前,在世界范围内流行的以 HIV-1 为主。由于分子生物学和生物技术的发展,在短短的 10 多年中,已基本上搞清了 HIV 结构(图 1)及其大致的功能。

#### 1 HIV 的结构及其功能

HIV 属反转录病毒科(Retroviridae)慢病毒属(Lentivirus)灵长类慢病毒群(Primate lentivirus group),有外膜的单股、双基因组 RNA。HIV 粒子的形态,1 型和 2 型完全相同。粒子呈直径为 110 nm 球型(图 1)。HIV-1 基因组的 5'端有帽(cap)结构,3'端有多聚腺苷酸 poly(A)序列,如果去掉 poly(A),基因组全长为 9 100 碱基(图 2)。如图 1 所示基因组 RNA 附着于核蛋白(NC 或 p15),反转录酶(RT 或 p61/55)和核衣壳蛋白(CA 或 p24)形成圆锥型核心。核心的外侧为脂质双层组成的外膜,膜上有穿膜蛋白 gp41 和膜外蛋白 gp120,外膜内侧为基质蛋白(MA 或 p17)等。

##### 1.1 末端重复序列(long terminal repeat, LTR)

HIV 基因组两侧有 100 碱基的 U5 序列,3'端 R 序列上游存在 450 碱基的 U3 序列。与其他反转录病毒一样, HIV 基因 RNA 反转录成 DNA 基因组时,其两端形成 U3-R-U5

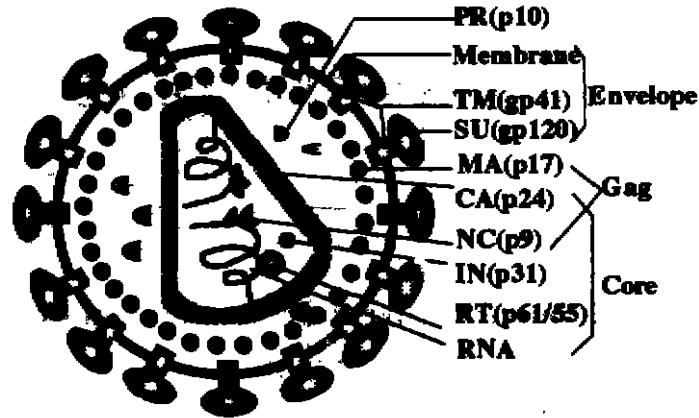


图1 人免疫缺陷病毒粒子结构

Fig 1 Structure of HIV-1 virion

(LTR), 整合到宿主细胞染色体 DNA 基因组中。LTR 序列中存在的增强子、启动子利用细胞的 RNA 聚合酶 II, 从 5' 端 R 处开始转录, 到 3' 端 R 处附加 poly(A) 后至少形成 20 种 mRNA。

LTR 中还存在 NRE (negative regulatory element)、NF- $\kappa$ B 及 TAR element 等多种与调控有关的基因。

## 1.2 结构基因(图 2)

HIV-1 基因组中含 3 个结构蛋白基因 gag、pol 和 env, 7 个调控和修饰基因 tat、rev、nef、vif、vpr、vpu 及 tev。HIV-2 的基因组中无 vpu, 而在 vif 和 vpr 中间有 vpx<sup>[1]</sup>。

1.2.1 核心蛋白基因(group specific antigen, gag) gag 基因产物是未经拼接的 mRNA 翻译的 55 kDa Gag 前体蛋白和 160 kDa Gag-Pol 聚蛋白, 且后者占前者的 5~10% 左右。经 pol 基因产物蛋白酶(PR)作用下裂解为成熟的 MA(基质蛋白 p17)、CA(衣壳蛋白 p24)、NC(核衣壳蛋白 p9 和 p6 蛋白)。Gag 前体蛋白首先形成病毒样粒子后被 PR 识别并加工。由于 MA、CA 和 NC 为 HIV 的内部核心骨架, 即使无其他结构蛋白也能形成病毒样粒子。

1.2.2 聚合酶基因(polymerase, pol) pol 基因产物是病毒 DNA 合成、前病毒 DNA 与细胞染色体的整合及 pol 前体蛋白降解有关的重要酶系。pol 的产物来源于同一个 gag 的 mRNA, 即首先形成 Gag-Pol 融合蛋白质后, 被蛋白酶降解成 PR(蛋白酶 p10)、RT(逆转录酶 p66/51) 及 IN(整合酶 p32)。在 Gag 或 Gag-Pol 前体蛋白(160 kDa)汇集成出芽形成的粒子时, PR 单体形成二聚体显示其活性。RT 可使病毒 RNA 逆转录成 DNA, 还具有 RNase H 活性。p61 部分降解成 p55 则丧失 RNase H 活性。由于 HIV 逆转录酶比小鼠白血病病毒(MLV)的逆转录酶误读率高, 很容易产生变异株。IN(整合酶 p32)使反转录后产生的前病毒 DNA 整合到宿主细胞染色体中, 如果 IN 部分发生缺失 HIV 体则不能复制。由此看来, HIV 基因组整合到细胞染色体 DNA 的过程, 在病毒生活史中占有重要地位。

pol 基因中无 ATG 起始密码子, 而是靠 gag 基因框移位(frame shifting)方式进行 pol 基因的翻译。

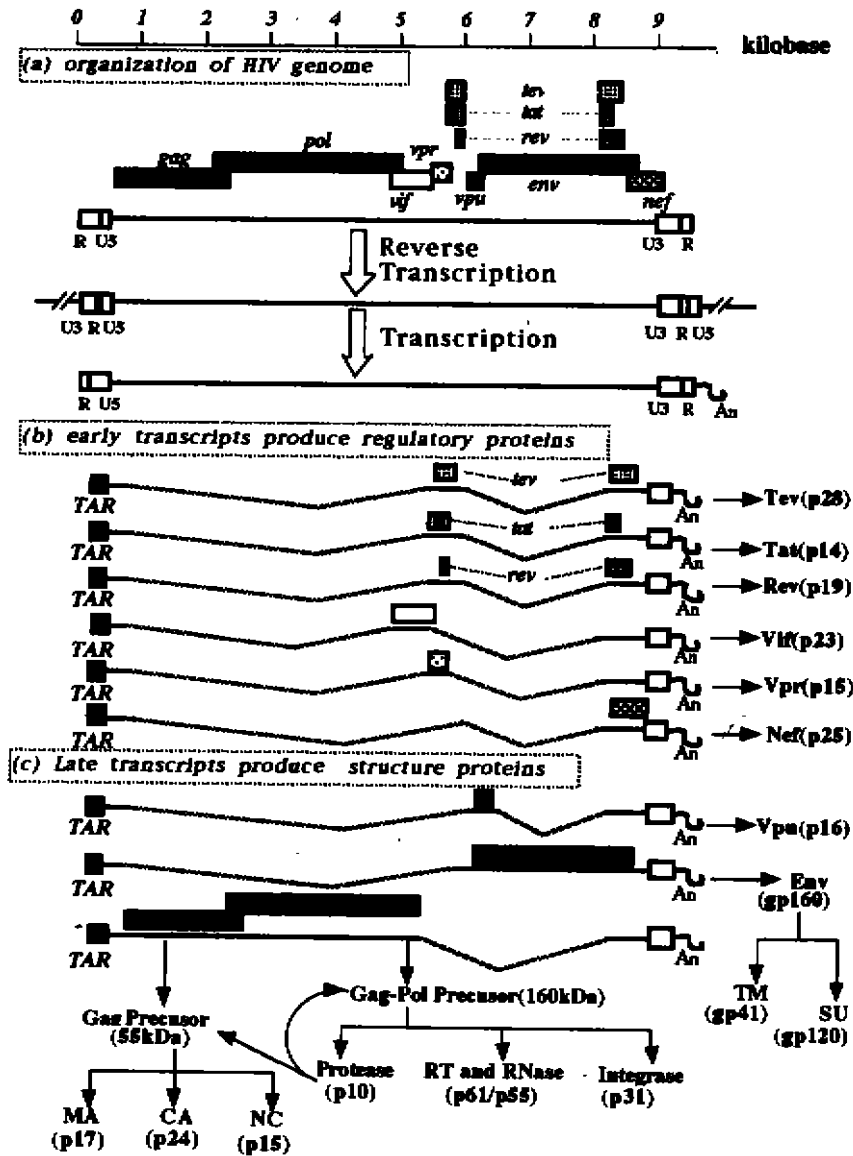


图2 HIV-1的基因组构造和 HIV-1 的转录

Fig 2 Organization of HIV-1 genome and the transcription of HIV-1

1.2.3 外膜蛋白基因(envelope, env) env 基因编码病毒粒子外膜糖蛋白,此基因产物为经一次拼接的约5000 碱基 mRNA 翻译出来的160 kDa 糖蛋白(gp160)。gp160 被宿主细胞蛋白分解酶修饰加工后成为膜表面蛋白 gp120(surface glycoprotein, SU)和穿膜蛋白 gp41(transmembrane glycoprotein, TM)。SU 是 HIV-1 结构蛋白中变异率最高的蛋白,有5 个高度可变区(V1~V5)和5 个恒区(C1~C5)。

HIV 与辅助性 T 淋巴细胞(Th)等具有 CD4 受体的细胞结合,结合部位是 SU 的 V4~V5

之中间区。SU和CD4结合时V3区与TM则可从HIV粒子表面露出<sup>[2]</sup>。如果在TM的N端导入部分突变,可使Env与CD4受体细胞膜融合作用降低。此外,V3区含有产生中和抗体决定簇、Th识别区、细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)识别区<sup>[6]</sup>。V3区还有对巨噬细胞、脑组织纤维的特异识别区。如果对V3区导入点突变,同样亦降低病毒对宿主细胞的融合作用。

### 1.3 调控修饰基因

1.3.1 反式作用因子(trans-activator, Tat) tat产物具有对HIV基因正调控作用。tat产物Tat是经2次或3次拼接的2000碱基mRNA翻译的、分子量14 kDa的碱性蛋白,存在于细胞核中。Tat的作用特点是它不与LTR中的启动子、增强子DNA相结合,而与RNA聚合酶II结合在一起的mRNA 5'端二级结构TAR(trans-acting responsive element, 顺式活性识别单元)结合,并与细胞内因子TBP-1(tat binding protein-1)相结合,促进并稳定mRNA的延长反应<sup>[4]</sup>。如果TAR RNA二级结构的主干部、隆起部和茎环部任一部位发生突变,则使其下游基因表达降低200~5000倍。在无tat时mRNA转录开始数量显著减少<sup>[5]</sup>,可以说Tat的主要作用是提高转录后的大分子mRNA量。Tat蛋白和外膜蛋白gp120共同作用于CD95受体,导致表面有该受体的T淋巴细胞凋亡<sup>[6]</sup>。

1.3.2 病毒蛋白表达调节因子(regulator of expression of viron proteins, Rev) rev基因产物具有促进HIV结构蛋白表达作用。其产物Rev是经2次或3次拼接的2000 bp mRNA翻译的产物,分子量为19 kDa蛋白,存在于细胞核中。Rev与HIV mRNA env区的RRE(rev responsive element)相互作用后,促进只进行一次拼接的5000 bp mRNA向核外输送,其结果未进行过分拼接的长mRNA翻译成Gag、Pol和Env,使病毒复制向感染晚期转换,在HIV生活史中起到举足轻重的作用。另一方面使无RRE序列的2000 bp等小mRNA产量减少,从而抑制了这些小mRNA翻译成Tat、Rev和Nef等调节蛋白。无Rev时HIV mRNA的拼接激增,只产生多次拼接的tat、rev和nef等翻译产物<sup>[7]</sup>。

1.3.3 负因子(negative factor, Nef) nef基因位于3'端,且与3'端LTR部分重叠,其产物Nef的分子量为27 kDa,存在于细胞膜内侧。起初的研究结果表明Nef具有抑制病毒的增殖作用,即对LTR有负调节作用,由此命名为nef。但在对于某些毒株的增殖,Nef则无抑制效应。体外实验结果表明nef还有降低细胞表面CD4数目的作用<sup>[7]</sup>。这对病毒增殖有何作用尚不清楚。nef基因也存在于HIV-2和SIV(simian immunodeficiency virus)基因组中。在猴体感染SIVmac实验中发现,如果无Nef的表达则使猴不能表现出AIDS症状。无nef基因时p24产率降低100~10000倍,看来Nef并不是负因子。另外,HIV-1 Nef蛋白可被HIV-1蛋白酶降解为19 kDa和8 kDa两种蛋白,消化降解位点在Nef蛋白的第57~58氨基酸之间,由此暗示Nef蛋白可能还有其它生物学功能。

1.3.4 病毒感染因子(virion infectivity factor, Vif) vif基因编码23 kDa蛋白,是经一次拼接的5000 bp mRNA翻译产物,在已发现的慢病毒中均发现了该基因。Vif的表达依赖于Rev的表达。但它并不是病毒粒子的组成成份。无vif基因时,病毒的感染效率降低到1/100。vif对于HIV基因的转录和病毒粒子组成无促进作用,但可促进病毒在血淋巴细胞和巨噬细胞中的增殖。Vif的主要作用是在细胞内的一些细胞因子协同下促进病毒的复制。

1.3.5 R蛋白(viral protein R, Vpr) vpr基因编码96个氨基酸,15 kDa蛋白(HIV-1),是

经过一次拼接的 5 000 bp mRNA 翻译产物。已证明在巨噬细胞中的 HIV 增殖却需要 Vpr 的存在。猴体接种试验证明,无 vpr 基因则使 SIV 的增殖急剧降低,同时延缓发病进程。有类似 Nef 的作用。有人推测 HIV-1 Vpr 作为病毒粒子成份,其 N-端与 Gag 相互作用,促进病毒粒子的形成<sup>[5]</sup>和病毒粒子数目的增加。

1.3.6 U 蛋白(viral protein U, Vpu) vpu 基因只存在于 HIV-1 基因组中,而 HIV-2 和 SIV 基因组中不存在这种基因。vpu 基因编码 16 kDa 蛋白,存在于细胞膜内侧。Vpu 促进在细胞膜上形成的病毒粒子的释放,促进 CD4 分子在内质网中的降解作用。Vpu 和 Env 均使用同一 mRNA(bicistronic mRNA, 双顺反子 mRNA)。Vpu 蛋白的 N-端穿膜部位与促进病毒粒子释放有关,而与 CD4 的降解无关<sup>[2]</sup>。有人认为 Vpu 通过作用于病毒粒子组成蛋白,很有可能通过细胞内的某种因子或靠增加细胞通透性,达到这种促进病毒粒子释放的作用。

1.3.7 X 蛋白(viral protein X, Vpx) vpx 基因只存在于 HIV-2 和 SIV 基因组中,而 HIV-1 中无此基因。vpx 作为成熟病毒粒子的成份,为病毒在外周血淋巴细胞和巨噬细胞中增殖所必需。Vpx 作为病毒粒子成份,其作用类似 HIV-1 的 Vpr,与 Gag 蛋白相互作用的方式促进病毒粒子的形成。

1.3.8 tev(tat/env/rev sequences) tev 基因编码蛋白是 tat 的第 1 外显子、env 一部分和 rev 第 2 外显子的翻译产物,分子量为 28 kDa。Tat 与 Tev 类似,具有反式刺激正调控作用,同时又有弱的 Rev 活性,但它的作用尚不清楚。

对以上 HIV 粒子结构和基因组结构及其功能的了解,这对今后研究 HIV 的潜伏、激活、AIDS 临床及疫苗开发定会有所帮助。

## 2 HIV 疫苗研究

为了预防 AIDS,很多实验室和公司投入大量的人力、物力,深化研究 AIDS 疫苗。很多制品已进入 I、II 和 III 期临床试验,有了安全性和诱导机体产生中和抗体的数据,但尚未见能够预防 AIDS 的报道。作者认为 AIDS 疫苗的关键在于能否诱导机体产生强的细胞免疫,能否中和各种变异的 HIV 株和具有持久的免疫效果,也就是说能否诱导强的 T 细胞应答,使机体抵御外来 HIV 感染和控制已被感染的病毒复制,及清除染色体 DNA 中整合的 HIV 感染细胞。

### 2.1 抗原决定簇

在探讨 HIV 疫苗之前有必要了解能够诱导体液免疫和细胞免疫的 HIV 抗原决定簇的性质。

2.1.1 V3 区 能够中和 HIV 的抗体,主要识别外膜蛋白(Env)gp160 及其分解产物 gp120 和 gp41。其中最重要的部位存在于 gp120 的 V3 区 35 个氨基酸。感染 HIV-1 后可迅速产生抗 V3 中和抗体,给实验动物注射含 V3 蛋白也出现同样结果。在 V3 35 个氨基酸中,真正被抗 V3 中和抗体识别的是其 N 端前 4~8 氨基酸残基直线排列。即使含 V3 区蛋白不保持天然立体结构,也同样能够诱导中和抗体。目前世界上流行的 HIV-1 至少可有 10 个大流行型株。HIV 最早流行的中、西非地区 V3 区序列变化幅度较大。而北美流行的 HIV V3 区中居突出部一氨基酸序列(G-P-G-R)具有保守性,变异只在它两侧。对泰国流行的 HIV-1 V3 区序列测定结果可分为 E、B 两种亚型。E 亚型为性接触感染者为主,类似于非洲流行株;V3 区中央突出部氨基酸组成为 I-G-P-G-Q-V-F;B 亚型为注射药物乱用者(injecting drug user, IDU)为主,类似于北美、欧洲流行株,V3 区中央突出部氨基酸序列为 L-G-P-Q

-A-W。这提示人们能否利用抗 V3 区保守性中央突出区抗体,中和类似 HIV-1 流行株的问题。

2.1.2 gp120 上的 CD4 结合区 由于引起 HIV 感染时首先与 T 淋巴细胞等细胞膜上的 CD4 受体结合。现已证明除了抗 V3 区抗体以外的中和性抗体亦能够阻止病毒粒子与 CD4 受体的结合。与 V3 区序列相比 gp120 上的 CD4 结合部位序列很少发生变异,但用抗 CD4 结合部位抗体却不能完全阻止各种不同分离株 HIV 与 CD4 的结合。另外,由于抗 CD4 抗体能够与正常的 CD4 受体结合并抑制其活性,因此很多人在设法利用人工合成可溶性 CD4 (sCD4) 来阻止 HIV 感染方面做了许多工作。但在临床上如果使 sCD4 中和 HIV,其使用量要高出体外实验数据的 200~2 700 倍。有人认为抗 CD4 结合部位抗体和 V3 区中和抗体协同作用能够拦截 HIV 粒子。

有人也发现除了 V3 区有抗原决定簇以外, gp120 的 C1 区和 gp41 区也有诱导机体产生高水平中和抗体的抗原决定簇<sup>[8]</sup>。有人发现用牛的  $\beta$ -乳球蛋白和化学修饰的 3-羟基邻苯二甲酸酐形成一种 3HP- $\beta$ -LG 物质,该物质能与细胞的 CD4 受体结合,并能阻止 HIV 和 SIV 对含该受体 T 淋巴细胞的感染<sup>[9]</sup>。

2.1.3 诱导 CTL 反应决定簇 因为与病毒粒子直接作用的中和抗体,不能作用于感染细胞,因此如何消除 HIV 感染细胞,是机体重要的细胞免疫反应。

一些测试结果表明,在早期感染 HIV 患者中就有对 Env、Gag 和 Pol 的 CTL 反应<sup>[4]</sup>。许多研究结果表明, HIV-1 Env(gp120、gp41)、Gag(p17、p24 和 p15)、Pol 和 Nef 中均有诱导对 HIV-1 特异性 CTL 反应决定簇群。在 SIV Gag、Nef 和 HIV-2 Gag 中,亦相继发现了对应于 SIV 和 HIV-2 的特异性 CTL 反应决定簇。肝细胞、神经细胞等有核细胞表面均有 MHC I (major histocompatibility complex I, MHC I) 分子,而 B 细胞、巨噬细胞表面有 MHC II 分子。具有 MHC I 表面标志的细胞感染了 HIV 后,在细胞内将 HIV 蛋白降解或合成 HIV 蛋白时,产生 10 多个氨基酸组成的直线型多肽,此多肽与在内质网中产生的 MHC I 分子结合后,经高尔基体最后达到细胞表面。此时含有 CD8 受体的杀伤性 T 淋巴细胞识别 MHC I-多肽复合物,产生直接细胞杀伤作用。而与 MHC II 结合的 HIV 多肽露出细胞表面,被含有 CD4 受体的辅助性 T 淋巴细胞识别,并在此细胞介导下活化 B 细胞刺激抗体产生。因此为了清除象 HIV 感染后在细胞内长期潜伏的病毒,制备出能诱导中和抗体、同时能诱导杀伤性 T 细胞活性的疫苗尤为重要。

## 2.2 合成多肽疫苗

目前,大多以 V3 区合成多肽为疫苗候补。如果 V3 区合成肽超过 20 个氨基酸则会有充分的抗原性,此时不需蛋白载体。为了增强合成多肽的抗原性,在合成 V3 区多肽基础上,再合成能够被辅助性 T 淋巴细胞识别的多肽后再进行交联和免疫<sup>[10]</sup>。猩猩在两次注射 V3 区合成肽后,接种了游离的病毒粒子和病毒感染细胞,未能使其发病。有人证明 HIV-2(ROD 株)的 V3 区也能诱导型特异性抗体。有人将抗 V3 中和抗体注射给猩猩能抵抗 HIV-1 强毒攻击<sup>[11]</sup>,但一些研究表明,在显示中和活性时 V3 区与 Env 蛋白其他部位诱导的抗体协同作用尤为重要。遗憾的是, V3 的氨基酸排列在各种不同株间有一定的差异,这给疫苗开发研究带来一些困难。但有人发现用 HIV-1 SF2 株 gp120 蛋白免疫人体后诱导的中和抗体,不仅能中和 SF2 毒株,又能中和 MN 毒株,亦有人发现 HIV-1 O 亚群感染者血清抗体能够中和

M 亚群病毒<sup>[12]</sup>。Takahashi 等针对 gp120 合成多肽与氢氧化铝凝胶、破伤风毒素、MAP(multiple antigen peptide)、卵白蛋白、皂素、Frend's 佐剂等进行多种免疫试验。

### 2.3 亚单位疫苗/颗粒化疫苗

随着分子生物学技术的发展,已有多种 HIV 亚单位疫苗进入 I、II 和 III 期临床试验。利用基因重组方法生产的亚单位疫苗将目标对准 HIV 结构蛋白 Env - rgp160、rgp120。近年来应用重组痘苗病毒、杆状病毒、酵母表达了 Env 蛋白。利用高效表达痘苗病毒载体可表达 gp160 或 gp120 20  $\mu\text{g}$ ~60  $\mu\text{g}/10^7$  细胞<sup>[13]</sup>。用多角体病毒载体在昆虫细胞中表达 rgp160 产量很高,并具有诱导机体产生抗 gp160 抗体及使用安全等优点,只是中和抗体效价很低。在临床应用表明,首先用痘苗病毒表达的 rgp160 进行基础免疫后,再用昆虫细胞表达的 rgp160 进行追加免疫,才能诱发人体产生较高的中和抗体。这可能与多角体病毒表达外源蛋白时糖基化等不完全修饰和折叠有关。

MicroGenesys 用 40 或 80  $\mu\text{g}$  rgp160 免疫人体时只产生低水平中和抗体,而用 160 或 640  $\mu\text{g}$  进行免疫时则产生高水平的中和抗体。Genentech 制备的亚单位疫苗对 HIV 感染者连续两年进行免疫,其中 2 人血液里即使使用 PCR 也检查不出 HIV 核酸。这说明制造的疫苗株与实际流行的毒株相吻合,有望用于 AIDS 的治疗。

用酵母生产的 rgp120,用油水或 MTP - PE 作为佐剂,每人注射 30  $\mu\text{g}$  或 100  $\mu\text{g}$ ,但有些供试者注射 2~3 次后才出现中和抗体。看来,用酵母表达时只有极少量的糖链被修饰,可能折叠成非自然型 rgp120 立体结构所致。

目前对 Gag、Gag - Pol、Gag - Env 用 Gag - Pol - Env 的重组表达,也作为“巨分子颗粒化疫苗”进行研究。颗粒抗原的主要优点是可提供天然病毒颗粒相同的抗原,增强免疫原性,但无病毒核酸,无感染性。可根据需要任意改造,使之能更好地刺激机体产生保护性免疫反应。HIV - 1 gag 基因在重组痘苗病毒和重组杆状病毒中表达时,均可产生 p55 gag 病毒样粒子。若在其中插入 env 基因的有关保护性抗原性基因片段,同样可以产生嵌合型的病毒样粒子,这种病毒粒子可诱导机体产生很强的抗 Gag 免疫应答和相应的抗 Env CTL 反应。若将重组的 gp120 蛋白包裹于可被生物降解的多聚(PLG)微粒中免疫小鼠,能诱导持久的 HIV 特异的 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞应答。用该复合体进行鼻腔粘膜免疫可诱导 HIV 特异的 CD8<sup>+</sup> CTL 和分泌型 IgA。CD4<sup>+</sup> Th1 亚群分泌的 IL - 2、IFN -  $\gamma$  和 TNF -  $\beta$  等参与细胞介导的抗细胞内病原体的免疫应答。利用酵母表达 p24 gag 后制备的 p24 病毒样粒子 100~500  $\mu\text{g}$  免疫健康受试者后发现,具有良好的免疫诱导效应<sup>[14]</sup>。有人亦利用高效痘苗病毒载体,大量表达 HIV - 1 和 2 型 gag 基因,其表达量大约为 14  $\mu\text{g}/10^6$  细胞,并在电镜下看到了大量串珠状表达的病毒粒子,将其纯化以期作为防治 AIDS 的颗粒化疫苗。

### 2.4 基因重组活疫苗

利用痘苗病毒载体制备 HIV 活疫苗已成为热点。这是由于痘苗病毒表达的外源基因免疫原性强,容易诱导细胞免疫。

MicroGenesys 公司用痘苗 - gp160 免疫人体后,再用 rgp160 追加免疫 2 周,即可产生中和抗体<sup>[15]</sup>,仅用痘苗 - gp160 接种人体也能产生 CD8<sup>+</sup> CTL 反应。Giavedoni 等在痘苗病毒载体中插入了 IFN - r、gp120、gp41、gag 等不同组合的基因进行表达,其中 IFN - r - gag 融合表达的痘苗病毒也许具有抗病毒作用<sup>[9]</sup>。用金丝雀痘病毒作载体表达 HIV - 1 外膜蛋白已进入 I

期临床试验,并证明诱导机体产生很强的 CTL 反应<sup>[1]</sup>。由于禽痘病毒等非复制表达载体对人体很安全,近年来具有替代痘苗病毒载体的趋势。有人将感染了重组痘苗病毒的细胞接种小鼠,可使其产生持久的抗 HIV 抗体。

Therion 公司将 gag、pol 和 env 插入痘苗病毒载体,表达了多种不同结构 HIV 蛋白,并将这种活的多价重组疫苗命名为 TBC-3B 艾滋病疫苗,正在 50 名健康受试者中进行 I 期临床试验。

利用腺病毒载体表达了 Gag 和 Env,其中 Gag 重组病毒能使小鼠和猴产生抗 HIV 中和抗体,而 Env 重组病毒能使犬产生抗 HIV 中和抗体<sup>[16]</sup>。在脊髓灰质炎病毒表面抗原决定簇部位置换 HIV-1 gp41 基因进行表达,也具有 HIV 的中和活性。同样,将 HIV-1 V3 区重组到此病毒中表达,也能与抗体发生中和反应。

在反转录病毒载体中插入 HIV env 基因后,转化小鼠细胞,将此转化细胞注射给小鼠,使小鼠产生 HIV 的 CD8<sup>+</sup> CTL 反应和体液免疫反应<sup>[17]</sup>,并正在探索 HIV 转基因治疗的可靠性。

由于 HIV 只能在猩猩体内进行复制和致病,有人利用与 HIV 具有类似结构的 SIV 部分替代 HIV 基因,构建出 SIV-HIV 杂交病毒,这种病毒能够在猴体内增殖,这在接近人体的动物体内观察、追踪 HIV 提供了方便。

在 BCG 载体中表达 HIV gag 基因时能诱导体液免疫和细胞免疫。在沙门氏菌载体中表达 HIV-2 gag 基因和 env 基因,将此重组沙门氏菌供小鼠和猴口服,能使机体产生 CD8<sup>+</sup> CTL 反应。将含 SIVmac env-gag 基因的重组质粒接种猴体发现,同样可诱导 CD8<sup>+</sup> CTL 反应。

## 2.5 核酸疫苗

有人给小鼠肌肉注射含 HIV 膜蛋白基因的质粒,结果诱导了抗 HIV 特异性抗体的产生,同时还观测到特异性 T 淋巴细胞增殖反应和 CTL 应答。进一步研究发现,给小鼠肌肉注射含 HIV 包膜蛋白基因的质粒后,体内抗 HIV 特异性抗体水平高达 1:1 000,这种阳性抗血清可在体外中和 HIV 感染,并出现特异性 T 淋巴细胞增殖反应和 CTL 应答。有人将含 gag-pol-rev、env-rev 和去掉 env 的全基因组的质粒 DNA (pDNA) 免疫机体后发现,不仅可诱导 Th1 亚型细胞的免疫应答和 CTL 反应,且能增加分泌 IL-12 和 IFN- $\beta$ <sup>[18]</sup>。应用家兔和灵长类动物进行实验,获得了类似结果。动物实验结果初步显示,注射 HIV 核酸疫苗可诱导机体产生广泛而强烈的免疫应答,为此,美国已批准应用 HIV 核酸疫苗治疗艾滋病,现已进行 I 期临床试验。

## 2.6 基因缺失疫苗

有人发现,猴经免疫 SIV nef 基因缺失株后,可抗最大剂量(1 000 动物感染剂量单位)SIV 强毒的攻击。Therion 公司已利用 nef 基因缺失疫苗株接种 HIV 感染者,使感染者存活时间得以延长。但目前对这种基因缺失疫苗的安全性仍未得到解决。

## 2.7 抗独特型抗体疫苗

抗独特型抗体(抗 Id)是另一种新型 HIV 疫苗,其优点在于不含有 HIV 基因和蛋白,但缺点是有可能引起免疫抑制。抗 Id 抗体是针对抗体的 V 区与抗原结合的部位,因而具有针对抗原中抗体决定簇模拟的空间构象。在体内可起到与抗原相似的作用,刺激机体产生针对相应决定簇的抗体。在 HIV 疫苗研究中,可用 HIV gp120 的中和抗体和抗 CD4 单抗为抗原,经



两条途径来制备抗 Id 疫苗。实验证明,用鼠抗 CD4 单抗免疫恒河猴和狒狒产生了抗 HIV gp120 的抗体,证明 Id 抗体可模拟 CD4 分子而与 HIV gp120 结合。

### 3 结束语

尽管进行了近 10 年的 AIDS 疫苗研究,但因根据过分简单的概念,认为如同乙肝病毒疫苗那样,通过艾滋病病毒外膜抗原的体液应答就能预防 HIV 感染,而实验结果却证明这种方法用于 HIV 并不成功。因此,当前对 HIV 疫苗研究的要求是:(1)诱导 CTL 应答以消除病毒感染细胞;(2)疫苗中应该包含保守的核心抗原组分;(3)免疫记忆;(4)对粘膜感染部位有效。在重点发展预防性疫苗的同时,积极开展治疗性疫苗的研制。利用含有广泛免疫决定簇群的病毒样粒子、巨分子颗粒化结构蛋白,以及诱导机体产生强免疫力的活病毒载体(例如痘苗病毒载体),制备重组活病毒,有可能使机体及粘膜感染部位的 CTL 和体液免疫达到有效平衡。

在 HIV 对人类的危害日愈严重之际,如何进一步深入了解 HIV 的详细结构和功能,如何制备理想的疫苗,给人们留下深刻的课题。最大的难点是制备适合时刻变异的 HIV 的疫苗和治疗已感染了 HIV 的带毒者。因此必需着重开发适合于本地区、有效防治 HIV 的疫苗。

### 参 考 文 献

- 1 Egan MA, Pavlat WA, Tartaglia J *et al.*. Induction of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) - specific cytolytic T lymphocyte responses in seronegative adults by nonreplicating, host - range - restricted canarypox vector (ALVAC) carrying the HIV - 1MN env gene. *J Infect Dis*, 1995, 171:1623~1627
- 2 Schudert U, Bour S, Ferrer - Montiel AV *et al.*. The two biological activities of human immunodeficiency virus type I Vpu protein involve two separable structural domain. *J Virol*, 1996, 70:809~819
- 3 Henderson LE, Sowder RC, Copeland TD *et al.*. Isolation and characterization of a novel protein (XORF product) from SIV and HIV - 2. *Science*, 1988, 241:199~201
- 4 Kundu SK, Merigan TC. Equivalent recognition of HIV proteins, Env, Gag, and Pol, by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. *AIDS*, 1992, 6:643~649
- 5 Mahacigam S, Khan SA, Jabbar MA *et al.*. Identification of residues in the N - terminal acidic domain of HIV - 1 Vpr essential for virion incorporation. *Virology*, 1995, 207:297~302
- 6 Westendorp MO, Frank R, Ochsensdauer C *et al.*. Sensitization of T cells to CD95 - mediated apoptosis by HIV - 1 Tat and gp120. *Nature*, 1995, 375:497~500
- 7 Bandres JC, Shaw AS, Ratner L. HIV - 1 Nef protein down regulation of CD4 surface expression; relevance of the lock binding domain of CD4. *Virology*, 1995, 207:338~341
- 8 Clerici M, Lucey DR, Zajac RA *et al.*. Detection of cytotoxic T lymphocyte specific for synthetic peptides of gp160 in HIV - seropositive individuals. *J Immunol*, 1991, 146:2214~2219
- 9 Neurath AR, Jiang S, Strick N, *et al.*. Bovine beta - lactoglobulin modified by 3 - hydroxyphthalic anhydride blocks the CD4 cell receptor for HIV. *Nat Med*, 1996, 2:230~234
- 10 Ou CY, Ciesielski CA, Myers G *et al.*. Laboratory investigation group, and epidemiologic investigation group. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. *Science*, 1992, 256:1165~1171
- 11 Emin EA, Schlerf WA, Nunberg JH *et al.*. Prevention of HIV - 1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain - specific monoclonal antibody. *Nature*, 1992, 355:728~730
- 12 Nyambi PN, Nkengasong J, Peeters M *et al.*. Reduced capacity of antibodies from patients infected with human immunodeficiency virus type 1(HIV - 1)group O to neutralize primary isolates of HIV - 1 group M viruses. *J Infect Dis*, 1995, 172:1228~1237

- 13 金宁一, 志田寿利. HIV-1 外膜(env)基因在重组痘苗病毒中的高效表达. 病毒学报, 1994, (4):327~333
- 14 Weber J, Cheinsong - Popov R, Callow D *et al.* Immunogenicity of the yeast recombinant p17/p24:Ty virus - like particles (p24 - VLP) in healthy volunteers. *Vaccine*, 1995, 13(9):831~834
- 15 Wu X, Liu H, Xiao H *et al.* Targeting foreign proteins to human immunodeficiency virus particles via fusion with vpr and vpx. *J Virol*, 1995, 69:3389~3398
- 16 Nutuk RJ, Chanda PK, Lubeck MD *et al.* Adenovirus human immunodeficiency virus (HIV) envelope recombinant vaccines elicit high - titered HIV - neutralizing antibodies in the dog model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:7777~7781
- 17 Chada S, Dejesus C, Laube I. *et al.* Lysis IIIB and MN - infected human targets by murine anti - HIV CTL (Meeting abstract). *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1992, 8:943
- 18 Oxford JS, Jeffs SA. New scientific developments towards an AIDS vaccine: report on a workshop organized by EU programme EVA entitled novel approaches to AIDS vaccine development held at the Institut Pasteur, Paris. *Vaccine*, 1996, 14: 1712~1717