

# 病毒跨膜蛋白的结构功能与抗病毒药物设计

杨金华, 叶荣

复旦大学上海医学院, 上海 200032

**摘要:** 根据病毒衣壳表面有无包膜结构, 病毒可被分为无包膜病毒和有包膜病毒。包膜病毒的膜蛋白在病毒的吸附、侵入、脱壳、生物大分子合成、病毒颗粒的装配与释放等生命周期中起重要作用。某些包膜病毒的膜蛋白对病毒侵入宿主细胞的膜融合是不可或缺的。结构分析显示, I 型和 II 型病毒融合蛋白采用类似的膜融合方式。此外, 流行性感冒病毒的 M<sub>2</sub> 蛋白、人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 的 Vpu 蛋白、严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 3a 蛋白等膜蛋白还具有离子通道功能。针对这些病毒膜融合蛋白设计的抑制分子, 将为研发抗包膜病毒新型药物提供新思路 and 策略。本文以 3 种病毒膜融合蛋白为例, 对其融合机制、跨膜蛋白离子通道功能及其在抗病毒药物设计中的应用作一简要综述。

**关键词:** 病毒跨膜蛋白; 膜融合; 病毒性离子通道; 药靶

## Advances in the viral transmembrane proteins: structure, function and antiviral drug design

YANG Jin-Hua, YE Rong

Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China

**Abstract:** Viruses have been classified into enveloped and non-enveloped subtypes according to their surface structures. The membrane proteins of the enveloped viruses are involved in the attachment, penetration, uncoating, replication, and release of the viruses. The special membrane proteins are essential for the membrane fusion by which the enveloped viruses penetrate into host cells. Furthermore, structural data show that class I and class II viral fusion proteins utilize a similar principle in membrane fusion. In addition, there are some viral membrane proteins, such as M<sub>2</sub> of the influenza virus, Vpu of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), 3a of the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), among others, that have ion channel functions. The processes involved in viral membrane fusion and ion channel function provide new insights into therapeutic design and proteins as potential targets of antivirals. Here we give three typical viral membrane fusion proteins as examples to review the mechanisms of viral membrane fusion and viral ion channel function and the strategies of antiviral drug design.

**Key words:** Viral transmembrane protein; Membrane fusion; Viral ion channel; Drug targets

膜蛋白是指细胞或细胞质膜上蛋白质的总称。根据膜蛋白所处位置, 可分为外周膜蛋白和内在膜蛋白。其中根据与脂质双层结构之间结合关系的差异, 内在膜蛋白又可分为跨膜蛋白和单向内在膜蛋白。许多膜蛋白经翻译后修饰, 如糖基化、脂酰化等, 才能发挥生物学功能。根据病毒外壳是否包裹着富含脂质的包膜, 将病毒分为无包膜病毒和有包膜病毒。跟其他膜结构一样, 病毒包膜由双层脂质

和镶嵌在其中的膜蛋白所组成。双层脂质来源于宿主细胞膜, 也包含一些病毒的糖蛋白, 形成一个细胞来源的脂质与病毒来源的蛋白相结合的混合结构。病毒膜蛋白在大部分情况下以糖基化的形式行使功能, 这些蛋白以病毒 mRNA 为模板, 翻译后通过细胞的转运体系运送至细胞膜。在病毒出芽时, 糖蛋白通过高尔基复合体运送至细胞表面。

包膜病毒通过脂包膜与细胞膜的融合进入宿主细胞。一些包膜病毒在与宿主细胞上的受体结合后直接与宿主细胞质膜融合, 另外一些则通过内吞作用进入细胞, 再发生融合。在这两种情况下, 病毒诱导的膜融合都是通过病毒包膜糖蛋白的构象改变而激发的。此类有促使病毒-细胞膜融合和感染细胞-

基金项目: 国家自然科学基金 (30670473), 上海浦江人才计划 (06PJ14015)

通信作者: 叶荣, E-mail: yerong24@fudan.edu.cn

Corresponding author: YE Rong, E-mail: yerong24@fudan.edu.cn

未感染细胞膜融合功能的蛋白被称为膜融合蛋白(membrane fusion protein)。

有些病毒跨膜糖蛋白可以改变细胞膜的通透性,这类由病毒基因组编码的含 1 个疏水氨基酸簇的小分子蛋白被称为病毒孔蛋白(viroporin)<sup>[1]</sup>。许多病毒孔蛋白被陆续报道,研究较多的包括流行性感冒(简称流感)病毒(influenza virus)的 M<sub>2</sub> 蛋白、人类免疫缺陷病毒 1 型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)的 Vpu 蛋白等。最近有报道,严重急性呼吸综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)的 3a 蛋白也行使细胞离子通道的功能,进而影响病毒颗粒的装配和释放。

由于膜蛋白结晶困难,因此对病毒跨膜蛋白结构的研究相对滞后。然而,仍有一些病毒跨膜蛋白的三维结构被成功解析,这有助于揭示膜蛋白的结构与功能,也为抗病毒治疗提供新的策略。本文以 SARS-CoV、流感病毒和 HIV-1 为例,就病毒膜蛋白介导的膜融合机制、离子通道相关蛋白的结构功能及其作为抗病毒药物靶点的新型药物设计策略进行综述。

## 1 病毒膜蛋白参与的膜融合

无包膜病毒进入宿主细胞通过吞饮作用(endocytosis)和网格蛋白(clathrin)的介导得以完

成,而有包膜病毒则主要通过自身膜蛋白与宿主细胞膜蛋白介导的融合而进入细胞。这种关键性的膜融合是通过一种病毒跨膜蛋白——融合蛋白将其疏水性融合肽插入细胞膜并再折叠来促发融合反应的发生。根据蛋白结构特性,病毒融合蛋白通常分为 I 型和 II 型。

I 型病毒膜融合蛋白包括流感病毒的血凝素(hemagglutinin, HA)糖蛋白<sup>[2]</sup>, CoV 的棘突(spike, S)蛋白<sup>[3, 4]</sup>, 猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)、HIV 的包膜(envelop, Env)蛋白<sup>[5-7]</sup>等,其受体结合部分通过与宿主细胞表面受体结合使病毒膜与细胞膜靠近,形成内吞体后进入细胞。II 型病毒膜蛋白有猴泡沫病毒(simian foamy virus, SFV)的 E1 蛋白和蜱传脑炎病毒(tick-borne encephalitis virus, TBEV)的 E 蛋白,其进入细胞也是通过受体介导内吞作用和低 pH 值刺激膜融合来实现的。不同的是 II 型膜融合蛋白从二聚体(dimer)变成三聚体(trimer),不是形成 1 个卷曲螺旋(coiled-coil)<sup>[8]</sup>。此外,弹状病毒属的水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)介导 G 蛋白融合的构象改变是以低 pH 值、可逆的方式进行的,与 I 型及 II 型膜融合蛋白机制不完全一样,该病毒存在 1 个双向融合域(bipartite fusion domain)。有人认为它可能属于一种全新的 III 型融合膜蛋白<sup>[9]</sup>(表 1)。

表 1 病毒的膜融合蛋白

Tab 1. Viral membrane fusion proteins

Type	Family	Fusion protein	pH of fusion	Location
	Orthomyxovirus	HA	Low	N-terminal
	Retrovirus	Env	Neutral	N-terminal, internal
	Coronavirus	S	Neutral	Internal
	Paramyxovirus	F, HN	Neutral	N-terminal
	Filovirus	GP	Low	Internal
	Alphavirus	E1	Low	Internal
	Flavivirus	E	Low	Internal
	Rhabdovirus	G	Low	Internal
Unknown	Bunyavirus	G1/G2	Low	?
	Arenavirus	GP	Low	?
	Hepesvirus	gB, gD, gH, gL	Neutral	?

### 1.1 流感病毒的 HA 膜糖蛋白

流感病毒为单负链 RNA 病毒,属于正黏病毒科,包括甲(A)、乙(B)、丙(C) 3 型。它们都具有 1 个主要的表面糖蛋白,甲型和乙型为 HA,丙型为血凝素酯酶融合(hemagglutinin esterase fusion,

HEF) 蛋白。甲型和乙型流感严重危害人类健康和生命。

流感病毒表面包括 HA 膜糖蛋白和神经氨酸酶(neuraminidase, NA) 2 种糖蛋白。HA 得名是因为能凝集红细胞,并能通过识别细胞表面糖蛋白和糖

脂的唾液酸使病毒结合细胞<sup>[10]</sup>。此外, HA 还参与膜融合和细胞间感染。现已公认其为流感病毒的主要毒力因子, 并已断定为一种种属特异性蛋白, 流感病毒大流行的危险亦来自其受体结合区域的特异性改变。HA 表面糖蛋白是极典型的 II 型膜融合蛋白, 可用来说明通过内吞途径完成的融合过程。HA 是第 1 个(1981 年)在天然状态中被解析结构的包膜病毒蛋白, 晶体结构提示它带有 2 个结构特异区域, 即包含 1 个三束折叠的卷曲螺旋的茎部和位于茎顶部反向平等的 II 型折叠所形成的球状头部<sup>[2]</sup>。1994 年, 有关低 pH 激活的融合蛋白亚单位 HA2 的晶体结构作为第 1 个活化的融合蛋白结构的论述于 13 年后再次发表<sup>[11]</sup>。这 2 种晶体结构很好地揭示了融合蛋白从天然状态到融合状态或活化状态的构象改变过程。目前很多 HA 的分子结构被成功解析, 包括 1918 流感病毒 H1 的 HA。值得注意的是, 尽管全部氨基酸序列的一致性都少于 50%, 但这些 HA 的结构和功能却十分保守。表明在遗传过程中, 序列可出现很大幅度变异, 结构和功能却保持不变。

流感病毒 HA 蛋白的前体多肽 (polypeptide) HA0 在内质网合成。HA 头部含有唾液酸受体结合位点, 在 H3 亚型被可变抗原簇 A、B、C 和 D 所包绕; 在 H1 亚型则被 Sa、Sb、Ca1、Ca2 和 Cb 包绕。病毒复制时, HA0 蛋白的每个单体被丝氨酸蛋白酶酶解成多肽 HA1 (N 端部分) 和 HA2 (C 端部分)。两者以 1 个单二硫键连接, 这种酶解对病毒的感染性是必需的。HA0 酶解成 HA1 和 HA2 的过程使 HA2 疏水的 N 端融合肽结构域转换成亚稳定状态, 从而激发 HA 的膜融合潜能。在中性 pH 值时, 融合肽被埋藏在三聚体内部<sup>[2]</sup>, 内含体酸化环境诱使 HA 构象发生实质性改变, 融合肽从其包埋位置被重新分配, 形成 10 nm 的三束卷曲螺旋的膜末梢尖端形式并突向宿主细胞膜<sup>[11, 12]</sup>。在与宿主细胞结合及内化过程中, HA 经历不可逆的构象改变, 从而促使膜融合的发生。

有研究发现, 流感病毒 HA 跨膜区和胞质区的脂酰化对膜融合病毒颗粒装配均有用。质谱分析发现, 甲型流感病毒 HA 中 1 个跨膜区和 2 个胞质区的半胱氨酸都发生了脂酰化<sup>[13]</sup>。对于 H1 流感病毒, 替换跨膜区的半胱氨酸可导致病毒毒力急剧下降, 突变胞质尾区半胱氨酸则不使病毒产生感染性。有证据表明, HA 的脂酰化(棕榈酰化)可使其与脂筏结合更紧密, 有利于融合孔的形成和病毒感

染<sup>[14]</sup>。HA2 部分被认为充当介导病毒包膜与细胞膜融合的角色, 而 HA1 部分包含受体结合部位和抗原位点<sup>[15]</sup>。识别 HA1 的抗体可抑制病毒血细胞凝集, 中和病毒的感染性并给宿主提供很好的保护。但其作用并不广泛, 对某一亚型起作用的抗体不一定对其他亚型有相同作用。不同病毒株 HA1 的抗原位点进化频繁, 氨基酸变异性较大, 这种较为微小的变异积累称为抗原漂移 (antigen drift)。最终, 许多抗原位点的突变导致不能被宿主抗体中和的毒株产生, 从而使宿主对此毒株易感。但 HA2 在不同病毒株和亚型较为保守, 也许可为设计新颖而有效的流感疫苗提供思路。

## 1.2 CoV S 糖蛋白

CoV 广泛分布于环境中, 感染人、家养及野生的哺乳动物和禽类, 导致支气管炎、肺炎、胃肠炎、肝炎和脑膜炎等一系列疾病。CoV 的进化会产生新的变种, 从而导致疾病的大流行, 如 2003 年起源于我国广东的 SARS<sup>[16]</sup>。在 SARS 暴发前, 就已经有牛冠状病毒 (bovine coronavirus, BCoV) 跨种属 (cross-species) 传播的零星报道<sup>[17]</sup>。CoV 是一种有包膜的单正链 RNA 病毒, 基因组大小为 28 ~ 32 kb。依其宿主种类、免疫学和基因组等特征分为 1、2 和 3 群 (groups)。SARS-CoV 大部分特征符合 2 群, 但也有人认为是新的群<sup>[18]</sup>。CoV 包膜至少包含 S、E 和 M 3 种不同结构蛋白, 其中 S 蛋白是类似于流感病毒 HA 蛋白的跨膜蛋白, 能介导宿主受体的结合和随后的膜融合, 为一种典型的 II 型病毒膜融合蛋白<sup>[19, 20]</sup>。未被糖基化的单体 S 蛋白大小为 (128 ~ 180) × 10<sup>3</sup>, 糖基化后变为 (150 ~ 200) × 10<sup>3</sup>, 一般经 N 端糖基化后方可发挥生物学功能<sup>[20, 21]</sup>。S 蛋白通常以三聚体形式存在, N 端朝外、C 端朝内 (胞质), 形成 CoV 典型的表面棘突<sup>[21]</sup>。胞外结构域 (ectodomain) 构成 S 蛋白的大部分, 位于其中的受体结合结构域 (receptor-binding domain, RBD) 通常决定病毒的宿主特异性。研究表明, 来源于 SARS-CoV 的 S 蛋白 N 端 17 ~ 537 和 272 ~ 537 氨基酸残基片段均可特异地结合 Vero E6 细胞, 并纯化出可溶性受体分子 (ACE2)。进一步的受体结合抑制实验表明, S 蛋白的 RBD 位于氨基酸残基 303 ~ 537<sup>[22]</sup>。

鼠肝炎病毒 (murine hepatitis virus, MHV) 是典型的 2 群 CoV, 其 S 蛋白 RBD 位于 S1 开始的 330 个氨基酸上<sup>[23, 24]</sup>。大部分 2 型和 3 型 CoV S 蛋白被蛋白酶酶解成 N 端亚单位 S1 和膜锚定亚单位

S<sub>2</sub>, S<sub>1</sub> 亚单位组成棘突的球状头部, 行使受体结合功能; 而 S<sub>2</sub> 亚单位则组成棘突的茎部, 行使膜融合功能。阻止 S 蛋白酶解可明显影响细胞-细胞融合, 但不影响病毒-细胞融合<sup>[25]</sup>。不同群的 CoV S<sub>1</sub> 变异性较大, 甚至在同群的不同种病毒, 同种病毒的不同分离株之间, S<sub>1</sub> 序列都有较大差异。而 S<sub>2</sub> 的胞外区域和跨膜区域的开始段则是 S 蛋白中最为保守的区域<sup>[26]</sup>。S<sub>2</sub> 可进一步分为膜外区、跨膜区和膜内区 3 个功能区。膜外区由融合肽及 2 个七肽重复结构(heptad repeat, HR) HR-1 和 HR-2 组成。跨膜区由 23 ~25 个疏水残基组成, 通过疏水作用整合在双层脂质膜中。而膜内区位于蛋白的 C 端, 分布在细胞或病毒膜的内侧, 主要与病毒颗粒的装配有关, 也参与病毒膜融合功能<sup>[27]</sup>。至今仍不确定 CoV 融合肽的具体位置及序列, 只是预测可能位于 S<sub>2</sub> 结构域。对 S 蛋白的序列和氨基酸疏水性分析初步表明, SARS-CoV 融合肽位于 HR1 的 N 端, 在所有 CoV 中都非常保守<sup>[20]</sup>。以前普遍认为 CoV S<sub>1</sub>-S<sub>2</sub> 切割位置并没有紧邻融合肽, 但最近有研究表明 SARS-CoV S 蛋白可于 S<sub>2</sub> 下游位置(氨基酸 797) 被蛋白酶酶解<sup>[28, 29]</sup>。在 SARS-CoV, 与紧邻 S<sub>2</sub> 酶解位点 SIEDLLFNKVTILADAGF 的 C 端氨基酸在所有 CoV 中高度保守。对 SARS-CoV 的这些氨基酸在突变后再做病毒学功能分析, 提示 S<sub>2</sub> 内部的酶解可能为 S 暴露出其新的内部融合肽而促使膜融合<sup>[30, 31]</sup>。

MHV 与细胞发生融合时 S<sub>1</sub> 首先与可溶性受体结合, 诱使 S<sub>1</sub> 与 S<sub>2</sub> 分开(暴露于 37 °C 和高 pH 时也会导致这种改变), 暴露出融合肽插入目标膜中的外侧。进入细胞后, pH 值降低导致构象进一步改变, 使 HR1 回转并与 HR2 靠近, 形成六聚体的卷曲螺旋, 产生的机械力使膜发生融合<sup>[32-34]</sup>。HR1 和 HR2 是 Ⅱ 型膜融合蛋白的保守特征, 它形成经典的六螺旋束(six-helix bundle, 6-HB), 并促使病毒颗粒与细胞膜融合<sup>[7]</sup>。我国结构生物学家饶子和等首先在晶体结构水平阐明 MHV S 蛋白有 HR1 与 HR2 结构域, 同样也证明 SARS-CoV 的 S 糖蛋白 HR1 和 HR2 结构与 MHV 的这些结构非常类似<sup>[3, 4]</sup>。同时发现, 来源于 S<sub>2</sub> 的 N 端和 C 端的短肽可与 S<sub>2</sub> 形成稳定的复合体, 该复合体是融合过程中重要的调节体, 可破坏六联体重复结构的形成而抑制病毒感染。最近, 通过检测人工合成的 SARS-CoV 来推测融合肽诱导膜融合及与细胞膜上磷脂相互作用的能力, 证明该融合肽可牢固分配至磷脂膜, 特别是含负电荷的磷脂膜, 表明用 SARS-CoV 推测的融合肽通过

扰乱脂膜表面磷脂, 特别是内部磷脂的分布来参与病毒与目标细胞膜的融合<sup>[35]</sup>。此外, 针对 SARS-CoV S<sub>2</sub> 环结构域设计的肽可与模拟膜相互作用, 很快分配至磷脂膜, 扰乱脂环境。通过脂成分的改变来调节膜的活性, 提示此区域可能也参与病毒与细胞膜融合<sup>[36]</sup>。

### 1.3 HIV Env 蛋白

HIV 可导致获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS), 属于反转录病毒。病毒颗粒外面包围着来源于宿主细胞膜的双层磷脂分子。HIV 包膜蛋白 Env 即 gp160, 类似于流感病毒 HA, 行使受体结合和膜融合的功能, 对病毒进入宿主细胞及其毒力等都很重要。发挥膜融合功能时, 前体蛋白 gp160 被蛋白酶切割成 gp120 和 gp41 亚单位, 3 分子 gp120 组成帽子结构, 3 分子 gp41 组成茎样结构。研究发现, gp160 被切割成 gp120 和 gp41 时会产生很大的构象改变, 至少在 gp120 是如此。与 HA1 和 HA2 不一样, gp120 和 gp41 不是通过二硫键连接, 而是以稳定的非共价方式连接, 对应其受体结合和抗体结合的功能。单独的 gp41 结构研究提示, 将 gp120 从包膜复合体中去除可使 gp41 松弛成一种稳定的、融合后状态, 尽管 gp120 从包膜复合体中脱落不是膜融合的前提条件<sup>[6]</sup>。

HIV-1 gp41 重要的功能区域包括融合肽、N 端七肽重复区(N-terminal heptad repeat, NHR)、C 端七肽重复区(C-terminal heptad repeat, CHR)、跨膜结构域和胞质尾区。在氨基酸水平, gp41 与其他参与膜融合病毒包膜蛋白有许多共同特点: N 端约含 15 个疏水残基, 即“融合肽”<sup>[37]</sup>, 在融合过程中插入膜并使目标细胞膜变得不稳定; 融合肽和跨膜域之间为 2 个七肽重复区。核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR) 和晶体学研究显示 3 个 NHR 折叠成 1 个三聚体的卷曲螺旋, 再被 3 个 CHR 螺旋所围绕, 每个 NHR-CHR 组合被延伸环所连接<sup>[5, 38, 39]</sup>。这种 6-HB 可能代表一种融合后的构象改变<sup>[40]</sup>, 在这些束里, 外面的螺旋跟里面的螺旋紧密连接, 将细胞膜与病毒膜拉近和并置。研究表明, HIV gp41 转变成 6-HB 可能提供诱导膜融合的能量, 而且融合也依赖螺旋内的相互作用, 即 gp41 螺旋结构的稳定性, 但其内部谷氨酸盐突变在不影响 gp41 核心结构稳定性的情况下病毒表现为融合缺陷<sup>[41]</sup>。根据外层螺旋设计的抗病毒肽有重要意义, 如抗 HIV 新药 T20(fuzeon) 就是一种来源于 gp41

CHR 的肽, 通过其 N 端和 C 端序列分别结合 gp41 的 NHR 和细胞膜来抑制病毒融合。此外, HIV-1 gp41 糖蛋白跨膜结构域也发挥重要的生物学功能, 诱使其高度保守的核心结构 12 个氨基酸突变, 可阻止病毒-细胞融合和病毒侵入细胞<sup>[42]</sup>。

## 2 病毒离子通道的相关跨膜蛋白

病毒离子通道蛋白是一种在病毒生命周期中起多种作用的小跨膜蛋白, 可在宿主细胞膜上形成选择性离子通道, 介导一些离子运输而对病毒的许多功能产生影响<sup>[43]</sup>。与病毒其他膜蛋白不同, 离子通道蛋白不参与病毒入侵, 也不是病毒颗粒的组成成分。它们属于病毒孔蛋白家族, 含有约 100 个氨基酸, 且至少含有 1 个疏水氨基酸组成的跨膜结构域<sup>[1]</sup>。它们通过亚基聚合形成一个亲水通道, 从而促使离子通过宿主细胞膜。研究发现, 有许多包膜病毒编码离子通道蛋白, 如流感病毒 M2 蛋白、HIV Vpu 蛋白、SARS-CoV 3a 蛋白、小球藻病毒 (chlorovirus) PBCV-1 Kcv 蛋白等。

甲型流感病毒 M2 蛋白由 RNA 节段 7 编码, 该 RNA 片段也编码 M1 蛋白。M2 蛋白编码区在禽、猪、马和人的甲型流感病毒各个亚型中都较为保守<sup>[44]</sup>。M2 蛋白在非洲爪蟾卵母细胞<sup>[45]</sup>和哺乳动物卵母细胞<sup>[46, 47]</sup>中成功表达, 并具有通道活性。M2 蛋白可以单体形式存在, 但其活性状态却是四聚体, 由 97 个氨基酸组成型内在膜磷酸化蛋白, 包括 24 个残基的胞外区、19 个残基的跨膜区和 54 个氨基酸残基的胞质尾区<sup>[45]</sup>。跨膜区中包含极性氨基酸和 1 个组氨酸, 使 M2 蛋白的跨膜区能形成 1 个允许质子通过膜的蛋白性通道孔。H<sup>+</sup> 进入病毒粒子, 可酸化病毒颗粒内部, 从而促使病毒在内含体中脱壳。此外, 反面高尔基复合体网络结构 (trans Golgi network, TGN) 膜上的 M2 蛋白还能提高 TGN 的 pH 值, 平衡 TGN 与宿主胞质之间的 pH 值, 防止新合成的 HA 由于低 pH 值环境而导致未成熟构象改变<sup>[48]</sup>。

通过固态 NMR 方法获得 M2 蛋白的结构显示, His37 和 Trp41 依靠氢键网络控制着 H<sup>+</sup> 通道的开放与关闭<sup>[49, 50]</sup>。利用 NMR 光谱确定了 M2 蛋白 38 个氨基酸残基片段的结构, 提示 4 个紧密相连的跨膜螺旋组成了 1 个狭窄的离子通道, “色氨酸门”也是由其与天冬氨酸相互作用来锁定的, 在 C 端两性螺旋垂直朝向跨膜螺旋组成 1 个内在朝向的底部<sup>[51]</sup>。降低 pH 值, 促使跨膜螺旋不稳定, 打开离

子通道的门, 允许离子通过, 但 C 端的底仍然完整, 可避免四聚体的解散<sup>[51]</sup>。M2 通道活性可被金刚乙胺所抑制, 4 个金刚乙胺分子结合在靠近门的通道朝向面, 并稳定着关闭的孔构象。用 X 线衍射方法得到了结合或不结合金刚乙胺的四聚体 M2 蛋白 (25 个氨基酸残基) 的晶体结构, 提示主要是一系列保守的组氨酸和色氨酸参与质子门控, 单个金刚乙胺分子位于离子通道的孔内部<sup>[52]</sup>。

Vpu 蛋白是 HIV-1 的辅助调节蛋白之一, 为型内在膜蛋白, 通过共翻译插入感染细胞膜结构<sup>[53]</sup>。它含有 81 个氨基酸, N 端为疏水跨膜螺旋, C 端胞质区含 2 个在一个水平的两性螺旋。在胞质区 2 个两性螺旋间, 氨基酸残基 47 ~58 有一个非常保守的区段, 该区段 52 位和 56 位丝氨酸发生酪氨酸激酶磷酸化<sup>[54]</sup>。根据流感病毒 M2 离子通道蛋白的结构相似性推测, Vpu 以聚合体的形式具有孔形成的能力<sup>[53]</sup>。其通道形成跨膜结构域的三维结构已于 2003 年用 NMR 波谱学方法得到解析<sup>[55]</sup>, 跨膜结构域特点决定了其具备离子通道活性, 并与其促进新生病毒颗粒释放的功能有关。Vpu 还可促进病毒颗粒从质膜释放, 对跨膜区进行突变, 其对病毒颗粒促进释放的能力丧失<sup>[56]</sup>。体内、外实验证明, Vpu 在感染细胞的内质网下调细胞表面 CD4 受体<sup>[57]</sup>。对 CD4 降解起重要作用的胞质尾区 52 和 56 位丝氨酸进行突变后, 仅能部分影响病毒释放, 而 Vpu 对于病毒结构蛋白的合成、修饰及稳定性无影响<sup>[56]</sup>。

此外, SARS-CoV 的 3a 蛋白以四聚体形式形成钾敏感性离子通道; 对 3a 进行沉默后, 病毒释放能力明显下降<sup>[58]</sup>; 小球藻病毒 PBCV-1 Kcv 蛋白形成钾离子通道, 用钡离子对其抑制后, 噬斑形成能力下降, 提示对病毒复制的 1 个或多个步骤起作用<sup>[59]</sup>; 甲病毒 (alphavirus) 6K<sup>[60]</sup>、丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) p7 也都具有离子通道活性<sup>[61]</sup>。

## 3 病毒膜蛋白与抗病毒药物设计

### 3.1 融合抑制剂

抑制病毒-细胞膜间的融合可以通过阻止融合蛋白与受体的结合, 或干扰融合蛋白在融合过程中的构象正确变化来实现。CoV S 蛋白与受体的相互作用成为抗病毒药物设计的一个靶点。有文献报道, 对 2 型 CoV S 蛋白与受体相互作用的关键肽环进行确定, 然后构建相关肽段用来诱导未成熟的蛋白融合, 从而抑制感染<sup>[62]</sup>。同样, 来源于 S 蛋白

HR2 序列的短肽对 SARS-CoV 感染 Vero 细胞有很好的抑制效果<sup>[63]</sup>。必须注意的是,很多可溶性的受体肽段可使 S 糖蛋白变成无活性状态,但有些亦可明显促使活性融合的产生<sup>[64]</sup>。研究还发现,CoV 可通过 HR1 的突变来避开 HR2 来源短肽的抑制作用<sup>[65]</sup>,因此推断两者相互组成复合体才能发挥作用。

以 gp41 为靶点研究其内在的功能性模序并设计不同的短肽,对开发临床抗 HIV 新药有巨大的潜力和很好的可行性。20 世纪 90 年代,以 HIV-1 gp41 的 NHR 和 CHR 区域为目标的一系列人工合成肽段可有效抑制膜融合,从而抑制感染<sup>[66,67]</sup>。HIV-1 gp41 膜近侧区域及其钙结合位点(残基 628 ~683)的肽 P5 也能有效抑制 HIV-1 感染<sup>[68]</sup>。Fuzeon(T20)由 Roche 和 Trimeris 公司共同开发,为第 1 个,也是唯一 1 个通过美国食品药品监督管理局认证并用于治疗 HIV 的融合抑制剂。T20 是 CHR 模拟肽,较低浓度就能有效抑制 HIV 感染。其机制为与病毒 gp41 的 NHR 区段形成异三聚体,抑制 gp41 6-HB 核心的形成和病毒-细胞融合。T20 的不足之处是疗效不及反转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂,且易形成耐药性。最近合成的 HIV 融合性抑制性肽 CP32M,包含 1 个位于 gp41 C 端重复序列上游区段的模序(残基 621 ~627),非常靠近对 6-HB 形成和稳定起重要作用的“口袋结合结构域”(pocket-binding domain),可有效抑制 T20 耐受的 HIV-1 毒株<sup>[69]</sup>。

### 3.2 离子通道抑制剂

如前所述,有些病毒膜蛋白可在宿主细胞膜上形成选择性的离子通道,因此可用一些离子通道阻滞剂抑制这些病毒的增殖。有些离子通道对于病毒颗粒的包装释放是必需的,可作为理想的抗病毒药设计靶标。目前已有不少药物以病毒离子通道为药靶,如 20 世纪 60 年代中期发现的抗流感代表药物金刚烷胺可阻止病毒侵入细胞、脱去衣壳和成熟过程,对甲型流感病毒有较好的预防和治疗作用。

已有明确证据表明,HIV-1 的 Vpu 可增加病毒颗粒产量,下调细胞表面 CD4,从而增加体内病毒载量<sup>[56,57]</sup>,因此 Vpu 也是抗 HIV 新药设计的靶标。Vpu 对病毒颗粒的释放活性依赖于其离子通道活性,开发特异针对 Vpu 的新药可借鉴流感病毒 M2 抑制剂的经验。此外,可针对 SARS-CoV 3a 离子通道活性进行药物设计,上海巴斯德研究所孙兵等于 2006 年向国家知识产权局申报了专利。

然而,以病毒性离子通道为靶点设计药物还面

临许多理论和技术问题。首先,离子通道的改变,到底是病毒膜蛋白的本身具有离子通道功能,还是病毒膜蛋白调控了细胞本身蛋白的离子通道功能;其次,当此类抑制剂用于临床治疗时,是否会抑制宿主细胞上的离子通,从而影响机体的正常生理功能,引发药物特异性。

### 3.3 膜蛋白相关抗体

膜蛋白相关抗体发挥抗病毒作用是多重的,除了诱发的进一步免疫效应清除病毒外,还能直接干扰病毒膜蛋白与相应受体结合,阻止病毒膜融合发生。已经证明 SARS-CoV S 蛋白 RBD 可诱导高效价中和抗体,病毒进入细胞可被该抗体抑制,因此该序列可作为 SARS 亚单位疫苗很好的候选者。近期成功建立了高灵敏噬菌体展示库筛选法,获得在纳摩尔浓度水平就能有效抑制膜融合的人单克隆抗体,与 ACE2 竞争结合 S 蛋白<sup>[70]</sup>。S 蛋白的抗体在活体内表现出中和病毒的重要作用,可用全长 S 蛋白,或全部胞外结构域可溶性片段,或 RBD 片段,通过免疫在活体内得到。此外,康复期 SARS 患者的血清亦有此类中和抗体,可有效中和病毒<sup>[71]</sup>。研究发现,W423 和 N424 氨基酸残基对单克隆抗体识别是必需的,在 107 株不同的 SARS-CoV 中高度保守,提示这 2 个残基可作为关键表位研制治疗性单克隆抗体<sup>[72]</sup>。

HIV-1 疫苗的研发主要直接针对 Env 蛋白有限的几个保守抗原位点进行,其主要可变区域具有很强的免疫原性,针对这些区域的抗体在患者血清中易产生。因此,Env 蛋白可变区的中和表位对开发 HIV-1 治疗性抗体更具潜力。gp41 的 CHR 和 NHR 不但可作为融合抑制剂的设计靶点,亦可作为设计抗 HIV 疫苗的靶点。大部分针对上述 2 个区域的抗体都不能在生理温度(37 °C)时起中和作用<sup>[73-75]</sup>,但此类抗体有些可在亚适温(31.5 °C)中止 HIV-1 Env 介导的细胞-细胞融合的活性<sup>[76]</sup>。因为在膜融合过程中,gp41 中间体发夹结构和 6-HB 核心位于病毒和细胞膜之间的狭窄空间中,而较大的抗体分子因空间位阻效应(steric hindrance effect)较难起作用<sup>[77]</sup>。而且,这些抗原位点的免疫原性较弱,根据这些表位设计的免疫原刺激不容易产生抗体。

## 4 展望

位于病毒颗粒表面的膜蛋白通常具有多种生物学功能,包括诱导中和抗体、与受体特异性结合、介

导膜融合的作用,同时也参与调控病毒基因复制、病毒颗粒装配与释放等。病毒蛋白膜融合与离子通道作用机制的共性与结构依赖性使之成为新的抗病毒策略的关注点。然而,由于大部分病毒跨膜蛋白的含量非常低、疏水性高,分离、纯化、结晶较困难,限制了大量病毒膜蛋白结构的解析。随着冷冻电子显微术、傅里叶红外变换光谱仪(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)、分子动力模拟等新技术的应用,病毒跨膜蛋白结构和功能的研究正取得积极的进展。目前,针对病毒膜融合蛋白设计的药物多以蛋白质膜外区为靶点,但参与膜融合和细胞信号转导的跨膜区和膜内区也可作为潜在的药物靶标。另外,对病毒膜融合蛋白与脂质的相互作用和未分类融合蛋白的功能进行研究也有利于发现新的抗病毒药物靶标。随着新技术的出现与应用、多学科交叉的迅速发展,相信病毒跨膜蛋白的研究将会取得一系列突破性进展。

### 参考文献

- [1] Gonzalez ME, Carrasco L. Viroproins[ J ]. FEBS Lett, 2003, 552(1): 28-34
- [2] Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 resolution[ J ]. Nature, 1981, 289(5796): 366-373
- [3] Xu Y, Liu Y, Lou Z, *et al*. Structural basis for coronavirus-mediated membrane fusion. Crystal structure of mouse hepatitis virus spike protein fusion core[ J ]. J Biol Chem, 2004, 279(29): 30514-30522
- [4] Xu Y, Lou Z, Liu Y, *et al*. Crystal structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein fusion core[ J ]. J Biol Chem, 2004, 279(47): 49414-49419
- [5] Chan DC, Fass D, Berger JM, *et al*. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein[ J ]. Cell, 1997, 89(2): 263-273
- [6] Yang ZN, Mueser TC, Kaufman J, *et al*. The crystal structure of the SIV gp41 ectodomain at 1.47 resolution[ J ]. J Struct Biol, 1999, 126(2): 131-144
- [7] Colman PM, Lawrence MC. The structural biology of type I viral membrane fusion[ J ]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(4): 309-319
- [8] Kielian M. Class II virus membrane fusion proteins[ J ]. Virology, 2006, 344(1): 38-47
- [9] Sun X, Belouzard S, Whittaker GR. Molecular architecture of the bipartite fusion loops of vesicular stomatitis virus glycoprotein G, a class III viral fusion protein[ J ]. J Biol Chem, 2008, 283(10): 6418-6427
- [10] Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, *et al*. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin[ J ]. Science, 2004, 303(5665): 1838-1842
- [11] Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, *et al*. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion[ J ]. Nature, 1994, 371(6492): 37-43
- [12] Skehel JJ, Bayley PM, Brown EB, *et al*. Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79(4): 968-972
- [13] Kordyukova LV, Serebryakova MV, Baratova LA, *et al*. S acylation of the hemagglutinin of influenza viruses: mass spectrometry reveals site-specific attachment of stearic acid to a transmembrane cysteine[ J ]. J Virol, 2008, 82(18): 9288-9292
- [14] Wagner R, Herwig A, Azzouz N, *et al*. Acylation-mediated membrane anchoring of avian influenza virus hemagglutinin is essential for fusion pore formation and virus infectivity[ J ]. J Virol, 2005, 79(10): 6449-6458
- [15] Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus[ J ]. Virology, 1999, 258(1): 1-20
- [16] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, *et al*. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[ J ]. Science, 2003, 300(5624): 1394-1399
- [17] Saif LJ. Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome[ J ]? Rev Sci Tech, 2004, 23(2): 643-660
- [18] Snijder EJ, Bredenbeek PJ, Dobbe JC, *et al*. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage[ J ]. J Mol Biol, 2003, 331(5): 991-1004
- [19] Stuman LS, Ricard CS, Holmes KV. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments[ J ]. J Virol, 1985, 56(3): 904-911
- [20] Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, *et al*. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex[ J ]. J Virol, 2003, 77(16): 8801-8811
- [21] Song HC, Seo MY, Stadler K, *et al*. Synthesis and characterization of a native, oligomeric form of recombinant severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein[ J ]. J Virol, 2004, 78

- (19) : 10328-10335
- [ 22 ] Xiao X, Chakraborti S, Dinitrov AS, *et al*. The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization[ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312(4) : 1159-1164
- [ 23 ] Kubo H, Yamada YK, Taguchi F. Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein[ J ]. *J Virol*, 1994, 68(9) : 5403-5410
- [ 24 ] Tsai JC, Zelus BD, Holmes KV, *et al*. The N-terminal domain of the murine coronavirus spike glycoprotein determines the CEACAM1 receptor specificity of the virus strain[ J ]. *J Virol*, 2003, 77(2) : 841-850
- [ 25 ] De Haan CA, Stadler K, Godeke GJ, *et al*. Cleavage inhibition of the murine coronavirus spike protein by a furin-like enzyme affects cell-cell but not virus-cell fusion[ J ]. *J Virol*, 2004, 78(11) : 6048-6054
- [ 26 ] De Groot RJ, Luytjes W, Horzinek MC, *et al*. Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses[ J ]. *J Mol Biol*, 1987, 196(4) : 963-966
- [ 27 ] Ye R, Montalto-Morrison C, Masters PS. Genetic analysis of determinants for spike glycoprotein assembly into murine coronavirus virions: distinct roles for charge-rich and cysteine-rich regions of the endodomain[ J ]. *J Virol*, 2004, 78(18) : 9904-9917
- [ 28 ] Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR, *et al*. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(14) : 5871-5876
- [ 29 ] Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K, *et al*. Entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein[ J ]. *J Virol*, 2008, 82(23) : 11985-11991
- [ 30 ] Madu IG, Roth SL, Belouzard S, *et al*. Characterization of a highly conserved domain within the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein S2 domain with characteristics of a viral fusion peptide[ J ]. *J Virol*, 2009, 83(15) : 7411-7421
- [ 31 ] Guillen J, Perez-Berna AJ, Moreno MR, *et al*. A second SARS-CoV S2 glycoprotein internal membrane-active peptide. Biophysical characterization and membrane interaction [ J ]. *Biochemistry*, 2008, 47(31) : 8214-8224
- [ 32 ] Gallagher TM. A role for naturally occurring variation of the murine coronavirus spike protein in stabilizing association with the cellular receptor[ J ]. *J Virol*, 1997, 71(4) : 3129-3137
- [ 33 ] Holmes KV, Zelus BD, Schickli JH, *et al*. Receptor specificity and receptor-induced conformational changes in mouse hepatitis virus spike glycoprotein[ J ]. *Adv Exp Med Biol*, 2001, 494: 173-181
- [ 34 ] Zheng Q, Deng Y, Liu J, *et al*. Core structure of S2 from the human coronavirus NL63 spike glycoprotein [ J ]. *Biochemistry*, 2006, 45(51) : 15205-15215
- [ 35 ] Guillen J, de Almeida RF, Prieto M, *et al*. Structural and dynamic characterization of the interaction of the putative fusion peptide of the S2 SARS-CoV virus protein with lipid membranes[ J ]. *J Phys Chem B*, 2008, 112(23) : 6997-7007
- [ 36 ] Guillen J, de Almeida RF, Prieto M, *et al*. Interaction of a peptide corresponding to the loop domain of the S2 SARS-CoV virus protein with model membranes[ J ]. *Mol Membr Biol*, 2009, 26(4) : 236-248
- [ 37 ] Callaher WR. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus[ J ]. *Cell*, 1987, 50(3) : 327-328
- [ 38 ] Caffrey M, Cai M, Kaufman J, *et al*. Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41 [ J ]. *EMBO J*, 1998, 17(16) : 4572-4584
- [ 39 ] Skehel JJ, Wiley DC. Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion[ J ]. *Cell*, 1998, 95(7) : 871-874
- [ 40 ] Melikyan GB, Markosyan RM, Hemmati H, *et al*. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion[ J ]. *J Cell Biol*, 2000, 151(2) : 413-423
- [ 41 ] Suntoko TR, Chan DC. The fusion activity of HIV-1 gp41 depends on interhelical interactions [ J ]. *J Biol Chem*, 2005, 280(20) : 19852-19857
- [ 42 ] Shang L, Yue L, Hunter E. Role of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in cell-cell fusion and virus infection[ J ]. *J Virol*, 2008, 82(11) : 5417-5428
- [ 43 ] Fischer WB, Sansom MS. Viral ion channels: structure and function[ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1561(1) : 27-45
- [ 44 ] Ito T, Gorman OT, Kawaoka Y, *et al*. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins[ J ]. *J Virol*, 1991, 65(10) : 5491-5498
- [ 45 ] Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity[ J ]. *Cell*, 1992, 69(3) : 517-528



- [46] Wang C, Lamb RA, Pinto LH. Direct measurement of the influenza A virus M2 protein ion channel activity in mammalian cells[ J]. *Virology*, 1994, 205( 1): 133-140
- [47] Mould JA, Li HC, Dudlak CS, *et al*. Mechanism for proton conduction of the M2 ion channel of influenza A virus[ J]. *J Biol Chem*, 2000, 275( 12): 8592-8599
- [48] Takeuchi K, Lamb RA. Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemagglutinin during intracellular transport[ J]. *J Virol*, 1994, 68( 2): 911-919
- [49] Hu J, Asbury T, Achuthan S, *et al*. Backbone structure of the amantadine-blocked trans-membrane domain M2 proton channel from influenza A virus[ J]. *Biophys J*, 2007, 92( 12): 4335-4343
- [50] Takeuchi H, Okada A, Miura T. Roles of the histidine and tryptophan side chains in the M2 proton channel from influenza A virus[ J]. *FEBS Lett*, 2003, 552( 1): 35-38
- [51] Schnell JR, Chou JJ. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus[ J]. *Nature*, 2008, 451( 7178): 591-595
- [52] Stouffer AL, Acharya R, Salom D, *et al*. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel[ J]. *Nature*, 2008, 451( 7178): 596-599
- [53] Maldarelli F, Chen MY, Willey RL, *et al*. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein[ J]. *J Virol*, 1993, 67( 8): 5056-5061
- [54] Schubert U, Henklein P, Boldyreff B, *et al*. The human immunodeficiency virus type 1 encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase-2 (CK-2) at positions Ser52 and Ser56 within a predicted alpha-helix-turn-alpha-helix-motif[ J]. *J Mol Biol*, 1994, 236( 1): 16-25
- [55] Park SH, Mirse AA, Nevzorov AA, *et al*. Three-dimensional structure of the channel-forming trans-membrane domain of virus protein "u" (Vpu) from HIV-1[ J]. *J Mol Biol*, 2003, 333( 2): 409-424
- [56] Strelbel K, Klimkait T, Maldarelli F, *et al*. Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein[ J]. *J Virol*, 1989, 63( 9): 3784-3791
- [57] Chen MY, Maldarelli F, Karczewski MK, *et al*. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of CD4 *in vitro*: the cytoplasmic domain of CD4 contributes to Vpu sensitivity[ J]. *J Virol*, 1993, 67( 7): 3877-3884
- [58] Lu W, Zheng BJ, Xu K, *et al*. Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release[ J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103( 33): 12540-12545
- [59] Plugge B, Gazzarini S, Nelson M, *et al*. A potassium channel protein encoded by chlorella virus PBCV-1[ J]. *Science*, 2000, 287( 5458): 1641-1644
- [60] Sanz MA, Perez L, Carrasco L. Semliki Forest virus 6K protein modifies membrane permeability after inducible expression in *Escherichia coli* cells[ J]. *J Biol Chem*, 1994, 269( 16): 12106-12110
- [61] Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, *et al*. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine[ J]. *FEBS Lett*, 2003, 535( 1-3): 34-38
- [62] Tan K, Zelus BD, Meijers R, *et al*. Crystal structure of murine sCEACAM1a[ 1, 4]: a coronavirus receptor in the CEA family[ J]. *EMBO J*, 2002, 21( 9): 2076-2086
- [63] Bosch BJ, Martina BE, van der Zee R, *et al*. Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides[ J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101( 22): 8455-8460
- [64] Matsuyama S, Taguchi F. Receptor-induced conformational changes of murine coronavirus spike protein[ J]. *J Virol*, 2002, 76( 23): 11819-11826
- [65] Bosch BJ, Rossen JW, Bartelink W, *et al*. Coronavirus escape from heptad repeat 2 (HR2)-derived peptide entry inhibition as a result of mutations in the HR1 domain of the spike fusion protein[ J]. *J Virol*, 2008, 82( 5): 2580-2585
- [66] Jiang S, Lin K, Strick N, *et al*. HIV-1 inhibition by a peptide[ J]. *Nature*, 1993, 365( 6442): 113
- [67] Wild C, Oas T, McDaniel 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
- [68] Yu H, Tudor D, Alfsen A, *et al*. Peptide P5 (residues 628-683), comprising the entire membrane proximal region of HIV-1 gp41 and its calcium-binding site, is a potent inhibitor of HIV-1 infection[ J]. *Retrovirology*, 2008, 5: 93-104
- [69] He Y, Cheng J, Lu H, *et al*. Potent HIV fusion inhibitors against Enfuvirtide-resistant HIV-1 strains [ J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105( 42): 16332-16337

- [ 70 ] Sui J, Li W, Murakami A, *et al*. Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome ( SARS ) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association [ J ] . Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101( 8 ) : 2536-2541
- [ 71 ] Hofmann H, Hattermann K, Marzi A, *et al*. S protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients[ J ] . J Virol, 2004, 78( 12 ) : 6134-6142
- [ 72 ] Bian C, Zhang X, Cai X, *et al*. Conserved amino acids W423 and N424 in receptor-binding domain of SARS-CoV are potential targets for therapeutic monoclonal antibody[ J ] . Virology, 2009, 383( 1 ) : 39-46
- [ 73 ] Chen CH, Greenberg ML, Bolognesi DP, *et al*. Monoclonal antibodies that bind to the core of fusion-active glycoprotein 41 [ J ] . AIDS Res Hum Retro, 2000, 16( 18 ) : 2037-2041
- [ 74 ] Hice CE, Xu S, Chigurupati P, *et al*. Neutralization of HIV-1 primary isolates by polyclonal and monoclonal human antibodies [ J ] . Int Immunol, 1997, 9 ( 9 ) : 1281-1290
- [ 75 ] Jiang S, Lin K, Lu M. A conformation-specific monoclonal antibody reacting with fusion-active gp41 from the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein[ J ] . J Virol, 1998, 72( 12 ) : 10213-10217
- [ 76 ] Golding H, Zaitseva M, de Rosny E, *et al*. Dissection of human immunodeficiency virus type 1 entry with neutralizing antibodies to gp41 fusion intermediates[ J ] . J Virol, 2002, 76( 13 ) : 6780-6790
- [ 77 ] Li J, Chen X, Huang J, *et al*. Identification of critical antibody-binding sites in the HIV-1 gp41 six-helix bundle core as potential targets for HIV-1 fusion inhibitors[ J ] . Immunobiology, 2009, 214( 1 ) : 51-60

( 收稿日期: 2009-03-26 )