

HIV-1 融合肽及其突变体与脂膜的相互作用

邱 阳^① 沙印林^② 黄力新^① 林克椿^① 聂松青^{①*}

(^①北京医科大学生物物理系,北京 100083 ^②北京大学物理化学研究所,北京 100871. *联系人)

摘要 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}这2个多肽分别代表 HIV-1 gp41 N 末端由 23 个氨基酸组成的融合肽及其第 2 位的突变体 (Val→Glu). 采用多种方法研究了 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}与酸性和中性脂膜作用时的结构-功能关系. 结果表明, HIV_{WT}和 HIV_{V2E}具有相同的构象特点及构象变化趋势但功能却完全不同: HIV_{WT}主要采取 α -helix 构象和酸性 POPG 脂膜作用并引起膜融合及膜稳定性的破坏, 分子中的 Phe 残基可插入到 POPG 脂双层的疏水核心; HIV_{V2E}也主要采取 α -helix 构象和 POPG 脂膜作用但不引起膜融合和膜稳定性的破坏, 分子中的 Phe 残基的位置接近 POPG 脂膜的表面. HIV_{WT}和 HIV_{V2E}与中性 POPC 脂膜作用时的主要构象均为 β -sheet, 并且都不能引起 POPC 脂膜相互融合和膜稳定性的破坏, 分子中 Phe 残基的位置都接近 POPC 脂膜的表面. 以上结果证明, 融合肽 N 末端的疏水性以及与膜脂相互作用时所采取的二级结构及插膜深度对融合肽功能的发挥起决定作用.

关键词 人类免疫缺陷病毒 I 型 融合肽 脂膜

由于 CD4⁺ 淋巴细胞(helper/inducer T)被人类免疫缺陷病毒 I 型(HIV-1)感染而使爱滋病患者的治疗成为一个难以攻克的医学壁垒. HIV-1 进攻靶细胞时, 病毒细胞膜与靶细胞膜发生融合, 造成两种可能的后果: 一是将病毒的核心蛋白和遗传物质注入宿主细胞内, 在宿主细胞内进行复制, 并随宿主细胞的分裂传至子代细胞, 造成宿主细胞死亡、健康细胞受到侵染; 二是破坏靶细胞膜的稳定性, 使细胞内外环境失去平衡, 最终导致细胞死亡. 因此, 膜融合是 HIV-1 感染人体细胞的一个首要而且关键的过程. HIV-1 进入人体后, 其外周糖蛋白 gp160 被蛋白酶解为表面糖蛋白 gp120 及跨膜糖蛋白 gp41, 在 CD4⁺ 受体及辅助因子的作用下, gp120/gp41 被激活, 暴露出 gp41 N 末端的融合肽. Freed 等人于 1990 年已经证实, 这段高度保守的疏水序列起着“桥”的作用, 将 HIV-1 的包膜与靶细胞的质膜连接起来, 启动病毒与靶细胞膜的融合过程, 从而破坏靶细胞膜的稳定性, 导致细胞死亡^[1,2].

分子生物学点突变的方法已确定 HIV-1 融合肽大约由 25 个左右的氨基酸残基组成, 同时证明, 用亲水性氨基酸取代其 N 末端的疏水性氨基酸后形成的突变体将会失去融合功能^[3,4]. 这一结果提示我们, HIV-1 gp41 N 末端的疏水性和融合肽的结构在膜融合过程中起着关键的作用. 膜融合是一个复杂的过程, 涉及多种物理的和化学的相互作用, 为了研究 HIV-1 融合肽导致膜融合的机制, 建立该融合肽结构与功能之间的关系, 我们采用荧光能量转移、荧光猝灭、光散射等方法研究了用化学方法合成的代表 HIV-1 gp41 N 末端的 23 肽(HIV_{WT})及其 N 端第 2 位的突变体(HIV_{V2E})与酸性和中性脂膜作用时促融合能力及插膜能力的区别, 并用圆二色(circular dichroism, CD)和 Fourier 变换红外光谱(FTIR)分析了这两者与脂膜作用前后多肽本身的构象变化, 从而揭示 HIV-1 gp41 N 端疏水肽促融合的分子机理.

1 材料与方 法

(i) 实验材料. 合成多肽 HIV_{WT}与 HIV_{V2E}的序列分别为: HIV_{WT}(AVGIGALFLGFL-

GAAGSTMGARS-NH₂), HIV_{v2E}(AEGIGALFLGFLGAAGSTMGARS-NH₂). 购自 Advanced ChemTech (Louisville, KY, USA) 纯度分别大于 91% 和 88%, 质谱检验分子量与计算值相符合, 用 DMSO 配成 10 mg/mL 溶液储存于 -20°C. 1-棕榈酰-2-油酰-磷脂酰甘油(1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol, POPG) 和 1-棕榈酰-2-油酰-磷脂酰胆固醇(1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine, POPC) 购自 Sigma. 荧光标记磷脂 NBD-PE, Rh-PE 和自旋标记磷脂 5-doxy-PC, 12-doxy-PC 为 Avanti Polar Lipids(Alabaster, AL, USA) 产品. 荧光探针 ANTS 和 DPX 为 Molecular Probes(Junction City, OR, USA) 产品. HEPES 缓冲液(5 mmol/L HEPES, 100 mmol/L NaCl, pH = 7.4). 其余试剂均为国产分析纯.

(ii) 荧光能量转移. 取 2 mg 磷脂溶于 200 μ L CHCl₃/CH₃OH(2:1, 体积比) 溶剂中, 用旋转蒸发器蒸干, 真空干燥 3 h, 加入 500 μ L HEPES 缓冲液, 振荡 10 min, 反复冻溶 6 次后, 用 0.2 μ m 微孔滤膜过滤 10 次, 得到的大单层脂质体(large unilamellar vesicles, LUV) 直径在 100 ~ 200 nm 之间. 脂浓度按照 Ames 定磷方法⁵ 确定. 将制得的 POPC 或 POPG LUV 分别与标记了 0.6% (mol/mol) 的 NBD-PE 和 Rh-PE 的 POPC 或 POPG LUV 按 1:4 (mol/mol) 混合, 使磷脂浓度为 100 μ mol/L, 固定激发波长为 467 nm, 发射波长为 530 nm, 检测该溶液中 NBD 的荧光强度, 记为 F_0 (反映 NBD 和 Rh 两者产生能量转移的情况), 再加入不同量多肽 DMSO 溶液(DMSO 的体积小于总体积的 1%), 待多肽与脂在 37°C 作用 10 min 后检测溶液中 NBD 的荧光强度, 记为 F , 用分别含 0.12% (mol/mol) NBD-PE 和 Rh-PE 的脂质体溶液中 NBD 的荧光强度代表脂质体完全融合时荧光能量转移的情况, 记为 F_1 . NBD 荧光增强的百分率(即能量转移降低的程度) 代表脂融合的百分率, 由下式计算 $(F - F_0)/(F_1 - F_0) \times 100\%$. 荧光测量均在 37°C 进行, 仪器为 Hitachi 850 型荧光分光光度计.

(iii) 脂质体内容物的漏出. 用含 12.5 mmol/L ANTS, 45 mmol/L DPX, 20 mmol/L NaCl, 5 mmol/L HEPES 的缓冲液(pH = 7.4) 制备包裹 ANTS/DPX 的大单层脂质体, 方法同(ii), 0.2 μ m 微孔滤膜过滤后的脂质体溶液经 Sephadex G-75 柱层析去除未被包裹的 ANTS 和 DPX, 用 5 mmol/L HEPES, 100 mmol/L NaCl, pH = 7.4 的缓冲液洗脱. 纯化后的脂质体溶液用 Ames 定磷方法⁵ 确定浓度. 取 100 μ mol/L 脂质体溶液放入比色杯中, 固定激发波长为 355 nm, 发射波长为 520 nm, 测量不加多肽时溶液的荧光强度(I_0), 加入不同量的多肽后, 溶液于 37°C 保温 10 min 后再测量荧光强度(I), 用脂质体溶液加入 Triton X-100(0.5%, 体积比) 后的荧光强度(I_1) 代表脂质体内容物 100% 漏出的情况, 根据下式计算漏出百分率 $(I - I_0)/(I_1 - I_0) \times 100\%$. 测量温度与仪器同(ii).

(iv) 光散射. 取磷脂 0.2 mg, 溶于 20 μ L CHCl₃/CH₃OH(2:1, 体积比) 溶剂中, N₂ - 2 吹干, 真空干燥 2 h, 用 2 mL HEPES 缓冲液水化, 20 ~ 25°C 水浴超声 20 min 至溶液清亮, 得到小单层脂质体(small unilamellar vesicles, SUV). 取 1 mL 脂质体溶液置比色杯中, 加入一定量的多肽 DMSO 溶液, 使肽脂比为 1:25 (mol/mol), 于 420 nm 处(狭缝宽 3 nm) 立即测量 90° 光散射值随时间的变化, 用同浓度的多肽溶液作空白对照. 测量温度与仪器同(ii).

(v) 电子显微镜. 按(ii) 中的方法制备 POPG 和 POPC 大单层脂质体, 在 100 μ mol/L 脂质体溶液中加入一定量的多肽, 使肽/脂比为 1:25 (mol/mol), 于 37°C 保温 10 min 后取一滴 LUV 或 LUV 与肽的混合溶液滴于石墨包被的铜网上, 用 1.5% 磷钨酸负染后在 H-500 透射电子显微镜下观察.

(vi) 多肽中的苯丙氨酸残基插膜深度测量. 用自旋标记的磷脂 *n*-doxyl-PC 作为荧光猝灭剂, 测量多肽中的苯丙氨酸残基插入 POPG 或 POPC 脂膜的深度. 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 POPG 或 POPC/PC (86/14, $\mu\text{mol/mol}$), POPG 或 POPC/5-doxyl-PC (浓度比同上), POPG 或 POPC/12-doxyl-PC (浓度比同上) 小单层脂质体溶液中, 加入 4 $\mu\text{mol/L}$ 多肽, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min, 固定激发波长为 265 nm, 测量多肽从 290 ~ 400 nm 的荧光发射光谱, 并读出 305 nm 处的最大荧光强度, 数据按照 Chattopadhyay 和 London 的方法^[6]进行处理, 从下式计算出苯丙氨酸残基至脂双层中心的距离 Z_{cf} :

$$Z_{cf} = -\frac{1}{2L_{m-n}} \left[\frac{1}{\pi C} \ln\left(\frac{F_m}{F_n}\right) + L_{m-n}^2 \right] + L_{c-m}$$

式中 C 为猝灭剂在膜中的二维浓度(0.000 02 个分子/ nm^2 , 假设每个脂分子的横截面积为 0.7 nm^2), F_m 和 F_n 分别为 5-doxyl-PC 和 12-doxyl-PC 存在时多肽的荧光强度, L_{c-m} 为脂酸层中心至自旋标记基团 5-doxyl 的距离 1.215 nm, L_{m-n} 为 5-doxyl 和 12-doxyl 之间的距离 0.63 nm. 测量温度与仪器同(ii).

(vii) CD 谱. 25 μg 多肽分别溶于 30 μL HEPES 缓冲液和 30 μL 1% SDS 溶液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min 后, 装入厚度为 0.1 mm 的样品池中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 测量 184 ~ 260 nm 的 CD 谱, 步长 0.5 nm, 积分时间 1 s, 带宽 2 nm, 扫描次数 4 次, 测量仪器为 Jobin Yvon-Spex CD6.

(viii) FTIR 谱. 200 μg 多肽分别溶于 50 μL 用 D_2O 配制的 HEPES 缓冲液、POPG 和 POPC 小单层脂质体溶液中(小单层脂质体用 D_2O 配制的 HEPES 缓冲液制备, 肽/脂比为 1:50), 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min 后, 取 25 μL 样品溶液滴于 2 片 CaF_2 窗片之间, Teflon 垫片的厚度为 50 μm , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 测量 FTIR 谱, 扫描次数 200 次, 分辨率 4 cm^{-1} , 测量仪器为 Bio-Rad FTS-165 型红外光谱仪.

2 实验结果

2.1 荧光能量转移

图 1 为 HIV_{WT} 和 HIV_{V2E} 对 POPG 和 POPC 大单层脂质体的促融合作用曲线. 可以看出, 随肽/脂比的增加, POPG 脂质体中 NBD 能量转移的效率降低, 荧光增强, 说明 POPG 膜融合的百分率增加, 当肽/脂比为 1:12.5 时, POPG 膜融合的百分率达到 47.5%, 但 HIV_{WT} 对 POPC 中性脂膜几乎没有促融合作用. 而 HIV_{V2E} 对 POPG 和 POPC 脂膜都没有促进融合的作用.

2.2 荧光内容物漏出

图 2 为 HIV_{WT} 和 HIV_{V2E} 诱导的 POPG 和 POPC 大单层脂质体内容物的漏出曲线. 随肽/脂比增加, POPG 脂质体内容物漏出的百分率增加, 表现为 ANTS 荧光去猝灭的程度增加, 当肽/脂比为 1:12.5 时, 漏出百分率达到 77.8%, 而 HIV_{WT} 几乎不能诱导 POPC 脂质体内荧光物质的漏出. HIV_{V2E} 对 POPG 和 POPC 脂质体内容物均没有诱导漏出的作用.

2.3 90 $^{\circ}$ 光散射

图 3 为加入 HIV_{WT} 和 HIV_{V2E} 后 POPG 和 POPC 小单层脂质体光散射值增加率随时间的变

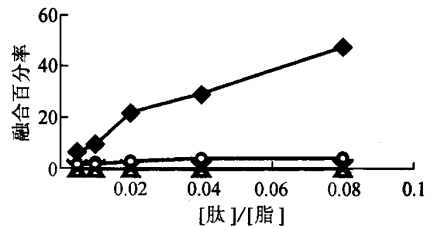


图 1 HIV_{WT} 和 HIV_{V2E} 诱导 POPG 和 POPC LUVs 脂融合

脂浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, pH = 7.4. 溶于 DMSO 中的多肽按不同的肽/脂比加入脂溶液中, 膜融合后 NBD 荧光强度增加. 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行测量. \blacklozenge 为 $\text{HIV}_{\text{WT}}/\text{POPG}$, \circ 为 $\text{HIV}_{\text{WT}}/\text{POPC}$, \triangle 为 $\text{HIV}_{\text{V2E}}/\text{POPG}$, \times 为 $\text{HIV}_{\text{V2E}}/\text{POPC}$.

化. 肽/脂比均为 1:25. 加入 HIV_{WT}后 10 min ,POPG 小单层脂质体的光散射值增加了 286% , 而 POPC 小单层脂质体的光散射值只增加了 66%. HIV_{V2E}对 POPG 和 POPC 小单层脂质体的光散射值没有影响.

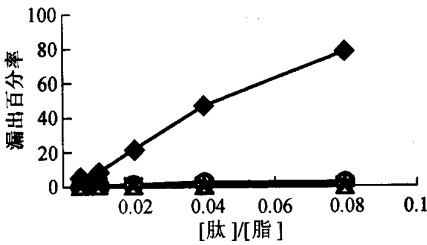


图2 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}诱导的 POPG 和 POPC LUVs 内容的漏出

脂浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, pH = 7.4. 溶于 DMSO 中的多肽按不同的肽/脂比加入脂溶液中. 脂膜被破坏后荧光去猝灭的程度升高. 测量条件为 37 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda = 520 \text{ nm}$. ◆为 HIV_{WT}/POPG , ○为 HIV_{WT}/POPC , △为 HIV_{V2E}/POPG , ×为 HIV_{V2E}/POPC

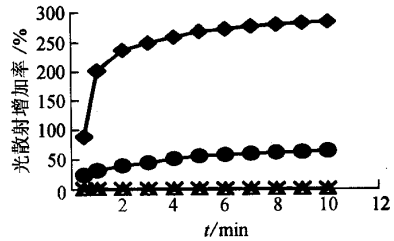


图3 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}诱导 POPG 和 POPC SUVs 的光散射变化曲线

脂浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, pH = 7.4. 溶于 DMSO 中的多肽加入脂溶液后立即开始记时. 肽的终浓度为 4 $\mu\text{mol/L}$. 于 420 nm (狭缝宽 3 nm) 37 $^{\circ}\text{C}$ 记录 90 $^{\circ}$ 光散射值. ◆为 HIV_{WT}/POPG , ●为 HIV_{WT}/POPC , △为 HIV_{V2E}/POPG , ×为 HIV_{V2E}/POPC

2.4 电子显微镜

图4为 POPG 大单层脂质体的透射电子显微镜图,与 HIV_{WT}作用后,POPG 大单层脂质体的直径增加,与 HIV_{V2E}作用后,POPG 大单层脂质体的直径没有变化. HIV_{WT}和 HIV_{V2E}对 POPC 大单层脂质体的大小均没有影响(图略).

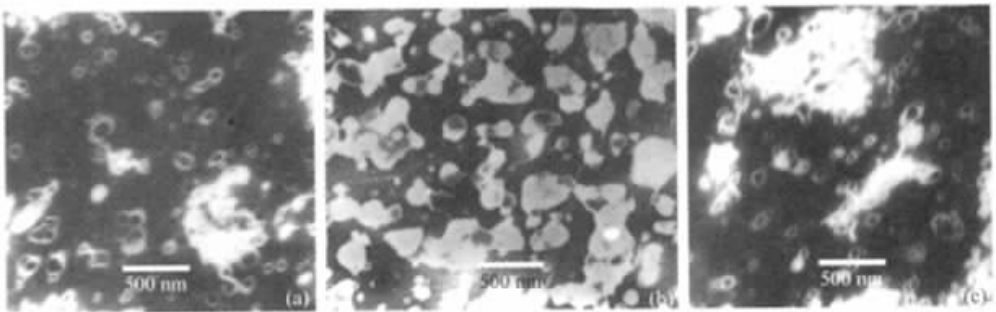


图4 POPG 大单层脂质体经染后的电子显微镜照片

(a) POPG LUVs (100 $\mu\text{mol/L}$)本身 (b) POPG LUVs 和 HIV_{WT}(4 $\mu\text{mol/L}$)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min (c) POPG LUVs 和 HIV_{V2E}(4 $\mu\text{mol/L}$)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min

2.5 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}分子中苯丙氨酸残基的插膜深度

苯丙氨酸残基发射出的荧光可被自旋基团 doxyl 猝灭,猝灭剂 doxyl 分别共价结合在磷脂脂肪酸烃链的 5 位或 12 位碳原子上. 根据公式(1)计算出的 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}分子中苯丙氨酸残基分别插入 POPG 或 POPC 脂膜的深度见表 1.

表1 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}分子中苯丙氨酸残基插入 POPG 和 POPC 脂膜的平均深度

样品	HIV _{WT} /POPG	HIV _{WT} /POPC	HIV _{V2E} /POPG	HIV _{V2E} /POPC
Z _d /nm	0.905	1.673	1.527	1.782

2.6 CD 谱

HIV_{WT}和 HIV_{V2E}主要以 β -sheet 构象存在于 HEPES 缓冲液中(195 nm 处出现正峰, 217 nm 处出现负峰), 而模拟膜环境的 SDS 溶液则可诱导 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}的大部分二级结构转化为 α -helix(193 nm 处出现正峰, 208 和 222 nm 处出现双负峰), 如图 5 所示。

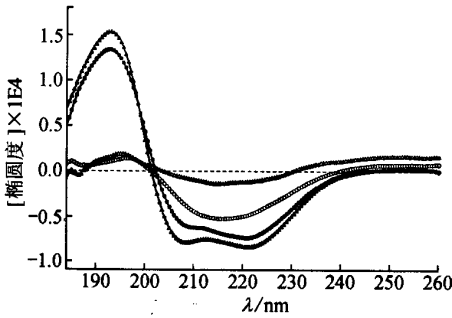


图5 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}在 HEPES 缓冲液和 1% SDS 溶液中的 CD 光谱按照“材料与方法 (vii)”的条件采集光谱。○为 HIV_{WT}在 HEPES 缓冲液中, △为 HIV_{V2E}在 HEPES 缓冲液中, ●为 HIV_{WT}在 1% SDS 溶液中, ▲为 HIV_{V2E}在 1% SDS 溶液中

2.7 FTIR 谱

图 6 (a)~(f)为 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}在 HEPES 缓冲液中以及在 POPG 和 POPC 脂质体分别存在的情况下酰胺 I 带的红外光谱和曲线拟合结果, 二级结构的定量分析结果总结在表 2。

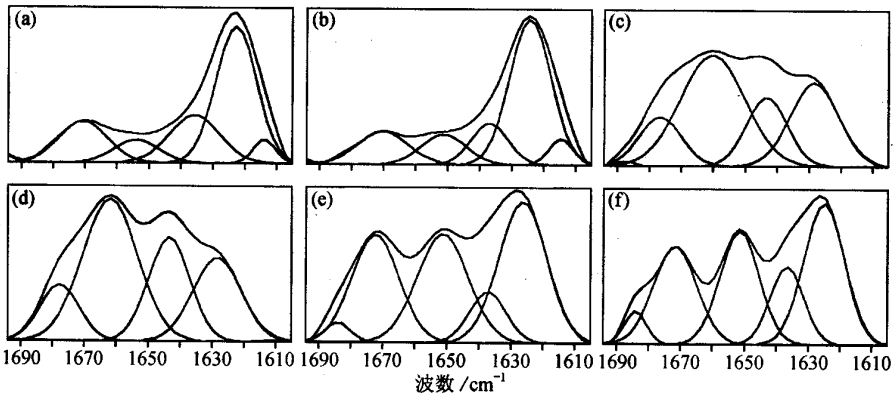


图6 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}在 HEPES 缓冲液和脂质体溶液中的 FTIR 谱和谱线拟合结果。多肽按 1:50 的肽/脂比加入 SUVs 溶液中, 于 pH=7.4, 37℃ 保温 10 min。(a) HIV_{WT}在 HEPES 缓冲液中; (b) HIV_{V2E}在 HEPES 缓冲液中; (c) HIV_{WT}在 POPG SUVs 溶液中; (d) HIV_{V2E}在 POPG SUVs 溶液中; (e) HIV_{WT}在 POPC SUVs 溶液中; (f) HIV_{V2E}在 POPC SUVs 溶液中

表 2 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}在 HEPES 缓冲液和脂质体溶液中的二级结构定量分析结果

样品	α -螺旋 / %	无规卷曲 / %	β -折叠 / %	β -转角 / %
HIV _{WT} /HEPES	8.7	0	73.9	17.4
HIV _{V2E} /HEPES	12.2	0	73.0	14.8
HIV _{WT} /POPG	44.2	17.4	26.0	12.4
HIV _{V2E} /POPG	42.7	23.5	22.0	11.8
HIV _{WT} /POPC	28.2	0	46.0	25.8
HIV _{V2E} /POPC	25.2	0	50.9	23.9

3 讨论

HIV_{WT}和 HIV_{V2E}这 2 个用化学方法合成的多肽分别代表了 HIV-1 gp41 N 末端由 23 个氨基酸组成的融合肽及其第 2 位的突变体(Val \rightarrow Glu). 我们曾经用荧光光谱和单分子层膜的技术初步研究了 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}与脂膜的结合,结果证明:HIV_{WT}较深地插入到带负电荷的酸性 POPG 脂膜内部,HIV_{V2E}可以和 POPG 脂膜结合但基本不插膜或插膜很浅,而 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}对不带电荷的中性 POPC 脂膜均无明显的结合作用^[7]. 在本文中,进一步采用荧光能量转移、荧光内容物的漏出、荧光猝灭、光散射和电子显微镜等方法研究了 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}与上述两种脂膜作用时促融合能力及插膜能力的区别,并用 CD 和 FTIR 分析了这两者与脂膜作用前后多肽本身的构象变化,以深入探索 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}结构与功能之间的关系.

荧光能量转移、荧光内容物的漏出、光散射及电子显微镜观察的结果指出:HIV_{WT}能够诱导带负电荷的酸性 POPG 脂质体发生融合并破坏 POPG 脂膜的稳定性,但却不能诱导中性的 POPC 脂质体发生融合,也不破坏 POPC 脂膜的稳定性;HIV_{V2E}对 POPG 和 POPC 脂质体都没有促进融合和破坏膜稳定性的作用. 为了进一步研究上述现象的结构基础,用荧光猝灭的方法测量了 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}分子中的苯丙氨酸残基分别插入 POPG 和 POPC 脂双层的深度,结果说明,HIV_{WT}分子中 8 位和 11 位的 2 个苯丙氨酸残基可以较深地插入到 POPG 脂双层的内部(平均插膜深度为距离脂双层中心 0.905 nm),但只能较浅地插入中性 POPC 脂双层(距离脂双层中心的平均距离为 1.673 nm),而 HIV_{V2E}分子中的两个苯丙氨酸残基无论对 POPG 和 POPC 都只位于接近脂双层表面的位置(距离 POPG、POPC 脂双层中心的平均距离分别为 1.527 nm 和 1.782 nm). 这一结果和 Chang 等人^[8]用 ¹H-NMR 方法得到的结果类似,他们认为,HIV_{WT}分子中从第 8 位到第 10 位的 3 个氨基酸残基 FLG 在 SDS 囊泡中的位置接近囊泡的中心. 从 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}的一级结构来看,苯丙氨酸是 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}分子中疏水性最强的氨基酸残基,在与膜脂发生相互作用时应具有最强的表面活性,如果苯丙氨酸只结合在脂膜表面,那么,可以推测,HIV_{WT}和 HIV_{V2E}分子中其他的疏水性氨基酸也不能插入脂膜中.

另外,CD 的结果指出,HIV_{WT}和 HIV_{V2E}分别存在于水溶液中时,主要采取 β -sheet 构象,在 1% SDS 溶液中则主要为 α -helix 构象. 由于存在光散射的问题,应用圆二色技术研究 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}与脂质体相互作用时所采取的构象有一定的困难,所以,我们用 FTIR 技术作为 CD 的补充,研究了 HIV_{WT}和 HIV_{V2E}单独存在以及与 POPG、POPC 脂质体作用后二级结构的变化. 与 CD 的结果相同,HIV_{WT}或 HIV_{V2E}单独存在于水溶液中时,主要构象为 β -sheet;与 POPC 脂质体作用后 β -sheet 含量减少但仍为主要构象, α -helix 和 β -turn 的含量有所增加;与 POPG 脂质体作用后 α -helix 成为主要构象并出现部分无规卷曲, β -sheet 的含量则大大减少. 从 CD 和 FTIR 的结

果来看,野生型融合肽 HIV_{WT}和它的第2位突变体 HIV_{V2E}呈现出相同的构象特点及构象变化趋势.脂环境可诱导其构象由 β -sheet 转变为 α -helix,而不同性质的脂质体则导致不同的构象变化.与中性脂质体 POPC 相比,酸性脂质体 POPG 使这两个肽的构象更多地转化为 α -helix 并出现无规卷曲.

综合荧光猝灭和二级结构的分析结果,可以判断,当 HIV_{WT}的二级结构以 α -helix 为主并插入脂膜中时,才具有促进膜融合和破坏膜稳定性的功能. HIV_{V2E}与 POPG 脂质体作用时,虽然也能形成以 α -helix 为主的二级结构,但由于它不能插入 POPG 脂膜中,所以不会导致膜融合和膜稳定性的破坏.至于 HIV_{WT}不能插入 POPC 脂膜的原因可能由于 POPC 是中性脂,不能与 HIV_{WT}分子中带正电荷的 Arg 残基产生静电相互作用,因而不能诱导 HIV_{WT}产生以 α -helix 为主的二级结构.而 HIV_{V2E}不能插入 POPG 脂膜的原因则可能是由于 N 端疏水性的 Val 被亲水性的 Glu 所取代,由此推测, HIV-1 融合肽的插膜过程可能首先由 N 端开始,带动分子中形成 α -helix 的大部分疏水性氨基酸进入膜内,扰乱脂双层的结构,从而导致膜融合.研究融合肽的其他部分学者也认为,融合肽在与膜脂相互作用时要经历一个从 β -sheet 到 α -helix 的构象转化过程^[8,9],但有的学者认为,融合肽实现其功能时主要采取 β -结构^[10].由于目前只用了静态的方法(如 CD、FTIR)来研究融合肽与膜脂作用时所采取的平衡构象,所以,我们只能根据现有的结果对融合肽的插膜过程作出初步的推测.下一步的研究工作中,我们将采用动态荧光技术、拉曼技术、偏振红外等方法对 HIV-1 融合肽的插膜过程作深入探讨.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号 39770181)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Freed E O, Myers D J, 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
- 2 Mobley P W, Curtain C C, Kirkpatrick A, et al. The amino-terminal peptide of HIV-1 glycoprotein 41 lyses human erythrocytes and CD4⁺ lymphocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1139: 251 ~ 256
- 3 Kowalski M, Potz J, Basiripour L, et al. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science*, 1987, 237: 1351 ~ 1355
- 4 Felser J M, Klimkait T, Silver J. A syncytia assay for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope protein and its use in studying HIV-1 mutations. *Virology*, 1989, 170: 566 ~ 570
- 5 Ames B N. Phosphate Assay. *Methods in Enzymology*, 1966, 8: 115 ~ 118
- 6 Chattopadhyay A, London E. Parallax methods for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. *Biochemistry*, 1987, 26: 39 ~ 45
- 7 吴曼,林克椿,聂松青,等. HIV-1 gp41 N 端融合肽与脂膜作用的荧光及单分子层膜研究. *生物物理学报*, 1999, 15: 47 ~ 52
- 8 Chang D K, Cheng S F, Chien W J. The amino-terminal fusion domain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41 inserts into the sodium dodecyl sulfate micelle primarily as a helix with a conserved glycine at the micelle-water interface. *J Virol*, 1997, 71: 6593 ~ 6602
- 9 Martin I, Schaal H, Scheid A, et al. Lipid membrane fusion induced by the human immunodeficiency virus type 1 gp41 N-terminal extremity is determined by its orientation in the lipid bilayer. *J Virol*, 1996, 70: 298 ~ 304
- 10 Nieva J L, Nir S, Muga A, et al. Interaction of the HIV-1 fusion peptide with phospholipid vesicles: different structural requirement for fusion and leakage. *Biochemistry*, 1994, 33: 3201 ~ 3209

(1999-04-29 收稿, 1999-08-03 收修改稿)