

targeting oncogene LIN28B2[J]. Hepatology, 2010, 52(5): 1731-1740.

[11] Scott GK, Goga A, Bhaumik D, et al. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b[J]. J Biol Chem, 2007, 282(2): 1479-1486.

[12] Zhang Y, Yan LX, Wu QN, et al. miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast Cancer[J]. Cancer Res, 2011, 71(10): 3552-3562.

[13] Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis[J]. JAMA, 2007, 297(17): 1901-1908.

[14] Wu N, Lin X, Zhao X, et al. MiR-125b acts as an oncogene in glioblastoma cells and inhibits cell apoptosis through p53 and p38MAPK-independent pathways [J]. Br J Cancer, 2013, 109(11): 2853-2863.

[15] Fu Q, Liu Z, Pan D, et al. Tumor miR-125b predicts recurrence and survival of patients with clear-cell renal cell carcinoma after surgical resection[J]. Cancer Sci, 2014, 105(11): 1427-1434.

[16] Yu JC, Cai XE, He JQ, et al. Microarray-based analysis of gene regulation by transcription factors and microRNAs in glioma[J]. Neurol Sci, 2013, 34(8): 1283-1289.

[17] Jin Z, Xu S, Yu H, et al. miR-125b inhibits connexin43 and promotes glioma growth[J]. Cell Mol Neurobiol, 2013, 33(8): 1143-1148.

[18] Shi XB, Xue L, Ma AH, et al. miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting proapoptotic genes [J]. Prostate, 2011, 71(5): 538-549.

[19] Ufkin ML, Peterson S, Yang X, et al. miR-125a regulates cell cycle, proliferation, and apoptosis by targeting the ErbB pathway in acute myeloid leukemia[J]. Leuk Res, 2014, 38(3): 402-410.

[20] Sonoki T, Iwanaga E, Mitsuya H, et al. Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Leukemia, 2005, 19(11): 2009-2010.

[21] Chapiro E, Russell LJ, Struski S, et al. A new recurrent translocation t(11;14)(q24;q32) involving IGH and miR-125b-1 in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia [J]. Leukemia, 2010, 24(7): 1362-1364.

[22] Bousquet M, Quelen C, Rosati R, et al. Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the t(2;11)(p21;q23) translocation[J]. J Exp Med, 2008, 205(11): 2499-2506.

[23] Enomoto Y, Kitaura J, Shimanuki M, et al. MicroRNA-125b-1 accelerates a C-terminal mutant of C/EBP α (C/EBP α -C(m))-induced myeloid leukemia[J]. Int J Hematol, 2012, 96(3): 334-341.

[24] Bousquet M, Nguyen D, Chen C, et al. MicroRNA-125b transforms myeloid cell lines by repressing multiple mRNA [J]. Haematologica, 2012, 97(11): 1713-1721.

(收稿日期: 2014-10-21)

• 综 述 •

诱导广谱中和抗体的 HIV-1 疫苗研究进展*

欧阳圣洁^{1,2}综述, 廖国阳^{2△}审校

(1. 昆明医科大学, 云南昆明 650550; 2. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所, 云南昆明 650118)

关键词: 人类免疫缺陷病毒 I 型; 包膜刺突; 广谱中和抗体; 疫苗
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 04. 041 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2015)04-0529-03

疫苗是感染性疾病防治中最有效的干预手段。已有超过 70 种疫苗批准用于防治 30 余种病原微生物的感染, 拯救了无数人的生命。但是, 由于人类免疫缺陷病毒 I 型 (HIV-1) 的高频变异和包膜刺突 (Env) 的“构象面罩”, 病毒获得了强大的免疫逃逸能力, 导致人体无法产生有效的免疫应答反应, 这给 HIV-1 疫苗研发带来了挑战。目前进行的人体 HIV-1 疫苗有效性试验中, RV-144 是唯一有效的疫苗, 但有效率仅 31%^[1]。因此, 针对高度变异性病毒疫苗的设计, 免疫后机体能否持续产生高效价的广谱中和抗体 (BnAbs) 是急需考虑的关键问题。近年来, 研究人员先后从感染者血清中分离到了多种针对 HIV-1 病毒 Env 保守抗原表位的 BnAbs, 并通过模式动物的被动免疫实验, 证明这些 BnAbs 具有良好的保护性, 提示通过设计合理的免疫原启动机体产生 BnAbs 的体液保护免疫机制是可行的。

1 HIV-1 逃避免疫监控的机制

HIV-1 属于正链 RNA 病毒, 病毒颗粒表面的 Env 聚合体

由 gp120 亚基和 gp41 亚基组成, 介导病毒识别、融合并侵入宿主细胞的整个过程。Env 聚合体“融合前”, 可变区 1/2 (V1/V2) 位于三聚体顶端, 可变区 3 (V3) 隐藏在 V1/V2 之下, 部分被 V1/V2 遮蔽。Gp120 由四个螺旋束组成, 在膜近端构成一个颈圈状结构, gp41 亚基被 gp120 亚基的氨基和羧基端环绕。当 gp120 亚基与 CD4⁺ T 细胞受体、共受体 CXCR4 或 CCR5 先后结合后, 导致 Env 三聚体构象重排, V1/V2 环从聚合体的顶端位置变构到聚合体的外围, gp120 构成的颈圈状结构被打开, 暴露出 V3 位点和 gp41 位点, 形成短暂的“开放构型的中间体”。gp41 亚基的 N 端多肽插入宿主 CD4⁺ T 细胞膜中, 形成“融合后”的核心六螺旋束结构, 将 CD4⁺ T 细胞膜与 HIV-1 病毒包膜连接在一起, 完成了 HIV-1 侵染 CD4⁺ T 细胞的过程^[2-4]。因此, HIV-1 通过“融合前-开放构型中间体-融合后”的感染模式侵入宿主细胞。Env 聚合体在“融合前”长时间处于闭合基态构型, gp41、V3 等位点隐藏其中, 只有在结合宿主

* 基金项目: 国家科技重大专项资助项目 (2013ZX1004003)。 作者简介: 欧阳圣洁, 女, 研究实习生, 主要从事病毒性疫苗的研发。 △ 通讯作者, E-mail: liaogy@imbcams. com. cn。

细胞受体后短暂处于开放状态,暴露出保守抗原表位。所以,在自然感染和疫苗免疫过程中不易诱生针对 Env 上保守抗原表位的中和抗体。

Env 是抗体识别的主要免疫原。由于 HIV-1 遗传信息在逆转录过程保真度较低,会产生多种碱基突变或重组,导致 Env 产生高频变异,使得机体免疫系统对快速变异的免疫原无法作出相应的免疫效应。同时,HIV-1 Env 平均有 28 个 N 端连接糖基化位点,约 50% 的 Env 表面覆盖着宿主来源的多聚糖。丰富的多聚糖遮蔽了 Env 包括受体结合位点在内的多个保守抗原表位^[5]。

病毒粒子表面的 Env 聚合体数量稀少,分布稀疏,抗体无法二价结合两个 Env 聚合体,使抗体亲和力降低。同时,Env 聚合体上的保守抗原表位或被多聚糖遮蔽,或处于聚合体内部,使得大体积的免疫球蛋白与抗原表位结合时会产生空间位阻效应,导致人体无法针对 HIV-1 产生有效的免疫反应^[6]。

2 抗 HIV-1 BnAbs 的研究现状

近年来,随着 B 细胞克隆、噬菌体展示、高通量微中和筛选、冷冻电镜 X 射线的断层摄影等技术的进步,研究人员先后从感染者血清中分离到了多种针对病毒 Env 保守抗原表位的 BnAbs,并解析了 Env 聚合体与 BnAbs 共结晶复合物结构。目前发现的抗 HIV-1 BnAbs 识别 Env 聚合体的保守区域主要包括以下几类:gp120 与 CD4 结合的部位(CD4-binding site, CD4bs)、V1/V2 的糖基化位点 N160、gp41 的近膜外结合区(membrane-proximal external region,MPER)、V3 的糖基化位点 N332、gp41 与 gp120 间相连区域^[7-9],见附表 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

BnAbs 具有一些特殊的特征。(1)BnAbs 具有特殊的过长或过短的 CDR-H3(third complementarity-determining region on the heavy chain)或 CDR-L3(third CDR on the light chain)。正常人体的 CDR-H3 平均为 16 个残基,但识别 HIV-1 病毒包膜 V1/V2 和 V3 糖基化位点的 BnAbs 通常具有更长的 CDR-H3^[10]。而模拟 CD4⁺ T 细胞受体识别 gp120 的 BnAbs,其 CDR-L3 只有 5 个氨基酸残基^[11]。(2)正常人抗体重链可变区亲和成熟时携带 15~20 个突变碱基,而抗 HIV-1 的 BnAbs 亲和成熟时重链可变区携带 40~100 个突变碱基。高频突变造成了重链可变区(variable segment of immunoglobulin heavy chain,VH)序列的多样性,是 BnAbs 能广谱中和多种 HIV-1 变异体的原因。正常人抗体框架区(framework regions,FWRs)的作用是维持抗体结构完整性,具有保守性高的碱基序列,但 HIV-1 BnAbs 的 FWRs 却累积多种突变碱基^[12],这有助于增加 BnAbs 的广谱性,并提高 BnAbs 与抗原的亲合性。(3)多反应性,BnAbs 可低亲和力结合非 HIV-1 抗原。由于分布在 HIV-1 膜表面的 Env 聚合体数量较少,每个病毒颗粒大约有 10~15 个 Env 聚合体,导致 BnAbs 无法二价结合两个 Env 抗原,多反应性可增强 BnAbs 抗 HIV-1 的中和活性^[13]。

B 细胞 VDJ 重排过程中形成以上具有特殊抗体特征的 BnAbs 的概率较小,且在 B 细胞亲和成熟过程中会被机体免疫调控所抑制,这是仅有少数 HIV-1 感染者在感染病毒数年后产生 BnAbs 的原因。也正是由于 BnAbs 具有的特殊抗体特征,使其能有效识别病毒 Env 上的保守位点,获得了广谱中和活性。采用单分子荧光共振能量转移(single-molecule fluorescence resonance energy transfer,smFRET)成像技术,追踪 Env 介导病毒感染 CD4⁺ T 细胞的整个动态过程,发现 BnAbs 可将

Env 聚合体稳定在闭合的基态构型,从而阻止病毒侵染宿主细胞^[14]。

3 诱导靶向 Env 的 BnAbs HIV-1 疫苗的研发策略

病毒逃避机体免疫监控和 B 细胞功能失调是削弱人体针对 HIV-1 免疫反应的两个因素^[15]。已发现约 20% 的 HIV-1 感染者在病毒感染数年后会产生 BnAbs。使用 BnAbs 被动免疫猕猴,两天后用 SHIV(simian/human immunodeficiency virus)毒株进行攻毒试验,检测发现在一定抗体浓度下,BnAbs 均产生有效的保护性^[16]。但是,至今仍没有找到一种能够激发机体产生 BnAbs 的免疫原,这是否因为多数 HIV-1 病毒株的包膜抗原无法刺激 BnAbs 的未突变初始 B 细胞进入免疫反应。因此,研究 HIV-1 感染者体内生成 BnAbs 的免疫学机制,设计出能有效刺激机体分泌 BnAbs 的免疫原是 HIV-1 疫苗研发的关键。

应用免疫球蛋白基因的 DNA 高通量测序方法(high-throughput DNA sequencing of immunoglobulin genes, Ig-seq)^[17],对 BnAbs 亲和成熟过程中产生的多个抗体的重链和轻链进行测序,绘制出 HIV-1 BnAbs 的抗体进化谱系,据此推测 BnAbs 的亲和成熟过程^[18]。这对设计激活特定 BnAbs 初始 B 细胞的疫苗起到重要的启示作用。B-cell-lineage 疫苗的设计策略是模拟与 BnAbs 进化谱系中未突变初始抗体和亲和成熟过程中产生的抗体具有高亲和力的免疫原,驱动 BnAbs 的亲和成熟过程。B-cell-lineage 疫苗设计通常包含以下步骤:(1)利用单细胞技术筛选相关的记忆 B 细胞,测序获得免疫球蛋白重链和轻链的 V、D、J 基因序列。(2)借助计算机推导并模拟 BnAbs 的未突变初始 B 细胞受体和亲和成熟过程中产生的 B 细胞受体。(3)设计对这些 B 细胞受体具有高亲和力的免疫原^[19]。Jardine 等^[20]利用 B-cell-lineage 设计策略,借助计算机设计并改造 VRC01 类 BnAbs 前体靶向的 Env 膜蛋白免疫原,通过大量的抗体筛选,获得 eOD-GT6 抗原,可体外激活 VRC01 类 BnAbs 的未突变初始 B 细胞。

Doria-Rose 等^[21]在南非 AIDS 研究项目中心发现了 1 例 HIV 感染者 CAP256,其在感染 59 周后出现了识别 V1/V2 表位的 BnAbs,研究人员利用 454 焦磷酸测序和病毒单基因组扩增技术研究了感染者 CAP256 的病毒 Env 与 BnAbs VRC26 协同进化的过程。在中和抗体的选择压力下 HIV-1 病毒持续改变 Env 聚合体 V2 表位的序列结构信息。与此同时,病毒感染后 30~38 周,VDJ 重排形成 VRC26 未突变的共同始祖(unmutated common ancestors,UCAs),感染后的 59 周内,随着 V2 区不断积累突变,推动生成含硫酸化酪氨酸阴离子抗原结合环的 CDR-H3 和具有广谱中和活性的抗体。由此推断,病毒在不同时期的逃逸突变推动 BnAbs VRC26 的产生。这种病毒演化塑造相应抗体的过程也体现在 Moore 等^[22]的研究中,他们发现病毒感染后 Env 的 332 位点被糖基化,刺激机体产生 BnAbs,而初始感染病毒并没有这个糖基化位点。

BnAbs 与高频突变的 HIV-1 的协同进化过程遵循固定的循环模式。在感染发生前,机体就拥有一个多样化的种系 B 细胞库,它是抗体 VDJ 重排的产物。每个 B 细胞生成一种抗体,当发生感染时,被抗原刺激的 B 细胞进入生发中心,处于暗区的 B 细胞发生突变和增殖;而在明区里,分泌高亲和力抗体的 B 细胞被选择。明区中的某些特化 T 细胞可识别高亲和力 B 细胞,并向它们发出信号,使高亲和力 B 细胞在暗区停留更长时间,累积更多突变。这种突变、增殖和选择反复循环发生^[23]。因此,HIV-1 的高频突变促进免疫系统生成了累积多

种突变的高亲和力 BnAbs。

Liao 等^[24] 在一位非洲 HIV-1 C 亚型 T/F 病毒感染者 CH505 体内分离到 CD4bs BnAbs: CH103, 并探索了病毒与 CH103 协同进化的过程。CH103 与 Env 聚合体的共结晶结构显示 CH103 与 Env 聚合体上的 V5、D loop、CD4 结合环相互作用。其中 V5、CD4 结合环的突变导致病毒逃避抗体的中和作用, 但 D loop 的突变并不导致病毒逃避抗体的中和作用, 而是增强与 CH103 之间的亲和力。这是由于存在另一个辅助 B 细胞系 CH235, 选择了与 BnAbs 亲和力增强的 D loop 突变病毒逃逸株, 由此, 辅助 B 细胞系 CH235 和分泌 CH103 的 B 细胞系协同作用, 共同促进 B 细胞亲和成熟分泌 BnAbs CH103^[25]。

综上所述, 可提出如下免疫策略: 设计 HIV-1 膜蛋白抗原作初次免疫, 同时激活 BnAbs 的初始 B 细胞和辅助 B 细胞, 再使用与 BnAbs 亲和成熟过程中产生的 B 细胞受体高度亲和的免疫原作加强免疫, 以此模拟病毒和 BnAbs 协同进化过程, 诱导 BnAbs 生成。

4 小 结

有效诱导能广谱识别病毒突变体, 并产生免疫保护的疫苗是阻断高度变异性病毒传播的有效手段。对于 HIV-1 BnAbs 疫苗的设计, 随着 Ig-seq、B 细胞克隆、高分辨率冷冻电镜等技术的发展, 研究人员深入研究 HIV-1 感染者体内生成 BnAbs 的免疫学机制, 并提出了通过设计合适的免疫原和免疫程序方案, 模拟病毒与 BnAbs 协同进化过程, 诱导产生 BnAbs 的 HIV-1 疫苗设计策略。目前, HIV-1 BnAbs 疫苗仍处于初始研究阶段, 尚未进入动物实验阶段。如何设计安全性高且可持续产生高效价 BnAbs 的免疫方案, 仍然是有待解决的问题。可喜的是, BnAbs 的发现, 以及对机体产生 BnAbs 的免疫学机制的深入研究, 使 HIV 疫苗的研制向成功迈进了一步, 也对其其他高频变异病毒的疫苗研制起到了一定的启示作用。

参考文献

- [1] Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, et al. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(14): 1275-1286.
- [2] Pancera M, Zhou T, Druz A, et al. Structure and immune recognition of trimeric pre-fusion HIV-1 Env[J]. *Nature*, 2014, 23, 514 (7523): 455-461.
- [3] Julien JP, Cupo A, Sok D, et al. Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer[J]. *Science*, 2013, 342(6165): 1477-1483.
- [4] Lyumkis D, Julien JP, de Val N, et al. Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer[J]. *Science*, 2013, 342(6165): 1484-1490.
- [5] Julien JP, Lee PS, Wilson IA. Structural insights into key sites of vulnerability on HIV-1 Env and influenza HA[J]. *Immunol Rev*, 2012, 250(SD): 180-198.
- [6] Klein JS, Gnanapragasam PN, Galimidi RP, et al. Examination of the contributions of size and avidity to the neutralization mechanisms of the anti-HIV antibodies b12 and 4E10[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(18): 7385-7390.
- [7] Kwong PD, Mascola JR, Nabel GJ. Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(9): 693-701.
- [8] Scharf L, Scheid JF, Lee JH, et al. Antibody 8ANC195 reveals a

- site of broad vulnerability on the HIV-1 envelope spike[J]. *Cell Rep*, 2014, 7(3): 785-795.
- [9] Huang J, Kang BH, Pancera M, et al. Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41-gp120 interface[J]. *Nature*, 2014, 515(7525): 138-142.
- [10] Pancera M, Shahzad-UI-Hussan S, Doria-Rose NA, et al. Structural basis for diverse N-glycan recognition by HIV-1-neutralizing V1-V2-directed antibody PG16[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20 (7): 804-813.
- [11] West J, Diskin R, Nussenzweig MC. Structural basis for germ-line gene usage of a potent class of antibodies targeting the CD4-binding site of HIV-1 gp120[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109 (30): 2083-2090.
- [12] Klein F, Diskin R, Scheid JF, et al. Somatic mutations of the immunoglobulin framework are generally required for broad and potent HIV-1 neutralization[J]. *Cell*, 2013, 153(1): 126-138.
- [13] Mouquet H, Nussenzweig MC. Polyreactive antibodies in adaptive immune responses to viruses[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(9): 1435-1445.
- [14] Munro JB, Gorman J, Ma XC, et al. Conformational dynamics of single HIV-1 envelope trimers on the surface of native virions[J]. *Science*, 2014, 346(6210): 759-763.
- [15] Tenzer S, Crawford H, Pym P, et al. HIV-1 adaptation to antigen processing results in Population-Level immune evasion and affects subtype diversification[J]. *Cell Rep*, 2014, 7(2): 448-463.
- [16] Pegu A, Yang ZY, Boyington JC, et al. Neutralizing antibodies to HIV-1 envelope protect more effectively in vivo than those to the CD4 receptor[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(243): 88.
- [17] Georgiou G, Ippolito GC, Beausang J, et al. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(2): 158-168.
- [18] Wu X, Zhou T, Zhu J, et al. Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing[J]. *Science*, 2011, 333(649): 1593-1602.
- [19] Haynes BF, Kelsoe G, Harrison SC, et al. B-cell-lineage immunogen design in vaccine development with HIV-1 as a case study[J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 423-433.
- [20] Jardine J, Julien JP, Menis S, et al. Rational HIV immunogen design to target specific germline B cell receptors[J]. *Science*, 2013, 340(6133): 711-716.
- [21] Doria-Rose NA, Schramm CA, Gorman J, et al. Developmental pathway for potent V1V2-directed HIV-neutralizing antibodies [J]. *Nature*, 2014, 509(7498): 55-62.
- [22] Moore PL, Gray ES, Wibmer CK, et al. Evolution of an HIV glycan-dependent broadly neutralizing antibody epitope through immune escape[J]. *Nat Med*, 2012, 18(11): 1688-1692.
- [23] Gitlin AD, Shulman Z, Nussenzweig MC. Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation[J]. *Nature*, 2014, 509(752): 637-640.
- [24] Liao HX, Lynch R, Zhou T, et al. Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus[J]. *Nature*, 2013, 496 (7446): 469-476.
- [25] Gao F, Bonsignori M, Liao HX, et al. Cooperation of B cell lineages in induction of HIV-1-broadly neutralizing antibodies [J]. *Cell*, 2014, 158(3): 481-491.