

LEDGF/p75: 抗 HIV-1 感染的新靶点及其抑制剂研究

陈文敏, 刘新泳*

(山东大学药学院药物化学研究所, 山东 济南 250012)

摘要: 晶状体上皮源性生长因子 (lens epithelium-derived growth factor, LEDGF) 又名 p75 蛋白是人类免疫缺陷病毒 1 型 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 整合过程中不可缺少的细胞辅助因子。LEDGF/p75 将整合酶链合到特定的 DNA 序列上, 促进链转移反应和整合的完成。LEDGF/p75 对整合酶具有稳定作用, 在 LEDGF/p75 缺陷的感染细胞中, 整合酶很快被降解, HIV-1 的复制和感染被阻断, 大量研究证明干扰 LEDGF/p75 的作用是抑制 HIV 复制感染的有效途径。而 LEDGF/p75 与整合酶结合的三维晶体结构已被解析, 并通过高通量筛选获得了该细胞辅助因子的抑制剂。本文综述了 LEDGF/p75 的结构功能、与整合酶作用的机制以及基于该细胞辅助因子的抑制剂研究。

关键词: 人类免疫缺陷病毒 1 型; 晶状体上皮源性生长因子; 整合酶; 抑制剂

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2009) 09-0953-08

LEDGF/p75: a novel target for anti-HIV therapy and advances in the study of its related inhibitors

CHEN Wen-min, LIU Xin-yong*

(Institute of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: LEDGF/p75 is a newly found cell cofactor, which plays an essential role in the integration of HIV-1 cDNA into host chromosomes. LEDGF/p75 tethers HIV integrase to chromatin, protects it from degradation, and strongly influences the genome-wide pattern of HIV integration. Depleting the protein from cells or over-expressing the integrase-binding domain of LEDGF/p75 blocks viral replication. The essential role of LEDGF/p75 in HIV-1 replication makes it a new target for anti-HIV-1 drug development. This article reviews the function of LEDGF/p75, LEDGF/p75-integrase interaction and LEDGF/p75 inhibitors.

Key words: HIV-1; lens epithelium-derived growth factor; integrase; inhibitor

晶状体上皮源性生长因子 (lens epithelium-derived growth factor, LEDGF) 属肝癌衍生生长因子 (hepatoma-derived growth factor, HDGF) 相关蛋白 (HRP) 家族, 将它加入晶状上皮细胞、成纤维细胞、角质化细胞的培养基中, 可促进细胞生长, 延长细胞寿命^[1]。LEDGF 与已发现的转录协同激活因子 p75 为同一种蛋白, 因此称为 LEDGF/p75。但它既不是一种生长因子也不是特异在晶状上皮细胞中表达, 而

是广泛存在于人体各种细胞中。LEDGF/p75 在特异性皮炎、哮喘、间质性膀胱炎等多种炎症发生时作为一种核自身抗原, 导致自身免疫反应, 诱导细胞程序性死亡, 与一些自身免疫性疾病相关^[2]。早期研究还表明 LEDGF/p75 为转录辅助因子 PC4 的相互作用蛋白, 后来发现它可通过激活应激蛋白和抗细胞凋亡蛋白, 如热休克蛋白 27/90、抗氧化蛋白 2 的表达, 保护细胞免于压力应激条件诱导的细胞死亡^[3]。因此, LEDGF/p75 对细胞存活与凋亡起着重要调节作用。

LEDGF/p75 在免疫共沉淀过表达整合酶的细胞

收稿日期: 2009-02-06.

*通讯作者 Tel: 86-531-88380270, Fax: 86-531-88382264,

E-mail: xinyongl@sdu.edu.cn

核提取物中被发现,引起人们极大关注。进一步研究发现 LEDGF/p75 将整合酶链合到 DNA/染色体上,促进链转移和整合的完成,是 HIV-1 整合过程中第 1 个被发现的细胞辅助因子。

1 LEDGF/p75 的结构

LEDGF/p75 属肝癌衍生生长因子 (HDGF) 相关蛋白 (HRP) 家族,现已发现 6 个 HRP 家族成员: HDGF、HRP1、HRP2、HRP3、LEDGF/p75 和 LEDGF/p52。在基因结构上,HRP 家族 N 端都含有 1 个 PWWP 区域,其中 LEDGF/p75 和 HRP2 的 C 端都有 1 个进化保守序列可与 HIV-1 整合酶结合,称为整合酶结合域 (integrase-binding domain, IBD)^[4]。LEDGF/p75 由 530 个氨基酸残基组成,根据其功能可以划分为 2 个区域^[5](图 1)。

1.1 N 端 DNA / 染色体结合区

① PWWP 区 (aa1-93): 由“脯氨酸-色氨酸-脯氨酸-色氨酸”(Pro-Trp-Pro-Trp) 保守序列构成,核心结构为 5 股反向平行的 β -折叠和数个 α -螺旋,该区域是介导蛋白质-蛋白质和蛋白质-DNA 相互作用的主要结构^[6,7]。

② 3 个极性氨基酸区域 (charged region CR1-3): LEDGF/p75 PWWP-CR1 缩短重组蛋白足以与 DNA 结合,而单独的 PWWP 则不能缩短蛋白,表明 CR1 在 PWWP 与 DNA 结合时有潜在的作用^[7]。CR2、CR3 区富含负电荷,可影响 AT-钩基序 (AT-hook motifs) 功能的发挥。③ 核定位信号 (nuclear-localization signal, NLS) (aa146-156): 参与 LEDGF/p75 对整合酶的链合作用,决定 LEDGF/p75 的核定向转运,对 HIV-1 整合前复合物 (pre-integration complex) 的核输入的影响尚不清楚^[8]。④ 2 个 AT-钩基序: AT-钩基序核心序列 RGRP 从细菌到哺乳动物保持高度保守性,该区域易于和富含 AT 碱基的 DNA 小沟结合,辅助 PWWP 将 LEDGF/p75 链合在 DNA 特定序列,同时能通过修饰 DNA 结构促进转录因子进入启动序列

而发挥转录调节作用^[9]。

Turlure^[8]提出 LEDGF/p75 结合 DNA/染色体的 3 个元件: NLS 和 2 个 AT-钩基序。PWWP 不是介导 LEDGF/p75 与裸 DNA 结合的必需元件,但是它与 NLS、AT-钩基序一起参与 LEDGF/p75 结合染色体。另外,体外钓饵试验表明 PWWP 可与核小体结合,因此 PWWP 结构域可能通过与核小体的蛋白质-蛋白质之间的相互作用介导整合酶与染色体的结合^[6]。

1.2 C 端整合酶结合区 (integrase-binding domain, IBD)

LEDGF/p75 的 IBD 结构域由 2 个进化高度保守的紧密 α -螺旋发卡结构构成。HIV-1 的整合酶由 3 个功能域构成: N-末端结构域 (NTD)、核心区 (CCD) 和 C-末端结构域 (CTD)。使用荧光蛋白融合表达技术测定表明,与 LEDGF/p75 结合的结构为 CCD,体外钓饵试验也验证了 CCD-IBD 结合。整合酶与 LEDGF/p75 的完整晶体结构尚未测定,但两者免疫共沉淀结晶的三维结构已被测定^[10,11](图 2)。

LEDGF/p75 蛋白与整合酶的免疫共结晶三维结构显示: 2 分子 LEDGF/p75 整合酶结合位点 (IBD) 与 1 分子整合酶核心结合位点 (CDD) 对称结合。LEDGF/p75 的 Ile-365 与 Asp-366 残基分别位于 IBD 螺旋 1、2 底部弯曲臂末端,伸入 CCD 二聚体表面的凹陷口袋中。Ile-365 伸入由整合酶 Ala-128、Trp-132、Leu-102 和 Met-178 残基构成的疏水性口袋中,而 Asp-366 与整合酶 Glu-170、His-171 的酰胺键形成的二齿状氢键对 CCD-IBD 的结合至关重要^[10,11]。用 Ala 取代 Ile-365 或 Asp-366 氨基酸,LEDGF/p75 蛋白对整合酶的结合力完全丧失,表明这 2 个氨基酸为 LEDGF/p75 蛋白与整合酶结合的必需残基^[12]。

原癌基因 N-端结合蛋白 JPO₂ 是 LEDGF/p75 蛋白 IBD 结构域的一种细胞结合蛋白。细胞内过表达 (overexpression) JPO₂ 蛋白而与整合酶竞争结合 LEDGF/p75 蛋白对 HIV-1 复制有一定的抑制作用。

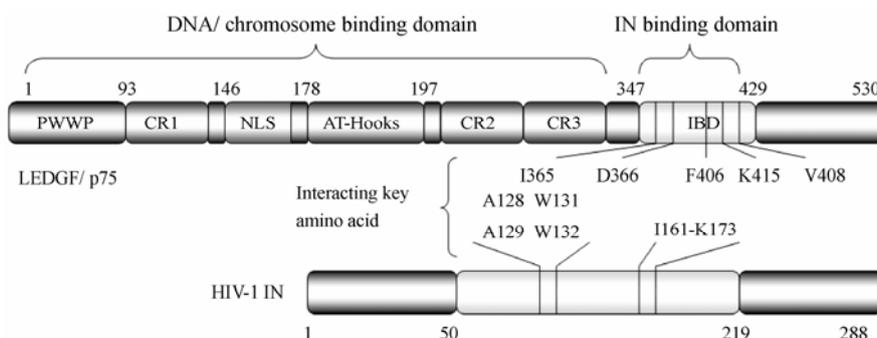


Figure 1 Domain organization of LEDGF/p75 and integrase proteins [IN(integrase)]^[5]

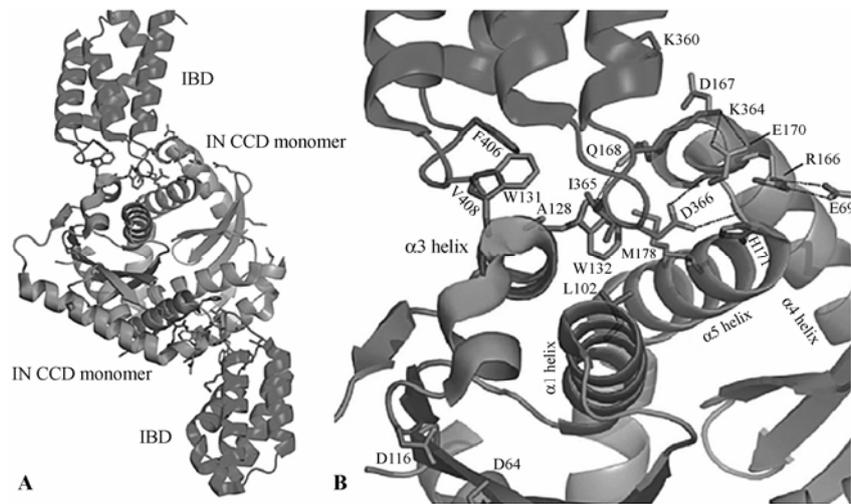


Figure 2 The structure of HIV-1 integrase CDD-IBD interface^[10]. A: An integrase dimer interacting with IBD; B: Close-up view of integrase CDD-IBD interface

Bartholomeeusen 等^[13]通过试验验证 LEDGF/p75 蛋白 IBD 结构域的 I365A、D366A、F406A 突变株完全不能与整合酶结合,但仍保持与 JPO₂ 的结合力,说明整合酶、JPO₂ 与 LEDGF/p75 蛋白的结合机制不同。这为开发以阻断 LEDGF/p75 与 HIV-1 整合酶相结合,但不干扰其与内源细胞蛋白结合的小分子抑制剂提供了依据。

2 LEDGF/p75 在 HIV-1 整合中的作用

2.1 LEDGF/p75 是 HIV-1 复制必需的细胞辅助因子

将可编码荧光蛋白和打靶 LEDGF/p75 基因的 shRNA 慢病毒载体转导进入 CD4⁺细胞,强化 RNA 干扰基因抑制,使 CD4⁺细胞感染 HIV-1 水平下降 10~30 倍^[14]; CD4⁺细胞中过表达绿色荧光蛋白-整合酶结合域 (IBD) 的融合蛋白与 LEDGF/p75 竞争结合整合酶,使 HIV-1 感染水平下降 7 倍,且传代病毒中出现整合酶 CDD 区域突变的耐受毒株^[14, 15]; 不能与 LEDGF/p75 结合的整合酶 Q168 突变病毒株则无法完成复制^[16]。这些研究充分证明了 LEDGF/p75 为 HIV-1 的复制和感染必需的细胞辅助因子。

LEDGF/p75 在 HIV 整合过程中发挥多种作用,在其他慢病毒中类似^[17]。LEDGF/p75 蛋白-整合酶相互作用使整合酶免于遍在蛋白化作用 (ubiquitination) 及体内蛋白酶体的降解^[18]。LEDGF/p75 在整合酶的核转运过程中也发挥一定作用。更重要的是,LEDGF/p75 利于整合酶与核染色质的相互作用,促进病毒整合过程的进行^[14]。在体外试验中,该辅助因子不但激发整合酶的链转移活性,而且可使整合酶与 DNA 的结合力提高 30 多倍^[17]。

2.2 LEDGF/p75 提高整合酶的稳定性

异种蛋白进入细胞后会立即被泛素标记,然后由蛋白酶体降解,而 LEDGF/p75 可与整合酶相结合而防止整合酶水解,提高其稳定性^[18]。在 p75 缺陷的细胞系中整合酶 mRNA 的水平正常,但检测不到整合酶。在这些细胞系中恢复表达 p75,整合酶的细胞浓度相应恢复正常,或者过表达绿色荧光蛋白-整合酶结合域 (IBD) 的融合蛋白也能使整合酶水平恢复正常。具体机制有待进一步研究。

2.3 LEDGF/p75 介导的整合位点的选择性

Bushman 实验室对人类基因组大量的 HIV 整合位点进行了统计学分析,结果发现富含 AT 的活性转录单位 (transcription units, TUs) 是 HIV-1 整合优先发生区域,这与 LEDGF/p75 的 AT-钩基序对富含 AT 的 DNA 序列的特殊亲和力一致^[19]。现在普遍认为某些细胞因子将整合酶链接到特定的 DNA 整合位点上,使病毒 DNA 优先整合到这些特定的序列上,导致出现了某些整合高频的基因座 (locus)。这种由宿主决定整合位点的现象在整合机制中常见,例如,与逆转录病毒类似的酵母转座子 Ty3 通过与转录因子 TFIIIB 或 TFIIIC 相互作用,而整合到聚合酶 III 转录起始位点附近的一两个核苷酸处^[20]; 酵母转座子 Ty5 通过与 Sir4p C 端部分结合而整合到端粒的异染色质 DNA 或不发生交配型转换的沉默暗盒序列^[20, 21]。

与酵母转座子的整合机制类似,整合酶可与 LEDGF/p75 结合的慢病毒亚科在整合时对 TUs 序列表现出高度选择性,如人免疫缺陷病毒 (HIV)、猴免疫缺陷病毒 (SIV)、猫免疫缺陷病毒 (FIV)^[17]。而不

能与 LEDGF/p75 结合的逆转录病毒, 如莫洛尼鼠白血病病毒 (MLV) 对 TUs 序列仅有一般选择性, 而对启动序列和 CpG 岛具有高度选择性; 猴泡沫病毒 (SFV) 也对启动序列与富含 GC 的 CpG 岛 (CpG island) 有较高选择性; 鸟肉瘤白细胞病毒 (ASLV) 对整合位点无特殊选择性^[22, 23]。另外, 敲除 LEDGF/p75 基因使 HIV 病毒整合受阻而影响复制, 残余的少量的整合对 TUs 的选择性大大下降, 而对 CpG 岛和启动序列的选择性提高, 这与其他不能结合 LEDGF/p75 的逆转录病毒整合位点的选择性相似^[24, 25]。大量试验证明整合酶通过 LEDGF/p75 链接到 DNA 特异的序列 (TUs) 上进行整合, 导致了 HIV 整合序列的选择性, 这方面的研究为其链合机制提供了有力的证据。

2.4 LEDGF/p75 促进 HIV 的半整合 HIV 的整合酶可催化 3'加工和链转移两个过程, 整合酶的二聚体将 HIV-1 cDNA 的 U3、U5 末端分别去掉 1 个 3'-GT 二核苷酸, 形成可与染色体 DNA 相匹配的交错切口。然后连接在 cDNA 两端的两个整合酶二聚体齐聚化形成整合酶四聚体, 相关病毒和宿主因子进入形成整合前复合物 (pre-integration complex, PIC), 该反应在胞浆中发生。整合前复合物进入细胞核, 并在整合酶的催化下完成链转移。在体内, 整合酶的二聚体可以将 HIV-1 cDNA 的一端整合到宿主 DNA, 称为半整合 (half-site integration); 而整合酶四聚体可将 HIV-1 cDNA 的两端都整合到宿主 DNA, 称为全整合 (full-site integration)^[26]。Raghavendra 观察到 LEDGF/p75 促进 HIV cDNA 的半整合而抑制全整合, 并通过试验证明了 LEDGF/p75 可能干扰整合酶的多聚化, 但不影响整合前复合物的催化活性。因此推测, LEDGF/p75 在整合酶四聚体和整合前复合物形成之

后发挥作用, 支持了 LEDGF/p75 结合到 DNA/染色体上作为一种链合因子的观点^[26]。

3 LEDGF/p75 在 HIV-1 整合中的作用机制

Engelman 等^[27]提出了 LEDGF/p75 对 HIV-1 整合的作用机制模型 (图 3): LEDGF/p75 首先通过 NLS 和 AT-钩基序结合到 DNA, 或通过 PWWP 结构域和 AT-钩基序与核小体的组蛋白或其他因子的蛋白质-蛋白质之间的相互作用结合到染色体上, 然后作为整合前复合物的受体与之结合, 在宿主 DNA/染色体与整合酶之间建立一种链索, 增强整合前复合物与 DNA/染色体的亲和力, 促进链转移过程, 并使病毒 DNA 优先整合到富含 AT 序列的转录活跃单位 (TUs)。当 LEDGF/p75 缺陷或减少时, HIV-1 对 TUs 序列的整合优先性丧失, 而与不结合 LEDGF/p75 的 α - β - δ -逆转录病毒对启动序列和 CpG 岛整合频率趋同。这时整合前复合物只能以一种缓慢低效的, 不依赖细胞因子 LEDGF/p75 的补救途径与 DNA/染色体结合, 这就使得整合前复合物处于非整合状态的时间延长, 且复合物中的整合酶缺乏 LEDGF/p75 的稳定作用, 因此整合酶被降解的几率增加, 导致整合频率下降, HIV-1 复制受阻。Engelman 的链合 (tethering) 模型成功解释了 LEDGF/p75 对整合酶的保护作用和 HIV-1 对整合位点的选择性^[27]。

4 基于 LEDGF/p75 新靶点的抗 HIV 抑制剂研究

4.1 小分子抑制剂 开发直接作用于蛋白质-蛋白质相互作用的小分子药物比较困难, 主要是因为蛋白质表面的作用靶点大而平坦, 没有已知底物作为设计拮抗剂的先导化合物, 筛选时难以辨别和降低小分子与蛋白质非特异性的结合^[1]。但 LEDGF/p75 与整合酶之间的相互作用仍是抗 HIV 研究一个非常有前景的靶点, 多项生物学试验证实, LEDGF/p75 蛋

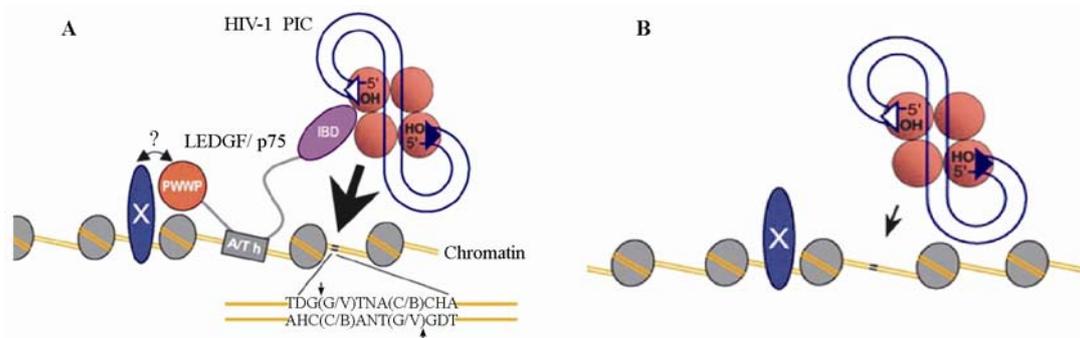


Figure 3 Engelman's LEDGF/p75 model for tethering mechanism^[27]. A: Model of HIV integration on the existence of LEDGF/p75; B: HIV integration after knockout of LEDGF/p75 gene (PIC (pre-integration complex); red ovals represent integrases, and grey ones represent nucleosomes; yellow double lines represent the DNA stands.)

白通过其 IBD 结构域对整合酶核心区的特异性识别, 在整合酶与宿主染色体之间建立一种链索, 发挥其“链合 (tethering) 作用”, 而介导 HIV 整合酶对宿主 DNA/染色体特异位点 (TUs) 的结合, 这是病毒的整合过程中的关键环节^[13]; LEDGF/p75 蛋白 IBD 结构域过表达或 LEDGF/p75 基因敲除均可造成 HIV 复制受阻, 细胞感染水平下降, 因此 LEDGF/p75 是保持 HIV-1 复制及感染性必需的辅助因子^[28]; 在人免疫 T 细胞系中将 LEDGF/p75 基因敲除后, 细胞的活力不受影响。因此以 LEDGF/p75 蛋白为靶点不影响细胞的正常生理功能^[29]; LEDGF/p75 蛋白 IBD 与整合酶核心区结合的晶体结构 (分辨率 0.2 nm, 蛋白质数据库代码 2B4J) 已经被解析, LEDGF/p75 蛋白 IBD 结构域的 α -螺旋结构域伸入到整合酶表面相对较小而深的裂隙中, 结合凹槽中的关键性氨基酸已经被确证, 这为基于靶点的合理药物设计提供了非常有价值的信息^[10, 11]。

香豆素类整合酶抑制剂 (图 4) 通过靶向作用于整合酶变构中心, 以抑制整合酶的齐聚化来发挥抗 HIV 活性。Al-Mawsawi 等^[30]对香豆素类整合酶抑制剂进一步研究发现, 其特异作用靶点正好位于整合酶核心区表面的¹²⁸AACWWAGIK¹³⁶肽段, 而这一区域包含了 LEDGF/p75 蛋白-整合酶相互作用的必需氨基酸 A128、A129、W131 和 W132。因此, 这类整合酶抑制剂还有可能干扰 LEDGF/p75 蛋白与整合酶的结合, 具体机制有待进一步研究。

Molteni 等^[31]发现了两个作用于整合酶 CDD 表面的小分子化合物——四苯砷和二羟苯基三苯砷, 两者具有抑制 3'加工和链转移的活性。四苯砷和二羟苯基三苯砷可通过电荷作用而与 HIV 整合酶 Q168 残基的羰基氧结合, 而 HIV 整合酶 Q168 突变毒株不能与 LEDGF/p75 结合, 因此其作用靶点正是 LEDGF/p75 结合的必需残基, 但它是否可以干扰 LEDGF/p75 与整合酶的结合, 尚未见报道。

中国科学院的研究人员^[32]将 HIV-1 整合酶与酵

母转录激活因子 Gal4 的 DNA 结合域的融合蛋白作为“诱饵”, 以 LEDGF/p75 蛋白 IBD 结构域与 Gal4 的转录激活域的融合蛋白作为“猎物”, 以 LacZ 作为报道基因构建酵母双杂交系统, 利用该系统对 300 多个候选化合物进行筛选, 发现苯甲酸衍生物 D77 (图 5) 与 α -半乳糖苷酶活性的下降表现出浓度依赖性, 从而表明 D77 对 IN-LEDGF/75 复合物形成具有抑制作用, 这一结论在哺乳类双杂交实验中也得到了验证。

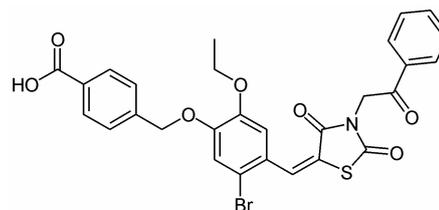


Figure 5 The structure of D77

通过表面等离子体共振技术测定分析和定点突变分析表明, D77 可以直接干扰整合酶 CCD 区结合 LEDGF/p75 蛋白 IBD 结构域, 破坏整合酶的核定向分布。分子对接结果显示 D77 直接作用于整合酶 CCD 二聚体的表面, 嵌入由整合酶 B 链 Ala98、Leu102、Ala128、Ala129、Trp131 和 Trp132 氨基酸残基和整合酶 A 链 Ala169、Met178 氨基酸残基构成的疏水性口袋中。D77 羧基上-OH 的 O 原子分别与 A 链上 Thr174 残基和 B 链上 Gln95 残基形成 O···H-O 和 O···H-N 氢键, 羰基 O 原子与 B 链上的 Thr125 残基形成 O···H-O 氢键结合。D77 的苯环 1、2 之间与 B 链 Trp131 的吡啶基团之间存在 2 个 C-H···N 氢键。B 链上的 Trp131、Thr125、Gln95 和 A 链上的 Thr174 是 D77 结合 CCD 的必需氨基酸残基 (图 6)。D77 可直接竞争结合 CCD, 对已经形成的 LEDGF/p75-整合酶复合物也有破坏作用。抗逆转录病毒活性试验表明, D77 可有效抑制 MT4 细胞中 HIV-1 的复制 (IC_{50} $23.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 目前正在对 D77 进行结构修饰以增强

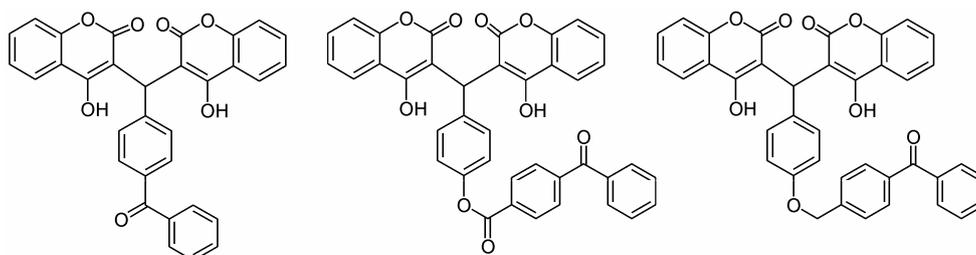


Figure 4 The structure of coumarin integrase inhibitors

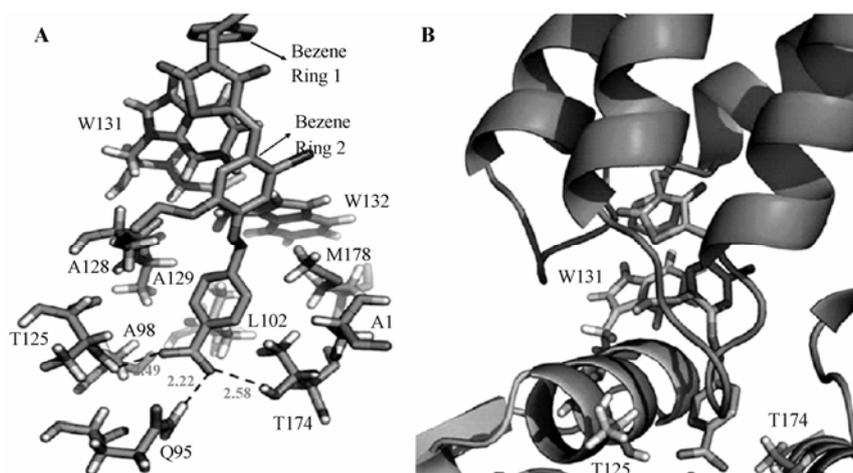


Figure 6 Molecular docking of D77 into HIV-1 integrase CCD^[32]. A: The interaction between D77 and HIV-1 integrase CCD in detail; B: Molecular docking of D77 with CCD/IBD complex

其活性及水溶性^[32]。

4.2 拟肽抑制剂的研究 Al-Mawsawi 等^[33]合成了一种 p75 蛋白衍生短肽³⁵⁵IHAIEKNSLKIDNLDVNR CIEAL³⁷⁷, 保留了 I365 上游 355-364aa 10 个氨基酸和 D366 上游 366-377aa 12 个氨基酸以维持 IBD 的二级 α -螺旋折叠构象, 该肽段包含了整合酶 IBD 区结合的两个重要的残基 I365 和 D366^[11]。此短肽可与完整 LEDGF/p75 蛋白竞争结合整合酶而不激活其活性, 还可以干扰 HIV-1 整合酶的多聚化而使 DNA 在整合酶四聚体中不稳定, 从而对整合酶催化活性产生直接抑制作用, IC_{50} 达 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 3'加工和链转移的抑制作用 IC_{50} 分别为 (165 ± 28) 和 $(153 \pm 28) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。但预加入 Ca^{2+} 诱导产生的整合酶-DNA PIC 后再加入此活性肽, 则完全丧失对整合酶的抑制作用, 这与 LEDGF/p75 在整合酶-DNA PIC 形成后加入, 丧失其促进链转移作用一致^[33]。对整合酶具有抑制活性的 LEDGF/p75 衍生短肽, 为开发低分子模拟肽类抑制剂具有重要意义。

4.3 基因治疗前景 De Rijck 等^[28]分别构建了两种增强型绿色荧光蛋白 (eGFP) 与 LEDGF/p75 蛋白 IBD 片段的真核共表达质粒, 转导进入 HeLaP4 细胞和 293T 细胞, 筛选可稳定过表达融合蛋白的单克隆细胞系进行 HIV-1 感染, 实时 PCR 技术检测细胞中 HIV-1 DNA 水平。结果发现过表达 eGFP-IBD 融合蛋白的细胞系 HIV-1 复制严重抑制, 定量 PCR 检测表明病毒整合被阻断但仍保持核定向转运; 而过表达对整合酶无结合能力的 eGFP-IBD ($\Delta 366A$) 融合蛋白的细胞系, HIV-1 复制水平未受影响。因此, 细胞内过表达缩短 LEDGF/p75 突变体可以有效抑制

HIV-1 的复制, 为抗 HIV 的基因治疗提供了可能^[28]。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是生物体内普遍存在的特异性基因沉默机制, 体外合成的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 转染哺乳动物可以引起特异性基因抑制, 目前应用 RNA 干扰技术是 HIV 基因治疗的有效途径。RNA 干扰技术 (RNAi) 在抗 HIV 感染方面的研究已经广泛展开, HIV 基因的快速变异, RNA 局部空间结构改变及核衣壳介导的 RNAi 屏蔽作用, 大大削弱了靶向病毒基因的 siRNA 效果。以病毒复制必需的 LEDGF/P75 细胞辅助因子为靶点, 由于宿主基因相对稳定, 且基因敲除后不影响细胞活力生长, 因此更具有发展前景^[29]。

5 结语

目前高效抗逆转录病毒疗法使用的抗 HIV 感染药物主要是蛋白酶抑制剂和逆转录酶抑制剂, 这两类药物极易产生耐药性和毒性, 寻找新作用机制和不易产生耐药性的药物是当今抗艾滋病药物研究的首要任务。LEDGF/p75 在体内与 HIV-1 整合酶相结合, 是其整合过程必需的细胞辅助因子, 对 HIV 的复制和感染有重要作用, 因此 LEDGF/p75 在抗 HIV 治疗策略中成为药物研究的理想靶点。目前, 随着 LEDGF/p75 与整合酶结合的三维晶体结构和作为药物作用靶点的蛋白质结合位点的确定, 为基于受体的合理药物设计提供了有用信息。通过高通量筛选获得的第 1 个阻断 LEDGF/p75 与整合酶结合的抑制剂 D77 的分子对接结果验证了计算机辅助药物设计的可行性。另外, 基于 LEDGF/p75 表达的基因治疗展现了独特的应用前景。LEDGF/p75 在 HIV 生命周期中作用机制的发现为新型抗艾滋病药物的研发和临

床治疗提供了新的靶点。

References

- [1] Poeschla EM. Integrase, LEDGF/p75 and HIV replication [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 1403–1424.
- [2] Ganapathy V, Casiano CA. Autoimmunity to the nuclear autoantigen DFS70 (LEDGF): what exactly are the auto-antibodies trying to tell us? [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50: 684–688.
- [3] Shinohara T, Singh DP, Fatma N. LEDGF, a survival factor, activates stress-related genes [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2002, 21: 341–358.
- [4] Nishizawa Y, Usukura J, Singh DP, et al. Spatial and temporal dynamics of two alternatively spliced regulatory factors, lens epithelium-derived growth factor (ledgf/p75) and p52, in the nucleus [J]. *Cell Tissue Res*, 2001, 305: 107–114.
- [5] Al-Mawsawi LQ, Neamati N. Blocking interactions between HIV-1 integrase and cellular cofactors: an emerging anti-retroviral strategy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28: 526–535.
- [6] Botbol Y, Raghavendra NK, Rahman S, et al. Chromatinized templates reveal the requirement for the LEDGF/p75 PWWP domain during HIV-1 integration *in vitro* [J]. *Nucl Acids Res*, 2008, 36: 1237–1246.
- [7] Llano M, Vanegas M, Hutchins N, et al. Identification and characterization of the chromatin-binding domains of the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75 [J]. *J Mol Biol*, 2006, 360: 760–773.
- [8] Turlure F, Maertens G, Rahman S, et al. A tripartite DNA-binding element, comprised of the nuclear localization signal and two AT-hook motifs, mediates the association of LEDGF/p75 with chromatin *in vivo* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 1663–1675.
- [9] Turlure F, Maertens G, Rahman S, et al. A tripartite DNA-binding element, comprised of the nuclear localization signal and two AT-hook motifs, mediates the association of LEDGF/p75 with chromatin *in vivo* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 1663–1675.
- [10] Cherepanov P, Ambrosio AL, Rahman S, et al. Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 17308–17313.
- [11] Cherepanov P, Sun ZYJ, Rahman S, et al. Solution structure of the HIV-1 integrase binding domain in LEDGF/p75 [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12: 526–532.
- [12] Busschots K, Voet A, Maeyer MD, et al. Identification of the LEDGF/p75 binding site in HIV-1 integrase [J]. *J Mol Biol*, 2007, 365: 1480–1492.
- [13] Bartholomeeusen K, De Rijck J, Busschots K, et al. Differential interaction of HIV-1 integrase and JPO2 with the C terminus of LEDGF/p75 [J]. *J Mol Biol*, 2007, 372: 407–421.
- [14] Llano M, Saenz DT, Meehan A, et al. An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration [J]. *Science*, 2006, 314: 461–464.
- [15] Hombrouck A, De Rijck J, Hendrix J, et al. Virus evolution reveals an exclusive role for LEDGF/p75 in chromosomal tethering of HIV [J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3: 418–430.
- [16] Emiliani S, Mousnier A, Busschots K, et al. Integrase mutants defective for interaction with LEDGF/p75 are impaired in chromosome tethering and HIV-1 replication [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 25517–25523.
- [17] Busschots K, Vercammen J, Emiliani S, et al. The interaction of LEDGF/p75 with integrase is lentivirus-specific and promotes DNA binding [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 17841–17847.
- [18] Llano M, Delgado S, Vanegas M, et al. LEDGF/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 55570–55577.
- [19] Schröder ARW, Shinn P, Chen H, et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots [J]. *Cell*, 2002, 110: 521–529.
- [20] Kirchner J, Connolly CM, Sandmeyer SB. Requirement of RNA-polymerase III transcription factors for *in vitro* position-specific integration of a retrovirus-like element [J]. *Science*, 1995, 267: 1488–1491.
- [21] Zhu Y, Dai J, Fuerst PG, et al. Controlling integration specificity of yeast retrotransposon [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 5891–5895.
- [22] Maele B, Busschots K, Vandekerckhove L, et al. Cellular co-factors of HIV-1 integration [J]. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31: 98–105.
- [23] Mitchell RS, Beitzel BF, Schroder ARW, et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2: 1127–1137.
- [24] Shun MC, Raghavendra NK, Vandegraaff N. LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration [J]. *Genes Dev*, 2007, 21: 1767–1778.
- [25] Marshall HM, Ronen K, Berry C, et al. Role of PSIP1/LEDGF/p75 in lentiviral infectivity and integration targeting [J]. *PLoS One*, 2007, 2: 1–13.
- [26] Raghavendra NK, Engelman A. LEDGF/p75 interferes with the formation of synaptic nucleoprotein complexes that catalyze full-site HIV-1 DNA integration *in vitro*: implications for

- the mechanism of viral cDNA integration [J]. *Virology*, 2007, 360: 1-5.
- [27] Engelman A, Cherepanov P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication [J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4: 1-9.
- [28] De Rijck J, Vandekerckhove L, Gijsbers R, et al. Overexpression of the lens epithelium-derived growth factor/p75 integrase binding domain inhibits human immunodeficiency virus replication [J]. *J Virol*, 2006, 80: 11498-11509.
- [29] Vandekerckhove L, Christ F, Van Maele B, et al. Transient and stable knockdown of the integrase cofactor LEDGF/p75 reveals its role in the replication cycle of human immunodeficiency virus [J]. *J Virol*, 2006, 80: 1886-1896.
- [30] Al-Mawsawi LQ, Fikkert V, Dayam R, et al. Discovery of a small-molecule HIV-1 integrase inhibitor binding site [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 10080-10085.
- [31] Molteni V, Greenwald J, Rhodes D, et al. Identification of a small-molecule binding site at the dimer interface of the HIV integrase catalytic domain [J]. *Acta Cryst*, 2001, 57: 536-544.
- [32] Du L, Zhao YX, Chen J, et al. D77, one benzoic acid derivative, functions as a novel anti-HIV-1 inhibitor targeting the interaction between integrase and cellular LEDGF/p75 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375: 139-144.
- [33] Al-Mawsawi LQ, Christb F, Dayama R, et al. Inhibitory profile of a LEDGF/p75 peptide against HIV-1 integrase: insight into integrase-DNA complex formation and catalysis [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582: 1425-1430.

欢迎订阅 2010 年《药学报》

《药学报》(CN: 11-2163/R, ISSN: 0513-4870)是由中国药学会主办、中国医学科学院药物研究所承办、国内外公开发行的药学综合性学术期刊。辟有栏目:述评和综述、研究论文、研究简报、学术动态。本刊自 1953 年创刊以来,一直报道药学领域原始性、创新性科研成果,旨在促进国内外学术交流。刊登论文内容包括药理学、合成药物化学、天然药物化学、药物分析学、药剂学、生药学等。

《药学报》为我国自然科学核心期刊,据中国科学引文数据库的数据库的统计数据,在中国科技核心期刊排行表中,《药学报》名列前茅,在药学类期刊中居首位;本刊已被世界主要检索系统收录,为我国药学界高水平的学术刊物,在国际上享有一定知名度。本刊 1999 年荣获首届“国家期刊奖”,2001 年入选中国期刊方阵“双高”(高知名度、高学术水平)期刊;2002 年被评为第二届“国家期刊奖百种重点科技期刊”,并荣获第三届“中国科技优秀期刊奖”二等奖;2002~2007 年连续 6 届荣获“百种中国杰出学术期刊”称号;2008、2009 年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助(B类)。

本刊为 112 页,月刊,大 16 开本。每期定价 30 元,全年定价 360 元。国内邮发代码:2-233,国外代码:M105。欢迎广大作者踊跃投稿,欢迎广大读者订阅。可采用的订阅方式如下:

- 通过当地邮局;
- 通过 E-mail (yxxb@imm.ac.cn) 或从网上 (www.yxxb.com.cn) 下载订阅单,填好后寄至编辑部;
- 通过本刊编辑部,联系人:李淑芬、张晓晔

电话:86-10-63165208, 传真:86-10-63026192

编辑部地址:北京市先农坛街 1 号《药学报》编辑部

邮编:100050