

## · 实验室研究 ·

# 4 例接受抗病毒治疗的艾滋病患者 HIV-1 核苷类反转录酶抑制剂类耐药基因突变的选择动力学研究

李珏 焦丽燕 李韩平 李林 刘永健 庄道民 刘思扬 鲍作义 李宏 王哲 李敬云

**【摘要】** 目的 阐明接受抗病毒治疗的艾滋病患者核苷类反转录酶抑制剂(nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTI)类耐药基因突变分子进化特征。方法 从中国中部农村某抗病毒治疗艾滋病病例研究队列中选择 4 例服药依从性较好,治疗初期为野生型毒株,在治疗过程中逐渐产生 NRTI 类耐药基因突变的患者为研究对象,对每位患者的 4~5 次随访血浆样本的反转录酶(RT)基因进行克隆测序分析,观察每个克隆的基因型耐药性特征。结果 共检测 855 个克隆,平均每份血液样本 47.5 个 ± 22.8 个克隆,得到 4 例患者历次克隆序列中带各种 NRTI 类耐药基因突变的构成图谱:某些患者随治疗时间延长逐渐表现为典型的 TAMs-1 型突变模式,如 L210W、T215Y、M41L 突变,并且随治疗时间延长,优势种所携带的突变数目有累加趋势;某些患者表现为较明显的 TAMs-2 型突变,如 K70R、D67N、K219Q 等突变;其中,某些患者的克隆同时含有 T215Y(TAMs-1 型)和 K70R、D67N(TAMs-2 型)突变。结论 总结出 4 例患者 HIV-1 NRTI 类耐药基因突变的选择动力学特征。4 例患者表现出不同的 NRTI 类耐药基因突变演变途径:TAMs-1 型、TAMs-2 型以及 TAMs-1/TAMs-2 融合型,该类突变表现出逐级累加的趋势,最先筛选出来的耐药突变往往能够成为最后的优势种。

**【关键词】** 核苷类反转录酶抑制剂; 耐药基因突变; 分子进化规律

**Research on the selective kinetics of HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitor drug resistance-associated mutations among 4 AIDS patients receiving highly active antiretroviral therapy** LI Jue\*, JIAO Li-yan, LI Han-ping, LI Lin, LIU Yong-jian, ZHUANG Dao-min, LIU Si-yang, BAO Zuo-yi, LI Hong, WANG Zhe, LI Jing-yun. \*State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Academy of Military Medical Science Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China  
Corresponding author: LI Jing-yun, Email:lijy@nic.bmi.ac.cn

**【Abstract】** **Objective** To elucidate the molecular evolutionary characteristics of HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) drug resistance-associated mutations in patients with AIDS receiving highly active antiretroviral therapy. **Methods** We selected 4 AIDS patients receiving highly active antiretroviral therapy (HAART) with good adherence under a HIV-1 drug resistance cohort from a rural region in central China. Those people carried susceptible virus at the beginning of treatment and gradually came to produce virus resistant to NRTIs during the process of antiretroviral therapy (ART). Reverse transcriptase (RT) genes from each patient's peripheral blood samples (from 3 to 33 months after withdrawal) were cloned and sequenced in succession. **Results** We sequenced a total number of 855 clones and obtained the HIV-1 NRTI drug resistance-associated mutations patterns of the 4 patients. Typical resistance mutations of thymidine analogue mutations (TAMs) pattern 1, such as L210W, T215Y and M41L, were generated in patient 'A'. TAMs pattern 2, including D67N, K70R and K219Q mutations, was discovered in patient 'B'. Interestingly, in patient 'C', some clones comprising not only TAMs pattern 1 mutations (T215Y) but also TAMs pattern 2 mutations (K70R, D67N). **Conclusion** The four patients show different pathways on HIV-1 NRTI drug resistance-associated mutations, including TAMs pattern 1, TAMs pattern 2 and the fusion pattern of TAMs-1 & TAMs-2. We also noticed that the tendency of gradual accumulation was obvious and those mutations detected earlier tended to be the predominant strains.

**【Key words】** Nucleoside reverse transcriptase inhibitor; Drug resistance-associated mutations; Molecular evolutionary characteristics

基金项目:国家“973”课题资助项目(2006CB504206)

作者单位:100071 北京,军事医学科学院微生物流行病研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室(李珏、焦丽燕、李韩平、李林、刘永健、庄道民、刘思扬、鲍作义、李敬云);河南省疾病预防控制中心(李宏、王哲)

李珏与焦丽燕同为第一作者

通讯作者:李敬云, Email:lijy@nic.bmi.ac.cn

HIV-1感染者体内的毒株是以准种的形式存在的<sup>[1]</sup>,由于 HIV 的高复制速率<sup>[2]</sup>、高频重组现象以及反转录酶(RT)缺乏校读功能等因素,使其准种得以不断丰富。目前对 HIV-1 耐药突变选择动力学的研究还很少<sup>[3]</sup>,采用的方法也多是通过对 PCR 直接测序<sup>[4]</sup>,扩增出优势准种,再将所得序列与数据库资料进行分析比对,这种方法只能检测到准种中大于 20% 的耐药基因突变毒株,不能检测从野生型到突变型转变的早期阶段所产生的少量耐药基因突变。采用克隆测序的方法来研究抗病毒治疗过程中耐药突变的发生规律具有独特的优势,不但能够检测到少量的病毒准种,而且可以特异地检测到单一病毒基因的突变,从而避免了各准种间的混杂效应。本研究以 4 例服药依从性较好的艾滋病患者为研究对象,对其系列血浆样本的 RT 基因进行了克隆分析,在对 855 个克隆序列进行分析的基础上,总结出这些患者核苷类反转录酶抑制剂(NRTI)类耐药基因突变发生的选择动力学特征。

对象与方法

1. 病例:从我国中部农村地区接受免费抗病毒治疗(AZT、ddI 和 NVP)的艾滋病患者中选择 4 例服药依从性较好、治疗 3 个月时标准基因型检测未发生 HIV-1 耐药突变、在以后的治疗过程中逐渐产生 NRTI 类耐药突变的艾滋病患者为研究对象。患

者 1,女,43 岁;患者 2,女,42 岁;患者 3,男,38 岁;患者 4,男,45 岁。这 4 例患者均在 1992 年前后通过有偿献血感染 HIV-1。在治疗 3、9、15、21、27 和 33 个月后进行随访,收集 4 例的系列 EDTA 抗凝全血及相关问卷调查资料。4 例患者的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 淋巴细胞计数和病毒载量(VL)的测定见图 1。

2. 方法:

(1)分离、富集、提取血浆 HIV 病毒的 RNA:使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒(Qiagen, 德国)提取病毒 RNA,按照说明书推荐的步骤进行。

(2)RT-PCR 扩增 HIV-1 pol 区基因:用 TaKaRa 一步法 RT-PCR 试剂盒(AMV)(宝生物工程大连有限公司)RT-PCR 扩增 HIV-1 pol 基因片段。第一轮反应体系:5 μl 10 × One Step RT-PCR buffer; 10 μl MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L); 5 μl dNTP Mixture; 1 μl RNase Inhibitor (40 U/μl); 1 μl AMV RNaseXL (5 U/μl); 1 μl AMV-Optimized Taq (5 U/μl); 1 μl 上游引物 MAW26:5'-TTG GAA ATG TGG AAA GGA AGG AC-3', 于 HXB2 上位于 2028~2050; 1 μl 下游引物 RT21: 5'-CTG TAT TTC TGC TAT TAA GTC TTT TGA TGG G-3', 于 HXB2 上位于 3509~3539; 1 μl RNA 模板; 24 μl RNase Free dH<sub>2</sub>O。反应条件为:50℃ 30 min, 94℃ 2 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。第二轮反应体系为:5 μl 10 × PCR buffer; 1 μl dNTP

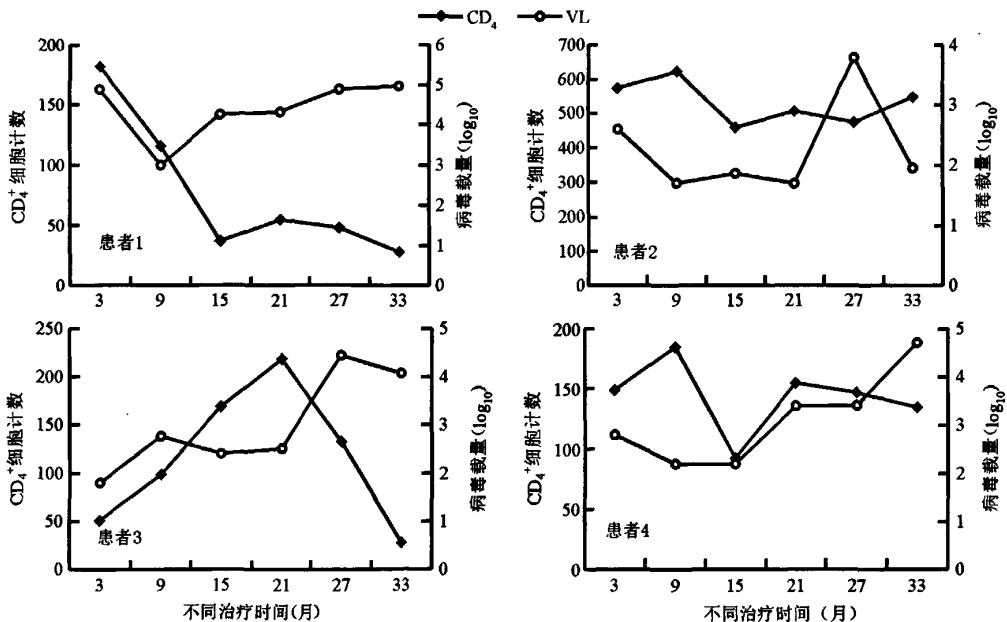


图1 4 例患者在不同采样时间的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 计数和病毒载量

Mixture; 0.5  $\mu\text{l}$  rTaq (5 U/ $\mu\text{l}$ ); 1  $\mu\text{l}$  上游引物 PRO-1: 5'-CAG AGC CAA CAG CCC CAC CA-3', 于 HXB2 上位于 2147~2166; 1  $\mu\text{l}$  下游引物 RT4: 5'- AGT TCA TAA CCC ATC CAA AG, 于 HXB2 上位于 3441~3462; 5  $\mu\text{l}$  第一轮 RT-PCR 产物; 36.5  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$  5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  2.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。

(3) PCR 产物切胶回收、纯化: 使用 Wizard SV Gel and PCR Clean-up System 试剂盒 (Promega, 美国) 进行 PCR 产物的回收和纯化, 按照说明书推荐的步骤进行。

(4) 目的片段的连接: 在冰中融解 T 载体和 Ligation Mix, 在微量离心管中配制 DNA 溶液 (1  $\mu\text{l}$  PMD18-T Vector/4  $\mu\text{l}$  Insert DNA/5  $\mu\text{l}$  Solution I), 16 $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min。

(5) 含有目的片段的 T 载体的转化: 取 50  $\mu\text{l}$  冰浴上融化的感受态细胞, 加入目的片段 5  $\mu\text{l}$ , 轻轻混匀, 在冰浴中放置 30 min。42 $^{\circ}\text{C}$  热激 90 s, 迅速转移至冰上使细胞冷却 2~3 min; 加入 500  $\mu\text{l}$  不含抗生素的 LB 培养基, 混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$  200 r/min 的摇床中培养 1 h, 使细菌复苏; 吸取 100  $\mu\text{l}$  已转化的感受态细胞加到含有 X-Gal、IPTG、Amp 的平皿上培养, 将平皿置 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱培养, 12 h 后计菌落数。

(6) 阳性克隆的鉴定: 挑选分隔良好的单克隆白色菌落, 使用 PCR 法确认载体中插入片段的长度大小; 在无菌操作台内使用接种环挑起菌落, 在 PCR 管中反复混匀数下, 观察到管中液体混浊的情况下将接种环转移至含有 Amp LB 培养基的试管中; 将已含菌落的 PCR 管放入 100 $^{\circ}\text{C}$  的沸水中加热 10 min, 取出 PCR 管, 置于室温; 完全冷却后加入反应体系: 10 $\times$  PCR buffer, 2.5  $\mu\text{l}$ ; dNTP Mixture, 1  $\mu\text{l}$ ; rTaq (5 U/ $\mu\text{l}$ ), 0.25  $\mu\text{l}$ ; 上游引物 PRO-1, 0.5  $\mu\text{l}$ ; 下游引物 RT4, 0.5  $\mu\text{l}$ ; ddH<sub>2</sub>O, 20.25  $\mu\text{l}$ 。扩增反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。恒压电泳 40 min 左右观察结果。

(7) 阳性克隆的培养、测序及结果分析: 将 PCR 鉴定阳性的含有菌落的试管放入摇床内, 37 $^{\circ}\text{C}$  200 r/min 培养 12~16 h。将菌液分装, 送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行序列测定。用 Chromas.exe 软件对序列质量进行初步评估; 用 Vector NTI 软件, 使用 Contig Express 组件进行序

列拼接和手工编辑; 用 Stanford HIV Drug Resistance Database 网站 HIVdb Program 进行耐药性分析。

## 结 果

1. 标准基因型检测结果: 4 例患者治疗 3 个月时标准基因型检测均为敏感型 (表 1)。患者 1 治疗 21 个月时开始检测到 NRTI 类耐药基因突变: M41LM、L210W、T215Y, 该突变模式持续至治疗后 33 个月; 患者 2 在治疗 15 个月时 NRTI 类耐药基因突变出现, 为 D67N、K70R, 27 个月时新增了 K219Q, 并一直持续至 30 个月; 患者 3 在治疗 15 个月时开始出现 NRTI 类耐药突变, 为 T215Y, 18 个月时增加为 M41L、T215Y, 治疗 27 个月时仍然是该突变类型; 患者 4 前三次标准基因型耐药性检测结果均为敏感型, 33 个月时检测出 NRTI 类耐药基因突变, 为 T215Y。

### 2. 克隆测序检测结果:

(1) 克隆分析序列数目: 受到克隆转化效率和测序成功率的影响, 各样本最终得到的克隆序列总数不完全一致 (表 2)。最终共获得 855 个克隆序列。从 4 例患者得到的克隆序列总数分别是 261、157、237 和 200。

(2) 克隆测序分析 4 例患者 NRTI 类耐药基因突变的选择动力学: 与标准基因型检测相比, 克隆基因型检测方法在治疗早期即可筛选出携带耐药突变的克隆 (表 1)。

如图 2 所示, 患者 1 在治疗 3 个月的检测中未发现典型突变; 治疗 15 个月时发现 1 株含有 M41L、L210W、T215Y、E44D、L74I 突变的克隆 (10%); 治疗 21 个月时 100% 克隆 (32/32) 携带 L210W、T215Y 突变, 其中 93.8% 克隆 (30/32) 只携带这两个突变, 占优势, 另外 6.2% 克隆 (2/32) 在此基础上累积了第三个突变; 治疗 27 个月时携带 M41L、L210W、T215Y 三个突变的克隆占了优势 (58/92, 63.0%), 另有 16.3% 克隆 (15/92) 在此基础上累积了第四个突变, 2.2% 克隆 (2/92) 携带五个突变位点; 治疗 33 个月时, 只携带 M41L、L210W、T215Y 三个突变的克隆所占比例有所下降 (18/79, 22.8%); 与此同时, 在此基础上累积一个突变成为含有四个突变位点克隆的比例则上升为 39.2% (31/79), 携带五个突变位点克隆的比例上升为 21.5% (17/79), 甚至有 2.5% 克隆 (2/79) 携带了六

表1 4 例患者不同治疗时间的标准基因型检测和克隆基因型检测比较结果

患者编号	3M	9M	15M	21M	27M	33M
1	标准 <sup>a</sup>	None	-	None	M41L, L210W, T215Y	M41L, L210W, T215Y
	克隆 <sup>b</sup>	F116L(1 <sup>c</sup> /48 <sup>d</sup> )	-	M41L, L210W, T215Y + XX(1/10)	L210W, T215Y(30/32) L210W, T215Y + X(2/32)	M41L, L210W, T215Y (58/92), M41L, T215Y (14/92), M41L, L210W, T215Y + X(14/92), O <sup>e</sup> (5/92)
2	标准	None	-	D67N, K70R	-	D67N, K70R, K219Q
	克隆	D67N, K70R (17/58), O(4/58)	-	T215Y (10/28), D67N, K70R(3/28), D67N, K70R, T215Y (4/28), O(2/28)	-	D67N, K70R, K219Q(26/30), D67N, K70R, K219Q + X(2/30)
3	标准	None	None	T215Y	M41L, T215Y	M41L, T215Y
	克隆	M41L, T215Y (1/69), M41L, T215Y + X (1/69), O(6/69)	O(12/41)	T215Y (7/34), D67N, K70R, T215Y (6/34), M41L, T215Y (3/34), M41L, T215Y + X (XX) (3/34), O(4/34)	M41L, T215Y(58/66), M41L, T215Y + X(XX) (3/66), O(2/66)	M41L, D67N, K70R, T215Y (+ X) (12/27), M41L, T215Y (7/27), M41L, T215Y + X (XX) (9/27)
4	标准	None	None	-	-	None
	克隆	O(12/86)	T215Y (1/45), O(2/45)	-	-	T215Y(3/27), O(2/27)

注：<sup>a</sup> 标准基因型检测结果；<sup>b</sup> 克隆测序检测结果；<sup>c</sup> 携带该突变的克隆数日；<sup>d</sup> 每次随访样本的克隆总数；<sup>e</sup> O:携带其他突变的克隆数日；None:没有发现耐药突变；M:开始接受治疗后时间(月)；“-”:没有检测出标准基因型和克隆基因型

表2 4 例患者不同治疗时间的克隆基因型分析序列数日

患者	3个月	9个月	15个月	21个月	27个月	33个月	合计
1	48	-	10	32	92	79	261
2	58	-	28	-	30	41	157
3	69	41	34	66	27	-	237
4	86	45	-	-	27	42	200
合计	261	86	72	98	176	162	855

注：“-”未做克隆分析

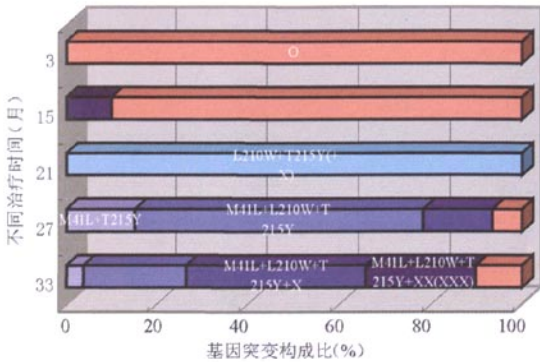
个突变位点，累加频率最高的突变是 D67E/N 和 E44D。从该患者历次检测可以看出，是 TAMs-1 型耐药突变，并且随着治疗时间延长，含多个突变的克隆比例逐渐增加，准种中优势克隆携带的突变数目也逐渐增加。

患者 2 在历次监测中携带各种 NRTI 类耐药基因突变的克隆构成见图 3，该患者治疗 3 个月时即发现含有 K70R 突变的克隆(18/58, 31.0%)，其中 29.3%(17/58)克隆携带 K70R、D67N 两个突变；治疗 15 个月时携带 K70R、D67N 突变的克隆有所下降，占 25%(7/28)，其中有 3 个克隆累积了 T215Y 突变，同时此次监测中出现只携带 T215Y 突变的克隆，占 35.7%(10/28)；治疗 27 个月时携带 K70R 突变的克隆重新占优势 93.3%(28/30)，并且均以

D67N、K219Q 突变为背景，同时 T215Y 突变消失；33 个月时仍然以 D67N、K70R、K219Q 突变模式为主。总之，患者 2 NRTI 类耐药突变的发生发展过程比较单一，总体上呈现出 TAMs-2 型耐药突变的特征。

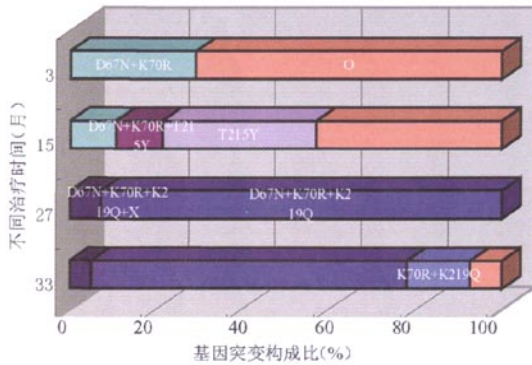
患者 3 在历次监测中携带各种 NRTI 类耐药基因突变的克隆构成见图 4，在前两次监测中以敏感型毒株为主，同时出现少量携带 41 和/或 215 位点的突变(3/69, 2/41)，还有一些单位点非典型突变；治疗 15 个月时携带 T215Y 的克隆增加至 61.8%(21/34)，其中 20.6%(7/34)克隆只携带 T215Y 一个突变，17.6%克隆(6/34)携带 T215Y、M41L；还发现有 20.6%克隆(7/34)同时携带 T215Y、K70R 突变，而且多数克隆(6/7)以 D67N 为背景；治疗 21 个月时，没有看到同时携带 T215Y、K70R 突变的克隆，有 1 个克隆(1.5%)携带 K70R、K219Q、D67N 三位点突变，93.9%克隆(62/66)携带 T215Y、M41L，占绝对优势；治疗 27 个月时，携带 T215Y、M41L 的克隆达到 100%(27/27)，同时又发现其中 44.4%克隆(12/27)在此基础上累积了 K70R、D67N 两个突变。患者 3 NRTI 类耐药突变的发生发展规律较为复杂，其显著特点是有些克隆中既含有

TAMs-1型耐药突变 (T215Y、M41L), 同时又含有 TAMs-2型耐药突变(K70R、D67N、K219Q)。



注: X:代表 1 个其他位点突变; XX:代表 2 个其他位点突变; XXX:代表 3 个其他位点突变; O:没有携带 M41L、L210W、T215Y 突变的克隆

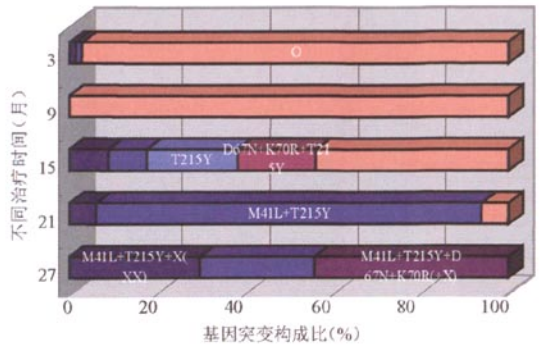
图2 患者 1 历次克隆序列中携带各种 HIV-1 NRTI 类耐药基因突变的构成图谱



注: X:代表 1 个其他位点突变; O:没有携带 D67N、K70R、K219Q 和 T215Y 突变的克隆

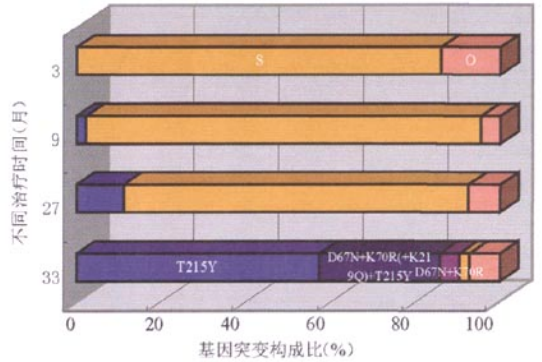
图3 患者 2 历次克隆序列中携带各种 HIV-1 NRTI 类耐药基因突变的构成图谱

患者 4 在历次监测中携带各种 NRTI 类耐药基因突变的克隆构成见图 5, 该患者前三次检测多数克隆为敏感型, 所占比例分别为 86.0% (74/86)、93.3% (42/45) 和 81.5% (22/27), 这几个时间点除少量克隆携带 T215Y 突变外, 其余大多为非典型单位点突变; 在治疗 33 个月时 NRTI 类耐药基因突变突然增多, 携带 T215Y 突变的克隆占到 90.5% (38/42), 同患者 3 类似的是, 其中 28.6% 克隆 (12/42) 在 T215Y 突变基础上累积了 K70R、D67N 两个突变, 这 12 株克隆中又有 9 株以 K219Q 为背景。患者 4 的监测中, 同样出现了某些克隆既含有 TAMs-1 型耐药突变 (T215Y), 又含有 TAMs-2 型耐药突变



注: X:代表 1 个其他位点突变; XX:代表 2 个其他位点突变; O:没有携带 M41L、D67N、K70R 和 T215Y 突变的克隆

图4 患者 3 历次克隆序列中携带各种 HIV-1 NRTI 类耐药基因突变的构成图谱



注: S:敏感株; O:携带其他突变 (D67N、K70R、K219Q 或 T215Y 突变之外的突变) 的克隆

图5 患者 4 历次克隆序列中携带各种 HIV-1 NRTI 类耐药基因突变的构成图谱

### 讨论

AZT 是第一个发明的抗反转录病毒药物<sup>[5]</sup>, 于 1987 年 3 月批准用于临床, Larder 等<sup>[6]</sup>首先认识到由于耐药使得 AZT 治疗效果下降。在接受 AZT 治疗的患者分离到的 HIV-1 耐药毒株中, 常常出现 41、67、70、210、215 和 219 位点的突变, 这类突变被称为 TAMs<sup>[7]</sup>。Hanna 等<sup>[8]</sup>以接受 AZT、ddI 和 AZT、ddI、NVP 治疗方案的人群为研究对象, 对 NRTI 类耐药基因突变中发生突变的各个位点的相关性进行了分析, 认为 TAMs 突变可分为两条通路: 一条与 T215Y 突变有关 (包括 M41L、L210W、T215Y 和 E44D), 称为 TAMs-1; 另一类与 T215F 突变有关 (包括 D67N、K70R、T215F 和 K219Q), 称为 TAMs-2。

Hanna 等<sup>[8]</sup>和 Boucher 等<sup>[9]</sup>认为在 TAMs-1 通路中,最初出现的突变是 T215Y,随后是 M41L 和 L210W,之后再在此基础上逐级积累 1~3 个其他突变密码子。本研究从患者 1 历次克隆分析结果可以看出,是 TAMs-1 型耐药突变:首先出现 L210W、T215Y 突变,进一步演变为 M41L、L210W、T215Y,再在此基础上逐级增加 1 个、2 个和 3 个下列位点的突变:44、67、70、74、118、151、184、219,治疗 33 个月时耐药突变位点最多达到 6 个。该患者 NRTI 类耐药的选择动力学发生发展的特点与报道的 TAMs-1 型通路基本一致<sup>[7-9]</sup>。

至于 TAMs-2 通路,很多研究认为 K70R 突变通常是反转录酶在 AZT 治疗过程中最先出现的基因突变<sup>[8,9]</sup>。尽管这个突变只会造成 AZT 敏感性中等程度的降低( $IC_{50}$  提高 8 倍左右),但在 AZT 单药或两药治疗后会被快速选择出来,并且随着 215 位点突变的出现和增加,K70R 突变逐渐消失<sup>[10,11]</sup>,随着治疗继续进行,在一些个体中,K70R 会重新出现<sup>[9]</sup>。本研究中患者 2 NRTI 类耐药基因突变的发生发展过程比较稳定而单一,呈现出 TAMs-2 型耐药突变特点:首先快速出现 D67N、K70R 突变,之后逐步发展为 D67N、K70R、K219Q 突变,并少量增加 E44G、A62V、T69A 或 M184I 等耐药突变。但是,该患者治疗 12 个月时大量出现的 T215Y 突变在之前和之后的检测中均未发现。

在 de Jong 等<sup>[10]</sup>的研究中发现治疗早期有 K70R 出现,之后由 T215Y 突变取代,没有发现 T215F 突变。本研究同样没有发现 T215F 突变。患者 3 NRTI 类耐药基因突变的发生发展较为复杂,特点是既有 TAMs-1 型突变克隆,也有 TAMs-2 型突变克隆。一个引人注目的现象是患者 3 有些克隆中同时存在 D67N、K70R (TAMs-2 型)与 M41L、T215Y (TAMs-1 型)突变,患者 4 也有这种克隆出现。这种在同一个克隆中 TAMs-1 型主要突变 (T215Y 或 T215Y、M41L) 和 TAMs-2 型主要突变 (K70R、D67N 或 K70R、D67N、K219Q) 同时出现的情况,以往文献中报道得较少,我们将其称作 TAMs-1/TAMs-2 融合型。Hanna 等<sup>[8]</sup>还认为有些突变组合不太稳定,如 215Y/219Q、215T/219Q 或 215F/219Q 通常会发展为 215F/219Q,本研究患者 4 治疗 33 个月时出现 K70R/D67N/K219Q + T215Y 突变组合 (9/42, 21.4%),患者 4 会不会发展为 215F/219Q 突变组合尚需进一步观察。

AZT 和 ddI 联合使用会出现一系列突变: A62V、V75I、F77L、F116Y 和 Q151M<sup>[12]</sup>,被称为 Q151M 突变复合体,可以导致对 AZT、ddI、ABC、d4T 的高水平耐药。该复合体在 AZT 或 ddI 单独治疗的患者体内不会出现<sup>[13]</sup>,其耐药机制与选择性降低类似物结合到 DNA 的催化反应常数有关<sup>[14-16]</sup>。Iversen 等<sup>[13]</sup>对这一系列突变中单个突变和各种不同组合的突变均进行了详细的表型分析,2-4 年的观察表明,在多药耐药中,这些突变可能是顺序出现并且逐渐累积,其中 Q151→M 突变首先出现且作用最为关键。V75I、F77L 和 F116Y 自身不会影响对药物的敏感性,但是加上 Q151M 后会促进对 AZT、ddI、ddC 和 d4T 的耐药。以往研究表明在接受抗反转录病毒治疗的患者中,Q151M 突变复合体的发生频率较 TAMs 突变低<sup>[17]</sup>,在本研究中这类突变发生的频率普遍较低,特别是没有发现典型的 Q151M 突变复合体。Q151M 发生率低的原因可能是该突变需要改变 2 个碱基 (CAG→ATG),与只需要改变一个碱基的突变相比,其发生率要低一些<sup>[11]</sup>。此外,Q151M 突变复合体按顺序累加的现象在本研究中并未出现,在本研究中各个突变位点多是单独出现或累加到 TAMs 突变群或其他非典型突变组合上,并没有出现典型的 Q151M 突变复合体组合。患者 2 和患者 4 在治疗 3 个月时发现 151 位点的突变,同时还发现 116 和/或 62 等位点的突变;在患者 1 和患者 3 中,116 和/或 62 位点突变的出现早于 151 位点突变,这提示不排除 116 位点可能是 Q151M 突变复合体中最先出现的突变。

有研究认为 M41L 和 T215Y 联合出现可以对 AZT  $IC_{50}$  增加 60 倍,并加速疾病进程和/或死亡发生。本研究也发现 M41L 对 T215Y 有着至关重要的作用。M41L 的出现能够稳定 T215Y 的存在。如在患者 1、3、4 中,M41L 都在治疗早期出现,保证了 T215Y 在基因组中长期存在,并进一步发展。而患者 2 中,M41L 自始至终没有出现,尽管 T215Y 在治疗 12 个月时已是所有克隆中数量最多的耐药突变,但最终被 D67N、K70R 完全取代。而且 M41L 的出现还对 NRTIs 突变类型的选择起着决定性的作用,M41L 出现时常常发展为 TAMs-1 型突变,M41L 不出现时往往发展为 TAMs-2 型突变。

这 4 例患者,从历次病毒载量的变化来看,在治疗初期都出现了不同程度的下降(除患者 3 外),表明在治疗开始时病毒得到抑制,取得较好的治疗效

果。但治疗 15~21 个月以后所有患者的病毒载量出现反弹,患者 1、3、4 治疗 33 个月时,病毒载量均高于治疗 3 个月的水平。病毒载量的上升和耐药性出现的时间吻合。一般认为对于产生耐药性的个体来说,耐药毒株在治疗前就存在于感染者体内。抗病毒治疗开始后,在持续的抗病毒药物的选择压力下,敏感毒株被抑制,耐药株趁机大量繁衍而成为优势株,从而导致治疗失败。本研究采用克隆测序方法研究 4 例艾滋病患者 NRTI 类耐药基因突变发生的选择动力学特征。这 4 例患者在治疗早期标准基因型检测均为敏感型,而采用 RT 基因克隆测序分析却检测到这些样本中某些克隆已经携带数量不等的耐药突变,说明采用克隆测序方法有助于耐药突变的早期筛选,在治疗初期即可将典型 NRTI 类耐药突变位点筛选出来。在治疗早期除了典型耐药突变,还不同程度存在非典型耐药突变,这种现象可能是由于药物选择压力迫使敏感株首先发生基因屏障较低的非典型耐药突变,再逐步过渡到典型突变。克隆分析可清除地看出,随着治疗时间的延长,突变图谱由简单逐渐变得复杂,优势克隆携带的突变位点的数目逐渐增多。本研究中 4 例患者的 NRTI 类耐药基因突变以 TAMs 突变为主,要么以 TAMs-1 模式为主,要么以 TAMs-2 模式为主,还有两者同时发生发展,在长期的抗病毒过程形成 TAMs-1/TAMs-2 融合型的复杂耐药突变模式,并且该类突变表现出逐级累加的趋势,而最先筛选出来的耐药突变往往可以把优势保留到最后(除患者 4 外)。

本研究存在的一个缺憾在于没有采集到治疗前的血浆样本及相关资料,因此无法观察早期耐药出现的情况。

#### 参 考 文 献

- [1] Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*, 1995, 267 (5197): 483-489.
- [2] Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, et al. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, 1996, 271(5255): 1582-1586.
- [3] Parikh UM, Bachelier L, Koontz D, et al. The K65R mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase exhibits bidirectional phenotypic antagonism with thymidine analog mutations. *J Virol*, 2006, 80(10): 4971-4977.
- [4] Joly V, Descamps D, Peytavin G, et al. Evolution of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) resistance mutations in nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in HIV-1-infected patients switched to antiretroviral therapy without NNRTIs. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(1): 172-175.
- [5] Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(20): 7096-7100.
- [6] Larder BA, Darby G, Richman DD. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science*, 1989, 243(4899): 1731-1734.
- [7] Marcelin AG, Delaunay C, Wirden M, et al. Thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors resistance mutations profiles and association to other nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations observed in the context of virological failure. *J Med Virol*, 2004, 72(1): 162-165.
- [8] Hanna GJ, Johnson VA, Kuritzkes DR, et al. Patterns of resistance mutations selected by treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection with zidovudine, didanosine, and nevirapine. *J Infect Dis*, 2000, 181(3): 904-911.
- [9] Boucher CA, O'Sullivan E, Mulder JW, et al. Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects. *J Infect Dis*, 1992, 165 (1): 105-110.
- [10] de Jong MD, Veenstra J, Stilianakis NI, et al. Host-parasite dynamics and outgrowth of virus containing a single K70R amino acid change in reverse transcriptase are responsible for the loss of human immunodeficiency virus type 1 RNA load suppression by zidovudine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(11): 5501-5506.
- [11] Kuritzkes DR, Quinn JB, Benoit SL, et al. Drug resistance and virologic response in NUCA 3001, a randomized trial of lamivudine (3TC) versus zidovudine (ZDV) versus ZDV plus 3TC in previously untreated patients. *AIDS*, 1996, 10(9): 975-981.
- [12] Shirasaka T, Kavlick MF, Ueno T, et al. Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(6): 2398-2402.
- [13] Iversen AK, Shafer RW, Wehrly K, et al. Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *J Virol*, 1996, 70(2): 1086-1090.
- [14] Deval J, Selmi B, Boretto J, et al. The molecular mechanism of multidrug resistance by the Q151M human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and its suppression using alpha-boranophosphate nucleotide analogues. *J Biol Chem*, 2002, 277 (44): 42097-42104.
- [15] Ray AS, Basavapathruni A, Anderson KS. Mechanistic studies to understand the progressive development of resistance in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase to abacavir. *J Biol Chem*, 2002, 277(43): 40479-40490.
- [16] Jeffrey JL, Feng JY, Qi CC, et al. Dioxolane guanosine 5'-triphosphate, an alternative substrate inhibitor of wild-type and mutant HIV-1 reverse transcriptase. Steady state and pre-steady state kinetic analyses. *J Biol Chem*, 2003, 278(21): 18971-18979.
- [17] Kosalaraksa P, Kavlick MF, Maroun V, et al. Comparative fitness of multi-dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in an *In vitro* competitive HIV-1 replication assay. *J Virol*, 1999, 73(7): 5356-5363.

(收稿日期: 2008-02-01)

(本文编辑: 尹廉)