

HIV-1 B'亚型毒株新型耐药相关突变位点的筛选

李韩平 郭伟 刘永健 鲍作义 李林 庄道民 刘思扬 王铮 王晓林 李敬云

【摘要】 目的 筛选HIV-1 B'亚型病毒株中可能存在的新型耐药相关突变位点。方法 收集整理前期研究获得的451条HIV-1 B'亚型pol区基因序列,序列含蛋白酶全长(1~99个密码子)和反转录酶全长(1~560个密码子),长度约1977 bp。将354条来自接受抗病毒治疗艾滋病患者的(服药组)序列与97条来自未接受治疗患者的(未服药组)序列,分别与B亚型野生型pol基因共享序列进行逐个密码子比对,筛选在服药组序列中出现的频率显著高于未服药组序列的突变位点,将筛选出来的突变位点在斯坦福大学HIV-1耐药数据库中检索,根据数据库收录的情况及解释,初步分析突变与耐药的关系。结果 在服药组序列中反转录酶区有6个位点7个突变的频率显著高于未服药组,分别是D123E、V292I、K366R、T369A、T369V、A371V和I375V,即前2个突变位于反转录酶的聚合酶区、后5个突变位于反转录酶的连接区。检索数据库收录情况,有7个突变均为相应位点的主要变异形式,在服药患者中出现的频率显著高于未服药患者。结论 筛选出的HIV-1 B'亚型病毒株7个突变可能与耐药有关。

【关键词】 HIV-1; B'亚型; 新型耐药突变

Screening program on novel drug resistance mutations of subtype B' in human immunodeficiency virus type 1 in China LI Han-ping, GUO Wei, LIU Yong-jian, BAO Zuo-yi, LI Lin, ZHUANG Dao-min, LIU Si-yang, WANG Zheng, WANG Xiao-lin, LI Jing-yun. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China

Corresponding author: LI Jing-yun, Email: lijy@nic.bmi.an.cn

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30830088, 30800938) and the National Science and Technology Support Projects for the "Eleventh Five-Year Plan" of China (No. 2008ZX10001-004, 2008ZX10001-013).

【Abstract】 Objective To screen the level of novel drug resistance mutations in subtype B' in China. **Methods** 451 pol sequences collected from the previous study, which including 354 AIDS patients who had received antiretroviral treatment (ART) and 97 the untreated patients. Entire protease gene (codons 1-99) and full-length reverse transcriptase gene (codons 1-560) were included. Variation of mutations between the treated and the untreated patients with consensus/ancestral sequences were compared and the mutations with higher frequencies in the treated patients than in the untreated patients were screened before submitting the mutations to the Stanford HIV Drug Resistance Database (SHDB) (<http://hivdb.stanford.edu/>). Relation between the mutations and resistance preliminarily was then analyzed, according to the information including SHDB. **Results** Frequencies of 7 mutations at 6 positions, D123E, V292I, K366R, T369A, T369V, A371V and I375V, 2 at DNA polymerase domain and 5 at connection domain of reverse transcriptase (RT) were higher in the treated patients than in the untreated patients. The information of 7 mutations including the SHDB showed that 7 mutations were major variants at corresponding positions, and theirs frequencies were higher in the treated patients using some drugs, than in the untreated patients. **Conclusion** 7 mutations being screened from the China subtype B were possibly associated with the resistance, which called for the construction of mutated viruses by site-directed mutagenesis to identify their effects on the susceptibility of different drugs.

【Key words】 HIV-1; Subtype B'; Novel resistance mutations

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.05.018

基金项目:国家自然科学基金(30830088, 30800938);“十一五”国家科技重大专项(2008ZX10001-004, 2008ZX10001-013)

作者单位:100071 北京, 军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室

通信作者:李敬云, Email: lijy@nic.bmi.an.cn

HIV-1 具有高度变异性, 大约每合成 10 000 ~ 30 000 个核酸就会产生一次碱基错配^[1], 而 HIV-1 的基因组大约有 10 000 个碱基, 因此每产生一个新的病毒基因组, 在反转录过程中就会产生一个突变^[2]; 此外在抗病毒治疗过程中, 药物压力使病毒发生耐药性突变, 导致病毒对药物的敏感性下降, 严重影响艾滋病抗病毒治疗的效果。目前已确定与 6 类艾滋病抗病毒药物有关的 HIV 耐药突变有 138 多个^[3-6]。

B' 亚型是我国广泛流行的 HIV-1 毒株之一, 也是我国中部农村地区通过血液途径感染 HIV 的主要毒株类型。在 2003 年该地区艾滋病患者已开始了国家免费抗病毒治疗。目前已知的 HIV-1 耐药突变位点都是基于国外人群研究而发现的, 我国人群特有的长期治疗是否存在未被认识的新型耐药相关突变位点还不得而知, 为此本研究通过对接受与未接受抗病毒治疗艾滋病患者的病毒基因序列比较, 筛选并初步鉴定新型耐药相关突变位点。

对象与方法

1. HIV-1 pol 基因序列及其来源: 本实验室通过对河南、河北、广东、山东、甘肃、北京、广西、宁夏等地部分接受和未接受抗病毒治疗的艾滋病患者进行耐药毒株流行监测而获得的 451 条 HIV-1 B' 亚型 pol 基因区序列, 包含 HIV-1 蛋白酶全基因(1 ~ 99 个密码子)及反转录酶全基因(1 ~ 560 个密码子)序列, 长度约 1977 bp。其中来自接受抗病毒治疗(治疗方案主要是 AZT/DDI/NVP)患者的序列(服药组序列)354 条, 来自未接受抗病毒治疗患者的序列(未服药组序列)97 条。使用 Cexpress.exe 程序对序列进行拼接和编辑。

2. 耐药相关突变位点的筛选: 首先以 HIV Database 数据库中的 Ref 08-pol 毒株为参考序列, 确认 pol 基因序列为 B' 亚型。根据分型的结果, 从 <http://www.hiv.lanl.gov> 数据库检索并下载野生型 HIV-1 B' 亚型 pol 区基因共享序列(consensus/ancestral sequence)。将 354 条服药组序列和 97 条未服药组序列分别产生的共享序列与 B 亚型毒株共享序列进行逐个密码子比对, 计算两组序列各个密码子突变的频率并进行 χ^2 检验, 筛选在服药组序列中出现的频率显著高于未服药组序列的突变位点。如果未服药组序列中某一与共享序列不同的氨基酸位点所占比例 > 1%, 则认为此位点为多态性; 如某一位点特定氨基酸的比例 > 50%, 则认为此位点为

HIV-1 毒株在该位点所固有的氨基酸^[7,8]。

3. 耐药突变位点的初步鉴定: 将筛选出的突变位点在斯坦福大学 HIV-1 耐药数据库(Stanford HIV Drug Resistance Database, SHDB, <http://hivdb.stanford.edu/>)中检索, 检查数据库收录的情况及解释, 初步分析突变与耐药的关系。

结 果

1. HIV B' 亚型毒株多态性: 比较 B 亚型毒株共享序列与 B' 亚型毒株共享序列蛋白酶与反转录酶基因序列(图 1、2), 未服药组中蛋白酶区主要多态性突变位点为 E35D(79.0%)、L63P(93.0%)、I72V(76.0%)、V77I(98.0%)和 I93L(93.0%), 其他突变为 T12P(10.0%)、T12A(9.0%)、K14R(8.0%)、I15V(5.0%)、L19V(10.0%)、M36I(5.0%)、R41K(12.0%)、I62V(29.0%)、L63S(12.0%)、A71T(19.0%)、A71V(20.0%)、I72E(20.0%); 反转录酶区多态性突变位点为 I135V(82.46%)、S162C(95.61%)、T200A(78.95%)、K277R(80.70%)、Q278E(97.37%)、Q334L(93.86%)、F346Y(89.47%)、V417T(76.32%)、V435E(85.96%)、D460N(90.35%)、R461K(94.74%)、S468T(94.74%)、L491V(55.26%)、V548I(78.85%), 其他发生频率在 10% 以上的突变有 R211G(13.16%)、R211K(18.42%)、V245E(14.91%)、V276I(11.40%)、I293V(46.69%)、K311R(10.53%)、P345Q(15.79%)、I411V(13.16%)、N447S(24.56%)、H483Y(23.68%)、L491A(28.07%)、A554S(23.47%)、A554T(11.22%)、K558R(11.46%)、V559S(23.47%)、V559T(11.22%)。

蛋白酶区突变 E35D、L63P、I72V、V77I 和 I93L 与反转录酶区多态性突变位点为 I135V、S162C、T200A、K277R、Q278E、Q334L、F346Y、V417T、V435E、D460N、R461K、S468T、L491V、V548I 不同于共享序列 B, 且突变发生率 > 50%, 因此可以推测上述突变氨基酸为 B' 亚型毒株固有氨基酸。

2. 蛋白酶和反转录酶区密码子的比较: 比较服药组与未服药组患者蛋白全长基因的序列, 通过逐个密码子比对, 在两组序列中 HIV-1 蛋白酶基因 99 个密码子突变频率的差异均无统计学意义。

比较两组患者反转录酶基因的 560 个密码子, 筛选出 16 个服药序列发生频率显著高于未服药序列的突变位点(表 1), 其中 M41L、D67N、K70R、K103N、Y181C、M184V、T215Y、L283I、N348I 是已明确的 9 个核苷类反转录酶抑制剂(NRTIs)和非核苷类反转录酶抑制剂(NNRTIs)耐药突变, 其他 6 个

图1 HIV-1 B'亚型蛋白酶区共享序列与B亚型共享序列差异性氨基酸比较

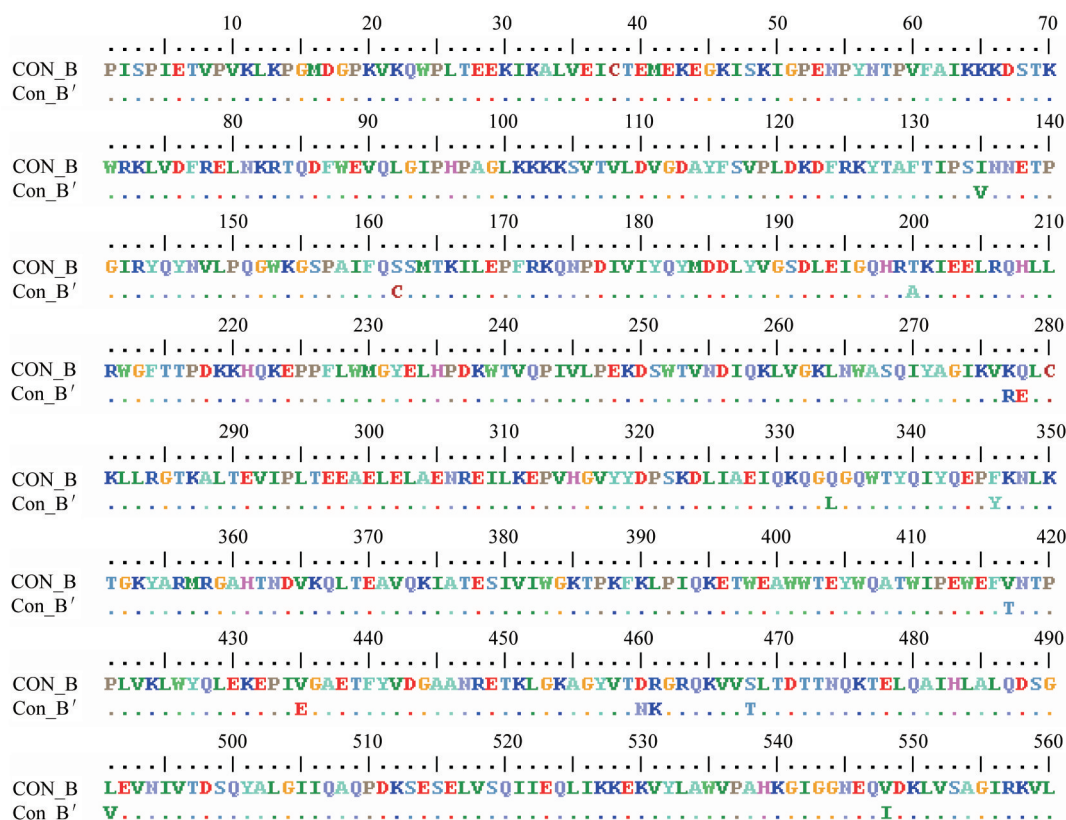


图2 HIV-1 B'亚型反转录区共享序列与B亚型共享序列差异性氨基酸比较

表1 16个服药患者序列的发生频率显著高于未服药患者序列的突变位点

密码子	野生型氨基酸	突变型氨基酸	发生频率(%)		χ^2 值	P值	解释
			未服药组	服药组			
41	M	L	2.63	10.56	5.10	<0.05	耐药突变
67	D	N	0	8.04	6.42	<0.05	耐药突变
70	K	R	0	5.78	4.07	<0.05	耐药突变
103	K	N	6.14	20.71	9.13	<0.01	耐药突变
123	D	E	0	7.88	6.25	<0.05	不明确
181	Y	C	2.63	13.43	7.90	<0.01	耐药突变
184	M	V	0.88	10.19	8.29	<0.01	耐药突变
215	T	Y	1.75	14.12	10.47	<0.01	耐药突变
283	L	I	0	26.33	30.32	<0.01	耐药突变
292	V	I	0	5.71	4.00	<0.05	不明确
348	N	I	0	5.91	4.20	<0.05	耐药突变
366	K	R	0	21.74	24.39	<0.01	不明确
369	T	A	0	8.30	6.70	<0.01	不明确
369	T	V	0	7.51	5.86	<0.05	不明确
371	A	V	0	5.93	4.22	<0.05	不明确
375	I	V	0	7.20	5.54	<0.05	不明确

位点的7个突变(D123E、V292I、K366R、T369A、T369V、A371V、I375V)对药物敏感性的影响暂不明确。

3. 突变位点在数据库中检索及初步鉴定:分析筛选出的7个突变,其中D123E、V292I位于反转录聚合酶区, K366R、T369A、T369V、A371V和I375V位于反转录酶链接区(图3)。对上述位点在美国斯坦福大学HIV耐药数据库进行检索,根据收录的情况初步分析突变与耐药的关系。

首先检索筛选出来的HIV-1反转录酶的6个密码子位点(D123、V292、K366、T369、A371、I375)的变异情况(表2)。收录的数据显示, D123位点有12种氨基酸替换,其中D123E占总数的39.0%; V292位点有8种氨基酸替换, V292I占总数的99.0%; K366位点仅检出2种氨基酸替换, K366R占总数的99.0%; T369位点有5种氨基酸替换, T369A和T369V分别占总数的61.0%和34.0%; A371位点有4

注:红色分别代表 7 个耐药相关突变位点,其中连接区 5 个(T369 位有 2 种突变形式),聚合酶区 2 个;蓝色片段代表 α -螺旋;黄色片段代表 β -折叠;连接区和 Rnase H 区已经标出,未标出部分为聚合酶区[由 Molecular Operating Environment(MOE)软件绘制]

图 3 7 个突变位点在反转录酶三级结构上的分布

表 2 6 个密码子位置的突变情况

项 目	密码子位点					
	D123	V292	K366	T369	A371	I375
序列数						
服药组	15 587	6 588	1 053	724	1 756	1 133
未服药组	1 855	641	34	47	78	65
突变频率(%)	E(39.0)	I(99.0)	R(99.0)	A(61.0)	V(96.0)	V(94.0)
	S(33.0)	T(<1.0)	N(<1.0)	V(34.0)	T(3.0)	A(5.0)
	N(17.0)	L(<1.0)	-	I(2.0)	L(1.0)	M(1.0)
	G(10.0)	G(<1.0)	-	S(2.0)	I(<1.0)	T(<1.0)
	T(<1.0)	M(<1.0)	-	P(1.0)	-	L(<1.0)
	K(<1.0)	K(<1.0)	-	-	-	-
	A(<1.0)	R(<1.0)	-	-	-	-
	Q(<1.0)	A(<1.0)	-	-	-	-
	R(<1.0)	-	-	-	-	-
	V(<1.0)	-	-	-	-	-
	H(<1.0)	-	-	-	-	-
	Y(<1.0)	-	-	-	-	-

注:表中的数字代表反转录酶中氨基酸的位置编码,各种突变是指在数据库中收录的相应位置出现过的突变以及每种突变在所有突变中所占的比例

种氨基酸替换,A371V 占总数的 96.0%;I375 位点有 5 种氨基酸替换,I375V 占总数的 94.0%。可见我们筛选出来的突变在数据库中都有收录,而且是相应位点的主要突变形式,其中 V292I、K366R、A371V 和 I375V 占全部突变的 94.0%以上,是相应位点绝对优势的突变形式。

在 SHDB 数据库中检索 6 个位点的 7 个突变(D123E、V292I、K366R、T369A、T369V、A371V、I375V)在两组患者序列中出现的频次,并进行比较(表 3)。D123E 在使用 1 种及以上 NRTI、AZT/有或无 NNRTI、DLV/有或无 NRTIs 三种治疗方案患者中的发生率与未服药患者间的差异有统计学意义,提示 D123E 与对 NRTIs(特别是 AZT)和 DLV 的敏感性有一定关联。V292I 在使用 NVP 及有或无 NRTIs 治疗方案患者中的发生率与未服药患者间的差异有统计学意义,可能与对 NVP 的敏感性有关。K366R 在服用 AZT 及有或无 NNRTIs、EFV 和有或无 NRTIs 方案患者中的发生率与未服药患者间的差异有统计学意义,提示与对 AZT 和 EFV 的敏感性有一定关联。T369V 在使用 1 种及以上 NNRTIs/有或无 NRTIs、NVP/有或无 NRTIs、EFV/有或无 NRTIs 三种方案患者中出现的频率均显著高于未服药患者,可能与对 NRTIs 和 NNRTIs 的敏感性有一定关联。A371V 在使用 EFV/有或无 NRTIs 方案患者中出现的频率显著高于未服药患者,提示与 EFV 的服用有一定关联。I375V 在服用 NVP/有或无 NRTIs 方案的患者中与未服药患者间的差异有统计学意义,可能与服用 NVP 有关。

讨 论

HIV-1 的反转录酶为不对称二聚体,由一个 51 KD 的亚单位(p51)和一个 66 KD 的亚单位(p66)组成。具有催化活性的 p66 亚基由聚合酶区(1~

表 3 7 种突变在各种序列中出现的频率

药物	D123E			V292I			K366R			T369A			T369V			A371V			I375V		
	S	M	MR	S	M	MR	S	M	MR	S	M	MR	S	M	MR	S	M	MR	S	M	MR
0	0	19 576	3266 16.6	9349	4412 47.1	2923	614 21.0	2907	315 10.8	2907	107 3.6	2903	918 31.6	2898	706 24.3						
≥1	0	4 832	1051 21.7°	2218	524 23.6	566	135 23.8	561	41 7.3	561	16 2.8	560	169 30.1	560	86 15.3						
≥0	≥1	7 956	1387 17.4	4489	1629 36.2	1674	253 15.1	1656	86 5.1	1656	112 6.7°	1649	551 33.4	1650	241 14.6						
AZT	≥0	430	118 27.4°	172	48 27.9	115	34 29.5°	115	5 4.3	115	4 3.4	115	33 28.6	115	12 10.4						
DDI	≥0	49	9 18.3	17	5 29.4	1	0 0.0	1	0 0.0	1	0 0.0	1	0 0.0	1	0 0.0						
D4T	≥0	55	10 18.1	25	8 32.0	16	4 25.0	16	0 0.0	16	1 6.2	16	1 6.2	16	1 6.2						
ABC	≥0	45	12 26.6	0	0 0.0	0	0 0.0	0	0 0.0	0	0 0.0	0	0 0.0	0	0 0.0						
≥0	NVP	2 450	259 10.5	1685	895 53.1°	161	29 18.0	151	11 7.2	151	14 9.2°	146	57 39.0	146	47 32.1°						
≥0	EFV	1 575	264 16.7	926	440 47.5	68	27 39.7°	63	4 6.3	63	7 11.1°	62	49 79.0°	62	21 33.8						
≥0	DLV	158	38 24.0	90	3 3.3	33	3 9.0	33	1 3.0	33	1 3.0	33	4 12.1	33	2 6.0						

注:数据源自斯坦福大学耐药数据库(Stanford HIV Drug Resistance Database,SHDB)(http://hivdb.stanford.edu/);S:序列(sequence)数;M:突变(mutation)数;MR:突变率(%);°为经 χ^2 检验且经 Yate 校正,差异有统计学意义($P < 0.05$),服用相应治疗方案药物的患者与未服药患者间该突变位点出现频率的差异有统计学意义,提示该突变位点可能与服药有关

315aa)、连接区(316~437aaa)和核糖核酸酶H区(438~560aa)组成。聚合酶区可以被细分为p51指结构域(fingers)、掌结构域(palm)和拇指结构域(thumb)3个亚结构域。目前发现的NRTIs耐药突变位点主要位于具有反转录酶催化活性的palm结构域和促使RNA模板进入反转录酶催化位点的fingers结构域,NNRTIs突变位点主要位于palm结构域。以往HIV-1耐药性研究主要针对具有催化活性的聚合酶区,通常使用的HIV-1基因型耐药检测方法主要分析反转录酶基因前240位氨基酸。近几年,在反转录酶区催化活性以外的区域,特别是在连接区发现了一些新型耐药突变位点。Nikolenko等^[6]于2007年初在连接区发现耐药突变位点E312Q、G335C/D、N348I、A360I/V、V365I和A376S导致AZT一定程度的耐药;同年Yap等^[4]确定了N348I具有对AZT的低度耐药性,与TAMs突变共同出现时可以增加对AZT的耐药性;Brehm等^[5]也发现连接区的A371V与TAMs突变位点同时存在时,可增强对AZT的耐药性(约增强10倍)。可见,反转录酶连接区的耐药突变主要通过TAMs突变的协同作用而增加耐药程度。

已知HIV病毒株中,未治疗人群的蛋白酶区75%突变为自然发生的多态性突变,其中L10I/V/R、K20R/I、M36I、L63P/S/T、A71T/V、V77I、V82A/T/S/F和I93L被定义为次要耐药突变。M36I与其他突变位点同时出现时蛋白酶抑制剂影响也很微弱,并且体外实验表明在无药物选择压力情况下含有M36I的病毒株复制速度超过野生型病毒株,在有药物压力的情况下K20I和或M36I能增加毒株的复制适应性。M36I(5.0%)、L10I(3.0%)、K20R(1.0%)、L63T(3.0%)、L63S(12.0%)、L63C(1.0%)在未治疗人群中都有发生,蛋白酶区其他一些已报道的次要突变,如K70N(2.0%)在B'亚型毒株中也有发现。而在B'亚型毒株中,突变E35D(79.0%)、L63P(93.0%)、I72V(76.0%)、V77I(98.0%)和I93L(93.0%)发生概率较高,显著不同于B亚型毒株共享序列,故可能为该亚型毒株固有氨基酸。上述研究结果与已有研究结果相一致^[8]。本研究分析了反转录酶区的氨基酸多态性,其中发生频率在10%以上的多态性突变有R211G、R211K、V245E、V276I、I293V、K311R、P345Q、I411V、N447S、H483Y、L491A、A554S、A554T、K558R、V559S、V559T,而发生频率在50%以上的突变包括I135V、S162C、T200A、K277R、Q278E、Q334L、F346Y、V417T、V435E、D460N、R461K、S468T、L491V、V548I,这些发生概率较高的

突变位点可能是该病毒株的固有氨基酸序列。

本研究通过对354条来自服药患者和97条来自未服药患者的蛋白酶和反转录酶基因全长序列的比较,在反转录酶基因筛选出在服药患者中出现的频率显著高于未服药患者6个位点的7个突变,未发现蛋白酶区的相关突变,与患者未使用蛋白酶抑制剂有关。检索数据库收录的情况,发现7个突变均为相应位点的主要变异形式,在服用某些药物患者中出现的频率显著高于未服药患者,可能与服药及对药物的敏感性有关。

需要注意的是,斯坦福大学HIV耐药数据库收录的未治疗患者的序列约有50%属于非B亚型,而本研究的pol基因序列全部为B'亚型,可能出现对突变数据库检索结果的偏差。本研究筛选的7个突变位点中有2个位于DNA聚合酶区(D123E和V292I)、5个位于连接区(K366R、T369A、T369V、A371V和I375V),推测位于连接区的突变可能与该区域已确定的其他耐药突变一样,通过与TAMs突变的协同作用导致耐药性增加。今后将通过定点诱变构建含有相应突变的病毒及测定对药物的敏感性,进一步鉴定突变对耐药的作用。

参 考 文 献

- [1] Siliciano RF. Scientific rationale for antiretroviral therapy in 2005: viral reservoirs and resistance evolution. *Top HIV Med*, 2005, 13(3):96-100.
- [2] Mansky LM, Temin HM. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol*, 1995, 69(8):5087-5094.
- [3] Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*, 2009, 4(3):e4724.
- [4] Yap SH, Sheen CW, Fahey J, et al. N348I in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase confers zidovudine and nevirapine resistance. *PLoS Med*, 2007, 4(12):1887-1899.
- [5] Brehm JH, Koontz D, Meteer JD, et al. Selection of mutations in the connection and RNase H domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that increase resistance to 3'-azido-3'-dideoxythymidine. *J Virol*, 2007, 81(15):7852-7859.
- [6] Nikolenko GN, Delviks-Frankenberry KA, Palmer S, et al. Mutations in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase increase 3' - azido -3' -dideoxythymidine resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(1):317-322.
- [7] Kantor R, Katzenstein D. Polymorphism in HIV-1 non-subtype B protease and reverse transcriptase and its potential impact on drug susceptibility and drug resistance evolution. *AIDS Rev*, 2003, 5(1):25-35.
- [8] Jiang SL, Xing H, Si XF, et al. Polymorphism of the protease and reverse transcriptase and drug resistance mutation patterns of HIV-1 subtype B prevailing in China. *J AIDS*, 2006, 42(4):512-514.

(收稿日期:2011-01-28)

(本文编辑:张林东)