

· 实验研究 ·

河南省 45 例未经治疗的艾滋病患者蛋白酶和逆转录酶基因型耐药性检测与系统发生分析

杨坤 李敬云 鲍作义 李韩平 李林 庄道民 王哲 李宏

【摘要】 目的 了解河南省部分未经抗病毒治疗的艾滋病患者蛋白酶和逆转录酶基因耐药性突变发生的频率、类型和临床意义以及系统发生情况。方法 采集河南省 45 例未经抗病毒治疗的艾滋病患者的抗凝全血,分离血浆,用逆转录-聚合酶链反应扩增 *pol* 区蛋白酶基因全序列与逆转录酶基因部分序列并直接进行序列测定,提交 Web 站点 <http://hivdb.stanford.edu> 分析耐药性突变。用 BioEdit 和 DNAClub 软件以及登陆 Web 站点 <http://hiv-web.lanl.gov> 进行系统发生分析。结果 从 36 份血浆标本中扩增出 *pol* 区基因并进行了序列测定。蛋白酶基因耐药性主要突变的发生率是 8.3% (3/36),突变的类型是 D30A、V32A、G73C 和 V82A;次要突变的发生率是 100%,突变的类型为 L63PS(36/36)、I93L(35/36)、V771L(34/36)、A711VT(10/36)和 D60E(2/36)。逆转录酶基因耐药性突变的发生率是 38.9% (14/36)。通过对耐药性突变进行评分,并依据此分值解释其临床意义,提示蛋白酶耐药率为 5.6% (2/36),逆转录酶耐药率为 22.2% (8/36);另有 1 份标本对全部蛋白酶抑制剂、3 份对部分逆转录酶抑制剂潜在低度耐药。系统发生分析显示 36 份标本的 *pol* 区基因与 B. US. 83. RF ACC M17451 的亲缘关系最为接近,且彼此之间具有高度同源性,推测此 36 份标本为同一感染来源,其耐药性突变的发生不是源于耐药株感染,而是病毒在体内进化的结果。结论 河南省未经抗病毒治疗的艾滋病患者多数对现有的抗病毒药物敏感,但抗病毒治疗必须遵守严格的程序并保持较好的依从性,否则极易导致耐药性毒株的流行。

【关键词】 艾滋病病毒; 序列分析; 基因型耐药性

Genotypic antiretroviral resistance testing and phylogenetic analysis of protease and reverse transcriptase in antiretroviral drug-naïve AIDS patients in Henan province YANG Kun*, LI Jing-yun, BAO Zuo-yi, LI Han-ping, LI Lin, ZHUANG Dao-min, WANG Zhe, LI Hong. *Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China*

【Abstract】 **Objective** Frequency, type and clinical implications on protease and reverse transcriptase drug resistance mutations were investigated and phylogenetic analysis in antiretroviral drug-naïve AIDS patients was carried out in Henan province. **Methods** 45 plasma samples were separated from the anticoagulatory whole blood, from which reverse transcription-polymerase chain reaction technique was used to amplify the partial *pol* gene. The sequences were analysed for genotypic antiretroviral resistance and phylogenetic relation through landing the websites <http://hivdb.stanford.edu> and <http://hiv-web.lanl.gov>, under BioEdit and DNAClub software. **Results** Partial *pol* sequences of 36 samples were successfully amplified. The major mutation rate of resistance to protease was 8.3% (3/36), including types D30A, V32A, G73C and V82A. Minor mutation rate of resistance was 100%, including types of L63PS(36/36), I93L(35/36), V771L (34/36), A711VT (10/36) and D60E (2/36). The mutation rate of resistance to reverse transcriptase was 38.9% (14/36). Mutation-scoring and clinical implication clewed drug resistance rates were 5.6% (2/36) and 22.2% (8/36) to protease inhibitors and reverse transcriptase inhibitors respectively, while 1 sample was potentially low-level resistant to all of the protease inhibitors and 3 samples to part of the reverse transcriptase inhibitors. Phylogenetic analysis revealed that the *pol* gene of 36 samples were highly homologous and having a near relative to B. US. 83. RF ACC M17451. 36 samples seemed to have the same infection source while their resistance mutations were not due to drug-resistant virus infection but to the evolving of virus in vivo. **Conclusion** Most of the antiretroviral drug-naïve AIDS patients in

基金项目:卫生部艾滋病防治应用性研究基金资助项目(WA2003-02)

作者单位:100071 北京,军事医学科学院微生物流行病学研究所全军艾滋病检测中心(杨坤、李敬云、鲍作义、李韩平、李林、庄道民);河南省疾病预防控制中心(王哲、李宏)

Henan province were sensitive to the currently available antiviral medicine, but antiviral treatment must be in accordance with the strict procedure and to keep better adherence, to avoid the epidemics caused by drug-resistant virus.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Sequence analysis; Genotypic antiretroviral resistance

高效联合抗病毒治疗(HAART)是治疗艾滋病的有效方法,能够将患者体内的艾滋病病毒(HIV)载量控制在现有方法无法检测的水平(≤ 50 cp/ml),推迟感染的临床进程,有助于患者的免疫重建^[1]。HAART 治疗的效果受多种因素的影响,其中 HIV 的耐药性是导致抗病毒治疗失败的主要原因之一^[2]。由于 HIV-1 基因的高度变异性以及耐药性毒株的传播,未经抗病毒治疗的患者也可能携带耐药性 HIV 毒株。为此我们选取河南省 45 例未经抗病毒治疗的艾滋病患者进行了蛋白酶和逆转录酶的基因型耐药性检测和系统发生分析。

对象与方法

1. 标本来源:45 例艾滋病患者均来自河南省农村,经问卷调查确认未接受过任何抗病毒治疗,主要感染途径为有偿献血,估计感染时间 > 8 年,CD₄⁺T 细胞计数多数介于 100~500 个/mm³(表 1)。于 2001 年 7 月和 2002 年 10 月采集患者的 EDTA 抗凝全血,血浆冻存于 -80℃。2004 年 4-5 月统一进行基因型耐药性检测。

2. 基因型耐药性检测^[3]:操作流程为,扩增目的基因→基因序列测定→检测与耐药相关的基因突变→对突变进行分析→对耐药性作出解释。

3. 血浆中病毒 RNA 的提取:采用德国 Qiagen 公司 QIAamp[®]Viral RNA 分离试剂盒,按照说明书操作。

4. 扩增 HIV 蛋白酶基因全序列和部分逆转录酶基因:

(1) 病毒 RNA 的逆转录(所用试剂均来自 Promega 公司):取 RNA 和随机引物(Random primer 9),70℃ 孵育 5 min,立即冰浴 2 min,然后依次加入 M-MLV 5× buffer, 10 mmol/L dNTPs, M-MLV Reverse, RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor, 37℃ 逆转录 1 h,99℃ 5 min 灭活逆转录酶。即获得 cDNA。

(2) 聚合酶链反应(PCR)引物设计:根据 HIV Sequence Compendium 提供的全基因序列图谱及参考文献[3]的方法,设计合成 2 对引物(表 2),扩增范围是 HIV pol 区蛋白酶基因全序列和逆转录酶

1~238 位密码子序列,扩增长度为 1170 bp。

表 1 艾滋病患者临床和流行病学特征

患者特征*	例数	构成比(%)
性别		
男	12	33.3
女	24	66.7
感染途径		
有偿献血	33	91.7
异性性传播#	3	8.3
首次献血时间		
1990 年之前	14	42.4
1990-1996 年	19	57.6
CD ₄ ⁺ T 细胞计数(个/mm ³)		
≤ 100	1	2.8
101~	16	44.4
301~	11	30.6
> 500	8	22.2
病毒载量 [△] (cp/ml)		
< 20 万	7	63.6
20~万	2	18.2
> 100 万	2	18.2

注:表中数据来自扩增出 pol 区基因的 36 份标本; * 艾滋病患者均为青壮年,平均年龄 37.8 岁,年龄范围从 27~56 岁; # 传播自有献血经历的配偶; △ 检测方法为 NASBA,由于经费限制仅检测了 11 份标本

表 2 扩增使用的引物

引物名称	序 列	位置*
PR-A	5'-CCTAGGAAAAAGGGCTGTGGAAATGTGG	2011~2039
RT-A	5'-AACTTCTGTATGTCATTTGACAGTCCA	3303~3328
PR-B	5'-ACTGAGAGACAGGCTAATTTTTAGGGA	2068~2095
RT-B	5'-CAITTTATCAGGATGGAGTTCATA	3243~3265

* 在 HXB2 参考毒株上的定位

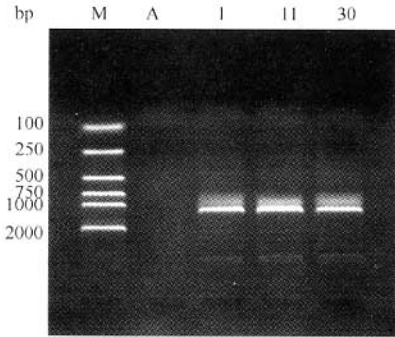
(3) 扩增目的基因片段,采用 Nest-PCR 方法扩增两轮, DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司的高保真 Pyrobest DNA Polymerase: 第一轮 PCR 引物为 PR-A、RT-A, 反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 20 s, 55℃ 20 s, 72℃ 2 min 扩增 35 个循环, 72℃ 延伸 7 min。第二轮 PCR 引物为 PR-B、RT-B。退火温度降为 52℃, 其余反应条件同上。

(4) 目的片段的回收和纯化: PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察确定分子量正确后, 用博大泰克公司的 DNA 片段玻璃奶回收试剂盒纯化。按说明书操作。

5. 序列测定及耐药性分析: 回收的基因片段送上海生工生物技术服务有限公司进行测序, 测序引物为 PR-B 和 RT-B, 将测序结果提交 web 站点 <http://hivdb>。

stanford.edu, 利用其提供的专家系统对基因型耐药性进行分析, 并得到最终的耐药性解释。

结 果



M: DNA Marker(DL2000); A: 阴性对照; 1、11、30 为标本

图1 Nest-PCR 扩增结果电泳图

6. 系统发生分析: 将测序结果用 BioEdit 和 DNAClub 软件进行分析和比较, 并登录 web 站点 <http://hiv-web.lanl.gov>, 利用其提供的在线工具进行系统发生分析。

1. 蛋白酶和逆转录酶的基因型耐药性突变与记分: 45 份标本中共扩增出 36 份 *pol* 区基因, 并进行了耐药性突变的检测。3 份标本中检出对蛋白酶抑制剂的 4 个耐药性主要突变位点, 突变类型是 D30A、V32A、G73C 和 V82A, 其中 1 份标本存在 2 个主要突变位点, 突变率是 8.3% (3/36); 36 份标本均存在对蛋白酶抑制剂的次要突变, 突变率为 100% (36/36)。14 份标本中检出对逆转录酶抑制剂的 17 个耐药性突变位点, 共 25 种突变类型, 突变率是 38.9% (14/36); 针对核苷类逆转录酶抑制剂的突变位点有 11 个, 对非核苷类逆转录酶抑制剂的突变位点有 6 个。另有 1 份标本既存在对蛋白酶的耐药突变, 又有对逆转录酶的耐药突变。全部耐药性突变及其评分见表 3。

2. 人群对抗病毒药物敏感性的评价: 利用

表3 蛋白酶和逆转录酶的耐药性突变与评分

突变分类	突变类型	例数*	突 变 评 分#							
			APV	ATV	IDV	LPV	NFV	RTV	SQV	
蛋白酶抑制剂										
主要突变	D30A	1	0	0	0	0	30	0	0	
	V32A	1	10	2	10	2	2	10	2	
	G73C	1	5	5	5	5	5	5	5	
	V82A	2	10	20	35	18	35	35	10	
次要突变	D60E	2	0	0	0	0	0	0	0	
	L63P	35	2	2	2	2	2	2	2	
	L63S	1	1	1	1	1	1	1	1	
	A71IT	6	2	2	2	2	2	2	2	
	A71V	4	4	4	4	3	4	4	4	
	V77I	33	0	0	1	0	0	0	0	
	V77L	1	0	0	0	0	0	0	0	
	I93L	35	1	1	1	1	1	1	1	
逆转录酶抑制剂	核苷类		3TC	ABC	AZT	D4T	DDC	DDI	FTC	TDF
	M41WN	2	0	0	10	0	0	0	0	0
	E44K	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	A62V	1	0	5	5	5	5	5	0	2
	D67A	1	0	10	12	10	5	5	0	3
	D67E	1	0	10	18	12	5	5	0	5
	T69I	1	5	5	5	5	25	10	5	5
	K70NY	2	0	0	12	0	0	0	0	0
	K70R	1	0	5	18	5	5	5	0	5
	L74V	1	0	25	-8	0	50	50	0	0
	V75K	1	0	5	5	20	10	10	0	0
	L210GF	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	L210W	1	0	12	12	12	10	10	0	12
	T215S	1	0	5	20	10	0	0	0	5
	K219E	1	0	10	18	12	5	5	0	5
	非核苷类		DLV	EFV	NVP					
	L100I	1	40	40	40					
	V106I	2	0	0	0					
	V179D	1	10	10	10					
	Y181I	1	60	20	60					
	Y188H	1	25	25	25					
	P236L	1	50	-10	-10					

* 为检测到的突变类型的数量, 而不是标本数量; # 10 分以下为敏感, 15 分以上为耐药, 分值越高表明耐药性越显著, 负数分值表明突变增强了毒株对药物的敏感性

Stanford 大学 Shafer 教授建立的 HIV 耐药性突变评分表 (mutation-scoring), 依据特定耐药突变的评分, 对耐药性检测结果进行评价^[4,5] (表 4)。

表 4 耐药性突变评分的解释

药物种类	耐药(例数)*				
	敏感	潜在低度	低度	中度	高度
蛋白酶抑制剂					
APV	33	3	N	N	N
ATV	33	3	N	N	N
IDV	33	1	N	2	N
LPV	33	1	N	1	1
NFV	33	1	N	2	N
RTV	33	1	N	2	N
SQV	33	1	2	N	N
逆转录酶抑制剂					
3TC	36	N	N	N	N
ABC	31	2	2	1	N
AZT#	28	3	4	1	N
D4T#	30	3	3	N	N
DDC	32	2	N	1	1
DDI#	32	2	1	N	1
DLV	31	1	1	2	1
EFV	32	1	2	1	N
FTC	36	N	N	N	N
NVP#	32	1	1	1	1
TDF	36	N	N	N	N

注: N 代表无; * 针对每种抗病毒药物的例数, 多重耐药与交叉耐药的情况未在表中体现, 见文中; # 我国目前免费发放的药物

36 份标本中对 3 种蛋白酶抑制剂 IDV、NFV 和 RTV 具有中度以上耐药性的有 2 份。其中 7 号标本对 IDV、NFV 和 RTV 中度耐药; 4 号标本在对 NFV 高度耐药、对 IDV 和 RTV 中度耐药的同时, 还对逆转录酶抑制剂 AZT/DLV/EFV 和 NVP 中度耐药; 4 与 7 号标本都对 APV/ATV/LPV 和 SQV 低度耐药; 20 号标本对全部蛋白酶抑制剂均呈潜在低度耐药性。

对逆转录酶抑制剂具有中度以上耐药性的标本有 5 份, 其中 14 号标本对 DLV 和 NVP, 18 号对 DDC 和 DDI 高度耐药; 1 号标本对 DDC、18 号标本对 ABC 中度耐药。3 号标本存在的 P236L 突变评分为 DLV(50), EFV(-10), NVP(-10), 提示其在对 DLV 中度耐药的同时, 还增强了对 EFV 和 NVP 的敏感性。16 号、21 号和 31 号标本的 V106I 和 L210GF 突变评分均为 0 分, 说明其单独存在不影响耐药性。

依据耐药性解释, 蛋白酶与逆转录酶耐药率分别为 5.6% (2/36) 和 22.2% (8/36)。36 份标本中多数对抗病毒药物敏感, 对我国目前免费发放的 4 种抗病毒药物敏感性也比较高, 提示目前在我国使用这些药物对艾滋病患者进行抗病毒治疗是可行的。

3. *pol* 区基因的系统发生分析: 以 outgroup = 02HNsc11/B/CN/2002/HIV-1 (GenBank No. AY275556);

Ts:Tv = 1.7。建立系统发生树^[6] (图 2)。

从图中可以看出 36 份标本的 HIV-1 *pol* 区基因均由一枝进化而来, 与毒株 B. US. 83. RF ACC M17451 的亲缘关系最为接近。所有标本具有较高的系统发生同源性, 提示该 36 份标本的感染可能为同一来源, 耐药性突变的出现可能不是耐药株直接感染所造成, 而是感染后病毒基因在体内逐渐演化的结果。

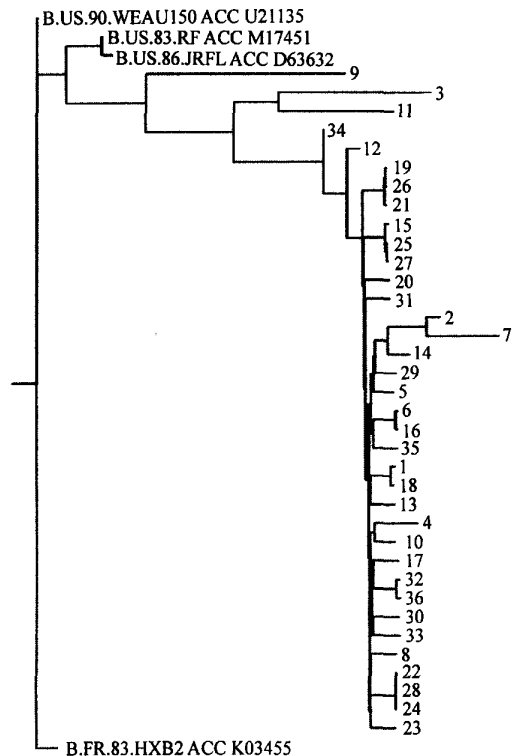


图 2 *pol* 区基因系统发生树

讨 论

HIV 耐药性的出现是病毒基因多样性和治疗过程中药物选择压力共同作用的结果。HIV 感染宿主细胞后, 首先将它的 RNA 逆转录为 cDNA 并整合入宿主细胞的基因组, 然后便开始以 $10^7 \sim 10^8$ 次/天的速度进行着病毒的复制。由于 HIV 逆转录酶缺乏校对功能, 造成复制产物中存在着碱基错配。一般而言, 每一个感染者体内平均有 $10^7 \sim 10^8$ 个的被感染细胞 (140~300 代/年), 所以每天大约产生 10^{10} 个新的病毒颗粒, 尽管只是其中的一部分具有感染性并能够稳定传代, 但由于病毒群体十分庞大, 所以每天至少仍有 10 000~100 000 的子代 HIV 出现单个位点的基因突变^[7]。由于病毒基因的高度变异性和耐药性毒株的传播, 未经抗病毒治疗的艾滋

病患者也可能存在耐药性突变。在欧、美进行的分子流行病学调查发现,在大约 10% 的新感染病例中,能分离出至少对一种药物耐药的 HIV 毒株,甚至从一部分感染者体内分离的毒株,对目前所有的抗病毒药物均存在不同程度的耐药^[7]。我们检测的 36 份未经抗病毒治疗的标本中也发现了 2 份对 7 种蛋白酶抑制剂,8 份对 8 种逆转录酶抑制剂分别存在不同程度的耐药性;其中 4 号标本既对蛋白酶抑制剂(NFV、IDV 和 RTV)耐药,又对逆转录酶抑制剂(AZT、DLV、EFV 和 NVP)耐药。同时我们检测到的蛋白酶耐药突变率为 5.6% (2/36);而逆转录酶耐药突变率为 22.2% (8/36),明显高于同类研究的报道,可能是由于 36 份标本的感染时间都比较长,耐药性突变逐渐积累所致。

HIV 蛋白酶耐药性突变可以分为主要突变和次要突变。前者是指造成 HIV 对不同药物出现耐受的突变,它存在相对特异性,直接影响 HIV 对药物的敏感性,但是携带主要突变的 HIV 毒株在体内外的适应能力(fitness)明显降低;次要突变又称为补偿性突变,其本身并不直接影响病毒对药物的敏感性,它们通常出现在主要突变之前,特异性不强,针对同一种药物往往存在许多共同的次要突变,其主要作用是恢复或提高携带主要突变的突变株的复制能力,有时也增强其耐药性^[8]。本研究中几乎所有的标本都存在对蛋白酶抑制剂耐药的次要突变 L63PS(36/36)、I93L(35/36)和 V77IL(34/36),有 3 份标本存在对蛋白酶抑制剂耐药的主要突变(D30A、V32A、G73C 和 V82A),其中只有 1 份标本对 NFV 高度耐药。

相对于蛋白酶的耐药性来说,HIV 逆转录酶的耐药相关突变较为简单。据文献报道,仅仅逆转录酶基因的点突变就可导致毒株对逆转录酶抑制剂较程度的耐药。例如:单独存在的 M184V 突变即可引起对 3TC 的高度耐药;同时,M184V 突变能够补偿 T215Y 突变引起的对 AZT 的耐药^[9]。本研究中我们未检测到单个点突变造成高度耐药的情况,只是 18 号标本中的 L74V 突变造成了对 DDC 和 DDI 的中度耐药。3 号标本中存在的 P236L 突变造成了对 DLV 中度耐药,也同时增强了病毒对 EFV 和 NVP 的敏感性。4 号(L100I)、5 号(Y188H)、6 号(V179D)和 14 号(Y181I)标本均对非核苷类逆转录酶抑制剂(DLV、EFV 和 NVP)存在不同程度的耐药性。这可能是由于所有的非核苷类逆转录酶抑

制剂作用原理都是结合到逆转录酶上共同的位点,因此发生单点突变的突变株,可能引起药物与逆转录酶间结合的稳定性降低,或由于出现空间位阻以致药物难以结合。结果不仅造成对所用的非核苷类逆转录酶抑制剂,而且对所有该类药物的敏感性均明显降低^[9]。

对 *pol* 区基因进行系统发生分析发现,36 份标本全部属于 HIV-1 B 亚型,而且具有较高的系统发生同源性。据此我们分析这些艾滋病患者可能在相同传播途径的基础上还存在相同的传染源。有文献报道,来自同一传染源的不同感染者,其体内分离的 HIV 毒株存在大约 15% 的基因序列差异^[10]。所以对于 36 份未经抗病毒治疗的标本所检测出来的耐药性差异,我们考虑可能是病毒自身进化的结果,而不是原发性的耐药性毒株直接感染所致。

综合以上结果,可以说河南省大部分艾滋病患者对免费 HAART 治疗方案中的 4 种药物(AZT、D4T、DDI 和 NVP)敏感,但是由于感染时间长及耐药性突变的积累,存在对主要抗病毒药物具有高度耐药性的病例,潜在的耐药性突变则非常普遍,因此抗病毒治疗必须遵守严格的程序并保持较好的依从性,否则极易导致耐药性毒株的大量出现和传播。

参 考 文 献

- 1 Li Ts, Tubiana R, Katlama C, et al. Long-lasting recovery in CD₄ T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet*, 1998, 351:1682-1686.
- 2 Moroni M. Genotypic resistance tests for the management of patients with viro-immunological discordant response to highly active antiretroviral therapy. *Scand J Infect Dis Suppl*, 2003, 106:85-87.
- 3 Puro V. Genotypic resistance tests for the management of postexposure prophylaxis. *Scand J Infect Dis Suppl*, 2003, 106:93-98.
- 4 Shafer RW, Jung DR, Betts BJ, et al. HIV reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28:346-348.
- 5 Shafer RW, Smeaton LM, Robbins GK, et al. Comparison of four-drug regimens and pairs of sequential three-drug regimens as initial therapy for HIV-1 infection. *N Engl J Med*, 2003, 349:2304-2315.
- 6 Heungsup Sung, Brian TF, In GB, et al. Phylogenetic analysis of reverse transcriptase in antiretroviral drug-naïve Korean HIV type 1 patients. *AIDS Res and Human Retroviruses*, 2001, 17:1549-1554.
- 7 Little SJ. Transmission and prevalence of HIV resistance among treatment-naïve subjects. *Antiviral Therapy*, 2000, 5:33-40.
- 8 Larder BA, Kemp SD, Harrigan PR. Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science*, 1995, 269:696-699.
- 9 Demeter LM, Shafer RW, Meehan PM, et al. Delavirdine susceptibilities and associated reverse transcriptase mutations in HIV-1 isolates from patients in a phase I/II trial of delavirdine monotherapy (ACTG 260). *Antimicrob Agents Chemotherap*, 2000, 44:794-797.
- 10 Hirsch MS, Brun-Veziner F, D'Aquila RT, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA. *JAMA*, 2000, 283:2442-2444.

(收稿日期:2004-07-10)

(本文编辑:尹廉)