

山东省部分艾滋病患者抗病毒治疗效果及耐药性研究

张静 林彬 林琳 杨培菊 傅继华 李韩平 李敬云

【摘要】 目的 了解山东省艾滋病患者高效抗逆转录病毒治疗(HAART)效果和病例中HIV-1耐药毒株的出现情况及其对治疗产生的影响。**方法** 于2004、2005年分别对治疗和未接受抗病毒治疗的HIV感染人群进行2次横断面调查。对接受调查者经知情同意,进行个人访谈填写耐药性研究调查表并进行免疫学、病毒学实验室指标评价和服药依从性调查;测定CD₄⁺T淋巴细胞计数、血浆病毒载量(VL);用RT-PCR方法扩增HIV-POL区基因,进行基因型耐药性分析。**结果** 正在接受治疗的艾滋病患者31例,未治疗的27例,2年内分别有83.3%、64.5%的治疗患者CD₄⁺T淋巴细胞计数>350个/μl,分别有45.8%、45.2%的治疗患者VL达到检测限以下,与未治疗组的差异有统计学意义。治疗组患者中出现7个耐药位点,未治疗组出现4个耐药位点,高度耐药突变率及总耐药性突变率前者远高于后者。**结论** 抗病毒治疗患者大部分达到了病毒抑制和免疫重建的目的,症状得到明显好转,治疗患者中出现HIV耐药性毒株,但对总体治疗效果影响不大。

【关键词】 艾滋病; 耐药性; 高效抗逆转录病毒治疗

Study on the effect of treatment and the status of drug resistance among HIV/AIDS patients treated with highly active antiretroviral therapy in Shandong province ZHANG Jing*, LIN Bin, LIN Lin, YANG Pei-ju, FU Ji-hua, LI Han-ping, LI Jing-yun. *Shandong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250014, China

【Abstract】 Objective To understand the effect of highly active antiretroviral therapy (HAART) on AIDS patients, and to explore the prevalence and the impact of HIV-1 drug resistance in Shandong province. **Methods** 2 cross-sectional studies were carried on in 2004 and 2005, to collect data on clinical symptoms and compliance of the AIDS patients with HAART through questionnaire. Informed-consent principle was followed to test on immunological, viral and laboratory index of them. HIV-1 drug genotype resistance by sequencing the gene of HIV-POL after RT-PCR was performed and analyzed. **Results** 31 AIDS cases with and 27 AIDS cases without HAART, were studied. 83.3% and 64.5% of the AIDS patients with HAART showed that the CD₄⁺T cell count was rising to over 350/μl, in the first study (2004) and in the second (2005) study respectively but still 45.8% and 45.2% of AIDS patients under HAART in the 2 years showed a decreasing HIV load under the detected limit. However, these findings were showing remarkable difference when compared with the AIDS without HAART. 7 drug resistance gene sites were found in AIDS patients with HAART and 4 in AIDS patients without HAART. The rate on high degree drug resistance mutation and total drug resistance rate of mutation of the former were higher remarkably than those of the latter. **Conclusion** Most of the AIDS patients with HAART met the purpose of rebuilding immunity and control of HIV, as well as alleviation of symptoms. Although the drug resistance strain appeared in Shandong, but had little effect on HAART.

【Key words】 AIDS; Drug resistance; Highly active antiretroviral therapy

高效抗逆转录病毒治疗(HAART)的出现是艾滋病病毒感和艾滋病(HIV/AIDS)治疗史上一个重要的里程碑,通过对艾滋病患者进行有效的抗病毒治疗,可以控制HIV感染的病程,延长生存期,提

高患者的生命质量。在HAART不规范的情况下,可以迅速导致HIV耐药株的出现,而且一些耐药株还具有交叉耐药性^[1]。一旦HIV产生耐药,HAART疗效就会下降。耐药是HIV的药物作用靶位蛋白变异的结果,耐药的出現使未来的抗病毒治疗更加复杂^[2]。2003年山东省陆续开始对艾滋病患者中符合抗病毒治疗指征的感染者进行免费

作者单位:250014 济南,山东省疾病预防控制中心艾滋病防治所(张静、林彬、林琳、杨培菊、傅继华);军事医学科学院微生物流行病研究所(李韩平、李敬云)

HAART。为全面掌握山东省艾滋病患者抗病毒治疗效果,及 HIV 耐药出现情况,我们分别于 2004、2005 年在山东省治疗 HIV/AIDS 比较集中的某县进行了两次横断面调查,并通过 HIV 毒株耐药基因的检测和实验室免疫学、病毒学指标评价,了解和掌握抗病毒治疗后临床效果以及耐药毒株的出现对其治疗产生的影响。

材料与方 法

1. 对象:在该县抽取正在免费接受抗病毒治疗和未治疗的艾滋病患者作为研究对象。2004 年治疗和未治疗的患者均为 24 例,2005 年治疗和未治疗的患者各为 27 例和 31 例。其中不符合 HAART 治疗指征选择未接受治疗的感染者是为获取 HIV 毒株耐药性突变的类型及流行水平的本底数据作为对照组。研究对象年龄分布为 32~59 岁,男女比例为 1.29,受教育程度文盲占 54.2%,其余以小学、初中为主,婚姻状况均为已婚,感染时间为 1995 年前后,感染途径为既往有偿献血、非正规采血感染者,潜伏期 8~10 年。

2. 调查内容与方 法:研究对象经知情同意,进行个人访谈了解抗病毒治疗服药情况,填写耐药性研究调查表。同时采集感染者 EDTA 抗凝全血,采用流式细胞技术测定 CD_4^+/CD_8^+ T 淋巴细胞水平,测定 HIV-1 血浆病毒载量 (VL),并进行 HIV 基因型耐药性检测。监测药物包括 6 种核苷类逆转录酶抑制剂 (NRTI):拉米夫定 (lamivudine, 3TC)、阿巴卡韦 (abacavir, ABC)、齐多夫定 (zidovudine, AZT)、司坦夫定 (stavudine, D4T)、去羟肌苷 (didanosine, DDI) 和 emtricitabine (FTC); 1 种核苷酸类逆转录酶抑制剂:tenofovir (TDF); 3 种非核苷类逆转录酶抑制剂 (NNRTI):地拉韦啉 (dileviridine, DLV)、依法韦伦 (efavirenz, EFV) 和奈韦拉平 (nevirapine, NVP); 7 种蛋白酶抑制剂 (PI):安普那韦 (amprenavir, APV)、瑞亚他 (atazanavir, ATV)、茚地那韦 (indinavir, IDV)、洛匹那韦 (lopinavir, LPV)、奈非那韦 (Zelfinavir, NFV)、利托那韦 (ritonavir, RTV) 和沙奎那韦 (saquinavir, SQV)。

3. 治疗方案:根据当时该县的具体情况和患者对抗病毒治疗的理解及接受程度,患者以 $CD_4^+ < 200$ 个/ μ l 作为入选治疗的标准,经知情同意后签定协议书开始抗病毒治疗,并首选一线药物配方为:联合应用 NRTI 中的 DDI、AZT 和 NNRTI 中的 NVP。二

线药物配方为 D4T 替代 AZT。

4. 实验室检测:

(1) CD_4^+/CD_8^+ T 淋巴细胞计数:利用美国 BD 公司生产的 FACSCalibur 流式细胞仪,采用四色荧光法进行 CD_4^+/CD_8^+ T 淋巴细胞绝对计数。

(2) LV 测定:使用生物梅里埃生产的 NASBA Nuclisence 载量检测仪按 NASBA HIV-QT 检测试剂盒说明书操作。

(3) PCR 扩增使用引物:通过 PCR 反应扩增编码抗病毒药物靶位蛋白酶、逆转录酶的 HIV-1 pol 基因,并进行序列分析,以检测耐药基因的突变位点,引物见表 1。

表 1 PCR 和测序引物

引物	序列 (5'~3')	HXB2 位点
MAW26	TTG GAA ATG TGG AAA GGA AGG AC	2028~2050
RT21	CTG TAT TTC TGC TAT TAA GTC TTT TGA TGG G	3509~3539
PRO-1	CAG AGC CAA CAG CCC CAC CA	2147~2166
RT20	CTG CCA GTT CTA GCT CTG CTT C	3441~3462
MAW-46	TCC CTC AGA TCA CTC TTT GGC AAC GAC	2251~2277
RT-A	GTT GAC TCA GAT TGG TTG CAC	2519~2539
RT-B	CCT AGT ATA AAC AAT GAG ACA C	2946~2967

注:MAW26、RT21 为 PCR 反应第一轮引物,PRO-1、RT20 为 PCR 反应第二轮引物,MAW-46、RT-A、RT-B 为测序引物

(4) RNA 的提取:从患者血浆中提取 HIV-1 RNA,按照 QIAGEN 公司 QIAamp[®] Viral RNA 分离试剂盒操作说明进行。

(5) RNA 逆转录和目的基因扩增:Random primers、M-MLV Reverse Transcriptase、Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor、dNTP 为 Promega 公司产品;RNA PCR Kit (AMV) 为 TaKaRa 公司产品。cDNA 合成体系及反应条件:取 RNA 10 μ l, RT21 2 μ l, 5 \times M-MLV Reverse Transcriptase buffer 4 μ l, dNTP (10 mmol/L) 1 μ l, M-MLV Reverse Transcriptase 0.5 μ l, Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor 0.5 μ l, DEPC 处理过的 0.01% H₂O 4 μ l 充分混匀,42 $^{\circ}$ C 水浴反应 1 h 后,转入 95 $^{\circ}$ C 灭活 5 min,然后迅速转入 -20 $^{\circ}$ C 孵育 5 min,即获得目的 cDNA。用引物 MAW26 进行第一轮扩增,反应程序:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 150 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 然后以第一轮产物为模板,以 PRO-1、RT20 为引物进行第二轮扩增,反应程序:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C

30 s, 72℃ 150 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。

(6)目的基因序列测定:用 Qiaegen 公司的 Qiaex 试剂盒按说明进行扩增产物的纯化,回收所得 DNA 溶于 10 mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.7, 选用 MAW-46、RT-A、RT-B 作为测序引物,以提纯的 PCR 产物为模板,用 ABI 公司荧光标记末端终止物循环测序试剂盒进行测序反应,反应产物经提纯后,在 ABI 公司 377 型测序仪上进行序列测定。

(7)序列分析与耐药基因检测:基因序列经 Vector NTI 软件进行拼接、纠正后,到 Stanford 大学的 HIV 耐药基因数据网站进行分析,以获得该序列的耐药基因位点。

结 果

1. 病毒抑制强度:患者血浆中 HIV 的 LV 变化可以显示抗病毒治疗药物对病毒的抑制效果,治疗组与未治疗组 2 次监测 LV 变化见表 2 和表 3。2 年治疗数据均显示:治疗组与未治疗组在 3 组数据对比中的差异有统计学意义 ($P < 0.05$),分别采用 1 种和 2 种治疗方案的患者在 3 组数据对比中的差异无统计学意义。2005 年 31 例治疗患者中,24 例为 2004 年的监测对象,7 例为新加入治疗的病例,未治疗患者中有 18 例同为 2 次的监测对象。

2. CD_4^+ T 淋巴细胞计数水平: CD_4^+ T 淋巴细胞水平可以显示抗病毒治疗后患者免疫系统重建的情况,是评价治疗效果的直接指标,治疗组与未治疗组 2 次监测的 CD_4^+ T 淋巴细胞计数比较见表 2 和表 3。2 次监测显示,治疗前后患者 CD_4^+ T 淋巴细胞计数 < 200 个/ μ l 比例数的差异有统计学意义, CD_4^+ T 淋巴细胞计数治疗后显著提高。

表2 2004 年不同治疗情况的患者 LV、 CD_4^+ T 淋巴细胞计数、耐药相关突变率比较

评价指标	未治疗组 (n = 24)	治疗组 (n = 24)		
		1 种方案 (n = 18)	2 种方案 (n = 6)	合计
LV(拷贝/ml)				
< LDL	1(4.2)	9(50.0)	2(33.3)	11(45.8)
< 1000	2(8.2)	14(77.8)	3(50.0)	17(50.0)
均值(log, $\bar{x} \pm s$)	4.64 ± 0.79	2.98 ± 0.59	4.08 ± 1.09	3.32 ± 0.90
CD_4^+ T 淋巴细胞计数(个/ μ l)				
< 200	4(16.7)	1(5.6)	1(16.7)	2(8.4)
200~	7(29.2)	1(5.6)	1(16.7)	2(8.4)
350~	8(33.3)	3(16.7)	2(33.3)	5(20.8)
500~	5(20.8)	13(72.2)	2(33.3)	15(62.5)
耐药相关突变率(%)(VL>1000 拷贝/ml)				
例数	16	8	2	10
低中度	1(6.3)	1(12.5)	0(0.0)	1(10.0)
高度	0(0.0)	1(12.5)	1(50.0)	2(20.0)
合计	1(6.3)	2(25.0)	1(50.0)	3(30.0)

注:括号外数据为例数,括号内数据为率(%);治疗组耐药位点分别为 ABC, AZT, D4T, DDI, DLV, EFV, NVP;未治疗组耐药位点为 AZT, D4T, DDI, DLV

表3 2005 年不同治疗情况的患者 LV、 CD_4^+ T 淋巴细胞计数、耐药相关突变率比较

评价指标	未治疗组 (n = 27)	治疗组 (n = 31)		
		1 种方案 (n = 25)	2 种方案 (n = 6)	合计
LV(拷贝/ml)				
< LDL	0(0.0)	10(40.0)	4(66.7)	14(45.2)
< 1000	2(7.4)	15(60.0)	5(83.3)	20(64.5)
均值(log, $\bar{x} \pm s$)	4.44 ± 0.70	3.47 ± 0.97	4.35 ± 2.13	3.59 ± 1.11
CD_4^+ T 淋巴细胞计数(个/ μ l)				
< 200	7(25.9)	2(8.0)	1(16.7)	3(9.7)
200~	10(37.0)	6(24.0)	2(33.3)	8(25.8)
350~	6(22.2)	8(32.0)	1(16.7)	9(29.0)
500~	4(14.8)	9(36.0)	2(33.3)	11(35.5)
耐药相关突变率(%)(VL>1000 拷贝/ml)				
例数	19	-	-	14
低中度	0(0.0)	-	-	1(7.1)
高度	1(5.3)	-	-	2(14.3)
合计	1(5.3)	-	-	3(21.4)

注:括号外数据为例数,括号内数据为率(%);治疗组耐药位点分别为 3TC, ABC, D4T, DDI, FTC, DLV, EFV, NVP;未治疗组耐药位点为 3TC, ABC, DDI, FTC

3. 治疗中耐药毒株的监测:根据接受治疗的情况,对患者产生的耐药相关突变进行分析,结果见表 2 和表 3。可以看出,山东省目前正在接受治疗的患者其高度耐药相关突变率及总的耐药相关突变率均要高于未治疗的患者,而比较 2 次监测的结果,耐药患者例数未有进展,但耐药程度有所提高,耐药基因位点有所增多。

4. 患者服药情况:2 年内参与治疗的患者,在服药期间均未出现漏服现象,达到 100% 的依从性,除了 6 例因第一治疗方案带来强烈的肝肾不良反应,治疗中改用第二方案,其余均一直坚持采用第一方

案。24 例已治疗并连续监测 2 年的治疗病例中有 18 例无临床症状,比治疗前明显好转,5 例有低热症状但比治疗前亦有好转,1 例病情恶化,生活不能自理。2005 年开始治疗并参加第二次监测的 7 例中有 4 例无临床症状,比治疗前明显好转,3 例比治疗前有好转。

讨 论

HIV-1 耐药性的产生是导致艾滋病患者抗病毒治疗失败的重要原因,也往往是初次抗病毒治疗不严格而产生的后果,因此患者携带 HIV-1 毒株耐药性基因位点的产生成为衡量抗病毒治疗效果的重要指标。

除了 HIV-1 毒株耐药性基因位点的检测,患者体内 HIV-1 的 LV 和 CD₄⁺ T 淋巴细胞计数则是评价抗病毒治疗效果最直接的指标,前者水平的高低是药物对 HIV-1 抑制的程度,后者表现为在药物的帮助下患者免疫系统恢复的情况^[3],只有两方面都取得好的效果,才能说明抗病毒治疗的成功。从 LV 的变化看,2 年的监测中均显示近一半的治疗患者达到了最低检测线以下,平均载量对数值与未治疗组相比差异有统计学意义,显示抗病毒治疗在病毒抑制方面效果良好。另外,2 次监测中改换方案与未改换方案的患者比较其 LV 的变化差异不大,提示因患者难以忍受不良反应而改变治疗方案,在病毒抑制方面是成功的,2 个方案治疗效果相同。前后 2 年的 LV 数据比较显示无差异,说明病毒抑制效果并没有因为治疗时间的延长而下降。从 CD₄⁺ T 淋巴细胞计数看,2 年内分别有 83.3% 和 90.3% 的治疗患者其 CD₄⁺ T 淋巴细胞计数上升到 200 个/ μ l 以上,提示免疫系统功能有改善,有一半的治疗患者达到了 350 个/ μ l 以上,与自身治疗前比较达到了免疫重建的目的。由于山东省将 CD₄⁺ T 淋巴细胞计数 < 200 个/ μ l 作为入选治疗的标准,患者一旦达此标准即进入治疗程序,因此在此次监测中治疗组与未治疗组 CD₄⁺ T 淋巴细胞计数差异不大,无法通过两组的比较显示抗病毒治疗的免疫重建效果。而 2 年的监测数据无差异则显示了抗病毒治疗免疫重建效果的延续性。大部分治疗患者体内病毒的高效抑制和其免疫系统的改善及重建显示抗病毒治疗在该地区是成功的,这与治疗后临床症状明显改善相一致。

从 2 次监测的 HIV-1 耐药位点来看,未接受治疗患者的耐药突变流行率很低且为低度突变,低于我国 HIV 耐药本底检测的平均水平^[4],更远低于四川、河南等省的较高的未治疗患者的耐药突变率^[5,6],说明本研究在开展抗病毒治疗以前并没有受到其他高发或已开展治疗省份的耐药毒株影响,因此极为适宜开展 HIV 抗病毒治疗,而且选用国家示范区推荐的一线药物配方即可取得较好疗效,患者的疗效即证明了这一点。正在接受治疗的患者其耐药突变的流行率远高于未治疗组,说明抗病毒治疗诱导了 HIV-1 耐药的发生,患者在改变治疗方案后与一直沿用第一方案的患者比较,其耐药位点的发生没有明显的变化,2 次监测中发现耐药突变的位点和耐药程度有所增加。大多数发生耐药的治疗病例其耐药位点针对的是治疗方案以外的药物或是表现为低度和潜在低度耐药,从治疗效果看并未受到耐药基因突变的影响,耐药监测的结果与患者体内病毒抑制、免疫重建和临床症状的表现相一致,均反映了抗病毒治疗有效,且 2 种方案的选择无差异。但有 1 例患者 2004 年即检出 5 个耐药位点,其中对 D4T 中度耐药, NVP 高度耐药,治疗 1 年后 CD₄⁺ T 淋巴细胞计数为 49 个/ μ l, LV 为 350 000 拷贝/ml,1 年后由于出现不良反应改用第二治疗方案,2005 年监测又发现对 DDI 有潜在耐药, CD₄⁺ T 淋巴细胞计数降到 7 个/ μ l, LV 为 710 000 拷贝/ml,病情也严重恶化,这是因产生耐药导致治疗失败的典型范例。

参 考 文 献

- [1] Horimoto T, Rivera E, Pearson J, et al. Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *Virology*, 1995, 213: 223-230.
- [2] Miller V, Larder BA. Mutational patterns in the HIV genome and cross-resistance following nucleoside and nucleotide analogue drug exposure. *Antivir Ther*, 2001, 6 Suppl 13: S25-44.
- [3] 李敬云, 李宏, 李韩平, 等. 河南省部分地区 HIV 耐药性毒株流行状况及进化特征研究. *军事医学科学院刊*, 2005, 29(1): 8-12.
- [4] 司雪峰, 黄海龙, 魏民, 等. 我国 HIV-1 感染者耐药突变的流行性研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004, 18(4): 308-311.
- [5] 王哲, 梁妍, 辛天义, 等. 河南省部分艾滋病患者抗病毒治疗效果及耐药性研究. *医药论坛杂志*, 2005, 26(19): 1-3.
- [6] 刘莉, 郑国英, 吴晓敏, 等. 四川省艾滋病病毒耐药性及影响因素. *预防医学情报杂志*, 2005, 21(1): 1-5.

(收稿日期: 2007-04-12)

(本文编辑: 张林东)