

湖北省抗病毒治疗和未治疗的 HIV-1 感染者耐药基因变异研究

王晓琼 童骁 汤恒 刘萍萍 张伟 杨荣阁

【摘要】 目的 研究湖北省流行的 HIV-1 毒株在经过高效抗逆转录病毒治疗 (HAART) 及未治疗人群中耐药基因变异情况。方法 采集 HIV-1 感染者抗凝外周血, 提取前病毒 DNA, 用巢式 PCR 方法扩增 HIV-1 *pol* 基因约 2 kb 的核酸序列, 进行序列测定并通过斯坦福耐药基因数据库进行耐药基因型分析。结果 抗病毒治疗组 19 例, 未治疗组 25 例。在所有的 HIV-1 感染者样本序列中, 发现针对蛋白酶抑制剂 (PIs) 的耐药突变: D30N (2.27%), D30G (2.27%), M46I (4.55%), M46N (2.27%), I47V (4.55%), I84V (4.55%), I84L (2.27%), N88S (2.27%), L90S (2.27%), 以及针对 PIs 的次要耐药基因突变: A71T (29.55%)。在治疗组中出现针对逆转录酶抑制剂 (NRTIs 及 NNRTIs) 的主要耐药基因突变的样本 5 例, 突变主要有 M41L (5.26%), A62V (5.26%), D67N (5.26%), L210W (5.26%), T215Y (15.79%); K103E (5.26%), K103N (10.53%), Y181C (5.26%), G190A (5.26%), K238N (5.26%)。在未治疗组中出现针对逆转录酶抑制剂 (NRTIs 及 NNRTIs) 的主要耐药基因突变的样本 5 例, 突变主要有 M184V (4%), K65N (4%), Y115M (4%), F116L (4%), M184I (4%); V179D (4%), G190R (4%)。在逆转录酶 (RT) 基因中耐药意义不明的突变 F214L, 与药物的使用有统计学上的相关性 ($P=0.03$)。结论 湖北省 HIV-1 感染者 RT 基因的耐药突变, 在治疗和未治疗人群样本中差异有统计学意义, 说明药物治疗已经对 HIV 耐药基因突变的产生有了一定影响。同时, 耐药意义尚未明确的突变位点 F214L 也可能与治疗或是某些药物的使用有一定的相关性。

【关键词】 艾滋病病毒; 耐药变异; 高效抗逆转录病毒治疗

Study on genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs on HIV strains of treated and treatment-naive HIV-1 infectious patients in Hubei province WANG Xiao-qiong*, TONG Xiao, TANG Heng, LIU Ping-ping, ZHANG Wei, YANG Rong-ge. *HIV Molecular Biology Laboratory, The State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China

Corresponding author: YANG Rong-ge, Email: ryang@wh.iov.cn

【Abstract】 Objective To study the drug resistance status on HIV-1 patients who had been treated with highly active antiretroviral therapy (HAART) and those treatment-naive ones in Hubei province. **Methods** Nested polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify 2 kb DNA fragment in HIV *pol* gene from peripheral blood of the HIV infected patients and the PCR products were sequenced. The sequences were compared to the Stanford HIV drug resistance database. **Results** Nineteen patients were treated with regimens composed of two Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) and one Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTI), with 25 patients as treatment-naive. Some protease (PR) drug-resistant mutations were found in these samples, such as D30N (2.27%), D30G (2.27%), M46I (4.55%), M46N (2.27%), I47V (4.55%), I84V (4.55%), I84L (2.27%), N88S (2.27%) and L90S (2.27%) that all belonged to major drug-resistant but A71T (29.55%) belonged to minor resistance mutations. Five treated patients were detected having mutations associated RT drug resistance: M41L (5.26%), A62V (5.26%), D67N (5.26%), L210W (5.26%), T215Y (15.79%); K103E (5.26%), K103N (10.53%), Y181C (5.26%), G190A (5.26%), K238N (5.26%), while five treatment-naive patients were detected to have had mutations associated RT drug resistance M184V (4%), K65N (4%), Y115M (4%), F116L (4%), M184I (4%), V179D (4%), G190R (4%). Some additional mutations

基金项目: 国家“973 计划”资助项目 (2005CB522903); 国家“863 计划”资助项目 (2005AA219070)

作者单位: 430071 武汉, 中国科学院武汉病毒研究所艾滋病实验室 病毒学国家重点实验室 (王晓琼、童骁、刘萍萍、张伟、杨荣阁); 湖北省疾病预防控制中心性病艾滋病防治所 (汤恒)

通讯作者: 杨荣阁, Email: ryang@wh.iov.cn

were detected in RT whose role involve in drug resistance still remained unknown. F214L was positively associated with HAART treatment ($P = 0.03$). **Conclusion** Significant differences were found between drug resistance mutations to RTIs in treated and treat-naïve patients in Hubei province, indicating that drugs had affected the occurrence of drug resistance mutations. At the same time, novel RT mutations F214L might be associated with HAART or some other drugs.

【Key words】 HIV; Drug resistance mutations; Highly active antiretroviral therapy

高效抗逆转录病毒治疗 (highly active antiretroviral therapy, HAART) 是目前治疗艾滋病的最有效的方法,但抗病毒药物的广泛使用及治疗的不规范导致 HIV 迅速产生耐药性^[1],而且,随着 HAART 的广泛应用,在药物选择压力下 HIV 毒株很容易出现交叉耐药和多重耐药^[1-3]。而耐药株的出现正是治疗失败的主要原因之一^[4]。在此我们选取了湖北省 19 例经过抗病毒治疗和 25 例未经过抗病毒治疗的 HIV-1 感染者 (主要是 B' 亚型^[5]),进行耐药基因突变分析。

材料与方 法

1. 样品收集和处理:收集湖北省随州、黄石、襄樊、黄冈和孝感 5 个地区 (各地区地理位置相邻,且 HIV 感染者接受政府的免费治疗) 经 ELISA 和 Western blot 方法确认的 HIV-1 阳性感染者全血共 44 份,样品和流行病学资料的收集经过调查对象的知情同意。每人采集抗凝全血 5 ml,利用淋巴细胞分离液分离 PBMCs,使用德国 Qiagen 公司的 QIAamp Blood 试剂盒,按试剂盒说明提取细胞核 DNA。

2. 核酸序列扩增及序列测定:巢式 PCR 扩增相当于在 HXB2 (K03455) 中的 1726~3825 的 2 kb 的 *pol* 区域,以 507A/3K3R 或 507A/3K1R 配对的外侧引物进行第一轮 PCR: 5'-AAG GAA CCC TTT AGA GAC TAT GTA GA-3' (507A) 和 5'-GTA ACT AGA GAT CCC TCA GAC CCA TTT AGT-3' (3K1R) 或 5'-GCA TAT TGT GAG TCT GTT ACT ATG TTT ACT T-3' (3K3R), 反应条件: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 10 min, 取第一轮 PCR 产物作模板,以 508A/3K2R 为内侧引物按上述反应条件进行第二轮 PCR: 5'-GTA AAA AAT TGG ATG ACA GAA ACC TTG-3' (508A) 和 5'-ATA ATT TCA CTA AGG GAG GGG TAT TGA TAA-3' (3K2R)。通过 PCR 扩增得到约 2 kb 的片段。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,利用 OMEGA 公司的胶回收试剂盒进行胶回收,通过 TA 克隆连接 pMD18T 载体 (TaKaRa 公

司),送 Invitrogen Biotechnology 公司进行测序。

3. 序列分析: BioEdit 软件处理原始核苷酸序列,参照测序谱图进行基因序列修订后,利用斯坦福 HIV 耐药基因变异数据库 (<http://hivdb.stanford.edu>) 对所得序列进行耐药基因型的分析,进行统计学处理。

结 果

1. 临床资料: 44 例感染者中有 19 例 (43.18%) 接受逆转录酶抑制剂的治疗 (治疗组), 25 例 (56.82%) 未经过任何治疗 (未治疗组)。根据 Yang 等^[6]的方法鉴定有 42 例为 B' (泰国 B) 亚型, 另外有 1 例 B 亚型, 1 例 AE 重组亚型。治疗采用两种核苷类逆转录酶抑制剂 (NRTIs) 和一种非核苷类逆转录酶抑制剂 (NNRTIs) 配伍的方案。其中, 用药时间不足 4 个月的有 3 例, 1 年以上 (包括 2 年) 的有 11 例, 2 年以上的有 6 例。调查者用药依从性较好或一般。

2. 蛋白酶 (PR) 基因变异的检测: 44 份样本中, 有 9 份 (20.45%) 出现 PR 的主要耐药突变, 其中经过 HAART 治疗的样本 2 例 (11.11%), 未治疗样本 7 例 (28.00%)。从单个位点突变的频率上看 (表 1), 未发现较集中的主要耐药突变, 但发现一个出现频率较高的次要耐药突变: A71T ($n = 13$, 29.55%), 该突变的出现频率比 2002 年的调查结果 (A71T 1.83%; A71V 13.41%) 有大幅的提高^[7]。

表 1 44 例 HIV 感染者中出现 PR 基因耐药突变例数的分布

基因型	治疗	未治疗	基因型	治疗	未治疗
D30G	-	1	I84L	-	1
D30N	1	-	I84V	1	1
M46I	1	1	N88S	-	1
M46N	-	1	L90S	-	1
I47V	-	2	合计	3	9

注: 经 NRTIs 治疗的感染者 19 例, 未经治疗 25 例; 全部病例均未使用 PIs

3. 逆转录酶 (RT) 基因的主要耐药突变: 治疗组中有 5 例 (26.32%) 产生对 RTIs 的耐药突变, 未治疗组中有 5 例 (20.00%) 产生对 RTIs 的耐药突变。

治疗组样本出现的变异中与 NRTIs 相关的有 7 个突变: M41L, A62V, D67N, L210W, T215Y ($n = 3$); 与 NNRTIs 相关的有 7 个突变: K103E, K103N ($n = 2$), Y181C, G190A, G190S, K238N。未治疗组出现的变异中与 NRTIs 相关的 5 个突变: K65N, Y115M, F116L, M184I, M184V; 与 NNRTIs 相关的有 2 个突变: V179D, G190R (表 2)。治疗和未治疗组之间针对 NRTI 耐药基因突变发生数的差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.54, P > 0.1$), 而针对 NNRTI 的突变总数的差异有统计学意义 ($\chi^2 = 3.89, P < 0.05$)。

表2 44 例 HIV 感染者 RT 基因的主要耐药突变分布

RT 基因 耐药 突变	NRTIs		RT 基因 耐药 突变	NNRTIs	
	治疗组 ($n = 19$)	未治疗组 ($n = 25$)		治疗组 ($n = 19$)	未治疗组 ($n = 25$)
M41L	1(5.26)	-	K103E	1(5.26)	-
A62V	1(5.26)	-	K103N	2(10.53)	-
K65N	-	1(4.00)	V179D	-	1(4.00)
D67N	1(5.26)	-	Y181C	1(5.26)	-
Y115M	-	1(4.00)	G190A	1(5.26)	-
F116L	-	1(4.00)	G190R	-	1(4.00)
M184I	-	1(4.00)	G190S	1(5.26)	-
M184V	-	1(4.00)	K238N	1(5.26)	-
L210W	1(5.26)	-			
T215Y	3(15.79)	-			
合计	7	5	合计	7	2

注: 括号外数据为例数; 括号内数据为比率 (%)

4. RT 基因耐药意义未明的突变:

(1) RT 基因耐药意义未明的突变与感染者的治疗情况: 测序得到 RT 的前 554 个氨基酸的序列, 在主要的耐药基因突变之外, 仍然存在 139 个耐药意义不明的突变。图 1 列出了其中出现频率较高 ($n > 5$) 的 18 个突变, 其中 I135V, S162C, T200A, Q278E, Q334L, F346Y, V417I 等突变频率超过半数 (图 1), 它们与药物治疗没有统计学上的关联性。而另外一个耐药意义未明的突变 F214L 在治疗和未治疗的样本中的差异有统计学意义 ($P = 0.03$)。

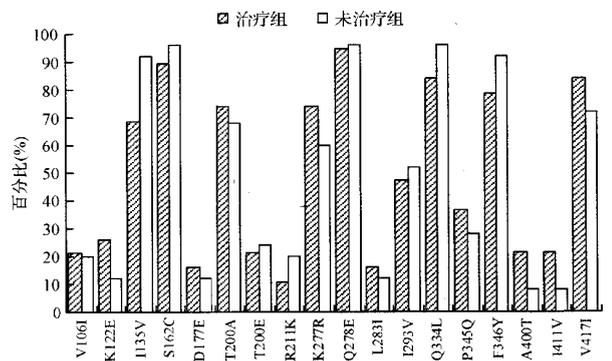
(2) 突变 F214L 的特性: 对 F214L 突变的发生与这些感染者的用药情况的四格表检验发现, F214L 与药物齐多夫定 (AZT) ($P = 0.04$) 和奈韦拉平 (NVP) ($\chi^2 = 5.61, P < 0.05$) 的使用有统计学上的正相关性 (表 3), 而与药物去羟肌苷 (DDI) ($\chi^2 = 2.36, P > 0.1$)、司坦夫定 (D4T) ($P = 0.43$)、拉米夫定 (3TC) ($P = 0.39$) 和依法韦伦 (EFV) ($\chi^2 = 2.87, P > 0.05$) 的使用没有统计学上的相关性。该突变可能具有一定的表型意义。

5. 序列登录: 本文中的 44 个序列均已登录 GenBank, 登录号为: DQ833415-DQ833427, DQ833429-DQ833436, EF394214-EF394221, EF394224-EF394227, EF394229-EF394236, EF428445-EF428446, EF471865-EF471866。

表3 突变 F214L 与药物治疗的关系

药物	F214L ^a	F214L ^a		P 值
		阳性	阴性	
AZT	服用 ($n = 10$)	3	7	0.04
	未服用 ($n = 31$)	1	30	
NVP	服用 ($n = 14$)	4	10	< 0.01
	未服用 ($n = 27$)	0	27	

注: ^a 为病例数



注: 出现数目 $n > 5$ 的突变

图1 44 例 HIV 感染者 (治疗组 $n = 19$, 未治疗组 $n = 25$) 在 RT 上大量出现但耐药意义尚未明确的突变

讨 论

在以前对感染者同时期的调查中, 我国流行的 HIV 毒株出现耐药基因突变的比率远远小于欧美流行的毒株^[2,7-9], 然而我国 HIV 感染者在治疗过程中存在药物种类单一, 用药不规范, 依从性差等不利因素, 使得在治疗过程中更易产生耐药毒株。

本研究中, 所有 HIV 感染者均未接受蛋白酶抑制剂 (PIs) 类药物的治疗, 却发现 9 例感染者 (20.45%) 出现针对 PIs 的耐药基因突变, 比先前国内的调查 (0.61%) 高出很多^[7]。同时, 另外 3 个耐药意义未明的突变 L63P、V77I 和 I93L 的出现频率较高 (分别为 L63P 治疗组出现 94.12%, 未治疗组 100%; V77I 治疗组 94.12%, 未治疗组 96.00%; I93L 治疗组 82.35%, 未治疗组 96.00%)。3 个高发突变在治疗和未治疗组人群中的差异无统计学意义。它们的出现可能与某些亚型的序列特征有关。

本研究中 RT 的耐药突变发生数在治疗和未治疗组中的差异有统计学意义, 说明药物治疗已经对

HIV 耐药基因突变产生发生一定影响。但在治疗与未治疗组样本中,针对 NRTIs 的耐药突变发生数的差异无统计学意义,而针对 NNRTIs 耐药突变发生数的差异有统计学意义。由于在治疗组感染者中有 3 例治疗时间不足 4 个月,另外 5 例治疗时间小于 1 年;这也可能是针对 NRTIs 的耐药突变检出较少的原因。针对 NNRTIs 类药物的耐药突变一个位点往往对多个药物产生耐药性,因此较高水平的交叉耐药在 NNRTIs 类药物中十分常见^[10]。在治疗组的数据中,针对 NNRTI 的耐药突变最容易出现,且表现出交叉耐药和高度耐药的特点。

在用药人群中,K103N 和 T215Y 出现频率较高(K103N 10.53%;T215Y 15.79%),这两个位点分别导致 3 种 NNRTIs 和 AZT、D4T 的高度耐药。而 K103E 只能导致地拉韦啉(DLV)和 NVP 的低度耐药。另外,L210W 与 T215Y 共同存在时引起 3TC 和 FTC 的耐药;M184I/V 引起 3TC 和 FTC 的高度耐药;G190A/S 引起 NVP 和 EFV 的耐药,Y181C 引起 NVP 和 DLV 的高度耐药。其他一些非典型突变 A62V、K65N、Y115M、F116L 不会导致耐药性的产生。

RT 基因的耐药突变在未治疗组中也存在,可能是由 HIV 基因的高度随机变异性造成的^[11],因为感染者感染时间集中在 20 世纪 90 年代中期,因此传播获得的几率很小。但是,HIV 耐药性毒株在未治疗组中尤其是通过母婴的传播应该引起高度重视。

近年来,除了对已知的有耐药意义的突变位点的研究外,国外一些研究机构也对一些新发现的耐药意义尚未明确的突变做了大量的研究^[12,13]。本文对在 RT 序列上的未定义突变做了统计分析,发现 RT 基因上出现了一些突变率高于 50.00% 的位点,如 I135V (77.27%),S162C (93.18%),T200A (68.18%),Q278E (95.45%),Q334L (88.64%),F346Y (81.82%),V417I (70.45%),这些位点的突变尚未确定有任何耐药意义,在我们的资料中,它们在治疗和非治疗组中的差异也无统计学意义,因此可能是 B' 毒株特异性的序列。而另外一个耐药意义尚未明确的突变 F214L 在国外的研究中,一度被认为与毒株的耐药性有关,并有 17.80% 的突变比率^[13],然而在我们的调查中,该突变出现为 9.30%,且与治疗组有统计学的正相关。这可能是由于流行的毒株不同,也可能是因为使用了不同的药物。在

以往的报道中,F214 位还可能突变为氨基酸 M、V、I 和 S^[13],在我们的样本中并没有发现。再进一步的研究发现,在治疗组中,F214L 和 AZT、NVP 的使用有统计学上的相关性,对于二者间是否有关,我们正在通过实验的方法加以验证。

参 考 文 献

- [1] Moroni M. Genotypic resistance tests for the management of patients with *in vitro*-immunological discordant response to highly active antiretroviral therapy. *Scand J Infect Dis*, 2003, 35 Suppl 106:S85-87.
- [2] Harzic M, Pellegrin I, Deveau C, et al. Genotypic drug resistance during HIV-1 primary infection in France (1996 - 1999): frequency and response to treatment. *AIDS*, 2002, 16:793-796.
- [3] Malim MH, Emerman M. HIV-1 sequence variation: drift, shift, and attenuation. *Cell*, 2001, 104:469-472.
- [4] Palmer S, Shafer RW, Merigan TC. Highly drug-resistant HIV-1 clinical isolates are cross-resistant to many antiretroviral compounds in current clinical development. *AIDS*, 1999, 13:661-667.
- [5] Su B, Liu L, Wang F, et al. HIV-1 subtype B' dictates the AIDS epidemic among paid blood donors in the Henan and Hubei provinces of China. *AIDS*, 2003, 17:2515-2520.
- [6] Yang R, Xia X, Kusagawa S, et al. On-going generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in the Yunnan province of China. *AIDS*, 2002, 16:1401-1407.
- [7] 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*, 2002, 18(4):308-311.
- [8] Little SJ, Holte S, Routy JP, et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med*, 2002, 347:385-394.
- [9] UK Collaborative Group on Monitoring the Transmission of HIV Drug Resistance. Analysis of prevalence of HIV-1 drug resistance in primary infections in the United Kingdom. *BMJ*, 2001, 322:1087-1088.
- [10] Huang W, Gamarnik A, Limoli K, et al. Amino acid substitutions at position 190 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase increase susceptibility to delavirdine and impair virus replication. *J Virol*, 2003, 77:1512-1523.
- [11] Maga G, Hübscher U, Pregnolato M, et al. Potentiation of inhibition of wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptases by combinations of nonnucleoside inhibitors and D-and-L-(β)-dideoxynucleoside T triphosphates analogs. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(4):1192-1200.
- [12] Valentina S, Tobia S, Maria MS, et al. Involvement of novel human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutations in the regulation of resistance to nucleoside inhibitors. *J Virol*, 2006, 80(14):7186-7198.
- [13] Francesca C-S, Federico G, Maria S, et al. High sequence conservation of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase under drug pressure despite the continuous appearance of mutations. *J Virol*, 2005, 79(16):10718-10729.

(收稿日期:2007-06-28)

(本文编辑:张林东)