

辽宁省未经治疗 HIV-1 感染者耐药变异本底研究[△]

韩晓旭, 张 旻, 代 娣, 卢春明*, 张子宁, 刘 静, 王亚男, 姜拥军, 尚 红[#]

(中国医科大学 附属第一医院卫生部艾滋病免疫学重点实验室, 沈阳 110001)

摘要: **目的** 研究辽宁省未经抗病毒治疗的人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染人群中耐药突变的发生和流行情况。**方法** 提取辽宁省 91 例 HIV-1 感染者外周血基因组 DNA, 巢式 PCR 方法扩增 pol 区蛋白酶基因全序列与逆转录酶基因部分序列, 直接进行序列测定。序列拼接后, 递交 HIVdb-Drug Resistance Algorithm 进行耐药性分析。**结果** 3 株毒株在蛋白酶编码区含有 M46I 变异, 在蛋白酶编码区次要变异普遍存在, 由高到低依次为 L63P (60.4%) 及 V77I (60.4%)、M36I/V (31.9%)、A71V/T (22.0%)、L10I (8.8%) 和 K20R (6.6%)。1 株毒株在逆转录酶编码区含有 M184I 变异。**结论** 约 4.4% 的感染者对至少一种我国现有的抗病毒药物耐药。辽宁省未经抗病毒治疗的 HIV-1 感染人群绝大部分为抗病毒治疗敏感人群, 但应加强监测, 防止耐药株流行。

关键词: 人类免疫缺陷病毒; 耐药; 基因型

中图分类号: R512.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2006)05-0632-05

Background Study of HIV-1 Drug Resistant Mutations in Treatment-naïve Patients in Liaoning Province[△]

HAN Xiao-xu, ZHANG Min, DAI Di, LU Chun-ming*, ZHANG Zi-ning, LIU Jing,
WANG Ya-nan, JIANG Yong-jun, SHANG Hong[#]

(Key Laboratory of AIDS Immunology of Ministry of Health, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

ABSTRACT: Objective To collect background information on drug resistance mutations in treatment-naïve HIV-1 infected individuals in Liaoning Province. **Methods** Samples from 91 antiretroviral therapy-naïve patients were collected. The entire protease gene and 1-290 amino acids of the reverse transcriptase gene were amplified by nested PCR from provirus DNA and sequenced. The results were analyzed with HIVdb-Drug Resistance Algorithm, and genotypic resistance mutations were determined to particular anti-HIV drugs. **Results** Totally 91 sequences were obtained, 3 of which displayed M46I mutations in the protease gene. Minor resistance mutation rate to protease inhibitors was 100%, including types of L63P (60.4%), V77I (60.4%), M36I/V (31.9%), A71V/T (22.0%), L10I (8.8%), and K20R (6.6%). Only one sequence carried reverse transcriptase related resistance mutations M184I. **Conclusions** About 4.4% of HIV-1 infected individuals in Liaoning Province carried strains with drug resistance mutations. Most treatment-naïve HIV-1 infected individuals in Liaoning Province were sensitive to the currently available antiviral medicines, but antiviral treatment must be in accordance with the strict procedures to keep better adherence and avoid the prevalence of drug-resistant strains.

△基金项目:“十五”国家科技攻关计划项目(2004BA719A12)、卫生部艾滋病防治研究项目(WA2003-01)和辽宁省教育厅科技攻关计划(2012215112) Supported by the Key National Technologies R&D Program for the 10th Five-year Plan (2004BA719A12), AIDS Prevention and Cure Project of Ministry of Health (WA2003-01), and Science & Technology Tackle Project from the Educational Department of Liaoning Province (2012215112); * Center for Disease Control and Prevention of Liaoning Province, Shenyang 110005; # Corresponding author Tel/Fax: 024-23254254, E-mail: p31ab@yeah.net

Key words: human immunodeficiency virus; drug resistance; genotype

Acta Acad Med Sin, 2006, 28(5):632-636

辽宁省 HIV-1 感染率在全国处于中等水平,近年来呈增长趋势,2000 年起年均增长率超过 50%,2005 年则超过 100%,全省 14 个城市均报告发现 HIV-1 感染者。艾滋病患者和艾滋病相关死亡的不增加,使抗病毒治疗的开展成为当务之急。目前我国可生产 5 种抗逆转录病毒药物,包括 3 种核苷类逆转录酶抑制剂,1 种非核苷类逆转录酶抑制剂和 1 种蛋白酶抑制剂,此外还进口多种药物。2003 年起,我国陆续在艾滋病综合防治示范区开展免费抗病毒治疗,并取得了较好的疗效。然而,尽管高效抗逆转录病毒治疗能够显著抑制 HIV-1 复制,延长患者生命,降低艾滋病死亡率,但如果不能完全抑制病毒复制,则容易导致耐药性变异的发生,而耐药株的复制是抗病毒治疗失败的主要原因之一。目前辽宁省部分患者已经接受了抗逆转录病毒治疗,但尚缺乏较大样本的治疗前耐药本底情况调查,本研究分析了辽宁省 91 例未经治疗 HIV-1 感染者的耐药变异情况。

对象和方法

对象 1999~2004 年在本院随访的 91 例辽宁省 HIV/AIDS 患者,均经艾滋病确认实验室确认。其中,男 61 例,女 29 例;中位年龄 35 岁;平均估计感染时间 7 年。43 例通过异性间接触感染,30 例为既往献血员,7 例为静脉吸毒者,8 例输血及血制品感染者,2 例同性恋者,1 例母婴传播者。所有感染者均未经抗病毒治疗。以 EDTA-3K 抗凝管采集 HIV-1/AIDS 感染者外周静脉血,于 24 h 内测定抗凝血的 CD4 + T 淋巴细胞数,常规离心抗凝血分离血浆,分装后 -80℃ 冻存用于测定病毒载量和耐药基因变异。

CD4 + T 淋巴细胞测定 用 FACSCALIBUR 流式细胞仪 (BECTON DICKINSON, 美国) 测定 CD4 +、CD8 +、CD3 + T 淋巴细胞绝对值。将 20 μl CD4/CD8/CD3 TRITEST 试剂加入 CD4 绝对计数管中,加入 50 μl 抗凝血,室温避光 15 min,加入 450 μl 免洗溶血素,室温避光 15 min, FACSMULTISET 软件检测并进行自动分析。

病毒载量测定 以 200 μl 血浆采用标准版模板

制备法提取 RNA,采用 HIV-1 Monitor 1.5 commercial kit (Roche, 美国) 在 COBAS AMPLICOR 自动载量仪 (ROCHE, 瑞士) 上以 RT-PCR 方法测定病毒载量。检测范围为 50 ~ 750 000 拷贝/ml。

耐药变异分析

前病毒 DNA 提取: 以 200 μl 抗凝全血提取前病毒基因组 DNA,使用 MagNA Pure LC 全自动核酸提取仪 (ROCHE, 日本),按仪器操作说明进行,纯化 DNA 溶于 100 μl 洗脱液中。

巢式 PCR: 外侧引物反应体系: 外侧引物 507A/503B 和 325A/326B (各引物序列见表 1) 各 0.75 μl (20 μmol/L), 10 × PCR Buffer 2.5 μl (100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 500 mmol/L KCl), TaKaRa Taq 酶 0.15 μl (5 U/μl), dNTP 混合物 1.8 μl (2.5 mmol/L), 高压去离子水 14.05 μl, 5 μl 提取的 DNA, 反应体积为 25 μl。反应条件: 94℃ 5 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2.5 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。内侧引物反应体系: 内侧引物 508A/504B 和 327A/328B (各引物序列见表 1) 各 1.25 μl (20 μmol/L), 10 × Buffer 5 μl (100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 500 mmol/L KCl, MgCl₂ 25 mmol/L), TaKaRa Taq 酶 0.25 μl (5 U/μl), 高压去离子水 34.75 μl, dNTP 混合物 3 μl (2.5 mmol/L), 第 1 轮产物 5 μl, 反应体积为 50 μl。反应条件: 94℃ 5 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2.5 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。QIAquick Gel Extraction Kit 试剂盒 (Qiagen, 德国) 纯化巢式 PCR 产物。

核苷酸序列测定及分析: 使用 ABI 377 全自动 DNA 测序仪 (ABI, 美国),按操作说明应用双脱氧终止法测定 HIV-1 RNA pol 区部分基因序列 (蛋白酶 1-99 密码子和逆转录酶 1-290 密码子)。测序引物选用 PCR 内侧引物。Vector NTI 中 Contig Express 组件进行序列拼接,参照测序谱图进行基因序列修订后,将序列递交 Stanford HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/hiv/>) 在线分析耐药变异的位置和种类。以 gag P24-RT 1.8kb 基因序列为基因分型依据,参考 Los Alamos 国家实验室 HIV Sequence Database 中 2005 年亚型参考株序列资料,MEGA 2.1 进行 Neighbor-joining 方法绘制系统进化树鉴定基因亚型。

表 1 gag-pol 区 PCR 反应引物名称、序列和位置

Table 1 Name, sequence, and location of PCR primers in gag-pol region

| Name | Sequence (5'-3') | Location (HXB2) |
|------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| Outer forward primer 1: 507A | AAggAACCCTTTAgAgACTATgTAgA | 1 658-1 682 |
| Outer reverse primer 1: 503B | TATggATTTTCaggCCCAATTTTTg | 2 692-2 716 |
| Inner forward primer 1: 508A | gTAAAAAATTggATgACAgAAACCTTg | 1 726-1 752 |
| Inner reverse primer 1: 504B | ACTTTTgggCCATCCATTCC | 2 592-2 611 |
| Outer forward primer 2: 325A | ggAAACCAAAAATgATAgggggAAATggAg | 2 377-2 406 |
| Outer reverse primer 2: 326B | CTgTACTTCTgCTACTAAgTCTTTTgATggg | 3 509-3 539 |
| Inner forward primer 2: 327A | gTggAAAAAagg CTATAggTACAg | 2 452-2 475 |
| Inner reverse primer 2: 328B | CTgCCAACCTCTAATTCTgCTTC | 3 441-3 462 |

结 果

基本情况 系统进化树对分析表明, 在 91 例 HIV-1 感染者中, B'亚型 50 例, CRF01_AE 15 例, CRF07_BC 7 例, CRF08_BC 5 例, B 亚型 3 例, A 亚型 4 例, 其他 7 例。病毒载量为 (4.86 ± 0.95) lg 拷贝/ml, CD4 + T 细胞计数 (332 ± 251) 个/μl。

蛋白酶抑制剂相关耐药变异 在蛋白酶编码区, 有 2 例 CRF01-AE 和 1 例 B'亚型毒株含有 M46I 主要变异; 次要变异普遍存在, 由高到低依次为 L63P

(60.4%) 及 V77I (60.4%)、M36L/V (31.9%)、A71V/T (22.0%)、L10I (8.8%) 和 K20R (6.6%) (表 2)。HIV-1 毒株蛋白酶区氨基酸序列与 HXB2 的差异见图 1。在主要功能区: 活性位点、flap 区和底物结合区均未发现明显变异。有 3.3% 的感染者携带蛋白酶抑制剂相关的主要耐药变异。

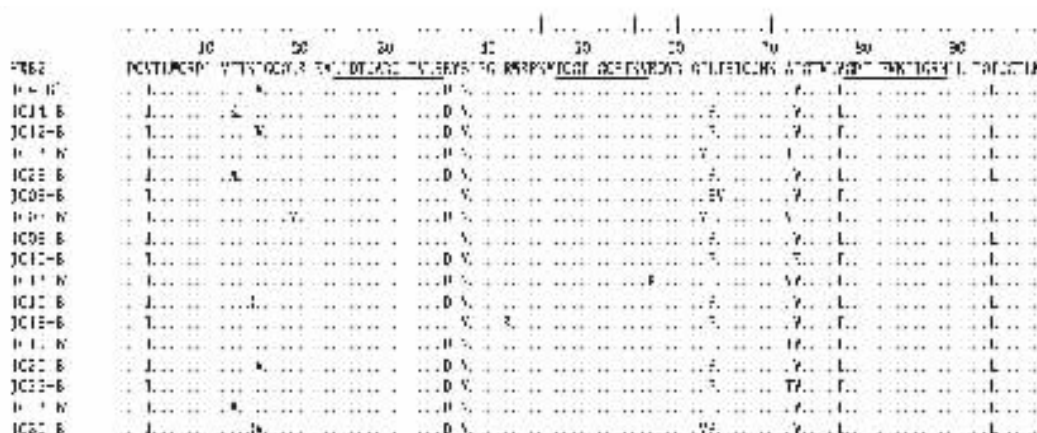
逆转录酶抑制剂相关耐药变异 在逆转录酶编码区, 有 1 例 CRF07 感染者携带 M184I 变异, 1 例 CRF08 感染者携带 A62V 和 T69N 变异, 另 1 例 HIV-1 其他亚型感染者携带 A62V 变异。有 1.1% 的感染者携带明确的逆转录酶抑制剂耐药突变。

表 2 91 例未经治疗的 HIV-1 感染者蛋白酶编码区与耐药变异有关的氨基酸替换

Table 2 Amino acid substitutions in the HIV-1 protease sequences of isolates from 91 treatment-naïve patients at key positions associated with resistance to protease inhibitors

| Subtype | n | L10I | K20R | M36L/V | M46I* | L63P | A71V/T | V77I |
|----------|----|----------|----------|------------|----------|------------|------------|------------|
| A | 4 | 3 | 1 | 4 | | | | |
| B | 3 | | | | | 2 | | 3 |
| B' | 50 | 2 | | 1 | 1 | 39 | 18 | 47 |
| CRF01_AE | 15 | | 3 | 15 | 2 | 1 | | |
| CRF07_BC | 7 | | | | | 6 | 2 | 2 |
| CRF08_BC | 5 | | | 5 | | 3 | | |
| Other | 7 | 3 | 2 | 4 | | 4 | | 3 |
| Total | 91 | 8 (8.8%) | 6 (6.6%) | 29 (31.9%) | 3 (3.3%) | 55 (60.4%) | 20 (22.0%) | 55 (60.4%) |

* major resistance mutations



讨 论

目前,国际上已经有多种抗病毒药物被批准用于艾滋病治疗,包括13种核苷类逆转录酶抑制剂、3种非核苷类逆转录酶抑制剂和11种蛋白酶抑制剂,此外还有T20等新型药物,每种药物都存在相关的耐药变异。携带耐药变异的突变株可在药物的选择压力下被筛选出来,逐渐成为优势株进而导致抗病毒治疗失败。在美国,有21%~40%的原发HIV感染毒株对1种以上抗病毒药物耐药,而70%以上的抗病毒治疗失败与耐药株产生有关^[1-3]。

本研究发现,在91例HIV-1感染者中,有4.4%的感染者对茚地那韦和拉米夫定等我国常用抗艾滋病病毒药物耐药,此水平虽然低于对国外人群的研究报道,但在国内则处于较高水平^[2,3]。在辽宁省HIV-1 B'亚型和CRF01_AE亚型感染者中发现蛋白酶抑制剂主要耐药变异,总发生率3.3%,这可能是由于毒株自发的高突变长时间积累的结果。而蛋白酶抑制剂次要耐药变异的发生率100%。次要变异本身不引起药物敏感性下降,但可以补偿由主要变异引起的病毒适应性下降。不同蛋白酶抑制剂的主要变异可有区别,但次要变异异常相同。研究显示,未经治疗非B亚型感染人群中可存在与大量蛋白酶抑制剂耐药有关的氨基酸替换,但次要变异的大量存在是否易导致蛋白酶抑制剂耐药株的产生目前尚无定论^[4-6]。辽宁省已经发现的HIV-1亚型较复杂,其中以B'亚型最为多见,而CRF01_AE、CRF07_BC、CRF08_BC和A亚型也有一定数量的感染者。本研究发现在不同亚型蛋白酶编码区耐药相关变异存在一些特异性:L63P、V77I及A71V/T在B'亚型多见;L10I在A亚型多见;K20R在CRF01_AE多见;M36I/V在CRF01_AE及A亚型多见,CRF08_BC的第77位氨基酸保持不变。在逆转录酶编码区未发现亚型特异性的突变。本研究与国外对非B亚型毒株的耐药变异研究结果总体上相似^[5,7,8],但有所差异,即L63P、V77I及A71V/T变异率高于B亚型毒株,K20R在CRF01_AE中的发生率也与国外研究不同,这可能反映了B'亚型和CRF01_AE在我国流行过程中形成的特征。

在逆转录酶编码区,只有1例CRF07感染者携带M184I变异,该变异可引起对3TC和FTC的高度耐药。1例CRF08_BC感染者携带A62V和T69N变

异,另1例HIV-1其他亚型感染者携带A62V变异。这两个变异均是核苷类逆转录酶抑制剂相关耐药变异,对HIV-1 B亚型毒株而言,前者常与Q151M共同引起多药耐药,在无Q151M存在时对药物敏感性的影响不清,后者对药物敏感性的影响尚不清楚。

参 考 文 献

- 1 Metzner KJ, Rauch P, Walter H, *et al.* Detection of minor populations of drug resistant HIV-1 in acute seroconverters. *AIDS*, 2005, 19(16):1819-1825.
- 2 Little SJ, Holte S, Routy JP, *et al.* Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med*, 2002, 347(6):385-394.
- 3 Chin-Hong PV, Deeks SG, Liegler T, *et al.* High-risk sexual behavior in adults with genotypically proven antiretroviral-resistant HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2005, 40(4):463-471.
- 4 Danutaa P, Marka R, Dale H, *et al.* Protease sequences from HIV-1 group M subtypes A-H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease resistance in protease inhibitor-naive individuals worldwide. *AIDS*, 2000, 14(11):1489-1495.
- 5 Montes B, Vergne L, Peeters M, *et al.* Comparison of drug resistance mutations and their interpretation in patients infected with non-B HIV-1 variants and matched patients infected with HIV-1 subtype B. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2004, 35(4):329-336.
- 6 Holguin A, Sune C, Hamy F, *et al.* Natural polymorphisms in the protease gene modulate the replicative capacity of non-B HIV-1 variants in the absence of drug pressure. *J Clin Virol*, 2006, 36(4):264-271.
- 7 Arivoshi K, Matsuda M, Miura H, *et al.* Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2003, 33(3):336-342.
- 8 Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, *et al.* Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med*, 2005, 2(4):e112.

(2006-05-16 收稿)