

計畫編號：DOH93-DC-2020

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

計畫名稱： 台灣地區人類免疫缺乏病毒第一型亞型分析與抗藥性自然突變點分析

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：楊志元 研究員

研究人員：楊志元、陳豪勇、劉素真、王聖帆、徐秋菊

執行期間： 93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

## 目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
壹、綜合資料	
貳、計畫摘要	
中文摘要	( 3 )
英文摘要	( 5 )
參、計畫內容	
一、研究簡介	( 7 )
二、材料方法	( 10 )
三、結 果	( 14 )
四、討 論	( 16 )
五、表 圖	( 20 )
六、參考文獻	( 31 )

\* 中文摘要：

關鍵字：愛滋病毒、高效能抗反轉錄病毒治療法、亞型、抗藥性

人類免疫缺乏病毒( Human immunodeficiency virus , 簡稱 HIV , 俗稱愛滋病毒 ) 是造成後天免疫缺乏症候群的主要病毒 , 自從西元 1983 年人類首度分離出愛滋病毒後 , 愛滋病即以驚人的速度襲捲全球造成許多人的感染與死亡。西元 1996 年 , 何大一博士提出 ” 高效能抗反轉錄病毒治療法 ” (Highly active antiretroviral therapy , HAART) 俗稱為 “ 雞尾酒療法 ” (combination therapy)。目前全世界對於愛滋病患的治療多採此法 , 但是治療失敗情形也出現了。失敗的原因很多其中最重要的是抗藥性病毒的出現 , 抗藥性病毒主要基因改變有兩種 : 即反轉錄酶與蛋白質酶的基因改變 , 此兩種酵素為愛滋病毒複製所需。近年來有發現從未服藥的愛滋病患體內的愛滋病毒於反轉錄酶與蛋白質酶的基因上產生抗藥性突變點 , 又可稱為自然變異(natural polymorphism) , 如此亦會造成 HAART 治療產生輕度至重度的抗藥性。

為了了解近幾年來國內愛滋病感染的亞型盛行率與愛滋病毒自然變異之抗藥性相關突變點 , 因此本計劃以疾病管制局病毒實驗室自西元 1996-2004 年所篩選出來全國的 HIV-1 陽性檢體共 440 件 , 將其作性別與亞型關係之分析與愛滋病毒蛋白質酶與反轉錄酶與抗藥性相關的自然變異點。根據愛滋病毒 C2V3、gag、pol 區域設計特定之引子利用反轉錄與聚合酶連鎖反應(RT-PCR)的方法增幅出愛滋病毒套膜片段與蛋白質酶、反轉錄酶的全長片段 , 分析亞型型別與抗藥性相關突變點。在愛滋病毒亞行分析結果發現有 376 件(85.6%)為 B 亞型、39 件(8.9%)為 A/E 亞型、16 件(3.6%)B/C 亞型、2 件(0.4%)A/G

亞型、7 件(1.5%)為 C 亞型。在抗藥性自然突變點分析發現在蛋白質酶(Protease)基因方面，在 L63 的位點產生突變共有 304 件，突變率為 73 %;其次在 V77 的位點產生突變共有 173 件,突變率為 42%;而 M36 的位點產生突變共有 134 件，突變率為 32%。在反轉錄酶(Reverse Transcriptase)基因方面，在 K70 的位點產生突變共有 45 件，突變率為 67.1%;其次為 S68 的位點產生突變共有 12 件,突變率為 17.9 %。從抗藥性的觀點來分析發現主要突變點(Primary mutation)在這些初篩檢體出現機率不高，在蛋白質酶與反轉錄酶基因主要突變點發生機率低，而其它突變點多均為次要突變點(Secondary mutation)。

## \*英文摘要

\*Key word: HAART、quasispecies、PI、RTI

Human immunodeficiency Virus type1 (HIV-1) is the major pathogen known for causing acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Since the first isolation of HIV in 1983 , AIDS has been rapidly increasing . In 1996 , Dr. David Ho advocated the HAART (Highly active antiretroviral therapy) , so called combination therapy. Recently a great advance has been made against HIV-1 by combination antiretroviral therapy worldwide , however , there appears failure of the treatment with certain reasons. One important reason is the occurrence of drug-resistant quasispecies during the therapy, especially that resistant to protease inhibitors (PIs) and reverse transcriptase inhibitors (RTIs) are the major obstacle. Recently some researchers found that there were drug resistant mutations occurred in drug-naïve hiv-1(+) patients, it's also called natural polymorphism that will make light to heavy drug resistance to HAART.

In order to understand the prevalence of HIV-1 subtypes and drug resistant associated natural polymorphism, this study analyzed the correlation between sexuality and subtypes, and drug associated natural polymorphism on HIV-1 protease and reverse transcriptase. The specific primers were designed for RT-PCR method to amplify HIV-1 envelope 、 protease and reverse transcriptase gene fragments , according to HIV-1 C2V3、 gag、 pol regions. The result of subtypes showed that there were 376 (85.6%) B subtype、 39(8.9%)A/E subtype、 16(3.6%) B/C subtype、 2 (0.4%) A/G and 7(1.5%) C subtype. In drug

resistant natural polymorphism analysis showed that in protease gene , there were 304 (73%) PR mutations at L63 、 173 (42%) at V77 and 134 (32%) at M36 position. In reverse transcriptase gene , there were 45 (67.1%) RT mutations at K70 and 12 (17.9%) at S68 position. The frequencies of primary mutation occurred in protease and reverse transcriptase genes were low , most of them were secondary mutations.

計劃內容：

一、研究簡介：

**\*愛滋病毒結構與分型：**

HIV 在分類上屬於反錄病毒科 (retroviridae) 中的緩慢病毒 (lentivirus) 之一，在電子顯微鏡下觀察到愛滋病毒為 110nm 的球型病毒，具有糖化蛋白外套膜的病毒顆粒，其內殼含有雙股 RNA 基因體及病毒複製時所需要的酵素，例如反轉錄酶 (reverse transcriptase)，嵌入酵素 (integrase)，蛋白酶 (viral protease) 及一些調節蛋白。HIV 之 RNA 全長約為 9.2kb，共有 9 個基因，其中 gag、pol、env 為病毒組成蛋白酶，而 gag 基因所轉譯出來的蛋白質有 p24、p17、p2、p7、p1 及 p6 [1]；pol 基因轉譯出來的產物有反轉錄酶、蛋白酶以及嵌入酵素；env 基因的產物則是病毒的外套膜糖蛋白，包括 gp120 及 gp41 為和 CD4 淋巴球的接受器 (receptor) 結合之處，病毒進入宿主細胞所需 (圖二)。其餘 6 個非結構性基因則與病毒的複製調控感染力及病毒成熟有關。其中 rev 及 tat 轉譯出病毒複製時所需的調控蛋白質；而 nef、vpr、vpu 及 vif 轉譯出輔助蛋白質 (accessory protein) 和病毒感染力有關。

愛滋病毒分為第一型 HIV-1 及第二型 HIV-2，分別源自於非洲東部及非洲西部，兩者在血清學反應上差異極大，HIV-2 和猴子的免疫缺乏病毒 (simian immunodeficiency virus, SIV) 較相似，而 HIV-1 和黑猩猩的免疫缺陷病毒較為相似之又分成兩大群：主群 M (Major group) 及局外群 O (outlier)。主群 M 根據 env 基因的差異又分為十個亞型 A 至 K [2]，其彼此差異約在 20% 以上 [1, 3]；局外群 O 尚未分亞型。如今又發現了新型 (群)，命名為 N (New group)，是一位西非喀美隆 (Cameroon) 的婦女 1995 年 5 月因腸胃症狀住院，亦帶有大腸黴菌感染，其檢體送到巴黎作病毒培養發現此新型病毒 [4]。此三大群 M, O, N 其間差異達 50% 以上。HIV 亞型的分

布跟地區有關，例如：北美及西歐地區以 B 亞型為多，中國大陸以 C 亞型為多而台灣和泰國以 B 亞型及 E 亞型為多。根據研究報告指出，不同亞型盛行於不同的族群，而且跟性別及性行為的模式有些關係[5]。

### **\*愛滋病毒亞型**

HIV-1 基因的亞型鑑定非常重要，可以知道 HIV-1 全球性的演化複雜性以及傳播的區域，其另一個特徵就是高度的、局部性的衝擊，個別流行的型態可能緊鄰而存在，但彼此卻只有很微妙的交互作用，而 HIV-1 亞型與感染的途徑、傳播的方式有關，對於疫苗的研發也有重要的影響。而且 HIV-1 不同亞型在人體中產生的自然突變點以及對於藥物感受度可能就有不同[3, 6]。

### **\*愛滋病毒蛋白質酶( Viral protease )**

愛滋病毒蛋白質酶全長為 297bp，由 99 個胺基酸所組成的單體 (monomer) 分子量為約 11KD，當蛋白質酶從 gag-pol 聚合蛋白中被釋放出來後兩條胺基酸會以非共價鍵結合並以對稱的方式形成同質複體 (homodimer)，由兩組 Asp26-Thr26-Gly27 形成活化中心，若以點突變的方式將 Asp 換置成其它胺基酸則會造成酵素活性消失，所以一般將其歸類為 Aspartic 型的蛋白質酶，其較 conserved active-site motifs 位在 loop 靠近中心的地方[7, 8]。此酵素在病毒的生命週期非常重要，若無法形成成熟的蛋白質酶，則無法將反轉錄酶自聚合蛋白(polyprotein)上切下，即使能產生反轉錄酶 p66/p66 同質複體 (homodimer) 也無法將未成熟的反轉錄酶 (p66/p66, RT) 切割成成熟且具有正常功能的異質副體 (heterodimer)，也無法從 gag p55 蛋白質上切割出構成殼衣蛋白(Capsid)的各組成蛋白( p24 ,p17, p7,p6 )。

### **\*愛滋病毒反轉錄酶( Viral Reverse Transcriptase;RT ):**

反轉錄酶在愛滋病毒複製過程中扮演一個重要角色，將病毒單股 RNA

反轉錄成單股 DNA 再利用 DNA 聚合酶形成雙股 DNA，此雙股 DNA 能嵌入宿主染色體中進行之後轉譯及轉錄作用。反轉錄酶為異質複體(heterodimer)由兩個次單位體(subunits) p66(66KDa)、p51(51KDa)構成，p51 是由 p66 經蛋白質酶切割產生，其具有相同的 N terminal 胺基酸序列，p66 的 C terminal 的部份具 Rnase H 活性[9, 10]。

#### **\*抗藥性與雞尾酒療法：**

愛滋病毒抗藥性的出現是造成臨床上治療的一個重大難題，從目前的研究可以肯定的說，病毒的抗藥性是由於基因變異性(genetic diversity)的結果。由於反轉錄酶本身具極高錯誤率( inherent high error rate )以及病毒在體內的高複製速率，導致容易產生許多的突變株(variants)。自從何大一 博士提出高效能抗反轉錄病毒療法(HAART)後[11, 12]，經臨床實驗證實能抑制病毒於宿主內複製降低病毒量，此基本療法是結合兩種反轉錄酶抑制劑(Reverse Transcriptase Inhibitor ;RTI)與一種蛋白質酶抑制劑(Protease Inhibitor ;PI)[13, 14]，藉由終止及抑制此兩種酵素的反應及活性達到藥物抑制病毒的效果，此療法不僅副作用降低也大大地提高愛滋病患的存活率與生活品質，不過當長期服藥或服藥順從性降低亦會驅使抗藥性病毒產生，此時醫生就須考慮換藥。因此，定期抽血檢查檢測患者血中的病毒量來反映病毒對於藥物的感受性是必要的！在台灣愛滋病感染率不斷攀升，感染年齡層也有下降的趨勢，愛滋病是一個相當值得重視的問題，在國外的研究有發現未曾服藥的愛滋感染者體內的病毒亦有產生抗藥性突變基因，如此會造成此感染者未來採用 HAART 治療效果降低，因此，若能篩選未服藥的愛滋病感染者體內病毒抗藥性之情形，除了可以了解病毒於宿主體內自然變異性亦可了解台灣地區愛滋病感染現況與複雜性提供愛滋病防治與疫苗研發重要之訊息！

## 二、材料與方法：

### \* 檢體的收集：

收集由疾病管制局病毒實驗室自 1996~2003 年台灣地區所篩選出的陽性血清、血漿檢體共約 440 件。

### \* 病毒 RNA 的萃取

使用 QIAGEN 公司的 QIAmp Viral RNA kit 進行 RNA 的純化。取血清 140ul 加入 560 ul Buffer AVL 於室溫下作用 10 分鐘再加入 560 ul 絕對酒精混合完全(vortexing)，上述混合液再過 QIAmp spin column，column 以 Buffer AW 清洗兩次以後，用 80 純水(Rnase Free)將 RNA 溶出。製備的病毒 RNA 可用於反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應 (RT-PCR)。

\* **亞型分析**：根據 HIV-1 C2V3 基因設計引子用於亞型分析(表二)，將以 Qiagen ViralAmp 試劑萃取好的病毒 RNA 以 RT-PCR 與 Nest-PCR 的方法來增幅引子所結合之特定片段，再定序分析。

#### a. 反轉錄反應(Reverse Transcription)

取病毒 RNA 10ul 加入 75mM KCl、50 mM Tris-HCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM DTT、ATCG dNTP mixture 0.5 mM、RNasin 38U/ul 及 anti-sense primer :35R (表二) 50 pmole 的混合物中，70 10 分鐘，再加入 100 units MuLV-reverse transcriptase，於 37 作用 90 分鐘。

#### b. 聚合酶鏈反應(Polymerase Chain Reaction )

取 5ul 的 cDNA 當模板( template) 50 mM KCl、 10 mM Tris-HCl、 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、 0.1 % Triton-X 100、 ATCG dNTP mixture、 1 mM primer 44F 與 35R (表二)各 50 pmole 的混合物中，加入 5 units Taq polymerase ( Invitrogen )，於 94 變性 (denature) 5 分鐘後，以 94 30 秒、 54 45 秒、 72 1 分鐘，進行 35 次反應，最後在 72 作用 15 分鐘。

c. (巢式聚合酶連鎖反應 ; Nest-PCR )

將第一次 PCR 的產物取 5ul 當模板(template)加入 50 mM KCl、 10 mM Tris-HCl、 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、 0.1 % Triton-X 100、 ATCG dNTP mixture 1 mM 及 primer 33F 與 48R 各 50 pmole 的混合物中，加入 5 units Taq polymerase ( Promega )，於 94 變性 (denature) 3 分鐘後，以 94 30 秒、 55 45 秒、 72 1 分鐘，進行 35 次反應，最後在 72 作用 15 分鐘。

d. 定序與演化樹分析：

將 Nest-PCR 的產物先以洋菜膠電泳分析以 ETBR 染色後預期可見約 525bp 的基因片段，再以 ABI 377 定序儀作定序分析。將定序的結果直接上網比對可到 NCBI 核酸比對網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>) 就可以比對的結果判斷亞型。演化樹是以電腦軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 2.0 及 PHYLIP 軟體操作。

\* 蛋白質酶與反轉錄酶之抗藥性分析：由於蛋白質酶與反轉錄酶的基因片段位於 gag 與 pol 的區域，針對這兩基因片段設計引子(表一)，

以 RT-PCR 與 Nest PCR 的方法來作分析。

a. 反轉錄反應(Reverse Transcription)

取病毒 RNA 10ul 加入 75mM KCl、50 mM Tris-HCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM DTT、ATCG dNTP mixture 0.5 mM、RNasin 38U/ul 及 anti-sense primer: RT21 (反轉錄酶片段)與 R-PR-probe(蛋白質酶片段)(見表一) 50 pmole 的混合物中, 70 10 分鐘, 再加入 100 units MuLV-reverse transcriptase, 於 37 作用 90 分鐘。

b. 聚合酶鏈反應(Polymerase Chain Reaction )

取 5ul 的 cDNA 當模板( template) 50 mM KCl、10 mM Tris-HCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 % Triton-X 100、ATCG dNTP mixture、1 mM 蛋白質酶與反轉錄酶引子對 F-MAW26/R-PR-probe 與 1-F-RT18/1-R-RT20 各 50 pmole 的混合物中, 加入 5 units Taq polymerase ( Invitrogen ) 分別作此兩片段基因增幅, 94 變性 (denature) 5 分鐘後, 以 94 30 秒、54 45 秒、72 1 分鐘, 進行 35 次反應, 最後在 72 作用 15 分鐘。

c. (巢式聚合酶連鎖反應 ; Nest-PCR )

將第一次 PCR 的產物取 5ul 當模板(template)加入 50 mM KCl、10 mM Tris-HCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 % Triton-X 100、ATCG dNTP mixture 與蛋白質酶與反轉錄酶 Nest-PCR 引子對 Nest-F-PR/Nest-R-PR 與 2-F-RT19/ 2-R-RT20 各 50 pmole 的混合物中, 加入 5 units Taq polymerase ( Invitrogen ), 於 94 變性 (denature) 3 分鐘後, 以 94 30 秒、55 45 秒、72 1 分鐘, 進行 35 次反應, 最後在 72 作用 15 分鐘。

d. 基因定序與抗藥性分析：

將 Nest-PCR 的產物先以洋菜膠電泳分析以 ETBR 染色後預期可見蛋白質酶基因片段約 369bps 與反轉錄酶的基因片段 600bps 約，再以 ABI 377 定序儀作定序分析。經訂序後的核酸序列，可用 GeneWorks ( IntronGenetics) 進行核酸序列連結比對，亦可將轉譯為胺基酸序列，以分析蛋白質酶與反轉錄酶所產生的突變，或上 Los Alamos National Laboratory 網站直接分析： [\(http://hiv-web.lanl.gov\)](http://hiv-web.lanl.gov)。

\* 基因序列註冊：

疾病管制局將台灣地區所篩選出的陽性檢體作亞型分析與自然變異產生抗藥性相關突變點之基因序列連線至 NCBI 的基因庫電腦網站，(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Bankit/>) 註冊申請 Accession number，建立台灣地區愛滋病毒亞型與自然變異抗藥性基因庫。

### 三、研究結果

愛滋病毒亞型分析方面，取實驗室經篩選檢驗(ELISA、PA 等)兩次陽性與西方點墨法(Western blotting)確認愛滋病毒抗體陽性的檢體，從西元 1996 年~2003 年共取 440 件(表三)，主要以引子對 44F/35R 作第一次 RT-PCR，在將 RT-PCR 增幅的產物作第二次的巢式 PCR 使用引子對為 33F/48R，經兩次 PCR 的循環增幅放大出愛滋病毒 C2V3 的基因片段約 525 bp，將基因定序的結果利用 NCBI 網站作亞型比對分析，結果發現有 376 件為 B 亞型(85.6%)、39 件(8.9%)為 A/E 亞型、16 件(3.6%)B/C 亞型、2 件(0.4%)A/G 亞型、7 件(1.5%)為 C 亞型(表四)。愛滋病毒亞型分析的結果可顯示此批檢體愛滋病毒 B 亞型為最多，其次為 E 亞型。其中亦有發現幾件較特殊的型別 B/C 與 A/G 重組病毒，從演化樹的分析也發現獨自形成一個聚集(cluster)(圖三)。如欲了解病毒重組的片段與區域需要作愛滋病毒基因全長定序，利用分析軟體找出病毒重組的中斷點 (Break point)，便可進一步確認。

愛滋病毒抗藥性分析方面，目前 HIV-1(+)的治療方式多採用高效能抗反轉錄酶(Highly Active Antiretroviral Therapy ; HAART)結合蛋白質酶抑制劑(Protease Inhibitor ; PI)與反轉錄酶抑制劑(Reverse Transcriptase Inhibitor ; RTI)同時抑制愛滋病毒複製時所需要的兩個重要的酵素，一旦病患的服藥順從性不佳或同一種藥物服用時間太長，或者因為病毒複製過程中反轉錄(Reverse transcription)或轉錄作用所發生的自然突變所造成自然變異等，都有可能造成對 HAART 輕度到重度的抗藥性。在愛滋病毒蛋白質酶分析方面可以發現，總共分析檢體為 440 件 RT-PCR 與 nest PCR 所增幅放大的片段為 403bp，將定序後的基因序列以 NCBI 網站與 Stanford HIV database 網站作抗藥性分析，結果發現在產生

抗 PI 相關突變點有 414 件(414/440; 94%)，在 L10 的位置有 39 件有突變，機率为 9.4%、 K20 的位置有 27 件有突變，機率为 6.1%、 M36 的位置有 134 件有突變，機率为 32.5%、 L63 的位置有 304 件有突變，機率为 73.8%、 A71 的位置有 37 件有突變，機率为 8.8%、 V77 的位置有 173 件有突變，機率为 42%、 V82 的位置有 3 件有突變，機率为 0.7%、 I84 的位置有 2 件有突變，機率为 0.48%、 L90 的位置有 5 件有突變，機率为 1.21% (表五)(表七)，其中跟抗藥性有關的主要突變點(Primary mutation)為 V82、 I84 與 L90， 其它突變點均為次要突變點(Secondary mutation) (表十)。

在愛滋病毒反轉錄酶分析方面,在 440 件檢體以專一性引子對 1-F- RT18/1-R-RT21 與 2-F-RT19/2-R-RT20 作 RT-PCR 與 nest-PCR 的增幅片段長 598bp，將定序後的基因序列以 NCBI 網站與 Stanford HIV database 網站作抗藥性分析，結果發現產生抗 RTI 相關突變點有 67 件 (67/440;15.2%) M41 的位置有 3 件有突變，機率为 4.4%、 S68 的位置有 12 件有突變，機率为 17.9%、 T69 的位置有 2 件有突變，機率为 2.9%、 K70 的位置有 45 件有突變，機率为 67.16%、 V75 的位置有 3 件有突變，機率为 4.4%、 M184 的位置有 4 件有突變，機率为 5.9%、 L210 的位置有 4 件有突變，機率为 5.9%、 T215 的位置有 7 件有突變，機率为 10.44%(表六)(表八)。其中跟抗藥性有關的主要突變點(Primary mutation)為 T69S、 K70R、 V75T、 T215Y、 Y181C、 M184V 等，本次分析僅發現有 2 件為 T69S、 4 件在 M184V、 7 件在 T215Y，產生與抗藥性相關之突變點機率不高(表九)。

## 討 論:

何大一博士在西元 1996 年提出了高效能抗反轉錄酶(HAART)治療法即俗稱的雞尾酒療法(cocktail therapy)，結合蛋白質酶抑制劑(PI)與反轉錄酶抑制劑(RTI)共同抑制愛滋病毒於細胞內複製時所需的酵素。根據愛滋病毒動力學來計算當患者服用 HAART 治療後，假設病毒完全被抑制而且沒有其它未知的宿主細胞，使得  $T^*$  (潛伏 T 細胞的愛滋病毒)、 $V$  (血漿中的愛滋病毒)變為測不到且  $k$ 、 $r$  兩種速率常數變為零，預計在 3 年內便可完全將愛滋病毒消滅(圖四)。但是情況並不是如此，當病患服用 HAART 治療後血漿中的病毒是可迅速被抑制，但是潛伏在 CD4 淋巴球中的病毒仍無法將其消滅[15]，因此，科學家又提出新的治療方法，以 interleukin-2(IL-2) 搭配 HAART 來治療，因為 IL-2 是 T 細胞生長分裂所需的細胞激素，希望以 IL-2 來刺激潛伏病毒複製再以 HAART 將其抑制，但此方法已被證實無法完全消滅愛滋病毒[16-18]。因此，目前被醫界廣為使用的治療方法即 HAART 治療配方加上監測 CD4 淋巴球的數目與愛滋病毒量(Viral load)。

愛滋病毒抗藥性的出現是造成臨床上治療的一個重大難題，從目前的研究可以肯定的說，病毒的抗藥性是由於基因變異性(genetic diversity)的結果。由於反轉錄酶本身具極高錯誤率(inherent high error rate)以及病毒在體內的高複製速率，導致容易產生許多的突變株(variants)。加上選擇性壓力(selective pressure)的出現，例如：抗愛滋病毒藥物的使用，便會驅使抗藥性病毒的快速出現，而這些抗藥性病毒就是其基因上產生突變出現病毒反彈(viral rebound)的現象[19, 20]。本計劃研究目的是為了了解愛滋病毒抗藥性在未服藥病患(treatment-naive patient)中的盛行率與台灣地區愛滋病毒亞型型別。在本研究結果中發現在初次確認愛滋病陽性 440 件檢體中，愛滋病毒蛋白質酶方面發現與 PI 相關的自然突變點有 414 件(414/440; 94%)，僅有 3 件(3/414; 0.72%)在 V82 位置改變

為 A (Alanine)、有 2 件( 2/414 ;0.48%)在 I84 位置改變為 V (Valine)、5 件( 5/414; 1.29%)在 L90 位置改變為 M (Methionine)為主要突變點，這些位點位於酵素活性區域即受質結合位(substrate binding site)。其餘的皆為次要突變點，位於酵素活性區域以外的部分[21]。在愛滋病毒反轉錄酶方面發現與 RTI 相關的自然突變點有 67 件(67/440;15.2%)，僅有 2 件(2/67 ; 17.9%)在 T69 位置改變為 S (Serine)、有 4 件(4/67; 5.9%)在 M184 位置改變為 V (Valine)、有 7 件(7/67; 10.44%)在 T215 位置改變為 Y (Tyrosine)以上為主要突變點，其餘為次要突變點。

從 HAART 治療方面來分析，在這些未服藥的病人在 V82A/F/T/S 可能會對 Indinavir、Ritonavir 兩種 PI 藥物產生明顯的抗藥性；在 L90M 會對 Saquinavir 、Nelfinavir 兩種 PI 藥物產生明顯的抗藥性，在 I84V 則會對 Amprenavir 藥物產生明顯的抗藥性(表十)[22]。在愛滋病毒蛋白質酶上發現最多的突變點累積為 5 個 L10I+K20R+M36I+L63P+V71I，這些次要的自然突變點的累積也會造成抗藥性的表現型(Phenotype)出現。若病人在 T215Y 突變則會對 Zidovudine 藥物產生明顯的抗藥性；在 M184V 則會對 Zalcitabine、Lamivudine、Abacavir 藥物產生明顯的抗藥性；至於若產生 T69S 突變則會對多種 NRTI (Nucleoside RT inhibitor)產生抗藥性(表九) [23]。在愛滋病毒反轉錄酶上發現病人最多突變點累積為 3 個 S68G+L210W+T215F 或 M41L+K70R+V75I。

此外，HIV-1 基因的亞型鑑定非常重要，可以知道病毒演化複雜性以及傳播流行的區域，而 HIV-1 亞型與感染的途徑、傳播的方式有關，對疫苗與藥物研發也有重要的影響。而且 HIV-1 不同亞型對於藥物感受度可能有差異進而影響產生不同的抗藥性病毒株。在本次研究愛滋病毒亞型發現除

了台灣地區常見的兩個亞型 B 亞型(376/440; 85%)與 E 亞型(39/440 ;8.9%) (表四) , 但與過去的台灣地區愛滋病毒亞型研究有所差別。例如:陽明大學陳宜民教授的研究發現在 288 感染者中 B 亞型佔 68.2% E 亞型佔 27.3%, 男性感染者多為 B 亞型 , 女性感染者多為 non-B 亞型[1, 3]。台灣大學李君男教授藉由 vpu 基因的分型研究中也指出在 363 位感染者中 73.8%為 B 亞型、23.1%為 E 亞型、1.1%為 C 亞型[6]。本次的研究中 B 亞型的比例偏高而 E 亞型比例降低 , 可能與分析的母群體有關 , 本次分析的檢體是疾管局從西元 1996 年到 2004 年的初篩或確認的愛滋病檢體 , 有的則是性病防治所或捐血中心送來的需要本局確認的個案 , 此類的檢體男性的比例較高 , 女性比率較低。從亞型與性行為模式有研究發現 B 亞型多為男同性戀或雙性戀 , E 亞型多為男異性戀 , 而 E 亞型亦是異性戀族群主要傳播的型別[1, 5]。

此外 , 愛滋病毒亞型演化樹分析方面有發現兩種較特殊的亞型 , HIV-1 BC 與 AG 重組型病毒(circulating recombinant forms;CRF)(圖三) , 這是台灣地區罕見的亞型。重組病毒產生的原因可能為同一個體感染兩種不同亞型的愛滋病毒 , 病毒在細胞內發生基因片段的重新組合 , 成為新型的病毒。HIV-1 AG 重組病毒在非洲的中部與西部為主要流行的型別[24] , 追蹤其檢體來源編號 5927 來自高雄捐血中心為一名男性的血袋而編號 6412 為一名女性來自屬立桃園醫院。而 HIV-1 BC 重組病毒於中國的雲南省的靜脈毒癮者中傳布 , 其中 CRF07\_BC 分布於中國的西北部新疆而 CRF08\_BC 分布中國的東南方廣西[2] , 目前發現的 HIV-1 BC 重組病毒(例如:97CN001 97CNGX-6 等)其基因體以 C 亞型為主其間插入 B 亞型的片段[25](圖一)。由於中國雲南早期的靜脈毒癮族群感染愛滋病以 B 亞型與 Thai-B 亞型為主 , 到了西元 1990 年發現中國的靜脈毒癮族群感染以 C 亞型為多 , 毒癮者藉由針頭的共用進而導致共同感染(coinfection)兩種亞型的病毒[2]。而本研究所發現

的 HIV-1 BC 重組病毒其檢體來源為台南監獄與台南看守所裡感染愛滋病的靜脈毒癮者。如欲了解整個基因的結構與病毒重組的中斷點(breakpoint) 需要定出基因序列全長再以 bootscanning plots 與 exploratory tree 來作分析找出重組的片段，搭配問卷調查以釐清感染的來源。

## 五：圖表

圖一、愛滋病毒之重組病毒株( Recombinant virus )

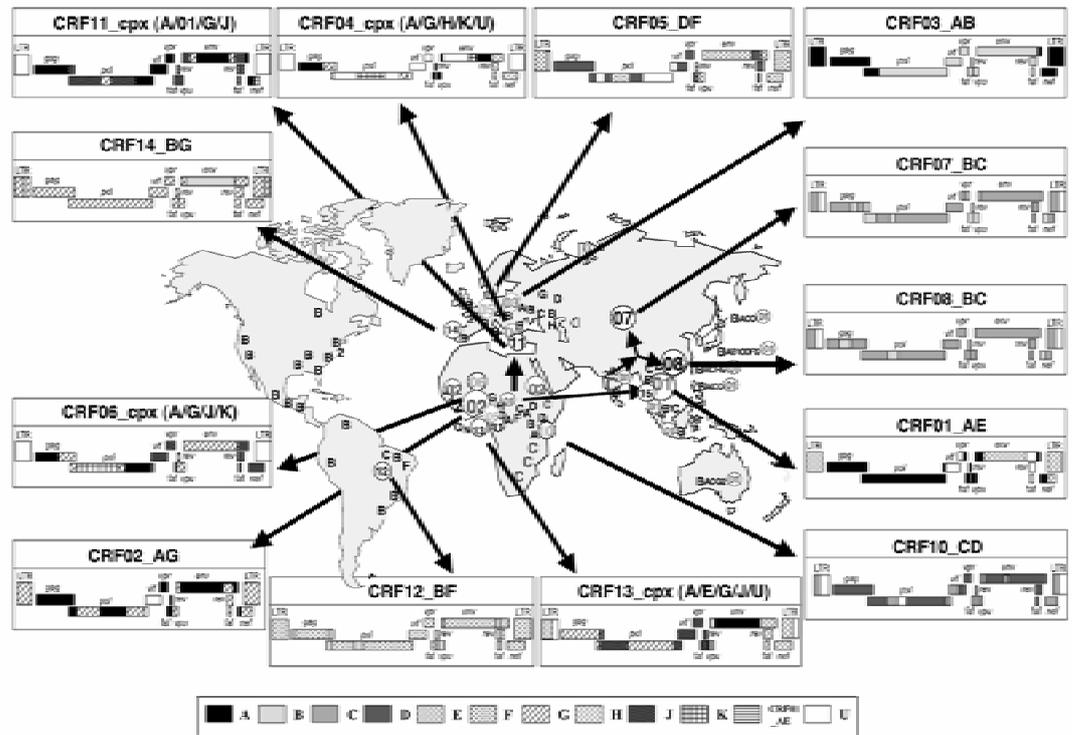


Fig. 3 Recombinant structure of selected circulating recombinant forms (CRF01 through 14) and their geographic distribution.

圖二、愛滋病毒結構與感染史(infection cycle)

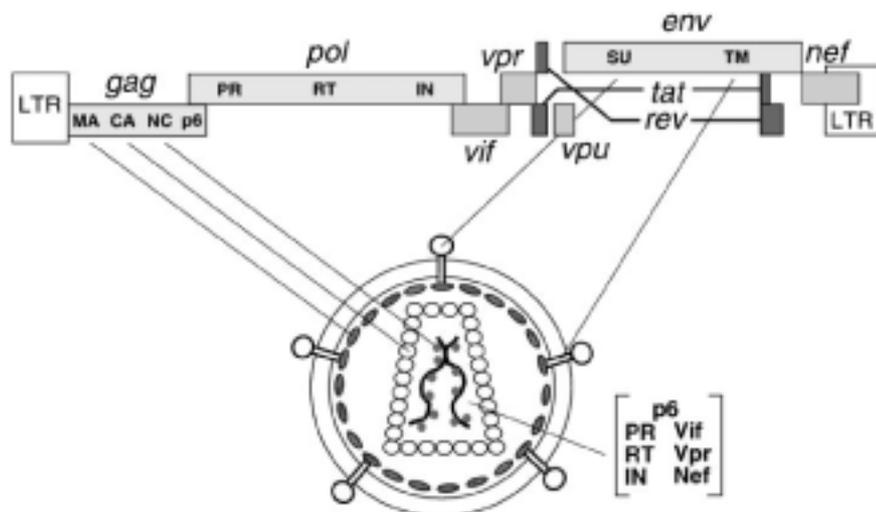
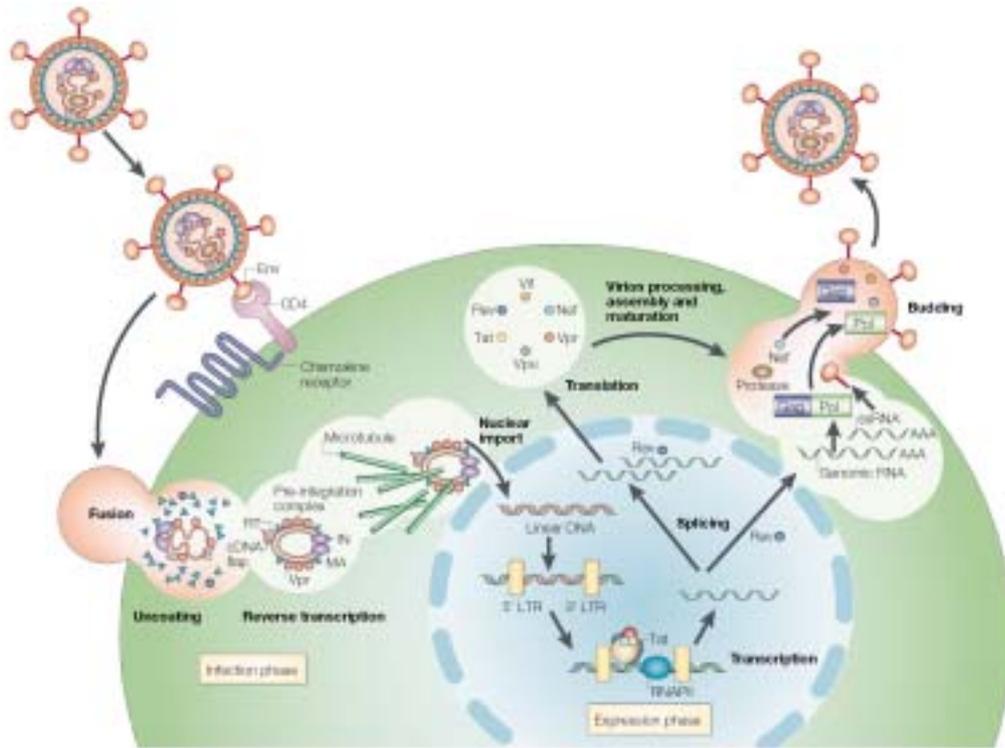
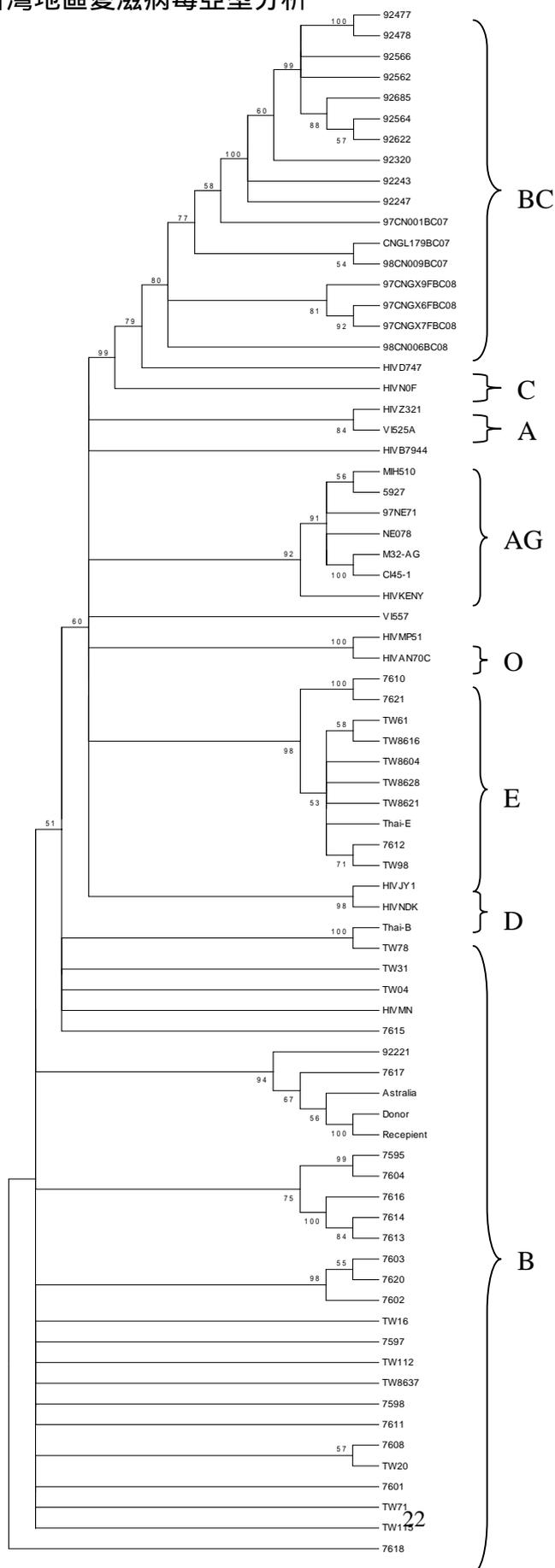
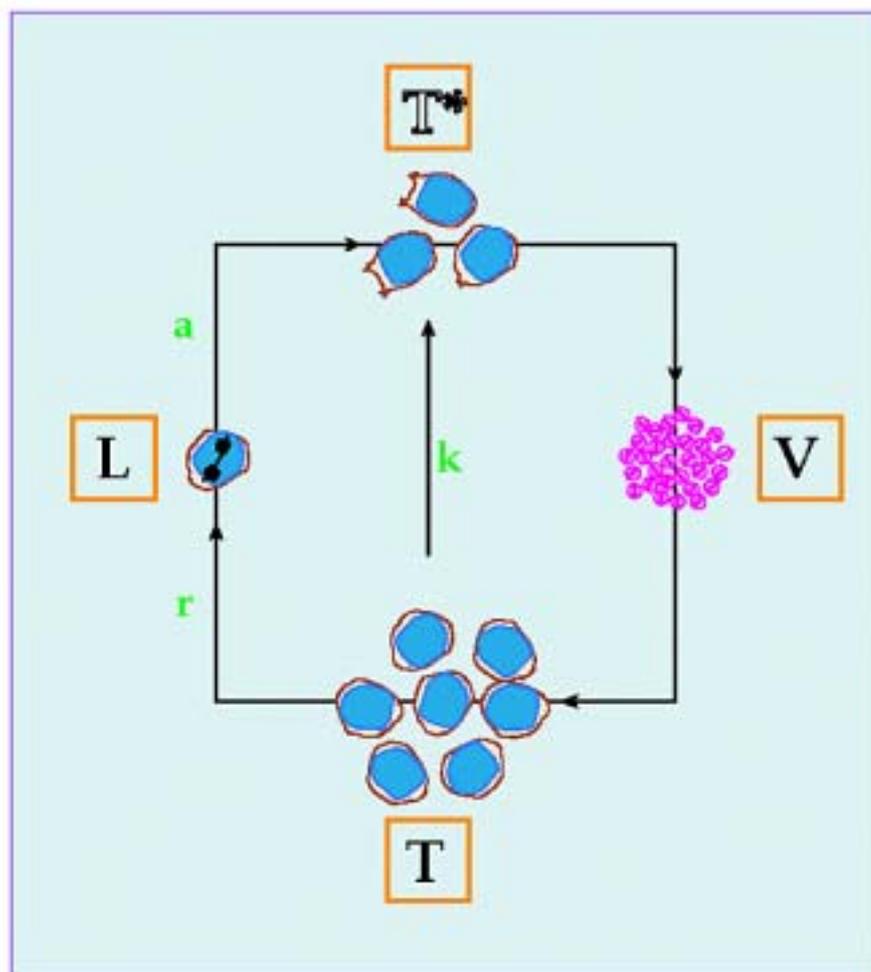


Figure 1 Organization of the HIV-1 genome and virion.

圖三、台灣地區愛滋病毒亞型分析



圖四、HAART 藥物動力學



( David Ho , Nature Medicine Vol.6 No.7 July2000 )

**HAART :  $V, T^* \longrightarrow$  undetectable ;  $k, r \longrightarrow$  zero**

V: cell free virions ; T: CD4 T lymphocyte ; T\* : latently infected reservoir ; L: productively infected CD4  
; T lymphocyte ; k : equally fast rate ; r: replacement rate ; a: decay rate

表一. 為 RT-PCR 與 Nest PCR 增幅愛滋病毒蛋白質酶(Protease)與反轉錄酶(Reverse transcriptase)所用之引子對(primers)序列

Primer	Sequence <sup>a</sup>	Gene	Position
1-F-RT18	GGAAACCAAAAATGATAGGGGGAATTGGAGG	Pol	2376-2407
1-R-RT21	CTGTATTTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGG	Pol	3088-3119
2-F-RT19	GGACATAAAGCTATAGGTACAG	Pol	2453-2475
2-R-RT20	CTGCCAGTTCVAGCTCTGCTTC	Pol	3021-3051
F-MAW26	TTGGAAATGTGGAAAGGAAGGAC	Gag	1991-2013
R-PR-probe	GGCAAATACTGGAGTATTGTATGG	Pol	2734-2711
Nest-F-PR	CAACTCCCCCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAA	Gag	2197-2230
Nest-R-PR	CATCCATTCTGGCTTTAATTTTACTGGTACAGT	Pol	2600-2566

表二. 為 RT-PCR 與 Nest PCR 增幅愛滋病毒 C2V3 基因所用之引子對序列

Primer	sequence	polarity
44F	5'-ACAGTRCARTGYACACATGG-3'	Sense
35R	5'-CACTTCTCCAATTGTCCITCA-3'	Anti-sense
33F	5'-CTGTTIAATGGCAGICTAGC-3'	Sense
48R	5'-RATGGGAGGRGYATACAT-3'	Anti-sense

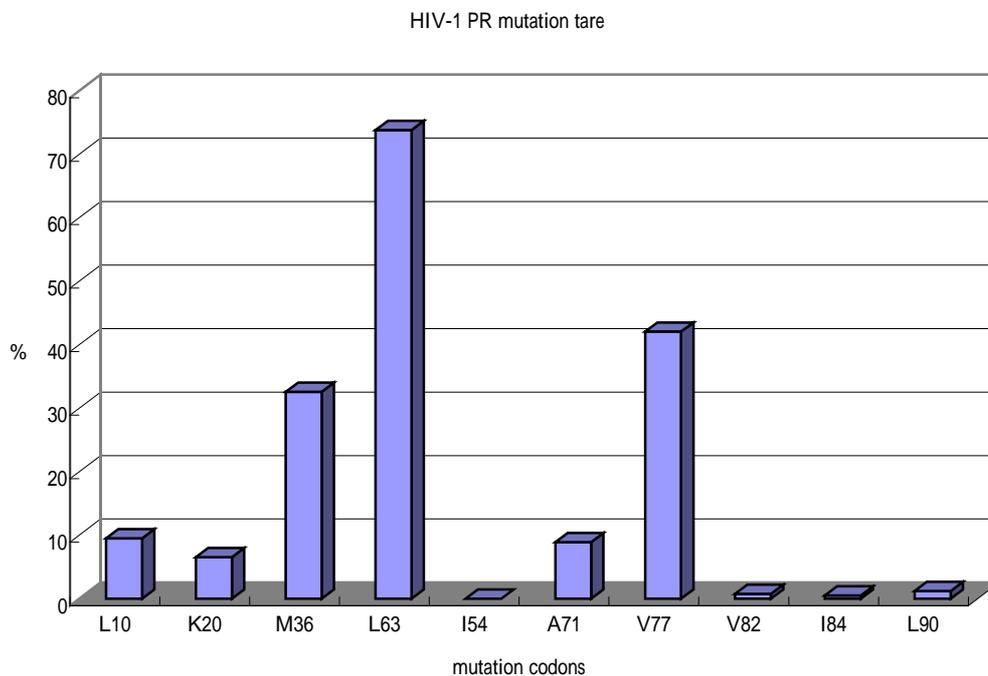
表三、歷年愛滋病檢體的分析數量

年度	1996	1998	1999	2001	2002	2003	2004
分析數量	2	30	68	28	88	125	99

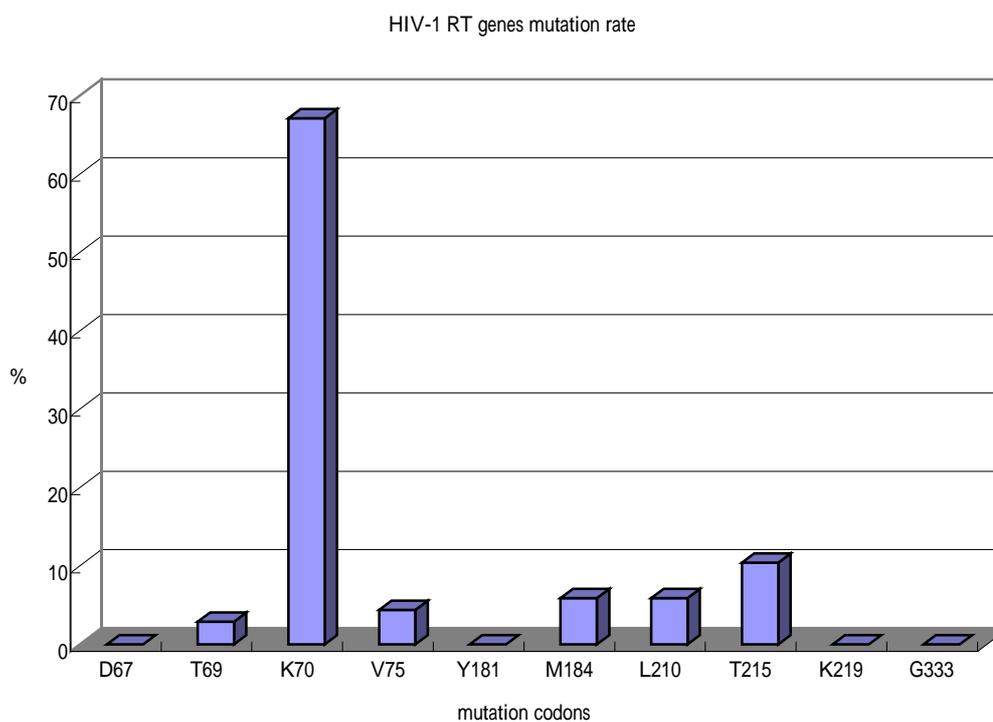
表四、愛滋病毒亞型分析數目與盛行百分比

Subtype	Quantities	Percentage (%)
B	377	85.6 %
A/E	31	7.1 %
B/C	16	3.6 %
A/G	2	0.4 %
C	7	1.5 %
E	8	1.8 %
Total	440	100 %

表五、愛滋病毒蛋白質酶抗藥性相關突變點分析



表六、愛滋病毒反轉錄酶抗藥性相關突變點分析







表九、 HIV-1 反轉錄酶 (Reverse transcriptase) 相關之主要突變點 (Primary mutation) 與次要突變點 (Secondary mutation)

Mutations associated with resistance to HIV-1 RT inhibitors		
RT inhibitor	Primary mutations	Secondary mutations
<i>Nucleoside RT inhibitors</i>		
Zidovudine	K70R, T215Y/F	M41L, D67N, L210W, K219Q
Didanosine	L74V	K65R, M184V/I
Zalcitabine	K65R, T69D, L74V, M184V/I	
Lamivudine	E44D, V118I, M184V	
Stavudine	V75T	
Abacavir	K65R, L74V, M184V	M41L, D67N, K70R, Y115F, L210W, K219Q
Multinucleoside resistance (a)	Q151M	A62V, V75I, F77L, F116Y
Multinucleoside resistance (b)	T69S-SA/G/S	M41L, A62V, D67N, K70R, L210W, T215Y, K219Q
<i>Non-nucleoside RT inhibitors</i>		
Nevirapine	K103N, V106A, V108I, Y181C, Y188C, G190A	L100I
Delavirdine	K103N, Y181C	P236L
Efavirenz	K103N, Y188L, G190A	L100I, V108I, P225H

表十、 HIV-1 蛋白質酶(Protease)相關之主要突變點(Primary mutation)與次要突變點(Secondary mutation)

Mutations associated with resistance to HIV-1 protease inhibitors

Protease inhibitor	Primary mutations	Secondary mutations
Indinavir	M46I, V82A/F/T/S	L10I/R/V, K20M/R, L24I, V32I, M36I, I54V, A71V/T, G73S/A, V77I, I84V, L90M
Ritonavir	V82A/F/T/S	K20M/R, V32I, L33F, M36I, M46I/L, I54V/L, A71V/T, V77I, I84V, L90M
Saquinavir	G48V, L90M	L10I/R/V, I54V, A71V/T, G73S, V77I, V82A, I84V
Nelfinavir	D30N, L90M	L10F/I, M36I, M46I/L, A71V, V77I, V82A/F/T/S, I84V, N88D
Amprenavir	I50V, I84V	L10F/I/R/V, V32I, M46I, I47V, I54V

## 六、參考文獻

1. Chen YM, Lee CM, Lin RY, Chang HJ. **Molecular epidemiology and trends of HIV-1 subtypes in Taiwan.** *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998,19:393-402.
2. Yang R, Kusagawa S, Zhang C, Xia X, Ben K, Takebe Y. **Identification and characterization of a new class of human immunodeficiency virus type 1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07\_BC and CRF08\_BC, in China.** *J Virol* 2003,77:685-695.
3. Chen YM, Huang KL, Jen I, *et al.* **Temporal trends and molecular epidemiology of HIV-1 infection in Taiwan from 1988 to 1998.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001,26:274-282.
4. Mauclore P. **[HIV-1 group N in Cameroon and apparent viruses in the chimpanzee].** *Bull Soc Pathol Exot* 2000,93:162.
5. Dillner L. **HIV subtype may explain sexual transmission.** *Bmj* 1996,312:530-531.
6. Lee CN, Wang WK, Fan WS, *et al.* **Determination of human immunodeficiency virus type 1 subtypes in Taiwan by vpu gene analysis.** *J Clin Microbiol* 2000,38:2468-2474.
7. Perryman AL, Lin JH, McCammon JA. **HIV-1 protease molecular dynamics of a wild-type and of the V82F/I84V mutant: possible contributions to drug resistance and a potential new target site for drugs.** *Protein Sci* 2004,13:1108-1123.
8. Hong L, Zhang XC, Hartsuck JA, Tang J. **Crystal structure of an in vivo HIV-1 protease mutant in complex with saquinavir: insights into the mechanisms of drug resistance.** *Protein Sci*

- 2000,9:1898-1904.
9. Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A, *et al.* **Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance.** *J Mol Biol* 1994,243:369-387.
  10. Yadav PN, Yadav JS, Modak MJ. **Nucleoside drug resistance in HIV-1 reverse transcriptase.** *Nat Struct Biol* 1995,2:193-195.
  11. Ho D. **HIV research overview: interview with David Ho, M.D. Interview by John S. James.** *AIDS Treat News* 1997:1-6.
  12. Ho DD. **How far can you knock down HIV? An interview with David D. Ho, MD. Interview by Mark Mascolini.** *J Int Assoc Physicians AIDS Care* 1997,3:40-44.
  13. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, *et al.* **Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy.** *Science* 1997,278:1295-1300.
  14. Ortiz GM, Nixon DF, Trkola A, *et al.* **HIV-1-specific immune responses in subjects who temporarily contain virus replication after discontinuation of highly active antiretroviral therapy.** *J Clin Invest* 1999,104:R13-18.
  15. Siliciano RF. **A reservoir for HIV in patients on combination antiretroviral therapy.** *Hopkins HIV Rep* 1998,10:1, 5-6, 11.
  16. Kulkosky J, Sullivan J, Xu Y, Souder E, Hamer DH, Pomerantz RJ. **Expression of latent HAART-persistent HIV type 1 induced by novel cellular activating agents.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004,20:497-505.

17. Crowe S. **Effect of interleukin-2 plus highly active antiretroviral therapy on HIV-1 replication and proviral DNA (COSMIC trial), by Ling et al.** *Aids* 2003,17 Suppl 4:S105-107.
18. Martinez-Marino B, Ashlock BM, Shiboski S, Hecht FM, Levy JA. **Effect of IL-2 therapy on CD8+ cell noncytotoxic anti-HIV response during primary HIV-1 infection.** *J Clin Immunol* 2004,24:135-144.
19. de la Rosa R, Ruiz-Mateos E, Rubio A, *et al.* **Long-term virological outcome and resistance mutations at virological rebound in HIV-infected adults on protease inhibitor-sparing highly active antiretroviral therapy.** *J Antimicrob Chemother* 2004,53:95-101.
20. Mocroft A, Ruiz L, Reiss P, *et al.* **Virological rebound after suppression on highly active antiretroviral therapy.** *Aids* 2003,17:1741-1751.
21. Yerly S, Fagard C, Gunthard HF, Hirschel B, Perrin L. **Drug resistance mutations during structured treatment interruptions.** *Antivir Ther* 2003,8:411-415.
22. Paolucci S, Baldanti F, Maserati R, *et al.* **Quantification of the impact of HIV-1 reverse transcriptase and protease mutations on the efficacy of rescue HAART.** *Antiviral Res* 2000,45:101-114.
23. Yu M, Kabat W, Wang J. **[Rapid detection of drug resistant HIV-1 to reverse transcriptase and protease inhibitors in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapies].** *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*

2000,14:325-329.

24. Tebit DM, Zekeng L, Kaptue L, Krausslich HG, Herchenroder O.  
**Construction and characterisation of a full-length infectious molecular clone from a fast replicating, X4-tropic HIV-1 CRF02\_AG primary isolate.** *Virology* 2003,313:645-652.
25. McClutchan FE, Carr JK, Murphy D, *et al.* **Precise mapping of recombination breakpoints suggests a common parent of two BC recombinant HIV type 1 strains circulating in China.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002,18:1135-1140.