

· 论 著 ·

贵州省新发现 HIV-1 毒株亚型特征研究*

孙显光¹, 何翔², 李志坚¹, 张信辉¹, 申莉梅¹(1. 贵州省 CDC 艾滋病性病皮肤病防治研究所艾滋病二科, 贵阳 550002; 2. 中国 CDC 艾滋病
艾滋病预防控制中心病毒免疫室, 北京 100050)

摘要:目的 分析研究贵州省 HIV-1 亚型毒株分布及流行特征, 为艾滋病防治及疫苗研制提供科学依据。方法 用套式基因扩增方法(PCR)扩增 HIV-1 毒株 gag 基因和 env 基因并测序分析。结果 128 例样本扩增、测序成功 119 例, 其中 CRF01-AE 亚型 62 例, CRF07-BC 重组亚型 49 例, CRF08-BC 重组亚型 2 例, B 亚型 6 例。结论 本次研究贵州省 HIV-1 毒株以新发现的 CRF01-AE 重组亚型流行为主, CRF07-BC 重组亚型次之, 多亚型并存; 分析结果提示贵州省 HIV-1 毒株亚型向性传播转变。

关键词: HIV-1; 亚型特征; 基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.29.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)29-2922-03

The Study of characteristic of new HIV-1 subtypes in Guizhou*

Sun Xianguang¹, He Xiang², Li Zhijian¹, Zhang Xinhui¹, Shen Limei¹(1. Guizhou Province CDC Institute of Prevention and Control AIDS/STD/ Dermatology, Guiyang, Guizhou 550002, China;
2. Department of Virology and Immunology, Chinese CDC Center for AIDS Prevention and Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To study the HIV-1 subtype strain distribution and epidemic characteristics in Guizhou province and to provide scientific data for HIV/AIDS prevention and control. **Methods** Using a nested Polymerase Chain Reaction(PCR) to amplify gag and env gene of HIV strains, and for sequencing. **Results** 119 samples were amplified and sequenced successfully among 128 samples, of which 62 subtype CRF01-AE, 49 recombinant subtype CRF07-BC, 2 recombinant subtype CRF08-BC and 6 subtype B. **Conclusion** The study showed that newly discovered recombinant subtype CRF01-AE was most prevalent in Guizhou province. recombinant subtype CRF07-BC was the second one. Different subtypes of HIV stains existed. The results suggest that the subtypes of HIVstains will change to sexual transmission.

Key words: HIV-1; characteristics genotype; genes

艾滋病病毒为了适应新的环境, 必然通过变异或重组方式改变其属性来求得生存^[1-2]。艾滋病病毒亦称人类免疫缺陷病毒, 简称 HIV, 属 RNA 逆转录酶病毒, 具有高度的遗传变异性, 容易通过基因重组方式产生新的毒株或亚型。HIV 分 HIV-1、HIV-2 两个型别, 我国以 HIV-1 流行为主。目前全球 HIV-1 共发现 14 种亚型, 我国 31 个省发现 9 种亚型^[3], 其中本省发现 7 种。随着 HIV-1 在本省流行时间的延长, 其亚型内的变异也会越来越大。研究 HIV 毒株的基因亚型特征, 具有重要的现场实用性, 有助于从分子流行病学角度掌控 HIV 的流行状况、制定预防干预措施以及疫苗的研制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 安顺地区采样 41 份, 全为吸毒传播样本; 贵阳、黔东南两地区采样 19 份, 全为性传播样本; 铜仁、六盘水、黔南 3 个地区采样 68 份, 包括血液传播样本 29 份、吸毒传播样本 26 份、性传播样本 13 份。病例对象全部为 2007 年新发现的 HIV 感染者并签订知情同意书。对照病毒株采用国际标准亚型参考株。

1.2 核酸提取 采用 Qiangen 公司的 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒, 按说明书操作。

1.3 基因扩增与测序分析

1.3.1 引物 用中国疾病预防控制中心合成的 NP21 和 NP22 引物对为外侧引物(ACA GTR CAR TGY ACA CAT GG, CAC TTC TCC AAT TGT CCI TCA); Env-C 和 Env-D3 引物对为内侧引物(CTG TTI AAT GGC AGI CTA GC, RAT

GGG AGG RGY ATA CAT)。

1.3.2 方法 按 Nested 基因扩增方法(PCR)进行。即: 用 5 μL 核酸样品与 NP21/NP22 初次扩增, 95 °C 1 min; 94 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。取 1/10 的反应产物再与 Env-C、Env-G 做第 2 次扩增, 95 °C 1 min; 94 °C 20 s, 54 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.3.3 PCR 产物纯化 采用 Qiangen 公司的 Qiaex 试剂盒, 按说明书提纯 HIV 基因片断, 回收 DNA 溶于 10 mmol/L Tris-HCl, pH8.7, 经琼脂糖凝胶电泳后与标准品对照计算核酸浓度。

1.3.4 核酸序列测定 1 μg 样品与 6 pmol/L 引物经测序反应提纯后, 在 ABI 公司 3100A 型 DNA 测序仪上进行序列测定。

1.3.5 序列分析 采用目前国际通用的基因序列分析方法。即: 所测序列经 DNA 软件编辑后用 GCG 软件包进行分析。以 Pileup 程序进行排序并与国际标准序列进行比较, 以 Pretly 程序计算共享序列, 用 Distance 程序测定毒株间序列离散率, 用 Growtree 程序做系统树状分析。

1.3.6 HIV-1 毒株亚型的判定 利用计算机软件模型将样本基因序列与国际标准参考株基因序列进行比对、构建系统进化树、确定 HIV 毒株亚型是目前国际公认的基因序列分析方法。用此法分析获得 gag 和 env 基因区序列, 分别确定不同基因的亚型; 对于新发现的重组模式的序列进行重组断点分析, 结合

* 基金项目: 贵州省“十一五”重点攻关社发资金项目(黔科合 NY 字[2006]-3051)。

2 个基因片段的结果最终确定样本亚型^[4-5]。

3.7 统计学处理 采用 SPSS 17 进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 贵州省 HIV-1 毒株亚型分布结果 此次研究共发现 4 种 HIV-1 亚型毒株,其中 CRF01-AE 为贵州省首次发现,且占检出毒株的 52.1%(62/119),是本次研究发现的优势流行毒株,见表 1。

表 1 119 例 HIV-1 样本亚型分布

HIV 亚型	病例数	比例(%)
CRF01-AE	62	52.1
CRF07-BC	49	41.2
B	6	5.0
CRF08-BC	2	1.7

2.2 贵州省 HIV-1 亚型毒株系统进化树分析结果 119 例 HIV-1 亚型毒株经 gag 基因和 env 基因系统进化树分析,结果

表 3 119 例 HIV-1 亚型毒株在不同地区及传播人群中的分布

地区	采样例数(n)	成功例数(n)	CRF01-AE[n(%)]	CRF07-BC[n(%)]	CRF08-BC[n(%)]	B[n(%)]
安顺地区	41	40	1(2.50)	37(92.50)	1(2.50)	1(2.50)
贵阳等地区	19	16	10(62.50)	4(25.00)	1(6.25)	1(6.25)
铜仁等地区	68	63	52(82.54)	5(7.94)	1(1.58)	5(7.94)

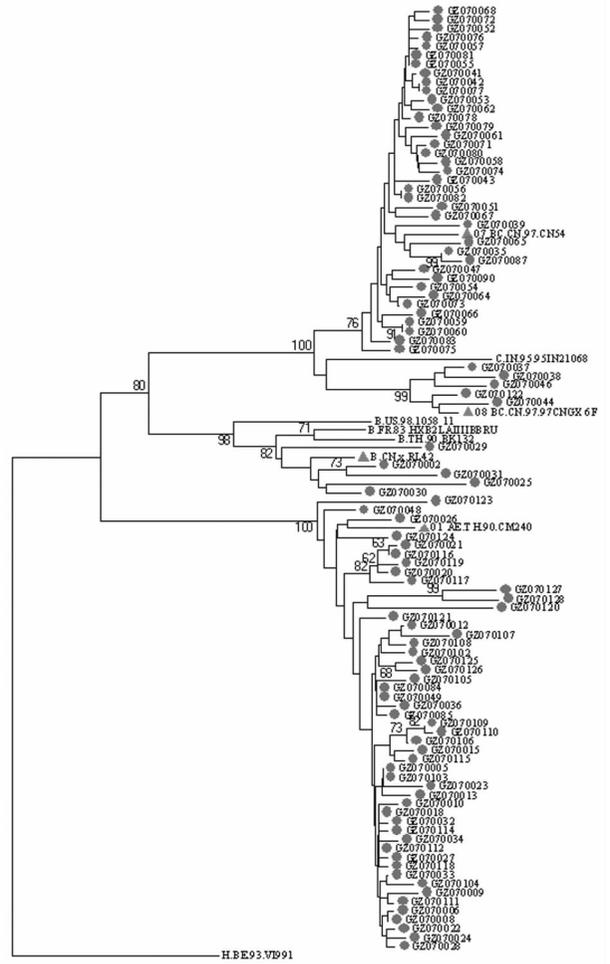
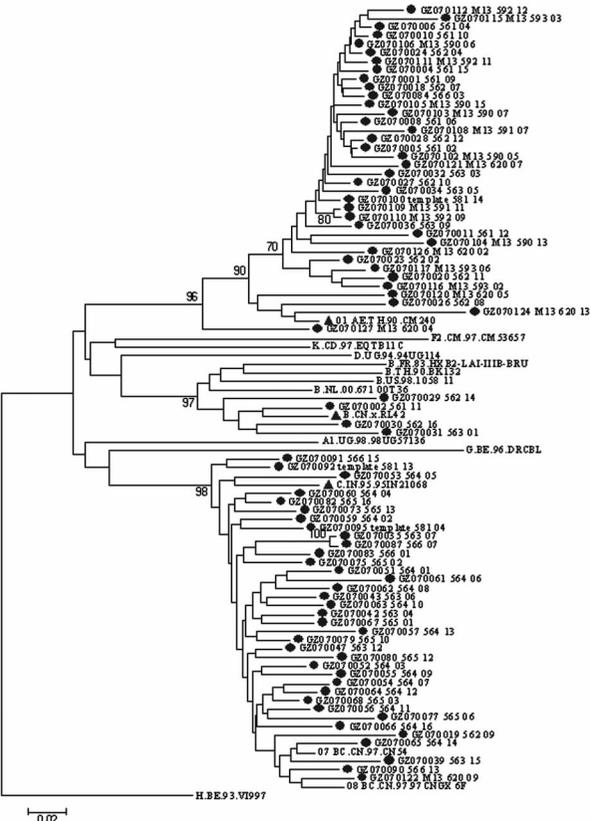
CRF01-AE 的 gag 基因与国际标准株相近度达 100%,其 env 基因与国际标准株相近度达 96%,CRF07-BC 的 gag 基因与国际标准株相近度达 100%,其 env 基因与国际标准株相近度达 98%,见图 1、2。

2.3 贵州省 HIV-1 流行毒株组内基因距离分布情况 此次研究结果 01-AE 基因离散率远比 07-BC 基因离散率小,表明 01-AE 亚型毒株在贵州的流行时间较短,见表 2。

表 2 119 例 HIV-1 流行毒株组内基因距离分布

项目	gag-01-AE	env-01-AE	gag-07-BC	env-07-BC
序列数量	55	48	49	38
基因距离	0.019±0.003	0.066±0.010	0.015±0.001	0.102±0.011

2.4 贵州省 HIV-1 各亚型毒株在不同人群中的分布 用不同地区测序成功病例数与各亚型所占比例数进行统计分析,发现它们之间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。



*注:图中、三角标注的基因序列为与贵州 HIV-1 亚型毒株相近的国际标准参考株基因序列,圆点标注序列为贵州 HIV-1 亚型毒株基因序列;图中横线上的数值表示样本基因序列与国际标准参考株基因序列的相近度值。

图 1 贵州省 HIV-1 毒株 env 基因系统进化树分析

图 2 贵州省 HIV-1 毒株 gag 基因系统进化树分析

3 讨 论

3.1 亚型毒株分布特征 本次研究通过 HIV-1 毒株外膜蛋白扩增和基因序列测定分析,贵州省 119 份样本有 CRF01-AE、CRF07-BC、B、CRF08-BC 4 种亚型,以 CRF01-AE 重组亚型为主要流行株,CRF07-BC 次之。其中,CRF01-AE 亚型毒株主要从铜仁、安顺地区的样本中检出,CRF07-BC 亚型毒株主要从安顺和贵阳地区的样本中检出,而为数较少的 B 亚型和 CRF08-BC 亚型毒株则主要从黔东南和贵阳地区的样本中检出。CRF01-AE 和 CRF07-BC 亚型为主要流行毒株,CRF01-AE 亚型毒株 62 例占总样本数的 52.1%,CRF07-BC 亚型毒株 49 例占总样本数的 41.2%,且均为基因重组亚型。值得注意的是,在贵州省以往的研究中只检出 B、B'、E、CRF07-BC、CRF08-BC 亚型^[6-7],CRF01-AE 亚型毒株为此次研究发现。目前为止,贵州省 HIV-1 毒株已检出 B、B'、C、E、CRF07-BC、CRF08-BC、CRF01-AE 7 种亚型。由此可见贵州省 HIV-1 毒株亚型种类繁多、分布广泛而复杂。这必将给今后的防治工作带来较大的难度。

3.2 亚型毒株的流行链 根据树状图和表 1 分析,此次研究发现的 CRF01-AE 占较大比例,且在贵州首次发现,是贵州省 HIV-1 亚型毒株流行特点的重大变化。据报道,此毒株源于泰国性服务人群,经我国东南沿海多次传入我国,主要在性传播人群引发流行^[8-9]。结合流行病学资料推测,贵州省 HIV-1 CRF01-AE 亚型毒株,首先经劳务输出的沿海各省打工人群带入本省,先在性服务人群中流行,然后再传给吸毒人群。显示贵州省 HIV 流行,以吸毒为主的传播方式已逐步向性传播方式扩散,应该引起高度重视。

CRF07-BC 亚型毒株是本次研究发现的第二优势亚型毒株。据文献报道,该毒株由 20 世纪 90 年代中期从印度传入缅甸,再传入我国云南瑞丽的 C 亚型病毒与早先从缅甸传入我国云南瑞丽的 B'亚型病毒重组而成(CRF07-BC、CRF08-BC),此亚型毒株主要在吸毒人群中蔓延传播^[10-12]。鉴于贵州省早期研究中就已发现 C、B'两种亚型毒株^[6],推断贵州省 CRF07-BC 亚型毒株的形成,有可能通过性传播杂交和共用注射器吸毒杂交两种方式形成,主要通过云南、四川、广西传入^[13-14]。

本次研究发现 B、B'亚型毒株相对较少,不再成为贵州省 HIV-1 亚型毒株流行的优势毒株。由于 B 亚型毒株主要由泰国传入云南,再由云南传入河南^[15],由到河南卖血人员带入贵州省。表明,通过取缔地下卖血,保障血液安全等措施成效显著,输血传播已经遏制。同时也说明输血传播的感染者相对稳定,向周围人群扩散不如吸毒或性传播方式快,形成二代传播少。

3.3 HIV-1 亚型毒株在不同地区传播人群中的分布 此次研究结果经统计分析发现,各亚型毒株在不同地区传播人群中的分布,存在显著差异。尤其值得高度重视的是铜仁等地区的亚型毒株分布与以前的研究结果大相径庭,以前的结果为 B、CRF07-BC 亚型毒株流行为主,而此次则以 CRF01-AE 流行为主,CRF01-AE 所占比例为 82.54%。由此表明:在一定区域内,新的 HIV 亚型毒株一旦形成,即可很快成为这一区域的优势毒株。

3.4 防治对策 通过本次研究结果分析发现,贵州省 HIV-1 流行优势毒株已不再是以前的 B、B'亚型毒株,而是 CRF01-AE 亚型毒株。因此建议,在 HIV 防治对策上,亦应对以往所采取的以阻断吸毒人群传播为主的防治措施调整为以阻断性

服务人群、社会流动人口、吸毒人群经性传播为主的综合防治措施上来。防治重心、经费投向、政策导向均应作相应的调整。只有这样,进行全方位的 HIV 综合防治,才能有效地阻止 HIV 病毒的传播和蔓延,达到控制艾滋病流行的目的。

参考文献:

- [1] Jensen MA, Li FS, van 't Wout AB, et al. Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences[J]. *J Virol*, 2003, 77(24):13376-13388.
- [2] Kandathil AJ, Ramalingam S, Kannangai R, et al. Molecular epidemiology of HIV[J]. *Indian J Med Res*, 2005, 12(1):333-344.
- [3] 赵全壁, 潘品良, 温宁, 等. 中国艾滋病病毒 1 型流行株 V3 环序列变异性研究[J]. *中国性病艾滋病防治*, 2002, 8(4):208-211.
- [4] 程春林, 冯毅, 何翔, 等. 中国南方四省区流行的 HIV-1 CRF01-AE 病毒株基因特征研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2009, 7(26):1097-1111.
- [5] Zhang Y, Lu L, Ba L, et al. Dominance of HIV-1 subtype CRF01-AE in sexually acquired cases leads to a new epidemic in Yunnan province of China[J]. *PLoS Med*, 2006, 3(11):e443.
- [6] 雷世光, 孙显光, 邵一鸣, 等. 贵州省 HIV-1 感染毒株膜蛋白基因序列测定及流行病学分析[J]. *中华皮肤科杂志*, 2000, 33(4):149-151.
- [7] 孙显光, 雷世光. 贵州省 HIV-1 毒株亚型分布研究[J]. *贵州医药*, 2007, 31(7):582-584.
- [8] McCutchan FE, Hegerich PA, Brennan TP, et al. Genetic variants of HIV-1 in Thailand[J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1992, 8(11):1887-1895.
- [9] Cheng H, Zhang J, Capizzi J, et al. HIV-1 subtype E in Yunnan, China[J]. *Lancet*, 1994, 344(8927):953-954.
- [10] Luo CC, Tian C, Hu DJ, et al. HIV-1 subtype C in China [J]. *Lancet*, 1995, 345(8956):1051-1052.
- [11] 邵一鸣, 邢辉, 严延生, 等. 福建省 HIV-1 流行毒株的基因序列测定和亚型分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 5(20):458-461.
- [12] 刘丽花, 杨丽华, 赵欣荣, 等. 不同途径感染人群 HIV-1 亚型分布[J]. *中国公共卫生*, 2009, 8(25):1023-1024.
- [13] 秦光明, 邵一鸣, 刘刚, 等. 四川省 HIV-1 流行毒株的基因序列测定和亚型分析[J]. *中华流行病学杂志*, 1998(1):39-42.
- [14] 邵一鸣, 赵峰, 杨维中, 等. 我国西南西北地区吸毒人群重组人类免疫缺陷病毒 1 型毒株的发现[J]. *中国实验和临床病毒学杂志*, 1999, 13(2):109-112.
- [15] 辛若雷, 何翔, 邵一鸣. HIV-1 CRF07-BC 重组毒株的起源和分子流行病学研究进展[J]. *中国艾滋病性病*, 2009, 5(2):200-202.