

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.26.002

钦州市钦南区 HIV-1 流行亚型及基因变异特征研究*

沈平¹, 苏齐鉴^{2△}, 黄毅毅¹, 蒋丽萍¹, 张达燕¹, 郭继昌¹, 徐鸿庄¹, 韦建立¹

(1. 广西壮族自治区钦州市钦南区疾病预防控制中心 535000; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011)

[摘要] 目的 调查流行于钦南区的 HIV-1 亚型种类并分析其基因变异特征。方法 抽取 100 例未抗病毒治疗的 HIV-1 感染者, 从血样中提取病毒 RNA 或前病毒 DNA, 采用聚合酶链反应(PCR)扩增 HIV-1 gag 基因和 pol 基因片段并测序, 用系统进化树分析其亚型, 并计算 gag 和 pol 区的基因离散率。结果 97 份血样获得 gag 基因序列或 pol 基因序列, 4 份血样的 gag 与 pol 分型不一致, 其他 93 份分型明确, 其中 CRF01_AE 重组型、CRF07_BC 重组型、CRF08_BC 重组型及 G 亚型分别占 76.34% (71/93)、9.68% (9/93)、12.90% (12/93) 和 1.07% (1/93)。CRF08_BC 的 gag 基因离散率为 0.059 ± 0.005 , 高于 CRF07_BC 的 0.053 ± 0.005 ($P < 0.01$) 和 CRF01_AE 的 0.049 ± 0.004 ($P < 0.01$)。CRF01_AE 的 pol 基因离散率为 0.044 ± 0.003 , 高于 CRF07_BC 的 0.035 ± 0.004 ($P < 0.01$) 和 CRF08_BC 的 0.033 ± 0.003 ($P < 0.01$)。结论 钦南区 HIV-1 存在至少 3 种流行亚型, 其中 CRF01_AE 是最主要的亚型, 不同基因区的变异程度有所不同。

[关键词] HIV-1; 基因; gag; 基因; pol; 亚型; 离散率; 变异

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)26-3605-03

HIV-1 subtype distribution and genetic variation in Qinzhou South district of Qinzhou city*

Shen Ping¹, Su Qijian^{2△}, Huang Yiyi¹, Jiang Liping¹, Zhang Dayan¹, Guo Jichang¹, Xu Hongzhuang¹, Wei Jianli¹

(1. Qinzhou South District Center for Disease Prevention and Control, Qinzhou, Guangxi 535000, China;

2. Affiliated Ruikang Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530011, China)

[Abstract] **Objective** To investigate HIV-1 subtypes circulating in Qinzhou South District and understand the features of genetic variation of the virus. **Methods** Blood samples were collected from 100 HIV-1 antiretroviral treatment(ART)-patients from Qinzhou South District of Qinzhou city. Viral RNA and proviral DNA was extracted and amplified. The gag and pol gene fragments of HIV-1 were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and were sequenced, then phylogenetic tree was constructed and genetic distance was calculated for each genetic region. **Results** Gag or pol gene sequences were successfully amplified from blood samples, 4 samples had different subtyping results in the two genetic region. There were 76.34% of CRF01_AE(71/93), 9.68% of CRF07_BC(9/93), 12.90% of CRF08_BC(12/93) and 1.07% of subtype G(1/93). The genetic distance of the gag gene for CRF08_BC was 0.059 ± 0.005 , higher than CRF07_BC (0.053 ± 0.005 , $P < 0.01$) and CRF01_AE (0.049 ± 0.004 , $P < 0.01$). But in the pol gene, the distance for CRF01_AE was 0.044 ± 0.003 , higher than CRF07_BC (0.035 ± 0.004 , $P < 0.01$) and CRF08_BC (0.033 ± 0.003 , $P < 0.01$). **Conclusion** There are at least three subtypes circulating in Qinzhou South District, and CRF01_AE is the most predominant strain. The levels of genetic variation are different in the two genetic regions.

[Key words] HIV-1; gene; gag; gene; pol; subtype; genetic distance; variation

自 2010 年起, 广西实施的为期 5 年的艾滋病攻坚工程已初显成效, 研究显示 2008~2013 年新报告的人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者、艾滋病患者呈现出先上升后下降的趋势, 而晚发现比例仍然呈逐年上升趋势^[1]。虽然广西新报告的艾滋病病例在 2011 年之后有所下降, 但是此下降趋势在钦州市的某些地区并不明显^[2]。钦州市是广西北部湾沿海正在建设的新兴城市之一, 交通便利, 艾滋病的流行因素广泛存在, 艾滋病防治形势严峻。为了解该地区的 HIV-1 分子流行病学特征, 本研究以钦州市钦南区未治疗艾滋病感染者为研究对象, 对 HIV-1 的 gag 和 pol 基因进行分析, 探讨流行于该地区的 HIV-1 亚型, 并分析其基因变异情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 在艾滋病综合防治数据管理系统中查询钦南区所有未经抗病毒治疗的 HIV 感染者, 在查询到的 361 例中, 利用随机数字表抽取 100 例, 辖区内 12 个乡镇均有病例被抽

中。对抽中的研究对象进行流行病学资料并抽取外周静脉血 10 mL。

1.2 方法

1.2.1 病毒核酸提取 分离血浆和血细胞, 保存于一 80 °C 冰箱。用 RNA 提取试剂盒 (high pure viral RNA kit, Roche 公司产品) 从血浆中提取病毒 RNA。当 PCR 扩增或测序失败时, 用全血基因组 DNA 提取试剂盒 (北京艾德莱公司) 由血细胞提取前病毒 DNA。

1.2.2 gag 和 pol 区基因序列扩增 前病毒 DNA 通过巢式 PCR 分别扩增 gag 和 pol 基因, RNA 经逆转录后进行巢式 PCR。gag 和 pol 区扩增引物及反应条件参照文献^[3-4]。

1.2.3 扩增产物鉴定与测序 第二轮扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 对出现目的条带的 PCR 扩增产物进行 DNA 测序, 其中, gag 区产物送北京天一辉远生物公司测序, pol 区产物送至北京博迈德生物公司进行测序。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360258); 钦州市钦南区科技局资助项目(20140101)。 作者简介: 沈平(1956-), 主任医师, 本科, 主要从事流行病学研究。 △ 通讯作者, E-mail: agansue@163.com。

1.2.4 序列亚型分析与系统进化树分析 序列经拼接、校正,用在线亚型分析工具 Genotyping (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/>) 对序列进行亚型分析,用 MEGA 5.03 软件构建邻接系统进化树(重复运算 1 000 次)分析亚型和计算基因离散率(碱基替代模型为 Kimura-2 parameter model),进化树拓扑结构用 Bootstrap 法检验。gag 和 pol 区参考序列来自 HIV Database(<http://www.hiv.lanl.gov>)。

1.3 统计学处理 所有数据用 SPSS 16.0 进行处理。不同亚型基因离散率的比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流行病学资料 3 例研究对象的血样因严重溶血而排除,最后纳入 97 例。研究对象年龄 9~89 岁,其中 20~49 岁占 62.8%;男性占 67.0%;异性性传播占 86.60%;职业以农民、工人及民工为主。CD4 细胞计数平均为每微升 415 个。见表 1。

表 1 研究对象的流行病学资料

项目	n(%)	项目	n(%)
性别		传播途径	
男	65(67.0)	异性性传播	84(86.6)
女	32(33.0)	静脉吸毒传播	8(8.2)
年龄(岁)		同性传播	4(4.1)
<19	1(1.0)	母婴传播	1(1.0)
20~49	61(62.8)	职业	
50~69	30(30.9)	农民	58(59.8)
>69	5(5.2)	工人及民工	18(18.6)
CD4 细胞计数		家务及待业	7(7.2)
<350	39(40.2)	其他	14(14.4)
≥350	58(57.8)		

2.2 基因亚型鉴定及分布 在 97 份血样中,获得 72 株 HIV-1 的 gag 基因序列和 95 株 HIV-1 的 pol 基因。对序列进行 Genotyping 分型及进化树验证(图 1,2),规定某样本在 gag 基因和 pol 基因的分型中一致,或仅在 1 个基因测得其分型,则可确定其分型,若两基因分型不一致则不进行进一步分析。结果 4 份血样 gag 基因分型与 pol 基因分型不一致,其他 93 份血样 Genotyping 分型明确(表 2),其中,CRF01_AE 占 76.34%

(71/93),CRF07_BC 占 9.68%(9/93),CRF08_BC 占 12.90%(12/93),G 亚型占 1.07%(1/93)。本研究获得的 G 亚型毒株(QN100)与在广西发现的首例 G 亚型毒株(G. CN. 2008. GX_2084_08. JN106043)成簇,Bootstrap 达 100%。

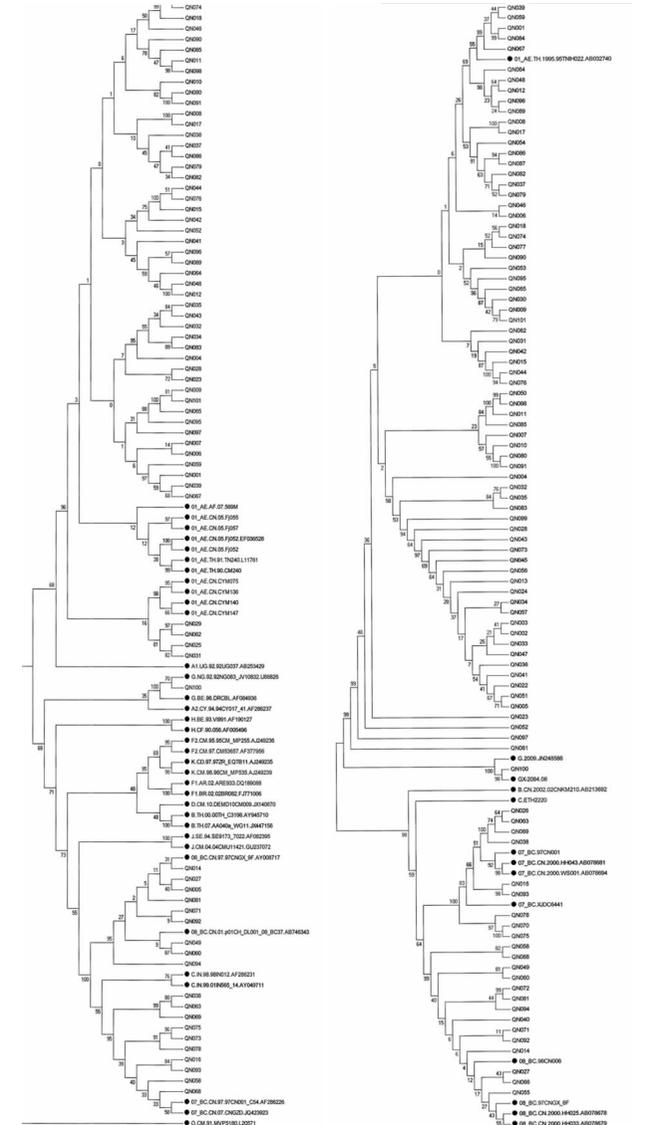


图 1 gag 基因序列的系统进化树分析

图 2 pol 基因序列的系统进化树分析

表 2 HIV-1 基因亚型分布

项目	类别	CRF01_AE	CRF07_BC	CRF08_BC	G
性别	男	43(74.14)	8(13.79)	6(10.34)	1(1.72)
	女	28(80.00)	1(2.86)	6(17.14)	0(0)
年龄(岁)	<19	1(100.00)	0(0)	0(0)	0(0)
	20~49	40(68.97)	7(12.07)	10(17.24)	1(1.72)
	50~69	27(90.00)	1(3.33)	2(6.67)	0(0)
	>69	3(75.00)	1(25.00)	0(0)	0(0)
感染途径	异性性传播	65(77.38)	7(8.33)	11(13.09)	1(1.19)
	静脉吸毒传播	5(83.33)	0(0)	1(16.67)	0(0)
	同性传播	0(0)	2(100.00)	0(0)	0(0)
	母婴传播	1(100.00)	0(0)	0(0)	0(0)

2.3 基因离散率 CRF01_AE、CRF07_BC 和 CRF08_BC 在 gag 及 pol 区的离散率见表 3。经方差分析,gag 基因离散率差

异有统计学意义($P < 0.01$);SNK 检验显示,CRF08_BC 的 gag 基因离散率大于 CRF01_AE($P < 0.01$)和 CRF07_BC($P <$

0.01)。3 种重组型的 pol 基因离散率的差异也有统计学意义 ($P < 0.01$)；SNK 检验显示, CRF01_AE 的离散率大于 CRF07_BC ($P < 0.01$) 和 CRF08_BC ($P < 0.01$)。

表 3 HIV-1 gag 基因及 pol 基因的基因离散率

HIV-1 分型	gag	pol
CRF01_AE	0.049±0.004	0.044±0.003 ^b
CRF07_BC	0.053±0.005	0.035±0.004
CRF08_BC	0.059±0.005 ^a	0.033±0.003
F	21.38	86.94
P	<0.01	<0.01

^a: $q = 9.79$, $P < 0.01$, 与 CRF01_AE 比较; $q = 4.61$, $P < 0.01$, 与 CRF07_BC 比较。^b: $q = 11.62$, $P < 0.01$, 与 CRF07_BC 比较; $q = 16.09$, $P < 0.01$, 与 CRF08_BC 比较。

3 讨论

据文献报道,截至 2009 年,我国 HIV-1 流行亚型最多的是 CRF01_AE(占 30%)^[5]。CRF01_AE 也是近年来广西最主要的流行亚型,所占比例超过 70%^[6-8]。本次调查发现钦南区有 CRF01_AE 重组型(76.34%)、CRF07_BC 重组型(9.68%)、CRF08_BC 重组型(12.90%)和 G 亚型(1.07%),亚型分布特点与广西其他地区相似。从历年的监测数据来看,CRF01_AE 所占的比例在广西地区呈逐步上升的趋势。经分析,CRF01_AE 的广泛流行可能与其 Gp120 蛋白独特的 N 连接糖基化位点分布有关,该毒株的 N 连接糖基化位点(PNGSs)总数量尤其在 V2 和 V4 区的数量明显较其他亚型的毒株少,而 V5 区的 N 连接糖基化位点数量又明显更多^[9]。N 连接糖基化具有维持 Gp120 蛋白的三级结构和回避宿主免疫攻击的作用,并且有可能影响 HIV-1 病毒的传染性^[10-11]。

经查阅文献发现,G 亚型在国内较为罕见,只有个别报道^[12-13]。2008 年广西发现的 G 亚型感染病例是北海市的 1 例静脉吸毒者^[14];本研究中发现的唯一 1 例 G 亚型样本与该毒株形成一簇,Bootstrap 达 100%。根据流行病学调查资料,本研究发现的 G 亚型感染病例及其配偶未曾北海发生过高危行为,提示 G 亚型可能已经在北海和钦州的某些人群中小范围流行。

系统树分析发现 4 份样本的 gag 和 pol 基因区分型结果不一致。其中,QN005 的 gag 区为 CRF08_BC 亚型, pol 区为 CRF01_AE 区; QN058 的 gag 区为 CRF07_BC 区, pol 区为 CRF08_BC; QN068 的 gag 区为 CRF07_BC 区, pol 区为 CRF08_BC 区; QN073 的 gag 区为 CRF07_BC 区, pol 区为 CRF01_AE 区。考虑到 HIV-1 高度的变异性和活跃的重组特性,分型的不一致可能是由于所感染的毒株发生了新的重组。

基因离散率分析通过计算序列间的变异程度来估计 HIV-1 在当地流行时间的长短。本研究发现,在 gag 区,CRF08_BC 的基因离散率高于 CRF07_BC 和 CRF01_AE,而在 pol 区,CRF01_AE 的基因离散率高于 CRF07_BC 和 CRF08_BC。两基因区离散率不一致的原因有待进一步分析,不排除两个基因区得到的序列数量不一致对此造成的影响。本研究的 pol 基因区离散率分析结果与王敏连等^[15]的研究相吻合,目前各种证据比较倾向于 CRF01_AE 是广西流行时间最早的 HIV-1 毒株之一,而且目前已经成为不同传播途径的最主要流行亚型。

本次调查覆盖了辖区内所有乡镇,而且各乡镇的民族构成、生活方式和地方习俗等,以及影响艾滋病流行的因素基本一致,因此,抽取的样本有较好的代表性。本次调查获得了钦南区 HIV-1 分子流行病学特征的第一手资料,为追溯当地艾

滋病的流行史和演变趋势,了解艾滋病的流行现状,以及为今后开展 HIV-1 流行监测提供了基础数据,这对于当地的艾滋病防控工作有重要的指导作用。

参考文献

- [1] 王学燕,葛宪民,唐振柱,等. 广西壮族自治区 2008~2013 年艾滋病流行趋势分析[J]. 应用预防医学,2015,21(4): 217-222.
- [2] 黄齐华. 2005~2012 年广西壮族自治区钦州市钦北区艾滋病流行病学分析[J]. 职业与健康,2014,30(1):90-93.
- [3] Chen M, Ma Y, Su Y, et al. HIV-1 genetic characteristics and transmitted drug resistance among men who have sex with men in Kunming, China[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87033.
- [4] 沈平,苏齐鉴,黄毅毅,等. 钦州市钦南区 HIV-1 原发性耐药及其影响因素的研究[J]. 中国热带医学,2015,15(10):1181-1185.
- [5] 金艳涛,郭会军,姜枫,等. 中国 HIV-1 基因亚型分布文献分析[J]. 卫生研究,2011,40(5):645-648.
- [6] 刘伟,梁淑家,杨进业,等. 广西壮族自治区 2008-2009 年 HIV-1 流行毒株基因型及其分布[J]. 中华流行病学杂志,2013,34(1):53-56.
- [7] 孔衍琳,张帅,王雪雯,等. 广西三城市 HIV-1 型流行毒株 gag 基因亚型分析[J]. 广西师范大学学报:自然科学版,2015,33(1):127-133.
- [8] 王洪,梁冰玉,周波,等. 2010~2012 年广西壮族自治区 HIV-1 流行株 pol 基因亚型的分布情况[J]. 中华预防医学杂志,2016,50(1):79-84.
- [9] Shi Y, Feng Y, Ding X, et al. Short communication: the distribution of potential N-linked glycosylation sites in Gp120 differs among major HIV-1 subtypes circulating in China[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2016, 32(1): 101-108.
- [10] Huang X, Barchi JJ Jr, Lung FD, et al. Glycosylation affects both the three-dimensional structure and antibody binding properties of the HIV-1 III B GP120 peptide RP135[J]. Biochemistry, 1997, 36(36):10846-10856.
- [11] Clark GF. The role of glycans in immune evasion: the human foetoembryonic defence system hypothesis revisited [J]. Mol Hum Reprod, 2014, 20(3):185-199.
- [12] 褚小刚,詹发先,彭国平,等. 湖北省 HIV-1 流行株 gag 基因序列测定及亚型分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2012,26(6):460-463.
- [13] 周成林,杨启生,殷竹君,等. 江苏省 HIV-1 流行株 env 和 pol 基因亚型及其系统分析[J]. 新医学,2012,43(4): 253-255.
- [14] 李天一,梁淑家,陈立力,等. 广西首例 HIV-1G 亚型毒株的发现和近似全长基因组序列分析[J]. 军事医学,2012, 36(3):192-195.
- [15] 王敏连,梁冰玉,叶力,等. 广西 HIV-1 流行株 env 基因 C2V3 区序列特征和亚型研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2015,19(12):1191-1194.