

# 贵州省HIV-1毒株亚型与艾滋病流行的关系研究

孙显光 邢辉 李志坚 程春林 张信辉 申莉梅 何翔

**【摘要】** 目的 研究HIV-1毒株基因变异与艾滋病在贵州省快速传播之间的关系。方法 在不同时间采集贵州省多个地区HIV-1感染者样本共190份,利用巢式PCR扩增 $env$ 和 $gag$ 基因并测定序列,采用MEGA 4.0软件确定样本亚型并分析其与贵州省艾滋病流行之间的关系。结果 贵州省HIV/AIDS的报告数从1998年的66例上升到2009年的8435例,7年增加16.38倍。在不同时间采集的样本中共检出B(9例)、B'(4例)、C(2例)、CRF07\_BC(75例)、CRF08\_BC(17例)、CRF01\_AE(64例)等多种亚型的HIV-1毒株;CRF07\_BC、CRF08\_BC的 $env$ 基因离散率在传播过程中基因多态性不断增大( $0.035 \pm 0.006 \rightarrow 0.092 \pm 0.011$ )。贵州省HIV亚型1998年以B'亚型(4/11)为主,2002年以CRF07\_BC亚型(26/41)为主,而2007年以CRF01\_AE(62/119)为主,亚型分布的变化与近年来贵州省艾滋病流行呈现快速上升趋势及2001—2006年以吸毒传播感染为主(吸毒传播感染2610例、性传播感染176例)、2006年后性传播感染人数开始急速上升(吸毒传播感染1713例、性传播感染1833例)的特点有直接关系,HIV主要流行毒株的变化与传播途径高度相关( $\chi^2=41.253, P=0.000$ )。结论 不同亚型毒株随时间和主要感染途径的改变而成为当地的主要流行株,性传播人群是贵州省艾滋病防控的重点。

**【关键词】** 艾滋病; 艾滋病病毒; 亚型

## Distribution of HIV-1 subtype and its relationship with HIV/AIDS epidemic in Guizhou province

SUN Xian-guang<sup>1</sup>, XING Hu<sup>2</sup>, LI Zhi-jian<sup>1</sup>, CHENG Chun-lin<sup>2</sup>, ZHANG Xin-hui<sup>1</sup>, SHEN Li-mei<sup>1</sup>, HE Xiang<sup>2</sup>. 1 Institute of AIDS/STD/Dermatology Control and Prevention, Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550002, China; 2 National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: SUN Xian-guang, Email: sxgpf@yahoo.com.cn

This work was supported by a grant from the Social Development Fund Project for the "Eleven Five-Year Plan" of Guizhou Province (No. [2006]-3051).

**【Abstract】 Objective** To study the HIV-1 diversity and how did it promote the rapid spread of AIDS, in Guizhou province. **Methods** A total of 190 HIV-1 positive subjects were collected in different years and regions from Guizhou province. The  $env$  and  $gag$  genes were amplified with nested PCR and their sequences were determined. The subtypes were identified by the MEGA 4.0 software and the relationships between subtypes and AIDS epidemic were analyzed. **Results** The number of HIV/AIDS reported cases was increased from 66 in 1998 up to 8435 in 2009, a 16.38 time increase in 7 years. Subtypes B(9), B'(4), C(2), CRF07\_BC(75), CRF08\_BC(17), CRF01\_AE(64) were identified in Guizhou province among the samples collected in various periods of time. The genetic diversities in  $env$  gene of CRF07\_BC and CRF08\_BC increased along with the spreading of HIV (from  $0.035 \pm 0.006$  to  $0.092 \pm 0.011$ ). Subtype B'(4/11) appeared the main subtype prevailed in Guizhou in 1998 as well as CRF07\_BC(26/41) in 2002 and CRF01\_AE(62/119) in 2007. The HIV/AIDS epidemic in Guizhou province showed an rapidly upward trend, with the main risk factors of HIV transmission as 2610 cases through injecting drug users (IDUs), and 176 cases due to sexually transmitted infections (STIs), from year 2001 to 2006. However, STIs began to increase rapidly, after 2006, with 1713 cases of IDUs and 1833 cases of STIs. Data indicated that the change of

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.07.012

基金项目:贵州省“十一五”重点攻关社会发展资金项目(黔科合字[2006]-3051)

作者单位:550002 贵阳,贵州省疾病预防控制中心艾滋病性病皮肤病防治研究所(孙显光、李志坚、张信辉、申莉梅);中国疾病预防控制中心艾滋病预防控制中心(邢辉、程春林、何翔)

通信作者:孙显光, Email: sxgpf@yahoo.com.cn

composition of different HIV-1 subtypes was correlated with the mode of transmission in Guizhou province ( $\chi^2=41.253, P=0.000$ ). **Conclusion** The types of HIV strains changed over time as well the turnover of the main risk factors. Sexual transmission, including both hetero- and homo-sexual became the main risk factors, suggesting the development of related prevention and control programs, on HIV/AIDS should be considered accordingly in the future.

**【Key words】** Acquired immune deficiency syndrome; Human immunodeficiency virus-1; Subtype

HIV 高度变异使其在人群流行中产生众多亚型和重组型<sup>[1]</sup>。为探索 HIV-1 毒株变异与艾滋病流行的关系,本研究分时段采集贵州省多个地区 HIV-1 毒株样本,对 HIV-1 病毒的 *env* 及 *gag* 两个主要结构基因进行序列及亚型研究,并与各地区艾滋病流行的因素进行相关分析。

### 对象与方法

1. 数据来源:艾滋病疫情数据来源于贵州省各地区艾滋病疫情报表。从1993年1月至2009年12月,统计每年贵州省各传播途径新报告的 HIV 感染者人数。

2. 样本来源:190 份基因亚型分析样本分别于 1998、2002、2007 年 3 个时段采集,主要来自贵州省安顺、铜仁、毕节、六盘水、黔南、贵阳等地区。其中 1998 年 20 份,2002 年 42 份,2007 年 128 份,研究对象全部为当年新确认的 HIV 感染者,签订知情同意书。

3. RNA 模板提取及基因扩增:RNA 提取采用美国 Qiagen 公司的 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒,按说明书操作。基因扩增方法参照文献[2,3]。

4. 序列测定:PCR 产物纯化使用美国 Qiagen 公司的 Qiaex 试剂盒,按说明书操作。序列测定在美国 ABI 公司 3100A 型 DNA 测序仪上完成。

5. 序列分析:①应用 Sequencher 4.8 软件对序列进行拼接和编辑,经 BioEdit 软件进行序列比对后,加入 Los Alamos HIV 序列数据库提供的 HIV-1 分型参考毒株序列,用 MEGA 4.0 软件中的 Maximum composite Likelihood 模型构建系统进化树(片段长度大于 300 bp 的序列),Bootstrap 重复值为 1000。通过其与国际亚型判定标准毒株形成稳定的进化簇来判定病毒基因型(与标准亚型判定毒株形成进化簇的 Bootstrap 检验值大于 70%)。长度未达到要求的序列利用 Los Alamos HIV 序列数据库中的 BLAST 软件判定病毒基因型。再利用 MEGA 4.0 软件的 Maximum composite Likelihood 模型计算不同年份不同基因型 *env* 和 *gag* 组内基因距离。

6. 统计学分析:采用 SPSS 17 软件。3 个时段采

集样本分布、检测结果差异分析及各地区间不同途径感染者及突变重组株分布差异进行非参数检验中的多个相关样本  $\chi^2$  检验;各年份 HIV 感染人数与不同传播途径分析采用偏相关检验方法;部分地区不同传播途径与变异重组株的相关分析采用 Pearson (双侧)相关检验方法,在进行 Pearson 相关分析时,先作散点图,根据散点图结果,再决定是否进行相关分析。

### 结 果

1. HIV 感染者传播途径变化:对不同传播途径的感染人群按年份进行分类,以血液传播为控制对象,经偏相关检验分析显示,HIV/AIDS 与性传播  $r=0.932, P=0.000$ ; HIV/AIDS 与吸毒传播  $r=0.916, P=0.000$ 。统计结果表明,贵州省 HIV/AIDS 随时间与性传播、吸毒传播高度相关。结果显示艾滋病流行具有 3 个特征:①性传播感染人群从 2006 年开始急速上升;②吸毒传播感染人群 2006 年后开始下降;③血液传播感染基本得到控制(图 1)。

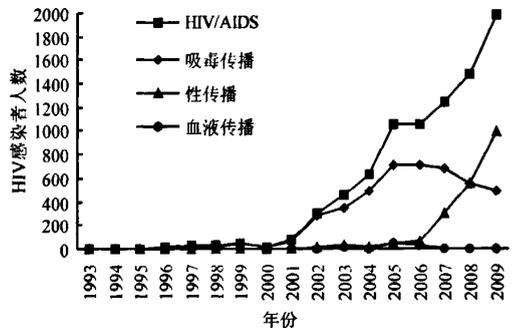


图 1 贵州省不同传播途径 HIV 感染者数量随时间的变化

2. HIV-1 毒株基因亚型:①1998 年采样 20 例,占累计报告数的 30.30%(20/66),11 例得到测序结果。11 例中吸毒传播样本 4 例,占这一时段吸毒感染者总数的 13.79%(4/29);性传播样本 2 例,占这一时段性传播感染者总数的 16.67%(2/12);血液传播样本 5 例,占这一时段血液传播感染者总数的 27.78%(5/18)。样本中检出 B、B'、C、E 4 种基因亚型毒株,其中 B 亚型 3 例、B' 亚型 4 例、C 亚型 2 例、E

亚型2例。②2002年采样42例,41例获得测序结果。其中吸毒传播样本33例,占这一时段吸毒感染者人数的7.73%(33/427);性传播样本4例,占这一时段性传播感染者总数的12.12%(4/33);血液传播样本4例,占这一时段血液传播感染者总数的19.05%(4/21)。样本中检出CRF07\_BC、CRF08\_BC 2种变异重组亚型,其中CRF07\_BC亚型占63.41%(26/41),CRF08\_BC亚型占36.59%(15/41)。③2007年采样128例,获得序列119例。其中吸毒传播74例,占这一时段吸毒感染者总数的2.20%(74/3367);性传播样本36例,占这一时段性传播感染者总数的5.37%(36/671);血液传播样本9例,占这一时段血液传播感染者总数的7.69%(9/117)。样本中检出B、CRF07\_BC、CRF08\_BC、CRF01\_AE 4种基因亚型,其中B亚型占5.04%(6/119),CRF07\_BC亚型占41.18%(49/119),CRF08\_BC亚型1.68%(2/119),CRF01\_AE亚型占52.10%(62/119)。为使抽样结果更具代表性,遵循“总样数小,采样比例必须足够大”的采样原则,第一时段采样比例相对较大。经非参数多个相关样本 $\chi^2$ 检验, $\chi^2=9.511, P=0.218$ ,显示各时段样本分布及结果差异无统计学意义,表明采样结果具有代表性(表1)。

表1 贵州省3个时段 HIV-1 毒株基因亚型分布

年份	检测例数	阳性例数	基因亚型					
			B	B'	C	CRF07_BC	CRF08_BC	CRF01_AE
1998	20	11	3	4	2	0	0	2
2002	42	41	0	0	0	26	15	0
2007	128	119	6	0	0	49	2	62
合计	190	171	9	4	2	75	17	64

注: $\chi^2=9.511, P=0.218$

3. HIV/AIDS与各变异毒株相关分析:为了解贵州省不同地区、不同人群、不同变异毒株之间的差异和关系,对贵州省不同地区、不同传播途径、不同变异毒株之间进行统计学分析,各地区间不同途径感染者及重组毒株分布差异分析,经非参数多个相关样本 $\chi^2$ 检验, $\chi^2=41.253, P=0.000$ ,表明各地区间不同途径感染及重组毒株分布差异具有统计学意义。部分地区不同传播途径与重组株的偏相关分析结果显示,HIV/AIDS与性传播 $r=0.770, P=0.025$ ;HIV/AIDS与吸毒传播 $r=0.906, P=0.002$ ;HIV/AIDS与CRF01\_AE亚型 $r=0.715, P=0.046$ ,结果表明,HIV/AIDS与性传播、吸毒传播及CRF01\_AE亚型密切相关(表2)。

4. 主要流行毒株env基因离散率:贵州省3个时

段HIV-1毒株env基因序列经拼接后,获得基因片段长度大于300 bp的序列共118条,经MEGA 4.0软件的Maximum composite Likelihood模型计算主要亚型不同年份env基因的组内基因离散率(注:表3与表1数据明显不一致,是因为计算基因序列的组内基因离散率以env基因组内基因离散率为准,而HIV-1基因亚型的确定则需要根据env和gag两个基因序列同时符合才能判定),结果显示,CRF07\_BC、CRF08\_BC的env基因离散率1998—2007年呈不断增大趋势( $0.035 \pm 0.006 \rightarrow 0.092 \pm 0.011$ ),表明病毒在传播过程中基因多态性增加(表3)。

表2 贵州省部分地区不同途径HIV/AIDS与变异重组毒株的分析

地区	HIV/AIDS	传播途径			基因亚型		
		性	血液	吸毒	CRF08_BC	CRF07_BC	CRF01_AE
贵阳	1742	555	1	485	1	4	10
六盘水	726	262	3	214	1	0	4
安顺	1043	133	3	476	1	37	1
铜仁	2083	424	52	1195	1	5	52
黔西南	299	102	1	64	0	4	0
毕节	1224	369	11	602	2	30	0
黔东南	541	277	24	146	0	0	7
黔南	1170	425	1	466	0	0	4
合计	8828	2547	96	3648	6	80	78

注:数据截至2010年9月底

表3 贵州省3个时段 HIV-1 毒株env基因亚型组内离散率(CV±s)

年份	C	CRF01_AE
1998	$0.035 \pm 0.006(12)$	$0.086 \pm 0.016(3)$
2002	$0.049 \pm 0.007(26)$	$0.000 \pm 0.000(0)$
2007	$0.092 \pm 0.011(42)$	$0.064 \pm 0.008(35)$
合计	$0.078 \pm 0.009(80)$	$0.074 \pm 0.009(38)$

注:CRF07\_BC、CRF08\_BC的env基因均为C亚型;括号内数据为序列条数

讨 论

贵州省HIV的传播和流行与传播途径及社会活动主体人群高度相关。从流行趋势上看,性传播途径感染人群曲线从2006年开始急速上升,2008年后性传播感染者超过吸毒传播感染者,2009年上升1倍,说明性传播是造成贵州省目前HIV流行的主要因素,提示今后HIV的防治重点在传播途径上,以阻断性传播途径为主。

HIV-1毒株的变异及亚型种类的变化加速贵州省艾滋病的传播与流行。1998年检出的HIV-1亚型毒株是B、B'、C、E(E亚型后来归为CRF01\_AE);2002年出现CRF07\_BC和CRF08\_BC重组毒株;

2007 年又发现大量 CRF01\_AE 重组毒株。贵州省自 HIV 感染者数倍增加后(不排除这些感染者早几年就已存在而未被发现的可能),伴随着发现大量重组毒株,2002 年感染者仅 515 例,2009 年增加至 8435 例,7 年增加 16.38 倍。尤其是 2007 年发现大量 CRF01\_AE 重组毒株,HIV 感染人数上升迅猛,特别是性传播感染人数上升显著。凡是检出重组毒株较多的地区其 HIV 感染者人数也相对较多,如贵阳、铜仁、安顺、毕节等地区检出变异重组毒株较多,HIV 感染者人数明显比其他地区多。此外贵州省发现的 HIV 感染人数自 2002 年有较大幅度的上升,尤其是吸毒人群 HIV 阳性人数的上升,同期伴随着 CRF07\_BC 和 CRF08\_BC 重组毒株的大量出现,特别是性传播途径感染人数自 2006 年迅速上升,在 2007 年发现大量 CRF01\_AE 重组毒株,占 52.10%,由于重组毒株存在辅助受体等差异<sup>[2]</sup>以及变异毒株更易逃逸宿主的免疫识别<sup>[4-6]</sup>,提示重组毒株可能存在一定的传播优势。重组毒株由于存在辅助受体等特殊基因结构,它的产生和存在可能加速 HIV-1 毒株在某些特定人群或地区中的流行与传播。

传播途径的改变可能是引起 HIV-1 主要流行毒株发生改变的原因之一。贵州省 HIV 的传播分为 3 个阶段。1997 年以前以血液传播为主(58.54%, 24/41);1998—2006 年以吸毒传播为主(76.12%, 3356/4409);2006 年以后以性传播上升最快,2008 年性传播感染人数首次超过吸毒传播感染人数(吸毒 547 人、性传播 548 人),2009 年以成倍的速度递增(吸毒 495 人、性传播 986 人)。1998 年以前 HIV-1 流行毒株以 B'、B 亚型为主,表明血液传播以 B'、B 亚型为主;而 1999—2006 年贵州省的 HIV-1 流行毒株以 CRF07\_BC、08\_BC 亚型为主,是吸毒传播的主要亚型毒株;2006 年以后,贵州省检出的 HIV-1 流行毒株以 CRF01\_AE 亚型为主,占检出毒株比例的 52.1%,是性传播的主要亚型毒株。由此可见,贵州省 HIV-1 主要流行毒株的改变与传播途径的改变存在高度的一致性,提示在艾滋病流行中,传播途

径的改变可能是引起 HIV-1 主要流行毒株发生改变的原因之一。因此,及时监控 HIV-1 毒株亚型变异情况,对于预防和控制艾滋病的流行有极为重要的预警作用。

## 参 考 文 献

- [1] Kandathil AJ, Ramalingam S, Kannangai R, et al. Molecular epidemiology of HIV. *Indian J Med Res*, 2005, 121(4): 333-344.
- [2] Xin RL, Feng Y, Cheng CL, et al. Primers of *gag* gene for HIV-1 subtyping in China and application thereof in practice. *Natl Med J Chin*, 2009, 89(13): 876-880. (in Chinese)  
辛若雷,冯毅,程春林,等.适用于中国 HIV-1 分型的 *gag* 基因引物及其应用. *中华医学杂志*, 2009, 89(13): 876-880.
- [3] Xing H, Liang H, Wang ZY, et al. Distribution of recombinant human immunodeficiency virus type-1 CRF01\_AE strains in China and its sequence variations in the *env* V3-C3 region. *Chin J Prev Med*, 2004, 38(5): 300-304. (in Chinese)  
邢辉,梁浩,万卓越,等.中国 CRF01\_AE 亚型人类免疫缺陷病毒毒株的分子流行病学研究. *中华预防医学杂志*, 2004, 38(5): 300-304.
- [4] Shao YM, Zhao F, Yang WZ, et al. The identification of recombinant HIV-1 strains in IDUs in southwest and northwest China. *Chin J Experimental Clin Virol*, 1999, 13: 109-112. (in Chinese)  
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. *中国实验和临床病毒学杂志*, 1999, 13: 109-112.
- [5] Nabatov AA, Pollakis G, Linnemann T, et al. Intrapatient alterations in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V1 V2 and V3 regions differentially modulate coreceptor usage. virus inhibition by CC/CXC chemokines, soluble CD4, and the b12 and 2G12 monoclonal antibodies. *J Virol*, 2004, 78(1): 524-530.
- [6] Liu Y. Progress of molecular epidemiological study on HIV subtype. *Chin J Frontier Health Quarantine*, 2006, 29 Suppl 1: S146-150. (in Chinese)  
刘翌. 艾滋病病毒分子亚型流行病学研究进展. *中国国境卫生检疫杂志*, 2006, 29 增刊 1: 146-150.

(收稿日期:2010-12-31)

(本文编辑:万玉立)