

# 郑州市男男性行为人群HIV-1毒株变异特征及其与既往有偿供血感染者的关系

王哲 崔为国 孙国清 刘佳 田逢安 刘春华 薛秀娟 李林 李敬云

**【摘要】目的** 分析郑州市男男性行为者(MSM)中HIV感染者的毒株变异特点及其与当地有偿供血者中流行毒株的关系。**方法** 以郑州市2010年确证的31例MSM的HIV感染者和41例既往有偿供血HIV感染者为研究对象,采集血标本并收集流行病学信息。RT-PCR法扩增全部研究对象的HIV-1 *gag-pol*全长基因(分别为1584 bp和3147 bp)及*env*基因的C2V3片段(558 bp)并测序,使用LosAlamos HIV Database在线工具确定病毒基因亚型、绘制系统进化树并分析可能的传播关系。**结果** 在72例研究对象中,获得全长*gag*序列53条,*pol*序列38条,*env*(C2V3)序列48条;31例MSM的HIV感染者中,CRF01\_AE亚型14例,CRF07\_BC亚型5例,B亚型12例(B'亚型11例、B亚型1例),41例既往有偿供血的HIV感染者均为B'亚型。MSM人群的CRF01\_AE亚型毒株与河北、辽宁省的毒株关系密切,CRF07\_BC毒株与河北省石家庄和北京市的毒株关系密切。在MSM人群中的12条HIV-1 B亚型中,有8条聚集簇并与1例有偿供血感染者的序列距离最近,2条形成可靠的进化簇且与O2HNseq4的序列距离最近,提示MSM人群中的B'毒株可能来自有偿供血者,且在MSM人群中存在传播关系。**结论** 郑州市MSM人群中流行的HIV-1毒株遗传背景复杂、有多个来源。首次发现目前MSM人群中流行的HIV-1 B亚型毒株主要是B'亚型,可能来自当地的有偿供血人群。

**【关键词】** 男男性行为者; 艾滋病病毒; 有偿供血者

**Men who have sex with men and its relationship with HIV-1 strains prevailing in the paid blood donors from Zhengzhou city, Henan** WANG Zhe<sup>1</sup>, CUI Wei-guo<sup>1</sup>, SUN Guo-qing<sup>1</sup>, LIU Jia<sup>1</sup>, TIAN Sui-an<sup>1</sup>, LIU Chun-hua<sup>1</sup>, XUE Xiu-juan<sup>1</sup>, LI Lin<sup>1</sup>, LI Jing-yun<sup>2</sup>. 1 Henan Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China; 2 Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science

Corresponding author: CUI Wei-guo, Email: cuiwg@hncdc.com.cn

This work was supported by grants from the National Science and Technology Mega-Projects of China (No. 2008ZX10001-004, 2009ZX10701).

**【Abstract】 Objective** To clarify the genetic characteristics of human immunodeficiency virus (HIV) circulated in the population of men who have sex with men (MSM) in Zhengzhou, Henan and to analyze its relationship with HIV-1 prevailing in the paid blood donors (PBDs). **Methods** Thirty-one MSM who were confirmed as HIV positive individuals in 2010 together with 41 HIV-positive former PBDs were enrolled in the study. Information on related epidemiological characteristics and their plasma were collected. RT-PCR was used to amplify HIV-1 full length *gag* (1584 bp), *pol* (3147 bp) genes and partial *env* gene (C2V3 segment, 558 bp) followed by sequencing on those subjects. Online software available at LosAlamos HIV Database was used to identify the HIV subtypes based on the findings of the sequences. Phylogenetic tree was used to identify the possible relationship of transmission. **Results** Fifty-three full length *gag*, 38 full length *pol* and 48 partial *env* (C2V3) genes were collected from 72 participants. Among the 31 HIV (+) MSM individuals, 14 CRF01\_AE strains, 5 CRF07\_BC strains and 12 subtype B (1 subtype B and 11 B') strains were identified respectively. All of the 41 strains identified from former PBDs were infected by B' strains. The CRF01\_AE strains identified in MSM showed a close relationship to those

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.09.003

基金项目: 国家科技重大专项(2008ZX10001-004, 2009ZX10701)

作者单位: 450016 郑州, 河南省疾病预防控制中心(王哲、崔为国、孙国清、刘佳、田逢安、刘春华、薛秀娟); 解放军军事医学科学院(李林、李敬云)

通信作者: 崔为国, Email: cuiwg@hncdc.com.cn

identified from both Hebei and Liaoning provinces. The CRF07\_BC strains showed a close relationship with those from Shijiazhuang and Beijing cities. Among the 12 subtype B strains, 8 sequences grouped into 1 cluster with 1 sequence from the former PBDs. Two sequences grouped with 02HNscq4 suggested that B' had been prevailed in the MSM population might come from the former PBDs and were closely related to the strains identified in the MSM population. **Conclusion** Complicated genetic background and multiple introductions of HIV in the MS population in Zhengzhou, were found. This was also the first report which noticed that the subtype B epidemic among Zhengzhou MSM was mainly originated from the B' among the former PBDs.

**[Key words]** Men who have sex with men; Human immunodeficiency virus; Paid blood donors

目前,我国男男性行为(MSM)人群HIV的感染率在逐年快速上升<sup>[1-4]</sup>,局部地区该人群的HIV感染率达到3.0%~4.6%<sup>[2]</sup>,已成为我国HIV新发感染率最高的人群<sup>5-7</sup>。河南省既往的HIV感染主要发生于有偿供血者中。2004—2006年的调查显示,河南省既往有有偿供血人群中HIV的感染率达到10.9%<sup>[8]</sup>,但监测结果显示预防既往有偿供血HIV感染者的二代传播对于控制新发HIV感染的作用十分有限。最近几年河南省MSM人群中的HIV流行快速增长<sup>[9]</sup>,郑州市MSM人群的HIV流行率从2005年的0.88%增加到2006年的2.67%<sup>[8]</sup>。为此,本研究分析郑州市MSM人群中HIV-1毒株的变异特点及其与既往有有偿供血感染者的关系。

### 对象与方法

1. 研究对象及标本采集:①2010年国家艾滋病MSM哨点中监测到的31例HIV抗体阳性者;②抽取41例河南省既往有有偿供血HIV感染者的血浆标本,为2010年HIV耐药专项调查时招募的HIV/AIDS。研究对象均知情同意纳入研究,在经过培训的调查员面对面访谈收集流行病学信息,采集10 ml EDTA抗凝静脉血标本,分离血浆冻存于-80℃。

#### 2. 扩增HIV-1 *gag*、*pol*全长片段 *env*(C2V3)片

段:取500 μl血浆,超速离心浓缩病毒,使用高效病毒RNA提取试剂盒(Roche, USA)提取纯化病毒RNA,对每份标本扩增HIV-1 *gag*、*pol*全长基因(分别为1584 bp和3147 bp) *env*基因的C2V3片段(558 bp),扩增引物见表1<sup>[10]</sup>。第一轮RT-PCR反应体系为20 μl,采用TaKaRa公司的One Step RT-PCR试剂盒;第二轮反应体系为50 μl,采用TaKaRa公司的Ex Taq试剂盒。将扩增产物送北京博迈德公司进行Sanger法测序。如果某条引物测序失败,则使用加测引物进行第二次测序,如2次都失败则将产物稀释后重复上述测序步骤,如果仍然失败则放弃。使用ContigExpress软件拼接测序片段,得到完整的序列<sup>[11]</sup>,保存为fasta格式文件。

3. 序列分析:首先使用LosAlamos HIV Database (<http://www.HIV.lanl.gov>)的在线工具Quality Control进行序列校正和裁剪,再使用BioEdit软件进行手工校对。BLAST检索数据库(<http://hiv-web.lanl.gov/content/index>)证实无污染。用美国NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/>)的在线亚型分析工具Genotyping分别对*gag*、*pol*和*env*(C2V3)序列进行初步分型。然后从LosAlamos HIV Database下载标准HIV-1亚型(A\_D, F\_H, J, K, CRF01\_AE, CRF07\_BC, CRF08\_BC)的*gag*、*pol*和*env*(C2V3)代

表1 *gag*、*pol*及*env* C2V3片段扩增引物序列

基因	引物	HXB2位点	引物序列(5'-3')	方向
<i>gag</i>	gag-617	617-638	TGTGGAAAATCTCTAGCAGTGG	Forward
	gag-763	763-783	TGACTAGCGGAGGCTAGAAG	Forward
	gag-5	2377-2401	TTCCYCCATATCTTTTGGTTCC	Reverse
	gag-6	2681-2712	TAATGCTTTATTTTTCYCTGTCAATGGC	Reverse
<i>pol</i>	Pol-1e	2029-2050	TGGAAATGTGGA(G)AAG(A)GAA(G)GGAC	Forward
	Pol-3	2068-2095	ACT GAG AGA CAG GCT AA TTT TTT AGG GA	Forward
	Pol-4e	5221-5192	CTCCTAGTGGGATRGTACTTCYGARCTTA	Reverse
	Pol-x	5241-5265	CCTGTATGCAG(A)A(C)CCCCAATATGTT	Reverse
<i>env</i> (C2V3)	44F	6954-6973	ACAGTRCARTGYACACATGG	Forward
	33FM	6983-7021	TGTAAACACGACGGCCAGTCTGTTLAATGGCAGICTAGC	Forward
	35R	7668-7648	CACCTTCCAATTTGCCITCA	Reverse
	48RM	7541-7523	CAGGAACAGCTATGACCRATGGGAGGRGYATACAT	Reverse

表序列,与本研究得到的序列进行比对,用 Mega 5.03 软件构建 Neighbor-joining (NJ) 系统进化树(重复运算 1000 次)进行分型验证<sup>[2]</sup>。

## 结 果

1. 基本检测及其分型:31 例 MSM HIV 抗体阳性者(经过实验验证)均居住在郑州市,平均年龄 33.2(21~59)岁,均为汉族;2 例有发热、皮疹、口腔溃疡、腹泻等临床症状,均未接受抗病毒治疗。检测 31 份血标本,获得 29 条 *gag* 全长序列、14 条 *pol* 全长序列和 21 条 *env*(C2V3)序列。其中 CRF01\_AE 亚型 14 例、CRF07\_BC 亚型 5 例、B 亚型 12 例(B' 亚型 11 例、B 亚型 1 例)。检测 41 例既往有有偿供血者血标本,获得 24 条 *gag* 全长序列、24 条 *pol* 全长序列和 27 条 *env*(C2V3)序列,HIV-1 基因亚型均为 B'。

使用 Kimura 2 参数模型计算 MSM 人群中不同 HIV-1 亚型的基因距离(表 2),B 和 CRF01\_AE 亚型的基因距离较大,而 CRF07\_BC 的基因距离相对较小,较大的基因距离提示 HIV-1 毒株多次传入 MSM 人群,而不具有奠基效应。

表 2 郑州市 MSM 感染者中不同 HIV 亚型毒株的基因距离

基因	CRF01_AE		B		CRF07_BC	
	例数	$\bar{x} \pm s$	例数	$\bar{x} \pm s$	例数	$\bar{x} \pm s$
<i>gag</i>	12	0.040±0.003	12	0.044±0.003	5	0.030±0.003
<i>pol</i>	4	0.040±0.003	6	0.045±0.002	4	0.012±0.001
<i>env</i> (C2V3)	9	0.097±0.009	8	0.130±0.010	4	0.052±0.010

2. MSM 人群 HIV-1 毒株的来源:用 BLAST 工具在 Los Alamos National Laboratory (<http://www.hiv.lanl.gov>) 数据库中搜索和选择与我们获得的毒株具有最大相似性的序列,每个毒株下载至少 5 条具有最大相似性的序列。使用在线分析工具 Clustal W 将下载的序列与本研究所得序列一同分析,用 Mega 软件构建 NJ 进化树。

在基于 *gag* 基因的进化树中,将 29 条 MSM 感染者的序列与 47 条参考序列进行比较(图 1)。不同亚型的序列分别聚集在一起,Bootstrap 值都很高。12 个 B 亚型序列的 11 条与 ThaiB(B') 的序列聚集在一起,有 1 条(3386-*gag*)显示与欧美 B 亚型的关系较近。在所有 12 条 B 亚型序列中,8 条聚集成一个簇并具有较高的 Bootstrap 值(92%),提示该人群中可能存在传播关系,其他 4 条 B 亚型毒株分散在其他参考序列中,显示与湖北、辽宁省的毒株具有密切的关系。14 例 CRF01\_AE 亚型的序列,1 条与辽宁的聚在一起,另外一个簇包含 6 条郑州的序列、6 条河

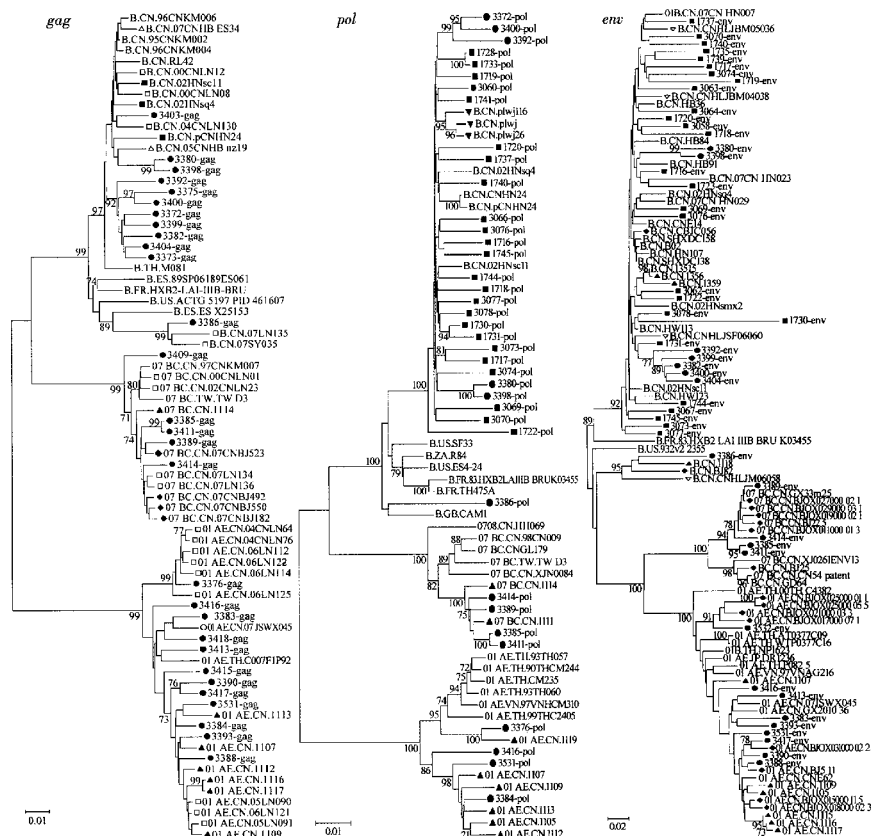
北的序列和 3 条辽宁的序列,提示河南与河北两地 MSM 的人群关系密切,另外 5 条序列分散在参考序列中,提示郑州市的 CRF01\_AE 毒株有多个来源。MSM 人群的 5 条 CRF07\_BC 毒株的 *gag* 序列与石家庄和北京市的毒株关系密切,有些毒株也与辽宁省的毒株聚在一起。基于 *pol* 和 *env*(C2V3) 序列的 NJ 进化树也同样显示郑州市 MSM 人群中 HIV-1 毒株的高度多样性。

3. MSM 人群与有偿供血人群 HIV-1 毒株关系:ThaiB(B') 是在河南省既往有有偿供血者中广泛流行的 HIV-1 毒株,在对采供血进行严格管理以后,河南省已经阻断了 HIV 的经血传播途径。在郑州市 31 例 MSM 的 HIV 感染者中,检出 11 例为 B' 亚型毒株感染者。将这 11 条 HIV-1 B' 亚型序列与 24 条河南省有供血员中的 B' 序列一起绘制系统进化树(图 2),8 条来自 MSM 人群的 *gag* 序列(编号分别为 3375、3400、3372、3392、3399、3373、3404、3382)聚集成簇,并与编号为 1745 的有供血员的序列距离最近,推测这 8 例 MSM 的 HIV-1 毒株来自有偿供血感染者,且在他们之间存在传播关系。2 条 MSM 感染者的 *gag* 序列(编号分别为 3380 和 3398)形成可靠的进化簇(Bootstrap 值为 100),且与 02HNseq4 的序列距离最近,提示毒株来自有偿供血员,且这 2 人之间可能存在传播关系。编号为 3403 的 MSM 序列分散在有供血员的序列中。

## 讨 论

据估计中国日前有 1782 万 MSM 人群<sup>[12]</sup>,多数 MSM 既有同性性行为,同时还有家庭<sup>[13,14]</sup>,从而促进了 HIV 从高危人群向一般人群的传播,并导致女性由于无保护性行为而感染 HIV 的增加,对 MSM 人群中 HIV 的遗传背景及可能的传播来源进行分析,可以为预防和干预提供重要的线索<sup>[15-18]</sup>。

本研究获得了郑州市 MSM 人群 HIV 感染者的 *gag*、*pol* 全长序列和 *env*(C2V3) 序列,观察到 HIV-1 毒株的高度多样性和多次传入,在该人群中 HIV-1 毒株复杂多样,存在多个可能的传入来源,不仅与河南省既往有有偿供血人群中的毒株可能存在传播关系,而且与河北、湖北和辽宁省的艾滋病人群也同样可能存在传播关系。这些结果是由于 MSM 人群的流动性大且往往具有多个性伴造成的。提示河南省 MSM 人群中 HIV-1 毒株的来源十分复杂,防控的难度大,同时在学习和疫苗的开发中毒株类型也是不容忽视的重要因素。



注：●为郑州 MSM 人群的 HIV 序列标记；△为湖北序列标记；▲为河北序列标记；■为河南本地的序列标记；□为辽宁序列标记；○为江苏序列标记；◆为北京序列标记；◇为广西序列标记；▽为黑龙江序列标记；▼为福建序列标记

图1 郑州市 MSM 感染者中 HIV-1 序列与其他地区或人群中流行毒株的关系

之前的研究检出的我国 MSM 人群中 HIV-1 B 亚型毒株主要是欧美 B 亚型,但是在郑州市发现以前主要在有有偿供血人群中流行的 HIV-1 B' 毒株是当地 MSM 人群中流行的主要 B 亚型,进化树分析显示郑州市的 MSM 人群与当地有有偿供血 HIV 感染者有密切关系。尽管河南省已经阻断了 HIV 的经血传播途径,但是既往有有偿供血 HIV 感染者仍有可能通过性途径导致 HIV-1 毒株的扩散,因此不可忽视对河南省既往有有偿供血 HIV 感染者的宣传教育和管理工作。

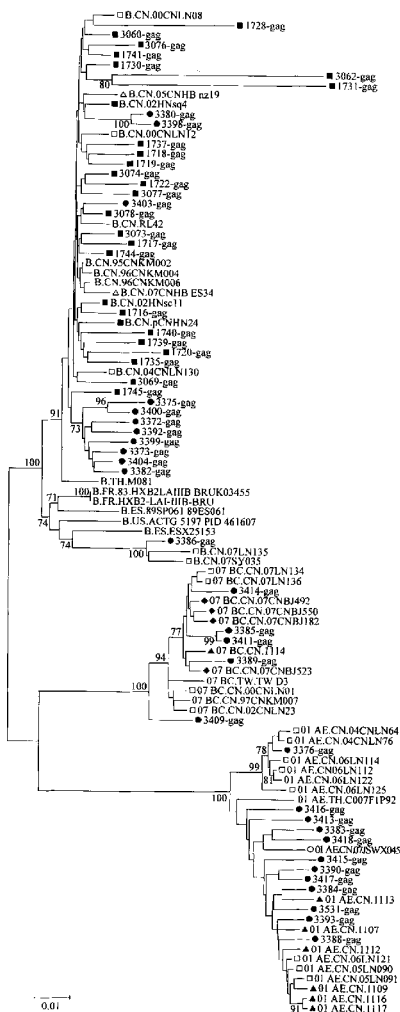
参 考 文 献

[1] China Ministry of Health, UNAIDS, World Health Organization

(WHO). 2009 estimates for the HIV/AIDS epidemic in China. Beijing, China: China Ministry of Health, 2010. <http://www.unaids.org.cn/download/2009%20China%20Estimation%20Report-En.pdf>.

[2] China Ministry of Health, UN Theme Group on HIV/AIDS in China. A joint assessment of HIV/AIDS prevention, treatment and care in China. Beijing: State Council AIDS Working Committee Office, UN Theme Group on AIDS in China, 2007; <http://www.unpd.org.cn/downloads/other/local/HIV/20080104.pdf>.

[3] China Ministry of Health, UNAIDS, WHO. 2005 Update on the HIV/AIDS epidemic and response in China. Beijing: National Center for AIDS/STD Prevention and Control, 2006; <http://>



注：●为郑州市 MSM 人群的 HIV 序列标记，■为河南有偿供血 HIV 感染者的序列标记

图 2 郑州市 MSM 感染者中 HIV-1 序列与有偿供血 HIV 感染者的关系

data.unaids.org/publications/External-Documents/rp\_2005\_chinaestimation\_25jan06\_en.pdf.

[4] China Ministry of Health, UN Theme Group on HIV/AIDS in China. A joint assessment of HIV/AIDS prevention, treatment

and care in China. Beijing, China: Ministry of Health, UNAIDS China Office. 2003. [http:// data. unaids. org/ UNA- docs/ china\\_ joint\\_ assessment\\_ 2003\\_ en. pdf](http://data.unaids.org/UNA_docs/china_joint_assessment_2003_en.pdf).

[5] Zhang BC, Chu QS. MSM and HIV/AIDS in China. *Cell Res*, 2005, 15: 858-864.

[6] Choi KH, Lui H, Guo Y, et al. Lack of HIV testing and awareness of HIV infection among men who have sex with men, Beijing, China. *AIDS Educ Prev*, 2006, 18: 33-43.

[7] UNAIDS/WHO. AIDS epidemic update: December 2006. 2007; Available at: [http:// www. unaids. org/](http://www.unaids.org/).

[8] Li N, Wang Z, Sun DY, et al. HIV among plasma donors and other high-risk groups in Henan, China. *J AIDS*, 2010, 53 Suppl 1: S41-47.

[9] Cui ZL, Wang Z, Liu GH, et al. An analysis of epidemic and trend of HIV/AIDS in Henan province. *Chin J AIDS/STD*, 2006, 12: 324-326. (in Chinese)

崔兆麟, 王哲, 刘国华, 等. 河南省艾滋病疫情现状及流行形式分析. *中国艾滋病性病*, 2006, 12: 324-326.

[10] Li L, Lu X, Li H, et al. High genetic diversity of HIV-1 was found in men who have sex with men in Shijiazhuang, China. *Infect Genet Evol*, 2011, 11: 1487-1492.

[11] Li L, Liang S, Chen L, et al. Genetic characterization of 13 subtype CRF01\_AE near full-length genomes in Guangxi, China. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010, 26: 699-704.

[12] Zhang BC, Li XF, Shi TX, et al. Survey on the high risk behaviors and other AIDS/STI related factors among men who have sex with men (MSM) in mainland China (2001). *Chin J Dermatol*, 2002, 35: 214-216. (in Chinese)

张北川, 李秀芳, 史同新, 等. 2001 年 1109 例男男性接触者性病艾滋病高危行为监测与调查. *中华皮肤科杂志*, 2002, 35: 214-216.

[13] Zhang D, Bi P, Lv F, et al. Changes in HIV prevalence and sexual behavior among men who have sex with men in a northern Chinese city: 2002-2006. *J Infect*, 2007, 55: 456-463.

[14] Zhang X, Li S, Li X, et al. Characterization of HIV-1 subtypes and viral antiretroviral drug resistance in men who have sex with men in Beijing, China. *AIDS*, 2007, 21 Suppl: S59-65.

[15] de Oliveira T, Pybus OG, Rambaut A, et al. Molecular epidemiology: HIV-1 and IICV sequences from Libyan outbreak. *Nature*, 2006, 444: 836-837.

[16] Hue S, Pillay D, Clewley JP, et al. Genetic analysis reveals the complex structure of HIV-1 transmission within defined risk groups. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 4425-4429.

[17] Hue S, Clewley JP, Cane PA, et al. HIV-1 *pol* gene variation is sufficient for reconstruction of transmissions in the era of antiretroviral therapy. *AIDS*, 2004, 18: 719-728.

[18] Yahi N, Fantini J, Tourres C, et al. Use of drug resistance sequence data for the systematic detection of non-B human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtypes: how to create a sentinel site for monitoring the genetic diversity of HIV-1 at a country scale. *J Infect Dis*, 2001, 183: 1311-1317.

(收稿日期: 2012-04-19)

(本文编辑: 尹廉)