

· 实验室研究 ·

北京地区 2006—2010 年女性 HIV-1 感染者
流行毒株分子特征研究

叶景荣 苏雪丽 余双庆 辛若雷 郝明强 卢红艳 冯霞 贺雄 曾毅

【摘要】 目的 分析北京地区女性 HIV-1 感染者流行毒株分子特征。方法 随机采集 2006—2010 年北京地区新发现女性 HIV-1 感染者的抗凝全血标本 100 份,分离血浆,提取病毒 RNA,用反转录/巢式聚合酶链反应扩增病毒 *gag* 基因,并进行序列测定和亚型分析。结果 系统进化分析确定北京地区女性 HIV-1 感染者存在 A1(1)、A2(1)、B(3)、B'(23)、C(8)、G(2)、H(1)、CRF01_AE(18)、CRF02_AG(3)、CRF06_cpx(1)、CRF07_BC(14)、CRF08_BC(4)和 B'/C(3) 13 种亚型,其比例分别为 1.22%、1.22%、3.66%、28.05%、9.76%、2.44%、1.22%、21.95%、3.66%、1.22%、17.07%、4.88%和 3.66%,B'、CRF01_AE 和 CRF07_BC 为主要亚型,6 种少见亚型(A1、A2、G、H、CRF02_AG 和 CRF06_cpx)合计占 11.0%。结论 北京地区女性 HIV-1 感染者流行毒株遗传多样性高于男性,B'亚型比例高,少见亚型比例也较高。

【关键词】 艾滋病病毒;亚型;巢式聚合酶链反应

Molecular-epidemiological characteristics of HIV-1 isolated from newly diagnosed female subjects in Beijing, 2006–2010 YE Jing-rong^{1,2}, SU Xue-li², YU Shuang-qing¹, XIN Ruo-lei², HAO Ming-qiang², LU Hong-yan², FENG Xia¹, HE Xiong², ZENG Yi¹. 1 National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2 Beijing Center for Disease Control and Prevention
Corresponding authors: FENG Xia, Email: fengxia621@126.com; ZENG Yi, Email: zengyi@public.bta.net.cn
This work was supported by a grant from the National Science and Technology Major Project of China (No. 2012ZX10001-005).

【Abstract】 **Objective** To analyze the molecular-epidemiological characteristics of HIV-1 strains prevailing among female people living with HIV in Beijing. **Methods** *Gag* gene fragments from the 100 newly diagnosed female HIV-1 infections during 2006 to 2010 in Beijing were amplified, sequenced, and phylogenetically analyzed. **Results** Eighty-two HIV-1 *gag* gene fragments were amplified and analyzed. 1(1.22%), 1(1.22%), 3(3.66%), 23(28.05%), 8(9.76%), 2(2.44%), 1(1.22%), 18(21.95%), 3(3.66%), 1(1.22%), 14(17.07%), 4(4.88%) and 3(3.66%) individuals were infected with HIV-1 subtypes A1, A2, B, B', C, D, G, H, CRF01_AE, CRF02_AG, CRF07_BC, CRF08_BC and B'/C recombinants respectively. **Conclusion** The subtypes circulating in females HIV infections in Beijing were more diversities than in males and the proportions of B' and rare subtypes were relatively high. Surveillance programs on HIV-1 genetic diversity should be strengthened.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Subtype; Nested-PCR

北京地区 1985—2011 年累计报道艾滋病病毒感染者和艾滋病患者(HIV/AIDS)10 393 例,其中男性 8678 例,女性 1700 例,性别比为 5.1:1;性传播途径感染占 56.98%(异性传播占 21.67%,男男同性传播占 35.31%),静脉吸毒传播途径感染占 22.47%。

目前关于女性 HIV-1 感染者流行毒株分子流行病学资料较少,为了解北京地区女性 HIV-1 感染者分子流行特征,本研究对 2006—2010 年北京地区新发现的 82 例女性感染者 HIV-1 *gag* 基因序列进行系统进化分析,现报告如下。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.01.012

基金项目:国家科技重大专项(2012ZX10001-005)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(叶景荣、余双庆、冯霞、曾毅);北京市疾病预防控制中心(叶景荣、苏雪丽、辛若雷、郝明强、卢红艳、贺雄)

通信作者:冯霞,Email: fengxia621@126.com; 曾毅, Email: zengyi@public.bta.net.cn

材料与方法

1. 样本来源及处理:采用单纯随机抽样方法抽取北京市疾病预防控制中心艾滋病确证中心 2006—2010 年新发现女性 HIV-1 感染者 100 例,签订知情同意后,用 EDTA 抗凝管采集 HIV-1 感染

者外周静脉血, 24 h 内检测 CD₄⁺T 淋巴细胞计数, 抗凝血经常规离心分离血浆, 使用 Qiagen Viral RNA Mini Kit 试剂盒提取病毒 RNA, 分装后 -80 °C 冻存。

2. 基因序列扩增: 设计合成扩增 *gag* 基因两对 PCR 引物, 引物序列见表 1; 用 Gag-F2 和 Gag-E2 为外侧引物进行第一轮 PCR 反应, 以 306 和 c-*gag* 为内侧引物进行第二轮 PCR, PCR 体系和扩增条件参考文献 [1]。PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳与分子质量标准对照判定无误后, 送上海生工生物工程有限公司测序。

表 1 HIV-1 *gag* 基因扩增及测序引物

引物	序列(5' ~ 3')	位置(HXB2)
Gag-F2	ATGGGTGCGAGAGCGTCARTAITTAAR=A/G	790 ~ 814
Gag-E2	TCCAACAGCCCTTTTTCCTAGG	2032 ~ 2011
306	GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCC	836 ~ 857
c- <i>gag</i>	TAGTTCCTGCTATRCACTTCC R=A/G	1507 ~ 1486

3. 序列分析: 为鉴定病毒株的亚型, 从 Los Alamos database HIV 数据库中下载各亚型的参考序列; 采用 Vector NTI 8.0 软件将所有的序列排列在一起, BioEdit 软件进行序列自动比对, 并手工校正; 利用 Mega 4.0 软件进行系统进化分析, 并计算各亚型组内和组间离散率^[2]。

结 果

1. 样本资料特征: 100 份标本最终扩增得到 82 条 *gag* 基因序列, 扩增率为 82.0%。82 份样本中 77 份来自中国籍(19 个省)感染者, 其中汉族 65 份, 维族 3 份, 回、满、傣族各 2 份, 蒙古、彝、景颇族各 1 份; 5 份为外籍人员; 平均年龄 33.0(2 ~ 69) 岁; 感染传播途径为异性 62 份、静脉吸毒 9 份、经血 6 份、母婴 1 份、不详 4 份。

2. HIV 亚型分析:

(1) 亚型判定: 将所获得的 *gag* 基因序列与 HIV-1 各亚型参考株比较, 并进行系统进化分析, 结果显示北京地区 2006—2010 年女性 HIV-1 感染者中存在 A1、A2、B、B'、C、G、H、CRF01_AE、CRF02_AG、CRF06_cpx、CRF07_BC、CRF08_BC 和 B'/C 重组型 13 种亚型, 主要亚型为 B'、CRF01_AE 和 CRF07_BC, 表 2 为计算的各亚型同参考株组间离散率和各亚型进化簇的组内离散率。

值得注意的是不同亚型进化簇各有特征。B' 亚型进化簇内经血途径和异性传播的病例混杂; C 亚型进化簇内 2 条序列同英国参考株 BR025_d 序列关系较近, 6 条序列同印度参考株 95IN21068 较近;

表 2 北京地区女性 HIV-1 感染者流行毒株系统进化分析

亚型	例数 (构成比, %)	参考株	离散率(%)	
			组间	组内
A1	1(1.22)	PS1044	8.5	-
A2	1(1.22)	97CDKTB48	11.5	-
B	3(3.66)	1058	9.4	-
B'	23(28.05)	RL42	4.4	5.5
C	8(9.76)	95IN21068	9.4	10.7
G	2(2.44)	HH8793	10.6	-
H	1(1.22)	CF.90.056	14.5	-
CRF01_AE	18(21.95)	CM240	5.0	6.5
CRF02_AG	3(3.66)	CM.99.pBD6	12.9	-
CRF06_cpx	1(1.22)	AU.96.BFP90	5.4	-
CRF07_BC	14(17.07)	97CN001	2.9	3.9
CRF08_BC	4(4.88)	97CNGX_6F	4.2	-
B'/C	3(3.66)	-	-	-
合计	82(100.00)	-	-	-

注: - 为不详

CRF01_AE 进化簇内各序列分散分布, 存在 1 对母婴配对病例, 母亲(BJ091029)为静脉吸毒途径传播, 婴儿(BJ091037)为母婴传播感染, 两者聚集在一起, bootstrap 值为 90%, 组间离散率为 1.8%, 从分子流行病学角度证明母婴传播关系; 进化树上有 3 条序列不能很好的同 CRF07_BC 或 CRF08_BC 聚集在一起, 无法判断是 CRF07_BC 和 CRF08_BC, 故笼统称为 B'/C 重组型。总体而言, 进化树分析无大的传播链, 病例多为散发感染, 不存在爆发性流行(图 1)。

(2) 少见亚型: 本研究发现 9 例感染者存在 6 种少见亚型(A1、A2、G、H、CRF02_AG 和 CRF06_cpx), 感染者中泰国籍 3 例、中国籍 6 例(其中北京籍 3 例), 即 7.8%(6/77) 中国籍女性病例为少见亚型感染, 北京地区有 11.0%(9/82) 的女性病例为少见亚型感染(表 3)。

表 3 北京地区 9 例女性 HIV 少见亚型病例一般情况

编号	国籍 (省份)	年龄 (岁)	检测时间 (年)	亚型	CD ₄ ⁺ T 淋巴细胞 计数(cell/μl)
BJ07515	中国河南	27	2007	A1	169
BJ09674	不详	25	2009	A2	360
BJ07646	中国北京	43	2006	06_cpx	152
BJ10822	中国北京	26	2010	02_AG	431
BJ09750	中国北京	27	2009	02_AG	1046
BJ09642	泰国	47	2009	02_AG	322
BJ10794	中国湖南	36	2010	G	7
BJ10798	泰国	27	2010	G	328
BJ09641	泰国	37	2009	H	225

注: 传播途径除编号 BJ09641 为静脉吸毒外均为异性传播

(3) 亚型地区分布: 按户籍分组分析, 北京籍女性感染者存在 8 种亚型, 以 CRF01_AE 和 B' 亚型为主; 河南籍感染者存在 4 种亚型, 以 B' 亚型为主, 其他省份感染者存在 8 种亚型, 以 CRF07_BC 为主; 外

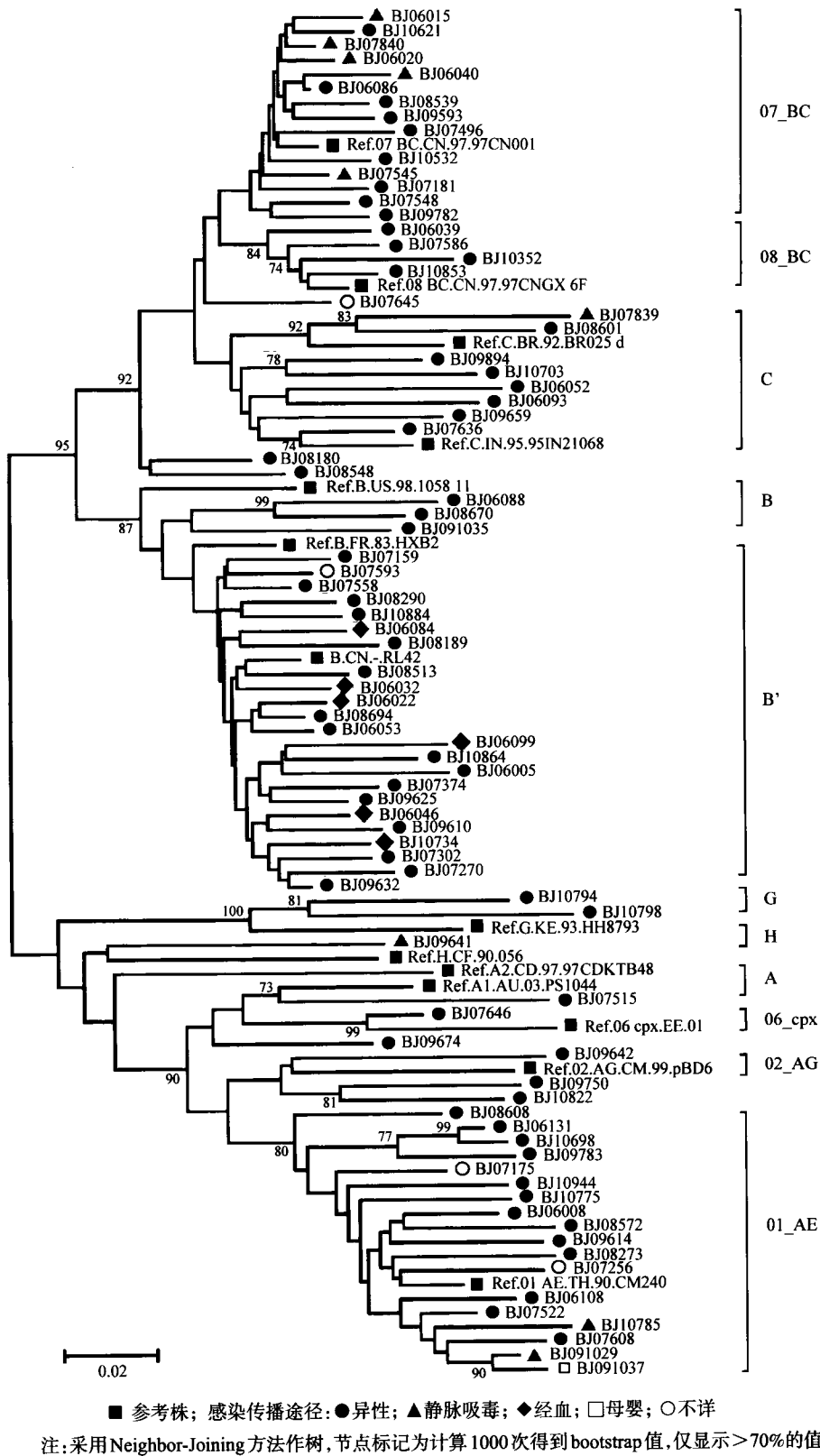


图 1 北京地区女性 HIV-1 感染者流行毒株 gag 基因系统进化树分析

籍感染者存在 4 种亚型(表 4)。

(4)亚型传播途径分布:按传播途径分组分析,异性传播途径中存在 A1、A2、B、B'、C、G、H、CRF01_AE、CRF 02_AG、CRF06_cpx、CRF07_BC、

CRF08_BC、B'/C 重组型 13 种亚型,静脉吸毒传播途径中存在 4 种亚型,经血传播途径全部为 B' 亚型,1 例母婴传播为 CRF01_AE(表 5)。

讨 论

联合国艾滋病规划署 (UNAIDS)估计截止 2009 年年底全球存活 HIV/AIDS 有 3330 万,其中女性占 52%(撒哈拉以南非洲占 60%,北美、西欧和中欧地区占 27%,亚洲占 35%)^[3];截至 2011 年年底,估计我国存活 HIV/AIDS 78 万人,女性占 28.6%,北京地区女性占 16.4%^[4],可以说女性 HIV 感染者所占比例一定程度上反映 HIV 疫情的严重程度。我国女性 HIV 感染者所占比例较低。本研究发现北京地区 2006—2010 年新发现的 82 例女性感染者中存在 A1 (1.22%)、A2 (1.22%)、B (3.66%)、B' (28.05%)、C (9.76%)、G (2.44%)、H (1.22%)、A (2.44%)、H (1.22%)、06_cpx (1.22%)、02_AG (3.66%)、CRF01_AE (21.95%)、CRF02_AG (3.66%)、CRF06_cpx (1.22%)、CRF07_BC (17.07%)、CRF08_BC (4.88%)、B'/C 重组型 (3.66%) 13 种亚型,同一时期 512 例男性感染者中存在 A1、B、B'、C、CRF01_AE、CRF02_AG、CRF07_BC、CRF08_BC 和 B'/C 重组型 9 种亚型(未发表数据),虽然女性感染者人数远少于男性,亚型种类却多于男性,分析发现女性感染者中异性传播比例较高(71.7%),男性感染者中异性传播占 22.8%,而异性传播途径中 HIV-1 遗传多样性最高,因此出现了女性感染者人数较少,但亚型种类较多的现象。同男性感染者

分析发现女性感染者中异性传播比例较高(71.7%),男性感染者中异性传播占 22.8%,而异性传播途径中 HIV-1 遗传多样性最高,因此出现了女性感染者人数较少,但亚型种类较多的现象。同男性感染者

表4 北京地区女性HIV-1感染者亚型地区分布

地区 例数	亚 型												
	A1	A2	B	B'	C	G	H	01_AE	02_AG	06_cpx	07_BC	08_BC	B'/C
北京	21		3	4	3			5	2	1	2		1
河南	17	1		11				4			1		
外籍	5				2	1	1		1				
其他	39		1		8	3	1	9			11	4	2
合计	82	1	1	3	23	8	2	18	3	1	14	4	3

注:其他地区包括河北、山西、辽宁、吉林、黑龙江、浙江、安徽、江西、山东、湖北、湖南、广西、重庆、四川、云南、甘肃、新疆

表5 北京地区女性HIV-1感染者亚型传播途径分布

传播途径 例数	亚 型												
	A1	A2	B	B'	C	G	H	01_AE	02_AG	06_cpx	07_BC	08_BC	B'/C
异性	62	1	1	3	16	7	2	13	3	1	9	4	2
静脉吸毒	9				1		1	2			5		
经血	6				6								
母婴	1							1					
不详	4				1			2					1
合计	82	1	1	3	23	8	2	18	3	1	14	4	3

CRF01_AE(37.11%)、CRF07_BC(28.52%)和B亚型(22.46%)为主的流行模式有所不同,女性感染者中流行毒株的主要亚型为B'(28.05%)、CRF01_AE(21.95%)和CRF07_BC(17.07%),河南籍病例所占比例较高有助于解释该现象,但非河南籍病例B'亚型仍占18.5%;另外,B亚型所占的比例较小(3.66%),大部分为北京籍感染者,B亚型主要通过男男性行为接触传播,推测这些病例可能是被其双性恋性伴感染。

C亚型是全世界所占比例最大的亚型(约占50%),主要分布在南部非洲和印度,我国C亚型首先于1992年在云南省静脉吸毒人群中检出,C和B'亚型在静脉吸毒人群中的共流行导致了两种新的B'/C重组型CRF07_BC和CRF08_BC的产生,随后这两种重组型的广泛传播,基本上取代了C亚型;本研究中C亚型在女性感染者中所占比例相对较高(9.76%),其中2例为英国C亚型,6例为印度C亚型,C亚型是否会卷土重来,需要加强监测。B、B'、C、CRF01_AE、CRF07_BC和CRF08_BC这6种亚型在我国较为常见,此外其他亚型在我国均为少有亚型,本研究检测到的6种少有亚型(A1、A2、G、H、CRF02_AG和CRF06_cpx)可能是其他国家的主要亚型。例如A亚型在全世界占12%,主要分布在东欧和非洲;CRF02_AG在全世界占4.8%,主要分布在西部非洲。少有亚型在中国籍女性感染者中占有较高的比例(7.8%),说明有进一步传播的可能,如监测到这些少有亚型在我国男性中(特别是静脉吸毒和男男性行为接触人群)占有一定比例,就有可能造成大范围的本土传播。

HIV-1遗传多样性表现为复杂的准种和准种变异。在病毒学研究领域,准种被用于表示感染个体内同种病毒的遗传异质性(genetic heterogeneity)^[5]。HIV感染母婴传播通常会发生病毒准种的改变,表现为母婴体内的HIV-1准种高度相关,却又存在明显差异,母体内HIV-1遗传异质性远大于婴儿体内分离到的病毒,有时母亲体内罕见的病毒变异株却是婴儿体内主要的毒株,这种现象出现的原因之一是HIV-1传播过程中的选择性^[6,7]。本研究中母婴传播配对病例体内毒株虽然亲缘关系很近,但并不完全相同,仍然存在一定的差异,证明HIV-1母婴传播过程中准种改变现象的存在。

HIV女性感染者的主要传播途径是异性传播,而女性通常处于被动和弱势地位,有研究显示在异性传播途径中女性感染HIV的危险性是男性的2~5倍^[8],因此在我国艾滋病预防控制工作中需要更多关注女性。本研究发现女性感染者HIV-1分子流行特征不同于男性,这对于制定针对女性的艾滋病预防控制策略有重要参考价值。

参 考 文 献

- [1] Ye JR, Xing H, Liu HL, et al. Subtype and sequence analysis of gag and env genes among HIV-1 strains circulating in Beijing residents during 2006. Chin J Epidemiol, 2007, 28(6): 586-588. (in Chinese)
叶景荣,邢辉,刘海林,等.北京市2006年HIV-1流行毒株的gag和env基因序列测定及亚型分析.中华流行病学杂志,2007,28(6): 586-588.
- [2] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. Molecular evolutionary genetic analysis (Mega) software version 4.0. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [3] UNAIDS. UNAIDS report on the global aids epidemic. 2010: 6-192.
- [4] Ministry of Health of the People's Republic of China, UNAIDS, WHO. China 2011 AIDS Epidemic Report. Chin J AIDS STD, 2012, 18(1): 1-5. (in Chinese)
中华人民共和国卫生部,联合国艾滋病规划署,世界卫生组织.2011年中国艾滋病疫情估计.中国艾滋病性病,2012,18(1): 1-5.
- [5] Hahn BH, Gonda MA, Shaw GM, et al. Genomic diversity of the acquired immune deficiency syndrome virus HTLV-III: different viruses exhibit greatest divergence in their envelope genes. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(14): 4813-4817.
- [6] Montano M, Russell M, Gilbert P, et al. Comparative prediction of perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission, using multiple virus load markers. J Infect Dis, 2003, 188(3): 406-413.
- [7] Li GH, Chen ZW, Chen Z, et al. Study on the distribution of human immunodeficiency virus-1 subtypes in different regions of China and mother-to-child transmission. Chin J Epidemiol, 2004, 25(12): 1013-1018. (in Chinese)
李关汉,陈志伟,陈铮,等.中国部分地区HIV-1流行株基因型分布与母婴传播.中华流行病学杂志,2004,25(12): 1013-1018.
- [8] Padian NS, Shiboski SC, Jewell NP. Female-to-male transmission of human immunodeficiency virus. JAMA, 1991, 266(12): 1664-1667.

(收稿日期:2012-07-13)
(本文编辑:张林东)