

广西壮族自治区 2008—2009 年 HIV-1 流行毒株基因型及其分布

刘伟 梁淑家 杨进业 李剑军 王斌 陈立力 李林 刘永健 李敬云

【摘要】 目的 了解广西地区目前 HIV-1 流行毒株的基因型及其分布。方法 收集广西地区 13 个市 294 名 2008—2009 年新诊断的 HIV 感染者血浆标本和背景信息,感染途径主要为异性性传播(86.1%)。采用 RT-PCR 法分别扩增 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),序列编辑后用 Genotyping 及 Mega 5.03 工具确定病毒的基因型,用 Simplot 和 Recombinant HIV-1 Drawing Tool 软件进行病毒基因的重组分析。结果 获得全长 *gag* 基因序列 270 条、全长 *pol* 基因序列 246 条、*env* 基因 C2V3 区序列 223 条,确定 272 例标本的基因型。CRF01_AE 占的比例最高(77.6%),其次为 CRF08_BC(10.7%)和 CRF07_BC(7.4%),有 4 例 B(B') 亚型、1 例 G 亚型,还有 7 例未知重组型。性别、民族间病毒基因型分布的差异无统计学意义。7 株新型重组毒株有 6 株以 CRF01_AE 为母株,嵌入 B 和/或 C 的片段,还有 1 株为 CRF07_BC 和 CRF08_BC 的二代重组。结论 广西地区目前流行的 HIV-1 毒株以 CRF01_AE 为主,并出现以 CRF01_AE 为母株嵌入其他毒株基因片段的新型重组毒株,呈现基因组结构复杂化趋势。

【关键词】 艾滋病病毒 1 型; HIV 基因亚型; 分子流行病学

Distribution of HIV-1 subtypes in Guangxi Zhuang Autonomous Region, 2008–2009 LIU Wei¹, LIANG Shu-jia¹, YANG Jin-ye¹, LI Jian-jun¹, WANG Bin¹, CHEN Li-li^{2,3}, LI Lin², LIU Yong-jian², LI Jing-yun². 1 Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Nanning 530028, China; 2 Department of AIDS Research, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science; 3 Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Area Command

Corresponding author: LI Jing-yun, Email: lijy@nic.bmi.ac.cn

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Major Projects of China (No. 2008ZX10001-004).

【Abstract】 Objective To understand the distribution of HIV-1 subtypes in Guangxi Zhuang Autonomous Region. Methods 294 participants who were infected by HIV-1 in 2008–2009 and residing in 13 cities in Guangxi were enrolled into this study. Epidemiological information showed that heterosexual transmission was the main transmitting route. 1584 bp full length *gag* gene, 3147 bp full length *pol* gene and 558 bp *env* (C2V3) fragments were amplified by using RT-PCR and then directly sequenced. NCBI genotyping tool and Mega 5.03 software were used to determine the HIV subtypes. Simplot and Recombinant HIV-1 Drawing Tool were used for the analysis of recombination. Results A total of 739 sequences, including 270 *gag*, 246 *pol* and 223 *env* (C2V3), were successfully obtained from 294 plasma specimens. Genotypes of HIV from 272 participants were determined. CRF01_AE was found the dominant (77.6%), followed by CRF08_BC (10.7%) and CRF07_BC (7.4%). 7 unique recombinant forms, 4 subtype B(B') and 1 subtype G were also identified. No significant difference on the distribution of subtypes among different regions and ethnics was found. Among the 7 unknown recombinant forms, 6 strains were mosaic B and/or C fragments with CRF01_AE genome as the backbone, while one strain originated from CRF07_BC and CRF08_BC. Conclusion Currently, CRF01_AE was found the major subtype of HIV epidemic in Guangxi. New recombinant forms with CRF01_AE as backbones had been emerging, which called for serious attention.

【Key words】 Human immunodeficiency virus type 1; Genetic subtype; Molecular epidemiological distribution

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.01.013

基金项目: 国家科技重大专项(2008ZX10001-004)

作者单位: 530028 南宁, 广西壮族自治区疾病预防控制中心(刘伟、梁淑家、杨进业、李剑军、王斌); 军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物生物安全国家重点实验室(陈立力、李林、刘永健、李敬云); 兰州军区乌鲁木齐总医院(陈立力)

通信作者: 李敬云, Email: lijy@nic.bmi.ac.cn

广西地区于 1996 年首次发现本地居民 HIV-1 感染和出现区域性流行^[1], 此后疫情快速向全区扩散, 截至 2009 年 10 月 31 日累计报告艾滋病病毒感染者/艾滋病患者(HIV/AIDS) 51 877 例, 全区 111 个县有疫情报告, 累计报告感染人数超过 1000 例的县有 14 个, 疫情以柳州、南宁、钦州市居首。广西地区早期 HIV 流行主要是在静脉吸毒(IDU)人群, 毒株的亚型以 BC 重组为主, 但近年来 HIV 迅速从 IDU 人群向性传播人群扩散^[2], 毒株亚型也出现 CRF01_AE 逐渐增多的趋势。为此本文进行 HIV-1 毒株的遗传多样性研究, 以了解毒株变异情况、评估流行状况及预测流行趋势。

材料与方 法

1. 标本来源: 为 2008 年或 2009 年 294 份新确认 HIV 感染者血浆样本。分别来自广西地区 13 个地市, 根据新报告感染者的地区和传播途径分布选择抽取, 样本具有一定代表性。在疫情信息库中收集病例临床和流行病学信息。血浆标本冷冻条件下运送至实验室, -80 °C 保存待检。

2. 研究方法:

(1) 基因序列扩增: 常规方法提取纯化血浆标本中的病毒 RNA, 对每份标本分别扩增 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), 扩增引物见表 1。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 PCR 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, 如两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, 保存为 faster 格式文件。

(2) 测序分析: 使用 Los Alamos 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, 保证序列中没有错误的插入/缺失和异常的突变。

使用美国 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 Los Alamos HIV Database 下载标准亚型的 *gag*、*pol* 和 *env* C2V3 序列, 与本研究得到的序列分别比对, 用 Mega 5.03 软件构建 Neighbor-Joining 系统进化树(重复运算 1000 次)进行分型验证^[3]。采用 Los Alamos HIV Database 的在线工具 RIP 进行初步的基因重组分析。使用 Simplot 软件定位重组断点, Recombinant HIV-1 Drawing Tool 绘制重组镶嵌模式图。

结 果

1. 样本特征: 294 例 HIV-1 感染者, 男女比例为 1.85 : 1, 年龄 18 ~ 80 (平均 36) 岁; 壮族例数多于汉族; 感染途径中异性性接触占绝大多数(86.1%), 而静脉药物注射和同性性接触仅分别占 7.5% 和 3.1%; 在全区 14 个地市的 13 个采集样本, 其中有 3 个地市的样本数占总数的比例 > 10%, 分别为南宁(31.6%)、崇左(16.3%)和河池(10.9%), 三地合计占总例数的 58.8%, 其余 10 个地市的病例数占总数的 1% ~ 7%; 所有感染者均未接受抗病毒治疗(表 2)。

2. HIV-1 基因型的判定及其分布: 对 294 份血浆标本进行两轮扩增, 对扩增产物进行首测、加测、稀释后加测三轮测序, 共得全长 *gag* 基因序列 270 条、全长 *pol* 基因序列 246 条、*env* 基因 C2V3 区序列

表 1 *gag*、*pol* 全长片段及 *env* C2V3 片段扩增引物序列

基因	引物	位置	序列(5' ~ 3')	方向
<i>gag</i>	gag-617	617 ~ 638	TGTGGAAAATCTCTAGCAGTGG	F
	gag-763	763 ~ 783	TGACTAGCGGAGGCTAGAAGG	F
	gag-5	2377 ~ 2401	TTCCYCCTATCATTTTTGGTTCC	R
	gag-6	2681 ~ 2712	TAATGCTTTTATTTTTYCYTCTGTCAATGGC	R
<i>pol</i>	Pol-1e	2029 ~ 2050	TGGAAATGTGGA(G)AAG(A)GAA(G)GGAC	F
	Pol-3	2068 ~ 2095	ACTGAGAGACAGGCTAATTTTTAGGGA	F
	Pol-4e	5221 ~ 5192	CTCCTAGTGGGATRTGTACTTCYGARCTTA	R
	Pol-x	5241 ~ 5265	CCTGTATGCAG(A)A(C)CCCAATATGTT	R
<i>env</i> (C2V3)	44F	6954 ~ 6973	ACAGTRCARTGYACACATGG	F
	33FM	6983 ~ 7021	TGTAAAACGACGGCCAGTCTGTTIAATGGCAGICTAGC	F
	35R	7668 ~ 7648	CACTTCTCAATGTCCITCA	R
	48RM	7541 ~ 7523	CAGGAAACAGCTATGACCRATGGGAGGRGYATACAT	R

表 2 294 例 HIV-1 感染者基本特征

特征	例数	构成比(%)
性别	男	191 65.0
	女	103 35.0
年龄(岁)	18~	179 60.9
	41~80	115 39.1
民族	壮	166 56.5
	汉	118 40.1
	其他	10 3.4
感染途径	异性性接触	253 86.1
	静脉药物注射	22 7.5
	同性性接触	9 3.1
	不详	10 3.4
地区	南宁	93 31.6
	崇左	48 16.3
	河池	32 10.9
	钦州	21 7.1
	贵港	17 5.8
	百色	15 5.1
	来宾	15 5.1
	柳州	14 4.8
	其他	39 13.3

注:其他地区包括≤10例的北海、贺州、防城港、玉林、梧州等市

223 条。由于扩增的 *gag* 和 *pol* 序列覆盖完整的 *Gag*、*Pol* 蛋白编码区(HXB2:790~5096),将这两个基因区的序列连在一起,作为一个完整的基因区(*gag-pol*)进行分型分析,如果仅 *gag* 或 *pol* 一区有序列,则按该区序列进行分型,如仅有 *env* C2V3 序列的样本则不统计。

确定了 272 份样本的基因型,其中 244 份(89.7%)的基因型由 *gag-pol* 完整基因获得、28 份(10.3%)由 *gag* 或 *pol* 全长基因获得,系统进化树验证结果与 Genotyping 的分型一致。CRF01_AE 占的比例最高(77.6%),其次为 CRF08_BC(10.7%)和 CRF07_BC(7.4%),有 4 份 B(B') 亚型、1 份 G 亚型,还有 7 份未知重组型(表 3)。由于全部样本中的 89.2% 通过同性或异性性传播感染,可以认为 CRF01_AE 是性途径感染者当中占优势的毒株。

表 3 广西地区 HIV-1 毒株的基因型

基因型	得到基因型的基因区			合计	构成比 (%)
	<i>gag-pol</i>	仅 <i>gag</i>	仅 <i>pol</i>		
CRF01_AE	186	24	1	211	77.6
CRF07_BC	19	1	-	20	7.4
CRF08_BC	27	1	1	29	10.7
B(B')	4	-	-	4	1.5
G	1	-	-	1	0.4
未知重组	7	-	-	7	2.6
合计	244	26	2	272	100.0

获得基因型样本的 272 例 HIV 感染者分布在广西地区 13 个地市,其中以南宁市最多,约占总数的

1/3(30.15%),有 3 个市的样本(南宁、崇左和河池)>30 例,其他 10 个市有 5 个(钦州、贵港、来宾、百色和柳州)>10 例,另 5 个地区(北海、贺州、防城港、玉林和梧州)<10 例。各地区 HIV-1 毒株的基因型分布见表 4。所有地区均以 CRF01_AE 毒株为主,CRF07_BC 和 CRF08_BC 主要集中在南宁市,CRF07_BC 除南宁市外在其他 5 个市均只有 1 例,CRF08_BC 在崇左(13.0%)、百色(21.4%)有少量分布,B(B') 亚型在河池和钦州市各有 2 例,7 例未知重组型主要在南宁和钦州市,在北海市发现 1 例我国少见的 G 亚型。

表 4 广西 HIV-1 基因亚型地区分布

地区	CRF01_AE	CRF07_BC	CRF08_BC	B(B')	G	未知重组型	合计
南宁	54(61.4)	14(15.9)	17(19.3)	-	-	3(3.4)	88
崇左	39(84.7)	1(2.2)	6(13.0)	-	-	-	46
河池	29(93.5)	-	-	2(6.5)	-	-	31
钦州	13(72.2)	-	1(5.6)	2(11.1)	-	2(11.1)	18
贵港	15(88.2)	1(5.9)	1(5.9)	-	-	-	17
来宾	14(93.3)	1(6.7)	-	-	-	-	15
百色	9(64.3)	1(7.1)	3(21.4)	-	-	1(7.1)	14
柳州	13(100.0)	-	-	-	-	-	13
其他	25(83.3)	2(6.7)	1(3.3)	-	1(3.3)	1(3.3)	30
合计	211(77.6)	20(7.4)	29(10.7)	4(1.5)	1(0.4)	7(2.6)	272

注:其他地区包括总例数<10例北海、贺州、防城港、玉林和梧州

HIV-1 基因型男女性分布的差异无统计学($\chi^2=5.197, P=0.392$);壮族与汉族 HIV-1 基因型构成的差异亦无统计学意义($\chi^2=10.38, P=0.068$)。

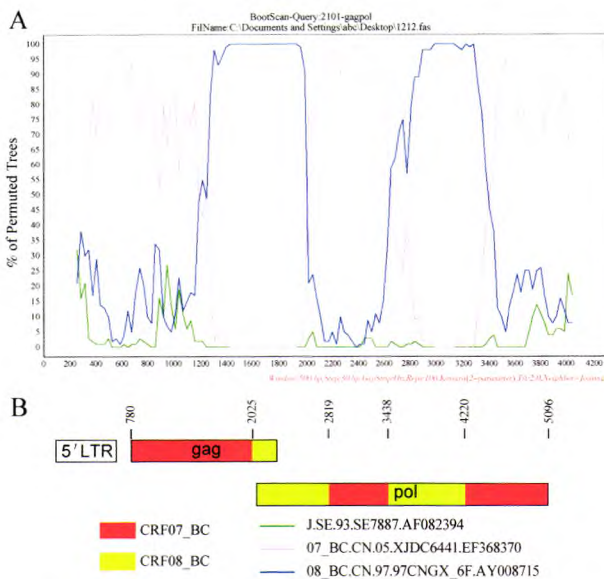
3. 未知重组毒株的鉴定和分析:本研究根据完整的(*gag-pol*)基因区序列,发现 7 株基因组与目前已知的流行重组型(CRF)重组模式不同的 HIV-1 毒株(表 5),其中来自异性性接触感染者 4 株、IDU 2 株、同性性接触感染者 1 株,分布在南宁(3 株)、钦州(2 株)、百色(1 株)和玉林(1 株)。对新型重组毒株进行基因组结构分析,7 株中有 6 株是在 CRF01_AE 母株基因组的基础上嵌入 B 和(或)C 亚型毒株的基因片段,其中 CRF01_AE/B 重组 3 株,CRF01_AE/C 重组 1 株,CRF01_AE/B/C 重组 2 株,这与 CRF01_AE 是当前广西地区流行的主要毒株有关。此外,还发现了 1 株 CRF07_BC 和 CRF08_BC 毒株的二代重组毒株(2101 号标本),是以 CRF07_BC 为骨架,在 *pol* 区有两段分别为 794 bp 和 782 bp 的 CRF08_BC 毒株的片段嵌入(图 1)。

讨论

本研究的特点:收集的病例样本以性传播途径

表 5 广西地区 HIV-1 新型重组 HIV-1 毒株感染者的基本信息

标本编号	性别	年龄(岁)	民族	居住地	感染途径	重组模式
2025	女	42	汉	南宁	静脉药物注射	01_AE/C
2037	男	20	汉	南宁	同性性接触	01_AE/B
2113	男	22	汉	玉林	异性性接触	01_AE/B
2261	男	48	汉	钦州	异性性接触	01_AE/B
2094	男	32	汉	南宁	静脉药物注射	01_AE/B/C
2154	男	37	壮	百色	异性性接触	01_AE/B/C
2101	男	28	汉	钦州	异性性接触	07_BC/08_BC



注: A 为 Bootscan 分析。参考株为 CRF07_BC (97CN54), CRF08_BC (97CNGX6F) 和 subtype J (SE7887) 为外组, 所有序列比对均去掉空格, 滑动窗口为 500 bp, 步进 30 bp; B 为重组镶嵌模式图

图 1 2101 号标本基于 gag-pol 序列的重组分析

为主(同性和异性性传播占 89.2%), 而以往在广西地区的研究均以 IDU 人群为主^[4], 这与近年来 HIV 传播途径由 IDU 为主转变为异性性传播为主的情况相一致。本次共计获得 272 例标本的 739 条 HIV-1 基因序列, 概括了整个广西地区 HIV-1 毒株分布情况, 且采用基因组长片段分析, 准确鉴定新型重组毒株。

本研究发现, 广西地区流行的 HIV-1 毒株已发生改变, CRF01_AE 占据绝对优势。以往 HIV 感染人群主要是 IDU, 毒株主要为 HIV-1 C 亚型和 CRF01_AE, 其中 C 亚型来自云南省^[5], CRF01_AE 来自越南^[6-8]。1999 年陈杰等^[9]在广西地区 28 株病毒中发现 B(B')、C、D 和 CRF01_AE 四种亚型, 其中 B(B') 亚型主要在有偿供血者中流行, C 亚型在 IDU 人群中流行, CRF01_AE 亚型仅在中越边境凭祥(属崇左地区)的 IDU 中流行。此后的研究仍大多集中在 IDU 人群, CRF08_BC 和 CRF01_AE 为其主要流行亚型, CRF08_BC 主要分布在南宁和靠近云南省

的百色市, 而与越南接壤的崇左地区则以 CRF01_AE 为主^[10,11]。本研究发现, CRF01_AE 已成为广西地区优势毒株, CRF08_BC 所占比例很少, 未发现 C 亚型。提示随着 HIV 传播途径转变为异性性传播为主, 毒株的类型也转变为 CRF01_AE 占绝对优势。

本研究还发现, 在广西地区正出现新型重组 HIV-1 毒株, 在目前 CRF01_AE 占据优势的背景下, 重组模式多数为以 CRF01_AE 为母株嵌入其他毒株的基因片段。说明目前广西地区一方面呈现单一毒株(CRF01_AE)占据优势, 另一方面优势毒株也正在与其他毒株重组, 呈现基因组结构愈加复杂的趋势。应高度重视这些新型毒株, 并密切监测。

参 考 文 献

- [1] Yu ES, Xie Q, Zhang K, et al. HIV infection and AIDS in China, 1985 through 1994. *Am J Public Health*, 1996, 86: 1116-1122.
- [2] Zhu QY, Liu W, Chen J, et al. Analysis of data of AIDS sentinel surveillance from 1996 to 2003 in Guangxi. *Chin J AIDS STD*, 2006, 12(5): 429-432. (in Chinese) 朱秋映, 刘伟, 陈杰, 等. 广西 1996-2003 年艾滋病哨点监测结果分析. *中国艾滋病性病*, 2006, 12(5): 429-432.
- [3] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [4] Zhu QY, Liu W, Chen J, et al. Analysis on HIV/AIDS epidemic situation in Guangxi from 1989 to 2006. *J Appl Prev Med*, 2008, 4(2): 70-73. (in Chinese) 朱秋映, 刘伟, 陈杰, 等. 1989-2006 年广西艾滋病流行情况分析. *应用预防医学*, 2008, 4(2): 70-73.
- [5] Yu XF, Chen J, Shao Y, et al. Emerging HIV infections with distinct subtypes of HIV-1 infection among injection drug users from geographically separate locations in Guangxi, China. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1999, 22(2): 180-188.
- [6] Kato K, Kusagawa S, Motomura K, et al. Closely related HIV-1 CRF01_AE variant among injecting drug users in northern Vietnam: evidence of HIV spread across the Vietnam-China border. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001, 17(2): 113-123.
- [7] Quan VM, Chung A, Long HT, et al. HIV in Vietnam: the evolving epidemic and the prevention response, 1996 through 1999. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2000, 25(4): 360-369.
- [8] Kato K, Shiino T, Kusagawa S, et al. Genetic similarity of HIV type 1 subtype E in a recent outbreak among injecting drug users in northern Vietnam to strains in Guangxi Province of southern China. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1999, 15(13): 1157-1168.
- [9] Chen J, Liu W, Young NL, et al. Molecular-epidemiological analysis of HIV-1 initial prevalence in Guangxi, China. *Chin J Epidemiol*, 1999, 20(2): 74-77. (in Chinese) 陈杰, 刘伟, Young NL, 等. 广西 HIV-1 首次流行的分子流行病学分析. *中华流行病学杂志*, 1999, 20(2): 74-77.
- [10] Yu XF, Liu W, Chen J, et al. Maintaining low HIV type 1 *env* genetic diversity among injection drug users infected with a B/C recombinant and CRF01_AE HIV type 1 in southern China. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2002, 18(2): 167-170.
- [11] Laeyendecker O, Zhang GW, Quinn TC, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 subtypes in Southern China. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2005, 38(3): 356-362.

(收稿日期: 2012-07-17)

(本文编辑: 张林东)