

## · 实验室研究 ·

# 江苏省男性 HIV 感染者梨支原体 16S rRNA 基因片段序列分析

吴建茹 朱一 谢彦昕 周良佳 徐金水 还锡萍 王蓓

**【摘要】** 目的 了解梨支原体(*Mpi*)在男性 HIV 感染者中的流行情况,复核鉴定部分 *Mpi* 16S rRNA 基因片段序列。方法 以江苏省男性 HIV/AIDS 为研究对象,采集其首段尿,用巢式 PCR 法检测 *Mpi*,并描述该人群中 *Mpi* 的感染情况。纯化 PCR 产物进行 *Mpi* 16S rRNA 基因片段序列测定,采用 Mega 4.0 软件的多序列排列程序对支原体临床株和下载序列进行同源位排列、比对,利用 Neighbor-Joining 构建系统发育树。将 *Mpi* 的 p1 基因序列信息输入 Vector NTI Advance 11.0 软件进行分析,并推算其编码的氨基酸序列,将推断出的理论氨基酸序列与其他支原体 p1 全序列进行同源性分析。结果 *Mpi* 总感染率为 21.5%。18 株临床分离株几乎全部汇聚为一个分支,相似度 >90%,且与实验室保存 *Mpi* 标准株在同一分支,*Mpi* 的 p1 蛋白与穿通支原体 HF-2 同源关系较近。结论 *Mpi* 的感染率与以往调查结果相比明显增高,且临床分离株具有较高同源性。

**【关键词】** 梨支原体; HIV 感染者和艾滋病患者; p1 基因; 16S rRNA 基因

**Analysis on *Mycoplasma pirum* infection in male HIV/AIDS patients and related 16S rRNA genes in Jiangsu province** WU Jian-ru<sup>1</sup>, ZHU Yi<sup>1</sup>, XIE Yan-xin<sup>1</sup>, ZHOU Liang-jia<sup>1</sup>, XU Jin-shui<sup>2</sup>, HUAN Xi-ping<sup>2</sup>, WANG Bei<sup>1</sup>. 1 Department of Epidemiology & Biostatistics, School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009; 2 Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention  
Corresponding author: WANG Bei, Email: wangbeilxb@seu.edu.cn

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation (No. 30872156).

**【Abstract】 Objective** To investigate the prevalence of *Mycoplasma pirum* (*Mpi*) in male HIV infected patients, and to identify the 16S rRNA gene of *Mpi*. **Methods** The first void urine of male HIV/AIDS patients in Jiangsu province was collected for *Mpi* detection. Purified 16S rRNA gene PCR production was sequenced for analysis on its identification, homogeneity and phylogenetic tree. P1 protein sequence of *Mpi* was analyzed by Vector NTI Advance 11.0 to calculate the coded amino acid sequence. Homogeneity analysis was conducted between the theoretical amino acid sequence of *Mpi* and other *Mycoplasmas*. **Results** The prevalence of *Mpi* in male HIV/AIDS patients was 21.5% while the *Mpi* prevalence rates in different age groups were significantly different ( $\chi^2_{Mpi}=124.63, P<0.01$ ). The homogeneity of 18 strains of *Mpi* was higher than 90%. **Conclusion** The *Mpi* prevalence seemed much higher than the results from previous detection on HIV/AIDS patients, suggesting that more attention should be paid on AIDS treatment. More bioinformatic research on gene/nucleotide sequence analysis and forecast should be carried out to identify the molecular characteristics of *Mpi*.

**【Key words】** *Mycoplasma pirum*; HIV/AIDS; p1 gene; 16S rRNA gene

梨支原体(*Mycoplasma pirum*, *Mpi*)是从 HIV 感染者和艾滋病患者(HIV/AIDS)体内成功分离的一种支原体,被称为“艾滋病相关支原体”<sup>[1]</sup>。本研究通过对江苏省 HIV/AIDS 人群进行流行病学调查与检测,了解 *Mpi* 在该人群中的流行情况,对部分 *Mpi*

的 16S rRNA 基因片段进行序列分析,同时利用生物信息学技术在互联网上筛选获得 *Mpi* p1 基因序列,分析其同源关系。

## 材料与方法

1. 研究对象:2009 年 3 月至 2011 年 10 月经 HIV 抗体初筛及 Western blot 确认的江苏省男性 HIV/AIDS 为主要研究对象,由调查对象自行填写调查表,调查员仅负责解释说明。文盲或年幼患者由调查员询问研究对象或其父母,代为填写。采用国家

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.03.013

基金项目:国家自然科学基金(30872156)

作者单位:210009 南京,东南大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系(吴建茹、朱一、谢彦昕、周良佳、王蓓);江苏省疾病预防控制中心(徐金水、还锡萍)

通信作者:王蓓, Email: wangbeilxb@seu.edu.cn

统一的问卷进行调查,主要内容包括出生年月、民族、住址、婚姻状况、职业、文化程度、感染途径等。

2. 检测方法:

(1)标本收集:用尿杯按要求收集与上次排尿间隔>2 h 的首段尿 10~20 ml,转入尿液标本保存管,常温保存。编号登记(包括地区、姓名等信息)后,4 h 内送实验室检测 *Mpi*。

(2)裂解液配制:KCl 溶液(1 mol/L) 5.0 ml、MgCl<sub>2</sub> 溶液(1 mol/L) 0.25 ml、Tris-HCl 缓冲液(1 mol/L, pH 8.0) 1.5 ml、20% Tween-20 2.5 ml,用双蒸水定容至 100 ml。应用前裂解液与蛋白酶 K(200 μg/ml)以 50:2 的体积混合。

(3)*Mpi* 16S rRNA 基因检测:首段尿液经 3500 r/min 离心 15 min 后,弃上清液,用 1 ml 生理盐水溶解沉淀,振荡混匀后取 300 μl 于 0.5 ml 离心管内,15 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加裂解液 30 μl,充分混匀后置入 55 °C 水浴保温 60 min,后置入 95 °C 保温 10 min,10 000 r/min 离心 30 s,上清即为 PCR 扩增用模板液。采用巢式 PCR 法检测 *Mpi*,外套扩增引物为:正向 5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA CG-3',反向 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GGC AG-3';特异性片段扩增引物为:正向 5'-ATA CAT GCA AGT CGA TCG GA-3',反向 5'-ACC CTC AGC CTA TAG CGG TC-3',扩增产物长度为 180 bp,反应体系见表 1。

表 1 *Mpi* 巢式 PCR 检测反应体系

试剂	PCR 检测 <i>Mpi</i> 反应体系(μl)	
	第一轮	第二轮
正向引物(20 μmol/L)	0.5	1.25
反向引物(20 μmol/L)	0.5	1.25
dNTP(10 mmol/L)	0.4	1
10×PCR Buffer	2	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	1.2	3
Taq 酶(5 U/μl)	0.3	0.5
双蒸水	10.1	37
模板	5	1

PCR 扩增条件:两次 PCR 扩增热循环参数均为 94 °C 预变性 2 min,然后按 94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 40 s,共 40 个循环,最后一个循环 72 °C 延长至 5 min。每次检测均设立阳性、阴性对照。扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳并经全自动凝胶成像仪观察结果。

(4)扩增片段序列测定:纯化 PCR 产物由深圳华大基因研究院进行 *Mpi* 16S rRNA 基因片段序列测定,测序引物即为扩增引物。

3. 核苷酸序列生物信息学分析:分析软件为 Mega 4.0(下载地址: <http://www.clustal.org/download/>

current/) 和 Vector NTI Advance 11.0(下载地址: <http://www.invitrogen.com/VectorNTIAdvance>),公共数据库为 GenBank(网址: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>)。

(1)*Mpi* p1 基因分析:以往认为 p1 主要作用于支原体黏附细胞,而近来研究发现其 C 端主要表现为具有免疫优势抗原的特性和免疫佐剂的功能,可诱导和增强机体体液免疫和细胞免疫的发生<sup>[2]</sup>,故本研究选择 *Mpi* p1 作为分析对象。登录 GenBank,输入“*Mycoplasma pirum*”,通过 Entrez Nucleotide 查询其 p1 基因序列。将 *Mpi* 的 p1 基因序列信息输入 Vector NTI Advance 11.0 软件进行分析,并推算其编码的氨基酸序列。将推断出的理论氨基酸序列与其他支原体 p1 全序列进行同源性分析。

(2)*Mpi* 16S rRNA 基因同源性分析:所获得的序列通过 Internet 进入 [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov),用 BLAST 对 GenBank 核酸数据库进行检索。从 GenBank 基因数据库中下载支原体属内代表种的 16S rRNA 序列,登录号见表 2。用 Mega 4.0 软件的多序列排列程序对支原体临床株和下载序列进行同源位排列、比对,利用 Neighbor-Joining(NJ)构建系统发育树,并进行 1000 次 Bootstraps 检验。

表 2 本研究所用已知支原体 16S rRNA 片段序列

支原体	16S rRNA 序列登录号
解脲脲原体( <i>U. urealyticum</i> , serum type 7)	GU272020
解脲脲原体( <i>U. urealyticum</i> , serum type 13)	AF059335
猪肺炎支原体( <i>M. hyopneumoniae</i> )	MHU04651
生殖支原体( <i>M. genitalium</i> )	AB069813
穿通支原体( <i>M. penetrans</i> )	AB069817
发酵支原体( <i>M. fermentans</i> )	AF031374
肺炎支原体( <i>M. pneumoniae</i> )	D14528
梨支原体( <i>M. pirum</i> )	MYC25960

结 果

1. HIV/AIDS 患者基本情况:本研究涉及江苏省 13 个地级市横断面调查男性 HIV/AIDS 患者共 1813 例,其中苏南地区(常州、南京、苏州、无锡)862 例,苏中地区(南通、泰州、扬州)467 例,苏北地区(连云港、盐城、徐州)484 例。年龄 8~70 岁,平均(34.8±10.7)岁。患者中大多数(87.7%)为江苏省本地人口。

2. *Mpi* 感染率:检测结果显示,*Mpi* 的总感染率为 21.5%。不同年龄组 *Mpi* 感染的差异有统计学意义( $\chi^2=124.63, P<0.01$ ),且在合并年龄组后呈现支原体感染随年龄降低而增加的趋势( $\chi^2=123.49, P<0.01$ );在 HIV 不同传播途径人群中 *Mpi* 感染率的差异无统计学意义( $\chi^2=1.59, P>0.05$ ); AIDS 患

者的 *Mpi* 感染率高于 HIV 感染者, 差异有统计学意义 ( $\chi^2_{Mpi}=57.76, P<0.01$ ), 见表 3。

表 3 江苏省 13 市 1813 例男性 HIV/AIDS 患者 *Mpi* 感染情况

项目	例数	<i>Mpi</i> 感染
年龄(岁)		
<20	123	69(56.1)
20~	517	110(21.3)
30~	708	164(23.2)
40~	297	27(9.1)
50~	168	20(11.9)
HIV 传播途径		
性传播	1342	279(20.8)
其他	471	111(23.6)
病程		
HIV 感染	1297	219(16.9)
AIDS	516	171(33.1)

注: 括号内数据为感染率(%)

3. *Mpi* 感染与 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 淋巴细胞水平的关联性: 本研究将 HIV/AIDS 外周血 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 淋巴细胞计数 500 cell/ $\mu$ l 为界分为两组, 比较 *Mpi* 感染在不同 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 淋巴细胞计数分组时的差异。结果显示 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 淋巴细胞计数 < 500 cell/ $\mu$ l 时, *Mpi* 感染率较高 ( $\chi^2=5.09, P=0.024$ )。

4. *Mpi* 16S rRNA 基因 PCR 扩增及序列测定: 部分 *Mpi* 16S rRNA 基因扩增结果见图 1, 可见在 180 bp 出有特异性条带, 与标准株阳性对照相符, 经测序后与实验室保存标准株及 NCBI 参考株比对, 确认其为 *Mpi* 16S rRNA 基因片段, 测序结果见图 2、3。

5. 16S rRNA 序列分析比较: 以支原体为外群构建 16S rRNA 基因序列发育树(图 4), 可见共汇聚 5 个主要分支。18 株临床分离株几乎全部汇聚在一个分支, 相似度 > 90%, 且与实验室保存 *Mpi* 标准株在同一分支。穿通支原体、生殖支原体及猪肺炎支原体汇聚为一支, 且相似度 > 99%。下载参考 *Mpi* 序列与肺炎支原体汇聚为一支, 相似度 > 97%。

6. *Mpi* p1 蛋白同源性分析: 利用 GenBank 的 Entrez 功能查询其 Protein sequence, 进行同源比对, 由图 5 可见, *Mpi* p1 预测核苷酸序列与穿通支原体 HF-2 同源关系较近。

### 讨 论

HIV 感染后存在无症状潜伏期, 此时支原体有可能成为机会性感染因子<sup>[3]</sup>。现有文献显示,

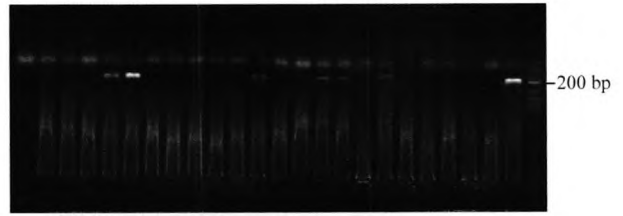


图 1 *Mpi* 16S rRNA 基因扩增电泳图

对于艾滋病相关支原体致病性及其机制的研究, 主要结论包括证明 *Mpi* 与 HIV 之间存在协同效应, 并增强 HIV 相关的细胞病变作用<sup>[4-6]</sup>。有研究表明支原体能够促进 HIV 复制, 将 *Mpi* 添加到感染了 HIV 的外周血单核细胞(PBMCs)后, 病毒复制程度增加<sup>[7]</sup>。氧化应激能够引起 HIV 长末端重复序列(HIV-LTR)介导的转录活化<sup>[8,9]</sup>, *Mpi* 能增强依赖 HIV-LTR 的基因表达<sup>[10]</sup>, 因此支原体促进 HIV 复制至少可以部分归因于细胞感染支原体后产生的活性氧分子<sup>[11,12]</sup>。截止目前, 支原体在 HIV 感染至发病的过程中所起的作用及其机制尚未明确。本研究通过多次横断面调查和随访发现, *Mpi* 在 HIV/AIDS 中的感染率与以往调查结果相比明显增高, 由于样本来自同一人群, 可推断是该人群中 *Mpi* 的感染率增高。本研究中经性传播途径感染 HIV 的患者, 其 *Mpi* 感染率与其他传播途径感染人群的差异无统计学意义, 可能与 HIV/AIDS 所处的免疫状态有关。当机体 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 淋巴细胞大量破坏时, 免疫功能受抑

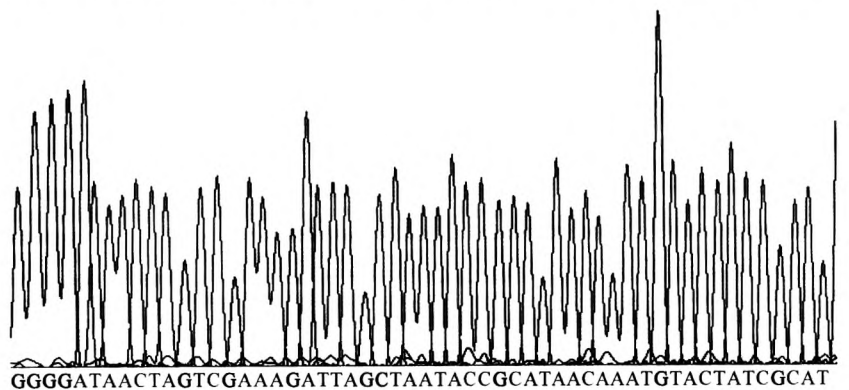


图 2 *Mpi* 标准株 16S rRNA 基因测序结果

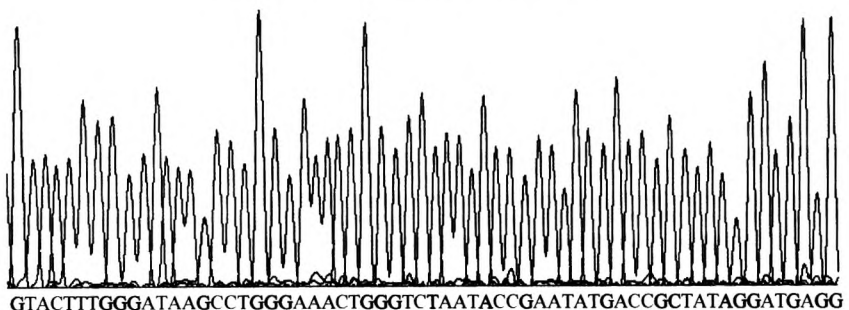


图 3 *Mpi* 临床株 16S rRNA 基因测序结果

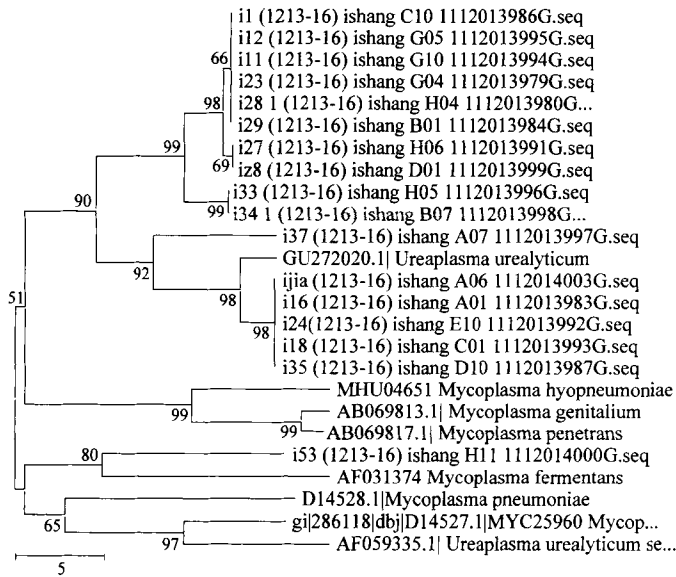


图4 基于16S rRNA序列和NJ分析法的系统发育树

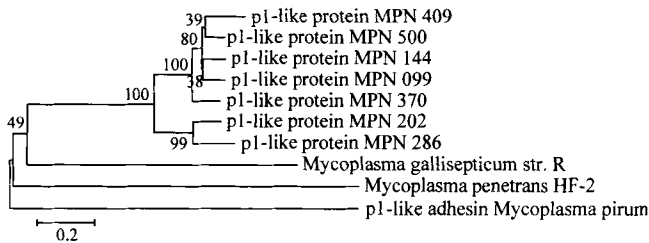


图5 Mpi p1蛋白关系进化图

制,病情进展加快,更易发生机会性感染<sup>[13]</sup>,本研究发现Mpi的感染情况与HIV/AIDS人群的CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞计数变化有关,当CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞计数<500 cell/ $\mu$ l时,其Mpi感染率较高,所以在HIV/AIDS治疗时,应注意机会性感染。

近年来较多采用16S rRNA基因序列分析确定微生物系统发育的关系<sup>[14]</sup>。根据16S rRNA基因序列,支原体目可分成5类种系发生单位。通过DNA同源性、16S rRNA基因的限制性酶分析,16S rRNA基因序列描绘了支原体属分化支中的14个不同的亚分化支<sup>[15]</sup>。根据16S rRNA基因序列,Mpi属于按肺炎支原体(Mpn)所定义的同一种系发育的家族成员,且采用来自Mpn主要黏附素基因保守区的基因探针从Mpi基因组中分离到p1样黏附素基因片段。本研究结果显示,来自临床标本的16S rRNA基因测序结果并未显示出与Mpn较好的同源性,这可能与16S rRNA序列分析在实际应用中存在一定缺陷,对亲缘关系比较近的种分辨率精度不高有关,需借助管家基因<sup>[16]</sup>或者特异PCR<sup>[17]</sup>进一步区分。

关于Mpi的p1蛋白同宿主细胞黏附时与相应受体相结合等研究报道较少<sup>[18]</sup>,也未见Mpi p1样黏附素基因的分子特征研究结果。因此可利用生物信

息学方法对该基因序列及核苷酸序列进行生物信息学预测分析,进而为研究该物种的致病因子提供靶向信息。目前有关Mpi的文献及GenBank上基因序列资料较少,是否在疾病进展中起到作用还未知,而其在HIV/AIDS人群中又存在较高感染,需在其基因组测定完成后,通过预测开放阅读框及编码功能蛋白,明确其分子及进化、流行特征,可更好地了解Mpi的黏附或致病机制。

参考文献

- [1] Lo SC, Hayes MM, Wang RY, et al. Newly discovered *Mycoplasma* isolated from patients infected with HIV. *Lancet*, 1991, 338: 1415-1418.
- [2] Wu YM, Ye YK. *Mycoplasma*ology. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008. (in Chinese) 吴移谋, 叶永康. 支原体学. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [3] Blanchard A, Montagnier L. Role of *Mycoplasma* infection in the cytopathic effect induced by human immunodeficiency virus type 1 in infected cell lines. *Annu Rev Microbiol*, 1994, 48(1): 687-712.
- [4] Lo SC, Tsai S, Benish JR, et al. Enhancement of HIV-1 cytotoxic effects in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes by the AIDS-associated *Mycoplasma*. *Science*, 1991, 251(4997): 1074-1076.
- [5] Lemaitre M, Guetard D, Henin Y, et al. Protective activity of tetracycline analogs against the cytopathic effect of the human immunodeficiency viruses in CEM cells. *Res Virol*, 1990, 141(1): 5-16.
- [6] Phillips DM, Pearce-Pratt R, Tan X, et al. Association of *Mycoplasma* with HIV-1 and HTLV-I in human T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1992, 8(11): 1863-1868.
- [7] Sasaki Y, Honda M, Makino M, et al. *Mycoplasmas* stimulate replication of human immunodeficiency virus type 1 through selective activation of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1993, 9(8): 775-780.
- [8] Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J*, 1991, 10(8): 2247-2258.
- [9] Gougerot-Pocidal MA, Aillet F, Virelizier JL, et al. Influence of redox status of lymphocytes and monocytes on HIV transcription and replication. *Immunobio*, 1995, 193(2-4): 204-209.
- [10] Nir-Paz R, Israel S, Honigman A, et al. *Mycoplasmas* regulate HIV-LTR-dependent gene expression. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, 128(1): 63-68.
- [11] Razin S, Yegorov D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(4): 1094-1156.
- [12] Chochola J, Strosberg AD, Stanislawski M. Release of hydrogen peroxide from human T cell lines and normal lymphocytes co-infected with HIV-1 and *Mycoplasma*. *Free Radic Res*, 1995, 23(3): 197-212.
- [13] Elliott AM, Mawa PA, Joseph S, et al. Associations between helminth infection and CD4<sup>+</sup>T cell count, viral load and cytokine responses in HIV-1-infected Ugandan adults. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2003, 97: 103-108.
- [14] Relman DA. Microbial genomics and infectious diseases. *N Engl J Med*, 2011, 365: 347-357.
- [15] Stakenborg T, Vicca J, Butaye P, et al. Evaluation of amplified rDNA restriction analysis for the identification of *Mycoplasma* species. *BMC Infect Dis*, 2005, 5(1): 46.
- [16] Zhao T, Han H. Isolation and identification of *Bifidobacterium animalis* subsp lactis in fermented milk products. *Microbiology*, 2010, 37(3): 407-412. (in Chinese) 赵婷, 韩辉. 发酵乳中动物双歧杆菌乳亚种分离及鉴定. *微生物学通报*, 2010, 37(3): 407-412.
- [17] Liu Y, Li H. Identification and differentiation of *Bacillus subtilis* group by specific PCR method. *Food Indus*, 2010, 31(4): 52-54. (in Chinese) 刘勇, 李辉. 特异PCR方法对枯草芽孢杆菌群的鉴定区分. *饲料工业*, 2010, 31(4): 52-54.
- [18] Than TN, Ferria S, Bahraoui E, et al. Molecular characterization of the p1-like adhesin gene from *Mycoplasma pirum*. *J Bacteriol*, 1994, 176(3): 781-788.

(收稿日期: 2012-11-06)  
(本文编辑: 张林东)