

# 四川省 HIV-1 流行毒株的基因序列测定和亚型分析

秦光明<sup>1</sup> 邵一鸣<sup>2</sup> 刘刚<sup>1</sup> 苏玲<sup>2</sup> 张灵麟<sup>1</sup> 管永军<sup>2</sup>  
郑国英<sup>1</sup> 陈钧<sup>2</sup> 马义才<sup>1</sup> 赵全璧<sup>2</sup> Josef Kostler<sup>3</sup> Hans Wolf<sup>3</sup>

**摘要** 使用 PCR 对 9 份采集于 1996 年中旬的四川省经血液途径感染的 HIV-1 阳性感染者外周血单个核细胞(PBMCs) 样品进行扩增, 获得 HIV-1 膜蛋白(env) 基因的核酸片段, 并对其 C2-V3 及邻区 350~450 个核苷酸序列进行了测定和分析。结果表明, 9 份样品中存在 B 和 C 两种亚型的 HIV-1 毒株序列, 其中 B 亚型 5 份, 彼此间的基因离散率为 1.4%; C 亚型 4 份, 在不包括 sc3 号样品的情况下彼此间的基因离散率为 2.6%, 而 sc3 号样品与其它 3 份样品在核苷酸序列上的差异却达 11.5%。与 A~E 参考亚型及部分 B 和 C 亚型代表株序列相比较, 属四川 B 亚型的 5 个毒株与包括泰国、缅甸及中国云南德宏在内的 B 亚型毒株序列十分接近, 基因离散率在 3.6%~4.3% 的范围内; 属四川 C 亚型的 4 个毒株除 sc3 外则与代表印度毒株的 C 亚型共享序列及德宏 C 亚型毒株序列十分相似, 其基因离散率均为 3.1%, 与非洲 C 亚型毒株 nof 的基因离散率为 13.1%, 而 sc3 号序列与印度、中国德宏和非洲 C 亚型 HIV-1 的基因离散率却在 10.1%~17.2% 的范围内。提示, HIV-1 在四川的流行时间不长, 且其 B 和除 sc3 之外的 C 亚型毒株的传入与流行在云南德宏州的相同亚型 HIV-1 毒株密切相关, 而由 sc3 所代表的 C 亚型毒株则存在目前还尚不了解的其它传入来源。

**关键词** 人免疫缺陷病毒 I 型 亚型 基因变异

**Subtype and Sequence Analysis of the C2-V3 Region of gp120 Genes among HIV-1 Strains in Sichuan Province** Qin Guangming\*, Shao Yiming, Liu Gang, et al.\* Sichuan Sanitation and Anti-epidemic Station, Chengdu 610031

**Abstract** Nine DNA fragments of HIV-1 env gene were amplified by PCR from uncultured peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from HIV-1 sero-positive intravenous drug users (IDUs) in Sichuan province, in mid 1996. Their C2-V3 region (about 450 bp) was sequenced. Sequence analysis showed that there were two HIV-1 subtypes B and C, with 1.4% and 2.6% gene divergence inside each subtype, in Sichuan. The 5 subtype B strains, when comparing with sequences of several reference HIV-1 strains, were found similar to those identified in Thailand, Myanma and Yunnan province. The nucleotide sequence divergence between them was ranged from 3.6% to 4.3%. Meanwhile, the 4 subtype C strains except sc3, were most close to those found in India as well as in Yunnan province, and both their nucleotide sequence divergence was 3.1%. The sc3 strain belonged to subtype C but had larger genetic distance, between 10.1% - 17.2%. Above results suggested a recent epidemic of both subtype HIV-1 strains in Sichuan province and they were very close to those identified in Yunnan province. The subtype C strain of sc3 is special and its source remains not clear.

**Key words** HIV-1 Subtype Gene variation

从 1995 年开始, 在四川若干地区的人群及凉山州注射吸毒人群中先后发现了一定数量的 HIV-1 阳性感染者。从初步的流行病

1 四川省卫生防疫站 成都 610031

2 中国预防医学科学院艾滋病参比实验室

3 德国累根斯堡大学医学微生物学研究所

学调查结果看,凉山州静脉吸毒人群中 HIV-1 的传入可能与在云南德宏州吸毒人群中流行的 HIV-1 毒株有关,而在其它地区出现的 HIV-1 的流行情况则较为复杂。为了对流行于四川境内的 HIV-1 毒株有一较全面的了解,我们于 1996 年 6 月采集了一批 HIV 阳性感染者血样,对 HIV-1 毒株 env 基因 C2- V3 区序列进行了测定和分析。

### 材料和方法

一、对象和样品:研究对象为 9 名四川省 HIV-1 抗体阳性的经血途径感染者,其中 3 人为注射吸毒人群,其余 6 人有频繁外流动及职业献血史。每名对象采集静脉血 3~5ml,肝素抗凝(20U/ml),用淋巴细胞分离液分离单个核细胞(PBMC),用常规方法提取染色体 DNA。

二、PCR:按 nested-PCR 方法,设计合成多对 PCR 引物<sup>[9]</sup>,扩增 HIV-1 env 基因。以 env-L/ env-i 为外侧扩增引物,按常规方法进行第一次 PCR 反应,取十分之一 PCR 产物,以 env-C/ env-k 为内侧引物,进行第二次扩增得到 env 基因 C2- V3 区,用 Qiaegen 公司的 Qiaex 试剂回收并纯化以上扩增产物。

三、核苷酸序列测定:分别使用 env-D3 和 env-f2 为测序引物,以提纯的 PCR 产物为模板,用 ABI 公司荧光标记末端终止物循环测序试剂盒,在 PE 公司 9600 型 PCR 仪上进行测序反应,模板用量约 1μg,引物用量为 6pmol。反应产物经提纯后用自动 DNA 序列分析仪进行序列测定。

四、序列分析:测得的序列用 SeqEd 和 DNA 软件进行编辑校正,每个样品 C2- V3 区核苷酸的最终序列根据两个同向测序引物所测结果重叠校核后确定。序列的排列、比较和同源性等分析,使用威斯康星 GCG 公司软件包完成,具体包括:①用 piluep 程序对样品及国际标准序列的排列和比较;②用 pretty 程序计算一组序列的共享序列(consensus sequence);③用 distances 计算一

组序列间的基因离散率;④用 groutree 程序做系统树(phylogenetic tree)分析。

### 结 果

经 nest-PCR 扩增后,从 9 份 HIV-1 阳性者 PBMC 样品中获得可用于序列测定的 HIV-1 env 基因目的片段。将由 env-D3 和 env-f2 引物测序结果进行编辑整理后,根据序列特征,9 个毒株可分为两组,第一组 5 个毒株,均来自职业献血员,第二组 4 个毒株,包括 3 例吸毒者和 1 例职业献血员。

将两组毒株核苷酸序列分别与国际 A~E 5 个亚型的共享序列(A con~ E con)及 B 和 C 亚型部分代表株核苷酸序列进行比较,计算彼此间的基因离散率(附表),结果发现第一组 5 个毒株与 A、B、D 和 E 亚型共享序列间的离散率均在 23% 以上,与主要代表欧美 B 亚型的 B con 间仅为 7.9%,而与属泰国 B 亚型的毒株包括泰国 t8655、缅甸 mnrp05 和云南 yn289 间的离散率分别为 4.3%、3.6% 和 4.1%。第二组除 sc3 外的其它 3 个毒株与主要代表印度 C 亚型的 C con 和云南 C 亚型代表株 yn272 间的离散率均为 3.1%,与非洲 C 亚型代表株 nof 的较大,为 13.1%,而与其它亚型的差异最大均在 22% 以上;sc3 号样品序列则较为独特,与组内其它毒株、C con、yn272 和 nof 间的差异分别为 11.5%、10.1%、11.6% 及 17.2%,与其它几种国际亚型间的差异更大,均在 24% 以上。

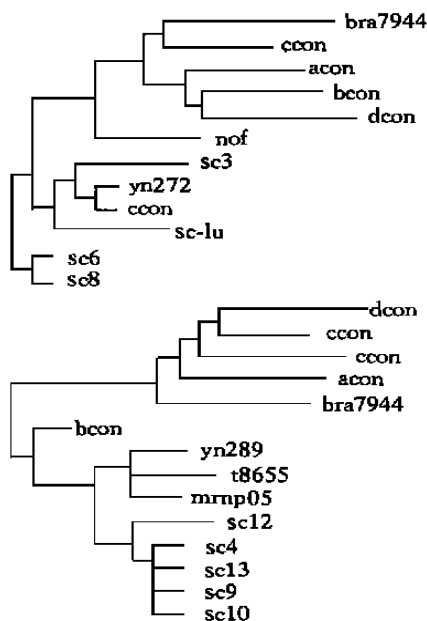
进一步的系统树分析也显示,第一组 5 个毒株与 B con 及 t8655、mnrp05 和 yn289 等聚集在一起而远离其它国际亚型毒株序列,第二组除 sc3 外的 3 个毒株与 C con 和 yn272 聚集在一块,与 nof 稍远但远离其它国际亚型毒株(附图)。尽管 sc3 与上述代表序列间均有一定的距离,但由于其距其它亚型更远,因而仍属 C 亚型毒株。比较四川两亚型毒株组内的基因离散率可以看出 B 亚型毒株(1.4%)较 C 亚型(sc3 除外,2.6%)为小。

附表 四川 HIV-1 各亚型毒株与 A~E 国际亚型和部分参考毒株基因离散率比较

亚型	基因离散率* (% , s <sub>x</sub> )										
	本型内	A con	B				C			D con	E con
			con	t8655	mnrp05	yn289	con	yn272	nof		
B	1.4±0.3	23.8±0.8	7.9±0.6	4.3±0.5	3.6±0.5	4.1±0.7	28.4±0.8	-	-	26.7±0.4	25.3±1.0
C(除 sc3 外)	2.6±1.4	23.5±0.6	22.5±2.4	-	-	-	3.1±0.5	3.1±0.5	13.1±0.4	25.4±0.9	22.6±0.6
(sc3)	11.5±0.9 <sup>▽</sup>	25.3	24.3	-	-	-	10.1	11.6	17.2	29.5	24.9

\* 序列基因离散率是用 GCG 程序计算 C2-V3 区第 165~450 核苷酸序列得到;

<sup>▽</sup> 为 sc3 与 C 亚型组内其余 3 个毒株间比较结果。



附图 四川 HIV-1 毒株的系统树分析

### 讨论

在对 9 名 HIV-1 阳性感染者 PBMC 中 HIV-1 env C2-V3 及其邻近区序列进行分析,发现四川省存在 B 和 C 两种亚型的 HIV-1 毒株的流行。从本研究中 HIV-1 基因离散率的结果看, B 亚型毒株间的基因离散率为 1.4% 左右,在不包括 sc3 号样品的情况下, C 亚型毒株间的基因离散率为 2.6%,两型毒株在其外膜蛋白 gp120 之 V3 环区域内的变化也很小,这表明 HIV-1 在四川省内的流行时间不长。根据 HIV-1 毒株基因平均每年以 0.5%~1% 的速率变异计算<sup>[2]</sup>,可以认为 B 和 C 两亚型毒株在四川省内的流行时间大约在 1.5~2.5 年之间。

从与国际其它地区及我国云南流行毒株

比较结果看,四川 B 亚型毒株与泰国、缅甸以及我国云南德宏 B 亚型毒株间的基因离散率非常小,在系统树分析中亦聚集在一起,这表明在四川流行的 B 亚型毒株与流行于泰国、缅甸及我国云南德宏吸毒人群中的 B 亚型毒株间存在着非常密切的关系。对毒株的 gp120 中最重要的中和抗体决定簇所在的 V3 环多肽序列进行的比较也支持这一结论。在 5 个 B 亚型毒株中,我们发现带有 GPCR 这一典型欧美 B 亚型 V3 环顶端四肽序特征的毒株只有 1 例(20%),且其精氨酸(R)由多见于泰国 B 亚型的 CGA 而不是多见于欧美 B 亚型的 AGA 编码,其余 4 个毒株(80%)则带有 GPGQ 这一典型泰国 B 亚型 V3 环顶端四肽序特征,这与我们在云南德宏 B 亚型毒株中发现的情况是一致的<sup>[5,6,8]</sup>。

从基因的分化水平上看,四川 3 例吸毒者的 C 亚型毒株与流行于我国云南德宏的 C 亚型毒株 yn272 以及主要代表印度毒株的 C con 间的关系密切,彼此间基因离散率均为 3.1%,而与非洲 C 亚型代表株 nof 的距离较远,达 13.1%。来自职业献血员的 sc3 则较特殊,与其它四川 C 亚型毒株、yn272 及 C con 间的差异在 10.1%~11.6% 的范围,与非洲毒株 nof 的差异更大为 17.2%。我们已曾证明云南德宏吸毒人群中的 C 亚型毒株是由印度吸毒人群传入的<sup>[8]</sup>。上述结果提示,四川吸毒者的 C 亚型 HIV-1 毒株可能来源于云南德宏吸毒人群中的 C 亚型毒株,而 sc3 毒株与其它 C 亚型毒株较大的差异是由于有别于吸毒的经输血感染途径或其个体差异性造成毒株的特殊变异,还是由另一

来源的 C 亚型毒株感染所致尚有待分析更多的样品才能确定。

参 考 文 献

1 Myers G, Korber S, Wain-Hobson RF, et al. Human Retroviruses and AIDS 1993. Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory, 1993.

2 Weniger BG, Takebe Y, Ou CY, et al. The molecular epidemiology of HIV in Asia. AIDS, 1994, 8(suppl2): S1.

3 Janssons W. Genetic and phylogenetic analysis of env subtypes G and H in central Africa. AIDS Res Hum Retroviruses, 1994, 10: 877.

4 邵一鸣, 曾毅, 陈箐, 等. 从云南艾滋病病毒(HIV)感染者分离 HIV. 中华流行病学杂志, 1991, 12: 129.

5 邵一鸣, 赵全壁, 王斌, 等. 我国云南德宏地区 HIV 感染

者 HIV 毒株膜蛋白基因的序列测定和分析. 病毒学报, 1994, 4: 291.

6 Shao YM, Zhao QB, Wang B, et al. Variation and shift of HIV-1 env gene found in IDUs of Dehong epidemic area in China. Tenth International Conference on AIDS, 1994, 380A.

7 Luo CC. HIV subtype C in China. Lancet, 1995, 345: 1051.

8 邵一鸣, 赵全壁, 管永军. 1995 年云南瑞丽 HIV-1 毒株的基因变异和分析. 病毒学报, 1996, 1: 9.

9 李允文, 邵一鸣, 罗小光, 等. 湖北省 HIV-1 流行毒株的基因序列测定和亚型分析. 中华流行病学杂志, 1997, 18: 217.

(收稿: 1997- 03- 03 修回: 1997- 06- 12)

## 老年人体型与心、脑、肺疾病关系的分析

钟树林 朱志明 周永生 周丽红

在探讨老年人生活质量及其影响因素中, 我们发现体型与心、脑、肺疾病的关系非常密切, 现将有关资料作如下分析。

一、对象和方法: 调查长沙市区老年人 555 例(湖南曙光电子企业集团公司职工 350 例, 樊西巷街办企业职工 205 例), 男 296 例, 女 259 例, 男女之比为 1.14 1; 年龄 60~ 69 岁 399 例(71.9%), 70~ 87 岁 156 例(28.1%)。采用中华医学会老年医学学会提供的老年生存质量调查内容及方法。先制定表格, 然后分层整群抽样确定对象, 并逐个问卷、检测, 照表格要求填写。对健康分良中差 3 级作出评价。每例测量身高、体重, 按 Quetelet 公式计算出体重指数[体重指数= 体重(kg)/身高(m)<sup>2</sup>]。评价体型: 消瘦型 < 18.5, 正常型 18.5~ 25, 肥胖型 > 25(含超重 > 25 < 27, 肥胖 ≥ 27)。疾病包括高血压、冠心病、脑卒中、慢性支气管炎(简称慢支炎)、肺气肿等, 均经省市级医院检查确诊, 完全符合国内外诊断标准。调查结束将全部资料归类整理, 经统计学处理, 进行对比分析。

二、结果: 老年人 555 例, 正常型 355 例(64.0%), 较肥胖型 120 例(21.6%) 和消瘦型 80 例(14.4%) 高( $P < 0.01$ ), 以上基本符合老年人群的体型变化规律。不同体型所致高血压、冠心病、脑卒中的患病率, 显然以肥胖型最高分别为 63 例(52.5%)、57 例(47.5%)、28 例(23.3%), 与消瘦型 16 例

(20.0%)、11 例(13.8%)、6 例(7.5%) 和正常型依次为 90 例(25.4%)、80 例(22.5%)、40 例(11.3%) 比较差异显著( $P < 0.01$ )。而慢支炎、肺气肿的发病率, 则消瘦型最高分别为 50 例(62.5%)、24 例(30.0%), 较正常型 101 例(28.5%)、12 例(3.4%) 及肥胖型依次为 43 例(35.8%)、10 例(8.3%) 明显( $P < 0.01$ )。

三、讨论: 调查证实, 肥胖型以高血压、冠心病、脑卒中的患病率最高, 消瘦型则为慢支炎、肺气肿的发病最多, 而正常型却吸取了该两型的优点, 介于其间, 患病率最低。研究表明, 肥胖或超重可引起血压升高, 其机制可能与血容量及心输出量增加, 肾素-血管紧张素系统活性增高, 肾上腺能活性增加, 细胞脱离子转运功能缺陷等有关。由上述原因引起左室肥厚、扩大, 心肌脂肪沉积致心肌劳损, 冠状动脉供血不足。超重者常有高脂血症, 亦是促发动脉硬化、冠心病的基础。肥胖型中风者多, 可能是通过高血压为 2 级危险因素。老年人随增龄骨骼、韧带和胸部肌肉萎缩, 使胸廓变形与活动受到限制。若消瘦更加重了呼吸肌的萎缩, 使肺组织弹性回缩力减退, 潮气量减少, 常表现为“老年性肺气肿”。因呼吸肌力量减弱, 支气管纤毛活动减退和死腔增大, 加之消瘦者常伴有营养不良和机体免疫力降低, 亦易发生慢支炎及呼吸道感染。由此可见, 肥胖和超重是心脑血管病的危险因素, 而消瘦与呼吸道疾患的关系甚密。