

云南瑞丽静脉药瘾人群 HIV 1 感染者毒株 env 基因 V3 区序列测定研究

王斌¹ 鲁晓晴¹ 路永波¹ 邵一鸣² 陈箐² 赵全壁² 曾毅²

摘要 为了解云南瑞丽静脉药瘾人群 HIV 1 感染者毒株的分子流行病学特征, 运用套式聚合酶链反应(nested PCR)对来自云南静脉药瘾人群的 16 株 HIV 1 env 基因 V3 区进行扩增, 并对扩增片段进行 DNA 序列测定和分析。结果显示, 与本地区共享序列相比, 16 株 HIV 1 膜蛋白 V3 区氨基酸序列的株间变异为 0%~23%, 平均为 7%。HIV 1 云南株膜蛋白 V3 区氨基酸共享序列与 HIV 1 SF2 株及美欧株共享序列同源性在 90% 以上, 而与海地、日本及非洲等地的代表毒株同源性较低。结果表明, 在进化上这 16 株 HIV 1 毒株间有非常密切的关系。这一地区的流行毒株在这一时期以美欧株、HIV 1 SF2 株及其衍生株为主。

关键词 人类免疫缺损病毒 I 型 静脉药瘾者 分子流行病学

Sequence Analysis on HIV 1 env V3 Region from HIV 1 Infected Intravenous Drug Users in Ruili City, Yunnan
Wang Bin*, Lu Xiaoping, Lu Yongbo et al. * Department of Molecular Virology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021

Abstract To study the molecular-epidemiologic features of HIV 1 epidemic strains from intravenous drug users (IVDUs) in Yunnan, nested primers polymerase chain reaction was developed for the amplification of env gene V3 fragment of HIV 1 strains. DNA sequencing and analysis were performed with these fragments. Results showed that the variation of HIV 1 gp120 V3 amino acids sequences among 16 HIV 1 strains was averaged 7% (0%—23%), when comparing their consensus sequence. The amino acids consensus sequences of gp120 V3 region showed that more than 90% of homology compared with that of HIV 1 SF2 strain and HIV 1 American—European strain. However, lower homology with that of HIV 1 strains from Haiti, Japan and Africa was revealed. The results suggested that there was a close relation among these 16 HIV 1 epidemic strains isolated in Yunnan Ruili in terms of virus evolution. The epidemic HIV 1 strains in the area were predominately American—European, SF2 and their derivatives in this period.

Key words Human immunodeficiency virus type 1 Injecting drug users Molecular epidemiology

HIV 1 膜蛋白 V3 区与病毒的免疫中和、免疫逃避、感染细胞间的融合及病毒的细胞嗜性^[1,2] 等有密切的关系, 不同毒株间膜蛋白 V3 区氨基酸序列的变异可达 50% 以上^[3]。文献表明, HIV 1 的膜蛋白 V3 区氨基酸序列的变异具有地理分布特征, 并对毒株的分子流行病学追踪有重要的意义^[4-6]。

我们对 1992~1994 年来自我国云南瑞丽地区静脉药瘾人群 (Injecting Drug Users, IDUs) 中的 16 株 HIV 1 毒株膜蛋白基因 V3 区进行了序列测定, 确定了这些毒株膜蛋白 V3 区的氨基酸序列并分析了其共享序列的保守性, 并与世界其他地区 HIV 1 代表株膜蛋白 V3 区氨基酸序列进行了比较。

材料与方 法

一 标本采集及其处理: 16 名 HIV 1 感染者均来自我国云南德宏州瑞丽市静脉药瘾人群, 其 HIV 1 感染使用中国预防医学科学

1 青岛大学医学院分子病毒学实验室 266021

2 中国预防医学科学院病毒学研究所

本项研究为国家 863 高科技生物技术领域基金资助项目

院研制的 HIV1 gp41 抗体初筛及确证试剂盒检测证实为无症状 HIV1 感染者, 其外周血 CD4⁺ 细胞计数及 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比例均未改变。标本系 1992 年 5 月~1994 年 4 月采集。采集 5ml 静脉抗凝血, 使用 DNA 提取仪 (ABI 341 DNA Purification system) 提取其外周血单核巨噬细胞 DNA, 溶于 50 μ l TE 中, -20 $^{\circ}$ C 冻存。

二、HIV1 前病毒 env 基因 V3 区的套式 PCR 扩增: 根据 HIV1 MN 株全基因组序列及计算机 DNASIS 软件进行套式 PCR 的引物设计及其合成。设计 PCR 外侧引物 EP1: 5'-CACAGTACAATGTACACATG-3' (正义, nt 6982~7001) 及 EP2: 5'-ACAGTAGA AAAATTCCCCTC-3' (反义, nt 7383~7402)。内侧引物 EV 1: 5'-TAAGAATGTC GACTGTACAAGACCCAAC-3' (正义, nt 7130~7153) 及 EV 2: 5'-TGTAAGAG CTCAGTACAATGTGCTGTCTCAT (反义, nt 7226~7244)。在内侧引物的 5' 分别导入 Sal I 及 Sac I 识别位点以利于 M13 测序克隆的构建。取上述 HIV1 感染者 PBMC DNA 1 μ l 作为外侧引物 PCR 扩增的模板, 取外侧引物扩增产物 5 μ l 作为内侧引物的模板。PCR 混合液为 67mmol/L Tris \cdot HCl pH 8.8, 16mmol/L (NH₄)₂SO₄, 2.5 mmol/L

MgCl₂, 2.5 μ mol/L dNTP, 引物浓度各为 100pmol/L, Taq DNA 多聚酶 2.5U (Biolabs 公司)。使用 PE4800 DNA 扩增仪。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 2 分钟, 55 $^{\circ}$ C 2 分钟, 72 $^{\circ}$ C 2 分钟, 共 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 5 分钟结束扩增。外侧引物特异性扩增产物为 420bp 片段, 内侧引物特异性扩增产物为 115bp 片段。

三、DNA 序列测定: 取 PCR 产物 200 μ l, 经 PCR 纯化试剂盒 (美国 Promega 公司) 纯化后, 参照文献 [7] 将 PCR 产物构建 M13 噬菌体测序克隆, 提取单链模板。自动测序使用脱氧终止物标记循环测序试剂盒 (ABI 公司), 配合 M13 测序引物及引物标记循环试剂盒 (ABI 公司), 在 ABI 公司 373A 型 DNA 序列分析仪测定序列。

结 果

一、16 株云南 HIV1 毒株 env V3 区核苷酸序列测定结果及其共享序列: 根据 16 株 HIV1 膜蛋白基因 V3 区的序列测定结果, 使用 DNASIS 分析软件, 得出 16 株 HIV1 膜蛋白 V3 区的氨基酸序列及其共享序列 (Consensus sequence), 结果见表 1。与共享序列相比, 株间膜蛋白 V3 区氨基酸序列变异为 0%~23%, 平均为 7%。

二、16 株云南 HIV1 膜蛋白 V3 区氨基

表 1 16 株云南 HIV1 毒株膜蛋白 V3 区氨基酸序列测定结果及其共享序列

标本号	HIV1 毒株 gp120 V3 区氨基酸序列 (1~35)	同源性%	变异性%
共享序列	C T R P N N N T R K S I Y I G P G R A F H T T G R I I G D I R Q A H C	100	0
YNRL 1	----- T -----L-----K-----	91	9
YNRL 2	-----L-----K-----	94	6
YNRL 3	----- S T ----- R ----- P -----K-----	86	14
YNRL 4	----- T -----	97	3
YNRL 5	-----K-----	97	3
YNRL 6	-----N-----	97	3
YNRL 7	-----K-----	97	3
YNRL 8	-----L-----K-----	94	6
YNRL 9	----- H L ----- Q W Y ----- Q -----	83	17
YNRL10	- K ----- S ----- P L ----- K W Y ----- Q -----	77	23
YNRL11	----- R -----	97	3
YNRL12	----- P ----- Q ----- Q L -----	86	14
YNRL13	-----K-----	97	3
YNRL14	----- Y P -----	94	6
YNRL15	-----	100	0
YNRL16	-----L-----	97	3

酸共享序列的保守性分析: 根据构成共享序列 V3 区中每个氨基酸在 16 株 HIV1 中的出现频率, 计算其保守性, 结果见表 2。

三、16 株云南 HIV1 膜蛋白 V3 区氨基酸共享序列与世界其他地区 HIV1 代表株膜蛋白 V3 区序列的比较: 将来自云南静脉药

瘾者的 16 株 HIV1 膜蛋白 V3 区氨基酸的共享序列与来自北美洲的 HIV1 MN 株、SF2 株、加勒比海地区的海地株 (HRF 株)、南美洲的巴西株 (Bra 株)^[8]、欧洲的俄罗斯株 (Rus 株)^[9]、北美及西欧地区的美欧株共享序列 (AE 株)、亚洲的日本株 (JH32 株)、泰国株 A 亚群 (THA 株)、泰国株 B 亚群 (THB 株)、非洲的乌干达株 (Uroam 株) 及赞比亚株 (ZELI 株)^[4] 等 HIV1 毒株的膜蛋白 V3

区氨基酸序列比较并计算其同源性, 以了解云南株与这些毒株在基因进化上的关系。结果见表 3。

表 2 16 株 HIV1 毒株膜蛋白 V3 区氨基酸的保守性(百分比)

C ₁₀₀	T ₉₄	R ₁₀₀	P ₁₀₀	N ₈₈	N ₈₈	N ₉₄	T ₁₀₀	R ₁₀₀	K ₁₀₀
S ₉₄	I ₁₀₀	Y ₇₅	I ₈₈	G ₁₀₀	P ₁₀₀	G ₁₀₀	R ₈₁	A ₁₀₀	F ₈₈
H ₈₁	T ₁₀₀	T ₈₈	G ₁₀₀	R ₈₁	I ₁₀₀	I ₇₅	G ₁₀₀	D ₁₀₀	I ₉₄
R ₁₀₀	Q ₅₀	A ₁₀₀	H ₁₀₀	C ₁₀₀					

表 3 云南 HIV1 毒株膜蛋白 V3 区共享序列与世界其他地区 HIV1 毒株膜蛋白 V3 区序列的比较*

毒株	HIV1 毒株 gp120 V3 区氨基酸序列(1~35)	同源性%	变异性%
YNCON	C T R P N N N T R K S I Y I G P G R A F H T T G R I I G D I R Q A H C	100	0
SF2	-----K-----	97	3
AE	-----H-----Y-----E-----	91	9
Bra	-----H-----Y A-----E-----	89	11
Rus	-----S L-----Q-----E-----	86	14
HRF	-----T K-----V I Y A-----Q-----K-----	77	23
THA	-----S-----T-----S-----Q V-----Y R-----D-----K-----Y-----	71	29
THB	-----P L-----Q-----W Y-----Q-----	83	17
MN	-----Y-----K-----R-----H-----Y-----K-----N-----T-----	77	23
JH32	-----S K T-----R-----R-----H-----Y-----K-----Q-----A-----P L-----	66	34
Uroam	-----Y-----K-----Q-----R-----T-----P-----R-----Q-----L-----Y-----V-----V-----K-----I-----T-----D-----	54	46
ZELI	-----A-----Y-----Q-----Q-----R-----T-----P-----L-----Q-----S-----L-----Y-----T-----S-----R-----S-----I-----C-----	49	51

* YNCON: 云南 HIV1 株共享序列 SF2: HIV1 SF2 株
 Rus: HIV1 俄罗斯株 HRF: HIV1 海地株
 MN: HIV1 MN 株 JH32: HIV1 日本株

AE: HIV1 美欧株共享序列 Bra: HIV1 巴西株
 THA: HIV1 泰国 A 亚群 THB: HIV1 泰国 B 亚群
 Uroam: HIV1 乌干达株 ZELI: HIV1 赞比亚株

讨 论

HIV1 膜蛋白 V3 区由 35 个氨基酸组成, 因二硫键而形成环状。自然状态下, 这个 V3 环与 HIV1 的致病及免疫有密切关系。HIV1 的膜蛋白 V3 区氨基酸序列变异具有地理分布特征, 并对毒株的分子流行病学追踪有重要的意义^[4~6]。

1989 年首次在云南省德宏州瑞丽县静脉药瘾人群中发现 HIV1 感染^[9]。多年的研究表明, 该地区至今仍然是我国唯一的因静脉药瘾导致的 HIV1 流行区。建立这一地区 HIV1 毒株的分子流行病学资料对于了解流行趋势, 追踪原始传染源及疫苗设计均有重要的意义。

资料显示, 非相关 HIV1 毒株间膜蛋白 V3 区的氨基酸序列变化平均为 18%^[3]。我们的研究表明, 在 1992~1994 年来自云南瑞丽地区静脉药瘾人群的 16 株 HIV1 膜蛋白 V3 区氨基酸序列的株间变异为 0%~23%, 平均为 7%, 表明这个 HIV1 流行区的毒株

间有高度的相关性。对 16 株 HIV1 膜蛋白 V3 区 35 个氨基酸共享序列的保守性分析显示, 有 28 个(80%)的保守性达到 100%, 表明在进化上这 16 株 HIV1 毒株间有非常密切的关系。这一结果反映了由于共用注射器而导致的 HIV1 交叉感染有聚集的倾向, 有亲缘关系非常接近的毒株存在。同源性分析表明在这一时期该地区静脉药瘾人群中流行的毒株以 HIV1 SF2 株及美欧株为主, 而不是以往资料表明的 HIV1 MN 株^[10]。结果还表明云南株在进化上与南美、欧洲及加勒比地区的代表株有趋同性, 反映了各自的原始毒株有很大的亲缘关系。9、10 及 12 号标本 HIV1 膜蛋白 V3 区氨基酸序列与泰国 HIV1 毒株 B 亚群有较高的同源性(分别为 97%、89%和 91%), 表明主要存在于泰国静脉药瘾人群的 HIV1 毒株 B 亚群及其衍生株已进入我国。我们的研究还表明, 尽管存在着地缘的关系, 云南瑞丽静脉药瘾人群中流行的 HIV1 毒株与泰国 A 亚群(主要存在于性乱人群)及日本流行株 JH32 的亲缘关系

较远,这进一步证实了瑞丽地区 HIV1 流行方式及原始传染源的单一性。

参 考 文 献

- 1 Profy AT, Salinas PA, Eckler LL, et al. Epitopes recognized by the neutralizing antibodies of an HIV-1 infected individual. *J Immunol* 1990, 144:4641.
- 2 Cordnier A, Montagnier L, Emerman M, et al. Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding. *Nature* 1989, 340:571.
- 3 Benn S, Rutledge R, Folks T, et al. Genomic Heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. *Science*, 1985, 230:949.
- 4 Zwart G, Wolfs TFW, Bookelman R, et al. Great diversity of the HIV-1 V3 neutralization domain in Tanzania compared with the Netherlands: serological and genetic analysis. *AIDS* 1993, 7:467.
- 5 Cheing song-Popov R, Bobkov A, Garaev MM, et al. Identification of human immunodeficiency virus type 1 subtype and their distribution in the Commonwealth of

- Independent States (former Soviet Union) by serologic V3 peptide-binding assays and V3 sequence analysis. *J Infect Dis* 1993, 168:292.
- 6 Cheing song-Popov R, Callow D, Beddews S, et al. Geographic diversity of human immunodeficiency virus type 1: serological reactivity to env epitopes and relationship to neutralization. *J Infect Dis* 1992, 165:256.
- 7 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. CSH press, 1989, 13, 1-102.
- 8 Potts KE, Kalish ML, Lott T, et al. Genetic heterogeneity of V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. *AIDS* 1993, 7:1191.
- 9 郑锡文, 曾毅, 王哲, 等. 云南瑞丽县 225 例吸毒者行为及 HIV 感染危险因素初步调查分析. *中华流行病学杂志*, 1988, 9:135.
- 10 邵一鸣, 曾毅, 赵全壁, 等. 中国及国外某些地区 HIV 感染者血清 HIV-1 gp120 V3 肽反应的比较研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1993, 13:1.

(收稿: 1998-05-08 修回: 1998-06-05)

一起肠侵袭性大肠杆菌腹泻爆发流行的调查

刘剑光

1997 年 11 月 23 日至 12 月 7 日, 重庆市大足县城区居民发生肠侵袭性大肠杆菌(EIEC)腹泻爆发流行, 现将调查结果报告如下。

一、流行特征: 本次爆发流行波及该县城区西片区, 共发病 995 例。爆发流行时间为 15 天, 11 月 27 日至 12 月 5 日为流行高峰, 共发病 907 例, 占总病例数的 91.16%。病例主要分布于中学校(844 例), 占总病例数的 84.82%; 住校师生与走读生发病率分别为 34.11% 和 37.67%, 两者差异无显著性($\chi^2=3.12, P>0.05$)。男女发病分别为 610 例和 385 例, 比值为 1.59:1。12~18 岁发病 858 例, 占总病例数的 86.23%。临床表现为腹泻(100.00%)、腹痛(73.87%)及少数伴有恶心、呕吐、呃逆等, 大便次数每日 3~5 次占 88.54%, 稀便占 61.81%, 水样便占 38.09%。病原分离病人 21 例, 水源水 3 份、自来水厂水 3 份、健康人群 28 人, 培养阳性数分别为 9 例、

3 份、3 份、1 人, 全部鉴定为 O124:B17 血清型。

二、防治措施: 立即停止片区自来水厂供水, 切断传播途径; 居民饮用水及炊餐餐具用氯制剂消毒; 用氟哌酸和黄连素治疗病人并全民预防服药; 开展卫生宣传教育。落实措施 3 天后爆发流行基本得以控制。

三、讨论: 本次 O124:B17 血清型 EIEC 腹泻爆发流行在我市为首次。原因一是水厂取水点已污染 EIEC; 二是水厂设备停用 110 天后再启用时未严格冲洗消毒, 于供水的第 5 天发生爆发流行; 三是在 18 天供水期间有 6 天直供水源水, 另 12 天均为一次性投放全天漂白粉用量; 四是迟报疫情, 发病单位于首批病例出现的第 11 天才将疫情报告基层卫生防疫站, 延误了防治措施的落实。这次爆发流行水源型流行, 发病以青少年及成人为主, 季节为冬季, 临床症状轻, 脱水不严重, 发热及里急后重不典型, 少有脓血便, 以腹痛、稀便和水样便腹泻为主要特点, 值得重视。

作者单位: 重庆市第二卫生防疫站 402160

(收稿: 1998-04-25 修回: 1998-05-20)