

辽宁省流行的人类免疫缺陷病毒 1 基因亚型调查

韩晓旭 姜拥军 尚红 王亚男 卢春明 张世博 姜凤霞 邵一鸣

【摘要】 目的 了解辽宁省人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus-1, HIV-1)各亚型的流行情况。方法 采集 1997 年 6 月至 2000 年 12 月间辽宁省检出的 16 例 HIV-1 感染者的全血标本,提取核酸后用巢式-聚合酶链反应(nested-PCR)技术扩增 HIV-1 env 基因区,用异源双链泳动分析法(heteroduplex mobility assay, HMA)进行 HIV-1 亚型的分析。结果 辽宁省目前已有 HIV-1A、B'、C 和 E 亚型流行。经性途径感染占全部 HIV 感染的 31.25%,分别为泰国 B' 亚型和 A 亚型,以 B' 为主。经注射吸毒感染占全部 HIV 感染 31.25%,分别为 C 亚型和 E 亚型,以 C 亚型为主,其中 1 名吸毒者为 B 或 E 亚型。经输血途径感染占全部 HIV 感染的 31.25%,主要为泰国 B' 亚型,也可见 C 亚型,垂直传播 1 名为 A 亚型。结论 辽宁省已有多种亚型 HIV-1 毒株流行,有效地控制艾滋病经性乱、吸毒和输血途径传播的问题已迫在眉睫。

【关键词】 人类免疫缺陷病毒-1 亚型;前病毒脱氧核糖核酸;异源双链泳动分析

Genetic subtyping of HIV-1 in Liaoning province of China HAN Xiaoxu, JIANG Yongjun, SHANG Hong, et al. P3 Laboratory, The 1st Affiliated Hospital China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】 Objective To study the prevalence of HIV-1 in Liaoning province of China. **Methods** Nuclear acids were extracted from blood samples of 16 HIV-1 infected individuals collected locally in Liaoning province of China from Jun. 1997 to Dec. 2000. The 0.7 kb or 1.2 kb segments of HIV-1 env gene were amplified using nested-PCR and the HIV-1 genetic subtypes were then assayed by heteroduplex mobility assay. **Results** Fifteen of 16 samples were positive by PCR amplification of HIV-1 env region and samples were found to be genetic subtype A, B', C, E. The proportion due to sexual transmission in all HIV infection was 31.25% (5/15), among which subtype B' (3/5) was the majority. A man who returned from Africa together with his spouse both had type A (2/5) infection. Intravenous drug users (IDUs) took up 31.25% (5/15) of all the HIV infections. Subtype C (2/4) and E were predominant among intravenous drug users. However, there was one IDU with subtype B or E. Nearly all blood recipients and blood donors were B (4/5) except one with C. **Conclusion** There have been several subtypes of HIV-1 existed in Liaoning province, demonstrating the complexity of HIV epidemiology in Liaoning province and the difficulty conducting prevention and treatment.

【Key words】 Subtype of human immunodeficiency virus-1; Proviral deoxyribonucleic acid; Heteroduplex analysis

获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)是由人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染引起的一种传染病。

人们在对 HIV 流行的监测过程中,发现在不同人群不同时间内检测到的 HIV 具有相对独立的基

因序列特性——亚型。目前发现的 HIV 分两型: HIV-1 和 HIV-2,其中 HIV-1 分为 M、O 和 N 群, M 群又分为 A~I 9 个亚型^[1,2]。HIV 在全球范围的流行蔓延过程中形成了一定的地区性分布特点^[3,4],且随时间迁移发生变化^[5]。不同亚型可能有不同的传播途径,感染率也有不同^[6]。监测 HIV-1 亚型的流行情况可以从分子水平揭示艾滋病的流行病学特征及其动态变化,为探寻适合本地区治疗方法和疫苗研制打下基础,还可以根据亚型在不同地区、不同高危人群中的分布,追踪传染源和传播途

作者单位:110001 沈阳 中国医科大学附属第一医院 P3 实验室(韩晓旭、姜拥军、尚红、王亚男);辽宁省疾病预防控制中心性病控制科(卢春明、张世博、姜凤霞);卫生部艾滋病预防与控制中心参比实验室(邵一鸣)

径,为制定有效的预防控制措施提供科学依据。本研究采用目前广泛应用的异源双链泳动分析法(heteroduplex mobility assay, HMA)首次对辽宁省 16 例 HIV-1 感染者进行了基因亚型的分析。

材料与方法

一、流行病学调查

选择辽宁省 1997 年 6 月至 2000 年 12 月间使用荷兰阿克苏(Akzo-Nobel)抗-艾滋病酶联免疫吸附试剂盒(Vironsrike HIV Uniform II Plus O)检出的 HIV 血清抗体阳性,并经过蛋白印迹试验确认的 HIV-1 感染者 16 例,进行个案流行病学调查,重新采集静脉血,核实感染者。了解其可能的传染来源、感染途径以及家属或密切接触者等可能进一步传染的有关情况,与当地卫生行政部门协定对 HIV 感染者、AIDS 病人指定特定的医疗机构检查治疗。

二、异源双链泳动分析法基因亚型分析

1. 样品采集和处理:采取静脉血 5 ml, EDTA 抗凝, -20℃ 贮存。取 200 μl 全血,以德国 Qiagen 公司 DNA 提取试剂盒(QiAamp DNA Blood mini kit),按说明书操作提取基因组 DNA,标本于 -20℃ 贮存。

2. 巢式-聚合酶链反应(nested-PCR, n-PCR):采用 n-PCR 方法扩增 HIV-1 env 基因,引物及对照质粒由卫生部艾滋病预防与控制中心参比实验室惠赠。引物序列及扩增条件参见文献^[4]。以 ED5/ED12 为外侧扩增引物进行第一轮 PCR 反应;取 5 μl PCR 产物或 1 μl 对照质粒,以 ES7/ES8 为内侧引物进行第二轮 PCR。取 5 μl PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳,与 Marker 及阴性和阳性对照对比,判断结果。未扩增出特异产物的标本用 ED3/ED14 为外侧引物,ED5/ED12 或 ED31/ED33 为内侧引物进行扩增。

3. 异源双链泳动分析:

(1)异源双链的形成:取 4.5 μl 第二轮 PCR 产物(约 100~250 ng DNA), 4.5 μl 对照质粒的 PCR 产物(或 H₂O), 1.0 μl 异源双链体杂交液(NaCl 100 mmol/L, Tris 10 mmol/L, pH 7.8, EDTA 2 mmol/L), 94℃ 水浴 3 min, 迅速置于冰浴中 15 min。

(2)聚丙烯酰胺凝胶电泳:加入 2 μl 点样缓冲液(0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青, 40% 蔗糖水溶液), 点样至 5% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺为 30:0.8), 胶厚 1.0 mm, 胶面

为 7 cm × 8 cm。电泳槽为购自美国伯乐公司的 BIO-RAD mini-protean III 型垂直电泳槽, 电泳液用 1 × Tris-硼酸。电泳条件参见文献^[7]。电泳于 4℃ 下进行。电泳结束, 将凝胶浸入 0.5 μg/ml 溴化乙锭中染色 1 h, 在紫外灯下观察结果。根据标本与某一亚型的对照质粒形成的异源双链体泳动率最快, 则可确定该标本为其相应亚型。

结 果

辽宁省 1997 年 6 月至 2000 年 12 月间发现的 HIV-1 感染者 16 例, 其中男 13 例, 女 3 例。年龄最小 4 岁, 最大 52 岁。21~30 岁年龄组 3 例, 31~40 岁年龄组 9 例, 41~50 岁年龄组 2 例。经 n-PCR 扩增 HIV-1 env 区, 15 例的标本为阳性, 另 1 例用本系列引物 n-PCR 无法扩增成功。

到目前为止, 在我国流行的 HIV-1 主要有 7 种亚型, 即 B', 欧美 B, C, E, A, D 和 F 亚型, 其中 B' 亚型占比例最大, C 亚型次之^[8]。因此, 首先把 15 份扩增阳性的标本分别与 RW20(A 卢旺达), TH14(B2 泰国), SF162(B3 美国), IN868(C3 印度), UG21(D1 乌干达), TH22(E2 泰国), TH06(E3 泰国) 7 种参考亚型的质粒进行比较, 获得初步亚型结果后, 再用相应亚型质粒详细区分具体来源。全部 16 份标本通过 HMA 能够确定亚型的有 15 份, 占标本总数的 93.8% (表 1)。

表1 辽宁省 HIV-1 感染者亚型分布

标本号	质粒毒株来源	亚型
1	IN868 印度	C
2	TH14 泰国	B'
3	ZM18 赞比亚	C
4	TH14/TH06 泰国	B'/E
5	IN868 印度	C
7	TH22 泰国	E
8	TH14 泰国	B'
9	TH14 泰国	B'
10	SF170 卢旺达	A
11	SF170 卢旺达	A
12	SF170 卢旺达	A
13	TH14 泰国	B'
14	TH14 泰国	B'
15	TH14 泰国	B'
16	TH14 泰国	B'

16 例感染者中经性接触感染 5 例, 注射吸毒感染 5 例, 输血传播 5 例, 垂直传播 1 例。性传播者中可见泰国(B')亚型和 A 亚型, 以 B' 为主(3/5); 吸毒人群中可见 C 亚型和 E 亚型, 以 C 亚型为主

(2/4), 其中 1 例吸毒者为 B 或 E 亚型, 输血传播者主要为泰国 B' 亚型(4/5), 也可见 C 亚型, 垂直传播 1 例为 A 亚型。结合流行病学调查, 推测毒株分别来源于泰国、中国云南及贵州吸毒人群、辽宁省同性恋人群及非洲。

讨 论

异源双链泳动分析是近年来广泛应用的确定 HIV 基因亚型的一种新的、快速、简便、可靠的方法。有报道其准确性与测序法的一致率在 94% 以上^[9]。本研究是辽宁省首次报道 HIV-1 亚型流行分布情况。经 HMA 方法确定辽宁省已有 HIV-1A、B'、C 和 E 亚型流行, 以 B' 及 C 亚型多见。本次研究对象来源于辽宁省各地, 其危险因素多样: 有吸毒、同性恋、性乱、供血、输血和垂直传播等。从我们的实验结果可以看出, 辽宁省 HIV-1 流行情况与卫生部艾滋病预防与控制中心参比实验室公布的全国 HIV 分子流行病学调查情况相一致, 即我国以泰国 B 亚型所占比例最大, C 亚型次之, 吸毒人群中流行株主要为 C 亚型, 输血者主要为 B' 亚型, 性传播者亚型种类较多。

本次研究所采标本中有 1 份不能用该系列引物扩增成功, 分析原因可能是病毒株本身有较大的差异, 基因组结构中存在较大片段的插入和缺失, 或者是双重感染或三重感染造成重组毒株。由此看来该系列引物已不能完全适合于辽宁地区所有流行株。流行随着时间的进程, HIV 毒株变异越来越大, 需要不断设计适合于本地区流行 HIV 毒株的新的引物, 才能更好地完成 HIV 流行监测工作。

虽然目前辽宁省不属 HIV 感染高发省, 但是本研究结果已经告诉我们辽宁省 HIV-1 流行毒株亚型较复杂, 且已经侵入辽宁省性乱人群及吸毒人群,

经此两种途径感染所占的比例各为 31.25%。性病和吸毒是 HIV 传播的温床, 辽宁省是性病高发省^[10], 并有大批吸毒人群, 因此有效地控制艾滋病经吸毒、性乱传播的问题已迫在眉睫。另一方面, 我们的 HIV 监控网络还处于发展建设中, 调查来源还很有限, 实际的情况可能还要严重。本研究已预示我省艾滋病病毒流行状况的复杂性与防治工作的艰巨性。

参 考 文 献

- 1 Simon F, Maucher P, Roque P, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*, 1998, 4: 1032-1037.
- 2 Myers G. HIV between past and future. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1994, 10: 1317-1324.
- 3 Zwart GF, Wolfs R, Bookman S, et al. Greater diversity of the HIV-1 V3 neutralizing domain in Tanzania compared with that in Netherland: serological and genetic analysis. *AIDS*, 1993, 7: 467-474.
- 4 姚均, 潘品良, 邢辉, 等. 应用异源双链泳动分析法快速确定 HIV-1 基因亚型. *病毒学报*, 1999, 4: 296-309.
- 5 邵一鸣, 苏玲, 陈钧, 等. 1995 年云南瑞丽 HIV 毒株的基因变异和分析. *病毒学报*, 1996, 12: 9-17.
- 6 Cohen J. Differences in HIV strains may underlie disease patterns. *Science*, 1995, 270: 30-31.
- 7 李晖, 曾常红, 陈伟师, 等. 采用异源双链泳动分析法进行 HIV-1 亚型分析的研究. *中国性病艾滋病防治*, 2000, 1: 19-21.
- 8 Novitsky V, Arnold C, Clewley P, et al. Heteroduplex mobility assay for subtyping HIV-1; Improved methodology and comparison with phylogenetic analysis of sequence date. *J Virol Meth*, 1996, 59: 61-72.
- 9 郑锡文. 遏制艾滋病在我国经吸毒及采供血传播的流行. *中华流行病学杂志*, 2000, 1: 6.
- 10 全国性病监测协作组. 1999 年全国性病流行病学分析. *中国性病艾滋病防治*, 2000, 3: 129-132.

(收稿日期: 2001-06-30)

(本文编辑: 尹廉)

· 出版信息 ·

关于《中华物理医学与康复杂志》与《中华理疗杂志》 合刊及变更编辑出版单位的通告

为适应社会主义市场经济条件下期刊发展的需要, 进一步优化中华医学会系列杂志的结构, 进一步理顺管理体制, 中华医学会决定并报经中国科学技术协会批准: 自 2002 年起, 将《中华物理医学与康复杂志》与《中华理疗杂志》合并为一刊, 合刊后刊名为《中华物理医学与康复杂志》, 刊期由双月刊改为月刊; 两刊合并的同时《中华理疗杂志》刊名、刊号自然取消。自 2002 年第 1 期起《中华物理医学与康复杂志》编辑出版单位变更为华中科技大学同济医学院附属同济医院《中华物理医学与康复杂志》编辑部通讯地址: 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 邮政编码: 430030。 中华医学会杂志社