

山东省 HIV-1 感染者分子流行病学研究

傅继华 李盛长 张静 刘学真 黄涛 邢辉 邵一鸣

【摘要】 目的 了解流行于山东省境内艾滋病病毒(HIV-1)毒株的亚型及各种亚型的分布特点。方法 对 93 例 HIV 感染者进行详细的流行病学调查,并采集外周静脉防凝血,提取前病毒 DNA 进行体外扩增,获得包膜蛋白(env)、核心蛋白(gag)、tat 区基因的核酸片段,并对各基因区核苷酸进行测定和分析。结果 发现在所有目标人群中存在 B、B'、C 3 种亚型以及 CRF07-BC、CRF08-BC、CRF02-AG 和 CRF01-AE 4 种重组毒株,B'亚型在人群和地域上分布最广,涉及献血员、受血者、二者的配偶和性乱人群,分布在山东省 10 个地市;CRF07-BC、CRF08-BC 亚型以吸毒人群为主,分布在 5 个地市;CRF01-AE 和其他亚型则主要为性乱人群,集中在几个经济发达的城市。结论 山东省 HIV-1 亚型众多,各亚型在我省高危人群和地域分布不平衡,各有特点,从总的亚型流行特征来看,HIV-1 在我省有流行加快的趋势。

【关键词】 人免疫缺陷病毒;亚型;序列分析;流行病学,分子

Study on the molecular epidemiology of people infected with human immunodeficiency virus-1 in Shandong province FU Ji-hua*, LI Sheng-zhang, ZHANG Jing, LIU Xue-zhen, HUANG Tao, XING Hui, SHAO Yi-ming. *Shandong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250014, China

【Abstract】 Objective To study the distribution of human immunodeficiency virus-1(HIV-1) strains subtypes in Shandong province and to study their source in order to predict the epidemic trend. **Methods** Epidemiological investigation was made and 93 DNA fragments of HIV-1 env, gag, tat gene were amplified by nested polymerase chain reaction from people infected with HIV-1, in 2002-2003. Their C2-V3, P17/P24, 1st exon of tat and adjacent region were sequenced. **Results** Sequence analysis showed that there were 7 HIV-1 strains or circulating recombinant forms(CRFs), B' (n = 71), CRF01-AE (n = 9), CRF07-BC (n = 3), CRF08-BC (n = 3), B (n = 2), C (n = 2), CRF02-AG (n = 2). B' strains was the predominant which, covered 10 cities and 4 kinds of population including blood donors, blood receivers, spouses of the infected people and clients of the sex workers. CRF07-BC, CRF08-BC strains were identified in 5 cities, mainly from injecting drug users. CRF01-AE and other strains were found distributed in developed cities, among sex workers. **Conclusion** There were many kinds of subtypes and CRFs of HIV and their genomes which generated obvious variation in Shandong province, suggesting that they might facilitate the spread of the disease in Shandong province.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Subtype; Sequence analysis; Epidemiology, molecular

我国第一次分子流行病学调查共发现四种艾滋病病毒(HIV)亚型和一种重组毒株^[1],目前我国已报道确定的流行毒株有 A、B、B'、C、D、F 六种亚型和三种重组毒株^[2,3],即 CRF01-AE 和两种不同的 B/C 嵌合型,其中两种 B/C 重组株为中国所特有。从 2002 年起我们对山东省 HIV-1 感染者和患者进行了连续的分子生物学监测,为山东省艾滋病的预防和治疗提供依据。

对象与方法

1. 对象与样品:2002 年 1 月至 2003 年 12 月在

作者单位:250014 济南,山东省疾病预防控制中心艾滋病防治所(傅继华、张静、刘学真、黄涛);济南市长清区中医医院(李盛长);中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心(邢辉、邵一鸣)

全省采集 93 例经酶联免疫吸附试验(ELISA)初筛和免疫印迹(WB)确认的 HIV 阳性人群作为研究对象。所有调查对象经知情同意后根据统一调查表通过培训的调查员收集血样和详细的流行病学资料。每例对象采集静脉血 3~5 ml, EDTA 防凝(0.15%),分离血细胞,用 PBS 对倍稀释,分装, -20℃ 冻存备用。

2. 主要调查内容:包括 HIV 感染者的性别、年龄、职业、家庭住址、婚否、配偶和子女的感染状况、危险因素等。

3. 前病毒 DNA 的提取:利用研究对象的外周血单个核细胞,提取 HIV-1 前病毒 DNA,使用 QIAGEN 公司 DNA Blood Mini Kit,操作步骤按说

说明书进行。

4. 引物: 分别利用多对引物进行 env、gag、tat 3 个区基因片段的扩增和扩增产物的测序(表 1)。

5. 巢式聚合酶链反应(nPCR)方法: 所有反应均采用 30 μ l 反应体系。env 区反应条件如下: 第一轮, 94 $^{\circ}$ C 1 min、55 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 90 s 3 个循环, 94 $^{\circ}$ C 15 s、55 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 1 min 32 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min; 第二轮, 94 $^{\circ}$ C 2 min、55 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 90 s 1 个循环, 94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。gag 区反应条件为: 第一轮, 94 $^{\circ}$ C 5 min、52 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 2.5 min 1 个循环, 94 $^{\circ}$ C 30 s、52 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 90 s 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min; 第二轮, 94 $^{\circ}$ C 2 min、50 $^{\circ}$ C 50 s、72 $^{\circ}$ C 90 s 1 个循环, 94 $^{\circ}$ C 30 s、50 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。tat 区反应条件为: 第一轮, 94 $^{\circ}$ C 5 min、53 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 3 min 1 个循环, 94 $^{\circ}$ C 30 s、53 $^{\circ}$ C 40 s、72 $^{\circ}$ C 2 min 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。第二轮, 94 $^{\circ}$ C 3 min、53 $^{\circ}$ C 50 s、72 $^{\circ}$ C 3 min 1 个循环, 94 $^{\circ}$ C 30 s、53 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 70 s 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。

6. PCR 产物的纯化: PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 与标准对照判定无误后, 再用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行浓缩, 切下特异扩增条带, 用 Qiaegen 公司的 Qiaex 试剂盒进行扩增产物的纯化, 回收所得 DNA 溶于 10 mmol Tris-HCl, pH 8.7, 再经琼脂糖凝胶电泳与分子量标准比较, 估算核酸浓度。

7. 核苷酸序列测定: 根据 PCR 引物不同, 分别选用 env7、306、VIF-E 作为测序引物, 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进行测序反应, 反应条件为: 96 $^{\circ}$ C 10 s、50 $^{\circ}$ C 5 s、60 $^{\circ}$ C 4 min 25 个循环, 反应产物经提纯后, 在 ABI 公司 377 型测序仪上进行序列测定。

8. 序列分析: 测得的序列用 ABI 公司的 SeqEdit 软件进行编辑、校正, 然后使用威斯康星 GCG 公司软件和 Mega 软件完成序列的排列、比较和同源性分析等工作。

9. 分型方法: 经过 nPCR 反应和序列测定, env、gag、tat 区分别得到 C2~V3、核心蛋白 P17/P24、tat 区第一外显子及邻区的核苷酸的序列, 将每个区得到的序列与从美国 Los Alamos 网站上的专业 HIV 核酸序列库(HIV Database)下载得到的国际标准参考序列同时以 Pileup、Pretty 和 Clustal 等软件进行排列和比较, 并使用 Mega 软件的 Neighbor-joining 方法绘制系统进化树, 由序列比较和进化树分析可以对亚型进行判断, 对于单纯亚型在序列比较和进化树上靠近哪一标准株即为哪一标准株的亚型, 三个区的结果可以相互印证, 对于在序列比较和进化树上靠近重组标准株的毒株要参照三区分型结果还要用拉莫斯国家实验室 HIV 核酸序列库中提供的重组分析工具 RIP 程序或美国 NCBI 提供的重组分析工具 BLAST Genotyping 程序进行综合鉴定。其中, B'/C 重组毒株的判断依据为: 如果 env 基因型为 C 亚型, gag 基因型为 C 和 B 重组型, tat 基因型为 C 和 B 重组型, 则鉴定为 CRF07-BC 重组型毒株; 如果 env 基因型为 C 亚型, gag 基因型为 C 和 B 重组型, tat 基因型为 C 亚型, 则鉴定为 CRF08-BC 重组型毒株; 如果 env 基因型为 A 亚型, gag 基因型为 A 亚型, tat 基因型为 A 和 G 重组型, 则鉴定为 CRF02-AG 重组型毒株^[4]。CRF01-AE 重组型原先被叫做 E 亚型, 最早在泰国被发现, 近年来被证实为实际上是起源于非洲的一种重组型毒株, 由 A 亚型片段、E 片段和未知片段构成^[5], 由于并不存在单独的 E 亚型毒株, 因此在进行亚型判

表1 常用引物的名称、序列和位置

名称	序列 (5'→3')	方向	位置 (HXB2)	扩增片段长度 (bp)	
env	ED5	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG	正向	6557~6582	1255
	ED12	AGTGCTTCCTGCTGCTCCCA	反向	7811~7792	(外侧)
	Env7	CTGTAAATGGCAGTCTAGC	正向	7002~7021	668
	Env8	CACTTCTCAATTGTCCCTCA	反向	7668~7648	(例侧)
gag	gag F2	ATGGGTGCGAGAGCGTCARTATTAA	正向	790~814	1242
	gag 2	TCCAACAGCCCTTTTTCCTAGG	反向	2032~2011	(外侧)
	306	GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCC	正向	836~857	671
	c-gag	TAGTTCCTGCTAIRTCACTTCC	反向	1507~1486	(内侧)
tat	NP5	CCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGT	正向	4653~4678	1709
	ENV-1	TTCCACACAGGTACCCCA	反向	6361~6344	(外侧)
	VIF-E	AGATGGAACAAGCCCCAGAAGACC	正向	5557~5580	791
	NP11	CCCATAATAGACTGTGACCCACAA	反向	6347~6324	(内侧)

断时,无法进行重组分析,仍以 CRF01-AE 国际代表株为标准,判断依据与单纯亚型相同。

结 果

1. 分型结果:经过以上分析,我们发现在所有目标人群中存在 B、B'、C 3 种亚型以及 CRF07-BC、CRF08-BC、CRF02-AG 和 CRF01-AE 4 种重组毒株,其中 B' 亚型数量最大 71 株(占 77.2%),CRF01-AE 9 株(占 9.8%),CRF07-BC、CRF08-BC 各 3 株(均占 3.3%),B、C 和 CRF02-AG 各 2 株(占 2.2%)。

2. 不同亚型的人群分布特点:山东省的 HIV 感染者主要涉及以下高危人群:以往有无偿献血员、性乱者、静脉毒瘾者、血液制品使用者、感染者的配偶或性伴、感染者感染后出生子女,分析我们所研究的目标人群与所感染 HIV-1 毒株的关系,发现每种亚型毒株在人群中的分布各有其特点。从分布可见 B' 亚型毒株主要在无偿献血员中流行(50 例),同时波及血液制品使用者(10 例)、性乱者(6 例)、感染者的配偶(5 例),共分布在 4 类人群中,其中 5 例感染者配偶人群,作为传染源的感染者均为无偿献血员或血液制品使用者。CRF01-AE 则主要分布在以性乱者(6 例)为主,辅以感染者子女(2 例)和感染者配偶(1 例)的 3 类人群中。CRF07-BC 的 3 例全部为静脉毒瘾者,CRF08-BC 则 1 例为静脉毒瘾者,1 例为性乱者(其性伴有静脉毒瘾者),1 例既是静脉毒瘾者又是性乱者。B 亚型性乱者 1 例、感染者配偶 1 例。C 和 CRF02-AG 的 4 例均为性乱者。作为性乱者人群的重要组成部分,归国人员在几个亚型中占了很大比例,其中 CRF01-AE 有 1 例为归国人员,CRF02-AG 和 B、C 则全部为归国人员,流行病学资料显示所有归国人员均是在国外有性乱史感染 HIV-1。

3. HIV 不同亚型的传播途径分布特点:目前 HIV-1 的 3 种传播途径(血液、性、母婴)在山东省均已出现,上面提到的 6 类人群按其传播途径又可归类为:血液途径传播——无偿献血员、血液制品使用者、静脉毒瘾者;性途径传播——性乱者、感染者的配偶;母婴途径传播——感染者子女。因此我们可归纳出各亚型的传播途径,B' 亚型以血液传播为主(60/71),性传播次之(11/71);CRF01-AE 以性传播为主(7/9),母婴传播次之(2/9);CRF07-BC 全部为血液传播,CRF08-BC 血液传播和性传播各占一半;

CRF02-AG 和 B、C 全部为性传播。在所有通过性接触感染的病例中有 7 例是通过配偶间性传播的,分别是 B' 亚型 5 例、CRF01-AE 亚型 1 例、B 亚型 1 例,与 3 种亚型中配偶感染状况明确的已婚感染者数比较,配偶间的性传播率分别达到 9.6% (5/52)、20% (1/5) 和 100% (1/1)。2 例母婴传播全部为 CRF01-AE 亚型,与已婚已育 CRF01-AE 亚型女性感染者数比较,该亚型的母婴传播率达到 100% (2/2)。

4. HIV 各亚型在山东省的地区分布特点:从我们收集的研究对象家庭住址分布来看,标本主要来自山东省的 12 个地区市和 3 个外地省。就每一个 HIV-1 毒株亚型的分布看,B' 亚型分布最广,除了 8 例来自 2 个外省,其余分布于山东省的 10 个地区市;从方位上看包括了北、中、西南和胶东等地区,可见遍布山东省,从各市病例数看,以无偿献血员集中的西南地区地市最多,其他地市只是零散病例。8 例外省病例有 7 例来自河南省,均为来济南、青岛等市各大医院就诊的患者,另 1 例来自黑龙江省的感染者则为感染后来山东省的打工者。其次为 CRF01-AE 亚型,分布于我省的 5 个地区市,分别为临沂、潍坊、济宁、青岛、威海等市,其中临沂市 2 例、潍坊市 1 例、济宁市 1 例的感染者均为原籍云南省的女子感染后嫁入山东省的,前 3 例又通过性途径和母婴传播造成了丈夫或孩子的感染。CRF07-BC 的 3 例其中 2 例为在青岛市服刑的新疆籍人,另一例也是到青岛市打工的新疆籍人员。3 例 CRF08-BC 的感染者分布于临沂、济南、威海市,其中前 2 例为嫁入山东省的云南籍女子。剩余的 CRF02-AG 和 B、C 亚型的感染者均集中在青岛和烟台 2 市。

5. HIV 主要亚型感染的人口学特征:各亚型的男女比例为:B' 为 1.21:1,CRF01-AE 为 1.25:1,B'/C 为 2:1,其他为 5:1。年龄构成:B' 亚型 13~71 岁,其中 20~49 岁 60 例、<20 岁 2 例、>50 岁 9 例;其他亚型除了 1 例为 50 岁,2 例为未足岁的婴儿,其余均在 20~49 岁之间。

讨 论

从对山东省流行的 HIV 亚型的研究来看,共发现 B、B'、C 3 种亚型以及 CRF07-BC、CRF08-BC、CRF02-AG 和 CRF01-AE 4 种重组毒株,其中 CRF02-AG 在全国范围内未见报道。从各亚型所占比例看,B' 亚型占 77.2%,CRF01-AE 占 9.8%,

CRF07-BC、CRF08-BC 各均占 3.3%，B、C 和 CRF02-AG 各占 2.2%，可见 B' 为绝对优势毒株，其次为 CRF01-AE、B'/C，与我国范围内流行的 3 种优势毒株相一致^[6]，只是各亚型所占比例有所不同，而我国流行的几种亚型大部分都已在山东省出现，说明 HIV-1 传播的各种危险因素山东省均有存在，使得山东省的 HIV-1 流行在我国具有一定代表性，又因为我省各种高危人群的分布和比例与我国的总趋势有所差异，而使得山东省又具有自己的一些特点。这 7 种亚型中有 4 种为重组型，占总数的 18.6%，是个不容忽视的危险因素，因为重组毒株是多种毒株混合感染、在复杂的免疫环境中优势选择的结果，意味着比单纯毒株有更强的传播能力^[7]，因此重组毒株的增加，可能预示着 HIV 在山东省的流行进一步加快。从不同亚型在各种高危人群中的分布看，B' 亚型除了最早的有偿献血员人群，已经渗透到血液制品使用者、感染者配偶和性乱人群中，血液制品使用者是最直接的受害者。而因为性途径被以上两种人群感染的感染者配偶和性乱人群则是一个难以预测的群体，而在该研究的调查中显示，由于这类人群均为农民，无一例使用安全套，因此应加强对献血员和血液制品使用者的管理和行为干预，以防止 B' 亚型通过性途径在普通人群中传播。CRF01-AE 的感染者主要是性乱者，只有 1 例是感染者配偶、2 例为感染者子女，可见 CRF01-AE 是山东省性传播的优势亚型，应加强其在性乱人群中的监测。2 种 B'/C 亚型均主要分布在吸毒人群中，只有 2 例为性乱人群，B、C 和 CRF02-AG 则全部是归国的性乱者。从传播途径看，3 种途径在山东省都已出现，B' 和 B'/C 是血液和性传播途径，CRF01-AE 为性和母婴传播，B、C 和 CRF02-AG 均为性传播，值得注意的是所有亚型都有性传播，一旦各种亚型通过性传播进入性乱人群，则会加快他们在普通人群中的传播，照此下去几年后 HIV 亚型在山东省的分布会发生大的变化。母婴传播是 2003 年在山东省首次发现的，母婴传播的出现是 HIV 在某一流行区流行加速的标志。

从 HIV 各种亚型在山东省的地区分布看，亚型的分布并不平衡。B' 亚型分布最广，但绝大多数还是集中于经济相对欠发达献血员最多的西南部地区，而经济发达的济南、胶东等地区病例较少且分散，他们多是由于发生性乱行为而感染，或感染后发

病而到此寻医治疗的输入性病例，因此这几个地区虽然没有职业献血员，但由于经济发达，在娱乐场所和医院吸引来了被感染的献血人群，也应当提高警惕，加强娱乐场所的管理和医院的监测。其他几个亚型相对较集中，多分布在经济较发达、人口流动频繁的东部地区，但是几例 CRF01-AE 感染者的输入值得注意，他们均为嫁入山东省的南方女子，后来又造成了配偶和子女的感染，因此应加强这一部分人的监测和管理。不同亚型的人口学特征显示 B' 和 CRF01-AE 亚型在男女分布上无明显差别，即男女感染两种亚型的危险性是相同的，而在以吸毒人群和归国人员为主的其他亚型中男性占绝对优势，这与该两类人群多为男性有关。在年龄分布上看，所有亚型均以青壮年为主，而以 B' 亚型分布更广一些，有 9 例为 50 岁以上人群。因此从人群分布、地区分布、男女比例、年龄分布等几个方面看，B' 亚型都是对我省的 HIV 疫情和流行趋势影响最大的亚型。而 B、C 和 CRF02-AG 3 个亚型本是欧美和非洲流行的优势毒株，通过性接触由归国劳务人员传入国内，增加了我省亚型分布的复杂性，他们在我省分布的数量虽然很少，但由于感染者多是性活跃期的青壮年男性，增加了他们在我省普通人群中传播的危险因素，与其他亚型相结合会增加 HIV 在我省流行态势的复杂性，因此我省还应该加强对输出劳务人员艾滋病预防知识的宣传教育和行为干预，以阻断外来亚型在山东省的传播。

参 考 文 献

- 1 邢辉, 秦光明, 冯毅, 等. 中国人类免疫缺陷病毒(HIV-1)D 亚型毒株 gag、env 和 tat 基因的序列分析. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13: 157-162.
- 2 潘品良, 曾常红, 范秀娟, 等. 人类免疫缺陷病毒膜蛋白基因 F 亚型毒株在中国的首例发现. 病毒学报, 1999, 15: 97-101.
- 3 Ling SU, Marcus Graf, Zhang YZ, et al. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. J Virol, 2000, 74: 11367-11376.
- 4 Carr JK, Salminen MO, Albert J, et al. Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants. Virology, 1998, 247: 22-31.
- 5 Laukkanen T, Salminen MO, Koch C, et al. Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. J Virol, 1996, 70: 5935-5943.
- 6 赵全壁, 潘品良, 温宁, 等. 中国艾滋病病毒 1 型流行毒株 V3 环序列变异性的研究. 中国性病艾滋病防治, 2002, 8: 208-211.
- 7 Africa H, Berta R, Vincent S. Recombinant human immunodeficiency viruses type 1 circulating in Spain. AIDS Research and Human Retroviruses, 2000, 16: 505-511.

(收稿日期: 2004-04-15)

(本文编辑: 尹廉)