

## · 实验室研究 ·

浙江省 HIV-1 CRF01<sub>AE</sub> 流行株的分子特征分析

姚亚萍 辛若雷 何翔 孟哲峰 潘晓红 郭志宏 杨介者 徐云 邢辉

**【摘要】** 目的 分析艾滋病病毒 1 型(HIV-1) CRF01<sub>AE</sub> 重组毒株在浙江省的分子流行特征。方法 提取 234 例 HIV-1 感染者基因组 DNA 用巢式聚合酶链反应(nPCR)方法扩增 *gag* 部分基因片段,测定序列以后分析核苷酸和氨基酸序列。结果 在扩增阳性并成功测序的 192 个序列中 HIV-1 CRF01<sub>AE</sub> 有 81 个,占 42%,是浙江省 HIV 主要的流行毒株之一。系统进化树中存在 3 个 bootstrap 值 >60 的分支簇,其中 MIX 组包括 47 个序列,内部基因离散率为  $2.4\% \pm 0.7\%$ ,与参考株 CM240 的基因离散率为  $3.4\% \pm 0.5\%$ ;SEX 组包括 7 个样本,组内基因离散率为  $3.0\% \pm 1.2\%$ ,与参考株的基因离散率为  $3.9\% \pm 1.0\%$ ;MSM 组包括 12 个样本,组内基因离散率为  $2.8\% \pm 1.1\%$ ,与参考株的基因离散率为  $4.9\% \pm 0.6\%$ ,三者差别有统计学意义。特征性氨基酸分析表明 MIX 组、SEX 组、MSM 组共享序列与国际参考株共享序列之间分别存在 2 个、4 个和 8 个位点的差异。结论 浙江省内 HIV-1 CRF01<sub>AE</sub> 流行株中主要存在三个进化簇,其中两个簇与广西来源株密切相关。CRF01<sub>AE</sub> 毒株在浙江省内主要以异性性途径和注射吸毒形式传播。

**【关键词】** 人类免疫缺陷病毒;分子特征;基因

**Molecular characteristics of HIV-1 CRF01<sub>AE</sub> strains in Zhejiang province** YAO Ya-ping\*, XIN Ruo-lei, HE Xiang, MENG Zhe-feng, PAN Xiao-hong, GUO Zhi-hong, YANG Jie-zhe, XU Yun, XING Hui. \*Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310009, China

**【Abstract】** **Objective** Using molecular epidemiology method to characterize human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype CRF01<sub>AE</sub> strains being prevailed in Zhejiang province. **Methods** *Gag* fragments of the HIV-1 strains were amplified by nested-polymerase chain reaction (nPCR) from the DNA extracted from whole blood of HIV-1 infected individuals in Zhejiang province. PCR products were sequenced and analyzed by phylogenetic method. **Results** 81 HIV-1 subtype CRF01<sub>AE</sub> sequences were identified from the 192 samples that sequenced successfully. As one of the dominant subtypes in Zhejiang, CRF01<sub>AE</sub> was transmitted mainly by heterosexual or homosexual contact in local residents. In migrants living in Zhejiang, CRF01<sub>AE</sub> were transmitted mainly by heterosexual contact or injecting drug use. There were three main clusters in the phylogenetic tree which bootstrap value was larger than 60. We named the clusters with group MIX (47 sequences), group SEX (7 sequences) and group MSM (12 sequences) based on the transmission. Pairwise DNA distances in the *gag* region within the three groups and between CM240 were different ( $P = 0.000$ ). Data through the analyses of deduced amino acid sequences from the three groups showed that several signature amino acid sites were distinct from the same positions of the subtype reference strains. **Conclusion** The CRF01<sub>AE</sub> strain prevailing in Zhejiang province was from several sources, transmitted by more than three different transmission routes, and becoming the main subtypes circulating in homosexual population in this study. More attention needs to be paid to the epidemic characteristic of CRF01<sub>AE</sub>.

**【Key words】** Human immunodeficiency virus-1; Molecular characteristics; Genes

人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)是造成全球范围流行的主要 HIV 毒株。根据遗传变异程度和进

化关系分析,HIV-1分为 M、O 及 N 组等型<sup>[1]</sup>。除此以外,HIV-1 新亚型形成的另一个重要机制就是基因重组。能够引起传播和流行的重组毒株称为“流行重组模式”(circulating recombinant form, CRF)<sup>[2]</sup>。到目前为止,全世界已经发表了 35 个流行重组模式<sup>[3]</sup>。在东南亚地区广为流行的是 HIV

作者单位:310009 杭州,浙江省疾病预防控制中心艾滋病性病防治所(姚亚萍、潘晓红、郭志宏、杨介者、徐云);中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心病毒免疫室(辛若雷、何翔、孟哲峰、邢辉)

重组毒株 CRF01\_AE<sup>[4]</sup>。我国在第一次 HIV 分子流行病学调查时就发现在东南和西南地区的性传播感染人群和吸毒感染人群中存在 CRF01\_AE 的流行<sup>[5]</sup>。浙江省在以往的研究中也发现 CRF01\_AE 主要在经异性性接触传播的人群中流行<sup>[6]</sup>。本文对 CRF01\_AE 毒株在浙江省的分子流行病学特征进行分析。

## 材料与方法

1. 样本情况:在 2004 年 5 月至 2007 年 3 月间,选择在浙江省各市县接受阳性告知并进行个案流行病学调查的 HIV 感染者,采集 EDTA 抗凝全血共 234 份。采用聚合酶链反应(PCR)方法扩增阳性并获得序列 192 例,其中 CRF01\_AE 序列 81 例(42%, 81/192);81 例中男性 56 例(69.1%),女性 25 例(30.9%);年龄 2~59 岁,中位数( $M$ )=31 岁。采样时的  $CD_4$   $M$  = 320 个/ $mm^3$ 。感染者的户籍地与感染途径分布见表 1。个人资料、感染途径等信息来源于各县市疾病预防控制中心工作人员流行病学调查后输入国家网络直报系统的报表。

表1 2004-2007 年浙江省和外省户籍感染者与传播途径分布

户籍	传播途径						合计	构成比 (%)
	异性	同性	静脉注射	母婴	输血	不详		
本省	29	6	1	1	-	1	38	46.0
省外	18	3	15	0	1	2	39	48.0
不详	-	-	-	-	-	4	4	4.0
合计	47	9	16	1	1	7	81	100.0

2. 核酸提取及目的片段的扩增、鉴定:采用 QIAGEN 公司的 QIAamp Blood Mini Kit 试剂盒对 200  $\mu$ l 全血样本进行基因组 DNA 的提取。以提取的 DNA 为模板,用 nPCR 方法扩增 HIV *gag* p17 和 p24 交界区的 650 bp 基因片段,反应体系、反应条件及扩增引物参照文献<sup>[6]</sup>,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

3. 序列测定:PCR 阳性产物由上海生工生物工程技术有限公司和上海晶大生物有限公司进行纯化和序列测定。

4. 序列分析:使用 NTI advance 9 软件包组件 Contig Express 对序列进行编辑和校正。使用 Bioedit 软件的 CLUSTAL multiple alignment 对样本序列和标准序列进行排列和比对。用 MEGA 3.1 软件选择 Kimura 双参数模型计算序列间的基因距离并进行 Neighbor-Joining 系统进化树构建。国际参考

株序列来自 Los Alamos HIV 数据库;校准后的核苷酸和氨基酸利用 [http://hiv\\_web.lanl.gov](http://hiv_web.lanl.gov) 网站的 Translate 程序翻译成氨基酸,用 Consensus Marker 程序计算共享序列。假设检验使用单因素方差分析或多个独立样本的秩和检验(Kruskal-Wallis H Test);统计分析使用 SPSS 13.0 软件。

## 结 果

1. HIV-1 CRF01\_AE 传播途径和户籍分布:检测得到的 81 例 HIV-1 CRF01\_AE 样本有 38 例是本省户籍的感染者,39 例为省外户籍感染者,4 例户籍不详。外省户籍的感染者主要来自于广西(38.5%, 15/39)、贵州(20.5%, 8/39)、四川(17.9%, 7/39)、云南(10.3%, 4/39)、广东(5.1%, 2/39)、江苏(5.1%, 2/39)和江西(2.6%, 1/39),以注射吸毒和性传播为主要感染途径。本省户籍感染者以性接触传播(包括同性性接触和异性性接触)为主;见表 1。

2. HIV-1 CRF01\_AE 的系统进化树分析:81 个序列在系统树上与参考株 01\_AE. TH. CM240 聚集在一个进化簇上,其可靠性为 91%;因此判定,这 81 例样本感染的病毒均为 CRF01\_AE(图 1)。从系统进化树图形分析,一些序列在进化树中呈散在分布。有三个分支簇的 bootstrap 值 >60,显示出具有流行病学的亲缘关系。对这三个簇内的序列样本进行了传播途径和户籍分布的重点分析。第一簇内包含 47 例样本:17 例为省内户籍的异性传播感染者;27 例为广西、贵州、四川的注射吸毒感染者和异性传播感染者、云南的异性传播感染者、广东和江西的注射吸毒感染者;另有 3 例户籍和感染途径不详。将这一簇标记为 CRF01\_AE MIX 组。第二簇内包含 7 例样本,以异性传播感染为主,包括本省户籍的 1 对夫妻和 2 例 HIV 阳性感染者配偶,1 例广西籍的外媳妇和因母婴传播被感染的儿童,1 例有非婚性伴的云南籍男子;将这一簇标记为 CRF01\_AE SEX 组。第三簇内包括 12 例样本,均为男性;其中 7 例为同性恋感染者(6 例为本省,1 例为江苏),4 例为本省户籍异性传播感染者,1 例为江西注射吸毒感染者;将其标记为 CRF01\_AE MSM 组。

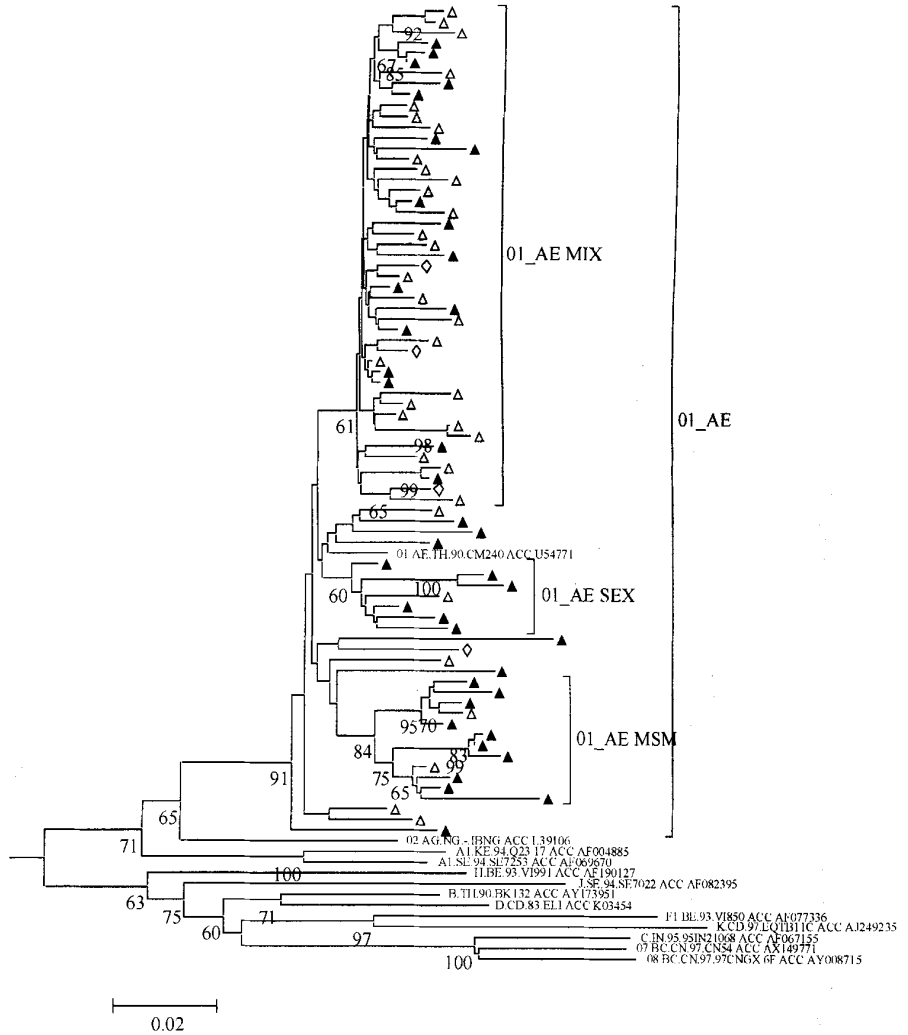
3. 基因距离分析:81 个序列组内基因距离平均为  $4.0\% \pm 1.5\%$ ,与国际参考株 01\_AE. TH. CM240 的基因距离为  $3.7\% \pm 0.9\%$ ,而与其他国际参考株基因距离在 9.2% 以上。按照上述的分组方

法,分别计算并分析了三组样本的组内基因距离及其与参考序列之间的基因距离,并使用对数转换后单因素方差分析和 Kruskal-Wallis H Test 进行多个独立样本的非参数检验(表 2);结果显示三组样本的组内基因距离和与参考株之间的基因距离有统计学意义 ( $P=0.000$ )。

4. 特征性氨基酸分析:通过将三个组的共享序列与国际参考株的共享序列进行比较发现,CRF01\_AE MIX 组与国际参考株共享序列只存在 2 个位点的差异;CRF01\_AE SEX 组与国际参考株共享序列之间有 4 个位点的差异;而 CRF01\_AE MSM 组与国际参考株共享序列的位点差异多达 8 个(图 2、3)。

讨论

HIV-1 CRF01\_AE 在浙江省户籍主要分布在以性接触(包括同性和异性)感染的人群中。而外省户籍感染者,则主要分布在异性接触和注射吸毒感染的人群中。系统进化树分析结果表明,浙江省户籍的一部分异性性接触感染者与来自西南省份的经注射吸毒和异性性接触传播感染者聚集成一个进化传播簇。这一分支簇具有一定规模(46/81, 56.8%),表现为较小的组内基因距离和与 CM240



注:系统树的每一个支点代表一个样本,bootstrap 只显示高于 60 的节点;▲:本省户籍 HIV 感染者样本;△:外省户籍 HIV 感染者样本;◇:户籍地不详样本

图1 81 个 CRF 01\_AE 序列样本的系统进化树分析

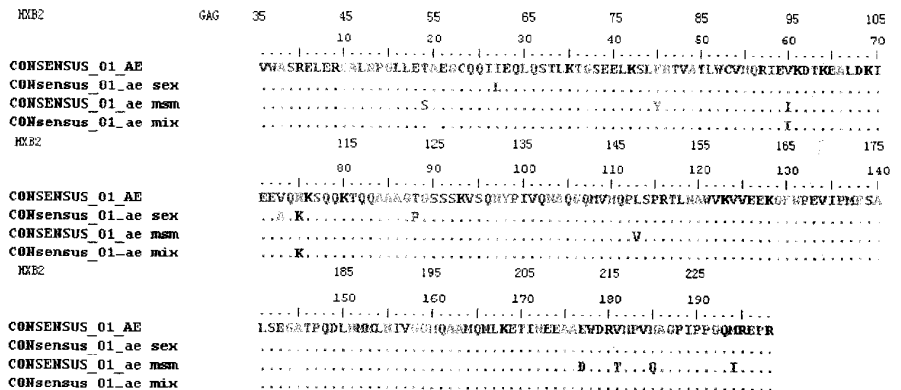
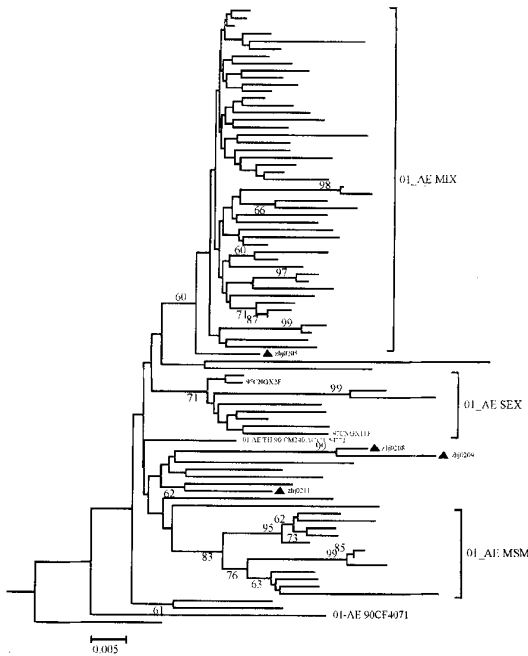


图2 3 个进化簇与 HIV-1 CRF01\_AE 国际标准株的氨基酸共享序列比较



注：系统树的每一个支点代表一个样本，bootstrap 只显示高于 60 的节点；▲：2002 年序列样本

图3 HIV-1 CRF01\_AE 与 2002 年序列样本的系统进化树分析

表2 三组 CRF01\_AE 样本序列的基因距离分析

组别	样本数	基因离散率(%, $\bar{x} \pm s$ )		
		组内	H <sup>a</sup>	与参考株 CM240 F <sup>b</sup>
SEX	7	3.0 ± 1.2		3.9 ± 1.0
MIX	47	2.4 ± 0.7	219.202	3.4 ± 0.5
MSM	12	2.8 ± 1.1		4.9 ± 0.6

注：<sup>a</sup> 多个独立样本的非参数检验， $P = 0.000$ ；<sup>b</sup> 对数转换后的单因素方差分析  $P = 0.000$

参考株较近的亲缘关系，是目前浙江省内 HIV-1 CRF01\_AE 流行的主要形式。我们推测这种以异性性接触和注射吸毒为主要传播途径，共同导致 CRF01\_AE 传播的方式也可能是全国大部分地域内该毒株流行的主要传播模式<sup>[7-10]</sup>。

我们在系统进化树上还发现另外两个进化簇。一个进化簇以异性性接触感染为主，另一个进化簇则以同性性接触感染为主。在异性性接触传播进化簇内的样本表现为较大的组内基因距离，与 CM240 参考株的亲缘距离比 MIX 组大，序列中出现 4 个位点的特征性氨基酸变异；而同性性接触感染进化簇内的毒株序列与国际参考株共享序列相比有 8 个位点的氨基酸变异，远多于其他两组，与 CM240 参考株的亲缘距离也较其他两组大。为了确定传播来

源，我们将这些序列与 2002 年在浙江省检出的 HIV-1 CRF01\_AE 序列和 1997 年广西地区检出的参考序列 97CNGX2F 和 91CNGX11F 进行系统进化树分析(图 3)，结果显示 CRF01\_AE MIX 组与 zhj0205 毒株序列有较近的亲缘关系。资料显示，zhj0205 样本为 2002 年 5 月确认的广西籍来浙江打工的女性。CRF01\_AE SEX 组与 97CNGX2F 和 91CNGX11F 汇聚在一起，没有发现与 CRF01\_AE MSM 组有亲缘关系的毒株来源。系统进化证明浙江省内流行的 CRF01\_AE 是通过不同输入源或传播途径传入而引起的流行，浙江省内至少存在 3 个以上 CRF01\_AE 毒株的传入来源，其中 2 个与广西来源株密切相关。

分析 CRF01\_AE MSM 组病例的一般流行病学资料，可以发现同性恋感染者的样本主要来源于浙江北部的杭州、嘉兴、湖州和绍兴 4 个市，另有 1 例来自与浙江湖州接壤的江苏省，进一步分析发现在这一分簇中的 4 例异性性接触感染者也分布在杭嘉湖平原，这一信息提示 4 例感染者可能同时存在同性和异性高危行为，而且极大可能是同性恋人群中 HIV-1 CRF01\_AE 毒株传入的原因。以往国内的一些研究数据表明，同性恋人群主要以欧美 B 亚型为主<sup>[11,12]</sup>，我国台湾多渠道的一项调查表明在异性恋和同性恋的男性中，B 亚型分别占 52% 和 78%，CRF01\_AE 的感染分别占 44% 和 21%<sup>[13]</sup>。但在本次研究中，浙江省户籍的同性恋感染者却检出较高比例的 CRF01\_AE(85.7%，6/7)。这一信息值得我们关注。由于社会伦理道德的压力，同性恋人群一直以一种隐蔽的形式存在，却又具有较高感染 HIV 的危险行为。而且系统进化树研究还显示这些同性恋感染者之间存在传播关系。因此应该高度重视这一群体，加大对同性恋人群的艾滋病宣传和干预力度。

有研究表明，我国 HIV-1 CRF01\_AE 重组毒株在人群中的感染数量不断上升，在高危人群传播过程中具有不同的变异特点<sup>[9,14,15]</sup>。本次研究数据明确了在不同地域<sup>[7,9,10]</sup>、不同行为特征的感染人群中可能存在相对独立的进化传播簇，而不同进化传播簇中的毒株具有一定的基因特征。这一特征的出现是否是由于病毒在通过不同途径进入宿主时经受了不同的免疫压力导致变异，或者是由于选择压力的筛选使某些毒株成为特定传播途径的优势毒株。以上问题都需要我们对 CRF01\_AE 毒株进行更深

人的研究。

(感谢浙江省各市县疾病预防控制中心工作人员对本研究所提供的大力支持与帮助)

### 参 考 文 献

- [1] 杰伊 A 维利. 艾滋病病毒与艾滋病的发病机制. 2 版. 北京: 科学出版社, 2000: 127-131.
- [2] Carr JK, Foley BT, Leitner T, et al. Reference sequences representing the principal genetic diversity of HIV-1 in the pandemic//Korber B, Kuiken CL, Foley B, eds. Human Retroviruses and AIDS 1998: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. 1998.
- [3] Sanders-Buell E, Saad MD, Abed AM, et al. A nascent HIV type 1 epidemic among injecting drug users in Kabul, Afghanistan is dominated by complex AD recombinant strain, CRF35 \_ AD. AIDS Res Hum Retroviruses, 2007, 23(6): 834-839.
- [4] Gao F, Bailes E, Robertson DL, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. Nature, 1986, 339: 389-392.
- [5] 邢辉, 潘品良, 苏玲, 等. 1996 - 1998 年中国流行的 E 亚型 HIV-1 毒株的分子流行病学研究. 中国性病艾滋病防治, 2002, 8(4): 200-203.
- [6] 姚亚萍, 梁浩, 杨介者, 等. 浙江省 HIV-1 流行毒株 GAG 基因序列测定和亚型分析. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(6): 660-661.
- [7] 罗皓, 梁浩, 邵一鸣, 等. 广西 HIV-1 CRF01 \_ AE 重组毒株 *env* 基因 V3 环序列变异及其与生物表型的关系. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(12): 1092-1095.
- [8] 周磊明, 潘启超, 郑晓虹, 等. 上海市新诊断 114 例人类免疫缺陷病毒 I 型感染者分子生物学研究. 中华传染病学杂志, 2006, 24(5): 328-330.
- [9] 邢辉, 梁浩, 万卓越, 等. 中国 CRF01 \_ AE 亚型人类免疫缺陷病毒毒株的分子流行病学研究. 中华预防医学杂志, 2004, 38(5): 300-304.
- [10] 刘建芳, 严延生, 林勋, 等. 福建省 HIV-1 流行毒株基因分型与流行特征分析. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(7): 601-605.
- [11] 张晓燕, 王晨, 李新旭, 等. 北京市 MSM 人群 HIV 感染者合并 HCV 与梅毒感染的状况及相应免疫指标与病毒载量的变化. 中国艾滋病性病, 2006, 12(4): 294-296.
- [12] 姚均, 张福杰, 何忠平. 北京市同性恋感染者的包膜基因 *c2-v3* 区序列测定和亚型分析. 中国性病艾滋病防治, 2002, 8(3): 131-133.
- [13] Chen YM, Lee CM, Lin RY, et al. Molecular epidemiology and trends of HIV-1 subtypes in Taiwan, 1998, 19(4): 393-402.
- [14] 梁浩, 邢辉, 魏民, 等. 中国艾滋病病毒 1 型 AE 循环重组型毒株 *env* 基因的变异和进化分析. 中华流行病学杂志, 2003, 24(11): 966-970.
- [15] 关琪, 王素芬, 张卓然, 等. CRF01 \_ AE 亚型人类免疫缺陷病毒的基因序列特征研究. 微生物学杂志, 2005, 25(5): 33-35.

(收稿日期: 2007-08-30)

(本文编辑: 尹廉)

## · 消息 ·

### 中华医学会系列杂志网上在线订阅通知

为加强中华医学会系列杂志整体品牌宣传, 扩大中华医学会系列杂志的影响力, 做好期刊征订工作, 开辟新的发行征订渠道, 方便广大读者订阅, 中华医学会杂志社在中华医学网上搭建了“中华医学会系列杂志网上在线征订在线支付平台”, 现已正式开通。在线订阅不仅改变了原有单一的邮局征订渠道, 而且较传统邮局征订具有更大的优势: 使期刊征订工作不再是阶段性的, 可以实现全年征订; 同时网上订阅减少了订阅环节, 节约了时间和成本, 使杂志订阅更加便捷。欢迎广大读者网上在线订阅中华医学会系列杂志, 订阅办法: 请登陆中华医学网 <http://www.medline.org.cn/>, 点击“在线订阅”或登陆 <http://ebook.medline.org.cn/> 进行在线订阅和在线支付。网上订阅 2008 年全年杂志的订户将享受 9 折优惠。联系电话: 010-85158339、85158299, 传真: 010-85158391, 电子邮件地址: [info@cma.org.cn](mailto:info@cma.org.cn)

中华医学会杂志社

### 本刊 2008 年开始实行网上在线投稿

《中华流行病学杂志》自 2008 年 1 月 1 日起启动网上投稿平台。投稿网址: <http://zhlxh.medline.org.cn> 各位作者可登录此网站注册后即可在线投稿。单位介绍信请从邮局寄出, 来稿需付稿件处理费 20 元/篇(邮局汇款), 凡未寄单位介绍信和稿件处理费者, 本刊将对文稿不再做进一步处理, 视为退稿。新的网上投稿平台可以做到: ①投稿过程一步到位, 稿件处理进程一目了然; ②随时在线查询稿件处理情况; ③缩短稿件处理时滞; ④避免稿件寄失, 退修后作者修回不及时, 编辑部送审时间过长等弊端。

本刊编辑部