

辽宁省2008—2010年HIV-1基因亚型分布特征及流行病学分析

鄂爽 吴少慧 马宁 熊建萍 梁雪威 郭惠君 周金玲 卢春明 王莉

【关键词】 人类免疫缺陷病毒1型; 基因亚型
Epidemiologic study on HIV-1 gene subtypes in different groups of HIV-1 infectors in Liaoning province, 2008-2010 E Shuang, WU Shao-hui, MA Ning, XIONG Jian-ping, LIANG Xue-wei, GUO Hui-jun, ZHOU Jin-ling, LU Chun-ming, WANG Li. Liaoning Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shenyang 110005, China
Corresponding author: WU Shao-hui, Email: wushaohui@hotmail.com

This work was supported by a grant from the Liaoning Science and Technology Program Projects of China (No. 2010225034).

【Key words】 Human immunodeficiency virus type-1; Gene subtypes

HIV-1 毒株的感染力较强,是目前 HIV 流行的主要病毒株和重点研究对象^[1]。HIV-1 分为 M(main)、O(outlier)和 N(non-M-non-O)3 个组。其中 M 组又分为 A~K 亚型。近年又证实了至少 16 种各种亚型的重组型 CRF_01 至 CRF_016。本研究对 59 例 HIV-1 感染者血浆样本进行基因扩增和序列分析并收集相关流行病学资料,结果报道如下。

1. 材料与与方法:

(1)样本来源:选取 2008—2011 年经病毒载量检测,载量 >1000 copy/ml 的 59 例样本进行 HIV 蛋白酶(PR)和反转录酶(RT)基因区的扩增和测序。

(2)基因扩增^[2](In-house 方法):取血浆 140 μl,参照德国 Qiagen 公司 Viral RNA Extraction Kit 操作步骤提取样本 RNA。One-step RNA PCR Kit (AMV) 和 Ex-Taq 酶购于大连宝生物工程有限公司;所有引物均由该公司合成。以提取的 RNA 为模板,用 RT-PCR 和巢式 PCR 扩增 HIV-1 pol 区 PR 和 RT 基因区的 1300 bp,扩增区域包括 PR 全长和 RT 前 300 个氨基酸。引物序列:MAW-26: 5'-TGG AAA TGT GGA AAG GAA GGA C-3' (2027~2050, 外侧上游); RT-21: 5'-CTG TAT TTC TGC TAT TAA GTC TTT TGA TGG G-3' (3509~3539, 外侧下游); PRO-1: 5'-CAG AGC CAA CAG CCC CAC CA-3' (2147~2166, 内侧上游); RT-4R: 5'-CTT CTG TAT ATC ATT GAC AGT CCA GCT-3' (3300~3326, 内侧下游)。扩增条件分别为 55℃ 30 min, 94℃ 2 min, RT 失活后, 94℃ 15 s, 60℃ 30 s, 68℃ 90 s, 40 个循环, 68℃ 再延伸 5 min, 4℃ 保存。第二轮 94℃ 5 min 变性

后, 94℃ 30 s, 63℃ 30 s, 72℃ 150 s, 30 个循环, 72℃ 再延伸 10 min, 4℃ 保存。

(3)扩增片段电泳和测序^[3]:PCR 扩增阳性片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳与标准 Marker 位置比较正确后, PCR 产物送大连宝生物工程有限公司(ABI 3730)。测序引物为 PRO-1: 5'-CAG AGC CAA CAG CCC CAC CA-3' (2147~2166, 正向); RTA: 5'-GTT GAC TCA GAT TGG TTG CAC-3' (2519~2539, 正向); RTB: 5'-CCT AGT ATA AAC AAT GAG ACA C-3' (2946~2967, 正向); ProC1-down: 5'-CCC TGC TGG GTG TGG TAT TCC-3' (2826~2846, 反向); RT-4R: 5'-CTT CTG TAT ATC ATT GAC AGT CCA GCT-3' (3300~3326, 反向)。标准 DNA Marker 购于大连宝生物工程有限公司。

(4)序列分析:使用 NTI advance 9 软件包组件 contig express 对序列进行编辑、拼接和校正。登录美国斯坦福大学 HIV 耐药数据库(<http://hivdb.stanford.edu>)进行序列分析,同时运用 BioEdit 7.01 和 Mega 4.1 软件包与美国国家生物技术信息中心(NCBI)GenBank 中各亚型代表参考株序列进行比较。

2. 结果:

(1)病例职业与传播途径分布:表 1 显示, 50.00%(10/20) 的农民因既往献血感染艾滋病;均为 B 亚型(表 2)。而既往献血感染者中有 88.33%(10/12) 是农民。

表 1 59 例 AIDS 患者职业与传播途径分布

职业	传播途径								合计
	MSM	非婚异性性接触	既往献血	吸毒	固定性伴阳性	母婴	输血/血制品/手术	不详	
农民	2	3	10	2	2	0	1	0	20
待业	2	3	1	1	1	0	0	1	9
工人	3	2	0	0	0	0	0	2	7
离退休	1	3	0	0	1	0	0	0	5
海员	0	1	0	0	0	0	1	0	2
干部	2	0	0	0	0	0	0	0	2
商业服务	2	0	0	0	0	0	0	0	2
学生及儿童	0	1	0	0	0	2	0	0	3
不详	4	1	1	1	0	0	1	1	9
合计	16	14	12	4	4	2	3	4	59

注:MSM:男男性行为者

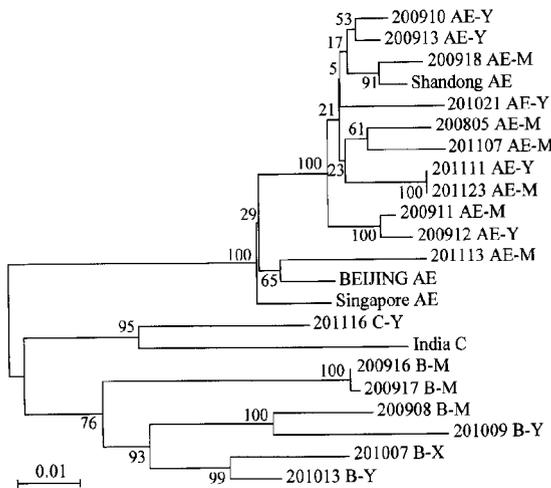
(2)传播途径与亚型分布:表 2 显示, 75.00%(12/16) 的 MSM 感染者是 CRF01_AE 重组型; 12 例既往献血感染者均为 B 亚型。14 例非婚异性性接触感染者中, B 亚型 6 例(42.86%)、CRF01_AE 重组型 7 例(50.00%)、C 亚型 1 例

表2 59例AIDS患者传播途径与亚型分布

传播途径	亚型					合计
	B	CRF01_AE	CRF07_BC	C	G	
MSM	4	12	0	0	0	16
既往献血	12	0	0	0	0	12
非婚异性性接触	6	7	0	1	0	14
吸毒	2	1	1	0	0	4
固定性伴阳性	2	1	1	0	0	4
母婴	2	0	0	0	0	2
输血/血制品/手术	1	0	1	0	1	3
不详	0	3	1	0	0	4
合计	29	24	4	1	1	59

(7.14%)。4例固定性伴阳性感染者中,2例B亚型感染者的配偶均为既往献血感染者;1例CRF01_AE重组型感染者的配偶是MSM感染者;1例CRF07_BC重组型感染者配偶的感染途径不详(结合流行病学资料)。

(3)进化树分析:图1显示,部分样本基因序列与GenBank中国内外各亚型代表参考株序列同源性较高,如200918 AE-M与Shandong AE,201116 C-Y与India C。部分MSM感染者基因序列与非婚异性性接触感染者的基因序列同源性较高,如200911 AE-M与200912AE-Y,201123AE-M与201111AE-Y,200908 B-M与201009B-Y。部分非婚异性性接触感染者基因序列与既往献血感染者的基因序列同源性较高,如201013 B-Y与200807B-X。



注:图中基因序列的表示方法:如200918 AE-M,200918代表样品编号,AE代表CRF01_AE重组型(B代表B亚型,C代表C亚型,BC代表CRF07_BC重组型);M代表MSM感染(X代表既往献血感染者,Y代表非婚异性性接触感染)

图1 2008—2011年辽宁省HIV-1基因系统进化树分析

3. 讨论:辽宁省是艾滋病的低发区,艾滋病在MSM、既往有无偿献血者、非婚异性性接触者等高危人群中发病率较高,数量较大。HIV亚型分布与传播途径相关,不同高危人群传播途径不同,所以HIV亚型的分布呈现明显的人群分布的特点。12例既往献血感染者均为B亚型,其中10例是农民,经流行病学调查显示,这些既往献血感染者集中于20世

纪90年代初,在周边某省献血而感染,因此感染人群相对集中,人数较多,亚型较单一,主要为B亚型。在20例农民艾滋病患者中也因此出现较多的B亚型感染,达17例(85%)。16例MSM感染者中,CRF01_AE重组型12例(75%);B亚型4例(25%)。刘丽花等^[4]2010年对河北省MSM感染者HIV-1基因序列测定和亚型分析时发现,CRF01_AE重组型16例(31.37%,16/51),B亚型32例(62.75%,32/51),CRF07_BC3例(5.88%,3/51)。辽宁省和河北省MSM人群中CRF01_AE重组型($\chi^2=9.53, v=1, P<0.01$)和B亚型($\chi^2=6.98, v=1, P<0.01$)的分布差异均有统计学意义。在固定性伴阳性HIV感染者中,发现了既往献血感染者、MSM以及感染途径不详者的家庭内传播。随着艾滋病感染者数量的逐年增加,HIV单阳家庭(即异性固定性伴双方,一方HIV抗体阳性,另一方HIV抗体阴性)大量出现,异性固定性伴HIV性传播已经成为HIV传播的重要组成部分。

通过基因系统进化树分析发现:①辽宁省内部分基因亚型与国内外一些亚型代表参考株序列密切相关,同时有研究表明^[5],CRF01_AE重组型已从东南沿海和西南边境扩散至内陆,并直接或间接传入辽宁省,影响HIV-1亚型的组成和分布。②部分非婚异性性接触感染者基因与MSM和既往献血感染者基因同源性较高,提示这三类人群间存在着直接或间接的HIV-1的感染和传播。随着辽宁省艾滋病疫情不断上升,HIV感染亚型的构成也将更加多样。因此了解不同感染人群HIV-1亚型的动态分布特点,对防控艾滋病疫情具有重要的现实意义。

参 考 文 献

- [1] Wainberg MA, Brenner BG. Role of HIV subtype diversity in the development of resistance to antiviral drugs. *Vriuses*, 2010 (11): 2493-2508.
- [2] Wu SH, Lu CM, Jiang FX, et al. Genetic characteristics of HIV-1 primary drug resistance-associated mutations in treatment-naïve individuals in Liaoning province, 2004-2008. *Chin J Prev Med*, 2009,43(11):951-955. (in Chinese)
吴少慧,卢春明,姜凤霞,等. 辽宁省2004—2008年人类免疫缺陷病毒感染者原发耐药基因特征. *中华预防医学杂志*, 2009, 43(11):951-955.
- [3] Wu SH, Lu CM, Jiang FX, et al. HIV-1 drug-resistance profiles of treated AIDS patients in Liaoning: genetic characteristics and prevalence. *Chin J Epidemiol*, 2009, 30 (12) : 1273-1276. (in Chinese)
吴少慧,卢春明,姜凤霞,等. 辽宁省艾滋病治疗患者耐药基因特征及分子流行病学分析. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(12): 1273-1276.
- [4] Liu LH, Bu XL, Li WH, et al. Study on the subtypes and sequence of HIV-1 strains in MSM. *Hebei Med J*, 2010, 32(3) : 287-288. (in Chinese)
刘丽花,卜宪岭,李卫红,等. 男男性行为人群HIV-1基因序列测定和亚型分析. *河北医药*, 2010, 32(3):287-288.
- [5] Xing H, Liang H, Wan ZY, et al. Distribution of recombinant human immunodeficiency virus type-1 CRF01_AE strains in China and its sequence variations in the env V3-C3 region. *Chin J Prev Med*, 2004, 38(5):300-304. (in Chinese)
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.

(收稿日期:2011-12-13)
(本文编辑:尹廉)