

辽宁省艾滋病病毒 1 流行株膜蛋白 V3 环氨基酸变异特点

韩晓旭 尚红 周立平 王亚男 张子宁 姜拥军

【摘要】 目的 了解辽宁省艾滋病病毒 1(HIV-1)感染者/艾滋病(AIDS)患者体内不同亚型 HIV-1 膜蛋白 V3 环氨基酸序列特征、突变种类特点。方法 提取含有整合 HIV-1 前病毒的基因组 DNA,巢式聚合酶链反应(nest-PCR)扩增后直接测序,并做序列排列比对、翻译和分析。结果 辽宁省 HIV-1 感染者感染病毒分属 A、B、C、G 四种亚型,AIDS 患者体内病毒 V3 环发生与 T 嗜性/SI 表型有关的氨基酸突变形式(11 位出现 R,13 位出现 S、T、N,19 位出现 V,20 位出现 Y,25、29 位出现 N 等)高于无症状感染组($P < 0.05$)。此外还发现 GQGR、APGQ、RPGA、GLGR、RPGA 等少见的 V3 环顶端四肽组成形式及第 5 位 H,34 位 S、F 等罕见突变形式。结论 辽宁省 AIDS 人群中,A、B、C、G 亚型 HIV-1 毒株 V3 环各位置出现氨基酸突变情况与国外对 B 亚型毒株的研究结果总体上相似,但发现一些罕见突变和少见 V3 环顶端四肽组成形式。

【关键词】 艾滋病病毒;变异;亚型

Mutation of envelop protein V3 loop in HIV-1 epidemic in Liaoning province HAN Xiao-xu, SHANG Hong, ZHOU Li-ping, WANG Ya-nan, ZHANG Zi-ning, JIANG Yong-jun. P3 Laboratory the 1st Affiliated Hospital China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】 Objective To study the characteristics of human immunodeficiency virus (HIV-1) V3 loop amino acid mutations among HIV-1 infected people in Liaoning province. **Methods** The whole blood samples of the HIV carriers and AIDS patients were collected in Liaoning province, China and were extracted PBMC genome DNA. HIV-1 V3 and flanking region sequences were amplified by nest-polymerase chain reaction (nest-PCR) with env specific primers: ED5/ED12 and ED31/ED33. Products were sequenced directly and sequences were aligned, translated and analyzed. **Results** In AIDS group, some amino acid mutations at specific position of V3 loop: S to R at position 11, H to S, T and N at position 13, A to V at position 19, F to Y at position 20, Q or D to N at position 25 and 29, were found and all common mutations were associated with T tropic/SI phenotype. The frequency of such amino acid mutations in specific positions was higher in AIDS group than that of the asymptomatic infection group ($P < 0.05$). In addition, we found some unusual tetramer compositions on the tip of V3 loop: GQGR, APGR and RPGA, GLGR, RPGA in addition to some rare mutations, such as: N to H at position 5 and H to S, F at position 34. **Conclusion** The amino acid mutations on the V3 loop of HIV-1 epidemic in Liaoning province were in agreement with the results of subtype B, but we observed some rare mutations and unusual tetramer compositions on the tip of V3 loop.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Mutation; Subtype

艾滋病病毒(HIV)感染流行难以控制的主要原因之一是其基因具有高度变异性。在 HIV-1 基因组中,膜蛋白基因的变异程度最高,其中第三高变区(V3 环)核苷酸序列的株间变异度最高,可达 50% 以上^[1]。V3 环基因变异与 HIV-1 的细胞嗜性、复制动力学、细胞致病性有密切关系,并可使 HIV-1

逃避细胞毒性 T 细胞及中和性抗体的免疫攻击^[2,3]。有研究表明,从无症状感染者分离到的毒株主要为巨噬细胞嗜性/非合胞体诱导型(macrophage tropic/non-syncytium-inducing, M/NSI)毒株,复制速度较慢;而在 AIDS 期患者体内则分离到 T 细胞嗜性/合胞体诱导型(T lymphocyte tropic/syncytium-inducing, T/SI)毒株,复制较快。由 NSI 向 SI 表型的转变可能与 CD4⁺ T 细胞快速下降和迅速进展到 AIDS 期相关,V3 环基因变异对上述表型变化可能有重要影响。HIV 基因的变化受到不同毒株

基金项目 国家重大基础研究规划'973'项目资助 G1999054107)
作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院 P3 实验室

的生物学特征、宿主机体免疫力水平及治疗干预的多重影响,不同毒株在不同人群中流行会具有不同特点,目前的研究结果主要来自欧美人群和 HIV-1B 亚型毒株。由于人种的差异,我国人群机体的免疫状况与欧美人种可能有所不同,此外我国目前已经有 A、B、C、D、E、F、G 和 B 亚型变种 B' 及 B' / C 重组株等多种 HIV-1 亚型流行^[4],人种遗传背景和病毒亚型的差异可能会对 HIV-1 V3 区基因变化造成影响^[5,6],目前国内这方面的研究资料尚少。本研究通过基因序列分析,了解辽宁省 HIV-1 流行株 V3 环氨基酸变异的特征和变化。

资料与方法

1. 病例选择:收集辽宁省 2000~2001 年发现的 HIV 感染者/AIDS 患者的流行病学资料,临床资料。感染途径有吸毒、性乱、不安全采供血及垂直传播。所有感染者均经 Western Blot 确认,感染时间为 1~10 年。采集全血标本共 23 份, -70℃ 冻存。

2. HIV-1 外膜蛋白 V3 区及侧翼序列基因序列测定:QIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAgen,德国产品)按操作说明从全血标本提取基因组 DNA(含有整合的 HIV-1 前病毒 DNA)。以外膜蛋白特异性引物 ED5/ED12(序列参考文献[7])为外侧引物进行第一轮 PCR 扩增,同时设阴性对照和阳性对照。取 5 μl 第一轮 PCR 扩增产物为模板,以 ED31/ED33 为内侧引物进行 nest-PCR 扩增。QIAquick Gel Extraction Kit(QIAgen,德国产品)按操作说明回收目的 DNA 片段。取 50 fmoles PCR 扩增片段为模板,IRDye TM800 Terminator Mixes(LICOR,美国产品)为底物,Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit(USB corporation,美国产品)双脱氧终止法进行测序反应,醋酸钠乙醇沉淀法回收反应产物,LI-COR Global IR2 System(LI-COR,美国产品)测序仪进行基因序列测定。

3. 辽宁省 HIV 流行株 V3 环与侧翼序列基因及氨基酸序列特征分析:

(1)根据《2001 年中华人民共和国 HIV/AIDS 诊断标准》对我国 HIV-1 感染者进行分组。I 组:AIDS 组,CD4 细胞 $< 200 \times 10^6/L$; II 组:无症状 HIV 感染组,CD4 细胞 $\geq 200 \times 10^6/L$ 。

(2)下载 HIV Sequence Database(<http://hiv-web.lanl.gov>)中不同亚型 HIV-1 共享序列,用 BIOEDIT 软件包中 CLASTAL W 程序对下载序列及测得序列进行排列比对,并在核苷酸序列中人工引入 gaps 以

保持翻译完整性。NEIGHBOR 程序生成系统进化树。统计 V3 环区核苷酸及氨基酸突变位置和种类,并检索 HIV Sequence Database,与国内外 HIV-1 流行株序列进行比较。

4. 统计学分析:将 AIDS 组和无症状 HIV 感染组特定位置上发生氨基酸变异的例数进行比较,采用 Fisher's exact test 方法检验。

结 果

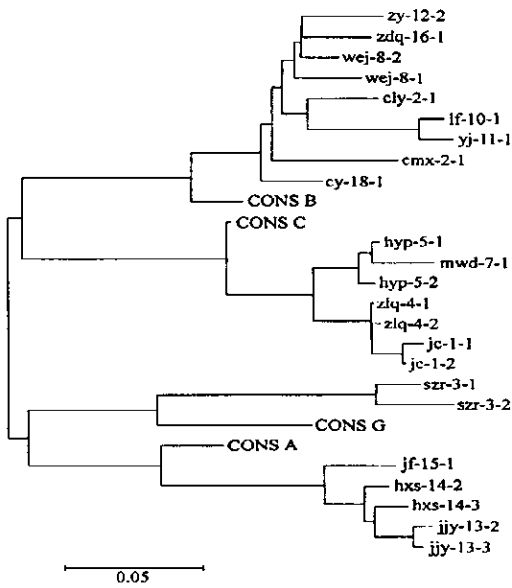
无症状感染者男性 6 例,儿童 1 例,女性 3 例; AIDS 患者男性 6 例,女性 1 例。同一感染者采血时间间隔 8~9 个月。临床资料见表 1。

表1 辽宁省部分 HIV 感染者及 AIDS 患者临床情况

编号	采样时间 (年.月)	病程	CD4 绝对计数 ($\times 10^6/L$)
Jjy-13-2	2000.12	AIDS	44
Jjy-13-3	2001.09	AIDS	57
Hxs-14-3	2001.09	AIDS	156
cmx-2-1	2000.07	AIDS	9
Lf-10-1	2000.12	AIDS	44
Cy-18-1	2001.04	AIDS	29
Clw-21-1	2001.09	AIDS	49
Szr-3-1	2000.07	AIDS	157
Szr-3-2	2001.04	AIDS	162
Hxs-14-2	2000.12	无症状 HIV 感染	254
Jf-15-1	2000.12	无症状 HIV 感染	855
Wej-8-1	2000.07	无症状 HIV 感染	319
Wej-8-2	2001.04	无症状 HIV 感染	217
Yj-11-1	2000.12	无症状 HIV 感染	508
Zy-12-2	2001.04	无症状 HIV 感染	861
Zdq-16-1	2000.12	无症状 HIV 感染	356
Je-1-1	2000.07	无症状 HIV 感染	452
Je-1-2	2001.03	无症状 HIV 感染	457
Zlq-4-1	2000.07	无症状 HIV 感染	388
Zlq-4-2	2001.04	无症状 HIV 感染	398
Hyp-5-1	2000.07	无症状 HIV 感染	457
Hyp-5-2	2001.03	无症状 HIV 感染	320
Mwd-7-1	2000.07	无症状 HIV 感染	280

在系统进化树上(图 1)各毒株分别与 A、B'、C、G 国际共享序列集中一起。说明此次采集辽宁省流行的 HIV-1 毒株分别为 A、B'、C、G 亚型,其中 A 亚型 5 株, B 亚型 9 株, C 亚型 7 株, G 亚型 2 株。

将测得核苷酸序列翻译成氨基酸序列,并与流行于泰国的 B' 亚型 M 嗜性/NSI 表型毒株 TH014W01-1gCR 及流行于我国的 B' 亚型毒株 RL42CG(表型未知)进行比较,结果如图 2 所示。

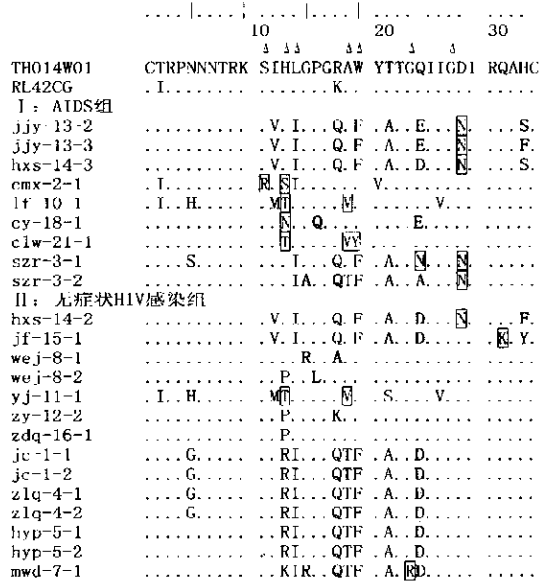


(CONS A、CONS B、CONS C、CONS G 序列来自 HIV 序列数据库)
图1 辽宁省 HIV-1 感染者/AIDS 患者感染 HIV-1 毒株的系统进化树

在 AIDS 组毒株的 V3 环 11 位出现 R 取代 S;13 出现 S、T、N 取代 H;19 位出现 V 取代 A;20 位出现 Y 取代 W;第 25 位、29 位 N 取代 Q 和 D 等与 T 嗜性和/或 SI 表型相关的常见突变形式,高于无症状 HIV 感染组($P < 0.05$)。此外还可见 GQGR、APGQ 两种少见的 V3 环顶端四肽组成形式及第 5 位 H 取代 N,第 34 位 S、F 取代 H 等罕见取代形式。而无症状 HIV 感染组在上述位置上发生取代的氨基酸较少,在与 M 嗜性和/或 NSI 表型相关第 11 位全部为 S;第 25 位全部为酸性氨基酸 D 或中性氨基酸 Q;值得发现的发现是 RPGA、GLGR、RPGA 三种少见的 V3 环顶端四肽组成形式。此外,无症状 HIV 感染组发现一 A 亚型毒株 JF-15-1 的 32 位出现 K,一 B 亚型毒株 YJ-11-1 的 13 位出现 T,19 位出现 V,一 C 亚型毒株 mwd-7-1 的 24 位出现 R 等 T 嗜性毒株的序列特征。

讨 论

HIV-1 外膜蛋白的 V3 区具有很高的异质性,在此区域内的氨基酸序列变化能够影响到病毒对巨噬细胞及转化 T 细胞系等易感细胞的亲嗜性,也能影响到病毒的复制能力及诱导合胞体形成的能力。



I 组为 AIDS 组;II 组为无症状感染组,TH014W01 为流行于泰国 B 亚型 M 嗜性/NSI 表型毒株;RL42CG 流行于我国的 B'亚型毒株;与 T 嗜性/SI 表型有关的氨基酸用方框表示,国外资料此类氨基酸所在位置用 Δ 标出,辽宁省 HIV-1 感染者中发现的罕见突变用黑体字母表示;与 M 嗜性/NSI 表型有关的氨基酸用阴影表示;· 表示与 TH014W01 的氨基酸一致

图2 辽宁省 HIV-1 感染者/AIDS 患者体内毒株 V3 环氨基酸变异情况

目前已知在 HIV 感染的早期和无症状期,宿主体内主要是 M 嗜性/NSI 表型的毒株,而进入 AIDS 期则出现由 M 嗜性/NSI 表型向 T 嗜性/SI 表型的转化,这样通过病毒的生物学表型为中介,将病毒基因、氨基酸水平的变化与临床疾病进展程度之间建立了一定的相关性^[8]。

国外学者通过对大量 HIV 分离株和实验室株的分析研究认为,特定位置的氨基酸变异可以作为预测 B 亚型 HIV-1 毒株表型的标志^[9-12]。在 M 嗜性毒株 V3 环的 25 位氨基酸主要为酸性氨基酸(D 或 E)或丙氨酸(A),而 T 嗜性的毒株在此位置上主要被碱性氨基酸或不带电荷的氨基酸所取代,并且与第 11、24、32 位上发生碱性氨基酸取代相关^[13,14]。还有一些研究认为 V3 环第 11、25、13 位氨基酸由带碱性氨基酸取代对于 SI 表型很重要^[15]。用定点突变的方法也证实 11 位出现 R、13 位出现 T、19 位出现 V、29 位出现 N、32 位出现 K 与 M 嗜性毒株向 T 嗜性转变有关^[10,15]。在辽宁省 AIDS 人群中存在毒株 V3 环第 11 位、13 位、19 位、20 位、25 位、29 位出现氨基酸取代较多见,高于无症状感染组($P < 0.05$),

与国外资料不同的是,我们未发现第 14、32 位出现此类突变,但发现了一些新的罕见突变(参照 HIV Sequence Database 公布序列),如第 5 位 N→R,第 34 位 H→S、F 等突变,最明显的是 GQGR、APCQ 两种少见的 V3 环顶端四肽组成形式。AIDS 组每一毒株至少存在一点上述氨基酸取代或罕见突变,而 CD4 计数最低,临床表现最为严重的 CMX-2-1、CLW-21-1 两株突变位点更多。这些氨基酸序列的变异可能会引起抗原性改变或通过 N 连糖基化位点数目变化而改变抗原结构,造成免疫逃逸,或产生毒力更强的变异株进而发展成为优势株。在无症状感染组毒株中,V3 环第 11 位全部为 S,第 25 位全部为酸性氨基酸 D 或中性氨基酸 Q,这些都是 M 嗜性/NSI 表型毒株的特征,我们还发现有 1 例 B 亚型感染者两次采得毒株 V3 环顶端四肽分别为 RPGA、RLGR,属罕见类型,另一例 C 亚型 V3 环顶端四肽变成 RPGQ,由于 V3 环顶端四肽组成对 V3 环抗原结构有重大影响,有必要对罕见变异的意义进一步考证。此外,在无症状感染组发现一 A 亚型毒株 JF-15-1 的 32 位出现 K,一 B 亚型毒株 YJ-11-1 的 13 位出现 T、19 位出现 V,一 C 亚型毒株 mwd-7-1 的 24 位出现 R 等 T 嗜性毒株特征。这几例感染者一般状况良好,CD4⁺ 细胞也未下降到 200 × 10⁶/L 以下,那么测得序列是否代表其体内优势毒株值得探讨。总之,从 V3 环及侧翼氨基酸序列上看,辽宁省各亚型 HIV-1 感染人群进入 AIDS 期后,其毒株 V3 环与侧翼序列氨基酸变化情况与国外对 B 亚型毒株的研究结果基本相符,但发现一些罕见突变和少见 V3 环顶端四肽组成形式,这些变异是否能造成抗原性的改变或毒力增强还需要通过进一步的定点突变试验加以确证。

参 考 文 献

- 1 Bennis, Rutledge R, Folks T, et al. Genomic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. *Science*, 1985, 230: 949-951.
- 2 Hwang SS, Boyle TJ, Lysterly HK, et al. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science*,

1991, 253:71-74.

- 3 Shioda T, Levy JA, Chen-Mayer C, et al. Small amino acid change in the V3 hypervariable region of gp 120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:9434-9438.
- 4 郑锡文. 我国艾滋病流行形势及预防与控制成就. *中华流行病学杂志*, 1999, 20:131-134.
- 5 Peeters M, Vincent R, Perret JL, et al. Evidence for differences in MT2 cell tropism according to genetic subtypes of HIV-1: syncytium-inducing variants seem rare among subtype C HIV-1 viruses. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retroviro*, 1999, 20:115-121.
- 6 Shankarappa R, Chatterjee R, Learn GH Jr, et al. Human immunodeficiency virus type 1 env sequences from Calcutta in eastern India: identification of features that distinguish subtype C in India from other subtype C sequences. *J Virol*, 2001, 75:10479-10487.
- 7 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, 15:296-304.
- 8 Koot M, Keet IP, Vos AH, et al. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4⁺ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med*, 1993, 118:681-688.
- 9 Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, et al. Mapping of independent V3 envelop determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J Virol*, 1996, 70:9055-9059.
- 10 De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, et al. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol*, 1992, 66:6777-6780.
- 11 Kato K, Sato H, Takebe Y. Role of naturally occurring basic amino acid substitution in the human immunodeficiency virus type 1 subtype E envelop V3 viral on coreceptor usage and cell tropism. *J Virol*, 1999, 73: 5520-5526.
- 12 Briggs DR, Tuttle DL, Sleasman JW, et al. Envelop V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophage). *AIDS*, 2000, 14:2037-2939.
- 13 Milich L, Margolin B, Swanstrom R, et al. V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. *J Virol*, 1993, 67:5623-5634.
- 14 Strunnikova N, Ray ST, Livingston RA, et al. Convergent evolution within the V3 loop domain of human immunodeficiency virus type 1 in association with disease progression. *J Virol*, 1995, 69:7548-7558.
- 15 Willey RL, Theodore TS, Martin MA. Amino acid substitution in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 that change viral tropism also alter physical and functional properties of the virion envelop. *J Virol*, 1994, 68:4409-4419.

(收稿日期 2002-06-10)

(本文编辑:尹廉)