

· 艾滋病预防与控制 ·

江苏省艾滋病病毒感染的分子流行病学研究

羊海涛 邢辉 贾成梅 梁浩 徐晓琴 魏明 李雷 陈钊 邵一鸣

【摘要】 目的 了解江苏省不同人群中艾滋病病毒(HIV)各亚型毒株的流行情况和传播规律。方法 收集 HIV 感染者及患者的流行病学资料,无菌采集 HIV 感染者或艾滋病(AIDS)患者抗凝全血标本 5 ml,提取前病毒 DNA,用巢式聚合酶链反应(nested-PCR)扩增膜蛋白基因的 C2~V3 区,进行序列测定,鉴定病毒亚型。用威斯康星 GCG 软件进行共享序列、基因离散率的计算和毒株的聚类分析。结果 截止 2001 年底,江苏省已发现 HIV-1 中的 A、B、C、D、E 五种亚型和一个 B 亚型变种(B')流行, C 占 40.48% 和 B (38.10%) 亚型为主要流行株,静脉吸毒感染人群中 86.67% 为 C 亚型,采供血和受血感染人群中 91.67% 为 B 亚型,在性途径传播人群中所有六种亚型均有,且分布较为均一。结论 有偿献血人群中 B 亚型毒株由邻省传入,吸毒人群中 C 亚型毒株的传入主要与新疆籍流动人口的介入有关,多种亚型的并存说明江苏省存在着适宜 AIDS 流行的各种危险因素,提示今后在药物治疗、疫苗研制以及其他防制工作上将面临更大的困难。

【关键词】 人类免疫缺陷病毒;感染;流行病学;分子

A molecular epidemiological study on the human immunodeficiency virus infection in Jiangsu province
 YANG Hai-tao*, XING Hui, JIA Cheng-mei, LIANG Hao, XU Xiao-qin, WEI Ming, LI Lei, CHEN Zhao, SHAO Yi-ming. *Jiangsu Province Center for Diseases Prevention and Control, Nanjing 210009, China

【Abstract】 Objective To identify subtypes of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) strains and their distribution, infection sources, and the trends of HIV infection in Jiangsu province. **Methods** Anticonglutated bloods from 46 infected persons were collected to separate previrus DNA. HIV-1 env genes were then amplified by nested-PCR and sequenced for their C2-V3 region so as to identify subtypes. The analysis of consensus sequence, genetic distance and phylogenetic tree were conducted with GCG software. **Results** By the end of 2001, there had been six subtypes of HIV-1 strains identified in Jiangsu province: A, B, B', C, D and E. The predominant subtypes were C (accounting for 40.48%) and B (accounting for 38.10%). Subtype C accounted for 86.67% among injecting DUs while subtype B' accounted for 91.67% among commercial blood donors and receivers. **Conclusion** Subtype B' among commercial blood donors was brought to Jiangsu from neighboring provinces. The outbreak of HIV-1 infection among local DUs was caused by subtype C from Xinjiang province. Findings from HIV/AIDS molecular epidemiologic study suggest that it is challenging for Jiangsu to treat patients, apply vaccine, prevent and control AIDS in the future.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Infection; Epidemiology; molecular

艾滋病病毒(HIV)是一种具有高度变异性的逆转录病毒,在全球的传播过程中产生了许多具有相对独立基因序列特征的亚型。目前发现的 HIV 分为 1 型和 2 型。HIV-1 是引起全球艾滋病(AIDS)广泛流行的病原, HIV-2 则主要局限于西部非洲^[1]。

根据 HIV 外膜糖蛋白(env)C2~V3 区的序列可把 HIV-1 分为 A~J 和 O 等多种亚型^[2,3]。不同亚型的生物学特性在不同人群中的传播效率有所差异。因此应用分子流行病学方法摸清某一地区的 HIV-1 亚型分布和基因变异情况,可以了解该地区 HIV 流行毒株的种类、来源、人群分布、流行时间,对掌握 HIV 的传播规律和流行趋势、指导 AIDS 的预防控制具有重要的指导意义和理论价值。江苏省疾病预防控制中心对当地 HIV 流行情况进行了系统的分子流行病学研究,现报道如下。

基金项目 江苏省预防医学基金资助项目(99029)

作者单位 210009 南京 江苏省疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制科(羊海涛、贾成梅、徐晓琴、李雷);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学实验室(邢辉、梁浩、魏明、陈钊、邵一鸣)

资料与方法

1. 血液标本来源: 2000~2001 年 6 月, 在江苏省内有 HIV 疫情报告的 8 个省辖市采集了所有能随访到的 35 例江苏籍及 11 例暂住江苏的外省籍共 46 例 HIV 感染者和 AIDS 患者的血液标本, 其中经静脉注射毒品感染 17 例, 经性途径感染 15 例, 经采供血和受血感染 13 例, 经母婴途径感染 1 例。

2. 核酸提取: 使用 Qiagen 公司的 QIAampBlood 试剂盒, 按照说明书提取基因组 DNA, 最终样品溶于 10 mmol/L pH 8.7 的 Tris-HCl 缓冲液中, -80°C 保存。

3. 巢式聚合酶链反应 (nested-PCR) 扩增: 用 5 μl 样品核酸和外侧引物 env-B₁/env-K 进行初次扩增, 反应条件为 94°C 2 min, 56°C 1 min, 72°C 3 min, 1 个循环; 94°C 30 s, 56°C 45 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。用 1/10 的反应产物与引物 env-E₇/env-E₈ 进行第二次扩增, 反应条件为 94°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 2 min, 1 个循环; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min, 25 个循环; 72°C 10 min。

4. HIV 基因片段的提纯和回收: PCR 扩增终产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 与 Marker 对照判断无误后, 切下特异扩增带, 用 Qiaex 公司的 Qiaex 试剂, 按照说明提纯扩增的 HIV-1 DNA 片段。回收得到的 DNA 溶于 10 mmol/L Tris-HCl buffer pH 8.7, 经琼脂糖凝胶电泳与分子量标准比较估算核酸浓度。

5. 序列测定: 分别使用引物 env-D₃ 和 env-F₂ 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, 在 PCR 仪上进行测序反应, 模板用量约 1 μg , 引物用量为 6 pmol/L。反应产物经提纯后用自动 DNA 序列分析仪进行序列测定。

6. 序列分析: 测得序列的编辑校正排列、比较和同源性分析, 使用威斯康星 GCG 公司软件完成 (用 pileup 程序对样品及国际标准序列的排列和比较; 用 pretty 程序计算一组毒株的共享序列 (consensus sequence); 用 distance 程序测定毒株间的核苷酸序列的基因离散率; 用 growtree 程序做系统树分析)。

结 果

1. 江苏省 HIV-1 毒株亚型种类及其构成: 截止 2001 年 6 月底, 江苏省累计报告 HIV/AIDS 共 133

例, 其中经静脉吸毒感染者 51 例, 经性途径感染 31 例, 经采供血和受血感染 47 例, 母婴感染 1 例, 不详 3 例。由于 HIV/AIDS 的流动性较大, 本研究中共采集了 46 份血液标本, 但上述传播途径的构成比与所报告的构成比在统计学上差异无显著性 (Fish's 精确概率 $P=0.405$)。

46 份标本中有 4 份 PCR 扩增阴性, 均为暂住江苏的外省籍 HIV 感染者。PCR 扩增阳性的 42 份标本中共发现有 A、B、C、D、E 五个亚型和一个亚型变种 B' (泰国 B) 的 HIV-1 毒株。其中 C 亚型占 40.48% (17 例), B' 亚型占 38.10% (16 例), E 亚型占 9.52% (4 例), A 和 D 亚型各占 4.76% (均为 2 例), B 亚型占 2.38% (1 例)。未发现 HIV-2 型病毒存在的分子生物学证据。

2. 江苏省 HIV-1 亚型毒株地区分布特点: 从表 1 可以看出, HIV-1 亚型毒株呈不均衡分布。以 B' 亚型和 C 亚型流行区域最广, 而 A、B、D、E 则比较局限。不同地区有不同的优势亚群, 徐州市 B' 亚型占 87.50%, 常州市 C 亚型占 72.73%。

表 1 江苏省不同地区 HIV-1 亚型毒株分布

地区	样品份数	HIV-1 亚型毒株					
		A	B	B'	C	D	E
苏州	8	2	0	1	3	2	0
南京	6	0	1	2	3	0	0
无锡	6	0	0	3	1	0	2
常州	11	0	0	2	8	0	1
徐州	8	0	0	7	1	0	0
镇江	1	0	0	0	1	0	0
扬州	1	0	0	1	0	0	0
连云港	1	0	0	0	0	0	1
合计	42	2	1	16	17	2	4

3. 江苏省 HIV-1 亚型毒株的人群分布特点: 通过共用注射器静脉吸毒感染的人群 86.67% (13/15) 为 C 亚型, 通过采供血和受血感染的人群中 91.67% (11/12) 为 B' 亚型。通过性途径传播的人群中所有六种亚型毒株均有, 且分布较为均一。

4. 江苏籍 HIV/AIDS 中 HIV-1 流行株 env 基因 C2~V3 区与国际标准株 A~E 亚型共享序列的比较: 从表 2 可以看出, 江苏籍 HIV/AIDS 中 HIV-1 毒株的优势亚型 B' 和 C 亚型与国际同种参考亚型毒株间基因离散率仅为 7.05% 和 7.27%, 而 E、A、D、B 四种亚型与国际同种参考亚型毒株间基因离散率均在 15% 左右。所有亚型与非同一亚型的国际参考亚型毒株间基因离散率均在 22% 以上。

表2 江苏籍 HIV/AIDS 中 HIV-1 亚型与国际 HIV-1 亚型基因离散率比较

亚型	例数	基因离散率($\bar{x} \pm s, \%$)					
		Acon	Bcon	B (RL42)	Ccon	Dcon	Econ
B'	15	23.26 ± 1.91	14.94 ± 2.86	7.05 ± 2.49	23.55 ± 3.13	24.38 ± 2.10	25.02 ± 3.00
C	11	23.91 ± 1.76	27.81 ± 2.56	26.85 ± 1.78	7.27 ± 2.38	27.95 ± 2.30	23.87 ± 1.83
E	4	28.99 ± 0.77	28.19 ± 1.04	30.58 ± 3.08	26.53 ± 3.98	29.44 ± 1.55	11.50 ± 4.87
A	2	10.83	22.87	24.61	24.78	27.82	27.90
D	2	27.42	24.23	27.74	27.20	14.54	30.66
B	1	25.90	18.06	18.85	26.07	25.11	27.17

5. 江苏籍 HIV/AIDS 中 HIV-1 主要流行株的流行时间分析 HIV-1 在某个地区流行后,其 env 基因的年均变异率为 0.5%~1%。此次研究发现以吸毒感染为主的常州市 C 亚型毒株间的平均离散率只有 2.52%,而与血源有关的徐州市 B'亚型毒株间的平均离散率则达到 6.98%。按此推算,C 亚型和 B'亚型在当地的流行时间分别为 2 年和 7 年,与现场流行病学调查分析推断的时间基本吻合(表 3)。

表3 江苏籍 HIV/AIDS 中优势毒株 env 基因 C2~V3 区基因变异性及对流行时间的估计

HIV-1 亚型毒株	本型内基因离散率($\bar{x} \pm s, \%$)	估计流行时间(年)	估计开始流行时间(年)
徐州 B' ($n=7$)	6.98 ± 1.92	6~7	1995~1996
常州 C ($n=8$)	2.52 ± 0.51	2~3	1999~2000

6. 江苏籍 HIV/AIDS 中 HIV-1 主要流行株与国内部分地区同类亚型共享序列比较:为进一步摸清江苏省 HIV-1 流行株的传播来源,选择国内数省主要流行于职业献血员人群中的 B'亚型和主要流行于吸毒人群的 C 亚型与江苏同类亚型进行了相互间基因距离的测定(表 4, 5)。从表 4, 5 可以看出,徐州地区通过血源感染的人群中主要流行株 B'亚型与河南和山东省主要流行于职业献血员人群的 B'亚型毒株较为接近,与云南、广东和湖北等省则较远。常州地区本地吸毒人群中出现的 C 亚型与 96 新疆代表株及新疆 B'亚型代表株(CN54B)基因距离较为接近,与云南、广西则稍远。

表4 江苏籍 HIV/AIDS 中 HIV-1 B'亚型毒株与国内部分地区 B'亚型序列比较

HIV-1 亚型毒株	云南 (97YN-B)	广东 (98GD-B)	河南 (96HeN-B)	山东 (98SD-B)	湖北 (96HuB-B)
江苏 B' ($n=15$)	13.56	19.18	5.10	4.46	5.61
徐州 B' ($n=7$)	13.37	18.68	4.88	4.18	5.48

表5 江苏籍 HIV/AIDS 中 HIV-1 C 亚型毒株与国内部分地区 C 亚型序列比较

HIV-1 亚型毒株	广西 B'亚型 (97CNGX)	新疆 (96XJ)	B'亚型代表株 (CN54B)	云南 (96YN)
江苏 C ($n=11$)	7.15	3.81	4.24	5.17
常州 C ($n=8$)	6.94	3.90	4.60	5.17

讨 论

1989 年在我国云南德宏地区发现了以吸毒人群为主的中国第一个 AIDS 流行区^[4],亚型分析结果表明,当时流行的毒株均为 B 亚型^[5]。1994 年以后,全国大部分省份均已发现了 HIV 感染者,为了解我国 HIV 流行状况和 HIV-1 亚型分布,1996~1999 年国家艾滋病参比中心组织了全国首次 HIV 分子流行病学调查,结果查明我国已有 7 个亚型(A~G)和 1 个亚型变种(B')共 8 种类型的 HIV-1 流行^[6],是世界上 HIV 亚型最多的国家之一,且存在着 B'和 C 亚型毒株重组的现象^[7]。江苏省参加了这次调查,并首次在中国境内发现了 A 亚型的存在^[8]。本次研究结果显示,截至 2001 年底,江苏省已存在 A、B、B'、C、D、E 的 HIV-1 流行株,且 C 亚型和 B'亚型为主要流行株。

江苏省发现 HIV 感染者较多的三个地区各具特点:①苏州市是江苏省经济最发达的地区,在 20 世纪 80 年代末期就有大量的劳务人员输出到乌干达、肯尼亚和科威特等非洲国家,是江苏最早的 HIV 流行区,此次研究结果也证明苏州 HIV-1 亚型种类最为复杂。②徐州市地处江苏最北端,与河南、山东、安徽等省接壤,现场流行病学调查发现一定数量的当地人在 1995 年以前曾有异地卖血史。第一次全国分子流行病学调查证实 90 年代中期我国数省职业献血员中的 HIV 感染毒株都是最初来源于云南省吸毒人群中的泰国 B'亚型和 C 亚型^[6],本次研究结果进一步证实了这个结论,而且提示江苏省血源中 HIV 感染的发生不是孤立的,主要流行株 B'亚型与河南和山东等省主要流行于职业献血员

人群的 B'亚型毒株的基因距离仅为 4.88% 和 4.18%, 而云南、广东等省则均超过了 10%。并且河南、山东等省的流行时间又明显早于徐州, 因而这些数据提示徐州地区的 HIV-1B'亚型毒株是由邻省传入的。③常州市于 1999 年首次在省内吸毒人员中发现 HIV 感染者, 本次研究发现毒株均为 C 亚型, 经测算基因离散率, 与 96 新疆代表株及新疆 B'YC 代表株(CN54B)基因距离较为接近, 与云南和广西的 C 亚型则较远, 进一步的系统树分析, 基因序列与 CN54 株聚为一类。CN54 是在第一次全国分子流行病学调查后由国家艾滋病参比中心提供给国际基因库的我国新疆 B'YC 重组毒株的代表株。提示常州地区流行的 C 亚型很可能也是 B'YC 重组毒株。在 <http://www.HIV-web.lanl.gov> 网页上, 把常州地区的 C 亚型序列与 genebank 中的 C 亚型进行了比较, 结果显示在 env 区与 CN54 基因序列有 94% 的一致性, 说明江苏本地吸毒人群中 HIV 感染的流行与新疆籍流动人口的介入有关。

综合本次研究结果并参考其他省份的分子流行病学研究结果, 可初步确定江苏省 HIV-1 主要流行毒株传播轨迹为: A 亚型于 90 年代初由归国劳务人员从非洲传入, B'亚型来源于泰国吸毒人群, 并经缅甸于 80 年代末传入云南省^[9], 经吸毒和非法采供血传播至我国数省^[6], 再由周边省传入江苏省的徐州地区, 并在当地的人群中引起一定数量的 HIV 感染, C 亚型则是于 90 年代中期由印度吸毒人群传入云南^[5], 经吸毒人群沿贩毒路线向西快速传播至新疆^[6], 再由新疆流动人口传入江苏省苏南地区的吸毒人群。

江苏省是国内 HIV 低流行、性病高发的省份,

此次研究又证实江苏省是国内 HIV-1 亚型较多的省份, 多种亚型并存从一个侧面说明江苏省存在着适宜 AIDS 流行的各种危险因素。因此, 江苏目前的防制工作重点应针对流动人口和性乱人群, 江苏省今后在药物治疗、疫苗应用以及其他防制工作上将面临更大的困难。

参 考 文 献

- 1 Clavel F, Mansinho K, Chanaret S, et al. Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in west African. *New Eng J Med*, 1987, 316:1180-1185.
- 2 Myers G. Human retroviruses and AIDS 1993: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos New Mexico, 1993.
- 3 Potts KE, Kalish ML, Lott T, et al. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. *AIDS*, 1993, 7: 1191-1197.
- 4 马瑛, 李祖正, 张开祥, 等. 首次在我国吸毒人群中发现艾滋病病毒感染者. *中华流行病学杂志*, 1990, 11:184-185.
- 5 邵一鸣, 赵全壁, 王斌, 等. 我国云南德宏地区 HIV 感染者 HIV 膜蛋白基因的序列测定和分析. *病毒学报*, 1994, 10:291-299.
- 6 Shao Y, Su L, Sun XH, et al. Molecular epidemiology of HIV infections in China. Presented at fourth international congress in AIDS in Asia and the Pacific, Manila, 1997.
- 7 Su L, Graf M, 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.
- 8 苏玲, 邢辉, 羊海涛, 等. 中国首例人类免疫缺陷病毒(HIV-1)A 亚型毒株的鉴定. *病毒学报*, 1997, 13:265-267.
- 9 腾智平, 朱托夫, 段一娟, 等. 我国云南瑞丽市 HIV 感染者 HIV 分子流行病学分析. *中国性病艾滋病防治杂志*, 1995, 1:1-5.

(收稿日期: 2003-02-25)

(本文编辑: 尹廉)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对统计学符号及统计学方法的要求

按 GB 3358-82《统计学名词及符号》的有关规定书写, 常用如下 (1) 样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} (中位数仍用 M); (2) 标准差用英文小写 s ; (3) 标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$; (4) t 检验用英文小写 t ; (5) F 检验用英文大写 F ; (6) 卡方检验用希腊小写 χ^2 ; (7) 相关系数用英文小写 r ; (8) 自由度用希腊小写 ν ; (9) 概率用英文大写 P (P 值前应给出具体检验值, 如 t 值、 χ^2 值、 q 值等)。以上符号均用斜体。关于资料的统计学分析: 对于定量资料, 应根据实验或调查设计类型和资料的条件选用合适的统计学分析方法, 不能盲目套用 t 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据实验或调查设计类型、列联表中定性变量的性质和分析目的选用合适的统计学分析方法, 不能盲目套用 χ^2 检验; 对于回归分析, 应结合专业知识和散布图选用合适的回归类型, 不能盲目套用简单直线回归分析。