

# 人类免疫缺陷病毒 1 型 *vpr* 基因变异研究

王晓辉 秦彦珉 程慧 石向东 陈琳

**【摘要】** 目的 分析 HIV-1 毒株 *vpr* 基因变异规律。方法 RT-PCR 扩增 HIV-1 毒株 *vpr* 基因,经测序后构建基因进化树并分析其亚型分布;比较 Vpr 蛋白 32~46 位关键肽段氨基酸序列的差异;分析国内外 Vpr 蛋白 77 位氨基酸多态性的分布差异。结果 01\_AE 为 HIV-1 主要亚型 (49.53%);B 亚型 *vpr* 基因组内变异最大;Vpr 蛋白 77 位存在多态性,分别编码谷氨酰胺、精氨酸和组氨酸残基,这种多态性在国内外分布差异无统计学意义 ( $P=0.617$ )。结论 HIV-1 毒株 *vpr* 基因型以 01\_AE 亚型为主,*vpr* 基因存在多态性,与国内外报道一致。

**【关键词】** 人类免疫缺陷病毒 1 型; *vpr* 基因; 基因多态性

**Molecular epidemiology on *vpr* gene of HIV-1 strains** WANG Xiao-hui<sup>1</sup>, QIN Yan-min<sup>1</sup>, CHENG Hui<sup>2</sup>, SHI Xiang-dong<sup>1</sup>, CHEN Lin<sup>1</sup>. 1 Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China; 2 Shenzhen Futian District Center for Disease Control and Prevention  
Corresponding author: WANG Xiao-hui, Email: wxhszcn@gmail.com

**【Abstract】** Objective To understand the rule of *vpr* gene variance of HIV-1 strains. Methods RT-PCR was used to amplify *vpr* gene of HIV-1 strains in Shenzhen. PCR products were sequenced and used for gene phylogenetic analysis and the 32-46 amino acids of Vpr protein were compared. The difference of 77 amino acid polymorphism distribution between domestic region and foreign region was analyzed. Results 01\_AE was the major HIV-1 subtype in Shenzhen. The gene distance among subtype B was larger than in other subtypes. 77-amino acid of Vpr protein had three polymorphism forms as Arginin, Glutamine and Histidine, with Glutamine as the wild form. There were no significant differences in the three amino acid distributions between HIV-1 strains from domestic region and foreign region. Conclusion *vpr* genes of different HIV-1 strains belonged to 01\_AE subtype. There was polymorphism seen in the *vpr* gene which was consistent with both domestic and international HIV-1 strains.

**【Key words】** Human immunodeficiency virus type 1; *vpr* gene; Gene polymorphism

HIV-1 的 *vpr* 基因参与反转录过程的保真性调节,促进整合前复合物的核运输,影响细胞周期过程,诱导细胞凋亡,并对 HIV 长末端重复序列及宿主基因具有调节作用,参与 RNA 剪接<sup>[1-3]</sup>,是 HIV-1 的一个重要功能基因。本研究选择 HIV-1 病毒株进行了 *vpr* 基因的测序和序列分析,以研究 *vpr* 基因变异对于亚型分析的意义以及重要变异位点的分布规律。

## 材料与方 法

1. 标本来源及处理:深圳市疾病预防控制中心于 2002—2007 年确认的 107 例 HIV-1 感染者(分别来自广东、广西、云南、河南等 19 个省市及自治区),其中男性 60 例,女性 47 例。抽取患者 10 ml 静脉血,

经乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝,2 h 内分离血清,-80 ℃ 冻存。

2. *vpr* 基因引物:根据 HIV-1 (GenBank 号: AF033819) 病毒株设计 *vpr* 基因引物<sup>[1]</sup>,外侧 FP: 5'-GAG ACT GGC ATT TGG GTC A-3',外侧 RP: 5'-TTT GTA AAG GTT GCA TTA CAT-3';内侧 FP: 5'-GCA GGA CAT AAC AAG GTA GGA-3',内侧 RP: 5'-GTC GCT GTC TCC GCT TC-3',PCR 扩增片段长 547 bp。

3. 病毒 RNA 提取和 *vpr* 基因扩增:采用 QIAamp 试剂盒(德国 Qiagen 公司)提取病毒 RNA,One Step RNA PCR (AMV) RT-PCR(日本 TaKaRa 公司)试剂盒进行第一轮 RT-PCR,反应条件为:50 ℃ 30 min,95 ℃ 15 min;95 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,30 个循环;72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存。第二轮 PCR 反应条件为:95 ℃ 15 min;95 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,30 个循环;72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.08.018

作者单位:518020 深圳市疾病预防控制中心(王晓辉、秦彦珉、石向东、陈琳);深圳市福田区疾病预防控制中心(程慧)

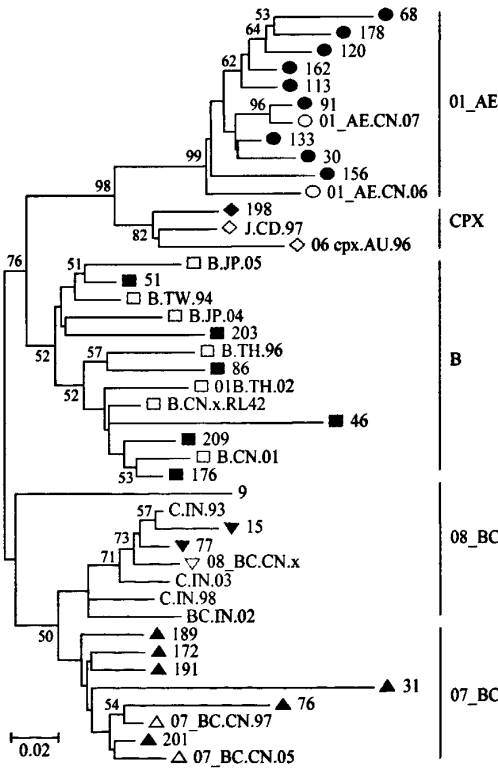
通信作者:王晓辉, Email: wxhszcn@gmail.com

4. PCR 产物测序: 阳性 PCR 扩增产物送上海生物工程技术有限公司测序, 测序引物为: VPR2FP(5'-GCA GGA CAT AAC AAG GTA GGA-3') 及 VPR2RP(5'-GTC GCT GTC TCC GCT TC-3')。

5. 基因和氨基酸序列分析: 将测序所得病毒序列采用 NCBI Blast 功能进行亚型分析, 应用多功能基因分析软件 Mega 4 进行序列比对、应用邻接法构建基因进化树并进行氨基酸序列变异分析和基因距离分析。应用 SPSS 13.0 统计分析软件进行  $\chi^2$  检验。

### 结 果

1. *vpr* 基因进化树分析: 因样本较多, 随机选择每种亚型中的部分毒株进行进化树分析。从进化树可以看出, 01\_AE、CPX、B、08\_BC 和 07\_BC 各亚型形成界限分明的群(Cluster)(图 1)。



注: 每一个亚型实心标记的是深圳病毒株, 空心标记的是从 GenBank 中选择的参照株, 图中树枝节点的数字为 Bootstrap 值(只显示 > 50% 的 Value 值)

图 1 HIV-1 病毒株 *vpr* 基因进化树分类模型

2. 病毒亚型比例和各亚型组内基因距离分析: 107 株 HIV-1 病毒株依据 *vpr* 基因分型结果显示, 01\_AE 亚型占 50% 左右(图 2), 各亚型的比例与中国东南沿海地区近年公布的 HIV-1 亚型比例接近<sup>[4,5]</sup>。

3. *vpr* 基因 32~46 位关键肽段氨基酸位点变异

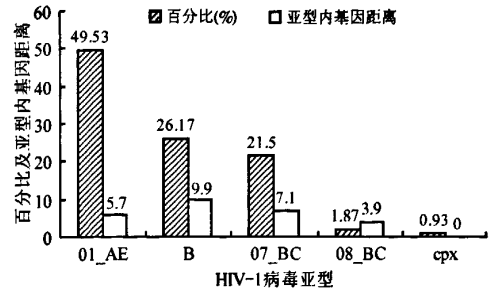


图 2 HIV-1 病毒株各亚型百分比和各亚型 *vpr* 基因组内基因距离

分析: 从本文结果 2 可以看出, 不同亚型 HIV-1 病毒株的 *vpr* 基因变异较大, 即使同一亚型的病毒株也有显著的基因变异。由于 Vpr 蛋白的抗原递呈多肽有重要的免疫学意义, 本研究选择 *vpr* 基因 32~46 位多肽(该多肽为 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 淋巴细胞所识别), 分析其氨基酸序列上的变异特点。结果显示, 不同亚型的 HIV-1 病毒株 32~46 位氨基酸序列明显不同, 即使在同一个亚型内, 其递呈肽段的氨基酸序列也有差异。尤其是 B 亚型变异形式最多, 这可能与本文结果 2 显示的 B 亚型组内基因距离最大有直接关系(图 3)。

Consensus	R	H	F	P	R	P	W	L	H	G	L	G	Q	H	I	
07_BC-76	-	H	-	-	-	-	P	W	-	H	S	L	-	-	H	I
08_BC-15	-	H	-	-	-	-	P	W	-	H	G	L	-	-	Y	V
01_AE-133	-	H	-	-	-	-	P	W	-	L	G	L	-	-	Y	I
01_AE.CN.06	-	H	-	-	-	-	P	W	-	L	G	L	-	-	H	I
01_AE-120	-	H	-	-	-	-	P	W	-	H	G	L	-	-	H	I
01_AE.CN.07	-	H	-	-	-	-	P	W	-	H	V	L	-	-	Y	I
B-176	-	H	-	-	-	-	G	W	-	H	G	L	-	-	H	I
B-86	-	H	-	-	-	-	P	W	-	H	G	L	-	-	H	I
B.CN.x.RL42	-	H	-	-	-	-	I	W	-	H	G	L	-	-	H	I
01B.TH.02	-	H	-	-	-	-	V	W	-	H	G	L	-	-	H	I
B.JP.04	-	H	-	-	-	-	P	W	-	H	S	L	-	-	Y	I
B-203	-	H	-	-	-	-	M	W	-	H	S	L	-	-	Y	I
B.CN.01	-	H	-	-	-	-	S	W	-	H	E	L	-	-	H	I
B-46	-	L	-	-	-	-	P	G	-	H	E	L	-	-	H	I
Cpx-198	-	H	-	-	-	-	P	W	-	H	S	L	-	-	Y	I
06_cpx.AU.96	-	H	-	-	-	-	P	W	-	H	N	I	-	-	Y	I

注: 左侧为不同病毒株的亚型和编号的组合名称, Consensus 为各病毒株的共享氨基酸序列;“-”代表各亚型完全一致的氨基酸位点

图 3 不同亚型的 HIV-1 病毒株 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 淋巴细胞递呈肽段氨基酸位点变异分析

4. 国内外 HIV-1 病毒株 Vpr 蛋白 77 位氨基酸多态性分布: Vpr 蛋白 77 位氨基酸变异在国内外文献报道较多, 该位点可能是一个导致 Vpr 蛋白功能变异的重要突变位点。本研究对深圳发现的 HIV-1 毒株和国外报道的病毒株 Vpr 蛋白 77 位氨基酸多态性变异进行分析, 发现存在三种氨基酸分布形式(表 1),  $\chi^2$  检验结果显示深圳毒株与国外毒株在该氨基酸多态性位点上的分布差异无统计学意义( $P=0.617$ )。

表 1 HIV-1 毒株和国外毒株 *vpr* 基因 77 位氨基酸

毒株	多态性分布			合计
	精氨酸(R)	谷氨酰胺(Q)	组氨酸(H)	
国外毒株	12(12.63)	74(77.89)	9(9.47)	95
本研究毒株	11(10.28)	89(83.18)	7(6.54)	107

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为百分比(%)

### 讨 论

HIV-1 基因按功能可以分为多个区域, 进行 HIV-1 的亚型分析一般采用 *env* 区和 *gag* 区基因, 但近年国外应用 *pol*、*vpr* 和 *tat* 基因进行分型研究的报道也逐渐增多<sup>[6-8]</sup>, 基因分型研究对于病毒重组及变异分析具有重要意义。本研究涉及的 107 例 HIV-1 病毒携带者来自全国各地, 具有较好的代表性。HIV-1 毒株各亚型基因距离的组内变异以 B 亚型最大, 达到 9.9%, 这可能与 B 亚型在中国的流行时间长有关<sup>[9]</sup>。已有研究表明, 一个地区的 HIV-1 毒株传入时间愈长, 该地区的相同亚型毒株的基因变异越大<sup>[10]</sup>。

本研究发现一个 *cpx* 亚型的 HIV-1 毒株, 该毒株 *env* 区和 *gag* 区的分型结果也证实为 *cpx* 亚型。该亚型毒株在中国罕见, 一般流行于非洲, 澳洲、美洲也有少量报道, 怀疑该病例可能为境外感染。查询流行病学资料, 显示该毒株携带者籍贯为香港, 男性, 为临床可疑人群, 传播途径为异性感染, 疫情资料缺乏其感染发生地的记录。可以看出, 通过不同毒株之间 *vpr* 基因分型和基因距离的分析, 可以为追踪传染源提供依据。

Lum 等<sup>[11]</sup> 研究报道认为, *Vpr* 蛋白 77 位氨基酸位点 R77Q 的突变导致细胞凋亡能力降低, 可使感染者无症状期延长, 但 Fischer 等<sup>[12]</sup> 研究认为两者并无明显关系。本研究发现无论国外还是国内病毒株均以 77 位谷氨酰胺 Q 为其野生型存在形式。除了存在精氨酸 R 突变, 本研究还发现 77 位组氨酸 H 突变的存在, 统计分析显示国内外病毒株 *Vpr* 蛋白 77 位氨基酸多态性分布差异无统计学意义。进一步分析发现, 这三种氨基酸均为可以形成氢键的极性氨基酸, 因此, 该位点氨基酸的多态性变异可能对 *Vpr* 蛋白的结构和功能影响不大。

尽管 HIV-1 病毒 *vpr* 基因变异比 *env* 区少, 但从本研究结果可以看出, HIV-1 *vpr* 基因和氨基酸序列的变异仍较复杂。本研究对 107 个样本和参照株 *Vpr* 蛋白全部 96 个氨基酸进行分析, 发现 32 个氨基酸位点存在不一致。由于 32 个氨基酸变异位点具有众多的多态性组合形式, 如果分析 *Vpr* 蛋白各氨基酸位点变异与病程进展的关系, 需要首先考虑不

同亚型之间的差异, 然后在同一个亚型的基础上比较关键氨基酸位点变异对于 *Vpr* 蛋白功能和病毒携带者病程的影响。在分子流行病学分析的基础上, 还可以借助生物工程技术, 体外表达具有不同氨基酸序列的 *Vpr* 蛋白, 分析其生物活性的差异, 从而揭示 HIV-1 *vpr* 基因变异与其功能变化的关系。

国内应用 *env* 区和 *gag* 区基因对 HIV-1 进行分型研究的报道已有很多, 本研究尝试性地应用 *vpr* 基因对 HIV-1 进行分型, 并对 *vpr* 基因的变异特征进行了初步分析, 证实 *vpr* 基因具有亚型特异性, 其基因变异与疾病进展的关系有待进一步研究。

[本研究得到深圳市科技计划项目(200802074)基金资助]

### 参 考 文 献

- [1] Li H, Feng TJ, Zheng YH, et al. Polymorphisms of *vpr* gene of human immunodeficiency virus type 1 in China. *Chin J Infect Dis*, 2009, 27(1): 39-43. (in Chinese)  
李慧, 冯铁建, 郑煜煌, 等. 中国人免疫缺陷病毒-1 *vpr* 基因多态性及其临床意义. *中华传染病学杂志*, 2009, 27(1): 39-43.
- [2] Majumder B, Venkatachari NJ, Srinivasan A, et al. HIV-1 mediated immune pathogenesis: spotlight on the role of viral protein R (*Vpr*). *Curr HIV Res*, 2009, 7(2): 169-177.
- [3] Zhang X, Aida Y. HIV-1 *Vpr*: a novel role in regulating RNA splicing. *Curr HIV Res*, 2009, 7(2): 163-168.
- [4] Liang SL, Ling FX, Chen J, et al. Study on molecular epidemiology of HIV/AIDS among drug users in Guangxi. *Applied Prev Med*, 2007, (5): 263-267. (in Chinese)  
梁绍伶, 梁富雄, 陈杰, 等. 广西吸毒人群艾滋病分子流行病学研究. *应用预防医学*, 2007, (5): 263-267.
- [5] Wan ZY, Li J, Diao LM, et al. Subtype and sequence analysis of human immunodeficiency virus type-1 strains in Guangdong province. *Chin J Prev Med*, 2006, 40(5): 344-347. (in Chinese)  
万卓越, 李杰, 刁丽梅, 等. 广东省人免疫缺陷病毒 1 亚型基因序列特征分析. *中华预防医学杂志*, 2006, 40(5): 344-347.
- [6] Kanizsai S, Ghidan A, Ujhelyi E, et al. Monitoring of drug resistance in therapy-naive HIV infected patients and detection of African HIV subtypes in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2010, 57(1): 55-68.
- [7] Bano AS, Sood V, Neogi U, et al. Genetic and functional characterization of human immunodeficiency virus type 1 *Vpr* C variants from north India: presence of unique recombinants with mosaic genomes from B, C and D subtypes within the open reading frame of *Vpr*. *J Gen Virol*, 2009, 90(Pt 11): 2768-2776.
- [8] Mullick R, Sengupta S, Sarkar K, et al. Molecular characterization of *tat* gene and long terminal repeat region of human immunodeficiency virus type-1 detected among the injecting drug users (IDUs) of Manipur, India: identification of BC recombinants. *Virus Res*, 2010, 147(2): 195-201.
- [9] Zhao F, Wang Z, Zhu Q, et al. Studies on HIV-1 strains in Henan province. *Chin J Epidemiol*, 2009, 30(3): 231-234. (in Chinese)  
赵飞, 王哲, 朱谦, 等. 河南省人类免疫缺陷病毒 1 型流行现状研究. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(3): 231-234.
- [10] Dalai SC, de Oliveira T, Harkins GW, et al. Evolution and molecular epidemiology of subtype C HIV-1 in Zimbabwe. *AIDS*, 2009, 23(18): 2523-2532.
- [11] Lum JJ, Cohen OJ, Nie Z, et al. *Vpr* R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J Clin Invest*, 2003, 111(10): 1547-1554.
- [12] Fischer A, Lejezak C, Lamberr C, et al. Is the *vpr* R77Q mutation associated with long-term non-progression of HIV infection? *AIDS*, 2004, 18(9): 1346-1347.

(收稿日期: 2010-01-05)

(本文编辑: 万玉立)