

· HIV/AIDS 预防控制 ·

北京地区流行的 HIV-1 CRF01_AE 株 基因特征研究

叶景荣 卢红艳 白立石 辛若雷 曾毅

【摘要】 目的 分析北京地区 HIV-1 CRF01_AE 株存在的基因特征。方法 采集北京地区 2006—2008 年新确证 HIV 感染者的抗凝全血标本,分离血浆和提取病毒 RNA,用反转录/巢式聚合酶链式反应扩增病毒 *gag* 基因,对获得的 105 条 CRF01_AE 株序列进行系统进化分析,并通过计算组间距离和 Entropy 核苷酸多态性差异方法分析病毒株的遗传特征。结果 在 CRF01_AE 株序列系统进化树中存在 4 个主要的亚簇, Homo-Max 亚簇包含 67 例样本,同参考株 CM240 组间基因离散率为 5.4%,组内离散率为 2.8%; Hetero 亚簇包含 6 例样本,组间基因离散率为 4.8%,组内离散率为 4.2%。 Mix 亚簇包含 8 例样本,组间基因离散率为 4.2%,组内离散率为 5.2%。 Homo-Min 亚簇包含 18 例样本,组间基因离散率为 4.4%,组内离散率为 2.8%。 Homo-Max、Hetero 和 Homo-Min 亚簇无其他国家的序列, Mix 亚簇与越南和泰国 CRF01_AE 株关系密切;核苷酸多态性分析结果显示,以 Mix 亚簇为参照, Homo-Max、Homo-Min 和 Hetero 亚簇分别有 37、29 和 11 个位点的核苷酸组成,差异有统计学意义。结论 北京地区流行的 CRF01_AE 病毒株中首次观察到 4 个独立的亚簇; Homo-Max 亚簇株为最主要的 CRF01_AE 株; Mix 亚簇株与来自于泰国和越南的 CRF01_AE 株有较高同源性。

【关键词】 人类免疫缺陷病毒; 亚型; 巢式聚合酶链式反应

Genetic characteristics of HIV-1 CRF01_AE strains circulating in Beijing YE Jing-rong^{1,2}, LU Hong-yan², BAI Li-shi², XIN Ruo-lei², ZENG Yi¹. 1 National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China; 2 Beijing Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: YE Jing-rong. Email: basketball197602@hotmail.com

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Mega-projects in Infectious Diseases of China (2008ZX10001-009).

【Abstract】 **Objective** To analyze the genetic characteristics of HIV-1 CRF01_AE strains prevailing in Beijing. **Methods** Plasma samples were collected from the newly diagnosed HIV-1 individuals being reported during 2006 to 2008 in Beijing. Gag gene fragments were amplified from RNA template which were extracted from plasma by RT and nested PCR methods. 105 CRF01_AE sequences were analyzed by phylogenetic methods and characterized through calculating the genetic distance and Entropy analysis. **Results** There were four main sub-clusters in the phylogenetic tree. We named them as sub-clusters Homo-Max (67 sequences), Hetero (6 sequences), Mix (8 sequences) and Homo-Min (18 sequences) respectively, based on the mode of transmission. It was found that no international reference strain was closely related to the sub-cluster Homo-Max, Hetero or Homo-Min, including 91 samples. The strains in sub-cluster Mix consisting 8 cases that were closely related to the strains identified in Thailand and Vietnam. Genetic distance analysis on gag genes showed that the diversity of sub-clusters Homo-Max and Homo-Min was obviously less than that of the sub-cluster Hetero or Mix. When compared with sub-cluster Mix, there were 37, 29 and 11 significantly different nucleotides polymorphism compositions sites in sub-clusters Homo-Max Homo-Min and Hetero. **Conclusion** This was the first report describing that four main epidemic sub-clusters were existed in CRF01_AE strains prevailing in Beijing. The virus with sub-cluster Homo-Max was the dominant strain in this region with shorter period of circulation and higher proportion seen in the HIV-infected persons. The virus in sub-cluster Mix was highly homologous with the CRF01_AE strains from Thailand and Vietnam.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Subtype; Nested-PCR

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.11.007

基金项目: 国家科技重大专项(2008ZX10001-009)

作者单位: 100052 北京, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(叶景荣、曾毅); 北京市疾病预防控制中心(叶景荣、卢红艳、白立石、辛若雷)

通信作者: 叶景荣, Email: basketball197602@hotmail.com

CRF01_AE 株是最早被证实的 HIV-1 流行重组型(circulating recombinant form, CRF), 该病毒株起源于非洲而主要流行于东南亚^[1]。我国于 1994 年从曾在泰国从事性工作的云南籍妇女中首次检测到该病毒株^[2]。1996 年 Chen 等^[3]首次发现广西地区静脉吸毒和异性传播人群中存在 CRF01_AE 病毒株流行。2007 年北京地区分子流行病学调查显示 CRF01_AE 占有亚型的 30.4%, 是该地区 HIV-1 的主要流行株^[4]。本研究对北京地区 2006—2008 年新确认 HIV-1 感染者中流行的 CRF01_AE 株进行病毒基因序列系统进化分析, 以了解 CRF01_AE 株的遗传变异特征及其可能来源。

材料与方法

1. 样品来源: 将北京市疾病预防控制中心艾滋病确证中心 2006—2008 年 HIV 分子流行病学中被确定为 CRF01_AE 105 名病例纳入本研究; 经知情同意后, 用 EDTA 抗凝管采集 HIV 感染者外周静脉血, 常规离心分离血浆, 分装后 -80 °C 冻存。

2. PCR 引物和扩增条件: 设计合成扩增 gag 基因两对 PCR 引物(表 1)。用 GAG-F2 和 GAG-E2 为外侧引物进行第一轮 PCR 反应, 取 5 μl 第一轮 PCR 产物, 以 306 和 c-gag 为内侧引物进行第二轮 PCR, 扩增条件参考文献^[5]。PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳, 与 Marker 对照判定无误后, 切下特异扩增条带, 使用德国 Qiagen 公司的 Gel Extraction Kit 试剂盒进行 PCR 产物纯化, 然后用美国 Applied Biosystem 公司的 BigDye Terminator Sequencing Kit 和 ABI 377 型 DNA 测序仪测序。

3. 序列分析: 为分析流行病毒株的可能来源, 从 Los Alamos database HIV 序列数据库中下载不同国家获得的 CRF01_AE 序列作为参考序列; 用 Vector NTI 8.0 将所有的序列排列在一起, 用 BioEdit 软件进行序列自动比对, 并进行手工校正, 用 MEGA 4 软件 Neighbor-joining 法进行系统进化分析, 用 Kimura 2-parameter 法计算各亚型组内和组间离散率^[6]; 应用 Entropy 软件分析不同流行簇之间核苷酸组成差异^[7]。

结 果

1. 流行病学资料: 105 名病例来自我国 22 个省

份。其中 1 例来自泰国, 北京市户籍 33 例, 外省户籍的感染者主要为河北(10 例)、四川(8 例)和河南省(7 例), 其他省份 46 例; 男性 96 例, 女性 9 例; 年龄最小 20 岁, 最大的 62 岁, 平均 31.3 岁; 汉族 104 例, 傣族 1 例; 传播途径包括异性传播(23 例)、同性传播(71 例), 传播途径不详 11 例。CRF01_AE 病毒株感染样本的传播途径统计结果见表 2。

表 2 北京地区流行 CRF01_AE 株感染者不同户籍和传播途径分布

户籍	传播途径			合计
	异性传播	同性传播	不详	
中国北京	6(26.1)	22(31.0)	5(45.5)	33(31.4)
其他省份	17(73.9)	48(67.6)	6(54.5)	71(67.6)
泰国	-	1(1.4)	-	1(0.95)
合计	23	71	11	105

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为百分率(%)

2. CRF01_AE 的系统进化树分析: 在系统树上 105 条序列与参考株 CM240 聚集为一个大的进化簇, 基因离散率为 5.1%, 组内离散率为 4.8%, 而与其他国际参考株基因距离在 10% 以上。因此判定这 105 例样本感染的病毒均为 CRF01_AE(图 1)。大进化簇中存在 4 个亚簇。

第 1 亚簇包含 67 例样本。其中 7 例为异性传播, 53 例为同性传播, 7 例传播途径不详; 21 例来自北京市, 45 例来自其他省份, 1 例来自泰国。该亚簇内 79.1% 的病例为同性传播, 因此将这一亚簇命名为 Homo-Max 亚簇。该亚簇内无其他国家的序列, 仅有多条来源于辽宁以 05LN0903 为代表和来自江苏的 1 条序列 07JSWX045, 提示该亚簇内的病毒株可能是北京地区特有的株; 该亚簇同参考株 CM240 组间基因离散率为 5.4%, 组内离散率为 2.8%。亚簇内还存在 4 个亚亚簇, 表明这些亚亚簇内的病毒株有很近的亲缘关系或在一条传播链中。

第 2 亚簇包含 6 例样本, 均为异性传播, 北京、河北和河南省(市)户籍各 2 例, 命名为 Hetero 亚簇。该亚簇内无其他国家的序列, 与来源于辽宁(07LN187)、广西(GQ845125)和福建(Fj056)的多条序列形成一个进化簇, 提示该亚簇内的病毒株在国内流行广泛。该亚簇同参考株 CM240 组间基因离散率为 4.8%, 组内离散率为 4.2%。

第 3 亚簇内包括 8 例样本。其中 2 例为异性传播, 3 例为同性传播, 3 例传播途径不详; 2 例为北京市户籍, 内蒙古、辽宁、江西、河南和广西省(自治区)户籍各 1 例, 不详 1 例。该亚簇命名为 Mix 亚簇。其序列与 CRF01_AE 国际参考株 CM240 聚

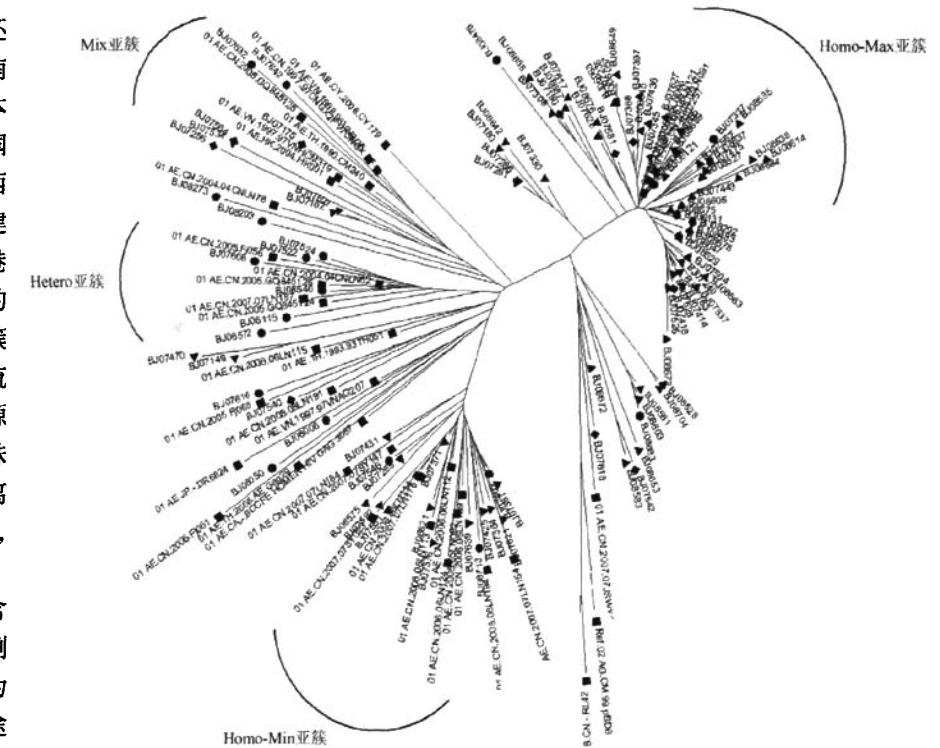
表 1 HIV-1 gag 基因扩增及测序引物

引物	序列(5' ~ 3')	用途	位置(HXB2)
Gag-F2	ATG GGT GCG AGA GCG TCA RTA TTA A R=A or G	PCR	790 ~ 814
Gag-E2	TCC AAC AGC CCT TTT TCC TAG G	PCR	2032 ~ 2011
306	GGG AAA AAA TTC GGT TAA GGC C	PCR, 测序	836 ~ 857
c-gag	TAG TTC CTG CTA TRT CAC TTC C R=A or G	PCR	1507 ~ 1486

集在一起,亚簇内还存在来源于越南(98VNBG50)、日本(JP-DR6824)、泰国(CM240)和中国广西(97CNGX2F)、福建(FJ066)、香港(HK001)不同时间的多条序列,提示亚簇内的病毒株与国际流行株存在较高的同源性。该亚簇同参考株 CM240 组间基因离散率最近,为 4.2%,组内离散率为 5.2%。

第 4 亚簇内包含 18 例样本。其中 4 例为异性传播,13 例为同性传播,1 例传播途径不详;7 例来自北京市,11 例来自其他省份。该亚簇 72.2% 的病例为同性传播感染者,病例数少于第 1 亚簇,因此命名为 Homo-Min 亚簇。该亚簇同参考株 CM240 组间基因离散率为 4.4%,组内离散率为 2.8%。该亚簇内无其他国家的序列,存在以 06LN114 为代表的多条来自辽宁地区的序列,提示该亚簇内的病毒株同辽宁地区的流行株有亲缘关系。

3. 核苷酸多态性分析:应用 Entropy 软件分析 4 个亚簇毒株的核苷酸多态性差异,结果见图 2(以 Mix 亚簇为参照,红色线条代表 2 个流行簇核苷酸分布呈显著性差异的位点)。当熵值 > 0 时,表明流行簇在该位点核苷酸组成多态性小于 Mix 亚簇。Homo-Max、Homo-Min 和 Hetero 亚簇分别有 37、29 和 11 个位点的核苷酸组成存在显著性差异。



注:进化树分析使用 Neighbor-Joining 方法;■ 参考株;● 异性传播;▲ 同性传播;◆ 传播途径不详

图 1 北京地区流行 CRF01_AE 株 gag 基因系统进化树分析

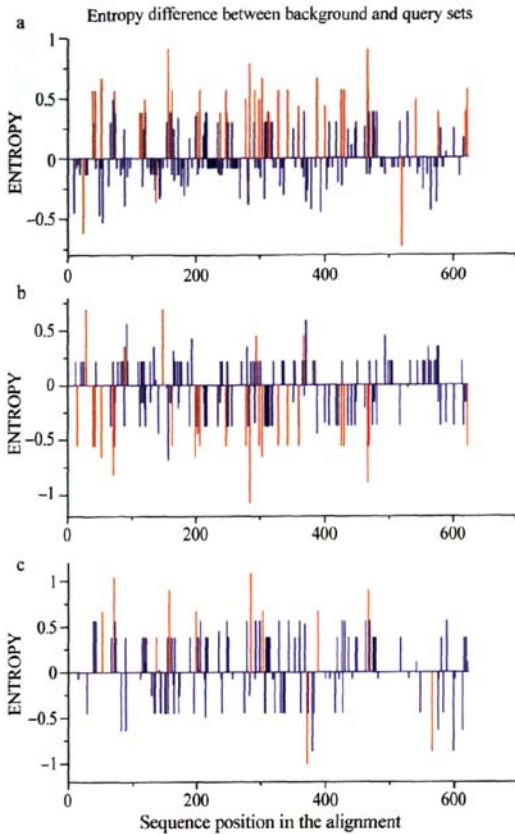
的 CRF01_AE 株在人群中所占比例不断上升,CRF01_AE 仍然是异性传播感染者中的主要亚型,在同性传播感染者中 CRF01_AE 已经超过 B 亚型^[4]。目前关于北京地区 CRF01_AE 株基因特征和来源的报道很少,本研究抽取该地区 2006—2008 年分子流行病学调查中 105 条 CRF01_AE 株的 gag 序列做系统进化分析。

结果表明,北京地区 CRF01_AE 亚型存在 4 个亚簇:分别为 2 个同性传播亚簇,1 个异性传播亚簇和 1 个混合亚簇;亚簇内包含 99 例样本,占有研究对象的 94.2%,6 例样本散在分布于 4 个亚簇以外;进化树中未见到明显的地域因素聚集现象。Homo-Max 亚簇最大,包含 63.8% 的标本,79.1% 的病例为同性传播;Homo-Min 亚簇规模稍小,包含 17.1% 的标本,72.2% 的病例为同性传播。这两个亚簇内都没有国外参考毒株,共包含 80.9% 的标本,是北京地区同性恋人群中流行的 CRF01_AE 优势株。Hetero 亚簇最小,仅包含 6 例样本,全部为异性传播,簇内没有国外参考株。Mix 亚簇规模也较小,包含 8 例样本,2 例为异性传播,3 例为同性传播,该亚簇包括多条以 CM240 为代表的 CRF01_AE 国际参考株序列。

Homo-Max、Homo-Min、Hetero 和 Mix 亚簇与

讨论

CRF01_AE 最早被命名为 E 亚型,早期的分子流行病学研究是基于短片段的序列,如 *env* 基因 C2V3 区的分析,后来基于长片段的序列分析研究表明,E 亚型实际是由 A 和 E 亚型重组而来,因此命名为 CRF01_AE,而迄今为止没有发现纯的 E 亚型。文献报道 CRF01_AE 主要流行于东南亚地区^[8],通过异性接触传播^[9]。分子流行病学研究表明,北京地区



注: a: Homo-Max 亚簇 Entropy 分析结果; b: Homo-Min 亚簇 Entropy 分析结果; c: Hetero 亚簇 Entropy 分析结果; 线段长度表示该点核苷酸多态性差异大小, 红色线条表示核苷酸多态性存在显著性差异的位点

图2 北京地区流行CRF01_AE株主要亚簇核苷酸多态性差异分析

CM240的组间离散率分别为5.4%、4.4%、4.8%和4.2%,组内离散率分别2.8%、2.8%、4.2%和5.2%,提示Homo-Max亚簇同参考株CM240亲缘关系最远,Mix亚簇最近,Homo-Max和Homo-Min簇组内离散率较小,提示这两个亚簇流行时间较短,但在本研究中,它们占有所有研究对象的比例高,特别是Homo-Max亚簇(占63.8%),表明该病毒株在传播过程中可能存在一定优势,进而在较短时间内成为北京CRF01_AE的优势病毒株。Mix亚簇组内离散率最大,流行的时间最长;Homo-Max和Homo-Min簇组内离散率相同,表明这两个亚簇几乎同时进入北京地区的同性恋人群。

CRF01_AE最早是从泰国通过异性传播传入我国,代表株为CM240,经过了近20年的流行,北京地区CRF01_AE流行株只有Mix亚簇仍然同代表株CM240具有较近的亲缘关系,其他的CRF01_AE株在进化过程中同泰国的参考株拉开了距离,成为有

北京地区特点的CRF01_AE株;泰国和越南外源性病毒株在北京地区所占的比例只有7.6%,已经被北京本土的CRF01_AE株所取代。系统分析发现北京地区CRF01_AE株存在4个主要亚簇,还有部分样本未被包含于这4个亚簇中,表明北京地区CRF01_AE株可能有4个或以上的病毒株来源,其中1个与越南和泰国来源株密切相关,这不同于我国南方四省区和浙江省关于HIV-1 CRF01_AE流行株的分子特征分析报道^[10,11],表明CRF01_AE株在不同地域不同传播途径的感染人群中流行模式有不同的特征,了解这些特征对于本地区艾滋病的预防控制将会有很大帮助。

参 考 文 献

- [1] Murphy E, Korber B, Georges-Courbot MC. Diversity of V3 region sequences of human immunodeficiency viruses type 1 from the central African Republic. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1993, 9(10):997-1006.
- [2] Cheng H, Zhang J, Capizzi J, et al. HIV-1 subtype E in Yunnan, China. *Lancet*, 1994, 334:953-954.
- [3] Chen J, Young NL, Subbarao S, et al. HIV type 1 subtypes in Guangxi province, China, 1996. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1999, 15:81-84.
- [4] Ye JR, Li Y, Bai LS, et al. Subtype and sequence analysis of *gag* genes among HIV-1 strains circulating in Beijing during 2007. *Chin J Virol*, 2009, 25(6):420-423. (in Chinese)
- [5] 叶景荣, 李洋, 白立石, 等. 北京市2007年新确认HIV-1感染者流行毒株 *gag* 基因序列测定和亚型分析. *病毒学报*, 2009, 25(6):420-423.
- [6] Ye JR, Xing H, Liu HL, et al. Subtype and sequence analysis of *gag* and *env* genes among HIV-1 strains circulating in Beijing residents during 2006. *Chin J Epidemiol*, 2007, 28(6):586-588. (in Chinese)
- [7] 叶景荣, 邢辉, 刘海林, 等. 北京市2006年HIV-1流行毒株的 *gag* 和 *env* 基因序列测定及亚型分析. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(6):586-588.
- [8] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. Molecular evolutionary genetic analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24:1596-1599.
- [9] <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy.html>.
- [10] Gao F, Bailes E, Robertson DL, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 1999, 397:436-441.
- [11] Xing H, Liang H, Wan ZY, et al. Distribution of recombinant of 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, 38:300-304. (in Chinese)
- [12] 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, 38:300-304.
- [13] Cheng CL, Feng Y, He X, et al. Genetic characteristics of HIV-1 CRF01_AE strains in four province, southern China. *Chin J Epidemiol*, 2009, 30(7):720-725. (in Chinese)
- [14] 程春林, 冯毅, 何翔, 等. 中国南方四省区流行的HIV-1 CRF01_AE病毒株基因特征研究. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(7):720-725.
- [15] Yao YP, Xin RL, He X, et al. Molecular characteristics of HIV-1 CRF01_AE strains in Zhejiang province. *Chin J Epidemiol*, 2008, 29(2):161-165. (in Chinese)
- [16] 姚亚萍, 辛若雷, 何翔, 等. 浙江省HIV-1 CRF01_AE流行株的分子特征分析. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(2):161-165.

(收稿日期:2010-09-09)

(本文编辑:张林东)