

深圳地区吸毒人群 HIV-1 分子流行病学调查

赵广录 冯铁建 王晓辉 赵锦 石向东 张燕 甘永霞 罗贤如

【摘要】 目的 了解 HIV-1 毒株亚型在深圳地区吸毒人群中的流行情况,并分析其流行趋势及进化规律。方法 收集 1996~2008 年深圳地区吸毒人群 HIV 确认阳性样本 166 例,应用巢式聚合酶链反应(nPCR)技术,对样本膜蛋白基因(*env*)进行扩增,并对其基因区核苷酸序列进行测定和分析。结果 166 份样本中共存在 CRF01_AE、CRF07_BC、CRF08_BC 3 种重组毒株以及 B'、C、A1 3 种亚型;其在所有分析样本中的比例分别为 65.06%(108/166)、19.88%(33/166)、6.02%(10/166)、7.23%(12/166)、0.60%(1/166)和 1.20%(2/166);系统进化分析发现,不同时间段 HIV-1 各亚型出现较明显的汇聚现象;3 个不同时间段所流行的 CRF01_AE、CRF07_BC 亚型组内及与标准参考株间的基因离散率有较为显著性的增大趋势。结论 深圳地区吸毒人群 HIV-1 流行毒株以 CRF01_AE 重组亚型为主,其次是 CRF07_BC 重组亚型,也存在 CRF08_BC、B'、C、A1 亚型,并且各亚型在流行过程中已发生较大变异。

【关键词】 艾滋病病毒;吸毒人群;分子流行病学

Molecular epidemiological survey on HIV-1 among the injecting drug users population in Shenzhen ZHAO Guang-lu, FENG Tie-jian, WANG Xiao-hui, ZHAO Jin, SHI Xiang-dong, ZHANG Yan, GAN Yong-xia, LUO Xian-ru. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: FENG Tie-jian, Email: tiejian.feng@gmail.com

【Abstract】 **Objective** To study the prevalent status of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) subtypes in IDU (injecting drug users) population in Shenzhen and to study their source of infection in order to predict the epidemic trend and evolution. **Methods** 166 HIV-1 positive plasma from the IDUs was collected from 1996 to 2008. HIV-1 *env* genes were amplified by nested-PCR from RNA. The C2-V3 regions (450 bp) of HIV-1 *env* were sequenced for analyses. Phylogenetic analyses were performed on the nucleotide sequence data. **Results** Among 166 samples, there were 6 HIV-1 strains including CRF01_AE, CRF08_BC, CRF07_BC 3 circulating recombinant forms (CRFs) and B', C, A1 3 subtypes. Data from the genotype analyses showed that 65.06% (108/166) were CRF01_AE, 19.88% (33/166) were CRF07_BC, 6.02% (10/166) were CRF08_BC, 7.23% (9/166) were subtype B', 0.60% (1/166) were subtype C and 1.20% (2/166) were subtype A1. Phylogenetic tree analysis showed that some of HIV-1 clusters defined in CRF01_AE, CRF07_BC and subtype B' in different time groups. Significant increase of gene distance in CRF01_AE and CRF07_BC strains in the three different periods. **Conclusion** CRF01_AE and CRF07_BC were the major epidemic CRF strains among the IDU population in Shenzhen while the subtype B', C, A1 and CRF08_BC were also circulating in IDU population in this region. The variation of all different subtypes was increasing through these years.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Injecting drug users; Epidemiology, molecular

HIV 的一个重要生物学特征是基因的高度变异;HIV-1 型病毒又可分为 M、O 和 N 组。M 组是全球主要流行的病毒株,又可分为 9 个亚型。随着对 M 组病毒研究的进一步深入,又发现了不同亚型以及同一亚型不同毒株间的基因重组现象,称之为流

行重组形式(CRFs),共分为 34 种^[1-5]。HIV-1 *env* 基因的 V3~V4 区及其临近区域特别是 V3 环是主要中和抗体决定簇和辅助受体的结合部位。因此,*env* 区的基因序列特别是 V3~V4 区及其临近的基因变异成为研究 HIV-1 分型的重要依据^[6]。自深圳地区 1996 年在吸毒人群中检出 HIV 感染者^[7],静脉吸毒成为 HIV 主要传播途径^[8]。本研究对深圳地区吸毒者中流行的 HIV-1 亚型分布,及其不同亚型在吸毒者人群中的流行规律和进化趋势进行分析。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.11.010

作者单位:518020 深圳市疾病预防控制中心艾滋病防治科

赵广录、冯铁建工作单位:518020 深圳市慢性病防治中心

通信作者:冯铁建, Email: tiejian.feng@gmail.com

对象与方法

1. 研究对象及样本: 根据 1996 - 2008 年每年吸毒人群 HIV-1 感染者在所有感染者中所占的比例及流行趋势, 按照单纯随机抽样的方法从深圳市疾病预防控制中心各年份样本库中抽取 10% 吸毒感染者样本共 166 例, 样本均经初筛实验 (晒标, PA 或 ELISA) 和 WB 确认实验证实为 HIV-1 抗体阳性样本作为研究对象, 每份样本均有国家执行的网络直报编号, 并对每份样本进行详细的流行病学个案调查, 防止同一人不同年份的样本重复出现的可能。166 例 HIV 感染者中, 男性 118 例 (71.1%), 女性 48 例 (28.9%)。每例对象采集静脉血 3 ~ 5 ml, EDTA 抗凝 (1.5%), 分离血浆, 分装, -70 °C 冻存备用。根据 1996 - 2008 年深圳地区各年份检出的吸毒者 HIV-1 感染例数及所占比例, 将其分 1996 - 1999 年 (吸毒人群感染占 38.9%)、2000 - 2005 年 (吸毒人群感染占 57.4%) 和 2006 - 2008 年 (吸毒人群感染占 39.2%) 三个阶段进行分析比较。

2. 病毒 RNA 提取: 使用 QIAamp Viral RNA extraction Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), 按说明书操作步骤提取研究对象的 HIV-1 RNA, 巢式 PCR 扩增蛋白基因 (*env* 基因) 片段, 扩增引物及条件具体参见文献 [9]。

3. PCR 产物鉴定和核苷酸序列测定: PCR 产物经 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定无误后。用 207 作为测序引物, 取 1 μl PCR 产物作为模板, 用 ABI 公司荧光标记末端终止物循环测序试剂盒 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) 进行测序反应。反应产物经 ABI PRISM®3130xl 测序仪进行序列测定。

4. 亚型测定和序列系统树分析: 测定后的序列 (除去引物段序列) 与 HIV-1 参考株进行比较分析, 判断出亚型结果。后用 ABI 公司的 SeqEdit 软件进行编辑、校正, 然后用 GCG 公司软件和 Mega 3.0 软件对序列进行比较和同源性分析, 将排列、校正后的序列和国际标准参考序列用 Pileup、Pretty 和 Clustal 等软件进行排列和比较, 并用 Mega 软件绘制系统进化树, 用双参数算法法进行基因离散率的计算。

结 果

1. HIV-1 亚型分布: 在 166 份样本中共存在 CRF01_AE、CRF07_BC、CRF08_BC 3 种重组毒株以及 B'、C、A1 3 种亚型, 各亚型在人群中的分布见表 1。

2. HIV-1 亚型传播途径分布特点: 1996 - 1999

表 1 1996 - 2008 年深圳地区吸毒人群中 HIV-1 各亚型的分布

| HIV-1 亚型 | 例数 | 构成 (%) | HIV-1 亚型 | 例数 | 构成 (%) |
|----------|-----|--------|----------|-----|--------|
| CRF01_AE | 108 | 65.06 | C | 1 | 0.60 |
| CRF07_BC | 33 | 19.88 | A1 | 2 | 1.20 |
| CRF08_BC | 10 | 6.02 | 合计 | 166 | 100.00 |
| B' | 12 | 7.23 | | | |

年主要流行的是 CRF01_AE 和 CRF07_BC 重组株和 B' 亚型, 分别占有所有样本分析数的 42.86%、28.57% 和 28.57%。2000 - 2005 年主要流行的是 CRF01_AE、CRF07_BC、CRF08_BC 重组株和 B' 亚型, 分别占有所有样本分析数的 56.45%、19.35%、12.90% 和 9.68%; 在这个时间段发现 1 例 C 亚型。2006 - 2008 年主要流行的是 CRF01_AE、CRF07_BC 重组株, 占有所有样本分析数的 74.44% 和 18.89%; 在这个时间段 B'、CRF08_BC 和 A1 亚型各发现 2 例。从同一重组株或亚型在不同时间段的分布来看, 重组株 CRF01_AE 由 1996 - 1999 年所占的 42.86% 到 2000 - 2005 年所占 56.45%, 再到 2006 - 2008 年所占 74.44%, 可以看出该重组株在吸毒者人群所占的比例有逐渐增大的趋势 (表 2)。

3. HIV-1 各亚型毒株 *env* 基因区系统树分析: 深

表 2 深圳地区吸毒人群三个不同时间段 HIV-1 各亚型的分布

| HIV-1 亚型 | 1996 - 1999 年 | 2000 - 2005 年 | 2006 - 2008 年 | 合计 |
|----------|---------------|---------------|---------------|-----|
| CRF01_AE | 6(42.86) | 35(56.45) | 67(74.44) | 106 |
| B' | 4(28.57) | 6(9.68) | 2(2.22) | 12 |
| CRF07_BC | 4(28.57) | 12(19.35) | 17(18.89) | 33 |
| CRF08_BC | 0(0) | 8(12.90) | 2(2.22) | 10 |
| C | 0(0) | 1(1.62) | 0(0) | 1 |
| A1 | 0(0) | 0(0) | 2(2.22) | 2 |
| 合计 | 14(100.00) | 62(100.00) | 90(100.00) | 166 |

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为百分比 (%)

圳地区吸毒人群流行的 CRF01_AE 亚型毒株与代表株 01AE1.CN.97.97CNGX2F (中国株) 和 01AE.TH.90.CM240 (泰国株) 有较明显的亲缘关系, 而远离 01AE1.CF.90.90CF11697 和 01AE.CF.90.90CF402 非洲株。另外从系统树同样可以看出不同时间段吸毒人群中流行的 HIV-1 各亚型出现较为明显的汇聚现象; CRF01_AE 亚型在 2000 - 2005 年和 2006 - 2008 年均出现 7 例基因汇聚簇 (簇 I、簇 II); CRF_BC 亚型在 2006 - 2008 年出现 9 例基因汇聚簇 (簇 III); 在 1996 - 1999 年出现 4 例 B' 亚型基因汇聚簇 (簇 IV)。该样本具有较高的同源性, 他们自成一簇, 并且在系统树上分支较短, 显示出较近的进化关系 (图 1)。

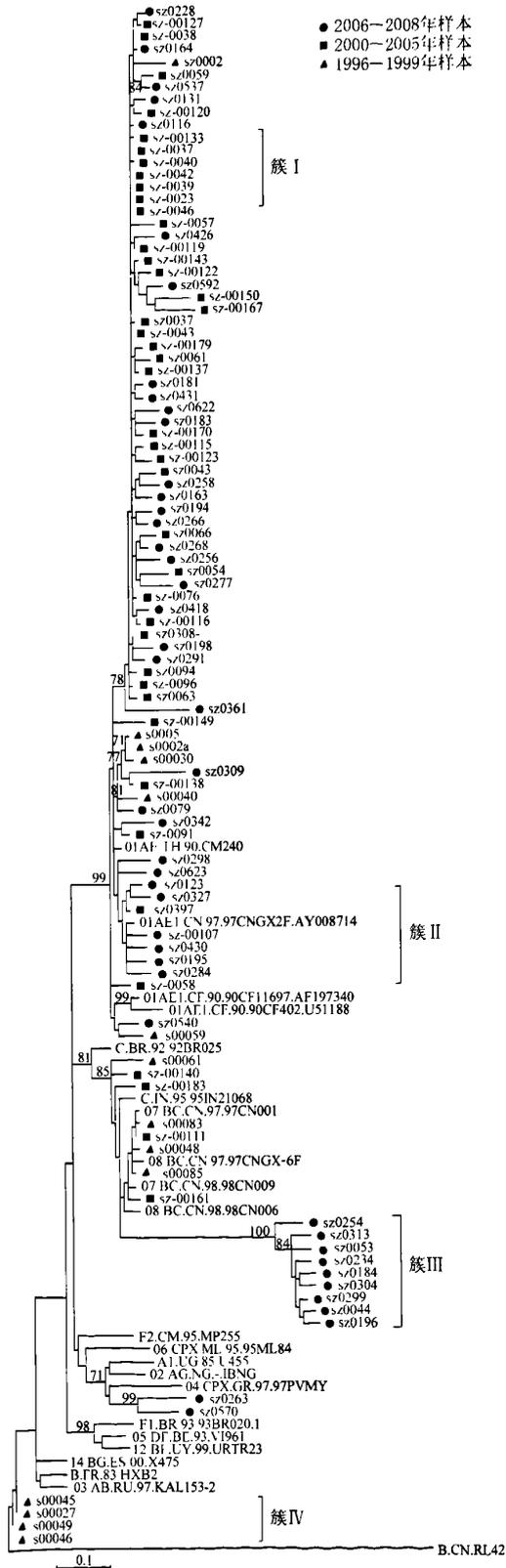


图1 深圳地区吸毒人群中三个时间段 HIV-1 各亚型毒株 *env* 基因区系统树

4. 不同重组株基因离散率进化分析:以 1996 - 1999 年、2000 - 2005 年、2006 - 2008 年均发现的 CRF01_AE 和 CRF07_BC 重组株为例,分析比较不同时间段基因离散率的不同,表 3 显示,CRF01_AE 重组株中不同时间段组内的基因离散率是逐渐增大的,即随着时间的增加该重组株的变异性逐渐增大。

表3 深圳地区吸毒人群中三个时间段流行的 CRF01_AE 重组株基因离散率(%)

| 年份 | 组内离散率 | 与参考株 01_AE.TH.90.CM240 间离散率 |
|-------------|---------------|-----------------------------|
| 1996 - 1999 | 5.930 ± 3.205 | 5.400 ± 1.483 |
| 2000 - 2005 | 6.120 ± 5.278 | 5.869 ± 2.783 |
| 2006 - 2008 | 9.755 ± 3.118 | 9.679 ± 1.784 |

同样,表 4 显示,在 CRF07_BC 重组株中,组内基因离散率在 3 个时间段呈逐渐增加趋势;可以明显地看到,随着时间的增加该重组株的变异性逐渐增大。由于其他亚型和重组株没有在 3 个不同的时间段连续发现,因此暂不做离散率变化的分析比较。

表4 深圳地区吸毒人群中的三个时间段流行的 CRF07_BC 重组株基因离散率(%)

| 年份 | 组内离散率 | 与参考株 07_BC.CN.97.97CN001 间离散率 |
|-------------|---------------|-------------------------------|
| 1996 - 1999 | 6.567 ± 3.999 | 4.325 ± 4.188 |
| 2000 - 2005 | 7.444 ± 2.297 | 5.122 ± 2.144 |
| 2006 - 2008 | 8.000 ± 1.030 | 5.767 ± 1.665 |

讨论

通过对深圳地区吸毒人群中流行的 HIV-1 亚型的研究,共发现 B'、C、A1 三种亚型以及 CRF01_AE、CRF07_BC、CRF08_BC 三种重组毒株,亚型分布呈多样化,其中 CRF01_AE 占整个人群的 65.06%,CRF07_BC、CRF08_BC 分别占整个人群的 19.88%、6.02%,B' 亚型占整个人群的 7.23%,C 和 A1 分别发现 1 例和 2 例。可以看出在深圳地区吸毒人群中 CRF01_AE 是最主要的流行毒株,其次是 CRF_BC 重组株,这与广东省珠江三角洲吸毒人群中流行的 HIV-1 亚型的格局有所不同,广东省珠江三角洲吸毒人群中流行的 HIV-1 毒株以 CRF07_BC 重组株为主,也存在 CRF01_AE 和 CRF08_BC 重组株、泰国 B 亚型^[10]。

本次研究所发现在吸毒人群中主要流行株 CRF01_AE 即是过去的 E 亚型,由于 *gag* 区全是 A 亚型,因此整个毒株序列为 AE 重组亚型^[11]。研究发现的 CRF07_BC 和 CRF08_BC 两种 BC 重组亚型都是以 C 亚型毒株为框架,泰国 B 亚型毒株片段在不同位点插入^[12,13]。C 亚型最早于 1992 - 1993 年在云

南省内发现,与印度 C 亚型非常接近,随后几年该亚型由吸毒途径迅速传播到中国的南部、中部和西北部。全国范围的 HIV 分子流行病学研究发现 BC 重组株在传播过程中逐步取代了 B' 和 C 亚型毒株^[14],从本研究的结果来看,CRF_BC 重组株共占有亚型的 25.90%(43/166),C 亚型占有亚型的 0.60%(1/166),可以证实深圳地区吸毒人群中存在 BC 重组株取代 C 亚型的情况。

系统进化树分析结果表明,HIV-1 各亚型流行株在吸毒人群中出现较明显的基因簇现象,它们成为一个相对独立的一簇,可以看出簇中的人群在感染过程中有较密切的关系,他们可能是一个群体间的相互感染;对出现该现象的群体进行流行病学个案调查发现,该群体中存在共用注射器吸毒的现象,这有助于寻找该人群的传染源,控制传播途径,对制定本地区的艾滋病防治策略具有重要的参考依据。

从吸毒人群中不同亚型的离散率来看,CRF01_AE 和 CRF_BC 重组株在吸毒人群中流行时间较长,按照 HIV 毒株每年 0.5%~1.0% 的变异率,AE 重组株在深圳地区流行时间大约是 9~18 年,BC 重组株约是 8~16 年,可以初步推断 AE 重组株在深圳吸毒人群中开始流行的时间要略早于 BC 重组株流行的时间。从两个不同重组株离散率的进化比较来看,BC 重组毒株在流行过程中变异要比 AE 重组株稍小,这一特点可能与之前研究发现的在本地区 AE 重组株较 BC 重组株在不同途径传播的人群中流行分布广泛有一定的关系^[7,15]。

本次研究发现三类重组亚型 CRF01_AE、CRF07_BC、CRF 08_BC 毒株占有亚型的 90.69%(151/166),这说明重组毒株具有更强的传播优势。随着近年来深圳地区对吸毒人群的干预,由吸毒途径感染 HIV-1 的比例略呈现下降趋势,从 HIV-1 各亚型在吸毒人群中的流行趋势来看,亚型越来越集中于 AE 重组株,其他亚型所占的比例有减少的趋势,可能与 AE 重组毒株的生物学活性有关,亦可能与高危人群中高危行为交互混杂所致,在性传播人群中为主要流行株的 AE 重组株逐步扩散至其他人群,并成为主要流行株。产生这一现象的具体原因有待对本地区 AE 重组毒株的生物学活性并结合该人群的

流行病学资料进行进一步分析。

参 考 文 献

- [1] Simon F, Mauciere P, Roques P, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*, 1998, 4: 1032-1037.
- [2] Ayoub A, Souquieres S, Njunku B, et al. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive Individuals in Cameroon. *AIDS*, 2000, 14: 2623-2625.
- [3] Takebe Y, Kusagawa S, Motomura K. Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS pandemic. *Pediatr Int*, 2004, 46: 236-244.
- [4] Thomson MM, Najera R. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev*, 2005, 7: 210-224.
- [5] Los Alamos Laboratory: The circulating recombinant forms (CRFs), 2007. <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>.
- [6] 杰伊·利维. 艾滋病病毒与艾滋病的发病机制. 2 版. 邢一鸣, 张健慧, 译. 北京: 科学出版社, 2000: 146-156.
- [7] 冯铁建, 李良成, 何建凡, 等. 1988-1998 年深圳市艾滋病流行病学分析. *中国艾滋病性病*, 2000, 6(2): 100-103.
- [8] 陶晓燕, 冯铁建, 石向东, 等. 深圳地区吸毒人群 AIDS 流行状况及相关危险因素分析. *中国艾滋病性病*, 2004, 10(5): 341-342.
- [9] 赵广录, 冯铁建, 赵锦, 等. 深圳地区男男同性恋人群中 HIV-1 分子流行病学研究. *中国艾滋病性病*, 2008, 14(2): 137-141.
- [10] 颜瑾, 王玉, 李杰, 等. 广东省珠江三角洲地区吸毒者中流行的 HIV-1 ENV 基因序列分析. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2006, 20(3): 223-225.
- [11] Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, et al. Recombination in HIV-1. *Nature*, 1995, 374: 124-126.
- [12] Ling S, Craff MC, Zhang YZ, et al. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (CB') recombinant strain in China. *J Virol*, 2000, 74: 11367-11376.
- [13] Piyasirisilp S, McCutchan FE, Carr JK, et al. A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J Virol*, 2000, 74: 11286-11295.
- [14] 陆彬, 邢辉, 赵全璧, 等. 我国 HIV-1 B'/C 重组流行株 Tat 蛋白的表达、纯化及功能分析. *病毒学报*, 2002, 18(2): 297-302.
- [15] 冯铁建, 赵广录, 陈琳, 等. 深圳市 HIV-1 毒株的流行状况. *中国医学科学院学报*, 2006, 28(5): 637-641.

(收稿日期: 2009-04-28)

(本文编辑: 尹廉)