

· 临床论著 ·

哈尔滨市男男同性恋HIV-1感染者env基因V3环
序列分析

刘婷 邵冰 李文静 崔文秀 李航 杜鑫 王永革 王滨有 王福祥

【摘要】 目的 了解哈尔滨市感染HIV的男男同性恋者(MSM) HIV-1 亚型分布状况, 以及env基因V3环序列变异情况。 **方法** 采用巢氏PCR扩增HIV-1 env基因 V3~V4区并对扩增产物进行测序, 利用MEGA、BioEdit软件进行基因序列整理和分析。 **结果** 哈尔滨市28例MSM人群HIV-1感染者基因型分布为CRF01-AE 18例(64.29%), CRF07-BC 3例(10.71%), B亚型5例(17.86%)和B' (Thailand B) 2例(7.14%), V3环顶端4肽以GPGQ为主14例(50.00%), GPGR 5例(17.86%), GWGR 3例(10.71%)。27例被预测为使用CCR5作为辅助受体, 1例不可预测使用何种受体, 没有被预测为使用CXCR4作为辅助受体的感染者。 **结论** 哈尔滨市MSM 感染HIV-1以CRF01-AE为主, V3环顶端的4肽呈现多态性但以GPGQ为主。HIV-1主要为以CCR5作为辅助受体的巨细胞嗜性毒株。

【关键词】 男男同性恋; env基因; V3环

Sequence analysis on V3 loop of env gene among men who have sex with men with HIV-1 infection in Harbin LIU Ting*, SHAO Bing, LI Wen-jing, CUI Wen-xiu, LI Hang, DU Xin, WANG Yong-ge, WANG Bin-you, WANG Fu-xiang. *Center for Diseases Control and Prevention of Harbin, Harbin 150056, China
Corresponding author: WANG Fu-xiang, Email: wangfuxiang999@163.com

【Abstract】 Objective To identify HIV-1 subtypes and sequence variation of env gene V3 loop among men who have sex with men (MSM) in Harbin. **Methods** V3-V4 area of HIV-1 env gene was amplified by nested-PCR, and the subsequent products were carried out for sequencing. Mega and BioEdit software were applied to sort and analyze gene sequences. **Results** The main HIV subtypes among MSM in Harbin City were CRF01-AE (64.29%, 18/28), following by subtype B (10.71%, 5/28), CRF07-BC (10.71%, 3/28) and B' (Thailand B) (7.14%, 2/28). The four main peptide sequences in the top of V3 loop of env gene were GPGQ (50.00%, 14/28), GPGR (17.86%, 5/28) and GWGR (10.71%, 3/28). Total of 27 cases were predicted to take CCR5 as auxiliary receptor. No case was predicted to take CXCR4 as auxiliary receptor. **Conclusions** CRF01-AE was the main HIV genotype among MSM in Harbin. Four peptide sequences in the top of V3 loop was polymorphic, with GPGQ as the main type. HIV-1 strains mainly take CCR5 as auxiliary receptor and showed tropism of cytomegalovirus.

【Key words】 Men who have sex with men; env gene; V3 loop

根据2012年11月28卫生部通报的我国AIDS疫情状况, 2012年1至10月新报告HIV感染者和患者共68802例; 较去年同期分别增加12.8%和20.2%。截至2012年10月底, 全国累计报告HIV感染者和患者492 191例, 存活的感染者和患者383 285例。当前我国艾滋病疫情以性途径传播为主, 男男性传播

(men who have sex with men, MSM) 比例显著上升。2012年1~10月报道的HIV感染者中经性途径传播者占84.9% (2011年同期为77.9%), 其中男男性传播占21.1% (2011年同期为15%)^[1]。有报道哈尔滨MSM人群中, HIV感染率由2006年的1.0%增长到2010年的7.5%^[2]。MSM人群具有多种高危行为, 并有可能通过与其他人群接触, 使其成为传播艾滋病的“桥梁”人群。分析MSM人群中流行的HIV基因亚型以及基因变异情况, 对于开展针对MSM这一高危人群的艾滋病预防与治理措施具有重要意义。以往对于哈尔滨市MSM人群的HIV分子流行病

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.04.024

基金项目: 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目 (No. 2010RFQSQ088)

作者单位: 150056 哈尔滨市, 哈尔滨市疾病预防控制中心 (刘婷、崔文秀、杜鑫、王永革); 哈尔滨医科大学公共卫生学院流行病教研室 (邵冰、李航、王滨有); 哈尔滨医科大学附属第四医院感染科 (李文静、王福祥)

通讯作者: 王福祥, Email: wangfuxiang999@163.com

第一作者: 刘婷和邵冰为共同第一作者

学调查尚未见报道。本文对哈尔滨市MSM人群中HIV-1的env基因进行测序分析,以了解当地MSM人群中的HIV的流行及基因变异情况。

资料与方法

一、研究对象和方法

2011年哈尔滨市经Western blot分析确认感染HIV-1且未经过抗病毒药物治疗的男男同性恋感染者28例。采集外周静脉全血3~5 ml, 0.15% EDTA抗凝, Ficoll法分离PBMC后, 用QIAamp Viral DNA Mini Kit (德国Qiagen公司) 提取基因组DNA, 并询问采血对象的年龄、居住地等信息。并对感染者CD4⁺ T淋巴细胞计数进行检测。

本研究采用横断面调查的方法, 调查前向调查对象充分说明调查目的, 并告知将严格保守感染者的信息, 取得感染者本人同意并签署知情同意后采集其血液标本进行检测。

二、反应条件

首轮PCR反应体系: 采用Nested-PCR方法扩增HIV-1 env基因的V3~V4区, 引物由上海生工生物技术有限公司合成, 以ED3和ED12为外侧引物, Env7和Env8为内侧引物进行PCR扩增。第一轮反应条件: 94 ℃ 2 min, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min 30 s, 1个循环; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30个循环。第2轮反应条件同第1轮。

三、产物纯化及测序

env基因的PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳, 在668 bp处出现明显的目标条带, 用QIAGEN公司QIA quick gel extraction kit切胶纯化。将获得的PCR产物送至北京Invitrogen公司进行测序, 目标片段为HIV-1的env基因V3~V4区。

四、序列分析

测得的序列经Sequencer 4.9软件进行整理与拼接, 并进行序列校对、整理和比对分析。参考HIV-1国际参考株序列, 用MEGA 5.05软件以Neighbor-joining法绘制系统进化树, 用Distance选

项计算各亚型组内基因距离。BioEdit 7.0软件将V3环序列翻译成相应的氨基酸, 以确定顶端4肽类型。各亚型参考株均来源于美国Los Alamos HIV基因序列数据库。

结 果

一、系统进化分析

28例成功测序的感染者, 年龄17~70岁, 平均(36.1 ± 11.2)岁, 治疗前CD4⁺ T淋巴细胞计数中位数为239细胞/μl, 其中CD4⁺ T淋巴细胞计数> 200/μl的15例, 占53.57%。系统进化树如图1所示: 28个样本中有18例为CRF01-AE (64.29%), 3例CRF07-BC (10.71%), B亚型5例 (17.86%) (经Blast证实为欧美B亚型), B' (泰国B亚型) 2例 (7.14%)。哈尔滨市MSM人群中HIV-1流行亚型以CRF01-AE为主, 其组内基因离散率为(12.20 ± 0.84)%, 其中2株B' (Thailand B)的组内基因离散率最大(23.23 ± 2.35)%, 见表2。

二、env基因V3环顶端4肽分布及受体预测

V3环顶端为最重要的中和抗体决定簇由特征性4肽组成。不同基因亚型毒株4肽存在不同的变异型。28例HIV-1感染者中14例(50%)呈现GPGQ, 5例(17.86%)呈现GPGR, 3例(10.71%)呈现GWQR, 1例为GPGK, 1例为GHVG, 1例GLGP, 1例GPGH, 2例GPGX (图2)。根据V3环11和25位同时被精氨酸(R)和谷氨酰胺(Q)所替代情况预测病毒的辅助受体, 28例HIV-1感染者中, 仅HLJ10 V3环第11位G被R取代, 不能预测其使用了何种受体, 其余均以CCR5作为辅助受体, 未预测到以CXCR4作为辅助受体的HIV-1感染者。

讨 论

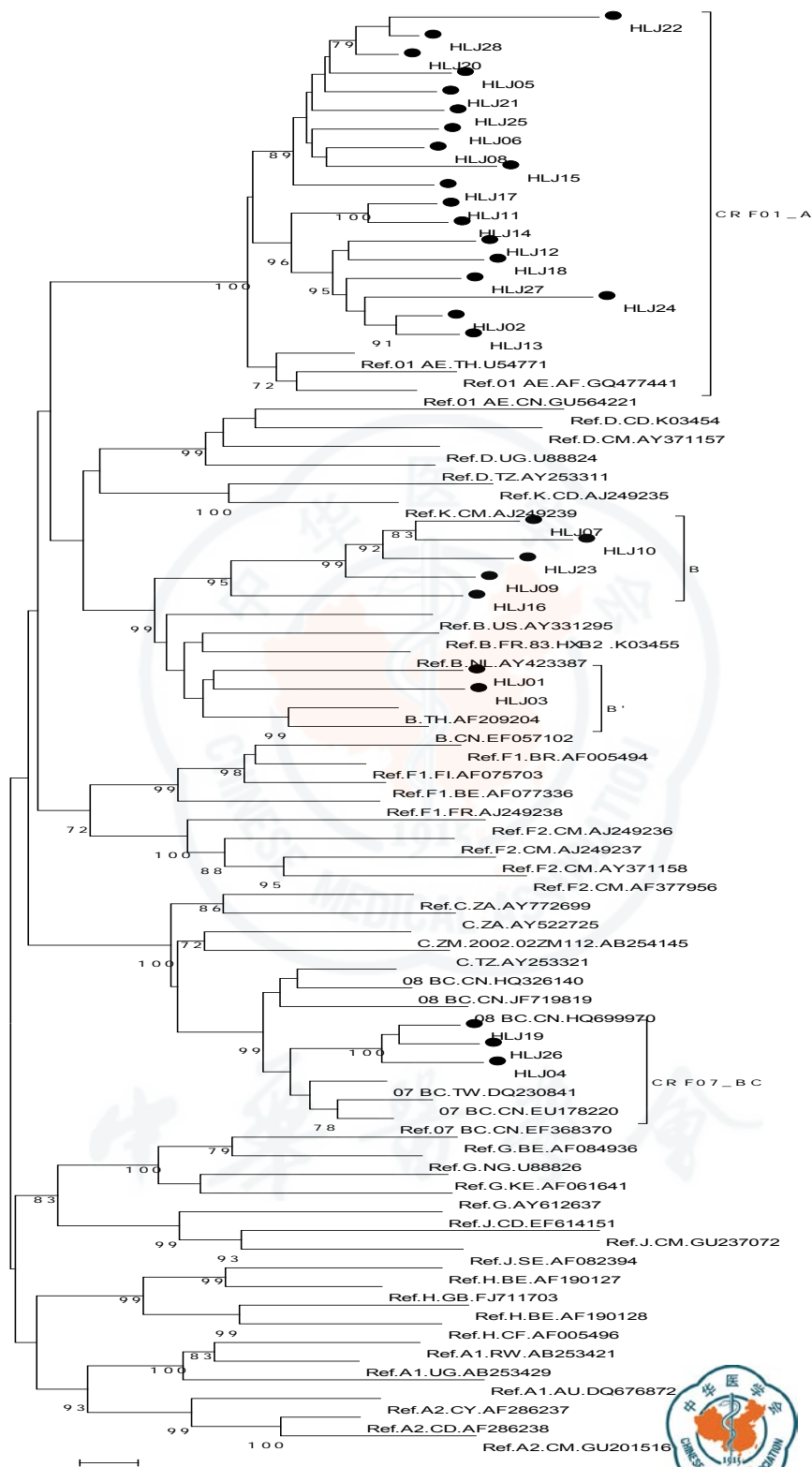
HIV具有高度变异性, 主要原因为反转录过程中的逆转录酶无校正功能且在复制时不能及时清除

表1 env基因 V3~V4区引物序列及位置

名称	序列 (5' → 3')	位置 (HXB2)	扩增片段长度 (bp)
ED5 正向	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG	6557~6582	1255
ED12 反向	AGTGCTTCCTGCTGCTCCCA	7811~7792	(外侧)
Env7 正向	CTGTATAATGGCAGTCTAGC	7002~7021	668
Env8 反向	CACTTCTCCAATTGTCCCTCA	7668~7648	(内侧)

表2 哈尔滨市男男同性恋者HIV-1 基因亚型分布及组内基因离散率

各亚型	例数	平均年龄 (岁)	构成比 (%)	基因离散率 (%)
CRF01-AE	18	36	64.29	12.20 ± 0.84
CRF07-BC	3	35	10.71	5.92 ± 0.81
B	5	35	17.86	13.32 ± 1.10
B'	2	40	7.14	23.23 ± 2.35



注: bootstrap值>70%者被显示

图1 28例感染HIV-1的MSM env基因的系统进化树分析



图2 28例感染HIV-1的MSM env基因V3环顶端四肽分布

错配的核苷酸,以及宿主免疫选择而发生随机变异。基因突变是HIV-1亚型形成的生物学基础,但基因重组也可导致HIV-1基因变异。当人体同时感染多亚型的HIV-1毒株时,不同亚型毒株间可能发生基因重组。CRF01-AE最初流行于东南亚地区,在泰国商业性性服务者中广泛传播。而此次在哈尔滨市MSM人群中也发现CRF01-AE且为主要流行株,提示CRF01-AE可能已经在中国MSM人群中广泛传播。CRF01-AE既往主要流行于与异性接触的人群中,而CRF07-BC主要存在于静脉注射吸毒(intravenous drug users, IDUs)人群^[3-4],这说明哈尔滨市MSM人群可能同时存在多种危险行为,而这些危险行为的发生又为HIV在MSM和其他人群中的传播拓宽了渠道。此次调查发现的HIV亚型中以B' (Thailand B)的组内基因离散率最大,而CRF01-AE和B亚型基因离散率接近,CRF07-BC最小,推测B'可能在本地地区流行时间最长,而CRF07-BC流行时间则相对较短。本次在哈尔滨市MSM人群中发现的HIV-1亚型与中国其他地区如深圳、四川和北京等地流行的主要亚型接近^[5-7],主要以CRF01-AE、CRF07-BC、B型为主要流行株。因此,推测目前中国MSM人群中可能以这3种亚型为主。

此外,哈尔滨市MSM人群中CRF01-AE亚型形成两个独立的进化簇,与辽宁省报道的MSM人群中的结果一致^[8]。根据其39条近全长HIV序列的分析结果,辽宁CRF01-AE的两个独立进化簇均起源于泰国,之后进入中国并在MSM人群间传播。其中一簇可能沿着中国东南沿海省份进入中国东北部地区。推测此次哈尔滨市发现的两个独立进化簇可能是由离黑龙江省较近的辽宁省MSM人群传入。

在HIV所编码的各种蛋白质中, gp120变异程

度最高,根据对env基因及gp120氨基酸序列分析,将其划分为5个可变区(v1~v5),多暴露在gp120分子表面并被保守区(C1~C4)所间隔^[9]。V3区含有主要中和抗体决定簇,其顶端4肽存在不同变异型,此次在哈尔滨MSM中发现的各亚型中有50%感染者V3环顶端4肽为GPGQ,此外还存在GPGQ (17.86%)和GWQR (10.71%),以及少量其他变异型,这比之前黑龙江省所报道的在感染HIV的普通人群中的4肽类型增多^[10],表明V3环4肽类型正随着时间发生漂移。V3环是决定HIV CCR5/CXCR4辅助受体生物学特性的重要区域。若V3环11和25位同时被精氨酸(R)和谷氨酰胺(Q)所替代,HIV-1将以CXCR4作为辅助受体进入细胞,呈T细胞嗜性;若未被R/Q同时替代,则以CCR5作为辅助受体,呈巨噬细胞嗜性,若单一位点被替代,则不可预测其辅助受体^[11]。当HIV为T细胞嗜性时,相对巨噬细胞嗜性会加快艾滋病病程发展。本次在哈尔滨市调查的MSM人群中HIV-1感染者均以CCR5为主要辅助受体,未发现以CXCR4为辅助受体的感染者,由此推测在哈尔滨市的MSM人群中主要为巨噬细胞嗜性毒株,这或许可为针对本地区MSM人群诊断试剂及HIV疫苗的研究提供依据。加强对MSM高危人群中流行的HIV毒株变异情况的监控,从而及时采取必要措施阻止HIV由该人群向其他人群的扩散,对控制艾滋病疫情进展具有重要意义。

参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部. 我国艾滋病防治工作进展情况.
- 2 Wang K, Yan H, Liu Y, et al. Increasing prevalence of HIV and syphilis but decreasing rate of self-reported unprotected anal intercourse among men who had sex with men in Harbin, China: results of five consecutive surveys from 2006 to 2010. *Int J Epidemiol*, 2012, 41(2): 423-432.
- 3 Guo D, Ding N, Xu Y, et al. Near full-length genome characterization of an HIV-1 CRF01_AE strain in Jiangsu, China: evidence of two independent introductions from Fujian. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2009, 25(6): 619-623.
- 4 He X, Xing H, Ruan Y, et al. A comprehensive mapping of HIV-1 genotypes in various risk groups and regions across China based on a nationwide molecular epidemiologic survey. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47289.
- 5 刘志英, 李海英, 张彤, 等. 北京市部分男男同性恋人群中HIV-1分子流行病学研究. *首都医科大学学报*, 2009, 30(5): 616-620.
- 6 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.
- 7 袁丹, 冯燎, 奚竞婧, 等. 四川省77名男男性行为人群HIV-1分子流行病学研究. *中国艾滋病性病*, 2011, 4: 410-413, 447.
- 8 An M, Han X, Xu J, et al. Reconstituting the epidemic history of HIV strain CRF01_AE among men who have sex with men (MSM) in Liaoning, northeastern China: implications for the expanding epidemic among MSM in China. *J Virol*,

- 2012,86(22):12402-12406.
- 9 王洪军, 王继群, 胡玲美. HIV的基因结构与功能及致病机理. 细胞生物学杂志, 2002, 24(6): 334-338.
- 10 周慧, 王福祥, 凌虹, 等. 黑龙江省17例HIV/AIDS患者的病毒亚型及基因序列特征分析. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(7): 619-622.
- 11 罗皓, 梁浩, 邵一鸣, 等. 广西HIV-1 CRF01-AE重组毒株env基因V3环序列变异及其与生物表型的关系. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(12): 1092-1095.
- (收稿日期: 2013-03-05)
(本文编辑: 温少芳)
- 刘婷, 邵冰, 李文静, 等. 哈尔滨市男男同性恋HIV-1感染者env基因V3环序列分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(4): 566-570.



中华医学会