

· 临床论著 ·

哈尔滨市男男同性恋 HIV-1 感染者 gag 区基因分析

孙冬莹¹ 邵冰² 张春蕾³ 李春兰⁴ 杜娟⁵ 宋波⁴ 林元龙⁴李庆海⁶ 岳超⁶ 金刚⁶ 刘树林⁶ 王滨有¹ 王福祥⁴

【摘要】目的 了解哈尔滨市男男同性恋者 (MSM) 感染 HIV-1 流行株的亚型分布状况及基因变异情况。**方法** 采集 MSM 人群中 HIV 感染者血液标本, 提取病毒 RNA 并应用巢式聚合酶链反应 (nested-PCR) 对 HIV 病毒 gag 区基因进行扩增, 并对扩增产物测序。Mega 5.1 软件进行系统进化树分析及基因离散距离的计算, BioEdit 7.0.0 软件将相应的基因序列翻译成氨基酸并分析其变异情况。**结果** 成功获得 61 条 gag 基因序列, 亚型分析结果显示, CRF01_AE 49 例 (80.32%), CRF07-BC 5 例 (8.19%), B 亚型 7 例 (11.47%)。其中 B 亚型基因离散距离最大 (0.078 ± 0.005), CRF01_AE 最小 (0.051 ± 0.004)。CRF01_AE 在 MSM 人群中形成两个独立的进化簇。各亚型的 MHR 序列变异对比结果显示, B 亚型的中 MHR 序列中第 7 位缬氨酸 (V) 突变为异亮氨酸 (I) 的比例最大。**结论** 哈尔滨市 MSM 人群中主要存在 CRF01-AE、CRF07-BC 和 B 三种亚型, 以 CRF01-AE 为主要流行亚型; 其中 B 亚型基因变异程度最大。对 MSM 人群 HIV-1 流行及变异情况的监测有助于对 MSM 人群开展及时有效的治疗。

【关键词】 男男同性恋; gag 基因; HIV-1 亚型

Analysis on the characteristics of HIV-1 gag gene among men who have sex with men living with HIV-1 in Harbin City SUN Dongying¹, SHAO Bing², ZHANG Chunlei³, LI Chunlan⁴, DU Juan⁵, SONG Bo⁴, LIN Yuanlong⁴, LI Qinghai⁶, YUE Chao⁶, JIN Gang⁶, LIU Shulin⁶, WANG Binyou¹, WANG Fuxiang⁴.

¹Department of Epidemiology, Public Health College, ⁶Genome Center of Harbin Medical University, Harbin Medical University, Harbin 150056, China; ²Department of Epidemiology, Public Health College, ⁵Basic Chemistry Laboratory of Pharmacy College, Jilin Medical College, Jilin 132013, China; ³Laboratory of Harbin Chest Hospital, Harbin 150001, China; ⁴Department of Infectious Diseases, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Corresponding author: WANG Binyou, Email: wangbyhyd@126.com; WANG Fuxiang, Email: wangfuxiang999@163.com

【Abstract】Objective To determine the distribution of HIV-1 subtype and the genetic variation among men who have sex with men (MSM) infected with HIV-1 in Harbin. **Methods** Blood samples were collected from MSM infected with HIV, and viral RNA was extracted, HIV-1 gag gene was amplified by nested-PCR, and the subsequent products were carried out for sequencing. The phylogenetic analysis and calculated gene discrete distance were done by Mega 5.1 software. The variation of amino acid sequences were analyzed by BioEdit 7.0.0 software. **Results** According to the 61 gag gene sequences obtained, subtype analysis showed. Among them 49 samples (80.32%) were CRF01-AE, 5(8.19%) samples were CRF07-BC (8.19%), 7 (11.47%) samples were B subtype. In which gene discrete distance of B subtype was maximum (0.078 ± 0.005), CRF01_AE was minimum (0.051 ± 0.004). The result of analysis the variation of major homology region (MHR) sequence of gag gene region showed that the seventh valine (V) was mutated to isoleucine (I) owned the largest proportion in subtypes B comparison with the others. **Conclusions** The CRF01-AE, CRF07-BC and B subtypes of HIV-1 co-circulation among HIV infected MSM in Harbin. CRF01-AE was the main epidemic strain of HIV-1. Where subtype B owned the maximum of genetic variability.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.01.005

基金项目: 黑龙江省自然科学基金 (No. H201383)

作者单位: 150086 哈尔滨市, 哈尔滨医科大学公共卫生学院流行病教研室¹、基因组中心⁶; 吉林医药学院公共卫生学院流行病教研室²、药学院基础化学实验室⁵; 哈尔滨市胸科医院检验科³; 哈尔滨医科大学附属第四医院感染科⁴

通讯作者: 王滨有: wangbyhyd@126.com; 王福祥: wangfuxiang999@163.com

Monitoring the variation of HIV-1 epidemic among MSM could contribute to treatment for MSM timely and effectively.

【Key words】 Men who have sex with men; Gag gene; HIV-1 subtype

近年来,我国艾滋病的传播途径已由原来的经血液传播转变为经性接触传播为主,其中男男同性恋者(men who have sex with men, MSM)的HIV感染发生率持续增高^[1-2]。根据《2012年我国艾滋病疫情及防治工作报告》评估结果显示,目前我国艾滋病的主要传播途径为性接触传播,其中男男同性传播的比例显著升高。2012年报告的HIV感染者中,经性接触传播所占比例为84.9%,较2011年同期增长7%,其中男男同性性传播所占比例为21.1%,较2011年同期增长6.1%^[3]。MSM已经成为我国感染HIV的主要人群之一。2011年哈尔滨市MSM人群中HIV-1感染者比例已达到9.5%^[4]。而2011至2012年黑龙江省HIV感染者中MSM人群所占比例已近70%^[5];MSM已成为哈尔滨市主要的HIV感染者。通过对MSM人群感染HIV-1流行株的亚型分布状况及基因变异情况进行分析,可对MSM这一高危人群采取针对性的预防和治疗措施。为进一步了解哈尔滨市MSM人群HIV-1的感染情况,特对本市MSM人群中HIV-1阳性感染者的HIV-1 gag区基因进行分析,报道如下。

资料与方法

一、研究对象和方法

61例样本采自2012年9月至2014年4月哈尔滨市男男同性恋人群,送市疾控中心用免疫印记法(Western blot)确证为抗-HIV-1阳性,且未经过抗病毒药物治疗。调查和采血前征得感染者的同意,并签订知情同意书。向研究对象说明研究目的,收集相关的流行病学资料,填写病例基本信息登记

表(包括年龄和居住地等信息),并检测其CD4⁺T淋巴细胞计数。

静脉采集外周EDTA抗凝全血3~5 ml,分离血浆和PBMC,用QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen,德国)试剂盒提取血浆中的病毒RNA。

二、反应体系

由上海生工生物技术有限公司设计并合成引物,详见表1。采用一步法RNA RT-PCR试剂盒(TaKaRa宝生物工程有限公司)扩增gag基因区。第一轮外侧引物(gag-L和gag-E2)扩增时总体系为50 μl,反应体系为: Prime Script 1 Step Mix 2 μl, 2 × 1 Step Buffer 25 μl, gag-E2 (20 mmol/L) 1 μl, Template RNA 4 μl, RNase Free dH₂O 18 μl。PCR反应条件为: 50 °C 30 min; 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 40个循环; 72 °C延伸10 min; 4 °C保温。第二轮内侧引物(gag-GUX和gag-GDX)扩增时总体系50 μl,反应体系为: 10 × Ex Taq Buffer 5 μl, dNTP mixture (2.5 mmol/L) 4 μl, gag-GUX (20 mmol/L) 1 μl, gag-GDX (20 mmol/L) 1 μl, 第一轮PCR产物2 μl, Ex Taq (5 U/μl) 0.5 μl, RNase Free dH₂O 36.5 μl。PCR反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35个循环; 72 °C延伸10 min; 4 °C保温。

三、序列测定

将第二轮PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳,与DL2000 DNA Marker对照,在约1000 bp处出现清晰的目的条带,将获得的PCR产物送至北京生工生物工程公司进行纯化及序列测定。

四、序列分析

应用BioEdit软件对序列进行整理,并将相应

表1 gag区扩增引物

引物	序列(5'→3')	基因位置(HXB2)
gag-L	TCGACGCAGGACTCGGCTTGC	686-707
gag-E2	TCCAACAGCCCTTTTCCTAGG	2 032-2 011
gag-GUX	AGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTC	781-806
gag-GDX	GGCTAGTTCCTCTACTCCCTGACAT	1 861-1 836

表2 哈尔滨市MSM感染者中HIV-1亚型及基因离散距离

亚型	例数	平均年龄(岁)	构成比(%)	基因离散率(%)
CRF01-AE	50	33.06	82.0	0.051 ± 0.004
CRF07-BC	4	44.50	6.6	0.064 ± 0.006
B亚型	7	27.71	11.5	0.078 ± 0.005

的基因序列翻译成氨基酸序列, 并对 gag 区主要同源区 (major homology region, MHR) 氨基酸序列的变异情况和各个亚型的标准株进行比对分析。HIV-1 各亚型国际标准参考序列来源于美国 Los Alamos 基因序列数据库。用 MEGA 5.1 软件的 Distances 程序计算各亚型的组内基因离散距离, 以 Neighbor-joining 法构建系统发育树。

结 果

一、系统进化分析

61例成功扩增并测序分型的HIV感染者, 年龄19~65岁, 平均(33.20 ± 9.95)岁; 未经抗病毒治疗前的最近一次CD4⁺T淋巴细胞计数的中位数为288个/μl, 其中36例样本的CD4⁺T淋巴细胞计数>200/μl, 占59%。系统进化树结果显示: 哈尔滨市MSM人群中主要存在CRF01-AE, CRF07-BC和B三种亚型, 其中CRF01_A 50例(82.0%)和CRF07_BC 4例(8.2%), harbin 55在进化树中虽然与CRF01_AE在一个进化枝中, 但HIV_Blast结果结果显示其与CRF07_BC有较高相似度, B亚型7例(11.5%), 而CRF01_AE又形成了2个独立进化簇(见图1)。哈尔滨市MSM人群中以CRF01_AE为主要流行亚型, 其组内的基因离散率为(0.051

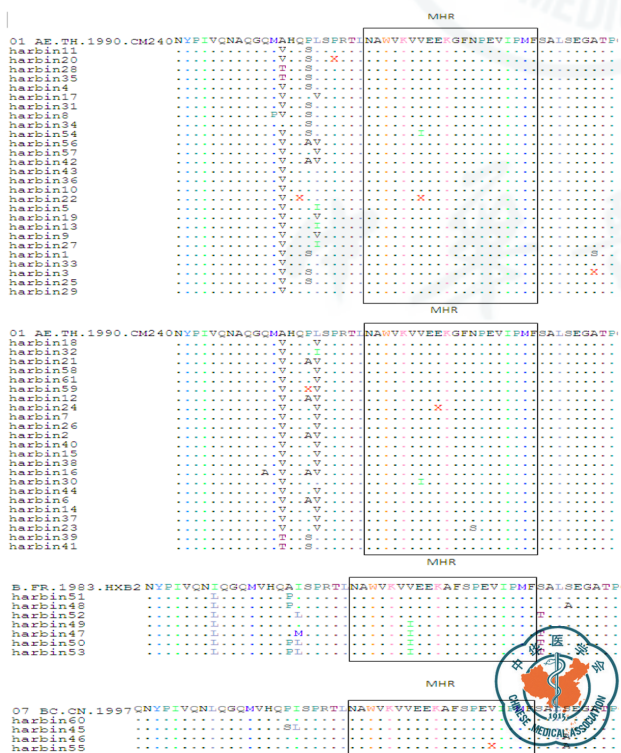


图2 MSM HIV-1 感染者中 gag 基因 MHR 序列变异分析

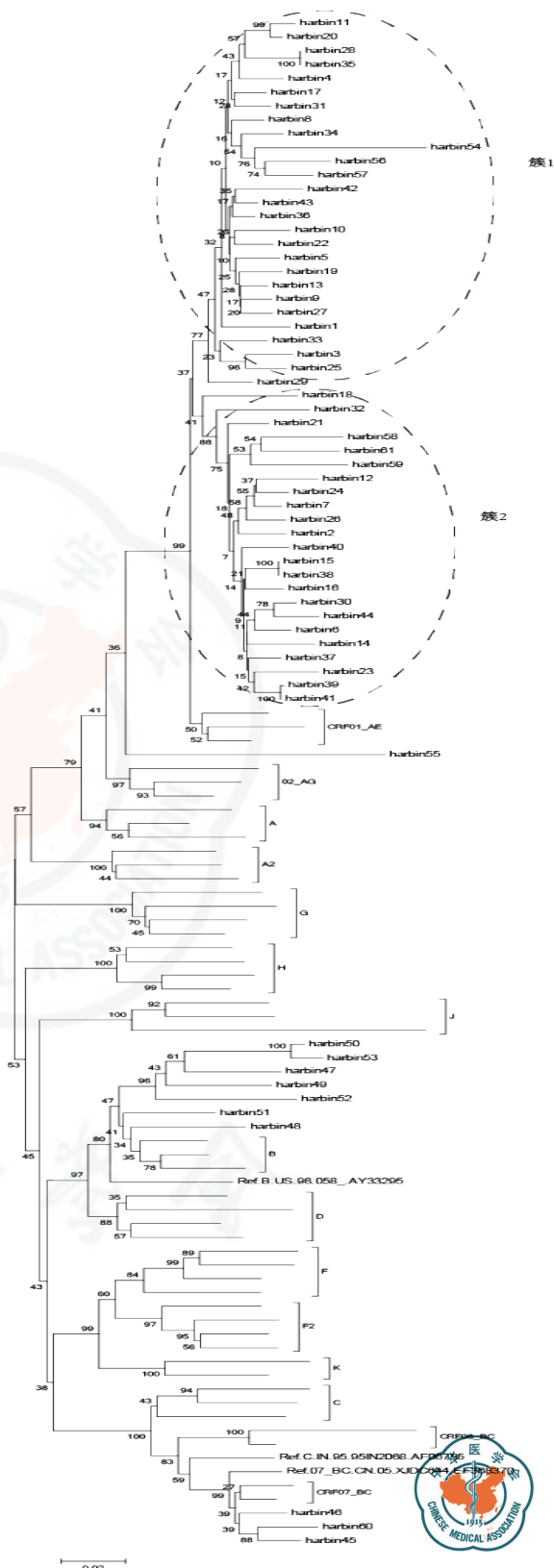


图1 61例感染 HIV-1 的 MSM gag 基因的系统发育树分析

(0.078 ± 0.005), 详见表1。

二、主要同源区基因序列变异分析

gag蛋白第153-172位氨基酸的位置为主要同源区(major homology region, MHR)。该区段对病毒样颗粒的形成至关重要,此区段的氨基酸变异将影响HIV-1病毒的复制。本研究分别对MSM中HIV-1 CRF01_AE、CRF07_BC、B三种亚型的MHR序列变异情况与各亚型标准株(01_AE CM240、B亚型 HXB2、07BC_CN54)进行比较,结果如图2所示:在CRF01_AE形成的两个独立进化簇中,簇1和簇2分别有一个氨基酸位点发生突变,即MHR序列的第7位缬氨酸(V)突变为异亮氨酸(I)(突变分别为1:26和1:23)。而这种突变在B亚型中发生的比例较大(4:7)。

讨 论

HIV-1基因组在复制过程中容易发生差错,因此具有高度变异的特性。当患者体内存在多种亚型的HIV-1毒株时,不同亚型毒株之间可能发生基因重组,进而成为流行重组模式(CRF)毒株导致基因变异,CRF毒株在HIV感染者中所占的比重逐年增大^[6]。MSM人群中HIV的快速流行越来越引起人们的重视。根据第二次全国范围内的HIV分子流行病学调查结果显示,MSM人群中CRF01_AE已经取代B亚型成为主要流行毒株^[7]。CRF01_AE最早在东南亚地区流行,在泰国从事性工作的妇女中广泛传播。我国在1994年首次检测到这种毒株。本次研究发现在哈尔滨市MSM人群中的主要流行株为CRF01_AE,并且形成了两个独立的流行进化簇。这与其他地区报道的结果一致^[8-9]。

此次对哈尔滨市MSM人群中的HIV-1亚型分析结果与我国石家庄、北京、安徽和深圳等地区发现的基因亚型分布基本一致^[10-13]。推测目前中国MSM人群中可能主要以CRF01_AE、CRF07_BC、B型这3种亚型为主。本研究还发现B亚型的组内基因离散率最大,CRF01_AE亚型最小,这可能与亚型流行的时间长短有关,流行的时间越长,亚型表现出的多样性越显著,从而导致各亚型组内离散率的不同^[14]。本次研究推测在哈尔滨地区流行的时间最长的是B亚型,而CRF01_AE流行时间则相对较短。周慧等^[15]报道也得到进一步证实。B亚型是我国最早流行的毒株,最初在云南的静脉吸毒人群和上世纪90年代河南的有偿献血人群中流行^[16],之后陆续扩散到我国各艾滋病高发地区。另外,通过对HIV-1 gag区MHR氨基酸序列的分析,在B亚

型中MHR序列的第7位缬氨酸(V)突变为异亮氨酸(I)的比例较CRF01_AE和CRF07_BC亚型大。这与基因离散距离计算的结果一致。而这种突变对HIV-1复制的影响多大,尚需要进一步的实验研究加以证实。

加强对哈尔滨市MSM人群感染HIV-1流行株的亚型分布状况及基因变异情况的监测,有利于及时发现优势流行的毒株,并采取有效的应对措施,阻断HIV在MSM人群中的传播,对控制艾滋病疫情的发展具有重要意义,而且也为HIV疫苗及HIV-1诊断试剂的研制和应用等提供了病原学依据。

参 考 文 献

- 1 中华人民共和国卫生部,联合国艾滋病规划署,世界卫生组织. 2011年中国艾滋病疫情估计[R]. 北京,2011.
- 2 王岚,王璐,丁正伟,等. 中国1995-2009年艾滋病哨点监测主要人群艾滋病病毒感染流行趋势分析[J]. 中华流行病学杂志,2011,32(1):20-24.
- 3 中华人民共和国卫生部. 我国艾滋病防治工作进展情况[EB/OL]. http://www.gov.cn/gzdt/2012-11/29/content_2278527.htm
- 4 Zhang L, Zhang D, Yu B, Wang S, Liu Y, et al. Prevalence of HIV infection and associated risk factors among men who have sex with men (MSM) in Harbin, P. R. China[J]. PLoS One,2013,8(3):e58440.
- 5 Shao B, Li Y, Yu L, et al. The HIV/AIDS epidemic characteristics in a northeast province of China men who have sex with men have made a tremendous contribution to the growth of the HIV epidemic[J]. J Infect,2014,68(3):273-280.
- 6 Baird HA, Gao Y, Galetto R, et al. Influence of sequence identity and unique breakpoints on the frequency of intersubtype HIV-1 recombination[J]. Retrovirology,2006,9(1):1-17.
- 7 He X, Xing H, Ruan Y, et al. A comprehensive mapping of 4 HIV-1 genotypes in various risk groups and regions across China based on a nationwide molecular epidemiologic survey[J]. PLoS One,2012,7(10):e47289.
- 8 Ye J, Xin R, Yu S, et al. Phylogenetic and temporal dynamics of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE in China[J]. PLoS One,2013,8(1):e54238.
- 9 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]. J Virol,2012,86(22):12402-12406.
- 10 Li L, Lu X, Li H, et al. High genetic diversity of HIV-1 was found in men who have sex with men in Shijiazhuang, China[J]. Infect Genet Evol,2011,11(6):1487-1492.
- 11 Zhang X, Li X, Li X, et al. Characterization of HIV-1 subtypes and viral antiretroviral drug resistance in men who have sex with men in Beijing, China[J]. AIDS,2007,21(Suppl 8):S59-S65.
- 12 Wu J, Meng Z, Xu J, et al. New Emerging recombinant HIV-1 strains and close transmission linkage of HIV-1 strains in the Chinese MSM population indicate a new epidemic risk[J]. PLoS One,2013,8(1):e54322.

- 13 赵广录, 冯铁建, 王晓辉, 等. 深圳地区吸毒人群HIV-1分子流行病学调[J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(11): 1131-1134.
- 14 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[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2009, 25(6): 619-623.
- 15 Wang F, Zhou H, Ling H, et al. Subtype and sequence analysis of HIV-1 strains in Heilongjiang Province[J]. Chin Med J, 2007, 120(22): 2006-2010.
- 16 Li Z, He X, Wang Z, et al. Tracing the origin and history of HIV-1 subtype B epidemic by near full-length genome analyses[J]. AIDS, 2012, 26(7): 877-884.

(收稿日期: 2014-12-27)

(本文编辑: 孙荣华)

孙冬莹, 邵冰, 张春蕾, 等. 哈尔滨市男男同性恋HIV-1感染者gag区基因分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(1): 14-18.

