

## · 临床论著 ·

# 哈尔滨市男男同性恋HIV-1感染者 gag基因分型特征分析

岳超<sup>1</sup> 金刚<sup>1</sup> 李海宁<sup>1</sup> 宋波<sup>2</sup> 林元龙<sup>2</sup> 张铮<sup>3</sup> 金春英<sup>3</sup> 李宇欧<sup>3</sup> 高玉梅<sup>3</sup>  
王福祥<sup>2</sup> 刘树林<sup>1</sup> 李庆海<sup>1</sup>

**【摘要】目的** 分析哈尔滨市确诊的男男同性恋(MSM) HIV-1感染病例gag基因序列, 确定新发感染毒株基因型。**方法** 收集2014年7月至12月确诊且未经过抗病毒治疗的感染者抗凝血, 分离外周血单个核细胞, 从中提取基因组DNA, 采用巢式PCR法扩增gag基因。采用MEGA 5.05软件构建gag基因系统发育树, 分析基因型特点。**结果** 共收集49例MSM感染者样本, 且均获得gag基因序列。系统发育树显示, 49例gag基因主要分布于3个亚型内, 其中CRF01\_AE亚型39例, 占79.6%; B亚型5例, 占10.2%; CRF07\_BC亚型4例, 占8.2%。另外, 发现CRF01B重组型1例, 占2.0%。在CRF01\_AE毒株中, 92.3% (36/39) 与我国MSM人群参考株成簇, 7.7% (3/39) 与泰国及我国西南地区异性传播参考株成簇。**结论** 本研究时间段哈尔滨市确诊MSM感染病例以CRF01\_AE基因型为主。MSM人群可能成为本地区复杂基因型的重要来源, 实时监测该人群新发感染病例的分子流行病学特征, 对制定有效地预防和干预措施非常重要。

**【关键词】** I型人类免疫缺陷病毒; 男男同性恋; gag基因; 基因型

**Genotype analysis of HIV-1 gag genes from cases diagnosed as men who have sex with men in Harbin**  
Yue Chao<sup>1</sup>, Jin Gang<sup>1</sup>, Li Haining<sup>1</sup>, Song Bo<sup>2</sup>, Lin Yuanlong<sup>2</sup>, Zhang Zheng<sup>3</sup>, Jin Chunying<sup>3</sup>, Li Yu'ou<sup>3</sup>, Gao Yumei<sup>3</sup>, Wang Fuxiang<sup>2</sup>, Liu Shulin<sup>1</sup>, Li Qinghai<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Genomics Research Center (One of The State-Province Key Laboratory of Biopharmaceutical Engineering), Harbin Medical University, Harbin 150081, China; <sup>2</sup>Department of Infectious Diseases, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China; <sup>3</sup>Intensive Care Unit, Infectious Diseases Hospital of Harbin, Harbin 150030, China

Corresponding author: Liu Shulin, Email: kobayashikatsufumi@gmail.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the gag genes derived from cases diagnosed as HIV-1-infected men who have sex with men (MSM) in Harbin. **Methods** Genomic DNA were extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 49 MSM with HIV-1-infection diagnosed as HIV-1 positive. The gag gene fragments were amplified by nested PCR. Phylogenetic tree was constructed to observe gag clustering and subsequently to analyze the genotyping feature of these cases. **Results** Total of 49 sequences of gag gene were obtained successfully. The phylogenetic analysis showed that these sequences clustered with three subtype lineages as follows: 39 sequences (79.6%) clustered with CRF01\_AE lineage, 5 sequences (10.2%) clustered with subtype B, 4 sequences (8.2%) clustered with CRF07\_BC. Moreover, one recombinant genotype CRF01B (2.0%) was also identified. And 1 sequence (2.0%) clustered with subtype CRF01B. Among CRF01\_AE sequences, 92.3% (36/39) gathered with reference genes from Chinese MSM, and 7.7% (3/39) gathered with reference genes epidemic in Thailand and Southwest regions of China. **Conclusions** The CRF01\_AE was the predominant genotype among cases diagnosed as HIV-1-infected MSM in Harbin. The MSM population may become the important source of new genotypes and complicated recombinant

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2017.01.006

基金项目: 黑龙江省自然科学基金(No. H201383); 黑龙江省大学生创业创新基金(No. 201510226017、No. 201410226040)

作者单位: 150081 哈尔滨市, 哈尔滨医科大学基因组中心<sup>1</sup>; 150001 哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第四医院感染科<sup>2</sup>; 150030 哈尔滨市, 哈尔滨市传染病医院重症医学科<sup>3</sup>

通信作者: 刘树林, Email: kobayashikatsufumi@gmail.com

forms. Therefore, timely epidemiological surveillance of HIV-1 molecular epidemiology and development of prevention measures for HIV-1 infections among MSM are important.

**【Key words】** Human immunodeficiency virus type 1; Men who have sex with men (MSM); Gag gene; Genotype

据2012年全国HIV-1分子流行病学调查报告显示,性传播依然是我国HIV-1传播的最主要途径,同时HIV-1在男男同性恋(men who have sex with men, MSM)人群中的感染比例逐年上升<sup>[1]</sup>。哈尔滨市是黑龙江省省会,位于我国东北部,本地区HIV-1感染率一直处于全国的较低水平。2008年,哈尔滨市MSM人群中发生HIV-1暴发感染。自此,同性传播成为哈尔滨市HIV-1传播的主要途径<sup>[2]</sup>。至2011年底,本市MSM人群HIV-1感染率由2006年的1%快速增至9.5%<sup>[3-4]</sup>。因此,实时监测本地区MSM人群中HIV-1感染的分子流行病特征和基因型变化非常必要。然而,与我国其他省份和城市相比,哈尔滨市HIV-1分子流行病学研究较少。基于当前我国HIV-1流行和基因型的复杂性和多样性,本研究收集2014年7月至12月确诊MSM感染者样本,并分析了其gag基因特征,现报道如下。

## 资料与方法

### 一、研究对象和样品采集

研究对象为2014年7月至12月确诊的HIV-1感染者,于哈尔滨医科大学附属第四医院治疗点进行抗病毒治疗的MSM,共49例。于抗病毒治疗前,收集患者EDTA抗凝全血3~5 ml,分离外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。本研究经哈尔滨医科大学附属第四医院伦理学委员会批准进行(编号[2015]KT003),收集样本前,与每位感染者签署知情同意书。

### 二、HIV-1核酸提取、基因扩增和测序

采用Qiagen公司DNA提取试剂盒从PBMCs中提取基因组DNA,采取巢式PCR技术扩增gag基因:首先,以基因组DNA为模板,用外侧引物gag-OF(5'-ATATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATT-3')和gag-OR(5'-TCCAACAGCCCTTTTTCCTAGG-3')进行第一轮PCR扩增。然后以第一轮产物作为模板,用内侧引物gag-IF(5'-TAGTTCCTGCTATGTCACTTCC-3')和gag-

IR(5'-GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCC-3')进行第二轮PCR扩增,获得目的基因片段。两轮PCR扩增条件相同:首先94℃变性10 min;然后94℃、30 s, 55℃、30 s, 72℃、1 min,共35个循环;最后72℃延伸10 min。PCR终产物在1%琼脂凝胶中电泳,采用Qiagen公司凝胶纯化试剂盒回收PCR产物,直接进行序列测定。

### 三、系统进化分析和重组分析

采用MEGA 5.05软件内置的Clustal X功能对获得的gag基因序列进行多重序列比对,用MEGA软件的Phylogeny选项中的Neighbor-joining法绘制系统进化树。采取Bootstrap检验对Neighbor-joining系统树和数枝形状的可信性进行检验,重复抽样构建系统树的参数为1 000,高于70%的Bootstrap值显示在系统树节点上。构建系统进化树所用的参考毒株序列均来自美国Los Alamos HIV数据库。

根据进化树上gag基因的分布判定该感染者HIV-1基因型。如果基因序列分布于进化树各分支之间或无明显分支定位,则采用Los Alamos网站在线软件jumping profile Hidden Markov Model program(jpHMM: <http://jphmm.gobics.de/>)进行基因重组分析,进一步判断该基因型别。

## 结 果

### 一、研究对象的人口统计学和流行病学信息

所有研究对象均为MSM,且通过同性性传播途径感染HIV-1。自49例研究个体的PBMCs样本中,成功获得49条gag基因序列,并成功对其进行基因分型,成功率为100%。研究对象年龄为20~55岁,平均年龄为36.2岁;其中34例感染者(69.4%)年龄为20~40岁。外周血CD4<sup>+</sup>T细胞数范围为3~864个/μl,中位数为221个/μl;其中21份样本(42.9%)CD4<sup>+</sup>T细胞数<200个/μl,详见表1。

### 二、HIV-1基因型分布特征

系统进化分析显示,49例gag基因序列主要分布于3个亚型内,包括CRF01\_AE型39例

表 1 哈尔滨市确诊的 19 例感染 HIV-1 MSM 人口学和流行性信息 [ 例 ( % ) ]

指标	HIV-1 基因型				合计 (n = 49)
	CRF01_AE (n = 39)	Subtype B (n = 5)	CRF07_BC (n = 4)	URF <sup>a</sup> (n = 1)	
年龄 (岁)					
20~30	11 (28.2)	2 (40.0)	1 (25.0)	0 (0.0)	14 (28.6)
31~40	16 (41.0)	2 (40.0)	1 (25.0)	1 (100.0)	20 (40.8)
41~50	7 (18.0)	1 (20.0)	1 (25.0)	0 (0.0)	9 (18.4)
≥ 51	5 (12.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (10.2)
未知	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (25.0)	0 (0.0)	1 (2.0)
CD4 细胞数 (个/μl)					
≥ 200	21 (53.8)	4 (80.0)	2 (50.0)	1 (100.0)	28 (57.1)
< 200	18 (46.2)	1 (20.0)	2 (50.0)	0 (0.0)	21 (42.9)

注: <sup>a</sup> URF: 独特重组型

(79.6%), B亚型5例(10.2%), CRF07\_BC型4例(8.2%)和CRF01B 1例(2.0%)。本研究获得CRF01\_AE序列主要形成3个基因簇, 其中24例与来自我国东北地区(吉林省和辽宁省)的CRF01-5分枝序列成簇, 12例与来自华北和江南地区(北京市和江苏省)的CRF01-4分枝序列成簇, 3例与泰国及我国西南地区(云南省和四川省)的CRF01-1分枝序列成簇, 详见图1。

在进化树上, HRB14046序列与CRF01\_AE基因亲缘关系较近, 但是与本研究获得的其他CRF01\_AE序列或参考序列均未形成明显的基因簇。对HRB14046序列的进一步分析显示, 该序列为CRF01\_AE与B亚型的重组型, 即CRF01B, 详见图2。

讨 论

自1993年黑龙江省发现首例HIV-1感染者至今, 病毒传播途径由最初的血液传播转变为异性传播, 再转变为同性传播。根据2014年黑龙江省HIV-1感染病例报告, 哈尔滨市于该时间段确诊HIV-1病例中约75.7%通过同性性传播途径感染。因此, 及时进行哈尔滨市新发HIV-1感染的分子流行病学研究十分必要。

CRF01\_AE亚型最早在泰国女性性工作者中流行, 于1994年传入我国, 并由西向东、由南向北在全国范围内迅速播散。2000年以后, 黑龙江省开始出现此基因型毒株, 主要在MSM人群中传播。2009至2011年哈尔滨市新增MSM感染病例中, CRF01\_AE毒株约占64.5%<sup>[5]</sup>; 而2012年9月至2014

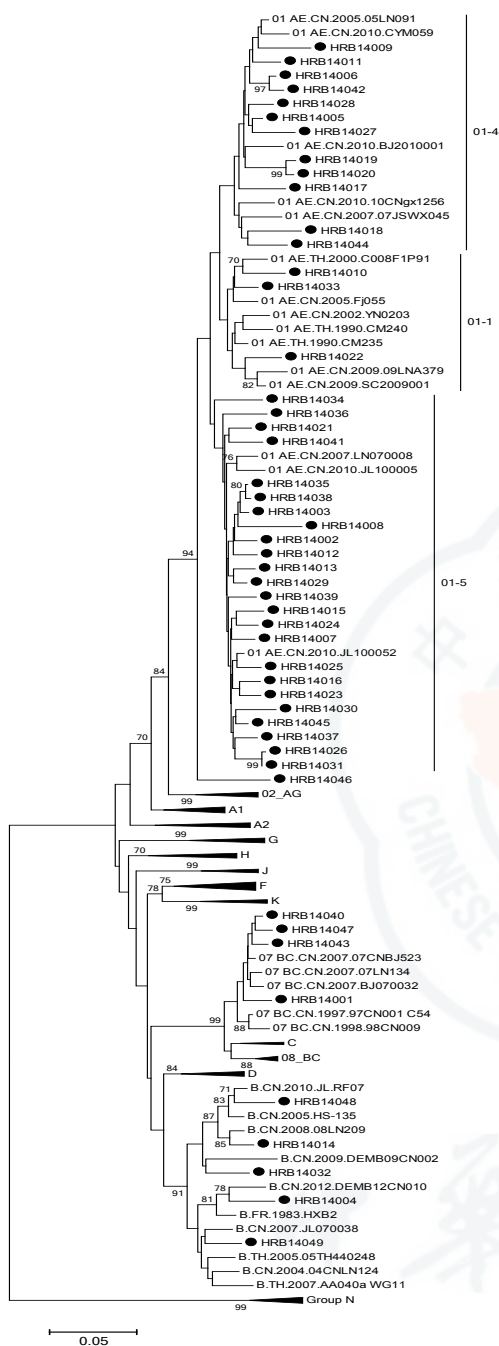
年4月的新增病例中, CRF01\_AE毒株比例升高至80.32%<sup>[6]</sup>。本研究对2014年哈尔滨市新发MSM感染者的基因型分析发现, CRF01\_AE占79.6%, 与前期研究结果相近, 提示CRF01\_AE依然是MSM人群的优势基因型。

我国CRF01\_AE亚型流行范围广, 为了便于进行分子流行病学检测, 将我国CRF01\_AE流行毒株划分为7个亚簇, 其中CRF01-1、CRF01-2和CRF01-3主要流行于云南、广西壮族自治区和福建等西南地区的异性传播和吸毒人群; CRF01-4和CRF01-5分别流行于北京、天津、江苏、湖南、辽宁以及吉林等地区的MSM人群<sup>[7]</sup>。本研究中新发感染CRF01\_AE病例中, 绝大多数(92.3%, 36/39)为CRF01-4或CRF01-5同性传播亚簇, 符合本地区HIV-1传播特点。另外, 少数病例属于CRF01-1亚簇, 提示本地区HIV-1毒株来源较为复杂。

HIV-1 B亚型毒株最初在云南省毒品使用者中发现, 随后通过血液和异性性传播的方式在其他省份进行传播。此种传播方式的改变主要是由于20世纪90年代中期不卫生的全血和血浆制品引起。90年代末期以来, 国家对无偿献血的严格管制已经有效地阻断了不卫生血制品的传播<sup>[8-9]</sup>。然而, 已经通过输血途径感染HIV-1 B亚型的个体往往会通过异性性传播的方式感染其性伴侣。因此, 目前B亚型毒株的传播已经转向异性性传播人群<sup>[10]</sup>。

1993年, HIV-1 CRF07\_BC亚型传入我国, 主要在西部和南部省份注射吸毒者中发现, 包括新疆维吾尔自治区、四川和云南等地区<sup>[11]</sup>。2002年第二次全国范围内的分子流行病学调査中尚未





注: 黑色实心圆: 本研究鉴定的gag基因序列

图1 哈尔滨市HIV-1感染MSM的gag基因系统进化分析

发现CRF07\_BC亚簇, 而在2007年第三次全国范围内的分子流行病学调查中, CRF07\_BC亚簇在为数不多的男男同性恋患者中发现<sup>[9]</sup>。进化分析表明, CRF07\_BC毒株首次传入MSM人群在2004年左右, 当时中国MSM人群中非法使用毒品很罕见<sup>[12]</sup>, 通过注射吸毒途径感染HIV-1的案例较少。据北京地区统计, 2006至2007年, MSM人群中曾经使用过亚硝酸盐吸入剂的比例仅为0.8%<sup>[13]</sup>, 然而, 截至2012年, 该人群的所占比例已高达47.3%, 并与高风险HIV-1感染有关<sup>[14]</sup>。毒品的乱用在西方国家的MSM人群中很普遍, 这也大大加剧了HIV-1在MSM人群中的传播<sup>[15-16]</sup>。吸毒可以放松警惕, 增加无保护措施肛交和感染HIV的风险。令人担忧的是, 我国MSM人群中多采用非注射式吸毒, 因此, 曾经在发达国家发生的严重AIDS流行事件可能在我国MSM人群中重演。同时, 鉴于CRF07\_BC亚型一直是我国注射吸毒患者中的主要亚型, 而我国一部分MSM也采取静脉注射毒品, 未来研究需要探索CRF07\_BC亚型病毒在MSM人群中快速传播的原因和实时监测该亚型的流行情况。

我国有多个HIV-1型流行, 不同亚型在同一地区的流行加速了亚型内或亚型间基因重组的发生<sup>[17-21]</sup>。在哈尔滨地区, CRF01\_AE与B亚型、CRF01\_BC亚型长期共存, 也为这些亚型间的重组提供了条件。本研究中发现1例CRF01\_AE/B重组型gag基因(HRB14046), 提示哈尔滨市HIV-1基因组已经日趋复杂, MSM人群可能成为传播和产生复杂基因型的重要来源<sup>[22-23]</sup>。

本研究分析了哈尔滨市2014年下半年新确诊HIV-1男男同性恋感染病例的gag基因, 发现本地区HIV-1基因型较为复杂, 此类患者也可能成为复杂基因型的来源, 因此, 实时监测本地区男男同性恋人群感染病例的分子流行病学特点, 并建立针对这

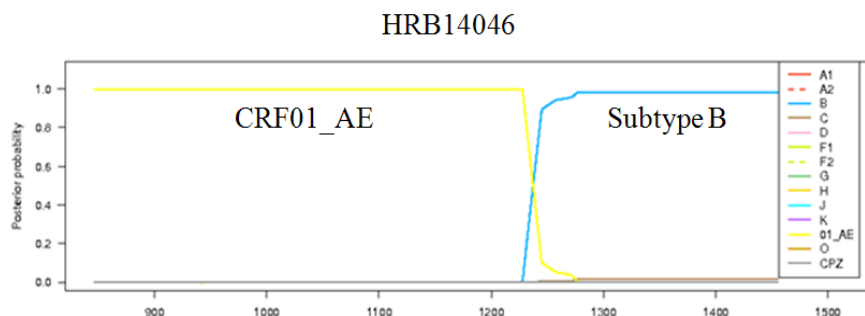


图2 HRB14046 gag基因重组分析

些新发感染的预防和干预措施非常重要。

### 参 考 文 献

- [1] Li X, Xue Y, Cheng H, et al. HIV-1 genetic diversity and its Impact on baseline CD4<sup>+</sup> T cells and viral loads among recently infected men who have sex with men in Shanghai, China[J]. PLoS One,2015,10(6):e0129559.
- [2] 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.
- [3] 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[J]. Int J Epidemiol,2012,41(2):423-432.
- [4] Zhang L, Zhang D, Yu B, 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 W J, Liu T, et al. Subtype B was the dominant strain among HIV type 1 infections except for the population of men who have sex with men in Harbin City, China[J]. AIDS Res Hum Retroviruses,2013,29(9):1260-1264.
- [6] 孙冬莹, 邵冰, 张春雷, 等. 哈尔滨市男男同性恋HIV-1感染者gag区基因分析[J/CD]. 中华实验与临床感染病杂志:电子版,2015,9(1):14-17.
- [7] Feng Y, He X, Hsi JH, et al. The rapidly expanding CRF01\_AE epidemic in China is driven by multiple lineages of HIV-1 viruses introduced in the 1990s[J]. AIDS,2013,27(11):1793-1802.
- [8] Mastro TD, Yip R. The legacy of unhygienic plasma collection in China[J]. AIDS,2006,20(10):1451-1452.
- [9] Wu Z, Sullivan SG, Wang Y, et al. Evolution of China's response to HIV/AIDS[J]. Lancet,2007,369(9562):679-690.
- [10] Xiang H, Hui X, Yuhua R, et al. A comprehensive mapping of 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-e47289.
- [11] 邢辉, 潘品良, 苏玲, 等. 1996-1998年中国流行的E亚型艾滋病病毒1型毒株的分子流行病学研究[J]. 中国艾滋病性病,2002,8(2):200-203.
- [12] Li D, Li S, Liu Y, et al. HIV incidence among men who have sex with men in Beijing: a prospective cohort study[J]. BMJ Open,2012,2:e001829.
- [13] Yuhua R, Jia YJ, Zhang XX, et al. Incidence of HIV-1, syphilis, hepatitis B, and hepatitis C virus infections and predictors associated with retention in a 12-month follow[J]. J AIDS,2009,52(5):604-610.
- [14] Li D, Yang X, Zhang Z, et al. Nitrite inhalants use and HIV infection among men who have sex with men in China[J]. Biomed Res Int,2014,2014(1):365261.
- [15] Folch C, Marks G, Esteve A, et al. Factors associated with unprotected sexual intercourse with steady male, casual male, and female partners among men who have sex with men in barcelona, Spain[J]. AIDS Educ Prev,2006,18(3):227-242.
- [16] Koblin BA, Husnik MJ, Colfax G, et al. Risk factors for HIV infection among men who have sex with men[J]. AIDS,2006,20(5):731-739.
- [17] Wei H, Su L, Feng Y, et al. Near full-length genomic characterization of a novel HIV type 1 CRF07\_BC/01\_AE recombinant in men who have sex with men from Sichuan, China[J]. AIDS Res Hum Retroviruses,2013,29(8):1173-1176.
- [18] Wang W, Jiang S, Li S, et al. Identification of subtype B, multiple circulating recombinant forms and unique recombinants of HIV type 1 in an MSM cohort in China[J]. AIDS Res Hum Retroviruses,2008,24(10):1245-1254.
- [19] Feng Y, Li X, Zang X, et al. Identification of a novel HIV-1 second-generation recombinant form (CRF01\_AE/CRF07\_BC) in Jilin, China[J]. AIDS Res Hum Retroviruses,2014,30(8):819-822.
- [20] Guo H, Hu H, Zhou Y, et al. A Novel HIV-1 CRF01\_AE/B recombinant among men who have sex with men in Jiangsu Province, China[J]. AIDS Res Hum Retroviruses,2014,30(7):706-710.
- [21] 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.
- [22] Wang Y, Liang Y, Yue F, et al. HIV-1 prevalence and subtype/recombinant distribution among travelers entering China from Vietnam at the HeKou port in the Yunnan province, China, between 2003 and 2012[J]. J Med Virol,2015,87(9):1500-1509.
- [23] Li X, Zang X, Ning C, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Jilin province, northeastern China: emergence of a new CRF07\_BC transmission cluster and intersubtype recombinants[J]. PLoS One,2014,9(10):e110738.

(收稿日期: 2016-02-06)

(本文编辑: 孙荣华)

岳超, 金刚, 李海宁, 等. 哈尔滨市男男同性恋HIV-1感染者gag基因分型特征分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志 (电子版), 2017,11(1):27-31.