

HIV-1 包膜基因变异的体外研究

R373.9

樊卫平², 李敬云^{1*}, 鲍作义¹, 吕富双¹, 王宏霞¹¹(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)²(山西医科大学微生物免疫教研室, 太原 300050)

摘要: 采用亚型测定、核苷酸和氨基酸序列测定和同源性分析等方法, 观察了 HIV-1 III B 毒株在实验室长期传代过程中包膜基因变异的情况。研究的毒株包括: 经过实验室 8 年多连续使用而获得的毒株、在 MT4 细胞长期连续传代而获得的每间隔 10 代的毒株样品及多次更换宿主细胞传代而获得的毒株。主要结果有: (1) 各种毒株包膜基因变异均不显著, 核苷酸序列同源性均大于 92%, 变异距离均小于 7.5%, 且随着传代数增加核苷酸趋于稳定, 代间同源性由 92% 上升至 99%, 而变异距离由 7.5% 下降为 0.6%。(2) 在传代过程中 HIV-1 亚型保持稳定, 各种毒株均为 HIV-1 B3 亚型。结果显示 HIV 在体外长期传代培养的过程中变异不大, 遗传性状稳定, 可能是体外生长的环境十分稳定, 缺乏机体免疫学压力。结果也提示体外长期传代 HIV 毒株仍然适用于各种 HIV 的应用研究, 用长期传代的方法发展 HIV-减毒活疫苗的可能性不大。

关键词: HIV-1; 传代; 包膜基因; 变异

中图分类号: R512.91 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2000)02-0127-09

人免疫缺陷病毒(HIV)的显著特征之一是其高度的变异性, 这是 HIV 逃脱机体免疫监视的主要原因, 也是 HIV 疫苗和治疗研究的主要障碍。观察 HIV 在体外培养条件下的变异情况对于评估机体内环境在 HIV 变异中的作用以及评价体外长期传代 HIV 毒种的实用性具有一定的意义。为此, 我们对体外长期传代 HIV 毒株 env 基因的变异情况进行了系统的观察, 对本室保存的长期传代 HIV 毒株以及为本实验目的而连续传代的毒株样品进行了 HIV 亚型测定, 同时进行核苷酸和氨基酸序列测定和同源性分析。

1 材料和方法

1.1 细胞

MT4 细胞, 1997 年引自日本, 本室保存。Hela CD4 细胞, 1997 年引自美国, 本室保存。

1.2 HIV 毒株

1.2.1 880508 株: 系本室 1988 年从美国引进的 HIV-1 III B 毒株。

1.2.2 960905 株: 系 880508 株经过本实验室 8 年的传代使用, 于 1996 年冻存的毒株。

1.2.3 880508-11、-21、-31、-43 株: 系 880508 株在 MT4 细胞上连续传代收获的第 11 代、21 代、31 代、43 代毒株样品。

收稿日期: 1999-03-08, 修回日期: 1999-08-31

作者简介: 樊卫平(1967年-), 女, 山西省人, 讲师、硕士学位。主要从事微生物免疫学研究。

* 通讯作者: 李敬云(1963年-), 女, 山东省人, 副研究员、博士学位。主要从事艾滋病病毒的研究。

1.2.4 42 h 株:系 880508 株在 MT4 和 HeLaCD4 细胞间反复更换宿主细胞,传至第 42 代收获的毒株样品。

1.3 HIV 亚型测定

使用 HMA 法(Heteroduplexes Mobility Assay)^[1],用套式 PCR 方法(引物序列分别是:外引物 ED3 TTAG-GCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG。ED14 TCTTGCCCTGGAGCTGTTTGTATGCCCCAGAC 内引物 ED5 ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG。ED12 AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG)扩增 HIV env 基因 1 200 bp 的片段(图 1),扩增产物与含标准 HIV 亚型基因的质粒的扩增片段杂交,然后进行 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,PCR 扩增引物和 HIV 标准亚型质粒由卫生部艾滋病预防与控制中心提供。

1.4 核苷酸序列测定

将亚型测定时 PCR 扩增的 HIV env 基因 V1-V5 区 1 200 bp 的片段连接于 pGEM-T 载体质粒,转化入感受态细胞 XL-1,经过扩大培养、筛选和特异性鉴定以后,阳性克隆用于核苷酸序列测定,880508 株毒种测定了二个克隆,分别为 880508A 和 880508B。由大连宝生物有限公司用 ABIPRISMTM337DNA 全自动测序仪测定。

1.5 序列测定结果分析

1.5.1 用 Goldkey 和 Clustawl 软件进行核苷酸和氨基酸同源性分析。

1.5.2 用 Phylip3.57 软件进行核苷酸和氨基酸最大相似距离分析。

2 结果

2.1 扩增不同 HIV-1 毒株的 env 基因片段

以 DE3、DE14 为外引物,DE5、DE12 为内引物,用套式 PCR 方法扩增 HIV-1 的 env 基因,经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后,在紫外灯下观察到 1 200 bp 扩增片段(图 1)。



图 1 不同毒株样品 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 PCR production derived from different HIV strains

1 and 11, DNA Marker; 2 and 10, Negative control; 3-9, PCR fragments of 880508-1, -11, -21, -31, -43, 960905 and 42 h respectively.

2.2 HIV 亚型测定和分析

所有 HIV 毒株均为 HIV-1 B3 亚型(图 2),代表美国 SF162 毒株。由同一毒种传代而得的毒株遗传距离非常接近,与 sd、dph、jfq、xgh 等其他来源的毒株的距离较远(图 3)。

2.3 核苷酸和氨基酸同源性分析

序列分析结果显示长期传代 HIV 毒株的 env 基因核苷酸和氨基酸变异均不显著,不论高变区还是恒定区均不存在变异明显的区域(图 4)。除了多处出现终止密码子的 880508-11 克

隆以外, 随着传代数的增加, 代间核苷酸和氨基酸的同源性有上升的趋势(表 1), 同时代间核



图 2 HMA 法测定 HIV-1 亚型的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 2 Subtype analysis of HIV strains using HMA method

Left to right, the hybridization results of 880508-1 and -11 with standard plasmids of HIV-1 subtype A1, B2, B3, C1, D3, E1, E2 and negative control respectively.

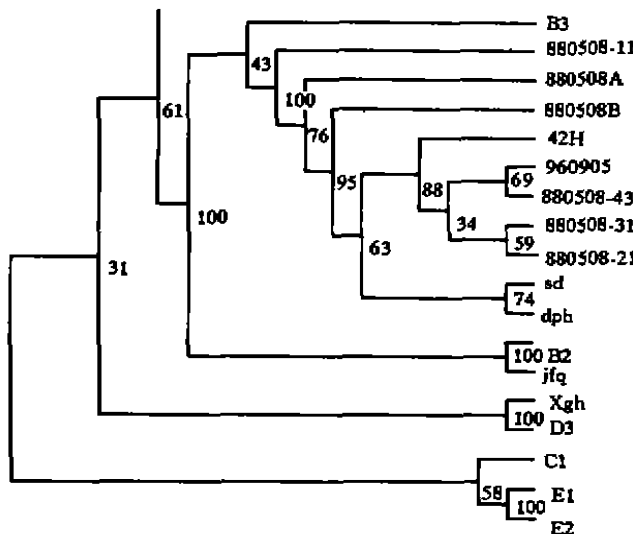


图 3 不同 HIV 毒株的亚型测定结果及其相互间的关系

Fig. 3 Subtype analysis and the relationship among different strains

苷酸和氨基酸的变异距离有下降的趋势(表 2)。

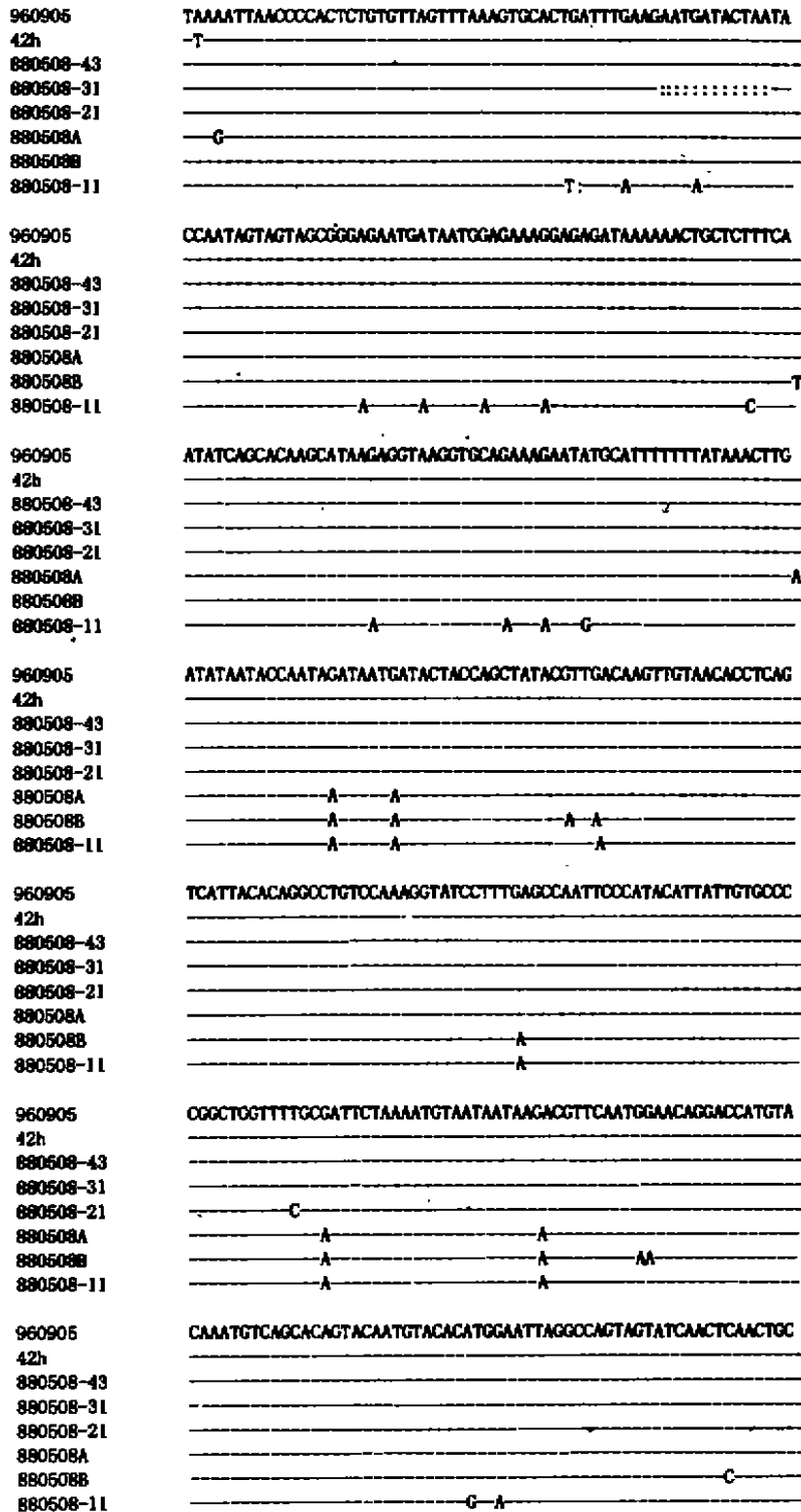
所有 HIV 毒株的核苷酸序列的同源性均大于 92%, 变异距离小于 7.5%, 随着传代数的增加核苷酸序列更趋于一致, 代间同源性由 92% 上升至 99%, 而变异距离由 7.5% 下降为 0.6%。氨基酸同源性也由 92% 上升为 99%, 变异距离由 7.94% 下降为 0.25%。

3 讨论

HIV 高度变异性的分子基础是复制过程中反转录酶的忠实性

较差^[2], 即缺乏 3'-5' 外切核酸的校读功能, 导致 RNA 转录为 DNA 时经常出现错误。真核细胞 DNA 多聚酶的错误率大约是 $10^{-10} \sim 10^{-9}$, 而 HIV-1 反转录酶平均每一个位点的错误率是 $10^{-4} \sim 10^{-3}$, 这意味着每一个 HIV 基因组(10^4 碱基)的反转录酶都有 1~10 个错误。HIV 变异的频率是真核细胞 DNA 基因组的 100 万倍^[2]。

在 HIV 感染者体内, HIV 变异株出现的频率是 HIV 复制周期的函数。在 HIV 感染的所有阶段, 都有持续高水平的 HIV 复制, 有时相对较低水平的血浆 HIV RNA 是通过高水平的 HIV 复制和破坏所保持的, 更高水平的 HIV 复制发生在外周组织中, 特别是淋巴器官^[3,4]。



960905	TGT TAAATGCCAGTCTAGCAGAGAAGAGGTAGTAATTAGATCTGTCAATTTCCACAGACA
42h	-----
880508-43	-----
880508-31	-----
880508-21	-----
880508A	-----C-----A-A-A-----A-----G-----
880508B	-----A-----A-A-----A-----
880508-11	-----A-----A-----A-----
960905	ATGCTAAAACCATAAATAGTACAGCTGAACACATCTGTAGAAATTAATTGTACAAGACCCA
42h	-----
880508-43	-----
880508-31	-----CA-----
880508-21	-----CA-----
880508A	-----T-----
880508B	-----A-----A-----G-----
880508-11	-----A-----A-----
960905	ACAAAAATACAAGAAAAAAA: TCCGTA TCCAGAGGGGACCAGGAGGCATTTGTTACA
42h	-----C-----: -A-----A-----A-----
880508-43	-----: -A-----
880508-31	-----: -----
880508-21	-----C-----: -----
880508A	-----: -----
880508B	-----: -----A-----A-----
880508-11	-----C-----A-----AA-A-----A-----
960905	ATAGGAAAAATAGGAAATATGAGACAAGCACATTGTAACATTAGTAGACAAAAATGGAAT
42h	-----
880508-43	-----
880508-31	-----
880508-21	-----
880508A	-----
880508B	-----A-----A-----A-----
880508-11	-----A-----AA-----A-----A-----
960905	AACACTTTAAACAGATAGCTAGCAAATTAAGAGAACAATTTGGAAATAATAAAACAATA
42h	-----
880508-43	-----
880508-31	-----
880508-21	-----
880508A	-----T-----
880508B	-----A-----
880508-11	-----C-----A-A-----AA-----
960905	ATCTTTGAGCAATCCTCAGGAGGGGACCAGAAATTTGTAACGCACAGTTTAATTGTGGA
42h	-----
880508-43	-----
880508-31	-----
880508-21	-----
880508A	-----A-----G-----
880508B	-----
880508-11	-----A-----G-----A-----
960905	GGGGAATTTTCTACTGTAATTCACACAACCTGTTTAATAGTACTTGGTTAATAGTACT
42h	-----
880508-43	-----
880508-31	-----T-----
880508-21	-----
880508A	-----
880508B	-----C-----
880508-11	-----A-A-----A-----A-----

960905	TGGAGTACTGAAGGGTCAAATAA	CTGAAGGAAGTGACACAATCACA	CTCCATGCAGA
42h	-----	-----	-----C-----
880508-43	---	-----	-----C-----
880508-31	---	-----	-----C-----
880508-21	-----	-----	-----C-----
880508A	-----	-----	-----C-----
880508B	-----	-----	-----C-----
880508-11	---	A--A-----A-----	-----
960905	ATAAAACAAATTATAAACATGTGC	CAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTAT	GCCCTCCATC
42h	-----	-----	-----
880508-43	-----	-----	-----
880508-31	-----	-----	-----
880508-21	-----	C-----	-----
880508A	-----	-----	-----
880508B	-----	-----	-----
880508-11	-----	G-----A-----	-----
960905	AGTGGACAAATTAGATGTTTCATCA	ATAATTACTGGGCTGCTATTAACA	AGAGATGGTGGT
42h	-----	A-----	-----
880508-43	-----	A-----	-----
880508-31	-----	A-----	-----
880508-21	-----	A-----	-----
880508A	-----	A-----	-----
880508B	-----	T-----A-----	-----
880508-11	-----	A-----A-----A-----	A--A--A-----
960905	AATAACAACAATGGGCTGAGATCTTC	CAGACCTGGAGGAGATATGAGGG	ACAATTGG
42h	-----	-----	-----
880508-43	G-----A-----C-----	-----	-----
880508-31	G-----A-----C-----	-----	G-----
880508-21	G-----A-----C-----	-----	-----
880508A	G-----A-----C-----	-----	-----
880508B	G-----A-----C-----	-----	-----
880508-11	G-----AA-----C-----A-----	-----	A--A--A-----AA-----
960905	AGAAGTGAATTATATAAATATAA	AGTAGTAAAAATTGAACCATTAGG	AGTAGCACCACC
42h	-----	C-----	-----
880508-43	-----	-----	-----
880508-31	-----	-----	-----
880508-21	-----	A-----A-----A-----	-----
880508A	-----	-----	-----
880508B	-----	-----	-----
880508-11	-----	A-----A-----A-----AA-----	-----
960905	AAGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAG	CAGAGAAAAAAGA:GCAGTGGAA	TAGGAGCTTTGTT
42h	-----	-----	-----
880508-43	-----	-----	-----C-----
880508-31	-----	-----	-----
880508-21	-----	A-----A-----A-----A-----	A-----AA-----
880508A	-----	-----	-----
880508B	-----	-----	-----
880508-11	-----	A-----A-----A-----A-----	-----
960905	C		
42h	-		
880508-43	:		
880508-31	-		
880508-21	-		
880508A	-		
880508B	-		
880508-11	-		

图 4 HIV 毒株 env 基因 1 200 bp 片段核酸序列
 "----"代表与上列核苷酸相同; "—"代表核苷酸缺失。

Fig. 4 Nucleotide sequences of 1 200 bp fragments derived from HIV env gene
 "----" Same with the upper line; "—" Nucleotide deletion.

表 1 不同毒株之间核苷酸和氨基酸序列的同源性 (%)

Table 1 Homogeneous of nucleotide and amino acid (%)

	880508 A	880508 B	880508 - 21	880508 - 31	880508 - 43	42h	960905	880508 - 11
	Nucleotide							
	Amino acid							
880508A	100							
	100							
880508B	97	100						
	95	100						
880508-21	96	97	100					
	92	94	100					
880508-31	97	98	98	100				
	94	96	96	100				
880508-43	97	98	98	99	100			
	94	96	96	98	100			
42h	97	97	98	98	98	100		
	94	96	96	98	98	100		
960905	97	98	98	99	99	99	100	
	94	96	96	98	98	99	100	
880508-11	93	93	92	92	92	92	92	100

表 2 不同毒株之间的核苷酸及氨基酸距离 (%)

Table 2 Distance of nucleotide and amino acid (%)

	960905 Nucleotide	42h	880508 - 43	880508 - 31	880508 - 21	880508 A	880508 B	880508 - 11
	Amino acid							
960905	0.00							
	0.00							
42h	0.59	0.00						
	0.25	0.00						
880508-43	0.59	0.85	0.00					
	0.76	1.02	0.00					
880508-31	0.68	1.11	0.60	0.00				
	1.29	1.56	1.03	0.00				
880508-21	1.68	1.86	1.45	1.37	0.00			
	3.33	3.07	3.11	3.15	0.00			
880508A	1.76	2.20	1.53	1.81	2.63	0.00		
	3.07	3.33	2.84	3.41	5.47	0.00		
880508B	2.54	2.98	2.49	2.60	3.59	2.46	0.00	
	5.46	5.74	5.26	5.87	7.94	4.39	0.00	
880508-11	7.40	7.50	7.32	7.38	7.04	6.95	6.69	0.00

感染过程中每天发生的大量复制周期提供了产生大量变异毒株的机会。

我们的研究表明, HIV 体外长期传代过程中变异的情况与在感染者体内有较大的区别, 尽管变异的现象依然存在, 如 880508 株病毒的两个克隆之间仍有一定程序的遗传差异, 但是总的来说在经历了长达数年的传代以后, HIV 变异不明显, 这说明机体体内环境在 HIV 变异的过程中起着重要的作用。HIV 感染以后可以诱发机体强烈的免疫反应, 这种反应可以在感染的早期抑制病毒复制的高峰^[5,6]。HIV 体外传代的环境与体内相比十分单纯, 在缺乏免疫压力的情况下, HIV 变异不明显, 这说明免疫学压力是 HIV 变异的主要驱动力。

一些研究显示在无免疫压力下体外传代 HIV 的状况类似体内免疫系统全面崩溃的感染末期的状况: HIV 变异株相对少, 株间变异小, 但毒力强、复制快、病毒产量高, 可形成多核巨细胞等等; HIV 在适应了体外培养的环境和宿主细胞、失去了选择压力后, 少数变异株在传代过程中经逐步稀释后逃脱优势株的抑制逐渐被固定下来而成为新的优势株^[7]。

长期传代 HIV 毒株的遗传稳定性显示它具有较好的实用性。长期传代 HIV 毒种仍然适用于 HIV 灭活效果评价、HIV 全抗原制备等多种应用研究。同时也提示试图用长期传代的方法发展 HIV 减毒活疫苗的做法可能是徒劳的。

参 考 文 献

- [1] Delwart EL, Busch MP, Kalish ML, *et al.* Genetic Subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay [J]. PCR Methods and Applications, 1995, 4; S202~S216
- [2] Vladimir V, Luka Shov, Jaap Goudsmit. HIV heterogeneity and disease progression in AIDS; a model of continuous virus adaptation [J]. AIDS, 1998, 12(Suppl A); S43~S52
- [3] Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, *et al.* HIV-1 dynamic *in vivo*: Virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time [J]. Science, 1996, 27; 1582~1586
- [4] Pantaleo G, Graziosic, Demarest JF, *et al.* HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease [J]. Nature, 1993, 362; 355~360
- [5] Moss PAH, Rowland-Jones S, Frodsham PM, *et al.* Persistent high frequency of human immunodeficiency virus-specific cytolytic T cell in peripheral blood of infected donors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92; 5773~5777
- [6] Yang OO, Kalams S, Trocha A, *et al.* Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: Evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanism [J]. J Virol, 1997, 71; 3120~3128
- [7] Delwart E L, Sheppard H W, Walker B D, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 evolution *in vivo* tracked by DNA heteroduplex mobility assay [J]. J Virol, 1994, 68; 6672~6683

Study on the Variation of the env Gene of HIV-1 *in vitro*

FANG Wei-ping*, LI Jing-yun, BAO Zuo-yi, LU Fu-shuang, WANG Hong-xia

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

* (Department of Microbiology and Immunology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: In order to understand the characteristics and rules of HIV diversity when passaged *in vitro*, the systematic study on the variation of env gene of HIV strain introduced from American in 1988 was carried out. Taking all the following strains as the objects: the 96-strain derived from

the primary strain by continuous freeze-thaw-usage in laboratory for more than eight years; the 42 h strain derived from primary strain by serial passaging with continuous changing of host cell in MT4 and HelaCD4⁺ and the strains sampled from serial passaged primary strain in MT4 cell every ten generations. The pre-DNA fragments of these HIV env gene were amplified by nested PCR. The fragment of 1 200 bp originated from the V1-V5 region was analyzed. The subtypes of these HIV strains were identified by Heteroduplexes Mobility Assay (HMA). The main results were: (1) the env gene diversity of all the strains were indistinctive, all the nucleotide homogeneous were greater than 92% and all the gene diversity distance were less than 7.5%, moreover, the gene was seem to becoming fixed as the passage going on, the homogeneous between generation risen from 92% to 99%, where gene distance decreased from 7.5% to 0.59%. (2) All strains' s subtypes were HIV-1 B3, the genetic type maintained stable during the passage. It meant that the variation of env gene of HIV *in vitro* was similar to that of infecting terminal period *in vivo*. The reasons may lie in that the more adaptive and higher virulence HIV strain, with the simple culturing circumstances and without the selective pressure of anti-HIV humoral and cellular immune existing in body. It is concluded that the characteristics of heredity maintained stable when HIVs were serial passaged *in vitro*, so passaged HIVs *in vitro* fit for use of HIV applied studies. But it is futile to want to get attenuated HIV vaccine by long term passages.

Key words: HIV; Serial passage; env gene; Diversity