维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷1期 中国病毒学 16(1):34-39
2001年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 2001

山东省归国劳务人员中HIV-1感染毒株的序列特征和亚型分析*

苏生利[1],邢 辉[2],刘传新[1],潘品良[2],黄 涛[1],傅继华[1],赵世立[1],邵一鸣[2]

(1.山东省卫生防疫站,山东济南 250014;
2.卫生部艾滋病预防与控制中心,北京 100050)

Analysis of HIV-1 Sequence and Subtype in Returned Laborers Worked Abroad in Shandong Province

SU Sheng-li, XING Hui, LIU Chuan-xin, PAN Pin-liang, HUANG Tao, FU Ji-hua, ZHAO Shi-li, SHAO Yi-ming

(*Shandong Provincial Health and Anti-epidemic Station, Jinan 250014, China*)

Abstract: To understand the molecular epidemiological characteristic of HIV-1 virus strain in laborers worked abroad in Shandong province since 1992, 11 specimens of peripheral blood of identified HIV infected cases were sampled and PBMC was separated by Ficoll density gradient centrifuge. The pre-virus DNA was extracted and the membrane protein gene *env* DNA was multiplied by nested PCR, and then the sequence of env C2-V3 region was measured and analyzed. The results indicated that 10 laborers worked abroad and 1 female-spouse of a laborer worked abroad were found catching HIV-1 A, B, C, E subtype by gene sequencing and analyzing, with subtype C 7, subtype B 2, subtype A and E 1 respectively. Thus it can be seen that the infection of HIV virus strain in the laborers worked abroad was complex. The gene variation rate of these virus strains was greatly different. It is suggested that we strengthen the detection and control of the laborers worked abroad to prevent the spread of the virus strains from other countries.

Key words: HIV-1; Laborers worked abroad; DNA sequence measurement; Subtype; Systematic tree

摘要:为了解自1992年以来,山东省归国劳务人员HIV-1感染毒株的分子流行病学特征。我们采集了11份确认为HIV-1感染者的全血分离单核细胞(PBMC),提取前病毒DNA,用套式PCR扩增HIV-1膜蛋白(*env*)基因,并对其*env* C2-V3区进行序列测定和分析。结果表明:10名归国劳工人员及1名归国劳工配偶的样本经序列测定和基因分析发现了HIV-1的4种基因亚型:A、B、C、E亚型。其中C亚型7名,B亚型2名,A和E亚型各1名。由此可见:山东省归国劳务人员中HIV-1毒株的感染情况较复杂,通过计算发现这些毒株间的基因离散率相差较大。提示应加强归国劳务人员的教育、检测和控制以防其它国家毒株传入。

关键词:HIV-1;归国劳工;序列测定;亚型;系统树

中图分类号:R512.91 **文章标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2001)-0034-06

1992年山东省在回国劳工中发现首例HIV-1感染者。近几年随着经济的发展,对外交流日趋频

收稿日期:1999-12-27,修回日期:2000-10-16

* 基金项目:山东省卫生厅基金资助(98年第1070102号)

作者简介:苏生利(1964-),男,山东寿光籍,主管技师,从事艾滋病实验室研究工作。

维普资讯 http://www.cqvip.com

繁,出国劳工不断增加,而归国劳工中HIV-1感染者也在不断上升。

HIV基因的高度变异性是HIV的主要特征,本研究共测定了11名1992年以来归国劳工HIV-1感染者全血中单核细胞前病毒 *env* 基因C2-V3区基因序列变化,与国内外资料进行比较,以反映目前山东省内归国劳工HIV-1感染毒株的流行趋势及变异情况,这对于进一步分析了解HIV-1在山东地区的传播过程与传播途径,追踪传染源,进行疫苗设计,以及补充完善分子流行病学资料都具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象

研究对象为山东10名归国劳工HIV-1抗体阳性感染者,均为男性,1名女性为归国劳工HIV感染者的配偶,年龄在24～43岁。经了解均有境外性接触的高危行为。

1.2 标本制备

采集肝素抗凝静脉血5 mL,用淋巴细胞分离液分离单核细胞,用PBS洗2遍后,加入200 μL裂解缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 10%SDS, 200 μg/mL蛋白酶K)混匀,50℃保温1 h。用酚-氯仿抽提,将DNA沉淀溶于100 μL 10 mmol/L Tris-HCl中,－20℃保存。

1.3 Nested-PCR扩增方法

设计合成多对PCR引物(表1),以 *env* B_1/K为外侧扩增引物,进行第一次PCR反应,条件为:94℃ 2 min, 55℃ 1 min, 72℃ 4 min, 2个循环;94℃ 30 s, 55℃30 s, 72℃ 3 min, 30个循环;72℃ 10 min。取5 μL PCR扩增产物,用Es7/Es8为内侧引物,按上述条件进行第二次PCR反应扩增 *env* 基因C2-V3区。

1.4 PCR产物的纯化

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳,与Marker对照判定无误后,切下特异扩增条带,用Qiagen公司的Qiaex试剂按说明提纯扩增的HIV-1DNA片段,回收的DNA溶于10 mmol/LTris-HCl(pH8.7),经琼脂糖凝胶电泳与DNA标准品比较后估算核酸浓度。

1.5 核苷酸序列测定

以提纯的第二次PCR扩增的DNA片段作为测序模板,以 *env*-D3为测序引物(表1),用ABI公司的荧光标记末端终止物循环测序试剂盒,进行PCR测序反应,模板用量约1 μg,引物用量约6 pmol。反应产物经提纯后用自动DNA序列分析仪进行序列测定。

表1 PCR和测序引物

Table 1 The primers of PCR and sequencing

引物 primer	用途 usage	序列(5'-3') sequence	在 *env* 基因的定位 The gene localization of env
env-B1	PCR	ATGGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTGT	6681-6708
env-K	PCR	GCGCCCATAGTGCTTCCTGCTGCTCC	8028-8002
env-Es7	PCR	TGTAAAACGACGGCCAGTCTCTTAAATGGCAGTCTAGC	7166-7185
env-Es8	PCR	CAGGAAACAGCTATGACCCACTTCTCCAATTGTCCCTCA	7871-7850
env-D3	Seq	TGGCAGTCTAGCAGAAGA	7195-7213

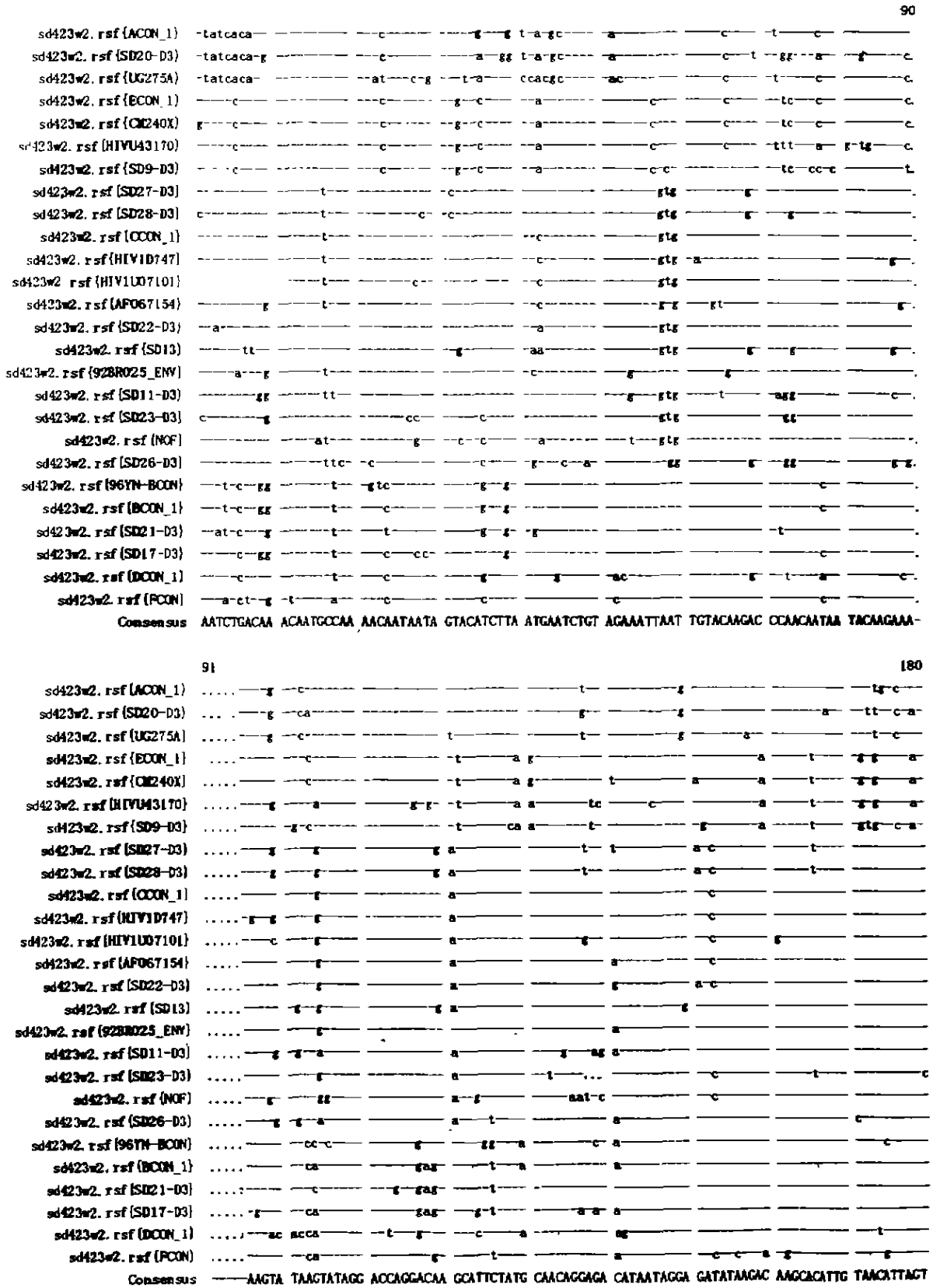
1.6 序列分析

测得的序列用Seqed软件进行编辑、校正,排列比较和同源性等分析使用威斯康星GCG公司软件包完成,分别用Pileup程序对样品及国际标准序列的排列和比较;Pretty程序计算一组序列的共享序列(Consensus Sequence);Distances计算一组序列间的基因离散率;Growtree程序做系统树(Phylogenetic tree)分析。

2 结果

经nested-PCR反应,从11名HIV-1感染者扩增到HIV-1 *env* 基因的C2-V3区片段。用 *env*-D3引物进行序列测定,测得 *env*C2-V3及其相邻区的340个碱基长的核苷酸序列。用Pileup和Pretty程序计算其共享序列(图1)。将样品的序列分别与国际HIV-1A～F6个亚型的共享序列(Acon-Fcon)进行比较,并用distances程序计算相互间的基因离散率(表2),发现样品11个毒株的基因特征比较复杂,可归纳为:①其中有7个毒株序列与国际C亚型共享序列间相距最近为(8.65%),而与A、B、D、E相距很远(22.46%～25.48%);②有2个毒株序列与B亚型共享序列十分相近,基因离散率为(6.07%),

维普资讯 http://www.cqvip.com



维普资讯 http://www.cqvip.com

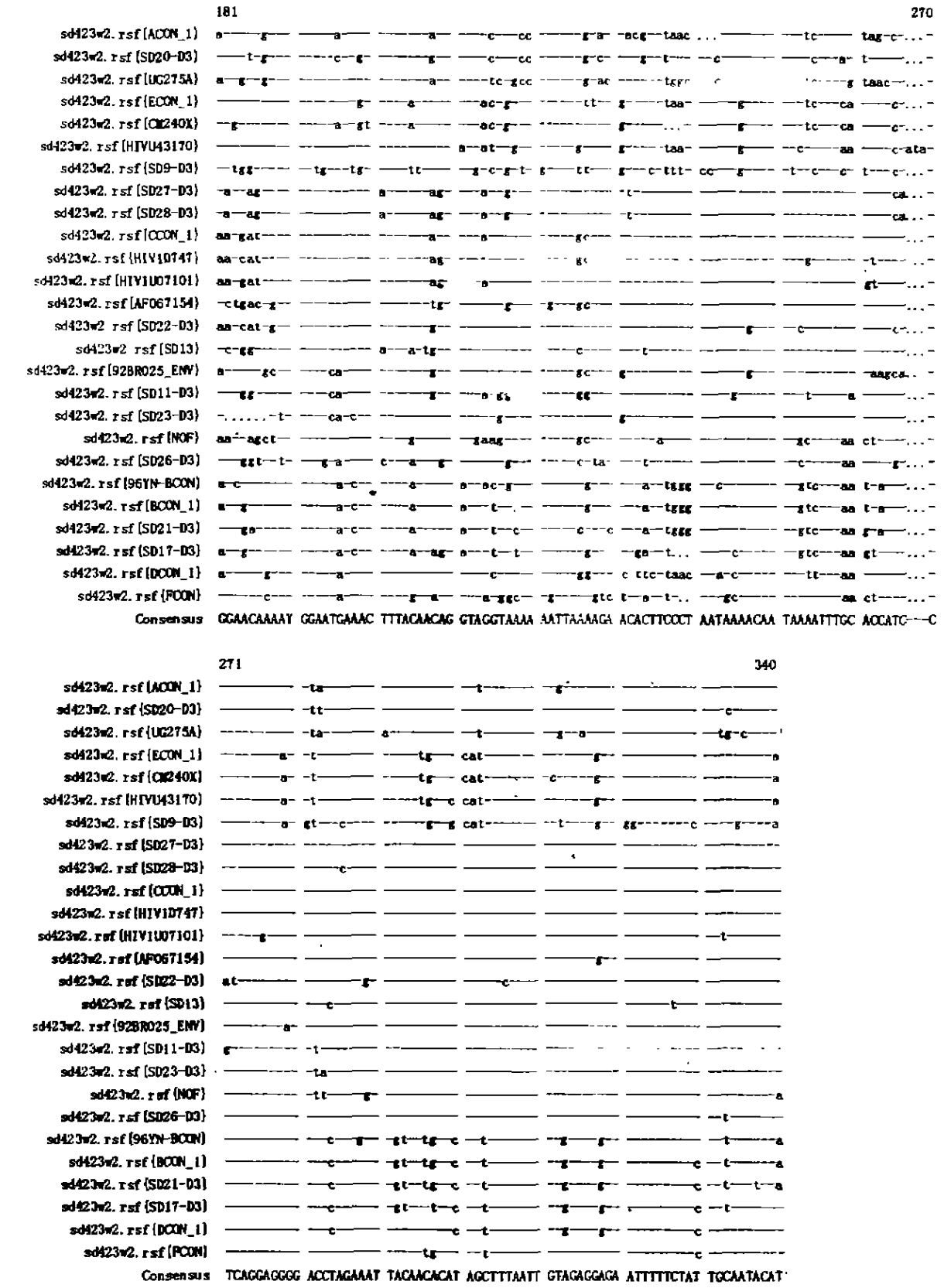


图1　山东省回国劳务人员HIV-1毒株 *env* 基因 C_2-V_3 区核苷酸序列比较及其共享序列

Fig.1　Comparative analysis of C_2-V_3 region of HIV-1 *env* gene sequence from infected Laborers worked abroad of shanddong province and their consensus sequence.

维普资讯 http://www.cqvip.com

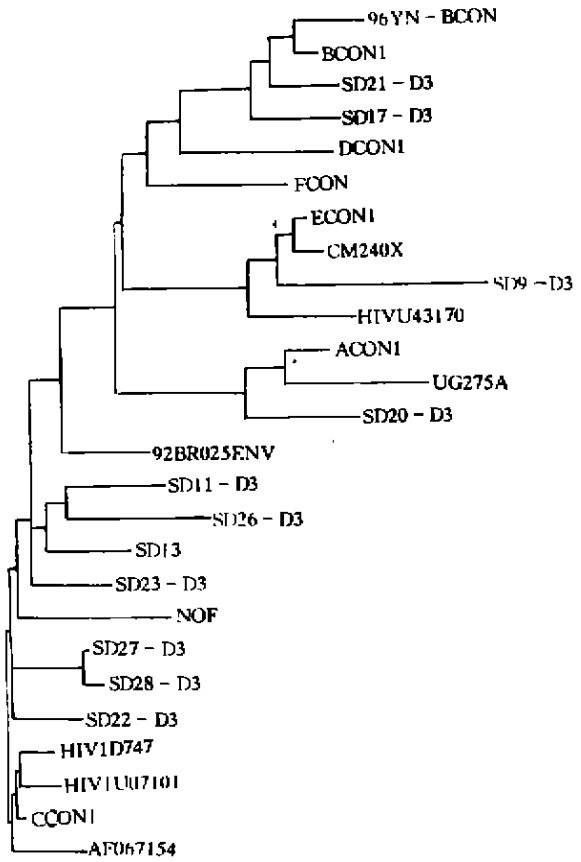


图2 山东省回国劳务人员中HIV-1毒株env基因区与国际参考株的系统树分析

国际参考序列为A(UG275A)、B、C(HIV1D747、HIVIU07101、AF067154、NOF)D、E(CM240X、HIVU43170)、F

Fig.2 Systematic tree analysis of the env gene region of HIV-1 strain from infected laborers worked abroad of Shangdong province and the international strains of reference

而与其它亚型的差异较大(20%-34.15%)；③1个毒株序列与A亚型间距离较近(基因离散率为11.46%)与其它亚型相距较远(22.67%～28.69%)④1个毒株与E亚型间相距较近(13.91%)而与其它亚型共享序列间距离较远(29.30%～34.54%)。

进一步的系统树分析显示(图2)，在与各亚型的共享序列而且及其各亚型代表毒株序列的比较显示，上述图1中的7个毒株与C亚型共享序列及HIV1D747，HIV1V07101，AF067154印度C亚型毒株聚集在一起，并远离其它亚型的毒株；2个毒株在系统树分析中则全部聚集于B亚型的共享序列和云南96YN-Bcon亚型毒株，而远离其它亚型的毒株；有1个毒株与A亚型共享序列及VG275A非洲A亚型代表株聚集在一起，而远离其它国际亚型毒株及代表株序列；还有1个毒株在系统树中与Econ及CM240X泰国E亚型毒株聚集在一起，而远离其它亚型毒株。

上述结果分析说明，在我们采集的11份样本中有7人携带的是C亚型HIV-1毒株，2人携带有B亚型毒株，1人是A亚型毒株，还有1人是E亚型毒株。

3 讨论

本研究对11名HIV-1感染者PBMC中HIV-1 env C2-V3及其邻近区序列进行分析后发现，这11份样品中存在A、B、C和E四种亚型HIV-1毒株的流行。他们中6名去非洲的回国劳工为C亚型，2名分别去乌克兰和和博茨瓦纳的劳工为欧美B亚型，1名去几内亚比绍的劳工为A亚型，另1名曾去泰国、日本、印度尼西亚等国家的劳工为E亚型。这与国内有关文献报道相一致[1~4]。

本文中报道的这6名感染C亚型的回国劳工到过非洲南部的博茨瓦纳、莱索托等国家，这与C亚型主要流行于非洲南部的报道是相一致的[5]这些C亚型的劳工多数是1995年前检出的，经 *env*

表2 山东回国劳工HIV-1亚型毒株与其A-F国际亚型和部分参考毒株基因离散率比较

Table 2 Comparative analysis between the gene disperse rates of the strain of HIV-1 subtypes from infected Laborers worked abroad of Shandong province and the A～F international subtypes and some strains of reference

亚型 Subtype	基因离散率 Genetic distance* (mean±SD%)									
	亚型内	A		B		C		E		DCON1	FCON
	Intergroup	ACON1	UG275A	BCON1	96YN-BCON	CCON1	HIVIV07101	ECON1	CM240X		
SD-C(n=7)	12.31±3.53	24.15±1.84	30.05±1.09	5.47±2.36	27.88±1.41	8.65±2.94	10.36±4.14	23.76±1.07	24.27±2.24	25.48±1.62	22.46±0.90
SD-A(n=1)		11.46	18.19	27.08	28.69	22.67	25.07	24.90	26.68	26.19	26.58
SD-E(n=1)		31.27	37.41	29.47	32.48	29.30	33.83	13.91	15.57	30.80	31.97
SD-B(n=2)	11.81	24.34	34.15	6.07	12.16	21.88	22.98	25.58	25.76	19.90	19.43

*序列基因离散率是用GCG程序计算C_2-V_3区核苷酸序列得到

维普资讯 http://www.cqvip.com

基因序列分析研究后发现其彼此间的基因离散率达12.31%。根据HIV-1毒株基因平均每年以0.5%～1%[6,7]的速度变异计算,可推断HIV-1C亚型毒株在山东省内的流行时间大约有7～8年左右。从与国际其它地区流行的C亚型代表株看,山东C亚型与国际标准C亚型(Ccon)及印度C亚型代表株HIV1V07101, HIV1D747的基因离散率分别为(8.65%,10.36%,10.34%)。印度C亚型起源于非洲,而且C亚型在非洲流行时间较长已发生变异。流行病学资料显示,这些劳工在境外均有与当地妓女的性接触史,而且性伙伴并非固定1人,加之感染时间较长,估计可能毒株在体内已发生变异。有否重组HIV-1病毒株尚有待进一步研究。1对感染HIV-1 C亚型的夫妇,从共享序列及系统树分析中可以看出,感染的毒株也完全一致。

A亚型HIV-1毒株是最早发现于非洲,并在非洲广泛流行的一种HIV-1毒株[2]。从序列分析结果表明,1例A亚型毒株与非洲VG275A亚型毒株很接近,流行病学资料显示该感染者到过非洲西部的几内亚比绍,其感染途径为境外性途径感染,而无其它可能的途经。以上结果表明,非洲的A亚型毒株已经由非洲回国劳工传入我省。

通过序列分析,各毒株间基因离散率分析,发现1个样品为在泰国性传播人群中广泛流行的HIV-1E亚型毒株。基因离散率数据表明这份样品与E亚型国际标准毒株的距离为13.91%与泰国CM240X毒株间为15.57%而与已知的其它亚型毒株及国际标准亚型间的距离都在21%～37%之间。系统树分析结果也表明,这个样品与E亚型国际标准毒株及来自泰国毒株CM240X聚在一起,但距离不是太近。结合流行病学资料,这名劳工曾去泰国、印度尼西亚、日本等国家,有境外性接触史,是否还有其它亚型感染的可能,还有待于进一步研究。

随着社会开放政策的不断深入,对外交往更加频繁,近几年HIV在我省的流行数量迅速增长,尤其在归国劳务人员中发现的HIV-1感染者,呈现为多种HIV-1M组病毒基因亚型混合存在的情况,出现A、B、C、E各种亚型,感染情况复杂。这预示着今后对这一人群的艾滋病预防将会变得更加复杂和困难。因此应加强对归国劳务人员的抗体检测和控制,同时据此卫生部门也应及早制定相应的预防与控制艾滋病的政策,从而有效的预防HIV-1毒株在全省的蔓延,以防其他亚型毒株传入我省造成更大危害。

参考文献

[1] 冯铁建,邵一鸣,李良成,等. 深圳地区HIV-1流行毒株的*env*基因序列测定和亚型分析[J]. 中华传染病杂志,1998,16(4):203-206.

[2] 苏玲,邢辉,羊海涛,等. 中国首例人类免疫缺陷病毒(HIV-1)A亚型毒株的鉴定[J]. 病毒学报,1997,13(3):264-267.

[3] Cheng H, Zhang J, Young N L, *et al*. Introduction of HIV-1 subtype E into Yunan[J]. Lancet, 1994, 344: 953-954

[4] 曾常红,苏玲,江立敏,等. 广东省HIV-1流行毒株的基因序列测定和亚型分析[J]. 中华流行病学杂志,1998,19(5-B):313-315.

[5] 邵一鸣,赵全璧,王斌,等. 我国云南德宏地区HIV感染者HIV毒株膜蛋白的序列测定和分析[J]. 病毒学报,1994,10(4):291-299.

[6] Murhpy E, Korber B, Georges-Courbot MC, *et al*. Diversity of V3 Region Sequence of Human Immunodeficiency Viruses type 1 from the Central African Republic[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1993, 9:997.

[7] Jaons W, Heyndrickx J, Fransen K, *et al*. Genetic Analysis of ENV Subtype Gand Hin Central Africa[J] AIDS Res Hum Retroviruses, 1994, 10:877.