

深圳市 HIV-1 毒株的流行状况[△]

冯铁建[#], 赵广录, 陈琳, 王晓辉, 石向东

(深圳市疾病预防控制中心, 深圳 518020)

摘要: 目的 了解深圳地区人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 毒株亚型及流行情况, 分析其传染来源和传播规律。**方法** 应用巢式聚合酶链反应技术, 对 122 例在深圳市发现的 HIV-1 感染者外周血单个核细胞中的 *env* 基因和 *gag* 基因进行扩增, 并对各基因区核苷酸序列进行测定和分析。**结果** 122 份样本中共存在 CRF01_AE、CRF08_BC、CRF07_BC 3 种重组毒株以及 B'、B、C 3 种亚型, 其在所有分析样本中的比例分别为 45.1% (55/122)、31.1% (38/122)、6.6% (8/122)、14.8% (18/122)、1.6% (2/122) 和 0.8% (1/122)。CRF01_AE、CRF08_BC、CRF07_BC、B 和 B'亚型间的组内离散率分别为 (4.455 ± 1.478)%、(2.997 ± 1.345)%、(4.380 ± 2.024)%、(5.186 ± 2.487)% 和 (4.869 ± 2.638)% , 与部分国内和国际参考株 01AE.TH.90.CM240、97CNGX-9F、CN.97.C54A、B.US.83.JRFL、RL42 核苷酸序列间的离散率分别为 (5.228 ± 0.823)%、(3.634 ± 1.073)%、(4.233 ± 1.119)%、(4.950 ± 2.564)%、(5.795 ± 2.198)%。CRF07_BC 和 CRF08_BC 亚型以吸毒人群为主, CRF01_AE 重组亚型以性途径和吸毒人群为主, B 和 B'亚型主要分布在静脉吸毒、性传播和献/输血人群。**结论** 深圳地区有 3 种亚型和 3 种重组亚型 HIV-1 毒株流行, CRF01_AE、CRF08_BC 重组亚型和 B'亚型为主要流行毒株, CRF01_AE 是性传播人群中的主要流行毒株, CRF08_BC 和 CRF01_AE 是静脉吸毒人群中的主要流行毒株。

关键词: 人类免疫缺陷病毒 1 型; 序列分析; 亚型; 巢式聚合酶链反应

中图分类号: R512.91 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2006)05-0637-05

Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains Epidemic in Shenzhen[△]

FENG Tie-jian[#], ZHAO Guang-lu, CHEN Lin, WANG Xiao-hui, SHI Xiang-dong

(Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China)

ABSTRACT: Objective To study the epidemic status of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtypes in Shenzhen and to study their transmission source and routes. **Methods** HIV-1 *env* and *gag* genes were amplified by nested PCR from uncultured peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from 122 HIV-1 carriers confirmed in Shenzhen. The C2-V3 region (about 450 bp) of HIV-1 *env* and P17/P24 region were sequenced. **Results** Among 122 samples, 6 HIV-1 strains including 3 circulating recombinant forms (CRFs) of CRF01_AE, CRF08_BC, CRF07_BC and 3 subtypes of B', B, C were found in Shenzhen, and the percentages were 45.1% (55/122) for CRF01_AE, 31.1% (38/122) for CRF08_BC, 6.6% (8/122) for CRF07_BC, 14.8% (18/122) for B' subtype, 1.6% (2/122) for B subtype, and 0.8% (1/122) for C subtype. The intragroup genetic distances were (4.455 ± 1.478)% , (2.997 ± 1.345)% , (4.380 ± 2.024)% , (5.186 ± 2.487)% , and (4.869 ± 2.638)% , respectively. In comparison with the sequence of respective international strains 01AE.TH.90.CM240, 97CNGX-9F, CN.97.C54A, B.US.83.JRFL, and RL42, the genetic distances were (5.228 ± 0.823)% , (3.634 ± 1.073)% , (4.233 ± 1.119)% , (4.950 ± 2.564)% , and (5.795 ± 2.198)% , respectively. The major subtypes found in

△基金项目: 深圳市科技局资助项目 (200204124) Supported by Shenzhen Science and Technology Bureau (200204124); #Corresponding author Tel: 0755-25632404, Fax: 0755-25632404, E-mail: szftj@public.szptt.net.cn

injection drug users (IDUs) were CRF07_BC, CRF08_BC, and CRF01_AE strains. CRF01_AE and B' strains were epidemic mainly in sexual workers. **Conclusion** There are 3 HIV-1 subtypes (B', B, C) and 3 CRFs (CRF01_AE, CRF08_BC, CRF07_BC) epidemics in Shenzhen. The predominant subtypes varies among different transmission routes. While CRF01_AE is predominant among sexual workers, CRF08_BC and CRF01_AE are major subtypes among IDU population.

Key words: human immunodeficiency virus type 1; sequence analysis; subtype; nested PCR

Acta Acad Med Sin, 2006, 28(5):637-641

目前,世界上已经发现的人类免疫缺陷病毒 1 型 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 可分为 M (Main) 组、O (the Outline) 组和 N (Non-M, Non-O) 组。M 组是全球主要流行毒株,可分为 A、B、C、D、F、G、H、J 和 K 共 9 个亚型,以及 M 组的不同亚型和同一亚型不同毒株间的基因重组产生的 CRF01 ~ CRF14 等流行重组形式 (circulating recombinant forms, CRFs), 其中 CRF01_AE 即过去所认为的 E 亚型。HIV 发生高度变异的原因主要在于其逆转录酶无校正功能以及病毒群体在体内的快速换代,宿主的免疫选择作用,以及不同病毒 DNA 之间及病毒与宿主 DNA 间的重组^[1]。

HIV 的结构基因按顺序有 *gag* 基因、*pol* 基因以及 *env* 基因。在不同亚型毒株中, *env* 基因变异程度最大,其次为 *gag* 基因区,其中 *env* 基因的 V3-V4 区及其临近区域特别是 V3 环是主要中和抗体决定簇和辅助受体的结合部位。因此, *env* 区的基因序列特别是 V3-V4 区及其临近的基因变异成为研究 HIV-1 分型的重要依据^[2]。本研究对 2001 年 ~ 2004 年深圳

地区发现的 HIV-1 毒株流行情况进行分析,报道如下。

对象和方法

对象 2001 年 2 月 ~ 2004 年 7 月在深圳市发现的 122 例经确证的 HIV-1 抗体阳性者,其中男 84 例,女 36 例,性别不详 2 例;年龄 17 ~ 63 岁;经性途径感染 53 例 (43.4%), 静脉吸毒感染 64 例 (52.5%), 经供血或受血感染 3 例 (2.5%), 母婴传播感染 1 例 (0.8%), 感染途径不详 1 例 (0.8%); 深圳市户籍感染者 18 例, 外来流动人口 104 例。每名对象采集静脉血 3 ~ 5 ml, EDTA 抗凝 (1.5%), 分离血细胞, 分装, -20℃ 冻存备用。

前病毒 DNA 提取 采用德国 QIAGEN 公司的 DNA Blood Mini Kit, 按说明书操作步骤提取研究对象的外周血单个核细胞 HIV-1 前病毒 DNA。

引物 分别用多对引物进行 *env* 和 *gag* 区基因片断的扩增和扩增产物的测序 (表 1)。

表 1 *env* 和 *gag* 区 PCR 和测序引物

Table 1 Primers used for PCR sequence analysis of HIV-1 *env* and *gag* genes

Primer	Sequence (5'→3')	Direction	Location	Length	
Env	Env-B1	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG	Farward	6 557-6 582	1 250 bp
	Env-4	GCCCATAGTGCTTCCTGCTGCTCC	Reverse	7 811-7 792	
	Env-7	TGTCAGCACAGTACAATGTACACATG	Farward	7 002-7 021	
	Env-8	TTCACCTCTCCAATTGTCC	Reverse	7 668-7 648	
	Env-D	CTGTAAATGGCAGTCTGGCAG			
Gag	Gag F2	ATGGGTGCGAGAGCGTCAATATTA	Farward	790-814	1 242 bp
	Gag e2	TCCAACAGCCCTTTTCTAGG	Reverse	2 032-2 011	
	306	GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCC	Farward	836-857	
	Cn-gag	TAGTTCCTGCTATATCACTTCC	Reverse	1 507-1 486	
	306	GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCC			

巢式聚合酶链反应 所有反应均采用 50 μl 反应体系。

env 区反应条件: 第 1 轮, 以 env-B1/env-4 为外侧引物, 94℃ 3 min, 52℃ 30 s, 72℃ 3 min, 1 个循

环; 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。第 2 轮, 以 env-7/env-8 为内侧引物, 取第 1 轮 PCR 产物 5 μl 做模板, 94℃ 3 min, 55℃ 30 s, 72℃ 3 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 55℃

30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。

gag 区反应条件: 第 1 轮, 以 gagF2/gage2 为外侧引物, 94°C 5 min, 52°C 1 min, 72°C 150 s, 1 个循环; 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 90 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。第 2 轮, 以 306/Cn-gag 为内侧引物, 取第 1 轮 PCR 产物 5 μl 做模板, 94°C 2 min, 50°C 50 s, 72°C 90 s, 1 个循环; 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min 延伸。

PCR 产物纯化 PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 与 marker 对照鉴定无误后, 再用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳, 切下特异性片断, 用 QIAGEN 公司 QIA quick Gel Extraction 试剂盒进行片断回收, 回收后的特异性 DNA 片断置去离子双蒸水中, 用紫外分光光度计测定 DNA 浓度。

核苷酸序列测定 分别用 env-D 和 306 作为 env 和 gag 区的测序引物, env 区和 gag 区产物作为模板, 用 ABI 公司荧光标记末端终止物循环测序试剂盒进行测序反应。

序列分析 测定后的序列用 ABI 公司的 SeqEdit 软件进行编辑、校正, 然后用 GCG 公司软件和 Mega2 软件对序列进行比较和同源性分析, 将排列、

校正后的序列与国际标准参考序列用 Pileup、Pretty 和 Clustal 等软件进行排列和比较, 并用 Mega2 软件绘制系统进化树, 对亚型进行判断。

结 果

HIV-1 亚型分析 122 份样本中共有 B (欧美 B 亚型)、B'(泰国 B 亚型)、C 3 种亚型以及 CRF01_AE、CRF07_BC、CRF08_BC 3 种重组毒株, 其中 CRF01_AE、CRF08_BC 和 B'为主要流行毒株, 分别占所有研究对象的 45.1% (55/122)、31.1% (38/122) 和 14.8% (18/122), CRF07_BC、B 和 C 亚型在人群中流行较少, 分别仅占 6.6% (8/122)、1.6% (2/122) 和 0.8% (1/122)。

HIV-1 亚型的传播途径分布特点 吸毒人群中以 CRF08_BC (46.9%) 重组亚型为主, 其次为 CRF01_AE (34.4%) 和 CRF07_BC (10.9%); 性途径感染者以 CRF01_AE (60.4%) 重组亚型为主, 其次为 B' (18.9%) 和 CRF08_BC (15.1%), 而 B 亚型 (3.8%) 和 CRF07_BC 重组亚型 (1.9%) 较少; 经输献血感染者则全部为 B'亚型 (表 2)。

表 2 深圳市 HIV-1 感染者亚型分布
Table 2 Subtypes distribution among HIV-1 carriers in Shenzhen

Transmission route	n	Subtype, n (%)					
		CRF01_AE	CRF07_BC	CRF08_BC	B	B'	C
IDU	64	22 (34.4)	7 (10.9)	30 (46.9)	—	4 (6.3)	1 (1.6)
Sex	53	32 (60.4)	1 (1.9)	8 (15.1)	2 (3.8)	10 (18.9)	—
BDI	3	—	—	—	—	3 (100)	—
MTC	1	1	—	—	—	—	—
Uncertain	1	—	—	—	—	1	—

IDU: injection drug user; BDI: blood donation or infusion; MTC: mother to child

主要亚型的地区分布特点 深圳户籍人群以性接触传播感染 (15/18) 为主, CRF01_AE 是该传播中的主要流行毒株 (8/15); 广东籍 (除深圳外) 人群以静脉吸毒感染 (31/43) 为主, CRF08_BC (18/31) 和 CRF01_AE (10/31) 是该传播的主要流行毒株; 其他省籍外来人员感染者主要来自湖南、湖北、四川、广西、江西、贵州等地, 以静脉吸毒感染 (30/56) 为主, CRF01_AE (11/30)、CRF08_BC (11/30) 和 CRF07_BC (7/30) 是该人群的主要流行毒株 (表 3); 来自于中原省份经采供血途径传播主要流行毒株为 B'亚型。

深圳地区主要 HIV-1 毒株与部分国内和国际代表株的基因离散率比较 CRF01_AE、CRF08_BC、CRF07_BC、B、和 B'亚型间的组内离散率分别为 (4.455 ± 1.478)%、(2.997 ± 1.345)%、(4.380 ± 2.024)%、(5.186 ± 2.487)% 和 (4.869 ± 2.638)% , 与部分国内和国际参考株 01AE.TH.90.CM240、97CNGX-9F、CN.97.C54A、B.US.83.JRFL、RL42 核苷酸序列之间的离散率分别为 (5.228 ± 0.823)%、(3.634 ± 1.073)%、(4.233 ± 1.119)%、(4.950 ± 2.564)%、(5.795 ± 2.198)%。

表3 HIV-1 不同亚型感染者的主要感染途径和地区分析

Table 3 HIV-1 infectors with different subtypes analyzed by main transmission routes and regions found in Shenzhen

Region	CRF01_AE		CRF08_BC		CRF07_BC		B'		B		C		Total
	Sex	IDU	Sex	IDU	Sex	IDU	Sex	IDU	Sex	IDU	Sex	IDU	
SZ	8	1	3	1	0	0	3	1	1	0	0	0	18
GD	8	10	1	18	0	0	3	2	0	0	0	1	43
Other	16	11	4	11	1	7	4	1	1	0	0	0	56

SZ: Shenzhen; GD: Guangdong (except Shenzhen); Other: other provinces (except Guangdong)

讨 论

深圳是一个外来务工人员 and 流动人员占多数的城市，而人员流动和高危行为发生则是艾滋病流行传播的重要影响因素。已知 HIV-1 不同亚型具有一定的地区和人群分布特点，本研究分析了 2001 ~ 2004 年深圳市流行的 HIV-1 亚型，共发现 B、B'、C 3 种亚型和 CRF01_AE、CRF07_BC、CRF08_BC 3 种重组流行毒株，其中 CRF01_AE、CRF08_BC 和 B' 亚型为主要流行毒株，分别占 45.1%、31.1% 和 14.8%，而 CRF07_BC、B 和 C 亚型在人群中流行较少，分别仅占 6.6%、1.6% 和 0.8%，而 2000 年以前，我市 HIV-1 流行毒株以 CRF01_AE 亚型 (52.7%) 和 B' (30.9%) 为主^[3]。深圳地区 HIV-1 亚型的流行格局与全国和广东省有所不同，全国以 B、C 亚型流行为主，分别占 65.4% 和 26.9%，其他亚型，如 A、E、F 等在人群中的比例相对较低^[4]；广东省 HIV-1 流行毒株以 CRF01_AE 和 CRF07_BC 重组型为主，CRF08_BC、B' 和 B 亚型较少^[5]。近年来，深圳地区 HIV-1 流行毒株与 2000 年前的流行分布情况相比亦有较明显变化，主要表现为 CRF08_BC 成为主要流行株，而 C 亚型则少见^[3]。本研究发现，CRF01_AE、CRF07_BC、CRF08_BC 3 种重组亚型毒株在所有研究对象中占 82.8%，提示重组毒株在深圳地区具有更强的传播优势。

从各亚型的人群分布来看，2000 年以前，在吸毒人群中主要为 CRF01_AE 亚型，其次为 B' 亚型和 1997 年传入我市的 C 亚型；性传播人群中主要为 E 亚型，其次为 B' 亚型，以及 90 年代早期从境外传入的 B 亚型^[3]。2001 年以来，CRF01_AE 重组亚型以性途径和吸毒人群为主，分别占各自人群的 60.4% 和 34.4%，根据其组内基因离散率 (4.455 ± 1.478)%，按照 HIV 毒株每年 0.5% ~ 1.0% 的变异率推算，CRF01_AE 在深圳地区的流行时间大约是 5 ~ 10 年；CRF08_BC 重组亚型是深圳地区另一个主要 HIV-1 流

行毒株，其所占比重约为 31%，且主要在吸毒人群中流行，近年的分析数据表明，深圳地区吸毒人群中 B'/C 重组毒株 (CRF08_BC) 已逐步取代了原来的 C 亚型毒株而成为主要的流行株^[6]，且已开始性传播人群流行。此外，本研究发现该重组亚型的一个显著分布特点是其流行人群均为广东周边地区的外来人群，其组内基因离散率为 (2.997 ± 1.345)%，在深圳流行的时间大约是 3 ~ 6 年；CRF07_BC 重组亚型所占的比例相对较小，其流行人群的分布也较为分散，主要是在深圳地区的外省籍流动吸毒人群中流行，提示 BC 亚型可能来自于西南省份并经静脉吸毒人群传入深圳。同时，本研究发现，近年来，我市性传播人群中有相当一部分人感染了主要在吸毒人群中流行的 BC 重组亚型，说明吸毒人群已经成为 2 个高危人群中 HIV-1 流行传播的“桥梁”。B' 亚型的感染人群包括了经性途径、静脉吸毒和输献血传播人员，流行人群分布则比较分散，本研究发现的 3 例在 90 年代早中期经单采浆途径传播的感染者均为 B' 亚型，与我国中原地区献血员中流行的亚型毒株一致^[7]。研究发现，2 例欧美 B 亚型感染者均为同性恋人员，其中 1 例来自香港，1 例来自安徽。CRF01_AE (原称 E 亚型) 首先主要在泰国的卖淫妇女和男性嫖客中暴发流行，经性和吸毒途径在东南亚扩散蔓延。深圳邻近香港地区和泰国、缅甸、马来西亚等东南亚国家，从深圳口岸出入境人数众多，深圳地区的社会人口构成主要为年轻人和外来流动人员，多种有利于艾滋病流行传播的因素共存。因此，多种 HIV-1 亚型毒株相继传入，其中 AE 重组亚型自 80 年代末期经去泰国旅游探亲人员传入后迅速在我市的性传播人群和吸毒者中流行，并成为我市的主要流行型别，BC 重组亚型大约在 2000 年传入我市。由于 AE 亚型通常主要在性传播人群中流行，BC 主要在吸毒人群中流行，而近年来我市吸毒人群中 AE 亚型及性传播人群中 BC 亚型流行呈现上升趋势，说明有性乱或卖淫行为的吸毒

者在我市 HIV 的传播中起相当重要的作用。

从各亚型感染者的地区分布来看,深圳户籍感染者主要为经性接触传播,且绝大部分为 CRF01_AE 重组亚型,而经静脉吸毒传播均为 CRF08_BC 重组亚型;广东省(非深圳)籍在深圳检测发现的感染者以吸毒人群为主,其主要流行毒株为 CRF08_BC 和 CRF01_AE 重组亚型。

总之,深圳地区具有多种复杂的亚型分布,流动人员中,特别是吸毒人群 HIV-1 感染毒株传入,以及吸毒者和性服务人群中 HIV-1 亚型的交叉传播,将对艾滋病的传播蔓延和新毒株的形成产生深刻影响,因此,应当采取一系列针对性的控制策略,大力开展艾滋病预防知识的宣传和教育和行为干预工作,以阻断外来亚型在深圳地区的传播。

参 考 文 献

- 1 姚 均,张福杰. HIV 分型的分子流行病学和临床意义. 传染病信息, 2002, 15(2):65-67.
- 2 杰伊 A. 利 维, 著. 邵一鸣, 张健慧, 陈 刚, 等, 译. 艾滋病病毒与艾滋病的发病机制. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2000. 146-156.
- 3 冯铁建, 陈 琳, 李良成, 等. 深圳地区艾滋病病毒分子流行病学研究. 中国性病艾滋病防治, 2001(增刊):176-178.
- 4 赵 峰, 邵一鸣, 段一娟, 等. 我国云南省艾滋病病毒感染者的长期不进展者人免疫缺陷病毒 1 型 tat 基因的序列分析. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13(1):37-40.
- 5 颜 瑾, 王 玉, 李 杰, 等. 艾滋病病毒 1 型流行株分子流行病学调查. 中国公共卫生杂志, 2005, 21(1):90-91.
- 6 Vanichseni S, Kitayaporn D, dondero TJ, *et al.* Continued high HIV-1 incidence in a vaccine trial preparatory cohort of injecting drug users in Bangkok, Thailand. AIDS, 2001, 15(3):397-405.
- 7 刘淑贞. 经输血传播 HIV 的研究热点分析. 国外医学病毒学分册, 2000, 5(7):129-131.

(2006-05-29 收稿)