

北京市 29 例新确证 HIV-1 感染者 多区段序列病毒亚型分析

宋川, 陈丹瑛, 杜鹏程, 韩俊燕, 张媛媛

首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所, 新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015

摘要: **目的** 了解北京市男男性行为人群 (MSM) 中, 29 例新确证 HIV-1 感染者病毒株的基因序列特征。 **方法** 对 HIV-1 感染者进行流行病学调查, 采集全血, 分离血浆提取病毒核酸, 应用套式反转录聚合酶链式反应 (nested reverse transcription-polymerase chain reaction, nested RT-PCR) 分别扩增 *gag*、*env* 和 *pol* 基因的部分片段, 并对扩增产物进行测序, 用 Mega 5.0 软件将测序结果与各亚型国际参考株比对, 根据基因序列离散度确定系统进化树, 综合三个区域的分型结果分析基因型及其特征。 **结果** 分析样本中扩增阳性的基因序列, 结果表明至少存在 5 种不同的 HIV-1 亚型和重组模式, 包括 3 种常见 CRF01_AE (48.4%), CRF07/08_BC (24.1%), B/B' 亚型 (10.3%), 以及罕见重组型 CRF01_AE/CRF07_BC (6.9%) 和 CRF01_AE/B (10.3%); V3 环顶端四肽分析发现, 共有五种类型的顶端四肽: GPGQ、GPGR、GPGG、GPGL 和 GPGP, 主要以 GPGQ 为主 (73.3%); 辅助受体分析结果发现, CRF01_AE 亚型和 CRF01_AE/B 亚型的样本中出现了预测为 X4 嗜性的毒株。 **结论** 北京地区 MSM 人群中 29 例 HIV-1 感染者病毒株遗传多样性高, 来源复杂, 且存在罕见 CRF01_AE/CRF07_BC 和 CRF01_AE/B 重组型, 应当继续加强 HIV-1 分子流行病学特征的监测。

关键词: 男男性行为人群; HIV-1; 基因测序; 系统进化树; 亚型特征

中图分类号: R512.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2016)11-1315-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.11.011

Sequence and subtype analysis of HIV-1 strains in *gag*, *env* and *pol* C2-V3 regions isolated from 29 newly-confirmed HIV-1 infectors in Beijing

SONG Chuan, CHEN Dan-ying, DU Peng-cheng, HAN Jun-yan, ZHANG Yuan-yuan

Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Institute of Infectious Diseases,

Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: ZHANG Yuan-yuan, E-mail: zhangyuanyuan@ccmu.edu.cn

Abstract: **Objective** To investigate the gene sequence characteristics of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) strains derived from 29 newly confirmed HIV-1 infectors among men who have sex with men (MSM) in Beijing City. **Methods**

An epidemiological survey was conducted in the 29 HIV-1 infectors and anticoagulating blood samples were collected. The plasma samples were isolated, and then RNA was extracted from each sample. The *gag*, *env* and *pol* genes were amplified by nested reverse transcription-polymerase chain reaction (nested RT-PCR) and the amplified products were sequenced. Phylogenetic analysis was performed based on genetic distance using Mega 5.0 software. The genetic subtypes were determined based on the constructed phylogenetic tree. **Results** In this study, 15 of 29 samples were PCR positive within at least 2 targeted regions. Phylogenetic analysis revealed at least 5 variants of HIV-1 and recombinants among the HIV-1 infected MSM in Beijing City, including CRF01_AE (48.4%), CRF07/08_BC (24.1%) and subtype B/B' (10.3%) and 2 rarely reported recombinants, CRF01_AE/CRF07_BC (6.9%) and CRF01_AE/B (10.3%). 5 types of 4 peptides motifs of V3-loop were found, including GPGQ, GPGR, GPGG, GPGL and GPGP. GPGQ was the predominant type (73.3%). Co-receptor analysis revealed that most strains might utilize CCR5 as co-receptor to entry cells. But X4-tropic strains also appeared in the samples of CRF01_AE and CRF01_AE/B. **Conclusions**

The genome sequences of HIV-1 strains among MSM in Beijing show high genetic diversity and complex origins; moreover, there exist 2 rarely reported recombinants, CRF01_AE/CRF07_BC and CRF01_AE/B. It is necessary to continuously strengthen the monitoring of molecular epidemiological characteristics of HIV-1.

Key words: MSM; HIV-1; Gene sequence; Phylogenetic tree; Subtype character

基金项目: 北京市医院管理局“青苗”人才计划 (QML20151701)

作者简介: 宋川 (1983-), 女, 北京人, 学士, 技师, 研究方向: 分子流行病学。

通讯作者: 张媛媛, E-mail: zhangyuanyuan@ccmu.edu.cn。

男男性行为人群 (men who have sex with men, MSM) 由于其特殊的高危性行为, 已经成为艾滋病 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 传播的重要易感人群^[1]。近年来, 北京市 MSM 人群中 HIV 感染

率呈上升趋势^[2],同时,由于 HIV 序列具有高度的变异性,在病毒传播过程中可重组产生相对独立的基因亚型(subtype),或突变为新的变异体(virant)^[3],因此,监测和鉴定一个地区 HIV 流行毒株基因亚型种类及其地域分布,不仅可以追踪 HIV 传播的轨迹,分析当地流行毒株的传播链和传播危险因素,还可以为落实干预措施、控制 AIDS 传播提供科学依据。特别是在首都北京,有必要采取有效的干预措施,以降低 HIV 的传播。本研究针对 MSM 人群,筛选北京市确证中心实验室新近确证的 29 例感染者的血浆标本中 HIV-1 病毒进行多序列片段分析,结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 样本来源、核酸提取 研究对象筛选自 2015 年北京地区 MSM 人群中经蛋白免疫印迹法(western blot, WB)确证为 HIV-1 抗体阳性的 MSM 感染者 29 例,采集外周血,分离血浆。使用 QIAamp Viral RNA extraction mini kit (Qiagen, Germany),按说明书操作步骤提取 RNA。

1.2 基因片段的扩增 病毒 RNA 经逆转录酶用随机引物首先合成 cDNA,以此 cDNA 为模板,经套式聚合酶链反应(Nested-PCR)扩增 HIV-1 gag 区部分基因 671 bp、env 基因 539 bp 和 pol 基因 1 315 bp。引物序列参见表 1,所有引物合成于苏州鸿讯生物科技有限公司。扩增体系总体积为 50 μl,94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s、55 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 30 s,重复 35 个循环,72 ℃ 延伸 5 min。每次试验设立阳性对照和阴性对照 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳与 DNA Marker 对照判定无误后,送北京睿博兴科生物技术有限公司测序。

1.3 核酸序列整理、比对和构建进化树 将测得序列用 Bioedit 软件进行编辑和校对,并与 HIV-1 不同亚型和重组型国际参考序列进行比对,利用 Mega 5.0 软

件 Neighbor-Joining tree 方法构建系统进化树(Phylogenetic tree)。根据不同基因片段区的系统进化树,综合考虑 3 个基因区域的结果,确定样本的 HIV-1 亚型。

2 结果

2.1 基因扩增与 HIV-1 亚型分析 从 29 份样本中得到 26 份 gag,15 份 env 和 26 份 pol 特异性的基因序列。通过对这三个区域基因序列系统进化树(见图 1~图 3)分析结果的综合比较,共确定至少存在 5 种不同的 HIV-1 亚型和重组模式,分别为 HIV-1 CRF01_AE 14 例(48.4%)、CRF07/08_BC 7 例(24.1)和 B/B' 亚型 3 例(10.3%)以及重组型 CRF01_AE/CRF07_BC 2 例(6.9%)和 CRF01_AE/B 3 例(10.3%)。



图 1 北京地区 MSM 人群 HIV-1 gag 基因系统进化分析

表 1 HIV-1 gag、env、pol 区片段扩增引物

基因	产物大小(bp)	引物名称	引物序列(5'-3')	位置(参考序列 HXB2)
gag	1 242	gag F2	ATG GGT GCG AGA GCG TCA RTA TTA A	790-814
		Gag e2	TCC AAC AGC CCT TTT TCC TAG G	2032-2011
	671	306	GGG AAA AAA TTC GGT TAA GGC C	836-857
		Cn-gag	TAG TTC CTG CTA TRT CAC TTC C	1507-1406
pol	1 510	MAW2	TTGGAATGTGGAAGGAAGGAC	2029-2050
		RT21	CTGTATTCTTGCTATTAAAGTCTTTTGATGGG	3509-3539
	1 315	PR01	CAGAGCCAAACAGCCCCACCA	2147-2166
		RT20	CTGCCAGTTCTAGCTCTGCTTC	3441-3462
env	714	C2V3-env F1	ACAGT TCATTGGACACATGG	6954-6973
		C2V3-env R1	CAC TTTCCAAT TGTCCITCA	7648-7668
	539	C2V3-env F2	CTGT TCAATGGCAGTCTAGC	7002-7021
		C2V3-env R2	CATGGGAGGTGGATACAT	7524-7541

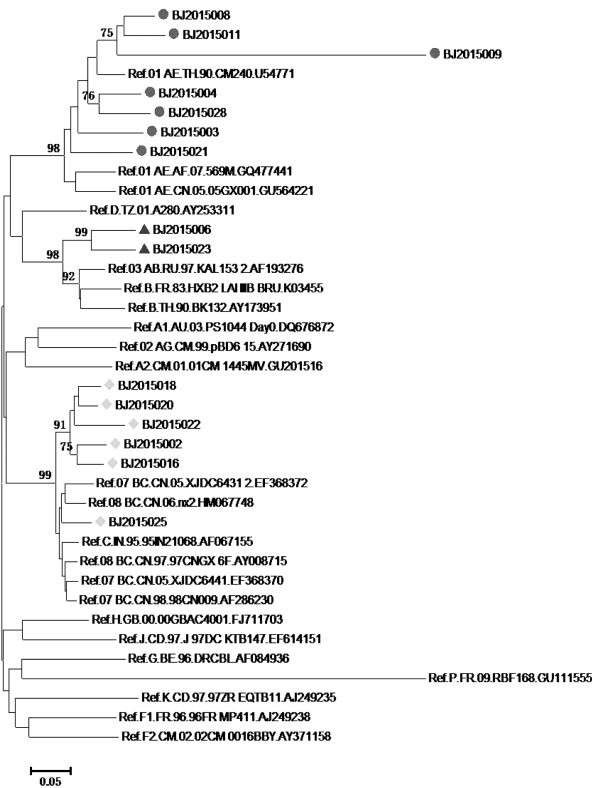


图 2 北京地区 MSM 人群 HIV-1 *env* 基因系统进化分析

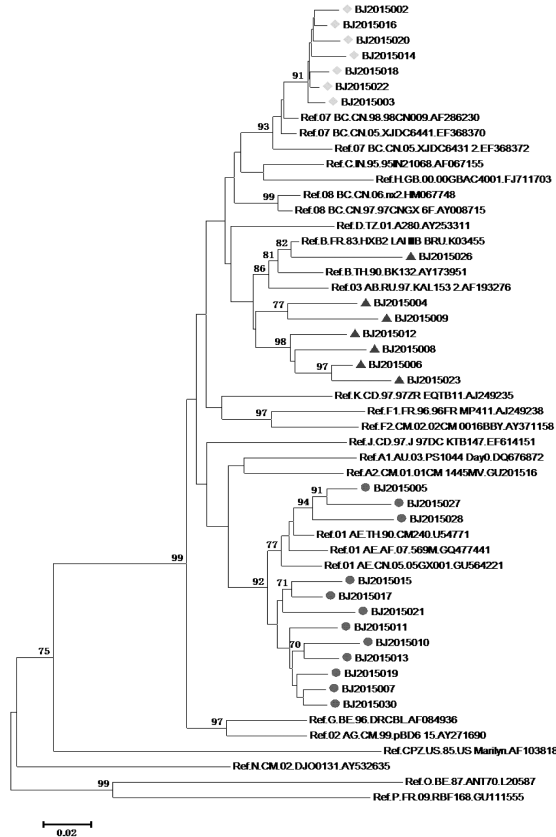


图 3 北京地区 MSM 人群 HIV-1 *pol* 基因系统进化分析

2.2 环顶端四肽分析 采用 BioEdit 软件对 C2V3 区序列进行校正后,使用 MEGA5.0 将校正后的 C2V3 区

序列翻译成氨基酸序列,并进一步分析 V3 环顶端四肽。结果显示,15 份 *env* C2V3 区序列共有五种类型的顶端四肽:GPGQ、GPGR、GPGG、GPGL 和 GPGP,主要以 GPGQ 为主(73.3%),同时也发现了较为罕见的 GPGG、GPGL 和 GPGP,分别占 6.7%。其中 CRF01_AE 有 3 种,CRF08_BC 有 2 种;B/B'亚型为 GPGG 类型,CRF01_AE/CRF07_BC 和 CRF01_AE/B 亚型由于样本例数较少,仅出现了 1 种顶端四肽模式。结果见表 2。

表 2 HIV-1 各基因型顶端四肽分布情况(*n*/亚型例数)

顶端四肽	CRF01_AE	CRF07_BC	subtype B	CRF01_AE/CRF07_BC	CRF01_AE/B
GPGQ	3/5	5/6		1/1	2/2
GPGR	1/5				
GPGG			1/1		
GPGL	1/5				
GPGP		1/6			

2.3 辅助受体分析 采用在线分析工具 Geno2pheno [coreceptor] 2.5 (<http://coreceptor.geno2pheno.org/index.php>),预测病毒株的辅助受体。假阳性率默认值设置为 10%^[4],结果见表 3。其中,CRF01_AE 亚型和 CRF01_AE/B 亚型的样本中出现了预测为 X4 嗜性的毒株。

表 3 北京地区 HIV-1 各亚型辅助受体预测

辅助受体类型	CRF01_AE	CRF07_BC	subtype B	CRF01_AE/CRF07_BC	CRF01_AE/B
CCR5	3	6	1	1	1
CXCR4	2	-	-	-	1

3 讨论

根据血清学和基因序列的差异,HIV 分为 HIV-1 型和 HIV-2 型,前者广泛分布于世界各地,是造成 HIV/AIDS 流行的主因^[5]。由于 HIV-1 各亚型之间容易发生基因重组使 HIV 病毒具有高度变异的生物学特性,给诊断和疫苗研发带来了诸多困难^[6]。因此对 HIV 病毒进行分子流行病学监测对我国的 HIV 疫情控制具有重要意义。

HIV-1 型分为三个组,M 组、N 组和 O 组,其中 M 组又可分为 A、B、C、D、F、G、H、J、K 共 9 个基因亚型,不同亚型间的基因经过重组可形成多种独特型重组模式(unique recombinant forms, URFs)和流行重组模式(circulating recombinant forms, CRFs)。目前全球已经发现了多达 75 种 HIV-1 流行重组型^[4]。在传播过程中,病毒亚型和重组模式的分布通常表现出在特定的地区和人群中保持相对稳定的特点^[1]。中国主要的 HIV-1 流行亚型包括 B/B', 01_AE, 07_BC, 08_BC 亚型以及其他 CRFs 和 URFs^[5-6]。本研究中,29 例感染者血浆病毒序列分析显示,HIV-1 基因型趋于多样化,

特别是出现了 CRF01_AE/CRF07_BC 和 CRF01_AE/B 重组型。CRF01_AE/B 重组型于 2001 年首次在泰国发现^[7],近三年来,该基因型在我国江苏和北京地区亦时有报道^[8-9],本次研究样本中也发现存在有 CRF01_AE/B 重组型,提示该重组型病毒株可能已经成为北京地区 MSM 人群中重要的流行株,需要引起重视。另外,还发现了两种 CRF01_AE/CRF07_BC 重组型,该重组型在台湾南部、江苏、吉林、四川和广西等省均有发现^[10],但在北京地区尚无报道,提示北京地区 MSM 人群感染的 HIV 基因型复杂,来源多样,有必要继续加强分子流行病学监测工作。

本研究中,不同亚型中存在不同的 V3 环顶端四肽变异型。在 *env* C2V3 区发现的 7 种 V3 顶端四肽变异型,除 B (B') 亚型外,GPGQ 在各亚型中均占优势,与前期研究结果一致^[11-12]。Stanfield 等^[13]的研究发现 GPGQ 为高度保守序列,常在非 B 亚型中出现,本研究结果与之一致。但是,CRF01_AE 的 V3 环顶端四肽呈现出比以往更复杂的多样性,其中 GPGL 未在国内以往研究中被报道。同时,本研究在 B 亚型中也发现了一种新的顶端四肽 GPGG,提示北京地区 *env* 基因 V3 环顶端四肽基序出现了新变化。由于两者为新发现的顶端四肽,其发生机制尚未明确,推测这种新的突变与病毒重组及宿主对病毒的免疫压力有关,可能会诱导病毒-细胞的融合能力发生改变。辅助受体预测的结果显示,除了 CRF01_AE 和 CRF01_AE/B 亚型的样本外,其他样本的 HIV-1 病毒均可能利用辅助受体 CCR5 进入宿主。而 X4 嗜性仅在 CRF01_AE 和 CRF01_AE/B 亚型样本中出现,这可能是由于本次研究的样本数量较少导致的,亦有可能是 CRF01_AE 和 CRF01_AE/B 亚型毒株的特性,需要今后持续监测和深入研究以明了二者之间的关联。

HIV-1 的结构基因包括编码核心蛋白的 *gag* 基因、编码多聚酶类的 *pol* 基因以及编码包膜蛋白的 *env* 基因。在不同的亚型毒株中,*env* 区基因的变异程度最大。这三个区域的基因变异成为研究 HIV-1 分型的重要依据。与其他文献报道相比^[14-16],本研究采用对 *gag*、*env*、*pol* 三个区段的序列分析从而确定感染者的 HIV-1 型别,可以获得更加丰富的序列信息,得到的结果更具代表性和准确性,同时相较于全长基因测序分析,更加简便和经济。

针对北京市 MSM 人群 29 例新确证 HIV-1 感染者,采用 HIV 病毒多区域序列分析方法,发现感染者病毒株遗传多样性高,来源复杂,重组型比例较高,一定

程度的反映出,北京市 MSM 人群中 HIV-1 流行株的基因型趋于多样化,重组模式较为复杂,应当继续加强 HIV-1 分子流行病学特征的监测,为落实干预措施、控制 AIDS 传播提供科学依据。

参考文献

- [1] Choi KH, Liu H, Guo Y, et al. Emerging HIV-1 epidemic in China in men who have sex with men[J]. Lancet, 2003, 361 (9375): 2125-2126.
- [2] Yan J, Xin R, Li Z, et al. CRF01_AE/B/C, a novel drug-resistant HIV-1 recombinant in men who have sex with men in Beijing, China[J]. AIDS Res Hum Retrov, 2015, 31(7): 745-748.
- [3] Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination[J]. J Virol, 1999, 73(1): 152-160.
- [4] Sierra S, Kaiser R, Lubke N, et al. Prediction of HIV-1 coreceptor usage (tropism) by sequence analysis using a genotypic approach[J]. J Vis Exp, 2011, (58): 616-620.
- [5] Hemelaar J. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic[J]. J Infect, 2013, 66(5): 391-400.
- [6] He X, Xing H, Ruan Y, 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.
- [7] Tovanabutra S, Polonis V, De Souza M, et al. First CRF01_AE/B recombinant of HIV-1 is found in Thailand[J]. Aids, 2001, 15(8): 1063-1065.
- [8] 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 Retrov, 2014, 30(7): 706-710.
- [9] Li Z, Li J, Feng Y, et al. Genomic characterization of two novel HIV-1 unique (CRF01_AE/B) recombinant forms among men who have sex with men in Beijing, China[J]. AIDS Res Hum Retrov, 2015, 31(9): 921-925.
- [10] Wang Y, Wei H, Xu W, et al. Identification of a novel CRF01_AE/CRF07_BC recombinant form in men who have sex with men in Sichuan, China[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2016, 32(7): 718-721.
- [11] Choi KH, Lui H, Guo Y, et al. Lack of HIV testing and awareness of HIV infection among men who have sex with men, Beijing, China[J]. AIDS Edu Prev, 2006, 18(1): 33-43.
- [12] 罗皓,梁浩,邵一鸣,等.广西 HIV-1 毒株膜蛋白 V3 环氨基酸变异分析[J].实用预防医学,2008,15(1): 11-16.
- [13] Ruan Y, Luo F, Jia Y, et al. Risk factors for syphilis and prevalence of HIV, hepatitis B and C among men who have sex with men in Beijing, China: implications for HIV prevention[J]. AIDS Beh, 2009, 13(4): 663-670.
- [14] 叶景荣,苏雪丽,郝明强,等.北京市人类免疫缺陷病毒-1 B 亚型分子的流行特征[J].中华传染病杂志,2013,31(6): 558-560.
- [15] 刘志英,李海英,张彤,等.北京市部分男男同性恋人群中 HIV-1 分子流行病学研究[J].首都医科大学学报,2009,30(5): 616-620.
- [16] 程春林,冯毅,何翔,等.中国南方四省区流行的 HIV-1 CRF01_AE 病毒株基因特征研究[J].中华流行病学杂志,2009,30(7): 720-725.