

河南省和云南省 HIV-1 病毒 env 基因在脑脊液及血液中基因型分析

李 莉, 赵焕英, 武彦宁, 刘利峰

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(编号:81200848)

作者单位: 100069 北京, 首都医科大学附属北京佑安医院性病艾滋病实验室(李 莉, 刘利峰); 首都医科大学(赵焕英); 北京肝病研究所(武彦宁)

作者简介: 李 莉(1969-), 女, 医学博士, 副研究员, 研究方向: 感染传染性疾病的诊治。E-mail: wang.lily@tom.com

通讯作者: 刘利峰(1978-), 男, 医学博士, 助理研究员, 研究方向: 艾滋病基础研究。E-mail: liulif68@yahoo.com.cn

[摘要] **目的** 了解河南省和云南省 HIV-1 病毒 env 基因在脑脊液及血液中的亚型变化。**方法** 收集 6 例河南省和 5 例云南省 HIV-1 阳性病人的血浆及脑脊液标本并提取 RNA, 逆转录为模版 DNA 后, 采用巢式 PCR 法扩增 env 基因, 对扩增产物进行核苷酸序列测定, 构建系统进化树并进行离散度分析。**结果** 云南省各基因亚型与 CRF07-BC、CRF08-BC 和 C 亚型相近, 河南省各基因亚型与 B 和 B' 亚型相近; 河南人群脑脊液的测序结果显示患者 1 的部分克隆株与患者 5 的基因亚型一致, 云南人群中 12 号患者和 127 号患者的血液及脑脊液的病毒亚型来自不同的分支, 而其他患者的血液与脑脊液的病毒亚型一致。河南省 HIV-1 各亚型分离株脑脊液和血液间基因离散度差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 云南省 HIV-1 基因亚型为 C 亚型, 而河南省为 B 和 B' 亚型。脑脊液和血液中的病毒亚型存在变异, 中枢神经系统中 HIV 病毒的离散度低于血液中 HIV 病毒的离散度。

[关键词] 人类免疫缺陷病毒; 基因亚型; 序列分析; 进化树

[中图分类号] R 512.91 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)04-0291-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.04.01

Genotype analysis of HIV-1 env gene in cerebrospinal fluid and plasma of infected Chinese patients in Henan and Yunnan Provinces Li Li, ZHAO Huan-ying, WU Yan-ning, et al. Laboratory of STD and AIDS, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

[Abstract] **Objective** To monitor the epidemic subtypes and evolution of HIV-1 in cerebrospinal fluid and plasma of infected Chinese patients in Henan and Yunnan Provinces by analyzing env gene. **Methods** The C2-V5 regions of the env gene was amplified by nested PCR following RNA reverse transcription extracted from both cerebrospinal fluid (CSF) and blood samples of HIV-1 positive patients. The amplicons were then sequenced, and the genetic subtype was identified by comparative analysis. The phylogenetic tree was constructed. **Results** Sequence analysis revealed that the sequences from Yunnan Province clustered closely with subtypes CRF07-BC, CRF08-BC, and C, and Henan with subtypes B and B'. Some CNS clonal sequences from Patient 1 of Henan Province fell on different branches and clustered closely with the sequences of Patient 5; The sequences from the CSF and blood in patients 12 and 127 from Yunnan Province were all monophyletic and fell on different branches, but in the other three patients sequences from the CSF and blood were intermingled with each other. The levels of diversity revealed significant difference between the CSF and plasma samples from Henan patients ($P < 0.05$). **Conclusion** HIV-1 gene C subtype prevailed in Yunnan Province, while B and B' subtypes prevailed in Henan Province. The sequences from blood showed a significantly higher divergence from those from the CSF.

[Key words] HIV; Gene subtype; Sequence analysis; Phylogenetic tree

作为逆转录病毒的人类免疫缺陷病毒(HIV), 由于缺乏有效的病毒 RNA 聚合酶的校正功能, 其基因变异在速度和数据程度上极为显著, 从而造成其在世

界范围内流行过程中出现了许多变异株, 形成地区性或人群特定性的亚型(subtype)分布。I 型人类免疫缺陷病毒(HIV-1)包膜基因 env 长约 2.6 kb, 其

蛋白产物 gp160 经酶切后形成表面糖蛋白 gp120 和跨膜糖蛋白 gp41,介导病毒对宿主细胞的吸附和穿入^[1]。因此,HIV 病毒可以进入人类中枢神经系统,引起中枢神经系统疾病并导致认知、运动、行为等症状,形成艾滋病痴呆综合症(AIDS Dementia Complex,ADC)^[2]。有研究^[3]认为,HIV-1 env 基因序列在血液及脑中存在差异。HIV-1 不同株或亚型之间最具特征的基因改变主要位于 env 基因的 V3 区^[4],因此,我们对河南献血人群 HIV 感染者和云南吸毒人群 HIV 感染者的血液及脑脊液中 HIV 病毒的 env 基因的 V2 ~ V5 区进行了序列测定和亚型分析,探究中国不同地区、不同感染途径 HIV-1 长期感染者(HIV 感染超过 10 年)脑脊液和血液中 HIV 病毒 env 基因 C2 ~ V5 区毒株变异的情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 HIV-1 感染者血标本的采集 河南省 HIV-1 阳性患者 6 例,血液及脑脊液采集时间为 2010-03 ~ 2010-08,感染途径为不安全采供血,所有感染者均经河南省疾病预防控制中心 AIDS 确证,实验室检测为 HIV-1 抗体阳性。云南省 HIV-1 阳性患者 5 例,血液及脑脊液采集时间为 2010-03 ~ 2010-05,感染途径为静脉吸毒,所有感染者均经云南省疾病预防控制中心 AIDS 确证,实验室检测为 HIV-1 抗体阳性。患者均采集 5 ml 静脉血及脑脊液,将分离后血清及脑脊液置于 -80 °C 冻存。

1.1.2 试剂和仪器 Taq DNA 酶、dNTP、PCR marker(DL 2 000)、PrimeScript® One Step RT-PCR Kit Ver. 2 均为大连宝生物工程有限公司产品。pGEM-T Vector Systems 购自 Promega 公司。QIAamp Viral RNA Mini Kit 购自 Qiagen 公司。PCR 产物纯化试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。大肠杆菌 JM109 菌株为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 的提取 使用 Qiagen 公司的病毒 RNA 提取试剂盒(QIAamp Viral RNA Mini Kit)从血清及脑脊液标本中提取 HIV 病毒 RNA,具体步骤按试剂盒说明书操作。

1.2.2 HIV-1 病毒 env 基因 C2 ~ V5 区的巢式 PCR 扩增 分别以提取的 HIV-1 感染者血清及脑脊液中的病毒 RNA 为模板,采用大连宝生物工程有限公司的一步法 PCR 试剂盒(PrimeScript® One Step RT-PCR Kit Ver. 2)进行 PCR 扩增,ENV-FO、ENV-RO 和 ENV-FI、ENV-RI 分别为内、外侧引物,引物序列

见表 1。对 HIV-1 病毒 env 基因 C2 ~ V5 区进行巢式 PCR 扩增,用一步法试剂盒所获得的 PCR 产物作为模板,进行第二轮 PCR 扩增,总体积为 50 μl,94 °C 变性 5 min,94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 30 s,共扩增 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。同步设立阴性和阳性对照。

表 1 PCR 内套及外套引物序列及碱基数

引物名称	引物序列(5'-3')	碱基数
ENV-FO	atgggatcaaagcctaaagccatgtgt	27
ENV-RO	gcgccatagtgcttctctgctgtgc	26
ENV-FI	ctgttaaatggcagctctagc	20
ENV-RI	acttctccaattgtccctcat	21

1.2.3 PCR 产物的纯化、连接与转化 取 PCR 产物 10 μl 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,在紫外线灯下观察结果。使用北京全式金生物技术有限公司的 PCR 产物纯化试剂盒(Easy Pure Quick Gel Extraction Kit)对 PCR 反应产物进行纯化。使用由 Promega 公司生产的 pGEM-T Easy-Vector 试剂盒,将纯化的 PCR 产物与 T-Easy 载体连接,转化于大肠杆菌 JM109 中。每例患者选取 5 ~ 8 个克隆株,送往上海生物工程技术有限公司进行测序,使用 T7 测序引物在 ABI 3730 型测序分析仪上进行核苷酸序列测定。所有样品进行双向测序。

1.2.4 序列分析 所有的序列用 DNASTAR 软件进行校正,每个样品的 C2 ~ V5 区核苷酸序列由两个第二轮 PCR 引物校核后确定。使用 HIV Database (Los Alamos) HIV-1 数据库和 GenBank 中检索的 HIV-1 亚型的基因型(A1、A2、B、B'、C、D、F1、F2、G、H、J、K、L)和相关重组基因型(CRF01-AE、CRF02-AG、CRF07-BC、CRF08-BC、CRF13、CRF15-01B、CRF33-01B、CRF34-01B)的核酸序列,对云南及河南感染者不同基因亚型的序列加以分析,初步确定 HIV-1 分离株的基因亚型。使用 Clustal X 程序对所有获得的序列与在基因库中检索出来的序列进行比对,将各亚型的基因序列与相应的国际代表株进行系统发生树分析(应用 www.hiv.lanl.gov/components/Sequence/HIV/treemaker/treemaker.html 及 Mega 5.0 软件两种方法进行分析),分析各标本毒株的进化程度,并在血液及脑脊液中进行比较。

1.3 统计学方法 应用 SPSS16.0 软件处理系统进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,属于正态分布的样本均数比较采用 *t* 检验,偏态分布采用非参数检验。本实验 HIV-1 分离株脑脊液

与血液中的 C2 ~ V5 区编码基因的离散率的差异分析,采用非参数 Mann Whitney 的方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIV-1 分离株的基因亚型的初步分析及基因系统发生树分析 所测得的河南及云南省 HIV-1 分离株 env 基因 C2 ~ V5 区的核苷酸序列显示均具有常见的突变,特别是位于可变区内的序列。云南省各基因亚型与 CRF07-BC、CRF08-BC 和 C 亚型相近,河南省各基因亚型与 B' 和 B 亚型相近。河南人群脑脊液的测序结果显示只有 1 例患者(例 1)的部分克隆株与血液的基因亚型不一致,其他患者脑脊

液与血液的亚型一致。云南人群中有 2 例(12 号和 127 号)患者的血液及脑脊液均具有单源性,其来自血液及脑脊液的病毒亚型均来自不同的分支,而其他患者的血液及脑脊液的病毒亚型一致。应用 1.2.4 中两种方法所获得的发生树分析结果相似,均以 HIV-1 分离株亚型,而非标本组织来源进行发生树分析。河南省 HIV-1 分离株中存在有 B' 和 B 亚型,参考毒株分别为 U71182.1、AY945710 和 DQ990880。云南省 HIV-1 分离株中存在有 C 亚型及 BC 亚型,参考毒株分别为 DQ369991/C 和 AY967806/C 等,而与 B. FR. K03455 和 DQ990880/B 等 B 亚型相距较远。发生树分析结果见图 1。

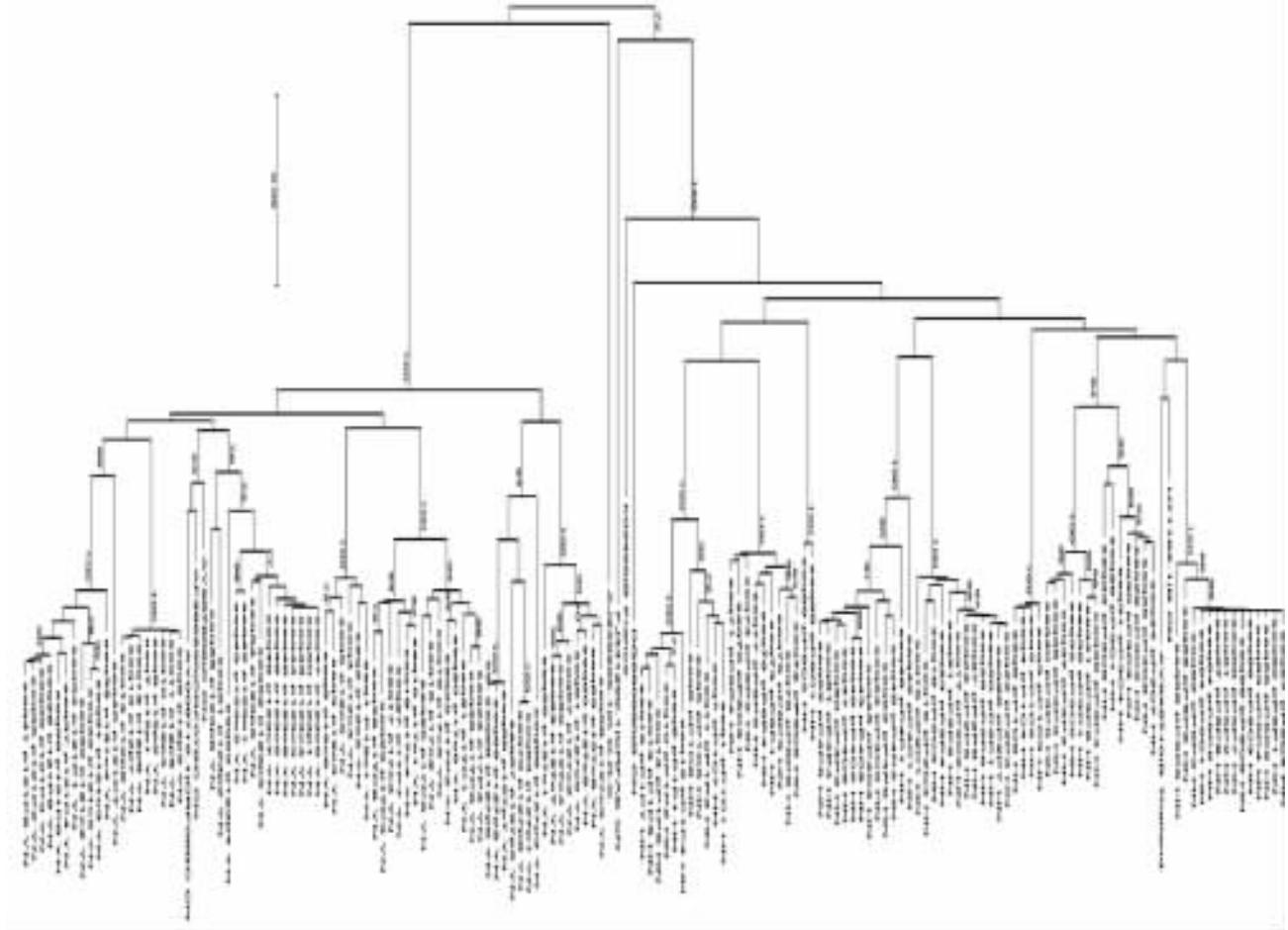


图 1 河南省及云南省 HIV-1 阳性患者血液及脑脊液 HIV 分离株发生树分析结果

2.2 HIV-1 的传播途径与亚型分布之间的关系

HIV-1 可经血源传播、性传播和垂直传播,不同亚型中其主要的传播方式亦不同。本实验所涉及的云南省感染者主要是静脉吸毒人群, HIV-1 基因型为 CRF07-BC、CRF08-BC 和 C 亚型。而河南省感染者主要是职业献血者和不安全血制品使用者,以 B、B' 亚型为主。

2.3 HIV-1 分离株 C2 ~ V5 区编码基因离散率分析 对云南省 HIV-1 分离株 C2 ~ V5 区编码基因的离散率分析发现,脑脊液和血液两者之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。对河南省标本的分析结果发现, HIV-1 各亚型分离株脑脊液和血液间基因离散度比较差异有统计学意义,中枢神经系统中 HIV 病毒的离散度低于血液中 HIV 病毒的离散度($P <$

0.05)。见表2。

表2 HIV-1 各亚型分离株脑脊液和血液间基因离散度比较($\bar{x} \pm s$)

样品来源	基因离散度	Z	P
云南省	脑脊液	0.138 ± 0.006	5.00 >0.05
	血液	0.171 ± 0.005	
河南省	脑脊液	0.116 ± 0.007	6.00 <0.05
	血液	0.218 ± 0.009	

3 讨论

3.1 获得性免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS)是由人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 引起,至2007年底全世界感染 HIV 或已患 AIDS 的患者有4000余万,我国有70余万^[5]。因此,HIV 感染已成为全世界共同关注的首要社会问题。HIV 病毒不仅侵犯人体的各个器官,还可以通过血脑屏障侵犯患者的中枢神经系统。统计认为,在未得到有效的抗病毒治疗的患者中,有一半以上的儿童和20%~25%的成人 HIV/AIDS 患者可以发展为 HIV 相关痴呆 (HIV associated dementia, HAD) 或称为艾滋病痴呆综合征 (AIDS dementia complex, ADC)^[6]。在 Schrier 等研究的 HIV 感染者队列中,轻至中度的神经精神损伤检出率为30%~40%,影响到患者的工作能力及日常生活^[7~9]。随着高效联合抗逆转录病毒 (highly active antiretroviral therapy, HAART) 治疗的出现, HAD 的发生率随之下降,但由于 AIDS 患者的寿命被显著延长,实际 HAD 患者数量反而相应增加。目前国内对艾滋病相关痴呆的研究较少,但在国外对其的研究方兴未艾。

3.2 我们通过对河南人群和云南人群的脑脊液及血液的 HIV 病毒的 env 基因 C2-C5 区的研究发现,不同人群、不同来源的组织标本 (血液、脑脊液) 进行发生树分析时,分析系统是按照病毒的亚型,而非按照标本来源进行分类。河南人群 HIV 基因亚型为 B' 和 B 亚型,除 1 例患者 (例 1) 的部分脑脊液及血液中病毒的亚型不同外,其余患者脑脊液及血液中病毒的亚型均相同,而云南人群中 2 例患者的脑脊液及血液中病毒的亚型分支不同,脑脊液中病毒的离散度低于血液中。这一研究结果与 Strain 等^[10]在脑脊液及血液中的报道类似,提示脑脊液中 HIV 的病毒亚型在免疫选择、压力及中枢神经系统的其它各种因子等的作用下发生了改变。

3.3 另有研究提示,在不同的 HIV 亚型中,神经

损伤及 HAD 的发生率存在差异。HAD 在欧美等无症状的 HIV 感染者中占 15%~30%,而在印度等国家其发生率在 1.4% 左右,在印度、中国及一些不发达国家和地区, HIV 病毒 C 亚型为主要流行株,而在美国及欧洲等地,其主要流行株为 B 亚型,提示其发生率与 HIV 病毒的亚型相关。C 亚型有较差的神经侵犯能力,这意味着感染 C 亚型 HIV 的患者具有较慢的病情发展及更长的无临床症状期,病毒传播的概率更大。因此,在本研究中,我们初步观察了云南省和河南省 HIV 不同亚群中的脑脊液及血液的差别,在今后的试验中,我们将对这些患者进行神经损伤方面的测评,以期对我国感染 HIV 不同亚型患者的 HAD 的发病情况等进行全面的研究。

参考文献

- Cheung R, Ravyn V, Wang L, et al. Signaling mechanism of HIV-1 gp120 and virion-induced IL-1 beta release in primary human macrophages[J]. J Immunol, 2008, 180(10):6675-6684.
- Price RW, Brew B, Sidtis J, Rosenblum M, et al. The brain in AIDS: Central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex[J]. Science, 1988, 239(4840):586-592.
- Ohagen A, Devitt A, Kunstman KJ, et al. Genetic and functional analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 env genes derived from brain and blood of patients with AIDS [J]. J Virol, 2003, 77(22):12336-12345.
- Cordnner A, Montagnier L, Emerman M. Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding [J]. Nature, 1989, 340(6234):571-574.
- Sheng L, Cao WK. HIV/AIDS epidemiology and prevention in China [J]. Chin Med J (Engl), 2008, 121(13):1230-1236.
- Swin dell s S, Zh eng J, Gendelman HE. HIV associated dementia: new insights into disease pathogenes is and therapeutic interventions [J]. AIDS Patient Care STDS, 1999, 13(3):153-163.
- Schrier RD, Gupta S, Riggs P, et al. The Influence of HLA on HIV-Associated Neurocognitive Impairment in Anhui, China [J]. PLoS One, 2012, 7(5):e32303.
- Cysique LA, Maruff P, Brew BJ. Variable benefit in neuropsychological function in HIV-infected HAART-treated patients [J]. Neurology, 2006, 66(9):1447-1450.
- Cysique LA, Jin H, Franklin DR Jr, et al. Neurobehavioral effects of HIV-1 infection in China and the United States: a pilot study [J]. J Int Neuropsychol Soc, 2007, 13(5):781-790.
- Strain MC, Letendre S, Pillai SK, et al. Genetic composition of human immunodeficiency virus type 1 in cerebrospinal fluid and blood without treatment and during failing antiretroviral therapy [J]. J Virol, 2005, 79(3):1772-1788.
- Ranga U, Shankarappa R, Siddapa NB, et al. Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 subtype C strains is a defective chemokine [J]. J Virology, 2004, 78(5):2586-2590.

[收稿日期 2013-01-22][本文编辑 黄晓红 韦颖]