

桂林市经性传播的 HIV-1 的流行特征和亚型分析

孔衍琳¹ 张 帅¹ 王雪雯¹ 李赫伟¹ 胡婷婷¹ 蒋 骞¹ 蒋就喜¹ 潘定权²,
张振开² 王海泉³ 李 林⁴ 孙常荣⁴ 李敬云⁴ 梁 浩⁵ 梁冰玉⁵ 张 奇⁶

摘要 目的 了解桂林市 2008 年及以后确诊的经性传播的人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)感染者的流行病学及亚型的分布情况。方法 选取样本 100 例,收集流行病学资料,采集抗凝全血,提取病毒 RNA,RT-PCR 法行 gag 基因扩增,对产物进行测序和分析。结果 100 例样本中男女比例为 2.125:1;青壮年年龄组(20~49 岁)患者为 54%,>50 岁年龄组患者为 45%;职业为农民的患者为 40%,学生为 6%;初中及以下文化水平患者占 69%;经异性和同性性接触途径传播的分别为 93%、7%。100 例样本最终成功扩增得到 61 例样本的 gag 基因序列,CRF01_AE 重组亚型 48 例,CRF07_BC 重组亚型 8 例,B 亚型 5 例。结论 应更加重视婚检、孕检的艾滋病抗体筛查;关注老年人群经性接触途径感染艾滋病的现象;采取针对低素质人群的有效防治措施;随着主要传播途径和主要亚型的变化,迫切需要对高危人群进行宣传教育和行为干预以阻断 HIV/AIDS 的流行和传播。
关键词 HIV-1;流行特征;亚型;gag 基因

中图分类号 R 373.51

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0966-04

截至 2013 年底,中国现存活艾滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)患者和 HIV 感染者约 436 817 例,死亡 136 274 例,现存活 AIDS 患者 173 825 例, HIV 感染者 262 992 例,疫情十分严峻^[1]。根据血清学反应和病毒核酸序列测定结果, HIV 被分为 1 型(HIV-1)和 2 型(HIV-2), HIV-1 型

又分为诸多亚型,其组内各亚型之间的基因离散率是 20%~30%,同一亚型内的基因离散率是 7%~20%^[2]。我国是世界上发现 HIV-1 亚型最多的国家之一。2011 年桂林市感染现状估计,全人群 HIV 感染率为 0.157%,高于 2011 年全国艾滋病疫情估计结果中的全人群感染率 0.058%;现存成年 HIV 感染者(15~49 岁)4 398 例,现存 HIV 感染者中妇女(15~49 岁)1 017 例(比例均为 23.12%),现存 HIV 感染者中注射吸毒者的比例为 22.269%^[3]。笔者对广西壮族自治区桂林地区 2008 年以后(包括 2008 年)确诊的 AIDS 患者和 HIV-1 感染者的流行特征和 HIV-1 流行毒株的亚型做了研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 病例资料 于 2013 年 9 月~2014 年 5 月,在桂林市第三人民医院收集 2008 年以后(包括 2008 年)经桂林市疾病预防控制中心(CDC)确诊经性传播的 HIV-1 患者 100 例(其病毒载量最好 $\geq 1\ 000$ copies/ml),对其进行流行病学问卷调查并采集静脉血 10 ml,于 6 h 内送至实验室进行高速离心分离出血浆, -80℃ 保存备用。

1.2 HIV-1 病毒 RNA 提取与 gag 区基因的 PCR 扩增 采用德国 Roche 公司的病毒 RNA 提取试剂盒(High Pure Viral RNA Kit),严格按试剂盒说明书提取血浆病毒 RNA,用日本 TaKaRa 公司一步法试剂盒(TaKaRa one step RNA PCR kit)进行 RNA 逆转录和第一轮 PCR,通过巢式 PCR,采用日本 TaKaRa 公司 PCR 扩增试剂盒(TaKaRa Ex Taq Kit)进行第二轮 PCR, gag 区 PCR 扩增引物。见表 1。

表 1 gag 基因片段扩增引物

引物	位置	引物序列(5'-3')
gag-617	617-638	F(外侧): TGTGAAAATCTCTAGCAGTGG
gag-763	763-783	F(内侧): TGACTAGCGGAGGCTAGAAGG
gag-5	2377-2401	R(内侧): TTCCYCTATCATTTTTGGTTTCC
gag-6	2681-2712	R(外侧): ATGCTTTTATTTTTTCYCTCTGTCATGGC

1.3 序列测定 将第二轮 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,并在电泳结束后将胶从胶板上取

2015-03-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81273137); 国家科技重大专项课题(编号: 2012ZX10001-002); 广西本级技术与开发项目(桂财教[2012]98 号); 桂林市科学研究与技术开发项目(编号: 20130120-18); 广西壮族自治区研究生教育创新计划资助项目(编号: YCSZ2013101)

作者单位: ¹ 桂林医学院附属医院感染性疾病科 桂林 541001

² 桂林市疾病预防控制中心 桂林 541001

³ 桂林市传染病医院 桂林 541002

⁴ 军事医学科学院微生物流行病研究所 北京 100071

⁵ 广西医科大学公共卫生学院 南宁 530021

⁶ 临沂市沂水中心医院 临沂 276000

作者简介: 孔衍琳,女,硕士研究生;

蒋就喜,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: gljiangjx@sohu.com

下,置于凝胶扫描成像仪上,与 Marker 比较,观察目的条带,并将阳性扩增样本的第二轮 PCR 产物送至北京博迈德公司进行 Sanger 法测序, gag 基因片段测序引物。见表 2。

表 2 gag 基因测序引物

引物	位置	引物序列 (5'-3')
07Rev2	1319-1294	TCTGATAATGCTGWRAACATGGGTAT
gag763	763-783	TGACTAGCGGAGGCTAGAAGG
07Rev3	2105-2077	GGCCARATYTTCCCTAATAAAATTAGCCTG
gag-5	2377-2401	TTCCYCTATCATTTTGGTTTCC

1.4 序列分析 使用拉莫斯国家实验室 HIV 核酸序列库 (Los Alamos HIV Database) (<http://www.HIV.lanl.gov>) 提供的在线工具 Quality Control 进行序列校正和裁剪,再用 BioEdit 软件进行手工校对,用 MEGA 5.03 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树 (重复运算 1 000 次),确定分型及与国际参考株序列进行比对分析,以 Bootstrap 值 > 70% 来检验进化树拓扑结构的正确性。所需国际参考株均由美国 Los Alamos HIV Database 提供。

2 结果

2.1 人群分布特征 100 例 HIV 患者的样本资料中,男性构成比为 0.68 (68/100),女性构成比为 0.32 (32/100),男女比例为 2.125 : 1 (68/32)。青壮年年龄组 (20 ~ 49 岁) 患者所占比例最大,为 54% (54/100); < 20 岁年龄组患者的构成比为 1% (1/100); > 50 岁年龄组患者的构成比为 45% (45/100)。职业为农民的患者所占比例最大,为 40% (40/100); 职业为离退人员的构成比为 11% (11/100); 学生所占构成比为 6% (6/100)。初中及以下文化水平患者占 69% (68/100),所占比例最大; 大专及以上的构成比占 9% (9/100)。经异性性接触传播所占的比例最大,为 93% (93/100); 同性性传播构成比为 7% (7/100); 其他传播途径的样本未采集到。汉族和少数民族的检出率分别为 88% (88/100) 和 12% (12/100)。

2.2 基因分型结果

2.2.1 基因亚型鉴定 100 例样本最终成功扩增得到 61 例样本的 gag 基因序列,扩增率为 61%。经系统树分析显示,此次样本中共发现 3 种亚型,其中 CRF01-AE 重组亚型 48 例 (78.69%), CRF07-BC 重组亚型 8 例 (13.11%), B 亚型 5 例 (8.20%)。见图 1。

2.2.2 系统进化分析 GL-gag6331、GL-gag6395、

GL-gag6341、GL-gag6350、GL-gag6504、GL-gag6388、GL-gag6397、GL-gag6344 等 48 株 CRF01-AE 重组亚型与泰国、非洲、中国 AE 代表株 01-AE、AF、07、569M、GQ477441、01-AE、TH、91、TN240、L11761、01-AE、CN、05、Fj055、EF036527、01-AE、CN、05、Fj052、EF036528 聚在一起。GL-gag6324、GL-gag6339、GL-gag6380、GL-gag6386、GL-gag6322 等 5 株 B 亚型与泰国代表株 B、TH、07、AA040a-WG11、JX447156、B、TH、00、00TH-C3198、AY945710 聚在一起。GL-gag6353、GL-gag6351、GL-gag6362、GL-gag6372、GL-gag6335、GL-gag6343 等 8 株 CRF07-BC 重组亚型与中国代表株 07-BC、CN、07、CNGZD、JQ423923、07-BC、CN、97、97CN001-C54、AF286226 聚在一起。系统树从系统进化角度进一步证实了桂林各毒株、亚型之间的变异进化关系。见图 1。

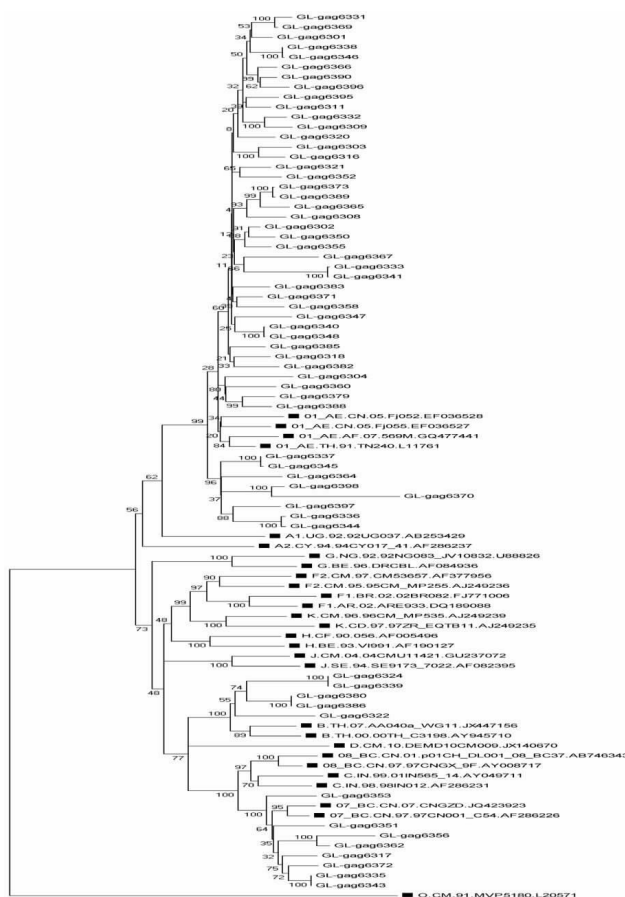


图 1 桂林地区 HIV-1 gag 基因序列系统进化树分析

3 讨论

综合分析对广西及桂林地区 HIV-1 流行状况的研究^[4-7] 经性传播的、2008 年及以后确诊的 HIV-1 在桂林地区的流行情况如下: 从性别特征来看, HIV-1 感染者中男性仍多于女性, 但女性感染人数增加, 男女比例下降为 2.125 : 1, 与研究^[8] 一致。

育龄期的女性感染人数增加,应该更加重视婚检、孕检,及早发现感染者,实施夫妻、母婴阻断措施,减少感染机会。从年龄特征来看,20~49岁青壮年仍然为新确认患者人数主体,占新确认感染人数的一半以上。值得关注的是,50岁以上老年患者人数占本次调查研究的近一半,这说明老年人,特别是老年男性的感染比例呈明显上升趋势,其传播途径一般为异性性传播,这一特征与全国和广西报道的情况一致。一方面可能是因为老年男性本身的生理特征,加上空巢老人的精神生活匮乏、孤独、寂寞的心理特征,很容易成为暗娼猎捕的对象;另一方面这些老年人发生商业性行为的对象一般为低档暗娼,对于AIDS的防控知识不了解,也不会选择正确使用安全套等方式防控AIDS,从而成为AIDS感染的高危人群,提示必须对老年人经性接触传播艾滋病的问题加以重视。从职业和文化程度来看,农民所占比例最大,农民及待业人员占本次研究的52%,初中以下文化程度占69%,这说明2008年及以后确诊的感染人群仍然跟以往的调查研究一样,文化程度比较低,这提示传统的说教、讲解教育方式可能对这部分人群收效甚微,应该探索更多针对这部分人群的有效宣传模式。本研究显示学生和干部职员占的比例分别为6%和9%,说明并非文化程度越高的群体对AIDS的防范意识就一定强,即存在着学历高、AIDS知晓情况良好的前提下,行为与认知仍然严重分离导致感染的情况,应该继续加大宣传教育的力度;此外,这部分学生几乎全部通过同性性接触而感染,说明学生群体里可能存在这部分特殊人群,应该重点加以宣传教育和行为干预,防范AIDS在这部分特定人群里进一步蔓延。从传播途径特征来看,与以往主要关注吸毒人群的研究不同,本次研究的样本都是性传播人群,且异性性接触传播占绝大多数,同时存在少数同性性接触传播的情况,说明桂林2008年及以后确诊的感染者依然以异性性传播为主要感染途径,性乱人群逐渐成为主要的HIV感染人群。

广西流行的HIV-1毒株比较复杂,研究^[9]结果显示,广西流行的亚型按照构成比大小依次为CRF01_AE、CRF08_BC、CRF07_BC、未知重组型、B(B')亚型、G亚型。本研究以异性性传播占大多数,表明这个人群中亚型多样,主要以CRF01_AE为其主要流行亚型,这与以往广西CRF01_AE主要在吸毒人群中流行不同,与研究^[10]结果相同,这说明CRF01_AE已经从吸毒人群向异性性传播感染人群扩散。桂林作为广西北部的重要城市,国际人员往来多,国内人口流动频繁,增加了HIV传播和流行的机会,必须加大对暗娼的打击力度,增强对高危人群和HIV感染者的教育和管理,切断性传播这一主要传播途径,对于全区甚至全国的AIDS控制有重要意义。本研究也存在一定局限,首先,由于样本过于特殊,本研究无法做到随机取样;其次,本研究只采样100例,相对于桂林AIDS庞大的基数来说,样本数量偏少,而且部分样本采集时实际病毒载量比选取样本时CDC提供病毒载量低,无法提取到病毒RNA,从而导致扩增效率偏低。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部,UNAIDS,WHO. 中国艾滋病防治工作进展(2013). [2013-11-11]. www.chinaaids.org.cn.
- [2] Korber B, Muldoon M, Theiler J, et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains [J]. *Science* 2000, 288(5472): 1789-96.
- [3] 文小青. 2011年广西壮族自治区桂林市艾滋病疫情估计[J]. *疾病监测* 2012, 27(8): 627-30.
- [4] 王勇, 唐振柱, 朱秋映, 等. 广西2009-2011年艾滋病流行特征分析[J]. *华南预防医学* 2013, 39(1): 6-11.
- [5] 简华慧. 我国偏远地区艾滋病的防治研究综述[J]. *中国医药指南* 2013, 11(14): 461-3.
- [6] 蒋就喜, 李赫伟, 周方, 等. 桂林市HIV-1流行毒株的基因序列测定和亚型分析[J]. *广西师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 28(2): 91-5.
- [7] 蒋就喜, 李赫伟, 周方, 等. 桂北地区HIV-1感染者的HIV-1病毒亚型分布观察[J]. *山东医药* 2010, 50(22): 13-5.
- [8] 杨艳, 周月姣, 孟琴. 广西第二轮全国艾滋病综合防治示范区艾滋病流行特点分析[J]. *广西医学* 2014, 36(9): 1258-61.
- [9] 陈立力. 云南和广西HIV-1流行毒株的基因变异和分子进化研究[D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2011.

Epidemiology and gene analysis of HIV-1 infections in Guilin who infected by sexually transmission

Kong Yanlin, Zhang Shuai, Wang Xuewen, et al

(Dept of Infectious Diseases, The Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001)

Abstract Objective To determine the epidemiological situation of confirmed HIV-1 infections in Guilin after 2008 who were infected by sexually transmission, and to understand the distribution of HIV-1 subtypes. **Methods**

◇ 药学研究 ◇

白藜芦醇对佐剂性关节炎大鼠血管内皮因子表达的影响

卢锦森¹, 马中飞¹, 纵何香¹, 叶桂萍¹, 郭利梅¹, 何舒宁¹, 张梦琳¹, 陈晓宇²

摘要 目的 探讨白藜芦醇(Res)对佐剂性关节炎(AA)模型大鼠关节滑膜组织的抗炎作用和对血管内皮生长因子(VEGF)表达水平的影响。方法 60只SD大鼠随机分正常组(10只)和模型组(50只),模型组左后足趾皮下注射弗氏完全佐剂建立AA模型,模型组在建模后12d再分5组:模型对照组、Res低剂量组(5 mg/kg)、Res中剂量组(15 mg/kg)、Res高剂量组(30 mg/kg)、阳性药塞来昔布组(5 mg/kg),给药16d后处死大鼠,对各组大鼠踝关节滑膜组织行病理切片、HE染色和VEGF免疫组化染色。观察滑膜增生、血管翳形成、炎症渗出、关节软骨和骨破坏等情况。Western blot法检测VEGF蛋白的表达情况。结果 Res治疗组的关节病理学评分明显低于模型对照组,免疫组化染色以及Western blot结果显示,Res能降低滑膜组织VEGF表达水平。结论 Res有改善大鼠关节滑膜炎、抑制滑膜组织VEGF表达的作用,这可能与Res治疗AA关节炎有关。

关键词 佐剂性关节炎;白藜芦醇;血管内皮因子;大鼠

中图分类号 R-332

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0969-05

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关节滑膜炎为主要病理表现的慢性、系统性的自身免疫性关节疾病,持久反复发作的滑膜炎导致关节内软骨和骨的破坏,关节功能障碍,甚至残废^[1]。大鼠佐剂性关节炎(adjutant arthritis, AA)模型是一种RA免疫性炎症模型,RA和AA存在许多类似之处,且造模方法简单易行,是目前较常用的RA动物模型,为理想的筛选和研究治疗RA药物的模型^[2]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种特异性的作用于血管内皮细胞的生长因子,能促进血管生成^[3]。白藜芦醇(resveratrol, Res)是存在于葡萄、虎杖、决明、藜芦等的非黄酮类多酚化合物,具有抗脂质过氧化、抗炎、抗肿瘤、免疫调节等多种生物学功效^[4]。该课题组前期研究^[5-6]表明,Res对AA模型大鼠有一定的治疗作用,但其机制有待进一步阐明,该研究进一步观察Res对AA模型大鼠的治疗作用,探究这种治疗作用是否与抑制滑膜组织VEGF有关。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 足跖容积测量仪 YLS-TA 购自山东医学科学院; Res(溶于无菌0.5%羧甲基纤维素钠中)、弗氏完全佐剂(freund's complete adjuvant, FCA)购自美国Sigma公司;兔抗大鼠单克隆

2015-04-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81373421);国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:201310366007)

作者单位:安徽医科大学¹临床医学系、²组胚教研室,合肥 230032

作者简介:卢锦森,男,硕士研究生;

陈晓宇,男,博士,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail:

chenxy@ahmu.edu.cn

To make epidemiological survey on the 100 confirmed HIV-1 infections, extract HIV-1 RNA from their whole blood and amplified by RT-PCR. HIV-1 gag gene was sequenced directly from the PCR product. **Results** In the chosen patients, male to female ratio was 2.125:1. Patients aged ≥ 20 and ≤ 49 years old accounted for 54% in total, and patients aged 50 years old or older accounted for 45%. Farmers accounted for 40% and students accounted for 6%. Patients with education level of junior middle school or below accounted for 69%. The proportions which were transmitted through heterosexual and homosexual contact were 93% and 7% respectively. 61 specimens were gained in 100 specimens, then sequence analysis showed that there were 3 HIV-1 subtypes, CRF01_AE(48 samples), B(5 samples), CRF_07BC(8 samples). **Conclusion** The more attentions should be paid to the HIV/AIDS antibody screening in marriage and pregnancy inspection, focus on HIV/AIDS infection through sexual transmission in elderly people, and more effective ways to prevent HIV/AIDS infection for the population with poor education level should be explored. With the change of the main transmission and subtype, the more education and behavioral interventions should be done to prevent the spread of HIV/AIDS.

Key words HIV-1; epidemiological characteristics; subtype; gag gene