

· 论 著 ·

阜新市 HIV-1 *env* 基因 C2 ~ V4 区序列特征分析李贺¹, 杜波¹, 田晓东¹, 刘文新¹, 姚文清²

1. 阜新市卫生健康服务中心, 辽宁 阜新 123000; 2. 辽宁省疾病预防控制中心

摘要: **目的** 分析阜新市艾滋病病毒 1 型 (HIV-1) *env* 基因 C2 ~ V4 区序列及代表性广谱单克隆中和抗体的表位变异, 为 HIV-1 变异趋势研究及阐明 V3 环与病毒生物学特征提供依据。**方法** 采集 2018—2019 年在阜新市卫生健康服务中心确证阳性的 112 例 HIV-1 感染者全血标本, 采用巢式 PCR 扩增 *env* 基因 C2~V4 区核苷酸序列并测序, 采用 MEGA 软件鉴定分型, 采用 HIV Database 等软件分析 V3 环顶端四肽、辅助受体、净电荷和特征性氨基酸。**结果** 获得 101 条有效基因序列, 发现 5 种 V3 环顶端四肽类型, 其中 GPGQ 77 条, 占 76.24%, 存在于 CRF01_AE、CRF07_BC、CRF65_cpx 和 G 亚型; GPGR 19 条, 占 18.81%, 存在于 CRF01_AE、CRF07_BC 和 B 亚型; GPGH 3 条, GPGK 和 GPGA 各 1 条, 均只存在于 CRF01_AE 亚型。辅助受体主要使用 CCR5, 84 条占 83.17%。CRF01_AE、CRF07_BC、B、CRF65_cpx 和 G 亚型 V3 环净电荷数分别为 3.28 ± 1.17 、 3.22 ± 0.92 、 4.25 ± 0.83 、 2.50 ± 0.50 和 3。结合 b12 和 VRC01 中和抗体表位氨基酸位点突变率为 0 ~ 9.90%; 295 位和 332 位氨基酸 N-糖基化位点缺失率分别为 18.81% 和 14.85%, 未发现两者同时缺失的情况。**结论** 2018—2019 年阜新市 HIV-1 毒株主要是以 CCR5 为辅助受体的巨噬细胞嗜性非合胞体诱导型病毒, V3 环顶端四肽以 GPGQ 为主, 复制速度较慢, 逃逸中和抗体能力较低。

关键词: 艾滋病病毒 1 型; *env* 基因; 变异; 包膜蛋白; V3 环

中图分类号: R512.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2020) 10-0983-04

Sequence analysis of C2-V4 of HIV-1 *env* genes in Fuxin

LI He*, DU Bo, TIAN Xiaodong, LIU Wenxin, YAO Wenqing

*Fuxin Health Service Center, Fuxin, Liaoning 123000, China

Abstract: Objective To learn the sequence characteristics of C2-V4 of HIV-1 *env* genes and the epitope variation of representative broadly monoclonal neutralizing antibody in Fuxin, so as to provide evidence for the HIV-1 variation trend and the biological characteristics of V3 loop. **Methods** The whole blood samples of 112 HIV-1 cases in Fuxin Health Service Center from 2018 to 2019 were collected and the DNA was extracted. The C2-V4 of *env* genes were amplified by nested-PCR and the PCR products were subjected to sequencing. The bioinformatics analysis was carried out using MEGA software, and the V3-tip motifs, co-receptors, net charge and characteristic amino acids were analyzed using HIV Database. **Results** Totally 101 effective gene sequences were obtained, and 5 types of V3-tip motifs were found. Among them, 77 pieces of GPGQ (76.24%) were found in CRF01_AE, CRF07_BC, CRF65_cpx and G subtypes; 19 pieces of GPGR (18.81%) were found in CRF01_AE, CRF07_BC and B subtypes; 3 pieces of GPGH, 1 piece of GPGK and 1 piece of GPGA were only found in CRF01_AE subtype. The co-receptor was mainly CCR5 (84, 83.17%). The net charge numbers of V3 loops in CRF01_AE, CRF07_BC, B, CRF65_cpx and G were 3.28 ± 1.17 , 3.22 ± 0.92 , 4.25 ± 0.83 , 2.50 ± 0.50 and 3, respectively. The mutation rates of neutralizing antibodies binding b12 and VRC01 were 0-9.90%. The deletion rates of N-glycosylation sites of 295 and 332 were 18.81% and 14.85%, without the loss of both sites. **Conclusion** The HIV-1 strains in Fuxin from 2018 to 2019 are macrophage-tropic and non-syn-cytium-inducing, with GPGQ as the main type of V3-tip motif, CCR5 as the main co-receptor, slow replication and

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2020.10.003

基金项目: 国家科技重大专项艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治项目 (2017ZX10103007)

作者简介: 李贺, 硕士, 主管检验师, 主要从事实验室检测工作

通信作者: 田晓东, E-mail: dt520@fxcdc.org

low ability to escape neutralizing antibodies.

Keywords: HIV-1; *env* genes; mutation; envelop protein; V3 loop

基因变异性是艾滋病病毒 1 型 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 的重要生物学特征, 其包膜蛋白基因 *env* 高度变异^[1]。*env* 基因主要编码 gp41 跨膜蛋白和 gp120 糖蛋白, gp41 序列相对保守, 变异主要位于 gp120 上。gp120 不仅是病毒侵入宿主并与宿主细胞受体结合的位点, 还是宿主免疫反应的主要靶位点^[2], 在 HIV-1 发病机理和免疫逃逸中起到关键作用。gp120 基因包含 5 个保守区 (C1 ~ C5) 和 5 个由核苷酸缺失、插入和重复产生氨基酸多样性的可变区 (V1 ~ V5), 变异主要存在于 V1 ~ V5 区^[3], 其中 V3 环缺失会破坏病毒的传染性^[4], 可能直接影响 HIV-1 的各种生物学特性。本文对 2018—2019 年阜新市 HIV-1 *env* 基因 C2 ~ V4 区, 尤其是 V3 环的变异进行研究, 为 HIV-1 变异趋势研究及阐明 V3 环与病毒生物学特征的关系提供依据。

1 材料与方法

1.1 标本 选取 2018—2019 年在阜新市卫生健康服务中心经免疫印迹试验确证阳性的 112 例 HIV-1 感染者, 采集静脉抗凝全血 20 mL, -80 ℃ 保存备用。纳入的 HIV-1 感染者均签署知情同意书。研究通过阜新市卫生健康服务中心伦理委员会审查。

1.2 方法

1.2.1 核酸提取和基因扩增 采用 0.2% NaCl 溶液富集 10 mL 抗凝全血中的白细胞, 使用 QIAGEN 公司的 QIAcube 全自动核酸提取仪和 QIAamp DNA Mini Kit 提取试剂盒提取白细胞中的前病毒 DNA, 使用 Promega 公司的 GoTaq® Colourless Master Mix 试剂盒进行巢式 PCR 扩增 *env* 基因 C2 ~ V4 区, 反应条件及引物见文献^[5]。

1.2.2 产物的纯化 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定无误后切胶纯化, 纯化后产物委托 Invitrogen 公司测序。

1.2.3 基因序列分析 采用 Sequencher 软件对测序结果进行校正、编辑和拼接, 使用美国洛斯阿拉莫斯国家实验室 HIV 核酸序列库中提供的基因分型工具 BLAST 程序进行基因亚型鉴定, 利用 MEGA 4.0 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树 (重复运算 1 000 次) 进行分型验证, 用于比对的各亚型国际参考株序列来自 HIV Database 数据库。

1.2.4 氨基酸序列分析 采用 HIV Database 在线工

具 Gene Cutter 将获得的 *env* 基因 C2 ~ V4 区核苷酸序列翻译成氨基酸序列并剪切, 记录每条序列的 V3 环顶端四肽; 采用在线工具 Geno2pheno (coreceptor) 2.5 预测 V3 环氨基酸序列辅助受体的使用情况, 假阳性率 > 15% 为使用 CC 类趋化因子 5 (CCR5) 作为辅助受体, 假阳性率 < 5% 为使用 CXC 类趋化因子 4 (CXCR4) 作为辅助受体, 假阳性率在 5% ~ 15% 之间为使用 CCR5/CXCR4 作为辅助受体参与细胞融合^[6]; 采用在线工具 Variable Region Characteristics 计算 V3 环净电荷; 采用在线工具 N-GlycoSite 预测 N-糖基化位点, 分析 C2 ~ V4 区序列上代表性广谱单克隆中和抗体的表位变异。

2 结果

2.1 HIV-1 基因亚型鉴定 采集的 112 份标本经核酸提取和 PCR 扩增后, 成功获得 101 条有效基因序列。这 101 例 HIV-1 感染者年龄为 20 ~ 65 岁, 20 岁 ~ 组 29 例, 占 28.71%; 30 岁 ~ 组 34 例, 占 33.66%; 40 岁 ~ 组 21 例, 占 20.79%; 50 ~ 65 岁 17 例, 占 16.83%。男性 97 例, 占 96.04%; 女性 4 例, 占 3.96%。基因序列分析显示, CRF01_AE 重组亚型 85 条, 占 84.16%; CRF07_BC 重组亚型 9 条, 占 8.91%; B 亚型 4 条, 占 3.96%; CRF65_cpx 重组亚型 2 条, 占 1.98%; G 亚型 1 条。

2.2 HIV-1 V3 环顶端四肽 101 条 V3 环氨基酸序列没有缺失, 共有 5 种顶端四肽类型: GPGQ 77 条, 占 76.24%, 存在于 CRF01_AE、CRF07_BC、CRF65_cpx 和 G 亚型; GPGR 19 条, 占 18.81%, 存在于 CRF01_AE、CRF07_BC 和 B 亚型; GPGH 3 条, GPGK 1 条, GPGA 1 条, 均只存在于 CRF01_AE 亚型。CRF01_AE 亚型的 V3 环 5 种顶端四肽均存在, 以 GPGQ 最多, GPGR 次之; CRF07_BC 亚型有 2 种顶端四肽, 以 GPGQ 为主; B 亚型、CRF65_cpx 亚型和 G 亚型由于样本例数较少, 仅出现 1 种顶端四肽。见表 1。

2.3 HIV-1 辅助受体 阜新市各亚型 HIV-1 主要使用 CCR5 作为辅助受体, 84 条占 83.17%。使用 CXCR4 作为辅助受体的有 CRF01_AE 和 B 亚型, 使用 CCR5/CXCR4 作为辅助受体的有 CRF01_AE 和 CRF07_BC 亚型。CRF01_AE 亚型使用 CCR5 和 CXCR4 作为辅助受体分别占 83.53% 和 10.59%, B 亚型分别占 50.00% 和 50.00%。见表 2。

表1 阜新市各亚型 HIV-1 V3 环顶端四肽类型及数量

基因亚型	GPGQ	GPGR	GPGH	GPGK	GPGA	总计
CRF01_AE	66	14	3	1	1	85
CRF07_BC	8	1	0	0	0	9
B	0	4	0	0	0	4
CRF65_cpx	2	0	0	0	0	2
G	1	0	0	0	0	1
合计	77	19	3	1	1	101

表2 阜新市各亚型 HIV-1 辅助受体预测结果

基因亚型	CCR5	CXCR4	CCR5/CXCR4	总计
CRF01_AE	71	9	5	85
CRF07_BC	8	0	1	9
B	2	2	0	4
CRF65_cpx	2	0	0	2
G	1	0	0	1
合计	84	11	6	101

2.4 HIV-1 V3 环净电荷分析 CRF01_AE、CRF07_BC、B、CRF65_cpx 和 G 亚型 V3 环净电荷数分别为 3.28 ± 1.17 ($n=85$)、 3.22 ± 0.92 ($n=9$)、 4.25 ± 0.83 ($n=4$)、 2.50 ± 0.50 ($n=2$) 和 3 ($n=1$)，B 亚型净电荷数明显多于其他亚型。

2.5 HIV-1 重要氨基酸位点变异 101 条序列的 368、370、371、427 和 430 位氨基酸分别突变 1 条、2 条、0 条、2 条和 0 条，突变率分别为 0.99%、1.98%、0、1.98% 和 0；结合 b12 中和抗体表位氨基酸位点 Ser364、Thr373 和 Ile420 分别突变 10 条、0 条和 6 条，突变率分别为 9.90%、0 和 5.94%；结合 VRC01 中和抗体表位氨基酸位点 Asn276、Aer365、Gly366 和 Gly367 分别突变 0 条、5 条、0 条和 6 条，突变率分别为 0、4.95%、0 和 5.94%；295、332、339、386 和 392 位氨基酸 N-糖基化位点分别缺失 19 条、15 条、12 条、6 条和 7 条，缺失率分别为 18.81%、14.85%、11.88%、5.94% 和 6.93%，未发现 295 和 332 位氨基酸 N-糖基化位点同时缺失的情况。

3 讨论

HIV-1 入侵过程是一个级联的结合与构象变化反应，其包膜糖蛋白复合物 gp120-gp41 中的 gp120 与靶细胞上的受体 CD4 分子结合，gp120 构象发生改变，继而与靶细胞上的辅助受体 CXCR4 或 CCR5 结合，使得 gp41 构型发生改变，暴露出融合肽并插入宿主细胞膜，启动病毒膜与细胞膜的融合，完成病

毒进入宿主细胞的感染过程^[7]。gp120 上的 V3 环是感染过程主要的辅助受体结合位点，与病毒的感染性、细胞嗜性、合胞体形成等密切相关^[8]，构成 V3 环的氨基酸有 35 个，由 2 个半胱氨酸形成环形结构连接，其暴露在顶端的 4 个连续氨基酸（15~18 位）是最重要的特异性抗原决定簇，毒株类型不同，相应的顶端四肽序列也存在差异^[9]。结果显示，阜新市检出的 HIV-1 共存在 5 种顶端四肽，以 GPGQ 为主，存在于 CRF01_AE、CRF07_BC、CRF65_cpx 和 G 亚型中，B 亚型只有 GPGR 顶端四肽类型，与之前的研究结果^[10]一致。

HIV 攻击人类不同类型的免疫细胞，具有 T 淋巴细胞或巨噬细胞嗜性。一般情况下，HIV-1 不同细胞嗜性毒株辅助受体使用情况具有特异性，在感染早期，HIV 主要侵袭巨噬细胞，表现为非合胞体诱导型（NSI 型），以 CCR5 为辅助受体；随着疾病的进展，HIV 侵袭 T 淋巴细胞，表现为合胞体诱导型（SI 型），以 CXCR4 为辅助受体^[11]。有研究认为，HIV 的基因型和病毒嗜性可能是影响疾病进展的重要因素，巨噬细胞嗜性毒株在人体内复制较慢，T 淋巴细胞嗜性毒株复制较快^[12]，辅助受体由 CCR5 转变为 CXCR4，导致 CD4 受体急剧下降及临近效应细胞凋亡，从而加速了疾病的进展^[13]。由辅助受体预测结果可知，阜新市大部分毒株以 CCR5 为进入靶细胞的辅助受体，表明目前阜新市 HIV-1 的流行仍以复制速度较慢的 NSI 型病毒为主。

计算 5 种亚型 V3 环净电荷数发现，B 亚型的平均净电荷数多于其他亚型，可能是因为 B 亚型 V3 环顶端四肽为 GPGR，人体中的精氨酸和赖氨酸带正电荷，天冬氨酸和谷氨酸带负电荷^[14]，B 亚型 V3 环的正电荷数多，而其他亚型顶端四肽主要为不带电的 GPGQ。B 亚型 V3 环的净电荷数最多，使用 CXCR4 作为辅助受体的比例也最高，提示 V3 区的电荷变化与病毒辅助受体的使用相关，进而与病毒表型转换相关^[15-16]。

HIV-1 包膜蛋白是中和抗体与病毒发生免疫反应的靶位点，膜蛋白可通过突变和 N-糖基化逃逸抗体的免疫压力。包膜蛋白的 368、370、371、427 和 430 位氨基酸与 CD4 分子结合，启动病毒对宿主细胞的感染，本研究样本中上述位点突变率较低，表明绝大部分毒株与宿主细胞的融合能力较强，可成功感染靶细胞。b12 和 VRC01 可识别 gp120 上 CD4 结合位点，b12 是早期发现的中和性抗体，它识别的表位部分与 gp120 上 CD4 结合表位重叠，b12 通过重

链的3个互补决定区几乎抓住了CD4环所有暴露的部位并与之结合,但没有改变gp120的构象,使得b12也能中和被构象屏蔽保护的病毒^[17-18];VRC01不仅可以识别病毒刺突上CD4结合位点还可以识别非CD4结合位点的构象,同样可逃避构象屏蔽隐藏CD4结合位点的配体^[19],另外VRC01具有高度亲和力,能与gp120有效结合,增加其中和病毒的效能。本研究样本的b12和VRC01表位识别位点突变率低,提示绝大部分毒株对b12和VRC01中和抗体敏感,多数感染者体内的HIV-1毒株未受上述抗体的压力;2G12是唯一识别gp120表面包膜蛋白的甘露聚糖抗体,其中和能力受限于包膜蛋白295、332、339、386和392位氨基酸N-糖基化位点,前2个位点为2G12抗体的特异性结合位点,后3个位点起到维持表位空间构象的作用^[20]。本研究样本中295和332位氨基酸N-糖基化位点缺失率不高,并且未出现2个特异性结合位点同时缺失的毒株,表明研究样本逃逸2G12抗体能力较弱,2G12抗体可有效中和HIV-1毒株。

HIV-1 *env* 基因C2~V4区具有重要的生物学意义。本文从分子流行病学层面研究了2018—2019年阜新市分离的HIV-1基因变异特点,其V3环顶端四肽多为GPGQ型,主要为以CCR5为辅助受体的巨噬细胞嗜性的NSI型病毒,复制速度较慢,逃逸中和抗体能力较低,可为艾滋病防控及HIV-1相关研究提供参考。

参考文献

- [1] 董万强,姚能,徐庆刚.亚洲主要流行HIV-1 Gp120及其5个高变区多态性分析[J].生物学杂志,2013,30(1):9-13.
- [2] SCHEID J F, MOUQUET H, FELDHAHN N, et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals [J]. *Nature*, 2009, 458 (7238): 636-640.
- [3] 兰芸,胡凤玉,李凌华,等.广州市男男性行为HIV-1感染者主要流行株Gp120序列变异分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,2019,33(3):291-296.
- [4] HEDSKOG C, BRODIN J, HEDDINI A, et al. Longitudinal ultra-deep characterization of HIV type 1 R5 and X4 subpopulations in patients followed from primary infection to coreceptor switch [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2013, 29 (9): 1237-1244.
- [5] 叶景荣,邢辉,刘海林,等.北京市2006年HIV-1流行毒株的gag和env基因序列测定及亚型分析[J].中华流行病学杂志,2007,28(6):586-588.
- [6] LENGAUER T, SANDER O, SIERRA S, et al. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25 (12): 1407-1410.
- [7] 常晓云,李海宁,王馨仪,等.黑龙江省HIV-1型流行株CRE01_AE *env* 基因序列特征和传播簇分析[J].国际免疫学杂志,2018,41(2):142-147.
- [8] 王敏连,梁冰玉,叶力,等.广西HIV-1流行株 *env* 基因C2V3区序列特征和亚型研究[J].中华疾病控制杂志,2015,19(12):1191-1194.
- [9] 何瑞英,廖宝林,袁小珍,等.广东省人类免疫缺陷病毒1型CRF01_AE毒株膜区V3环氨基酸序列多态性分析[J].中国热带医学,2018,18(10):984-990.
- [10] BOONCHAWALIT S, JULLAKSORN D, UTTIYOUNG J, et al. Molecular evolution of HIV-1 CRF01_AE Env in Thai patients [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (11): e27098.
- [11] ZHANG Y, LU L, BA L, et al. Dominance of HIV-1 subtype CRF01_AE in sexually acquired cases leads to a new epidemic in Yunnan province of China [J]. *PLoS Med*, 2006, 3 (11): e443.
- [12] 劳飞翔,莫实德,邓培雪,等.广西防城港市HIV-1流行株 *env* 基因C2V3区序列特征及亚型分析[J].医学动物防制,2019,35(7):624-628.
- [13] JOSHI A, NYAKERIGA A M, RAVI R, et al. HIV ENV glycoprotein-mediated bystander apoptosis depends on expression of the CCR5 co-receptor at the cell surface and ENV fusogenic activity [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (42): 36404-36413.
- [14] 张燕,赵广录,石向东,等.深圳市HIV-1主要流行株外膜蛋白V3环氨基酸变异分析[J].中国热带医学,2019,19(7):638-641.
- [15] PIYASIRISILP S, MCCUTCHAN F E, CARR J K, et al. A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in Southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant [J]. *J Virol*, 2000, 74 (23): 11286-11295.
- [16] MILICH L, MARGOLIN B H, SWANSTROM R, et al. Patterns of amino acid variability in NSI-like and SI-like V3 sequences and a linked change in the CD4-binding domain of the HIV-1 Env protein [J]. *Virology*, 1997, 239 (1): 108-118.
- [17] ZHOU T Q, XU L, DEY B, et al. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120 [J]. *Nature*, 2007, 445 (7129): 732-737.
- [18] WU X, ZHOU T, O'DELL S, et al. Mechanism of human immunodeficiency virus type 1 resistance to monoclonal antibody B12 that effectively targets the site of CD4 attachment [J]. *J Virol*, 2009, 83 (21): 10892-10907.
- [19] KWONG P D, DOYLE M L, CASPER D J, et al. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites [J]. *Nature*, 2002, 420 (6916): 678-682.
- [20] SCANLAN C N, PANTOPHLET R, WORMALD M R, et al. The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha 1→2 mannose residues on the outer face of gp120 [J]. *J Virol*, 2002, 76 (14): 7306-7321.

收稿日期:2020-05-25 修回日期:2020-06-29 本文编辑:徐文璐