文章编号:1000-5404(2005)17-1785-04

论著

人类免疫缺陷病毒1型在垂直传播的个体间病毒基因型和准种的差异性的实验研究

黄广宇,王宇明 (第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 通过对人类免疫缺陷病毒1型(human immunodeficiency virus-1, HIV-1)在垂直传播的个体间病毒基因型和准种的差异性研究揭示HIV-1在垂直传播过程中的变异规律。**方法** 提取HIV-1感染母亲及其子女共4例的血浆中总RNA,通过逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)获得HIV-1包膜蛋白(*env*)基因的C2-V5区域片段,纯化后装入T载体,转化至Top10大肠埃希菌内增殖,通过蓝白筛选获得阳性克隆,阳性克隆为模板行PCR,产物进行构象敏感性凝胶电泳(conformation sensitive gel electrophoresis, CSGE)分析,挑选优势准种和劣势准种测序。**结果** 第1对母亲准种复杂性较其子女低,母子之间各准种的核苷酸序列高度同源,均为C亚型;第2对母亲准种复杂性较其子女高,母子之间各准种的核苷酸序列高度同源,母子均为AE亚型。**结论** HIV-1在垂直传播过程中亚型不发生变化,病毒准种在传播过程中可能具有选择性,进入新宿主后因环境变化而被重新筛选,二者可能共同导致优势/劣势准种的变化。此外,母婴之间准种的复杂性与其宿主的免疫状态有关。

关键词: HIV-1;准种;构象敏感性凝胶电泳
中图法分类号: R373; R394.2; R512.910.2 **文献标识码:** A

Differences of HIV-1 genotypes and quasispecies in the individuals with vertical transmission

HUANG Guang-yu, WANG Yu-ming (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To disclose the variant rule of HIV-1 vertical transmission by studying the differences of genotypes and quasispecies in the individuals with HIV-1 vertical transmission. **Methods** RNA was extracted from the plasma of the individuals of vertical transmission and C2-V5 DNA segment of HIV-1 *env* gene was acquired by RT-PCR. Purified DNA segment was inserted into T vector and transformed into Top10 *Escherichia coli*. Positive clones were acquired by blue-white screening and used as models in PCR. PCR products were analyzed by conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE). The clones of major and minor quasispecies were sequenced. **Results** HIV-1 quasispecies in the mother of the first group were less complex than her child, and their quasispecies nucleotide sequences were highly homologous and of HIV-1 of C subtype. HIV-1 quasispecies in the mother of the second group were more complex than her child, and their quasispecies nucleotide sequences were highly homologous and of HIV-1 of AE subtype. **Conclusion** HIV-1 genetic subtypes are generally not changed in vertical transmission, but HIV-1 quasispecies could be selected in vertical transmission and screened by the new environment of the new host which may both induce the changes of dominative and minor quasispecies. We also find that complexity of HIV-1 quasispecies is associated with immune status of host.

Key words: HIV-1; quasispecies; conformation sensitive gel electrophoresis

由于感染人类免疫缺陷病毒1型(human immunodeficiency virus-1, HIV-1)的妇女人数不断增多,而且大多处于生育年龄,尽管有抗病毒治疗等干预措施,仍然不断有大量婴儿感染HIV-1。目前,全世界约有220万HIV-1阳性儿童,全世界每天新增HIV-1阳性婴幼儿达1 500例左右,仅2004年就有64万婴幼儿的HIV-1新发感染,其中绝大部分来源于母婴垂直传播。因此,研究HIV-1垂直传播机制有着重大意义,但至今为止,我们对母婴垂直传播的机制方面了解甚少,尽管有学者提出HIV-1垂直传播的选择性,但缺乏相应的实验依据。我们对HIV-1在垂直传播过程中的病毒生物学演变进行研究,试图为HIV-1垂直选择性传播提

作者简介: 黄广宇(1979-),男,黑龙江省哈尔滨市人,硕士,主要从事艾滋病基础和临床相关方面的研究。电话:(023)66591752
通讯作者: 王宇明,电话:(023)68754141
收稿日期: 2005-04-29;**修回日期:** 2005-07-10

供实验依据，并且为进一步揭示 HIV-1 垂直传播的机制提供有价值的线索。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 研究对象 2003－2004 年我科住院的 2 对垂直传播的 HIV-1 感染者的血浆标本为研究对象，第 1 对母亲为 YJ，33 岁，为无症状 HIV 感染者，女儿 WYF，54 d，艾滋病患者；第 2 对母亲为 CM，30 岁，为艾滋病患者，儿子 ZDB，12 个月，为无症状 HIV 感染者。

1.1.2 主要试剂 QIAamp Viral RNA mini kit 购自美国 Qiagen 公司，QIAGEN OneStep RT-PCR Kit 购自德国 Qiagen 公司，Rnasin Plus Ribonuclease Inhibitor 购自美国 Promega 公司，TaKaRa Ex Taq 和 dNTP Mixture 购自中国 TaKaRa 公司，引物：外侧引物：上游 C2-V5-F1 5′-CTCCAGCTGGTTWTGCRATT-3′，下游 C2-V5-R1 5′-GCCTGTACCGTCAGCGTTAT-3′，内侧引物：上游 C2-V5-F2 5′-CAGCTGGTTWTGCGATTCTAA-3′，下游 C2-V5-R2 5′-RTYYCCTCCTCCAGGTCTGA-3′由上海生工生物技术公司合成（简并碱基 W = A/T，R = A/G，Y = C/T/U）。玻璃珠 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物技术公司，TA-Cloning kit 购自美国 Invitrogen 公司，Top10 大肠埃希菌为徐宝艳博士惠赠。牛磺酸（Taurin）和尿素（Urea）购自 Sigma 公司，羟甲基氨基甲烷（Tris）、乙二胺四乙酸（EDTA）、丙烯酰胺（acrylamide）和甲叉双丙烯酰胺（methylene bisacrylamide）购自 BBI 公司。

1.1.3 主要仪器 Protein Ⅱ 垂直电泳仪（Bio-Rad）、GEL-DOC2000 凝胶成像仪（Bio-Rad）、PTC-225 热循环仪（MJR）。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取 按照 QIAamp Viral RNA mini kit 说明自血浆内提取总 RNA。

1.2.2 RT-PCR 及第 2 轮 PCR RT-PCR 反应体系如下：5 × RT-PCR 缓冲液 10 μl + dNTP（10 mmol/L）2 μl + 引物 C2-V5-F1/R1（10 mmol/L）各 2 μl + 逆转录酶 2 μl + RNasin（40 U/μl）1 μl + 模板 RNA 10 μl + 无 RNase 水 21 μl，体系总共 50 μl，反应条件为：50 ℃ 30 min→95 ℃ 15 min→（94 ℃ 1 min，55 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min）35 个循环→72 ℃ 10 min；第 2 轮 PCR 反应体系如下，10 × PCR 缓冲液 5 μl + dNTP（10 mmol/L）2 μl + 引物 C2-V5-F2/R2（10 mmol/L）各 2 μl + Ex Taq 多聚酶 2 μl + 模板 DNA 5 μl + 无菌水 31 μl，体系总共 50 μl，其中模板 DNA 为 RT-PCR 产物的 50 倍稀释物，反应条件 95 ℃ 3 min→（94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min）30 个循环→72 ℃ 10 min。

1.2.3 目的 DNA 片段回收纯化 按照玻璃珠 DNA 胶回收试剂盒说明书回收纯化目的 DNA。

1.2.4 目的 DNA 与 T-载体连接 连接反应体系如下：目的 DNA 5 μl + 线性质粒 PCR2.1 2 μl + 连接缓冲液 1 μl + 无菌水 1 μl + 连接酶 1 μl，于 14 ℃下反应 12 h。

1.2.5 重组质粒转化 TOP10 感受态细菌 连接有目的 DNA 的 T 载体转化进入 TOP10 感受态细菌增殖，经蓝-白菌落筛选，得到阳性克隆，随机挑选 40 个阳性克隆用 PCR 法鉴定。经鉴定确实为阳性的产物进行 CSGE 分析。

1.2.6 异源双链的形成 挑选 30 个结果阳性 PCR 产物与驱动子（driver）PCR 产物以等物质的量混合后加入灭菌 EDTA 至终浓度 10 mmol/L（抑制 DNA 多聚酶活性）。驱动子为不相关个体阳性克隆的 PCR 产物。混合后于 98 ℃变性 5 min，使 DNA 双链解链为 2 条单链，68 ℃复性 1 h，驱动子的 2 条 DNA 单链和样本的 2 条 DNA 单链两两结合，理论上形成 2 条同源双链和 2 条异源双链[1]。

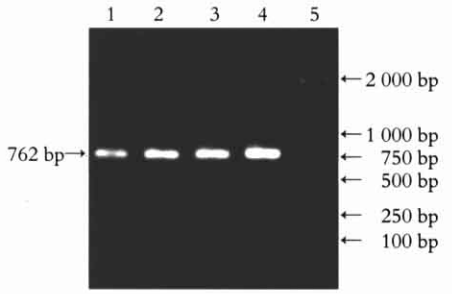
1.2.7 CSGE 配制 10% 变性聚丙烯酰胺溶液，具体配方如下：尿素 5.25 g + 5 × TTE 缓冲液 3.5 ml + 乙二醇 3.5 ml + 甲酰胺 5.25 ml + 30% 丙烯酰胺溶液（其中丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺之比为 29∶1）11.7 ml→加去离子水定容至 35 ml，然后加新鲜的 10% 过硫酸铵 240 μl 和 TEMED 22 μl。配制好的溶液注入双层玻璃板中，于 28 ℃聚合约 30 min，制成聚丙烯酰胺凝胶（polyacrylamide gel，PAG），于垂直电泳槽内电泳，上下槽内均为 0.5 × TTE 电泳缓冲液（1 × TTE：89 mmol/L Tris，15 mmol/L taurine，0.5 mmol/L EDTA，pH 9.0）[2]，室温下 300 V 预电泳 30 min，将异源双链产物与 2 × 载样缓冲液（20% 乙二醇/30% 甲酰胺/0.025% 溴酚蓝）等容积混合加入上样孔，冰浴下，300 V 电泳 48 h。电泳结束后 PAG 于 1 μg/ml 溴化乙锭溶液中染色 5 min，凝胶成像仪上成像并保存。

1.2.8 测序及结果分析 根据凝胶电泳成像结果挑选优势准种和劣势准种的代表克隆型送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。测序结果用 Bioedit5.0 将目的 DNA 序列剪切整齐并与参考序列（参考序列均来自 GenBank）进行比对，用 Phylip3.2 以最大似然法生成种系发生树，确定 HIV-1 的亚型。

2 结果

2.1 第 2 轮 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定

由于血浆内 HIV-RNA 水平较低，RT-PCT 结果于琼脂糖凝胶电泳上鉴定呈弱阳性，经第 2 轮 PCR 后，2 对母子的标本于琼脂糖凝胶电泳上鉴定均为阳性，目的 DNA 片段大小约为 762 bp，图示条带刚好与 DNA 分子质量标准的 750 bp 条带接近，证明阳性条带正是目的 DNA（图 1）。



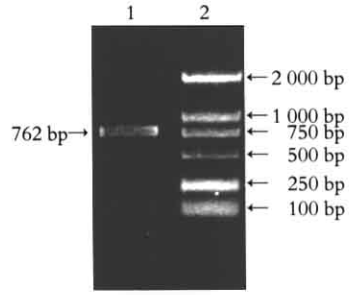
1：YJ；2：WYF；3：CM；4：2DB；5：DNA ladder

图 1 第 2 轮 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果

Fig 1 The second round PCR products identified by agarose gel electrophoresis

2.2 纯化目的 DNA 于琼脂糖凝胶电泳鉴定

目的 DNA 经切胶回收纯化后于琼脂糖凝胶电泳鉴定（图 2），T（target）代表目的 DNA，在 DNA 分子量标准 750 bp 条带位置呈现阳性条带，条带清晰锐利，无拖尾，证明纯化后的目的 DNA 不含其它杂质 DNA。



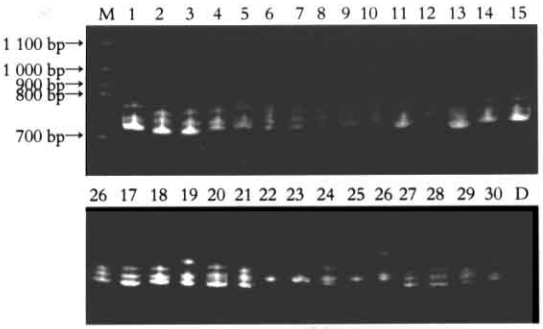
1：Target DNA；2：DNA ladder

图 2　回收目的 DNA 于琼脂糖凝胶电泳鉴定结果

Fig 2　Purified target DNA identified by agarose gel electrophoresis

2.3　CSGE 结果

CSGE 结果于凝胶成像仪上成像（图 3）：M 代表 DNA 分子量标准，条带清晰；1～30 标本代表 WYF 的 30 个克隆，多数呈现 3 条带，靠近图下端的条带为同源双链，其上面 2 条为异源双链，少数呈现 1 条带，说明无异源双链形成，仅有同源双链；D 代表驱动子，其本身只有同源双链。



M：DNA ladder；1－30：30 clones of AIDS patient WYF；D：Driver

图 3　CSGE 结果

Fig 3　CSGE results of the positive clones

2.4　CSGE 准种复杂性、克隆型分布、准种遗传差异性分析结果（表 1）

表 1　CSGE 准种复杂性、异质性和克隆型分布分析结果

Tab 1　Analysis of quasispecies complexity, and clonotype distribution by CSGE

Sample	Quasispecies clonotype number	Clonotype distribution	Quasispecies complexity (%)
WYF	7	8,7,6,5,3,3,1	20.59
YJ	3	28,4,2	8.82
ZDB	4	24,6,2,2	11.76
CM	6	18,8,4,2,1,1	17.65

2.5　测序结果与参考序列比对后生成种系发生树

从种系发生树图上分析的结果：YJ 和 WYF 核苷酸序列具有高度同源性（WYF3，4，7，10，20，33 和 YJ3，6，9 分别代表一种克隆型），且均为 C 亚型；CM 和 ZDB 核苷酸序列具有高度同源性（CM18，20，22 和 ZDB25 分别代表一种克隆型），且均为 AE 亚型。

3　讨论

通过本实验结果可以看出，婴儿体内的 HIV-1 准种与母亲体内的高度相关，母婴垂直传播的过程不会出现亚型的变化，但由于传播过程中，HIV-1 感染可能具有一定的选择性，因此母婴体内的 HIV-1 准种组成存在明显差异。Philpott 等[2] 研究发现尽管母亲体内可存在 X4 HIV-1（以 CXCR4 作为协同受体）及 R5 HIV-1 病毒株，但在婴幼儿体内检测到的却常是 R5 HIV-1。母体内分离到的 HIV-1 病毒变异株种类，远多于婴幼儿体内分离到的 HIV-1 病毒变异株，有时母体内罕见的病毒变异株却是子代体内主要的病毒变异株，这些现象均提示在垂直传播过程中存在选择性传播（selective transmission）。由于胎盘滋养层中的 HIV-1 病毒变异株种类，远少于孕妇血液内的 HIV-1 病毒变异株，因此在子宫内垂直传播这一过程中也涉及了选择性[2,3]。Mognetti 等[4] 发现，滋养细胞表达的 HIV-1 协同受体存在明显的个体差异，这可能也是选择性传播的原因之一。有关选择的具体机制尚不明了，有可能是病毒变异株逃离母体免疫应答、选择性感染、选择性扩增、在婴幼儿体内选择性复制等多个环节的作用，最终导致了病毒的选择性传播[4]。此外 HIV-1 进入新宿主后，由于外界免疫压力的不同，准种的组成与原宿主体内可能会有不同，甚至有可能会出现新的病毒准种。本研究还表明 HIV-1 准种复杂性与机体免疫状态高度相关，第 1 对中发病的婴儿 WYF 其准种复杂性明显高于其母亲，婴儿免疫系统本身就尚未发育，HIV-1 在体内直接侵犯免疫系统使免疫功能进一步降低，在免疫压力较低的情况下，HIV-1 大量复制，同时也产生大量的突变病毒株；第 2 对母亲 CM 发病，其免疫功能较低，HIV-1 准种复杂性较高，其子 ZDB 尽管没有发病，由于婴幼儿阶段免疫功能尚不健全，HIV-1 复制水平较高，因此准种复杂性较高，但低于其母亲。

目前，用于 HIV-1 基因变异分析的方法很多，主要有序列测定法和核酸探针法等。序列测定法比较特异，但需要专门测序仪，且技术要求和价格相对较高，不易普及到对大样本进行分析，特别是对 HIV-1 在体内的准种复杂性分析时只能测出其优势病毒群。CSGE 是原有的异源双链分析的一种改进方法，是一种快速、简便和可靠研究 HIV-1 基因变异的分子生物学方法，其优点是可同时对大量的 HIV-1 病毒进行基因分析，了解病毒株基因大体演变过程及它们之间的相互关系而且可以用来追踪在不同免疫状况下和疾病不同阶段人体内 HIV-1 的变异水平，确定其病毒准种

的复杂性,以此分析HIV变异与机体免疫系统及病程的关系。

参考文献:

[1] Ganguly A, Rock M J, Prockop D J. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(21): 10325-10329.

[2] Philpott S, Burger H, Charbonneau T, *et al*. CCR5 genotype and resistance to vertical transmission of HIV-1 [J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 1999, 21(3): 189-193.

[3] Montano M, Russell M, Gilbert P, *et al*. Comparative prediction of perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission, using multiple virus load markers [J]. J Infect Dis, 2003, 188(3): 406-413.

[4] Mognetti B, Moussa M, Croitoru J, *et al*. HIV-1 co-receptor expression on trophoblastic cells from early placentas and permissivity to infection by several HIV-1 primary isolates [J]. Clin Exp Immunol, 2000, 119(3): 486-492.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2005)17-1788-01

肌间沟臂丛神经两点阻滞法临床应用

Clinic application of two-point brachial plexus block through intermuscular approach

赵彩明,陈文波,肖 实 (武警江西总队医院麻醉科,南昌 330001)

上臂近端1/3处及肩锁部位的手术,采用传统的肌间沟臂丛神经阻滞法往往效果不佳,自2002年1月至2004年1月,我科应用肌间沟臂丛神经两点阻滞法,取得较好效果,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

38例需行上臂近端1/3处或肩锁部位手术的患者,随机分为两组:实验组19例采用肌间沟臂丛神经两点阻滞,对照组19例,采用传统肌沟臂丛神经单点阻滞,两组间年龄,体质量和ASA分级无差异,手术时间1~5 h。

1.2 麻醉方法

所有病人均在监测血压,心电图下完成手术,局麻药均采用2%利多卡因10 ml,0.75%布比卡因10 ml+0.9%生理盐水5 ml配成混合液,实验组病人取仰卧位,头偏向对侧,于前,中斜角间隙三角顶端或C_6平面进针,取得异感回吸无血及脑脊液后注射器药5 ml,然后退针到颈阔肌表面,向下呈扇形注药5 ml再以肌间沟和环状软骨水平线的交点为进针点刺向C_6横突,针尖抵C_6横突后稍退针回吸无血及脑脊液后注药15 ml。对照组病人于肌间沟距锁骨上缘约2.5~3 cm处穿刺,见神经异感后回抽无血及脑脊液,即缓慢注入局麻药25 ml。

2 结果

以阻滞完善,病人自觉无痛,肌肉松弛良好为优良;术中需加辅助药物或改麻醉方法均视为欠佳,采用肌间沟臂丛神经两点阻滞与采用传统肌间沟臂丛神经阻滞相比较,实验组明显优于对照组。

经χ^2检验,$\chi^2=3.897$,$P<0.05$,实验组比对照组的效果有明显差异。

3 讨论

从锁骨,肩胛骨及肱骨外踝颈周围比邻与周围神经支配的关系,颈前下部皮肤,颈侧区胸臂上部及肩部和前后臂区皮肤分别有锁骨上神经,部分颈横神经,肌皮神经,臂后皮神经臂外侧上皮神经及臂外侧下皮神经支配。因胸锁乳突肌,胸大肌,三角肌,冈上肌,冈下肌小圆肌,大圆肌,肩胛下肌和喙肱肌的起点或经路与锁骨及肱骨外踝颈关系密切,而支配它们的神经分别为:颈浅丛的锁骨上神经,颈横神经,臂丛的分支:腋神经,肩胛上,下神经及肌皮神经。由此可见,锁骨手术区域在部分颈神经浅丛或臂神经丛分布,选择肌间沟臂丛两点阻滞法,可有效阻滞颈浅丛的锁骨上神经和部分颈横神经,因臂丛神经包裹在连续相通的筋膜间隙中,而臂丛三干在肌间沟内是上下排列的,采用两点肌间沟穿刺法,用药量少,并能有效的阻滞来自C_5,C_6,C_7神经根的腋神经,肩胛上下神经,肩胛背神经及肌皮神经[1]。目前临床上一般采用20~30 ml局麻药于传统肌间沟法进针寻得异感即注药,药液仅靠局部张力在臂丛鞘内扩散,浸润,此药量不足以扩散到整个臂丛鞘[2]。因此采用两点阻滞法尽量把有限的局麻药注射到臂丛三干的上,中干,以期达到在C_6横突截面上臂丛各个干和股均有药液浸润,提高了麻醉的完善率,减少了局麻药中毒等并发症[3]。

关键词:肌间沟;臂丛神经;两点阻滞
中图法分类号:R614 文献标识码:B

参考文献:

[1] 彭裕文. 局部解剖学[M]. 第5版. 北京:人民卫生出版社, 2001. 300-400.

[2] 徐铭军,刘玉兰,詹丽春,等. 肌间沟臂丛神经扇形阻滞法的临床观察[J]. 临床麻醉学杂志, 2003, 19(4): 245-246.

[3] 徐国亭,刘玉德,王春亭,等. 连续高位硬膜外加浅颈丛神经阻滞在颈部手术的应用[J]. 郑州大学学报(医学版), 2003, 38(3): 442-443.

(编辑 龙 亮)

作者简介:赵彩明(1970-),女,江西省南昌市人,医师,主要从事全麻机制方面的研究。电话:(0791)5234259

收稿日期:2004-05-17;修回日期:2004-09-18