

2)。

经典纯化法用苯酚/氯仿抽提去除蛋白,再用乙醇沉淀收集质粒 DNA。离心柱吸附法选用特异的核酸吸附材料硅胶膜吸附质粒,结合高速离心去除蛋白和其他杂质的污染。我们比较两种纯化方法所得的 DNA 浓度和纯度(表 2),发现各有利弊。抽提纯化 DNA 终浓度比较高,但是纯度低;胶回收纯化得率很低,但是纯度非常高。于是我们进一步设计了比较实验,将所得的 DNA 用转录试剂盒转录成 RNA,通过比较所得转录产物 RNA 的浓度来选择比较优化的 DNA 纯化方法。结果发现离心柱吸附法(胶回收纯化法)的 DNA 转录率显著高于抽提纯化法(表 3)。我们进行分子生物学实验目的是获得高浓度的 P2X<sub>4</sub>嘌呤受体的 RNA,将其微量注射到具有完整表达体系的非洲爪蟾卵母细胞中进行表达,从而翻译出我们所要研究 P<sub>2</sub>X<sub>4</sub>嘌呤受体(ATP 受体的亚型之一),因此,高浓度的 RNA 的获得是我们后续电生理(电压钳技术)实验得以顺利进行的前提。通过反复研究比较,我们认为,配体门控通道的质粒转录成 RNA 的过程中,选择胶回收方法纯化 DNA 更有利于获得较高浓度的 RNA。

综上所述,比较 150 $\mu$ l、160 $\mu$ l、170 $\mu$ l、180 $\mu$ l 4 种酶切体系中:180 $\mu$ l 的酶切效果最好,由于将酶切体系放大,杂质将相对稀释,不需增加酶的用量就能取得较好的酶切效果。同时,在我们的实验中还发现,

提取质粒 DNA 片段的纯度低就很难酶切完全,如果延长酶切的时间 1~2h, DNA 片段将会被切碎。我们的目的是获得高浓度的纯化 DNA 片段,由于 150 $\mu$ l 酶切体系胶回收纯化 DNA 片段浓度最高,所以选用 150 $\mu$ l 体系。比较两种 DNA 纯化方法:苯酚/氯仿抽提纯化和离心柱吸附法(胶回收试剂盒),结果显示,抽提纯化 DNA 片段的浓度高、纯度低;离心柱吸附法浓度低、纯度高。将两种纯化方法所得 DNA 片段进一步转录成 RNA,离心柱吸附法转录成 RNA 的浓度较高。我们研究的 P<sub>2</sub>X<sub>4</sub>受体来自于非洲爪蟾卵母细胞对相应 RNA 的翻译,所以选择离心柱吸附法(胶回收方法)纯化 DNA 片段。

#### 参考文献

- 1 刘水平,罗志勇. 琼脂糖凝胶电泳实验技巧. 实用预防医学, 2006, 13(4):1068
- 2 薛仁镐,金圣爱,孙世孟,等. 琼脂糖凝胶中 DNA 片段的挤压回收法. 生物技术, 2006, 16(3):50-51
- 3 曹阳,董晓宇,姜国斌,等. 碳酸钙沉淀法回收琼脂糖凝胶中 DNA 的探讨. 生物技术, 2004, 14(2):28-29
- 4 谭艳平,杨玖英,朱英国,等. 琼脂糖电泳凝胶中回收微量 DNA 片段的新方法. 中南民族大学学报(自然科学版), 2004, 23(1):10-13
- 5 孙连魁,殷剑宁. 内切酶 XhoI 部分氨基酸残基的化学修饰. 西北大学学报, 1990, 20(1):65-71

(收稿:2010-04-24)

(修回:2010-06-28)

## 改良人骨髓间充质干细胞分离方法提高细胞定向分化能力

张 卉 董学君 邵健忠 项黎新

**摘 要 目的** 改良人骨髓间充质干细胞(hBM-MSCs)分离方法,提高细胞定向分化能力。**方法** 用密度梯度离心法从少量人骨髓中分离得到单个核细胞,贴壁培养 3 天后换液,实验组换液后 72h 内每隔 12h 更换新鲜培养液,传代时胰蛋白酶 37℃ 作用 2min 后终止消化;对照组未经频繁换液,胰蛋白酶消化 3min。镜下观察分离细胞的形态变化。用成骨、脂肪和软骨细胞诱导液诱导两组第 3 代(P3)细胞分化,碱性磷酸酶钙钴染色法、茜素红染色法和 Von Kossa 银染色法检测成骨细胞分化;油红 O 染色法检测脂肪细胞分化;阿尔新蓝染色法检测软骨细胞分化。**结果** 首次换液 72h 后,实验组与对照组相比,贴壁细胞数量较少

基金项目:浙江省省部共建项目(WKJ2007-2-037);浙江省自然科学基金项目(Y2090337)

作者单位:325035 温州医学院检验医学院(张卉);312000 浙江省绍兴市人民医院(张卉、董学君);310058 杭州,浙江大学生命科学院(邵健忠、项黎新)

通讯作者:董学君,电子信箱:dxj9666@163.com

但形态均一性高。不同染色结果显示:诱导分化成骨细胞 14 天时,实验组 95% 以上细胞分化,对照组为 60% ~ 70%;诱导分化脂肪细胞 21 天时,实验组 50% ~ 60% 细胞分化,对照组为 40%;诱导分化软骨细胞 21 天时,实验组 90% 以上细胞分化,对照组为 60% ~ 70%。**结论** 首次换液 72h 内频繁更换新鲜培养液和传代时缩短胰蛋白酶消化时间的方法能够提高 hBM - MSCs 的定向分化能力。

**关键词** 人骨髓间充质干细胞 成骨细胞 脂肪细胞 软骨细胞

**An Improved Protocol for Isolating and increasing the Multiple Differentiation Potentials of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow.** Zhang Hui, Dong Xuejun, Shao Jianzhong, Xiang Lixin. School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical College, Zhejiang 325035, China

**Abstract Objective** To explore an improved protocol for isolating and increasing the multiple differentiation potentials of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBM - MSCs). **Methods** Mononuclear cells were isolated from human bone marrow by density gradient centrifugation and the medium was changed after 3 days. In the following 72 hours, the medium was changed every 12 hours in experimental group but not in control group. hBM - MSCs were digested with trypsin for 2 minutes in experimental group, while the time was 3 minutes in control group. The morphological changes of the separated cells were observed by phase - contrast microscope. Three induction media induced oriented differentiation of hBM - MSCs at passages 3 into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. Osteoblasts were identified by ALP stain, Alizarin Bordeaux stain and Von Kossa stain, and adipocytes by morphological change and Oil Red - O stain, as well as chondrocytes by Alcian Blue stain. **Results** After 72 hours when medium was exchanged for the first time, the number of adherent cells in experimental group was less than that in control group, while the uniform of the cells was higher. Different staining methods showed that when the cells were induced in the osteoblast induction media for about 14 days, the differentiation rate of experimental group was more than 95%, the control group was 60% ~ 70%; when the cells were induced in the adipocyte induction media for about 21 days, the differentiation rate of experimental group was 50% ~ 60%, the control group was 40%; when the cells were induced in the chondrocyte induction media for about 21 days, the differentiation rate of experimental group was more than 90%, the control group was 60% ~ 70%. **Conclusion** Frequent medium change during 72 hours after first - time exchange of medium and diminishing the trypsinization time could increase the multiple differentiation potentials of hBM - MSCs.

**Key words** Human bone marrow mesenchymal stem cells; Osteoblasts; Adipocytes; Chondrocytes

干细胞是一类具有自我复制能力的多潜能细胞,在一定条件下,它可以分化为多种功能细胞,根据干细胞所处的发育阶段分为胚胎干细胞和成体干细胞。就分化能力而言,胚胎干细胞最具临床应用前景,但其来源不足、体外培养困难、定向诱导存在许多技术问题,用于临床存在免疫排斥和伦理学问题<sup>[1]</sup>;而成体干细胞来源丰富、取材方便,易实现自体取材,可避免免疫排斥反应和社会伦理争论,因此,成体干细胞的研究和应用开发具有重大现实意义。造血干细胞和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是主要的成体干细胞,其中, MSCs 主要存在于结缔组织和器官间质中,以骨髓中含量最为丰富,它能够定向分化为成骨、软骨、脂肪和神经等细胞,是一种细胞和基因治疗的潜在资源<sup>[2~6]</sup>。要使细胞治疗能够早日进入临床,人体自身的 BM - MSCs 将起到重要作用,虽然目前已有多种方法可分离得到 hBM - MSCs,但我们仍面临此细胞分离纯度不高、生物学特性不稳定及分化效率低的问题。针对上述问题,本研究组在密度梯度离心与贴壁筛选相结合的基础上进一步改进 hBM - MSCs 的分离方法,期望能够得到纯度和分化

效率更高的 hBM - MSCs,为其作为组织工程理想的种子细胞及广泛应用于临床提供实验依据<sup>[7]</sup>。

### 材料与方法

1. 标本来源:人骨髓来源于绍兴市人民医院健康成年志愿者。

2. 主要试剂和仪器:IMDM 培养基,低糖 DMEM 培养基(Gibco);胎牛血清(fetal bovine serum;FBS)(PAA);人淋巴细胞分离液、胰蛋白酶、 $\beta$ -甘油磷酸钠、维生素 C、胰岛素、地塞米松(dexamethasone;Dex)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin;BSA)(Sigma);青/链霉素(华东医药公司);转化生长因子 $\beta_1$ (Transforming growth factor - beta 1;TGF  $\beta_1$ )(Peprotech)。高速冷冻离心机(Sigma);二氧化碳培养箱(Thermo Forma);倒置相差显微镜(Olympus);酶标仪(Bio - Rad)。

3. hBM - MSCs 分离培养的改良方法:将取自成年健康志愿者的骨髓用 PBS 洗涤 1 ~ 2 次,并将骨髓稀释成细胞悬液,轻轻加入人淋巴细胞分离液(Ficoll - Hypaque, D = 1.077 ± 0.002g/ml)上层;室温 2200r/min 离心 25min 后,将上层 PBS 吸出,吸取中间白色细胞层(单个核细胞层);加入培养液 A(含有 10% FBS、100mg/ml 链霉素、100U/ml 青霉素的 IMDM)洗涤细胞,然后 1000r/min 低速离心 6 ~ 7min,倒去培养液,并用此培养液将细胞稀释成一定浓度的细胞悬液,按  $20 \times 10^6$

cells/ml 的密度接种于  $75\text{cm}^3$  培养瓶中,置  $37^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养,3 天后首次换液,除去未贴壁的造血干细胞及其他类型细胞。

首次换液后,将细胞分为实验组和对照组,分别进行如下操作:实验组首次换液后每隔 12h 更换新鲜培养液 A,72h 内共换 6 次,在此过程中,换液时应轻轻弃去培养液(若动作剧烈,可将贴壁的 MSCs 随非 MSCs 一起弃去),72h 后每隔 3~4 天换液;对照组细胞首次换液后直接每隔 3~4 天换液。待两组贴壁细胞生长至培养瓶底部 80%~90% 时,弃去培养液,PBS 洗两次后,分别向两组培养瓶中加入 1ml 0.25% 胰酶消化细胞,将培养瓶置于  $37^\circ\text{C}$  环境中,待镜下观察实验组约 50% 细胞质皱缩呈类圆形时终止消化,约需 2min,对照组约 70%~80% 细胞皱缩时终止消化,约需 3min,将两组消化得到的细胞分别以  $4 \times 10^4$  cells/ $\text{cm}^3$  的密度接种培养。后续的传代过程,两组细胞均按上述操作完成。

4. 分离 hBM-MSCs 的形态观察:用倒置相差显微镜逐日对实验组和对照组分离的贴壁细胞生长情况和形态变化进行观察、拍照。

5. 分离 hBM-MSCs 的定向分化能力检测:以生长良好的实验组和对照组第 3 代(P3)细胞为诱导细胞。将消化后的细胞调节密度为  $4 \times 10^4$  cells/ $\text{cm}^3$ ,分别接种于 12 孔培养板中培养,24h 细胞完全贴壁后,更换不同分化诱导培养基,诱导细胞向成骨、脂肪和软骨细胞分化。(1)定向分化成骨细胞:以成骨诱导培养基(培养液 A、10mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  维生素 C、 $10^{-7}$  mol/L Dex)诱导细胞分化,培养至第 14 天时,弃去诱导液,PBS 洗两次,10% 中性甲醛缓冲液固定 10min,蒸馏水洗 3 次,碱性磷酸酶(ALP)钙钴染色法检测分化细胞的 ALP 活性,茜素红染色法和 Von Kossa 银染色法检

测分化细胞钙结节形成情况。具体操作方法如下:①ALP 钙钴染色法:加入孵育液, $37^\circ\text{C}$  温浴反应 4~6h,自来水冲洗数次,2% 硝酸钴液反应 3~5min,蒸馏水洗 3 次,加入 1% 硫化铵浸 2min,蒸馏水冲洗;②茜素红染色法:加入 0.1% 茜素红 Tris HCl 染色(pH 8.3), $37^\circ\text{C}$  染色 30min,蒸馏水冲洗;③Von Kossa 银染色法:加入 1%  $\text{AgNO}_3$ ,紫外灯下照射 1h,蒸馏水洗,5%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$  处理 15min,蒸馏水洗。经不同方法染色后的细胞在倒置相差显微镜下观察、拍照。(2)定向分化脂肪细胞:以脂肪诱导培养基(低糖 DMEM、10% FBS、100mg/ml 链霉素 100U/ml 青霉素、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10^{-7}$  mol/L Dex)诱导细胞分化,培养至第 21 天时按定向分化成果细胞中所述方法固定细胞,蒸馏水洗 3 次后,加入油红 O 染液处理 15min,蒸馏水洗后显微镜下观察、拍照,此方法用于检测诱导细胞中脂滴形成情况。(3)定向分化软骨细胞:以软骨诱导培养基(培养液 A、10ng/ml TGF- $\beta_1$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  维生素 C)诱导细胞分化,培养至第 14 天、21 天时按定向分化成果细胞中所述方法固定细胞,蒸馏水洗 3 次后,行阿尔新蓝染色,检测诱导细胞的胞外基质形成情况。方法为:3% 乙酸处理 3min 后加入 1% 阿尔新蓝处理 30min,再用 3% 乙酸处理 3min,蒸馏水洗后显微镜下观察、拍照。

## 结 果

1. 改良方法分离 hBM-MSCs 的形态观察:原代细胞接种 3 天首次换液后,可见较多外观呈纺锤形和多边形的细胞贴壁生长。继续培养 72h 后,实验组与对照组相比,贴壁细胞相对较少,但细胞形态均一性高(图 1)。两组细胞均呈集落样生长,传代后,细胞呈纤维状,增生速度快。

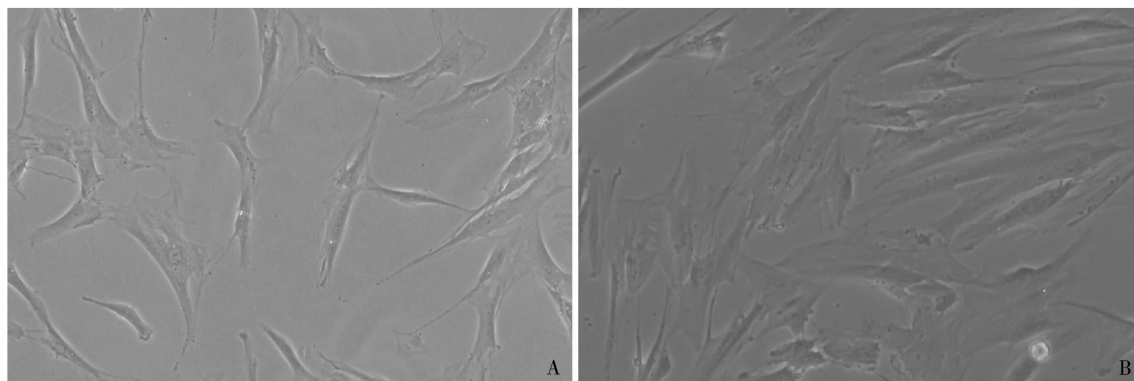


图 1 首次换液 72 h 后两组细胞的贴壁生长情况( $\times 100$ )

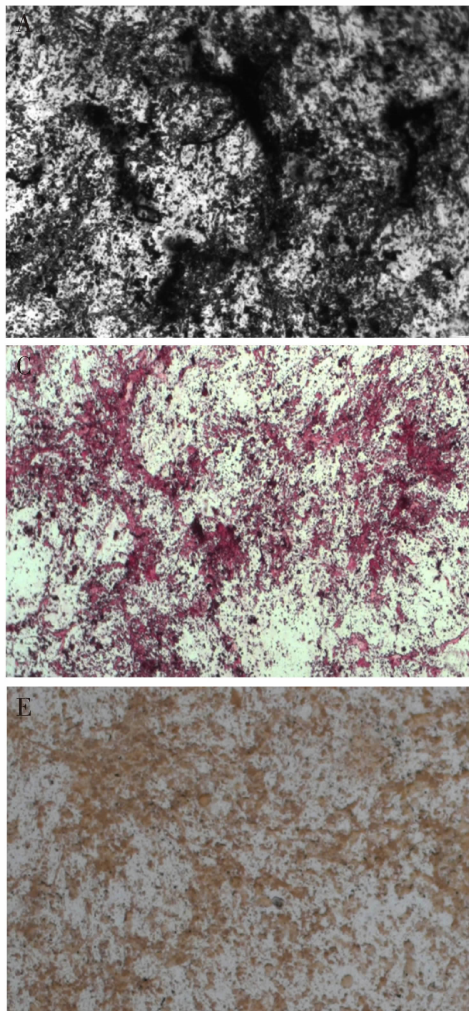
A. 实验组;B. 对照组

2. 改良方法分离 hBM-MSCs 的定向分化能力检测:(1)定向分化成骨细胞:在成骨诱导培养液培养过程中,实验组细胞于诱导第 5 天开始出现矿化结节,随着诱导时间延长结节中央逐渐变浓,14 天时矿化结节大部分互相融合;在对照组中,细胞于诱导 6~7 天后开始出现矿化结节,随诱导时间的延长,其

数量逐渐增多,但与诱导同期的实验组相比,矿化结节明显较少。经 ALP 钙钴法染色后,可观察到两组分化细胞均具有 ALP 活性;茜素红染色和 Von Kossa 银染色后,均可观察到两组细胞矿化沉着钙结节阳性,前者呈红色,后者呈棕褐色。3 种染色方法均表明:成骨细胞诱导液诱导细胞分化 14 天后,实验组

95% 以上细胞可分化为成骨细胞(图 2A、C、E),而对照组细胞分化率仅达 60% ~ 70% (图 2B、D、F)。(2)定向分化脂肪细胞:脂肪诱导液培养 7 天后,实验组与对照组细胞逐渐向类圆形转变,体积变大,胞质内出现少量圆形透亮小滴,随着诱导时间延长,两

实验组



对照组

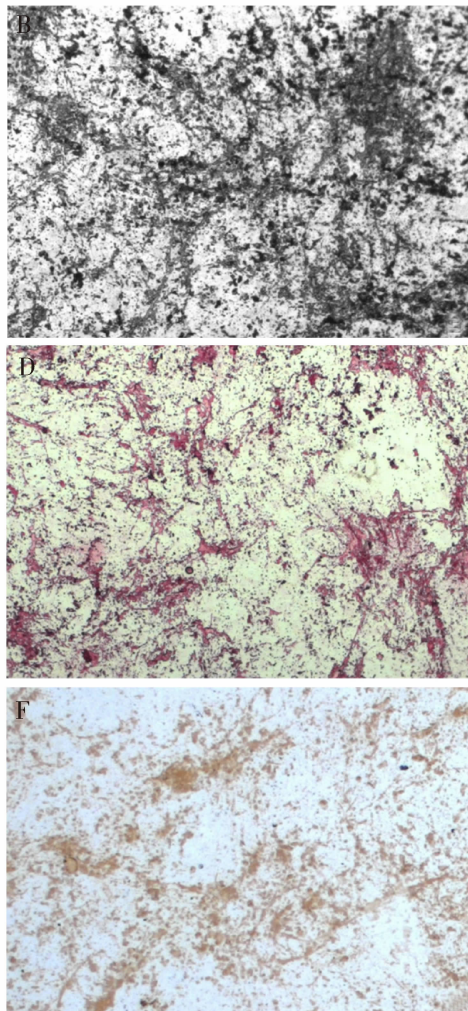


图 2 诱导两组细胞向成骨细胞分化 14 天后不同染色方法检测结果

A、B. 碱性磷酸酶染色;C、D. 茜素红染色;E、F. Von Kossa 银染色(×50)

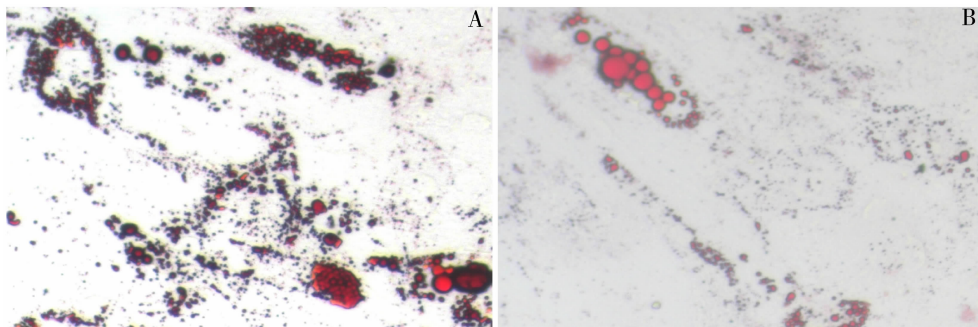


图 3 诱导两组细胞向脂肪细胞分化 21 天后油红 O 染色(×200)

A. 实验组;B. 对照组

细胞密度不断增加。第 14 天时,阿尔新蓝染色显示两组细胞中的细胞内外均可见较多蓝色斑块状着色,说明分化细胞有胞外基质合成和分泌,但两组细胞差

异不明显;待反应第 21 天时染色,可见实验组细胞的阳性率达 90% 以上,而对照组仅为 60% ~ 70% (图 4)。

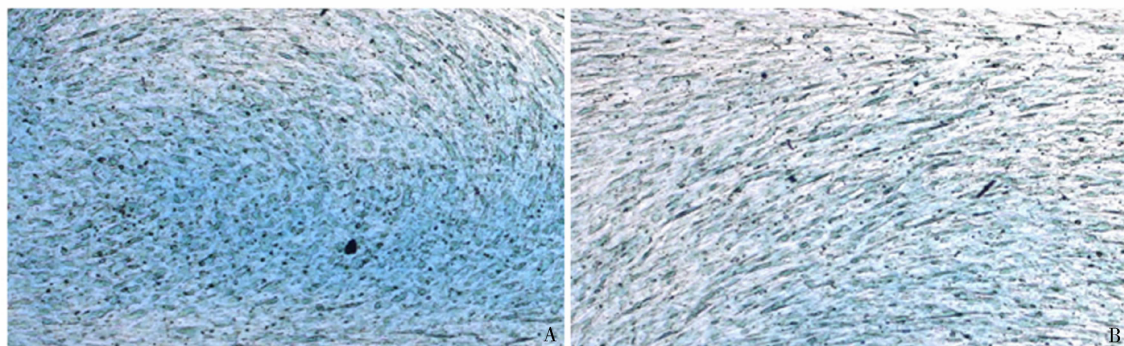


图 4 诱导两组细胞向软骨细胞分化 21 天后阿尔新蓝染色 (×50)

A. 实验组; B. 对照组

## 讨 论

目前我们常用的人骨髓间充质干细胞 (hBM - MSCs) 分离方法主要有 4 种,即<sup>[7-9]</sup>:①密度梯度离心法:利用 hBM - MSCs 与其他细胞密度不同采用 Percoll 或 Ficoll 液将其分离出来;②免疫学分离法:如流式细胞仪法、免疫磁珠法等,根据细胞特性或表面标志将 hBM - MSCs 从骨髓中分离;③贴壁筛选法:根据 hBM - MSCs 在培养瓶中呈贴壁生长而造血细胞呈悬浮生长的特性将两者分离;④密度梯度离心与贴壁筛选结合法:hBM - MSCs 属于单个核细胞的一种,利用单个核细胞与其他细胞密度不同采用 Ficoll 液将其分离出来,进一步利用 hBM - MSCs 贴壁生长的特性将其与单个核细胞中的造血细胞分离。上述第 4 种方法简单可行、细胞分离效率高,但仍未达到理想的分离效果,需进一步改进。

hBM - MSCs 呈成纤维形,具有较强的增生能力和多向分化潜能,在不同诱导因子的作用下可分化为所有中胚层来源的组织细胞,其中向成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞的分化是其主要的生物学特性<sup>[2]</sup>。成骨细胞分化过程中 ALP 是最早出现的成骨性标志,随着诱导时间的延长,ALP 表达量增加,通过 ALP 钙钴染色法可检测 ALP 的活性;生理性钙盐沉积是成骨细胞成熟的主要特性,茜素红染色和 Von Kossa 银染色可显示细胞的钙盐沉积情况<sup>[10]</sup>。脂肪细胞胞质内含有大量透亮圆形的脂肪滴,油红 O 染色后呈橘红色<sup>[11]</sup>。软骨细胞能够表达 II 型胶原、蛋白多糖,也能够合成和分泌大量细胞外基质,阿尔新蓝染色后细胞外基质呈蓝色<sup>[11]</sup>。

本实验首先利用密度梯度离心法得到单个核细胞,贴壁生长 3 天后首次换液,实验组在换液后 72h 内每隔 12h 更换新鲜培养液,去除贴壁不牢的非 hBM - MSCs,由于 hBM - MSCs 与巨噬细胞、内皮细胞等其他贴壁细胞相比,易于消化,所以实验组在传代尤其初次传代过程中控制胰蛋白酶消化时间,镜下观察实验组细胞 50% 左右皱缩呈类圆形时即终止消化,约需 2min,对照组消化 3min 终止,此时约 70% ~ 80% 细胞皱缩。本实验分离得到的 hBM - MSCs 具有贴壁生长的特性,形态类似成纤维细胞;经成骨、脂肪和软骨诱导培养基诱导实验组和对照组细胞分化后,ALP 钙钴染色法、茜素红染色法以及 Von Kossa 银染色法均证实两组细胞分化为成骨细胞,油红 O 染色证实两组细胞分化为脂肪细胞,阿尔新蓝染色证实两组细胞分化为软骨细胞,比较两组细胞向 3 种细胞分化的效率,发现实验组均高于对照组。通过上述较广泛的可被大多数研究者接受的鉴定标准,证实我们从人骨髓中获取的这些细胞即是 MSCs,细胞的分离纯度和定向分化能力高。

本课题组在密度梯度离心与贴壁筛选相结合法分离 hBM - MSCs 的基础上,通过首次换液后频繁更换新鲜培养液和传代时缩短胰蛋白酶消化时间的方法,得到了纯度和分化能力均比对照组高的 hBM - MSCs 细胞群,是一种分离 hBM - MSCs 的理想方法,为 hBM - MSCs 作为组织工程理想的种子细胞及广泛应用于临床提供了实验依据。

## 参考文献

- Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow - derived stem

- cells. *Blood*, 2003, 102 (10): 3483 – 3493
- 2 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284 (5411): 143 – 147
- 3 da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post – natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 2006, 119 (Pt 11): 2204 – 2213
- 4 Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*, 2007, 25 (6): 1384 – 1392
- 5 Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, *et al.* Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40 (5): 815 – 820
- 6 Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 2004, 8 (3): 301 – 316
- 7 Kazemnejad S, Allameh A, Soleimani M, *et al.* Biochemical and molecular characterization of hepatocyte – like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells on a novel three – dimensional biocompatible nanofibrous scaffold. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24 (2): 278 – 287
- 8 Carrancio S, Lopez – Holgado N, Sanchez – Guijo FM, *et al.* Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol*, 2008, 36 (8): 1014 – 1021
- 9 Jarocha D, Lukasiewicz E and Majka M. Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105<sup>+</sup> and CD271<sup>+</sup> cells. *Folia Histochem Cytobiol*, 2008, 46 (3): 307 – 314
- 10 Marie PJ, Fromiguet O. Osteogenic differentiation of human marrow – derived mesenchymal stem cells. *Regen Med*, 2006, 1 (4): 539 – 548
- 11 Chen Y, Dong XJ, Zhang GR, *et al.* In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes. *J Cell Biochem*, 2007, 102 (1): 52 – 63

(收稿:2010 – 04 – 14)

## HIV – 1 感染者不同人群的亚型分析

李巧敏 苗香芬 赵宏儒 赵翠英 路新利 李 岩

**摘 要** **目的** 研究河北省 2008 年新确认的 HIV – 1 感染者不同人群的亚型分布情况。**方法** 选取 2008 年新确认的 HIV – 1 感染者,利用分子生物学方法进行分型后,对不同人群的亚型分布情况进行分析,探讨不同 HIV – 1 感染者人群的亚型分布比例有无差异。**结果** 在 58 例已确定亚型的 HIV – 1 感染者中,来源于性传播、吸毒、血液和不详 4 种不同的人群,包含了 B、CRF01\_AE、CRF07 – BC、CRF08 – BC 和 C 5 种亚型。在这 4 种人群中,性传播途径的人群以 B 亚型(42.1%)和 CRF01\_AE(34.2%)为主,但是 5 种亚型的毒株均存在;血液传播途径中,均为 B 亚型;在吸毒人群中,均为 CRF07\_BC 亚型;不详人群中亚型相对较复杂,包含了 C 亚型除外 4 种亚型。**结论** 河北省 HIV 感染者亚型的分布具有明显的人群特点。

**关键词** HIV – 1 亚型 B 亚型 CRF01 – AE 亚型 CRF07 – BC 亚型 CRF08 – BC 亚型 C 亚型

**Analysis on Subtypes in Different Groups of HIV – 1 Infectors.** Li Qiaomin, Miao Xiangfen, Zhao Hongru, Zhao Cuiying, Lu Xinli, Li Yan. Department of STD and AIDS Prevention and Control, Center for Disease Control and Prevention of Hebei Province, Hebei 050021, China

**Abstract Objective** To study the subtypes distribution of HIV – 1 newly infected individuals in different groups in Hebei Province during 2008. **Methods** We collected blood of 63 HIV – 1 newly infected individuals and separated plasma specimens from the blood samples. RNAs were extracted and amplified by RT – PCR and nest – PCR. The PCR products were sequenced directly and phylogenetic analysis was performed. The subtypes distribution was studied in different groups. **Results** Among the 58 cases of HIV – 1 infections who were diagnosed with the subtypes, there were 5 subtypes including B, CRF01\_AE, CRF07 – BC, CRF08 – BC and C in 4 infected groups through sex transmit, drug – taking, blood transfusion and some unknown reason. The infected group through sex transmit mainly consisted of subtype B (42.1%) and CRF01\_AE (34.2%) but the five subtypes of virus all existed. Those infected through blood transfusion were mainly B, and those of drug takings were all with CRF07\_BC. Among the rest, subtypes were relatively complex, containing four subtypes except subtype C. **Conclusion** The subtypes distribution of HIV – 1 newly infector in Hebei province had significant characteristic in dif-

基金项目:河北省卫生厅青年科技课题(08042)

作者单位:050021 石家庄,河北省疾病预防控制中心性病艾滋病防治所