

# 人类免疫缺陷病毒 1 感染相关的基因多态性在中国汉族人群中的分布

王福生 金磊 雷周云 施红 洪卫国 徐东平 施明  
蒋建东 汪悦 张冰 刘明旭 李跃旗

**【摘要】** 目的 调查中国汉族人群中人类免疫缺陷病毒 1(HIV-1)感染相关的 CCR5 $\Delta$ 32、CCR2-64I 和 SDF1-3'A 等位基因突变频率和多态性的特点。方法 以 1 251 例汉族人群为研究对象,应用 PCR、PCR/RFLP(聚合酶链反应/限制性片段长度多态性分析)和 DNA 直接测序等方法进行检测,并用统计学方法进行分析。结果 发现中国汉族人群中存在 CCR5 $\Delta$ 32 等位基因突变(均为杂合子基因型)突变频率为 0.001 19,和西欧及美国白人相比,中国人群中 CCR5 $\Delta$ 32 基因突变频率极低,而 CCR2-64I 和 SDF1-3'A 基因突变频率相对较高,分别为 0.200 23 和 0.287 23。结论 中国汉族人群的 CCR5 $\Delta$ 32、CCR2-64I 和 SDF1-3'A 等位基因的突变和多态性特点,具有一定的代表性。由于 CCR5 $\Delta$ 32 突变率低,中国汉族人群对性接触传播的 HIV-1 病毒(R5)株可能有较大的遗传易感性。

**【关键词】** 趋化因子受体-5;趋化因子受体-2;人类免疫缺陷病毒 1;基因突变;多态性

**Distribution of HIV resistance CCR5-delta 32, CCR2-64I and SDF1-3'A alleles and their polymorphisms in the Han population in China** WANG Fusheng, JIN Lei, LEI Zhouyun, et al. 302nd Hospital of PLA, Beijing 100039, China

**【Abstract】 Objective** To study the frequency and polymorphism of three mutations (CCR5 $\Delta$ 32, CCR2-64I and SDF1-3'A alleles) conferring resistance to determined HIV-1/AIDS in the indigenous Han population in China. **Methods** The study population included 1 267 subjects, of which consisted 98.7% (1 251/1 267) Han people. The genotypes of the three mutations were respectively, detected by polymerase chain reaction (PCR) for CCR5 $\Delta$ 32 mutation, or by PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) assay with the digestion of restriction endonuclease Bsa BI and Msp I for CCR2-64I and SDF1-3'A mutations. DNA sequencing was employed to confirm the accuracy of PCR or PCR/RFLP products. **Results** The frequency of the mutant alleles were: 0.001 19 for CCR5 $\Delta$ 32; 0.200 23 for CCR2-64I, and 0.287 23 for SDF1-3'A. The three heterozygous CCR5-wt/ $\Delta$ 32 mutants were identified and no homozygotes were detected in indigenous Han population. The frequencies of CCR2-64I and SDF1-3'A alleles in China were higher than those of Caucasians descents in the USA and Europe. **Conclusion** Our data was the first findings on the frequency and polymorphism of CCR5 $\Delta$ 32, CCR2-64I and SDF1-3'A alleles in indigenous Han population in China which implied that the indigenous Han people might have a higher genetic susceptibility to the infection of sexually transmitted HIV-1 (R-5) strain. Further study is needed to clarify the significance of higher frequency of CCR2-64I and SDF1-3'A alleles in Han population.

**【Key words】** CCR5; CCR2; HIV-1; Gene mutation; Polymorphism

迄今,已证实趋化因子的受体(如 CCR5 和 CXCR4)是人类免疫缺陷病毒 1(HIV-1)感染人体的协同受体(coreceptor)<sup>[1]</sup>。在 HIV-1 感染靶细胞的过程中,与 CD<sub>4</sub> 分子结合的病毒还必须和协同受体结合,才能进入靶细胞<sup>[2]</sup>。在密切接触而不被感染的高危人群中,约有 1/3 的个体中 CCR5 等位基

因发生缺失突变,使机体在基因水平上对 HIV-1 感染产生天然的抵抗力<sup>[3,4]</sup>。例如 CCR5 基因发生了 32 碱基缺失,称之为 CCR5 $\Delta$ 32 突变;CCR2 基因阅读框架(ORF)起始位点 ATG 后的第 190 位点上发生 G $\rightarrow$ A 碱基替换突变叫做 CCR2-64I;SDF1 基因 3'非翻译区(UTR)第-801 位(从 ATG 起始密码子计数)碱基 G $\rightarrow$ A 转换,称为 SDF1-3'A 突变。这些等位基因的突变和多态性变化不仅影响 HIV-1 感染靶细胞,而且能改变艾滋病的发病进程<sup>[5,6]</sup>。因此,开展上述等位基因的研究具有重要的意义。

基金项目:国家自然科学基金资助(39770683)

作者单位:100039 北京 解放军第三〇二医院生物工程研究室(王福生、金磊、雷周云、施红、洪卫国、徐东平、施明、张冰、刘明旭、李跃旗);美国纽约西奈山医学院肿瘤研究中心(蒋建东、汪悦)

目前,在我国艾滋病的流行模式主要以高危人群为主,但在普通人群中也有发病。由于我国人口众多,特别是近年来 HIV-1 感染者呈快速上升趋势,因此尽早开展 CCR5 $\Delta$ 32、CCR2-64I 和 SDF1-3'A 等位基因突变和多态性的研究对于全面评估我国人群对 HIV-1 感染的遗传易感性,阐明人群中 HIV 感染的流行病学特点等尤为重要。为此我们首次对中国汉族人群中 HIV-1 相关的 CCR5 $\Delta$ 32、CCR2-64I 和 SDF1-3'A 等位基因突变和多态性进行了分析。

## 材料和方法

1. 研究人群:为了将被调查人群限制在土生土长的中国人(其父辈和祖辈均是中国人,且与欧洲、美洲等外国人无血缘关系)范围内,我们仅收集符合这些条件的中国人的外周静脉血标本(每人 1.0 ml)。我们研究的人群为 1 267 例中国人(无一例 HIV-1 感染者),其中绝大多数为汉族人(1 251 例),回族 11 例,满族 3 例,朝鲜族 2 名。589 例来自北京解放军第三〇二医院的住院病人(主要是患各种急慢性肝炎、菌痢、高血压和肿瘤等病人),678 例来自我院门诊健康查体人和京外(如哈尔滨、兰州等地)健康人等。年龄范围为 15~80 岁。性别男 931 例,女 336 例。

2. 基因组 DNA 的提取<sup>[7]</sup>:经 QIAamp blood kit 法(购自美国 QIAGEN 公司)提取的基因组 DNA 样品。其简要步骤是:向 200  $\mu$ l 外周静脉血中加入 25  $\mu$ l 蛋白酶 K 储存液(20 mg/ml)和 200  $\mu$ l AL 缓冲液,振荡混匀后,在 70 $^{\circ}$ C 温育 10 min。接着加入 210  $\mu$ l 的无水乙醇,振荡混匀。小心地将前述的混合物加到 QIAamp spin 柱子中,用台式离心机 8 000 r/min 离心 1 min。再用 500  $\mu$ l AW 缓冲液洗 QIAamp spin 柱子 2 次。最后用 70 $^{\circ}$ C 预热的 75  $\mu$ l AE 缓冲液洗脱柱中的基因组 DNA。取出 2~4  $\mu$ l DNA 样品用作定性和定量分析,其余 DNA 样品置 -20 $^{\circ}$ C 备用。

### 3. PCR 扩增和 PCR/RFLP(限制性片段长度多

表1 不同基因型符号及其与 PCR 扩增产物大小之间的相应关系

基因	基因型符号			PCR 产物大小(bp)		
	wt 纯合子	mt 杂合子	mt 纯合子	wt 纯合子	mt 杂合子	mt 纯合子
CCR5	wt/wt	wt/ $\Delta$ 32	$\Delta$ 32/ $\Delta$ 32	242	210, 242	210
CCR2	64V/64V	64V/64I	64I/64I	191	191, 165, 26	165, 26
SDF1	3'G/3'G	3'G/3'A	3'A/3'A	202, 100	302, 202, 110	302

注:CCR5 仅为 PCR 扩增的产物,CCR2 和 SDF1 为 PCR/RFLP 的产物;wt(wild-type)野生型,mt(mutant-type)突变型

态性)分析<sup>[8-11]</sup>:用于 PCR 扩增的 CCR5 $\Delta$ 32、CCR2-64I 和 SDF 基因的引物如下:CCR5 $\Delta$ 32 正向引物:5'-CTCGGATCCACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCT-3',反向引物:5'-CTCGTTCGACATGATGTGTAAGATAAGCCTCAC-3';CCR2-64I 正向引物:5'-CTCGGATCTTGTGGGCAACATGATGG-3'(26 mer),反向引物:5'-CTGTGAATAATTGACATTGC-3'(23 mer);SDF1-3'A 正向引物:5'-CAGTCAACCTGGGCAAAGCC-3',反向引物:5'-AGCTTTGGTCCTGAGAGTCC-3'。所有引物全部由美国 Genset 公司合成。PCR 的反应组成:1  $\times$  PCR 反应缓冲液中,含 Mg<sup>2+</sup> 3 mmol/L,4  $\times$  dNTP mix 200  $\mu$ mol/L,正向和反向引物分别为 0.5  $\mu$ mol/L,Taq 酶 1.5 U(购自美国 Promega 公司),人外周血基因组 DNA 模板 100 ng,加无菌 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 50  $\mu$ l。PCR 反应条件为:变性 94 $^{\circ}$ C 3 min;循环反应:94 $^{\circ}$ C,30 s $\rightarrow$ 62 $^{\circ}$ C,30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C,1 min,30 个循环;延伸反应:72 $^{\circ}$ C,10 min。PCR 扩增完毕,取 CCR2-64I 和 SDF1-3'A PCR 扩增的产物,分别用 Bsa B I 和 Msp I 限制性内切酶消化,并将所有的酶切产物进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳。PCR 和 PCR/RFLP 产物大小和基因型之间的关系见表 1。

4. DNA 测序:用 DNA 纯化试剂盒(Clontech,美国)将 PCR 扩增产物进行纯化和定量。利用 Dye Terminator 循环测序的方法在本实验室的全自动荧光测序仪(Applied Biosystem 310)上测序<sup>[7]</sup>。

5. 统计学方法: $\chi^2$  检验用于统计学分析。

## 结 果

### 一、HIV-1 感染相关基因突变频率

CCR5 $\Delta$ 32 基因:根据靶 DNA 的基因类型,预期 PCR 扩增的产物经过电泳分析后,得到三种结果:①242 bp 片段为 CCR5 野生纯合子基因型;②210 bp 片段为突变纯合子基因型;③242 和 210 bp 片段为突变型杂合子基因型(表 1)。我们在所检测的 1 267 个体中,仅有 3 例汉族人的基因组发生了  $\Delta$ 32 个碱基缺失突变,表现为杂合子 CCR5wt/

△32 基因型,其余 1 264 例均为纯合子 CCR5wt/wt 等位基因型,没有发现纯合子 CCR5△32/△32 突变的基因型(表 2)。经过 DNA 测序表明中国人野生型和突变型的 CCR5 基因序列与世界上其他人种相同。这提示在我国汉族人群中,的确存在 CCR5 △32 突变,只是等位基因的突变频率很低(约为 0.001 19)。

表2 中国人群 CCR5△32、CCR2-64I 和 SDF1-3'A 等位基因多态性分布

基因	例数	wt/wt		wt/mt		mt/mt		基因频率
		例数	构成比(%)	例数	构成比(%)	例数	构成比(%)	
CCR5	1 267	1 264	99.76	3	0.24	0		0.000 119
CCR2	1 251	791	63.23	419	33.49	41	3.28	0.200 23
SDF1	893	441	49.38	391	43.79	61	6.83	0.287 23

CCR2-64I 基因:我们应用 PCR/RFLP 检测法对 1 251 例汉族人群中的 CCR2-64I 基因多态性进行了分析(表 1)。由于 CCR2-64V/64V 基因型的 PCR 产物不含有 BsaB I 限制性酶切割位点,电泳时 191 bp 一条带。CCR2-64V/64I 基因片段能被 BsaBI 限制性酶切割,表现为 191 bp、165 bp 和 26 bp, CCR2-64I/64I 为 165 bp 和 26 bp。在 1 251 例汉族人群中,CCR2-64V/64V 有 791 例,CCR2-64V/64I 有 419 例,CCR2-64I/64I 有 41 例,CCR2-64I 等位基因频率为 0.200 23(表 2)。

SDF1-3'A 基因:由于 SDF1-3'A 的变异,使 SDF1 基因序列中原来存在的 Msp I 酶切位点丢失,所以可用 Msp I 酶切分析 PCR 扩增的 SDF1-3'A 基因产物,根据 PCR/RFLP 产物的片段大小很快能区分 SDF1-3'A 突变的基因型(表 1)。在 1 267 例中国人人群中,我们随机检测了其中的 893 例个体,结果:SDF1-3'G/3'G 有 441 例,SDF1-3'G/3'A 突变杂合子有 391 例,SDF1-64I/64I 突变纯合子有 61 例,SDF1-3'A 等位基因频率为 0.287 23(表 2)。

## 二、HIV-1 感染相关的等位基因突变频率在男女性别中分布的比较

为了比较上述三个基因突变和多态性在中国汉族人群男、女性别中有何差别,我们利用  $\chi^2$  检验进行分析,结果发现 CCR5△32 和 CCR2-64I 等位基因的 wt/wt、wt/mt 和 mt/mt 基因型构成比在男女性别中没有统计学差别;而 SDF1-3'A 基因型在男女性别分布有统计学上显著的差异( $P < 0.05$ ),即表

现为 SDF1-3'A 等位基因频率女性要高于男性(表 3)。这是我们在国际上首次报道的现象,具体意义值得进一步研究。

表3 中国人群 SDF1-3'A 基因型在男、女性别上构成比较

性别	例数	3'G/3'G		3'G/3'A		3'A/3'A		基因频率
		例数	构成比(%)	例数	构成比(%)	例数	构成比(%)	
男	652	326	50.00	286	43.87	40	6.13	0.280 67
女	241	115	47.72	105	43.57	21	8.71	0.304 92
合计	893	441	49.38	391	43.79	61	6.83	0.287 23

## 三、HIV-1 感染相关基因突变频率在不同地区人群中的分布

本研究人群主要是土生土长的中国汉族人。我们分别在北京、哈尔滨、兰州等地收集人群的 DNA 样品,检测的 CCR5△32、CCR2-64I 和 SDF1-3'A 基因多态性分布符合 Hardy-Weinberg 平衡,所以我们的研究人群具有一定的代表性<sup>[12]</sup>。根据被研究人群的籍贯(即出生地),我们比较了汉族人群的 CCR5△32、CCR2-64I 和 SDF1-3'A 基因多态性在不同地区的分布,未见明显差别。主要原因可能是①上述基因多态性在我国不同地区人群的分布本身可能不存在差别;②在我国,由于子代的籍贯常代表双亲中父亲所在的地点,不能代表母亲的籍贯,加上我们在上述几个大城市中收集基因样品,人群的流动性很大;还有被检测个体的双亲籍贯不同(约占 30%),仅以被检测个体的籍贯进行分析,所以检测结果难以真正代表某些等位基因的地区性分布。因此要分析上述基因在中国人群中的地区性分布,最好选择人口流动较小的农村或某一特定范围的人群进行调查。

## 讨 论

近年来,HIV-1 感染相关的等位基因的研究,特别是协同受体(CCR5、CCR2)基因及其突变体的重大发现,是 HIV-1 感染及其致病机理研究上的突破。相关的内容已成为艾滋病领域中研究的热点<sup>[6,9,10]</sup>。在这一研究领域中,最基本的问题之一就是弄清不同种族和人群中 HIV 感染相关基因的突变频率和基因多态性规律,才有可能正确地判断人群对 HIV 的遗传易感性和艾滋病的流行病学特点。基于这一目的,我们在国际上首次阐明了中国汉族人群中 CCR5△32、CCR2-64I 和 SDF1-3'A

等位基因突变频率和多态性特点。

HIV-1 抗性基因突变在全球不同区域和人群中的分布变化性很大<sup>[13]</sup>。在西欧后裔和美国白人中, CCR5 $\Delta$ 32 突变很常见, 等位基因频率为 0.08 ~ 0.12, 俄罗斯人的基因突变频率很高, 达到 0.122 1。在亚洲阿拉伯人群中 CCR5 $\Delta$ 32 基因突变频率是 0.011 1<sup>[14]</sup>。目前 CCR5 $\Delta$ 32 的突变对 HIV 感染和艾滋病发病产生的抗性机制已经基本清楚, 例如纯合子突变( CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 基因型)通过干扰 R-5 株病毒株进入靶细胞, 从而阻断 R-5 病毒的感染途径(主要是性接触传播); 而杂合子突变( CCR5<sup>wt</sup>/ $\Delta$ 32 基因型)对 HIV-1 的感染不产生明显的保护作用, 只能起到延缓 AIDS 的病程的作用<sup>[6, 15, 16]</sup>。在我们检测的 1 267 例个体中, 我国汉族人群的 CCR5 $\Delta$ 32 等位基因是频率 0.001 19, 值得注意的是仅 3 例发生了 CCR5- $\Delta$ 32 突变, 均为杂合子基因型, 其中 2 例为女性, 1 例男性。在他们中, 除了 1 例女性为慢性乙型肝炎患者外, 另 2 例是健康个体。可见在我国汉族人群中 CCR5- $\Delta$ 32 突变极少, 并且几乎缺乏纯合子突变基因型。此结果提示汉族人群对性传播性的 R-5 病毒株有较大的遗传易感性。特别值得指出的是在我们沿海开放城市, 更应该加强对性传播的 R-5 病毒株感染的预防。为何我国汉族人缺乏纯合子突变 CCR5- $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 基因型, 从遗传的角度而言, 一方面说明汉族人群中, 父母同时为 CCR5- $\Delta$ 32 携带者机会很少, 如果 CCR5 $\Delta$ 32 按照孟德尔遗传规律传给子代的话, 其几率也非常低。另一方面, 这也为 $\Delta$ 32 突变可能是从国外基因流入的结论提供间接的证据。

Kostrikis 等<sup>[9, 10, 13]</sup>报道 CCR2-64I 等位基因频率在白人占 9.8%, 非裔美国人 15.1%, 西班牙人 17.2%, SDF1-3'A 基因频率是: 美国白人 0.211, 非洲人 0.057, 西班牙人 0.160。我们测定中国人群中 CCR2-64I 和 SDF1-3'A 基因突变频率, 分别是 0.200 23 和 0.287 23。目前尚未发现上述三个等位基因在中国人群中分布存在地区性差异。已有证据表明 CCR2-64I 和 SDF1-3'A 突变对 AIDS 病程产生保护作用, 其中 SDF1-3'A 对 X-4 病毒株的感染有抑制作用, 我国人群 CCR2-64I 和 SDF1-3'A 等位基因频率明显高于美国白人、欧洲人, 是否代表我国人群如果感染 HIV-1 后, 病程进展相对缓慢, 或对 X-4 病毒株有较强的抗性问题, 需要深入研究。此外我们发现中国人群中 SDF1-3'A 等位基因频率女性

要高于男性, 这是否代表在中国人群中男性比女性对 HIV-1 的遗传易感性高, 是值得研究的问题。

我们研究的人群以汉族为主(占 98.73%), 数量相对较大、分布较广; 特别是对实验样品进行 2~3 次检测, 并经过 DNA 直接测序证实, 重复性好, 因而我们的研究结果具有较好的代表性, 同时为下一步继续研究 HIV-1 感染相关基因之间的相互关系奠定了良好的基础。

## 参 考 文 献

- Deng HK, Liu R, Ellmeier, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 1996, 381: 661-666.
- Smith MW, Dean M, Carrington M, et al. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science*, 1997, 277: 959-965.
- Detels R, Liu Z, Hennessey K, et al. Resistance to HIV-1 infection: Multicenter AIDS cohort study. *AIDS*, 1994, 7: 1263-1269.
- Samson M, Libert F, Doranz B, et al. Resistance to HIV-1 infection of caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene. *Nature*, 1996, 382: 722-725.
- Maas J, de Roda Husman AM, Brouwer M, et al. Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. Amsterdam cohort study. *AIDS*, 1998, 17: 2275-2277.
- Michael N, Louie LG, Kostrikis L, et al. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med*, 1997, 3: 1160-1162.
- 王福生, 蒋建东, 雷周云, 等. 我国人群中人类免疫缺陷病毒 1 感染的协同受体 CCR5 $\Delta$ 32 基因突变的初步检测. *中华医学杂志*, 2000, 80: 290-291.
- Charo IF, Myers SJ, Herman A, et al. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternate splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 2752-2756.
- Kostrikis L, Huang Y, Moore JP, et al. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat Med*, 1998, 4: 350-353.
- Winkler, William M, Smith MW, et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF1 chemokine Gene variant. *Science*, 1998, 279: 389-391.
- Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (sdf1) gene. *Genomics*, 1995, 28: 495-500.
- 约翰 B 詹金斯. 人类遗传学. 刘国瑞, 赵景春, 译. 北京: 中国医药科技出版社, 1990. 323-338.
- Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, et al. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nature Genetics*, 1997, 16:

100-102.

- 14 Rousset D , Soares JL , Reynes JM , et al. High frequency of the 3' A mutation of the SDF-1 gene in Cambodia. *AIDS* , 1999 , 13:420-421.
- 15 Guignard F , Combadiere C , Tiffany HL , et al. Gene organization and promoter function for CC chemokine receptor 5 ( CCR5 ). *J*

*Immuol* , 1998 , 160:985-992 .

- 16 Mummidi S , Ahuja SS , Gonzalez E , et al. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat Med* , 1998 , 4:786-793.

( 收稿日期 2000-03-02 )