

# 中国蒙古族人群中人类免疫缺陷病毒 1 感染相关的基因多态性的初步研究

杜清友 王福生 洪卫国 刘明旭 金磊 施红 雷周云 额尔敦

**【摘要】** 目的 调查中国蒙古族人群中与人类免疫缺陷病毒 1 (HIV-1) 感染相关的等位基因 CCR5-Δ32、CCR2b-64I 和 SDF1-3'A 的频率和多态性分布。方法 随机采集血样, 提取基因组 DNA, 经聚合酶链式反应 (PCR) 或聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 电泳分析, 计算各个突变基因的频率, 并对其群体分布、性别分布和三者相关性进行统计分析, 同时与其他已报道的种族人群进行比较。结果 等位基因的突变频率分别为 CCR5-Δ32 1.1%、CCR2b-64I 24.8%、SDF1-3'A 22.0%。三种突变等位基因群体分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡; CCR2b-64I 突变频率在性别上的分布有明显差异 ( $P < 0.1$ ), 女性的分布频率高于男性, 而其他两个等位基因在性别之间差异无显著性; 任何两个基因之间也未发现有相关性。结论 同美国白种人群相比, 中国蒙古族 CCR2b-64I 和 SDF1-3'A 等位基因的突变频率比较高, 与汉族人群的接近, 而 CCR5-Δ32 突变频率比美国白人低, 而比汉族人群的高, 有关机制有待于进一步阐明。

**【关键词】** HIV-1 协同受体; 基因频率; 抗性基因

**Polymorphisms of chemokine receptor alleles influencing genetic susceptibility to HIV-1 infection in Mongolia population in China** DU Qingyou, WANG Fusheng, HONG Weiguo, et al. Division of Bioengineering, the 302nd Hospital of PLA, Beijing 100039, China

**【Abstract】 Objective** Mutant frequency and polymorphism of HIV-1 resistance CCR5-Δ32, CCR2b-64I and SDF1-3'A alleles were investigated in Chinese population from Mongolian ethnic origin. **Methods** Whole blood samples from 134 Mongolian subjects were collected randomly and their genomic DNA were extracted using Qiagen Blood Kit. Allelic frequency was identified by means of PCR or PCR-RFLP analysis. Allelic polymorphism in population and between sex in the sample as well as correlation of the three genes were analyzed by  $\chi^2$  test. **Results** The frequencies of the three alleles were as following: CCR5-Δ32 1.1%, CCR2b-64I 24.8% and SDF1-3'A 22.0% respectively. Distribution of the three mutant alleles among the Mongolian population was in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium. Statistical analysis showed there was a higher frequency of CCR2b-64I in female than in male subjects (29.2% vs 19.7%). No Statistical difference was found in the allelic frequencies of both CCR5-Δ32 and SDF1-3'A between male and female individuals. **Conclusion** Compared with the Caucasian American, there were higher frequencies of CCR2b-64I and SDF1-3'A alleles and lower frequency of CCR5-Δ32 allele found in Mongolian population while the factors responsible for the variation of genetic polymorphisms in different ethnic populations need to be clarified.

**【Key words】** HIV-1 coreceptor; Allele frequency; Genetic resistance

人免疫缺陷病毒 (HIV) 是艾滋病 (AIDS) 的病原体, HIV 感染靶细胞, 除了需要 CD4 分子外, 还必须有人类趋化因子受体作为协同受体<sup>[1]</sup>。Feng 等人<sup>[2]</sup>首次发现  $\alpha$  类趋化因子受体 4 (CXCR4) 是 T 细

胞嗜性 HIV-1 (T-tropic HIV-1) 侵入 T 细胞的协同受体。随后, 人们又发现  $\beta$  类趋化因子受体 5 (CCR5) 是巨噬细胞嗜性 HIV-1 (M-tropic HIV-1) 感染巨噬细胞的协同受体<sup>[3]</sup>; 此外, 某些 HIV-1 毒株还能利用 CCR2b、CCR3 等作为感染细胞的协同受体<sup>[4,5]</sup>。趋化因子 SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) 还可抑制 T 细胞嗜性 HIV-1 对 T 细胞的感染<sup>[6]</sup>。这些协同受体及其配基在 HIV-1 的感染和发病过程中起着重要作用。分子遗传学研究表明, 协同受体 CCR5 有 10 多种基因突变, 但研究最多的是 CCR5-Δ32 和 CCR5-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (397706830)

作者单位: 100039 北京, 解放军第三〇二医院生物工程研究室 (杜清友、王福生、洪卫国、刘明旭、金磊、施红、雷周云); 内蒙古呼和浩特市解放军第二五三医院免疫研究室 (额尔敦)

通信作者: 王福生, E-mail: fswang@public.bta.net.cn

m303<sup>[7]</sup>;协同受体 CCR2b 的主要突变基因型为 CCR2b-64I<sup>[8]</sup>,趋化因子 SDF-1 的主要突变基因型为 SDF1-3'A<sup>[9]</sup>。这些基因突变可不同程度地影响个体对 HIV-1 感染的遗传易感性。为此,世界各国都对 HIV-1 相关协同受体进行基因调查<sup>[10,11]</sup>。但在我国,仅有汉族人的结果见诸报道<sup>[12]</sup>。另一方面,由于我国目前正处于 AIDS 早期流行阶段,某些地区的感染率已进入快速增长期,尽快调查我国各民族中 HIV-1 感染相关基因的突变情况,对于 AIDS 防治政策的制订具有重要意义。笔者首次对我国蒙古族人群的等位基因突变及基因多态性分布进行了调查分析。

### 材料与方 法

#### 一、样本来源

在内蒙古呼和浩特市采集蒙古族入血液标本 134 份,年龄范围为 10~76 岁。其中男性 61 人,女性 73 人(本次研究对象的 134 名蒙古族人均是根据本人自述确定的,且无蒙汉通婚后裔);病人 43 份(为内蒙古中蒙医医院的住院病人),健康人 91 份,主要是医务人员和学生。地域分布主要以呼和浩特市为主,所有血样均无 HIV-1 感染。

#### 二、基因组 DNA 提取

用 QIAgen 公司的基因组 DNA 提取试剂盒,自 200 μl 全血中分离 DNA 作为 PCR 反应模板。具体步骤见参考文献<sup>[13]</sup>。

#### 三、PCR 及聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测

CCR5-Δ32 及 SDF1-3'A 检测方法参见文献<sup>[13,14]</sup>。CCR2b-64I 的 PCR 引物为:上游引物 5'-CTCGGATCTTGTGGGCAACATGATGG-3',下游引物 5'-CTGTGAAAATTTGCACATTGC-3';PCR 条件为 95℃ 变性 5 min,循环反应 95℃ 15 s,60℃ 15 s,72℃ 30 s,30 个循环,72℃ 10 min。然后用限制性内切酶 BsaB I 酶切 PCR 反应产物,60℃ 2 h 后,将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳。

#### 四、统计分析

采用行×列表  $\chi^2$  检验,检测等位基因 CCR5-Δ32、CCR2b-64I 和 SDF1-3'A 在群体、性别上的分布是否平衡,以及它们之间是否存在基因相关性。

### 结 果

#### 一、各基因型的聚合酶链式反应-限制性片段长

#### 度多态性(PCR-RFLP)分析结果

根据 PCR 或 PCR/RFLP 的产物电泳结果,分别判断 CCR5-Δ32、CCR2b-64I 和 SDF1-3'A 的基因型。由于 CCR5-Δ32 突变是在编码基因内发生了一段 32 bp 的 DNA 缺失,可以预期 PCR 的产物经过电泳有三种结果:仅见一条 242 bp 的 DNA 片断则为纯合野生型,仅见 210 bp 一条带则为突变野生型,有 242 bp 和 210 bp 两条带的为杂合型。CCR2b-64I 突变是在基因内发生点突变形成了新的酶切位点(BsaB I 位点),BsaB I 可以将突变的 191 bp 的 PCR 产物切为 165 bp 和 26 bp 两个片段;故酶切产物电泳时仅见 191 bp 一条带则为纯合野生型,仅出现 165 bp 一条带则为突变野生型(26 bp 的 DNA 片断太小,电泳中不可见),见到 191 bp 和 165 bp 两条带为杂合型。SDF1-3'A 突变基因使原来的 Msp I 酶切位点消失,因而 302 bp 的突变 PCR 产物不能被切开,故酶切产物电泳时仅见 302 bp 一条带则为纯合突变型,见到 202 bp 和 100 bp 两条带为突变野生型,见到 302 bp、202 bp 和 100 bp 三条带则为杂合型。CCR5-Δ32、CCR2b-64I、SDF1-3'A 三种等位基因在被调查蒙古族人群中的突变情况见表 1。研究发现,这三种等位基因的杂合子均检测到;而除了 CCR5-Δ32 突变纯合子外,其他两种突变纯合子均检测到;突变基因 CCR5-Δ32、CCR2b-64I 和 SDF1-3'A 在被调查人群中的频率分别为 1.1%、24.8% 和 22.0%。 $\chi^2$  检验结果表明,三种等位基因突变频率 P 值均大于 0.1,符合 Hardy-Weinberg 平衡。

表1 三种等位基因的基因型组成和突变基因频率

基 因	例数	基 因 型			突变基因频率(%)	$\chi^2$ 值	P 值
		wt/wt	wt/mt	mt/mt			
CCR5-Δ32	134	131	3	0	1.1	0.016	>0.975
CCR2b-64I	133	71	58	4	24.8	2.210	>0.25
SDF1-3'A	134	83	43	8	22.0	0.276	>0.95

注:w( wild-type )野生型;m( mutant-type )突变型

#### 二、三种 HIV-1 相关基因间的相关性

对这三种突变基因中的任何两者之间是否具有相关性进行统计分析,CCR5-Δ32 与 CCR2b-64I、SDF1-3'A 基因之间的相关性见表 2;CCR2b-64I 与 SDF1-3'A 基因之间的相关性见表 3。由表 2 可见,在 CCR5-Δ32 纯合野生型及杂合型中 CCR2b-64I 的突变频率分别为 25.0% 和 16.7%,在 CCR5-Δ32 纯合野生型和杂合型中 SDF1-3'A 的突变频率分别为 21.9% 和 33.3%。由表 3 可见,在 SDF1-3'A 纯合野

生型、杂合型及纯合突变型中 CCR2b-64I 的频率分别为 23.8%、27.9%、18.7%。 $\chi^2$  检验分析表明, 三种等位基因的突变基因型任何两者之间均无相关性。提示这三种等位基因突变的发生可能是独立的事件, 但由于我们样品数不多, 可能需要进一步扩大样品数进行分析。

表2 CCR5-Δ32 与 CCR2-64I、SDF1-3'A 基因间的相关性分析

CCR5-Δ32 基因型	CCR2b-64I				SDF1-3'A			
	wt/wt	wt/mt	mt/mt	频率 (%)	wt/wt	wt/mt	mt/mt	频率 (%)
wt/wt	69	57	4	25.0	82	41	8	21.9
wt/mt	2	1	0	16.7	1	2	0	33.3
$\chi^2 = 0.266, P > 0.75$				$\chi^2 = 1.729, P > 0.25$				

wt, mt 注同表 1

表3 CCR2b-64I 与 SDF1-3'A 基因间的相关性分析

SDF1-3'A 基因型	CCR2b-64I			$\chi^2$ 值	P 值
	wt/wt	wt/mt	mt/mt		
wt/wt	46	33	3	23.8	1.882 > 0.75
wt/mt	20	22	1	27.9	
mt/mt	5	3	0	18.7	

wt, mt 注同表 1

三、三种 HIV-1 相关基因在性别上的分布状况

统计分析 CCR5-Δ32、CCR2-64I、SDF1-3'A 三种等位基因在性别上的分布情况, 发现 SDF1-3'A 和 CCR5-Δ32 等位基因的分布在性别上差异无显著性, 这符合常染色体上基因的分布规律; 而 CCR2b-64I 等位基因女性上的分布高于男性, 且有明显差别, 但未达到显著性水平 ( $0.05 < P < 0.1$ ), 这与基因的分布规律不符, 其原因可能是由于所研究的人群造成的, 也可能由于蒙古族中 CCR2b-64I 在女性上的分布原本就高于男性(表 4)。

讨 论

自 HIV-1 协同受体发现以来, 研究最多且证明

表4 SDF1-3'A、CCR5-Δ32 和 CCR2b-64I 突变基因的性别构成比较

基 因	性别	基 因 型			突变基因频率 (%)	$\chi^2$ 值	P 值
		wt/wt	wt/mt	mt/mt			
SDF1-3'A	男	38	20	3	21.3	0.226	> 0.75
	女	45	23	5	22.6		
CCR2b-64I	男	37	24	0	19.7	4.973	0.1 > P > 0.05
	女	34	34	4	29.2		
CCR5-Δ32	男	60	1	0	0.8	0.184	> 0.9
	女	71	2	0	1.4		

wt, mt 注同表 1

国蒙古族人群对嗜巨噬细胞 HIV-1 的易感性较大。

对于 HIV-1 感染和发病有重要影响的突变等位基因主要有三种, 即 CCR5-Δ32、CCR2b-64I、SDF1-3'A。CCR5-Δ32 等位基因是其编码基因从 185 位开始发生了一段 32 bp 的 DNA 缺失, 造成了移码突变, 因而表达缺陷的 CCR5 蛋白无活性, 不能辅助 HIV-1 感染巨噬细胞。研究表明, CCR5-Δ32 纯合子对 HIV-1 感染有很高的抵抗力, 其杂合子并不显示对 HIV-1 感染的抗性, 但可以延缓艾滋病的发病进程<sup>71</sup>。CCR2b-64I 是在基因内 190 位点一个 G→A 的突变, 造成第一跨膜区的缬氨酸 (Val) 变为异亮氨酸 (Ile), 其突变并不位于 HIV-1 的结合区。这种变异很可能通过改变 HIV-1 感染机制, 或者间接影响 HIV-1 对 CCR5 的利用, 从而可以延缓 AIDS 的发生约 2~4 年<sup>151</sup>。SDF1-3'A 是编码基因第 801 位的 G 突变为 A, 位于 3' 端非翻译区, 可能对基因的表达有重要的调控作用。这种突变可能增加了 SDF-1 的产生和利用, 导致 SDF-1 与 CXCR4 的过度结合, 从而竞争性抑制 T 细胞嗜性 HIV-1 的感染。这种突变纯合子可显著延缓 AIDS 的发病进程, 其作用比 CCR5-Δ32 和 CCR2b-64I 均高两倍<sup>91</sup>。

对我国蒙古族人群中艾滋病易感基因的突变及多态性的调查研究, 一方面, 有助于探索其种族的起源及分析造成这种基因分布的环境因素; 另一方面, 可以在 HIV-1 易感基因的水平上, 评估人群对 HIV-1 的遗传易感性, 也有利于在 AIDS 的早期阶段就可以对患者的预后作出有益的判断。通过比较蒙古族与世界其他民族 CCR5-Δ32、CCR2b-64I、SDF1-3'A 三种等位基因的突变情况, 可以看出等位基因 SDF1-3'A 和 CCR2b-64I 突变频率均比美国白人高; CCR5-Δ32 突变频率低于美国白人, 高于一般汉族人群, 而 CCR5 协同受体是启动嗜巨噬细胞 HIV-1 感染过程所必须的条件之一, 并参与了 AIDS 病程的发展过程, 提示在 CCR5-Δ32 基因水平上, 中

从表 5 可以看出, CCR5-Δ32、CCR2b-64I、SDF1-3'A 这

三种等位基因在不同人种中,其基因突变频率存在较大的差异,说明不同人种对 HIV-1 的遗传易感性的不同,以及不同人种在 HIV-1 感染后,AIDS 的发生、发展存在着差异。

表5 CCR5-Δ32、CCR2b-64I、SDF1-3'A  
在种族中的分布频率

民 族	等位基因及其频率(%)		
	CCR5-Δ32	CCR2b-64I	SDF1-3'A
俄罗斯人 <sup>[16]</sup>	12	(无资料)	(无资料)
高加索人 <sup>[10,14]</sup>	10	9.8	21.1
美国黑人 <sup>[14]</sup>	1.7	15.1	5.7
美国白人 <sup>[10,14]</sup>	10	9.8	21.1
中国汉族人 <sup>[12]</sup>	0.12	18	27.9
中国蒙古族人*	1.1	24.8	22.0

\* 本文资料

一般认为,人类许多等位基因的突变频率在群体分布和性别分布上是平衡的,符合 Hardy-Weinberg 平衡。实验发现蒙古族人群中 CCR5-Δ32、CCR2b-64I、SDF1-3'A 这三种等位基因在群体分布上是平衡的,CCR5-Δ32 和 SDF1-3'A 等位基因在性别分布上也是平衡的,而 CCR2b-64I 突变频率在女性上的分布高于男性,且统计学上有差别( $P < 0.1$ ),这种差异可能是由于研究人群的样本太少造成的,还是蒙古族中原本存在这种差异(由于突变、迁移或自然选择的原因造成的),还需要进一步的调查研究。有文献报道 CCR5 和 CCR2 基因均位于第 3 号染色体上,而且位置很近,CCR5-Δ32 与 CCR2b-64I 之间存在排斥现象<sup>[14]</sup>。但实验发现在 CCR2b 纯合野生型、杂合型及纯合突变型中 CCR5-Δ32 的频率分别为 1.40%、0.02% 和 0%;而在 CCR5 纯合野生型及杂合型中 CCR2b-64I 的频率分别为 20.0% 和 16.7%,虽然这两种等位基因在杂合型中的突变频率有所下降,但统计分析表明差异无显著性,推测原因,一是 CCR5-Δ32 杂合型样本太少,一是没有检测到突变纯合子基因型,影响了统计检测结果。

#### 参 考 文 献

- Deng H, Liu R, Ellimeier W, et al. Identification of a major coreceptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 1996, 381:661-666.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, et al. HIV-1 entry cofactor:

functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 1996, 272:872-877.

- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, et al. HIV-1 entry into CD4<sup>+</sup> cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, 1996, 381:667-673.
- Choe H, Farzan M, Sun Y, et al. The β-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*, 1996, 85:1135-1148.
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusion and the β-chemokine receptor CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*, 1996, 85:1149-1158.
- Blend CC, Farzan M, Doranz BJ, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusion and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 1996, 382:829-833.
- 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.
- Kostrikis L, Huang Y, Moore JP, et al. A chemokine receptor CCR2 alleles delays HIV-1 disease progression and is associates with a CCR5 promoter mutation. *Nat Med*, 1998, 4:350-353.
- Winkler C, William M, Smith MW, et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF1 chemokine gene variant. *Science*, 1998, 279:389-391.
- Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, et al. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet*, 1997, 16:100-103.
- 王福生, 刘德培. 人类基因组中与 HIV 感染相关的基因多态性及其意义. *中华医学遗传学杂志* 2000, 17:289-291.
- 王福生, 金磊, 雷周云, 等. 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. *中华流行病学杂志* 2000, 21:253-257.
- 王福生, 蒋建东, 金磊, 等. 中国人 HIV-1 感染相关的基因 CCR5 多态性检测和不同方法提取的基因组 DNA 的比较. *中国性病艾滋病防治*, 2000, 6:5-8.
- Voevodin A, Samilchuk E, Dashti S. Frequencies of SDF1 chemokine, CCR-5 and CCR-2 chemokine receptor gene alleles conferring resistance to human immunodeficiency virus types 1 and AIDS in Kuwait. *J Virol*, 1999, 58:54-58.
- 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.
- Voevodin A, Samilchuk E, Dashti S. A survey for 32-nucleotide deletion in the CCR-5 chemokine receptor gene (Δccr-5) conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 in different ethnic group and in chimpanzees. *J Med Vir*, 1998, 55:147-151.

(收稿日期 2000-07-26)