

四川彝族人群 HIV-1 辅助受体 CCR5 Δ 32 和 CCR2-64I 基因多态性分析

邓小玲 洪坤学 陈健平 阮玉华 许铭炎 秦光明 李克 邢辉 邵一鸣

【摘要】 目的 了解中国四川彝族人群艾滋病病毒-1(HIV-1)辅助受体 CCR5 Δ 32 和 CCR2-64I 基因多态性特点。方法 提取 119 份彝族正常人和 88 份 HIV-1 感染人群外周血基因组 DNA。用聚合酶链反应(PCR)方法检测 CCR5 Δ 32 突变,阳性产物经克隆、测序进一步证实;用 PCR-限制性片段长度多态性技术检测 CCR2-64I 突变,并测序验证。结果 119 份正常人样本中,CCR5 wt/ Δ 32 等位基因突变杂合子 2 例(1.68%),未检测到 CCR5 Δ 32/ Δ 32 突变纯合子,CCR5 Δ 32 等位基因频率为 0.0084;CCR2-64I 突变杂合子 26 例(21.85%),突变纯合子 2 例(1.68%),等位基因频率为 0.1261。88 份 HIV-1 感染者样本中,未检测到 CCR5 Δ 32 突变;CCR2-64I 突变杂合子 12 例(13.64%),突变纯合子 7 例(7.95%),等位基因频率为 0.1327。统计分析表明,上述等位基因多态性在该群体中均呈 Hardy-Weinberg 平衡分布;两种等位基因的突变频率在正常人和感染人群中的差异均无统计学意义。结论 研究获得了中国四川彝族人群 CCR5 Δ 32、CCR2-64I 等位基因多态性资料,结果有助于综合评估中国人群对 HIV-1 感染的遗传易感性,同时为深入研究 HIV-1 抗性基因在中国不同民族的 HIV 感染及发病机制中的作用奠定基础。

【关键词】 人免疫缺陷病毒;辅助受体;基因多态性;突变

Genetic polymorphism of human immunodeficiency virus coreceptor CCR5 Δ 32 and CCR2-64I alleles in Chinese Yi Ethnic group in Sichuan DENG Xiao-ling*, HONG Kun-xue, CHEN Jian-ping, RUAN Yu-hua, XU Ming-yan, QIN Guang-ming, LI Ke, XING Hui, SHAO Yi-ming. *National Center for Sexually Transmitted Disease and Acquired Immune Deficiency Syndrome Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

Corresponding author: SHAO Yi-ming, Email: yshao@public3. bta. net. cn

【Abstract】 **Objective** To explore genetic polymorphisms CCR5 of HIV coreceptor and CCR2 in Chinese Yi Ethnic group in Sichuan. **Methods** Genomic DNA samples were obtained from 119 healthy individuals and 88 HIV-1 infected individuals of Chinese Yi Ethnic group in Sichuan. Polymerase chain reaction (PCR), cloning and gene sequencing techniques were employed to identify the genotype of CCR5 Δ 32; PCR-restriction fragment length polymorphism(RFLP) and gene sequencing were employed to identify the CCR2-64I alleles. **Results** At CCR5 locus, 2 heterozygotes (CCR5-wt/ Δ 32) and none homozygote (CCR5- Δ 32/ Δ 32) were observed in 119 healthy individuals, allelic frequency of CCR5- Δ 32 was 0.84%; No mutant was found in 88 HIV-1 infected individuals. At CCR2 locus, 26 heterozygotes (CCR2-64V/64I) and two homozygotes (CCR2-64I/64I) were observed in healthy individuals but the allelic frequency CCR2-64I was 12.61%. Among infected individuals, 12 heterozygotes (CCR2-64V/64I) and 7 homozygotes (CCR2-64I/64I) were observed and the allelic frequency CCR2-64I was 13.27%. Statistical analysis revealed that the differences of both loci between healthy and infected individuals were insignificant. Both loci were consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium in the two different groups. **Conclusion** The polymorphism of CCR5 Δ 32 and CCR2-64I alleles from Chinese Yi Ethnic group was detected which was of significance for the evaluation of genetic resistance to HIV-1 infection in Chinese population.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Coreceptor; Genetic polymorphism; Mutation

基金项目:国家“十五”科技攻关资助项目(2001BA705B02);国家“973”高技术资助项目(G199905107)

作者单位:100050 北京,中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心[邓小玲(现工作单位:515041 汕头大学医学院预防医学教研室)、洪坤学、陈健平、阮玉华、邢辉、邵一鸣];汕头大学医学院流行病学教研室(许铭炎、李克);四川省疾病预防控制中心(秦光明)

通讯作者:邵一鸣,Email: yshao@public3. bta. net. cn

CCR5 是艾滋病病毒-1(HIV-1)感染时的主要辅助受体^[1],其等位基因编码区发生的 32 个碱基缺失是最常见的突变型,称为 CCR5 Δ 32。这种突变可使其丧失受体功能^[2-4],纯合性突变可有效抵制病毒感染,杂合性突变可延缓艾滋病(AIDS)病程。CCR2 是 HIV-1 感染的次要辅助受体^[2],当其基因编码区的第 64 位缬氨酸被异亮氨酸替代,即发生 CCR2-64I 突变时,也可延缓艾滋病病程。CCR5 Δ 32 和 CCR2-64I 基因多态性分布在不同种族中存在差异^[5],调查我国不同民族中这两种基因多态性的分布,对于评估相关人群对 HIV 的遗传易感性和艾滋病的防治具有参考意义;为此,我们调查了四川省彝族正常人和 HIV-1 感染人群的 CCR5 Δ 32 和 CCR2-64I 基因多态性分布情况。

对象与方法

1. 样品采集:2000 年 1 月至 2002 年 12 月间根据知情同意原则在四川凉山彝族自治州昭觉县随机采集三代均为彝族且无亲缘关系的研究对象外周血液样本 207 份,其中健康人 119 份,男性 89 份,女性 30 份,平均年龄(25.35 \pm 6.72)岁;HIV-1 感染者样本 88 份,男性 76 份,女性 12 份,平均年龄(31.94 \pm 8.63)岁。所有样本均用 BioMerix 公司 Vironostika HIV Uni-Form II plus O 诊断试剂盒做 HIV 抗体初筛,并用 Genelabs 公司的 GENELABS HIV BLOT 2.2 确证试剂盒做 HIV 感染的确认。

2. 基因组 DNA 的提取:应用 QIAamp Blood Kit (德国 QIAGEN 公司)试剂盒提取人外周血基因组 DNA,操作步骤按说明书进行。

3. 聚合酶链反应(PCR)扩增检测 CCR5 Δ 32 突变:根据 CCR5 缺失位点设计三对引物 69/70、del3/70、del4/70,扩增产物片段长度分别为 225、190、174 bp。引物 69:5'-ACCAGATCTCAAAA GAAGGTCT-3';引物 70:5'-CATGATGGTGAA GATAAGCCTACA-3'; del3:5'-GCAGCTCTC ATTTTCCATACATTA-3'; del4:5'-TACAGT CAGTATCAATTCTGGA, A-3'。PCR 条件:95 $^{\circ}$ C 80 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,1 个循环;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

4. PCR-限制性片段长度多态性(RFLP)检测 CCR2-64I 突变:扩增 CCR2 基因片段长度为 380 bp。引物 CCR2a:5'-GGATTGAACAAGGACGCAT TTCCC-3';引物 CCR2b:5'-TTGCACATTGCAT

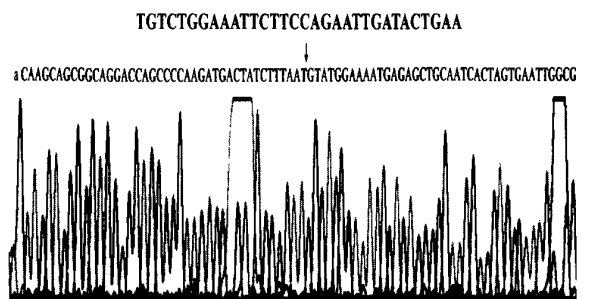
TCCCAAAGACCC-3'。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 2 min 30 s,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,1 个循环;94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 FOK I (购自美国 Biolab 公司)酶切,酶切位点为 GGATGNN。10 μ l 酶切反应体系于 37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h,产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

5. DNA 序列测定:将引物 del3/70 扩增的 CCR5 基因片段进行细胞克隆,并提取质粒 DNA。以纯化的质粒 DNA 及 CCR2 基因扩增片段为模板,于 ABI 公司 377 型 DNA 序列测定仪进行序列测定。

6. 统计学分析:采用 χ^2 检验对两种人群的突变频率进行比较。

结 果

1. CCR5 Δ 32:根据被检测个体 CCR5 的等位基因突变与否,可以预测 PCR 产物电泳后的三种结果:①出现 225 bp 和 174 bp 二条带,为 CCR5 野生型纯合子(基因型 CCR5-wt/wt);②出现 225 bp 和 190 bp 二条带,为 CCR5 Δ 32 突变纯合子(CCR5- Δ 32/ Δ 32);③出现 225、190 和 174 bp 三条带,为 CCR5 Δ 32 突变杂合子(CCR5-wt/ Δ 32)。按照这些带型,在我们检测了 119 份正常人样本中,CCR5-wt/wt 有 117 例,占 98.32%;CCR5-wt/ Δ 32 有 2 例,占 1.68%,并将这 2 例杂合子进行了测序(图 1),未发现 CCR5 Δ 32 突变纯合子,等位基因频率为 0.0084。88 例感染者中未发现有 CCR5 Δ 32 突变样品。



箭头所指为缺失 32 bp 的位置,箭头上方所示为缺失的 32 个碱基
图 1 CCR5 Δ 32 基因测序图

2. CCR2-64I:CCR2 野生型纯合子(CCR2-64V/64V)的 PCR 产物因未发生突变,则不能被 FOK I 酶切,电泳时只有一条带,仍为 380 bp;PCR 扩增的 CCR2-64V/64I 基因片段,由于其突变只发生于一条链,则只有一条链可被 FOK I 酶切,故电泳时为三条带,380、153、227 bp;CCR2-64I/64I 则可被完全酶

切,故电泳时仅有 153、227 bp 两条带。根据上述 FOK I 酶切结果可知,在检测的 119 份彝族正常人样本中,CCR2-64V/64V 有 91 份 (76.47%),CCR2-64V/64I 有 26 份 (21.85%),CCR2-64I/64I 2 份 (1.68%),CCR2-64I 等位基因频率为 0.1261;88 例感染者样本中,CCR2-64V/64V 68 例 (78.41%),CCR2-64V/64I 12 例 (13.64%),CCR2-64I/64I 2 例 (7.95%),CCR2-64I 等位基因频率为 0.1327。

3. CCR5 Δ 32 和 CCR2-64I 连锁分析:在正常人群的 2 例 CCR5-wt/ Δ 32 个体中,未发现同时存在 CCR2-64I 杂合性或纯合性突变,说明在本研究中彝族正常人群的 CCR5 Δ 32 和 CCR2-64I 突变无连锁关系。由于感染人群没有发现 CCR5 Δ 32 突变样品,因此也不存在连锁关系。

4. 统计学分析:由于 CCR5 Δ 32 基因突变频率低,采用精确检验法比较正常人群和阳性人群突变频率的差别,结果显示 $P > 0.05$,因此认为两种人群的 CCR5 Δ 32 基因突变频率差别没有统计学意义。用 χ^2 检测 CCR2-64I 基因突变在正常人群和感染人群的差别, $\chi^2 = 0.108 < \chi^2_{(0.05)} = 3.84$, $P > 0.05$,两种人群的 CCR2-64I 基因突变频率差异也没有统计学意义。两种人群中各种基因型的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡。由于男性和女性样品数相差较大,因此未做异性间突变率差别的比较。

讨 论

本实验设计了三对引物,用 PCR 技术检测 CCR5 Δ 32。引物 69 为缺失片段区域的上游外侧正向引物,70 为缺失片段区域的下游外侧反向引物,69/70 扩增产物包括缺失片段区域;del4 为含有一部分缺失片段区域的正向引物,del4/70 只能扩增出无 CCR5 Δ 32 突变的样品;del3 是由位于 32 个缺失碱基前的 21 个碱基及其后的 3 个碱基所组成,由于 3' 末端严格配对,故 del3/70 只能扩增出有缺失突变的样品。由于引物的严密设计,大大减少了假阳性结果的出现。对本次实验中检测到的两例 CCR5 Δ 32 杂合子均进行了克隆、测序,进一步证实了方法的可靠性。另外随机抽取 CCR2-64I 样品的测序结果也证实了 PCR-RFLP 方法对检测 CCR2-64I 的准确性。

CCR5 是 HIV-1 感染的主要辅助受体,CCR5 Δ 32 基因多态性对 HIV 病毒感染及感染后疾病进程的影响已得到证实,目前不同实验室已对多

个不同民族的 CCR5 Δ 32 等位基因突变做了调查^[1-5]。经鉴定在美国白人和欧洲后裔中,CCR5 Δ 32 等位基因突变率为 10%,在全欧洲、中东和印度次大陆为 2%~5%,而在中国汉族人中,据最新的文献报道仅为 0.18%^[5]。我们的实验检测到四川彝族正常人群 CCR5 Δ 32 等位基因突变频率为 0.84%,且无突变纯合子,突变率远远低于美国白人和欧洲后裔。从中国其他民族的检测结果来看^[6],CCR5 Δ 32 等位基因频率均普遍较低,且有多个民族人群未检测到 CCR5 Δ 32 突变,各民族中均未检测到纯合子突变,这可能是由于中国人群的特点,其突变率本身很低,而父母同时具有 Δ 32 基因型的概率更小,所以在子代中突变纯合子难以产生。有学者认为最早的 CCR5 Δ 32 突变起源于欧洲,在世界上其他地区的 CCR5 Δ 32 突变可能是基因漂流的结果,从所比较的等位基因频率来看,似乎印证了这一说法。

CCR2-64I 突变位于 CCR2 的第一穿膜功能区,其突变率在白人中占 9.8%^[7],非裔美国人为 15.1%,西班牙人 17.2%,而在亚洲人群中为 25%。在我们研究的彝族正常人群中,CCR2-64I 等位基因突变频率达到 12.61%,在中国其他民族的突变频率也普遍较高^[5],均高于欧洲白种人,但我们调查的彝族正常人群 CCR2-64I 等位基因突变频率又低于亚洲人群,这说明各民族有着自身的遗传特点。

实验结果显示,CCR5 Δ 32 和 CCR2-64I 突变率在正常人群和 HIV-1 感染人群中均有差别,但统计分析表明差别无显著性。由于本次调查的样本例数有限,样本采集时未能获得感染者的 CD₄⁺ T 细胞数及病毒载量,且有些感染者具体的发病时间不详,因此不能仅根据本次实验的数据来判断这两种突变在四川彝族人群中是否起到延缓 AIDS 进程的作用。CCR2 基因与 CCR5 基因间隔不到 10 kb,两者之间存在着很强的连锁不平衡现象^[2],因此曾认为 CCR2-64I 的保护作用是 CCR5 Δ 32 相关联的,但本次实验,并未发现同时存在 CCR5 Δ 32 和 CCR2-64I 的个体,这一结果与其他研究者的结果一致^[7-9]。

从我们的调查结果和中国其他民族的结果来看^[6],我国各民族的 HIV 辅助受体 CCR5 Δ 32 和 CCR2-64I 基因多态性有着各自的特点,但若考虑辅助受体基因多态性的保护作用时,总体趋势上中国人群中可能是以 CCR2-64I 为主,而欧洲人群则是以 CCR5 Δ 32 为主。由于目前许多研究者已开始利

用 CCR5 和 CCR2 作为靶点进行药物研究^[10-12], 试图找到预防和治疗艾滋病的突破口, 而今在这一领域也有了重大突破。因此对中国人群 HIV-1 感染辅助受体基因多态性研究很必要, 这不仅可以帮助了解我国人群宿主遗传因素与其他人种的差异, 获得我国不同人群有关遗传因素的背景资料, 同时这些背景资料为未来 HIV-1 感染者的用药选择可提供合理的参考依据。

参 考 文 献

- 1 Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, et al. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med*, 1997, 3:1160-1162.
- 2 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.
- 3 Ioannidis JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, et al. Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3' A alleles on HIV-1 disease progression: an international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Med*, 2001, 135:782-795.
- 4 Meyer L, Magierowska M, Hubert JB, et al. Early protective effect of CCR-5 delta 32 heterozygosity on HIV-1 disease progression: relationship with viral load. *AIDS*, 1997, 11:F73-F78.
- 5 Wang FS, Hong WG, Cao Y, et al. Population survey of CCR5Δ32, CCR5m303, CCR2b 64I, and SDF13' A allele frequencies in indigenous Chinese healthy individuals, and in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals in HIV-1 risk groups. *J AIDS*, 2003, 32:124-130.
- 6 王福生, 金磊, 刘明旭, 等. 中国普通人群中 HIV-1 感染辅助受体和配体基因多态性的分析. *科学通报*, 2001, 46:569-573.
- 7 Kostrikis LG, 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.
- 8 Shin HD, Winkler C, Stephens JC, et al. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:14467-14472.
- 9 Carrington M, Nelson G, O'Brien SJ. Considering genetic profiles in functional studies of immune responsiveness to HIV-1. *Immunol Lett*, 2001, 79:131-140.
- 10 Khaliq S, Hameed A, Ayub Q, et al. Frequency of CCR5 gene 32-bp deletion in Pakistani ethnic groups. *Genet Test*, 2002, 6:123-127.
- 11 Sheppard HW, Celum C, Michael NL, et al. HIV-1 infection in individuals with the CCR5-Delta32/Delta32 genotype: acquisition of syncytium-inducing virus at seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2002, 29:307-313.
- 12 Susman E. First anti-CCR5 drug. *AIDS*, 2002, 16:N7-N8.

(收稿日期:2003-11-19)

(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

人附红细胞体病合并人芽囊原虫病一例报告

官友生 周健 徐相凯 唐国华 张梅烈

患者男性, 58 岁, 高密市畜牧兽医站职工。2004 年 4 月 26 日剥解解剖确诊患有附红细胞体病(附红体病)的死猪时不慎划破手部皮肤并有出血, 当时未作处理, 5 月 10 日开始发热, 体温 37℃~38.2℃, 全身乏力, 胸闷, 食欲不振, 四肢关节酸痛, 脐周间歇性隐痛, 由于职业原因自己怀疑为附红细胞体病, 13 日到高密市人民医院就诊。B 超检查肝脾正常, 红细胞计数 $4.09 \times 10^{12}/L$, 血红蛋白 124 g/L, 谷丙转氨酶升高; 取血查附红体, 镜检观察 200 个红细胞, 80% 以上有附红体附着, 且大部分有多个附着, 形状多为卵圆形。对病例进行个案调查, 结合流行病学史、临床表现、实验室检查诊断为附红细胞体病。5 月 14 日患者服用强力霉素每天 200 mg, 连服 3 周, 19 日始体温降至正常, 22 日又加用青蒿素, 连服 3 天, 26 日出现四肢瘙痒, 及时给予抗过敏止痒治疗, 症状减轻, 6 月 18

日再采血查视野下 200 个红细胞约 20% 有附红体附着, 患者仍呈间歇性腹痛, 并出现轻度腹泻, 22 日到中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所诊治, 大便镜检查到人芽囊原虫, 24 日始每日服甲硝唑片 250 mg, 连服 2 周后, 腹痛症状减轻, 大便镜检未再查到人芽囊原虫, 7 月 16 日、8 月 22 日随访时仍有间歇性腹痛。

讨论: 附红体进入机体后, 主要为隐性感染, 只有少数患者出现症状, 该患者为畜牧工作者, 症状出现后警惕性高, 及时得到诊治; 人芽囊原虫病感染并不多见, 该患者轻度腹泻, 粪便中查到人芽囊原虫, 人芽囊原虫病感染的诊断亦成立。附红体病在动物特别是猪、牛、羊中常见, 人附红体病并不多见, 患者于发病半月前接触过病猪, 可能通过破损皮肤由血液传播而发病。强力霉素、青蒿素治疗后效果明显, 但一直伴有间歇性腹痛, 此方面的报道较少, 原因不能解释。人附红体病在山东省为首例报告, 合并人芽囊原虫病感染更为少见。

(收稿日期:2004-09-09)

(本文编辑:张林东)

作者单位: 261041 山东省潍坊市卫生防疫站(官友生、周健、徐相凯); 高密市卫生防疫站(唐国华、张梅烈)

通讯作者: 周健