

# 四川彝族人群 HIV-1 辅助受体 CX3CR1 基因多态 性分析

# Genetic Polymorphism of HIV Coreceptor CX3CR1 Allele in Chinese Yi Ethnic Group in Sichuan

邓小玲<sup>1,2</sup> 洪坤学<sup>1</sup> 陈健平<sup>1</sup> 阮玉华<sup>1</sup> /  
许铭炎<sup>2</sup> 秦光明<sup>3</sup> 邢 辉<sup>1</sup> /  
李 克<sup>2</sup> 邵一鸣<sup>1,\*</sup>

DENG Xiao-ling<sup>1,2</sup> HONG Kun-xue<sup>1</sup> CHEN Jian-ping<sup>1</sup>,  
RUAN Yu-hua<sup>1</sup> XU Ming-yan<sup>2</sup> QIN Guang-ming<sup>3</sup>,  
XING Hui<sup>1</sup> LI Ke<sup>2</sup> SHAO Yi-ming<sup>1,\*</sup>.

(1. 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心, 北京 100050; 2. 汕头大学医学院病原生物学教研室, 汕头 515041; 3. 四川省疾病预防控制中心, 成都 610003)

(1. National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050; 2. Department of Pathogenic Biology, Shantou University Medical College, Shantou 515041; 3. Center for Disease Control and Prevention of Sichuan Province, Chengdu 610003, China)

【摘要】背景与目的: 了解四川省彝族人群中 HIV-1 辅助受体 CX3CR1 基因多态性在正常人和 HIV-1 感染者中的分布特点, 探讨此辅助受体多态性对 HIV 感染的影响。材料与方法: 从 202 份外周血中提取基因组 DNA (正常人 115 份, HIV-1 感染者 87 份)。用 PCR-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术检测 V249I 和 T280M 两种变体, 检测结果用行列表  $\chi^2$  检验法进行统计学分析。结果: 在检测的 115 例正常人样品中, 249I 和 280M 等位基因频率分别为 8.3% 和 5.7%; HIV 感染者中, 两种等位基因频率分别为 7.5% 和 5.7%。249I 和 280M 间存在明显的连锁关系。正常人和感染者的两种等位基因频率的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论: 所获得的四川彝族人群 HIV-1 辅助受体 CX3CR1 基因多态性资料有助于进一步分析四川彝族人群 HIV 感染和艾滋病病程的影响因素。

【关键词】HIV-1; 受体; CX3CR1; 等位基因; 遗传多态性; 突变

中图分类号: R512.91 R759

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)06-0420-03

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To explore the CX3CR1 genetic polymorphisms in HIV-infected and uninfected Chinese Yi Ethnic Groups in Sichuan. MATERIALS AND METHODS: The genomic DNA of 202 Yi subjects (115 HIV-1 uninfected, 87 HIV-1 infected) was extracted from PBMCs. The V249I and T280 M allelic frequencies were identified by PCR-RFLP. All data were tested by  $\chi^2$  analysis. RESULTS: Allelic frequencies of 249I and 280M in HIV-1 uninfected group were 8.3% and 5.7%, respectively. The frequencies in HIV-1 infected group were 7.5% and 5.7%, respectively. There was no significant difference between HIV-1 infected group and HIV-1 uninfected group, and both groups were in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium. There are strong linkage disequilibrium between 249I and 280M of CX3CR1. CONCLUSION: Polymorphism of CX3CR1 allele from Chinese Yi Ethnic Group was found, this would be helpful for the risk analysis of HIV infection and the rate of HIV disease progression in Chinese Yi Ethnic Group in Sichuan.

【KEY WORDS】HIV-1; receptors; CX3CR1; alleles; genetics polymorphism; mutation

HIV-1 的辅助受体及其配体的基因多态性与 HIV-1 感染及感染后的疾病进程关系密切<sup>[1~3]</sup>。CX3CR1 是最近被鉴定的 HIV 辅助受体<sup>[4]</sup>, 其基因编码区的两种单核苷酸多态性 (SNP), 即 V249I 和 T280M 很可能与加速 AIDS 病程有关<sup>[5]</sup>。我们对我国四川彝族正常人和 HIV 感染者的 CX3CR1 基因多态性进行了测定, 以进一步分

析其对 HIV 感染及感染后疾病进程的影响。

## 1 对象和方法

1.1 样本采集 采集四川凉山州彝族三代以内无血缘关系的正常人群血液标本 115 份, 所有样品均无 HIV-1 感染; HIV-1 感染者样品 87 份, 样品均经过 ELISA

收稿日期: 2006-03-28; 修订日期: 2006-07-06

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目 (2001BA705B02) 和 973 项目 (G1999054107) 资助

作者简介: 邓小玲 (1977-), 女, 江西省金溪县人, 硕士, 研究方向: 人类遗传多态性与疾病。

\* Correspondence to: SHAO Yi-ming, Tel: 010-63166184, E-mail: yshao@bbn.cn

初筛、Western blot 确认证实为 HIV 感染。

**1.2 基因组 DNA 的提取** 应用 QIAamp Blood Kit(德国 Qigen 公司)试剂盒提取人外周血基因组 DNA, 操作步骤按试剂盒说明书进行。

**1.3 PCR-RFLP 技术检测 CX3CR1 等位基因突变**  
扩增 CX3CR1 等位基因突变区的引物为: 正向 5'-GCCGCCAACTCCATGAAC-3', 反向 5'-AGACACAAGGCTT TGGGATTC-3', 产物长度为 693 bp。PCR 反应体系 20  $\mu$ l, 包括样品 2  $\mu$ l (约含 DNA 250 ng), 引物 1  $\mu$ mol/L, 10 $\times$  Buffer 2  $\mu$ l (含 Mg<sup>2+</sup>, 25 mmol/L), 2.5 mmol/L dNTP 1.6  $\mu$ l, Taq 酶 0.4  $\mu$ l (2 IU/ $\mu$ l), 其余由蒸馏水补至 20  $\mu$ l。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min, 53  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 1 个循环; 95  $^{\circ}$ C 1min, 53  $^{\circ}$ C 1min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 31 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。酶切条件: Psp1406I, 37  $^{\circ}$ C 2 h (V249I); BsmB I, 37  $^{\circ}$ C 2 h (T280M)。10  $\mu$ l 酶切反应体系包括样品 2.5  $\mu$ l (约含 DNA 500 ng), 酶 0.5  $\mu$ l (10 IU/ $\mu$ l), 10 $\times$  酶缓冲液 1  $\mu$ l, 其余由蒸馏水补至 10  $\mu$ l。酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳 1 h。

**1.4 统计学方法** 采用  $\chi^2$  检验, 检测正常人与 HIV 感染者之间等位基因频率的差异性, 群体分布是否平衡; 两种 SNP 之间是否存在连锁不平衡。

## 2 结果

**2.1 CX3CR1 基因多态性检测结果** 检测结果见图 1、2。图 1 中, 由于 344、349 bp 相隔太近, 在电泳图上不易区分, 因此电泳图中只见 1 条带。

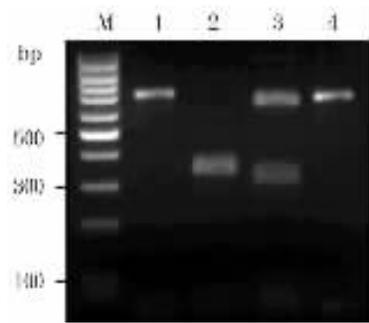


图 1 Psp1406I 酶切结果电泳检测图谱。1. PCR 扩增产物; 2. 未突变产物, 电泳仅 1 条带, 396 bp; 3. 突变杂合子, 电泳有 3 条带 (693、344、349 bp) 4. 突变纯合子, 电泳示 1 条带 (693 bp)。  
Figure 1 Agarose gel showing the result of Psp1406I enzyme cut Lane 1: the product of PCR, 693 bp. Lane 2: the sample without mutation, kept one band, 396 bp. Lane 3: heterozygous, three bands were shown: 693 bp, 344 bp, 349 bp. Lane 4: homozygous, 693 bp.

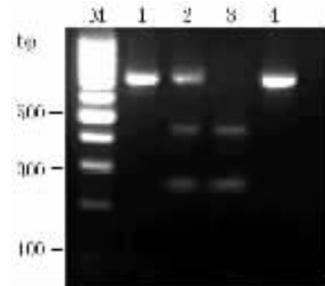


图 2 BsmBI 酶切结果电泳检测图谱。1. PCR 扩增产物; 2. 突变杂合子, 电泳有 3 条带 (693、263、430 bp) 3. 未突变产物, 电泳 2 条带 (263、430 bp) 4. 突变纯合子, 电泳示 1 条带 (693 bp)。  
Figure 2 Agarose gel showing the result of BsmBI enzyme cut Lane 1: the product of PCR, 693 bp. Lane 2: heterozygous, three bands were shown: 693 bp, 263 bp, 430 bp. Lane 3: the sample without mutation, two bands were shown: 263 bp, 430 bp. Lane 4: homozygous, 693 bp.

**2.2 249I 和 280M 的等位基因频率及单倍体型频率** 正常人群和感染者的等位基因频率及单倍体频率分别见表 1、2。在 115 例正常人中, 249I 突变纯合子仅

表 1 正常人 CX3CR1 等位基因频率及单倍体频率

Table 1 Allele and haplotype frequencies for CX3CR1 polymorphisms in normal population (n = 115)

Genotype at codon 249	Genotype at codon 280	Normals (n, %)	Allele frequencies	Haplotype frequencies
A/A (249I)	C/C (280T)	0 (0)	249A = 0.083	249I280T = 0.065
A/A (249I)	T/T (280M)	1 (0.9)	249G = 0.917	249I280M = 0.037
A/A (249I)	C/T (T280M)	0 (0)	-	-
G/G (249V)	C/C (280T)	97 (84.3)	280C = 0.943	249V280T = 0.898
G/A (V249I)	C/C (280T)	6 (5.2)	280T = 0.057	-
G/A (V249I)	C/T (T280M)	11 (9.6)	-	-

表 2 HIV 感染者 CX3CR1 等位基因频率及单倍体频率

Table 2 Allele and haplotype frequencies for CX3CR1 polymorphisms in patients (n = 87)

Genotype at codon 249	Genotype at codon 280	Patients (n, %)	Allele frequencies	Haplotype frequencies
A/A (249I)	C/C (280T)	1 (1.15)	249A = 0.075	249I280T = 0.052
A/A (249I)	T/T (280M)	0 (0)	249G = 0.925	249I280M = 0.04
A/A (249I)	C/T (T280M)	1 (1.15)	-	-
G/G (249V)	C/C (280T)	76 (87.36)	280C = 0.943	249V280T = 0.908
G/A (V249I)	C/C (280T)	0 (0)	280T = 0.057	-
G/A (V249I)	C/T (T280M)	9 (10.34)	-	-

1 例 (0.9%), 249V 野生型纯合子 97 例 (84.3%), 其余均为突变杂合子 (14.8%); 280M 突变纯合子 1 例

(0.9%), 280T 野生型纯合子 103 例 (89.6%), 突变杂合子 11 例 (9.6%)。87 例感染者中, 249I 突变纯合子 2 例



(2.3%), 249V 野生型纯合子 76 例 (87.4%), 其余均为突变杂合子 (10.3%); 未检测到 280M 突变纯合子 (0%), 280T 野生型纯合子 77 例 (88.5%), 突变杂合子 10 例 (11.5%)。

**2.3 统计分析** 正常人群和 HIV 感染者的 249I、280M 等位基因频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡。用  $\chi^2$  检验可知 (表 3), 两种突变的差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 3 在正常人和感染者中 V249I、T280M 突变频率差别的分析  
Table 3 Differences in the genotypes at V249I and T280M in the two groups analyzed by chi-square test

Genotypes	Patients (n = 87)	Normals (n = 115)	chi-square test
V249I mt/mt	2	1	$\chi^2 = 0.36$ $P > 0.05$
wt/mt	9	17	
wt/wt	76	97	
T280M mt/mt	0	1	$\chi^2 = 0.09$ $P > 0.05$
wt/mt	10	11	
wt/wt	77	103	

### 3 讨论

CX3CR1 属于 CX3C 类趋化因子受体, 配体是 fractalkine(FKN)。CX3CR1 V249I、T280M 是在其等位基因编码 249 和 280 氨基酸的密码子分别发生 G→A 和 C→T 核苷酸的替换, 从而使翻译的缬氨酸突变为异亮氨酸 (V249I)、苏氨酸突变为甲硫氨酸 (T280M), 其中 T280M 突变位点是在第 7 跨膜区域由非极性氨基酸变为极性氨基酸。不同民族背景, V249I 和 T280M 的突变频率不一样。Faure 等<sup>[5]</sup>在 78 名法裔高卢人的血样中检测到遗传突变子 V249I、T280M 在正常人群中的突变频率分别为 25.7% 和 13.5%, 刘明旭等<sup>[6]</sup>检测到我国彝族正常人群的这两种突变频率分别为 15.8% 和 13.8%, 我们所调查的彝族正常人中, 其突变频率分别为 8.3% 和 5.7%, 均低于前两者的突变频率, 而对于感染者的等位基因突变频率也均低于前两者的检测结果。统计分析表明正常人和感染者的 V249I、T280M 突变频率及单倍体频率的差别无统计学意义。故推测 HIV-1 的辅助受体 CX3CR1 V249I、T280M 突变在四川彝族群体与 HIV-1 的感染并无一定关联。由于标本采集时未能获得感染者的 CD4<sup>+</sup>T 细胞数及病毒载量, 且有些感染者具体的发病时间不详, 因此本研究不能进一步探讨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。

众多研究者在对不同人种的 CX3CR1 基因多态性分布进行调查时均认为 V249I 和 T280M 存在紧密连锁<sup>[7,8]</sup>, Faure 等<sup>[5]</sup>的结果显示: 只有 249 位发生 G→A 突变, 280 位才有可能发生 C→T 突变, 连锁不平衡系数达

0.999,  $P < 10^{-65}$ , 其单倍体型只有 249V280T、249I280T、249I280M, 其中 249V280T 单倍体最常见。从本研究结果看 (表 2, 3), 也只检测到上述 3 种单倍体型, 且以 249V-280T 单体型最多, 但 249I 和 280T、249I280M 单倍频率均低于 Faure 等的检测结果。在正常人中, 仅有的 1 例 V249I 突变纯合子同时也是 T280M 突变纯合子, 且 17 例突变杂合子中同时有 11 例也是 T280M 突变杂合子; 在感染者中, 2 例 V249I 突变纯合子中有 1 例 T280M 杂合子, 9 例突变杂合子均同时伴有 T280M 杂合性突变。此结果可看出, 彝族正常人和感染者中这两种突变间均存在明显的连锁关系。

我国的民族构成复杂, 对 CCR5 及 CCR2 等辅助受体在不同民族中已有了一定的调查研究<sup>[9]</sup>, 而对于 CX3CR1 这一辅助受体的基因多态性的研究甚少, 鉴于此, 在四川彝族人群中开展此项研究, 将有助于综合评估中国人群对 HIV-1 感染的遗传易感性, 及分析影响我国 AIDS 病程进展的主要因素。

### 参考文献:

- [1] Fauci AS. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease[J]. *Nature*, 1996, 384(6609):529-534.
- [2] Cairns JS, D' Souza MP. Chemokines and HIV-1 second receptors: the therapeutic connection[J]. *Nat Med*, 1998, 4(5):563-568.
- [3] Horuk R. Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields[J]. *Immunol Today*, 1999, 20(2):89-94.
- [4] Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, et al. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273:23 799-23 804.
- [5] Faure S, Meyer L, Costagliola D, et al. Rapid progression to AIDS in HIV + individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1[J]. *Science*, 2000, 287(5461): 2 274-2 277.
- [6] 刘明旭, 王福生, 候静, 等. 维吾尔族人群 CX3CR1 基因多态特征及其意义[J]. *解放军医学杂志*, 2002, 27(3):244-245.
- [7] Brumme ZL, Dong WW, Chan KJ, et al. Influence of polymorphisms within the CX3CR1 and MDR-1 genes on initial antiretroviral therapy response[J]. *AIDS*, 2003, 17(2):201-208.
- [8] Faure S, Meyer L, Genin E, et al. Deleterious genetic influence of CX3CR1 genotypes on HIV-1 disease progression [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2003, 32(3):335-337.
- [9] Wang FS, Jin L, Liu MX, et al. Polymorphisms of chemokine receptors and its ligand alleles influencing genetic susceptibility to HIV-1 infection in eight ethnic groups in Chinese mainland [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46(12):1 019-1 023.