云南汉族人群 *CD6* 基因多态性与 HCV 慢性感染的关系*

刘城秀[1,2]，沈云松[3]，李桃意[1,2]，张 禹[1,2]，檀林萍[1,2]，姚月婷[1,2]，俞建昆[1,2]，姚宇峰[1,2]，史 荔[1,2]**

（1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院 医学生物学研究所，云南 昆明 650118；2. 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室，云南 昆明 650118；3. 云南省第一人民医院 & 昆明理工大学附属医院，云南 昆明 650032）

［摘 要］**目的：**探讨云南汉族人群中 *CD6* 基因多态性与慢性丙型肝炎病毒（HCV）感染的关系。**方法：**随机抽取云南地区汉族人群 HCV 慢性感染患者 434 例，健康对照人群 444 例；采用 TaqMan 探针基因分型方法对 2 组人群的 *CD6* 基因 3 个 SNPs（rs17824933、rs12360861、rs11230563）进行基因分型，构建 *CD6* 基因单倍型，评估上述 3 个 SNPs 与 HCV 慢性感染的关系。**结果：**两组人群 *CD6* 基因 SNP-rs17824933（C > G）、SNP-rs12360861（G > A）和 SNP-rs11230563（C > T）基因型频率和等位基因频率比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$）；2 组人群的 SNP-rs17824933（C > G）、SNP-rs12360861（G > A）和 SNP-rs11230563（C > T）单倍型频率比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。**结论：**此次调查的云南汉族群体的 *CD6* 基因 SNP-rs17824933（C > G）、SNP-rs12360861（G > A）和 SNP-rs11230563（C > T）与 HCV 慢性感染无关。

［关键词］肝炎，丙型，慢性；多态性单核苷酸；基因，*CD6*；云南
［中图分类号］R512.6 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2016）05-0527-05
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.05.008

The Association between CD6 Polymorphisms and Chronic HCV Infection of Han Population in Yunnan Province

LIU Chengxiu[1,2], SHEN Yunsong[3], LI Taoyi[1,2], ZHANG Yu[1,2], TAN Linping[1,2], YAO Yueting[1,2], YU Jiankun[1,2], YAO Yufeng[1,2], SHI Li[1,2]

(*1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, Yunnan, China; 2. Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Disease, Kunming 650118, Yunnan, China; 3. The First People's Hospital in Yunnan Province & the Affiliated Hospital of Kunming Science and Technology University, Kunming 650032, Yunnan, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To investigate the association between CD6 gene polymorphism and chronic HCV chronic infection of Han population in Yunnan province. **Methods**: 434 HCV chronic infectious patients and 444 healthy individuals of Han Chinese population in Yunnan province were recruited for this study. Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) of SNP-rs17824933, SNP-rs12360861 and SNP-rs11230563 of CD6 gene were determined by real-time TaqMan polymerase chain reaction and the haplotypes were constructed. Then evaluating the association correlation of these SNPs and haplotypes with HCV chronic infection. **Results**: The comparison of frequencies of allele and genotype of both groups of SNP-rs17824933 (C > G), SNP-rs12360861 (G > A) and SNP-rs11230563 (C > T) showed that differences were not statistically significant ($P > 0.05$). The frequency of haplotypes constructed by SNP-rs17824933 (C > G), SNP-rs12360861 (G > A) and SNP-rs11230563 (C > T)

*［基金项目］国家自然科学基金（81160197）；吴阶平医学基金（320.6750.13395）
**通信作者 E-mail：shili.imb@gmail.com
网络出版时间：2016－05－13 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160513.2015.006.html

showed no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion**: SNP-rs17824933 (C > G), SNP-rs12360861 (G > A) and SNP-rs11230563 (C > T) in the CD6 were not associated with HCV chronic infection in the Han population in Yunnan province.

[**Key words**] hepatitis C,chronic; polymorphism,single nucleotide; gene,*CD6*; Yunnan

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus,HCV)属黄病毒科,为单股正链 RNA 病毒,基因组全长约 9.6 kb。我国 HCV 感染率约为 3.2%,感染者已达 3 800 万人[1]。感染 HCV 后,约 20% 急性感染者可自发清除 HCV,其余发展为慢性持续感染,继而发展成肝纤维化、肝硬化甚至肝细胞癌[2]。因此,宿主免疫系统遗传因素在 HCV 感染后的清除或持续感染中可能起到的作用研究一直是该方向的热点之一。有研究发现我国不同人群中的 HLA-B 与慢性 HCV 感染关系密切[3-6]。CD6 在 T 细胞的活化和增殖过程中起着重要作用。*CD6* 基因位于人类染色体 11q13,编码一个分子量为 100 ~ 130 kDa 跨膜糖蛋白,这个跨膜糖蛋白包含 3 个富含半胱氨酸结构域的清道夫受体(scavenger receptor cysteine-rich, SRCR)和 1 个活化白细胞黏附分子(activated leukocyte cell adhesion molecule, ALCAM)的结合位点[7]。CD6 主要表达在 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞,胸腺细胞,某些 B 细胞和自然杀伤细胞亚群上以及脑的某些区域[8]。但是,目前国内外研究者对 CD6 基因多态性与 HCV 慢性感染的相关性研究并没有得到明确结论。本研究对云南地区汉族人群 CD6 基因内含子区域 SNP-rs17824933 (C > G)和编码区域 SNP-rs12360861 (G > A)、SNP-rs11230563 (C > T)位点进行分析,探讨这 3 个位点多态性与 HCV 慢性感染的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

随机抽取云南省 434 名 HCV 慢性感染者为病例组,诊断依据中华医学会肝病学分会和中华医学会感染病学分会 2015 年制定的《丙型肝炎防治指南》[9],血清 ALT、AST、抗 HCV、HCV-RNA 阳性,排除其他肝炎的患者。随机抽取同时期云南省正常健康个体 444 名为对照组,纳入标准为受试者血清 ALT、AST、抗 HCV、HCV-RNA 正常。所有受试者均为居住于云南地区的彼此无血缘关系汉族个体并签署知情同意书,允许其样本与临床资料用于本次研究。病例组,年龄(43.27 ± 10.23)岁,男性 250(57.60%)例,女性 184 例(42.40%);对照组,年龄(42.74 ± 9.07)岁,男性 227 例(51.13%),女性 217 例(48.87%)。两组受试者基础资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 采集受试者空腹静脉血 5 mL,用 EDTA 抗凝,置 -80 ℃保存,按照 Qiagen 血基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取外周血基因组 DNA,置 -20 ℃保存。

1.2.2 *CD6* 基因 SNP 位点基因分型 采用实时荧光定量 PCR 法进行 SNP 分型,由 Applied Biosystems 公司合成检测 rs17824933 (C > G),rs12360861 (G > A)及 rs11230563 (C > T)位点的引物及 TaqMan 探针。针对每个 SNP 位点所设计的两条探针分别用 VIC 和 FAM 进行荧光标记。罗氏 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪检测 SNP 位点,并用 LCS480 1.5.1.62 软件进行基因分型。PCR 反应体积为 20 μL,反应条件为 95 ℃ 10 min 预变性,92 ℃变性 15 s、60 ℃退火 1 min(共 40 个循环),40 ℃延伸 5 min。以 3 个已知基因型(野生纯合子、突变纯合子、杂合子)的样品作为标准对照(均为本课题组经基因测序样本验证,SNP-rs17824933 (C > G)样本其野生纯合子、突变纯合子、杂合子的基因型分别是 CC、GG 及 CG,SNP-rs12360861 (G > A)为 GG、AA 及 AG;SNP-rs11230563 (C > T)为 CC、TT 及 CT)。

1.3 统计学方法

采用 Hardy-Weinberg 平衡检验基因型频率的代表性。χ^2 检验检测对照组与病例组 3 个 SNP 基因型、等位基因频率差异。SHEsis 软件程序计算连锁不平衡,根据连锁不平衡(Linkage Disequilibrium , LD)结果构建单倍型;两位点间的 LD 关系用 D′表示,D′ > 0.8 认为位点间强连锁[10-11]。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *CD6* 多态性位点的等位基因频率与基因型频率

CD6 基因 3 个 SNP 位点 rs17824933 (C > G)、

rs12360861（G > A）及 rs11230563（C > T）的基因型分布在病例组和对照组中均符合 Hardy-Weinberg 平衡（$P > 0.05$）。*CD6* 基因 3 个 SNP 位点 rs17824933（C > G）、rs12360861（G > A）及 rs11230563（C > T）的等位基因频率与基因型频率在病例组和对照组中的分布比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$），见表 1 ~ 3。

表 1　*CD6* 基因 rs17824933 位点的基因频率及等位基因频率分布（n，%）

Tab. 1　Distribution of genotypic and allelic frequencies of rs17824933 SNPs in *CD6* gene

组别	基因频率			等位基因频率	
	CC	CG	GG	C	G
病例组	404(93.1)	30(6.9)	0(0.0)	838(96.5)	30(3.5)
对照组	417(93.9)	27(6.1)	0(0.0)	861(97.0)	27(3.0)
统计值	$P = 0.617$			$P = 0.623$	

表 2　*CD6* 基因 rs12360861 位点的基因频率及等位基因频率分布（n，%）

Tab. 2　Distribution of genotypic and allelic frequencies of rs12360861 SNPs in *CD6* gene

组别	基因频率			等位基因频率	
	GG	AG	AA	G	A
病例组	431(99.3)	3(0.7)	0(0.0)	865(99.7)	3(0.3)
对照组	442(99.5)	2(0.5)	0(0.0)	886(99.8)	2(0.2)
统计值	$P = 0.635$			$P = 0.636$	

表 3　*CD6* 基因 rs11230563 位点的基因频率及等位基因频率分布（n，%）

Tab. 3　Distribution of genotypic and allelic frequencies of rs11230563 SNPs in *CD6* gene

组别	基因频率			等位基因频率	
	CC	CT	TT	C	T
病例组	291(67.1)	122(28.1)	21(4.8)	704(81.1)	164(18.9)
对照组	315(70.9)	115(25.9)	14(3.2)	745(83.9)	143(16.1)
统计值	$P = 0.295$			$P = 0.124$	

2.2　连锁不平衡

CD6 基因 3 个 SNP 位点 rs17824933（C > G）、rs12360861（G > A）及 rs11230563（C > T）的连锁不平衡分析结果显示 rs17824933（C > G）、rs12360861（G > A）及 rs11230563（C > T）位点之间存在强连锁不平衡，见表 4。

2.3　*CD6* 基因多态性位点的单倍型构建及频率

构建 *CD6* 基因 3 个 SNP 位点的单倍型结果显示，单倍型的频率在病例组和对照组中的分布比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$），见表 5。

表 4　*CD6* 基因 3 个 SNP 位点连锁不平衡分析

Tab. 4　Linkage disequilibrium analysis on 3 SNP sites of *CD6* gene

D′	rs12360861	rs11230563
rs17824933	0.990	0.819
rs12360861	–	1.000

表 5　病例组和对照组 *CD6* 基因 3 个 SNP 位点单倍型频率比较

Tab. 5　Comparison of haplotype frequency of 3 SNP sites of *CD6* gene in case group and control group

单倍型	单倍型频率（%）		P	OR（95% CI）
	病例组	对照组		
CAT[(1)]	0.3	0.2	–	–
CGC	77.8	80.9	0.137	0.838（0.664 ~ 1.058）
CGT	18.4	15.9	0.152	1.199（0.935 ~ 1.538）
GGC	3.3	3.0	0.736	1.096（0.642 ~ 1.871）
GGT[(1)]	0.2	0.0	–	–

[(1)] SHEsis 软件程序忽略分析频率 < 0.03 的单倍型，不作统计分析

3　讨论

感染 HCV 是引起丙型肝炎发生的主要因素之一。HCV 感染的主要方式有输血传播、静脉吸毒传播、性传播和母婴传播。近年来，新发感染与静脉吸毒和不洁注射有关。在云南，静脉用药人群中的 77.7% 可以检测到抗-HCV 抗体[12]。因此本研究选取云南汉族人群研究对象。

CD6 是富含半胱氨酸结构域的 SRCR 超家族的成员，参与 T 细胞的活化和增殖、调节细胞间磷蛋白的表达和前炎性细胞活素的产生[13-14]。CD6 刺激在维持 T 细胞活化过程中起重要作用，因阻断与其配体 ALCAM 的相互作用而导致 T 细胞增殖的减少[15]。而且，由于 CD6 与中央超分子活化簇（central supramolecular activation cluster，cSMAC）区域的结合，会使 CD6 参与到免疫突触的突变[16]。有研究表明，*CD6* 基因多态性可能影响 CD6 的表达和功能，从而改变免疫应答水平而引起疾病的发生。De Jager 等[17]发现，*CD6* 基因多态性与多发性硬化症（Multiple sclerosis，MS）有关。其中，*CD6* 基因中的 SNP-rs12360861（G > A）位于第 2 富含半胱氨酸结构域的 SRCR 第 5 外显子，编码 CD6 与其配体 ALCAM 的结合位点；同时也处于叫做外显子剪接增强子（exonic splicing enhancer，

ESE)的顺式作用元件中[18],通过无义突变、错义突变或同义突变,ESE 被破坏而影响 mRNA 的正确的持续合成能力[19]。因此,有学者提出假设认为 G 取代 A 会导致 ESE 被破坏,ALCAM 与 CD6 配体受体结合减少,可能引起限制自体反应的 T 淋巴细胞通过血脑屏障的转移,这样对发生 MS 起保护作用[20]。Baratte 等[21]的研究也表明第 5 外显子的选择性剪接作用对调节 T 细胞的活化起到重要作用。Wagner 等[20]对波兰人群的研究发现,携带 AA 基因型的个体患 MS 的的风险比携带 GG 基因型的低 3 倍。*CD6* 基因的另一个 SNP-rs11230563 (C>T)位点位于第 2 富含半胱氨酸结构域的 SRCR 的第 4 外显子。Swaminathan 等[8]对西班牙人群的研究发现,SRCR 区域的非同义突变 SNP-rs11230563 可能引起 CD6 表达水平的改变以及与其配体结合能力或者信号传导的改变;运用流式细胞荧光分析技术对 MS 患者的淋巴细胞进行实验,所得结果发现初始的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞比效应性和中心性记忆 T 细胞更容易受 CD6 单倍型的影响。CD6 在胸腺细胞中的高表达并且认为有助于阳性选择和抵抗细胞凋亡[22]。SNP-rs17824933 (C>G)位于 *CD6* 基因第 1 内含子。Swaminathan 等[23]研究表明 SNP-rs17824933 (C>G)位点的 G 等位基因可能是罹患 MS 的危险因素。Kofler 等[24]首次做了与疾病相关的 *CD6* 基因 SNP 位点 rs17824933 与 T 细胞功能关系的研究,研究结果表明在 *CD6* 基因上的 MS 的风险等位基因与 $CD4^+$ T 细胞的异常增殖相关,并且证明了与疾病相关的等位基因在免疫学特性上的影响。rs12360861 第 1036 位碱基 G>A,引起第 271 个氨基酸由非极性脂肪族氨基酸突变为极性中性氨基酸,rs11230563 第 898 位碱基 C>T,引起第 225 个氨基酸由碱性氨基酸突变为芳香族氨基酸,均为错义突变;rs17824933 是在 *CD6* 基因非编码区的第 1 内含子中发生了碱基的颠换。

本研究选取云南省汉族人群,研究 *CD6* 基因内含子区域 SNP-rs17824933 (C>G)和编码区域 SNP-rs12360861 (G>A)、SNP-rs11230563 (C>T) 3 个位点与 HCV 慢性感染的关系,这些 SNP 与 HCV 慢性感染的无直接关联。参照 Ensembl 网站 SNP 位点的基因频率,在亚洲人群中 rs17824933 (C>G)等位基因 G 的基因频率约为 3%,而在欧洲人群中 G 的基因频率高达 23%;rs12360861 (G>A)等位基因 A 在亚洲人群中频率极低约为 0.1%,本研究为 0.3%,与此对比在欧洲人群中 A 的基因频率为 19%;rs11230563 (C>T)的等位基因 T 在亚洲人群中的基因频率约为 17%,而在欧洲人群中该基因频率为 36%,但并未找到关于这 3 个 SNP 位点在亚洲、欧洲正常人群中和 HCV 感染者之间的关系研究。本研究未观察到基于基因频率的关联性,需要在以后的研究中进一步开展病例分层分析,同时增加其他多态位点的检测。

4 参考文献

[1] Zhang C, Wu N, Liu J. HCV subtype characterization among injection drug users: implication for a crucial role of Zhenjiang in HCV transmission in China [J]. PLoS One, 2011(6): e16817.

[2] Sebastiani G, Gkouvatsos K, Pantopoulos K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis [J]. World J Gastroenterol, 2014(20): 11033 - 11053.

[3] Zuniga J, Romero V, Azocar J. Protective KIR-HLA interactions for HCV infection in intravenous drug users [J]. Mol Immunol, 2009(46): 2723 - 2727.

[4] Knapp S, Warshow U, Hegazy D. Consistent beneficial effects of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL3 and group 1 human leukocyte antigen-C following exposure to hepatitis C virus [J]. Hepatology, 2010(51): 1168 - 1175.

[5] 戎霞, 黄杰庭, 熊华平. 广州献血人群 HLA 多态性与慢性 HCV 感染的关联研究 [J]. 中国输血杂志, 2014(27):1116 - 1119.

[6] 刘铮, 康轶青, 张丽. 河南人群病毒性丙型肝炎与 HLA 多态性的关联研究 [J]. 免疫学杂志, 2015(31):790 - 794.

[7] Bodian DL, Skonier JE, Bowen MA. Identification of residues in CD6 which are critical for ligand binding [J]. Biochemistry, 1997(36): 2637 - 2641.

[8] Swaminathan B, Cuapio A, Alloza I. Fine mapping and functional analysis of the multiple sclerosis risk gene CD6 [J]. PLoS One, 2013(8): e62376.

[9] 陈红松, 窦晓光, 段钟平. 丙型肝炎防治指南(2015 年更新版) [J]. 临床肝胆病杂志, 2015(31):1961 - 1979.

[10] Shi YY, He L, SHEsis. a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci [J]. Cell Res, 2005(15): 97 - 98.

[11] Li Z, Zhang Z, He Z. A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with

multiallelic markers: update of the SHEsis (http://analysis.bio-x.cn) [J]. Cell Res, 2009(19): 519 - 523.
[12] Zhou YH, Yao ZH, Liu FL. High prevalence of HIV, HCV, HBV and co-infection and associated risk factors among injecting drug users in Yunnan province, China [J]. PLoS One, 2012(7): e42937.
[13] Hassan NJ, Barclay AN, Brown MH. Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166 [J]. Eur J Immunol, 2004(34): 930 - 940.
[14] Oliveira MI, Goncalves CM, Pinto M. CD6 attenuates early and late signaling events, setting thresholds for T-cell activation [J]. Eur J Immunol, 2012(42): 195 - 205.
[15] Zimmerman AW, Joosten B, Torensma R. Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells [J]. Blood, 2006(107): 3212 - 3220.
[16] Castro MA, Oliveira MI, Nunes RJ. Extracellular isoforms of CD6 generated by alternative splicing regulate targeting of CD6 to the immunological synapse [J]. J Immunol, 2007(178): 4351 - 4361.
[17] De Jager PL, Jia X, Wang J. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci [J]. Nat Genet, 2009(41): 776 - 782.
[18] Desmet FO, Hamroun D, Lalande M. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals [J]. Nucleic Acids Res, 2009(37): e67.
[19] Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes [J]. J Med Genet, 2005(42): 737 - 748.
[20] Wagner M, Bilinska M, Pokryszko-Dragan A. ALCAM and CD6-multiple sclerosis risk factors [J]. J Neuroimmunol, 2014(276): 98 - 103.
[21] da Gloria VG, Martins de Araujo M, Mafalda Santos A. T cell activation regulates CD6 alternative splicing by transcription dynamics and SRSF1 [J]. J Immunol, 2014(193): 391 - 399.
[22] Singer NG, Fox DA, Haqqi TM. CD6: expression during development, apoptosis and selection of human and mouse thymocytes [J]. Int Immunol, 2002(14): 585 - 597.
[23] Swaminathan B, Matesanz F, Cavanillas ML. Validation of the CD6 and TNFRSF1A loci as risk factors for multiple sclerosis in Spain [J]. J Neuroimmunol, 2010(223): 100 - 103.
[24] Kofler DM, Severson CA, Mousissian N. The CD6 multiple sclerosis susceptibility allele is associated with alterations in CD4 + T cell proliferation [J]. J Immunol, 2011(187): 3286 - 3291.

(2016-01-06 收稿,2016-03-25 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵　毅

(上接第 526 页)

[2] Halliday J, Oke K, Breheny S, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study[J]. Am J Hum Genet, 2004 (3):526 - 528.
[3] Ishida M, Moore GE. The role of imprinted genes in humans[J]. Mol Aspects Med, 2013 (4):826 - 840.
[4] Choufani S, Shuman C, Weksberg R. Molecular findings in Beckwith-Wiedemann syndrome. [J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2013 (2):131 - 140.
[5] 施晓鋆,洪焱,黄绘,等. 不同载体和冷冻保护剂用于人胚胎玻璃化冷冻的初步研究.[J]. 中国计划生育学杂志, 2009(9):546 - 549.
[6] Chen SL, Shi XY, Zheng HY, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted H19 gene in human preimplantation embryos. [J]. Fertil Steril, 2010(6):2356 - 2358.
[7] Wang Z, Xu L, He F. Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2[J]. Fertil Steril, 2010 (8):2729 - 2733.
[8] Shi XY, Chen SL, Zheng HY, et al. Abnormal DNA Methylation of Imprinted Loci in Human Preimplantation Embryos[J]. Reprod Sci, 2014(8):978 - 983.
[9] Petrussa L, Van de Velde H, De Rycke M. Dynamic regulation of DNA methyltransferases in human oocytes and preimplantation embryos after assisted reproductive technologies[J]. Mol Hum Reprod, 2014 (9):861 - 874.
[10] Denomme MM, Mann MR. Maternal control of genomic imprint maintenance[J]. Reprod Biomed Online, 2013(6):629 - 636.

(2015-12-15 收稿,2016-04-23 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘　华