

云南汉族人群 CCR5 基因启动子多态性与 HCV 慢性感染的关系*

陈 珺¹, 刘舒媛¹, 聂 磊², 朱永玉², 李传印¹, 刘楠楠¹, 周紫云¹, 史 荔¹, 张淑琼^{2**}

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院 医学生物学研究所, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 云南 昆明 650118; 2. 昆明市第三人民医院, 云南 昆明 650041)

[摘 要] 目的: 研究云南汉族人群 CCR5 基因启动子单核苷酸多态性位点(SNPs)与丙型肝炎病毒(HCV)慢性感染的关系。方法: 选取 356 例云南汉族 HCV 慢性感染者作为病例组, 353 例健康体检者作为对照组, 采用 PCR 法扩增受检者 CCR5 基因启动子区基因序列; 然后采用 Sanger 法对扩增序列进行测序并与 GenBank (NC_000003. 12) 序列比较获得与云南省汉族人群具有多态性的 SNPs 位点, 对获得的 SNPs 位点进行基因分型, 计算这些 SNPs 位点的等位基因频率和基因型频率; 构建单倍型并分析遗传模式进行, 比较两组间的分布差异。结果: 在 CCR5 基因启动子区域有 9 个 SNPs 位点, 其中 rs2227010 (A > G)、rs2734648 (T > G)、rs1799987 (G > A)、rs1799988 (T > C)、rs1800023 (G > A) 及 1800024 (C > T) 6 个位点在云南省汉族人群中具有多态性; 这 6 个 SNPs 位点的基因型频率、等位基因频率及单倍型频率在病例组与对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: CCR5 基因启动子中的 rs2227010 (A > G)、rs2734648 (T > G)、rs1799987 (G > A)、rs1799988 (T > C)、rs1800023 (G > A) 及 1800024 (C > T) SNPs 位点与云南汉族人群 HCV 慢性感染无关。

[关键词] 基因; 多态性; 单核苷酸; 肝炎, 丙型; CCR5; 肝炎病毒; 慢性感染; 云南; 汉族

[中图分类号] R575.1; R333.4 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2019)01-0018-08

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.01.004

Association of SNPs in CCR5 Gene Promoter with Chronic HCV Infection in Yunnan Han Population

CHEN Jun¹, LIU Shuyuan¹, NIE Lei², ZHU Yongyu², LI Chuanyin¹,
LIU Nannan¹, ZHOU Ziyun¹, SHI Li¹, ZHANG Shuqiong²

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Development on Severe Infectious Disease, Kunming 650118, Yunnan, China;
2. The Third People's Hospital in Yunnan Province, Kunming 650041, Yunnan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in CCR5 gene promoter with chronic HCV infection in Yunnan Han population. Methods: Among Chinese Han population in Yunnan Province, 363 patients with HCV chronic infection were recruited as a case group, and 354 healthy individuals as control group. The CCR5 promoter sequences were amplified by PCR. Sanger sequencing was used to detect six SNPs including rs2227010 (A > G), rs2734648 (T > G), rs1799987 (G > A), rs1799988 (T > C), rs1800023 (G > A) and rs180024 (C > T) in CCR5 promoter region. We compared these six SNPs with the GenBank (NC_000003.12) sequence to obtain SNP sites in the Han population of Yunnan Province. The obtained SNPs were genotyped and

*[基金项目] 国家自然科学基金(31401063)

** 通信作者 E-mail: 1357626082@qq.com

网络出版时间: 2019-01-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190118.1118.004.html>

calculated for allele frequency and genotype frequency; the haplotype was constructed to analyze the genetic model and the distribution difference between the two groups. **Results:** Among nine SNPs sites in the CCR5 gene promoter, six SNPs including rs2227010 (A > G), rs2734648 (T > G), rs1799987 (G > A), rs1799988 (T > C), rs1800023 (G > A), rs41355345 (C > G) and 1800024 (C > T) have polymorphisms in Yunnan Han population. However, there is not statistically significant difference in the frequencies of allele, genotype, haplotype and inheritance patterns of these six SNPs between HCV infection group and healthy control group ($P > 0.05$). **Conclusion:** These six SNP locus in CCR5 gene promoter region may not be associated with the susceptibility of HCV chronic infection in Han population of Yunnan province.

[**Key words**] gene; polymorphism, single nucleotide; hepatitis C; CCR5; hepatitis virus; sexual infection; Yunnan, Han population

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV), 属黄病毒科的单股正链 RNA 病毒。据 WHO《2017 年全球肝炎报道》显示, 2015 年全世界有 7 100 万人存在慢性 HCV 感染, 我国感染率为 0.7%, 感染者高达 987.5 万人^[1]。HCV 感染后, 20% 的急性感染者可自发清除, 其余发展为慢性持续感染, 在 30 年内, 慢性持续感染者有 20% ~ 30% 发展为肝硬化, 每年有 1% ~ 2% 的肝硬化患者发展成肝癌^[2-3]。目前, 尽管直接抗病毒 (direct-acting antiviral agents, DAA) 小分子药物能够治愈 HCV 感染, 但近年来新发 HCV 感染病例仍在增加^[4]。HCV 感染初期及持续的 CD4 + T 和 CD8 + T 细胞反应对于控制 HCV 感染十分关键, 与急性 HCV 感染患者相比, 慢性 HCV 感染者体内 T 细胞反应的强度显著降低^[5]。HCV 属于高变异病毒, 感染后易产生抗原漂变而逃避宿主的免疫识别^[6]。已清除病毒的患者体内有针对各种表位的全面的 T 细胞反应, 而 HCV 慢性感染者体内仅有少量的 HCV 特异性的细胞毒性 T 细胞 (CTL), 提示 HCV 感染的临床结局与宿主免疫系统的有效应答有关^[7-9]。CCR5 (C-C chemokine receptoer type5) 是趋化因子 CC 亚家族受体成员, 是人类免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus, HIV) 进入 CD4 + T 细胞的主要辅助受体^[10]。CCR5 主要表达于 NK 细胞、T 淋巴细胞、吞噬细胞等免疫效应细胞表面, 在抗病毒的免疫应答中, 参与调节免疫细胞的活化和迁移, CCR5 的表达变化可影响病毒的感染进程^[11-14]。有研究发现, 乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 慢性感染者的 CCR5 表达水平下调^[15]。CCR5 基因从启动子区的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 位点会影响 CCR5 的转录和 mRNA 稳定性, 从而影响 CCR5 的表达,

最终影响机体的免疫应答^[10], 但目前未见 CCR5 启动子多态性位点与 HCV 慢性感染相关性的研究报道。本文通过检测 CCR5 基因启动子区域 6 个 SNPs 位点, 分析这 6 个 SNPs 位点的基因型频率、等位基因频率及所构建单倍型频率与 HCV 慢性感染的关系, 报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

根据知情同意原则, 随机选取 356 例在云南省某医院就诊的 HCV 慢性感染者作为病例组, 所有患者均符合中华医学会肝病学会和中华医学会感染病学会 2015 年制定的《丙型肝炎防治指南》^[16] 诊治标准, 临床和实验学检查明确患者血清抗-HCV 阳性, HCV RNA $\geq 15\ 000\ \text{U/L}$ 持续 6 个月以上, 血清丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和 (或) 天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 升高、肝脏病理学符合慢性肝炎表现, 且患者未经抗病毒、保肝等治疗; 排除合并慢性 HBV 等其他病毒性肝炎、非酒精性、脂肪性肝病、药物性肝损伤、自身免疫性肝炎、失代偿性肝病、原发性胆汁性肝硬化、遗传代谢性肝病及肝脏血管病等其他肝病患者。随机选取 353 例同期正常健康体检者 (血清抗 HCV、HCV-RNA 阴性, 且血清 ALT、AST 水平正常) 作为对照组。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, 其中病例组男 200 例、女 156 例, 对照组男 180 例、女 173 例。

1.2 方法

1.2.1 样本 DNA 提取 采集受试者空腹静脉血 5 mL、EDTA 抗凝, 置 -80 °C 保存、备用。按照 Qia-

gen 血基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取外周血基因组 DNA, -20 ℃ 保存。

1.2.2 CCR5 基因启动子 SNPs 检测 使用以下引物对 *CCR5* 启动子区域进行 PCR 扩增, *CCR5* 上游引物序列为 5'-GACGAGAAAGCTGAGGGTAA-GA-3', 下游引物序列为 5'-TAACCGTCTGAAACT-CATTCCA-3', PCR 扩增产物为 1 388 bp。扩增体系包括: 模板 DNA 10 ng, 上下游引物各 10 pmol, TaKaRa PCR Mix 25 μL (含 ExTaq 聚合酶, dNTPs), ddH₂O 21 μL, 反应总体积 50 μL。PCR 条件为 98 ℃ 预变性 10 min, 98 ℃ 变性 10 s, 55 ℃ 退火 5 s, 72 ℃ 延伸 90 s (共 30 个循环)。PCR 产物进行 Sanger 测序以检测该区域中的多态性基因座。

1.3 统计学方法

病例组和对照组受试者的年龄、性别比、肝功能指标等各项基本信息比较采用 *t* 检验, 群体代表性采用 *Hardy-Weinberg* 平衡检验。病例组和对照组间各 SNPs 的基因型、等位基因频率差异用卡方检验(χ^2), 使用 SHEsis^[17] 计算各 SNPs 位点间的连锁不平衡 (Linkage Disequilibrium, LD), 根据 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, 病例组和对照组间单倍型的频率分布差异用 χ^2 检验进行比较。采用 SNPstats 在线软件对 *CCR5* 基因启动子区域的 SNPs 位点进行遗传模式分析^[18], 用于分析的遗传模式包括共显性遗传模式 (codominant model)、显性遗传模式 (dominant model)、隐性遗传模式 (recessive model)、超显性遗传模式 (overdominant model) 及加性遗传模式 (log-additivemodel); 并根据赤池信息量准则 (akaikein formation criterion, *AIC*) 和贝叶斯信息准则 (bayesian information criterions, *BIC*) 的数值来确定每个位点的最优遗传模式, 即 *AIC* 和 *BIC* 数值最小的遗传模式。数据统计分析使用 SNPstats 软件进行, *P* < 0. 05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 年龄、性别及血清 ALT、AST 水平

病例组和对照组的年龄、性别比较, 差异无统计学意义 (*P* > 0. 05); 病例组血清 ALT、AST 水平显著高于对照组, 差异有统计学意义 (*P* < 0. 05); 且病例组患者血清 ALT、AST 水平符合 HCV 慢性感染的诊断标准, 见表 1。

表 1 两组被检者年龄、性别及血清 ALT 及 AST 水平

Tab. 1 Basic characteristics of the subjects			
指标	病例组 (n = 356)	对照组 (n = 353)	P
年龄 (岁)	44. 27 ± 11. 87	44. 64 ± 9. 26	0. 323
性别 (n, %)			
男	200 (56. 18)	180 (50. 99)	0. 166
女	156 (43. 82)	173 (49. 01)	
血清 ALT (U/L)	73 280 ± 13 770	20 560 ± 650	< 0. 001
血清 AST (U/L)	66 950 ± 6 840	17 580 ± 1 330	< 0. 001

2.2 测序发现的 CCR5 基因启动子区域 9 个 SNPs 位点

测序结果与 GenBank (NC_000003. 12) 序列进行比较发现, 在 *CCR5* 基因启动子区域有 9 个 SNPs 位点, 分别为 rs2227010、rs2856758、rs2734648、rs1799987、rs1799988、rs41469351、rs1800023、rs41355345 及 rs1800024; 其中, 6 个 SNPs 位点 rs2227010、rs2734648、rs1799987、rs1799988、rs1800023 及 rs1800024 在云南省汉族人群中具有多态性。

2.3 等位基因与基因型分析

CCR5 基因启动子具有多态性的 rs2227010 (A > G)、rs2734648 (T > G)、rs1799987 (G > A)、rs1799988 (T > C)、rs1800023 (G > A) 及 rs180024 (C > T) SNPs 位点在病例组和对照组中的分布均符合 *Hardy-Weinberg* 平衡 (*P* > 0. 05)。比较两组 6 个 SNPs 位点基因型和等位基因频率分布的结果显示, rs2227010 的 A 等位基因频率分布差异有统计学意义 (*OR* = 0. 753, 95% *CI* 为 0. 578 ~ 0. 983, *P* = 0. 026), 但经 FDR 校正后, 差异无统计学意义 (*P* > 0. 05); 其余 5 个 SNPs 位点的等位基因频率与基因型频率分布比较, 差异均无统计学意义 (*P* > 0. 05), 见表 2。

2.4 6 个 SNPs 位点间的连锁不平衡分析

CCR5 基因启动子区域 6 个 SNP 位点的连锁不平衡分析结果显示, rs2227010 (A > G), rs2734648 (T > G), rs1799987 (G > A), rs1799988 (T > C), rs1800023 (G > A), rs180024 (C > T) 位点之间存在强连锁不平衡 (*D'* > 0. 8), 见表 3。

2.5 单倍型分析

构建 *CCR5* 基因启动子区域 6 个 SNPs 位点 rs2227010 (A > G)、rs2734648 (T > G)、rs1799987 (G > A)、rs1799988 (T > C)、rs1800023 (G > A) 及 rs180024 (C > T) 的单倍型, 选取单倍型频率 > 3% 的单倍型进行分析, 结果显示, 共有 3 种单倍型的

表 2 两组被检者 *CCR5* 基因启动子 6 个 SNPs 位点等位基因及基因型频率分布

Tab. 2 The distribution frequencies of alleles and genotypes of at 6 SNPs locus in case group and control group

SNPs 位点	项目	等位基因频率(<i>n</i> ,%)		<i>P</i>	<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)	校正 <i>P</i>	基因型频率(<i>n</i> ,%)			χ^2	<i>P</i>	校正 <i>P</i>
rs2227010	基因(基因型)	A	G	0.026	0.743 (0.572 ~ 0.964)	>0.05	AA	AG	GG	4.71	0.095	>0.05
	病例组	551	161				218	115	23			
		(0.774)	(0.226)				(0.612)	(0.323)	(0.065)			
	对照组	580	126				243	94	16			
		(0.822)	(0.178)				(0.688)	(0.266)	(0.045)			
rs2734648	基因(基因型)	G	T	0.866	1.018 (0.826 ~ 1.254)	>0.05	GG	GT	TT	0.217	0.897	>0.05
	病例组	336	376				78	180	98			
		(0.472)	(0.528)				(0.219)	(0.506)	(0.275)			
	对照组	330	376				73	184	96			
		(0.467)	(0.533)				(0.207)	(0.521)	(0.272)			
rs1799987	基因(基因型)	A	G	0.852	0.980 (0.792 ~ 1.211)	>0.05	AA	AG	GG	0.236	0.889	>0.05
	病例组	288	424				64	160	132			
		(0.404)	(0.596)				(0.180)	(0.449)	(0.371)			
	对照组	289	417				62	165	126			
		(0.409)	(0.591)				(0.176)	(0.467)	(0.357)			
rs1799988	基因(基因型)	C	T	0.811	1.026 (0.831 ~ 1.267)	>0.05	CC	CT	TT	1.03	0.598	>0.05
	病例组	306	406				61	184	111			
		(0.430)	(0.570)				(0.171)	(0.517)	(0.312)			
	对照组	299	407				65	169	119			
		(0.424)	(0.576)				(0.184)	(0.479)	(0.337)			
rs1800023	基因(基因型)	A	G	0.739	1.036 (0.841 ~ 1.277)	>0.05	AA	AG	GG	0.581	0.748	>0.05
	病例组	330	382				77	176	103			
		(0.463)	(0.537)				(0.216)	(0.494)	(0.289)			
	对照组	321	385				69	183	101			
		(0.455)	(0.545)				(0.195)	(0.518)	(0.286)			
rs1800024	基因(基因型)	C	T	0.598	1.068 (0.836 ~ 1.366)	>0.05	CC	CT	TT	1.757	0.415	>0.05
	病例组	549	163				214	121	21			
		(0.771)	(0.229)				(0.601)	(0.340)	(0.059)			
	对照组	536	170				200	136	17			
		(0.759)	(0.241)				(0.567)	(0.385)	(0.048)			

表 3 *CCR5* 基因启动子 6 个 SNPs 位点的连锁不平衡分析

Tab. 3 Linkage disequilibrium analysis on 6 SNPs in *CCR* gene promoter

SNPs 位点	rs2734468	rs1799987	rs1799988	rs1800023	rs1800024
rs2227010	0.882	0.751	0.83	0.718	0.847
rs2734468	—	0.943	0.934	0.910	0.876
rs1799987	—	—	0.934	0.849	0.811
rs1799988	—	—	—	0.876	0.920
rs1800023	—	—	—	—	0.889

频率>3%,单倍型在病例组和对照组的分布频率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

2.6 遗传模式分析

分别用共显性遗传模式、显性遗传模式、隐性遗传模式、超显性遗传模式及加性遗传模式对各 SNPs 位点与 HCV 慢性感染的相关性进行分析,结果显示,SNPs 位点 rs2227010 在病例组与对照组之间比较,最优的遗传模式为显性遗传模式($P=0.034$)和加性遗传模式($P=0.032$),但经 FDR 校正后,差异无统计学意义($P>0.05$),其余 5 个

表 4 病例组和对照组 CCR5 基因启动子区域 6 个 SNPs 位点单倍型频率比较
Tab.4 Comparison of haplotype frequency of 6 SNPs in CCR5 gene promoter
region between case group and control group

单倍型	病例组 (n = 356)	对照组 (n = 353)	χ^2	P	OR (95% CI)
A T G T G C	342. 59(0. 481)	338. 32(0. 479)	0. 533	0. 533	0. 929(0. 736 ~ 1. 172)
A G A C A T	134. 49(0. 189)	135. 06(0. 191)	0. 656	0. 656	0. 940(0. 716 ~ 1. 234)
G G A C A C	119. 43(0. 168)	97. 81(0. 139)	0. 203	0. 203	1. 212(0. 901 ~ 1. 629)

SNPs 位点 rs2734648 (T > G)、rs1799987 (G > A)、(C > T) 基因型在病例组和对照组中的分布频率比
rs1799988 (T > C)、rs1800023 (G > A) 及 rs1800024 较, 差异无统计学意义, 见表 5。

表 5 6 个 SNPs 位点在病例组和对照组中的遗传模式分析
Tab.5 Analysis of genetic patterns of 6 SNPs sites in case group and control

SNPs 位点	遗传模式	基因型	病例组 (n, %)	对照组 (n, %)	OR (95% CI)	P	校正 P	AIC	BIC
rs2227010	共显性	A/A	243 (68. 8)	218 (61. 2)	1	0. 09	>0. 05	984. 1	997. 8
		A/G	94 (26. 6)	115 (32. 3)	1. 36(0. 98 ~ 1. 89)				
		G/G	16 (4. 5)	23 (6. 5)	1. 60(0. 83 ~ 3. 11)				
	显性	A/A	243 (68. 8)	218 (61. 2)	1	0. 03	>0. 05	982. 4	991. 5
		A/G - G/G	110 (31. 2)	138 (38. 8)	1. 40(1. 03 ~ 1. 91)				
	隐性	A/A - A/G	337 (95. 5)	333 (93. 5)	1	0. 26	>0. 05	985. 6	994. 7
		G/G	16 (4. 5)	23 (6. 5)	1. 45(0. 76 ~ 2. 80)				
	超显性	A/A - G/G	259 (73. 4)	241 (67. 7)	1	0. 10	>0. 05	984. 1	993. 2
		A/G	94 (26. 6)	115 (32. 3)	1. 31(0. 95 ~ 1. 82)				
	加性	- - -	- - -	- - -	1. 31(1. 02 ~ 1. 69)	0. 03	>0. 05	982. 3	991. 4
rs2734468	共显性	T/T	96 (27. 2)	98 (27. 5)	1	0. 90	>0. 05	988. 7	1 002. 0
		G/T	184 (52. 1)	180 (50. 6)	0. 96(0. 68 ~ 1. 36)				
		G/G	73 (20. 7)	78 (21. 9)	1. 05(0. 68 ~ 1. 60)				
	显性	T/T	96 (27. 2)	98 (27. 5)	1	0. 92	>0. 05	986. 9	996. 0
		G/T - G/G	257 (72. 8)	258 (72. 5)	0. 98(0. 71 ~ 1. 37)				
	隐性	T/T - G/T	280 (79. 3)	278 (78. 1)	1	0. 69	>0. 05	986. 7	995. 8
		G/G	73 (20. 7)	78 (21. 9)	1. 08(0. 75 ~ 1. 54)				
	超显性	T/T - G/G	169 (47. 9)	176 (49. 4)	1	0. 68	>0. 05	986. 7	995. 8
		G/T	184 (52. 1)	180 (50. 6)	0. 94(0. 70 ~ 1. 26)				
	加性	- - -	- - -	- - -	1. 02(0. 82 ~ 1. 26)	0. 86	>0. 05	986. 8	996. 0
rs1799987	共显性	G/G	126 (35. 7)	132 (37. 1)	1	0. 89	>0. 05	988. 6	1 002. 0
		A/G	165 (46. 7)	160 (44. 9)	0. 93(0. 67 ~ 1. 28)				
		A/A	62 (17. 6)	64 (18. 0)	0. 99(0. 64 ~ 1. 51)				
	显性	G/G	126 (35. 7)	132 (37. 1)	1	0. 70	>0. 05	986. 7	995. 9
		A/G - A/A	227 (64. 3)	224 (62. 9)	0. 94(0. 69 ~ 1. 28)				
	隐性	G/G - A/G	291 (82. 4)	292 (82. 0)	1	0. 89	>0. 05	986. 8	996. 0
		A/A	62 (17. 6)	64 (18. 0)	1. 03(0. 70 ~ 1. 51)				
	超显性	G/G - A/A	188 (53. 3)	196 (55. 1)	1	0. 63	>0. 05	986. 6	995. 8
		A/G	165 (46. 7)	160 (44. 9)	0. 93(0. 69 ~ 1. 25)				
	加性	- - -	- - -	- - -	0. 98(0. 80 ~ 1. 21)	0. 86	>0. 05	986. 8	996. 0
rs1799988	共显性	T/T	119 (33. 7)	111 (31. 2)	1	0. 60	>0. 05	987. 8	1 002. 0
		C/T	169 (47. 9)	184 (51. 7)	1. 17(0. 84 ~ 1. 63)				
		C/C	65 (18. 4)	61 (17. 1)	1. 01(0. 65 ~ 1. 55)				
	显性	T/T	119 (33. 7)	111 (31. 2)	1	0. 47	>0. 05	986. 4	995. 5
		C/T - C/C	234 (66. 3)	245 (68. 8)	1. 12(0. 82 ~ 1. 54)				
	隐性	T/T - C/T	288 (81. 6)	295 (82. 9)	1	0. 66	>0. 05	986. 7	995. 8
		C/C	65 (18. 4)	61 (17. 1)	0. 92(0. 62 ~ 1. 35)				
	超显性	T/T - C/C	184 (52. 1)	172 (48. 3)	1	0. 31	>0. 05	985. 8	995. 0
		C/T	169 (47. 9)	184 (51. 7)	1. 16(0. 87 ~ 1. 56)				
	加性	- - -	- - -	- - -	1. 03(0. 83 ~ 1. 27)	0. 81	>0. 05	986. 8	995. 9

续表 5

SNPs 位点	遗传模式	基因型	病例组(<i>n</i> ,%)	对照组(<i>n</i> ,%)	OR(95% CI)	<i>P</i>	校正 <i>P</i>	AIC	BIC
rs1800023	共显性	G/G	101 (28.6)	103 (28.9)	1	0.75	>0.05	988.3	1 002.0
		A/G	183 (51.8)	176 (49.4)	0.94(0.67 ~ 1.33)				
		A/A	69 (19.6)	77 (21.6)	1.09(0.72 ~ 1.67)				
	显性	G/G	101 (28.6)	103 (28.9)	1	0.92	>0.05	986.9	996.0
		A/G – A/A	252 (71.4)	253 (71.1)	0.98(0.71 ~ 1.36)				
	隐性	G/G – A/G	284 (80.5)	279 (78.4)	1	0.49	>0.05	986.4	995.5
		A/A	69 (19.6)	77 (21.6)	1.14(0.79 ~ 1.64)				
	超显性	G/G – A/A	170 (48.2)	180 (50.6)	1	0.52	>0.05	986.5	995.6
		A/G	183 (51.8)	176 (49.4)	0.91(0.68 ~ 1.22)				
	加性	– – –	– – –	– – –	1.04(0.84 ~ 1.28)	0.74	>0.05	986.8	995.9
rs1800024	共显性	C/C	200 (56.7)	214 (60.1)	1	0.42	>0.05	987.1	1 001.0
		C/T	136 (38.5)	121 (34.0)	0.83(0.61 ~ 1.14)				
		T/T	17 (4.8)	21 (5.9)	1.15(0.59 ~ 2.25)				
	显性	C/C	200 (56.7)	214 (60.1)	1	0.35	>0.05	986.0	995.1
		C/T – T/T	153 (43.3)	142 (39.9)	0.87(0.64 ~ 1.17)				
	隐性	C/C – C/T	336 (95.2)	335 (94.1)	1	0.52	>0.05	986.5	995.6
		T/T	17 (4.8)	21 (5.9)	1.24(0.64 ~ 2.39)				
	超显性	C/C – T/T	217 (61.5)	235 (66.0)	1	0.21	>0.05	985.3	994.4
		C/T	136 (38.5)	121 (34.0)	0.82(0.60 ~ 1.12)				
	加性	– – –	– – –	– – –	0.94(0.73 ~ 1.20)	0.60	>0.05	986.6	995.7

注:加性“– – –”表示多态性位点如为 A > G 的变异,则加性遗传模式表示 2GG + AG 基因型与 AA 基因型进行比较

3 讨论

CCR5 基因位于人染色体 3p21.31,由 1 个启动子、4 个外显子和 2 个中间分隔的内含子组成。*CCR5* 属于 G-蛋白耦联受体超家族成员,是 β 趋化因子 RANTES、MIP-1α、MIP-1β 的细胞受体,*CCR5* 主要表达于 NK 细胞、T 淋巴细胞、吞噬细胞等免疫效应细胞表面,在抗病毒的免疫应答中,参与调节免疫细胞的活化和迁移^[11-14]。*CCR5* 的表达变化可影响病毒的感染进程。Gilliam 等^[15]研究表明,下调 *CCR5* 的表达,可减缓 HIV 的感染进程,Vilela 等^[19]研究发现,*CCR5* 表达缺失的小鼠,可加速 HSV (herpes simplex virus, HSV) 的清除。Javad 等^[20]研究发现,与对照组相比,HBV 慢性感染者的 *CCR5* 表达水平下调。*CCR5* 基因从启动子区到编码区有很多多态性位点^[21],这些多态性位点可能影响 *CCR5* 的转录和 mRNA 稳定性,从而影响 *CCR5* 的表达,最终影响机体的免疫应答^[10]。*CCR5* 启动子多态性与许多病毒的感染相关:rs1799987G 基因及 rs1799988T 基因与 HBV 感染急性期的病毒清除有关^[22];rs1799987A/G 基因变体可减少 *CCR5* 的转录,从而减缓 HIV 的感染进程^[23],此外,Shien 等^[24]研究发现,携带 rs1799987A/A 基因

突变的个体,CD4 + 细胞表面的 *CCR5* 水平升高,从而加速了 HIV 的感染进程。Konishi^[25]等研究发现,rs1799987G/G 基因与 HCV 慢性感染者的干扰素治疗效果相关,*CCR5* 启动子区域基因多态性位点的存在可以影响 *CCR5* 的表达水平,最终影响病毒的感染进程^[25-26]。目前,未见 *CCR5* 启动子多态性位点与 HCV 慢性感染相关性研究报道。*CCR5* 基因有 2 个启动子,位于第 1 内含子上游的弱启动子 (Upstream promoter, P_U),和位于第 1 内含子包括第 2 外显子,及 3 外显子的部分的强启动子 (Downstream promoter, P_D)^[27]。*CCR5* 启动子区域的多态性位点,可通过以下 2 种方式影响 *CCR5* 的表达:(1)5' UTR 的多态性位点影响启动子区域结合的转录因子的种类,数量及转录因子结合的稳定性,从而影响 *CCR5* 基因的转录,进而影响 *CCR5* 的表达水平,rs2734468T 基因具有更强的核因子 (Nuclear factor, NF) 结合活性;(2)5' UTR 多态性位点的存在,使得 5' UTR 区域形成不同的茎环结构,从而影响 *CCR5* mRNA 的转录后翻译,影响 *CCR5* 的表达水平^[10]。本研究的 6 个 SNPs 位点均位于强启动子 P_D,因而其多态性可能会影响 *CCR5* 基因的转录,继而影响 *CCR5* 的表达。rs1799987 与 HBV 感染急性阶段的清除^[21]、HIV-1 的感染进程^[28]及干扰素治疗 HCV 的疗效^[24]有关,而本研

究结果显示,rs1799987 与 HCV 的慢性感染无关。rs1799988C 可降低儿童患 HIV 的风险^[29],rs1800023G 基因可降低儿童和成人感染 HIV 的风险^[30],rs1800024T 基因与中国南方汉族 HIV-1 的感染相关^[31],本研究中,对这些位点与云南汉族人群 HCV 慢性感染的相关性进行了分析,结果显示这些位点可能与云南汉族人群 HCV 慢性感染无关。

CCR5 强启动子 P_D 区域的 SNPs 位点之间存在强连锁,不同的 *CCR5* 转录活性影响了 CD4 + T 细胞的凋亡进程,HHC 单倍群的个体具有更多的 CD4 + T 细胞,从而减缓 HIV 的感染进程^[32-33]。本研究中,所有个体的 rs2856758(A > G)和 rs41469351(C > T)没有多态性,rs2856758 位点均为 A,rs41469351 均为 C,而这两个位点突变对应的单倍群分别为 HHG 和 HHD,因此在云南汉族人群中,未发现 HHG 及 HHD 单倍群。本研究构建了 *CCR5* 启动子区域 6 个 SNPs 位点的单倍型,分析结果显示所构建的单倍型均与云南汉族人群 HCV 慢性感染无关,在云南汉族人群中,分布频率最高的单倍型为 ATGTGC (47.97%),AGACAT (19.04%),GGACAC (15.31%)这一结果与中国南方汉族人群中的单倍型结果一致^[31],其中 ATGTGC 属于 HHC 单倍群,AGACAT 属于 HHF 单倍群,GGACAC 属于 HHE 单倍群。

由于 SNP 位点的频率分布在不同人群中存在差异性,另外,HCV 慢性感染的免疫机制与 HIV 不同,CCR5 是 HIV-1 早期感染人体的主要辅助性受体,而在 HCV 的感染进程中,CCR5 主要通过影响细胞免疫来调解抗病毒应答^[34],因此 CCR5 与病原体感染的相关性并不相同。对于对研究云南汉族人群 *CCR5* 基因启动子区域多态性与 HCV 慢性感染的关系存在一定的局限性,需要在以后的研究中扩大样本量,并增加其他多态位点的检测,以期发现与云南汉族人群 HCV 慢性感染相关的 SNP 位点。

4 参考文献

- [1] BLACH S, ZEUZEM S, MANNS M, et al. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study[J]. *Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2017, 2(3): 161 - 176.
- [2] SEBASTIANI G, GKOUVATSOS K, PANTOPOULOS K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(32): 11033 - 11053.
- [3] LISTED N A. New hepatitis data highlight need for urgent global response [J]. *Saudi Medical Journal*, 2017, 38(6): 672 - 675.
- [4] CAMPBELL C, CANARY L, SMITH N, et al. State HCV incidence and policies related to HCV preventive and treatment services for persons who inject drugs-United States, 2015 - 2016. [J]. *American Journal of Transplantation*, 2017, 17(7): 1945 - 1948.
- [5] LECHNER F, GRUENER N H, URBANI S, et al. CD8 + T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained[J]. *European Journal of Immunology*, 2015, 30(9): 2479 - 2487.
- [6] KUMAR U, MONJARDINO J, THOMAS H C. Hyper-variable region of hepatitis C virus envelope glycoprotein (E2/NS1) in an agammaglobulinemic patient[J]. *Gastroenterology*, 1994, 106(4): 1072 - 1075.
- [7] HE X S, REHERMANN B, LÓPEZLABRADOR F X, et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8 + T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(10): 5692 - 5697.
- [8] SURUKI R Y, MUELLER N, HAYASHI K, et al. Host immune status and incidence of hepatocellular carcinoma among subjects infected with hepatitis C virus: a nested case-control study in Japan. [J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2006, 15(12): 2521 - 2525.
- [9] ZHANG S, BAKSHI R K, SUNEETHA P V, et al. Frequency, private specificity, and cross-reactivity of preexisting hepatitis c virus (HCV)-Specific CD8 + T cells in hcv-seronegative individuals: implications for vaccine responses[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(16): 8304 - 8317.
- [10] MUMMIDI S, BAMSHAD M, AHUJA S S, et al. Evolution of human and non-human primate CC chemokine receptor 5 gene and mRNA. Potential roles for haplotype and mRNA diversity, differential haplotype-specific transcriptional activity, and altered transcription factor binding to polymorphic nucleotides[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(25): 18946 - 18961.
- [11] PATERLINI M G. Structure modeling of the chemokine receptor CCR5: implications for ligand binding and selectivity[J]. *Biophysical Journal*, 2002, 83(6): 3012 - 3031.
- [12] FUKADA K, SOBAO Y, TOMIYAMA H, et al. Functional expression of the chemokine receptor CCR5 on virus epitope-specific memory and effector CD8 + T cells

- [J]. *Journal of Immunology*, 2002, 168(5): 2225 – 2232.
- [13] XIANG J, GEORGE S L, WÜNSCHMANN S, et al. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta, and SDF-1. [J]. *Lancet*, 2004, 363(9426): 2040 – 2046.
- [14] MONIKA R, KATHARINA B, ANDREAS G, et al. Host genetic variants in the pathogenesis of hepatitis C [J]. *Viruses*, 2012, 4(12): 3281 – 3302.
- [15] GILLIAM B L, RIEDEL D J, REDFIELD R R, et al. Clinical use of CCR5 inhibitors in HIV and beyond[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2011, 9(Suppl 1): S9.
- [16] HERSBERGER M, MARTI J J E, SPECK R F. Rapid detection of the CCR2-V64I, CCR5-A59029G and SDF1-G801A polymorphisms by tetra-primer PCR[J]. *Clinical Biochemistry*, 2002, 35(5): 399 – 403.
- [17] SHI Y Y, HE L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci [J]. *Cell Research*, 2005, 15(2): 97 – 98.
- [18] SOLÉ X, GUINÓ E, VALLS J, et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(15): 1928 – 1929.
- [19] VILELA M C, LIMA G K, RODRIGUES D H, et al. Absence of CCR5 increases neutrophil recruitment in severe herpetic encephalitis [J]. *Bmc Neuroscience*, 2013, 14(1): 19.
- [20] JAVAD S, NIMA S, MOHAMMAD K A, et al. CCR5 plays important roles in hepatitis B infection [J]. *Viral Immunology*, 2014, 27(1): 2 – 6.
- [21] HOLTE S, LEE J, KAUPP N, et al. Analysis of genetic polymorphisms in CCR5, CCR2, stromal cell-derived factor-1, RANTES, and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin in seronegative individuals repeatedly exposed to HIV-1 [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2004, 190(6): 1055 – 1058.
- [22] CHANG H Y, AHN S H, KIM D Y, et al. Association between CCR5 promoter polymorphisms and hepatitis B virus infection [J]. *Korean Journal of Hepatology*, 2005, 11(2): 116 – 124.
- [23] MCDERMOTT D H, ZIMMERMAN P A, GUIGNARD F, et al. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression [J]. *Lancet*, 1998, 352(9131): 866 – 870.
- [24] SHIEH B, LIAU Y E, HSIEH P S, et al. Influence of nucleotide polymorphisms in the CCR2 gene and the CCR5 promoter on the expression of cell surface CCR5 and CXCR4 [J]. *International Immunology*, 2000, 12(9): 1311 – 1318.
- [25] KONISHI I, HORIIKE N, HIASA Y, et al. CCR5 promoter polymorphism influences the interferon response of patients with chronic hepatitis C in Japan [J]. *Intervirol*, 2004, 47(2): 114 – 120.
- [26] KALLEL A, SEDIRI Y, MOURALI M S, et al. 296 CC chemokine receptors (CCR5 and CCR2) polymorphisms in Tunisian patients with myocardial infarction [J]. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, 2012, 4(1): 94.
- [27] MUMMIDI S, AHUJA S S, MCDANIEL B L, et al. The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and noncoding exons [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(49): 30662 – 30671.
- [28] CATANO G, CHYKARENKO Z A, MANGANO A, et al. Concordance of CCR5 genotypes that influence cell-mediated immunity and HIV-1 disease progression rates [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2011, 203(2): 263 – 272.
- [29] PARCZEWSKI M, URBA? SKA A, MACIEJEWSKA K, et al. Association of chemokine receptor gene variants with HIV-1 genotype predicted tropism [J]. *Hiv Medicine*, 2015, 15(10): 577 – 586.
- [30] CARRINGTON M, DEAN M, MARTIN M P, et al. Genetics of HIV-1 infection: chemokine receptor CCR5 polymorphism and its consequences [J]. *Human Molecular Genetics*, 1999, 8(10): 1939 – 1945.
- [31] JIAPENG L, AIJUAN S, YOUXIN W, et al. The genetic associations and epistatic effects of the CCR5 promoter and CCR2-V64I polymorphisms on susceptibility to HIV-1 infection in a Northern Han Chinese population [J]. *Genetic Testing & Molecular Biomarkers*, 2012, 16(12): 1369.
- [32] MARTIN M P, DEAN M, SMITH M W, et al. Genetic Acceleration of AIDS Progression by a Promoter Variant of CCR5 [J]. *Science*, 1998, 282(5395): 1907 – 1911.
- [33] JOSHI A, PUNKE E B, SEDANO M, et al. CCR5 promoter activity correlates with HIV disease progression by regulating CCR5 cell surface expression and CD4 T cell apoptosis [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 232.
- [34] COENEN M, NATTERMANN J, FELDMANN G, et al. The role of CCR5 in HCV infection [J]. *European Journal of Medical Research*, 2010, 15(3): 97 – 101.

(2018-11-25 收稿, 2019-01-08 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 张启芳