

蒙古国胡拉哈山谷M21号匈奴墓主的线粒体DNA分析*

蔡大伟¹ 陈曦¹ 赵欣² 朱泓¹ 周慧¹

(1. 吉林大学边疆考古研究中心考古DNA实验室, 长春, 130023; 2. 中国社会科学院考古研究所, 北京, 100710)

一、前言

匈奴是中国古代北方一个古老的游牧民族。匈奴之名最早出现在中国古代史籍是在公元前4世纪末。公元前3世纪(东周时期)匈奴开始崛起,至秦汉之际已经成为蒙古草原一个极为重要的政治和军事势力,其疆域幅员广阔,北至贝加尔湖,南至蒙古戈壁沙漠,西至帕米尔高原,东至辽河流域。匈奴在公元前1世纪开始衰落(东汉时期)。公元48年,匈奴在东汉王朝的持续打击下分裂为南北二部,南匈奴附汉,北匈奴被迫西迁。在大漠南北活跃了约三百年的匈奴帝国由此谢幕。在漫长的历史长河中,匈奴的产生、存在和发展对中国的历史产生了重大而深远的影响。在匈奴帝国的形成过程中,匈奴吸收和兼并了许多较小的氏族部落,最终发展成为一个包含众多不同民族或者种族的统一共同体。因此,匈奴人种的构成非常复杂,关于匈奴主体民族的人种问题一直争论不休,中外学者从历史文献、考古学、语言学、体质人类学等不同角度对其进行了讨论,主要有蒙古人种和欧罗巴人种两说^[1~5]。

近年来,随着分子生物技术的飞速发展及其在考古研究中的应用,古代DNA技术使人们可以直接获取古代遗存中的遗传信息,对古代遗存进行个体、群体遗传学研究,并重建过去的历史。线粒体DNA(mtDNA)是人体细胞中重要的细胞器,遵循严格的母系遗传,无重组,进化速率快,数量多,是研究人群起源、迁移及演化的理想工具。

* 本研究先后得到以下基金项目的资助:国家基础科学人才培养基金项目(批准号:J1210007)、吉林大学本科业务费平台基地建设项目(批准号:201106001)、国家社科基金重大项目(汉民族历史形成过程的生物考古学考察,批准号:11&ZD182)、教育部人文社会科学重点研究基地重大项目(青铜—早期铁器时代蒙古高原古代居民体质人类学的综合研究,批准号:11JJD780008)。

人类mtDNA单倍型类群（Haplogroup）存在大陆特异性，例如A、B、C、D、F、G等主要分布在亚洲人群中，而U、K、H、V、T等则分布在欧洲人群中，这一特性非常适合我们进行人种的鉴定和分析。2007年6月至9月，内蒙古自治区文物考古研究所与蒙古国游牧文化研究国际学院、蒙古国国家博物馆联合组成考古队，对蒙古国后杭爱省浩腾特苏木乌兰朝鲁巴戈胡拉哈山谷1号回鹘墓园和其周边区域的部分墓葬进行了第二次发掘，清理出不同时期的墓葬15座，其中包括1座匈奴时期的墓葬（编号2007HHM21，以下简称M21号墓），墓主为一名35岁左右的男性，体质人类学鉴定为亚洲蒙古人种的北亚类型， ^{14}C 年代数据为距今2170年 $\pm$ 35年，属于匈奴早期^[6]。为了从分子水平上进一步揭示匈奴的人种类型，我们对M21墓主进行了mtDNA分析，以期为匈奴的人种类型研究提供新的线索。

二、材料与方法

1. 样本处理

两颗牙齿样本由内蒙古自治区文物考古研究所提供，取自M21号墓地。首先用毛刷清理牙齿表面的灰尘和泥土，将样本浸泡在浓度为3%~5%的次氯酸溶液中20分钟，样本取出后，依次用超纯水、无水乙醇溶液清洗干净，然后把牙齿的每个侧面在紫外光下照射30分钟，最后放入6750冷冻研磨机（Metuchen, USA）中研磨成粉，-20℃冷冻保存。

2. DNA提取、PCR扩增和测序

取200毫克牙粉，按照杨东亚等人先前描述的方法将古DNA从骨粉中提取出来^[7]。

使用两对套叠引物扩增线粒体DNA高可变I区（Hypervariable Region I，HVR I）16017-16409长度共393bp的序列，利用一对引物扩增AMG基因进行性别鉴定（表一）。

表一 实验所用引物序列

HVI片段	引物	扩增长度
HVI-a	L16017 5' TTCTCTGTTCTTTCATGGGGA 3'	235bp
	H16251 5' GGAGTTGCAGTTGATGTGTGA 3'	
HVI-b	L16201 5' CAAGCAAGTACAGCAATCAAC 3'	209bp
	H16409 5' AGGATGGTGGTCAAGGGA 3'	
AMG基因	引物	扩增长度
AMG gene	XBamel-1 5' CCTGGGCTCTGTAAAGAATAG3'	103bp（F女）
	XBamel-2 5' CAGAGCTTAACTGGGAAGCTG3'	103 and 109bp（M男）

PCR采用25L反应体系, 包括2 μ l DNA抽提液、1.5 $\times$ PCR buffer、2.5mM MgCl₂、0.25mM dNTPs、每条引物0.5 μ M、1.0U Taq聚合酶以及2mM BSA。扩增程序如下: 94℃变性5分钟后, 94℃1分钟, 55℃~54℃45秒, 72℃1分钟, 33个循环, 最后于72℃延伸10分钟。

扩增产物使用2%琼脂糖进行检测。用QIAEXR II GEL Extraction Kit (QIAGEN, Germany) 纯化PCR产物。纯化后PCR产物用ABI 310 DNA自动测序仪进行测序。

3. 污染的防止

本实验采用了严格的防污染措施: 所有的研究都在专门的古DNA研究实验室中进行, PCR前与PCR后分别在两个相互隔离的空间操作, 实验过程中均穿着专用的实验防护服, 并佩戴口罩和一次性乳胶手套, 一次性耗材与所用器皿都经过高温蒸汽灭菌 (121℃, 15分钟)。每个样本都要进行至少两次抽提, 每次抽提液至少要进行2~3次PCR, 并在抽提与PCR操作过程设置阴性对照来监测可能的污染。

4. DNA数据分析

古DNA序列被截取到16038-16391 (去除两端引物序列), 长度354bp, 进行数据分析。DNA序列用Clustal X 1.83软件 (下载地址<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) 进行对位比对, 确定变异位点及单倍型。

三、结果与分析

1. 线粒体变异和世系归属

我们进行了三次独立抽提, 有三次抽提产物的扩增序列进行验证结果的真实性, 所有抽提和扩增空白对照都呈阴性, 表明在实验过程中没有收到外源DNA的污染。最终我们获得了真实可靠的线粒体高可变一区354bp的序列, 未发现来自实验室人员的污染。将这些序列与剑桥标准序列CRS^[8] 比对发现共存在4个变异位点, 全部是转换, 没有颠换, 具体如下: 16126 (T→C), 16294 (C→T), 16296 (C→T), 16324 (T→C)。根据变异位点, 我们确定M21属于T2a1b1型 (特异性分型位点16294T-16296T-16324C)。

2. 共享序列搜索

为了研究所得到的M21号墓主人DNA序列在现今人群的分布情况, 我们利用BLAST程序在GenBank核酸数据库中搜寻与这个古代序列共享的人群分布, 我们一共搜索到29个现代人和1个距今约4800年的乌克兰古代人与M21号墓主人共享同一序列, 除7

个人所在地区未知以外，几乎所有人都为欧洲人，仅有少数分布在中亚乌兹别克斯坦，详见表二。

表二 古代序列在现代人群中的分布

古代个体	共享群体（个体数目）
M21	英格兰（3）、冰岛（1）、匈牙利（2）、希腊（1）、西班牙（4 ^a ）、意大利（2）、爱尔兰（1）、埃及（1）、乌克兰（1 ^b ）、俄罗斯（5）、乌兹别克斯坦（2）、未知（7）

注：a.其中3人为美籍西班牙人；b.乌克兰Trypillian文化时期（距今4720年±70年）。

3. 性别鉴定

我们对M21号墓主的性别进行了鉴定。首先，我们设计了一对引物扩增牙釉蛋白编码基因AMG，该基因是X和Y染色体同源基因，如果检测个体是男性（含X和Y染色体），PCR扩增将出现两条条带（X和Y）；如果是女性（含X和X染色体），PCR扩增将出现一条条带（X）。我们检测出M21为男性，与体质人类学的鉴定结果完全一致，这一结果证明了基因检测的可靠性以及进行古DNA分析的可行性。

四、讨 论

关于匈奴的人种问题一直是考古界关注的热点问题，蒙古说和突厥说一直存在争论。经过近半个世纪的人类学和考古学研究，匈奴主体属于蒙古人种的证据较为充分，至于欧罗巴人种，可能是随着匈奴势力扩张、征服而吸收进来的。西汉初年是匈奴势力最为鼎盛的时期，在冒顿单于的带领下，匈奴“东灭东胡、西击月氏，南并楼烦，北服丁零”，统一了蒙古草原，建立起强大的匈奴帝国。在此扩张期间，匈奴完成了对很多弱小部落或民族的征服，很可能包含有欧罗巴人种的西方部落。近年来的分子考古研究也证明了这个观点。2003年，Keyser-Tracqui等^[9]人对蒙古国Egyin Gol墓地匈奴时期（距今2000年）的62具遗骸进行了常染色体、Y染色体STR和mtDNA分析。常染色体和Y染色体STR主要用于个体之间的亲缘关系鉴定，而mtDNA则用于推测群体的母系起源。研究一共获得46个古代匈奴数据，结果表明89%的匈奴序列属于亚洲单倍型类群，主要有A（17.4%）、B4b（2.2%）、C（13%）、D4（36.9%）、D5/D5a（4.3%）、F1b（8.7%）、G2a（2.2%）和M（4.3%），都是典型的蒙古人种序列，其中频率最高的D4不仅在现代东亚地区最为普遍，而且在古代北方地区也广泛分布，例如在宁夏彭阳县古城镇春秋战国时期的两处墓地^[10]、内蒙古商都东大井墓地东汉时期的拓跋鲜卑遗存中都发现了高频率的D4^[11]。尚有11%的序列属于欧洲单倍型类群，主要有U2（2.2%）、U5a1a（4.4%）和J1（4.4%），是典型的欧罗巴人种序列。2010年，Kim等人对蒙古国东北部Duurlig Nars距今2000年的匈奴贵族墓地的三具遗骸进行了Y-SNP、Y-STR和mtDNA分析，其中一个男性的母系（U2e1）和父系（R1a1）都是常见于印

欧人群的单倍型类群。另外两人, 其中一位是女性, mtDNA为D4型; 另一位是男性, Y-SNP为C3型, mtDNA为D4, 这些单倍型类群广泛分布在东北亚人群中。从上述研究看, 匈奴人的主体还是蒙古人种, 少量的欧罗巴人在2000年前已经到达了东北亚地区^[12]。

T型是欧洲的几个主要特有单倍型类群之一, 在欧洲人群中的分布频率为6%~14%^[13]。T型可进一步分为T1和T2亚型, 每个亚型下面还有许多小型, 如T2可进一步分为T2a、T2b、T2c、T2d、T2e、T2f和T2g^[14]。T2是古老的欧洲世系, 其起源可以追溯到旧石器晚期。在本研究中, 我们获得的匈奴序列属于T世系下T2a1b1小亚型, 共享序列搜索也表明T2a1b1主要分布在欧洲人群中, 而且该型在约4800年前就已经在欧洲出现, 这表明T2a1b1是一个古老的欧洲单倍型类群。先前的研究显示, 在匈奴中发现的欧洲单倍型类群主要是U和J, 此次是首次在匈奴中发现T型。M21号墓主的生活年代在距今2170年, 此时正是匈奴对外征服扩张时期, 具有欧洲单倍型类群的印欧人被吸收进入匈奴部落联盟是正常现象。M21号墓主的体质人类学鉴定为蒙古北亚人种, 由于样本保存问题, 我们没有获得M21号墓主的父系Y染色体信息, 考虑到M21的蒙古北亚人种特征, 我们推测他的父系来源可能是东北亚。在本研究中, 我们的样本数量有限, 仅能够提供局部点的信息, 很难全面反映匈奴人群的遗传结构。因此, 今后开展更多的匈奴人群以及与匈奴起源相关的蒙古高原石板墓居民的母系和父系的古DNA分析, 对于我们揭示匈奴的起源和人种类型将具有重要意义。

附记: 衷心感谢内蒙古自治区文物考古研究所为本研究提供人骨标本及相关研究背景材料。

注 释

- [1] 张全超, 朱泓. 关于匈奴人种问题的几点认识 [J]. 中央民族大学学报, 2006 (6) : 34 ~ 38.
- [2] 朱泓. 人种学上的匈奴、鲜卑与契丹 [J]. 北方文物, 1994 (2) : 7 ~ 13.
- [3] 李法军. 匈奴的语言属性——来自考古学和人种学的线索 [J]. 青海民族研究, 2007 (4) : 20 ~ 25.
- [4] 林干. 关于匈奴、东胡、突厥三大族系人种的探索 [J]. 内蒙古大学学报 (人文社会科学版), 1997 (5) : 7 ~ 16.
- [5] 阿列克谢耶夫, 格赫曼, 杜门. 中央亚细亚古人类学概览 (石器时代—早期铁器时代) 蒙古的考古学民族学和人类学 [M]. 新西伯利亚, 1987: 208 ~ 241.
- [6] 塔拉, 陈永志, 宋国栋等. 蒙古国后杭爱省浩腾特苏木胡拉哈山谷匈奴墓的发掘 [J]. 考古, 2009 (6) : 50 ~ 56.
- [7] Yang D Y, Eng B, Wayne J S, et al. Technical Note: Improved DNA Extraction from Ancient Bones Using Silica-based Spin Columns[J]. *Am J Phys Anthropol.* 1998, 105(4): 539-543.
- [8] Andrews R M, Kubacka I, Chinnery P F, et al. Reanalysis and Revision of the Cambridge Reference

- sequence for human mitochondrial DNA[J]. *Nat Genet.* 1999, 23(2): 147.
- [9] Keyser-Tracqui C, Crubezy E, Ludes B. Nuclear and Mitochondrial DNA Analysis of a 2000-year-old Necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia[J]. *Am J Hum Genet.* 2003, 73(2): 247-260.
- [10] Zhao Y B, Li H J, Cai D W, et al. Ancient DNA from nomads in 2500-year-old archeological sites of Pengyang, China[J]. *J Hum Genet.* 2010, 55(4): 215-218.
- [11] 于长春, 谢力, 张小雷等. 拓跋鲜卑与四个北方少数民族间亲缘关系的遗传学分析 [J] . 东北师大学报 (自然科学版) , 2007 (4) : 121 ~ 126.
- [12] Kim K, Brenner C H, Mair V H, et al. A Western Eurasian Male is Found in 2000-year-old Elite Xiongnu Cemetery in Northeast Mongolia[J]. *Am J Phys Anthropol.* 2010, 142(3):429-440.
- [13] Finnila S, Lehtonen M S, Majamaa K. Phylogenetic Network for European mtDNA[J]. *Am J Hum Genet.* 2001, 68(6): 1475-1484.
- [14] Pike D A, Barton T J, Bauer S L, et al. mtDNA Haplogroup T Phylogeny Based on Full Mitochondrial Sequences[J]. *Journal of Genetic Genealogy.* 2010, 6(1).

Mitochondrial DNA Analysis of M21 Xiongnu Tomb in Hulaha Valley of Mongolia

Cai Dawei Chen Xi Zhao Xin Zhu Hong Zhou Hui

Xiongnu was an ancient nomad in North China. Xiongnu rose to great power in the 3rd century B. C. (Eastern Zhou Dynasty), and began to decline in the 1st century B. C. (Eastern Han Dynasty), ruling the Mongolian Plateau for about three hundred years. The generation, existence and development of Xiongnu play an important role in the history of China, produced profound and far-reaching effects. However, about the race type of the main body of Xiongnu remain in dispute. In order to answer this question at molecular level, we performed ancient mtDNA analysis of M21 Xiongnu tomb in Hulaha Valley of Mongolia. The results indicated that M21 belonged to the Europe Haplogroup T2a1b1. Previous studies showed that only European haplogroups U and J were found in Xiongnu, it was the first time that T was present in Xiongnu. Combined with the previous ancient DNA analysis of Xiongnu populations, we suggested that the main body of Xiongnu belong to Mongoloid, as for the Europoid found in Xiongnu, may be absorbed into Xiongnu during the rapid expansion and the conquest of Xiongnu power.