

• 论 著 •

TGF- β 1 启动子基因多态性与中国人自身免疫性肝病的相关性研究

屠小卿,范列英,朱 烨,周 琳,刘海英,袁 媛,仲人前*

(第二军医大学长征医院实验诊断科,上海 200003)

[摘要] **目的:**探讨 TGF- β 1 启动子基因多态性与中国人自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis,AIH)、原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis,PBC)发病的相关性。**方法:**采用序列特异性引物 PCR(PCR with sequence-specific primers,PCR-SSP)分析 44 例 AIH、95 例 PBC 患者外周血单核细胞基因组 DNA TGF- β 1 启动子-988、-800、-509 基因多态性,并与 220 例正常人比较。**结果:**PBC 组 C-988A 中 CC(88.4%)低于对照组(95.5%)、CA(11.6%)高于对照组(4.0%)($P<0.05$);C-509T 中,C(43.2%)明显下降、T(56.8%)明显升高,CT 降低、TT 升高($P<0.05$);联合分析-988~-800 基因型 C-G/A-G(11.6%)显著高于对照组(4.1%)($P<0.05$)。AIH 组 C-988A 多态性 C(90.9%)下降而 A(9.1%)上升,CC 降低,CA、AA 上升($P<0.05$);其-988~-800 基因单体型 C-G 89.8%降低、A-G(8.9%)升高($P<0.05$);-988~-800 基因型 C-G/C-G 降低而 C-G/A-G(13.6%)显著高于对照组($P<0.05$)。**结论:**PBC、AIH 与-988 位点、-509 位点多态性相关,且与-988~-800 的基因型相关,其作用机制可能均是通过干扰机体正常的免疫调节功能,致使机体对自身抗原的免疫耐受能力降低或丧失。

[关键词] 肝炎,自身免疫性;肝硬化,胆汁性;转化生长因子 β 1;启动子;基因多态性

[中图分类号] R 575.1; R 575.22

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2004)12-1279-05

Genetic association of transforming growth factor- β 1 promoter polymorphisms with autoimmune liver diseases in Chinese

TU Xiao-Qing, FAN Lie-Ying, ZHU Ye, ZHOU Lin, LIU Hai-Ying, YUAN Yuan, ZHONG Ren-Qian* (Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the association between primary biliary cirrhosis(PBC), autoimmune liver disease(AIH) and the promoter polymorphisms of the TGF- β 1 gene at position -988, -800 and -509 in Chinese. **Methods:** We investigated 4 candidate gene loci in 44 patients with AIH, 95 patients with PBC, and 220 healthy controls. The polymorphisms were assessed by the PCR specifically for the single-nucleotide polymorphisms. **Results:** There were differences in the presence of the different alleles and genotypes among the PBC, AIH and the healthy controls. The allele CC of C-988A polymorphism in the group of PBC(88.4%) was lower than that in the healthy group(95.5%), and the allele CA(11.6%) was higher than that in the healthy group(4.0%)($P<0.05$). The allele C of C-509T polymorphism in PBC group(43.2%) decreased significantly and T increased significantly(56.8%); CC decreased but CA and AA increased($P<0.05$). The genotype of -988~-800 C-G/A-G increased significantly in PBC group(11.6%) compared with healthy controls(4.1%)($P<0.05$). The allele C in AIH group(90.9%) of C-988A was lower than healthy group, but allele A(9.1%) was higher($P<0.05$). The homozygote CC was low, but CA and AA was high. The haplotype C-G of -988~-800 was decreased significantly(89.8%) and A-G increased significantly(8.9%)($P<0.05$). The genotype C-G/C-G of -988~-800 was lower and the C-G/C-A was higher(13.6%) than the healthy group($P<0.05$). **Conclusion:** Our findings suggest that there are genetic links of TGF- β 1 polymorphisms of gene loci of -988 and -509 to AIH and PBC. The genotype of -988~-800 is associated with the susceptibility of PBC and AIH. It is predicted that the immune regulation imbalance might cause the immune toleration reduction or loss of the human body.

[KEY WORDS] hepatitis, autoimmune; liver cirrhosis; transforming growth factor- β 1; promoter; gene polymorphism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12): 1279-1283]

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis,AIH)和原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis,PBC)是两组重要的自身免疫性肝病,均主要累及中、老年妇女。同卵双生及家族研究结果显示遗传因素在 AIH、PBC 的发生、发展中起作用^[1,2]。肝纤维化是所有慢性肝病向肝硬化发展的必然病理过程,肝星形细胞(hepatic stellate cells,HSCs)激活又是

肝纤维化形成的重要步骤。因而,控制 HSCs 激活、调节基质蛋白合成和降解已成为肝纤维化的研究焦

[基金项目] 国家自然科学基金(30080027);上海市基础研究重大项目(02JC14005);上海市卫生系统百人跨世纪优秀学科带头人培养基金(沪卫科 9713)。

[作者简介] 屠小卿(1970-),女(汉族),硕士,助理研究员。

*Corresponding author. E-mail:rqzhong@guomai.sh.cn

点。已明确 TGF- β 1 是重要的促 HSCs 活化因子之一^[3]。本研究采用序列特异性引物 PCR (PCR with sequence-specific primers, PCR-SSP) 分析中国人 AIH、PBC 患者外周血单核细胞基因组 DNA TGF- β 1 启动子-988、-800、-509 基因多态性,并与 220 例正常人比较。

1 材料和方法

1.1 研究对象 患者为近 4 年在我院住院或门诊就诊的 44 例 AIH、95 例 PBC 患者。AIH 组中女性 30 例,年龄 16~79 岁,平均年龄(50.21 $\pm$ 16.15)岁;患者均有转氨酶异常 1~2 年、肝炎病毒感染指标阴性、AIH 标志性自身抗体阳性,其中抗核抗体阳性者(效价 1:100 以上)39 例、抗平滑肌抗体阳性 16 例、抗肝肾微粒体抗体阳性 2 例、抗可溶性肝抗原抗体阳性 4 例。PBC 患者组中女性 80 例,年龄 25~79 岁,平均年龄(52.53 $\pm$ 15.22)岁;患者均有转氨酶异常 1~2 年(部分患者同时有碱性磷酸酶升高)、肝炎病毒感染指标阴性、抗线粒体抗体 M2 型

阳性。其中 AIH 组 5 例、PBC 组 9 例患者经肝活检病理确诊。对照组为 220 例正常献血员。

1.2 TGF- β 1 多态性分析 收集患者及正常对照外周抗凝血、分离单核细胞,采用 Qiagen 公司 DNA 纯化试剂盒纯化基因组 DNA。采用 PCR-SSP 方法分析 TGF- β 1 多态性,简要步骤如下:按照 GenBank 上报道的人类 TGF- β 1 序列及其单核苷酸多态性,分别设计 8 条特异性引物(表 1),采用立陶宛 MBI 公司 PCR 试剂合成 TGF- β 1 启动子区部分基因片段(PCR 仪为美国 MJ PTC-200)。产物片段长度分别为 188 bp 和 291 bp,PCR 反应模板 DNA 30~50 ng,引物 1 pmol/ μ l。95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,40 个循环,最后一个循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 PCR 产物在含溴化乙锭的 2.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。设 PCR 内参照 796 bp 的 HLA-DRB1 片段。

1.3 统计学处理 采用 EpiCalc 2000 软件包分析 Fisher 精确概率检验(可从 www.brixtonhealth.com/epicalc.html 下载),检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

表 1 TGF- β 1 启动子 SNPs 特异性引物序列

Tab 1 PCR-SSP primer specificities and sequences for upstream regions of TGF- β 1 gene

Polymorphism specificity		Sequence	Amplicon size (bp)	Denaturing temperature($t/^{\circ}$ C)
-988C	Sense	5'-GCC CCT GGG CAG TTG GC	188	59.6
-988A	Sense	5'-GGC CCC TGG GCA GTT GGA	188	
-800G	Antisense	5'-GGG TGT GGA TGG TGG TGA C	188	
-800A	Antisense	5'-GGG TGT GGA TGG TGG TGA T	188	
-800G	Sense	5'-AGG GAC TCT GCC TCC AAC G	291	61.0
-800A	Sense	5'-AGG GAC TCT GCC TCC AAC A	291	
-509C	Antisense	5'-GGG CAA CAG GAC ACC TGA G	291	
-509T	Antisense	5'-GGG CAA CAG GAC ACC TGA A	291	
HLA-DRB1	Sense	5'-TGC CAA GTG GAG CAC CCA A-3'	796	
	Antisense	5'-GCA TCT TGC TCT GTG CAG AT-3'		

2 结果

采用 SSP 方法分析 TGF- β 1 启动子区域基因多态性(见图 1、图 2)。图 1 显示对照组 C5: -988C 纯合子、-800G 纯合子,表现型为 C-G/C-G; C28: -988C/A 杂合子、-800G 纯合子,表现型为 C-G/A-G; PBC 组患者 P33: -988C 纯合子、-800G/A 杂合子,表现型为 C-G/C-A; AIH 组患者 A27: -988A/A 纯合子、-800G/G 杂合子,表现型为 A-G/A-G。图 2 显示 PBC 组患者 P9: -800G/A 杂合子、-509C 纯合子,表现型为 G-C/A-C; AIH 组患者 A15: -800G 纯合子、-509C 纯合子,表现型为 G-C/G-C; A29: -800G 纯合子、-509T 纯合子,表

现型为 G-T/G-T; 对照组 N203: -800G 纯合子、-509T/C 杂合子,表现型为 G-T/G-C。

将 AIH 和 PBC 患者及正常献血员的 TGF- β 1 基因分布情况进行统计学分析,结果见表 2。PBC 组 C-988A 中 CC(88.4%) 低于对照组(95.5%)、CA(11.6%) 高于对照组(4.0%) ($P<0.05$); C-509T 多态性分别为 43.2%C 和 56.8%T(9.5%CC、64.7%CT 和 23.1%TT) 与对照组 53.2%C 和 46.8%T(9.7%CC、87.4%CT 和 2.9%TT) 比较, C 明显下降、T 明显升高, CT 降低、TT 升高 ($P<0.05$)。联合分析 -988 和 -800: PBC 组单体型 C-G94.2%、A-G5.8%、C-A 0 与对照组的 95.7%、2.5%、1.8% 比较有显著性差异 ($P<0.05$), 而基因

表型 C-G/A-G (11.6%) 显著高于对照组 (4.1%) ($P < 0.05$)。AIH 组 C-988A 多态性分别为 90.9% C 和 9.1% A (CC84.1%、CA13.6% 和 AA2.3%), 与对照组 97.5% C 和 2.5% A (CC95.5%、CA4.0%、AA0.5%) 相比有显著差异, C 下降而 A 上升, CC 降低, CA、AA 上升 ($P < 0.05$)。其 -988~-800 基

因单体型 C-G89.8% 降低、A-G8.9% 升高 ($P < 0.05$); -988~-800 基因表型 C-G/C-G 降低而 C-G/A-G 13.6% 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。两患者组比较, PBC 组 -988CC 较 AIH 组为高, 而 CA 为低 ($P < 0.05$); -509CC、-509TT PBC 组较 AIH 组为高, -509CT 为低 ($P < 0.05$)。

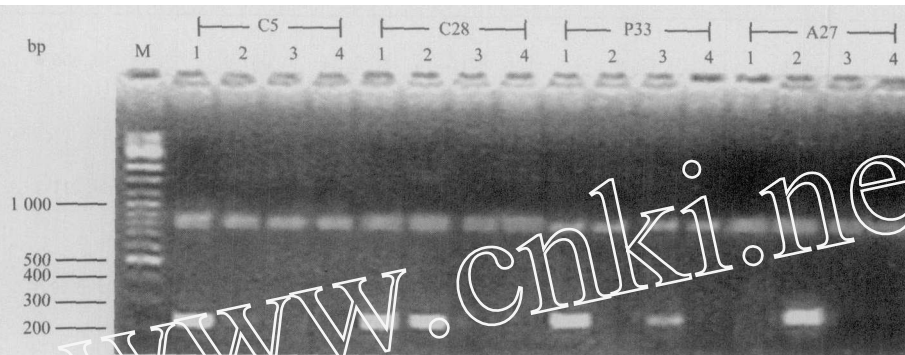


图 1 TGF- β 1 -988、-800 位的 PCR-SSP 结果

Fig 1 Representative examples of PCR-SSP genotyping at positions -988 and -800 of TGF- β 1

M: Marker; 1: -988C, -800G; 2: -988A, -800G; 3: -988C, -800A; 4: -988A, -800A

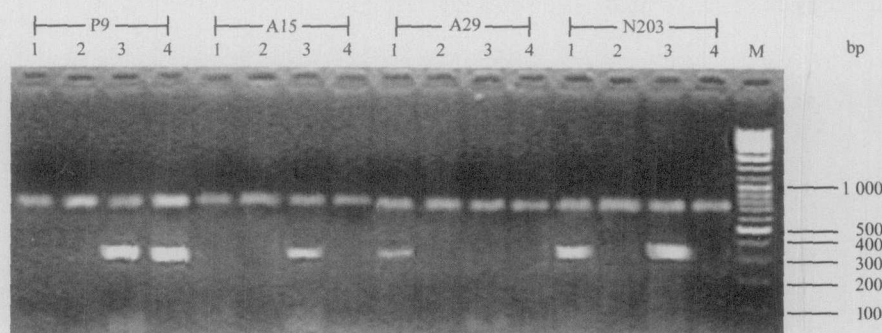


图 2 TGF- β 1 -800、-509 位的 PCR-SSP 结果

Fig 2 Representative examples of PCR-SSP genotyping at positions -800 and -509 of TGF- β 1

1: -800G, -509T; 2: -800A, -509T; 3: -800G, -509C; 4: -800A, -509C; M: Marker

3 讨论

AIH、PBC 的发病机制尚未阐明, 然而现已明确多基因遗传因素与疾病的易感性、病情轻重相关。几个相关基因, 包括 HLA、TNF- α 、补体 C₄、CTLA-4 的基因多态性均与 AIH、PBC 发病及其病情相关, 并且不同人种相关的基因也有差异^[4~7]。但是至今尚未发现一个与自身免疫肝病的病因真正高度相关并影响机体免疫耐受的基因。

TGF- β 1 是一种多功能的细胞活性调节因子, 成熟的 TGF- β 1 同源二聚体分子在胚胎发生、脂肪形成、纤维发生、肌形成、软骨形成、骨发生、上皮细胞分化以及免疫细胞的功能调节方面发挥重要作用。TGF- β 1 多态性位点的存在与多种自身免疫性

疾病相关, 如多发性硬化症^[8]、类风湿性关节炎^[9]、干燥综合征^[10]均有报道与之相关, 但未见启动子区域多态性与自身免疫性疾病相关性的报道。TGF- β 1 启动子的基因型和血浆中的 TGF- β 1 浓度存在相关^[11]。TGF- β 1 启动子中含有 3 个多态性位点, 分别位于 -988C>A、-800G>A、-509C>T。在本研究中我们对 44 例 AIH 和 95 例 PBC 患者的 TGF- β 1 启动子基因多态性进行分析, 并与 220 例正常献血员相比较, 发现 PBC 组 C-988A 中 CC (88.4%) 低于对照组 (95.5%)、CA (11.6%) 高于对照组 (4.0%); C-509T 与对照组比较, C (43.2%) 明显下降、T (56.8%) 明显升高, CT 降低、TT 升高。联合分析 -988 和 -800 基因表型 PBC 组 C-G/A-G (11.6%) 显著高于对照组 (4.1%)。AIH 组与对照

组比较 C-988A 多态性 C (90.9%) 下降而 A (9.1%) 上升, CC 降低, CA、AA 上升。

表 2 中国人 PBC、AIH 及健康正常人 TGF- β 1 启动子区域基因多态性分布

Tab 2 Differential distribution of TGF- β 1 phenotype, allele and genotype frequencies in Chinese patients with PBC and AIH

Genotype	PBC (n=95, %)	AIH (n=44, %)	Control (n=220, %)	PBC vs control		AIH vs control		PBC vs AIH	
				χ^2	P	χ^2	P	χ^2	P
Genotype									
-988C	94.2	90.9	97.5	3.34	0.067 6	7.38	0.006 6	0.58	0.447 8
-988A	5.8	9.1	2.5						
-800G	100	98.9	98.2	2.20	0.138 1	0	1	0.16	0.692 8
-800A	0	1.1	1.8						
-509C	43.2	46.6	53.2	4.94	0.026 2	1.03	0.311 1	0.17	0.684 6
-509T	56.8	53.4	46.8						
Allele									
-988C/C	88.4	84.1	95.5	6.64	0.036 1	7.99	0.018 4	9.63	0.008 1
-988C/A	11.5	13.6	4.0						
-988A/A	0	2.3	0.5						
-800G/G	100	97.7	96.4	3.54	0.059 7	0.21	0.649 1	2.17	0.140 3
-800G/A	0	2.3	3.6						
-509C/C	9.5	2.5	9.7	34.33	0	6.24	0.044 3	7.18	0.027 5
-509C/T	67.4	87.5	87.4						
-509T/T	23.1	10.0	2.9						
Haplotype									
-988--800									
C-G	94.2	89.8	95.7	7.06	0.022 4	9.32	0.009 5	3.25	0.197 3
A-G	5.8	9.1	2.5						
C-A	0	1.1	1.8						
-800--509									
A-T	0	0	0.2	7.19	0.066 0	1.62	0.654 6	3.56	0.168 9
G-T	56.8	53.4	46.6						
A-C	0	1.1	0.9						
G-C	43.2	45.5	52.3						
Phenotype									
-988--800									
C-G/C-G	88.4	81.8	91.8	9.83	0.020 1	8.09	0.044 3	4.57	0.205 8
C-G/A-G	11.6	13.6	4.1						
C-G/C-A	0	2.3	3.6						
A-G/A-G	0	2.3	0.5						
-800--509									
G-T/G-C	67.8	87.5	83.5	7.19	0.066 0	1.62	0.654 6	2.36	0.307 5
A-C/G-C	0	2.5	1.0						
G-C/G-C	9.2	0	10.0						
G-T/G-T	23.0	10.0	4.0						
G-T/A-C	0	0	1.0						
A-T/G-T	0	0	0.5						

联合分析 -988 和 -800 基因单体型 C-G 89.8% 降低、A-G 8.9% 升高; 基因表型 C-G/C-G 降低而 C-G/A-G 13.6% 显著高于对照组。两患者组间比较: PBC 组 -988CC 较 AIH 组为高, 而 CA 为低; -509CC、-509TT PBC 组较 AIH 组为高, -509CT 为低。说明 PBC、AIH 与 -988 位点、-509 位点多态性相关, 且与 -988~-800 的基因表型相关, 两者之间可能存在基因连锁关系。在我们的研究

中发现 C-509T 的多态性的 T 基因频率的升高, 根据 Grainger 等^[12]报道 C-509T 多态性与血浆中的 TGF- β 1 浓度有明显的相关, 血浆中 TGF- β 1 浓度 -509T/T 较 C/T、C/C 为高。推测中国人 AIH、PBC 患者 -509T 基因频率较正常人群高可能与血浆 TGF- β 1 浓度升高相关, 从而导致 HSCs 激活、促进肝纤维化形成, 这有待于进一步的研究证实。同时这些多态性位点是否通过影响 TGF- β 1 启动子启动

活性发挥作用目前还不清楚。我们推测 TGF- β 1 启动子区域基因多态性 PBC、AIH 相关,无疾病特异性,其作用机制可能均是通过干扰机体正常的免疫调节功能,致使机体对自身抗原的免疫耐受能力降低或丧失。

参考文献

- [1] Jones DE, Watt FE, Metcalf JV, et al. Familial primary biliary cirrhosis reassessed: a geographically-based population study [J]. *J Hepatol*, 1999, 30(3):402-407.
- [2] Brind AM, Bray GP, Portmann BC, et al. Prevalence and pattern of familial disease in primary biliary cirrhosis [J]. *Gut*, 1995, 36(4):615-617.
- [3] Dooley S, Delvoux B, Lahme B, et al. Modulation of transforming growth factor β response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts [J]. *Hepatology*, 2000, 31(5):1094-1106.
- [4] Czaja AJ, Strettell MD, Thomson LJ, et al. Associations between alleles of the major histocompatibility complex and type 1 autoimmune hepatitis [J]. *Hepatology*, 1997, 25(2):317-323.
- [5] 邱德凯, 马雄. 上海地区 I 型自身免疫性肝炎与 HLA-DRB1 等位基因的相关性研究 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2002, 10(5):347-349.
- Qiu DK, Ma X. Relationship between type 1 autoimmune hepatitis and alleles of HLA-DRB1 in Chinese patients of Shanghai area [J]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi (Chin J Hepatol)*, 2002, 10(5):347-349.
- [6] Agarwal K, Czaja AJ, Jones DE, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis [J]. *Hepatology*, 2000, 31(1):49-53.
- [7] Agarwal K, Jones DE, Daly AK, et al. CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to primary biliary cirrhosis [J]. *J Hepatol*, 2000, 32(4):538-541.
- [8] Green AJ, Barcellos LF, Rimmler JB, et al. Sequence variation in the transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) gene and multiple sclerosis susceptibility [J]. *J Neuroimmunol*, 2001, 116(1):116-124.
- [9] Sugiura Y, Niimi T, Sato S, et al. Transforming growth factor beta 1 gene polymorphism in rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2002, 61(9):826-828.
- [10] Ohtsuka T, Yamakage A, Yamazaki S. The polymorphism of transforming growth factor-beta 1 gene in Japanese patients with systemic sclerosis [J]. *Br J Dermatol*, 2002, 147(3):458-463.
- [11] Luedecking EK, DeKosky ST, Mehdi H, et al. Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor-beta 1 gene and the risk of Alzheimer's disease [J]. *Hum Genet*, 2000, 106(5):565-569.
- [12] Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, et al. Genetic control of the circulation concentration of transforming growth factor type β 1 [J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(1):93-97.

[收稿日期] 2004-07-23

[修回日期] 2004-10-11

[本文编辑] 曹静

• 个案报告 •

以脾梗死为主要表现的急性早幼粒细胞白血病一例报告

Acute promyelocytic leukemia with splenic infarction as main manifestation: a case report

吕书晴, 冯曹波, 许晓倩, 王健民

(第二军医大学长海医院血液科, 上海 200433)

[关键词] 脾梗死; 白血病, 早幼粒细胞性, 急性; 体征和症状

[中图分类号] R 733.71 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2004)12-1283-01

1 临床资料 患者男性, 20岁。因左上腹痛伴发热 6 d 于 2004 年 4 月 6 日收入我院普外科。既往无传染病史, 1 个月前在当地医院诊断为“白细胞减少症”, 当时骨髓检查未见明显异常, 2 周前复查血常规正常。查体: T 38.1℃, 皮肤黏膜无淤点、淤斑, 浅表淋巴结无肿大, 心肺(一), 腹平坦, 左上腹压痛明显, 肝肋下未及, 脾肋下约 0.5 cm 可触及, 腹水征(一)。入院后胸片未见异常, 腹部 B 超示脾脏增大, 总长 13.9 cm, 脾门厚 4.8 cm, 脾内可见片状不规则低回声区, 可见散在的点状高回声, 彩色显示未见明显血流信号, 提示脾梗死。血常规 WBC $7.35 \times 10^9/L$, 原粒 0.16, 早幼粒 0.44, 中性杆核 0.02, 中性多核 0.06, 淋巴 0.30, 单核 0.02, 晚红 0.02, HGB 127 g/L, PLT $103 \times 10^9/L$ 。肝功 TBIL 20.2 $\mu\text{mol/L}$, DBIL

9.3 $\mu\text{mol/L}$, ALT 40 U/L。出凝血指标 PT 17.0 s, PT 对照 12.8 s, APTT 35.6 s, APTT 对照 35.0 s。入院后经抗感染、解痉、补液等治疗, 患者腹痛缓解, 体温下降, 为进一步诊治于 2004 年 4 月 13 日转入我科。转入后查体: T 37.2℃, 皮肤黏膜无淤点、淤斑, 浅表淋巴结无肿大, 胸骨中下段轻度压痛, 心肺(一), 腹平坦, 无压痛, 肝肋下未及, 脾肋下约 0.5 cm 可触及, 腹水征(一)。CT 检查: 脾脏增大, 脾内大片地图样低

(下转第 1313 页)

[作者简介] 吕书晴(1972-), 女(汉族), 硕士, 主治医师。
E-mail: lvshu7219@hotmail.com