

TGF- β 1 基因多态性与肝炎后肝纤维化的相关性研究

王 皓¹, 杨再兴¹, 高春芳^{1*}, 万漠彬², 王晓今³, Senait Mengsteab⁴, Axel M. Gressner⁴, Ralf Weiskirchen⁴

(1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003; 2. 第二军医大学长海医院感染科, 上海 200433; 3. 中国人民解放军第 85 医院传染科, 上海 200031; 4. Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, RWTH University Hospital Aachen D52074, Germany)

[摘要] 目的: 探讨 TGF- β 1 基因多态性与肝炎后肝纤维化的关系。方法: 以实时荧光 PCR 结合熔点曲线分析, 建立可高通量检测 TGF- β 1 编码区 3 个单核苷酸多态性(SNPs)位点的 LightCycler 方法, 这 3 个位点分别为 Leu10Pro(T>C)、Arg25Pro(G>C)、Thr263Ile(C>T), 并对亚洲人群中 HBV 感染导致的肝纤维化患者(90 例)及高加索人群中 HCV 感染导致的肝纤维化患者(210 例)进行 SNP 分析, 并分别与 104 例亚洲人群和 50 例高加索人群正常献血员进行比较。结果: 亚洲人群中病患组与正常对照组 TGF- β 1 编码区第 25、263 位氨基酸皆无基因多态性, 与高加索人群的检测结果有显著差异; 而亚洲人群第 10 位氨基酸基因多态性出现频率相对较高, 病患组(T/C=0.444/0.556)较正常对照组(T/C=0.514/0.486)突变频率稍高, 但无显著差异。在高加索人群 HCV 感染导致的肝纤维化患者中第 10、25 位氨基酸基因多态性出现的频率与肝纤维化发展程度(average METAVIR-Score)密切相关。结论: 提示 TGF- β 1 基因多态性与高加索人群肝炎后肝纤维化的发生具有重要相关性; 与亚洲人群肝炎后肝纤维化发生的相关性有待进一步研究。

[关键词] 转化生长因子 β 1; 基因多态性; 肝炎; 肝纤维化

[中图分类号] R 575.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)12-1284-04

Transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms in Caucasians and Asians with post hepatitis fibrosis

WANG Hao¹, YANG Zai-Xing¹, GAO Chun-Fang^{1*}, WAN Mo-Bin², WANG Xiao-Jin³, Senait Mengsteab⁴, Axel M. Gressner⁴, Ralf Weiskirchen⁴ (1. Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Infectious Diseases, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Department of Infectious Diseases, No. 85 Hospital of PLA, Shanghai 200031; 4. Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, RWTH University Hospital Aachen D52074, Germany)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the association between polymorphisms at coding region of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) gene and post hepatitis fibrosis in Caucasians and Asians. **Methods:** A novel approach for analyzing the polymorphisms of TGF- β 1 gene was developed by combining real time fluorescence PCR and melting curve analysis in LightCycler system. Leu10Pro(T>C), Arg25Pro(G>C) and Thr263Ile(C>T) of TGF- β 1 were analyzed with the above mentioned approach. The TGF- β 1 genotypes were determined in Caucasians(210) and Asians(90) with post hepatitis fibrosis and the results were compared with those of 104 Asian normal controls and 50 Caucasian normal controls. **Results:** There was no gene polymorphisms at codon 25 and 263 in the Asian ancestry, which was significantly different from that of Caucasians. Meanwhile, in Asians the frequency of C at codon 10 was higher in patients with chronic hepatitis C infection(T/C=0.444/0.556) than in that of the controls(T/C=0.514/0.486), but the difference was not statistically significant. In Caucasians, the frequencies of genetic variations at codon 10 and codon 25 in patients with chronic hepatitis C infection were closely associated with the progression of liver fibrosis(Average METAVIR-Scores). **Conclusion:** This study suggests that TGF- β 1 polymorphisms are associated with fibrosis progression in hepatitis C in the Caucasians, while its association with liver fibrosis in Asians remains to be further confirmed.

[KEY WORDS] transforming growth factor- β 1; gene polymorphism; hepatitis; liver fibrosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12):1284-1287]

临床上由肝炎病毒感染引起慢性肝炎, 进而发展为肝纤维化、肝硬化的病例较为多见, 目前有关这类疾病的形成机制尚不清楚, 其治疗也是临床棘手的难题。肝纤维化是肝细胞外基质异常过度沉积的结果, 其过程十分复杂, 受遗传、环境等多种因素的影响。临床上可以观察到肝纤维化的形成具有一定

的“体质性”, 即不同的患者对相同病症表现出不同的转归, 这可能与患者的遗传背景有关。TGF- β 1 是已经明确的与肝纤维化的形成密切相关的细胞因

[基金项目] 国家自然科学基金(30270605)。

[作者简介] 王 皓(1972-), 男(汉族), 主管技师。

*Corresponding author. E-mail: wanggaob@online.sh.cn

子,可以通过刺激细胞外基质的合成并抑制其降解而促进肝纤维化的形成^[1~3]。研究表明,TGF- β 1 基因编码区至少存在3个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点,即 Leu10Pro (T>C)、Arg25Pro (G>C)、Thr263Ile (C>T)。本研究以实时荧光 PCR 结合熔点曲线分析,建立可高通量检测 TGF- β 1 编码区3个 SNPs 位点的 Light-Cycler 方法,并对亚洲人群中 HBV 感染导致的肝纤维化患者及高加索人群中 HCV 感染导致的肝纤维化患者进行 SNP 分析,进而探讨可能存在的 SNPs 位点与肝炎后肝纤维化的关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象 90例乙肝后肝纤维化亚洲人群患者分别为中国人民解放军第85医院、第二军医大学长海医院患者。其中男72例,女18例,平均年龄(47.8 $\pm$ 11.0)岁,均排除其他肝炎病毒感染和乙醇、药物等其他原因引起肝纤维化的可能。104例对照均为上海市献血中心献血员,其中男80例,女24例,平均年龄(30.5 $\pm$ 10.1)岁。210例丙肝后肝纤维化高加索人群患者分别来自德国 Regensburg 大学医院($n=141$)和 RWTH 大学医院($n=69$),其中200例患者肝穿刺活检病理结果已经 METAVIR 系统(METAVIR-Score)记分评级,分值愈高则纤维化程度亦愈高^[4,5]。50例对照均为高加索人群正常献血员。

1.2 主要仪器及试剂 LightCycler 实时荧光 PCR 仪为德国 Roche 公司产品;荧光 PCR 反应试剂盒 LC-FastStart DNA Master 为 Roche 公司产品;DNA 抽提采用德国 Qiagen 公司 Qiaamp DNA Blood Mini extraction 试剂盒;引物及荧光探针分别由德国 MWG-Biotech AG 公司与 Metabion 公司合成;测序仪为 ABI PRISM 310;测序试剂盒为 Big Dye Termination Reaction Cycle Sequenceing Kit。

1.3 标本采集 分别抽取肝炎后肝纤维化患者和正常献血者全血3ml,以 EDTA 抗凝。3 000 $\times g$ 离心10 min 后,分离血浆和有形细胞层,将血浆冻存于-70 $^{\circ}\text{C}$,以备用于相应的血浆成分检测;有形细胞层,用于基因组 DNA 的提取。

1.4 模板 DNA 的抽提 采用 Qiagen DNA 抽提试剂盒按照操作说明进行抽提。

1.5 TGF- β 1 基因多态性分析 TGF- β 1 编码区3个 SNPs 位点 Leu10Pro (T>C)、Arg25Pro (G>C)、Thr263Ile (C>T)的引物、荧光探针及反应条件分别为:(1)Leu10Pro (T>C)上游引物 5'-CTA

GGT TAT TTC CGT GGG-3',下游引物 5'-CCT TGG CGT AGT AGT CG-3',锚链探针 5'-TCC CCC ATG CCG CCC TCC GGG CT-Fluo-3',检测探针 5'-LCRed640-CGG CTG CTG CCG CTG CT-P-3';(2)Arg25Pro (G>C)上游引物 5'-CTA GGT TAT TTC CGT GGG-3',下游引物 5'-CCT TGG CGT AGT AGT CG-3',锚链探针 5'-GCT ACC GCT GCT GTG GCT ACT GGT GCT-Fluo-3',检测探针 5'-LCRed640-ACG CCT GGC CCG CCG-P-3';(3)Thr263Ile (C>T)上游引物 5'-AAG CAG GGT TCA CTA CCG GC-3',下游引物 5'-AGG CCT CCA TCC AGG CTA CA-3',锚链探针 5'-LCRed640-GAG AGG GCC CAG CAT CTG CAA AGC T-P-3',检测探针 5'-ATG GCC ACC CCG CT-Fluo-3';反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 预变性,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,45 个循环,降温至 45 $^{\circ}\text{C}$ 后,以每秒 0.2 $^{\circ}\text{C}$ 的速率上升至 78 $^{\circ}\text{C}$ 进行熔点曲线检测。反应总体积 20 μl ,终浓度分别为 1 $\times$ LC-Fast-Start DNA Master Buffer,3 mmol/L MgCl_2 ,锚链探针和检测探针 0.2 $\mu\text{mol/L}$,上游、下游引物各 0.5 $\mu\text{mol/L}$,5%(V/V) DMSO。GenBank Accession NO. X05839 (Leu10Pro、Arg25Pro)、X05844 (Thr263Ile)。

1.6 序列测定 将 PCR 反应产物电泳并割胶纯化,ABI PRISM 310 测序仪测序证实 LightCycler 实时荧光 PCR 检测 SNP 的结果。

1.7 统计学处理 基因频率采用基因计数法计算;组间基因型及等位基因频率的比较采用 χ^2 检验;主要应用 EpiCalc 2000 Version 1.02 进行统计学处理。

2 结果

2.1 建立检测 TGF- β 1 基因 SNP 位点的实时荧光 PCR 结合熔点曲线分析法 以 LightCycler 实时荧光 PCR 来检测 SNP 位点,探针的设计为荧光共振能量转移法(FRET),ANCHOR 锚链探针标记荧光素,SENSOR 检测探针标记红荧光,以检出荧光的强弱来反映产物的多少;PCR 后结合熔点曲线分析,由于单核苷酸的改变可使荧光探针与 PCR 产物结合的 T_m 值发生变化(熔点曲线漂移),进而可从熔点曲线图得出 SNP 结果(图1)。经测序证实该方法可靠、快速,适合于高通量标本的检测(图2)。本研究建立了检测 TGF- β 1 编码区3个 SNP 位点 Leu10Pro (T>C)、Arg25Pro (G>C)、Thr263Ile (C>T)的 LightCycler 方法。

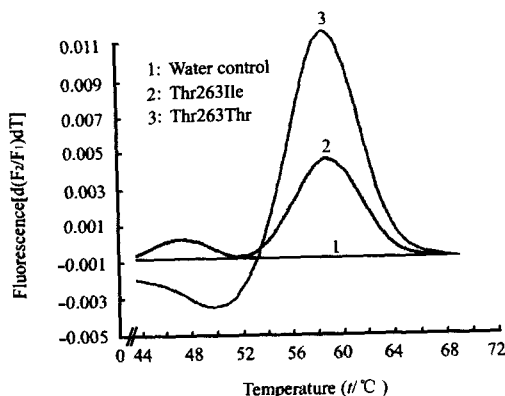


图 1 Thr263Ile(C>T) 位点熔点曲线图

Fig 1 Melting curve of Thr263Ile(C>T)

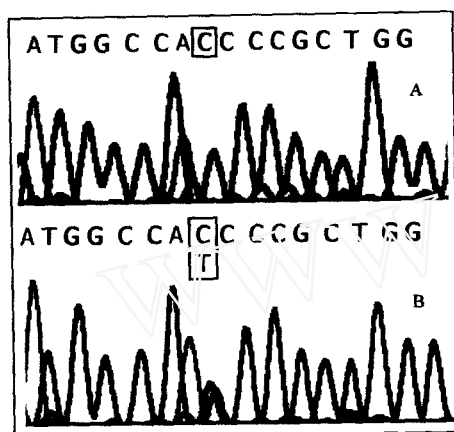


图 2 Thr263Ile(C>T) 位点 SNP 测序图

Fig 2 Thr263Ile(C>T) SNP sequence map

A: Thr263Thr; B: Thr263Ile

2.2 TGF- β 1 编码区 3 个 SNP 位点基因型在亚洲人群、高加索人群的肝纤维化组和对照组分布情况 亚洲人群中肝炎后肝纤维化组与正常对照组 TGF- β 1 编码区第 25、263 位氨基酸皆无基因多态性,与高加索人群的检测结果有显著差异($P < 0.01$);亚洲人群第 10 位氨基酸基因多态性出现频率相对较高,104 例正常对照样本第 10 位氨基酸基

因型 TT、TC 和 CC 分别为 29(27.9%)、49(47.1%)和 26(25.0%),而高加索人群 50 例正常对照样本第 10 位氨基酸基因型分别为 19(38.0%)、27(54.0%)和 4(8.0%),也显示该两个种群在基因型上有显著差异($P < 0.05$)。亚洲人群中乙肝后肝纤维化组 TGF- β 1 编码区第 10 位氨基酸基因型 TT、TC 和 CC 分别为 21(23.3%)、38(42.2%)和 31(34.5%),正常对照组分别为 29(27.9%)、49(47.1%)和 26(25.0%),肝纤维化组与正常对照组相比多态性出现频率相对较高,但无显著差异。

高加索人群丙肝后肝纤维化组 TGF- β 1 编码区第 10 位氨基酸基因型 TT、TC 和 CC 分别为 87(41.4%)、100(47.6%)和 23(10.0%),正常对照组为 19(38.0%)、27(54.0%)和 4(8.0%);丙肝后肝纤维化组第 25 位氨基酸基因型 GG、GC 分别为 178(84.8%)、32(15.2%),对照组为 42(84.0%)、8(16.0%);第 263 位氨基酸基因型 CC、CT 分别为 196(93.3%)、14(6.7%),对照组为 45(90.0%)、5(10.0%);皆无显著差异。

由于人类基因组计划大多由西方人完成,故在基因库中的 SNP 结果,大多来自高加索人群,我们的实验结果的确证实了东西方人群的基因差异,亚洲人群中病患组与正常对照组 TGF- β 1 编码区第 25、263 位氨基酸皆无基因多态性,与高加索人群的检测结果有显著差异($P < 0.01$);而亚洲人群正常对照组(T/C=0.514/0.486)与高加索人群正常对照组(T/C=0.650/0.350)相比 TGF- β 1 编码区第 10 位氨基酸等位基因多态性出现频率较高,有显著差异($P < 0.05$)。结果皆显示东西方人群在基因型上有显著差异。本研究结果还显示亚洲人群 HBV 感染导致的肝纤维化组(T/C=0.444/0.556)较正常对照组(T/C=0.514/0.486)TGF- β 1 编码区第 10 位氨基酸等位基因多态性突变频率稍高,但无显著差异(表 1)。

表 1 亚洲和高加索地区肝炎后肝纤维化患者的 TGF- β 1 等位基因频率Tab 1 TGF- β 1 allelic frequencies in Asians and Caucasians with hepatic fibrosis after hepatitis

Polymorphic site	Asians			Caucasians		
	Total (n=194)	Controls (n=104)	Patients (n=90)	Total (n=260)	Controls (n=50)	Patients (n=210)
Codon 10(T/C)	0.502/0.498	0.514/0.486	0.444/0.556	0.652/0.348	0.650/0.350	0.652/0.348
Codon 25(G/C)	1/0	1/0	1/0	0.923/0.077	0.920/0.080	0.924/0.076
Codon 263(C/T)	1/0	1/0	1/0	0.963/0.037	0.950/0.050	0.967/0.033

高加索人群丙肝后肝纤维化患者的 METAVIR 平均记分 TGF- β 1 第 25 位氨基酸杂合子基因型组(Arg25Pro=2.000 $\pm$ 1.160)高于未突

变的纯合子基因型组(Arg25Arg=1.698 $\pm$ 1.017);且在第 25 位氨基酸纯合子基因型(Arg25Arg)组中,相关联的 TGF- β 1 第 10 位氨基酸各基因型的

METAVIR 评分为:突变的纯合子组(Pro10Pro= 1.909 ± 1.044)>杂合子组(Leu10Pro= 1.789 ± 1.011)>未突变的纯合子组(Leu10Leu= 1.585 ± 1.018)。

3 讨 论

TGF- β 1 是一种强效的促纤维化的细胞因子,可以通过刺激细胞外基质的合成并抑制其降解而促进纤维化的形成。因此,TGF- β 1 与多种组织或器官的纤维化性疾病密切相关,并以肝纤维化最为令人关注。人类的 TGF- β 1 基因定位于染色体 19q13,由 7 个外显子和 6 个内含子组成,TGF- β 1 基因至少存在 8 个 SNP 位点,它们的定位分别是-988(C>A)、-800(G>A)、-509(C>T)、+72 插入 C、第 4 个内含子缺失 C、第 10 位氨基酸密码子(C T G>C C G, Leu>Pro)、第 25 位氨基酸密码子(C G G>C C G, Arg>Pro)、第 263 位氨基酸密码子(A C C>A T C, Thr>Ile)^[3,6]。在 8 个 SNPs 位点中,我们选择了 TGF- β 1 编码区的 3 个 SNPs 位点,其中第 10 位(Leu10Pro T869C)与第 25 位(Arg25Pro G915C)的氨基酸基因多态性皆位于 TGF- β 1 的信号肽区,有文献报道^[7]其中第 10 位信号肽氨基酸由 Leu 突变为 Pro 后,可使 TGF- β 1 的表达量提高 2.8 倍。而第 263 位(Thr263Ile C1632T)氨基酸位于成熟 TGF- β 1(112AA)与 TGF- β 1 潜活相关多肽(LAP)裂解位点的附近,可能与 TGF- β 1 的活性相关。在此我们以实时荧光 PCR 结合熔点曲线分析,建立了可检测 SNPs 位点的 LightCycler 方法,经测序证实该方法可靠、快速,适合于高通量标本的检测。该方法避免了以往方法所需时间较长、酶切反应是否完全、扩增较难控制等缺点,并可将其推向临床检测。

高加索人群丙肝后肝纤维化组较对照组 TGF- β 1 编码区基因多态性突变频率相类似,无显著差异。有文献报道^[11]在高加索人群 HCV 感染导致的肝纤维化患者中,如第 25 位氨基酸基因表现为杂合子基因型(Arg25Pro),重度肝纤维化患者(METAVIR-Score 3~4)为中度纤维化患者(METAVIR-Score 0~2)的 2 倍。本研究结果显示 TGF- β 1 第 25 位氨基酸杂合子基因型(Arg25Pro)组的 METAVIR 平均记分高于未突变的纯合子基因型组(Arg25Arg);且在第 25 位氨基酸纯合子基因型组(Arg25Arg)中,相关联的 TGF- β 1 第 10 位

氨基酸各基因型的 METAVIR 评分为:突变的纯合子组(Pro10Pro)>杂合子组(Leu10Pro)>未突变的纯合子组(Leu10Leu),结果提示在高加索人群 HCV 感染导致的肝纤维化患者中第 10、25 位氨基酸基因多态性出现的频率与肝纤维化发展程度(average METAVIR-Score)密切相关。

本研究提示 TGF- β 1 基因多态性与高加索人群肝炎后肝纤维化的发生具有重要相关性;其与亚洲人群肝炎后肝纤维化发生的相关性,有待通过增加检测样本量并与组织学对照来进一步研究。本研究为进一步探讨肝纤维化的发病机制及预测肝纤维化的发生及进展程度提供了基因学基础。

[参 考 文 献]

- [1] Elche GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(18):1350-1358.
- [2] Bachem MG, Meyer D, Melchior R, et al. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblast like cells. A potential mechanism of self-perpetuation in liver fibrogenesis[J]. *J Clin Invest*, 1992, 89(1):19-27.
- [3] Gewaltig J, Mangasser-Stephan K, Gartung C, et al. Association of polymorphisms of the transforming growth factor- β 1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2002, 316(1-2):83-94.
- [4] Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group[J]. *Hepatology*, 1994, 20(1):15-20.
- [5] Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group[J]. *Hepatology*, 1996, 24(2):289-293.
- [6] Bataller R, North, KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal[J]. *Hepatology*, 2003, 37(3):493-503.
- [7] Dunning AM, Ellis PD, McBride S, et al. A transforming growth factor beta 1 signal peptide variant increases secretion *in vitro* and is associated with increased incidence of invasive breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(10):2610-2615.
- [8] Holla LI, Fassmann A, Benes P, et al. 5 polymorphisms in the transforming growth factor-beta 1 gene(TGF- β 1)in adult periodontitis[J]. *J Clin Periodontol*, 2002, 29(4):336-341.
- [9] Tag CG, Mengsteab S, Hellerbrand C, et al. Analysis of the transforming growth factor- β 1(TGF- β 1) codon 25 gene polymorphism by LightCycler-analysis in patients with hepatitis C infection[J]. *Cytokine*, 2003, 24(5):173-181.

[收稿日期] 2004-07-23

[修回日期] 2004-09-29

[本文编辑] 曹 静