

TGF- β 1 基因多态性对乙肝肝纤维化的影响杨再兴¹, 王 皓¹, 万谋彬², 王晓今³, 徐玲玲¹, 赵文静¹, 高春芳^{1*}

(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. 解放军第 85 医院传染科, 上海 200052)

[摘要] **目的:**探讨 TGF- β 1 基因-509C>T 多态性与乙肝肝纤维化的关系及其对血浆 TGF- β 1 浓度的影响。**方法:**应用 ARMS-PCR 结合测序的方法,测定 92 例健康对照组和 93 例乙肝患者(肝纤维化组)TGF- β 1 基因-509 位点的单核苷酸多态性,并确定其基因型和等位基因频率的分布;ELISA 法检测血浆中 TGF- β 1 和 IV 型胶原的浓度,放射免疫法检测血浆中透明质酸和 III 型前胶原 N 端肽的浓度。**结果:**TGF- β 1-509 位点基因型及等位基因分布频率在肝纤维化组和正常对照组中并无显著差异,-509CC 基因型在肝纤维化程度比较高的 Child-Pugh C 级组中分布频率明显高于 TT 基因型($P<0.05$)。肝纤维化组中的血浆 TGF- β 1、IV 型胶原、透明质酸及 III 型前胶原 N 端肽的浓度显著高于对照组($P<0.05$)。在对照组中,血浆 TGF- β 1 浓度在-509 位点两种基因型之间并无明显差别;而在肝纤维化组中,-509CC 基因型者血浆 TGF- β 1 浓度显著高于 TT 基因型者($P<0.01$)。**结论:**TGF- β 1 基因-509 C>T 多态性与肝纤维化的发生没有密切关系,但与肝纤维化的进展程度相关;该多态性影响肝纤维化患者血浆中 TGF- β 1 的浓度。

[关键词] 转化生长因子 β 1; 基因多态性; 肝纤维化; 肝炎, 乙型**[中图分类号]** R 575.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)12-1288-04Effect of polymorphism C>T at position -509 of transforming growth factor- β 1 gene on HBV-induced liver fibrosisYANG Zai-Xing¹, WANG Hao¹, WAN Mo-Bin², WANG Xiao-Jin², XU Ling-Ling³, ZHAO Wen-Jing³, GAO Chun-Fang^{1*}

(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, PLA Nanjing Military Area Command, Shanghai 200052)

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the association of polymorphism C>T at -509 of TGF- β 1 gene with liver fibrosis induced by HBV and the effect of this polymorphism on plasma concentration of TGF- β 1. **Methods:** Ninety-two healthy blood donors and 93 patients with HBV-induced liver fibrosis were studied. The patients were further classified into 3 groups (A, B and C) according to Child-Pugh classification. The polymorphism at position -509 of TGF- β 1 gene was analyzed by ARMS-PCR and sequence analysis. Concentrations of TGF- β 1, collagen type IV, hyaluronan, N-terminal type III procollagen peptide in plasma were measured, the former 2 by ELISA and the latter 2 by RIA. **Results:** No significant difference of -509C>T polymorphism between the diseased and control group was found in this study. The frequency of C allele was significantly higher than that of T allele in Child-Pugh C grade. The TGF- β 1 plasma concentrations did not show any difference between carriers of -509CC and TT genotypes in control groups. Conversely, the concentrations were statistically lower in populations with TT genotype than in those with CC genotype in diseased group. **Conclusion:** There is no relationship between -509C>T polymorphism of TGF- β 1 and liver fibrosis in Chinese populations, but the presence of C allele at position -509 may play an important role in the progression of liver fibrosis and may influence plasma concentration of TGF- β 1 in patients with liver fibrosis.

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

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12):1288-1291]

由乙型肝炎病毒感染引起慢性肝炎,进而发展为肝纤维化,是我国大部分肝纤维化患者的病程。该过程很复杂,有多种因子参与,受多种因素影响。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。该因子在血浆中的浓度是否受其基

[基金项目] 国家自然科学基金(30270605)。**[作者简介]** 杨再兴(1978-),男(满族),硕士生。

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

因多态性的影响值得系统研究。本研究主要探讨 TGF- β 1 基因调控区 -509C>T 多态性与乙肝后肝纤维化的关系及其对血浆中 TGF- β 1 浓度的影响,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分子生物学基础。

1 材料和方法

1.1 研究对象 93 例乙肝后肝纤维化患者分别为解放军第 85 医院、第二军医大学长海医院患者。其中男 66 例,女 27 例,平均年龄(47.4 $\pm$ 10.7)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。根据 Child-Pugh 分级^[1],93 例肝纤维化患者分为 A 级、B 级、C 级 3 组,其中 A 组 18 例,B 组 35 例,C 组 40 例,92 例对照均为上海市献血中心献血员,其中男 63 例,女 24 例,平均年龄(29.5 $\pm$ 10.1)岁。

1.2 主要仪器及试剂 PE-9600 PCR 仪为美国 PE 公司产品,GIS-2010 凝胶成像系统为天能科技(上海)有限公司产品。DNA 抽提采用德国 Qiagen 基因有限公司试剂盒;Taq DNA 聚合酶、pfu DNA 聚合酶、dNTPs 和 DNA marker 均为晶美生物工程有限公司产品;引物由上海基康生物技术有限公司合成;PCR 产物胶回收采用上海华舜生物工程有限公司试剂盒;血浆 TGF- β 1 检测试剂盒购自于晶美生物公司;Ⅲ型胶原(ⅢC)检测试剂盒购自于上海华泰生物工程实业有限公司;透明质酸(HA)检测试剂盒购自于上海生物技术研究中心;Ⅲ型前胶原 N 端肽(PⅢNP)购自于芬兰 ORION 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 分别抽取乙肝后肝纤维化患者和正常献血者全血 5 ml,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℃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。

1.3.2 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。

1.3.3 PCR 扩增 包含-509 位点的大片段(-1065 bp~-271 bp) 扩增大片段:利用 Primer5.0 软件,设计正义引物:5'-CTC CAT TTC CAG GTG TGG TCC CA-3'反义引物:5'-CAC CAA AGC GGG TGA TCC AGA T-3'。PCR 反应总体积为 50 μ l,其中 10 $\times$ Buffer [Mg²⁺]5 μ l,Mg-Cl₂ 浓度为 1.5 mmol/L,4 $\times$ dNTPs 浓度为 0.2 mmol/L,正义、反义引物各 0.5 mmol/L,模板 DNA

4 μ l,pfu DNA 聚合酶 2.5 U。PCR 的反应条件为:94℃ 5 min;94℃ 45 s,60℃ 45 s,72℃ 1.5 min,共进行 35 个循环;72℃ 5 min。胶回收目的片段:扩增产物经 1.5%琼脂糖电泳,EB 染色,于紫外灯下观察结果、照相并切胶目的条带。采用胶回收试剂盒按照操作说明回收目的片段,溶于 30 μ l 蒸馏水中。取 20 μ l 测序,剩余部分准备用于下一步实验。

1.3.4 扩增难控性突变系统(polymerase chain reaction-amplification refractory mutation system, PCR-ARMS) 参考相关文献^[2]设计-509 位点的特异性引物,即:5'-GCC TCC TGA CCC TTC CAT CC C-3',5'-GCC TCC TGA CCC TTC CAT CC T-3',其中下划线部分为该位点可能存在的碱基形式;反义引物为:5'-CAC CAA AGC GGG TGA TCC AGA T-3'。PCR 反应体系为:总体积为 25 μ l,包括 2.5 μ l 10 $\times$ Buffer [Mg²⁺],1.5 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L 4 $\times$ dNTPs,正义、反义引物各 0.5 mmol/L,大片段扩增产物作为模板,加入量为 1 μ l,Taq 聚合酶 2.5 U。PCR 的反应条件均为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,63℃ 30 s,72℃ 1 min,共进行 30 个循环;72℃ 5 min。扩增产物经含 EB 的 2%琼脂糖凝胶电泳,于紫外灯下观察结果并拍照,根据电泳结果初步鉴定等位基因型。

1.3.5 确定基因型 将特异性扩增结果与测序结果相对照,最终确定各个样本的等位基因型。

1.3.6 血浆 TGF- β 1、ⅢC、HA 及 PⅢNP 浓度的检测 TGF- β 1 和 ⅢC 的检测采用 ELISA 方法,HA 和 PⅢNP 的检测采用放免法,均按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 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;组间各血浆成分的比较采用秩和检验;肝纤维化组内各血浆成分之间相关性的检测采用直线相关分析;不同基因型患者血浆 TGF- β 1 浓度的比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 确定 TGF- β 1 -509 位点基因型 将 ARMS-PCR 结果与测序结果相对照,最终可知 TGF- β 1 基因存在-509 T>C 多态性,存在-509TT 和-509CC 两种纯合子基因型,但并不存在-509T/C 杂合子基因型。见图 1 及图 2。

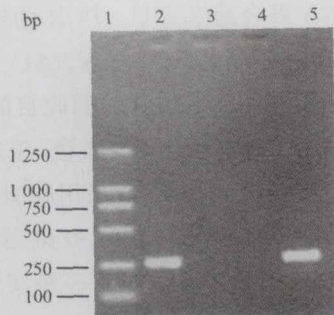


图1 ARMS-PCR产物电泳结果

Fig 1 Gel electrophoresis for ARMS-PCR product

1: DNA marker; 2, 4: Sense primer T; 3, 5: Sense primer C

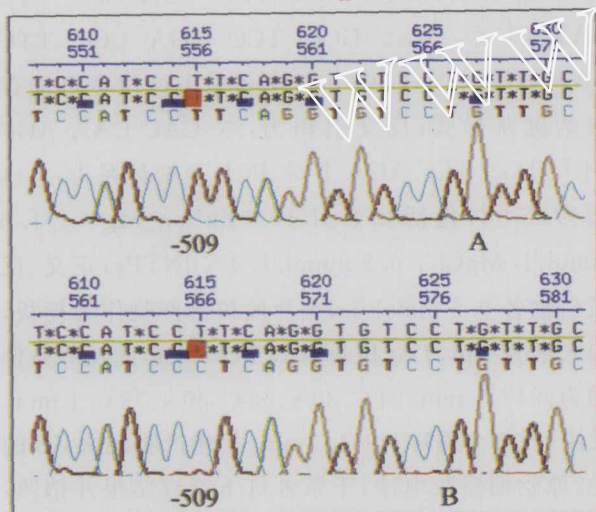


图2 包括-509位点的部分测序结果

Fig 2 Partial sequence of polymorphism at position -509

A: Genotype TT; B: Genotype CC

2.2 TGF- β 1 -509位点基因型及等位基因频率在对照组和肝纤维化组的分布情况 TGF- β 1 -509CC基因型在肝纤维化组和对照组的分布频率分别为52.3%和47.7%,TT基因型在肝纤维化组和对照组的分布频率分别为47.4%和52.6%;CC基因型在肝纤维化Child-Pugh A、B、C级组的分布频率分别为13.2%、28.9%和57.9%,TT基因型在肝纤维化Child-Pugh A、B、C级组的分布频率分别为23.7%、43.6%和32.7%。CC基因型在肝纤维化组的分布频率高于TT基因型,但这种差异并无统计学意义;CC基因型在肝纤维化程度比较高的Child-Pugh C级组的分布频率明显高于TT基因型($P<0.05$),也明显高于该基因型在Child-Pugh B级组中的分布频率(28.9%)($P<0.05$)。

2.3 血浆中TGF- β 1、NC、HA及PⅢNP的浓度

由于所得的数据方差不齐性,故对血浆中TGF- β 1、NC、HA及PⅢNP的浓度在肝纤维化组和对照组中的比较均是基于秩和检验所得的,其浓度用中位数(median)及四分位间距(25%~75%)表示。肝纤维化组中的血浆TGF- β 1、NC、HA及PⅢNP的浓度均显著高于正常对照组($P<0.05$, $P<0.01$)。在肝纤维化组中,血浆TGF- β 1的浓度与NC、HA和PⅢNP之间并不存在明显的相关性;而NC与HA($r=0.4016$, $P<0.01$)、HA与PⅢNP($r=0.5435$, $P<0.01$)及NC与PⅢNP($r=0.4535$, $P<0.01$)之间均存在显著的相关性,详见表1。

表1 健康对照组和肝纤维化组人群血浆TGF- β 1、NC、HA和PⅢNP的浓度Tab 1 Serum concentrations of TGF- β 1, NC, HA and PⅢNP in liver fibrosis patients and controls

Group	n	TGF- β 1		NC		HA		PⅢNP	
		Median	25%-75%	Median	25%-75%	Median	25%-75%	Median	25%-75%
Control	92	7.7	4.5-15.2	14.5	6.1-20.8	62.9	41.8-90.8	4.7	4.3-5.5
Liver fibrosis	93	15.7*	5.2-23.6	76.6**	16.2-188.5	573.4**	322.4-841.6	14.4**	9.1-19.1

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group

2.4 TGF- β 1 -509位点基因型对血浆TGF- β 1浓度的影响 在肝纤维化组中,TGF- β 1 -509CC基因型患者血浆TGF- β 1的浓度为(22.4 $\pm$ 17.2) ng/ml,明显高于TT基因型(9.9 $\pm$ 8.9) ng/ml($P<0.01$),而在对照组中,血浆TGF- β 1的浓度在TGF- β 1 -509CC基因型者[(10.9 $\pm$ 9.9) ng/ml]和TT基因型者[(10.3 $\pm$ 6.2) ng/ml]之间并不存在显著差异。

3 讨论

肝纤维化形成是细胞外基质异常过度沉积的结果,与慢性炎症损伤密切相关,在我国,这种慢性炎症大部分由感染乙肝病毒引起。TGF- β 1在肝纤维化形成的过程中起到强效促进作用,该细胞因子可以通过刺激细胞外基质的表达和沉积、抑制细胞外基质的降解等多种机制参与形成肝纤维化^[3~5]。有

研究^[6~8]表明,在高加索人群中,TGF- β 1 基因调控区-509 C>T 基因多态性与阿尔茨海默病、浸润性乳腺癌、慢性牙周炎等多种疾病的发生或进展程度具有相关性。韩国研究者 Kim 等^[9]发现,该基因多态性还与韩国人群慢性乙型肝炎后的肝细胞癌的发生率密切相关。

本研究结果显示,TGF- β 1 基因-509 C>T 多态性与乙肝肝纤维化的发生与否并不存在密切的关系。提示在现有研究中,TGF- β 1 基因-509 C>T 多态性对中国人乙肝肝纤维化的发生无明确的影响;由于本研究所选择的样本数量有限,该结论尚需进一步扩大验证。本研究还分析了该基因多态性与肝纤维化分级的关系。根据 Child-Pugh 分级标准,将肝纤维化组人群又分为 A 级、B 级、C 级 3 组以表示肝纤维化的严重程度,A 级到 C 级肝纤维化程度逐渐加重。结果发现,该位点多态性与肝纤维化的严重程度存在相关性。CC 基因型在 Child-Pugh 分级的 C 级组中的分布频率显著高于 TT 基因型。而且,在患者中,等位基因 C 以及基因型 CC 的分布频率随肝纤维化程度的加重而升高,可以推断,TGF- β 1 基因-509 位点等位基因 C 可能是影响肝纤维化进展程度的一个重要的遗传因素。

有文献报道^[2,10~12],TGF- β 1 在血浆中的浓度与其基因某些多态性之间存在着密切关系。有人发现,TGF- β 1 -509C>T 与-800G>A 之间存在连锁不平衡,并与 TGF- β 1 的血浆浓度高低密切相关^[12]。本研究结果表明,在健康人群中,TGF- β 1 -509C>T 多态性对其血浆浓度并没有显著的影响,而在肝纤维化人群中,该多态性则与其血浆浓度的高低存在密切关系,TGF- β 1 -509CC 基因型者血浆 TGF- β 1 的浓度明显高于 TT 基因型。提示 TGF- β 1 -509 位点基因多态性在肝纤维化情况下,对 TGF- β 1 基因的表达间接发挥作用,进而影响 TGF- β 1 的表达和分泌。

此外,本研究还检测了血浆中 NC、HA 及 PⅢNP 的浓度,结果验证了肝纤维化组中此 3 种成分及 TGF- β 1 的血浆浓度均明显高于对照组,且 NC、HA 及 PⅢNP 的血浆浓度彼此之间存在显著的相关性,但与 TGF- β 1 的血浆浓度之间均不存在明显的相关性,与文献报道^[2]的结果相一致。

总之,通过本研究,我们可知 TGF- β 1 基因-509 位点碱基 C 的出现,可以增高肝纤维化患者血浆中 TGF- β 1 的浓度,并且能够影响肝纤维化的

进展程度。

[参考文献]

- [1] 王吉耀. 全国肝硬化专题学术讨论会纪要[J]. 中华消化杂志, 1991, 11(5): 290-291.
 - [2] 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.
 - [3] Blode GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(12): 1350-1358.
 - [4] Eassey 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.
 - [5] Dixon MC, Yeaman SJ, Agius L, et al. Transforming growth factor beta increases the activity of phosphatidate phosphohydrolase-1 in rat hepatocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 230(2): 365-369.
 - [6] Luedeking EK, DeKosky ST, Mehdi H, et al. Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor β 1 gene and the risk of Alzheimer's disease [J]. *Hum Genet*, 2000, 106(5): 565-569.
 - [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] de Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, et al. Analysis of the TGF beta 1 promoter polymorphism (C-509T) in patients with chronic periodontitis [J]. *J Clin Periodontol*, 2003, 30(6): 519-523.
 - [9] Kim YJ, Lee HS, Im JP, et al. Association of transforming growth factor beta 1 gene polymorphisms with a hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. *Exp Mol Med*, 2003, 35(3): 196-202.
 - [10] Awad MR, Elgamel A, Hasleton P, et al. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta 1 gene; association with transforming growth factor-beta 1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation [J]. *Transplantation*, 1998, 66(8): 1014-1020.
 - [11] Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC. TGF- β in blood: a complex problem [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000, 11(1-2): 133-145.
 - [12] Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type β 1 [J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(1): 93-97.
- [收稿日期] 2004-06-15 [修回日期] 2004-08-31
[本文编辑] 曹 静