

· 专题报道 ·

人 I 型胶原基因 COL1A1 启动子区多态性与肝硬化疾病的相关性

赵云鹏^{1△}, 王皓^{2△}, 高春芳^{1*}, 房萌¹, 王璐¹, 杨再兴²

(1. 第二军医大学东方肝胆外科医院实验诊断科, 上海 200438; 2. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 研究人 I 型胶原基因 COL1A1 基因启动子区多态性与肝硬化性疾病的相关性。**方法:** 在 111 例乙型肝炎病毒感染后慢性肝硬化患者和 95 例正常对照中, 用直接测序法对 COL1A1 基因启动子区 3 个多态性位点进行基因分型。分析单个位点的等位基因和基因型频率是否与肝硬化相关, 并用单倍型推测软件计算上述位点单倍型频率的分布, 分析这些单倍型是否与肝硬化的发生有关。**结果:** 在 COL1A1 基因启动子区的 3 个多态性位点中, -1662del/insT 多态性在疾病组和对照组中均未发现, -1997G>T 和 -1363C>G 多态性在疾病及正常组间没有差异, 但 -1997T/-1363C 单倍型分布频率在疾病组中显著高于对照组 ($P<0.05$)。**结论:** I 型胶原基因启动子区 -1997G>T 和 -1363C>G 多态性与肝硬化的发生可能存在一定相关性。

[关键词] 肝硬化; 胶原 I 型; 多态性; 单核苷酸**[中图分类号]** R 575.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)12-1288-04**Correlation between polymorphism of promoter region of $\alpha 1$ (I) collagen gene and hepatic cirrhotic/fibrotic diseases**ZHAO Yun-peng^{1△}, WANG Hao^{2△}, GAO Chun-fang^{1*}, FANG Meng¹, WANG Lu¹, YANG Zai-xing² (1. Department of Laboratory Medicine, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the association between polymorphisms in $\alpha 1$ (I) collagen (COL1A1) gene promoter region and hepatic cirrhotic/fibrotic patients with hepatitis B infection. **Methods:** Three polymorphisms within COL1A1 promoter region were genotyped in 111 Chinese liver cirrhotic patients with chronic HBV infection and 95 healthy controls by direct DNA sequencing. Allelic and genotypic associations of these polymorphisms with liver cirrhosis were examined. The association between haplotype distribution, haplotype frequency and liver cirrhosis was analyzed by haplotype software. **Results:** No polymorphisms at position -1662del/insT of COL1A1 gene were observed in subjects of both groups. There was no statistical difference in the genotype frequencies at position -1997T>G or -1363C>G in both groups. The frequency of haplotype -1997T/-1363C in the diseased group was significantly higher than that in the normal control group ($P<0.05$). **Conclusion:** Polymorphisms in the promoter region of COL1A1 gene at position -1997T>G, -1363C>G might be correlated with liver cirrhosis.

[KEY WORDS] liver cirrhosis; collagen type I; polymorphism, single nucleotide

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(12):1288-1291]

肝纤维化是慢性肝病重要的病理特征, 因慢性肝病患者大多数都伴有肝纤维化。肝纤维化是肝细胞坏死或损伤后常见的反应, 任何破坏肝脏内环境稳定的过程均可引起肝纤维化, 尤其是炎症、化学毒性损害、肝血流改变、感染(病毒、细菌、真菌、寄生虫)等。肝纤维化的物质基础是细胞外间质的异常过度沉积, 胶原蛋白是这种细胞外间质的主要成分, 其中 I 型胶原属于成纤维胶原, 在人体胶原中含量最丰富。在正常肝脏中 I 型胶原所占的比例很少, 但肝纤维化时, I 型胶原迅速增加, 成为纤维(硬化)的主要间质。因此, I 型胶原的研究对整个细胞外间质成分的研究具有代表性。I 型胶原由两条 α_1 链及一条 α_2 链构成, 分别由 COL1A1 和 COL1A2 基因

编码^[1]。研究表明, I 型胶原基因存在约 200 种变异, 包括点突变、缺失和插入突变^[2]。因此 I 型胶原基因存在较多的多态性, 但多数基因多态性与疾病没有密切关系, 且与疾病关系密切的基因多态性中, 大部分是与骨质疏松症或成骨不全等疾病相关^[3-5], 而在纤维化疾病中 I 型胶原基因多态性的研究未见报道。本课题中我们主要研究由乙型肝炎病毒 (HBV) 感染引起的肝硬化患者和正常人 COL1A1

[基金项目] 国家自然科学基金(30270605)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30270605)。**[作者简介]** 赵云鹏, 硕士生。E-mail: jane124600@163.com

△共同第一作者

* Corresponding author. E-mail: gaocf1115@yahoo.com

基因启动子区域的单核苷酸多态性 (SNP), 探索与肝硬化的相关性。

1 材料和方法

1.1 标本 本课题选取 111 例 HBV 感染的慢性肝病肝硬化患者的血液样本作为研究对象, 临床标本主要来源于中国人民解放军第 85 医院感染科、第二军医大学长征医院感染科和第二军医大学长海医院感染科。患者的入选标准为: (1) 年龄 27~68 岁, 包括男性患者 71 例, 女性患者 40 例; (2) 患者的肝硬化诊断大多基于临床特征性表现 (比如出现腹水、食管静脉曲张等症状)、实验室检验项目 (比如肝功能检测、HBV 标志物检测等) 和 B 超检查, 其中 9 例患者通过肝组织学鉴定确诊, 40 例患者通过 X 线断层扫描 (CT) 或核磁共振 (MRI) 检测确诊, 患者的主要临床及实验室特征详见表 1; (3) 排除人类免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒等除 HBV 感染之外的其他病原感染; (4) 排除患有自身免疫性疾病 (如抗核抗体浓度大于 1:160) 的患者。选取 95 例正常对照的血液样本, 样本取自上海市血液中心, 平均年龄为 (30.5±10.5) 岁, 包括男性 58 例, 女性 37 例。

表 1 入选本研究的疾病及正常对照者的临床及实验室特征

Tab 1 Clinical and laboratory data of patients in 2 groups

Index	Normal control	Cirrhosis patients
Case number	95	111
Sex (M/F)	58/37	71/40
Age (t/year)		
$\bar{x} \pm s$	30.5±10.1	44.6±8.8
Range	19-53	22-68
Liver function tests ($\bar{x} \pm s$)		
TBIL ($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	4.9±2.6	70.5±51.6
ALB ($\rho_B/g \cdot \text{L}^{-1}$)	43.9±6.3	30.2±6.5
ALT ($\alpha_B/\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	10.9±4.3	134.2±67.5
HBV serology tests (n/N)		
HBsAg positive	0/95	111/111
HBeAg positive	0/95	111/111
HBV DNA positive	0/95	111/111
Cirrhosis confirmation (n/N)		
Histology		9/111
Image (CT or MRI)		40/111
Image (Ultrasonic)		111/111
Child-Pugh score [$\bar{x} \pm s$ (Range)]		
Grade A		5.8±0.9 (5-6)
Grade B		7.4±0.5 (7-9)
Grade C		13.2±2.7 (10-15)

TBIL: Total bilirubin; ALB: Albumin; ALT: Alanine aminotransferase

1.2 外周血细胞基因组 DNA 的提取 将实验组和对照组的血液样本用 QIAamp 全血细胞 DNA 抽提试剂盒 (Qiagen, Hilden, Germany) 提取基因组 DNA, 紫外分光光度计测定所抽基因组 DNA 的 D_{260} 及 D_{280} 值, -20°C 保存待用。

1.3 PCR 按照人 COL1A1 基因启动子区基因 (-2049~-1306) 序列设计相应的引物 [HW001: (-2049) 5'-TAA ATG TCT GTT CCC TCC AA-3'; HW002: (-1306) 5'-TAC ACT CTG AAA GGG TCT GG-3'], 片段长度为 744 bp, 依据文献报道, 上述序列中包含 3 个 SNP 位点, 分别为 -1997 G>T, -1662del/insT, -1363 C>G。50 μl PCR 反应体系为: 基因组 DNA 模板 3 μl , 上下游引物各 0.5 μl (1 $\mu\text{mol/L}$), $5 \times$ PCR buffer 10 μl , dNTP mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μl , TaKaRa Taq 酶 (5 U/ μl) 0.5 μl , 加灭菌去离子水至 50 μl 。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min, 然后 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 60 s, 72°C 延伸 75 s, 共 35 个循环, 之后 72°C 延伸 5 min, 使用 High-fidelity PCR 系统 (Roche) 按常规方法进行 PCR (PE-9600 PCR 扩增仪)。

1.4 PCR 产物纯化及基因序列分析 用胶回收试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司) 对所得 PCR 产物进行胶回收纯化, 操作步骤按试剂盒说明书操作。PCR 纯化产物送往上海市南方人类基因组学中心进行测序分析, 根据测序结果判断特定位点是否存在基因多态性及其基因型。

1.5 统计学处理 用在线软件计算 Hardy-Weinberg 平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) (http://www.kursus.kvl.dk/shares/vetgen/_Popgen/genetik/applets/kitest.htm)。用 SPSS 11.0 软件计算单位点等位基因、基因型的 χ^2 、P 值、比数比 (odds ratio, OR) 及其 95% 的可信区间 (confidence intervals, CI)。用 EMLD 软件分析各位点间的连锁不平衡情况, 计算 D' 和 r^2 值。单倍型分析采用 UNPHASED-3.0 软件 (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased/>)^[6]。

2 结果

经测序分析发现, 在人 COL1A1 基因启动子区 -2049~-1306 序列包含的 3 个 SNP 位点中, 在正常人及肝硬化组中均不存在 -1662del/insT 多态性。-1997G>T, -1363C>G 虽然存在多态性改

变,但其基因型及等位基因频率在疾病和正常组中均没有显著差异,结果见表 2。正常对照组中两位点之间连锁不平衡的 D' 值为 0.968, r^2 值为 0.657, 疾病组中 D' 值为 0.846, r^2 为 0.530, 可认为两位点

间呈强连锁不平衡。单倍型分析结果显示 -1997G > T、-1363G > C 的特殊单倍型 -1997T/-1363C 在疾病组中的频率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 结果见表 3。

表 2 肝纤维化中 I 型胶原基因多态性 -1997(T>G)、-1363(G>C) 的基因型和等位基因频率

Tab 2 Genotype and allele frequencies of COL1A1 gene -1997(T>G) and -1363(G>C) in liver cirrhosis patients

SNP	Genotype frequency				Allele frequency				
	Genotype	Liver cirrhosis [n(%)]	Control [n(%)]	P value (df=2)	Allele	Liver cirrhosis [n(%)]	Control [n(%)]	P value (df=1)	OR [95%CI]
-1997	G/G	55(49.6)	47(49.5)	0.709	G	153(68.9)	134(70.5)	0.724	0.927[0.608-1.413]
	G/T	43(38.7)	40(42.1)		T	69(31.1)	56(29.5)		
	T/T	13(11.7)	8(8.4)						
	HWE(P)	0.313	0.901						
-1363	C/C	44(39.6)	33(34.7)	0.235	C	138(62.2)	119(62.6)	0.922	0.991[0.657-1.462]
	G/C	50(45.0)	53(55.8)		G	84(37.8)	71(37.4)		
	G/G	17(15.4)	9(9.5)						
	HWE(P)	0.655	0.061						

表 3 肝纤维化和对照组中单倍型频率分布比较

Tab 3 Comparison of estimated haplotype frequencies between hepatic cirrhosis patients and healthy controls

Haplotype	SNP		Haplotype frequency		
	-1997	-1363	Patient	Control	P value
1	G	C	131.4(0.5919)	117.9(0.6205)	0.5732
2	G	G	21.6(0.0973)	16.1(0.0848)	0.7067
3	T	C	6.6(0.0297)	1.1(0.0058)	0.0233
4	T	G	62.4(0.2811)	54.9(0.2889)	0.9048

3 讨论

胶原是人体最主要的蛋白之一, I 型胶原作为人体内重要的细胞外间质的主要成分, 在器官纤维化进程中发挥着极其重要的作用。在我国, 每年因感染 HBV 导致的肝纤维化/硬化等疾病引起的死亡率居高不下, 因此针对肝纤维化/硬化的临床早期诊断以及给予患者正确的治疗措施显得尤为重要。纤维化的形成从细胞外间质 (ECM, 主要为 I 型胶原) 各组分基因激活、转录、翻译、酶解、分泌, 到 ECM 的过度沉积, 最终导致器官纤维化历经多个环节, 大量的国内外研究均集中在中、下游蛋白质及 mRNA 的研究, 虽为临床肝纤维化 (典型例证) 的早期诊断指标的选择、细胞和基因分子水平的机制研究提供了理论依据和实验基础, 但这显然不足以在分子水平揭示纤维化形成的机制^[7]。因此进一步对胶原基因转录激活机制, 特别是对这些基因的顺式调控元件与反式作用因子进行研究, 是器官纤维化

进程研究中非常重要的一环, 为建立分子水平筛选抗纤维化药物提供技术平台和广阔的应用前景。

近年来的研究发现胶原基因存在多态性, 但多数基因多态性与疾病没有密切关系, 与疾病相关紧密的基因多态性中, 大部分报道是与骨质疏松症或成骨不全、骨关节炎等骨性疾病相关^[8-10], 并且 I 型胶原多态性与疾病的关系在不同国家、不同地区、不同种族人群之间存在着差异^[11]。目前除与基质代谢有关的基质金属蛋白酶 (MMPs) 基因调控区 SNP 与疾病相关、 $\alpha 2(I)$ 型胶原基因微卫星与系统硬化症有关的报道外^[12-13], 尚无器官纤维化、硬化性疾病与胶原基因多态性相关的研究报道。本课题在既往对 COL1A1 基因启动子区转录调控系列分析的基础上, 进一步研究其 SNP, 寻找硬化性疾病与 I 型胶原基因异常的相关性。我们研究了 111 例 HBV 感染的慢性肝硬化患者和 95 例正常人, 结果发现在人 COL1A1 基因启动子区 -2049~-1306 存在的 3 个基因多态性中, 在正常对照组及肝硬化组中均不存在 -1662del/insT 多态

性。-1997G>T、-1363C>G 虽然存在多态性改变,但其基因型及等位基因频率在疾病和正常组中均没有显著差异。-1997G>T 和 -1363G>C 的特殊单倍型 -1997T/-1363C 在疾病组中的频率高于对照组,因此我们初步推测 -1997G>T、-1363C>G 的多态性可能与肝硬化的发生存在一定相关性,但由于在本研究所涉及的共 206 例样本中以 -1997T/-1363C 单倍体形式存在的频率极低,这种单倍型的临床意义尚有待于进一步扩大研究。在我们后期的研究中我们针对 -1997G>T、-1363G>C 多态性对于 COL1A1 转录调控活性的影响研究已经证实了这种 -1997T/-1363C 单倍型具有较高的转录调控活性(另文发表)。

纤维化、硬化性疾病属多基因疾病,目前疾病相关基因多态性在纤维化性疾病中的研究尚处于初级阶段,相信随着技术手段的进步以及研究工作的深入,胶原基因多态性将在纤维化、硬化性疾病的相关机制研究及临床早期诊断、疾病预测和治疗中发挥重要作用。

[参考文献]

- [1] Vurio E, de Crombrughe B. The family of collagen genes[J]. *Annu Rev Biochem*, 1990, 59:837-872.
- [2] Prockop D J. Mutations that alter the primary structure of type I collagen. The perils of a system for generating large structures by the principle of nucleated growth[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265:15349-15352.
- [3] Myllyharju J, Kivirikko K I. Collagens and collagen-related diseases[J]. *Ann Med*, 2001, 33:7-21.
- [4] Garcia-Giralt N, Nogues X, Enjuanes A, et al. Two new single-nucleotide polymorphisms in the COL1A1 upstream regulatory region and their relationship to bone mineral density[J]. *Bone Miner Res*, 2002, 17:384-393.
- [5] Mirandola S, Pignatti P F, Mottes M, et al. Three novel polymorphic sequence variants in the type I collagen gene COL1A1, the main disease locus for Osteogenesis Imperfecta[J]. *Mol Cell Probes*, 2000, 14:329-332.
- [6] Dudbridge F. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes[J]. *Genet Epidemiol*, 2003, 25:115-121.
- [7] 高春芳. 胶原基因转录调控与纤维化[J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13:166-171.
- [8] Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop D J, et al. Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans[J]. *FASEB J*, 1991, 5:2052-2060.
- [9] Pollitt R, McMahon R, Nunn J, et al. Mutation analysis of COL1A1 and COL2A2 in patients diagnosed with osteogenesis imperfecta type I-IV[J]. *Hum Mutat*, 2006, 27:716.
- [10] Todhunter C E, Sutherland-Craggs A, Bartram S A, et al. Influence of IL-6, COL1A1, and VDR gene polymorphisms on bone mineral density in Crohn's disease[J]. *Gut*, 2005, 54:1579-1584.
- [11] Lee K S, Song H R, Cho T J, et al. Mutational spectrum of type I collagen genes in Korean patients with osteogenesis imperfecta[J]. *Hum Mutat*, 2006, 27:599.
- [12] Tower G B, Coon C I, Brinckerhoff C E, et al. The 2G single nucleotide polymorphism (SNP) in the MMP-1 promoter contributes to high levels of MMP-1 transcription in MCF-7/ADR breast cancer cell[J]. *Cancer Res Treat*, 2003, 82:75-82.
- [13] Hata R, Akai J, Kimura A, et al. Association of functional microsatellites in the human type I collagen alpha2 chain (COL1A2) gene with systemic sclerosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 272:36-40.

[收稿日期] 2007-09-18

[修回日期] 2007-11-09

[本文编辑] 曹 静

· 消 息 ·

第二军医大学基础部成功举办“第七届长三角生理科学论坛暨两省一市生理学学术研讨会”

为了促进长三角生理学领域科研人员之间的交流,第七届长三角生理科学论坛暨两省一市生理学学术研讨会于 2007 年 12 月 9 日在第二军医大学科技馆顺利召开。此次会议由上海生理学会主办,第二军医大学基础部生理学教研室承办,参会代表 220 余人。会议围绕近年来生理学领域的热点领域开展,包括:分子神经生物学,肾移植排斥反应的细胞治疗与基因治疗,心交感传入反射与慢性心力衰竭等。会议由著名的生理学家陈宜张院士做大会的重点报告,还邀请了复旦大学上海医学院陈思锋教授和浙江省、江苏省多位著名教授就其近年有重大突破的研究成果进行专题报告。