·基础实验研究论著·

转化生长因子-β1 基因多态性与乙型肝炎病毒慢性感染发展至肝细胞癌风险的相关研究

吴志强，熊　焰，费　青，张志明，伍仕敏△
（武汉市医疗救治中心检验科，武汉 430023）

摘　要：目的　探讨转化生长因子-β1 基因多态性与乙型肝炎病毒（HBV）慢性感染发展至肝细胞癌风险的关系。**方法**　随机纳入 120 例 HBV 慢性感染患者（病例组）和 100 例与病例组性别、年龄相匹配的健康者（对照组），并将病例组分为非肝癌组和肝癌组。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析法检测各组 TGF-β1 基因多态性（T29C）并结合 TGF-β1 mRNA 水平进行比较分析。**结果**　携带基因型 CC 发生肝癌的风险较携带基因型 TT 显著降低（$OR=0.317$，95%$CI=0.110\sim0.913$，$P=0.033$；$OR=284$，95%$CI=0.093\sim0.866$，$P=0.027$）。携带等位基因 C 较等位基因 T 发生肝癌的风险显著降低（$OR=0.570$，95%$CI=0.341\sim0.953$，$P=0.032$；$OR=0.548$，95%$CI=0.320\sim0.936$，$P=0.028$）。肝癌组中携带基因型 CC 的患者 TGF-β1 mRNA 水平较低。**结论**　TGF-β1 基因 T29C 多态性可能与 HBV 慢性感染进展至肝细胞癌风险有关。

关键词：转化生长因子；　多态现象，遗传；　肝炎病毒，乙型；　癌，肝细胞
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.004　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2014)13-1673-03

Association between transforming growth factor-β1 gene polymorphism and risk of chronic hepaitis B virus infection progressing to hepatocellular carcinoma

Wu Zhiqiang, *Xiong Yan*, *Fei Qing*, *Zhang Zhiming*, *Wu Shimin*△
(*Department of Clinical Laboratory*, *Wuhan Municipal Medical Rescue Center*, *Wuhan*, *Hubei* 430023, *China*)

Abstract: Objective　To investigate the relationship between the polymorphism of transforming growth factor-β1 (TGF-β1) gene and risk of chronic hepatitis B virus (HBV) infection progressing to hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods**　120 patients with chronic HBV infection (case group) and 100 age-and sex-matched healthy individuals (healthy control group) were randomly enrolled to this study. The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique was adopted to detect the single nucleotide polymorphism of TGF-β1 gene (T29C), and made the comparative analysis combined with TGF-β1 mRNA level. **Results**　The risk of HCC occurrence in the patients carrying genotype CC was decreased than that in the patients carrying genotype TT ($OR=0.317$, 95%$CI=0.110-0.913$, $P=0.033$; $OR=284$, 95%$CI=0.093-0.866$, $P=0.027$), the risk of HCC in patients carrying allele C was significantly decreased compared with that in the patients carrying allele T ($OR=0.570$, 95%$CI=0.341-0.953$, $P=0.032$; $OR=0.548$, 95%$CI=0.320-0.936$, $P=0.028$). In the HCC group, the patients carrying genotype CC had the lower lever of TGF-β1 mRNA. **Conclusion**　TGF-β1 gene polymorphism (T29C) may be related to the risk of chronic HBV infection progressing to HCC.

Key words: transforming growth factor;　polymorphism, genetic;　hepatitis B virus;　carcinoma, hepatocyte

转化生长因子（tranforming growth factor，TGF）包括两种多肽类生长因子，即 TGF-α 和 TGF-β。TGF-β 属于多功能蛋白质，参与人体多种细胞的生长、分化和凋亡，并具有调节免疫的功能[1]。TGF-β 主要包括 3 种亚型，即 TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3。TGF-β1 是 1984 年发现的一种多肽性细胞生长调节因子，属于分泌性多肽因子，参与调节细胞的生长、分化、迁移。近年来，研究发现 TGF-β1 对多种肿瘤的发生、发展起重要作用[2-4]。

在中国，原发性肝癌是临床上常见的恶性肿瘤，其发病率位于恶性肿瘤第 5 位、病死率位于第 2 位。全世界每年新发病例约为 60 万例，而我国为原发性肝癌的高发区域，每年新发病例占世界新发病例总数的 50%以上。在我国，乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）感染是引起原发性肝癌的重要原因[5-6]。正常肝细胞中 TGF-β1 含量较低，研究发现 TGF-β1 参与肝病理损伤过程，是导致肝纤维化、肝癌的重要因素[7]。TGF-β1 基因可能影响 TGF-β1 的表达而影响其生理功能，本文旨在通过分析比较健康者、HBV 慢性感染而未发生肝癌的患者及 HBV 慢性感染引起肝癌发生的患者之间 TGF-β1 基因 T29C 多态性情况，探讨 TGF-β1 基因 T29C 多态性对 HBV 慢性感染进展为肝癌风险的影响。

1　资料与方法

1.1　一般资料　随机选取 120 例 2011 年 1 月至 2012 年 1 月到武汉医疗救治中心就诊的 HBV 慢性感染患者，纳入者诊断均符合 2000 年中华医学会制定的《病毒性肝炎防治方案》中的诊断标准，并排除其他肝脏疾病如丙型肝炎病毒感染、酒精肝、脂肪肝等。纳入研究的 120 例 HBV 慢性感染患者分为两组：即肝癌（$n=42$ 例）和非肝癌组（$n=78$）。原发性肝癌的诊断依靠临床指标和影像学诊断（包括超声、CT、MRI）或病理学诊断。选取 100 例性别、年龄与病例组相匹配的健康者作为对照组。收集记录病例组和对照组肝功能指标，包括总胆红素（total bilirubin）、总蛋白（total protein）、清蛋白/球蛋白比值 A/G、丙氨酸氨基转移酶（AST）、天门冬氨酸氨基转移酶（ALT）、碱性磷酸酶（ALP）。本研究通过本院医学伦理委员会认可，所有研究对象均签发知情同意书。

作者简介：吴志强，男，副主任技师，主要从事输血及分子生物学检验研究。　△　通讯作者，E-mail：mintyrain@126.com。

1.2 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)鉴定基因型

1.2.1 外周血 DNA 抽取　用 EDTA 抗凝采血管抽取 2 mL 外周静脉血，采用血液基因组提取试剂盒(天根)提取 DNA，使用紫外可见光光度计检测 DNA 浓度，DNA 浓度调到 20 ng/μL，20 ℃保存。

1.2.2 引物设计　正向引物：5′-GAC CAT GAC CCT CCA CAC CAA AGG ATC-3′，反向引物：5′-ACC GTA GAC CTG CGC GTT G-3′。

1.2.3 PCR 扩增　本研究 PCR 反应体系(25 μL)如下：20 ng DNA、10×PCR buffer、2.5 mmol/L dNTPs 及 TransFast Taq DNA polymerase、0.3 μmol/L 引物。扩增条件设置：94 ℃ 5 min 预变性；95 ℃ 5 s，60 ℃ 15 s，72 ℃ 9 s，共 35 个循环；延伸72 ℃ 7 min。

1.2.4 基因位点鉴定　PCR 扩增后，取 5 μL 的 PCR 产物，和 1 μL 的 *Bam*HI 酶 30 ℃孵育 2 h 后用 3.5%的琼脂糖凝胶电脉确定基因型。基因型 CC 出现 197 bp 的条带，基因型 TT 出现 220 bp 的条带，基因 TC 出现 197 bp 和 220 bp 两条条带。

1.2.5 基因鉴定质量控制　随机抽取 10%的标本进行 DNA 测序，测序结果要与 PCR-RFLP 鉴定结果 100%一致。

1.3 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定 mRNA　用 Trizol 法提取外周血单核细胞的总 RNA，反转录为 cDNA，反应体系(10 μL)：1×PCR buffer、1 U Taq polymerase、1 μmol/L 引物、200 μmol/L dNTP。TGF-β1 引物设计，正向引物：GGG ACT ATC CAC CTG CAA GA，反向引物：CCT CCT TGG CGT AGT AGT CG。以 β-Actin 为内参，引物设计，正向引物：CAC TCT TCC AGC CTT CCT T，反向引物：CGG ACT CGT CAT ACT CCT。PCR 条件：95 ℃ 2 min 预变性；94 ℃ 45 s，66 ℃(TGF-β1)或 60 ℃(β-Actin)45 s，72 ℃ 1 min，共 40 个循环；延伸 72 ℃ 10 min。扩增产物在 2%琼脂糖凝胶中电泳，TGF-β1 和 β-Actin 的 PCR 产物长度分别为 239 bp 和 318 bp。利用 Gel Doc XR 凝胶成像系统分析 TGF-β1 产物和对应的 β-Actin 产物的灰度值比值，以灰度值比值表示 TGF-β1 mRNA 水平。

1.4 统计学处理　使用 SPSS 16.0 软件进行数据分析处理，使用 Hardy-Weinberg 平衡检验判断纳入样本的代表性，使用卡方检验比较各组基因型，采用 Logistic 回归评估风险，以比值比(*OR*)及 95%可信区间(*CI*)表示相对危险度，采用配对 *t* 检验比较 TGF-β1 mRNA 水平。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 一般特征　对照组($n=100$)平均年龄(56.2±5.6)岁，其中男性 75 例(75.0%)；病例组分为非肝癌组和肝癌组，非肝癌组($n=78$)平均年龄(55.7±6.7)岁，其中男性 57 例(73.1%)；肝癌组($n=42$)平均年龄(57.2±3.4)岁，其中男性 32 例(76.2%)。比较 3 组肝功能指标，结果发现：病例组总胆红素、AST、ALT、ALP 显著高于对照组，A/G 显著低于对照组，差异有统计学意义($P<0.05$)，见表 1。

2.2 TGF-β1 基因 T29C 多态性分布　对照组和病例组的 TGF-β1 基因 T29C 多态性分布见表 2，各组基因型和等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。如表 2 所示，HBV 慢性感染发展至肝癌的患者(肝癌组)与对照组和 HBV 慢性感染对照组(非肝癌组)比较发现携带基因型 CC 发生肝癌的风险较携带基因型 TT 显著降低($OR=0.317$，95% $CI=0.110\sim0.913$，$P=0.033$；$OR=0.284$，95% $CI=0.093\sim0.866$，$P=0.027$)。携带等位基因 C 较等位基因 T 发生肝癌的风险显著降低($OR=0.570$，95% $CI=0.341\sim0.953$，$P=0.032$；$OR=0.548$，95% $CI=0.320\sim0.936$，$P=0.028$)。

表 1　纳入研究对象的一般情况

项目	对照组($n=100$)	非肝癌组($n=78$)	肝癌组($n=42$)
年龄(岁)	56.20±5.60	55.70±6.70	57.20±3.40
男性[n(%)]	75(75.0%)	57(73.1%)	32(76.2%)
总胆红素(mg/dL)	0.35±0.05	1.10±0.32*	1.12±0.20*
总蛋白(g/dL)	7.20±0.01	7.19±0.15	7.15±0.20
A/G	2.06±0.05	1.43±0.13*	1.14±0.32*
AST(IU/L)	15.50±0.34	79.23±9.45*	80.12±3.24*
ALT(IU/L)	12.63±0.78	156.32±76.45*	132.45±45.29*
ALP(IU/L)	144.34±4.67	285.51±46.23*	264.30±38.21*

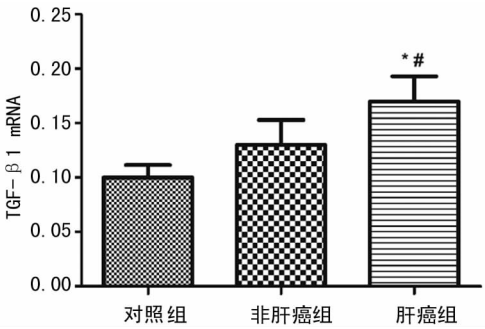
*：$P<0.05$，与对照组比较。

表 2　病例组和对照组 TGF-β1 基因多态性的基因型和等位基因频率

项目	基因型			等位基因型	
	TT	TC	CC	T	C
对照组($n=100$)	17	50	33	84	116
非肝癌组($n=78$)	12	40	26	64	92
肝癌组($n=42$)	13	21	8	47	37
肝癌组与对照组比较[*OR*(95%*CI*)]	1	0.549(0.227～1.329)	0.317(0.110～0.913)	1	0.570(0.341～0.953)
肝癌组与非肝癌组比较[*OR*(95%*CI*)]	1	0.485(0.188～1.248)	0.284(0.093～0.866)	1	0.548(0.320～0.936)
P 值(肝癌组与对照组比较)	—	0.184	0.033	—	0.032
P 值(肝癌组与非肝癌组比较)	—	0.133	0.027	—	0.028

—：无数据。

2.3 TGF-β1 mRNA 与 TGF-β1 基因 T29C 多态性　对照组 TGF-β1 mRNA 水平为0.10±0.02，非肝癌组 TGF-β1 mRNA 水平为0.13±0.04，肝癌组 TGF-β1 mRNA 水平为 0.17±0.04(显著高于对照组和非肝癌组)。肝癌组中各基因型、等位基因型 TGF-β1 mRNA 水平见表 3，提示携带基因型 CC 的患者 TGF-β1 mRNA 水平较低，见图 1。



*：$P<0.05$，与对照组比较；#：$P<0.05$，与非肝癌组比较。

图 1　对照组、非肝癌组和肝癌组 TGF-β1 mRNA 水平

表 3　肝癌患者 TGF-β1 mRNA 表达

项目	n	TGF-β1 mRNA 水平	P^*
TT	13	0.19±0.07	—
TC	21	0.17±0.01	0.089
CC	8	0.15±0.09	0.026

*：与基因型 TT 比较；—：无数据。

3　讨　论

肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）是较常见的消化道恶性肿瘤，在全世界范围内，HCC 发病率位于第 5 位，病死率位于第 2 位。HCC 通常是由肝硬化进展恶化而来，引起肝硬化的因素主要包括 HBV、丙型肝炎病毒（hepatitis C virus，HCV）、酒精肝[8]。在中国，HBV 慢性感染引起的肝硬化是 HCC 发生的主要病因。近年来，研究发现基因因素参与 HBV 慢性感染进展至肝细胞癌。TGF-β1 是人体内表达的一种重要的多功能细胞因子，参与调节细胞生长、分化、凋亡及其功能。研究发现肿瘤患者血清中 TGF-β1 表达较健康人呈同水平趋势，TGF-β1 在肿瘤细胞的发生及发展中起重要作用[9]，TGF-β1 509C/T 基因多态性与 TGF-β1 表达相关，本研究旨在通过对健康者、HBV 慢性感染但未发生 HCC 者和 HBV 慢性感染引起 HCC 者的 TGF-β1 基因 T29C 基因多态性进行比较，并结合外周血 TGF-β1 mRNA 水平，探讨 TGF-β1 基因 T29C 基因多态性与 HBV 慢性感染进展至 HCC 风险的关系。

比较分析健康者、HBV 慢性感染但未发生 HCC 者和 HBV 慢性感染引起 HCC 者 TGF-β1 基因 T29C 基因多态性，发现携带基因型 CC 发生肝癌的风险较携带基因型 TT 显著降低（$OR=0.317$，95%$CI=0.110\sim0.913$，$P=0.033$；$OR=284$，95%$CI=0.093\sim0.866$，$P=0.027$）。携带等位基因 C 较等位基因 T 发生肝癌的风险显著降低（$OR=0.570$，95%$CI=0.341\sim0.953$，$P=0.032$；$OR=0.548$，95%$CI=0.320\sim0.936$，$P=0.028$），提示携带等位基因 T 是促进 HBV 慢性感染进展至 HCC 的危险因素。同时，本研究发现肝癌组外周血 TGF-β1 mRNA 水平显著高于对照组和非肝癌组，这一结果与既往临床实验、动物实验结果是一致的，且肝癌组中携带 TT 的患者外周血 TGF-β1 mRNA 水平较高。因此，笔者推测等位基因 T 可能与 TGF-β1 mRNA 水平呈正相关。目前研究发现 TGF-β1 对 HCC 的发生及发展起重要作用，TGF-β1 可刺激人体内的血管生成，具有免疫抑制作用，从而提高了肿瘤部位的血液供应且对识别细胞、溶解细胞的免疫作用产生抑制[10-11]。TGF-β1 还可使黏附因子及细胞外基质表达增加，增加肿瘤细胞在肝脏内的转移潜能[12]。本研究通过对健康者、HBV 慢性感染但未发生 HCC 者和 HBV 慢性感染引起 HCC 患者的 TGF-β1 基因 T29C 基因多态性进行比较，并结合外周血 TGF-β1 mRNA 水平的比较，发现 TGF-β1 基因 T29C 多态性可能与 HBV 慢性感染进展至 HCC 风险有关，但尚需大样本病例进行验证。

参考文献

[1] Taflinski L, Demir E, Kauczok J, et al. Blue light inhibits TGF-beta1-induced myofibroblast differentiation of human dermal fibroblasts[J]. Exp Dermatol, 2014, 23(4): 240-246.

[2] Meindl-Beinker NM, Matsuzaki K, Dooley S. TGF-beta signaling in onset and progression of hepatocellular carcinoma[J]. Dig Dis, 2012, 30(5): 514-523.

[3] Caja L, Sancho P, Bertran E, et al. Dissecting the effect of targeting the epidermal growth factor receptor on TGF-beta-induced-apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells[J]. J Hepatol, 2011, 55(2): 351-358.

[4] Liu Y, Zhou W, Zhong DW. Meta-analyses of the associations between four common TGF-beta1 genetic polymorphisms and risk of colorectal tumor[J]. Tumour Biol, 2012, 33(4): 1191-1199.

[5] Song P. Standardizing management of hepatocellular carcinoma in China: devising evidence-based clinical practice guidelines[J]. Biosci Trends, 2013, 7(5): 250-252.

[6] Zheng J, Li C, Wu X, et al. Astrocyte elevated gene-1 is a novel biomarker of epithelial-mesenchymal transition and progression of hepatocellular carcinoma in two China regions[J]. Tumour Biol, 2014, 35(3): 265-269.

[7] Kim KH, Kim HC, Hwang MY, et al. The antifibrotic effect of TGF-beta1 siRNAs in murine model of liver cirrhosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343(4): 1072-1078.

[8] Fan C, Jin G, Sun C, et al. Clinical characteristics, treatment patterns and survival outcome of hepatocellular carcinoma patients aged 70 years or older: a single-center retrospective study from China[J]. Aging Clin Exp Res, 2014, 26(2): 123-130.

[9] Dandawate S, Williams L, Joshee N, et al. Scutellaria extract and wogonin inhibit tumor-mediated induction of T(reg) cells via inhibition of TGF-beta1 activity[J]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61(5): 701-711.

[10] Liu S, Etto T, Rodriguez-Cruz T, et al. TGF-beta1 induces preferential rapid expansion and persistence of tumor antigen-specific $CD8^+$ T cells for adoptive immunotherapy[J]. J Immunother, 2010, 33(4): 371-381.

[11] Pan JJ, Chang WJ, Barone TA, et al. Increased expression of TGF-beta1 reduces tumor growth of human U-87 Glioblastoma Cells in vivo[J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55(8): 918-927.

[12] Muinelo-Romay L, Colas E, Barbazan J, et al. High-risk endometrial carcinoma profiling identifies TGF-beta1 as a key factor in the initiation of tumor invasion[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(8): 1357-1366.

（收稿日期：2014-02-18）