

· 临床研究 ·

转化生长因子 β_1 基因多态性与慢性肾衰竭的相关性研究

董建华¹, 谢志华¹, 刘建^{2△}

(1. 四川省乐山市人民医院肾内科 614000; 2. 泸州医学院附属医院肾内科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨转化生长因子(TGF- β_1)T869C 基因多态性与慢性肾衰竭的相关性。方法 将入选该研究的 79 例慢性肾小球肾炎患者(21 例肾功能正常, 58 例肾功能异常)和 70 例健康体检者分为慢性肾小球肾炎肾功能代偿组、慢性肾小球肾炎肾功能失代偿组和健康对照组。用序列特异性引物聚合酶链(PCR-SSP)技术检测 TGF- β_1 T869C 基因多态性。结果 健康对照组和慢性肾小球肾炎肾功能代偿组 TGF- β_1 T869C 基因型和基因频率分布差异无统计学意义($P>0.05$); 而该两组与慢性肾小球肾炎肾功能失代偿组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。携带 C 等位基因的个体患慢性肾衰竭的风险度约是 T 等位基因的 2.297 倍(OR=2.297, 95%CI:1.395~3.783)。结论 TGF- β_1 T869C 基因多态性与慢性肾衰竭进展存在显著相关性, C 等位基因和 CC 基因型是慢性肾衰竭进展的遗传易感性标记。

关键词:转化生长因子 β_1 ; 肾功能衰竭, 慢性; 基因多态性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.30.021

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)30-3066-03

Association study of gene polymorphism of transforming growth factor-beta 1 and chronic renal failure

Dong Jianhua¹, Xie Zhihua¹, Liu Jian^{2△}

(1. Department of Nephrology, the Leshan People's Hospital, Leshan, Sichuan 614000, China; 2. Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between polymorphism of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β_1) T869C and chronic renal failure(CRF). **Methods** Seventy-nine patients with chronic glomerulonephritis(21 of patients with normal renal function and 58 with CRF) and 70 healthy controls were included in the present study. All of them were divided into three groups: control group, chronic glomerulonephritis with normal renal function group, and chronic glomerulonephritis with CRF group. The polymorphism of TGF- β_1 gene T869C was analyzed by sequence specific primers-polymerase chain reaction method. **Results** No significant differences in distributions of TGF- β_1 T869C genotype and allele frequencies were found between the chronic glomerulonephritis with normal renal function group(TT:TC:CC= 42.9%:38.1%:9.0%, T:C=61.9%:38.1%) and the control group(TT:TC:CC= 34.3%:50%:15.7%, T:C=59.3%:40.7%)($P>0.05$). However, the TGF- β_1 T869C polymorphism in the chronic glomerulonephritis with CRF group(TT:TC:CC= 13.8%:50.0%:36.2%, T:C=38.8%:61.2%) was significant different from control group and chronic glomerulonephritis with normal renal function group. The frequencies of C allele and CC homozygote in the chronic glomerulonephritis with CRF group were significantly higher than the other two groups($P<0.05$). The relative risk suffered from CRF of C allele was 2.297 times to that of the T allele(OR=2.297, 95%CI:1.395~3.783). **Conclusion** TGF- β_1 gene T869C polymorphism is associated with CRF. C allele and CC genotype may be two genetic markers for the genesis and development of CRF.

Key words: transforming growth factorbeta1; kidney failure, chronic; gene polymorphisms

慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)是严重危害人民健康和生命的常见病。近年研究发现, 遗传因素在 CRF 的发生、发展和其对某些药物的疗效方面有重要作用, 寻找与 CRF 发生、发展密切相关的基因和遗传标记, 有助于对高危患者进行早期药物干预或基因治疗及用药个体化提供更多的理论依据, 以有效地阻止 CRF 的发生、逆转或延缓 CRF 的进展。本实验采用序列特异性引物聚合酶链反应(PCR-SSP)检测技术对 TGF- β_1 T869C 进行基因分型, 拟求了解 TGF- β_1 T869C 基因多态性与 CRF 发生、发展的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象 临床及肾活检确诊为原发性慢性肾炎患者 79 例, 男 45 例, 女 34 例, 年龄 17~60 岁, 平均(40.1±13.6)岁。健康对照组为相互间无血缘关系的体检志愿者 70 例, 男 39 例, 女 31 例, 年龄 19~55 岁, 平均(38.0±9.6)岁。所有患者均无原发性高血压、冠心病、糖尿病、风湿性疾病, 无肝脏、肺

部等疾病。根据 Cockcroft-Gault 公式计算出的肾小球滤过率(GFR)水平将患者分成两组:(1)肾功能代偿组: GFR \geq 60 mL/min; (2)肾功能失代偿组: GFR<60 mL/min。

1.2 研究方法

1.2.1 实验方法 采集研究对象外周血 2~5 mL, EDTA 抗凝。按 Omega 公司生产试剂盒说明书进行操作, 提取外周血白细胞 DNA。TGF- β_1 T869C 基因多态性检测采用 PCR-SSP 技术。参照文献设计引物^[1](由上海生物工程公司合成): 引物 F1 5'-AGC AGC GGT AGC AGC AGC A-3', 引物 F2 5'-GCA GCG GTA GCA GCA GCG-3', 共同引物 R 5'-TCC GTG GGA ACT GAG ACA C-3', 内参引物 f1 5'-TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A-3', 内参引物 f2 5'-CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC-3'。由 F1 和 R 组成一对引物扩增 T 等位基因, 由 F2 和 R 组成一对引物扩增 C 等位基因。由 f1 和 f2 组成一对内参引物同管扩增生长激素基因, 以确定在无

△ 通讯作者, E-mail: liujianhy@sina.com.

表 1 健康对照组、慢性肾炎肾功能代偿组和失代偿组 TGF-β₁ T869C 基因型、基因频率分布[n(%)]

项目	基因型			基因频率	
	TT	TC	CC	T	C
对照组	24(34.3)	35(50.0)	11(15.7)	83(59.3)	57(40.7)
病例组	17(21.5)	37(46.8)	25(31.6)	71(44.9)	87(55.1)
肾功能代偿组	9(42.9)	8(38.1)	4(19.0)	26(61.9)	16(38.1)
肾功能失代偿组	8(13.8)*#	29(50.0)*#	21(36.2)*#	45(38.8)*#	71(61.2)*#

*: P<0.05, 与健康对照组比较; #: P<0.05, 与慢性肾炎代偿组比较。

表 2 TGF-β₁ T869C 各基因型一般临床资料

组别	男/女	年龄 (岁)	收缩压 (mm Hg)	舒张压 (mm Hg)	三酰甘油 (mmol/L)	总胆固醇 (mmol/L)	低密度脂蛋白 (mmol/L)	高密度脂蛋白 (mmol/L)	尿蛋白定量 (g/24 h)
TT	22/19	41.0±14.4	161.1±26.3	92.8±13.0	2.05±1.26	5.04±0.87	3.18±0.29	1.14±0.19	1.00±0.54
TC	40/32*	41.7±12.8	163.6±27.1	95.7±17.6	1.95±0.90	5.06±0.64	3.18±0.33	1.19±0.16	1.13±0.76
CC	22/14*△	37.0±14.2	165.1±30.1	97.1±19.7	1.80±0.75	5.20±0.67	3.10±0.28	1.15±0.16	1.10±0.68
F 值	—	0.957	0.101	0.310	0.375	0.385	0.513	0.602	0.098
P	—	0.389	0.904	0.734	0.689	0.682	0.601	0.550	0.916

*: P>0.05, 与 TT 组比较; △: P>0.05, 与 TC 组比较; —: 表示无数据。

TGF-β₁ 基因扩增产物时扩增有效。建立反应体系,反应总体积 50 μL : 2×即用 PCR Master 25 μL, ddH₂O 13 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1 μL, 引物 1(或引物 2) 0.25 μL, 共同引物 R 0.25 μL, 内参引物 f1 0.25 μL, 内参引物 f2 0.25 μL, DNA 模板 10 μL。反应条件: 预变性 95 °C 2 min, 变性 95 °C 30 s, 退火 65 °C 30 s, 延伸 72 °C 30 s。共计 35 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。

1.2.2 凝胶电泳判读基因型 将 TGF-β₁ 基因 T、C 等位基因扩增产物用溴化乙锭染色后, 分别移入 2% 琼脂糖凝胶加样孔, 80 V 电压电泳 50 min, 紫外灯下与 Marker 电泳条带对比判读基因型: TT 型仅 T 等位基因扩增产物电泳出现 241 bp 条带, CC 型仅 C 等位基因扩增产物电泳出现 241 bp 条带, TC 型 T、C 等位基因扩增产物电泳均出现 241 bp 条带。

1.2.3 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间计量资料比较用 *t* 检验或方差分析, 计数资料比较和 Hardy-Weinberg 平衡采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法, 均以 P<0.05 为差异有统计学意义, 并用比值比(OR)及其 95% 可信区间(CI)表示相对风险度。所有数据用 SPSS10.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 TGF-β₁ 基因分型结果 TGF-β₁ 基因共分为 TT、CT、CC 三种基因型。TT 型仅 T 等位基因扩增产物电泳出现 241 bp 条带, CC 型仅 C 等位基因扩增产物电泳出现 241 bp 条带, TC 型 T、C 等位基因扩增产物电泳均出现 241 bp 条带。见图 1、2。

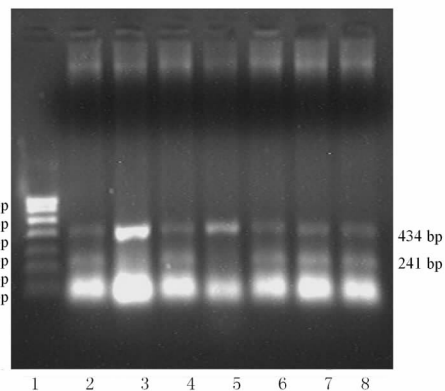
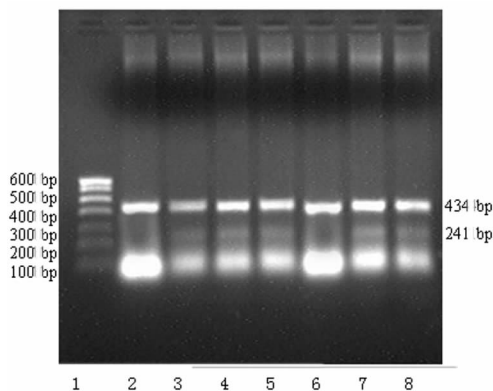


图 1 TGF-β₁ T869C 基因 T 等位基因电泳结果

2.2 健康对照组、慢性肾炎肾功能代偿组和失代偿组 TGF-β₁ T869C 基因型、基因频率分布 见表 1。

2.3 TGF-β₁ T869C 各基因型性别比例、年龄、血压、血脂及尿蛋白比较, 差异无统计学意义(P>0.05), 见表 2。



1: Marker; 2, 6: TT; 4, 7, 8: TC; 3, 5: CC。

图 2 TGF-β₁ T869C 基因 C 等位基因电泳结果

3 讨论

原发性慢性肾小球肾炎的病因及发病机制尚不完全明确, 大多数学者认为免疫反应介导的炎症损伤及肾脏疾病慢性化过程中高血压、蛋白尿、高脂血症等非免疫因素在发病机制中发挥重要作用, 而遗传因素也不容忽视。T869C 多态性是 TGF-β₁ 基因多态性位点之一, 位于 19q13 外显子编码 TGF-β₁ 信号肽疏水的 α 螺旋内, 当密码子 T→C 替换时出现亮氨酸(Leu)变成脯氨酸可直接影响 α 螺旋结构, 从而改变其转运蛋白穿过内质网的稳定性, 影响 TGF-β₁ 的生成量。Brezzi 等^[2] 发现 TGF-β₁ 生成量高的 IgA 肾病患者病情更严重。陈慧生等^[3] 研究认为转化生长因子-β₁ 基因多态性及其血清水平与高血压肾脏损害有关。而另有许多研究认为, TGF-β₁ 基因多态性可能通过多种途径影响 TGF-β₁ 的表达量、活性及功能。因此, 可以认为不同个体遗传因素可通过 TGF-β₁ 基因多态性对慢性肾衰竭的易感性、发展及预后产生影响。

TGF-β₁ 是致纤维化的关键因子之一, 活化的 TGF-β₁ 主要通过多方面促进肾小球硬化和肾间质纤维化最终导致慢性肾脏疾病进行性发展直至肾功能衰竭。Li 等^[4] 发现终末期肾

衰竭患者血压水平与血中 TGF- β_1 水平呈正相关,且 TGF- β_1 水平是由 25 密码子的多态性所产生的不同基因型决定的;而 TGF- β_1 T869C 基因多态性产生的不同基因型亦可引起个体血浆中 TGF- β_1 水平差异,CC 基因型个体血中 TGF- β_1 水平高于 CT、TT 型。Nishikawa 等^[5]研究认为能通过增加 TGF- β_1 合成而刺激 IgA 产生并最终导致 IgA 肾病的发生。Wong 等^[6]及 Valladares-Salgado 等^[7]报道 TGF- β_1 CC/CT 基因型的 2 型糖尿病患者并肾病的发生率增加而且肾脏病变恶化加速。Jahromi 等^[8]研究发现 TGF- β_1 T869C 基因多态性与 1 型糖尿病肾损害有关。同样有研究提示了 TGF- β_1 基因多态性与狼疮性肾病、移植肾病、返流性肾病、多囊肾之间的相关性,不过也存在相反的结论^[9-14]。TGF- β_1 基因多态性与原发性肾小球疾病所致慢性肾衰竭有无相关性迄今国内未见报道。

本实验肾功能代偿组和健康对照组比较,其 TGF- β_1 基因型分布和基因频率差异无统计学意义($P > 0.05$);健康对照组与肾功能失代偿组比较,基因型分布、基因频率均存在统计学意义($\chi^2 = 5.050, P < 0.05; \chi^2 = 5.113, P < 0.05$),而肾功能失代偿组 C 等位基因和 CC 基因型频率均高于健康对照组(61.2%:40.7%:36.2%:15.7%);肾功能失代偿组和肾功能代偿组基因型分布、基因频率也均存在统计学意义($\chi^2 = 4.462, P < 0.05; \chi^2 = 5.672, P < 0.05$),同样肾功能失代偿组 C 等位基因和 CC 基因型频率均高于肾功能代偿组(61.2%:38.1%:36.2%:19.0%);携带 C 等位基因的个体患慢性肾衰竭的风险度约是 T 等位基因的 2.297 倍(OR=2.297,95%CI:1.395~3.783)。TGF- β_1 T869C 各基因型的男女比例、年龄、血压、血脂、尿蛋白等可能与慢性肾功能衰竭发生、发展有关的因素比较差异无统计学意义,因此可以认为 T869C 基因多态性与慢性肾功能衰竭发生、发展存在相关性,C 等位基因和 CC 基因型是慢性肾功能衰竭发生、发展的高危因素。该结果与国外 Choi 等^[15]研究结果不符,表明 TGF- β_1 T869C 基因多态性存在种族和地域差异。

总之,慢性肾功能衰竭发生、发展的发病机制尚未阐明,遗传因素可能在其中起重要作用。本研究提示 TGF- β_1 T869C 基因多态性与慢性肾功能衰竭存在相关性,C 等位基因和 CC 基因型是慢性肾功能衰竭发生进展的高危因素。然而,目前 TGF- β_1 T869C 基因多态性与慢性肾功能衰竭相关性的研究很少,尚需进行大样本、多地域、多民族的广泛深入研究。

参考文献:

[1] Matthey DL, Nixon N, Dawes PT, et al. Association of polymorphism in the transforming growth factor β_1 gene with disease outcome and mortality in rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(8):1190-1194.

[2] Brezzi B, Del Prete D, Lupu A, et al. Primary IgA nephropathy is more severe in TGF-beta 1 high secretor patients[J]. *J Nephrol*, 2009, 22(6):747-759.

[3] 陈慧生, 张七一, 王云英. 转化生长因子- β_1 基因多态性及其血清水平与高血压肾脏损害的关系[J]. *临床内科杂志*, 2007, 24(1):57-59.

[4] Li B, Khanna A, Sharma V, et al. TGF-beta1 DNA poly-

morphisms, protein levels, and blood pressure[J]. *Hypertension*, 1999, 33(1 Pt 2):271-275.

[5] Nishikawa Y, Shibata R, Ozono Y, et al. Streptococcal M protein enhance TGF-beta production and increases surface IgA-positive B cells in vitro in IgA nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15(6):772-777.

[6] Wong TY, Poon P, Chow KM, et al. Association of transforming growth factor-beta(TGF-beta)T869C(Leu 10Pro)gene polymorphisms with type 2 diabetic nephropathy in Chinese[J]. *Kidney Int*, 2003, 63(5):1831-1835.

[7] Valladares-Salgado A, Angeles-Martinez J, Rosas M, et al. Association of polymorphisms within the transforming growth factor- β_1 gene with diabetic nephropathy and serum chonlesterol and triglyceride concentrations[J]. *Nephrology (Carton)*, 2010, 15(6):644-648.

[8] Jahromi MM, Millward BA, Demaine AG. Significant correlation between association of polymorphism in codon 10 of transforming growth factor-beta1 T(29)C with type 1 diabetes and patients with nephropathy disorder[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2010, 30(2):59-66.

[9] 李川江, 于立新, 徐健, 等. 转化生长因子 β_1 基因多态性与慢性移植肾损害的关系[J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27(4):535-537.

[10] Wang B, Morinobu A, Kanagawa S, et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphism in Japanese patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Kobe J Med Sci*, 2007, 53(1/2):15-23.

[11] Cho JH, Huh S, Kwon TG, et al. Association of C-509C and T869C polymorphisms of transforming growth factor-beta1 gene with chronic allograft nephropathy and graft survival in Korean renal transplant recipients[J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(7):2355-2360.

[12] Lee JG, Ahn C, Yoon SC, et al. No association of the TGF-beta1 gene polymorphisms with the renal progression in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) patients[J]. *Clin Nephrol*, 2003, 59(1):10-16.

[13] Bijlsma FJ, van der Horst AA, Tilanus MG, et al. No association between transforming growth factor beta gene polymorphism and acute allograft rejection after cardiac transplantation[J]. *Transpl Immunol*, 2002, 10(1):43-47.

[14] Solari V, Owen D, Puri P. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphism with reflux nephropathy[J]. *J Urol*, 2005, 174(4 Pt 2):1609-1611.

[15] Choi HJ, Cho JH, Kim JC, et al. Interleukin-18, transforming growth factor-beta, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and susceptibility to primary glomerulonephritis[J]. *Tissue Antigens*, 2010, 76(4):289-296.