

TGF- β 1-509C/T 基因多态性与原发性膝骨关节炎的关系

许辉¹, 罗洁², 冯岚¹, 苏新平¹, 吴官保¹, 罗继¹

1. 湖南省中医药研究院附属医院骨伤二科, 湖南 长沙 410006; 2. 长沙市口腔医院检验科

摘要: **目的** 探讨 TGF- β 1-509C/T 基因多态性与原发性膝骨关节炎(primary knee osteoarthritis, PKOA)的相关性,为 PKOA 的发病机制、诊断和治疗提供一种新的方法。 **方法** 采用关联分析,随机选取湖南省中医药研究院附属医院 PKOA 患者 88 例,正常对照组 89 例,应用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)对所选对象 TGF- β 1-509 位点基因和基因型进行检测。基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验;并以 OR 和 95% 可信区间(CI)表示相对风险度。 **结果** PKOA 组和健康对照组 TGF- β 1-509C/T 基因型的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,所选人群具有代表性。PKOA 组与健康对照组基因型频率和等位基因分布差异均有统计学意义,PKOA 组 CC 基因型频率显著高于健康对照组(44.3% vs. 13.5%, $\chi^2 = 20.51$, $P = 0.0000$);C 等位基因的频率显著高于对照组(65.9% vs. 41.6%, $\chi^2 = 21.08$, $P = 0.0000$),差异均有统计学意义。PKOA 组轻型和重型 CC 基因型的频率比较(39.5% vs. 48.9%, $\chi^2 = 0.792$, $P = 0.37$)、C 等位基因的频率比较(62.8% vs. 68.9%, $\chi^2 = 0.728$, $P = 0.39$),差异均无统计学意义。 **结论** TGF- β 1-509C/T 基因多态性与湖南地区人群 PKOA 相关,该位点等位基因 C 携带者可能是 PKOA 的易感人群。

关键词: 原发性膝骨关节炎; 转化生长因子 β 1; 基因多态性; 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性

中图分类号: R684.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2016)08-0900-04 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2016.08.002

Association of TGF- β 1-509C/T gene polymorphisms with primary knee osteoarthritis

XU Hui*, LUO Jie, FENG Lan, SU Xin-ping, WU Guan-bao, LUO Ji

* The Second Department of Orthopaedics and Traumatology, the Affiliated Hospital of Hunan Institute of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China

Corresponding author: LUO Jie, E-mail: 327033693@qq.com

Abstract: **Objective** To explore the relation between the gene polymorphisms of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) promoter-509C/T and primary knee osteoarthritis (PKOA), and to provide a new approach for the pathogenesis analysis, diagnosis and treatment of PKOA. **Methods** Correlation analysis was used in this study. 88 patients with PKOA were randomly selected from the Affiliated Hospital of Hunan Institute of Traditional Chinese Medicine, and 89 healthy controls served as the controls. The TGF- β 1-509C/T gene polymorphisms were analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The genotypes and allele frequencies were compared by chi-square test, and the relative risk was indicated by the OR and 95% confidence intervals (CI). **Results** The -509C/T genotypic frequencies in the PKOA group and the control group both conformed to Hardy-Weinberg equilibrium, indicating that the selected population were representative. There were statistically significant differences in the genotypic frequencies and the distribution of alleles between the PKOA group and the healthy control group. The -509 CC genotypic frequency was significantly higher in the PKOA group than in the healthy control group (44.3% vs. 13.5%, $\chi^2 = 20.51$, $P = 0.0000$). So was the -509C allelic frequency (65.9% vs. 41.6%, $\chi^2 = 21.08$, $P = 0.0000$). No statistically significant differences were found in the -509 CC genotypic frequency (39.5% vs. 48.9%, $\chi^2 = 0.792$, $P = 0.37$) and the -509C allelic frequency (62.8% vs. 68.9%, $\chi^2 = 0.728$, $P = 0.39$) between the mild PKOA group and the severe PKOA group. **Conclusions** The gene polymorphisms of transforming growth factor- β 1 promoter -509C/T are associated with PKOA in Hunan Province. The individuals carrying the -509C allele may be more susceptible to PKOA.

Key words: Primary knee osteoarthritis; Transforming growth factor beta1; Genetic polymorphism; Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

基金项目: 湖南省科技厅课题(2013FJ3152); 湖南省中医药研究院院级课题(201224)

作者简介: 许辉(1974-), 男, 湖南衡阳人, 副主任医师, 主要从事骨科临床工作。

通讯作者: 罗洁, E-mail: 327033693@qq.com。

原发性膝骨关节炎(primary knee osteoarthritis, PKOA)是骨关节外科的常见病和多发病,发病率呈现不断上升趋势,已成为严重危害中老年人健康的慢性疾病之一^[1]。国内外学者对于本病的发病病因、机理、预防和治疗进行了广泛的深入研究,致病机制仍不清楚,难以早期发现^[2]。PKOA 的发生发展是全身因素和局部因素,遗传因素和环境因素等共同作用所致^[3-4]。本研究着眼于从基因水平来研究 TGF- β 1-509C/T 基因多态性与湖南地区人群 PKOA 的关联,为 PKOA 的防治开辟一个新的领域。

1 对象与方法

1.1 研究对象 随机选择湖南省中医药研究院附属医院 2013 年 5 月-2014 年 9 月期间在骨伤科门诊和住院确诊的原发性膝骨性关节炎(PKOA 组)患者 88 例(轻型 43 例,重型 45 例),均无血缘关系,男性 32 例,女性 56 例;年龄(47.5 \pm 8.3)岁。入选标准:(1)临床症状符合中华医学会骨科学分会骨性关节炎诊治指南(2007 版)标准,膝关节 X 线根据 Kellgren-Lawrence (K-L)X 线分级标准^[5],将骨性关节炎分为五级,临床症状结合膝关节 X 线 K-L 0、I、II 级属轻型 PKOA;临床症状结合 K-L III、IV 级属重型 PKOA;(2)排除继发性膝骨性关节炎;(3)排除高血压、糖尿病和肝肾功能不全。随机选择同期体检健康无 PKOA 临床症状以及膝关节 X 线检查无明显异常 89 例作为健康对照组,年龄(48.8 \pm 7.5)岁,男性 28 例,女性 61 例。

1.2 试剂与仪器 Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ l)(广州东盛公司),限制性内切酶 Bsu36I(500 U/ml)(MBI Fermentas),全血基因组提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(广州东盛公司),PCR 仪(ABI 公司),电泳仪(北京六一仪器厂),一体化凝胶成像分析系统(北京赛智创业科技有限公司)。

1.3 基因多态性检测 每位研究对象于清晨空腹抽取外周静脉血 2 ml,采用 EDTA-Na₂ 抗凝,储存于 4℃,于 1 周内进行基因组 DNA 提取;如果 1 周内未进行基因组 DNA 提取,则储存于-20℃保存备用,外周血基因组 DNA 的提取参照试剂盒说明书进行。参照文献^[6],在 NCBI 数据库中查找基因序列(rs1800469),应用引物设计软件 Primer5.0 设计 PCR 引物(上游引物序列:5'-GCTACGGCGTGGAGTGCTGA-3';下游引物序列:5'-AGAGGACCAGGCGGAGAAGG-3'),引物由北京华大基因研究中心合成。扩增片段长度为 506 bp。PCR 反应条件:94℃ 4 min 预变性(94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s)35 个循环,72℃ 5

min,4℃保存。扩增产物经内切酶 Bsu36I(Eco811)消化,酶切产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,观察结果。

1.4 统计学分析 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,Hardy-Weinberg 平衡、基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验;并以 OR 和 95%可信区间(CI)表示相对风险度。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电泳结果 若扩增片段中存在-509 位点(-CT-TC-)可发生胸腺嘧啶(T)与胞嘧啶(C)的互换,即-509 位点(-CCTC-)时,则产生 Bsu36I 酶切位点,经 Bsu36I 内切酶消化后产生 329 bp 和 177 bp 两个片段。TT 基因型只有 1 个片段(506 bp),CC 基因型有 2 个片段(329 bp、177 bp),CT 基因型有 3 个片段(506 bp、329 bp 和 177 bp),见图 1。

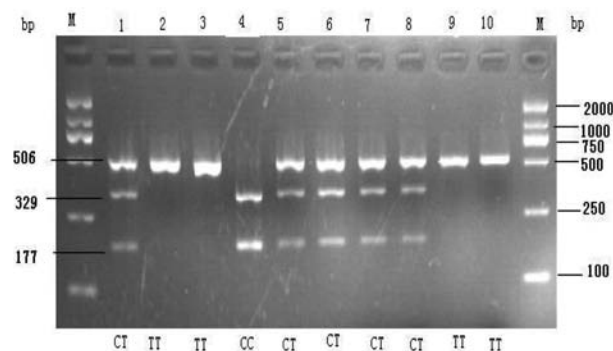


图 1 RFLP 电泳

2.2 PCR 产物测序 随机挑选 3 种基因型各 1 份测序,其结果与电泳结果完全一致,见图 2。

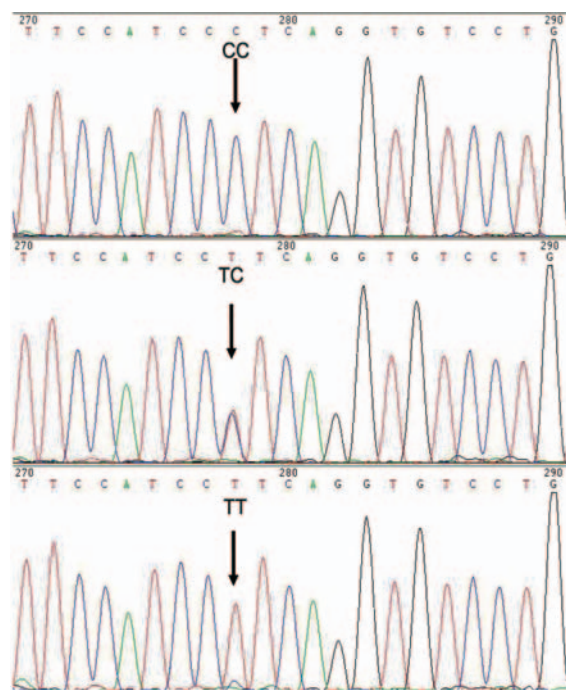


图 2 TGF- β 1-509 多态位点测序图

2.3 PKOA 组与健康对照组 TGF-β1-509C/T 基因型和等位基因频率比较 经检验,PKOA 组与对照组 TGF-β1-509C/T 基因型的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律(分别 $\chi^2=0.135, P=0.934; \chi^2=2.190, P=0.335, P>0.05$),所选人群具有代表性。PKOA 组与健康对照组基因型频率和等位基因分布均有差异,CC 基因型频率高于健康对照组(44.3% vs. 13.5%, $\chi^2=20.51, P=0.0000$);C 等位基因的频率高于对照组(65.9% vs. 41.6%, $\chi^2=21.08, P=0.0000$),差异均有统计学意义($P<0.05$)。对等位基因频率的相对风险分析发现,C 等位基因携带者患 PKOA 的风险是 T 等位基因的 2.72 倍($OR=2.72, 95\%CI=2.57\sim2.88, P=0.0000$),见表 1。

表 1 PKOA 组和对照组 TGF-β1-509C/T 基因多态性分布比较(n,%)

组别	基因型				等位基因		
	#CC	CT	TT*	合计	*C	T	合计
PKOA 组	39(44.3)	38(43.2)	11(12.5)	88(100.0)	116(65.9)	60(34.1)	176(100.0)
对照组	12(13.5)	50(56.2)	27(30.3)	89(100.0)	74(41.6)	104(58.4)	178(100.0)

注:# $\chi^2=20.51, P=0.0000$; * $\chi^2=21.08, P=0.0000, OR=2.72, 95\%CI=2.57\sim2.88, P=0.0000$ 。

2.4 PKOA 组轻型和重型 TGF-β1-509C/T 基因多态性分布比较 PKOA 组轻型和重型 CC 基因型频率比较(39.5% vs. 48.9%, $\chi^2=0.792, P=0.37$)、C 等位基因频率比较(62.8% vs. 68.9%, $\chi^2=0.728, P=0.39$),差异均无统计学意义,见表 2。

表 2 PKOA 组轻型和重型 TGF-β1-509C/T 基因多态性分布比较(n,%)

PKOA 分型	基因型				等位基因		
	#CC	CT*	TT	合计	*C	T	合计
轻型	17(39.5)	20(46.5)	6(14.0)	43(100.0)	54(62.8)	32(37.2)	86(100.0)
重型	22(48.9)	18(40.0)	5(11.1)	45(100.0)	62(68.9)	28(31.1)	90(100.0)

注:# $\chi^2=0.792, P=0.37$; * $\chi^2=0.728, P=0.39$ 。

3 讨论

OA 的发病是个复杂的病理过程,目前对 PKOA 的基础研究主要集中在软骨和滑膜两个方面,能影响软骨细胞和滑膜细胞的细胞因子主要包括生长因子、趋化因子、白细胞介素、肿瘤坏死因子等,其中 TGF-β 被认为在 OA 骨赘和滑膜增生中起到重要作用,是今后研究的热点。TGF-β1 属于 TGF-β 超家族,在软骨的生长和重建中发挥重要作用,是 PKOA 的重要关联

基因。目前关于 TGF-β1 基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点与 OA 的关联研究很多,但结果不尽一致,王友成等^[7]研究发现 TGF-β1C1348-T 位点多态性与 PKOA 的发生显著相关。因中国人常见的变异主要发生在-509C/T,国内外尚未见有关于-509C/T 位点与 PKOA 关联研究的相关报道。

本研究采用的是关联分析,关联分析的对象是两个遗传背景相同或至少非常相似的分别由病例和对照组成的人群,目的在于比较两人群间某候选基因多态性的等位基因频率有无差异。通过关联分析会发现,如果某种等位基因本身或其附近位点与疾病易感性有关,那么在病人组中,该等位基因频率分布会明显高于对照组,如果与疾病抵抗性或保护性有关,那么在病人组中,该等位基因频率分布会明显低于对照组。通过上述实验得出,PKOA 组与健康对照组基因型频率和等位基因分布差异均有统计学意义,CC 基因型频率高于健康对照组(44.3% vs. 13.5%);C 等位基因的频率高于对照组(65.9% vs. 41.6%),差异均有统计学意义($P<0.05$)。logistic 回归分析结果显示相对于携带 T 等位基因而言,携带 C 等位基因的人群患 PKOA 的风险是 2.72 倍($OR=2.72, 95\%CI=2.57\sim2.88$)。说明 TGF-β1 启动子区域-509 等位基因 C 可能是 PKOA 的易感基因,等位基因 T 可能是保护基因,这可能是由于 C 向 T 的改变,增加了 TGF-β1 的转录和表达水平,增加了对免疫细胞活化的抑制,从而增加抗炎性有关^[8],也有可能是 TGF-β1 的高度表达介导软骨合成,抑制胶原和蛋白多糖分解,保护软骨基质不被各种蛋白酶水解破坏,实现使软骨的损伤逆转相关^[9-10]。

郭静和李琪佳^[11]研究发现,OA 组软骨和滑膜细胞凋亡程度与 TGF-β1 的表达均呈负性相关,OA 中 TGF-β1 的高表达有可能负性调节软骨和滑膜区域细胞凋亡的发生、延缓骨性关节炎的发生发展;陈明等^[12]研究发现,KOA 患者关节液 TGF-β1 水平与 KOA 分期呈显著负相关,KOA 中晚期患者关节液 TGF-β1 水平明显低于对照组($P<0.01$),KOA 早期患者关节液 TGF-β1 水平与健康对照组比较,差异无统计学意义($P<0.05$)。以上研究表明,TGF-β1 对 KOA 可能有保护和修复作用,是衡量病情严重程度的一个指标。本实验将 PKOA 分为轻型和重型进行研究,通过实验得出,两者基因型和等位基因频率比较,差异均无统计学意义,未发现-509C/T 基因多态性与 PKOA 病情轻重有关联。

以上研究结果的差异,可能与样本的数量大小、不

同地域、种族以及研究人群的遗传异质性相关,因为 PKOA 的发生是一个多基因遗传的复杂的病理过程,遗传异质性、环境因素以及环境因素与遗传因素相互作用等诸多复杂因素均可对 PKOA 产生影响。因此基因与基因以及基因与环境之间的交互作用还有待进一步实验研究。

参考文献

- [1] Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, et al. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis [J]. *Osteoarthr Cartilage*, 2010, 18: 24-33.
- [2] Mobasheri A. Osteoarthritis year 2012 in review biomarkers [J]. *Osteoarthr Cartilage*, 2012, 20(12): 1451-1464.
- [3] Valdes AM, Spector TD. Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(1): 23-32.
- [4] 曾敏川, 李康华. 湖南郴州地区膝关节骨性关节炎流行病学调查 [J]. *实用预防医学*, 2014, 21(10): 1157-1160.
- [5] Lawrence JS. *Rheumatism in population* [M]. London: Wiliam Heinemann Med Books LTD, 1997: 153.

- [6] 陈斌, 曾志荣, 柯斌, 等. TGF- β 1-509C/T 基因多态性与不同中医证型胃癌关系的研究 [J]. *广州中医药大学学报*, 2011, 28(4): 339-343.
- [7] 王友成, 刘铮, 刘国华, 等. TGF- β 1 基因 C1348-T 位点与膝关节炎的关系 [J]. *中华关节外科杂志*, 2015, 9(4): 500-504.
- [8] 王豫萍, 周艳, 肖林生, 等. TGF- β 1-509C/T 基因多态性与类风湿关节炎相关性研究 [J]. *临床检验杂志*, 2008, 26(1): 31-32.
- [9] 郭铁峰, 周明旺, 李盛华, 等. 转化生长因子 β 对软骨组织代谢影响的研究进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(15): 2827-2834.
- [10] 樊志强, 庞炜, 杨连甲, 等. 白细胞介素-1 受体拮抗剂及转化生长因子 β 1 对兔膝关节骨性关节炎的治疗研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(13): 2447-2450.
- [11] 郭静, 李琪佳. TGF- β 1 在骨性关节炎中的表达及关节软骨和滑膜细胞凋亡的关系 [J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2008, 11(4): 462-465.
- [12] 陈明, 王丹娜, 高福明, 等. 关节液 TNF- α 和 TGF- β 1 检测在膝骨性关节炎中的应用 [J]. *中国现代医生*, 2015, 53(1): 22-25.

收稿日期: 2015-12-25

(接 899 页)

3 讨论

虽然药品费占住院总费用的比例最高,但是导致女性病人个体住院总费用差别的主要原因并非药品费,而主要是检查费和化验费,例如,在不同年龄组中,30~39 岁女性病人的检查费为 450.1 元,而 29 岁以下的病人仅为 93.8 元,相差了 4.8 倍,两组间药品费相差 0.9 倍。从医院类型看,由于三级医院的机会性感染病人病情严重,住院时间长,收费标准高,三级医院检查费和化验费均高于二级医院,考虑到艾滋病疫情严重地区的经济相对落后,治疗费用主要还是依靠各级财政拨款和各类项目,因此,在一个特定地区,应根据病人的病情严重程度在级别不同的医院之间进行必要的转诊,避免病情较轻的病人过多的集中到高级别的医院,以提高治疗经费的使用效率^[6]。

受生理、求医心理和社会因素等方面的影响,女性艾滋病病人的卫生服务需求和利用有别于男性病人;有调查显示,女性病人两周患病率为 31.4%,高于男性病人 (22.8%)^[7],高于一般农村居民的两周患病率 (17.7%);女性病人的两周就诊率为 27.5% 高于男性病人 (19.3%),高于一般农村居民 (15.2%);女性病人住院率为 42.2%,男性病人住院率为 14.9%,农村居民年住院率为 6.8%。因此,是否及时就诊或住院可能会影响到女性艾滋病病人的住院费用。由于住院费用较

高,即使对经济困难家庭实行部分费用减免的政策^[8],病人仍然需要支付较高的费用,使得部分女性艾滋病病人因经济原因不去住院,导致病情加重,考虑到很多女性病人感染艾滋病的无辜性(多被其配偶感染),更重要的是有可能导致母婴传播,因此,应该对女性艾滋病病人的住院费用加大减免力度,如纳入大病医保范畴或特殊医疗救助。

参考文献

- [1] 卫生部, 联合国艾滋病规划署, 世界卫生组织. 2011 年中国艾滋病疫情估计工作报告 [R]. 北京: 卫生部, 2011: 2.
- [2] 张福杰. 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 8-9.
- [3] 王陇德. 艾滋病学 [M]. 第 1 版. 北京: 北京出版社出版集团公司, 2009: 396.
- [4] 徐鹏, 韩琳, 朱坤, 等. 我国贫困农村地区艾滋病病人治疗费用纳入新农合统筹基金的可行性分析 [J]. *中国卫生政策研究*, 2008, 1(3): 22-26.
- [5] 王陇德. 艾滋病防治工作手册 [M]. 第 1 版. 北京: 北京出版社, 2005: 217.
- [6] 徐鹏, 朱坤, 王颖, 等. 我国艾滋病高流行地区病人住院费用分析 [J]. *中国卫生经济*, 2009, 28(1): 33-35.
- [7] 徐鹏, 时允, 徐芸中, 等. 农村户籍艾滋病病人的患病、就诊和住院情况分析 [J]. *中国卫生经济*, 2012, 31(1): 48-50.
- [8] 徐鹏, 刘康迈, 吕繁, 等. 艾滋病与商业医疗保险能否渐行渐近 [J]. *中国卫生经济*, 2011, 30(1): 31-33.

收稿日期: 2016-01-10