

转化生长因子 β 基因多态性与煤工尘肺相关性研究

李娟, 范雪云, 郝晓惠

(华北煤炭医学院 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 探讨转化生长因子 β (TGF β) 基因多态性与煤工尘肺的关系。方法 采用 1:1 配对的病例对照研究方法, 病例组为确诊的 40 例 I 期煤工尘肺病人, 对照组与煤工尘肺组同性别、同民族、同一工作车间或相同采掘工作面、年龄差 < 5 岁、开始接尘时间和累积接尘工龄差 < 2 年的接尘工人。应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术对 TGF β 启动区的 -509C/T 位点和第一外显子的 +869T/C +915G/C 位点的基因多态性进行检测。结果 煤工尘肺组 TGF β 启动区的 -509C/T +869T/C +915G/C 三位点等位基因和基因型频率与对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 TGF β 基因多态性在煤工尘肺的发病中不起主要作用。

关键词: 煤工尘肺; 转化生长因子 β (TGF β); 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术 (PCR-RFLP); 基因多态性

中图分类号: R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2010)05-0335-04

Relationship between genetic polymorphism of transforming growth factor β
and susceptibility of coal worker's pneumoconiosis

LI Juan, FAN Xueyun, HAO Xiaohui

(North China Coal Medical University, Tangshan 063000, China)

Abstract: Objective To explore the relation between genetic polymorphism of transforming growth factor β (TGF β) and susceptibility of coal worker's pneumoconiosis (CWP). Methods The 1:1 paired case-control study was applied. The pneumoconiosis group consisted of 40 workers with the first phase of CWP, the control group consisted of 40 workers without CWP. There was no obvious difference between the two groups in sex, nationality, workshop or work site, and the differences in age and cumulative exposure time between the two groups were less than 5 years and 2 years, respectively. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect the polymorphism of TGF β . Results The differences of -509C/T +869T/C and +915G/C frequencies in TGF β genotype between the case and control group were not significant ($P > 0.05$). Conclusion The genetic polymorphism of TGF β does not play a dominant role in the susceptibility of coal worker's pneumoconiosis.

Key words: coal worker's pneumoconiosis; transforming growth factor β (TGF β); polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP); genetic polymorphism

煤工尘肺 (coal worker's pneumoconiosis, CWP) 是长期吸入煤矿无机粉尘所致的以肺组织纤维化为主的严重职业病, 以煤矽肺居多。转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF β) 在纤维化中起着重要的作用, 它可以调控肺成纤维细胞分裂、增殖及胶原蛋白的合成与降解, 在纤维化性疾病中表达水平增高^[1-3]。调查发现, 煤工尘肺发病存在着很大的个体差异, 本文拟探讨 TGF β 基因多态性与 CWP 的关系, 揭示其在 CWP 发生发展中遗传易感性的作用, 为进一步防治 CWP 奠定理论基础。

1 对象与方法

1.1 对象

本研究在对开滦 (集团) 有限责任公司下属某

煤矿 800 名接尘工人进行健康检查基础上, 详细核实每名工人的职业史, 调查其接尘性质及累积接尘工龄, 全部拍摄后前位胸大片, 由尘肺诊断组按《尘肺病诊断标准》(GBZ70-2002) 确诊的煤工尘肺病人为研究对象。从受检工人中选择与病例年龄差 < 5 岁、同性别、同民族、开始接尘时间及累积接尘工龄差 < 2 年、在同一车间或同一采掘工作面工作的非尘肺接尘工人作为对照组, 与病例组进行 1:1 配对。

选择男性、汉族 I 期煤工尘肺患者 40 例为病例组。平均年龄为 (55.9 ± 9.4) 岁 (43~81 岁), 平均发病年龄为 (51.4 ± 8.2) 岁 (25~75 岁), 平均发病工龄为 (26.5 ± 7.3) 年 (3~46 年); 对照组的性别、民族与煤工尘肺组相同, 平均年龄为 (55.6 ± 9.4) 岁 (39~80 岁)。

对影响煤工尘肺的主要因素进行均衡性检验表明, 其开始接尘年龄、开始接尘时间、累积接尘工

收稿日期: 2010-05-26

基金项目: 国家安全生产监督管理局资助 (2002)

作者简介: 李娟, (1978-), 女, 硕士, 讲师。

龄、吸烟情况和血型等，两组差异均无统计学意义。

1.2 方法

1.2.1 样品采集 现场采集空腹静脉血 5 ml 取 1 滴用于血型测定，其余用 2% EDTA 抗凝。采用低渗溶血法分离白细胞，酚氯仿异戊醇法抽提 DNA 于 4℃ 冻存备用。

1.2.2 TGFβ 基因多态性检测 (1) 目的基因片段的扩增：PCR 引物设计参照文献 [3, 4]。(2) PCR 扩增体系及循环体系：总体系是 25 μl 内含模板 DNA 50 ng 上下游引物各 40 pmol/L 50 mmol/L KCl 1.5 mmol/L MgCl₂ 200 μmol/L dNTP 1 U Taq

表 1 TGFβ 各点引物序列

基因位点	前引物	后引物
TGFβ -509	5'-GGAGAGCAATCTTACAGGTG-3'	5'-TAGGAGAAGGAGGGTCTGTGC-3'
TGFβ +869	5'-TCCGGGCTGCGGCTG CAGCTGCT-3'	5'-CAGGATCTGGCCGCGGATGG-3'
TGFβ +915	5'-ACCACACCAGCCCTGTTGTC-3'	5'-AGCTTGGACAGGATCTGGCC-3'

1.3 统计学处理

用 Excel 建库，SPSS 1.5 进行数据分析。定量资料选用 1:1 配对 检验；多分类有序及无序资料采用行 × 列表 检验；配对计数资料采用 1:1 配对 检验。

2 结果

2.1 病例组和对照组开始接尘年龄、累计接尘工龄及接尘时间的比较

由于环境因素对尘肺的影响极大，我们对配对的病例组和对照组的开始接尘年龄、累计接尘工龄及接尘时间进行了比较，结果显示差异均无统计学意义 (P>0.05)，结果见表 2。

表 2 病例组和对照组开始接尘年龄、累计接尘工龄及接尘时间的比较

组别	开始接尘年龄 (年)		开始接尘年代			累计接尘工龄 (年)	
	$\bar{x}$	s	≤1959	1960~	1970~1987	$\bar{x}$	s
CWP 组	21.64	3.49	25	23	69	27.96	5.51
对照组	21.56	3.51	27	30	60	28.73	5.73
	t=0.201	P=0.833	χ ² =1.629	P=0.443	t=1.331	P=0.653	

2.2 TGFβ 基因多态性与煤工尘肺之间的关系

CWP 组和对照组 TGFβ 3 个基因位点的基因型进行比较，结果显示，煤工尘肺组 TGFβ -509、+915、+869 位点的基因型频率与对照组比较，差异均无统计学意义 (P>0.05)，见表 3。

对 TGFβ 3 个位点等位基因携带率进行比较，结果显示，煤工尘肺组 TGFβ -509、+915、+869 位点的等位基因频率与对照组比较，差异均无统计学意义 (P>0.05)，见表 4。

DNA 聚合酶。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 4 min 94℃ 变性 30 s 57℃ 退火 30 s (-509) /60℃ 退火 30 s (+869) /59℃ 退火 30 s (+915)，72℃ 延伸 1 min 为 1 个循环，共扩增 30 个循环，结束后于 72℃ 延伸 5 min。(3) RFLP 法检测基因型：TGFβ -509 位点扩增出 120 bp 的产物，通过 DdeI 内切酶识别，酶切成 74 bp 和 46 bp 片段；+869 位点扩增出 153 bp 的产物，被 Pvu II 内切酶切成 135 bp 和 18 bp +915 位点扩增出 224 bp 的产物，通过 Crlj3I 内切酶识别，酶切成 124 bp 和 100 bp 片段。TGFβ 各点引物序列详见表 1。

表 3 煤工尘肺组与对照组 TGFβ 基因型频率的比较

基因位点	基因型	CWP		对照组		χ ² 值	OR 值
		例数	比 (%)	例数	比 (%)		
-509 (C/T)	CC	12	30.0	16	40.0	3.423	1.238
	CT	15	37.5	18	45.0		
	TT	13	32.5	6	15.0		
+869 (T/C)	TT	9	22.5	14	35.0	1.843	1.334
	TC	18	45.0	17	42.5		
	CC	13	32.5	9	22.5		
+915 (G/C)	GG	32	80.0	34	85.0	0.346	1.202
	GC	8	20.0	6	15.0		
	CC	0	0.0	0	0.0		

表 4 煤工尘肺组与对照组 TGFβ 等位基因频率的比较

等位基因	CWP		对照组		χ ² 值	OR 值
	例数	比 (%)	例数	比 (%)		
-509 * C	39	48.8	50	62.5	3.064	1.330
-509 * T	41	51.2	30	37.5		
+869 * T	36	45.0	45	56.3	2.025	1.254
+869 * C	44	55.0	35	43.7		
+915 * G	72	90.0	74	92.5	0.313	1.183
+915 * C	8	10.0	6	7.5		

考虑到同一基因不同位点之间可能存在着相互作用，我们对煤工尘肺组中 -509 位点和 +915 位点的基因型进行协同分析，结果显示，煤工尘肺组同时携带 -509 CC 基因型和 +915 GG 基因型频率低于对照组，差异无统计学意义 (P>0.05)，见表 5。

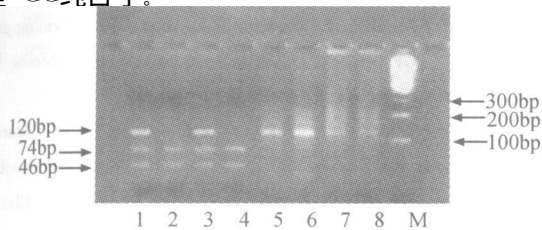
表 5 煤工尘肺组与对照组同时携带 TGF β (-509和+915)

两位点基因型和等位基因频率的比较

基因型 / 等位基因	CWP		对照组		χ^2 值	OR值
	例数	比 (%)	例数	比 (%)		
CC/GG	7	17.5	12	30.0	1.726	0.189
CT/GC	1	2.5	2	5.0	0.346	0.556
TT/GC	2	5.0	0	0	2.051	0.152
-509 C+915G	27	33.8	34	42.5	1.298	0.255
-509 T+915C	3	3.8	1	2.5	1.026	0.311

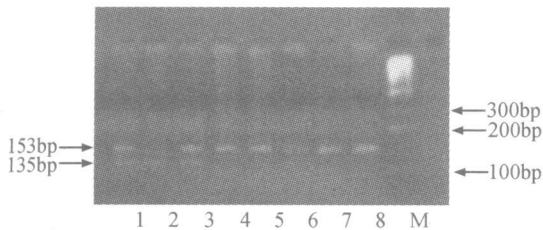
2.3 PCR产物及酶切产物结果判定

图 1 是 PCR 扩增产物经酶切电泳图。图 (a) 是 -509 位点由内切酶 DdeI 酶切后, 电泳显示 3 条带的是杂合子 CT 2 条带的是纯合子 CC 显示 1 条带的是 TT 纯合子; 图 (b) 是 +869 位点由 PvuII 酶切后, 电泳显示 2 条带的是杂合子 TC 1 条带的 (153 bp) 是纯合子 CC 显示 1 条带的 (135 bp) 是 TT 纯合子; 图 (c) 是 +915 位点由内切酶 Crf3I 酶切后, 电泳显示 3 条带的是杂合子 GC 显示 1 条带的是 GG 纯合子。



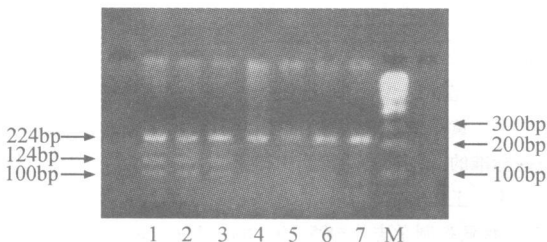
1 和 3 为突变杂合型, 2 和 4 为突变纯合型, 5 和 6 为未突变型, 7 和 8 为扩增产物, M 为 DNA 标准物

(a) -509 位点扩增及酶切图谱



1 和 3 为突变杂合型, 2 为突变纯合型, 4 和 5 为未突变型, 6、7、8 为扩增产物, M 为 DNA 标准物

(b) +869 位点扩增及酶切图谱



1、2、3 为突变杂合型, 4 为未突变型, 5、6、7 为扩增产物, M 为 DNA 标准物

(c) +915 位点扩增及酶切图谱

图 1 PCR 扩增产物酶切电泳图

3 讨论

煤工尘肺是由于长期吸入煤尘所引起的肺纤维化疾病, 基本病变是煤尘斑、灶周肺气肿及弥漫性纤维化, 发病工龄多在 15~20 年, 病变发展较快, 危害较重, 同一工作环境, 煤工尘肺发生率也存在着个体差异。

TGF β 位于人类染色体 19q13 包含 6 个内含子和 7 个外显子, 它的启动区有 2 个重要位点, 来启动转录并具有多种调节机制, 编码区主要有 2 个基因多态性位点引起编码蛋白的差异, 可影响疾病的产生或严重程度; 必须在严格控制其他因素的情况下, 才能研究基因多态性对煤工尘肺发病的作用。本研究结果表明, 两组间开始接尘年龄、累计接尘工龄及接尘时间差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 两组的吸烟率及直接反映吸烟情况的吸烟指数差异均无统计学意义, 煤工尘肺组与对照组间血型的构成差异无统计学意义。

TGF β 基因 -509 (C/T) 突变的意义目前还不十分清楚, 有人认为, TGF β -509 (C $\rightarrow$ T) 是一个功能性的变异, 因这个变异位于 TGF β 基因启动子区域, 所以它可能产生或破坏一个转录因子结合位点, 从而导致 TGF β 异常表达; TGF β -509 T 变异与真正起作用的多态现象存在连锁不平衡; -509 位点与血浆中 TGF β 的浓度有着密切的关系^[5], 对免疫系统有一定的影响, 与重度哮喘有关^[6], 与 IRE 水平增高^[7]有关。有研究报道, 携带 -509 * T 等位基因人群血浆中 TGF β 的浓度增高^[8]。TGF β 在体内产生量的多少可能是由编码 10 和 25 密码子的 +869、+915 位点的基因多态性造成^[7], 当 +869 位点碱基 T 被 C 取代时, 密码子 10 编码的氨基酸从亮氨酸 (Leu) 变成脯氨酸 (Pro), 如果编码的氨基酸为 Pro 时, 机体合成 TGF β 量较多^[9]。然而 Suthanthiran 等^[10]研究报道, +869 * T 等位基因与 TGF β 合成有关, 而不是 C 等位基因。另有报道, 10 密码子基因型为 TC 和 CC 患者纤维化的发生率是基因型为 TT 的 3 倍^[11]; 然而 Arkwright 等研究 TGF β 基因多态性与囊性肺纤维化的关系时发现, +869 基因型为 TT 的囊性肺纤维化患者比基因型为 TC、CC 的患者更易发生急性肺功能损伤^[12], +915 GC 基因型与 TGF β 分泌量增多有关^[13]。Gewaltig 等在研究肝纤维化时发现, 25 密码子杂合子 (GC) 基因型发展成为纤维化比纯合子 (GG) 基因型更快^[14]。

本研究显示, TGF β (-509、+869、+915) 三个位点的基因型与等位基因的频率在煤工尘肺的研

究中, 病例组和对照组, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。也有其他研究报道, TGF- β 等细胞因子的基因多态性与尘肺缺乏联系^[15]。

综上, 可以假设, 在煤工尘肺的发病中 TGF- β 基因多态性可能不扮有主要角色; 另外, 过去认为煤工尘肺的纤维化是煤尘中的二氧化硅所致, 现在已肯定煤尘本身可至肺纤维化, 但致病能力较弱, 故可能不会导致人类基因的改变, 具体的原因还需要进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] Kanzler S, Lohse A, Keil A, et al. TGF- β 1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis [J]. *Am J Physiol* 1999 276: 1059-1068
- [2] Ikegawa K, Tada H, Kuboki K, et al. Role of protein kinase C- α signaling pathway for extracellular matrix production in cultured human mesangial cells exposed to high glucose levels [J]. *Diabetes Res Clin Pract* 2003 59: 25-30
- [3] Hsiang Tai Chou, Yi Ru Shi, Yuan Hsu, et al. Lack of association between transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms and mitral valve prolapse in Taiwan Chinese [J]. *Journal Heart Valve Dis* 2002 11: 479-483.
- [4] Bema A, Hale Q, Gulersu J, et al. Role of transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *JPediatr Hematol Oncol* 2003 25: 885-889
- [5] Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta 1 [J]. *Hum Mol Genet* 1999 8: 93-97.
- [6] Yao H, Su Yang, Huey Jen Lai, Cheng Ksi Kao, et al. The association between transforming growth factor- β gene promoter C-509T polymorphism and Chinese children with Henoch-Schönlein purpura [J].

Pediatr Nephrol 2004 19: 975.

- [7] Grainger DJ, Metcalfe JC. Transforming growth factor- β and cardiovascular protection. In: Rubanyi JM, Dzau VJ, eds. *The Endothelium in Clinical Practice: Source and Target of Novel Therapies*. 1st ed [M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1997: 203-243.
- [8] Bayat A, Bock Q, Mrowietz U, et al. Genetic susceptibility to keloid disease and hypertrophic scarring: transforming growth factor beta 1 common polymorphisms and plasma levels [J]. *Plast Reconstr Surg* 2003 111: 534-543
- [9] Coran SA, Gbadegesin RA, Williams S, et al. Role of TGF- β 1 in renal parenchymal scarring following childhood urinary tract infection [J]. *Kidney Int* 2002 61: 61-67
- [10] Suthamthiran M, Li B, Song JQ, et al. Transforming growth factor- β 1 hyperexpression in African American hypertensives: a novel mediator of hypertension and/or target organ damage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 97: 3479-3484.
- [11] Louise J, Newton R, Adcock IM, et al. TGF- β allele association with asthma severity [J]. *Hum Genet* 2001 109: 623-627
- [12] Akwariht PD, Laurie S, Super M, et al. TGF- β genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis [J]. *Thorax* 2000 55: 459-462
- [13] ElGamel A, Awad MR, Hasleton P S, et al. Transforming growth factor beta (TGF-beta 1) genotype and lung allograft fibrosis [J]. *J Heart Lung Transplant* 1999 18: 517-523.
- [14] Gwahlig J, Mangasser Stephan K, Garung C, et al. Association of polymorphisms of the transforming growth factor beta 1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis [J]. *Clin Chim Acta* 2002 316: 83-94.
- [15] Fen W, Yahin Q, Yunxia T, et al. Lack of association between cytokine gene polymorphisms and silicosis and pulmonary tuberculosis in Chinese iron miners [J]. *J Occup Health* 2008 50: 445-454

(上接第 334 页)

对于尘肺肺功能损伤与影像学改变间的关系, 本文见不规则小阴影中肺功能异常率较圆形小阴影高, 这与不规则小阴影的间质纤维化病理基础是一致的。此时胸膜下、小叶间隔、小血管周围以及肺泡间隔的纤维组织增生致使这些部位增宽变厚、互相连接形成弥漫性网格, 肺泡体积缩小, 必然会影响肺通气功能和氧的弥散。有大阴影改变者较仅有小阴影时肺功能异常率高, 说明随尘肺病变严重、期别增高, 肺功能损伤明显。本文尘肺肺功能损伤程度与影像学改变间未见有统计学意义的相关结果, 从组织病理生理学基础看两者间总体上应一致, 但临床上有时不完全平行, 或许与个体的肺代偿情况不同, 或是与不同病变类型、发生部位以及合并症的有无等均有关系。此外

功能性改变较影像学改变更早些, 如何从影像学、肺功能两方面更客观地评价生产性粉尘对作业工人的健康危害值得深入研究。

参考文献:

- [1] 涂勇勤. 粉尘作业人员 1392 名肺功能测定分析 [J]. *职业与健康*, 2008 24 (14): 1379-1380.
- [2] 张敏, 姜金萍, 张幸. 煤矿工人肺通气功能 69 例分析 [J]. *浙江省医学科学院学报*, 2008 19 (2): 26-27
- [3] 丘逸逸, 张东辉, 李文勇, 等. 广东省四市宝石加工工人矽肺流行病学研究 [J]. *中国职业医学*, 2005 32 (6): 8-10.
- [4] 李志平, 黄旭斌, 黄建强. 对慢性阻塞性肺病防治全球倡议诊断分级标准的一些看法 [J]. *中国康复*, 2003 18 (2): 65-66
- [5] 王培席, 王锦珍, 王治明. 60 例矽肺患者肺功能 10 年跟踪研究 [J]. *疾病控制杂志*, 2005 9 (5): 434-436.