مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره سیزدهم، شمارهٔ ۴، تیر ۱۳۹۰، صفحه ۳۳-۲۶

نقش پلی مورفیسم کدون ۱۰ ژن TGF-β1 در بیماران مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت C

پدرام عظیم زاده(MSc)[۱]، سیدرضا محبی(PhD)[*۱]، سارا رومانی(MSc)[۱]، شبنم کاظمیان(BSc)[۱]، هانیه میرطالبی(BSc)[۱]،

محسن واحدی(MSc)[۱]، فرامرز درخشان(MD)[۱]، محمدرضا زالی(MD)[۱]

۱- مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دریافت: ۸۹/۴/۱۲، اصلاح: ۸۹/۹/۱۷، پذیرش: ۸۹/۱۱/۲۰

خلاصه

سابقه و هدف: فاکتور رشد Transforming Growth Factor-Beta 1 (TGF-β) دارای نقش مهاری در هموستاز پاسخ ایمنی سلولهای T و سلول های T تنظیمی است و عامل تنظیم کننده پاسخ ایمنی بر ضد عفونت های ویروسی می باشد. کدون شماره ۱۰ این پروتئین در پپتید نشانه آن واقع شده و در فرایند ترشح سایتوکاین ایفای نقش می نماید. این مطالعه به منظور بررسی پلی مورفیسم لوسین- پرولین کدون ۱۰ TGF-β در بیماران مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت C انجام شد.

مواد و روشها: این مطالعه مورد- شاهدی بر روی ۱۱۲ بیمار مبتلا به هپاتیت C مزمن و ۱۲۲ نفر شاهد سالم انجام گردید. توالی ژن TGF-β1 به روش PCR تکثیر شد و ژنوتیپ افراد دو گروه با روش Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) با آنزیم محدود کننده MspA1I مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته ها: در مورد کدون ۱۰ فراوانی ژنوتیپ CT در هر دو گروه بیماران و شاهد سالم نسبت به دو حالت دیگر CC و TT بیشتر گزارش شد. بطوریکه ژنوتیپ های CT، CC وTT در بیماران به ترتیب ۵۰٪، ۱۹/۶٪ و۳۰/۴٪ و در افراد سالم به ترتیب ۵۹٪،۱۳/۹٪ و ۲۷/۱٪ مشاهده گردید و اختلاف معنی داری میان گروه بیماران و شاهد یافت نشد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که هیچ ارتباطی میان پلی مورفیسم ژن کد کننده این پروتئین با حساسیت افراد نسبت به عفونت مزمن هپاتیت C وجود ندارد.

واژه های کلیدی: ***هپاتیت C، سایتوکاین، پلی مورفیسم.***

مقدمه

هپاتیت C مزمن در نتیجه عفونت با ویروس هپاتیت C (Hepatitis C Virus) روی می دهد، این نوع از عفونت های ویروسی می تواند منجر به ایجاد عوارض بالینی مثل هپاتیت مزمن، سیروز کبدی، نارسائی کبدی و هپاتوسلولار کارسینوما (HCC) شود، به نحوی که یکی از عوامل مهم پیوند کبد می باشد. این ویروس در سال ۱۹۸۹ کشف شد و در یک آمار کلی حدود ۱۷۰ میلیون نفر حدود ۲/۲ تا ۳ درصد را در سرتاسر جهان آلوده کرده است (۳-۱). شیوع HCV در ایران البته در میان جمعیت عمومی کشور، کمتر از ۱٪ است که نسبت به خیلی از کشور های خاور میانه کمتر است (۴). شیوع HCV در جمعیت عمومی شیراز ۰/۵۹ درصد، تهران ۰/۱۲ درصد و کرمانشاه ۰/۸۷ درصد گزارش شده است (۷-۵). با وجود اینکه بیماران دیالیزی از گروههای در معرض خطر عفونت هپاتیت C هستند، در ایران شیوع HCV در این گروه از ۱۴/۴ درصد در سال ۱۹۹۹ به ۴/۵ درصد در سال ۲۰۰۵ کاهش یافته است (۸). این عفونت در بیماران هموفیلی و تالاسمی نیز بعنوان دو گروه در معرض خطر دیگر تحت بررسی است و بعنوان مثال در شیراز در سال ۲۰۰۰ میزان شیوع HCV در بیماران هموفیلی ۱۵/۶ درصد، در زاهدان در سالهای ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۶، ۲۹/۶ درصد، در استان مرکزی ۴۳/۴ درصد و در گیلان ۷۱/۳ درصد گزارش شده است (۱۲-۹). ۸۰ درصد افراد آلوده به ویروس هپاتیت C، نمی توانند ویروس را پاک کنند و دچار عفونت مزمن می گردند (۱۳). از طرفی پاسخ ایمنی سلولی قوی و تولید بیش از حد انواعی از

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۴۵۳ مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: تهران، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۲۵۱۴ e-mail:srmohebbi@rigld.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.4.4.9]

سایتوکاین ها، که تلاش می کنند عفونت را پاکسازی کنند باعث ایجاد علائم بالینی هپاتیت و مزمن شدن عفونت در بدن میزبان می شوند (۱۴). سایتوکاین فاکتور رشد Transforming Growth Factor-Beta 1(TGF-β1) بعنوان مهمترین عضو ابر خانواده TGF-β یک سایتوکاین مهم و چند عملکردی تنظیم کننده پاسخ، در سیستم ایمنی است که از چندین مکانیسم انتقال پیام در لنفوسیت ها استفاده می کند تا بر هموستاز لنفوسیت های T و سلول های T تنظیمی (T_{Reg}) تأثیر بگذارد. لیگاند TGF-β از فعال شدن غیرطبیعی سلول های T و فاگوسیت های دارای منشأ منوسیتی، ممانعت کرده و در سلول های T تنظیمی (T_{Reg}) نیز تأثیر آن با واسطه مولکول های سیستم انتقال پیام درون سلولی SMAD ها صورت می گیرد (۱۵). این پروتئین علاوه بر عملکرد ضد التهابی معمول خود در هموستاز لنفوسیت های C، می تواند بعنوان یک سایتوکاین پیش التهابی (pro-Inflammatory) پاسخ سلول های T تولید کننده اینترلوکین-۱۷ که دارای اثر افزایش پاتوژنیسیته و ایجاد آسیب بافتی بر اثر عمل سیستم ایمنی هستند، را القاء کند و در کل می توان TGF-β را بعنوان بازوی تنظیم کننده پاسخ سیستم ایمنی به عفونت های ویروسی در نظر گرفت (۱۶). با توجه به اینکه پاسخ ایمنی نقش کلیدی در پاک شدن HCV از فرد آلوده ایفا می کند و عدم پاکسازی سریع ویروس منجر به بروز عفونت مزمن می گردد، تأثیر ویژگی های ژنتیکی هر فرد بعنوان میزبان عفونت می تواند بر برون ده بالینی بیماری اثر گذار باشد (۱۷). منشأ این تنوع می تواند مکانیسم هائی از قبیل تفاوت در رونویسی، ترجمه و یا سیستم های ترشح باشد که منتج به اختلاف میان افراد از نظر میزان تولید سایتوکاین می گردد (۱۹و۱۸). مؤلفه اصلی تأثیر گذار بر توانائی فرد برای تولید حداکثر سایتوکاین ها، عامل ژنتیک می باشد (۲۱و۲۰). مکانیسمی که Turner و همکارانش در بررسی ژن سایتوکاین اینترلوکین-۱۰ استفاده کرده اند، مشخص می کند تغییرات ژنی از قبیل پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی می توانند بر بیان و ترشح کلی پروتئین، اثر گذار باشند و ارتباط این پلی مورفیسم ها همچون دیگر پلی مورفیسم های ژنتیکی شناسائی شده، با بیماری های مختلف تحت مطالعه قرار گرفته است (۲۴-۲۲). پلی پپتید TGF-β1 در انتهای آمینی خود دارای یک پپتید نشانه ۲۰ تا ۳۰ آمینو اسیدی است که وجود آن برای ترشح به بیرون از سلول ضروری می باشد، در نتیجه پلی مورفیسم های موجود در این ناحیه ژنی بر میزان ترشح سایتوکاین به خارج از سلول اثر دارد (۲۵).

هدف از این مطالعه بررسی توزیع اللی و ژنوتیپی جایگاه پلی مورفیسم کدون ۱۰ واقع در پپتید نشانه پروتئین TGF-β1 که بر اثر آن توالی CTG به CCG تبدیل شده و اسید آمینه لوسین به پرولین تبدیل می گردد و مقایسه نتایج در جمعیت بیماران ایرانی درگیر عفونت مزمن هپاتیتC با افراد شاهد سالم می باشد.

مواد و روشها

این مطالعه مورد- شاهدی به روش نمونه گیری آسان بر روی ۲۳۴ فرد ایرانی مراجعه کننده به بیمارستان طالقانی تهران انجام شد. از این میان تعداد ۱۱۲ بیمار مبتلا به هپاتیت C مزمن با آزمایش الایزا Anti-HCV Ab مثبت و تشخیص پزشک فوق تخصص گوارش، در مورد مزمن بودن بیماری وارد مطالعه شدند و افراد با منفی بودن آنتی بادی ضد ویروس هپاتیت C از مطالعه خارج شدند. برای تأیید عفونت ویروس هپاتیت C در بیماران، بر روی همه نمونه های دارای پاسخ الایزای مثبت آزمایش RT-PCR برای ژن NS5B ویروس انجام گردید. تعداد ۱۲۲ فرد داوطلب سالم نیز با Anti-HCV Ab منفی بعنوان گروه شاهد وارد مطالعه شدند و افراد با پاسخ مشکوک آزمایش آنتی بادی ضد هپاتیت C از مطالعه خارج شدند. نمونه ها از لحاظ سن و جنس همسان سازی شدند. مقدار ۵ میلی لیتر خون محیطی از افراد هر دو گروه در لوله های حاوی EDTA گرفته شد. بر روی سرم همه افراد آزمایش الایزا برای آنتی بادی ضد هپاتیت C بوسیله کیت آماده مصرف، (DRG- امریکا) انجام گردید. سپس مراحل استخراج DNA ژنومی به روش استاندارد فنل-کلروفرم با استفاده از پروتئیناز K، بر روی نمونه ها انجام گردید (۲۶). میکروتیوب های حاوی DNA تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- سانتی گراد درجه نگهداری شدند.

روش های تعیین ژنوتیپ: تکثیر ژن TGF-β1 به روش PCR انجام شد، برای این کار دو پرایمر اختصاصی طراحی و برای سنتز ارسال گردید (Sigma Aldrich - آلمان)، به گونه ای که محصول PCR جایگاه کدون ۱۰ پروتئین را روی ژنوم، پوشش دهد. توالی پرایمرها و مشخصات کاربردی آنها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. تکثیر PCR با ۱۰۰نانوگرم DNA ژنومی در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از ۰/۳ میلی مولار از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرو مولار از مخلوط dNTP ها، ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq پلیمراز و ۵٪ حجم کلی واکنش برابر ۱/۲۵ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید و ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم (Fermentas بلاروس) انجام گردید. برنامه PCR با ۵ دقیقه در $۹۵^{\circ C}$ و در ادامه ۳۵ سیکل سه قسمتی شامل ۳۰ ثانیه در $۹۵^{\circ C}$، ۴۵ ثانیه در $۵۸/۴^{\circ C}$ و ۳۰ ثانیه در $۷۲^{\circ C}$ و طویل سازی نهائی در $۷۲^{\circ C}$ بمدت ۱۰ دقیقه تنظیم گردید و محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ (Merck- آلمان) برده شد و با اتیدیوم برماید (Roch- آلمان) رنگ آمیزی گردید (جدول ۱).

جدول ۱: مشخصات پرایمر های PCR

پرایمر	توالی	Tm	GC
مستقیم	5- GTTATTTCCGTGGGATACTGAGAC -3	۶۶/۴	٪۴۵/۸
معکوس	5- GACCTCCTTGGCGTAGTAGTCG -3	۶۷/۷	٪۵۹/۱

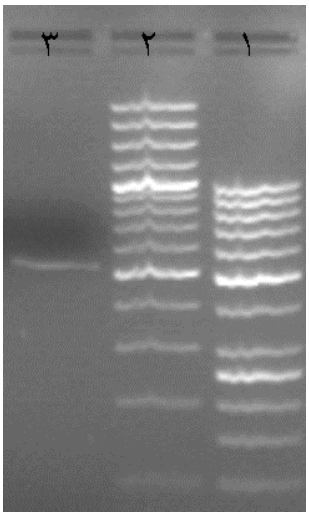
در مرحله تعیین ژنوتیپ به روش RFLP، محصول PCR تحت هضم با آنزیم محدودکننده MspA1I (Fermentas- بلاروس) قرارگرفت. برای این کار در حجم کلی ۲۸ میکرولیتر ۵ واحد آنزیم ، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR و ۲ میکرولیتر بافر ویژه این واکنش آنزیمی، ۰/۲ میکرولیتر BSA و آب دیونیزه استفاده شد. زمان انکوباسیون ۱۶ ساعت و غیر فعالسازی آنزیم پس از اتمام انکوباسیون در دمای ۶۵ درجه بمدت ۱۵ دقیقه انجام گردید. محصول هضم آنزیمی بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۶ درصد برده شد و قطعات برش خورده با رنگ آمیزی نیترات نقره آشکار شدند (۲۶). آنزیم محدود کننده محصول PCR را به چهار تا شش قطعه وابسته به نوع ژنوتیپ نمونه تقسیم می کند و از میان قطعات حاصل از هضم، دو قطعه با طول های ۲۳۰ و ۲۴۲ جفت باز برای تعیین ژنوتیپ حائز اهمیت هستند.برای تأیید انجام صحیح تعیین ژنوتیپ به روش PCR-RFLP، از میان نمونه های بیمار و شاهد ۵ درصد انتخاب و با دستگاه

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.4.4.9]

تمام اتوماتیک تعیین توالی مستقیم (ABI- امریکا) بر روی آنها انجام شد. همسان سازی نمونه ها با استفاده از رگرسیون لجستیک چند متغیره انجام گردید. توزیع اللی و ژنوتیپی در جمعیت مورد مطالعه با استفاده از رابطه تعادل هاردی- واینبرگ و مقایسه نتایج تعیین ژنوتیپ و فراوانی الل ها در دو گروه تحت بررسی بوسیله آزمون مجذور کای انجام شد و $p<۰/۰۵$ معنی داری درنظر گرفته شد.

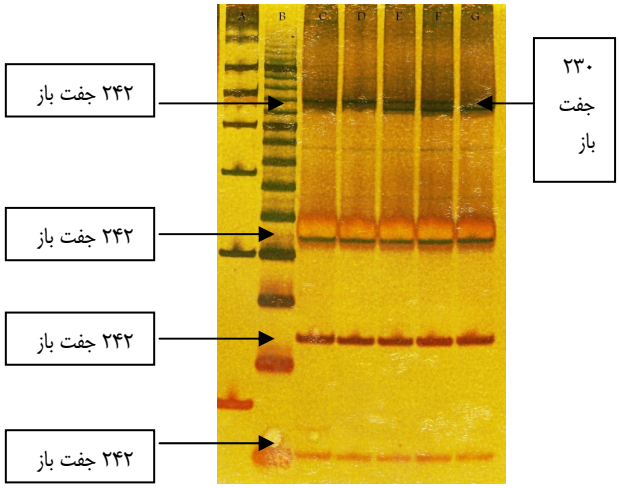
یافته ها

سن افراد بین ۱۴ تا ۷۸ سال با میانگین ۴۳/۲±۱۵/۴ سال بود. محصول PCR به طول ۵۲۴ جفت باز بدست آمد که بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برده شد (تصویر ۱). ژنوتیپ جایگاه ژنی کدون ۱۰ پروتئین TGF-β1 افراد دو گروه بیمار و شاهد سالم با بررسی طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی تعیین شد. نمونه ای از ژل آکریل آمید و ژنوتیپ های مختلف تعیین شده در تصاویر ۱ قابل مشاهده است (تصاویر ۲و۱).



تصویر ۱: ژل آگارز حاوی محصول PCR به طول ۵۲۴ جفت باز. ۱) سایز مارکر ۵۰ جفت باز. ۲) سایز مارکر ۱۰۰ جفت باز. ۳) محصول PCR به طول ۵۲۴ جفت باز.

چند شکلی طولی قطعات حاصل از هضم آنزیمی در افراد واجد ژنوتیپ های مختلف جایگاه مورد بررسی در این مطالعه بطور خلاصه در جدول شماره ۲ آمده است. در جمعیت ایرانی مورد بررسی این مطالعه، ژنوتیپ هتروزیگوت CT، به ترتیب میان ۵۰ و ۵۹ درصد بیماران هپاتیت C و افراد سالم مشاهده شد. ژنوتیپ TT نیز در ۳۰/۴ درصد بیماران و ۲۷/۱ درصد افراد سالم یافت شد و کمترین شیوع مربوط به ژنوتیپ CC بود که فقط در ۱۹/۶ درصد از بیماران و ۱۳/۹ درصد از افراد شاهد سالم مشاهده گردید. توزیع ژنوتیپ های مختلف به تفکیک دو جنس مرد و زن در دو گروه مورد و شاهد نیز تعیین شد که بین دو گروه بیمار و شاهد از نظر ژنوتیپ های پلی مورفیسم کدون ۱۰ در TGF-β اختلاف معنی داری یافت نشد (جدول ۳). توزیع الل های C و T نیز در گروه بیمار به ترتیب ۴۴/۶٪ و ۵۵/۴٪ و در گروه شاهد به ترتیب ۴۳/۴٪ و ۵۶/۶٪ بدست آمد. فراوانی الل ها بسیار نزدیک به هم بوده و از این نظر اختلاف معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد (جدول ۳). نتیجه تعیین توالی مستقیم برای ۵ درصد از نمونه هائی که بطور تصادفی انتخاب شدند، نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ به روش RFLP را کاملا" تأیید کرد (تصویر ۳).



تصویر ۲: نتیجه RFLP با استفاده از ژل پلی اکریل آمید (A) مارکر ۵۰ جفت باز. (B) مارکر ۲۰ جفت باز. (C) ژنوتایپ TT. (D) ژنوتایپ TT. (E) ژنوتایپ CT. (F) ژنوتایپ CT. (G) ژنوتایپ CC.

جدول ۲: مشخصات ژنوتیپی و طولی نتایج RFLP در مبتلایان به عفونت مزمن هپاتیت C و افراد سالم

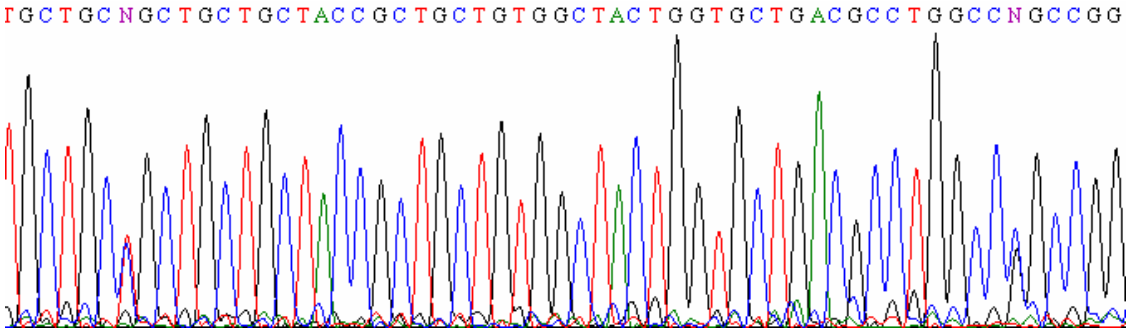
طول قطعات	ژنوتیپ	جایگاه شناسائی و هضم	آنزیم
۲۳۰و۱۰۸و۶۷و۴۰و۱۲	CC	cmg/ckg	MspA1I
۲۴۲و۲۳۰و۱۰۸و۶۷و۴۰و۱۲	CT		
۲۴۲و۱۰۸و۶۷و۴۰	TT		

جدول ۳: توزیع ژنوتیپی و اللی در دو گروه مبتلایان به عفونت ویروس هپاتیت C مزمن و افراد سالم

جنسیت	گروه	ژنوتیپ CC تعداد(٪)	CT	TT
مرد	شاهد	۱۱(۲۸/۲٪)	۵۰(۳۹/۱٪)	۲۲(۳۲/۸٪)
	بیمار	۱۷(۴۳/۶٪)	۴۰(۳۱/۳٪)	۲۲(۳۲/۸٪)
زن	شاهد	۶(۱۵/۴٪)	۲۲(۱۷/۲٪)	۱۱(۱۶/۴٪)
	بیمار	۵(۱۲/۵٪)	۱۶(۱۲/۸٪)	۱۲(۱۷/۹٪)
جمع	شاهد	۱۷(۱۳/۹٪)	۷۲(۵۹٪)	۳۳(۲۷/۱٪)
	بیمار	۲۲(۱۹/۶٪)	۵۶(۵۰٪)	۳۴(۳۰/۴٪)

تفاوت معنی داری در هیچ یک از گروهها وجود نداشت.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.4.4.9]



تصویر ۳: نتیجه تعیین توالی مستقیم محصول PCR. در این تصویر قطعه ای از توالی ژن TGF-β شامل کدون ۱۰ با پیکان مشخص شده است. وجود دو پیک در این قسمت نشانگر ژنوتیپ هتروزیگوت CT در فرد مورد آزمایش می باشد.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه با وجود افزایشی که در ژنوتیپ هتروزیگوت CT در افراد شاهد سالم نسبت به مبتلایان هپاتیت C مزمن به چشم می خورد، اما این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود. پیش از این مطالعه ای در مورد ارتباط پلی مورفیسم کدون ۱۰ ژن TGF-β1 با حساسیت به ابتلا به هپاتیت C مزمن در جمعیت ایرانی منتشر نشده است، در نتیجه آمار حاصل از این مطالعه برای اولین بار منتشر می گردد. با وجود اینکه داده ای از توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم کدون ۱۰ در جمعیت ایرانی مبتلا به هپاتیت C از قبل موجود نیست، برای بدست آوردن دید کلی از وضعیت این پلی مورفیسم در جمعیت عمومی ایرانی، مقایسه نتایج این مطالعه را با بررسی های انجام شده بر روی این پلی مورفیسم در بیماری های دیگر مفید خواهد بود. پلی پپتید TGF-β1 چندین اثر بالقوه شناخته شده در مهار سلول های سیستم ایمنی دارد، که از جمله آنها می توان به مهار تکثیر و تمایز سلول های T و اثر تنظیمی منفی بر فرایند فعالسازی ماکروفاژ ها و بلوغ سلول های دندریتی اشاره نمود. با توجه به استفاده لنفوسیت های T تنظیمی (T_{reg}) از ترشح TGF-β برای مهار پاسخ ایمنی سلول های T و ویروس هپاتیت C در تخریب پاسخ ایمنی سلول های T اجرائی ویژه HCV، مکانیسمی شکل می گیرد که بر اساس آن سلول های T تنظیمی (Treg) با ترشح سایتوکاین مهاری TGF-β1، در باقیماندن طولانی مدت عفونت HCV و بروز هپاتیت C مزمن نقش ایفا می کنند (۲۹-۲۷). سایتوکاین TGF-β1 در ابتدا بصورت غیرفعال با ۳۹۰ آمینواسید تولید شده و شکل فعال آن از دو زنجیره پلی پپتیدی که با باند های دی سولفیدی اتصال دارند، تشکیل می گردد. ژن TGF-β1 بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۹ قرار دارد و شامل ۷ اگزون است. در انتهای آمینی این پلی پپتید یک توالی نشانه ۲۰ تا ۳۰ آمینو اسیدی وجود دارد که کدون ۱۰ در آن منطقه جای گرفته است. بر اثر پلی مورفیسم کدون ۱۰ یک جایگزینی بین پرولین و لوسین صورت می گیرد و نشان داده شده است که وجود پرولین در این توالی باعث می شود ترشح TGF-β1 به میزان ۲/۸ برابر نسبت به فرم لوسین دار، افزایش پیدا کند که احتمالا" این تغییر با اثر بر ترافیک درون سلولی ایجاد می شود (۳۰). در چند مطالعه نشان داده شده است که پلی مورفیسم کدون ۱۰ بر میزان بیان و ترشح TGF-β1 موثر است و برخی از بررسی ها دقیقا" از اثر حالت هموزیگوت پرولین بر افزایش TGF-β1 حکایت دارند (۳۳-۳۱). برخی مطالعات نیز ارتباط پلی مورفیسم کدون ۱۰ را با تغییر میزان TGF-β1 رد می کنند (۳۴). در مطالعه Pereira و همکاران بر روی ۱۲۸ بیمار مبتلا به هپاتیت C و ۹۴ نمونه شاهد سالم در جمعیت برزیل، توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم کدون ۱۰ میان دو گروه اختلاف معنی داری را نشان نداد (۱۳). در مطالعه مشابهی که توسط Suzuki و همکاران صورت گرفت، رابطه معنی داری میان عفونت هپاتیت C و پلی مورفیسم کدون ۱۰ یافت نشد (۳۵). Amirzargar همکارانش که به بررسی پلی مورفیسم های ژن چند سایتوکاین در بیماران لوسمی مزمن پرداختند در میان، یک هاپلو تایپ متشکل از کدون ۱۰ و ۲۵ ژن TGF-β1 را با این بیماری در جمعیت ایرانی مرتبط تشخیص دادند (۳۶) اما Amani و همکاران نیز که توزیع ژنوتیپی و اللی این پلی مورفیسم را در دو گروه از زنان ایرانی مبتلا به سقط جنین خود به خودی و شاهد سالم بررسی کردند، ارتباط معنی داری میان بیماری و پلی مورفیسم مذکور نیافتند (۳۷).

در نهایت با وجود اینکه نقش TGF-β1 در مهار پاسخ ایمنی علیه برخی عفونت ها مانند هپاتیت C مزمن مشخص شده و از سوی دیگر به تأثیر پلی مورفیسم کدون ۱۰ بر میزان تولید و ترشح این سایتوکاین در برخی مطالعات اشاره شده و به توضیح نقش پلی مورفیسم کدون ۱۰ ژن TGF-β1 در بیماری های مختلف مانند سرطان سینه، سرطان پروستات و انفارکتوس میوکارد پرداخته اند (۴۱-۳۸)، اما در این مطالعه نتایج حاصل نشان می دهد که این پلی مورفیسم را نمی توان بعنوان یک فاکتور افزایش خطر ابتلا به عفونت هپاتیت C مزمن در نظر گرفت. برای حصول نتایج قابل تعمیم به همه جمعیت نیاز به انجام بررسی هایی با تعداد بیشتر بیماران و بررسی سطح سرمی- هورمونی افراد احساس می شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و کارکنان بخش نمونه گیری و استخراج DNA مرکز، صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.4.4.9]

Role of TGF-β1 Codon 10 Polymorphism in Chronic Hepatitis C Patients

P. Azimzadeh (MSc) [1], S.R. Mohebbi (PhD) [*1], S. Romani (MSc)[1], Sh. Kazemian (BSc)[1], H. Mirtalebi (BSc) [1], M. Vahedi (MSc) [1], F. Derakhshan (MD) [1], M.R. Zali (MD) [1]

1. Cell and Molecular Biology-Research Center for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

J Babol Univ Med Sci; 13(4); Jul 2011

Received: Jul 3rd 2010, Revised: Dec 8th 2010, Accepted: Feb 9th 2011.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Transforming growth factor beta (TGF-β) has an inhibitory role in homeostasis of T-cell response and regulatory T cells and regulation of immune response against viral infections. Codon 10 of protein is located in the signal peptide and involved in secretion of cytokine. The aim of this study was to investigate the association of leu-pro polymorphism of codon 10 and hepatitis C susceptibility in patients.

METHODS: This case-control study was performed on 112 chronic hepatitis C patients and 122 healthy control subjects. TGF-β1 gene was amplified with PCR method and genotypes were determined using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) with MspA1I restriction enzyme.

FINDINGS: The frequency of CT genotype in both groups was higher than CC and TT. Genotyping results for CC, CT and TT states in patients was 50%, 19.6% and 30.4% and in healthy controls was 59%, 13.9% and 27.1% respectively. We found no significant difference between patients and healthy controls according to codon 10 polymorphism.

CONCLUSION: According to the results of this study, no relationship was found between this protein's genetic variations and chronic hepatitis C infection susceptibility.

KEY WORDS: *Hepatitis C, Cytokine, Polymorphism.*

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.4.4.9]

[*]**Corresponding Author;**
Address: Research Center for Gastroenterology and Liver Diseases (RCGLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Velenjak, Shahid Chamran Highway,1985711151 Tehran, Iran
Tel: +98 21 22432514
E-mail: srmohebbi@rigld.ir

References

1. Global Burden of Hepatitis C Working Group. Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. J Clin Pharmacol 2004;44(1):20-9.
2. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. Lancet Infect Dis 2005;5(9): 558-67.
3. Szabo E, Lotz G, Paska C, Kiss A, Schaff Z. Viral hepatitis: new data on hepatitis C infection. Pathol Oncol Res 2003;9(4):215-21.
4. Alavian SM, Adibi P, Zali MR. Hepatitis C virus in Iran: Epidemiology of an emerging infection. Arch Iran Med 2005;8(2):84-90.
5. Ghavanini AA, Sabri MR. Hepatitis B surface antigen and anti-hepatitis C antibodies among blood donors in the Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2000;6(5-6):1114-6.
6. Alavian SM, Gholami B, Maserrat S. Hepatitis C risk factors in Iranian volunteer blood donors: a case-control study. J Gastroenterol Hepatol 2002;17(10):1092-7.
7. Sayad B, Shamsedin Saeed F, Keyvani H. Seroepidemiology of hepatitis C in Kermanshah (West of Iran). Hepat Mon 2008;8(2):141-6.
8. Alavian SM, Bagheri-Lankarani K, Mahdavi-Mazdeh M, Nourozi S. Hepatitis B and C in dialysis units in Iran: changing the epidemiology. Hemodial Int 2008;12(3):378-82.
9. Karimi M, Ghavanini AA. Seroepidemiology of HbsAg, anti-HCV, and anti-HIV among haemophiliac patients in Shiraz, Iran. Haematologia 2001;31(3):251-5.
10. Sharifi-Mood B, Eshghi P, Sanei-Moghaddam E, Hashemi M. Hepatitis B and C virus infections in patients with hemophilia in Zahedan, southeast Iran. Saudi Med J 2007;28(10):1516-9.
11. Samimi-Rad K, Shahbaz B. Hepatitis C virus genotypes among thalasemia and inherited bleeding disorders in Markazi provience, Iran. Haemophilia 2007;13(2):156-63.
12. Mansour-Ghanaei F, Fallah MS, Shafaghi A. Prevalence of hepatitis B and C seromarkers and abnormal liver function tests among hemophiliacs in Guilan (northern provience of Iran). Med Sci Monit 2002;8(12):797-800.
13. Pereira FA, Pinheiro da Silva NN, Rodart IF, Carmo TM, Lemaire DC, Reis MG. Association of TGF-beta 1 codon 25 (G915C) polymorphism with hepatitis C virus infection. J Med Virol 2008;80(1):58-64.
14. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, et al. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. Gastroenterology 2003;125(1):80-8.
15. Bommireddy R, Doetschman T. Review: TGFbeta1 and Treg cells: alliance for tolerance. Mol Med Trends 2007; 13(11):492-501.
16. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. Immunity 2006;24(6):677–88.
17. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. Transplantation 1998;66(8):1014–20.
18. Bidwell JL, Wood NA, Morse HR, Olomolaiye OO, Laundy GJ. Human cytokine gene nucleotide sequence alignments. Eur J Immunogenet 1998;25(2-3):83-265.
19. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: On-line databases. Genes Immun 1999;1(1):3-19.
20. Pravica V, AsderakisA, Perrey C, HajeerA, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. Eur J Immunogenet 1999;26(1):1-3.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.4.4.9]

21. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFNgamma gene: Absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. Hum Immunol 2000;61(9):863-6.
22. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur J Immunogenet 1997;24(1):1–8.
23. Laguila Visentainer JE, Lieber SR, Lopes Persoli LB, et al. Relationship between cytokine gene polymorphisms and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation in a Brazilian population. Cytokine 2005;32(3-4):171-7.
24. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J Clin Invest 1998;102(7):1369-76.
25. Khalil N. TGF-beta: from latent to active. Microbes Infect 1999;1(15):1255-63.
26. Sambrook J, Russel WR. Molecular cloning, Vol 1, 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y. USA CSHL Press 2000; pp: 473-81.
27. Fahlen L, Read S, Gorelik L, et al. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. J Exp Med 2005;201(5):737-46.
28. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4 (+) CD25 (+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. J Exp Med 2001;194(5):629-44.
29. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. 2004. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: The role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. J Immunol 2004;172(9):5213-21.
30. Dunning AM, Ellis PD, McBride S, et al. A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. Cancer Res 2003;63(10):2610–15.
31. Gonzalez-Zuloeta Ladd AM, Arias-Vasquez A, Siemes C, et al. Transforming-growth factor beta1 Leu10Pro polymorphism and breast cancer morbidity. Eur J Cancer 2007;43(2):371-4.
32. Yamada Y. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis. Pharmacogenet 2001;11(9):765-71.
33. Hinke V, Seck T, Clanget C, Scheidt-Nave C, Ziegler R, Pfeilschifter J. Association of transforming growth factor-beta1 (TGFbeta1) T29--> C gene polymorphism with bone mineral density (BMD), changes in BMD, and serum concentrations of TGF-beta1 in a population-based sample of postmenopausal German women. Calcif Tissue Int 2001; 69(6):315-20.
34. Li X, Yue ZC, Zhang YY, et al. Elevated serum level and gene polymorphisms of TGF-b1 in gastric cancer. J Clin Lab Anal 2008;22(3):164-71.
35. Suzuki S, Tanaka Y, Orito E, et al. Transforming growth factor-beta-1 genetic polymorphism in Japanese patients with chronic hepatitis C virus infection. J Gastroenterol Hepatol 2003;18(10):1139-43.
36. Amirzargar AA, Bagheri M, Ghavamzadeh A, et al. Cytokine gene polymorphism in Iranian patients with chronic myelogenous leukaemia. Int J Immunogenet 2005;32(3):167-71.
37. Amani D, Zolghadri J, Ravangard F, et al. Lack of association between the TGF-beta1 gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion. J Rep Immunol 2005;68(1-2):91-103.
38. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: On-line databases, supplement 1. Genes Immun 2001;2(2):61-70.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.4.4.9]

39. Shu XO, Gao YT, Cai Q, et al. Genetic polymorphisms in the TGF-beta 1 gene and breast cancer survival: a report from the Shanghai Breast Cancer Study. Cancer Res 2004;64(3):836–9.
40. Li Z, Habuchi T, Tsuchiya N, et al. Increased risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia associated with transforming growth factor-beta 1 gene polymorphism at codon10. Carcinogenesis 2004;25(2):237-40.
41. Cambien F, Ricard S, Troesch A, et al. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. Hypertension 1996;28(5):881-7.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.4.4.9]