

血管紧张素原基因T174M变异与肝硬化的相关性

肖凡, 魏红山, 樊文梅, 李国力

■背景资料

已有研究证实AGT基因多态性与多种疾病相关, 包括高血压、脑梗塞、冠心病、肝纤维化等。本课题组的前期工作也证实AGT基因核心启动子区的变异与乙型肝炎感染后的肝硬化相关。

肖凡, 魏红山, 樊文梅, 李国力, 北京地坛医院研究室 北京市100011

通讯作者: 肖凡, 100011, 北京安外大街地坛公园13号地坛医院研究室. cindy2358@163.com
电话: 010-64211031-2358
收稿日期: 2007-08-21 修回日期: 2007-11-02

Association analysis of T174M variants of the angiotensinogen gene with hepatocirrhosis

Fan Xiao, Hong-Shan Wei, Wen-Mei Fan, Guo-Li Li

Fan Xiao, Hong-Shan Wei, Wen-Mei Fan, Guo-Li Li, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Correspondence to: Fan Xiao, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, Beijing 100011, China. cindy2358@163.com
Received: 2007-08-21 Revised: 2007-11-02

Abstract

AIM: To detect the relationships between variants in the T174M polymorphism of the angiotensinogen gene and hepatocirrhosis.

METHODS: Genomic DNA from leukocytes was analyzed for genetic variants at the T174M polymorphism of the AGT gene by polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP) and automatic sequencing.

RESULTS: The distributions of MT and TT genotypes were not different between the hepatocirrhosis group (84.6%, 15.4%) and the control group (82.8%, 17.2%) ($\chi^2 = 0.077, P > 0.05$).

CONCLUSION: T174M polymorphism in the AGT gene is not likely to be involved in hepatocirrhosis.

Key Words: Angiotensinogen; Genetic polymorphism; Hepatocirrhosis; PCR

Xiao F, Wei HS, Fan WM, Li GL. Association analysis of T174M variants of the angiotensinogen gene with hepatocirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(35): 3752-3754

摘要

目的: 研究血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)基因T174M分子变异与肝硬化的关系。

方法: 提取正常人64例和肝硬化患者65例白细胞基因组DNA, 通过PCR、限制性片段长度多态性和测序等技术, 观察AGT基因型在肝硬化组和正常组分布的差异。

结果: AGT基因T174M位点MT和TT基因型的频率在正常组和肝硬化组分别为82.8%、17.2%和84.6%、15.4%, 两组之间不存在差异($\chi^2 = 0.077, P > 0.05$)。

结论: 血管紧张素原基因T174M变异与肝硬化没有显著关系。

关键词: 血管紧张素原; 遗传多态性; 肝硬化; 聚合酶链式反应

肖凡, 魏红山, 樊文梅, 李国力. 血管紧张素原基因T174M变异与肝硬化的相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3752-3754

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3752.asp>

0 引言

魏红山 *et al*报道组织局部肾素-血管紧张素系统的激活与肝纤维化的发生有关^[1-2]。血管紧张素原基因(angiotensinogen, AGT)是存在于血清中的球状糖蛋白, 主要在肝脏合成, 是肾素-血管紧张素系统的唯一初始底物^[3]。人AGT全长13 kb, 含5个外显子和4个内含子^[4]。已有研究证实AGT基因多态性与多种疾病相关, 包括高血压、脑梗塞、冠心病、肝纤维化等^[5-8]。我们的前期工作也证实AGT基因核心启动子区的变异与乙型肝炎感染后的肝硬化相关^[9]。现在通过对人AGT基因第二外显子的T174M分子变异分析, 探讨慢性HBV感染后, AGT基因突变与肝硬化发生的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2005-06/2005-12在北京地坛医院住院的慢性HBV感染后转换成的肝硬化患者全血

■研究前沿

最新的研究表明AGT基因核心启动子区的变异与乙型肝炎感染后的肝硬化相关, 暂无ATG基因外显子的变异与肝硬化的关系。

标本64份, 男25例, 女39例, 年龄 40 ± 5 岁; 正常人全血标本62份, 男29例, 女33例, 年龄 35 ± 5 岁。病例的诊断标准符合2000年西安第十次全国病毒性肝炎及肝病学术会议制定的《病毒性肝炎防治方案》中的相关标准。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取: 人基因组DNA样品取自实验对象外周血。采用全血基因组DNA提取试剂盒(北京华美生物公司)提取白细胞基因组DNA, -20°C 放置, 备用。

1.2.2 DNA片段的扩增: 5'引物TGGCACCCTGG CCTCTCTCTATCT, 3'引物CAGCCTGCATGAA CCTGTCAATCT(上海生物工程有限公司合成)。扩增体系含各引物1 $\mu\text{mol/L}$, dNTP浓度各为200 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 浓度为2.0 mmol/L, Taq DNA聚合酶2.5 U, $10\times$ 缓冲液2.5 μL (深圳晶美生物工程有限公司), 模板DNA约0.1 μg , 加灭菌去离子水补足体积为25 μL 。按下述程序进行DNA扩增反应: 94°C 预变性5 min, 94°C 变性30 s, 63.5°C 退火30 s, 72°C 延伸40 s, 循环35次后于 72°C 继续延伸7 min。20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察扩增结果。

1.2.3 PCR产物的RFLP分析: *Nco* I 酶切反应(针对T174M变异), PCR扩增产物8 μL , $10\times$ 缓冲液2 μL , *Nco* I 内切酶12 U, 加灭菌去离子水补足体积至20 μL , 酶切反应在 37°C 进行12 h。酶切产物在30 g/L琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统仪下观察并保存结果。

统计学处理 分析计数资料组间差异采用 χ^2 检验分析, $P < 0.05$ 认为组间有显著差异。

2 结果

2.1 PCR扩增结果 PCR扩增片段约为311 bp, 与理论设计片段大小基本一致。

2.2 RFLP酶切分析及测序结果 126个样品经*Nco* I 酶切, 电泳结果显示出现3种带型。带型311 bp为TT纯合型, 带型311 bp、140 bp为MT杂合型; 带型140 bp为MM纯合型, 本次实验中未检测出MM纯合型(图1)。PCR直接测序结果进一步验证了此结果。

2.3 AGT T174M变异与肝硬化相关性分析 统计分析表明, 实验样本基因型分布符合Hardy-Weiberg平衡。采用 χ^2 统计, 对62例正常人样品和64例肝硬化样品AGT基因T174M多态性进行分析, 发现携带AGT基因T174M位点MT、TT基因型的样品数目分别为55(84.6%)、10(15.4%)和

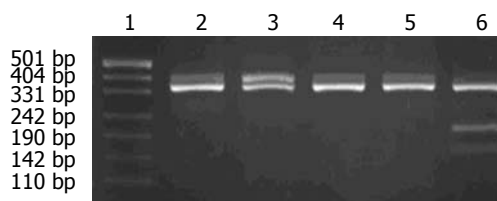


图1 PCR/RFLP电泳结果。1: DNA Marker; 2-5: TT纯合型; 6: MT杂合型。

53(82.8%)、11(17.2%), 基因型分布差异没有显著性意义($\chi^2 = 0.077$, $P > 0.05$)。

3 讨论

越来越多的研究证明肾素-血管紧张素系统的激活与肝纤维化的发生有关。AGT主要在肝脏合成, 是肾素-血管紧张素系统的唯一初始底物。其合成不仅受多种激素调节, 更主要的是受基因转录水平的调控。AGT基因的基因变异与人类多种疾病相关^[10-12]。我们的前期工作证实AGT基因5'核心启动子区的变异(A-20C和A-6G)与乙肝感染后的肝硬化相关。而位于第二外显子的T174M也已被证实与多种疾病相关, 如高血压、肾病、心血管疾病等^[13-15]。因此本课题研究AGT基因T174M多态性是否与慢性乙肝感染后的肝硬化相关。

我们采用PCR、PCR/RFLP、测序等方法分析64个肝硬化血液标本, 62个正常人血液标本。AGT基因T174M位点MT、TT基因型的频率在慢性HBV感染后的正常组和肝硬化组分别为82.8%、17.2%和84.6%、15.4%, 两组之间不存在差异($\chi^2 = 0.077$, $P > 0.05$)。分析表明, HBV感染后肝硬化的形成可能与AGT基因T174M分子变异无关。

4 参考文献

- Wei HS, Lu HM, Li DG, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Cheng JL, Xu QF. The regulatory role of AT 1 receptor on activated HSCs in hepatic fibrogenesis: effects of RAS inhibitors on hepatic fibrosis induced by CCl₄. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 824-828
- Yang L, Bataller R, Dulys J, Coffman TM, Gines P, Rippe RA, Brenner DA. Attenuated hepatic inflammation and fibrosis in angiotensin type 1a receptor deficient mice. *J Hepatol* 2005; 43: 317-323
- Corvol P, Jeunemaitre X. Molecular genetics of human hypertension: role of angiotensinogen. *Endocr Rev* 1997; 18: 662-677
- Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S. Induction of rat liver angiotensinogen mRNA following acute inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 129: 826-832
- Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM,

■名词解释

血管紧张素原基因(AGT): 是存在于血清中的球状糖蛋白, 主要在肝脏合成, 是肾素-血管紧张素系统的唯一初始底物。

■同行评价

本文选题较好, 方法成熟, 结论有些简单, 建议作进一步的研究.

- Jonsson JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 31: 828-833
- 6 Dixon JB, Bhathal PS, Jonsson JR, Dixon AF, Powell EE, O'Brien PE. Pro-fibrotic polymorphisms predictive of advanced liver fibrosis in the severely obese. *J Hepatol* 2003; 39: 967-971
- 7 Inoue I, Nakajima T, Williams CS, Quackenbush J, Puryear R, Powers M, Cheng T, Ludwig EH, Sharma AM, Hata A, Jeunemaitre X, Lalouel JM. A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest* 1997; 99: 1786-1797
- 8 Forrest EH, Thorburn D, Spence E, Oien KA, Inglis G, Smith CA, McCrudden EA, Fox R, Mills PR. Polymorphisms of the renin-angiotensin system and the severity of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2005; 12: 519-524
- 9 Xiao F, Wei H, Song S, Li G, Song C. Polymorphisms in the promoter region of the angiotensinogen gene are associated with liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1488-1491
- 10 Gross CM, Perrot A, Geier C, Posch MG, Hassfeld S, Kramer J, Schmidt S, Derer W, Dietz R, Ozcelik C. Recurrent in-stent restenosis is not associated with the angiotensin-converting enzyme D/I, angiotensinogen Thr174Met and Met235Thr, and the angiotensin-II receptor 1 A1166C polymorphism. *J Invasive Cardiol* 2007; 19: 261-264
- 11 Jiang X, Sheng HH, Lin G, Li J, Lu XZ, Cheng YL, Huang J, Xiao HS, Zhan YY. Effect of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms on blood pressure response to antihypertensive treatment. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 782-786
- 12 Noroozianavval M, Argani H, Aghaeishahsavari M, Veisi P, Ghorbanihaghjo A, Rashtchizadeh N, Jabbarpourbonyadi M, Hamzeiy H. Renin-angiotensin system polymorphisms and hemoglobin level in renal allografts: a comparative study between losartan and enalapril. *Transplant Proc* 2007; 39: 1018-1022
- 13 Takashima Y, Kokaze A, Matsunaga N, Yoshida M, Sekiguchi K, Sekine Y, Sumiya Y. Relations of blood pressure to angiotensinogen gene T174M polymorphism and alcohol intake. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 2003; 22: 187-194
- 14 Chang HR, Cheng CH, Shu KH, Chen CH, Lian JD, Wu MY. Study of the polymorphism of angiotensinogen, angiotensin-converting enzyme and angiotensin receptor in type II diabetes with end-stage renal disease in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2003; 66: 51-56
- 15 Chistiakov DA, Turakulov RI, Moiseev VS, Nosikov VV. Polymorphism of angiotensinogen T174M gene and cardiovascular diseases in the Moscow population. *Genetika* 1999; 35: 1160-1164

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起, 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流. 凡在在线办公系统注册的用户, 将可获得世界华人消化杂志最新出版消息.