● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیستم، شمارهٔ ۳، ص ۲۳۱-۲۲۳، ۱۳۹۲

مقالهٔ پژوهشی

ارتباط پلی مورفیسم پروموتر ژن TGF-β1 (-509C>T) با هپاتیت B مزمن در بیماران ایرانی مراجعه‌کننده به بیمارستان طالقانی تهران

آرمین حسینی‌رضوی[۱و۲]، سیدمسعود حسینی[۳]، پدرام عظیم‌زاده[۴]، سیدرضا محبی[*۵]، مهسا خوان یغما[۶]، افسانه شریفیان[۷]، آذر صنعتی[۸]، محمد رضا زالی[۹]

خلاصه

مقدمه: عفونت هپاتیت B یک مشکل بهداشتی جهانی است. ویروس هپاتیت Bاز سیستم ایمنی ذاتی فرار می‌کند و به‌طور عمده سیستم ایمنی اکتسابی علیه آن عمل می‌کند. فاکتور رشد تراریختی β (TGF-β) در پستانداران دارای سه ایزوفورم است. اخیراً مشخص شده که TGF-β1 می‌تواند همانندسازی ویروس هپاتیت B را مهار کند همچنین بیان زیاد این فاکتور در فیبروز کبدی مؤثر است. در این مطالعه ارتباط پلی مورفیسم پروموتر TGF-β1 (-509C>T) با هپاتیت Bمزمن مورد بررسی قرار گرفت.

روش: در این مطالعه مورد- شاهدی ۱۰۹ فرد مبتلا به هپاتیت B مزمن و ۱۰۹ فرد سالم بررسی شدند. روش PCR-RFLP به‌منظور تعیین ژنوتیپ افراد به‌کار گرفته شد. ابتدا با استفاده از واکنش زنجیره پلی مراز (PCR) توالی مورد نظر تکثیر شد سپس محصول آن مورد هضم آنزیمی Eco81I قرار گرفت و ۱۵ نمونه برای تایید نتایج توالی یابی شد.

یافته‌ها: در جمعیت بیماران فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CT و TT به‌ترتیب برابر ۱۹/۳٪، ۵۹/۶٪ و ۲۱/۱٪ و در جمعیت شاهد برابر ۳۰/۳٪، ۵۲/۳٪ و ۱۷/۴٪ بود. فراوانی آلل‌های C و T در بیماران (۴۹/۱٪ و ۵۰/۹٪) و در افراد شاهد (۵۶/۴٪ و ۴۳/۶٪) تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

نتیجه‌گیری: از آنجا که بین ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم -509C>T در گروه شاهد و بیمار ارتباط معنی‌داری وجود نداشت، می‌توان گفت این پلی مورفیسم به‌عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی هپاتیت B مزمن در بیماران ایرانی مطرح نیست.

واژه‌های کلیدی: پلی مورفیسم -509C>T، TGF-β1، هپاتیت B مزمن

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی ۳- استاد ویروس‌شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۴- کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۵- دکترای تخصصی ویروس‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۶- کارشناس ارشد زیست‌شناسی دریا، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۷- دانشیار فوق‌تخصص بیماری‌های گوارش و کبد، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۸- پزشک عمومی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۹- استاد فوق‌تخصص بیماری‌های گوارش و کبد، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* **نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** srmohebbi@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۷/۲ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۱/۱۰/۱۲ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۱/۱۰/۲۷

مقدمه

یکی از مطالعات مولکولی که به‌منظور یافتن ژن تأثیرگذار در فرآیند یک بیماری انجام می‌شود، بررسی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) به‌عنوان یک نشان‌گراست؛ درصورتی که فراوانی این نشان‌گر در جمعیت بیماران نسبت به جمعیت افراد سالم به‌میزان معنی‌داری بیشتر باشد می‌توان گفت که نشان‌گر مورد نظر با بیماری ارتباط دارد(۳-۱).

ویروس هپاتیت B (HBV) یک DNA ویروس است که از طریق خون، روابط جنسی و همچنین از مادر به جنین انتقال می‌یابد (۶-۴). در حال حاضر بیش از سیصد و پنجاه میلیون فرد در دنیا به هپاتیت B مزمن مبتلا هستند و تاکنون ده ژنوتیپ این ویروس شناخته شده‌اند ولی تنها ژنوتیپ نوع D درجمعیت ایرانی یافت شده است (۹-۷). بعد از دچار شدن فرد به حالت حاد این بیماری (با توجه به پاسخ سیستم ایمنی میزبان) ممکن است ویروس‌ها به‌طور کامل از بین بروند و یا این بیماری به سمت مزمن شدن پیش برود (۱۰). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که ویروس هپاتیت B به‌طور مستقیم برای هپاتوسیت‌های آلوده، کشنده (سیتوپاتیک) نیست و سیستم ایمنی در این امر دخالت دارد. ویروس هپاتیت B می‌تواند از سیستم ایمنی ذاتی فرار کند و بنابراین سیستم ایمنی اکتسابی نقش عمده‌ای در پاتوژنز بیماری و پاک‌سازی ویروس دارد (۱۱).

خانواده فاکتور رشد تراریختی β (TGF-β) در مهره‌داران پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوان (BMPs) و اکتیوین را شامل می‌شود. در پستانداران سه ایزوفورم از این فاکتور وجود دارد (TGF-β1، TGF-β2 و TGF-β3) که روی کروموزوم‌های متفاوت قرار دارند اما هشتاد در صد توالی اسیدآمینه آنها مشابه است (۱۲). فاکتور رشد تراریختی دارای سه گیرنده است (Type1، Type2 و Type3) که بر اساس وزن مولکولی نامگذاری شده‌اند. گیرنده‌های ۱ و ۲ به خانواده بزرگ رسپتور سرین-ترئونین کیناز تعلق دارند. نوع ۳ یا بتا گلیکان برای انتقال سیگنال (signal transduction) ضروری نیست و در اتصال لیگاند به گیرنده‌های نوع ۱ و ۲ نقش دارد. بعد از اتصال لیگاندهای خانواده فاکتور رشد تراریختی به گیرنده‌های ۱ و ۲ پروتئین‌های SMAD تحریک شده و از سیتوپلاسم به سمت هسته حرکت کرده و در آن جا به‌عنوان فاکتور تنظیم‌کننده رونویسی عمل می‌کنند (۱۵-۱۳). عملکرد اعضای خانواده فاکتور رشد تراریختی تقریبا مشابه است اما به‌طور خاص درباره عملکرد TGF-β1 می‌توان گفت که این فاکتور در القای اجزای ماتریکس خارج سلولی و مهار تکثیر سلولی نقش دارد. TGF-β1 یک مولکول پروفیبروژنتیک کلیدی است که به‌عنوان یک عامل مهار کننده تومور نیز ایفای نقش می‌کند (۱۶).

TGF-β1 یکی از سیتوکین‌هایی است که به میزان بالایی از سلول‌های هپاتوسیتی و غیر پارانشیمی ترشح می‌شود اما تا سال ۲۰۰۷ اثر آن بر روی ویروس هپاتیت B مورد مطالعه قرار نگرفته بود؛ در این سال مشخص شد که TGF-β1 از طریق مهار RNA پیش ژنومی همانندسازی ویروس هپاتیت B را مهار می‌کند و درسال ۲۰۱۲ مشخص شد که TGF-β1 می‌تواند با کاهش بیان فاکتور ۴α هسته هپاتوسیت همانندسازی هپاتیت B را مهار کند (۱۷،۱۸). نقش این سیتوکین در تعدیل فرآیند فیبروز کبد هم مشخص شده است. TGF-β1 با القای تبدیل سلول‌های ستاره‌ای کبد به سلول‌های شبه فیبروبلاست، سنتز پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی را تحریک کرده و از تجزیه آنها جلوگیری می‌کند. فیبروز کبدی در بیان بالای آن تشدید می‌شود (۱۶). با توجه به مطالب گفته شده، TGF-β1 می‌تواند در مسیر مزمن شدن هپاتیت B نقش داشته باشد.

تا کنون شش پلی مورفیسم مهم در TGF-β1 شناخته شده‌اند که از میان آنها پلی مورفیسم T<C509- یا rs1800469 در ناحیه تنظیمی منفی پروموتر TGF-β1 (۴۵۳- تا ۷۳۱-) واقع است که در تنظیم میزان رونویسی پروتئین نقش دارد (۲۰،۲۱) و یکی از پلی مورفیسم‌هایی می‌باشد که مطالعات

زیادی بر روی آن انجام شده است و تا کنون ارتباط آن با سرطان کبد هپاتیت B مزمن و هپاتیت C مزمن مورد بررسی قرار گرفته است. ارتباط این پلی مورفیسم با میزان پلاسمایی TGF-β1 مشخص شده است (۱۶،۱۹،۲۲،۲۳).

طی بررسی که توسط محققان مطالعه حاضر در موتورهای جستجو انجام شد، مشخص شد که تا به حال این مطالعه بر روی بیماران ایرانی مبتلا به هپاتیت B مزمن انجام نشده است و در دنیا تنها یک مطالعه در لهستان انجام گرفته است که طی آن ارتباطی میان پلی مورفیسم‌های TGF-β1 و هپاتیت B مزمن در کودکان یافت نشده است (۲۲). در این مطالعه ارتباط پلی مورفیسم T>C509- با هپاتیت B مزمن در بیماران ایرانی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

روش آماری مورد- شاهدی برای تحلیل نتایج به‌کار گرفته شد. این مطالعه بر روی ۱۰۹ بیمار مبتلا به هپاتیت B مزمن مراجعه‌کننده به بیمارستان طالقانی تهران و ۱۰۹ فرد سالم به‌عنوان گروه شاهد انجام شد. روش نمونه‌گیری آسان (convenience sampling) در این مطالعه به کار گرفته شد. تمام افراد رضایت‌نامه مورد تأیید کمیته اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه شهید بهشتی را امضا کردند. از روش الایزا برای تشخیص افراد HbsAg مثبت و روش PCR به‌منظور بررسی حضور HBV DNA استفاده شد. افرادی در گروه بیماران قرار گرفتند که شاخص سرمی آنها از نظر HBsAg حداقل به مدت ۶ ماه مثبت بود. آزمون HBsAg در کلیه بیماران مورد مطالعه به مدت طولانی‌تر (بیش از یکسال و در دفعات متوالی) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج همگی آنها مثبت بود. علاوه بر بررسی حضور HBsAg، وجود HBV DNA هم در کلیه این بیماران (مثبت بودن در چندین مقطع با فواصل بیش از ۶ ماه) تأیید گردید. افراد گروه شاهد از بین داوطلبان اهداکننده خون که HbsAg آنها منفی بود، انتخاب شدند.

استخراج DNA ژنومی و تعیین ژنوتیپ

از هر فرد ۴ میلی‌لیتر خون محیطی گرفته شد و برای جلوگیری از لخته شدن از EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) در لوله‌های خون‌گیری استفاده شد. روش فنل کلروفرم برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت و برای ماندگاری بهتر قبل از انجام طرح در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تعیین ژنوتیپ افراد از روش PCR-RFLP استفاده شد. واکنش زنجیره پلی مراز (PCR) در دستگاه ترموسایکلر اتوماتیک (Epependorf آلمان) انجام شد. به مخلوط واکنش حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۰/۷۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۵ میلی‌مولار dNTP ، ۰/۷ میلی‌مولار از هر پرایمر و ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلی مراز (Fermentas بلاروس)، آب مقطر اضافه گردید و به حجم ۲۵ میکرولیتر رسید و همچنین ۱۰۰ نانوگرم DNA به آن اضافه شد. در برنامه واکنش، واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. چرخه واکنش شامل واسرشت (با دمای مشابه واسرشت اولیه) و زمان ۳۰ ثانیه، دمای ۶۲/۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور اتصال پرایمرها به منطقه مورد نظر در توالی DNA و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر قطعه مورد نظر توسط آنزیم Taq بود که ۴۰ مرتبه تکرار گشت. برای تکثیر نهایی از دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. محصول واکنش توسط Eco81I (Fermentas بلاروس) بریده شد و قطعات حاصل از واکنش RFLP (Restriction fragment length polymorphism) بر روی ژل با فرمول ۱درصد آگارز (Roche آلمان) و ۲ درصد LMP (low melting point) آگارز (Roche آلمان) برده شد و با رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم برماید آشکار شد. ژنوتیپ و طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی در جدول ۱ مشخص شده است. به‌منظور تایید نتایج ۱۵ نمونه توسط دستگاه ABI genetic analyzer 3130xl توالی یابی و تعیین ژنوتیپ شدند.

جدول ۱. *مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR ژنوتیپ و طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی*

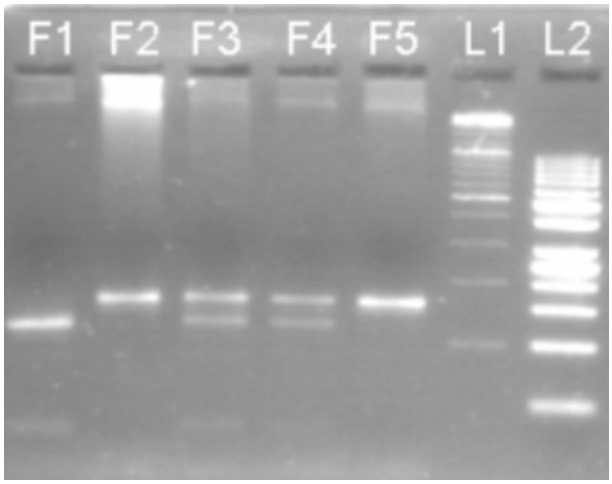
جهت پرایمر	توالی	دمای اتصال	درصد GC
Forward	5'- CAGTAAATGTATGGGGTCGCAG -3'	۵۵/۸	۵۰
Reverse	5'- GGTGTCAGTGGGAGGAGGG -3'	۵۶/۱	۶۸/۴۲
آنزیم	**جایگاه شناسایی و برش**	**ژنوتیپ**	**طول قطعات**
Eco81I	5'...C C^T N A G G...3' 3'...G G A N T^C C...5'	CC	۳۶، ۱۱۷
		CT	۳۶، ۱۱۷، ۱۵۳
		TT	۱۵۳

روش‌های آماری

در این مطالعه برای تجزیه و تحلیل‌های آماری، نرم افزار SPSS Version 20 به کار گرفته شد. برای آنالیز توزیع آللی، تعادل‌هاردی-واینبرگ و مقایسه توزیع فروانی ژنوتیپی و آللی از آزمون مربع کای (Chi-square) استفاده شد. P<۰/۰۵ به‌عنوان معیار معنا دار بودن در نظر گرفته شد.

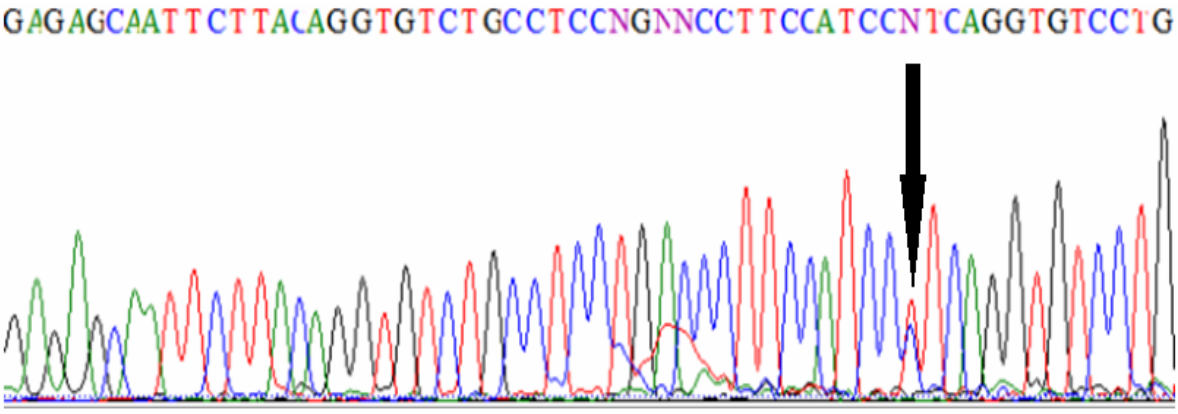
نتایج

محصول PCR و RFLP در تصویر ۱ قابل مشاهده است. سن افراد گروه شاهد و گروه بیمار به ترتیب در بازه ۱۴ تا ۷۸ سال و ۱۱ تا ۸۸ سال قرار داشت؛ میانگین سن آنها به ترتیب برابر با ۱۶/۸۲۵±۳۹/۷ و ۱۶/۵۰۲±۴۷/۳۶ سال بود. پس از بررسی نتایج حاصل از مطالعه توسط آزمون فراوانی مشخص شد که فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CT و TT در جمعیت بیماران به ترتیب برابر ۱۹/۳٪، ۵۹/۶٪ و ۲۱/۱٪ و در جمعیت افراد شاهد برابر ۳۰/۳٪، ۵۲/۳٪ و ۱۷/۴٪ است. توزیع آلل‌های C و T در گروه بیمار به ترتیب برابر ۴۹/۱٪ و ۵۰/۹٪ و در گروه شاهد برابر ۵۶/۴٪ و ۴۳/۶٪ تعیین شد. فراوانی آلل‌ها درگروه شاهد از تعادل هاردی واینبرگ برخوردار بود. در جدول ۲ فراوانی ژنوتیپی و آللی به تفکیک جنس مشخص شده است. یافته‌های این مطالعه نشان داد که میان ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم 509C>T- و هپاتیت B مزمن ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. نتایج حاصل از تعیین توالی مستقیم صحت واکنشRFLP را ثابت کرد، نمونه ای از نتایج آن در تصویر ۲ قابل مشاهده است.



تصویر ۱. *قطعات حاصل از هضم آنزیمی Eco81I*

L1) مارکر ۱۰۰ جفت باز، L2) مارکر ۵۰ جفت باز، F1) ژنوتیپ هموزیگوت CC، F2) ژنوتیپ هموزیگوت TT، F3) ژنوتیپ هتروزیگوت CT، F4) کنترل مثبت و F5) کنترل منفی (محصول PCR)



تصویر ۲. *نتیجه تعیین توالی مستقیم محصول PCR*

این تصویر مربوط به بخشی از توالی ژن TGF-β1 در فردی با ژنوتیپ هتروزیگوت برای جایگاه ۵۰۹- می‌باشد. ناحیه‌ی مشخص شده توسط پیکان نشان دهنده وجود هر دو آلل C و T است.

جدول ۲. *توزیع ژنوتیپ‌ها و آلل‌های پلی مورفیسم T>C509- ژن TGF-β1 به تفکیک جنس*

متغیر	مرد			زن		
	شاهد (۵۳)	بیمار (۷۱)	همسان سازی شده Pvalue، OR (CI ٪۹۵) *	شاهد (٥٦)	بیمار(۳۸)	همسان سازی شده Pvalue، OR (CI ٪۹۵) *
ژنوتیپ تعداد(٪)						
CC	۱۶ (۳۰/۲)	۱۴ (۱۹/۷)	۱/۰۰ (مرجع)	۱۷ (۳۰/۳)	۷ (۱۸/۴)	۱/۰۰ (مرجع)
CT	۲۶ (۴۹/۱)	۴۴ (۶۲)	۱/۷۶۹ (۰/۷۳۲ – ۴/۲۷۳)، ۰/۲۰۵	۳۱ (۵۵/۴)	۲۱ (۵۵/۳)	۱/۲۸۸ (۰/۴۳۴ – ۳/۸۲۷)، ۰/۶۴۸
TT	۱۱ (۲۰/۷)	۱۳ (۱۸/۳)	۰/۱۵۲ (۰/۳۸۲ – ۰/۴۷۲)، ۰/۸۰۲	۸ (۱۴/۳)	۱۰ (۲۶/۳)	۲/۸۴۸ (۰/۷۶۴ – ۱۰/۶۲۴)، ۰/۱۱۹
آلل تعداد(٪)						
C	۵۸ (۵۴/۷)	۷۲ (۵۰/۷)	۱/۰۰ (مرجع)	۶۵ (۵۸)	۳۵ (۴۶/۱)	۱/۰۰ (مرجع)
T	۴۸ (۴۵/۳)	۷۰ (۴۹/۳)	۱/۳۴۰ (۰/۶۵۴ – ۱/۸۳۴)، ۰/۱۰۷	۴۷ (۴۲)	۴۱ (۵۳/۹)	۰/۶۷۹ (۰/۸۵۱ – ۲/۸۵۵)، ۰/۶۵۰

*همسان سازی شده بر اساس سن

بحث و نتیجه گیری

TGF-β1 یک سایتوکین پلی ترو‌پیک است که می‌تواند سیستم ایمنی و عملکردهای سلولی را تنظیم کند. مشخص شده که این سایتوکین قادر به‌مهار همانندسازی هپاتیت B می‌باشد. TGF-β1 به‌طور چشمگیری RNA پیش ژنومی، رونوشت‌های ویروسی، نوکلئوکپسید و پروتئین core را کاهش می‌دهد. اخیراً مشخص شده که TGF-β1 همانندسازی هپاتیت B را از طریق کاهش بیان فاکتور ۴α هسته هپاتوسیت (HNF-4α) مهار می‌کند. HNF-4α رونویسی RNAپیش ژنومی را فعال می‌کند. در حضور TGF-β1 بیان HNF-4α فروکش می‌کند و به‌دنبال آن سنتز پروتئین core به‌شدت کاهش می‌یابد و بنابراین تشکیل

نوکلئوکپسید و همچنین همانندسازی ویروس هپاتیت B سرکوب می‌شود. TGF-β1 پاسخ ایمنی علیه ویروس را مهار می‌کند. از طرف دیگر به‌طور مستقیم همانندسازی ویروس را مهار کرد. و در نتیجه می‌تواند آسیب‌های کبدی را در بیماران هپاتیت مزمن کاهش دهد (۱۷،۱۸).

یکی از مشکلاتی که در پی مزمن شدن هپاتیت B رخ می‌دهد، فیبروز کبدی است. از میان سه ایزوفورم TGF-β، TGF-β1 نقش عمده‌ای در تحریک سلول‌های ستاره‌ای کبد برای تولید ماتریکس خارج سلولی بر عهده دارد و از این طریق از تخریب آنها جلوگیری می‌کند. بیان بالای آن تجمع کلاژن نوع ۱ را افزایش می‌دهد و فیبروز کبدی را تشدید می‌کند. مطالعه‌ی که اخیراً بر روی سرکوب این ژن انجام شده، مهار کردن TGF-β1 را در بهبود فیبروز کبدی مؤثر می‌داند (۲۴).

لوکوس TGF-β1 در انسان بر روی کروموزوم 19q13 قرار دارد. تا به حال چندین SNP در این لوکوس یافت شده که یکی از آنها 509C>T- است، این SNP در منطقه پروموتر قرار دارد. مطالعات نشان داده است که آلل T در محل 509 با افزایش میزان TGF-β1 ارتباط دارد(۱۹). تاکنون مطالعات زیادی بر روی این SNP انجام شده که به برخی از آنها اشاره می‌شود.

یک بررسی بر روی سه TGF-β1 SNP (509C>T- ، 800G>A- ، Leu10Pro و Arg25Pro) مشخص شده که Leu10Pro با سرطان کبد ارتباط دارد و در بیماران مبتلا به سیروز، ژنوتیپ‌های CT و TT پلی مورفیسم 509C>T- و ژنوتیپ‌های CG و CC پلی مورفیسم Arg25Pro فراوانی بیشتری نسبت به جمعیت شاهد داشتند (۱۶).

در پژوهشی ارتباط پلی مورفیسم 509C>T- و سرطان کبد در بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که این دو عامل با هم در ارتباط هستند. این مطالعه بر روی ۳۷۹ بیمار مبتلا به هپاتیت B مزمن و سرطان کبد، ۱۹۶ بیمار بدون سرطان و ۲۹۹ فرد سالم انجام شد (۱۹).

در مطالعه‌ای در لهستان، آشکار شد که پلی مورفیسم‌های TGF-β1 با هپاتیت B مزمن در کودکان ارتباط ندارند(۲۲).

اخیراً مطالعه‌ای در ایران توسط رومانی و همکاران انجام شده که طی آن پلی مورفیسم‌های C/T 509-، C/T 869+ و G/C 915+ در ۳۳۳ فرد ایرانی شامل ۱۶۴ بیمار مبتلا به هپاتیت C مزمن و ۱۶۹ فرد سالم مورد مطالعه قرار گرفته است. هیچ‌کدام از این SNPها با هپاتیت C مزمن مرتبط نبودند (۲۳).

با توجه به اینکه در مطالعه حاضر فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CT و TT در جمعیت شاهد به‌ترتیب برابر۳۰/۳٪، ۵۲/۳٪ و ۱۷/۴٪ و در جمعیت بیمار برابر ۱۹/۳٪، ۵۹/۶٪ و ۲۱/۱٪ و توزیع آلل‌های C و T در گروه شاهد به‌ترتیب برابر ۵۶/۴٪ و ۴۳/۶٪ و در گروه بیمار برابر ۴۹/۱٪ و ۵۰/۹٪ بود، این احتمال وجود دارد که بین هپاتیت B مزمن و ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم پروموتر TGF-β1 (509C>T-) ارتباط معنی‌داری وجود نداشته باشد. با توجه به کوچک بودن نسبی جامعه آماری مورد مطالعه برای تعمیم این نتیجه به کل جمعیت پیشنهاد می‌شود که مطالعاتی با تعداد بیشتر نمونه انجام پذیرد. با توجه به این که میزان پلاسمایی TGF-β1 با آلل T پلی مورفیسم 509C>T- ارتباط دارد، نیاز به مطالعه‌ای در جمعیت ایرانی احساس می‌شود که طی آن میزان سرمی TGF-β1 در افراد با ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم 509C>T- مورد بررسی قرار بگیرد.

References

1. Azimzadeh P., Mohebbi S.R, Romani S, Kazemian SH, Mirtalebi H, Vahedi M, et al. Role of TGF-β1 codon 10 polymorphism in chronic hepatitis C patients. *Journal of Babol University of Medical Sciences* 2011; 13(4): 26-33 [Persian].
2. Azimzadeh P., Mohebbi SR, Romani S, Naghoosi H, Vahedi M, Kazemian Sh, et al. Effect of interleukin-12 p40 subunit gene 3'-untranslated region polymorphism in chronic HCV infection. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences* 2011; 16(1): 10-19 [Persian].
3. De Andrade DR Gr, de Andrade DR, The influence of the human genome on chronic viral hepatitis outcome. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2004; 46(3): 119-26.
4. Dienstag J.L. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 2008; 359(14): 1486-500.
5. Mohebbi S.R, Sanati A, Cheraghipour K, Rostami Nejad M, Mohaghegh H, Zali M.R. Hepatitis C and hepatitis B virus infection: epidemiology and risk factors in a large cohort of pregnant women in Lorestan, west of iran. *Hepat Mon* 2011; 11(9): 736-9.
6. Tahaei S.M, Mohebbi SR, Azimzadeh P, Vahedi M, Almasi Sh, Romani S, et al. Frequency of HIV and HCV Co-Infections in Chronic HBV Patients Referred to Taleghani Hospital, Tehran, Iran from 2006 to 2010. *Hepat Mon* 2011; 11(12): 993-6.
7. Mohebbi S.R, Amini-Bavil-Olyaee S, Zali N, Damavand B, Azimzadeh P, Derakhshan F, et al. Characterization of hepatitis B virus genome variability in Iranian patients with chronic infection, a nationwide study. *J Med Virol* 2012; 84(3): 414-23.
8. Kao J.H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus. *Korean J Intern Med* 2011; 26(3): 255-61.
9. Mohebbi S.R, Amini-Bavil-Olyaee S, Zali N, Noorinayer B, Derakhshan F, Chiani M, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Iran. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(9): 858-66.
10. Shi Y.H. Shi C.H. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2009; 15(25): 3099-105.
11. Chisari F.V, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)* 2010; 58(4): 258-66.
12. Bissell D.M, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 2001; 34(5): 859-67.
13. Chang H, Brown C.W, Matzuk M.M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 2002; 23(6): 787-823.
14. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13(22): 3056-62.
15. Hu P.P, Datto M.B, Wang X.F. Molecular mechanisms of transforming growth factor-beta signaling. *Endocr Rev* 1998; 19(3): 349-63.
16. Falleti E, Fabriz C, Toniutto P, Fontanini E, Cussigh A, Bitetto D, et al. TGF-beta1 genotypes in cirrhosis: relationship with the occurrence of liver cancer. *Cytokine* 2008; 44(2): 256-61.
17. Chou Y.C, Chen ML, Hu CP, Chen XL, Chong CL, Tsai XL, et al. Transforming growth factor-beta1 suppresses hepatitis B virus replication primarily through

transcriptional inhibition of pregenomic RNA. *Hepatology* 2007; 46(3): 672-81.

18. Hong M.H., Chu YC, Wu YC, Tsai KN, Hu CP, Jeng KS, et al., Transforming growth factor-beta1 suppresses hepatitis B virus replication by the reduction of hepatocyte nuclear factor-4alpha expression. *PLoS One* 2012; 7(1): e30360.
19. Qi P., Chen YM, Wang H, Fang M, Ji Q, Zhao YP, et al., -509C>T polymorphism in the TGF-beta1 gene promoter, impact on the hepatocellular carcinoma risk in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. Cancer Immunol Immunother, 2009; 58(9): 1433-40.
20. Kim S.J,Glick A, Sporn MB, Roberts AB. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J Bio Chem* 1989; 264(1): 402-8.
21. Peng Z., Zhan L, Chen S, Xu E. Association of transforming growth factor-beta1 gene C-509T and T869C polymorphisms with atherosclerotic cerebral infarction in the Chinese: a case-control study. *Lipids Health Dis* 10: 100.
22. Liberek A., Jakobkiewicz-Banecka JJ, Kloska AA, Swierska JJ, Marek AA, Luczak GG, et al. Gene polymorphism of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) in the pathogenesis and clinical course of chronic hepatitis in children. *Med Wieku Rozwoj* 2009; 13(3): 171-9.
23. Romani S., Azimzadeh P, Mohebbi SR, Kazemian SH, Almasi Sh, Naghoosi H, et al. Investigation of Transforming Growth Factor-beta1 Gene Polymorphisms Among Iranian Patients With Chronic Hepatitis C. *Hepat Mon* 2011; 11(11): 901-6.
24. Cheng K, Yang N, Mahato R.I. TGF-beta1 gene silencing for treating liver fibrosis. *Mol Pharm* 2009; 6(3): 772-9.

The Assosiation of Promoter Polymorphism of TGF-β1 (-509C>T) with Chronic Hepatitis B in Iraninan Patients Referred to Taleghani Hospital, Tehran

Hosseini Razavi1 A., M.Sc.[1,2], Hosseini S.M., Ph.D.[3], Azimzadeh P., M.Sc.[4], Mohebbi S.R., Ph.D.[5], Khanyaghma M., M.Sc.[6], Sharifian A., M.D.[7], Sanati A., M.D.[8], Zali M.R., M.D.[9]

1. Master of Microbiology, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid-Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Professor of Virology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Master of Callular & Molecullar Biology, Gostroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Ph.D. of Medical Virology, Gostroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6. Master of Marine Biology, Gostroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
7. Associate Professor, Gostroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
8. General Practitioner Gostroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
9. Professor, Gostroenterology and Liver Diseases Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: srmohebbi@gmail.com

(Received: 24 Sep. 2012 Accepted: 17 Jan. 2013)

Abstract

Background & Aims: Hepatitis B infection is a global health problem. Hepatitis B virus can escape from the innate immune system, however adaptive immune system mainly acts against it. Transforming growth factor β (TGF-β) has three isoforms in mammals. Several studies have recently shown that TGF-β1 suppresses replication of hepatitis B virus. Moreover, high expression of this factor is effective in liver fibrosis. In this study, association of promoter polymorphism of TGF-β1 with chronic hepatitis B was investigated.

Method: In this case-control study, 109 patients with chronic hepatitis B and 109 healthy control subjects formed the study population. Genotyping was performed by PCR-RFLP method. First polymerase chain reaction (PCR) was used for amplification and then its product was digested with Eco81I enzyme. Fifteen samples were sequenced to confirm the results.

Results: Genotype frequency of CC, CT, TT in patient group were respectively 19.3%, 59.6% and 21.1%. The corresponding values in the control group were respectively 30.3%, 52.3% and 17.4%. The C and T allele Frequencies in the patient group (49.1% and 50.9%) and in the control group (56.4% and 43.6%) showed no significant difference.

Conclusion: There was no significant difference in genotypes of -509C>T polymorphism between control and patient groups, therefore, it can be concluded that this polymorphism is not a prognostic factor for chronic hepatitis B in Iranian patients.

Keywords: Polymorphism, Single nokleotide, TGF-β1, Chronic Hepatitis B

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2013; 20(3): 223-231