

LIÊN QUAN ĐIỂM ĐA HÌNH GEN $TGF\beta 1 - 509$ VÀ NGUY CƠ UNG THƯ BIỂU MÔ TẾ BÀO GAN

Nguyễn Bá Vượng¹; Phan Thị Hiền Lương²
Trần Việt Tú²; Lương Thị Lan Anh³

TÓM TẮT

Mục tiêu: kiểu gen của vật chủ ảnh hưởng lớn đến hậu quả nhiễm virus viêm gan B và hình thành ung thư biểu mô tế bào gan, do vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu bệnh chứng từ 1 - 2016 đến 1 - 2018 nhằm đánh giá ảnh hưởng của điểm đa hình $TGF\beta 1 - 509$ với nguy cơ bị ung thư biểu mô tế bào gan. **Đối tượng và phương pháp:** 102 bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan có HBsAg (+) và 102 người cho máu khỏe mạnh, tiến hành phân tích điểm đa hình gen $TGF\beta 1 - 509 C>T$ bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp. **Kết quả:** sử dụng kiểu gen CC làm nhóm chứng cho thấy kiểu gen TT tăng nguy cơ bị ung thư với (OR = 2,323; 95%CI: 1,026 - 5,288, p = 0,041). Cá thể mang alen T tăng nguy cơ bị ung thư so với những cá thể mang alen C (OR = 1,529; 95%CI: 1,029 - 2,271, p = 0,035). Tuy nhiên, không thấy mối liên quan về điểm đa hình gen trên với đặc điểm lâm sàng như số lượng, kích thước khối u hay hiện tượng di căn. **Kết luận:** nghiên cứu thấy điểm đa hình gen $TGF\beta 1 - 509 C>T$ có liên quan đến nguy cơ bị ung thư biểu mô tế bào gan, cần nghiên cứu thêm với số lượng bệnh nhân lớn hơn để khẳng định kết quả trên.

* Từ khóa: Ung thư biểu mô tế bào gan; Virus viêm gan B; $TGF\beta 1 - 509$; Đa hình gen.

The Correlation between $TGF\beta 1 - 509$ Gene Polymorphisms and Risk of Hepatocellular Carcinoma.

Summary

Objectives: Host genetic factor may affects clinical outcomes of hepatitis B virus infection, this case control study aimed to evaluate transforming growth factor $\beta 1$ ($TGF\beta 1$) - 509 gene polymorphisms as a risk factor of hepatocellular carcinoma from 1 - 2016 to 1 - 2018. **Subject and methods:** 102 hepatocellular carcinoma patients with HBsAg (+) and 102 healthy blood donors were investigated. Polymorphisms of $TGF\beta 1 - 509$ gene were determined using the sequence specific primer PCR. **Results:** Using the CC genotype as reference genotype, TT was significantly associated with increased risk of hepatocellular carcinoma (OR = 2.323; 95%CI: 1.026 - 5.288, p = 0,041). Furthermore, we found T allele was significantly associated with increased risk of hepatocellular carcinoma, compared C allele (OR = 1.529; 95%CI: 1.029 - 2.271, p = 0.035). However, in a subsequent analysis of the association between $TGF\beta 1 - 509$ gene polymorphism and clinical characteristics of hepatocellular carcinoma including tumor size, type, presence or absence of metastasis, and portal vein thrombosis, there were no significant differences in both the distribution of genotype frequency with hepatocellular carcinoma patients. **Conclusion:** The present study showed that $TGF\beta 1 - 509 C>T$ polymorphism was associated with increased hepatocellular carcinoma risk. Further prospective studies on large are necessary to confirm our findings.

* **Keywords:** Hepatocellular carcinoma; Hepatitis B virus; $TGF\beta 1 - 509 C>T$ polymorphism.

1. Bệnh viện Quân y 103

2. Bệnh viện Bạch Mai

3. Trường Đại học Y Hà Nội

Người phản hồi (Corresponding): Nguyễn Bá Vượng (bavuongsang@gmail.com)

Ngày nhận bài: 11/03/2019; **Ngày phản biện đánh giá bài báo:** 16/05/2019

Ngày bài báo được đăng: 22/05/2019

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sinh lý bệnh của ung thư biểu mô tế bào gan (UTBMTBG) rất phức tạp, có sự đóng góp của nhiều yếu tố, qua nhiều bước, trong đó nhiễm virus viêm gan B (HBV) là nguyên nhân quan trọng nhất. Theo các nghiên cứu khác nhau, HBV chiếm 60 - 80% nguyên nhân gây UTBMTBG, tuy nhiên, > 90% người trưởng thành khi bị nhiễm HBV có thể tự khỏi trong vòng 6 tháng, chỉ có 5 - 10% trường hợp nhiễm mạn sẽ tiến triển thành viêm gan mạn, xơ gan, UTBMTBG [2]. Điều này cho thấy kiểu gen và đáp ứng miễn dịch của vật chủ có liên quan đến nguy cơ bị UTBMTBG của cơ thể khi tiếp xúc với yếu tố gây bệnh.

TGF β 1 (Transforming growth factor β 1) là một cytokine đa chức năng, kiểm soát nhiều hoạt động của tế bào. Trên những tế bào bình thường, TGF β 1 tác động như một chất ức chế u bằng cách ức chế tăng sinh tế bào, thúc đẩy tế bào biệt hóa, gây chết theo chương trình. Tuy nhiên, ở giai đoạn đầu của quá trình sinh ung thư, các tế bào không tuân theo sự kiểm soát bình thường trên, cytokine này thúc đẩy hoạt động gen tăng sản xuất collagen, tăng hình thành xơ ở gian bào, ức chế chúng thoái hóa. Đối với bệnh nhân (BN) HBV mạn, protein nhân của HBV kích thích hoạt động phiên mã của gen TGF β 1, hơn nữa virus còn tác động lên con đường truyền tin TGF β , gây chuyển tác dụng từ ức chế u sang tăng cường xơ hóa, tăng nguy cơ UTBMTBG [3].

Gen TGF β 1 nằm trên nhánh dài của nhiễm sắc thể 19 (19q13,1-13,3), có nhiều điểm hình đơn liên quan đến nồng độ TGF β huyết tương, trong đó vị trí -509 C>T đã được nghiên cứu cho thấy có giá

trị nhất. Hơn nữa, phân tích kiểu hình gen TGF β 1 - 509 C>T thấy những cá thể có alen T sẽ tăng nguy cơ bị UTBMTBG so với những cá thể mang alen C. Điểm đa hình gen TGF β 1 - 509 C>T nằm ở vùng khởi động nên có vai trò lớn đến quá trình sản xuất TGF β [4]. Để đánh ảnh hưởng của điểm đa hình này với nguy cơ bị ung thư, nhiều nghiên cứu được tiến hành nhằm làm sáng tỏ cơ chế bệnh sinh và mối liên quan giữa nhiễm virus với quá trình sinh ung thư, từ đó giúp phát hiện sớm và điều trị hiệu quả hơn. Việt Nam là quốc gia có tỷ lệ nhiễm HBV cao với gánh nặng UTBMTBG rất lớn. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm: *Đánh giá mối liên quan của điểm đa hình gen TGF β 1-509 C>T và nguy cơ bị UTBMTBG ở quần thể người Việt Nam.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu tiến hành tại Bệnh viện Bạch Mai và Trường Đại học Y Hà Nội từ 1 - 2016 đến 1 - 2018.

1. Đối tượng nghiên cứu.

* *Nhóm bệnh:*

- 102 BN (94 nam, 8 nữ) được chẩn đoán UTBMTBG theo Hướng dẫn của Bộ Y tế Việt Nam (2012) [4].

+ Có bằng chứng giải phẫu bệnh mô bệnh học hoặc tế bào học về UTBMTBG.

+ Hình ảnh điển hình trên phim chụp cắt lớp vi tính (CT-scan) ổ bụng có cản quang, hoặc MRI ổ bụng có cản từ + α FP > 400 ng/ml.

+ Hình ảnh điển hình trên CT-scan ổ bụng có cản quang hoặc MRI ổ bụng có cản từ + α FP tăng cao hơn bình thường (< 400 ng/ml), tiến hành sinh thiết gan chẩn đoán bằng mô bệnh học.

- BN có HBsAg (+).
- BN lần đầu được chẩn đoán UTBMTBG, chưa điều trị hóa chất trước đó.

** Tiêu chuẩn loại trừ:*

- BN nhiễm HIV; HCV; nghiện rượu; bệnh viêm gan do thuốc, do hóa chất; ung thư gan di căn từ các cơ quan khác.

** Nhóm chứng:* 102 người khỏe mạnh cho máu, không có triệu chứng lâm sàng hay tiền sử bị viêm gan, HBsAg (-), anti-HCV (-), HIV (-), tương đồng về giới so với nhóm bệnh.

2. Phương pháp nghiên cứu.

Nghiên cứu mô tả cắt ngang, bệnh chứng.

** Đánh giá lâm sàng:*

Đánh giá đặc điểm: tuổi, giới, kích thước u, huyết khối tĩnh mạch cửa, di căn.

** Giải trình tự gen:*

Lấy 2 ml máu toàn phần của 102 BN UTBMTBG, 102 người khỏe mạnh, chống đông bằng EDTA, bảo quản -80°C.

Dùng PathogenFree ADN Isolation PCR Kit (GeneProof) để chiết tách ADN từ máu toàn phần. Dùng phản ứng PCR để khuếch đại gen *TNF-α*, sử dụng mỗi xuôi 5'-GGAGAG-TAGGTTTTACAGGTG-3', mỗi ngược 5'-TAGGAGAAGGAGGGTCT-

GTC-3' với chu trình nhiệt 95°C/30 giây; 58°C/30 giây; 72°C/30 giây x 35; 72°C/5 phút. Tinh sạch sản phẩm PCR được bằng kit Qiagen (Đức) có kích thước 377 bp, kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1%.

Phân tích trình tự gen trực tiếp bằng máy ABI 3500 Genetic analyzer và phần mềm Variant reporter version 2.0 (Thermo Fisher), BioEdit. Trình tự tham chiếu TGFβ1 - 509 (X05839) được tham khảo từ cơ sở dữ liệu của NCBI. Kết quả kiểu gen đồng hợp tử được xác định là CC, TT và kiểu gen dị hợp tử được xác định là CT.

Định lượng HBV-ADN bằng phương pháp realtime PCR với hệ thống CFX96 C1000 Thermal Cycler Bio Rad, sử dụng kit GeneProof.

** Phân tích và xử lý số liệu:*

Tiến hành thu thập, xử lý số liệu với phần mềm SPSS 17 để tìm ra sự khác biệt về phân bố kiểu gen của đa hình gen *TGFβ1 - 509 C>T* và nguy cơ bị UTBMTBG. Trình bày số liệu theo trung bình hoặc trung vị khi phù hợp. Thuật toán test χ^2 , OR (Odds ratio: tỷ xuất chênh), CI (Confident intervals: độ tin cậy), giá trị tin cậy 95%, giá trị $p < 0,05$ được xác định có ý nghĩa thống kê.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu.

Bảng 1:

	Nhóm bệnh (n = 102)	Nhóm chứng (n = 102)
Tuổi trung bình ± SD (năm)	57,4 ± 9,7	24,8 ± 3,9
Tỷ lệ giới (nam/nữ)	11,8/1	11,8/1
HBsAg	(+)	(-)
Trung vị (25 - 75%) HBV-ADN (cp/ml)	222500 (1855 - 4744755,08)	
Trung vị (25 - 75%) AFP (ng/ml)	157,1 (15,48 - 6828,75)	

Loại u gan	1 khối	72,5%	
	Nhiều khối	27,5%	
Di căn ung thư	Có	19,6%	
	Không	80,4%	
Huyết khối tĩnh mạch cửa	Có	22,5%	
	Không	77,5%	
Kích thước u gan	< 5 cm	29,4%	
	≥ 5 cm	70,6%	
Đường kính tổng u gan (cm)		10,81 ± 12,03 (1,7 - 98,7)	

Nam chiếm ưu thế trong nhóm ung thư, tỷ lệ nam/nữ là 11,8/1; nhóm chứng đạt tương đồng về giới so với nhóm UTBMTBG.

2. Mối liên quan đa hình gen TGFβ1 - 509 và nguy cơ bị UTBMTBG.

Bảng 2:

Kiểu gen và alen	Nhóm bệnh (n = 102)	Nhóm chứng (n = 102)	OR (95%CI)	p
Kiểu gen (n)				
CC	14	23	Ref	
CT	47	50	1,544 (0,712 - 3,351)	0,270
TT	41	29	2,323 (1,026 - 5,258)	0,041
Tổ hợp các gen lặn và trội (n)				
CC	14	23	Ref	
TT + CT (T-)	88	79	1,830 (0,881 - 3,799)	0,102
CT + CC (C-)	61	73	Ref	
TT	41	29	1,692 (0,943 - 3,036)	0,077
Kiểu alen (2n)				
Alen C	75	96	Ref	
Alen T	129	108	1,529 (1,029 - 2,271)	0,035

(Ref: Reference - Tham chiếu)

Người mang kiểu gen TT có khả năng mắc UTBMTBG cao hơn người mang kiểu gen CC với OR = 2,323; 95%CI: 1,026 - 5,258; p = 0,041. Người mang alen T có khả năng mắc UTBMTBG cao hơn người mang alen C với OR = 1,529; 95%CI: 1,029 - 2,271, p = 0,035.

Bảng 3: Đa hình gen *TGFβ1 - 509 C>T* và triệu chứng lâm sàng.

Kiểu gen <i>TGFβ1 - 509 C>T</i>	Tuổi (mean ± SD)	Đường kính tổng u (cm); median (25 - 75%)
CC	56,14 ± 9,437	60,5 (39,25 - 109)
CT	59,30 ± 10,323	89 (50 - 110)
TT	55,71 ± 9,413	71(40,5 - 160)
p	0,209	0,725

Không có sự khác biệt về tuổi trung bình và kích thước tổng u trung bình ở BN mang đa hình gen khác nhau của *TGFβ1 - 509 C>T*.

Bảng 4: Đa hình kiểu gen *TGFβ1 - 509 C>T* và đặc điểm khối u.

<i>TGFβ1 - 509 C>T</i>					
Đặc điểm u		CC (%)	CT (%)	TT (%)	p
Số lượng	1 khối	11 (14,9)	35 (47,3)	28 (37,8)	0,699
	Nhiều khối	3 (10,7)	12 (42,9)	13 (46,4)	
Mức độ biệt hóa UTBMTBG	Cao	4 (33,3)	3 (25)	5 (42,7)	0,551
	Trung bình	4 (15,4)	12 (46,1)	10 (38,5)	
	Kém	1 (10)	5 (50)	4 (40)	
Hình thái	Lan tỏa	0 (0)	3 (35,7)	5 (62,5)	0,301
	Khối	14 (14,9)	44 (46,8)	36 (38,3)	
Kích thước	< 5 cm	5 (16,7)	11 (36,7)	14 (46,6)	0,466
	≥ 5 cm	9 (12,5)	36 (50)	27 (37,5)	

Phân bố các đa hình gen của *TGFβ1 - 509* đối với đặc điểm khối u như số lượng, độ biệt hóa, hình thái, kích thước đều không có khác biệt.

Bảng 5: Đa hình kiểu gen *TGFβ1 - 509 C>T* và đặc điểm cận lâm sàng.

<i>TGFβ1 - 509 C>T</i>					
Chỉ số cận lâm sàng		CC (%)	CT (%)	TT (%)	p
HBV-ADN	< 10 ⁴ cp/ml	2 (6)	16 (47)	16 (47)	0,235
	≥ 10 ⁴ cp/ml	12 (17,6)	31 (45,6)	25 (36,8)	
AFP	< 400 ng/ml	9 (16,7)	22 (40,7)	23 (42,6)	0,450
	≥ 400 ng/ml	5 (10,4)	25 (52,1)	18 (37,5)	
Huyết khối tĩnh mạch cửa	Có huyết khối	2 (8,7)	11 (47,8)	10 (43,5)	0,724
	Không huyết khối	12 (15,2)	36 (45,6)	31(39,2)	
Di căn khác	Có di căn	5 (25)	7 (35)	8 (40)	0,227
	Không di căn	9 (11)	40 (48,8)	33 (40,2)	

Phân bố các đa hình gen *TGFβ1 - 509* với đặc điểm lâm sàng như giá trị HBV-ADN, nồng độ AFP, huyết khối tĩnh mạch cửa và di căn khác đều không có khác biệt.

BÀN LUẬN

TGF β là một cytokine quan trọng tác động lên nhiều quá trình của tế bào, trong đó có quá trình hình thành ung thư. TGF β có vai trò lưỡng cực với khối u, tác động ức chế khối u trong giai đoạn đầu và kích thích u trong giai đoạn tiến triển. Bình thường, TGF β tác dụng như một chất ức chế u do kim hãm tế bào tăng sinh, kích thích tế bào biệt hóa và gây chết theo chương trình. Tuy nhiên, ở giai đoạn đầu của quá trình sinh ung thư, tế bào trở nên mất kiểm soát do tác dụng này của TGF β , tạo điều kiện cho quá trình truyền tin của TGF β từ ức chế thành phát triển u. Nhiều bằng chứng cho thấy nồng độ TGF β tăng trong huyết tương ở BN UTBMTBG, tăng biểu hiện TGF β 1 ở mô ung thư gan so với mô lành [5]. Do vậy, bằng việc kiểm soát hoạt động gen, quy định nồng độ TGF β 1 huyết tương, điểm đa hình TGF β 1 - 509 nằm ở vùng khởi động gen sẽ ảnh hưởng đến hình thành UTBMTBG.

Kết quả cho thấy kiểu alen T tăng nguy cơ bị UTBMTBG (OR = 1,529; 95%CI: 1,029 - 2,271, p = 0,035) so với kiểu alen C, kiểu gen TT tăng nguy cơ bị UTBMTBG (OR = 2,323; 95%CI: 1,026 - 5,288, p = 0,041) so với kiểu gen CC. J. Ma (2015) nghiên cứu trên 159 BN UTBMTBG nhiễm HCV và 234 người khỏe mạnh nhiễm HCV thấy người mang kiểu gen TT và alen T tăng nguy cơ so với người mang gen CC hoặc alen C (OR = 1,820, 95%CI: 1,051 - 3,153, p = 0,036 và OR = 1,383, 95%CI: 1,037 - 1,844, p = 0,028) [6].

Năm 1999, Grainger công bố alen T tại vị trí - 509 của gen TGF β 1 có liên quan đến tăng nồng độ TGF β 1 huyết tương, hơn nữa nồng độ này ở cá thể mang gen

2 alen T cao hơn ở cá thể mang 1 alen T, cho thấy hiệu ứng cộng liều của alen. Nhiều nghiên cứu chỉ ra biểu hiện rộng rãi của cytokine này ở bào tương của tế bào gan, tế bào Kupper, đại thực bào... [7]. TGF β giúp chuyển tế bào hình sao của gan thành các nguyên bào xơ sợi, kích thích tổng hợp ECM protein (extracellular matrix protein - protein gian bào) và ức chế chúng thoái triển. Tích lũy EMC góp phần bóp méo cấu trúc gan, tạo sẹo xơ, phát triển nốt tăng sản, hình thành xơ gan. Thực nghiệm gây phá vỡ tổng hợp TGF β 1 và/hoặc con đường truyền tín hiệu của TGF β làm giảm hiện tượng di căn và xâm nhập của tế bào ung thư [2].

Một số nghiên cứu cho thấy kiểu gen TT và alen T liên quan đến tăng nồng độ TGF β , tăng nguy cơ bị UTBMTBG như Mohamed (2012) [8], J. Ma (2015) [6], tuy nhiên nghiên cứu của Qi P (2009) [9], Roli Saxena (2013) cho thấy kiểu gen CC và alen C mới đóng vai trò này [10]. Đa số các nghiên cứu đều thừa nhận ảnh hưởng của điểm đa hình TGF β 1 - 509 với nguy cơ UTBMTBG, tuy nhiên alen và kiểu gen nào gây tăng nguy cơ hiện vẫn chưa có sự đồng thuận rõ ràng. Kết quả nghiên cứu của Wei - Qun Lu (2016) thực hiện một phân tích gộp trên 2.809 BN UTBMTBG và 4.802 người không ung thư. Phân tích dưới nhóm trên những nghiên cứu, lựa chọn BN từ quần thể chung, lấy kiểu gen CC làm chứng, tác giả thấy kiểu gen TT làm tăng nguy cơ UTBMTBG (OR, 95%CI, p: 1,74; 1,08 - 2,8; 0,023). So sánh theo mô hình gen trội (TT + TC so với CC) tăng nguy cơ bị UTBMTBG (OR, 95%CI, p: 1,48; 1,01 - 2,17; 0,047), alen T tăng nguy cơ UTBMTBG so với alen C (OR, 95%CI, p: 1,35; 1,05 - 1,74; 0,021) [11].

Tuy nhiên, khi phân tích mối liên quan của điểm đa hình gen *TGFβ1 - 509* và đặc điểm lâm sàng của BN UTBMTBG bao gồm: tuổi, kích thước u, hình thái, huyết khối tĩnh mạch cửa hay hiện tượng di căn, chúng tôi không thấy khác biệt về tỷ lệ phân bố khi so sánh các kiểu gen khác nhau. Như vậy, mặc dù điểm đa hình trên góp phần vào nguy cơ hình thành u, nhưng nó ít có vai trò đối với tiến triển UTBMTBG. Điều này cũng được giải thích do UTBMTBG là một bệnh lý phức tạp, chịu tác động của nhiều yếu tố từ gen vật chủ đến môi trường.

Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam đánh giá về ảnh hưởng của điểm đa hình gen *TGFβ1 - 509 C>T* với nguy cơ bị UTBMTBG. Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi với số lượng BN còn thấp, tất cả BN đều được lựa chọn tại bệnh viện, do vậy kết quả chưa đại diện cho tất cả BN UTBMTBG trong quần thể. Mặc dù đã cố gắng lựa chọn đạt được sự tương đồng về giới, nhưng chưa lựa chọn được nhóm chứng với độ tuổi tương tự nhóm bệnh. Do vậy, kết quả này cần được khẳng định thêm ở những nghiên cứu sau với số lượng BN lớn hơn, đối tượng mẫu được lựa chọn từ nhiều viện và trong cộng đồng.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ ra alen T và kiểu gen chứa alen T của gen *TGFβ1 - 509 C>T* liên quan đến tăng nguy cơ UTBMTBG. Tuy nhiên, không có sự khác biệt về phân bố kiểu gen đa hình trên với đặc điểm lâm sàng của BN UTBMTBG

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế. Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị ung thư tế bào gan nguyên phát. 2012.

2. Omata M et al. Asian Pacific Association for the study of the liver consensus recommendations on hepatocellular carcinoma. *Hepatology International*. 2010, 4 (2), pp.439-474.

3. Bataller. R, D.A. Brenner. Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005, 115 (2), pp.209-218.

4. Grainger D.J et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type β1. *Human Molecular Genetics*. 1999, 8 (1), pp.93-97.

5. Mohamed Ahmed Samy Kohla et al. Association of serum levels of transforming growth factor β1 with disease severity in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatitis Research*. 2017, 3, pp.294-301.

6. J. Ma et al. TGF-β1 polymorphism 509 C>T is associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma in HCV - infected patients. *Genes and Molecular Research*. 2015, 14 (2), pp.4461-4468.

7. Zhi - Zhen Dong et al. Clinical impact of plasma TGF-β1 and circulating TGF-β1 mRNA in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2008, 7 (3), pp.288-295.

8. Mohamed I. Radwan, Heba F. Pasha, R.H. Mohamed. Influence of transforming growth factor - β1 and tumor necrosis factor - α genes polymorphisms on the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients. *Cytokine*. 2012, 60, pp.271-276.

9. Peng Qi et al. 509 C>T polymorphism in the *TGF-β1* gene promoter, impact on the hepatocellular carcinoma risk in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Cancer Immunol Immunother*. 2009, 58, pp.1433-1440.

10. Roli Saxena et al. Effect of *IL-12 B*, *IL-12B*, *TGF-β1*, and *IL-4* polymorphism and expression on hepatitis B progression. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2013, pp.1-11.

11. Wei - Qun L.U et al. Enhanced circulating transforming growth factor beta 1 is causally associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma: a mendelian randomization meta - analysis. *Oncotarget*. 2016, 7 (51), pp.84695- 84704.