

青岛地区汉族人群190例NAFLD患者IL28B基因rs12979860及rs8099917多态性研究

李江文^{1,2}, 许新^{1,2}, 董全勇^{1,2}, 林中华², 初蕾蕾², 辛永宁^{2,3}, 宣世英^{2,3,4} (1. 大连医科大学, 大连 116044; 2. 青岛市市立医院 消化内二科, 青岛 266021; 3. 青岛市消化疾病重点实验室, 青岛 266021; 4. 中国海洋大学医药学院, 青岛 266003)

摘要: 目的 探讨青岛地区汉族人群IL28B基因rs12979860、rs8099917多态性与NAFLD的相关性。方法 收集190例青岛地区汉族NAFLD患者和183例正常人的血液标本, 采用多重高温连接酶检测反应技术(iMLDR)进行IL28B的基因分型。计数资料比较进行 χ^2 检验, 计量资料进行 t 检验, 非条件Logistic回归模型计算比值比(OR)及其95%可信区间(CI)。结果 IL28B基因rs12979860、rs8099917位点基因型及等位基因在NAFLD组与对照组中的分布频率差异无统计学意义($P > 0.05$)。相对于野生型rs12979860 CC型、rs8099917 TT型, 含突变位点基因型未增加NAFLD的发病风险, 经多变量Logistic回归分析计算后, 含等位基因rs12979860 T、rs8099917 G的基因型携带者发生NAFLD的比值比(OR及95% CI)分别为0.958 (95% CI: 0.517~1.776, $P = 0.892$)及0.959 (95% CI: 0.490~1.876, $P = 0.903$)。结论 在青岛地区汉族人群中, IL28B基因rs12979860、rs8099917两位点基因多态性与NAFLD的发生无明显相关性。

关键词: 脂肪肝, 非酒精性; 白细胞介素28B; 单核苷酸多态性

IL28B gene rs12979860 and rs8099917 polymorphism in 190 patients of Han population with nonalcoholic fatty liver disease in Qingdao

LI Jiang-wen^{1,2}, XU Xin^{1,2}, DONG Quan-yong^{1,2}, LIN Zhong-hua², CHU Lei-lei², XIN Yong-ning^{2,3}, XUAN Shi-ying^{2,3,4} (1. Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 2. Second Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266021, China; 3. Key Laboratory of Qingdao Digestive Diseases, Qingdao 266021, China; 4. China Ocean University Medical College, Qingdao 266003, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between IL28B gene rs12979860, rs8099917 polymorphisms and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) of Han population in Qingdao. **Methods** Blood samples of 190 patients of Han population in Qingdao with NAFLD and 183 healthy controls were analyzed and the IL28B genotypes were detected by improved multiple high temperature ligase detection reaction technology (iMLDR). Chi square test, t test, and logistic regression analysis were used in this study. **Results** The frequencies of IL28B gene rs12979860, rs8099917 genotypes and alleles had no significant difference between the two groups. Compared with the wild CC genotype of rs12979860 and TT genotype of rs8099917, the genotypes containing mutation did not increase the risk of developing NAFLD. Logistic regression analysis showed that the OR of carriers with the TT + TC genotype of IL28B gene rs12979860 and GG+TG genotype of rs8099917 developing NAFLD were 0.958 (95% CI: 0.517~1.776, $P = 0.892$) and 0.959 (95% CI: 0.490~1.876, $P = 0.903$), respectively. **Conclusions** The two polymorphisms of IL28B gene are not associated with the development of NAFLD in the Han population in China.

Key words: Fatty liver, nonalcoholic; IL28B; Single nucleotide Polymorphism (SNP)

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)作为严重危害人类健康以肝脏损

害为主的代谢应激性疾病,其特点是脂肪大量沉积于肝细胞内,疾病谱广泛包括:单纯性非酒精性脂肪肝(NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)及其相关肝硬化,甚至肝细胞癌^[1]。近年来研究不

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2015.03.010

基金项目: 青岛市民生科技计划项目(14-2-3-17-nsh)

通讯作者: 宣世英 Email: dxxyxn@163.com

断发现, IL28B基因rs12979860、rs8099917多态性与慢性病毒性肝炎患者尤其是HBV、HCV感染有着密切关联, 但它们与NAFLD之间的关系尚不明确。为探讨此遗传因素在NAFLD发病中的作用, 笔者对IL28B基因rs12979860、rs8099917多态性与NAFLD的相关性进行了研究。

1 资料与方法

1.1 研究对象 纳入从2013年4月至2014年4月就诊于青岛市市立医院西院消化内二科、肝病门诊及健康体检中心经临床及B型超声诊断为NAFLD的汉族患者及体检为健康者共计373例, 其中190名NAFLD患者为实验组, 其诊断符合中国非酒精性脂肪性肝病诊疗指南的临床诊断标准^[2], 同期体检健康者183名作为正常对照组, 两组均为无血缘关系的北方汉族人群。由影像学专业医师应用美国LOGIQ500Pro彩色B超仪对患者进行脂肪肝的影像学诊断, 并统一出具报告。所有实验对象均已签署了知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 全血基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)、Hotstar Taq (Qiagen)、PCR反应缓冲液(TaKaRa)、MgCl₂ (TaKaRa)、溴化乙啶(上海生工)、溴酚蓝(上海生工)、imLDR Multiplex (上海天昊生物科技有限公司)、SAP (Promega)、EXO-I (Epicentre)、HI-DI (ABI)、GeneScanTM-500 (ABI)、2720 Thermal Cycler (美国ABI公司)、3730xl genetic analyze (美国ABI公司)、FR-250电泳仪(上海复日科技有限公司)、Milli-Q Academic (Millipore)、Centrifuge5810R (德国Eppendorf)。

1.3 标本采集和DNA提取 各研究受试者均在禁食12 h后, 于次日清晨, 测量体重、腰围、臀围。抽取正中静脉血4 ml分两管置于EDTA抗凝管中, 2 ml

进行肝功能生化指标、血脂、血糖、肝炎病毒感染标志物(HBsAg、抗-HCV)分析, 2 ml分离出血浆200 μl置于无菌EP管中-80℃冰箱保存, 其余充分混匀后-80℃冰箱保存, 以备DNA提取, 各组统一按照全血基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)(购自北京百泰克生物技术有限公司)说明书进行DNA的提取。

1.4 引物设计与合成 引物由上海天昊生物科技有限公司设计和合成, rs12979860上游引物为5'-GGCGCTTATCGCATACGGCTA-3', 下游引物为5'-CCAGCAGGCGCCTCTCCTAT-3'。rs8099917上游引物为5'-CAATTTGTCA-CTGTTCTCCTTTTGT-3', 下游引物为5'-TGTGGGAGAATGCAAATGAGAGA-3'。以上引物浓度为1 μmol/L, -20℃冰箱保存。

1.5 IL28B基因rs12979860、rs8099917多态性的测序由上海天昊生物科技有限公司进行测序。采用多重高温连接酶检测反应技术(iMLDR)进行IL28B的基因分型。测序所用仪器为3730xl genetic analyze (购自美国ABI公司)。

1.6 统计学方法 根据NAFLD组和正常对照组的一般情况, 采用 χ^2 检验来分析两组间性别是否存在差异, 对于两组在年龄以及生化指标方面的差异则应用独立样本t检验进行分析。利用H-W遗传平衡定律来检验NAFLD组和正常对照组的群体代表性, 应用Pearson χ^2 检验来分析两组间不同基因型及等位基因的频率分布是否符合H-W平衡定律, 以 $P > 0.05$ 表明具有群体代表性。IL28B基因rs12979860、rs8099917多态性与NAFLD发生的相对风险度通过非条件逻辑回归模型来计算比值比(odd ratio, OR)及其95%可信区间(confidence interval, CI), 以 $P < 0.05$ 为判定具有统计学差异的标准。基因型以及等位基因频率采用直接基因计数法,

表1 NAFLD组与正常对照组临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	男性(例)	年龄(岁)	体重(kg)	腰围(cm)	臀围(cm)
NAFLD组	190	93	41.8 ± 9.3	74.8 ± 11.8	91.3 ± 9.7	102.9 ± 10.6
对照组	183	90	40.1 ± 9.6	63.1 ± 11.6	81.2 ± 8.2	93.6 ± 9.6
t值			1.950	11.170	12.937	10.463
P值			0.520	0.000	0.000	0.000

表2 NAFLD组与正常对照组生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	GGT(U/L)	FPG(mmol/L)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	HDL(mmol/L)	LDL(mmol/L)
NAFLD组	26.8 ± 13.4	22.1 ± 10.9	31.0 ± 24.5	5.4 ± 1.6	2.1 ± 1.8	4.9 ± 1.0	1.3 ± 0.5	3.3 ± 1.0
对照组	17.4 ± 8.8	19.6 ± 6.1	18.3 ± 10.3	4.9 ± 1.0	1.2 ± 1.2	4.6 ± 0.9	1.5 ± 0.3	2.9 ± 0.7
t值	9.993	3.472	8.548	4.925	7.326	4.227	-5.965	5.969
P值	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: NAFLD: 非酒精性脂肪性肝病; ALT: 丙氨酸氨基转移酶; AST: 天冬氨酸氨基转移酶; GGT: γ -谷氨酰转移酶; FPG: 空腹血糖; TG: 甘油三酯; TC: 总胆固醇; HDL: 高密度脂蛋白; LDL: 低密度脂蛋白

行 χ^2 检验来比较基因型及等位基因的差异;对于计量资料在经过方差齐性检验之后应用独立样本 t 检验对其结果进行分析,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据采用SPSS 17.0软件进行处理,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 入选对象一般情况 共收集青岛地区汉族NAFLD患者190例,其中男性93例,女性97例,年龄23~70岁,平均(41.0 ± 2.3)岁;对照组183例,其中男性90例,女性93例,年龄22~66岁,平均(40 ± 1.8)岁。NAFLD组与对照组在性别、年龄方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);两组间体重、腰围、臀围数值相比具有统计学差异($P < 0.05$),见表1。

2.2 NAFLD组和对照组各生物化学指标比较 两组的性别年龄匹配,在丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)、空腹血糖(FPG)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)指标水平上NAFLD组均高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);在高密度脂蛋白胆固醇(HDL)指标水平上NAFLD组则低于对照组,且差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

2.3 IL28B基因rs12979860、rs8099917位点基因多态性与NAFLD发生风险关系分析 rs12979860位点CC、CT、TT 3种基因型以及rs8099917位点TT、

TG、GG 3种基因型在NAFLD组和对照组中均被检出,经吻合度检验,两组各位点基因多态性其分布均符合Hardy-Weinberg平衡定律法则,在NAFLD组与对照组中IL28B基因rs12979860、rs8099917两位点 χ^2 值分别为0.146、0.634和0.753、0.493($P > 0.05$),均符合遗传定律,具有群体代表性。rs12979860、rs8099917位点各基因型及等位基因频率在NAFLD组及对照组其分布不具有统计学差异($P > 0.05$),见表3。非条件Logistic回归模型分析显示rs12979860位点CT+TT基因型携带者与CC基因型携带者相比较,前者发生NAFLD的 $OR = 0.958$ (95% CI 为0.517~1.776), $P > 0.05$,见表4。rs8099917位点GG+TG基因型携带者与TT基因型携带者相比较,前者发生NAFLD的 $OR = 0.959$ (95% CI 为0.490~1.876), $P > 0.05$,见表5。携带rs12979860位点T等位基因与携带C等位基因相比,发生NAFLD的风险为 $OR = 1.004$,95% $CI = 0.562 \sim 1.791$, $P = 0.991$,见表4。携带rs8099917位点G等位基因与携带T等位基因相比,发生NAFLD的风险为 $OR = 1.012$,95% $CI = 0.539 \sim 1.900$, $P = 0.970$,见表5。

3 讨论

全球普通人群NAFLD的患病率为6.3~33%(中位值20%),在我国慢性肝脏疾病发病率排序中,NAFLD发病率仅次于慢性病毒性肝炎。目前我国有越来越多的人在处于亚健康的同时伴随着

表3 IL28B 基因 rs12979860、rs8099917 位点基因型及等位基因频率分布 [例 (%)]

组别	例数	rs12979860			rs8099917						
		CC	CT	TT	C	T	TT	TG	GG	T	G
NAFLD 组	190	167 (87.9)	21 (11.1)	2 (1.0)	355 (93.4)	25 (6.6)	171 (90.0)	17 (8.9)	2 (1.1)	359 (94.5)	21 (5.5)
对照组	183	160 (87.4)	22 (12.0)	1 (0.6)	342 (93.4)	24 (6.6)	164 (89.6)	18 (9.8)	1 (0.6)	346 (94.5)	20 (5.5)
χ^2 值			0.375			0.000		0.377			0.001
P 值			0.829			0.991		0.828			0.970

表4 IL28B 基因 rs12979860 位点各等位基因及基因型的发病风险

等位基因及基因型	OR (95% CI)	P 值
C	1.000	
T	1.004 (0.562 ~ 1.791)	0.991
C/C	1.000	
C/T	0.915 (0.484 ~ 1.728)	0.783
T/T	1.916 (0.172 ~ 21.339)	0.597
C/T+T/T	0.958 (0.517 ~ 1.776)	0.892

注:OR 值以野生型为参考,非条件 Logistic 回归计算 OR 及 CI

表5 IL28B 基因 rs8099917 位点各等位基因及基因型的发病风险

等位基因及基因型	OR (95% CI)	P 值
T	1.000	
G	1.012 (0.539 ~ 1.900)	0.970
T/T	1.000	
T/G	0.906 (0.451 ~ 1.818)	0.781
G/G	1.918 (0.172 ~ 21.356)	0.596
G/G+T/G	0.959 (0.490 ~ 1.876)	0.903

注:OR 值以野生型为参考,非条件 Logistic 回归计算 OR 及 CI

各种生化及临床指标异常,如高血脂、高血压、高血糖等,同时患有慢性疾病的风险如2型糖尿病、NAFLD等也在不断增加,这无疑增加了患者的经济负担以及造成了国家卫生资源不必要的浪费。慢性肝脏疾病中NAFLD在人群中的普遍易感目前已成为受到社会普遍关注的公众健康问题,因此NAFLD发病机制的研究具有越来越重要的现实及临床意义。一直以来人们都普遍认为,NAFLD为一种由遗传—环境—生理因素相互作用及影响的代谢性疾病。除了肥胖、胰岛素抵抗(IR)以及肝脏炎症坏死等这些传统危险因素外^[3],越来越多的证据表明遗传因素在NAFLD的易感性以及肝脏疾病的严重程度方面扮演了重要的角色,在遗传因素中尤其是基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)参与了炎症反应、氧化应激以及肝脏纤维化发生等多个方面^[4]。

IL-28B是Ⅲ型IFN中重要的一员,是一种新型的白细胞介素,它的基因的编码位于人类第19号染色体上(19q13.13),IL-28B基因单核苷酸多态性可以影响基因转录及自身基因表达,可以在免疫调节、抗病毒等多个方面发挥重要的作用,既往对IL-28B基因研究较多的是其与HCV的关系^[5]。近年来IL-28B基因与NAFLD的研究成为热点,但目前关于IL-28B基因与NAFLD关系的报道并不一致。Petta^[6]等研究发现IL-28B rs12979860 CC纯合基因型与有组织学诊断的NAFLD患者的肝小叶炎症反应程度有关联,而且这种基因型对脂肪变性起到保护作用。有研究^[7,8]发现NAFLD患者携带IL-28B rs12979860 CC基因型的比例较其他基因型相比更高一些,且IL-28B CC纯合基因型患者较其他基因型中IL-28B基因转录和表达程度更高。因此认为在肝脏发生炎症反应之前,IL-28B基因型或许能对NAFLD患者肝脏疾病的严重程度作出预测^[6]。有研究报道IL-28B基因多态性与肝脂肪变性^[9,10]、炎症组织活动^[11]和肝纤维化^[12,13]等肝脏疾病的严重程度有关联。但Karlas^[14]等研究认为IL28B基因多态性与脂肪变、脂肪硬度并无明显相关。Garrett^[15]等通过对北美白人患者队列研究发现,IL28B rs12979860与NAFLD患者组织学特征并无明显相关性。与之类似,有学者对IL-28B基因rs8099917位点研究^[13]发现IL-28B基因rs8099917位点基因型频率与NAFLD之间无明显相关性,认为IL-28B基因rs8099917位点基因多态性并非罹患NAFLD的危险因素。

本研究对青岛地区汉族NAFLD患者及正常对照组之间基因型及等位基因频率直接进行了比较,

并未发现NAFLD组和正常对照组间rs12979860、rs8099917两位点含突变位点基因型及等位基因其频率分布具有明显差异,也未发现含突变位点基因型及等位基因会增加患有NAFLD的风险。本实验在IL-28B基因rs8099917位点上得出基因型及等位基因与NAFLD无相关性的结论与国外相关研究基本一致,而对于IL-28B基因rs12979860位点而言所得结论却与外国相关研究结果有所不符,其首要原因可能是主要受到种族差异的影响,因为在不同地域环境人们生活方式及饮食习惯的不同往往会掩盖目前所要研究的IL28B基因多态性与NAFLD之间的真正意义;其次,可能也同样受到多态性位点之间基因连锁不平衡的影响;再次,本实验是通过B型超声及相关血液学各项生化指标检查进行的NAFLD诊断,样本量也略显不足,同时缺乏肝穿刺活检样本,因此尚需遵循循证医学思想具有更大样本量的相关研究更进一步的支持。

综上所述,本研究从遗传学角度进行了IL28B基因rs12979860、rs8099917两位点在NAFLD组和正常对照组之间含突变位点的基因型及等位基因频率分布的相关研究,结果均显示IL28B两基因位点与NAFLD的发生无明显相关性。

参考文献

- Petta S, Craxi A. Hepatocellular carcinoma and non-alcoholic fatty liver disease: from a clinical to a molecular association[J]. *Curr Pharm Des*,2010,16:741-752.
- 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版)[J]. *中华肝脏病杂志*,2010,18:163-166.
- Petta S, Tripodo C, Grimaudo S, et al. High liver RBP4 protein content is associated with histological features in patients with genotype 1 chronic hepatitis C and with nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Dig Liver Dis*,2011,43:404-410.
- Tilg H, Moschen A. Update on nonalcoholic fatty liver disease: genes involved in nonalcoholic fatty liver disease and associated inflammation[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*,2010,13:391-396.
- Zheng MH, Li Y, Xiao DD, et al. Interleukin-28B rs12979860/T and rs8099917T/G contribute to spontaneous clearance of hepatitis C virus in Caucasians[J]. *Gene*,2013,518:479-482.
- Petta S, Grimaudo S, Camma C, et al. IL28B and PNPLA3 polymorphisms affect histological liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Hepatol*,2012,56:1356-1362.
- Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy[J]. *Nat Genet*,2009,41:1100-1104.
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C[J]. *Nat Genet*,2009,41:1105-1109.
- Tillmann HL, Patel K, Muir AJ, et al. Beneficial IL28B genotype associated with lower frequency of hepatic steatosis in patients with

- chronic hepatitis C[J]. J Hepatol, 2011,55:1195-1200.
- [10] Cai T, Dufour JF, Muellhaupt B, et al. Viral genotype-specific role of PNPLA3, PPARG, MBOAT7, and IL28B in hepatitis C virus-associated steatosis[J]. J Hepatol, 2011,55:529-535.
- [11] Abe H, Ochi H, Maekawa T, et al. Common variation of IL28 affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients[J]. J Hepatol, 2010,53:439-443.
- [12] Marabita F, Aghemo A, De Nicola S, et al. Genetic variation in the interleukin-28B gene is not associated with fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and known date of infection[J]. Hepatology, 2011,54:1127-1134.
- [13] Falletti E, Bitetto D, Fabris C, et al. Role of interleukin 28B rs12979860 C/T polymorphism on the histological outcome of chronic hepatitis C: relationship with gender and viral genotype[J]. J Clin Immunol, 2011,31:891-899.
- [14] Karlas T, Kollmeier J, Böhm S, et al. Noninvasive characterization of graft steatosis after liver transplantation[J]. Scand J Gastroenterol, 2015,50:224-232.
- [15] Garrett ME, Abdelmalek MF, Ashley-Koch A, et al. IL28B rs12979860 is not associated with histologic features of NAFLD in a cohort of Caucasian North American patients[J]. J Hepatol, 2013,58:402-404.
- [16] Hashemi M, Moazeni-Roodi A, Bahari A, et al. A tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction for the detection of rs8099917 IL28B genotype[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2012,31:55-60.

收稿日期: 2015-01-27

· 消息 ·

本刊对来稿参考文献格式的要求

执行 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》。采用顺序编码制著录,依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字标出,并将序号置于方括号中,排列于文后。内部刊物、未发表资料(不包括已被接受的待发表资料)、个人通信等请勿作为文献引用,确需引用时,可将其在正文相应处注明。日文汉字请按日文规定书写,勿与我国汉字及简化字混淆。同一文献作者不超过3人全部著录;超过3人可以只著录前3人,后依文种加表示“等”的文字。作者姓名一律姓氏在前、名字在后,外国人的名字采用首字母缩写形式,缩写名后不加缩写点;不同作者姓名之间用“,”隔开,不用“和”、“and”等连词。请于文献题名后增加标注文献类型标志项目,示例如下:

[1] 陈登原. 国史旧闻 [M]. 北京:中华书局, 2000:29.

[2] 袁训来, 陈哲, 肖书海, 等. 蓝田生物群: 一个认识多细胞生物起源和早期演化的新窗口 [J]. 科学通报, 2012,55:3219.

[3] 余建斌. 我们的科技一直在追赶: 访中国工程院院长周济 [N/OL]. 人民日报, 2013-01-12(2). [2013-03-20]. http://paper.people.com.cn/rmrb/html/2013-01/12/nw.D110000renmrb_20130112_5-02.htm.

本刊编辑部