

# MTTP基因rs1800591位点多态性与非酒精性脂肪性肝病的相关性研究

张旻<sup>1,2</sup>, 辛永宁<sup>2</sup>, 程钰婷<sup>2</sup>, 姜曼<sup>2</sup>, 陈立震<sup>1,2</sup>, 宣世英<sup>2</sup> (1.青岛大学医学院, 青岛 266021; 2.青岛市市立医院, 青岛 266011)

**摘要:** 目的 研究微粒体甘油三酸酯转移蛋白(MTTP)基因rs1800591位点多态性与非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的关系。方法 采用聚合酶链式反应(PCR)-限制性片段长度多态性检测219例NAFLD患者和210例正常对照组MTTP基因rs1800591位点基因型和等位基因。应用方差分析、卡方检验、非条件Logistic回归分析方法判断NAFLD患者与正常对照组的各项指标。结果 NAFLD组与对照组两者rs1800591位点的基因型分布和等位基因频率差异有统计学意义( $\chi^2 = 9.007$ ,  $P = 0.011$ ;  $\chi^2 = 9.599$ ,  $P = 0.002$ )。经混杂因素校正后, 非条件Logistic 回归分析结果显示, 与TT基因型相比, GG + GT基因型发生NAFLD的风险比值比:  $OR = 1.623$ , 95%  $CI$  为1.070~1.648,  $P = 0.030$ 。等位基因G携带者患NAFLD的风险是T等位基因的1.521倍( $OR = 1.521$ , 95%  $CI$  为1.089~2.123,  $P = 0.014$ )。TT基因型与GG + GT组ALT、LDL、TG的差异有统计学意义(ALT:  $P = 0.001$ ; LDL:  $P = 0.008$ ; TG:  $P = 0.024$ )。结论 青岛地区汉族人群中MTTP基因rs1800591位点多态性与患NAFLD的风险有相关性。

**关键词:** 微粒体甘油三酸酯转移蛋白; 单核苷酸多态性; 非酒精性脂肪肝

## The association between polymorphism rs1800591 in MTTP and non-alcoholic fatty liver disease

ZHANG Yang<sup>1,2</sup>, XIN Yong-ning<sup>2</sup>, CHENG Yu-ting<sup>2</sup>, JIANG Man<sup>2</sup>, CHEN Li-zhen<sup>1,2</sup>, XUAN Shi-ying<sup>2</sup> (1.Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, China; 2.Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, China)

**Abstract: Objective** To study the association between the microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) gene and hereditary risk of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Peripheral blood DNA from 219 patients diagnosed with NAFLD and 210 control subjects were used to determine the MTTP genotype by polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing. Inter-group differences and associations were assessed statistically using  $t$  tests, Chi square and logistic analysis. **Results** There were significant differences in the frequencies of rs1800591 genotype and allele between the NAFLD and control subjects ( $\chi^2 = 9.007$ ,  $P = 0.011$ ;  $\chi^2 = 9.599$ ,  $P = 0.002$ ). Logistic regression analysis adjusted for confounding factors showed that the  $OR$  of carriers with the GG + GT genotype of rs1800591 developing NAFLD was 1.623, (95%  $CI$ : 1.070~1.648,  $P = 0.030$ ), compared with those with TT genotype. Also, in contrast with T allele, there was an increased risk of NAFLD for rs1800591 G allele ( $OR = 1.521$ , 95%  $CI$ : 1.089~2.123,  $P = 0.014$ ). The levels of ALT, LDL and TG were higher in GG + GT genotype than that in TT genotype, with significant differences. **Conclusions** The polymorphism rs1800591 in MTTP is related to the risk of NAFLD.

**Key words:** Microsomal triglyceride transfer protein; Single nucleotide polymorphism; Non-alcoholic fatty liver

随着肥胖和代谢综合征的全球化流行, 非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的发病率也与日俱增, 现已超越病毒性肝炎成为第一大肝脏疾病, 但其发病机制尚未阐明。遗

传因素在NAFLD的发生和发展过程中起到了重要作用<sup>[1]</sup>。微粒体甘油三酯转运蛋白(MTTP)基因是调控脂质代谢的基因之一<sup>[2]</sup>。国外大量研究表明MTTP rs1800591基因多态性与NAFLD的发生发展存在密切关系<sup>[3]</sup>,但是目前有关汉族人群该基因位点的研究报道相对较少,因此,本文对MTTP基因rs1800591位点与汉族人群NAFLD的相关性进行了研究。

## 1 资料与方法

1.1 研究对象 NAFLD组为2013年5月到2014年5月到青岛市市立医院门诊、病房及健康查体中心就诊经临床及B超诊断为NAFLD的患者。对照组为随机收集同期体检中心健康查体合格者。NAFLD诊断标准符合中华医学会肝病学分会NAFLD组标准<sup>[4]</sup>,排除有饮酒史(每周饮酒>140 g)、病毒性肝炎、药物性肝炎、自身免疫性肝病等可导致脂肪肝的特定疾病。采用美国LOGIQ500Pro彩色超声仪进行脂肪肝的诊断。所有受试者签署知情同意书。

## 1.2 研究方法

1.2.1 主要试剂与仪器 HI-DI、3730xl genetic analyze购自ABI公司, Hotstar Taq购自Qiagen公司, PCR反应缓冲液购自TaKaRa, 琼脂糖购自BIOWEST公司, PCR Marker购自NEW ENGLAND Biolabs公司, FR-110紫外分析装置、FR-250电泳仪购于上海复日科技有限公司, 凝胶成像仪购于上海培清科技有限公司, H1650-W台式微量高速离心机购于长沙湘仪离心机仪器有限公司。

1.2.2 标本采集 各受试者均在禁食12小时后,于次日晨,测量身高、体质量、腰围、臀围,计算体质量指数(BMI)=体重(kg)/身高<sup>2</sup>(m<sup>2</sup>)。抽取正

中静脉血4 ml分别置于EDTA抗凝管中,2 ml进行生物化学指标、血尿酸、血糖、血脂、肝炎病毒标志物(如抗-HBs,抗-HCV等)等分析,2 ml分离出血浆200 μl置于无菌EP管中-80℃冰箱保存,以备DNA提取。

1.2.3 引物设计与合成 上游引物(Primer1): 5'-CAATGCTGATTTGCTCCAACCTC-3'; 下游引物(Primer2): 5'-TGGGAGGG-TAGTAAGGATTCTCAAAC-3'。引物由上海天昊生物科技有限公司合成,浓度均为10 μmol/L, -20℃冰箱保存。

1.2.4 单核苷酸多态性的测序 由上海天昊生物科技有限公司进行。采用多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)方法进行MTTP目的基因的扩增,多态基因型分析。

1.2.5 统计学方法 应用Pearson  $\chi^2$ 检验分析基因型及等位基因频率的分布是否符合Hardy-Weinberg(H-W)平衡检验以确认样本的群体代表性。以非条件Logistic回归模型计算比值比(odd ratio, OR)及其95%可信区间(confidence interval, CI)以表示基因型及等位基因发生NAFLD的相对风险度。基因型采用直接基因计数法,定量资料结果用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,经方差齐性检验之后,行t检验;性别、基因型、等位基因频率行 $\chi^2$ 检验。所有统计检验均为双侧概率检验,数据采用SPSS 19.0软件分析。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

2.1 研究对象基本资料 NAFLD组共收集219例,其中,男111例,女109例,平均年龄( $44.18 \pm$

表1 NAFLD组与正常对照组的选择性特征比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	男性[例(%)]	体质量指数( $\bar{x} \pm s$ , kg/m <sup>2</sup> )	腰围( $\bar{x} \pm s$ , cm)	腰臀比( $\bar{x} \pm s$ )
NAFLD组	219	111(50.68)	1.66 ± 0.078	26.51 ± 3.27	0.89 ± 0.09
正常对照组	210	109(51.90)	23.29 ± 3.21	83.13 ± 8.43	0.86 ± 0.08
t值			64.906	61.285	-2.266
P值			0.00	0.00	0.024

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

	NAFLD组	对照组	t值	P值
例数	219	210	-	-
TC (mmol/L)	4.97 ± 0.93	4.23 ± 0.94	-2.331	0.020
TG (mmol/L)	1.78 ± 1.39	1.32 ± 1.61	-2.267	0.024
LDL-C (mmol/L)	3.37 ± 1.00	3.03 ± 0.82	-2.690	0.008
HDL-C (mmol/L)	1.34 ± 0.50	1.49 ± 0.33	2.432	0.016
ALT (U/L)	24.22 ± 11.74	18.96 ± 9.33	-3.535	0.001
AST (U/L)	21.78 ± 12.45	19.16 ± 5.73	-1.879	0.062
γ-GT (U/L)	26.39 ± 24.10	18.94 ± 21.57	-2.338	0.020
UA (mmol/L)	363.72 ± 218.75	305.63 ± 79.54	-2.395	0.017

注:与正常对照组比较,NAFLD:非酒精性脂肪性肝病;ALT:丙氨酸转氨酶;AST:天冬氨酸转氨酶;GGT:γ-谷氨酰转肽酶;UA:血尿酸;TG:甘油三酯;TC:总胆固醇;HDL:高密度脂蛋白;LDL:低密度脂蛋白

10.47)岁,健康对照组210例,其中男109例,女101例,平均年龄( $42.41 \pm 11.52$ )岁,两组在性别、年龄等方面的比较,差异无统计学意义(性别  $P=0.819$ ; 年龄  $P=0.653$ )。

2.2 NAFLD组和对照组人体学和血生化指标比较 NAFLD组体质量指数(BMI)、腰围、腰臀比、丙氨酸转氨酶(ALT)、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶(GGT)、血尿酸(UA)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)差异有统计学意义(ALT:  $P=0.001$ ; GGT:  $P=0.02$ ; UA:  $P=0.017$ ; TC:  $P=0.02$ ; TG:  $P=0.024$ )。高密度脂蛋白(HDL)低于对照组,且差异有统计学意义( $P=0.016$ ),见表1和表2。

2.3 PCR基因分型结果 经过PCR反应,各基因型产物为510 bp片段,2.0%琼脂糖凝胶电泳检测显示扩增特异性良好,与DNA相对分子质量标准电泳对照条带一致。

2.4 单核苷酸多态性测序结果 rs1800591基因多态性经过ABI3730XL测序仪检测得出的GG、GT、TT3种基因型。除突变位点外,其余基因片段序列均与GenBank中的资料一致。

2.5 MTTTP基因rs1800591位点基因型、等位基因分布频率的比较及其与NAFLD发生风险的关系分析在NAFLD组和对照组均检出GG、GT、TT3种基因

型,经吻合度检验,各组基因多态性分布均符合Hardy-Weinberg(H-W)平衡法则( $P=0.237$ )。NAFLD组与对照组基因型及等位基因频率分布差异有统计学意义(基因型:  $P=0.011$ ; 等位基因:  $P=0.002$ ),见表3。非条件logistic回归模型分析显示GG+GT基因型携带者与TT基因型携带者相比较,前者发生NAFLD的 $OR=1.639$ ,95%CI为1.161~1.946,  $P=0.023$ 。校正性别、年龄等混杂因素后OR无明显改变( $P=0.030$ )。携带G等位基因相对于T等位基因来说,发生NAFLD的风险度是 $OR=1.521$ ,95%CI为1.089~2.123,  $P=0.014$ ,见表4。

2.6 两位点不同基因型的代谢指标和肝损指标比较 将两位点分别分为TT组和GG+GT组。各指标经方差齐性检验后行 $t$ 检验,TG、LDL、ALT差异有统计学意义(TG:  $P=0.024$ ; LDL:  $P=0.008$ ; ALT:  $P=0.001$ ),见表5。

### 3 讨论

作为一种遗传-环境-代谢性疾病,NAFLD的发生发展与肥胖、糖尿病、脂质代谢紊乱等密切相关<sup>[5-8]</sup>,而发病机制尚不明确。目前较为公认的是“二次打击”学说,即肝脏的脂质代谢紊乱作为第一次打击促进甘油三酯在肝脏内过量堆积,使肝脏出现脂肪变性且呈受损易感状态,再经历其他各

表3 基因型及等位基因在NAFLD组与对照组中的分布[例(%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		GG	GT	TT	G	T
NAFLD组	219	154	58	7	366	72
对照组	210	123	69	18	315	105
$\chi^2$ 值		9.077			9.599	
$P$ 值		0.011			0.002	

注: NAFLD: 非酒精性脂肪性肝病; 基因型和等位基因型 H-W 平衡 Pearson  $\chi^2$  检验, NAFLD 组  $\chi^2$  值为 1.401,  $P$  值为 0.237

表4 两位点不同基因型及等位基因的发病风险

MTTP 基因	OR (95%CI)	$P$ 值	校正 OR (95%CI)	$P$ 值
TT	1		1	
GT	1.461 (1.104 ~ 2.535)	0.031	1.196 (1.028 ~ 1.960)	0.034
GG	1.820 (1.303 ~ 1.956)	0.011	1.907 (1.060 ~ 1.869)	0.029
GG+GT	1.639 (1.161 ~ 1.946)	0.023	1.623 (1.070 ~ 1.648)	0.030

注: OR 值以野生型为参考, 非条件 logistic 回归计算 OR 及 CI, 校正 OR (95%CI) 及校正  $P$  值经非条件 Logistic 回归模型校正性别、年龄、体质量指数、腰围等混杂因素后得到。G 对比 T:  $OR=1.521$ , 95%CI 为 1.089 ~ 2.123,  $P=0.014$ 。

表5 TT基因型组与GG+GT基因型组的代谢指标和肝损伤指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

	TT 组	GG+GT 组	$t$ 值	$P$ 值
BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	$23.94 \pm 2.36$	$25.12 \pm 3.63$	0.559	0.577
腰臀比	$0.91 \pm 0.12$	$0.87 \pm 0.08$	-0.654	0.514
TC (mmol/L)	$5.07 \pm 2.00$	$4.86 \pm 0.93$	-1.235	0.218
TG (mmol/L)	$1.29 \pm 1.71$	$1.80 \pm 1.40$	2.277	0.024
LDL-C (mmol/L)	$3.13 \pm 0.81$	$3.41 \pm 1.00$	2.710	0.008
HDL-C (mmol/L)	$1.23 \pm 0.38$	$1.41 \pm 0.44$	0.701	0.871
ALT (U/L)	$19.01 \pm 9.45$	$24.13 \pm 12.69$	3.634	0.001
AST (U/L)	$20.00 \pm 5.57$	$20.64 \pm 10.19$	-0.109	0.914
$\gamma$ -GT (U/L)	$30.00 \pm 31.19$	$23.02 \pm 23.22$	-0.515	0.607
UA (mmol/L)	$381.67 \pm 164.21$	$337.05 \pm 174.57$	-0.440	0.661

注: BMI: 体质量指数; ALT: 丙氨酸转氨酶; AST: 天冬氨酸转氨酶; GGT:  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶; UA: 血尿酸; TG: 甘油三酯; TC: 总胆固醇; HDL: 高密度脂蛋白; LDL: 低密度脂蛋白

种损害因素的第二次打击后,最终形成NAFLD<sup>[9]</sup>。MTTP是一种异二聚体脂质转移蛋白,通过协助载脂蛋白B(apoB)折叠及转位使四种主要的脂质(胆固醇,磷脂,甘油三酯,胆固醇酯)加速转运至新生成的脂蛋白颗粒中,同时避免新生的apoB被蛋白酶体所降解<sup>[10]</sup>。目前,已发现MTTP存在多个有功能的基因多态性位点,其中研究较多的是rs1800591位点。

2011年埃及一项研究表明,MTTP rs1800591基因多态性与肥胖儿童NAFLD的罹患以及病情发展密切相关<sup>[11]</sup>。巴西Oliveira等<sup>[12]</sup>对MTTP基因rs1800591的位点基因多态性研究证明等位基因G可能增加NAFLD的严重程度。同时,有两项关于rs1800591位点多态性与NAFLD易感性关系的荟萃分析<sup>[13,14]</sup>也认为,该位点的G等位基因增加了NAFLD的发病风险。我们的研究结果显示,rs1800591位点基因存在多态性,且基因型频率和等位基因频率分布在NAFLD组和对照组之间差异有统计学意义(基因型 $P=0.011$ ;等位基因 $P=0.002$ ),G等位基因与NAFLD的发病有相关性。该结果与以上国外研究结果基本一致。MTTP在脂质的转运、代谢及脂蛋白的分泌中,发挥重要作用。我们的研究结果显示MTTP rs1800591 GG+GT基因型的携带者的TG、LDL明显高于TT型携带者,提示G等位基因可能通过抑制MTTP的功能致使脂质代谢紊乱,从而促进NAFLD的发生和发展,这一点与日本Namikawa<sup>[15]</sup>等的研究结果一致。

综上所述,MTTP rs1800591位点存在多态性,且与NAFLD的发病有相关性,具有G等位基因的个体可增加患NAFLD的风险。这将有助于为NAFLD患者早期筛选提供一个较为可靠的基因位点,从而进一步加强对于NAFLD的防治。

#### 参考文献

- [1] Pandey V, Sultan M, Kashofer K, et al. Comparative analysis and modeling of the severity of steatohepatitis in DDC-treated mouse strains[J]. PLoS One,2014,9:e1111006.
- [2] Hashemi M, Hoseini H, Yaghmaei P, et al. Association of polymorphisms in glutamate-cysteine ligase catalytic subunit and microsomal triglyceride transfer protein genes with nonalcoholic fatty liver disease[J]. DNA Cell Biol,2011,30:569-575.
- [3] Pereira IV, Stefano JT, Oliveira CP. Microsomal triglyceride transfer protein and nonalcoholic fatty liver disease[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol,2011,5:245-251.
- [4] 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.
- [5] Soh J, Hussain MM. Supplementary site interactions are critical for the regulation of microsomal triglyceride transfer protein by microRNA-30c[J]. Nutr Metab (Lond),2013,10:56.
- [6] Rubin D, Helwig U, Pfeuffer M, et al. A common functional exon polymorphism in the microsomal triglyceride transfer protein gene is associated with type 2 diabetes, impaired glucose metabolism and insulin levels[J]. J Hum Genet,2006,51:567-574.
- [7] Toth PP, Shah PK, Wilkinson MJ, et al. Use of microsomal triglyceride transfer protein inhibitors in patients with homozygous familial hypercholesterolemia: translating clinical trial experience into clinical practice[J]. Rev Cardiovasc Med,2014,15:1-10.
- [8] Musso G, Gambino R, Cassader M. Lipoprotein metabolism mediates the association of MTP polymorphism with beta-cell dysfunction in healthy subjects and in nondiabetic normolipidemic patients with nonalcoholic steatohepatitis[J]. J Nutr Biochem,2010,21:834-840.
- [9] Clarke JD, Novak P, Lake AD, et al. Characterization of hepatocellular carcinoma related genes and metabolites in human nonalcoholic fatty liver disease[J]. Dig Dis Sci,2014,59:365-374.
- [10] Rios-González BE, Ibarra-Cortés B, Ramírez-López G, et al. Association of polymorphisms of genes involved in lipid metabolism with blood pressure and lipid values in mexican hypertensive individuals[J]. Dis Markers,2014,2014:150358.
- [11] El-Koofy NM, El-Karakasy HM, Mandour IM, et al. Genetic polymorphisms in non-alcoholic fatty liver disease in obese Egyptian children[J]. Saudi J Gastroenterol,2011,17:265-270.
- [12] Oliveira CP, Stefano JT, Cavaleiro AM, et al. Association of polymorphisms of glutamate-cysteine ligase and microsomal triglyceride transfer protein genes in non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Gastroenterol Hepatol,2010,25:357-361.
- [13] Li L, Wang SJ, Shi K, et al. Correlation between MTP -493G>T polymorphism and non-alcoholic fatty liver disease risk: a meta-analysis[J]. Genet Mol Res,2014,13:10150-10161.
- [14] Zheng W, Wang L, Su X, et al. MTP -493G>T polymorphism and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis[J]. DNA Cell Biol,2014,33:361-369.
- [15] Namikawa C, ShuPing Z, Vyselaar JR, et al. Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in nonalcoholic steatohepatitis[J]. J Hepatol,2004,40:781-786.

收稿日期: 2015-03-18