

文章编号: 1000-8020(2014)05-0724-08

·论著·

## 瘦素受体基因 Gln223Arg、锰超氧化物歧化酶 9Ala/Val 基因多态性与吸烟的交互作用和非酒精性脂肪性肝病关系



张超贤<sup>1</sup> 郭李柯<sup>1</sup> 郭晓凤<sup>2</sup>

新乡医学院第一附属医院消化内科 河南 卫辉 453100

**摘要:**目的 探讨瘦素受体(LEPR)基因 Gln223Arg、锰超氧化物歧化酶 9Ala/Val (manganese superoxide dismutase 9Ala/Val, MnSOD9Ala/Val) 基因多态性与吸烟的交互作用与非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的关系。方法 采用病例-对照研究的方法,以 600 例 NAFLD 患者及 600 例健康对照者的外周血白细胞为样本,利用 PCR 分析 LR 基因 Gln223Arg 和 MnSOD9Ala/Val 基因多态性。结果 LR 基因 LEPR Gln223Arg (G/G) 基因型和 MnSOD9Ala/Val (V/V) 基因型频率分布分别为 48.67%、50.17% (病例组) 和 21.17%、21.50% (对照组),二者经  $\chi^2$  检验差异有显著性 ( $P < 0.01$ ;  $P < 0.01$ )。Gln223Arg (G/G) 患 NAFLD 的风险显著增加 ( $OR = 3.5309$ , 95%  $CI$  1.8165 ~ 5.0724)。MnSOD9Ala/Val (V/V) 基因型者患 NAFLD 的风险也显著增加 ( $OR = 3.6756$ , 95%  $CI = 1.9137 \sim 5.5496$ )。基因突变的协同分析发现 Gln223Arg (G/G) / MnSOD9Ala/Val (V/V) 基因型者在 NAFLD 组和对照组中的分布频率分别为 40.33% 和 7.50%,二者经  $\chi^2$  检验有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。Gln223Arg (G/G) / MnSOD9Ala/Val (V/V) 基因型者患 NAFLD 的风险显著增加 ( $OR = 8.4014$ , 95%  $CI$  4.2926 ~ 12.4238)。病例组的吸烟率显著高于对照组的吸烟率 ( $OR = 3.6754$ , 95%  $CI$  1.4193 ~ 4.9581,  $P < 0.01$ ),吸烟与 Gln223Arg (G/G) 和 MnSOD9Ala/Val (V/V) 基因型均有交互作用 ( $OR = 8.5476$ ;  $OR = 8.8665$ )。结论 Gln223Arg (G/G) / MnSOD9Ala/Val (V/V) 基因型和吸烟是 NAFLD 的易患因素,基因多态性与吸烟的交互作用增加了 NAFLD 的发病风险。

**关键词:** 非酒精性脂肪性肝病 瘦素受体基因 Gln223Arg 锰超氧化物歧化酶 9Ala/Val 多态性 吸烟

中图分类号: R575.4 R195.4 Q591

文献标志码: A

## Interaction of polymorphisms of Leptin receptor gene Gln223Arg , MnSOD9Ala/Val genes and smoking in nonalcoholic fatty liver disease

ZHANG Chaoxian , GUO Like , GUO Xiaofeng

Department of Gastroenterology , the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College , Weihui 453100 , China

**Abstract: Objective** To investigate the interaction of polymorphisms of leptin receptor (LR) gene Gln223Arg , manganese superoxide dismutase 9Ala/Val (MnSOD9Ala/Val) genes and smoking in nonalcoholic fatty liver disease. **Methods** The genetic polymorphisms of LEPR gene Gln223Arg and MnSOD9Ala/Val were analyzed by

作者简介: 张超贤,男,副主任医师,副教授,研究方向:消化系统肿瘤、慢性肝病的分子生物学基础研究,Email: nm21882001@aliyun.com

1 新乡医学院第一附属医院口腔科

2 杭州市第六人民医院

polymorphism-polymerase chain reaction ( PCR) technique in peripheral blood leukocytes of 600 NAFLD cases and 600 healthy persons. **Results** The frequencies of LR gene Gln223Arg ( G/G) and MnSOD9Ala/Val ( V/V) were 48. 67% and 50. 17% in NAFLD cases and 21. 17% and 21. 50% in healthy controls respectively. Statistical tests showed significant difference in the frequencies between the two groups (  $P < 0. 01$  ). The risk of NAFLD with Gln223Arg ( G/G) was significantly higher than those of controls (  $OR = 3. 5309$  ,  $95\% CI = 1. 8165 - 5. 0724$  ). The individuals who carried with MnSOD9Ala/Val ( V/V) had a high risk of NAFLD (  $OR = 3. 6756$  ,  $95\% CI = 1. 9137 - 5. 5496$  ). Combined analysis of the polymorphisms showed that percentage of Gln223Arg ( G/G) / MnSOD9Ala/Val ( V/V) in NAFLD and control groups was 40. 33% and 7. 50% respectively (  $P < 0. 01$  ). The people who carried with Gln223Arg ( G/G) / MnSOD9Ala/Val ( V/V) had a high risk of NAFLD (  $OR = 8. 4014$  ,  $95\% CI = 4. 2926 - 12. 4238$  ). The smoking rate of the case group was significantly higher than which in the control group (  $OR = 3. 6754$  ,  $95\% CI = 1. 4193 - 4. 9581$  ,  $P < 0. 01$  ) , and statistic analysis suggested an interaction between smoking and Gln223Arg ( G/G) / MnSOD9Ala/Val ( V/V) which increase risk of NAFLD (  $OR = 9. 8665$  ;  $OR = 8. 5476$  ). **Conclusion** Gln223Arg ( G/G) , MnSOD9Ala/Val ( V/V) and smoking are the risk factors in NAFLD , and the significant interactions between genetic polymorphisms of Gln223Arg , MnSOD9Ala/Val and smoking added the risk of NAFLD.

**Key words:** nonalcoholic fatty liver disease , leptin receptor gene Gln223Arg , manganese superoxide dismutase 9Ala/Val ( MnSOD9Ala/Val ) , polymorphism , smoking

非酒精性脂肪性肝病( nonalcoholic fatty liver disease ,NAFLD) 是指无过量饮酒史却出现肝细胞脂肪变性和脂肪蓄积的临床病理综合征 ,疾病谱包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎、肝纤维化及肝硬化。随着肥胖和代谢综合征的全球化流行 ,近十余年来非酒精性脂肪性肝病已成为慢性肝病越来越重要的原因 ,严重危害公众的健康<sup>[1]</sup>。NAFLD 病因和发病机制尚未完全明确 ,目前认为脂质代谢紊乱和在此基础上发生的氧化应激和脂质过氧化损伤在 NAFLD 发病中起重要作用 ,并与环境因素、遗传因素密切相关<sup>[2]</sup>。香烟以燃烧过程中释放的尼古丁、一氧化碳成分干扰脂质代谢及多种自由基成分激发、促进脂质过氧化来参与 NAFLD 的发生、发展<sup>[3]</sup>。瘦素( leptin) 是肥胖基因( ob 基因) 编码的一种分泌型蛋白质 ,通过与瘦素受体( leptin receptor ,LR) 结合发挥作用 ,参与机体饮食控制、脂肪代谢和体重调节 ,若瘦素-瘦素受体结合障碍将导致脂肪代谢紊乱<sup>[4]</sup>。MnSOD 主要存在于细胞线粒体基质内 ,生物体使用的能源主要在线粒体内产生 ,在能量合成过程中 ,氧化呼吸链的电子传递过程是机体内自由基产生的最主要途径 ,因此存在于线粒体基质内的 MnSOD 可首先清除这些自由基 ,以防止自由基的

累积和扩散 ,所以 MnSOD 对维持体内自由基的平衡起关键作用<sup>[5]</sup>。通过清除自由基、抑制脂质过氧化反应而成为 NAFLD 进展的重要控制因素。瘦素受体、MnSOD 基因具有单核苷酸多态性位点 ,即一个单核苷酸多态性位点具有 2 或多个等位基因 ,不同的等位基因编码的瘦素受体或 MnSOD 活性有差异。瘦素受体或 MnSOD 活性基因的多态性可使机体对外界环境( 如吸烟) 的反应能力有所不同 ,这是决定机体 NAFLD 易感性的一个重要因素。瘦素受体、抗氧化酶基因多态性与 NAFLD 易感性的研究日渐增多 ,但尚未见吸烟与上述基因多态性的联合作用对 NAFLD 易感性影响的报道。为研究瘦素受体和 MnSOD 在当地人群中的分布状态 ,进而探索其与吸烟习惯相互作用与 NAFLD 高发的关系 ,在国内开展了瘦素受体和 MnSOD 联合基因多态性与 NAFLD 易感性关系的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象及相关资料

2008 年 9 月—2012 年 8 月在新乡医学院第一附属医院收治的 NAFLD 患者 600 例 ,男 407 例 ,女 193 例 ,平均年龄 (  $54. 76 \pm 4. 89$  ) 岁 ,

NAFLD 的诊断参照中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组的诊断标准<sup>[6]</sup>, 对照组 600 例为健康体检人群, 男 410 例, 女 190 例, 平均年龄 (54.81 ± 5.65) 岁, 排除 2 型糖尿病、肥胖、高血压、高脂血症及其他代谢性疾病, 排除饮酒史。研究对象均为本地区汉族人群, 且无血缘关系。调查收集研究对象的人口学资料、吸烟史、职业史和家族史。吸烟状况本文分为不吸烟者、吸烟者 (将每天至少吸一支烟, 持续半年以上定义为吸烟者)。每人各抽取静脉血 2~3 ml, 置乙二胺四乙酸钠抗凝管, 分离白细胞层。用 QIAampDNA 提取试剂盒 (德国 QIAgen 公司) 提取白细胞 DNA, DNA 置 -30 °C 低温冰箱保存备用。

## 1.2 基因测定

**1.2.1 Gln223Arg 多态性检测<sup>[7]</sup>** 引物序列: 上游 5'-ACCCTTTAAGCTGGGTGCCCAAATAG3', 下游 5'-AGCTA GCAAA TATT TTTG TAAG CTATT-3', 由上海生工生物技术有限公司合成, PCR 反应体系包括: 基因组 DNA 1 μl, 上下游引物各 0.5 μl, Taq DNA 聚合酶 Mix 液 (Takara 公司) 25 μl。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性及 55 °C 退火各 45 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。

经 Bio-Rad 染色琼脂糖凝胶电泳确认扩增结果后, 以 Msp I (NEB 公司) 酶切, 37 °C 孵育 4 h, 取酶切产物 4 μl 经 Bio-Rad 染色琼脂糖凝胶电泳后, 酶切产物放入紫外线凝胶成像仪观测结果。

**1.2.2 MnSOD9Ala/Val 多态性检测<sup>[8]</sup>** 引物序列: 上游 5'-CAGCCAGCCTGCGTAGACG 3', 下游: 5'-GCGTTGATGTGAGGTTCCAG 3' 由上海生工生物技术有限公司合成。应用 TaKaRa PCR Amplification Kit (大连宝生物工程有限公司) PCR 试剂盒在 25 μl PCR 反应体系中进行基因组 DNA 扩增, 包括模板 DNA 1 μl (10 mg/L), 10 × PCR Buffer (含 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 2.5 μl, dNTP Mix ture 2 μl, TaKaRa Taq DNA 聚合酶 0.125 μl (5U/μl), 引物各 1 μl (0.5 μmol/L), 灭菌去离子水 17.375 μl。PCR 反应条件如下: 93 °C 预变性 3 min, 然后 93 °C 变性 1 min, 66 °C 退火 1 min, 70 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 70 °C 延伸 10 min。PCR 扩增后的 MnSOD 9Ala/Val 基因片段为 172 bp, PCR 反应完成后, 在 10 μl 的 PCR 反应产物中加入: 10 × buffer 2 μl, 100 × 牛血清白蛋白 (BSA) 0.2 μl, BsaWI 酶 0.5 μl (5U/μl 美国新英格兰生物公司); 灭菌去离子水 7.3 ml, 酶切反应

总体为 20 μl 酶切反应液放置于 60 °C 恒温干浴锅温育 16 h 进行酶切。酶切产物经 3.5% 琼脂糖凝胶电泳 (含 0.5 μg/ml 溴乙啶), 电泳缓冲液为 0.5 × TBE, 在 80 V 电压下电泳 40 min。酶切产物放入紫外线凝胶成像仪观测结果

## 1.3 统计方法

运用 Hardy-Weinberg 平衡检验研究样本的群体代表性, 以  $P > 0.05$  为符合 Hardy-Weinberg 规律。用比值比 (OR) 值和 95% 可信区间 (95% CI) 评价相对风险, 病例组和对照组之间的基因型频率和等位基因频率采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。条件 logistic 回归模型分析交互作用。根据 Khoury 和 Wagener 提出的交互作用模型和交互系数判断基因-环境交互作用模型以及交互作用类型<sup>[9]</sup>。判定依据 1:  $\gamma > 1$ , 表示基因对环境暴露的效应有放大作用, 正向交互作用;  $\gamma < 1$ , 表示基因对环境暴露的效应有减弱作用, 负向交互作用;  $\gamma = 1$ , 表示基因对环境暴露没有交互作用。在病例对照研究中,  $\gamma$  为两变量 lgOR 的比值。判定依据 2:  $OR_{1 \times 2} = OR_1 \times OR_2$  为相乘模型;  $OR_{1 \times 2} > OR_1 \times OR_2$  为超相乘模型;  $OR_{1 \times 2} < OR_1 \times OR_2$  为次相乘模型;  $OR_{1 \times 2} = OR_1 + OR_2 - 1$  为相加模型。交互作用归因比 (attributable proportion of interaction, API) =  $[OR_{1 \times 2} - (OR_1 + OR_2) + 1] / OR_{1 \times 2}$ 。交互作用超额相对危险度 (relative excess risk of interaction, RERI) =  $OR_{1 \times 2} - (OR_1 + OR_2) + 1$ 。其中  $OR_{1 \times 2}$  表示 2 个因素共存时的 OR 值,  $OR_1$ 、 $OR_2$  是其中一个因素存在时的 OR 值。使用 SPSS 11.0 统计软件。

## 2 结果

### 2.1 NAFLD 组和对照组的一般资料分析

如表 1 所示, NAFLD 组和对照组性别年龄分布差异无统计学意义; NAFLD 组吸烟率显著高于对照组。

表 1 NAFLD 组和对照组的一般资料

特征	NAFLD 组	对照组	P
性别			>0.05
男	407 (67.83%)	410 (68.33%)	
女	193 (32.17%)	190 (31.67%)	
年龄 ( $\bar{x} \pm s$ )	54.76 ± 4.89	54.81 ± 5.65	>0.05
吸烟状况			<0.01
-	305 (50.83%)	475 (79.17%)	
+	295 (49.17%)	125 (20.83%)	

### 2.2 基因型分析

**2.2.1 Gln223Arg 基因型分析** Gln223ArgMsp I 酶切位点扩增片段长度为 421 bp, 扩增产物经 Msp I 内切酶消化后可见 3 种带型: A/A、G/G 和 A/G, 其中 G/G 型可被 Msp I 内切酶完全酶切, 凝胶电泳可见 294 bp, 127 bp 两条带; A/G 型可被 RsaI 内切酶部分酶切, 可见 421 bp、294 bp, 127 bp 三条带; A/A 型不能被 Msp I 内切酶酶切, 只见 421 bp 一条带(图 1)。

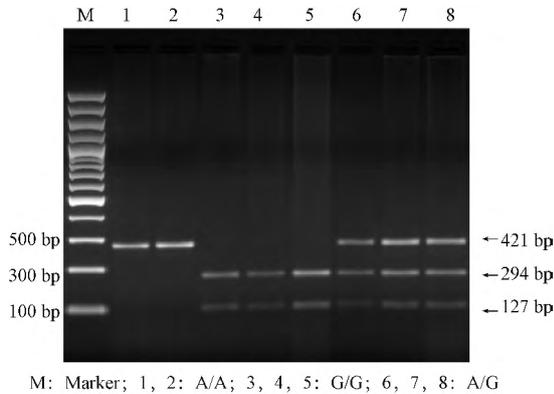
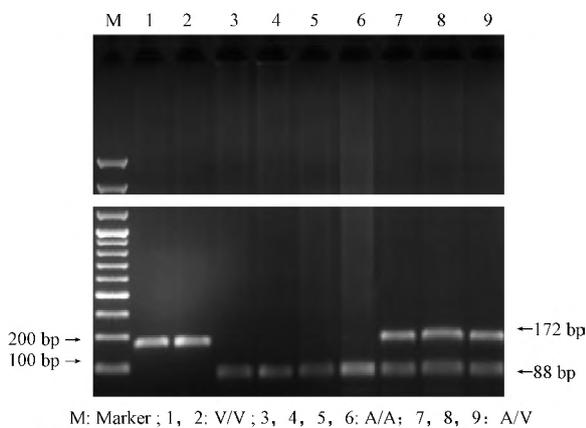


图 1 Gln223Arg 基因 PCR 产物检测电泳

Figure 1 The electrophoretogram of PCR products of Gln223Arg gene digested

**2.2.2 MnSOD9Ala/Val 基因型分析** MnSOD9Ala/Val (A/A) 纯合子基因型个体显示 1 条 88 bp 长的 DNA 片段, MnSOD9Ala/Val (V/V) 纯合子基因型个体显示 1 条 172 bp 长的 DNA 片段, 而 MnSOD9Ala/Val (A/V) 杂合子基因型个体则显示 2 条长度分别为 88 和 172 bp 的 DNA 片段(图 2)。



M: Marker; 1, 2: V/V; 3, 4, 5, 6: A/A; 7, 8, 9: A/V

图 2 MnSOD9Ala/Val 基因 PCR 产物检测

Figure 2 The electrophoretogram of PCR products of MnSOD9Ala/Val gene

### 2.3 Gln223Arg 和 MnSOD9Ala/Val 基因型、等位基因频率及相关遗传模型关联分析

经 Hardy-Weinberg 平衡检验, LR Gln223Arg 各基因型在对照组中的分布均符合 Hardy-

Weinberg 规律( $P > 0.05$ ), 说明研究群体具有代表性(表 2)。AA + AG、GG 基因型频率在病例组和对照组差异有显著性( $P < 0.01$ ); 等位基因 G 在 NAFLD 组和对照组之间的分布差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ), 且 OR 值大于 1, 说明含等位基因 G 的个体发生 NAFLD 的风险相对较高; 采用显性和隐性两种遗传模型进行分析发现: 在隐性模型中, 两位点的不同基因型在病例、对照组之间的分布差异均具有统计学意义( $P < 0.01$ ), 说明 GG 纯合型个体具有 NAFLD 易感性。由表 2 可见, Gln223Arg (A→G 突变) 可能增加 NAFLD 的患病风险, MnSOD9Ala/Val3 种基因型、等位基因频率及相关遗传模型关联亦符合上述规律。

### 2.4 Gln223Arg 和 MnSOD9Ala/Val 基因多态性在 NAFLD 发病中的交互作用

由表 3 可见, 基因组合 Gln223Arg (G/G) / MnSOD9Ala/Val (V/V) 的 NAFLD 患病比例是 Gln223Arg (Non-G/G) / MnSOD9Ala/Val (Non-V/V) 的 8.4014 倍, 两个基因型之间存在交互作用。

### 2.5 NAFLD 的易感性与吸烟的相关分析

将正常对照组的吸烟人数和不吸烟人数与 NAFLD 组的吸烟人数和不吸烟人数进行  $\chi^2$  检验, 结果由表 4 可见, NAFLD 的发生与吸烟有关, 吸烟者容易患 NAFLD。

### 2.6 Gln223Arg 基因多态性和吸烟在 NAFLD 发病中的交互作用

由表 5 可见, Gln223Arg (G/G) 基因型且吸烟者患病比例是 Gln223Arg (AA + AG) / 不吸烟者的 9.8665 倍, Gln223Arg (G/G) 基因型和吸烟者之间存在交互作用。

### 2.7 MnSOD9Ala/Val 基因多态性和吸烟在 NAFLD 发病中的交互作用

由表 6 可见, MnSOD9Ala/Val (V/V) 基因型且吸烟者患病比例是 MnSOD9Ala/Val (AA + A/V) / 不吸烟者的 8.4014 倍, MnSOD9Ala/Val (V/V) 基因型和吸烟者之间存在交互作用。

## 3 讨论

瘦素是由肥胖基因 (ob) 编码, 脂肪细胞分泌的多肽激素, 编码 4.5 Kb mRNA, 由 166/167 个氨基酸组成, 在分泌入血的过程中, N 末端的 21 个氨基酸信号肽被去除, 形成 145/146aa 的成熟瘦素, 分子量约为 16 kD。瘦素在循环中以游离型和结合型两种形式存在, 其中游离型具有生物活性。机体脂肪增多时, 外周脂肪组织分泌瘦素增多, 通过血脑屏障进入下丘脑与瘦素受体结合, 激

表 2 Gln223Arg 及 MnSOD9Ala/Val 基因型与等位基因分布及其遗传模型分析

Tab 2 Distribution of polymorphisms of Gln223Arg genotypes and MnSOD9Ala/Val allele and analysis of genetic model

基因		NAFLD 组	对照组	OR	95% CI	P
Gln223Arg	基因型					
	AA + AG	308( 51. 33%)	473( 78. 83%)	1. 0000		
	GG	292( 48. 67%)	127( 21. 17%)	3. 5309	1. 8165 - 5. 0724	<0. 01
	等位基因					
	A	432( 36. 00%)	639( 53. 25%)	1. 0000		
	G	768( 64. 00%)	561( 46. 75%)	2. 0250	1. 8975 ~ 5. 4706	<0. 01
	显性模型					
	( AG + GG) /AA	476: 124	434: 166	1. 4683	0. 9487 ~ 1. 8036	>0. 05
	隐性模型					
	GG/( AG + AA)	292: 308	127: 473	3. 5309	1. 9592 ~ 6. 8945	<0. 01
MnSOD9Ala/Val	基因型					
	AA + AV	299( 49. 83%)	471( 78. 50%)	1. 0000		
	VV	301( 50. 17%)	129( 21. 50%)	3. 6756	1. 9137 ~ 5. 5496	<0. 01
	等位基因					
	A	418( 34. 83%)	631( 52. 58%)	1. 0000		
	V	782( 65. 17%)	569( 47. 42%)	2. 0747	1. 4649 ~ 4. 2871	<0. 01
	显性模型					
	( AV + VV) /AA	481: 119	440: 160	1. 4698	0. 7930 ~ 1. 9063	>0. 05
	隐性模型					
	VV/( AV + AA)	301: 299	129: 471	3. 6756	1. 9592 ~ 6. 8945	<0. 01

表 3 Gln223Arg 和 MnSOD9Ala/Val 基因多态性在 NAFLD 发病中的交互作用<sup>(1)</sup>

Table 3 Interaction of polymorphisms of Gln223Arg, MnSOD9Ala/Val genes in nonalcoholic fatty liver disease

联合基因型		NAFLD 组	对照组	OR	95% CI	P
Gln223Arg	MnSOD9Ala/Val					
AA + A/G	AA + A/V	249( 41. 50%)	389( 64. 83%)	1. 0000		
AA + A/G	V/V	59( 9. 83%)	84( 14. 00%)	1. 0973( $OR_1$ )	0. 5725 - 2. 1792	>0. 05
G/G	AA + A/V	50( 8. 33%)	82( 13. 67%)	0. 9626( $OR_2$ )	0. 7594 - 1. 9703	>0. 05
G/G	V/V	242( 40. 33%)	45( 7. 50%)	8. 4014( $OR_{1 \times 2}$ )	4. 2926 - 12. 4238	<0. 01

注: (1)  $\gamma > 1$ ;  $OR_{1 \times 2} > OR_1 \times OR_2$  为超相乘模型; 交互作用归因比 =  $[OR_{1 \times 2} - (OR_1 + OR_2) + 1] / OR_{1 \times 2} = 0. 8738$ ; 交互作用超额相对危险度 =  $OR_{1 \times 2} - (OR_1 + OR_2) + 1 = 7. 3415$

表 4 NAFLD 易感性与吸烟的相关分析

Table 4 Related analysis of NAFLD susceptibility and smoking status

吸烟	NAFLD 组	对照组	OR	95% CI	P
否	305( 50. 83%)	475( 79. 17%)	1. 0000		
是	295( 49. 17%)	125( 20. 83%)	3. 6754	1. 4193 ~ 4. 9581	< 0. 01

表 5 Gln223Arg 基因多态性和吸烟在 NAFLD 发病中的交互作用<sup>(1)</sup>

Table 5 Interaction of polymorphisms of Leptin receptor gene Gln223Arg genes and smoking in nonalcoholic fatty liver disease

Gln223Arg 基因型	吸烟	NAFLD 组	对照组	OR	95% CI	P
AA + AG	否	251( 41. 83%)	385( 64. 17%)	1. 0000		
AA + AG	是	57( 9. 50%)	88( 14. 67%)	0. 9935( $OR_1$ )	0. 5902 ~ 1. 9794	>0. 05
GG	否	54( 9. 00%)	90( 15. 00%)	0. 9203( $OR_2$ )	0. 6439 ~ 1. 9406	>0. 05
GG	是	238( 39. 67%)	37( 6. 17%)	9. 8665( $OR_{1 \times 2}$ )	4. 6701 ~ 13. 5394	<0. 01

注: (1)  $\gamma > 1$ ;  $OR_{1 \times 2} > OR_1 \times OR_2$  为超相乘模型; 交互作用归因比 =  $[OR_{1 \times 2} - (OR_1 + OR_2) + 1] / OR_{1 \times 2} = 0. 9074$ ; 交互作用超额相对危险度 =  $OR_{1 \times 2} - (OR_1 + OR_2) + 1 = 8. 9527$

表 6 MnSOD9Ala/Val 基因多态性和吸烟在 NAFLD 发病中的交互作用<sup>(1)</sup>

Table 6 Interaction of polymorphisms of MnSOD9Ala/Val genes and smoking in nonalcoholic fatty liver disease

MnSOD9Ala/Val 基因型	吸烟	NAFLD 组	对照组	OR	95% CI	P
AA + AV	否	246(41.00%)	391(65.17%)	1.0000		
AA + AV	是	53(8.83%)	80(14.33%)	1.0530(OR <sub>1</sub> )	0.7806 - 2.1734	>0.05
VV	否	59(9.83%)	84(14.00%)	1.1164(OR <sub>2</sub> )	0.7430 - 2.0426	>0.05
VV	是	242(40.33%)	45(7.50%)	8.5476(OR <sub>1x2</sub> )	4.6923 - 12.3762	<0.01

注: (1)  $\gamma > 1$ ;  $OR_{1x2} > OR_1 \times OR_2$  为超相乘模型; 交互作用归因比 =  $[OR_{1x2} - (OR_1 + OR_2) + 1] / OR_{1x2} = 0.8632$ ; 交互作用超额相对危险度 =  $OR_{1x2} - (OR_1 + OR_2) + 1 = 7.3782$

活酪氨酸激酶-转录激活因子(JAK-STAT)通路,作用于下丘脑,通过抑制神经肽 Y 的产生,并促进促黑素细胞刺激素释放,引起食欲下降,摄食减少;同时,下丘脑发出神经冲动兴奋交感神经,释放大量的去甲肾上腺素,使大量的贮存能量转为热能,使机体脂肪量减少来维持能量平衡<sup>[10-11]</sup>。瘦素受体(LR)为单跨膜受体,由胞外、跨膜和胞内 3 个结构域构成,属于 N 类细胞因子受体家族,基因全长约 5.1kb,编码 1165 个氨基酸,广泛分布于中枢和外周组织,是一个庞大的受体家族。根据不同的胞内结构域长度,分为 ob-Ra、b、c、d、e、f 6 种亚型,可分为长型和短型 2 种,其胞外长度一致,胞内长度及氨基酸序列组成不同。瘦素与瘦素受体相结合,发挥其生物学作用<sup>[12]</sup>。下丘脑是瘦素作用的关键部位,瘦素受体的分布和结构的不同,决定了瘦素作用的多样性。瘦素受体的表达受基因的控制和环境因素的诱导,其表达和诱导表达水平均有显著的个体差异。瘦素受体基因多态性为第 6 外显子第 668 位 A→G 的碱基突变,该突变位于瘦素受体的胞外区,其所编码的氨基酸由谷氨酰胺(Gln)变成精氨酸(Arg),突变基因的存在可能是通过与该基因调节区其他多态性的连锁而影响瘦素受体的诱导性。瘦素受体多态性具有 3 种基因型: Gln223Arg(A/A)、Gln223Arg(A/G)和 Gln223Arg(G/G),国内外已有研究报道认为 Gln223Arg 位点的多态性与代谢综合征有关<sup>[13-14]</sup>。本研究发现 Gln223Arg(G/G)基因型者发生 NAFLD 的风险显著增加,其 OR 等于 3.5309 95% CI 为 1.8165 ~ 5.0724。与上述研究结果一致。Gln223Arg(G/G)基因型者易患 NAFLD 的机制还不清楚,相关研究显示 Gln223Arg(G/G)基因编码的氨基酸改变可能影响受体的空间构象,从而影响瘦素受体的结合活性,使瘦素-受体的功能异常,产生瘦素抵抗<sup>[15]</sup>。瘦素作用障碍使下丘脑分泌神经肽 Y 升高,导致高胰岛素血症,游离脂肪酸水平升高,超过肝脏的分解代谢能力,从而引起肝脏内脂质沉积,增加 NAFLD 发生的危险性。

活性氧自由基(ROS)就是主要是由氧组成的、性质活泼、氧化性强的物质的总称,ROS 对机体造成的最大损害是导致脂质过氧化,大量研究发现肝细胞受损时 ROS 含量明显增高,ROS 能攻击生物膜磷脂中的多聚不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,形成脂质过氧化物(LPO),LPO 可通过诱导炎性细胞浸润,激活 Kupffers 细胞和 HSCs,引发肝纤维化<sup>[16]</sup>。超氧化物歧化酶(SOD)是一类广泛存在于生物体内的金属酶,可催化超氧离子歧化为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,而使体内的超氧离子维持在一定的水平。根据 SOD 中心金属原子的不同可将其分为: CuZnSOD、MnSOD、FeSOD、NiSOD 和 FeZnSOD 等几种。线粒体内的氧化呼吸链是 ROS 产生的主要场所,锰型超氧化物歧化酶(MnSOD)是线粒体内的主要酶性自由基清除剂,能将超氧阴离子歧化为过氧化氢和氧,对维持胞内氧化还原平衡至关重要。MnSOD 基因定位于 6 号染色体(6q25),目前共发现 4 个功能多态性位点,研究最多的是位于第 2 外显子的 GCT/GTT 点突变。现已证实, MnSOD 基因第 2 外显子 GCT/GTT 点突变引起 MnSOD 线粒体靶序列(MTS)第 9 位氨基酸替换,即丙氨酸(Ala)替换丝氨酸(Val),MnSOD9Ala/Val 基因多态性可改变蛋白的二级结构,影响成熟 MnSOD 蛋白的转运效能,并改变其功能作用,Ala 多态性形成  $\alpha$ -螺旋结构,而 9Val 多态性则形成  $\beta$ -折叠层结构,  $\alpha$ -螺旋结构对酶蛋白前体有效地转运进入线粒体是重要,结构分析显示 Ala 等位基因的存在可改变氨基酸序列的两性分子螺旋结构,有利于 MnSOD 转运进入线粒体基质,因此 MnSODVal 多态性在线粒体内抗氧化活性可能比 9Ala 多态性低<sup>[17]</sup>,研究证明 MnSOD 基因多态性可增加氧化应激相关疾病如食管癌、肺癌等的发病率<sup>[18-19]</sup>。

本研究发现 MnSOD9Ala/Val(VV)是 NAFLD 易感的基因型,个体携带 VV 基因型可能增加了发生 NAFLD 的风险,VV 基因型与吸烟的交互作用 OR 值 8.5436  $\gamma > 1$ ;提示 VV 基因型与吸烟暴露于 NAFLD 发生中有正向交互作用,携带 VV 基

因型者吸烟的危害更大,  $OR_{1 \times 2} > OR_1 \times OR_2$  显示 VV 基因与吸烟交互作用机制在 NAFLD 发生中为超相乘模型, 与 MnSOD9Ala/Val (VV) 相似, Gln223Arg (G/G) 与吸烟也以超相乘模型的交互作用增加 NAFLD 的发病风险。另本研究显示上两易感基因型在 NAFLD 发病中也存在明显的交互作用。香烟中含有的尼古丁和一氧化碳成分, 均能刺激交感神经释放儿茶酚胺, 使血浆游离脂肪酸水平升高, 而游离脂肪酸又可被肝脏和脂肪组织摄取而合成甘油三酯; 同时儿茶酚胺也会促进脂质从脂肪组织中释放出来, 因此吸烟可造成血液中甘油三酯和胆固醇水平升高, 进而引发脂肪肝。香烟中的尼古丁和一氧化碳等毒性成分被吸入人体后, 会渗透到血液, 随着血液循环输送到肝脏。长期吸烟, 输送到肝脏的毒性物质就会增多, 当超过肝脏的解毒和代偿能力时, 肝细胞就会受损伤, 肝功能会随之下降, 肝脏的脂肪代谢就会受阻, 从而引发脂肪肝<sup>[20]</sup>。通常情况下生物体内的活细胞均可产生氧自由基, 因存在着包括 SOD 在内的自由基清除系统, 可及时地清除体内过剩的自由基, 维持自由基的动态平衡, 香烟含多种化合物, 多环类的苯并芘能接受电子而形成自由基, 另香烟烟气中有一氧化碳、二氧化碳、一氧化氮 (NO)、烷基和烷氧基等多种有害自由基。长期吸烟的人, 过量氧自由基通过血液进入肝细胞, 促使肝细胞发生脂质过氧化及启动新的自由基反应, 最终导致脂肪肝<sup>[21-22]</sup>。这可能是吸烟可单独增加及与 MnSOD9Ala/Val (V/V)、Gln223Arg (G/G) 协同增加 NAFLD 发生风险性的重要原因。

NAFLD 是涉及环境因子和多种基因相互作用的复杂过程, 本研究提示携带 Gln223Arg 和 MnSOD9Ala/Val 突变基因型的个体属 NAFLD 高危人群, NAFLD 防治方案中应加以重视, 虽然尚不能通过改变其 NAFLD 易感的基因型来防治 NAFLD, 但可以根据其与环境病因相互作用的特点, 采取相应的控制环境病因的措施如戒烟或基因调控以达到有效预防 NAFLD 的目的。

### 参考文献

[1] WILKINS T, TADKOD A, HEPBURN I, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: diagnosis and management [J]. *Am Fam Physician*, 2013, 88(1): 35-42.

[2] KANURI G, BERGHEIM I. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(6): 11963-11980.

[3] LIU Y, DAI M, BI Y, et al. Active smoking,

passive smoking, and risk of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population-based study in China [J]. *J Epidemiol*, 2013, 23(2): 115-121.

- [4] HUANG X D, FAN Y, ZHANG H, et al. Serum leptin and soluble leptin receptor in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(18): 2888-2893.
- [5] ZLATKOVIĆ J, FILIPOVIĆ D. Stress-induced alternations in CuZnSOD and MnSOD activity in cellular compartments of rat liver [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 357(1-2): 143-150.
- [6] 葛均波, 徐永健, 梅长林, 等. 内科学 [M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 408-409.
- [7] PEREIRA T V, MINGRONI-NETTO R C, YAMADA Y. ADRB2 and LEPR gene polymorphisms: synergistic effects on the risk of obesity in Japanese [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2011, 19(7): 1523-1527.
- [8] CHEN Y, PEI J. Possible risk modifications in the association between MnSOD Ala-9Val polymorphism and breast cancer risk: subgroup analysis and evidence-based sample size calculation for a future trial [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 125(2): 495-504.
- [9] KHOURY M J, WAGENER D K. Epidemiological evaluation of the use of genetics to improve the predictive value of disease risk factors [J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 56(4): 835-844.
- [10] KAHN B B, MINOKOSHI Y. Leptin, GABA, and Glucose Control [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(3): 304-306.
- [11] MISRA V K, STRAUGHEN J K, TRUDEAU S. Maternal serum leptin during pregnancy and infant birth weight: the influence of maternal overweight and obesity I [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2013, 21(5): 1064-1069.
- [12] GARFIELD A S, PATTERSON C, SKORA S, et al. Neurochemical characterization of body weight-regulating leptin receptor neurons in the nucleus of the solitary tract [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(10): 4600-4607.
- [13] BIENERTOVÁ Á-VASKŮJA, SPINAROVÁ L, BIENERT P, et al. Association between variants in the genes for leptin, leptin receptor, and proopiomelanocortin with chronic heart failure in the Czech population [J]. *Heart Vessels*, 2009, 24(2): 131-137.
- [14] GOTTLIEB M G, BODANESE L C, LEITE L E, et al. Association between the Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor and metabolic syndrome in free-living community elderly [J]. *Metab Syndr Relat*

Disord ,2009 ,7( 4) : 341-348.

[15] 丁百静,朴云峰,祝尔建,等. 瘦素受体 Gln223Arg 基因多态性与慢性肝病的关系 [J]. 实用医学杂志 ,2007 ,23( 23) : 3689-3690.

[16] MORITA M , ISHIDA N , UCHIYAMA K , et al. Fatty liver induced by free radicals and lipid peroxidation [J]. Free Radic Res , 2012 ,46( 6) : 758-765.

[17] WANG S , WANG F , SHI X , et al. Association between manganese superoxide dismutase ( MnSOD) Val-9Ala polymorphism and cancer risk: a meta-analysis [J]. Eur J Cancer , 2009 ,45( 16) : 2874-2881.

[18] SUN L , KÖNIG I R , HOMANN N. Manganese superoxide dismutase ( MnSOD) polymorphism , alcohol , cigarette smoking and risk of oesophageal cancer [J]. Alcohol Alcohol 2009 ,44( 4) : 353-357.

[19] ZEJNILOVIC J , AKEV N , YILMAZ H , et al. Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer [J]. Cancer Genet Cytogenet 2009 ,189( 1) : 1-4.

[20] ATHYROS V G , KATSIKI N , DOUMAS M et al. Effect of tobacco smoking and smoking cessation on plasma lipoproteins and associated major cardiovascular risk factors: a narrative review [J]. Curr Med Res Opin 2013 ,29( 10) : 1263-1274.

[21] PIRES K M , LANZETTI M , RUEFF-BARROSO C R , et al. Oxidative damage in alveolar macrophages exposed to cigarette smoke extract and participation of nitric oxide in redox balance [J]. Toxicol In Vitro , 2012 ,26( 6) : 791-798.

[22] NAGAMMA T , ANJANEYULU K , BAXI J , et al. Effects of cigarette smoking on lipid peroxidation and antioxidant status in cancer patients from Western Nepal [J]. Asian Pac J Cancer Prev 2011 ,12( 1) : 313-316.

收稿日期: 2013-10-06

(上接第 723 页)

参考文献

[1] 刁波,唐瑛,王晓昆,等. 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体外诱导大鼠海马细胞氧化损伤观察 [J]. 实验动物与比较医学 2008 ,28( 2) : 121-124.

[2] 孙晓红,邵海华,于丹玫,等. 阿尔茨海默病与胰岛素抵抗及血脂相关性研究 [J]. 卫生研究 2010 ,39( 5) : 573-575.

[3] 葡萄籽原花青素对过氧化氢致大鼠海马神经元损伤的保护作用 [J]. 环境与职业医学 2009 ,26( 2) : 162-165.

[4] 彭扬中,崔海峰,冯淑怡,等. 黄连解毒汤对神经细胞保护作用活性成分的筛选 [J]. 中国实验方剂学杂志 2012 ,18( 16) : 203-207.

[5] HAN Mei , LIU Ying , TAN Qi , et al. Therapeutic efficacy of stemazole in a beta-amyloid injection rat model of Alzheimer's disease [J]. Eur J Pharmacol , 2011 ,657( 1-3) : 104-110.

[6] 寇现娟. 牛蒡子苷元抗炎机理及双氢杨梅素对神经细胞保护机制的实验研究 [D]. 武汉: 华中科技大学 2011.

[7] 范姜砾. 氧化应激在年龄相关性黄斑变性中的作用 [D]. 西安: 第四军医大学 2012.

[8] SHIM S W , KWON J K. Effects of [6]-shogaol on cholinergic signaling in HT22 cells following neuronal damage induced by hydrogen peroxide [J]. Food Chem Toxicol 2012 ,50( 5) : 1454-1459.

[9] 刘甜甜,赵海峰. 植物化学物对阿尔茨海默病保护作用研究进展 [J]. 中国公共卫生 2013 ,29( 5) : 772-775.

[10] 陈一燕. 柯里拉京对氧化应激损伤 SH-SY5Y 和 N9 细胞的保护作用及其机制研究 [D]. 福州: 福建医科大学 2007.

[11] YIN Fei , LIU Jianhui , JI Xiuhong , et al. Baicalin prevents the production of hydrogen peroxide and oxidative stress induced by Aβ aggregation in SH-SY5Y cells [J]. Neurosci Lett , 2011 , 492( 2) : 76-79.

[12] BREWER G J , TORRICELLI J R , EVEGE E K , et al. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal , a new serum-free medium combination [J]. J Neurosci Res , 1993 , 35: 567-576.

[13] BREWER G J. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of Neurons from the striatum , substantia nigra , septum , cerebral cortex , cerebellum , and Dentate gyrus [J]. J Neurosci Res , 1995 ,42: 674-683.

[14] 田凤艳. 戊二酸致大鼠脑神经元毒性作用的机制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学 2010.

[15] 庞伟,蒋与刚,杨红澎,等. 蓝莓提取物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的体外培养的大鼠海马神经元氧化损伤的保护作用 [J]. 中国应用生理学杂志 2010 ,26( 1) : 51-54.

收稿日期: 2013-10-08