

• 腹部疾病 •

脂联素基因+45多态性与肥胖儿童及青少年非酒精性脂肪性肝病的关系

1. 暨南大学第二临床医学院(深圳市人民医院)感染内科(广东 深圳 518020)

2. 南方医科大学深圳妇幼保健院儿科(广东 深圳 518028)

彭红¹ 董国庆² 钟丽华²

【摘要】目的 观察脂联素(ADP)基因+45多态性在肥胖儿童及青少年非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)中的分布,探讨其基因多态性与血清ADP、胰岛素抵抗(IR)、体脂、血脂的关系。**方法** 选取100例单纯性肥胖NAFLD儿童及青少年,年龄6.5-18.3岁,另选70例年龄、性别相匹配的健康儿童及青少年。清晨空腹测量其体质量、身高、腰围(WC)和臀围,计算体块指数(BMI)和腰臀比(WHR)、腰围身高比(WHtR),静脉采血检测血清胰岛素(FINS)、糖(FBG)、胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、ALT、AST等,计算稳态模型胰岛素抵抗指数($HOMA-IR = FINS \times FBG / 22.5$),行肝胆等部位超声检查。采用ELISA法测定ADP浓度,酚氯仿法提取DNA,经PCR扩增后用双脱氧链终止法进行基因测序。**结果** NAFLD组血清ADP为 $(2.79 \pm 2.19) \text{ mg/L}$,明显低于健康对照组的 $(3.90 \pm 2.13) \text{ mg/L}$,与BMI、WHtR、TG、FINS、 $HOMA-IR$ 值呈负相关,其中 $HOMA-IR$ 为影响ADP最为显著的因素;NAFLD组ADP基因+45位点T/G的基因型分布和等位基因频率与对照组的差异无显著性意义($P > 0.05$),血清ADP、血脂、血糖、胰岛素和IR、BMI、WC、WHR、WHtR等在NAFLD组ADP基因+45位点各基因型间的差异也无统计学意义(P 均 > 0.05)。**结论** 脂联素基因+45T/G多态性可能与深圳市汉族单纯性肥胖儿童及青少年NAFLD及其代谢指标无显著关联性。

【关键词】 脂联素基因; 多态性; 非酒精性脂肪性肝病; 肥胖; 儿童及青少年

【中图分类号】 R322.4+7

【文献标识码】 A

DOI: 10.3969/j.issn.1009-3257.2015.03.015

Association between Adiponectin Gene SNP+45 and Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Obese Children and Adolescents

PENG Hong¹, DONG Guo-qing², ZHONG Li-hua². 1 Department of Infectious Disease, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020; 2 Department of Pediatrics, Shenzhen Maternal and Child Healthcare Hospital affiliated to the Southern Medical University, Shenzhen 518028, Guangdong province, China

【Abstract】Objective To study the relationship between adiponectin gene +45 polymorphism and serum adiponectin(ADP), insulin resistance(IR), body fat and serum lipids in the obese children and adolescents with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** One hundred simple obese children and adolescents with NAFLD aged 6.5 years to 18.3 years and 70 healthy children and adolescents of similar age and sex (healthy control group) were randomly enrolled in the study. Early in the morning, fasting body weights, heights, waist circumferences and hip circumferences were measured for calculation of BMI, WHR and WHtR, and venous blood samples were collected for test of serum insulin(FINS), glucose(FBG), total cholesterol(TC), triglycerides(TG), high density lipoprotein cholesterol(HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), alanine aminotransferase(ALT) and aspartate aminotransferase (AST), which contributed to the calculation of homeostasis model assessment-Insulin resistance ($IR = FINS \times FBG / 22.5$). Ultrasonographic examinations were given to the liver and related organs. Serum ADP levels were measured by ELISA, and DNA sequencing after PCR amplification were performed with dideoxy chain termination method. **Results** Serum ADP level in NAFLD group was $2.79 \pm 2.19 \text{ mg/L}$, significantly lower than the healthy control ($3.90 \pm 2.13 \text{ mg/L}$), it was negatively correlated with BMI, WHtR, TG, FINS and IR values, and IR was the most significant factor that affected serum ADP level. NO significant differences in genotype or allele frequency of ADP gene SNP+45 between NAFLD group and healthy controls($P > 0.05$). There was no difference of serum ADP, lipid, FBG, FINS and IR, BMI, WC, WHR, WHtR among different genotype of +45 site in children and adolescents with NAFLD(all $P > 0.05$). **Conclusions** ADP gene SNP+45 may be not associated with occurrence of NAFLD and the metabolic parameters in Chinese simple obesity children and adolescents of Shenzhen.

【Key words】 Adiponectin Gene; Polymorphisms; Nonalcoholic Fatty Liver Disease; Obesity; Children; Adolescents

作者简介: 彭红,女,感染内科专业,副主任医师,主要研究方向:慢性肝病
通讯作者: 董国庆

表1 两组脂联素SNP+45基因型及等位基因频率比较

	n	基因型			等位基因	
		TT	TG	GG	T	G
NAFLD组	100	46 (46.00%)	50 (50.00%)	4 (4.00%)	142 (71.00%)	58 (29.00%)
对照组	70	36 (51.43%)	28 (40.00%)	6 (8.57%)	100 (71.43%)	40 (28.57%)
χ^2		1.306			0.004	
P		0.521			0.952	

表2 NAFLD组脂联素+45各基因型间血脂联素及代谢指标比较($\bar{X} \pm S$)

	TT型(n=46)	TG型(n=50)	GG型(n=4)	F	P
ADP(ug · ml ⁻¹)	2.52 ± 2.13	3.15 ± 2.01	4.35 ± 2.94	1.823	0.402
BMI(kg · m ⁻²)	26.78 ± 3.67	25.12 ± 4.11	24.19 ± 2.93	1.312	0.275
WC(cm)	92.56 ± 13.67	89.11 ± 13.97	87.11 ± 19.11	0.389	0.680
WHR	0.94 ± 0.06	0.94 ± 0.04	1.00 ± 0.09	1.228	0.302
WHtR	0.60 ± 0.06	0.59 ± 0.05	0.60 ± 0.01	0.202	0.815
FBG(mmol · L ⁻¹)	5.06 ± 0.59	4.90 ± 0.45	5.10 ± 0.06	0.655	0.522
FINS(pmol · L ⁻¹)	4.78 ± 0.69	4.50 ± 0.76	4.33 ± 0.36	1.080	0.349
HOMA-IR ^a	3.41 ± 0.75	3.08 ± 0.82	2.93 ± 0.37	1.178	0.316
TC(mmol · L ⁻¹)	4.13 ± 1.38	4.35 ± 0.80	4.58 ± 0.74	0.315	0.731
TG(mmol · L ⁻¹)	2.00 ± 1.50	1.95 ± 1.67	3.51 ± 0.14	0.893	0.416
HDL-C(mmol · L ⁻¹)	0.94 ± 0.26	1.01 ± 0.31	1.06 ± 0.20	1.586	0.216
LDL-C(mmol · L ⁻¹)	3.07 ± 1.69	2.84 ± 0.89	2.96 ± 0.74	0.190	0.828

注:a为自然对数值

儿童和青少年非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是以肝细胞脂肪变性和脂肪蓄积为病理特征的临床综合征,是代谢综合征在肝脏的表现^[1],与肥胖、胰岛素抵抗(IR)密切相关。随着儿童和青少年肥胖发病率的增高,该年龄阶段的代谢综合征发病率也逐渐增高。研究显示脂联素(adiponectin, ADP)基因多态性与代谢综合征密切相关^[2]。本文通过观察单纯性肥胖儿童及青少年NAFLD的血清ADP及其+45基因变化,以探讨ADP基因+45多态性与NAFLD及IR、体脂、血脂的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2011年1月~2014年10月在深圳市人民医院感染内科和深圳市妇幼保健院儿科就诊及住院的单纯性肥胖儿童及青少年非酒精性脂肪性肝病100例(NAFLD组),均为汉族,其中男58例,女42例;年龄6.5~18.3岁,平均(12.02 ± 4.10)岁,身高在同年龄同性别组正常范围内,无饮酒史。由专人行体格检查和腹部彩超检查,同时行肝、肾功能、内分泌等辅助检查,除外其他中枢神经系统疾病、遗传代谢病及内分泌病引起的继发性肥胖,排除甲、乙、丙型肝炎、肝外感染、药物性及免疫性肝病。肥胖诊

断标准为与成年人界值点接轨的中国2~18岁儿童超重、肥胖筛查BMI界值点法^[3],NAFLD依据2010年中华医学会肝病学分会《非酒精性脂肪肝病诊疗指南》诊断^[4]。随机选择同期健康体检者70例为对照组,均为汉族,其中男40例,女30例,年龄5.5~18岁,平均(11.12 ± 5.90)岁,体重、身高在正常范围内,无感染及慢性疾病。两组年龄、性别等比较,差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。

1.2 方法

1.2.1 体格指标测量:受试者于清晨8~9时空腹测量其体重、身高、腰围(WC)和臀围,计算体块指数[BMI=体重(Kg)/身高²(m²)]和腰臀比[WHR=腰围(cm)/臀围(cm)]、腰围身高比[WHtR=腰围(cm)/身高(cm)]。

1.2.2 血清标本采集及实验室检测:受试者均隔夜禁食后于清晨8~9时空腹抽取静脉血5ml,分离血清后立即检测胰岛素(FINS)、糖(FBG)、胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和ALT、AST及甲、乙、丙型肝炎病原学标志物等;余血清置于-70℃冰箱保存,采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测ADP,试剂盒由美国R&D公司提供,仪器为西门子医学诊断产品有限公司生产的BEP III全自动酶免分析

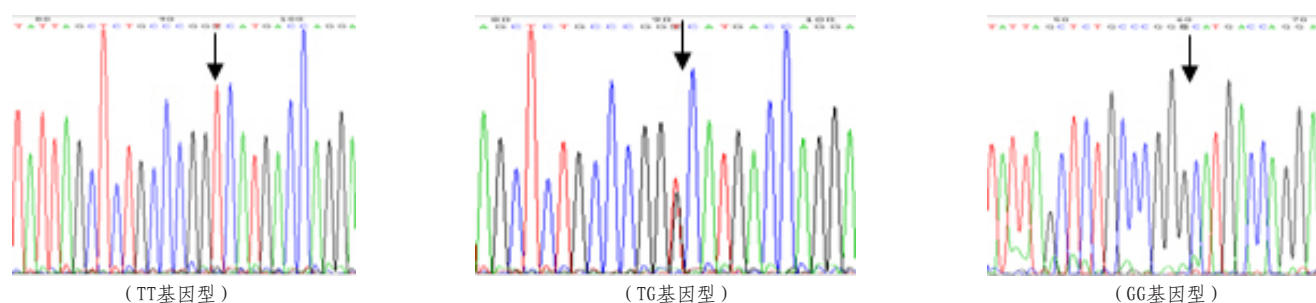


图1 ADP基因+45位点T/G测序图

仪。所有检测均按说明书由专人操作。以稳态模型胰岛素抵抗指数($HOMA-IR = FINS \times FBG / 22.5$)公式计算IR值。

1.2.3 脂联素基因+45多态性检测

1.2.3.1 DNA提取和扩增: 取静脉血2ml, EDTA-Na2抗凝, 酚氯仿法提取DNA。按照文献^[5]方法由上海生工生物工程公司合成引物, 用于扩增目的基因。正向引物: 5'-TCTCTCCATGGCTGACAGTG-3', 反向引物: 5'-AGATGCAGCAAAGCCAAAGT-3'。聚合酶链反应体系: 反应总体积25 μ L, 成分为: 2mmol/L dNTP 2.5 μ L、5 μ mol/L TaqDNA聚合酶2.5 μ L、样本DNA 1 μ L、Buffer 2.5 μ L、MgCl₂ 2.5 μ L、正反向引物各1 μ L, 无菌用水12 μ L。PCR反应条件为96℃预变性5min $\rightarrow$ 96℃40s $\rightarrow$ 62℃40s $\rightarrow$ 72℃40s, 循环35次, 72℃延伸10min。

1.2.3.2 ADP基因+45位点T/G测序(见图1): 取PCR产物20 μ L由生工生物工程(上海)股份有限公司应用双脱氧链终止法进行测序, 试剂为Big Dye terminator v3.1, 测序仪为美国Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer。

1.3 统计学处理 数据采用SPSS13.0软件进行统计学分析。检验数据是否呈正态分布, 血清脂联素、胰岛素、HOMA-IR为非正态分布, 转换为自然对数后按照正态分布比较。计数资料用R $\times$ C卡方检验; 计量资料采用 $\bar{X} \pm S$ 表示, 组间比较采用t检验或单因素方差分析; 相关性分析用Pearson相关分析和多元逐步回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NAFLD患者脂联素变化及与代谢指标相关性分析 NAFLD组血ADP水平为(2.79 ± 2.19)mg/L, 低于健康对照组的(3.90 ± 2.13)mg/L, 差异有显著统计学意义, $t = -2.086$, $P = 0.041$ 。ADP与BMI、WHtR、TG、FINS、IR值呈负相关, r 分别=-0.195、-

0.191、-0.232、-0.308、-0.312, P 分别=0.037、0.039、0.023、0.002、0.002; 与WC、WHR、GLU、TC、HDL-C、LDL-C均无相关性, P 均 > 0.05 ; 采用多元逐步回归分析, IR为影响ADP最为显著的因素, $R^2 = 0.085$ 。

2.2 NAFLD组与正常对照组脂联素+45位点基因型及等位基因频率比较(见表1) 对两组ADP+45基因型分布进行Hardy-Weinberg平衡检验, P 均 > 0.05 , 所选人群具有群体代表性。两组基因型及等位基因频率的差异均无统计学意义, P 均 > 0.05 。

2.3 NAFLD组脂联素+45各基因型间脂联素及代谢指标比较(见表2) 血ADP、血脂、血糖、胰岛素和IR、BMI、WC、WHR、WHtR等在NAFLD组ADP基因+45位点各基因型间的差异均无统计学意义, P 均 > 0.05 。

3 讨 论

脂联素是由脂肪细胞分泌的一种激素蛋白, 与VII型、X型胶原和补体C1q有高度同源性, 其基因全长17kb, 定位于染色体3q27, 由2个内含子和3个外显子组成, 全基因组扫描显示该区域存在肥胖及其相关疾病(NAFLD、2型糖尿病和代谢综合征等)的易感位点^[6]。脂联素基因的单核苷酸多态性与低脂联素血症密切相关, 而低脂联素血症可能会增加2型糖尿病、胰岛素抵抗及代谢综合征等的发生机会^[7,8]。本组NAFLD儿童及青少年存在低脂联素血症, 与胰岛素抵抗、BMI、WHtR、TG、FINS等呈负相关。

一般认为, NAFLD存在胰岛素抵抗和血脂紊乱, 主要是游离脂肪酸和TG增加。本文显示单纯性肥胖儿童及青少年NAFLD以腹型肥胖为主, 存在明显的胰岛素抵抗, 血TG和LDL-C明显升高。脂联素作为胰岛素增敏激素, 能抑制肝糖异生而增加骨骼肌脂肪酸氧化, 使TG水平降低, 改善IR。另外, 脂联素可促进肝内脂肪酸氧化, 减少肝脏糖异生的原料; 还增强胰岛素对肝细胞内糖异生和肝糖输出的抑制作用^[8]。显示

脂联素与NAFLD的发生密切相关。

研究发现ADP基因存在十余个常见的单核苷酸位点(SNPs)以及一些罕见的错义突变。韩国、日本、加拿大、西班牙、伊朗、芬兰、希腊等国报道ADP+45多态性与肥胖、胰岛素抵抗、代谢综合征、2型糖尿病等的相关性存在明显的种族差异,而台湾、法国、瑞士、捷克、马来西亚等国的研究未发现这种相关性^[7]。在我国ADP基因+45多态性与肥胖及相关疾病的相关性报道也不尽相同,可能与我国多民族有关。李黎等对我国22个研究的分析显示ADP基因+45多态性与中国人2型糖尿病相关,G等位基因是2型糖尿病的危险因素^[7]。吴静等认为脂联素基因SNP+45变异与儿童单纯性肥胖相关,可诱发产生胰岛素抵抗,高脂血症,且影响肥胖儿童血浆脂联素水平的表达^[9]。而有些研究未发现ADP基因+45多态性与代谢因素或疾病相关,如血脂^[10]、肥胖以及肥胖类型和血清脂联素水平^[11]、成人NAFLD的发病易感性^[12]。本组对肥胖NAFLD儿童及青少年研究的结果显示,ADP基因+45位点T/G的基因型分布和等位基因频率与正常人群无差异,血ADP、血脂、血糖、胰岛素水平和IR、BMI、WC、WHR、WHR等ADP基因+45位点各基因型间也无差异,表明脂联素基因+45T/G多态性与深圳市汉族单纯性肥胖儿童及青少年NAFLD及其代谢指标无显著关联性。

参考文献

[1] Cortez-Pinto H, Camilo ME, Baptiste A, et al. Non-alcoholic fatty liver: another feature of metabolic syndrome?[J]. Clin Nutr,

1999,18(6): 353-358.

[2] Ranjith N, Pegoraro RJ, Shanmugam R. Adiponectin gene polymorphism is selectively associated with the concomitant presence of metabolic syndrome and essential hypertension[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19999.

[3] 李辉,宗心南,季成叶,等.中国2-18岁儿童青少年超重和肥胖筛查体重指数界值点的研究[J].中华流行病学杂志,2010,31(6): 616-620.

[4] 中华医学会肝病学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(3): 163-166.

[5] Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS, et al. Adiponectin gene polymorphisms (T45G and G276T), adiponectin levels and risk for metabolic diseases in an Arab population[J]. Gen, 2012, 493(1): 142-147.

[6] Guzman-Ornelas MO, Chavarria-Avila E, Munoz-Valle JF, et al. Association of ADIPOQ +45T>G polymorphism with body fat mass and blood levels of soluble adiponectin and inflammation markers in a Mexican-Mestizo population[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2012, 5: 3693-378.

[7] 李黎,刘忠华,余芳雪,等.中国人群脂联素基因+45位点基因多态性与2型糖尿病相关性的Meta分析[J].中国卫生统计,2012,12(10): 1235-1240.

[8] 赵小元,丁秀原,孟铃慧,等.肥胖及伴非酒精性脂肪肝病儿童血清脂联素与代谢综合征的相关性[J].实用儿科临床杂志,2009,24(7): 491-493.

[9] 吴静,颜伟建,莫娟,等.脂联素基因多态性变化与儿童单纯性肥胖的关系[J].中国当代儿科杂志,2011,13(7): 539-542.

[10] Zhao T, Zhao J. Genetic effects of adiponectin on blood lipids and blood pressure[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2011, 74(2): 214-222.

[11] 王遂军,贾伟平,包玉倩,等.脂联素基因多态性与肥胖,血清脂联素水平的相关性[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(7): 1295-1299.

[12] 黄春明,李瑜元,周永健,等.脂联素基因多态性和非酒精性脂肪肝发病易感性的关系[J].广州医学院学报,2010,38(2): 1-5.

【收稿日期】2015-06-10

(上接第 21 页)

[2] Boehm BO, Vaz JA, Biondsted L, et al. Long-term efficacy and safety of biphasic insulin aspart in patients with type 2 diabetes[J]. Eur J Int Med, 2004, 24: 496-502.

[3] American Diabetes Association. standards of medical care in diabetes-2012[J]. Diabetes Care, 2012, 35(suppl): S4-S63.

[4] 张惠娟,刘晟.2型糖尿病对冠心病粥样硬化斑块影响的CTA评价[J].中国CT和MRI杂志,2012, 10(6): 55-58.

[5] Cheung Nw, Wong Vw, Mclean M. The hyperglycemia: Intensive Insulin in infarction (HI-5) study: a randomized controlled trial of insulin infusion therapy for myocardial infarction[J]. Diabetes Care, 2006, 29: 765-770.

【收稿日期】2015-05-28