

# 白介素6基因启动子-572C/G多态性与非酒精性脂肪肝炎的关系

马瑞宏, 黄颖秋

马瑞宏, 黄颖秋, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科 辽宁省本溪市 117000

马瑞宏, 佳木斯大学临床医学院硕士, 医师, 2005年赴日本高知医科大学学习, 主要从事非酒精性脂肪肝炎的研究。

通讯作者: 马瑞宏, 117000, 辽宁省平山区本溪市人民路29号, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科。

maruihong120@yahoo.com.cn

电话: 0414-2215138

收稿日期: 2007-11-07 修回日期: 2008-01-31

## C/G homozygotes of interleukin-6 single nucleotide polymorphism at -572 are associated with nonalcoholic steatohepatitis

Rui-Hong Ma, Ying-Qiu Huang

Rui-Hong Ma, Ying-Qiu Huang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel and Iron (Group) Co., Benxi 117000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Rui-Hong Ma, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel and Iron Co., 29 Renmin Road, Pingshan District, Benxi 117000, Liaoning Province, China. maruihong120@yahoo.com.cn

Received: 2007-11-07 Revised: 2008-01-31

### Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between the C/G genotypes of interleukin-6 (IL-6) single nucleotide polymorphism (SNP) at 572 and the development of nonalcoholic steatohepatitis (NASH).

**METHODS:** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to determine a common polymorphism of the human IL-6 gene -572C/G in 104 controls and NASH 78 patients. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the concentration of serum IL-6 in 78 patients with NASH.

**RESULTS:** Homozygotes for -572C of IL-6 gene were more frequent in NASH patients than in controls (0.564 vs 0.404,  $P < 0.05$ ). Level of IL-6 was significantly higher in NASH patients with IL-6 -572C/C genotype than that in NASH pa-

tients with other genotypes ( $6.54 \pm 4.21$  vs  $4.68 \pm 2.88$ ,  $P < 0.05$ ). The significant difference in HOMA-IR was not seen in three genotypes.

**CONCLUSION:** The C/G homozygotes of IL-6 single nucleotide polymorphism at -572 have something to do with the pathogenesis of NASH.

**Key Words:** Interleukin-6; Single nucleotide polymorphism; Insulin resistance; Nonalcoholic steatohepatitis

Ma RH, Huang YQ. C/G homozygotes of interleukin-6 single nucleotide polymorphism at -572 are associated with nonalcoholic steatohepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(6): 635-639

### 摘要

**目的:** 探讨白介素6(IL-6)基因启动子-572C/G多态性与非酒精性脂肪肝炎(NASH)相关性。

**方法:** 应用聚合酶联反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法, 分别检测NASH患者78例和正常者104例IL-6基因启动子-572C/G多态性的变异。采用ELISA法检测NASH患者组IL-6血清含量。

**结果:** IL-6基因启动子-572位点的C等位基因频率高于健康对照组, 两组基因分布频率有显著统计学差异( $0.564$  vs  $0.404$ ,  $P < 0.05$ ); NASH患者组中CC基因型携带者IL-6血清含量显著高于其他基因型携带者( $6.54 \pm 4.21$  vs  $4.68 \pm 2.88$ ,  $P < 0.05$ ), 但HOMA-IR及BMI与其他两组基因型相比较并无显著统计学差异。

**结论:** IL-6基因启动子-572位点的C等位基因与NASH发病具有一定程度相关性。

**关键词:** 白细胞介素6; 单核苷酸多态性; 胰岛素抵抗; 非酒精性脂肪肝炎

马瑞宏, 黄颖秋. 白介素6基因启动子-572C/G多态性与非酒精性脂肪肝炎的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16(6): 635-639  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/635.asp>

### ■背景资料

目前认为NASH发病机制主要包括胰岛素抵抗、氧化应激作用、脂质过氧化作用等方面。其中氧化应激机制关于细胞因子如TNF- $\alpha$ 、白细胞介素等的研究成为近年研究的热点, IL-6是一种重要的促炎细胞因子, 该基因启动子区存在基因变异及基因多态性, 有研究表明IL-6参与胰岛素抵抗的形成。

### ■同行评议者

陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

## ■创新盘点

鉴于IL-6、胰岛素抵抗及NASH存在待证实的交叉关系,本文从IL-6基因启动子-572C/G多态性着手,观察我国人群中该基因频率及与胰岛素抵抗、NASH的相关性。

## 0 引言

非酒精性脂肪肝(NASH)是一种代谢综合征,常合并内脏性肥胖、血脂紊乱、高血压、糖调节异常和Ⅱ型糖尿病等多元代谢紊乱<sup>[1-2]</sup>,胰岛素抵抗(IR)是此类代谢综合征共同的病理生理特点。近年来发现多种炎症因子在IR发生发展中扮演重要角色,包括TNF- $\alpha$ 、IL-6等<sup>[3]</sup>。而NASH兼具慢性炎症性疾病特点,炎症因子在其发病中应具有一定作用,此方面研究较少。本文试图就IL-6基因启动子第572C/G等位基因单核苷酸多态性与NASH疾病及IR相关性做初步探讨。

## 1 材料和方法

1.1 材料 选取无亲缘关系182人,其中经临床血液检查结合超声及CT证实NASH患者组78例,男39例,女39例,年龄 $44.08 \pm 15.93$ 岁,体质指数(BMI) $28.93 \pm 4.56$ ;健康对照组(NC)104例,男53例,女51例,年龄 $42.12 \pm 16.34$ 岁;BMI  $28.90 \pm 4.31$ 。

### 1.2 方法

1.2.1 NASH的诊断条件: (1)非酒精性; (2)CT诊断脂肪肝; (3)除外其他肝脏原因疾病包括药物性肝损害<sup>[4]</sup>。

1.2.2 临床血指标检查: 所有受试者均空腹12 h后抽取肘部静脉血,各3份,每份3 mL,抗凝处理后用于模板DNA的制备,不抗凝处理分别用于血IL-6浓度检测及其临床血指标检查。

1.2.3 模板DNA的制备: 抽取受试者外周静脉血3 mL,经抗凝处理后,加入9 mL红细胞溶血剂,红细胞充分溶解后,再加入2 mL白细胞溶解剂,隔夜后,将667  $\mu$ L的蛋白质沉淀剂加入上述未出现沉淀等异常现象的溶液内,离心后取上清液,加入2-丙醇(2-propanol)2 mL,振荡至液体澄清,可见白色絮状物出现,即为DNA。

1.2.4 PCR-RFLP分析及DNA序列测定: 利用已制备的两组受试者的DNA,应用PCR扩增包括IL6基因启动子第572位点等位基因在内的163 bp长度片段。从GenBank(NM000600)中查取人IL6基因序列(略),使用primer Premier 5.0 Demo软件进行在线引物设定。引物序列为: 上游引5'GGAGACGCCTTGAAGTAAGTGC3',下游引物为5'GAGTTTCCTCTGACTCCATCGCAG3',购自日本北海道sequence株式会社。PCR反应体系含Taq PCR Mixture 1.5  $\mu$ L(QIAGEN Taq PCR core kit试剂盒);上游引物600 pmol,下游引物600 pmol;模板DNA<1  $\mu$ g;加超纯水至30  $\mu$ L。PCR

扩增循环: 94 $^{\circ}$ C预变性10 min, 94 $^{\circ}$ C 60 s, 51 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min, 4 $^{\circ}$ C终止, 36个循环。取PCR扩增产物3  $\mu$ L, 40 g/L琼脂糖凝胶电泳10 min, 电压100 V, Kodak电泳图像分析系统EDAS290比较PCR扩增产物,并根据Marker条带位置确定PCR扩增产物是否为目的基因片段。另取PCR扩增产物3  $\mu$ L, 混入0.5  $\mu$ L 10 $\times$  Buffer G, 0.5  $\mu$ L限制性内切酶Mbi I (Fermentas, Burlington, Canada), 4  $\mu$ L超纯水,对PCR扩增产物进行酶切,条件是37 $^{\circ}$ C, 6 h,酶切产物经40 g/L琼脂糖凝胶电泳10 min, 电压100 V, Kodak电泳图像分析系统,观察带型并拍照。

1.2.5 血液实验室检查: 对78例NASH患者进行空腹12 h临床血指标检查。包括应用酶联免疫测定法测定IL-6血清水平(Fermentas, Burlington Canada),同时用全自动生化仪测定血清白蛋白、血清丙氨酸转氨酶(ALT)、血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)值,空腹血糖(FPG,葡萄糖氧化酶法)、空腹胰岛素(FINS,胰岛素放射免疫试剂盒Fermentas, Burlington Canada,放射免疫分析法)。测量身高、体重、腰围及血压,并计算出体质指数(BMI = 体重kg/身高的平方 $m^2$ )。采用稳态模式评估法(HOMA公式)评价胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),计算公式如下:  $HOMA-IR = FPG \times FINS / 22.5$ 。

统计学处理 应用SPSS10.0软件包,文中有关变量用mean $\pm$ SD。HOMA-IR经对数转换后进行分析,相对危险度和相关分析采用软件包中的比值比(odds ratio, OR)和Chi-square检验。 $P < 0.05$ 具有显著差异性。

## 2 结果

2.1 IL-6基因启动子-572C/G多态性分析 两组受试者均可检测到预计的163 bp片段,且均符合Hardy-Weinberg平衡检验及卡方Chi-square检验( $P > 0.05$ )。限制性内切酶Mbi I对IL-6基因PCR扩增产物酶切后存在三种基因型: CC(缺乏Bpi I酶切位点,仅见与扩增产物一样的163 bp片段)、GC(可见163 bp片段,101 bp片段和62 bp片段)、GG(可见101 bp片段和62 bp片段)见图2。NASH患者组与正常对照组相比,C等位基因频率有显著差异性(56.4% vs 40.4%,  $P < 0.05$ )。NASH患者组的CC基因型频率要显著高于正常对照组(35.9% vs 17.3%,  $P < 0.05$ ,表1),通过CT诊断脂肪肝(图1)。

2.2 NASH患者组的三组基因型临床数据分析 依据基因PCR扩增产物酶切后3种基因型(图2),将

表 1 NASH患者组和NC组IL-6基因启动子第-572位点基因型及C/G等位基因的分布

分组	n	等位基因		基因型		
		G	C	G/G	C/G	C/C
NASH	78	34(0.436)	44(0.564) <sup>a</sup>	20(0.256)	30(0.385)	28(0.359) <sup>a</sup>
NC	104	62(0.596)	42(0.404)	40(0.385)	46(0.442)	18(0.173)

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs NC组.

表 2 NASH患者三组基因型临床数据间的比较

基因型	C/C	C/G	G/G	<i>P</i> 值
年龄	44.8 ± 14.8	49.2 ± 15.3	35.4 ± 16.5	>0.05
性别(M/F)	14/14	14/16	11/9	>0.05
腰围(cm)	90.6 ± 15.0	81.4 ± 15.1	99.2 ± 16.3	>0.05
BMI	30.1 ± 4.8	27.0 ± 3.2	30.2 ± 5.6	>0.05
收缩压(mmHg)	132.1 ± 13.53	124.1 ± 16.3	138.2 ± 16.2	>0.05
舒张压(mmHg)	80.2 ± 11.7	72.9 ± 10.3	81.3 ± 10.2	>0.05
ALT(IU/L)	93.2 ± 61.1	76.1 ± 38.1	117.4 ± 65.0	>0.05
白蛋白(g/L)	42.1 ± 3.1	43.3 ± 2.2	45.4 ± 4.0	>0.05
TG(mg/dL)	169.3 ± 103.2	178.6 ± 111.2	136.7 ± 61.1	>0.05
TC(mg/dL)	211.3 ± 37.2	208.7 ± 56.3	175.5 ± 35.4	>0.05
HDL-Chol(mg/dL)	47.4 ± 13.9	47.7 ± 14.9	42.1 ± 10.6	>0.05
IL-6(ng/L)	6.54 ± 4.21	4.72 ± 3.1	4.63 ± 2.66	<0.05
空腹血糖FPG(mg/dL)	114.6 ± 35.5	100.7 ± 14.4	104.4 ± 16.2	>0.05
空腹胰岛素FINS(mU/L)	13.4 ± 10.5	9.9 ± 8.7	13.0 ± 9.6	>0.05
HOMA-IR	3.16 ± 1.79	3.01 ± 2.72	3.24 ± 2.42	>0.05

## ■应用要点

本文为阐明IL-6在NASH发病机制中的作用提供新证据。

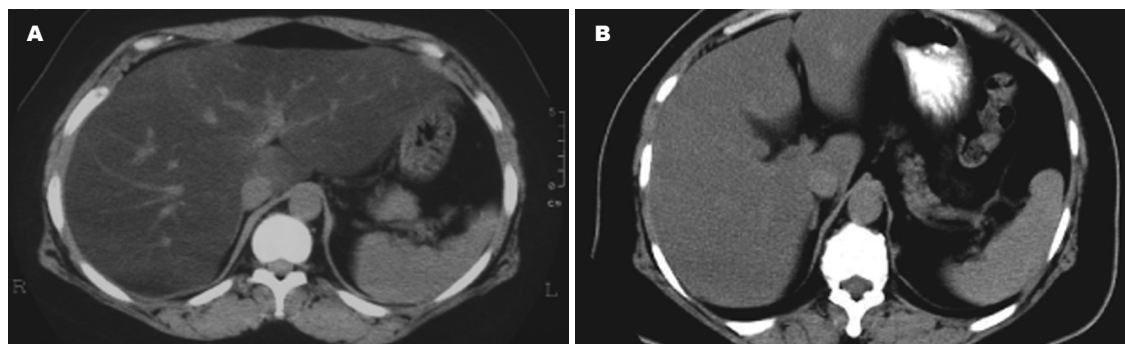


图 1 NASH患者CT影像.

NASH患者分为CC组、GC组和GG组, 3组基因型临床资料数据见表2. CC组与其他两组相比血清IL-6水平明显高于其他两组( $6.54 \pm 4.21$  ng/L vs  $4.68 \pm 2.88$  ng/L,  $P < 0.05$ ). GG基因组的HOMA-IR, BMI与其他两组基因型相比无显著统计学差异, resistin基因三种酶切产物电泳见图3.

### 3 讨论

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)是指除过量饮酒及其他明确损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞

大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征<sup>[5]</sup>, NASH是NAFLD病程进展的一个阶段. NASH发病机制至今不明确, 目前认为它是一种遗传、环境及代谢应激相关性疾病, 广为接受的是二次打击学说<sup>[6]</sup>, 该学说主要包括胰岛素抵抗、氧化应激作用、脂质过氧化作用等方面机制. 其中氧化应激机制中关于细胞因子如TNF- $\alpha$ 、白介素等的研究成为近年研究的热点, 而这些研究都与NASH的分子机制有着千丝万缕的联系<sup>[7-9]</sup>. IL-6是一种重要的促炎细胞因子, 作为炎症细胞



### ■名词解释

NASH二次打击学说: 第一次打击使脂肪在肝内过量堆积, 引起脂肪变性, 与胰岛素抵抗有关, 第二次打击包括氧化应激和脂质过氧化, 这是由促氧化物和抗氧化物失衡所致。这其中涉及了基因遗传易感性、多种外界因素及多种细胞因子的相互作用, 中心环节是IR和氧化应激。

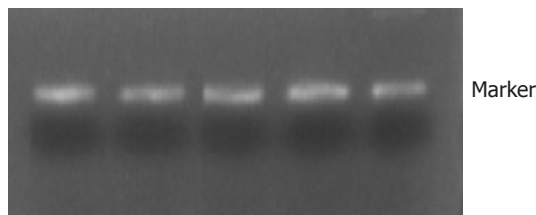


图2 PCR扩增resistin基因电泳。

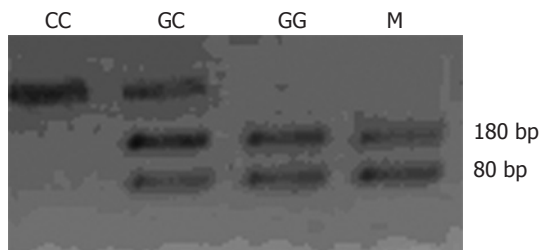


图3 resistin基因三种酶切产物电泳。

分化的主要调节因子可以上调黏附分子的表达, 从而加强炎症反应, 还可参与脂类代谢, 在调节免疫应答和炎症反应中起重要作用。IL-6基因位于第七号染色体短臂上, 含5个外显子和4个内含子。IL-6基因启动子区存在基因变异及基因多态性, 这种多态性与多种疾病存在密切相关性<sup>[10-12]</sup>, 其中有研究表明IL-6在胰岛素抵抗患者中升高, 参与胰岛素抵抗的形成<sup>[13-15]</sup>。Fishman *et al*<sup>[16]</sup>于1998年报导IL-6基因启动区174位点存在C/G多态性, 等位基因C纯合子形成IL-6减少, 而等位基因G的纯合子和杂合子形成IL-6增多, 携带GG纯合子人的血清中IL-6浓度大约是CC纯合子的2倍, 得出推论IL-6基因多态性与胰岛素抵抗有关, 随后欧美国家相继有报道支持这一研究<sup>[17-20]</sup>。而在我国类似研究的结果却有着一定差距, IL-6基因174G/C多态性频率等位基因C明显少于欧美人群, 可能与胰岛素抵抗无关<sup>[21-22]</sup>。鉴于IL-6、胰岛素抵抗及NASH存在待证实的交叉关系, 本文从IL-6基因启动子-572C/G多态性着手, 观察我国人群中该基因频率及与胰岛素抵抗、NASH的相关性。在本文的研究中IL-6基因启动子-572位点的CC、CG及GG基因型在NASH患者组中分别为0.359、0.385及0.256, 健康对照组中分别为0.173、0.442及0.385。两组基因分布频率有明显统计学差异( $P<0.05$ ); NASH患者组中CC基因型携带者IL-6血清含量显著高于其他基因型携带者( $6.54 \pm 4.21$  ng/L vs  $4.68 \pm 2.88$  ng/L,  $P<0.05$ ), 但HOMA-IR及BMI与其他两组基因型相比较并无显著统计学差异。

NASH的病因机制复杂, 参与的基因很多, 而研究单个基因多态性时, 可能会因样本的选择及数量不足、基因突变频率低及外界环境影响而致研究结果受到局限, 在以后的研究中可采取增加样本数量及联合相关基因研究。

### 4 参考文献

- 1 Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 3-20
- 2 Ratzliff V, Tahiri M, Bonyhay L. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Endocrinol (Paris)* 2005; 66: 1571-1580
- 3 Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997; 40: 1286-1292
- 4 橘本悦子, 谷仁辉. 非酒精性脂肪肝炎的诊断标准. 日本医学介绍 2007; 28: 146-148
- 5 范建高. 亚太地区非酒精性脂肪性肝病诊断与治疗共识简介. 中华肝脏病杂志 2007; 15: 552-553
- 6 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- 7 Casano-Sancho P, Lopez-Bermejo A, Fernandez-Real JM, Monros E, Valls C, Rodriguez-Gonzalez FX, Ricart W, Ibanez L. The tumour necrosis factor (TNF)-alpha-308GA promoter polymorphism is related to prenatal growth and postnatal insulin resistance. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 129-135
- 8 Yang X, Jansson PA, Pellme F, Laakso M, Smith U. Effect of the interleukin-6 (-174) g/c promoter polymorphism on adiponectin and insulin sensitivity. *Obes Res* 2005; 13: 813-817
- 9 Qi L, van Dam RM, Meigs JB, Manson JE, Hunter D, Hu FB. Genetic variation in IL6 gene and type 2 diabetes: tagging-SNP haplotype analysis in large-scale case-control study and meta-analysis. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1914-1920
- 10 Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Ricart C, Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1334-1339
- 11 Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Chiappelli M, Dolzani P, Martelli M, Bianchin M, Mariani E, Bolondi L, Licastro F. Associations of the -174 G/C interleukin-6 gene promoter polymorphism with serum interleukin 6 and mortality in the elderly. *Biogerontology* 2005; 6: 415-423
- 12 Park BL, Lee HS, Kim YJ, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Shin HD. Association between interleukin 6 promoter variants and chronic hepatitis B progression. *Exp Mol Med* 2003; 35: 76-82
- 13 Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci* 2000; 67: 291-300
- 14 Wolford JK, Colligan PB, Gruber JD, Bogardus C. Variants in the interleukin 6 receptor gene are associated with obesity in Pima Indians. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 338-343
- 15 Sato W, Horie Y, Watanabe S, Suzuki A. Tumor suppressor gene PTEN and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Nippon Rinsho* 2005; 63: 1475-1483
- 16 Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V,

- Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102: 1369-1376
- 17 Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Gutierrez C, Casamitjana R, Pugeat M, Richart C, Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. *Diabetes* 2000; 49: 517-520
- 18 Vozarova B, Fernandez-Real JM, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD, Ricart W, Vendrell J, Richart C, Tataranni PA, Wolford JK. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet* 2003; 112: 409-413
- 19 Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1154-1159
- 20 Esteve E, Villuendas G, Mallolas J, Vendrell J, Lopez-Bermejo A, Rodriguez M, Recasens M, Ricart W, San Millan JL, Escobar-Morreale H, Richart C, Fernandez-Real JM. Polymorphisms in the interleukin-6 receptor gene are associated with body mass index and with characteristics of the metabolic syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65: 88-91
- 21 杨冀衡, 罗国辉, 陆泽元, 胡雪松, 新霞, 张东辉, 许香广. 白细胞介素6基因174G/C多态性与胰岛素抵抗的关系. *中国动脉硬化杂志* 2005; 13: 101-104
- 22 刘永生, 王金凤, 于连慧, 刘和平, 孟繁超, 刘德铭. 白细胞介素6基因启动子-174G/C, 572C/G多态性与冠心病的相关性. *中国心血管病研究杂志* 2007; 5: 264-266

#### ■同行评价

本文对非酒精性脂肪肝的基因多态性提供了一些有价值的信息,具有一定的探索价值.

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界胃肠病学杂志社

#### • 消息 •

### 世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版

本刊讯 《世界华人消化杂志》采取开放存取出版方式,自1995年起,发表的文章可以在线免费阅读全文(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>).自2003-04-15至2007-12-31,电子版的点击次数为21762951,平均每天点击12743次.总下载次数280505,平均每天下载164次.(世界胃肠病学杂志社 2008-02-28)